

ŠIAULIŲ UNIVERSITETAS
GAMTOS MOKSLŲ FAKULTETAS
APLINKOTYROS KATEDRA

Miglė Doveikaitė

**APLINKOS VEIKSNIŲ ĮTAKA PETUNIJŲ (*PETUNIA*)
REGENERACIJAI *IN VITRO***

Bakalauro darbas

Dekoratyvosios želdininkystės bakalauro studijų programa

Vadovė: doc. dr. Ingrida Šaulienė

Šiauliai, 2010

TURINYS

SUTRUMPINIMŲ SĄRAŠAS	3
ĮVADAS.....	4
1. LITERATŪROS ANALIZĖ.....	5
1.1. Petunia augalų dekoratyvumas, biologija ir panaudojimas želdinimui.....	5
1.2. Mikrodauginimas – būdas gauti daug sveikų augalų per trumpą laiką	8
1.2.1. Augalų auginimas <i>in vitro</i> aplinkoje	8
1.3. Aplinkos veiksnių reikšmė regeneracijai.....	10
1.3.1. Fitohormonų reikšmė.....	10
1.3.2. Šviesos įtaka augalams	12
1.4. Solanaceae augalų regeneracijos <i>in vitro</i> kultūrose pasiekimai.....	13
2. DARBO OBJEKTAS IR METODAI	16
2.1. Darbo objektas	16
2.2. Darbo metodai.....	17
2.2.1. Tėvinių augalų išauginimas	17
2.2.2. Kultivavimo terpės ruošimas.....	18
2.2.3. Fitohormonų ruošimas	20
2.2.4. Eksplantų kultivavimo sąlygos.....	21
2.2.5. Gautų rezultatų skaičiavimas ir vertinimas.....	22
3. DARBO REZULTATAI IR JŲ ANALIZĖ	25
3.1. Tėvinių augalų išauginimas	26
3.2. Fitohormonų reikšmė regeneracijai šviesoje	26
3.3. Fitohormonų reikšmė regeneracijai tamsoje.....	31
3.4. Rezultatų palyginimas ir aptarimas	36
IŠVADOS.....	41
SANTRAUKA.....	42
SUMMARY	43
LITERATŪRA	44

SUTRUMPINIMŲ SĄRAŠAS

- ACK – aminociklopropano-1karboksilo rūgštis
BAP – 6-benzilaminopurinas
GA₃ – giberilinas A₃
IAR – 3-indolilacto rūgštis
ISR – 3-indolilsvieto rūgštis
IOA – 2-jodacemidas
MS – Murashige Skoog maitinamoji terpė
MS (+) ar MS (1:5) – Murashige Skoog maitinamoji terpė papildyta IAR:5BAP fitohormonais
MA (-) – Murashige Skoog maitinamoji terpė be fitohormonų
NAR – 1-naftilacto rūgštis
PP-333 - paklobutrazolas
R6G - rudaminas
STS – sidabro tiosulfatas
TDZ – tidiazuronas
VDF2 – 2 tipo vidutinių dalelių filtras
2,4-D – 2,4-dichlorfenoksiacto rūgštis

IVADAS

Mikrodauginimas yra vegetatyvinio dauginimo kultūroje *in vitro* būdas, skirtas greitai ir dideliais kiekiais padauginti augalus. Šis būdas jau keletą dešimtmečių yra analizuojamas moksliniais tikslais, skatinant sunkiai besidauginančių augalų regeneraciją, didinant jų populiacijas. Taip pat jį propaguoja augalų augintojai, prekeiviai, dėl masinio augalų dauginimo mažose teritorijose.

Darbo objektu pasirinkti *Petunia* genties augalai, siekiant įvertinti, šių plačiai naudojamų balkonų ir lauko želdinimui gėlių, fitohormonų ir šviesos – tamsos įtaką audinių regeneracijai.

Augalas yra priklausomas nuo šviesos, nuo pat jo dygimo iki žydėjimo ir net augalo senėjimo. Šviesa – tai neatsiejamas nuo fotosintezės energijos šaltinis bei augalo vystymosi dirgiklis, tačiau tai dar nereiškia, kad augalas negali vystytis tamsoje (Dagys, 1974). Augalas tamsoje auga daug greičiau, bet tuomet yra neišvengiami augimo nukrypimai ir deformacijos. Anot C. Cabaleiro (1992), kultivuojant petunijas, susiformavusių šaknų skaičius, ilgis bei svoris, tiesiogiai priklauso nuo naudojamo apšvietimo dydžio. Augalo augimą ir diferenciacijos procesus kontroliuoja augalų hormonai. J. van Staden (2006) teigimu, siekiant pagreitinti ląstelių regeneraciją yra naudojami fitohormonai, tačiau jų balanso parinkimas yra svarbiausias etapas, norint juos panaudoti, nes parinkus netinkamą, galimos deformacijos. Pasak O. Purer (2009), fitohormonai gali lėtinti arba skatinti natūralius augalo augimo procesus. Atskirų veiksmų poveikiai literatūroje dažnai aprašomi, tačiau kompleksinis veikimas analizuojamas mažai.

Darbo tikslas – ištirti kompleksinę fitohormonų ir šviesos įtaką *Petunia* regeneracijai *in vitro*.

Darbo uždaviniai:

1. Atlikti mokslinės ir metodinės literatūros, susijusios su darbo tema, analizę.
2. Atlikti eksperimentus su izoliuotais *Petunia* eksplantais, kultivuojant juos skirtingos sudėties terpėse šviesoje ir tamsoje.
3. Įvertinti eksplantuose įvykusią regeneraciją.

Darbas aktualus, nes jis buvo nukreiptas ištirti kompleksinę fitohormonų ir šviesos įtaką augalų regeneracijai ir surasti optimaliausias sąlygas norint gauti maksimalų regenerantų kiekį, panaudojant mažiausias medžiagų ir žmogiškųjų išteklių sąnaudas. Darbe pateikiami rezultatai yra nauji mokslui, nes regeneracijos potencialas nustatomas, vertinant kompleksinį esminių veiksmų poveikį, o ne kiekvieno įtaką atskirai. Todėl gauti duomenys naudingi tiek mokslui, tiek verslui.

1. LITERATŪROS ANALIZĖ

1.1. *Petunia* augalų dekoratyvumas, biologija ir panaudojimas želdinimui

Petunija (*Petunia*) gentis priskiriama bulviečių (*Solanales*) eilės bulvinių (*Solanaceae*) augalų šeimai, kuriai priklauso apie 2300 rūšių iš 85 genčių (Šlapakauskas ir kt., 1980). *Petunia* gentyje yra apie 14 rūšių, paplitusių Pietų Amerikoje (Balvočiūtė, Gudiničius, 1988). Šios gėlės tėvynėje Brazilijoje *petun* vadinamas tabakas, manoma, kad petunija gavo savo pavadinimą dėl savo panašumo į šį augalą. Į Europą petunijos buvo atgabentos prieš porą šimtų metų ir maždaug nuo 1825, prancūzų (P. L. Vilmorin), belgų (L. van Houte) bei vokiečių (E. Benary ir T. Heinemann) veislininkų dėka, sėkmingai kuriamos vis naujesnės, geresnės jų veislės (Heic, 1996).

Petunia genties augalai gali būti ir daugiamečiai, tačiau Lietuvos sąlygomis nežiemoja, todėl auginami kaip vienmečiai. Stiebas kylantis arba gulsčias, šakotas bei apaugęs liaukiniais plaukeliais. Augalo viršutiniai lapai neretai priešiniai, apatiniai pražanginiai, trumpakočiai, o kai kurie bekočiai. Jų forma nuo plačiai kiaušiniškų iki elipsiškų, abipus apaugę trumpais, retais plaukeliais (1 pav.).



1 pav. Petunijos lapo plaukeliai (Janssen ir kt., 2010)

Augalui būdingi lėkštės, trimito formos, įvairiaspalviai ar margi, dvilyčiai, ilgakočiai, išsidėstę stiebo išlinkimuose arba viršutinių lapų pažastyse žiedai (2 pav. A). Taurelė varpiška, giliai suskaidyta į 5, pailgai linijįškas, bukaviršūnes, vaisiams subrendus, atgal atsilenkiančias, skiltis. Ji 2 – 3 kartus trumpesnė už plačiai piltuvišką vainikėlį, kurio vamzdelis ilgas, į viršų plėtėjantis, o jo atbraila klostyta, su 5 skiltelėmis. Vainikėlis gana įvairaus dydžio, dažniausiai 25 – 40 mm ilgio, įvairių spalvų, paprastai margas, nevienodos spalvos su vamzdeliu ir atbraila. Kuokeliai 5, laisvi, kurių koteliai paprastai nevienodo ilgio, o geltonos spalvos dulkinės atsiveria į vidų išilginiu plyšiu (2 pav. B). Piestelė dvilizdė, liemenėlis ilgas ir plonas, purka išsiplėtusi, neryškiai dviskiautė. Sėklų paprastai daug, jos subręsta vaisiuje (2 pav. C) – kiaušiniškoje, smailia viršūne, dėžutėje, viršutinėje dalyje atsiveriančioje 2 išilginėmis sąvaromis (Butkus ir kt., 1976, Lekavičius, 1989, Courtier ir kt., 2009).



2 pav. Petunijos žiedas (A) (Loosemore, 2000), žiedo pjūvis (B) (Gerats, 2008) ir vaisius su sėklomis (C) (Anonimas 3, 2009)

Petunijos Lietuvos sąlygomis nežiemoja, todėl kasmet paprastai dauginamos sėklomis, kurios sėjamos sausio – vasario mėnesiais. Sėklos 18 – 20°C temperatūroje sudygsta po 10 – 12 dienų. Dėl apšvietimo stokos, nepatartina laikyti kambaryje, tačiau jei laikoma, būtina saulėta ir gana šilta vieta. Daigus reikia pikuoti, o kovo mėn. sustiprėjusius sėjinukus sodinti po vieną į 8 cm ar po 3 į 12 cm skersmens vazonus. Laistymas turi būti saikingas, o tręšimas dažnokas. Nuo balandžio mėn. reikėtų pradėti pratinti prie lauko sąlygų (Vilhelmas, 1982). Į pastovią vietą sodinamos 20x25 cm atstumais. Petunijos dauginamos ir auginiais, kurie imami pavasarį nuo per žiemą vėsioje, šviesioje patalpoje išlaikytų petunijų kerų (Balvočiūtė, Gudiniavičius, 1988).

Petunijos žydėti pradeda po pasodinimo praėjus 70 – 75 dienoms ir žydi nuo pavasario pabaigos iki rudens pradžios. Žiedai būna įvairių rožinių, raudonų atspalvių, gelsvos, violetinės, baltos, mėlynos spalvos. Be to, yra petunijų, kurių žiedai nusėti baltomis žvaigždutėmis arba išrašyti purpurinėmis gyslelėmis (Heic, 1996). Priklausomai nuo žiedų dydžio, rūšys yra dalijamos į didžiažiedes ir mažažiedes.

Didžiažiedės (*P. grandiflora*) turi didesnius žiedus, 12 – 16 cm skersmens, todėl jas gali lengviau sužaloti lietus, vejas ar kitos nepalankios oro sąlygos. Lietingą vasarą dažnai būna neišvaizdžios. Jas tinka auginti apsaugotuose pakabinamuose vazonuose (3 pav. A).

Skirtingai nuo didžiažiedžių, smulkiažiedės (*P. multiflora*) turi daugiau smulkesnių žiedų, 2,5 – 3 cm skersmens, todėl jos aplinkos veiksniams yra atsparesnės. Smulkiažiedėms tinka drėgnas oras, nederlingas dirvožemis ir gali būti sodinamos neapsaugotuose vazonuose (Courtier ir kt., 2009). A. Boguševičiūtės (1980) teigimu, jas galima auginti ir pusiau pavėsingose vietose (3 pav. B).

Yra ir pilnavidurės veislės, kurios esti labai puošnios, bet jas sunkiau auginti. Anot H. Heic (1996), pilnaviduriai žiedais žydinčių petunijų būta dar 1849, nors tikrąsias pilnavidures rūšis sukurti pavyko tik po 100 metų japonų selekcininkui Saksai. Jos sėklų neužmezga, todėl dauginamos tik vegetatyviškai (Boguševičiūtė, Daujotaitė, 1980). F₁ veislės, gautos heterozės būdu, yra labai patvarios ir žydi (3 pav. C) gausiau už kitas (Vilhelmas, 1982).



3 pav. Petunijos gali būti: didžiažiedės (A) (Iannotti, 2010), smulkiažiedės (B) (Anonimas 3, 2010) ir pilnaviduriais žiedais (C) (Klett, 2008)

Visų petunijų priežiūra yra panaši. Per karščius būtina gausiai laistyti, o norint, kad augalas gausiau žydėtų, reikia šalinti peržydėjusius žiedus, o per ilgus išsišakojusius žiedus reikia sutrumpinti, tuomet išauga naujos šakelės ant kurių susiformuoja žiedai. Petunijas dažnai puola amarai ir baltasparniai, todėl nuolat reikia tikrinti apatines lapų dalis. Pageltę lapai dažniausiai rodo geležies trūkumą dirvožemyje (Wagener, Vollrath, 2007). O jei augalai nustoja žydėti vasaros metu, tuomet galime daryti prielaidą, kad trūksta maisto medžiagų (Vilhelmas, 1982).

Petunia – tai nepakeičiamas bulvinių šeimos augalas, tinkamas interjero ir eksterjero puošybai bei želdinimui. E. Sisko (1996) teigė, jog petunijos tikriausiai yra vienintelės gėlės, be kurių neįsivaizduojamas nė vienas puošnus gėlynas. Šiuo metu tai vienas populiariausių augalų, auginamų soduose, gėlynuose, darželiuose, taip pat balkonuose, ant saulėtų palangių, terasose, kambariuose, bordiūruose. Veislių augalai besidriekiančiais ir žemyn svyrančiais stiebais auginami kubiluose, palangių loveliuose ar pakabinamose pintinėse. Petunijų naudojimo želdinimui populiarumą lemia išvestų veislių gausa ir įvairovė. Galima rinktis stačiais, svyrančiais žemyn ar šliaužiančiais stiebais, paprastais ir pilnaviduriais, vienspalviais ar kelių spalvų žiedais, taip pat glotniais ar gofruotais žiedlapiais. Šiuo metu daugelio mūsų sodus, balkonus bei palanges puošiančių petunijų „pramotės“ – kvapnioji baltažiedė *Petunia axillaris* bei rausvai violetiniais žiedais žydinti svyrančioji *Petunia violaceae*, abi vienmečiai puskrūmiai truputį lipniais stiebais bei lapais. Iš jų sukurta aibė puikiausių didžiažiedžių veislių, kurių žiedai 25 – 30 cm skersmens ir kuo įvairiausių spalvų. Vėliausiai, palyginti neseniai, pasisekė sukurti geltonžiedes veisles: ‘*Summer sun*’, ‘*Ruban Jaunes*’, ‘*Magic Jaune*’, ‘*California girl*’, ‘*Yellow magic*’ (Hessayon, 2003).

Tinkamai derinant nusvirusias ir stačiaūges, krūmeliu augančias veisles įvairiais žiedais, apsodinti galima vien petunijomis, nenaudojant kitų rūšių augalų. Veislių įvairovės dėka,

kurdami savo sodybos aplinką kiekvienais metais galime įrengti vis kitokių petunijų gėlyną. Dažnai petunijos yra komponuojamos su pelargonijomis, dėl priežiūros panašumo (Vilhelmas, 1982). Taip pat tinka su mažomis stačiaūgėmis balkonų gėlėmis, pvz., krūmine chrizantema, paprastąja lobelija ar pajūrine lobularija. Neretai petunijos gėlynuose sodinamos su dekoratyviu lapus turinčiomis gėlėmis, pvz., vilnotoji notra (*Stachys byzantina*).

Labiausiai paplitusios ir dažniausiai Lietuvoje auginamos hibridinės petunijos (*Petunia x hybrida*), dar vadinamos darželinėmis petunijomis (Anonimas 1, 2009). Tai hibridinė rūšis, gauta sukryžminus *Petunia violaceae* Lindl. su *P. nyctaginiflora* Juss., dabar auginama visame pasaulyje (Butkus ir kt., 1976).

Iš petunijų yra išvesti heteroziniai hibridai, kurie tik pirmos kartos būna produktyvesni ir atsparesni nepalankioms sąlygoms. Surfinijos retai ar visai neužmezga sėklų, o jei jas užmezga, sėjinukai nekartoja veislės požymių (Anonimas 1, 2009). Todėl dažniausiai jos dauginamos auginiais.

