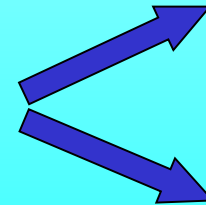


Embryogeneze

1. zygotická

2. somatická



in situ

in vitro

Vývoj embrya = embryogeneze

Nahosemenné rostliny

Krytosemenné rostliny

Makrosporogeneze = tvorba makrospor

samičí archespor



makrosporocyt



Meióza I,II

tetráda haploidních makrospor

Makrogametogeneze = tvorba zárodečného vaku

tetráda haploidních makrospor



fungující makrospora (makrospory)



mitotická dělení

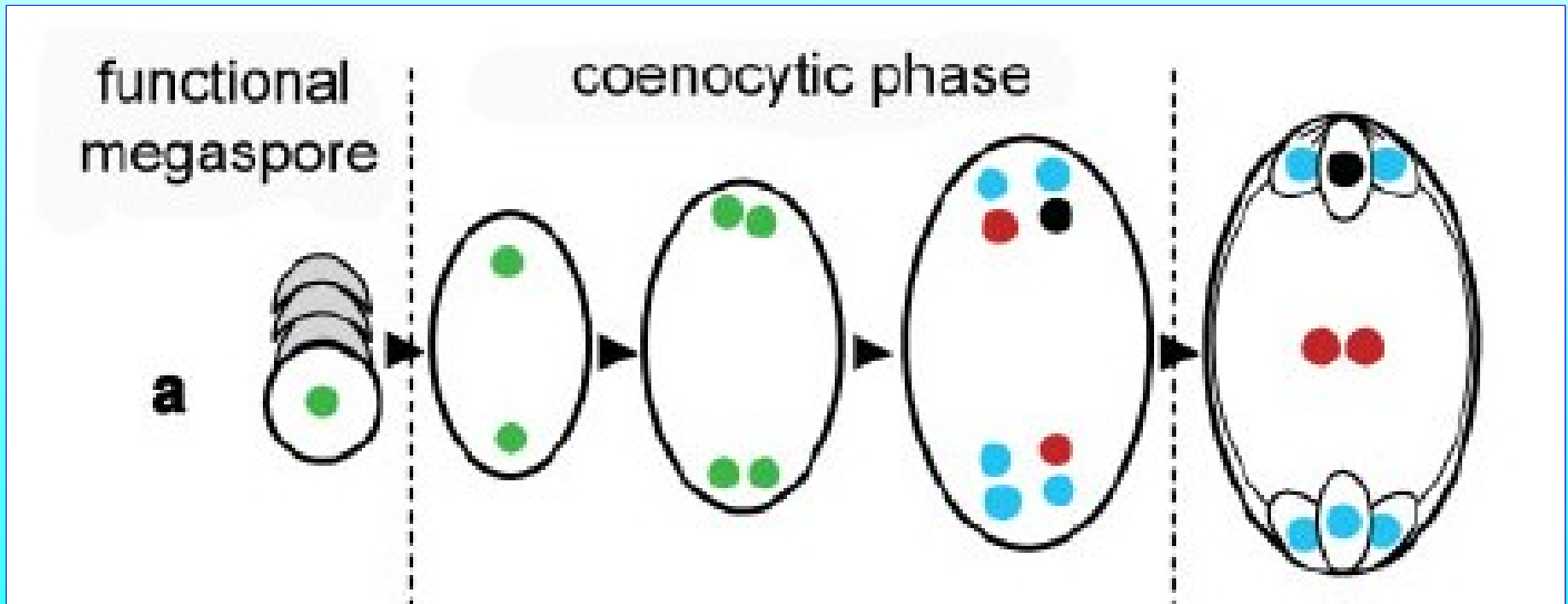
mladý zárodečný vak



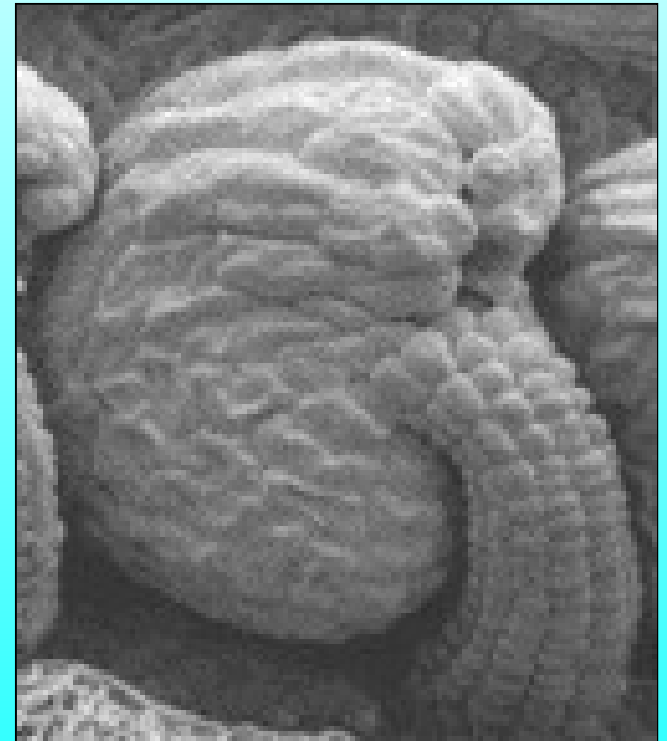
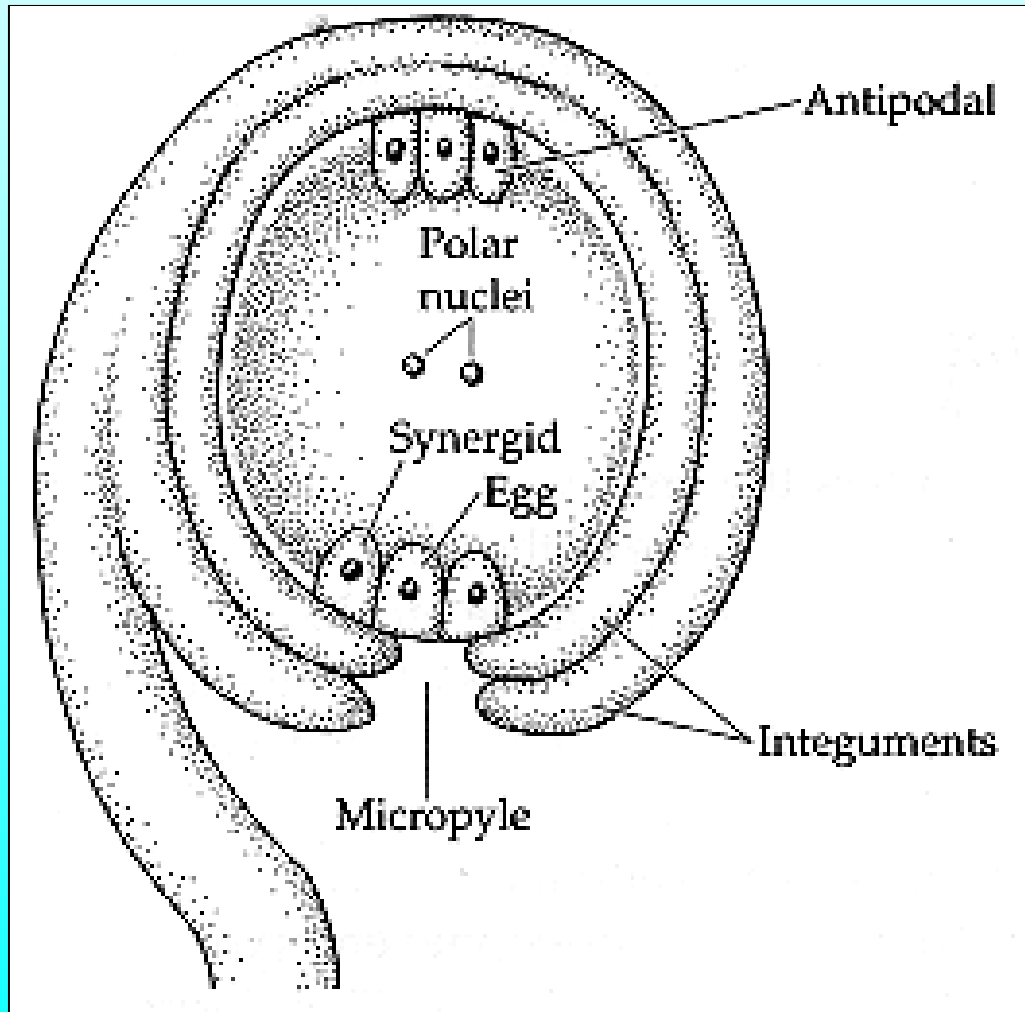
diferenciace buněk

zralý zárodečný vak = samičí gametofyt
monosporický, bisporický, tetrasporický

Zárodečný vak typu *Polygonum*



Anatropní vajíčko - schema



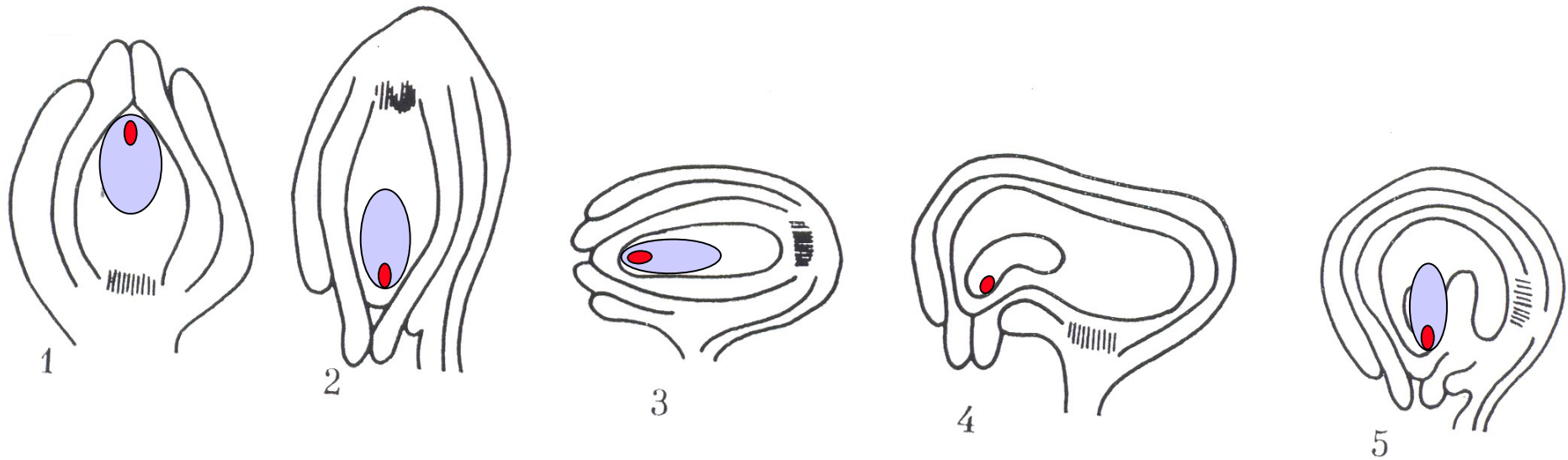
Základní typy vajíček krytosemenných rostlin

Goebel 1933

přímé

obrácené

příčné



ortotropní
(atropní)

anatropní

hemitropní

kampylotropní

amfitropní

Embryogeneze

Rostlinné embryo je charakterizováno svým **původem**, svou **morfologií** a svým **vývojem** v čase.

Původ: **zygotická embrya** vznikají ze zygoty, která je výsledkem fúze gametických buněk - zárodečný vak

somatická embrya (syn. asexuální embrya, adventivní embrya, embryoidy) se vyvíjejí ze somatických buněk

Morfologie: plně vyvinuté embryo je **bipolární struktura** se **stonkovým meristémem** na jednom konci a **kořenovým meristémem** na konci druhém; dále je charakterizováno specifickým typem listů, tzv. **dělohami**.

Vývoj embrya v čase

je charakterizován sledem typických morfologických stadií

zygota

globulární embryo

srdcovité embryo

hruškovité (torpédovité)

zralé embryo

Modelové rostliny z čeledi *Brassicaceae*

Capsella bursa-pastoris L.



Arabidopsis thaliana (L.) Heynh.

