

3. AUGU AUDU KUTŪRU LABORATORIJA, BAROTNES

LABORATORIJA

Sterilitāte ir viens no svarīgākajiem priekšnosacījumiem augu audu kultūru uzturēšanai. AAK laboratorijā un AAK audzēšanas telpās ir jāizvairās no netīrumiem, kuri nāk no ārpusēs (jāizmanto maiņas apavi un jāvelk laboratorijas halāti), jāizvairās no kukaiņiem un mikroorganismiem, kuri var atrasties uz augiem (piemēram, telpaugiem) kā arī laboratorijai jāatrodas, ja iespējams, tālāk no siltumnīcām vai mikrobioloģijas laboratorijas (jo mikroorganismi var nonākt AAK laboratorijā ar gaisu, savukārt, kukaiņi un augu ērces darbinieki var ienest laboratorijā uz drēbēm).

Nepieciešamo AAK laboratorijas telpu un aprīkojuma saraksts (punkti var mainīties konkrētajos gadījumos atkarībā no pieejamo telpu skaita, izkārtojuma un laboratorijā paredzēto darbu specifikas):

1. Telpa(s) barotnes pagatavošanai, kultūru izvērtēšanai un pierakstiem
 - a. Galda virsma
 - b. Plīts (var būt magnētiskais maisītājs); mikroviļņu krāsns
 - c. Analītiskie un vienkāršie laboratorijas svāri
 - d. pH-metrs
 - e. ledusskapis, saldētava
 - f. destilators vai cita ūdens attīrīšanas iekārta
 - g. izlietne, vieta trauku mazgāšanai
 - h. plaukti/skapji trauku un vielu glabāšanai
 - i. autoklāvs
 - j. velkme
 - k. var būt – rakstāmgalds un skapis pierakstu glabāšanai, centrifūga, spektrofotometrs
2. Telpa(s) darbam ar sterilām kultūrām
 - a. Laminārbokss
 - b. Binokulārā lupa (nav obligāti)
 - c. Instrumenti – pincetes, skalpeļi, var būt vienreiz lietojamie asmeņi
 - d. Instrumentu sterilizators vai trauks ar spirtu
 - e. Gāzes deglis vai spirta lampiņa (sērkokciņi)
 - f. Sterilizētas papīra loksnes vai virsma, kuru var apdedzināt ar spirtu
 - g. Strūklene ar spirtu (darba virsmas sterilizēšanai)
3. Telpa kultūru audzēšanai (ar kontrolējamo temperatūru un apgaismojumu)
 - a. Apgaismojami plaukti ar taimeru diennakts fotoperioda uzstādīšanai
 - b. Klimata kameras ar kontrolējamo temperatūru un apgaismojumu
 - c. Kratītāji (šūnu kultūrām)
Parasti temperatūra ir 25-27 °C, fotoperiods – 16/8 stundas (gaisma/tumsa). Lampas var būt izvietotas virs plauktiem vai sānos (arī vidū, atkarībā no plaukta konstrukcijas).
4. Telpa augu aklimatizācijai pēc izstādīšanas *ex vitro*
5. Var būt – telpa ar pazemināto temperatūru kultūru aukstumuzglabāšanai

Trauki kultūru audzēšanai: izmanto stikla traukus (mēģenes, burkas, kolbas, Petri

traukus) un plastmasas traukus (autoklavējamus un neautoklavējamus). Speciālus kultūru traukus pārdod sterilus (tie var būt vienreiz vai atkārtoti lietojami), bet stikla traukus pirms lietošanas autoklavē (ar vai bez barotnes). Trauka veids un izmērs ir atkarīgs no eksplanta lieluma un kultivēšana mērķa (īslaicīga/ilglaicīga uzturēšana, proliferācija, apsākšana). Izmanto arī dažējās imersijas sistēmas, bet kallusu un šūnu kultūras var audzēt speciālos bioreaktoros.