1.2. Mikrodauginimas – būdas gauti daug sveikų augalų per trumpą laiką

1.2.1. Augalų auginimas *in vitro* aplinkoje

Žmogui yra labai svarbus greitas, lengvas ir paprastas augalų dauginimas, todėl jis dažnai renkasi dauginimą sėklomis. Nepaisant to, yra sukurta daug vegetatyvinio (nelytinio) augalų dauginimo būdų. A. Sliesaravičiaus (2005) teigimu, 10 iš 30 svarbiausių pasaulio žemės ūkio augalų dauginami vien tik vegetatyviniu būdu. Efektyviausiu laikomas augalų mikrodauginimas *in vitro*. Šiuo būdu galima per trumpą laiką gauti kokybiškų, sveikų ir gyvybingų augalų. Mikrodauginimas yra vegetatyvinio dauginimo kultūroje *in vitro* būdas, skirtas greitai ir dideliais kiekiais padauginti augalus (Sliesaravičius, Stanys, 2005). Šiuo būdu, iš nedidelio eksplanto (augalo audinio ar organo izoliuota dalis) regeneruojama daug augalų nedidelėje erdvėje. Mikrodauginimo technika taikoma žoliniams bei medėjantiems augalams, pvz., miško medžiams, klonuoti ir auginti. Pasak A. Sliesaravičiaus (2005), pagal gaunamus dauginimo rezultatus genetinio ir fiziologinio stabilumo požiūriu, išskiriami du mikrodauginimo aspektai: pats mikrodauginimas, kada panaudojant įvairias *in vitro* sistemas, sužadinama morfogenezė indukcijos būdu, regeneruojami augalai, ir mikrovegetatyvinis dauginimas, arba mikroklonavimas, kai siekiama klonuoti augalus, išlaikant jų genetines ir fiziologines savybes. *In vitro* sąlygomis sisteminių ligų pernešėjai yra pašalinami, todėl tai yra metodas tinkamas augalams gydyti ir palaikyti sveikų individų kolekcijas. Šis būdas yra svarbiausias tiems augalams, kurių neįmanoma ar labai sunku padauginti sėklomis: dauginant poliploidines ir

aneuploidines formas, iš jų sėklų išauga nevienodi palikuonys, ir dauginant triploidinius individus.

Pastaruoju metu biotechnologijos srityje matomas ryškus progresas. Masinis komercinis vegetatyvinis dauginimas *in vitro* kol kas atliekamas ribotomis apimtimis. Kiekvienai augalo rūšiai turi būti optimali terpės sudėtis ir auginimo sąlygos, kurios nustatomos eksperimentiškai. Augalus dauginant neoptimaliomis tai rūšiai sąlygomis, pasitaiko regenerantų nukrypimų nuo pradinės formos: pakinta lytis, žiedų skaičius, žydėjimo reguliarumas ir kitos savybės. Anot V. Stanio (1998), tik tinkamai įrengtoje laboratorijoje galima pasiekti norimų dauginimo rezultatų. Patalpa neprivalo būti didelė, jos erdvumas priklauso nuo dauginimo apimčių. Joje turi būti dauginimui reikalingi prietaisai, įrankiai.

Jau keletą dešimtmečių neabejojama mikrodauginimo metodo naudingumu mokslinei praktikai. Pagrindiniu šio dauginimo privalumu yra laikoma tai, kad iš vieno augalo, per labai trumpą laiko tarpą, galima gauti daug to pačio augalo klonų. Šis būdas leidžia išauginti tūkstančius naujų augalų iš eksplantų, kai įprastais metodais dauginami augalai gali pasiekti tik mažą dalelę šio skaičiaus. Tai labai svarbu verslo įmonėms, kurioms tai yra pagrindinis kriterijus siekiant išlaikyti bei toliau plėtoti verslą. Tuo labiau, kad *in vitro* būdu dauginami tik neužsikrėtę augalai, tokie patys ir gaunami. I. Hudak (2006), atliko tyrimus, padedančius *in vitro* auginimo metodais išauginti bulves, atsparias *Erwiniae* – minkštojo puvesio virusui. Tyrimai buvo atlikinėjami kelis dešimtmečius, siekiant iširti skirtingų *Solanum* rūšių atsparumą ir išvermingumą *Erwinia* virusui. Pagrindinis tyrimo tikslas buvo naujaisiais *in vitro* metodais įverti atsparumą ar išvermingumą bulvių minkštajam puvesiui. *In vitro* mėginiai buvo užkrėsti, ir panaudoti ligos plitimui įvertinti. Gautų duomenų pagalba buvo nustatomas kiekvienos rūšies jautrumo virusui kategorijos. Šie rezultatai dabar taikomi auginant sveikus *Solanum* ūglius.

Nemažai svarbu tai, kad dauginant *in vitro* būdu, paruošiami jau išsiskniję augalai, kas leidžia sutaupyti daug laiko, kuomet sėkla ar auginiai lėtai prigyja ar išauga. Dar viena priežastis, dėl kurios prekeiviai dažnai renkasi šį dauginimo būdą, tai telpantis išpūdingas augalų skaičius viename kvadratiname metre. Taip sutalpinti augalai gali ilgai išsilaikyti, nes jiems pakanka maisto medžiagų esančių maitinamosios terpės sudėtyje. Manoma, kad mikrodauginimas yra vienintelis, perspektyvus metodas, genetiškai modifikuotų ląstelių regeneracijai, arba ląstelėms po protoplastų susiliejimo. Taip pat, šiuo būdu naudinga dauginti augalus, kurie nesubrandina didelio skaičiaus sėklų, kai augalai yra sterilūs ir nesubrandina gyvybingų sėklų, arba kai augalai visiškai nebrandina sėklų. Taip yra išsaugoma augalų rūšinė įvairovė. Negana to, mikrodauginimo būdu padauginami augalai yra tvirtesni, palyginus su padaugintais tradiciniais metodais, šių augalų dalys, tokios kaip sėklos ir auginiai, greičiau

vystosi. Augalai brandinantys labai mažas sėklas, daugiausiai orchidiniai, labiausiai tikėtina, kad išaugs sterilioje aplinkoje, nes jie yra jautrūs nepalankioms aplinkos sąlygoms, kurių *in vitro* aplinkoje išvengiama. Taigi, augalai gali būti dauginami ištisus metus, nekreipiant dėmesio į sezoniškumą.

Dėl pernelyg didelės kainos, dauguma augalų selekcininkų nenaudoja mikrodauginimo, tačiau kai kurių augalų klonų galima gauti tik šiuo būdu. Nepaisant didelių pastangų išvystyti šio proceso mechanizavimą, kuris būtų daug pigesnis, to dar niekam nepavyko padaryti.

1.3. Aplinkos veiksnių reikšmė regeneracijai

1.3.1. Fitohormonų reikšmė

Lašelių gyvavimui, augimui ir vystymuisi visada reikalingas vanduo, maisto medžiagos ir augimą bei vystymąsi reguliuojantys fitohormonai. Visi šie elementai - tai pagrindinės maitinamųjų terpių sudedamosios dalys.

Augalų augimui, raidai bei regeneracijai didelės įtakos turi hormonai, kurie dar vadinami fitohormonais. Jų reikšmė augalams yra labai svarbi, dažnai lemiama, todėl, kad išaiškintų jų poveikį mokslininkai skiria daug laiko ir pastangų. Atliktų daugybės tyrimų rezultatai rodo, kad fitohormonai patenka į ląsteles ir ten regeneruoja ląstelinius procesus. Fitohormonai – tai organinės medžiagos, sintetamos augalų audiniuose (paprastai sintetinami vienoje augalo dalyje ir vėliau transportuojami į kitas). Tai labai smulkios molekulės, kurios yra išplitusios po įvairias augalo dalis. Fitohormonai lemia daugelį augalo audinio būsenos pasikeitimų. Jie įtakoja augalo vystymąsi, augimą, žydėjimą, vaisių formavimąsi, senėjimą. Kontroliuoja *in vitro* augalines ląsteles, audinius, organus ar augalų kultūras pagal pageidaujamus gauti rezultatus: palaikyti gyvybingumą, auginti, inicijuoti specifinę augalų organogenezę (organų susidarymą), pumpurų formavimąsi ir pan. Taip pat labai svarbūs specifiniams dalijimosi procesams, lašelių diferenciacijai, metabolizmo reakcijoms.

Visi augalų hormonai pasižymi daugybiniu veikimu augale. Augalų augimą ir diferenciacijos procesus kontroliuoja penkios pagrindinės augalų augimą reguliuojančių medžiagų ar fitohormonų klasės (pagal atliekamas pagrindines funkcijas): auksinai, citokininai, giberelinai, abscizo rūgštis, etilenas (etenas), 6-aminopurinas (adeninas). Audiniams kultivuoti ir regeneruoti, beveik visada naudojami auksinai ir citokininai, o giberelinai ir abscizo rūgštis – tik specialiais atvejais, pvz., embriogenezei (Galvydis ir kt., 2007).

Dauginimą augalų kultūromis, maitinamąją terpę papildant fitohormonais propaguoja ir augalų augintojai. Kaip pavyzdys pateikiama *Solanum surattense* (Burm. f.) bulvinių šeimos

rūšis, kuri yra mediciniškai svarbi. Šio augalo greitas mikrodauginimas ir tiesioginė organogenezė buvo pasiekta iš ūglių galiukų ir lapų eksplantų. Lapai ir ūglių viršūnės izoliuoti iš jaunų augalų. Iš vieno eksplanto, auginto ant MS maitinamosios terpės, papildytos BAP ir kinetinu atskirai ir kartu, vidutiniškai susiformavo 180-200 ūglių. Regeneravę *in vitro* sąlygomis ūgliai buvo sveiki, tamsiai žaliais lapais ir pasiekė 5-10 cm ilgį per 10 dienų. Po perkėlimo į laukus išgyveno 80 ūglių, be sezoninių apribojimų (Pawar ir kt., 2002).

J. Mityko (1997) atliko tyrimus su *Capsicum annuum* L. augalais. Mikrosporų kultūrų eksperimentams pasirinktas aktyvus (Feherozon) ir du menkai aktyvūs (Nr. 40017 R-13 (itališkas) ir Nr. 40017 RK-II (vengriškas)) šio augalo genotipai. Eksperimentams panaudotos trijų rūšių maitinamosios terpės su skirtingais angliavandenių ir augimo reguliatorių papildais. Didžiausias mikrosporų dalijimasis pastebėtas NLN-2-15 terpėje (sukurta Lichterio, 1981 terpė susidedanti iš 2% sacharozės, 0.5 mg/l NAR ir 0.5 mg/l BAP).

Fitohormonai naudojami ir kaip indikatorius, siekiant natūraliems augalo senėjimo procesams lėtinti. Atlikus tyrimą, kuriuo buvo siekiama išsiaiškinti fitohormonų poveikį augalo senėjimui gauti rezultatai. Anot O. Purer (2009), dirbtinės augalų eksploatavimo sąlygos lėtina šaknų formavimąsi ir pagreitina jų senėjimą, o auginių lapijos senėjimą stabdo fitohormonai GA₃ ir STS. Šis slopinamasis poveikis, lėtinantis senėjimą, gali būti neutralizuotas ISR ar PP-333. ACK taip pat stimuliuoja šaknų augimą.

Siekiant išsiaiškinti tiesioginį savarankišką fitohormonų judėjimą lapo eksplantu, buvo atlikti tyrimai. Gauti rezultatai rodė, kad fitohormonai uždėti ant pasirinktos *Pelargonium* eksplanto vietos, sukelia radioaktyviųjų S, P, Rb, gliukozės ir metilo gliukozės kryptingus pakitimus vykstančius būtent ant uždėjimo vietos. Pastebėta, kad stipriausias poveikis buvo su GA₃, mažiau stiprus su BAP, 2,4-D. IAR ir NAR. Ca ir Cl veikė visiškai kitaip. IAR¹⁴C migracija vyko GA₃ susitelkimo vietoje (Penot, 1978).

Pasaulyje atlikta daug tyrimų, kuriais siekiama išsiaiškinti kiekvieno fitohormono veikimą atskirame augale ir kiekvienam augalui reikalingų fitohormonų kiekį, nes parinkus ne tikslų fitohormonų balansą, galimi įvairūs augalo nukrypimai ir deformacijos. J. van Staden (2006) ištyrė fitohormonų įtaką *in vitro* sąlygomis auginamų augalų patiriamam stresui. Labiausiai tikėtina, kad genetiniai ir morfologiniai nukrypimai, kurie pastebimi dauginant augalų kultūromis yra oksidacinio streso rezultatas. Keletas faktorių, sukeliančių augalų audinių kultūrų stresą yra: tėvinio augalo priežiūra, eksplantų izoliavimas, terpės sudėtis, auginimo inde esanti atmosfera ir laboratorijos aplinka. Nepaisant to, nustatyta, kad svarbiausia priežastis, dėl kurios augalai patiria stresą – netinkamas fitohormonų kiekis maitinamojoje terpėje. Visos augalų

deformacijos labai brangiai atsieina augalų veisimo pramonei, todėl būtina žinoti tiksliai nukraipymų priežastis, kurios padėtų to išvengti.

Taip pat būtina žinoti fitohormonų sąveiką su kitais preparatais. Visi terpės papildai sąveikauja ne tik su augalu, bet ir vienas su kitu. A. Szasz (1997) atlikinėjo tyrimus, siekiančius pagerinti saldžiųjų paprikų (*Capsicum annuum* L.) regeneracijos potencialą. Atliekant genetinės transformacijos bandymus ant sėklaskiltės ir šaknydinant eksplantus, buvo naudojamos nukenksmintos *Agrobacterium* atmainos. Ūglių išgyvenimo pailginimui buvo pasirinktas kanamicinas. Tuomet, pastebėta, kad naudojant cefotaximą bakterijų pašalinimui, fitohormonai kenkia šiam regeneracijos žingsniui. Taip pat pastebėta antibiotikų (cefotaximas, amoxycilinas) ir fitohormonų (BAP, TDZ) sąveika, sėklaskilčių eksplantų regeneracijos proceso metu.

Taigi, fitohormonai yra puikūs pagalbininkai auginant augalus, kadangi juos naudojant galima augimą nukreipti mums patogiai linkme. Tačiau būtina išsiaiškinti kiekvieno šio preparato veikimą, kadangi panaudojus ne taip, galima sutrikdyti augalų augimą.

1.3.2. Šviesos įtaka augalams

Augalas nuolat sąveikaudamas su aplinka, kuria savo organizmą iš čia gaunamų maisto medžiagų. Taigi, jo augimas ir derlius yra tiesiogiai priklausomi nuo dirvožemio ir klimato sąlygų, kurių viena iš svarbiausių šviesa. Ji turi didelę įtaką regeneracijos potencialui, todėl optimalų apšvietimo intensyvumą stengiamasi sukurti ir augalų audinių kultūroje auginamoms sėkloms ar eksplantams.

Šviesos poveikis augalams priklauso nuo jos bangos ilgio (spektro) ir spinduliuotės srauto tankio (Šlapakauskas, 2006). Ji neatsiejama nuo pat sėklų dygimo iki žydėjimo ir net augalo senėjimo. Tai neatsiejamas fotosintezės energijos šaltinis bei augalo vystymosi dirgiklis. Tačiau dar nereiškia, kad augalas negalėtų vystytis be šviesos. Anaiptol, augalai tamsoje auga daug greičiau, bet tuomet yra neišvengiami augimo nukrypimai ir augalo deformacijos. Jų stiebai ištįsta ir tampa labai pažeidžiami, silpnesnės ramstinių ir apytakos audinių sistemos, atsiranda didelė išgulimo tikimybė. Tokių augalų lapai blogai vystosi, jie lieka smulkūs ir dėl šviesos trūkumo nepažaluoja (Dagys ir kt., 1974). Augalas negaudamas šviesos spindulių išaugina didesnes šaknis, nes tuomet koncentruojasi ne į fotosintezės vykdymą, bet į maisto medžiagų ėmimą iš dirvos. J. Dagys (1974) tvirtina, jog augalų antžeminių dalių augimą šviesa lėtina, o tamsa greitina, esant pastoviai temperatūrai.

Augalų šaknis ir požeminiai stiebai taip pat sparčiau auga tamsoje. Anot, J. Dagio (1974), apkaupos bulvės išleidžia daugiau požeminių stiebų ir užmezga daugiau gumbų.

Iš F. Kjelmano (1885), G. Bonjè (1895), M. Turnua (1912), G. Klebso (1918) darbų jau buvo žinoma apie augalų reagavimą į dienos trukmę (Stašauskaitė, 1995). Evoliucijos metu augalai prisitaikė prie sezono ir paros metu kintančių aplinkos sąlygų, taip ilgainiui suformuodami vidinius ritmus tiems pakitimams pajusti. Jau esame pripratę, kad krokai žydi pavasarį, ramunės – vasarą, chrizantemos – rudenį, tai nėra atsitiktinumas, o augalų reakcija į išorinio veiksnio poveikį priklausančių nuo vidinių augalo savybių. M. Turnua ir G. Klebsas vieni iš pirmųjų įrodė, kad augalo vystymasis ir žydėjimo terminai priklauso ne tik nuo šviesos intensyvumo, bet, svarbiausia, nuo šviesos ir tamsos periodo santykio per parą (Stašauskaitė, 1995). Pasak I. Šaulienės (2002), fotoperiodo įtaka vegetatyvinio ir reprodukcinio vystymosi kaitai neatsiejama nuo hormoninės reguliacijos, koordinuojančios augimo bei morfogenezės procesus visame organizme. Organizmo perėjimas iš vegetatyvinių organų (šaknų, stiebų ir lapų) genezės į reprodukcinę organų (žiedų, sėklų ir vaisių) formavimą kontroliuojamas daugelio veiksnių, tarp kurių fotoperiodinė reakcija ir fitohormoninis stimulus yra vieni reikšmingiausių, to pasakoje, augalams fotoperiodinė reakcija padeda išauginti palikuonis tik pačiomis palankiausiomis aplinkos sąlygomis. Šviesos ir tamsos poveikio reikšmė fotoperiodizme tiriama, ieškant kritinės trukmės ar periodiškumo ribos. Augalų reprodukcinį vystymąsi lemia: kritinis dienos ilgis (t.y. paros laikotarpyje minimalus būtinas šviesos periodas) ir kritinis nakties ilgis (tamsos periodo trukmė, minimaliai būtina trumpadieniams ir maksimaliai leistina ilgadieniams augalams). Todėl augalai buvo suskirstyti į trumpadienius (*Amaranthus caudatus*, *Salvia splendens*, *Cosmos bipinnatus*), neutralios dienos (*Senecio vulgaris*, *Lathyrus odoratus*, *Fuchsia hybrida*) bei ilgadienius (*Rudbeckia bicolor*, *Melilotus albus*, *Dianthus superbus*), kurių ir yra daugiausia, jie sudaro 50% visų augalų.

