

## 8. EMBRIOĢENĒZE, SOMATISKĀ EMBRIOĢENĒZE

**Embriogēnēze** sākas ar zigotas (apauglotās olšūnas) izveidošanos. Tālāk embrijs (jeb dīgļlis) attīstās, izejot vairākas stadijas, kuras nedaudz atšķiras kailsēkļiem un segsēkļiem. Segsēkļiem notiek dubultā apaugļošanās, kā rezultātā izveidojas diploīdais embrijs un triploīdā endosperma. Kailsēkļiem notiek vienkāršā apaugļošanās, barības vielu rezerves sēklā veido megagametofīta audi.

Segsēkļu embriogēnēzes etapi ir

1. embriogēnēze šaurā nozīmē:

- zigotas asimetriskā dalīšanās,
- globulārā stadija, kurā tiek definēti šūnu slāņi un embrija ass,
- pāreja uz dīgļlapu stadiju, kurā notiek sakes un pumpura aizmetņu iniciācija;

2. embrija nobriešana.

Kailsēkļu embriogēnēzes etapi pēc būtības atbilst segsēkļu embriogēnēzes (šaurā nozīmē) etapiem. Izšķir proembriogēni, agrīno embriogēni un vēlo embriogēni, kura noslēdzas ar embrija nobriešanu. Skujkoku tipa proembriogēnēze (tipiskākā kailsēkļiem) ietver "brīvo kodolu fāzi" - apauglotās olšūnas kodoli vairākkārt dalās un izveidojas atsevišķi "stāvi", no kuriem vēlāk attīstās embrijs un suspensors.

Rezultātā izveidojas sēklas embrijs ar sugai raksturīgu uzbūvi. Embrija attīstības beigās notiek embrija nogatavošanās (*maturation*). Šajā stadijā uzkrājas rezerves vielas, notiek pakāpeniska atūdeņošana un ieiešana miera stadijā (var iestāties arī organiskais miera periods).

Embrija attīstības laikā ir aktīvi augsīns, citokinīni un giberelīni. Vēlīnā embriogēnēzes stadijā to aktivitāte samazinās un pieaug abscīzskābes aktivitāte.

Embriogēnēze (zigotiskā embrija attīstība) un somatiskā embriogēnēze (embrija attīstība no somatiskas šūnas) ir divi dažādi procesi, bet abu procesu rezultātā izveidojas bipolāri embriji ar orgānu aizmetņiem. Līdzība starp zigotiskā embrija un somatiskā embrija (SE) attīstības stadijām parāda, ka darbojas ļoti līdzīga vai tā pati attīstības programma, lai gan vairāku gēnu izpaušme, visticamāk, atšķiras.

Atsevišķos gadījumos somatiskā embriogēnēze notiek arī dabīgos apstākļos. Piemēram, *Paeonia* (sēklaizmetņos), *Asplenium* un *Kalanchoe* (lapās). Tomēr šis process ir vairāk raksturīgs *in vitro* kultūrām, kur šūnas pakļauj specifiskai fitohormonu ietekmei.

Izšķir **tiešo** un **netiešo** somatisko embriogēni, atkarībā no tā, vai embrijs attīstās no eksplanta šūnas, vai no kallusa šūnas. Tiešās embriogēnēzes paveids ir sekundārā somatiskā embriogēnēze - ja nenotiek SE nobriešana, no tā šūnām var veidoties sekundārie, terciārie SE utt. No vienas puses, tas ir veids, kādā var iegūt daudz jaunu augu, no otrās puses, ja neizdodas apturēt sekundāro SE veidošanos, neveidojas normāli attīstīti augi. Netiešās embriogēnēzes gadījumā SE veidojas no PEM (pro-embriogēnās masas), kura veido t.s. embriogēno kallusu (EK). Embriogēnais kalluss atšķiras no neembriogēnā (NEK) morfoloģiski un pēc krāsas. EK un NEK raksturo atšķirības gēnu ekspresijā un stresa atbildes reakcijas, var atšķirties specifisko enzīmu aktivitāte (piem. antioksidatīvo enzīmu) un *red/ox* potenciāls. Taču mehānismi, kuri regulē šūnu

diferenciāciju somatiskās embriogēneses procesā, vēl nav pilnībā izprasti.

