

GALA PĀRSKATS



SIA «Bulduru Dārzkopības vidusskola», VZI APP «Nacionālais botāniskais dārzs», SIA stādaudzētava «Baižas», Z/S «Bērziņi», SIA «Puķu lauki»

**«ZIEMCIEŠU GENCIĀNAS UN SUDRABSVECES MIKROPAVAIROŠANAS
TEHNOLOĢIJU IZSTRĀDE UN IEGŪTO JAUNSTĀDU PĀRBAUDE DAŽĀDOS
AUGŠANAS APSTĀKĻOS LATVIJĀ»**

19-00-A01620-000097

NACIONĀLAIS
ATTĪSTĪBAS
PLĀNS 2020



EIROPAS SAVIENĪBA
EIROPA INVESTĒ LAUKU APVIDOS
Eiropas Lauksaimniecības fonds
lauku attīstībai

Atbalsta Zemkopības ministrija un Lauku atbalsta dienests

Projekta izstrādātājs, informācijas sagatavotājs:

Bulduru Dārzkopības vidusskola

Bulduri, 2023. gada jūnijs

Informācijas sagatavotājs

Bulduru Dārzkopības vidusskola: Līva Purmale, Anna Korica, Kārlis Švirksts

Projekta koordinators un tā kontaktinformācija

Līva Purmale

Bulduru Dārzkopības vidusskola

E-pasts: liva.purmale@bulduri.lv

Adrese: Bulduru Biotehnoloģiju centrs, Bulduru
Dārzkopības vidusskola, Viestura iela 6,
Jūrmala, LV-2010

Sadarbības partneri un to kontaktinformācija

Gunita Ķiesnere

APP „Nacionālais botāniskais dārzs”

E-pasts: gunita.kiesnere@nbd.gov.lv

Adrese: Miera iela 1, Salaspils, LV-2169

Zane Zeltiņa

SIA Stādaudzētava "Baižas"

E-pasts: baizas@baizas.lv

Adrese: “Krustiņi”, Krimuldas pagasts, LV-2145

Raivis Reinbergs

SIA “Puķu lauki”

E-pasts: info@pukulauki.lv

Adrese: “Palejas”, Miegūze, Laidzes pagasts, LV-3280

Didzis Bērziņš

Z/S "Bērziņi"

E-pasts: berzini@berzini.lv

Adrese: Liepu iela 4, Pope, LV-3614

Projekta īstenošanas periods

No 01.04.2020. līdz 15.06.2023.

Kopējās projekta izmaksas

100 000,00 eur

Projekta pamatjēdzieni

Datu kopa par pavasara genciānas un sudrabsveces mikropavairošanas tehnoloģijām un datu kopa par jaunaugu augšanu dažādos klimatiskajos apstākļos Latvijā.

Darbības un projekta kopsavilkums

Lai veicinātu stādu materiāla pieejamību pavasara genciānai un sudrabsveces šķirnei 'Brunete', 2020. gadā tika uzsākts projekts "Ziemciešu genciānas un sudrabsveces mikropavairošanas tehnoloģiju izstrāde un iegūto jaunstādu pārbaude dažādos augšanas apstākļos Latvijā". Abi augi ir grūti un lēni pavairojami, bet stādu materiāls lielākajiem ziemciešu audzētājiem Latvijā ir nepieciešams, tādēļ izvēlēts izmēģināt augu audu kultūru metodi. *In vitro* dzinumumu kultūra genciānai sekmīgi uzsākta 2020. gadā. Pirmās genciānas aklimatizētas 2021. gada pavasarī un nodotas SIA "Baižas", Z/S "Bērziņi", SIA "Puķu Lauki" un APP "Nacionālais Botāniskais Dārzs". Aklimatizācija bij apgrūtināta, un daudzi augi gāja bojā. Genciānas pārziemoja APP "Nacionālais Botāniskais Dārzs" un SIA "Puķu Lauki", kur 2022. gada pavasarī arī uzziedēja. 2022. gada sezonā veikta atkārtota jaunaugu aklimatizācija un augi nodoti lauka izmēģinājumiem. Par grūtībām audzēšanā ziņo gan stādaudzētava "Baižas", gan Z/S "Bērziņi", gan APP "Nacionālais Botāniskais Dārzs".

Sudrabsvecei 2021. gadā uzsākta kallusu kultūra, bet kallusu proliferāciju inducēt neizdodas, problēmas sagādā fenolu uzkrāšanās barotnē un eksplantu brūnēšana. Izmēģināti dažādi antioksidanti un kultivēšanas apstākļi- pagaidām nesekmīgi.

Projekta mērķis ir iegūt datu kopu par ziemciešu sudrabsveces (*Actaea racemosa* L. Syn. *Cimicifuga racemosa*) un pavasara genciānas (*Gentiana verna* L.) mikropavairošanas tehnoloģijām un datu kopa par jaunstādu augšanu dažādos klimatiskajos apstākļos Latvijā.

Darba uzdevumi

-pārbaudīt daļēji publikācijās pieejamos *in vitro* pavairošanas protokolus, un tos, nepieciešamības gadījumā, pielāgot, lai iegūtu sudrabsveču un genciānu jaunaugus.

-Pārbaudīt iegūto jaunaugu augšanu dažādos klimatiskajos apstākļos Latvijā.

Rezultātā ir iegūta pavasara genciānas pavairošanas un audzēšanas datu kopa, informēti interesenti (1. pielikums) un apzinātas turpmāk pētāmās audzēšanas nianšes, kas būtu jāprecizē metodikas optimizēšanai. Sudrabsvecei ir iegūta datu kopa par kallusu iegūvi *in vitro* apstākļos un datu kopa par barotnēm, kas nav piemērotas dzinumai vai somatisko embriju ieguvei.

Saturs

Darbā izmantotie saīsinājumi.....	5
Ievads	6
Literatūras apskats – pavasara genciāna	7
Materiāli un metodes – genciānas mikropavairošana	8
Rezultāti – Pavasara genciāna.....	11
Literatūras apskats – Sudrabsvece	19
Materiāli un metodes - Sudrabsveces mikropavairošana.....	20
Rezultāti- Sudrabsvece.....	22
Secinājumi.....	27
Izmantotā literatūra	28
1. Pielikums. Publicitāte	29
2. Pielikums	33

Darbā izmantotie saīsinājumi

BAP - 6-benzil-aminopurīns (6-Benzylaminopurine)

GA – giberālīnskābe

IBA – indolil-3-sviestskābe (Indole-3-butyric acid)

KIN – kinetīns

MS – Murašige un Skoog barotne (Murashige & Skoog medium)

NAA- 1 – naftalēnetiķskābe (1 – Naphthalenacetic acid)

PVP-polyvinylpyrrolidone

TDZ – tidiazurons

WP – Kokaugu barotne (Woody plant medium)

2,4-D- 2,4-dihlorfenoksietiķskābe

2iP -6-(γ,γ -Dimethylallilamino) purīns

Ievads

Sudrabsveses ir dekoratīvi gundegu dzimtas augi, kuriem pavasarī izveidojas lielas vairākkārt saliktas, spīdīgas lapu rozetes. Ziedu sveces paceļas virs lapotnes atkarībā no sugas – sākot no vasaras vidus līdz vēlām rudenim. Sudrabsveses pavairošana ir apgrūtināta – tās var pavairot, ļoti uzmanīgi dalot, (bet iegūto meitas augu skaits ir 2-3) vai no sēklām, bet arī tā ir apgrūtināta (dīgst pat 1-2 gadus). Savukārt pavasara genciānas ir zems, pavasarī skaisti ziedošs augs, kas daudzviet Eiropā ir reti sastopams un aizsargājams (Latvijā sastopams tikai kā kultūraugs). Pieprasījums pēc stādiem patlaban pārsniedz piedāvājumu un stādu materiāls šīm kultūrām ir nepietiekams. *In vitro* pavairošanas protokoli abām kultūrām ir pieejami, bet tie ir nepilnīgi un ir nepieciešama to pārbaude un atsevišķu posmu uzlabošana.

Projekta laikā iegūtajiem sudrabsveses un genciānas jaunaugiem nepieciešams veikt kvalitātes pārbaudi. Projektā iesaistītās stādaudzētavas ir pieredzes bagātas un savā nozarē lielākās, kā arī, novietotas atšķirīgos klimatiskajos apstākļos- Z/S “Bērziņi”- Popē, SIA “Puķu lauki”- Talsu novadā, un SIA “Baižas” Krimuldas novadā. Tāpat izmēģinājumi tiks veikti arī Nacionālajā Botāniskajā dārzā Salaspilī. Pārbaudes audzēšanas laikā tiks veikti novērojumi, vai iegūtie jaunaugi atbilst mātes augam, vai ir normāla augšana un attīstība, kā arī pārziemošana.

Sudrabsveču un genciānas jaunaugus piedāvā Polija un Holande, bet Latvijas ziemciešu audzētājiem ērtāk un lētāk jaunaugus būtu iegūt tepat Latvijā (samazinās transporta izmaksas, atvieglota komunikācija). Projektu realizējot varētu prognozēt, ka stādaudzētājiem kļūs pieejamāki genciānu un sudrabsveču jaunaugi. Galapatērētājs iegūs kvalitatīvas, vietējas izcelsmes stādus saviem apzaļumošanas projektiem un mazdārziņiem. Projektā izstrādātās metodes un tehnoloģijas tieši vērstas uz nozares konkurētspējas paaugstināšanu, perspektīva radot iespēju arī produktu eksportam.