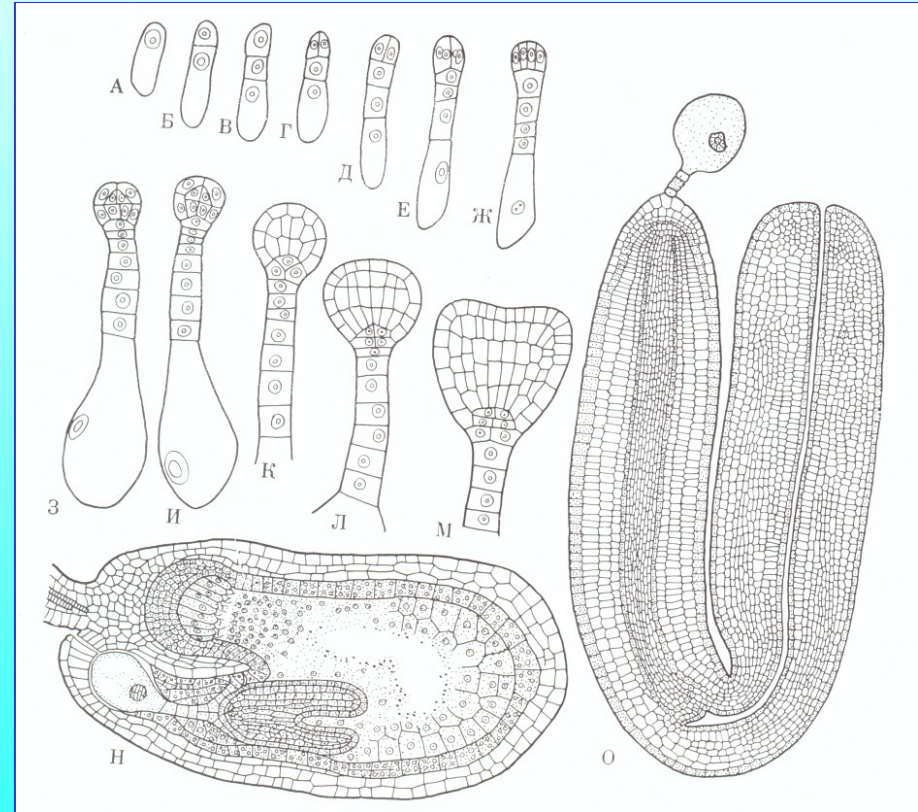
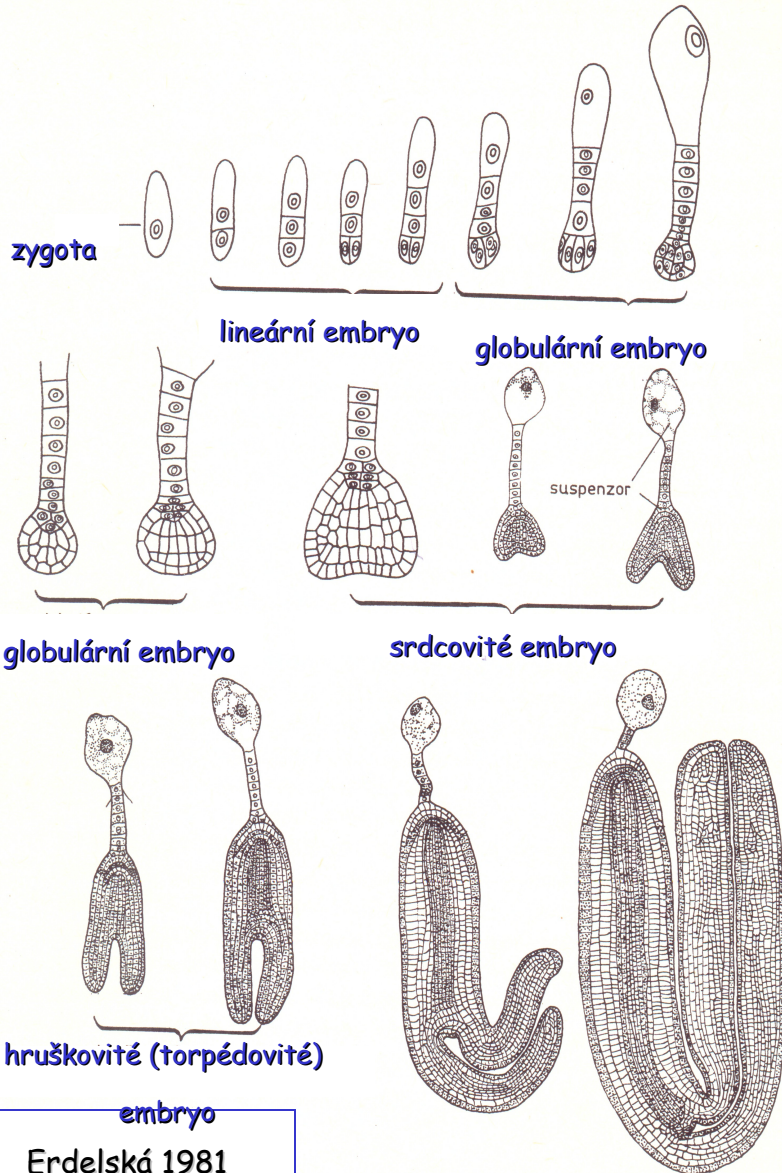


- jednoletá nebo ozimá, krátce žijící bylina
- lodyha 5-30 cm, větvená
- přízemní listová růžice + řídce olistěná lodyha

<http://botit.botany.wisc.edu>

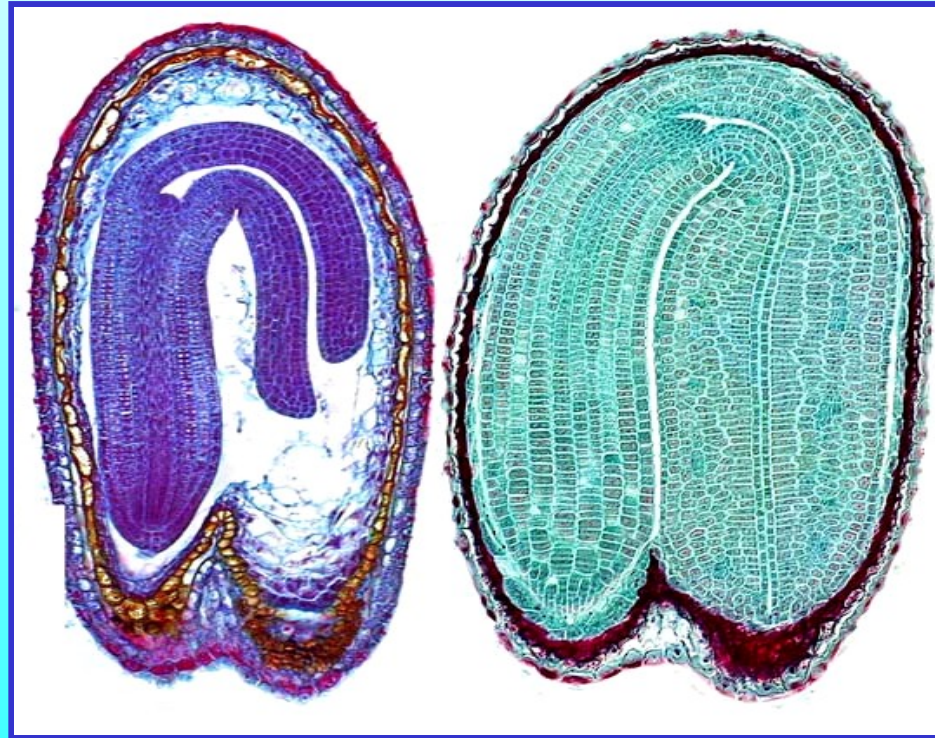
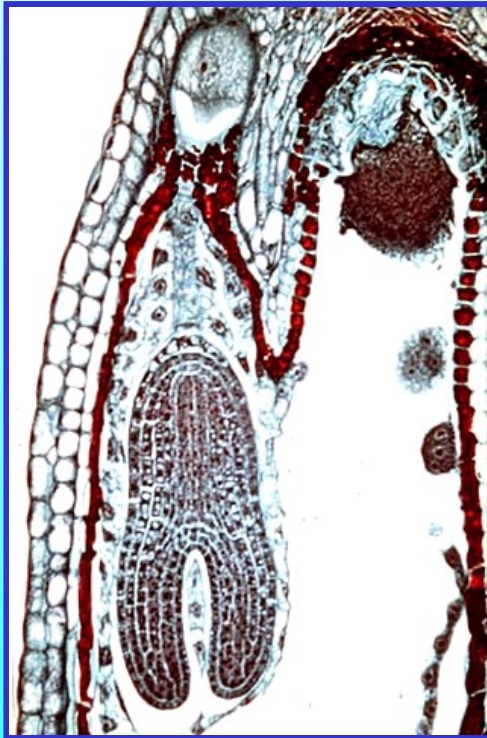
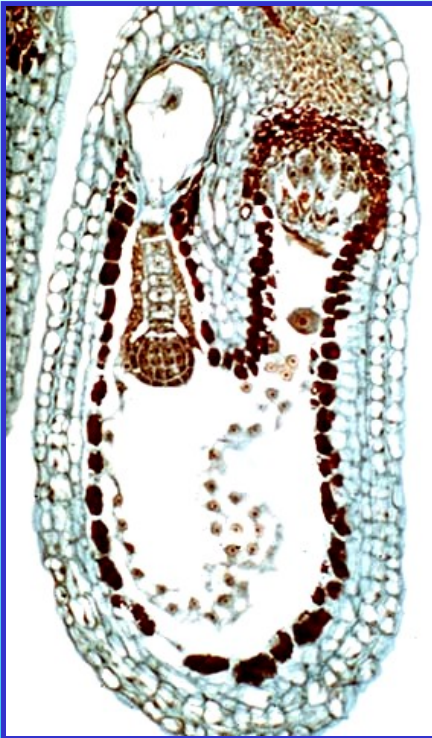
(Painting by Janet Wehr,
courtesy of Chris Somerville)