Sterilitātes nodrošināšana

- Telpa un darba virsmas: telpām, kurās strādā ar audu kultūrām, jābūt pēc iespējas izolētām no pārējām telpām; regulāri jāmazgā grīda un virsmas; lieto maiņas apavus un laboratorijas halātus. Telpā, kurā atrodas laminārbokss, ir vēlams ielikt UV lampu un no rīta vai pirms darba uzsākšanas jāapstaro telpa, tajā novietojot arī maiņas halātu (20-30 min).
 - Trauki un instrumenti: traukus mazgā ar līdzekli un skalo destilētā ūdenī, pēc mazgāšanas stikla traukus karsē $t > 100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Instrumentus karsē mufelī (biežums ir atkarīgs no tā, vai kultūrās novēro infekcijas) un glabā darbam paredzētajā telpā. Pirms darba instrumentus sterilizē, iemērcot etilspirtā un apdedzinot, vai ievietojot augstā temperatūrā īpašā sterilizatorā (bumbiņu sterilizators).
 - Barotne: pēc pagatavošanas barotni, iepildītu audu kultūras traukos vai atsevišķi, autoklavē $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ 15-20 min. Ja barotnē ietilpst vielas, kuras autoklavējot sadalās, tās pievieno barotnei pēc autoklavēšanas, izmantojot sterilu filtru ar šļirci.
 - Rokas, laminārbokss: pirms darba uzsākšanas laminārboksā ieslēdz gaisa plūsmu un 20-30 min darbina UV lampu (tajā laikā boksu lietot nedrīkst!). Tikpat laicīgi ieslēdz instrumentu sterilizatoru, ja tādu lieto. Pirms darba rokas notīra ar spirtu (ja lieto cimdus – pašus cimdus), izmantojot papīra salveti notīra ar spirtu boksa iekšējo virsmu. Darba laikā regulāri notīra virsmu (piemēram, pirms jauna kultūras trauka attaisīšanas, mainot sterilu papīru, uz kura veic manipulācijas ar augiem). Sterilizētos instrumentus pirms darba atdzēsē, instrumentu sterilizēšanu atkārtoti pēc vajadzības, vai pirms katra trauka atvēršanas, vienmēr sterilizē, ja instruments pieskārs virsmai, nokrīt utt. Pēc darba notīra laminārboksa virsmu ar spirtu.
- Pirms ievadīšanas kultūrā sterilizē pašu augu eksplantu - metodes ļoti atšķiras, atkarībā no eksplanta izcelsmes (no siltumnīcas vai no āra apstākļiem, pazemes/virszemes orgāns utt), virsmas īpatnībām (cieta/mīksta, rievaina/gluda) u.c. īpašībām. Plaši izmanto hipohlorītu (ietilpst dezinfekcijas un bālināšanas līdzekļu sastāvā). Atsevišķos gadījumos var izmantot arī antibiotikas (pievieno barotnei).

BAROTNE

- Pareizs barotnes sastāvs ir viens no pamatnosacījumiem augu audu kultūras veiksmīgai uzsākšanai un uzturēšanai. Barotnes sastāvam jābūt piemērotam konkrētam šūnu (audu) tipam (arī sugai), kā arī vēlamajam procesa virzienam.
- *Murashige & Skoog* (1962) barotne (MS) ir izstrādāta ar domu izveidot barotni, kurā tabakas audu kultūra būtu pilnībā nodrošināta ar barības vielām bez orgānisko piedevu izmantošanas (rauga ekstrakts, kokosriekstu piens, kazeina hidrolizāts), t.i. barotnes sastāvs būtu pilnībā zināms un kontrolējams (tādas barotnes sauc par sintētiskām). MS barotnei ir raksturīgs liels slāpekļa saturs (kas ne vienmēr ir piemērots kokaugu kultūrām).
- Uzskata, ka minerālelementi ir ne tikai materiāls auga uzbūvei, bet arī signāli attīstības procesu regulēšanā. Arī fitohormonu iedarbība uz kultūru var būt atkarīga no minerālvielu un organisko vielu (piem. cukuru) sastāva un daudzuma.
- Daži elementi nonāk barotnē kopā ar agaru (piemaisījumi) – piemēram, Ni, kas izrādījās labvēlīgs kultūru augšanai. Pretēji, agars un aktivētā ogle (dažreiz iekļauj barotnē) var absorbēt minerālvielas.
- Augi kultūrā izlieto minerālvielas ar dažādu ātrumu: visātrāk - N un P (pirmo divu nedēļu laikā).

