



TARTU RIIKLIK ÜLIKOO

Bioloogia-geograafiateaduskond

Geneetika ja tsütoloogia kateeder

IMBI PÄID

KASVUREGULAATORAINETE MÕJUST AEDNELGI
JA KOERATUBAKA MERISTEEMKULTUURIDELE

Diplomitöö

Juhendaja: dots. H.Kallak

Lubau heakskiit

12.06.89.

Kallak
heakskiit

Tartu 1989

SISUKORD

SISSEJUHATUS.....	3
-------------------	---

I KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1. Regulaatorainete mõjust <u>in vitro</u>	
1.1. Indool-3-äädikhappe mõjust.....	5
1.2. Kinetiini ja BAP-i mõjust.....	9
1.3. Maleiinhappehüdrasiidi mõjust.....	12

II EKSPERIMENTAALNE OSA

1. Materjal ja metoodika.....	18
2. Töö tulemused	
2.1. Regulaatorainete mõjust nelgi meristeemkultuuridele.....	23
2.2. Regulaatorainete mõjust koera- tubaka meristeemkultuuridele.....	30
2.3. Regeneraatide karioloogiline ja histoloogiline analüüs.....	36

ARUTELU.....	44
--------------	----

KOKKUVÕTE.....	48
----------------	----

KASUTATUD KIRJANDUS.....	50
--------------------------	----

RESÜMEED

LISAD

Sissejuhatus

Taimede morfogeneesi uurimine in vitro on teadlasi köitnud juba aastakümneid. laialdased võimalused selleks avas meristeesmeetodi kasutuselevõtmine ja taimsete kasvuregulaatorainete rakendamine. Kasvuregulaatoritena võivad teatud kontsentratsioonides mõjuda ka mitmed herbitsiidid, levinum nendest on maleiinhappehüdrasiid.

1951. aastal tuvastati MH klastogeenne toime ja seetõttu leiab ta mutageenina kasutamist sordiaretuses. Tähtis on ka küsimus MH klastogeensest toimest.

Organismi tasemel toimub mõjuainetega regulatsioon väga keeruliselt, tuleb arvestada rakkude, kudede ja ka organitevahelisi seoseid. Sobivaks mudelsüsteemiks, mille najal saab uurida kasvuregulaatorainete ja mutageenide toimet, on taimsed koekultuurid.

Käesoleva töö ülesandeks oli tutvuda kirjandusega, mis käsitleb mõningaid regulaatoraineid (indool-3-äädikhapet, kinetiini ja 6-bensüülaminopuriini) ja herbitsiid maleiinhappehüdrasiidi. Töö eksperimentaalses osas uuriti ülalmainitud ühendite mõju aednelgi ja koeratubaka meristeeskultuuride kasvule ja arengule ning karüoloogilisele ja histoloogilisele ehitusele.

Olen väga tänulik oma juhendajale, dotsent Henni Kallakule kasulike nõuannete ja märkuste eest kirjanduse ülevaate koostamisel ning töö tulemuste analüüsil. Tänan ka nooremteadur Maere Reidlat ja insener Anu Kõiveeri praktiliste nõuannete eest katsete läbiviimisel.

I KIRJANDUSE ÜLEVAADE

1. Regulaatorainete mõjust in vitro

Taimede morfogeneesi määravad mitmed tegurid. Tähtis osa kuulub regulaatorainetele.

Tänapäevaks on teada viis regulaatorainete rühma: auksiinid, tsütokiniinid, giberelliinid, abtsissiinid ja etüleen (kaks viimast on inhibiitorid). Käesolevas töös leiavad lähemat käsitlust auksiinidest indool-3-äädikhape (IAA) ja tsütokiniinidest 6-bensüülaminopuriin (BAP) ning 6-furfüülmetüülaminopuriin (kinetiin), sest neid regulaatoraineid kasutati katsete läbiviimisel.

Mitmed autorid kinnitavad, et kasvustimulaatorite kasutamisel väheneb stabiilse kariotüübiga rakkude arv (Кунах, Алпатова, 1978). Haplopappus gracilis kalluskultuuris kahanes kasvuregulaatoritega söötmel diploidsete rakkude arv 20%-ni, 70% osutus tetraploidseteks. Kasvuregulaatoreid pidasid njetatud teadlased miksoploidsuse peamiseks põhjustajaks. Mõju peab olema suunatud olulistele protsessidele mis muudavad raku põhiainevahetust (Кулаева, 1985).

1.1. Indool-3-äädikhappe mõjust

Esimeste eksogeensete kasvuregulaatorainetena võeti ka-

sutusele auksiinid . Juba 1926. aastal sooritas hollandlane Went vastavad katsed, mille tulemused jäid aga 1950. aastani unustusse(Overbeek,1966).IAA on peamine auksiin, mida leidub kasvavates kudedes väikestes kogustes na-tiivsel kujul.

Kõige enam on in vitro uuritud IAA mõju juurte moodustumisele. Katsed näitavad IAA soodsa mõju võsu-regeneraatide juurdumisele(Skoog,Miller,1957;Gorst et al., 1981;Slaytor,1981;Полевой,1981).Gorsti ja kaasautorite and-meil(1981) näiteks kasvasid auksiine mittesisaldaval söötmel üksikud pikkade juurtega Eucalyptus ficifolia regeneraadid. Auksiini lisandiga söötmel asuvatel tai-medel oli palju lühikesi juuri ning soodustus juure-karvade teke. IAA võib indutseerida juuri kogu võsu ulatuses(Полевой,1981).

Võsude moodustumine inhibeerub auksiinide juu-resolekul(Tanimoto, Harada,1984;Siziraki,Maroti,1971).Pärssiva toime intensiivsus sõltub mõjuaine kontsentratsioonist. Auksiinide transpordi häired võivad soodustada võsumist ning tekitada anomaalseid regeneraate.In vitro on sel-list anomaaliat kirjeldanud aednelgil Dianthus carvopyl-lus, Gersani(Gersani et al.,1986).Regeneraatidel puudusid juured,lehed olid kitsad ja klaasja välimusega,värred ebataavaliselt lühikesed.Autorid põhjendasid ülalmainitud anomaaliaid häiretega kasvuregulaatorite transpordis.Auk-siinid liiguvad võrsetipust juurestiku suunas mööda floeemi rakke kiirusega $5-15^{mm}/h$ ning ainult erandjuh-tudel võib transport toimuda vastupidises suunas.

Auksiinide transport ja taimekudede diferentseerumine on põhjuslikus seoses. IAA mõjutab juhtkoe moodustumist, seejuures esineb koostoime IAA ja sahharoosi vahel (Полевой, 1981; Бутенко, 1974). Katsetes 1,5%-2,5%-se sahharoosi lahusega tekkis ksüleem, 3-4% lahus soodustas floemi moodustumist, 2,5-3,5% lahus auksiini lisandiga tekitas nii floemi kui ksüleemi ning keskele kujunes kambium.

Gersani on juhtinud tähelepanu mitmetele anomaaliatele ka regeneraatide histoloogilises ehituses: juhtkoe elemente esines väga vähe, epidermise- ja mesofüllirakud olid silmatorkavalt suurenenud, õhulõhed puudulikult välja arenenud. Gersani mainib tõsiasja, et IAA polaarne transport mitte ainult ei suuna juhtkoe kujunemist, vaid ka sõltub sellest, sest rakukesta läbilaskevõime määrab ära auksiinide liikumise rakust rakku. Anomaalse lehe struktuur on seega nii põhjus kui ka tagajärg polaarsuse häiretele.

Auksiinid mõjutavad rakkude jagunemist, venimist ja diferentseerumist (Overbeek, 1966; Wozni et al., 1972; Nash, Borman, 1973; Gersani et al., Полевой, 1981).

Auksiinide mõju rakkude venimisele põhjendatakse nende otsese või kaudse toimega. (Phyologia, 1986) Otsese teooria kohaselt indutseerib auksiin prootonite sekretsiooni.

ooni, mis mõjutab spetsiifiliste, kasvuks vajalikke polüpeptiide kodeerivate, mRNA-de sünteesi. Kaudsel regulatsioonil mõjustavad need polüpeptiidid geenide avaldumist.

Auksiinide mõjul suureneb ka plasmalemmi läbitavus. Sellele järgneb tsütoplasmas olevate valkude aktiveerumine ja mRNA süntees. Kõik ülalmainitu viib DNA replikatsiooni indutseerimisele. Auksiinid tõstavad seega mitootilist aktiivsust. Katsed on näidanud, et auksiinita söötmel toimub regeneraatide kasv rakkude suurenemise, mitte aga jagunemise teel (Гамбурт, Леонова, Рекославская, 1974). Kasvab ka RNA ja valgu hulk rakkudes (Гамбурт, Ошарова, Кондрашова, 1974). Auksiini manulusel vallandub aktiivne DNA süntees. Katsed Cum bidu miga näitasid et IAA põhjustab valikulist DNA replikatsiooni, mille tagajärjel suureneb A-T rikas DNA fraktsioon (Nagl, 1976).

Ühe ja sama liigi piires on täheldatud erinevat vastusreaktsiooni kasvuregulaatori toimele. Porgandi Daucus carota võsuregeneraatide kasvatamisel IAA-d sisaldaval söötmel saadi näiteks erineva roheline värvusega võsuregeneraadid (Çaplin, 1965).

Kõrgematel kontsentratsioonidel võivad auksiinid toimida inhibiitoritena ja isegi toksiinidena (Булатов, 1987). Wozny ja kaasautorite andmetel (1972) inhibeerub kõrgetel IAA kontsentratsioonidel

del tülakoidide areng ning protoplastid arenevad amüloplastideks. Samal ajal pärssub organogeneesi ning tekitab kallus.

Katsetes sibulal Allium cepa juurregeneraatidega on täheldatud, et IAA kaitseb röntgenikiirte mõju eest, sest ta aktiveerib reparatsioonisüsteemi (Mandal, Basu, 1976).

1.2. Kinetiini ja BAP-i mõju

Üks esimesi puhtal kujul saadud tsütokiniine oli kinetiin, mille F. Skoog eraldas 1955. aastal (Полево́й, 1981). Tänapäevaks on sünteesitud mitmeid tsütokiniine, mis aktiivsusest ületavad kinetiini. Niisugune ühend on ka BAP (6-bensüülaminopuriin). Põhiliselt on tsütokiniinid adeniini derivaadid, millel kuuendas positsioonis asetseb erinev külghela. Külghela pikkus ja küllastamatus määrab ära tsütokiniini aktiivsuse.

Tsütokiniinid indutseerivad rakujagunemist (Skoog, Miller, 1957) (Overbeek, 1966; Szweykowska, 1976; Полевой, 1981), Кунах, Зосимович, 1977).

On leitud, et in vitro intensiivistab kinetiin kõikide RNA-de ja valgu sünteesi ning takistab sünteesitud valgu lagunemist (Кулаева, 1985).

Tsütokiniinid moodustavad tsütoplasmaatilise retseptoriga hormoon-retseptor kompleksi, mis kan-

dub tuuma ja indutseerib RNA polümeraaside tööd. Sünteesitakse kindlad RNA-d ja neile vastavad valgud, mis toimivad raku metabolismile. Igale tsütokiniinile vastab mitu erisugust retseptorit, see on kooskõlas erinevate metaboolsete reaktsioonidega. Erinevate retseptorite olemasolu seletab ära regulaatorainete polüfunktsionaalsuse.

Tsütokiniinid mõjuvad ka rakkude diferentseerumisele (Overbeek, 1966; Szweykowska, 1976; Полевой, 1981).

Nad indutseerivad plastiidides tülakoidide ja graanide teket. Szweykowska andmetel (1976) tekivad kinetiini toimetel protoplastidest ja BAP toimetel amüloplastidest kloroplastid.

Tsütokiniinid modifitseerivad teiste hormoonide mõju (Overbeek, 1966; Szweykowska, 1976; Полевой, 1981; Кулаева, 1985). Kinetiin moodustab teiste ainete suhtes külgetõmbe- ja atraktsioonitsentreid. Sellisel teel koguneb rakku mitmesuguseid aineid (ka aminohappeid ja auksiine). Arvatakse, et tsütokiniinid võivad muuta rakumembraani läbitavust (Szweykowska, 1985).

Eksogeensete tsütokiniinide vajadus erineb taimeliigiti, kusjuures esineb ka hormoon-sõltumatust. Katsetes kinetiiniga on näidatud, et kaheidulehelised sõltuvad tsütokiniinidest rohkem kui üheidulehelised (Полевой, 1981).