Embryogeneze *Capsella bursa-pastoris*



Poddubnaja-Arnoldi 1976

Capsella bursa-pastoris - vývojová stadia embrya



globulární embryo

torpédovité embryo

starší torpédovité
embryo

zralé embryo

Stadia embryogeneze *Arabidopsis thaliana*

<http://people.whitman.edu/~vernondm/index.html>

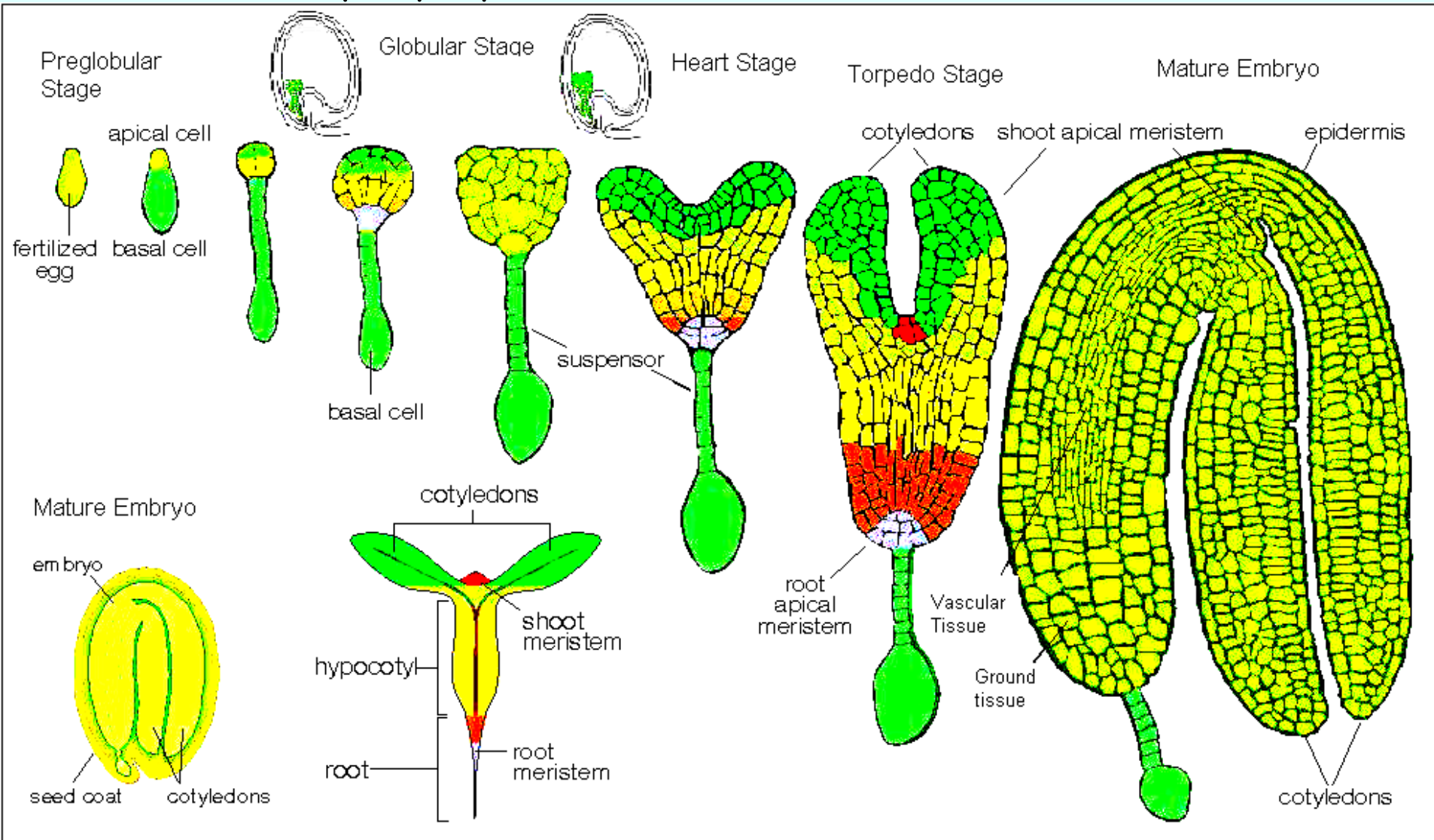
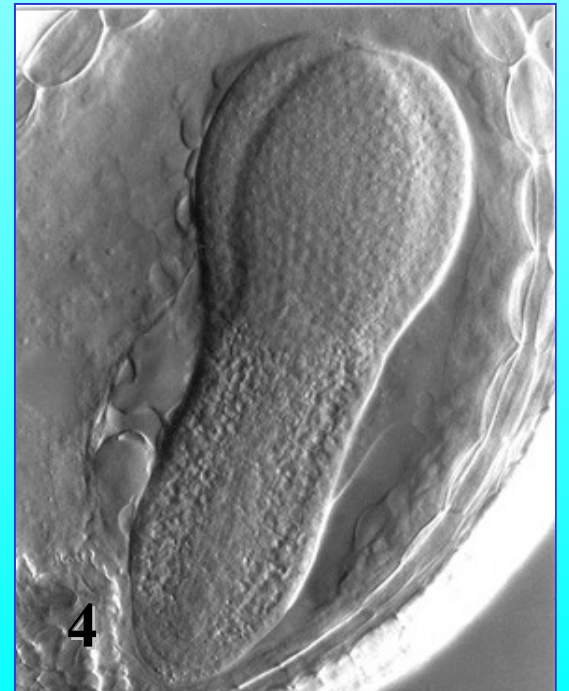
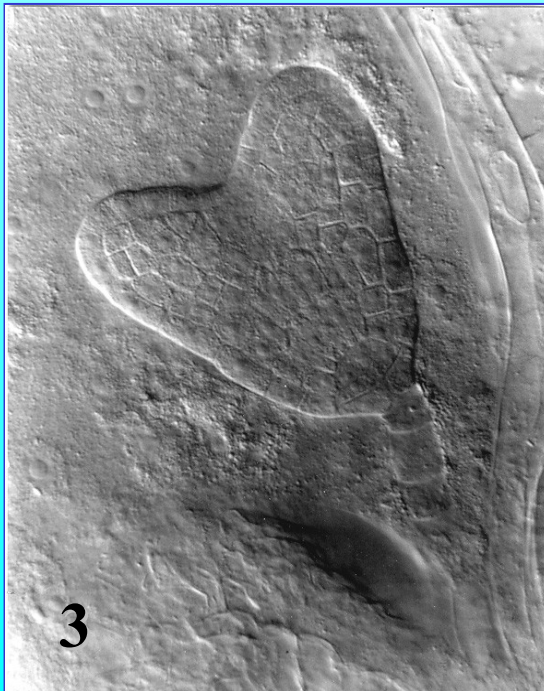
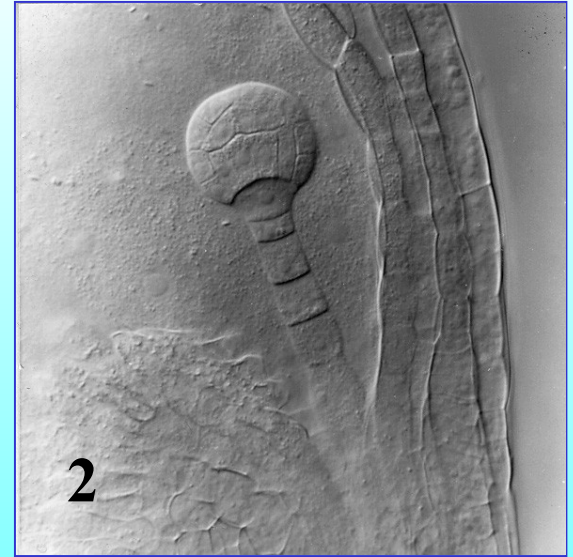
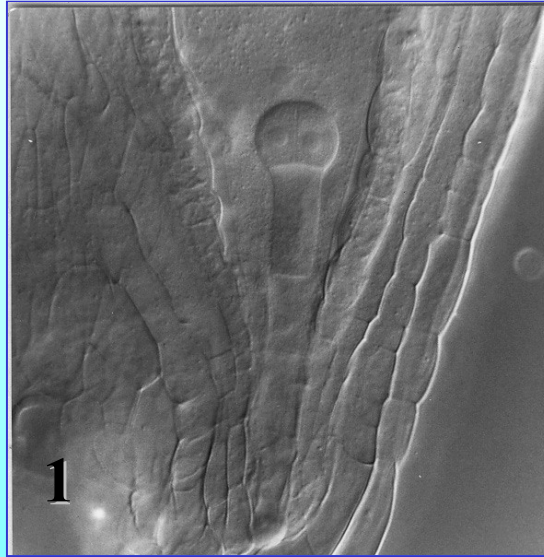


Image adapted from Wolpert, Lewis.

(1998) *Principles of Development*. Oxford University Press, NY

Embryogeneze Arabidopsis - Nomarski DIC

- 1 preglobulární
- 2 globulární
- 3 srdcovité
- 4 torpédovité



DM Vernon and D Meinke (1994)
Dev. Biol. 165: 566-573.

Photos by DM Vernon

Kultivace izolovaných zygotických embryí

historie

aplikace

Historický přehled

Bonnet (1754) - klíčení zárodků fazolu zbavených děloh

Sachs - 19. stol.- špatné klíčení embryí bez endospermu

van Tieghem - pěstování izolovaných embryí na rozetřeném endospermu jiného druhu

Brown a Morris (1890) - transplantace embryí ječmene do endospermu pšenice

Hannig (1904) - nezralá i zralá embrya *Raphanus* a *Cochlearia*

Knudson (1920 - 1930) rostliny ze zárodků *Orchidaceae* - kultivace na agarovém médiu s cukrem bez symbiotických hub

Dietrich (1924) - možnost zkrácení dormance

Historický přehled

Raghavan - experimentální embryologie

Torrey

Monnier - izolace globulárních embryí *Capsella*

Norstog - kultivace embryí obilovin

Pret'ová - izolovaná embrya lnu

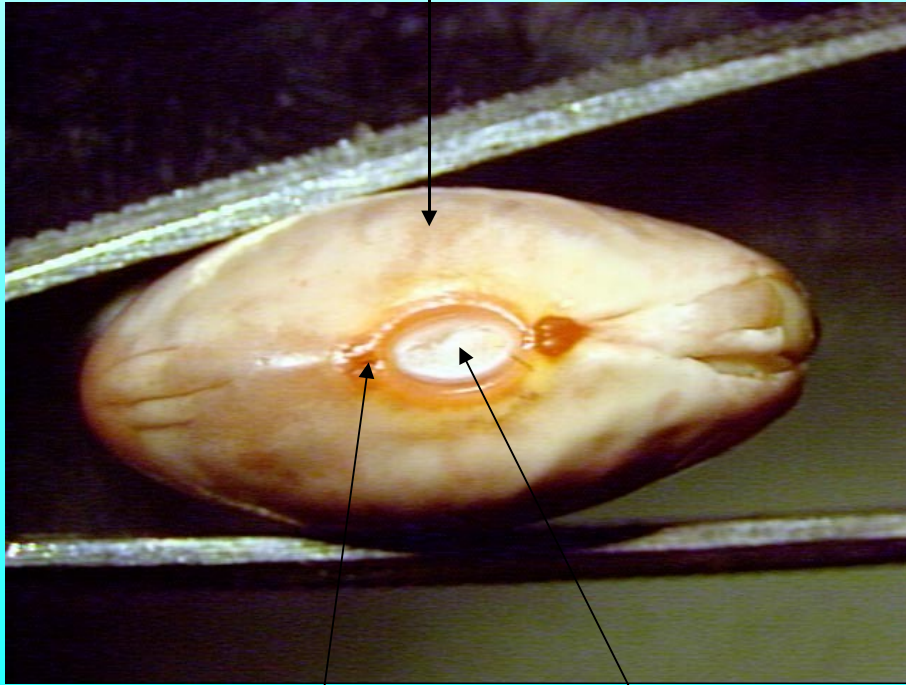
Rangaswamy

Bajaj

Zenkler - využití překování aborce embryí po opylení
in vitro

Semeno a embryo fazolu *Phaseolus vulgaris* L.

osemení
(testa)

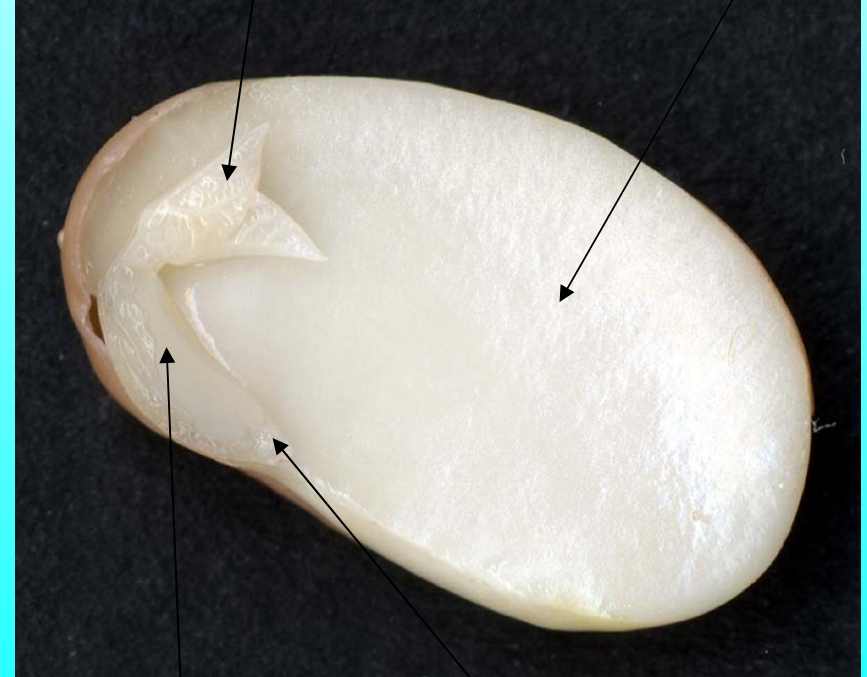


cikatrikula

semenná jizva
pupek = hilum

plumula
apex+pravé listy

děloha
(kotyledon)



hypokotyl

radikula

Kultura izolovaných embryí

aseptické vyjmutí embrya a jeho přenos do vhodného média a optimálních kultivačních podmínek

- relativní snadnost získání embryí bez patogenů (povrchová desinfekce semen nebo plodů)
- semena s tvrdým o semením - měkčení vodou, pak opakovaná desinfekce
- podmínka nutná pro vývoj izolovaných embryí = nepoškození embrya (suspensor) - preparační mikroskop
- výběr média - čím mladší embryo, tím větší nároky

