



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

**Steviozido įtaka hibridinės drebulės mikroūglių vystymuisi ir  
bioaktyviųjų junginių kaupimuisi *in vitro* sistemoje**

Baigiamasis magistro projektas

---

**Greta Kuliešiūtė**

Projekto autorė

**Doc. dr. Iona Jonuškienė**

Vadovė

---

**Kaunas, 2019**



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

# **Steviozido įtaka hibridinės drebulės mikroūglių vystymuisi ir bioaktyviųjų junginių kaupimuisi *in vitro* sistemoje**

Baigiamasis magistro projektas

Pramoninė biotechnologija (6211FX010)

---

**Greta Kuliešiūtė**

Projekto autorė

**Doc. dr. Iona Jonuškienė**

Vadovė

**Doc. dr. Sigutė Kuusienė**

Konsultantė

**Dr. Ingrida Tumosienė**

Recenzentė

---

**Kaunas, 2019**



**Kauno technologijos universitetas**

Cheminės technologijos fakultetas

Greta Kuliešiūtė

## **Steviozido įtaka hibridinės drebulės mikroūglių vystymuisi ir bioaktyviųjų junginių kaupimuisi *in vitro* sistemoje**

Akademinio sąžiningumo deklaracija

Patvirtinu, kad mano, Gretos Kuliešiūtės, baigiamasis projektas tema „Steviozido įtaka hibridinės drebulės mikroūglių vystymuisi ir bioaktyviųjų junginių kaupimuisi *in vitro* sistemoje“ yra parašytas visiškai savarankiškai ir visi pateikti duomenys ar tyrimų rezultatai yra teisingi ir gauti sąžiningai. Šiame darbe nei viena dalis nėra plagijuota nuo jokių spausdintinių ar internetinių šaltinių, visos kitų šaltinių tiesioginės ir netiesioginės citatos nurodytos literatūros nuorodose. Įstatymų nenumatytų piniginių sumų už šį darbą niekam nesu mokėjęs.

Aš suprantu, kad išaiškėjus nesąžiningumo faktui, man bus taikomos nuobaudos, remiantis Kauno technologijos universitete galiojančia tvarka.

---

(vardą ir pavardę įrašyti ranka)

---

(parašas)

Kuliešiūtė, Greta. „Steviozido įtaka hibridinės drebulės mikroūglių vystymuisi ir bioaktyviųjų junginių kaupimuisi *in vitro* sistemoje“. Magistro studijų baigiamasis projektas / vadovė doc. dr. Ilona Jonuškienė; Kauno technologijos universitetas, Cheminės technologijos fakultetas.

Studijų kryptis ir sritis (studijų kryptių grupė): Biotechnologijos, Technologijų mokslai.

Reikšminiai žodžiai: stevia, steviozidas, augimo reguliatoriai, hibridinė drebulė, mikroūgliai.

Kaunas, 2019. 52 p.

### Santrauka

Šio darbo tikslas buvo įvertinti *Stevia rebaudiana Bertoni* natūralaus steviozido saldiklio poveikį hibridinių drebulių auginimui *in vitro* sistemoje. Suformuluoti keturi pagrindiniai darbo uždaviniai: įvertinti stevijos augalų augimo greitį skirtingose *in vitro* terpėse ir apšvietime; suformuoti hibridinių drebulių mikroūgliams efektyviausias maitinamąsias terpes naudojant steviozido saldiklį; atrinkti informatyviausius oligonukleotidinius pradmenis stevijos DNR analizei; įvertinti *Stevia rebaudiana Bertoni* klonų DNR tapatumą naudojant atrinktus informatyviausius pradmenis.

Tyrimams atlikti naudojami metodai: maitinamųjų terpių gaminimas anglies šaltinį pakeičiant steviozido saldikliu; Genominės DNR išskyrimas naudojant CTAB metodą; Genominės DNR pagausinimas (PGR) naudojant atsitiktinius pradmenis; PGR produktų atskirimas elektroforezės būdu, gelio analizavimas ir rezultatų dokumentavimas.

Įvertinus stevijos augalų augimo greitį nustatėme, kad pasodinti 20 mm auginiai po 2 savaitių auginimo hormoninėse ir be hormoninėse terpėse užauga dvigubai ar net trigubai didesni auginant juos 2570 lux šviesoje. Efektyviausios maitinamosios terpės hibridinių drebulių auginimui gautos naudojant 0,06 g/l sacharozės ir 0,06 g/l baltojo steviozido mišinį terpėje. Po trijų savaitių auginimo tokioje terpėje, lyginant su kontroliniais ūgliais, kurie išauga iki  $21,38 \pm 5,34$  mm aukščio, hibridinės drebulės ūgliai pasiekia iki  $29 \pm 7,53$  mm aukštį. Informatyviausi oligonukleotidiniai pradmenys atrinkti stevijos DNR analizei buvo: Roth 170-01, Roth 170-02, Roth 170-03, Roth 170-04, Roth 170-05, Roth 170-10, Roth A-14, Roth A-19, Roth B-01, Roth B-08, Roth B-15, Roth B-17. Nustatinėjant stevijos augalų ir jų klonų DNR tapatumą gautas 100% polimorfizmas.

Kuliešiūtė, Greta. The influence of stevioside on development of hybrid aspen microshoots and bioactive accumulation *in vitro* system. Master's Final Degree Project/ supervisor assoc. prof. Ilona Jonuškienė. The Faculty of Chemical Technology, Kaunas University of Technology.

Study field and area (study field group): Biotechnology, Technological sciences.

Keywords: Stevia, Stevioside, growth regulators, hybrid aspen, microshoots.

Kaunas, 2019. 52.

### Summary

The purpose of this work was to evaluate the effect of *Stevia rebaudiana Bertoni* natural stevioside sweetener on *in vitro* hybrid aspen cultivation. Four main objectives have been formulated: to evaluate stevia plant growth rate in different *in vitro* media and lighting; to form the most effective nutrient media for hybrid aspen microshoots using a stevioside sweetener; to select the most informative oligonucleotide primers for stevia DNA analysis; to evaluate DNA identity of the *Stevia rebaudiana Bertoni* clones using selected primers.

Methods used for testing: producing nutrients by substituting a stevioside sweetener as a carbon source; isolation of DNA using CTAB method; DNA multiplication (PCR) using random primers; electrophoresis separation of PCR products, gel analysis and documentation of results.

After evaluating the growth rate of stevia plants, we found that planted 20 mm cuttings after 2 weeks of growth in hormonal and non-hormonal media grow twice or even tripled at 2570 luxlight. The most effective nutrient media for hybrid aspen production were obtained using a mixture of 0.06 g/l sucrose and 0.06 g/l white stevioside in the medium. After three weeks of growing in such a medium, the hybrid aspen microshoots reach a height of  $29 \pm 7.53$  mm compared to the control microshoots that grow to  $21.38 \pm 5.34$  mm height. The most informative oligonucleotide primers for selected stevia DNA analysis were: Roth 170 - 01, Roth 170 - 02, Roth 170 - 03, Roth 170 - 04, Roth 170 - 05, Roth 170 - 10, Roth A - 14, Roth A - 19, Roth B - 01, Roth B -08, Roth B - 15, Roth B - 17. 100% polymorphism was obtained by determining the DNA identity of stevia plants and their clones.

## Turinys

<b>Santrumpų ir terminų sąrašas</b> .....	<b>7</b>
<b>Įvadas</b> .....	<b>8</b>
<b>1. Literatūros apžvalga</b> .....	<b>9</b>
1.1. Saldžioji stevija (lot. <i>Stevia rebaudiana Bertoni</i> ).....	9
1.1.1. Botaninis aprašymas, aktyvių metabolitų sudėtis ir naudojimas .....	9
1.1.2. Aktyvių steviolio gliukozidų išskyrimas iš <i>Stevia rebaudiana Bertoni</i> augalų lapų .....	10
1.1.3. Augimo reguliatorių naudojimas siekiant pagerinti <i>Stevia rebaudiana Bertoni</i> derlių .....	11
1.1.4. Genetinės įvairovės įvertinimas naudojant DNR žymenis .....	12
1.1.5. Atsitiktinai pagausintos polimorfinės DNR (APPD) rezultatų įvertinimas ir statistinė analizė 15	
1.2. Hibridinė drebulė (lot. <i>Populus tremula L. X P. tremuloides</i> ).....	17
1.2.1. Hibridinės drebulės botaninis aprašymas .....	17
1.2.2. Hibridinės drebulės komercinė nauda .....	18
1.2.3. Hibridinės drebulės dauginimas ir augimo valdymas .....	18
<b>2. Medžiagos ir tyrimų metodai</b> .....	<b>20</b>
2.1. Tyrimų objektas .....	20
2.2. Tyrimų vieta.....	20
2.3. Tyrimų metodikų schema .....	20
2.4. Tyrimams naudoti reagentai ir tirpalai .....	21
2.5. Tyrimams naudoti prietaisai ir aparatūra.....	21
2.6. Augimo reguliatorių paruošimas.....	21
2.7. Maitinamųjų terpių sudėtis ir gaminimas .....	22
2.8. Mikroūglių sodinimas aseptinėmis sąlygomis .....	24
2.9. Steviozido ekstrakto išskyrimas iš stevijos lapų.....	24
2.10. <i>Stevia rebaudiana Bertoni</i> DNR išskyrimas modifikuotu CTAB metodu.....	25
2.11. <i>Stevia rebaudiana Bertoni</i> DNR koncentracijos nustatymas .....	26
2.12. Polimerazės grandininė reakcija (PGR), naudojant atsitiktinius pradmenis .....	27
2.13. PGR produktų atskyrimas agarozės gelyje elektroforezės būdu.....	28
2.14. PGR rezultatų dokumentavimas bei pagausintų DNR fragmentų ilgio nustatymas .....	29
<b>3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas</b> .....	<b>30</b>
3.1. <i>Stevia rebaudiana Bertoni</i> mikroūglių įvertinimas.....	30
3.2. Steviozido įtaka <i>Populus tremula</i> ūglių augimui .....	31
3.3. Hibridinių <i>Populus tremula</i> viršūnių ūglių aukščių įvertinimas.....	32
3.4. Hibridinių <i>Populus tremula</i> stiebų mikroūglių aukščių įvertinimas .....	34
3.5. Efektyviausių koncentracijų atrinkimas ir <i>Populus tremula</i> augimo optimizavimas .....	35
3.6. Atsitiktinių pradmenų įvertinimas polimorfinės <i>Stevia rebaudiana Bertoni</i> DNR amplifikavime .....	39
3.7. Informatyviausių pradmenų atrinkimas ir polimorfiškumo įvertinimas .....	41
<b>Rekomendacijų dalis</b> .....	<b>48</b>
<b>Išvados</b> .....	<b>49</b>
<b>Literatūros sąrašas</b> .....	<b>50</b>

## Santrumpų ir terminų sąrašas

### Santrumpos:

BAP – 6 – benzilaminopurinas;

IAR – 3 – indolilacto rūgštis;

PGR – polimerazinė grandininė reakcija;

APPD – atsitiktinai pagausinta polimorfinė DNR;

CTAB – cetilo trimetilamonio bromidas.

## Įvadas

Šiaurės ir Baltijos šalyse, kur miškininkystė tradiciškai orientuota į ilgus rotacijos laikotarpius (dažniausiai 50 - 120 metų), trumpalaikio sodinimo miškininkystė, kurios rotacijos laikotarpis yra trumpesnis nei 30 metų, yra nauja miškininkystės koncepcija. Trumpalaikės miškininkystės tikslas yra pasiekti didžiausią biomasės gamybą ir nuimti derlių, kai metinis prieaugis pasiekia didžiausią vertę. Ši miškininkystės šaka leidžia mažiau dėmesio skirti aplinkosaugos ir biologinės įvairovės aspektams miškuose, kurie yra svarbūs tradicinėje miškininkystėje su ilgais derliaus intervalais. Tačiau yra keletas svarbių priežasčių, kodėl trumpalaikė miškininkystė per pastaruosius tris dešimtmečius įgavo daugiau dėmesio. Pirma, pramoninės medienos, įskaitant medienos plaušo ir popieriaus pluoštą, paklausa auga beveik nuolat, o tokios miško plantacijos suteikia galimybę sumažinti medienos derlių iš natūralių miškų [1]. Pasaulyje sodinamų miškų plotas sudaro 6,6% viso miško ploto ir ta dalis pastaraisiais dešimtmečiais nuolat didėjo [2]. Antra, dėl politinių, ekonominių ir socialinių pokyčių, žemės ūkio paskirties žemė sumažėjo ir miškų plotas išaugo keliose regiono šalyse. Trumpalaikės miškininkystės steigimas yra viena iš alternatyvių apleistiems žemės plotams išnaudoti. Trečia priežastis, kiekviena Europos Sąjungos valstybės narė yra įsipareigojusi laikytis ES energetikos politikos ir iki 2020 m. padidinti atsinaujinančių išteklių energijos dalį iki 20%; medienos biomasė iš trumpos miškininkystės plantacijų suteikia galimybę pasiekti šį tikslą [3].

Greitai augantys *Populus tremula L.* ūgliai yra tinkamas, su biomasės moksliniais tyrimais susijęs, modelis. *In vitro* kultūra suteikia galimybę gauti kuo daugiau naujų ūglių per trumpą laiką. Tačiau paprastai šis ūglių auginimas yra pagrįstas plačiu egzogeninių hormonų, ypač auksinų ir citokinų, naudojimu. Tai lemia ne tik padidėjusias išlaidas, bet ir tam tikrą neapibrėžtumą dėl galimų šalutinių poveikių pobūdžio ir patvarumo, nes egzogeniškai naudojami hormonai gali įvairiai sąveikauti su augaliniiais hormonais. Augalų audiniuose yra žinoma, kad auksinai ir citokininai, taip pat įvairūs stresiniai aplinkos veiksniai didina etileno dujų sintezę, kuri taip pat skaičiuojama tarp augalų hormonų [4]. Siekiant kuo efektyviau optimizuoti hibridinės drebulės mikroūglių auginimą *in vitro* sistemose ir atrasti augimą skatinančius natūralius produktus, įvertintas steviozido saldiklio poveikis maitinamosiose terpėse.

Šio darbo tikslas buvo įvertinti *Stevia rebaudiana Bertoni* natūralaus steviozido saldiklio poveikį hibridinių drebulių auginimui *in vitro* sistemoje. Suformuluoti keturi pagrindiniai darbo uždaviniai:

1. įvertinti stevijos augalų augimo greitį skirtingose *in vitro* terpėse ir apšvietime;
2. suformuoti hibridinių drebulių mikroūgliams efektyviausias maitinamąsias terpes naudojant steviozido saldiklį;
3. atrinkti informatyviausius oligonukleotidinius pradmenis stevijos DNR analizei;
4. įvertinti *Stevia rebaudiana Bertoni* klonų DNR tapatumą naudojant atrinktus informatyviausius pradmenis.



## 1. Literatūros apžvalga

### 1.1. Saldžioji stevija (lot. *Stevia rebaudiana Bertoni*)

#### 1.1.1. Botaninis aprašymas, aktyviųjų metabolitų sudėtis ir naudojimas

*Stevia rebaudiana Bertoni*, yra pramoniniu ir medicininu požiūriu svarbus mažas daugiamečių krūmas, priklausantis astrinių (*Asteraceae*) šeimai [5]. Stevija buvo rasta Paragvajuje, todėl šis augalas dažnai vadinamas „Paragvajaus saldžiaja žolele“. Stevija yra subtropinis augalas, kuris gali būti lengvai auginamas. Šio augalo aukštis siekia 65 – 80 cm, o sparčiam augimui reikalingas smėlingas dirvožemis, kurio pH terpė yra 6,5 arba 7,5 [6].

*Stevia rebaudiana Bertoni* sudėtyje yra: diterpenų, triterpenų, stigmasterolio, taninų, lakiųjų aliejų ir aštuoni diterpeniniai glikozidai: steviozidas, steviobiozidas, dulkozidas ir rebaudiozidas A, B, C, D ir E [7]. Gausiausiai randamos medžiagos yra steviozidas ir rebaudiozidas A. Iš stevijos glikozidų rebaudiozidas A yra saldžiausias, stabiliausias ir mažiau kartus nei steviozidas. Rebaudiozidas E ir D yra toks pat saldus kaip ir steviozidas, o visi kiti glikozidai yra mažiau saldūs nei steviozidas [8].

Steviozidas yra išgaunamas iš *Stevia rebaudiana Bertoni* augalo lapų. Steviozidas 100% natūrali, neturinti kalorijų, 200 – 300 kartų saldesnė nei cukrus, stabilus iki 198 °C temperatūros ir nefermentuojama, balta kristalinė medžiaga. *Stevia rebaudiana Bertoni* augalo komponentai pateikti 1.1. lentelėje, o stevijos lapų miltelių ir gryno steviozido ekstrakto palyginimui su granuliuotu cukrumi pateikti 1.2. lentelėje [5].

#### 1.1. lentelė. Komponentai esantys *Stevia rebaudiana Bertoni* augalo lapuose

Komponentai	Komponentų kiekis augale, %
Aliuminis	0,007
Manganas	0,015
β-karotinas	0,008
Fosforas	0,320
Kalcis	0,544
Proteinai	11,200
Chromas	0,004
Selenas	0,003
Kobaltas	0,003
Riebalai	1,900
Druska	0,089
Skaidulos	15,200
Geležis	0,004
Vitaminų	0,011
Magnis	0,349
Vanduo	82,300

## 1.2.lentelė. Stevijos lapų pudros ir stevijos baltojo ekstrakto palyginimas su granuliuotu cukrumi

Granuliuotas cukrus	Stevijos lapų milteliai	Stevijos baltasis ekstraktas
1 arbatinis šaukštelis	1/8 arbatinis šaukštelis	Kelios dulkelės
1 valgomas šaukštas	3/8 arbatinis šaukštelis	½ žiupsnelio
¼ puodelis	½ arbatinis šaukštelis	žiupsnelis
½ puodelis	1 valgomas šaukštas	1/8 arbatinis šaukštelis
1 puodelis	2 valgomas šaukštas	1/4 arbatinis šaukštelis

Nustatyta, kad ekstraktas, išskirtas iš stevijos žolės, turi panašų saldumą kaip 10% sacharozės tirpalas, kurio pH yra 3,0 arba 7,0. Pagrindinio *Stevia rebaudiana Bertoni* komponento steviozido koncentracija ekstrakto buvo 24 mg/ml [6].

*Stevia rebaudiana* lapų ekstraktas ir išgrynintas bioaktyvus junginys steviozidas turi slopinamąjį poveikį su maistu susijusiems patogenams. *S. rebaudiana* tirpiklių ekstraktai (1000 mg / ml) rodo antibakterinį aktyvumą *Serratia marcescens*, *Klebsiella pneumoniae*, *Bacillus cereus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *B. subtilis*, *Alcaligenes denitrificans* ir *Salmonella typhimurium*. Iš šešių tirpiklių etanolio ir acetono ekstraktai rodo didžiausias patogenų slopinimo zonas [9].

Steviolio glikozidų kaip maisto saldiklių naudojimas reikalauja išsamių žinių apie šių medžiagų stabilumą skirtingomis apdorojimo ir laikymo sąlygomis. Būtina nustatyti ar atsiranda skilimas į steviolį. Literatūroje maisto produktuose steviolio glikozidai apibūdinami kaip labai stabilūs. Tyrimai parodė, kad steviosidas yra stabilus buferinėse sistemose, esant 2–10 pH intervalui 2–10 °C temperatūroje. Steviosidas ir rebaudiosidas A yra stabilūs rūgštiniuose tirpaluose, kai pH yra 2 po 3 dienų laikymo kambario temperatūroje, taip pat išlaiko stabilumą prie pH 3,8 po 7 dienų esant 80 °C temperatūrai [10].

Steviozidas nesukelia dantų ėduonies, gali būti saugiai vartojamas cukriniu diabetu sergantiems pacientams. Taip pat gali būti naudojamas mažo kaloringumo dietose, siekiant sumažinti žmogaus kūno svorį. Stevia lapai gali būti naudojami tiesiogiai kaip saldiklis arba steviozidas gali būti ekstrahuojamas grynąja forma ir tada naudojamas kaip saldiklis. Džiovinti lapai arba steviozidas grynoje formoje gali būti maišomi su dauguma maisto produktų ir gėrimų, siekiant sumažinti cukraus vartojimą [6].

### 1.1.2. Aktyvių steviolio gliukozidų išskyrimas iš *Stevia rebaudiana Bertoni* augalų lapų

Komercinis stevijos augalo eksploatavimas padidėjo nuo 1970 m., kai Japonijos mokslininkai sukūrė stevijos komponentų gavybos procesą. [11]. Esminiai proceso etapai yra ekstrahavimas, paruošimas, atskyrimas, valymas ir rafinavimas. Daugumoje iš pateiktų procesų naudojami koagulantai ir organiniai tirpikliai. Kai kuriuose iš pasirinktų procesų naudojami chromatografiniai atskyrimo ir agentų valymas tirpikliais metodai. Galimas ekstrakto išankstinis apdorojimas kalkėmis, jonų mainų kolonų naudojimas, superkritinio skysčio ekstrakcija anglies dioksidu ir bendrinė ekstrakcija tirpikliais, tokiais kaip metanolis, etanolis ir acetonas [12].

Kai kurie mokslininkai sutelkė dėmesį į steviolio gliukozidų iš stevijos lapų gavybos procedūrą. Veikimas karštu vandeniu buvo naudojamas kaip klasikinis ekstrakcijos metodas. Tačiau reikia pažymėti, kad ekstrakcijos procesas naudojant karštą vandenį yra labai ilgas ir nuolat reikalaujantis aukštos temperatūros palaikymo. Ultragarvinė ekstrakcija yra puiki alternatyva steviolio

gliukozidams išskirinti, nes šis metodas reikalauja mažiau laiko ir sumažina žmonių ir aplinkos poveikį. Ultragarstinė ekstrakcija parodė, kad tai yra labai perspektyvus būdas, norint gauti didelį kiekį medžiagos ir aktyvius metabolitus [13].

Atsižvelgiant į steviozido naudojimą kaip maisto priedą ir jo biologinį aktyvumą, būtina sukurti veiksmingą metodą, skirtą atskirti ir išvalyti vieną steviolio glikozidą, turintį didelį grynumą, norint kontroliuoti kokybę ir atlikti farmakologinius tyrimus. Tačiau sunku gauti vieną konkretų steviolio glikozidą įprastiniais atskyrimo metodais, pvz., kolonėlės chromatografija ar plonasluoksne chromatografija, nes steviolų glikozidų cheminė struktūra ir adsorbcijos elgsena stacionarioje fazėje yra panaši. Vienas iš būdų steviolio glikozidams atskirti gali būti didelio greičio priešpriešinė chromatografija (angl. *High-speed counter-current chromatography (HSCCC)*) [14].

Glikozidams iš *Stevia* lapų apibūdinti naudojami skirtingi ekstrahavimo metodai ir chromatografiniai metodai. Atliekamos skysčių chromatografijos ir masių spektrometrijos metodai individualiems glikozidams aptikti. Dėl didelio jautrumo ir specifiškumo, masių spektrometrija atlieka svarbų vaidmenį nustatant, diferencijuojant ir struktūrizuojant natūralius produktus. Nors šie metodai yra sėkmingi augalinių medžiagų analizei, jie yra sudėtingi. Dėl šių priežasčių pradėta domėtis greitais atrankos metodais, kuriems atlikti nereikia paruošti mėginių ir pateikti konkrečią informaciją apie medžiagos cheminę sudėtį. Desorbcinės elektropurkštuvinės jonizacijos masių spektrometrija, derinama su masių spektrometrija ir tiksliais masės matavimais, atitinka šiuos kriterijus [15].

