INDUKCE TVORBY MIKROHLÍZEK BRAMBORU *IN VITRO*

TUBERIZACE BRAMBOR (*Solanum tuberosum*)

Tuberizace je morfogenetický proces přeměny stonku v zásobní hlízu. Hlíza je metamorfovaný stonek (oddenek). Tuberizace je sezónní vývojový jev regulovaný fotoperiodou a fytohormony. Se zkrácením délky světla klesá v lodyhách obsah giberelinů a je inhibován dlouživý růst. Fytohormonem indukujícím tvorbu hlíz je kyselina tuberonová. Procesu se však patrně účastní i cytokininy a kyselina abscisová. Tyto se podílejí na změně transportních procesů (v relaci zdroj-sink). Dospělé rostliny translokují fotosyntáty a z nich vytvořené zásobní látky do podzemní části rostliny. Na indukci procesu se podílí i vnější podmínky - vlhké prostředí umožňuje metamorfózu stonku v hlízu. Celý proces tuberizace probíhá ve třech etapách:

1, stolonizace - indukce a horizontální růst oddenků (je spojený s dlouživým růstem bez větvení, a tudíž s uplatněním apikální dominance),

2, inhibice růstu stolonů - uplatňuje se krátký den a pokles obsahu GA,

3, indukce a iniciace růstu hlíz - je spojena s aktivací apikálního meristému stonku a radiálním dělením jeho iniciál, zde se uplatňuje vliv cytokininů a ABA.

FAKTORY OVLIVŇUJÍCÍ TVORBU HLÍZ

indukující faktory	inhibující faktory
nízká teplota	vysoká teplota
krátký den	dlouhý den
nízký přísun dusíku	vysoký přísun dusíku
sacharidy	
ABA (kyselina abscisová)	gibereliny
kyselina jasmonová	etylén (později inhibuje)
IAA (kyselina indolyl-3-octová)	
kyselina tuberonová	
cytokininy	
etylén (na počátku)	

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

HORMONÁLNÍ REGULACE TVORBY HLÍZ

Tvorba hlíz je regulována v různých etapách různými fytohormony. Úloha endogenních regulací vytváří komplex, v němž se mění poměr jednotlivých fytohormonů. Iniciace tuberizace je spojována s **kyselinou jasmonovou** (ta byla izolována z listů brambor) a tuberonovou, dále s ABA, cytokininy a s uvolňováním etylénu v období iniciace hlíz. K vlastní iniciaci tvorby hlíz dochází pod vlivem zkrácení fotoperiody – to jsou podmínky, kdy se v listech hydroxyluje kyselina jasmonová (tuberonová kyselina) a translokuje se do kořenů kde indukuje stolonizaci a tvorbu hlíz. Endogenní ABA a cytokininy regulují transport látek v procesu tuberizace. Exogenní aplikace ABA, CEPA, cytokininů rovněž stimulují tvorbu hlíz, významný je však také vliv koncentrace a správné období aplikace. Velmi významná je role etylénu, který může stimulovat v nízkých koncentracích zvláště na počátku tuberizaci. Později etylén tvorbu hlíz inhibuje. Cytokininy a gibereliny se patrně účastní regulace aktivity cytoskeletu při metamorfóze (morfogenezi) stolonu v hlízu.

DUSÍKATÁ VÝŽIVA A TUBERIZACE

Hormonální regulace tvorby hlíz *in vivo* je nedílně spojena s vlivem vnějších faktorů, především s alokací živin a minerálních látek. Je známo, že zvýšené množství či příjem nitrátů vede ke zvýšení obsahu endogenních cytokininů a snížení obsahu ABA a tím ke zkrácení dormance, klíčení či **prodloužení vegetativního růstu**. Naopak snížené množství nitrátů a zvýšení obsahu ABA za současného snížení obsahu cytokininů vede obecně v rostlinách k **přechodu ke kvetení, indukci tvorby hlíz** a zásobních orgánů, eventuelně k dormanci. Tatáž situace nastává při zvýšeném množství amidického dusíku (současně se snižuje obsah cytokininů a zvyšuje se obsah ABA), který je výsledkem redukce nitrátů. Amoniakální ionty stimulují aktivitu ABA-aldehydoxidázy (zvyšuje se obsah ABA).