Použití kultur izolovaných embryí

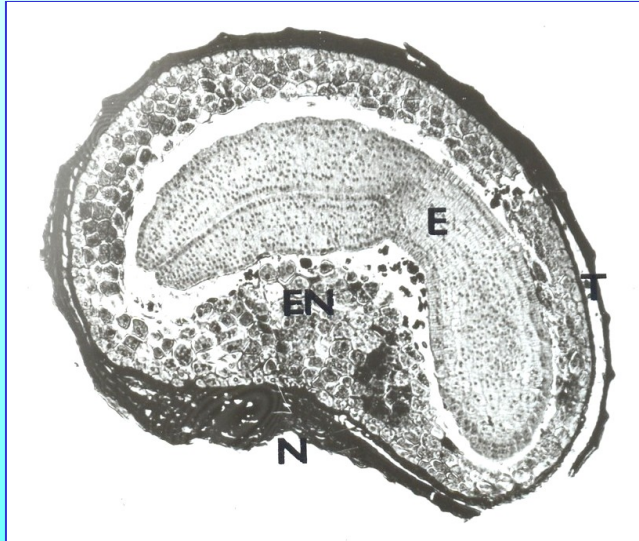
- překonání dormance semen
- překonání aborce embryí („embryo rescue“) po křížení *in situ* nebo *in vitro*

mezidruhové hybridy: bavlník, ječmen, rýže, juta,

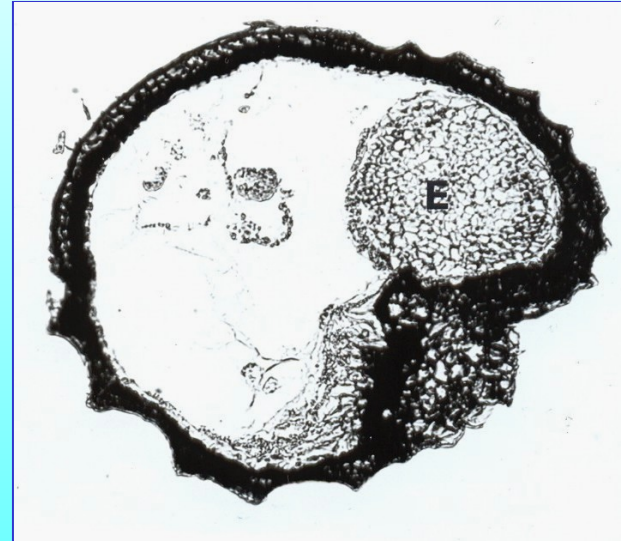
mezirodové hybridy: *Hordeum x Secale*, *Triticum x Secale*, *Hordeum x Hordelymus*, *Tripsacum x Zea*

- monoploidní ječmen
- studie experimentální embryogeneze
- zdroj mladého materiálu pro mikropropagaci

Překonávání aborce embryí po opylování *in vitro*

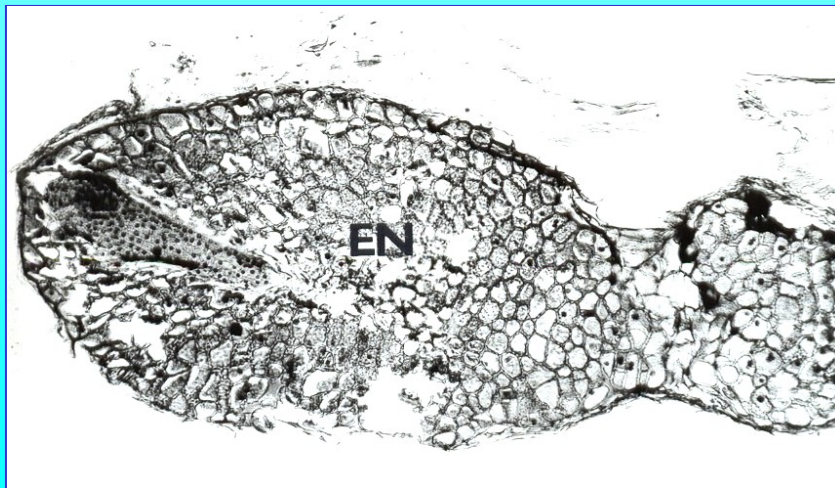


9 MC



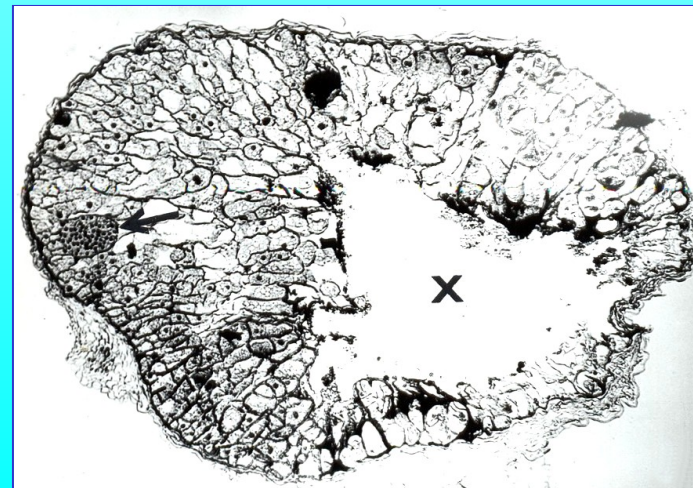
Papaver

35 DC

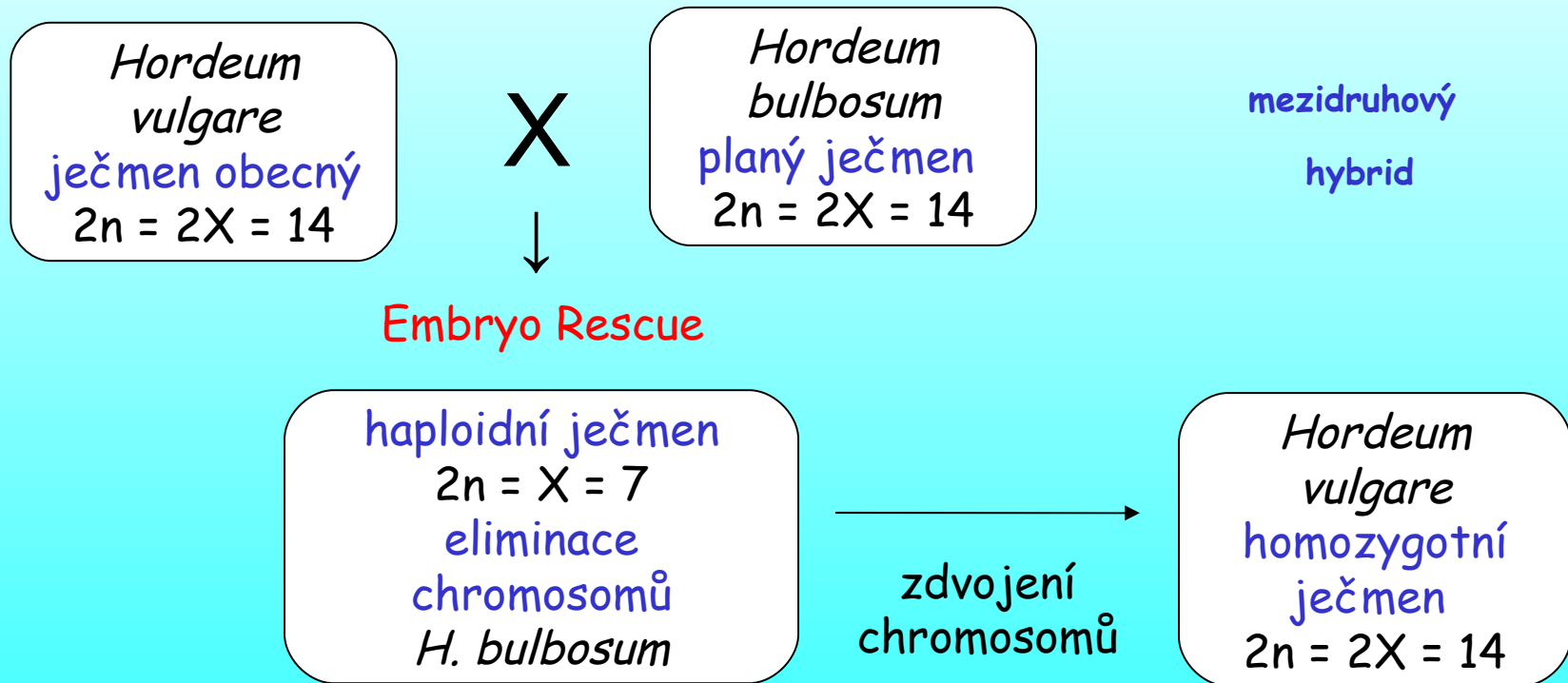


Galanthus

60 DC

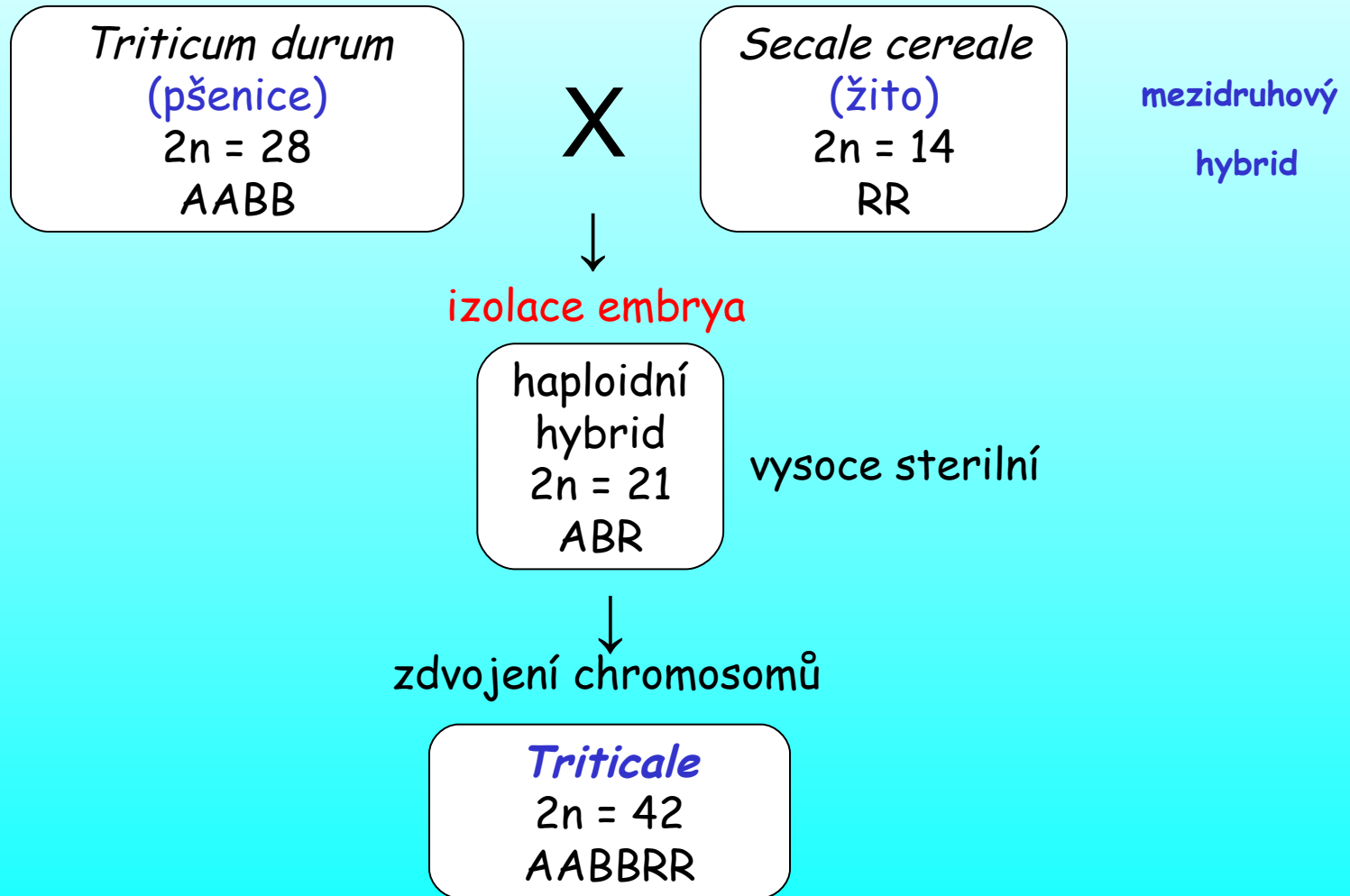


Bulbosum Method of Haploid Production



- dříve mnohem účinnější metoda pro tvorbu haploidních rostlinek než mikrosporové kultury (ale použití jen u ječmene)
- nyní, při použití zlepšeného složení média (sacharosa nahrazena maltosou), je mikrosporová kultura mnohem účinnější (~2000 rostlin ze 100 prašníků)