Literatūras apskats – pavasara genciāna

Pavasara genciāna (*Gentiana verna* L.) pagaidām ir ļoti rets viesis Latvijas dārzos. Pavasara genciāna pieder pie genciānu dzimtas (*Gentianaceae*) augiem, kurā ietilpst aptuveni 1750 sugas, kas galvenokārt, ir viengadīgi vai daudzgadīgi lakstaugi, retāk krūmi vai koki. Pavasara genciāna ir mazākā no genciānām un parasti izaug tikai dažus centimetrus virs zemes. Savvaļā pavasara genciāna aug Centrāleiropā, mazliet arī Āzijā – pļavās, akmeņainās kalnu nogāzēs (1. attēls), piemēram, Alpu nogāzēs (Cvrčková et al., 2014).



1. attēls. Pavasara genciānas savvaļas atradnes.

(<https://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Gentiana+verna>)

Latvijā pavasara genciāna sastopama reti un tika kā kultūraugs, pat stādaudzētavās tā praktiski nav atrodamā. Latvijas lielāko stādaudzētavu sortimentā no genciānām reizēm gan var atrast krustlapu genciānu (*Gentiana cruciate* L.), asklēpijveida genciānu (*Gentiana asclepiadea* L.), Dzeltēno genciānu (*Gentiana lutea* L.) un Lagodehas genciānu (*Gentiana septemfida* var. *Lagodechiana* Kusn.). Iemesls, kādēļ pavasara genciāna nav stādaudzētavu sortimentā ir vienkāršs – tās ir grūti pavairojamas. Sēklas, ja izdodas ievākt vai iegādāties, dīgst slikti, reizēm izdodas, pavairojot augu dalot, bet arī mātes augi Latvijā ir maz, mazi un ļoti reti. Literatūrā ir aprakstīti vairāki paņēmieni genciānu mikropavairošanai.

In vitro pavasara genciānas pavairošanai izmanto Woody Plant medium (WPM) ar 0,2 ml/L BAP un 0,1 mg/L IBA, papildus pievienojot 200 mg/L glutamīnu un kazeīna hidrolizātu (Cvrčková et al., 2014). Pavairošanai izmanto arī MS (Murashige and Skoog, 1962) barotni. Ir ziņots, ka pavasara genciānas mikropavairošanai optimāla fitohormonu kombinācija ir 1 mg/L BAP un 0,2 mg/L KIN (Rybczyński et al., 2015). Tomēr *in vitro* apstākļos, līdztekus augu materiāla attīstībai, var attīstīties mikroorganismi, kas audu kultūrā nokļuvuši kopā ar augu materiālu. Tādos gadījumos mikroorganismus ierobežo, augu materiālu atkārtoti sterilizējot vai lietojot antibiotikas (Reed et al. 1998).

Materiāli un metodes – genciānas mikropavairošana

Mātes augu materiālu *in vitro* kultūru uzsākšanai Bulduru Dārzkopības vidusskolā nodrošināja stādaudzētava “Baižas”. Augu materiālu ievāca 2020. gada vasarā. Ievadīšanu veica trīs reizes 11.06.2020., 8.07.2020 un 30.07.2020. Pavisam ievadīti 174 eksplanti.

Augu materiālu pēc ievākšanas, rūpīgi nomazgāja ar ziepēm un skaloja tekošā ūdenī. Sterilizēja 1 minūti 70% etanola šķīdumā, kam sekoja sterilizācija 20 min, 15% “Domestos šķīdumā” ar pievienotu pilienu “Tween”. Sterilo augu materiālu skaloja trīs reizes autoklāvētā, dejonizētā ūdenī. Kā eksplantus izmantoja galotnes pumpurus. Dzinumu kultūras uzsākšanai izmēģināja četras barotnes (1. tabula).

1. tabula. Izmēģinātās barotnes pavasara genciānas dzinumu kultūras uzsākšanai

	WP1	WP2		MS1	MS2
	mg/L	mg/L		mg/L	mg/L
NH ₄ NO ₃	400	400	KNO ₃	1900	1900
MgSO ₄ *7H ₂ O	180,54	180,54	NH ₄ NO ₃	1650	1650
KH ₂ PO ₄	170	170	KH ₂ PO ₄	170	170
K ₂ SO ₄	990	990	MgSO ₄ *7H ₂ O	370	370
Ca(NO ₃) ₂ *H ₂ O	471,26	471,26	CaCl ₂ *2H ₂ O	440	440
CaCl ₂ *2H ₂ O	440	440	H ₃ BO ₃	6,2	6,2
H ₃ BO ₃	6,25	6,25	MnSO ₄ *H ₂ O	22,3	22,3
MnSO ₄ *H ₂ O	22,3	22,3	ZnSO ₄ *7H ₂ O	8,6	8,6
ZnSO ₄ *7H ₂ O	8,6	8,6	CuSO ₄ *5H ₂ O	0,025	0,025
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,25	0,25	Na ₂ MoO ₄ *	0,25	0,25
Na ₂ MoO ₄ *	0,25	0,25	KI	0,83	0,83
FeSO ₄ *7H ₂ O	27,83	27,83	CoCl ₂ *6H ₂ O	0,025	0,025
Na ₂ EDTA	37,3	37,3	FeSO ₄ *7H ₂ O	27,83	27,83
Nikotīnskābe	0,5	0,5	Na ₂ EDTA	37,3	37,3
Pyridoxine HCl	0,5	0,5	Nikotīnskābe	0,5	0,5
Thiamine HCl	1	1	Pyridoxine HCl	0,5	0,5
Glicīns	2	2	Thiamine HCl	0,1	0,1
Myo-inositol	100	100	Glicīns	2	2
Glutamīns	200	200	Myo-inositol	100	100
Kazeīna hidrolizāts	200	200	BAP	1	
BAP	0,2	1	IBA		0,2
IBA	0,1		Kin	0,2	
Kin		0,2	NAA		0,1
Saharoze	20 g/l	20 g/l	Saharoze	20 g/l	20 g/l
Agars	7,5 g/l	7,5 g/l	Agars	7,5 g/l	7,5 g/l
pH	5,8	5,8		5,8	5,8

Augi tika audzēti audzēšana plauktos, diennakts cikls ar 16h gaismas periodu un 8h tumsas periodu.

Novērojot spēcīgu infekciju, ievadītajam augu materiālam, pievienoja papildus pēc vajadzības 0,05 % ppm (plant preservative mixture).

Aptuveni četras nedēļas pēc dzinumu kultūras uzsākšanas augu materiālu pārlika uz proliferācijas barotnes (2. tabula MS3). Pārlikšanu uz svaigas proliferācijas barotnes veica reizi 5 – 6 nedēļās. Sākotnēji tika izmēģināta barotne bez giberelīnskābes, bet redzot, ka augiem posmi ir īsi un grūti dalāmi pievienoja papildus 1 mg/l giberelīnskābi. Papildus veica giberelīnskābes ietekmes novērtējumu laikā, un saildzināti dažādi apstrādes varianti:

A – ar giberelīnskābi

B – galotnes ar giberelīnskābi, posmi bez giberelīnskābes.

C – vienreiz ar giberelīnskābi, vienreiz bez.

D – kontrole bez giberelīnskābes.

Ziemā uzsāka genciānas apsākņošanu. Lai veicinātu pavasara genciānas apsākņošanu, samazināja makroelementu un saharozes koncentrāciju, noņēma citokinīnu, bet palielināja augsīna koncentrāciju. Nedēļu genciānas dzinumus turēja tumsā. Pēc nedēļas pārlika uz svaigas barotnes bez fitohormoniem (2. tabula MS T un MS G).

Aptuveni pēc četrām/piecām nedēļām uzsāka genciānas jaunstādu aklimatizāciju. Sākotnēji genciāna stādīta kūdrā un perlītā, bet saistībā ar nelielu skaitu izdzīvojušo augu, tika izmēģināti citi substrāta varianti - ar keramzīta slāni apakšā. Kopā aklimatizācijai izmēģināja dažādus substrātus un to kombinācijas:

- 1) Kūdra,
- 2) Perlīts
- 3) Kūdra ar keramzīta slāni apakšā
- 4) Kūdra sajaukta ar smiltīm (1:1) ar keramzīta slāni apakšā
- 5) Kūdra sajaukta ar granti (1:1) ar keramzīta slāni apakšā
- 6) Kūdra sajaukta ar perlītu (1:1) ar keramzīta slāni apakšā
- 7) Kūdra sajaukta ar vermikulītu (1:1) ar keramzīta slāni apakšā

Augus novietoja uz audzēšanas plauktiem un apsedza ar plēvi, nodrošinot paaugstinātus mitruma apstākļus. Temperatūra telpā 18 – 20 grādi, gaismas režīms – 16 h diena un 8 h nakts. Pakāpeniski uzsāka vēdināšanu un aptuveni 2-3 mēnešu laikā jaunaugus aklimatizēja.

Aklmatizētos jaunaugus 2021 un 2022. gada pavasarī nogādāja APP „Nacionālais botāniskais dārzs”, SIA Stādaudzētava "Baižas", SIA “Puķu lauki”, Z/S "Bērziņi".

2. tabula. Pavasara genciānas proliferācijas barotne un apsākņošanas barotnes. MS3 proliferācijai, MS T – apsākņošanas barotne (tumsā, vienu nedēļu), MS G – apsākņošanas barotne, kuru izmantoja pēc tam, kad augi bija nedēļu auguši uz MS T.

