



**2004-2006 m. Bendrojo programavimo dokumento 2 prioriteto „Žmogiškųjų išteklių plėtra“ 4 priemonė „Mokymosi visą gyvenimą sąlygų plėtra“**

Projekto sutarties numeris: **ESF/2004/2.4.0-K01-160/SUT-261**

Projekto pavadinimas: **Inovatyvūs mokymosi metodai ir naujausios technologijos gamtos mokslų bakalauro rengimui**

---

## **BIO 221. AUGALŲ SISTEMATIKA IR FIZIOLOGIJA**

Laboratorinis darbas

### **KALIAUS GAVIMAS IŠ BALTAŽIEDŽIO VAIRENIO (*ARABIDOPSIS THALIANA*) LAPŲ BEI ŠAKNŲ, NAUDOJANT IZOLIUOTŲ AUDINIŲ KULTŪROS METODĄ**

**Augimas** — negrįžtamas augalų tūrio ir masės didėjimas, susijęs su naujų audinių ir organų susidarymu. Kuomet auga vegetatyviniai organai, tai augimas vadinamas vegetatyviniu augimu. Kuomet auga generatyviniai organai - generatyviniu augimu. Stuomeninių augalų dalijasi tik meristeminių audinių ląstelės.

Naudojant izoliuotų audinių kultūros metodą, įmanoma sukelti ne tik meristeminių augalo ląstelių dalijimąsi - į atitinkamos sudėties sterilią mitybinę terpę įdėjus sterilų augalo organo gabalėlį iš, pvz., stiebo, šaknies, lapo, jo ląstelės ima dalytis, suformuodamos nediferencijuotų ląstelių masę – **kalių**. Kalių galima padalinti į mažesnes dalis ir kiekvieną iš jų atskirai perkelti į naują terpę, kur ląstelės vėl dalijasi toliau. Kaliaus susidarymui būtinas cukrus (sacharozė ar gliukozė), makroelementai ir mikroelementai, vitaminai bei fitohormonai. Augimą įtakoja ir aplinkos sąlygos. Itin svarbi augimą ir vystymąsi įtakojančių medžiagų grupė yra fitohormonai – auksinai, citokininai, giberiliniai.

E. Vildje 1901 m., atlikdamas eksperimentus su kultūrinėmis mielėmis, pastebėjo, kad chemiškai valyto cukraus ir mineralinių druskų mitybiniame tirpale mielės nesidaugina. Tačiau į

mitybinę terpę įdėjus miežių salyklo, arbatos lapų, kepenų arba mėsos ekstrakto, mielės imdavo normaliai daugintis. Ekstraktuose esančią mielių augimą skatinančią medžiagą E. Vildjė pavadino **biosu**. Biosas yra 6 aktyvių medžiagų kompleksas: mezoinozito; pantoteno rūgšties (vitamino B<sub>3</sub>), biotino (vitamino H), vitaminų B<sub>1</sub> ir B<sub>6</sub> bei nikotino rūgšties (vitamino PP arba B<sub>5</sub>). Šis medžiagų kompleksas būtinas įvairių augalų augimui. Daugiausiai bioso esti sprogstančiuose pumpuruose ir jaunuose lapeliuose.

1928 m. F. Ventas įrodė, jog varpinių augalų koleoptilės viršūnė į tįstamojo augimo zoną perduoda augimą skatinančią medžiagą, kurią pavadino augimo medžiaga. Šią medžiagą vėliau chemiškai ištyrė F. Kioqlis ir pavadino ją **auksinu**. Svarbiausiu auksinų grupės fitohormonu yra laikoma indolilacto rūgštis (IAR, heteroauksinas), rasta visuose augaluose. IAR sintetinama meristeminiuose audiniuose iš triptofano. Iš jų IAR patenka ir į kitas augalų sritis. Augančiose augalo dalyse IAR koncentracija yra 500—1000 kartų didesnė. Taip pat svarbūs auksinai yra indolilsviesto rūgštis (ISR),  $\alpha$ -naftilacto rūgštis (NAR), 2,4-dichlorfenoksiacto rūgštis (2,4 – D). Auksinai skatina augalų tįstamąjį augimą, brazdo ląstelių dalijimąsi, pridėtinių šaknų susidarymą, intensyvina fotosintezę bei kvėpavimą. Taip pat auksinai kaip efektoriai veikia augalų ląstelių branduolių genomą ir dalyvauja baltymų sintezėje. Jie reikalingi dulkiadaigių augimui ir apsisvaisinimui, vaisių užsimezgamui bei augimui.

