

Latvijas Universitāte

SIGNE TOMSONE

***RHODODENDRON L. ĢINTS AUGU
KALLUSOĢENĒZE UN KALLUSA KULTŪRAS
ĪPATNĪBAS IN VITRO***

Disertācija
bioloģijas doktora
zinātniskā grāda iegūšanai



Darba zinātniskie vadītāji:

Dr. hab. biol., prof R. Kondratovičs

Dr. biol. D. Gertnere

Rīga 1997

Saturs

	lpp.
Ievads	1
1. Literatūtas apskats	3
1. 1. Kallusa kultūra	3
1. 1. 1. Kallusa kultūras raksturojums	3
1. 1. 2. Kallusoģenēzi un kallusa kultivēšanu ietekmējošie faktori	7
1. 1. 2. 1. Bioloģiskais materiāls	7
1. 1. 2. 2. <i>In vitro</i> kultivēšanas vide	8
1. 1. 2. 2. 1. Barotne	8
1. 1. 2. 2. 2. Fizikālie faktori	12
1. 1. 3. Rododendru kallusa kultūra	13
1. 2. <i>In vitro</i> kultūras attīstības potenciālie bioķīmiskie rādītāji	15
1. 3. Peroksidāzes bioķīmiskais un fizioloģiskais raksturojums	20
1. 4. Katalāzes fizioloģiskais un bioķīmiskais raksturojums	23
1. 5. Fenola savienojumu bioķīmiskais un fizioloģiskais raksturojums	26
2. Materiāls un metodes	32
2. 1. Kallusa kultūras iegūšana	34
2. 2. Organoģenēzes etapu noteikšana	35
2. 3. Ogļhidrātu kvantitatīvā analīze	36
2. 4. Peroksidāzes aktivitātes noteikšana	37
2. 4. 1. Peroksidāzes aktivitātes noteikšana izmantojot gvajakolu kā substrātu	37
2. 4. 2. Peroksidāzes aktivitātes noteikšana izmantojot benzidīnu kā substrātu	38
2. 5. Peroksidāzes izoformu lokalizēšana	39
2. 6. Katalāzes aktivitātes analīze	40
2. 7. Fenola savienojumu analīze	40

3.	Rezultāti un to analīze	42
3. 1.	Rododendru kallusa kultūras iegūšana	42
3. 1. 1.	Dažādu orgānu eksplantu kallusoģenēze	42
3. 1. 2.	Minerālsāļu, fitohormonu, pH, barotnes konsistences un fotoperioda ietekme uz kallusa veidošanos un attīstību	49
3. 1. 3.	Dažādu taksonu rododendru kallusoģenēze	58
3. 1. 4.	Rododendru gada attīstības cikla ietekme uz ziedu eksplantu kallusoģenēzi	62
3. 1. 5.	Kallusa proliferācijas stimulēšana	76
3. 2.	Peroksidāzes kvalitatīvais un kvantitatīvais sastāvs rododendru dažādu taksonu kallusus atkarībā no kultivēšanas apstākļiem	79
3. 3.	Katalāzes aktivitāte kallusus atkarībā no to kultivēšanas apstākļiem	93
3. 4.	Fenola savienojumi rododendru kallusus	101
	Nobeigums	111
	Secinājumi	114
	Literatūra	116

SAĪSINĀJUMU UN TERMINU SKAIDROJUMS

BAP	6-benzilaminopurīns
2,4-D	2,4-dihlorfenoksietikskābe
IES	indolil-3-etikskābe
IPA	N ⁶ -(Δ^2 -izopentenil)adenīns
NES	1-naftiletikskābe
PVPP	polivinilpolipirolidons

Eksplants: izolēta audu vai orgānu daļa, ko izmanto *in vitro* kultūru iegūšanai.

Nekroze: lokāla audu atmiršana.

Neorganogēns kalluss: proliferējošs kalluss, no kura nediferencējas orgāni.

Organogēns kalluss: kalluss, no kura veidojas, vai var veidoties dažādi auga orgāni.

Proliferācija: šūnu, audu vai orgānu vairošanās *in vitro*.

Subkultivēšana: šūnu un audu pārstādīšana no vienas barotnes otrā.

Taksons: jebkurš no grupējumiem augu klasifikācijas ietvaros, piemēram, ģints, suga, šķirne, hibrīds.

Vitrifikācija: šūnu hiperhidrācija - to var izraisīt augsta citokinīnu koncentrācija barotnē, šķidra barotne un citi faktori.

IEVADS

Termins "kalluss" apzīmē nediferencētu vai mazdiferencētu audu un šūnu neorganizēti augoša amorfu masu, kas veidojas gan *in vivo*, gan *in vitro*. *In vivo* kallusa veidošanās notiek ievainojuma vietā. *In vitro* tas tiek uzskatīts par vienu no kultūru veidiem, kallusa veidošanos no eksplantiem stimulē gan ievainojums, gan *in vitro* kultivēšanas apstākļi. Kallusa kultūru izmanto dažādu teorētisku un praktisku uzdevumu risināšanai. Piemēram, augu pavairošanā; sekundāro vielu iegūšanā; selekcijā - transgēno augu iegūšanai, pret dažādiem stresa faktoriem izturīgu formu veidošanai; šūnu un protoplastu kultūru iegūšanā; dažādu morfoloģisko procesu - dediferenciācijas, reģenerācijas, kā arī fizioloģisko procesu pētīšanā.

Kallusa veidošanās *in vitro*, tā proliferācijas un reģenerācijas potences ir ģenētiski noteiktas. Dažādu taksonu augiem atšķiras arī morfoģenētiskos procesus stimulējošie *in vitro* vides apstākļi. Tos parasti noskaidro empīriski - daudzu eksperimentu rezultātā. Pašlaik arvien lielāka uzmanība tiek pievērsta bioķīmisko un fizioloģisko rādītāju izmaiņu pētīšanai, lai izskaidrotu novērotās atšķirības *in vitro* kultūru attīstībā, ļautu to prognozēt un vadīt, optimizējot kultivēšanas apstākļus. Šajā sakarā īpaša uzmanība tiek veltīta antioksidatīvo fermentu, pigmentu, fenola savienojumu kvalitatīvajai un kvantitatīvajai analīzei, kas dod informāciju par morfoģenēzes procesu norisi un audu un šūnu reakciju uz dažādiem apkārtējās vides faktoriem.

Rhododendron L. ģints augiem subkultivējamas kallusa kultūras iegūšana līdz šim nav aprakstīta. Tomēr kallusa kultūras izmantošana pavērtu jaunas iespējas darbā, kas saistīts ar rododendru selekciju, pavairošanu un morfofizioloģisko procesu īpatnību analīzi. Latvijas Universitātē jau apmēram 40 gadus nodarbojas ar *Rhododendron* L. ģints augu vispusīgu pētīšanu dažādos virzienos - introdukcija, aklimatizācija, selekcija, pavairošana, anatomija, morfoloģija, fizioloģija. Šim nolūkam darbs ir organizēts LU Augu audu kultūru laboratorijās (AAKL) un LU Rododendru selekcijas un izmēģinājumu audzētavā "Babīte". Viens no pašreizējiem AAKL uzdevumiem ir rododendru

subkultivējamas kallusa kultūras iegūšana. Tādēļ šim darbam tika izvirzīts mērķis: noskaidrot rododendru kallusoģenēzes un kallusa kultūras attīstību ietekmējošos faktoros un attīstību raksturojošos morfofizioloģiskos rādītājus.

Atbilstoši mērķim tika izvirzīti šādi darba uzdevumi:

- noskaidrot dažādu orgānu un audu eksplantu kallusoģenēzes potenci, gada attīstības cikla un kultivēšanas apstākļu ietekmi uz *Rhododendron* L. ģints augu kallusa kultūras iegūšanu un proliferāciju;
- analizēt peroksidāzes, katalāzes un fenola savienojumu sastāvu dažādu *Rhododendron* L. ģints augu kallusos atkarībā no kultivēšanas apstākļiem.

1. LITERATŪRAS APSKATS

1. 1. Kallusa kultūra

1. 1. 1. Kallusa kultūras raksturojums

Kallusa kultūra ir viens no *in vitro* kultūru veidiem, ko var raksturot kā neorganizēti augošu mazdiferencētu šūnu vai audu amorfu masu. Tās attīstībā izšķir trīs etapus [Pierik, 1987]:

- kallusoģenēze, jeb kallusa veidošanās;
- kallusa proliferācija;
- reģenerācija - organoģenēze vai embriogēnēze.

Pirmajā kallusoģenēzes etapā notiek specializēto eksplanta šūnu dediferenciācija, ko var inducēt ievainojums [Калинин, 1980; Бутенко и др., 1987] vai eksplanta novietošana uz proliferāciju veicinošas barotnes, kas satur auksīnus vai citokinīnus [Бутенко, 1975; Кордюм и др., 1980; Bhojwani, 1983]. Jau R. Butenko (1975; 1987) savos apskatos min, ka dediferenciācijas procesā šūnas redeterminējas, tajās inducējas spēja intensīvi dalīties.

Šajā etapā šūnās notiek dažādas anatomiski - morfoloģiskas un bioķīmiskas izmaiņas. Novērots endoplazmatiskā tīkla, Goldži kompleksa elementu, polisomu un brīvo ribosomu daudzuma pieaugums [Бутенко, 1975; Кордюм и др., 1980], kā arī kodoliņu skaita un izmēru palielināšanās [Бутенко, 1975] un mitohondriju apjoma samazināšanās [Кордюм и др., 1980]. Ja eksplantā ir meristemātiskās šūnas, tajās var izbeigties mitoze. *In vitro* šīs šūnas palielinās apjomā, zaudē meristemātisko šūnu formu, mainās to kodola un citoplazmas struktūra [Crèvecoeur et al., 1992] un tikai tad notiek dalīšanās, kas noved pie kallusa audu veidošanās [Бутенко и др., 1987].

Dediferenciācijas laikā šūnās notiek rezerves barības vielu izmantošana [Бутенко, 1975] un audu specifisko olbaltumvielu izžušana [Бутенко и др., 1987]. Pastiprinās t-RNS un r-RNS, DNS un dalīšanās procesā esošām šūnām raksturīgu olbaltumvielu sintēze [Бутенко и др., 1975; 1987]. Novērotas izmaiņas fermentu aktivitātē, piemēram, katalāzes [Siminis et al., 1994]. E. Bensons [Benson et al., 1992] izvirza hipotēzi, ka dediferenciācijas laikā tiek

veicināta brīvo radikālu veidošanās, tātad ir paaugstināta oksidatīvā stresa varbūtība. Eksperimenti ir parādījuši, ka kallusoģenēzes intensitāte atkarīga no taksona, ekshalntu veidojošo audu un orgānu veida, to attīstības pakāpes, *in vitro* kultivēšanas fizikālajiem un ķīmiskajiem faktoriem un citiem apstākļiem [Калинин, 1980; Румянцева и др., 1989]. No vienas puses šie faktori, īpaši ar vidi saistītie, var veicināt aktīvo skābekļa formu veidošanos, bet no otras puses - ietekmēt antioksidatīvās aizsargsistēmas aktivitāti. Ir pierādījumi, ka oksidatīvais stress ir viens no iespējamiem iemesliem šūnu nekrozei un citām parādībām, kas ir novērojamas gadījumos, kad *in vitro* kultūra ir grūti iegūstama [Siminis et al., 1994]. Tas liek domāt, ka šādos gadījumos dediferenciācijas laikā kāds no biotiskajiem vai abiotiskajiem faktoriem ir veicinājis papildus aktīvā skābekļa formu veidošanos un oksidatīvā stresa iestāšanos. Tomēr jāreķinās ar atsevišķām tendencēm, kas novērotas *in vitro* kultūru attīstībā, piemēram, biežāk brūnē kokaugu nekā lakstaugu eksplanti [Zimmerman, 1985].

Dediferenciācijas procesā nobriedušās, specializētās šūnas, zaudējot savu specializāciju, atgriežas juvenīlā stāvoklī [Бутенко и др., 1974; 1975; 1987; Narayanaswamy, 1988]. Domājams, ka faktors, kas nosaka rejuvenilizāciju, atrodas citoplazmā. Uz to norāda izdarītie eksperimenti ar nobriedušu šūnu kodolu pārvietošanu uz juvenīlu šūnu citoplazmu, kā rezultātā juvenīla kļūst visa šūna [Bonga, 1982]. Tomēr rejuvenilizācijas mehānisms vēl nav pilnībā noskaidrots [Chen, 1990], nav atklāta arī šī procesa bioķīmiskā daba [Pierik, 1990]. Ir atsevišķi mēģinājumi rejuvenalizētus audus raksturot ar peroksidāžu, fenola savienojumu saturu [Pierik, 1990]. Dediferencētas, rejuvenalizētas šūnas dalās intensīvi, tām ir liels augšanas un dalīšanās potenciāls, īpašos apstākļos tās spēj reģenerēt orgānus vai embrijus [Pierik, 1987].

Otrajā - kallusa kultūras attīstības etapā sākas intensīva dediferencēto šūnu proliferācija un veidojas kalluss [Бутенко, 1975]. Kallusā ir nediferencēti vai mazdiferencēti audi, visbiežāk kalluss nav homogēns un tajā ir gan diferencēti, gan nediferencēti audi vienkopus [Hussey, 1986; Kyte, 1987; Cachita et al., 1990]. Neorganizētā masa sastāv no parenhimatiskām šūnām

[Thimann, 1977; Калинин, 1980; Dornelas et al., 1992]. Parasti proliferācijas stimulēšanai citokinīni un/vai auksīni ir nepieciešami zemākā koncentrācijā nekā kallusoģenēzei [Калинин, 1980; Pierik, 1987]. Subkultivējot kalluss proliferē un to var kultivēt *in vitro* neierobežoti ilgi [Бутенко, 1975; Narayanaswamy, 1988].

Kallusu morfoloģijā, pigmentācijā un augšanas intensitātē ir novērotas atšķirības [Бутенко и др., 1987; Narayanaswamy, 1988]: audi var būt kompakti vai irdeni, balti vai krāsaini [Калинин, 1980; Кордюм и др., 1980; Narayanaswamy, 1988]. Jāatzīmē, ka viena taksona ietvaros tas var būt atkarīgs no eksplanta pozīcijas augā, no mātesauga augšanas apstākļiem *in vivo*, kā arī *in vitro* kultivēšanas apstākļiem [Hussey, 1986; Narayanaswamy, 1988], subkultivēšanas ilguma un eksplanta audu fizioloģiskā stāvokļa [Hussey, 1986]. Kultivējot, kallusa morfoloģija var mainīties [Румянцева и др., 1989].

In vitro šūnas var saglabāt daļu sugai, indivīdam, orgānam un audiem raksturīgās iezīmes. To apliecina kaut vai sekundāro produktu sintēze [Бутенко, 1975; Урманцквa, 1988]. Subkultivēšanas laikā ir iespējama mutāciju rašanās [Boxus, 1987; Табацкая и др. 1988]. Ja kalluss pastiprināti uzņem ūdeni var veidoties vitrificēti audi [Murashige, 1990]. Vitrifikācija biežāk notiek šķidrās bartotnēs, vai arī, ja barotnē ir liela citokinīnu koncentrācija [Pierik, 1987]. Šajā etapā, pēc vairākām subkultivēšanām, var notikt arī kallusu "pierašana" - kalluss kļūst irdens un tā proliferācijas stimulēšanai nav nepieciešami auksīni un/vai citokinīni. Iespējams, ka šajos gadījumos šūnās notikušas antioksidatīvo fermentu aktivitātes izmaiņas [Hagege et al., 1992; Le Dily et al., 1993^(b)], un veidojušies fitohormonu biosintēzei nepieciešamie fermenti [Thimann, 1977]. Uzskata, ka "pierašana" var veidoties epiģenētisku izmaiņu [Бутенко и др., 1987; Gaspar et al., 1992^(a)] vai mutāciju rezultātā [Бутенко и др., 1987]. Ja kallusu izmanto augu pavairošanai, tad subkultivēšanas laikā tas nedrīkst zaudēt reģenerācijas potenciālu - tam jā saglabā ģenētiskā stabilitāte, jo iegūtajam materiālam jābūt ģenētiski identam ar izejas materiālu.

Trešajā kallusa kultūras attīstības - reģenerācijas - etapā notiek šūnu un audu rediferenciācija: veidojas adventīvie orgāni vai notiek somatiskā

embriogēze. Šī etapa pamatā ir šūnu totipotences teorija, kas nosaka, ka šūna ir mazākā bioloģiskā vienība, saturoša ģenētisko informāciju, kas ļauj reģenerēt veselu augu, ja tā atrodas atbilstošā vidē [Bhojwani et al., 1983; Boxus, 1987]. Lai šī iedzimtā totipotences spēja izpaustos, diferencētām šūnām vispirms jādediferencējas, un tikai tad var notikt rediferenciācija [Bhojwani et al., 1983]. Jāatzīmē, ka rediferenciācija iespējama arī tieši no dediferencētām šūnām, apejot kallusa fāzi [Bhojwani et al., 1983; Kyte, 1987]. Lai inducētu reģenerāciju, nepieciešamas izmaiņas kultivēšanas apstākļos. Klasiskais F. Skuga darbs [Skoog et al., 1957] ar tabakas kallusa audiem pierāda, ka adventīvo dzinumumu veidošanos stimulē relatīvi augsta citokinīnu koncentrācija barotnē, bet adventīvo sakņu inducēšanos - auksīnu. Jāatzīmē, ka ir gadījumi, kad šo sakarību nenovēro [Fosket, 1980; Катаева, 1983]. Reģenerācijas potenciālu var ietekmēt subkultivēšanas ilgums, tam pieaugot morfoģenēzes spējas samazinās [Катаева, 1983; Hussey, 1986; Fitch et al., 1993]. Pieņemts, ka kodola DNS varētu būt notikušas izmaiņas, mainījies šūnās esošais fitohormonu līdzsvars, vai arī šūnu jutība pret eksogēnajiem fitohormoniem. Tiek uzskatīts, ka praktiski tikai dažām šūnām piemīt morfoģenētiskais potenciāls, pārējās nav totipotentas [Barešova, 1986].

Kallusa kultūras reģenerācijas potenciālu praktiski izmanto augu pavairošanai. No kallusiem var iegūt adventīvos dzinumus vai somatiskos embrijus [Herman et al., 1975; Reynolds et al., 1979; Мемот, 1981; Arnold et al., 1986; Bonga, 1988]. Kallusus izmanto protoplastu [Cornejo et al., 1995] un suspensiju [Бутенко и др., 1987] kultūru iegūšanai. Salīdzinot ar citiem audu kultūru veidiem, kalluss ir homogēnāka audu sistēma, tādēļ tas tiek pielietots kā modelis, lai risinātu teorētiskos jautājumus augu fizioloģijā un bioķīmijā [Калинин, 1980]. To izmanto, piemēram, lai pētītu, fitohormonu lomu morfoģenēzē [Макарова, 1990], diferenciāciju [Straub et al., 1992; Oka et al., 1995] un dediferenciāciju [Калинин, 1980], plastīdu veidošanos [Кордюм и др., 1980], sekundāro produktu sintēzi un to iegūšanas iespējas *in vitro* apstākļos [Запрометов и др., 1986; Кислов и др., 1986; Ментелл и др., 1987], transgēno augu iegūšanas iespējas [Siemens et al., 1996], kā arī augu izturības

mehānismus [Lugue et al., 1988], augu - patogēnu attiecības [Miller, 1985; Dai et al., 1995 ^(a)], augu - mikorīzas sēņu attiecības [Sbrana et al., 1993], auga - insektu attiecības [Steinitz et al., 1993; Sales et al., 1995].

1. 1. 2. Kallusoģenēzi un kallusa kultivēšanu ietekmējošie faktori

1. 1. 2. 1. Bioloģiskais materiāls

Konstatēts, ka morfoģenētiskos procesi *in vitro* dažādiem augiem var būt atšķirīgi. Kallusoģenēze un reģenerācija parasti ir aktīvāka divdīgļlapjiem, nekā viendīgļlapjiem [Калинин; 1980; Катаева, 1983]. Morfoģenētiskā potence var atšķirties pat radniecīgiem taksoniem [Cheema et al., 1992].

Eksplanta audu fizioloģiskais stāvoklis, kas ir atkarīgs no auga, tā orgānu un audu vecuma, ietekmē kallusoģenēzi. *In vitro* šūnu dalīšanos vieglāk ir panākt juvenīliem augiem un audiem, īpaši tas attiecas uz kokaugiem [Cohen, 1986]. Lai samazinātu audu brūnēšanu, iesaka eksplantus izolēt laikā, kad fenola savienojumi, kuru oksidēšanās veicina nekrotizāciju, ir salīdzinoši zemākā koncentrācijā [Chen, 1990]. Piemēram, *Castanea sativa* tieši juvenīlos audos fenola savienojumi un to oksidācijas produkti ir mazāk kā nobriedušos [Cherve, 1983]. Eksplantiem parasti ir piemērotāki jauni, nepārkoksnējušies audi [Катаева, 1983; Hussey, 1986]. Šūnu dalīšanās un reģenerācijas spējas samazinās līdz ar tā auga un orgāna novecošanos, no kura ņemts eksplants [Tran Than Van, 1981]. Viens no iemesliem varētu būt augšanas inhibitoru - etilēna [Полевой, 1982], IES oksidācijas produktu [Bhatnagar, 1983] un citu pastiprināta veidošanās.

Novērots, ka augšanas apstākļi, gadalaiks un eksplanta izolēšanas laiks ietekmē *in vitro* kultūru attīstību. Ja eksplantu izolē no atklātā laukā augoša auga, tad *in vitro* kultivēšanas rezultāti var būt atkarīgi no klimatiskajiem apstākļiem [Pierik, 1987]. Gadalaiks, kad izolēts eksplants, nosaka mātesauga fizioloģisko stāvokli [Катаева, 1983]. Eksplantu atšķirīgu morfoģenētisko potenciālu A. Altmans [Altman et al., 1974] izskaidro ar endogēno fitohormonu līmeņa izmaiņām dažādos gada laikos. Piemēram, miera periodā esošu augu daļas ir grūti kultivēt *in vitro* [Chen, 1990], jo tajās ir samērā augsts

abscizskābes daudzums. K. Kauls atzīmē, ka *Pinus strobus* intensīvākā kallusa proliferācija sasniedzama no dzinumu eksplantiem, kas izolēti agrā pavasarī, jo tad var iegūt sterīlus eksplantus [Kaul, 1985].

Uzskata, ka visa veida orgāni (saknes, stumbrs, lapas, ziedi u.c.) un audi var tikt izmantoti kā izejas materiāls kallusa iegūšanai [Калинин, 1980; Pierik, 1987; Chen, 1990]. Tomēr, jāņem vērā eksplanta pozīcija augā, kas atspoguļo tā endogēno fitohormonu līmeni [Pierik, 1987] un attīstības pakāpi [Chen, 1990]. Piemēram, augsni vairāk ir jaunajās lapās un dzinumu meristēmās, bet citokinīni - apikālajās sakņu meristemās. Kokaugiem juvenīlāki ir snaudošie pumpuri, kas ir tuvāk saknei. Tādēļ kallusi, kas veidojušies no viena auga dažādu orgānu eksplantiem vienādos *in vitro* apstākļos var būt dažādi [Hussey, 1986; Pierik, 1987].

Ir pierādīts, ka kultūras attīstību ietekmē arī eksplanta izmērs. Piemērotāki ir relatīvi lielāka izmēra eksplanti, jo tajos ir lielākas barības vielu un hormonu rezerves, tādēļ arī vieglāk inducēt ar augšanu saistītos procesus. Tomēr pārāk liels eksplants var būt inficēts, to grūti iegūt sterīlu [Катаева, 1981]. Eksplanta izmērs var ietekmēt arī kallusoģenēzes spēju, piemēram, *Manihot esculenta* dzinumu galotņu eksplanti veido kallusu, ja ir īsāki par 2 mm [Chen, 1990]. Optimāls eksplanta izmērs atkarīgs no sugas un no izmantojamā orgāna [Катаева и др., 1981; Катаева, 1983].

1. 1. 2. 2. *In vitro* kultivēšanas vide

1. 1. 2. 2. 1. Barotne

Barotņu sastāvu variē atkarībā no genotipa un *in vitro* kultūras attīstības īpatnībām. Apmēram 95% no barotnes ir ūdens [Pierik, 1987]. Pēc konsistences izšķir dažādus barotņu veidus: 1) cietās, kurām kā gēlveidotāju izmanto agaru, gelrītu; 2) šķidrās - tās var būt ar vai bez barotnes nesēju - filtrpapīra tiltiņu, celulozes masu vai kādu citu materiālu; 3) kombinētās, kur uz cietās barotnes ir šķidrās barotnes slānis. Gēlveidotāji, kā arī šķidro barotņu nesēji var ietekmēt kallusoģenēzi [El Hadrami et al., 1993]. Ir konstatēts, ka morfoģenētiskos procesus *in vitro* ietekmē gēlveidojošo vielu ķīmiskais sastāvs - šādā aspektā

visvairāk ir pētīts agars [Катаева и др. , 1980; Pierik, 1987]. Bez tam, svarīga ir arī gēlveidojošo vielu koncentrācija - ja tā ir pārāk augsta, audiem tiek apgrūtināta vielu uzņemšana no barotnes. Šķidra barotne nodrošina audiem labāku kontaktu ar vidi un vielu uzņemšanu, bet kritiskais moments šādās sistēmās var būt nepietiekama aerācija, kas nelabvēlīgi ietekmē attīstību.

In vitro apstākļos fotosintēze parasti ir ierobežota, jo ir nepietiekama gāzu apmaiņa, gaismas intensitāte, vai arī kultivēšana notiek tumsā, lai to kompensētu, kā oglekļa avotu izmanto ogļhidrātus - saharozi, glikozi, fruktozi [Pierik, 1987]. Barotnei pievieno arī vitamīnus un citas piedevas: kazeīna hidrolizātu, peptonu, iesala un rauga ekstraktus, aminoskābes, kokosriekstu pienu, aktīvo ogli, fenola savienojumus un citas [Pierik, 1987]. Vairumam augu barotņu pH pirms autoklāvēšanas parasti ir robežās no 5,0 līdz 6,5 [Pierik, 1987]. Jāņem vērā, ka pēc autoklāvēšanas, barotnes pH pazeminās [Урианцева, 1988]. Svarīgi barotnes komponenti, atbilstoši katra auga prasībām, ir minerālsāļi, kas auga šūnām nepieciešami organisko savienojumu sintēzei un kā fermentatīvo reakciju katalizatori. Neorganiskie joni nodrošina osmotisko regulāciju un elektroķīmisko potenciālu. Rododendriem raksturīga nepieciešamība pēc pazeminātas sāļu koncentrācijas [Pennel, 1990], tādēļ barotnē ir samazināta N, K, P sāļu koncentrācija, bet Fe (II) ir palielināta [Anderson, 1984].

In vitro attīstības procesi ir ļoti atkarīgi no barotnes fitohormonu sastāva. Fitohormoni ir viena no augšanas regulatoru grupām, kas zemās koncentrācijās ietekmē fizioloģiskos procesus, kuri nosaka augšanu, diferenciaciju un attīstību. Vislielākā nozīme *in vitro* attīstībā ir auksīniem un citokinīniem.

Auksīni. Auksīnu aktivitāte piemīt indola savienojumiem, piemēram, indoliletīkskābei (IES); hloraizvietotajiem fenoksiatvasinājumiem, piemēram, dihlorfenoksietīkskābei (2,4-D) un naftilkarbonskābēm, piemēram, naftiletīkskābei (NES) [Полевой, 1982]. Šo ķīmiski dažādo savienojumu līdzīgo fizioloģisko aktivitāti var izskaidrot ar to, ka visiem šiem savienojumiem aromātiskais gredzens ar skābes atlikumu sānu ķēdē telpiski ir vienādi izvietots, kas nodrošina spēju mijiedarboties ar vieniem un tiem pašiem receptoriem.

Jāatzīmē, ka fizioloģiski aktīvi auksīni ir tikai kompleksā ar receptoriem, kas pēc savas ķīmiskās dabas ir olbaltumvielas [Lobler et al., 1987; Cleland, 1988]. Konstatēts, ka auksīni var sintezēties no triptofāna [Kutaček, 1988] stumbra apikālajās meristēmās, jaunajās lapās, dīgļos, dīgļlapās, kambijā [Катаева, 1983; Savičiené et al., 1988; Гамбург, 1990]. To oksidēšanos var katalizēt gaisma vai arī peroksidāze/auksīnoksidāze [Полевой, 1982]. Uzskata, ka fizioloģiski aktīvi ir brīvie auksīni, bet ar ogļhidrātiem vai olbaltumvielām saistītie - neaktīvi [Полевой, 1982; Гамбург, 1990].

In vitro barotnē auksīni ir nepieciešami tādēļ, ka vairumā gadījumu šūnas nespēj sintezēt IES, jo ir ierobežots triptofāna daudzums [Gamburg, 1988]. Pierādīts, ka auksīni var ietekmēt 1) šūnu dalīšanos, 2) šūnu stiepšanos, 3) dediferenciāciju un 4) diferenciāciju - šūnu, audu (vadaudu), gan arī organoģenēzi (stimulē sakņu veidošanos, bet inhibē to augšanu, kavē aksilāro un adventīvo dzinumus veidošanos) [Катаева, 1983; Полевой, 1986; Finn, 1987; Гамбург и др., 1990]. Mitotiskā cikla laikā auksīni var ietekmēt G₁ un G₂ fāzes, jo stimulē t-RNS, r-RNS un i-RNS sintēzi [Полевой, 1986; Gamburg, 1988; Гамбург и др., 1990]. Auksīni stimulē arī DNS sintēzi [Полевой, 1986; Cleland, 1988; Gamburg, 1988; Гамбург и др., 1990]. Izvirzīta hipotēze, ka auksīnu darbības rezultātā saīsinās mitotiskā cikla periodi, saīsinās šūnu dalīšanās laiks, tādējādi paātrinās to proliferācija, bet pats mitozes ātrums auksīnu darbības rezultātā tomēr nemainās [Гамбург и др., 1990]. Kopumā kultūras augšanas ātrums atkarīgs no diviem faktoriem: mitotiskā cikla ilguma un proliferējošo šūnu skaita. Ir konstatēts, ka augstāka auksīnu koncentrācija stimulē proliferācijai arvien vairāk šūnas, bet mitotiskā cikla ilgumu pieaugoša auksīnu koncentrācija neietekmē [Gamburg, 1988]. Auksīni var ietekmēt šūnu stiepšanos [Гамбург, 1976, 1990], jo aktivē protonu sūkni - tā rezultātā ūdeņraža joni aizplūst caur membrānām uz šūnapvalku, izraisot tā paskābināšanos [Hanson et al., 1982; Cleland, 1988], līdz ar to pastiprinās fermentatīvās hidrolīzes procesi šūnapvalkā, kas nodrošina šūnas stiepšanos [Полевой, 1982].

Citokinīni. Tie ir adenīna atvasinājumi, kam pie purīna gredzena sestā oglekļa atoma ūdeņradis ir aizvietots ar alifātisku vai ciklisku radikāli. Par galveno citokinīnu sintēzes vietu tiek uzskatīta sakņu apikālo meristēmu zona, no kurienes pa ksilēmu tie tiek transportēti uz virszemes daļām [Катаева, 1983, Полевой, 1982]. Citokinīnsintetāze, kas katalizē izopentenilgrupas pievienošanu adenozinmonofosfātam, ir izolēta arī no lapām, kas pierāda citokinīnu sintēzi arī auga virszemes daļās [Chen, 1981]. Citokinīni ir konstatēti arī negatavos augļos un sēklās [Полевой, 1982; Катаева, 1983]. Tiek uzskatīts, ka citokinīni ir fizioloģiski aktīvi kompleksā ar olbaltumvielu dabas receptoriem [Amrhein, 1979; 1981; Кулаева, 1982].

Augu audu kultūrās ir novērots, ka citokinīni var ietekmēt: 1) šūnu dalīšanos, 2) šūnu stiepšanos, 3) diferencēšanos - gan šūnu, gan audu, kā arī orgānu (stimulē dzinumumu veidošanos, bet inhibē sakņu veidošanos un apikālo dominēšanu) [Кулаева, 1973; Fosket et al., 1978; Firn, 1987]. Uzskata, ka mitotiskā cikla laikā atsevišķos gadījumos citokinīni var ietekmēt G₂ fāzi, tādējādi stimulējot pāreju no interfāzes uz mitozi [Гамбыр, 1990]. Citokinīni stimulē specifisko RNS un olbaltumvielu sintēzi, fermentu darbību, kas nepieciešama, lai šūnā sāktos mitozes cikls [Бутенко, 1975; Кулаева, 1983]. Ir izteikta doma, ka citokinīnu klātbūtne ir nepieciešama, lai pabeigtu ģenētiski noteikto transkripcijas programmu [Amrhein, 1979]. Šūnu stiepšanos citokinīni var stimulēt, aktivējot protonu sūkni, tādā veidā ietekmējot membrānu funkcionālo stāvokli [Кулаева, 1977]. Citokinīni stimulē šūnas organoīdu diferenciaciju - ribosomu, endoplazmatiskā tīkla, mitohondriju un hloroplastu veidošanos [Fosket et al., 1978; Кулаева, 1977; Amrhein, 1981].

Apkopojot dažādu pētījumu rezultātus, secināts, ka normālu mitozes ciklu, kā arī pilnvērtīgu augšanas un attīstības procesu *in vitro* nodrošina auksīni kopā ar citokinīniem [Бутенко, 1975, 1984; Fosket, 1980; Катаева, 1983]. Lai inducētu šūnu dalīšanos, fitohormonu koncentrācijai un attiecībām barotnē jābūt dažādām atkarībā no taksona; eksplanta audiem, jo tajos var būt dažāds endogēno auksīnu/citokinīnu līmenis; tā pat arī no citu regulējošo vielu klātbūtnes barotnē [Fosket, 1980; Tran Than Van, 1981; Билялиева и др.,

1985; Cleland, 1988; Гамбург и др., 1990]. Audu reakcija uz auksīniem/citokinīniem *in vitro* bieži vien notiek mijiedarbībā ar ievainojuma stimulu. Tiek uzskatīts, ka tieši tādēļ, šūnu dalīšanās visbiežāk notiek griezumu tuvumā [Гамбург и др., 1990]. Ir izteikta doma, ka auksīni un citokinīni savstarpēji var mijiedarboties divējādi [Гамбург и др., 1990]:

1) viens fitohormons iedarbojas uz otra saturu šūnā, jo ietekmē otra sintēzi, inaktivāciju, uzņemšanu un izdalīšanu no šūnas;

2) pāmaiņus piedaloties dažādu augšanas un attīstības procesu regulācijā.

Jau klasiskajā F. Skuga un C. O. Millera darbā [Skoog et al., 1957] ir aprakstīts, ka morfoģenētisko reakciju nosaka fitohormonu koncentrācija un attiecības barotnē, kā rezultātā no šūnām, kas rodas inducētās dalīšanās rezultātā var veidoties saknes, kalluss vai dzinumi. Tādēļ pēc auksīnu/citokinīnu nepieciešamības barotnē, *in vitro* kultūras var iedalīt [Гамбург и др., 1990]:

1) no auksīniem un citokinīniem atkarīgās;

2) no auksīniem atkarīgās;

3) no citokinīniem atkarīgās (ļoti reti);

4) no auksīniem/citokinīniem neatkarīgās.

1. 1. 2. 2. 1. Fizikālie faktori

In vitro kultivācijā visbiežāk izmantotais fotoperiods ir 14 līdz 16 stundas [Катаева, 1983; Pierik, 1987], vai arī nepārtraukta tumsa, retāk gaisma [Pierik, 1987]. Ir gadījumi, kad kallusoģenēze ir vienādi intensīva gan fotoperiodiskā apgaismojumā, gan tumsā, piemēram, *Populus balsaminifera* L. [Быченкова, 1978]. Gaismas intensitāte telpā parasti ir 1000 - 5000 lx [Катаева, 1983; Hussey, 1986], - zemāka nekā atklātā laukā, jo augsta apgaismojuma intensitāte izsauc temperatūras paaugstināšanos kultivēšanas traukā, bez tam fotosintēze tikpat nav iespējama ierobežotā CO₂ daudzuma dēļ [Pierik, 1987]. *In vitro* gaisma regulē morfoģenētiskos procesus, tādēļ svarīgs parametrs ir gaismas spektrs. Piemēram, sarkanā gaisma var izraisīt citokinīniem līdzīgu efektu, vai arī veicināt to uzkrāšanos audos [Reod, 1990], bet zilā gaisma

veicina auksīnu sabrukšanu [Pierik, 1987], kaut gan to nevar apgalvot viennozīmīgi.

Arī temperatūra ietekmē *in vitro* kultūru attīstību - no tās atkarīga fermentu aktivitāte, līdz ar to arī fizioloģisko procesu norise [Калинин и др., 1980]. *In vitro* audi ir jutīgāki pret temperatūras svārstībām, jo tiem trūkst intakta auga adaptācijas spēju [Reod, 1990]. Temperatūra audzēšanas telpā parasti ir 24 līdz 26 °C [Pierik, 1987].

Kultūru attīstību ietekmē arī gaisa mitrums. Augsts relatīvais gaisa mitrums audzēšanas kamerā un kultivēšanas traukā var veicināt infekcijas izplatīšanos un audu vitrificēšanos [Pierik, 1987], bet zems - kultūras dehidrēšanos [Reod, 1990]. Labvēlīgākais relatīvais gaisa mitrums ir 70 % [Reod, 1990]. Bez tam, svarīga ir arī ūdens piejamība audiem barotnē. Šķidrā barotnē, vai arī barotnē ar zemu gēlveidojošo vielu koncentrāciju, tā noteikti ir labāka, tomēr ir novērots, ka tas var būt par iemeslu audu vitrifikācijai, īpaši, ja ir zema gaismas intensitāte, paaugstināta temperatūra, vai paaugstināts citokinīnu saturs barotnē [Pierik, 1987]. Šķidra barotne var būt par iemeslu nepietiekamai audu aerācijai. Lai no tā izvairītos, izmanto šķidro barotņu nesējus, barotnes šūpošanu vai caurteci [Калинин и др., 1980; Pierik, 1987].

Ir novērots, ka gāzu sastāvs kultivēšanas traukā ietekmē kultūras attīstību un augšanu, piemēram, uzkrājoties etilēnam, var tikt kavēta sakņu augšana [Pua et al., 1993]. Gāzu sastāvu kultivēšanas traukā var ietekmēt divi faktori: a) tauka slēgšanas veids - regulē gāzu apmaiņu starp trauku un telpu [Woltering, 1989], b) pašas *in vitro* kultūras augšana un attīstība [Righetti et al., 1988; Buddendorf - Joosten et al., 1994].

1. 1. 3. Rododendru kallusa kultūra

Literatūrā ir norādes, ka rododendriem ir novērota organogēna kallusa vai kallusveidīgas graudainas masas veidošanās tieši no eksplantiem *in vitro* pavairošanas sākumstadijā [Harbage et al., 1987; Economou et al., 1988; Economou et al., 1989; Iapichino et al., 1991^(a), 1991^(b), 1992]. Pētījumos eksplanti bijuši izolēti no dzinumū stumbriem [Robenek, 1977; Norton et al.,

1989] un to galotnēm [Harbage et al., 1987; lapichino et al., 1991^(a); 1991^(b)], lapām [lapichino et al., 1991^(b)], ziediem [Meyer, 1982, 1983^(a), 1983^(b); Dai et al., 1987; Pennel, 1990; Shevade et al., 1993]. Organogēna kallusa veidošanās ir novērota arī *in vitro* dzinumu bazālajā daļā [Economou et al., 1989; lapichino et al., 1991^(b)]. Jādomā, ka ar terminu "kalluss" šajos darbos bijusi apzīmēta starpstadija starp eksplantu un dzinumu diferencēšanos, jo apraksti vairumā gadījumu nepārliecina par patiesu kallusa audu veidošanos. Kā izņēmumu jāmin C. R. Nortonu (1989), kas rododendru kallusus no dzinumu eksplantiem ir izmantojis, lai pētītu auksīnu un citokinīnu ietekmi uz morfoģenēzi *in vitro*. Organogēno struktūru iegūšanai tikušas izmantotas Andersona [Anderson, 1975; 1978, 1984] barotnes [Harbage et al., 1987; Norton et al., 1989; Hunsinger, 1989; Pennel, 1990; lapichino et al., 1991^(a), 1991^(b)] un Woody Plant Medium [Lloyd et al., 1981] barotne [Norton et al., 1989; Pennel, 1990], kurās minerālvielu koncentrācija ir apmēram viena trešā daļa no tās, kāda nepieciešama lakstaugiem [Pennel, 1990]. Šīs barotnes ir izveidotas tieši rododendru un citu *Ericaceae* dzimtas augu pavairošanai. No citokinīniem ir izmantoti IPA [Norton et al., 1989; Pennel, 1990], kinetīns [Norton et al., 1989] un zeatīns [Harbage et al., 1987; Hunsinger, 1989], bet no auksīniem - IES, [Robenek, 1977; Hunsinger, 1989; Pennel, 1990], ISS [Pennel, 1990;], 2,4-D [Harbage et al., 1987; Norton et al., 1989], NES [Norton et al., 1989]. Barotnes pH - apmēram 4,5 [Pennel, 1990; lapichino et al., 1991^(a)], 4,8 [Harbage et al., 1987], ir minēts arī 5,7 [Dabin et al., 1983]. Parasti, lai inducētu dzinumu veidošanos, izmantots 16 stundu fotoperiods [lapichino et al., 1991^(b), Norton et al., 1989]. Tikai C. R. Nortons (1989) morfoģenēzes pētījumos kallusa iniciācijai izmantojis tumsu. Atkarībā no taksona, eksplanta un kultivēšanas apstākļiem, ir novērotas dažādas rododendru kallusveida struktūras: irdenas, pigmentācija no krēmkrāsas līdz brūnai [Hunsinger, 1989; Norton et al., 1989]; gludas, baltas [Norton et al., 1989]; kompaktas, zaļas [Hunsinger, 1989]; kompaktas, bāli zaļas [Norton et al., 1989]; granulāra kallusa masa [Pennel, 1990].

1. 2. *In vitro* kultūras attīstības potenciālie bioķīmiskie rādītāji

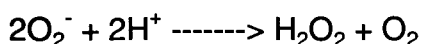
Izolējot eksplantu un stimulējot *in vitro* kultūras veidošanos un attīstību, šūnās notiek fizioloģiskas izmaiņas, kas ir atkarīgas no bioloģiskā materiāla īpatnībām un ko var ietekmēt dažādi *in vitro* vides faktori.

Uzsākot jaunu taksonu kultivēšanu vai jauna kultūras veida iegūšanu, *in vitro* vides optimizēšana notiek, manipulējot ar dažādiem tās faktoriem. Pašreizējā augu audu kultūru tehnoloģijas attīstības posmā optimizēšana visbiežāk notiek empīriski - novērojot bioloģiskā objekta atbildes reakciju uz apkārtējo vidi. Bieži vien nākas koriģēt vidi, jo notiek izmaiņas kultūras attīstībā. To cēlonis var būt 1) eksplantu audu fizioloģiskā stāvokļa neviendabīgums; 2) kultūras epigēnētiskas vai ģenētiskas izmaiņas; 3) kultivēšanas gaitā izmainījusies *in vitro* vide (barotnes ķīmiskais un fizikālais stāvoklis, gāzu sastāvs kultivēšanas traukā). Kāds no iepriekš optimālo kultivēšanas apstākļu faktoriem jaunajā situācijā var kļūt par stresa cēloni.

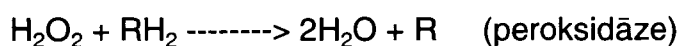
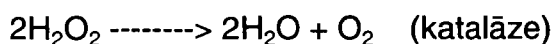
Kultūras morfoģenētiskās attīstības vadīšanai, tiek mainīti atsevišķi *in vitro* vides faktori, piemēram, fitohormoni, apgaismojums un citi. Būtībā tas nozīmē, ka morfoģenēzes apzināta ietekmēšana notiek, manipulējot ar dažādiem potenciāliem stresa faktoriem. Ir zināms, ka gan stresa faktoru iedarbību, gan arī morfoģenēzi, kas var būt savstarpēji saistīti procesi, raksturo izmaiņas fizioloģiskajos procesos.