Mõjutamise efektiivsus sõltub mitte ainult sobivast kontsentratsioonist, vaid ka mõjutamise kestvusest (Полевой, 1981). Kinetiini kõrged kontsentratsi-

oonid võivad osutada mutageenideks(Кунах, Зосимович, 1977). Katsetes Haplopappus gracilise kallusega suurendas kinetiin(3mg/l) aberratiivsete kromosoomidega anafaaside hulka 8,2%-lt 35,8%-le. Tekkis palju kromosoomifragmentidega rakke. Kinetiin indutseeris jagunema polüploidseid rakke, mis tavaliselt ei pooldu ja kus võis olla kahjustatud kromosoome.

Phaseolus vulgaris võsuregeneraatidel tekkisid kõrge kinetiini kontsentratsiooni mõjul paksenenud lehed(Bosselaers, 1983). Anomaaliaid esines ka lehe histoloogilises ehituses: intratsellulaarne ruum vähenes, õhulõhed ei sulgunud nii tihedalt kui kinetiinita söötme regeneraatidel. Kõik ülalmainitud anomaaliad ei takistanud CO_2 diffusiooni, kuid õhulõhede puudulik suletus põhjustas liigset veekaotust.

Tsütokiniinide ja auksiinide omavaheline suhe määrab kindlaks morfogeneesi suuna. Koekultuuri tingimustes soodustavad eksogeensed tsütokiniinid võsude regenereerumist ning inhibeerivad juurdumist (Skoog, Miller, 1957; Overbeek, 1966; Szweykowska, 1976; Tanimoto, Harada, 1984; Полевой, 1981). Tsütokiniinid soodustavad nii tipu kui ka külgpungade kasvu. Tugeva tsütokiniinse mõju korral puudub apikaalne domineerimine. Regulaatorainete jaotuse täpset mehhanismi võsus ei teata. Oletatakse, et võsuosade vahel esineb konkurents

sünteesitud tsütokiniinile. Apikaalset domineerimist mõjutab auksiini ja tsütokiniini suhe. Püsival kinetiini kontsentratsioonil kasvas IAA kontsentratsioon suurenedes kalluse moodustumine tubaka Nicotiana tabacum võsuregeneraatidel (Skoog, Miller, 1957).

1.3. Maleiinhappehüdrasiidi mõjust

Maleiinhappehüdrasiidi (MH) kasutatakse herbitsiidina 1950. aastast (Swietlinska, Žuk, 1978). MH on tuntud efektiivse ainenä umbrohutõrjeks, kartuli säilitamiseks ja õitsemise pärssimiseks ning puude külma kindluse suurendamiseks (Гидразид..., 1973).

MH on selektiivse toimega kemikaal. Swietlinska ja Žuki nä andmetel kuulub MH herbitsiidide hulka, mis peaaegu ei kahjusta loomorganisme, kuid avaldavad taimedele toksilist ja mutageenset toimet.

Kihlman (1966) jagas mutageene kahte tüüpi, sõltuvalt rakutsükli perioodist, mille vältel nad mõjuvad:

1) mutageenid, mis avaldavad mõju nii G_1 , kui G_2 perioodil (not-delayed type)

2) mutageenid, mis mõjuvad G_1 ja S perioodil (delayed type)

MH kuulub teise tüüpi.

MH tuntakse efektiivse kromosoome lõhkuva ainenä juba 1951. aastast (Swietlinska, Žuk, 1978). Tä põhjustab

katkemisi kromosoomi kindlates piirkondades, n.n. "kuuma-
des punktides", mis vastavad kromosoomistiku hetero-
kromatiinsele osale (Mc Leish, 1953; Andersson, Kihlman, 1987¹,
Шевченко, 1965). Lobov tõestas katseliselt, et muutunud
anafaaside arv seostub heterokromatiini hulga (Лобов
И др., 1969). Katsed näitasid, et Vicia faba tekitab MH
katkemisi metatsentrilise kromosoomi kindlas osas, IV
segmendis (Schubert et al., 1981). Vastava segmendi viimisel
kromosoomistiku erinevatesse osadesse säilis tema tund-
likkus mutageeni suhtes. Ülalmainitud segment koosneb
kahest heterokromatiinsest piirkonnast. Schuberti katse
kummutas väite, nagu sõltuks MH mõju NOR-i asukohast.
Põhiliselt kuuluvad MH poolt indutseeritud aberratsioonid
isokromatiidsete katkemiste, duplikaatsete ja interkalaar-
sete deletsioonide ning retsiprooksete kromatiidide
translokatsioonide hulka (Heindorff et al., 1984).

Kromatiidsete aberratsioonide teke kromosoo-
mide reduplikatsioonil näitab vastavate muutuste toimu-
mist varases interfaasis (Evans, Scott, 1964). Katsed radio-
aktiivselt märgistatud tümidiiniga näitasid, et kui rakke
mõjutada G_2 perioodil, ilmnesid aberratsioonid teises
mõjutusjärgses mitoosis. Seevastu G_1 ja S perioodil mõju-
tatud rakkudes esinesid juba esimese mitoosis kromatiid-
aberratsioonid. Järelikult toimusid MH poolt indut-
seeritud kromosoomide struktuuri muutused S ja

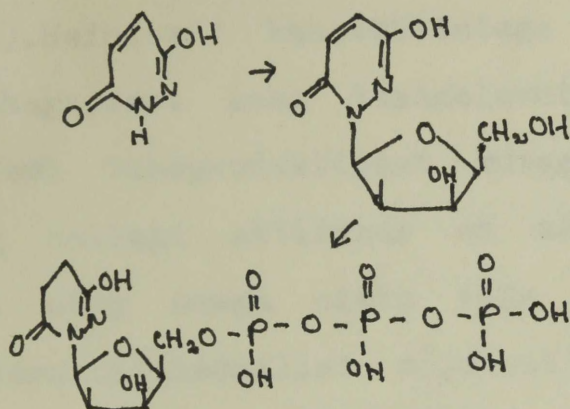
G_1 perioodis. Autorid pidasid selle põhjuseks vigu kromosoomide duplikatsioonil, DNA sünteesi ajal. Ševtšenko arvates mõjutab MH G_1 staadiumis DNA sünteesi eellasi või kromosoome, sest realiseerub mutageeni toime varases interfaasis (Шевченко, 1965). Duplikatsiooni käigus tekivad vastavalt kromatiidsed aberratsioonid.

Katkenud kromatiidid võivad taasühineda (Mc Leish, 1953). Taasühinemine sõltub katkenud pindade suhtelisest asukohast ja nende liikuvusest. Ühinemise võimalikkus seostub kromosoomi immobiliseeritusega: ana-faasis ilmnevad katked liituvad uuesti telofaasis. Mc Leish esitab ka teise, eelmisele vastandliku hüpoteesi, mille kohaselt kromosoomi vähene liikuvus välistab ühinemise.

Mitmete teadlaste andmetel indutseerib MH aberratsioonide viivitusega (Evans, Scott, 1964; Swietlinska, Žuk, 1978). Katsetes Crepis capillaris idujuurtega kasvavas aberratsioonide arv 12 tunni möödudes peale mõjutamist ning saavutas maksimumi 24-36 tunni järel (Шевченко, 1965). Mutageeni kontsentratsiooni suurenemisel saabus maksimum veelgi hiljem.

MH alandab ka mitootilist aktiivsust. Mitootsi inhibitsiooni ja aberratsioonide vahel puudub otsene side (Mc Leish, 1953). Korrelatsioon puudumisel võib oletada, et need realiseeruvad erinevate reaktsioonide tulemusena. Lobovi arvates ühineb MH taime-rakus desoksüriboosiga, mille tagajärjel tekib ano-

maalsete nukleosiidide ja nukleotiidide segu;



Anomaalsete nukleotiidide lülitumisel DNA-ssete te-
kivadki aberratsioonid. Mitootilise aktiivsuse langust
tõlgendas Lobov kui MH ühinemist kromatiinsete val-
kudega, mis reguleerivad mRNA biosünteesi.

MH toimemehhanismi selgitamisel lähtuvad mit-
med teadlased asjaolust, et MH on uratsiili analoog
ja võib teda asendada nukleotiidides (Mc Leish, 1953;
Evans, Scott, 1964; Szewietlinska, Žuk, 1978; Лобов и др., 1969).
Asendatud lämmastikalusega nukleotiid blokeerib DNA
polümeraasi ning DNA replikatsioonikiirus langeb.
Evans ja Scott (1964) tõestasid, et MH-ga mõjuta-
misel pikeneb DNA sünteesi periood ning langeb
mitootiline aktiivsus. Spektrofotomeetria kasutades
ei avastanud Lobov MH ühinemist RNA või DNA-ga
(Лобов и др., 1969). Vastavalt üldmainitule ar-
vavad mõned teadlased, et MH ühineb tuuma valku-
dega (Evans, Scott, 1969; Шерченко, 1965).

Gichneri järgi oleneb mutageensus MH spet-

siifilisest metabolismist taimerakkudes (Gichner et al., 1981). Heindorff kaastöolistega ei nõustu antud seisukohaga, sest seni teadaolevatel andmetel on metabolismi vaheproduktidest mutageenne ainult hüdrasiin ning sellegi aktiivsus on märgatavalt nõrgem kui MH-1 ning seega oleks vaja pikaajalist või kõrgekontsentratsioonilist mõjutust (Heindorff et al., 1984). Gichneri seisukohale räägib vastu ka fakt, et hüdrasiin ja MH mõjutavad erinevaid kromosoomiosi. Heindorfi arvates võib MH-1 olla kaudne mõju raku metabolismi vahendusel. Mõningad ained (katalaas) võivad suurendada MH poolt tekitatud aberratsioonide sagedust.

MH kui mutageeni toime efektiivsus oleneb mitmetest teguritest: temperatuurist, pH-st ja hapniku kontsentratsioonist (Шевченко, 1965). Vicia faba tekitab MH pH 7,3 puhul neli korda vähem katkemisi kui pH 4,7 juures (Kihlman, 1966). Otsene seos MH kontsentratsiooni ja mutageensuse vahel puudub: kõrged kontsentratsioonid võivad põhjustada madalamat mutatsioonisagedust kui madalad kontsentratsioonid (Mc Leish, 1953). Koeratubaka Crepis capillaris kalluskultuuris osutus mutageenne toime maksimaalseks MH kontsentratsioonil $4,5 \cdot 10^{-5} M$ (Kallak, Vapper, 1985). Kontsentratsiooni edasisel tõstmisel $1,4 \cdot 10^{-4} M$ aberratsioonide hulk enam ei kasvanud. Kofeiini ja teiste metüleeritud oksüpurinide juuresolekul aberratsioonisagedus

tõuseb(Swietlinska,Žuk,1978).Kofeiini võimendav toime seostub DNA reparatsiooni inhibeerivate omadustega.Katsetes Vicia faba leiti,et ka DNA sünteesi inhibiitorid suurendavad kromatiidaberratsioonide sagedust(Andersson,Kihlman,1987²).Pärssivat toimet avaldavad MH-le hingamise inhibiitorid(tsüaniid,süsinikoksiid)..

Taimede tundlikkus MH suhtes varieerub liigiti.Arabidopsisel inhibeerivad MH kõrged doosid juurte kasvu,kuid ei tõsta mutatsioonisagedust ega suurenda steriilsust(Gichner et al.,1982).Tradescantial tõstavad samad doosid oluliselt mutatsioonisagedust.Noored taimed on tundlikumad kui vanad(Swietlinska,Žuk,1978).Swietlinska ja Žuki arvates määrab tundlikkuse taimede võime lagundada MH-d.

Kõik ülalmainitu kinnitab,et MH kasutamiseks mutageeninina ja herbitsiidina on avarad võimalused.

I I EKSPERIMENTAALNE OSA

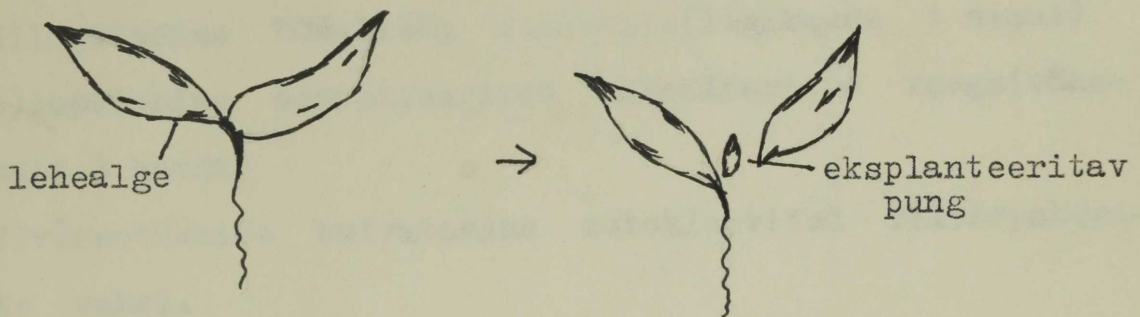
1. Materjal ja metoodika

Katsetes kasutati lähtematerjalina ühe nädala vanuseid koeratubaka (Crepis capillaris) idandeid ja aednelgi (Diantus caruophyllus, sort "Schocking") noori võsused.

