

6. *IN VITRO* KULTŪRU AUKSTUMUZGLABĀŠANA UN KRIOSAGLABĀŠANA. SOMAKLONĀLĀ MAINĪBA

***In vitro* kolekcijas, gēnu bankas**

Optimāls sugu un šķirņu saglabāšanas veids ir sēkļu bankas. Taču sugas, kurām sēklas nepanes izzūšanu (rekalcitrantas sēklas), kultūraugus, kuri neveido sēklas un kurus pavairo pārsvarā veģetatīvi, kā arī augus ar elites gēnu kombināciju var saglabāt lauka kolekcijās, veģetatīvā pavairošanas materiāla kolekcijās un audu kultūru (*in vitro*) kolekcijās.

In vitro kolekciju priekšrocība ir tas, ka augu materiālu var uzglabāt no patogēniem brīvā vidē, ir viegli nodrošināt fitosanitāro kontroli, kolekcijai nav nepieciešama liela platība. Svarīga priekšrocība ir iespēja pavairot un uzturēt no vīrusiem un citiem patogēniem brīva stādmateriāla kolekcijas. Trūkumi ir lielas izmaksas, grūtības ievadot konkrētās sugas *in vitro* kultūrā un ģenētiskās nestabilitātes risks.

Aukstumuzglabāšana

Lai kolekcijā nebūtu nepieciešams regulāri pārlikt augus uz jauno barotni (veikt pasāžas), var palēnināt augšanas un novecošanas procesus, pārvietojot kultūru telpā ar zemu pozitīvu temperatūru (4 - 15 °C). Lai veicinātu eksplantu izdzīvošanu, ir jāatrod optimālie uzglabāšanas apstākļi - kultivēšanas sistēmu (trauki, barotnes sastāvs, osmotiskais potenciāls) un vidē (parasti zems apgaismojums, iespējams - samazināts skābekļa parciālais spiediens). Viens no galveniem mērķiem ir palēnināt kultūras augšanas ātrumu. Lai palēninātu augšanu, var izmantot augšanas inhibitorus un fitohormonus (piemēram, abscīzskābi). Ja konkrētai kultūrai ir atrasta optimāla aukstumuzglabāšanas sistēma, kultūru var uzglabāt no dažiem mēnešiem līdz dažiem gadiem bez pasāžas vai ar retām pasāžām.

Aukstumuzglabāšanu veiksmīgi izmanto dekoratīvo un augļu koku audu kultūrā, kā arī citās kultūrās.

Kriosaglabāšana

Krisaglabāšana ir eksplantu uzturēšana negatīvā temperatūrā šķidrā slāpekļī (-196 °C) vai virs šķidrā slāpekļa (-150 līdz -196 °C). Šādā vidē ir pilnībā pārtraukti visi dzīvības procesi šūnās. Kritiskie posmi kriosaglabāšanas procesā ir pati sasaldēšana un atkausēšana pēc uzglabāšanas.

1. Pirms sasaldēšanas objekts ir jāsagatavo, pakāpeniski atūdeņojot to un pieradinot pie aukstuma.
2. Trīs galvenie riska faktori sasaldējot objektu ir objekta izmērs, ūdens saturs audos un temperatūras pārejas ātrums.
 - sasaldējot vai atkausējot objektu, rodas lokālas temperatūras pārejas. Ja objekts ir liels, tajā veidojas plaisas. Lielā objektā veidojas arī krioprotektantu koncentrācijas gradients, jo šīs vielas nevar izplatīties visā tilpumā.
 - ūdens saturs. Ledus kristāli var veidoties ārpus šūnām un iekšā šūnās. Ārpusšūnu ledus izjauc osmotisko līdzsvaru, jo samazinās ūdens saturs citoplazmā un var notikt plazmolīze. Ledus kristāli, kuri veidojās šūnā iekšā, mehāniski bojā šūnas organelas un plazmatisko membrānu.

