

LATVIJAS VALSTS MEŽZINĀTNES INSTITŪTS «SILAVA»

Augu audu kultūru laboratorija

Elva Girgžde, Baiba Krivmane, Ineta Samsone, Dainis Ruņģis

26.11.2020.

Latvijas valsts mežzinātnes institūts «Silava»



Laboratorijas iekārtojums



Laboratorijas iekārtojums



Laboratorijas iekārtojums



Mūsu laboratorijas uzdevumi



- Āra bērza (*Betula pendula*) klonu kolekcijas uzturēšana un papildināšana
- Bērza klonu pavairošana izmēģinājumu stādījumiem
- Bērza klonu *in vitro* pavairošanas metodes pilnveidošana

Āra bērza klonu kolekcija

- Kolekcijā atrodas 160 bērza klonu.



- Atlasīto bērza klonu pavairošana un izstādīšana. 2019. gadā pavairoti 60 kloni, kopā 16 000 augi.











Mūsu laboratorijas uzdevumi



- Hibrīdapses (*Populus tremuloides* x *Populus tremula*)
- Atlasīto klonu pavairošana izmēģinājumu stādījumiem
- Klonu *in vitro* pavairošanas metodes pilnveidošana

Mūsu laboratorijas uzdevumi

- Citu kokaugu sugu kā, ķirši (*Prunus*), ceriņi (*Syringa*), kolekciju uzturēšana un pavairošana.



Mūsu laboratorijas uzdevumi

- Somatiskās embriogēnēzes metodes pētniecība un izstrāde parastajai eglei (*Picea abies*).



Dažādu projektu īstenošana sadarbojoties ar citām laboratorijām. Pašlaik aktīvie projekti.

- Meža koku selekcijas pētījumi ģenētiski augstvērtīga meža reprodūktīvā materiāla atlasei. Tehnoloģija ģenētiskā ieguvuma efektīvai pārnesei stādu ražošanā un mežkopībā.
- Saldā ķirša (*Cerasus avium* Moench. syn. *Prunus avium* L.) pavairošanas tehnoloģiju aprobācija un perspektīvāko klonu atlase produktīvu lietkoksnes stādījumu ierīkošanai Latvijas klimatiskajos apstākļos.
- Īpaši pielāgotu LED gaismekļu izstrāde efektīva un energoefektīva kokaugu pavairošanas un apsākņošanas procesa nodrošināšanai.
- Molekulāro marķieru izstrāde juvenilitātes novērtēšanai āra bērza (*Betula pendula* Roth) mikropavairošanas laikā.

Molekulāro marķieru izstrāde juvenilitātes novērtēšanai āra bērza (Betula Pendula Roth) in vitro kultūrās mikropavairošanas laikā.

Fundamentālā un lietišķā pētījuma
Nr. Izp-2019/1-0387.



FLPP
FUNDAMENTĀLIE UN
LIETIŠĶIE PĒTĪJUMU
PROJEKTI

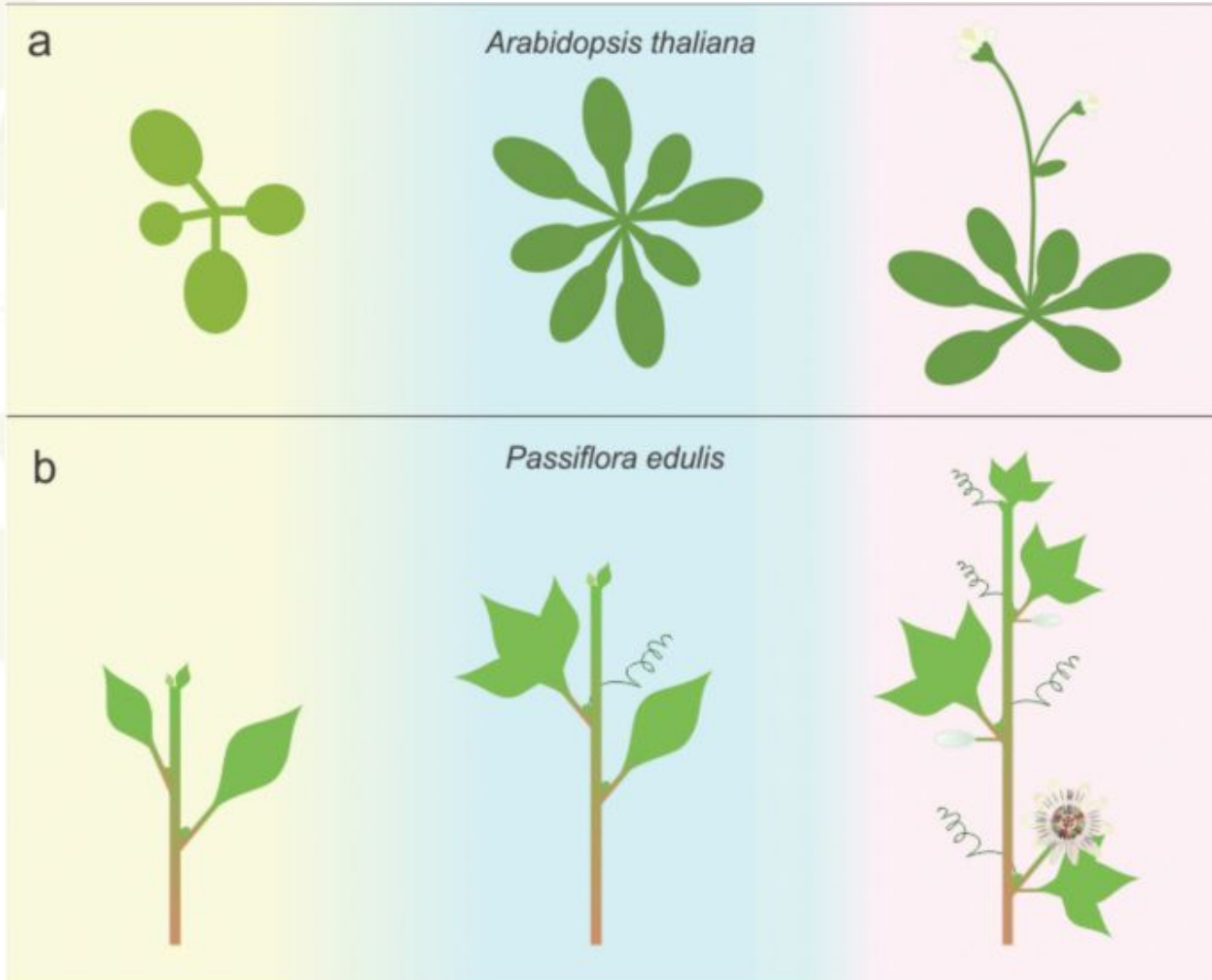
Pētāmais objekts

- Āra bērzs (*Betula pendula*) ir saimnieciski nozīmīga koku suga Latvijā un citviet Eiropā
- Latvijā bērzus veģetatīvi pavairo selekcijas vajadzībām un augstvērtīga sēklu materiāla iegūšanai, piemēram, plēves seguma siltumnīcās.



Plēves seguma siltumnīca Jaunkalsnavā, sēklu iegūšana no atlasītiem bērziem

Aktualitāte: juvenilitāte



Aktualitāte: juvenilitāte

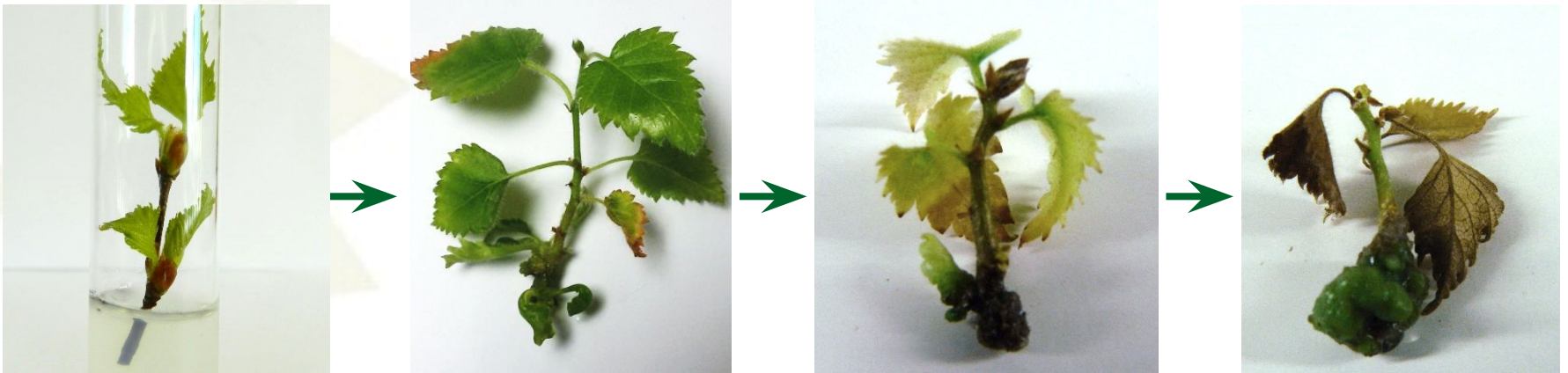
Kokiem atšķirībā no lakstaugiem raksturīgas nozīmīgas pārmaiņas pārejot no juvenīlās uz nobriedušo fāzi, kas izraisa rekalcitanci *in vitro*

- Lēna augšana
- Izteikta sezonāla dzinumu augšana
- Biezi, lignificēti šūnapvalki, palielināta fenolu un citu sekundāro metabolītu sintēze
- Paaugstināta oksidatīvo enzīmu aktivitāte

