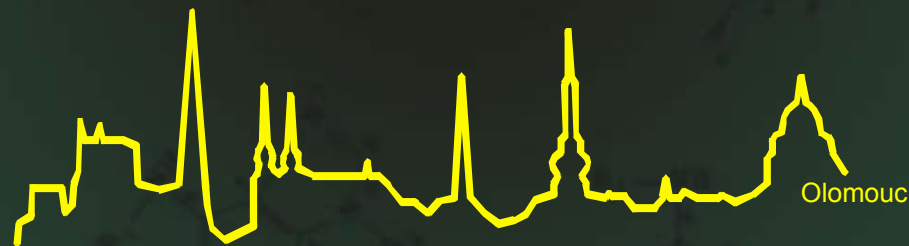


Laboratoř růstových regulátorů

Miroslav Strnad

Tkáňové kultury



Univerzita Palackého & Ústav experimentální botaniky AV ČR



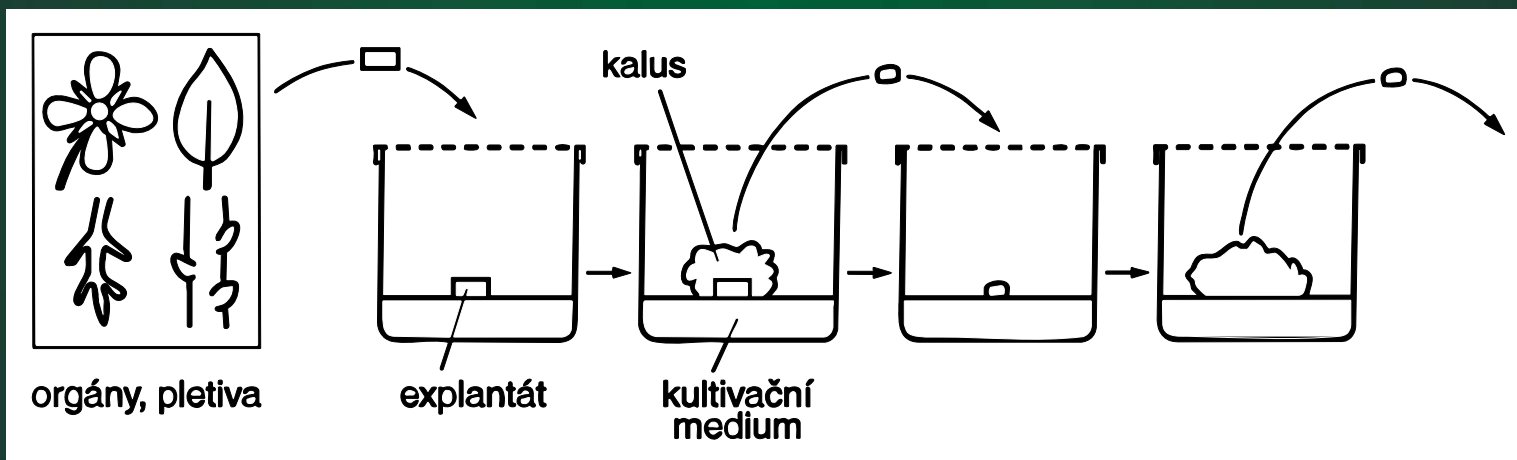
DEFINICE

- růst a vývoj rostlinných buněk, pletiv a orgánů lze účinně řídit (regulovat) *in vitro* v aseptických podmínkách
- dáno totipotencí – rostlina (orgán, buňky) je schopna dediferencovat, dělit se a zahájit nové směry vývoje různými směry, včetně vzniku nových rostlinných jedinců
- důležitý experimentální objekt + základem rostlinných biotechnologií
- tkáňová kultura: u nás explantátové kultury, není správné, neboť explantát je pouze primární pletivo nebo orgán, ale ne třeba kalusová kultura či jiná *in vitro* kultura
- ve světě: plant tissue, tkaněvaja kultura, die Gewebekultur (nerozlišují pletivo a tkáň – česká zvláštnost) a proto lepší používat tkáňové kultury než pletivové kultury



