

Cvičení z fyziologie rostlin

Organogeneze *in vitro*

Teoretický úvod

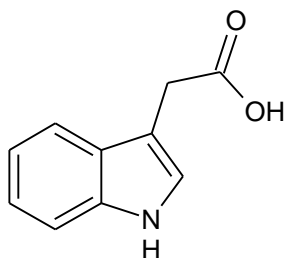
Fyziologické procesy v rostlinách jsou řízeny různorodými nízkomolekulárními látkami, které jsou na základě účinné koncentrace děleny na dvě skupiny: **rostlinné hormony** (fytohormony) působící ve velmi nízkých koncentracích (10^{-6} až 10^{-9} M) a **růstové regulátory**, jejichž účinek se projeví při vyšších koncentracích (od 10^{-5} M). Obě skupiny regulují například růst a vývoj rostlin, diferenciaci buněk a pletiv, vývoj orgánů, pohyby stomat, reakce na vnější podmínky, biotický a abiotický stres. Mezi rostlinné hormony patří auxiny, cytokininy, gibbereliny, kyselina abscisová, ethylen a strigolaktony. Mezi látky s regulační aktivitou náleží brassinosteroidy, jasmonáty, kyselina salicylová, polyaminy, oligosacharidy a fenolické látky. Růstové a vývojové procesy v rostlinách jsou navzájem propojeny a jsou ovlivňovány vzájemným působením fytohormonů a látek s regulační funkcí.

Cytokininy a auxiny jsou zásadní pro životaschopnost rostlin. V našem cvičení se budeme věnovat organogenezi rostlin *in vitro* a budeme sledovat vliv cytokininů a auxinů na vývoj rostlinných orgánů.

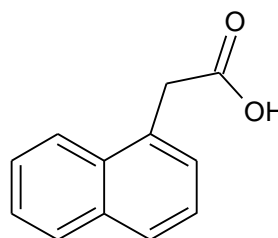
Auxiny

Kyselina indol-3-octová (IAA, indole-3-acetic acid) a kyselina indol-3-máselná (IBA, indole-3-butyric acid) jsou přirozeně se vyskytující auxiny v rostlinách. Příkladem syntetických auxinů jsou kyselina naftyloctová (NAA, 1-naphtaleneacetic acid) nebo kyselina 2,4-dichlorfenoxyoctová (2,4-D).

Syntéza auxinů probíhá především v buňkách stonkového a kořenového apikálního meristému, odkud jsou vzniklé auxiny transportovány polárně, podle polohy specifických transportních proteinů. Tímto způsobem se vytváří auxinový gradient v kořeni. Auxiny ovlivňují prodlužování buněk a dělení buněk kalusu (v přítomnosti cytokininů). Stimulují diferenciaci vodivých pletiv z prokambia, aktivují kambium, růst plodů, vývoj embrya, zakládání laterálních i adventivních kořenů a udržují apikální dominanci. Auxiny regulují růst rostliny v reakci na vnější podněty - tropismy (např. gravitropismus, fototropismus).