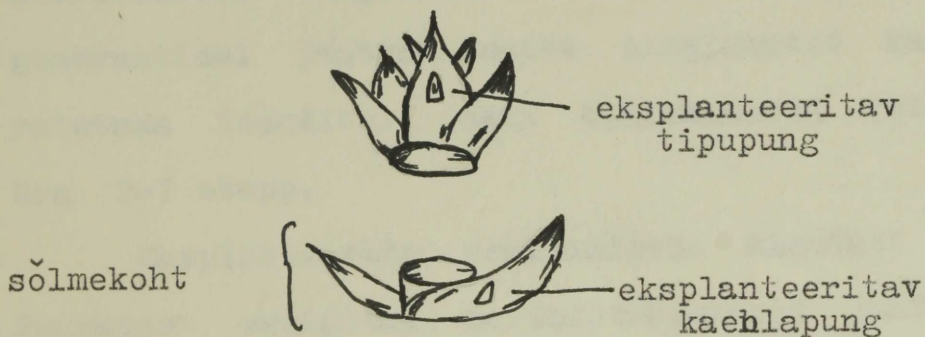
Koeratubaka idandite saamiseks kasutati kahte moodust. Esimese meetodi kohaselt idandati steriilimata seemneid Petri tassil niiskel filterpaberil kahe idulehe staadiumini. Idandeid steriiliti sarnaselt nelgile. Kuna esimene meetod osutus väheefektiivseks, siis teisel menetlusel steriiliti seemneid 8-10%-lises kloramiini lahuses (15 min), hoiti 70%-lises etanoolis (1 min) ning loputati seejärel kolm korda destilläeritud autoklaavitud veega ja tetratsükliini 0,001%-lise lahusega. Selliselt ettevalmistatud seemned külvati koe-kultuuride boksis, steriilsetes tingimustes, tardsöötmele ning kasvatati kahe idulehe staadiumini. Idulehtede vahel paiknev tipupung eksplanteeriti (Joon. 1). Eksplantaadid olid läbimõõduga 0,2-0,4 mm.

Aednelgi kultuuris paljundatud steriilsetelt re-regeneraatidelt ja Järva-Jaani koekultuuride laboratooriumis kasvatatud vegetatiivvõrsetelt eraldati kaen-

la ja tipupungad. Eksplantaadid olid läbimõõduga 0,5-0,6 mm., nõrgalt diferentseerunud lehealgmetega. Koos kasvukihikuga eraldati ka üks või kaks lehealget (joon.2).



Joonis 1. Koeratubaka eksplantaatide päritolu.



Joonis 2. Nelgi eksplantaatide päritolu.

Materjali ettevalmistus:

- 1) nelgi vegetatiivvõrsete tükeldamine 1,5-2,5 cm pikkusteks lõikudeks või juurte eemaldamine koeratubaka tõusmetelt
- 2) pesemine seebivees (ligikaudu 3 minutit)
- 3) loputamine jooksva kraanivee all
- 4) hoidmine 10%-lises kloramiini lahuses (ligikaudu 5 minutit)
- 5) loputamine 70%-lises etanoolis (ligikaudu 1 minut)
- 6) loputamine destilleeritud autoklaavitud veega (vähemalt 3 korda)
- 7) võrsetükkide kuivatamine autoklaavitud filterpaberite vahel.

Neli viimast etappi, samuti eksplantaatide eraldamine ja kasvamapanek viidi läbi keekultuuride boksis, steriilsetes tingimustes. Kultuuris paljundatud nelgiregeneraatidel ja steriilsetes tingimustes kasvatatud keeratubaka idanditel jäeti ülalmainitud ettevalmistuses ära 2-7 etapp.

Eksplantaatide eraldamiseks kasutati binokulaari. Pungadest eraldatud meristeamkoetükid pandi kasvama Murashige-Skoogi tardsöötmele. Mineraalelementidele oli lisatud vitamiine (B_1 (1 mg/l), B_6 (1 mg/l), PP (1 mg/l), kaseiin-hüdrolüsaati (500 mg/l), mesoinosiiti (100 mg/l), sahharoosi (2%) ja agarit (0,7%). Auksiinidena lisati söötmele indool-3-äädikhapet (IAA), naftüül-1-äädikhapet (NAA), maleiinhappehüdraasiidi (MH), tsütokiniinidena kinetiini (6-furfüülme-

tüülamino-puriini, kin) ja 6-bensüülamino-puriini (BAP). Katsevariandid on esitatud tabelis 1.

Tabel 1. Katsevariandid

Söötmevarianti nr.	Auksiin (μM)	Tsütokiniin (μM)	Korduste arv nelgil	Korduste arv koera-tubakal
1.	-	-	2	2
2.	-	BAP 4,45	2	1
3.	IAA 6	BAP 4,45 kin 4,65	2	-
4.	NAA 0,5	BAP 2,54	2	-
5.	NAA 5	BAP 4,45 kin 4,65	-	2
6.	MH 4,45	-	2	7
7.	MH 4,45	kin 4,65	2	-
8.	MH 8,9	-	2	7
9.	MH 8,9	kin 4,65	2	-
10.	MH 13,35	-	2	3
11.	MH 13,35	kin 4,65	2	1
12.	MH 17,8	-	2	3
13.	MH 17,8	kin 4,65	2	-
14.	MH 22,25	-	2	-
15.	MH 22,25	kin 4,65	2	-

Kõikides variantides valmistati söödet 20 katseklaasi jaoks, arvestades, et igas katseklaasis kasvab üks eksplantaat 10 ml. süütmel. Söödet steriilitsi autoklaavis rõhul 1 atm. poole tunni vältel. Kultuure kas-

2. Töö tulemused

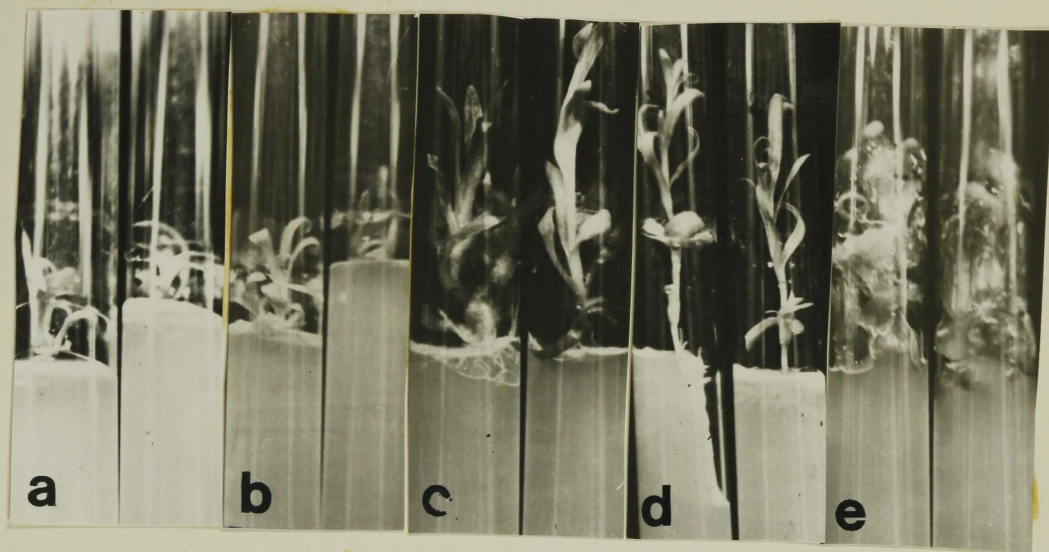
2.1. Regulaatorainete mõju nelgi meristeemkultuutidele

Aednelgi sordi "Schocking" meristeemkultuure kasvatati erinevate regulaatorainete sisaldusega söötmetel.

Regulaatorainete mõju iseloomustamiseks viidi läbi regeneraatide visuaalseid vaatlusi, mis toimusid kuuajalise intervalliga 2-3 kuu jooksul. Toimeainete mõju hindamisel võeti aluseks võsused, juuri ja kallust moodustanud kultuuride hulk ning visuaalselt jälgitavad hälbed normaalsest morfogeneesist. Vaatluste tulemused on esitatud joonistel 3-5 ja tabelina lisas (lisa 1).

Katsete tulemused näitasid, et nelgi meristeemkultuuride kasv ja areng sõltuvad regulaatorainete sisaldusest söötmes. Katsetes kasutati 14-t, regulaatorainete sisalduselt erinevat söötmevarianti. Kõigis variantides sooritati katsed kahes korduses (tabel 1).

Visuaalsed vaatlused näitasid, et esimesed rohelised lehekesed ilmusid eksplantaatidel nende teisel arengunädalal. Esimesel neljal arengunädalal kasvasid eksplantaadid kiiresti, edasi kasv aeglustus. Teise kuu lõpuks ilmnesisid regeneraatide kõrguses selged erinevused, sõltuvalt söötmevariandist (joon. 3, 4, lisa 1).



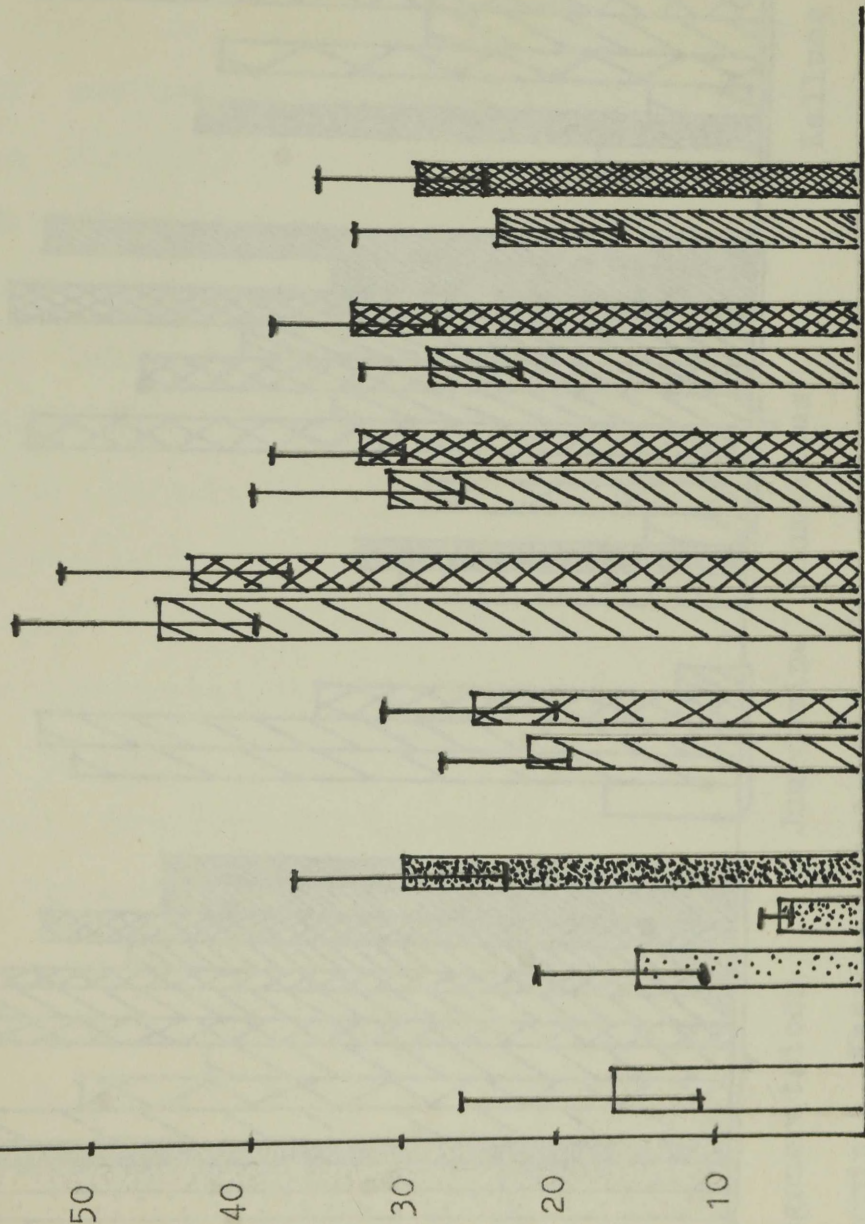
Joonis 3. Aednelgi regeneraadid 60.päeval pärast meristeemi eksplanteerimist erinevatel söötmetel:

- a) ilma regulaatoraineteta sööde
- b) BAP(4,45 M)
- c) MH(8,9 M)
- d) MH(13,35 M)
- e) MH(13,35 M), kin(4,65 M).

