

AUGU AUDU KULTŪRAS

1. IEVADS

- Jau XIX gs. beigās pētnieki veica pirmos mēģinājumus kultivēt atsevišķas augstāko augu šūnas. Interese par augu šūnu kultivēšanu bija saistīta, no vienas puses, ar pētījumiem par augu orgānu saistību savā starpā un to reģenerācijas spējām un, no otrās puses, ar sēklu dīgšanas fizioloģijas pētījumiem. Sākotnēji kultivēja sēklu embrijus un to daļas. Piemēram, *Irmisch* (1858) kultivēja dīgļlapas, pētot auga daļu morfogēno saistību ar veselo augu; *Sachs* (1859) kultivēja izolētos embrijus mākslīgā vidē un pierādīja, ka dīgļlapas ir rezerves vielu uzglabāšanas vieta. Daudzi citi pētnieki kultivēja embrijus, to daļas, kā arī nenobriedušus embrijus (*Hannig*, 1904). 1887. gadā *Koch* panāca auga reģenerāciju no dažām embrija šūnām. Uzskatīja, ka izolētās šūnas nevar dalīties, jo tām trūkst vielu, ko normāli piegādā blakusesošās šūnas.
- Soli no embriju reģenerācijas mākslīgā vidē līdz augstāko augu somatisko šūnu un audu kultivēšanas spera austriešu zinātnieks *Gottlieb Haberlandt* (1854.-1945.). Viņa pētījums nebija vispārpieņemtā nozīmē veiksmīgs, taču tā ideja un no eksperimentiem izdarītie secinājumi lika pamatu nozares attīstībai. Var teikt, ka tie apsteidza savu laiku un tikai vēlāk izdarītās prognozes izrādījās pareizas.
- 1902. gadā *Haberlandt* publicēja rakstu, kurā apkopoja savu pētījumu rezultātus. Tajā viņš apraksta eksperimentu ar izolētām augu šūnām gaitu un to rezultātus, pēc kā atzīst: “*Noslēgumā, es gribu atzīmēt to faktu, ka manās kultūrās, neskatoties uz to, ka bieži notika ievērojama šūnu palielināšanās, nekad nenovēroja šūnu dalīšanos*”. Taču raksta nobeigumā raksta: “... *es uzskatu (..) ka neizdaru pārāk drosmīgu prognozi, ja norādu uz iespēju, ka šādā veidā var iegūt mākslīgus embrijus no veģetatīvajām šūnām*”.
- *Haberlandt* savā laikā bija slavens ar zināmu apvērsumu augu anatomijas nozarē, jo viņa grāmata “*Augu fizioloģiskā anatomija*” lauza agrāko augu audu iedalījuma tradīciju. Tā vietā, lai iedalītu audus pēc šūnu formas, *Haberlandt* aprakstīja audu funkcionālās sistēmas – asimilētājaudu sistēma, mehānisko audu sistēma, vadaudu sistēma utt., kopumā 10 audu sistēmas. Tajā laikā vēl nebija populāri starpnozaru darbi un šāda pieeja pat likās nepieņemama – *Haberlanda* darbs ir pavēris ceļu starpnozaru pētījumiem.
- *Haberlanda* pārlicība par izolēto augu somatisko šūnu spēju dalīties balstījās uz šūnu teoriju un priekšstatu par šūnu kā par elementāro orgānismu. Lai gan pats *Haberlandt* nelietoja terminu “*totipotence*”, viņš formulēja ideju, ka no somatiskām šūnām var izcelties embriji. Pamats šai idejai radās pateicoties agrākiem pētījumiem par augu pavairošanu. Piemēram, novēroja, ka saknes var veidoties no gandrīz jebkādiem dzīvajiem audiem (*Tiegem, Douliot*, 1888); savukārt, adventīvie pumpuri var veidoties no dažām vai pat no vienas epidermas šūnas (*Winkler*, 1903).
- Savos eksperimentos *Haberlandt* izmantoja šūnas ar augstu diferenciācijas pakāpi – lapu parenhīmas šūnas, nātru dzeļmatīņu šūnas un citu augu trihomu šūnas. Iemesls bija tas, ka pētnieks centās izolēt atsevišķas šūnas un izmantoja tam piemērotākos audus. Barības šķīdumā šūnas turpināja asimilēt, izmērs palielinājās un šūnas palika dzīvas vēl dažas nedēļas. Tomēr šūnu dalīšanos nenovēroja.
- Šūnu izmēru palielināšanos *Haberlandt* saistīja ar to, ka uz izolētajām šūnām neiedarbojas augšanu inhibējošie faktori, kuri ierobežo šūnu izmēru veselā lapā. Sasaistot savus rezultātus ar augu un dzīvnieku partenogēneses pētījumu rezultātiem, *Haberlandt* secināja: 1. šūnu dalīšanos

var ietekmēt noteiktas vielas, kuras viņš nosauca par "augšanas enzīmiem"; 2. jāmēģina kultivēt šūnas kopā ar dīgstošiem putekšņiem, bet var arī mēģināt pievienot barības šķīdumam veģetatīvo galotņu ekstraktu vai embriju aptverošo šķidrumu.