Makroelementi – vienmēr ietilpst barotnes sastāvā

- **Slāpekklis:** kultūrā augi visvieglāk uzņem reducētā N formas (amīdi, amonija joni NH_4^+), bet barotnes sastāvā ietilpst gan NO_3^- (nitrāts, oksidētā forma), gan NH_4^+ .
 - o NO_3^- augi uzņem skābā vidē, kā rezultātā vide kļūst mazāk skāba, savukārt, augiem uzņemot NH_4^+ , tie izdala H^+ un vide paskābinās. Nitrāti ir nepieciešami barotnē arī tādēļ, ka NH_4^+ joni ir toksiski lielās koncentrācijās.
 - o Augā nitrāta un nitrīta reduktāzes darbības rezultātā nitrāta joni pārvēršas amonija jonos. Lielākai daļai kultūru ir nepieciešama ne tikai nitrāta, bet arī amonija joni barotnē, jo tie sekmē aminoskābju biosintēzi, šūnapvalku sintēzi un augšanas regulatoru (fitohormonu) aktivitāti. Amonija joni var būt nepieciešami normālai adventīvo orgānu attīstībai (pateicoties to lomai aminoskābju sintēzē). Taču liels amonija jonu saturs var izraisīt dzinumu vitrifikāciju, jo aminoskābju sintēze palielinās uz ogļhidrātu sintēzes rēķina. Ja lieto tikai amonija sāļus, ir jāregulē barotnes pH (piemēram, izmantojot buferšķīdumu).
 - o N pieejamība ietekmē morfoģenēzi augu kultūrā. Svarīgs ir ne tikai kopējais N daudzums, bet amonija un nitrāta jonu attiecība: piemēram, amonija joni bieži nomāc sakņu augšanu, savukārt, nitrāta joni to veicina. Atsevišķām sugām amonija joni nomāc arī dzinumu augšanu. Nepareizas NH_4^+ un NO_3^- attiecības dēļ var sākties nenormāla attīstība (pundurformas, netipiskas lapas, pāresninātas saknes). Šī attiecība regulē arī kallusa augšanu. Kopumā, nediferencēto šūnu kultūras uzturēšanai ir nepieciešams pietiekami liels N saturs barotnē. Optimāla NH_4^+ un NO_3^- attiecība ir atkarīga no sugas un audu tipa (dzinumi, saknes, nediferencēti audi).
 - o Dažreiz barotni papildina ar noteiktām aminoskābēm vai olbaltumvielām

hidrolizātiem (piem. kazeīna hidrolizātu). Konkrēto aminoskābju ietekme uz augšanu ir atkarīga no sugas un audu tipa.

