

09. AUGU PRIMĀRAIS UN SEKUNDĀRAIS METABOLISMS *IN VITRO* KULTŪRĀ

9.1. Primārais metabolisms

Augu primārais metabolisms ietver ogļhidrātu (un to polimēru), lipīdu, olbaltumvielu un nukleīnskābju sintēzes un noārdīšanas (jeb metabolisma) bioķīmiskos ceļus. Bez nosauktajiem produktiem svarīgi primārā metabolisma savienojumi ir bioķīmisko ceļu starpprodukti (Krebsa cikla savienojumi, ograniskās skābes, aminoskābes), ATF un redukcijas ekvivalenti (NADH, NADPH). Tieši starpprodukti saista savā starpā dažādus metabolisma ceļus un nodrošina kopējo līdzsvaru dažādu endogēno un eksogēno faktoru ietekmē.

Primārajā metabolismā var izdalīt ar konkrētiem minerāliem stuktūrelementiem saistītos metabolisma ceļus – oglekļa, slāpekļa, sēra metabolisms. No fizioloģijas viedokļa var izdalīt reakcijas un bioķīmiskos ceļus, kuri ir saistīti ar konkrētiem procesiem – piemēram, elpošana un fotosintēze.

Sekundārais metabolisms ietver to savienojumu sintēzes un noārdīšanas ceļus, kuri nav tiešā veidā iesaistīti primārā metabolisma reakcijās. Šo savienojumu veidošanās nav obligāta visām augu sugām. Primāros un sekundāros metabolītus ne vienmēr var krasi atšķirt pēc ķīmiskās dabas, atšķirība ir to funkcijā auga organismā. Sekundāro metabolītu funkcijas ir lielā mērā saistītas ar auga reakciju uz biotisko un abiotisko stresu un aizsardzību (konstitutīvo vai inducēto). Jāņem vērā, ka biotiskie stresa faktori – piemēram, patogēni un augēdāji – ietekmē arī primāro metabolismu. No vienas puses, daļa auga resursu tiek novirzīta uz aizsardzības reakcijām (sekundāro metabolītu sintēze, morfoloģiskās izmaiņas). No otrās puses, stresa ietekme var izmainīt fizioloģiskus procesus apdraudētajos orgānos un, līdz ar to, primāro metabolismu: palēninās augšana, samazinās fotosintēzes intensitāte, var paātrināties novecošana un izmainīties resursu donoru (*source*) un akceptoru (*sink*) attiecības starp auga orgāniem (Berger *et al.* 2007).

Oglekļa metabolisms

Augu oglekļa metabolisms ietver ne tikai enerģijas metabolismu, rezerves vielu un struktūrsavienojumu sintēzi, bet arī CO₂ fiksāciju fotosintēzē. *In vitro* kultūras apstākļos fotosintēzi ietekmē sākotnējais eksplants (izcelsmes audi, vecums, vai eksplants satur hloroplastus), saharozes un dažādu minerālelementu saturs barotnē, CO₂ saturs atmosfērā, apgaismojums. Šūnu vai kallusa kultūrā, kura ir izcēlusies no eksplanta bez hloroplastiem, hloroplastu veidošanās notiek pakāpeniski, to ietekmē gaisma, saharoze un fitohormoni barotnes sastāvā (īpaši citokinīni).

Galvenie procesi augā, kuri ir saistīti ar oglekļa metabolismu, ir elpošana, fotosintēzes bioķīmiskās reakcijas (Kalvina cikls, kuru var nosaukt arī par reduktīvo fosfopentožu ceļu. Jāņem vērā, ka fotosintēzes procesā foto- un bioķīmiskās reakcijas ir cieši saistītas), oksidatīvais fosfopentožu ceļš (no glikozēs-6-fosfāta, vairāku secīgu reakciju rezultātā, veidojas ribozēs-5-fosfāts).

Krebsa cikla reakcijas notiek mitohondriju matiksā.

