

Kultury izolovaných embryí

8.

Jaroslava Dubová

Ústav experimentální biologie
Oddělení fyziologie a anatomie rostlin
Přírodovědecká fakulta, Masarykova univerzita



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

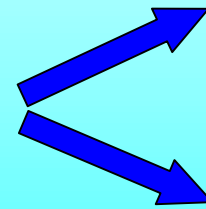
Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Krytosemenné rostliny

Vývoj embrya = embryogeneze

1. zygotická

2. somatická



in situ

in vitro

Co předchází embryogenezi?

Makrosporogeneze = tvorba makrospor

♀ samičí archespor



makrosporocyt



Meióza I,II

tetráda haploidních makrospor

(♂ podobně u samčího gametofytu mikrosporogeneze = tvorba mikrospor)

Co předchází embryogenezi?
♀ Makrogametogeneze
a tvorba zárodečného vaku

(a podobně ♂ mikrogametogeneze = tvorba pylových zrn)

tetráda haploidních makrospor



fungující makrospora (makrospory)



mitotická dělení

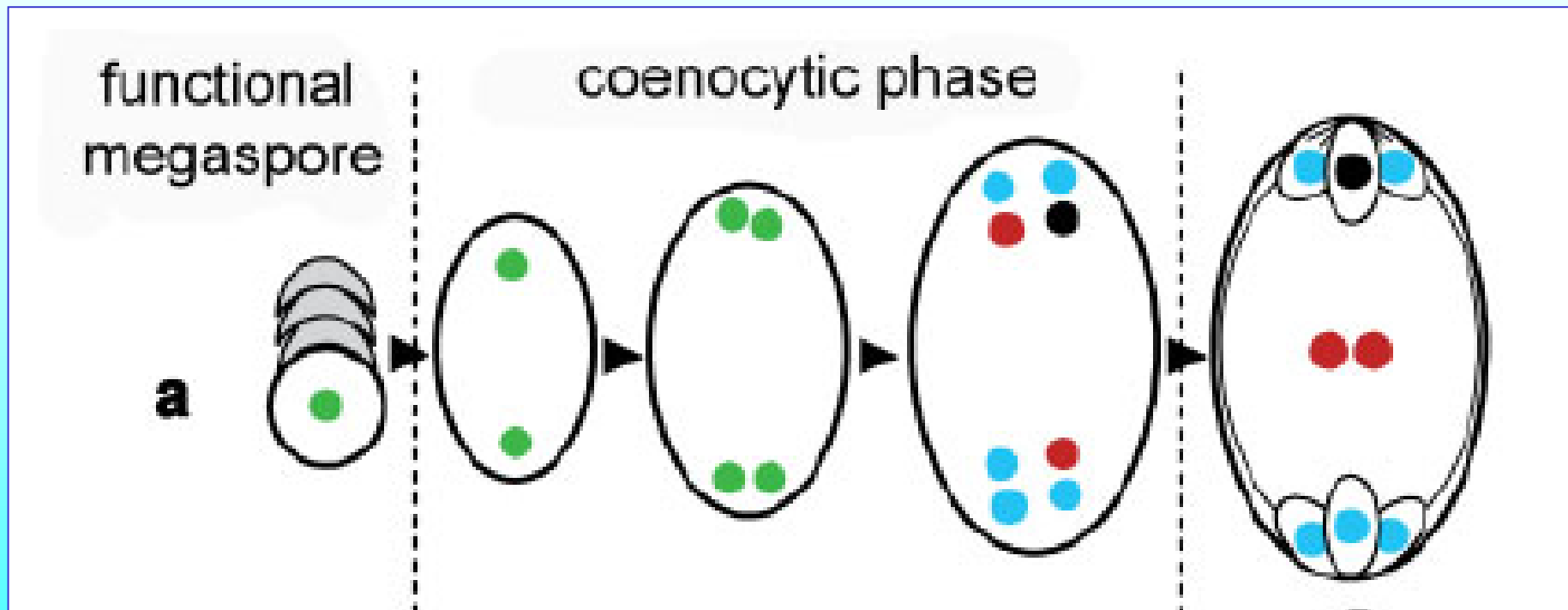
mladý zárodečný vak



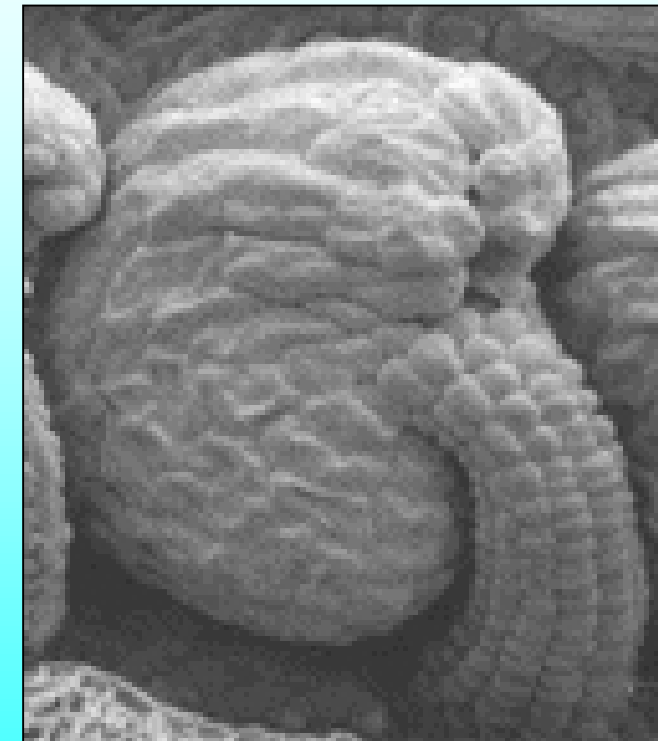
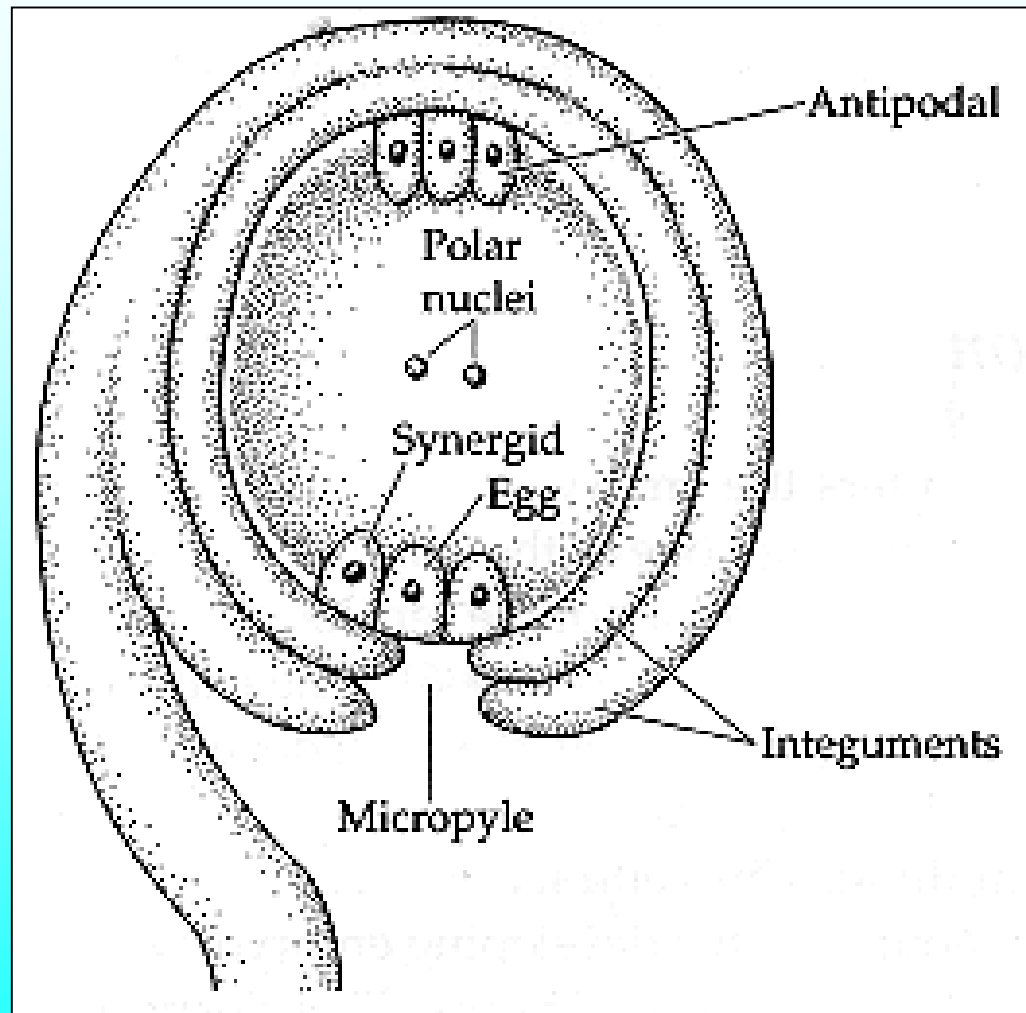
diferenciace buněk

zralý zárodečný vak = samičí gametofyt
monosporický, bisporický, tetrasporický

Vývoj zárodečného vaku typ *Polygonum*



Anatropní vajíčko - schéma



vajíčko *Arabidopsis*

Co předchází embryogenezi?
opelení, oplození a vývoj zygoty

details podrobněji viz Rostlinná embryologie

Embryogeneze – krytosemenné rostliny

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 (vaječná a spermatická buňka)

