

EMBRYOKULTURY

IZOLACE A KULTIVACE NEZRALÝCH EMBRYÍ U *CAPSICUM ANNUUM*

Materiál : nezralé plody *Capsicum annuum*

Postup: Povrchově dezinfikovaný plod položíme na dno sterilní misky, sterilním skalpelem rozřízneme a pinzetou vybíráme semena, která pokládáme na podložní sklíčko pod binokulární lupou a izolujeme embrya v různých vývojových stádiích. Izolovaná nezralá embrya - globule, srdce a torpédo kultivujeme na médiu MS s růstovými regulátory (0,1 mg/la IBA, 0,1 mg/l BAP) a embrya ve stádiu vycházkové hole a kroužku na médiu MS v Petriho miskách po dobu 3 dnů v termostatu (tma, 25 °C), poté přeneseme misky do kultivační místnosti.



Capsicum annuum - plod



Izolované embryo (nahore), rostoucí (dole)



Vyhodnocení po 4 týdnech

IZOLACE A KULTIVACE ZRALÝCH EMBRYÍ *CUCUMIS* SPP.

Materiál: semena *Cucumis sativus*, *C. melo*, *C. zeyheri*, *C. anguria*

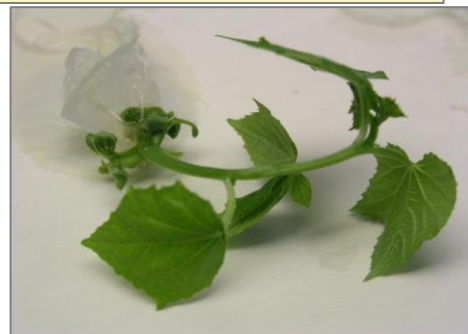
Postup: Zralá neporušená semena vložíme do injekční stříkačky a sterilizujeme – 70% ethanol (2min); 8% chloramin (30 min); 3 x propláchneme ve sterilní destilované vodě. Necháme nabobtnat ve sterilní vodě cca 1 hodinu. V aseptickém prostředí pod binokulární lupou izolujeme embrya pomocí sterilních nástrojů (skalpel, pinzeta, jehly – dle potřeby). 5 – 10 neporušených embryí umístíme na médium MS v Petriho misce (90 mm). Kultivujeme do doby než embrya vyklíčí v termostatu (tma, 25 °C), poté přeneseme do kultivačních boxů s médiem OK a umístíme do kultivační místnosti (16/8 hodin den/noc a teplota 22 ± 2 °C) .



C. zeyheri – izolované embryo



C. melo – klíčící rostlina



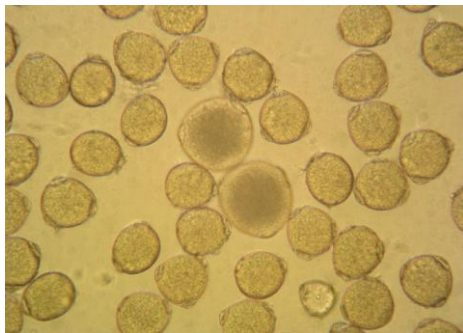
C sativus – dopěstovaná rostlina

IN VITRO OPYLOVÁNÍ U RODU *CUCUMIS*

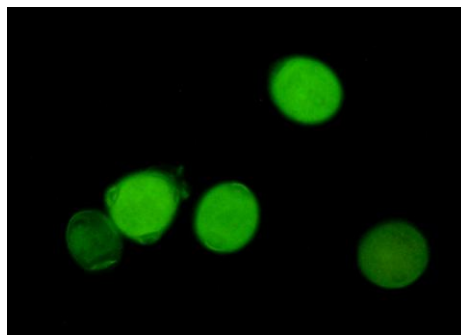
IZOLACE MIKROSPOR

Materiál : nezralá samčí poupata vybraných druhů *Cucumis* spp.