	MS3	MS T	MS G
	mg/L	mg/L	mg/L
KNO ₃	1900	633	633
NH ₄ NO ₃	1650	550	550
KH ₂ PO ₄	170	57	57
MgSO ₄ *7H ₂ O	370	123	123
CaCl ₂ *2H ₂ O	440	147	147
H ₃ BO ₃	6,2	6,2	6,2
MnSO ₄ *H ₂ O	22,3	22,3	22,3
ZnSO ₄ *7H ₂ O	8,6	8,6	8,6
CuSO ₄ *5H ₂ O	0,025	0,025	0,025
Na ₂ MoO ₄ *	0,25	0,25	0,25
KI	0,83	0,83	0,83
CoCl ₂ *6H ₂ O	0,025	0,025	0,025
FeSO ₄ *7H ₂ O	27,83	27,83	27,83
Na ₂ EDTA	37,3	37,3	37,3
Nikotīnskābe	0,5	0,5	0,5
Pyridoxine HCl	0,5	0,5	0,5
Thiamine HCl	0,1	0,1	0,1
Glicīns	2	2	2
Myo-inositol	100	100	100
Glutamīns	200	2	2
Kazeīna hidrolizāts	200	-	-
BAP	0,2	-	-
IBA	0,1	3	-
Giberalīnskābe	1	-	-
Saharoze	30 g/l	10 g/l	10 g/l
Agars	7,5 g/l	7,5 g/l	7,5 g/l
pH	5,8	5,8	5,8

Rezultāti – Pavasara genciāna

2020. gada vasarā uzsākta pavasara genciānas *in vitro* kultūra. Uzsākot kultūru, galvenā problēma bija infekcijas. Iegūt tīru materiālu palīdzēja atkārtota sterilizēšana kombinācijā ar PPM pievienošanu barotnei (0,05%), kas kavēja mikroorganismu attīstību uz barotnes. Kad eksplanti bija veiksmīgi ievadīti un attīrīti, nākamo problēmu sagādāja genciānas īsie posmi, augs palika rozetes formā un tā sadalīšana pārklonējot bija apgrūtināta (2. attēls), Posmu stiepšanos veicināja giberālīnskābes pievienošana barotnei (1 mg/l).



2. attēls. Genciānas *in vitro* kultūra bez giberālīnskābes un ar giberālīnskābi.

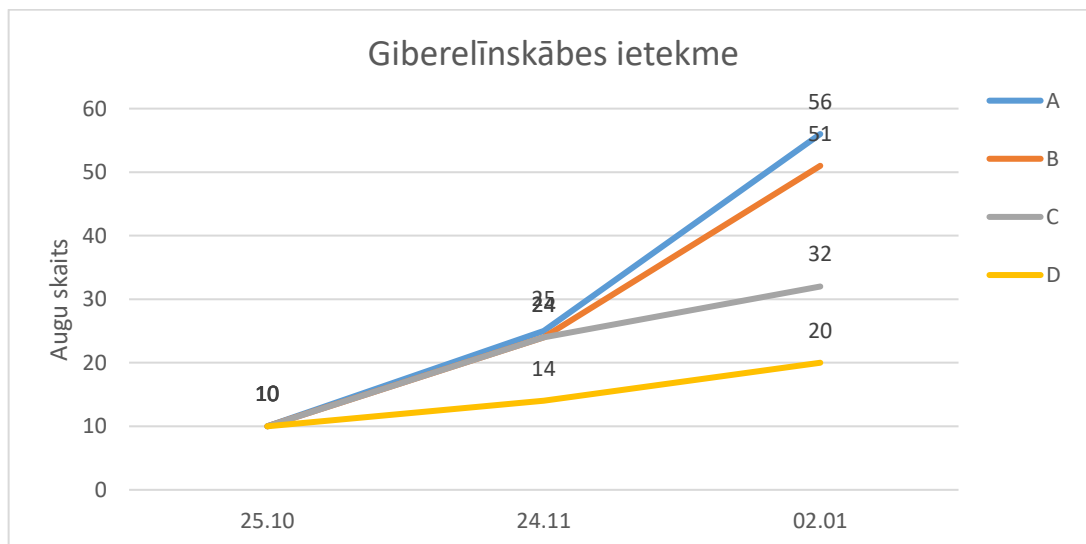
Izaicinājumus sagādāja arī augu stīdzēšana (3. attēls). Varētu domāt, ka ir pārāk liela giberālīnskābes koncentrācija. Lai novērtētu giberālīnskābes ietekmi, izveidoja eksperimentu, kura laikā daļu augu materiālu audzēja bez giberālīnskābes, daļu ar giberālīnskābi, daļu katru otro reizi uz barotnes ar giberālīnskābi un daļu augu katrā pārklonēšanas reizē sadalīja – galotni liekot uz barotnes ar giberālīnskābi, bet posmus bez giberālīnskābes (4. attēls). Eksperimentu uzsāka ar 10 augiem katrā variantā un novērtēja iegūto augu skaitu pēc divām subkultivēšanas reizēm. Nepievienojot giberālīnskābi tika iegūti 20 augi, bet variantā ar giberālīnskābi 56 augi., kas liecina, ka giberālīnskābi vēlams pievienot barotnei lielāka augu skaita ieguvei.



3. attēls. Izstīdzējusi pavasara genciānas *in vitro* kultūra.

Giberelīnskābes ietekme tika novērtēta laikā, un salīdzināti dažādi apstrādes varianti (6. attēls):

Datums/ apstrādes variants	Iegūto augu skaits			
	A	B	C	D
25.10	10	10	10	10
24.11	25	24	24	14
02.01	56	51	32	20



4. attēls. giberelīnskābes ietekme uz iegūto augu skaitu. A – ar giberelīnskābi
 B – galotnes ar giberelīnskābi, posmi bez giberelīnskābes. C – vienreiz ar giberelīnskābi, vienreiz bez.
 D – bez giberelīnskābes.

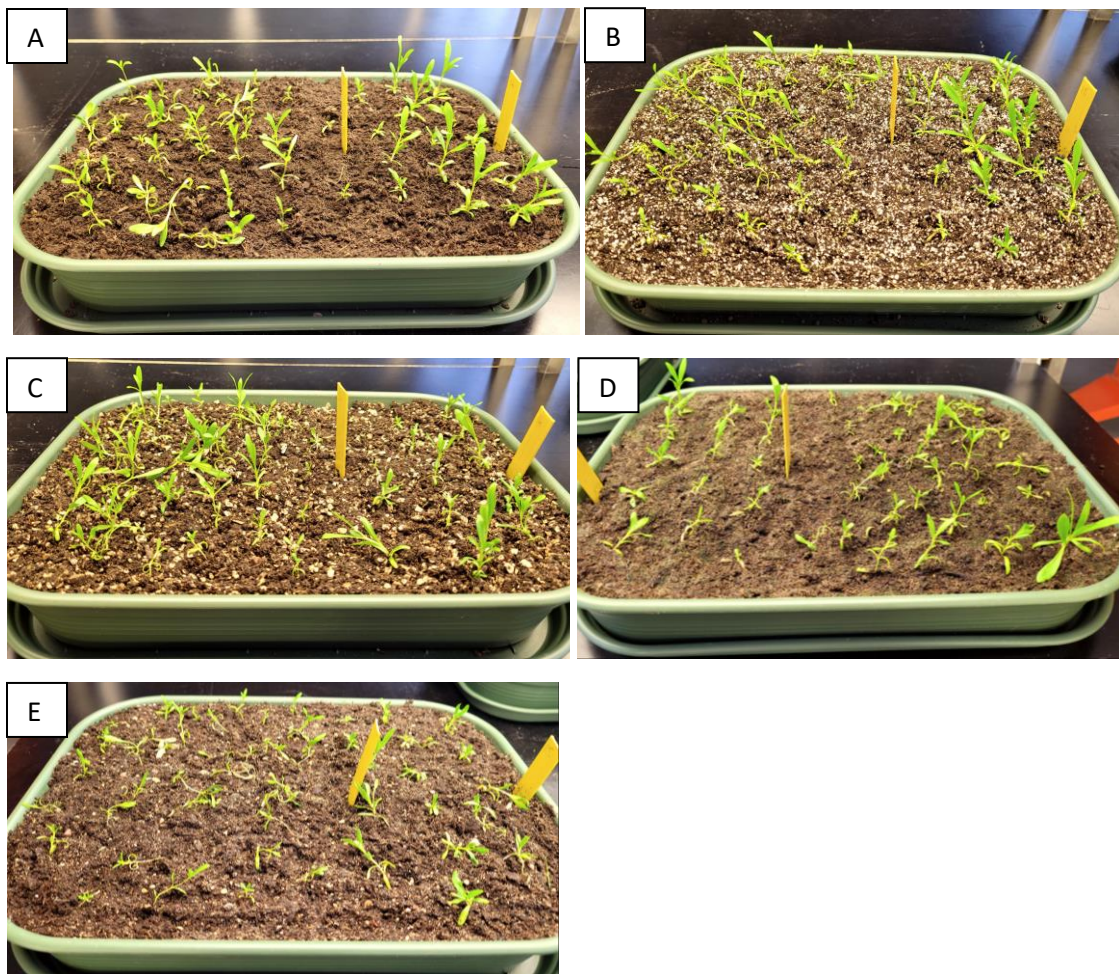
Jaunaugus sekmīgi izdevās apsakņot *in vitro* apstākļos (5. attēls). Aptuveni piecu nedēļu laikā izveidojās sakne. Apsakņotos dzinumus mēģināja aklimatizēt. Sakni nomazgāja no agara atliekām un augus izpiķēja kastēs ar substrātu un apsedza ar plēvi. Pēc nedēļas ļoti pakāpeniski uzsāka vēdināšanu. Diemžēl bija ļoti sarežģīti atrast optimālus mitruma apstākļus, lai augi nenopūtu un nenokalstu. Sākumā lielāka daļa augu gāja bojā, tādēļ nākamajiem stādiem tika mainīts substrāts, kā arī temperatūra telpā tika pazeminātā līdz 19 +/-1 °C. Katram sadarbības partnerim tika iedoti XXX augi.



5. attēls. Apsakņots genciānas dzinums un aklimatizēti dzinumi 2022. gada pavasarī

2023. gada pavasarī veikts eksperiments ar dažādiem substrātiem genciānas aklimatizācijai (6.-7. attēls).