Založení explantátové kultury a tvorba kalusu

- přenesení primárního rostlinného orgánu či pletiva (explantát) do aseptických (in vitro) podmínek na agar nebo do tekutého média v kulturační nádobě je explantátová kultura (viz. obr)
- medium obsahuje min. prvky, cukr, vitaminy, auxiny a cytokininy
- na povrchu explantátu se během několika dní začnou dělit buňky, tvoří se kalus – amorfní, histologicky neorganizované pletivo podobné nádorům, dediferenciace buněk explantátu a neorganizované dělení – ovlivňují hormony, ale i vlivem poranění, když bez hormonů tak mají pletiva vysoký endogenní obsah, nebo po transformaci *A. tumefaciens*



Založení explantátové kultury a tvorba kalusu

Tkáňová (kalusová) kultura

- část kalusu se pravidelně přenáší – pasážování, kultura je nesmrtelná, ale mění se cytogeneticky (\uparrow ploidie a aneuploidie a \downarrow morfogenetický potenciál – regenerační – schopnost diferencovat orgány či embrya), vznikají klony, které se liší – somaklonální variabilita – i u regenerovaných rostlin

Buněčná suspenzní kultura

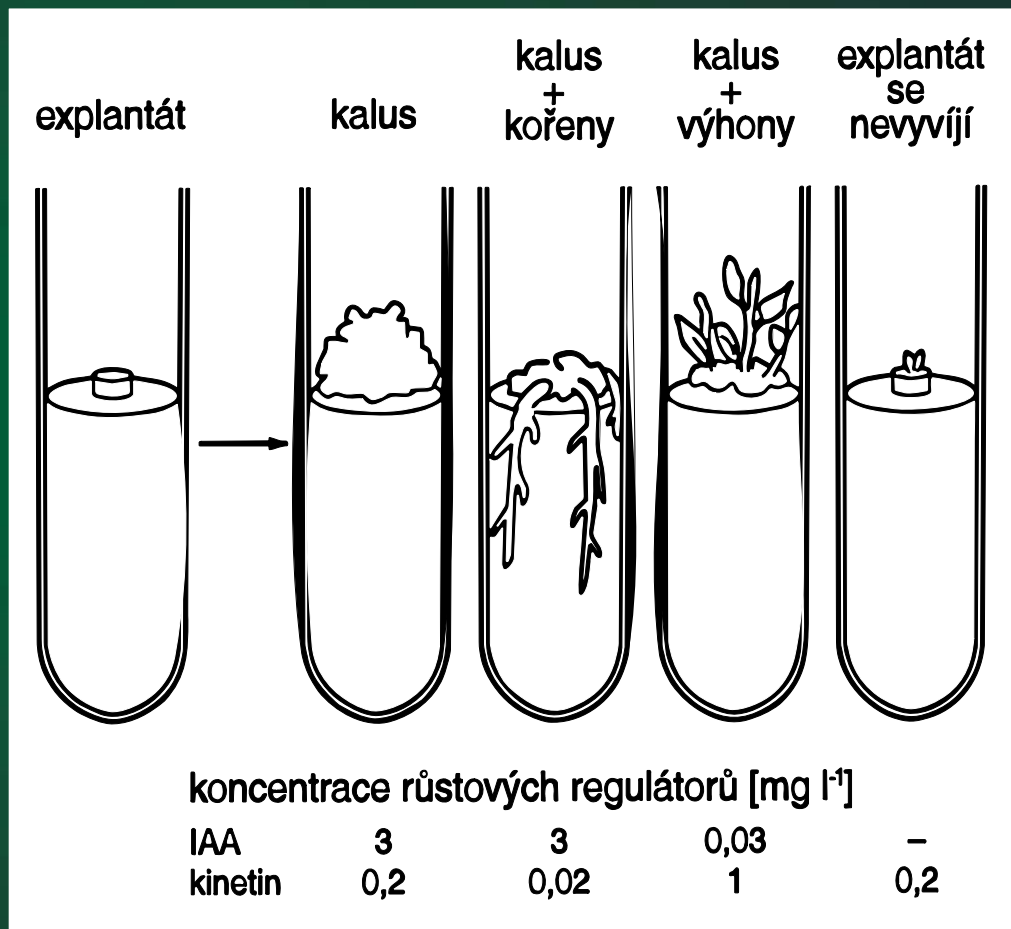
- kalus lze převést v suspenzi buněk třepáním v tek. médiu – směs buněk a jejich agregátů, lze udržovat ve stálém růstu a dělení, ale i synchronizovat bun. dělení – BY-2 – pro studium bun. cyklu