Kultivēšanas laikā notiek pakāpeniska dzinumu rejuvenilizācija



Nobriedušu dzinumumu bojāeja pēc ievadīšanas

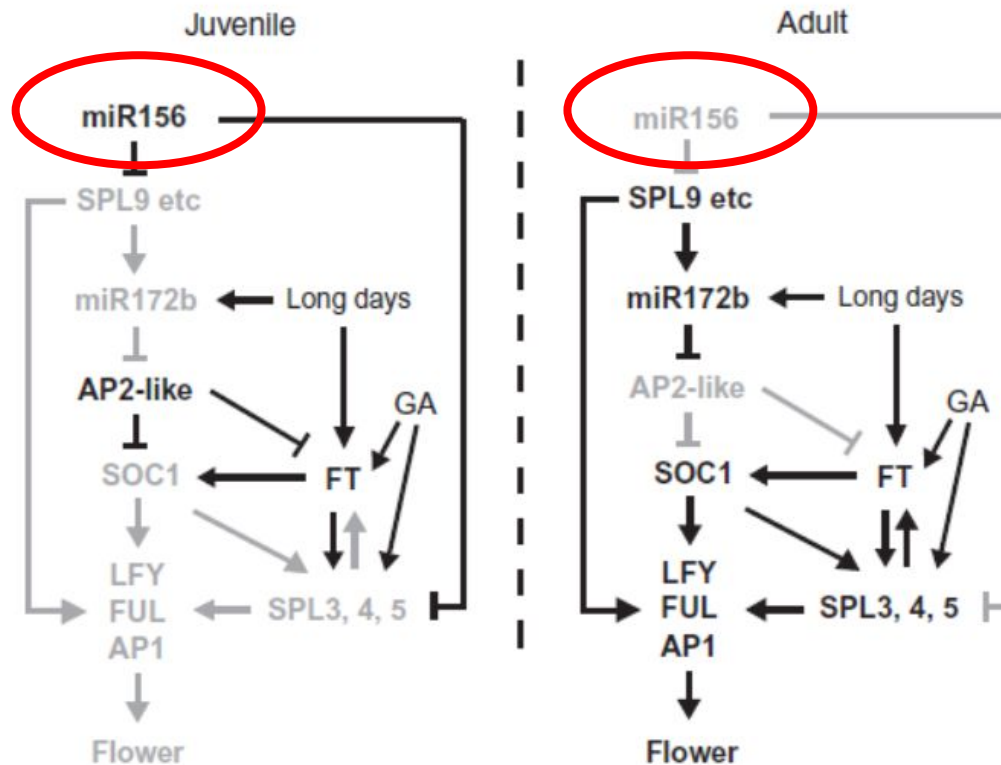
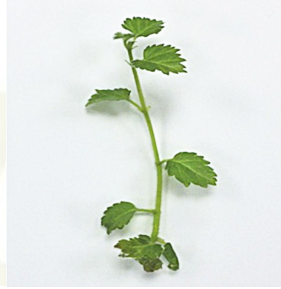


Trūkst fizioloģisku zināšanu par notiekošajiem procesiem





- Šie dzinumi atšķiras, gan morfoloģiski, gan anatomiski, gan **molekulāri**.



Darba uzdevumi

1. Morfoloģisko, anatomisko un fizioloģisko pazīmju novērtēšana āra bērza *in vitro* nobriedušos, rejuvenilizētos un juvenīlos dzinumos.
 2. miRNS un ekspresēto gēnu identificēšana sējeņos (juvenīlā kontrole), pieaugušā bērzā (nobriedusī kontrole), un bērza *in vitro* dzinumos.
 3. Pārbaudīt izveidotos marķierus uz 10-15 bērzu *in vitro* genotipiem ar dažādu augšanas potenciālu.
 4. Izpētīt rejuvenilizācijas mehānismu potētajos bērzos izmantojot molekulāros marķierus.
-

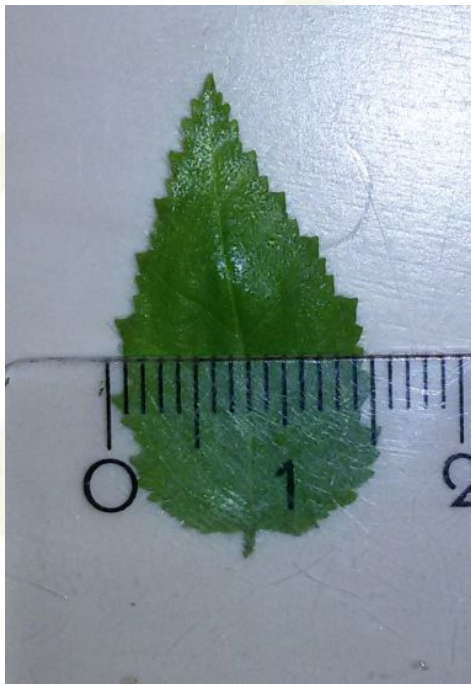
Morfoloģiskās un anatomiskās atšķirības

Tika salīdzināti 12 nobrieduši un rejuvenilizēti kloni un trīs sējeņu kloni.

- Lapu garums, platums, platuma un garuma attiecība
- Atvārsnīšu skaits lapas apakšējā epidermā
- Trihomu skaits lapas augšpusē un apakšpusē
- Trihomu skaits uz lapas kātiņa un stumbra
- Stumbra un lapu anatomisko struktūru atšķirības