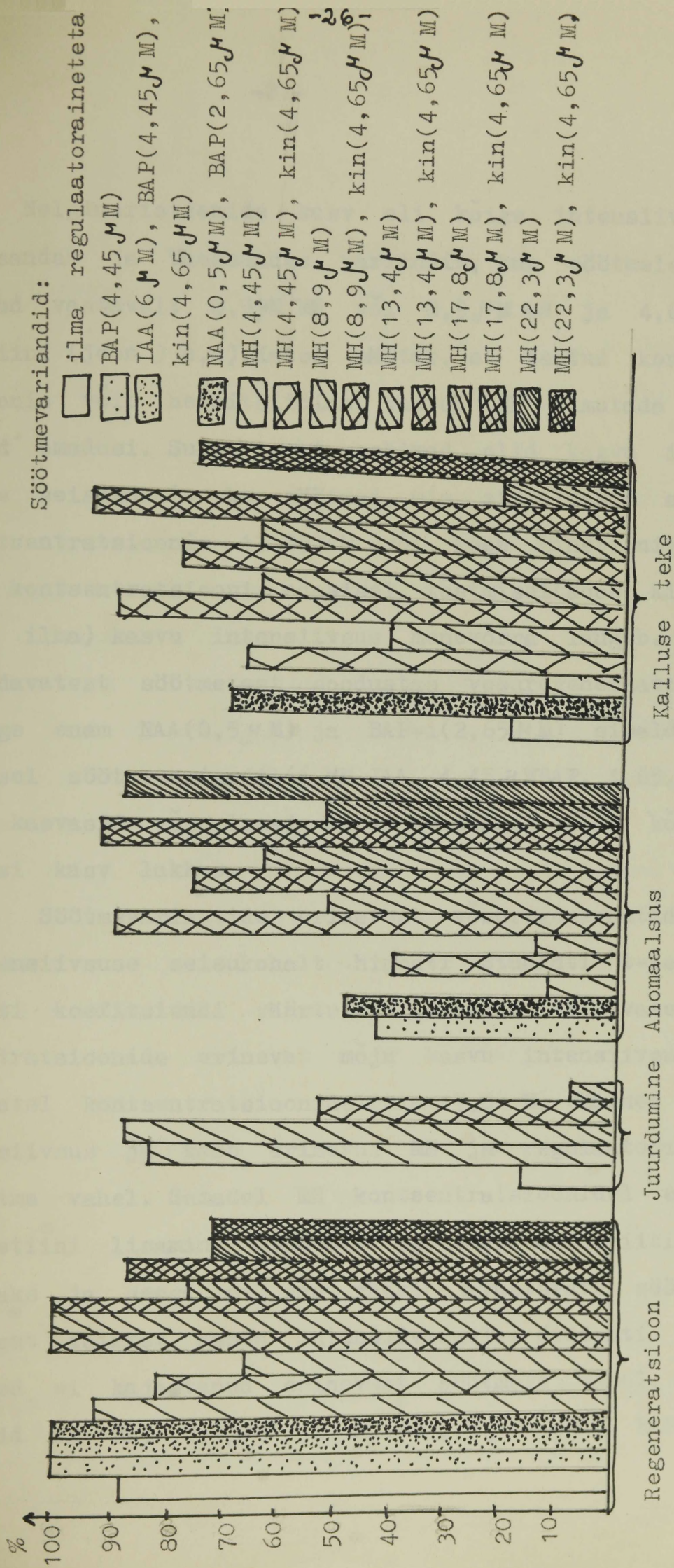
võsude kõrgus(mm)

Söötmevariandid:

-  ilma regulaatoraineteta
-  BAP(4,45 μ M)
-  IAA(6 μ M), BAP(4,45 μ M), kin(4,65 μ M)
-  NAA(0,5 μ M), BAP(2,65 μ M)
-  MH(4,45 μ M)
-  MH(4,45 μ M), kin(4,65 μ M)
-  MH(8,9 μ M)
-  MH(8,9 μ M), kin(4,65 μ M)
-  MH(13,4 μ M)
-  MH(13,4 μ M), kin(4,65 μ M)
-  MH(17,8 μ M)
-  MH(17,8 μ M), kin(4,65 μ M)
-  MH(22,3 μ M)
-  MH(22,3 μ M), kin(4,65 μ M).



Joonis 4. Nelgi võsuregeneraaside keskmised kõrgused 60. päeval pärast meristeemi eksplanteerimist.



Joonis 5. Kasvuregulaatorite mõju morfogeneesile aednelgi "Schocking" meristeemkultuurides.

Nelgimeristeemide kasv oli kõige intensiivsem kaheksandas ja üheksandas variandis, kus söötmele oli lisatud vastavalt $8,9\mu\text{M}$ MH või $8,9\mu\text{M}$ MH ja $4,65\text{ M}$ kinetiini (joon 3 c,d). Katse näitab, et teatud kontsentratsioonis võib herbitsiidina tuntud MH ilmutada auksii n-seid omadusi. Suhteliselt sobivad olid kasvu intensiivsuse seisukohalt ka söötmed, mis sisaldasid ainult MH kontsentratsioon $13,35\mu\text{M}$ või koos kinetiiniga ($4,65\mu\text{M}$). MH kontsentratsiooni edasisel tõstmisel (koos kinetiiniga või ilma) kasvu intensiivsus mõnevõrra langeb. BAP-i sisaldavatest söötmetest soodustas võsuregeneraatide kasvu kõige enam NAA ($0,5\mu\text{M}$) ja BAP-i ($2,65\mu\text{M}$) sisaldav sööde. Teisel söötmevariandil ($6\mu\text{M}$ IAA, $4,45\mu\text{M}$ BAP, $4,65\mu\text{M}$ kinetiini) kasvasid võsualgmed kahe nädalaga 3-5mm kõrguseks, edasi kasv lakkas.

Söötmevariantide erinevust võsuregeneraatide kasvu intensiivsuse seisukohalt hinnati Studenti t-testiga. Studenti koefitsiendi väärtused näitasid erinevate MH kontsentratsioonide erinevat mõju kasvu intensiivsusele. Kõrgematel kontsentratsioonidel (üle $17,8\text{ M}$) väheneb kasvuintensiivsus ja kaob erinevus MH ja regulaatoraineteta söötme vahel. Samadel MH kontsentratsioonidel ei muuda kinetiini lisamine Studenti t_d väärtust kriitilisest suuremaks ja seega ei saa rääkida vastavate söötmete erinevast toimest kasvu intensiivsusele. Studenti t_d väärtused ei kajastanud erinevust söötmete vahel, mis sisaldasid MH üle $8,9\mu\text{M}$ ja NAA-d $0,5\mu\text{M}$ ning BAP-i $2,65\mu\text{M}$.

Kõigil kasutatud söötmevariantidel hakkasid meristeemkultuuridest arenema võsud, ehkki erineva sagedusega (joon 5, lisa 1). Kõige efektiivsemalt(100%) toimus võsude regenereerumine söötmetel, mis sisaldasid BAP-i(variandi 2-4) või madalamates kontsentratsioonides(8,9-13,4 μ M) MH (variandid 9-11). Suhteliselt vähem(70%) võsusi regenereerus eksplantaatidest, mis olid kasvanud MH kõrgema kontsentratsiooniga(17,8-22,3 μ M) söötmetel. Kinetiini lisamine ei mõjutanud märgatavalt MH toimet võsude kasvule, välja arvatud söötmevariant nr.8(nr.-ga 9 võrreldes).

Meristeemkultuuride arengu erinevused ilmsid veelgi selgemalt, kui jälgiti ka võsude juurdumist,kalluse teket ja võsude morfoloogiat(joon. 5)..

Nelgi meristeemeksplantaatidest regenereerunud võsude morfoloogias võis täheldada mitmesuguseid anomaaliaid(joon. 3e). Anomaalseid taimi iseloomustas tipmise domineerimise puudumine, lühenenud sõlmevahed ning lihakad klaasja välimusega lehed. Ülalmainitud regeneraatidel esines ühtlasi rohkesti kallust. Meristeemkultuurisel esines ka geotropismi häireid- võsu või selle haru kasvas söötmesse ja juured ülespoole.

Erinevatel söötmetel moodustus anomaalseid regeneraate erineval hulgal. Regulaatoraineteta ning IAA-d(6 μ M), BAP-i(4,45 μ M) ja kinetiini(4,65 μ M) sisaldaval söötmel arenesid valdavalt normaalsed regeneraadid. Hulgaliselt (üle 50%) anomaalseid võsusi arenes söötmetel, mis si-

saldasid 13,4-22,3 μ M MH-d või 13,4-22,3 μ M MH-d ja 4,65 μ M kinetiini. Kinetiini lisamisel MH-ga söötmele kasvas anomaalsete regeneraatide hulk.

Juurdunud võsude hulk oli suurim (üle 85%) söötmetel, mis sisaldasid 4,45 μ M MH-d või 8,9 μ M MH-d, üle 50% juurdunud võsusid regenereerus 8,9 μ M MH ja 4,65 μ M kinetiini lisandiga söötmel. Üksikud juured tekkisid regulaatoraineteta söötmel kasvanud ja 13,35 μ M ^{MH} sisaldusega söötmel regenereerunud võsudel.

Mitmete söötmevariandi regeneraatidel tekkis hele-roheline kallus, mis vananedes muutus tumeroheliseks või pruunikaks. Võsude regeneratsiooni kallusest ei träheldatud, kallus moodustus juba regenereerunud võsude alusel. Kõige rohkem (100%) kallusega võsusid regenereerus 13-s söötmevariandis, mis sisaldas 17,9 μ M MH'd. Paljud (üle 70%) võsud moodustasid kalluse ka söötmetel, mis sisaldas NAA ja BAP-i (variant nr. 4) või MH koos kinetiiniga (variantid nr. 7, 9, 11, 15). Katsete tulemused näitasid, et kinetiini lisamisel MH-ga söötmele suurenes kallusega regeneraatide hulk, sõltumata MH kontsentratsioonist.

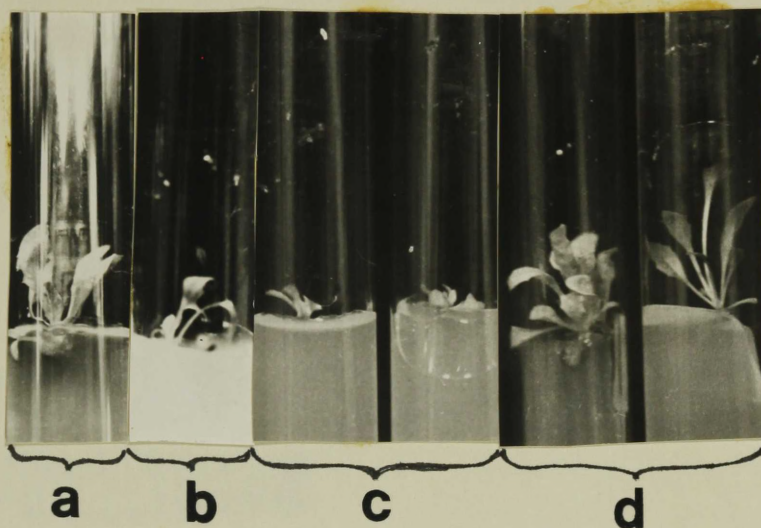
2.2. Regulaatorainete mõju koeratubaka meristeemkultuuridele

Koeratubaka meristeemkultuure kasvatati kaheksal regulaatorainete sisalduselt erineval söötmevariandil (tabel 1).

Katseid sooritati kuni seitsmes korduses. Sarnaselt nelgi meristeemkultuuridele viidi läbi visuaalseid vaatlusi, määrates võsude ilmumise ja kasvu, juurdumise ning kalluse tekke ja anomaalsete regeneraatide hulga. Vaatluste tulemused on esitatud joonistel 6-9 ja tabelina lisas.

