

8. Kultury izolovaných embryí

Rostlinné explantáty

Mgr. Hana Cempírková, Ph.D.

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

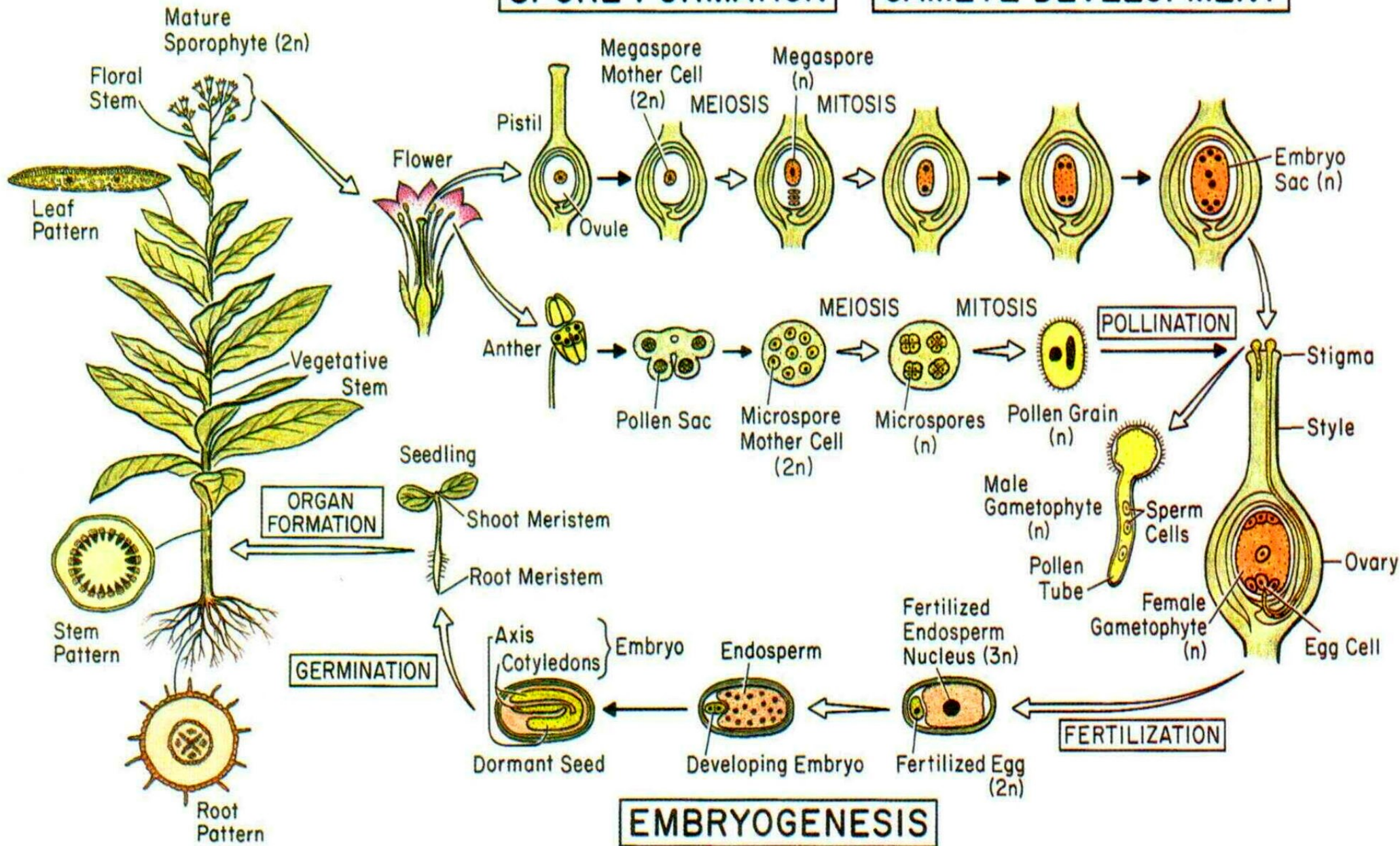


diferenciace buněk

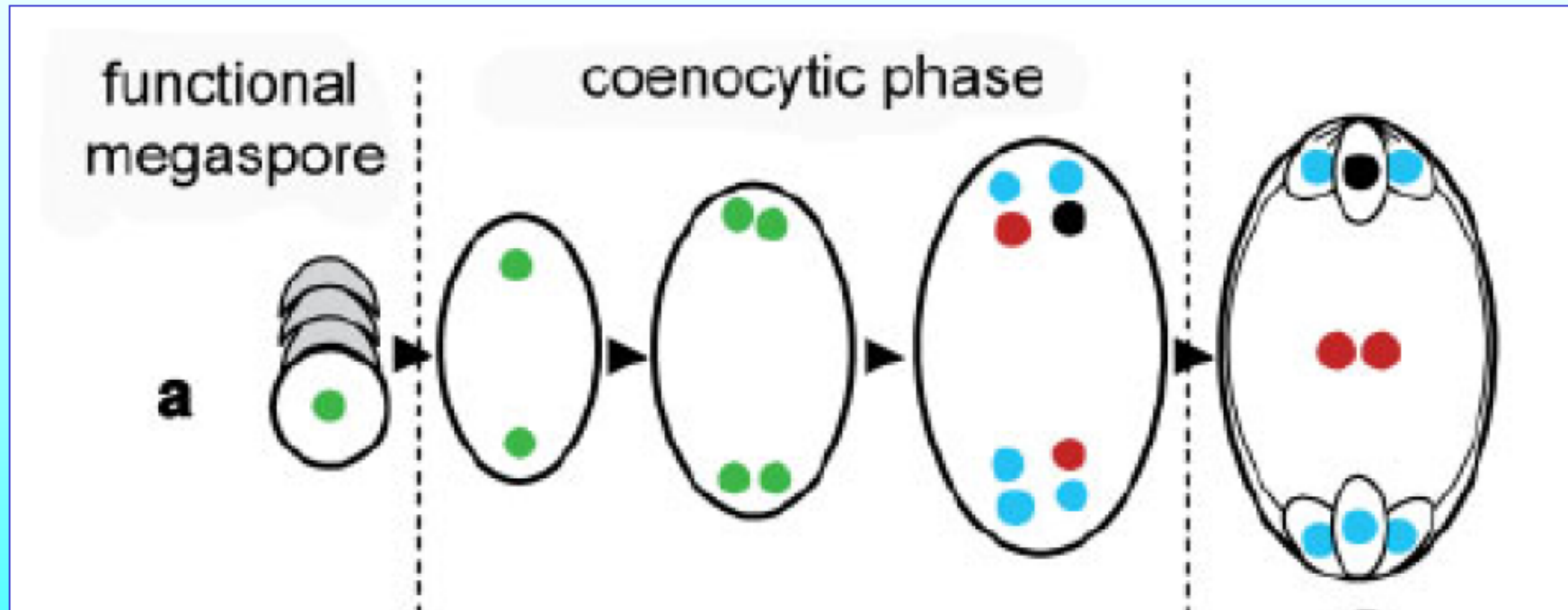
zralý zárodečný vak = samičí gametofyt
monosporický, bisporický, tetrasporický

SPORE FORMATION

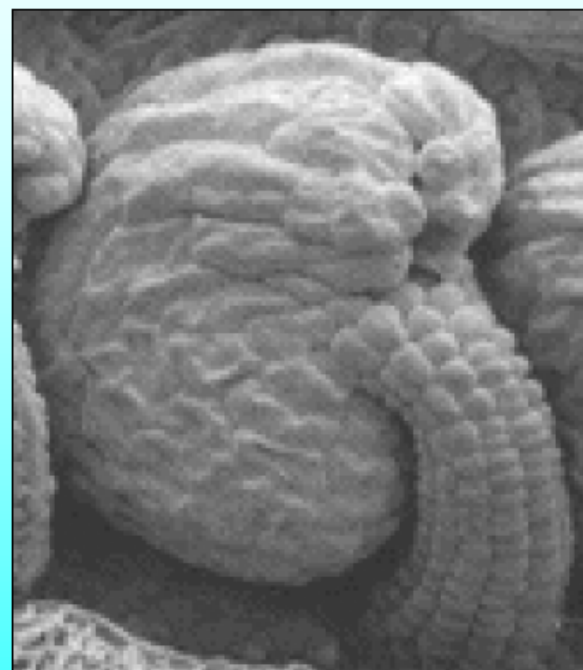
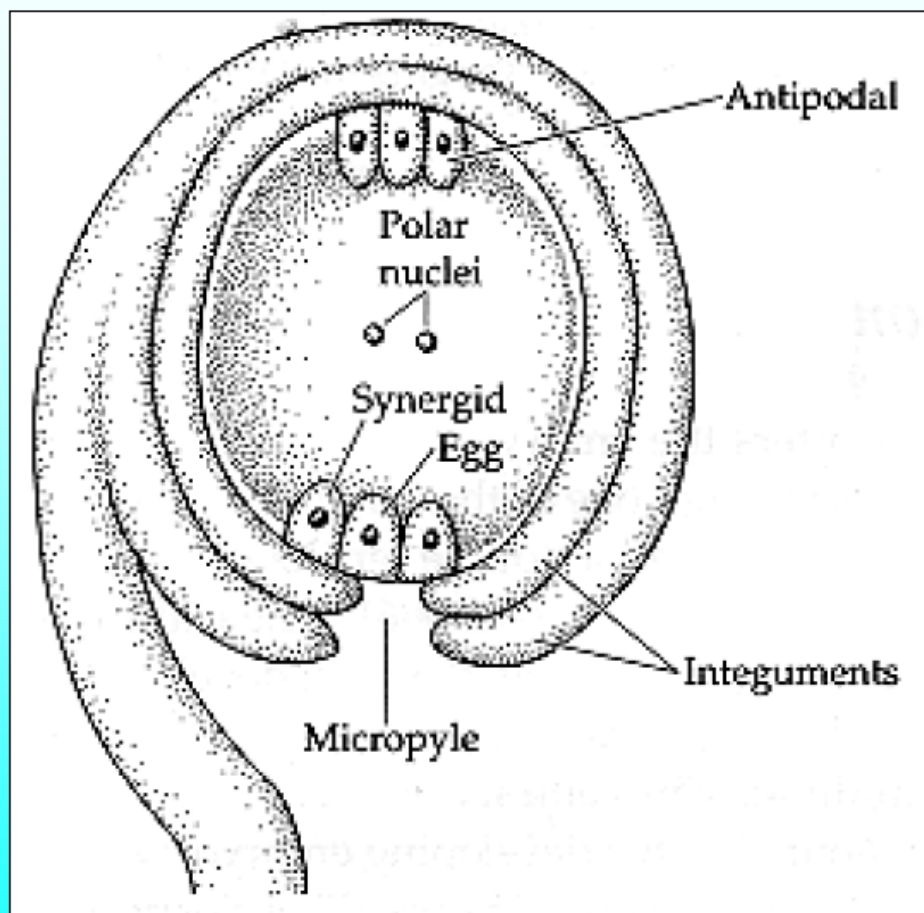
GAMETE DEVELOPMENT



Vývoj zárodečného vaku typ *Polygonum*



Anatropní vajíčko - schéma



vajíčko *Arabidopsis*

Co předchází embryogenezi?
opylení, 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

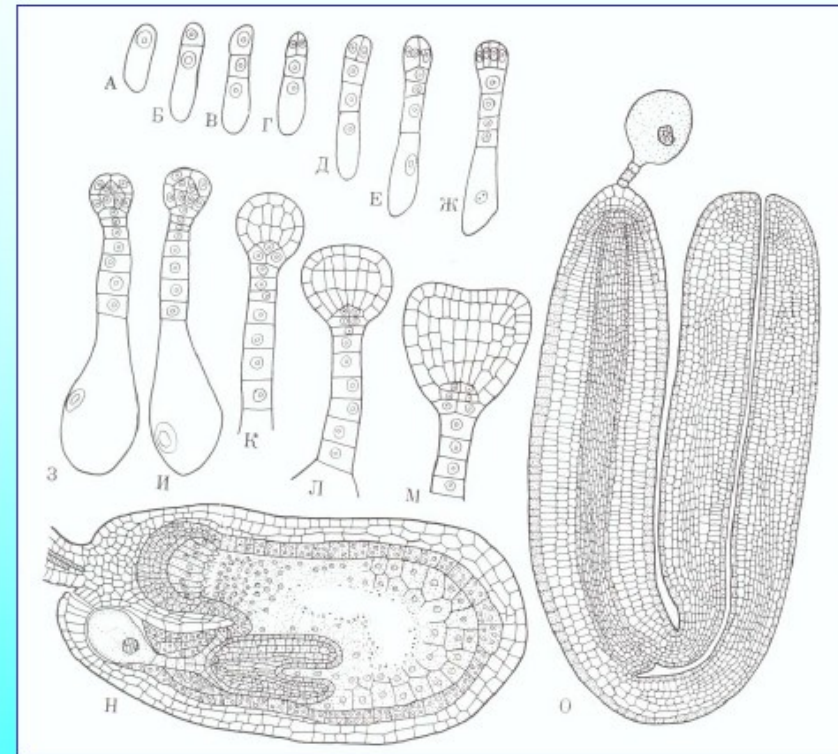
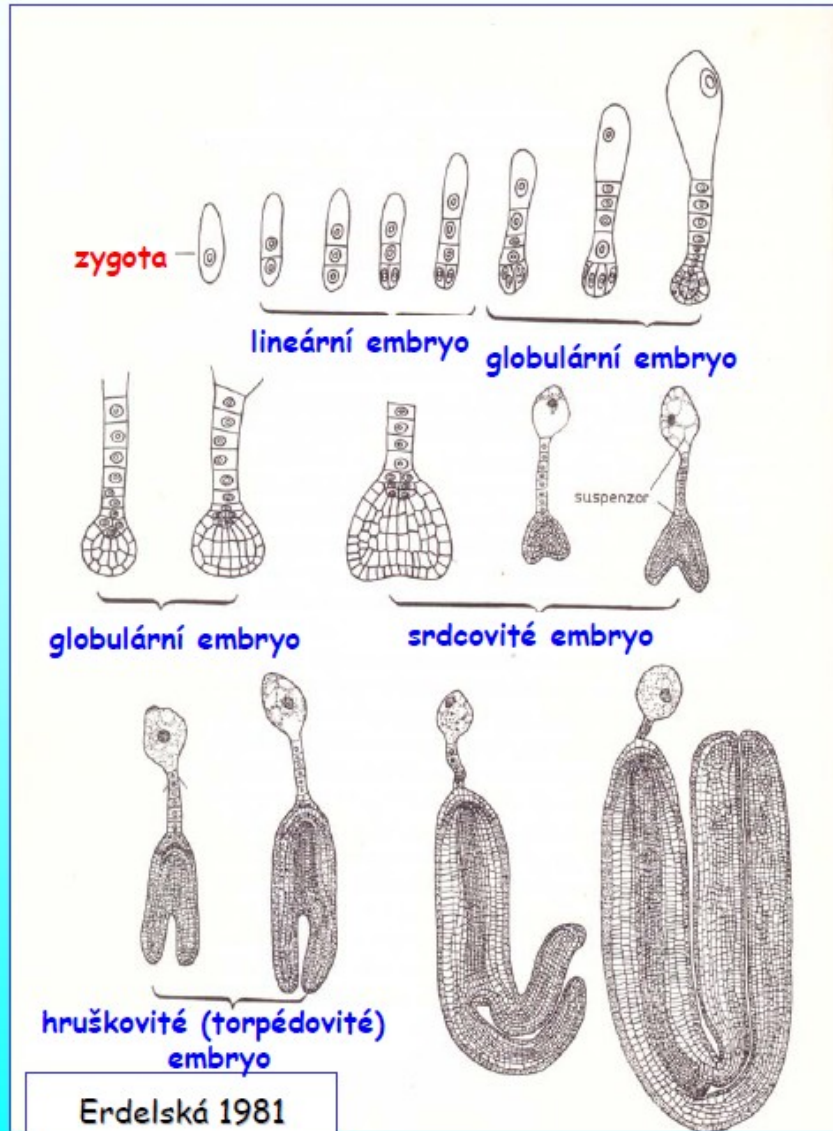
globulární embryo

srdcovité embryo

hruškovité (torpédovité)

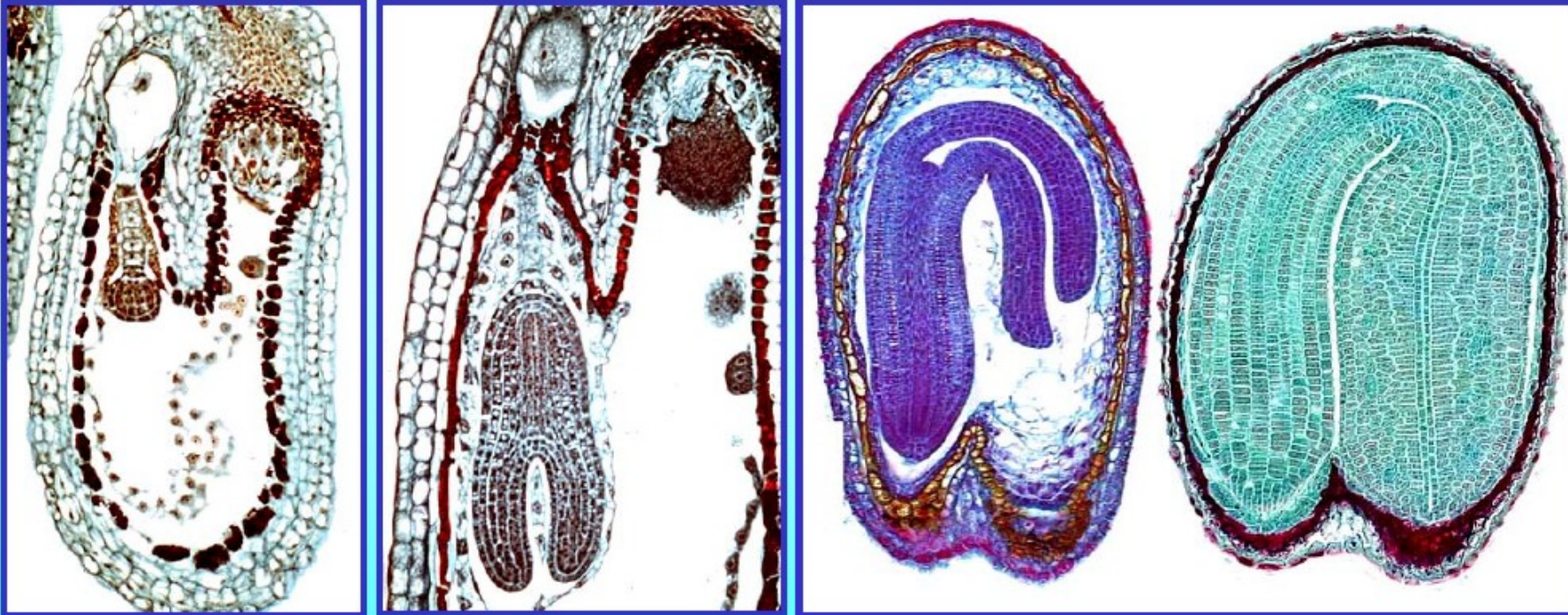
zralé embryo

Embryogeneze *Capsella bursa-pastoris*



Poddubnaja-Arnoldi 1976

Capsella bursa-pastoris - vývojová stadia embrya



globulární embryo

torpédovité embryo

starší torpédovité
embryo

zralé embryo

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

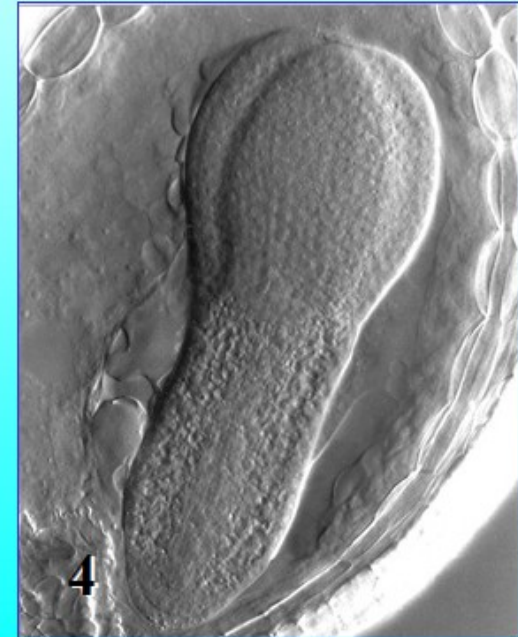
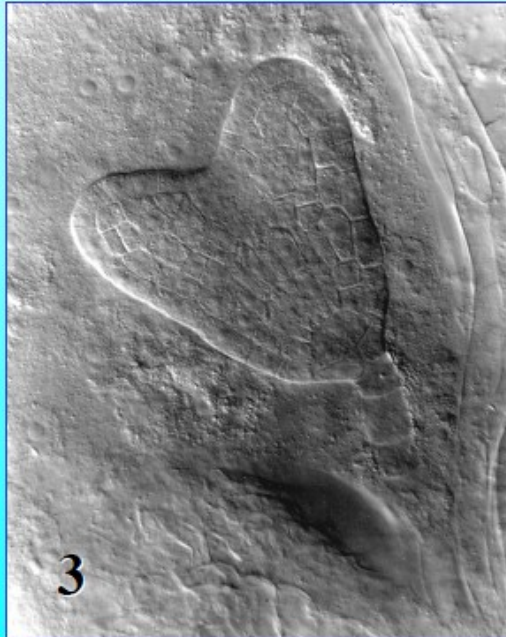
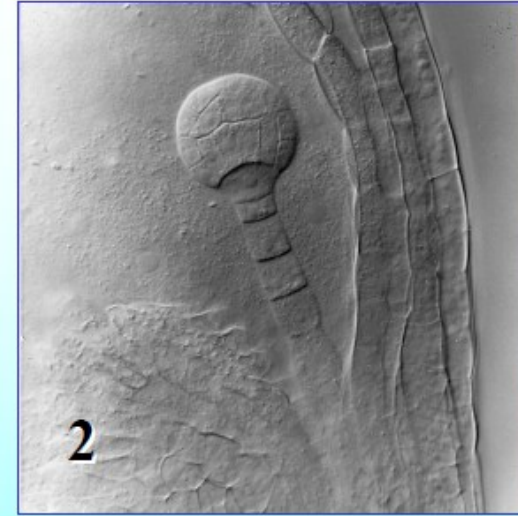
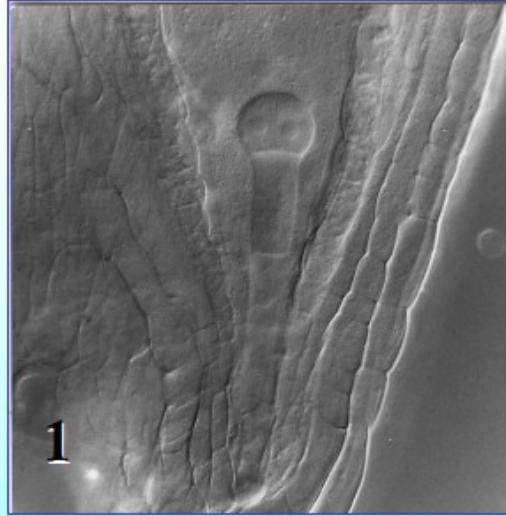
Embryogeneze *Arabidopsis* - Nomarski DIC

1 preglobulární

2 globulární

3 srdcovité

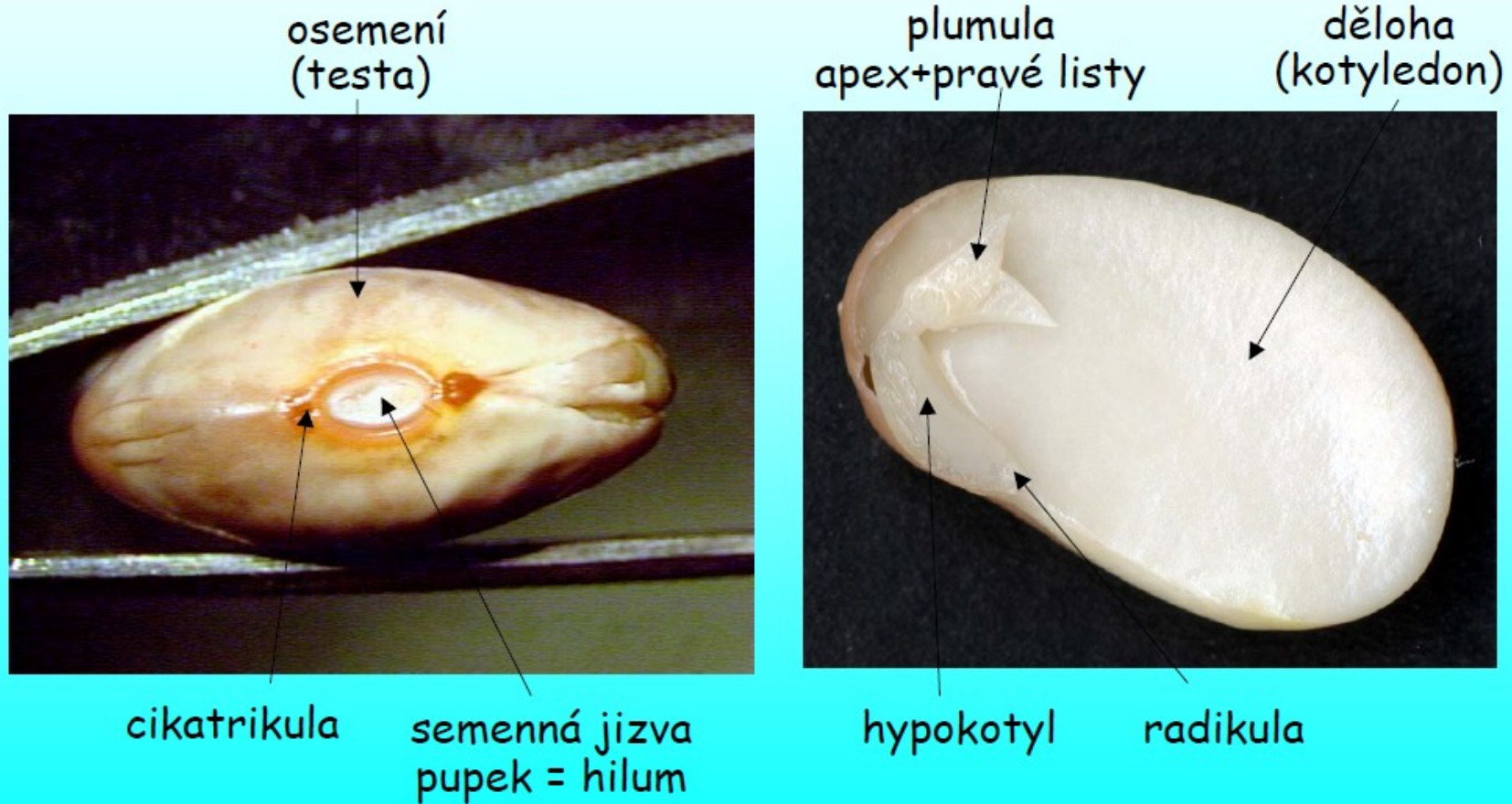
4 torpédovitě



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

Photos by DM Vernon

Semeno a embryo fazolu *Phaseolus vulgaris* L.



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

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

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

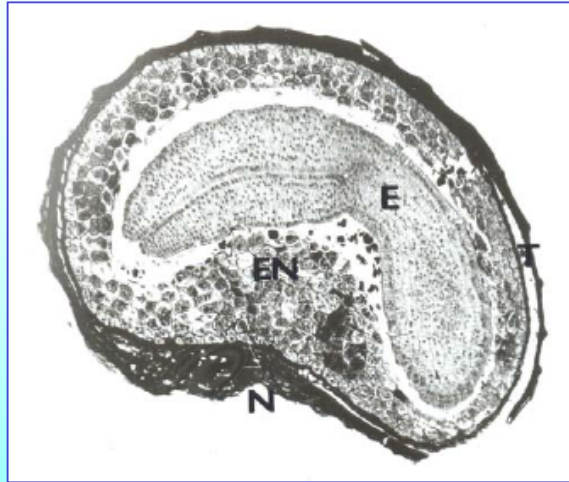
- překonání dormance semen
- překonání aborce embryí („embryo rescue“) po křížení *in situ* nebo *in vitro*

mezidruhové hybridy: bavlník, ječmen, rýže, juta

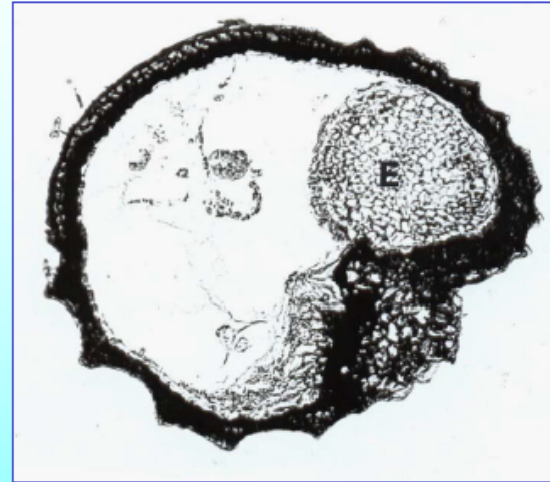
mezirodové hybridy: *Hordeum x Secale*, *Triticum x Secale*, *Hordeum x Hordelymus*, *Tripsacum x Zea*

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

Překonávání aborce embryí po opylování *in vitro*

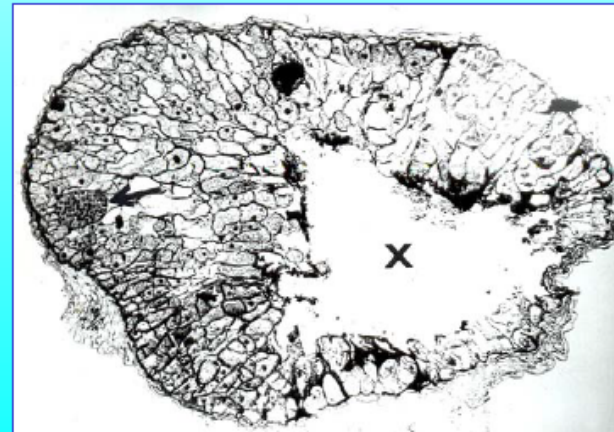
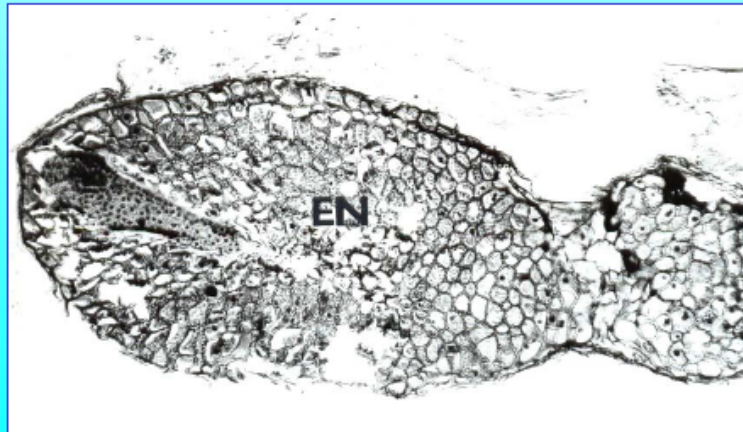


9 MC



Papaver

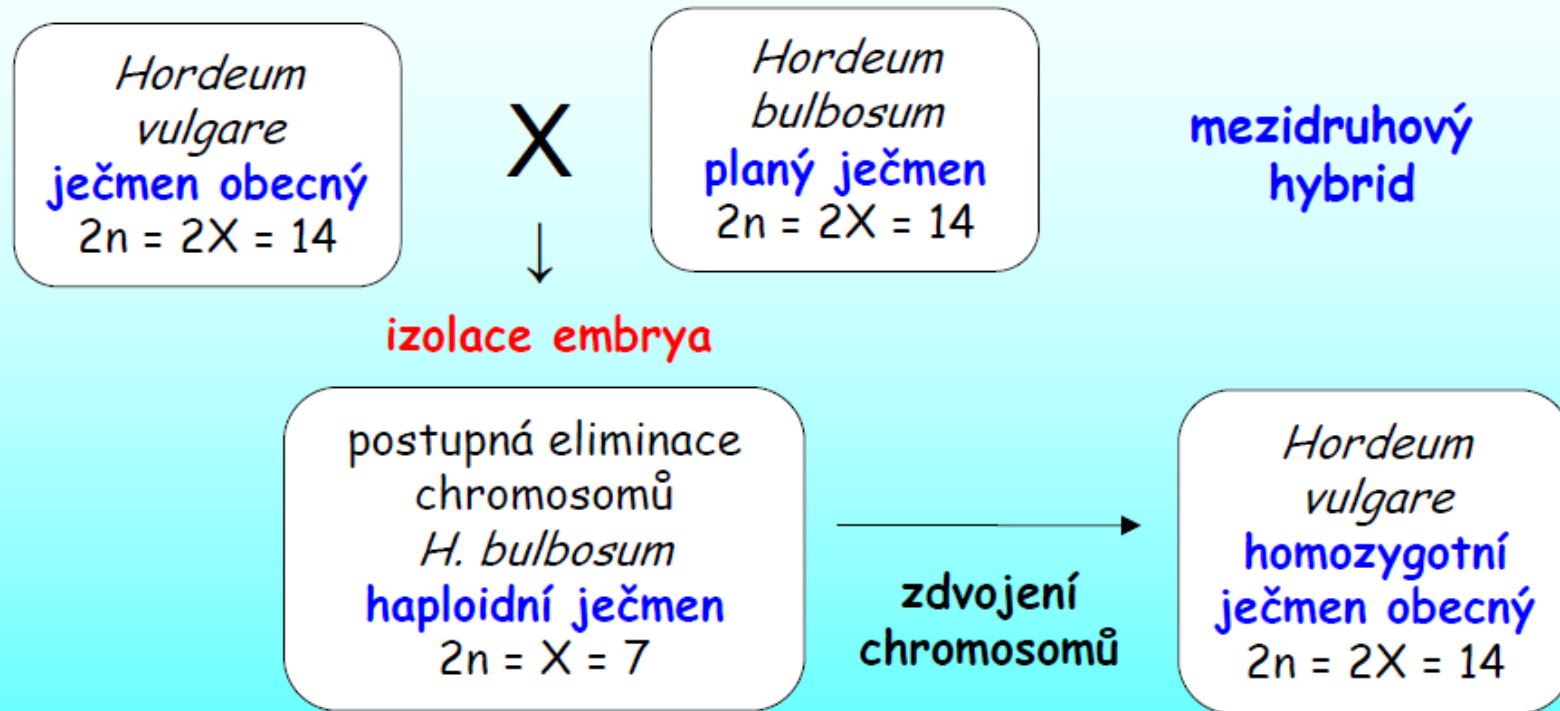
35 DC



Galanthus

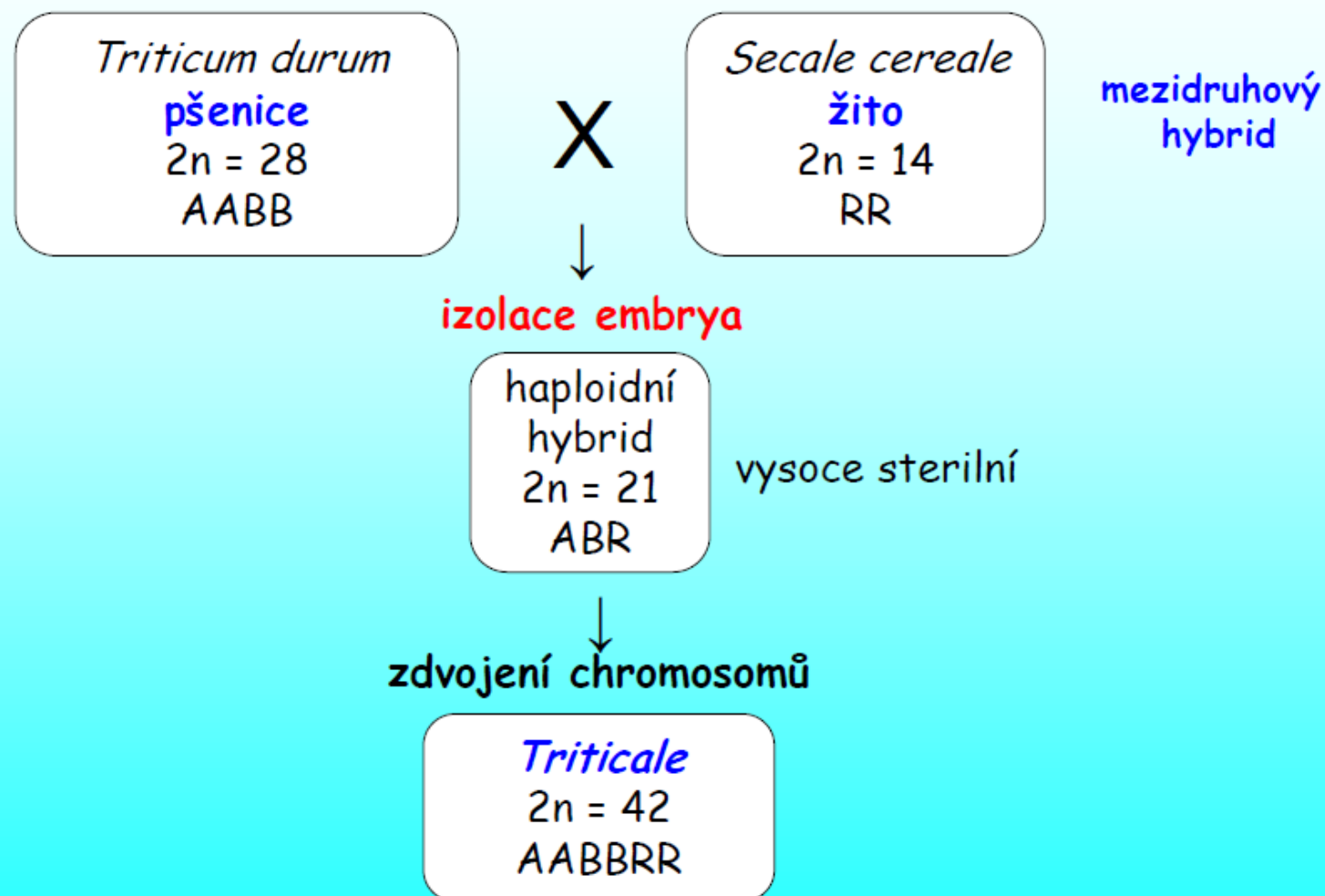
60 DC

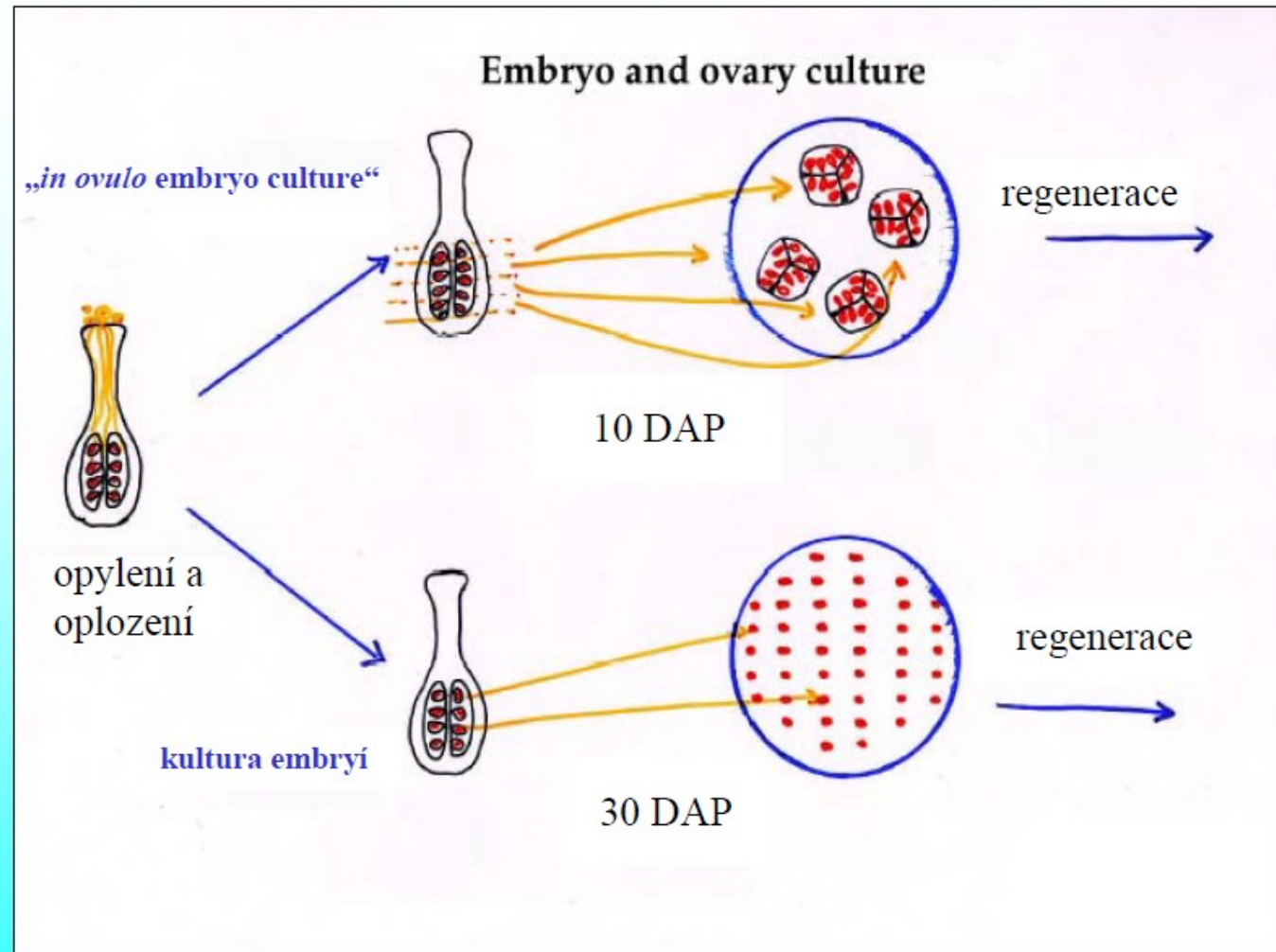
Hordeum bulbosum metoda tvorby haploidů



- **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)

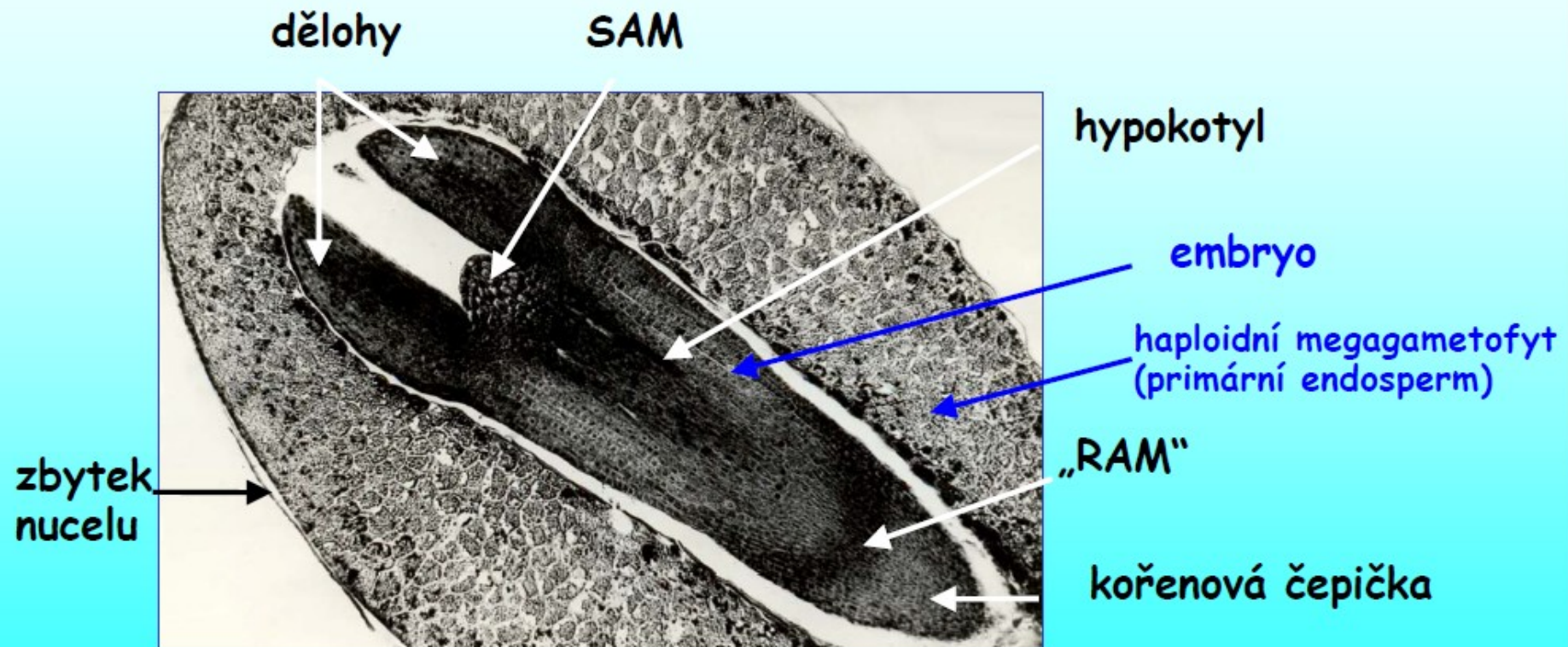
Příklad získání aloploidů





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

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



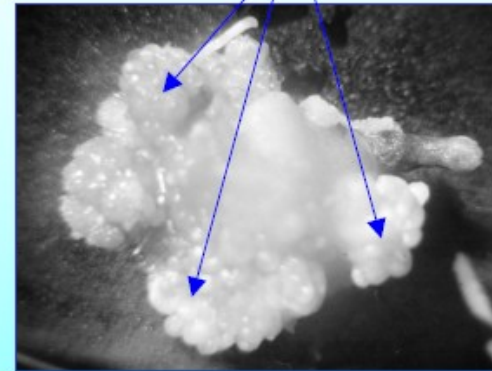
parafínový řez, barveno Heidenheinovým hematoxylinem, **osemení odstraněno** před procedurou

Mikropropagace konifer z izolovaných embryí

Picea
14 DC
médium s BA



adventivní pupeny na hypokotylu



Larix

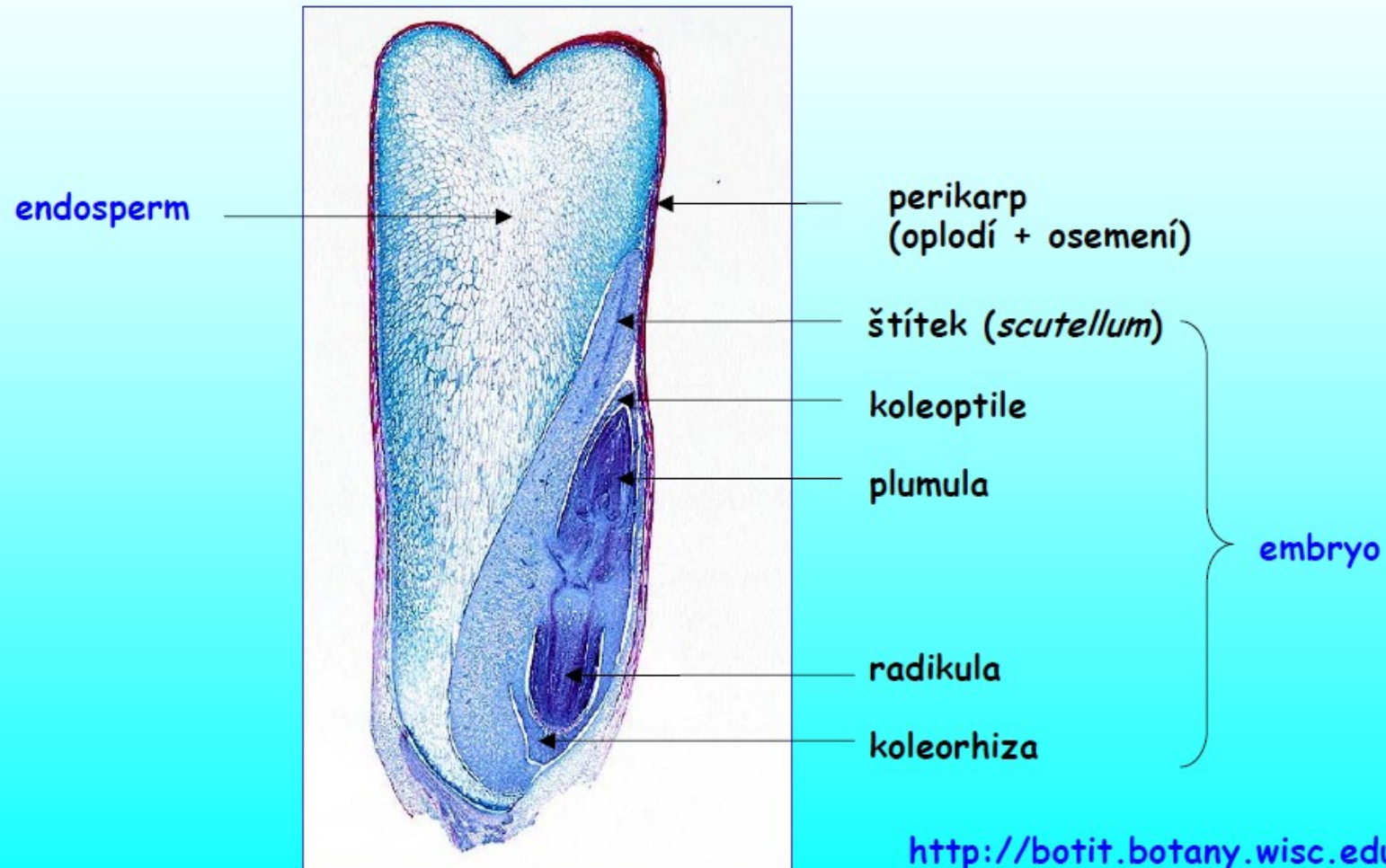


Picea

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 přísávkem 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 klíčnicích rostlin (délka kořenů a prýtlů)

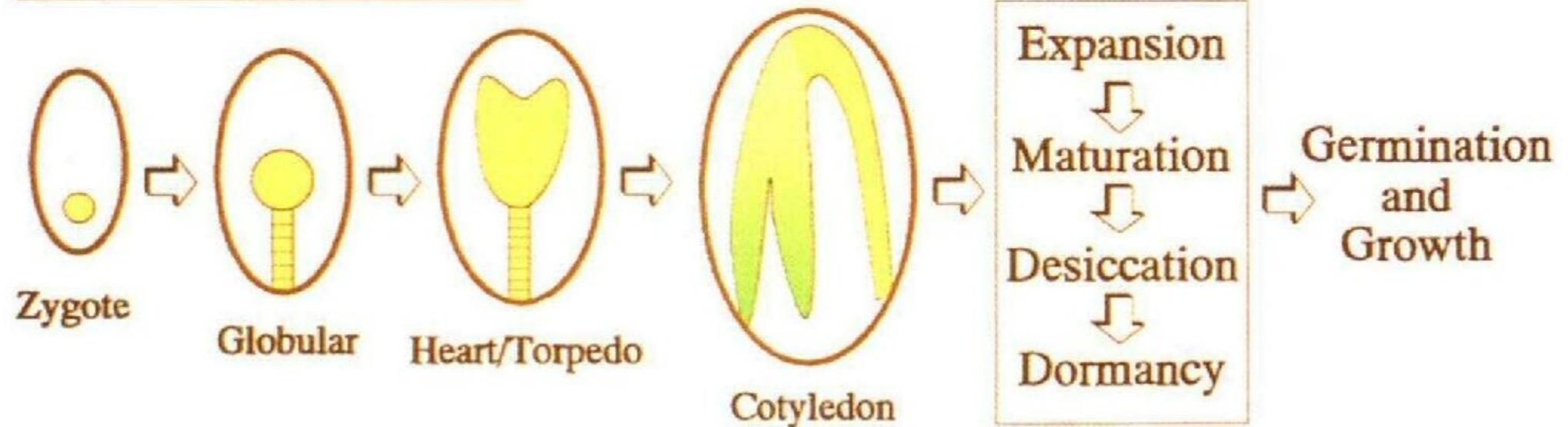
Somatická embryogeneze 9.

definice, historie objevu
iniciace
využití

Somatic Embryogenesis



Zygotic Embryogenesis



Comparison of Somatic and Zygotic Embryogenesis.

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, klíčnicí 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

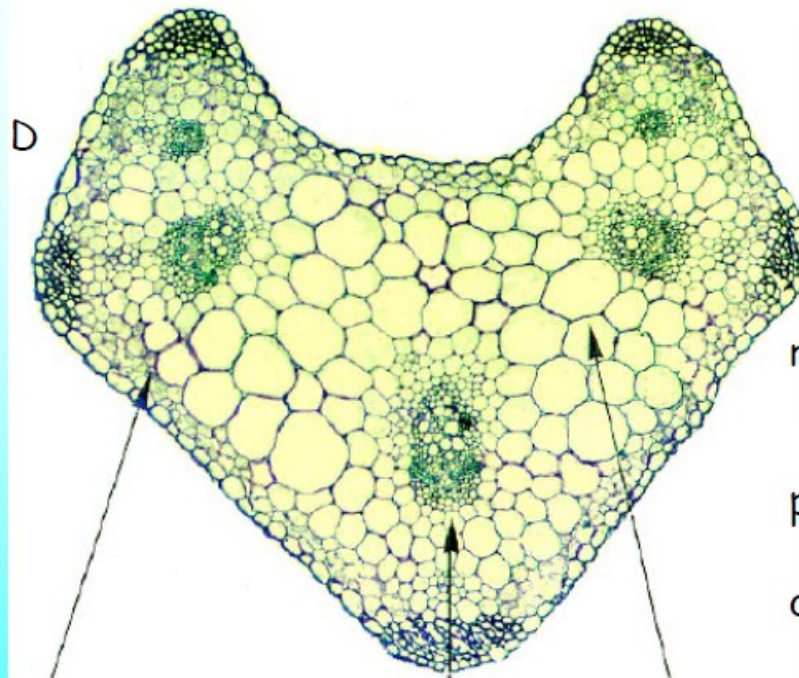
Základní požadavky jsou obecně platné i pro zygotickou embryogenezi = regulace dělení a diferenciace pletiv

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

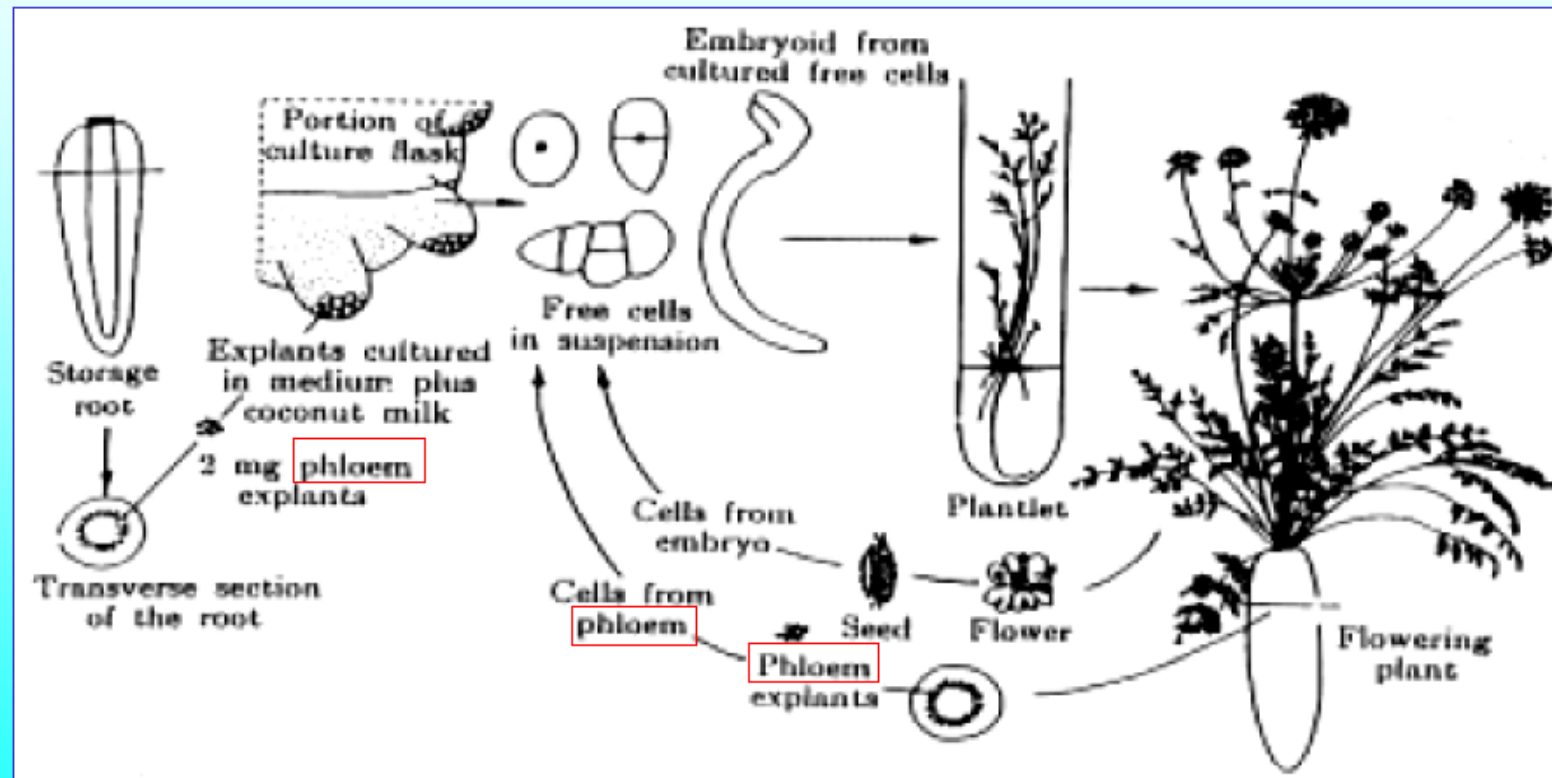
embryogenní oblast

rhizogenní oblast

kaulogenní oblast

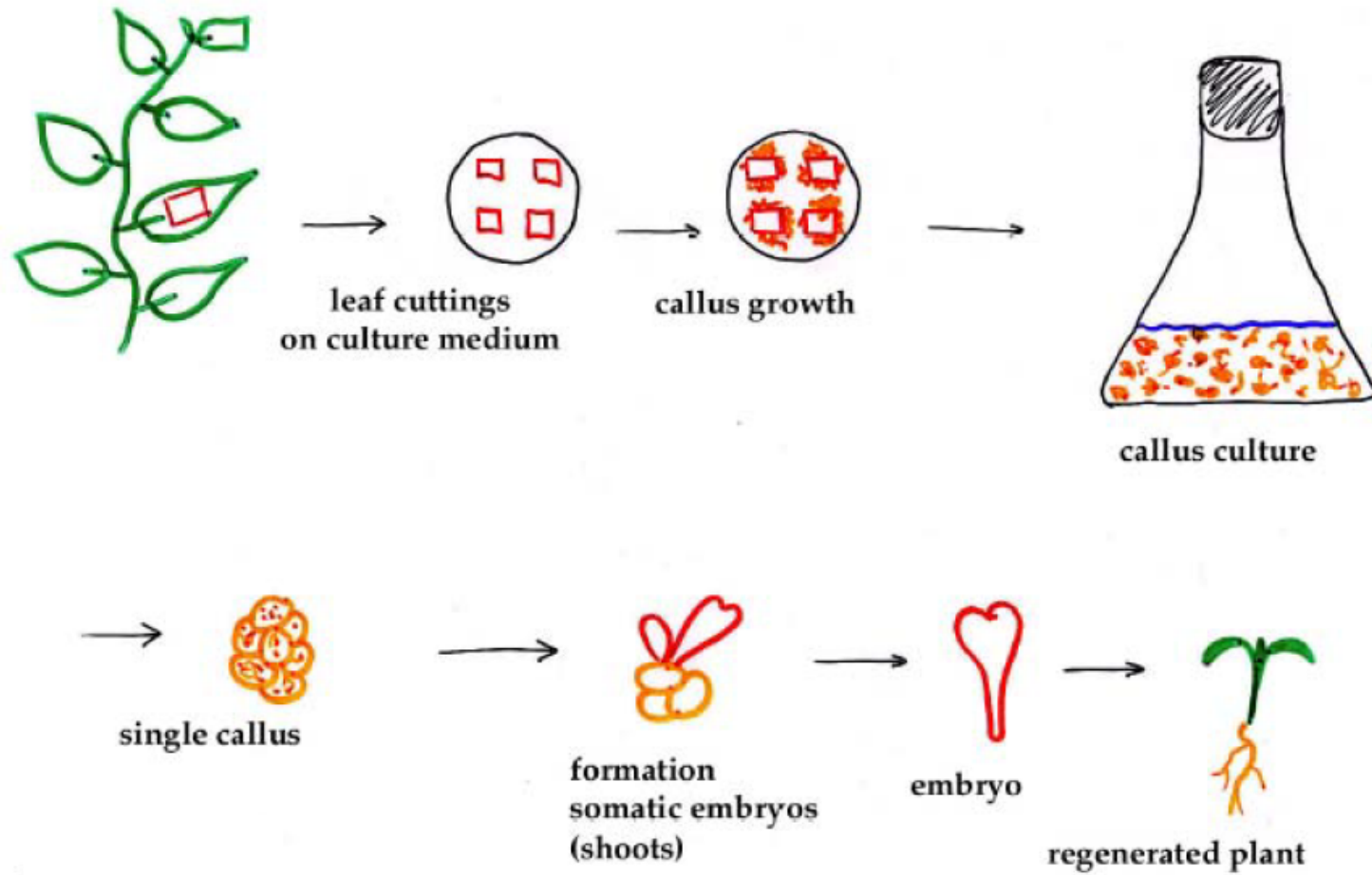
růst cytoplazmy
a dělení buněk = 2D
primordium kořene = 5D
objevení se kořene = 7-10D

Produkce somatických embryí odvozených od kořenových explantátů mrkve



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

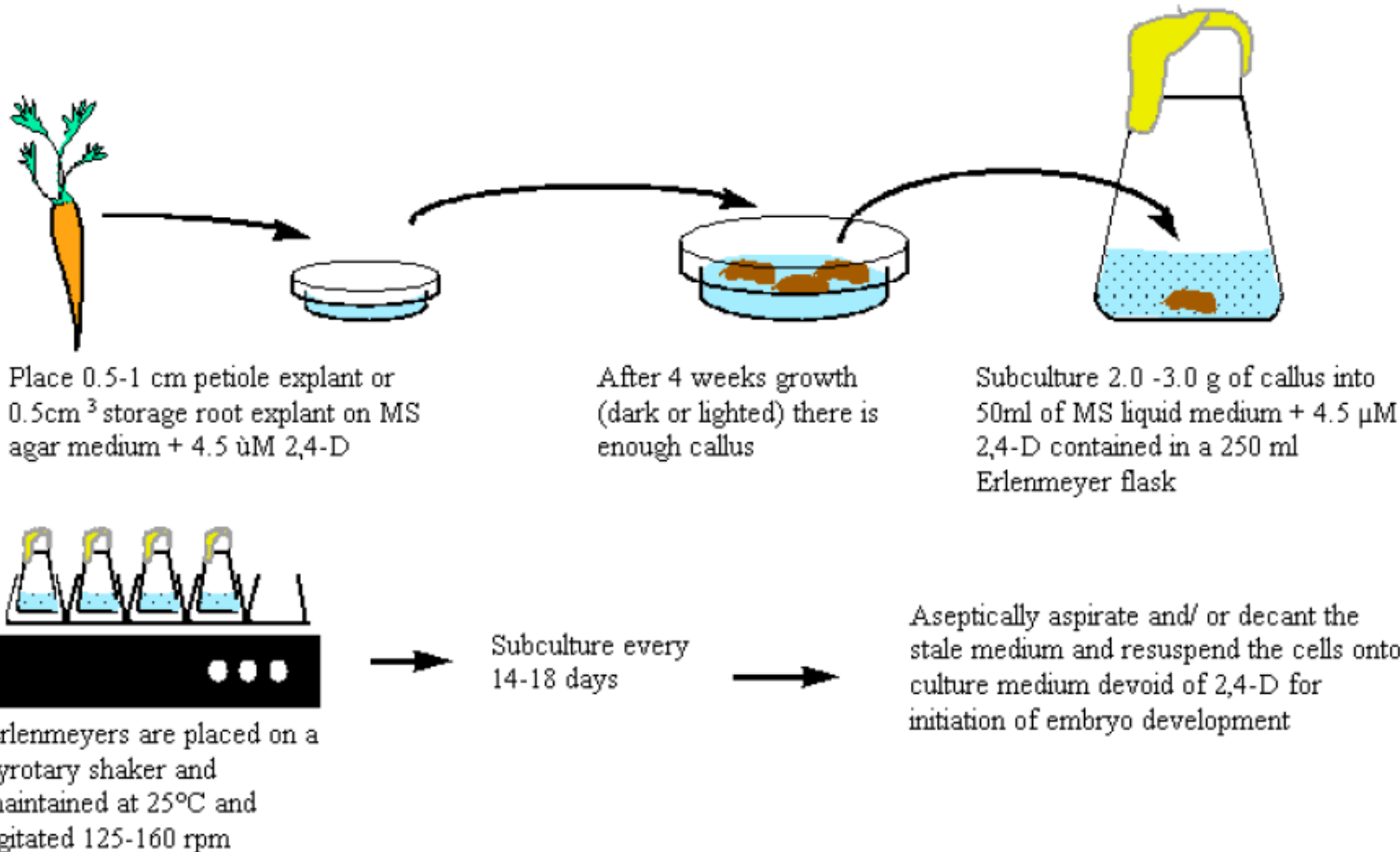
Somatic embryogenesis

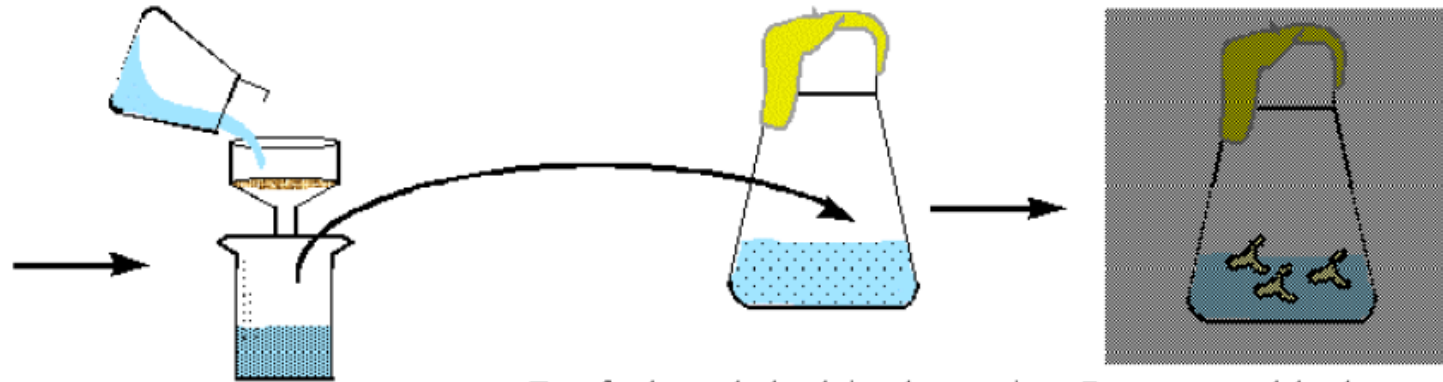


Lammerts van Bueren *et al.*, Luis Bolck Instituut

Somatic embryogenesis of *Daucus carota*: standard protocol

(Ammirato, 1983)





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 μM ABA can be added

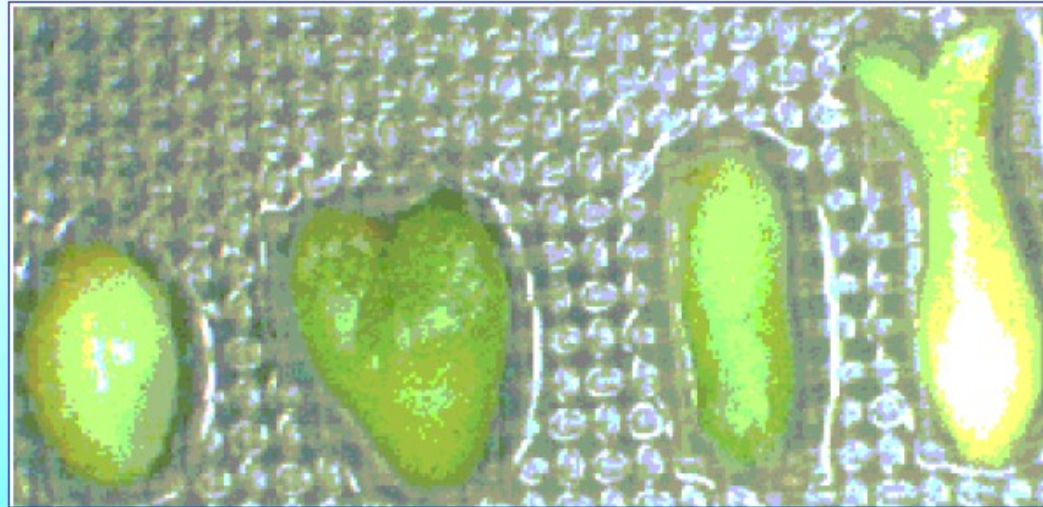
For more normal development cultures should be grown in darkness. Embryos should appear in about 8 days and reach mature size in 10-15 days



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

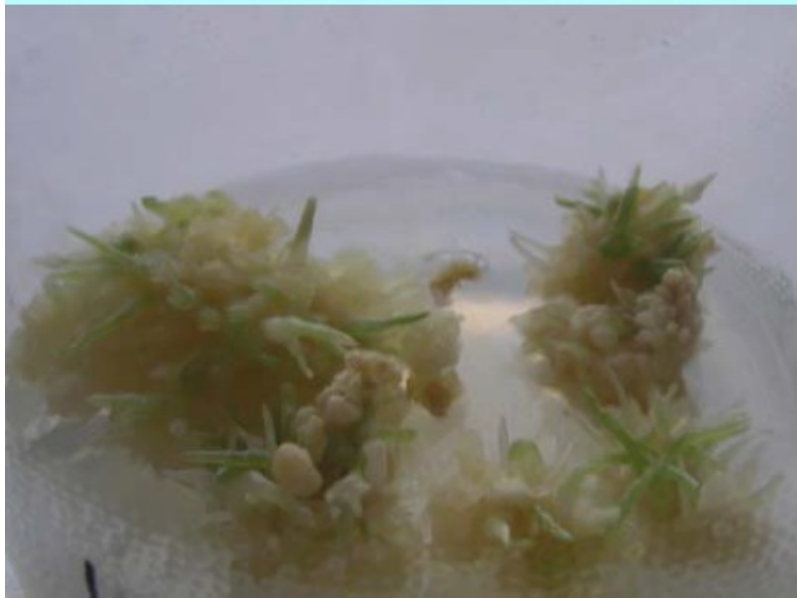
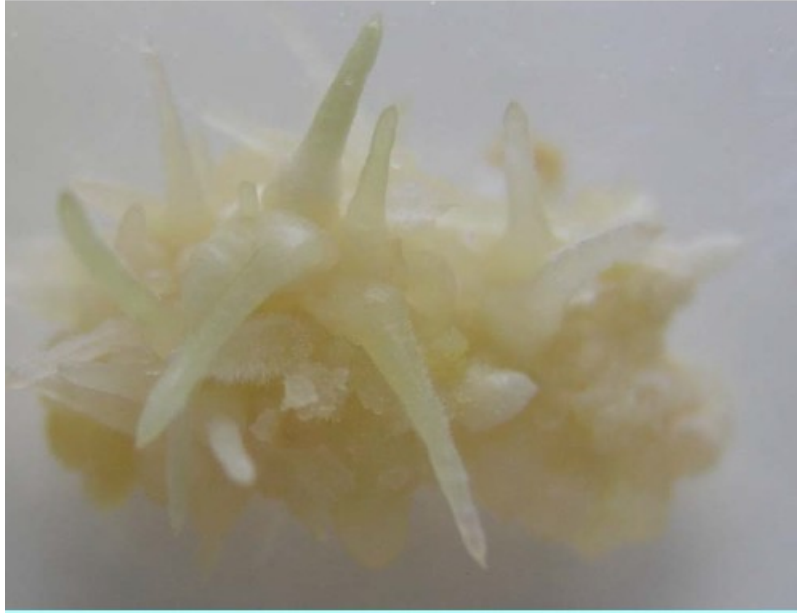
- **předčasné klíčení** = torpédovité embryo pokračuje v růstu do klíčící rostlinky **bez fáze dozrávání** = chybí zásobní látky a tolerance k vyschnutí
- akumulace zásobních proteinů
- nárůst obsahu kyseliny abscisové
- dehydratace



Nepřímá somatická embryogeneze

Debergh *et al.*

somatická embrya *Aesculus hippocastaneum*
odvozená z květenství



Nepřímá somatická embryogeneze

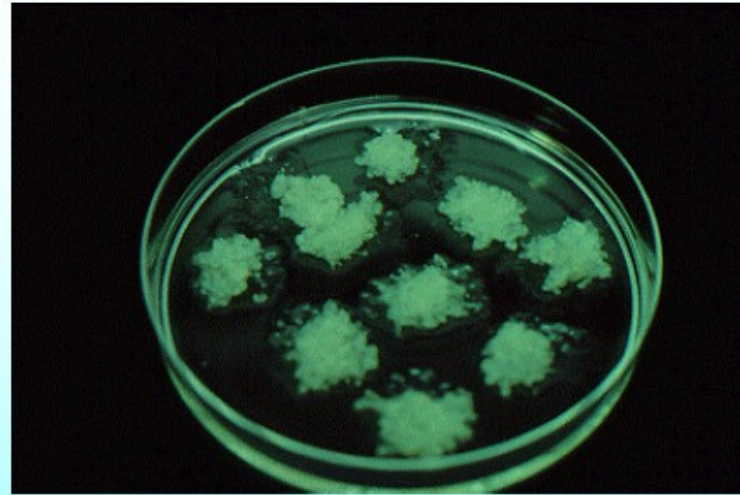
na kalusu lnu



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

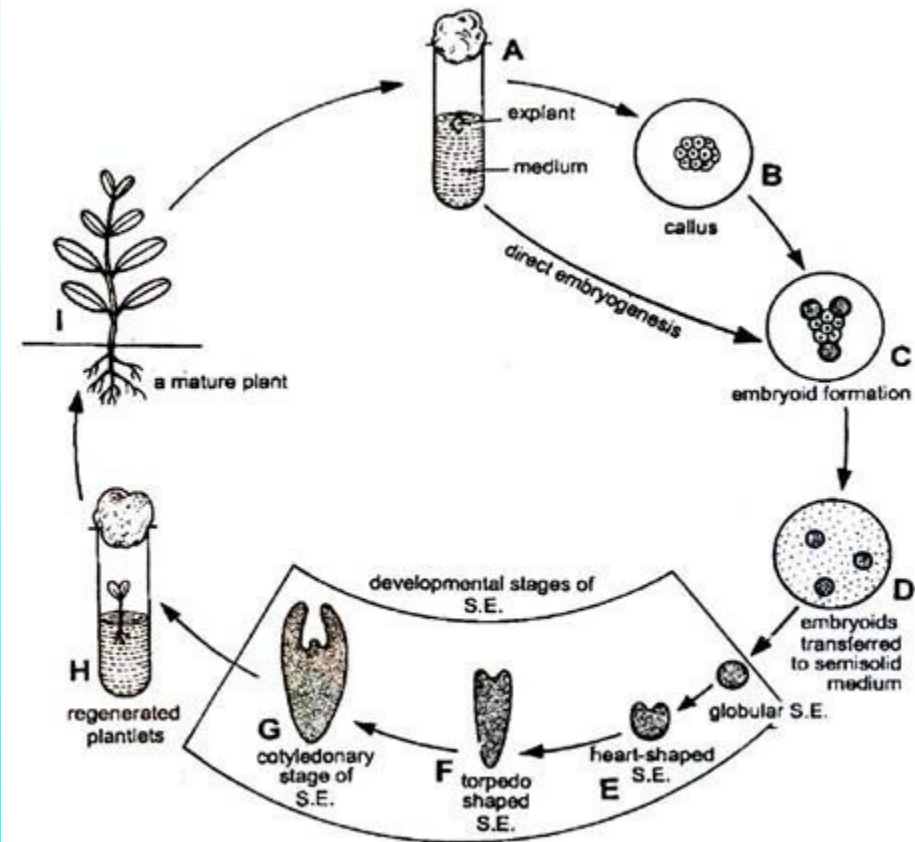


Fig. 5. Somatic Embryo (S.E.) Differentiation

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

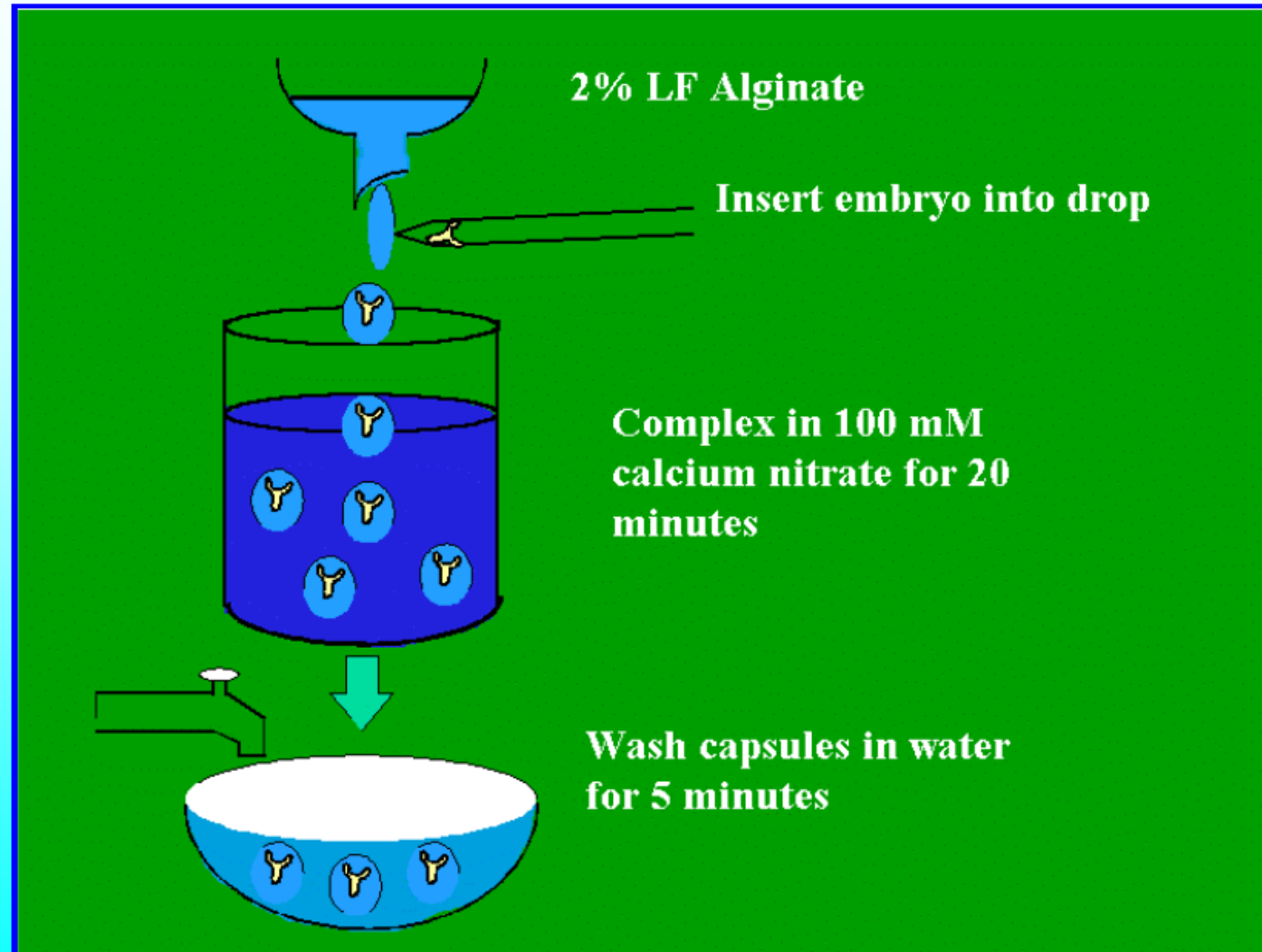
jsou jednotlivá enkapsulovaná somatická embrya
Termín '**embling**' se často používal pro označení rostlinek pocházejících ze somatických embryí nebo syntetických semen.

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:

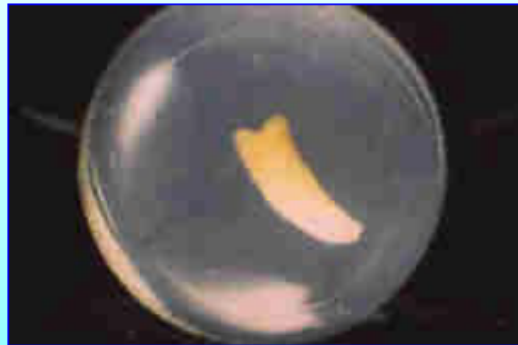
- **kvalita a pravidelná tvorba somatických embryí**
- **konverze embryí**

Příprava umělých semen



Umělá semena

Debergh et al.



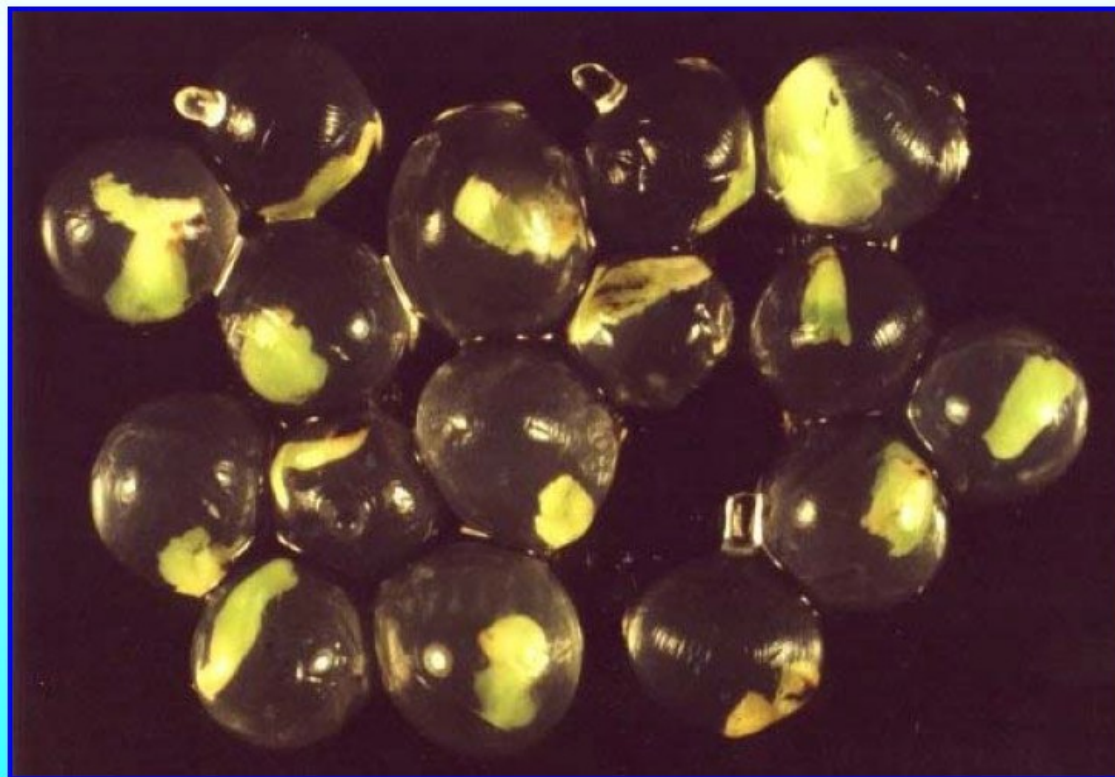
embryo enkapsulované
v alginátu sodném

Problémy:

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

konverze

Somatické embryá sóje enkapsulovaná v alginátu



Dr. M. Griga, Agritec s.r.o. Šumperk

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

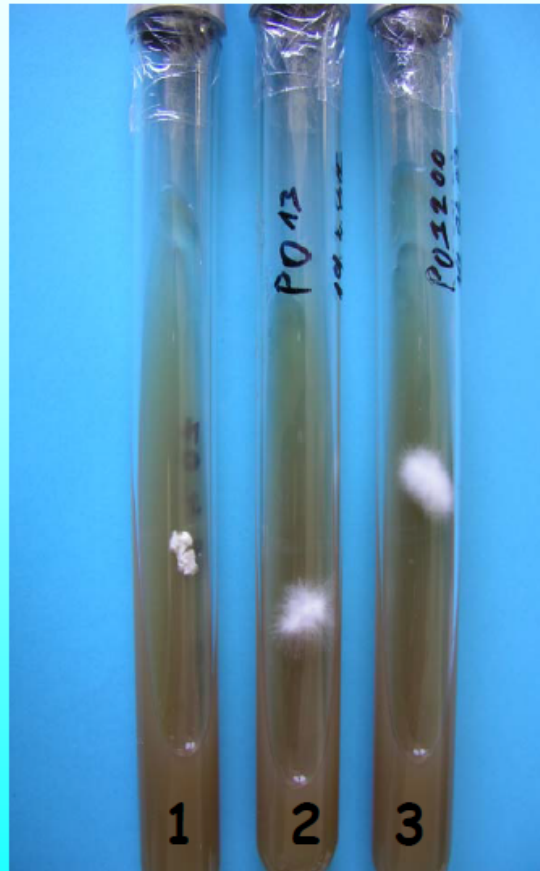
1. Co je podstatou konstituce embryogenní kompetence na buněčné a molekulární úrovni?
2. Jak jsou embryogenně kompetentní buňky produkovány během ontogeneze rostlin?
3. Molekulární organizace programu somatické embryogeneze a její realizace
4. Jaká je povaha stimulu, který indukuje program embryogeneze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



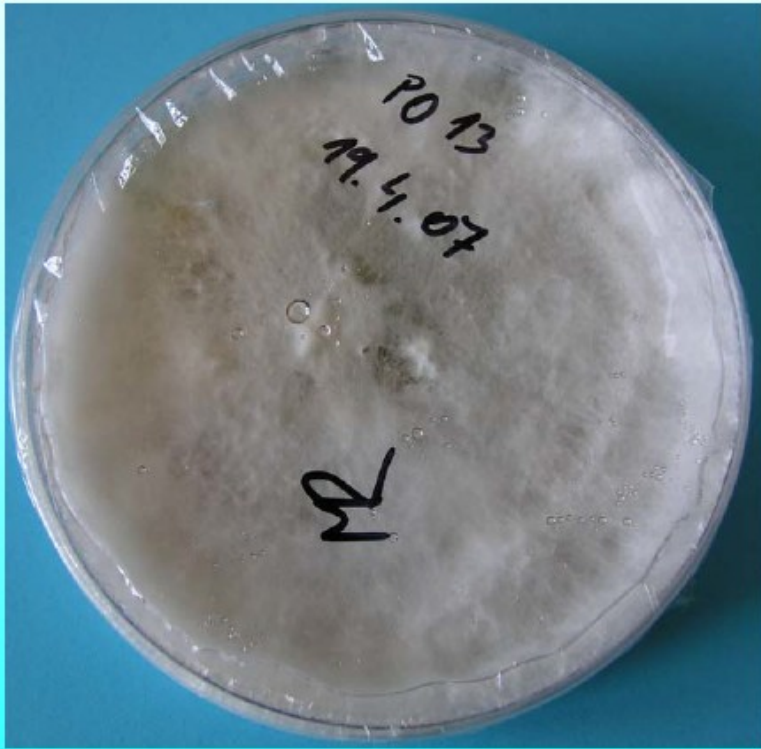
Lentinus tigrinus - houževnatec tygrovaný
(1)

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