

## 7. FITOHORMONI, AUGŠANAS REGULATORI

Par **fitohormoniem** sauc augu audos esošos (endogēnos) ķīmiskos savienojumus, kuriem ir regulēšanas, nevis barošanas funkcija auga augšanas un attīstības procesā. Ar terminu **augu augšanas regulatori** apzīmē gan fitohormonus, kurus atklāja un izpētīja pirmos, gan citas vielas, kuras regulē augšanu un attīstību.

Galvenās un visvairāk pētītās fitohormonu klases ir:

- auksīni
- citokinīni
- giberelīni
- etilēns
- abscīzskābe.

Par fitohormoniem sauc arī sintētiskas vielas ar tādu pašu fizioloģisko ietekmi kā dabīgiem fitohormoniem. Augšanu un attīstību visvairāk ietekmē auksīns un citokinīns.

Šos divus fitohormonus un to analogus visvairāk izmanto augu audu kultūru audzēšanā.

Atsevišķiem fitohormoniem ir raksturīgi pleiotropiski efekti: fitohormoni mijiedarbojas savā starpā, piemēram, viens hormons ietekmē otrā sintēzi, transportu vai noārdīšanos. Fitohormonu uztveršanas mehānismi bieži pārklājas ar vides faktoru uztveršanas mehānismiem, tādēļ var būt sarežģīti atšķirt eksogēno un endogēno faktoru nozīmi noteiktās augšanas reakcijās. Visbeidzot, fitohormonu iedarbība var atšķirties dažādām sugām. Minētās īpatnības atšķir fitohormonus no dzīvnieku hormoniem.

Fitohormonu sintēzi ietekmē gan iekšējie (endogēnie), gan ārējie (eksogēnie) faktori. Piemēram, citokinīnu un abscīzskābes sintēzi auga saknēs ietekmē ogļhidrātu un minerālelementu daudzums. Savukārt, fitohormoni - citokinīns vai abscīzskābe - kuri transportējas uz auga virszemes orgāniem, ietekmē procesus asimilējošos orgānos (Sage, 2002).

Ne visi pētnieki piekrīt tam, ka uz augiem var attiecināt terminu "hormons", jo dzīvnieku un augu regulējošo vielu darbība atšķiras.

Augu hormoni:

- mazmolekulāri savienojumi
- var sintezēties visā augā
- pārsvarā lokāla ietekme
- ietekme mainās, atkarībā no citu fitohormonu iedarbības
- nav centralizētas regulēšanas

Dzīvnieku hormoni:

- proteīni/peptīdi/mazmolekulāri savienojumi
- sintezē specializēti dziedzeri
- iedarbojas uz attāliem mērķiem (protams, gan augu, gan dzīvnieku hormonu gadījumā ir izņēmumi)
- specifiska ietekme
- centraizēta regulēšana (CNS)

([http://news7a1.atm.iwate-u.ac.jp/english/e\\_agr.html](http://news7a1.atm.iwate-u.ac.jp/english/e_agr.html))

Lai gan fitohormoni arī var transportēties no viena orgāna uz citiem pa vadaudiem, kā vienu no būtiskākām atšķirībām min to, ka augiem nav tādas cirkulācijas sistēmas, kā

dzīvniekiem. Tomēr daudziem fitohormoniem ir atklāts samērā līdzīgs iedarbības mehānisms - tie iedarbojas uz receptoriem, kuri tālāk nodod signālu pārnesējiem, līdz signāls sasniedz gala mērķi (bieži ietekmējot konkrēto gēnu ekspresiju vai noteiktus fizioloģiskus procesus). Ņemot vērā minētās atšķirības, bieži fitohormonus apzīmē ar terminu "augu augšanas regulatori". AAR ir plašāka grupa, kura ietver gan "klasiskos" fitohormonus (auksīns, citokinīni, giberelīni, abscīzskābe, etilēns), gan vēlāk atklātos augšanas regulatorus un arvien top papildināta.

**Auksīni** (grieķu *auxein* – augt, palielināties) veicina kallusa, šūnu suspensijas un augu orgānu augšanu, parasti kombinācijā ar citokinīniem. Šūnu līmenī auksīni ietekmē šūnu dalīšanos un stiepšanos. Auksīnu ietekmē notiek šūnu dalīšanas iniciācija, līdz ar to auksīni piedalās galotnes meristēmas veidošanās un orgānu iniciācijā. Auksīni piedalās augu orgānu polaritātes, apikālās dominēšanas un tropismu regulēšanā.

