

## Paprastųjų alyvų (*Syringa vulgaris* L.) veislių mikrovegetatyvinis dauginimas

Stasė Dapkūnienė\*<sup>1,2</sup>, Vitalija Bobyr<sup>3</sup>, Irena Žiemytė<sup>2</sup>, Audrius Skridaila<sup>2</sup>

<sup>1</sup>*Augalų genų bankas, Stoties g 2, LT-58343 Akademija, Kėdainių rajonas  
Tel. (8-5) 2317098, el. paštas [stase.dapkuniene@bs.vu.lt](mailto:stase.dapkuniene@bs.vu.lt)*

<sup>2</sup>*Vilniaus universiteto botanikos sodas*

*Kairėnų g.43, LT-10239 Vilnius. Tel. (8-5) 2193133, el. paštas [irenaz@vdnet.lt](mailto:irenaz@vdnet.lt)*

<sup>3</sup>*Vilniaus universiteto Gamtos mokslų fakulteto Botanikos ir genetikos katedra  
M. K. Čiurlionio g. 21/27, LT-23009 Vilnius. El. paštas [Vitalija.bobyr@gmail.com](mailto:Vitalija.bobyr@gmail.com)*

(Gauta 2014 m. sausio mėn.; atiduota spaudai 2014 m. balandžio mėn.; prieiga internete nuo 2014 m. gegužės 02 d.)

### Anotacija

Želdynuose naudojamų dekoratyvių augalų asortimentas nuolat kinta. Lietuvos sodybų želdynuose dažniausiai matomos paprastosios alyvos. Jomis dabinami įėjimai į sodybas, sodinamos želdynuose pavieniui ir grupėmis. 2002 metais Vilniaus universiteto botanikos sode įveista Ekspozicinė alyvų kolekcija. Šiuolaikiniai audinių kultūrų biotechnologijos metodai sudaro galimybes dauginti, auginti augalus mikrovegetatyviniu būdu. Straipsnyje aptariamas alyvų veislių mikrokloninis dauginimas Vilniaus universiteto botanikos sode.

**Reikšminiai žodžiai:** alyvos, veislės, mikrovegetatyvinis dauginimas, *in vitro*.

### Abstract

The assortment of ornamentals used in green areas of Lithuania is increasing every year. The common lilacs are very popular plants in Lithuanian landscape. The exposition collection of lilacs has been planted since 2002. Now there are 86 cultivars of common lilac. Propagation plants by tissue culture are important for obtaining of large number of lilac plants in a comparatively short time. The goal of our research is to present information about the micropropagation of lilac cultivars growing in the Lilacs exposition collection of Botanical Garden of Vilnius University.

**Key words:** Lilacs, cultivars, micropropagation, *in vitro*.

### Įvadas

Aplinkos želdinimas – svarbus mūsų visuomenės socialinis komponentas, susijęs su šalies įvaizdžio formavimu. Mus supa įvairios paskirties želdynai. Želdynuose naudojamų dekoratyvių augalų asortimentas nuolat kinta. Lietuvos sodybų želdynuose dažniausiai matomos paprastosios alyvos. Jomis dabinami įėjimai į sodybas, jos sodinamos želdynuose pavieniui ir grupėmis. Alyvos priskiriamos pavasarį žydintiems augalams. Pasak V. Baronienės (Baronienė, 2010), pavasarį žydinčiais laikomi sumedėję augalai, kurie sužysta iki gegužės pabaigos, bet vėlyvesnį pavasarį jų žydėjimas gali užsitęsti iki birželio vidurio ir ilgiau. Alyvos populiarios želdynuose kaip pakantus įvairiems aplinkos veiksniams ir kasmet žydintis augalas. Paprastųjų alyvų tėvynė – Balkanų pusiasalis. J. Strumilos sode Vilniuje 1818 m. šalia kitų augalų buvo auginamos *Syringa vulgaris* „Alba“ (Skridaila, 2001). Siekiant įvertinti alyvų populiarumą Lietuvoje, 1993–2007 metais buvo apilankyta daugiau kaip 250 individualių dendrologinių kolekcijų, išsibarsčiusių po visus Lietuvos regionus ir rajonus, iš kurių 152 buvo išsamiai įvertintos. Nustatyta, kad kolekcijose auginami 2006 rūšių ir žemesnio rango taksonų introdukuoti sumedėję augalai, tarp kurių 93 taksonai, priklausantys *Oleaceae* Hoffmanns. et Link šeimai. *Syringa* L. genties augalų aptikta 16 rūšių ir 26 žemesnio rango taksonai (Januškevičius, Baronienė, 2009). 2002 metais Vilniaus universiteto botanikos sode įveista Ekspozicinė alyvų kolekcija, kurioje pristatomos 86 paprastųjų alyvų veislės.