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

vývojová stadia embrya u **dvouděložných rostlin:**

zygota

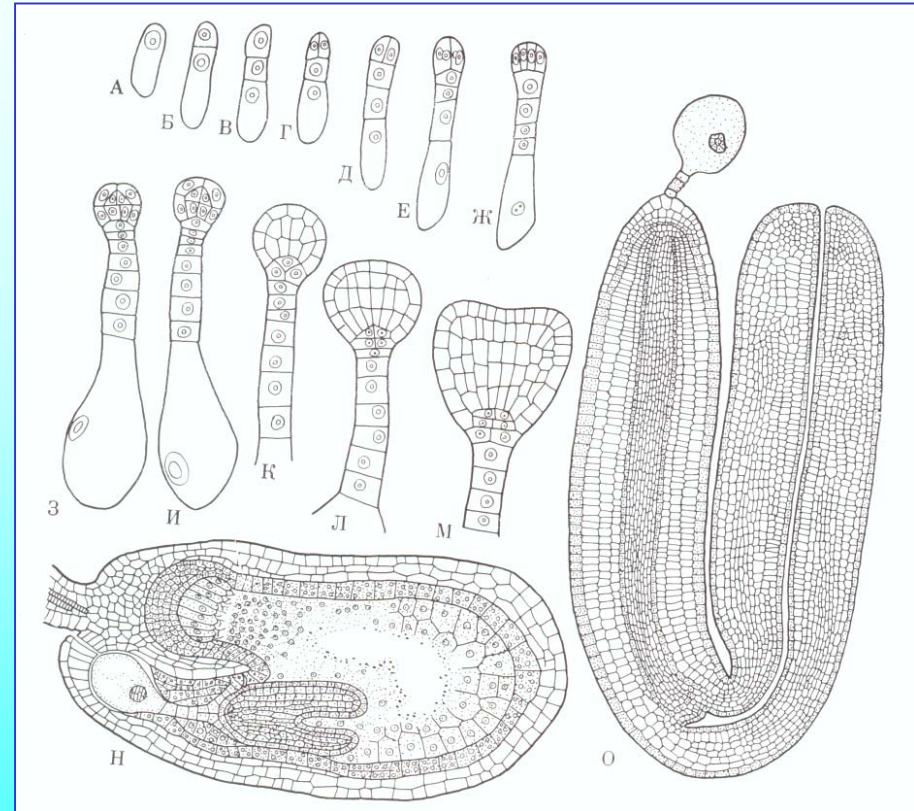
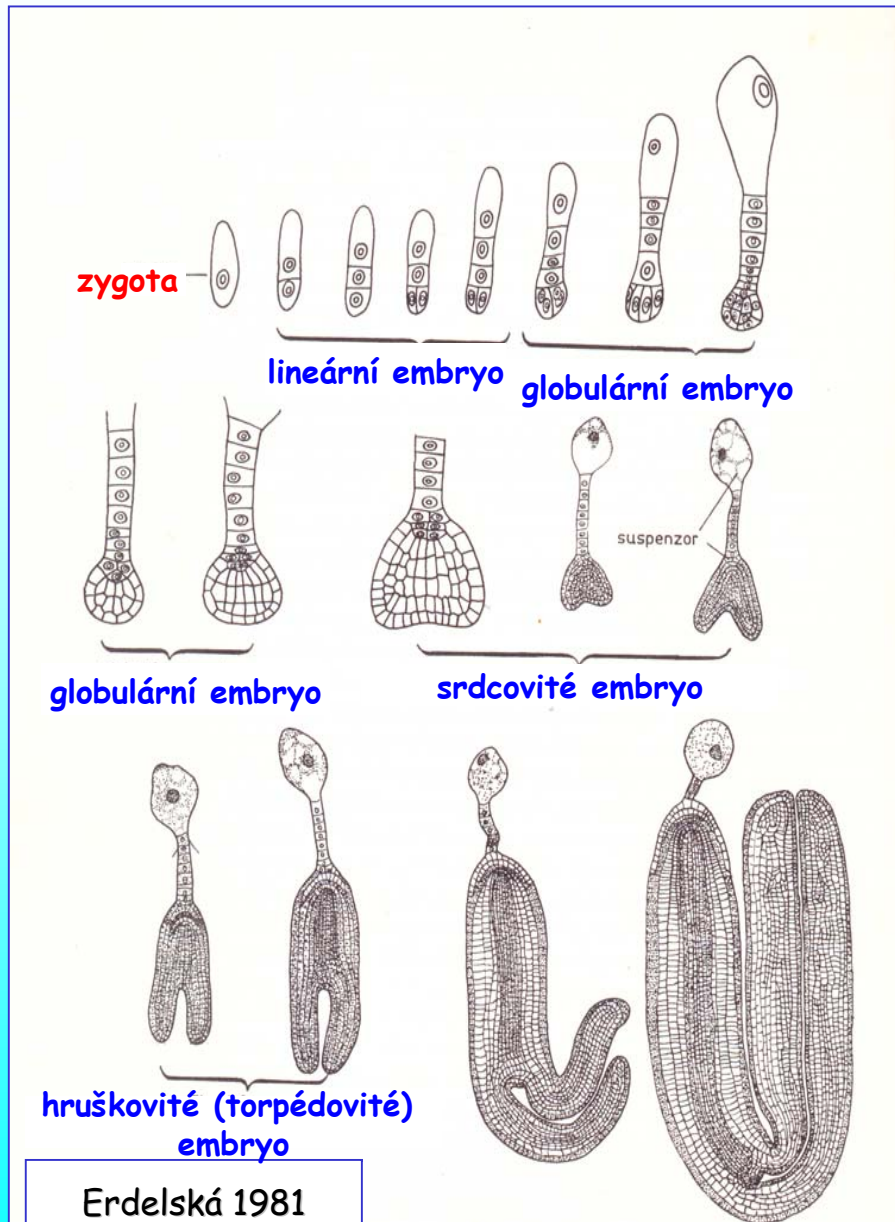
globulární embryo

srdcovité embryo

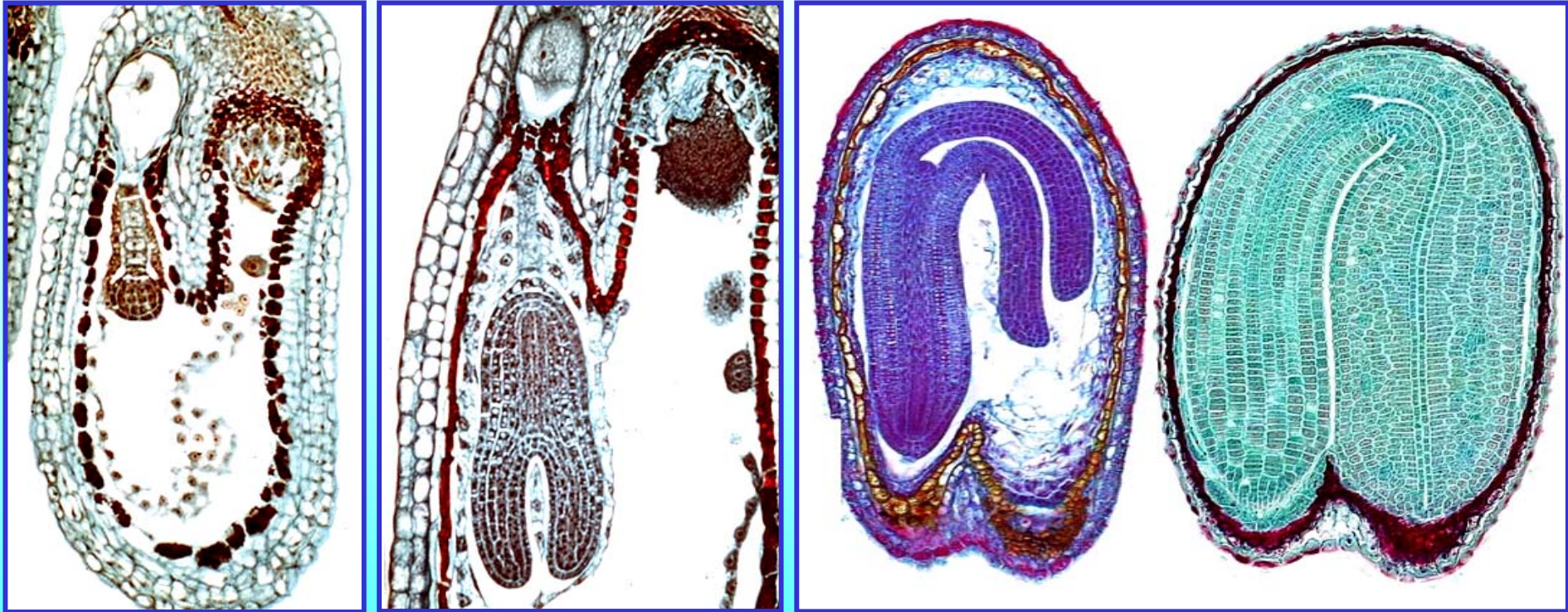
hruškovité (torpédovité)

zralé embryo

Embryogeneze *Capsella bursa-pastoris*



Capsella bursa-pastoris - vývojová stadia embrya



globulární embryo

torpédovité embryo

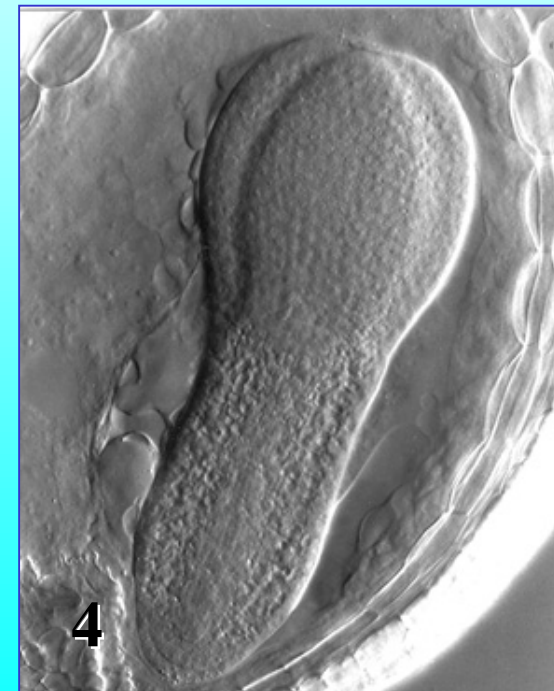
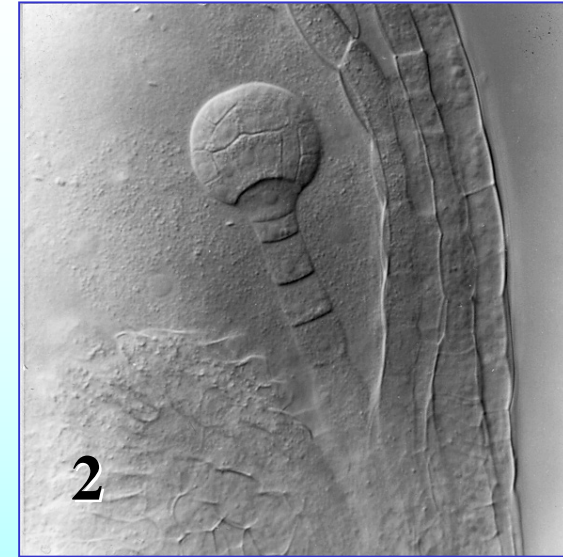
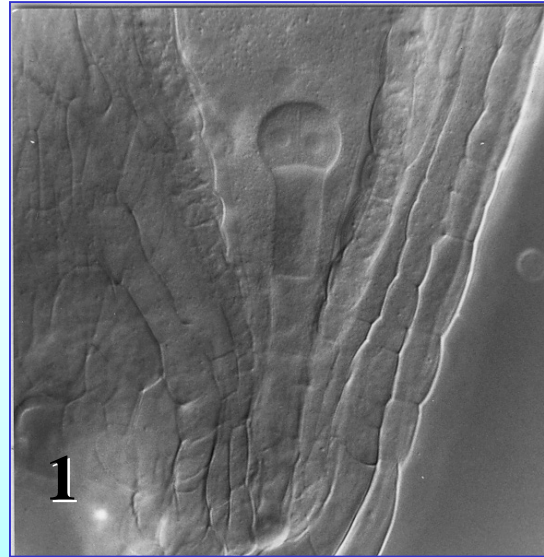
starší torpédovité
embryo