V průběhu indukce tvorby hlíz vedou tyto interakce k supresi vegetativního růstu a k přesměrování transportu fotosyntátů a ke změnám v relacích zdroj a sink. Nové významné sinky představují indukované a rostoucí hlízy. V průběhu růstu hlíz se interakce amidického dusíku a ABA podílí na menším výnosu hlíz a jejich vyšší kvalitě, přičemž dusičnany s cytokininy zvyšují výnos hlíz, ale snižují jejich kvalitu.

Praktické otázky regulace těchto interakcí vycházejí z potřeby produkce zdravé a vitální bramborové sadby. Taková sadba má své technologické parametry (limitující poškození mechanické a napadení chorobami, energie klíčení aj.), které souvisejí už od období indukce tvorby hlíz a jejich růstu až do fyziologické (sklizňové) zralosti s hormonálními a metabolickými interakcemi.

IN VITRO TVORBA MIKROHLÍZEK

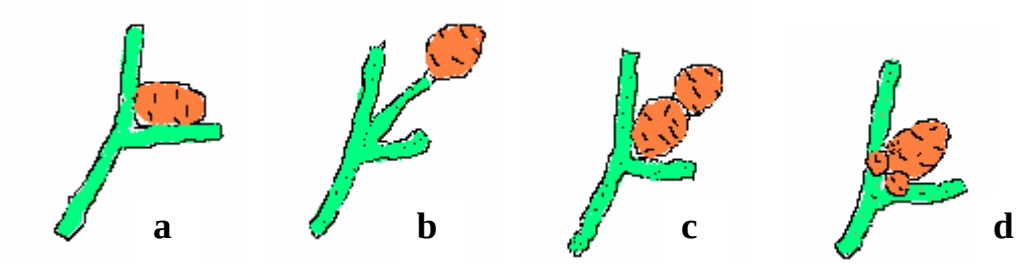
Při respektování výše uvedených faktorů je možno v *in vitro* kultuře indukovat tvorbu mikrohlízek. V množitelské praxi tento přístup mnohdy slouží k produkci

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

dostatečného množství viruprosté předsadby. Jedním z problémů je tvarová a fyziologická vyzrálost mikrohlízek a většinou dlouhá a nevyrovnaná dormance. Proces tvorby a růstu hlízky je dlouhodobý (několik měsíců). Mikrohlízky dorůstají velikosti 1 - 2 cm. Tvoří se:

- přímo v úžlabí řapíků jako axilární mikrohlízky (a),
- terminálně na stolonech v úžlabí řapíků (b),
- sekundárně na apikálním pólu mikrohlízky (c),
- seriálně jako sekundární axilární m ikrohlízky (d).

Typy mikrohlízek v in vitro kultuře bramboru



KULTIVAČNÍ PODMÍNKY A SLOŽENÍ MÉDIA

K indukci tvorby mikrohlízek se používají jednonodální segmenty lodyžek bramboru. Sterilní lodyžky bramboru byly kultivovány na médiu MS (Murashige and Skoog 1962) při trvalém osvětlení. Pro vlastní tvorbu mikrohlízek je nutné jednonodální segmenty kultivovat na modifikovaném médiu obsahujícím **vyšší koncentraci sacharózy a cytokininy**, resp. kyselinu abscisovou. Po 10 až 14 dnech kultivace na **fotoperiodě 8/16** (8 hod. světla a 16 hod. tmy) při teplotě do 20 ^{o}C je vhodné pravidelně odvětrávat etylén (sterilně ve flow-boxu).