Gamtoje alyvos dauginasi sėklomis, šaknų ataugomis ir stiebo atlankomis. Dirbtiniu būdu alyvų rūšys ir veislės gali būti dauginamos taip pat stiebo atlankomis, žaliaisiais auginiais ir skiepijimu. Šiuolaikiniai audinių kultūrų biotechnologijos metodai sudaro galimybes auginti augalus mėgintuvėliuose (*in vitro*) – mikrovegetatyviniu būdu (John, Fiala, 1998). Iš motininio alyvų augalo imamas pumpuras, sterilinamas įvairiais agentais ir kultivuojamas maitinamojoje terpėje, sterilioje aplinkoje. Augalo audinio arba organo dalis, savarankiškai auginama maitinamojoje terpėje ir naudojama audinių kultūroje, vadinama eksplantu. Augalų gebėjimą

regeneruoti *in vitro* lemia somatinių augalų ląstelių totipotencija. Iš eksplanto išaugęs naujas alyvų augalas *in vitro* vadinamas regenerantu. Kultivuojant diferencijuotus audinius, yra išsaugoma audiniui būdinga genomo raiška, kuri lemia augalų morfogenetines charakteristikas ir organų specializaciją, todėl tikėtina, kad kartu išsaugomos genomo aktyvumo ypatybės, būdingos skirtingiems ontogenezės etapams (Sharma, Fletcher, 2002). Vienas iš dažniausiai minimų audinių kultūrų privalumų yra tas, kad masinei produkcijai gali būti klonuojami genetiškai identiški organizmai ir galimybė iš mažo pradinės medžiagos kiekio išauginti daug augalų (Sliesaravičius, Stanys, 2005). Alyvų dauginimas *in vitro* pasiteisina. Mėgintuvėliuose išaugintos alyvos greičiau auga, yra atsparesnės virusinėms ir grybinėms ligoms, antrais–trečiais metais jau pradeda žydėti (John, Fiala, 1998).

Šio **darbo tikslas** – apžvelgti alyvų mikrokloninio dauginimo galimybes.

## Metodai

Tyrimai atlikti Vilniaus universiteto botanikos sodo Mokslo programų aptarnavimo ir koordinavimo skyriaus Biotechnologijų ir genetikos laboratorijoje 2012–2013 metais. Tyrimo objektas – paprastųjų alyvų (*Syringa vulgaris* L.) veislės: ‘Adelaide Dunbar’, ‘Andenken an Ludwig Spath’, ‘Fraincheur’, ‘Geant des Batailles’, ‘Leon Simon’, ‘Pasteur’, ‘Paul Hariott’, ‘Primrose’, ‘Red Giant’, ‘William Robinson’ ir ‘Woodland Blue’. Maitinamųjų terpių komponentai buvo sveriami, naudojant analitines svarstyklės „RAD WAG WAX 110“, elektronines svarstyklės “Mettler Toledo”. Tirpalų pH nustatymui buvo naudojamas pH-metras „Mettler Toledo 220”. Į mėgintuvėlius (16 x 150 mm) su 5 ml maitinamąja terpe buvo sodinama po 1 eksplantą. Kiekvienam eksperimento variantui panaudoti po 25 eksplantus. Mėgintuvėliai su eksplantais buvo laikomi augyne po baltų liuminiscencinių lempų OSRAM L 36 W/20 apšvietimu. Fotoperiodo trukmė – 16 valandų. Dienos ir nakties temperatūra siekė 26–22 laipsnius šilumos.