zralé embryo

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

Embryogeneze *Arabidopsis* - Nomarski DIC

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

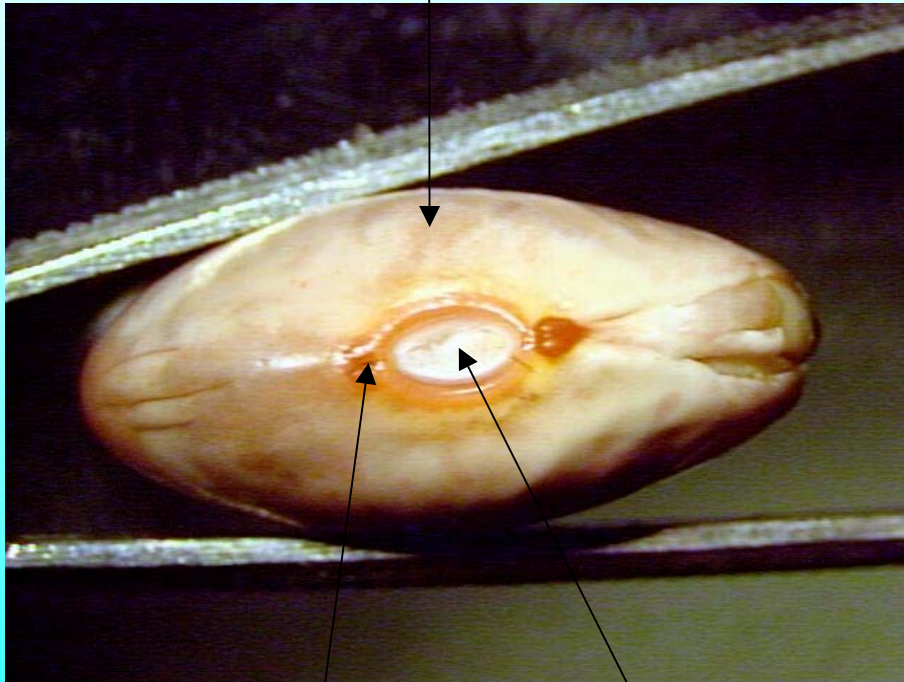


DM Vernon and D Meinke (1994)
Dev. Biol. 165: 566-573.

Photos by DM Vernon

Semeno a embryo fazolu *Phaseolus vulgaris* L.

osemení
(testa)

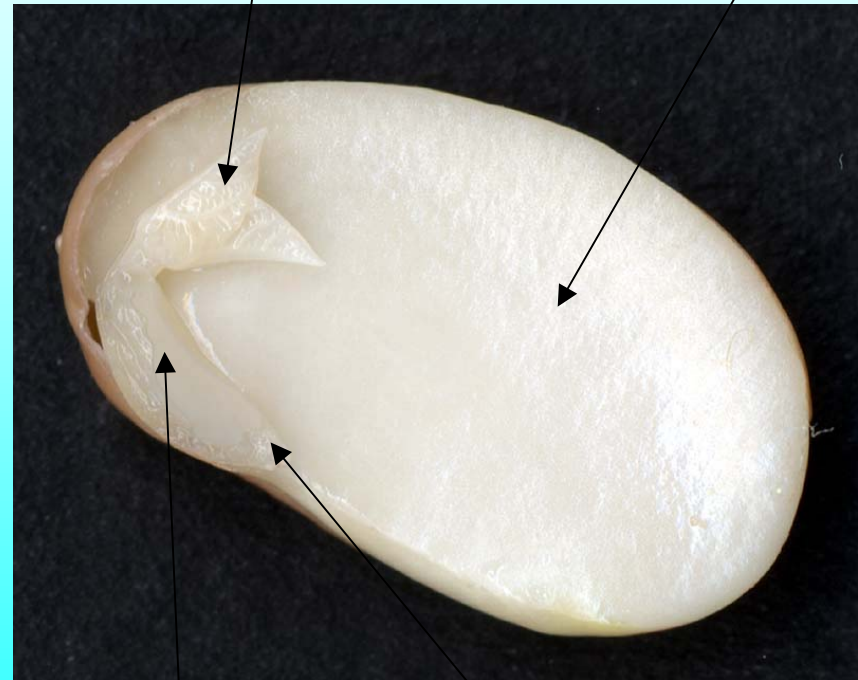


cikatrikula

semenná jizva
pupek = hilum

plumula
apex+pravé listy

děloha
(kotyledon)



hypokotyl

radikula

Kultivace izolovaných zygotických embryí

historie
aplikace

Historický přehled experimentů

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) - izolace nezralých i zralých embryí

Raphanus a Cochlearia

Knudson (1920 - 1930) výsevy semen *Orchidaceae* (semena s malými embryi) - 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 izolovaných embryí obilovin

Pret'ová - izolovaná embrya lnu (*Linum*)

Rangaswamy

Bajaj

Zenkeler - využití překonání aborce hybridních embryí
po opylení *in vitro*



V. Raghavan

1. kultivace izolovaných zralých embryí
2. kultivace proembryí

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 osemením - 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

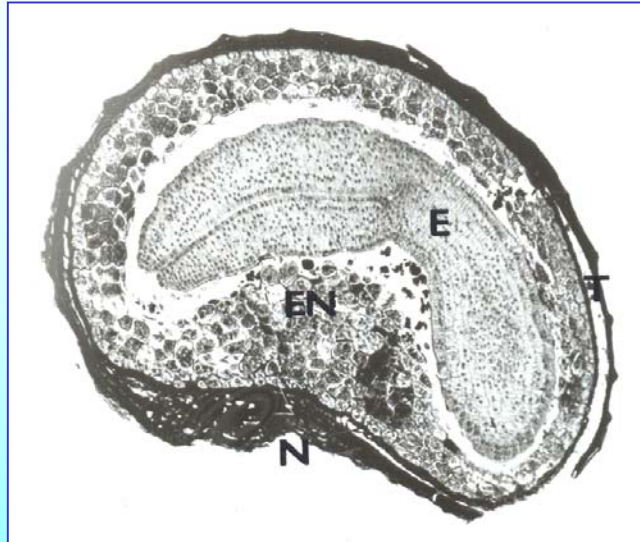
- překonání dormance semen
- překonání aborce embryí („embryo rescue“) po křížení *in situ* nebo *in vitro*

mezidruhové hybridy: bavlník, ječmen, rýže, juta

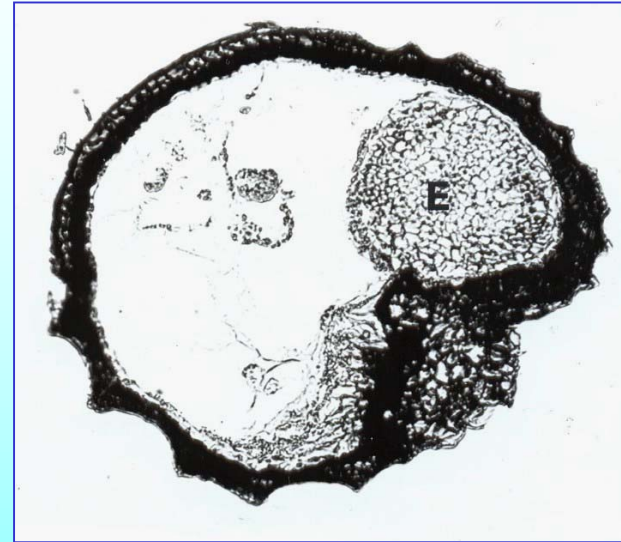
mezirodové hybridy: *Hordeum x Secale*, *Triticum x Secale*, *Hordeum x Hordelymus*, *Tripsacum x Zea*

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

Překonávání aborce embryí po opylování *in vitro*

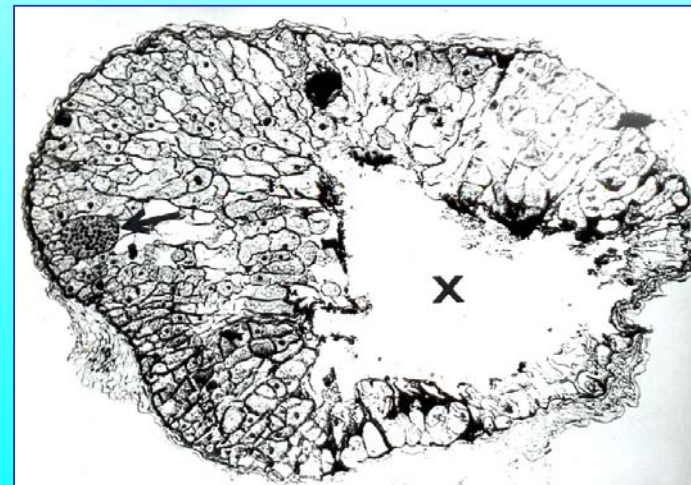
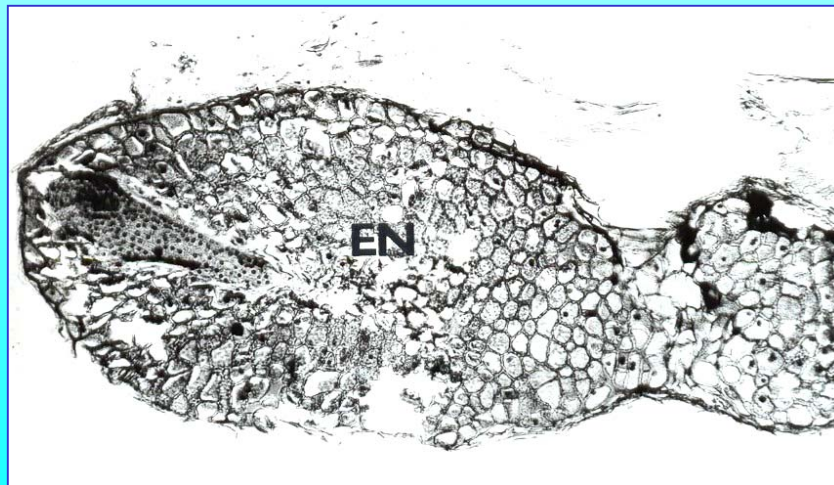