Lai risinātu šīs problēmas, izmanto divas pieejas:

lēnā sasaldēšana (*slow freezing*). Šajā procesā ledus veidojas ārpus šūnām, jo palielināta osmolītu koncentrācija citoplazmā novērš iekššūnas ledus veidošanos. Sasaldēšana var notikt divos posmos;

ātrā atdzēsēšana (*rapid cooling*). Ledus kristāli nepaspēj izveidoties (vai izveidojas mikrokristāli). Citoplazma pāriet stiklainā stāvoklī (*glassy state*) un kļūst par amorfu, sastingušu masu. Šo procesu sauc par *vitrifikāciju* (**nejaukt ar morfoloģiskām izmaiņām, kuras notiek *in vitro* eksplantos liela mitruma apstākļos**).

Lai pasargātu objektu sasaldēšanas laikā, izmanto dažādas metodes:

- objekta atūdeņošana un inkapsulācija;
- apstrāde ar dimetildulfoksīdu (*DMSO*, krioprotektants, novērš ledus kristālu veidošanos);
- apstrāde ar saharozi;
- saldēšana, suspendējot krioprotektanta pilienā (*droplet freezing*).

Nepieciešamas sasaldēšanas procedūras un to kombinācijas ir atkarīgas no eksplanta izturības - izturīgākie eksplanti ir sēklas un ziemas pumpuri, turpretī ziedputekšņu sasaldēšana ir sarežģītāka.

3. Lai panāktu eksplanta izdzīvošanu pēc atkausēšanas, tas ir jākultivē optimālos apstākļos. Līdzīgi kā sasaldējot, var būt nepieciešami vairāki pakāpeniskas pieradināšanas posmi.

Lēna (divpakāpju) sasaldēšana: sasaldēšana notiek ar ātrumu 0.1 - 0.5 °C minūtē. Ledus kristāli veidojas ārpus šūnām un pakāpeniski pieaug izšķīdušo vielu koncentrācija citoplazmā. Lai samazinātu iekššūnas ledus kristālu veidošanas risku, izmanto krioprotektantus un mākslīgi izsauc ledus veidošanos objekta ārpusē. Kritiskā temperatūra, kurā var spontāni veidoties ledus kristāli, ir 40 °C. Pēc tam objektu ātri sasaldē vai uzreiz iegremdē šķidrā slāpekļī.

Vitrifikāciju (ātrai atdzēsēšanai) var panākt, izmantojot lielas krioprotektantu koncentrācijas un tad ātri sasaldējot objektu. Atūdeņošana notiek pakāpeniski. Sākumā objektu ievieto šķīdumā ar zemu krioprotektanta koncentrāciju, tad - koncentrētākā šķīdumā. Krioprotektanti var iefiltreties šūnā (glicerīns, DMSO) vai palikt šūnapvalkā (saharoze un citi ogļhidrāti). Līdz ar to, tie pasargā dažādus šūnas kompartmentus. Var izmantot dažādu krioprotektantu kombinācijas. Šķīdumu, kurš satur dažādas vitrifikāciju veicinošas vielas, sauc par augu vitrifikācijas šķīdumu (*plant vitrification solution, PVS*). Piemēram, PVS2 satur 0.4 M saharozes, 3.2 M glicerīna, 2.4 M etilēnglikola un 1.9 M DMSO.

Iekapsulēšana-atūdeņošana daļēji atgādina dabisko sēklu nogatavošanas procesu, jo notiek objekta pakāpeniska izžūšana. Iekapsulētas dzinum galotnes dažreiz sauc par "mākslīgām sēklām". Kapsulas sastāv no gēla, kuru veido algināti divvertīgo jonu klātbūtnē (piem. Ca²⁺). Algināti sastāv no garām polisaharīdu ķēdēm, kuras savstarpēji saista jonu tilti. Gēlā iekapsulētos eksplantus sākumā atūdeņo koncentrētākā saharozes šķīdumā un tad žāvē virs silikagēla. Pēc tam tos uzreiz iegremdē šķidrā slāpekļī.