Kita labai svarbių fitohormonų grupė yra **giberiliniai**. Pirmą giberiliną atrado E. Kurosava 1926 m. Šiuo metu yra išskirta virš 50 giberelinų, jie sutrumpintai žymimi 'GA', pridedant atitinkamą skaitmeninį indeksą. Geriausiai iš jų iširta ir plačiausiai vartojama yra giberelino rūgštis (GA<sub>3</sub>). Giberelinai yra diterpenoidai, pagrindą sudaro tetraciklinis junginys – gibanas, prie kurio jungiasi įvairios grupės ir laktono žiedas. Giberelinus sintetina įvairūs augalai. Daugiausia giberelinų esti augančiose augalo srityse, pagrindinai sintetinami lapuose. Giberiliniai skatina antžeminių dalių augimą, ypač veikia tarpubamblių tįstamąjį augimą. Taip pat jie indukuoja žydėjimą, skatina sėklų dygimą, transpiraciją, įtakoja nukleino rūgščių ir baltymų sintezę, fotosintezę.

**Citokininiai** – dar viena fitohormonų grupė. Šiuo metu žinoma virš 10 įvairių citokininų, iš kurių itin dideliu fiziologiniu aktyvumu pasižymi 6-benzilamino purinas (BAP, BA). Taip pat paminėtini 6-furfurilamino purinas (kinetinas), zeatinas. Citokininų aptikta visuose augaluose, aukštesnieji augalai juos sintetina šaknyse, iš kur jie yra transportuojami į kitas augalo dalis. Daugiausiai šių fitohormonų yra bręstančiose ir dygstančiose sėklose, jaunuose lapuose, stiebų ir šaknų viršūnėse. Citokininiai sukelia ląstelių dalijimosi, diferencijavimosi ir organogenezės stimuliavimo bei audinių senėjimo stabdymo procesus.

Auksinai, giberilinais ir citokininais lėtina senėjimo procesus. Literatūroje ypač akcentuojamas citokininų poveikis.

Ląstelių dalijimasis izoliuotų audinių kultūroje ypač skatina citokininais, kaliumi susiformuoja bei gerai auga, kuomet mitybinės terpės litre yra keli citokininų mikrogramai. Ląstelių diferencijavimasis ir organogenezės procesus citokininais skatina tik sąveikaudami su auksiniais ir giberelinais. Itin svarbu yra santykis tarp įvairių fitohormonų koncentracijų:

- kai mitybinėje terpėje maža citokinino ir didelė auksino koncentracija, iš kaliumi formuojasi šaknys;
- kai mitybinėje terpėje yra didesnė citokinino ir maža auksino koncentracija, iš kaliumi formuojasi ir ūgliai ir lapai;
- kai mitybinėje terpėje yra atitinkama citokinino ir giberelino koncentracija, iš kaliumi formuojasi ir šaknys ir ūgliai;
- kai mitybinėje terpėje yra vienoda citokininų ir auksinų koncentracija, tuomet vyksta kaliumi augimas be diferenciacijos.

Šiuo metu izoliuotų audinių kultūros metodu yra auginami įvairūs augalai. Pirmiausiai iš augalo organo, pvz., lapo, šaknies, stiebo atitinkamos sudėties sterilioje mitybinėje terpėje išauginamas kaliumi. Kaliumi yra perkeliamas į kitas terpes, kuriose yra kitų fitohormonų arba pakeistas tų pačių fitohormonų santykis. Todėl priklausomai nuo mitybinėje terpėje esančių fitohormonų ir jų santykio vienu atveju iš kaliumi gali susiformuoti šaknys, kitu – ūgliai arba iš karto ir vieni, ir kiti organai. Galiausiai galima išauginti genetiškai identišką tėvams augalą.

Augalų dauginimo būdas izoliuotų audinių kultūros metodu yra ypač naudingas, nes iš nedidelio pradinės medžiagos kiekio per trumpą laiką galima gauti daug palikuonių ir padauginti sterilius hibridus, tai yra labai aktualu dauginant sunkiai dauginamus augalus arba augalus, kurie visai nesidaugina vegetatyviškai. Be to šiuo metodu gauti augalai yra neužkrėsti virusais.