Augos visbiežāk ir sastopams heteroauksīns – indolil-3-etilskābe (IES), bet ir ziņojumi arī par indolil-3-sviestskābes (ISS) noteikšanu augos. Augu audos ir arī citas vielas ar vāju auksīna aktivitāti, dažas ir heteroauksīna prekursori\*.

Pēc savas ķīmiskās dabas auksīni ir vājas organiskās skābes. Gan dabiskos, augos sastopamos auksīnus, gan vielas ar auksīnu aktivitāti, raksturo struktūra ar aromātisko gredzenu. Attīrīti auksīni ir kristāliskas vielas, kuras slikti šķīst ūdenī bet šķīst organiskajos šķīdinātājos un sārmu ūdens šķīdumā.

Auksīni, izņemot IES, ir stabilas vielas. IES, savukārt, ir jutīga pret UV starojumu, gaismu un oksidantiem. Gan IES, gan ISS daļēji sadalās autoklavēšanas procesā. Lai gan visiem auksīniem ir līdzīga fizioloģiskā iedarbība, to aktivitāte var būtiski atšķirties atkarībā no attīstības procesa kultūras šūnās vai audos. Aktivitāte var arī atšķirties starp individuālāiem augiem un pat starp viena auga orgāniem, atkarībā no audu vecuma un auga vai audu fizioloģiskā stāvokļa.

Auksīna koncentrācija dažādos orgānos nav vienāda. Tā ir maksimāla dzinuma apikalajā meristēmā un tās tuvumā (īpaši viendīgļlapjiem) un samazinās virzienā uz leju. Liela auksīna koncentrācija ir raksturīga arī jaunām lapām, ziediem, augļiem un sēklām to nogatavošanas stadijā (strauji augošiem orgāniem). Auksīna koncentrācija var mainīties laikā, augiem piemīt auksīna satura izmaiņu endogēnais ritms. Līdz ar auksīna koncentrāciju mātes augā, mainās no tā iegūto eksplantu īpašības.

Līdzīgi kā citi fitohormoni, auksīni augā lielākoties atrodas saistītā jet konjugētā formā. Konjugāti ir salikti savienojumi, kuri sastāv no fitohormona un cita mazmolekulārā savienojuma molekulām, kuras saista kovalentā saite. Auksīns visbiežāk veido konjugātus ir amīdiem (peptīdi) un glikozīdiem. Saistīti fitohormoni ir fizioloģiski neaktīvi. Tā kā saistīšanas reakcijas ir atgriezeniskas

---

\* prekursors (*precursor*) - konkrētās vielas priekštecis bioķīmiskajā ceļā (tas var būt tieši viens no sintēzes reakcijas substrātiem, vai arī kāda no vielām, kura ir iesaistīta iepriekšējās bioķīmiskā ceļa reakcijās)

un noteikts fitohormonu daudzums var tikt ātri atbrīvots, fitohormonu konjugātu veidošanās un fitohormonu atbrīvošanās ir elastīgs fizioloģisko procesu regulēšanas mehānisms. Atšķirībā no saistīšanas, fitohormonu degradācija ir neatgriezenisks process.

Auksīni ir vienīgā zināma augšanas regulatoru grupa, kurai piemīt aktīvais polārais transports auga organismā. Auksīns transportējas pa floēmu (tālais transports) un vadaudu maksts šūnām (tuvais transports). Auksīna importu un eksportu šūnā nodrošina dažādi transporta proteīni. Polāro transportu (vielas pārvietošanos vienā virzienā) nodrošina asimetrisks auksīna transportproteīnu izvietojums šūnu polos. Uzskata, ka auksīna difūzija arī ir polāri vērsta, tādēļ ka šūnu poliem atšķiras disociētās (ārpus šūnām) un nedisociētās (šūnās) auksīna formu caurlaidība.