Postup: Pylová zrna izolujeme z nezralých, povrchově sterilizovaných samčích poupat. 10 – 15 poupat vložíme do injekční stříkačky a sterilizujeme: 70% etanol (2 min); 2,5% chloramin (10 min); 3 x propláchneme ve sterilní vodě. Izolace prašníků probíhá ve flowboxu pomocí nástrojů na sterilním papíře. Izolované prašníky vložíme do zkumavky s vychlazeným NLN médiem a rozdrtíme skleněnou tyčinkou. Přidáme 2 - 5 ml vychlazeného NLN média a filtrujeme přes 72 µm filtr; podíl na filtru a případně zkumavku proplachujeme vychlazeným NLN médiem tak, abychom získaly výsledný objem 10 ml, který pipetujeme do čisté zkumavky.



Pylová zrna *Cucumis sativus*

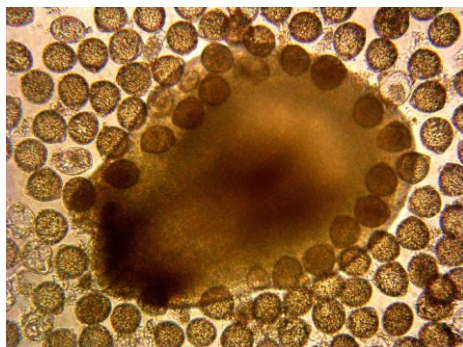


Pylová zrna *C. sativus* (barvena FDA)

IZOLACE NEZRALÝCH VAJÍČEK

Materiál : nezralá samičí poupata *Cucumis sativus*

Postup: Vajíčka izolujeme z nezralých, povrchově sterilizovaných samičích poupat. 10 – 15 poupat vložíme do injekční stříkačky a sterilizujeme: 70% etanol (2 min); 2,5% chloramin (10 min); 3 x propláchneme ve sterilní vodě. Na sterilním papíře řežeme poupata na ½ nebo ¼ (dle velikosti) a po binokulární lupou izolujeme pomocí nástrojů vajíčka (zárodečné vaky). Sterilní jehlou vajíčka (zárodečné vaky) přenášíme na médium pro IVP (*in vitro* opylování; médium CP, YS). Na jednu Petriho misku (6 cm) sadíme 10 – 15 vajíček (zárodečných vaků).

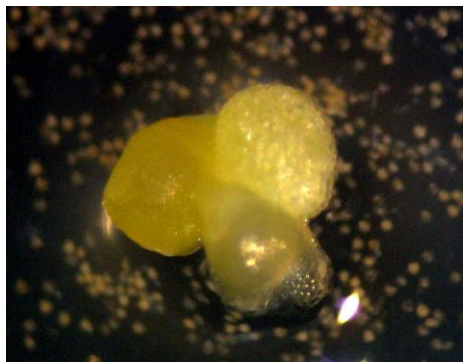


Pylová zrna *C. sativus* + zárodečný vak *C. sativus*

IN VITRO OPYLOVÁNÍ

Materiál : izolovaná pylová zrna a vajíčka *Cucumis* spp.

Postup: Pasteurovou pipetou se směsí pylových zrn v NLN médiu zakápneme izolovaná vajíčka (zárodečné vaky). Ke každému vajíčku (zárodečnému vaku) jedna kapka (závisí na hustotě pylových zrn). Petriho misky s izolovanými vajíčky (zárodečnými vaky) a pylovými zrny kultivujeme v termostatu (tma, 27 °C; do vzniku mikrokalusů), pak přeneseme Petriho misky do kultivační místnosti.



Mikrokalus (IVP *C. sativus* x *C. melo*)

PRAŠNÍKOVÉ KULTURY

ZALOŽENÍ PRAŠNÍKOVÉ KULTURY

Petunia sp., *Brassica oleracea*, *Nicotiana sp.*, *Salix sp.*

Materiál : poupata *Petunia sp.*, *Brassica oleracea*, *Nicotiana sp.*
samčí jehnědy *Salix sp.*

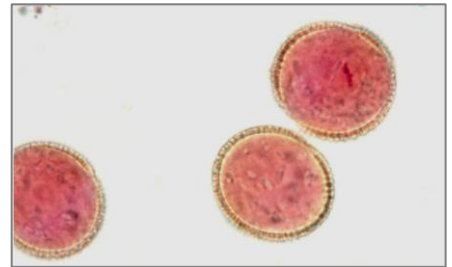
Postup: Prašníky jsou izolovány z nezralých neporušených pupat nebo jehněd (*Salix sp.*) – v jednojaderném stádiu mikrospór (stanovíme barvením pomocí acetokarmínu). Poupata nebo jehnědy jsou umístěny v injekční stříkačce nebo malé kádince a sterilizovány: 70% ethanol (2min); 2,5% chloramin (20 min); 3 x propláchnutí ve sterilní destilované vodě (již v aseptickém prostředí) a pak přeneseny a uzavřeny ve sterilní Petriho misce (ochrana před zavadnutím). Prašníky jsou izolovány pomocí nástrojů (pinzeta, preparační jehla) na podložním sklíčku pod binokulární lupou. Prašníky kultivujeme na živném médiu B5 (Keller a kol. 1975) s přídavkem 10% sacharosu, 2mg/l NAA a 1mg/l BAP na Petriho miskách (60 mm, 25 prašníků) v termostatu (tma, 25 °C). Po 4 - 6 týdnech vyhodnocujeme regeneraci - vznik kalusů nebo embryoidů, nekrotizaci prašníků (v %) a kontaminace (v%).



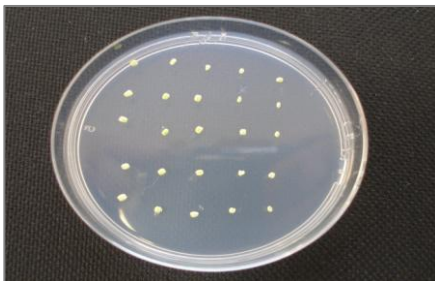
Brassica oleracea - poupě



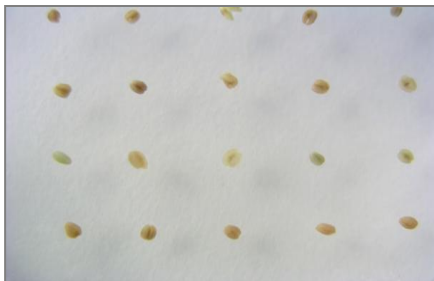
Nicotiana sp. - poupata



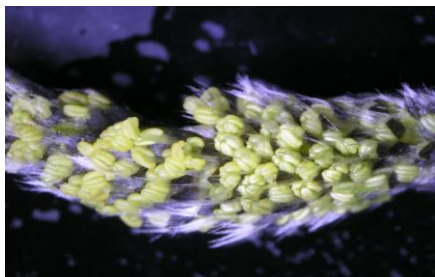
Brassica oleracea - barvené mikrospóry



Nicotiana sp. - izolované prašníky



Brassica oleracea - prašík s embryoidy



Salix viminalis - jehněda



Salix viminalis – prašíky



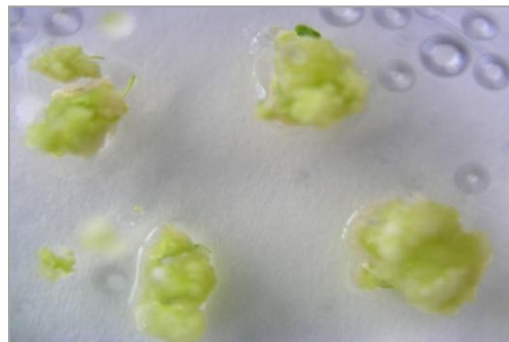
Salix viminalis – mikrokalus z prašíku

METODY EXPLANTÁTOVÝCH KULTUR

MERISTÉMOVÉ KULTURY

Materiál: růžice *Brassica oleraceae* var. *botrytis* (květák)

Postup: Z růžice nařežeme explantáty o velikosti 0,5 – 1,0 cm velké (10-15 ks). Explantáty povrchově sterilizujeme v injekční stříkačce: 70 % etanol (2 min); 2,5 % chloramin (10 min); 3 x propláchneme ve sterilní destilované vodě. Ve sterilním prostředí nařežeme explantáty na menší části a pomocí pinzety je přeneseme na MS médium v Petriho misce (5 explantátů/1 miska, 6 cm) přeneseme do kultivační místnosti. Vyhodnocujeme po 4 – 6 týdnech.



Po 2 týdnech kultivace

KALUSOVÉ KULTURY

Materiál: listy *in vitro* kultivovaných rostlin *Cucumis melo*, *C. sativus*

Postup: Rostlinky rostoucí v *in vitro* podmínkách (4 - 6 týdnů) vyjmeme pinzetou z baněk a položíme na sterilní filtrační papír, listy rozřežeme skalpelem na segmenty 1 x 1 cm. Segmenty položíme na kultivační médium MS doplněné růstovými regulátory (2,5 mg/l NAA a 1 mg/l BA) v Petriho miskách a kultivujeme v termostatu (tma, 25 °C). Vždy po 2 týdnech pasážujeme na svěží médium a po 6 týdnech hodnotíme tvorbu kalusů.



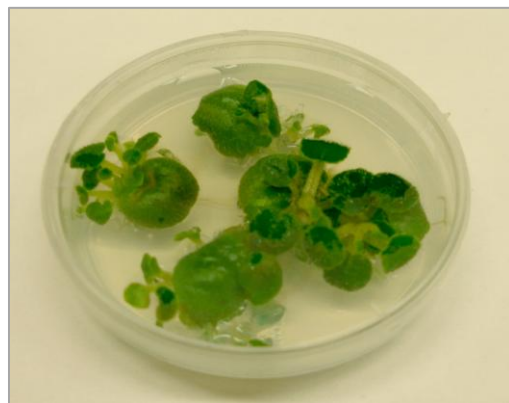
Kalus odvozený z listů *Cucumis melo*

MIKROPROPAGACE - INDUKCE PRŮTŮ

Materiál: listy *Saintpaulia* sp., *in vitro* rostlinky *Saintpaulia* sp.

Postup: Z mateřské rostliny odebereme 2 - 3 listy, které umístíme do kádinky a za mírného protřepávání sterilizujeme: 70 % etanol (1 min); 2,5 % chloramin (15 min); 3 x propláchneme ve sterilní destilované vodě. Listy položíme na sterilní filtrační papír a řežeme segmenty cca 1 x 1 cm. Segmenty položíme na kultivační médium v Petriho misce (9 segmentů/ miska, 9 cm). Přeneseme do kultivační místnosti a po 4 - 6 týdnech vyhodnocujeme regeneraci.

Z *in vitro* rostoucích rostlin, odřízneme listy a doložíme na MS médium do Petriho misek (5 lístků/miska). Přeneseme do kultivační místnosti a po 4 - 6 týdnech vyhodnocujeme regeneraci rostlin.



Regenerované rostlinky *Saintpaulia* sp. z *in vitro* listů

KLÍČENÍ SEMEN V PODMÍNKÁCH IN VITRO

Materiál: semena *Brassica* sp., *Cucumis* sp.

Postup: Vybereme nepoškozená semena, vložíme do injekční stříkačky a sterilizujeme: 70 % etanol (1 min), 36 % roztok SAVO (s kapkou Tweenu, 30 min), 3 x propláchneme sterilní destilovanou vodou. Semena přeneseme pinzetou na ½ MS médium v Petriho miskách, které umístíme v termostatu a kultivujeme ve tmě při 25 °C po dobu 5 - 7 dnů. Naklíčené semenáčky pasážujeme a kultivujeme na světle (kultivační místnost).

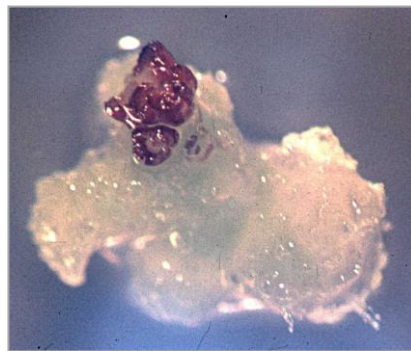
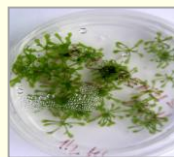


Semenáčky *Cucumis sativus*

METODY EXPLANTÁTOVÝCH KULTUR ROSTLIN

POSTUP PŘI PRÁCI *IN VITRO*

- **Příprava rostlinného materiálu** - povrchová desinfekce, narušení celistvosti rostliny, reakce po izolaci
- **Iniciace explantátové kultury** - izolace explantátu, velikost explantátu, stáří, médium, podmínky kultivace
- **Mikropropagace** - zmnožování, pasáže, regenerace rostlin
- **Zakořeňování *in vitro***
- **Převod do nesterilních podmínek** - aklimatizace



IN VITRO → STRESOVÁ SITUACE

vnitřní faktory - genotyp, vývojové stádium rostliny

vnější faktory - růstové podmínky mateřské rostliny, složení média, podmínky kultivace

SNÍŽENÍ REGENERAČNÍ SCHOPNOSTI V *IN VITRO*:

- odumírání explantátů po izolaci (nekrotizace)
- kontaminace
- dlouhodobá kultivace
- hromadění metabolitů (dlouhodobé působení růstových regulátorů)
- genetické změny (kalusové kultury, buněčné kultury)



METODY

Meristémové kultury

Kalusové kultury

Somatická embryogeneze

Embryokultury

Prašníkové a mikrosporové kultury

Protoplastové kultury, fúze protoplastů

Genetické manipulace - transformace



MIKROPROPAGACE ROSTLIN

REGENEROVANÉ ROSTLINY JSOU IDENTICKÉ - KLONY

Materiál : *in vitro* kultury *Brassica* sp., *Dianthus* sp., *Dionea* sp., *Drosera* sp., *Fragaria* sp., *Nephrolepis* sp., *Salix* sp., *Solanum* sp., *Saintpaulia* sp., další rostlinný materiál

Postup: Ve flowboxu otevřeme *in vitro* kulturu, rostlinky nebo shluk rostlinek vytáhneme pinzetou a přeneseme na sterilní filtrační papír, pomocí pinzety a skalpelu odstraníme staré listy, kořínky a rozřežeme rostlinky tak, že získáme jednotlivé (r. *Dionea*, *Fragaria*) rostlinky nebo stonkové segmenty s 2-3 lístky (*Dianthus*, *Solanum*). Rostlinky - 4 ks nebo stonkové segmenty – 6 ks sadíme bazálním koncem na agarová média (OK, 1C, 1O) na jednu baňku (100 ml, 30 ml média). Baňky uzavřeme, označíme a přeneseme do kultivační místnosti s teplotou 22 ± 2 °C a fotorežimem den/noc 16/8h. Po 4 - 6 týdnech vyhodnocujeme prorůstání úžlabních pupenů, vznik prýtů, tvorbu kořenů, rozdíly v habitu rostlin regenerovaných na médiu OK, 1C nebo 1O a rozdíly mezi genotypy.



Po vysazení



Kultivace



Před hodnocením



Drosera sp.



Saintpaulia sp.



Salix sp.



PŘEVOD *IN VITRO* ROSTLIN DO NESTERILNÍCH PODMÍNEK

Postup: Aklimatizované rostlinky vyjmeme z baněk, vymyjeme agar a vysadíme část do perlitu a část do jiffy potů, umístíme do miniskleníků ve skleníku. Po 4 týdnech hodnotíme převod.