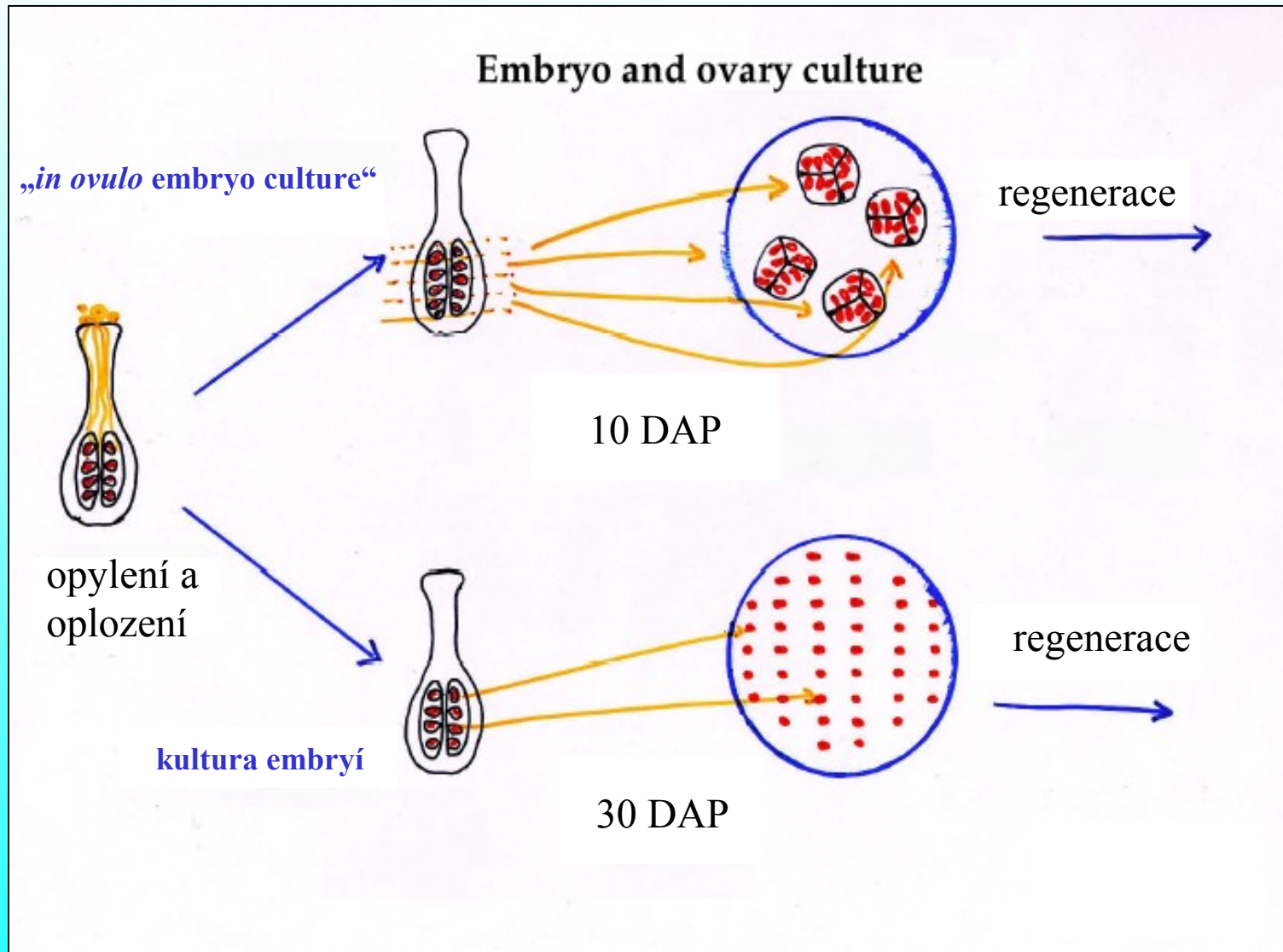
Příklady získání alopolyloidů





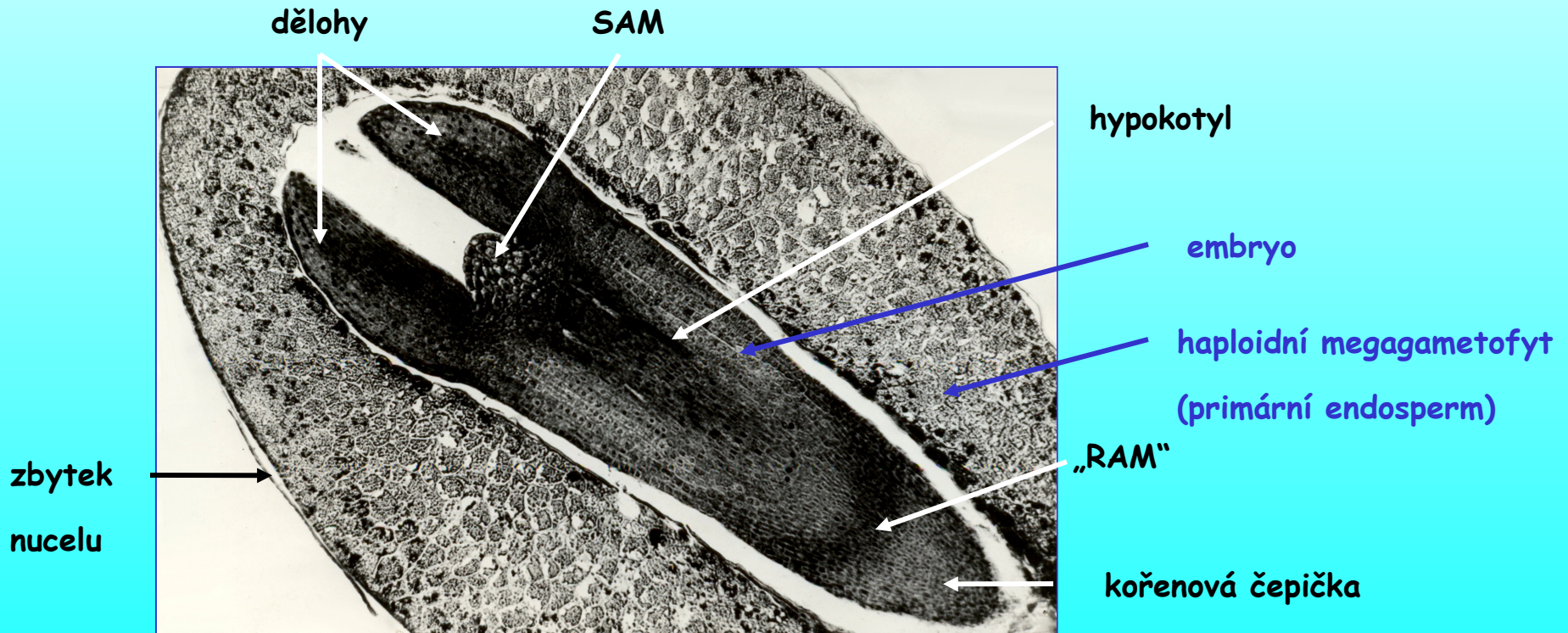
V. Raghavan

- 1. Kultivace izolovaných zralých embryí**
- 2. Kultivace proembryí**



Lammerts van Bueren *et al.*, Luis Bolk Instituut

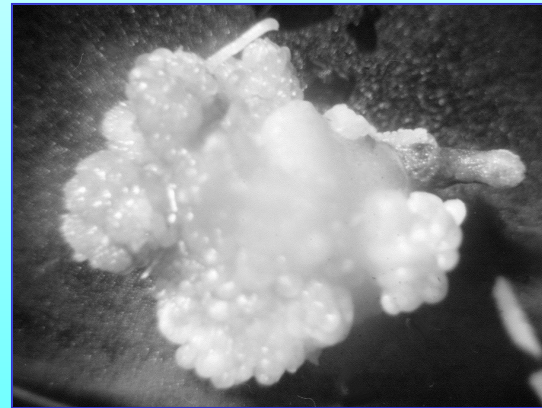
Podélný řez semenem modřínu *Larix dexidua* (L.)MILL.



parafínový řez, barveno Heidenheinovým hematoxylinem (osemení odstraněno před procedurou)

Mikropropagace konifer

Picea
14 DC
BA



Larix

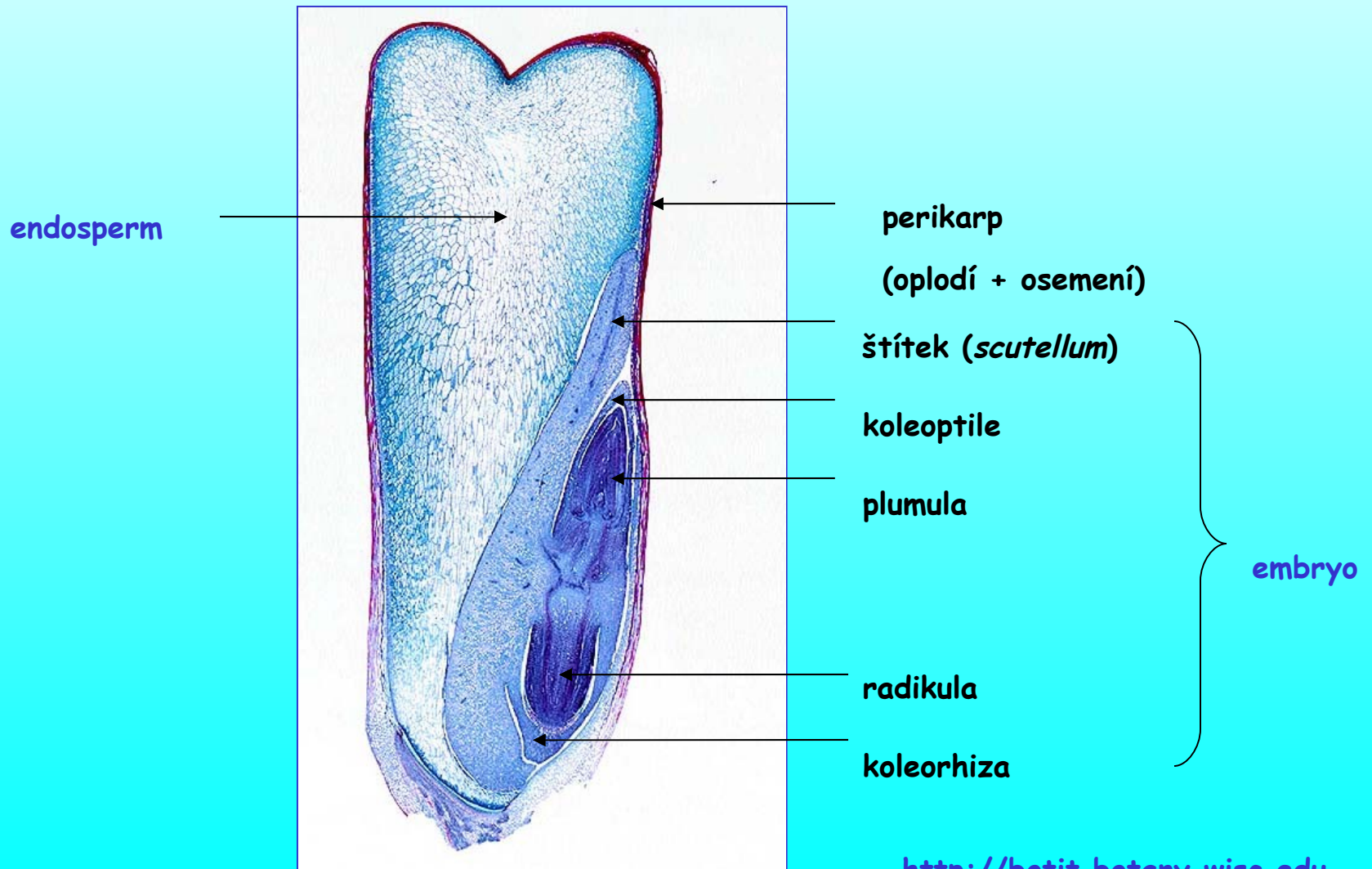


Picea

Kultivace izolovaných embryí konifer (*Picea*, *Pinus*)

- povrchová desinfekce semen
- bobtnání semen ve sterilní destilované vodě přes noc
- opakování povrchové desinfekce semen
- sterilní izolace embryí
- inokulace embryí na povrch agarem ztuženého média M-S s přidavkem auxinu a cytokininu (1F), kontrola M-S (1).

Stavba embrya kukuřice (*Zea mays* L.)



Izolace a kultivace embryí kukuřice (*Zea mays* L.)