Taigi, norint išvengti įvairių deformacijų, silpnai išvystytų ramstinių ir apytakos audinių sistemos, išgulimo, augalus būtina auginti šviesoje, tačiau kai kurie augalai be šviesos taip pat gali išlikti.

1.4. *Solanaceae* augalų regeneracijos *in vitro* kultūrose pasiekimai

Solanaceae augalai yra svarbūs visame pasaulyje, dėl šiai šeimai priklausančių genčių, kurių atstovai turi dekoratyvią bei maistinę vertę. Remiantis šiuo principu, visame pasaulyje atliekami įvairūs tyrimai, kuriais siekiama padidinti augalų regeneraciją, išvengti deformacijų bei genetinių pakitimų. Mikrodauginimas pripažintas vienu iš geriausių dauginimo priemonių. Papildant auginimo terpes subalansuotu fitohormonų kiekiu ir parenkant tinkamą, optimalų augimui apšvietimą, galima greitai ir našiai, išvengiant augalų ligų pavojaus, padauginti augalus.

Siekiant išsiaiškinti augimo reguliatorių poveikį protoplastų ląstelių dalijimosi greičiui, L. Meyer (2006) atliko tyrimus su *Petunia hybrida* augalais. Protoplastai buvo izoliuoti iš šešių skirtingų *P. hybrida* genotipų ir auginami maitinamojoje terpėje 8pm7 (1,0 mg/L benzilaminopurinas (BAP) + 1,0 mg/L indolilacto rūgštis (IAR) + 2,5% sacharozė). Terpė po septynių – devynių dienų buvo keičiama į kaliaus sužadanimui papildytą terpę – KF1 (0,5 mg/L BAP + 0,5 mg/L IAR ir 1,8% sacharozė), vėliau į KF2 (0,5 mg/L BAP + 0,5 mg/L IAR ir 1,3% sacharozė). Po to, protoplastai su kaliumi buvo perkelti į PET 2 terpę (1 mg/L BAP + 2 mg/L IAR). Protoplastų kiekis pakito nuo 0,5 iki $5,6 \cdot 10^6$ protoplastų grame, grynojo svorio. Ląstelių dalijimosi greitis buvo pakitęs nuo 15 iki 55%. Ūglių regeneracija buvo gauta iš trijų genotipų. Veikiant skirtingomis koncentracijomis rudaminu 6G (R6G) ir jodoacetamidu (IOA) buvo žymiai sumažintas ląstelių dalijimasis, tačiau ryškūs šių eksperimentų rezultatų skirtumai kol kas neleidžia nustatyti tinkamos koncentracijos.

C. Cabaleiro (1992), atliko eksperimentus, siekdamas išsiaiškinti šviesos įtaką, petunijų ūglių išsisknijimui *in vitro* sąlygomis. Esant 24 valandų fotoperiodui, po 5 dienų inkubacinio periodo MS terpėje be hormonų, buvo pastebėtas didelis šaknų formavimasis. Tačiau praėjus 10 ir 15 dienų inkubacinio periodo nebuvo pastebėta šaknų formavimosi skirtumų taikant 24 h ir 14 h fotoperiodus. Ūglių šaknijimas palaipsniui didėja apšvietus juos nuo $20 \mu\text{mol/s m}^2$ iki $60 \mu\text{mol/s m}^2$. Susiformavusių šaknų skaičius, jų ilgiai bei svoriai, tiesiogiai priklauso nuo naudojamo apšvietimo dydžio. Medžio anglis terpėje stabdo šaknijimąsi, tuo tarpu nepastebėtas joks neigiamas poveikis šaknijimuisi, uždengus viršutinę dalį indo, kuriame auginami ūgliai, su juoda polietilenu plėvele (Cabaleiro, Economou, 1992).

Šis tyrimas buvo atliktas, siekiant išvystyti techniką, greitam bulvių (*Solanum tuberosum* L.) dauginimui, augalų kultūromis. Tyrime naudoti eksplantai buvo paimti iš keturių šio augalo veislių: Diamant, Alpha, Almera ir Agria. Jie patalpinti į agaru sutirštintą (0,8%) MS terpę, sudarytą iš 3% sacharozės ir papildytą skirtingų koncentracijų citokininiais TDZ ir BAP, vienais arba kartu su 1-naftilacto rūgštimi (NAR). Augalų rūšių analizavimas įrodė, kad augalų augimo reguliatoriai turi didelės įtakos vystymuisi, o geriausi rezultatai pasiekti su Almera veisle. Eksplantų reakcija į BAP ir TDZ buvo vertinama pagal kiekvienos veislės eksplante išaugusių ūglių vidurkį. Didžiausias skaičius (5,4 ūglių/eksplante) ūglių eksplante buvo pastebėtas Almera eksplantų kultūroje, kultivuotų MS terpėje, papildytoje 3,0 mg/l TDZ kartu su 0,1 NAR. Regeneravę ūgliai buvo išsiskniję papildytoje auksiniais MS terpėje ir be jų. Ilgiausia šaknis ($8,8 \pm 1,3$ cm) buvo užfiksuota ūglyje, augintame terpėje su fitohormonais. Didžiausias šaknų skaičius ūglyje buvo pastebėtas auginant terpėje papildytoje 1,0 mg/l 3-indolilacto rūgštimi (IAR). Regeneravę augalai buvo pratinami prie natūralių augimo sąlygų ir perkelti į

šiltnamį, kur visi 100% išgyveno. Visi augalai atrodė morfologiškai sveiki, normalūs ir vienodi savo lapų forma, bendra išvaizda ir augimu. Anot G. Khadiga (2009), šis tyrimas yra svarbus kuriant bulvių mikrodauginimo pramonę ir padėtų įveikti sunkumus, išskylančius įprastu būdu dauginant šią svarbią rūšį.

C. He (2007), atliktas tyrimas įrodė citokinino ir giberelino svarbą. Tiriant išpūstos taurelės sindromą (ITS) *Physalis* gentyje. Bepiesteliniai eksperimentai ir ankstesni žiedų tyrinėjimai su fitohormonais, įrodė citokinino ir giberelino svarbą, ITS formavimuisi, kuris gali pakeisti augalų apdulkinimo reikšmę. Heterotopiškai išreikštas VDF2 sužadina mažas taurėlapio ląsteles, kurios yra išplečiamos citokininu, o giberelinai ląsteles prailgina, tokiu būdu sukuriamas ITS.

Surfinijos lapų eksplantai, uždėti ant MS terpės, papildytos 0,1 mg/l NAR, 1 mg/l BAP, 400 mg/l NAR, kazeino hidroksido ir sustingdyta 2 g/l fitogelio, efektyviai regeneruoja. Organogenezės indukcija vyksta tamsoje. Po 5 dienų, eksplantai perkelti į mažai apšviestą baltos šviesos vietą (19 – 21 $\mu\text{mol m}^2/\text{s}$), kur jie per 3 – 4 savaites atstatė ūglius. Tačiau šiomis sąlygomis, lapų eksplantai su *Agrobacterium tumefaciens* pagalba regeneravo nežymiai. Apšvietimo spindulių spalva taip pat įtakoja regeneracijos greitį (Michalczuk, 2000).

Taigi, su bulvinių šeimos augalais, tarp jų ir petunija, atlikta daug įvairių tyrimų, tačiau pastebėta, kad kompleksinis fitohormonų ir šviesos poveikis vis dar nėra aiškus. Tuo tarpu, tokio pobūdžio žinios yra ypatingai svarbios modeliuojant augalų augimą ir vystymąsi. Visi atlikti tyrimai, jų rezultatai yra labai svarbūs dauginimo augalų kultūromis evoliucijai.

2. DARBO OBJEKTAS IR METODAI

2.1. Darbo objektas

Darbo objektas - bulvinių (*Solanaceae*) šeimai priklausantys *Petunia* genties augalai. Šie augalai pasirinkti dėl savo svarbumo ir reikšmingumo dekoratyviojoje sodininkystėje. Jei bandytume reitinguoti vienametes gėles, petunijos užimtų aukščiausias vietas (Anonimas 1, 2009). Stačius stiebus auginančios, laisvai svyrančios ar pažeme besidriekiančios petunijos noriai sodinamos pakabinamuose vazonuose, įkurdinamos gėlynuose su kitais augalais ar vienos pačios. Tyrimams pasirinktos populiarios dviejų rūšių veislės, kad tiksliau sužinotume fitohormonų ir šviesos įtaką šių augalų regeneracijos potencialui.

Eksperimentai buvo atlikti su *in vitro* sąlygomis išaugintomis petunijomis: *P. nana compacta* 'Alderman' ir *P. grandiflora* 'Sneni'.

Smulkiažiedė petunija (*Petunia nana compacta*) – tai vienmetė, vidutiniškai 30 cm aukščio gėlė, žydinti gausiai ir ilgai (nuo birželio iki rugsėjo), 7-9 cm skersmens žiedais. Žydėjimo metu, rekomenduojama tręšti kompleksinėmis trąšomis. Atsparios nepalankioms augimo sąlygoms. Didžiažiedės petunijos sėklos labai smulkios, sudygsta per 17-20 dienų, esant +18-20C^o temperatūrai, jų nereikia užberti žeme. Į šiltnamį sėjama kovo – balandžio, o daigai sodinami gegužės – birželio mėnesiais.

Didžiažiedžė petunija (*Petunia grandiflora*) – vienmetė, nuo 20 iki 35 cm aukščio gėlė. Nuo smulkiažiedžių skiriasi žiedų dydžiu (9-10 cm skersmens). Jos jautresnės nepalankioms aplinkos sąlygoms, todėl geriausiai auga apsaugotose nuo vėjų vietose. Daiginant lauke sėklos substratu neužberiamos, tik lengvai išpaudžiamos į dirvos paviršių.

Skirtingai nuo natūralioje aplinkoje augančių, taip išauginti augalai yra visiškai sveiki, apsaugoti nuo kenkėjų bei įvairiausių šių augalų niokojančių ligų.

Tėvinių augalų išauginimui buvo naudojamos „Agronomo patarimas“ firmos sėklos, nupirktos parduotuvėje „Žalia stotelė“. Šios firmos sėklos yra plačiai žinomos ir naudojamos Lietuvoje, dėl savo patikrintos kokybės ir daigumo. Visos „Agronomo patarimo“ sėklos ir jų įpakavimas atitinka ES taisykles ir standartus. Jos iki naudojimo yra laikomos supakuotos į hermetišką pakuotę, kuri užtikrina jų saugumą iki naudojimo. Sėklų daigumui užtikrinti, jos apveliamos rišliu organinių ir mineralinių trąšų mišiniu. Darbe atliekamiems eksperimentams atlikti, nuo sėklų trąšos buvo nuskalautos.

2.2. Darbo metodai

2.2.1. Tėvinių augalų išauginimas

Visi bakalauro darbe aprašyti tyrimai buvo atliekami Šiaulių universiteto Gamtos mokslų fakulteto Aplinkotyros katedros augalų biotechnologijų laboratorijoje, kurioje suteikiamos ir užtikrinamos visos sąlygos, būtinos augalų kultivavimui.

Motivinių augalų išauginimas iš sėklų – tai ilgas, tikslumo ir kruopštumo reikalaujantis darbas. Tyrimams atlikti, buvo naudojami *P. nana compacta* 'Alderman' ir *P. grandiflora* 'Sneni' tėviniai augalai. Jie buvo išauginti iš sėklų, toje pačioje laboratorijoje, *in vitro* sąlygomis.

Prieš sėjant, sėklos turi būti atitinkamai paruoštos. Jos 30 min. skalaujamos po 25 – 35°C tekančio vandens srove. Tada pasidarome 50% ACE tirpalo (10 ml distiliuoto H₂O, 10 ml ACE), į jį sudedame jau išskalautas sėklas, viską maišome ant magnetinės maišyklės 5 min. Tada stiklinę su ACE tirpalu ir sėklomis perkeliame į laminarą. Toliau sėklos skalaujamos iškaitintu distiliuotu H₂O. Vyksta trys skalavimai, kurių metu sėklos su H₂O maišomos ant magnetinės maišyklės. Po 10 – 15 min. jos filtruojamos ir perkeliama į indą su švariu distiliuotu vandeniu, kur vėl skalaujamos.

Po trečiojo skalavimo sėklos nuo filtrinio popieriaus dedamos ant jau paruoštos ir išpilstytos į Petri lėkšteles terpės. Ant jos paviršiaus išdėstytos sėklos lengvai paspaudžiant pincetu.

Visos lėkštelės su sėklomis ir terpe bei dangteliai pakaitinami dujinio degiklio liepsnoje, taip užtikrinant, kad grybų sporos esančios ant kraštų bus sunaikintos. Tada Petri lėkštelių kraštai užklijuojami specialia tampria juoste, kad nepatektų bakterijos ar grybai, ir iškeliamos į nesterilią aplinką. Ant lėkštelės paviršiaus parašome joje pasėtų sėklų rūšį, sėjos datą, specialias terpės savybes ir visus kitus reikiamus duomenis. Taip paruoštą mėginį dedame į augimo kamerą.

Sėkloms sudygas, augalams darosi mažai vietos toliau augti, todėl norint užtikrinti augimą ir vystymąsi, juos reikia perkelti į didesnę indą. Augalai vėl keliami į laminarą, čia išimami iš Petri lėkštelių ir po du ar tris perkeliama į didesnes talpas. Perkeliama augalas išimamas jo nepažeidžiant. Tai atliekama kuo greičiau, kad augalui būtų daromas, kuo mažesnis stresas.

Persodinus augalas toliau auga ir vystosi. Eksperimentai aplinkos veiksnių įtakai tirti buvo pradėti, kai tėviniai augalai pasiekė apie 10 – 15 cm. Tuo metu jie buvo išvystę daug lapelių ir turėjo pakankamai ilgą stiebą. Iš šių dalių izoliuoti eksplantai buvo naudojami eksperimente.

2.2.2. Kultivavimo terpės ruošimas

Augalų kultivavimas *in vitro* aplinkoje, reikalauja specialaus pasiruošimo. Visų pirma, reikia pasiruošti kultivavimo terpę. Kad tai padaryti būtų lengviau, ruošiami kompleksiniai tirpalai. Nesumedėjusių augalų sėkloms ir audiniams kultivuoti dažniausiai naudojama Murashige Skoog terpė. 1 lentelėje pateikiami jos sudėtiniai elementai (500 ml terpės paruošti).

1 lentelė

Sudėtiniai elementai vienam litrui terpės paruošti

Bidistiliuotas vanduo	~ 500 ml
Makro druskos	50 ml
Mikro druskos	5 ml
Geležies chelatas	2,5 ml
Sacharozė	15 g
Agaras	4,5 g

Eksperimentui reikalingai terpei paruošti naudotos dvi kolbos po 500 ml. Viena pusės litro talpa su MS terpe buvo papildyta fitohormonais, o kita – be fitohormonų, naudojama kaip kontrolė.

MS terpės ruošimo proceso pradžioje į kolbą įpilama šiek tiek distiliuoto H₂O, įdedama 50 ml makrodruskų (4 pav.). Kolbą pastatoma ant magnetinės maišyklės ir į vidų įdedamas magnetas, kuris išmaišo tirpalą. Kol viskas maišosi tirpalas papildomas 5 ml mikrodruskų, su pipete įlašinama 2,5 ml geležies chelato.



4 pav. Maitinamosios terpės MS ruošimas: pilami koncentruoti tirpalai (A); beriami birūs terpės elementai (B)

Tada cilindru išmatuojamas tirpalo, esančios kolboje, tūris ir įpilamas distiliuotas vanduo iki numatyto tūrio (500 ml), paliekama vietos sacharozei ir agarui. Tada supilama 15 ml sacharozės (ji yra anglies šaltinis) ir galiausiai įdedama 4,5 g agaro (terpei sutirštinti). Tirpalas

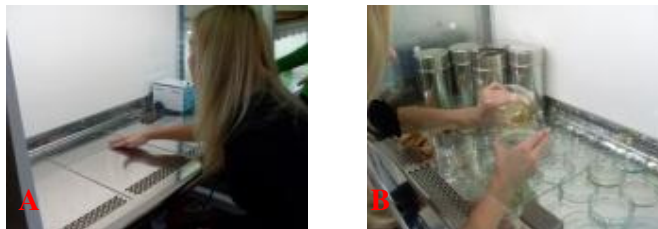
paliekamas ant magnetinės maišyklės, kol viskas išsimaišo. Tokiu pačiu principu pagaminama ir antra kolba su maitinamąja terpe.