Lapu morfoloģija

Nobrieduši



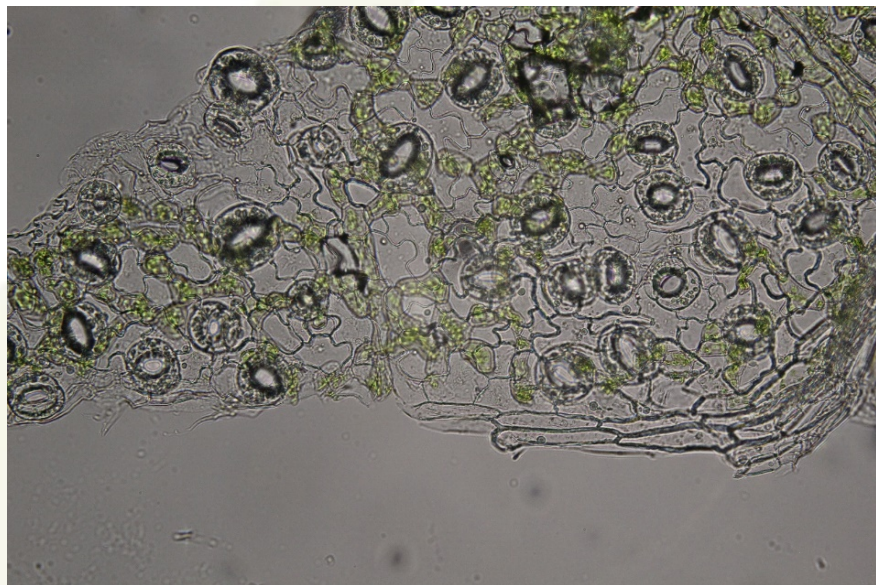
Rejuvenilizēti



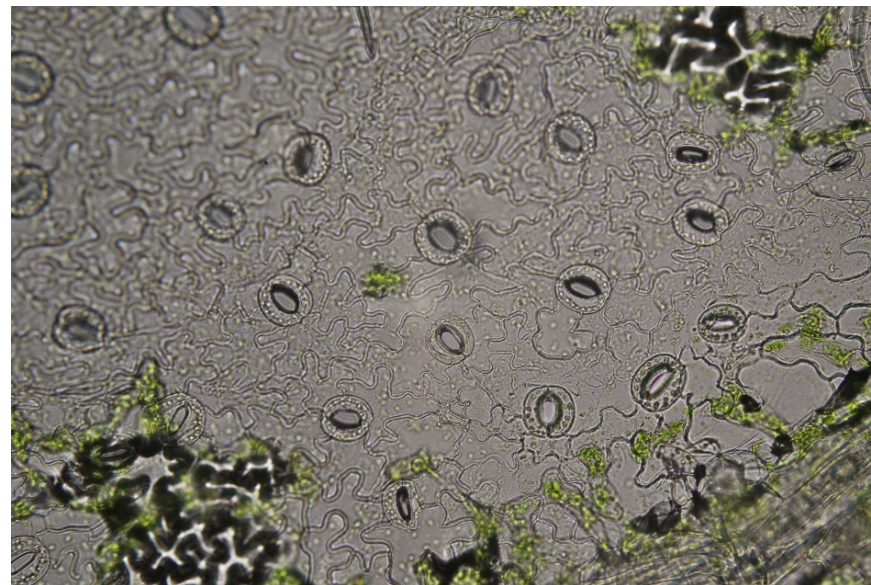
Juvenīli



Atvārsnīšu skaits



Nobrieduši un rejuvenilizēti



Juvenīli sējeņi

Trihomu skaits uz stumbra

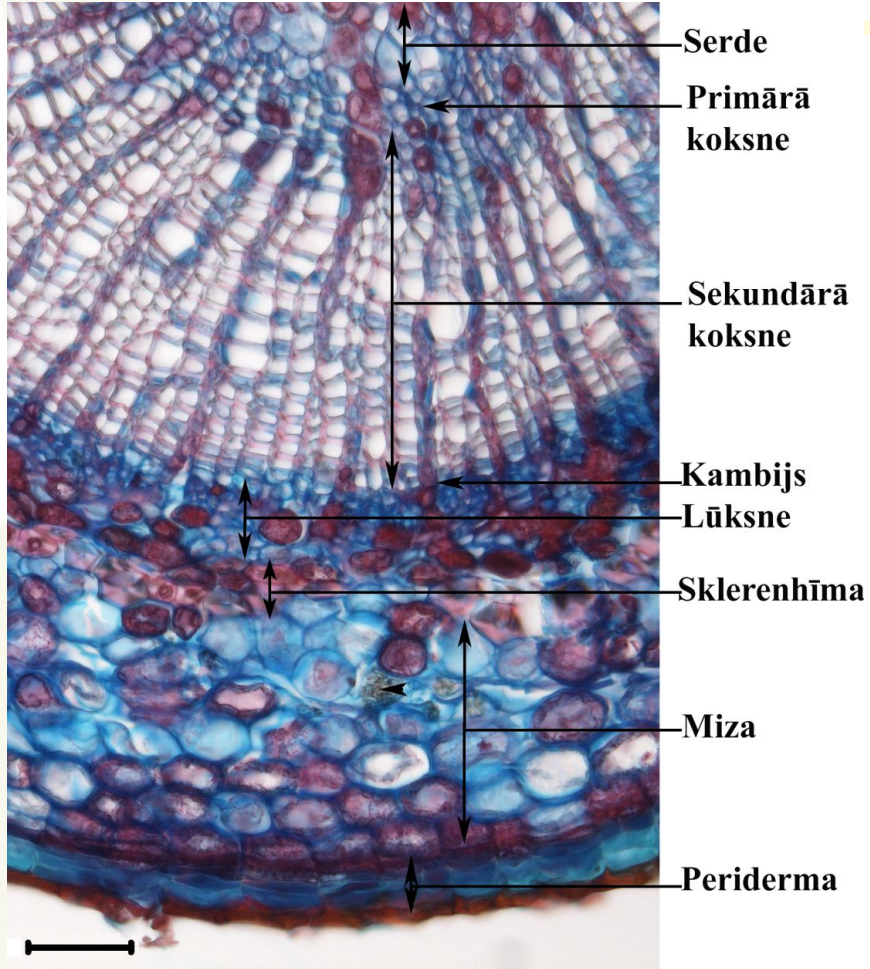


Nobrieduši un rejuvenilizēti

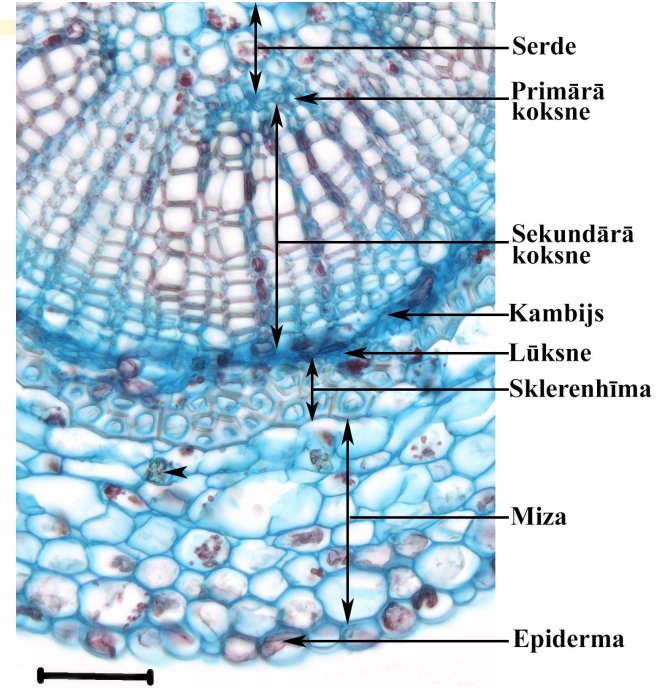


Juvenīli sējeņi

Stumbra anatomija

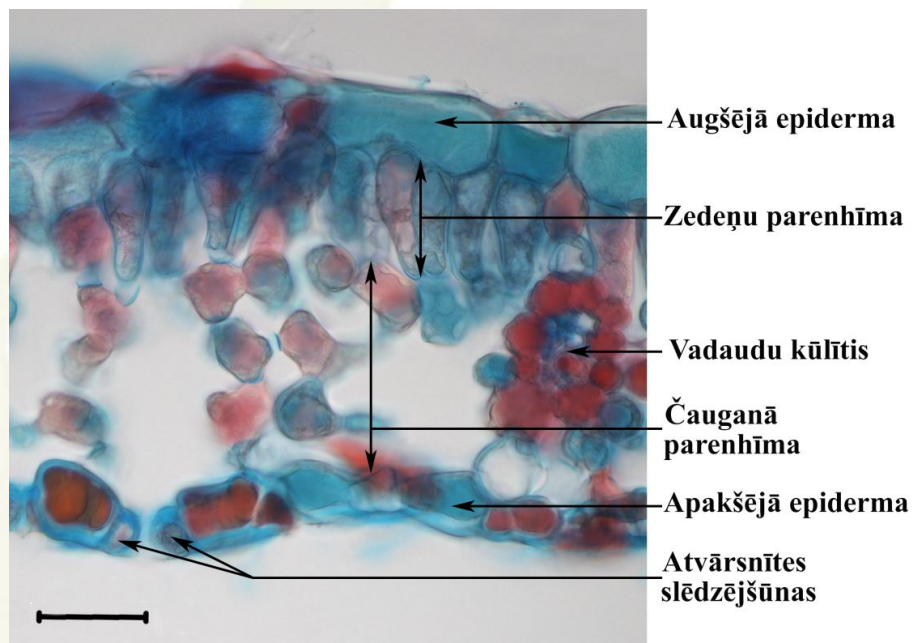


Nobrieduši

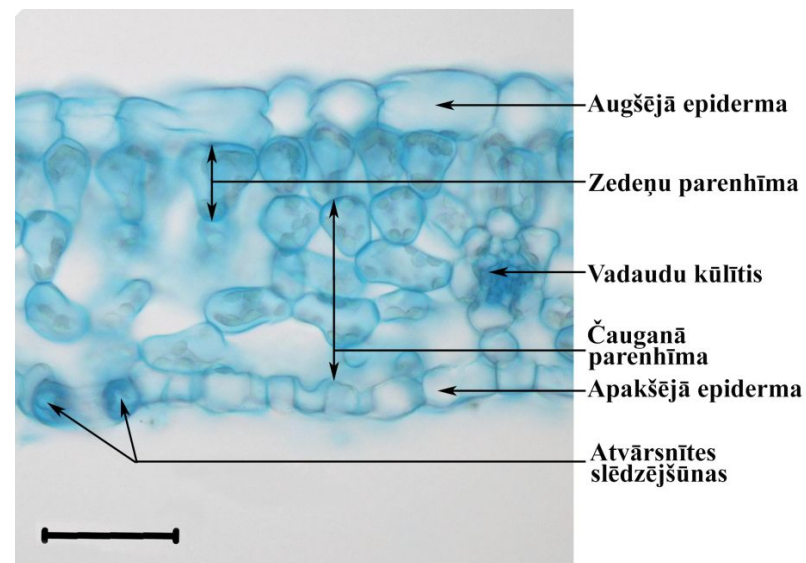


Rejuvenilizēti un juvenīli sēņi

Lapu anatomija



Nobrieduši

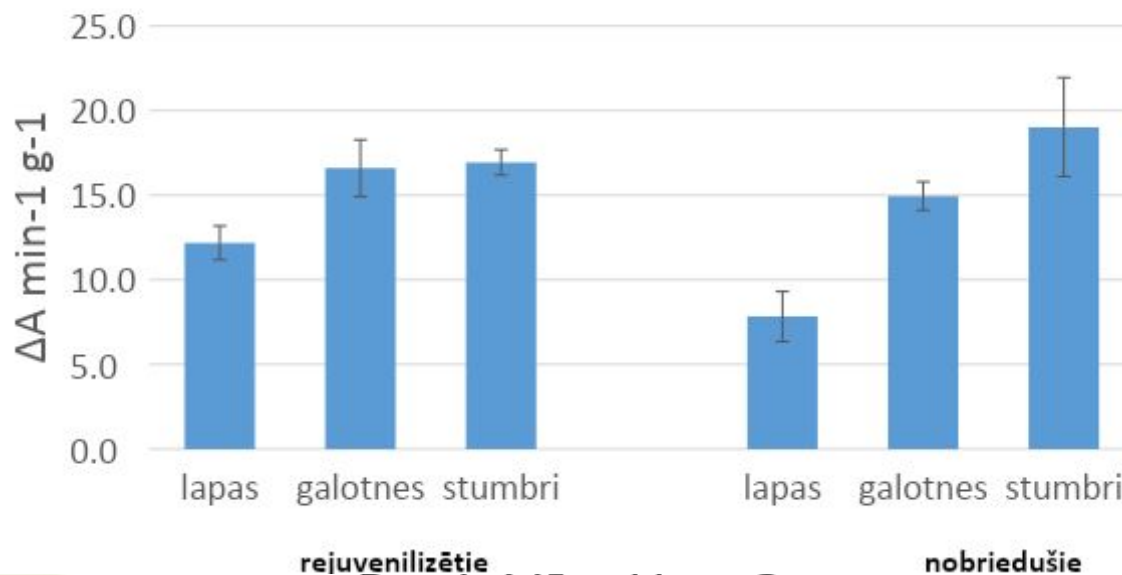


Rejuvenilizēti un juvenīli

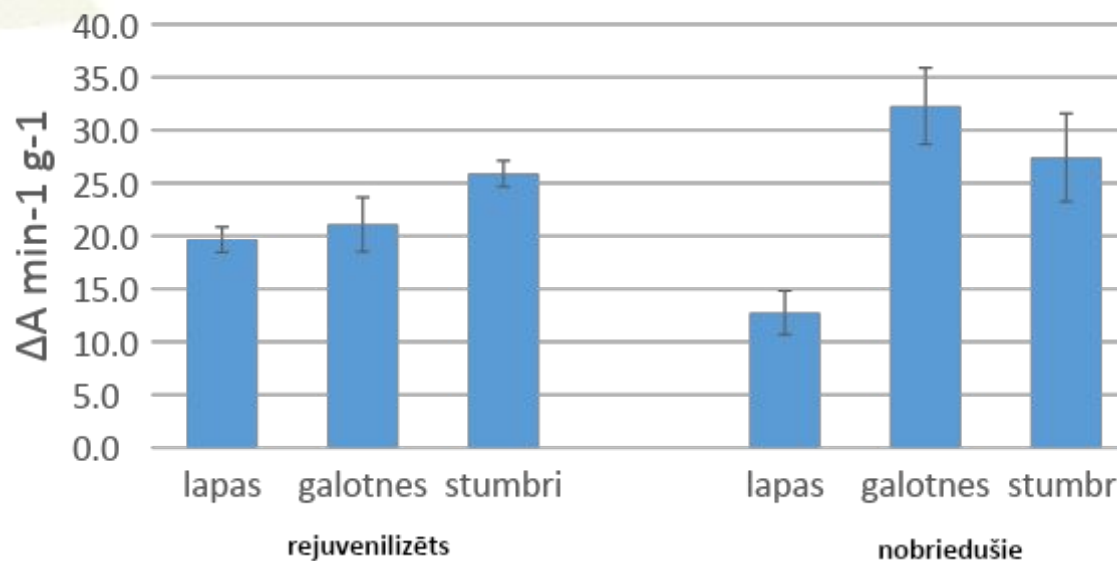


SILAVA

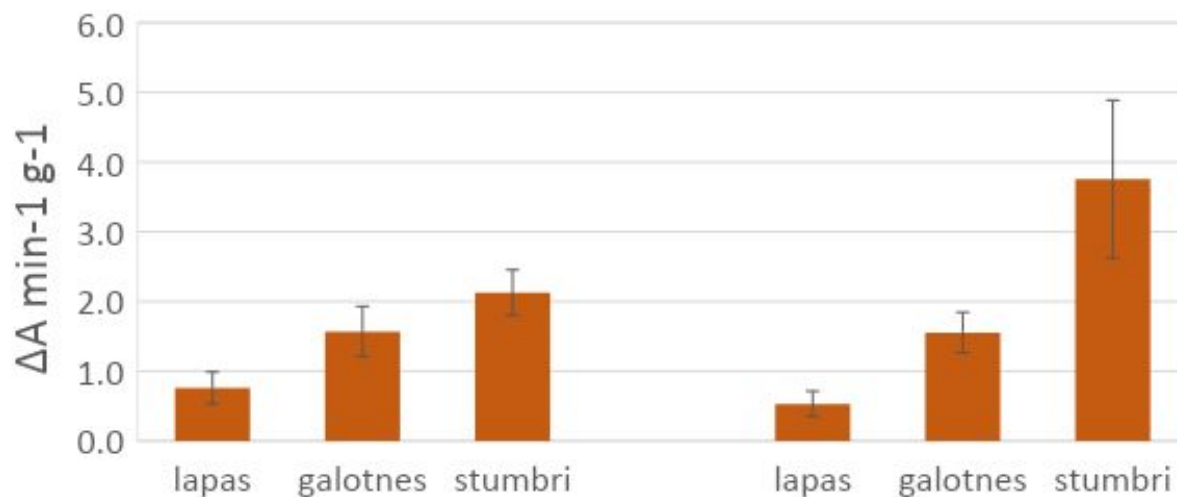
Peroksidāze klons 1



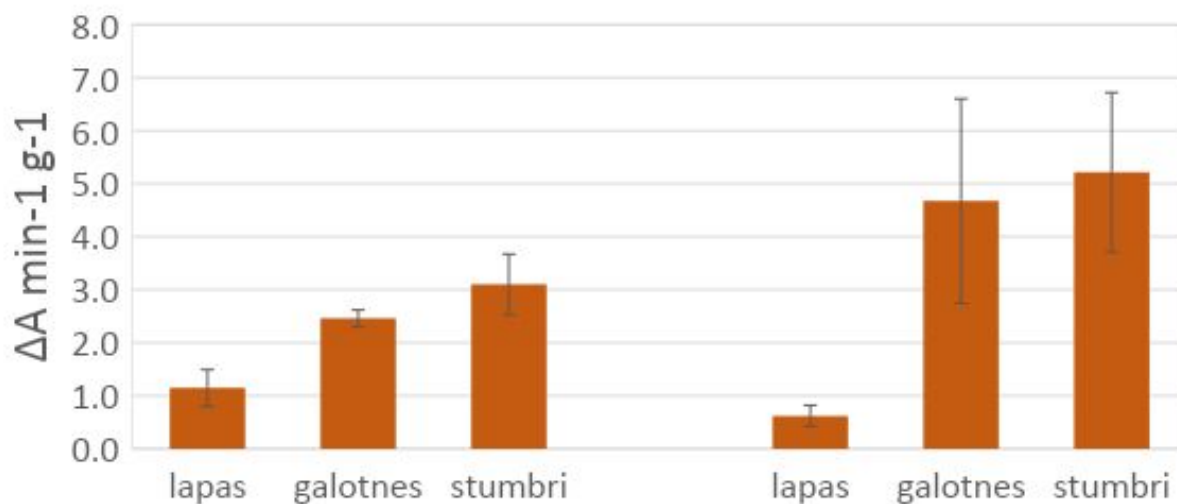
Peroksidāze klons 2



Polifenoloksidāze klons 103-3



Polifenoloksidāze klons 55-417



Molekulārais darbs

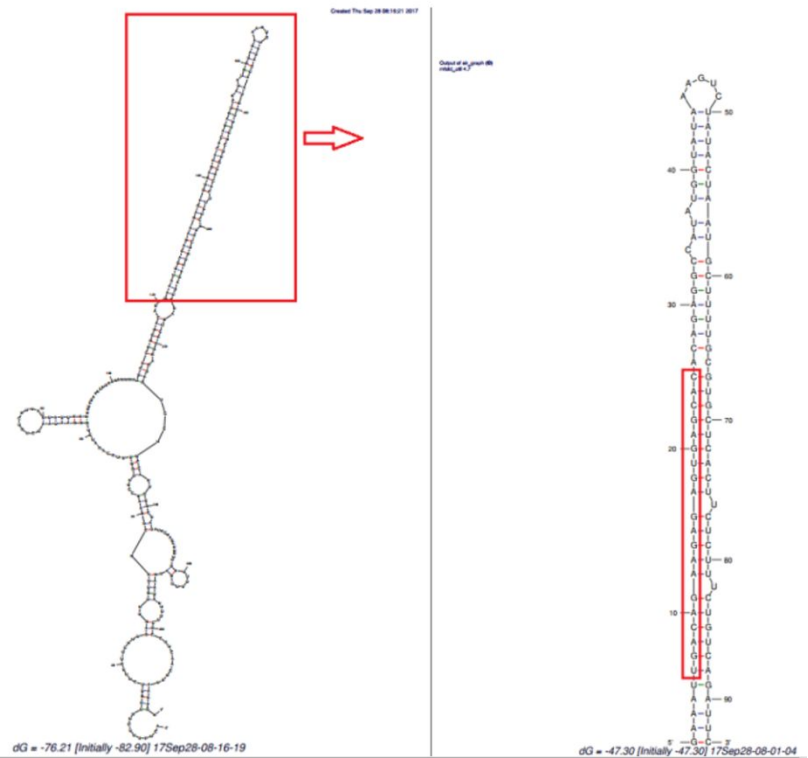
miRNS atlase un praimeru izveide

1. miR156/157 un miR172 izoformu atlase miRBase (<http://www.mirbase.org/>).
2. Pre-miRNS atrašana un pierādīšana, izmantojot āra bērza EST (<https://genomevolution.org>) un miRbase atrastās miRNS un pre-miRNS.