	Substrāts	iestādīto augu skaits	izdzīvojušo augu skaits 22.02.2023	daudzums %
1	kūdra	46	25	54
2	kūdra + smilts	44	8	18
3	kūdra + grants	45	7	15
4	kūdra + perlīts	50	25	50
5	kūdra + vermikulīts	48	28	58



6. attēls. Genciānu aklimatizācija 2023. gada pavasarī. Genciānu aklimatizācija 2023. gada pavasarī: a) tīra kūdra ar keramzīta slāni apakšā; b) kūdra ar perlītu un keramzīta slāni apakšā; c) kūdra ar vermikulītu un keramzīta slāni apakšā; d) kūdra ar smilti un keramzīta slāni apakšā; e) kūdra ar granti un keramzīta slāni apakšā.



7. Attēls. Genciānu sakņu sistēmas attīstība dažādos substrātos.

Vislabāk genciāna aklimatizējas vieglā, gaisu caurlaidīgā substrātā. Smilts un grants piejaukums augsni padara smagu un blīvu. Labākie rezultāti ir tīrā kūdrā, kūdrā ar perlītu un kūdrā ar vermikulītu. Starpība starp šiem trijiem variantiem nav būtiska, bet liela nozīme ir keramzīta slānim apakšā, jo tas nodrošina augsnei drenāžu.

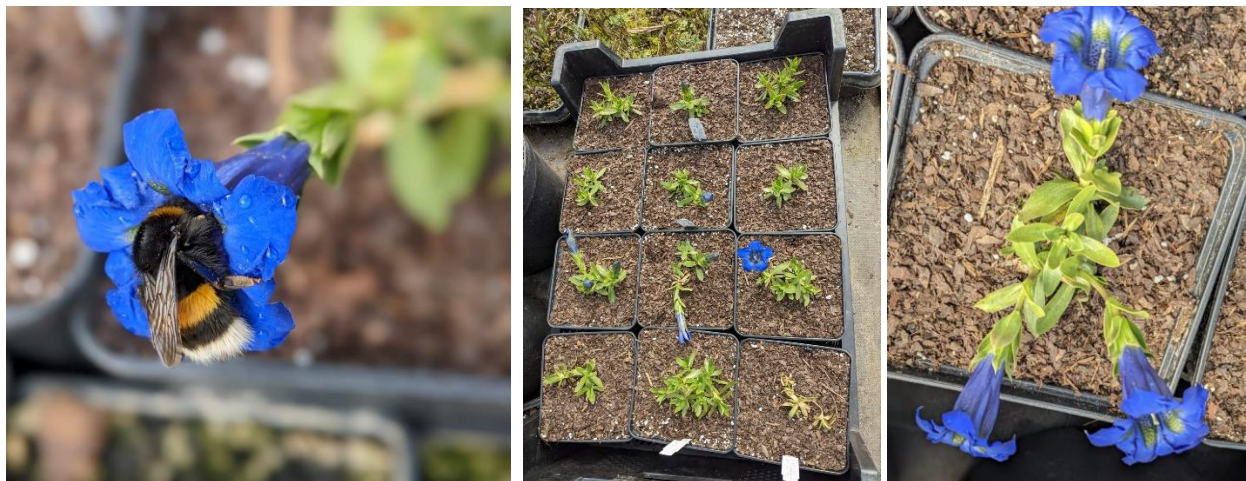
3. tabula. Sadarbības partneriem nogādātais augu skaits

Sezona/sadarbības partneris	“Baižas”	“Bērziņi”	“Puķu Lauki”	Nacionālais Botāniskais dārzs
2021-vāji attīstīti augi	~20	~20	~22	~21
2022	~20	~22	~21	~25
2023 – augi labi attīstīti	~40	~23	0	~25

Jaunaugus nogādāja sadarbības partneriem, lai pārlicinātos par stādu kvalitāti un to augšanu Latvijas apstākļos. SIA "Puķu Lauki", Z/S "Bērziņi", SIA stādaudzētava "Baižas" un Nacionālais Botāniskais dārzs pārstādīja podos un kopa. Grūtības sagādāja augu audzēšana. Z/S "Bērziņi" genciānas 2021/2022 gada ziemu neizturēja, līdzīgi arī SIA stādaudzētavā "Baižas", savukārt Nacionālais Botāniskais dārzs pārziemoja trīs augi, bet SIA "Puķu lauki" veicās vislabāk pārziemoja 12 augi un vairāki arī uzziedēja (8. un 9. attēls).



8. attēls. Pārziemojuši genciānu dzinumi Nacionālajā Botāniskajā dārzā, 2022. gada vasara



9. attēls. Pavasara genciāna uzziedējusi stādaudzētavā "Puķu lauki" 2022. gada pavasarī

2022. gada pavasarī saimniecībā tika nogādāti jauni augi.



10. attēls. Pavasara genciānas stādi 2022. gada vasarā Z/S “Bērziņi”- stādi pirmo sezonu uz lauka

SIA stādaudzētava “Baižas”, Z/S “Bērziņi” un Nacionālais Botāniskais dārzs genciānu jaunstādi 2022/2023 ziemā nepārziemoja, kā arī gāja bojā tie daži augi, kas bija izturējuši iepriekšējo ziemu Nacionālajā Botāniskajā dārzā. SIA “Puķu Lauki” veicās vislabāk pārziemoja 5 genciānas no 2021. gada un 1 genciāna no 2022. gadā dotajiem augiem.

Saimniecības SIA stādaudzētava “Baižas”, Z/S “Bērziņi” un Nacionālais Botāniskais dārzs un sia “Puķu lauki” nodrošināja augu kopšanu atbilstoši ikdienas praksei savā uzņēmumā – nodrošinot regulāru augu laistīšanu/ rasināšanu, pārstādīšanu, rušināšanu un mēslošanu (4. tabula izmēģinātā mēslošanas un kopšanas shēma).

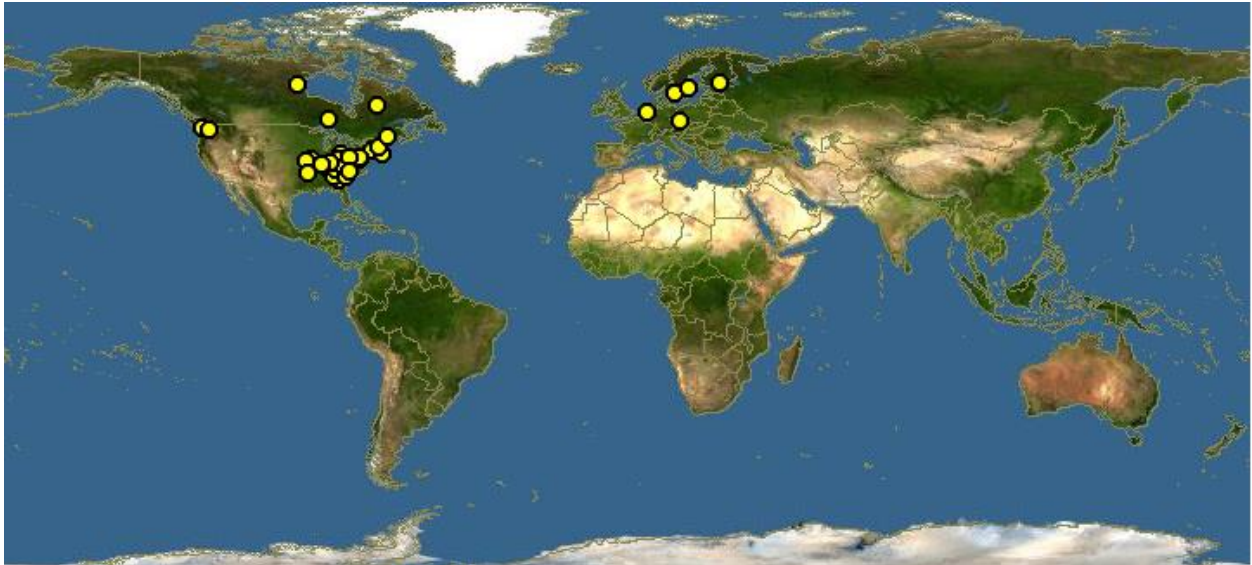
4. tabula. Kopšanas shēma, kas izmēģināta genciānai.

	mēslošana	kopšana
Maijs	2 g/l Yara Liva Calcinit	Irđināšana, rasināšana
jūnijs	2 g/l kristalons 12-12-36	Irđināšana, rasināšana
Jūlijs	2 g/l Ferticare 14-11-25	Irđināšana, rasināšana
augusts	2 g/l kristalons 6-12-36	Irđināšana, rasināšana
septembris	2g/l kristalons 6-12-36	Irđināšana
Oktobris	2g/l kristalons 6-12-36	Irđināšana
Novembris-janvāris	nemēslo	
Februāris	2g/l Yara Liva Calcinit	Irđināšana
Marts	2 g/l kristalons 12-12-36	Irđināšana, rasināšana
Aprīlis	2 g/l kristalons 12-12-36	Irđināšana, rasināšana
Maijs	2 g/l Ferticare 14-11-25	Irđināšana, rasināšana
Jūnijs	2 g/l Yara Liva Calcinit	Irđināšana, rasināšana
Jūlijs	2 g/l kristalons 12-12-36	Irđināšana, rasināšana
Augusts	2 g/l kristalons 6-12-36	Irđināšana, rasināšana
Septembris	2 g/l kristalons 6-12-36	Irđināšana,
Oktobris	2 g/l kristalons 6-12-36	Irđināšana,
Novembris-janvāris	nemēslo	

Lai arī mātes augs, no kura uzsākta pavasara genciānu *in vitro* kultūra auga Latvijā vairākus gadus, izskatās, ka Latvijas klimatiskie apstākļi nav piemēroti genciānu pārziemošanai. Saimniecības uzskatā, ka pavasara genciānu Latvijā komerciāli audzēt nav izdevīgi.

