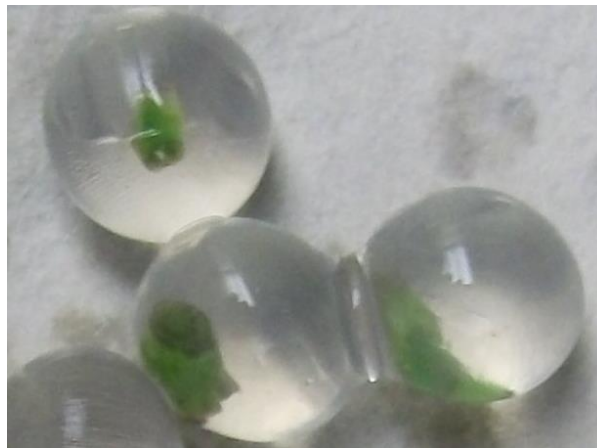




LIETUVOS
AGRARINIŲ IR MIŠKŲ
MOKSLŲ CENTRAS

Biotechnologiniai ir kriobiologiniai tyrimai LAMMC Sodininkystės ir daržininkystės institute.

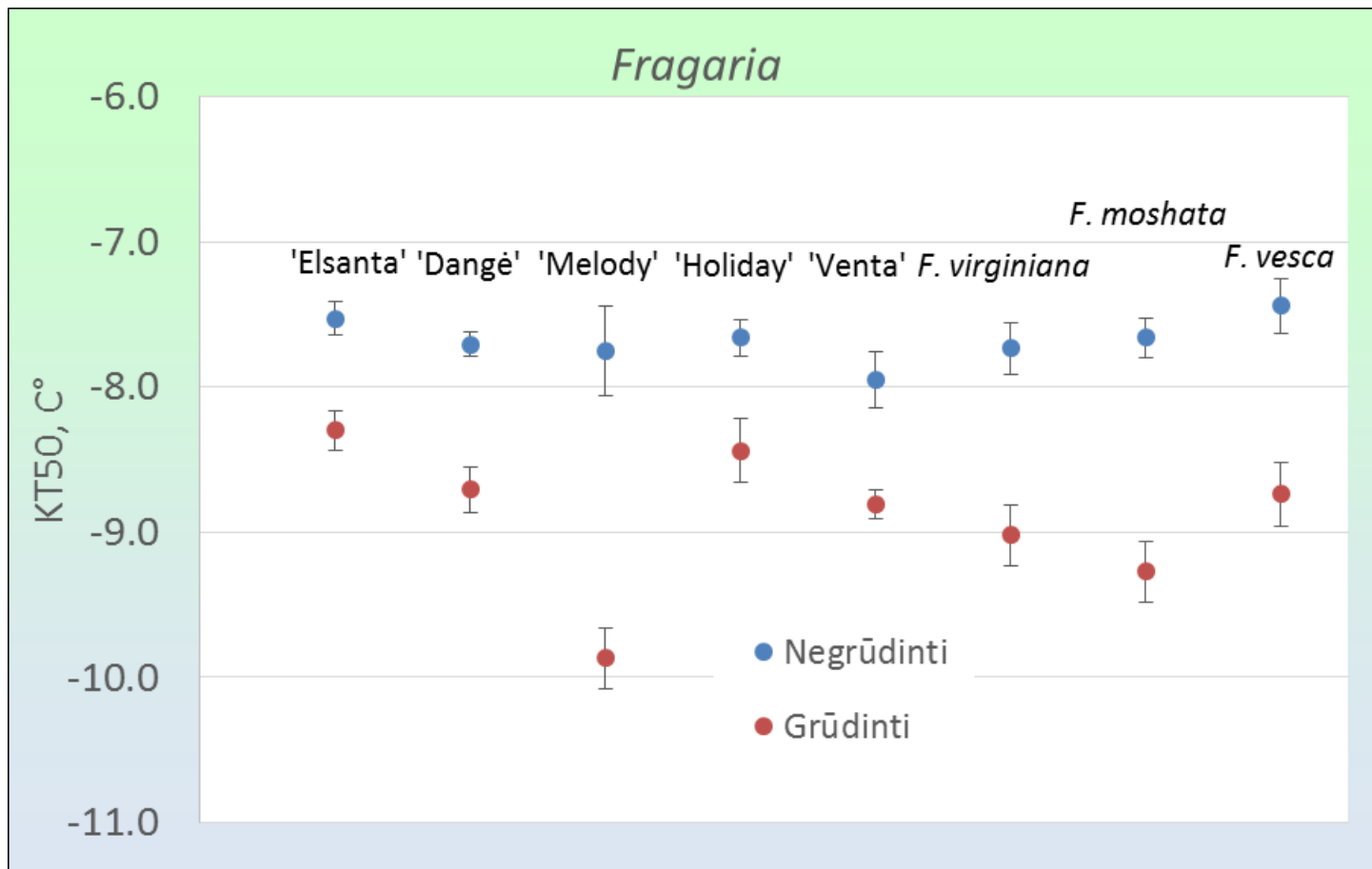
Rytis Rugienius



- Genetinė įvairovė yra svarbi ne tik gamtinių populiacijų evoliucijai, bet ir naujų veislių kūrimui.
- Lietuvos agrarinių ir miškų mokslų centro Sodininkystės ir daržininkystės institutas (LAMMC SDI) vykdo sodo ir daržo augalų nacionalinių genetinių išteklių kaupimo, tyrimo ir saugojimo veiklas.
