INDUKCE ORGANOGENEZE *IN VITRO* NA EXPLANTÁTECH LISTU

MORFOGENEZE *IN VITRO*

Morfogeneze je vývojový proces vytváření organizovaných struktur. Je determinována **diferenciací** tj. tvarovou a funkční specializací buněk a pletiv. Morfogeneze *in vivo* i morfogeneze *in vitro* je provázena řadou fyziologických aspektů jako je např. totipotence, již zmíněná diferenciace, polarita, apoptóza a regenerace. Pod **totipotencí** rozumíme schopnost exprese celé genetické informace nutné k růstu a vývoji buňky. Totipotentní buňky vykazují schopnost regenerovat v kompletní diferencovanou životaschopnou rostlinu. Zvláště přesvědčivým příkladem totipotence je monohistantní regenerace pupenu u africké fialky (*Saintpaulia ionantha).* **Regenerací** rozumíme schopnost obnovení porušené celistvosti rostliny. V přenesené slova smyslu je pojem regenerace mnohdy používán právě jako synonymum pro morfogenezi *in vitro*. **Apoptóza** je morfologickým projevem programované smrti buněk (tj. geneticky kódované), neboť některé buňky jsou funkční až např. po vymizení protoplastu. Mezi procesy morfogeneze řadíme somatickou embryogenezi a organogenezi.

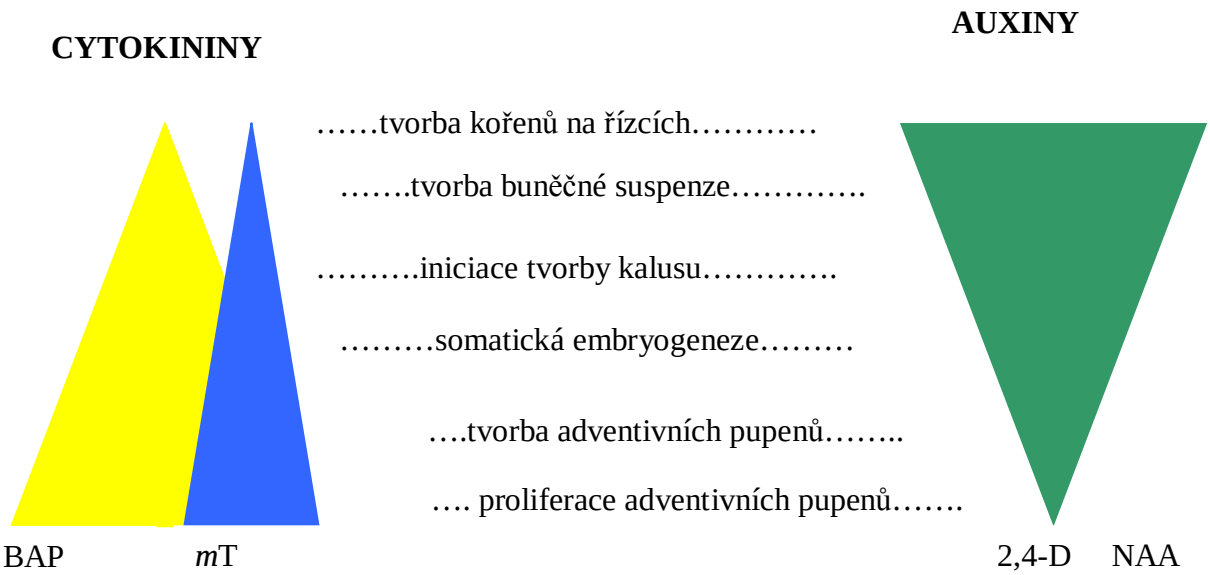
RŮSTOVÉ REGULÁTORY V MORFOGENEZI *IN VITRO*

Tak jako v intaktních rostlinách regulují vývojové procesy fytohormony, tak v **explantátech** (izolované asepticky kultivované části rostlin) mají výrazný podíl na jejich dalším vývoji či dediferenciaci růstové regulátory přijímané z kultivačního média, případně také endogenní fytohormony. Mnohdy závisí na kombinaci a koncentraci r. r. a na délce jejich působení. Všeobecně platí, že auxiny podporují tvorbu kořenů, kalusu, buněčných suspenzí, cytokininy tvorbu prýtů, abscisová kyselina vývoj a zrání embryí. Tato platnost však není univerzální, neboť i *in vitro* působí růstové regulátory pleiotropně.