Katalāzes un peroksidāzes. Pēdējos gados uzkrājušies daudz pierādījumu tam, ka jebkurš stresa faktors izsauc pastiprinātu toksisku aktīvā skābekļa formu (O_2^- ; 1O_2 ; H_2O_2) veidošanos [Foyer et al., 1994], kas izsauc oksidēšanās-reducēšanās procesus, kuru rezultātā rodas hidroksiljoni un hidroksilradikāli (OH^- ; OH^\cdot). Pēdējie arī izraisa olbaltumvielu denaturāciju, lipīdu peroksīdu veidošanos un DNS mutācijas [Bowler et al., 1992]. Aktīvā skābekļa savienojumu veidošanās izraisa bioķīmisko reakciju virkni, kas, darbojoties dažādiem aizsargmehānismiem, līdz minimumam samazina augam kaitīgo reakciju norišu iespējas. Aizsargsistēmā ietilpst savienojumi ar antioksidatīvām

īpašībām (fenola savienojumi, karotinoīdi un citi) [Bowler et al., 1992; Foyer et al., 1994; Larson, 1995] un fermenti, kas katalizē aktīvā skābekļa dažādu formu un to savienojumu pārveidošanas reakcijas (superoksīddismutāze EC 1.15.1.1; katalāze EC 1.11.1.6; peroksidāzes EC 1.11.1.7 un citi) [Tolbert, 1980; Gaspar et al., 1982; Bruce et al., 1989; Bowler et al., 1992; Siegel, 1993]. Superoksīddismutāze katalizē H_2O_2 veidošanos no superoksīda radikāla [Bowler et al., 1992]:



Savukārt H_2O_2 šķeļ katalāze un / vai, izmantojot kā substrātu ūdeņraža donoru (R), - peroksidāze [Bowler et al., 1992]:



Aizsargmehānismi pret aktīvā skābekļa formām ir visos aerobajos organismos, jo šie savienojumi rodas, reducējoties molekulārajam skābeklim, tam iesaistoties bioķīmiskās reakcijās [Bowler et al., 1992]. Kā jau iepriekš minēts, šo savienojumu veidošanās pastiprinās, darbojoties kādam stresa faktoram. Tas var izraisīt izmaiņas detoksificējošo fermentu aktivitātē [Gaspar et al., 1985; Benson et al., 1992; Siminis et al., 1994] un sintēzē [Siminis et al., 1994]. Ja fermentu aktivitāte un aizsargmehānismu darbība kopumā ir nepietiekama, lai pārveidotu papildus veidojušos aktīvā skābekļa savienojumus, tad bioloģiskajā sistēmā izveidojas oksidatīvā stresa stāvoklis [Elstner, 1982; Elstner et al., 1988]. Ir novērots, ka oksidatīvais var būt par iemeslu vājai kultūras augšanas intensitātei [Siminis et al., 1994]. Oksidatīvā stresa vizuālā pazīme var būt šūnu un audu brūnēšana [Benson et al., 1992].

Ir virkne darbu, kuros pēta iespējamos boiķīmisko kritērijus *in vitro* kultūru fizioloģiskā stāvokļa novērtēšanai un attīstības prognozēšanai. Pēc literatūras datiem var spriest, ka šādā aspektā aktuāla ir detoksificējošo fermentu darbības, īpaši peroksidāzes un katalāzes pētīšana [Gaspar et al., 1985_(a); Cutler et al., 1989; Benson et al., 1992; Wakamatsu et al., 1993; Siminis et al., 1994; Dey et al., 1995; Franck et al., 1995]. Peroksidāzes un katalāzes pētījumus *in vitro* kultūrās varētu iedalīt vairākos virzienos:

- 1) Stresa faktoru izraisīto bioķīmisko reakciju mehānismu pētīšana. Piemēram, Gaspars [Gaspar et al., 1985] ir noskaidrojis, ka dažādi fizikālie un ķīmiskie stresa faktori izraisa vispirms bāzisko un tad skābo peroksidāžu aktivitātes pieaugumu - noris tā saucamā divakāpju atbildes reakcija. Barotne, kas stimulē sakņošanas, inducē kopējo peroksidāzes aktivitātes pieaugumu audos, tad, samazinoties bāzisko peroksidāžu aktivitātei, sākas diferenciācija [Gaspar, 1990]. Izmaiņas poliamīnu un prolīna sintēzē var kavēt katalāzes un peroksidāzes veidošanās intensitāti, vienlaicīgi, intensīvi darbojoties superoksīddismutāzei, uzkrājas H_2O_2 . Tas veicina lipīdu peroksīdu veidošanas, izraisot šūnu nekrozi [Le Dily et al, 1993_(a); 1993_(b)].
- 2) Darbi, kuros analizētas tikai peroksidāžu un katalāžu aktivitātes un izoformu spektra izmaiņas dažādu stresa faktoru ietekmē, piemēram, apgaismojuma un temperatūras [McCown et al., 1970], ievainojuma [Wakamatsu et al., 1993], fitohormonu [Wolter et al., 1975], sāļu [Olmos et al., 1994].
- 3) Katalāzes un peroksidāzes aktivitātes un izoformu sastāvu salīdzināšana dažādiem taksoniem audos un šūnās *in vitro* kultūru attīstības laikā [Siminis et al., 1993, 1994] un to tolerancē pret dažādiem stresa faktoriem [Morpurgo et al., 1994].
- 4) Peroksidāzes un katalāzes aktivitātes dinamika un izoformu spektra analīze morfoģenētisko norišu laikā dažādas diferencētības pakāpes audos [Kochaba et al., 1977; Thorpe et al., 1978; Kay et al., 1987; Lal et al., 1988; Fett-Neto et al., 1992; Maheswaran et al., 1992; Zhou et al., 1992; Alves et al., 1994].
- 5) Vitrifikācijas un "pieradināto" audu fenomena pētīšana: piemēram, "pieradinātos" *Beta vulgaris* L. kallusos ir zema peroksidāzes un katalāzes aktivitāte [Hagege et al., 1992; Le Dily et al., 1993_(b)], kas bremsē lignīna biosintēzi, bet, uzkrājoties H_2O_2 , tiek veicināta lipīdu peroksīdu veidošanās.

Pētījumu rezultāti pagaidām ir nepietiekami, lai izveidotu vienotu antioksidatīvo fermentu darbības modeli, pēc kā varētu spriest par *in vitro* kultūras attīstību jebkurā gadījumā. Katalāzes un peroksidāzes aktivitāte un izoformu spektrs ir atkarīgs no konkrētā taksona un eksperimentā izmantotajiem stresa faktoriem, šūnu un audu diferencētības pakāpes, morfoģenētiskās

norises. Iespējams, ka rezultātu interpretācijas neviennozīmīgumu rada šo fermentu darbības un molekulārās uzbūves daudzveidība, īpaši peroksidāzei [Gaspar et al., 1982]. Bez tam, izturību pret stresu nodrošina dažādu antioksidatīvās sistēmas komponentu līdzsvars [Foyer et al., 1994]. Tomēr darbā ar konkrētu genotipu un *in vitro* kultūru veidu šo fermentu aktivitātes un izoformu spektra izmaiņu tendences varētu izmantot kā parametru kultūras attīstības kontrolei un prognozēšanai. Piemēram, peroksidāzes kvalitatīvo analīzi iesaka izmantot, lai kultūras agrīnās attīstības stadijās noteiktu audu embriogēneses potences [Baaziz, 1994], bet aktivitātes analīzi - optimālas sakņošanās barotnes un tās pielietojšanas visefektīvākā momenta noteikšanai [Gaspar, 1990]. Līdz šim literatūrā nav atrodami dati par peroksidāzēm un katalāzēm rododendru kallusos.

Fenola savienojumi. Literatūrā ir dati par fenola savienojumu kvalitatīvās un kvantitatīvās analīzes izmantošanu *in vitro* kultūru attīstības raksturošanai. Ir konstatēts, ka dažādu vides faktoru izraisītā stresa ietekmē:

- 1) fenola savienojumi oksidējas līdz hinoniem [Rhodes et al., 1978; Chen et al., 1990];
- 2) notiek monomēro fenola savienojumu sintēze, kā rezultātā savienojumi var uzkrāties [Rhodes et al., 1978];
- 3) notiek polimēro fenola savienojumu - lignīna sintēze [Rhodes et al., 1978]. Bez tam oksidatīvā stresa laikā fenola savienojumi augā var darboties kā antioksidanti [Larson, 1995].

Uzskata, ka *in vitro* kultūrā, salīdzinājumā ar intaktu augu, var izmainīties metabolītu kvalitatīvais un kvantitatīvais sastāvs. To izskaidro ar intakta auga veselumu nodrošinošo metabolisko procesu savstarpējās mijiedarbības trūkumu un iespējamo alternatīvo metabolisko ceļu izmantošanu [Урманцева, 1988]. Ir novērots, ka augu audu kultūrās mēdz būt tie paši fenola savienojumi, kas intaktā augā [Harborne, 1980]. Tomēr to kvalitatīvais un kvantitatīvais sastāvs var arī atšķirties, piemēram, *Camellia sinensis* L. kallusā sintezējas mazāk augam raksturīgo fenola savienojumu, nekā izejas materiāla audos mātesaugā

[Загоскина и др. , 1988]. Kultivēšanas laikā fenola savienojumu sastāvs var mainīties [Пушкаренко и др., 1989; Salaj et al., 1992]. Literatūras dati liecina, ka kultūrā fenola savienojumu sastāvu var ietekmēt:

1) kultivēšanas apstākļi, īpaši fitohormoni un apgaismojums [Загоскина и др. , 1986; Neera et al., 1992; Zaprometov et al., 1993; Maldhavi et al., 1995], kā arī barotnes minerālais sastāvs [Ishimaru et al., 1993] un barotnes gēlveidotāji [Elhadrami et al., 1993];

2) šūnas organoīdu diferencētības pakāpe, piemēram, *Picea abies* kallusā, kurā ir hloroplasti, ir vairāk tannīni, nekā kallusā kurā nav hloroplastu [Salaj et al., 1992];

3) audu diferencētības pakāpe [Загоскина и др. , 1994], uzskata, ka fenola savienojumi varētu būt arī par rizoģenēzes marķieriem [Berthon et al., 1990].

Ņemot vērā, ka rododendri ir īpaši bagāti ar fenola savienojumiem [Куршакова и др., 1961; Белова, 1968], bet citu augu *in vitro* kultūru attīstības pētījumos konstatēta šo savienojumu kvalitatīvā un kvantitatīvā sastāva mainība atkarībā no kultivēšanas apstākļiem un morfoģenētiskajām norisēm, varētu pieņemt, ka fenola savienojumi būtu piemēroti dažādu genotipu rododendru kallusa kultūras attīstības bioķīmiskie rādītāji.

1. 3. Peroksidāzes bioķīmiskais un fizioloģiskais raksturojums

Peroksidāze (EC 1.11.1.7) ir ferments, kas katalizē reakcijas, kurās ūdeņraža atoms tiek pārnests no substrāta uz peroksīda molekulu, un veidojas reģenerētspējīgi substrātu radikāli [Андреева, 1988]. Fermenta molekulas izmēri ir 40000 līdz 50000 daltoni [Gaspar et. al, 1982]. Peroksidāze sastāv no apofermenta un prostētiskās grupas. Apofermentā ietilpst olbaltumvielas molekula, ogļhidrāti un kalcija atomi, bet prostētiskajā grupā - dzelzs (III) porfirīns.

Peroksidāzei, veicot savu galveno - peroksidāzo funkciju, ir absolūta prasība pēc H_2O_2 , bet uzskata, ka tai raksturīgs nespecifiskums attiecībā pret ūdeņraža donoru [Butt, 1980; Андреева, 1988]. Darbojoties kā oksidāze, peroksidāze var katalizēt elektronu pārnesanu no substrāta molekulas uz molekulāro skābekli. Bet, katalizējot atmosfēras skābekļa ieslēgšanos substrāta molekulā, peroksidāze darbojas kā oksigenāze. Peroksidāze var katalizēt arī dekarboksilāciju, piemēram, fenola savienojumu [Berlin et al, 1975] un polimerizāciju, piemēram, sintezējoties lignīnam [Harborne, 1980].

Peroksidāzes molekulārā heterogenitāte nosaka tās skābās, bāziskās un neitrālās izoformas [Андреева, 1988].

Peroksidāzes ir atrastas šūnapvalkā, starpšūnu telpā, protoplastā, Goldži kompleksā, vakuolā, endoplazmatiskajā [Butt, 1980; Gaspar et. al, 1982]. Hloroplastos lokalizēta askorbātperoksidāze [Miyake et al., 1992]. Ir izteikta doma, ka peroksidāzes sintezējas kā endoplazmatiskajā tīklā, tā ribosomās vai diktiosomu cisternās [Gaspar et. al, 1982]. Iegūtie rezultāti ir neviennozīmīgi tādēļ, ka augā peroksidāžu lokalizācija, kvalitatīvie un kvantitatīvie rādītāji ir atkarīgi no sugas, auga attīstības pakāpes, augšanas apstākļiem, sezonas [Lobarzewski, 1981; Gaspar et. al, 1982; Андреева, 1988; Booij et. al, 1993; Sancherzomero et. al, 1993; Siegel, 1993; Polle et. al, 1994], pat no analīzes metodes [Gaspar, 1982].

Peroksidāze ir viens no fermentiem, kas katalizē reakcijas, kuras nodrošina augu augšanu un attīstību, mainoties apkārtējai videi. Ir konstatēts,

ka peroksidāzes tieši vai netieši ir iesaistītas dažādu fizioloģisko procesu norisē, piemēram, novecošanās [Bartoli et. al, 1995], aukstumizturībā [Prasad et. al, 1995], augļu attīstībā [Alba et. al, 1995] un nobriešanā [Mattoo et. al, 1969], dīgšanā [Cakmak et. al, 1993; Gidrol et. al, 1994], sakņu veidošanā [Gonzalez et. al, 1993; Hausman, 1993; Garciagomez, 1995]. Peroksidāzes piedalās auga pretstresa reakcijās. To aktivitāti var inducēt gan abiotiskie, gan biotiskie stresa faktori, piemēram, infekcija [Summermatter et. al, 1995], ievainojums [Kawaoka et al, 1994], gaisa piesārņojums [Rainieri et al, 1994], ūdens trūkums [Zhang et. al 1994].

Tiek uzskatīts, ka peroksidāzes varētu katalizēt arī tādās fizioloģiski svarīgas norises kā auksīnu metabolisms un lignīna biosintēzi. Ir vairākas hipotēzes par fermentu, kam ir auksīnoksidāzes aktivitāte. Divas no tām skar peroksidāzes [Gaspar et al., 1982]. Viena pārstāv uzskatu, ka peroksidāzei ir divi aktīvie centri, no kuriem vienam ir IES oksidāzes aktivitāte. Otra - atsevišķiem peroksidāzes izofermentiem ir arī IES oksidāzes aktivitāte. hipotēze, ka tieši bāziskās izoperoksidāzes katalizē auksīna oksidēšanos [Gaspar et. al, 1982, 1991]. Attiecībā par auksīnu biosintēzi - peroksidāzes varētu katalizēt acetaldoksīma sintēzi no triptofāna [Gaspar et. al, 1991]. Peroksidāzes piedalās lignīna biosintēzē [Polle et al., 1994], katalizējot kanēļspirtu polimerizēšanās reakcijas, kā rezultātā veidojas lignīns [Gaspar et al., 1982].

Ir zināms, ka auga augšana un attīstība ir ģenētiskās informācijas realizēšana atkarībā no apkārtējās vides ietekmes. T. Gaspars [Gaspar et al., 1991] uzskata, ka, mainoties apkārtējās vides apstākļiem, izmaiņas peroksidāžu kvantitatīvajā un kvalitatīvajā sastāvā varētu ietekmēt auga vai atsevišķa orgāna adaptāciju, augšanu vai attīstību regulējošos mehānismus. Viņš ir izveidojis stresa inducētas augšanas un attīstības skābo un bāzisko peroksidāžu divpakāpju darbības modeli [Gaspar, 1985_(a), 1991]. Stresa faktoru ietekmē veidojas aktīvā skābekļa formas, kas veicina lipīdu peroksīdu veidošanos. Rezultātā degradējas šūnu membrānas, samazinās fenola savienojumu un citu savienojumu daudzums, kas maskējuši bāzisko peroksidāžu darbību. Sekunžu

laikā notiek bāzisko peroksidāžu aktivēšanās, kas ir pirmā atbildes pakāpe. Bāziskās peroksidāzes, šķeļot peroksīdus, detoksificē auga iekšējo vidi, oksidē auksīnus un katalizē etilēna biosintēzi. Savukārt etilēns regulē skābo peroksidāžu aktivēšanos, kas ir atbildes otrā pakāpe. Skābās peroksidāzes katalizē lignīna, kas ir viens no šūnapvalka komponentiem, biosintēzi [Gaspar et al., 1982; Berthon et al., 1989; Gaspar et al., 1994]. Tas liek domāt, ka peroksidāzēm ir kāda loma stresa inducētajos diferenciācijas procesos.

Salīdzinoši daudzos pētījumos peroksidāžu kvalitatīvie un kvantitatīvie rādītāji ir izmantoti, lai interpretētu fizioloģiskās norises *in vitro* kultūru attīstības laikā [Fett-Neto et al., 1992; Gaspar et al., 1992; Kevers et al., 1992; Berthon et al., 1993] un bioķīmiski raksturotu dažādu stresa faktoru ietekmi uz fizioloģiskajiem procesiem [McCown et al., 1970; Kevers et al., 1991; Wakamatsu et al., 1993; Hausman et al., 1995] un morfoģenētiskās norises [Wochok et al., 1974; Lal et al., 1988; McDougall et al., 1992; Booj et al., 1993; Alves et al., 1994; Baaziz et al., 1994].

Peroksidāzes rododendros. Ir maz datu par peroksidāzēm rododendros. Tie galvenokārt ir saistīti ar rododendru apsākņošanās problēmu pētīšanu *in vitro* [Aghmair et al., 1991; Gaspar, 1990; Gaspar et al., 1994]. R. de Loose (1979) savos darbos ir nedaudz pieskāries peroksidāžu kvalitatīvajai analīzei un atzinis to par nederīgu rododendru hemosistemātikai.

1. 4. Katalāzes bioķīmiskais un fizioloģiskais raksturojums

Katalāze (EC 1.11.1.6) ir hemoproteīns, kura galvenā funkcija ir katalizēt H_2O_2 šķelšanu [Schonbaum et al., 1976]. Ferments sastāv no četrām subvienībām, kuru izmēri ir apmēram 60 000 daltoni. Katru subvienību veido peptīdu ķēdes, kas ir savienotas ar ferriprotoporfirīna grupu [Schonbaum et al., 1976; Сарсанбаев и др., 1982; Метелица, 1984]. Katalāzei piemīt molekulārā heterogenitāte [Сарсанбаев и др., 1982; Левитес, 1986].

Katalāzes bioķīmiskā funkcija ir šķelt H_2O_2 , kas veidojas fotoelpošanā peroksisomās, taukskābēm pārvēršoties par ogļhidrātiem glioksisomās, superoksīddismutāzei katalizējot aktīvā skābekļa formu pārveidošanos un citos procesos [Bowler et al., 1992].

H_2O_2 šķelšana ar katalāzes palīdzību ir pati ātrākā bioķīmiskā reakcija [Метелица, 1984], tās ātrums ir $10^3 - 10^4$ reizes lielāks nekā reakcijām, kuras katalizē citi fermenti. To izskaidro ar katalāzes lielo koncentrāciju organoīdos. Piemēram, peroksisomās tā ir 10 - 25% no visām olbaltumvielām [Tobler, 1980].

Ir konstatēta arī katalāzes peroksidāzā aktivitāte [Butt, 1980; Bruce et al., 1989]. Tādā gadījumā katalāze piedalās substrāta oksidēšanā, izmantojot H_2O_2 vai citus peroksīdus. Substrāti var būt metanols, etanols, formaldehīds, fenola savienojumi un citi savienojumi [Butt, 1980].

Katalāze ir konstatēta visos audos. Šūnās tā ir lokalizēta galvenokārt glioksisomās un peroksisomās [Butt, 1980; Bruce et al., 1989]. Fermentatīvā aktivitāte un izoformu spektrs ir atkarīgs no genotipa, auga attīstības pakāpes un apkārtējās vides faktoriem [Сарсанбаев и др., 1982].

Uzskata, ka sintezējoties katalāzei, citoplazmā vispirms veidojas olbaltumvielu monomēri, bet peroksisomās un glioksisomās hēma porfirīna cikls hidrofobi piesaistās olbaltumvielām un veidojas tetramērs [Schonbaum et al., 1976, Метелица, 1984; Bruce et al., 1989]. Oligomērs ir samērā stabils pH robežās no 3 līdz 10. Degradējoties, piemēram, deterģentu klātbūtnē, katalāzes aktivitāte zūd, bet subvienības saglabā peroksidāzo aktivitāti [Метелица, 1984].

Salīdzinot literatūras datus, redzams, ka katalāzes fizioloģiskās funkcijas pētītas mazāk nekā peroksidāzes. Tomēr ir zināmas konkrētas izmaiņas katalāzes aktivitātē un izoformu spektrā, kas rodas augšanas un attīstības gaitā, kā arī atkarībā no apkārtējās vides ietekmes. Jāatzīmē, ka vairumā gadījumu pētījumu rezultāts ir tikai fakta konstatēšana, bez dziļākas metabolisko procesu izpēti. Piemēram, ir noskaidrots, ka augļiem nogatavojoties, tajos var pieaugt katalāzes aktivitāte [Gaspar et. al., 1982; Sahu et al., 1987]. Audiem novecojot, tā samazinās [Gaspar et. al., 1982], bet ir pētījumi, kuros konstatēts, ka novecošanās sākumstadijās katalāzes aktivitāte var arī pieaugt, piemēram, *Chrysanthemum morifolium* Ram ziedlapās [Bartoli et. al., 1995]. Pirms miera perioda iestāšanās ģeneratīvajos pumpuros iespējama augsta katalāzes aktivitāte, miera perioda laikā aktivitāte samazinās, bet pirms šī perioda beigām tā sāk lēnām pieaugt [Kaminski et. al., 1976]. Novērots, ka katalāzes aktivitāti audos ietekmē dažādi ārējās vides faktori. Stresa faktori var izraisīt katalāzes aktivitātes pieaugumu [Siminis et al., 1994]. Novērota tendence, ka katalāzes aktivitāte ir salīdzinoši lielāka tādu taksonu augu audos, kas izturīgāki pret dažādiem stresa faktoriem [Patra et al., 1994; Rainieri et al., 1994; Jagtap et al., 1995]. Nedaudzie pētījumi liecina, ka salīdzinoši augstāka katalāzes aktivitāte *in vitro* kultūrā varētu būt par vienu no rādītājiem atsevišķu genotipu vai audu lielākai izturībai un līdz ar to arī piemērotībai *in vitro* kultivēšanai [Cutler et al., 1989; Benson et al., 1992], jo tas liecina par audu spēju pārveidot ūdeņraža peroksīdu. Tomēr ir dati, ka stresa faktori, piemēram, paaugstināta smago metālu koncentrācija, izraisa katalāzes aktivitātes pieaugumu audos, kas pēc pāris stundām sāk samazināties [Wecx et al., 1993]. Arī citos eksperimentos ir novērots, ka stresa stāvoklim ieilgstot, katalāzes aktivitāte sāk samazināties [Zhang et al., 1994]. Pazemināta temperatūra aukstumneizturīgos augos izraisa katalāzes aktivitātes samazināšanos, tādēļ var uzkrāties H₂O₂. Tas arī izskaidro tropu un subtropu augu neizturību zemās temperatūrās [Omran, 1980]. Kā uzskata H. Sarujama [Sarujama et al., 1995], *Oryza sativa* L. šķirņu izturība pret pazeminātām temperatūrām ir saistīta tieši ar katalāzes aktivitātes stabilitāti audos. Atsevišķos gadījumos stresa apstākļos (paaugstināta NaCl

koncentrācija) novērota katalāzes aktivitātes stabilitāte [Olmos et al., 1994]. Tomēr ir konstatēta arī pilnīgi pretēja tendence - katalāzes aktivitātes samazināšanās stresa apstākļos un zema katalāzes aktivitāte stresizturīgos augos. Piemēram, *Oryza sativa* L. saknēs ir zemāka katalāzes aktivitāte tiem īpatņiem, kas ir izturīgāki pret paaugstinātām divvērtīgā dzelzs koncentrācijām [Bode et al., 1995]. Infekcijas gadījumā *Phaseolus vulgaris* lapās katalāzes aktivitātei ir tendence samazināties [Adam et al., 1995]. *Picea abies* skujās ir novērota katalāzes aktivitātes fotoinaktivācija [Schittenhelm et al., 1994]. Apkopojot literatūras datus, jāsecina, ka katalāzes aktivitāte ir atkarīga no bioloģisko un apkārtējās vides faktoru kopuma katrā atsevišķā eksperimentālajā sistēmā, kas arī izskaidro iegūto rezultātu dažādību.

Katalāzes aktivitāte rododendros. Rododendros katalāzes aktivitāte ir pētīta intakta auga dažādu dzinumumu dažāda vecuma lapās atkarībā no augšanas apstākļiem jau 1947. gadā [Кезелы и др., 1947]. Latvijas Universitātē ir sistemātiski pētīta katalāzes aktivitāte intaktu rododendru lapās no sešdesmitajiem gadiem. Ir novērots, ka fermenta aktivitāte mūžzaļo rododendru lapās korelē ar hlorofila daudzumu [Гертнере, 1974]. Retardants CCC stimulē katalāzes aktivitāti lapās [Кондратовтч, 1981]. Ir noskaidrota katalāzes aktivitātes gada dinamika rododendru lapās - maksimums ir novērojams veģetācijas perioda beigās, kā arī pirms ziedēšanas un sēklu veidošanas [Кондратовтч и др., 1972_(a)].

1. 5. Fenola savienojumu bioķīmiskais un fizioloģiskais raksturojums

Fenola savienojumu raksturīgā pazīme ir aromātiskais gredzens, kam pievienota viena vai vairākas hidroksilgrupas [Harborne, 1980; З апрометов, 1988].



Fenola savienojumus pamatā var iedalīt trīs grupās, no kurām ir atvasināti visi pārējie savienojumi [З апрометов, 1988]:

- 1) C_6 - C_1 oksibenzoskābes un to atvasinājumi;
- 2) C_6 - C_3 fenilpropanoīdi;
- 3) C_6 - C_3 - C_6 flavonoīdi.

Fenola savienojumi viegli oksidējas [Harborne, 1980]. Fizioloģiski nozīmīga ir 1) fermentatīvā oksidēšanās, ko katalizē galvenokārt polifenoloksidāzes un peroksidāzes [З апрометов, 1974; Блажей и др., 1977 Butt, 1979]; 2) reakcijas ar hidroksiradikāliem vai aktivēto skābekli, kurās fenola savienojumi darbojas kā antioksidanti, novēršot aktīvā skābekļa formu toksisko iedarbību [Larson, 1995].

Augos fenola savienojumi parasti sastopami saistītā formā ar ogļhidrātiem, sulfāta joniem, organiskajām bāzēm (amīniem, aminoskābēm) [Harborne, 1979, 1980; З апрометов, 1988]. Uzskata, ka augs, veidojot saistītos fenola savienojumus, palielina to šķīdību, neitralizē toksiskos savienojumus, bez tam, šādā veidā fenola savienojumi ir rezerves barības vielu sastāvdaļa [Barz et al., 1979].

Augiem fenola savienojumi ir konstatēti visās šūnās un audos [Harborne, 1980]. Šūnā tie galvenokārt ir vakuolā, hloroplastos un šūnapvalkā [З апрометов, 1974; Кефели, 1974; McClure, 1979; Harborne, 1980]. Atsevišķi fenola savienojumi ir sastopami visos augos, piemēram, kanēļskābes atvasinājumi, bet ir arī savienojumi, kas raksturīgi konkrētam taksonam vai orgānam [Блажей и др., 1977]. Novērots, ka augi var izdalīt šos savienojumus

augsnē [Gallet et al., 1995], tāpat kā *in vitro* audi tos izdala barotnē, īpaši fenola savienojumu oksidācijas produktus - hinonus [Chen et al., 1990].

Uzskata, ka fenola savienojumi sintezējas hloroplastos [Кефели, 1974; McClure, 1979; Музафаров и др., 1985], endoplazmatiskajā tīklā, proplastidās, peroksisomās, glioksisomās un mitohondrijos [McClure, 1979]. Ir vairāki fenola savienojumu biosintēzes ceļi, bet divi galvenie ir šikimāta un acetāt - malonāta ceļš [З апрометов, 1973]. Fenola savienojumu biosintēzes centrālais posms ir fenilalanīna amonija liāzes katalizētā kanēļskābes veidošanās no fenilalanīna [Hegerman, 1987]. Šīs reakcijas norisi var ietekmēt dažādi stresa faktori, piemēram, fitohormoni, barības vielas, infekcija, ievainojums, apgaismojums [Harborne, 1980]. Pētījumus par dažādu faktoru ietekmi uz biosintēzi apgrūtinātas, ka fenola savienojumu biosintēze var būt atkarīga arī no dažādiem bioloģiskiem faktoriem, piemēram, genotipa, audu veida [Harborne, 1980], to attīstības pakāpes [Ravn et al., 1994], kā arī no globāliem vides faktoriem, piemēram, diennakts ritma [Музафаров и др., 1985]. Šo pašu iemeslu dēļ nav vispārināmi fakti, kas iegūti par kāda noteikta fenola savienojuma metabolismu [Barz et al., 1979]. Bez tam, rezultāti var atšķirties, pētot eksogēno un endogēno fenola savienojumu darbību gan *in vivo*, gan *in vitro* [Barz et al., 1979].

Fenola savienojumi auga augšanu un attīstību regulē netieši, jo ietekmē augšanas regulatoru - īpaši auksīnu - biosintēzi, to darbību un inaktivāciju. Ir vairākas hipotēzes par fenola savienojumu ietekmi uz auksīnu biosintēzi. Uzskata, ka fenola savienojumu oksidācijas produkti, reaģējot ar triptofānu, varētu veidot indoliletikskābi [Gordon et al., 1961; З апрометов, 1974], bet ir arī autori, kas šādu iespēju noliedz, uzskatot, ka ir fenola savienojumi, kas inhibē auksīnu sintēzi no triptofāna [Кефели, 1974]. Pierādīts, ka fenola savienojumu un auksīnu biosintēzē ir kopējs metaboliskais priekštecis - šikimskābe. Var pieņemt, ka tas ir viens no iespējamiem augšanas periodiskuma izskaidrojumiem [Кефели, 1974]. Ir konstatēts, ka fenola savienojumi regulē auksīnu fermentatīvo oksidēšanos inhibējot (difoleni) vai stimulējot (vienkāršie fenola savienojumi) IES-oksidāzes darbību [З апрометов, 1974; Thimann, 1977;

Harborne, 1980; Гуськов, 1991]. Atšķirīgām sugām dažādos audos un orgānos vienam un tam pašam fenola savienojumam ir konstatēts pretējs fizioloģiskais efekts [Гуськов, 1991]. Tā piemēram, ka kanēļskābes atvasinājumi, mijiedarbojoties ar peroksidāzi, var gan stimulēt, gan inhibēt peroksidāzes katalizēto IES oksidēšanos [Volpert et al., 1995]. Savukārt fenola savienojumi, kas ir peroksidāzes substrāti, var bloķēt augsīnu oksidēšanos [Гуськов, 1991]. Uzskata, ka fenola savienojumi piedalās arī augsīna polārā transporta regulēšanā [Jacobs et al., 1988]. Interpretējot etilēna biosintēzes pētījumu rezultātus, L. Mapsons pieļauj iespēju, ka *in vitro* fenola savienojumi var ietekmēt etilēna biosintēzi no metionīna [Mapson, 1970]. Ir atrasti giberelīniem antagoniski tannīni [Corcoran et al., 1972], gan arī tiem sinerģiski fenola savienojumi [Kamisaka et al., 1977].

Uzskata, ka fenola savienojumu oksidētās formas piedalās elpošanas procesos kā ūdeņraža akceptoru [З апрометов, 1974; Блажей и др., 1977; З апрометов, 1992]. Iespējams, fenola savienojumi var pārnest ūdeņradi uz akceptoru hloroplastos fotosintēzes reakcijās [З апрометов, 1974]. Enerģētisko līmeni šūnā fenola savienojumi var ietekmēt, regulējot ATF sintēzi un hidrolizēšanos [Музафаров и др., 1985]. Šūnapvalkā esošie fenola savienojumi var piedalīties gaismas enerģijas pārveidāšanā [З апрометов, 1992]. Ar olbaltumvielām fenola savienojumi veido ūdeņraža saites, kas var ietekmēt fermentu aktivitāti [З апрометов, 1974].

Fenola savienojumi rododendros. Literatūrā nav izdevies atrast datus par fenola savienojumiem *Rhododendron* L. ģints *in vitro* kultivētos augos. Turpretī intaktos augos tie ir vieni no visplašāk analizētajiem savienojumiem. Rododendri ir īpaši bagāti ar miecvielām [Куршакова и др., 1961] un flavonoīdiem [Белова, 1968]. Jāatzīmē, ka vairums darbu ir veltīti tikai fenola savienojumu kvalitatīvajai analīzei. Lai raksturotu sistemātisko vienību, flavonoīdi ir noteikti *Ericaceae* dzimtā [Бандюкова и др., 1973], bet dažādi fenola savienojumi *Rhododendron* ģintī [Белова, 1968; Harborne, 1986]. Atsevišķu sugu raksturošanai ir izmantoti antociāni - *Rhododendron reticulatum* [Kunishige et al., 1975], dažādi fenola

savienojumi - *Rh. kotschy* [Скварко и др., 1974]. Uzmanība tiek pievērsta arī fenola savienojumiem atsevišķos orgānos, piemēram, *Rh. farrarae* Tate [Arthur, 1955], *Rh. ponticum* [Boitschinoff et al., 1963], *Rh. aureum* [Запесочная и др., 1965], *Rh. ellipticum* [Ho et al., 1995] lapās, *Rhododendron sp.* [Harborne, 1962; Loose, 1970], *Obtusum* subsērijā [Loose, 1969, 1970], *Rh. kiusianum*, *Rh. kaempferi* [Miyajima et al., 1995] ziedos. Azaleatīns pirmo reizi ir izdalīts no *Rh. mucronulatum* ziediem [Wada, 1956]. No *Rh. mucronulatum* irbuļa ir izolēts fenola savienojums, kas veicina putekšņu dīgšanu ne tikai *Rh. mucronulatum*, bet arī *Camellia japonica*, *Styrax japonica*, kā arī vēl citiem augiem [Ozawa et al., 1993]. Flavonoīdu biosintēze ir pētīta *Rh. simsii* ziedu vainaglapās [Decooman et al., 1993].

Ir atsevišķi mēģinājumi fenola savienojumus izmantot rododendru hemosistemātikā. Ziemeļamerikas rododendru sugām ir konstatēta specifiska flavonoīdu kompozīcija [King, 1977]. Ir arī apskatīta iespēja flavonoīdus izmantot rododendru hemosistemātikā [Harborne, 1969; King et al., 1975; Spethmann, 1975; Harborne 1978; King, 1978; Spethmann, 1978], kā arī mēģināts raksturot [Loose, 1979; Sumere et al., 1985] un identificēt [Blumenberg, 1989] noteiktus rododendru genotipus ar flavonoīdu palīdzību. Bez tam, fenola savienojumi ir pētīti arī saistībā ar ziedu krāsas iedzimšanu [Heursel, 1975].

Daudzi rododendros esošie fenola savienojumi ir farmakoloģiski aktīvas vielas, tādēļ jau no piecdesmitajiem gadiem ir veikti samērā daudz pētījumi, lai tādus konstatētu [Медведева, 1952; Белова, 1968; Александрова, 1970; Коммсаренко и др., 1980; Вастльченко и др., 1986; Forlines et al., 1992;].

Kā jau iepriekš minēts, rododendru kallusa kultūra līdz šim nav aprakstīta iegūšana un pētīšana. Kallusa kultūra, kuras attīstību būtu iespējams vadīt un prognozēt, pavērtu jaunas iespējas rododendru pavairošanā, selekcijā, kā arī dažādu fizioloģisku un morfoģenētisku procesu pētīšanā un izskaidrošanā.

Kallusa kultūra varētu būt perspektīvs izejmateriāls rododendru pavairošanai, to liecina novērojumi par organogēna kallusa vai kallusvidīgas

masas veidošanos atsevišķu rododendru pavairošanas sākumstadijā [Harbage et al., 1987; Economou et al., 1988; 1989; Iapishino et al., 1991^(a), 1991^(b)]. Ir publicēta virkne pētījumu par dažādu citu augu reģenerāciju no kallusa [Peterson et al., 1985; Santis et al., 1988; Binh et al., 1989; Bourque et al., 1989]. Atsevišķos gadījumos kalluss dod iespēju ātri savairot tādu taksonu augus, kuriem ir grūti panākt tiešu dzinumumu veidošanos no eksplanta.

Kallusa kultūru var izmantot selekcijā ne tikai genotipu pavairošanai, bet arī transgēno augu iegūšanai. Tā ir salīdzinoši jauna un perspektīva metode, bet pagaidām praksē vēl nav plaši pielietojama. Tas ir saistīts ar virkni vēl risināmu problēmu, piemēram, transgēnajai metodei piemērotu bioloģiskā izejmateriāla iegūšanu un reģenerācijas sistēmas izstrādi. Rododendru selekcijā šī metode vēl nav izmēģināta.

Līdz šim transgēno augu pētījumos kā izejmateriāls ir izmantotas protoplastu, šūnu suspensiju un kallusa kultūras [Oliveira, et al., 1996; Siemens et al., 1996]. Gan protoplastu, gan šūnu suspensijas kultūras daudzos gadījumos nav iespējams iegūt, apejot kallusa kultūru. Vienas no visbiežāk izmantojamām reģenerācijas sistēmām ir tās, kurām starpstadija ir kallusa kultūra, kaut arī tās trūkums ir potenciālā ģenētiskā nestabilitāte. Ģenētiski stabila būtu tiešas reģenerācijas panākšana, bet šādu sistēmu pagaidām ir grūti izveidot [Oliveira et al., 1996].

Kallusu izmanto, lai pētītu augu izturību pret dažādiem stresa faktoriem [Dai et al., 1995^(b)].

Rododendru kallusa kultūru varētu izmantot mikorīzas pētīšanai, jo arvien plašāk tam tiek izmantotas *in vitro* sistēmas [Staatsma et al., 1986].

Attīstoties audu, arī kallusa kultūru pielietošanai dažādās zinātnes un prakses jomās, rodas nepieciešamība pēc to attīstības kontroles, prognozēšanas un ģenētiskās stabilitātes testēšanas sistēmas izveidošanas. Kā jau iepriekš minēts (nodaļa 1. 2.), ir virkne datu par to, ka tiek pētītas dažādas bioķīmisko rādītāju izmaiņas *in vitro* kultūru attīstības laikā, tajā skaitā arī antioksidatīvo fermentu un fenola savienojumu kvantitatīvais un kvalitatīvais

sastāvs šūnās un audos, jo jānoskaidro bioķīmiskie rādītāji, ko varētu kvalificēt kā kultūras attīstības kritērijus.

2. MATERIĀLS UN METODES

Darbs tika veikts Latvijas Universitātes Augu audu kultūru laboratorijā, Bioloģijas fakultātes Augu fizioloģijas laboratorijā un Lundas Universitātes Ekoloģijas departamentā (Zviedrija).

Darba mērķis bija noskaidrot rododendru kallusoģenēzi un kallusa kultūras attīstību ietekmējošos faktoros, arī attīstību raksturojošos morfofizioloģiskos rādītājus ar nolūku izstrādāt kallusa kultūras iegūšanas paņēmienus. Atbilstoši mērķim tika izvirzīti šādi uzdevumi:

1. Noskaidrot dažādu orgānu kallusoģenēzes potenci, gada attīstības cikla un kultivēšanas apstākļu ietekmi uz *Rhododendron* L. ģints augu kallusa kultūras iegūšanu un proliferāciju.
2. Analizēt peroksidāzes kvalitatīvo un kvantitatīvo sastāvu dažādu taksonu rododendru kallusos atkarībā no *in vitro* kultivēšanas apstākļiem.
3. Noteikt katalāzes aktivitāti dažādu taksonu rododendru kallusos atkarībā no kultivēšanas apstākļiem.
4. Analizēt fenola savienojumu kvalitatīvo sastāvu dažādu taksonu rododendru kallusos, kas veidojušies atšķirīgos kultivēšanas apstākļos.

2. 1. Kallusa kultūras iegūšana

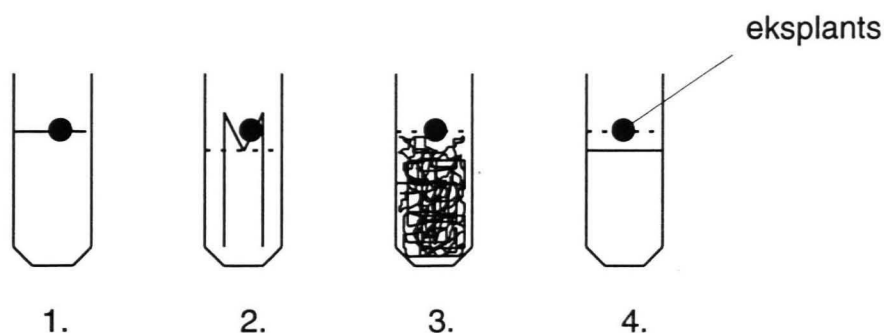
Kallusa kultūras iegūšanai tika izmantoti *Rhododendron* L. ģints augi no LU Botāniskā dārza atklātajiem laukiem un silrumnīcām. Eksplantiem izvēlēto orgānu virsma tika apstrādāta ar diocīda šķīdumu, kas saturēja 0,66 g/l N-cetilpiridīnchlorīdu un 0,33 g/l etanoldzīvsudraba hlorīdu. Strādājot iepriekš dezinficētā laminārajā boksā, eksplanti vispirms tika izolēti un tad ievietoti 25 ml mēģenēs ar barotni. Kultivēšanai tika izmantota Andersona [Anderson, 1984] un Cimmermana [Zimmermann et al., 1980] barotnes (2. tabula).

2. tabula

Andersona (1984) un Cimmermana (1980) barotņu minerālsāļu sastāvs

Barotnes komponenti	Andersona barotne mg/l	Cimmermana barotne mg/l
KNO ₃	480	202
NH ₄ NO ₃	400	160
(NH ₄) ₂ SO ₄		198
CaCl ₂ • 2H ₂ O	440	
Ca(NO ₃) ₂ • 4H ₂ O		708
MgSO ₄ • 7H ₂ O	370	369.6
KH ₂ PO ₄		405
NaH ₂ PO ₄ • H ₂ O	380	
H ₃ BO ₃	6.2	6.2
MnSO ₄ • H ₂ O	16.9	16.9
ZnSO ₄ • 7H ₂ O	8.6	8.6
KJ	0.30	0.30
Na ₂ MoO ₄ • 2H ₂ O	0.25	0.25
CuSO ₄ • 5H ₂ O	0.025	0.025
CoCl ₂ • 6H ₂ O	0.025	0.025
FeSO ₄ • 7H ₂ O	55.7	55.7
Na ₂ EDTA • 2H ₂ O	74.5	74.5

Barotnēm vēl tika pievienots inozīts 100 mg/l, tiamīns 0.4 mg/l, piridoksīns 0.1 mg/l, nikotīnskābe 0.5 mg/l, saharoze 20 g/l, Cimmermana barotnei arī adenīns 80 mg/l, kā arī fitohormoni - auksīni un / vai citokinīni. Ja īpaši nav norādīts, barotnes pH pirms autoklāvēšanas bija 5.1 - 5.4. Tika izmantotas dažādu barotņu sistēmas: 1) cieta - agarizēta (6.5 g/l Bacto Agar "Typ USA"); 2) šķidra ar filtrpapīra tiltiņu vai celulozes masu kā barotnes nesēju; 3) kombinēta - šķidrās barotnes slānis uz agarizētas (1. att.).



1. att. Barotņu konsistence : 1. agarizēta; 2. šķidra ar filtrpapīra tiltiņu; 3. šķidra ar celulozes masu; 4. kombinēta - šķidrās barotnes slānis uz agarizētas.

Tumsā kallusi tika kultivēti termostatā 25 °C temperatūrā, bet gaismā - audzēšanas telpā ar gaismas intensitāti apmēram 3000 lx, 16 stundu fotoperiodu, 25 ± 2 °C temperatūrā. Katrā eksperimentā bija 10 līdz 20 atkātojumi. Kultūras attīstība tika novērota vizuāli, attīstības sākumstadijās izmantojot stereoskopisko mikroskopu MEC-9.

2. 2. Organogēzes etapu noteikšana

Lai noteiktu auga attīstības stāvokļa ietekmi uz kallusoģenēzi, tika izmantota mūžzaļo rododendru H-75/1 (14.07.92. - 21.07.93.) un *Rh. caucasicum* (18.06.93. - 30.11.93.) augšanas koni un ziedi. Šim nolūkam ikreiz, uzsākot kallusa kultūras iegūšanu, puse no ziedkopas tika izmantota eksplantu

izloēšanai, bet otra puse fiksēta 70% etilspirtā. No 1. līdz 4. organoģenēzes etapam tika fiksēti augšanas koni. Fiksētajām ziedkopām tika atdalītas segzvīņas, izpreparēti ziedi, tiem atdalītas vainaglapas un daļēji arī putekšņlapas. Šādi sagatavots materiāls tika zīmēts ar stereoskopiskā mikroskopa МБС-10 zīmēšanas aparāta PA-4 palīdzību. Objektīva palielinājums zīmējot bija 1x, bet okulāra 8x, izņemot 11. 05. 1993 izolētajam ziedam objektīva palielinājums bija 0.6 x . Organoģenēzes etapu noteikšanai tika izmantota F. Kupermanes [Куперман, 1963] un R. Kondratoviča [Кондратович, 1981] metode.

2. 3. Ogļhidrātu kvantitatīvā analīze

Ogļhidrātu satura dinamika tika noteikta mūžzaļā rododendra hibrīda H-75/1 viengadīgo dzinumu lapās (14.07.1993. - 21.07.1994.). Reizē ar kallusa kultūras uzsākšanu viengadīgo dzinumu lapas tika fiksētas vāroša ūdens vannā. Lapas tika žāvētas istabas temperatūrā, saberztas bumbu dzirnavās un uzglabātas eksikatorā +4 °C temperatūrā līdz turpmākajai izmantošanai. Ogļhidrāti tika ekstrahēti no 10 mg parauga 5 ml 80% metilspirta. Ogļhidrātu acetilatvasinājumi tika iegūti pēc Sundina un Eka izstrādātās metodikas [Sundin et al., manuskripts]. Kā iekšējais standarts tika lietota ir ramnoze. Analīzei tika izmants 1 µl ogļhidrātu acetilatvasinājumu acetonitrila šķīdums (parauga koncentrācija apmēram 15 mg/ml). Ogļhidrāti tika atdalīti J&W kapilārajā kolonnā DB-5 (25 m × 0.2 mm I.D.), kas ievietota Perkina-Elmera 3900 modeļa gāzu hromatogrāfā ar liesmas jonizācijas detektoru. Detektora signālus apstrādāja un pierakstīja ar Helwett Packard 3390A modeļa integratoru. Nesējgāze bija ūdeņradis ar plūsmas ātrumu 3 ml/min, bet pirms detektora - arī slāpekļis ar plūsmas ātrumu 20 ml/min. Inžektora temperatūra bija 270 °C, detektora 290 °C, kolonnas temperatūras programma 150 līdz 270 °C, 8 °C/min.

