

## KALLUSU UN ŠŪNU SUSPENSIJU KULTŪRAS, SAKŅU KULTŪRAS.

Kallusu un šūnu suspensiju kultūras ir nediferencēto audu kultūras. To uzturēšanai ir nepieciešams novērst šūnu diferencēšanos par konkrēto audu un orgānu šūnām - procesu, kuru ietekmē gan endogēnie, gan eksogēnie (vides) faktori.

**Šūnu augšana un dalīšanās.** Šūnas cikls ietver četras pamatfāzes: G1-fāze (šūnas aug, 2n hromosomu komplekts), S-fāze (DNS dubultošanās), G2-fāze (4n hromosomu komplekts) un M-fāze (mitoze, šūnu dalīšanās).

Katras cikla fāzes ilgums ir sugas specifisks. G1 fāzes ilgums ir atkarīgs arī no audu tipa, to var ietekmēt fitohormoni (augu augšanas regulatori) un citi endogēnie faktori.

Šūnu dalīšanās aktivitāte (t.i. vidējais šūnas cikla ilgums) ir atkarīga no šūnu diferenciacijas pakāpes: jo šūnas ir mazāk diferencētas, jo intensīvāk tās dalās un jo īsāka ir G1 fāze.

G1 fāzes laikā šūnā uzkrājas sekundārie metabolīti. Tas ir skaidrojams ar to, ka diferencējoties, šūnas gan ilgāk atrodas sintēzes un augšanas fāzē (G1), kā arī noteiktu metabolītu sintēze ir saistīta ar šūnu specializāciju. Līdzīgi, ar diferencēšanos saistītais rizoģenēzes process notiek tikai tad, ja eksplantu (dzinumu vai citu eksplantu) pēc pastiprinātas šūnu dalīšanās (ko veicina, piemēram, eksogēnais augsns) pārceļ uz bezhormonu vidi un šūnas cikla ilgums palielinās.

G1 fāzes ilgums nosaka šūnas diferencēšanos molekulārajā līmenī - nosaka to, kura daļa no šūnas ģenētiskā materiāla būs ekspresēta, t.i. aktīvi iesaistīta sintēzes procesos, un kādi regulējošie proteīni būs noārdīti šajā periodā.

No šūnas cikla ilguma un diferencēšanas procesa saistības izriet "laika hipotēze", saskaņā ar kuru realizētās ģenētiskās informācijas apjoms ir atkarīgs no G1 fāzes ilguma.

Faktori, kuri ietekmē šūnas ciklu un diferencēšanos:

Citokinīnu iedarbība samazina G1 fāzes ilgumu (veicinot dalīšanos) un, līdz ar to, kavē diferencēšanās procesu.

Šūnas cikla regulēšanā piedalās augšanas regulatori - augsns, citokinīns, etilēns, kā arī saharoze (t.i. auga sintezētais metabolīts, kurš *in vitro* kultūras gadījumā ir barotnes sastāvā).

Šūnas spēja (kompetence) diferencēties pirms nākamās dalīšanas fāzes ir atkarīga no šūnas vecuma. Jaunos vai neattīstītos auga orgānos ir dažāda vecuma šūnas, līdz ar to dažas, atbilstošo faktoru ietekmē, var sākt diferencēties, bet citām pirms tam ir nepieciešams iziet caur dalīšanas fāzi.

Diferencēšanās procesā arī izšķir vairākas fāzes.

**Indukcijas** (sagatavošanas) fāzē šūnās, kuras diferencējas noteiktā virzienā, palielinās citoplazmas apjoms. Ja uz indukcijas fāzē esošām šūnām iedarbojas eksogēnais augsns, veidojas pre-embriālā masa (PEM).

**Realizācijas** fāzē notiek organoģenēze (piemēram, somatisko embriju attīstība vai rizoģenēze). Realizācijas fāze iestājas, kad augsna ietekme ir pārvarēta (audu kultūrā tas notiek, kad eksplantu pārceļ uz augsnu nesaturošo barotni). Atkarībā no audu tipa, pirms indukcijas fāzes var būt nepieciešama šūnu aktīvās dalīšanas fāze.

Jāņem vērā, ka šūnu dalīšanās aktivitāte pati pa sevi vēl nenosaka diferencēšanas procesa virzienu, to ietekmē dažādi endogēnie un eksogēnie faktori (Meijer, Murray 2001. Cell cycle controls and the development of plant form).

## **Kallusa kultūras**

**Kalluss** ir nediferencēto (parenhimātisko) šūnu masa. Kalluss veidojas ievainojuma vietā, kā arī *in vitro* kultūrā, dediferencējoties un daloties auga eksplanta šūnām. Ļoti nozīmīgs process ir kallusa veidošanās potzara un potcelma saaugšanas vietā.