- povrchová desinfekce obilek
- bobtnání obilek ve sterilní destilované vodě přes noc
- opakování povrchové desinfekce semen
- sterilní izolace embryí
- inokulace embryí na povrch agarem ztuženého média M-S.
- hodnocení experimentu - rychlost růstu klíčících rostlin (délka kořenů a prýtlů)

Somatická embryogeneze

definice, historie objevu

iniciace

využití

Somatická (adventivní) embryogeneze

vývoj bipolární struktury embryonálními stadii **bez fúze gamet**

1. spontánní SE *in vivo*

somatická pletiva - kapradiny, orchideje, *Kalanchoe*
reprodukční pletiva - *Citrus*, *Mango*

2. indukovaná SE *in vitro*

nepřímá - přes stadium kalusu

přímá - meristémy, zygotická embrya, klíčící rostliny

Totipotence somatických buněk

Každá buňka obsahuje celou sadu genetických informací, které jsou nezbytné k vytvoření celé rostliny. Časová a prostorová exprese genů je přesně regulována, aby došlo k diferenciaci různých orgánů.

Indukce SE musí sestávat z ukončení exprese genů vedoucích k diferenciaci orgánů a jejich nahrazení programem embryogenních genů („přepnutí morfogenetického programu“)

auxiny

2,4-D
picloram

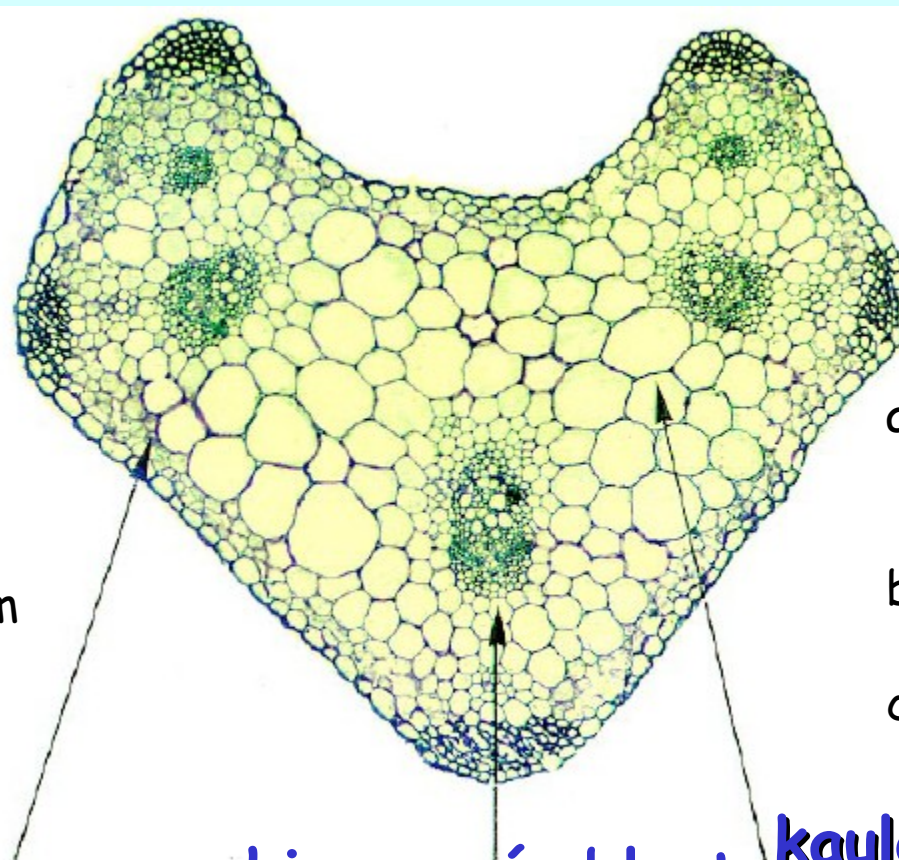
Co víme o somatické embryogenezi a na co se musí výzkum koncentrovat

Základní požadavky jsou obecně platné i pro zygotickou embryogenezi = regulace dělení a diferenciacie pletiv

Požadavky na indukci somatické embryogeneze:

- kompetentní buňky
- vhodné prostředí
- stimul

Regenerational responses of various parts of cultured petiole explants of *Daucus carota* (Schäfer et al., 1985).



- a) růst cytoplazmy a dělení buněk = 12 D
- b) stadium 4 buněk = 14 D
- c) globulární stadium = 18D
- d) srdcovité stadium = 24 D
- e) torpédovité stadium = 28 D
- f) zralá embrya = 30 D

- a) růst cytoplazmy a dělení buněk = 5D
- b) Primordium stonku = 12 D
- c) objevení se prýtu = 23D

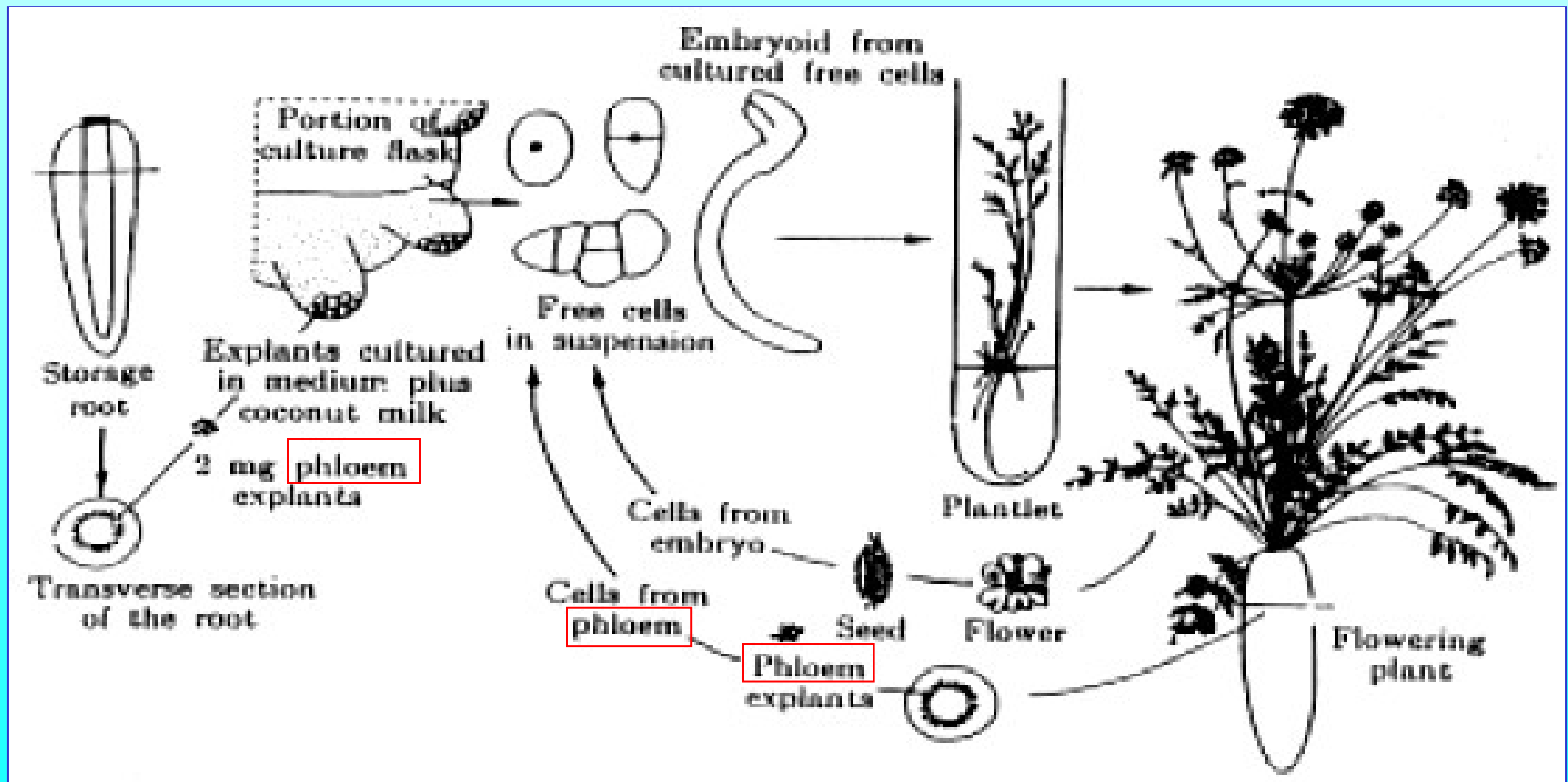
embryogenní oblast

rhizogenní oblast

kaulogenní oblast

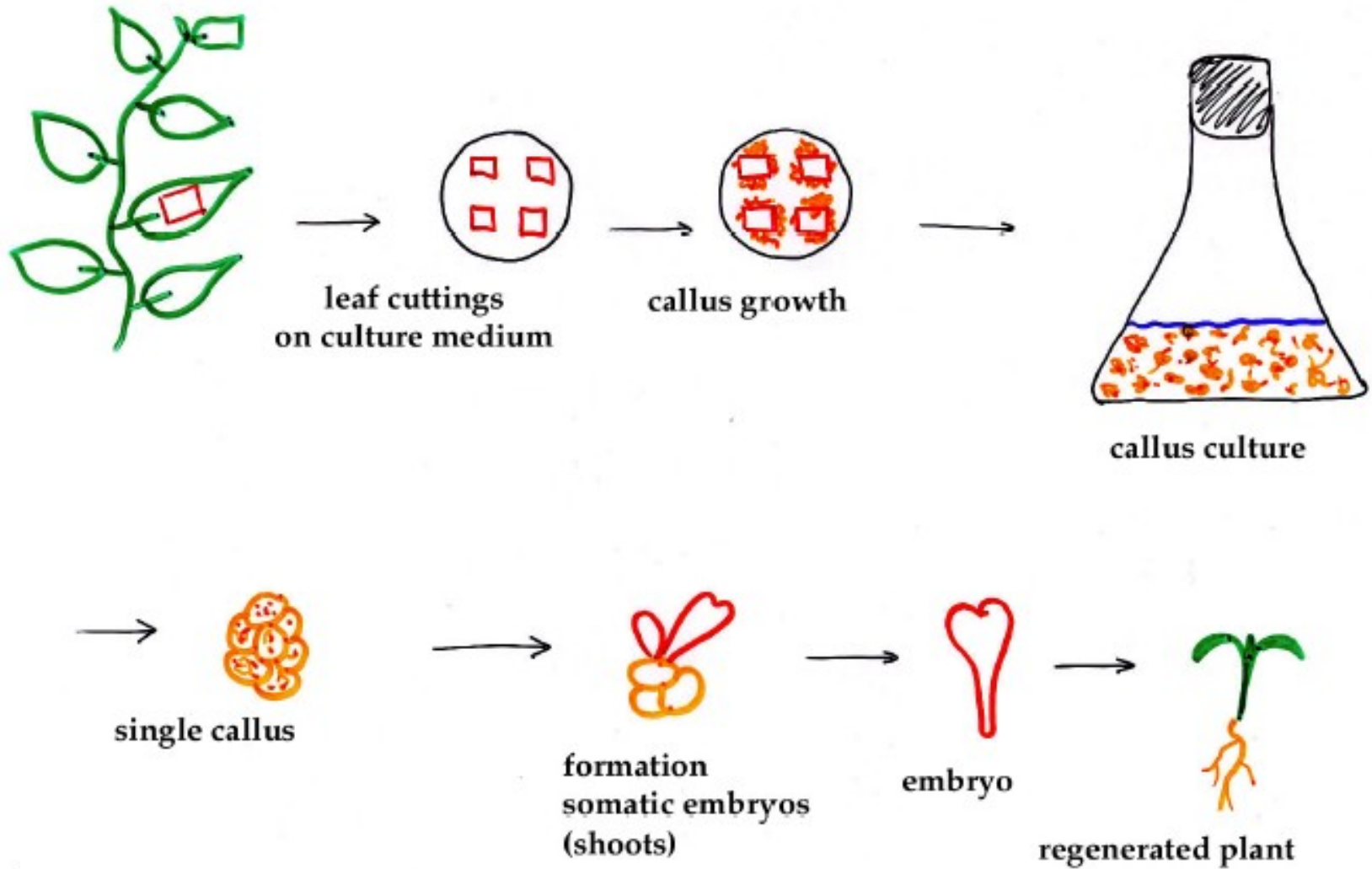
- a) růst cytoplazmy a dělení buněk = 2D
- c) primordium kořene = 5D
- d) objevení se kořene = 7-10D

Produkce somatických embryí odvozených od kořenových explantátů mrkve



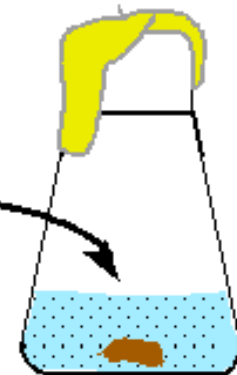
Steward et al. Science, 143, p. 20-27, 1964