IZGRIEZTS NO BĒRZA SEQ Contig511 Location: 10521-10540

TTGACAGAAGAGAGTGAGCAC
 TGACAGAAGAGAGTGAGCACA
 TGACAGAAGAGAGTGAGCAC
 GACAGAAGAGAGTGAGCACA
 TGACAGAAGAGAGTGAGCAC
 GACAGAAGAGAGTGAGCACA
 TGACAGAAGAGAGTGAGCA
 GACAGAAGAGAGTGAGCAC
 TTGACAGAAGAGAGTGAGCAC
 TGACAGAAGAGAGTGAGCA
 GACAGAAGAGAGTGAGCAC
 TGACAGAAGAGAGTGAGCA
 GACAGAAGAGAGTGAGCAC

ACTTTTTTTTTGTTCTTTCTTTGAGTTTGTTCGCTGAATCCTTTGGTTTCCACATCTGGGAATAAG
 CTGTCTTTATTATTCCTTTTCTAATTTCTGTTT**GTTCCTGGGACATAGAAAT**TGACAGAAGAGAGT
GAGCAC[ACAGAGGCCATATGGTATAA]AGTCTATACTAATGCTTTT**GCGTGCTCACTTCTCTTTCT**
GTCAGATTCCAGTCCCGGAGGAGTCCCTGCCATTGTTCCAGATCCTATCTTTTTTCTTTTTTGATGAA
 TATTTTTCTCCTTCAACTTCAACAGC



dG = -76.21 [Initially -82.90] 17Sep28-08-16-19


dG = -47.30 [Initially -47.30] 17Sep28-08-01-04

3. Pre-miRNS praimeru izveide (Primer 3, <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>).
4. miR156/157 un miR172 mērķa gēnu pārbaude, izmantojot psRNATarget (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>).

psRNATarget: A Plant Small RNA Target Analysis Server (2017 Update) [\[Visit The Previous Version, 2011 Release\]](#) Home Analysis Download Help Citation Contact