Auksīns ietekmē vairākus auga fizioloģiskos procesus, tā ietekme izpaužas dažādos līmeņos. Šūnu fenotipa veidošanos un organoģenēzi ietekmē auksīna: citokinīna attiecība. Pastāv vairākas hipotēzes, kuras skaidro auksīna darbības mehānismus dažādos fizioloģiskos procesos. Šūnu stiepšanos, iespējams, ietekmē šūnapvalkā lokalizētais auksīnu saistošais proteīns (*auxin binding protein, ABPI*). Auksīna darbība ir saistīta arī ar proteīnu degradāciju proteosomās un ar ubikvitīna ceļu. Ir virkne gēnu, kuru ekspresiju tieši regulē auksīns (*auxin-responsive genes*). Šo gēnu promoteri satur raksturīgu sekvenci (*AuxRE*), kurai pievienojas auksīna atbildes faktors (*auxin-response factor, ARF*). Auksīns ietekmē arī  $K^+$  jonu plūsmas membrānā,  $H^+$  sūkņa aktivizēšanos, membrānas proteīnu (arī auksīna transporta proteīnu, *PIN*) reutilizēšanas endocitozes posmu.

(Paciorek, Friml 2006.)

Vesela auga līmenī auksīni stimulē adventīvo sakņu veidošanos, spraudņu apsākņošanos. Ar auksīna polāro transportu ir saistīta apikalā dominēšana.

Auksīns piedalās fototropisma reakcijā. Pastāv hipotēze, ka noēnotajā dzinuma pusē auksīns ietekmē šūnu stiepšanos veicinošo gēnu ekspresiju.

Augu audu kultūrā auksīna ietekme uz eksplanta attīstību ir atkarīga no citu fitohormonu satura un aktivitātes. Katrai kultūrai (kultūras sistēmai) auksīna koncentrācijas ietekme uz attīstību un morfoģenēzi ir jāpārbauda atsevišķi.

Audu kultūrās auksīnam ir vieslielākā loma sekojošos procesos:

- kallusa iniciācija
- meristēmu un dzinumu galotņu sākotnējās augšanas stimulēšana
- rizoģenēze
- somatiskā embriogēze.

**Fenoli** ir savienojumi, kuru molekulā ir aromatisks gredzens ar vienu vai vairākām hidroksilgrupām. Daudzos gadījumos novēro fenolu un auksīnu sinerģisko darbību, tādēļ fenolus var izmantot kā piedevas AAK barotnei. Pastāv divas hipotēzes, kuras izskaidro fenolu kā augšanas regulatoru iedarbību.

1. Saskaņā ar pirmo hipotēzi, fenolu savienojumi novērš heteroauksīna (IES) oksidēšanos, jo ir oksidatīvo enzīmu alternatīvie substrāti. Nediferencētos audos ir

noteikts augsts IES oksidāzes inhibitoru saturs, pretstatā diferencētos audos to saturs ir zems, ja nenotiek ievainojums. Daži autori ziņoja, ka fenolu iedarbības mehānisms ir saistīts ar saistītās un brīvās IES līdzsvaru. Fenoli ar antioksidatīvām īpašībām ir, piemēram, floroglucinols, katehols, hlorogēnās skābes.

2. Saskaņā ar otro hipotēzi, fenolu morfoģeniskā aktivitāte ir saistīta ar divu fenolu savienojumu – floroglucinola un florizidīna (glikozīds) – oksidēšanos un polifenolksidāzes darbību. Abi minētie savienojumi novērš vitrifikāciju *in vitro* kultūrās, stimulējot lignīna biosintēzi.

Daži fenolu savienojumi (piem, kvercītīns) darbojas kā atsevišķa augšanas regulatoru grupa, *fitotropīni* (auskīna transporta inhibitori). *Salicilskābe* arī ir svarīgs regulators, kurš piedalās augu reakcijās uz biotisko stresu. Atsevišķos gadījumos tika parādīta *kumarīnu* ietekme uz morfoģenēzi, iespējams, ka tā ir saistīta ar to ietekmi uz proteīnu sintēzi un ogļhidrātu metabolismu.

Endogēno fenolu daudzumu arī saista ar eksplantu (audu) morfoģenēzes spēju. **Augstāks fenolu saturs ir raksturīgs audiem, kuros notiek morfoģenēze.**

**Citokinīni** stimulē proteīnu un RNS sintēzi, palielina poliribosomu skaitu, ietekmē ogļhidrātu metabolismu (piemēram, stimulē cietes katabolismu, veicina pentožu fosfātu ciklu), kontrolē šūnas ciklu, veicina hloroplastu nobriešanu un kavē šūnu novecošanu. Dabā visbiežāk sastopamā viela ar citokinīnu aktivitāti ir zeatīns, bet ir ziņots, ka augos ir konstatēti arī benziladenīna atvasinājumi.