IAA

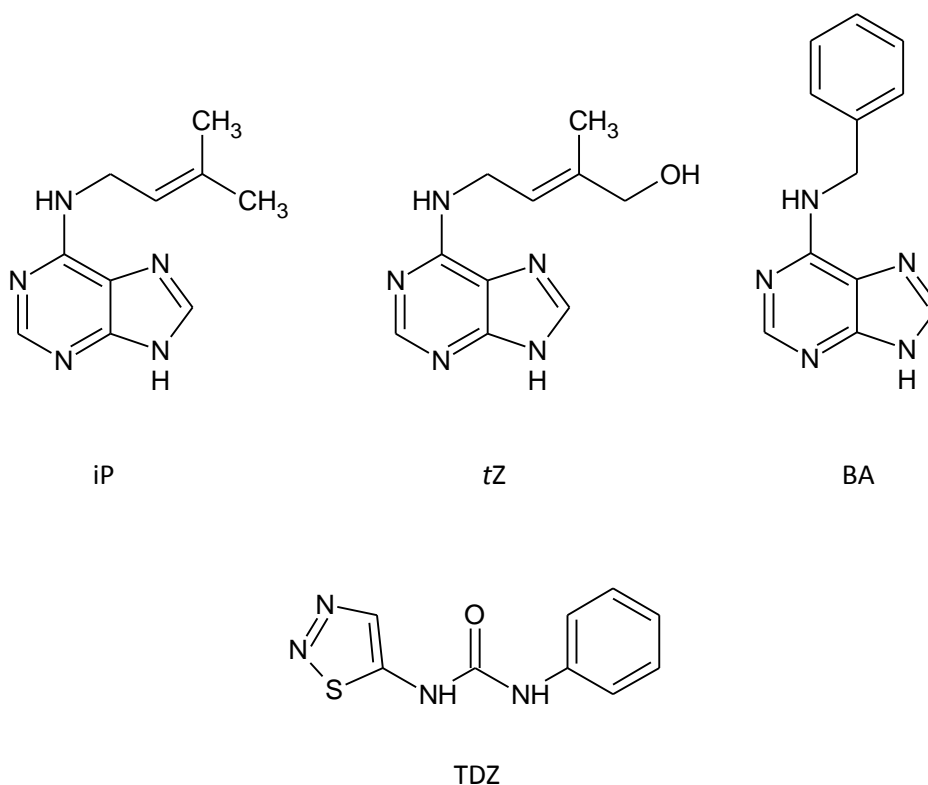


NAA

Cytokininy

Přírodně se vyskytující cytokininy v rostlinách jsou N^6 -substituované deriváty adeninu. V závislosti na typu postranního řetězce se dělí na isoprenoidní a aromatické. Nejčastějšími isoprenoidními cytokininy jsou *trans*-zeatin [*tZ*, *trans*-6-(4-hydroxy-3-methylbut-2-enylamino)purin], *cis*-zeatin (*cZ*) a N^6 -(Δ^2 -isopentenyl)adenin (*iP*). Z aromatických cytokininů se v rostlinách vyskytují benzyladenin (*BA*) a jeho hydroxy- a metoxyderiváty. Kinetin (*K*, furfuryladenin) patří také mezi aromatické cytokininy, ale doteď byl identifikován hlavně u živočichů. Pro laboratorní účely je připravován synteticky. Cytokininovou aktivitu mají také některé deriváty fenylmočoviny např. thidiazuron (*TDZ*), difenylmočovina (*DPU*), 1-(2-chloro-4-pyridyl)-3-fenylmočovina (*CPPU*), které se však v rostlinách přírodně nevyskytují

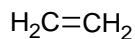
U vyšších rostlin jsou cytokininy syntetizovány především v dělicích se pletivech. Aktivují dělení buněk v meristémeh, stimulují tvorbu chloroplastů i syntézu fotosyntetických barviv, oddalují senescenci listů a odbourávání chlorofylu. Snižují apikální dominanci, aktivují vývoj axilárních pupenů, což se projevuje větvením nadzemních částí rostlin. Inhibují prodlužování kořenů a internodií, zvětšují plochu listů, regulují transport a mobilizaci živin v rostlinách. Cytokininy jsou také vylučovány patogenními organismy (bakterie, hmyz, hlístice) a hrají významnou roli i v některých symbiotických procesech, např. při tvorbě hlízek pro fixaci vzdušného dusíku (bakterie *Rhizobium*).



Ethylen

Ethylen je jediný plynný hormon. Působí hlavně na vývoj a zrání plodů a opad listů. V klíčcích rostlinách ve tmě vyvolává tzv. trojí efekt (triple response): podporuje radiální růst

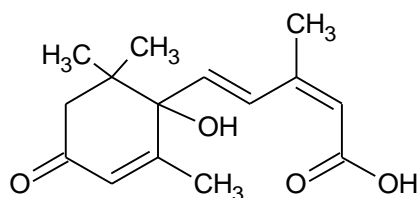
hypokotylu (krátký a silný hypokotyl), inhibuje pozitivně-geotropický růst kořenů (krátký kořen) a způsobuje tvorbu apikálního háčku. Stimuluje tvorbu kořenových vlásků, epinastii listů, urychluje senescenci, zkracuje dormanci a podporuje zrání dužnatých plodů, což se využívá hlavně u banánů, jablek, hrušek, rajčat, fíků či broskví. Inhibitory tvorby ethylenu se v praxi používají k prodloužení trvanlivosti řezaných rostlin.