Kalvina cikla un oksidatīvā fosfopentožu ceļa reakcijas notiek hloroplastu stromā, un, līdz ar to, šie procesi ir stingri nodalīti laikā. Gaismas ietekmē palielinās Kalvina cikla enzīmu aktivitāte, tumsā – oksidatīvā fosfopentožu ceļa enzīmu aktivitāte. Šo regulāciju nodrošina ferredoksīna-tioredoxīna sistēma. Kalvina cikla enzīmi ir

aktīvāki, ja ir augstāks pH– gaismā hloroplastu stromas pH paaugstinās līdz 8, jo veidojas transmembrānu H⁺ jonu gradients.

Neskatoties uz to, ka audu kultūru barotņu sastāvam kā oglekļa avotu pievieno saharozi (vai citus cukurus), audu kultūras apstākļos notiek arī CO₂ fiksācija. Šūnu kultūras gadījumā sākotnēji, lag-fāzes laikā, augu šūnas ir ir heterotrofas, vēlāk, pārejot log-fāzē (strauja augšana pirms stacionāras fāzes sasniegšanas) palielinās CO₂ fiksācija un kultūra pāriet uz miksotrofo barošanas veidu. Straujās augšanas fāze ir saistīta arī ar izmaiņām slāpekļa metabolismā - notiek slāpekļa asimilācija no nitrāta.

Ar nelielu intensitāti CO₂ fiksācija var notikt arī tumsā. Šajā gadījumā darbojās enzīms FEP-karboksilāze (CO₂ piesaistās pie fosfoenolpiruvāta, veidojoties oksaloacetātam un vēlāk - malātam).

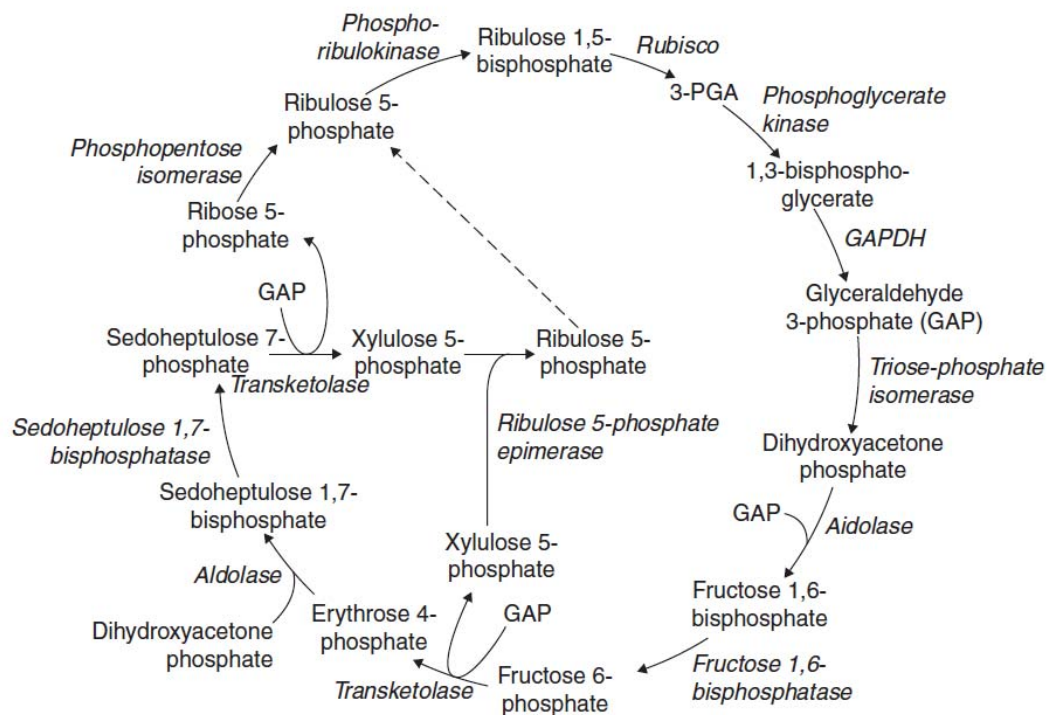


Figure 2.3 Simplified schematic of the Calvin cycle showing alternative routes for the regeneration of ribulose 5-phosphate.

