

AUGU AUDU KULTŪRAS

2. AUGU MIKROPAVAIROŠANAS METODES UN ETAPI

2.1 Pamatinformācija

- “*In vitro*” (“stiklā”) – mākslīga kultūra, t.sk. audu kultūra*. Plašā nozīmē – sterilu augu orgānu, šūnu vai audu kultūra.
- Izšķir divu veidu augu audu augšanu: organizēto un neorganizēto.

Organizēta augšana ir vērsta uz noteiktas struktūras veidošanos vai uzturēšanu (piemēri: apikālās meristēmas, lapu iniciāļu vai ziedu pumpuru augšana saglabājoties to struktūrai; jauno orgānu iniciācija – organoģenēze/morfoģenēze).

Neorganizēta augšana galvenokārt notiek *in vitro* apstākļos, nediferencētu šūnu/audu augšana. Audu agregātu spēja neierobežoti palielināties ir apgriezti proporcionāla to diferenciacijas pakāpei (piemērs - kallusa augšana).

- *In vitro* kultūras var iedalīt organizēto struktūru kultūrās un neorganizēto audu kultūrās.

Organizēto struktūru kultūras: meristēmu kultūras (tikai apikālā meristēma - iegūst vienu dzinumu); dzinuma galotņu/dzinumu kultūras (iegūst vairākus dzinumus); posmu kultūras (sānpumpuri pie neliela stumbra fragmenta); izolēto sakņu kultūra; embriju kultūras.

Neorganizēto audu kultūras: kallusu (jeb audu) kultūras (var iegūt no augu orgāniem, audu fragmentiem vai šūnu kultūras); šūnu suspensijas jeb šūnu kultūras; protoplastu kultūras; putekšņmaciņu kultūras (satur nenobriedušus putekšņus, izmanto haploīdo augu iegūšanai).

- Audu kultūru iniciācija:
 - **Eksplants – neliels augu orgāns vai audu fragments, kuru izmanto audu kultūras uzsākšanai.** Pārsvārā kultūras uzsākšanai ir nepieciešama eksplanta virsmas sterilizēšana, jo kultūrā ienestie mikroorganismi negatīvi ietekmē augu audus. Sterilizē gan pašu eksplantu, gan instrumentus, materiālus un darba virsmas. Manipulācijas ar eksplantiem un kultūrām veic īpašos kabinetos vai t.s. boksos (laminārboksos), kur ir iespējams nodrošināt sterilā gaisa plūsmu.
 - **Barotne – veido audu kultūras vidi un nodrošina kultūru ar nepieciešamām barības vielām.** Barotnes sastāv no minerālvielu maisījuma, kurā makro un mikro elementi ir noteiktā proporcijā, un papildus ingredientiem. Tie var būt: vitamīni, aminoskābes, enerģijas avots (parasti izmanto cukurus - saharozi, glikozi). Barotnes bieži satur arī fitohormonus (augšanas regulatorus). Izmanto šķidrās un puscietās barotnes - pēdējām pievieno želējošo vielu (parasti agaru).
 - **Pasāža (*subculture*) – kultūras daļas (kallusa fragmenta, šūnu, orgāna vai tā daļas) pārņemšana uz jaunu barotni.** Pasāžas ir nepieciešamas kultūras uzturēšanai, jo kultivētie audi/orgāni izsmeļ barotnes resursus un var izdalīt toksiskus vielmaiņas produktus. Pasāžas ir nepieciešamas arī pavairošanai - eksplantu sadalot atsevišķos fragmentos, posmos, dzinumos (atkarībā no kultūras veida).

Augu audu kultūru tipi

- Augu orgānu kultūras: izšķir determinēto un nedeterminēto orgānu kultūras.
 - **Determinēto orgānu kultūras:** meristēma ir ieprogramēta diferenciacijai, t.i. veidojas determinēts auga orgāns (piem. lapa, zieds, auglis, putekšņlapa, auglencīca). Pēc attiecīgā signāla saņemšanas meristēmas kļūst determinētas ļoti agri, jau pēc

dažiem šūnu dalīšanas cikliem. Kultūrā pārcelts determinētā orgāna aizmetnis var attīstīties par nobriedušu orgānu, bet tālākā augšana nenotiek. Veiksmīga orgāna attīstība ir lielā mērā atkarīga no barotnes sastāva. Lai gan determinēto orgānu kultūras parasti neder augu pavairošanai, tos izmanto galvenokārt lai pētītu dažādu faktoru ietekmi uz meristēmu darbību un orgānu attīstību. Atsevišķos gadījumos ir iespējams panākt determinētās meristēmas pārvēršanos par veģetatīvu (nedeterminētu) meristēmu.

