

4.1. EKSPLANTU VEIDI

Kā eksplantus auga ievadīšanai sterilajā kultūrā izmanto dažādus, gan veģetatīvus, gan ģeneratīvus, auga orgānus un to fragmentus. Pareiza eksplanta izvēle ir svarīga veiksmīgai kultūras uzsākšanai, kā arī turpmākai *in vitro* kultūras augšanai un attīstībai.

Eksplanta veids	Mērķis
Meristēmu saturošie eksplanti galotnes meristēma, dzinuma/saknes galotne, pumpurs	meristēmu kultūra, tiešā organoģenēze, augu iegūšana pavairošanai
Diferencēto audu eksplanti lūksnes, lapu, sakņu fragmenti	kallusa veidošanās, netiešā organoģenēze vai somatiskā embrioģenēze, augu iegūšana augu pavairošanai
Svaiga eksplanta macerācija	šūnu suspensija, somatiskā embrioģenēze un augu iegūšana pavairošanai vai šūnu kultūra sekundāro savienojumu ražošanai
Protoplasti iegūst pēc šūnu macerācijas un šūnapvalku degradēšanas	DNS modifikācija. Tālāk – somatiskā embrioģenēze vai šūnu kultūra (izmanto selekcijā)
Ģeneratīvie orgāni putekšņmaciņi, auglenciņa, mikrosporas	putekšņmaciņu vai mikrosporu kultūra, kallusa veidošanās, netiešā organoģenēze vai embrioģenēze, augu iegūšana (izmanto selekcijā)

Katrai sugai vai veselai taksonomiskai grupai piemēroto eksplantu bieži nosaka empīriski, eksperimentējot. Tomēr eksplanta tipa izvēle balstās uz priekstatu par auga attīstības fizioloģiju.

Šūnu kompetence

Augu šūnām ir raksturīga spēja mainīt attīstības programmu, reaģējot uz noteiktu signālu. Šāda spēja piemīt ne visām, bet tikai **kompetentām** šūnām. Uzskata, ka kompetentās šūnām no nekompetentām atšķir epiģenētiski regulētas gēnu ekspresijas īpatnības.

Augu ontogēze, **juvenilie un nobriedušie augi/augu orgāni**

- Augiem izšķir juvenilo un brieduma attīstības fāzes (dažkārt izšķir arī starpfāzi). Abās fāzēs meristēmām ir raksturīga sava stabila gēnu ekspresijas programma, atšķiras arī šūnu un šūnu kodolu izmērs (mazākas juvenilām meristēmām). Nobriedušas meristēmas spēj veidot ģeneratīvos orgānus. Juvenilajā fāzē augs var morfoloģiski atšķirties no nobriedušā auga (vai atšķiras nobriedušā auga daļas – piemēram lapas, kuras ir attīstījušas dažādā augstumā). Jo lielāks ir auga potenciālais izmērs un dzīves ilgums, jo ilgāk var turpināties juvenilā fāze (sal. koku un viengadīgo augu).
- Juvenilie dzinumi vieglāk apsakņojas un eksplanti, kuri ir iegūti no juvenilām auga daļām, labāk izdzīvo un proliferē audu kultūrā. Savukārt, nobrieduši augi var kļūt **rekalitranti**, t.i. no tiem nav iespējams iegūt dzīvotspējīgo eksplantu (piem. valriekstam).

Juvenilitātes atjaunošana

Lai gan eksplantu iegūšanai piemērotākā ir juvenilā attīstības fāze, bieži auga īpašības (piem. saistītās ar ziedu, augļu kvalitāti) var labāk raksturot nobriedušajiem augiem. Līdz ar to,

daudzos gadījumos ir vēlams veģetatīvi pavairot tieši nobriedušo augu. Lai iegūtu no izvēlētā mātes auga eksplantus, izmanto dažādas juvenilitātes atjaunošanas metodes:

- Dabīgā reversija (piemēram, ģeneratīvo orgānu attīstība) - ziedēšana, ka eksplantus izmanto zieda orgānus, kuriem ir juvenilo audu īpašības.
- Jauno dzinumumu iegūšana - lai veicinātu juvenilo dzinumumu augšanu, var apgriezt mātes augu (ja tas ir krūms vai koks). Jauniem dzinumiem (galotnēm) var būt arī piemērotāks izmērs.
- Potēšana un apsakņošana - no potcelma, vai attīstoties adventīvajām saknēm, dzinums saņem juvenilo īpašību atjaunojošos signālus (specifiskie proteīnu signāli; piemēram, sekvojai).
- Apstrāde ar augšanas regulatoriem - giberelīni un citokinīni var sekmēt auga juvenilitātes atjaunošanos. Kokaugu zarus var turēt giberelskābes šķīdumā pirms ievadīšanas kultūrā, lai veicinātu dzinumumu proliferāciju (*Spiraea* sugas). Visbiežāk gan apstrādei izmanto citokinīnu, retāk - auksīnu (zīdkoks).
- Augstās temperatūras ietekme
- Etiolācija
- Juvenilitātes atjaunošanās *in vitro* kultūrā