Ogļhidrātu daudzums paraugā tika aprēķināts:

$$m_x = \frac{A_x}{A_{i.s.}} \cdot \frac{m_{i.s.}}{Rf}$$

m_x - ogļhidrāta daudzums modificētajā paraugā (μg),

$m_{i.s.}$ - iekšējā standarta masa paraugā (μg),

A_x - ogļhidrāta pīķa laukums,

$A_{i.s.}$ - iekšējā standarta pīķa laukums,

Rf - kavēšanas faktors, kas raksturo ogļhidrāta atrašanās vietu uz hromatogrammas.

Ogļhidrātu daudzums audos tika aprēķināts pēc vienādojuma:

$$M_x = \frac{m_x \cdot v}{v_1 \cdot n}$$

M_x - ogļhidrātu daudzums audos ($\mu\text{g}/\text{mg}$),

m_x - ogļhidrātu daudzums modificētajā paraugā (μg),

v - metilspirta tilpums, kurā ekstrahēts paraugs (ml),

v_1 - acetonitrila tilpums (ml),

n - audu iesvars (mg)

2. 4. Peroksidāzes aktivitātes noteikšana

2. 4. 1. Peroksidāzes aktivitātes noteikšana izmantojot gvajakolu kā substrātu

Peroksidāzes aktivitāte tika noteikta spektrofotometriski pēc Pütter (1970) metodikas. Tika izmantots spektrofotometrs CФ - 26 ЛОМО. Peroksidāze tika ekstrahēta no 0.2 vai 0.3 g svaigu audu attiecīgi 3 vai 4 ml fosfātbufera šķīdumā (0.1 M, pH 7.0), pievienojot 0.1 g PVPP. Analizējamais šķīdums kivetē sastāvēja no: 2.1 ml fosfātbufera (\approx 0.1 M, pH 7.0); 0.05 ml gvajakola (20.1 mM); 0,03 ml H_2O_2 (12,3 mM) un 1 ml audu ekstrakta. Šķīduma optiskais blīvums tika nolasīts pie viļņu garuma 436 nm.

Peroksidāzes aktivitāte tika aprēķināta pēc formulas [Pütter, 1970]:

$$A = \frac{3.18 \cdot 0.1 \cdot 4 \cdot v}{1 \cdot 25.5 \cdot \Delta t \cdot n}$$

A - peroksidāzes aktivitāte ($\mu\text{mol gvajakols} \cdot \text{g (audu svaigā masa)}^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$),

3,18 - kopējais šķīduma tilpums kivetē (ml),

0,1 - optiskais blīvums pie kura tiek fiksēts reakcijas laiks,

v - fosfātu bufera tilpums, audu ekstrakta pagatavošanai (ml),

1 - audu ekstrakta tilpums kivetē (ml),

25,5 - īpatnējais absorbcijas koeficients gvajakola oksidācijas produktiem pie 436 nm, kad šķīduma optiskais blīvums ir 0.1,

Δt - reakcijas ilgums (min),

n - audu iesvars (g).

2. 4. 2. Peroksidāzes aktivitātes noteikšana izmantojot benzidīnu kā substrātu

Peroksidāzes aktivitāte tika noteikta spektrofotometriski, izmantojot modificētu Bojarkina metodi [Бояркин, 1951], kas pielāgota pētāmajam objektam. Izmantoja spektrofotometru СФ - 26 ЛОМО. Peroksidāze tika ekstraģēta no 0.05 līdz 0.1 g svaigu audu ar 10 ml acetāta bufera (pH 7,0), pievienojot 0.1 g PVP. Analizējamais šķīdums kivetē sastāvēja no 1,5 ml acetātu bufera (pH 7,0); 0,5 ml benzidīna (0.92 mg/ml); 0,5 ml 0.042% H₂O₂ un 0,5 ml audu ekstrakta. Optiskais blīvums tika nolasīts pie 590 nm. Peroksidāzes aktivitāti aprēķina pēc formulas [Бояркин, 1951]:

$$A = \frac{\Delta D \cdot v \cdot \gamma}{d \cdot \Delta t \cdot n}$$

A - peroksidāzes relatīvā aktivitāte gramā audu svaigajā masā sekundē,

ΔD - optiskā blīvuma starpība,

v - audu ekstrakta kopējais tilpums (ml),

γ - atšķaidījuma pakāpe kivetē,

d - slāņa biezums kivetē (cm),

Δt - reakcijas laiks (s),

n - audu iesvars (g).

Vidējam aritmētiskajam rezultātam no 3 bioloģiskajiem atkārtojumiem tika aprēķināta standartkļūda. Peroksidāzes aktivitāti vispirms noteica eksplantos. Kallusus nosakot aktivitāti, eksplantu audi netika atdalīti no kallusa.

2. 5. Peroksidāzes izoformu lokalizēšana

Izofermenti tika atdalīti ar vertikālo poliakrilamīda gēla elektroforēzi, izmantojot aparātu АВГ э-1. Izoperoksidāzes tika ekstrahētas no 0.29 g audu materiāla ar 1 ml šķīduma, kas satāvēja no koncentrējošās sistēmas bufera (pH 6.7) un glicerīna maisījums 2.5:1. Skābo izoformu ekstrahēšanai buferis tika gatavots pēc Dēvisa metodes [Davis, 1964], bāzisko - pēc Reifelda metodes [Reisfeld, 1962]. Izvilkuma pagatavošanas laikā audu materiālam tika pievienots 0.1 g PVP. Skābo peroksidāžu izdalīšanai elektroforēzes gēlus sagatavoja pēc Dēvisa metodes [Davis, 1964], bet bāzisko peroksidāžu - pēc Reifelda metodes [Reisfeld, 1962]. Elektroforēzē netika izmantoti koncentrējošie gēli. Uz gēla tika uznesti 100 μ l ekstrakta un indikatoršķīduma maisījums (3:1). Skābajām peroksidāzēm indikatoršķīdums bija bromfenilzilais 2.5 mg/ml, bet bāziskajām - bāziskais fuksīns 50 mg/ml. Gēla garums bija 11.5 cm, elektroforēzes ilgums 3 līdz 4 stundas, spriegums 255 V, strāvas stiprums 22 mA. Izofermenti tika vizualizēti, elektroforogrammas turot šķīdumā, kas saturēja benzidīnu (0,2 g benzidīns; 0.5 ml etiķskābe; 100 ml H₂O), pakāpeniski pievienojot 30 % H₂O₂. Analizējamo vielu kustīgums (Rf) tika noteikts pēc formulas [Hames, 1985]:

$$R_f = \frac{\text{izoformu migrācijas attālums}}{\text{krāsvielas migrācijas attālums}}$$

2. 6. Katalāzes aktivitātes analīze

Katalāzes aktivitāte tika noteikta, jodometriski titrējot pēc H. Počinoka metodes [Починок, 1956], kas balstās uz H_2O_2 sadalīšanu katalāzes klātbūtnē. H_2O_2 atlikumam reaģējot ar KJ skābā vidē, izdalās J_2 , ko cietes klātbūtnē attitrē ar $Na_2 S_2 O_3$. Katalāzes aktivitāti aprēķina pēc formulas [Починок, 1956]:

$$A = \frac{25 \cdot 293 \cdot [0,01 \cdot (a-b) + \lg \frac{a}{b}]}{10 \cdot n \cdot 5}$$

A - katalāzes aktivitāte [$\mu\text{mol } H_2O_2 \cdot (\text{g audu svaigā masa})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$],

a - $Na_2S_2O_3$ daudzums kontroles titrēšanai (ml),

b - $Na_2S_2O_3$ daudzums parauga titrēšanai (ml),

n - svaigo audu iesvars (g),

25 - izvilkuma tilpums (ml),

293 - koeficients H_2O_2 daudzuma pārrēķināšanai mikromolos,

10 - analīzei ņemtais izvilkuma tilpums (ml),

5 - reakcijas laiks (min).

Vidējam aritmētiskajam rezultātam no 3 bioloģiskajiem atkārtojumiem tika aprēķināta standartkļūda. Katalāzes aktivitāti vispirms noteica eksplantos. Kallusus nosakot aktivitāti, eksplantu audi netika atdalīti no kallusa.

2. 7. Fenola savienojumu analīze

Lai izdalītu fenola savienojumus, tika izmantota poliamīda plānslāņa hromatogrāfija [Лана, 1986]. Apmēram 1,5 g audu materiāla tika vairākkārt ekstraģēts 80% etilspirtā, visbeidzot ietvaicēts. Sausam paraugam pielēja 2-3 ml 80% etilspirta. Vienvirziena hromatogrāfijā kā nesējsistēma tika izmantots maisījums toluols 45 : etanols 36 : etiķskābe 16, bet divvirziena hromatogrāfijā - pirmā ir jau minētā sistēma, bet otra - 30% etiķskābe. Hromatogrammas izlases veidā tika krāsotas ar $FeCl_3$, kas parādīja hidroksilgrupu klātbūtni, ar $AlCl_3$, kas krāsoja flavonoīdus, un visas ar *Fast Blue RR* sāli, kas krāsoja lielāko daļu

fenola savienojumu. Bez tam fenola savienojumi tika lokalizēti, hromatogrammas aplūkojot ultravioletajā (UV) gaismā. Savienojumu iepriekšējā identifikācija tika veikta, nosakot to ultravioleto viļņu absorbcijas spektrus 96% etilspirtā ar *SPECORD UV VIS*. Spektri tika atšifrēti, izmantojot K. Hermaņa datus [Hermann, 1978]. Savienojuma atrašanās vietu uz hromatogrammas raksturoja ar kustīgumu (R_f) [Harborne, 1984].

3. REZULTĀTI UN TO ANALĪZE

3. 1. Rododendru kallusa kultūras iegūšana

3. 1. 1. Dažādu orgānu eksplantu kallusoģenēze

Literatūrā ir atrodami dati par dažādu audu un orgānu eksplantu morfoģenētiskā potenciāla atšķirībām, bez tam katram taksonam tas ir ģenētiski noteikts [Калинин и др., 1980; Pierik, 1987]. Atsevišķos *in vitro* pavairošanas gadījumos rododendriem ir novērota organogēna kallusa vai kallusveidīgas masas veidošanās tieši no dzinumumu [Harbage et al., 1987; Economou et al., 1988; Iapichino et al., 1991_(a), 1991_(b)], ziedu [Meyer, 1982, 1983_(a), 1983_(b); Dai et al., 1987; Shevade et al., 1993] un lapas plātnes [Iapichino et al., 1992] eksplantiem, bet trūkst salīdzinoša pārskata par dažādu orgānu eksplantu kallusoģenēzes potencēm. Tas izskaidrojams ar to, ka nevienā no publicētajiem eksperimentiem nav bijis mērķis kallusa iegūšana un subkultivēšana, bet gan rododendru pavairošana. Tikpat kā nav datu arī par proliferējošas organogēnas vai neorganogēnas subkultivējamas rododendru kallusa kultūras iegūšanu. Tādēļ, uzsākot darbu pie rododendru kallusa kultūras iegūšanas, pirmais uzdevums bija noskaidrot, no kura orgāna eksplantiem ir iespējams iegūt sterīlu *in vitro* kultūru un panākt intensīvu kallusoģenēzi.

Eksperimentos iegūtie rezultāti liecina, ka lapas plātnes, galvenās dzīslas, lapas kātiņa un sakņu eksplanti neveido kallusu (3. tabula). To veidoja stumbra eksplanti (3. tabula). Tas bija novērojams arī gadījumos, kad eksplantā bez stumbra audiem bija vēl arī augšanas kons (I-IV organoģenēzes etaps), veģetatīvais vai lapas paduses pumpurs (3. tabula). Tomēr jāatzīmē, ka no eksplantiem, kuros bija stumbra audi, grūti iegūt sterīlu kultūru: - inficēta 30 līdz 70% *in vitro* kultūra (3. tabula). Arī literatūrā ir atzīmēta rododendru dzinumumu eksplantu lielā inficētība [Gertnere u. c., 1990; Гертнере, 1990]. Lai to samazinātu, pirms eksplantu izolēšanas mātesaugu iesaka kultivēt siltumnīcā [Cohen, 1986], tomēr ir dati arī par siltumnīcas acāliju dzinumumu eksplantu salīdzinoši lielo inficētību [Economou et al., 1981; Гертнере, 1990]. Apkopojot

Rhododendron L. dažādu orgānu eksplantu kallusoģenēze tumsā uz Andersona barotnes ar IPA 2 vai 5 mg/l un NES 8 vai 1 mg/l

Orgāns, no kura iegūts eksplants	Kallusoģenēzes novērtējums	Inficētība (%)
Sakne	kalluss neveidojas	70 - 80
Dzinuma stumbra daļa	laba	60 - 70
Lapas kātiņš un galvenā dzisla	kalluss neveidojas	50 - 60
Lapas plātne	kalluss neveidojas	50 - 60
Lapas paduses pumpurs kopā ar stumbra daļu	reti, galvenokārt no stumbra daļas	60 - 70
Augšanas kons ar subapikālajiem stumbra audiem (I līdz IV organoģenēzes etapā)	laba, gan no galotnes, gan subapikālajiem audiem	30
Veģetatīvais galotnes pumpurs ar stumbra daļu	laba, galvenokārt no stumbra daļas	60 - 70
Zieds	laba	~5

eksperimentu rezultātus un literatūras datus, jāsecina, ka galvenais rododendru dzinumu eksplantu trūkums ir sterīlas *in vitro* kultūras iegūšanas grūtības.

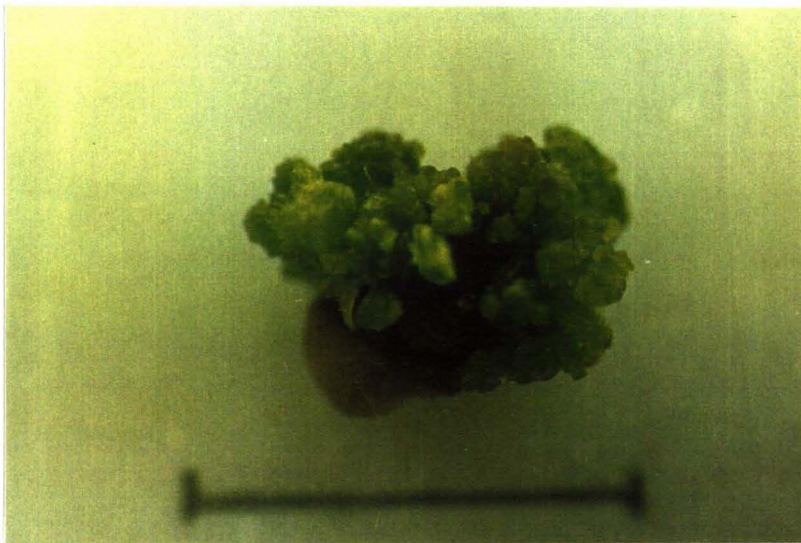
Visintensīvāk kallusu veidoja ziedu eksplantī, kultūras inficētība bija apmēram 5%, tātad salīdzinoši neliela (3. tabula). Tas ir saistīts ar zieda attīstības īpatnībām, jo vispirms veidojas segzviņas, bet zieda orgāni attīstās zem tām, tātad rododendriem ziedi ir vispiemērotākais orgāns eksplantu iegūšanai.

Kultivējot ziedu bez vainaglapām (tumsā), kallusoģenēzi varēja novērot no visām zieda daļām, izņemot no drīksnas un irbuļa, kas nekrotizējās. Tādēļ

radās doma izolēt atsevišķus zieda orgānus un pārbaudīt to kallusoģenēzes potences dažādos kultivēšanas apstākļos.

Rezultāti, kas iegūti eksplantus kultivējot gaismā, liecināja, ka zieds, ar atdalītām vainaglapām nekrotizē, bet atsevišķu zieda orgānu eksplanti - driksna ar irbuli, putekšņlapa, sēklotne kopā ar ziedgultni un ziedkātu - labi veidoja kallusu (4. tabula). Kultivējot Andersona barotnes ar IPA un IES (gaismā), kalluss atsevišķos gadījumos bija organogēns (4. tabula).

Lieratūrā ir dati par organoģenēzi no dažu rododendru zieda daļu eksplantiem [Pennel, 1990; Meyer, 1981_(a), 1981_(b), 1983_(a), 1983_(b)]. Eksperimentu rezultāti liecināja, ka visintensīvāk organoģēna kallusa veidošanās gaismā notika no eksplantiem, kuros sēklotne ir kopā ar ziedgultni, vainaglapu paliekām un ziedkātu (2. att.).



2. att. Organoģēns kalluss

(iegūts no H-75/1 zieda eksplanta, kas 2.5 mēnešus kultivēts gaismā uz Cimmermana barotnes ar IPA 15 mg/l un IES 4 mg/l); — - 1cm

Lieratūrā nav datu par neorganogēna kallusa veidošanos no rododendru ziedu eksplantiem. Darbā iegūtie rezultāti liecina, ka neorganogēns kalluss no dažādu

Dažādu zieda daļu eksplantu kallusoģenēze uz Andersona barotnes ar IPA 2-5 mg/l + NES 1-8 mg/l tumsā un ar IPA 6-15 mg/l + IES 1.5 - 4 mg/l gaismā (16 h foteperiods)

Eksplants	Kallusoģenēze gaismā	Kallusoģenēze tumsā
Driksna, irbulis, sēklotne, ziedgultne, putekšņlapas, vainaglapu paliekas un ziedkāts	nekroze, kalluss neveidojas	labā no visām daļām, izņemot no driksnas un irbuļa, kuri nekrotizē
Driksna un irbulis	labā, var veidoties organogēns kalluss	nekroze, kalluss neveidojas
Putekšņmaciņš un putekšņlapas kātiņš	labā	vidēja, biežāk no kātiņa, retāk no putekšņmaciņa
Sēklotne, ziedgultne, vainaglapu paliekas un ziedkāts	labā, var veidoties organogēns kalluss	labā no visām daļām
Sēklotne, ziedgultne un ziedkāts	labā, var veidoties organogēns kalluss	labā no visām daļām
Sēklotne un ziedgultne	labā, var veidoties organogēns kalluss	labā no abām daļām
Ziedgultne un ziedkāts	nav pārbaudīts	labā no abām daļām
Sēklotne	nav pārbaudīts	labā
Ziedgultne	nav pārbaudīts	vidēja
Ziedkāts	labā, var veidoties organogēns kalluss	samērā vāja

zieda daļu eksplantiem veidojas tumsā, nekrotizēja vienīgi drīksna un irbulis (4. tabula). Vislabāk kallusu veidoja rododendru zieda eksplanti, kuros sēklotne bija kopā ar ziedgultni, vainaglapu paliekām un ziedkātu (4. tabula). Kallusa veidošanās dažkārt bija novērojama arī no vainaglapu paliekām. **Tādēļ turpmākajā darbā eksplantus, kas sastāvēja no sēklotnes kopā ar ziedgultni, ziedkātu un vainaglapu paliekām izmantoja kā modeļobjektus, tālāk tekstā tie tiks dēvēti par ziedu eksplantiem (3. att.).**



3. att. Ziedu eksplanti, kas sastāv no sēklotnes, ziedgultnes, ziedkāta un vainaglapu paliekām

(pa kreisi - *Rh. luteum*, pa labi - *Rh. catawbiense*); — 1 cm

Kallusa veidošanās tumsā bija novērojama arī no atsevišķi izolētas sēklotnes, ziedgultnes un ziedkāta (4. tabula). Tie var tikt izmantoti par eksplantiem, gadījumā, ja ir ierobežots izejas materiāla daudzums. Daži zinātnieki ir konstatējuši kallusa veidošanos mikropavairošanas sākumstadijā no atsevišķām zieda daļām, Dai [Dai et al., 1987] no sēklotnes un ziedkāta, bet Mejers [Meyer, 1982] - no ziedgultnes un ziedkāta. Mūsu eksperimentos varēja novērot, ka eksplants, kas sastāvēja no vairākām zieda daļām, vairumā

gadījumu kalluss veidoja no tās daļas, kas bija tiešā saskarē ar barotni (5. tabula).

5. tabula

Kallusoģenēze atkarībā no zieda eksplanta (sēklotne kopā ar ziedgultni, ziedkātu un vainaglapu paliekām) novietojuma uz barotnes (Andersona barotne ar IPA 2 mg/l un NES 8 mg/l; tumsa)

Eksplanta novietojums uz barotnes	Atkārtojumu skaits	Kallusu veidojošā daļa
Eksplants ar ziedkātu uz barotnes	10	7 atkārtojumos kallusu veido ziedkāts
Eksplants ar sēklotni uz barotnes	10	7 atkārtojumos kallusu veido sēklotne

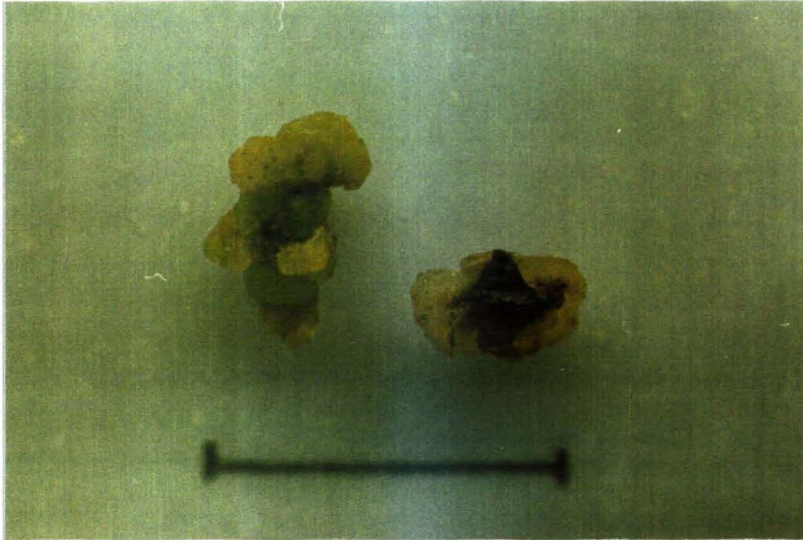
Tika konstatēts, ka zieda eksplanti varēja veidot kallusu gan no vienas, gan arī no vairākām daļām reizē. Kā redzams 4. attēlā pa kreisi - kallusu veido sēklotne, ziedgultne un ziedkāts reizē, bet attēlā pa labi - sēklotne ir pilnībā nekrotizējusies, kalluss veidojas tikai no ziedgultnes, 5. attēlā - organogēns kalluss veidojas no ziedkāta.

Tika konstatēts, ka kallusoģenēzi no zieda daļām neietekmē zieda novietojums ziedkopā.

Secinājumi no eksperimentos iegūtajiem rezultātiem:

** Rododendru kallusa iegūšanai vispiemērotākie ir eksplanti no ziediem. Atšķirībā no veģetatīvo orgānu eksplantiem, tos ir iespējams iegūt sterīlus un panākt intensīvu kallusoģenēzi.*

** Ja salīdzina dažādu zieda orgānu kallusoģenēzes potences, tad gan organogēna, gan neorganogēna kallusa iegūšanai vispiemērotākie ir eksplanti, kas sastāv no sēklotnes kopā ar ziedgultni, ziedkātu un vainaglapu paliekām.*



4. att. *Rh. catawbiense* kallusi no zieda eksplanta dažādām daļām; *pa kreisi* - kallus veidojies no sēklotnes, ziedgultnes un ziedkāta, *pa labi* - kalluss veidojies no ziedgultnes, sēklotne ir nekrotizējusi (kultivēts uz Andersona barotnes ar IPA 2 mg/l un NES 8 mg/l, 1.5 mēnešus tumsā); — - 1 cm



5. att. *Rh. catawbiense* kalluss, kas veidojies no ziedkāta (kultivēts uz Andersona barotnes ar IPA 15 mg/l un IES 4 mg/l, 2 mēnešus gaismā)

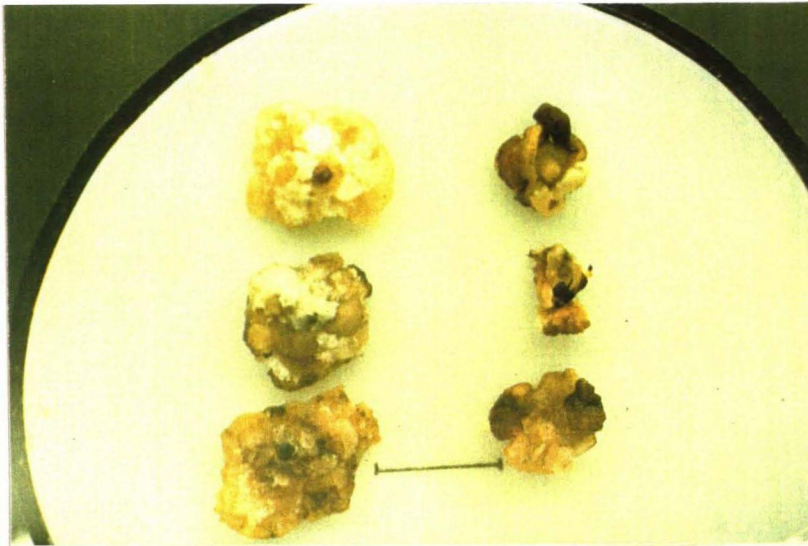
3. 1. 2. Minerālsāļu, fitohormonu, pH, barotnes konsistences un fotoperioda ietekme uz kallusa veidošanos un attīstību

Ir zināms, ka rododendriem gan *in vivo*, gan *in vitro* raksturīga zema izturība pret paaugstinātu minerālsāļu koncentrāciju [Anderson, 1978]. Tādēļ Andersons (1984) izveidoja barotni, kurā, salīdzinājumā ar Murašiges-Skuga barotni [Murashige et al., 1962] (45.14 mM), ir pazemināta makroelementu koncentrācija (16.99 mM). Šajā darbā tika pētīts, vai minerālsāļu sastāvs Andersona barotnē (1984), kas tiek uzskatīts par optimālu rododendru mikropavairošanai, ir piemērots arī kallusoģenēzes inducēšanai. Rezultāti tika salīdzināti ar tiem, kas iegūti kultivēšanai izmantojot Cimmermana barotni [Zimmermann et al., 1980], kurā kopējā minerālsāļu koncentrācija ir vēl zemāka (13mM) un citas $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$ attiecības. Andersona barotnē $\text{NH}_4^+ : \text{NO}_3^-$ ir 9.1 : 1, bet Cimmermaņa - 6.7 : 1.

Ekspērimētā tika novērots, ka Andersona barotne stimulēja ziedu eksplantu kallusoģenēzi tumsā un gaismā (6. A, B att.), gan arī organogēna kallusa veidošanos gaismā (6. B att.). Kallusoģenēze un kallusa proliferācija uz Cimmermana barotnes bija nedaudz vājāka nekā uz Andersona barotnes, īpaši tumsā (6. A; B att.). Literatūrā ir norādes uz kallusa veidošanos atsevišķu rododendru mikropavairošanas sākumstadijās, kad tiek izmantota Andersona barotne (1984) [Iapichino, 1991_(a); 1991_(b); 1992]. *Rezultāti parādīja, ka rododendru kallusa kultūras iegūšanai piemērotākā ir Andersona barotne (1984).*

Nākošais uzdevums bija noskaidrot citokinīnu un auksīnu koncentrāciju (arī to kombināciju), apgaismojuma ietekmi uz kallusoģenēzi un kallusa tālāko attīstību.

Pētīto rododendru ziedu eksplanti neveidoja kallusu un nebija organogēni uz barotnes, kas saturēja tikai auksīnus, vai tikai citokinīnus (6. tabula).

A**B**

6. att. Kultivēšanas apstākļu ietekme uz kallusa veidošanos; — 1 cm
 H-75/1 ziedu eksplantu kalluss pēc 2.5 mēnešu ilgas kultivēšanas:

A tumsā; **B** gaismā

pa kreisi - kultivēšana notikusi uz Andersona barotnes ar

IPA 2 mg/l un NES 8 mg/l;

IPA 3 mg/l un NES 4 mg/l;

IPA 5 mg/l un NES 1 mg/l;

pa labi - kultivēšana notikusi uz Cimmermana barotnes ar

IPA 10 mg/l un IES 2.5 mg/l;

IPA 15 mg/l un IES 4 mg/l;

IPA 10 mg/l un IES 8 mg/l.

Auksīnu un citokinīnu ietekme uz rododendru ziedu eksplantu kallusoģenēzi

Citokinīni	Auksīni			
	nav	NES	IES	2,4-D
nav	X	X	X	X
IPA	X	XXX	XX	XX
BAP	X	XX	X-XX	XX
kinetīns	X	XX	X-XX	X-XX

X - kalluss neveidojas; XX - kallusoģenēze vidēja; XXX - intensīva

Piemēram, 2,4-D un līdzīgi arī kinetīns un IPA (7. att; 8. att.) nestimulēja kallusa veidošanos. Tas ir pretēji C. R. Norton [Norton et al., 1989] un H. Robeneka [Robenek, 1977] aprakstītajai kallusoģenēzei no dzinumu eksplantiem, ko panāca uz barotnēm ar citokinīniem vai auksīniem. *Tātad jāsecina, ka ziedu eksplantu kallusoģenēzes inducēšanai ir nepeiciešama gan auksīnu, gan citokinīnu klātbūtne barotnē.*

Pārbaudot dažādu citokinīnu un auksīnu kombināciju ietekmi uz kallusoģenēzi varēja konstatēt, ka IPA vislabāk stimulē ziedu eksplantu kallusoģenēzi, ja salīdzina ar BAP un kinetīnu (6. tabula). Kallusoģenēzi vāji stimulēja tikai atsevišķas BAP un kinetīna koncentrācijas (BAP 0,1 mg/l kopā ar NES 5 vai 10 mg/l, tumsā; kinetīns 5 mg/l kopā ar IES 2 mg/l, gaismā; kinetīns kopā ar 2,4-D, tumsā (8. att.)). BAP klātbūtnē bieži bija novērojama audu nekroze. Vairākās publikācijās ir minēts, ka rododendru mikropavairošanai, īpaši kultivēšanas sākumā, vispiemērotākais citokinīns ir IPA [Economou et al., 1981; Fordham, 1982; McCown et al., 1983; Norton et al., 1985; Pennell, 1990]. Tomēr ir dati, ka dzinumu proliferācijas stimulēšanai ir

2,4-D mg/l IPA mg/l	0	0,1	0,5	1	3	5
0						
1						
3						
5						

7. att. IPA un 2,4-D ietekme uz *Rh. luteum* zieda eksplantu kallusoģenēzi
(kultivēšana notika uz Andersona barotnes tumsā 2 mēnešus)

2,4-D mg/l kin. mg/l	0	0,1	0,5	1	3	5
0						
0,5						
1						
5						

8. att. Kinetīna un 2,4-D ietekme uz *Rh. luteum* zieda eksplantu kallusoģenēzi
(kultivēšana notika uz Andersona barotnes tumsā 2 mēnešus)

pielietots kinetīns un BAP nelielās koncentrācijās [Economou et al., 1981]. Iespējams, ka cēlonis rododendru specifiskajai reakcijai uz BAP ir receptoru trūkums, līdz ar ko BAP ir fizioloģiski neaktīvs.

Salīdzinot dažādu auksīnu (IES, NES, 2,4-D) ietekmi uz rododendru ziedu eksplantu kallusoģenēzi kopā ar citokinīniem, varēja konstatēt, ka NES, īpaši kombinācijā ar IPA, visefektīvāk veicināja kallusoģenēzi gan tumsā, gan gaismā. NES tikpat kā netiek lietota rododendru mikropavairošanā. Nortons (1989) gan atzīmē, ka dzinumu eksplantu kallusoģenēzi NES stimulē mazāk nekā 2,4-D. Eksperimentos ar ziedpumpuru eksplantiem tika konstatēts, ka NES, plašā koncentrāciju diapazonā (1 - 12 mg/l, kopā ar IPA 1 - 10 mg/l) efektīgi stimulē kallusa veidošanos, īpaši tumsā. Visintensīvāko kallusoģenēzi varēja konstatēt uz barotnēm, kurās NES 8; 4; 1 mg/l bija kopā ar IPA attiecīgi 2; 3; 5 mg/l, tādēļ darbā tās tika izmantotas visbiežāk.

Tumsā uz barotnēm, kurās NES 5 vai 10 mg/l bija kombinācijā ar BAP 0.1 mg/l, rododendru ziedu eksplanti lēni veidoja nelielus kallusus, līdzīgi kā uz barotnes ar NES 5 mg/l un kinetīnu 1 mg/l.

IES kopā ar IPA izmanto rododendru mikropavairošanai, lai stimulētu mikrodzinumu diferencēšanos un proliferāciju [Anderson, 1975; 1984; Meyer, 1981^(b); 1982; 1983^(a); Dai et al, 1987; Iapichino 1991^(a); 1991^(b)]. Mūsu eksperimentos tika noskaidrots, ka ziedu eksplanti uz barotnes ar IES 2,5 - 12 mg/l un IPA 10 - 15 mg/l gaismā mēdz veidot organoģenu kallusu (9. att.), no kura turpmākajā kultivēšanas gaitā varēja diferencēties dzinumi. Tumsā IPA un IES iedarbības rezultātā bija novērojama vājāka kallusoģenēze, nekā uz barotnes ar NES un IPA (21. A att.). Savukārt IES un BAP vai kinetīns praktiski nestimulēja kallusoģenēzi.

Kā jau iepriekš minēts, eksperimentos novērots, ka NES, salīdzinājumā ar IES, bija tendence stimulēt kallusu veidošanos un proliferāciju, bet organoģenēze tika inhibēta, un otrādi. Pētījumos ar *Digitalis purpurea* ir

IPA : IES	IPA - IES (mg/l)			
3.7:1	15-4 	10-2.6 	6-1.6 	3-0.8
1.25:1	15-12 	10-8 	6-4.8 	3-2.4
6:1	15-2.5 	10-1.7 	6-1 	3-0.5

9. att. IPA un IES ietekme uz organogēna kallusa veidošanos

(*Rh. catawbiense* ziedu eksplanti kultivēti uz Andersona barotnes 2.5 mēnešus tumsā)

atzīmēts, ka NES stimulē kallusa augšanu un kavē organogēni, bet IES ietekmes rezultātā novērojams pretējs efekts. Iespējams, ka NES ir raksturīgi stimulēt tieši nediferencētu šūnu augšanu, bet IES - šūnu diferencēšanos.

C. R. Nortons [Norton et al., 1989] min 2,4-D kā vienu no visefektīgākajiem augsniem, kas stimulē rododendru dzinumu eksplantu kallusoģenēzi. Mūsu rezultāti liecināja, ka uz barotnes tikai ar 2,4-D vai 2,4-D kombinācijā ar BAP, IPA (7. att.) un kinetīnu (8. att.) ziedu eksplantu kallusoģenēze bija vāja.

Novērojot fitohormonu izraisīto rododendru ziedu eksplantu morfoģenētisko reakciju, varēja konstatēt, ka tā ir līdzīga plašā koncentrāciju diapazonā. Piemēram, IPA 10-15 mg/l kopā ar IES 2,5 - 12 mg/l (9. att.) stimulēja organogēna kallusa veidošanos; IPA 1-10 mg/l kopā ar NES 1-12 mg/l stimulēja neorganogēna kallusa veidošanos un proliferāciju. Piemēram, IPA 2/3/4/5 mg/l kopā ar NES attiecīgi 8/12/3/1 mg/l stimulēja vienlīdz intensīvu kallusoģenēzi. Tas nozīmē, ka citokinīni un augsni spējusi ietekmēt viens otra metabolismu vai arī uzņemšanu no barotnes [Полевой, 1982; Гамбург и др.,

1990]. Ir zināms, ka citokinīni stimulē dzinumu diferenciāciju [Полевой, 1982]. Eksperimentos varēja konstatēt, ka augstāka citokinīnu koncentrācija (IPA 10 - 15 mg/l) bija nepieciešama organogēnas kallusoģenēzes stimulēšanai, bet neorganogēns kalluss veidojās, ja IPA bija zemākā koncentrācijā (1-10 mg/l).

Tātad, eksperimentu rezultātā varēja konstatēt, ka rododendru ziedu eksplantu kallusoģenēzi stimulē IPA 1 - 10 mg/l kopā ar NES 1 - 12 mg/l vai IPA 10 - 15 mg/l kopā ar IES 2,5 - 12 mg/l.

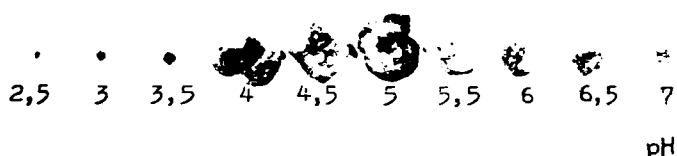
Kā jau iepriekš minēts, vairums rododendru mikropavairošanas pētījumi ir veikti apgaismojumā ar 16 - 18 h fotoperiodu, jo mērķis ir bijis dzinumu iegūšana. Tikai dažos eksperimentos tūlīt pēc eksplantu ievadīšanas *in vitro*, kultūras tiek inkubētas tumsā 2 - 4 nedēļas [Meyer, 1982; Dai et al., 1987]. Pēc C. R. Nortona [Norton et al., 1989] novērojumiem auksīni dediferenciāciju stimulē tumsā, bet citokinīni - gaismā.

Mūsu eksperimentos iegūtie rezultāti liecina, ka *ziedu eksplantu kallusoģenēzi, neatkarīgi no barotnes visiem taksoniem veicina tumsa* (6. A att.). Kā redzams 6. B un 21. B attēlā, gaismā (16 h fotoperiods) kallusoģenēze bija vājāka, arī gadījumos, kad kultivēšana notika uz dediferenciāciju stimulējošas barotnes (Andersona barotne kopā ar IPA un NES). Tomēr tika novēroti atsevišķi intensīvas kallusoģenēzes gadījumi arī gaismā. Gaisma stimulēja organogēna kallusa veidošanos (2. att.).

Literatūrā atrodami dažādi dati par rododendru mikropavairošanai izmantoto barotņu pH - 4,5 [Anderson, 1975; Dai et al., 1987; Pennel, 1990; Iapichino et al., 1991_(a), 1992], 5,0 [Economou et al., 1984; Dai et al., 1987; Preece et al., 1991], 4,5 - 5,2 [Norton, 1989], 5,2 [Barnes, 1985], 5,7 [Dabin, 1983]. Uzskata, ka rododendru kultivēšanai *in vivo* augsnes pH ir robežās no 4 līdz 6 ir optimāls [Konratovičs, 1978; Кондратович, 1981].

Kā redzams 10. attēlā, *Rh. hirsutum* kallusoģenēze visintensīvāk notikusi uz barotnes, kuras pH pirms autoklāvēšanas bija no 4,0 līdz 5,0. Par pH 4.0 - 5.0 skābāka vai bāziskāka vide kavēja kallusa veidošanos (10. att.). Eksperimentos ar H-75/1 iegūtie rezultāti liecināja, ka intensīva kallusoģenēze notiek arī uz barotnes ar pH 5,5. Tātad, iespējams, ka optimāli pieļaujamo

barotnes galējo pH vērtību robežas ir atšķirīgas dažādu taksonu rododendru kallusoģenēzi.



10. att. Barotnes pH ietekme uz *Rh. hirsutum* ziedu eksplantu kallusoģenēzi (kultivēts uz Andersona barotnes ar IPA 2 mg/l un NES 8 mg/l 2 mēnešus tumsā)

Novērots, ka barotnes pH ietekmē dažādu augu morfoģenēzi *in vitro* [Smith et al., 1990; Tran Than Van et al., 1990; Hrib, 1993], jo tas var ietekmēt, piemēram, auksīnu stabilitāti barotnē, audu spējas uzņemt no barotnes slāpekļa savienojumus [Калинин и др. , 1980; Pierik, 1987]. Jāņem arī vērā, ka autoklāvējot, barotnes pH nedaudz pazeminās, kā arī tas, ka audi kultūrā spēj regulēt vides pH [Pierik, 1987].

No eksperimentos iegūtajiem rezultātiem varēja secināt, ka rododendru kallusa kultūra vienlīdz labi attīstās, ja barotnes pH ir no 4.0 līdz 5.0-5.5.

Rododendru mikropavairošanai parasti izmanto agarizētu barotni [Dabin et al., 1983; Norton et al., 1985, 1986; Harbage et al., 1987; Economou et al., 1981; Iapichino et al., 1991_(a); 1991_(b); 1992]. Tomēr ir zināms, ka barotnes konsistence var ietekmēt *in vitro* kultūras morfoģenētisko potenciālu, jo no tās atkarīga audu spēja uzņemt barības vielas, kā arī aerācija [Калинин и др. 1980; Pierik, 1987]. Šķidrā barotnē kultivēšanas laikā audiem ir vienmērīgākas barības vielu uzņemšanas iespējas. Tomēr, kultivējot šķidrās barotnēs, audiem var tikt traucēta aerācija, ja neizmanto speciālas metodes. No šāda viedokļa

raugoties, labāki aerācijas apstākļi ir kultūrām, kas attīstās uz agarizētām barotnēm.

Iegūtie rezultāti ļāva konstatēt, ka *kallusoģenēzei vienlīdz piemērotas ir agarizētas barotnes (agars 6,5 mg/l), gan arī šķidrās barotnes ar celulozi vai filtrpapīra tiltiņu*. Uz kombinētas barotnes audi nekrotizēja, to, iespējams, izraisīja nepietiekama audu aerācija šķidrājā barotnes slānī. Daļai audu uz kombinētās barotnes bija novērojamas vitrifikācijas pazīmes, kas varētu būt saistītas ar paaugstināta vides mitruma ietekmi [Gaspar et al., 1992_(a)]. Dotajā darbā barotnes konsistences ietekme uz kallusoģenēzi tika novērtēta vizuāli.

Literatūrā ir dati par to, ka dažādi morfoģenēzes potences var ietekmēt gēlveidotāji un celuloze ķīmiskais sastāvs. Piemēram, *Hevea brasiliensis* embriogēneses potences *in vitro* [Hadrami et al., 1993] un dažādu augu *in vitro* kultūru bioķīmiskos rādītājus [Hadrami et al., 1993; Barbas et al. 1993].

Secinājumi no eksperimentos iegūtajiem rezultātiem:

- * *Rhododendru ziedu kallusoģenēzi stimulē Andersona barotne (1984) kopā ar IPA 1-10 mg/l un NES 1-12 mg/l vai IPA 10-15 mg/l un IES 2.5 -12 mg/l.*
- * *IPA kombinācijā ar NES ir tendence stimulēt neorganogēna kallusa veidošanos, bet IPA kopā ar IES - organogēna kallusa veidošanos.*
- * *Tumsa stimulē intensīvāku kallusoģenēzi, nekā gaisma (16 h fotoperiods), savukārt gaismā ir iespējama organogēna kallusa veidošanās.*
- * *Gaisma un IPA kopā ar IES barotnē ir organogēna kallusa veidošanos veicinoši faktori, bet tumsa un barotne ar IPA un NES veicina neorganogēna kallusa veidošanos un tā proliferāciju.*
- * *Kallusoģenēzei optimāls barotnes pH ir 4.0-5.5.*
- * *Agarizēta barotne ir piemērota kallusa kultūras iegūšanai, bet kā barotnes nesējus var arī izmantot filtrpapīra tiltiņus vai celulozes masu.*

3. 1. 3. Dažādu taksonu rododendru kallusoģenēze

Ir zināms, ka morfoģenētiskās reakcijas var ietekmēt *in vitro* kultivēšanas apstākļi, bez tam, tās var atšķirties dažādu taksonu augiem. Atšķirīga kallusoģenēze novērota, piemēram, *Saccharum* spp. [Cheema, 1992], *Oryza* spp. [Kishor, 1987] un *Crocus* L. [Чуб и др., 1994]. Morfoģenētiskā reakcija var būt atšķirīga arī viena taksona dažādiem genotipiem [Khmara et al., 1993]. Literatūrā ir minēts, ka organoģenēzes spējas var atšķirties starp dažādu taksonu rododendriem [McCown et al., 1983; Norton et al., 1985, 1986, 1989; Kavanagh et al., 1986; Iapichino et al., 1992]. Turpreti kallusoģenēzes potence dažādiem rododendriem nav pētīta.

Mūsu eksperimentu gaitā varēja novērot, ka dažādu sugu rododendru ziedu eksplantiem vienādos kultivēšanas apstākļos ir atšķirīga kallusoģenēzes intensitāte. Piemēram, *Rh. discolor* jau pēc 5 - 6 nedēļām tumsā veidoja salīdzinoši ļoti lielu kallusu; tas bija lielāks, nekā *Rh. catawbiense* vai *Rh. caucasicum* pēc 8 nedēļu ilgas kultivēšanas tādos pašos apstākļos. *Rh. discolor* kallusam nekrozes pazīmes sāka parādīties pēc 5 - 6 nedēļām. Kultivēšanas laikam pieaugot, arī nekrozes izplatīšanās ātrums arvien pieauga. Salīdzināšanai - *Rh. catawbiense* un *Rh. caucasicum* nekroze parādījās tikai pēc 8 - 10 nedēļām un izplatījās daudz lēnāk. Pēc 8 nedēļu ilgās kultivēšanas tumsā dažādu sugu rododendriem bija izveidojušies dažāda lieluma kallusi (7. tabula). Kultivējot gaismā, starp dažādām rododendru sugām varēja novērot kallusoģenēzes potences krasas atšķirības (8. tabula). Piemēram, tika konstatēts, ka *Rh. vaseyi* veidoja gan kallusu, gan reģenerēja dzinumus, *Rh. calendulaceum* labi veidoja kallusu, bet dzinumus tikpat kā neveidoja, bet *Rh. arborescens* - gaismā neveidoja ne kallusu, ne dzinumus (8. tabula).