### **1.1.3. Augimo reguliatorių naudojimas siekiant pagerinti *Stevia rebaudiana Bertoni* derlių**

Pastaruju metu didėja poreikis *Stevia rebaudiana Bertoni* komponentams, reikalaujamas steviozido kiekis sparčiai auga [16]. Atliekama vis daugiau tyrimų ir daugiausia dėmesio skiriama naujų veislių morfologiniam aprašymui, veisimui, ekstrakcijos metodams, skirtingų baltymų, chromosomų ir genų išskyrimui, funkciniais tyrimams bei augalų auginimo įpročiams [17].

Mokslo ir technologijų plėtra bei žemės ūkio gamybos technologijų tobulinimas, augalų augimo reguliatorių naudojimas auginimui ir vystymuisi reguliuoti, tapo svarbia žemės ūkio auginimo priemone. Tačiau tyrimų apie augalų augimo reguliatorių poveikį *Stevia rebandina Bertoni* vis dar trūksta. Šiuo tyrimu buvo siekiama ištirti augimo reguliatoriaus SY (PGR-SY) įtaką *Stevia rebaudiana Bertoni* augalų derliui Kinijos regione.

Tyrimas buvo atliktas eksperimentiniame sklype Qingdao žemės ūkio universitete, Shandong provincijoje. Eksperimentinis sklypas priklauso vidutiniam ir musoniniam klimatui. Dirvoje buvo: 0,20% bendro azoto, 105,42 mg · kg<sup>-1</sup> azoto, 24,58 mg · kg<sup>-1</sup> fosfato ir 85,72 mg · kg<sup>-1</sup> kalio.

Tiriama buvo *Stevia rebaudiana Bertoni* augalai. Šiame tyrime ūgliai buvo laistomi PGR-SY augimo reguliatoriumi, naudojant skirtingas jo koncentracijas. Kontrolė (K, saldus vanduo), režimas 1 (R1, 50 mg/L), režimas 2 (R2, 100 mg/L) ir režimas 3 (R3, 200 mg/L).

### 1.3. lentelė. Vegetatyvinis augimo etapas, derlius ir steviozido kiekis

Režimai	Vegetatyvinio augimo etapas (d)	Šviežių lapų svoris (g/augalas)	Sausų lapų svoris (g/augalas)	Sausų lapų svoris (kg/666.67m <sup>2</sup> )	Steviozido kiekis (%)
K	79	142,12	28,49	170,94	12,46
R1	78	148,23	29,84	179,04	12,76
R2	79	156,67	31,65	189,90	12,93
R3	61	84,78	15,42	92,52	11,67

Iš rezultatų (1.3. lentelė) matyti, kad *Stevia rebaudiana Bertoni* augalų vegetatyvinis augimas silpnėjęs buvo naudojant režimą R3, taip pat augalų biomasės augimas buvo mažesnis nei kontrolinių augalų. Šviežių lapų svoris, sausų lapų svoris bei steviozido kiekis naudojant režimą R1 buvo 10,24%, 11,09% ir 4,74% didesnis lyginant su kontroliniais augalais. Padidėjimas pasiekė labai didelį lygį naudojant režimą R2, rezultatai gauti gerokai didesni nei kontrolės K. Bet šviežių lapų svoris, sausų lapų masės derlius ir steviozido kiekis naudojant režimą R3 buvo 67,63%, 84,76% ir 6,77% mažesnis nei kontrolės K. Tai parodė, kad vegetatyvinio augimo stadijoje pokyčių nebuvo. Šviežių lapų svorio, sausų lapų masės derlius ir steviozido kiekis žymiai padidėjo, kai PGR-S-Y koncentracija atitinkamai padidėjo (R1, R2). Tačiau, kai koncentracija buvo per didelė, vegetatyvinis augimo etapas, derlius ir steviozido kiekis labai sumažėjo (R3) [18].

#### 1.1.4. Genetinės įvairovės įvertinimas naudojant DNR žymenis

Kartu su atrankos procesu, genetinės įvairovės įvertinimas naudojant DNR žymenis yra svarbus veisimui ir kryžminimui. Tam, kad būtų pasiektas didelis heterotinis poveikis ir didesnis segregantų populiacijų genetinis kintamumas, kryžminio procesuose dalyvauja tėvai, kurie genetiškai yra labiau skirtingi.

Taigi, molekulinės biologijos metodai atsirado kaip įrankiai, kurie yra naudingi ankstyvam ir tiksliam individų, turinčių geresnį palankių alelių derinį, identifikavimui. Bendra augalų veisimo tendencija apima klasikinių metodų naudojimą su šiuolaikinės molekulinės biologijos technologijomis.

Molekulinio žymeklio metodo pasirinkimas priklauso nuo jo atkuriamumo ir paprastumo. Molekulinio žymeklio technika, trumpas pasikartojančios sekos, buvo sukurta 1994 m. Trumpos atsikartojančios sekos yra pusiau atsitiktiniai žymenys, amplifikuoti polimerazine grandinine reakcija (PGR), esant oligonukleotidui, papildančiam tam tikrą mikrosatelitą. Šio tipo molekuliniai žymekliai turi įvairius augalų veisimo būdus, įskaitant genetinės įvairovės, filogenijos, genų kartografavimo ir pirštų atspaudų tyrimus įvairiose kultūrose [19].

Literatūroje yra keletas pranešimų apie stevijos kloninį dauginimą *in vitro* istemose naudojant lapų, stiebų ir šaknų segmentus. Tačiau didelė problema, susijusi su *in vitro* kultūra, yra galimos somakloninės variacijos tarp tėvų linijų subklonų. Šis pokytis gali atsirasti dėl egzistuojančių genetinių pokyčių, kurie atsiranda dėl tirpalų naudojamų *in vitro* istemose. Visų pirma auginimas *in vitro* aplinkoje sukelia problemų atkuriant tikrą tipą, nes vyksta chromosomų pertvarkymas, DNR metilacijos (metilo grupių pašalinimas arba prisijungimas) ir genų mutacijos. Taigi genetinė kontrolė išlieka pagrindine problema, susijusi su komerciniu stevijos mikroūglių dauginimu.

Mikropropagacija augalams Naudojant šaknų segmentus arba akiliarinį pumpurą leidžia atkurti genetiškai stabilius palikuonių tipus.

Somakloninę variaciją galima nustatyti naudojant DNR pirštų atspaudus, pasitelkiant skirtingų tipų trumpų pasikartojančių sekų žymenis [20]. Šie žymekliai suteikia pranašumų aptinkant somaklonines variacijas, ypač turinčias didesnę jautrumą, didesnę griežtumą, didesnę atkuriamumą, aukštą stabilumą ir dominuojančią polimorfinių genetinių alelių atstovavimą.

Atsižvelgiant į didėjančią *Stevia rebaudiana Bertoni*, kaip alternatyvaus cukraus gamybos šaltinio, svarbą ir ribotas žinias apie genetinį stabilumą kultūrose *in vitro* sąlygomis, labai svarbu nustatyti visišką *in vitro* protokolą nuo tiesioginio *Stevia rebaudiana Bertoni* segmentų dauginimo ir įvertinti *in vitro* sukeltos kultūros genetinį stabilumą naudojant žymenis [21].

Genetiniai ir aplinkos veiksniai bei jų sąveika veikia farmaciškai svarbius antrinius metabolitus vaistiniuose augaluose. Nustatyta, kad įvairūs aplinkos veiksniai, tokie kaip sezonas, spinduliuotė ir dirvožemio mikroelementų sudėtis, daro didelę įtaką antrinių metabolitų profiliui. Sėkmingas natūralių populiacijų valdymas ir išsaugojimas priklauso nuo tikslaus genetinės įvairovės vertinimo, kad būtų sprendžiami visi klausimai, susiję su genetiniais santykiais tarp individų, genetinių variacijų lygis ir struktūra. DNR žymenis naudojami genetinei įvairovei įvertinti įvairiose rūšyse, populiacijose bei palikuonių lygiuose. Rūšių genetinės įvairovės žinios padeda suprasti savybes, kurios leidžia ją atskirti nuo kitų rūšių.

DNR polimorfizmui nustatyti naudojami įvairūs molekuliniai žymenis. Vienas iš efektyviausių molekulinį metodų gebėjimo gaminti gausius polimorfinius žymenis per trumpą laiką ir mažomis sąnaudomis yra atsitiktinai pagausintos polimorfinės DNR (APPD) technika. Tai yra PGR pagrįsta technologija, paprasta ir ekonomiškai efektyvi priemonė augalų genomo analizei. Šis metodas siūlo mažiausius reikalavimai ir greitą metodą, ir teikia informatyvią informaciją iš daugybės lokusų, ypač tose rūšyse, kuriose anksčiau nebuvo atlikti genetiniai tyrimai. APPD yra plačiai naudojamas įvairiose augalų tyrimų srityse ir yra vertinga priemonė tiriant vidinį specifinį genetinį skirtumą, genų ekspresijos modelius ir specifinių genų identifikavimą [22].

Natūrali *S. rebaudiana* didelio stiprumo saldiklių savybė sukėlė didelį susidomėjimą stevijos produkcija ir veisimu. Nustatyta, kad molekuliniai žymenis efektyviai nustato įvairovę stevijos augalų rūšyse.

Šiuo tikslu dažniausiai naudojami polimerazės grandininės reakcijos (PGR) metodu paremti žymenis. Yra keli molekuliniai metodai genetinių skirtumų nustatymui veislių viduje ir tarp jų. Atsitiktinai pagausinta polimorfinė DNR (APPD) analizė yra PGR pagrįsta procedūra, plačiai vartojama genetiniam polimorfizmui, genetiniai įvairovei ir ryšių analizei tirti dėl jų paprastumo ir santykinai mažų sąnaudų. APPD metodas turi pranašumų, lyginant su kitų rūšių DNR žymenimis. Šis metodas yra palyginti greitas, lengvai atliekamas, pigus, labai informatyvus, nereikalauja informacijos apie šablono DNR seką ir specifinių žymenų, kurie yra labiau automatizuoti. Šiam metodui reikalinga tik nustatyti DNR koncentracijų kiekius. Dominuojantį polimorfizmą tarp atskirų mėginių / rasių rodo konkretaus APPD fragmento buvimas ar nebuvimas.

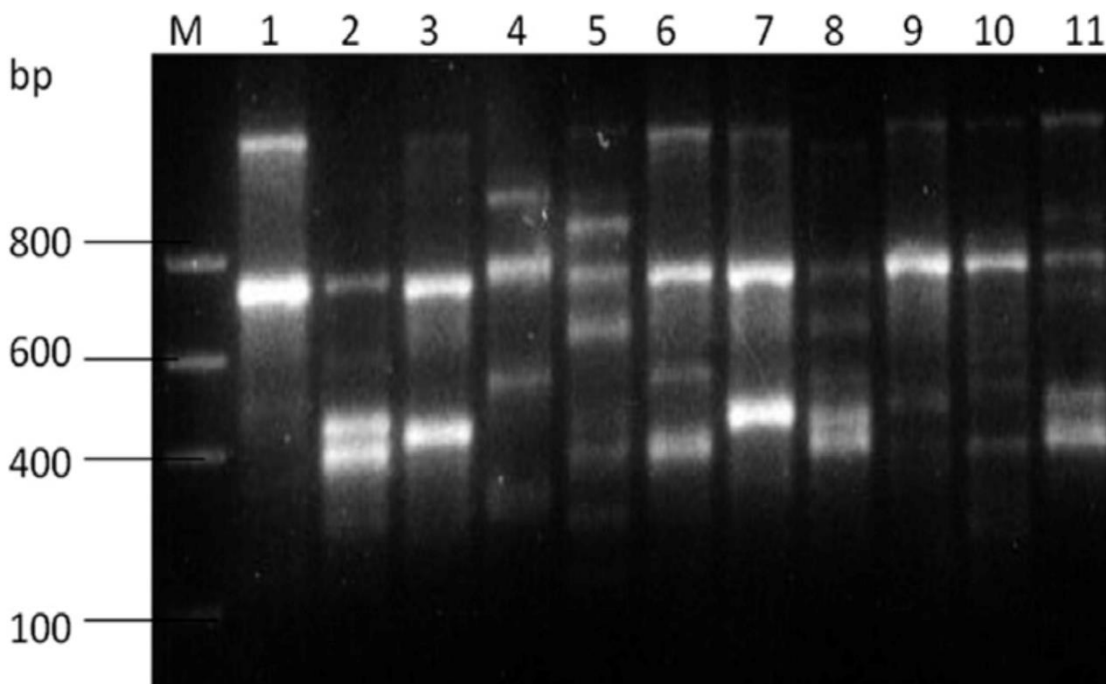
Iš dvidešimt tirtų pradmenų buvo atrinkti dešimt pradmenų, kurie buvo labiausiai informatyvūs. Genotipų amplifikacijos produktai iš viso davė 87 fragmentų juostas, iš kurių 67 juostos buvo

polimorfinės. Genetinio panašumo koeficientas (0,01–0,08) ir polimorfizmas (67,24 - 92,40%) parodė didžiulį genetinį skirtumą.

**1.4. lentelė.** Polimorfizmas, kurį parodė RAPD pradmenys *S. rebaudiana* genotipuose

Pradmenys	Pradmenų sekos 5'-3'	Amplifikuotų juostų skaičius	Polimorfinių juostų skaičius	Polimorfizmas, %	Amplifikuotų juostų dydžio diapazonas
OPA-1	CAGGCCCTTC	48	39	81,25	265–1015
OPA-2	TGCCGAGCTG	65	56	86,15	250–1500
OPA-3	AGTCAGCCAC	57	41	71,92	470–1110
OPA-4	AATCGGGCTG	79	73	92,40	230–1355
OPA-5	AGGGGTCTTG	80	71	88,75	330–1350
OPA-6	GGTCCCTGAC	54	39	72,22	265–1150
OPA-7	GAAACGGGTG	66	59	89,39	330–1250
OPA-8	GTGACGTAGG	74	56	75,68	250–1500
OPA-9	GGGTAACGCC	70	51	75,67	375–1110
OPA-10	GTGATCGCAG	58	39	67,24	265–1150

Šie pradmenys buvo naudojami visiems 11 stevijos DNR mėginių APPD analizei. Genotipų amplifikacijos produktai su šiais pradmenimis pavaizduotas 1.4 lentelė. Amplifikacijos produktų dydis svyravo nuo 230 iki 1500 bps. Didžiausias juostų skaičius (80) buvo gautas su OPA-5 pradmeniu, tuo tarpu mažiausias skaičius (48) buvo gautas su OPA-1 pradmeniu (1.1. pav.).



**1.1. pav.** Amplifikacijos modelis naudojant OPA-1 pradmenį

Įvairūs pradmenys parodė gebėjimą produkuoti didelį polimorfizmą. Polimorfizmas svyravo nuo 67,24 iki 92,40%. Pradmuo OPA-4 parodė didžiausią polimorfizmą (92,40%), o pradmuo OPA-10 parodė mažiausią polimorfizmą (67,24%) [23].

### 1.1.5. Atsitiktinai pagausintos polimorfinės DNR (APPD) rezultatų įvertinimas ir statistinė analizė

Šiuo metu molekuliniai tyrimų metodai yra pagrindiniai ir labai vertingi įrankiai *in vitro* dauginamų augalų genetinės įvairovės analizei. Auginat augalus *in vitro* genetiniai įvairovei įtakos neturi aplinkos veiksniai, o jų rezultatai yra patikimi ir atkuriami kintamumą [24]. Galimų somakloninių augalų nustatymas ankstyvoje vystymosi stadijoje laikomas labai naudingu augalų audinių kultūrų, transgeninių augalų gamybos ir naujų genų įvedimo kokybės kontrolei. Atsitiktinai pagausintos polimorfinės DNR (APPD) genetinio polimorfizmo nustatymas sėkmingai taikomas apibūdinant kai kurių augalų rūšių regeneruotų individų somakloninį kintamumą [25].

Pagrindinis šio tyrimo akcentas buvo ištirti *Stevia rebaudiana Bertoni* somakloninių augalų genetinius pokyčius, kai augalai vystosi *in vivo* ir *in vitro* aplinkose. Taip pat svarbus šių *in vitro* dauginamų augalų aklimatizavimas į šiltnamį ir galutinis perkėlimas į lauką.

Motininiai augalai buvo auginami botanikos sode, Osmanijos universitete. Po aklimatizacijos ir auginimo vienerius metus šie augalai buvo naudojami genetinės įvairovės tyrimuose, atliekant atsitiktinai pagausintos polimorfinės DNR (APPD) analizę. Genominė DNR buvo išskirta iš lauko augalų ir regeneruotų augalų MS terpėse su augimo reguliatoriais. Keturi augalų mėginiai buvo paimti kintamumo vertinimui.

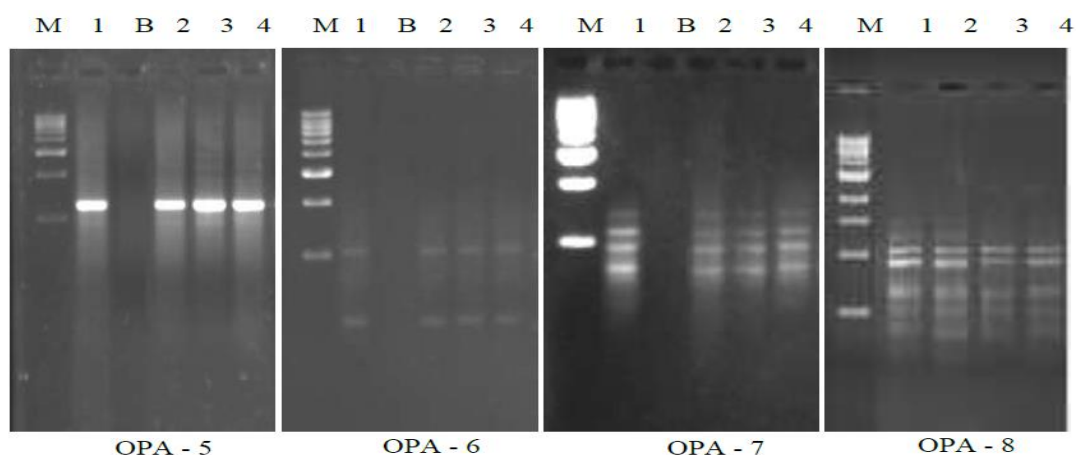
APPD analizei DNR buvo išskirta iš jaunų augalo lapų. Šis tyrimas apima tokius metodus kaip DNR išskyrimą, polimerazės grandinės reakciją (PGR), naudojant atsitiktinius pradmenis ir kokybinę - kiekybinę DNR analizę elektroforezės būdu. DNR išskyrimui lapai sutrinami su ekstrahavimo buferiu, po homogenizavimo apdoroti Tag polimeraze ir nusodinami. DNR plaunama 70% etanoliumi ir išdžiovinama, po to ištirpinama 100 ml Tris EDTA. Grynumas buvo patikrintas elektroforezės ir spektrofotometrinės analizės būdu. DNR koncentracija sureguliuota iki 50 ng/μl. PGR testo atlikimui naudota dvidešimt atsitiktinių pradmenų (1.5. lentelė).

1.5. lentelė. Atsitiktiniai pradmenys ir jų segmentai naudojami PGR testo atlikimui

Pradmens Nr.	Segmentai
OPA-01	5'-TGA GGG CCG T -3'
OPA-02	5'-TCG TTC ACC C -3'
OPA-03	5'-CAT AGA GCG G-3'
OPA-04	5'-CCA GCA CTT C-3'
OPA-05	5'-CCT GTC AGT G-3'
OPA-06	5'-GGG GAA GAC A-3'
OPA-07	5'-GTG TCA GTG G-3'
OPA-08	5'-CTG GCT CAG A-3'
OPA-09	5'-TGC CAC GAG G-3'
OPA-10	5'-CTG AAG CGC A-3'
OPA-11	5'-AAG ACC GGG A -3'

OPA-12	5'-CCG AGC AAT C -3'
OPA-13	5'-TGT GGA CTG G -3'
OPA-14	5'-GAG AGG CTC C-3'
OPA-15	5'-TGC CTG GAC C -3'
OPA-16	5'-TCC GTG CTGB A -3'
OPA-17	5'-GGC AGG TTC A -3'
OPA-18	5'-CTG GTGCTG A -3'
OPA-19	5'-GAC AGT CCC T -3'
OPA-20	5'-TTG ACC CCA G-3'

APPD žymenys buvo naudojami siekiant įvertinti *Stevia rebaudiana Bertoni* genetinį stabilumą. APPD analizei išgauta bendrojo genomo DNR iš šviežių motininio augalo lapų ir atsitiktinai atrinkti 20 OPA APPD pradmenys. Pradmenys buvo išbandomi juos amplifikuojant ir atrenkant monomorfines juostas. Su kiekvienu pradmeniu buvo atliktos amplifikacijos ir pagrindinės juostos geliuose svyravo tarp 500 bp - 2,5 kb. Iš keturių mėginių, genų DNR PGR amplifikacijos, iš viso buvo įvertintos 92 juostos (analizuotų augalų skaičius, padaugintas iš juostų skaičiaus su visais pradmenimis).



**1.2. pav. M juosta:** 1 Kb DNR laderis; **B juosta:** kontrolė; **1 juosta:** motininis augalas; **2 juosta:** mikropropaguoti augalai; **3 juosta:** iš somatinių ląstelių išauginti augalai; **4 juosta:** kaliaus kultūros

Rezultatai buvo vertinami iš juostų modelių, gautų iš *in vitro* regeneruotų augalų, kurie auginti MS terpėje su papildomais augimo reguliatoriais. Išbandyti 20 OPA RAPD pradmenų gamino amplifikacijos produktus, kurie buvo monomorfiniai visuose regeneratoriuose. Buvo parodytas šių pradmenų pagamintų monomorfinių DNR fragmentų dydis. Kiekvienam pradmeniui buvo atliktos pagrindinės juostos ir amplifikacijos produktų dydis svyravo tarp 500 bp-2,5 kb. Iš keturių mėginių genomines DNR amplifikacijos iš viso gauta 92 juostos. Po augalų auginimo skirtingose terpėse su augimo reguliatoriais, regeneruotų augalų polimorfizmas amplifikacijos PGR metu nenustatytas. Visi APPD profiliai iš visų augalų buvo monomorfiniai ir panašūs į kitus augalus, tai patvirtina genetinį stabilumą tarp klonuotų ir motininų augalų. Šie rezultatai gali būti labai naudingi šio svarbaus vaistinio augalo genetiniams ištekliams tirti ir valdyti.

Stevijos saldikliai gali padėti žmonėms mėgautis natūraliu saldumu, tuo pačiu sumažinant kalorijas ir prisidedant prie sveikos, subalansuotos mitybos. Akivaizdžiausias *Stevia rebaudiana Bertoni*



privalumas yra tas, kad jis suteikia saldumo, bet nepadidina gliukozės kiekio kraujyje, kaip tai daro baltasis cukrus. Be to, dauguma tyrimų parodė, kad šis augalas gali aktyviai sumažinti cukraus kiekį kraujyje [26].