Kokiem spēja veidot kallusu (ievainojuma sadzīšana) ir atkarīga no koka vispārējās augšanas intensitātes, līdz ar to – arī no gadalaika. Kalluss labāk veidojas aktīvās augšanas periodā. Ir būtisks arī auga minerālais nodrošinājums un skābekļa piekļuve ievainojuma vietai. Koku kalluss galvenokārt attīstās no koksnes stariem (parenhīmas šūnām), kā arī no kambija zonas un mizas. Pēc noteikta laika nediferencēto šūnu masā sāk veidoties korķa kambijs un vaskulārais kambijs. (“Physiology of Woody Plants”, Pallardy, 2007.)

Ievainojums (dabā, vai ievadot eksplantu kultūrā) stimulē sākotnējo šūnu dalīšanos veicinoši savienojumu veidošanos (G. Hāberlanda pētījumos konstatētais "nekrohormos"). Turpmākā šūnu dalīšanās (kallusa audu veidošanās) ir atkarīga no fitohormonu mijiedarbības.

Kallusa šūnas spēj dalīties, kā arī spēj diferencēties – diferencēšanas procesa iniciācija un tā virziens ir atkarīgi gan no paša kallusa bioloģiskajām (galvenokārt ar tā izcelsmi saistītām) īpašībām, gan no barotnes sastāva.

Sākotnējā kallusa attīstība, šūnu dalīšanās, ir atkarīga no eksogēniem (barotnes sastāvā iekļautiem) fitohormoniem. Vispirms atklāja auksīna, vēlāk – citokinīna nozīmi. Atkarībā no eksplanta izcelsmes avota, kallusa līnija var kļūt neatkarīga no eksogēniem hormoniem (*habituation*) – kalluss var turpināt augt arī bez tiem. Pēc morfoloģiskām īpašībām izšķir blīvus/kompaktus (*compact*) un irdenus (*friable*) kallusus.

**Kallusa līnija** ir eksplanti, kurus iegūst, sadalot vienu kallusu. Līnijai piemīt noteiktas morfoloģiskās un fizioloģiskās īpašības. Kallusu līniju uzturēšanai ir nepieciešamas regulāras pasāžas – to biežums ir atkarīgs no sugas īpašībām. Piemēram, orhideju kallusiem ir raksturīga intensīva fenolu izdalīšanās barotnē, līdz ar to pasāžas ir jāveic bieži (*Phalaenopsis* ģints – reizi 2-3 dienās). No citu sugu augiem iegūtie kallusi var augt uz vienas barotnes daudz ilgāku laiku (zemesrieksti – 6-8 nedēļas). Piemērotos apstākļos līniju var uzturēt neierobežotu laiku.

Kallusu var kultivēt uz cietas barotnes (ar agaru vai citu želējošo vielu) vai šķidrajā barotnē. Šķidrajā barotnē ir nepieciešams nodrošināt aerāciju un barotnes samaisīšanos. Nelielu kultūras daudzumu var audzēt traukos, kurus ievieto kratītajā, lielākam tilpumam izmanto speciālus “zvaigžņveida traukus” (*star flasks/nipple flasks*) vai bioreaktoros.

Lai gan kallusu veido nediferencētas šūnas, kalluss nav pilnībā neorganizēta masa: tajā var izšķirt šūnu slāņus (ar dažāda izmēra šūnām), pēc noteikta laika var veidoties meristemoīdi (meristēmu aizmetņi). No kallusa var attīstīties **adventīvie orgāni** (dzinumi vai saknes), kā arī somatiskie embriji.

Ar laiku, audzējot kultūru gaismā, kallusa šūnās veidojas hloroplasti un sākas fotosintēze. Nodrošinot paaugstinātu CO<sub>2</sub> saturu atmosfērā ir iespējams iegūt arī pilnībā autotrofu

kultūru. Līdzīgi, ja nodrošina piemērotus kultivēšanas apstākļus, pēc noteikta laika kallusā var atjaunoties veselam augam raksturīgo sekundāro savienojumu sintēze.

Ir iespējams iegūt kallusu līnijas, kuru augšana ir lielā mērā atkarīga no eksogēnā citokinīna klātbūtnes. Šo īpatnību izmanto **citokinīnu noteikšanai** (*cytokinine bioassay*) - ja dotais šķīdums vai ekstrakts veicina kallusa augšanu, var secināt, ka tas satur vielu ar citokinīna aktivitāti.