- Vēlāk Hāberlands vairs neturpināja eksperimentus ar izolētām šūnām, taču pētīja šūnu dalīšanos audu gabalos, lai noteiktu cik mazā audu paraugā var notikt dalīšanās un vai ir noteikti audu reģioni, kuros dalīšanās notiek labāk. Šī darba rezultātā Hāberlands pierādīja, ka dalīšanos nosaka īpašie faktori. Tos viņš nosauca par "leptohormoniem" (saistīts ar vadaudiem, īpaši floēmu) un "nekrohormoniem" (vielas, kuras izdala ievainotie audi). Hāberlands uzskatīja, ka daudzus procesus (apaugļošanās, ievainojumu sadzīšana, partenogēze, adventīvo embriju veidošanos) nosaka šo hormonu mijiedarbība. To var uzskatīt par pirmo hormonu teoriju botānikā; vēlāk šīs idejas apstiprināja auksīna un citokinīnu atklāšana.
 - Jaunie eksperimenti ar fotosintezējošo audu kultūrām arī nepanāca šūnu dalīšanos – zinātnieki sāka eksperimentēt ar audu avotiem (eksplantiem), barotnes sastāvu, radās priekšstats par sterilitātes nozīmi audu kultūrās.
 - Pirmā veiksmīga sterilā kultūra bija sakņu galotņu kultūra. 1922. gadā parādījās divi neatkarīgi pētījumi par zirņu un kukurūzas sakņu meristēmu kultūrām sintētiskajā vidē. *Robbins* (1922) un kolēģi pētīja augu barošanas un orgānu mijiedarbību, viņu mērķis bija noskaidrot, vai sakņu attīstību nosaka no lapām piegādātais "hormons" – cukurs. *Robbins* ievēroja kultūras sterilitāti. *Kotte* (1922) gribēja noskaidrot meristēmu augšanas potenciālu. Abi pētījumi parādīja, ka kultūrā sakņu meristēmas turpina diferencēties par saknēm. Šie un citi pētnieki izmantoja papildīngredientus baotnēs – rauga ekstraktu (pirmais – *Robbins*), vitamīnus (*Bonner*, 1937; *White* 1937) un aminoskābes (*Bonner*, *Addicott*, 1937). 1934. gadā *White* izveidoja pirmo pastāvīgo tomātu sakņu galotņu kultūru un noteica, kādas barības vielas ir nepieciešamas augšanas uzturēšanai (ieskaitot rauga ekstraktu). *Bonner* un *Addicott* pirmie aizvietoja rauga ekstraktu ar vitamīnu un aminoskābju maisījumu, tādējādi pirmoreiz panākot kultūras augšanu māklīgajā barotnē ar pilnībā zināmu sastāvu. Viņi pētīja arī auksīna ietekmi uz sakņu kultūru.
- NB: fitohormonu auksīnu atklāja 1926. gadā (lai gan pašu vielu, indoliletiķskābi, izdalīja vēl XIX gs. Augu orgānu kultūrās sākotnēji izmantoja 2,4-dihlorfenoksietīķskābi [2,4-D]).*
- Tā kā sākotnējie mēģinājumi izveidot augu audu kultūru bija neveiksmīgi, pētnieki sāka eksperimentēt ar barotnēm - sāka imantot agarizētās barotnes (pirmoreiz lietoja *Hannig*, 1904, kultivējot nenobriedušus sēklu embrijus), izmēģināja dažādas pH vērtības, kā arī izmantoja dažādus augu audu ekstraktus. 1927. gadā, pētot ievainojumu sadzīšanu augos, Hāberlanda students *Wehnelt* atklāja, ka nenobriesušu pupu sēklapvalku ekstrakts sekmēja kallusa veidošanos (tikai parenhīmas šūnu proliferāciju). Turpinot izmantot šo pieeju, *Bonner* (1936) kultivēja pupu pākstu fragmentus, pievienojot barotnei sēklapvalku ekstraktu un panāca kallusa šūnu augšanu un dalīšanos. 1939. gadā trīs zinātnieki neatkarīgi panāca ilgstoši augušo audu kultūru. *White* (ASV) pētīja patoloģiskos veidojumus augos (augoņus, neoplazmas), ko vēlāk turpināja *Skoog*, kas meklēja augšanu kontrolējošos faktorus un vēlāk atklāja citokinīnus. *Gautheret* un *Nobecourt* (Francija), izmantojot auksīnu, kultivēja kambija šūnas. Auksīns sekmēja kambija šūnu augšanu un par kambiju dediferencēties spējīgo šūnu augšanu divdīgļlapjiem, bet ne viendīgļlapjiem. *Caplin* un *Steward* (1948), sadarbībā ar citiem ziātniekiem, izmantoja kokosriekstu pienu – šķidro endospermu (kas saskan ar Hāberlanda ieteikumu! Pirmo reizi kokosriekstu pienu izmantoja 1942.gadā *Van Overbeek*, kultivējot *Datura* embrijus hibrīdu iegūšanai). Tas sekmēja kallusu proliferāciju. Kokosriekstu piens saturēja faktoru, kurš nebija auksīns.
 - 1948.gadā *Skoog* novēroja, ka adenīns sekmē šūnu proliferāciju un pumpuru veidošanos. Viņš