Literatūras apskats – Sudrabsvece

Ķerainai sudrabsvecei literatūrā plašāk tiek izmantoti divi latīniskie nosaukumi *Actaea racemosa* un *Cimicifuga racemosa*, no kuriem pirmais būtu korektākais. Dažkārt tiek lietoti arī nosaukumi *Actaea simplex*, *Actae racemosa*, *Cimicifuga simplex* un *Cimicifuga racemosa*. No latīņu valodas cimex nozīmē kukainis, bet fuga-skriet prom, bēgt, kas liek domāt, ka sudrabsvece ir augs, kas atbaida kukaiņus. Sudrabsveses ir dekoratīvi gundegu dzimtas augi, kuriem pavasarī izveidojas lielas vairākkārt saliktas, spīdīgas lapu rozetes. Ziedu sveces paceļas virs lapotnes atkarībā no sugas – sākot no vasaras vidus līdz vēlam rudenim. Tā ir lēni augošs augs – iestādīta dārzā, tā vienā vietā var augt pat 20 gadus. Tā kā sudrabsveses ir lēni augošas, pavairošana ir apgrūtināta – tās var pavairot, ļoti uzmanīgi dalot, (bet iegūto meitas augu skaits ir 2-3) vai no sēklām, bet arī tā ir apgrūtināta (dīgst pat 1-2 gadus). Savvaļā sudrabsveses aug Ziemeļamerika austrumu daļā, lai gan ir to savvaļas atradnes arī Eiropā (11. attēls). Savvaļā tā Amerikā ir iekļauta aizsargājamo augu sarakstā, jo tās rizoms tiek uzskatīts pirmiedzīvotāju vidū par augstvērtīgu ārstniecības drogu.



11. attēls. Sudrabsveses izplatība savvaļā.

(https://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Cimicifuga+racemosa&guide=Wildflowers&cl=US/NC/Jackson/Balsam_Mountain_Preserve&flags=col1)

Eiropā sudrabsvece ievesta 19. gadsimta otrajā pusē, bet 20. gadsimta pirmajā pusē selekcionēta sudrabsveses sarkanā forma, kas ir pieprasīts dekoratīvais augs arī Latvijā.

In vitro sudrabi var pavairot izmantojot kallusus, kas attīstījušies no lapu eksplantiem (Lata et al., 2002), izmantojot somatiskos embrijus, kas inducēti izmantojot 2,4-D (Pinker and Schenk, 2018). Sudrabsveses mikropavairošana ir apgrūtināta. Pinkers (Pinker et al., 2016) norāda, ka izdevies no 12 genotipiem *in vitro* kultūru iegūt pieciem.

Materiāli un metodes - Sudrabsveses mikropavairošana

Augu materiāls ievākts stādu audzētavā “Baižas” (koordinātas 57.24775, 24.87018) 2020. gada vasarā. Pēc literatūras datiem *in vitro* kultūru var uzsākt lapu eksplantiem. Lapas tika sterilizētas (10% Domestos šķīdums ar dažiem pilieniem Tween 20, 10 minūtes), kam sekoja trīs skalošanas ar dejonizētu, autoklāvētu ūdeni. Lapu eksplantus izmērā apmēram 5 x 5 mm novietoja uz MS barotnes, kurai papildus pievienots 30 g/L saharoze, 6,5 g/L agars un fitohormoni (3. tabula). Augu materiāls tika ievietots mēģenēs (50 ml) un mēģenes novietotas audzēšanas telpā ar temperatūru 18 +/- 2 °C, puse ar fotoperiodu 16h/8h diena/nakts un puse pilnīgā tumsā (20 atkārtojumi).

3. tabula. Fitohormonu kombinācijas, kas izmēģinātas kallusu ieguvei (mg/L)

	MS5	MS6	MS7	MS8	MS9	MS11	MS12
BAP	-	-	1 mg/L	-	-	-	-
Kin	-	-	-	1 mg/L	-	-	-
Naa	1 mg/L	0,1 mg/L	0,1 mg/L	0,1 mg/L	-	0,18 mg/L	-
TDZ	0,5 mg/L	1 mg/L	-	-	0,4 mg/L	0,11 mg/L	-
2,4 D	-	-	-	-	-	-	1 mg/L



2021. gadā eksperiments tika atkārtots. Ņemot vērā iepriekšējā gada negatīvos rezultātus, mātes augu pirms *in vitro* kultūras uzsākšanas divas nedēļas novietoja pilnīgā tumsā, lai iegūtu jaunas etiolētas lapas (12. attēls). Lapas ievāca un sterilizēja kā iepriekšējā gadā. Papildus izmēģināja daļu eksplantu novietot tumsā, kā arī eksplanti tika pārlikti uz svaigas barotnes nākamajā un trešajā dienā pēc *in vitro* kultūras uzsākšanas, kas varētu mazināt eksplantu brūnēšanu, kā arī puse no eksplantiem tika grieztī askorbīnskābes (10 mg/l) šķīdumā.

12. attēls. Sudrabsveses augs ar etiolētām lapām

Eksplantu brūnēšanas novēršanai barotnēm MS6 un MS8, kas iepriekšējos eksperimentos izskatījās visperspektīvākās, papildus izmēģināts pievienot antioksidantus (5. tabula).

5. Tabula. Antioksidanti ekshalntu brūnēšanas mazināšanai

Viola	Mg/L
PVP	0,5
PVP	1
PVP	1,5
Citronskābe	10
Askorbīnskābe	20
AgNO ₃	2,5
ogle	2000

Tā kā pat ar antioksidantiem, kallusi turpina brūnēt un tie jāpārliet uz svaigas barotnes reizi nedēļā, MS6 barotnei, kas ir visperspektīvākā, tika veiktas modifikācijas:

- 1 – Samazināts makroelementu daudzums (1/2)
- 2 – Samazināts makroelementu daudzums, samazināts saharozes daudzums (2 %)
- 3 – AgNO₃ aizstāts ar ogli (0,1 %).
- 4 – AgNO₃ aizstāts ar ogli, samazināts makroelementu daudzums (1/2), samazināts saharozes daudzums (2 %)

No eksperimentos iegūtajiem kallusiem neseismīgi izmēģināts iegūt dzinumus. Testētas 58 dažādas proliferācijas barotnes (skat pielikumā nr 2).

Kallusu kultūru izmēģināts iegūt sudrabsveces zaļajai formai, izmēģinot MS6 barotni.

Bioreaktori

Lai mazinātu eksplantu brūnēšanu, kas varētu būt saistīta ar gaistošo savienojumu uzkrāšanos un polifenolu uzkrāšanos barotnē ap augiem izmēģināts TIS-bioreaktors. Bioreaktoram izmantoti šādi režīmi.

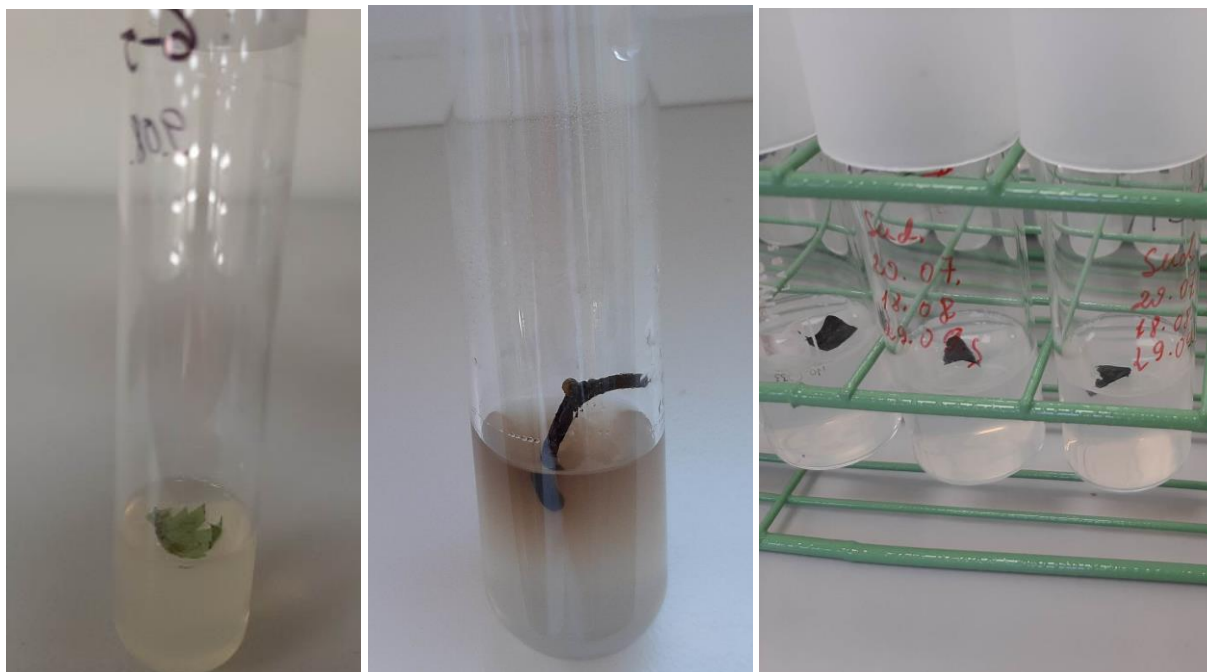
1. 21 minūte šķidrajā barotnē, 51 minūte gaisa plūsma, ciklu atkārto visas diennakts garumā.
2. 40 minūtes šķidrajā barotnē, 40 minūtes gaisa plūsma, ciklu atkārto visas diennakts garumā.
3. Divas reizes dienā pa desmit minūtēm šķidrajā barotnē, astoņas reizes dienā pa trīs minūtēm gaisa plūsmā.
4. Divas reizes dienā pa desmit minūtēm šķidrajā barotnē, divpadsmit reizes dienā pa desmit minūtēm gaisa plūsmā.