Citokinīnu sintēze notiek sakņu galotnēs un aktīvi augošos orgānos (lapas, augļi). Citokinīnu biosintēze un tālais transports floēmā un ksilēmā ir saistīts ar minerālelementu (piemēram, nitrātu, sulfātu un fosfātu) uzņemšanu augā un citokinīni piedalās minerālvielu sadales regulēšanā (Hirose et al. 2008).

Citokinīni var darboties sinerģiski ar auksīnu (piemēram, veicināt kallusa augšanu), iespējams tādēļ, ka citokinīni kavē IES oksidēšanos. Savukārt, pretēji auksīnu ietekmei, citokinīni palielina šūnu turgoru un ūdens potenciālu.

Citokinīniem ir svarīga loma šūnas cikla regulēšanā, kā arī apikālās meristēmas attīstībā. Uzska, ka citokinīni stimulē šūnas pāreju no G1 fāzes uz S (DNS replikācijas) fāzi un, iespējams, no G2 uz M (mitozes) fāzi.

Audu un orgānu kultūrās citokinīni stimulē šūnu dalīšanos (kallusa un šūnu kultūrās), stimulē adventīvo dzinumumu veidošanos no kallusa vai tieši no eksplanta audiem (piem. lapu fragmentiem). Parasti ir nepieciešami gan citokinīni, gan auksīni noteiktā proporcijā vai arī to secīga iedarbība (piemēram, īslaicīga inkubēšana citokinīnu saturošā barotnē un pasāža uz auksīnu saturošu barotni). Citokinīni stimulē arī sūnumpuru attīstību un sūndzinumu veidošanos.

Dabīgiem un sintētiskiem citokinīniem var būt raksturīgs iedarbības specifiskums. Atkarībā no sugas vai audu tipa un attīstības fāzes, vēlāmā efekta sasniegšanai var būt nepieciešams noteikts savienojums ar citokinīnu aktivitāti, turpretī cits savienojums nebūs aktīvs. Piemēram, juveniliem lazdu eksplantiem dzinumumu proliferāciju izsauc BAP (5 mg/l), taču nobriedušiem eksplantiem proliferāciju izsauc zeatīns (10 mg/l). Dažām sugām izmanto atšķirīgo citokinīnu kombināciju (piemēram, rododendriem).

Citokinīnu aktivitāte var mainīties atkarībā no vides apstākļiem – apgaismojuma un temperatūras. Paaugstināta temperatūra samazina citokinīnu efektivitāti.

Sintētiskie citokinīni lielākoties ir adenīna atvasinājumi (benziladenīns jeb benzilaminopurīns, topolīni), bet citokinīnu aktivitāte piemīt arī vielām ar atšķirīgu struktūru (piem. alkilaminopteridīni).

Dabīgās piedevas barotnei – kokosriekstu piens un rauga ekstrakts – satur zeatīnu un fenilurīnvielu kurām, kā arī to atvasinājumiem, piemīt citokinīnu aktivitāte. No fenilurīnvielas atvasinājumiem visvairāk izmanto 2Cl-4PU, 2,6Cl-PU un TDZ (tidiazurons). Dažām sugām šie savienojumi efektīvāk stimulē dzinumu veidošanos, nekā adenīna atvasinājumi (BAP).

AAK barotnei bieži adenīnu pievieno kombinācijā ar kādu no citokinīniem, jo ir novērots, ka tas veicina citokinīnu efektivitāti. Adenīns (kādreiz to uzskatīja par B grupas vitamīnu, vitamīns B4) var veicināt adventīvo dzinumu veidošanos, bet tā ietekme ir atšķirīga dažādām sugām un ir arī atkarīga no citokinīna veida, kuru pievieno attiecīgai barotnei. Iespējams, ka adenīns var kavēt citokinīnu noārdīšanos (inhibē atpakaļsaites regulāciju) vai arī ir izejmateriāls citokinīnu sintēzei.

### **Auksīna un citokinīna mijiedarbība.**

1957. gadā Skūgs un Millers parādīja, ka dzinumi no kallusa veidojas zemā auksīna un augstā citokinīna koncentrācijā. Vēlāk izrādījās, ka šo divu fitohormonu attiecība kontrolē vairākus šūnu diferenciācijas, organoģenēzes aspektus. Noteikts šo vielu līdzsvars ir nepieciešams meristēmu veidošanas procesam gan dzinumos, gan saknēs. Gan auksīns, gan citokinīns piedalās šūnu cikla regulācijā un to līdzsvars nodrošina šūnu cikla fāžu saskaņotu un sinhronu norisi, no kā ir atkarīga hromosomu struktūras stabilitāte.

**Giberelīni** ir fitohormonu grupa, kura sastāv no vairāk nekā 100 vielām ar līdzīgu ķīmisko uzbūvi un aktivitāti. Visu giberelīnu struktūrā ietilpst gibāna gredzens (*gibbane ring*). Lai apzīmētu atsevišķos savienojumus, tiem piešķir t.s. giberelīnu skaitli (GS<sub>x</sub>, kur GS - giberelskābe). Dažas vielas ir aktīvo giberelīnu prekursori vai otrādi, to metabolisma produkti, šo vielu fizioloģiskā aktivitāte ir zemāka. Aktīvākais no zināmiem giberelīniem ir GS<sub>1</sub>. No visas giberelīnu daudzveidības komerciāli ir pieejami GS<sub>3</sub> un GS<sub>4</sub>+GS<sub>7</sub> maisījums, kurus arī biežāk izmanto audu kultūrās. Tā kā giberelīni sadalās, autoklavējot barotni, tos pievieno jau gatavai barotnei ar sterila filtra palīdzību. Giberelīni veicina stiebru un lapu augšanu garumā graudzālēm (stimulē interkalārās meristēmas darbību), sekmē sēklu dīgšanu, augļu attīstību, ziedēšanu divgadīgiem augiem, piedalās juvenilitātes kontrolē.

Audu kultūrās izmanto gan giberelīnus, gan to antagonistus, t.s. antigiberelīnus. Uzska, ka GS iedarbība audu kultūrās galvenokārt izpaužas kā auksīna iedarbības pastiprināšana vai modulēšana. Giberelīna ietekme šūnu vai kallusa kultūrā var būt līdzīga auksīna ietekmei, GS izmanto, lai iesāktu šūnu kultūru ar ļoti zemu sākotnējo šūnu blīvumu. Vienlaicīgi, GS var kavēt kallusa veidošanos un, ja nav vēlams kallusa veidošanās eksplantiem, barotnē kuras sastāvā ietilpst citokinīns un auksīns, pievieno GS vai aizvieto auksīnu ar GS. Parasti GS kavē adventīvo orgānu un somatisko embriju veidošanos no kallusa, lai gan atsevišķām sugām GS klātbūtne palielināja adventīvo

dzinumu skaitu. Iespējams, GS ietekme uz morfoģenēzi ir atkarīga no morfoģenēzes stadijas - GS kavē meristemoīdu veidošanos, bet ir nepieciešama tālākai orgānu attīstībai no jau izveidotajiem meristemoīdiem. GS parasti inhibē rizoģenēzi, taču var stimulēt sakņu veidošanos lapu fragmentos, ko izskaidro ar to, ka GS sekmē auksīna sintēzi lapās. Atkarībā no eksplanta un rizoģenēzes stadijas, kurā pielieto GS, giberelīns var arī stimulēt sakņu veidošanos.

Somatisko embriju veidošanos parasti inhibē GS un stimulē GS antagonisti (piemēram, abscīzskābe). Savukārt, GS sekmē jau izveidojušos somatisko embriju attīstību ("dīgšanu").

Nelielās devās GS bieži izmanto izolēto meristēmu kultūrās. Noteiktā dzinumu attīstības posmā GS var uzlabot dzinumu augšanu (parasti dzinumu pavairošanas, retāk - ataudzēšanas stadijā). GS var izmantot, lai veicinātu dzinumu pagarināšanos gadījumos, kad citokinīna ietekmē augiem izveidojās liels īsu dzinumu skaits. GS palīdz novērst parādīnu, kad citokinīna ietekmē dzinumu galotnēs izveidojas divas apikālās meristēmas. Taču bieži GS ietekmē izveidojas izstīdzējuši dzinumi ar šaurām lapām, tādēļ GS izmantošana audu kultūrās ir ierobežota. *Ex vitro* aklimatizācijas stadijā GS var izmantot, lai pārtrauktu pumpuru miera periodu, bet ievadišanas stadijā - arī lai pārtrauktu sēklu miera periodu.