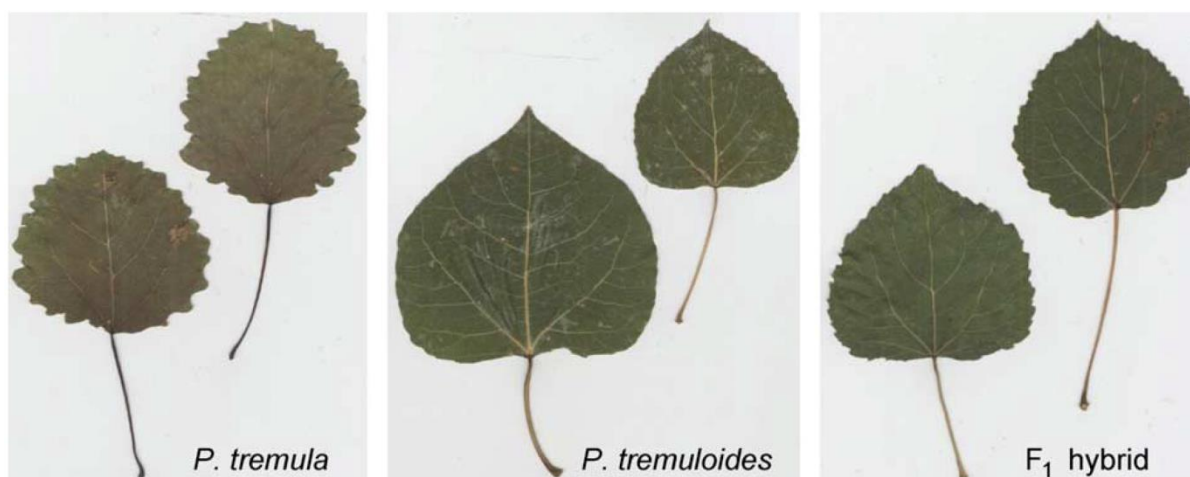
## 1.2. Hibridinė drebulė (lot. *Populus tremula* L. X *P. tremuloides*)

### 1.2.1. Hibridinės drebulės botaninis aprašymas

Hibridinės drebulės tėvų rūšys yra *Populus tremula* L. ir *P. tremuloides*. Šios rūšys priklauso šeimai *Salicaceae*, *Populus* genčiai. Abi rūšys turi didelį natūralumą ir pasiskirstymo diapazoną, *P. Tremula* rūšis yra vienas iš labiausiai paplitusių pasaulyje, o *P. tremuloides* yra rūšis plačiausiai paplitusi Šiaurės Amerikoje. *P. tremula* ir *P. tremuloides* yra genetiškai artimos rūšys, todėl buvo pasiūlyta atsižvelgti į jas kaip į vieną rūšį, turinčią apytakinį pasiskirstymą [27]. Drebulės paprastai yra diploidai ( $2n\ 38$ ), nors taip pat randami triploidiniai ir tetraploidiniai individai.

Paprastai *P. tremula* ir *P. tremuloides* yra vidutinio dydžio medžiai, jie gali siekti 35-40 m aukštį, o skersmuo kamieno gali siekti iki 1 m. Šios rūšys yra ekonomiškai svarbios, nes jos lengvai kryžminasi su kitomis medžių rūšimis, sukurdamos naujas, gerai veisiamas ir selektyvias rūšis.

Paprastas fenotipinis bruožas, kuris išskiria hibridinę drebulę nuo tėvų rūšių yra jų lapų forma (1.1. pav.). Lapų dimorfizmas hibridinėje drebulėje sudaro kitokią lapų formą nei tėvų rūšys. Hibridų lapai pasižymi suapvalinta trikampė forma su karpytais kraštais. Lapų dimorfizmas yra ypač ryškus jauname amžiuje. Hibrido pranašumas buvo paaiškintas trimis būdais: stipriu heterozės efektu, spartesniu augimu ir geresniu atsparumu *Melampsoraspp.* ir *Venturiaspp.* kenkėjams, kurie gali smarkiai sumažinti augimą [28].



1.1. pav. *P. tremula*, *P. tremuloides* ir  $F_1$  hibrido lapų formų skirtumai

Šios rūšys yra gerai prisitaikančios ir kolonizuojamos teritorijose po gaisro, pjovimo, sėjimo ar šaknų išrovimo. Tai yra dominuojantis natūralios regeneracijos būdas. O šių rūšių hibridinės drebulės auga daug greičiau ir per pirmuosius 20-30 metų rodo didesnę biomasės produktyvumą nei jos pagrindinės rūšys. Hibridinė drebulė yra derlinga ir eksperimentai parodė, kad ji gali kryžmintis ir produkuoti gyvybingas sėklas su savo pagrindinėmis rūšimis [3].

### 1.2.2. Hibridinės drebulės komercinė nauda

Biodegalai yra svarbūs šaltiniai iškastinei energijai pakeisti, bandant atstatyti atmosferos sutrikimus vidutinio klimato zonose. Apskaičiuota, kad šiuo metu ir ateityje potencialas gaminti medienos biomasę aplinkos apsaugos sąlygomis yra didelis Šiaurės ir Baltijos šalyse. Didėjančio medienos kuro kiekio naudojimas yra būtinas norint ateityje išsaugoti klimatą. Šiaurės šalys mano, kad iki 2050 m. anglies naudojimas turi būti minimalus.

Padidėjęs miško produktyvumas gali būti pasiektas keliais būdais. Svarbiausias kelias yra įvesti ir naudoti sparčiai augančias medžių rūšis ir sukurti jiems tinkamas valdymo sistemas. Populus gentis turi perspektyvių kandidatų, galinčių padėti išspręsti šią problemą, o hibridai gauti iš (*P. Tremuloides Michx.*) ir Europinės drebulės (*P. tremula L.*), siūlo dar didesnes biomasės sukaupimo galimybes [29]. Atsinaujinančių trumpos rotacijos medienos energetinių augalų auginimas žemės ūkio paskirties žemėje galėtų būti alternatyva žemės ūkio kultūrų gamybai. Trumpos rotacijos mediniai augalai taip pat galėtų būti alternatyva įprastam apželdinimui, todėl miškai tapo vis labiau dominuojantys šiaurės rytų Europos kraštovaizdyje [30].

Hibridinės drebulės plantacijų augalai, priklausantys atrinktiems klonams, komerciškai padauginami naudojant auginius arba šaknines augalų dalis. Skandinavijoje ir Baltijos šalyse sodinimo tankis paprastai yra 1100 - 1600 augalų ha<sup>-1</sup> [31]. Miškų apželdinimo metu medžių sodinukai konkuruoja su kitomis rūšimis dėl erdvės, šviesos, vandens ir maistinių medžiagų. Žemės ūkio dirvožemiuose konkurencija gali būti stipri dėl esamos žemės ūkio augmenijos [30]. Žemės ūkio dirvožemiuose pirmaisiais metais reikalingas cheminis ar mechaninis piktžolių valdymas. Didesnis sodinimo tankis gali būti naudojamas (4000 medžių ha<sup>-1</sup>), kai plantacija yra kuriama gaminti energetinę medieną ir rotacijos laikotarpis yra labai trumpu (5 - 10 metų). Hibridinė drebulė gali būti valdoma per 20 - 30 metų, kad būtų galima prekiauti mediena. Pasibaigus rotacijos laikotarpiui galima tikėtis, kad bus gauta 300 450 m<sup>3</sup>ha<sup>-1</sup> medienos. Norint pasiekti aukštesnės kokybės asortimentą, hibridinės drebulės genėjimas yra naudinga priemonė. Rotacijos metu atliekami 1-3 retinimai, retinimo laikas priklauso nuo medžių tankumo ir augimo greičio [31]. Trumpesnės rotacijos modeliuose retinimas nereikalingas [28].

### 1.2.3. Hibridinės drebulės dauginimas ir augimo valdymas

Miško medžiai teikia žaliavas, padeda išlaikyti biologinę įvairovę ir sušvelninti klimato kaitos padarinius. Kai kurios medžių rūšys taip pat gali būti naudojamos kaip žaliava bioenergijos gamybai. Šiems tikslams pasiekti gali prireikti įvesti ar modifikuoti genus, kad biomasės gamyba būtų tvari ir ekologiškai atsakinga. Medžio genų inžinerija jau pasiekė tašką, kur galima įvesti ir išreikšti efektyvius genus, skirtus pageidaujamiems požymiams; pavyzdžiai apima biotinę ir abiotinę streso toleranciją, pagerintas medienos savybes, šaknų formavimąsi ir fitoremediaciją. Siekiant išvengti ekologinės rizikos ir atitikti reguliavimo reikalavimus, gali prireikti transgeno sulaikymo, įskaitant žydėjimo kontrolę. Prieš pradėdant naudoti transgeninius medžius komerciškai turi būti suformuota stabili išraiška ir ištirtas efektyviausių augimo reguliatorių naudojimas [32].

Augalų regeneracija iš vegetatyvinių audinių yra ypač svarbi medinių augalų gerinimui, nes jie gali būti klonuoti ir padauginami naudojant tokius metodus kaip pjovimas, skiepijimas ir dalijimasis. Taip galima išlaikyti patobulintas augalų savybes. *In vitro* regeneravimas ir efektyvus dauginimo būdas, gali būti pasiektas dviem būdais: tiesioginiu regeneravimu ir netiesioginiu regeneravimu. Atsitiktiniai ūgliai išsivysto iš pradinių augalų ląstelių su tiesioginiu regeneravimu, pirmiausia iš

pradinio tiriamojo audinio susidaro kalius, o po to atsiranda nauji ūgliai iš kaliaus audinių su netiesioginiu regeneravimu. Palyginti su diferencijuotais audiniais (pvz., lapais, kamienais ir šaknimis), kaliaus ląstelių grupė, yra jautresnė *in vitro* sąlygoms, įskaitant ilgalaikį augalų augimo reguliatorių ir kitų cheminių medžiagų poveikį; todėl augalų regeneracija per kaliaus stadiją gali sukelti genetinius pokyčius, vadinamus somakloniniais pokyčiais, o tai kenkia procedūroms, kuriomis siekiama klonuoti [33].

Drebulių hibridinės rūšys priklauso ekonomiškai svarbiausioms medžių gentims pasaulyje, kurios pastaraisiais metais vis dažniau naudojamos trumpos rotacijos miškininkystėje. Šie hibridai, taip pat, yra ypač svarbūs, nes jie yra medinių augalų molekulinį ir fiziologinių tyrimų modeliai [34]. Hibridinės drebulės medžiai turi didžiulią ekologinę ir ekonominę vertę, dėl jų sugebėjimo greitai įsitvirtinti sutrikdytose vietovėse. Jų plitimas per kloninius mikroūglius yra labai veiksmingas ir efektyvus.

Tinkamų tirpalų parinkimas maitinamosiose terpėse yra labai svarbus, jei norima gauti optimalų šakninių ūglių skaičių. Mikroūglių diferencijavimas nuo pumpurų yra labai efektyvus. Tai yra svarbi masinių pasirinktų genotipų klonavimo ypatybė, siekiant išlaikyti kultūros sukeltą genetinį kintamumą mažiausiu priimtiniu lygiu. Apskritai, jauni medelynuose auginami dygliai rodo geresnius augimo atsakus nei pumpurai, paimti iš vyresnių medžių. Tačiau regeneracinį potencialą daugiausia lemia drebulės klonų genotipas *in vitro* sąlygomis.

Sparčiam kloniniam hibridinių drebulių dauginimui dažnai naudojami modifikuotos Murashige ir Skoog mineralinių druskų terpė (MS). Benzilaminopurinas (BAP; 0,5 mg/l) kartu su adenino sulfatu (20 mg/l) dažnai naudojami mikroūglių diferencijacijai sukelti, o mikroūglių proliferacijai buvo naudojamos mažos naftaleno acto rūgšties (NAR; 0,02 mg/l) koncentracijos. Po 6–8 savaičių mikroūglių iššaknijimui buvo naudojami nedideli auksinų kiekiai (0,5 mg/l indolebutirūgšties (IBA) ir 0,01 mg/l NAR). Be to, indol-3-acto rūgštis (IAR) gali būti naudojama efektyviam iššaknijimui pusiau skystoje MS terpėje arba vidutinio kietumo MS terpėje. Sintetiniai augimo reguliatoriai gali pakeisti genetinę augalo struktūrą, todėl yra aktualu ieškoti natūralių augimo reguliatorių tokių kaip zeatino ribozidas (ZR), tai didžiausiu natūralumu pasižymintis citokininas [35].

Aukštos išėigos drebulių biomasė gali būti labai apribota patogenų ir kenkėjų. *Melampsora* genties grybai sukelia lapų rūdis ir šie grybai dažnai veikia drebulės [36]. Infekcijos veda prie ankstyvo lapų ir ūglių džiūvimo ir taip sumažina augalų biomasę. Drebulių lapų rūdys gali sukelti net 40% biomasės praradimą [37]. Užteršimas ir hiperhidracija dažnai veikia medines audinių kultūras, nors jas galima iš dalies įveikti dažnai persodinus, naudojant antibiotikus ir vidutinio mitybinių terpių ir hormonų sudėties skirtumus. Gamyklinių padalinių gamybos sąnaudos *in vitro* yra didelės ir reikalauja daug darbo jėgos. Pelningumas gali būti pasiektas tik tuo atveju, jei rūšys yra efektyviai dauginamos ir pasiekama didelė biomasė [35].

## 2. Medžiagos ir tyrimų metodai

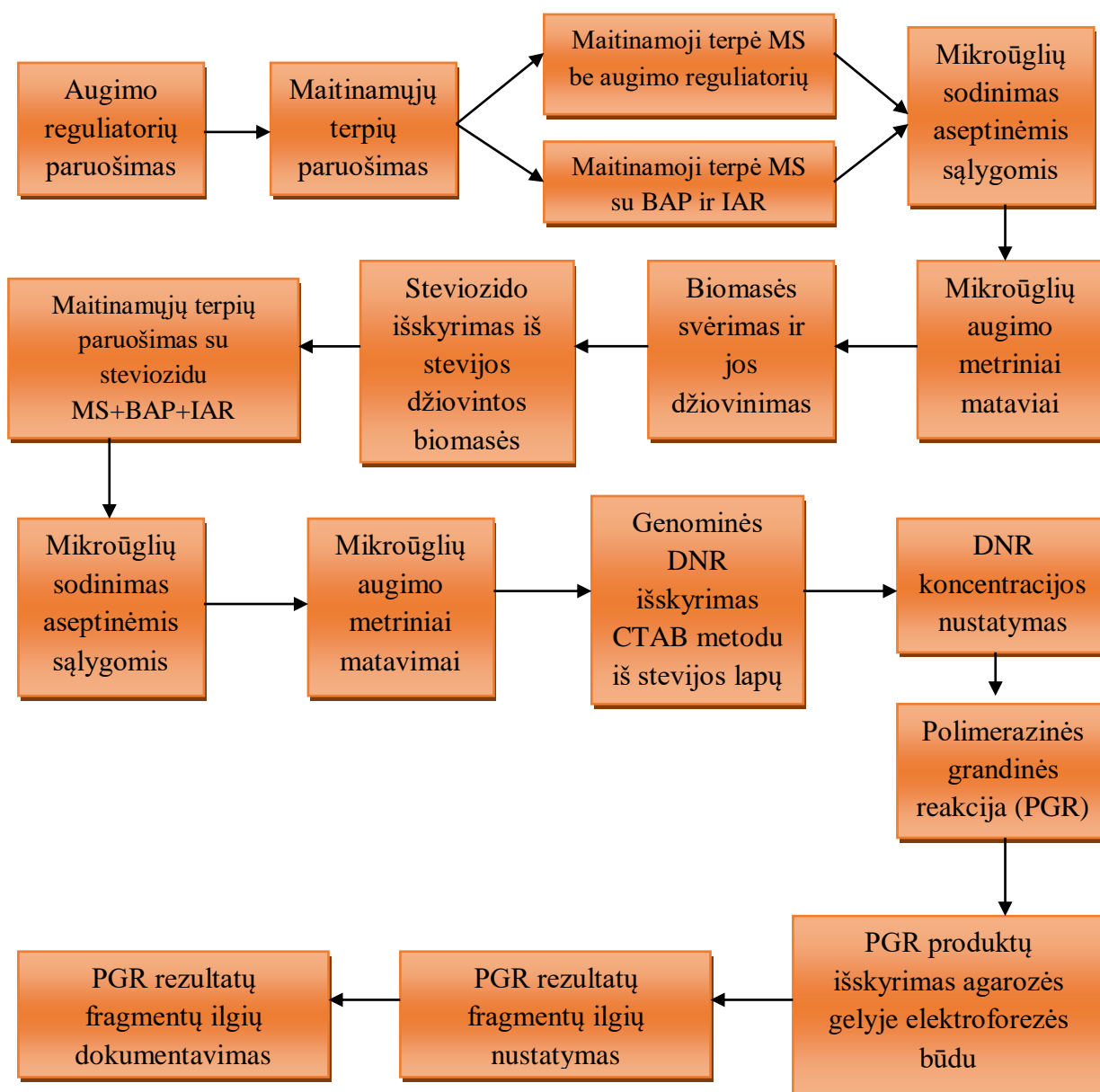
### 2.1. Tyrimų objektas

Tyrimo metu naudoti *Stevia rebaudiana Bertoni* augalai. Tirtas šių augalų augimo greitis ir genominės DNR struktūra. Taip pat, buvo išbandoma stevijos steviozido saldiklio įtaka hibridinių *Populus tremula* ūglių auginimui *in vitro* aplinkoje.

### 2.2. Tyrimų vieta

Bandymai atlikti 2017 – 2019 m. Lietuvos agrarinių ir miškų mokslo centro filiale Miškų instituto Miško augalų biotechnologijos laboratorijoje.

### 2.3. Tyrimų metodikų schema



2.1. pav. Nuosekli tyrimų metodų schema

## 2.4. Tyrimams naudoti reagentai ir tirpalai

96% C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH., metanolis, 0,5M EDTA, 1M NaCl pH 8, 10% CTAB, β-merkapotetanolis, PVP-40 (polivinilpirolidono-40000 nMWT), chloroformas (Chloroformas: izoamil alkoholis(24:1)), 5M NaCl, etilo alkoholis: 76% ir 95%, RNRazė A, 3 M natrio acetatas, sterilus dejonizuotas H<sub>2</sub>O, 10x PGR buferis, 4 dNTP mišinys: 2 mM kiekvieno, MgCl<sub>2</sub>, DNR matrica: 50 ng/ μl, termostabili *Taq* polimerazė, mineralinė alyva, distiliuotas H<sub>2</sub>O, 10X ir 1X TBE buferis (TRIS, boro rūgštis, EDTA), 1,5 % agarozės tirpalas, etidžio bromido tirpalas (0,5 μg/ml), dažas mėginiams, dedamas į agarozės gelį (60 % glicerinas, 50 mM EDTA, 0,05 % bromfenolio mėlis), DNR ilgio standartas (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus), distiliuotas H<sub>2</sub>O.

## 2.5. Tyrimams naudoti prietaisai ir aparatūra

Karščiui atsparios kolbos, sterilūs 20 ml mėgintuvėliai ir indeliai, termocikleris, mikrocentrifuga, traukos spinta, automatinės pipetės, sterilūs antgaliai automatinėms pipetėms, sterilūs 0,5 ml mėgintuvėliai, stoveliai mėgintuvėliams, guminės pirštinės, vandens termostatas, svarstyklės, purtyklė, grūstuvėliai, grūstuvės, sterilūs 1,5 ml ir 2 ml mėgintuvėliai, elektroforezės aparatas, nuolatinės srovės šaltinis, mikrobangų krosnelė, BioDocAnalyse sistema, pincetai, sterilios lėkštutės, spiritinė lempelė.

## 2.6. Augimo reguliatorių paruošimas

Augimo reguliatorių tirpalo (0,1 mg/ml) paruošimas atliekamas pasveriant 10 mg augimo reguliatorių miltelių ir suberti juos į matavimo kolbą. Milteliams ištirpinti įpilti 2 – 5 ml tirpiklio (distiliuoto vandens). Visiškai ištirpinus reguliatoriaus junginį, įpilti dvigubą kiekį distiliuoto vandens. Tirpalą išmaišius, pripilti distiliuoto vandens iki reikiamo lygio, t.y. iki 100 ml.

Reikalingas paimti augimo reguliatoriaus tirpalo tūris terpei iš pradinio tirpalo apskaičiuojamas pagal formulę (1):

$$X = \frac{A \times B}{C} \quad (1)$$

X – reikalingas paimti tirpalo tūris iš pradinio paruošto tirpalo su augimo reguliatoriaus medžiaga, ml;

A – reikalinga gauti galutinė koncentracija, mg/l;

B – praskiedimo tūris, l;

C – pradinio tirpalo, paruošto su tiriamąja medžiaga, koncentracija (mg/ml).

Šis tūris praskiedžiamas iki 100 ml, kad gauti reikiama koncentracija (mg/l).

### 2.1. lentelė. Augimo reguliatoriai naudojami MS terpėse

Sutrumpinimas	Cheminis pavadinimas
IAR (auksinai)	3-indolilacto rūgštis
BAP (citokininai)	6-benzilaminopurinas

## 2.2. lentelė. Auksinų molekulinės masės ir tirpalų paruošimui naudojami tirpikliai

Augimo reguliatorius	Molekulinė masė	Tirpiklis
3-indolilacto rūgštis	197,2	Vanduo
6-benzilaminopurinas	225,3	1 N NaOH ir vanduo

## 2.7. Maitinamųjų terpių sudėtis ir gaminimas

Tarp kitų *in vitro* veiksnių, tokių kaip temperatūra ir šviesa, augalų augimo reguliatorių koncentracija ir maitinamosios terpės sudedamosios dalys yra du svarbiausi sėkmingo mikroūglių augimo aspektai [5].

*Stevia rebaudiana Bertoni* ūglių auginimui buvo parinkta standartinė 30 g/l sacharozės koncentracija. *Stevia* ūgliai buvo auginami hormoninėse ir be hormoninėse terpėse (2.3 lentelė).

Taip pat, buvo stebima steviozido saldiklio įtaka hibridinių *Populus tremula* mikroūglių augimui *in vitro* terpėse.

Naudojamas baltasis steviozido ekstraktas, kuris 250 kartų saldesnis už sacharozę. Pasirinkti kiekiai, tirti saldiklių įtakai, buvo atitinkamai apskaičiuoti pagal sacharozės ir steviozido saldumo skirtumą kartais.

Naudojami sacharozės kiekių intervalai terpėms 1 litrui terpėms buvo parinkti: 10 g, 15 g, 20 g, 25 g, 35 g, 40 g, 45 g, 50 g. Perskaičiavus sacharozės kiekius gavome atitinkamus steviozido kiekius naudojamus terpėse: 0,04 g, 0,06 g, 0,08 g, 0,1 g, 0,12 g, 0,14 g, 0,16 g, 0,18 g, 0,2 g. Naudotos baltojo steviozido koncentracijos terpėms pateiktos (2.4. lentelė).

## 2.3. lentelė. Modifikuota MS maitinamoji terpė

Medžiagos	Terpė	
	Be hormoninė	Hormoninė
<b>Makroelementai, mg/l</b>		
KNO <sub>3</sub>	1900	1900
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	1650
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	170
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440	440
MgSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	555	555
<b>Mikroelementai, mg/l</b>		
KI	0,83	0,83
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	22,3	22,3
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,25	0,25
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,03	0,03
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	6,2
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	8,6	8,6
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,03	0,03
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	27,8	27,8

NaEDTA·2H <sub>2</sub> O	37,8	37,8
<b>Angliavandeniai, g/l</b>		
Sacharozė	30	30
<b>Vitaminai</b>		
Piridoksinas·HCl (B <sub>6</sub> )	0,2	0,2
Tiaminas·HCl (B <sub>1</sub> )	0,2	0,2
Askorbo rūgštis	0,5	0,5
Nikotininė rūgštis	0,5	0,5
Mio-Inozitolis	100	100
<b>Augimo reguliatoriai, mg/ml</b>		
BAP	-	0,1
IAR	-	0,01

**2.4. lentelė.** Skirtingi anglies šaltinių kiekiai naudojami MS terpėse

Anglies šaltinis terpėse	Anglies šaltinių kiekis, g/l										
	Kontrolė	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Sacharozė	30	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Baltasis steviozidas	0	0	0,04	0,06	0,08	0,1	0,12	0,14	0,16	0,18	0,2

Atlikus tyrimą ir atrinkus terpes, kuriose geriausiai augo hibridinių *Populus tremula* mikroūgliai, bandėmė dar labiau pagerinti ūglių augimą, todėl tyrėme sacharozės, baltojo steviozido ir stevia lapų ekstrakto metanolyje mišinius terpėse (2.5. lentelė).