**Darbo tikslas:** išmokyti išauginti kaliumi iš baltažiedžio vairo ( *Arabidopsis thaliana* ) lapų ir šaknų.

**Darbo uždaviniai:**

1. paruoškite kultūrų terpes;
2. sudaiginkite baltažiedžio vairo ( *arabidopsis thaliana* ) sėklas *in vitro*;
3. išauginkite baltažiedžio vairo ( *arabidopsis thaliana* ) šaknų ir lapų kaliumi *in vitro*.

**Darbo priemonės:**

1. termostatuojama kratyklė, auginimo kamera (TH 30),
2. mėgintuvėliai,
3. svarstyklės,
4. horizontalaus srauto laminaras 'Bioair',
5. įrankiai (skalpeliai, pincetai),
6. pH-metras 'Fisher-InoLab-370',
7. autoklavas,
8. Petri lėkštelės,
9. chalatai,
10. vienkartinės pirštinės,
11. keičiamo tūrio automatinės pipetės,
12. spiritinės lemputės.

**Reagentai:**

- Reagentai Murashige ir Skoog terpei ruošti (makroelementai:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ ,  $\text{KNO}_3$ ,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $12\text{H}_2\text{PO}_4$ ,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; mikroelementai:  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{H}_3\text{BO}_3$ ,  $\text{KI}$ ,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ ,  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ; priedai: tiaminas\*HCl, piridoksinas, nikotininė rūgštis, glicinas, sacharozė, mio-inozitolis);
- $\alpha$ -naftilacto rūgštis (NAR),
- indolilacto rūgštis (IAR),
- 2,4–dichlorfenoksiacto rūgštis (2,4-D),
- 6-benzilamino purinas (BAP),
- 96 % etanolis,
- HCl,
- KOH,
- Agar-agaras,
- NaOH tirpalas,
- distiliuotas vanduo,
- bidistiliuotas vanduo,
- $\text{AgNO}_3$  tirpalas.

**Tyrimo objektas** - baltažiedžio vairo ( *Arabidopsis thaliana* ) sėklos ir kalius (baltažiedis vairo yra modelinis augalas, plačiai naudojamas įvairiems tyrimams).

**Darbo eiga:**

Darbo metu būtina dėvėti chalata bei mūvėti pirštines. Darbas atliekamas horizontalaus srauto laminare.

**I. Kultūros terpių paruošimas:**

1. Visos kultūros terpės, kurios bus naudojamos šiame darbe, susideda iš pagrindinių Murashige ir Skoog (1962) mineralinių druskų, mikroelementų ir vitaminų. Todėl pirmiausia paruoškite vieną litrą Murashige ir Skoog terpės, kurioje medžiagų kiekiai yra:
  - makroelementai:  $\text{NH}_4\text{NO}_3$  – 1650 mg/l,  $\text{KNO}_3$  – 1900 mg/l,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 440 mg/l,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 370 mg/l,  $12\text{H}_2\text{PO}_4$  – 170 mg/l,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  – 85 mg/l;
  - mikroelementai:  $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  – 0,025 mg/l,  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  - mg/l,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  – 6,2 mg/l, KI – 0,83 mg/l,  $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  – 22,3 mg/l,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 0,25 mg/l,  $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 8,6 mg/l,  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  – 27,8 mg/l,  $\text{Na}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  – 37,3 mg/l, mg/l;
  - priedai: mio-inozitolis – 0,2 g/l, Tiaminas\*HCl – 0,1 mg/l, Piridoksinas – 0,5 mg/l, nikotininė rūgštis – 0,5 mg/l, glicinas – 2,0 mg/l, sachrozė – 30000 mg/l;
  - šias medžiagas skieskite iki reikiamo kiekio, naudodami bidistiliuotą vandenį.
2. Išmatuokite terpės pH naudodami pH-metrą ‘Fisher-InoLab-370’. Terpės pH turi būti 5.7. (Norimą pH vertę daveskite su HCl jei reikia mažinti pH ar KOH – jei reikia didinti pH).
3. Papildykite paruoštos terpės sudėtį, kad galėtumėte ją naudoti konkrečių uždavinių sprendimui:
  - terpę, kurią naudosite norėdami sudaiginti sėklas (sėklų dygimo terpė) sustingdykite su 8 g/L agar-agaru Petri lėkštelėse.
  - terpę, kurią naudosite kaliaus auginimui (kaliaus auginimo terpė) papildykite augimo regulatoriais: 0.5 mg/l 6-benzilamino purino (BAP) (pirmiausia paruoškite BAP 1 mg/ml tirpalą, ištirpindami BAP miltelius keliuose 1.0 M NaOH lašuose ir tada iki reikiamo kiekio pilkite bidistiliuotą vandenį); 1 mg/l  $\alpha$ -naftilacto rūgšties (NAR), 1 mg/l indolilacto rūgšties (IAR), 1 mg/l 2,4-dichlorfenoksiacto rūgšties (2,4-D) (auksinus NAR, IAR, 2,4-D ruoškite kaip 1 mg/ml tirpalus, ištirpinandami miltelius keliuose 1.0 M HCl lašuose ir tada iki reikiamo kiekio pilkite bidistiliuoto vandens).