pieņēma, ka adenīna atvasinājumi no ievainotiem audiem sekmē šūnu dalīšanos un organoģenēzi (Hāberlanda “nekrohormons”). Fracionējot rauga ekstraktu, 1955.g. izolēja kinētīnu (vēlāk parādīja, ka kokosriekstu piens satur citu citokinīnu, zeatīnu).

- 1962.g. divu pētnieku, *Murashige* un *Skoog*, sadarbības rezultātā tapa barotnes recepte, kura ir derīga lielākai daļai augu audu (satur augsnius, citokinīnus un minerālvielas). 1957.gadā *Skoog* un *Miller* veica klasiskos eksperimentus, kuri parādīja, ka augsna un citokinīnu attiecība nosaka organu veidošanos no kallusa masas: ja dominē augsnis, veidojās saknes, ja dominē citokinīns, veidojas dzinumi.
- Augu mikropavairošana: tehnoloģijā izmanto zināšanas par organoģenēzi (augusna un citokinīnu līdzsvars, histoģenēzes inducēšana). 1946.gadā *Ball* parādīja, kura dzinuma meristēmas daļa spēj izveidot veselu augu; 1964.g. *Morel* izmanto šo pieeju orhideju pavairošanai.
- Ap 1937.g. *Stanley* un viņa kolēģis *White* pētīja tabakas mozaīkas vīrusu. Lai pavairotu to lielā daudzumā, mēģināja izmantot izolēto sakņu kultūru. Taču izrādījās, ka sakņu meristēmas vīrusu nesatur. 1949. gadā to pašu parādīja *Limasset* un *Cornuet* apikālajās meristēmās. 1952. gadā no galotņu meristēmām ieguva veselus, no vīrusiem brīvus dāliju augus.
- Somatiskā embriogēze ir parādība, kuru prognozēja Hāberlands, izejot no priekšstata par šūnu totipotenci. 1947. Gadā *Levine* novēroja burkānu kallusa kultūrā “dīgstus”, kuri, iespējams, bija somatiskie embriji. Pēc daudzu pētnieku mēģinājumiem, 1966. gadā *Lutz* parādīja, ka somatisko embriju ir iespējams iegūt no vienas šūnas. 1970. gadā *Backs-Huseman* un *Reinert* nopublicēja šādas transformācijas fotogrāfijas. Mūsdienās, pēc daudziem citu autoru pētījumiem un pateicoties tam, ka ir izveidotas piemērotās barotnes, somatisko embriogēzi plaši izmanto augu pavairošanā un selekcijā, kā arī pētījumos.
- *Guha* un *Maheswari* 1964. gadā parādīja, ka no putekšņiem var veidoties haploīdie embriji. 1967. gadā *Bourgin* un *Nitsch* panāca veselo augu attīstību no šādiem embrijiem. Tas ir veids, kā iegūt stabilas formas no hibrīdiem augiem. Ar kolhicīna palīdzību ir iespējams iegūt dubultotos haploīdus un panākt veselo augu attīstību – tas ir noderīga metode augu selekcijā.
- Mēģinājumi ražot augu sekundāros savienojumus (alkaloīdus, glikozīdus, ēterskābes eļļas) augu šūnu/audu kultūrā sākotnēji nebija veiksmīgi, jo audu kultūrā šūnu spēja sintezēt šos savienojumus pazuda. Tomēr ir atrastas metodes, kuras ļauj ražot vajadzīgos savienojumus šūnu suspensiju kultūrās, kallusu un sakņu kultūrās (lai tas būtu iespējams, ir jāzin attiecīgo vielu sintēzes bioķīmiskie ceļi, jāatrod piemērotais kultūras veids un barotne, iespējams, var izmantot elisitorus).
- Augu šūnu protoplastus mehāniski izolēja *Klercker* jau 1892. gadā, bet 1909. gadā *Küster* panāca protoplastu saplūšanu. 1960. gadā *Cocking* ieguva lielas protoplastu populācijas, izmantojot celulāzes preparātu. 1970-s gados panāca no protoplastiem reģenerēto šūnu dalīšanos un veselo augu reģenerāciju. Protoplastu sapludināšanu mēģināja izmantot selekcijā, jo tā ļauj pārvarēt sugu nesaderības barjeru.

Literatūra:

Laimer M., Rucker W. 2003. Plant tissue culture 100 years since Gottlieb Haberlandt.

Plant Cell and Tissue Culture – A Tool in Biotechnology. 2009. Springer Verlag