- **Nedeterminēto orgānu kultūras:** meristēmu, dzinumu, embriju un izolēto sakņu kultūras. Apikālās meristēmas ir, līdzīgi kā determinēto orgānu meristēmas, agrīnā attīstības stadijā ieprogramētas jauno dzinumu vai sakņu attīstībai. Šādu orgānu augšana potenciāli var turpināties neierobežoti ilgi.

Meristēmas – 0.2-1.0 mm no dzinuma galotnes ar vai bez diviem lapu aizmetņiem

Dzinumi un dzinumu galotnes – 5-10 mm garas galotnes vai veseli pumpuri, kā arī posmi. No tiem var iegūt veselus dzinumus kurus, savukārt, var apsakņot lai iegūtu augus. Dzinumus var arī pavairot, inducējot sānpumpuru attīstību.

Embriju *in vitro* kultūras – izmanto, lai pārvarētu post-zigotisko nesaderību, krustojot dažādus augus (visbiežāk, dažādas sugas). Šo metodi sauc arī par embriju izglābšanu (*embryo rescue*). Embriju izolēšana var būt sarežģīta (īpaši tad, kad normālai attīstībai jāizolē nobrieduši embriji), līdz ar to kā alternatīvu metodi dažkārt izmanto apputeksnēto augu auglenci vai sēklaizmetņu kultūru (*in ovulo* embriju kultūra). Ja embriju attīstība tomēr nenotiek, ir iespējams izmantot netiešo organoģenēzi (iegūstot sākumā kallusu, no kura attīstās adventīvie dzinumi). Embriju kultūru izmanto orhideju komerciālai pavairošanai.

Izolēto sakņu kultūra – sakņu kultūru iegūst, kā eksplantu izmantojot saknes galotni. Kultūrā izveidojas sakņu sistēma bez dzinuma. Atkarībā no sugas, sakņu kultūru ir iespējams uzturēt neierobežotu laiku (āboliņš, velnābols, tomāts, *Citrus* sugas) vai arī pēc noteikta laika kultūra noveco – vairs neaug sānsaknes un kultūra iet bojā. Ir augi kuru sakņu kultūru nav izdevies iegūt (pamatā kokaugu sugas). Sakņu kultūras izmanto mikorizas pētījumos, gumiņu veidošanos pētīšanai. Sakņu kultūras ir ģenētiski stabilākas par dzinumu kultūrām. Atsevišķos gadījumos no saknes kultūras ir iespējams iegūt dzinumus – tiešā vai netiešā veidā (caur kallusu).

Kallusu kultūras (neorganizēto šūnu kultūras) – kalluss ir amorfi auga audi, kuri rodas, neorganizēti vairojoties augu šūnām. Augu gabaliņu (eksplantu) šūnās fitohormonu ietekmē notiek metabolisma izmaiņas – **dediferenciācija** - un šūnas sāk aktīvi dalīties. Dažādu augu audu spēja veidot kallusu atšķiras un ir liela atšķirība starp viendīgļlapjiem un divdīgļlapjiem. Viendīgļlapju augiem kallusu var iegūt tikai no juveniliem, galvenokārt embrionāliem, audiem. Šādi iegūtais kalluss ir primārais kalluss, no kura var iegūt sekundāro kallusu un potenciāli neierobežotu laiku uzturēt kultūru. Taču ar laiku pieaug risks ka šūnās notiks ģenētiskās izmaiņas.

Šūnu suspensiju kultūra – šis kultūras veids metodoloģiski ir līdzīgs baktēriju kultūrai. Šūnas kultivē šķidrā barotnē. Parasti nav iespējams panākt atsevišķu šūnu suspensiju, jo augu šūnu šūnapvalkiem ir tendence turēties kopā, veidojot klasterus. Kultūras uzturēšanai nepieciešama pastāvīga kratīšana vai barotnes maisīšana. Šūnu kultūras izmanto augu pavairošanai ar somatiskās embriogēneses metodi un sekundāro savienojumu ražošanai (parasti darbam ar lielu tilpumu izmanto bioreaktorus). Sekundāro savienojumu ražošanai izmanto arī imobilizēto šūnu

kultūras.

Protoplastu kultūras – protoplastus iegūst mehāniski izgriežot šūnas no šūnapvalkiem vai enzimatiski sadalot šūnapvalku. Protoplastus izmanto augu vīrusu infekciju pētījumos, kā arī DNS fragmentu iekļaušanai šūnu genomā (ģenētiskā modificēšana) un protoplastu sapludināšanai (somatiskā hibridizācija).

Izolētās šūnas – izolēto šūnu klonus (kallusu līnijas, kur katra līnija ir iegūta no atsevišķas šūnas) izmanto, lai pavairotu šūnas ar vēlāmām īpašībām, kā arī fizioloģiskajos pētījumos. Izolētās šūnas spēj augt tikai noteiktā attālumā viena no otrās, ja attālums ir pārāk liels, šūnas nesaņem nepieciešamos augšanas faktoros. Lai veicinātu izolēto šūnu augšanu, izmanto t.s. *nurse tissues*, kuri uztur audzējamo šūnu augšanu.

- **Šūnu diferenciācija un organoģenēze:** meristēmu un plānsienu parenhīmas šūnas sauc par nediferencētām, bet specializētās šūnas – par diferencētām. No nediferencētiem audiem nav iespējams iegūt viena veida diferencētās šūnas, jo diferencēšanas process ir cieši saistīts ar orgānu veidošanos un tam ir nepieciešami blakusesošo šūnu signāli. Līdzīgi, ir grūti uzturēt specializēto šūnu kultūru jo tādas šūnas mazāk aktīvi dalās un ar laiku noveco. Kallusu kultūrās parasti veidojas vadaudu šūnas, traheīdas un hloroplastus saturošas (parenhīmas) šūnas. Vadaudu veidošanās ir atkarīga no auga sugas un no barotnes sastāva (cukuru un fitohormoniem). Kallusu kultūrās, šūnām dediferencējoties, hloroplasti parasti noārdās, taču gaismā var notikt arī spontāna hloroplastu veidošanās (kallusi paliek zaļi), kultūras kļūst fotomiksotrofas.
- **Morfoģenēze/organoģenēze ir orgānu de novo veidošanās audu kultūrās.** Kultūrā izveidojušos jaunus augu orgānus sauc par *adventīviem orgāniem*, bet audus, no kuriem var veidoties jauni orgāni, par *morfogēniem audiem*. Audu kultūrā ir iespējams inducēt sekojošo orgānu veidošanos:
 - dzinumumu (kauloģenēze) un to pārveidņu
 - sakņu (rizoģenēze)
 - embriju (somatiskā embrijoģenēze)
 - ziedu.

Augu mikropavairošanas tehnoloģija

- **Mērķi, priekšrocības un trūkumi**

Augu pavairošanai *in vitro* (mikropavairošanai) var būt dažādi mērķi, atkarībā no tā, kāds ir konkrētā auga tradicionālais pavairošanas veids.

- Pavairojot *in vitro* augus, kurus parasti pavairo veģetatīvi, var ātri iegūt lielu daudzumu ģenētiski identisku augu;
- Mikropavairošanas metodes var izmantot vīrusbrīvo augu iegūšanai, vērtīgo mātesaugu saglabāšanai un lai iegūtu šķirnes augus, kuriem ir sava sakņu sistēma (bez potēšanas).

Mikropavairošanas priekšrocības ir:

- liela augu daudzuma uzturēšanai līdz to izstādīšanai *ex vitro* ir nepieciešama salīdzinoši maza platība un laikā starp pasāzām augiem nav nepieciešama kopšana;
- Ja augu parasti pavairo ar sēklām, atsevišķos gadījumos mikropavairošanas metode ļauj samazināt pavairošanai nepieciešamo laiku. Šādiem augiem mikropavairošanas metodes izmanto arī selekcijā, vērtīgo hibrīdu pavairošanai;

- Dažkārt ar mikropavairošanas metodi var pavairot augus, kurus ir citādi sarežģīti pavairot (piem. orhidejas).

Mikropavairošanas metožu trūkumi ir

- iespējama ģenētiska nestabilitāte (īpaši ja viena no pavairošanas stadijām ir kallusa veidošanās);
- metode ir darbietilpīga (ar ko ir sasitītas papildus izmaksas), nepieciešama atbilstoša kvalifikācija;
- speciālas laboratorijas un aprīkojuma nepieciešamība;
- iespējama kroplīgo augu veidošanās vai šķirnes raksturīgo īpašību pazušana (īpaši dekoratīviem augiem);
- sarežģīta augu adaptācija *ex vitro* (āra) apstākļiem. Adaptācijas problēmas pamatā izriet no tā, ka kultūrā augi atrodas lielā mitrumā (parasti 100%) un sākotnēji ir neizturīgi pret izžūšanu.

Katrā konkrētā gadījumā, atkarībā no mikropavairošanas mērķa, ir jāņem vērā metodes priekšrocības un trūkumi.

Kādos gadījumos mikropavairošanas metodei ir priekšrocības:

- ir vēlama ražošanas visa gada garumā, neatkarīgi no laika apstākļiem
- ir jāizvairās no slimībām pavairošanas procesā
- jāpavairo ģenētiski specifiski augi (aneiploīdi, poliploīdi, sterili)
- ir klonāli jāpavairo atsevišķi vērtīgi augi

Visos gadījumos jārēķinās ar kapitāla ieguldījumiem.

Augu audu kultūru ekonomiskā nozīme

Ekonomiski nozīmīgākais augu šūnu un audu kultūru izmantošanas veids ir augu pavairošana sterilajā kultūrā (mikropavairošana). Pārsvārā tā ir dekoratīvo augu pavairošana, ir nozīmīga arī dārza un lauka kultūru pavairošana, tajā skaitā selekcijā. Atsevišķu vietu ieņem tropu augu kultūras (piemēram, banāni, *Musa sp.*). Izaudzēto augu apjoma ziņā pirmo vietu var piešķirt orhidejām (īpaši *Phalaenopsis* ģints), no dārza kultūrām nozīmīgākā ir dārza zemene, no krūmiem – rododendri, kā arī rozes un ceriņi. No lauka kultūrām svarīgākie ir kartupeļi, kuriem seko spargēļi (*Asparagus*). 1990-to gadu laikā sterilā kultūrā pavairotu augu apjoms ir būtiski samazinājies gan Eiropā, gan ASV, īpaši tādiem augiem kā gerberas, antūrijas, sanpaulijas (*Saintpaulia*). Svarīga ir dekoratīvo un augļkoku un krūmu pavairošana (ceriņi, krūmmellenes, avenes, ķirši un saldie ķirši). Ar AAK metodēm pavairo arī meža kokus (skujkokus, apses). Šūnu, kallusu un sakņu kultūras izmanto dažādu augu sekundāro metabolītu (galvenokārt ārstniecisko vielu) iegūšanai.

.....

Mikropavairošanas etapi

Sākotnēji izšķir trīs augu mikropavairošanas etapus (*Murashige, 1974*):

I etaps – sterilas kultūras uzsākšana

Lai uzsāktu kultūru, ir nepieciešams iegūt sterilu eksplantu un panākt tā izdzīvošanu un turpmāko augšanu un attīstību. Parasti vienlaicīgi izmanto vairākus eksplantus.

II etaps – pavairošana

Atkarībā no izvēlētas metodes (skat. zemāk), pavairošanu var panākt stimulējot dzinumu veidošanos no jau esošām meristēmām (dzinumu un posmu kultūra) vai adventīvo orgānu veidošanos. Lai pavairotu augu var iegūt ne tikai dzinumus, bet arī somatiskos embrijus vai orgānu pārveidnes (uzkrājējorgānus, piemēram, bumbuļus).

III etaps – sagatavošana izstādīšanai *ex vitro* (var ietvert apsakņošanu)

2.-jā etapā iegūtie augi ir mazi un nespēj augt autonomi (parasti tie ir miksotrofi). Līdz ar to, ir nepieciešama to ataudzēšana līdz augi sasniedz noteiktu izmēru. Daudziem augiem nepieciešami stimuli priekš sakņu veidošanos. Atsevišķos gadījumos ir nepieciešama speciāla apstrāde, lai augiem neiestājas miera periods.

Vēlāk pie šiem trīs pamatetapiem pievienoja:

0. etapu (*Debergh, Maene* 1981) – mātes auga izvēle un sagatavošana,

Mātes augam ir jābūt kvalitatīvam (ar visām vēlamām īpašībām) un bez slimības pazīmēm.

Ir gadījumi, kad mātes augam ir nepieciešama apstrāde vai ir vēlams pirms eksplanta iegūšanas kultivēt to noteiktos apstākļos

un IV etapu – augu aklimatizācija *ex vitro* apstākļos.

Augi ir jāadaptē zemākam gaisa mitrumam un lielākai gaismas intensitātei, kā arī, daudzos gadījumos, autotrofam dzīvesveidam (dažkārt to var panākt vēl *in vitro*). Parasti no sterilas vides izņemtos augus sākumā audzē siltumnīcā vai audzēšanas telpā ar zemu apgaismojumu, piemērotā substrātā, nodrošinot sākotnēji paaugstinātu gaisa mitrumu (audzē zem plēves, miglo).

- Mikropavairošanas metodes var klasificēt dažādi, viens no veidiem ir klasifikācija pēc eksplanta izcelsmes:
 - Kultūru uzsāk, izmantojot galotnes pumpuru vai sānpumpuru (meristēmu). No tāda eksplanta iegūst vienu vai vairākus dzinumus.
 - Kultūru uzsāk, izmantojot somatiskos audus, no kuriem veidojas adventīvie orgāni. Tā var būt
 - tiešā morfoģenēze (organoģenēze un embriogēze) no sākotnējā eksplanta audiem
 - netiešā morfoģenēze no kallusa audiem

Literatūra:

Plant Propagation by Tissue Culture. 2008. Springer Verlag

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

* Dictionary of Plant Tissue Culture. Cassells A.C., Gahan P.B. 2006. The Haworth Press, Inc.