- **Fosfors:** augi uzņem fosforu HPO_4^{2-} un H_2PO_4^- jonu veidā, vēlāk augos P oksidējas līdz PO_4^{3-} (pašus ortofosfāta jonus augi parasti neuzņem). Vidē ar pH līdz 7 (parasti tāds pH ir barotnēm) dominē H_2PO_4^- joni. Audu kultūras izdala vidē fosfatāzes, kuras atbrīvo fosforu arī no organiskiem savienojumiem. MS barotnē fosfora koncentrācija ir salīdzinoši maza, atsevišķām kultūrām var būt nepieciešama lielāka koncentrācija (lai palielinātu periodu starp pasāžām un stimulētu adventīvo dzinumumu veidošanos). Dabā augiem ir raksturīga fosfora reutilizācija, tā notiek arī audu kultūrās. Fosfora saturam barotnē samazinoties, kad augi to izlieto, mainās arī barotnes pH, jo fosfāti darbojas kā buferis.
- **Kālijs:** K^+ joni neiesaistās organiskajos savienojumos, bet K ir daudzu enzīmu kofaktors, tas piedalās šūnu turgora (osmotiskā spiediena) un pH regulācijā. K trūkums samazina P uzņemšanu augos, savukārt, K uzņemšanu samazina Ca trūkums.
- **Nātrijs:** Na joni nav nepieciešami lielākai daļai augu. Tie var stimulēt augšanu atsevišķo dzimtu augiem (*Chenopodiaceae*, *Asteraceae*), bet graudzālēm var daļēji aizstāt K jonus (jo piedalās osmotiskajā regulācijā). Lielākoties Na speciāli neiekļauj barotnes sastāvā, bet tas nonāk barotnē līdz ar piemaisījumiem. Barotnē nav vēlama liela Na un Cl jonu koncentrācija.
- **Magnijs:** Mg saturs barotnēs parasti ir salīdzinoši neliels, taču šis elements ir neaizstājams kā hlorofila molekulas daļa, tas piedalās ATF sintēzē un ribosomu kompleksa veidošanas procesā. Palielināts Mg saturs var būt svarīgs somatisko embriju attīstībai.
- **Sērs:** augi uzņem sēru SO_4^{2-} jonu veidā. S uzņemšana ir saistīta ar N asimilāciju (ja trūkst S, šūnās var uzkrāties šķīstošie N savienojumi). S uzņemšana nav atkarīga no pH, bet noved pie pH palielināšanos.
- **Kalcijs:** Ca nav tik kustīgs elements, kā K un iesaistās šūnu struktūrās (savieno savā starpā biomolekulas – membrānās, lamelās, šūnapvalkos). Ca ir arī sekundārais signālsavienojums (iekššūnas Ca koncentrācijas ir zemas, jo Ca tiek transportēts uz vakuolu, lai novērstu fosfāta izkrišanu nogulsnēs). Nodrošinājums ar Ca ir svarīgs augšanas regulatoru darbības priekšnosacījums, tas ir nepieciešams, lai veidotos adventīve pumpuri. Ca trūkums izraisa dzinumumu galotņu nekrozi.
- **Hlors:** Cl joni ir nepieciešami augu augšanai. Tas līdzsvaro katjonus (K^+ , Mg^{2+} un Na^+) un piedalās šūnu turgora uzturēšanā. Atsevišķas sugas ir jutīgas pret Cl (piemēram, kokaugi), tām novēroja lapu dzeltēšanu un audu vitrifikāciju (plūmēm).

Mikroelementi – ne vienmēr, bet parasti ietilpst barotnes sastāvā

- MS barotnei ir salīdzinoši liels mikroelementu saturs; cita barotnes recepte, kuru plaši izmanto, ir B5 barotne vai *Bourgin & Nitsch* barotnes. No tām visām B5 barotnē ir viszemākais mikroelementu saturs. Taču mēdz izmantot arī lielākas koncentrācijas – nepieciešamā koncentrācija ir atkarīga gan no sugas, gan no audu tipa, gan no vēlamās reakcijas (piemēram, organoģenēzes inducēšanai ir nepieciešams lielāks mikroelementu saturs, nekā kallusa augšanas uzturēšanai).

- Helāti:** dažu metālu joni veido nešķīstošus savienojumus un kļūst augiem nepieejami. Lai novērstu nogulšņu veidošanos, izmanto metālu jonu kompleksus ar noteiktiem organiskiem savienojumiem (ja komplekss saistās ar metāla jonu ar vairāk, nekā vienu saiti, to sauc par helātu, bet pašu organisko vielu – par helatējošo aģentu). Helatējošā aģenta afinitāte pret konkrēto katjonu var būt atkarīga no šķīduma pH: Cu^{2+} joni labi veido kompleksu ar aminoskābēm sārmainā vidē, bet skābākā vidē labāk veido kompleksus ar organiskajām skābēm. Atšķiras arī kompleksu stabilitāte – viens un tas pats helatējošais aģents var veidot pēc stabilitātes atšķirīgus kompleksus ar dažādiem katjoniem. Ja komplekss ir pārāk stabils, katjons nebūs pieejams augam (piem. Cu^{2+} komplekss ar EDTA). Lai augs varētu izmantot attiecīgo katjonu, augam jābūt spējīgam sašķelt kompleksu aizvietojošā metāla jonu ar citu jonu vai denaturējot kompleksu. Helatējošos aģentus (gan dabīgos, gan sintētiskos) var izmantot, lai palielinātu metālu jonu pieejamību augiem.
- Dzelzs helāti.** Dzelzs pastāv [Fe(II)] un [Fe(III)] formā, kuras viegli pāriet viena otrā. Augos Fe ir nepieciešams red/ox reakciju norisē (hloroplastos, miohondrijos, peroksisomās), hlorofila prekursoru sintēzei (aminolevulīnskābes un porfirinogēna) un ietilpst ferredoksīnu sastāvā (elektronu pārnēsēji). Šķīdumā Fe joni veido nešķīstošus savienojumus ar fosfāta joniem, bet sārmainākā vidē – nešķīstošu hidroksīdu $\text{Fe}(\text{OH})_3$. Līdz ar to, jau agrīnos eksperimentos izmantoja helatējošos aģentus – citronskābi un vīnskābi, taču tie nav pietiekami efektīvi. 1950.-os gados sāka izmantot EDTA (*Ethylenediaminetetraacetic acid*). (Fe)-EDTA kompleksa pagatavošanai izmanto Fe^{3+} . Daļa no Fe jonu disociē no kompleksa un izveido nogulsnes, līdz ar to atlikusī EDTA viela var izveidot kompleksus ar citiem joniem. EDTA koncentrācijai barotnē nav jāpārsniedz 0.1 mM, jo lielā koncentrācijā viela ir toksiska dažiem augiem.