**2.5. lentelė.** Anglies šaltinių kiekiai naudojami MS terpėse

Anglies šaltinis terpėse	Anglies šaltinių kiekis, g/l							
	Kontrolė	1	2	3	4	5	6	7
Sacharozė	30	0	0,04	0,06	0,04	0,06	0,04	0,06
Baltasis steviozidas	0	0	0	0	0,04	0,06	0	0
Stevjos lapų ekstraktas	0	0	0	0	0	0	0,04	0,06

Gaminant terpes visus, išskyrus gelritą, maitinamajai terpei reikalingus komponentus pasverti ir supilame į 1 litro talpos karščiui atsparų indą. Supilti 0,5 litro distiliuoto vandens tūrį ir gerai viską išmaišyti.

Tuomet matuojama tirpalo pH. Jei reikia pH koreguojame su 0,1 M NaOH arba 0,1 M H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> tirpalais. Suregulavus terpės pH įpilti gelrito ir distiliuotu vandeniu užpildyti indą iki 1 litro. Maitinamosios terpės sterilinamos autoklave 120°C, esant 0,75 – 1 atm. slėgiui, 15 min. [38].

## 2.8. Mikroūglių sodinimas aseptinėmis sąlygomis

Mikroūglių sodinimas atliekamas aseptinėmis sąlygomis laminare „TELSTAR BV-100“. Prieš sodinant ūglius laminaras buvo dezinfekuojamas apvalant paviršius 96 % C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH. Pincetai sterilinami laminare juos sudedant į vieną vietą, kur jie užpilami 96 % C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH ir uždegami.

Užsidegti spiritinę lempelę ir su šluoste, suvilgyta etanoliu, apvalyti visus maitinamųjų terpių indelius ir mėgintuvėlius. Prieš kiekvieno naujo ūglio sodinimą pincetai yra dezinfekuojami, mirkyti į etanolį ir uždegti nuo spiritinės lempelės.

Laminare sodinome *Stevia rebaudiana Bertoni* išskaidytas augalų dalis (viršūnes ir stiebus) į Murashige ir Skoog (MS ir MS+BAP+IAR) maitinamąsias terpes (pH=5,7). Sodinamas ūglių aukštis 20 mm. Nuskintas augalo viršūnes ir stiebus su lapeliais įterpti į maitinamąsias terpes. Ūglius auginome visą parą apšvietoje patalpoje, esant 20-25 °C temperatūrai. Augimo rezultatai stebimi po 7 dienų.

Laminare sodinti hibridinės *Populus tremula* drebulės ūgliai į Murashige ir Skoog (MS+BAP+IAR) maitinamąsias terpes (pH=5,7).

Buvo pagaminta 16 skirtingų (MS) maitinamųjų terpių, kuriose vietoje sacharozės buvo naudojamas steviozido saldiklis, bandant ištirti kuri saldiklio koncentracija terpėse skatina spartesnę hibridinių drebulių augimą.

Statistiniams duomenims išvesti ir tikslesniam kiekvienos terpės poveikio įvertinimui, naudoti po 25 mėgintuvėlius kiekvienam terpės variantui.

Į 20 pirmų mėgintuvėlių sodinami hibridinės drebulės viršūnių ūgliai. Sodinamų ūglių aukštis turi būti 20 mm. Nuo ūglių viršūnių su steriliu pincetu nuskinti visus augalo lapelius į sterilę lėkštutę. Atidaryti sterilintus mėgintuvėlius ir įterpti į maitinamąją terpę viršūnių ūglius.

Į likusius 5 mėgintuvėlius sodinti hibridinės drebulės stiebų ūglius. Sodinamų ūglių aukštis turi būti 20 mm. Nuo ūglių stiebų su steriliu pincetu nuskinti visus augalo lapelius į sterilę lėkštutę. Atidaryti sterilintus mėgintuvėlius ir įterpti į maitinamąją terpę stiebų ūglius.

Ūglius auginti visą parą apšvietoje patalpoje, esant 20-22 °C temperatūrai. Augimo rezultatai stebimi 3 kartus kas 7 dienas.

## 2.9. Steviozido ekstrakto išskyrimas iš stevijos lapų

Išaugintus, *in vitro* *Stevia rebaudiana Bertoni*, 4 savaitių ūglius nuskinti, apdengti folija. Palikti džiūti kambario temperatūroje 2 savaites.

Steviozido ekstrakciją vykdyti naudojant 96% metanolio tirpiklį. Pasverti 5 g sausos stevijos biomasės, ją smulkiai sutrinti ir užpilti 50 ml metanolio. Po 2 valandų vykdyti filtraciją. Nufiltruotus stevijos lapus užpilti nauja 50 ml metanolio porcija, filtraciją vykdyti po 2 valandų. Paskutinį žingsnį kartoti dar du kartus, tik ketvirtąjį kartą stevijos lapus užpylus metanolio filtraciją vykdyti po 12 valandų [39,40].

Gautą 200 ml stevijos lapų ekstraktą metanolyje naudojame maitinamųjų terpių gamyboje.



## 2.10. *Stevia rebaudiana Bertoni* DNR išskyrimas modifikuotu CTAB metodu

Šio tyrimo metu buvo išskiriama DNR iš *Stevia rebaudiana Bertroni*, išaugintų *in vitro*, lapų, taikant modifikuotą CTAB metodą.

Tyrimui buvo paruošiamas sterilus ekstrakcijos buferis (2.6. lentelė). Pasveriami 50 – 100 mg šviežių stevijos lapų, kurie smulkiai sutrinami grūstuvėliu 2 ml mėgintuvėlyje. Sutrintus lapus užpilame ekstrakcijos buferiu ir gerai viską išmaišome.

### 2.6. lentelė. Sterilaus ekstrakcijos buferio paruošimas

Tirpalai ir reagentai	Vienam mėginiui pilti
EDTA	0,04 ml
TRIS	0,1 ml
NaCl	0,275 ml
CTAB	0,2 ml
β-merkapotetanolis	0,0002 ml
PVP-40	10 mg
Dejonizuotas H <sub>2</sub> O	0,3848 ml

Išmaišytus mėginius inkubuoti 60°C temperatūros vandens termostate 25 min., o po inkubacijos atvėsinti.

Į atvėsintus mėginius įpilti po 1 ml chloroformo, išmaišyti ir centrifuguoti mikrocentrifūgoje 3 min. 10000 aps./min. greičiu.

Mėginius nucentrifugavus nupilti viršutinę vandeninę fazę (iki 380 µl), kurioje yra DNR, šią fazę perkelti į naują 2 ml talpos mėgintuvėlį. Įpilti 0,5V 5M NaCl ir gerai išmaišyti.

Tada įpilti 2V šalto 95% etilo alkoholio. Mėginį išmaišyti vartant ir laikyti 20 min. -20°C temperatūroje.

Atšaldytą mėginį su nusėdusia DNR centrifuguoti 5 min. 10000 aps./min. greičiu. Tada supernatantą atsargiai pašalinti, o nusėdusią DNR ištirpinti 300 µl dejonizuotu vandeniu.

Į mėginį įpilti 2,5 µl RNRazės A ir inkubuoti vandens termostate 30 min. 37°C. Po inkubacijos įpilti 300 µl chloroformo, išmaišyti ir centrifuguojame 3 min. 10000 aps./min. greičiu.

Viršutinę vandeninę fazę atsargiai perkelti į naują 1,5 ml mėgintuvėlį. Įpilti 0,1V natrio acetato (3M) ir 2,5V šalto (-20°C) 95% etilo alkoholio.

Mėginį išmaišyti vartant ir laikome 30 min. -20°C temperatūroje, kad išsiskirtų DNR. Atšaldytą mėginį centrifuguoti 5 min. 10000 aps./min. greičiu.

Atsargiai pašalinti supernatantą, o DNR praplauti 200 µl 76% alkoholiu. Išskirtą DNR ištirpinti 100 µl steriliu dejonizuotu vandeniu.

Mėginius laikyti šaldytuve 4°C temperatūroje. Ilgesnį laiką nenaudojant DNR saugoti ją -20°C temperatūroje [41].

## 2.11. *Stevia rebaudiana Bertoni* DNR koncentracijos nustatymas

Stevijos DNR koncentracijas nustatinėjome su „Thermo Scientific NanoDrop One“ bekiuvečiu spektrofotometru, kuris nustato DNR, RNR ir baltymų koncentracijas.



2.2. pav. Thermo Scientific NanoDrop One spektrofotometras

Ištirpinta stevijos DNR medžiaga 50  $\mu\text{l}$  dejonizuotame vandenyje naudojama koncentracijos nustatymui. Tyrimui atlikti imti 1-2  $\mu\text{l}$  tiriamojo mėginio. Genetinės medžiagos koncentracija nustatoma prie 260 nm bangos ilgio.

Tyrimams reikalinga DNR koncentracija mėginiuose turi būti iki 50  $\text{ng}/\mu\text{l}$ . Kai koncentracijos yra didesnės nei 50  $\text{ng}/\mu\text{l}$ , atliekami skiedimai. Reikiamas dejonizuoto vandens kiekis skiedimui apskaičiuojamas pagal (2) formulę.

$$V_{H_2O} = \left( \frac{C_x \cdot V_m}{C_n} \right) - V_m \quad (2)$$

Čia:

$V_{H_2O}$  – reikalingas dejuonizuoto vandens kiekis mėginio praskiedimui iki 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$  koncentracijos,  $\mu\text{l}$ ;

$C_x$  – nustatyta mėginio koncentracija,  $\text{ng}/\mu\text{l}$ ;

$V_m$  – mėginio tūris,  $\mu\text{l}$ ;

$C_n$  – norimas koncentracijos kiekis, 50 $\text{ng}/\mu\text{l}$ .

Po praskiedimo mėginius gerai išmaišyti. Ilgesnį laiką nenaudojant DNR saugoti ją  $-20^\circ\text{C}$  temperatūroje.

## 2.12. Polimerazės grandininė reakcija (PGR), naudojant atsitiktinius pradmenis

Oligonukleotidiniai pradmenys: Roth A01 – Roth A020; Roth B01 – Roth B020; Roth 170 – 01 – Roth 170 – 10; Roth 370-01; Roth 370-04; Roth 370-10.

Traukos spintoje steriliomis sąlygomis į 0,5 ml talpos sterilius vienkartinis mėgintuvėlius paruošti DNR pagausinimo reakcijos mišinį (2.7. lentelė). Paruoštą mėginį gerai išmaišyti ir trumpai nucentrifuguoti. Ant mėginio viršaus užlašinti 15 µl mineralinės alyvos.

### 2.7. lentelė. DNR pagausinimo reakcijos mišinys

Reagentai	Kiekis, µl;
10X PGR buferis	2,5
MgCl <sub>2</sub>	3,0
dNTP	2,5
Pradmuo	1,0
<i>Taq</i> DNR polimerazė	0,2
DNR matrica	2,0
Dejonizuotas vanduo	13,8

### 2.8. lentelė. DNR pagausinimo pakopos termocikleryje

Pakopa	Temperatūra, °C	Trukmė, min
Pirminė denatūracija	94	5
DNR denatūracija	94	1
Pradmenų prilipimas	35	1
DNR sintezė	72	2
Baigiamoji DNR sintezė	72	5
Atvėsėjimas	25	1

Polimerazinė grandininė reakcija atlikta automatiname termocikleryje. DNR pagausinimo pakopos aprašytos (2.8. Lentelėje), 2 – 4 pakopos kartojamos 40 ciklų. Po reakcijos mėgintuvėliai su PGR produktais iki tolimesnės analizės laikyti šaldytuve [26].

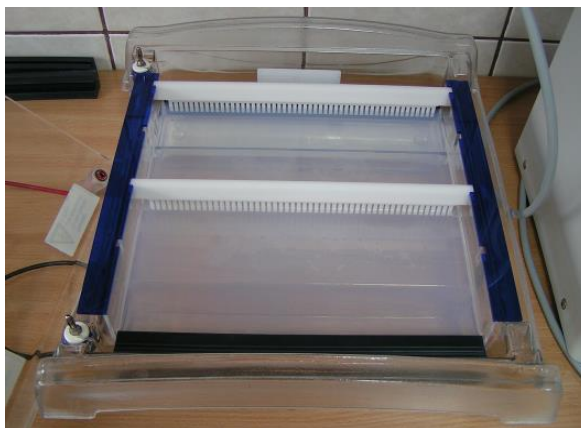
### 2.13. PGR produktų atskyrimas agarozės gelyje elektroforezės būdu

PGR produktų atskyrimas vykdomas elektroforezės būdu 1,5% agarozės gelyje.

#### 2.9. lentelė. 1,5% agarozės gelio sudėtis

Reagentai	Komponentų kiekis 100 ml
Agarozė	1,5 g
TBE (10X) buferis	10 ml
Etidžio bromido	10 µl
Distiliuotas H <sub>2</sub> O	Iki 100 ml

Pasverame agarozės miltelius, užpilame 10X TBE buferiniu tirpalu, pripildome indą distiliuotu vandeniu iki 100 ml ir viską gerai išmaišome. Mikrobangų krosnelėje kaitiname 2 – 3 min., kelis kartus gerai viską pamaišome. Gelį pravėsiname iki 60°C temperatūros, tada įpilame 10 µl etidžio bromido tirpalo. Paruoštą agarozės ištirpintą tirpalą supilame į elektroforezės padėklą su šukomis ir laukiame, kol gelis visiškai pilnai sustings (40 min.) (2.3. pav).



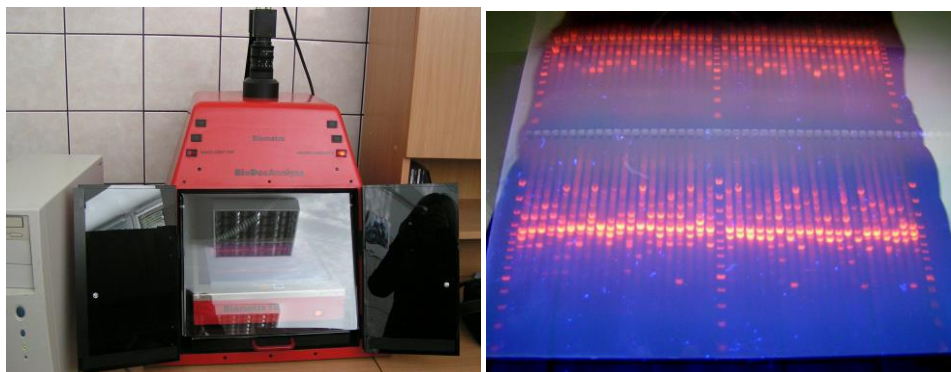
2.3.pav. Agarozės gelis

Paruošiamo DNR mėginius: į mėgintuvėlį su 25 µl PGR produktų įpilame 5,5 µl mėginio dažo. Mėginį išmaišome. Sustingus agarozės geliui, atsargiai ištraukiame šukas. Į duobutes supilame paruoštus DNR mėginius. Gelį su mėginiais atsargiai užpilame 1X TBE buferiu, kad apsemtų. Greta tiriamų mėginių į vieną duobutę įpilame 4 µl DNR ilgio standarto (GeneRuler™ 100bp DNA Ladder Plus).

Elektroforezę atliekame apie 3 val., esant 76 V įtampai [42].

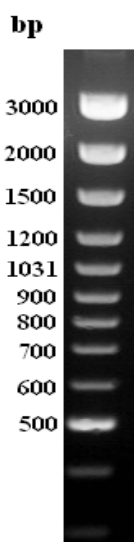
## 2.14. PGR rezultatų dokumentavimas bei pagraisintų DNR fragmentų ilgio nustatymas

Pasibaigus elektroforezei, išjungiame srovės šaltinį. Gelį nufotografuojame UV šviesoje, naudojant BioDocAnalyse sistemą. Nuotraukas su gautais rezultatais išsaugome kompiuteryje \*.jpg formatais.



2.4. pav. BioDocAnalyse sistema ir UV šviesa apšviestas agarozės gelis

Pagraisintų DNR fragmentų bazių porų dydžiai (bp) nustatomi pagal DNR ilgio standartą GeneRuler™ 100bp DNA LadderPlus, kurio fragmentų dydžiai pavaizduoti (2.5. pav.)



2.5. pav. DNR ilgio standartas

Vykdamas elektroforezę per tą patį laiką vienodą atstumą nukeliavę DNR fragmentai laikomi vienodais ir vadinami RAPD juostomis (RAPD aleliais, RAPD fragmentais). Kiekvienas atskiras DNR pavyzdžio RAPD juostų rinkinys vadinamas RAPD fenotipu.

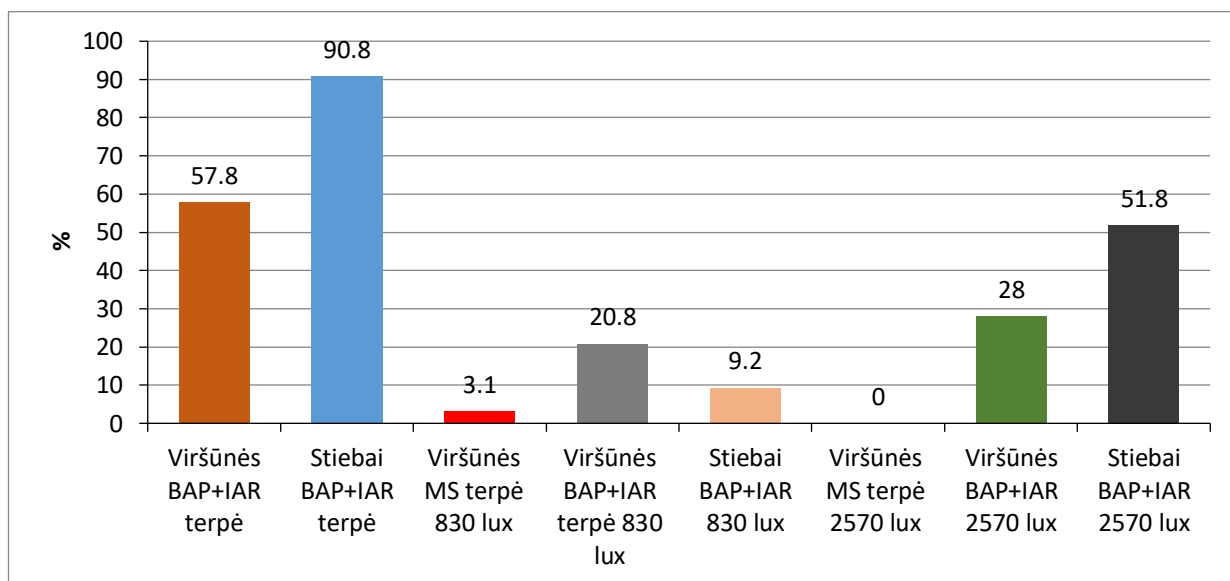
Fragmentų dydžių analizavimą atlikti vizualiai, lyginant juos su DNR ilgio standartais (2.4. pav.). Surašyti kiekvieno tirto individo APPD fenotipus į dvireikšmių požymių lentelę. Vienodo dydžio DNR fragmentų buvimas ar nebuvimas pagraisintų produktų spektruose žymimas atitinkamai: „1“ ir „0“. Po DNR pagraisintų kiekviename APPD spektre matomas gana didelis juostų (DNR fragmentų) skaičius. Neaiškios, neatsikartojančios, blogai atsiskyrusios DNR fragmentų juostos neanalizuojamos [43].

### 3. Tyrimų rezultatai ir jų aptarimas

#### 3.1. *Stevia rebaudiana Bertoni* mikroūglių įvertinimas

Šio tyrimo metu iš sėklų išauginti *Stevia rebaudiana Bertoni* ūgliai buvo dauginami *in vitro* auginiais (viršūnėmis ir stiebais), sodinat juos į skirtingų sudėčių terpes. Naudojamos buvo (MS) be hormoninės terpės ir (MS) terpės su BAP ir IAR hormonais. Tirta ir šviesos įtaka ūglių augimui prie 830 ir 2570 lux šviesos stiprumų.

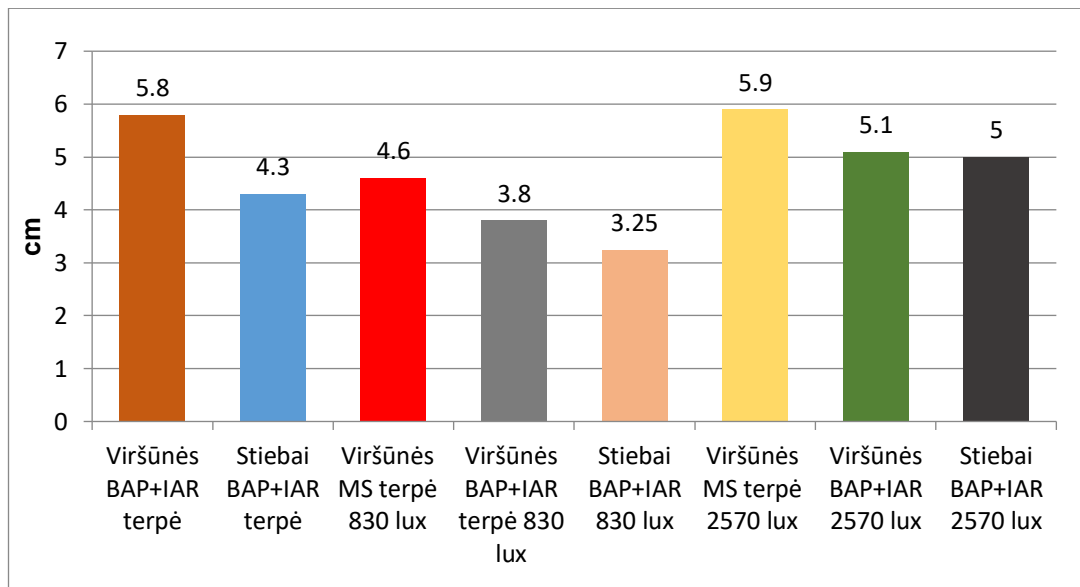
Į terpes sodinti 20 mm aukščio auginiai. Ūgliai buvo vertinami po dviejų savaitių auginimo *in vitro* aplinkoje. Įvertintas naujų ūglių priaugis ir ūglių aukščio pokytis (3.1. pav.).



**3.1. pav.** Procentinis naujų *Stevia rebaudiana Bertoni* ūglių priaugio įvertinimas, naudojant skirtingas maitinamąsias terpes ir skirtingo stiprumo apšvietimus

Stevijos stiebų auginiai auginti terpėse su BAP ir IAR hormonais sudaro daugiausiai naujų mikroūglių (90,8%). Tai rodo, kad stiebai yra labiau linkę į šakojimąsi ir naujų ūglių sudarymą nei viršūnės (57,8%) auginamos hormoninėse terpėse.

Apšvietimo stipris taip pat turi labai didelę įtaką naujų ūglių augimui. MS terpėse auginant viršūnių auginius naujų ūglių susidarymas 830 lux šviesoje yra labai mažas, ūgliai yra menki blankiai žalios spalvos, pageltę ir turi bordo atspalvį. Tuo tarpu, 2570 lux šviesoje naujų ūglių visai nesusidarė, tačiau ūgliai yra aukšti, turi stambius ryškiai žalius lapus. Stiebus auginant hormoninėse terpėse naujų ūglių augimas 2570 lux šviesoje buvo 18,2% didesnis nei auginant juos 830 lux apšvietime.



**3.2. pav.** *Stevia rebaudiana Bertoni* ūglių aukščių įvertinimas po 2 savaičių auginimo skirtingose maitinamosiose terpėse ir skirtinguose apšvietimuose

*Stevia rebaudiana Bertoni* pasižymi sparčiu augimu. Pasodinti 2 cm auginiai po 2 savaičių auginimo užauga dvigubai ar net trigubai didesni.