Terpės sterilinimui naudojamas autoklavas. Kolbos, su paruošta terpe užkemšamos kamščiu (pagamintas iš vatos ir audinio), ant viršaus uždedamas kaitinimui atsparus popierius ir užrišamas lininiu siūlu, įdedamas į šio įrenginio vidų (5 pav.). Kartu su terpe į laminarą dedami ir filtrai (įdėti į sandarų indą, kad nesudrėktų), kurie yra naudojami fitohormonų filtravimui. Kad terpė išsisterilintų, 20 min. kaitinama aukštoje 121°C temperatūroje. Visa sterilinimo procedūra (nuo autoklavo įjungimo iki terpės atvėsimo) trunko 3 valandas. Kol terpė kaitinama darbu paruošiamas laminaras. Iš autoklavo kolbas su terpe bei filtrus įdėjome į laminarą, kur atvėsinta iki 40°C temperatūros ir išpilstyta į sterilias Petri lėkšteles.



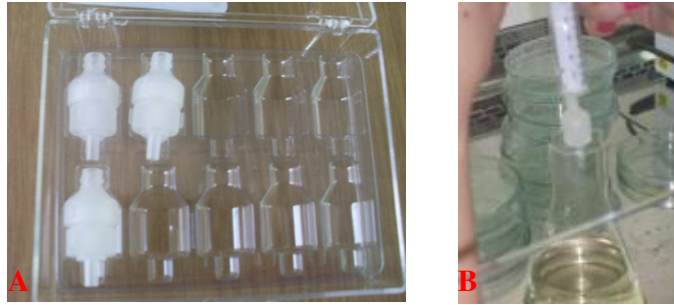
5 pav. Terpė įdėta į autoklavą

Darbo pradžioje būtina išsisterilinti laminare naudojamus indus. Tai atliekama džiovinimo spintoje, esant 180°C temperatūrai. Įjungus laminarą, rankos, visas laminaro vidus ir jame esantys prietaisai, dezinfekuojami 70% etanoliu. Viskas turi būti labai sterilu, nes menkiausias užkratas gali sugadinti visą darbą. Visi indai patalpinami į laminarą, į Petri lėkšteles supilstoma vienoje iš kolbų esanti terpė, po 20 ml (6 pav.).



6 pav. Laminaro valymas (A), terpės pilstymas į Petri lėkšteles (B)

Į antrąją terpe lašinami fitohormonai. Ant jau pasiruošto švirkšto su IAR ir BAP, buvo uždėtas mikroporinis filtras, per kurį į jau pravėsusią, bet dar nepradėjusią stingti terpe sulašinome fitohormonus (7 pav.). Taip terpė yra apsaugoma nuo virusinių ir bakterinių užkratų, galinčių patekti kartu su fitohormonais. Tada kolbos turinį gerai išmaišėme, tokiu pačiu principu išpilstėme į Petri lėkšteles ir laukėme kol terpė sustings.



7 pav. Mikroporiniai filtrai (A), fitohormonų filtravimas į maitinamąją terpę (B)

Kultivavimo terpei sustingus, paimama sterilioje aplinkoje išauginta petunija. Jos lapeliai skalpeliu pjaustomi lygiomis dalimis (10 mm ilgio ir 5 mm pločio), lengvais vieno mosto pjūviais, kad nepažeisti pjūvio vietoje esančių ląstelių. Eksplantai buvo izoliuojami iš lapelio kraštų, kad nepatektų pagrindinė gysla. Juos uždėjome ant terpės.

Taip paruošiama 13 Petri lėkštelių terpės su fitohormonais ir 13 be fitohormonų. Į likusias lėkšteles su terpe dedamos stiebo dalys. Stiebą pjaustome 5 mm ilgio dalimis. Vienoje lėkštelėje buvo kultivuojama 10 eksplantų. Prieš uždengiant lėkštelių kraštai pakaitinami ant dujinio degiklio liepsnos, o sterilumą išsaugoti visą tyrimo trukmę padeda, lėkštelės kraštai padengti parafilmu.

2.2.3. Fitohormonų ruošimas

Eksperto metu, buvo siekiama nustatyti fitohormonų įtaką petunijų regeneracijai, manipuluojant IAR ir BAP koncentracija terpės sudėtyje. Tyrimams naudojami auksinai IAR ir citokininai BAP, nes jie kartu stimuliuoja ląstelių dalijimąsi, šaknų formavimąsi. Prieš dozuojuant fitohormonus, iš jų reikia pasigaminti motininį tirpalą. Tai susikaupimo ir didelio tikslumo reikalaujantis darbas, nes tai maitinamosios terpės papildas, nuo kurio priklauso tyrimo sėkmė ir rezultatai.

Ant skalpelio galiuko paimamas kaip įmanoma mažesnis fitohormono kiekis, jį pasvėrus supilamas į mažą indelį. Kad auksinai tirptų reikalingas spiritas, tačiau jis labai toksiškas augalams, todėl fitohormoną užpilame mažu lašu spirito. Medžiagai ištirpus, ant jos užpilama tiek vandens (šiek tiek pašildyto), kiek mililitrų auksino buvo atsverta. Šiltame vandenyje fitohormonai tirpsta greičiau, tačiau jo negalima užkaitinti, nes karštyje fitohormonai suyra. Taip pat atsveriamas ir citokininas BAP, tačiau tirpdomas ne su spiritu, o su KOH. Ant ištirpusios medžiagos taip pat užpilamas toks pat kiekis vandens, kiek buvo atsverta fitohormono.

Taigi, tokiu būdu paruošiami IAR ir BAP motininiai tirpalai, kuriuose yra 1 mg fitohormono 1 ml tirpalo (8 pav.).



8 pav. Fitohormonų bazinių tirpalų paruošimui reikalingos medžiagos (A), paruošti BAP ir IAR motininiai tirpalai (B)

Tyrimo metu, siekiant sužadinti eksplantų regeneraciją, dalis terpės buvo papildyta IAR ir BAP santykiu 1IAR:5BAP. Iš žemiau pateiktos 2 lentelės matoma, kad norint gauti tokį fitohormonų santykį, į 500 ml terpės reikia įdėti 0,5 mg IAR ir 2,5 mg BAP.

2 lentelė

Fitohormonų kiekis 500 ml MS terpei papildyti

Fitohormonai MS terpeje	IAR, mg/l	BAP, mg/l
-	0	0
1IAR:5BAP	0,5	2,5

Taigi reikėjo į 500 ml terpės įdėti 0,5 IAR, mg/l ir 2,5 BAP mg/l. Automatine pipete paimama 50 µl IAR tirpalo ir supilama į švarią nedidelę stiklainaitę. Į tą pačią stiklainaitę įpilama 10 µl BAP tirpalo ir inde esantis koncentratas papildomas 5 ml distiliuoto vandens. Pasidarius reikiamos koncentracijos tirpalą, jis sutraukiamas į švarų švirkštą, kuris dezinfekavus spiritu įdedamas į laminarą, kur ir paliekamas, kol gaminama maitinamoji terpė.

2.2.4. Eksplantų kultivavimo sąlygos

Tyrimo rezultatuose taip pat atsispindėjo dar vienas aplinkos veiksnys – tai šviesa ir tamsa. Šis faktorius yra labai svarbus gaunant rezultatus, nes šviesa yra ne tik energijos šaltinis fotosintezei, bet ir tiesioginis dirgiklis, turintis įtakos augalo vystymuisi (Dagys ir kt., 1974). Todėl keturių grupių lėkštelės buvo padalinamos į 2 dalis ir pusė Petri lėkštelių, su izoliuotais eksplantais, buvo kultivuojamos šviesoje, tam skirtoje kultivavimo spintoje, kurioje buvo nustatyta optimali augimo temperatūra – 25°C.

Nepaisant to, augalai gali augti ir tamsoje, netgi daug greičiau, kaip šviesoje. Tačiau jie vystosi nenormaliai ir yra neišvengiamos deformacijos (Dagys ir kt., 1974). Remiantis šiuo faktu, buvo siekiama ištirti *Petunia* augalų eksplantų regeneraciją tamsoje ir palyginti tarpusavyje su kultivuotais šviesoje. Taigi buvo paimtos likusios lėkštelės ir sudėtos į spintą,

kurioje 24 valandas per parą vyravo tamsa. Temperatūra spintoje taip pat buvo optimali augimui – $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$.

Šviesoje ir tamsoje augalai buvo kultivuojami 30 dienų. Tiek laiko ir truko eksperimentas. Po to buvo skaičiuojami ir lyginami gauti rezultatai.

2.2.5. Gautų rezultatų skaičiavimas ir vertinimas

Atsižvelgiant į šio darbo tikslą - ištirti kompleksinę fitohormonų ir šviesos įtaką *Petunia* regeneracijai *in vitro*, surinkti tyrimų, vykusių 30 dienų, duomenys. Buvo nustatytas regeneravusių ir nepakitusių, vizualiai nematomų pakitimų turinčių, eksplantų skaičius. Visos eksplantų regeneracijos buvo registruojamos, o jų rezultatai rašomi į pateiktos 3 lentelės pobūdžio lenteles. Atlikus eksperimentą buvo įvertintas bendras regeneravusių lapų ir stiebų eksplantų, vidutinis šaknų, ūglių, jų tarpubamblių ir lapų skaičius. Po 30 dienų trukusio tyrimo, eksplantai, jų ūgliai bei susidaręs kalius buvo sveriami. O siekiant gauti ir palyginti konkrečius matmenis, buvo matuojami susidarę organai.



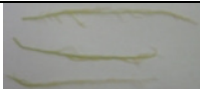
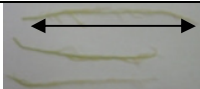


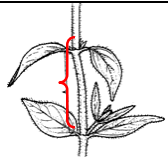

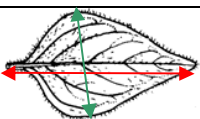

3 lentelė

Regeneravusių eksplantų vertinimo kriterijai

Lėkšt.	Šaknys		Ūgliai				Lapai			Kalius
Nr.	Skaičius	Ilgis (mm)	Skaičius	Svoris (g)	Ilgis (mm)	Tarpubamblių sk.	Skaičius	Ilgis (mm)	Plotis (mm)	Svoris (g)

Kadangi vertinant regeneracijos potencialą reikėjo išskirti skirtingo tipo regenerantus, tai rezultatų aprašyme laikomasi 4 lentelėje pateiktų terminų.

Rezultatų aprašyme naudojami terminai

Piešinys/nuotrauka	Terminas	Paaiškinimas
	Lapo ir stiebo eksplantas	Iš augalo izoliuota lapo ir stiebo dalis
	Regeneravusio ūglio svoris	Pakitusio eksplanto, su jame susiformavusiais dariniais svoris, g
	Šaknų skaičius	Išleistų šaknų vidutinis skaičius viename ūglyje, vnt.
	Šaknų ilgis	Išleistų šaknų vidutinis ilgis, mm
	Ūglių skaičius	Eksplantuose susiformavusių auginių vidutinis skaičius, vnt.
	Ūglių svoris	Susiformavusių auginių vidutinis svoris, g
	Tarpubamblių skaičius	Vidutinis tarpubamblių skaičius regeneravusiame ūglyje, vnt.
	Lapų skaičius	Vidutinis lapų skaičius regeneravusiame ūglyje, vnt.
	Lapų ilgis ir plotis	Regeneravusiame ūglyje susiformavusių lapų vidutinis ilgis ir plotis, mm
	Kaliaus svoris	Regeneravusiame eksplante susiformavusio kaliaus svorio vidurkis, g

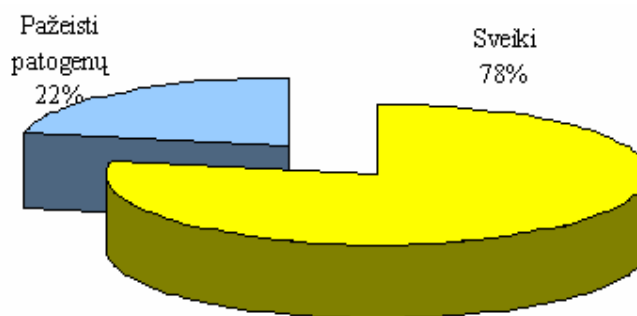
Buvo siekiama nustatyti fitohormonų reikšmę regeneracijai šviesoje ir tamsoje, todėl duomenys susisteminti ir grafiškai apdoroti, panaudojant Microsoft Exel programą, o diagramos ir rezultatai pateikiami, žemiau esančiame, rezultatų skyriuje.

3. DARBO REZULTATAI IR JŲ ANALIZĖ

Augalų kultivavimas *in vitro* sąlygomis reikalauja iš asmens, atliekančio manipuliacijas, specialių įgūdžių. Vykdam šį darbą jie susiformavo dar rengiant kursinį darbą, kai buvo siekiama išauginti tėvinius augalus *in vitro* aplinkoje. Gebėjimas valdyti technologiją ir metodiką buvo labai reikalingi atliekant pagrindinį baigiamojo darbo eksperimentą, kuris atliktas per laikotarpį nuo 2009-09 iki 2009-12.

Eksperimentai atlikti naudojant *Petunia nana compacta* 'Alderman' ir *Petunia grandiflora* 'Sneni' lapų ir stiebų eksplantus, auginant juos visiškoje šviesoje ir tamsoje bei naudojant IAR ir BAP fitohormonus, norint sužadinti šaknų ir organų regeneraciją. Norint sužinoti fitohormonų poveikį regeneratams ir palyginti, naudojama kultivavimo terpė be fitohormonų, toliau darbe ši terpė vadinama kontroline.

Nors technologija jau buvo žinoma, visai išvengti eksplantų užkrėtimo patogenais nepavyko (9 pav.)



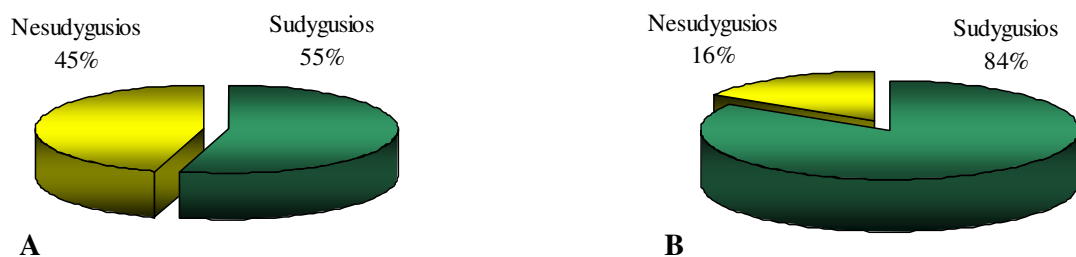
9 pav. Patogenų pažeisti eksplantai, kurie buvo numatyti dalyvauti tyrime, neužkrėstųjų atžvilgiu (%)

Tiriant aplinkos veiksnių įtaką, petunijų lapų ir stiebų eksplantų, regeneracijai *in vitro* sąlygomis, didžiule problema tapo nemažas užsikrėtusių maitinamosios terpės ir eksperimente dalyvaujančių eksplantų skaičius. Tiriamų objektų skaičių ir gautų rezultatų kiekį, ženkliai sumažino *Aspergillum* genties grybų patekimas į Petri lėkšteles, kuris pasirodydavo melsvo pelėsio pavidalu. Šio patogeno plitimas uždareme inde labai greitas, todėl per kelias paras nuo tada, kai pastebimas suardo talpoje esančią mikroflorą ir Petri lėkštelėse esantys eksplantai žūva. Ne mažiau pavojingas ir tyrimą sėkmingai vykdyti trukdęs buvo baltas, skaidrus pelėsis, būdingas *Alternaria* grybui, tačiau jis nebuvo toks dažnas.

3.1. Tėvinių augalų išauginimas

Tėvinių augalų išauginimo metu, buvo įsisavinta *in vitro* augalų auginimo metodika, kuri vėliau buvo reikalinga atliekant eksperimentus, siekiant išsiaiškinti fitohormonų ir šviesos įtaką augalų regeneracijai. Augalai, kursinio darbo metu, buvo auginami iš sėklų, steriliai patalpinant jas į Petri lėkštes, uždedant ant maitinamosios terpės.

Dėl patirties stokos, buvo neišvengta ir nesėkmių, kurios pasireiškė *Aspergillum* genties grybų sporų patekimu ant maitinamosios terpės ir sėklų nesudygimu, dėl galimai netinkamo *P. nana compacta* 'Alderman' ir *P. grandiflora* 'Sneni' sterilinimo (10 pav.).



10 pav. Sėklų skaičiaus palyginimas: *Petunia nana compacta* 'Alderman' (A), *Petunia grandiflora* 'Sneni' (B)

Nepaisant visų nesėkmių, buvo išaugintas pakankamas skaičius tėvinių augalų, vėliau panaudotų bakalauro eksperimentams atlikti. Pastebėta, kad *P. grandiflora* sėklos buvo daigesnės, nei *P. nana compacta*. Tai galėjo lemti tai, jog sėklos buvo skirtingų kartų F1 ir H, taip pat sėklų galiojimo laikas bei laikymo sąlygos.