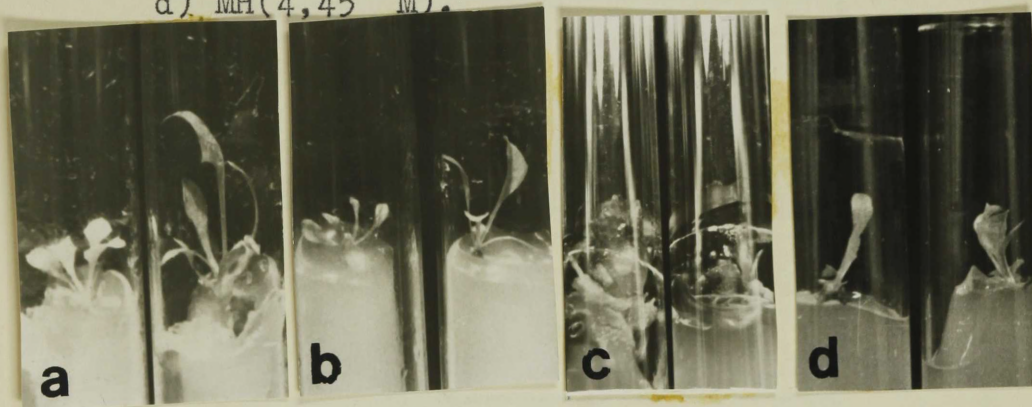
Katsed näitasid, et meristeemeksplantaatide kasvus ja arengus kuulub määrav osa regulaatorainetele. Kõigil söötmevariantidel moodustusid kahe kuu jooksul võsud vähemalt pooltel eksplantaatidest, Kõrgeim regeneratsiooniprotsent (90-100%) saavutati kahel söötmevariandil, mis sisaldasid vastavalt NAA-d ($0,5 \mu\text{M}$), BAP-i ($4,45 \mu\text{M}$) ja kinetiini ($4,65 \mu\text{M}$) või MH-d ($13,35 \mu\text{M}$) ja kinetiini ($4,65 \text{ M}$). Katsed MH sisalduselt erinevate söötmetega näitasid, et MH kontsentratsiooni tõusmisel regeneratsioon mõnevõrra väheneb.

Kasvu intensiivsuse seisukohalt osutusid söötmed, mis sisaldasid MH-d madalamates kontsentratsioonides ($4,45 \mu\text{M}$ või $8,9 \mu\text{M}$) (joon. 6d; joon. 7a). MH kontsentratsiooni edasisel tõstmisel vähenes regeneraatide keskmine kõrgus. Pärssivalt mõjus eksplantaatide kasvule sööde, mis sisal-



Joonis 6. Koeratubaka regeneraadid 60. päeval pärast meristeemi eksplanteerimist erinevatel söötmetel:

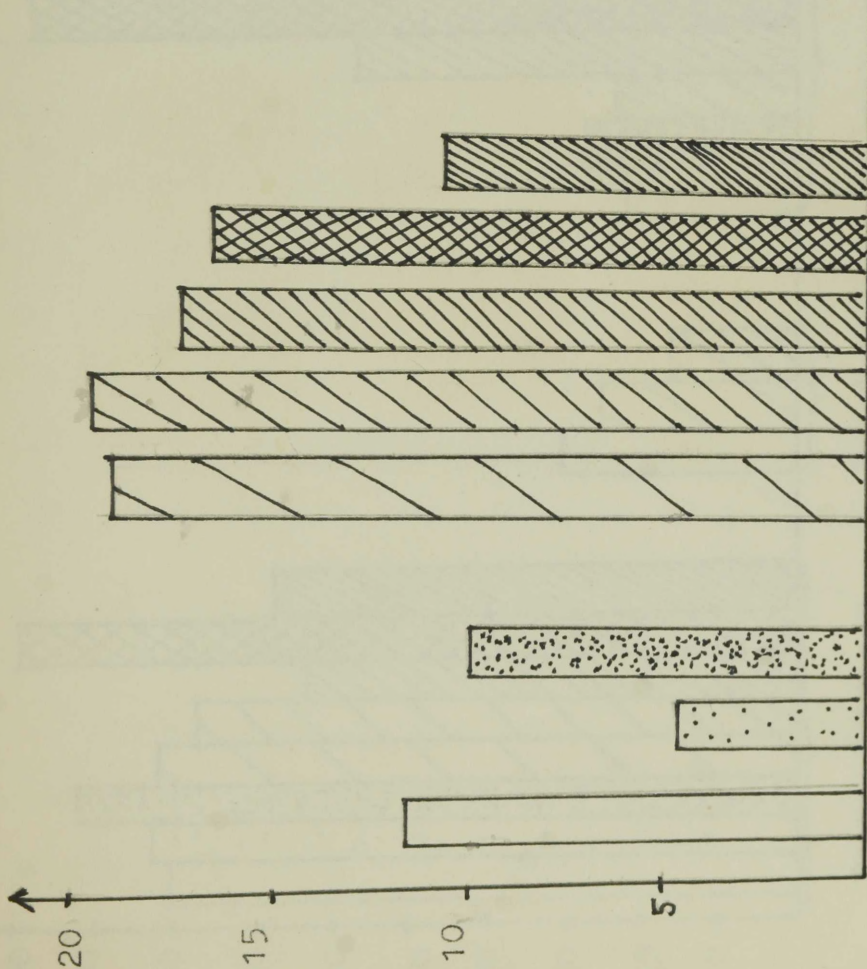
- a) ilma regulaatoraineteta
- b) NAA(5 M), BAP(4,45 M), kin(4,65 M)
- c) BAP(4,45 M)
- d) MH(4,45 M).



Joonis 7. Koeratubaka regeneraadid 60. päeval pärast meristeemi eksplanteerimist erinevatel söötmetel

- a) MH(8,9 M)
- b) MH(13,35 M)
- c) MH(13,35 M), kin(4,65 M)
- d) MH(17,8 M).

võsude kõrgus (mm)



Söötmevariandid:

ilma regulaatoraineteta

BAP(4,45 μM)

NAA(5 μM), BAP(4,45 μM), kin(4,65 μM)

MH(4,45 μM)

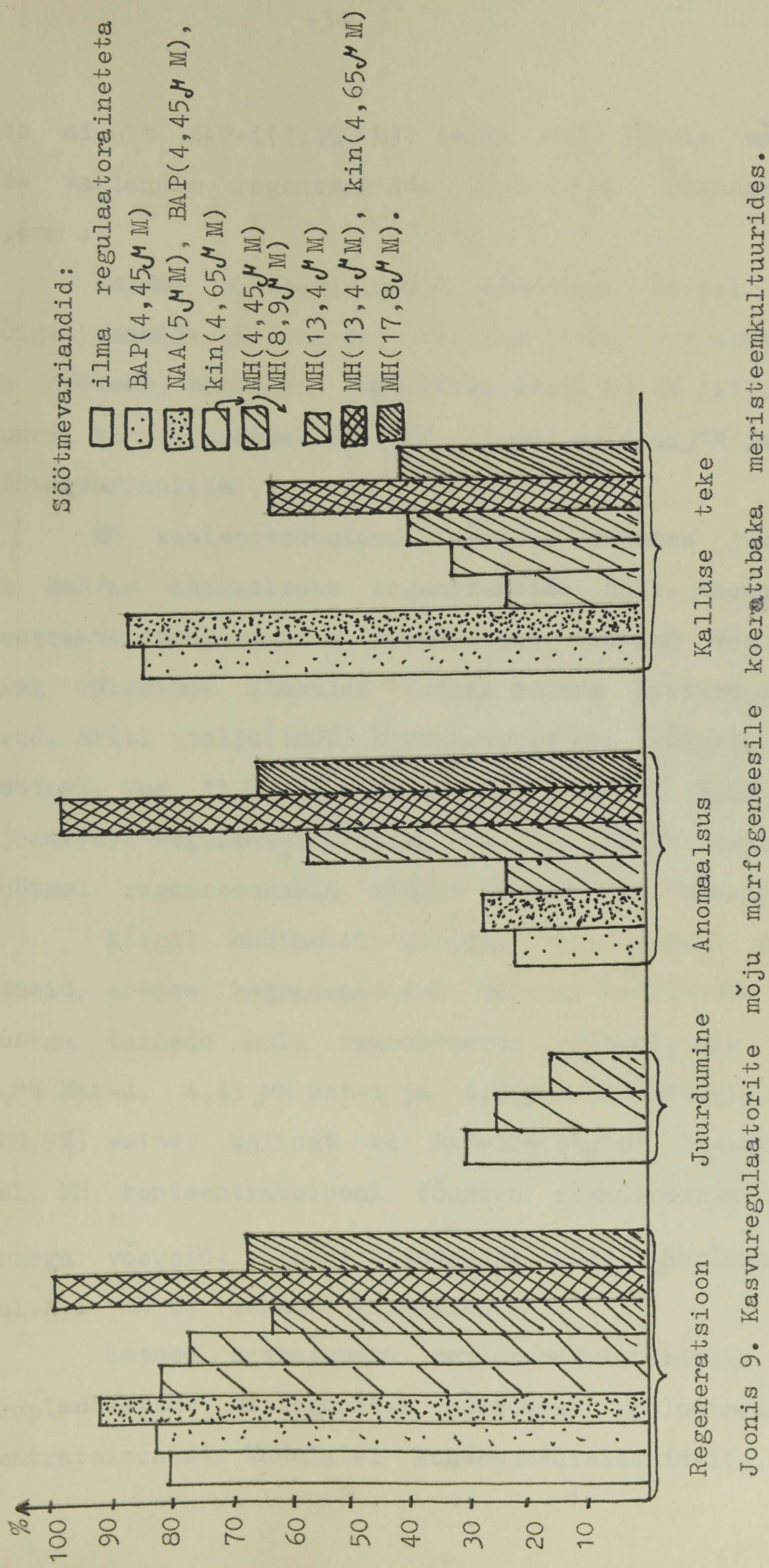
MH(8,9 μM)

MH(13,4 μM)

MH(13,4 μM), kin(4,65 μM)

MH(17,8 μM)

Joonis 8. Koeratubaka võsuregeneraatide keskmised kõrgused 60. päeval pärast meristeemi eksplanteerimist.



Regeneratsioon Juurdumine Anomaalsus Kalluse teke

Joonis 9. Kasvuregulaatorite mõju morfogeneesile koerätubaka meristeenkultuurides.

das ainult BAP-i(4,45 μ M): teise kuu lõpuks mõõdeti selles variandis regeneraatide keskmiseks kõrguseks vaid 4,6mm .

Kolmel söötmevariandil arenesid võsudel juured. Kõige enam(31,5%) juurdus võsusid ilma regulaatoraineteta söötmel, mõnevõrra vähem(vastavalt 27,2% ja 17,3%) tekkis juuri ka regeneraatidel MH lisandiga(4,45 μ M ja 8,9 μ M) söötmevariantidel.

MH kontsentratsiooni tõustes vähenes juurdumine ja kasvas anomaalsete regeneraatide hulk. Anomaalseid regeneraate iseloomustas normaalsest tihedam võsukodarik ning väiksemad klaasjad lehed; esines geotropismi häireid. Eriti palju(100%) kõrvalekalletega võsusid tekkis söötmel, kus 13,3 M-le MH-le oli lisatud 4,65 μ M kinetiini (joon.7c). Regulaatoraineteta ja 4,45 μ M MH sisaldusega söötmel regenereerusid ainult normaalsed võsud(joon.6a,d).

Kõigil söötmetel, millele oli lisatud regulaatoraineid, arenes regeneraatidel kallus. Suurim(üle 90%) kallusega taimede hulk regenereerus söötmel, mis sisaldas 5 μ M NAA-d, 4,45 μ M BAP-i ja 4,65 μ M kinetiini. Hulgaliselt (88,9%) esines kallust ka BAP-i(4,45 μ M) lisandiga söötmel. MH kontsentratsiooni tõustes regenereerus rohkem kallusega võsusid. Sarnast tendentsi võis täheldada ka juhul, kui MH-le lisati kinetiini.