Organiskās piedevas un oglekļa avots – ne vienmēr, bet parasti ietilpst barotnes sastāvā. Noteikti organiskie savienojumi var uzlabot kultūras augšanu vai veicināt morfoģenēzi. To iekļaušana barotnē, kā arī daudzums, ir atkarīgi no sugas un genotipa – iespējams tādēļ, ka augiem ir atšķirīgas spējas sintezēt kultūrā to vai citu savienojumu.

- Vitamīni.** Visbiežāk barotni papildina ar B1 (tiamīns), B6 (piridoksīns) un PP (nikotīnskābe) vitamīniem. Tie visi, kopā ar mio-inozitolu, ietilpst MS barotnes sastāvā. Jāņem vērā, ka bieži vien izmanto barotnes recepti bez izmaiņām, bet ne vienmēr tas nozīmē, ka vitamīni ir nepieciešami konkrētai kultūrai vai veicina tās augšanu (ir gadījumi, kad vitamīni arī negatīvi ietekmē augšanu).
- o **Tiamīns.** Nepieciešams ogļhidrātu metabolismā, iesaistās dažu aminoskābju sintēzē. T. saturs MS barotnē var būt nepietiekams konkrētu sugu kultūrām. Iespējams, mijiedarbojas ar citokinīniem.
 - o **Citi vitamīni:** lai novērstu audu nekrozi, kā arī izolējot eksplantus, dažreiz izmanto C vitamīnu (askorbīnskābi); B5 (pantotēnskābi) var izmantot, lai veicinātu noteiktu sugu kultūru proliferāciju vai kallusu augšanu; E vitamīnu (tokoferols) var izmantot kā antioksidantu; B2 vitamīns (riboflavīns) var samazināt kallusa veidošanos un veicināt apsakņošanas noteiktām kultūrām.

Mio-inozitols. Šis savienojums sintezējās augos, bet tā loma ir labāk izpētīta

dzīvnieku šūnās – tas iesaistās fosfatidil-inozitolā, kurš ir svarīgs membrānu funkcionēšanā. Augos mio-inozitola esteri piedalās regulācijas procesos, visticamāk arī auksīna iedarbības mehānismā un tā transportēšanā. Iespējams, mio-inozitols ir iesaistīts pektīna plātņu un šūnapvalku veidošanas procesā, un var būt iesaistīts jonu uzņemšanā un iesaistīšanā metabolismā (līdz ar to sekmē kultūru augšanu). Īpaši nozīmīga ir mio-inozitola piedeva viendīgļlapju kultūrām.

Dažādas piedevas. Tādas piedevas, ka gaļas ekstrakts, lapu u.c. augu orgānu sulas, dīgstu ekstrakti, sēkļu embriju aptverošie šķidrums (piem. kokosriekstu piens), izmanto arvien retāk, jo uzlabojās barotņu receptūras. Tomēr, kā papildus cukuru, aminoskābju, organisko skābju, taukskābju un vitamīnu avotu atsevišķos gadījumos izmanto piedevas.