Kalvina cikla shēma (Plaxton, McManus 2006).

Gaismas absorbcija šūnu kultūrā līdzinās lapu absorbcijai, izņemot dažas atšķirības zilās gaismas absorbcijas spektrā. Gaismā darbojas gan ribulozobifosfāta karboksilāze-oksigenāze (RuBisCo), gan FEP-karboksilāze, veidojot, attiecīgi, triozes (fosfoglicerāldehīdu) un oksaloacetātu. Oksaloacetāts ir Krebsa cikla metabolīts un iesaistās dažādās biosintēzes reakcijās. Abas sistēmas pastāv dinamiskā līdzsvarā, ja RuBisCo darbība ir ierobežota, intensīvāk darbojas FEP-karboksilāze. Oksaloacetāts tiek pārvērsts par malātu un tālāk transportējas uz mitohondrijiem, kur tas piedalās aspartāta (aminoskābes) sintēzē. Tādējādi šis metaboliskais ceļš var būt saistīts ar slāpekļa asimilāciju.

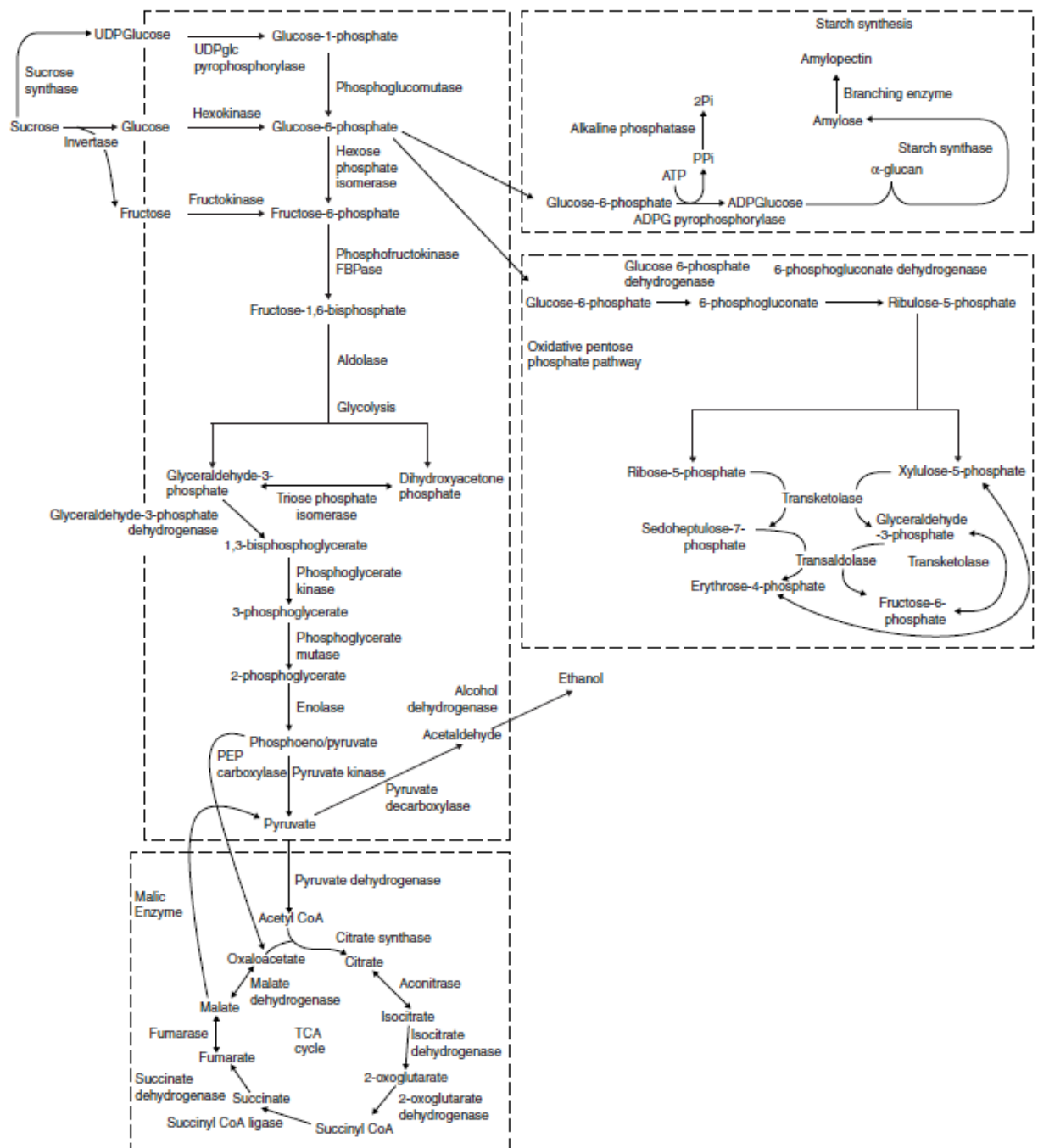


Figure 2.1 Pathways of primary carbon metabolism and respiration.