- Sukaupta ir saugoma unikali sodo augalų kolekcija.

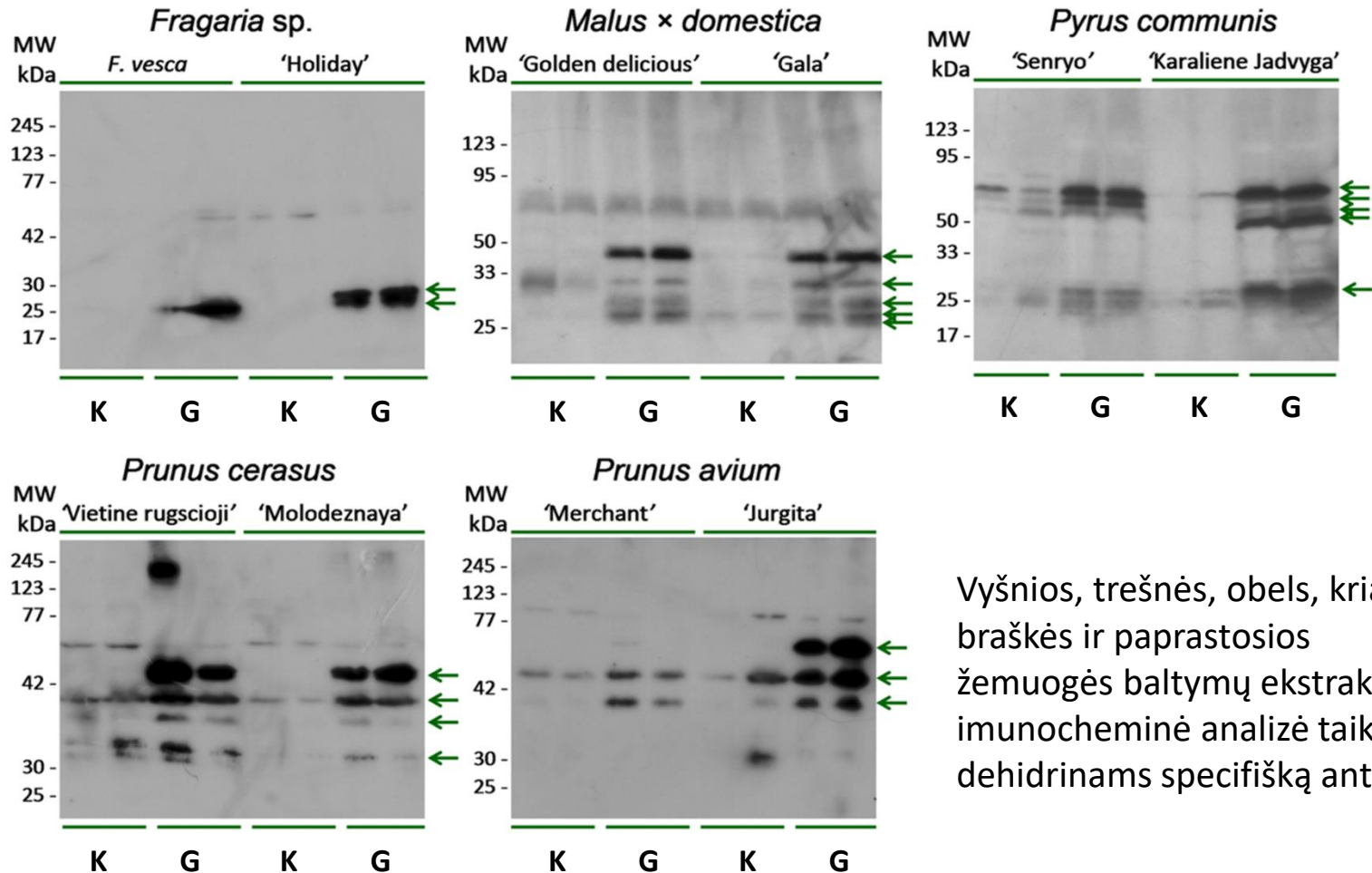
- Dėl klimato kaitos ekstremalių klimato sąlygų tikimybė didėja.
- Klimato sąlygos ir augalų ligos kelia pavojų genetiniams resursams saugojamiems augynuose, todėl institute naudojamos ir kuriamos ilgalaikio saugojimo technologijos, įkurta nauja kriobiologijos laboratorija
- Sėkmingam genetinių išteklių saugojimui ir panaudojimui būtinos genetikos, biotechnologijos, biochemijos, fiziologijos žinios – augalų adaptyvumo valdymo prielaidos