9 MC



Papaver

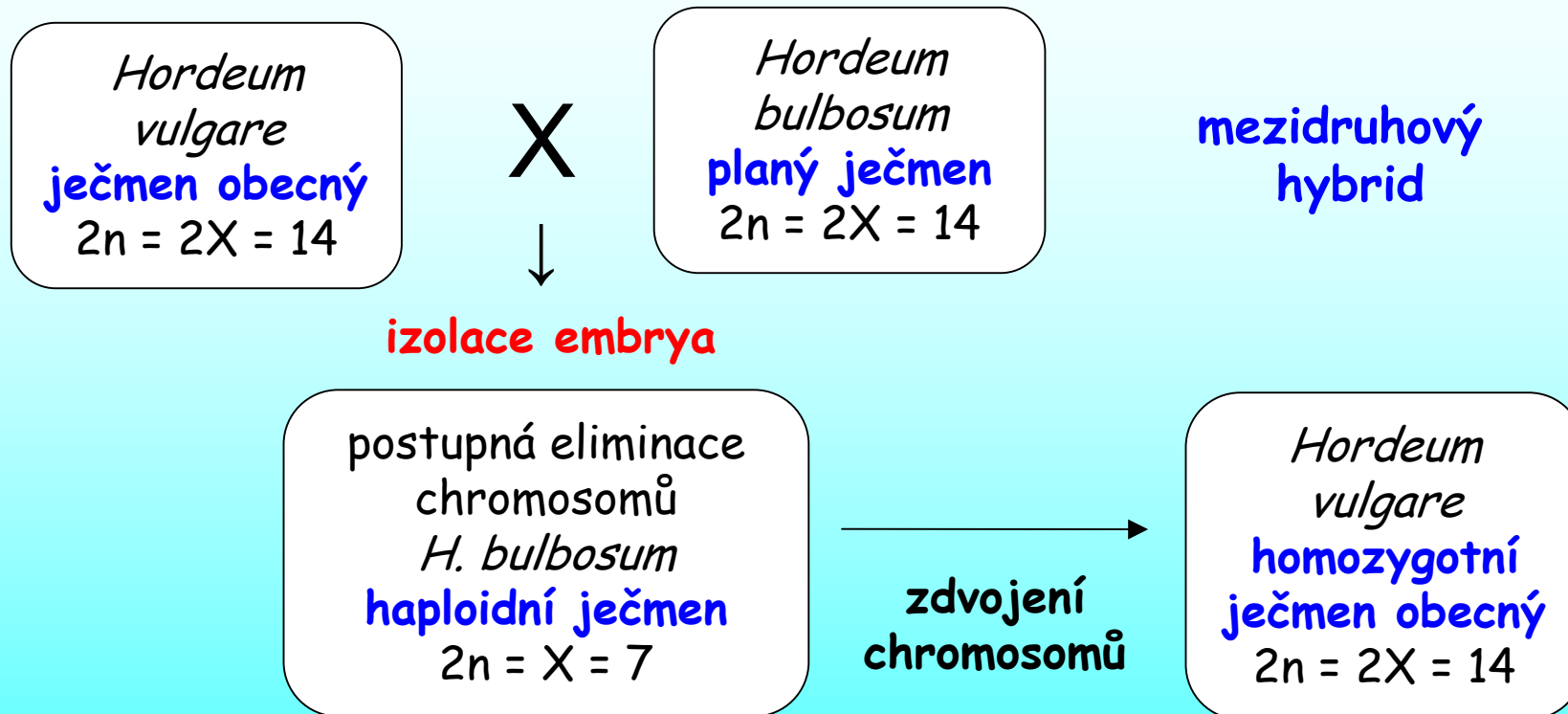
35 DC



Galanthus

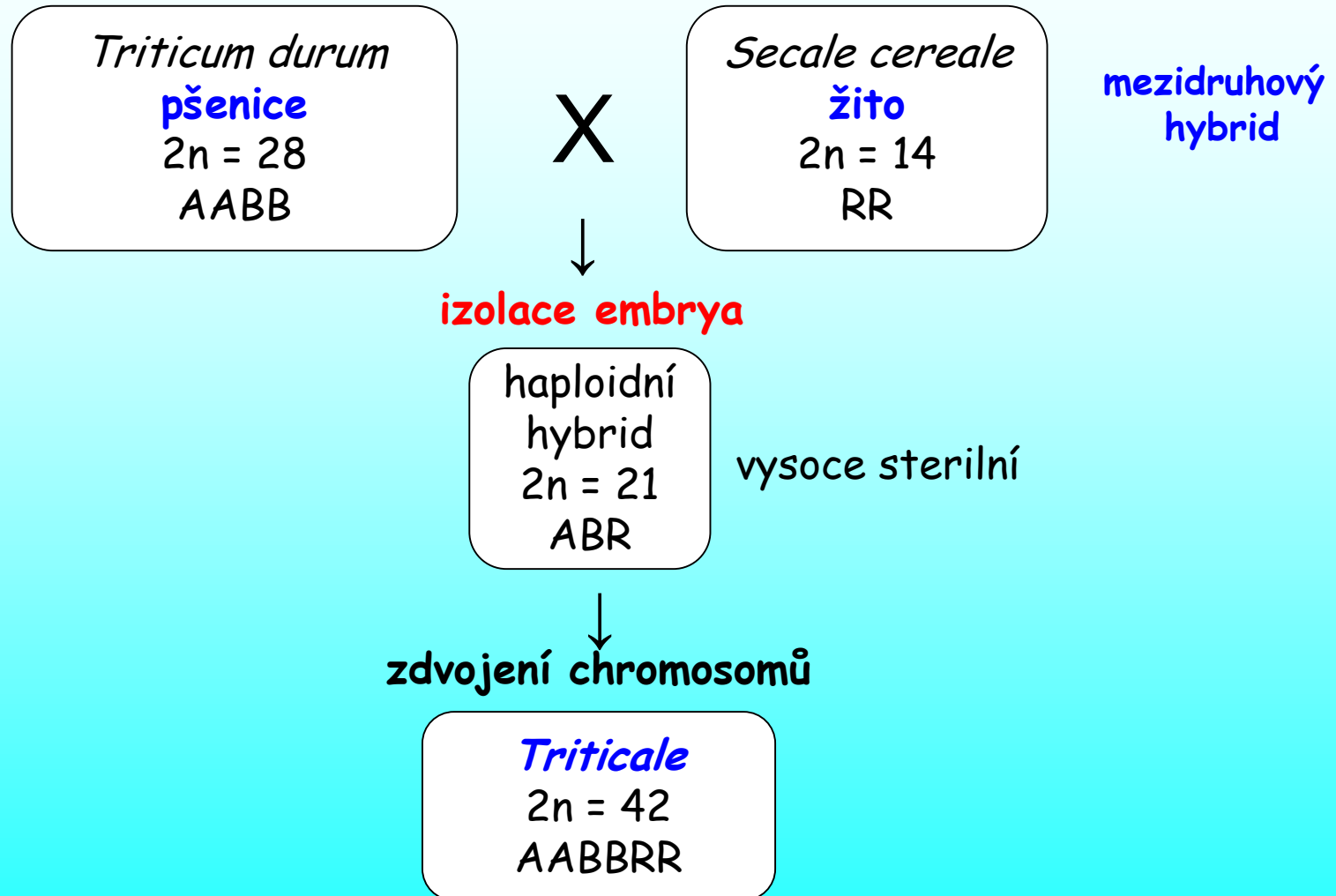
60 DC

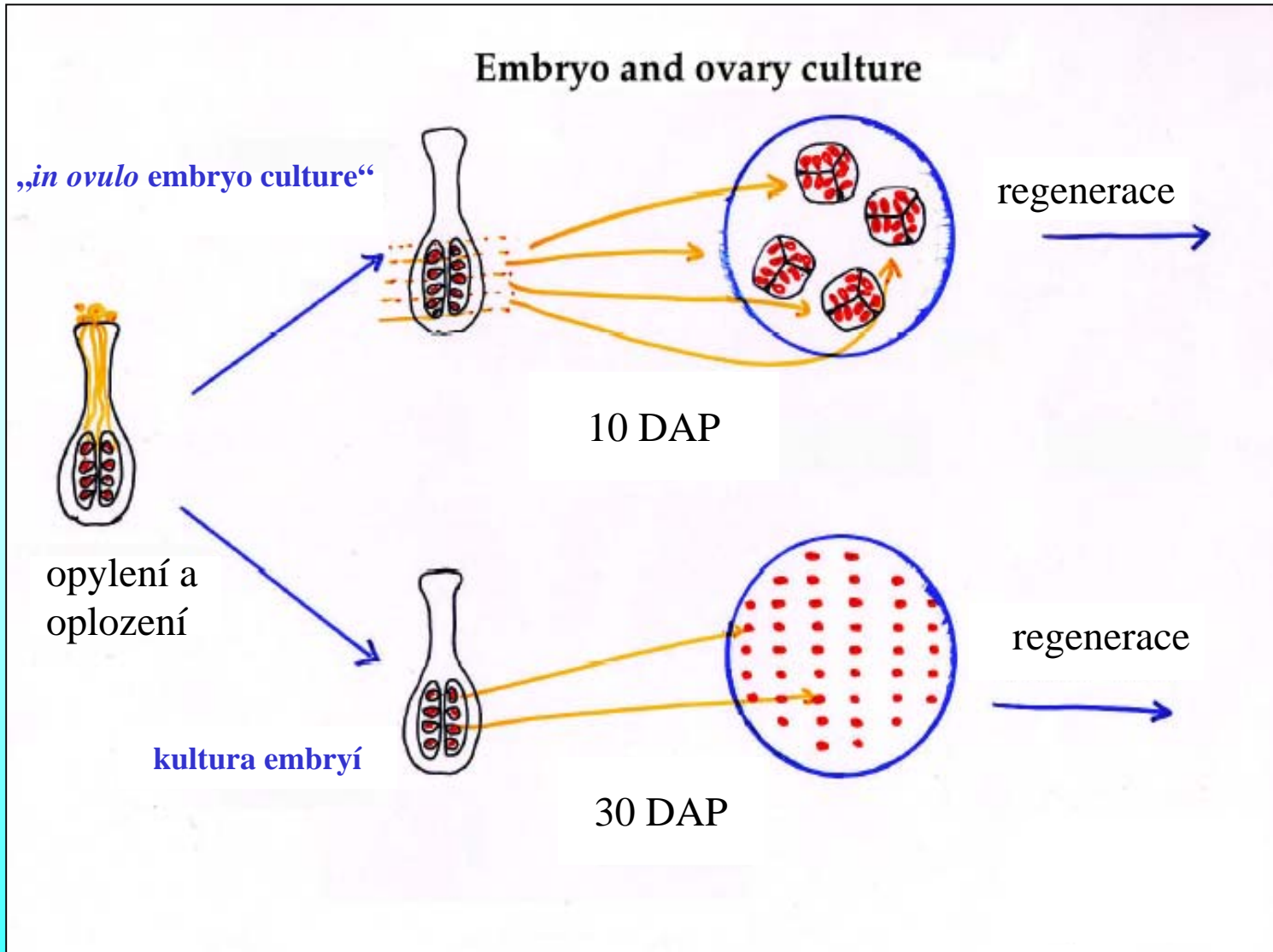
Hordeum bulbosum metoda tvorby haploidů



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

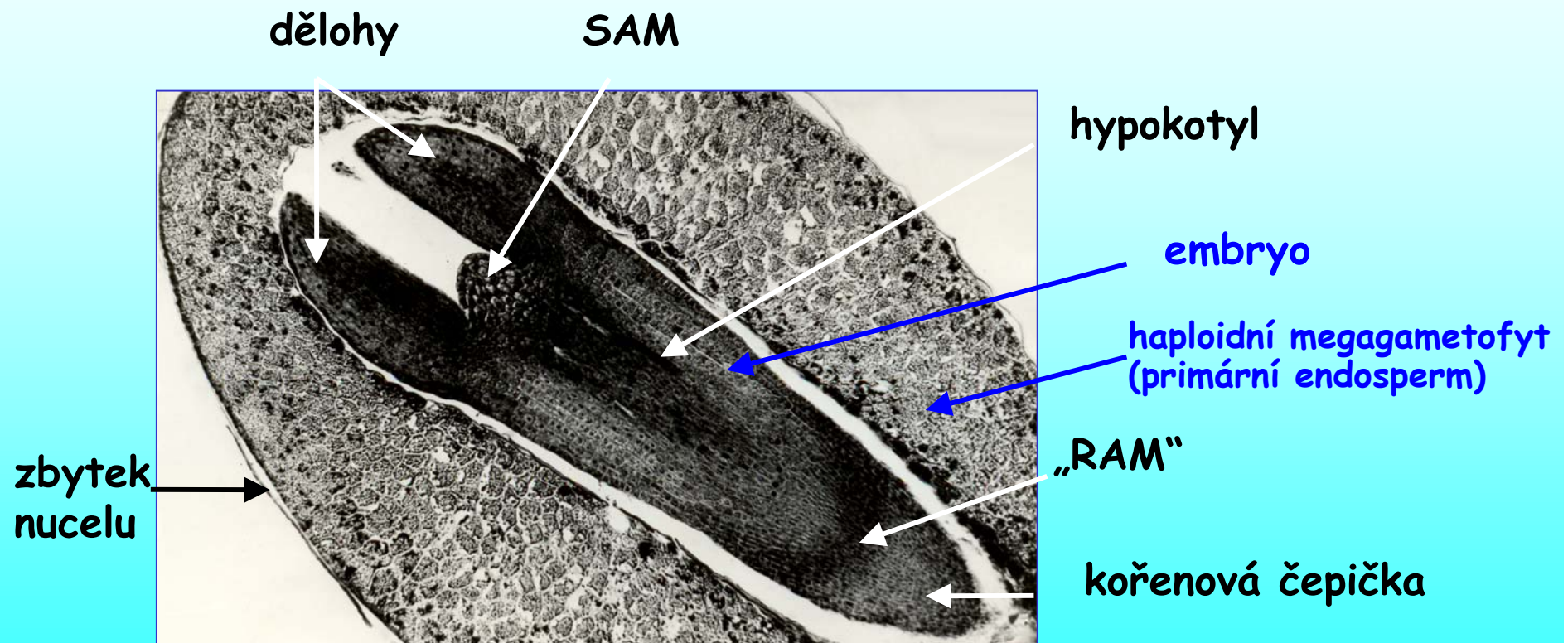
Příklad získání aloploidů





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

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