Analysis result

Scoring Schema: *Schema V2 (2017 release)*

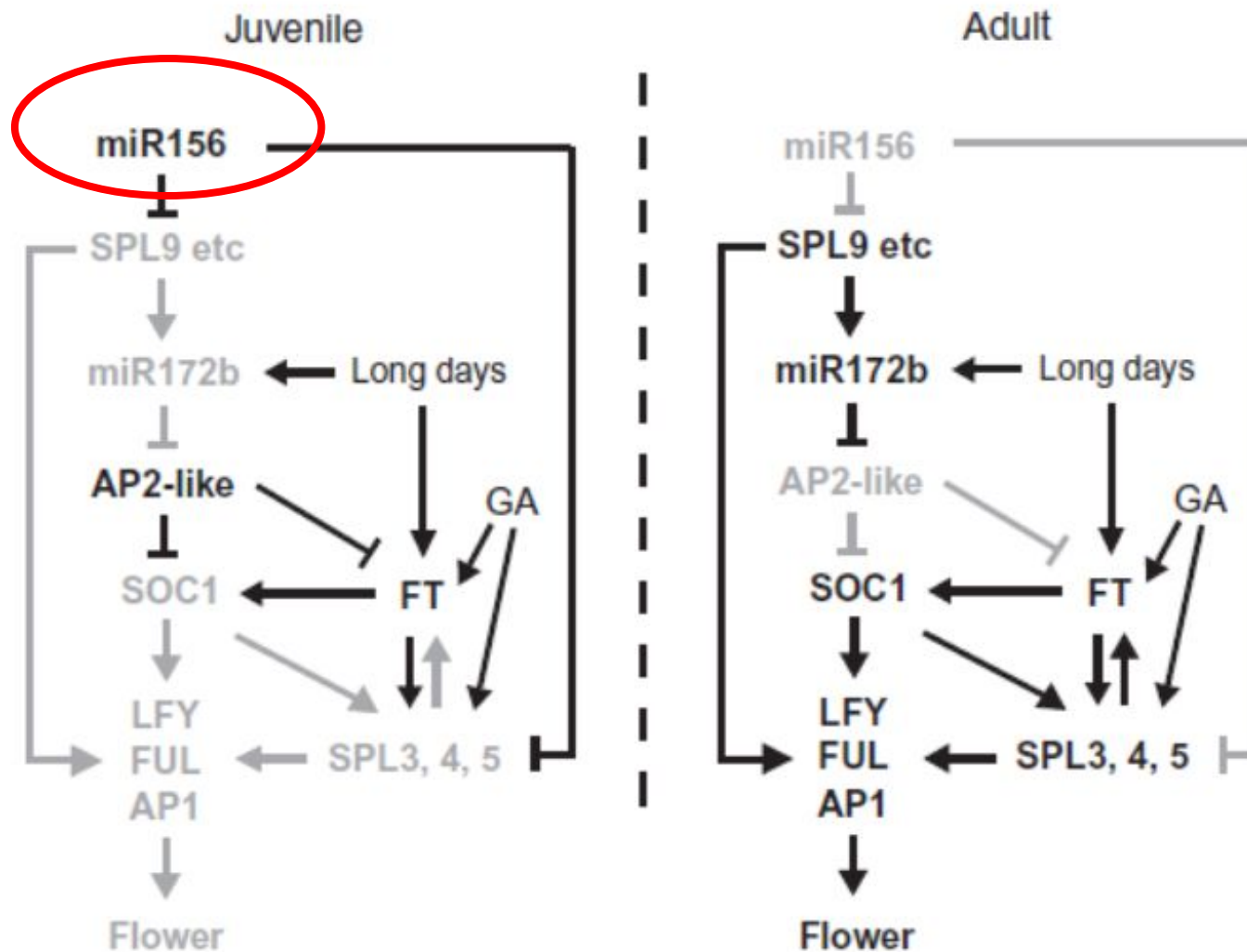
Download:  Filtering by keywords: expect: UPE: Sorting by: Expectation(E) miRNA Acc.

2 Rows Page 1/1

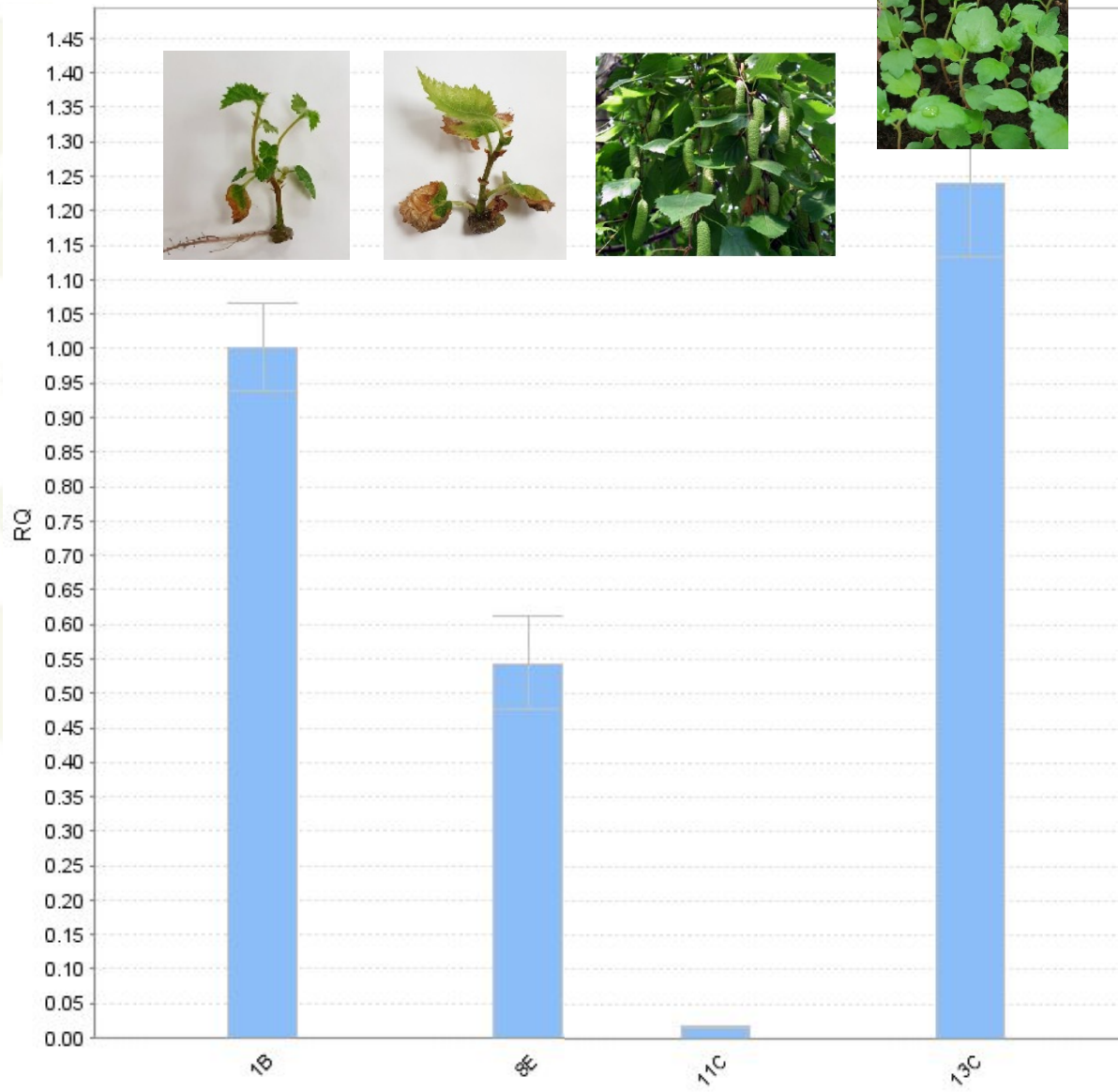
miRNA Acc.	Target Acc.	Expect	UPE	Alignment	Target Description	Inhibition	Multiplicity
TGACAGAAGAGAGTGAGCAC	TC140187	1.0	N/A	miRNA 20 CACGAGUGAGAGAAGACAGU 1 ::::: :::::::::::::: Target 727 AUGCUCUCUCUCUCUGUCA 746	similar to UniRef100_Q84JE4 Cluster: Squamosa promoter binding like-protein; n=1; Betula pendula Rep: Squamosa promoter binding like-protein - Betula verrucosa (White birch) (Betula pendula), partial (80%)	Cleavage	1
TGACAGAAGAGAGTGAGCAC	TC183201	1.0	N/A	miRNA 20 CACGAGUGAGAGAAGACAGU 1 ::::: :::::::::::::: Target 905 UUGCUCUCUCUCUCUGUCA 924	similar to UniRef100_Q52UU1 Cluster: Squamosa promoter binding-like protein; n=1; Betula platyphylla Rep: Squamosa promoter binding-like protein - Betula platyphylla, partial (74%)	Cleavage	1

5. SPL and AP2-like mērķa gēnu sekvenču meklēšana - NCBI datubāzē (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) un salīdzināšana ar bērza EST.
6. Mērķa gēnu praimeru izveide (Primer 3, <http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>).