Složení základního média MS (mg/l):

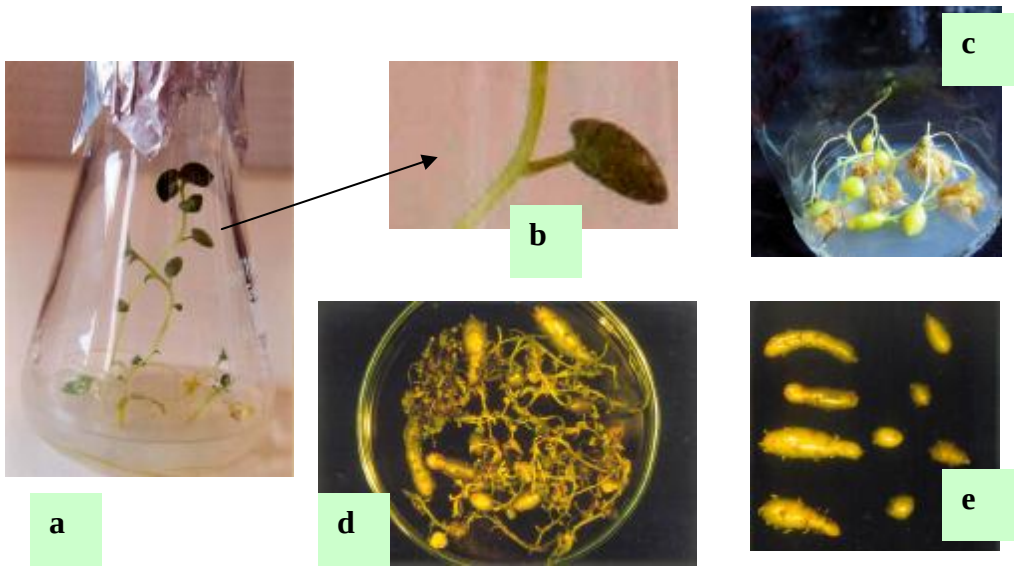
makroelementy		mikroelementy		chelát železa		organické látky	
NH_4NO_3	1650	H_3BO_3	6,2	Na_2EDTA	37,3	myo-inositol	100
$CaCl_2.2H_2O$	440	$ZnSO_4.7H_2O$	8,6	$FeSO_4.7H_2O$	27,8	thiamin-HCl	0,1
$MgSO_4.7H_2O$	370	$CuSO_4.5H_2O$	0,025			nikotinová kys.	0,5
KNO_3	1900	$CoCl_2.6H_2O$	0,025			pyridoxin-HCl	0,5
KH_2PO_4	170	$MnSO_4.4H_2O$	22,3			glycin	2
		$Na_2MoO_4.2H_2O$	0,25				
		KJ	0,83				

Živné médium obsahuje 30 g sacharózy, 8 g agaru (vše na litr média) a pH média je 5,8.

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

Pro indukci tvorby mikrohlízek je nutné do stejného média dát 80 g sacharózy a 10 mg BA (benzyladenin).

FOTODOKUMENTACE



a – sterilně předpěstované rostliny, b – jednonodální segment, c – mikrohlízky stáří několika týdnů, d + e – fyziologicky zralé mikrohlízky nastupující do dormance

Praktické provedení úlohy

1. Experimentální záměr a pokusné varianty

Cílem úlohy je sledovat vliv faktorů indukujících tvorbu mikrohlízek za využití explantátové techniky. Úloha vhodně demonstruje vývojový proces a je možno ji hodnotit nejen kvalitativně, ale i kvantitativně (za předpokladu pečlivého založení kultury, beze ztrát způsobených kontaminací při manipulaci ve flow-boxu). Modifikací složení kultivačního MS média bylo vytvořeno více pokusných variant při stejných podmínkách fotoperiody a teploty. Modifikace byla zaměřena na změnu obsahu solí dusíku oproti kontrole (klasické indukční médium).

Na základě modifikací média byly vytvořeny následující varianty:

- 1: MS médium + sacharóza 80 g/l + 10 mg/l BAP,
- 2: MS médium + sacharóza 80 g/l + 10 mg/l BAP, avšak snížený obsah dusíku v médiu 1

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

- 3: MS médium + sacharóza 80 g/l + 10 mg/l BAP, avšak zvýšený obsah dusíku v médiu 1

Poznámky k přípravě modifikovaných médií (připravuje technik následovně):

médium 2 – snížený dusík – koncentrát A_1 → F_1 + 0,134 g/l $(NH_4)_2SO_4$, zbytek MS

médium 3 – zvýšený dusík – MS koncentráty + 1,9 g/l KNO_3

2. Pracovní postup ve flow-boxu

Úkol: Ze sterilně předpěstovaných rostlin nastříhat ve flow-boxu jednonodální segmenty a přenést do kultivačních nádob (dle variant), 4 - 5 segmentů na baňku, vpichovat stonkem do média