Somatic embryogenesis



Somatic embryogenesis of *Daucus carota*: standard protocol

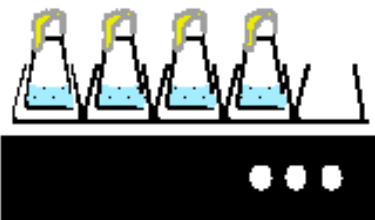
(Ammirato, 1983)



Place 0.5-1 cm petiole explant or 0.5cm³ storage root explant on MS agar medium + 4.5 μM 2,4-D

After 4 weeks growth (dark or lighted) there is enough callus

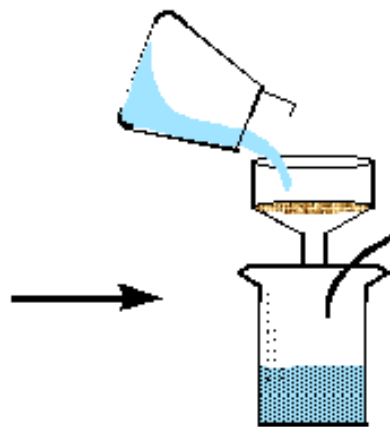
Subculture 2.0 -3.0 g of callus into 50ml of MS liquid medium + 4.5 μM 2,4-D contained in a 250 ml Erlenmeyer flask



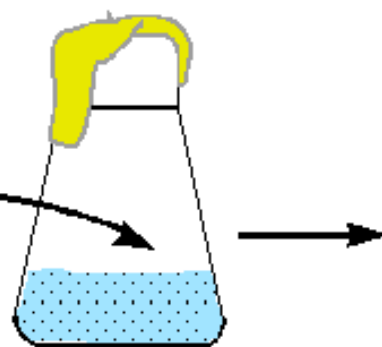
Erlenmeyers are placed on a gyrotary shaker and maintained at 25°C and agitated 125-160 rpm

Subculture every 14-18 days

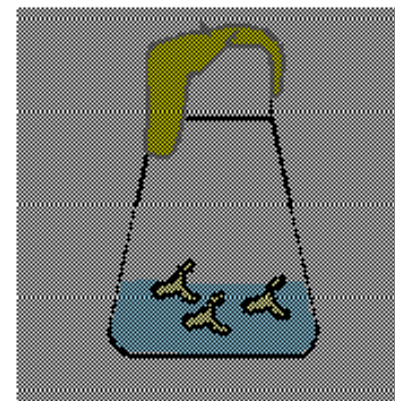
Aseptically aspirate and/ or decant the stale medium and resuspend the cells onto culture medium devoid of 2,4-D for initiation of embryo development



Pass the proembryo suspension through a series of mesh sieves for a uniform embryo population.



Transfer the washed and sieved suspension to 50ml of MS basal medium in Erlenmeyers. For more normal embryo development and to inhibit precocious germination, especially root elongation, 0.1-1 μ M ABA can be added



For more normal development cultures should be grown in darkness. Embryos should appear in about 8 days and reach mature size in 10-15 days



Somatic embryos can be placed out on agar medium devoid of 2,4-D for plantlet development



Plantlets are transferred to Jiffy pots or vermiculite for subsequent development

Vývojová stadia somatických embryí



globulární

srdcovité

torpédovité

kotyledonární

Zrání somatických embryí a desikace

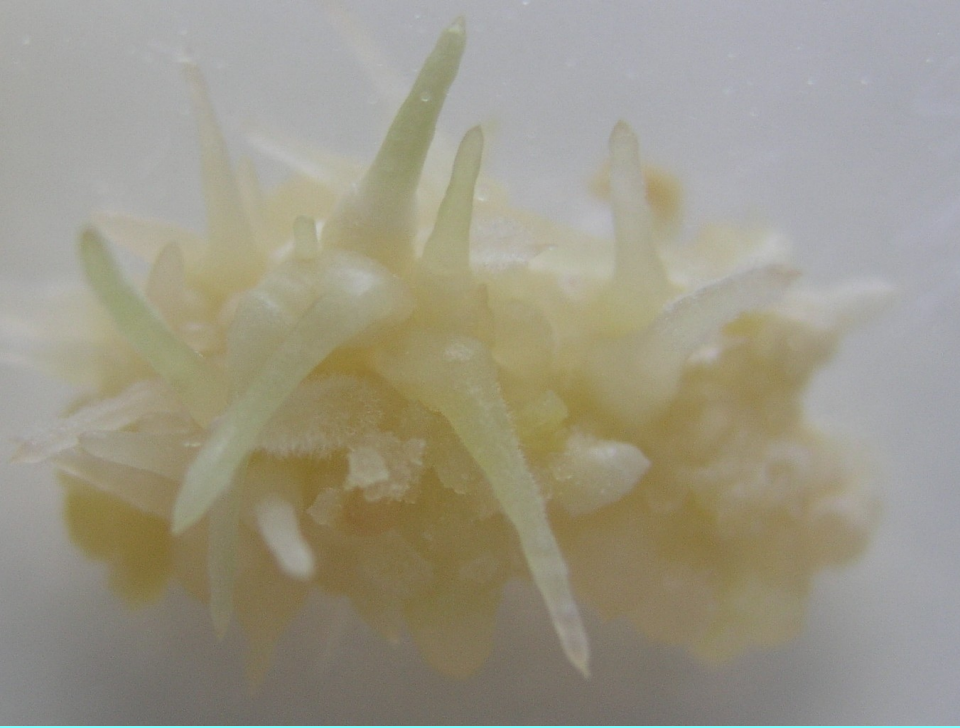
- Předčasné klíčení = torpédovité embryo pokračuje v růstu do klíčící rostlinky bez fáze dozrávání = chybí zásobní látky a tolerance k vyschnutí
- Akumulace zásobních proteinů
- Nárůst obsahu kyseliny abcisové



Nepřímá somatická embryogeneze

somatická embrya *Aesculus hippocastaneum*
odvozená z květenství

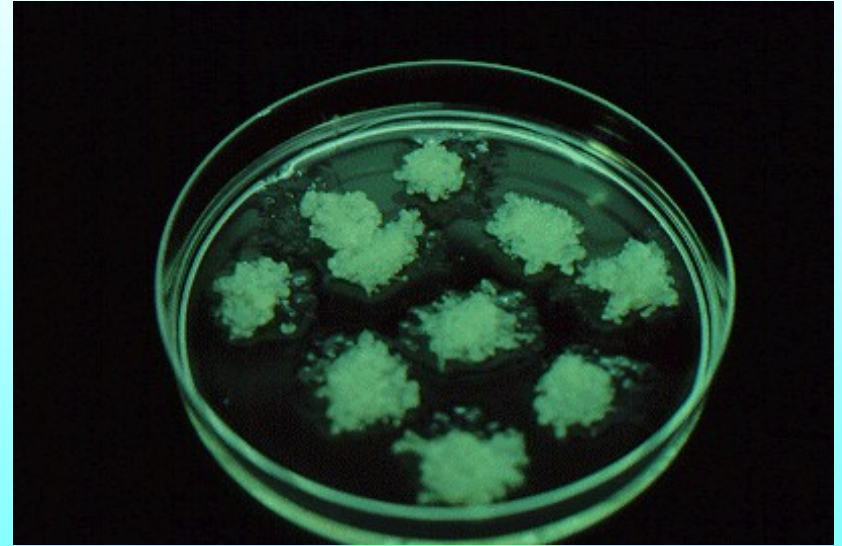
Nepřímá somatická embryogeneze na kalusu Inu



Somatic embryogenesis u dřevin



Hevea brasiliensis



Sitka spruce (*Picea sitchensis*) (Photo: Dr. P.Krogstrup)

Jednobuněčný *versus* mnohobuněčný původ SE

Haccius (1978)

SE - nová individua vznikající z jedné buňky a jsou bez spojení s cévními svazky mateřského pletiva

Raghavan (1976) a jiní

mnoho případů, kde zjevně bipolární embryoidy vznikly z agregátů buněk

Maheswaran et Williams (1985) - u přímé SE existuje gradient spojený s postupnou diferenciací pletiv - viz schema

Rozdíly mezi přímou a nepřímou SE (Sharp *et al.* 1980)

přímá SE - embryogenní buňky jsou již přítomny na explantátu = **pre-embryogenně determinované buňky (PEDC)**, které potřebují pouze vhodné podmínky, aby došlo k expresi embryogeneze

nepřímá SE - napřed musí dojít k redeterminaci diferencovaných buněk = proliferace kalusu a v něm u části buněk se uskuteční **indukce embryogenně determinovaného stavu (IEDC)**

Kompetence k somatické embryogenezi u mrkve

Generally speaking, some hierarchical order within the plant seems to exist for many species, with highest success using embryonic cell material, followed by that of the hypocotyl, the petiole, the young leaves and finally the root (Fig. 4).

Embryo > Hypocotyl > Petiole > Leaf lamina > Root

Fig. 4 Competence to somatic embryogenesis in carrot (*Daucus carota* L.)

To this loss of embryogenic competence during ontogenesis, however, some exceptions exist and one of these is *Daucus carota*, the common carrot. Here it is possible to culture intact six to eight weeks old plants aseptically and partly submerged in an appropriate medium containing an auxin, and within about 4 weeks somatic embryos from all parts of the shoot appear (Fig. 5). If IAA is used as the auxin adventitious roots emerge about two weeks earlier (Schäfer et al. 1988). In this system the competence to somatic embryogenesis is apparently preserved beyond the embryo stage and it can be activated rather easily by a suitable environment.

embryo > hypokotyl > řapík > listová čepel > kořen

Umělá semena

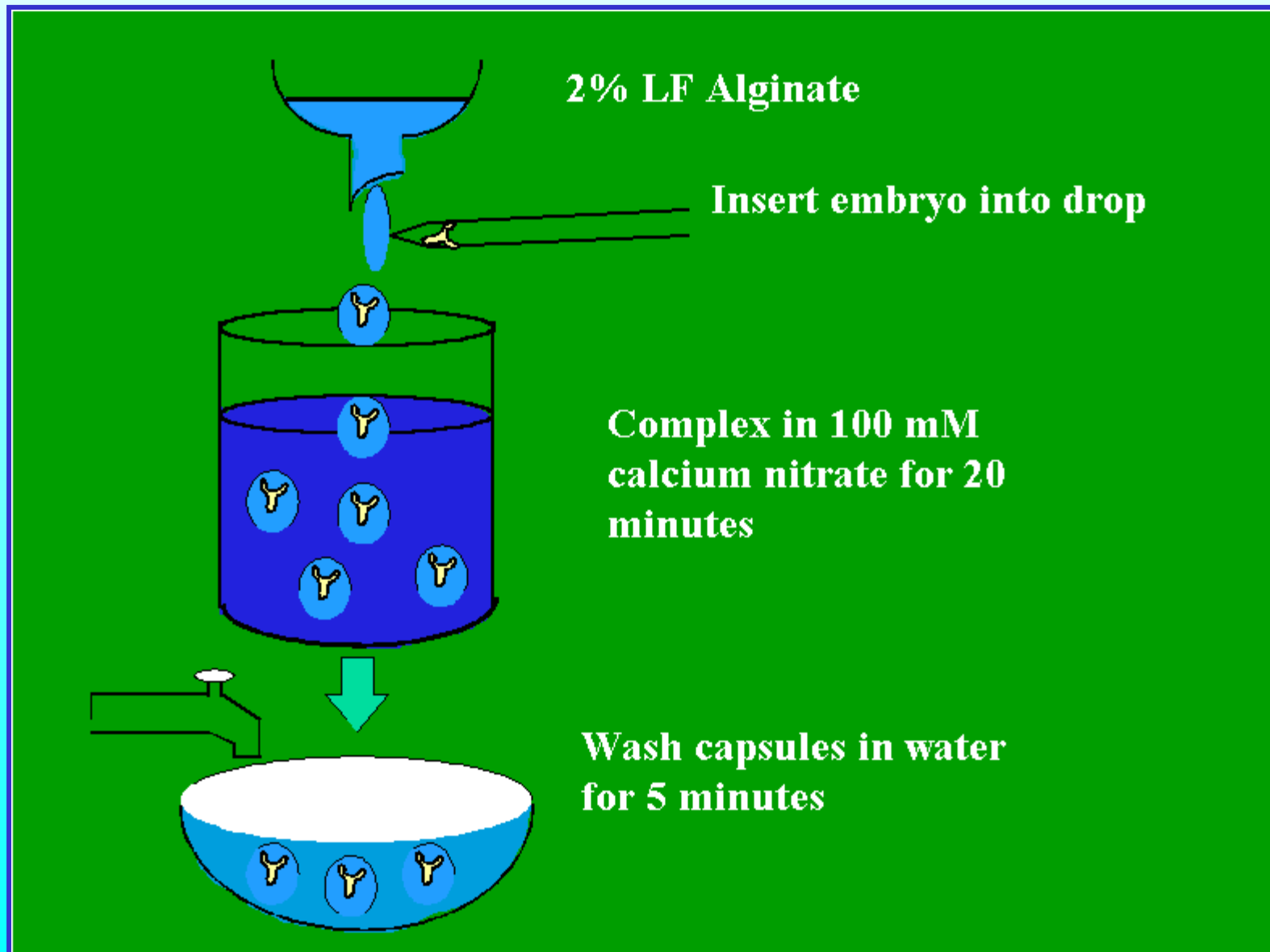
Syntetická nebo **umělá semena** jsou jednotlivá enkapsulovaná somatická embrya. Termín '**embling**' se často používá pro označení rostlinek pocházejících ze somatických embryí nebo syntetických semen.