Ogļhidrātu metabolisma shēma (glikolīze, Krebsa cikls, oksidatīvais fosfopentožu ceļš un cietes sintēze) (Plaxton, McManus 2006).

RuBisCo darbību var ierobežot neorganiskā fosfāta nodrošinājums, jo trioze (FGA) transportējas ārā no hloroplastiem apmaiņā pret neorganisko fosfātu. Šo triozes translācijas procesu ietekmē glikoze –tādēļ cukura saturs barotnē var ietekmēt RuBisCo darbību.

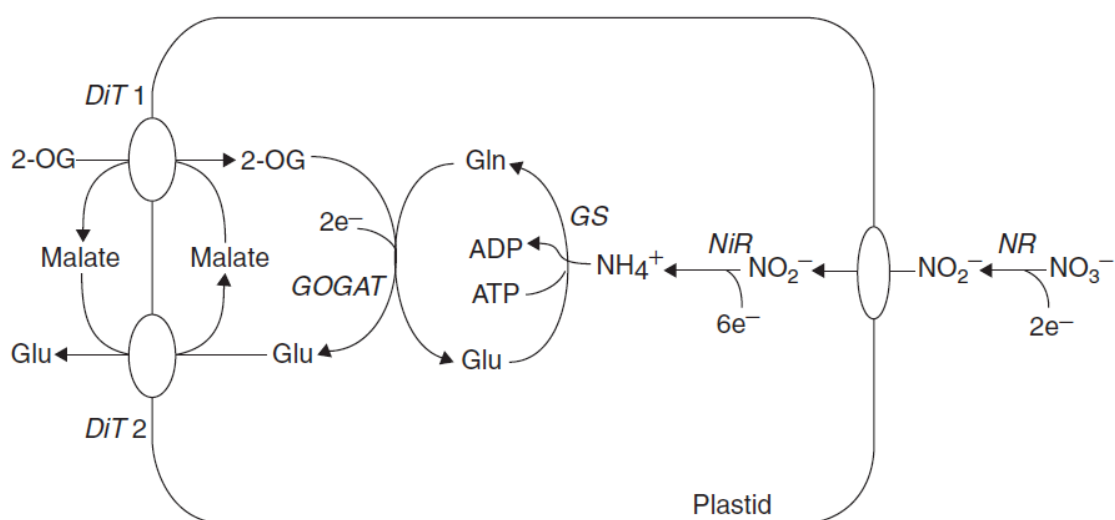
Barotnei pievienotā saharoze sadalās glikozē un fruktozē šūnapvalkā lokalizētā enzīma invertāzes darbības rezultātā. Ir parādīts, ka no invertāzes produktiem atkal sintezējas saharoze un vēlāk – ciete. Šī procesa loma ir neskaidra, iespējams, ka šāds saharozes metabolisms ir augu audu kultūru īpatnība. Tā kā lai heksozes (glikoze un

fruktoze) iesaistītos bioķīmiskajās reakcijās ir nepieciešama to fosforilēšana, šīs reakcijas patērē neorganisko fosfātu, kas arī var negatīvi ietekmēt CO₂ fiksāciju.