7. tabula

Dažādu sugu rododendru ziedu eksplantu kallusi pēc 8 nedēļu ilgas kultivēšanas tumsā uz Andersona barotnes ar IPA 2 mg/l un NES 8 mg/l (izmantota A. Hoffas klasifikācija) un kultūras inficētība

Grupa un suga	Kallusa izmērs	Inficētība (%)
Plēkšņzviņainie		
<i>Rh. hirsutum</i> L.	ooo	3
<i>Rh. ferrugineum</i> L.	oo-ooo	2
<i>Rh. carolinianum</i> Redh.	oo	3
<i>Rh. dauricum</i> L.	oo	6
<i>Rh. mucronulatum</i> Turcz.	o-oo	4
<i>Rh. ledebourii</i> Pojark.	oo	5
<i>Rh. sichotense</i> Pojark.	oo	4
Puškmatainie		
<i>Rh. orbiculare</i> Decne	o	3
<i>Rh. decorum</i> Franch.	ooo	3
<i>Rh. fortunei</i> Lindl.	oo	4
<i>Rh. discolor</i> Franch.	ooo	3
<i>Rh. catawbiense</i> Michx.	oo-ooo	3
<i>Rh. smirnowii</i> Trautv.	oo	47
<i>Rh. brachycarpum</i> D. Don ex G. Don f.	o	3
<i>Rh. caucasicum</i> Pall.	ooo	2
<i>Rh. maximum</i> L.	o	2
Acālijas		
<i>Rh. vaseyi</i> A. Gray	oo	3
<i>Rh. canadense</i> (L.) Torr.	o	1
<i>Rh. albrechtii</i> Maxim.	o-oo	2
<i>Rh. japonicum</i> (A. Gray) Suring.	oo	1
<i>Rh. molle</i> (Bl.) G. Don	o	3
<i>Rh. occidentale</i> (Torr. et A. Gray) A. Gray	oo	2
<i>Rh. calendulaceum</i> (Michx.) Torr.	oo	3
<i>Rh. luteum</i> Sweet	oo	3
<i>Rh. viscosum</i> (L.) Torr.	oo	2
<i>Rh. arborescens</i> (Pursh) Torr.	oo	2

o - kalluss ir mazāks par 2 eksplantiem; oo - kalluss ir 2 līdz 5 reizes lielāks par eksplantu; ooo - kalluss ir vairāk nekā 6 reizes lielāks par eksplantu

Varēja konstatēt, ka kallusoģenēzes intensitāte un kallusa veids atšķiras pat sugas ietvaros vienā laikā izolētiem eksplantiem, kas tiek kultivēti vienādos apstākļos. Tomēr, kopējas tendences noteikta taksona kallusa attīstībā konkrētos apstākļos bija novērojamas, izmantojot 10 un vairāk akārtojumus.

8. tabula

Dažādu sugu rododendru ziedu eksplantu morfoģenēzes novērtējums pēc 8 nedēļu ilgas kultivēšanas gaismā uz Andersona barotnes ar IPA 10-15 mg/l un IES 2.6-12 mg/l (izmantota A. Hoffas klasifikācija)

Grupa un suga	Kallusoģenēze (%)	Dzinumu reģenerācija (%)
Plēkšņzviņainie		
<i>Rh. hirsutum</i> L.	0	0
<i>Rh. ferrugineum</i> L.	80	70
Puškmatainie		
<i>Rh. decorum</i> Franch.	5	0
<i>Rh. fortunei</i> Lindl.	0	0
<i>Rh. discolor</i> Franch.	12	0
<i>Rh. catawbiense</i> Michx.	73	20
<i>Rh. smirnowii</i> Trautv.	13	0
<i>Rh. brachycarpum</i> D.Don ex G.Don f.	41	2
<i>Rh. caucasicum</i> Pall.	93	5
<i>Rh. maximum</i> L.	12	0
Acālijas		
<i>Rh. vaseyi</i> A. Gray	80	25
<i>Rh. canadense</i> (L.) Torr.	20	0
<i>Rh. albrechtii</i> Maxim.	2	0
<i>Rh. japonicum</i> (A. Gray) Suring.	2	0
<i>Rh. molle</i> (Bl.) G. Don		
<i>Rh. occidentale</i> (Torr. et A. Gray) A. Gray	24	0
<i>Rh. calendulaceum</i> (Michx.) Torr.	90	2
<i>Rh. luteum</i> Sweet	52	10
<i>Rh. viscosum</i> (L.) Torr.	10	0
<i>Rh. arborescens</i> (Pursh) Torr.	0	0

Eksperimenta gaitā varēja novērot, ka dažādu sugu rododendru kallusiem, kas attīstījušies vienādos kultivēšanas apstākļos, ir atšķirīga struktūra un pigmentācija. Piemēram, uz Andersona barotnes ar 2 mg/l IPA un 8 mg/l NES *Rh. hirsutum* un *Rh. ferrugineum* veidojās dzeltens, kompakts kalluss; *Rh. luteum* un *Rh. japonicum* - gaišāk dzeltens; *Rh. caucasicum* - dzeltenbalts, ļoti kompakts; *Rh. smirnowii* un *Rh. discolor* - dzeltenbalts, ļoti kompakts, kur baltie laukumi ir ievērojami lielāki nekā dzeltenie.

Sugu kallusoģenēzes potence tika salīdzināta, ņemot vērā to sistemātisko piederību. Tika konstatēts, ka morfoģenētiskās potences ir atšķirīgas vienai un tai pašai sugai, kallusoģenēzi inducējot dažādos apstākļos. Piemēram, *Rh. hirsutum* kallusu veidoja tikai tumsā, bet *Rh. ferrugineum* - gan tumsā, gan gaismā; bez tam *Rh. ferrugineum* bijar labas organoģenēzes potences (7., 8. tabula). Gan pēc A. Hofas [Seithe von Hoff, 1956] (7. tabula), gan pēc A. Balfura klasifikācijas [Berg et al., 1969] (rezultāti nav uzrādīti), šīs sugas ietilpst vienā grupā. Tātad sistemātiski tās tiek uzskatītas par tuvām sugām. Bet, kā liecina iegūtie rezultāti (7., 8. tabula) kallusoģenēzes spējas *in vitro* tām bija ļoti atšķirīgas. Salīdzinot pārējo sugu morfoģenēzi *in vitro*, varēja konstatēt, ka nav nekādas saistības starp sugas sistemātisko piederību un morfoģenētisko potenciālu *in vitro*. Tika novērotas kallusoģenēzes potences atšķirības arī starp 13 rododendru šķirnēm un hibrīdiem.

Kā jau iepriekšējos eksperimentos tika konstatēts, rododendriem sterīlus eksplantus vieglāk ir iespējams iegūt no ziediem, nekā no veģetatīvajiem orgāniem. Kā redzams 7. tabulā ziedu eksplantu inficētība *in vitro* dažādām sugām bija nedaudz atšķirīga. Tā bija robežās apmēram no 1 līdz 6 %. Izņēmums bija *Rh. smirnowii*, kuram kultūra bija salīdzinoši ļoti inficēta (7. tabula).

Secinājumi no eksperimentos iegūtajiem rezultātiem:

* *Rododendru dažādiem taksoniem kallusoģenēzes potence in vitro ir atšķirīga.*

3. 1. 4. Rododendru gada attīstības cikla ietekme uz ziedu eksplantu kallusoģenēzi

Ir novērots, ka augs, kā arī eksplanta audu attīstības stāvoklis ar tam raksturīgajām fizioloģiskajām norisēm ietekmē morfoģenētiskos procesus *in vitro* [Катаева, 1983; Cohen, 1986; Wernicke et al., 1993]. Piemēram, rododendriem organoģenēzi ir iespējams inducēt no stumbra dzinumu eksplantiem, ja tie ir izolēti aktīvajā augšanas periodā [Economou et al., 1981; McCown et al., 1983; Norton et al., 1985; 1986; Harbage et al., 1987]. Literatūrā ir minēts, ka mikropavairošanai eksplantus no rododendru ziedpumpuriem izolē no oktobra līdz aprīlim [Meyer, 1982; Pennel, 1990], vai arī no novembra līdz martam [Dai et al., 1987]. Šajos gadījumos nav analizēts augu vai atsevišķu orgānu attīstības stāvoklis izvēlētajā izolēšanas periodā un tā ietekme uz morfoģenēzi. Literatūrā ir dati, par to, ka zieda attīstības pakāpe tomēr ietekmē morfoģenēzi *in vitro*, piemēram, *Crocus* L. [Чуб и др., 1994].

Pagaidām pilnībā vēl nav izpētīta bioķīmisko norišu secība un attiecīgo ģēnu darbība, kas dzinumu apeksos izraisa pāreju no veģetatīvās attīstības uz ģeneratīvo, un kas nosaka atsevišķu zieda daļu attīstību [Greppin, 1990]. Ir zināms, ka ģeneratīvo aizmetņu veidošanos ietekmē gan augs individuālie faktori (genotips, brieduma pakāpe un citi), gan arī apkārtējās vides faktori - temperatūra, fotoperiods un mitrums [Бернье , 1985_(a); Greppin et al., 1990; Полевой и др., 1991; Bernier et al., 1993]. Uzskata, ka noteiktu ārējās vides faktoru izmaiņas varētu izsaukt kādu ķīmisko savienojumu veidošanos dažādos orgānos, kuri veicina vai kavē ziedu attīstību. Šīs vielas varētu darboties kā endogēnie signāli. Iespējams, ka tās tālāk tiek transportētas uz augšanas konu [Bernier, 1993]. Ir vairākas hipotēzes par šo signālu dabu. Viena no tām, ko pārstāv Bernje [Bernier et al., 1993], uzskata, ka ģeneratīvo attīstību vienlaicīgi kontrolē gan hormonālas dabas savienojumi, gan asimilāti. Tādēļ tiek pētītas citokinīnu [Bernier et al., 1977; Lejune et al., 1988] un auksīnu [Gaspar et al., 1985_(b)] iespējamās funkcijas ziedu attīstībā. Vairākos darbos ir minēts, ka svarīga loma varētu būt ogļhidrātiem. Uzskata, ka šajos procesos piedalās ogļhidrāti gan no saknēm [Loescher et al., 1990], gan lapām [Greppin et al.,

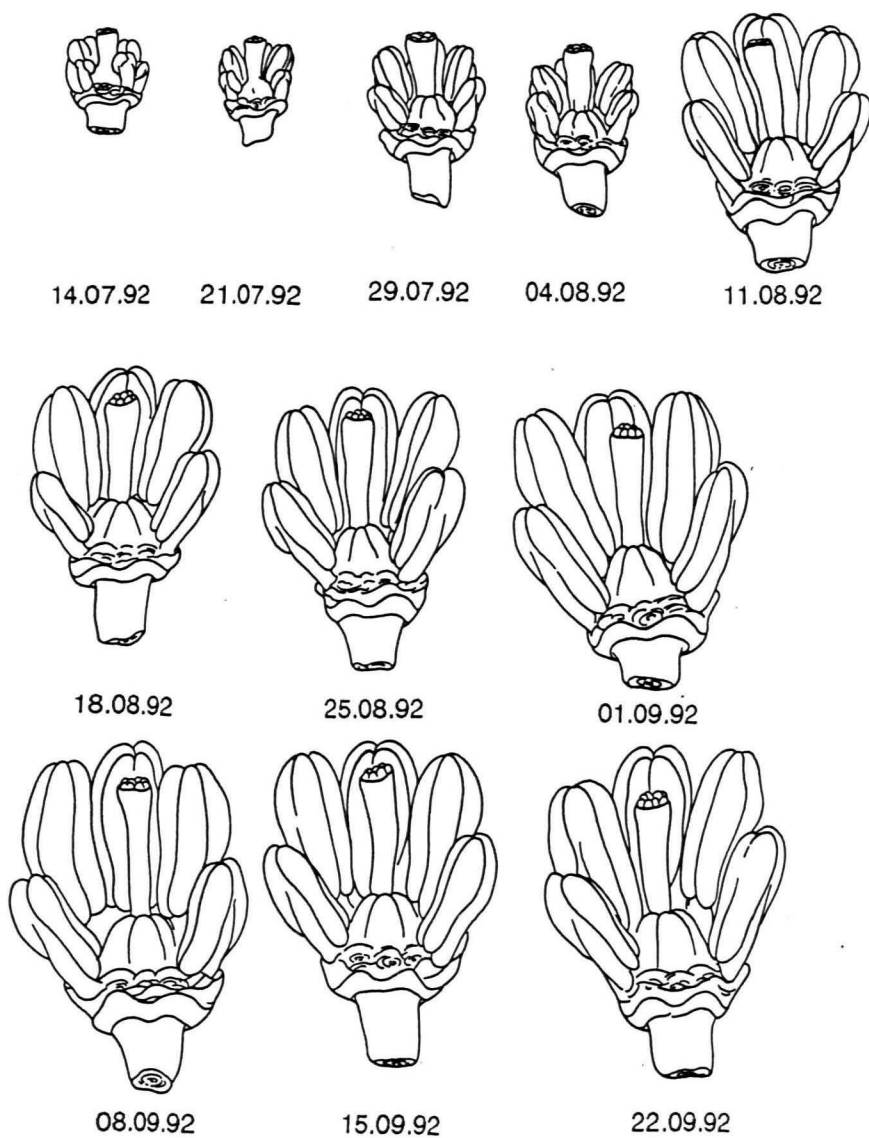
1990; Bernier et al., 1993]. Domā, ka signāla nozīme ir saharozei, jo ir novērots, ka sākoties ģeneratīvajai attīstībai, tā uzkrājas augšanas konos [Bodson et al., 1985; Bernier et al., 1993].

Ir pētījumi par to, ka pēc ogļhidrātu satura izmaiņām lapās varētu spriest arī par miera perioda iestāšanos rododendriem [Кондратович и др., 1972].

Mūsu eksperimenti tika veikti ar nolūku novērtēt rododendru gada attīstības cikla (ziedu eksplantu attīstības pakāpes) un eksplanta fizioloģiskā stāvokļa ietekmi uz kallusoģenēzi. Šim nolūkam uzsākot kallusa kultūras iegūšana no ziedu eksplantiem tika noteikti organoģenēzes etapi un iespējamais miera perioda iestāšanās laiks.

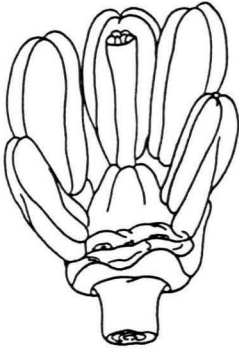
Tika konstatēts, ka dzinumu galotnes pumpuru aizmešanās un ģeneratīvo pumpuru diferencēšanās sākums (I - IV organoģenēzes etaps) rododendru hibrīdam H-75/1 notiek maija beigās - jūnijā (11. att.). Tieši šajā laikā H-75/1 viengadīgo dzinumu lapās ogļhidrātu dinamikai bija raksturīgs mezoinozitola pieaugums (12. att.), fruktozes maksimums (13. att.), salīdzinoši zema glikozes (13. att.) un saharozes koncentrācija (14. att.), un izteikts rafinozes minimums (15. att.). Aizsākoties jaunam organoģenēzes ciklam šāda ogļhidrātu dinamikas aina varētu arī liecināt par to nozīmi ģeneratīvajā attīstībā. Tomēr jāņem vērā, ka Latvijas klimatiskajos apstākļos visintensīvākā veģetatīvā augšana notiek tieši jūnija sākumā [Гертнер и др., 1984]. Bez tam, šajā laikā noris arī pēdējie iepriekšējā organoģenēzes cikla etapi, kuros notiek apaugļošanās un sēklu izveidošanās. Līdz ar to vienlaicīgi var būt vairāki spēcīgi atraģējošie centri. Tādēļ, lai izdarītu secinājumus par šo ogļhidrātu nozīmi tieši ģeneratīvajā attīstībā, tie papildus vēl būtu jānosaka lapu kātiņā un augšanas konos.

III organoģenēzes etapā rododendriem notiek pāreja no veģetatīvās uz ģeneratīvo attīstību, bet IV organoģenēzes etapā notiek putekšņlapu veidošanās [Куперман, 1963; Кондратович, 1981]. Novērojumi liecināja, ka IV organoģenēzes etaps H-75/1 1993. gadā norit jūnija otrajā dekādē (11. att.), bet *Rh. caucasicum* jūlija sākumā (dati nav uzrādīti). Praktiski no I līdz IV

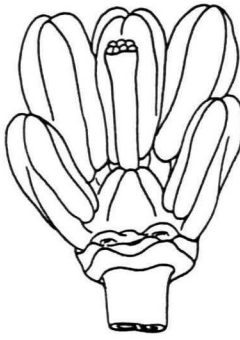


11. att H-75/1 ziedu attīstība (1992./1993. gads)

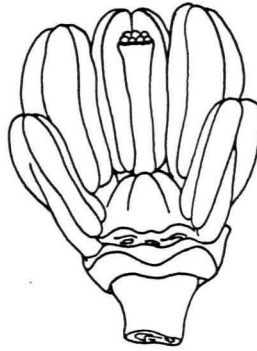
(turpinājums 65. lpp.)



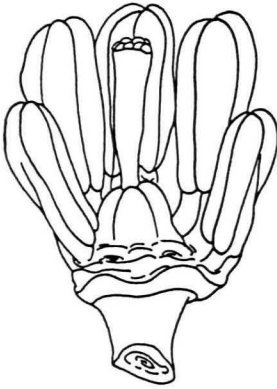
06.10.92



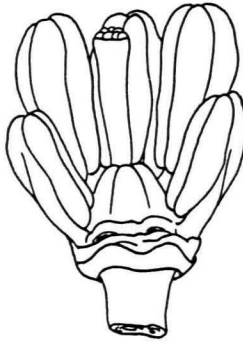
13.10.92



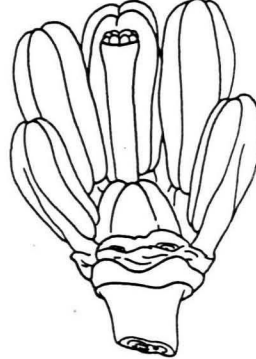
20.10.92



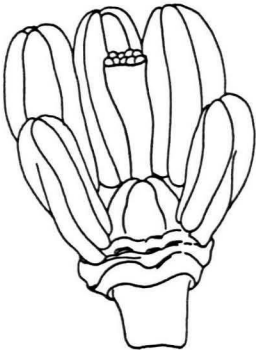
27.10.92



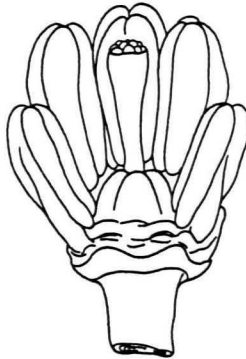
03.11.92



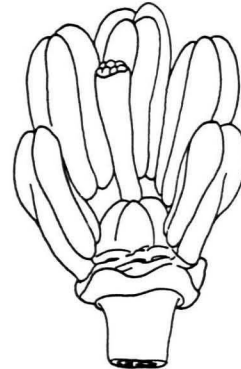
10.11.92



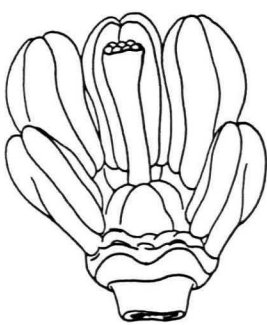
17.11.92



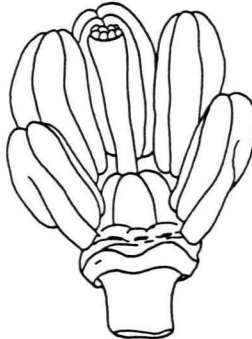
24.11.92



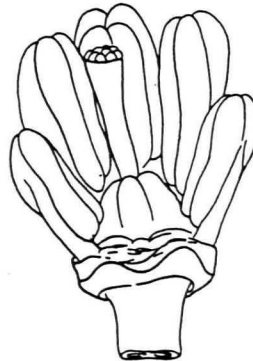
08.12.92



15.12.92

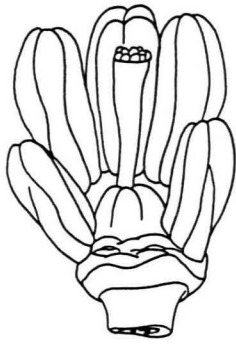


22.12.92

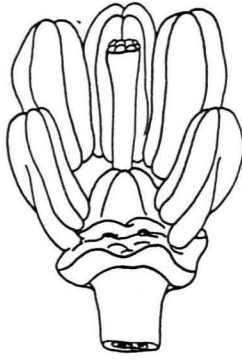


29.12.92

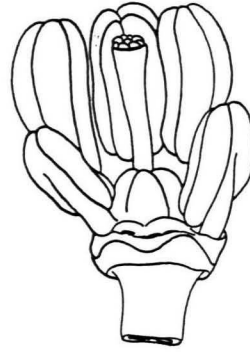
(11. att. turpinājums 66. lpp.)



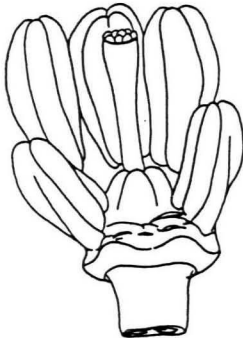
12.01.93



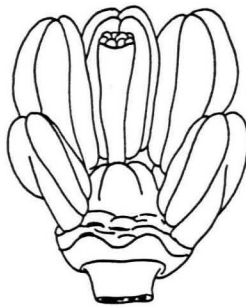
18.01.93



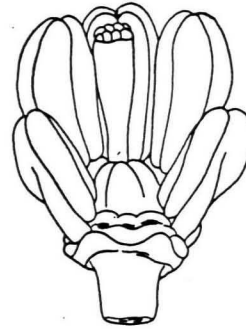
26.01.93



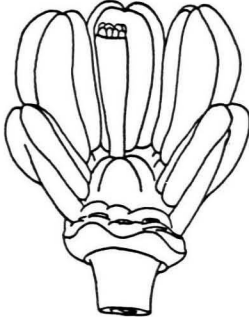
02.02.93



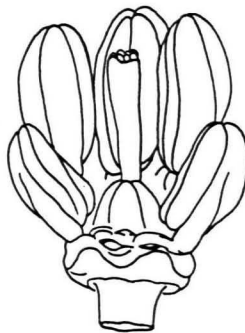
09.02.93



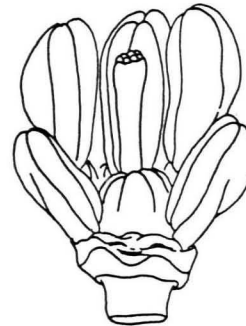
16.02.93



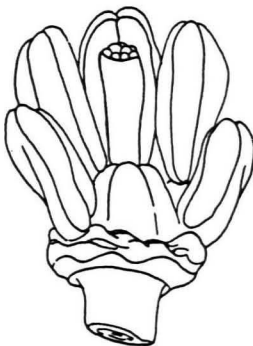
23.02.93



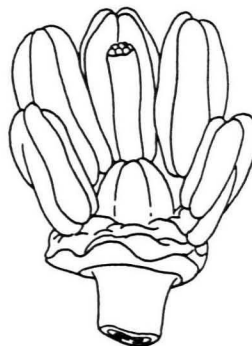
02.03.93



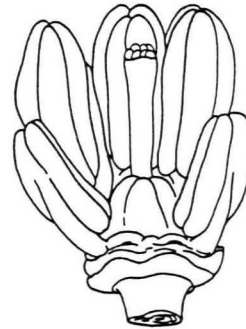
08.03.93



15.03.93

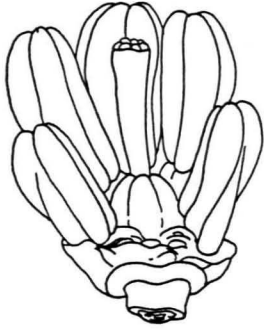


22.03.93

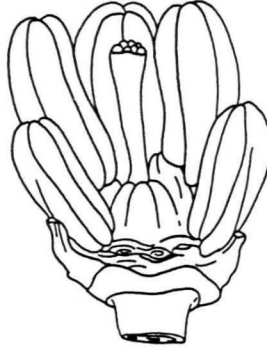


29.03.93

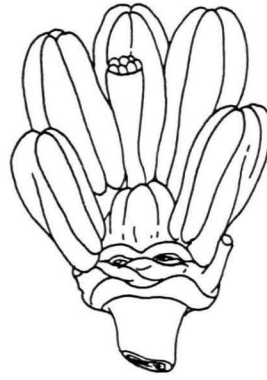
(11. att. turpinājums 67. lpp.)



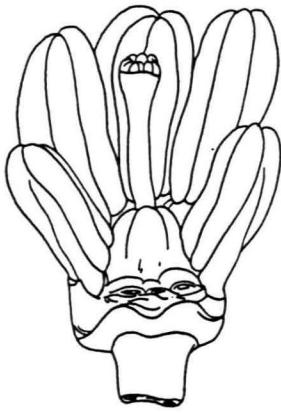
06.04.93



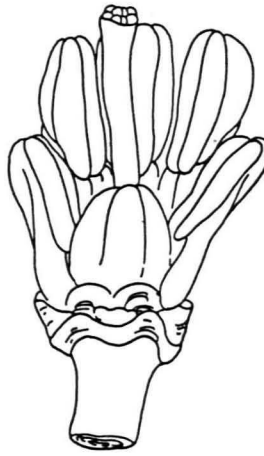
12.04.93



19.04.93



26.04.93



11.05.93



26.05.93



31.05.93



04.06.93



08.06.93



11.06.93



14.06.93



18.06.93



21.06.93



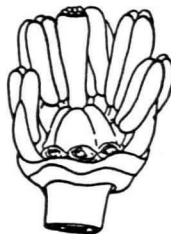
28.06.93



01.07.93



14.07.93



21.07.93

organoģenēze etapam kā eksplanti jāizmanto augšanas koni kopā ar subapikālajiem stumbru audiem. Vairumā gadījumu kalluss veidojās no subapikālā rajona. Iespējams, ka tas ir izskaidrojams ar pastiprinātu citokinīnu plūsmu uz apeksu [Бернье, 1985_(b); Bernier, 1993], kā arī ar auksīniem, kas veidojas pumpuru aizmetņos [Полевой, 1982; Бернье, 1985_(b)].

V organoģenēzes etapā turpinās atsvišķu zieda daļu veidošanās [Куперман, 1963; Кондратович, 1981]. IV - V organoģenēzes etaps H-75/1 1993. gadā sākās jūnija trešajā dekādē (11. att.), bet *Rh. caucasicum* - jūlija pirmajā - otrajā dekādē (dati nav uzrādīti).

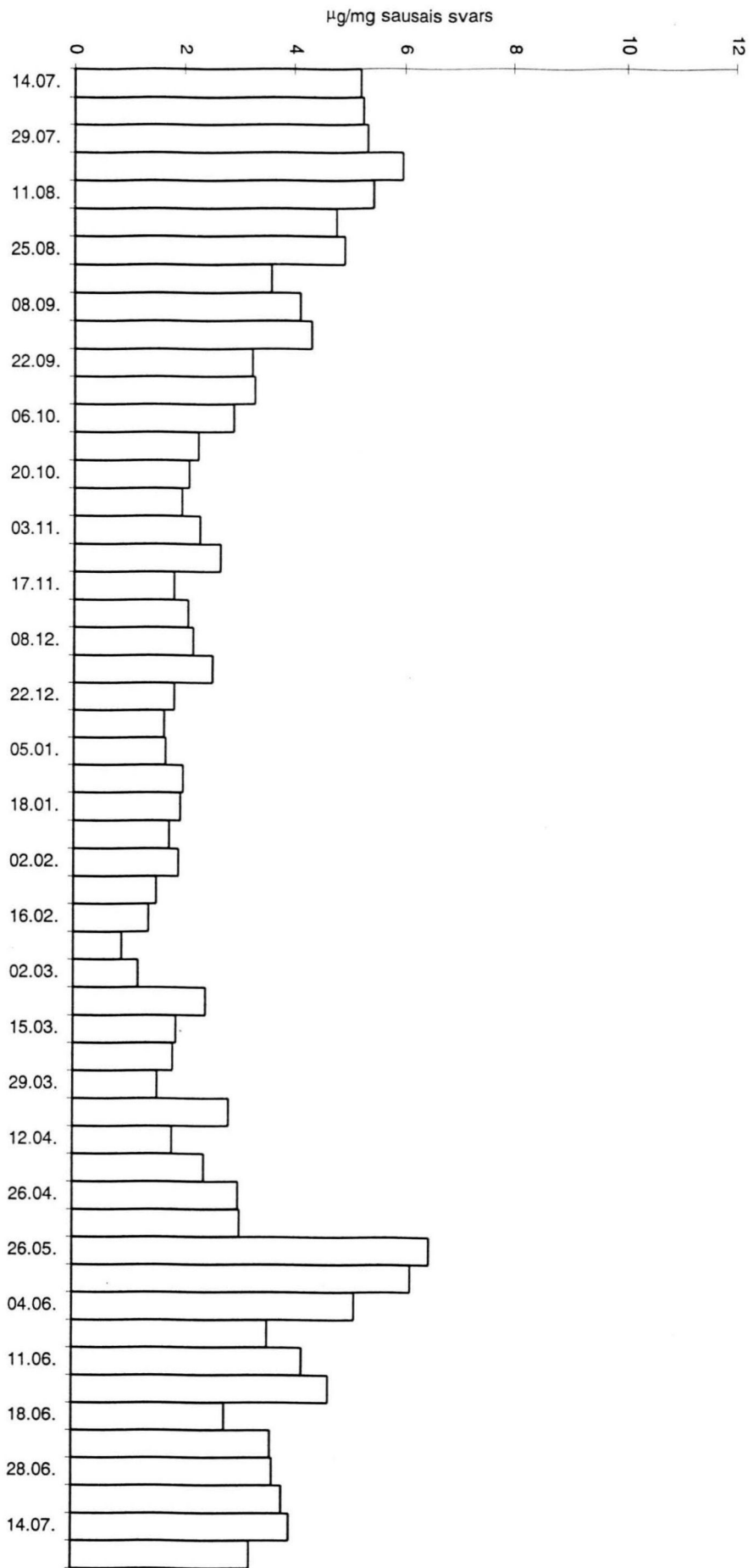
VI etapā pilnīgi izveidojas ziedpumpura visas daļas, notiek to augšana [Куперман, 1963; Кондратович, 1981]. Kā redzams 11. attēlā, gan 1993. gada jūlijā, gan 1992. gada jūlijā - septembrī notika intensīva visu zieda daļu augšana, ar mazāku intensitāti augšana turpinājās arī septembra beigās, oktobrī. Līdz ar to, varēja secināt, ka jūlijā - oktobrī H-75/1 atradās V-VI organoģenēzes etapā. Tālākajā periodā līdz pat aprīlim nekādas morfoloģiskās izmaiņas nebija novērojamas (11. att.). Izteikts pieņēmums, ka rododendriem, zieda daļu augšana turpinās arī ieejot dziļajā miera periodā - tātad notiek slēptā augšana [Гертнере и др., 1984]. Uzskata, ka atrodoties VI etapā, rododendri ieiet dziļajā miera periodā [Кондратович, 1981; Гертнере и др., 1984].

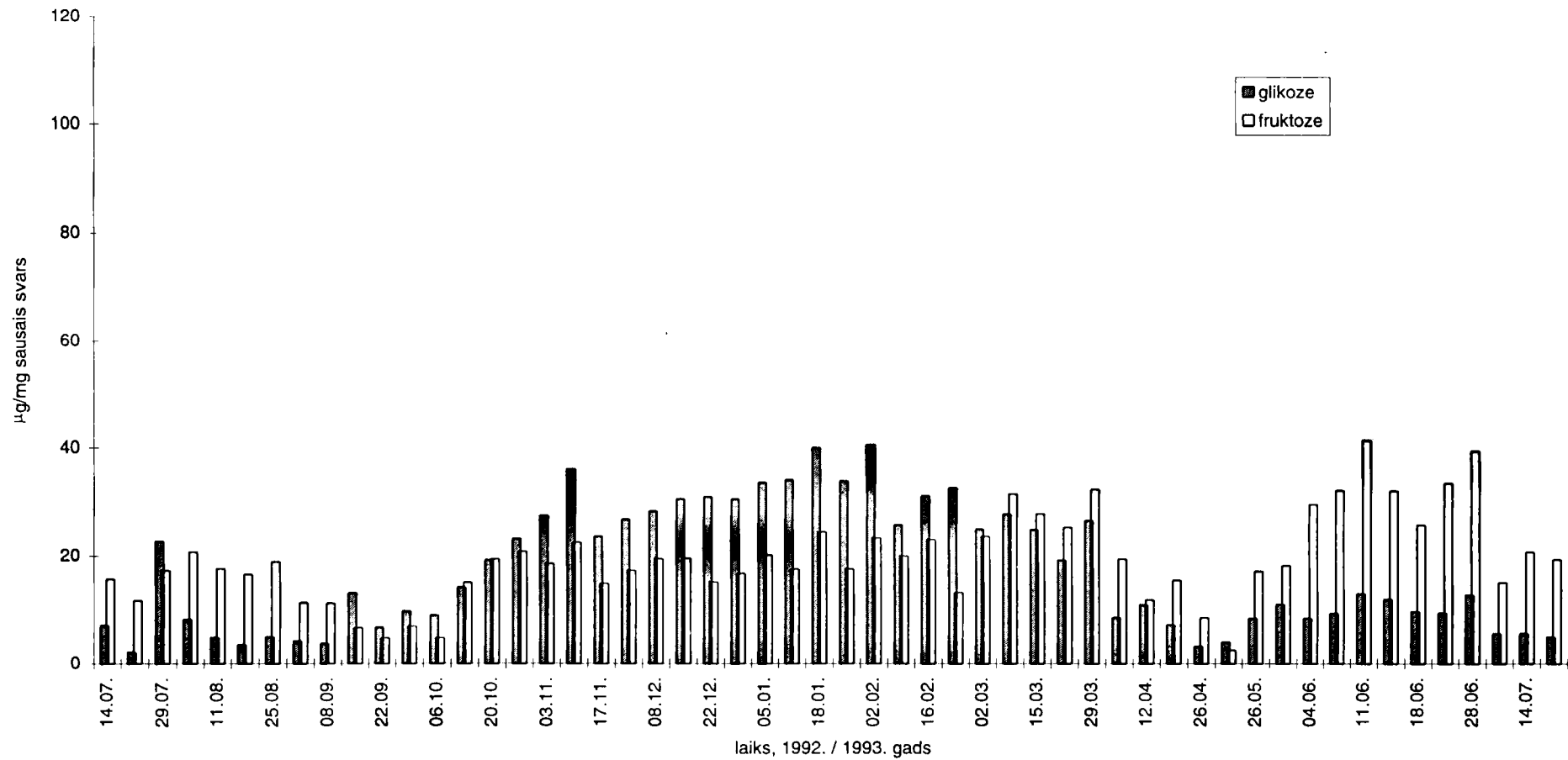
Ir pieņemts, ka Latvijas klimatiskajos apstākļos dziļais miera periods, atkarībā no rododendra genotipa un gada laika apstākļiem, sākas apmēram septembra vidū, bet beidzas decembrī [Гертнере и др., 1984]. Dziļajā un piespiedu miera perioda laikā Latvijas klimatiskajos apstākļos sākas pakāpeniska temperatūras pazemināšanās. Lapās pieaug monosaharīdu un disaharīdu koncentrācija, kas funkcionē kā rezerves barības vielas un aizsargvielas pret zemām temperatūrām, tā nodrošinot rododendru ziemcietību [Кондратович и др., 1972_(b); Кондратович, 1981].

Eksperimentā iegūtie rezultāti rāda, ka H-75/1 viengadīgajās lapās saharozes (14. att.) un rafinozes (15. att.) daudzums sāka palielināties septembrī, turpretī mezoinozitola daudzums sāka samazināties (12. att.).

12. att. Mezionoziola satūra dinamika H-75/1 viengadīgo dzinumu lapās

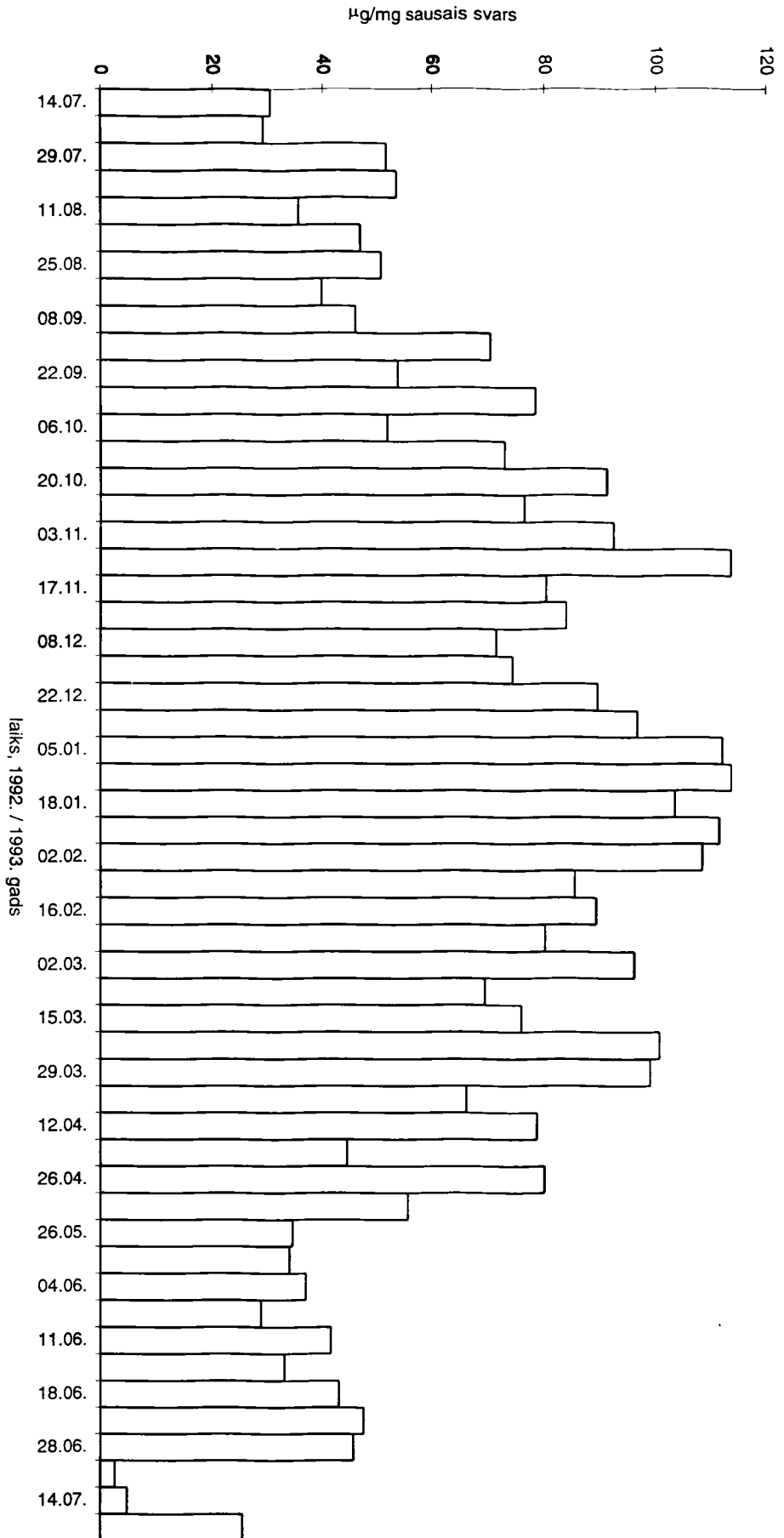
laiks, 1992. / 1993. gads



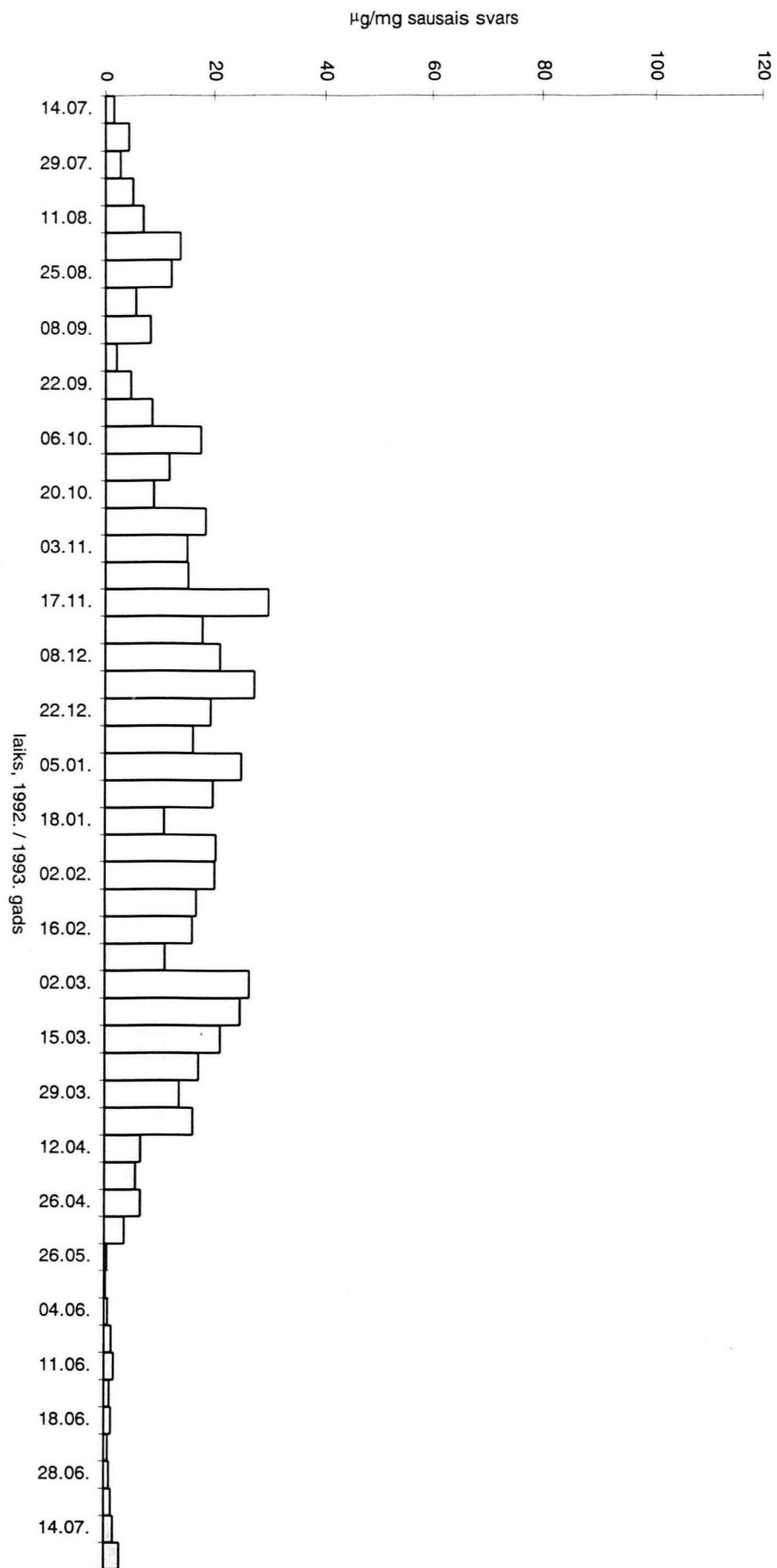


13. att. Glikozes un fruktozes satura dinamika H-75/1 viengadīgo dzinumu lapās

14. att. Saharozes satūra dinamika H-75/1 viengadīgo dzinumu lapās



15. att. Rafinozes satūra dinamika H-75/1 viengadīgo dzinumu lapās



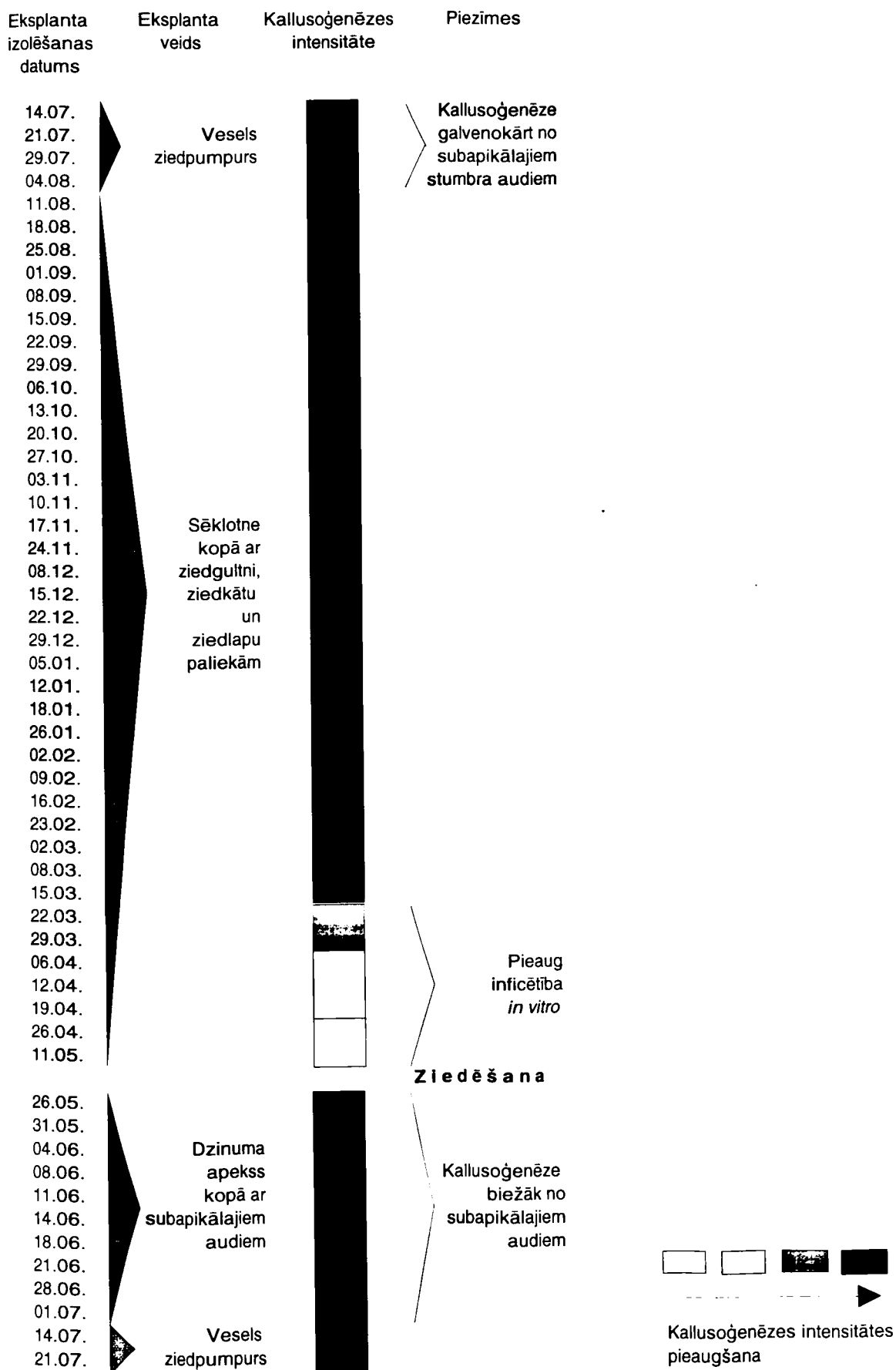
Glikozes un fruktozes daudzums sāka stabili pieaugt tikai oktobra sākumā (13. att.), kas rododendriem raksturo veģetācijas perioda beigas [Кондратович и др., 1972_(b)]. Pēc ogļhidrātu dinamikas H-75/1 viengadīgo dzinumumu lapās var spriest, ka 1992. gada oktobra sākumā iestājās dziļais miera periods, tātad H-75/1 oktobra sākumā atrodas VI organoģenēzes etapā. Savukārt, *Rh. caucasicum* 1993. gadā dziļajā miera periodā iegāja oktobra beigās - novembra sākumā (ogļhidrātu dinamikas dati nav uzrādīti). Tātad, laiks, kad rododendri ieiet miera periodā dažādos gados var atšķirties, līdz ar to arī fizioloģiskais stāvoklis dažādos gados vienā un tajā pašā kalendārajā laikā augam var būt atšķirīgs.