Kultivēšanas procesā kallusa šūnās var notikt ģenētiskās izmaiņas – piemēram, izveidojas aneiploīdas vai poliploīdas šūnas. Tādēļ, pavairojot šķirnes augus, lai saglabātu klonāli pavairoto augu ģenētisko viendabīgumu ir jāizvairas no kallusa veidošanās un adventīvo orgānu attīstības (augus pavairo ar meristēmu kultūru un stimulējot sūnpumpuru attīstību).

### Šūnu kultūras

Šūnu kultūru var iegūt no irdena kallusa, kuru kultivē šķīdrajā barotnē to aktīvi maisot/kratot. Pēc 10-14 dienām barotnē izveidojas šūnu suspensija no kallusa periferām šūnām. Ja kalluss ir pārāk blīvs, var izmantot šūnu macerāciju. Šūnu kultūru var uzsākt arī no protoplastu kultūras.

Šūnu kultūrā parasti izveidojas dažādas šūnu frakcijas: brīvās šūnas, šūnu agregāti (sekundārie kallusi, līdzīgi meristēmu aizmetņiem) un vairāku šūnu pavedieni. Tikai dažas metodes (piem. *hanging drop culture*) ļauj iegūt kultūru, kura pilnībā sastāv no izolētām šūnām.

Vecākām šūnām, kuras dalās mazāk aktīvi, novēro DNS daudzuma palielināšanos (poliploīdiju). Jaunākas, aktīvi dalošās šūnas, ir ģenētiski viendabīgākas. To sekmē eksogēna citokinīna iedarbība.

Bieži šūnu suspensijā veidojas šūnas vai to agregāti ar noteiktām morfoloģiskām iezīmēm, piemēram traheīdas. Ja barotnei pievieno augsni, veidojas somatiskie embriji (somatiskās embriogēnes nosacījumi var atšķirties dažādām sugām).

Lai uzturētu šūnu kultūru ir jāzin, kā kultivēšanas apstākļi ietekmē šūnu ciklu - ja ir vēlama biomasas uzkrāšanās, ir jāveicina aktīva šūnu dalīšanās.

Šūnu kultūru audzēšanas paņēmieni, imobilizēto šūnu kultūras. Šūnu kultūras, kuras audzē bioreaktorā vai mazākā traukā nemainīgā barotnes tilpumā, sauc par "periodisko kultūru" (*batch culture*). Periodiskajā kultūrā šūnas aug nemainīgā barotnes tilpumā. Šūnu biomasas izmaiņas periodiskajā kultūrā apraksta S-veida līkne. Pēc noteiktas *lag*-fāzes, kuras laikā šūnas gatavojas dalīšanās procesam, šūnas aktīvi dalās un aug. Pēc tam iestājas stacionārā (plato) fāze, kurā šūnu skaits un lielums vairs nemainās. Šūnas nav iespējams neierobežotu laiku uzturēt stacionārajā fāzē – ar laiku šūnas noveco un sāk atmirt. Kultūras uzturēšanai ir nepieciešama pasāža – pārceļšana uz jauno barotni.

Cits šūnu suspensijas audzēšanas paņēmiens ir "pastāvīgas kultūras" (*continuous culture*). Pastāvīgajā kultūrā daļu no šūnām ik pa brīdim izņem un pievada svaigu barotni, šādā veidā uzturot nepārtrauktu šūnu dalīšanos un augšanu.

Lai audzētu pastāvīgo augu šūnu kultūru, šūnas var imobilizēt, izmantojot dažādus porainus materiālus. Viens no piemērotākiem materiāliem ir poliuretāns. Nesēju iegremdē šūnu suspensijā un tās šūnas, kuras ir palikušas pēc nesēja izvilkšanas, sāk augt un dalīties, līdz aizņem visu iekšējo tilpumu. Poliuretāna nesēju ievieto traukā vai kolonnā un apskalo ar

barotni. Šādi audzētās šūnas izmanto augu primāro un sekundāro metabolītu iegūšanai.

### **Protoplastu kultūras**

Izmantojot fermentus, kuri sadala šūnapvalkus, ir iespējams iegūt "plikas šūnas", t.i. protoplastus, kurus var kultivēt izotoniskā vidē. Protoplastus izmanto pētījumos (nosaka šūnapvalka fizioloģisko lomu, tā lomu minerālelementu uzņemšanā, šūnapvalka sintēzes mehānismus) un selekcijā – starpsugu hibrīdu iegūšanai.

Protoplastu dalīšanās spēja ir ierobežota. Uzturot šūnas piemērotos apstākļos (mērenā apgaismojumā; lai neutralizētu toksiskus savienojumus, kuri rodas šūnapvalka noārdīšanas rezultātā, barotnei var pievienot aktivēto ogli), var sasniegt 10-kārtīgu šūnu daudzuma pieaugumu. Šūnapvalka sintēze var atsākties jau pēc 100 stundām un, iespējams, ir nepieciešama dalīšanas procesam. Tālāk no kultūras var iegūt somatiskus embrijus.

Protoplastu saplūšanu var panākt ar elektrošoka palīdzību. Ja traukā ir daudz protoplastu, lai konstatētu saplūšanu izmanto šūnas, kuras var atšķirt pēc noteiktas pazīmes – piemēram, krāsas, ja tikai viena vecākauga protoplastiem veidojas hlorofils, antociāni vai citi pigmenti. Abu protoplastu kultūrām (šūnām) jābūt izosmotiskām, jo sapludināšanai tās jāievieto vienā barotnē.

Protoplastu saplūšana neizrādījās tik lietderīga augu selekcijā, kā sākotnēji cerēja. Pētot tomātu un kartupeļu hibrīdus konstatēja, ka tie ir sterili. Neskatoties uz kodolu saplūšanu, pastāv divi izteikti hibrīdu veidi: tie, kuri pārmanto plastīdas tikai no kartupeļa (*pomato*) un tie, kuri pārmanto plastīdas no tomāta (*topato*). Mūsdienās selekcijā protoplastus izmanto nevis divu genomu apvienošanai (kas bieži nedod vēlamu rezultātu), bet DNS modificēšanai (piemēram, izmantojot *Agrobacterium*).

<http://www.biologie.uni-hamburg.de/b-online/e29/29a.htm>

### **Sakņu kultūras**

Izolēto sakņu kultūra ir pirmā stabilā augu orgānu *in vitro* kultūra. Sakņu kultūras izmanto, lai pētītu saknes fizioloģiju, piemēram, pašas saknes minerālvielu nodrošinājuma prasības (izolēti no pārējiem auga orgāniem). Cits pielietojums ir sakņu un dažādu mikroorganismu - sēņu, baktēriju – mijiedarbības izpēte. Sakņu kultūru var izmantot metabolītu iegūšanai. Jāņem vērā, ka izolētām saknēm sterilajā kultūrā ar laiku parādās atšķirības no dīgstu saknēm – piemēram, tomātu izolētajām saknēm pazūd ģeotropisms. Izolētām saknēm kultūrā pārtraucas sekundāra augšana, kā arī var būtiski izmainīties saknes bioķīmiskais sastāvs, piemēram, sekundāro metabolītu sintēze.

Sakņu kultūras ir veiksmīgi iegūtas daudzām lakstaugu sugām, bet kokaugiem iegūt sakņu kultūru ir sarežģītāk. Lai iegūtu sakņu kultūru, sēklas diedzē sterilos apstākļos un dīgsta sakni pārceļ uz jaunu barotni. Pavairošanai izmanto galvenās saknes fragmentus kopā ar vismaz vienu sānsakni.

Sakņu kultūru barotnēm rekomendē mazāku cukura koncentrāciju, jo liela koncentrācija var izmainīt sakņu metabolismu. Prasības pēc vitamīniem atšķiras, bet parasti izmanto tiamīna (B1) piedevu.

Īpatnējs paņēmiens sakņu kultūru audzēšanā ir t.s. "saknīšu" (*hairy root*) kultūras audzēšana.

*Hairy roots* ir neoplazmatiskie, saknēm līdzīgie veidojumi (cits augu neoplazmu piemērs ir pangas). Eksplants šādas kultūras iegūšanai var būt ne tikai saknes, bet arī lapas, stumbra fragmenti. Šūnu transformāciju izraisa *Agrobacterium rhizogenes* baktēriju infekcija. *A. rhizogenes* ir augsnē dzīvojošs augu patogēns, kura *Ri* plazmīda izraisa sakņu veidošanos inokulētajās šūnās. Transformētās saknes ir stabila kultūra ar augstāku šūnu diferencēšanas pakāpi, nekā kallusa kultūra, kas padara šādas kultūras piemērotas sekundāro metabolītu iegūšanai.

## VIDES IETEKME UZ AUGU AUDU KULTŪRĀM

Kultūras augšanu un organoģenēzes procesus ietekmē ne tikai eksogēnie augšanas regulatori (fitohormoni), barotnes sastāvs un eksplanta izcelsme un īpašības. Liela nozīme ir arī vides fizikālajiem parametriem. Tas attiecas gan uz audzēšanas telpu, gan uz vidi kultivēšanas traukā. Kultivēšanas apstākļi var izmainīt fitohormonu iedarbību uz eksplantu, kā arī tieši ietekmēt kultūras augšanu un attīstību.

### Vide kultivēšanas traukā

Barotnes konsistence ietekmē mitrumu traukā, eksplanta aerāciju un barības vielu pieejamību.

Gan šķidrāi, gan puscietai (agarizētai) barotnei ir savi trūkumi un priekšrocības. Šķidrajā barotnē var panākt ātrāku eksplantu augšanu - barotne apskalo eksplantus no visām pusēm, kas veicina barības vielu uzņemšanu. Šķidrā barotnē var notikt eksplantu **vitrifikācija** (*hyperhidricity*) – negatīvā parādība, kuru raksturo “stiklainas”, ar ūdeni pārsātinātas ekplanta lapas, galotņu un lapu galu nekroze un kallusa veidošanās dzinuma pamatnē. Jāatzīmē, ka vitrifikācija var notikt arī audzējot eksplantus uz agarizētās barotnes, to var izraisīt nepiemērots barotnes sastāvs un pārmērīgs mitrums kultivēšanas traukā.

Puscietajā barotnē labi saglabājas eksplantu orientācija, kas var būt svarīgi normālai dzinumu attīstībai. Nav nepieciešama papildus aerācija, kallusa kultūras gadījumā ir mazāka iespēja, ka kalluss sadalīsies un izveidos šūnu suspensiju. Agarizētai barotnei ir savi trūkumi. Atsevišķām kultūrām pie eksplantu griezumu vietām uzkrājas dažādi izdalījumi, kuri var būt toksiski (fenolu savienojumi) vai kavē barības vielu uzņemšanu (viskozi izdalījumi, gļotas). Šādas kultūras labāk aug un proliferē šķidrā barotnē. Par būtisku problēmu gan puscietajā, gan šķidrā barotnē var kļūt nepietiekama sakņu aerācija. Tās rezultātā saknes, kuras izveidojas *in vitro*, nav pilnībā funkcionālas un nespēj nodrošināt ūdens pārvietošanos augā pēc izstādīšanas *ex vitro* (piemēram, rododendriem).

Barotnes konsistence var dažādi ietekmēt eksplantu, atkarībā no eksplanta attīstības stadijas. Piemēram, *Cymbidium* orhidēju protokormi labāk proliferē šķidrā barotnē, bet turpmāko augu attīstību veicina audzēšana uz puscietais barotnes.

Vēl viens audzēšanas paņēmieni ir divfāzu barotnes – puscieta barotne pamatā un šķidra barotne virsū. Šāds audzēšanas veids ļauj ievadīt jaunas barības vielas vai fitohormonus, neveicot atseivšķū pasāžu, kas var traumēt eksplantu. Atseivšķas kultūras aug vai vairojas labāk, ja fitohormonus iekļauj vienā no fāzēm, vai arī ja

dažādi fitohormoni ir dažādās fāzēs (piem. citokinīns šķidrā un augsnis cietajā fāzē).

Dzinumu *in vitro* kultūrām izmanto arī īslaicīgas imersijas sistēmas (piemēram, Rita™). Šādās sistēmās eksplanti turās uz porainas plastmasas pamatnes un tiek periodiski iegremdēti šķidrā barotnē. Tas uzlabo eksplantu aerāciju, vienlaicīgi saglabājot to vertikālo orientāciju.

Barotnes osmotiskais potenciāls:

šķīduma osmotiskais potenciāls ( $\Psi$ ) ir lielums, kurš raksturo spēku, ar kādu ūdens no mazāk koncentrēta šķīduma tiecas uz doto šķīdumu, ja tos šķir puscaurlaidīga membrāna (tīrā ūdens  $\Psi = 0$  MPa, jebkura šķīduma  $\Psi < 0$ ). AAK barotnes osmotisko potenciālu veido tajā izšķīdinātie minerālie sāļi, saharoze un, nelielā mērā, arī želejošā viela. Zema vides osmotiskā potenciāla ietekmē šūnas zaudē ūdeni, kas ietekmē šūna metabolismu. Šūnā uzkrājas osmolīti, var palielināties abscīzskābes līmenis. Tā kā saharoze ietekmē barotnes osmotisko potenciālu, tās daudzumu barotnē nevar palielināt neierobežoti. Jau 4-5% saharozes saturs MS barotnē var izraisīt augšanas inhibēšanu. Savukārt, ir gadījumi kad ir nepieciešams panākt zemu osmotisko potenciālu – piemēram, audzējot nenobriedušu sēklu embriju un putekšņmaciņu kultūras. Tad izmanto barotni ar saharozes saturu līdz 10-12%.

Vides osmotiskais potenciāls var ietekmēt organoģenēzi: vairākos gadījumos pazemināts osmotiskais potenciāls stimulē adventīvo dzinumus veidošanos un somatisko embriju attīstību. Savukārt, sakņu iniciācija labāk notiek vidē ar augstāku osmotisko potenciālu (t.i. zemāku sāļu un cukuru saturu).

Gaisa sastāvs kultivēšanas traukā ir saistīts ar gāzu apmaiņu starp trauku un ārējo vidi.

Gāzu apmaiņa pamatā notiek, gaisam difundējot caur trauka vāku. Difūzijas ātrums ir atkarīgs no vāka tipa, gaisa temperatūras telpā un, nelielā mērā, no atmosfēras spiediena. Vāka materiāls (alumīnija folija, plastmasa, silikons, vatesmarles korķis) un struktūra (poru lielums) ietekmē skābekļa difūzijas ātrumu. Gaisa difūzijas ātrumu pašā traukā ietekmē arī trauka forma un lielums. Skābekļa trūkumu (hipoksiju, anoksiju) un, līdz ar to, elpošanas inhibēšanu, pastiprina augsts cukura saturs, liels barotnes dziļums, augsta temperatūra un maza eksplanta virsmas/tipuma attiecība.

Lai uzlabotu gaisa sastāvu traukā, izmanto traukus vai audzēšanas sistēmas ar papildus aerācijas iespējām. Traukos vai trauku vākos var paredzēt aerēšanas atveres, kuros ieliek filtrus, lai nodrošinātu sterilitāti. Tas veicina gāzu apmaiņu starp trauku un audzēšanas telpu. Audzēšanas kamerās ir iespējams regulēt atmosfēras sastāvu – piemēram, palielināt skābekļa parciālo spiedienu.

Ir iespējams arī savienot traukus ar aerēšanas sistēmu un mērķtiecīgi regulēt gaisa sastāvu traukā. Papildus aerācija parasti ir nepieciešama bioreaktoros, kuros audzē kallusus vai šūnu suspensiju šķidrā barotnē.

Kultūras augšanai ir nepieciešami gan skābeklis, gan ogļskābā gāze, neskatoties uz to, ka *in vitro* kultūras parasti ir miksotrofas. CO<sub>2</sub> trūkums var izraisīt oksidatīvo stresu. Eksplantus var ietekmēt arī citi gāzveida savienojumi,

piemēram, etilēns.

Skābekļa šķīdība ir zemāka, ja audzēšanas temperatūra ir augstāka. Skābekļa šķīdību samazina arī barotnē izšķīdinātas vielas. Iespējams, tas izraisa nepietiekamu sakņu aerāciju *in vitro* apstākļos. Hipoksija (skābekļa trūkums) kavē kultūras augšanu, jo samazinās elpošanas intensitāte un barības vielu uzņemšana. Paaugstināta skābekļa koncentrācija var veicināt sakņu un nediferencēto audu augšanu, bet var kavēt zaļo dzinumu augšanu fotoelpošanas dēļ. O<sub>2</sub> un CO<sub>2</sub> attiecība kultivēšanas trauka atmosfērā vai barotnē var ietekmēt ne tikai augšanas ātrumu, bet arī diferenciācijas procesu. Piemēram, burkāna šūnu suspensijā pazemināts barotnē izšķīdušā O<sub>2</sub> saturs veicināja somatisko embriju attīstību, savukārt, augstāks O<sub>2</sub> saturs tajā pašā barotnē izraisīja sakņu veidošanos. O<sub>2</sub> saturs var kavēt vai veicināt organoģenēzi. Vairāku pētījumu rezultāti apstiprināja to, ka oksidējošā vide veicina somatiskās embriogēneses procesu. Iespējams, tas ir saistīts ar aktīvo skābekļa savienojumu veidošanos, jo aktīvās skābekļa formas ir iesaistītas vairāku fizioloģisko procesu regulācijā (piemēram, sēklu dīģšanas procesā). Savukārt, dzinumu attīstību var veicināt tieši reducējošā vide. Tas, vai šūnā veidojas oksidējošā vai reducējošā vide, ir atkarīgs no aktīvo skābekļa formu veidošanos un antioksidatīvo enzīmu darbības. Skābekļa saturs, pH un temperatūra nosaka vides **redox potenciālu** kas var ietekmēt eksplanta šūnu redox potenciālu. Šis fizioloģiskais parametrs regulē daudzus procesus šūnā, to starpā šūnas ciklu (Boer, Murray 2000).

### Apstākļi audzēšanas telpā

#### Temperatūra

Visbiežāk temperatūras režīms audzēšanas telpās ir 20-25 °C. Šādā temperatūrā var audzēt ļoti dažādu sugu *in vitro* kultūras. Ir gadījumi, kad audzēšanai ir nepieciešama augstāka temperatūra – piemēram, tropu un subtropu sugām. Dažkārt kultūru labvēlīgi ietekmē diennakts temperatūras svārstības, jo zemāka temperatūra diennakts tumšajā laikā samazina elpošanu tumsā. Temperatūras svārstības var veicināt gāzu apmaiņu starp kultivēšanas trauku un apkārtējo telpu. Katrai kultūrai ir noteikts augšanai optimāls, plašāks vai šaurāks temperatūras intervāls. Optimālajā temperatūrā visātrāk notiek augšana un dzinumu proliferācija (līdz ar to – pavairošanas koeficients). Temperatūra ietekmē arī to, cik sekmīgi notiks eksplanta ievadīšana *in vitro*.

Temperatūras režīms var ietekmēt morfoģenēzi – pumpuru, sakņu, bumbuļu un vairsīpolu attīstību.

Kallusa kultūrā zemas pozitīvas temperatūras ietekme var veicināt organoģenēzi. Atsevišķos gadījumos eksplants (sīpols, dzinums) var iet miera periodā, kuru var pārtraukt zemas temperatūras ietekme.

#### Mitrums

Relatīvais gaisa mitrums kultivēšanas traukā parasti sasniedz 98-99%. Ja gaisa mitrums audzēšanas telpā ir zemāks par 70%, kultivēšanas trauki var zaudēt mitrumu un barotne izzūst. Ir ieteicams uzturēt augstu gaisa mitrumu, neskatoties uz to, tas var izraisīt eksplanta vitrifikāciju, jo *in vitro* kultivēti eksplanti slikti panes izzūšanu. Ja trauka apakšdaļā temperatūra ir lielāka, nekā augšdaļā, barotne

sāk iztvaikot un traukā pieaug relatīvais gaisa mitrums. Tad uz trauka sienīnām vai uz vāka veidojas ūdens kondensāts. Lai izvairītos no tā un samazinātu mitrumu, izmanto plauktus ar dzesēšanas sistēmu.

Relatīvā gaisa mitruma samazināšana kultivēšanas traukā pirms augu pārstādīšanas *ex vitro* var sekmēt augu izdzīvošanu. Ja tas nav iespējams, augi pēc pārstādīšanas ir jāsargā no izžūšanas un pakāpeniski jāpieradina pie zemāka gaisa mitruma.

Paaugstināts mitrums kultivēšanas traukā, samērā neintensīvs apgaismojums un zems CO<sub>2</sub> saturs gaisā, liela saharozes koncentrācija barotnē ietekmē gan augu anatomiskās, gan fizioloģiskās īpatnības. *In vitro* audzētiem dzinumiem var būt nefunkcionējošas atvārsnītes un plānāka kutikula, samazināta vadaudu lignifikācija un nefunkcionējošas saknes. Līdzīgi, atkarībā no apstākļiem kultivēšanas traukā, mainās hlorofila *a* un *b* attiecība, karotenoīdu un ksantofila saturs - līdz ar to, augi var būt mazāk pielāgoti normālai fotosintēzei *ex vitro* apstākļos.

Apgaismojums ietekmē *in vitro* augu augšanu un attīstību. Gaisma ietekmē eksplantu tieši, jau *in vitro* apstākļos, un netieši – ietekmējot mātes augu. Trīs nozīmīgākie auga fizioloģiskie procesi, kurus ietekmē gaisma ir fotosintēze, fotomorfoģenēze un fototropisms.

Fotosintēze: fotosintēzes procesi notiek, lapām absorbējot gaismu viļņu garumu intervālā starp 400 un 700 nm. Šādu gaismu sauc par fotosintētiski aktīvu (*photosynthetically active radiation*, PAR). Lai izmērītu apgaismojuma intensitāti, nosaka fotosintētiski aktīvo fotonu plūsmas blīvumu (*photosynthetic photon flux density*, PPFD) – fotonu daudzums sekundē uz kvadrātmetru, mol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>.

Tumsā iniciētā kallusa šūnas nesatur hloroplastus, tie veidojas gaismas ietekmē. Ir novērots, ka hloroplasti veidojās šūnu agregātos, tajās šūnās, kuras nedalās. Dažos gadījumos hlorofila sintēze signalizē par morfoģenēzes procesu sākumu kallusā. Sarkanās gaismas ietekmē no protohlorofilīda veidojas hlorofils. Dažām kultūrām ir nepieciešama arī zila gaisma, lai izveidotos hloroplasti.

Fotomorfoģenēze: auga, tā noteiktu struktūru vai orgānu attīstība gaismas ietekmē. Auga attīstība tumsā - skotomorfoģenēze, etiolācija. Tumsā notiek intensīva augšana garumā, neveidojas lapas un fotosistēmas, nesintezējas hlorofils. Apgaismojuma ietekmē notiek gēnu ekspresijas izmaiņas un sākas normāla auga attīstība. Attīstību visbiežāk regulē zila un sarkana gaisma. Sarkano un infrasarkano gaismu uztver specifiskie pigmenti - fitohroms A un B (absorbcijas maksimums 660 nm). Zilo un ultravioleto gaismu uztver citi pigmenti, to starpā kriptohroms un fototropīni.

Augšanas un attīstības procesus visvairāk ietekmē trīs gaismas parametri: **viļņu garums**, **fotonu plūsmas blīvums** un **fotoperiods**. Līdz ar to, kultūras augšanu un attīstību var ietekmēt gaismas avota īpašības – spektrs un gaismas intensitāte. AAK audzēšanai parasti izmanto fluorescentās lampas, jo tās izdala mazāk siltuma.



### Vilņu garums

Zila un UV-tuva gaisma var stimulēt kallusa augšanu, bet vairākos gadījumos tā inhibē gan kallusa augšanu, gan dzinumu attīstību. Tas var būt saistīts ar auksīna noārdīšanos un citokinīnu sintēzes inhibēšanu zilās gaismas ietekmē, kā arī ar pastiprinātu fenolu izdalīšanos.

Sarkanā gaisma regulē augšanu un attīstību ar fitohroma sistēmas starpniecību. Fitohromam ir divas formas: aktīvā forma ( $F_{IS}$ ) infrasarkanās gaismas ietekmē pārvēršas neaktīvajā formā ( $F_S$ ) un neaktīvā, savukārt, sarkanās gaismas ietekmē pārvēršas aktīvajā (tā darbojas fitohroms B). Ir hipotēze, ka aktīvā fitohroma forma stimulē citokinīna biosintēzi augos un, līdz ar to, veicina dzinumu proliferāciju. Savukārt, pētījumi ar mutantiem augiem, kuriem ir pārekspresēta citokinīnu biosintēze vai traucēti fitohroma regulētie procesi, liecina par to, ka fitohroma un citokinīna darbības mehānismi ir atšķirīgi, bet tie pārklājas noteiktu fizioloģisko procesu gadījumā (piemēram, deetioloģija, hloroplastu attīstība). Daudzos gadījumos gaisma stimulē adventīvo dzinumu veidošanos un uzlabo to kvalitāti (zemā apgaismojuma apstākļos augi vitrificējas), bet sarkanā gaisma var inhibēt sakņu veidošanos.

### Gaismas intensitāte

Intensīvs apgaismojums var paaugstināt temperatūru kultivēšanas traukos, jo notiek siltumnīcas efekts. Pašā eksplantā pārlietu intensīvs apgaismojums var izsaukt oskidaatīvo stresu. Pārāk intensīva apgaismojuma apstākļos barotnē var noārdīties IES, bet no EDTA veidojas formaldehīds. Tā kā lielākā daļa *in vitro* audzētu augu ir miksotrofi, tiem nav nepieciešams intensīvs apgaismojums. Gadījumos, kad ir panākta autotrofo augu vai šūnu kultūras attīstība, gaismas intensitāte ir jāpalielina.

Savukārt, daudzām kultūrām gaisma stimulē adventīvo dzinumu veidošanos un zemā apgaismojuma apstākļos veidojās mazāk dzinumu ar sliktāku kvalitāti (vitrificēti, sukulenti). Adventīvo dzinumu veidošanās var būt tieši saistīta ar fitohroma darbību (īsi sarkanās gaismas impulsi izraisa adventīvo dzinumu iniciāciju kallusa kultūrā).

Ir arī gadījumi, kad audzēšana tumsā vai tumsas periods stimulē noteiktus morfoģenēzes procesus. Audzēšana tumsā var stimulēt sakņu iniciāciju, jo šādos apstākļos palielinās dabīgā auksīna līmenis, bet tālākai sakņu augšanai ir parasti nepieciešams apgaismojums. Tumsā var kultivēt kallusa kultūras - ir sugas (piemēram *Hosta*, *Magnolia*), kurām kalluss veidojas tikai tumsā.

### 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.