Morfogeneze *in vitro*

Model morfogeneze podle Miller a Skoog – lze regenerovat orgány či embrya cestou diferenciacce z tkáňové kultury, explantátu, bun. suspenze, kultury pylových zrn,... působí hlavně fytohormony, tvoří se meristemoidy, ty se mohou vyvíjet těmito směry:

- 1) **Organogeneze – tvorba orgánů – kořeny, pupeny, prýty, listy, květy, hlízky, 1 i více**
- 2) **Somatická embryogeneze – tvorba somatických embryí či embryoidů – stadia vývoje stejná jako u zygotických embryí (globulární, srdčitá a torpédovitá), z nich je možné regenerovat celou rostlinu**
- 3) **Pylová embryogeneze – z kultur izolovaných pylových zrn**



KULTURY IZOLOVANÝCH ORGÁNŮ

- vývoj založen na histologicky organizovaném růstu a dělení meristemických nebo pohlavních buněk

Meristémové kultury – k vegetativnímu množení z apikálních nebo laterálních meristémů + regenerace rostliny (lupa), bez RR, někdy AUX k zakořenění – říká se tomu mikropropagace (10000/m²), bez somaklonální variability, eliminace virů, naklonování nejhezčí a nej... rostliny

Prašníkové kultury — kultivace nezralých prašníků *in vitro* vede k tvorbě embryoidů, androgeneze – z pylových zrn, organogeneze - z haploidního kalusu, může se tvořit i diploidní kalus z obalových pletiv, lze získat haploidní rostliny či embrya a kolchicinem převést na dihaploidní homozygotní linie (probíhá i spontánně) – ke šlechtění

Kultury pylových zrn a láček – izolované mikrospory a nezralá pylová zrna (lupa) → pylová embryogeneze (=androgeneze), indukce často stresem (hladovění, teplota) – zastavuje normální gametofytický vývoj pylu, přenos do podmínek indukujících sporofytický vývoj – embrya, většinou bez RR

Kultivace pylových láček – klíčení zralého pylu na médiu se sacharosou a H₃BO₃ posléze další složky, slouží ke studiím vývojové biologie pylu