Bioraktoros izmantota barotne MS6 ar AgNO₃, bet bez agara.

Rezultāti- Sudrabsvece



13. attēls. Sudrabsveces mātes augs, no kura mēģināts uzsākt *in vitro* kultūru



14. attēls. Sudrabsveces *in vitro* kultūras uzsākšana – dažādi eksplanti

Liela nozīme arī auga daļai, kas izmantota kallusu ieguvei. Lapu kāti un lielas un nobriedušas lapas nav piemērotas - kallusi neattīstās. Vispiemērotākās ir jaunas, etiolētas lapas.

Redzams, ka *in vitro* kultūras uzsākšana sudrabsvecei ir apgrūtināta. Augu stresa definīcija nav vienota, bet lielākā daļa autoru uzskata, ka ar augu stresu jāsaprot jebkuri augam nevēlami apstākļi vai vielas, kas nelabvēlīgi ietekmē, vai bloķē auga metabolismu, augšanu vai attīstību (Lichtenthaler 1996; Otte 2001). Augam stresu var izraisīt ūdens trūkums, augsnes sāļuma pieaugums (Chaves et al. 2009), smagie metāli (Yadav 2010), nepiemērota vides temperatūra, mikroorganismu radīti bojājumi, zālēdāji (Holopainen, Gershenzon 2010) un arī nokļūšana *in vitro* apstākļos. Audu ievadīšana *in vitro* kultūrā ir saistīta ar auga ievainošanu, lai paņemtu eksplantu. Šis ievainojums bieži vien ir signāls, kas inducē fenola savienojumu sintēzei. Brūnēšanu augu eksplantiem ir bieži sastopama (Amente and Chimdessa, 2021). Lai mazinātu brūnēšanu augu audu kultūrās izmanto:

- eksplantu mērcēšanu antioksidantu šķīdumā, pirms *in vitro* kultūras uzsākšanas,
- pievienotus antioskidantus barotnē,
- biežu subkultivēšanu,
- kultūras novietošanu tumsā.
- kultūras audzēšana pazeminātā temperatūrā

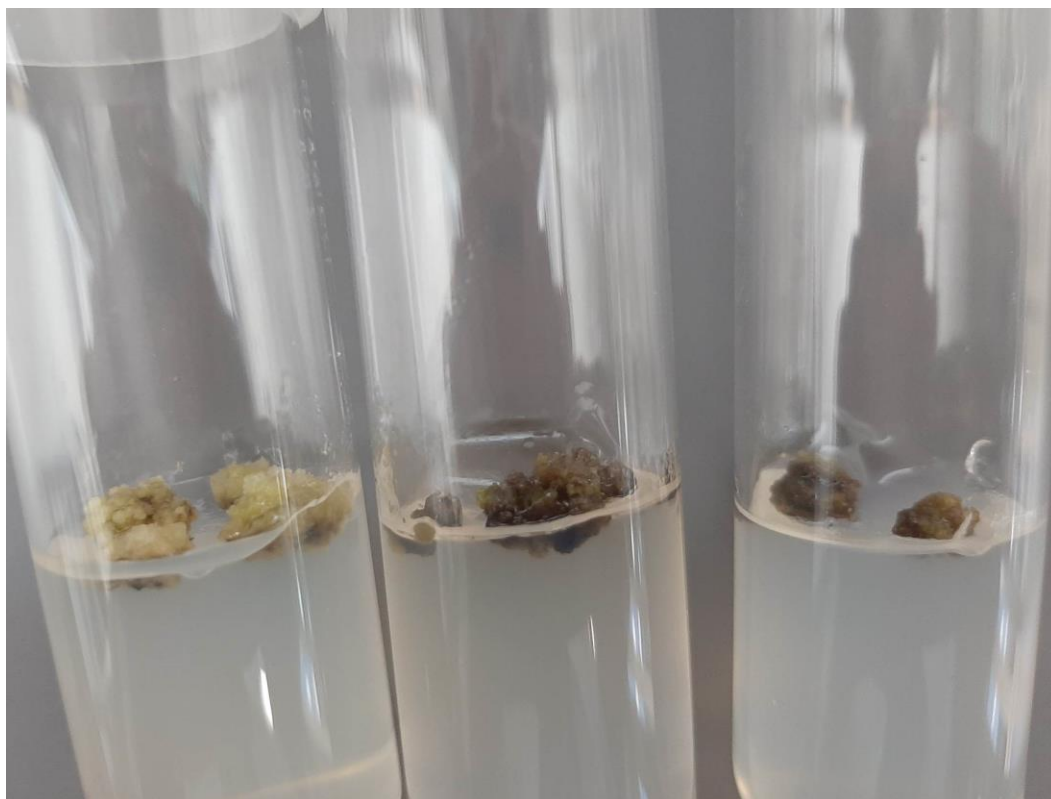
Brūnēšanu *in vitro* apstākļos saista ar fenola savienojumu uzkrāšanos un izdalīšanos barotnē. Fenola un polifenola savienojumiem ir aromātiskais gredzens (benzola gredzens), kuram viens (fenoliem) vai vairāki (polifenoliem) ūdeņraža atomi aizvietoti ar hidroksilgrupām. Pie fenola savienojumiem pieskaita arī visus funkcionālos atvasinājumus (ēsterus, metilēsterus, glikozīdus utt.). Visi šie savienojumi augos ir sekundārie metabolīti, kas veidojušies šķimāt – fenilpropanoīdu – flavonoīdu ceļos. Augiem ir dažādi fenola savienojumi, kas tiek izmantoti kā pigmenti, augšanas un šūnu izturības nodrošināšanai, rezistencei pret patogēniem (De Ascensao, Dubery 2003). Fenola savienojumus polifenola oksidāzes oksidē par to hinīna atvasinājumiem un tālāk oksidē, veidojot pigmentu melanīnu, kas atrodams organismos, un ir atbildīgs par brūnēšanu (Selvarajan et al., 2018). Arī fenilalanīna amonija liāze un peroksidāzes ir iesaistītas brūnēšanā, kuru izraisa ievainojums, kas katalizē polifenolu biosintēzi (Krishna et al., 2008).

No visām barotnēm, kas izmēģinātas sudrabsvecei, kallusu kultūru iegūt izdevās tikai ar MS6 barotni, kurai pievienots AgNO₃ (2,5 mg/L). Pārējos variantos eksplanti strauji nobrūnē – izņemot pievienojot ogli, eksplanti nenobrūnēja, bet nenovēroja arī kallusa attīstību.

Lai samazinātu iegūto kallusu brūnēšanu, tie tika pārlikti uz svaigas barotnes reizi nedēļā. Kā arī tika izmēģinātas nelielas modifikācijas MS6 barotnei. Diemžēl netika atrasta barotne, ar kuru samazinātos kallusu brūnēšanu, un piemērotākā barotne kallusu ieguvei pagaidām ir MS6 ar 2,5 mg/L AgNO₃.



15. attēls. Sudrabsveces kalluss.



16. attēls. Izmēģināti dažādi antioksidanti eksplantu nobrūnēšanas mazināšanai

Kad kallusi tika iegūti pietiekami lielā skaitā, daļa no tie tika pārlikti uz proliferācija barotnes, dzinumu iegūšanai. No izmēģinātajām 58 barotnēm (2.pielikums) neviena nebija derīga. Kallusi ātrāk vai vēlāk nobrūnēja, tā arī neizveidojot dzinumu.

In vitro kultūras iegūšana sudrabsveces zaļajai formai

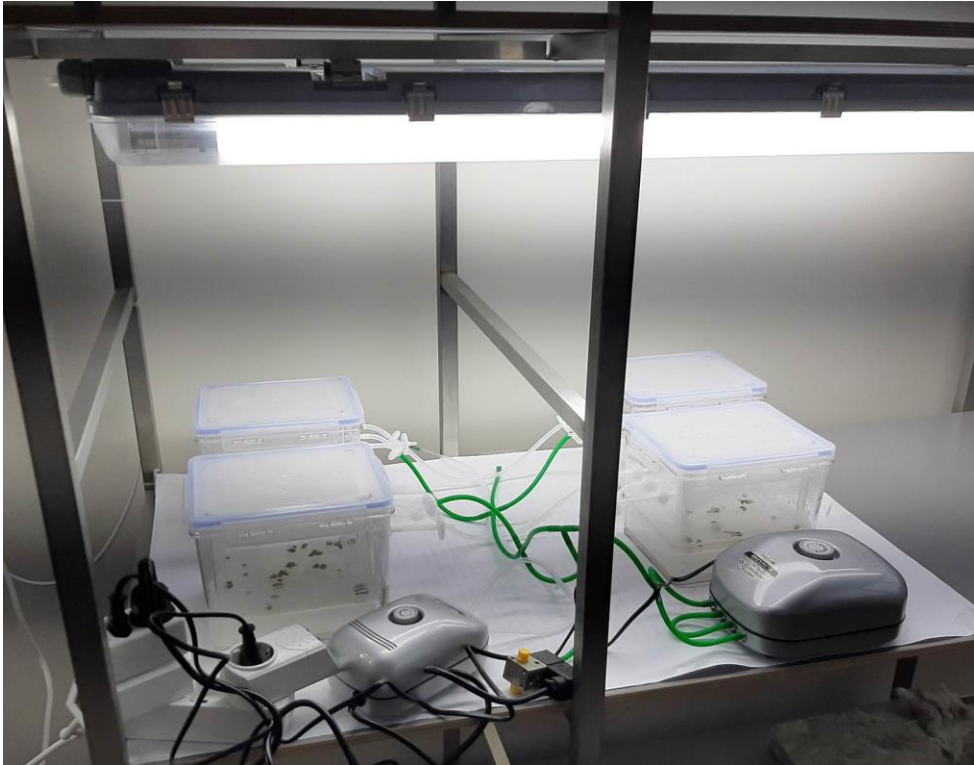
Lai pārliecinātos par protokola atbilstību, MS6 barotni izmēģināja sudrabsveces zaļajai formai. Kallusi veidojās viegli un atsevišķos gadījumos novēro arī dzinumu veidošanos. Eksplanti var stāvēt uz barotnes 3-4 nedēļas un nenobrūnēt (17. attēls).