Somatiskā embriogēze ir labs augu mikropavairošanas veids, jo ir iespējams iegūt lielu augu skaitu, salīdzinājumā ar adventīvajiem (no kallusa attīstījušies) dzinumiem, SE mazāk izpaužas somaklonālā mainība.

#### Somatiskās embriogēneses procesā izšķir 5 etapus:

1. embriogēnās kultūras iniciācija no primārā eksplanta (izmanto fitohormonus, galvenokārt auksīnu)
2. embriogēnās kultūras proliferācija (izmanto fitohormonus)
3. priekšnobriešana (pre-maturaton) – tiek inhibēta proliferācija un veicināta SE veidošanās (bez fitohormoniem)
4. SE nobriešana (izmanto abscīzskābi)
5. Augu reģenerācija no SE (bez fitohormoniem)

#### 1. Embriogēnās kultūras iniciācija

Primārā eksplanta audi vai embriogēnais kalluss satur kompetentās šūnas, kuras reaģē uz auksīnu un atgriežas pie embrionālās attīstības programmas. Iespējams, šūnas kompetenci jeb spēju veidot SE nosaka tās jutīgums pret auksīnu vai specifiskie auksīna receptori. Uzskata, ka auksīna ietekme ir saistīta ar šūnapvalka un citoplazmas pH pazemināšanos. Ja fitohormonu specifiskajā ietekmē notiek asimetriska šūnu dalīšanās, veidojas SE. Savukārt, simetriskās dalīšanās rezultātā veidojas kalluss.

SE iniciāciju var izsaukt auksīns vai auksīns kombinācijā ar nelielu citokinīna devu. Retos gadījumos SE iniciāciju var panākt tikai ar citokinīna piedevu barotnei. Īpatnēja iedarbība piemīt tidiazuronam - vielai ar citokinīna aktivitāti, kura dažos gadījumos aizstāj gan auksīnu, gan citus citokinīnus. Iespējams, TDZ ietekmē auksīna un citokinīna līmeni pašās šūnās. Ir hipotēze, ka SE veidošanos veicina stresa faktori, kas izskaidro dažādu augšanas regulatoru - oligosaharīdu, jasmonāta ietekmi uz SE iniciāciju. Burkāniem SE veidošanos bez eksogēno fitohormonu iedarbības stimulē eksplanta ievainojums. SE iniciāciju var ietekmēt arī barotnes neorganiskie komponenti, īpaši N saturošie savienojumi - amīdi un amonija joni. Ir pētījumi par dažādu oglekļa avotu ietekmi.

Spēja veidot SE ir ģenētiski noteikta, pastāv būtiskas atšķirības starp sugām un kultivāriem. Liela nozīme ir eksplantam - vairākiem augu SE veidojas no juveniliem vai pat tikai no embrionāliem audiem. Taču ir augi, piemēram, burkāni (*Daucus carota*) un lucerna (*Medicago sativa*), kuriem arī diferencēto auga orgānu šūnām piemīt SE veidošanas potenciāls. Interesanti, ka SE iniciāciju neembriogēnai kultūrai var veicināt audzēšana uz barotnes, kurā iepriekš ir bijusi embriogēna kultūra. Iespējams, ka ir šķīstoši savienojumi, kuri darbojas kā SE iniciācijas faktori (šāda audzēšana pieder pie *nursing culture* tipa - kad vienas kultūras augšanai ir nepieciešamas citas kultūras veidotie augšanas/attīstības faktori). Šie faktori var būt embriogēnie proteīni - līdz šim ir atrasti vairāki kandidāti, kuru starpā ir lipīdu transporta proteīns, skābā endohitināze un vielas, kuras klasificē kā signālmolekulas – arabinoglukāni u.c. Šie proteīni nav specifiski tieši somatiskai embriogēzei, bet var kalpot kā marķieri.