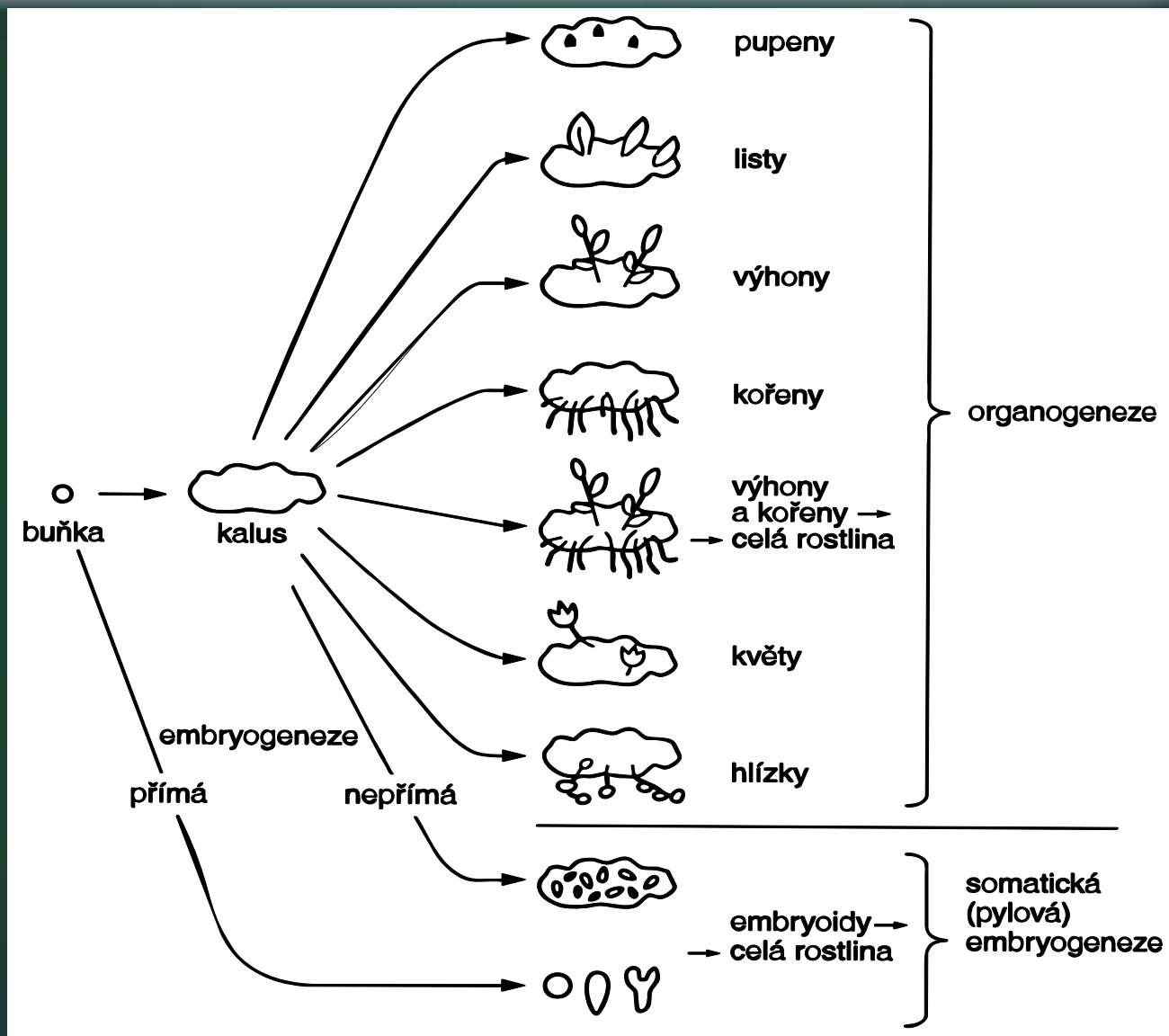
Kultury izolovaných vajíček a vaječníků – gynogeneze (embryonální vývoj neoplozeného zárodečného vaku), haploidní – z buněk vajíčka či dalších haploidních buněk zárodečného vaku

Kultury izolovaných embryí – nezralá embrya po extirpaci a kultivaci vytváří sekundární embrya – množení dřevin, důležité pro udržení rostlin, kde dochází k aborci endospermu

Kultury izolovaných kořenů – izolované kořeny na jednoduchých mediích (glukosa, glycin, min. živiny a thiamin), koř. špičky (5 mm), tvoří hustou síť kořenů