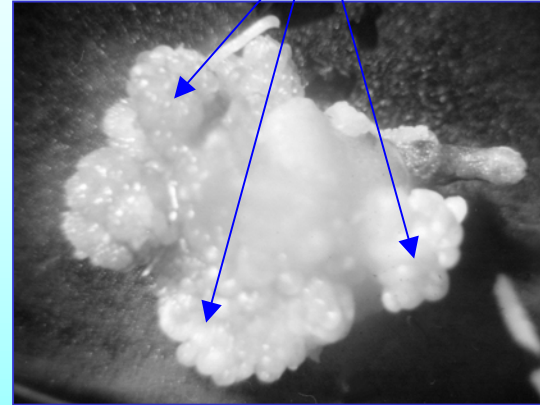
parafínový řez, barveno Heidenheinovým hematoxylinem, **osemení odstraněno** před procedurou

Mikropropagace konifer z izolovaných embryí

Picea
14 DC
médium s BA



adventivní pupeny na hypokotylu



Larix

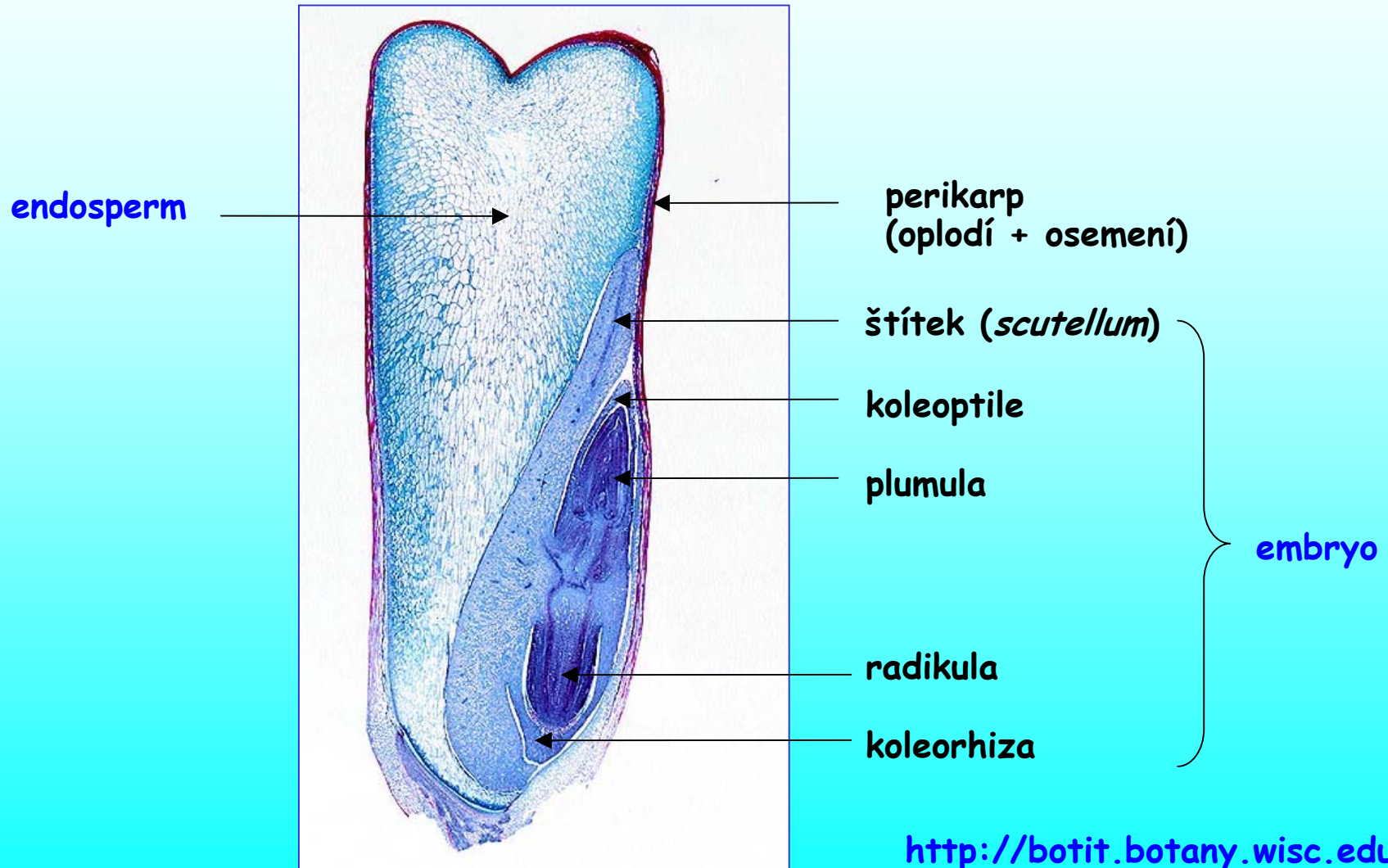


Picea

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 přídavkem auxinu NAA a cytokininu BA (1F), kontrola M-S (1).

Podélný řez obilkou 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 obilek
- sterilní izolace embryí
- inokulace embryí na povrch agarem ztuženého média M-S.
- hodnocení experimentu - rychlost růstu klíčících rostlin (délka kořenů a prýtlů)

Somatická embryogeneze 9.

definice, historie objevu
iniciace
využití



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

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 embryogenním programem („přepnutí morfogenetického programu“)

auxiny

**2,4-D
picloram**

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

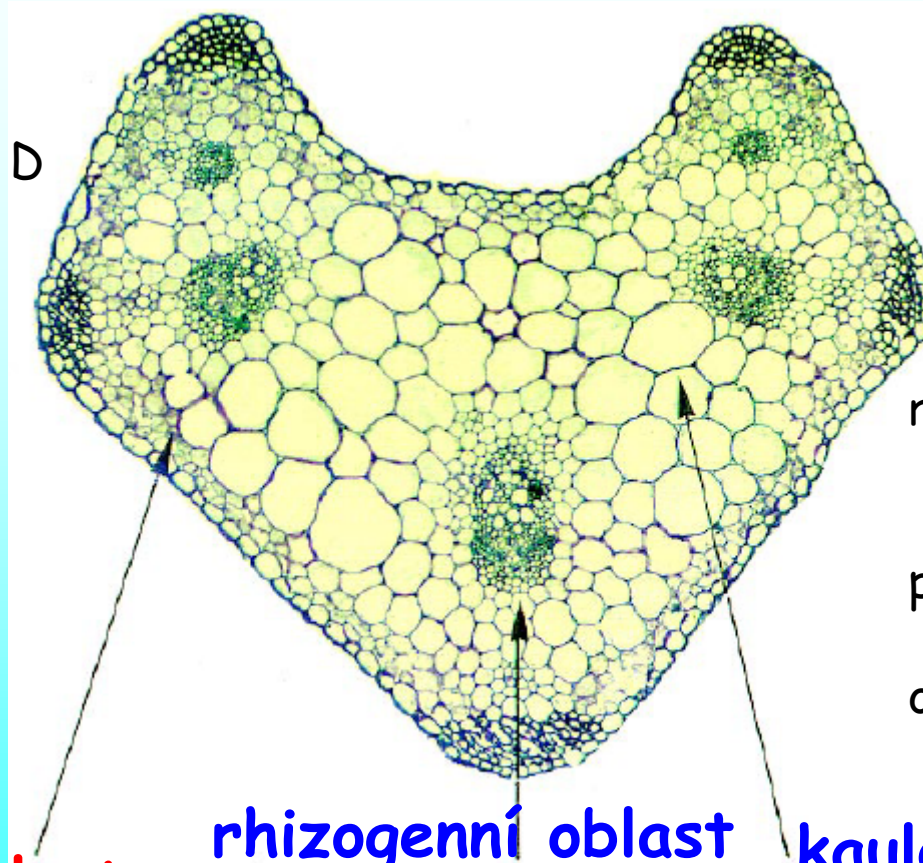
Základní požadavky jsou obecně platné i pro zygotickou embryogenezi = regulace dělení a diferenciace pletiv

Požadavky na indukci somatické embryogeneze:

- kompetentní buňky
- vhodné prostředí
- stimul

Typy regenerace na různých částech explantátu řapíku *Daucus carota* (Schäfer *et al.*, 1985)

růst cytoplazmy
a dělení buněk = 12 D
stadium 4 buněk
= 14 D
globulární stadium
= 18D
srdcovité stadium
= 24 D
torpédovité stadium
= 28 D
zralá embrya
= 30 D



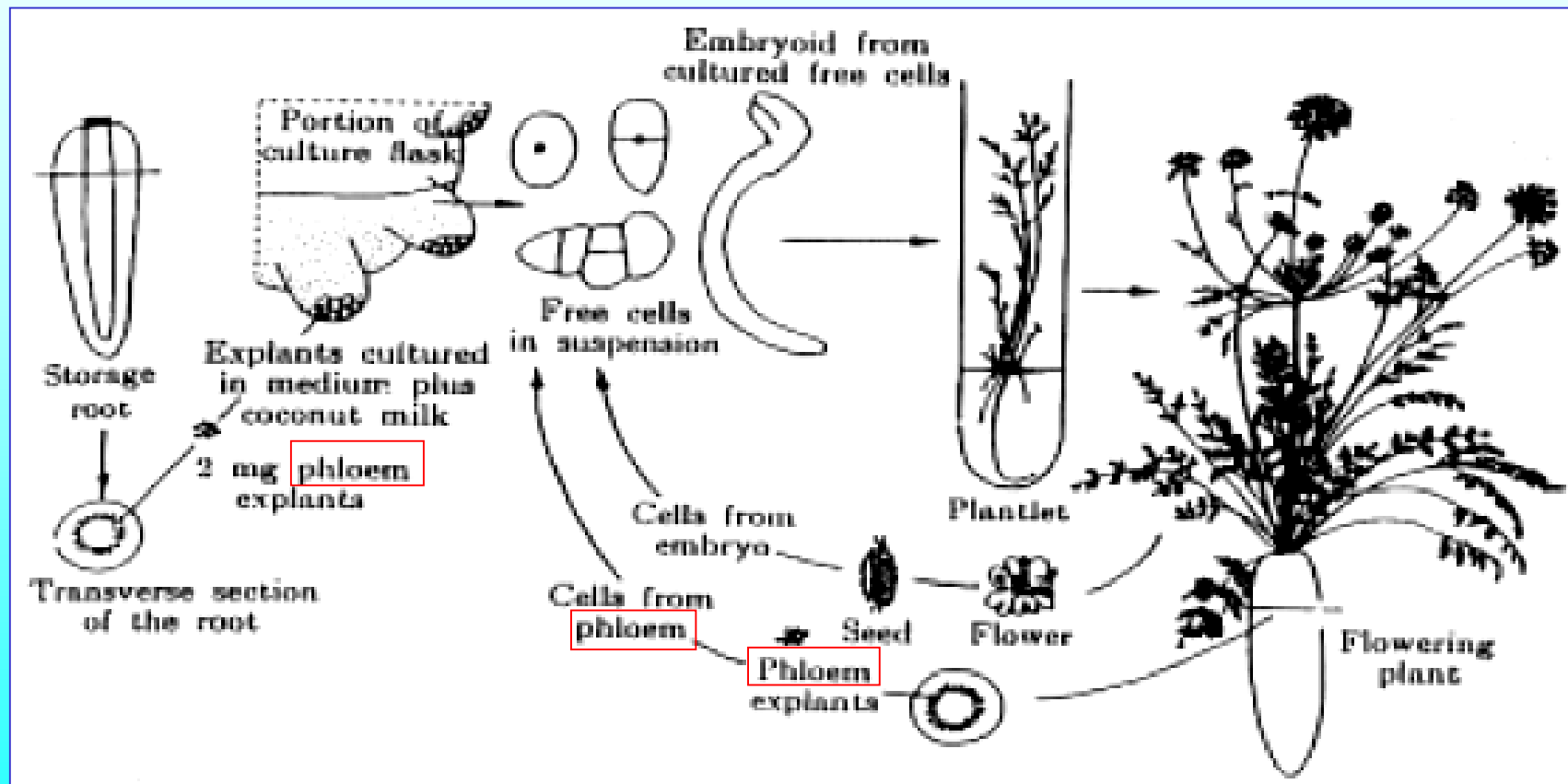
růst cytoplazmy
a dělení buněk
= 5D
primordium stonku
= 12 D
objevení se prýtu
= 23D

embryogenní oblast

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

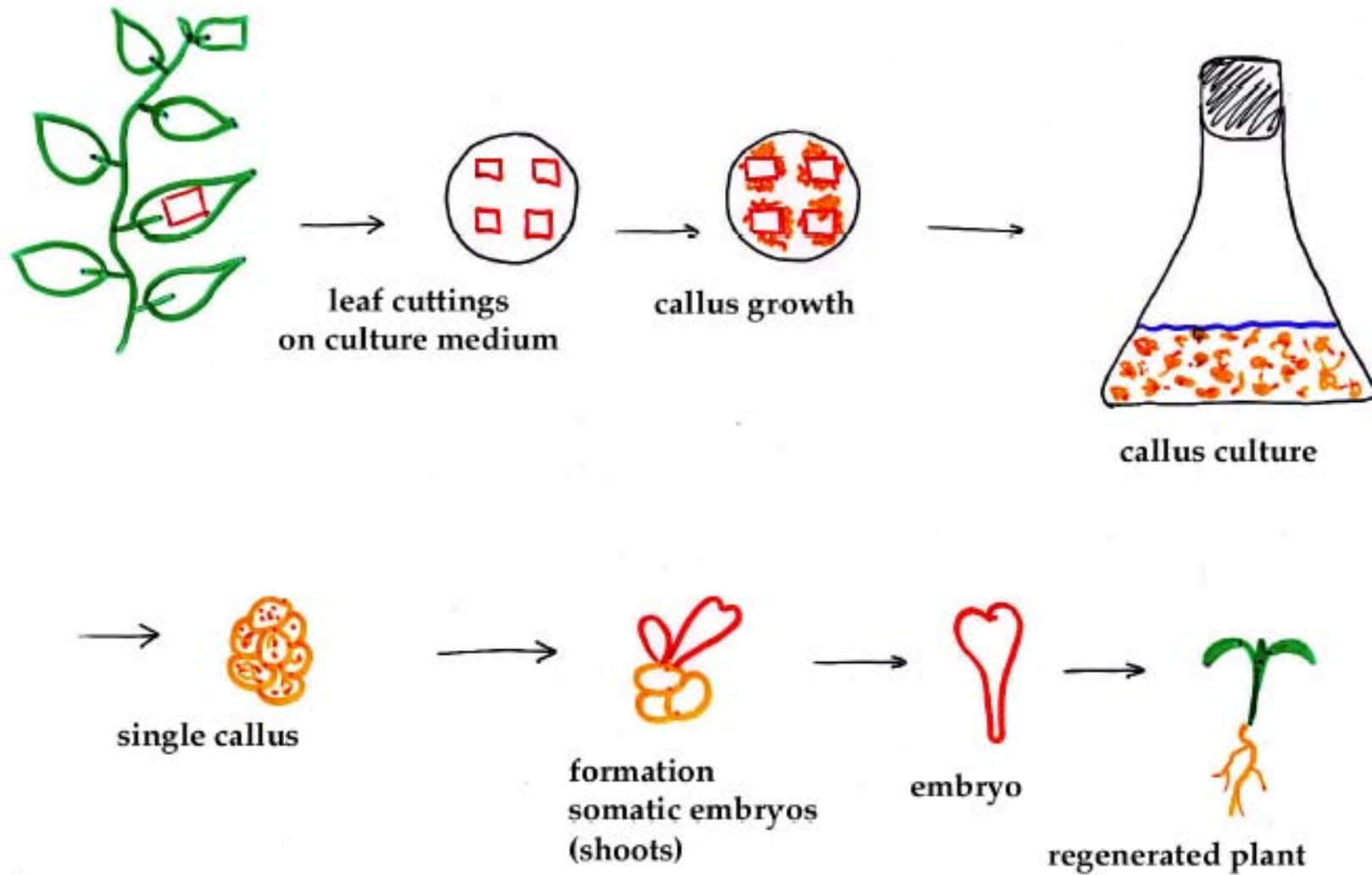
kaulogenní oblast

Produkce somatických embryí odvozených od kořenových explantátů mrkve



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

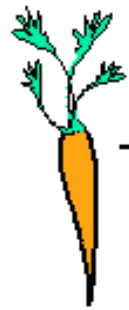
Somatic embryogenesis



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

Somatic embryogenesis of *Daucus carota*: standard protocol

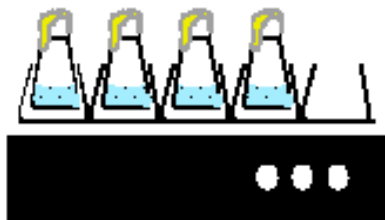
(Ammirato, 1983)



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

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

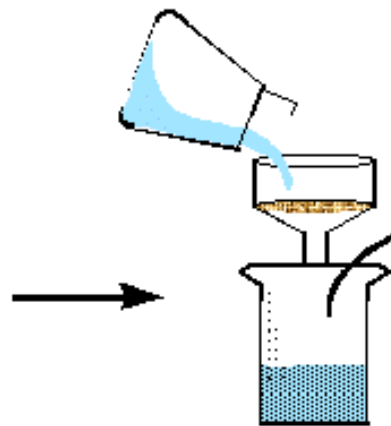
Subculture 2.0 -3.0 g of callus into 50ml of MS liquid medium + 4.5 μM 2,4-D contained in a 250 ml Erlenmeyer flask



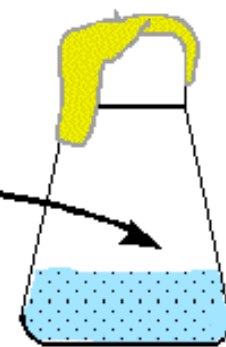
Erlenmeyers are placed on a gyrotary shaker and maintained at 25°C and agitated 125-160 rpm

Subculture every 14-18 days

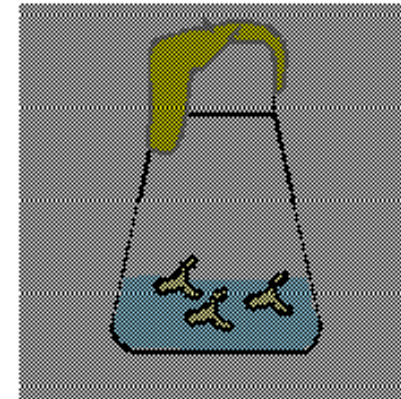
Aseptically aspirate and/ or decant the stale medium and resuspend the cells onto culture medium devoid of 2,4-D for initiation of embryo development



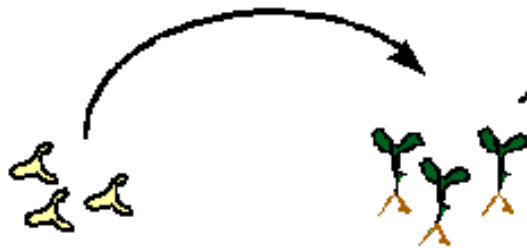
Pass the proembryo suspension through a series of mesh sieves for a uniform embryo population.



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

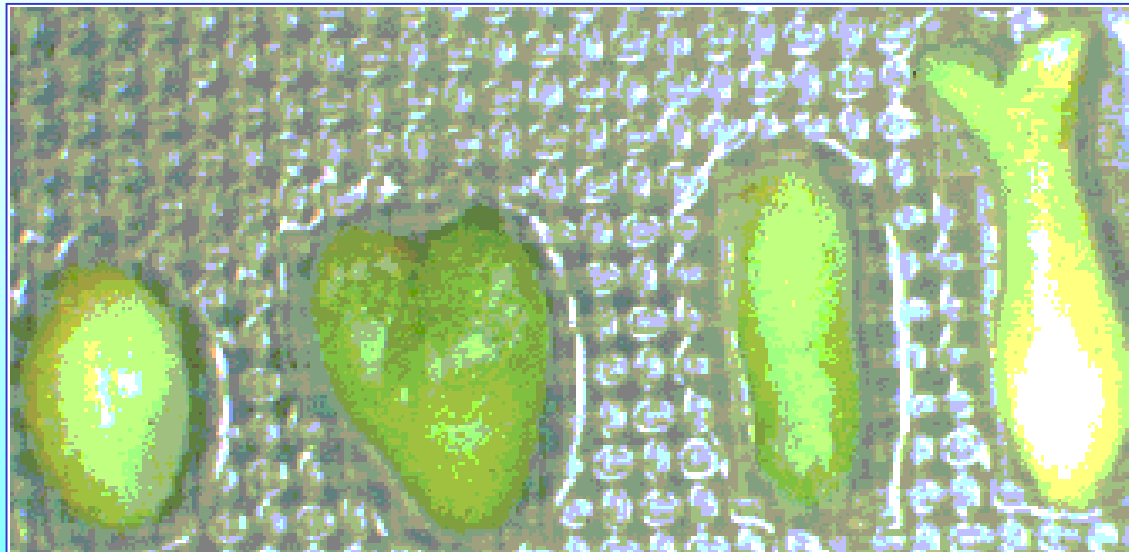


Somatic embryos can be placed out on agar medium devoid of 2,4-D for plantlet development



Plantlets are transferred to Jiffy pots or vermiculite for subsequent development

Vývojová stadia somatických embryí



globulární

srdcovité

torpédovité

kotyledonární

<http://www.plant.uoguelph.ca/research/embryo/IMG00003.GIF>

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 abscisové
- dehydratace



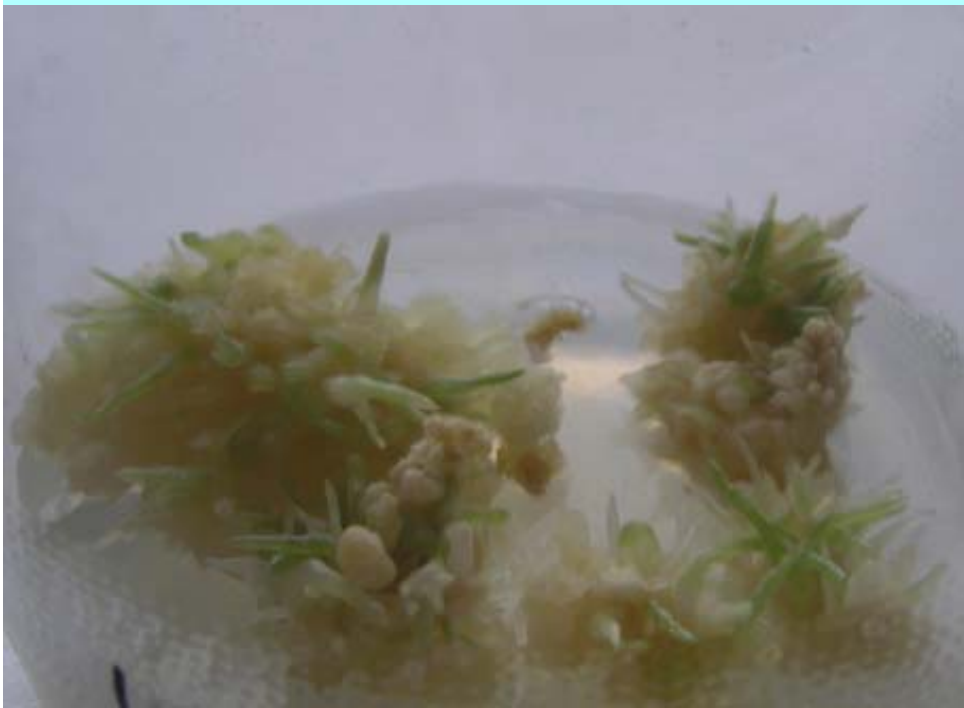
Nepřímá somatická embryogeneze

Debergh *et al.*

somatická embrya *Aesculus hippocastaneum*
odvozená z květenství

Nepřímá somatická embryogeneze

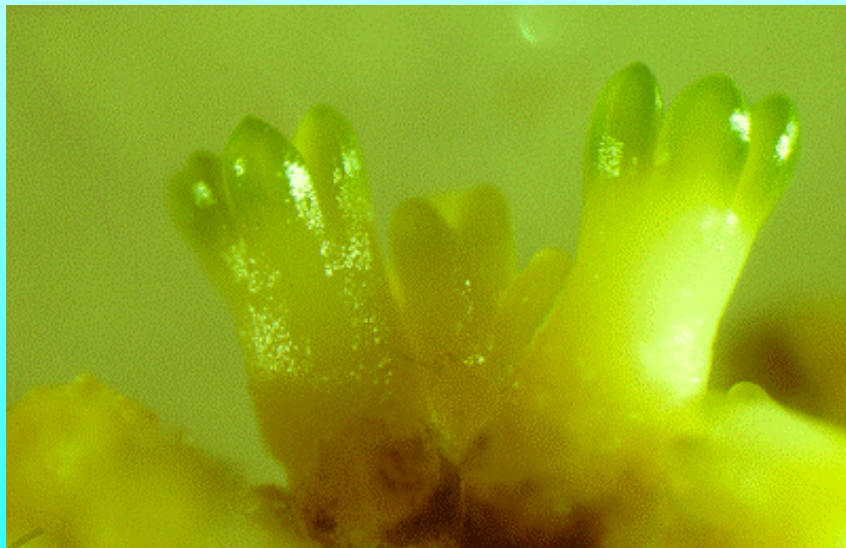
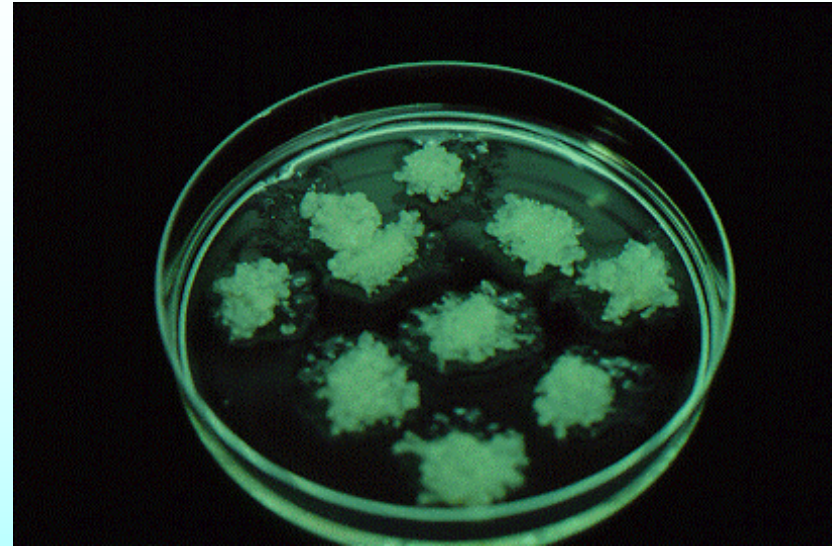
na kalusu Inu