Giberelīnu antagonisti var būt vielas, kuras kavē GS biosintēzi, veicina GS noārdīšanos vai netieši negatīvi ietekmē GS iedarbību. Tos izmanto, lai novērstu endogēno GS nevēlamo darbību eksplantos, kuros GS saturs ir lielāks par optimālo. Plašāk izmantotie savienojumi ir hlormekvata hlorīds (CCC), paklobutrazols (heterociklisks savienojums) un diaminozīds. Šos GS darbības inhibitorus izmanto pētījumos un lai stimulētu adventīvo orgānu un somatisko embriju veidošanos.

**Abscīzskābe** ir dabīgs savienojums, karbonskābe ar 15 C atomiem. Abscīzskābe sintezējas plastīdās, sašķeļoties karotinoīdiem (ksantofiliem). Augā ABS sintēzi veicina sausuma un sāluma stress. Šis savienojums ir viens no izplatītākajiem augos un piedalās dažādu procesu regulēšanā, to starpā atvārsnīšu kustību regulēšanu, ūdens un jonu uzņemšanu saknēs, lapu novecošanu un atdalīšanos, embriju attīstību un sēklu nogatavošanos.

Audu kultūrās ABS parasti inhibē kallusa augšanu, bet veicina morfoģenēzi. Eksogēnā ABS var izmainīt audu brieduma pakāpi (piemēram, izraisīt ziedu veidošanos veģetatīvajos dzinumos). ABS sekmē somatisko embriju attīstību, ABS klātbūtnē tie vairāk atgādina zigotiskus embrijus un veidojas mazāk somatisko embriju ar attīstības traucējumiem (sašķeltas vai saplūdušas dīgļlapas, lapas dīgļlapu vietā u.c.). Abscīzskābes ietekmē somatisko embriju veidošanās tiek apturēta, kas arī sekmē to nobriešanas sinhronizāciju, abnormālo embriju veidošanos, kā arī jauno embriju izveidošanos jau esošo somatisko embriju audos.

**Etilēns** sintezējas visos augu audos un ietekmē to augšanu. Etilēna koncentrācija šūnu citoplazmā ir aptuveni  $4.5 \cdot 10^{-10}$ , savukārt etilēna saturs gaisā, kurš izraisa pusi no maksimāli iespējamā efekta, ir 0.1 ppm (vai mikrolitri litrā).

Pazīstamākie etilēna iedarbības veidi ir tā ietekme uz augļu nogatavošanos un hipokoliles āķa veidošanos (*triple response*). Augos etilēns sintezējas no metionīna, viens no sintēzes starpposmiem ir aminociklopropāna-1-karboksilskābe (ACC), ko bieži izmanto

kā etilēna donoru. Etilēna sintēzi veic dažādi ACC sintāzes un ACC oksidāzes izoenzīmi, kuru regulācija ir atšķirīga. Līdz ar to, etilēna biosintēzi var veicināt dažādi faktori: galvenie ir augļu nogatavošanās, augsns un ievainojums. Citi etilēna sintēzi ietekmējošie faktori ir CO<sub>2</sub>, ABS, citokinīni un gaisma. Pats etilēns arī ietekmē etilēna biosintēzi: atkarībā no audu tipa, veicina vai kavē to.

Audu kultūrās izmanto dažādus etilēna biosintēzes inhibitorus: AVG (aminoetoksiviniļglicīns), kobalta hlorīds, antioksidanti (salicilskābe, acetilsalicilskābe, citohroma oksidāzes inhibitori u.c.). Etilēnu var saistīt helatējošie agenti, tadējādi kavējot audu novecošanu.

Etilēns darbojas, piesaistoties specifiskiem receptoriem, signāla ceļi ietver proteīnu kināzes, GTP saistošus proteīnus un gēnu transkripcijas faktoros. Oglekļa monoksīds (CO) un līdzīgi savienojumi inhibē etilēna darbību, piesaistoties etilēna receptoriem. Savukārt, etilēna antagonisti citokinīni visticamāk ietekmē ar etilēnu saistītos signālceļus.

Lai izmantotu etilēnu pētījumiem vai audu kultūrā, lieto etilēnu izdalošus savienojumus. Izplatītākais audu kultūru metodēs ir etefons (CEPA), kurš sadalās citoplazmā, izdalot etilēnu. Etilēna biosintēzi veicina tā prekursoru (ACC vai metionīna) piedevas.