Užsigrūdinimas



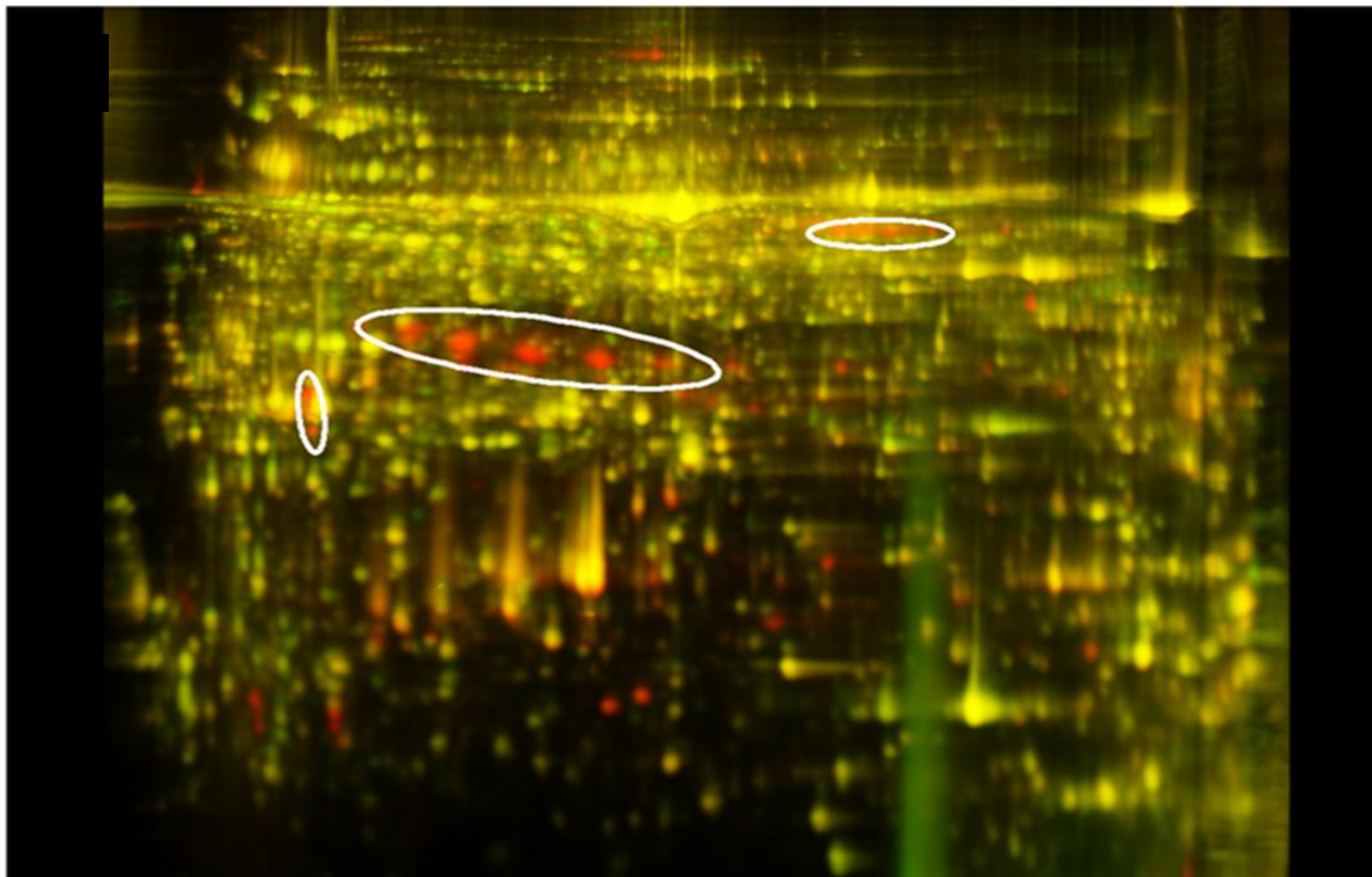
Grūdintų (4 °C) ir negrūdintų *Fragaria* mikroaugalų atsparumas šalčiui (KT50)