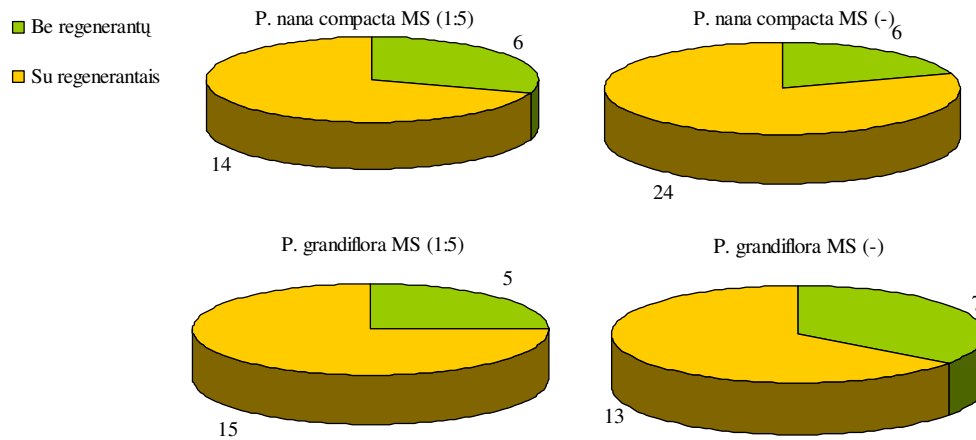
3.2. Fitohormonų reikšmė regeneracijai šviesoje

Žinant, kad šviesos poveikis yra svarbus augalo augimui ir vystymuisi, organų formavimui, jų būklei, augalai buvo laikomi kultivavimo spintoje, kurioje yra ilgos dienos fotoperiodas – 16 val. šviesos/ 8 val. tamsos. Joje vyrauja optimali augalų augimui temperatūra $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$. Taip pat buvo siekiama nustatyti šviesos ir fitohormonų daromą įtaką *Petunia* augalų regeneracijai, tam parinktas specialus auksinų ir citokininų (IAAR:5BAP) santykis, kurio dėka, skatinamas šaknų ir ūglių susidarymas.

Žemiau pateiktuose grafikuose išryškėja augimo reguliatorių poveikis *P. nana compacta* 'Alderman' ir *Petunia grandiflora* 'Sneni', izoliuotoms stiebo dalims.

Buvo nustatyta, kad ne visi, ant terpės uždėti eksplantai regeneravo ar suformavo regenerantus. Tyrimas parodė, kad *P. nana compacta* MS (+), viso susiformavo 70% pakitusių eksplantų, o to pačio augalo eksplantai, tik uždėti ant terpės be fitohormonų, regeneravo 10%

daugiau. Tačiau analizuojant *P. grandiflora* augalų eksplantus, pastebėta, kad terpėje su fitohormonais susiformavo 10% daugiau eksplantų su regenerantais, nei terpėje be fitohormonų, kur pakitusių ūglių užregistruota 65% (11 pav.).



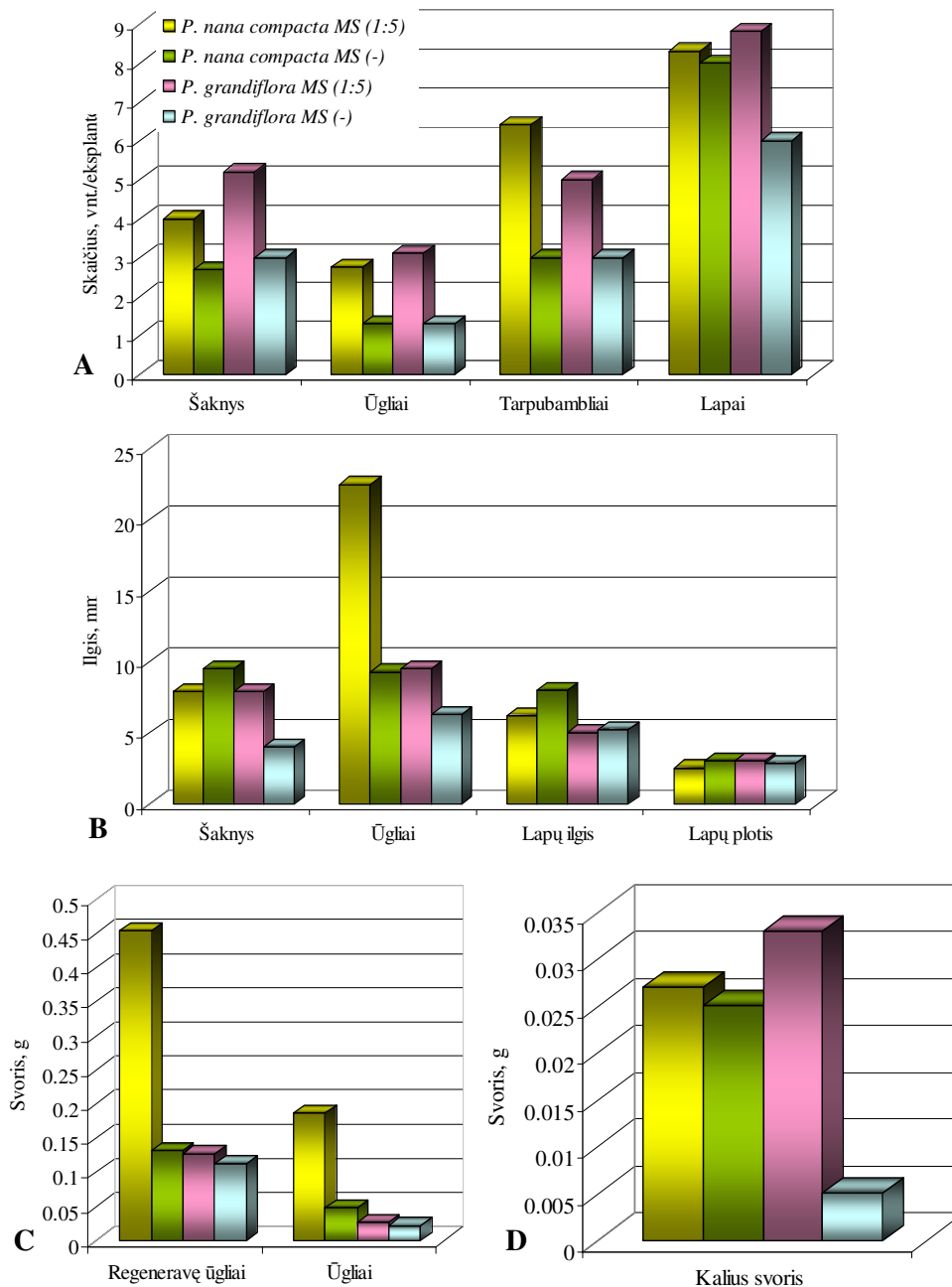
11 pav. Stiebo eksplantų su regenerantais ir be jų skaičiaus palyginimas

Atliekant bandymus taip pat buvo pastebėtas auksinų poveikis rizogenezei. Daugiausia šaknų suformavo *P. nana compacta* ir *P. grandiflora* ūgliai, auginami terpėje su fitohormonais. *P. nana compacta*, terpėje be fitohormonų regeneravo 32% mažiau šaknų nei terpėje su fitohormonais, o *P. grandiflora* 42% mažiau, nei terpėje su augimo reguliatoriais (12 pav. A).

Vidutinis šaknų ilgis, kultivuojant skirtingomis sąlygomis, taip pat skyrėsi. Ilgiausias šaknis išaugino *P. nana compacta* ūgliai, auginami terpėje be fitohormonų. Šaknys buvo 19% ilgesnės nei auginant su augimo reguliatoriais. *P. grandiflora* ūglių šaknys reagavo atvirkščiai. Terpėje su fitohormonais buvo išaugintos 49% ilgesnės šaknys, nei MS (-) (12 pav. B).

Žinoma, kad stiebo eksplantai iš augalo buvo izoliuojami, pjaustant juos 5 mm ilgio ir 2 mm pločio dalimis, tačiau regeneracijos proceso eigoje jie tįso ir deformavosi dėl susiformavusių ląstelių gausumo. Dėl šios priežasties padidėjo jų svoris. Didžiausia ūglių biomasė nustatyta *P. nana compacta* MS (+). Ji buvo 71% didesnė, nei auginant terpėje, be fitohormonų. Terpėje su fitohormonais, *P. grandiflora* ūgliuose biomasė 11% didesnė, nei auginamų MS (-) sąlygomis (12 pav. C).

Manoma, kad dėl citokininų poveikio ląstelių dalijimuisi ūgliuose, auginamuose terpėje su fitohormonais, susiformavusių išaugusių ūglių (auginių) skaičius buvo didesnis. *P. nana compacta*, terpėje su augimo reguliatoriais suformavo 53% daugiau auginių, nei kontrolinėje. *P. grandiflora* eksplantai, auginami terpėje su fitohormonais taip pat išaugino 58% daugiau auginių, nei kontrolinėje. *P. nana compacta*, išaugino 11% mažiau ūglių, nei *P. grandiflora* (12 pav. A).



12 pav. Fitohormonų reikšmė *Petunia nana compacta* 'Alderman' ir *Petunia grandiflora* 'Sneni' stiebų eksplantų regeneracijai : A – regeneravusių organų skaičius, B – regenerantų ilgis, C – regeneravusių struktūrų biomasė, D – kalio svoris.

Pastebėta, kad *P. nana compacta* eksplantai, auginami su augimo reguliatoriais, išaugino ilgiausius vegetatyvinius ūglius. Jie ištyšo 58% daugiau nei *P. grandiflora*, auginant tomis pačiomis sąlygomis. Taip pat *P. nana compacta* MS (+) išaugino 59% ilgesnius ūglius, nei tos pačios rūšies auginami neutralioje terpėje. Taip pat pastebėta, jog *P. grandiflora* augalų

eksplantuose, kultivuotose terpėje su fitohormonais, buvo išauginti 34% ilgesni auginiai, nei kontrolinėje terpėje (12 pav. B).

Auginių biomasė ne visada priklauso nuo jų skaičiaus. *P. nana compacta* MS (1IAR:5BAP) svoris buvo 74% didesnis nei MS (-), o *P. grandiflora* ūgliai, išauginti terpėje su fitohormonais, buvo 15% sunkesni, nei MS (-) (12 pav. C).

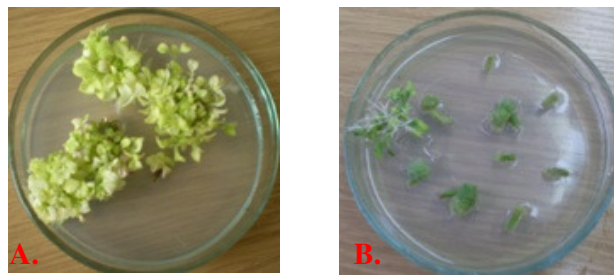
Tyrimo metu buvo registruojamas ir išaugusių ūglių tarpubamblių skaičius. Išvedus vidurkį, pastebėta, jog daugiausiai tarpubamblių turėjo *P. nana compacta* ūgliai. Tai galėjo priklausyti nuo ūglių ilgio. Kadangi nustatyta, kuo jie ilgesni, tuo daugiau tarpubamblių susidaro. Taigi, *P. nana compacta* terpėje su fitohormonais suformavo 53% daugiau tarpubamblių nei MS (-), o *P. grandiflora* MS (+) 40% daugiau nei be augimo reguliatorių (12 pav. A).

Užfiksuota, kad ūgliai išaugino vidutiniškai po 6 – 9 lapus. Daugiausia lapų išleido *P. grandiflora* MS (+) ūgliai, tai sudarė 6% daugiau nei *P. nana compacta* MS (1IAR:5BAP), kuri išleido 4% daugiau negu auginamų kontrolinėje terpėje. *P. grandiflora*, terpėje su fitohormonais, suformavo 32% daugiau lapelių nei terpėje be augimo reguliatorių (12 pav. A).

Analizuojant pastebėtas didelis lapo ilgio, tačiau mažas pločio vidurkio skirtumas. *P. nana compacta* MS (-) lapeliai buvo ilgiausi, jie 22,5% ilgesni ir 17% platesni, nei MS (+) lapai. *P. grandiflora* MS (-) lapeliai ilgesni 4% ir siauresni 7%, nei išaugintų MS (+) sąlygomis (12 pav. B).

Buvo stebima ir kaliaus biomasė regeneravusiame ūglyje. Didžiausias masės vidurkis nustatytas *P. grandiflora* MS (+) ūgliuose, tai sudarė 85% daugiau, nei auginamų MS (-). *P. nana compacta* MS (+), kaliaus biomasė 7% didesnė, nei ūgliuose, auginamuose terpėje be fitohormonų (12 pav. D).

Apibendrinant gautus rezultatus, galima teigti, jog iš *P. nana compacta* ir *P. grandiflora* stiebo eksplantų regeneravo šaknys, ūgliai ir lapai (13 pav.).

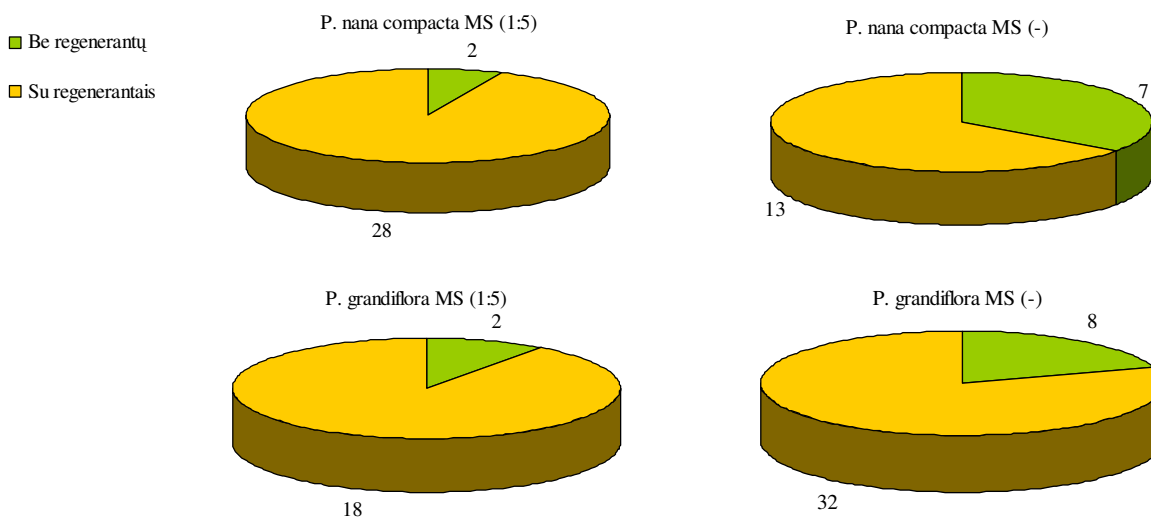


13 pav. *P. nana compacta* 'Alderman' ūgliai, auginti MS (1IAR:5BAP) (A) ir MS (-) (B) terpėse

Tyrimų rezultatai leidžia daryti prielaidą, kad stiebo eksplantų regeneracijos šviesoje neslopina ir neskatina fitohormonai. Tačiau galima teigti, jog organogenezei ir kaliaus formavimuisi tai turi lemiamos įtakos.

Ekperimentuose taip pat buvo naudojami izoliuoti lapų eksplantai. Žemiau pateiktuose rezultatuose išryškėja, jog skirtingai nuo stiebų eksplantų, lapų ūgliai nesuformavo auginių, dėl šios priežasties nebuvo ir tarpubamblių bei lapų. Taip pat negausiai formavosi šaknys, bet aptikta nemažai kaliaus ląstelių sandraupų.

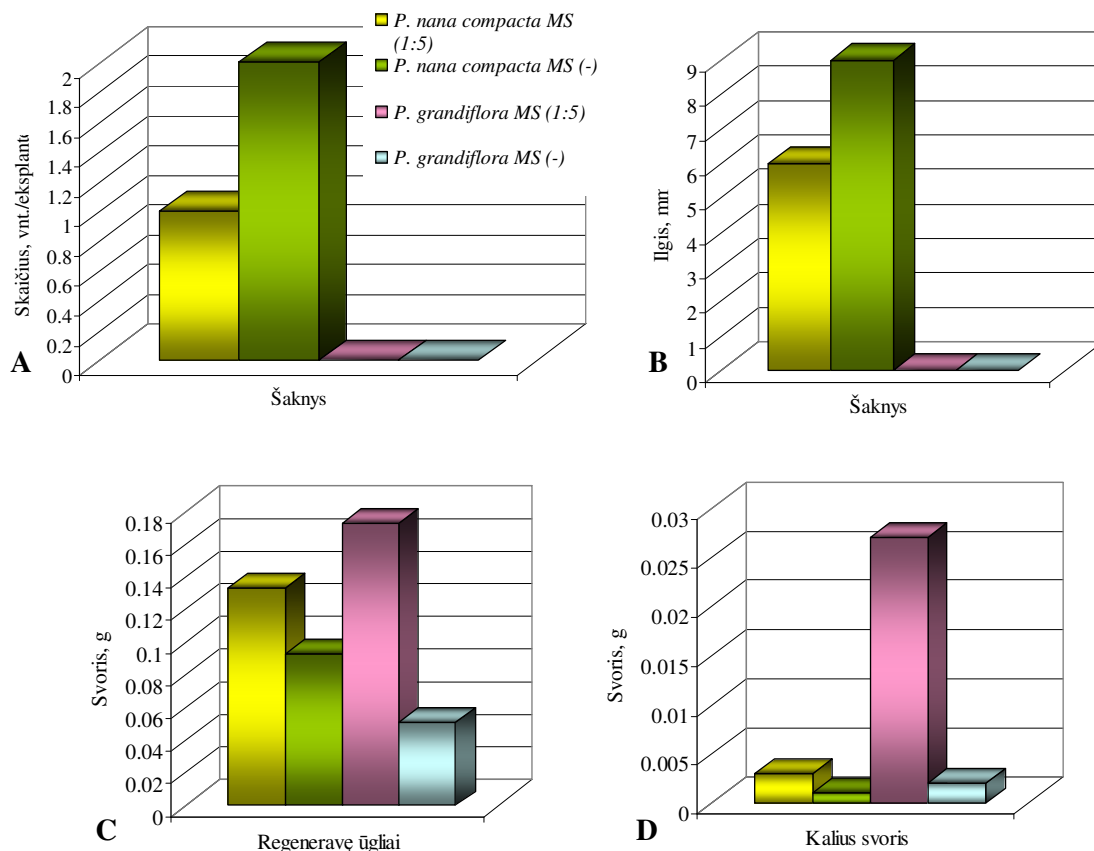
Iš atlikto tyrimo rezultatų, pateiktų diagramomis, aiškiai matomas eksplantų regeneracijos potencialas. *P. nana compacta* MS (1IAR:5BAP) regeneravo 93% ūglių, terpėje be fitohormonų – 65%. *P. grandiflora* auginant terpėje su augimo reguliatoriais, užfiksuota net 90% eksplantų su regenerantais, o MS (-) – 80%. Atsižvelgiant į pateiktus duomenis, galime teigti, jog *P. nana compacta* MS (+), regeneracijos potencialas buvo didžiausias (14 pav.).