Šneidera [Schneider, 1968] iegūtie dati liecina, ka, miera periodā esošiem rododendru ziedpumpuriem noņemot segzviņas, zieds var attīstīties. Tas varētu arī nozīmēt, ka paši ziedi neatrodas miera periodā, bet to attīstību kavē segzviņas, kurās acīmredzot atrodas inhibitori.

Eksperimenti ar H-75/1 un *Rh. caucasicum*, kā arī citiem rododendriem, pierādīja, ka no miera perioda laikā izolētu ziedu eksplantiem notiek intensīva kallusoģenēze *in vitro* (16. att.). Bez tam šajā laikā tika novērota intensīva organoģenēze, ja kultivēšana *in vitro* notika gaismā uz organoģenēzi stimulējošām barotnēm. Mejers (1982; 1983_(a)) rododendru mikropavairošanai arī ir izmantojis miera perioda laikā izolētus eksplantus no ziedpumpuriem. Šādi ar *in vitro* kultūru palīdzību iegūtie dati varētu būt arī par apstiprinājumu Šneidera [Schneider, 1968] hipotēzei, jo ir zināms, ka nav iespējams izsaukt dziļajā miera periodā esošu audu un orgānu augšanu un attīstību.

Iegūtie rezultāti liecināja, ka intensīva kallusoģenēze notiek rododendru ziedu eksplantiem, kas izolēti arī pēc dziļā miera perioda beigām, ja pieņem, ka tas ir decembrī [Гертнер и др., 1984], tātad arī piespiedu miera periodā (16. att.).

Sākot ar aprīļa otro dekādi, notika strauja H-75/1 ziedu augšana (11. att.). No tā var secināt, ka norit VII organoģenēzes etaps. Šajā laikā bija novērojams mezoinozitola koncentrācijas pieaugums (12. att.), bet pārējo ogļhidrātu koncentrācijai bija tendence samazināties (13. -15. att.). Iespējams,



16. att. H-75/1 eksplanta attīstības pakāpes ietekme uz kallusogēnēzi (1992. / 1993. gads)

ka šādas krasas ogļhidrātu dinamikas izmaiņas varētu liecināt par augšanas un attīstības kvalitatīvi jaunu pakāpi.

Aprīlī - maijā turpinās H-75/1 zieda daļu augšana (11. att), norit VII-VIII organoģenēzes etaps, tātad augs sagatavojas ziedēšanai. Sākot no apmēram marta beigām H-75/1 ziedu eksplantu kallusoģenēze kļuva vājāka (16. att.). Arī eksperimentos ar citiem rododendriem, bija novērojams, ka apmēram vienu līdz divus mēnešus pirms ziedēšanas, kallusoģenēzes intensitāte ir zema. Šajā laikā ziedkopas piebrieda. Reizē ar to bija raksturīgs inficēšanās pieaugums *in vitro* kultūrā (16. att.).

IX organoģenēzes etaps - ziedēšana H-75/1 notika maija otrās dekādes beigās (11. att.). Jāatzīmē, ka IX organoģenēzes etapa laikā viengadīgajās lapās bija raksturīgs izteikts rafinozes minimums (15. att.), bet mezoīnositola daudzums sāka pieaugt (12. att.).

Šis eksperiments, kā arī ilgstošie novērojumi par citu rododendru genotipu eksplantu kallusoģenēzi liecināja, ka ziedu eksplantu ievākšanas periods var būt daudz ilgāks, nekā tas tiek minēts literatūrā. Piemēram, Pennels [Pennel, 1990] un Mejers [Meyer, 1982] uzskata, ka tas ir no oktobra līdz aprīlim, bet Dai [Dai et al., 1987] - no novembra līdz martam. Protams, jāņem vērā ģeogrāfiskās vieta, kurā veikts pētījums un gada klimatiskās izmaiņas. Bez tam, kalendārā laika minēšana nedod informāciju par visa auga un arī izolējamā orgāna vai audu attīstības pakāpi. Piemēram, 1992./1993. gada jūlijā ir H-75/1 redzamas krasas zieda attīstības ātruma atšķirības (11. att.). Latvijas apstākļos, izdarot korekcijas attiecībā uz katru individuālo taksonu un gada klimatiskajām īpatnībām, ziedu eksplantu ievākšanas periods ir no jūlija-septembra līdz februārim-aprīlim, jo šajā laikā rododendri atrodas V-VI organoģenēzes etapā, kas ir konstatēts kā optimālākais kallusoģenēzes inducēšanai.

Secinājumi no eksperimentos iegūtajiem rezultātiem:

**Rododendriem visintensīvākā kallusoģenēze no ziedu eksplantiem notiek V- VI organoģenēzes etapā.*

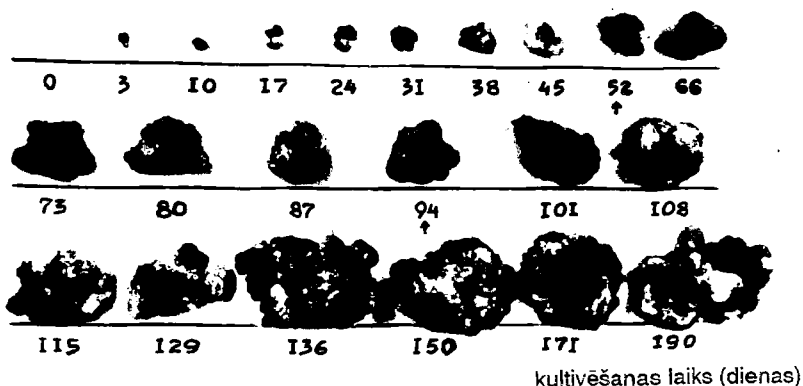
** I līdz IV organoģenēzes etapā kā eksplantus kallusoģenēzei var izmantot augšanas konu ar subapikālajiem stumbra audiem. Kalluss visbiežāk veidojas tieši no subapikālās daļas.*

** Tā, ka intensīva kallusoģenēze no rododendru ziedu eksplantiem notiek V- VI organoģenēzes etapā, tad, atkarībā no sugas un gada klimatiskajām īpatnībām, Latvijas apstākļos tas ir apmēram no jūlija-septembra līdz februārim-aprīlim. Aptuveni mēnesi, vai divus pirms ziedēšanas (VII-VIII organoģenēzes etapa laikā) kallusoģenēzes intensitāte pakāpeniski kļūst vājāka.*

3. 1. 5. Kallusa proliferācijas stimulēšana

Kallusoģenēzes potence un kallusa proliferācijas spēja atšķiras dažādiem augiem. Kallusu ir iespējams ilgstoši kultivēt, audus arvien pārstādot uz jaunas barotnes [Калинин и др. , 1980]. Tomēr ne visiem augiem izdodas uzturēt ilgstošu kallusa proliferāciju. Kā jau iepriekš minēts, pārsvarā ir sastopami dati par organoģēna kallusa veidošanos rododendru mikropavairošanas sākumstadijās [Dai et al., 1987; Iapichino et al., 1992]. Trūkst informācijas par rododendru kallusa kultūras ilgstošu subkultivēšanu. Kā izņēmumu varētu minēt Harbage [Harbage et al., 1987] eksperimentu, kurā viņam ir izdevies no *in vitro* dzinumiem iegūt *Rhododendron* 'Gibraltar' un *Rh.* 'Old Gold' subkultivējamu organoģēnu kallusu. Tomēr arī šajā gadījumā 12. subkultūrai jau bija novērojama spēcīga nekroze. Savukārt, lai inducētu dzinumu veidošanos, *Rh. laetum* × *aurigeranum* dzinumu galotņu eksplantu kallusoģenēze un kallusa kultivēšana bez pārstādīšanas ir notikusi 6-7 mēnešus [Iapichino et al., 1991_(a)]. Mūsu eksperimentu uzdevums bija pārbaudīt dažādu kultivēšanas apstākļu ietekmi uz rododendru ziedu eksplantu kallusu ilgstošu proliferāciju.

Mūsu eksperimentu gaitā tika novērotas kopējas tendences rododendru ziedu kallusoģenēzē un kultūras tālākā attīstībā. Pirmo divu nedēļu laikā pēc ziedu eksplantu novietošanas uz barotnes, kallusoģenēzi veicinošos apstākļos eksplanti "piebrieda", tad apmēram pēc 3 nedēļām uz to virsmas sāk parādīties redzams kalluss. Kallusi intensīvi proliferēja pirmos 3 mēnešus. Tad audi, kas bija tuvāk eksplantam pakāpeniski nobrūnēja, tomēr kalluss turpināja veidoties uz nekrotizējošiem audiem. Tas bija raksturīgi visos pārbaudītajos kultivēšanas apstākļos. Ilgstoši kultivējot, audu nekroze pakāpeniski kļuva intensīvāka, nekā kallusoģenēze (17. att.).



17. att. Kallusa attīstība no H-75/1 ziedu eksplantiem

(kultivēts tumsā; līdz 52. dienai uz Andersona barotnes ar IPA 2 mg/l un NES 8 mg/l, tad pārstādīts uz Cimmermana barotnes ar IPA 5 mg/l un NES 1 mg/l, 94. dienā pārstādīts uz Andersona barotnes ar kinetīnu 0.5 mg/l un NES 1 mg/l)

↑ - kallusa pārstādīšana

Dažādu rododendru kallusa kultūru, kallusa kultūru izdevās subkultivēt apmēram 6 mēnešus. Pagaidām nav izdevies atrast tādas kultivēšanas apstākļus, kuros rododendriem būtu iespējams iegūt ilgstoši proliferējošu kallusa kultūru. Tālākais darbs būtu jāsaista ar subkultivēšanai optimālu

apstākļu noskaidrošanu, jo iepriekšminētā kallusa attīstības tendence tika novēkota visos izmēģinātajos kultivēšanas apstākļos.

Rhododendrus var pavairot, ja organogēnu kallusu pārstāda apstākļos, kas stimulē dzinumus veidošanos (gaismā, uz Andersona barotnes ar IPA 10-15 mg/l un IES 2.6-12 mg/l).

Atkarībā no kultivēšanas apstākļiem dažādiem rododendriem varēja novērot atšķirīgas konsistences un pigmentācijas kallusu veidošanos. Tumsā veidojās trīs tipu kallusi:

- a) pelēcīgs vai gaiši brūns, vitrificēts (21. A attēlā trešajā rindā pēdējais kalluss),
- b) dzeltens, mīksts, kompakts (4. att. pa labi),
- c) dzeltenbalts, ļoti kompakts (6. A att. pa kreisi).

Gaismā veidojās četru veidu kallusi:

- a) tumši zaļš, mīksts (reti),
- b) zaļš ar graudainu struktūru, tālāk veido dzinumus (2. att.),
- c) dzeltenbrūns, mīksts (4. att. pa kreisi),
- d) dzeltenzaļš, kompakts (6. B att. pa kreisi otrais un trešais kalluss no augšas).

Secinājumi no eksperimentos iegūtajiem rezultātiem:

* *Kallusa struktūras un pigmentācijas veidošanās atkarīga no kultivēšanas apstākļiem in vitro.*

* *Rhododendrus var pavairot organogēnu kallusu kultivējot apstākļos, kas veicina dzinumus veidošanos.*

3. 2. Peroksidāzes kvalitatīvais un kvantitatīvais sastāvs rododendru dažādu taksonu kallusos atkarībā no kultivēšanas apstākļiem

Ir konstatēts, ka *in vitro* kultūru morfoģenētiskās attīstības laikā [Fett-Neto et al., 1992; Zhou et al., 1992] un dažādu stresa un vides faktoru ietekmē [Wolter et al., 1975; Gaspar, 1991; Kevers et al., 1991; Wakamatsu et al., 1993] var notikt antioksidatīvo fermentu, tajā skaitā arī peroksidāžu kvalitatīvā un kvantitatīvā sastāva izmaiņas. Ir doma, ka šos rādītājus varētu izmantot kultūras attīstības prognozēšanai [Gaspar et al., 1985_(a), 1990, 1992_(b)] un fizioloģiskā stāvokļa interpretēšanai [Berthon et al., 1989; Le Dily et al., 1993_(a)]. Tas ļautu mērķtiecīgāk optimizēt kultivēšanas vidi. Arvien paplašinoties *in vitro* kultūru pielietošanai, aktuāls kļūst jautājums par kultūru ģenētiskās stabilitātes testēšanu. Kā viens no iespējamajiem bioķīmisko rādītāju kandidātiem testēšanas sistēmās varētu būt peroksidāžu izoformu spektrs, jo uzskata, ka tas ir ģenētiski noteikts [Левитес, 1986; Андреева, 1988].

Viens no šī darba mērķiem bija raksturot rododendru kallusa kultūras attīstību, izmantojot peroksidāzes kvalitatīvos un kvantitatīvos rādītājus. Izejot no tā eksperimentu uzdevumi bija:

- 1) salīdzināt peroksidāzes aktivitāti un izoformu spektru dažādu sugu rododendru kallusos;
- 2) analizēt peroksidāzes aktivitāti un izoformu spektru kallusos atkarībā no kultivēšanas apstākļiem;
- 3) analizēt peroksidāzes aktivitātes dinamiku dažādu orgānu eksplantu kallusos, kas kultivēti atšķirīgos apstākļos;
- 4) noteikt peroksidāzes aktivitāti un izoformu spektru intakta rododendra orgānos (tika izmantotas *Rh. catawbiense* un *Rh. luteum* ziedi, lapas, miza, saknes, kuras ievāca maijā).

Analīzē kā substrātu izmantojot gvajakolu, dažādu sugu ziedu eksplantos peroksidāzes aktivitāti nebija iespējams noteikt. Ir zināms, ka peroksidāzes aktivitāte analizējot var mainīties, atkarībā no izmantotā substrāta [Ievinsh, 1991, 1992]. Izmantojot benzidīnu no astoņu sugu eksplantiem izdevās

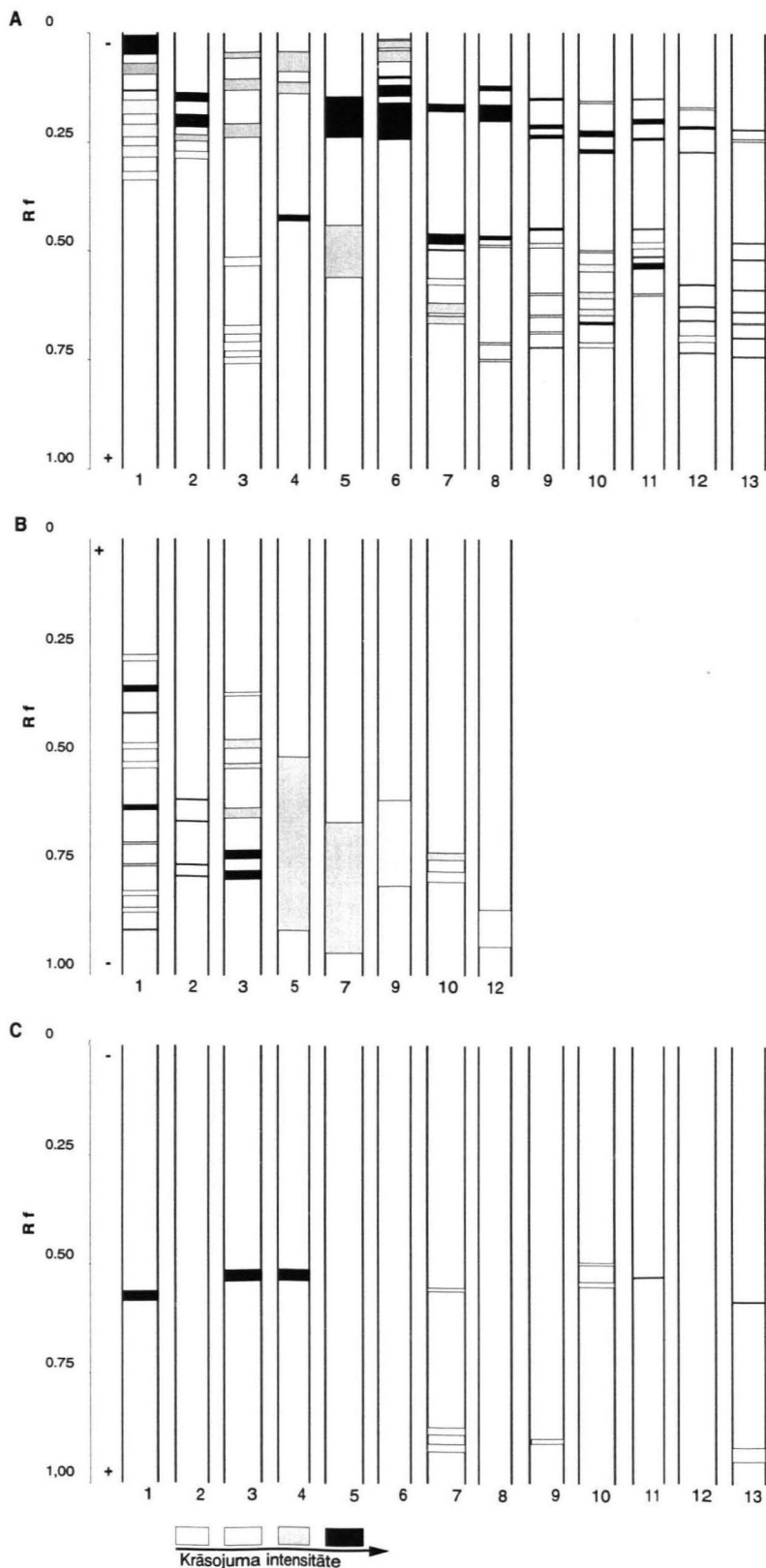
vizualizēt elektroforētiski izdalītās peroksidāzes skābās izoformas (18. A att.). Tas liecināja, ka ziedu eksplantos tomēr ir peroksidāzes aktivitāte, tikai ļoti zema. Arī citos intakta rododendra orgānos peroksidāzes aktivitāti varēja noteikt, kā substrātu izmantojot benzidīnu, iegūtie rezultāti rādīja, ka tā bija salīdzinoši zema (9. tabula). *No iegūtajiem rezultātiem varēja secināt, ka rododendru orgāniem kopumā ir raksturīga zema peroksidāzes aktivitāte.*

Izmantojot gvajakolu kā substrātu, peroksidāzes aktivitāti bija iespējams konstatēt kallusos, kas veidojušies no ziedu eksplantu (10.; 11. tabula). Tas liecināja, ka rododendriem dediferencētās šūnās peroksidāzes aktivitāte ir lielāka, nekā diferencētās.

Linum usitatissimum hipokotila [McDougall et al., 1992] un *Nicotiana tabacum* L. epidermas [Thorpe et al., 1978] eksplantiem dediferencējoties, audos konstatēts peroksidāzes aktivitātes pieaugums, salīdzinājumā ar izejas materiāla audiem. Savukārt *Ficus religiosa* L. eksplantos konstatēta lielāka peroksidāzes aktivitāte nekā kallusos [Lal et al., 1988]. Tas ļauj secināt, ka peroksidāzes aktivitātes izmaiņas diferencētos un nediferencētos audos ir ģenētiski determinētas.

Literatūrā tiek atzīmēts, ka tikai daļa no peroksidāzes izoformām, kas ir eksplantos, saglabājas arī kallusos [McCown et al., 1970; Lal et al., 1988]. Attiecībā par rododendru izoprosidāzēm, šādu salīdzinājumu nevar veikt, jo eksplantos bija tik zema fermenta aktivitāte, ka nav zināms, vai tikušas izdalītas visas izoformas.

Peroksidāzes aktivitātes dinamika tika noteikta, par substrātu izmantojot benzidīnu. Gan ziedu, gan veģetatīvo galotnes pumpuru eksplantu kallusoģenēzes laikā peroksidāzes aktivitātei bija tendence pieaugt attiecībā pret eksplanta audiem (19. att.). Jāatzīmē, ka peroksidāzes aktivitātes dinamika tika pētīta, *in vitro* kultivēšanu uzsākot maija sākumā, tātad kallusoģenēzi neveicinošā - VII-VIII organoģenēzes etapa laikā. Tomēr visos variantos neliela kallusa veidošanās tika novērota (20. att.). Tas vēlreiz apstiprināja, ka



18. att. Peroksidāžu izoformas dažādu sugu rododendru ziedu eksplantos un kallusos
(kallusi iegūti uz Andersona barotnes ar IPA 2 mg/l un NES 8 mg/l, tumsā)

A Skābās izoperoksidāzes kallusos

B Bāziskās izoperoksidāzes kallusos

C Skābās izoperoksidāzes eksplantos

1. *Rh. canadense*; 2. *Rh. vaseyi*; 3. *Rh. japonicum*; 4. *Rh. luteum*; 5. *Rh. carolinianum*;

6. *Rh. mucronulatum*; 7. *Rh. ferrugineum*; 8. *Rh. hirsutum*; 9. *Rh. discolor*;

10. *Rh. caucasicum*; 11. *Rh. smirnowii*; 12. *Rh. catawbiense*; 13. *Rh. maximum*

9. tabula

Peroksidāzes aktivitāte intaktu rododendru orgānos (analīzē kā substrāts izmantots benzidīns)

Paraugs sekundē	Peroksidāzes aktivitāte uz g svaigās masas	
	<i>Rh. catawbiense</i>	<i>Rh. luteum</i>
Ziedpumpurs	N	0.088 ± 0.027
Driksna un irbulis	N	N
Sēklotne, ziedgultne un ziedkāts	N	0.089 ± 0.029
Putekšņlapa	N	0.394 ± 0.147
Ziedlapa	N	0.052 ± 0.010
Zviņlapa	N	0.129 ± 0.034
Veģetatīvais pumpurs kopā ar daļu no dzinuma	0.017 ± 0.008	0.144 ± 0.012
Lapas - viengadīgās	N	N
- divgadīgās	0.088 ± 0.030	
Viengadīgā dzinuma miza	0.141 ± 0.026	0.492 ± 0.148
Sakne	0.088 ± 0.088	0.135 ± 0.012

N - peroksidāzes aktivitāti nevar noteikt, jo absorbcijas spektrs nemainās

rododendriem dediferencētās šūnās ir salīdzinoši augsta peroksidāzes aktivitāte. Ir konstatēts, ka peroksidāzes aktivitāte var būt atšķirīga dediferenciācijas un proliferācijas laikā [McDougall et al., 1992]. Lai konstatētu, vai rododendriem peroksidāzes aktivitāte atšķiras dediferenciācijas un proliferācijas laikā, šāds eksperiments būtu jāatkārto V - VI organoģenēses etapa laikā.

Kultivēšanas apstākļu ietekme uz peroksidāzes aktivitāti H- 75/1 kallusos
(analīzē kā substrāts izmantots gvajakols)

Barotne	Peroksidāzes aktivitāte ($\mu\text{mol gvajakola} \cdot (\text{g sv. masa})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)				
	IPA mg/l	NES mg/l	IES mg/l	kallusogēnēze tumsā	kallusogēnēze gaismā
Andersona	2	8		0.48 ± 0.05	0.88 ± 0.00
Andersona	3	4		0.95 ± 0.16	0.64 ± 0.10
Andersona	5	1		1.02 ± 0.12	0.42 ± 0.08
Cimmermana	10		2.5	0.95 ± 0.05	0.29 ± 0.02
Cimmermana	10		8	0.58 ± 0.09	0.49 ± 0.05
Cimmermana	15		4	0.83 ± 0.13	0.64 ± 0.03
Andersona	10		2.5	1.06 ± 0.09	0.24 ± 0.03
Andersona	10		8	0.83 ± 0.15	0.52 ± 0.03
Andersona	15		4	1.22 ± 0.28	0.73 ± 0.09

Raksturīgi, ka peroksidāzes aktivitātei *Rh. catawbiense* kallusos no veģetatīvajiem un ģeneratīvajiem eksplantiem bija tendence būt zemākai, nekā *Rh. luteum* attiecīgajos kallusos. Vienlaicīgi, salīdzinot šo sugu eksplantus jāatzīmē, ka tūlīt pēc izolēšanas *Rh. catawbiense* ģeneratīviem un īpaši veģetatīviem eksplantiem bija novērojama spēcīga audu brūnēšana, ko var uzskatīt par vizuālu oksidatīvā stresa pazīmi [Benson et. al., 1992]. Tas nozīmē, ka *Rh. catawbiense* eksplanta audi bija oksidatīvā stresa stāvoklī. Varēja novērot, ka ziedu eksplantu dediferenciācijas laikā un kallusa proliferācijas sākumā, *Rh. catawbiense* oksidatīvā stresa pazīmes izzuda, bet proliferējot, ar

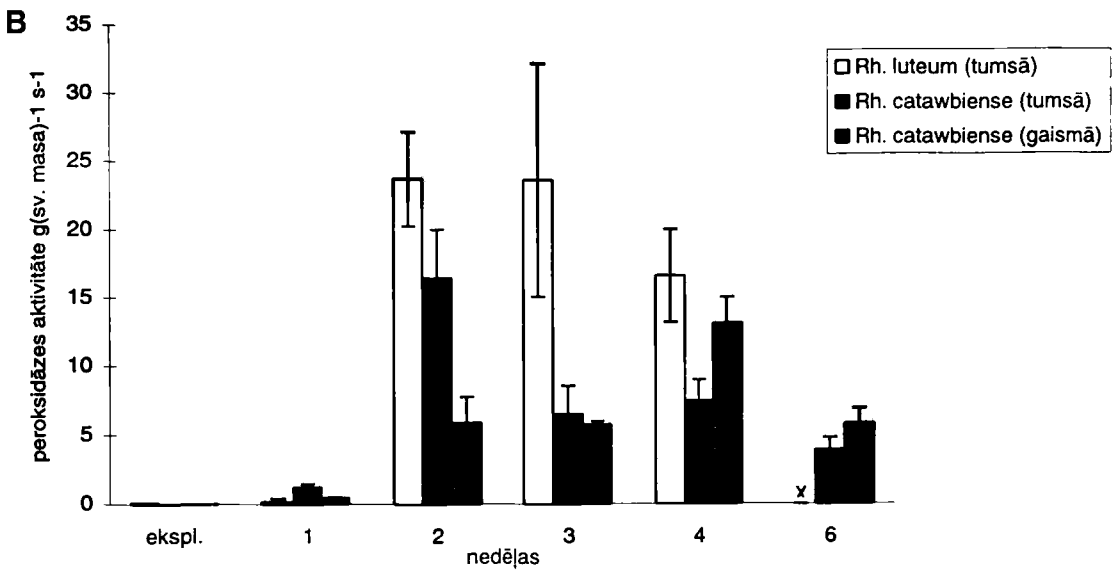
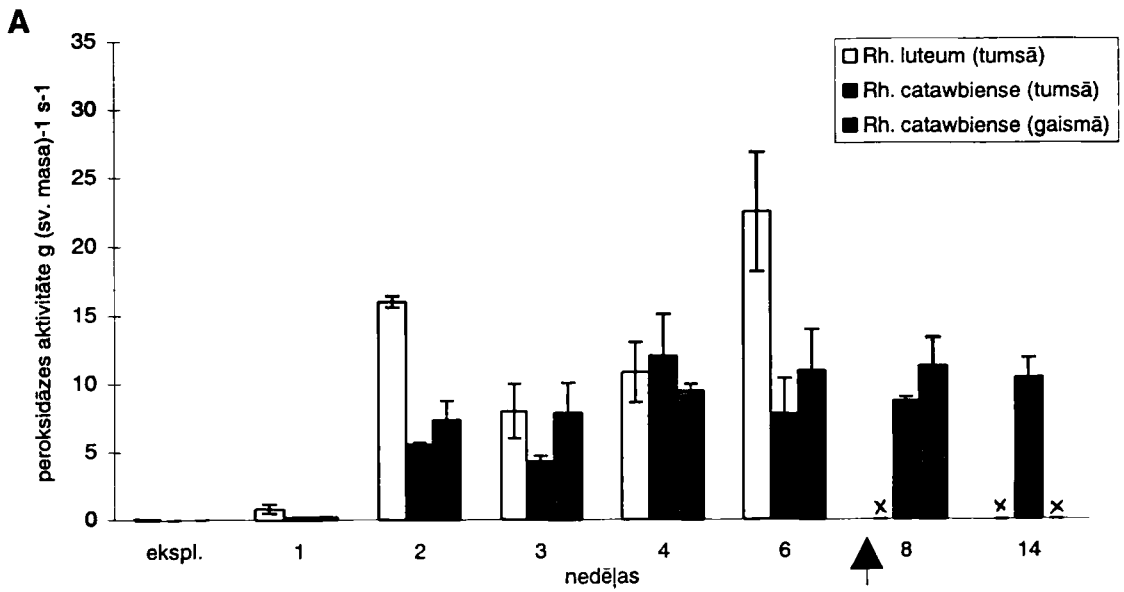
11. tabula

Dāžādu sugu rododendru kallusi un to peroksidāzes aktivitāte; rezultāti fiksēti pēc 2 mēnešu kultivēšanas uz Andersona barotnes ar IPA 2 mg/l un NES 8 mg/l tumsā (peroksidāzes analīzei kā substrāts izmantots gvajakols)

Suga	Kallusa izmērs	Peroksidāzes aktivitāte ($\mu\text{mol gvajakola} \cdot$ (g sv. masa) $^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)
<i>Rh. hirsutum</i>	OOO	0.31 ± 0.03
<i>Rh. ferrugineum</i>	OO - OOO	0.29 ± 0.02
<i>Rh. carolinianum</i>	OO	3.89 ± 0.56
<i>Rh. mucronulatum</i>	O-OO	2.03 ± 0.88
<i>Rh. discolor</i>	OOO	0.68 ± 0.01
<i>Rh. catawbiense</i>	OO-OOO	0.31 ± 0.04
<i>Rh. smirnowii</i>	OO	2.92 ± 0.22
<i>Rh. caucasicum</i>	OOO	1.02 ± 0.10
<i>Rh. maximum</i>	O	3.01 ± 0.43
<i>Rh. vaseyi</i>	OO	1.13 ± 0.10
<i>Rh. canadense</i>	O	0.90 ± 0.09
<i>Rh. japonicum</i>	OO	20.92 ± 2.17
<i>Rh. luteum</i>	OO	3.75 ± 0.00

O - kalluss 2 reizes mazāks par eksplantu; OO - kalluss 2 līdz 5 reizes lielāks par eksplantu; OOO - kalluss ir vairāk nekā 6 reizes lielāks par eksplantu

laiku atkal parādījās. *Rh. catawbiense* veģetatīvajiem pumpuriem dediferencējoties un kallusa kultūrai proliferējot, nekrozes pazīmes bija salīdzinoši vēl izteiktākas nekā ziedu eksplantiem. *Rh. luteum*, veģetatīvo un zieda eksplantu kallusiem proliferējot, ar laiku arī parādījās oksidatīvā stresa



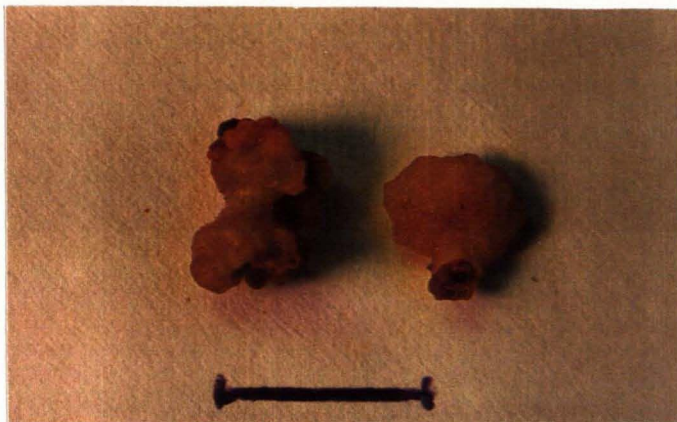
19. att. Peroksidāzes aktivitātes dinamika kallusa attīstības laikā
 (—► pārstādīšana uz jaunas barotnes; ekspl.- eksplants;
 x - paraugi nav analizēti)

Kallusu iegūšanai izmantota Andersona barotne ar IPA 8 mg/l un NES 2 mg/l
 Analīzei kā substrāts izmantots benzidīns

A Kallusi veidojušies no ziedu eksplantiem

B Kallusi veidojušies no veģetatīvo pumpuru eksplantiem

pazīmes, bet salīdzinoši daudz vēlāk nekā *Rh. catawbiense*. Zīmīgi, ka arī peroksidāzes aktivitātei bija tendence būt augstākai tieši *Rh. luteum* kallusā (19. att.), kā arī intakta auga audos kopumā (9. tabula).



20. att. Kallusi no ziedu eksplantiem, kas izolēti maija sākumā

pa kreisi - *Rh. luteum*, pa labi - *Rh. catawbiense*

(pēc 2 mēnešu kultivēšanas tumsā uz Andersona barotnes ar IPA 2 mg/l un NES 8 mg/l); — - 1 cm

No vienas puses ir zināms, ka zemāka antioksidatīvo fermentu aktivitāte, piemēram, katalāzes [Benson et al., 1992], raksturīga kallusiem, kas ir jutīgāki pret oksidatīvo stresu. Bet no otras puses, uzskata, ka augstāka antioksidatīvo fermentu aktivitāte, piemēram, katalāzes [Siminis et al., 1994] var norādīt uz to, ka audi tiek pakļauti oksidatīvajam stresam. No eksperimentiem ar rododendriem tomēr jāsecina, ka tieši pret oksidatīvo stresu tolerantākajai sugai *Rh. luteum*, ko norādīja salīdzinoši vēlākā audu brūnēšana *in vitro* un eksplantu nebrūnēšana, bija salīdzinoši augstāka peroksidāzes aktivitāte gan intakta auga audos (9. tabula), gan kallusos (19. att.), nekā tas bija *Rh. catawbiense*. Tātad augstāka peroksidāzes aktivitāte norāda uz auga lielāku izturību pret oksidatīvo stresu. No iegūtajiem rezultātiem varēja secināt, ka viens no iespējamiem bioķīmiskajiem rādītājiem kultūru attīstību atšķirību novērtēšanai starp dažādām sugām varētu būt peroksidāzes aktivitāte jau intaktā augā, kā arī audos kallusa

kultūras attīstības laikā. Gan šajā eksperimentā, gan arī pārējos eksperimentos, visiem izmēģinātajiem rododendriem, kallusam augot vienmēr tika novērota audu brūnēšanas tendence. Tas varētu liecināt par *Rhododendron* L. ģints augu audiem raksturīgu pastiprinātu jutību pret oksidatīvo stresu izraisošiem faktoriem *in vitro*.

Kallusi, kas bija izveidojušies dažādu kultivēšanas apstākļu rezultātā no H-75/1 ziedpumpuru eksplantiem redzami 21. attēlā. Tumsā, neatkarīgi no barotnes sastāva, tika iegūti dzelteni, mīksti vai dzeltenbalti, kompakti neorganogēni kallusi. Visintensīvāk kallusi attīstījās uz Andersona barotnes ar IPA 2 vai 3 mg/l un NES 8 vai 4 mg/l (21. A att.). Gaismā (16 h fotoperiods) eksplanti sintezēja hlorofilu, to izmēri pieauga; bet kalluss veidojās vāji, tie bija dzeltenbrūni mīksti vai zaļi kompakti (21. B att.). Kopumā uz organogēnēzi stimulējošām barotnēm ar IPA un IES, kallusiem vēl nebija novērojama graudainas virsmas veidošanās, kas vizuāli liecinātu par organogēna kallusa veidošanos, izņemot pāris atkārtojumos uz Cimmermana barotnes ar IPA 10 mg/l un IES 8 mg/l.

Eksperimentos iegūtie rezultāti, ka kallusus, kas izveidojušies dažādu kultivēšanas apstākļu ietekmē (21. att.) peroksidāzes aktivitāte bija atšķirīga (10. tabula). Tika konstatēts, ka aktivitātei bija tendence būt lielākai augstākai kallusus, kas kultivēti tumsā (10. tabula). Lidzīga tendence tika novērota arī peroksidāzes aktivitātei kallusus, kas kultivēti uz Andersona barotnes, gan gaismā, gan tumsā, salīdzinot ar kallusiem, kas veidojušies uz Cimmermana barotnes (10. tabula). *Tātad peroksidāzes aktivitātei bija tendence būt augstākai kallusus, kas veidojušies kallusoģenēzi veicinošos apstākļos (tajos arī audu nekroze bija salīdzinoši vājāka).* Iespējams, ka rododendru tendenci uz oksidatīvo stresu *in vitro* varētu mazināt koriģējot kultivēšanas apstākļus. Peroksidāzes aktivitāte varētu būt viens no iespējamiem bioķīmiskiem rādītājiem kallusa kultūras attīstības kontrolei. Paralēles starp fitohormonu sastāvu barotnē un peroksidāzes aktivitāti kallusus neizdodēvās atrast.

Eksperimenti parādīja, ka H-75/1 kallusus, kas iegūti uz dažādām barotnēm, gaismā un tumsā, gan skābo, gan bāzisko izoperoksidāžu izoformu



21. att. Kallusi, kas veidojušies dažādu kultivēšanas apstākļu ietekmē no H-75/1 ziedu eksplantiem; ——— - 1 cm

A tumsā; **B** gaismā

pa kreisi:

Andersona barotne ar
IPA 2 mg/l un NES 8 mg/l
IPA 3 mg/l un NES 4 mg/l
IPA 5 mg/l un NES 1 mg/l

vidū:

Andersona barotne ar
IPA 10 mg/l un IES 2.5 mg/l
IPA 15 mg/l un IES 4 mg/l
IPA 10 mg/l un 8 mg/l

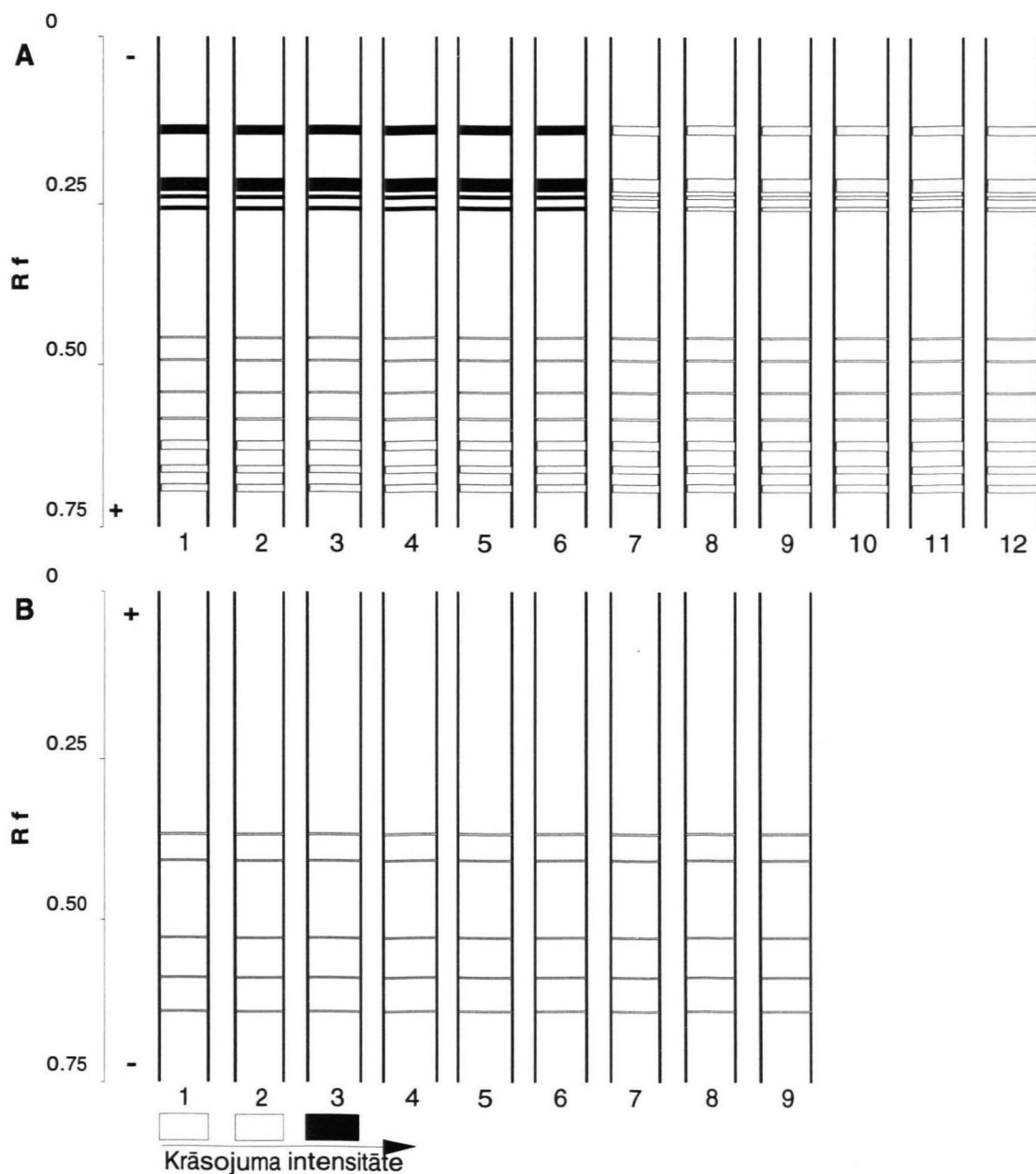
pa labi:

Cimmermana barotne ar
IPA 10 mg/l un IES 2.5 mg/l
IPA 15 mg/l un IES 4 mg/l
IPA 10 mg/l un IES 8 mg/l

skaits ir vienāds visos variantos (22. att.). Kā redzams skābās izoformas (22. A att.) bija vairāk nekā bāziskās (22. B att.).

Zhou (1992) uzskata, ka fitohormoni barotnē neietekmē peroksidāžu kvalitatīvo sastāvu kallusos, bet tas ir atšķirīgs dažādas diferencētības pakāpes audos, piemēram, embriogēnos un neembriogēnos kallusos. Viņš secina, ka variantos ar līdzīgu audu diferenciācijas pakāpi, kaut arī tie ir veidojušies uz barotnēm ar dažādas koncentrācijas fitohormoniem, izoperoksidāžu spektrs ir vienāds, bet nedaudz atšķiras to aktivitātes. Lielāka peroksidāzes aktivitāte un atšķirīgs izoformu kvalitatīvais sastāvs embriogēnā kallusā, salīdzinājumā ar neembriogēnu ir konstatēta - *Daucus carota* L. [Wochok et al., 1974], *Citrus sinensis* [Kochaba et al., 1977], *Phoenix dactylifera* L. [Baaziz et al., 1994]. Toties *Ipomoea batatas* (L.) Lam embriogēna kallusa veidošanos no neembriogēna pavada peroksidāzes aktivitātes un izoformu skaita samazināšanās [Alves et al., 1994]. Ir konstatēts, ka kallusoģenēzi un šūnu proliferāciju [Ray et al., 1987], dzinumumu [Fett-Neto et al., 1992; Maheswaran et al., 1992] un sakņu [Fett-Neto et al., 1992; Gaspar et al., 1992; Kevers et al., 1992] iniciāciju pavada izmaiņas peroksidāzes aktivitātē un izoformu daudzveidībā. Līdz ar to var secināt, ka izmaiņas peroksidāžu kvalitatīvajā un kvantitatīvajā sastāvā atkarīgas no morfoģenētiskajiem procesiem audos. Iegūtie rezultāti rāda, ka kultivēšanas apstākļi bija ietekmējuši peroksidāzes aktivitāti rododendru kallusos (10. tabula). Tomēr visos variantos vienāda izoperoksidāžu spektrs (22. att.) liek domāt, ka nebija notikuši pietiekami intensīvi diferencēšanās procesi, un visi iegūtie kallusi ir līdzīgā attīstības pakāpē.

Tumsā dažādu sugu neorganogēni kallusi, kas iegūti uz Andersona barotnes ar IPA 2 mg/l un NES 8 mg/l, bija atšķirīgi pēc lieluma (11. tabula), struktūras un pigmentācijas. Eksperimentā tika iegūti rezultāti, ka dažādu sugu kallusos peroksidāzes aktivitāte ir atšķirīga (11. tabula). Nevarēja vilkt paralēles starp kallusoģenēzes intensitāti un peroksidāzes aktivitāti, kaut gan Volters (1975) pieņem, ka *Populus tremuloides* Michx. kallusu svaigā masa korelē ar šī fermenta aktivitāti.



22. att. Peroksidāžu izoformas H-75/1 kallusus, kas kultivēti dažādos apstākļos (kallusi iegūti no ziedu eksplantiem)

A Skābās izoperoksidāzes

Kallusu kultivēšanas apstākļi:

1. Andersona bar., IPA 2 mg/l, NES 8 mg/l ; tumsa
2. Andersona bar., IPA 3 mg/l, NES 4 mg/l ; tumsa
3. Andersona bar., IPA 5 mg/l, NES 1 mg/l ; tumsa
4. Cimmermana bar., IPA 10 mg/l, IES 8 mg/l; tumsa
5. Cimmermana bar., IPA 10 mg/l, IES 2.5 mg/l; tumsa
6. Cimmermana bar., IPA 15 mg/l, IES 4 mg/l; tumsa
7. Andersona bar., IPA 2 mg/l, NES 8 mg/l ; gaisma
8. Andersona bar., IPA 3 mg/l, NES 4 mg/l ; gaisma
9. Andersona bar., IPA 5 mg/l, NES 1 mg/l ; gaisma
10. Cimmermana bar., IPA 10 mg/l, IES 8 mg/l; gaisma
11. Cimmermana bar., IPA 10 mg/l, IES 2.5 mg/l; gaisma
12. Cimmermana bar., IPA 15 mg/l, IES 4 mg/l; gaisma

B Bāziskās izoperoksidāzes

Kallusu kultivēšanas apstākļi:

1. Andersona bar., IPA 2 mg/l, NES 8 mg/l ; tumsa
2. Andersona bar., IPA 3 mg/l, NES 4 mg/l ; tumsa
3. Andersona bar., IPA 5 mg/l, NES 1 mg/l ; tumsa
4. Cimmermana bar., IPA 10 mg/l, IES 2.5 mg/l; tumsa
5. Cimmermana bar., IPA 10 mg/l, IES 8 mg/l; tumsa
6. Cimmermana bar., IPA 15 mg/l, IES 4 mg/l; tumsa
7. Andersona bar., IPA 10 mg/l, IES 2.5 mg/l; tumsa
8. Andersona bar., IPA 10 mg/l, IES 8 mg/l; tumsa
9. Andersona bar., IPA 15 mg/l, IES 4 mg/l; tumsa

Toties katras rododendru sugas kallusa audos, kas iegūti vienādos apstākļos, tika konstatēts atšķirīgs skābo un bāzisko izoperoksidāžu sastāvs (18. B, C att.). *Eksperimenta rezultātā varēja secināt, ka izoperoksidāžu spektru kallusus ietekmē taksons.*

Ir zināms, ka peroksidāzes kvalitatīvā sastāva pētījumus uzskata par perspektīviem ģenētiskajā identifikācijā [Bassiri, 1976; Левитес, 1986; Krzakowa, 1991; Zheng et al., 1993]. Lai atrisinātu atsevišķās neskaidrības rododendru sistemātikā, kā arī šķirņu identifikācijai un *in vitro* materiāla ģenētiskās stabilitātes konstatēšanai, blakus tradicionālajām morfoloģiskajām taksonomijas metodēm, būtu nepieciešama salīdzinoši vienkārša un precīza bioķīmiska genotipu atšķiršanas metode. Ir mēģinājumi rododendru hemosistemātikā izmantot flavonoīdus [Spethmann, 1975; King, 1977; De Loose, 1979; Blumenberg, 1989]. Darbā iegūtie rezultāti rāda, ka peroksidāžu kvalitatīvā sastāva analīze varētu būt perspektīva rododendru ģenētiskajai identifikācijai. Spriežot pēc iegūtajiem rezultātiem, rododendru audos *in vivo* ir zema peroksidāzes aktivitāte (9. tabula), līdz ar to elektroforētiski ir grūti izdalīt izoformas. Tādēļ, analīzei varētu izmantot *in vitro* kallusus (to attīstības sākumstadijās), jo tajos peroksidāzes aktivitāte ir lielāka. Vēl *in vitro* materiāla priekšrocības ir kontrolējami kultivēšanas apstākļi, līdz ar to ir iespēja vienmēr iegūt audus vienā un tajā pašā attīstības stadijā. Tas ir īpaši svarīgi, jo saskaņā ar Pleškova [Плешков, 1975], Gaspara [Gaspar et al., 1982], Sarsanbajeva [Саранбаев и др., 1982] un Andrejevas [Андреева, 1988] secinājumiem, kas iegūti apkopojot dažādu pētījumu rezultātus - izmaiņas apkārtējā vidē un attīstības pakāpe, kas var būt arī savstarpēji saistītas, ietekmē peroksidāžu kvalitatīvo un kvantitatīvo sastāvu. Turpmākajā darbā būtu jānoskaidro izoformu stabilitāte rododendru kallusus, kas ir iegūti no dažādā laikā un attīstības pakāpē izolētiem eksplantiem, kā arī kallusu subkultivējot.

Secinājumi no eksperimentos iegūtajiem rezultātiem:

** Kallusu audos no ziedu eksplantiem un veģetatīvajiem pumpuriem ir augstāka peroksidāzes aktivitāte, nekā eksplantu diferencētajos audos;*

- * *Peroksidāzes aktivitāti kallusos ietekmēja pārbaudītie kultivēšanas apstākļi in vitro, bet izoformu spektru tie neietekmē, acīmredzot, kultivēšanas apstākļi nav izraisījuši kvalitatīvas izmaiņas kallusu audu attīstībā;*
- * *Peroksidāzes aktivitātei ir tendence būt lielākai kallusos, kas iegūti kallusoģenēzi veicinošos apstākļos (uz Andersona barotnes tumsā);*
- * *Starp peroksidāzes aktivitāti intaktā augā un kallusa audos ir novērojamas paralēles ar kallusa audu nekrozes intensitāti - sugai ar zemāku peroksidāzes aktivitāti bija novērojama intensīvāka eksplanta audu brūnēšana un salīdzinoši ātrāka nekrozes pazīmju parādīšanās kallusa audiem;*
- * *Izoperoksidāžu spektrs kallusos ir atkarīgs no rododendra taksona;*
- * *Intakta rododenda dažādu orgānu audos ir raksturīga zema peroksidāzes aktivitāte.*

3. 3. Katalāzes aktivitāte kallusos atkarībā no to kultivēšanas apstākļiem

Līdzās peroksidāzei, arvien lielāka uzmanība tiek pievērsta katalāzes aktivitātes pētīšanai dažādu augu *in vitro* kultūru attīstības laikā saistībā ar morfoģenēzi [Benson et al., 1992; Siminis et al., 1994; Dey et al., 1995] un vides un stresa faktoru ietekmi [Wakamatsu et al., 1993].

Viens no šī darba mērķiem bija raksturot rododendru kallusa kultūras attīstību, izmantojot katalāzes aktivitāti audos. Izejot no tā eksperimentu uzdevumi bija:

- 1) analizēt katalāzes aktivitāti kallusos, kas attīstījušies atšķirīgos apstākļos,
- 2) analizēt katalāzes aktivitāti kallusos, kas iegūti no dažādās attīstības stadijās esošiem eksplantiem,
- 3) analizēt katalāzes aktivitāti intakta auga dažādos orgānos (tika izmantoti *Rh. luteum* un *Rh. catawbiense* lapas, ziedi, miza, saknes, kurus ievāca maijā).

Eksperimentu rezultāti parādīja, ka intakta auga dažādos ģeneratīvajos un veģetatīvajos orgānos katalāzes aktivitāte ir atšķirīga (12. tabula). Tika konstatēts, ka dediferenciācijas laikā katalāzes aktivitāte sasniedz savu maksimumu (23. att.). Siminis [Siminis et al., 1994] uzskata, ka dediferenciācijas process ir viens no katalāzes aktivitāti regulējošiem faktoriem. Laikā, kad sākas redzama kallusa parādīšanās, katalāzes aktivitātes dinamikai bija raksturīga lejupslīde (23. att.). Uz Andersona barotnes redzamu kallusa parādīšanos varēja novērot pēc 2 nedēļu eksplanta kultivēšanas, bet uz Cimmermana barotnes, nedaudz vēlāk.

Kallusam proliferējot, katalāzes aktivitātei bija tendence samazināties (23. att.). Katalāzes aktivitāte samazināšanās novērota arī *Vitis vinifera* L. [Siminis et al., 1994] un *Oryza sativa* L. [Dey et al., 1995] kallusa proliferācijas laikā.

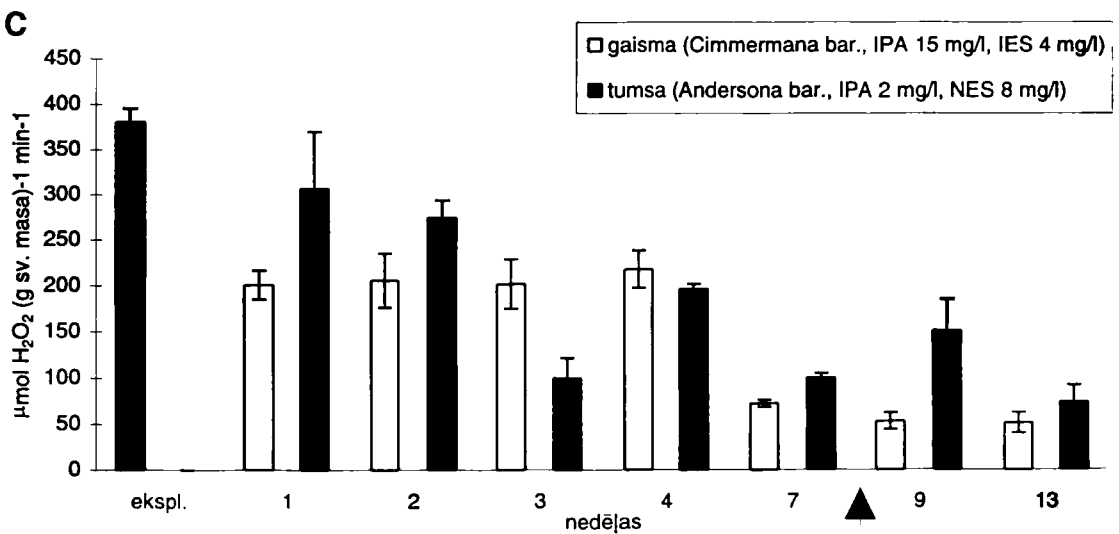
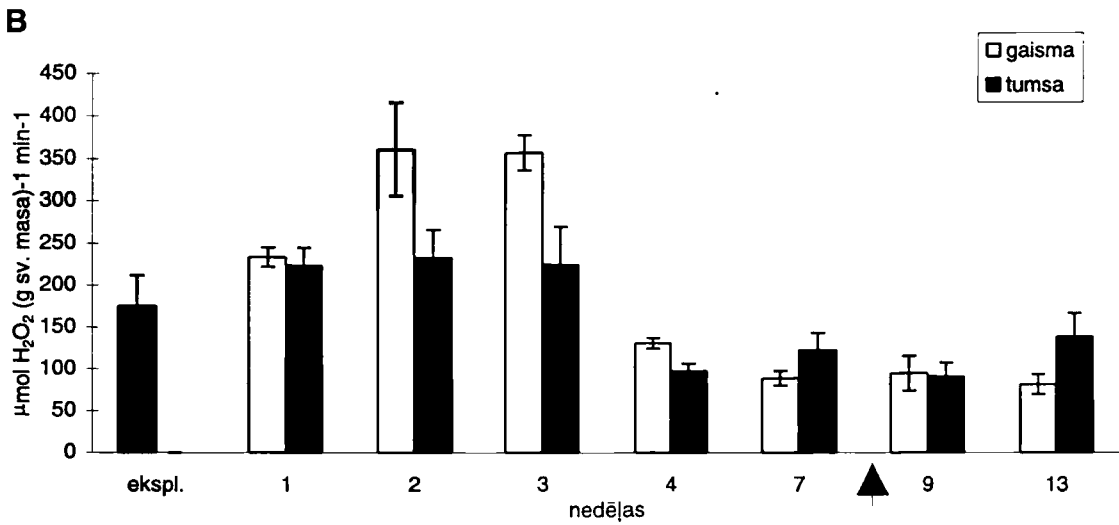
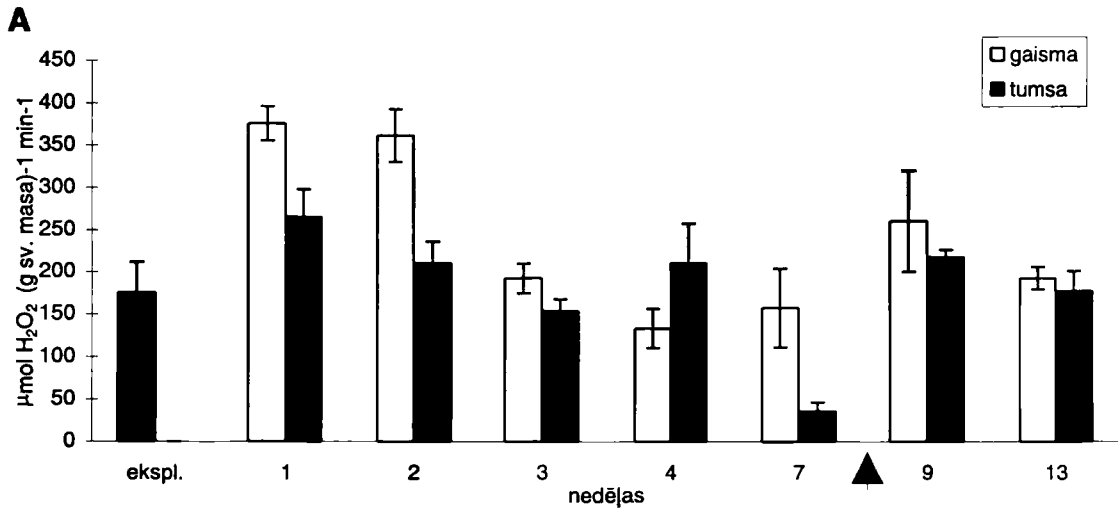
Salīdzinot *Rh. catawbiense* un *Rh. luteum* maijā un septembrī izolētu ziedpumpuru kallusģenēzi, varēja konstatēt, ka maijā izolētu eksplantu kallusi veidojas vāji. To var izskaidrot, tādējādi, ka maijā, eksplantu izolēšanas brīdī, līdz ziedēšanai ir apmēram mēnesis, tātad augs atrodas VII-VIII organoģenēzes

Katalāzes aktivitāte intaktu rododendru orgānos

Paraugs	Katalāzes aktivitāte ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \cdot (\text{g sv. masa})^{-1} \cdot \text{min}^{-1}$)	
	<i>Rh. catawbiense</i>	<i>Rh. luteum</i>
Ziedpumpurs	433.92 ± 26.89	498.28 ± 17.08
Sēklotne, ziedgultne un ziedkāts	229.82 ± 43.28	259.00 ± 24.09
Ziedlapa	116.07 ± 8.57	225.34 ± 15.32
Putekšņlapa	40.87 ± 7.05	65.38 ± 10.23
Ziedkopas zviņlapa	62.34 ± 2.71	52.80 ± 7.09
Veģetatīvais pumpurs	203.56 ± 14.91	365.67 ± 59.59
Lapas - viengadīgās	25.63 ± 5.62	528.14 ± 9.17
- divgadīgās	148.30 ± 18.10	
Viengadīgo dzinumu miza	68.72 ± 7.81	138.10 ± 23.09
Sakne	105.77 ± 11.76	39.50 ± 8.38

etapā, kurā, kā jau iepriekšējos eksperimentos tika konstatēts, rododendru ziedu eksplantu kallusoģenēze ir vāja. Jāatzīmē, ka arī veģetatīvo galotnes pumpuru eksplantu kallusoģenēze maijā bija vāja.

Raksturīgi, ka maijā izolētu eksplantu kallusa veidošanās laikā katalāzes aktivitātes dinamikas tendences (24. att.) atšķirās no tām, kādas bija konstatējamas septembrī izolētu eksplantu kallusoģenēzes laikā (23. att.). Tas nozīmē, ka ne tikai kallusoģenēzes potences, bet arī kallusu bioķīmiskie rādītāji atšķiras dažādos auga attīstības stāvokļos izolētiem eksplantiem.



23. att. Katalāzes aktivitātes dinamika kallusa attīstības laikā atkarībā no kultivēšanas apstākļiem (→ pārstādīšana uz jaunas barotnes; ekspl. - eksplants)

A *Rh. catawbiense* (Andersona barotne ar IPA 2 mg/l un NES 8 mg/l)

B *Rh. catawbiense* (Cimmermana barotne ar IPA 15 mg/l un IES 4 mg/l)

C *Rh. luteum*

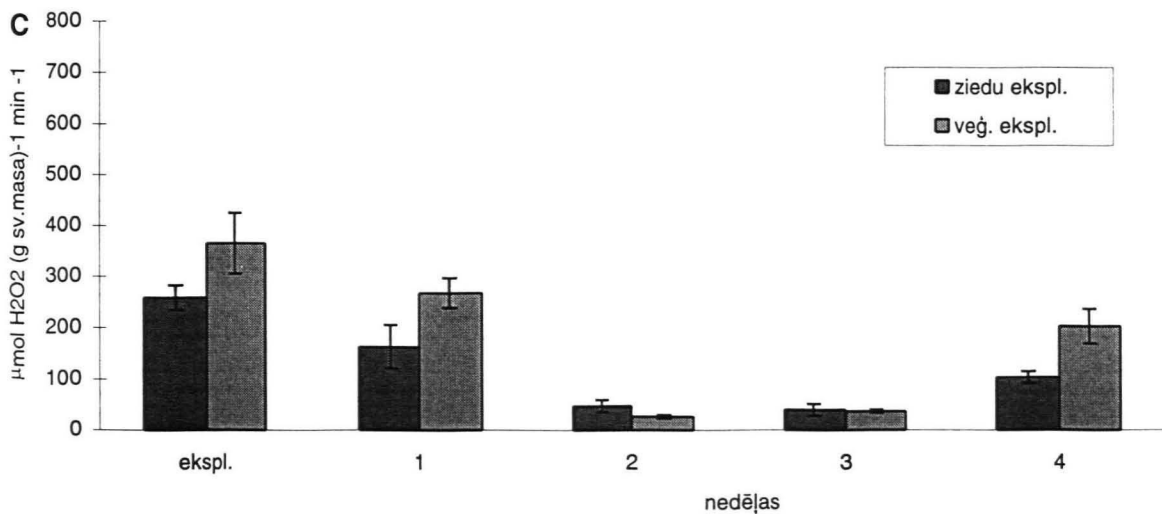
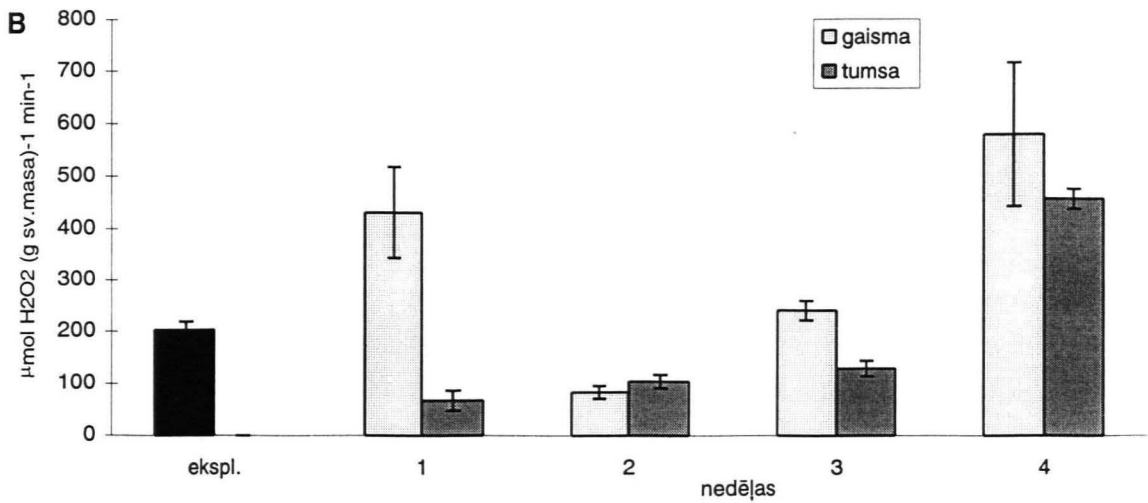
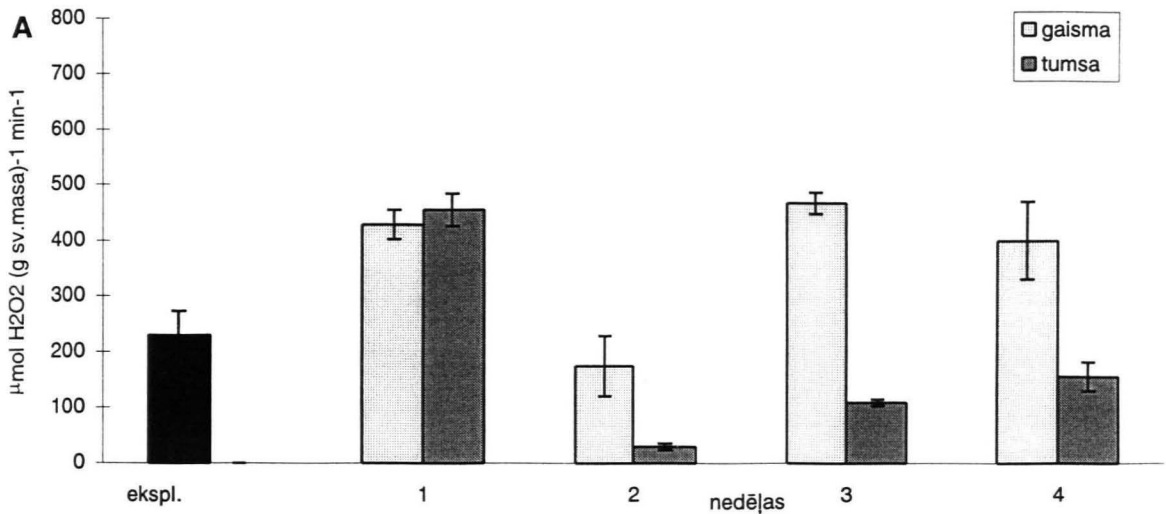
Tika novērotas dažādu sugu kallusa attīstības atšķirības, kas raksturīgas neatkarīgi no auga attīstības stāvokļa, kādā izolēts eksplants. *Rh. catawbiense* ziedu, bet īpaši veģetatīvo pumpuru eksplantu audi brūnēja tūlīt pēc to izolēšanas, arī kalluss sāk brūnēt ievērojami atrāk nekā *Rh. luteum*. *Rh. luteum* eksplanta audu brūnēšana izolēšanas laikā netika novērota.

Katalāzes aktivitāte *Rh. catawbiense* ziedu un veģetatīvo pumpuru eksplantos bija zemāka, nekā *Rh. luteum* eksplantos (23. att.; 24. att.). Ir doma, ka audi, kuros katalāzes aktivitāte ir bijusi augstāka, veidojot kallusu, šūnas tiek mazāk pakļauti brīvo radikālu iedarbībai [Benson et al., 1992]. Tādā gadījumā jāsecina, ka tieši atšķirības katalāzes aktivitātē jau eksplantos, varētu būt viens no iemesliem, kādēļ *Rh. catawbiense* kallusi brūnē atrāk.

Kallusoģenēzes sākumā katalāzes aktivitātei *Rh. catawbiense* audos bija tendence pieaugt, salīdzinājumā ar katalāzes aktivitāti eksplantu audos (23. att.; 24. att.). Pieaugošu katalāzes aktivitāti uzskata par vienu no bioķīmiskajiem signāliem, kas liecina par oksidatīvo stresu [Siminis et al., 1994]. Ir doma, ka dediferenciācijas [Benson, 1992] un neorganozētas šūnu proliferācijas [Dey et al., 1995] laikā ir pastiprināti oksidatīvā stresa apstākļi. Bensons [Benson et al., 1994] ir konstatējis, ka *Vitis vinifera* L. kallusoģenēzes un kallusa proliferācijas laikā, audos uzkrājas savienojumi, kas rodas oksidatīvā stresa rezultātā un ir raksturīgi novecojošām augu un dzīvnieku šūnām. Oksidatīvajiem procesiem intensificējoties, inducējas katalāzes aktivitāte [Siminis et al., 1994]. Tātad var pieņemt, ka *Rh. catawbiense* dediferenciācijas process bija vairāk tendēts uz oksidatīvā stresa stāvokļa veidošanos.

Kallusiem proliferējot, audu brūnēšanas pazīmes varēja novērot, ne tikai *Rh. catawbiense*, bet vēlāk arī *Rh. luteum*. Abām sugām katalāzes aktivitātes dinamikai kallusu proliferācijas laikā bija tendence samazināties. Bensons (1992) uzskata, ka kallusa šūnas ir izturīgākas, ja proliferācijas laikā katalāzes aktivitāte nesamazinās.

Kallusu proliferācijas laikā varēja konstatēt, ka *Rh. luteum* kallusi tomēr bija izturīgāks pret oksidatīvo stresu, kas izpaudās salīdzinoši vēlākā kallusa audu brunēšanā. Raksturīgi, ka *Rh. luteum* intakta auga lielākajai daļai



24. att. Katalāzes aktivitātes dinamika kallusa attīstības laikā.

Andersona barotne ar IPA 2 mg/l un NES 8 mg/l.

A kalluss veidots no ziedu eksplantiem (*Rh. catawbiense*)

B kalluss veidots no veģetatīvo pumpuru eksplantiem (*Rh. catawbiense*)

C *Rh. luteum* kalluss iegūts no ziedu un veģetatīvo pumpuru eksplantiem, kas kultivēti tumsā.

pārbaudītajos orgānos katalāzes aktivitātei bija tendence būt augstākai nekā *Rh. catawbiense* orgānos. Iespējams, ka tas liecina par ģenētiski noteiktu lielāku izturību pret oksidatīvo stresu izraisošiem kairinātājiem *Rh. luteum* salīdzinājumā ar *Rh. catawbiense*. Tomēr, iespējams, ka pašreizējā nespēja iegūt ilgstoši proliferējošu rododendru ziedu kallusa kultūru virknē izmantotajos kultivēšanas apstākļos, bija saistīta ar pārmērīgu oksidatīvo stresu izraisošas vides ietekmi, par ko liecināja katalāzes aktivitātes samazināšanās, vienlaicīgi ar audu brūnēšanu kallusa proliferēšanas laikā. Tas varētu nozīmēt, ka kultivēšanas vidē jāizdara kvantitatīvas un, iespējams, kvalitatīvas izmaiņas, piemēram, barotnei pievienojot antioksidantus.

Eksperimentu rezultātā tika konstatēts, ka katalāzes aktivitāte kallusos, kas kultivēti uz dažādām barotnēm, bija atšķirīga (13. tabula). Arī šajā eksperimentā bija novērojama sakarība starp kallusa attīstību un katalāzes aktivitāti. Aprīlī/jūnijā - kallusoģenēzei nelabvēlīgā laikā, kalluss visos variantos attīstījās vājāk, nekā septembrī/novembrī. Katalāzes aktivitātei aprīlī/jūnijā iegūtos kallusus ir tendence būt mazākai, nekā kallusus, kas veidojušies no rudenī izolētiem eksplantiem (13. tabula). Tātad kallusoģenēzi stimulējošā auga attīstības stadijā V-VI organoģenēzes etapā, izolētu eksplantu kallusus, katalāzes aktivitātei bija tendence būt augstākai, nekā kallusus, kas tika iegūti no pavasarī izolētiem eksplantiem (VII-VIII organoģenēzes etaps), kad kallusoģenēze bija vāja.

Salīdzinot rudenī iegūtos kallusus, bija redzams, ka katalāzes aktivitātei bija tendence būt lielākai kallusus, kas attīstījušies tumsā (13. tabula), tātad apstākļos, kas veicina kallusoģenēzi. Gaismā uz Cimmermana berotnes ar IPA 15/10 mg/l un IES 4/2.5 mg/l rudenī tika iegūti organoģenēti H-75/1 kallusi. Tim bija raksturīga lielāka katalāzes aktivitāte, nekā neorganoģenētiem kallusiem gaismā (13. tabula). Varētu būt, ka paaugstināta katalāzes aktivitāte, līdzīgi kā peroksidāzes aktivitāte [Lal et al., 1988; Zhou et al., 1992], liecina par diferencētu struktūru veidošanos. Tomēr tiešas paralēles starp fitohormonu koncentrāciju barotnē un katalāzes aktivitāti audos neizdevās konstatēt.

13. tabula

Katalāzes aktivitāte eksplantos un kallusos atkarībā no kultivēšanas apstākļiem un eksplantu izolēšanas laika

Barotne	Fitohormoni mg/l	Katalāzes aktivitāte ($\mu\text{mol H}_2\text{O}_2 \text{ g(svaigā masa)}^{-1} \text{ min}^{-1}$)			
		tumsa	gaisma	tumsa	gaisma
		aprīlis/jūnijs		septembris/novembris	
		R₇₄-128/2			
Andersona	IPA/NES 5/1	93.98 ± 11.61	59.68 ± 13.76	239.10 ± 21.86	187.84 ± 16.47
	IPA/NES 3/4	93.53 ± 14.88	56.55 ± 8.35	247.02 ± 13.59	196.60 ± 5.25
	IPA/NES 2/8	141.77 ± 34.13	58.55 ± 0.70	193.63 ± 16.01	256.01 ± 4.76
Cimmermana	IPA/IES 10/8	135.86 ± 35.03	194.11 ± 17.13	226.15 ± 6.56	176.28 ± 27.73
	IPA/IES 15/4	185.42 ± 6.04	85.76 ± 10.33	190.87 ± 18.94	154.41 ± 9.72
	IPA/IES 10/2.5	76.41 ± 6.23	217.02 ± 48.58	72.66 ± 7.83	56.36 ± 2.53
		Rh. luteum			
Andersona	IPA/NES 5/1	125.73 ± 10.22	38.73 ± 0.00	258.64 ± 40.12	161.86 ± 63.87
	IPA/NES 3/4	142.28 ± 35.10	142.39 ± 43.23	196.58 ± 32.24	138.15 ± 15.44
	IPA/NES 2/8	88.60 ± 14.02	241.96 ± 22.65	196.26 ± 36.49	156.70 ± 41.95
Cimmermana	IPA/IES 10/8	75.27 ± 8.61	28.02 ± 4.43	175.76 ± 23.44	110.34 ± 12.30
	IPA/IES 15/4	192.46 ± 22.56	23.44 ± 3.24	227.26 ± 2.53	109.48 ± 25.47
	IPA/IES 10/2.5	47.69 ± 6.22	70.58 ± 15.72	170.36 ± 15.72	203.27 ± 38.16
		H-75/1			
Andersona	IPA/NES 5/1			132.23 ± 15.02	140.13 ± 17.02
	IPA/NES 3/4			190.30 ± 15.60	112.11 ± 8.63
	IPA/NES 2/8			187.40 ± 15.35	139.69 ± 5.78
Cimmermana	IPA/IES 10/8			175.11 ± 21.34	143.69 ± 26.30
	IPA/IES 15/4			103.30 ± 6.30	210.66 ± 34.17
	IPA/IES 10/2.5			222.92 ± 21.10	231.06 ± 9.29

Ziedu eksplantos: Aprīlī R₇₄-128/2 142.14 ± 29.82; Rh.*luteum* 262.96 ± 28.28
 Septembrī R₇₄-128/2 82.49 ± 8.46; Rh.*luteum* 377.09 ± 24.95; H-75/1 240.83 ± 13.80

Secinājumi no eksperimentos iegūtajiem rezultātiem:

- * Kallusoģenēzes procesās katalāzes aktivitāte audos ir augstāka, nekā kallusu proliferācijas laikā: aktivitāte sāk samazināties, parādoties redzamiem kallusa audiem;*
- * Salīdzinoši zemāka katalāzes aktivitāte eksplantu audos korelē ar salīdzinoši ātrāku kallusa audu nekrozi in vitro;*
- * Katalāzes aktivitāti kallusos, iespējams, ietekmē audu diferencētības pakāpe in vitro;*
- * Katalāzes aktivitātei ir tendence būt lielākai kallusos, kas veidojušies kallusoģenēzi veicinošos apstākļos, tas ir - uz Andersona barotnes tumsā, no ziedu eksplantiem, kas izolēti V-VI organoģenēzes etapā;*
- * Salīdzinoši augstāka katalāzes aktivitāte intakta auga dažādos orgānos varētu norādīt uz attiecīgā taksona lielāku izturību pret oksidatīvo stresu izraisošu faktoru iedarbības sekām in vitro un, iespējams, ka līdz ar to arī taksona lielāku piemērotību kallusa kultūras iegūšanai.*

3. 4. Fenola savienojumi rododendru kallusos

Ir konstatēts, ka fenola savienojumu kvalitatīvais un kvantitatīvais sastāvs var izmainīties līdz ar šūnas un audu diferencētības pakāpi [Salaj et al., 1992; Загоскина и др. , 1994]. Bez tam, fenola savienojumu sastāvu *in vitro* kultūrā var ietekmēt kultivēšanas apstākļi [Загоскина и др. , 1986; Ishimaru et al., 1993; Zaprometov et al., 1993].

Viens no šī darba mērķiem bija, izmantot fenola savienojumu kvalitatīvo analīzi, lai raksturotu rododendru kallusus, kas veidojušies dažādos kultivēšanas apstākļos. Tādēļ eksperimenta uzdevums bija: noskaidrot fenola savienojumu spektru dažādu taksonu rododendru kallusus, kas veidojušies atšķirīgos kultivēšanas apstākļos, un ziedu eksplantos.

Kultivēšanas rezultātā, atkarībā no apstākļiem, tika iegūti dažāda veida kallusi, kas atšķirās pēc pigmentācijas, lieluma un struktūras. 14. tabulā ir norādīta kallusa krāsa; divvirzienu hromatogrāfijā izdalītais fenola savienojumu skaits un īss kallusa raksturojums, novērtējot kallusa lielumu un attīstību ballēs. Variantā Nr. 13 bija izveidojies ļoti liels, neorganogēns, vitrificēts kalluss. Daļu bezkrāsainā kallusa atdalīja no eksplanta (Nr. 13') un analizēja atsevišķi.

Salīdzinot fenola savienojumu kvalitatīvo sastāvu eksplantos (25. att.) un kallusos (14. tabula), ir redzams, ka kallusos fenola savienojumu daudzveidība bija mazāka, iespējams arī, ka atšķirīga. H-75/1 eksplantu hromatogrammā pēc apskates UV gaismā un krāsošanas ar FeCl_3 un Fast Blue RR sāli tika lokalizēti 27 savienojumi (25. A att.), bet nevienā *in vitro* variantā nebija vairāk par 21 (14. tabulā kalluss Nr. 11). Lidzīga aina bija vērojama arī R₇₄-128/2 - eksplantu hromatogrammā tika lokalizēti 23 savienojumi (25. B att.), bet kallusos, ne vairāk par 18 (14. tabulā kalluss Nr. 2). No eksplanta pilnīgi atdalītā kallusā Nr. 13' tika konstatēts mazāks fenola savienojumu skaits nekā kallusā kopā ar eksplantu Nr. 13 (14. tabula). Tas ļauj secināt, ka *dediferencētās struktūrās in vitro fenola savienojumu daudzveidība bija mazāka nekā diferencētajos eksplanta audos*. Iespējams, tomēr, ka arī pašā eksplantā, kallusa veidošanās

Kultivēšanas apstākļu ietekme uz rododendru kallusu veidošanos un fenola savienojumu spektru tajos

Rododendrs	Kallusa raksturojums	Barotnes sastāvs un kultivēšanas apstākļi					
		Andersona bar. IPA 2 mg/l NES 8 mg/l		Cimmermana bar. IPA 10 mg/l IES 8 mg/l		Cimmermana bar. IPA 15 mg/l IES 4 mg/l	
		gaisma	tumsa	gaisma	tumsa	gaisma	tumsa
R ₇₄ -128/2	Nr. p. k.	1.	2.	3.	4.	5.	6.
	Krāsa	gaiši zaļš	gaiši dzelt.	gaiši zaļš	pelēki balts	zaļš	pelēks
	Novērtējums, balles	2	6	1	3	2	2
	Fenola sav. skaits	9	18	7	9	17	13
H-75/1	Nr. p. k.	7.	8.	9.	10.	11.	12.
	Krāsa	pelēks	dzeltens	zaļš	balts	zaļš	balts
	Novērtējums, balles	5	6	2	6	6	6
	Fenola sav. skaits	12	13	15	14	21	15
'Nova Zembla'	Nr. p. k.	13. /13'	14.	15.	16.	17.	18.
	Krāsa	zaļš/bezkrās.	gaiši dzelt.	gaiši zaļš	balts	zaļš	balts
	Novērtējums, balles	2/5	5	6	6	6	6
	Fenola sav. skaits	14/7	14	9	20	20	13

Novērtējums ballēs:

1; 2 - eksplants izskatās uzbrīdis, deformējies, kalluss nav izveidojies;

3; 4; 5 - ir izveidojies kalluss, pieaugošais ballu skaits atbilst izmērā lielākiem kallusiem;

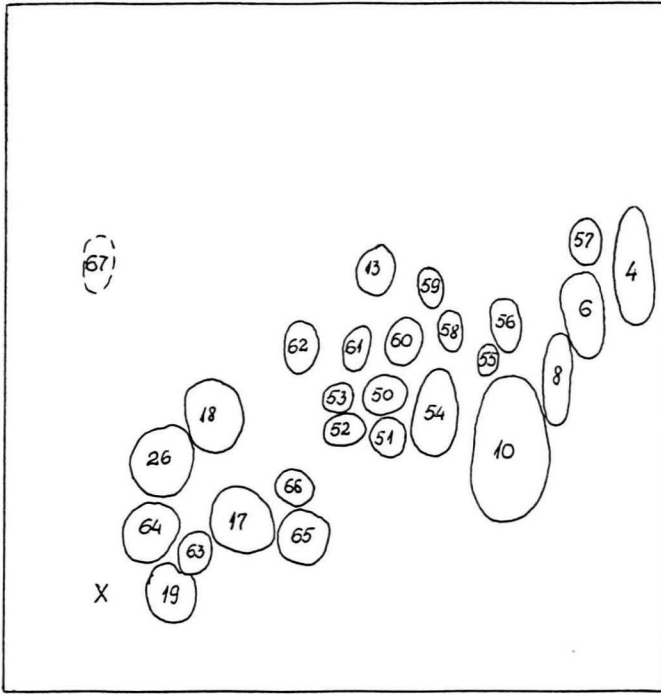
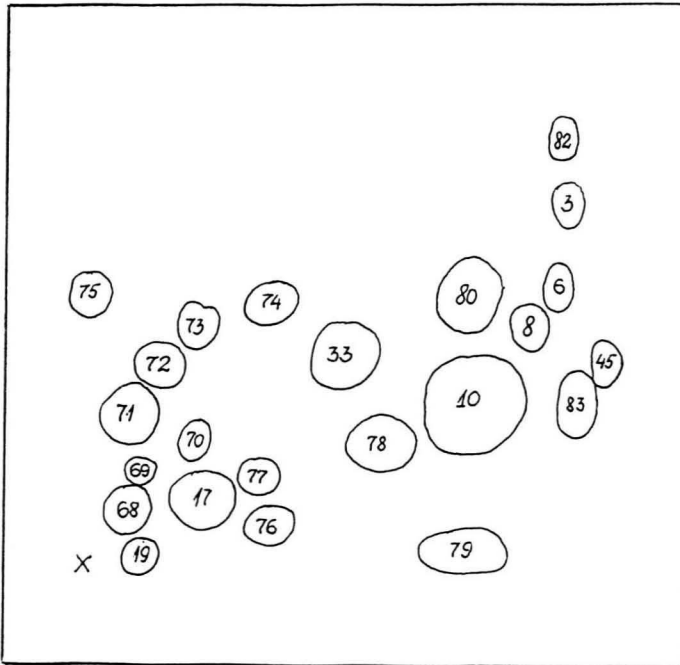
6 - gaismā veidojas organogēns kalluss, tā virsma ir graudaina, tumšā izveidojas salīdzinoši lielākie kallusi.

laikā bija notikušas izmaiņas fenola savienojumu sastāvā, jo visos pārējos variantos fenola savienojumu analīzei kallusi netika atdalīti no eksplantiem.

Literatūrā ir dati par to, ka fenola savienojumu sintēzes intensitāte intakta auga dažādos orgānos salīdzinājumā ar kallusa kultūru var būt atšķirīga, kā arī var atšķirties fenola savienojumu kvalitatīvais sastāvs. Piemēram, *Camellia sinensis* L. [Загоскина и др. , 1988] un *Alhagi kirghisorum* Screnk [Сапко и др. , 1992] kallusa kultūrās fenola savienojumu sintēze ir vājāka, nekā mātesaugā, atšķiras arī fenola savienojumu kvalitatīvais sastāvs. Atsevišķu fenola savienojumu sintēzes intensitāte *Alhagi kirghisorum* Screnk [Сапко и др. , 1992] un *Epimedium diphyllum* [Yamamoto et al., 1992] kallusa kultūrā var pat pieaugt. *Cornus kousa* kallusā ir identificēti tie paši fenola savienojumi, kas mātesaugā, atšķirīgs ir tikai to daudzums [Ishimaru et al. 1993]. Tas nozīmē, ka fenola savienojumu kvalitatīvais un kvantitatīvais sastāvs diferencētos un nediferencētos audos dažādiem taksoniem atšķiras.

Kā jau minēts, rododendru ziedu eksplantu uz barones ar dažādiem fitohormoniem, gaismas/tumsas ietekmē veidoja kallusus, kas atšķirās ne tikai pēc struktūras, pigmentācijas un izmēra, bet arī pēc fenola savienojumu kvalitatīvā sastāva. *Tātad vēja secināt, ka kultivēšanas apstākļi in vitro ietekmē fenola savienojumu kvalitatīvo sastāvu rododendru kallusus.*

Literatūrā ir dati par *Alhagi kirghisorum* - kallusoģenēzi ietekmē fitohormonu sastāvs barotnē un fotoperiods, bet fenola savienojumu daudzveidību kultivēšanas apstākļi neietekmē, tie var ietekmēt vienīgi fenola savienojumu koncentrāciju audos [Сапко и др. , 1992]. Pretēji tam, Neera [Neera et al., 1992] novērojis, ka *Sapium sebiferum* kallusa kultūras attīstība nemainās atkarībā no NH_4NO_3 klātbūtnes barotnē, bet tas var ietekmēt atsevišķu fenola savienojumu sintēzes intensitāti. Līdz ar to var secināt, ka kultivēšanas apstākļi atšķirīgi ietekmē fenola savienojumu sastāvu kallusus dažādiem taksoniem, kas veidojušies dažādos kultivēšanas apstākļos. Tomēr pastāv jautājums - vai fenola savienojumu kvalitatīvā sastāva atšķirības rododendru kallusus izraisa kultivēšanas apstākļi, vai arī šo apstākļu rezultātā radušās atšķirības kallusa audu attīstības (diferencētības) pakāpē.

A**B**

25. att. Fenola savienojumu hromatogramma. Ziedu eksplanti.

A H-75/1; **B** R₇₄-128/2

(X - parauga uznešanas vieta (starts))

Analizējot intensīvi zaļos kallusa audus, kas veidojušies gaismā (16 h fotoperiods) Nr. 5, 9, 11, 17, tika lokalizēts lielāks fenola savienojumu skaits nekā pārējos variantos (14. tabula). Lielāks fenola savienojumu skaits ir konstatēts arī *Camellia sinensis* [Загоскина и др., 1987; Субботина и др., 1987; Стрекова и др., 1989] gaismā augušā kallusā, salīdzinājumā ar kallusu, kas veidojies tumsā. Intensīvāku fenola savienojumu sintēzi saista ar šūnas organoīdu, īpaši hloroplastu, diferenciāciju gaismā [Загоскина и др., 1987; Субботина и др., 1987; Стрекова и др., 1989]. Ir novērots, ka turot apgaismojumā *Carpinus betulus* etiolētos dzinumus, tajos sāk sintezēties hlorofils un ar laiku fenola savienojumu kvalitatīvais sastāvs izveidojas tāds pats, kā gaismā visu laiku augušiem dzinumiem [Englert et al., 1991]. Tādēļ likumsakarīga ir lielāka fenola savienojumu daudzveidība hlorofilu sintezējošos rododendru kallusos, salīdzinājumā ar heterotrofiem audiem. Tas arī vēlreiz netieši apstiprina Subbotinas [Субботина и др., 1987] un Strekovas [Стрекова и др., 1989] secinājumus par hloroplastiem kā vienu no fenola savienojumu sintēzes vietām šūnā.

Uzskata, ka izmaiņas fenola savienojumu kvalitatīvajā sastāvā var būt saistītas ar kallusa audu diferenciācijas pakāpi. Zaprometova [Запериетов и др., 1986] un Zagoskinas [Загоскина и др., 1994] pētījumos *Camellia sinensis* kallusā ar vāji diferencētiem traheīdu elementiem novērota fenola savienojumu sintēzes zemāka intensitāte, nekā kallusā ar diferencētāku audu struktūru. Autori uzskata, ka šo savienojumu sintēze ir atkarīga no tā, cik kallusa audi morfoloģiski un citoloģiski ir līdzīgi eksplanta audiem. Rododendru kallusos Nr. 11 un 16 tika konstatēts lielākais fenola savienojumu skaits (14. tabula). Kā jau iepriekšējos eksperimentos tika novērots, rododendru ziedu eksplantiem barotne ar IPA 15 mg/l un IES 4 mg/l gaismā veicina organogēna kallusa veidošanos. Tomēr tikai kallusiem Nr. 11 un 16, tika novērota graudainas virsmas veidošanās pazīmes. Brisibe [Brisbie et al., 1992] un Nair [Nair et al., 1993] fiksējuši, ka morfoloģiski-citoloģiskas izmaiņas kallusu audos notiek jau pirms dzinumu vai sakņu aizmetņu diferencēšanās. Tādēļ iespējams, ka kallusu Nr. 11 un 16 struktūra jau bija diferencētāka, nekā pārējos variantos, kas arī

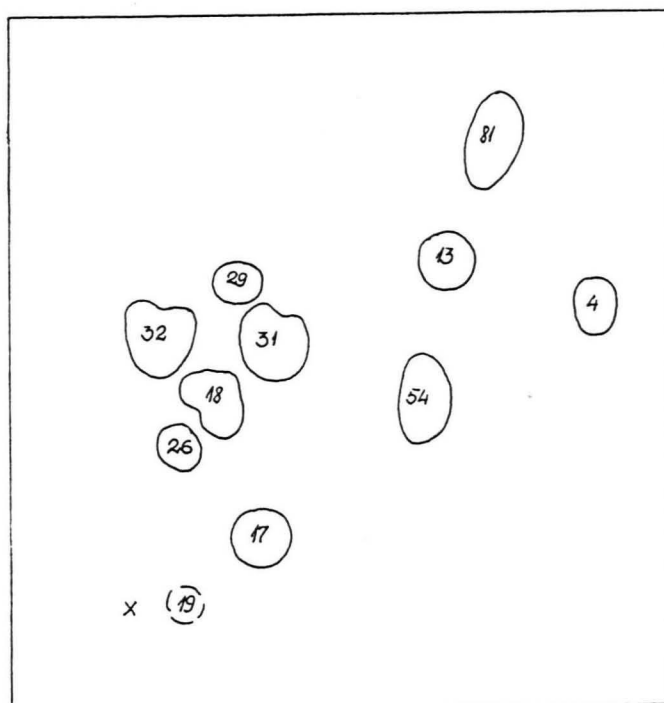
izskaidrtu fenola savienojumu lielāku daudzveidību. *No eksperimentā iegūtajiem rezultātiem varēja secināt, ka viens no iemesliem, kādēļ tika konstatētas fenola savienojumu kvalitatīvā sastāva atšķirības rododendru kallusos, varētu būt atšķirīgā audu diferencētības pakāpe.*

Savukārt variantos Nr. 5 un 9 kalluss neveidojās (14. tabula), audi bija intensīvi zaļi, ziedu eksplanti izskatījās uzbrieduši, tomēr fenola savienojumu tajos bija salīdzinoši daudz. To varētu izskaidrot divējādi. Pirmkārt, pieredze liecina, ka rododendriem, kas subkultivēti šādos apstākļos, organoģenēze varētu notikt tieši no eksplanta audiem. Tātad, iespējams, ka audi jau atradās organoģenēzi inducējošā fāzē. Otrkārt, - arī pašos eksplantos varētu būt saglabājušies sēklotnes, ziedgultnes un ziedkāta diferencēto audu elementi. Tādēļ salīdzinoši lielā fenola savienojumu daudzveidību variantos Nr. 5 un 9 varētu izskaidrot vienlaicīgi gan ar hloroplastu, gan arī ar organizētu struktūru esamību - iespējamo organoģenēzes iesākumu vai ar eksplanta audu daļēju saglabāšanos.

Pagaidām nav skaidrs, vai fenola savienojumu spektrs rododendru kallusos veidojās jaunu, eksplanta audiem neraksturīgu fenola savienojumu sintēzes, vai arī kāda jau esošo savienojumu intensīvākas vai vājākas sintēzes rezultātā. Lai to noskaidrotu, būtu nepieciešama savienojumu kvantitatīvā analīze.

Lai salīdzinātu izmaiņas fenola savienojumu sastāvā, kallusam diferencējoties, tika izmantots pusgadu gaismā kultivēts H-75/1 kalluss Nr. 20, kuram bija novērojama dzinumu diferenciacija no graudainās kallusa virsmas. Šajā kallusā tika identificēts salīdzinoši neliels fenola savienojumu skaits, tikai 11 (26. att.). No tiem četri - 5, 17, 19, 54 - bija tādi, kas raksturīgi arī citiem variantiem. Pārējo plankumu lielums, krāsa un novietojums uz hromatogrammas bija atšķirīgs. Tātad, parādoties difrencētām struktūrām, fenola savienojumu sastāvs mainās. Tomēr, jāņem vērā, ka jaunveidotās struktūras bija dzinumi. Tātad pilnīgi atšķirīgi orgāni, nekā eksplantos izmantotie, un, kā jau Šalāšvili [Шалашвили и др.,1973] ir minējis, katrā rododendru orgānā ir sava fenola savienojumu kompozīcija. Tas varētu izskaidrot ievērojamās atšķirības fenola

savienojumu kvalitatīvajā sastāvā kallusā no kura diferencējas dzinumi un pārējos kallusos. Tomēr, ņemot vērā šī varianta atšķirības no pārējiem, gan barotnes, gan kultivēšanas ilguma ziņā, šos rezultātus var uzskatīt tikai par orientējošiem.



26. att. Fenola savienojumu hromatogramma. Diferencējošs H-75/1 kalluss (Nr. 20).

(X - parauga uznešanas vieta (starts))

Izmantojot vienvirziena svītrveida hromatogrāfiju un rehromatogrāfiju ziedpumpuru eksplantos tika identificēti vairāki fenola savienojumi (15. tabula). Eksplantos un kallusos īpaši tika analizēti raksturīgākie fenola savienojumi (16. tabula). Tika konstatēts, ka daži savienojumi - 6, 10, 17, 19 - bija raksturīgi visiem variantiem, tie bija gan eksplantos, gan saglabājās arī *in vitro* struktūrās. Iespējams, ka tie bija ģintij raksturīgie savienojumi. Ne visiem savienojumiem izdevās noskaidrot absorbcijas spektrus, jo savienojumi bija pārāk mazās

koncentrācijās. Arī precīzai to identificēšanai un kvantitatīvajai analīzei ir nepieciešams papildus darbs un citas metodes.

Apskatot savienojumu krāsu UV gaismā, kā arī krāsojot ar speciālajām krāsvielām un novērtējot R_f, tika konstatēts, ka radniecīgi varētu būt savienojumi 11, 14, 15, 33, 50, 51, 52, 53, 54. Raksturīgi, ka H-75/1 un 'Nova Zembla' visiem kallusiem bija 11, 14, 15, H-75/1 eksplantam - 50, 51, 52, 53, H-75/1 Nr. 20 - 54, bet R_{74-128/2} - 33. Iespējams, ka arī šie savienojumi bija raksturīgi rododendriem.

Krāsojot ar AlCl₃, kas uzrāda flavonoīdu klātbūtni, tie netika konstatēti, kaut gan literatūrā ir minēts, ka flavonoīdi rododendriem ir raksturīgi [Белова, 1968]. Īpaši daudz flavonoīdu esot auglenīcās, mazāk ziedgultnē [Шалашвили и др., 1973], respektīvi tieši tajos orgānos, kuri tika izmantoti eksplantiem. Iespējams, ka arī šajā gadījumā analīzei ņemtā materiāla daudzums bija pārāk mazs.

Secinājumi no eksperimentos iegūtajiem rezultātiem:

- * *Kultivēšanas apstākļi in vitro ietekmē fenola savienojumu kvalitatīvo sastāvu kallusos, kas veidojušies no rododendru ziedu eksplantiem;*
- * *Dažādu taksonu rododendru kallusos fenola savienojumu kvalitatīvais sastāvs ir atšķirīgs;*
- * *Šūnām dediferencējoties, fenola savienojumu daudzveidība samazinās, salīdzinot ar eksplanta audiem;*
- * *Fenola savienojumu kvalitatīvais sastāvs rododendru kallusā iespējams ir atkarīgs no audu un šūnu diferencētības pakāpes.*

Ziedu eksplantos identificētie fenola savienojumi

Rododendrs	Savienojuma Nr. uz hromatogrammas	Savienojuma, vai fenola sav grupas orientējošais nosaukums	UV _{max} (nm)	Krāsa UV	Rf, sistēma 45:32:16	Rf pēc rehromatogrāfēšanas, sistēma 30% etiķskābe
R ₇₄ -128/2	2			zila	0.461	
	3			tumšs	0.346	
	4	hlorogēnskābe		zila	0.260	
	4 ₉	kafeilhīnas skābe	300	zila		0.634
H-75/1	1	hlorogēnskābes vai metakumārskābes atvasinājums	285	zila	0.640	
	2	metahidroksibenzoskābe vai β-rezorcilskābe	295	tumšs	0.360	
	2 ₃	hidroksibenzoskābes atvas.	292	tumšs		0.491
	3		300	zila		
	3 ₃	flavonoīds	290	tumšs		0.469
'Nova Zembla'	3	β-rezorcilskābe		tumšs	0.312	

Fenola savienojumu kvalitatīvais raksturojums ziedu eksplantos un kallusos

Savienojuma Nr. uz hromatogr.	Savienojuma vai fenola sav. grupas orientējošs nosaukums	UV _{max} (nm)	Krāsa			Rf	
			UV	Fast Blue RR sāls	FeCl ₃ ·6H ₂ O	sistēma 45:32:16	sistēma 30% etiķskābe
6	salicilskābe	290	gaiši zila			0.559	0.824
10	hlorogēnskābe	280	dzeltena		pelēka	0.267	0.718
17	digalluskābe	282	tumšs	sarkanbrūna	pelēka	0.119	0.236
19	fenolu komplekss, kas varētu saturēt miecvielas		tumšs	sarkanbrūna	pelēka	0.000	0.119
11	rezorcilskābes atvasinājums		tumšs	sarkanbrūna	pelēka	0.345	0.582
14	rezorcilskābes atvasinājums		tumšs	sarkanbrūna	pelēka	0.349	0.488
15	rezorcilskābes atvasinājums		tumšs	sarkanbrūna	pelēka	0.321	0.407
33	hidroksibenoskābe	292	tumšs	sarkanbrūna		0.344	0.477
54			tumšs	sarkanbrūna		0.352	0.500
50			tumšs	sarkanbrūna		0.320	0.504
51			tumšs	sarkanbrūna		0.254	0.512
52			tumšs	sarkanbrūna		0.262	0.422
53			tumšs	sarkanbrūna		0.313	0.414
2	sinepjskābe		dzeltenzaļa	pelēkzaļa		0.725	0.833
82			zaļi zila			0.715	0.848
81			zaļi zila			0.781	0.624
13			zila			0.758	0.423
38			zila			0.735	0.423
16			zila			0.525	0.384
5			tumšs	sarkanbrūna		0.075	0.877

NOBEIGUMS

Šajā darbā atrasts, ka rododendriem kallusa iegūšanai piemērotākais ir zieda eksplants, kas sastāv no sēklotnes, ziedgultnes, vainaglapu paliekām un ziedkāta. Tie kallusu veidoja intensīvāk nekā eksplanti no citām zieda daļām vai veģetatīvajiem orgāniem. Iespējams, ka zieda eksplanta audos ir salīdzinoši augsts auksīnu un citokinīnu saturs, vai arī tie ir jutīgi pret eksogēniem fitohormoniem, jo *in vivo* šie audi ir aktīvi augoši. Tādēļ arī *in vitro* tiem var inducēt dažādas morfoģenētiskās norises. Salīdzinot ar citu orgānu un audu daļām, ziedu eksplantiem pierādījās divas priekšrocības: pirmā - *in vitro* bija iespējams iegūt sterīlu kultūru; otrā - tos var izolēt salīdzinoši ilgākā laika posmā. Eksperimenti parādīja, ka intensīvāka kallusoģenēze panākama tādiem rododendru ziedu eksplantiem, kas izolēti no V-VI organoģenēzes etapā esoša auga. VI organoģenēzes etaps ietver arī miera periodu, par ko sprieda pēc ogļhidrātu dinamikas viengadīgo dzinumumu lapās.

Līdz šim nav atrasti kritēriji, pēc kuriem viennozīmīgi varētu spriest par miera perioda norisi. Kā viena no iespējam literatūrā tiek minēta ogļhidrātu dinamikas izmaiņu analīze lapās. Varētu pieņemt, ka par miera perioda esamību liecinātu arī morfoģenētisko procesu inducējamību *in vitro*. Mūsu darbs liecina, ka šādiem mērķiem rododendru ziedu eksplanti nav izmantojami, jo vienādi intensīvu kallusoģenēzi ir iespējams panākt kā no V, tā VI no organoģenēzes etapā izolētiem eksplantiem. Tas liek domāt, ka ziedam nav miera perioda.

Tika noskaidrots, ka kallusoģenēzes inducēšanai piemērotākā ir Andersona barotne (1984), kam pH 4.0 - 5.5 un IPA + NES vai IPA + IES. Tumsa, it īpaši, ja barotnē bija IPA un NES, stimulē neorganogēna, bet gaisma, ja barotnē ir IPA un IES - organogēna kallusa veidošanos.

Eksperimentos rezultāti parādīja, ka kallusa attīstības intensitāte, struktūra un pigmentācija atšķīrās dažādiem taksoniem un bija atkarīga no kultivēšanas apstākļiem. Tomēr *Rhododendron* L. ģints augiem kallusu augšanā tika novērotas arī kopējas tendences. Pārbaudītajos kultivēšanas apstākļos rododendriem nebija iespējams iegūt ilgstoši proliferējošu organogēna

vai neorganogēna kallusa kultūru, jo subkultivējot kallusi ar laiku nekrotizēja. Organogēnu kallusu subkultivējot apstākļos, kas stimulē kvalitatīvas izmaiņas augšanā, panāca dzinumus veidošanos, ko varēja izmantot rododendru pavairošanai.

Tiek uzskatīts, ka viens no cēloņiem, kas apgrūtina *in vitro* kultūras iegūšanu ir oksidatīvais stress, kura iemesls var būt ievainojums, kas ir neizbēgams eksplanta audu izolēšanas brīdī. Otrs šī stresa cēlonis - pats dediferenciācijas process. Mūsu eksperimenti parādīja, ka kallusoģenēzes sākumā audi ir oksidatīvajā stresā, par ko liecināja paaugstinātā katalāzes aktivitātes audos pirmajās 2 - 3 nedēļās pēc eksplantu ievadīšanas *in vitro* (23. att.).

Bez iepriekšējiem pētījumiem ir grūti atdalīt ģenētiski noteikto atkarību un vides ietekmi uz *in vitro* kultūras attīstību. Mūsu darbā noteiktie bioķīmiskie rādītāji zināmā mērā ļauj noteikt morfoģenētisko potenciālu ģenētisko atkarību un kultivēšanas apstākļu lomu kultūras attīstībā.

Darbā tika atrasta dažādu sugu rododendru kallusa veidošanās saistība ar peroksidāzes un katalāzes aktivitātes rādītājiem. Kallusu nekroze sākās salīdzinoši vēlāk un tā bija mazāk intensīva sugai, kuras intaktu augu audos peroksidāzes un katalāzes aktivitātei bija tendence būt augstākai (*Rh. luteum* tabula 9.; 12.). Iespējams, ka šīs sugas kallusi bija izturīgāki pret oksidatīvo stresu *in vitro*. Rododendriem šāda sakarība varētu dot iespēju jau pirms kallusa kultūras iegūšanas novērtēt tās attīstības perspektīvas ar bioķīmiskām metodēm.

Kallusam proliferējot, katalāzes aktivitātei bija tendence samazināties (23. att.), bet peroksidāzes aktivitātei - tā bija neizteikta (19. att.). Eksperimenti parādīja, ka proliferācijas laikā peroksidāzes un katalāzes aktivitātei bija tendence būt lielākai kallusos, kas kultivēti kallusa attīstību stimulējošos apstākļos, tas ir - uz Andersona barotnes tumsā (10.; 13. tabula). Tas, iespējams, liecina par audu lielāku izturību pret paaugstinātu oksidatīvo stresu, jo vienlaicīgi varēja novērot, ka minētajos apstākļos audu brūnēšana sākās vēlāk un ir mazāk intensīva. Tātad kultivēšanas apstākļiem varētu būt ietekme

uz oksidatīvā stresa stāvokļa veidošanos audos. Kallusa attīstībai nelabvēlīgi apstākļi varētu veicināt oksidatīvo stresu dediferenciācijas laikā, vai arī stimulēt to citā kultūras attīstības posmā. Tādēļ, lai iegūtu ilgstoši proliferējošu rododendru kallusa kultūru, jākorrigē kultivēšanas apstākļi.

Eksperimenti parādīja, ka dažādiem rododendru taksoniem morfoģenētiskie procesi *in vitro* ir atšķirīgi un tos ietekmē arī kultivēšanas apstākļi.

Intaktu rododendru dažādos audos un orgānos kopumā bija raksturīga zema peroksidāzes aktivitāte (9. tabula). Ziedu eksplantu kallusus peroksidāzes aktivitāte bija salīdzinoši lielāka, nekā eksplantu diferencētajos audos (19. att.), bet fenola savienojumu skaits ziedu eksplantu kallusus bija mazāks nekā eksplantos. Iespējams, ka analīzes parādīja peroksidāzes aktivitāti kallusus augstāku nekā eksplantos tādēļ, ka fenola savienojumu kvalitatīvais sastāvs audos bija mainījies izolācijas stresa dēļ, jo ir uzskats, ka eksistē fenola savienojumi, kas maskē peroksidāzes darbību.

Tika konstatēts, ka izoperoksidāzes atšķiras dažādu sugu rododendru kallusus (18. att.). Iespējams, ka peroksidāzes kvalitatīvās sastāva analīzi audos kallusu attīstības sākumstadijās varētu izmantot rododendru hemosistemātikā.

Dažādos apstākļos kultivētos kallusus, tika konstatēts vienāds izoperoksidāžu kvalitatīvais sastāvs (22. att.), kas, iespējams, norāda uz audu līdzīgo attīstības pakāpi visos izmantotajos kultivēšanas apstākļos.

Tika konstatēts, ka arī fenola savienojumu kvalitatīvo sastāvu kallusus ietekmē kultivēšanas apstākļi. No iegūtajiem rezultātiem varēja secināt, ka fenola savienojumu kvalitatīvais sastāvs ir daudzveidīgāks kallusus, kas attīstījušies diferenciāciju veicinošos apstākļos.

Rododendru kallusoģenēzes izpētes darba rezultātā atrasti:

- a) eksplantu veidi un to izolēšanas laiks;
- b) optimālie *in vitro* kultivēšanas apstākļi kallusa kultūras attīstības inducēšanai;
- c) sakarības starp fermentu (peroksidāzes, katalāzes) un fenola savienojumu kvalitatīvajiem un kvantitatīvajiem rādītājiem un kallusa attīstību.

SECINĀJUMI

1. *Rhododendron* L. ģints augu kallusoģenēzei piemērotākie ir ziedu eksplanti, kas sastāv no sēklotnes kopā ar ziedgultni, ziedkātu un vainaglapu paliekām. Intensīvu kallusoģenēzi var panākt no ziedu eksplantiem, kas izolēti V-VI organoģenēzes etapā, Latvijas klimatiskajos apstākļos, atkarībā no sugas, tas ir no jūlija/septembra līdz februārim/aprīlim. VI organoģenēzes etapa laikā norit arī miera periods, par ko varēja spriest pēc ogļhidrātu dinamikas viengadīgo dzinumu lapās.
2. Rododendriem kallusoģenēzi var inducēt uz Andersona barotne (1984), pH 4.0-5.5, ar IPA 1-10 mg/l un NES 1-12 mg/l vai IPA 10-15 mg/l un IES 2.5-12 mg/l. Tumsa, īpaši, ja barotnē ir IPA un NES stimulē neorganogēna, bet gaisma (16 h fotoperiods), īpaši, ja barotnē ir IPA un IES - organogēna kallusa veidošanos.
3. Kallusa attīstības intensitāti, struktūras, pigmentācijas veidošanos un audu nekrozi ietekmē kultivēšanas apstākļi, šie procesi ir atšķirīgi dažādām rododendra sugām, šķirnēm un hibrīdiem.
4. Subkultivējamas, ilgstoši proliferējošas kallusa kultūras iegūšanu pārbaudītajos apstākļos kavē kallusa audu nekroze. Atšķirībām starp nekrozes intensitāti dažādu *Rhododendron* L. ģints augu kallusus ir tendence korelēt ar katalāzes un peroksidāzes aktivitāti intaktu rododendru dažādos audos un orgānos kopumā, eksplanta audos un kallusa audos. Tiem rododendriem, kuru intaktā augā šo fermentu aktivitāte ir augstāka, nekrozes pazīmes kallusa audos attīstās salīdzinoši vēlāk. Katalāzes un peroksidāzes aktivitātei ir tendence būt augstākai kallusoģenēzi un kallusa proliferāciju veicinošos kultivēšanas apstākļos.
5. Rododendru kallusoģenēzes procesa laikā audos tika novērota augstāka peroksidāzes aktivitāte, nekā diferencētos veģetatīvo pumpuru un ziedu eksplantos.
6. Peroksidāžu kvalitatīvais sastāvs ir atšķirīgs dažādu sugu rododendru kallusus, kas kultivēti vienādos *in vitro* apstākļos.

7. Katalāzes aktivitāte audos mainās pēc eksplanta ievadišanas *in vitro* kultūrā. Maksimālā katalāzes aktivitāte ir kallusoģenēzes sākumā.
8. Fenola savienojumu kvalitatīvais sastāvs samazinās rododendru kallusoģenēzes laikā, salīdzinājumā ar eksplanta audiem. Fenola savienojumu kvalitatīvo sastāvu kallusos ietekmē *in vitro* kultivēšanas apstākļi, tas var būt atkarīgs no kallusa audu diferencētības pakāpes un rododendra piederības noteiktai sugai, šķirnei vai hibrīdam.

S. Townson

LITERATŪRA

- Adam A.L., Bestvick C.S., Barna B., Mansfield J.W. (1995) Enzymes regulating the accumulation of active oxygen species during the hypersensitive reaction of bean to *Pseudomonas syringae* PV Phaseolicola. *Planta*, **197**, 20, 240-249.
- Aghmair A., Kevers C., Hausman J.F., Gaspar T. (1991) Peroxidases, compartmentation cellulaire et enracinement *in vitro* de pousses de *Rhododendron catawbiense* Michaux cv. Album. *Archives Internationales de Physiologie, de Biochimie et de Biophysique*, **99**, 9-16.
- Akashi R., Adachi T. (1992) Somatic embryogenesis and plant regeneration from cultured immature inflorescences of apomictic dallisgrass (*Paspalum dilatatum* Prior.). *Plant Science*, **82**, 213-218.
- Alba C.M., Deforchetti S.M., Tigier H.A. (1995) Biochemical and histochemical lignin determination and related isoperoxidases in peach fruit endocarp. *Biocell*, **19**, 1, 3541.
- Александрова М.С. (1970) Полезные свойства рододендронов природной флоры СССР. *Растительные ресурсы*, 1, 12-21.
- Altman A., Goren R. (1974) Growth and dominance cycles in Citrus in vitro cultures and their hormonal control. *Physiol. Plant*, **30**, 240-245.
- Alves J.M.C., Sihachakr D., Allot M., Tizrontine S., Mussio, Servais A., Ducreux G. (1994) Isozyme modification and plant regeneration through somatic embryogenesis on sweet potato (*Ipomoea batatas* (L.) lam). *Plant Cell Reports Abstr.*, **13**, 8, 437-441.
- Amrhein N. (1979) Growth. *Progress in Botany*, **41**, 108-134.
- Amrhein N. (1981) Growth. *Progress in Botany*, **43**, 100-118.
- Anderson W.C. (1975) Propagation of rhododendrons by tissue culture: part 1. Development of a culture medium for multiplication of shoots. *Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc.*, **25**, 129-135.
- Anderson W.C. (1978) Tissue culture propagation of rhododendron. *In vitro Cellular & Development Biology*, **14**, 344.
- Anderson W.C. (1984) A revised tissue culture medium for shoot multiplication of rhododendron. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.*, **109**, 3, 343-347.
- Андреева В.А. (1988) Фермент пероксидаза, М: Наука, с. 127.

Arnold S., Eriksson T. (1986) Norway Spruce (*Picea abies* L.). Biotechnology in Agriculture and Forestry. p. 291-310. Ed. by Bajaj Y.P.S. vol. 1. Trees I. Berlin, Heidelberg. Springer-Verlag.

Arthur H.R. (1955) A new optically active flavonone from the leaves of *Rhododendron ferrare* Tate. Journal of the Chemical Society, 1589-1592.

Baaziz M., Aissam F., Braker Z., Bendiab K., Elhadrami I., Cheikh R. (1994) Electrophoretic patterns of acid soluble proteins and active isoforms of peroxidase and polyphenoloxidase typifying calli and somatic embryos of reputed date palm cultivars in Morocco. Euphytica, **76**, 3, 159-168.

Бандюкова В.А., Оганесян Т. (1973) Распространение флавоноидов в некоторых семействах высших растений. Растительные ресурсы, **9**, 2, 297-303.

Barbas E., Jay-Allemand C., Doumas P., Chaillon S., Cornu D. (1993) Effect of gelling agents on growth, mineral composition and naphthoquinone content of in vitro explants of hybrid walnut tree *Juglans regia*, *Juglans nigra*. Ann. Sci. For. (Paris), **50**, 2, 177-186.

Barešova H. (1986) Regulation of organogenesis in tissue culture. III. Symp. Young Sci. Physiol. and Biochem. Plants. 4, 8-15

Barnes L.R. (1985) Micropropagation of endangered native *Rhododendron champani* Gray. Tissue culture in forestry and agriculture. Ed. by Henhe R.R., et al. New York, London. Plenum Press. 303 p.

Bartoli C.G., Simontacchi M., Guaimet J.-J., Momtaldi E. (1995) Antioxidant enzymes and lipid peroxidation during aging of *Chrysanthemum morifolium* Ram petals. Plant Science, **104**, 2, 161-168.

Barz W., Hoesel W. (1979) Metabolism and degradation of phenolic compounds in plants. In: Biochemistry of Plant Phenolics. p. 339-369. Ed. by Swain T., Harborne J., B., Van Sumere C., F. New York, London: Plenum Press.

Bassiri A. (1976) Barley cultivar identification by use of soenzyme electrophoretic patterns. Canadian. J. Plant Sci., **56**, 1, 1-6.

Белова Н.В. (1968) К химическому исследованию растений рода *Rhododendron* L. Растительные ресурсы, **6**, 2, 258-272.

Benson E.E., Roubelakis-Angelakis K.A. (1992) Fluorescent lipid peroxidation products and antioxidant enzymes in tissue cultures of *Vitis vinifera* L. Plant Sci, **84**, 83-90.

- Benson E.E., Roubelakis-Angelakis K.A. (1994) Oxidative stress in recalcitrant tissue cultures of grapevine. *Free Radical Biology and Medicine*, **16**, 3, 355-362.
- Berg J., Heft, L. (1969) *Rhododendron und Immergrüne Lanbgehölze*. Deutsche Rhododendron gesellschaft, Berlin, 568.
- Berlin J., Barz W. (1975) Oxidative decarboxilation of para-hydroxybenzoic acids by peroxidases under *in vivo* and *in vitro* conditions. *Zeitschrift für Naturforsch.*, **30**, 650-658.
- Bernier G., Kinet J.-M., Jamagmard A., Havelange A., Bodson M. (1977) Cytokinins as a possible component of the floral stimulus in *Sinapis alba*. *Plant Physiol.*, **60**, 282-285.
- Bernier G., Havelange A., Housa C., Lejune P. (1993) Physiological signals that induce flowering. *The Plant Cell*, **5**, 1147-1155.
- Бернье Ж., Кине Ж.-М., Сакс Р. (1985а) Физиология цветения. т. 1.М.: Агропроиздат, с. 192.
- Бернье Ж., Кине,Ж.-М., Сакс Р. (1985б) Физиология цветения. т.2.М.: Агропроиздат, с. 317.
- Berthon J.-Y., Maldiney R., Sotta B., Gaspar T., Boyer N. (1989) Endogenous levels of plant hormones during the course of adventitious rooting in cuttings of *Sequoiadendron giganteum* (Lindl.). *Biochem Physiol Pflanzen*, **184**, 405-412.
- Berthon J.-Y., Boyer N., Gaspar T. (1990) Phenols as regulators and markers of root formation by shoots of *Sequoiadendron giganteum* raised *in vitro*. *Archives Internationales de Physiologie et de Biochemie*, **98**, 6, 28
- Berthon J.Y., Battraw M.J., Gaspar T., Boyer N. (1993) Early test using phenolic compounds and peroxidase activity to improve *in vitro* rooting and *Sequoiadendron giganteum* (Lindl.) Buchholz. *Saussurea*, **24**, 7-13.
- Bhatnagar P. (1983) Light induced destruction of indole-3-acetic acid and some physiological effects on one of it's metabolites, 3-methyleneoxindole. Dissertation. University of Stocholm. 39 p.
- Bhojwani S.S., Rardan (1983) *Plant tissue culture: theory and practice*. Elsewer, Amsterdam. 502 p.
- Билялиева Г.А., Ле Тхи М. (1985) Регуляторы роста в культуре каллусных тканей. Рост растений и его регуляция. с. 108-112. Кишинев. "Штиинца".

- Быченкова Э.А., Давид А. (1978) Каллусообразование и органогенез в тканях листа *Populus balsamifera* L., культивируемого *in vitro*. Физ. раст., **25**, 2, 274-282.
- Binh D.Q., Heszky L.E., Gyulai G., Kiss E., Csillag A. (1989) Plant regeneration from callus of *Puccinellia distans* (L.) Parl. Plant Cell, Tissue and Organ Cult., **18**, 2, 195-200.
- Блажей А., Шутый Л. (1977) Фенольные соединения растительного происхождения. М., Мир, с. 240.
- Blumenberg H. (1989) Identifikation von Rhododendron - Sorten durch flavonoide Blutensubstanzen. Immergrüne Blätter, **29**, 30-31.
- Bode K., Doring O., Luthje S., Neue H.U., Bottger M. (1995) The role of active oxygen in iron tolerance of rice (*Oryza Sativa* L.). Protoplasma, **184**, 1-4, 249-255.
- Bodson M., Qultlaw W.H.J. (1985) Elevation in the sucrose content of the shoot apical meristem of *Sinapis alba* at floral evocation. Plant Physiol., **79**, 420-424.
- Boitschinoff A., Achtardjeff C. (1963) Inhaltsstoffe phenolischer Natur in den Blättern von *Rhododendron ponticum*. Archiv Pharmazie, 296, 692-699.
- Бояркин А.Н. (1951) Быстрый метод определения активности пероксидазы. Биохимия, **16**, 4, 352-357.
- Bonga J.M. (1982) Vegetative propagation in relation to juvenility, maturity and regeneration. Tissue Culture in Forestry. p. 387-412. Ed. by Bonga J.M., Durran D.J.
- Bonga J.M. (1988) Application of tissue culture in forestry. Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture. p. 93-108. Ed. by Reinert J., Bajaj Y.P.S. New Dehli, Madras, Bombay. Narosa Publishing House.
- Booij I., Monfort S., Macheix J.J. (1993) Relationship between peroxidases and budding in date palm tissues cultured in vitro. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, **35**, 165-171.
- Booy G. (1995) Identification of gerbera cultivars based on differences in phenolic compounds in ray florets. Journal of Horticultural Science, **70**, 1, 135-146.
- Bourque J.E., Tanner S., Marby T.J. (1989) In vitro regeneration of *Gaillardia pulchella* Foug. Plant Cell, Tissue and Organ Cult., **16**, 1, 67-72.

- Bowler C., Montagn M.V., Inze D. (1992) Superoxide dismutase and stress tolerance. *Ann. Rev. Plant Mol. Biol.* **43**, 83-116.
- Boxus P.H. (1987) *In vitro* vegetative propagation of plants. p. 73-79. Nestle Research News 1986/87. Nestec Ltd
- Brisbie E.A., Miyake H., Taniguchi T., Maeda E. (1992) Callus formation and scanning electron microscopy of plantlet regeneration in African rice (*Oryza glaberrima* Steud), *Plant Science*, **83**, 217-224.
- Bruce A., Bray D., Lewis J., Raff M., Roberts K., Watson J. (1989) *Molecular biology of the cell*. p. 431-433. New York.
- Buddendorf-Joosten J.M.C., Woltering E.G. (1994) Components of the gaseous environment and their effects on plant growth and development *in vitro*. *Plant Growth Regulation*, **15**, 1-16.
- Бутенко Р.Г. (1974) Гормональная регуляция дифференцировки растительной клетки в культуре *in vitro*. Рост и гормональная регуляция жизнедеятельности растений. с. 76-85. Иркутск.
- Бутенко Р.Г. (1975) Экспериментальный морфогенез и дифференциация в культуре клеток растений. М., Наука. 50 с.
- Бутенко Р.Г. (1984) Индукция морфогенеза в культуре тканей растений. В кн.: Гормональная регуляция онтогенеза растений. с. 42-53. М., Наука.
- Бутенко Р.Г., Гусев М.В., Куркин А.Ф., Корженовская Е.Г., Маркарова Е.М. (1987) Клеточная инженерия. М., "Высшая школа", 127 с.
- Butt V.S. (1979) Oxidases in aromatic metabolism. In: *Biochemistry of plant phenolics*. p. 434-456. Ed. by Swain T., Harborne J., B., Van Sumere C., F. New York, London. Plenum Press.
- Butt V S. (1980) Direct oxidases and related enzymes. In: *The Biochemistry of Plants*. p. 85-123. Ed. by Strumpf P.K., Conn E.E
- Cachitá C.D., Crâciun C. (1990) Ultrastructural studies om some ornamentals. In: *Handbook of plant cell culture*. Vol. 5.p. 57-94. Ed. by Ammirato P.V., Evans D.A., Sharp W.K., Bajaj Y.R.S. New York. McGraw-Hill Publishing Comp.
- Cakmak J., Strabac D., Marschner H. (1993) Activities of hydrogen peroxide scavenging enzymes in germinating wheat seeds. *Journal of Experimental Botany*; **44**, 258, 127-132.
- Caldwell M.M., Robberecht R., Flint S.D. (1983) Internal filters: prospects for UV-acclimation in higher plants. *Physiologia Plantarum*, **58**, 445-450.

Chaudhry Z., Rashid H., Quraishi A. (1993) Analysis of protein and peroxidase from embryogenic and nonembryogenic cultures of *Citrus reticulata* L. Journal Sci. Ind. Res., **36**, 1, 20-22.

Cheema A.S., Singh H., Gosal S.S. (1992) Response of different genotypes to callus induction and plant regeneration in sugarcane. Crop Improv., **19**, 1, 6-13.

Chen C.M. (1981) Biosynthesis and enzymatic regulation of the interconversion of cytokinin. In: Metabolism and molecular activities of cytokinins. p.34-43. Ed. by J. Guern. Peaud-Lenoël. Springer-Verlag

Chen Z., Evans D.A. (1990) General techniques of tissue culture in perennial crops. In: Handbook of plant cell culture. p. 22-61. Ed. by Chen Z., Evans D.A., Sharp W.R., Ammirato P.V., Sondahl M.R. New York. McGraw - Hill Publishing Company.

Cherve A.M. (1983) In vitro vegetative multiplication of chestnut. J. Hort. Sci., **58**, 23-29.

Cleland R.E. (1988) The primary mechanisms of auxin action. In: Physiology and biochemistry of auxins in plants. p. 109-116. Ed. by M. Kutaček et al. Hague: SPB Acad. Publ.

Cohen D. (1986) The influence of explant source on the establishment of plant tissue cultures, New Zealand J. Technol., **2**, 95-97.

Concoran M.R., Geissman T., Phinney B.O. (1972) Tannins as gibberelins antagonists. Plant Physiology, **49**, 323-330.

Corneyo M.J., Wong V.L., Blechl A.E. (1995) Cryopreserved callus - a source of protoplasts for rice transformation. Plant Cell Reports, **14**, 4, 210-214.

Crevecœur M., Hagege D., Catesson A.-M., Greppin H., Gaspar T. (1992) Ultrastructural characteristics of cells from normal and habituated sugar beet calli. Plant Physiol. Biochem., **30**, 1, 87-95.

Cutler A.J., Saleem M., Coffly M.A., Loewan M.K. (1989) Role of oxidative stress in cereal protoplast recalcitrance. Plant Cell Tissue Organ Culture, **18** 1, 113-127.

Чуб В.В., Власова Т.А., Бутенко Р.Г. (1994) Каллусогенез и морфогенез в культуре генеративных органов весеннецветущих видов *Crocus* L. Физиол. раст., **41**, 6, 815-820.

Dabin P., Bouharmont J. (1983) Application of *in vitro* cultures in azalea (*Rhododendron simsii* Planch). Acta Horticulturae, **131**, 89-93.

- Dai C., Lambeth V.N., Taven R. (1987) Micropropagation of *Rhododendron prinophyllum* by ovary culture. Hort. Sci., **22**, 3, 491-493.
- Dai G.H., Andary C., Mondolotcosson L., Boubals D. (1995a) Histochemical responses of leaves of *in vitro* plantlets of *Vitis* spp. to infection with *Plasmophara viticola*. Phytopathology, **85**, 2, 149-154.
- Dai G.H., Andray C., Mondolotcosson L., Boublas D. (1995b) Involvement of phenolic compounds in the resistance of grapevine callus to downy mildew (*Plasmopara viticola*). European J. Plant Pathol., **101**, 5, 541-547.
- Davis B.J. (1964) Disc electrophoresis. II. Method and application to human serum proteins. Ann. New York Acad. Sci., **121**, 2, 404-427.
- De Santis C., Di Silvestro I. (1988) Plant regeneration from callus of *Triticum durum* Desf. cultivars. Ann. Bot., **46**, 141-149.
- Decooman L., Everaert E.S.W., Fache P., Vandecasteele K., Vansumere C.F. (1993) Flavonoid biosynthesis in petals of *Rhododendron simsii*. Phytochemistry, **33**, 6, 1419-1426.
- Dey S.K., Kar M. (1995) Antioxidant efficiency during callus initiation from mature rice embryo. Plant Cell Physiol., **36**, 4, 543-549.
- Dornelas M.C., Vieira M.L.C., Apperato-da-Gloria B. (1992) Histological analysis of organogenesis and somatic embryogenesis induced in immature tissues of *Stylosanthes scabra*. Ann. Botany, **70**, 477-482.
- Economou A.S., Read P.E., Pellet H.M. (1981) Micropropagation of hardy deciduous azaleas. Hort. Science, **16**, abstr. 392.
- Economou A.S., Read P.E. (1984) *In vitro* shoot proliferation of Minnesota deciduous azaleas. Hort. Science, **19**, 1, 60-62.
- Economou A.S., Read R.E., Spanoudaki M.J. (1988) Azalea regeneration from callus culture. Acta Horticulturae, **226**, 209-216.
- Economou A.S., Read P.E. (1989). Azalea regeneration from callus culture. Plant Breeding Abstracts, **59**, 9, 900.
- El Hadrami I., Housti F., Michany-Ferriere N., Carron M.P., Aurac J.D. (1993). Effect of Gelling Agents and liquid medium on Embryogenic Potential, Polyamines and Enzymatic Factors in Browning in *Hevea brasiliensis*. J. Plant Physiol., **141**, 230-233.
- Elstner E.F. (1982) Oxygen activation and oxygen toxicity. Ann. Rev. Plant Physiol., **33**, 73-96.

- Elstner E.F., Wanger G.A., Schutz W. (1988) Activated oxygen in green plants in relation to stress situation. *Curr. Topics Plant Biochem. Physiol.*, **7**, 159-187.
- Englert J.M., Maynard B.K., Bassuk N.L. (1991) Correlation of phenolics with etiolated and light - grown shoots of *Carpinus betulus* stock plants. Combined Proceedings of International Plant Propagators Society, **41**, 290-295.
- Fayer C.H., Descourvieres P., Kunert K.J. (1994) Protection against oxygen radicals: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant, Cell and Environment*, **17**, 507-523.
- Fett-Neto A.G., Teixeira S.L., Silva E.A.M.d., Sant Anna R. (1992) Biochemical and morphological changes during in vitro rhizogenesis in cuttings of *Sequoia sempervirens* (D. Don) Endl. *Journal of Plant Physiology*, **140**, 720-728.
- Firn R.D. (1987) Too many binding proteins not enough receptors. In: Plant hormone receptors. NATO ASI Series. Vol. H10. p. 1-11. Ed. by Klämbt D. Berlin, Heidelberg. Springer-Verlag.
- Fitch M. M. M., Moore P.H. (1993) Long term culture of embryogenic sugarcane callus. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **32**, 335-343.
- Fordham I., Stimart D.P., Zimmerman R.H. (1982) Axillary and adventitious shoot proliferation of *Exbury azalea in vitro*. *Hort. Science*, **17**, 738-739.
- Forlines D.R., Tavenner T., Malan J.C.S., Karchesy J.J. (1992) Plants of the Olympic Coastal Forests: Ancient knowledge of materials and medicines and future heritage. In: Plant Polyphenols. p. 767-782. Ed. by Hemingway R.W. Laks P.E. New York. Plenum Press.
- Fosket D.E., Tepfer D.A. (1978) Hormonal regulation of growth in cultured plant cells. *In vitro*, **14**, 1, 63-75.
- Fosket D.E. (1980) Hormonal control of morphogenesis in cultured tissues. Proc. of the 10-th International. Conf. on Plant Growth Substances. p. 362-369. Madison, Wisconsin, July 22-26, 1979. Ed. by F. Skoog.
- Foyer C.H., Descourvieres P., Kunert K.J. (1994) Protection against oxygen radical: an important defence mechanism studied in transgenic plants. *Plant, Cell and Environment*, **17**, 507-523.
- Franck T., Kevers C., Gaspar T. (1995) Protective enzymatic systems against activated oxygen species compared in normal and vitrified shoots of *Prunus avium* L. L. raised *in vitro*. *Plant Growth Regulation*, **16**, 3, 253-256.

Gallet C., Lebereton P. (1995) Evolution of phenolic patterns in plants and associated litters and humus of a mountain forest ecosystem. *Soil Biology & Biochemistry*, **27**, 2, 157-165.

Гамбург К.З. (1976) Биохимия ауксина и его действие на клетки растений. Новосибирск. Наука, Сиб. отд., 271 с.

Gamburg K.Z. (1988) Interrelations between the uptake and metabolism of auxin and growth of plant tissue cultures. In: *Physiology and biochemistry of auxins in plants*. p. 33-44. Ed. by M.Kutaaek et al. Hague, SPB Acad. Publ.

Гамбург К.З., Рекославская Н.И., Швецов С.Г. (1990) Ауксины в культурах тканей и клеток растений. Новосибирск, Наука, Сиб. отд. 240 с.

Garcia Gomez M.L., Sanchez Romero C., Barcelo Munoz A., Hederia A., Pliego Alfaró F. (1995) Peroxidase activity during adventitious root formation in avocado microcuttings. *Canadian Journal of Botany*, **73**, 10, 1522-1526.

Gaspar T., Penel C., Thorpe T., Greppin H. (1982) Peroxidases 1970 - 1980. p.324. Geneve, Universite de Geneve - Centre de Botanique.

Gaspar T., Penel C., Castillo F.J., Greppin H. (1985a) A two - step control of basic and acidic peroxidases and its significance for growth and development. *Physiologia. Plantarum*, **64**, 418-423.

Gaspar T., Penel C.R., Moncousin C., Greppin H. (1985b) The role of auxin level and sensitivity in floral induction. *Biologia Plantarum (Praha)*, **27**, 94-95, 325-329.