Apikālā dominēšana

Pavairošanas procesā ir ieteicams iegūt sāndzinumus, nevis **adventīvos dzinumus** (adventīvie dzinumi attīstās nevis no sānpumpura, bet dediferencējoties nemeristemātiskām šūnām). Adventīvie dzinumi var atšķirties no mātes auga - šādu parādību sauc par **somaklonālo variāciju**. Lai pārvarētu apikālo dominešanu un veicinātu sāndzinumu attīstību (vasas zarošanos), var izmantot citokinīnus. Konkrētās vielas ar citokinīnu aktivitāti izvēle un nepieciešamā koncentrācija ir atkarīgas no sugas/genotipa.

Miera periods

Pumpuru augšanu un sēklu dīgšanu var kavēt ne tikai nelabvēlīgie vides apstākļi (temperatūra, apgaismojums, ūdens pieejamība), bet arī iekšējie, jeb endogēnie, faktori, kuru ietekmes rezultātā iestājas **organiskais miera periods**. Šāda miera perioda iestāšanos un uzturēšanu pamatā nosaka fitohormonu līdzsvars pumpurā vai sēklā (izņemot gadījumus, kad sēklām miera periodu nosaka sēklapvalka vai sēklas embrija morfoloģiskās īpatnības). Galvenokārt miera periodu regulē giberelīni, abscīzskābe un citokinīni. Ja mātes augam ir raksturīgs pumpuru miera periods, eksplantus ir ieteicams iegūt tajā gadalaikā, kad augam aktīvi veidojas jaunie dzinumi, nevis kad pumpuri ir miera periodā. Viens no negatīviem blakus efektiem, ievācot miera periodā esošos pumpurus, ir liela mikroorganismu infekcijas iespējamība, jo starp biežām pumpuru zvīņām atrodas mikrobi vai to sporas. Jāņem vērā, ka ir izņēmumi – piemēram, noteiktām tulpju šķirnēm organoģenēze ir pilnībā vai daļēji inhibēta, ja eksplantus iegūst no aktīvi augošiem dzinumiem. Ir arī kokaugi, kuru ievadīšanai kultūrā izmanto ziemas pumpurus (piemēram, rododendri).

Mātes augu audzēšanas apstākļi un tā apstrāde

Minerālā barošanās: augam, no kuras iegūst eksplantus *in vitro* kultūrai, jābūt optimāli nodrošinātam ar minerālvielām. Ir novērots, ka konkrēti minerālelementi var veicināt vai kavēt organoģenēzi noteiktu sugu augiem.

Auga veselība: kā mātes augu nevar izmantot inficētus, slimus augus.

Apgaismojums: apgaismojuma efektam ir vairāki aspekti.

Apgaismojuma intensitāte (fotonu plūsma): vēlamā intensitāte ir atkarīga gan no sugas, gan no kultūras tipa (dzinumu, protoplastu, sakņu kultūra). Pelargoniju kultūrā apsākņošanas *in vitro* pozitīvi ietekmēja mātes auga audzēšana zemā apgaismojumā. Līdzīgu efektu novēroja azāliju dzinumiem; bet ir iespējama arī pretēja apgaismojuma ietekme uz apsākņošanas.

Viļņu garums: gaismas spektrālais sastāvs var ietekmēt auga zarošanos. Infrasarkanā gaisma var izmainīt endogēnā auksīna daudzumu augā kas, savukārt, ietekmē eksplanta īpašības.

Fotoperiods: garā/īsā diena var būtiski ietekmēt eksplanta īpašības. Piemēram, *Begonia hiemalis* kultūrā organoģenēze notika tikai eksplantiem, kurus paņēma no garā dienā audzētiem augiem. Fotoperioda ietekme ir atkarīga no auga un no *in vitro* reakcijas/procesa, kuru vēlas panākt.

Temperatūra: temperatūras ietekme ir būtiski atkarīga no sugas, tā var būt atkarīga arī no gadalaika (mēneša). Atkarībā no gadalaika, vides apstākļu ietekmē augā mainās noteiktu enzīmu aktivitāte. Daudzos gadījumos, lai veicinātu dzinumu vai lapu attīstību, mātesaugu pakļauj zemas pozitīvas temperatūras ietekmei.

Audzēšana siltumnīcā var palīdzēt vēl pirms ievadīšanas kultūrā samazināt mikroorganismu daudzumu uz auga, atvieglot dezinficēšanas pasākumus. Audzējot mātes augu siltumnīcā, ir jāizvairās no ūdens nokļūšanas uz tā virszemes orgāniem (veicina mikroorganismu attīstību). Ja augs (piemēram, koks) ir pārāk liels un to nevar audzēt siltumnīcā, ir iespējams iegūt jaunus dzinumus no nogrieztiem zariem.

Literatūra:

Plant Propagation by Tissue Culture. 2008. Springer Verlag

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

Experiments in Plant Tissue Culture. 1995. Cambridge University Press