Růstové regulátory (obecně myšleno exogenně aplikované růstové regulátory) či endogenní fytohormony se v morfogenezi (také v morfogenezi *in vitro*) podílejí na přenosu signálu vedoucího k dělení buněk a tím k indukci růstového či morfogenního procesu. Primární signální molekulou, která musí být rozpoznána receptorem v buňce je růstový regulátor. Toto rozpoznání signálu vede ke kaskádě dějů (tzv. signální dráha) aktivující geny a proteiny jejichž výsledkem jsou pak probíhající fyziologické procesy růstu, vývoje a diferenciace buněk.

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

Poměr auxinů vůči v indukci procesů diferenciace a dediferenciace cytokininům

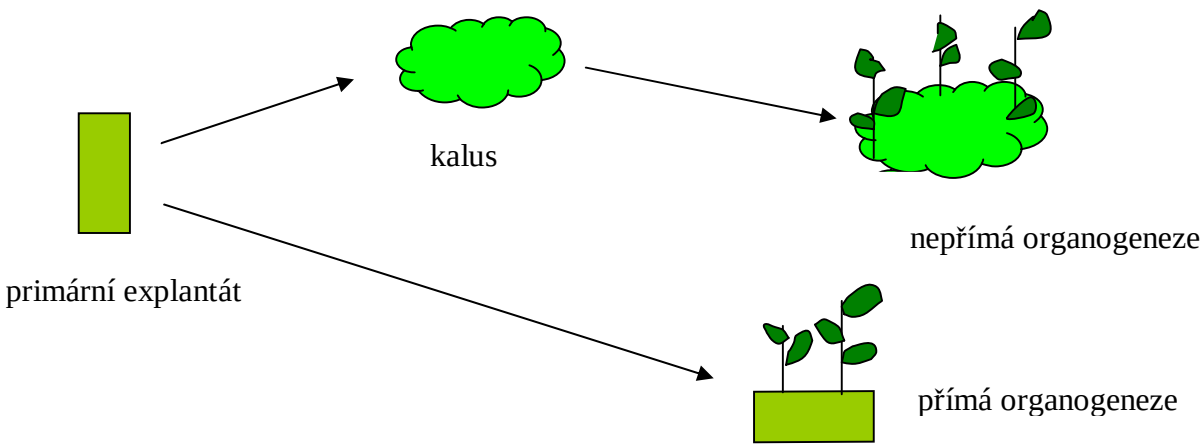


ORGANOGENEZE A SOMATICKÁ EMBRYOGENEZE

Somatická embryogeneze je vznik embrya ze somatické (2n diploidní) buňky explantátu (nikoli zygoty), přičemž vývojové fáze somatického embrya jsou obdobné s vývojovými fázemi embryí vzniklých ze zygoty. **Organogeneze** je proces diferenciace orgánů - kořenů, prýtů aj. Probíhají-li dva výše zmíněné procesy přímo na primárním explantátu mluvíme o organogenezi či somatické embryogenezi přímé, předbíhá-li však těmto procesům nejdříve tvorba kalusu na primárním explantátu a pak teprve organogeneze nebo tvorba embryí jsou to procesy nepřímé.

Nepřímé procesy organogeneze a somatická embryogeneze jsou provázeny tvorbou kalusu. **Kalus *in vitro*** chápeme jako heterogenní systém diferencovaných a nediferencovaných buněk, vytvářejících amorfní strukturu bez prostorové orientace a bez polarity. Vzniká **dediferenciací** což je opak vývojového procesu - reverze diferencovaných buněk do meristematického stavu. Buňky tak ztrácejí svou funkční specializaci a mohou nabývat schopnosti dělení. Procesy dediferenciace jsou provázeny genetickými změnami v komplexu nazvanými **somaklonální variabilita**. Ta představuje genovou nestabilitu, štěpitelnost znaků aj. Využívá se jí např. ve šlechtění pro rozšíření genetické variability.

Schéma přímé a nepřímé organogeneze prýtu ze segmentu listu



PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

RŮSTOVÉ REGULÁTORY V INDUKCI ORGANOGENEZE

Proces organogeneze je dán poměrem auxinů a cytokininů v kultivačním médiu. Organogeneze kořenů je všeobecně indukována vyšším obsahem auxinů v kultivačním médiu a organogeneze prýtů vyšším obsahem cytokininů. Z auxinů se nejčastěji používá syntetických látek: 2,4-D (2,4-dichlorfenoxyoctová kyselina), NAA - 1-naftyloctová kyselina, z přirozených IBA (indolyl-3-máselná kyselina) méně IAA (indolyl-3-octová kyselina). Z cytokininů se používají syntetický kinetin (furfurylaminopurin) a thidiazuron (derivát difenylmočoviny), z přirozených BAP (6-benzylaminopurin), 2iP (izopentenyladenin) či vysoce fyziologicky aktivní *m*T (*meta*-topolin).