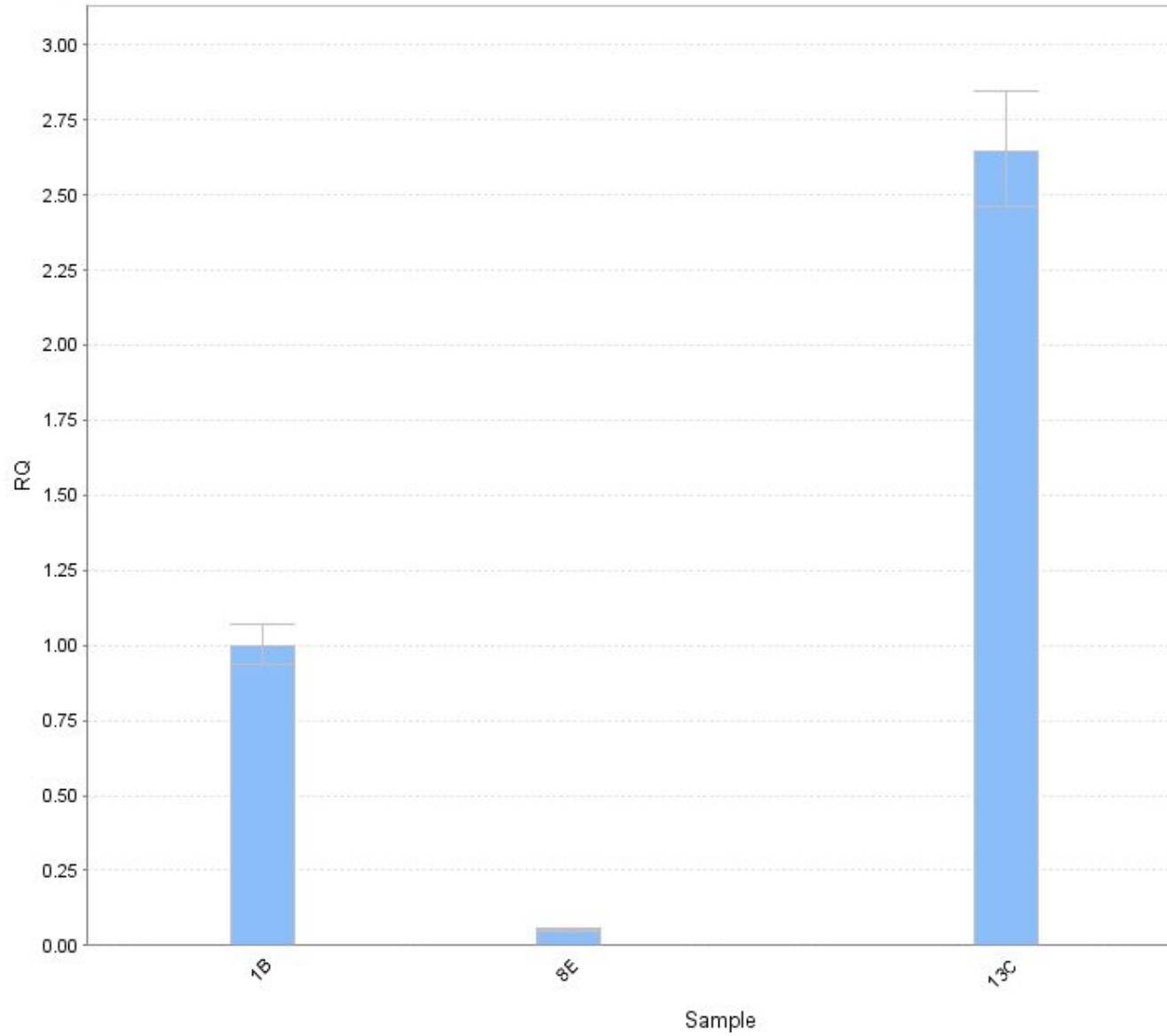
Rezultāti



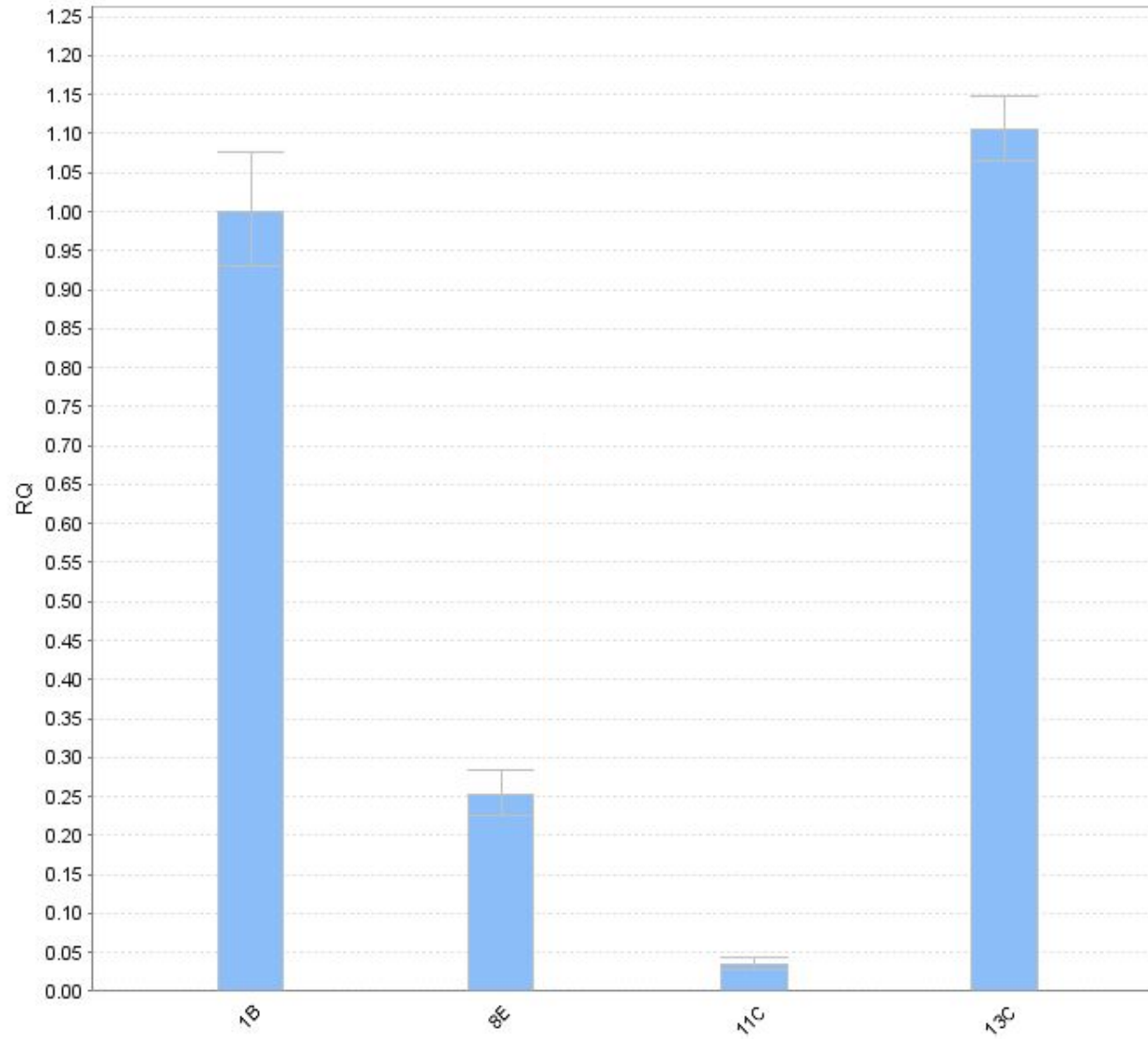
miR156_511



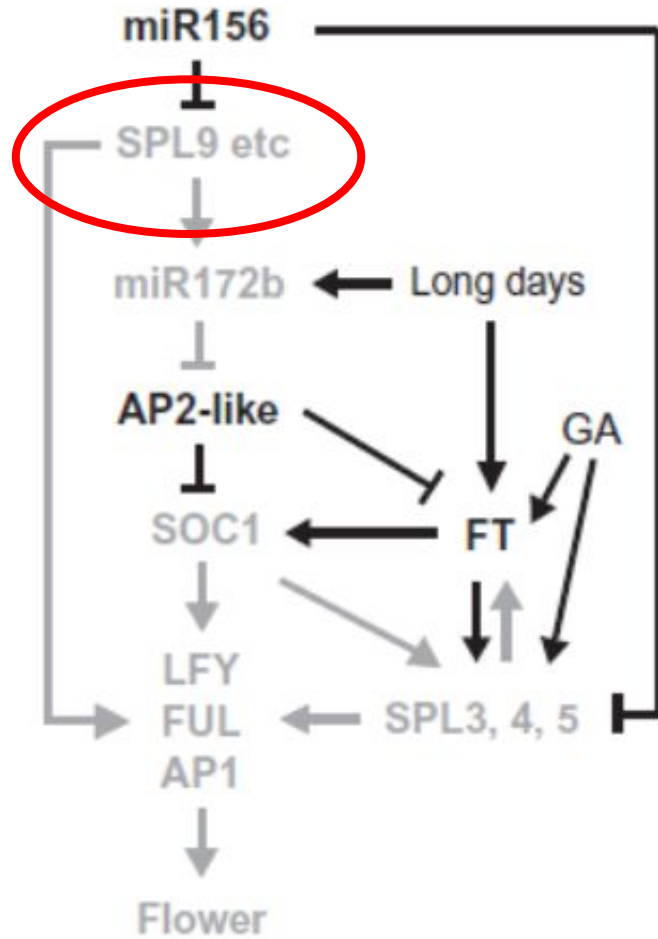
miR156_789



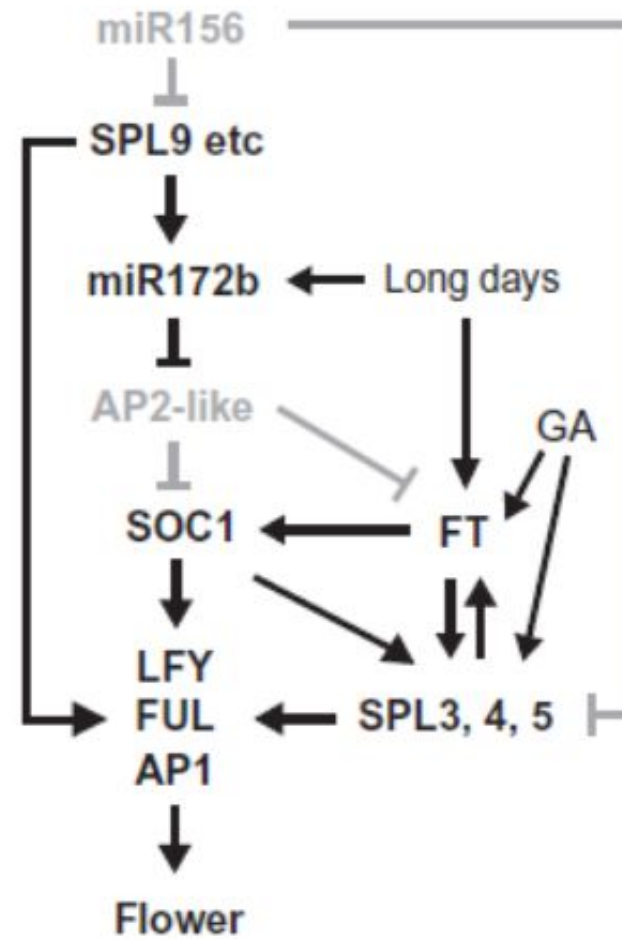
miR156_374



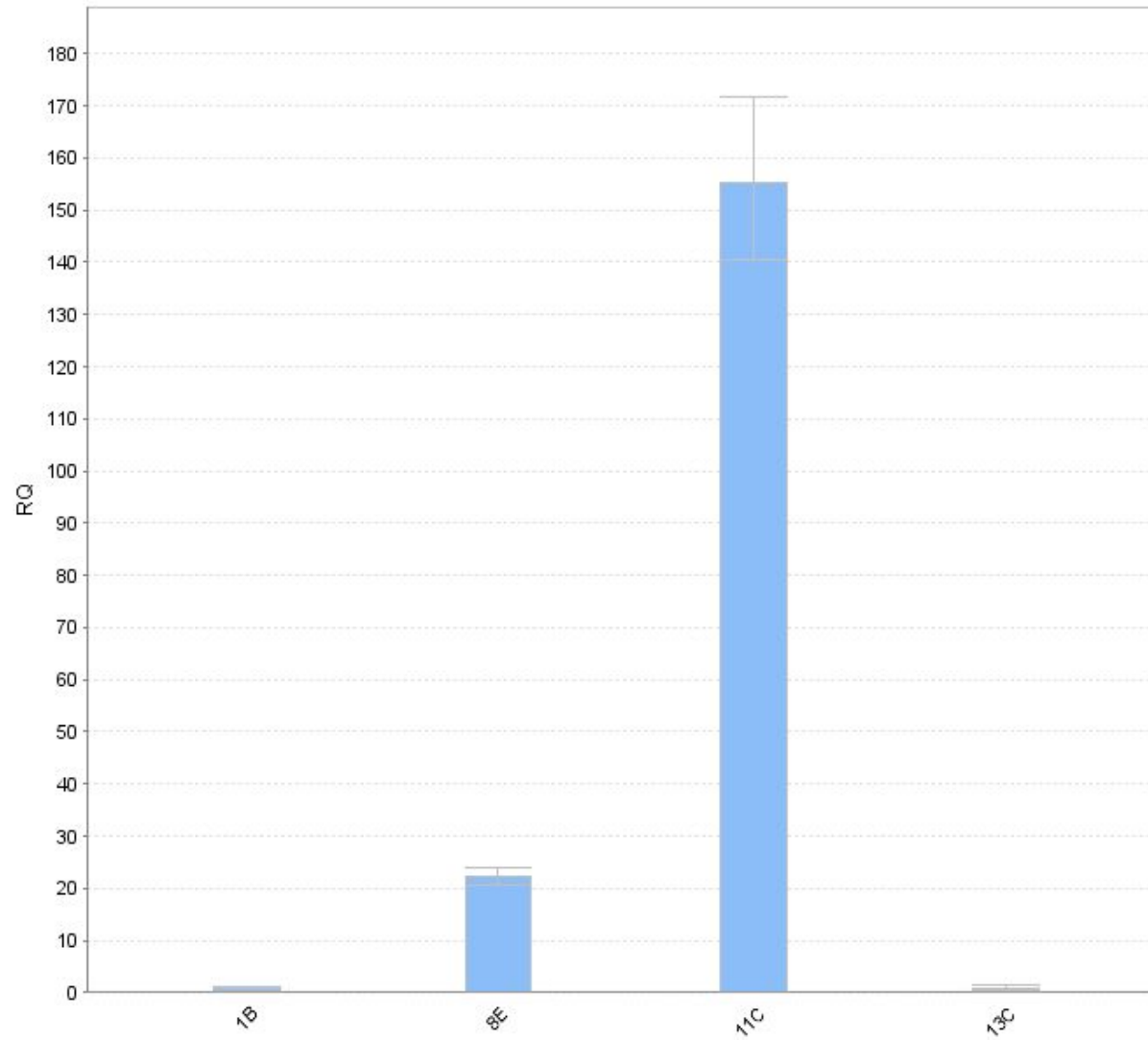
Juvenile



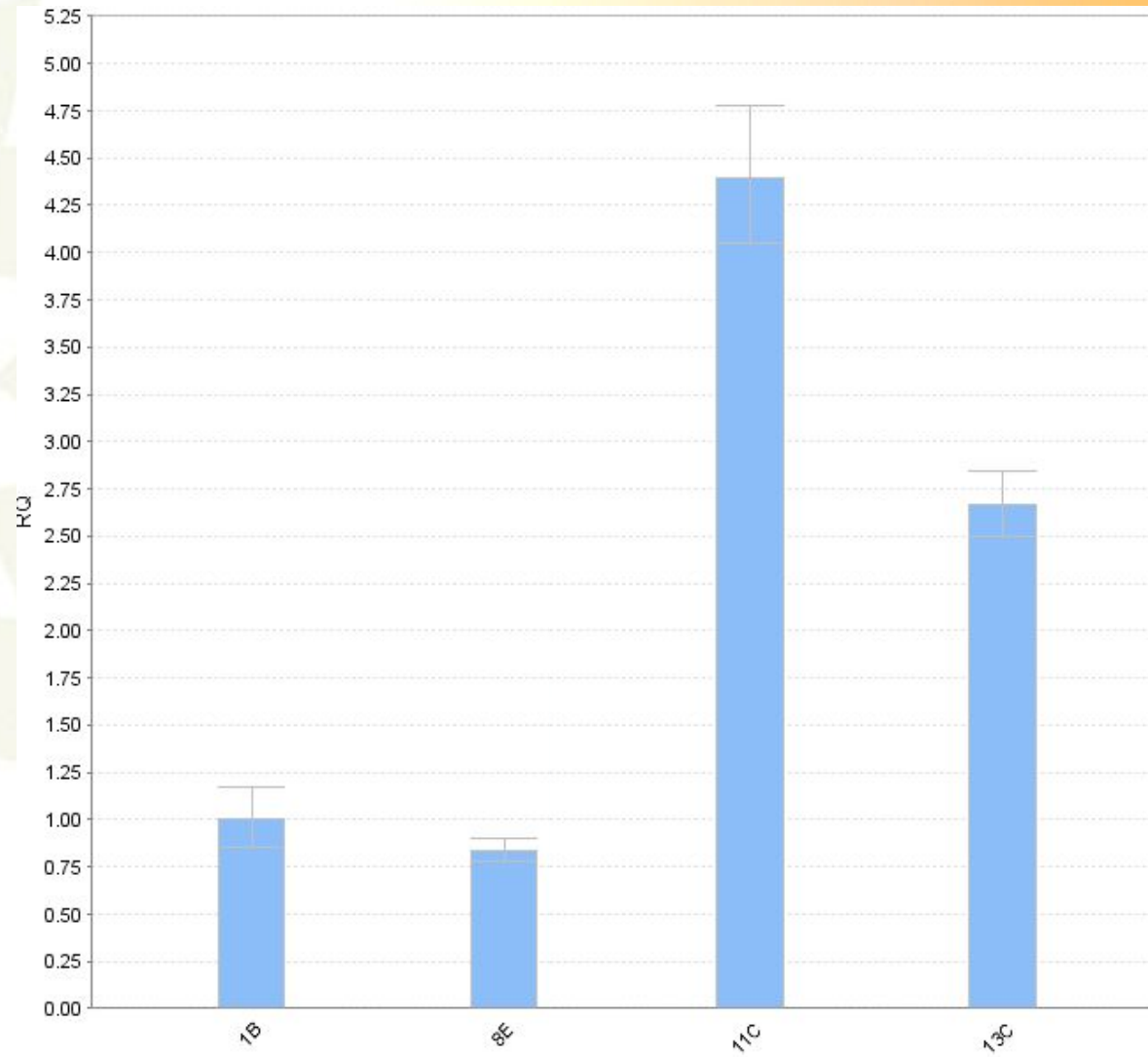
Adult



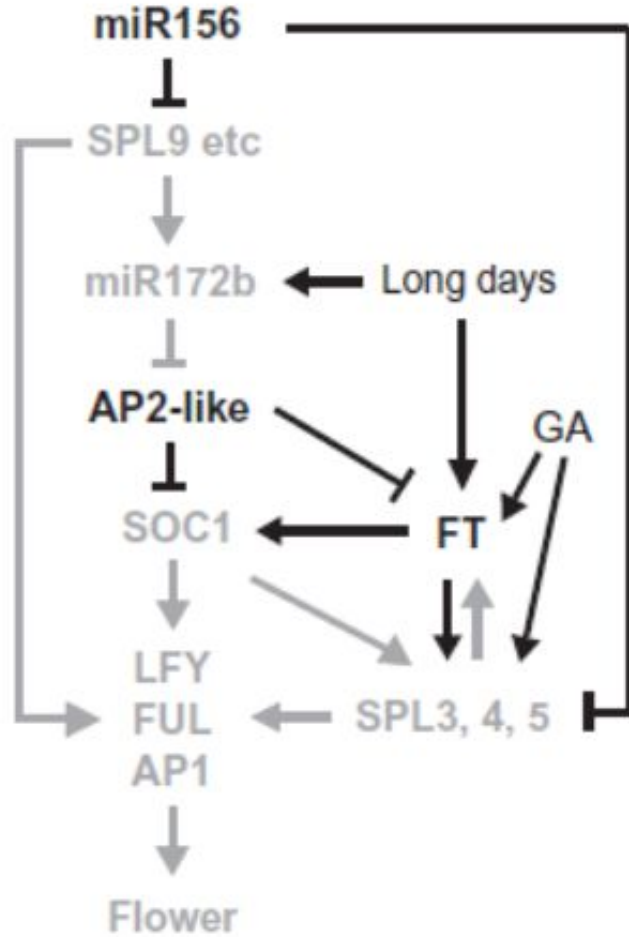
SPL1



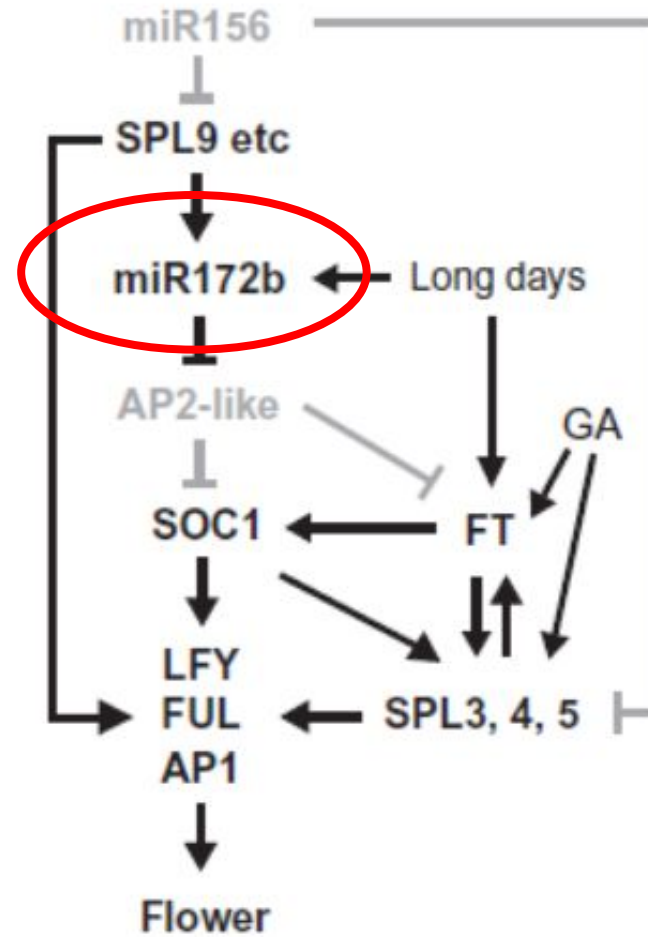
SPL9



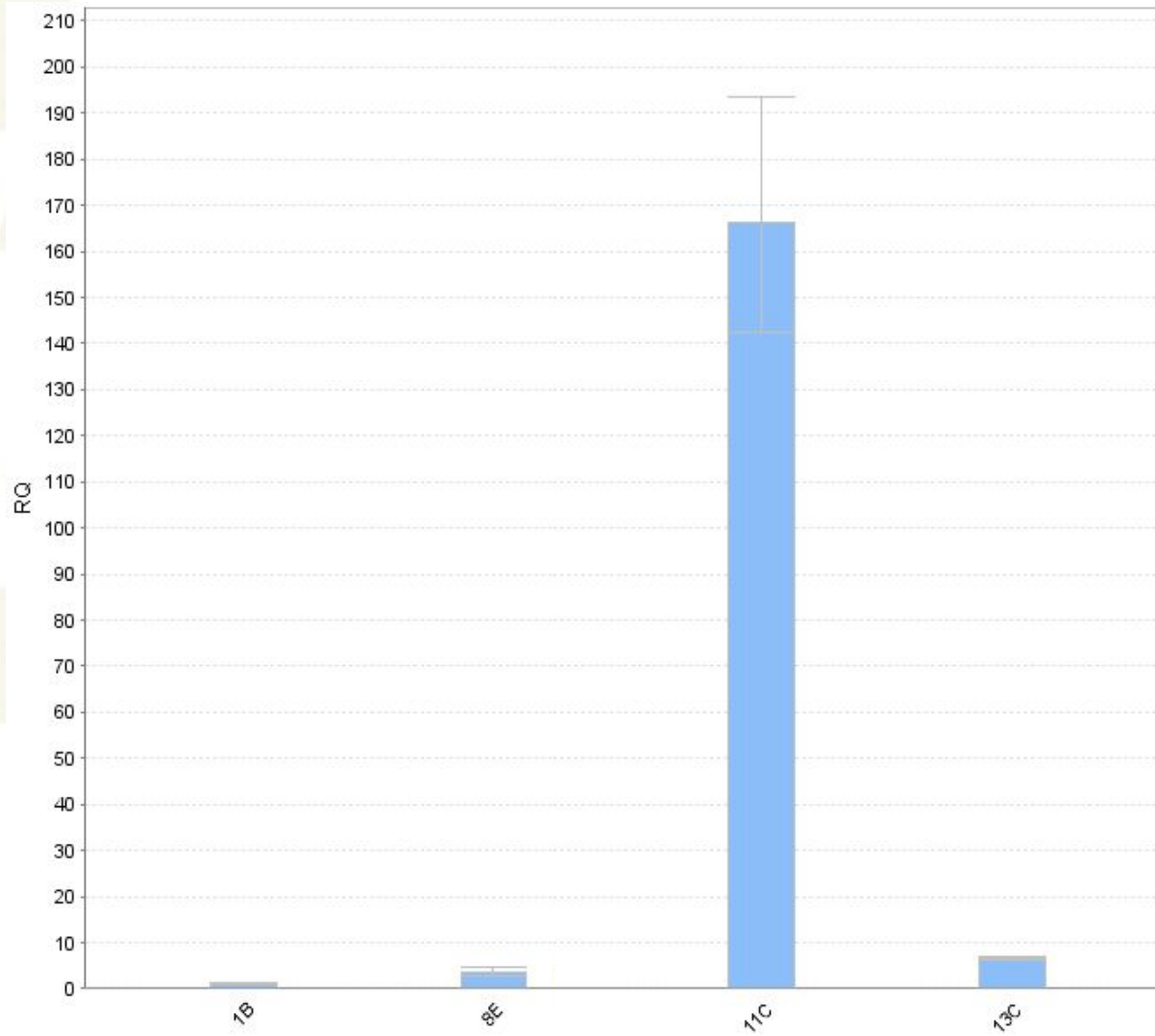
Juvenile



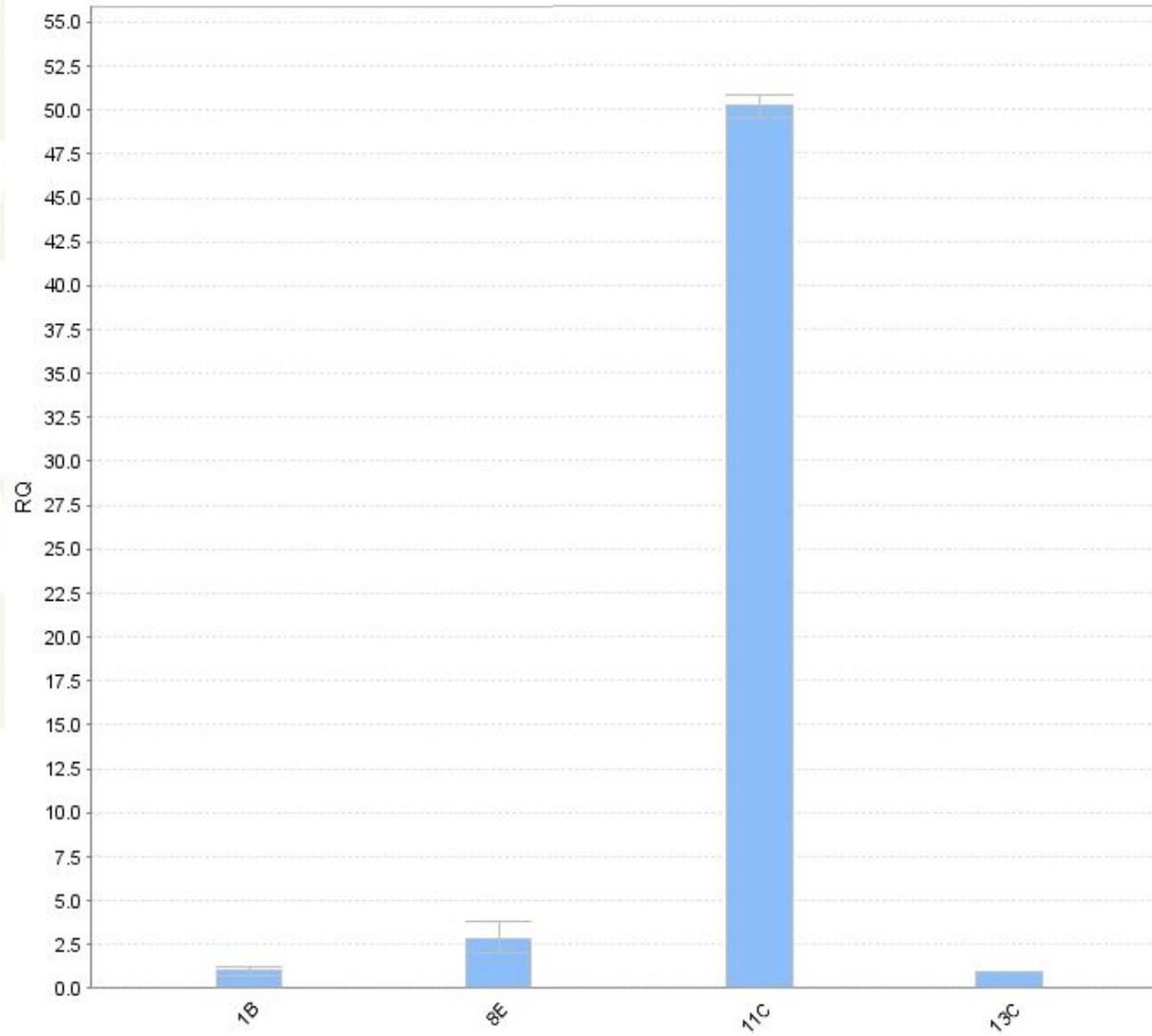
Adult



miR172_1931



miR172_42



Turpmākie uzdevumi

1. Pārbaudīt izveidotos marķierus uz 10-15 bērzu *in vitro* kloniem nobriedušiem un rejuvenilizētiem dzinumiem.
2. Izpētīt rejuvenilizācijas mehānismu potētajos bērzos izmantojot izveidotos molekulāros marķierus.

Paldies par uzmanību!