Vertinant stevijos viršūnių augimą, aukščiausi ūgliai buvo naudojant (MS) maitinamąją terpę be hormonų ir 2570 lux šviesos apšvietimą, vidutiniškai 5,9 cm. Net ir esant 830 lux šviesai (MS) terpėse auginti viršūnių ūgliai vidutiniškai siekė 4,6 cm. Visos viršūnės augintos hormoninėse terpėse ir stipresniame apšvietime pasižymėjo aukštais ūgliais. Šie stevijos eksplantai turi tvirtas šaknis ir ryškius stambius lapus, didesniame apšvietime sudaro daugiau biomasės.

Stevijos stiebų ūgliai auginti su hormonais yra ne tokie aukšti, jų lapai nėra labai stambūs, beveik nesudaro šaknų, vietoje šaknų susidaro kalius. Terpėje esantys hormonai skatina kaliaus susidarymą, o ne pačio augalo augimą, todėl biomasės gauname mažiau ir ūglių aukštis esant 2570 lux apšvietimui yra vidutiniškai 5 cm. Didesniame apšvietime eksplantai yra ryškesni ir šiek tiek didesni. Lyginant stevią augusią silpnesniame apšvietime pastebėjome, kad biomasės susidaro mažiau, lapai yra smulkesni ir turi bordo atspalvį.

### 3.2. Steviozido įtaka *Populus tremula* ūglių auginimui

Šio tyrimo metu atliktas statistinis tyrimas su hibridinėmis drebulėmis, bandant išsiaiškinti ar sacharozės naudojamą maitinamosiose (MS+BAB+IAR) terpėse galima pakeisti baltuoju steviozidu ir ar galimas *Populus tremula* ūglių augimo greičio optimizavimas.

Tyrimui buvo pagaminta 16 terpių su skirtingomis sacharozės, baltojo steviozido ir steviozido ekstrakto metanolyje koncentracijomis. Steviozidas yra 250 kartų saldesnis už sacharozę, todėl parinktos sacharozės koncentracijos buvo perskaičiuotos į steviozido kiekį, kuris atitinka sacharozės saldumą (3.1. lentelė).

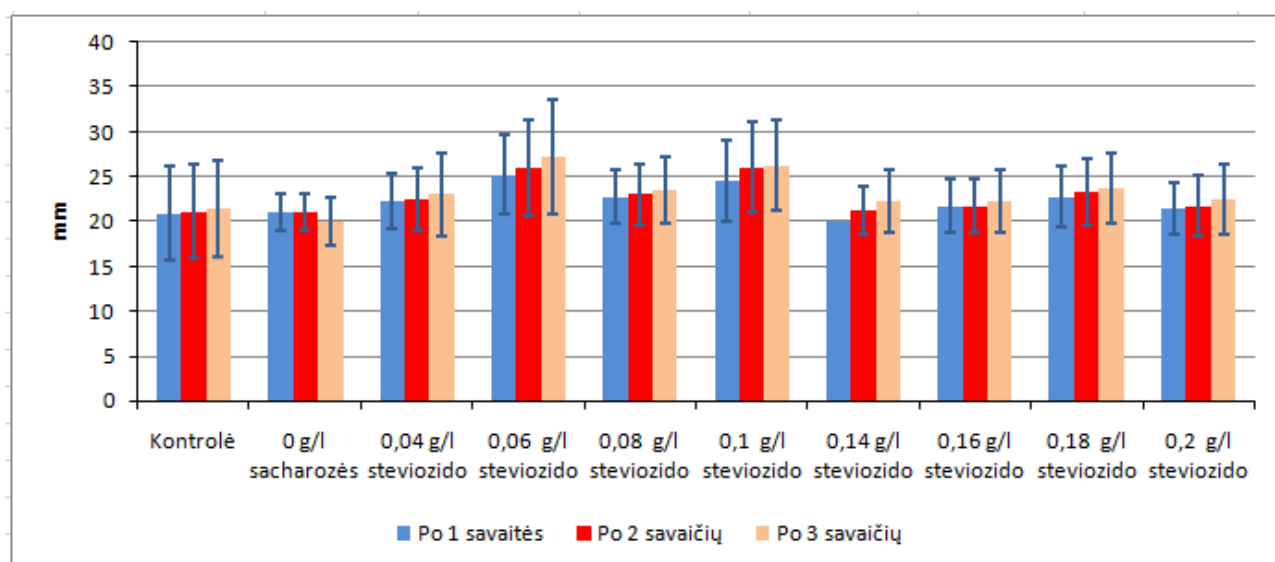
### 3.1. Lentelė. Steviozido naudojamų koncentracijų

Parinktos sacharozės koncentracijos (MS+BAP+IAR) terpėse, g/l									
0	10	15	20	25	30	35	40	45	50
Steviozido koncentracija (WPM) terpėse, kuri atitinka sacharozės saldumą, g/l									
0	0,04	0,06	0,08	0,1	-	0,14	0,16	0,18	0,2

### 3.3. Hibridinių *Populus tremula* viršūnių ūglių aukščių įvertinimas

Hibridinių *Populus tremula* kloninių ūglių *in vitro* viršūnes su nuskintais lapais 20 mm, kaip eksplantus, įterpiame į maitinamąją terpę (MS+BAP+IAR).

Pirmiausia buvo tirta dešimt koncentracijų (3.1. lentelė). Paruoštos aštuonios terpės tik su skirtingomis steviozido koncentracijomis. Kontrolei naudojama 30 g/l sacharozės koncentracija. Taip pat tirta kaip augalai reaguoja, kai maitinamojoje terpėje nėra jokių anglių šaltinių (0 g/l sacharozės). Tyrimo rezultatai fiksuoti 3 savaites, metriniai matavimai atlikti kas savaitę.



3.3. pav. Steviozido skirtingų koncentracijų įtaka hibridinių *Populus tremula* kloninių ūglių *in vitro* viršūnių aukščiams

Po pirmosios savaitės atlikus metrinį viršūnių auginių aukščio matavimą pastebėta, kad lyginant su kontrole, kurios vidutinis ūglių aukštis buvo  $20,9 \pm 5,2$  mm, spartus ūglių augimas ir gera augalų išvaizda buvo auginant juos terpėse su 0,04 g/l, 0,06 g/l ir 0,1 g/l steviozido koncentracijomis, atitinkamai jų aukštis vidutiniškai siekė  $22,25 \pm 3,02$  mm,  $25,25 \pm 4,03$  mm ir  $24,5 \pm 4,55$  mm. Šių ūglių išvaizda labai gera, ūgliai skleidžia naujus lapus, jie yra tvirti ir ryškiai žalios spalvos. Pastebėta, kad didėjant steviozido koncentracijai ūglių išvaizda pirmąją savaitę yra gera, bet jie sunkiau skleidžia naujus lapus. Terpėse kuriose nėra jokio anglių šaltinio drebulių mikroūgliai visi neskleidžia naujų lapų, bet turi žalius tvirtus stiebus.

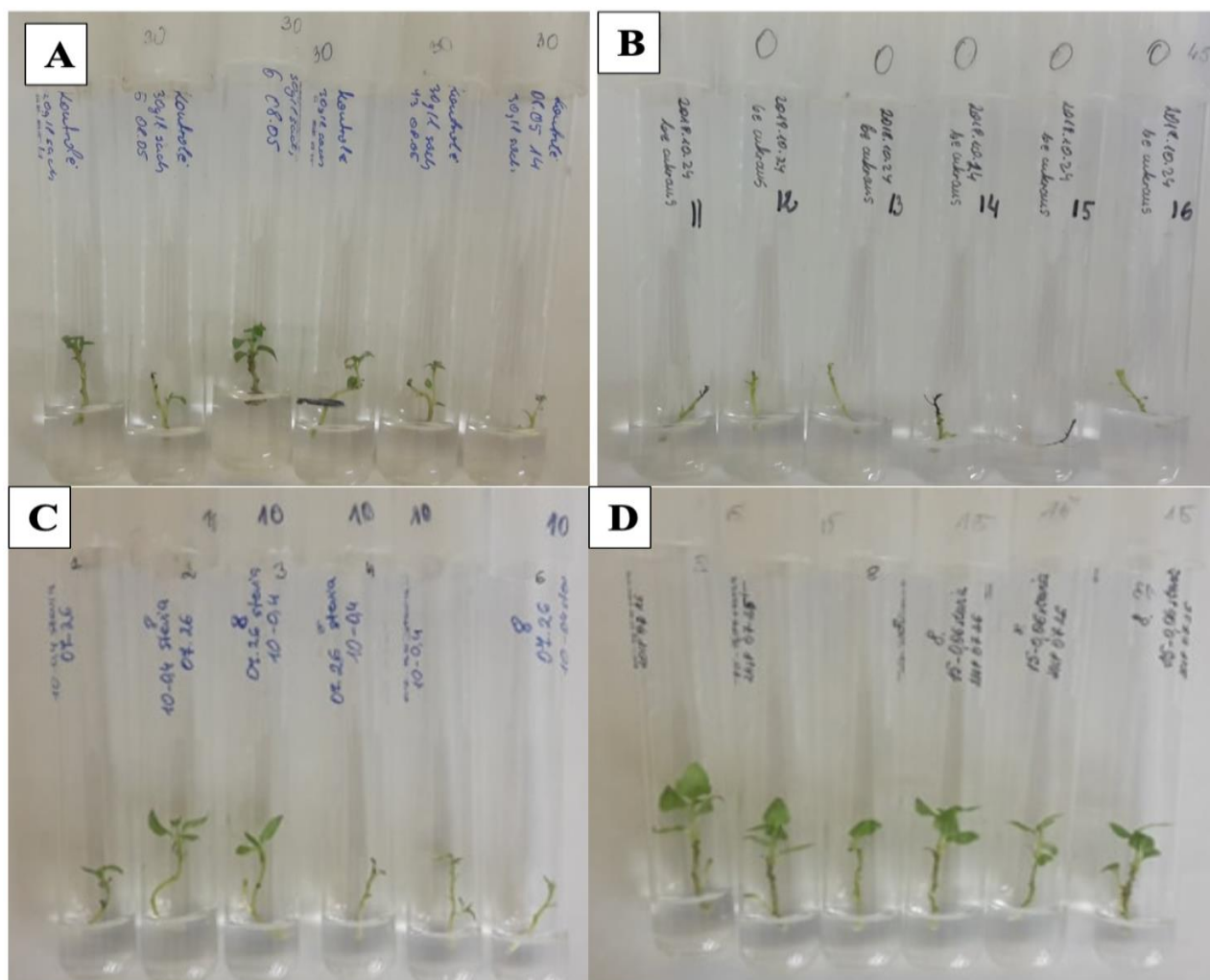
Po antrosios savaitės atlikus metrinį viršūnių auginių aukščio matavimą pastebėta, kad lyginant su kontrole, kurios vidutinis ūglių aukštis buvo  $21,1 \pm 5,29$  mm, spartus ūglių augimas ir gera augalų išvaizda vis dar buvo auginant juos terpėse su 0,04 g/l, 0,06 g/l ir 0,1 g/l steviozido koncentracijomis, atitinkamai jų aukštis vidutiniškai siekė  $22,5 \pm 3,44$  mm,  $26 \pm 5,28$  mm ir  $26 \pm 5,03$  mm. Šiose koncentracijose auginami ūgliai pasižymėjo spartesniu augimu, plačia ir gausia



lapija, augalai ryškiai žali su tvirtais stiebais. Pastebėta, kad didėjant steviozido koncentracijai ūglių išvaizda antrąją savaitę prastėja, augimas menkas, lapijos priaugis mažas, yra apvytusių ūglių. Nulinės koncentracijos terpėse drebulių mikroūgliai pradėjo vysti ir gelsti, tik keli ūgliai išskleidė menkus lapus, aukštis nepakito.

Po trečiosios savaitės atlikus metrinius viršūnių auginių aukščio matavimus pastebėta, kad lyginant su kontrole, kurios vidutinis ūglių aukštis buvo  $21,4 \pm 3,35$  mm, spartus ūglių augimas ir gera augalų išvaizda vis dar buvo auginant juos terpėse su 0,04 g/l, 0,06 g/l ir 0,1 g/l steviozido koncentracijomis, atitinkamai jų aukštis vidutiniškai siekė  $23 \pm 4,7$  mm,  $27,25 \pm 6,38$  mm ir  $26 \pm 5,09$  mm. Tik šį kartą 0,1 g/l steviozido koncentracijoje auginami ūgliai pradėjo vysti, lapija buvo apdžiūvusi. Kitose dvejose koncentracijose auginami ūgliai pasižymėjo labai gera išvaizda, plačia ir gausia lapija, augalai ryškiai žali su tvirtais stiebais. Didėjant steviozido koncentracijoms ūglių aukštis mažai skyrėsi nuo kontrolinių ūglių aukščių, o jų išvaizda trečiąją savaitę buvo prasta, augimas menkas, lapijos priaugis mažas, buvo daug apvytusių ūglių. Nulinės koncentracijos terpėse drebulių mikroūgliai buvo nuvytę, tik keli ūgliai dar buvo gyvybingi.

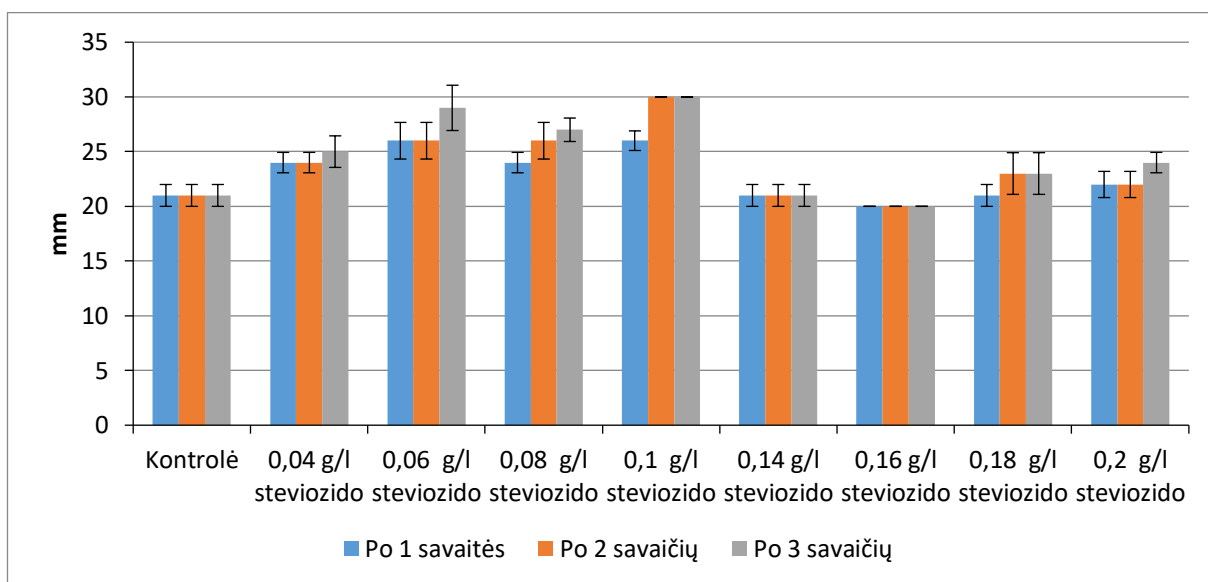
Vaizdiniai viršūnių mikroūglių skirtumai pateikti (3.4. pav.).



**3.4. pav.** Skirtingose terpėse auginamų hibridinių drebulių viršūnių mikroūgliai po 3 savaičių: A- kontrolinė 30 g/l sacharozės; B - 0 g/l sacharozės; C - 0,04 g/l baltojo steviozido; D – 0,06 g/l baltojo steviozido

### 3.4. Hibridinių *Populus tremula* stiebų mikroūglių aukščių įvertinimas

Tyrimo metu buvo taip pat siekiama išsiaiškinti, kuriuos hibridinių drebulių auginius geriausiai veikia maitinamosios terpės su steviozidu. Todėl tos pačios koncentracijos buvo parinktos tiriant ir drebulių stiebų ūglius. Hibridinių *Populus tremula* kloninių ūglių *in vitro* stiebus 20 mm, kaip eksplantus, įterpiame į maitinamąją terpę (MS+BAP+IAR). Ūglių ilgių metrinis matavimas fiksuojamas kas 7 dienas 3 savaites.



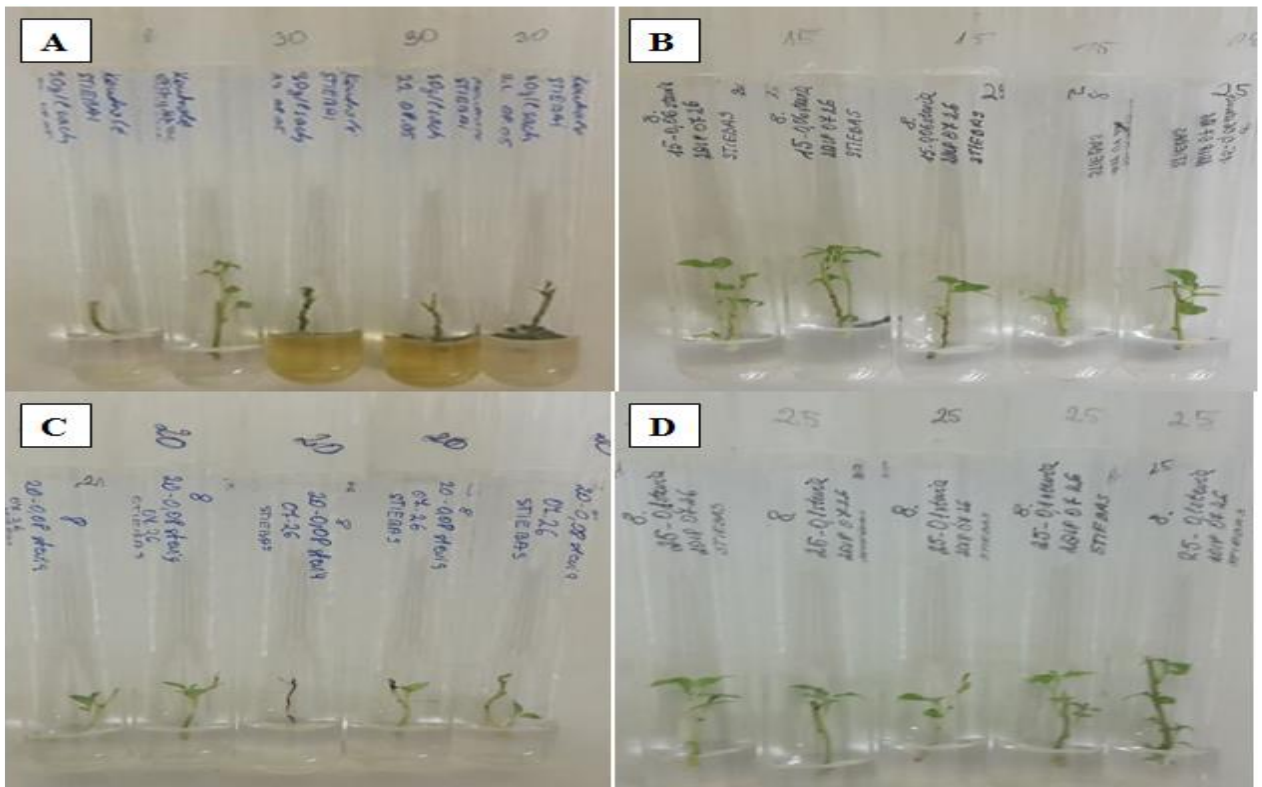
3.5. pav. Steviozido skirtingų koncentracijų įtaka hibridinių *Populus tremula* kloninių ūglių *in vitro* stiebų aukščiams

Po pirmosios savaitės atlikus metrinis stiebų ūglių aukščio matavimus pastebėta, kad lyginant su kontrole, kurios vidutinis ūglių aukštis buvo  $21 \pm 1$  mm, spartus ūglių augimas ir gera augalų išvaizda buvo auginant juos terpėse su 0,04 g/l, 0,06 g/l, 0,08 g/l ir 0,1 g/l steviozido koncentracijomis, atitinkamai jų aukštis vidutiniškai siekė  $24 \pm 0,93$  mm,  $26 \pm 1,67$  mm,  $24 \pm 0,93$  mm ir  $26 \pm 0,89$  mm. Šių ūglių išvaizda labai gera, ūgliai skleidžia naujus lapus, taip pat vyksta augalo šakojimasis, ko nepastebima kontroliniuose ūgliuose. Didėjant steviozido koncentracijai ūglių išvaizda pirmąją savaitę yra gera, bet jie beveik nesudaro naujos lapijos.

Po antrosios savaitės atlikus metrinis stiebų ūglių aukščio matavimus pastebėta, kad kontrolinių ūglių aukštis išliko nepakitęs. Geri augimo rezultatai matyti ūgliuose auginamuose 0,06 g/l, 0,08 g/l ir 0,1 g/l terpėse, ūglių aukštis atitinkamai siekia  $26 \pm 1,67$  mm,  $26 \pm 1,67$  mm ir  $30 \pm 0$  mm aukštį. Spartus augimas ir gausus ūglių šakojimasis. Didėjant steviozido koncentracijai ūglių išvaizda prastėja, augimas beveik sustojęs ir nesudaro naujos lapijos.

Po trečiosios savaitės atlikus metrinis stiebų ūglių aukščio matavimus pastebėta, kad kontrolinių ūglių aukštis išliko nepakitęs, augimas ir lapijos susidarymas nevyksta. Geri augimo rezultatai matyti ūgliuose auginamuose 0,06 g/l, 0,08 g/l ir 0,1 g/l terpėse, ūglių aukštis atitinkamai siekia  $29 \pm 2,07$  mm,  $27 \pm 1,07$  mm ir  $30 \pm 0$  mm aukštį. Spartus augimas, gausus ūglių šakojimasis ir graži plati lapija. Didėjant steviozido koncentracijai ūglių išvaizda prastėja, augimas beveik sustojęs ir nesudaro naujos lapijos, daug sudžiūvusių stiebų.

Vaizdiniai stiebų mikroūglių skirtumai pateikti (3.6. pav.).



**3.6. pav.** Skirtingose terpėse auginamų hibridinių drebulių stiebų mikroūgliai po 3 savaičių: A- kontrolinė 30 g/l sacharozės; B - 0,06 g/l baltjojo steviozido; C - 0,08 g/l baltjojo steviozido; D – 0,1 g/l baltjojo steviozido

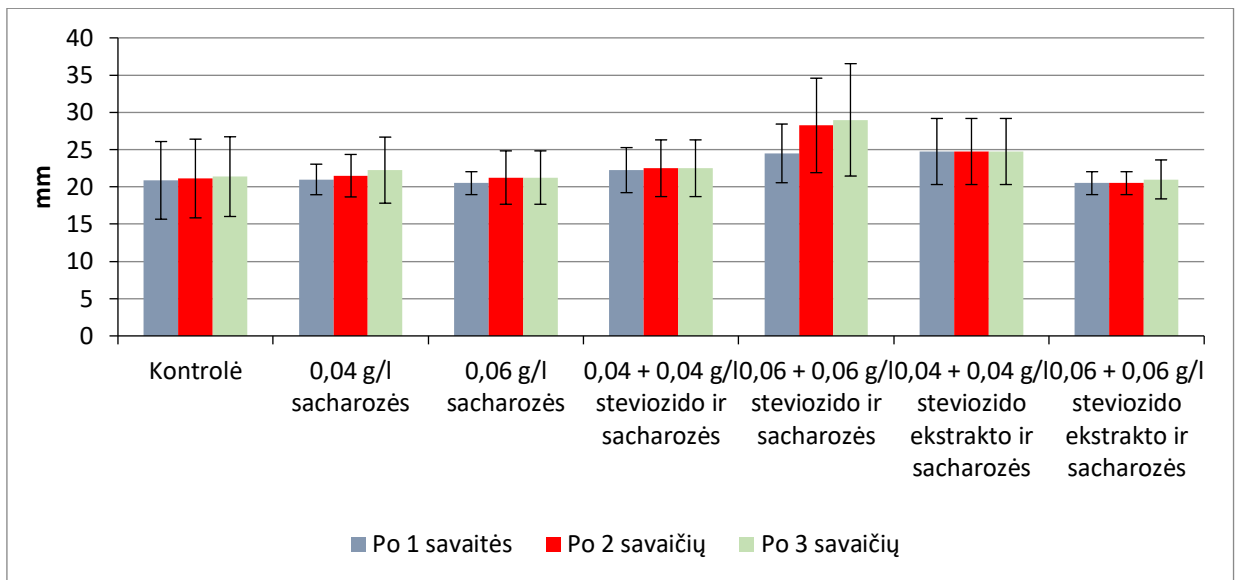
### 3.5. Efektyviausių koncentracijų atrinkimas ir *Populus tremula* augimo optimizavimas

Ankstesni tyrimai parodė, kad steviozido naudojimas terpėse yra efektyvus ir kai kuriais atvejais spartina ūglių augimą daug labiau nei naudojant sacharozę. Terpėse, kuriose nebuvo jokio anglies šaltinio, ūgliai po 3 savaičių nuvyto ir tapo negyvybingi, todėl galime daryti išvadą, kad augalai puikiai sugeba pasisavinti steviozidą kaip anglies šaltinį.