14 pav. Lapo eksplantų su regenerantais ir be jų skaičiaus palyginimas

Kadangi ūgliai regeneravo šaknis, buvo nustatytas jų kiekis bei kiti parametrai. Rizogenezė užfiksuota tik *P. nana compacta* ūgliuose. Pastebėta, kad 50% daugiau ir 33% ilgesnių šaknų išaugino augalai auginami terpėje be fitohormonų (15 pav. A ir B).

Pakitusių ūglių vidutinė biomasė taip pat skyrėsi. Nustatyta koreliacija tarp kaliaus svorio ir regeneravusių ūglių skaičiaus. Daugiausiai, 23% daugiau nei *P. nana compacta* MS (+), svėrė *P. grandiflora* MS (+) ūgliai. *P. grandiflora* MS (-) biomasė buvo 70% mažesnė nei terpėje su fitohormonais, o *P. nana compacta* MS (-) svėrė 30% mažiau nei auginant MS (1IAR:5BAP) sąlygomis (15 pav. C).



15 pav. Fitohormonų reikšmė *Petunia nana compacta* 'Alderman' ir *Petunia grandiflora* 'Sneni' lapų eksplantų regeneracijai : A – regeneravusių organų skaičius, B – regenerantų ilgis, C – regeneravusių struktūrų biomasa, D – kaliaus svoris.

Lapų eksplantai nepasižymėjo dideliu kaliaus svoriu. Daugiausiai jo suformavo *P. grandiflora* MS (IIAR:5BAP) ūgliai. Tai sudarė 89% daugiau, nei *P. nana compacta* eksplantai auginami tomis pačiomis sąlygomis. *P. grandiflora* MS (+) kaliaus biomasė užfiksuota 93% didesnės už MS (-), o *P. nana compacta* MS (+) – 67% didesnė už MS (-) (15 pav. D).

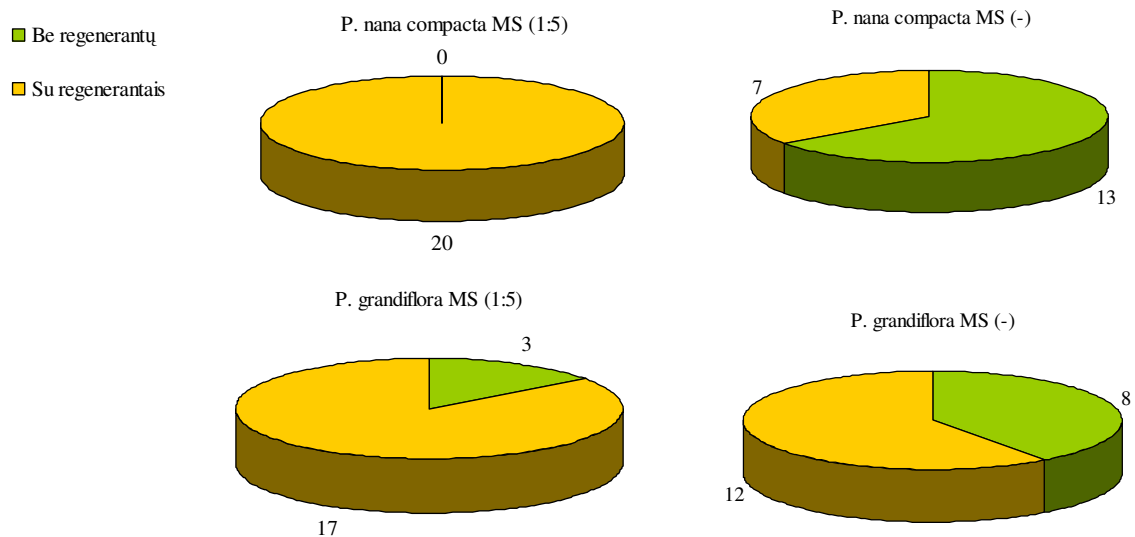
Įvertinus lapų eksplantus kultivuotus šviesoje, nustatyta, kad regeneravusių ūglių skaičiui jokio poveikio neturėjo augimo reguliatoriai, tačiau jų svorį būtent fitohormonai ir nulėmė, kadangi jie paskatino ląstelių dalijimąsi. Tuo tarpu, tirtu atveju, eksplantuose vyko silpna rizogenezė, kitų organų formavimosi nepastebėta, išskyrus kaliaus atsiradimą.

3.3. Fitohormonų reikšmė regeneracijai tamsoje

Tamsoje augalai taip pat gali vystytis, tačiau negaudami šviesos, jie nustoja vykdyti fotosintezę, nebesiformuoja chloroplastai, todėl augalai yra etioliuoti ir silpnai vystosi. Dėl to,

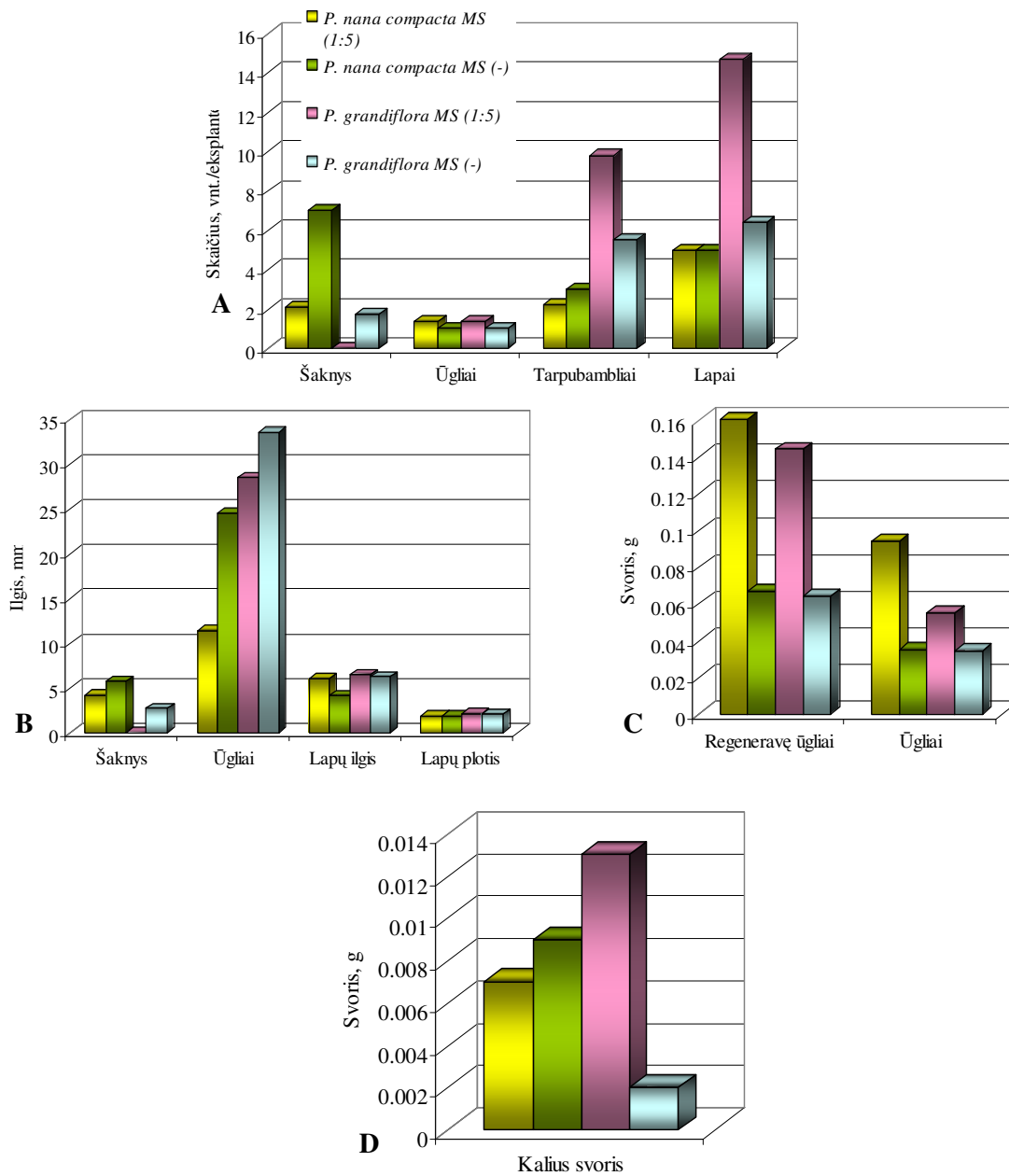
kad auksinas yra aktyvesnis tamsoje, augalai yra labiau ištįsę, lyginant su variantais šviesoje. Dėl šios priežasties, auginant augalus tamsoje, neišvengiamos deformacijos. Kadangi augalai stokoja šviesos, kurios dėka gaminasi chloroplastai, suteikiantys augalams sodriai žalią spalvą, jų spalva pasidaro blyški bei gali išryškėti nekrozė. Todėl, norint išsiaiškinti tamsos daromą įtaką augalams, buvo stebima regeneracijos eiga, kultivuojant tų pačių augalų dalis (lapų ir stiebų eksplantus), su fitohormonais ir be jų tamsoje. Augalai visą tyrimo vykdymo laiką buvo laikomi tamsoje. Žemiau esančiose diagramose, pateikti gauti rezultatų vidurkiai.

Pirmieji tyrimai tamsoje buvo atliekami su *P. nana compacta* ir *P. grandiflora* augalų stiebų eksplantais. Iš 17 pav. matoma, jog daugiausiai augalų eksplantų su regenerantais užfiksuota *P. nana compacta* MS (1IAR:5BAP), visuose buvo aiškiai matomi pakitimai. *P. grandiflora* MS (+) pakitusių ūglių buvo 15% mažiau, o MS (-) – 40% mažiau. *P. nana compacta* MS (-) eksplantų su regenerantais nustatyta 65% mažiau nei tos pačios rūšies auginamos su augimo reguliatoriais.



16 pav. Stiebo eksplantų su regenerantais ir be jų skaičiaus palyginimas

Regenerantus auginant tamsoje, didžiausias šaknų vidurkis eksplante užfiksuotas *P. nana compacta* MS (-) izoliuotose stiebuose. Šis skaičius buvo 70% didesnis nei kultivuojant su augimo reguliatoriais. *P. grandiflora* MS (+) nė vienas ūglis neišleido šaknų, o auginant kontrolinėje terpėje jų buvo, tačiau 75% mažiau, nei auginant tomis pačiomis sąlygomis *P. nana compacta* (17 pav. A).



17 pav. Fitohormonų reikšmė *Petunia nana compacta* 'Alderman' ir *Petunia grandiflora* 'Sneni' stiebų eksplantų regeneracijai : A – regeneravusių organų skaičius, B – regenerantų ilgis, C – regeneravusių struktūrų biomasė, D – kaliaus svoris.

Didžiausias vidutinis šaknų ilgis, kaip ir jų skaičius užfiksuotas *P. nana compacta* MS (-) ūgliuose, tai yra 26% daugiau nei auginant MS (+). *P. nana compacta* terpėje be fitohormonų išaugino 53% ilgesnes šaknis, nei *P. grandiflora* (17 pav. B).

Citokinino BAP įtaka auginių skaičiui buvo pastebėta, kadangi *P. nana compacta* ir *P. grandiflora* kultivuojant terpėje su fitohormonais, susiformavusių ūglių vidurkis eksplante buvo

29% didesnis, nei išaugusių MS (-) sąlygomis (17 pav. A). Tačiau MS (+) ūgliai buvo mažiau ištįsę už regeneravusius MS (-) terpėje: *P. nana compacta* 53,5 procentais, *P. grandiflora* 15% (17 pav. A ir B).

Pakitusių eksplantų vidutinė biomasė, terpėje su fitohormonais ir kontrolinėje, ženkliai skyrėsi. Daugiausiai svėrė *P. nana compacta* MS (+) ūgliai, kurių vidutinis svoris buvo 10% didesnis nei *P. grandiflora* MS (+). Pastebėta didelė fitohormonų įtaka regeneracijai, kadangi su jais auginamų ūglių biomasė buvo didesnė už auginamų be augimo reguliatorių: *P. nana compacta* 58 procentais, o *P. grandiflora* 56% (17 pav. C).

Vidutinė auginių biomasė priklausė nuo jų kiekio, bet ne nuo ilgio. *P. nana compacta* MS (+) 63% buvo sunkesni už kultivuotus MS (-) sąlygomis, o *P. grandiflora* terpėje su fitohormonais – 38% už MS (-). *P. grandiflora* MS (+) auginių biomasė buvo 41,5% mažesnė už tomis pačiomis sąlygomis augintų *P. nana compacta* (17 pav. C).

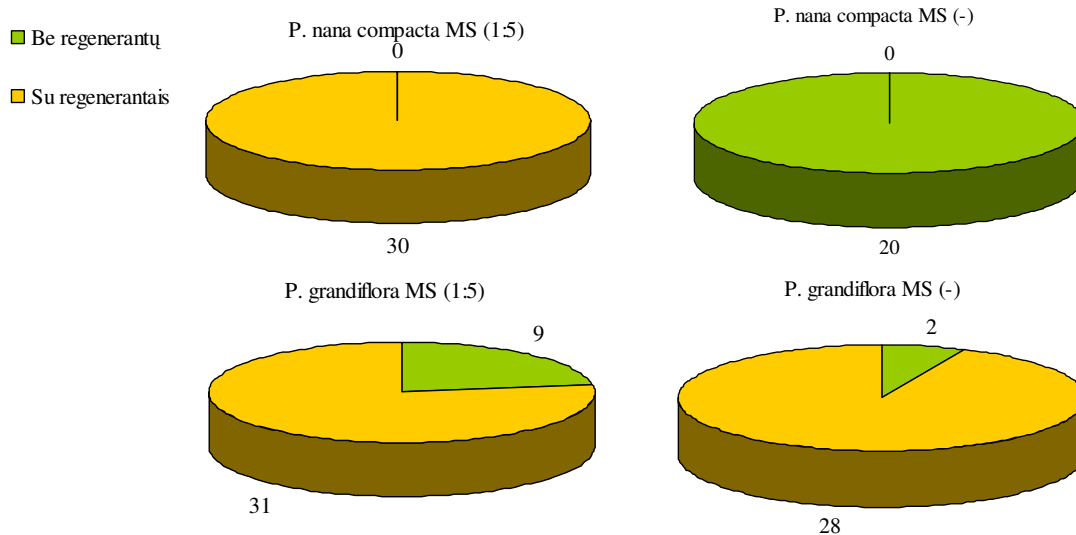
Suskaičiavus vidutinį tarpubamblių skaičių, aiškiai pastebima, jog *P. grandiflora*, eksplantai kultivuoti su fitohormonais, išaugino daugiausiai tarpubamblių. Tai sudarė 77% daugiau už tomis pačiomis sąlygomis augintus *P. nana compacta* eksplantus ir 44% daugiau už *P. grandiflora* MS (-). *P. nana compacta* MS (-) išaugino 27% daugiau tarpubamblių už MS (+) (17 pav. A).

P. grandiflora MS (+) ūgliai regeneravo daugiausiai lapų, tai sudarė 56% daugiau nei MS (-), ir 66% daugiau už *P. nana compacta*, kurie išaugino po tiek pat lapelių terpėje su fitohormonais MS (-). Lapelių vidutinis ilgis ir plotis skyrėsi nežymiai. *P. grandiflora* MS (+) lapai buvo 5% ilgesni ir 5% siauresni už auginamų MS (-) sąlygomis. *P. nana compacta* MS (+) 32% ilgesni ir vienodo pločio su kultivuojamais kontrolinėje terpėje (17 pav. A ir B).

Kaliumo genėzė intensyviausiai vyko *P. grandiflora* su fitohormonais kultivuojamuose ūgliuose. Susidariusio kaliumo biomasė buvo 85% didesnė nei terpėje be fitohormonų bei 46% didesnė už *P. nana compacta* MS (+). *P. nana compacta* be augimo reguliatorių kaliumo buvo 22% sunkesnis, nei MS (+) (17 pav. D).