Užsigrūdinimas ir dehidrinai



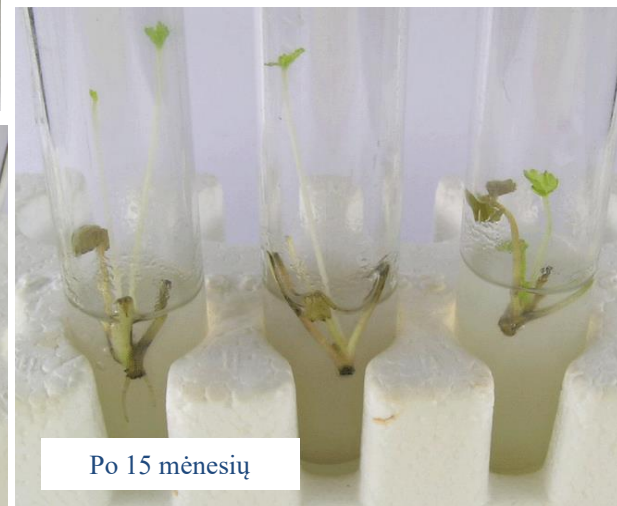
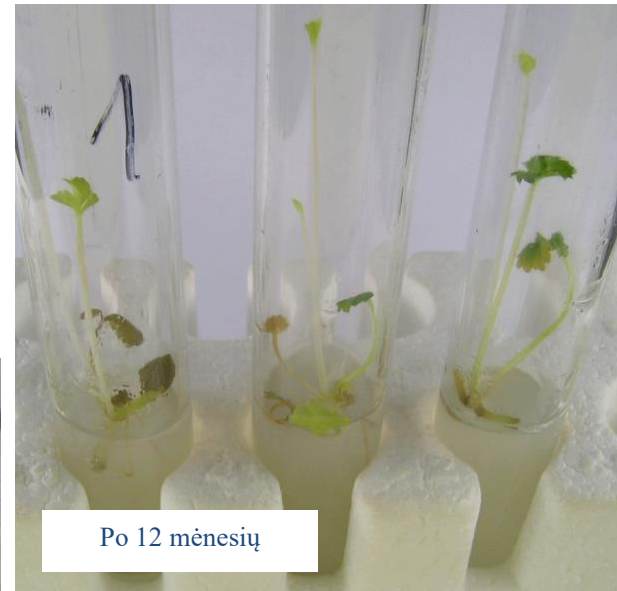
Vyšnios, trešnės, obels, kriaušės, braškės ir paprastosios žemuogės baltymų ekstraktų imunocheminė analizė taikant dehidrinams specifiską antikūnij.

Genų identifikavimas – žymeklių kūrimas



Grūdintų (raudona) ir negrūdintų (žalia) obels 'Gloden Delicious' mikroaugalų diferencinė baltymų elektroforezė. Dehidrinai identifikuoti masių spektrometrijos būdu pažymėti elipsėmis. Obels dehidrinai iš kairės: MdDHN6, MdDHN2 ir MdDHN4.