Katsed koeratubaka meristeenkultuuridega näitavad eksplantaatide morfogeneesi sõltuvust regulaatorainete kontsentratsioonist. Madalatel kontsentratsioonidel(4,45 μ M ja

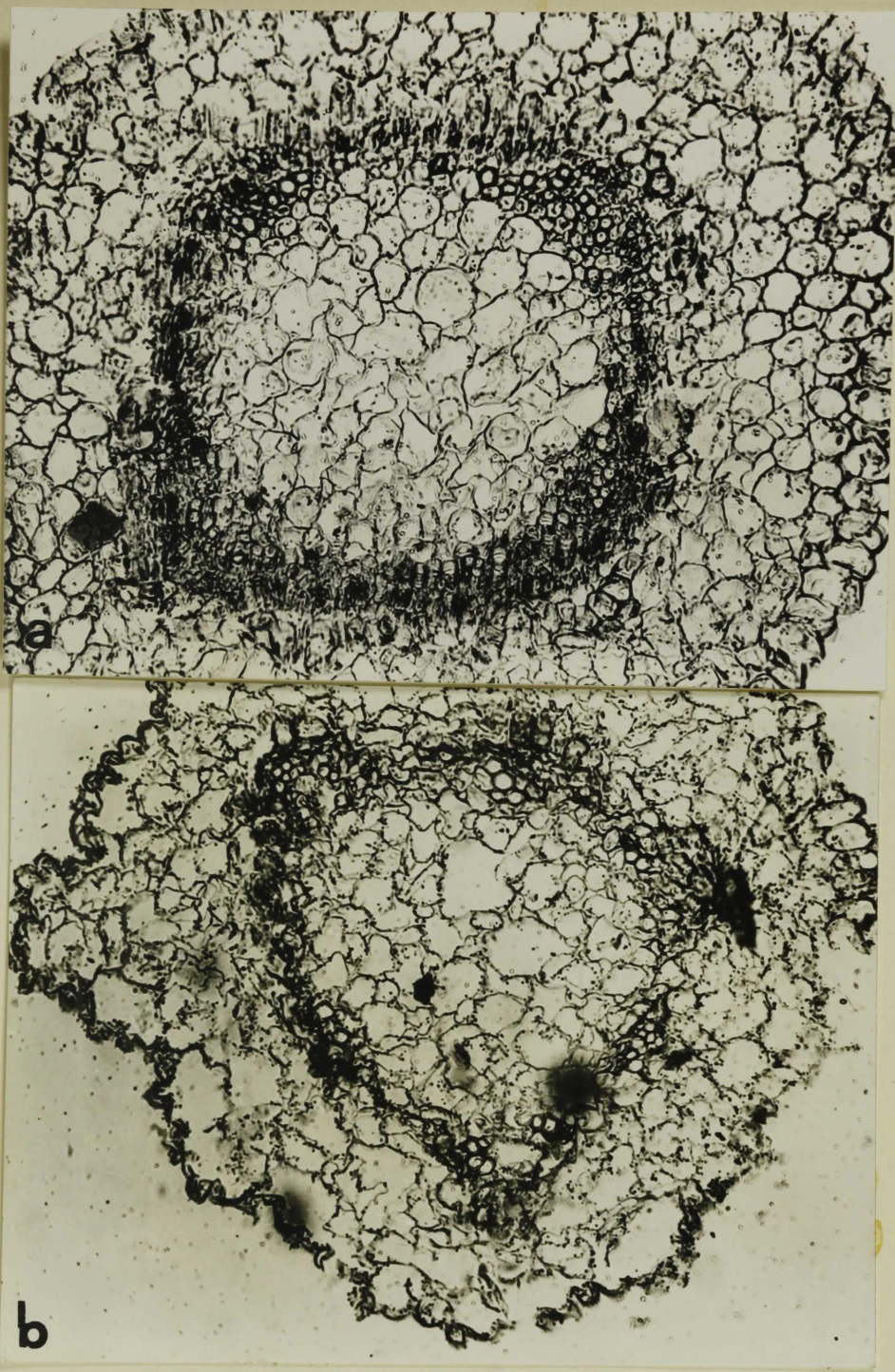
8,9 μ M) võib herbitsiidina tuntud MH toimida auksiinina.

2.3. Regeneraatide karioloogiline ja histoloogiline analüüs

Nelgi anomaalsete regeneraatide histoloogiliseks uurimiseks valmistati 8,9 μ M MH ja 4,65 μ M kinetiini lisandiga söötmel kasvanud kahe kuu vanustest regeneraatidest püsipreparaadid. Püsipreparaatideks fikseeriti varrelõike nii normaalsetelt kui ka anomaalsetelt regeneraatidelt. Anomaalseid regeneraate iseloomustasid tipmise domineerimise puudumine, klaasjad lehed ning lühenenud varred. Histoloogiliselt ei osutunud aga ülalmainitud regeneraadid anomaalseteks. Morfogeneesianomaaliatega regeneraatide vartel olid eristatavad epidermis, esikoor, juhtkimbud ja säsiparenhüüm, mis ei erinenud normaalse lehe vastavatest elementidest (joon. 10 a, b).

Vaadeldi ka MH(8,9 μ M) söötmel kasvanud anomaalsete koeratubaka regeneraatide lehtede histoloogilist ehitust ja võrreldi seda normaalsete regeneraatide lehtede ehitusega. Anomaalsetel regeneraatidel võis täheldada lehtedes väiksemat õhulõhede arvu, kusjuures erinev oli ka õhulõhede väliskuju (joon. 11 a, b). Anomaalsetel regeneraatidel esines ka vähem juhtkoe elemente (joon. 12, joon. 13). Võrrelduna normaalse lehe epidermiserakkudega torkas silma, et anomaalsete lehtede epidermiserakud olid suuremad ja ümaramad.

Püüti selgitada ka 8,9 μ M-17,8 μ M MH-d sisalda-

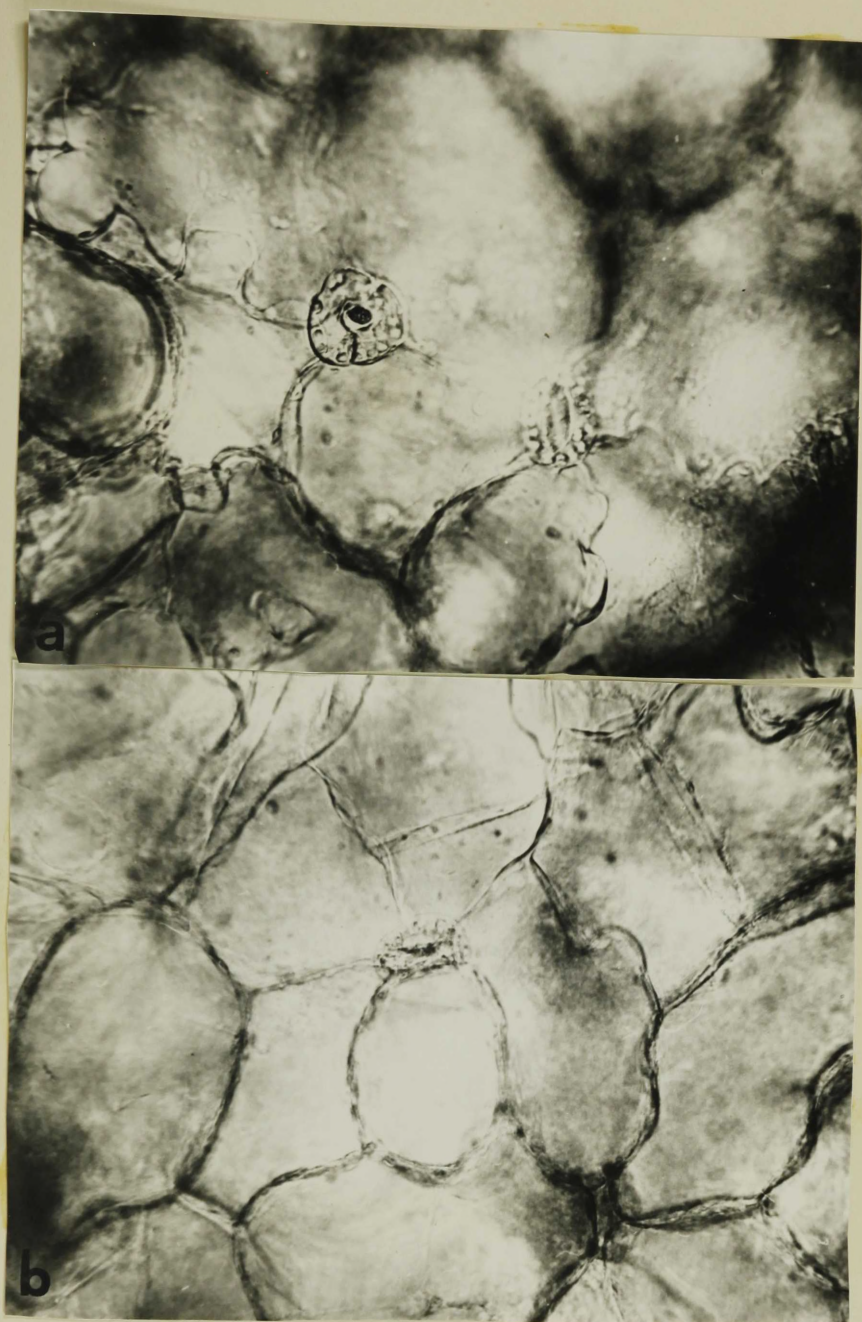


Joonis 10. Ristlõiked MH(8,9 M) ja kinetiini(4,65 M)
sisaldanud söötmel regenereerunud koera-
tubaka vartest

a) normaalselt regeneraadilt

b) anomaalselt regeneraadilt.

Suurendus 200x

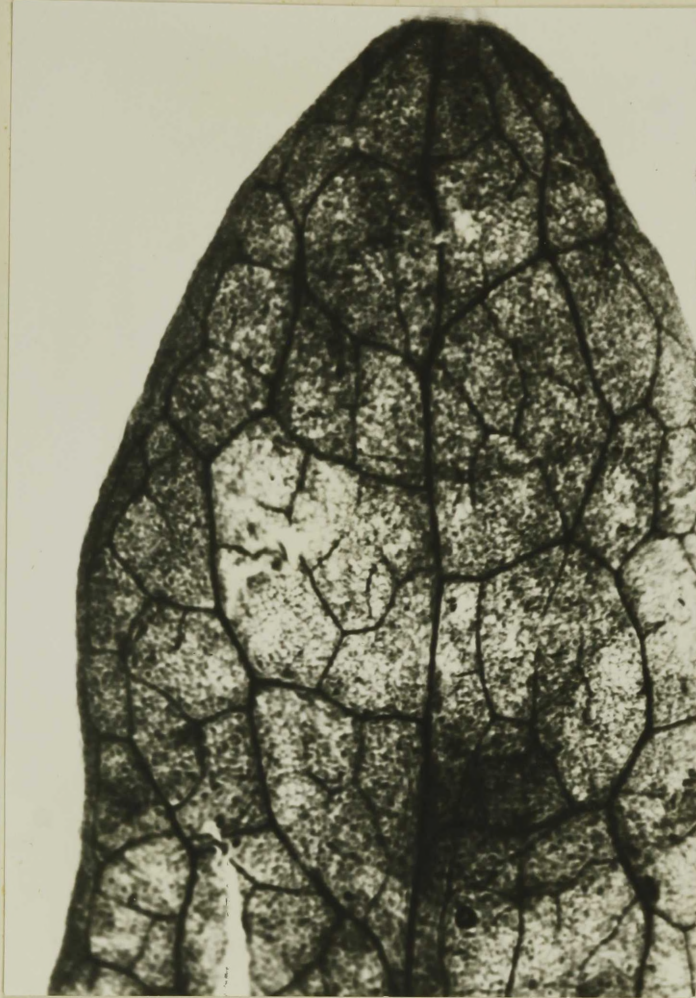


Joonis 11. Regenereerunud koeratubaka lehe epidermi-
se rakud 60. päeval pärast meristeemi
eksplanteerimist

a) normaalse regeneraadi lehest

b) anomaalse regeneraadi lehest.

Suurendus 380 x



Joonis 12. MH(8,9 M) sisaldavalt söötmelt regenereerunud koeratubaka normaalse lehe juhtkude.

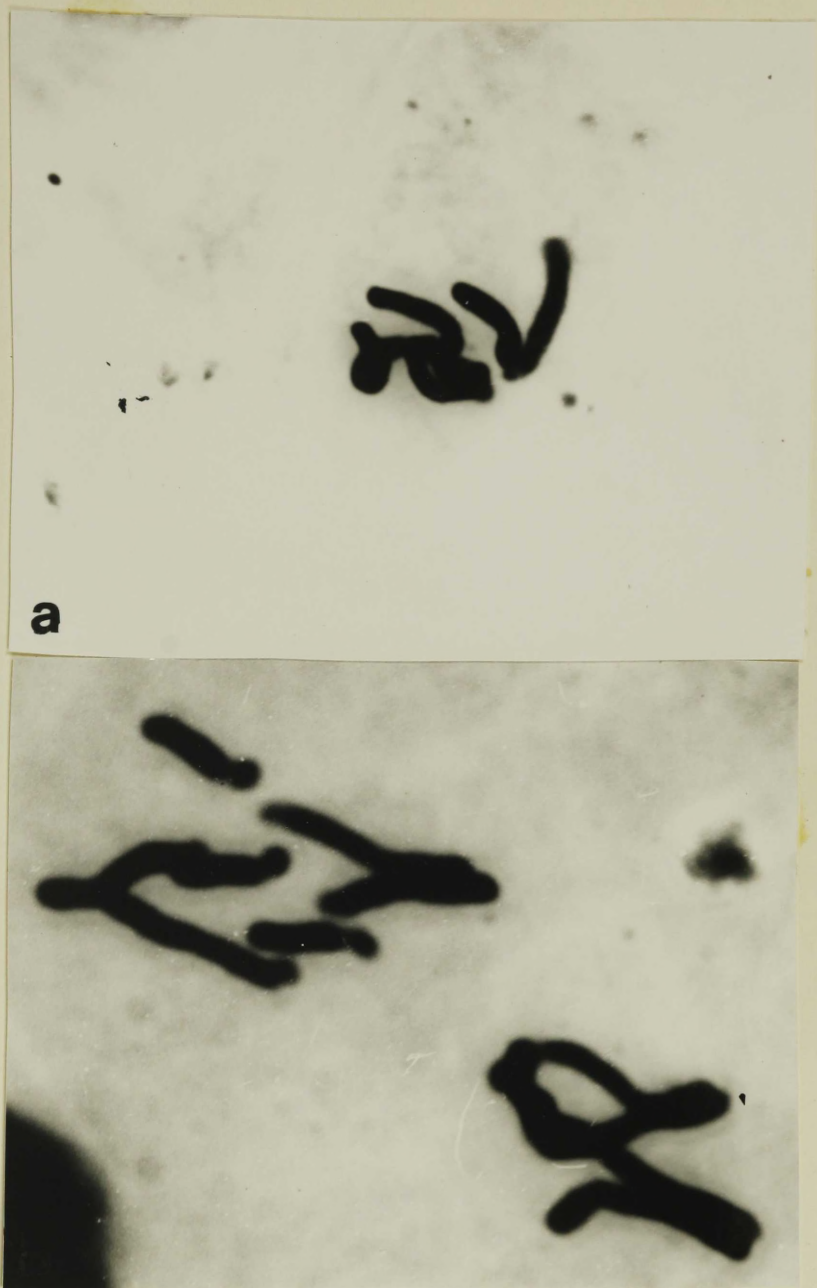
Suurendus 26 x



Joonis 13. MH(8,9 M) sisaldavalt söötmelt regenereerunud koeratubaka anomaalse lehe juhtkude.