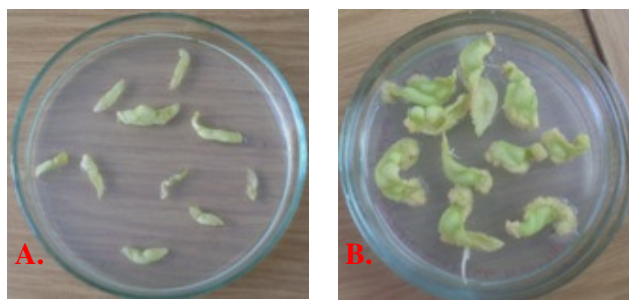
Atliktais bandymais, su stiebo eksplantais tamsoje, nustatyta, kad regeneravusių ūglių, kultivuojamų terpėje su fitohormonais buvo daugiau nei kontrolinėje. Šiuo atveju, nepriklausomai nuo terpės sudėties, intensyviai vyko rizogenezė ir organogenezė.

Dar vienas eksperimentas buvo atliekamas su *P. nana compacta* ir *P. grandiflora* lapų eksplantais. Vykdamas eksperimentą su *P. nana compacta* augalo lapo audiniais, kultivuojami MS (-) visi žuvo užsikrėtę *Aspergillum* grybo sporomis. To pačio augalo eksplantai, auginami terpėje su auginimo reguliatoriais, visi 100% regeneravo. *P. grandiflora* MS (1IAR:5BAP) regeneravo 77,5%, o MS (-) 70% ūglių (18 pav.).



18 pav. Lapo eksplantų su regenerantais ir be jų skaičiaus palyginimas

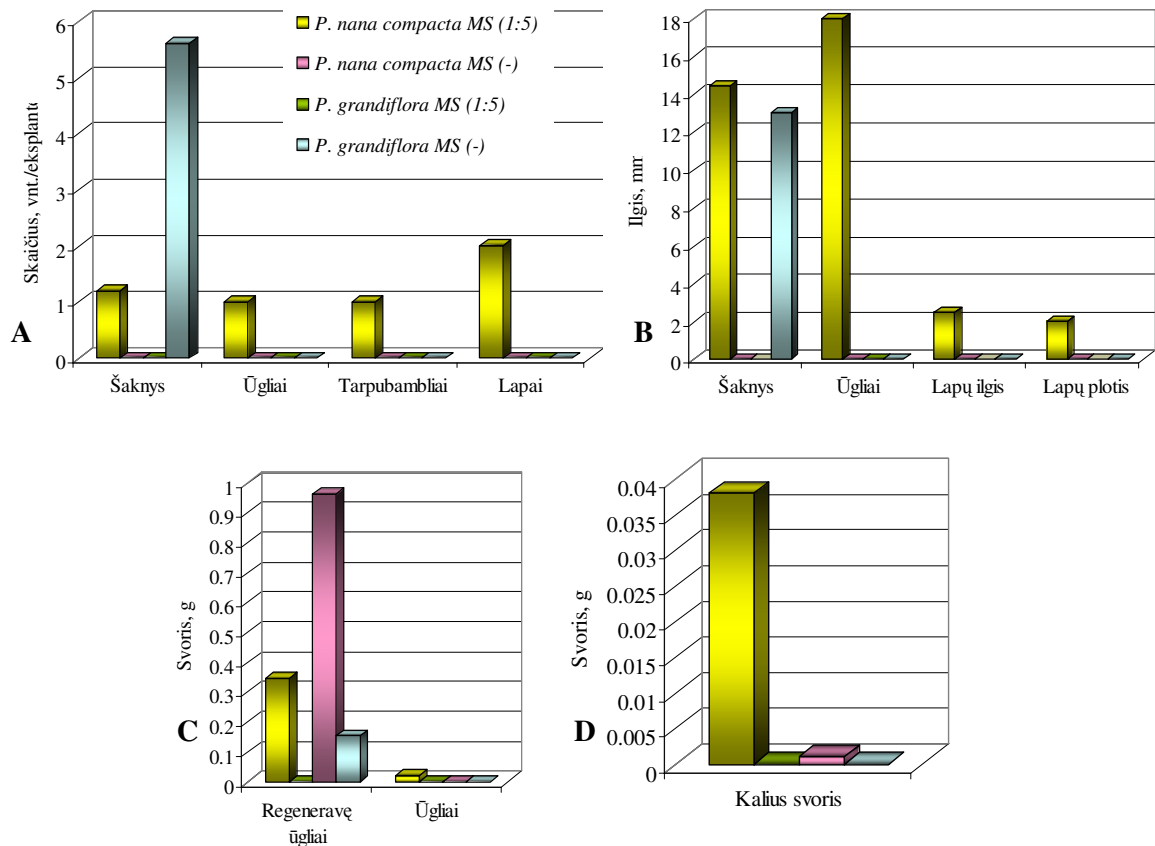
Lapų eksplantai, uždėti ant terpės ir kultivuojami 30 dienų pakeitė savo fizinę išvaizdą (19 pav.). Regenerantų formavimosi eigoje jie ištiso ir pasidarė ženkliai didesni, nei pradiniam etape. Tai galėjo nulemti didelis auksino, kuris skatina ląstelių tįsimą, kiekis.



19 pav. Lapų eksplantai praėjus trimis (A) ir 30 parų (B) po uždėjimo ant maitinamosios terpės

Lapų eksplantų regenerantų vertinimas buvo pradėtas nuo šaknų, kadangi jų dėka augalas pasiima maisto medžiagas. Rizogenezė vyko tik *P. nana compacta* MS (+), čia šaknų vidutinis ilgis buvo 14,45 mm ir *P. grandiflora* MS (-) terpėje, kurių šaknų vidurkis siekė 13 mm (20 pav. A ir B).

Didžiausias biomasės vidurkis užfiksuotas *P. grandiflora* MS (+) regeneravusiuose ūgliuose, tai yra 64% daugiau, nei *P. nana compacta* regenerantuose. *P. grandiflora* terpėje be fitohormonų kultivuojami regeneravę ūgliai svėrė 84% mažiau nei su jais (20 pav. C).



20 pav. Fitohormonų reikšmė *Petunia nana compacta* 'Alderman' ir *Petunia grandiflora* 'Sneni' lapų eksplantų regeneracijai : A – regeneravusių organų skaičius, B – regenerantų ilgis, C – regeneravusių struktūrų biomasė, D – kalio svoris.

P. nana compacta MS (+) regeneravę eksplantai išaugino ūglius su tarpubambliais ir lapais. *P. grandiflora* auginių ir lapų neregeneravo. *P. nana compacta* terpėje su fitohormonais suformavo 97% didesnės biomasės kalio, nei *P. grandiflora* MS (+) (20 pav. D).

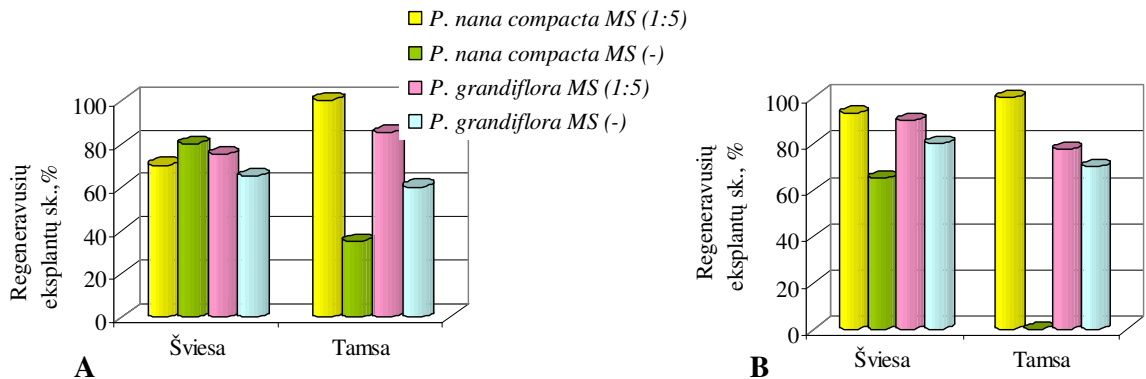
Įvertinus lapo eksplantų regeneracijos tamsoje intensyvumą, buvo nustatyta, kad pakitusių ūglių skaičius terpėje su augimo reguliatoriais buvo ženkliai didesnis nei kontrolinėje. *P. nana compacta* MS (1IAR:5BAP) pasižymėjo intensyvesne organogeneze nei *P. grandiflora*.

3.4. Rezultatų palyginimas ir aptarimas

Išanalizavus diagramas, kuriose pateikti tyrimų rezultatai, gauti kultivuojant *P. nana compacta* ir *P. grandiflora* ūglius kontrolinėje ir su fitohormonais terpėje, ilgos dienos fotoperiode ir visiškoje tamsoje, buvo gauti skirtingi rezultatai, kuriais remiantis padaryti apibendrinimai ir bandoma nustatyti dėsninumus.

Tyrimo metu, analizuotų rūšių eksplantuose įvyko daug morfogeninių pokyčių. Sudarant skirtingas augimo sąlygas, gaunami ir skirtingi rezultatai, priklausomai nuo augalo rūšies ir aplinkos veiksnių poveikio.

Išanalizavus ir palyginus regeneravusių ūglių skaičių šviesoje ir tamsoje, su fitohormonais ir kontrolinėje terpėje kultivuotus stiebo ir lapo eksplantus buvo nustatyta, kad beveik visais atvejais, papildžius terpę augimo regulatoriais, eksplantai efektyviai regeneruoja (Michalczuk, 2000). Didžiausias regeneracijos potencialas užfiksuotas *P. nana compacta* stiebo ir lapo eksplantuose, auginamuose tamsoje, terpėje su fitohormonais. *P. nana compacta* stiebo dalys MS (1IAR:5:BAP) šviesoje regeneravo 30% mažiau ūglių nei tamsoje. *P. nana compacta* kontrolinėje terpėje šviesoje pakito 45% daugiau eksplantų. *P. grandiflora* eksplantai, kultivuoti šviesoje su fitohormonais, regeneravo 10% mažiau nei tamsoje, o kontrolinėje šviesoje 5% daugiau (21 pav. A).

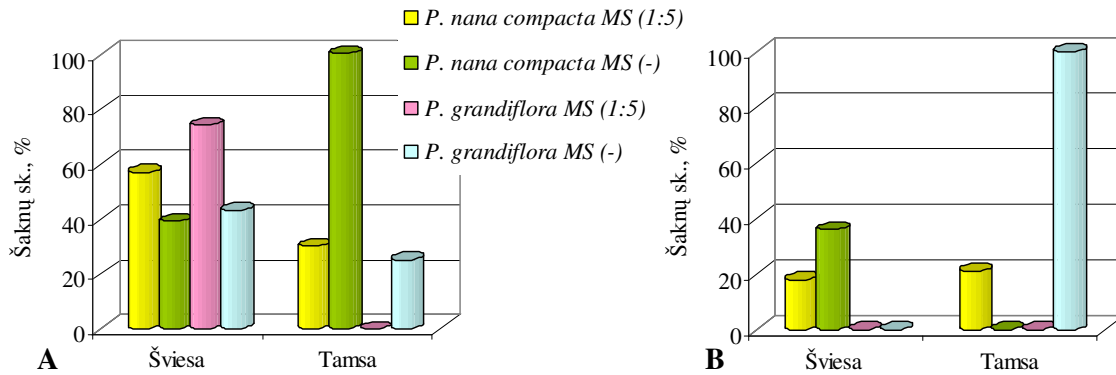


21 pav. Fitohormonų ir šviesos įtaka *P. nana compacta* 'Alderman' ir *P. grandiflora* 'Sneni' izoliuotų stiebo (A) ir lapo (B) dalių regeneracijai

P. nana compacta MS (1IAR:5BAP) šviesoje pakito 7% mažiau lapų eksplantų, nei tamsoje, o *P. nana compacta* terpėje be fitohormonų regeneravusių eksplantų nebuvo aptikta. *P. grandiflora* MS (+) šviesoje regeneravo 12,5%, o auginamų terpėje be fitohormonų 10% daugiau nei tamsoje (21 pav. B).

Anot C. Cabaleiro (1992), kultivuoiant petunijas, susiformavusių šaknų skaičius, ilgis bei svoris, tiesiogiai priklauso nuo naudojamo apšvietimo dydžio. Atlikus eksperimentus su stiebo eksplantais, pastebėta, kad *P. nana compacta* MS (+) šviesoje išleido 27% daugiau šaknų. Kultivuoiant *P. nana compacta* kontrolinėje terpėje, nustatyta, kad tamsoje rizogenezė buvo 100%, o šviesoje tik 39%. *P. grandiflora* MS (+) šaknys formavosi tik šviesoje, tuo tarpu terpėje be fitohormonų, šviesoje susiformavo 18% daugiau šaknų nei tamsoje (22 pav. A).

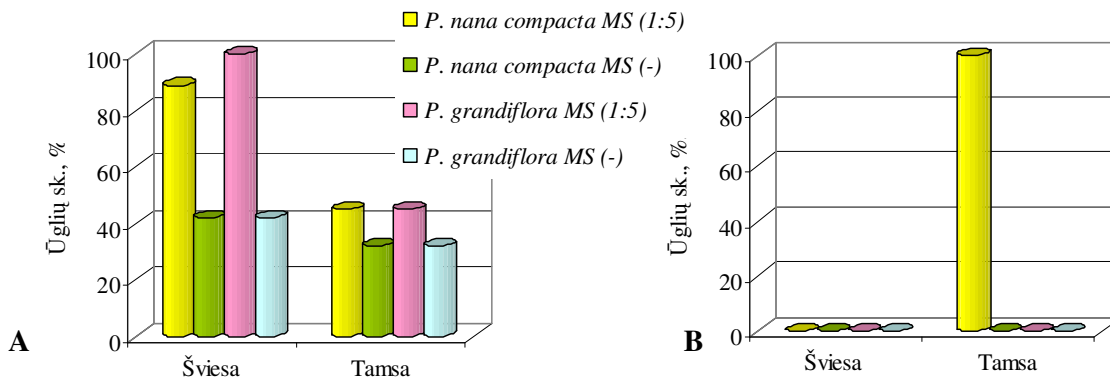
Lapų eksplantuose rizogenezė buvo pasyvesnė nei stiebų. *P. grandiflora* MS (+) šaknų nesuformavo, o MS (-) terpėje šaknys buvo tik tamsoje, bet 100% visuose ūgliuose. *P. nana compacta* MS (+) šviesoje ir tamsoje išaugo ~20% šaknų, o terpėje be fitohormonų rizogenezė pastebėta tik šviesoje (22 pav. B).



22 pav. Fitohormonų ir šviesos įtaka *P. nana compacta* 'Alderman' ir *P. grandiflora* 'Sneni' izoliuotų stiebo (A) ir lapo (B) dalių rizogenezei

Analizuojant išaugusių ūglių (auginių) skaičių viename eksplante, pastebėta, kad kultivuojant stiebo dalis, daugiau auginių eksplantai suformavo terpėje su fitohormonais. Visais atvejais tamsoje auginių buvo mažiau nei šviesoje. Daugiausiai auginių buvo *P. grandiflora* MS (+) eksplantuose (23 pav. A).

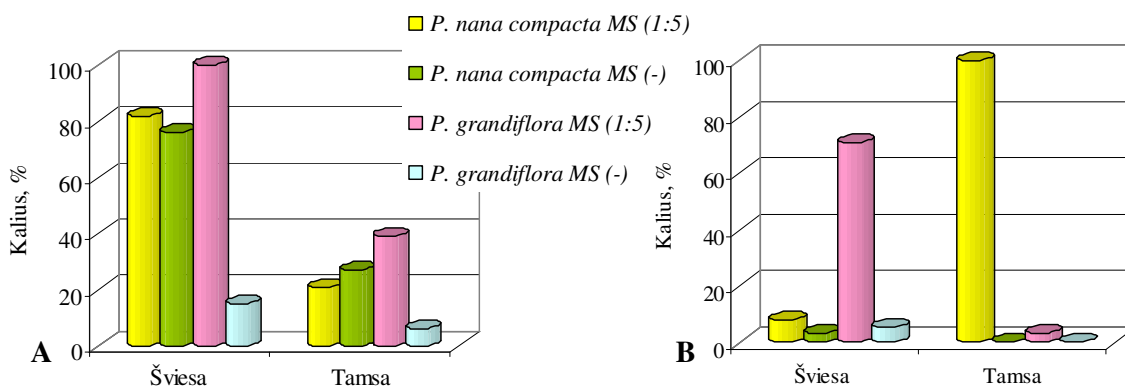
P. nana compacta MS (+), izoliuotos lapų dalys, vienintelės turėjo ūglių, kitais atvejais jų nebuvo suformuota (23 pav. B).



23 pav. Fitohormonų ir šviesos įtaka *P. nana compacta* 'Alderman' ir *P. grandiflora* 'Sneni' izoliuotų stiebo (A) ir lapo (B) dalių auginių susidarymui

Citokininai išplečia augalo ląsteles, taip pat paskatina jų gamybą (He, 2007). Ši teiginį galime patvirtinti remdamiesi atliktų tyrimų rezultatais, kur kaliaus, visais atvejais, daugiau susidarė kultivuojant eksplantus terpėje su fitohormonais. Auginant izoliuotas stiebo dalis tamsoje, kaliaus genėzė buvo pasyvesnė. Daugiausiai kaliaus ląstelių ilgos dienos fotoperiode ir tamsoje suformavo *P. grandiflora* MS (+) (24 pav. A).

Kultivuojant lapo eksplantus, nustatyta, kad šviesoje daugiausiai kaliaus suformavo *P. grandiflora* MS (+) (68% daugiau nei tamsoje), o tamsoje jo daugiausiai aptikta *P. nana compacta* MS (+) ūgliuose (92% daugiau nei šviesoje) (24 pav B).