Cietes saturs šūnās ietekmē organoģenēzi – piemēram, embriogēnai kultūrai ir raksturīgs lielāks cietes saturs. Līdzīgi, cietes saturs ir lielāks šūnās, no kurām veidojas jaunie auga orgāni. Organoģenēzes procesā ciete tiek izmantota kā enerģijas un C savienojumu avots. Cietes noārdīšanas procesus un izmantošanu enerģijas metabolismā stimulē giberelskābe.

Slāpekļa metabolisms

Augu audu kultūrā slāpekļi var būt pieejami neorganisko (NH₄⁺, NO₃⁻) un organisko (aminoskābes, kazeīna hidrolizāts) savienojumu veidā. Šūnu kultūras heterotrofās barošanas stadijā notiek slāpekļa uzņemšana no organiskajiem savienojumiem. NO₃ asimilācija ir saistīta ar šūnu dalīšanas intensitāti un oglekļa metabolisma reakcijām.



Saistība starp nitrāta asimilāciju plastīdās un oglekļa metabolismu citosolā. NR – nitrāta reduktāze, NiR – nitrīta reduktāze, GS – glutamīna sintāze, GOGAT – glutamāta sintāze, 2-OG – 2-oksoglutarāts (jeb α-ketoglutarāts) (Plaxton, McManus 2006).

Vēl viens process, kurš ir saistīts gan ar oglekļa, gan ar slāpekļa metabolismu, ir oksaloacetāta metabolisms. No oksaloacetāta var sintezēties malāts vai aspartāts. Šo procesu līdzsvars ir atkarīgs no apgaismojuma: gaismā dominē malāta sintēze, citosolā malāts var iesaistīties enerģijas metabolismā (Krebsa ciklā).

Elpošana. *In vitro* kultūrā ir noteikta aktīvāka alternatīvās oksidāzes darbība, nekā augiem *ex vitro*. Iespējams, ka tas ir saistīts ar reakciju uz stresu. Alternatīvā oksidāze katalizē koenzīma Q oksidēšanu un O₂ redukciju par H₂O. Šajā gadījumā neveidojas H⁺ gradients un, līdz ar to, nesintezējas ATF. Otra iespēja ir ka alternatīvā oksidāze palīdz uzturēt elektronu plūsmu, šūnām pārejot no anoksijas apstākļiem uz normālo, oksigenēto vidi.

9.2. Sekundārais metabolisms

Sekundāro metabolītu skaitā ir vielas, kuras pieder vairākām vielu klasēm. Tās parasti iedala pēc vielu ķīmiskās dabas un kopīgā biosintēzes ceļa. Uzskata, ka savienojumu biosintēze notiek vienādi gan veselā augā, gan *in vitro* kultūrā. Daži biosintēzes ceļi tika sākotnēji izpētīti tieši *in vitro* kultūrā un vēlāk pierādīti *ex vitro*. Tomēr tikai dažos gadījumos ir zināmi visi konkrētās vielas biosintēzes ķēdes enzīmi – viens no tādiem piemēriem ir berberīna* sintēze *Coptis japonica* šūnās.

Sekundāros savienojumus sākotnēji uzskatīja par metabolisma blakusproduktiem, bet vēlāk pierādīja to nozīmi aizsardzības reakcijās, kas attaisno lielus enerģijas ieguldījumus šo vielu sintēzē. Aizsardzības funkcija nav vienīgā, jo sekundārie metabolīti vai to sintēzes un noārdīšanas produkti, piedalās arī fizioloģijas pamatprocesos: alkaloidi ir iesaistīti N asimilācijā un transportā, karotinoīdi ir gaismas savācošā kompleksa sastāvā, steroīdi ir membrānu komponenti, fenoli (ubihinons jeb koenzīms Q, pigmenti) var piedalīties primārā metabolisma procesos un arī lignīna biosintēzē.