*Stabilizavimas in vitro kultūroje.* Eksplantai imami iš jaunų, nesumedėjusių alyvų veislių ūglių, jų intensyvaus augimo metu. Paviršinės infekcijos sumažinimui ūgliai buvo plaunami 2 val. po tekančio vandens srove, po to dezinfekuojami: 10 min. baliklyje „ACE“ ir vėl perplaunami steriliu distiliuotu vandeniu; 10 min. 0,05 % HgCl<sub>2</sub>; 10 min. 70 % etanolyje. Galiausiai viskas tris kartus perplaunama distiliuotu, steriliu vandeniu. Kiekvienos veislės išskirta po 24–30 eksplantų (pažastinių pumpurų su trupučiu medienos), kurie pasodinti į maitinamąją terpę. Naudota MS (Murashige, Skoog, 1962), MS<sub>1</sub> (MS terpė papildyta 1 mg/L BAP (6 benzilaminopurinas) ir 0,05 mg/L Isv.R (3-indolilsviesto rūgštis) ir MS<sub>2</sub> (MS terpė MS terpė papildyta 1 mg/L BAP ir 0,05 mg/L Isv.R (indolil sviestinė rūgštis 50 mg streptomicino).

*Maitinamosios terpės parinkimas mikrovegetatyviniam dauginimui.* Mikrovegetatyvinio alyvų dauginimo tyrimui naudojome 3 maitinamąsias terpes: MS<sub>1</sub>, MS<sub>2</sub> (aprašytos aukščiau) ir MS<sub>3</sub>. MS<sub>3</sub> tai mūsų modifikuota MS maitinamoji terpė, kurioje papildomai įdėta 0,05 mg/L IAR (3-indolilacto rūgštis) ir ISv.R, 0,1 mg/L – 2-ip (N<sup>6</sup>-izopentiladeninas) ir BAP. Stabilizuotų *in vitro* kultūroje regenerantų nupjauta viršūnėlė buvo eksplantu. Naujų regenerantų vegetatyvinių organų vertinimas, praėjus 8–9 savaitėms nuo eksplanto pasodinimo į maitinamąją terpę. Vertinome regeneranto augalo aukštį, galimų stiebo atkarpų skaičių, lapų skaičių ir susidariusių šaknų skaičių.

Alyvų veislių regenerantų aukščio kintamumas tirtas daugiafaktorine dispersine analize (MANOVA), kai regeneranto aukštis ir auginimo terpė yra fiksuoti faktoriai, o regenerantų pakartojimas yra atsitiktinis faktorius. Panaudotų duomenų normalusis pasiskirstymas ir homogeniškumas tirti atitinkamai Shapiro–Wilks Levene testais. Aukščio vidurkių palyginimas tarp auginimo terpių ir tarp atskirų alyvų veislių įvertintas Tukey’s (HSD) testu, esant reikšmingumo lygiui  $P < 0.05$ . Statistinė duomenų analizė atlikta MEAN (MS EXCEL), GLM (STATISTICA 5.5).

## Rezultatai

*Stabilizavimas in vitro kultūroje.* Tai mikrovegetatyvinio dauginimo *in vitro* etapas, nulemiantis tolimesnę tyrimų eigą. Svarbu pasiekti, kad *in vitro* kultūroje būtų didesnė regeneruojančių eksplantų išeiga. Mėgintuvėliai su infekuotais ir žuvusiais eksplantais brokuojami. Paviršinė alyvų ūglių dezinfekcija buvo vienoda. Manome, kad alyvų eksplantų stabilizacijos eigai įtakos turėjo aplinka (maitinamoji terpė), kurioje buvo pasodintas eksplantas. Mūsų atveju, didžiausia regenerantų išeiga gauta MS<sub>1</sub> ir MS<sub>2</sub> maitinamosiose terpėse (1 lentelė). Minėtose terpėse eksplantai išliko ne tik gyvi, bet ir pradėjo augti.