Jiffy poty



Jiffy poty



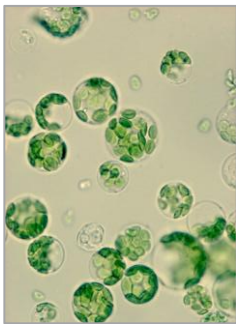
Perlit

PROTOPLASTOVÉ KULTURY

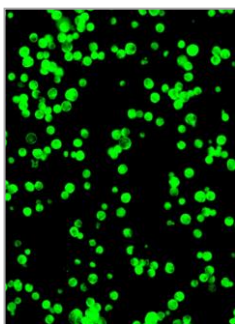
IZOLACE A KULTIVACE PROTOPLASTŮ = ROSTLINNÝCH BUNĚK ZBAVENÝCH BUNĚČNÉ STĚNY

Materiál : *in vitro* rostoucí rostlinky nebo kalusy r. *Cucumis*, *Brassica*

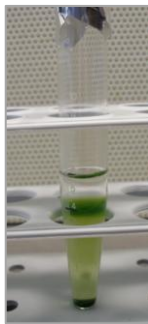
Postup: Hypokotyls, mladé listy nebo kalusy (každý zvlášť) nařežeme na 1 mm proužky, umístíme do enzymatického roztoku v Petriho miskách (6 cm, 5 ml enzymatického roztoku, 500 mg rostlinného materiálu) a inkubujeme v termostatu 18 hod ve tmě. Izolace a purifikace protoplastů probíhá filtrací přes nylonové sítko (72 μ m), centrifugací v promývacích roztocích a separací protoplastů pomocí 20% sacharosového gradientu. Životnost stanovujeme pomocí FDA, hustotu v Bügnerově komůrce. Kultivujeme v tekutém médiu při hustotě $1,5 \cdot 10^5$ prot/ml.



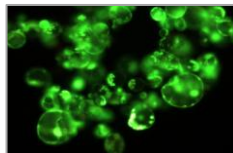
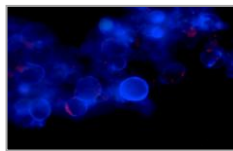
Mezofylové protoplasty



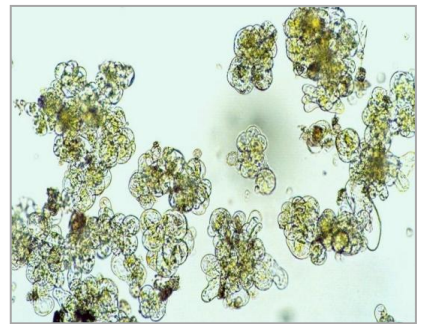
Životnost



Gradient



Po 48 hodinách



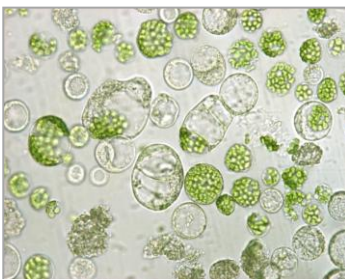
Mikrokalusy po 4 týdnech

FÚZE PROTOPLASTŮ

SOMATICKÁ HYBRIDIZACE = CHEMICKÁ FÚZE

Materiál : izolované mezofylové, hypokotylové, kalusové protoplasty

Postup: Purifikované protoplasty ve zvolených kombinacích smícháme v poměru 1:1 (hustota směsi 10^6 protoplastů/ml) a nakapeme na dno Petriho misky (průměr 35 mm, 4 kapky). Chemické fúze realizujeme pomocí 33% PEG (polyethylenglykolu 6000) po dobu 15 minut (50 μ l na každou kapku). Fúzi ukončíme STOP roztokem, který odebereme a přidáme tekuté kultivační médium.



Po fúzi



Mikrokalus



Kalus



Regenerace