Ilgalaikis saugojimas *in vitro*



Braškės 'Melody' mikroaugalų būklė po ilgalaikio saugojimo +4°C temperatūroje, tamsoje.

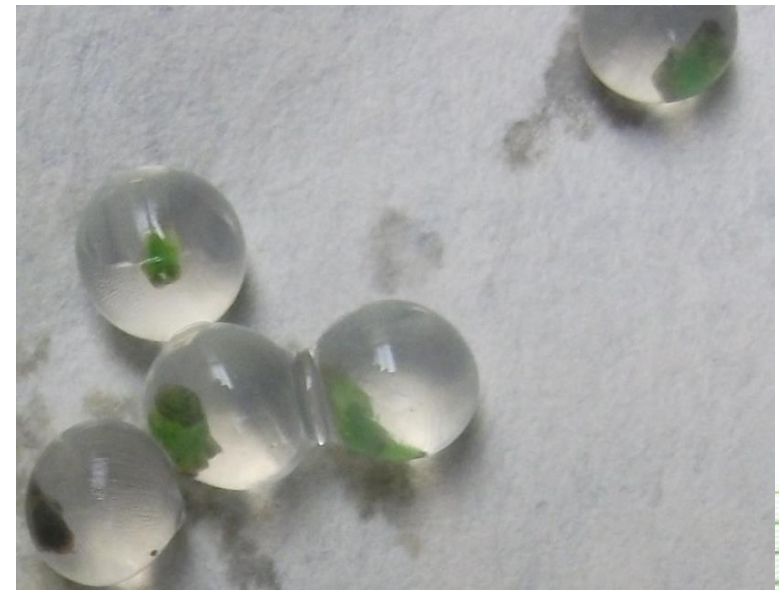
Kriosaugojimas

Kriosaugojimo tikslai:

- Rūšių genofondo išsaugojimas
- Veislių išsaugojimas
- Hibridų, mutantų, selekcinųjų linijų išsaugojimas
- Krioterapija

Kriosaugojimui tinka:

- Pumpurai
- Meristemos, mikroaugalai
- Sėklos
- Somatiniai gemalai
- Žiedadulkės
- Ląstelių linijos



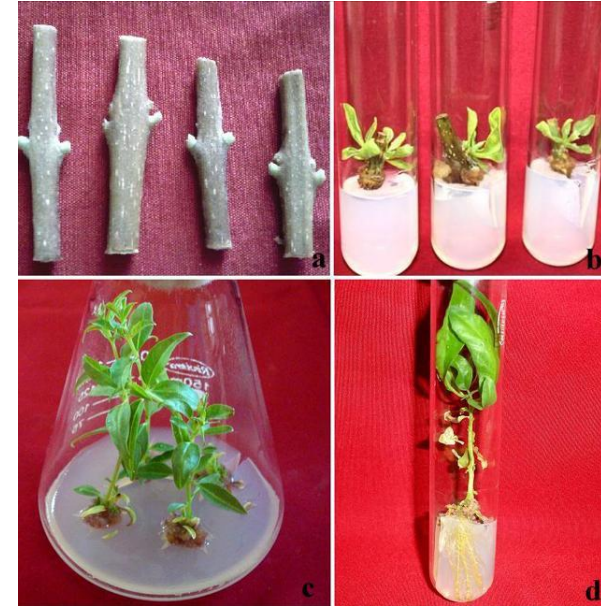
Kriaušių pumpurų kriosaugojimas



Šakelės su 4-5 pumpurais iš sodo paimamos sausio mėnesį, saugomos 4° C temperatūroje

Išpjunami 5-8 mm nodaliniai segmentai su pumpuru, 1-2 val padžiovinami kambario temperatūroje oro srovėje

Segmentai su pumpuru kriomėgintuvėliuose lėtai užšaldomi iki -40 °C (0,1-1,0 °C greičiu) ir perkeliama į skystą azotą



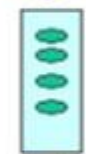
IN VITRO



Izoliuoti augaliniai
audiniai



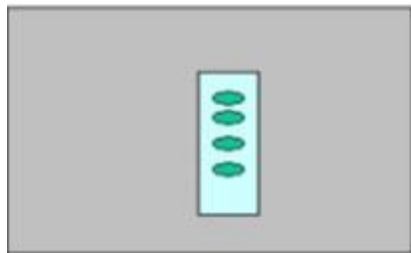
24 valandos skystoje MS terpėje
su 0,7M sacharozės priedu