Pilienu sasaldēšanu (*droplet freezing*) izmanto ultra-ātrai objekta sasaldēšanai. Mazus krioprotektanta (piem. DMSO) pilienus uzpilda uz alumīnija folijas strēmeliem un ievieto tajos eksplantus. Foliju ievieto uzreiz šķidrā slāpekļī. Tā kā alumīnijs ļoti labi vada siltumu, sasaldēšanas ātrums var sasniegt 8000-12000 °C minūtē. Ultra-ātrās

sasaldēšanas rezultātā nenotiek vitrifikācija, bet ledus kristāli nespēj izveidoties vai arī to izmēri ir niecīgi un tie nespēj bojāt šūnu iekšējās struktūras.

Somaklonālā mainība

Somaklonālā mainība (*somaclonal variation*) ir ģenētiskās un fenotipiskās atšķirības starp klonāli pavairotiem augiem, kuri ir izcēlušies no viena mātes auga.

Mainība izpaužas kā atšķirīgo fenotipu izskaldīšanās kloniem, kuri ir iegūti no viena eksplanta. Izšķir kvalitatīvas un kvantitatīvas atšķirības.

Somaklonālās variācijas var būt stabilas, t.i. fenotipa un genotipa izmaiņas pārmanto arī konkrētā klona pēcnācēji. Atkarībā no tā, vai izmaiņas saglabājas tikai pavairojot veģetatīvi, vai arī pavairojot ģeneratīvi, izšķir somatiski un meiotiski stabilas izmaiņas.

Viena daļa no somaklonālajām izmaiņām ir saistīta ar citoģenētisko nestabilitāti – hromosomu skaita izmaiņas un pašu hromosomu aberācijas. Tomēr pastāv uzskats, ka tas ir galvenais somaklonālās mainības cēlonis ir epiģenētiskās izmaiņas (Kaeppler *et al.* 2000). Epiģenētiskās izmaiņas ir potenciāli atgrieziniskas, bet tās var būt arī ļoti stabilas un saglabāties vairākās paaudzēs.

Jāņem vērā, ka somaklonālo mainību var izraisīt paša sākotnējā eksplanta šūnu neviendabīgums. Jo vecāks ir eksplants un jo diferencētākas ir tā šūnas, jo lielāka ir šāda iespēja. Mainība mēdz būt izteiktāka augiem ar mazāku hromosomu komplektu skaitu – piemēram, kukurūzai (diploīds), jo poliploīdiem augiem notiek izmaiņu “buferēšana”. Jo vecākas ir eksplanta šūnas, t.i. jo lielāka ir to diferenciacijas pakāpe, jo lielāka ir poliploīdo šūnu proporcija. Jaunām šūnām, kuras aktīvi dalās, hromosomu komplektu skaits ir vienmērīgāks un stabilāks, nekā vecākām šūnām. Nestabilitāte vairāk izpaužas arī audos, kuri ir izcēlušies no haploidām šūnām.

Lai raksturotu un salīdzinātu DNS daudzumu šūnās, izmanto t.s. C vērtību. Gametā hromosomu DNS daudzums ir 1 C, diploīdā šūnā – 2C. Attiecīgi, poliploīdās šūnās var būt nC .

Ja *in vitro* kultūras attīstība ietver kallusa veidošanos un netiešo morfoģenēzi, pieaug poliploīdo un aneiploīdo šūnu veidošanās iespēja. Ja auga orgāni attīstās no šūnām ar atšķirīgu C vērtību, var izveidoties **himēras** - augi, kuru audi un orgāni satur ģenētiski atšķirīgas šūnas. Visdrošākā *in vitro* pavairošanas metode no metodēm, kuras ir saistītas ar netiešo morfoģenēzi, ir somatiskā embriogēze, jo somatiskais embrijs attīstas no vienas šūnas.