Etilēna sadale starp gaisa un ūdens fāzēm ir būtiski atkarīga no temperatūras, līdz ar to, vides temperatūra var ietekmēt etilēna iedarbību uz eksplantu.

Etilēna veidošanās *in vitro* kultūrās ir atkarīga no audu vai šūnu vecuma (attīstības stadijas), tas intensīvāk veidojas audiem novecojot vai šūnu kultūras stacionārās augšanas stadijā. Etilēna sintēzi var veicināt noteikti barotnes komponenti - manīts, polietilēnglikols. Etilēna uzkrāšanos veģetācijas traukā var ietekmēt vāka tips (gaisa necaurlaidīgs vāks sekmē uzkrāšanos). Gāzveida etilēnu var saistīt dažādi savienojumi - K permanganāts, Hg perhlorāts, Ag nitrāts.

Daudzām kultūrām etilēns stimulē kallusa veidošanos un augšanu. Etilēna ietekme uz adventīvo dzinumumu veidošanos ir būtiski atkarīga no vides apstākļiem (gaismas) un šūnu vecuma un attīstības stadijas. Noteiktā šūnu vai audu attīstības posmā etilēns var inhibēt, citā - veicināt dzinumumu attīstību. Uzskata, ka etilēna ietekme ir saistīta ar IES polārā transporta inhibēšanu. Līdzīgi, etilēns var kavēt vai veicināt sakņu veidošanos un somatisko embriogēnēzi. Daudzu pretrunīgu rezultātu rašanos var izskaidrot atšķirības starp sugām un izmantotām etilēna (tā avota vai prekursora) koncentrācijām.

Kopumā etilēns kavē šūnu stiepšanos dzinumos, īpaši divdīgļlapjiem. Etilēns var veicināt stolonu veidošanos (dzinumus ar gariem posmiem un reducētām lapām).

**Steroīdi.** Galvenie augšanas regulatori šajā grupā ir brasinosteroīdi, kuru regulatorā funkcija augos jau ir pierādīta un kurus pieskaita pie fitohormoniem. BR (brasinosteroīdi) ir vielu grupa, kurā ietilpst brasinolīds un tā atvasinājumi. Pēc uzbūves šie savienojumi ir līdzīgi dzīvnieku steroīdajiem hormoniem - pamatā ir holesterola struktūra, kurai piesaistītas dažādas funkcionālās grupas. Atšķirībā no dzīvnieku steroīdiem hormoniem, kuru receptori atrodas kodolā, BR receptori var atrasties šūnu membrānā. Tālāk signāls tiek pārraidīts ar proteīnu kināžu palīdzību un ietekmē noteikto gēnu ekspresiju. BR sekmē šūnu stiepšanos un dalīšanos, veicinot ATP-āzes darbību, kura paskābina šūnapvalku un padara to elastīgāku. BR sekmē ksiloglukānu endotrans-glikozilāzes un hidrolāzes (XET un XTH) gēnu ekspresiju, kā arī, iespējams, citu šūnapvalka elasticitāti veicinošo enzīmu gēnu ekspresiju. BR piedalās šūnu

citoskeleta (mikrocaurulīšu) organizēšanas regulācija, kas arī ietekmē šūnu stiepšanos.

BR mijiedarbība ar citiem fitohormoniem. BR sekmē etilēna sintēzi un darbojas sinerģiski ar GS un auksīnu, veicinot hipokotiles stiepšanos. BR, iespējams, ir ABS antagonisti augšanas regulēšanā, bet darbojas sinerģiski sausuma stresa atbildes reakcijās. BR piedalās dīgšanas regulācijā un atvārsnīšu kustību, kā arī atvārsnīšu veidošanas regulācijā.

(Haubrick, Assmann 2006)

Audu kultūrā BR var sekmēt traheju elementu veidošanos, sekmēt kallusa veidošanos un šūnu kultūru augšanu. Iespējams, ka D grupas vitamīnu (sterolu) ietekme ir izskaidrojama ar to, ka tie darbojās kā BR prekursori.