Tiriant hibridinių drebulių viršūnes ir stiebus atrinkome dvi: 0,04 ir 0,06 g/l steviozido koncentracijas, kurios labiausiai spartino ūglių augimą, lapijos susidarymą ir skatino šakojimąsi. Su šiomis koncentracijomis pagaminome dar 6 skirtingų kombinacijų terpes ir bandėme optimizuoti hibridinių *Populus tremula* mikroūglių augimą.

Tyrėme, kaip mikroūgliai reaguoja į 0,04 ir 0,06 g/l sacharozės koncentracijas terpėse. Taip pat atlikome sacharozės ir steviozido mišinių kombinacijas terpėse. Pirmas terpės mišinys su 0,04 g/l sacharozės ir 0,04 g/l baltuoju steviozidu. Antras terpės mišinys su 0,06 g/l sacharozės ir 0,06 g/l baltuoju steviozidu. Trečias terpės mišinys su 0,04 g/l sacharozės ir 0,04 g/l stevijos lapų ekstraktu. Ketvirtas terpės mišinys su 0,06 g/l sacharozės ir 0,06 g/l stevijos lapų ekstraktu.

Hibridinių *Populus tremula* kloninių ūglių *in vitro* viršūnes ir stiebus 20 mm su apskintais lapais, kaip eksplantus, įterpiame į maitinamąją terpę (MS+BAP+IAR). Ūglių ilgių metrinius matavimus fiksavome 3 savaites kas savaitę.



**3.7.pav.** Hibridinū *Populus tremula* viršūnīu mikroūgliu optimizavimas naudojant atrinktas koncentracijas

Lyginant kontrolę (30 g/l sacharozės) su 0,04 g/l ir 0,06 g/l sacharozės koncentracijomis pastebėta, kad ūglių augimas yra apytiksliai panašus į kontrolės, bet naudojant mažesnes sacharozės koncentracijas ūgliai menkiausiai sklaidžia lapus ir po 3 savaičių augimo yra menkesni, užfiksuota nemažai apvytusių ūglių.

Lyginant terpės mišinį (0,04 g/l sacharozė ir 0,04 g/l baltasis steviozidas) su kontrole, pastebime, kad ūgliai auga šiek tiek didesni, bet didelio skirtumo nuo kontrolės nepastebėta.

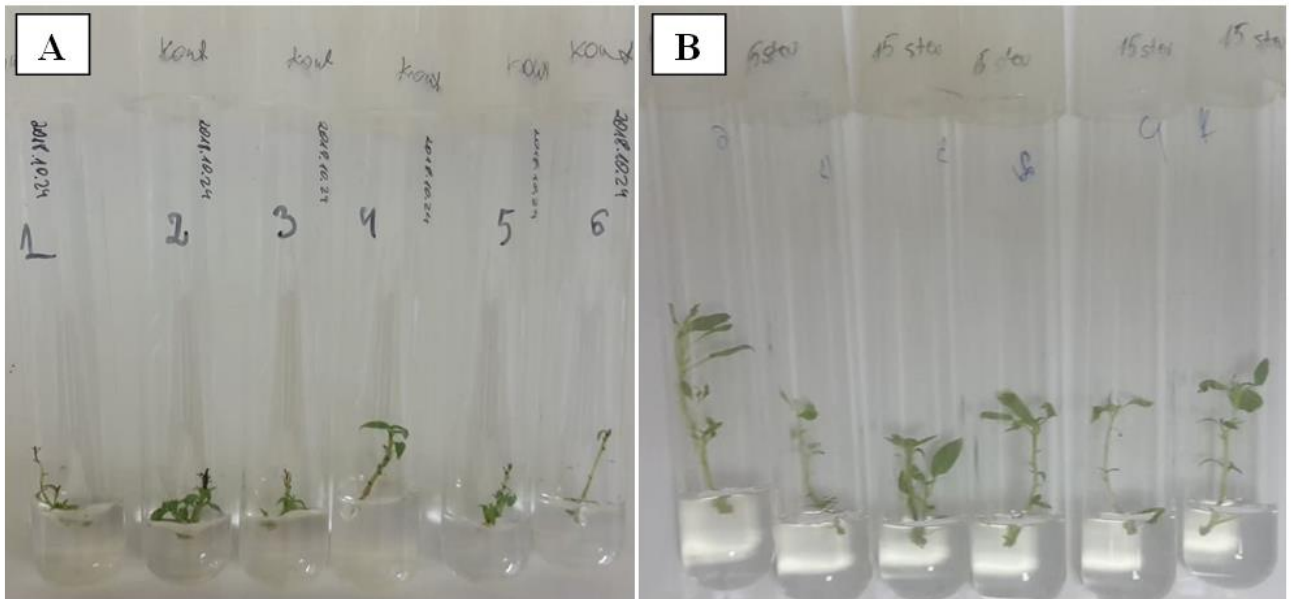
Lyginant terpės mišinį (0,04 g/l sacharozė ir 0,04 g/l stevijos lapų ekstraktas) su kontrole, pastebime, kad ūgliai pasiekia apytiksliai 24,75 ± 4,43 mm aukštį po 3 savaičių augimo, kai kontroliniai ūgliai vidutiniškai pasiekia tik 21,38 ± 5,34 mm. Tačiau kontrolės lapija gausesnė nei naudojant šį stevijos lapų ekstraktą. Taip pat pastebėtas augalų vytimas.

Lyginant terpės mišinį (0,06 g/l sacharozė ir 0,06 g/l stevijos lapų ekstraktas) su kontrole, pastebime, kad ūgliai auga menkai ir po 3 savaičių augimo pasiekia tik 21 ± 2,61 mm kai kontrolė pasiekia 21,38 ± 5,34 mm. Pastebėtas didelis ūglių nykimas, ūgliai tapo menki ir blankūs, sudarė menką lapiją, kuri greitai vyto.

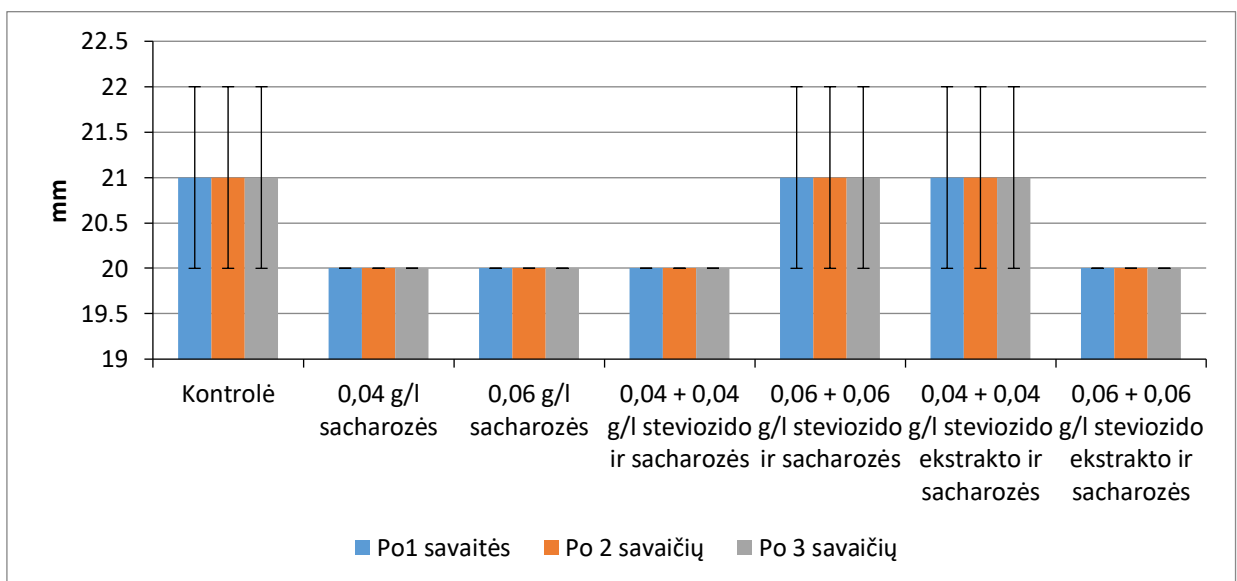
Geriausi rezultatai pasiekiami terpėje naudojant 0,06 g/l sacharozės ir 0,06 g/l baltojo steviozido mišinį. Lyginant su kontrole, kurios ūgliai po pirmosios savaitės pasiekė apytiksliai 20,88 ± 5,21 mm aukštį, terpėje su sacharozė ir baltuoju steviozidu ūgliai išaugo apytiksliai iki 24,5 ± 3,94 mm aukščio, o kai kurie ūgliai pagal standartinį nuokrypį pasiekdavo iki 29 mm aukštį. Po antros savaitės registravimų, kontrolė išaugo iki 21,12 ± 5,28 mm, kai mišinio terpėse ūgliai pasiekdavo iki 28,25 ± 6,34 mm aukštį. Kai kurie ūgliai apytiksliai pagal standartinį nuokrypį pasiekdavo iki 35 mm aukštį. Paskutinę trečiąją savaitę kontrolė išaugo iki 21,38 ± 5,34 mm, o ūgliai auginti mišų terpėse apytiksliai siekė 29 ± 7,53 mm. Pagal standartinį nuokrypį kai kurie ūgliai siekdavo iki 37 mm aukštį.

0,06 g/l sacharozės ir 0,06 g/l baltojo steviozido mišinio terpėje ūgliai buvo labai geros būklės. Nei vienas ūglys nebuvo nuvytęs. Stiebai buvo tvirti ir ryškiai žalios spalvos. Lapijos gausumas ir lapų platumas buvo dvigubai didesnis nei kontroliniuose ūgliuose. Naudojant šias koncentracijas terpėse

galima smarkiai pagreitinti ir pagerinti hibridinių drebulių mikroūglių augimą. Šis sacharozės ir steviozido saldiklio derinys buvo išrinktas kaip tinkamiausias ir labiausiai naudos duodantis mikroūglių augimui *in vitro* aplinkoje. Kontrolės ir (0,06 g/l sacharozės ir 0,06 g/l baltojo steviozido) mišinio terpėse augintų mikroūglių vaizdinį skirtumą galime pamatyti ( 3.8. pav.)



**3.8. pav.** Hibridinių drebulių viršūnių mikroūglių vaizdinis skirtumas po 3 savaitių: A- kontrolinė, 30 g/l sacharozės; B - 0,06 g/l sacharozės ir 0,06 g/l baltojo steviozido mišinys



**3.9. pav.** Hibridinių *Populus tremula* stiebų mikroūglių optimizavimas naudojant atrinktas koncentracijas

Tyrimo metu pastebėta, kad naudojant mažas sacharozės koncentracijas (0,04 ir 0,06 g/l) ūgliai visai neaugo ir neskleidė naujų lapų. Visas tris augimo savaites ūgliai išliko tokie patys kokie buvo pasodinti. Taip pat, augimas neužfiksuotas naudojant 0,04 g/l sacharozės ir 0,04 g/l baltojo steviozido koncentracijų derinį. Šiose koncentracijose ūgliai buvo apdžiūvę. O naudojant 0,06 g/l sacharozės ir 0,06 g/l stevijos lapų ekstrakto koncentracijų derinį ūgliai vyto ir neaugo. Naudojant 0,06 g/l sacharozės ir 0,06 g/l baltojo steviozido koncentracijų derinį terpėse ūgliai augo tik iki



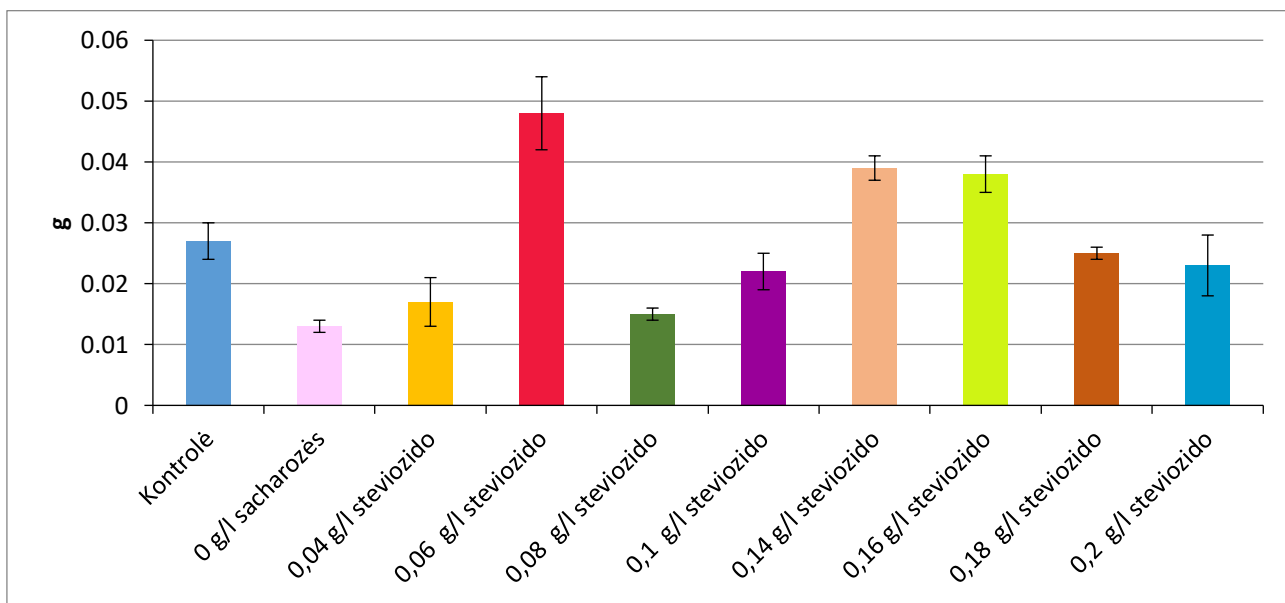
pirmos savaitės, susidarė smulki lapija. O naudojant 0,04 g/l sacharozės ir 0,04 g/l stevijos lapų ekstrakto koncentracijų derinį ūgliai augo tik pirmą savaitę, paskui vyto ir neaugo.

Iš rezultatų matyti, kad hibridinės drebulės stiebų mikroūgliams tinkamos terpės geram augimui išgauti nepavyko, stiebų ūgliai vyto ir pasižymėjo prasta lapija.

### 3.1.1. *In vitro* auginamos hibridinės *Populus tremula* biomasės įvertinimas

Tyrimo tikslas buvo nustatyti, ar naudojant maitinamosiose terpėse steviozido saldiklį, hibridinių *Populus tremula* mikroūglių biomasė didėja.

Hibridinių drebulių ūglių žalia biomasė buvo surenkama po 3 savaičių auginimo *in vitro* aplinkoje. Ūgliai pasveriami ir išvedama žalios biomasės statistika (3.10. pav. ir 3.11. pav.).



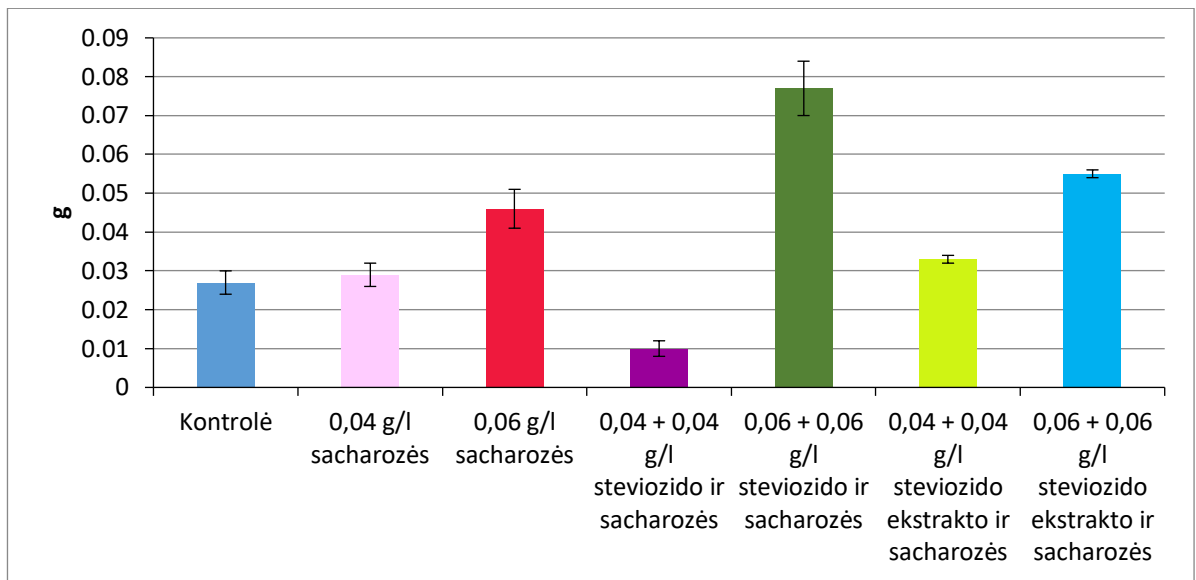
3.10. pav. Steviozido įtaka biomasės kiekiui

Hibridinių drebulių biomasės kiekis po 3savaičių įvertintas statistiškai. Iš grafiko (3.10. pav.) matome, kad lyginant su kontroliniais augalais (anglies šaltinis sacharozė), kurių vieno ūglio vidutinis biomasės svoris siekia iki  $0,027 \pm 0,003$ g, didžiausias biomasės kiekis pasiektas auginant ūglius 0,06 g/l baltojo steviozido terpėje, vidutiniškai vienas hibridinės drebulės ūglys svėrė  $0,048 \pm 0,005$  g. Biomasės kiekis, šioje terpėje, lyginant su kontroliniais augalais išauga dvigubai.

Terpėje, kurioje nėra jokio anglies šaltinio, biomasės kiekis lyginant su kontroliniais ūgliais yra dvigubai mažesnis. Iš to galime spręsti, kad steviozidas turi įtakos ir skatina spartesnį ūglių augimą.

Biomasės kiekis lyginant su kontrole, taip pat, didesnis pasiektas terpėse, kuriose buvo naudojamos 0,14 g/l ir 0,16 g/l baltojo steviozido koncentracijos. Tačiau, šios koncentracijos nebuvo atrinktos tolesniems tyrimams, nes augalų išvaizda buvo prasta, lapai ir stiebai po 3 savaičių auginimo buvo pageltę ir pavytę.

Tolesniems tyrimams atrinkome terpes, kuriose steviozido koncentracijos buvo 0,04 g/l ir 0,06 g/l. 0,04 g/l koncentracijoje augalai biomasės priaugino ne daug, tačiau jų išvaizda ir ūglių aukštis buvo geriasni nei kontrolės. Sacharozės ir steviozido mišinių terpėse poveikis pavaizduotas (3.11. pav.).



**3.11. pav.** Steviozido ir sacharozės mišinių poveikis hibridinės drebulės ūglių biomasei

Baltojo steviozido ir sacharozės mišinys terpėje, naudojant 0,06 g/l steviozido ir 0,06 g/l sacharozės, dar efektyviau pagerino hibridinės drebulės ūglių augimą *in vitro* aplinkoje. Lyginant su kontroliniais ūgliais ( $0,027 \pm 0,003$  g), mišinio terpėje auginti ūgliai biomasės sudaro trigubai daugiau, vienas ūglys vidutiniškai pasiekia  $0,077 \pm 0,007$  g. Naudojant tik 0,06 g/l steviozido (3.10. pav.), ūgliai vidutiniškai pasiekia  $0,046 \pm 0,005$  g, naudojant steviozido ir sacharozės mišinį augimo efektyvumas ir biomasės kiekis padidėja 1,5 kartus.

Tai rodo, kad naudojant mažus steviozido ir sacharozės kiekius maitinamosiose MS+BAP+IAR terpėse galima pagerinti ūglių biomasės augimo greitį ir kokybiškesnę jų išvaizdą. Taip pat, ekonominiu požiūriu steviozido ir sacharozės mišinių kombinacija mažais kiekiais sumažina kaštus, išleidžiamus anglies šaltinių pirkimui tepėms.

### 3.6. Atsitiktinių pradmenų įvertinimas polimorfinės *Stevia rebaudiana Bertoni* DNR amplifikavime

DNR išskirta iš *Stevia rebaudiana Bertoni* augalų, kurie išauginti iš sėklų. Iš 12 ūglių lapų išskyrėme genominę DNR modifikuotu CTAB metodu. Šio tyrimo metu atlikome atsitiktinį DNR amplifikavimą su skirtingais oligonukleotidiniais pradmenimis: Roth A01 – Roth A020; Roth B01 – Roth B020; Roth 170 – 01 – Roth 170 – 10; Roth 370-01; Roth 370-04; Roth 370-10. Šių pradmenų įvertinimas pateiktas 3.2. lentelėje.