20 minučių MS terpėje su 2M
glicerolio ir 0,4 M sacharozės priedu



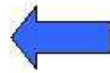
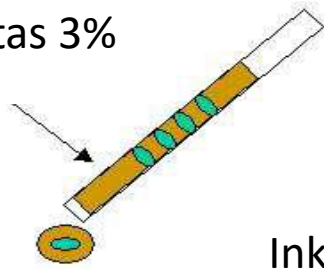
Po 5 min 20%, 40%, 60% ir 100% PVS2
(30% glicerolio, 15% etilen glikolio ir 15%
dimetilsulfoksido (DMSO) 0,4M sacharozės)
tirpale



Skystas azotas

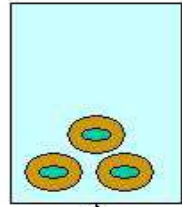
Vitrifikacija

Natrio alginatas 3%

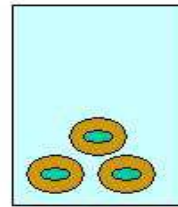
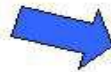


Izoliuoti augaliniai audiniai

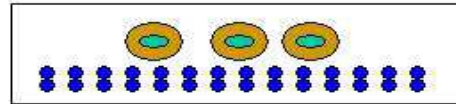
Inkapsuliacija



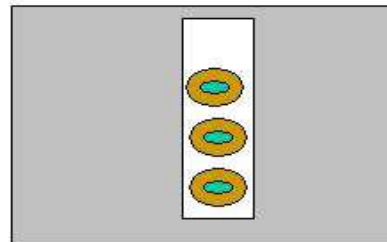
0.1 mol/L
CaCl₂



2 parų inkubacija
LP terpėje su 1M
sacharozės ir 1M
glicerolio priedu



Dehidratacija iki 20% pradinio
svorio naudojant silikagelį

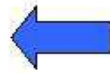
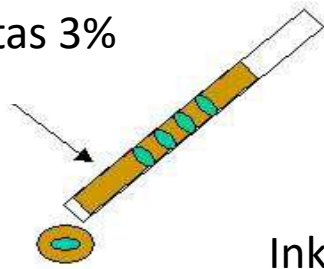


Perkėlimas į
kriomėgintuvėlius
ir į skystą azotą

**Inkapsuliacija-
dehidratacija/
vitrifikacija**

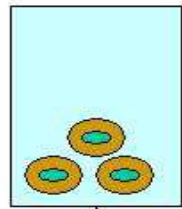


Natrio alginatas 3%

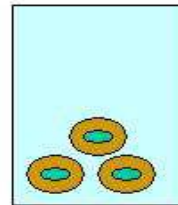
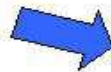


Izoliuoti augaliniai audiniai

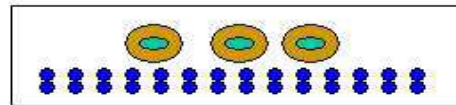
Inkapsuliacija



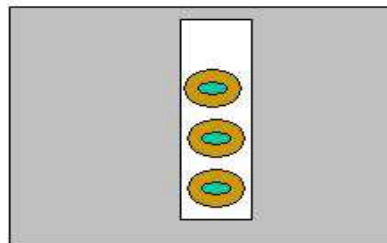
0.1 mol/L
CaCl₂



2 parų inkubacija
LP terpėje su 1M
sacharozės ir 1M
glicerolio priedu

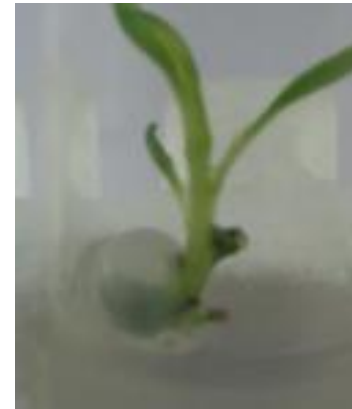


Dehidratacija iki 20% pradinio
svorio naudojant silikagelį



Perkėlimas į
kriomėgintuvėlius
ir į skystą azotą

**Inkapsuliacija-
dehidratacija/
vitrifikacija**



Išgyvenusių kriosaugojimą skystame azote kriausių mikroūglių kiekis %, priklausomai nuo genotipo ir paruošimo būdo