Somaklonālo mainību ietekmē procesi, kuri notiek eksplantā - šūnu dediferenciācija, kallusa veidošanās un netiešā morfoģenēze veicina mainību, kā arī dažādi kultivēšanas faktori - eksogēnie fitohormoni (atsevišķi fitohormoni un to attiecība), slāpekļa forma barotnē un barotnes osmotiskais spiediens.

Lai gan somaklonālā mainība ir nevēlama kultūru kolekcijā, to var izmantot selekcijā, atlasot fenotipus ar vēlamām īpašībām. Šajā gadījumā izmaiņām ir jābūt stabilām un jāsaglabājas, pavairojot iegūto augu veģetatīvi vai ģeneratīvi.

Citoģenētiskās mainības izpausmes ir:

- poli/aneiploīdija
- mutācijas (punktveida, insercijas/delēcijas)
- hromosomu pārkārtošanās
- transpozonu (DNS mobilo elementu) aktivizēšanās

- gēnu amplifikācija

Ar hromosomām un DNS sekvenci saistītās izmaiņas visbiežāk notiek neaktīvajās sekvencēs, heterohromatīnā un centromēru rajonos. Uzskata, ka tieši heterohromatīns šūnas dalīšanas laikā replicējas vēlāk un bieži nepilnīgi, kas izraisa hromosomu aberācijas, sekvenču translokācijas, delēcijas vai nepilnīgu hromosomu sadalīšanos starp meitšūnām.

Epigēnētiskā mainība jeb epimutācijas bieži ir saistītas ar DNS metilēšanas izmaiņām - metilēšana ir daļa no gēnu aktivitātes regulēšanas sistēmas.

DNS metilēšana izraisa gēnu "noslāpēšanu" (*gene silencing*), tādējādi izmainot šūnas attīstības programmu. Ir hipotēze, ka šīs izmaiņas ir saistītas ar šūnu dediferencēšanos. Dediferencējoties, šūnas atgriežas pie embrionālās šūnas attīstības programmas un DNS metilēšanas pakāpe samazinās. Tā kā *in vitro* kultūrā nenotiek apaugļošanās un attīstības procesi atšķiras no normāliem, šūnām atkal diferencējoties, DNS metilēšanas pakāpe ir mazāka, nekā normāli auga audu attīstības gaitā.

Ievadīšana *in vitro* kultūrā izraisa genoma šoku, kā rezultātā destabilizējas gēnu "noslāpēšanas" regulācija. Aktivizējas arī mobilie DNS elementi (transpozoni). Iespējams, ka epimutācijas izsauc arī citogēnētiskās, ar hromosomu struktūru saistītās izmaiņas, jo epigēnētiskā regulācija ietekmē hromatīna stāvokli (gēnu sekvenču aktivitāti).

Kāpēc audu kultūrā somaklonālā mainība izpaužas vairāk, nekā dabīgos apstākļos? Sumējot iepriekšminētos faktoros, mainību nosaka:

- īpatnējs attīstības process, kurā nenotiek apaugļošanās un auga un secīga attīstība;
- šūnu dediferenciācija, kuras rezultātā destabilizējas gēnu aktivitātes regulācijas mehānismi;
- genoma šoks, kura rezultātā aktivizējas mobilie DNS elementi;
- eksogēno fitohormonu ietekme.

Somaklonālās izmaiņas uzkrājas laikā - jo ilgāk pastāv *in vitro* kultūra, jo lielāka ir iespēja, ka eksplantos uzkrāsies izmaiņas. Tādēļ ilgstošai kultūras saglabāšanai, ja iespējams, izmanto kriosaglabāšanas metodi.

Literatūra:

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

Plant Cell Culture. Essential Methods. 2010. Wileys&Sons Ltd.

Kaeppler et al. 2000. Epigenetic aspects of somaclonal variation in plants. Plant Molecular Biology 43:179-188.

<http://cropgenebank.sgrp.cgiar.org/>