Na-alginát se často používá pro enkapsulaci embrya. Byly vyvinuty rovněž speciální gely, které se samovolně rozkládají.

Limitující faktory pro širší použití a tvorbu umělých semen ve větším měřítku:

- kvalita a pravidelná tvorba somatických embryí
- konverze embryí

Příprava umělých semen



Umělá semena



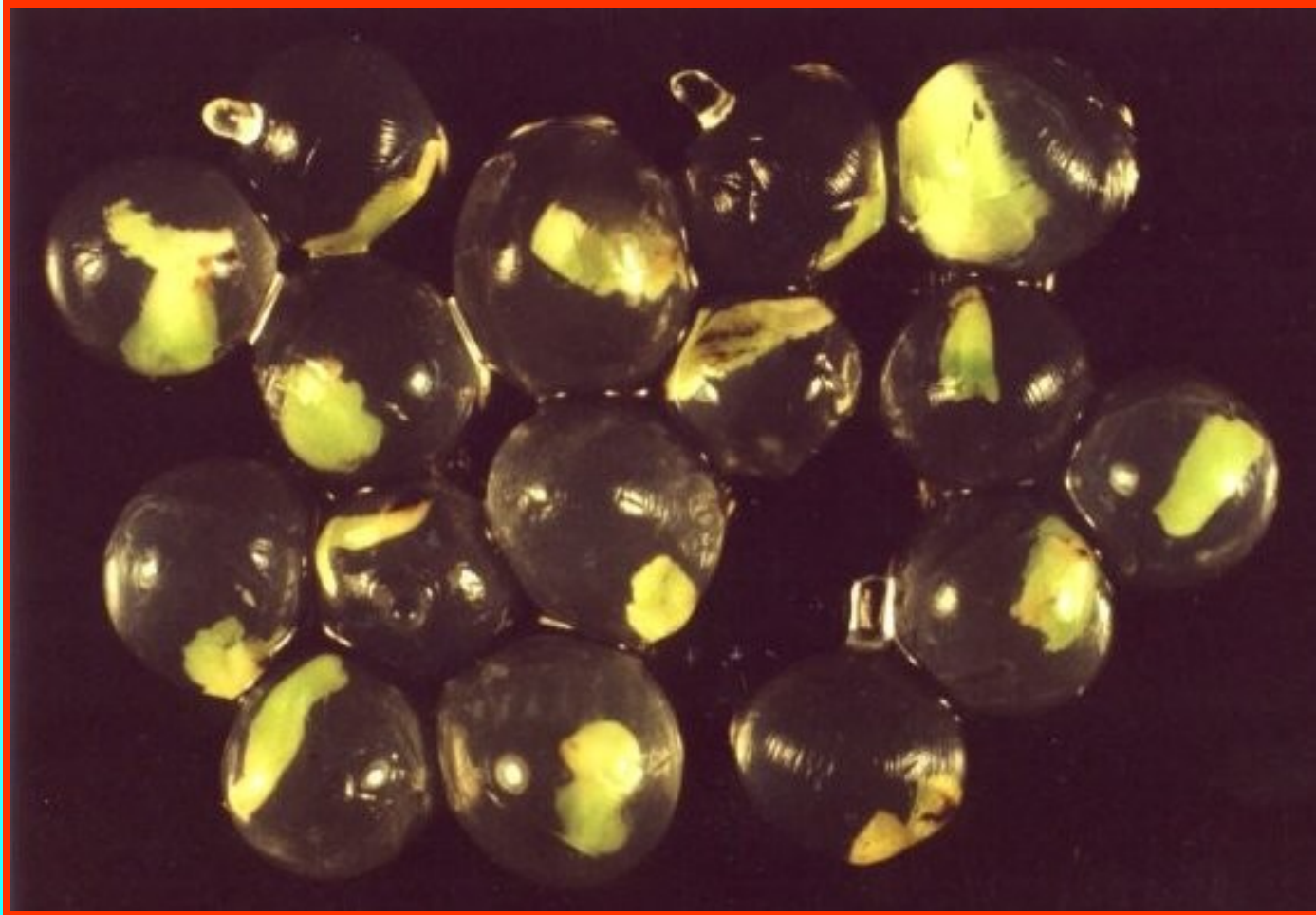
embryo enkapsulované v
alginátu sodném

Problémy:

nepravidelnosti utváření SE (často nedokonale vyvinuté, absence meristému, velké interceluláry, absence zásobních látek a ABA)

konverze

Somatické embryá sóje enkapsulovaná v alginátu



Dr. Griga, Agritec s.r.o.

<http://people.whitman.edu/~vernondm/embryo/plant.html>

*embryogeneze *Arabidopsis**

<http://bibd.uni-giessen.de/ghtm/2000/uni/p000004.htm>

somatická embryogeneze a biotechnologie

<http://www.cirad.fr/presentation/programmes/biotrop/resultats/biositecirad/es.htm>

somatická embryogeneze – kaučukovník, rýže, banánovník apod.

<http://www.botanic-garden.ku.dk/eng/forskning/vaev2.htm>

somatická embryogeneze – jehličnany

Využití SE - praktické i teoretické

1. u mnoha laboratoří je dnes SE základní metodikou pro množení transgenních rostlin
2. zatím ale není plně pochopeno ani její cytologické ani fyziologické nebo biochemické pozadí podstaty.
3. praktické aplikace jsou zřejmé, ale SE je stále i objektem základního výzkumu, který by měl vést k pochopení diferenciaci jako jednoho ze základních rysů biologických systémů.

Otázky pro další výzkum

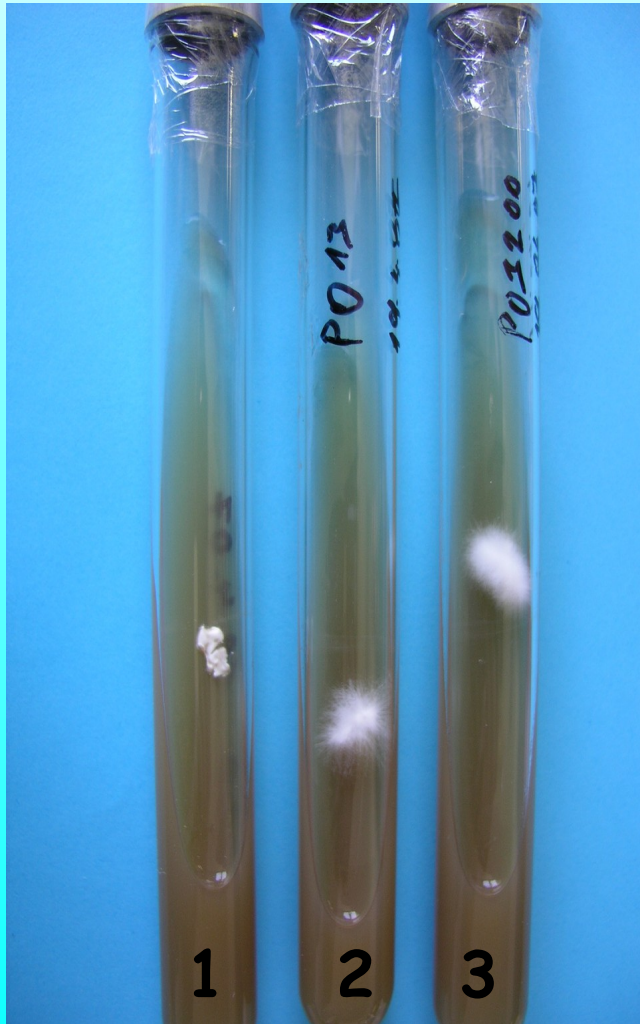
1. Co je podstatou konstituce embryogenní kompetence na buněčné a molekulární úrovni?
2. Jak jsou embryogenně kompetentní buňky produkovány během ontogeneze rostlin?
3. Molekulární organizace programu somatické embryogeneze a její realizace
4. Jaká je povaha stimulu, který indukuje program embryogeneze u kompetentních buněk?

Kultivace dřevokazných hub

Příklad suspenzní kultury

- uchování čisté kultury mycelia na šikmém agar-sladu (pasáž 1x ročně) **tma, 4°C**
- nárůst hmoty mycelia - Petriho misky s agar-sladovým médiem **termostat, tma, 25°C**
- pasáž mycelia na povrch skleněných perel s 3% sladem **termostat, tma, 25°C**
- roztřepání mycelia a inokulace do 3% sladu **třepačka, 25°C**
- inokulace substrátu nasyceného 3% sladem **termostat, tma, 25°C**
- indukce tvorby plodnic **chladový šok**

Kultivace dřevokazných hub



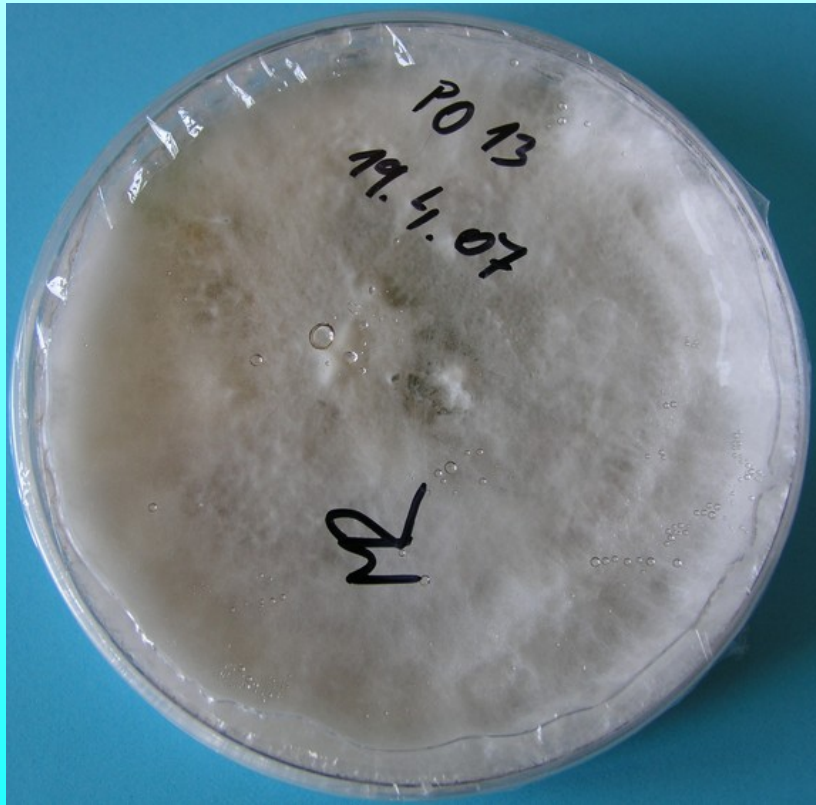
Lentinus tigrinus - houževnatec tygrovaný
(1)

Pleurotus ostreatus - hlíva ústříčná
(2, 3)

růst mycelia na šikmém agaru ve zkumavce
1 týden po pasáži na agar - sladové
médium

(tma, 25°C)

Kultivace dřevokazných hub



Pleurotus ostreatus - hlíva ústříčná

růst mycelia na Petriho misce

2 týdny po pasáži na agar - sladové médium

(tma, 25°C)

Kultivace dřevokazných hub



Pleurotus ostreatus - hlíva ústříčná

růst mycelia na sleněných perlách
2 týdny po pasáži na 3% sladové médium

(tma, 25°C)

Pleurotus ostreatus - hlíva ústříčná



plodnice

kukuřičné šustí a vřetena nasycená sladovým roztokem