MORFOGENEZE *IN VITRO* V BIOTECHNOLOGIÍCH

Šlechtitelská praxe, zemědělské a zahradnické podniky, četné výzkumné ústavy aj. organizace využívají morfogeneze *in vitro* v mnoha podobách od mikropropagace (tj. množení materiálu *in vitro*) za účelem produkce sadbového materiálu, přes záchranu genofondu až ke studiu diferenciačních pochodů.

Klasická mikropropagace mnohdy vychází přímo z kultur meristémů, kdy následujícím krokem je indukce tvorby prýtů (médium obsahující cytokinin) a teprve potom jsou prýtky separovány a zakořeňovány na médiu obsahujícím auxin. Tento postup se využívá tam, kde je ekonomicky výhodný, kde je množený materiál obtížně udržovatelný, kde je rychlá produkce takového materiálu apod.

Praktické provedení úlohy

1. Experimentální záměr a pokusné varianty

Cílem úlohy je navodit indukci organogeneze *in vitro*. Úloha vhodně demonstruje totipotenci rostlinných buněk, vývojový i růstový proces. Z narostlých regenerantů je možno dopěstovat květuschopné rostliny po *ex vitro* převodu do semisterilních a posléze nesterilních podmínek. Studenti mohou sledovat indukci organogeneze na 3 různých rostlinných materiálech – tabák, petunie a rulík.

2. Pracovní postup ve flow-boxu

Úkol: Ze sterilně předpěstovaných rostlin nastříhat ve flow-boxu segmenty z listových čepelí ve velikosti 5 x 5 mm, tyto umístit celou plochou segmentu styčně s indukčním médiem, počet segmentů na baňku cca 4 – 5. Kvantitativně vyhodnotit regeneraci, eventuelně zvážit přírůstky čerstvé hmotnosti (tj. i hmotnost vychozích, nesterilně připravených segmentů).

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz

1. Z listových čepelí sterilně předpěstovaných rostlin nastříhat ve flow-boxu segmenty a přenést do kultivačních nádob, 4 - 5 segmentů na baňku (provést sterilně). Nesterilně zvážit hmotnost 4 – 5 obdobných segmentů. Každý student zakládá 2 baňky, tj. libovolně ze dvou druhů rostlinného materiálu.

(Poznámka: principy bezpečné sterilní práce ve flow-boxu, včetně správného založení kultury jsou uvedeny v úloze č. 14)

2. Druhý týden vytřídit případné kontaminace, hodnotit charakter procesu a případnou frekvenci regenerantů

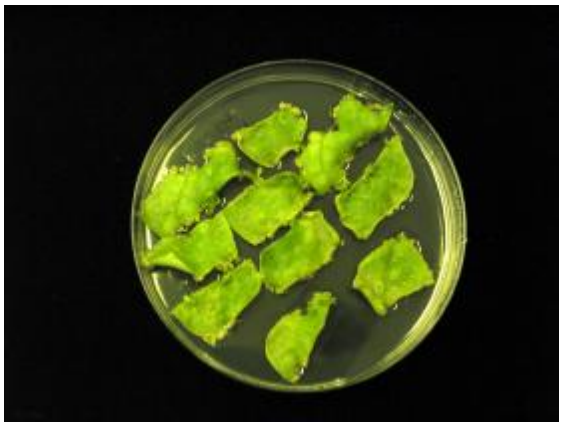
3. Po 2 až 4 týdnech kultury hodnotit sušinu a čerstvou hmotnost.

3. Kultivační podmínky

K indukci organogeneze listů lze použít MS (Murashige-Skoog 1962) médium s obsahem 0,18 $mg.l^{-1}$ NAA a 1,5 $mg.l^{-1}$ BAP. Živné médium obsahuje 30 g sacharózy, 8 g agaru a pH média je 5,8. Organogeneze bude indukována při trvalém osvětlení a teplotě 25 ^{O}C.

(Poznámka: složení MS média z hlediska obsahu makroelementů, mikroelementů, včetně vitamínů a aminokyselin je uvedeno v úloze č. 14)

4. Fotodokumentace





Zpracování protokolu

V protokolu budou uvedena data měření (frekvence regenerace a tvorby kalusu v % a čerstvá hmotnost v g na počátku (v den založení) a po 4 týdnech. Dále bude zaznamenáno srovnání regenerační schopnosti třech různých druhů. Každá dvojice studentů vypracuje protokol.

PDF vytvořeno zkušební verzí pdfFactory www.fineprint.cz