**1 lentelė.** Eksplantų regeneracijos *in vitro* vertinimas procentais  
*Table 1.* The evaluation of explants regeneration *in vitro* in percent

Maitinamoji terpė / <i>Nutrient medium</i>	Infekuoti eksplantai / <i>Infected explants</i>	Žuvę eksplantai / <i>Died explants</i>	Regeneruojantys eksplantai / <i>Regenerated explants</i>
MS	11,1	41,7	47,2
MS <sub>1</sub>	7,4	0,0	92,6
MS <sub>2</sub>	9,9	14,1	76,0

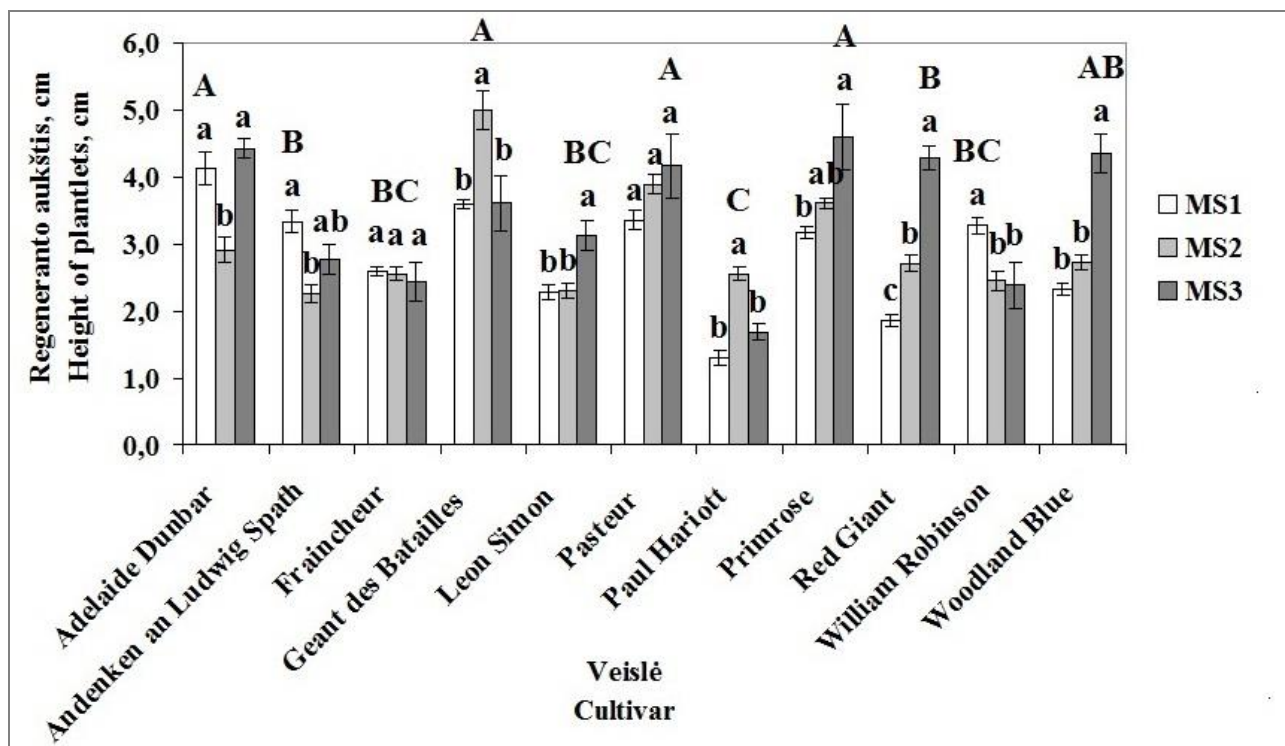
*Maitinamosios terpės parinkimas mikrovegetatyviniam dauginimui.* Stabilizavimo *in vitro* metu gaunami sterilūs regenerantai, kurie toliau naudojami eksplantais. Gautų regenerantų stiebo atkarpos šiame tyrime pasitarnavo eksplantais. Paveiksle pateikiame paprastųjų alyvų (*Syringa vulgaris* L.) veislių: ‘Adelaide Dunbar’, ‘Andenken an Ludwig Spath’, ‘Fraincheur’, ‘Geant des Batailles’, ‘Leon Simon’, ‘Pasteur’, ‘Paul Hariott’, ‘Primrose’, ‘Red Giant’, ‘William Robinson’ ir ‘Woodland Blue’ stiebo aukščio priklausomybę nuo trijų maitinamųjų terpių. Stiebo aukštį lemė skirtingos stiebo atkarpų eksplantų regeneracinės savybės ir veislių ypatybės. Šešios iš tirtų alyvų veislių (‘Adelaide Dunbar’, ‘Leon Simon’, ‘Pasteur’, ‘Primrose’, ‘Red Giant’ ir ‘Woodland Blue’) geriau augo MS<sub>3</sub> maitinamoje terpėje, trys (‘Andenken an Ludwig Spath’, ‘Fraincheur’ ir ‘William Robinson’) – geriau MS<sub>1</sub>, ir dvi veislės (‘Geant des Batailles’, ‘Paul Hariott’) – MS<sub>2</sub> maitinamojoje terpėje. Nuo regeneranto stiebo aukščio priklauso būsimų eksplantų skaičius, o tai lemia mikrovegetatyvinio dauginimo galimybes. Lapų skaičius nedaug skyrėsi tarp veislių ir buvo panašus tirtose maitinamosiose terpėse. Vidutinis vieno, maždaug 2 mėnesių amžiaus, regeneranto lapų skaičius buvo 9–12. Dauguma regenerantų turėjo 1–2 šaknis, kiti – visai nesišaknijo.

Daugiafaktorinė dispersinė analizė parodė, kad tirti faktoriai (veislė, maitinamoji terpė ir jų sąveika) yra reikšmingi regenerantų aukščiui (pav.). Pastarojo požymio skirtumų esmingumui labiausiai turi įtakos veislės savybės ( $F = 22,2$ ;  $p = 0,0001$ ), vidutiniškai – maitinamoji terpė ( $F = 17,0$ ;  $p = 0,0001$ ) ir mažiausiai – veislės ir terpės sąveika ( $F = 7,3$ ;  $p = 0,0001$ ).

## Rezultatų aptarimas

Dažniausiai dauginimui audiniai imami iš pumpurų, esančių arčiau stiebo ir taip pat iš šaknų vandens apytakos indų (Taji et al., 1997). Eksplantus stabilizavimui *in vitro* kultūroje reikėtų imti nuo žydėjimo pradžios (Tomsone et al., 2007) iki masinio žydėjimo.

Tai patvirtina ir su mūsų eksperimento rezultatai. Paviršinės infekcijos sumažinimui Lenkijos tyrėjai irgi rekomenduoja naudoti baliklį, HgCl<sub>2</sub> ir 70 % etanolį (Nesterowicz et al., 2006). Augančių *in vitro* sąlygomis augalų pagrindinis mitybos būdas heterotrofinis: augalas iš maitinamosios terpės turi gauti reikalingas mineralines druskas, vandenį ir kitas medžiagas, kurių jis pats pasigaminti negali.



**Pav.** Paprastųjų alyvų veislių, 2 mėnesius augintų skirtingose maitinamose terpėse, aukščio kitimas,  $x \pm Sx$  (a, b, c – esminiai skirtumai tarp maitinamųjų terpių; A, B, C – esminiai skirtumai tarp paprastųjų alyvų veislių, kai  $P < 0.05$ ,  $n = 25$ )

**Fig.** Variation of height of common lilac cultivars after two months of growth in various nutrition media,  $x \pm Sx$  (a, b, c – significant differences between nutrition media; A, B, C – significant differences between common lilac cultivars, when  $P < 0.05$ ,  $n = 25$ )

Dauginant alyvas mikrovegetatyviniu būdu rekomenduojama naudoti Murashigės-Skugo (Murashige, Skoog, 1962) maitinamąją terpę, praturtintą fitohormonais BAP, IAR, Isv R ir 2-ip (Tomsonė et al., 2007) arba BAP ir Isv R (Крючкова, 2011). Mikrovegetatyviškai padaugintos alyvos greičiau pražysta, yra dekoratyvesnės ir atjaunina patį augalą, kurį paskui lengviau dauginami įprastiniais metodais.

### Išvados

1. Paprastųjų alyvų veislių sodinamosios medžiagos gavimui per trumpą laiką tikslinga naudoti mikrovegetatyvinį dauginimą *in vitro*.
2. Eksplantų stabilizavimui *in vitro* kultūroje naudoti Murashige-Skoog maitinamąją terpę, papildant 1 mg/L BAP (6 benzilaminopurinas) ir 0,05 mg/L Isv.R (3-indolilsviesto rūgštis).
3. Tinkamiausia mikrovegetyviniam dauginimui *in vitro* yra Murashige-Skoog maitinamoji terpė, papildyta 0,05 mg/L IAR, 0,05 mg/L ISv.R, 0,1 mg/L – 2-ip ir 0,1 mg/L BAP.