Atkarībā no savienojumu biosintēzes izejas punkta, izdala piecas sekundāro metabolītu grupas: poliketīdus, izoprenoīdus, alkaloidus, fenilpropanoīdus un flavonoīdus.

Pastāv arī citi sekundāro vielu iedalījumi.

Fenoli – kumarīni, flavonoīdi, hidroksibenzoāti, lignīns, lignāni, tanīni (miecvielas), hinoni.

Izoprenoīdi (jeb terpenoīdi) – mono-, di-, tri-terpenoīdi, seskviterpēni, karotinoīdi, politerpenoīdi.

Specifiskie slāpekļa metabolīti, kuri ietver aminoskābes, kuras neietilpst proteīnu sastāvā, alkaloidus, amīnus u.c., kā arī glikozinolātus (sēru saturošie savienojumi, kuri sintezējas no glikozes un noteiktām aminoskābēm) un cianogēnos glikozīdus.

Kā atsevišķu grupu bieži izdala glikozīdus. Glikozīdi sastāv no glikozes un aglikona daļas, kuru var veidot dažādi mazmolekulārie savienojumi – steroīdi, cianīds, flavonoīdi, saponīni, spirti un daudzas citas vielas. Abas daļas saista īpaša glikozīdsaitē. **Glikozīdus var veidot arī fitohormoni – šādā veidā tie var būt inaktivēti.**

Pirmo ziņojumu par sekundārā savienojuma (kaučuka) sintēzi hevejas šūnu kultūrā 1940. gadā publicēja Džeimss Bonners. Pētījumu līmenī ir bijusi pierādīta iespēja panākt gandrīz visu grupu sekundāro savienojumu sintēzi šūnu/audu kultūrā. Taču joprojām vajadzīgo savienojumu sintēze audu kultūrās ne vienmēr ir iespējama praktiski un lielos apjomos (vai nav ekonomiski izdevīga). Viena no nopietnākām problēmām ir sekundāro savienojumu sintēzes kontroles stratēģija – ņemot vērā to, cik dažādos līmeņos notiek pat vienas klases savienojumu sintēzes regulācija, iespējams, katra auga gadījums jāizskata individuāli. Jo sarežģītāks ir konkrētās vielas biosintēzes ceļš un jo vairāk tajā ir atsevišķu posmu, jo grūtāk ir panākt šī savienojuma sintēzi audu kultūrā.

Sekundāro savienojumu sintēzi ietekmē šūnu diferenciācijas pakāpe un kultūras augšanas (šūnu dalīšanās) ātrums. Sekundārie savienojumi biežāk uzkrājas šūnu kultūras augšanas stacionārajā fāzē. Ir gadījumi, kad sintēze notiek tikai veidojoties noteiktām morfoloģiskām struktūrām. Atkarībā no vielu grupas, savienojumu sintēze

* *berberīns* - izohinolīna grupas alkaloids ar pretiekaisuma un antidiabētiskām īpašībām, to izmanto pret sēņu infekcijām.

var būt vairāk vai mazāk stabila – stabilāka ir glikozīdu, nestabila – alkaloīdu biosintēze.

Ir gadījumi, kad audu kultūrā notiek sintezēto vielu spektra paplašināšanās un šūnas sintezē pat vielas, kuras nesintezē mātes augs. Dažreiz tās ir vielas, kuras ir raksturīgas auga juvenilai formai, citos gadījumos tie var būt savienojumi, kuri ir raksturīgi filoģenētiski senākām augu grupām.

Eksplanta ģenētiskās īpašības. Nav viennozīmīgas sakarības sarp konkrētā savienojuma sintēzi mātes augā un kultūrā, kura ir uzsākta no šī mātes auga iegūtā eksplanta. Dažos gadījumos šāda sakarība ir aprakstīta – piemēram, *Catharantus roseus* augiem. Citos gadījumos, piemēram eksplantos, kuri ir iegūti no izogēnās *Papaver somniferum* augu līnijas, sekundāro savienojumu sintēze audu kultūrā atšķirās gan kvalitatīvi, gan kvantitatīvi.