**3.2. lentelė.** Pradmenų įvertinimas, *Stevia rebaudiana Bertoni* genetinei sekai nustatyti, taikant APPD metodą

Pradmuo	Pradmenų sekos 5'-3'	Polimorfinių fragmentų amplifikacija	DNR fragment dydžio skirtumai	DNR fragment atkuriamumas	Bendra RAPD profilio kokybė
Roth A01	CAGGCCCTTC	■	*	●	+
Roth A02	TGCCGAGCTG	■■	*	●	++
Roth A03	AGTCAGCCAC	■■	*	●	++
Roth A04	AATCGGGCTG	■	*	●	+
Roth A05	AGGGGTCTTG	■	*	●	+
Roth A06	GGTCCCTGAC	■	*	●	+
Roth A07	GAAACGGGTG	■	*	●	+
Roth A08	GTGACGTAGG	■	*	●	+
Roth A-10	GTGATCGCAG	■	*	●	+
Roth A011	CAATCGCCGT	■	*	●	+
Roth A012	TCGGCGATAG	■	*	●	+
Roth A013	CAGCACCCAC	■	*	●	+
Roth A014	TCTGTGCTGG	■■	*	●	++
Roth A015	TTCCGAACCC	■	*	●	+
Roth A016	AGCCAGCGAA	■■	*	●	++
Roth A017	GACCGCTTGT	■	*	●	+
Roth A018	AGGTGACCGT	■	*	●	+
Roth A019	CAAACGTCGG	■■	**	●●	++
Roth A020	GTTGCGATCC	■	*	●	+
Roth B01	GTTTCGCTCC	■■	**	●●	++
Roth B02	TGATCCCTGG	■	*	●	+
Roth B03	CATCCCCCTG	■	*	●	+
Roth B04	GGACTGGAGT	■	*	●	+
Roth B05	TGCGCCCTTC	■	*	●	+
Roth B06	TGCTCTGCCC	■	*	●	+
Roth B07	GGTGACGCAG	■	*	●	+
Roth B08	GTCCACACGG	■■	*	●	++
Roth B09	TGGGGGACTC	■	*	●	+
Roth B010	CTGCTGGGAC	■	*	●	+
Roth B011	GTAGACCCGT	■■	**	●●	++
Roth B012	CCTTGACGCA	■■	*	●	+
Roth B013	TTCCCCCGCT	■	*	●	+
Roth B014	TCCGCTCTGG	■	*	●	+
Roth B015	GGAGGGTGTT	■■	**	●●	++

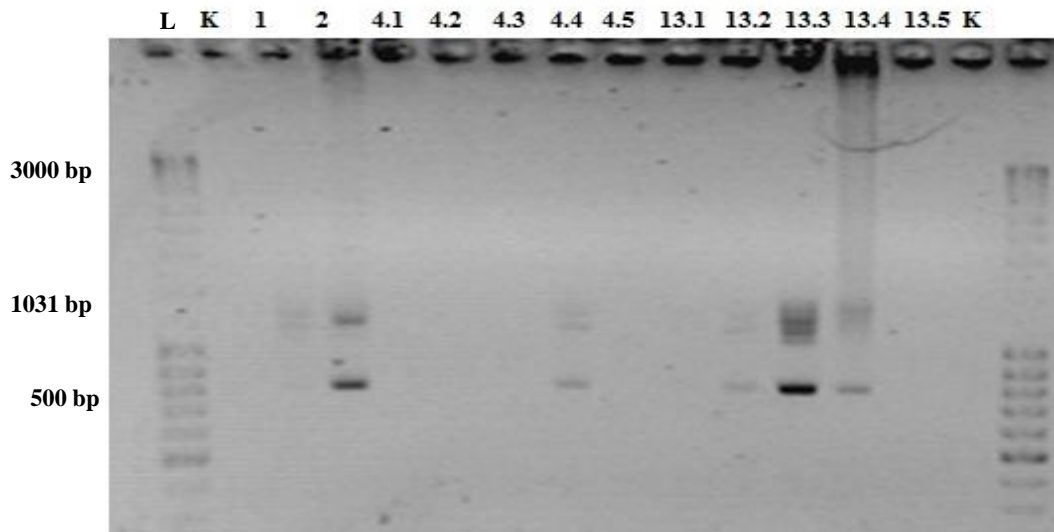


Roth B016	TTTGCCCGGA	■	*	●	+
Roth B017	AGGGAACGAG	■■	*	●	++
Roth B018	CCACAGCAGT	■	*	●	+
Roth B019	ACCCCGAAG	■	*	●	+
Roth B020	GGACCCTTAC	■	*	●	+
Roth 170-01	CATCCCGAAC	■■■	**	●●	+++
Roth 170-02	CAGGGTCGAA	■■	**	●●	+++
Roth 170-03	ACGGTGCCTG	■■	**	●●	+++
Roth 170-04	CGCATTCGCG	■■	*	●	++
Roth 170-05	GAGATCCGCG	■■	**	●●	+++
Roth 170-06	GGACTCCACG	■	*	●	+
Roth 170-07	ATCTCCCGGG	■	*	●	+
Roth 170-08	CTGTACCCCC	■■	*	●	++
Roth 170-09	TGCAGCACCG	■	*	●	+
Roth 170-10	CAGACACGGC	■■	**	●●	++
Roth 370-01	TCCCTGTGCC	■	*	●	+
Roth 370-04	GTATGCCGCG	■	*	●	+
Roth 370-10	CTGTCCGGTC	■	*	●	+

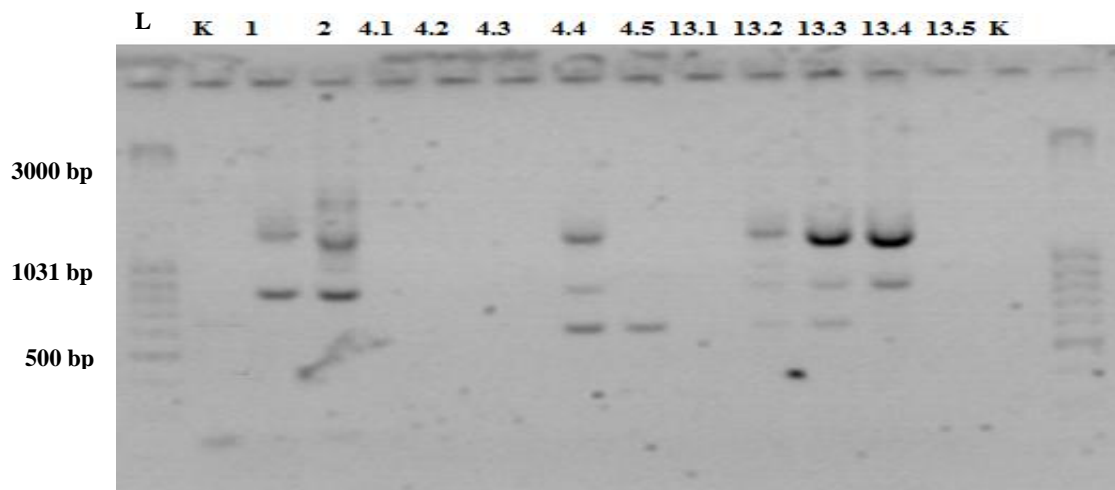
■ - Nėra polimorfinių DNR fragmentų, ■■ - Keletas polimorfinių DNR fragmentų, ■■■ - aiškūs polimorfiniai DNR fragmentai; \* - DNR fragmentų nėra arba visi skirtingo dydžio, \*\* - dauguma DNR fragmentų yra panašaus dydžio, \*\*\*- DNR fragmentai panašaus dydžio ir juos lengva atskirti; ● - DNR fragmentai neatkuriami, ●● - Dauguma DNR fragmentų yra atkuriami, bet vis dar neaiškūs, ●●● - DNR fragmentai yra atkuriami ir lengvai sugrupuojami; + - nėra amplifikacijos, ++ - žemos kokybės amplifikacija, +++ - geros kokybės amplifikacija.

### 3.7. Informatyviausių pradmenų atrinkimas ir polimorfiškumo įvertinimas

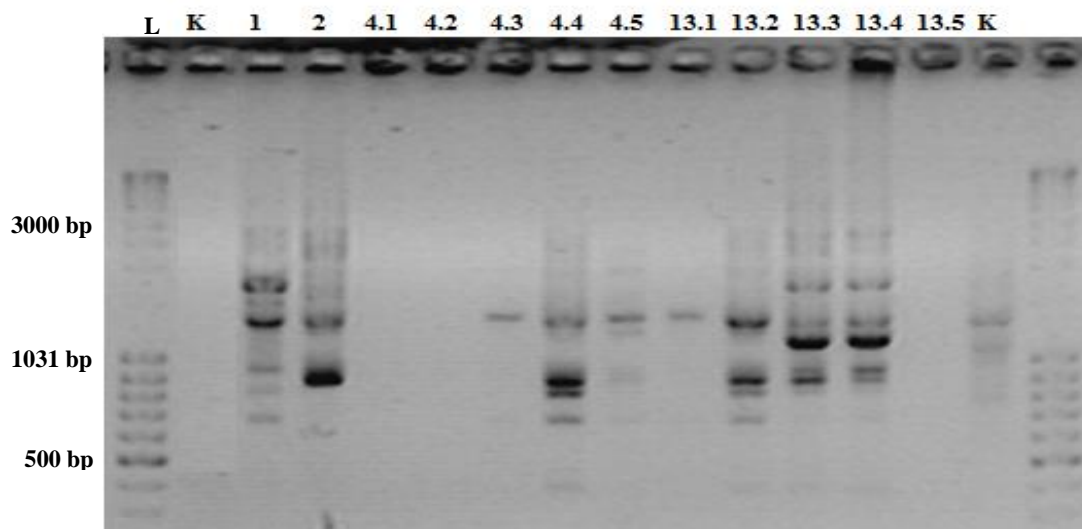
Iš 52 pradmenų atrinkta 12 geriausių oligonukleotidinių pradmenų, kurie pasižymėjo: aiškiais polimorfinais DNR fragmentais, panašiais fragmentų dydžiais ir geru atkuriamumu. Su šiais pradmenimis tirta branduolinė stevijos DNR medžiaga, išskirta iš 12 steviojos ūglių, kurie buvo išauginti iš sėklų. Su šiais pradmenimis vykdytas atsitiktinis polimorfinės *Stevia rebaudiana Bertonii* DNR pagausinimas. Toliau pateiktos elektroforezės gelio nuotraukos su atrinktais informatyviausiais pradmenimis.



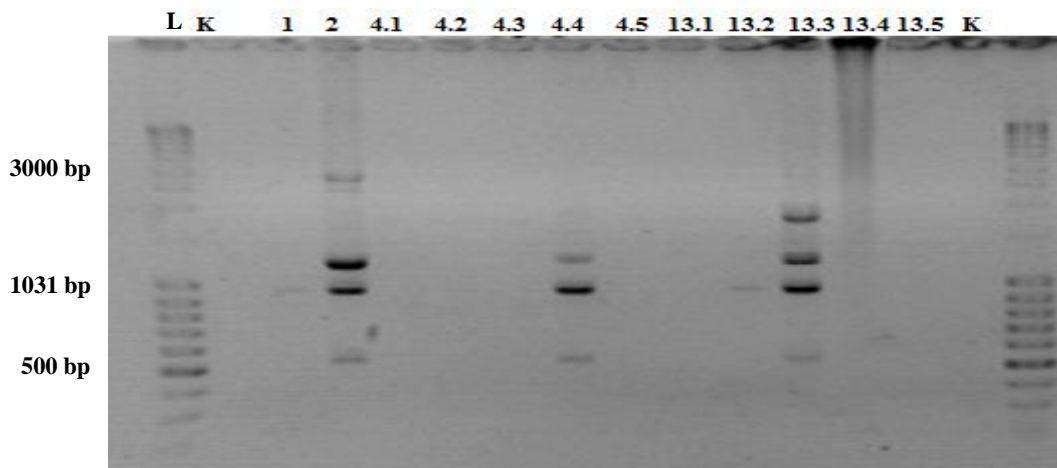
**3.12. pav.** Stevijos DNR pagausinimas naudojant Roth 170-01 pradmenį



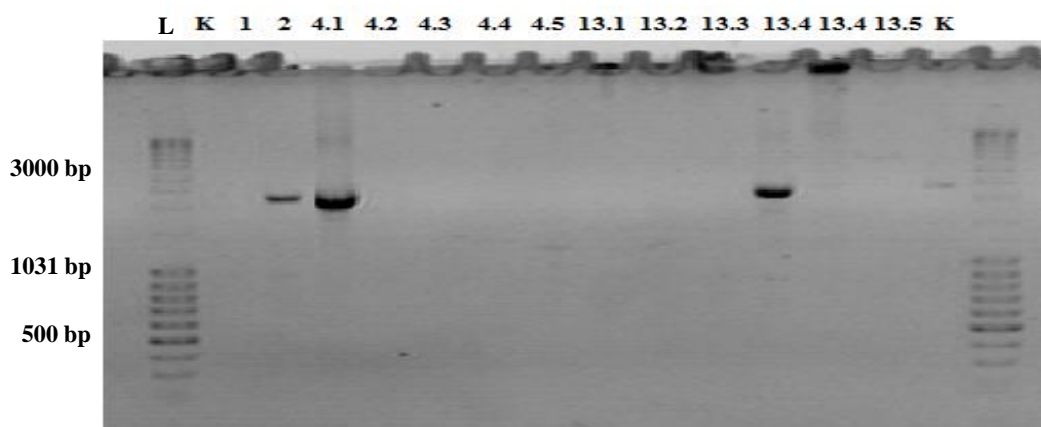
**3.13. pav.** Stevijos genominės DNR pagausinimas naudojant Roth 170-02 pradmenį



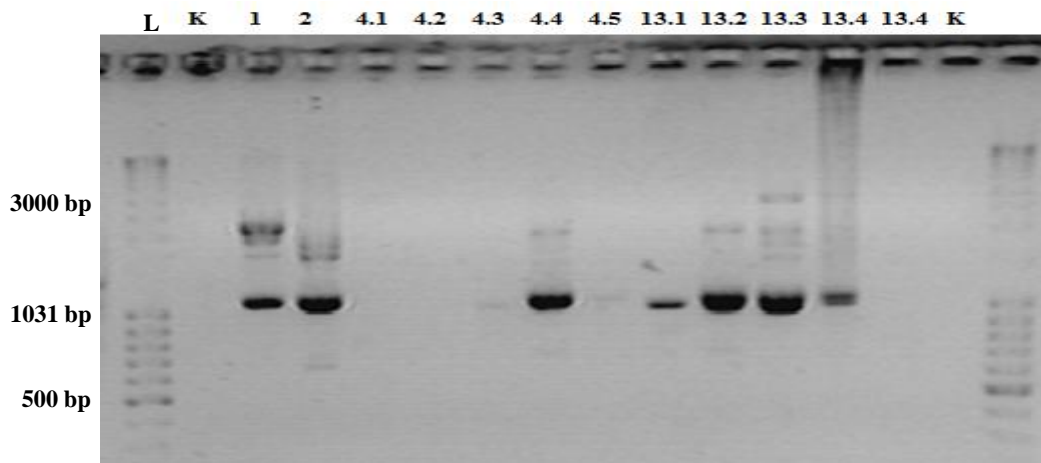
**3.14. pav.** Stevijos genominės DNR pagausinimas naudojant Roth 170-03 pradmenį



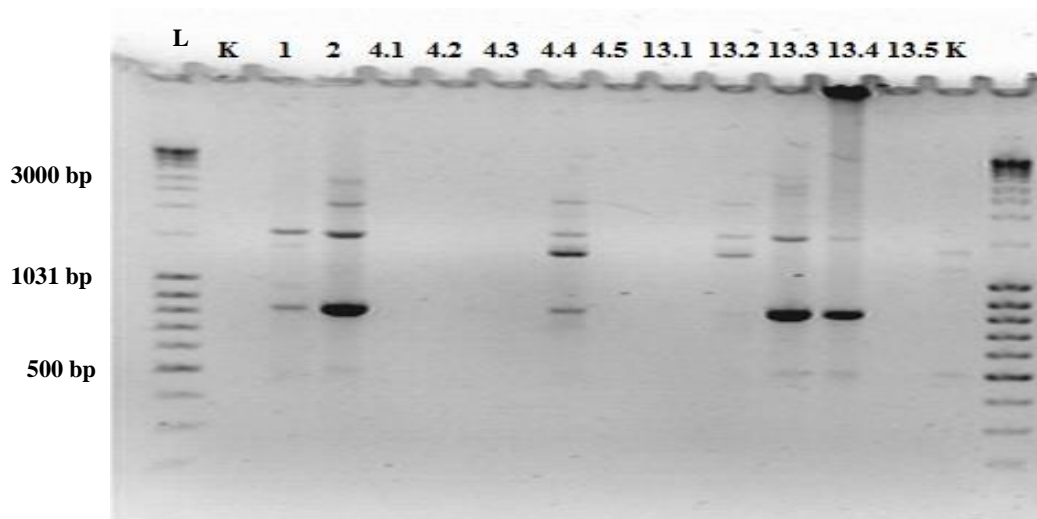
3.15. pav. Stevijos genominės DNR pagausinimas naudojant Roth 170-04 pradmenį



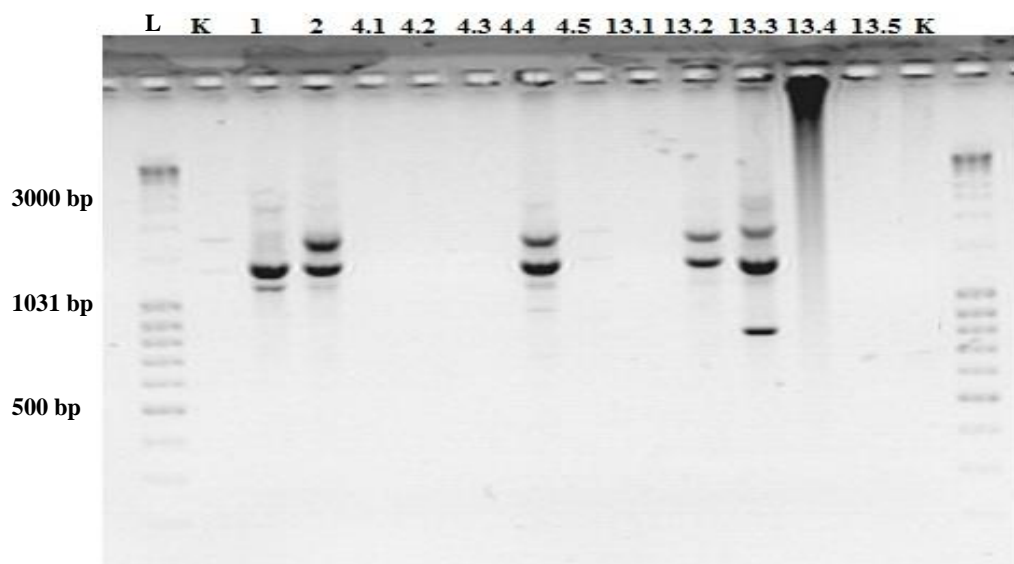
3.16. pav. Stevijos genominės DNR pagausinimas naudojant Roth 170-05 pradmenį



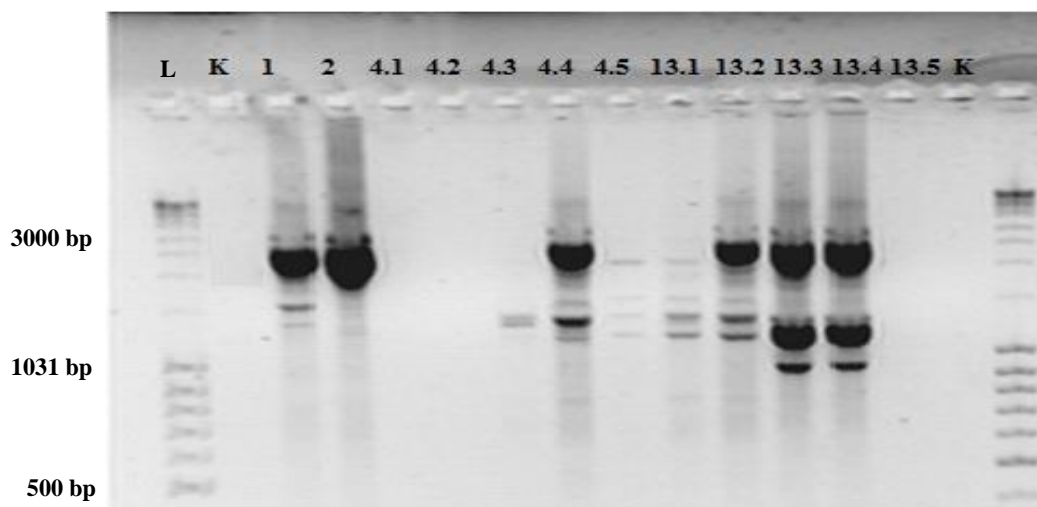
3.17. pav. Stevijos genominės DNR pagausinimas naudojant Roth 170-10 pradmenį



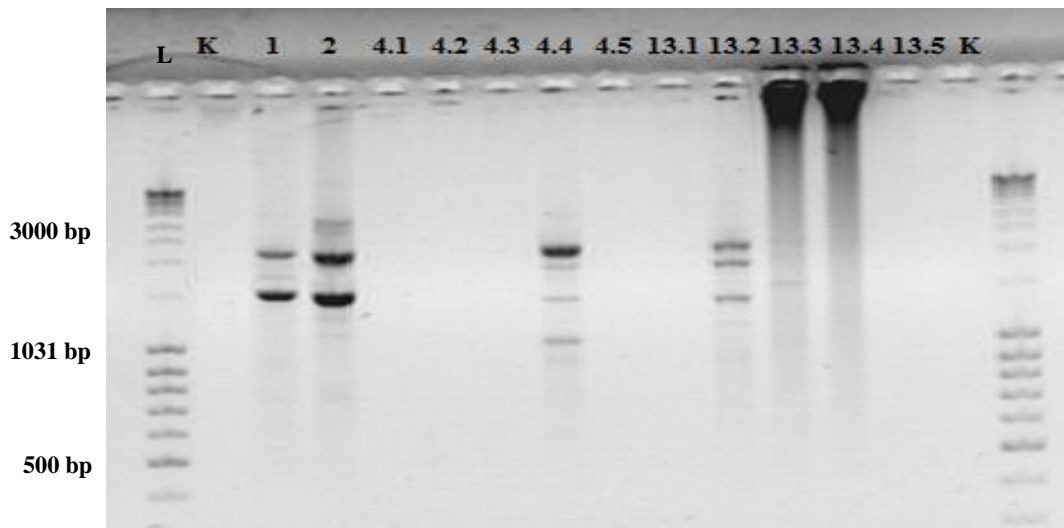
3.18. pav. Stevijos genominės DNR pagausinimas naudojant Roth A-14 pradmenį



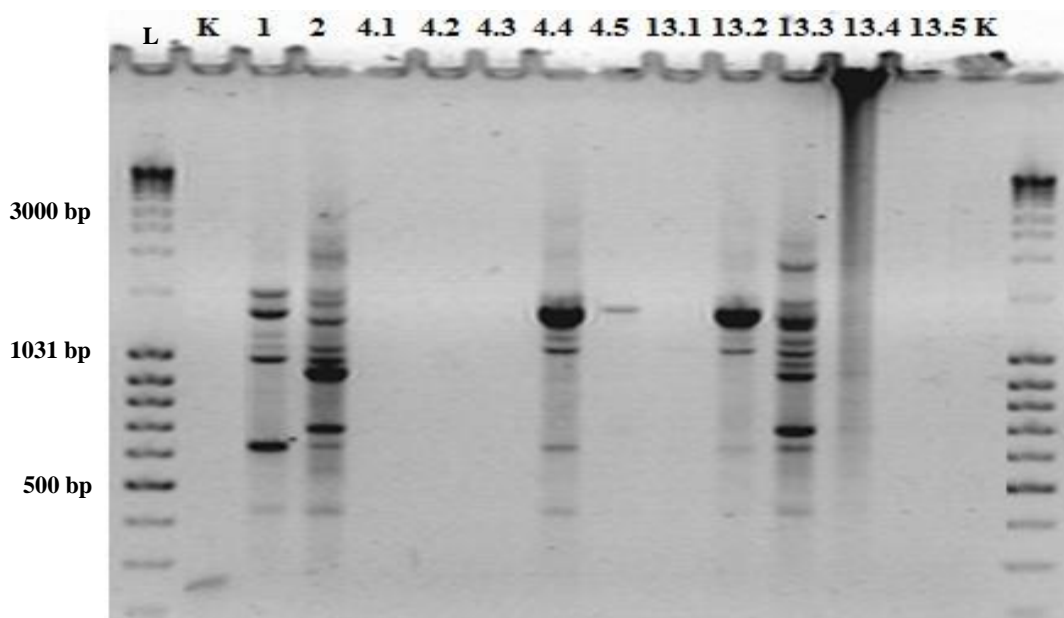
3.19. pav. Stevijos genominės DNR pagausinimas naudojant Roth A-19 pradmenį



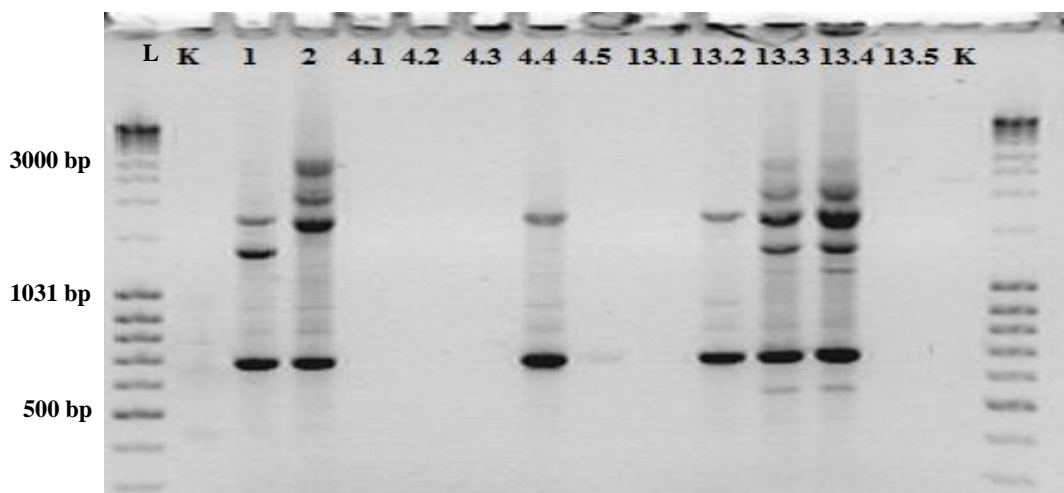
3.20. pav. Stevijos genominės DNR pagausinimas naudojant Roth B-01 pradmenį