KULTURY IZOLOVANÝCH ORGÁNŮ



5/13/2008



KULTURY IZOLOVANÝCH PROTOPLASTŮ

- izolace z listového mezofylu, kalusu nebo bun. suspenze - působení pektinasy a celulasy, bez buněčné stěny, ke studium transportu látek přes membránu, reg. bun. stěny, izolace organel, DNA a bílkovin
- Protoplasty mohou fúzovat – vznik somatických hybridů – napřed kalus a potom regenerace rostlin – tak lze křížit nekřížitelné druhy, brukev + rajče

Rostlinné nádory – viz. *A. tumefaciens* – nadprodukce RR

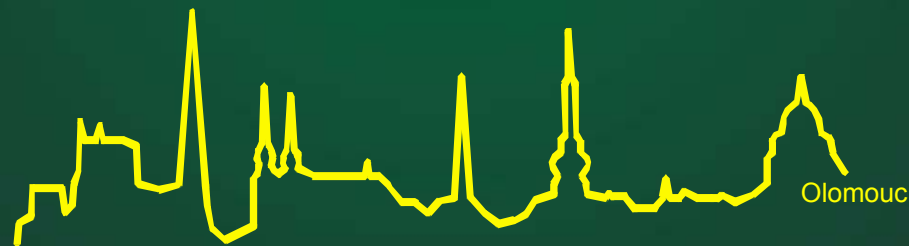
Habituace – při kultivaci se mohou kalusy stát nezávislými na exogenních RR, mají vlastní syntézu



Laboratoř růstových regulátorů

Miroslav Strnad

Biorytmy



Univerzita Palackého & Ústav experimentální botaniky AV CR

5/13/2008



DEFINICE

- mnohé procesy v rostlinách mají charakter rytmů – pravidelně se opakují
- rytmy exogenní (vliv vnějšího prostředí) a endogenní (biorytmy generovány zvláštním oscilátorem – biologickými hodinami) adaptace na střídání dne a noci, ročních období, měsíc, odliv,...
- Biorytmus – pravidelně se opakující změna v živé soustavě
- Biologický cyklus – je základní jednotkou biorytmů; opakuje se ve stejném pořadí a ve stejné době
- Endogenní rytmus (spontánní) – probíhá i v neperiodickém prostředí = biorytmus
- Perioda – doba trvání cyklu, dělení na:

Biorytmus	Perioda
Cirkadiální	v rozmezí 20-28 hod
Ultradiální	kratší než 20 hod (cirkumnutace)
Infradiální	delší než 28 hod
Semilunární	14 dní
Lunární	28 dní (mezi úplňky)
Annuální	jednoroční (klíčivost semen)

Amplituda – je polovina z rozdílu mezi maximální a minimální amplitudou měnící se veličiny

Frekvence – počet cyklů za jednotku času

Synchronizátor – signál z vnějšího prostředí, který seřizuje endogenní rytmus s vnějším, např. stmívání a svítání

Seřízení rytmu – synchronizace rytmu s jiným

Biologické hodiny nebo-li oscilátor – mechanismus, který je zdrojem časové informace v biol. rytmu

Fáze – libovolná část rytmu

Historie – starověk – listy mění polohu ve dne a v noci, rytmické (spánkové) pohyby, 1929 francouzský astronom de Marian, mimóza několik dní ve tmě