- o **Rauga ekstrakts.** Aminoskābju un vitamīnu (īpaši inozitola un B1 vitamīna) avots. Parasti pievieno 0.1-1 g L⁻¹. Dažreiz izmanto pavairošanas sākumposmā, lai atrastu lēni attīstošos mikroorganismus (infekciju). Var ietekmēt augu sekundāro metabolītu sintēzi.
- o **Kartupeļu ekstrakts.** Izmanto kā pamatu barotnei putekšņmaciņu kultūrām. Mikropavairošanā izmanto reti, pārsvarā orhideju kultūrām.
- o **Iesala ekstrakts.** Galvenokārt ogļhidrātu avots. Svarīga piedeva *Citrus* ģints augu kultūrā, to izmanto arī zigotisko embriju kultūrās.
- o **Kokosriekstu piens.** Kombinācijā ar auksīnu var stimulēt augu šūnu augšanu un dalīšanos. Var veicināt morfoģenēzi un somatisko embriogēzi. Parasti to var aizvietot ar adenīnu vai kinētīnu.

Organiskās skābes. Tās var kalpot kā helatējošie aģenti, kā pH buferi un kā barības vielas (piedalās Krebsa ciklā, sekmē amonija uzņemšanu).

Oglekļa avots – cukuri. Cukuri ir nepieciešami augu audu kultūrā kā barības vielas un kā osmotiski aktīvās vielas. Parasti sterilā kultūrā audzētās šūnas nav autotrofas (tie ir reti gadījumi, lai gan ir iespējams iegūt autotrofas kultūras, īpaši palielinot CO₂ saturu audzēšanas traukos).

- o **Saharoze.** Visbiežāk barotni papildina ar saharozi (var izmantot arī rafinētu pārtikas cukuru). Saharozes klātbūtne inhibē hlorofila sintēzi un fotosintēzi.
- o Citi cukuri (piem. glikoze, fruktoze) var veicināt organoģenēzi noteikto sugu kultūrām, taču parasti ir dārgāki. Ir gadījumi, kad saharozes aizvietošana ar citiem oglekļa avotiem stimulē vai inhibē noteiktus procesus – piemēram, galaktoze stimulē somatisko embriju attīstību balteglei un *Annona squamosa* apsakņošanas, lai gan tā ir toksiska lielai daļai audu kultūru. Fruktoze samazina kallusa veidošanos un, līdz ar to, veicina apsakņošanas *Castanea crenata* dzinumiem. Atsevišķām kultūrām izmanto arī laktozi un maltozi.
- o **Ciete.** Parasti audu kultūrā augu šūnas neizmanto cieti kā oglekļa avotu, bet var izdalīt ārpusšūnas amilāzes, lai to sadalītu. Giberelskābes pievienošana barotnei veicina šo procesu.
- o **Sorbitols, mannitols** – tie ir cukuru spirti, kurus parasti augu kultūrās

izmanto kā osmotiski aktīvās vielas, nevis kā C avotu, taču atsevišķos gadījumos tās var stimulēt augšanu vai morfoģenēzi. Iespējams, tiem ir loma fizioloģisko procesu regulēšanā.

Autoklavējot barotni, daļa saharozes sadalās – to sekmē zems pH (ja barotnes pH ir 3 sadalās 100%, ja pH 6 sadalās 0% saharozes). Taču ir novērots, ka dažas kultūras aug labāk tieši barotnē ar autoklavētu saharozi, iespējams notiek saharozes mijiedarbība ar agaru.

Optimālā saharozes koncentrācija ir atkarīga no sugas, šķirnes (genotipa), kā arī no vēlamā procesa (augšana, morfoģenēze, proliferācija). Uzskata, ka pietiekama koncentrācija ir 2-4 %; var izmantot kā standartu 30 mg L⁻¹ koncentrāciju (nepieciešamais saharozes daudzums ir atkarīgs arī no pasāžu biežuma. Ja kultūru bieži pārceļ uz jauno barotni, var pietikt arī ar zemāku koncentrāciju). Jāņem vērā, ka optimālā saharozes koncentrācija ir atkarīga arī no citām barotnes sastāvdaļām (piemēram, N saturs, vitamīnu piedevām). Un otrādi, minerālsāļu uzņemšana var būt atkarīga no cukura saturs barotnē (minerālvielu koncentrācijas palielināšana sekmē augšanu tikai tad, ja palielina arī cukura saturu).

Atkarībā no kultūras, saharoze un citi cukuri (piem. trehaloze) var sekmēt vadaudu attīstību un audu lignifikāciju.