Genotipas	Paruošimo būdas							
	Vitrifikacija		Inkapsuliacija – dehidratacija (3,2 μM BAP)		Inkapsuliacija – dehidratacija (0,32 μM BAP)		Inkapsuliacija - vitrifikacija	
	Kontrolė	SA	Kontrolė	SA	Kontrolė	SA	Kontrolė	SA
'Koncentrat'	100,0	0	100,0	20,0	100,0	33,3	100,0	11,1
'Princesė Dagmar'	100,0	0	100,0	0	100,0	0	100,0	37,5
'Hasselpear'	100,0	0	80,0	0	100,0	0	87,5	0
Nr.0408	86,7	0	60,0	12,5	100,0	16,7	87,5	0
'Muskatelka Seda'	100,0	0	100,0	0	100,0	0	100,0	8,3
'Senryo'	100,0	0	100,0	0	25,0	0	60,0	0
P.pyraster	93,3	0	100,0	0	100,0	0	80,0	0

Nuo ko priklauso kriosaugojimo sėkmė – mikroaugalų išgyvenamumas ir tolimesnis augimas?

- Eksplantas
- Užsigrūdinimas
- Paruošimo kriosaugojimui būdas
- Fiziologinė būklė – augimas ar ramybė
- Amžius

Užsigrūdinimas ir ramybės periodas

Ramybė



Užsigrūdinimas



22 °C



Mikroaugalai augantys,
neužsigrūdinę,
kriosaugojimas
nesėkmingas



Užsigrūdinimas 4°C
Kriosaugojimas –
-196 °C



22 °C



Mikroaugalai
užsigrūdinę,
ramybės būklėje,
neauga
kriosaugojimas
nesėkmingas



Mikroaugalai
užsigrūdinę, nėra
ramybės būklėje, auga
kriosaugojimas
sėkmingas

Kriobiologijos problemos ir sprendimo būdai

- **Ramybės periodas**

Ramybės būklė neleidžia toliau augti mikroaugalams po kriosaugojimo

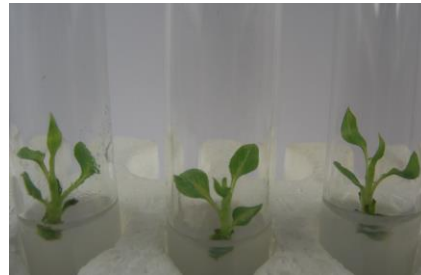
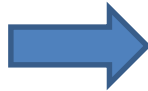
Sprendimas:

- naudoti apikalines o ne lateralines meristemas
- reguliuoti fitohormonų balansą, įvertinti šviesos, temperatūrinio režimo, metabolitų, siRNR reikšmę

Mikroaugalų amžius ir kriosaugojimas

Po kriosaugojimo
išgyvena 40-100%
mikroaugalų

Po kriosaugojimo
išgyvena 0-40%
mikroaugalų



**Mikro
augalų
polimor
fiškumas**

Izoliuojamos
meristemės

Regeneruoti augalai
padauginami.
**Pirmieji 4-5
mikrodauginimo
ciklai**

**Vėlesni
mikrodauginimo
ciklai**

Kriobiologijos problemos ir sprendimo būdai

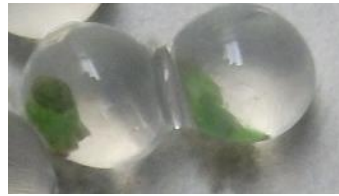
- **Amžius**

„Senose“ kultūrose didėja dezintegracija, polimorfiškumas, daugėja neoplastinių pasikeitimų, mažėja regeneracinės savybės.