Epiģenētiskā regulācija eksplantā. Konkrēto vielu sintēze var būt regulēta epiģenētiski. Piemēram, vielas var sintezēties tikai kultūrās, kuras ir iegūtas no noteiktiem mātes augu audiem. Tā, podofilotiksīns sintezējas šūnu kultūrā, kura ir iegūta no saknes, bet ne kultūrā, kura ir iegūta no stublāja. Tomēr biežāk šūnas ir totipotentas sekundāro savienojumu sintēzes ziņā.

Šūnu populācijas ģenētika. Šūnu kultūra var būt ģenētiski heterogēna – to izraisa gan sākotnējā eksplanta šūnu heterogenitāte, gan somaklonālā mainība. Šī īpašība ļauj atlasīt šūnas ar paaugstinātu vajadzīgo vielu sintēzi un kultivēt šīs šūnu līnijas. Tomēr ir gadījumi, kad vielu sintēze šūnu līnijās ir nestabila. Lai panāktu vēlamu efektu ir iespējams izmantot inducēto mutāģenēzi.

Šūnu populācijas fizioloģiju ietekmējošie faktori.

- a. Barotnes sastāvs. Sekundāro savienojumu sintēzi ietekmē minerālvielu, ogļhidrātu, fitohormonu un citu piedevu saturs barotnē. No ogļhidrātiem vislielākā ietekme ir ir saharozei. No minerālelementiem ir ļoti būtisks fosfora, kālija un slāpekļa saturs. Liela P koncentrācija sekmē kultūras augšanu, turpretī daudzu sekundāro savienojumu (fenolu, antociānu) sintēze ir aktīvāka tad, kad fosfora resursi barotnē ir izsmelti. Tomēr ir gadījumi, kad alkaloīdu vai citu vielu sintēzi stimulēja augsts P saturs. Sekundāro savienojumu sintēzi veicina neorganiskais N (nitrāts), bet N organiskās formas – kavē. Fitohormonu ietekme atšķiras atkarībā no sekundāro savienojumu klases, kultūras fizioloģiskā stāvokļa un audzēšanas apstākļiem. Var būt nozīme tam, kādu vielu ar fitohormonu aktivitāti izmanto kultūrā – piemēram, konkrētās vielas sintēzi veicina IES un NES, bet kavē 2,4-D un otrādi. Var būt nozīmīgs arī barotnes pH. Vajadzīgo vielu prekursoru* pievienošana barotnei sniedz pretrunīgus rezultātus un, visticamāk, ir atkarīga no vielas klases un tās biosintēzes ceļa īpatnībām.
- b. Fizikālie faktori. Sintēzei var būt nepieciešama intensīva aerācija un noteikts O₂/CO₂ līdzsvars. Ir gadījumi, kad noteiktas vielas sintēzei ir diezgan šaurs piemērotās temperatūras intervāls – piemēram, nikotīna sintēze tabakas šūnu kultūrā optimāli notiek 27 °C temperatūrā. Daudzi pētījumi ir veltīti gaismas ietekmei. Antociānu sintēzi inducē gaisma, ir svarīgs arī gaismas spektrālais sastāvs. *Ginkgo biloba* un *Crataegus* sugu šūnu un kallusu kultūrā proantociānu un katehīnu sintēze notiek tikai gaismā. Gaisma var mainīt sintezēto vielu kvalitatīvo sastāvu. Tomēr ir gadījumi, kad apgaismojums samazina konkrēto vielu sintēzi –

* 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)

tā, hiosciamīna un skopolamīna (alkaloīdi) sintēze *Datura* šūnu kultūrā notiek tikai tumsā. Gaisma var samazināt arī citu alkaloīdu sintēzi.