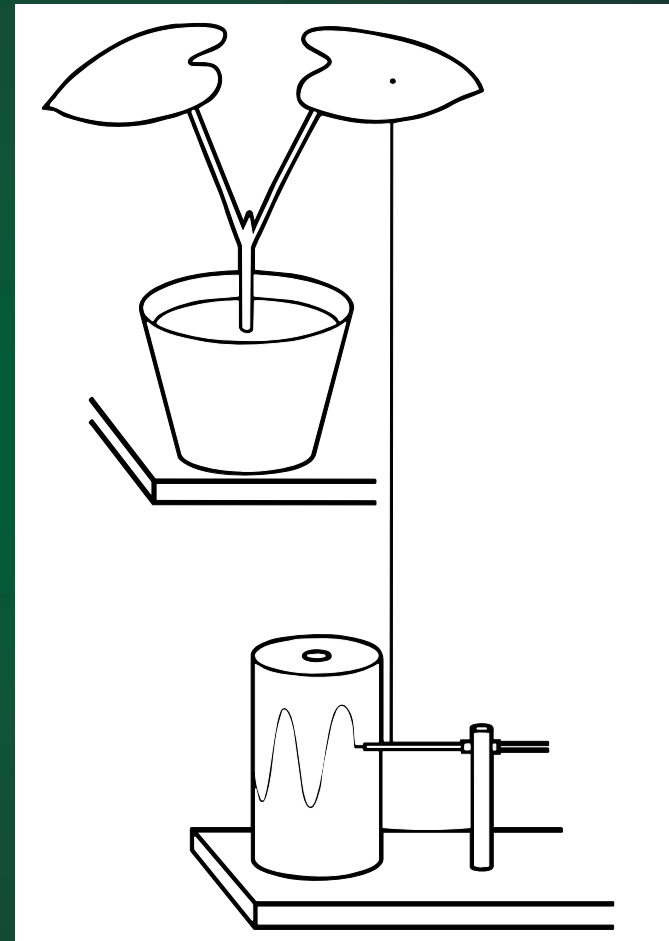
- dále Darwin Sachs, Pfeffer – cirkadiální rytmy, rytmus je dědičný – klíčení semen 6/6 hod – podle toho rytmy, když se předělali na 24 hod světlo, přešli na střídání dne a noci spánkové pohyby
- 1935 – Erwin Bünning – definoval biologické hodiny a postuloval jejich úloha ve fotoperiodické regulaci kvetení



Cirkadiální rytmy

Spánkové pohyby listů (nyktinastie) – fazol, mimóza, stromy *Samanea* a *Albizzia*; funguje i u uříznutých listů ve tmě v roztoku sacharosy, dáno vstupem K^+ (také H^+ a Cl^- podobně jako u svěracích buněk), v buňkách pulvinu, ne jedné straně extensorové buňky (zvětšují se ve dne, list jde nahoru), na druhé flexorové (pokles listu, zvětšení v noci)

Obr. Registrace spánkových pohybů fazolu – termohydrograf.



Cirkadiální rytmy

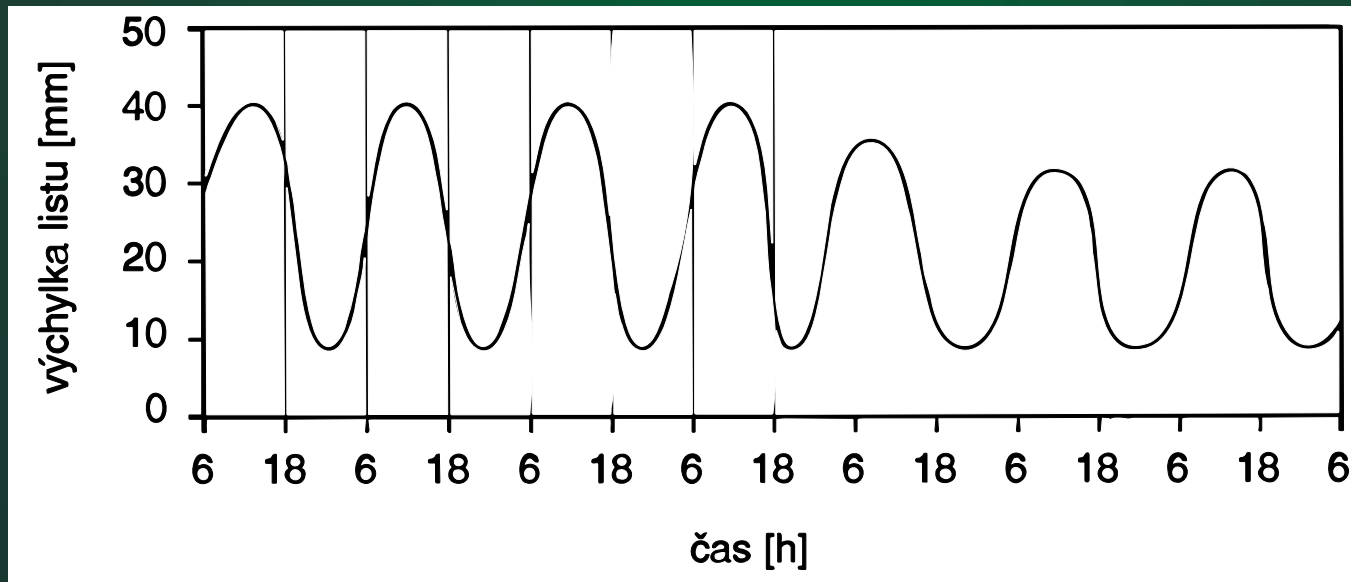
Spákové pohyby květů – u *Kalanchoe*, v noci korunní lístky vzhůru, uzavření květu, ve dne dolů – otvírání květu, funguje i u uříznutého květu (v cukru)