Suurendus 26 x

val söötmel kasvanud koeratubaka regeneraatide kariotüüpe. Analüüsiiti kallusrakke. Uuritud materjali hulgas oli vähe mitooset, enamik rakke oli interfaasis. Madalama kontsentratsiooniga ($8,9\mu\text{M}$) MH söötmel arenenud regeneraatidel tuvastati vaid normaalseid, diploidseid, kuue kromosoomiga rakke (joon. 14 a). MH kõrgemad kontsentratsioonid ($17,8\mu\text{M}$) tekitasid üksikuid aberratsioonide regeneraatide kallusrakkudes (joon. 14 b, joon. 15 a, b). Üldiselt jäi ka kõrgemate MH hulkade ($13,4\mu\text{M}$ ja $17,8\mu\text{M}$) puhul aberratsioonisagedus väikeseks.



Joonis 14. a) Koeratubaka normaalse kariotüübiga ($2n=6$)
rakk regeneraadi kallusest
b) tetraploidne ($2n=4x=12$) rakk regeneraadi
kallusest.

Suurendus 2700x



Joonis 15, Jaotushäired ` regenereerunud koeratubaka
kallusrakus

a) mahajäänud kromosoomid telofaasis

b) anomaalne metafasis.

Suurendus 2700x

ARUTELU

Katsete tulemused on üldiselt kooskõlas kirjanduses toodud andmetega, mille kohaselt regulaatorainetel on taimede morfogeneesis oluline osa.

Üldiselt väljakujunenud arusaamade järgi soodustavad auksiinid juurdumist ja võsude kasvu ning tsütokiniinid võsude kaenlapungade arengut. Põhilises osas kinnitavad läbiviidud katsed ülalmainitud seisukohta. Mõjuaineteta söötmel kasvanud regeneraatide suhteliselt intensiivne juurdumine ja võsumine seletub endogeensete regulaatorainete olemasoluga. Ilmselt on pungades eksplanteerimise hetkeks endogeensete regulaatorainete poolt välja kujundatud teatav arengusuund.

BAP-ga söötmevariantidel (variandid 2-5) ilmnes selgesti tsütokiniinide võsumist mõjutav toime. Nende söötmevariantide nelgi ja koeratubaka regeneraadid olid tugevasti harunenud, apikaalne domineerimine oli pärsitud. Esines ka morfogeneesianomaaliatega regeneraate. BAP lisand söötmele välistas apikaalse domineerimise ja tekkisid võsupuhamad.

Meristeemeksplantaatide arengus ilmnevatele morfogeneesianomaaliatele-lühenenud sõlmvahedele, lihakatele ja klaasja välimusega lehtedele ning apikaalse domineerimise puudumisele - on viidanud oma töös ka Gersani

kaasautoritega (Gersani et al., 1986). Nimetatud autorid peavad anomaaliate põhjuseks häireid kasvuregulaatorainete transpordis.

Nelgi meristeemeksplantaatide kasvu pärssumine IAA-d ($6\mu\text{M}$), BAP-i ($4,45\mu\text{M}$) ja kinetiini ($4,65\mu\text{M}$) sisaldaval söötmel näitas, et tähtis on ka regulaatorainete omavaheline suhe.

Et enamikus söötmevariantides sisaldus MH, võimaldas see hinnata MH mitmekesisest osa taimede morfogeneesis. Katsed toetasid seisukohta, mille järgi herbitsiidina tuntud MH toimib madalas kontsentratsioonis auksiini-na. MH ausiinsele toimele osutab asjaolu, et MH madala sisaldusega variantides (koeratubakal $4,45\mu\text{M}$ ja nelgil $8,9\mu\text{M}$) arenesid juurdunud ning intensiivselt kasvavad võsud. Kõrgetes kontsentratsioonides ($17,8\mu\text{M}$ ja $22,3\mu\text{M}$) inhibeerib MH regeneraatide kasvu.

Meristeemkultuuride kasvu ja arengu sõltuvus regulaatorainetest ilmneb eriti selgelt koeratubaka regeneraatidel: MH kontsentratsiooni kasvades vähenesid võsude kasvu intensiivsus ja juurdumine ning suurenes anomaalsete ja kallusega regeneraatide hulk. Nelgi meristeemkultuuridel ei ilmnunud ülalmainitud tendents nii selgesti.

Kinetiini lisamisel MH-d sisaldavale söötmele kasvas anomaalsete ja kallusega nelgiregeneraatide hulk. Ilmselt sisaldavad meristeemeksplantaadid piisavas koguses endogeenseid tsütokiniine ja seega puudub vajadus

neid eksogeenselt lisada. Ka kirjanduse andmeil pärivad kõrged kinetiini kontsentratsioonid apikaalset domineerimist ja tekivad lühenenud sõlmevahedega, tugevalt harunevad regeneraatide puhmad.

Kirjanduse andmeil tekitavad kõrgemad katsetes kasutatud MH kontsentratsioonid kariotüübi anomaaliaid. MH-ga (17,8 μ M) mõjutatud koeratubaka regeneraatide kallusrakkudes esines kromosoomifragmente ja mõningaid jaotushäireid, kuid täheldati, et isegi kõrgete MH kontsentratsioonide puhul säilis regeneraadi kallusrakkudes valdavalt normaalne diplöidne ($2n=6$) kariotüüp, kromosoomi- aberratsioonide esines vähe. Ülal kirjutatu viitab aitemistele reparatsioonisüsteemide olemasolule, mis vähendavad mutagenide kahjulikku toimet regeneraatide kallusrakkudes.

Anomaalsete koeratubaka regeneraatide lehtede histoloogilisel uurimisel tuvastati, et morfogeneesia anomaaliatega lehes oli vähem õhulõhesid ja juhtkudet. Sarnastele hälvetele on viidanud ka Gersani (Gersani et al., 1986).

Regulaatorainete mõju sõltuvust eksplantaadi lähteliigi iseärasustest võimaldas hinnata katsetulemuste võrdlemine koeratubaka ja nelgi meristeemkultuuridel. Katsete tulemused näitasid, et vaadeldavate liikide meristeemkultuurid on eksogeensete regulaatorainete toime suhtes erineva tundlikkusega. Koeratubaka meristeemeksplantaatide kasv pärssus söötmel, mis sisaldas regulaa-

torainetest ainult BAP-i(4,45 μ M), kuid nelgi meriteem-
kultuuridel sellist nähtust ei täheldatud. Koeratubaka
regeneraadid osutasid tundlikumaks ka MH toksilisele
toimele. 17,8 μ M MH-d pärssis tugevalt koeratubaka re-
generaatide kasvu, nelgi meristeemkultuurid kasvasid suh-
teliselt intensiivselt ka 22,3 μ M MH sisaldusega sööt-
mel. Tundlikkus regulaatorainete toimele varieerub ka lii-
gi ja katsekorduse piires: samade mõjuainetega samas
kontsentratsioonis mõjutamisel tekib nii normaalseid
kui ka morfogeneesianomaaliatega võsusi. Erinevused ilm-
nevad ka regeneraatide juurdumises ja võimes moodustada
kallust.

Kokkuvõtteks võib öelda, et taimede morfogeneesi
in vitro mõjutavad nii regeneraatide sisemised kui ka
välised tegurid. Sisemiste tegurite toime määravad ge-
neetilised ja epigeneetilised mõjutused. Geneetiliste
tegurite osas on oluline roll liikide erinevustest
tulenevatel tendentsidel, epigeneetilised tegurid on
määratletud eksogeensete regulaatorainete poolt.

Katsed näitasid regulaatorainete mitmekülgsel
toimet. Soodustades taimede kasvu põhjustasid toimeai-
ned ühtlasi morfogeneesianomaaliate ja kalluse teket
ja intensiivistasid mõningatel juhtudel ka juurdumist.

KOKKUVÕTE

Käesolevas töös püüti selgitada mõnede regulaatorainete(indool-3-äädikhappe, kinetiini ja 6-bensüülaminopuriini) ning auksiinilaadse herbitsiidi, maleiinhappehüd-rasiidi toimet taimede morfogeneesile koekultuuri tingimustes. Nimetatud ühenditega mõjutati koeratubaka(Crepis capillaris) ja aednelgi(Dianthus caryophyllus) "Schocking" meristeenkultuure.

Katsetes kasutati Murashige-Skoogi tardsöödet kolme tüüpi variantidena:

- 1) ilma regulaatoraineteta
- 2) BAP-i sisaldusega(2,65-4,45 μ M)
- 3) MH sisaldusega(4,45 M-22,3 μ M).

Kasvuregulaatorainete mõju ilmes võsused, juuri ja kallust moodustanud regeneraatide hulga ja võsude morfoloogia võrdlemisel. Kasvuregulaatorite mõju erines ka liigiti.

Nelgi meristeenkultuuride kasvatamisel 14-l, regulaatorainete sisalduselt erineval söötmevariandil näitas, et võsuregeneraatide kasvu intensiivsuse ja juurdumise ning normaalsete regeneraatide hulga poolest osutus suhteliselt sobivamaks sööde, mis sisaldas 8,9 μ M MH.

Kõrgematel MH kontsentratsioonidel regenereerus hulgaliselt anomaalseid ja kallusega võsusid. Kõige ebasobivam sööde sisaldas IAA'd(6 μ M), BAP-i(4,45 μ M) ja kinetiini (4,65 μ M).

Koeratubaka meristeemkultuuride kasvatamisel kasutati kaheksat, regulaatorainete sisalduselt erinevat Murashige-Skoogi tardsöödet. Sobivaimaks osutus sööde, millele oli lisatud 4,45 μ M MH. Sellel söötmel regenereerusid normaalsed, intensiivselt kasvavad, juurdunud regeneraadid. BAP(4,45 μ M) lisandiga sööde pärssis regeneraatide kasvu ja tekitas hulgaliselt kallust.

Katsete tulemused kinnitasid üldiselt levinud seisukohta, mille kohaselt MH mõjub madalates kontsentratsioonides auksinina, kõrgemates kontsentratsioonides inhibeerib aga regeneraatide kasvu ja tekitab karüotüübi anomaaliaid. Kõrgete MH kontsentratsioonidega(17,8 μ M) mõjutamisel tekkis kromosoomifragmente ja jaotushäireid.

Anomaalsete võsude siseehituse uurimine püsipreparaatide abil näitas, et nende varre ehitus sarnaneb normaalsete võsude omale, lehtedel esineb aga normaalsest vähem juhtkoelemente ja õhulõhesid ning erineb ka õhulõhede ehitus.

Späid

KASUTATUD KIRJANDUS

Andersson, H. C., Kihlman, B.A. Localization of chemically induced chromosomal aberrations in three different karyotypes of Vicia faba. - "Hereditas", 1987¹, Vol 107, pp. 15-25.

Andersson, H.C., Kihlman, B.A. Effects of G₂ treatments with inhibitors of DNA synthesis and repair on chromosome damage induced by X-rays and chemical caustogens in root tips of Vicia faba. - "Mutation Research", 1987², Vol 181, pp. 173-185.