3.21. pav. Stevijos branduonilė DNR pagausinimas naudojant Roth B-08 pradmenį



3.22. pav. Stevijos genominės DNR pagausinimas naudojant Roth B-15 pradmenį

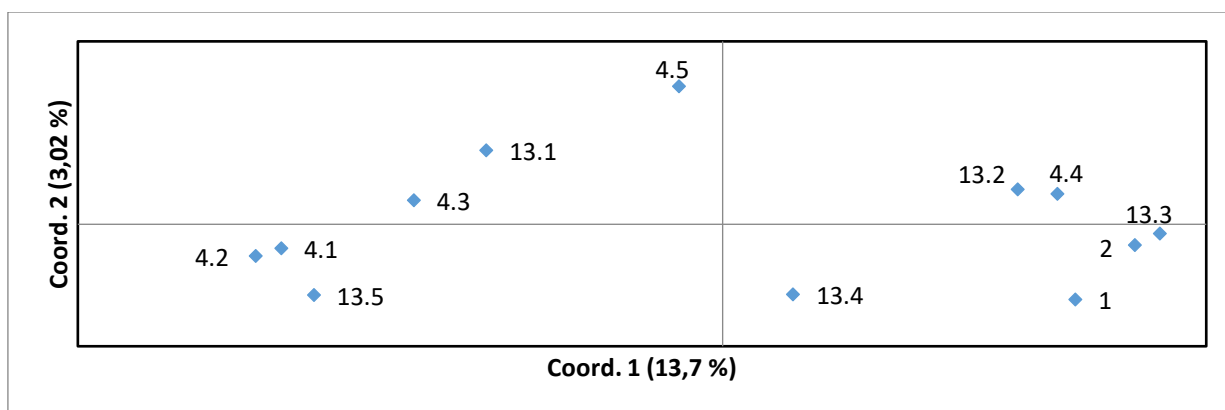


3.23. pav. Stevijos genominės DNR pagausinimas naudojant Roth B-17 pradmenį

**3.3. lentelė.** APPD pradmenų pagamintų amplifikuotų ir polimorfinių DNR juostų skaičius ir jų dydžių diapazonas genetinės įvairovės tyrime *Stevia rebaudiana* Bertoni populiacijose

Atrinkti pradmenys	Amplifikuotų juostų skaičius	Polimorfinių juostų skaičius	Polimorfizmas, %	Amplifikuotų juostų dydžio diapazonas
Roth 107-1	4	4	100	800–1130 bp
Roth 107-2	5	5	100	600–2000 bp
Roth 107-3	12	12	100	400–2500 bp
Roth 107-4	6	6	100	550–2500 bp
Roth 107-5	2	2	100	950–1300 bp
Roth 107-10	7	7	100	700–3000 bp
Roth A-14	8	8	100	500–3000 bp
Roth A-19	6	6	100	800–2000 bp
Roth B-1	10	10	100	800–3000 bp
Roth B-8	8	8	100	900–2000 bp
Roth B-15	11	11	100	450–1500 bp
Roth B-17	9	9	100	550–2000 bp
Iš viso	88	88	-	-
Vidutiniškai	7,3	7,3	100	-

Daugiausia fragmentų viename individe ir klonų populiacijose aptikta naudojant Roth 170-03, Roth B-15 ir Roth B-1 pradmenis. Tačiau, ištyrus atrinktus informatyviausius pradmenis nustatėme, kad individai išauginti iš sėklų ir jų klonai pasižymi 100 % polimorfizmu. Tirti individai ir klonai nėra genetiškai panašūs.



**3.24. pav.** *S. rebaudiana* visų tirtų individų ir klonų genetinio panašumo principinės koordinatų analizės rezultatai

Pagal individų išsidėstymą plokštumoje (2.24. pav) matomas didelis išsibarstymas. Tai rodo, kad genetinis panašumas tarp individų ir klonų yra labai mažas. Pagal klonų išsidėstymą dvimatėje koordinatų plokštumoje genetiškai artimiausi klonai yra 4,1 ir 4,2.

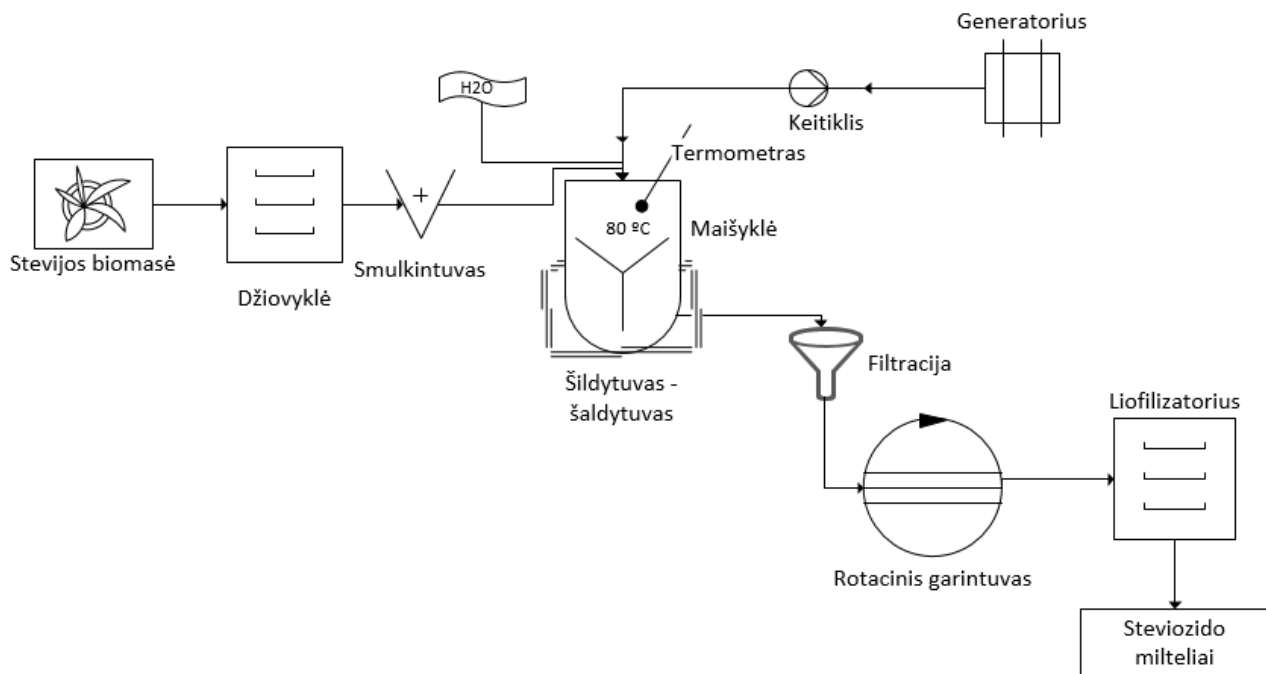
Tarp klonų gautas 100 % poliorfizmas gali būti siejamas su tuo, kad genetinei medžiagai išskirti buvo skinami stevijos lapai iš įvairių augalo vietų. Skirtingos augalo dalys gali turėti skirtingą kiekį įvairių metabolitų (pvz. Chlorofilas). O metabolitai gali imobilizuoti genetinę medžiagą ir turėti įtakos polimorfizmui. Taip pat, didelė problema, susijusi su *in vitro* kultūra, yra galimos somakloninės variacijos tarp tėvų linijų subklonų. Šis pokytis gali atsirasti dėl egzistuojančių genetinių pokyčių, kurie atsiranda dėl tirpalų naudojamų *in vitro* sistemose. Visų pirma auginimas *in vitro* aplinkoje sukelia problemų atkuriant tikrą tipą, nes vyksta chromosomų pertvarkymas, DNR metilacijos (metilo grupių pasišalinimas arba prisijungimas) ir genų mutacijos. Taigi genetinė kontrolė išlieka pagrindine problema, susijusi su komerciniu stevijos mikroūglių dauginimu [20].

## Rekomendacijų dalis

Saldžiosios stevijos (*Stevia rebaudiana B.*) saldikliai šiuo metu yra labai plačiai tyrinėjami, o jų komercinis naudojimas sparčiai auga. Todėl yra išbandomi įvairūs steviozido saldiklio išskyrimo būdai, tam kad būtų gaunamos optimalios šio saldiklio įšeigos.

Tyrimo metu iš stevijos lapų bandėme išskirti steviolio gliukozido saldiklius su metanolio tirpikliu. Šį metanolio ekstraktą naudojome terpių gamyboje. Tačiau, tyrimo rezultatai buvo visiškai skirtingi nei naudojant grynus steviozido miltelius. Terpės su steviozido ekstraktais metanolyje buvo neveiksmingos, augalai vyto, o biomasės kiekis buvo menkas, kai, tuo tarpu, terpėse su grynu steviozido saldikliu augalai pasižymėjo labai geru augimu ir dideliu biomasės kiekiu. Iš šių rezultatų galime daryti išvadą, kad steviozido kiekis metanolyje buvo labai mažas ir maitinamosiose terpėse sudarė mažas koncentracijas, todėl augalų augimas buvo menkas.

Ištyrinėjus literatūros šaltinius, susijusius su steviozido išskyrimu iš augalų biomasės, nustatėme, kad saldiklių ekstrakcija naudojant metanolio tirpiklį nėra vienas iš veiksmingiausių būdų gauti dideles saldiklių išeigas. Todėl pasiūlymas, didesnėms steviozido saldiklio išeigoms gauti, būtų išbandyti steviolio gliukozidų išskyrimą ultragarsiniu metodu [13]. Išskyrimo schema ultragarsiniu metodu pateikta 4.1. pav. Sausą susmulkintą stevijos biomasę užpilti vandeniu ir įjungti maišyklę, parinti 300 aps/min greitį. Ekstrakcija atliekama 80 °C temperatūroje 60 min, kai ultragarso galia yra 100 W. Po ekstrakcijos tirpalą atvėsinti ir nufiltruoti. Filtratas koncentruojamas rotaciniame garintuve ir vėliau liofilizuojamas.



4.1. pav. Rekomenduojama didesnės išeigos steviozido išskyrimo schema



## Išvados

1. Įvertinus stevijos augalų augimo greitį nustatėme, kad pasodinti 20 mm auginiai po 2 savaitių auginimo užauga dvigubai ar net trigubai didesni. Vertinant viršūnių auginių augimą efektyviausi augimo rezultatai gauti auginant juos MS be hormoninėje terpėje 2570 lux šviesoje. Viršūnių aukštis pasiekia vidutiniškai 59 mm. Vertinant stiebų auginius geriausi rezultatai gauti juos auginant MS+BAP+IAR hormoninėse terpėse, vidutiniškai pasiekia 50 mm aukštį.
2. Efektyviausios maitinamosios terpės hibridinių drebulių auginimui gautos naudojant 0,06 g/l sacharozės ir 0,06 g/l baltojo steviozido mišinį terpėje. Po trijų savaitių auginimo tokioje terpėje, lyginant su kontroliniais ūgliais, kurie išauga iki  $21,38 \pm 5,34$  mm, hibridinės drebulės ūgliai pasiekia iki  $29 \pm 7,53$  mm aukštį. Šioje mišinio terpėje ūgliai buvo labai geros būklės, stiebai tvirti ir ryškiai žalios spalvos, lapijos gausumas ir lapų platumas buvo dvigubai didesni nei kontroliniuose ūgliuose.
3. Informatyviausi oligonukleotidiniai pradmenys atrinkti stevijos DNR analizei buvo: Roth 170-01, Roth 170-02, Roth 170-03, Roth 170-04, Roth 170-05, Roth 170-10, Roth A-14, Roth A-19, Roth B-01, Roth B-08, Roth B-15, Roth B-17.
4. Nustatinėjant stevijos augalų ir jų klonų DNR tapatumą gautas 100% polimorfizmas.

## Literatūros sąrašas

1. FLADUNG, M., SCHENK, T. M., POLAK, O. and BECKER, D. Elimination of marker genes and targeted integration via FLP/FRT recombination system from yeast in hybrid aspen (*Populustremula* L.× *P. tremuloides*Michx.). *Tree genetics & genomes*. 2010, 6(2), 205-217. ISSN 16414-2942.
2. FELTON, A., KNIGHT, E., WOOD, J., ZAMMIT, C. and LINDENMAYER, D. A meta-analysis of fauna and flora species richness and abundance in plantations and pasture lands. *Biological Conservation*. 2010, 143, 545-554.
3. TULLUS, A., RYTTER, L., TULLUS, T., WEIH, M. and TULLUS, H. Short-rotation forestry with hybrid aspen (*Populustremula* L.× *P. tremuloides*Michx.) in Northern Europe. *Scandinavian Journal of Forest Research*. 2012, 27(1), 10-29.
4. ŽIAUKA, J., KUUSIENĖ, S. and ŠILININKAS, M. Fast growing aspens in the development of a plant micropropagation system based on plant-produced ethylene action. *Biomass and bioenergy*. 2013, 53, 20-28.
5. GOYAL, S. K., SAMSHER, G. R. and GOYAL, R. K. Stevia (*Stevia rebaudiana*) a bio-sweetener: a review. *Int J Food Sci Nutr*. 2010, 61(1), 1-10.
6. MODI, A. R., PATIL, G., KUMAR, N., SINGH, A. S. and SUBHASH, N. A simple and efficient in vitro mass multiplication procedure for *Stevia rebaudiana* Bertoni and analysis of genetic fidelity of in vitro raised plants through RAPD. *Sugar Tech*. 2012, 14(4), 391-397. ISSN 0974-0740.
7. BRAHMACHARI, G., MANDAL, L. C., ROY, R., MONDAL, S. and BRAHMACHARI, A. K. Stevioside and related compounds—molecules of pharmaceutical promise: a critical overview. *Archiv der Pharmazie*. 2011, 344(1), 5-19.
8. CHATURVEDULA, V. S. P. and PRAKASH, I. Structures of the novel diterpene glycosides from *Stevia rebaudiana*. *Carbohydrate Research*. 2011, 346(8), 1057-1060.
9. PURI, M. and SHARMA, D. Antibacterial activity of stevioside towards food-borne pathogenic bacteria. *Engineering in Life Sciences*. 2011, 11(3), 326-329.
10. WÖLWER-RIECK, U., TOMBERG, W. and WAWRZUN, A. Investigations on the stability of stevioside and rebaudioside A in soft drinks. *Journal of agricultural and food chemistry*. 2010, 58(23), 12216-12220.
11. DE OLIVEIRA, A. J. B., GONÇALVES, R. A. C., CHIERRITO, T. P. C., DOS SANTOS, M. M., DE SOUZA, L. M., GORIN, P. A. J. and IACOMINI, M. Structure and degree of polymerisation of fructooligosaccharides present in roots and leaves of *Stevia rebaudiana* (Bert.) Bertoni. *Food Chemistry*. 2011, 129(2), 305-311.
12. JAITAK, V., BANDNA, B. S. and KAUL, V. K. An efficient microwave-assisted extraction process of stevioside and rebaudioside-A from *Stevia rebaudiana* (Bertoni). *Phytochemical Analysis*. 2009, 20(3), 240-245.
13. LIU, J., LI, J. W. and TANG, J. Ultrasonically assisted extraction of total carbohydrates from *Stevia rebaudiana* Bertoni and identification of extracts. *Food and bioproducts processing*. 2010, 88(2-3), 215-221.

14. HUANG, X. Y., FU, J. F., DI, D. L. Preparative isolation and purification of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana* Bertoni using high-speed counter-current chromatography. *Separation and Purification Technology*. 2010, 71(2), 220-224.
15. JACKSON, A. U., TATA, A., WU, C., PERRY, R. H., HAAS, G., WEST, L. and COOKS, R. G. Direct analysis of *Stevia* leaves for diterpene glycosides by desorption electrospray ionization mass spectrometry. *Analyst*. 2009, 134(5), 867-874.
16. JANARTHANAM, B., GOPALAKRISHNAN, M., SAI, G. L. and SEKAR, T. Plant regeneration from leaf derived callus of *Stevia rebaudiana* Bertoni. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*. 2009, 19(2), 133-141.
17. DAS, A., GANTAIT, S. and MANDAL, N. Micropropagation of an elite medicinal plant: *Stevia rebaudiana* Bert. *International Journal of Agricultural Research*. 2011, 6(1), 40-48. ISSN 1816-4897.
18. REN, G., LIU, X. and SHI, Y. Effects of plant growth regulator SY on diurnal changes in photosynthetic parameters and yield of *Stevia Rebaudina* Bertoni. *Energy Procedia*. 2011, 5, 429-434.
19. ALMEIDA, L. M., VIANA, A. P., GONÇALVES, G. M. and ENTRINGER, G. C. Selection of sugar cane full-sib families using mixed models and ISSR markers. *Genetics and Molecular Research*. 2014, 13(4), 9202-9212.
20. XIAOMEL, L. and CUOCHEN, Y. Assessment of clonal fidelity of micro-propagated guava (*Psidium guajava*) plants by ISSR markers. *Aust J Crop Sci*. 2012, 6: 291–295. ISSN 7835-2693.
21. MODI, A. R., PATIL, G., KUMAR, N., SINGH, A. S. and SUBHASH, N. A simple and efficient in vitro mass multiplication procedure for *Stevia rebaudiana*Bertoni and analysis of genetic fidelity of in vitro raised plants through RAPD. *Sugar Tech*. 2012, 14(4), 391-397. ISSN 0974-0740.
22. THIYAGARAJAN, M. and VENKATACHALAM, P. Assessment of genetic and biochemical diversity of *Stevia rebaudiana*Bertoni by DNA fingerprinting and HPLC analysis. *Annals of Phytomedicine*. 2015, 4(1), 79-85. ISSN 2393-9885.
23. CHESTER, K., TAMBOLI, E. T., PARVEEN, R. and AHMAD, S. Genetic and metabolic diversity in *Stevia rebaudiana* using RAPD and HPTLC analysis. *Pharmaceutical biology*. 2013, 51(6), 771-777.
24. LATA, H., CHANDRA, S., TECHEN, N., WANG, Y. H. and KHAN, I. A. Molecular analysis of genetic fidelity in micropropagated plants of *Stevia rebaudiana* Bert. using ISSR marker. *American Journal of Plant Sciences*. 2013, 4(05), 964.
25. MD, M. and SM, M. R. Regeneration of *Stevia rebaudiana* and Analysis of Somacionai Variation by RAPD. *Biotechnology*. 2009, 8(4), 449-455. ISSN 1682-296X.
26. NAZNEEN, H., REDDY, P. V. and REDDY, S. K. Molecular analysis of genetic fidelity of *Stevia rebaudiana* Bert. using RAPD markers. *World Journal of Pharmaceutical Research*. 2016, 5(4), 750-759. ISSN 2277-7105.
27. MACKENZIE, N. A. Ecology, conservation and management of Aspen. *A Literature Review. Scottish Native Woods*. 2010, 1-42.
28. RYTTER, L., JOHANSSON, T., KARAČIĆ, A., WEIH, M., BÖRJESSON, P., FOGDESTAM, N. and STENER, L. G. Investigation for a Swedish research program on the genus *Populus*. *Skogforsk*. 2011, 148.

29. RYTTER, L. and RYTTER, R. M. Productivity and sustainability of hybrid aspen (*Populustremula* L. × *P. Tremuloides* Michx.) root sucker stands with varying management strategies. *Forest ecology and management*. 2017, 401, 223-232.
30. HYTÖNEN, J. Biomass, nutrient content and energy yield of short-rotation hybrid aspen (*P. tremula* x *P. tremuloides*) coppice. *Forest Ecology and Management*. 2018, 413, 21-31.
31. RYTTER, L. and JANSSON, G. Influence of pruning on wood characters in hybrid aspen. *Silva Fennica*. 2009, 43(4), 689-698. ISSN 0037-5330.
32. HARFOUCHE, A., MEILAN, R. and ALTMAN, A. Tree genetic engineering and applications to sustainable forestry and biomass production. *Trends in biotechnology*. 2011, 29(1), 9-17.
33. HUANG, D. and DAI, W. Direct regeneration from in vitro leaf and petiole tissues of *Populustremula* 'Erecta'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*. 2011, 107(1), 169-174.
34. MÜLLER, A., LEUSCHNER, C., HORNA, V. and ZHANG, C. Photosynthetic characteristics and growth performance of closely related aspen taxa: on the systematic relatedness of the Eurasian *Populustremula* and the North American *P. tremuloides*. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants*. 2012, 207(2), 87-95.
35. PETERNEL, Š., GABROVŠEK, K., GOGALA, N. and REGVAR, M. In vitro propagation of European aspen (*Populustremula* L.) from axillary buds via organogenesis. *Scientia horticulurae*. 2009, 121(1), 109-112.
36. CISZEWSKA-MARCINIAK, J., JEDRYCZKA, M., JEZOWSKI, S., PRZYBOROWSKI, J., WOJCIECHOWICZ, K. and ZENKTELER, E. Morphology of uredinia and urediniospores of the fungus *Melampsoralarici-epitea* Kleb. a damaging pathogen of common osier (*Salix viminalis* L.) in Poland. *Acta Agrobotanica*. 2010, 63(2), 117-125.
37. PRZYBOROWSKI, J. A., JEDRYCZKA, M., CISZEWSKA-MARCINIAK, J., SULIMA, P., WOJCIECHOWICZ, K. M. and ZENKTELER, E. Evaluation of the yield potential and physicochemical properties of the biomass of *Salix viminalis* × *Populustremula* hybrids. *Industrial Crops and Products*. 2012, 36(1), 549-554.
38. KHATTAB, S. Effect of different media and growth regulators on the in vitro shoot proliferation of aspen, hybrid aspen and white poplar male tree and molecular analysis of variants in micropropagated plants. *Life science journal*. 2011, 8(1), 177-184.
39. MARTINS, P. M., THORAT, B. N., LANCHOTE, A. D. and FREITAS, L. A. Green extraction of glycosides from *Stevia rebaudiana* (Bert.) with low solvent consumption: A desirability approach. *Resource-Efficient Technologies*. 2016, 2(4), 247-253.
40. KAUR, G., PANDHAIR, V. and CHEEMA, G. S. Extraction and characterization of steviol glycosides from *Stevia rebaudiana bertonii* leaves. *J. Med. Plants. Stud*. 2014, 2(5), 41-45.
41. COTA-SÁNCHEZ, J. H., REMARCHUK, K. and UBAYASENA, K. Ready-to-use DNA extracted with a CTAB method adapted for herbarium specimens and mucilaginous plant tissue. *Plant Molecular Biology Reporter*. 2006, 24(2), 161. ISSN 1572-9818.
42. TAI, H. H., PERCY, K. E. and KARNOSKY, D. F. DNA damage in *Populus tremuloides* clones exposed to elevated O<sub>3</sub>. *Environmental pollution*. 2010, 158(4), 969-976.
43. LEMEY, Philippe, SALEMI, Marco and VANDAMME, Anne-Mieke (ed.). *The phylogenetic handbook: a practical approach to phylogenetic analysis and hypothesis testing*. Second edition. Cambridge: Cambridge University Press, 2009. 654 psl.