### **Citi augšanas regulatori**

**Poliamīni** - alifātskie amīni, kuri sintezējas no ornitīna un arginīna (pazīstamākie ir putrescīns, spermidīns un spermiīns). Atsevišķu poliamīnu sintēzi ietekmē slāpekļa forma, kura dominē barotnes sastāvā. Tā, putrescīna sintēzi veicina amonija jonu pārsvars pār nitrāta joniem. Audu kultūrā izmanto gan poliamīnus, gan to sintēzes inhibitorus. Poliamīni stabilizē DNS un RNS un stabilizē osmotisko spiedienu šūnās, jo fizioloģiskā pH apstākļos pastāv katjonu formā. Daļēji tie darbojās kā pH buferi. Uzskata, ka poliamīni veicina DNS replikāciju un RNS transkripciju. To saturs ir lielāks jaunos, augošos audos un audos, kuros notiek morfoģenēze. Poliamīni darbojas sinerģiski ar auksīnu, bet inhibē etilēna biosintēzi. Citokinīni veicina poliamīnu sintēzi, un poliamīni kavē novecošanas procesus. Poliamīni stimulē šūnu dalīšanos, piedalās adventīvo orgānu veidošanās, ziedu un arī somatisko embriju attīstībā. Lielākoties tie darbojās kopā ar citiem augšanas regulatoriem (fitohormoniem).

Augšanu un attīstību audu kultūrā var ietekmēt vairāki savienojumi, kuru darbība galvenokārt ir saistīta ar stresa atbildes reakcijām. To skaitā ir:

salicilskābe,

metiljasmonāts,

oligosaharīdi (OGAs)

sistemīns (reakcija uz ievainojumu)

un citi elisitori, kuri sekmē sekundāro savienojumu sintēzi.

Šo savienojumu iedarbības izpēti ierobežo tas, ka ir grūti iegūt tos tīrā veidā pētījumam pietiekamā daudzumā.

Sugām vai genotipiem ar izteiktu apikālo dominēšanu, lai stimulētu sāndzinumu veidošanos, izmanto apikālā pumpura augšanu inhibējošus savienojumus: *dikegulac*, *glyphosate*, metillaureātu (MELA) un citu taukskābju esterus.

Lai modulētu eksogēno fitohormonu ietekmi uz eksplantiem, barotnei var pievienot aktīvo ogli. Ogle absorbē eksplantu izdalītās vielas un vielas barotnē, kuras potenciāli var ietekmēt augšanu vai morfoģenēzi. Uzskata, ka aktīvā ogle veicina embriogēni un rizoģenēzi. Salīdzinoši neliela aktīvās ogles piedeva var padarīt pilnībā nepieejamus barotnē esošus fitohormonus, līdz ar to tie ir jāpievieno lielākā koncentrācijā.



**Habituation** (pierašana) ir augu audu iegūtā spēja attīstīties neatkarīgi no eksogēniem fitohormoniem. Šī īpašība var izpausties lielākā vai mazākā pakāpē un ir atgrieziniska. Parasti pierašana ir cieši saistīta ar diferencēšanos - piemēram, tā ir raksturīga embriogēnajam kallusam. Vienlaicīgi, pierašana neietekmē nediferencēto šūnu totipotenci. Pierašanu var veicināt vides ietekme, piemēram, neatkarība no eksogēnā citokinīna tabakas kallusa šūnās izraisīja paaugstināta temperatūra (35 °C), savukārt, zema temperatūra (16 °C) izraisīja atgriešanos sākotnējā stāvoklī.

Eksogēno fitohormonu ietekme uz kultūras attīstību ir atkarīga ne tikai no katra savienojuma koncentrācijas un no barotnei pievienoto vielu kombinācijas, bet arī no ievadišanas veida un ekspozīcijas laika. Ir gadījumi, kad pulsveida (īslaicīga) ekspozīcija, izmantojot lielu fotohormona koncentrāciju, ir tik pat efektīva vai efektīvāka, nekā ilglaicīga inkubēšana barotnē ar zemāku fitohormona koncentrāciju. Atkarībā no ekspozīcijas laika var mainīties arī morfoģenēzes virziens.

Literatūra tālākai lasīšanai:

Plant Propagation by Tissue Culture. 2008. Springer Verlag

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

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

<http://plantbiotechinfo.blogspot.com/2011/10/cytokinins.html>

[http://plantcellbiology.masters.grkraj.org/html/Plant\\_Growth\\_And\\_Development5-Plant\\_Hormones-Cytokinins.htm](http://plantcellbiology.masters.grkraj.org/html/Plant_Growth_And_Development5-Plant_Hormones-Cytokinins.htm)