Saharoze (u.c. cukuri) ir arī osmotiski aktīvās vielas - barotnes osmotiskais potenciāls var ietekmēt morfoģenēzes procesus (veicināt, inhibēt vai arī kvalitatīvi to izmainīt). Piemēram, tabakas kallusiem, kurus audzēja uz MS barotnes ar 0.3 mg L⁻¹ IES (auksīns, indolilētiķskābe) 1-3% saharozes saturs veicināja dzinumu veidošanos, bet 6% - sakņu veidošanos. Saharozes koncentrācija un osmotiskais potenciāls ietekmē kultūru apsākņošanos, pumpuru, ziedpumpuru veidošanos, somatisko embriogēzi un uzkrājējorgānu veidošanos.

Barotnes pH. Nepieciešamo barotnes pH nosaka: (1) pH ietekme uz pašu eksplantu; (2) pH ietekme uz barotni un (3) pH ietekme uz augu un barotnes mijiedarbību. pH var ietekmēt sāļu šķīdību, minerālvielu un citu barības vielu uzņemšanu augā, ķīmiskās (īpaši enzīmu katalizētās) reakcijas, kā arī pH ietekmē želējošā aģenta darbību barotnē (zem pH 5.5 barotne var būt pārāk šķīdīga, virs 6 – pārāk cieta). Līdz ar to, parasti barotnes pH regulē, lai tas būtu 5.5-6 robežās (standarta pH – 5.7).

- o **Bufersšķīdumi.** Lai stabilizētu pH, var izmantot vielas, kuras darbojas kā buferi. Tās var būt organiskās skābes, “bioloģiskie buferi” (TRIS, Tricine, MES, HEPES, CAPS). No tiem efektīvākais ir MES [2-(N-morfolino)etānsulfonskābe]. Jāņem vērā, ka šiem buferiem var būt īpatnējā (pat toksiska) ietekme uz kultūrām. Orhideju pavairošanā pH stabilizēšanai izmanto banānu homogenātu.
- o Zems pH parasti sekmē anjonu, bet augstāks – katjonu uzņemšanu. Savukārt, jonu uzņemšana izmaina vides pH (piem. amonija un nitrāta uzņemšana). pH ietekmē auksīna uzņemšanu (IAA, IBA, NAA, 2,4-D): to veicina zems pH (nokļūstot citoplazmā, kur pH ir 7, IAA pastāv anjona formā un vairs netiek ārā no šūnām, līdz ar to ir svarīga arī pH starpība starp vidi un citoplazmu).
- o Autoklavēšana parasti samazina barotnes pH; tas ir atkarīgs no barotnes

sastāva (saharozes koncentrācija, fosfātu koncentrācija, agara koncentrācija). pH pazeminās arī autoklavētās barotnes glabāšanas laikā.

- o Atkarībā no sugas, pH var dažādi ietekmēt morfoģenēzi un somatisko embriogēnēzi. Tas var būt saistīts ar konkrētās sugas prasībām - piemēram, rododendru audzēšanai kultūrā ir nepieciešams salīdzinoši zems pH, tāpat arī dabā šie augi aug skābā augsnē.

Fitohormoni – ne vienmēr, bet parasti ietilpst barotnes sastāvā. Augu audu kultūrās izmanto dažādas vielas ar fitohormonu aktivitāti: dabīgām analogiskās un sintētiskās. Jāņem vērā, ka dažādām vielām ar līdzīgu efektu (piem. auksīni) ir atšķirīgs iedarbības stiprums un, līdz ar to, tās izmanto dažādās koncentrācijas (praksē, izmantojot noteikto recepti, nevar vienkārši aizstāt vienu vielu ar auksīna/citokinīna u.c. aktivitāti ar citu, pievienojot to tādā pašā koncentrācijā).