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 schéma

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)**

Syntetická nebo umělá semena

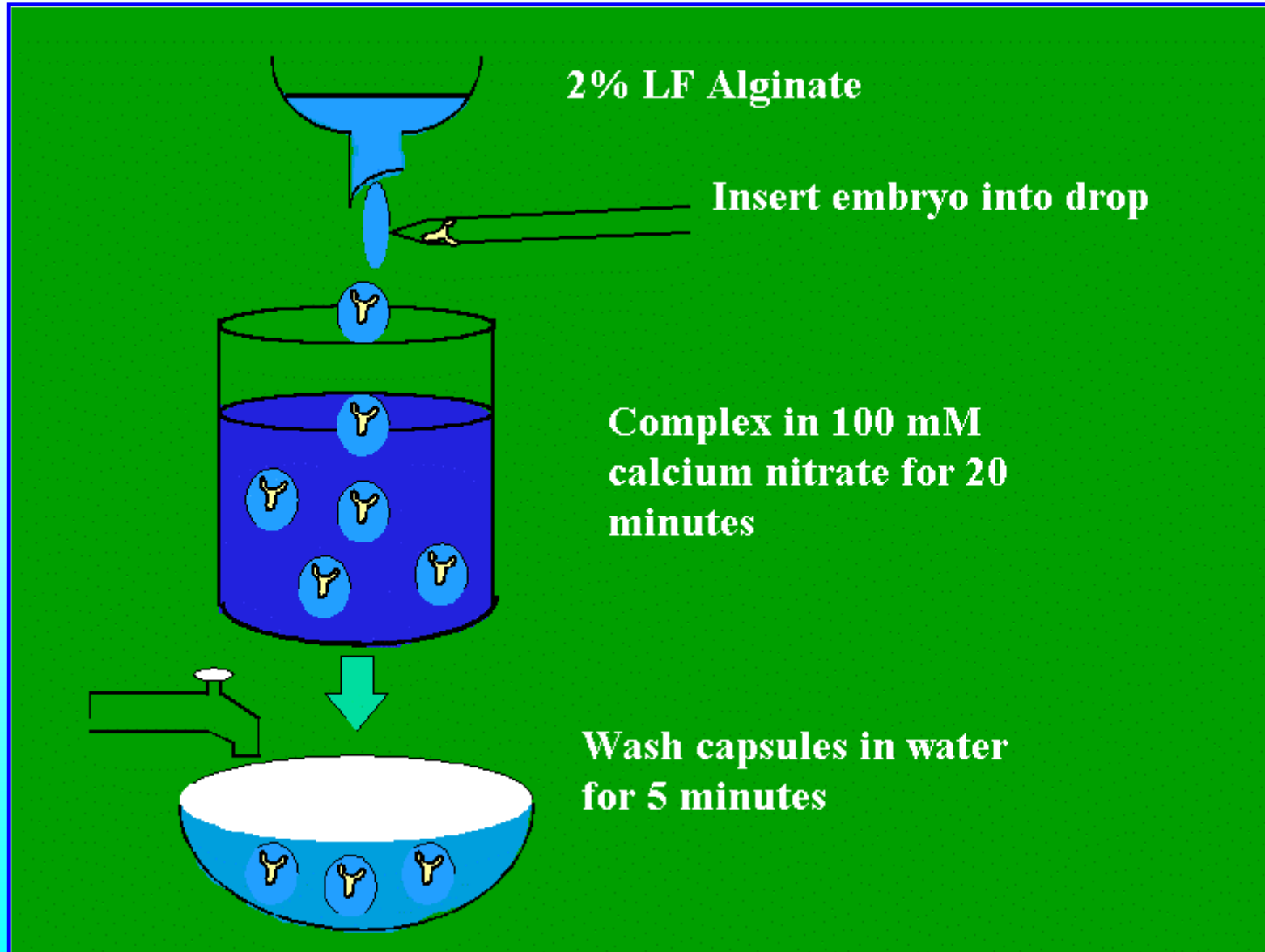
jsou jednotlivá enkapsulovaná somatická embrya
Termín '**embling**' se často používal pro označení rostlinek pocházejících ze somatických embryí nebo syntetických semen.

Pro enkapsulaci embrya se používá **Na-alginát** nebo **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

Debergh *et al.*



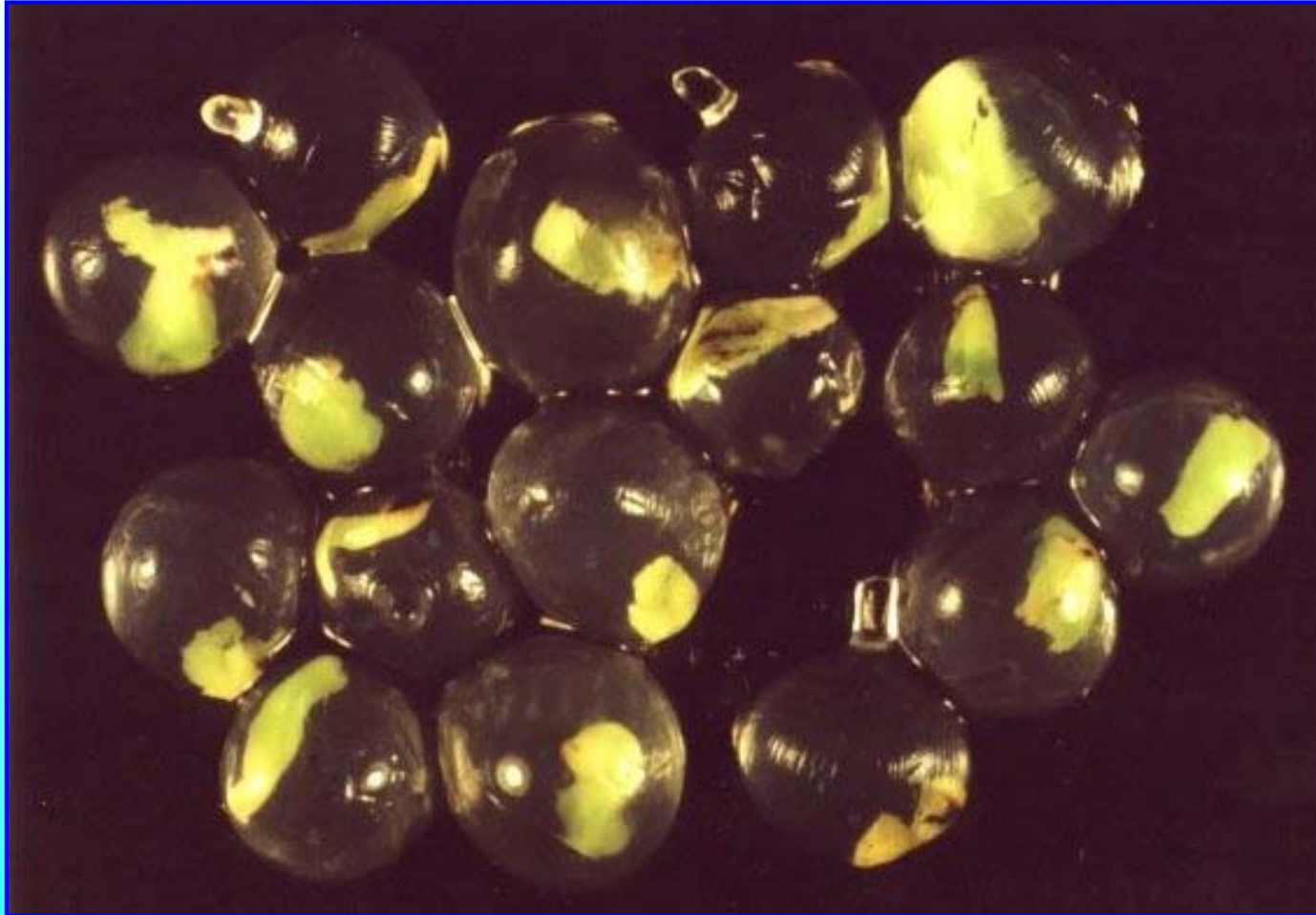
embryo enkapsulované
v alginátu sodném

Problémy:

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

konverze

Somatické embrya sóje enkapsulovaná v alginátu



Dr. M. Griga, Agritec s.r.o. Šumperk

<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 aj.

<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 diferenciacce jako jednoho ze základních rysů biologických systémů.

Otázky pro další výzkum

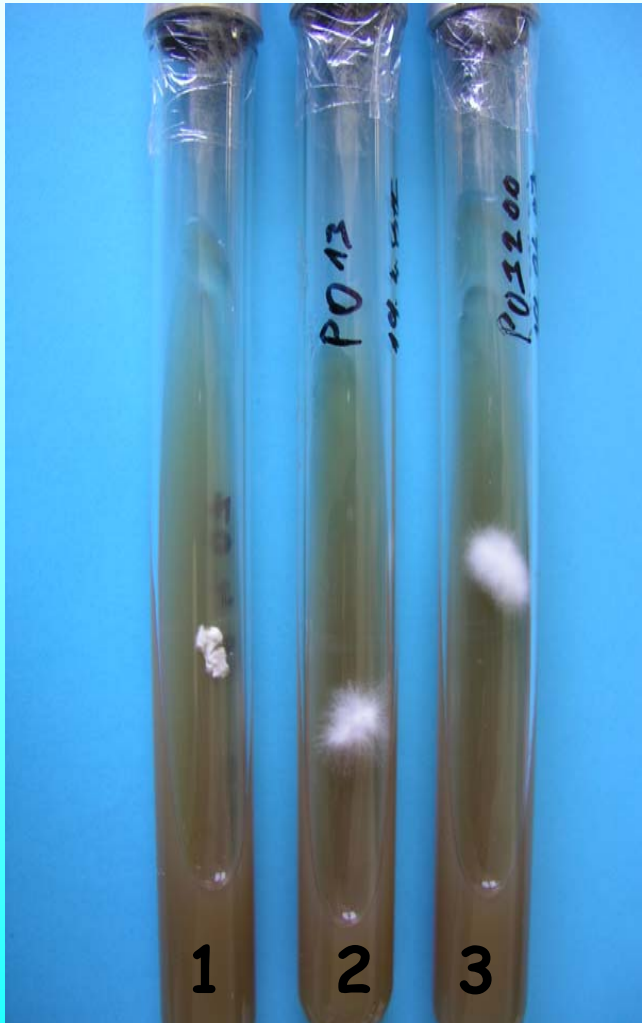
1. Co je podstatou konstituce embryogenní kompetence na buněčné a molekulární úrovni?
2. Jak jsou embryogenně kompetentní buňky produkovány během ontogeneze rostlin?
3. Molekulární organizace programu somatické embryogeneze a její realizace
4. Jaká je povaha stimulu, který indukuje program embryogeneze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