24 pav. Fitohormonų ir šviesos įtaka *P. nana compacta* 'Alderman' ir *P. grandiflora* 'Sneni' izoliuotų stiebo (A) ir lapo (B) dalių kaliaus ląstelių formavimuisi

Taip pat tyrimo metu buvo stebima ūglių spalva. Iš vizualiai susidarytų vaizdų, galime teigti, kad tamsoje augantys augalai nepagamina reikiamo kiekio chlorofilo, todėl jų spalva yra blyškiai žalsva ar net balkšva. Dėl nepakankamo šviesos kiekio, būtino fotosintezės vykdymui, augalų ląstelės ištiso, auginiai pasidarė ilgi, o lapeliai deformuoti, nevysiškai išsivystę. (25 pav.).



25 pav. Augalai auginti tamsoje (A) ir šviesoje (B)

Apibendrinant, galima teigti, jog įvairios manipuliacijos, kultivuojant augalų eksplantus, keičiant fitohormonų kiekį ir šviesos intensyvumą gali teigiamai arba neigiamai veikti individus,

priklausomai nuo parinktų sąlygų ir augalo biologinių savybių. Būtina tiksliai išsiaiškinti, koks fitohormonų balansas ir šviesos intensyvumas yra tinkamas konkrečiam augalui, kitu atveju jie gali ne sužadinti regeneraciją, kokia ir yra jų paskirtis, o ją slopinti, ar net sukelti deformacijas (Staden, 2006).

IŠVADOS

1. Mokslinės literatūros analizė parodė, kad augalų kultivavimo *in vitro* metodas taikomas mokslo ir praktikos tikslams bei kasmet vis plačiau naudojamas dekoratyviojoje želdininkystėje.
2. *P. grandiflora* sėklų daigumas apie 30% geresnis, nei *P. nana compacta*. Tai nulemti galėjo skirtingų kartų F1 ir H sėklos, taip pat sėklų galiojimo laikas bei laikymo sąlygos.
3. *P. nana compacta* stiebo ir lapo eksplantai pasižymi 100% regeneracija kultivuojami terpėje su fitohormonais tamsoje.
4. Nustatyta, kad lapų eksplantuose rizogenezė indukuojama beveik 2 kartus rečiau nei iš stiebų izoliuotuose audiniuose.
5. Rezultatų analizė parodė, kad kultivuojant stiebo dalis, 56% daugiau ūglių eksplantai suformuoja terpėje su fitohormonais ir visais atvejais tamsoje jų buvo mažiau nei šviesoje. Daugiausiai, 3,1 ūglių/eksplante, buvo *P. grandiflora* MS (+) regenerantuose.
6. Didžiausią kaliaus biomasę (0,033 g/eksplante) suformuoja *P. grandiflora* MS (+) stiebo eksplantai kultivuojami ilgos dienos fotoperiode ir *P. nana compacta* MS (+) lapo eksplantai (0,038 g/eksplante) kultivuojami tamsoje.

Aplinkos veiksnių įtaka petunijų (*Petunia*) regeneracijai *in vitro*

Miglė Doveikaitė

SANTRAUKA

Darbo objektu pasirinkti *Petunia* genties augalai, siekiant įvertinti, šių plačiai naudojamų balkonų ir lauko želdinimui gėlių, fitohormonų ir šviesos – tamsos įtaką audinių regeneracijai. Atskirų veiksnių poveikiai literatūroje dažnai aprašomi, tačiau kompleksinis veikimas analizuojamas mažai. Tokio tipo tyrimai yra svarbūs tiek mokslui, tiek verslui.

Atlikto tyrimo tikslas iširti kompleksinę fitohormonų ir šviesos įtaką *Petunia* regeneracijai *in vitro*. Tikslui pasiekti atlikta mokslinės ir metodinės literatūros, susijusios su darbo tema, analizė. Atlikti eksperimentai su izoliuotais *Petunia* eksplantais, kultivuojant juos skirtingos sudėties terpėse šviesoje ir tamsoje bei įvertinta eksplantuose įvykusi regeneracija. Pagrindinis metodas tyrimams atlikti – IAR ir 5BAP fitohormonų integravimas į MS terpę. Metodo akcentas – šviesos ir tamsos sąlygos, kuriose buvo kultivuojami eksplantai terpėje su fitohormonais ir kontrolinėje (be fitohormonų) MS terpėje.

Atlikus tyrimą nustatyta, kad *P. nana compacta* stiebo ir lapo eksplantai pasižymi 100% regeneracija kultivuojami terpėje su fitohormonais tamsoje. Nustatyta, kad lapų eksplantuose rizogenezė indukuojama beveik 2 kartus rečiau nei iš stiebų izoliuotuose audiniuose. Rezultatų analizė parodė, kad kultivuojant stiebo dalis, 56% daugiau ūglių eksplantai suformuoja terpėje su fitohormonais ir visais atvejais tamsoje jų buvo mažiau nei šviesoje. Daugiausiai, 3,1 ūglių/eksplante, buvo *P. grandiflora* MS (IAR:5:BAP) regenerantuose. Didžiausią kaliaus biomasę (0,033 g/eksplante) suformuoja *P. grandiflora* MS (+) stiebo eksplantai kultivuojami ilgos dienos fotoperiode ir *P. nana compacta* MS (+) lapo eksplantai (0,038 g/eksplante) kultivuojami tamsoje.

The Influence of Environmental Factors on the Regeneration of *Petunia* (*Petunia*) *in vitro*

Miglė Doveikaitė

SUMMARY

Plants of *Petunia* genus, flowers widely used for planting on balconies and outdoors, have been selected as the object of the Paper in order to estimate the influence of phytohormones and light – darkness on regeneration of tissues. The influence of particular factors is often described in literature, however, complex influence thereof is analysed scarcely. Researches of this type are very important for both science and business.

Aim of the research carried out is to study the complex influence of phytohormones and light on regeneration *in vitro* of *Petunia*. Analysis of scientific and methodical readings related to subject of the Paper has been carried out in order to achieve the above aim. Experiments with isolated *Petunia* explants have been made by cultivating them in media of different compositions in light and darkness and regeneration that took place in the explants was evaluated. The key research method was integration of IAA and BAP phytohormones into MS medium. Focus of the method – conditions of light and darkness under which the explants were cultivated in the medium with phytohormones and control (without phytohormones) MS medium.

Upon completion it was determined 100% *P. nana compacta* footstalk and leaf explants regeneration cultivating them in the medium with phytohormones in darkness. It has been determined that rhizogenesis induced in leaf explants was above 2 times less than in case of footstalk in isolated tissues. The results analysis showed that, in case of cultivating parts of footstalk, explants form 56 % more of cuttings in the medium with phytohormones and in all cases there were less of them in the darkness in comparison with light. The most, 3.1 cuttings per explant, were of *P. grandiflora* MS (1IAA:5:BAP) regenerants. The biggest biomass of callus is formed by footstalk explants of *P. grandiflora* MS (1IAA:5:BAP), 0.033 g/explant, cultivated within the photoperiod of a long day and leaf explants of *P. nana compacta* (1IAA:5:BAP), 0.038 g/explant, cultivated in darkness.

LITERATŪRA

1. Anonimas I. (2009). Petunijų vilionės. Naujos vasaros gėlynai. *Sodo idėjos*. Nr. 25, p. 44-45.
2. Balvočiūtė, J., Gudinavičius, S. (1988). Jaunajam gėlininkui. Kaunas: Šviesa. 98-99p.
3. Bluzmanas, P., Borusas, S., Dagys, J., Gruodienė, J., Stašauskaitė, S., Šlapakauskas, V., Vonsavičienė, V. (1991). Augalų fiziologija. Vilnius: Mokslas, 307-310, 342-348p.
4. Boguševičiūtė, A., Daujotaitė, I. (1980). Balkonų apželdinimas. Vilnius: Mokslas, 32-33p.
5. Butkus, V., Galinis, V., Jankevičienė, R., Kizienė, B., Lazdauskaitė, Ž. ir kt. (1976). Lietuvos TSR flora V. Vilnius: Valstybinė politinės ir mokslinės literatūros leidykla, 401-403p.
6. Courtier, J., Francis, A. R., McHoy, P., Mikolajski, A. (2009). Puikios idėjos jūsų sodui. Vilnius: Aktėja, 93p.
7. Dagys, J., Bluzmanas, P., Borusas, S., Šlapakauskas, V. (1974). Augalų fiziologija. Vilnius: Mintis, 285-288p.
8. Galinis, V. (1984). Aukštesniųjų augalų sistematika. Vilnius: Mokslas, 194-195p.
9. Galvydis, J., Navys, E. V., Šaulienė, I. (2007). Sodmenų auginimas urbanizuotoms teritorijoms. Šiauliai: Šiaulių universiteto leidykla, 140-152p.
10. Heic, H. (1996). Balkono gėlės ir stambieji augalai. Vilnius: UAB Gamta, 127p.
11. Hessayon, D. G. (2003). Sodo gėlės. Vilnius: Aktėja, 84p.
12. Lekavičius, A. (1989). Vadovas augalams pažinti. Vilnius: Mokslas, 271p.
13. Rosenfeld, R. (ats. Red.). (2005). Sodo augalų enciklopedija. Vilnius: Alma litera.
14. Skeivienė, O. (1987). Gėlių auginimas. Vilnius: Mokslas, 121p.
15. Sliesaravičius, A., Stanys, V. (2005). Žemės ūkio augalų biotechnologija. Vilnius: Enciklopedija, 38-52 p.
16. Stanys, V. (1998). Sodo augalų mikrovegetatyvinio dauginimo metodiniai nurodymai. Baltai: Lietuvos žemės ūkio universitetas, 4-10 p.
17. Stašauskaitė, S. (1995). Augalų vystymosi fiziologija. Vilnius: Debesija, 103-104, 111-123p.
18. Šaulienė, I. (2002). Somatinių embrioidų, žiedų ir vegetatyvinių ūglių regeneracija *Nicotiana* kultūrose (kultivavimo su fitohormonais trukmės ir fotoperiodo reikšmė). Botanikos institutas, biomedicinos mokslai: daktaro disertacija. Vilnius, 27-28 p.
19. Šlapakauskas, V. A. (2006). Augalų ekofiziologija. Kaunas: Lututė, 286, 314-316p.
20. Šlapakauskas, V., Aniulytė, G., Dastikaitė, A., Pranaitis, P., Ramanauskienė, K. (1980). Botanika ir mikrobiologijos pagrindai. Vilnius: Mokslas, 159p.
21. Vilhelmas, P. G. (1982). Tūkstantis patarimų gėlių augintojui. Vilnius: Mokslas, 130p.
22. Vilkonis, K. K. (2008). Lietuvos žaliasis rūbas. Kaunas: Lututė, 194 p.

23. Wagener, K., Vollrath, S. (2007). 333 balkonų ir terasų apželdinimo idėjos. Vilnius: Presvika, 191p.
24. Anonimas 2. (2009). Seeds of petunia explode from the calyx of a dead flower. [žiūrėta 2010-01-15]. Prieiga per internetą: <<http://weeklypaper.blogspot.com/2009/08/staycation.html>>
25. Anonimas 3. (2010). Griffin greenhouse & Nursery Supplies. [žiūrėta 2009-12-14]. Prieiga per internetą: <<http://gpshort.com/varieties/pvg.html>>
26. Augalų biotechnologijos centras. (2009). Mikrodauginimas. [žiūrėta 2006-02-24]. Prieiga per Internetą: <<http://www.plantbionet.lt/index.php?page=details&id=75>>
27. Augalų biotechnologijos centras. (2009). Sodo ir daržo augalų mikrodauginimas. [žiūrėta 2009-04-20]. Prieiga per internetą: <<http://www.plantbionet.lt/index.php?page=details&id=97>>
28. Bridgen, J. M., Bartok, W. J. (1996). Designing of a Plant Micropropagation Laboratory. Departments of Plant Science and Agricultural Engineering. University of Connecticut. [žiūrėta 2009-03-28]. Prieiga per internetą: <<http://aggie-horticulture.tamu.edu/tisscult/microprop/facilities/microlab.html>>
29. Cabaleiro, C., Economou A. S. (1992). Effect of light on rooting *in vitro* of petunia microshoots. [žiūrėta 2010-03-22]. Prieiga per internetą: <http://www.actahort.org/books/300/300_27.htm>
30. Gerats, A., Royaert, S., Cnudde, F., Vandenbussche, M., Geurts., H., Wolters-Arts, M. (2008). Flower development. [žiūrėta 2010-02-10]. Prieiga per internetą: <<http://www.vcbio.science.ru.nl/en/fesem/applets/flower/>>
31. He, C., Saedler, H. (2007). Molecular evolution of a morphological novelty in solanaceae: the inflated-calyx-syndrome (ICS) in *Physalis*. [žiūrėta 2009-10-12]. Prieiga per internetą: <http://www.actahort.org/books/745/745_6.htm>
32. Hudak, I., Dobranszki, J., Hevesi, M. (2006). *In vitro* methods for testing potato clones soft rot erwiniae. [žiūrėta 2010-04-12]. Prieiga per internetą: <http://www.actahort.org/books/725/725_62.htm>
33. Iannotti, M. (2010). Petunias – How to Choose the Right type of Petunia. [žiūrėta 2010-04-01]. Prieiga per internetą: <http://gardening.about.com/od/plantprofiles/tp/Petunia_Choices.htm>
34. Janssen, W. L. P., Worlters-Arts, M., Derksen, J., Pierson, E. S. (2010). Basic anatomy. [žiūrėta 2010-03-10]. Prieiga per internetą: <<http://www.vcbio.science.ru.nl/en/virtuallessons/leaf/basicanatomy/>>

35. Khadiga, Abd Elaleem, G., Rasheid, Modawi and Mutasim, S., Khalafalla, M. (2009). Effect of cultivar and growth regulator on *in vitro* micropropagation of potato (*Solanum tuberosum* L.). [Žiūrēta 2010-03-02]. Prieiga per internetą: <<http://www.insipub.com/aensi/aejsa/2009/487-492.pdf>>
36. Klett, J. E. (2008). Best of 2008. *Annual Flower Trial Gardena at Colorado State University*. [Žiūrēta 2010-02-02]. Prieiga per internetą: <http://www.flowertrials.colostate.edu/csu_trial_garden_best_of_2008.html>
37. Loosemore, J. (2010). Flower photography. [Žiūrēta 2010-01-25]. Prieiga per internetą: <<http://www.frogsonice.com/photos/flowers3/>>
38. Meyer, L., Serek, M., Winkelmann, T. (2006). Protoplast culture in *Petunia hybrida* and effects of cell cycle inhibitors on cell division frequency. [Žiūrēta 2010-04-05]. Prieiga per internetą: <http://www.actahort.org/books/725/725_21.htm>
39. Michalczuk, B., Michalczuk, L. (2000). The effect of ligot quality on regeneration rate and plantlet development in transgenic *Petunia* 'Revolution' (Surfinia type). [Žiūrēta 2010-02-15]. Prieiga per internetą: <http://www.actahort.org/books/530/530_46.htm>
40. Mityko, J., Fari, J. (1997). Problems and results of doubled haploid plant production in pepper (*Capsicum annuum* L.) via anther – and microspore culture. [Žiūrēta 2010-02-15]. Prieiga per internetą: <http://www.actahort.org/books/447/447_57.htm>
41. Pawar, P., Pawar, C., Narkhede, B., Teli, N., Bhalsing, S., Maheshwari, V. (2002). A Technique for Rapid Micropropagation of *Solanum surattense* Burm. f. *Indian Journal of Biotechnology*, 2, p. 201-204. [Žiūrēta 2010-01-21]. Prieiga per internetą: <<http://mdl.csa.com/partners/viewrecord.php?requester=gs&collection=ENV&recid=5435369&q=solanaceae+micropropagation+in+vitro&uid=788990763&setcookie=yes>>
42. Penot, M. (2009). Hormone - directed transport in detached leaf – phytohormonal competition. Symposium on Growth Regulators in Fruit Production, (abstract). [Žiūrēta 2009-06-05]. Prieiga per internetą: <http://www.actahort.org/books/80/80_10.htm>
43. Purer, O., Mayak, S. (2009). Postharvest treatments for improvement of the quality of *Pelargonium* cuttings. International Symposium on Propagation of Ornamental Plants, (abstract). [Žiūrēta 2009-06-19]. Prieiga per internetą: <http://www.actahort.org/books/226/226_78.htm>
44. Sisko, E., (1996). Petunias are the flowers you can't do without. [Žiūrēta 2010-04-05]. Prieiga per internetą: <<http://news.google.com/newspapers?nid=110&dat=19960622&id=gMIoAAAIBAJ&sjid=TVUDAAAIBAJ&pg=7086,7730122>>

45. Staden, van J., Fenneli, C. W., Taylor, N. J. (2006). Plant stress *in vitro*: the role of phytohormones. [žiūrēta 2010-01-09]. Prieiga per internetą: <http://www.actahort.org/books/725/725_2.htm>
46. Szasz, A., Mityko, J., Andrasfalvy, A., Fari, M. (1997). Methodological and genetic aspects of *in vitro* plant regeneration and genetic transformation of the recalcitrant pepper (*Capsicum annuum* L.). [žiūrēta 2010-01-09]. Prieiga per internetą: <http://www.actahort.org/books/447/447_75.htm>