Regulēt sekundāro savienojumu sintēzi šūnu vai audu/orgānu kultūrā tieši ietekmējot biosintēzes posmus ir sarežģīti, tāpēc ir jāņem vērā šo savienojumu funkciju šūnās un visā auga organismā. Šūnu kultūrā bieži veicot atlasas (pasāžas) dod priekšroku šūnām, kuras visātrāk aug un dalās. Tas ietekmē šūnu kultūras metabolismu – tas ir vērsts uz augšanu un vairošanos, un galvenokārt tiek veicinātas primārā metabolisma reakcijas. **Sekundāro savienojumu sintēzes veicināšanas stratēģijas ietver kultūras augšanas intensitātes samazināšanu, nespecifisko stresa faktoru ietekmi, specifisko aizsardzības reakciju inducējošo vielu (elisitoru) un signālmolekulu ietekmi, šūnu diferenciācijas virziena regulēšanu.**

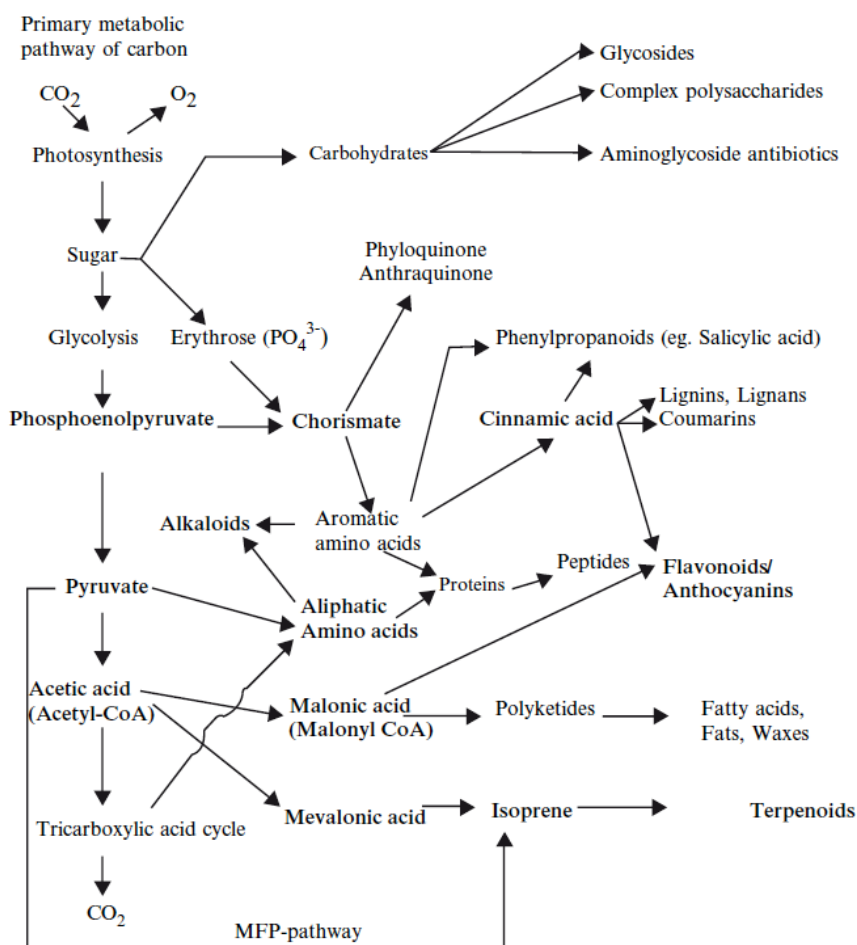


Fig. 10.2 Major pathways of biosynthesis of secondary metabolites, viz. polyketides, isoprenoids (e.g., terpenoids), alkaloids, phenylpropanoids, and flavonoids (after Verpoorte 2000)

Plant Cell and Tissue Culture - A Tool in Biotechnology. 2009. Springer-Verlag
 Plaxton W.C., McManus M.T. (eds.) Control of Primary Metabolism in Plants. 2006.
 Berger S., Sinha A.K., Roitsch T. 2007. Plant physiology meets phytopathology: plant primary metabolism and plant-pathogen interactions. Journal of Experimental Botany 58:4019-4026.
 Sekundāro savienojumu sintēzes regulācija augu šūnu kultūrā. Nosov A.M. 1991. (Kr. val.)