Šūnas kompetence ir saistīta ar citoplazmas blīvumu. Burkāna šūnās SE veidojas no šūnām ar blīvu citoplazmu un zemu vakuolizācijas pakāpi, vai arī citoplazmas blīvums

palielinās SE iniciācijas procesā. Salīdzinājumā, skujkokiem (parastai eglei) SE veidojas tikai no šūnām ar blīvu citoplazmu. Citoplazmas blīvuma izmaiņas ir novērotas arī organoģenēzes sākumā (piem. rizoģenēze).

## 2. Embriogēnās kultūras proliferācija

Pro-embriogēnās masas (PEM) proliferāciju stimulē eksogēnais augsnis. PEM var audzēt uz pusciētās barotnes, bet lielākam apjomam ir piemērotāka audzēšana šūnu suspensijas veidā šķidrā barotnē. Proliferācijai ir nepieciešams relatīvi zems pH. Ar laiku PEM šūnas zaudē spēju veidot SE, līdz ar to proliferācijas etaps nevar turpināties pārāk ilgi - uzskata, ka maksimālais laiks ir seši mēneši. Jāņem vērā, ka ilgstoša kultivēšana veicina somaklonālo mainību - gan ģenētiskās, gan epiģenētiskās izmaiņas.

Ja ir nepieciešams saglabāt kultūru embriogēnā kallusa veidā, ir iespējams izmantot kriosaglabāšanas metodes (to lieto arī komerciālās pavairošanas sistēmās).

## 3. Priekšnobriešana

Šis etaps ir nepieciešams, lai pārtrauktu augsņa ietekmi. Bieži SE iniciācijai izmanto sintētisko savienojumu 2,4-D. Tā kā 2,4-D ir stabils savienojums, tas saglabājas barotnē un arī šūnas nespēj to pilnībā metabolizēt, lai pārtrauktu augsņa ietekmi šūnas pārceļ uz bezhormonu barotni. Ja šajā stadijā ir nepieciešams sinhronizēt embriju attīstību, kultūru var izsijāt, lai atdalītu atsevišķas šūnas no šūnu agregātiem.

## 4. Nobriešana

Šajā etapā SE notiek vairākas bioķīmiskās un morfoloģiskās izmaiņas. Suspensora šūnās notiek apoptoze un tās noārdās. Sākas rezerves vielu akumulācija. Embrijiem veidojas sausuma stresa izturība. Skujkokiem, kā arī dažu citu sugu augiem, SE nobriešanas procesā parasti izmanto eksogēno abscīzskābi. Abscīzskābi arī izmanto, lai pārtrauktu sekundāro SE veidošanos.

Nobriešanas beigās SE pakļauj sausuma ietekmei (izmanto osmotiski aktīvās vielas, arī cukurus), var pakļaut arī zemas temperatūras ietekmei, lai SE ieietu miera stadijā. Ir sugas, kurām ir rasturīgi rekalcitranti embriji, t.i. tie nepanes izžūšanu un pastāv iespēja, ka tie sāks attīstīties priekšlaicīgi, veidojot augus ar zemu kvalitāti. Ja nobriešanas etapā SE izžāvē līdz noteiktai pakāpei, dziedējot ir jānodrošina pakāpenisku ūdens uzņemšanu, lai izvairītos no SE bojājumiem (parasti sākotnējo uzbriešanu var panākt, turot SE vai sēklas lielā gaisa mitruma apstākļos).

## 5. Reģenerācija

No SE izveidojas (uzdīgst) nelieli, dīgstiem līdzīgi augi. Parasti SE dīgšana var notikt uz bezhormonu barotnes, bet ir gadījumi, kad to stimulē ar eksogēniem fitohormoniem (giberelīniem).

Literatūra tālākai lasīšanai:

Plant Propagation by Tissue Culture. 2008. Springer Verlag

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