17. attēls. Sudrabsveces zaļās formas *in vitro* kultūra un dzinuma attīstība.

Bioreaktors

Lai mazinātu eksplantu brūnēšanu, kas varētu būt saistīta ar gaistošo savienojumu uzkrāšanos un polifenolu uzkrāšanos barotnē ap augiem izmēģināts TIS-bioreaktors (18. attēls). Tā kā brūnēšana ir saistīta ar fenolu un dažādu gaistošo savienojumu izdalīšanos, varētu domāt, ka papildus aerācija mazinās brūnēšanu. Tika izmēģināti dažādi režīmi. Vissliktākais bija otrais režīms, ar ciklu, kur kallusi 40 minūtes atrodas šķidrajā barotnē, pēc tam 40 minūtes gaisa plūsmā. Kallusi nobrūnēja nepilnas nedēļas laikā. Labākie rezultāti ir trešajam režīmam, kur kallusi ir šķidrajā barotnē divas reizes dienā pa desmit minūtēm un gaisa plūsmā astoņas reizes dienā pa trīs minūtēm. Taču diemžēl arī bioreaktorā nepieciešama svaiga barotne reizi pusotrā nedēļā un laika gaitā kallusi sāk brūnēt. Būtu nepieciešams turpināt darbu pie režīmu optimizācijas, kas, iespējams, varētu dot pozitīvu rezultātu. Darbs pie pētījuma turpinās.



18. attēls. Sudrabsveču kallusi TIS-bioreaktoros

Secinājumi

Projekta rezultāta ir iegūti dati par pavasara genciānas mikropavairošanu. Pavasara genciānu ir iespējams sekmīgi pavairot ar *in vitro* metodēm. *In vitro* kultūras uzsākšanai augu materiālu sterilizē 1 minūti 70% etanola šķīdumā, kam seko sterilizācija, 20 min, 15% “Domestos” šķīdumā ar pilienu Tween, novieto uz WP1 barotnes. Pēc četrām nedēļām pārstāda uz MS3 barotnes. Apsakņošanu *in vitro* apstākļos veicama divos posmos: nedēļu dzinumus novieto tumsā uz MS T barotnes, (pievienota IBA 3 mg/L), bet pēc tam pārvieto uz bezhormonu barotnes (MS G) un novieto gaismā. Aklimatizācijai piemērotākais substrāts – kūdra ar vermikulītu, kam apakšā ir keramzīta lodišu slānis. Pēc izstādīšanas ārā nākamajā pavasarī genciāna var uzziedēt. Ziedi un augs atbilst mātesaugam. Projekta mērķis izmēģināt pavasara genciānas pavairošanu *in vitro* sasniegts, bet mērķis pārbaudīt jaunaugu augšanu dažādās Latvijas vietās daļēji sasniegts un secināts, ka pavasara genciāna nepārziemo vai pārziemo slikti. Stādaudzētava secinājušas, ka genciānu komerciāliem mērķiem audzēt nav vērts.

Sudrabsveces sarkanās formas *in vitro* kultūras iegūšana ir apgrūtināta, kas iespējams saistīts ar palielināto fenola savienojumu daudzumu. Dzinumu kultūru uzsākt neizdevās. Kallusu kultūru iespējams sudrabsveces sarkanajai formai uzsākt no etiolētām lapām (barotne MS6 ar AgNO₃), bet tālāku kalusa proliferāciju panākt neizdevās, lai arī publikācijās tā ir aprakstīta. Iespējams, ka tas varētu būt saistīts ar savienojumiem, kas raksturīgi sarkanajām sudrabsveces formām (eksperimentā ar zaļo sudrabsveces formu ir iegūti pirmie dzinumi). Pētījumi pie dzinumu ieguves sudrabsvecei *in vitro* apstākļos turpinās. Tā kā dzinumi netika iegūti, nebija iespējams veikt arī jaunstādu augšanas pārbaudi dažādās Latvijas vietās un šis mērķis netika sasniegts.

Izmantotā literatūra

- Amente, G., and Chimdessa, E. (2021). Control of browning in plant tissue culture: A review. *J. Sci. Agric.* 5, 67–71.
- Chaves M.M., Flexas J., Pinheiro C. 2009. Photosynthesis under drought and salt stress: regulation mechanisms from whole plant to cell. - *Annals of Botany*, 103: 551-560.
- Cvrčková, H., Máchová, P., Dostál, J., and Malá, J. (2014). Protocol for efficient micropropagation of spring gentian and sand geranium. *J. For. Sci.* 60, 1–5.
- De Ascensao A.R.F.D.C., Dubery I.A. 2003. Soluble and wall-bound phenolics and phenolic polymers in *Musa acuminata* roots exposed to elicitors from *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. - *Phytochemistry*, 6: 679-686.
- Holopainen J.K., Gershenzon J. 2010. Multiple stress factors and the emission of plant VOCs. - *Trends in Plant Science*, 15: 176-184.
- Krishna, H., Sairam, R.K., Singh, S.K., Patel, V., Sharma, R.R., Grover, M., Nain, L., and Sachdev, A. (2008). Mango explant browning: Effect of ontogenic age, mycorrhization and pre-treatments. *Sci. Hortic. (Amsterdam)*. 118, 132–138.
- Lata, H., Bedir, E., Hosick, A., Ganzera, M., and Khan, I. (2002). In vitro Plant Regeneration from Leaf-Derived Callus of *Cimicifuga racemosa*.
- Lichtenthaler H.K. 1996. Vegetation stress: an introduction to the stress concept in plants. - *Plant Physiology*, 148: 4-14.
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473–497.
- Otte M.L. 2001. What is stress to a wetland plant? - *Environmental and Experimental Botany*, 46: 195-202.
- Pinker, I., and Schenk, R. (2018). *Black Cohosh (Actaea racemosa L.)* (Springer International Publishing).
- Pinker, I., Brosowski, S., and Schenk, R. (2016). Somatic embryogenesis from stamens of *Actaea*. 13–20.
- Rybczyński, J.J., Davey, M.R., and Mikula, A. (2015). *The gentianaceae - volume 2: Biotechnology and applications*.
- Selvarajan, E., Veena, R., and Manoj Kumar, N. (2018). Polyphenol Oxidase, Beyond Enzyme Browning BT - *Microbial Bioprospecting for Sustainable Development*. J. Singh, D. Sharma, G. Kumar, and N.R. Sharma, eds. (Singapore: Springer Singapore), pp. 203–222.
- Yadav S.K. 2010. Heavy metals toxicity in plants: An overview on the role of glutathione and phytochelatins in heavy metal stress tolerance of plants. - *South African Journal of Botany*, 76: 167-179.
- https://www.discoverlife.org/mp/20m?kind=Cimicifuga+racemosa&guide=Wildflowers&cl=US/NC/Jackson/Balsam_Mountain_Preserve&flags=col1

1. Pielikums. Publicitāte

1. Bulduru Dārzkopības vidusskolas mājaslapā:

<https://bulduri.lv/projekti/ziemciesu-gencianas-un-sudrabsvecas-mikropavairošanas-tehnologiju-izstrade-un-ieguto-jaunstadu-parbaude-dazados-augsanas-apstaklos-latvija/>

2. Nacionālais Botāniskais Dārzs mājaslapā:

<https://nbd.gov.lv/mes/projekti/>

3. Lauku tīkls mājaslapā:

<http://www.laukutikls.lv/ziemciesu-gencianas-un-sudrabsvecas-mikropavairošanas-tehnologiju-izstrade-un-ieguto-jaunstadu>

4. Bulduru Dārzkopības vidusskolas Facebook lapā:

<https://www.facebook.com/bulduri.lv/posts/pfbid028W2TsUYtPfRxHV2uJbzAdyNWw6tWwUptTVmPbSvhhWN1m6peKWf1bQcZ8yL1Dm2Zl>

5. studentu konference

L.Purmale, A. Korica, K. Švirksts Micropropagation of *Gentiana verna*, SymbioSe, 23.07-30.07.2022., Vācija. **Posteris.**

6. Konference

Purmale L., Švirksts K., Korica A. “Mēģinājumi uzsākt *Actaea ramosa* 'Brunette' *in vitro* kultūru”, 19.01.2023.81, Latvijas Universitāte starptautiskā zinātniskā konference, augu bioloģijas sekcija, Rīga. Kopsavilkums:
https://eeb.lu.lv/EEB/current/EEB_XXI_LU_konference.pdf

7. Konference

Anna Korica, Kārlis Švirksts, Līva Purmale. “Pavasara genciānas (*Gentiana verna* L.) mikropavairošanas izmēģinājumi Latvijā”, 08.02.2023. 81, Latvijas Universitāte starptautiskā zinātniskā konference, Augu introdukcijas un selekcijas sekcija, Rīga

8. Izstāde

“Laikmetīgā dārzkopība”, kurā iekļauti attēli no projekta norises. Pieejama Bulduru Dārzkopības vidusskolas vestibīlā.