- Paruoštą terpę sustingdykite mėgintuvėliuose, papildydami 8 g/L agar-agaru.
4. Sterilizuokite terpes autoklave, esant 120°C, 0,75 – 1,0 atmosferų slėgiui.
  5. Terpes laikykite šaldytuve 4°C temperatūroje.

## II. Sėklų sudaiginimas eksplantų paruošimui:

1. Į mėgintuvėlį įdėkite 30 baltažiedžio vairo ( *Arabidopsis thaliana* ) sėklų ir įpilkite 1 ml 70 % spirito, palaikykite 3 min. Po to nupilkite spiritą ir 3 kartus praplaukite steriliu distiliuotu vandeniu. Tuomet ant sėklų užpilkite 1 ml 0,1 % AgNO<sub>3</sub> tirpalo. Po 4 min. pašalinkite sterilinimo tirpalą ir 3 kartus praplaukite sėklas steriliu distiliuotu vandeniu.
2. Sterilinkite pincetus - pirmiausia juos pamerkite į etanolį, po to laminare dezinfekuokite spiritinės lemputės liepsnoje.
3. Laminare išpilkite sėklas ir vandenį į Petri lėkštelę ir steriliu pincetu išdėliokite daugiausiai po 5 sėklas į Petri lėkštes, kuriose yra sėklų dygimo terpė.
4. Laikykite lėkštes su sėklomis tamsoje, kol sėklos sudygs (vidutiniškai 5-7 dienas). Tuomet laikykite šviesoje.

## III. Kaliaus gaminimas iš lapų ir šaknų:

1. Praėjus 8 – 10 dienų po sėklų sudygimo paimkite lapus tolimesnėms auginimo *in vitro* procedūroms. Šaknis imkite – po 2 – 3 sav.
2. Sterilinkite įrankius (skalpelius, pincetus) pamerkdami į etanolį, po to dezinfekuodami spiritinės lemputės liepsnoje.
3. Naudodami sterilius įrankius, atskirkite lapus, lengvai juos nutrinkite ir dėkite į standžią kaliaus auginimo terpę. Inkubuokite tamsoje kol susiformuos kaliaus (apie 4 sav.)
4. Naudodami sterilius įrankius, nuimkite šaknis ir jas susmulkinkite. Įdėkite šaknų gabalėlius į standžią kaliaus auginimo terpę. Inkubuokite tamsoje kol susiformuos kaliaus (apie 4 sav.)
5. Kas 4 sav., pašalinkite mirusius kaliaus audinius, padalinkite kalių ir toliau auginkite naujai pakeistoje kaliaus auginimo terpėje.

## Kultūros auginimo (laikymo) sąlygos:

Visas augalų kultūras laikykite termostatuojamoje kratyklėje, auginimo kameroje (TH 30), esant 23 ± 1°C temperatūrai.

## Literatūra:

1. Bluzmanas P. ir kt. Augalų fiziologija. Vilnius: Mokslas, 1991, 419 p.
2. EL. Encina et all. An Easy and Reliable Method for Establishment and Maintenance of Leaf and Root Cell Cultures of *Arabidopsis thaliana*. Plant Molecular Biology Reporter 19: 245-248, 2001.
3. Sliesaravičius A. ir Stanys S. Žemės ūkio augalų biotechnologija. Vilnius: Enciklopedija, 2005, 234 psl.
4. Stašauskaitė S. Augalų vystymosi fiziologija. Vilnius: Debesija, 1995, 228 psl.
5. Stašauskaitė S. Augalų fiziologijos laboratoriniai ir lauko bandymai. Vilnius: Aldorija, 1999, 415 psl.