Bosselaers, J.P. Cytokinin Effects on Leaf Architecture in Phaseolus vulgaris L. - "Journal of Experimental Botany", 1983, Vol 34, No 145., pp. 1007-1017.

Caplin, S.M. Variability of carrots to auxin, casein hydrolysate and coconut milk. - "American Journal of Botany", 1956, Vol 43, No 10., pp. 749-754.

Evans, H. J., Scott, D. Influence of DNA Synthesis on the Production of chromatid Aberrations by X-Rays and Maleic Hydrazide in Vicia faba. - "Genetics", 1964, Vol 49, No. 1., pp. 17-38.

Gersani, M., Leshem, B., Sachs, T. Impaired Polarity in Abnormal Plant Development. - "Y. Plant Physiol.", 1986, Vol. 123, pp. 91-95.

Gichner, T., Veleminsky, J., Pankova, K. Differential Response to Three Alkylating Nitrosocompounds and Three Agricultural Chemicals in the Salmonella(Ames) and in the Tradescantia, Arabidopsis and Barley Mutagenicity Assays.- "Biol. Zbl.", 1982, Vol.101, pp.375-383.

Gorst, J.R., Fossard, R.A., Slaytor, M. The Influence of Auxins and Minerals on Root Morphogenesis of Eucalyptus ficifolia F. Muell in vitro.-IN:International Plant Propagators Society combined proceedings For 1981. Department of Botany, University of New England, Armidale, New South Wales 2351, 1981, Vol.31, pp.286-294.

Heindorff, K., Rieger, R., Veleminsky, I., Gichner, T. A comparative study of the clastogenicity of maleic hydrazide and some of its putative degradation products.- "Mutation Research", 1984, Vol.140, pp.223-226.

Kallak, H.J., Vapper, M.A. Plant tissue culture as a model system for mutagenicity testing of chemicals.- "Mutation Research", 1985, Vol.147, pp.51-57.

Kihlman, B.A. Actions of Chemicals on Dividing cells.-Prentice-Hall, Inc. Englewood Cliffs, New Jersey, 1966, 257p.

Mandal, S.K., Basu, K.K. Cytological Effects of Single and Combined Treatments with X-rays, IAA and GA₃ in Allium cepa.- "Cytologia", 1981, Vol.46, pp.133-139.

Mc Leich, J. The action of maleic hydrazide in Vicia.- "Heredity" (Suppl.), 1953, Vol.6, pp.125-147.

Nagl, W., Rücker, W. Effects of phytohormones on thermal denaturation profiles of Cymbidium DNA: Indication of differential DNA replicatin.- "Nucleic Acids Research", 1976, Vol. 3, No 8., pp. 2033-2039.

Nash, L. J., Borman, C. Uptake and Metabolism of Auxin in in vitro Cultures J. Tobacco Pith Explants.- "Z. Pflanzenphysiol.", 1973, Vol. 70, pp. 46-53.

Overbeek, J. Plant Hormones and Regulators.- "Sciece", 1966, Vol. 157, pp. 721-731.

Schubert, I., Michaelis, A., Rieger, R. Effects of Chromosome Repatterning in Vicia faba L.V. Influence of segment transpositions on maleic maleic hydrazide-specific aberration clusterning in a heterochromation containing chromosome region.- "Biol. Zbl.", 1981, Vol. 100, pp. 167-179.

Skoog, F., Miller, C. O. Chemical Regulation of Grofth and Organ Formation in Tissues Cultured in vitro.- In: Symp. Soc. Exper. Biol., XI The Biol. Action of Growth Substances., 1957, pp. 118-130.

Slaytor, M. The role of plant hormones in higher plant cellular differentiation,- "Histochem. J.", 1981, Vol. 15, pp. 437-445.

Sziraki, I. L., Maroti, M. Regulation of the Growth of Tobacco Tissues with Cytokinin and Auxins.- "Acta Botanica Academiae Scientiarum Hungariae", 1973, Vol. 18, pp. 203-214.

Szweykowska, A. The Role of Cytokinins in the Control of Cell Growth and Differentiation in Culture.- "Tissue Culture and Plant Science", 1976, Vol. 7, pp. 461-472.

Swietlinska, Z., Żuk, I. Cytokinin Effects of Malec Hydrazide.- "Mutation Research", 1978, Vol. 55, pp. 15-30.

Tanimoto, S., Harada, H. Roles of Auxin and Cytokinin in Organogenesis in Torenia Stem Segments Cultured in vitro.- "J. Plant Physiol.", 1984, Vol. 115, pp. 11-18.

Theologis, A. Rapid Gene Regulation by Auxin.- "Plant Physiol.", 1986, Vol. 37, pp. 407-438.

Wozni, A., Gwozdz, E., Szweykowska, A. The Effect of 3-Indolylacetic Acid on the Differentiation of Plastids in Callus Culture of Cichoriumintybus L.- "Protoplasma", 1973, Vol. 76, pp. 109-114.

Булатов, В.А. Гвоздика ремонтантная.- Л.: Агропромиздат. Ленингр. отд.-ние, 1987, 96 с.

Бутенко, О.Н. Гормональная регуляция дифференцировки растительной клетки в культуре.- Сб. статей: Рост и гормональная регуляция жизнедеятельности растений. Иркутск, 1974, ст. 67-85.

Гамбург, А.А., Леонова, М.И., Рекославская, М.Н. Гормональная автономность растительных клеток в изолированной культуре.- Сб. статей: Рост и гормональная регуляция жизнедеятельности растений. Иркутск, 1974, ст. 85-103.

Гамбург, А.А., Ошарова, Н.А., Кондровцова, И.Р. Роль ауксина в регуляции деления клеток.—Сб. статей: Рост и гормональная регуляция жизнедеятельности растений. Иркутск, 1974, ст. 103-141.

Гидрвзид малеиновой кислоты как регулятор роста растений.—Сб. статей/Отв. ред. Ю.В.Ракитин.—М.: Наука, 1973.—275 с.

Кулаева, Ю.Н. Фитогормоны как регуляторы активности генетического аппарата и синтеза белка у растений.—"Новые направления в физиологии растений", 1985, No. 85, ст. 62-84.

Кунах, В.А., Алпатова, Л.К. Роль фитогормонов в изменчивости числа хромосом в культуре тканей *Harporarpus gracilis*.—Доклады Академии Наук СССР, 1979, Том 245, No. 4, ст. 967-969.

Кунах, В.А., Зосимович, В.П. Влияние кинетина на уровень и типы aberrаций хромосом в культуре тканей *Harporarpus gracilis*.—"Генетика", 1977, No. 8., ст. 1355-1364.

Лобов, В.П., Яворская, В.К., Калинин, Ф.Л. Торможение митотической активности и хромосомные aberrации в корешках *Pisum sativum* при действии гидразида малеиновой кислоты.—"Генетика" и цитология", 1969, No. 3., ст. 247-251.

Полевой, В.В. Фитогормоны.—Ленинград, 1982, ст. 81-84, 91-94, 96-99, 102-103, 125-126, 132-140.

Шевченко, В.В. Распределение разрывов в хромосомах *Crepis capillaris* под действием гидразида малеиновой кислот.—"Генетика", 1965, No. 6, ст. 86-93.

SUMMARY

Shoot tip meristem^e cultures of hawk's-beard (Crepis capillaris) and carnation (Dianthus carvophyllus) cv. "Schocking" were used to investigate the influence of some growth regulators (indole-3-acetic acid, kinetin and 6-benzylaminopurine) and herbicide maleic hydrazide on plant morphogenesis and histological structure under in vitro conditions.

Three groups of Murashige-Skoog culture media, different by growth regulators, have been used: the medium without growth regulators and the media containing BAP (2,46-4,45 μ M) or MH (4,45 μ M-22,3 μ M) with or without kinetin, respectively.

Shoots were developed from the meristem explant on all the media variants. Among the 14 different culture media used for the regeneration of carnation meristems, the best one was that with MH (8,9 μ M). On this medium there developed normal, rooted plants.

Among the 8 different culture media used for the regeneration of Crepis capillaris meristems, the best one contained 4,45 μ M MH. On that medium there developed normal regenerates with roots.

The results of our experiments support the standpoint by which MH in lower concentrations ($4.45\mu\text{M}$ and $8.9\mu\text{M}$) acts as an auxin, whereas in the higher concentration ($22.3\mu\text{M}$) it provides the herbicidal as well as clastogenic activities. There were found some chromosome aberrations in the callus cells of Crepis capillaris cultured on the medium with MH ($17.8\mu\text{M}$).

Some histological abnormalities (stomatas and case tissue were fewer) in the abnormal leaf of carnation were also found.

There were differences in the mode of regeneration and growth rate of shoots, and in the frequency of rhizogenesis and callusogenesis as well.

РЕЗЮМЕ

В настоящей работе исследовано влияние некоторых фитогормонов (индол-3-уксусной кислоты, кинетина и 6-бензиламинопурина) и ауксинового гербицида гидразида малеиновой кислоты на морфогенез, гистологическую и кариологическую структуру меристемных культур. Объектами исследования служили меристемы, изолированные от проростков креписа (Crepis capillaris) и гвоздики (Dianthus caryophyllus).

В опытах использовали питательную среду Мурасиге и Скуга в трех типах вариантов: без фитогормонов и дополненных ВАП (2,46–4,45 μM) или ГМК (4,45–22,3 μM).

Меристемные культуры гвоздики выращивали в 14 вариантах питательной среды, лучшим из которых оказалась среда с 8,9 μM МК. На этой среде регенерировали интенсивно растущие с нормальной морфологией укорененные растения.

Меристемные культуры креписа выращивали на 8 вариантах питательной среды, лучшим из которых был вариант, содержащий 4,45 μM МК. В этом варианте регенерировали нормальные укорененные растения.

Результаты опытов подтвердили положение, по которому в низких концентрациях (4,45–8,9 μM) ГМК проявляет

ауксинное действие, а в больших количествах (например 22,3 μ M) ингибирует рост регенерантов и оказывает кластогенное действие на хромозомы. Цитогенетическим анализом были установлены хромозомные aberrации в каллусных клетках регенеранта креписа.

Kasvuregulaatorainete mõju aednelgi meristeemkulatuuridele

Lisa 1

Variandi nr.	Korduste arv	Auksiin (μM)	Tsütokiin (μM)	Auks. ja tsüt. konts.-i suhe	Võsuregulaatoride			Kaliluse teke	
					teke(%)	keskm. kõrgus 60. päeval	juurdu-mine(%)		
1.	2	-	-	-	89,5	18,4	16,5	-	19
2.	2	-	BAP 4,45	0:4,45	100	15,1	-	43,5	-
3.	2	IAA 6	BAP 4,45 kin 4,65	2:3	100	5,5	-	-	-
4.	2	NAA 0,5	BAP 2,65	1:5	100	30,8	-	50	72,5
6.	2	MH 4,45	-	4,45:0	93	23	86,3	11,3	12,5
7.	2	MH 4,45	kin 4,65	1:1	81,5	26,5	-	40	71,7
8.	2	MH 8,9	-	8,9:0	66	46,7	88,5	13,7	44,5
9.	2	MH 8,9	kin 4,65	2:1	100	44,8	52,5	92	95
10.	2	MH 13,35	-	13,35:0	100	31,3	7,3	54,5	69,5
11.	2	MH 13,35	kin 4,65	3:1	100	33,3	-	79,5	84
12.	2	MH 17,8	-	17,8:0	75,5	29,1	-	65	69,5
13.	2	MH 17,8	kin 4,65	4:1	87,5	33,7	-	95	100
14.	2	MH 22,3	-	22,3:0	70	24,8	-	53,5	22,5
15.	2	MH 22,3	kin 4,65	5:1	70	29,6	-	91,5	83,5

Kasvuregulaatorainete mõju koeratubaka meristeemkul tuuridele

Lisa 2

Variandi nr.	Korduste arv	Auksiin (μM)	Tsütokiniin (μM)	Auk- ja tsüt.konts.-i suhe	Võsuregulaatoride				Kalluse teke(%)
					teke(%)	keskm. korgus 60.päeval	juurdu- mine(%)	anomaalsus (%)	
1.	2	-	-	-	80	11,8	31,5	-	-
2.	1	-	BAF 4,45	0:4,45	82	4,6	-	22,2	88,9
5.	2	NAA 5	BAF 4,45 kin 4,7	1:2	91,5	8,6	-	28,2	90,9
6.	7	MH 4,45	-	4,45:0	81	18,5	27,2	-	23,5
8.	7	MH 8,9	-	8,9:0	78,6	18,6	17,3	25,2	33,9
10.	3	MH 13,4	-	13,4:0	64	16,8	-	59,7	43
11.	1	MH 13,4	kin 4,7	3:1	100	15,8	-	100	66
12.	3	MH 17,8	-	17,8:0	69	10,1	-	69	44