Eksudace vlivem kořenového vztlaku – např. u slunečnice

Fotosyntéza CAM a zavírání a otvírání průduchů

Buněčné dělení a fotosyntéza u řas – *Euglena gracilis*,...

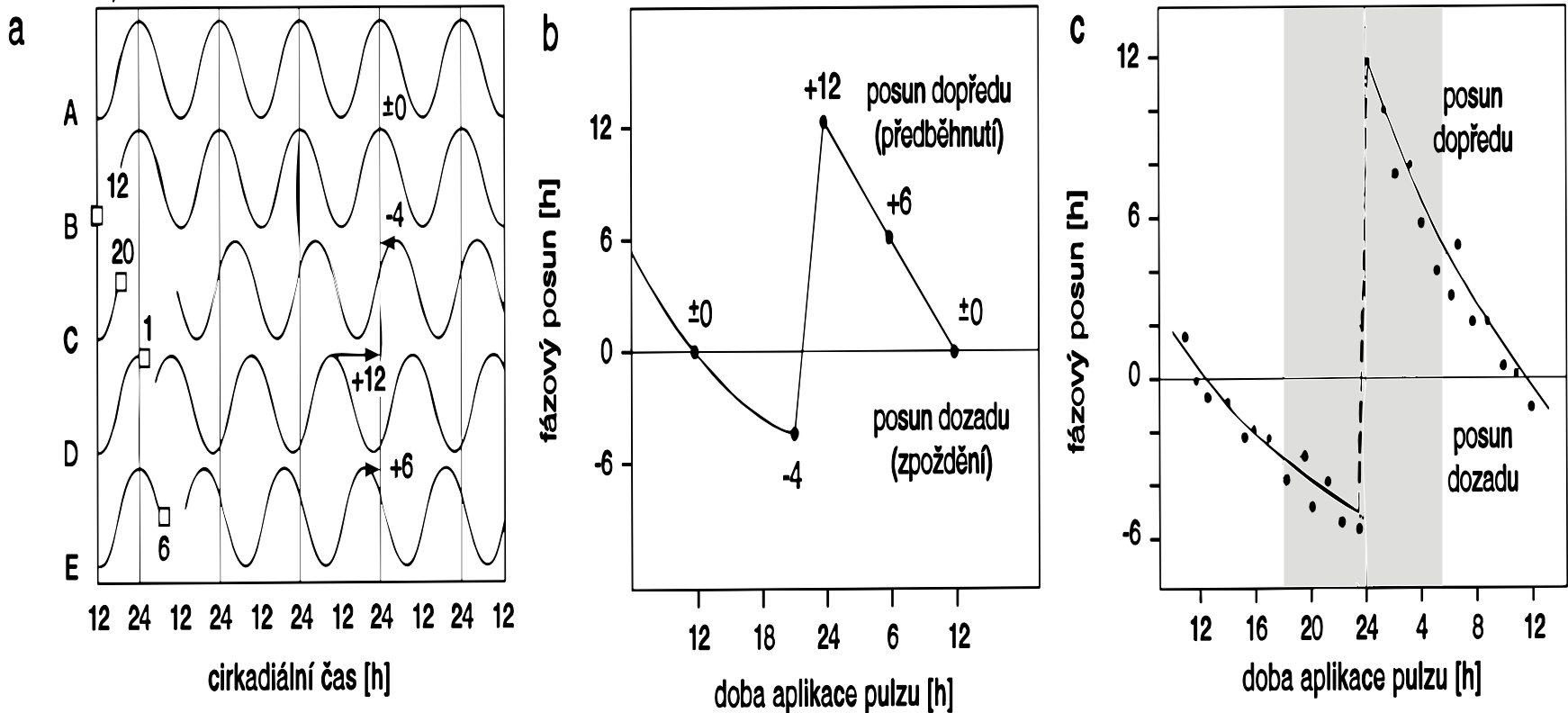
Obr. Záznam spánkových pohybů listu fazolu šarlatového. Rytmus přetrvává i v trvalé tmě, ale amplituda výchylky se postupně, s klesající zásobou energie zmenšuje.



Cirkadiální rytmy a světlo-fázový skok

Obecným znakem cirkadiálních rytmů je citlivost ke světlu, patrná z časového posunu fáze rytmu působením jediného světelného impulsu, pulsy na počátku noci cyklus zpožďují, po půlnoci posouvají cyklus dopředu

Pozoruhodný je fázový skok (přefázování), podobné u řady organismů



Seřízení rytmů v přirozených podmínkách

- Za seřízení zodpovědny fytochromy a kryptochromy (fotoreceptory) – důležitá je změna ozáření a spektra při svítání a stmívání, intenzivní světlo urychluje synchronizaci
- Biologické hodiny – žádný z biorytmů není zatím primárním zdrojem časové informace – pouze ručičkami, s cirkadiálními rytmy souvisí syntéza bílkovin
- Oscilátor u rostlin (u *A. thaliana*) – je to transkripční-zpětnovazebný obvod TF kódovaný genem TOC1 (timing of CAB, tj. chlorophyll A/B binding protein). Při mutaci jedné alely jsou zkráceny periody všech cyklických dějů v rostlině včetně cyklické exprese TOC1. Partnery TOC1 jsou protein Myb kódované lokusy CCA1 (circadian clock associated) a LHY (late elongated hypocotyl). Zatímco TOC1 aktivuje jejich expresi, CCA a LHY inhibují expresi TOC1. maxima genové exprese těchto vzájemně se regulujících jednotek oscilátoru jsou posunuta o 12 hod. Oscilátor je rovněž propojen s fotoreceptory. Micorarray analýzy ukázaly, že více jak 500 genů je v rostlinách exprimováno cyklicky.



Oscilátor

Oscilátor u rostlin (u *A. thaliana*) – je to transkripční zpětno-vazebný obvod TF kódovaný genem TOC1 (timing of CAB, tj. chlorophyll A/B binding protein). Při mutaci jedné alely jsou zkráceny periody všech cyklických dějů v rostlině včetně cyklické exprese TOC1. Partnery TOC1 jsou protein Myb kódované lokusy CCA1 (circadian clock associated) a LHY (late elongated hypocotyl). Zatímco TOC1 aktivuje jejich expresi, CCA1 a LHY inhibují expresi TOC1. maxima genové exprese těchto vzájemně se regulujících jednotek oscilátoru jsou posunuta o 12 hod. Oscilátor je rovněž propojen s fotoreceptory. Micorarray analýzy ukázaly, že více jak 500 genů je v rostlinách exprimováno cyklicky.