Gaspar T. (1990) Scientific research in public institutions. *Journal of Belgian Plant Tissue Culture Group*, **1**, 3, 2-8.

Gaspar T., Penel C., Hagege D., Greppin H. (1991) Peroxidases in plant growth, differentiation, and development processes. In: *Biochemistry, Molecular and Physiological Aspects of Plant Peroxidases*. p. 249-280. Ed. by Lobarzewski J., Greppin H., Penel C., Gaspar T. Geneve. Imprimerie Nationale.

Gaspar T., Kevers C., Crèvecoeur M., Penel C., Foidart J.M., Greppin H. (1992 a) Habituation and vitrification of plants cultured in vitro: a reciprocal relationship. *Wiss. Zeitschrift der Humboldt-Univ. zu Berlin, R. Mathematik / Naturwiss.* **41**, 3, 35-40.

Gaspar T., Kevers C., Hausman J.F., Berthon J.Y., Ripetti V. (1992b) Practical use of peroxidase activity as a predictive marker of rooting performance of micropropagated shoots. *Agronomie*, **12**, 757-765.

Gaspar T., Kevers C., Hausman J.F., Ripetti V. (1994) Peroxidase activity and endogenous free auxin during adventitious root formation. In: Physiology, Growth and Development of Plant in Culture. p. 289-298. Ed. by Lumsden P.J., et al. Netherlands: Kulwer Academic Publishers.

Гертнере Д.Х. (1974) Физиологические особенности листьев разного возраста вечнозеленых рододендров. Диссертация. с. 200.

Гертнере Д.Х., Кондратович Р.Я., Войцеховича Р.Н. (1984) Регуляция роста и развития рододендронов. LPSR ZA Vēstis, 5, 442, 95-108.

Gertnere D., Kalniņa E., Kalniņa J., Voicehoviča R., Kondratovičs R. (1990) Vasarzaļo rododendru un siltumnīcas acāliju (*Rhododendron L.*) klonālā mikropavairošana. LZA Vēstis, 9, 108-117.

Гертнере Д.Х. (1990) Возможности клонального микроразмножения растений рода *Rhododendron L.* Роль селекции в улучшение Латвийских лесов. с. 98-104. Рига, Зинатне.

Gidrol X., Lin W.S., Degousee N., Yip S.F., Kush A. (1994) Accumulation of relative oxygen species and oxidation of cytokinin in germinating soybean seeds. European Journal of Biochemistry, 224, 1, 21-28.

Gonzalez A., Rodriguez R., Tames R.S. (1993) Rooting in relation to ethylene, peroxidase and polyphenol oxidases in hazelnuts shoots. Plant Physiology and Biochemistry, 31, 3, 411-420.

Gordon S.A., Paleg L.G. (1961) Formation of auxins from tryptophan through action of polyphenols. Plant Physiology, 36, 6, 838-845.

Geppin H. Bonron M., Crespi P., Crevecokur, K. Degli Agosti, Penel C. (1990) Physiological macrofunctions and indicators of the flowering process. Intra and intercellular communications in plants. Reception - Transmission - Storage and Expression of Messages. p. 107-123. Ed. by B. Millet, H. Geppin. INRA. Paris.

Гуськов, А.В. (1991) Метаболизм ауксинов в растениях и его регуляция. Итоги науки и техники. 8, М., ВИНТИ, 51 с.

Hagege D., Kevers C., Salabert P., Gaspar T. (1992) Protective systems against activated oxygen species compared in normal and fully habituated nonorganic sugarbeet calluses. *In vitro* Cell. Dev. Biol., 143-147.

Hames B.D. (1985) An interaction to polyacrilamide gel electrophoresis. Gel electrophoresis of proteins. A practical approach. p. 1-79. Ed. by Hames B.D. Rickwood, Oxford, Washington D.C., Irl. Press.

Hanson J.B., Trewaves A.G. (1982) Regulation of plant cell growth: the changing perspective. The New Physiologist, 90, 1, 1-18.

- Harbage J.F., Stimart D.P. (1987) Adventitious shoot regeneration from *in vitro* subcultured callus of *Rhododendron Exbury* hybrids. Hort. Sci., **22**, 6, 1324-1325.
- Harborne J.B. (1962) Plant polyphenols. 5. Occurance of azalein and related pigments in flowers of *Plumbago* and *Rhododendron* species. Archives of Biochemistry and Biophysics, **96**, 171-178.
- Harborne J.B. (1969) Gossypetin and herbacetin as taxonomic markers in higher plants. Phytochemistry, **8**, 1, 177-183.
- Harborne J.B. (1978) Flavonoid pigments as both taxonomic and phyletic markers in the genus *Rhododendron*. In: Contributions toward a classification of *Rhododendron*. p. 145-164. Lawrence, New York. Allen Press.
- Harborne J.B. (1979) Variation in and functional significance of phenolic conjugation in plants. In: Biochemistry of plant phenolics. p.457-474. Ed. by Swain T., Harborne J., B., Van Sumere C., F. New York. London. Plenum press.
- Harborne J., B. (1980) Plant phenolics. In: Secondary plant products. p. 330-402. Ed. by Bell A., E. Charlwood B., V. Berlin, Heidelberg, New York. Springer - Verlag.
- Harborne J.B. (1984) Phytochemical methods. A guide to modern techniques of plant analysis. London, New York. Chapman and Hill, 288 p.
- Harborne J.B. (1986) Flavonoid patterns and phytogeography: the genus *Rhododendron* section *Vireya*. Phytochemistry, **25**, 7, 1641-1645.
- Hausman J.F. (1993) Changes in peroxidase activity, auxin level and ethylene production during root formation by poplar shoots raised *in vitro*. Plant Growth Regulation, **13**, 3, 263-268.
- Hausman J.F., Kevers C., Gaspar T. (1995) Putrescine control of peroxidase activity in the inductive phase of rooting in poplar shoots *in vitro*. Journal of Plant Physiology, **146**, 5-6, 681-685.
- Hegerman A.E. (1987) Phenolic biosynthesis: pathways and regulation. In: Models in plant physiology and biochemistry. Vol. II. p. 69-73. Ed. by Newman D.W., Wilson K.G. Florida. CRC Press, Inc. Boca Ration.
- Herman E.B., Haas G.G. (1975) Clonal propagation of *Coffea arabica* L. from callus culture. HortScience, **10**, 6, 588-589.

- Heursel J. (1975) Inheritance of the flavonols azaleatin and quercetin in *Rhododendron simsii* Planch. Zeitschrift für Pflanzenzucht, **74**, 1, 62-70.
- Ho L.K., Lin W.N. (1995) Quercetin 5,4'-dimethyl ether from *Rhododendron ellipticum*. Phytochemistry, **39**, 2; 463-464.
- Hrib J. (1993) Effect of acid pH on organogenesis *in vitro*. Biologia. Bratislav, **48** 1, 89-92.
- Hunsinger H. (1989) Experimentelle Untersuchungen zur *in vitro* Kultur von Vertretung der Gattung Rhododendron und immergrüne Laubgehölze. Jahrbuch. 66-73.
- Hussey G. (1986) Vegetative propagation of plants by tissue culture. In: Plant cell culture technology. Botanical monographs. Vol. 23. p.29-66. Ed. by: Yeoman M.M. Oxford: Blackwell Scientific Publications.
- Iapichino G., Chen T.H.H., Fuchigai L.H. (1991a). Adventitious shoot production from a vireya hybrid of rhododendron. HortScience, **26**, 5, 594-596.
- Iapichino G., Chen T.H.H., Fushigami L.H. (1991b) Plant regeneration from somatic tissue of *Rhododendron laetum x aurigeranum*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, **27**, 37-43.
- Iapichino G., McCulloch S., Chen T.H.H. (1992) Adventitious shoot formation from leaf explants of *Rhododendron*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, **30**, 237-241.
- G.levinsh (1991) Gradients of peroxidase, IAA-oxidase and lipoxygenase activity in rye, wheat and pea seedlings: relationship with ethylene formation. Biochemical, molecular and physiological aspects of plant peroxidases, 333-341.. Ed. by Lobarzeroski, J., Greppin, H., Penel, C., Gaspar, Th. Imp. Nationale, Geneva. p. 550
- levinsh G. (1992) Characterization of the peroxidase system in winter rye seedlings: compartmentation and dependence on leaf development and hydrogen donors used. J. Plant. Physiol., **140**, 257-263.
- Iqbal M.J., Paden D.W., Rayburn A.L. (1995) Assessment of genetic relationships among Rhododendron species, varieties and hybrids by rapid analysis. Scientia Horticulturae, **63**, 3-4; 215-223.
- Ishimaru K., Arakawa H., Neera S. (1993) Polyphenol production in cell cultures of *Cornus kousa*. Phytochemistry, **32**, 5, 1193-1197.
- Jagtap V., Bhargava S. (1995) Variation in the antioxidant metabolism of drought tolerant and drought susceptible varieties of *Sorghum bicolor* (L.)

- Moench- exposed to light, low temperature stress. J. Plant Physiol., **145**, 1-2, 195-197.
- Jacobs M., Rubery P.H. (1988) Naturally occurring auxin transport regulators. Science, **241**, 346-349.
- Ф.Л.Калинин (1980). Методы культуры тканей в физиологии и биохимии растений. Киев, Наукова думка. 488 с.
- Kaminska S., Shibata K. (1977) Anticotyledon factor: competitive inhibitor of dihydroconiferol alcohol in stimulating GA₃ induced lettuce hypocotil elongation. Plant Cell Physiology, **18**, 1057-1066.
- Kaminski W., Rom R. (1976) A possible role of catalase in the rest of peach *Prunus persica*, Sieb. and Zucc., flower buds. J. Am. Soc. Hort. Sci., **99**, 1, 84-86.
- Н.В.Катаева, В.А.Аветисов. (1981) Клональное размножение растений в культуре ткани. М.,Наука. 168 с.
- Н.В.Катаева, Р.Г.Бутенко. (1983) Клональное микроразмножение растений. М.,Наука. 164 с.
- Kaul K. (1985) Seasonal variation in callus proliferation from explants of nature Pinus stobus trees. In: Tissue culture in forestry and agriculture. Ed. by Henke R.K. et al. Plenum Press. New York-London. p. 330.
- Kavanagh J.M., Hunteer S.A., Crossan P.J. (1986) Micropropagation of catawba hybrid rhododendrons 'Nova Zembla', 'Cynthia' and 'Pink Pearl'. Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc., **36**, 264-272.
- Kawaoka A., Kawamoto T., Ohta H., Sakine M., Shinmyo A. (1994) Wound induced expression of horshreadish peroxidase. Plant Cell Reports, **13**, 3-4; 149-154.
- Kay L.E., Basile D.V. (1987) Specific peroxydase isoenzymes are correlated with organogenesis. Plant Physiology, **84**, 1, 99-105.
- Кефели В.И. (1974) Природные ингибиторы роста и фитогормоны. М., Наука, с. 252.
- Kevers C., Hausman J.F., Hagege D., Gaspar T. (1991) Post - effects of thidiazuron on peroxidase activity and rooting of microcuttings of *Kalmia latifolia*. Saussurea, **22**, 27-31.
- Kevers C., Gaspar T. (1992) Micropropagation of *Kalmia latifolia*: acclimation and rooting performance depending on the preceding steps. Relationship with peroxidase activity. Med. Fac Landbou Univ. Gent, 57 (3b), 977-985.

- Кезли Т.Ф., Чрелашвили М.Н. (1947) Аскорбиновая кислота и каталаза в листьях рододендрона в связи с вертикальной зональностью. Сообщ. АН Груз. ССР, VIII, 6, 413-418.
- Khmara K.A., Kataeva N.V. (1993). Effect of maternal plant genotype and cytokinin like substances on Norway spruce (*Picea aleies* L.) *in vitro* organogenesis. Russian J. of Plant Physiology, **40**, 5, 692-695.
- King B.L., Jones S.B., Galle F.C. (1975) The flavonoid chemistry of our native azaleas: uses in classification. Quarterly Bulletin American Rhododendron Society, **29**, 179-183.
- King B.L. (1977) Flavonoids of deciduous Rhododendron of North America (*Ericaceae*). American Journal of Botany, **64**, 3, 350-360.
- King B.L. (1978) The systematic implications of flavonoid in *Rhododendron* subgenus *Penthanthera*. In: Contributions toward a classification of Rhododendron. p. 163-186. Lawrence, New York. Allen Press.
- Kishor P.B., Peddy G.M. (1987) Callus initiation and plant regeneration from different explants and genotypes of *Oryza sativa* L. Indian J. Plant Physiol., **30** 1, 66-70.
- Кислов Л.Д., Кузовкина И.Н. (1986) Вторичные метаболиты культуры тканей. с.66-69. Кн.: Культура клеток растений и биотехнология. М., Наука
- Кезли, Т.А., Черерашвили, Н.Н. (1947) Аскорбиновая кислота и каталаза в листьях рододендрона в связи с вертикальной зональностью. Сообщения Акад. Наук Груз. ССР, **8**, 413-418.
- Kochaba J., Lavee S., Spiegel - Roy P. (1977) Differences in peroxidase activity and isoenzymes in embryogenic and non-embryogenic 'Shamouti' orange ovular callus lines. Plant & Cell Physiology, **18**, 463-467.
- Кондратович Р.Я., Гертнере Д.Х., Рамане М.К. (1972а) Изменение активности фермента каталазы в листьях некоторых видов вечнозеленых рододендронов в течение года. Тр. Бот. сада Латв. университета, **18**, 246-253.
- Кондратович Р.Я., Акмене Р.А., Рамане М.К., Гертнере Д.Х. (1972b) Динамика содержания углеводов в листьях вечнозеленых рододендров в течение года. Тр. Бот. Сада Латв. Ун-та, **18**, 234-245.
- R. Kondratovičs. (1978) Rododendri. R., Liesma. 180 lpp.
- Кондратович, Р.Я. (1981) Рододендроны в Латвийской ССР. Рига, Зинатне. 330 с.

Комиссаренко Н.Ф., Левашова И.Г. (1980) Биологически активные вещества листьев рододендрона желтого. Растительные ресурсы, 1, 12-21.

Кордюм Е.Л., Недуха Е.М., Сидоренко П.Г. (1980). Структурно-функциональная характеристика растительной клетки в процессах дифференцировки и дедифференцировки. Киев, Наукова Думка. 144 с.

Krazkova M. (1991) Peroxidase in genetic and taxonomic investigations. Biochemical, molecular, and physiological aspects of plant peroxidases. Ed. by Lobarzeroski, J., Greppin, H., Penel, C., Gaspar, Th. Imp. Nationale, Geneva. 550 p.

Кулаева О.Н. (1973) Цитокинины, их структура и функция. М., Наука. 264 с.

Клуева О.Н. (1977) О механизме действия цитокининов. В кн.: Рост растений и природные регуляторы. с. 216-234 Под ред. В.И. Кефели. М. Наука.

Kulaeva O.N. (1980) Cytokinin action on enzyme activities on plants. In: Plant growth substances 1979. p. 362-369. Ed. by F. Skoog. Berlin, Heidelberg. Springer-Verlag.

Кулаева О.Н. (1982) Цитокинины и их физиологическое действие. 56 с.

Кулаева О.Н. (1983) Гормональная регуляция физиологических процессов у растений в уровне синтеза РНК и белка. М., Наука. 83 с.

Kunishige M., Morishita S., Kobayashi Y. (1975) Anthocyanin variation of *Rhododendron reticulatum* in Amakus area. Report of the Japanese Horticultural Society, 352-353.

Куперман Ф.М. (1963) Морфологическая изменчивость растений в онтогенезе. М., изд. МГУ. с.63.

Куршакова Г.В. и др. (1961) Рододендрон золотистый, или кашлара и возможности его использования в качестве дубильного растения. АН СССР Бот. Инст. им. В.Л. Комарова, Труды, 5, 9, 291-302.

Kutaček M. (1988) Enzymes of auxin synthesis in plants and tissue cultures. In: Physiology and biochemistry of auxins in plants. p.57-64. Ed. M. Kutaček et al. SPB Academic Publ. The Hague.

Kyte L. (1987) Plants from test tubes. In: Introduction to micropropagation. Portland, Oregon. Timber Press. 160 p..

- Lal M., Narayan P., Jaswal V.S. (1988) Induction of somatic embryogenesis and associated changes in peroxidase activity in leaf callus cultures of *Ficus religiosa* L.. Proc Indian Nat. Sci. Acad., **B54**, 4,171-175.
- Лапа, И.К. (1986) Изучение фенольных соединений тонкослойной хроматографией на полиамиде. LPSR ZA Vēstis, 5, 575-581.
- Larson R.A. (1995) Plant defense against oxidative stress. Archives of Insect Biochemistry and Physiology, **29**, 175-186.
- Le Dily F., Kevers C., Huanlt C., Billard J.-P., Gaspar T. (1993a) Peroxidase deficiency in plant cancer cells as resulting from deviated nitrogen and sugar metabolisms/ In: Plant Peroxidases: Biochemistry and Physiology.p. 336-343. Ed. by Welinder K.G. Geneva: University of Geneva.
- Le Dily F., Huault C., Gaspar T., Billard J.-P(1993 b) Does altered nitrogen metabolism and H₂O₂ accumulation explain the vitrified status of the fully habituated callus of *Beta vulgaris* (L.). Plant Cell Tissue and Organ Culture, **35**, 69-74.
- Lejune P., Kinet J.-M., Bernier G. (1988) Cytokinin fluxes during floral induction in the longday plant *Sinapis alba* L. Plant Physiol., **86**, 1095-1098.
- Левитес, Е.В. (1986) Генетика изоферментов растений. Новосибирск, Наука, Сиб. отд. 145 с.
- Lobarzevski E. (1981) Peroksydazy roslinne. Wiadomosci Botaniczne, **25** 1, 29-44.
- Loescher W.H., McCamant T., Keller J.D. (1990) Carbohydrate reserves, translocation and storage in woody plant roots. Hort. Science, **25**, 3, 274-281.
- Löbler M., Klämbt D. (1987) The Auxin Receptor in Corn Coleoptiles. In: Plant Hormone Receptors. p. 41-49. Ed. by Klämbt D. NATO ASI Series, vol. H10.. Berlin, Heidelberg. Springer-Verlag.
- Loose R. de (1969) Flower pigments of *Rhododendron simsii* and other species and varieties from Rhododendron subseries Oletusum. Phytochemistry, **8**, 253-259.
- Loose R.de. (1970) Flavonoid glycosides in the petals of some rhododendron species and hybrids. Phytochemistry, **9**, 875-879.
- Loose R.d. (1979) Characterization of *Rhododendron simsii* Planch. cultivars by flavonoid and isoenzyme markers. Scientia Horticulturae, **11**, 2, 175-182.
- Lugue A., Robaina R., Garcia-Reina G. (1988) Characteristic of NaCl-tolerant calli and somoclonos of tomato. p. 143-148. Plant Cell Biotechnology. Ed. by

- Pais M.S., Mavituna F., Novais J.M. NATO ASI Series. Series H: Cell biology. Vol. 18. Berlin, Heidelberg. Springer-Verlag
- Maheswaran M., Rangassamy S.R.S. (1992) Changes in peroxidase activity during shoot formation in *Oryza sativa* L. Journal of Genetic Breeding, **46**, 1, 15-19.
- Макарова Р.В. (1990) Регуляторы роста в модельных системах. с.125-145. В кн.: Итоги науки и техники. Физиология растений. т.7. М.
- Maldhavi D.L., Smith M.A.L., Berberjimenz M.D. (1995) Expression of anthocyanins in callus cultures of cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait). Journal of Food Science, **60**, 2, 351-355.
- Мамот Т.С. (1981) Действие ауксинов и цитокининов на морфогенез хвойных в культуре *in vitro*. с. 167. В кн.: Регуляторы роста и развития растений: Тез. докл. I Всес. конф. М. Наука.
- Mapson L.W. (1970) Biosynthesis of ethylene and the ripening of fruit. Endeavour, **39**, 29-33.
- Matoo A.K., Modi V.V. (1969) Ethylene and ripening of mangoes. Plant Physiology, **44**, 308-310.
- McClure J., W. (1979) The physiology of phenolic compounds in plants. In: Biochemistry of plant phenolics. p. 525-554. Ed. by Swain T., Harborne J., B., Van Sumere C., F. New York, London. Plenum Press.
- McCown B.H., McCown D.D., Beck G.E., Hall T.C. (1970) Isoenzyme composition of *Dianthus* callus cultures: influence of light and temperature. Amer. J. Bot., **57**, 20, 148-152.
- McCown B.H., Lloyd G.B. (1983) A survey of the response of Rhododendron to *in vitro* culture. Plant Cell, Organ and Tissue Culture, **2**, 77-85.
- McDougall G.J. (1992) Alterations in surface - associated peroxidases during callus development and shoot formation in explants of *Linum usitatissimum*. Journal of Plant Physiology, **140**, 195-200.
- Mc Lean K.S., Lawrence G.W., Rechert N.A. (1992) Callus induction and adventitious organogenesis of kenat (*Hibixus cannabinus* C.). Plant Cell Reports, **11**, 532-534.
- Медведева, Р.Г. (1952) Сибирское лекарственное растение рододендрон золотистый (кашкара). Аптечное дело, **3**, 29-32.

Мемот Т.С. (1981) Действие ауксинов и цитокининов на морфогенез хвойных в культуре *in vitro*. В кн.: Регуляторы роста и развития растений. Тез. докл. I Всес. конф. С. 167. М., Наука.

Ментелл С.Г., СМИТ Т (1987) Факторы культивирования, влияющие на накопление вторичных метаболитов в культурах клеток и тканей растений. 75-104. В кн.: Биотехнология сельскохозяйственных растений. М., Агропромиздат.

Метелица Д.И. (1984) Моделирование окислительно-восстановительных ферментов. с. 37-41. Минск. Наука и техника.

Meyer M.M. (1981a) Tissue culture propagation of rhododendron plants using florets as explants. *In vitro Cellular & Developmental Biology*, **17**, 3, 228.

Meyer M.M. (1981b) *In vitro* propagation of rhododendron from flower buds. *HortScience*, **16**, 3.

Meyer M.M. (1982) *In vitro* propagation of Rhododendron from flower buds. *HortScience*, **17**, 891-892.

Meyer M.M. (1983a) A new method for propagating woody plants from tissue culture. *American Nurseryman*, **157**, 1, 65-66, 68, 70.

Meyer M.M. (1983b) Clonal propagation of perennial plants from flowers by tissue culture. *Comb. Proc. Int. Plant Prop. Soc.*, **33**, 402-407.

Miller S.A. (1985) Tissue Culture Methods in Phytopathology. II-Fungi. p.215-229. *Plant Cell Culture*. Ed. by R.A. Dixon. Oxford, Washington. JRL Press.

Miyake C., Asada K. (1992) Thylakoid - bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxydation product monodehydrascorbate radicals in thylakoides. *Plant Cell Physiol.*, **33**, 541-553.

Miyajima I., Uemoto S., Sakata Y., Arisumi K. (1995) Morphological and pigment variations in flowers of *Rhododendron kiusianum* Makino and *R. kaempferi* Plench - indigenous to the Unzen mountain mass. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, **65**, 2, 393-399 (abstr.).

Morpurgo R., Lopato S.V., Afra R., Novak F.J. (1994) Selection parameters for resistance to *Fusarium oxysporum* F. sp. *Cubense* race 1 and race 4 on diploid banana (*Musa Acuminata Colla*). *Euphytica*, **75**, 1-2, 121-129.

Muralitharan M.S., Chandler S.F., Vansteveniuck R.F.M. (1992) Physiological adaptation to high ion concentrations or water deficit by callus cultures of highbush blueberry *Vaccinium corymbosum*. *Australian Journal of Plant Physiol.*, **20**, 159-172.

- Murashige T., Skoog F.A. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, **15**, 13, 473-497.
- Murashige T. (1990) Plant Propagation by Tissue Culture. A Practice with Unrealized Potential. Handbook of Plant Cell Culture. Vol. 5. p. 3-9. Ed. by Ammirato P.V., Evans D.A., Sharp W.R., Bajaj Y.P.S. New York. McGraw-Hill Publ. Comp..
- Музафаров У.Н., Рузиева Р.Х. (1985) Фенольные соединения - фактор регуляции фотосинтеза и роста. В кн.: Рост растений и его регуляция.с. 210-218. Кишинев. Штиинца.
- Nair A.S, Bonga B.S. (1993) Plantlet regeneration from callus initiated from flower buds in the wild species *Allium senescens var minor*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **34**, 205-207.
- Narayanaswamy S. (1988) Regeneration of Plants from Tissue Culture. Application and Fundamental Aspects of Plant Cell Tissue and Organ Culture.p.178-206. Ed. by Reinert J., Bajaj Y.P.S. New Dehli, Madras, Bombay. Narosa Publ. House.
- Neera S., Arakawa H., Ishimaru K. (1992) Tannin production in *Sapium sebiferum* callus cultures. *Phytochemistry*, **31**, 2, 4143-4149.
- Norton M.E., Norton C.R. (1985) *In vitro* propagation of Ericaceae: a comparison of the activity of cytokinins N⁶-benzyladenine and N⁶-isopentenyladenine in shoot proliferation. *Sci. Horticulturae*, **27**, 335-340.
- Norton M.E., Norton C.R. (1986) Shoot proliferation in *in vitro* of Ericaceous plants. *The Plant Propagator*, June, p.3-4.
- Norton C.R., Norton M.E. (1989) Rhododendrons. In: Biotechnology in agriculture and forestry. Vol. 5. Tree II. Ed. by: Bajaj Y.P.S. Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag, 428-451.
- Oliveira M.M., Miguel C.M., Raquel M.H. (1996) Transformation studies in woody fruit species. In: *Plant Tissue culture and Biotechnology*, **2**, 2, 76-93.
- Olmos E., Hernandez J.A., Sevilla F., Hellin E. (1994) Induction of several antioxidant anzymes in the selection of a salt tolerant cell line of *Pisum sativum*. *Journal of Plant Physiology*, **144**, 4-5, 594-598.
- Omran R.G. (1980) Peroxidase levels and the activities of catalase, peroxidase, and indolacetic acid oxidase during and after chilling cucumber seedings. *Plant Physiol.*, **65**, 407-408.

- Ozawa T., Takeshita M., Negishi O., Imagawa H. (1993) Pollen tube growth promoters from the style of *Rhododendron mucronulatum* G. Don. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, **57**, 12, 2122-2126.
- Patra J., Lenka M., Panda B.B. (1994) Tolerance and co-tolerance of the grass *Chloris barbata* SW to mercury, cadmium and zinc. *New Physiologist*, **128**, 1, 165-171.
- Paterson K.E., Everett N.P. (1985) Regeneration of *Helianthus annuus* inbred plants from callus. *Plant. Sci.*, **42**, 2, 125-132.
- Pennel D.(1990) Micropropagation of the Ericaceae. *The Plantsman*, **12** (2), 120-125.
- Pierik R.L.M. (1987). *In vitro* culture of higher plants. Dordrecht-Boston-Lancaster Martin Nojhoff Publishers. 344 p.
- Pierik R.L.M.(1990) Rejuvenation and micropropagation. *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*.p. 91-101. Ed. by Nijkamp H.J.J., Van Da Plas L.H.W., Aartrijk Van J. Dordrecht. Kluwer Acad. Publ.
- Плешков, Б.П. (1975) Изоферменты растений. М. Мин. Сельск. Хоз. СССР, 46 с.
- Починок Х.Н. (1956) Определение активности каталазы иодометрическим методом. В кн.: Особенности физиологии питания растений. с. 92-106. Киев.
- Polle A., Otter T., Seifert F. (1994) Apoplastic peroxidases and lignification in needles of Norway spruce (*Picea abies* L.). *Plant Physiology*, **106**, 53-60.
- В.В. Полевой (1982) Фитогормоны. Изд. Ленингр. Ун-та, Ленинград, 248 с.
- Полевой В.В. (1986) Роль ауксина в системах регуляции у растений. Л. Наука. 79 с.
- Полевой В.В., Саламатова Т.С. (1991) Физиология роста и развития растений. Л. изд. Ленингр. Ун-та. 240 с.
- Prasad T.K., Anderson M.D., Stewart C.R. (1995) Localisation and characterization of peroxidases in the mitochondria of chilling acclimated maize seedlings. *Plant Physiology*, **108**, 1597-1605.
- Preece J.E., Imel M.R.(1991) Plant regeneration from leaf explants of *Rhododendron* P.J.M. Hybrids. *Sci Horticulturae*, **48**, 150-170,

Pua E.C., Chi G.L. (1993) De novo shoot morphogenesis and plant growth of mustard (*Brasica juncea*) in vitro in relation to ethylene. *Physiol. Plantarum*, **88**, 467-474.

Пушкаренко А.Я., Игнатова С.А., Лукьянюк С.Ф. (1989) Влияние эндогенных фенолов на индукцию каллусообразования и регенерацию in vitro у подсолнечника. Науч. -техн. бюлл. Всеселекц.-Генет. Инст. ВАСХНИЛ, 1, 36-42.

Püter J. (1970) Peroxydasen. Methoden der enzymatischen Analyse. Bd. 2. Aufl. 1. s. 648-653. Berlin. Akademie-Verlag.

Rainieri A., Schenone G., Lencioni L., Soldatini G.F. (1994) Detoxificant enzymes in pumpkin grown in polluted ambient air. *Journal of Environmental Quality*, **23**, 2, 360-364.

Ravn H., Pedersen M.F., Borums J., Andary C., Anthoni U., Christophen C., Nielsen P.H. (1994) Seasonal variation and distribution of 2 phenolic compounds, rosmarinic acid and caffeic acid in leaves and roots - rhizomes of eelgrass (*Zostera marina* L.). *Ophelia*, **40**, 1, 51-61.

Reisfeld R.A., Lewis J., Williams D.E. (1962) Disk Electrophoresis of basic Proteins and peptides on Polyacrilamide Gels. *Nature*, **195**, 81-83.

Reod P.E. (1990) Environmental effect in micropropagation. In: Ornamental species. Part B. Overviews. Handbook of Plant Cell Culture. **5**, 95-125 Ed. by Ammirato P.V. et al. New York: McGraw-Hill Publ. Comp.

Reynolds J.F., Murashige T. (1979) Asexual embryogenesis in callus cultures of palms. *In Vitro*, **15**, 5, 383-387.

Rhodes J.M., Wooltorton L.S.C. (1978) The biosynthesis of phenolic compounds in wounded plant storage tissues. In: Biochemistry of wounded plant tissues. p. 241-289. Ed. by Kahl G. Berlin, New York. Walter de Gruyter & Co.

Righetti B., Magnanini E., Maccaterri M. (1988) Ethylene and other volatile substances produced by *in vitro* cultured *Prunus avium*. *Acta Horticulture*, **227**, 402-404.

Robenek H. (1977) Der Einfluß der Phytohormone IES, Kinetin and 2,4-D auf die Entwicklung des Sproßkallus von Rhododendron "Scarlet Wonder" und *R. wardii* X. *R. yakushimanum*. *Rhododendron und immergrüne Laubgehölze. Jahrbuch*, 70-76.

Румянцева Н.И., Сергеев Н.В., Сальников В.В., Гумерова Е.А., Лозовая В.В. (1989) Органогенез и соматический эмбриогенез в культуре двух видов гречихи. *Физиол. растений*, **39** 1, 187-194.

- Sahu, A.C., Mishra, D. (1987) Changes in some enzyme activities during excised rice leaf senescence under NaCl stress. *Biochem. Physiol. Pflanzen*, **182**, 501-505.
- Salaj J., Salajova T. (1992) Intravacuolar inclusions in the cells of green and white callus of Norway spruce. *Biologia Bratislava*, **47**, 4, 301-306.
- Sales G.D., Norton R.A.J. (1995) Browning Associated mechanisms of resistance to insects in corn callus tissue. *Journal of Chemical Ecology*, **21**, 5, 583-600.
- Sanchezeromero C., Garciagomez M.L., Pliegoalfaro F., Heredia A. (1993) Peroxidase activities and isoenzyme profiles associated with development of avocado (*Persea americana* M.) leaves at different organogenic stages. *Journal of Plant Growth Regulation*, **12**, 2, 95-100.
- Santis de C., Di Silvestro I. (1988) Plant regeneration from callus of *Triticum durum* Desf. cultivars. *Ann. bot.*, **46**, 141-149.
- Сапко О.А., Мухмеджанов Б.Г., Кунаева Р.М. (1992) Образование фенольных соединений в культуре тканей верблюжей колючки. *Физиология растений*, **39**, 5, 1020-1025.
- Сарсанбаева, К.Н., Беков, А.А.-Х., Рахимбаев, И.Р. (1982) Изоферменты в хеиосистематике высших растений. с. 160. Алма-Ата. Наука.
- Saruyama H., Tanida M. (1995) Effect of chilling on activated oxygen - scavenging enzymes in low temperature sensitive and temperature tolerant cultivars of rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Sci.*, **109**, 2, 105-113.
- Saviciene E., Anisimoniene N. (1988) IAA synthesis localization and the role at transport for IAA distribution on intact plant. 259-260. In: *Physiology and biochemistry of auxins in plants*. Ed. by M. Kutaček. The Hague. SPB Academic Publishing.
- Sbrana C., Giovanetti M., Buiatti M., Storti E. (1993) Compatible and incompatible interactions between callus tissue and mycorrhizal on pathogenic fungi. *J. of phytopathology*, **139**, 1, 1-9.
- Schittenhelm, J., Toder, S., Fath, S., Westphal, S., Wagner, E. (1994) Photoinactivation of catalase in needles of Norway spruce. *Physiol. Planta*, **90** 3, 600-606.
- Schneider E.F. (1968) The rest period of *Rhododendron* flower buds. I. Effect of the bud scales on the onset and duration of rest. *J. Exp. Bot.*, **19**, 817-824.

Schonbaum G.R., Chance B. (1976) Catalase. In: The Enzymes. Vol. XIII, part C. p. 363-408. Ed. by: Boyer P.D. New York, San Francisco, London. Acad. Press.

Seithe von Hoff A. (1956) Bestimmungsschlüssel für die gärtenerisch wichtigsten Rhododendronarten s. 57-92. Bremen. DRG Jahrbuch.

Shevade A., Preece J.E. (1993) In vitro shoot and floral organogenesis from stamen explants from a Rhododendron PJM group clone. *Scientia Horticulturae*. (Amsterdam). **56**, 2, 163-170.

Siegel B.Z. (1993) Plant peroxidases an organismic perspective. *Plant Growth Regulation*, 12, 303-312.

Siemens J., Schieder O. (1996) Transgenic plants: genetic transformation - recent developments. *Plant Culture and Biotechnology*, 2, 2, 66-75.

Siminis C.I., Kanellis A.K., Roubelakis-Angelakis K.A. (1993) Differences in protein synthesis and peroxidase isoenzymes between recalcitrant and regenerating protoplasts. *Physiol. Plant*, **87**, 263-270.

Siminis, C.I., Kanellis, A.K., Roubelakis-Angelakis, K.A. (1994) Catalase is differentially expressed in dividing and nondividing protoplasts. *Plant Physiol.*, **105**, 1375-1383.

Skoog F., Miller C.O. (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. In: The biological action of growth substances: Symp. Soc. Exp. Biol. Cambridge: Univ. Press, 11, 118-131.

Скварко, К.А., Васильченко, О.В., Хомякова, Н.И. (1974) Полифенолы рододендра кочи. В кн.: Сборник. Интродукция и акклиматизация растений на Украине и в Молдавии. с. 117-118.

Smith D.L., Krikorian A.D. (1990) pH control of carrot somatic embryogenesis. In: *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*. p. 448-453. Ed. by Nijkamp H.J.J., Van Der Plass L.H.W., Van Artrijk J. Dordrecht. Kulwer Acad. Press.

Spethmann W. (1975) Flavonoide und carotinoide Inhaltstoffe in Rhododendron-Blüten und ihre möglichen Zusammenhänge zur Chemataxonomie und Farbgebung. *Rhododendron und Immergrüne Laubgehölze. Jahrbuch 1975*, 73-99.

Spethmann W. (1978) Flavonoids and carotinoids of rhododendron flowers and their significance for classification of the genus rhododendron. In: *Contributions toward a classification of Rhododendron*. p. 247-276. Lawrence, New York: Allen Press. 247-276.

Steinitz B., Navon A., Berlinger M.J., Klein M. (1993) Expression of insect resistance in *in vitro* derived callus tissue infected with Lepidopteran larvae. J. Plant Physiol., **142**, 4, 480-481.

Straatsma G., Van Griensven L.J.L.D., Bruinsma J. (1986) Root influence on *in vitro* growth of hyphae of the mycorrhizal mushroom *Cantharellus cibarius* replaced by carbon dioxide. Physiol. Plant, **67**, 521-528.

Straub P.F., Decker D.M., Gallagher J.L. (1992) Characterization of tissue culture initiation and plant regeneration in *Sporobolus virginicus* (Graminaceae). Amer. J. Botany, **79**, 10, 1119-1125.

Стрекова В.Ю., Загоскина Н.В., Субботина Г.А., Запрометов М.Н. (1989) Влияние длинного освещения на синтез фенольных соединений и формирование хлоропластов в каллусных тканях чайного растения. Физиология растений, **36**, 1, 83-88.

Субботина Г.А., Стрекова В.Ю., Загоскина Н.В., Запрометов М.Н. (1987) Влияние света на ультраструктурную организацию и синтез фенольных соединений в каллусных культурах чайного растения. Тез. докл. 5 Всес имп. по фенольным соединениям. Таллин 22-24 сент., 1987. Секц. биохимии и физиол. с. 50. Таллин, 1987.

Sumere C.F.v., Castelle E.K.v., Loose R.d., Heursel J. (1985) Reversed phase-hplc analysis of flavonoids and the biochemical identification of cultivars of evergreen azalea. In: Biochemistry of Plant Phenolics. p.17-43. Oxford University Press.

Summermatter K., Sticher L., Metraux J.P. (1995) Systematic response in *Arabidopsis thaliana* infected and challenged with *Pseudomonas syringae* pv *syringae*. Plant Physiology, **108** 1379-1385.

Sundin P., Ek H. Manuskripts. Fast and simple determination of soluble carbohydrates in small amounts of plant material by capillary gas chromatography.

Шалашвили Г.А., Джикариани О.Ш. (1973) Содержание и количественные изменения катехинов, лейкоантоцианов и флавонолов в разных органах рододендрона кавказского (*Rhododendron caucasicum* Pall.) при вегетации. В кн. Фенольные соединения и их физиологические свойства. с. 67-69. Алма-Ата. Наука.

Табакская Т.М., Бутова Г.П. (1988) Каллусные культуры как источник получения генетически измененных растений. Достиж. лес. генет. и селекции - науч. техн. прогрессу. с. 17-20. Воронеж.

Thimann K.V. (1977) Hormone action in the whole life of plants. p. 252-261. Univ. of Massachusetts Press. Amhers.

Thorpe T., Thanh M.T.v., Gaspar T. (1978) Isoperoxidases in epidermal layers of tobacco and changes during organ formation *in vitro*. *Physiologia Plantarum*, **44**, 388-394.

Tolbert N.E. (1980) Microbodies - peroxisomes and glyoxisomes. In: *The biochemistry of plants. A comprehensive treatise*. p. 395-388. New York, London, Sydney. Acad. Press.

Tran Than Van K. (1981) Control of morphogenesis in *in vitro* cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, **32**, 291-311.

Tran Than Van K., Mutattsciev S. (1990) Signals influencing cell division and morphogenesis. In: *Progress in Plant Cellular and Molecular Biology*. p. 514-519. Ed. by Nijkamp H.J.J., Van Der Plass L.H.W., Van Artrijk J. Dordrecht. Kulver Acad. Press.

Урманцева В.В. (1988) Культивирование каллюсных тканей на твердых питательных средах. В кн.: *Методы культивирования клеток*. с. 232-240. Ред. Пинаев Г.П. Л. Наука, Ленингр. отд.

Васильченко Е.А., Васильева Л.Н., Комиссаренко Н.Ф., Левашова И.Г., Батюк В.С. (1986) Анальгезирующее действие флавоноидов *Rhododendron luteum* Sweet, *Hypericum perforatum* L., *Lespedeza bicolor* Turcz. и *L. hedysaroides* (Pall.) Kitag. *Растительные ресурсы*, 1, 12-21.

Volpert R., Osswald W., Elstner E.F. (1995) Effect of cinnamic acid derivatives on indole acetic acid oxidation by peroxidase. *Phytochemistry*, **38**, 1, 191-22.

Wada E. (1956) On a flavonol glycoside isolated from flowers of a white azalea (*Rhododendron mucronulatum* G. Don.). *Journal of American Chemical Society*, **78**, 4725-4726.

Wakamatsu K., Takahama U. (1993) Changes in peroxidase activity and in peroxidase isoenzymes in carrot callus. *Physiologia Plantarum*, **88**, 167-171.

Watmough S.A., Dickinson N.M. (1995) Multiple material resistance and coresistance in *Acer Pseudoplatanus* L. (Sycamore) callus culture. *Annals of Botany*, 465-472.

Weckx, J., Vangronsveld, J., Clijsters, H. (1993) Heavy metal induction of ethylene production and stress enzymes. I Kinetic of the response. In: *Cellular and molecular aspects of the plant hormone ethylene* p. 238-239 ed. by Pech, J.C. et al., Kenwer, Academic Publishers.

Wernicke W., Parck H.Y. (1993) The apparent loss of tissue culture competence during leaf differentiation in yams (*Dioscorea bulbifera* L.) *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, **34**, 1, 101-105.

Williams W.P., Mathews G.A., Buckley P.M. (1994) Control of contamination in corn callus cultures used for insect resistance studies. *J. Agrocultural Entomology*, **11**, 4, 339-344.

Wochok Z.S., Burleson B. (1974) Isoperoxidase activity and induction in cultured tissues of wild carrot: a comparison of proembryos and embryos. *Physiologia Plantarum*, **31**, 73-75.

Wolter K.E., Gordon J.C. (1975) Peroxidases as indicators of growth and differentiation in aspen callus cultures. *Physiologia Plantarum*, **33**, 219-223.

Woltering E.J. (1989) Effect of the gaseous composition on development of gerbera plantlets grown *in vitro*. *Acta Horticulture*, **261**, 377-383.

Yamamoto H., Idea K., Tsuchiya S.-I., Yan K., Tanaka T., Inuma M., Mizuno M. (1992) Flavonol glycoside production in callus cultures of *Epimedium diphillum*. *Phytochemistry*, **31**, 3, 837-840.

Загоскина Р.В., Запрометов, М.Н. (1986) Фенольные соединения каллусных культур чайного растения и возможности регуляции их образования. В кн. Культура клеток растений и биотехнология. с. 46-52 М. Наука.

Загоскина Р.В., Цsik Т.В., Запрометов М.Н. (1987) Влияние света на ультраструктурную организацию и синтез фенольных соединений в каллусных культурах чайного растения. Тез. докл. 5 Всес. симп. по фенольным соединениям. с.50. Таллин, 22-24 сент. Секц. биохимии и физиол. Таллин, 1987.

Загоскина, Р.В., Федосеева, В.Г. (1988) Особенности фенольного метаболизма двух штаммов каллусных культур айного растения, выращиваемых на среде с 2,4-D. В кн. Регуляция жизнедеятельности растений химическими средствами. с. 73-80. Ярославль. Ярославский Гос. Университет.

Загоскина, Н.В., Федосеева, В.Г., Фролова, Л.В., Азаренкова, Н.Д., Запрометов, М.Н. (1994) Культура тканей чайного растения: дифференциация, уровень плодности, образование фенольных соединений. *Физиология растений*, **41**. 5, 726-767.

Запесочная, Г.Г., Баньковский, А.И. (1965) Изучение химического состава листьев *Rhododendron aureum* Georgi. *Химия природных соединений*, **4**, 289-292.

Запрометов М.Н., Стрекова В.Ю., Субботина Г.А., Загоскина Н.В. (1986) Действие кинетина на дифференциацию и образование фенольных соединений в каллюсной культуре чайного растения. Физиол. раст. **33**, 2, 356-364.

Запрометов, М.Н. (1973) О биосинтезе фенольных соединений. В кн.: Фенольные соединения и их физиологические свойства. с. 7-22. Алма-Ата: Наука.

Запрометов, М.Н. (1974) Основы биохимии фенольных соединений. М: Высшая школа. 212.с.

Запрометов, М.Н. (1988) Фенольные соединения растений и их биогенез. Итоги науки и техники.. **27**, М: ВИНТИ, с. 118.

Запрометов, М.Н. (1992) О функциональной роли фенольных соединений в растениях. Физиология растений, **39**, 6, 1197-1207.

Zaprometov M.N., Zagoskina N.V., Elkin V.V. (1993) Comparative study of lignins produced by the tea plant and by tea plant derived callus tissue. Phytochemistry, **32**, 3, 709-711.

Zhang J.X., Kirkham M.B. (1994) Drought stress induced changes in activities of superoxide dismutase, catalase and peroxidase in wheat species. Plant & Cell Physiology, **35**, 5, 785-791.

Zheng X.H., Ootani Y., Sawamura M. (1993) Isozymic analysis of peroxidase and esterase in *Citrus Flavedo*. Biosci. Biotechn. Biochem., **57**, 10, 1800-1802.

Zhou X., Han Y., Yang W., Xi T. (1992) Somatic embryogenesis and analysis of peroxidase in cultured lettuce (*Lactuca sativa* L.) cotyledons. Annals of Botany, **69**, 97-100.

Zimmerman R.H., Broome O.C.(1980) Blackberry micropropagation. US Dep. Agric., Sci., Educ. Admin. ARR-NE-11, 23-27.

Zimmerman R. H. (1985) Application of tissue culture propagation to woody plants. In: Tissue culture in forestry and agriculture. p. 165-177. New York, London: Plenum Press.