ethylen

Kyselina abscisová

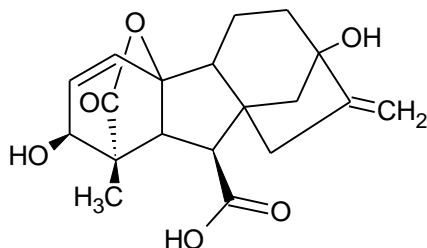
Je zapojena především v reakcích na stres. Její účinky jsou často antagonistické vůči giberelinům, cytokininům a auxinům. Působením kyseliny abscisové dochází k zavírání průduchů, reguluje zrání a dormanci semen, dormanci pupenů a navozuje senescenci listů nezávisle na ethylenu.



Kyselina abscisová

Gibereliny

Jedná se o chemické sloučeniny odvozené od diterpenů, které se značí GA s číselným indexem popisujícím pořadí identifikace dané látky. Obecně gibereliny stimulují růst stonku u druhů s listovou růžicí a u trav, pozitivně regulují klíčení semen, podporují růst a vývoj plodů, tvorbu pylu a růst pylové láčky. Fyziologické účinky jsou druhově specifické a velmi se liší. Gibereliny i inhibitory jejich biosyntézy se používají hojně v praxi, např. proti polehávání stébel obilí (inhibitory) nebo ke zvyšování násady květů a plodů (např. u révy vinné)

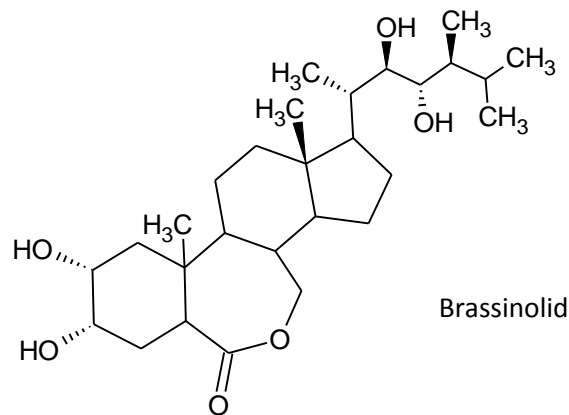


Kyselina giberelová (GA₃)

Brassinosteroidy

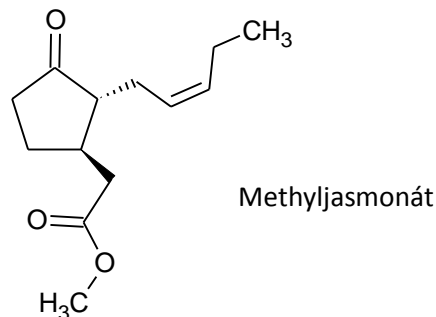
Jedná se o steroidní hormony regulující prodlužování a dělení buněk, podporující diferenciaci xylému a vývoj laterálních kořenů. Pomáhají zachovat apikální dominanci, urychlují

senescenci, podléjí se na růstu pylové láčky a vývoji samčích reprodukčních orgánů a stimulují klíčení semen. Jsou zapojeny v reakcích na biotické (patogeny) a abiotické stresy (zasolení, sucho, aj.).



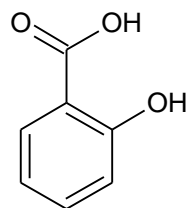
Jasmonáty

Jako jasmonáty označujeme především kyselinu jasmonovou a její methylester, methyljasmonát. Tyto látky ovlivňují expresi řady genů zapojených v obranných reakcích (poranění, napadení herbivory a patogeny), inhibují růst a stimulují senescenci. Methyljasmonát je těkavá látka sloužící ke komunikaci mezi rostlinami na daném stanovišti.



Kyselina salicylová

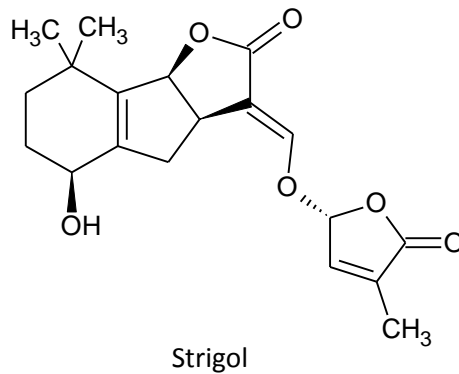
Fenolická sloučenina hrající klíčovou roli v obranných reakcích rostlin (biotrofní patogeny, hmyz sající na rostlinách, sucho, zasolení). Tento hormon je zapojen do regulace kvetení, termogeneze, klíčení semen, vývoje klíčících rostlin, růstu buněk a zavírání průduchů. Dále ovlivňuje fotosyntetický aparát, propustnost membrán a aktivitu řady enzymů.



Kyselina salicylová

Strigolaktony

Jedná se o nejmladší identifikovanou skupinu fytohormonů. Strigolaktony mají dvě hlavní funkce – jsou endogenními hormony kontrolujícími vývoj rostliny a za druhé jsou součástí kořenových exsudátů (látky vylučované rostlinnými kořeny), které podporují symbiotické interakce mezi rostlinami a půdními mikroorganismy. V případě parazitických rostlin stimulují jejich klíčení, pokud se nachází v těsné blízkosti hostitelského kořenového systému. Strigolaktony podporují růst a tvorbu výhonků, větvení kořenů, klíčení semen, arbuskulární mykorhizu, délku internodií, druhotné tloušťnutí a urychlují stárnutí listů.



Praktická část: Založení explantátových kultur tabáku a sledování vlivu cytokininů a auxinů na jejich vývoj.

Rostliny v *in vitro* podmínkách potřebují vhodná média obsahující všechny důležité složky pro optimální růst - vodu, mikro- a makroprvky, vitamíny, aminokyseliny, nebo další zdroje dusíku, sacharidy (zdroj uhlíku) a růstové regulátory. Jedno z nejnámějších a nejpoužívanějších médií je Murashige & Skoog (MS) médium.

Na přípravu 1l MS média se smíchají koncentrované roztoky a chemikálie (Tab. č.1), upraví se pH na 5,6 - 5,8 (KOH) a nakonec se doplní roztok na 1l destilovanou vodou. V případě přípravy pevného média se přidá agar (8g/l).

MS Major salts (20x koncentrovaný) - 50 ml
 MS Minor salts (200x koncentrovaný) - 5 ml
 MS Vitamins (200x koncentrovaný) - 5 ml
 Železo (200x koncentrovaný) - 5 ml
 Myo-inositol - 100 mg/l
 Sacharosa - 30g (3%)

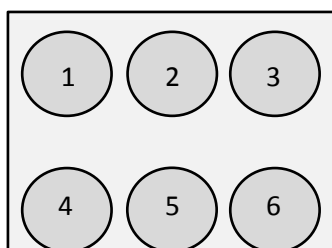
Tabulka č.1: Složení MS média (*Murashige T & Skoog F (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant 15: 473-4*).

MS Major salts	1l MS média obsahuje	0,5 l zásobní roztok (20x koncentrovaný)
NH ₄ NO ₃	1650 mg	16,5 g
KNO ₃	1900 mg	19 g
CaCl ₂ .2H ₂ O	440 mg	4,4 g
MgSO ₄ . 7H ₂ O	370 mg	3,7 g
KH ₂ PO ₄	170 mg	1,7 g
MS Minor salts	1l MS média obsahuje	0,5 l zásobní roztok (200x koncentrovaný)
H ₃ BO ₃	6,2 mg	620 mg
MnSO ₄ . 4H ₂ O	22,3 mg	2230 mg
ZnSO ₄ . 7H ₂ O	8,6 mg	860 mg
KI	0,83 mg	83 mg
Na ₂ MoO ₄ . 2H ₂ O	0,25 mg	25 mg
CoCl ₂ . 6H ₂ O	0,025 mg	2,5 mg
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025 mg	2,5 mg
MS Vitamins	1l MS média obsahuje	0,5 l zásobní roztok (200x koncentrovaný)
Thiamin	0,1 mg	10 mg
Niacin	0,5 mg	50 mg
Glycin	2,0 mg	200 mg
Pyrodoxin	0,5 mg	50 mg
Železo, zásobní 200x koncentrovaný roztok (50 ml)		
0,373g Na ₂ EDTA se rozpustí v 25 ml dH ₂ O. 0,278g FeSO ₄ . 7H ₂ O se rozpustí v 25 ml dH ₂ O. Za stálého míchání a přehřívání roztoku Na ₂ EDTA postupně přidávej roztok FeSO ₄ za vzniku žlutooranžového čirého roztoku železa.		

Úkol 1: Příprava roztoků

1. Dopočítejte do Tabulky č.2 objemy pipetovaných hormonů. Množství připraveného média pro celou skupinu sdělí vedoucí na začátku cvičení.
2. Vysterilizované MS médium s agarem nechte rozehřát v mikrovlnné troubě tak, aby byl agar zcela rozpuštěn. Přeneste médium do předem připravených laminárních boxů.
3. V laminárním boxu popište 5 sterilních falkon (1-5), médium bez hormonů (č. 6) budete pipetovat přímo z lahve (pro celou skupinu).
4. V laminárním boxu označte jamky v desce čísly 1-6 (Obr. č.1). Každá skupina bude mít 1 desku se všemi variantami roztoků.
5. MS médium rozdělte do označených plastových falkon.
6. Napipetujte hormony podle Tabulky č.2.
7. Roztoky pečlivě promíchejte a rozpipetujte po 5 ml do jamek na desce. Nechte média ztuhnout v zapnutém flowboxu.

Obrázek č.1: Schéma rozmístění jednotlivých roztoků na šestijamkové desce.



Tabulka č.2: Pipetování zásobních roztoků rostlinných hormonů do MS média (falkony č. 1-5)

	Rostlinný hormon	Číslo roztoku					
		1	2	3	4	5	6
Pipetování zásobních roztoků hormonů do 100 ml MS média	IAA	1 ml	0,1 ml	0,01 ml	0	0,01 ml	0
	kinetin	0,2 ml	0,02 ml	2 ml	0,2 ml	0	0
	BA	0	0	0	0	0,1 ml	0
Pipetování zásobních roztoků hormonů do ml MS média	IAA						
	kinetin						
	BA						
Výslední koncentrace hormonů v MS médiu (μM)	IAA						
	kinetin						
	BA						

Poznámka: Příprava zásobních roztoků rostlinných hormonů

IAA: Do čisté mikrozkuřavky navažte 3 mg IAA, rozpustěte v malém množství čistého ethanolu a doplňte teplou destilovanou vodou na objem 10 ml.

Kinetin: Do čisté mikrozkuřavky navažte 3 mg kinetinu, rozpustěte ho v kapce 1M NaOH a doplňte destilovanou vodou na konečný objem 10 ml.

BA: Navažte 0,3 mg BA a smíchejte s kapkou 1M NaOH, doplňte teplou destilovanou vodou do 1,5 ml.

Molární hmotnosti látek: IAA - 175,184 g.mol⁻¹; kinetin - 215,21 g.mol⁻¹; BA - 225,25 g.mol⁻¹

Úkol 2: Příprava rostlinného materiálu a očkování média

Příprava explantátů z *in vitro* rostlin tabáku

1. Před prací v laminárním boxu si vždy umyjte ruce mýdlem a poté pořádně vysterilizujte ethanolem nebo jiným vhodným desinfekčním roztokem.
2. Listy sterilního tabáku, případně stonkovou část, nařežte na malé explantáty (čtverečky o ploše cca 1 cm²).
3. Nařezané explantáty po jednom pokládejte do jamek destičky a lehce zanořte do média.
4. Explantáty nechte 4-6 týdnů růst a následně experiment vyhodnoťte

Sterilizace rostlinných segmentů

1. Z rostliny odřežte část, kterou chcete sterilizovat, a očistěte od hrubých nečistot (jar, voda).
2. Vložte očištěné segmenty do nádoby s 10 - 20% roztokem Sava na dobu 10 - 20 minut za stálého třepání.
3. Segmenty v laminárním boxu 3x promyjte ve sterilní vodě.
4. Opláchnutý explantát přeneste na sterilní papír a sterilními nástroji odřežte povrchové a koncové části.
5. Připravený explantát nařežte na cca 1cm kousky a ihned jemně zanořte do živného média.
6. Explantáty nechte 4-6 týdnů růst a následně experiment vyhodnoťte.

PROSTOR NA VÝPOČTY ☺