Visbiežāk lietotie fitohormoni (augšanas regulatori):

- **Auksīni:** veicina stumbra un tā posmu augšanu garumā, apikālo dominēšanu, lapu nokrišanu, sakņu veidošanos, kopā ar citokinīniem veicina šūnu dalīšanos. Visbiežāk izmantotās vielas (iekavās – saīsinājumi angļu valodā):
 - o **IES (IAA)** – indolil-3-etiķskābe (heteroauksīns - augu dabīgais auksīns, pretstatā vielām ar auksīna aktivitāti)
 - o **NES (NAA)** – naftiletiķskābe
 - o **ISS (IBA)** – indolilsviestskābe
 - o **2,4-D** – 2,4-dihlorofenoksietiķskābe
- **Citokinīni:** veicina šūnu dalīšanos, izraisa apikālās dominēšanas modifikāciju, veicina adventīvo orgānu attīstību, ietekmē šūnu diferenciacijas regulēšanu
 - o **Kinetīns** – 6-furfurilaminopurīns
 - o **Zeatīns** – trans-6-(4-hidroksil-3-metilbut-2-enil)-aminopurīns
 - o **BAP** – 6-benzilaminopurīns
 - o **2iP** – N⁶(²-izopentil)-adenīns
 - o **TDZ**, tidiazurons (thidiazuron) – 1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5YL)-urīnviela
- **Giberelīni:** salīdzinājumā ar auksīniem un citokinīniem, AAK tos izmanto reti, piemēram, embriju (zigotisko, somatisko) attīstības veicināšanai, sēklu miera perioda pārtraukšanai. Visbiežāk lieto GA₃ (giberelskābe).
- Citi fitohormoni un augšanas regulatori: abscīzskābe (augšanas kavēšana, ilgstošā uzglabāšana), etilēns.

Želējošā viela - protoplastu, šūnu un sakņu kultūrām bieži izmanto šķidro barotni. Bet lai nodrošinātu mehānisku atbalstu kultūrām, var izmantot dažādas papildierīces (kā do dara daļējās submersijas sistēmās), filtrpapīra tiltiņus. Šķidrajā barotnē ir ļoti svarīga aerācija. Želējošās vielas arī ir veids, kā nodrošināt atbalstu un eksplanta kontaktu ar gaisu.

- Agars (visbiežāk izmantotā viela. Izmanto gan baktēriju kultūrām paredzēto agaru, gan speciāli ražotu augu audu kultūru agaru, var izmantot arī pārtikas agaru).
- Zelena sveķi (gelrite)
- Algināti
- Ciete

□ Pektīni

Barotnes pagatavošana un piemērotas barotnes receptes izvēle. Vispirms ir jāmeklē atbilstoša barotnes recepte literatūrā, bet ja nav pieejama informācija par barotni, ko var izmantot konkrētai sugai vai eksplanta veidam, vai arī rezultāti ir neapmierinoši, jānosaka barotnes sastāvs eksperimentāli. Par pamatu var ņemt jau esošās barotņu receptes, piemēram tās, kuras ir piemērotas līdzīgiem augiem un līdzīgiem eksplanta veidiem. Sākumā var izmēģināt trīs dažādus barotnes veidus, kuri atšķiras pēc sāļu koncentrācijas (zema, vidēja, augsta). Līdzīgi var piemeklēt mikroelementu, saharozes un augšanas regulatoru koncentrācijas.

Mūsdienās ir nopērkami gatavi barotņu maisījumi, kurus var, ja nepieciešams, papildināt ar konkrētām piedevām. Ja gatavo barotni no atsevišķām vielām, bieži izmanto iepriekš sagatavotus koncentrētus minerālsāļu (un citu vielu) šķīdumus. Šķīdumu sastāvs var būt atšķirīgs, dažkārt lieto trīs ("makro-" un "mikrosāļu" un CaCl_2) šķīdumus, citos gadījumos – vairāk. Galvenā prasība ir lai šķīdumā esošās vielas nereaģētu savā starpā, veidojot nešķīstošas nogulsnes.

Sāļu šķīdumus var uzglabāt ledusskapī vairākus mēnešus (pirms lietošanas jāpārbauda, vai šķīdumā nav izkritušas nogulsnes, tad to var sildīt, līdz nogulsnes izšķīst. Šķīdumā nedrīkst savairoties mikroorganismi). Fitohormonu šķīdumus var uzglabāt nedēļu.

Literatūra:

Plant Propagation by Tissue Culture. 2008. Springer Verlag

Plant Tissue Culture. Techniques and experiments. 2000. Academic Press

Plant Tissue Culture. 2009. APH Publishing

Plant Tissue Culture: Theory and Practice. 1996. Elsevier.