### Literatūra

1. Baronienė V. Pavasarį žydintys sumedėję augalai Dubravos arboretume. *Dekoratyviųjų ir sodo augalų asortimento, technologijų ir aplinkos optimizavimas. Mokslo darbai*, 1(6). Mastaičiai, 2010. P. 19–24.
2. Januškevičius L., Baronienė V. *Lietuvos dendrologinės kolekcijos. Monografija*. Kaunas, 2009.
3. John F., Fiala L. *Lilacs, the genus Syringa*. Portland, Oregon, 1998.
4. Murashige T., Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol Plant*, No. 15, 1962, P. 473–497.
5. Nesterowicz S., Kulpa D., Moder K., Kurek J. Micropagation of an old specimen of common lilac (*Syringa vulgaris* L.) from the dendrological garden at Prezelewiec. *Acta Sci. Pol. Hortorumcultus*, 5(1). 2006. P. 27–35.

6. Sharma V., Fletcher J. Maintenance of shoot and floral meristem – cell proliferation and fate. *Plant Physiol*, No 129(1), 2002, P. 31–39.
7. Skridaila A. *Sumedėjusių augalų introdukcija Vilniaus universiteto botanikos sode 1781–2000 metais* (daktaro disertacija). Vilnius, 2001.
8. Sliesaravičius A., Stanyš V. *Žemės ūkio augalų biotechnologija*. Vilnius, 2005.
9. Taji A., Dood W., Williams R. *Plant tissue culture. Practice (Third edition)*. Armidale, 1997.
10. Tomšonė S., Galeniece A., Akere A., Priede G., Zira L. In vitro propagation of *Syringa vulgaris* L. cultivars. *Biologija*, Vol. 53, No 2, 2007, P. 28–31.
11. Крючкова В. *Биотехнологические приемы оптимизации микрклонального размножения и адаптации генотипов сирени (Syringa vulgaris L.)*. Автореферат канд. дисс. Москва, 2011.

## Micropagation of Common Lilac (*Syringa vulgaris* L.) Cultivars

(Received in January, 2014; Accepted in April, 2014; Available Online from 2<sup>nd</sup> of May, 2014)

### Summary

The common lilacs are very popular plants in Lithuanian landscape. Propagation plants by tissue culture are important for obtaining of large number of lilac plants in a comparatively short time. The goal of our research is to present information about the micropropagation of lilac cultivars growing in the Lilacs exposition collection of Botanical Garden of Vilnius University. The experimental work was carried out at the Biotechnology and Genetics laboratory of Vilnius University Botanical Garden in 2012-2013. The material for the *in vitro* cultures were fragments of the young shoots from the *Syringa vulgaris* L. cultivars ('Adelaide Dunbar', 'Andenken an Ludwig Spath', 'Fraincheur', 'Geant des Batailles', 'Leon Simon', 'Pasteur', 'Paul Hariott', 'Primrose', 'Red Giant', 'William Robinson' and 'Woodland Blue') growing in the exposition collection of our garden. The material intended for the culture stabilization was rinsed under running water for 2 hours, after it was submerged in commercial bleach ACE for 10 minutes, then in 0.05% HgCl<sub>2</sub> and 70% ethylalcohol for 10 minutes. The disinfected fragments of shoots were rinsed in sterile distilled water three times. Explants were grown under white luminescent lamps. The data was analysed by three-way analysis of variance, with the cultivar and growth medium as a fixed factors and the block as the random factor where the normality assumption of data and homogeneity of variance were tested through the Shapiro–Wilk test and Levene test, respectively. *Post hoc* comparisons of means among examined treatment variants were made using Tukey's honestly significant difference (HSD) test at a significance level of  $P < 0.05$ . We recommend using *in vitro* culture for obtaining of planting material of lilac cultivars. The medium used for stabilization and propagation *in vitro* was based on Murashige and Skoog (Murashige, Skoog, 1962) in organic salts and vitamins with 3,0 % sucrose with 1 mg/L BA, 0,05 mg IBA (for stabilisation *in vitro* culture) and with 0,1 mg/L 2-ip and BA, 0,05 mg/L IBA and IAA.