Sprendimas:

- riboti persodinimų kiekį, naudoti tik „jaunus“ eksplantus, padidinti eksplantų skaičių
- atjauninti mikroaugalus? Įvertinti kintamumą. Nustatyti genetines ir epigenetines prielaidas stabilumui palaikyti

Augalų oksidacinis stresas ir kriosaugojimas



Kriosaugojimui „atsparus“ genotipas



Užsigrūdinimas



Kriosaugojimui „jautrus“ genotipas

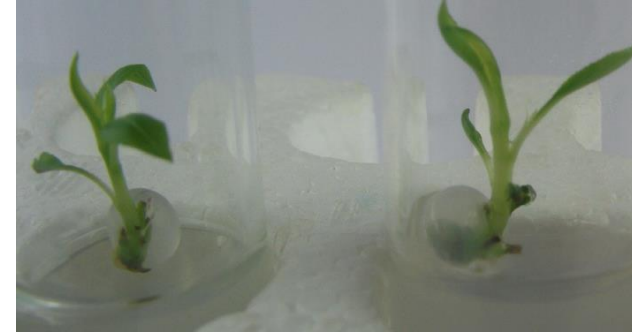
Programuojamas oksidacinis pliūpsnis

OH ir reaktyvūs O₂ junginiai ↑

Antioksidantai ↑

Fenoliniai junginiai ↑

Etilenas ↔



Augimas

Kriosaugojimas

Oksidacinis stresas Fotooksidacija

Antioksidantai ↓

Fenoliniai junginiai ↓

Etilenas ↑

Morfogenetinė kompetencija ↓



Žuvimas

Harding ir kt, 2009

Kriobiologijos problemos ir sprendimo būdai

- **Oksidacinis stresas**

Dėl oksidacinio streso mikroaugalai neauga po kriosaugojimo, nekrožė

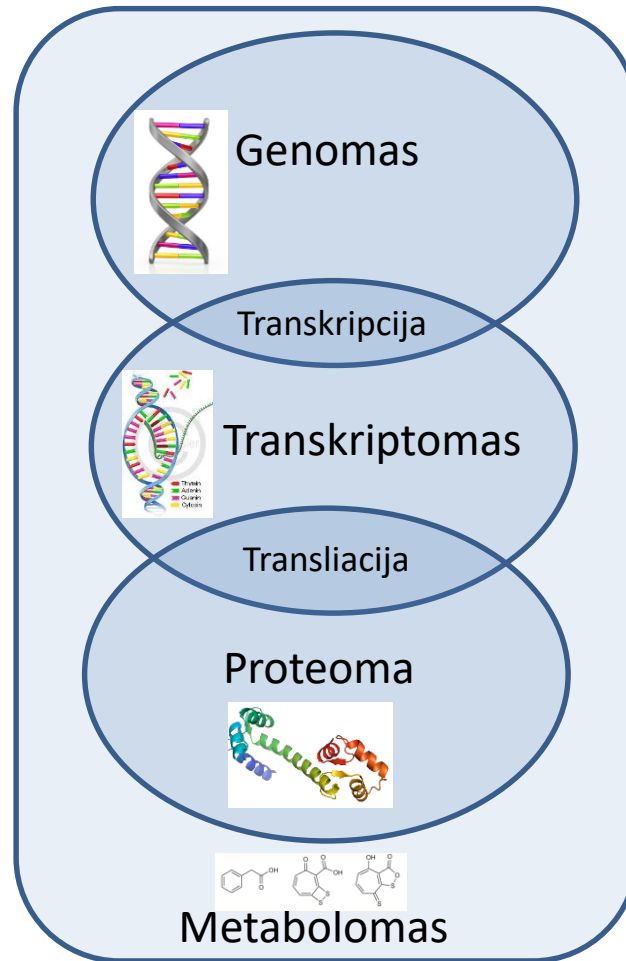
Sprendimas:

- sumažinti oksidacinį stresą
- išaiškinti streso reguliavimo, oksidacinio kelio valdymo genetines ir epigenetines prielaidas

Kriobionomika

Kriopoveikis

Dehidracija
Ledo kristalai
Laisvieji
radikalai
Oksidacinė
pažaidos,
Membranų
pažaidos



Stabilumas
Genetinis
Epigenetinis
Funkcinis
plastiškumas
Biologinė
sąveika

Morfologija
Histologija
Citologija
Biochemija
Molekulinė
biologija

Padėka:

- Prof. Habil. Dr. Vidmantui Staniui
- Dr. Perttu Haimi
- Dr. Danui Baniuliui
- Dr. Gražinai Stanienei
- Dr. Daliai Gelvonauskienei
- Dr. Vandai Lukoševičiūtei



Ačiū už dėmesį