9. Publiskais pasākums

Dārza un stādu svētki 2020. gada 7. maijā – demonstrēti projekta materiāli

10. Publiskais pasākums,

Rudens ražas svētki 2020. gada 1. oktobrī – demonstrēti projekta materiāli:

11. Publiskais pasākums/noslēguma seminārs

26.01.2023 “Contemporary horticulture”

12. Raksts “Dārzs un Drava” žurnālam-

“Retā viešņa – pavasara genciāna”- “Dārzs un Drava” 2022. gada ziemas numurā



18. attēls no publiska pasākuma. Spēles “Atpazīsti augu mēģenē” daļa



MICROPROPAGATION OF *GENTIANA Verna*

Līva Pūmale*, Anna Korica, Karlis Švirks

Bulduri Biotechnology Center, Viestura street 6, Jūrmala, Latvia
liva.pumale@bulduri.lv

INTRODUCTION

Spring gentian (*Gentiana verna* L.) is small, decorative perennial plant growing on sunny alpine meadows and moorlands in Eurasia. In some European countries it is listed as endangered as its propagation is slow and seed germination rate low. Although Latvia is outside of its natural growth area, local nurseries have shown interest in growing *Gentiana verna* as decorative plant. A plant tissue culture approach was chosen as there was little plant material available.



METHODOLOGY

Plant material was collected in summer 2021 in plant nursery "Baizas" in Latvia. Shoots were surface sterilized for 1 min in 70% ethanol followed by 20 min in 15% "Domestos" (<5% sodium hypochlorite) solution and three rinses in deionized autoclaved water (Vinterhalter et al., 2012). Explants were placed on Woody Plant (WP) medium supplemented with 0,2 mg L⁻¹ 6-benzylaminopurine, 0,1 mg L⁻¹ indole-3-butyric acid, 20 g L⁻¹ sucrose, and 7,5 g L⁻¹ agar, pH was adjusted to 5,8. After 4 weeks plants were transferred to fresh medium. Murashige and Skoog (MS) basal mineral medium (Murashige and Skoog, 1962) containing 0,1 mg L⁻¹ indole-3-butyric acid, 0,2 mg L⁻¹ 6-benzylaminopurine, 30 g L⁻¹ sucrose and 7,5 g L⁻¹ agar was used for plant multiplication. Rooting was performed in two steps. Modified (1/3 macorelements) MS medium supplemented with 3 mg L⁻¹ indole-3-butyric acid, 10 g L⁻¹ sucrose and 7,5 g L⁻¹ agar was used for first week (cultivated in darkness). After one week plantlets were transferred to same hormone free medium and placed in the grow room (photo period 16/ 8h light/dark) (Cvrčková et al., 2014)

RESULTS

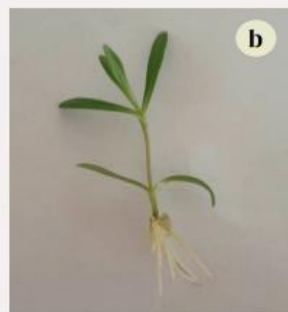
Gentiana verna shoot *in vitro* culture was successfully initiated on WP medium using stem/ axillary bud explants (Rybczyński et al., 2015). Though infections caused some serious problems, whereas addition of 0.01% plant preservative mixture improved the situation. Naturally *Gentiana verna* form very short internodes, nearly rosettes- making it very difficult to cut and subcultivate. However, addition of gibberellin acid (1 mg L⁻¹) to multiplication medium increased distance between internodes making multiplication easier. Acclimatization was dissatisfying- plantlets either wilted or rotted and very small percentage survived long enough to be transferred to the nurseries.

CONCLUSION

Gentiana verna in vitro culture can be initiated on WP medium and multiplied on MS medium supplemented with 0,1 mg L⁻¹ indole-3-butyric acid, 0,2 mg L⁻¹ 6-benzylaminopurine, 30 g L⁻¹ sucrose and 7,5 g L⁻¹ agar. Addition of 0.01% plant preservative mixture reduced infection. Addition of gibberellin acid (1 mg L⁻¹) to multiplication medium increased distance between internodes making multiplication easier. For *Gentiana verna* acclimatization further studies are required.

REFERENCES

- CVRČKOVÁ, H., MÁCHOVÁ, P., DOSTÁL, J., AND MALÁ, J. (2014). PROTOCOL FOR EFFICIENT MICROPROPAGATION OF SPRING GENTIAN AND SAND JUBINEA. J. FOR. SCI. 60, 1-5.
MURASHIGE, T., AND SKOOG, F. (1962). A REVISED MEDIUM FOR RAPID GROWTH AND BIO ASSAYS WITH TOBACCO TISSUE CULTURES. PHYSIOL. PLANT. 15, 473-497.
RYBCZYŃSKI, J.J., DAVEY, M.R., AND MIKULA, A. (2015). THE GENTIANA GENUS - VOLUME 2: BIOTECHNOLOGY AND APPLICATIONS.
VINTERHALTER, B., MILOŠEVIĆ, D.K., JANKOVIĆ, T., MILOJEVIĆ, J., AND VINTERHALTER, D. (2012). IN VITRO PROPAGATION OF GENTIANA DINARICA BRICK. CENT. EUR. J. BIOL. 7, 690-697.



a- *Gentiana verna in vitro* culture b- rooted *Gentiana verna* plantlet c- *Gentiana verna* plantlets in acclimatization

Micropropagation of *Gentiana verna*

Līva Purmale*, Anna Korica, Karlis Shvirksts

Bulduri Horticultural School, Jūrmala, Latvia

*liva.purmale@bulduri.lv

Keywords: *in vitro*, spring gentian, shoot culture.

Spring gentian (*Gentiana verna* L.) is small, decorative perennial plant growing on sunny alpine meadows and moorlands in Eurasia. In some European countries it is listed as endangered. Although Latvia is outside of its natural growth area, local nurseries have shown interest in growing *Gentiana verna* as decorative plant.

A plant tissue culture approach was chosen as there was little plant material available. Plant material was collected in summer 2021 in plant nursery "Baizas" in Latvia. Shoots were surface sterilized for 1 min in 70% ethanol followed by 20 min in 15% "Domestos" (<5% sodium hypochlorite) solution and three rinses in deionized autoclaved water. Explants were placed on Woody Plant medium supplemented with 0,2 mg L⁻¹ 6-benzylaminopurine, 0,1 mg L⁻¹ indole-3-butyric acid, 20 g L⁻¹ sucrose, and 7,5 g L⁻¹ agar, pH was adjusted to 5,8. After 4 weeks plants were transferred to fresh medium. Murashige and Skoog basal mineral medium containing 0,1 mg L⁻¹ indole-3-butyric acid, 0,2 mg L⁻¹ 6-benzylaminopurine, 30 g L⁻¹ sucrose and 7,5 g L⁻¹ agar was used for plant multiplication.

Gentiana verna shoot *in vitro* culture was successfully initiated. Though infections caused some serious problems, whereas addition of 0.01% plant preservative mixture improved the situation. Naturally *Gentiana verna* form very short internodes, nearly rosettes. However, addition of gibberellin acid (1 mg L⁻¹) to multiplication medium increased distance between internodes making multiplication easier. For *Gentiana verna* acclimatization further *in vitro* studies are required.

Research was supported by ELFLA project no 19-00-A01620-000097



2. Pielikums

Proliferācijas barotnes sudrabsvecei. Visās barotnēs standarta koncentrācijas mikroelementiem un vitamīniem, agars 0,6 %.

Barotne (Nr.)	MS makro	kazeīna hidrolizāts (mg/L)	saharoze (%)	AgNO ₃ (mg/L)	Ogle (%)	GA (mg/L)	Fitohormoni					
							TDZ (mg/L)	NAA (mg/L)	BAP (mg/L)	Kin (mg/L)	2.4-D (mg/L)	2iP (mg/L)
1	1	200	3 %	2,5			0,4					
2	1	200	2 %	2,5			0,4					
3	1/2	200	2 %	2,5			0,4					
4	1		2 %	2,5			0,4					
5	1/2		2 %	2,5			0,4					
6	1/2		3%	2,5			0,4					
7	1/2		2 %	2,5			0,4					
8	1		1 %	2,5			0,4					
9	1		3%		0,1 %		0,4					
10	1/2		2 %		0,1 %		0,4					
11	1		3 %		0,1 %		1					
12	1/2		2 %		0,1 %		1					
13	1/2		2 %		0,2 %		1					
14	1/2		2 %		0,2 %		0,5					
15	1/2		2 %		0,2 %							
16	1/2		1 %		0,2 %		0,5					
17	1/2		2 %		0,2 %	1	0,5					
18	1/2		2 %		0,1 %						2	
19	1/2		2 %		0,1 %						1	
20	1/2		2 %		0,1 %		0,5				1	
21	1/2		2 %		0,1 %				1		1	
22	1/2		2 %		0,1 %		1		1			
23	1/2		2 %		0,1 %				2			
24	1/2		2 %		0,1 %							0,5
25	1/2		2 %		0,1 %							1
26	1/2		2 %		0,1 %							5
27	1/2		2 %		0,1 %				0,5			2
28	1/2		2 %		0,1 %			0,5				2
29	1		3%					0,5	2			

30	1		3%							1		
31	1		3%					1,5		1		
32	1		3%			4				1		
33	1		3%			4			2			
34	1		3%						2			
35	1		3%			4	1					
36	1		3%	2,5				0,5	2			
37	1		3%	2,5						1		
38	1		3%	2,5				1,5		1		
39	1		3%	2,5		4				1		
40	1		3%	2,5		4			2			
41	1		3%	2,5					2			
42	1		3%	2,5		4	1					
43	1		3%					1	4			
44	1		3%					0,5		2		
45	1		3%				0,5				1	
46	1		3%				2					
47	1		3%									2
48	1		3%					0,5				1
49	1		3%					1			2	
50	1		3%					2				
51	1		3%	2,5				1	4			
52	1		3%	2,5				0,5		2		
53	1		3%	2,5			0,5				1	
54	1		3%	2,5			2					
55	1		3%	2,5								2
56	1		3%	2,5				0,5				1
57	1		3%	2,5				1			2	
58	1		3%	2,5				2				