Zásady sterilní práce:

- pročíst si a uvědomit bezpečnost práce ve flow-boxu
- pracovat s vyhrnutými rukávy, ruce omýt teplou vodou a mýdlem, osušit a desinfikovat lihem až po lokte
- žádné materiály a nástroje nevytahovat z flow-boxu, dodržovat sterilitu
- nenaklánět do flow-boxu hlavu, nemluvit, pracovní prostor (pro manipulaci s nástroji) mít volný, nezastavěný kultivačními nádobami
- jemnou motoriku rukou přizpůsobit tak, aby hrdla kultivačních nádob směřovala vždy k filtru (nikoliv ven z flow-boxu)
- nástroje pravidelně desinfikovat v lihu a sterilizovat nad kahanem, čistit lihem a buničinou pracovní desku, hrdla skleněných kultivačních nádob opalovat nad kahanem

1. vysterilizovat nástroje a dát je vychladnout
2. nastříhat ve sterilní nádobce jednonodové segmenty
3. přenést a zapíchnout do agaru v kultivační nádobce
4. opálit (sterilizovat) hrdla kultivačních nádob – jsou-li skleněné
5. nádobky uzavřít, popsat jménem
6. nástroje vrátit do nádobky s lihem, uklidit pracovní desku flow-boxu

Poznámky k bezpečnosti práce ve flow-boxu:

1. Nástroje jsou uloženy ve skleničce bez lihu.
2. Nástroje se ponoří do lihu a opálí nad plamenem. (Hořící nástroje nelze v žádném případě odložit do skleničky s lihem!)
3. Je nutné dbát na to, aby se sklenička s lihem nepřevrhla.
4. Hořící skleničku s lihem překrýt skleněnou Petriho miskou. (Nástroje z hořící skleničky vytáhnout pomocí pinzety, dlouhých nůžek apod. a odložit na Petriho misku. Nádobku s lihem opět překrýt miskou.)
5. Hořící líh na pracovní desce překrýt mokrou utěrkou, ručníkem, apod.

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

3. Kultivace a hodnocení výsledků

Každý týden hodnotit frekvenci (%) tvorby mikrohlízek *in vitro* v jednotlivých variantách a v jednotlivých kultivačních nádobách. Prohlížet nádoby z důvodů eventuální kontaminace (možnost převedení nekontaminovaných explantátů do nové kultivační nádoby). Po 3 – 4 týdnech pravidelně odvětrávat etylén (eventuální pasáže a odvětrávání etylénu provádí technik). Po 13 týdnech hodnotit počet mikrohlízek, jejich průměrnou velikost a čerstvou hmotnost pro jednotlivé varianty.

každé cvičení hodnotit:

- počet mikrohlízek - Σ jednotlivých mikrohlízek na variantu
- frekvence tvorby mikrohlízek - % vytvořených mikrohlízek vzhledem k původnímu počtu jednonodálních segmentů ve variantě
- % kultivačních nádob v nichž došlo ke tvorbě alespoň jedné mikrohlízky (odpověď na etylén a plynné složení kultivační nádoby)

Příklad tabulky pro záznam frekvence tvorby mikrohlízek (%)

frekvence indukce tvorby hlíz in vitro

jaro 2005	4 týdny	5 týdnů	6 týdnů	7 týdnů	8 týdnů	9 týdnů
kontrola 1						
snížený dusík 2						
zýšenýdusík 3						

Příklad tabulky pro záznam % ***kultivačních nádob v nichž vznikly hlízky***

vliv etylénu na frekvenci indukce hlízek

jaro 2005	4 týdny	5 týdnů	6 týdnů	7 týdnů	8 týdnů	9 týdnů
kontrola 1						
snížený dusík 2						
zýšenýdusík 3						

Zpracování výsledků a vypracování protokolu

V protokolu budou uvedena data měření (% frekvence tvorby hlíz, % kultivačních nádob v nichž vznikly hlízky). Dále budou vypočteny průměrné hmotnosti hlízek a jejich střední chyby pro jednotlivé varianty. Celá skupina vypracuje jediný protokol.

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz