

Kalusové kultury

Indukce a jejich využití

Definice kalusu

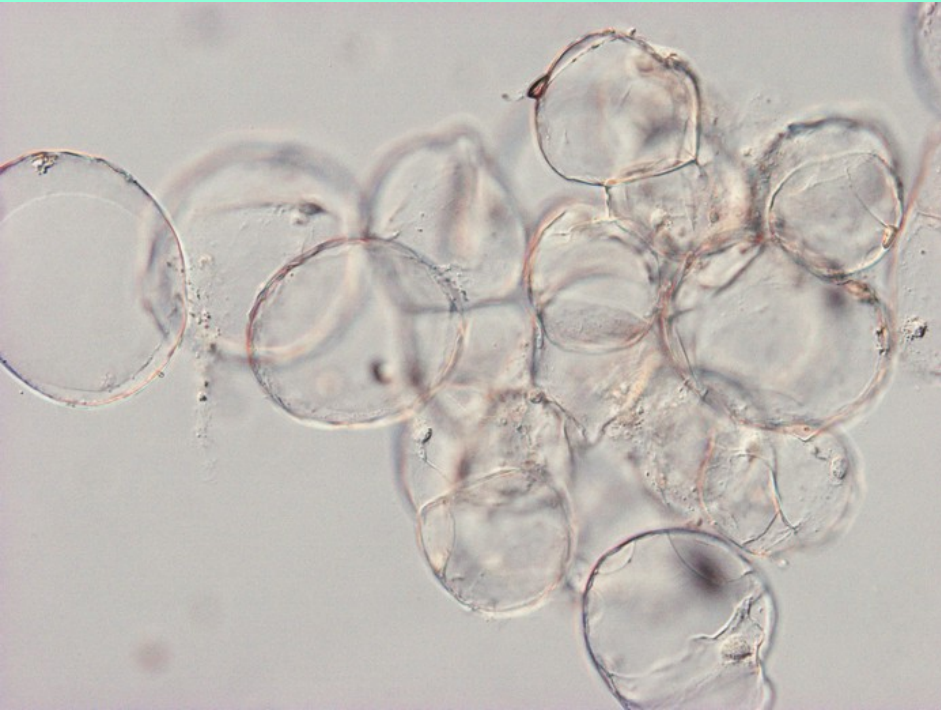
kalus je tvořen
amorfni hmotou
málo organizovaných
tenkostěnných,
parenchymatických
buněk



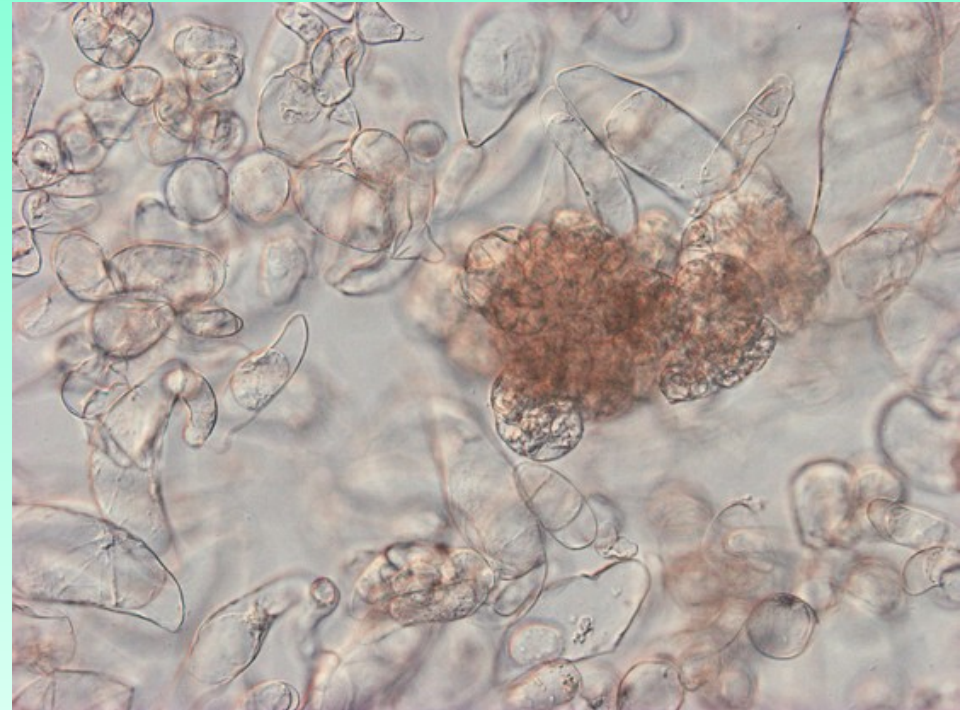
Debergh et al.

http://users.ugent.be/~pdebergh/cal1_p1.htm

Fenotyp buněk kalusů



tabák *Nicotiana tabacum* cv. Xantha



mrkev *Daucus carota* ssp. *carota*

Iniciace kalusu

Tvorba kalusu může být vyvolána poraněním stonků nebo kořenů.

Taková „ochranná“ odpověď na poranění byla pozorována u všech skupin žijících rostlin

Buněčné dělení je aktivováno jako výsledek změn endogenní rovnováhy fytohormonů.

- mechanické poškození
- invaze mikroorganismů
- napadení hmyzem



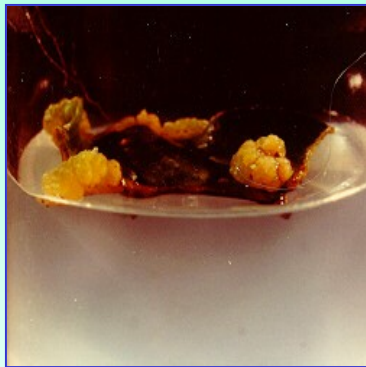
Ránový kalus na kmeni stromu *Erythrina*

Debergh *et al.*

Původ kalusu

Kalus vzniká proliferací buněk z mateřského pletiva.
V kultuře je kalus iniciován umístěním explantátů na médium,
které podporuje růst buněk.

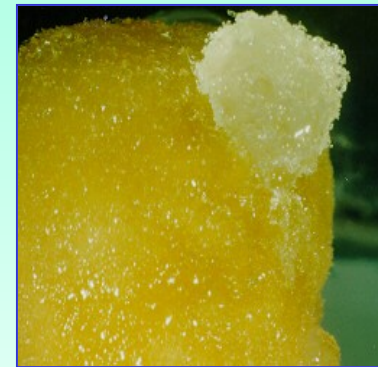
Hormony (auxiny) mění metabolismus buněk, které jsou v klidu
na buňky aktivní.



*kalus vznikající
z pletiva cévních
svazků*



*kalus vznikající
z pletiv kořene*



*kalus vznikající
z embrya*

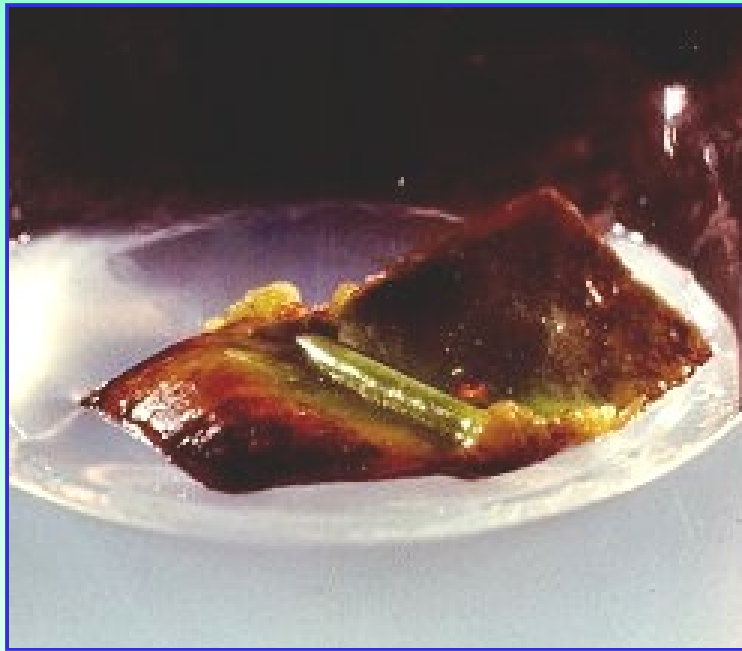
Debergh et al.

Stadia založení kalusu *in vitro*

1. Indukce
2. Buněčné dělení
3. Diferenciace

Debergh *et al.*

1. Indukce kalusu



Tvorba kalusu na segmentu listu
v blízkosti cévního svazku

Buňky se připravují na dělení.
U většiny druhů (rostliny dvouděložné, jednoděložné, nahosemenné, kapradiny i mechorosty) může být tvorba kalusu vyvolána relativně snadno.

Pletiva mnohých orgánů mohou mít vlastní potenciál pro dělení buněk na vhodném médiu.

Avšak některá pletiva (např. meristémy - kambium) jsou lépe disponována pro rychlé dělení buněk než pletiva diferencovaných buněk.

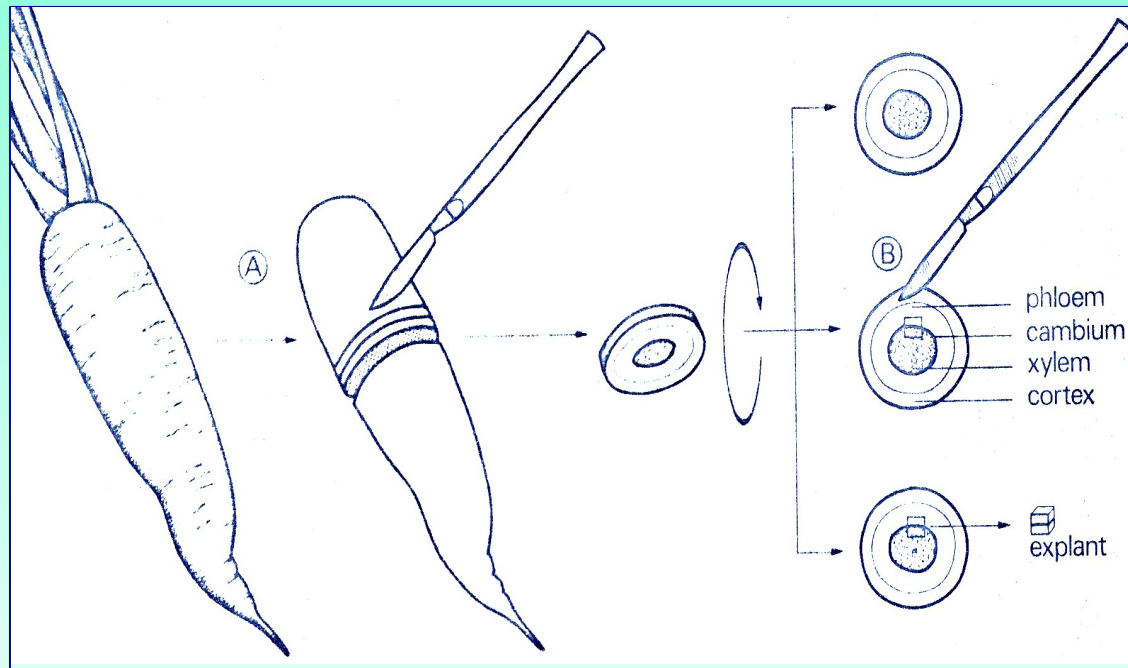
Iniciace kalogeneze
= indukce tvorby kalusu

Auxiny

- 2,4-D
- picloram

Iniciace kalusu ze segmentů kořene mrkve

Reinert and Yeomann (1981)



Indukce kalusu na stonku byliny (*N. tabacum* L.)



Tacchini a Walbot
1987

po infekci bakteriemi *Agrobacterium tumefaciens* vyvolaná působením bakteriálních genů pro biosyntézu auxinu a cytokininu

nádory krčku klíčnic rostlin = „crown-gall callus“

2. Buněčné dělení



Aktivní dělení buněk vrací
buňky do meristemického
dediferencovaného stavu.

3. Diferenciace - organogeneze



v kalusovém pletivu postupně
diferencují orgány:

- prýty
- kořeny
- somatická embrya

a začínají probíhat reakce drah
sekundárního metabolismu

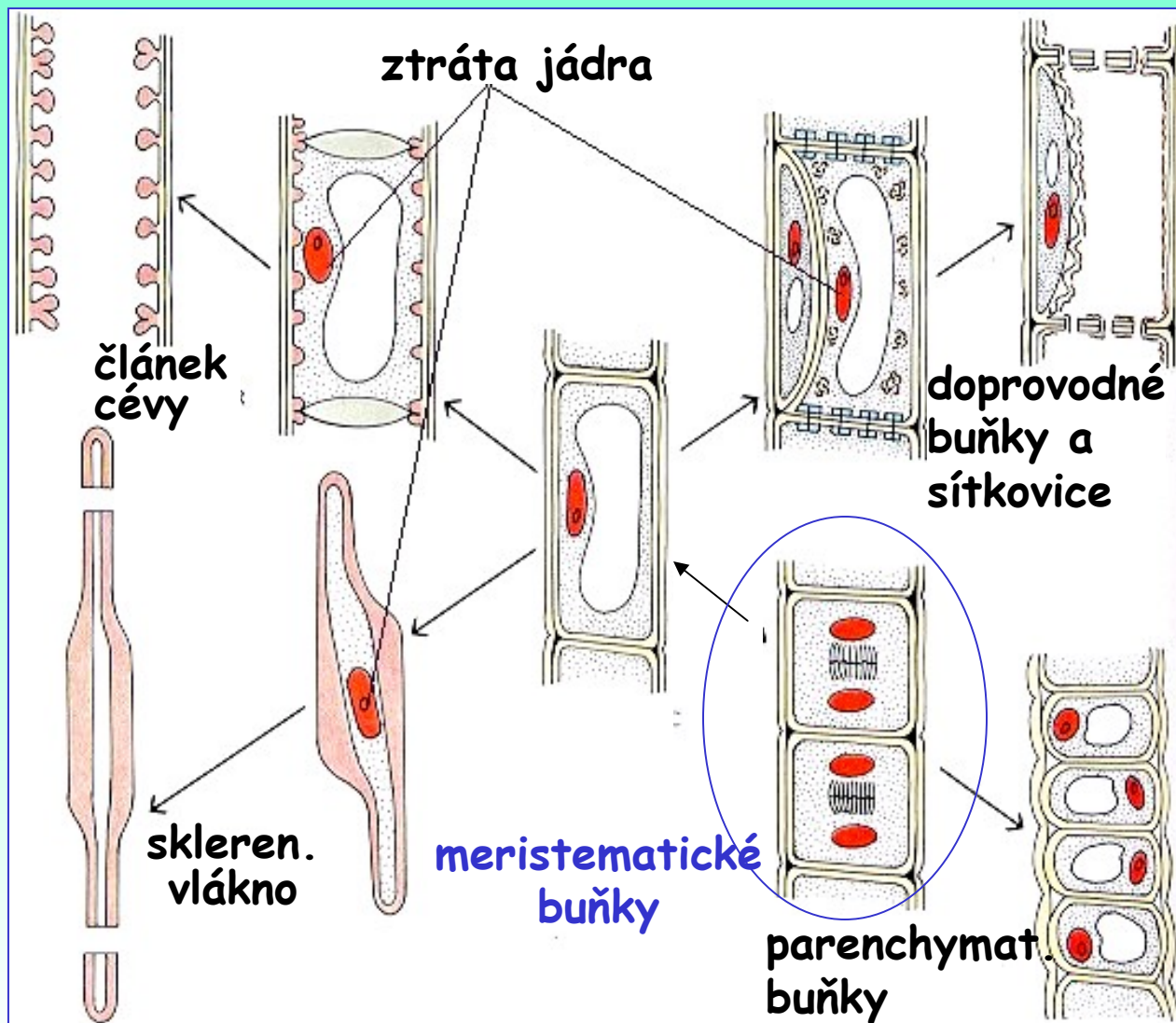
Diferenciace buněk kalusu

Kalusové kultury jsou význačné pozoruhodnou **variabilitou** typů buněčné diferenciace.

Homogenní kalus tvořený pouze parenchymatickými buňkami se vyskytuje pouze zřídka.

Cytodiferenciace vede ke tvorbě tracheálních elementů, sítkových elementů, suberinizovaných buněk, žláznatých buněk a trichomů.

Diferenciace meristematických buněk



Typy kalusů - podle převažujícího typu cytodiferenciace

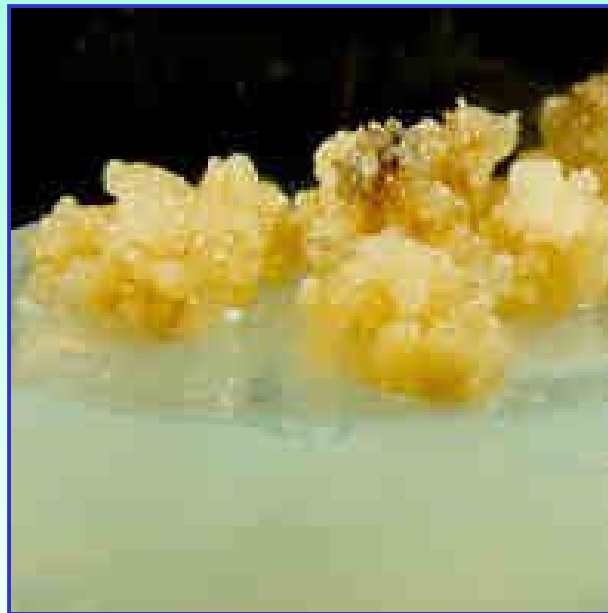
Kalusy mohou mít

pevnou texturu = tvořené buňkami se silně lignifikovanými stěnami (zpravidla pomalu rostoucí kalusy)

jiné mohou být rychle rostoucí, **snadno se rozpadající** na malé fragmenty („friable callus“).



lignif. kalus *Gloriosa*

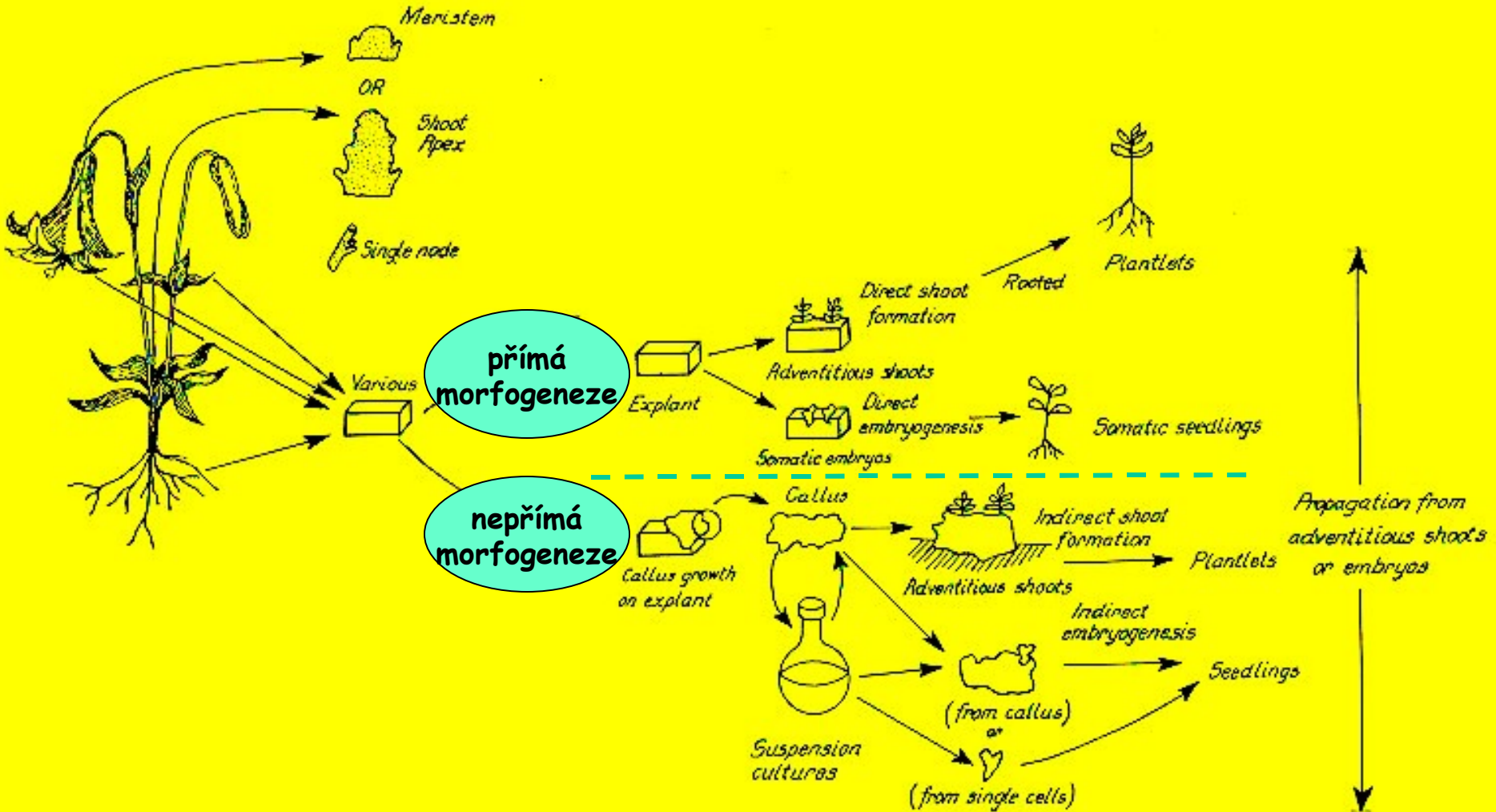


rozpadavý kalus *Gloriosa*



rozpadavý kalus *Vinca*

Přímá a nepřímá morfogeneze *in vitro*



Georg a Sherrington (1984), upraveno

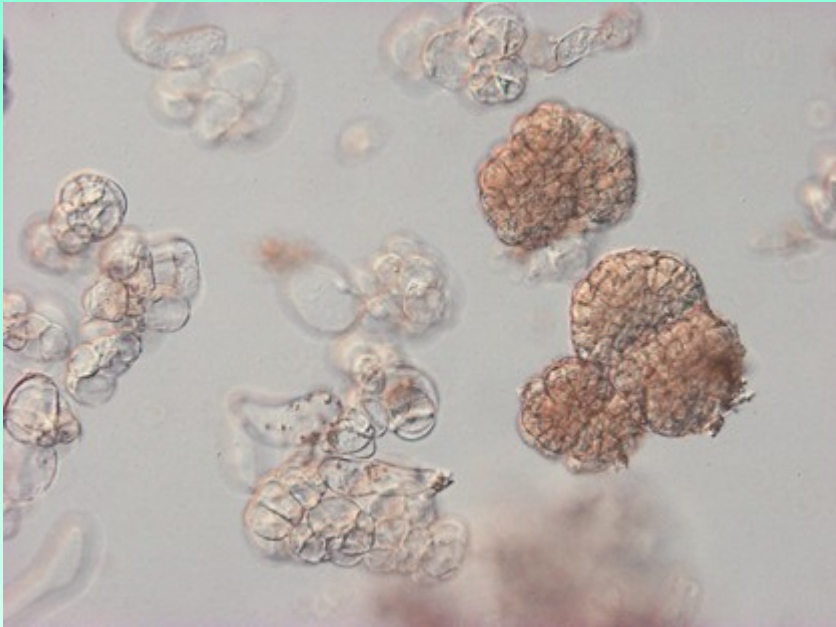
Diferenciace meristematických buněk



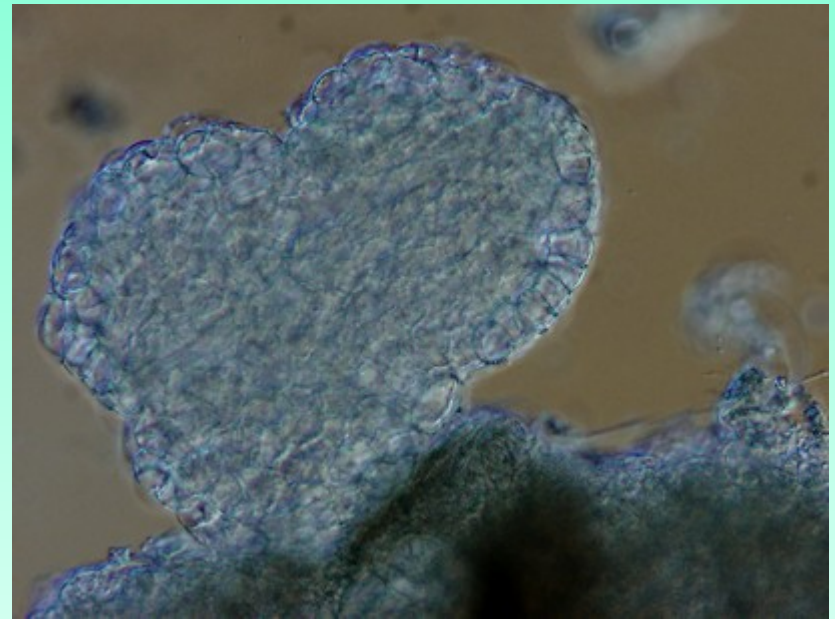
malá oblast dělicích se buněk meristemoidů nebo nodulů cév se může stát centrem pro tvorbu:

- A. prýtvých pupenů,
- B. kořenových primordií
- C. somatických embryí.

Daucus carota ssp. carota

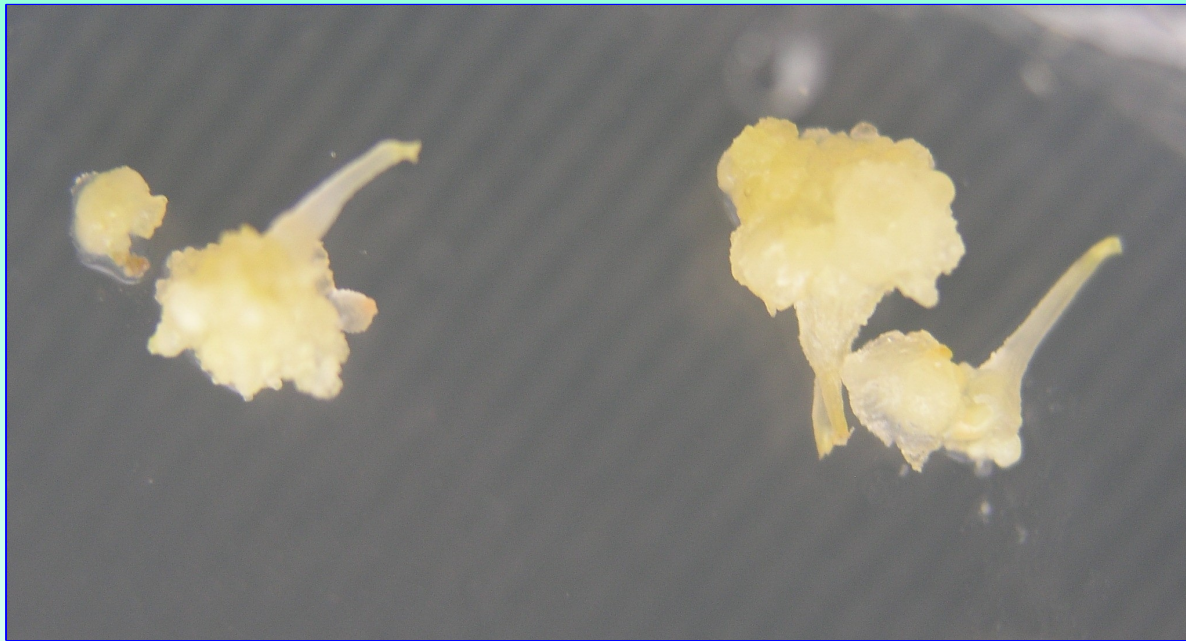


globulární somatická embrya
v kalusové kultuře



srdčité somatické embrya
v kalusové kultuře

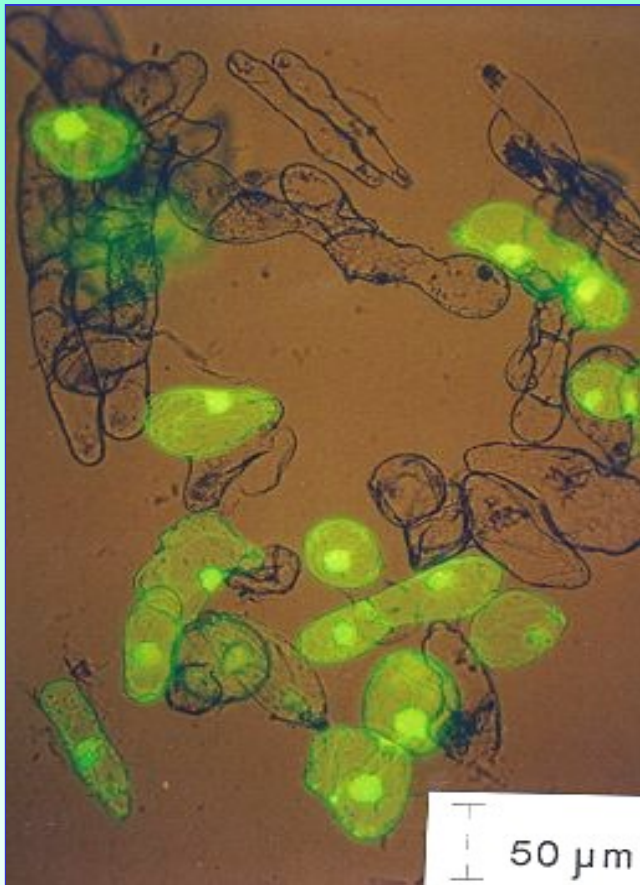
Kalus iniciovaný z kambiálních segmentů kořene mrkve se somatickými embryi



kalogeneze a jeho udržování: MS s 0.1 mg/l 2,4-D
indukce SE: MS bez auxinu

Reinert a Yeomann (1981)

Morfologie buněk suspenzí a jejich viabilita

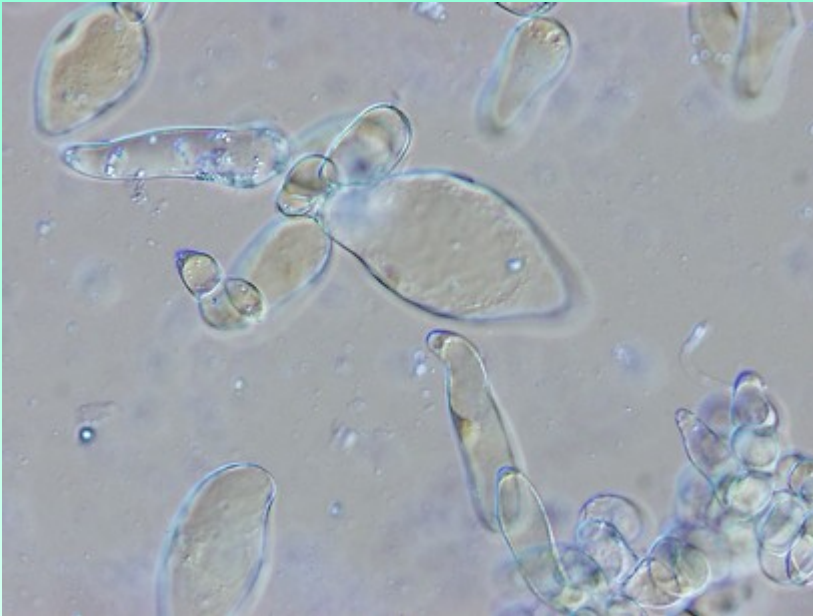


fluorescein diacetát (FDA)
= substrát pro esterázy, které
aktivní pouze v buňkách
s nepoškozenou plazmatickou
membránou

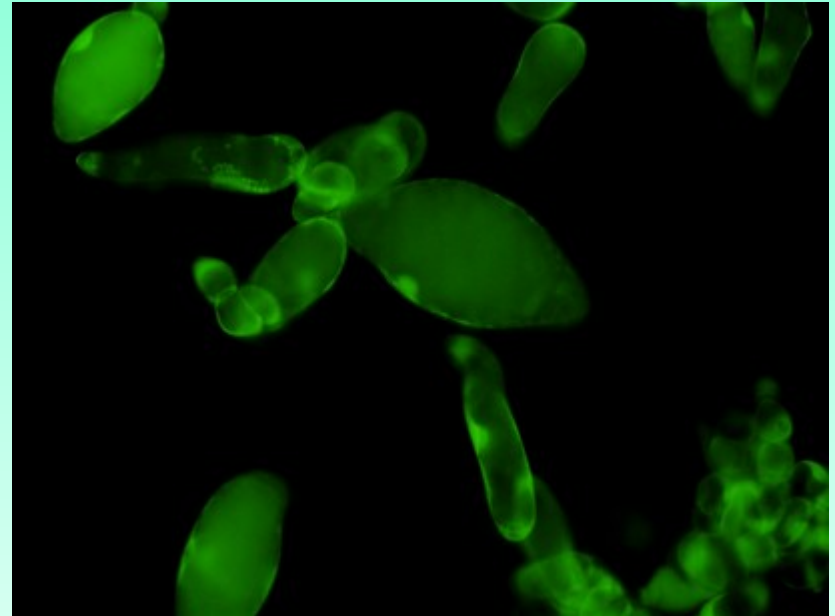
Esterázy hydrolyzují FDA a tak
se uvolní fluorescein, který v
modrém světle vyzařuje
žlutozelenou fluorecenci

Buňky kalusu mrkve

Daucus carota ssp. carota



Nomarského diferenciální
interferenční kontrast (DIC)



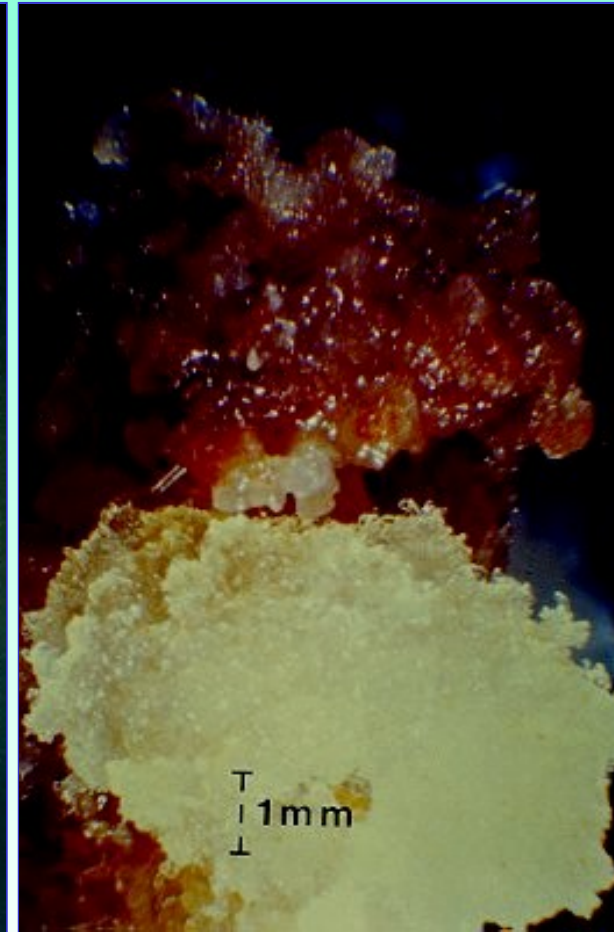
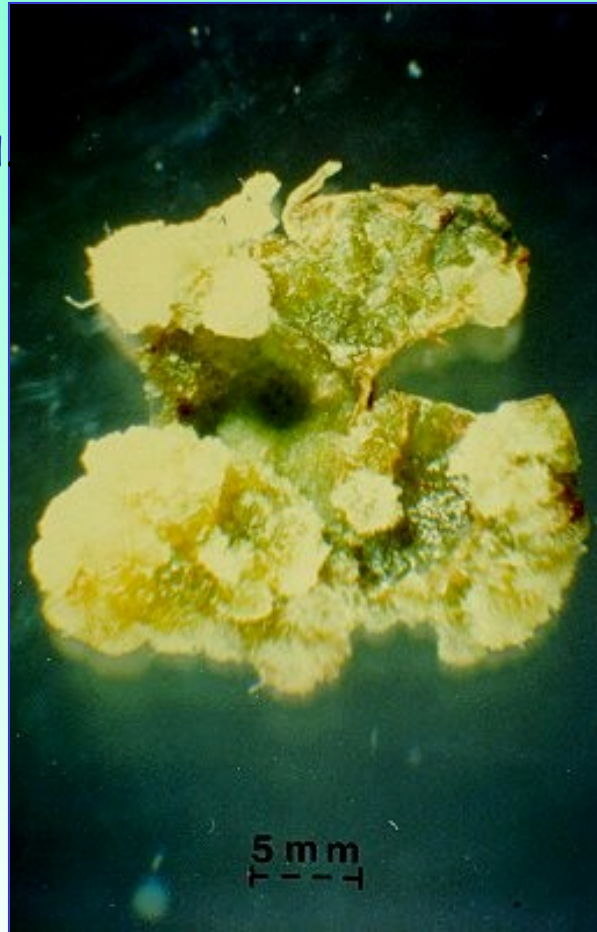
Fluorescence živých buněk
po inkubaci s FDA

Kalusy = genetická nestabilita

Kalusové kultury jsou charakteristické genetickou nestabilitou. Takto mohou vznikat fenotypové rozdíly v jedné kultuře.

Variace mohou mít základ

- epigenetický
- genetický



Epigenetické změny

= jakákoliv změna fenotypu, která **není výsledkem změny DNA** (selektivní genová exprese)

Tyto změny jsou **nedědičné**, tj. nedochází k přenosu změn na meiotické potomstvo, ale jsou stabilní a jsou přenášeny z jedné buněčné generace na generaci další vegetativně.

(např. habituace na cytokinin).

Genetické změny

= chromosomové aberace, jaderná fragmentace a endoreduplikace (vede k polyploidii).

Četnost těchto abnormalit obvykle **vzrůstá s rostoucím stářím** kultury. Kultivační podmínky mohou působit selektivně.

Určité **aneuploidní** nebo **polyploidní** buňky mohou získat výhodu v rychlosti dělení nad normálními buňkami a mohou proliferovat rychleji.

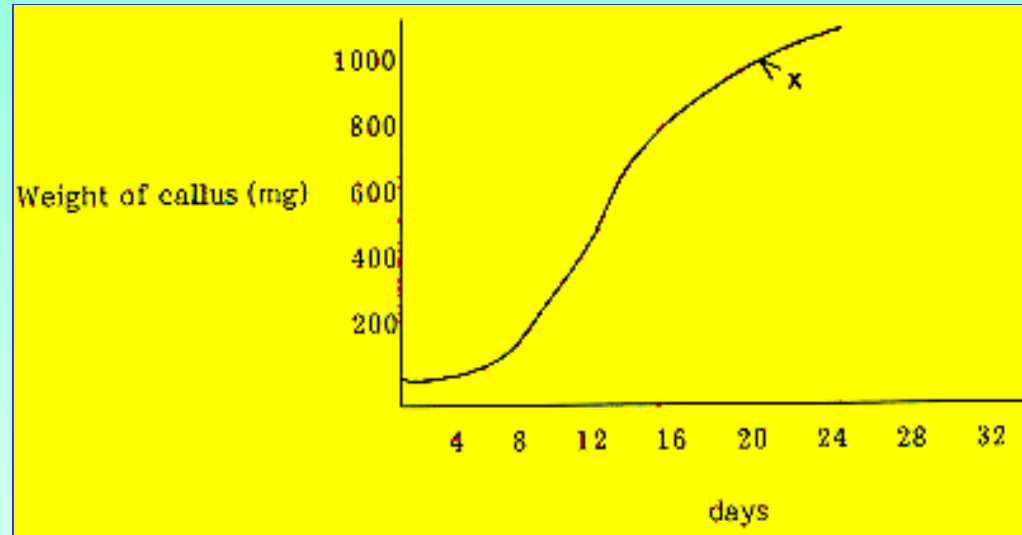
Pasážování kalusu

Po určité periodě kultivace je nezbytné **pasážovat** kalus na čerstvé medium, vzhledem k vyčerpání esenciálních živin a vysychání gelu.

Metabolity vylučované kalusem se mohou v mediu akumulovat až na **toxickou** úroveň.

Pasážovaný kalus musí být **dostatečně velký**, aby byl zajištěn obnovený růst po přenosu na čerstvé médium.

Pasáže se provádějí pravidelně každé **3 až 6 týdnů**.



typická růstová křivka

x = doba pasáže

Transformace pletiv trav - GUS marker

využití kalusové kultury pro transformace

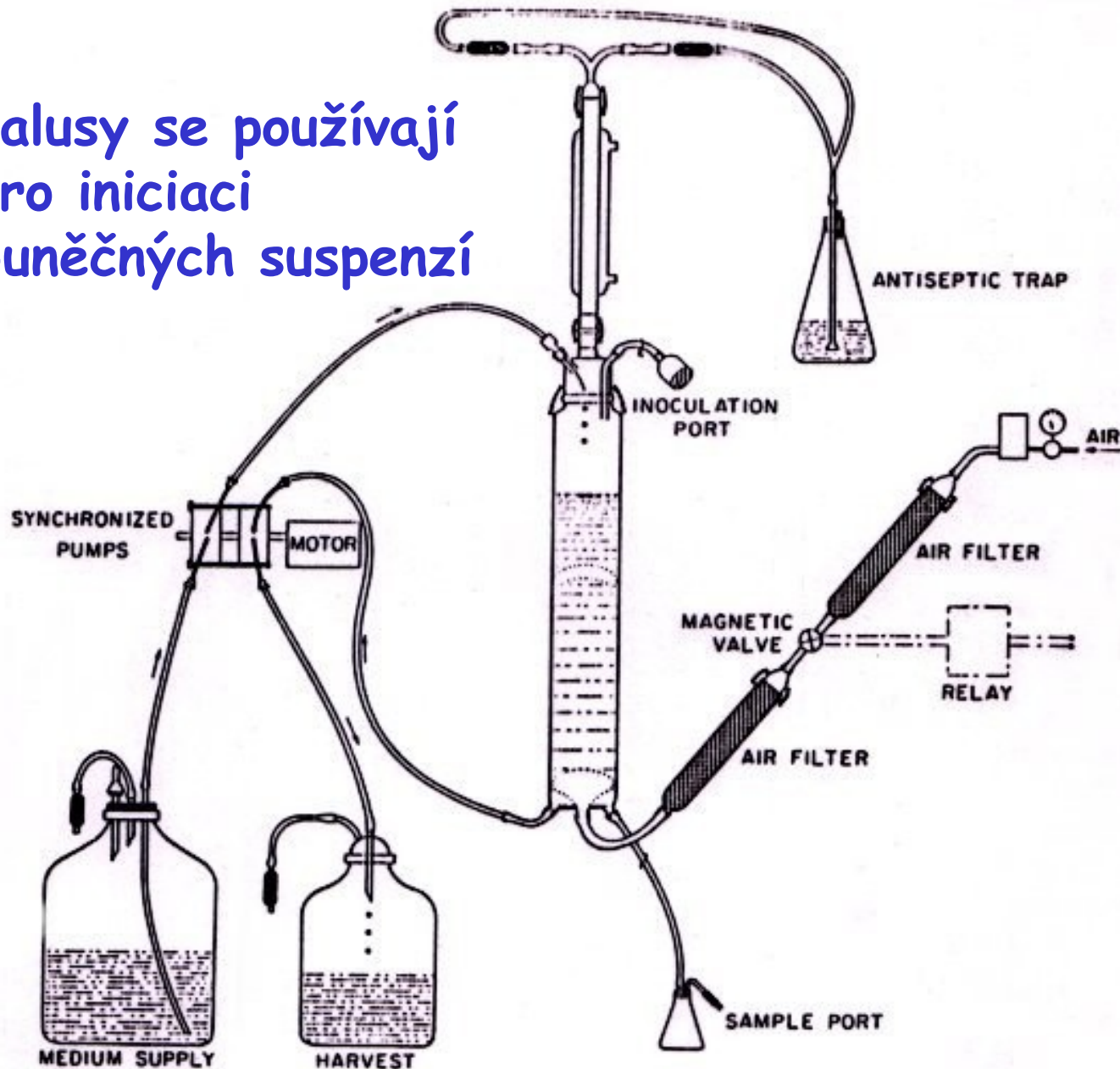


exprese aktivity
enzymu glukuronidázy
po bombardování kalusu
Brachypodium

prokázána indigogenní
histochemickou reakcí

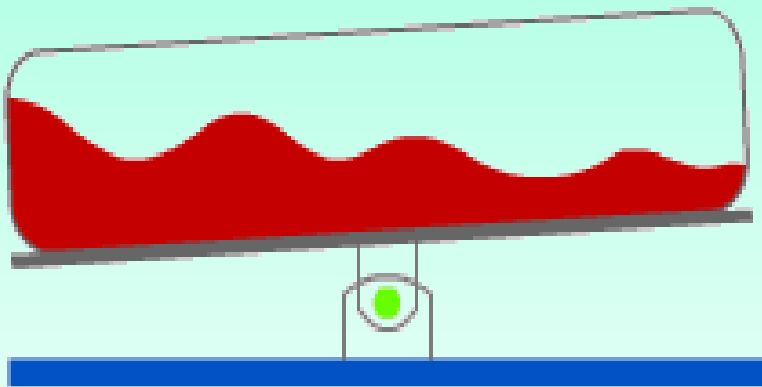
Schéma bioreaktoru

kalusy se používají
pro iniciaci
buněčných suspenzí



Jiná varianta kultivace v tekutém médiu

Unlike the traditional spinner system where oxygen transfer is limited by air-liquid surface, WaveBioreactor has no limitation.



nafouknuté plastické sáčky tvoří kultivační komoru

vlnění vytvářené houpáním:

- a) zvětšuje povrch rozhraní vzduch - tekutina pro přenos kyslíku
- b) zabraňuje sedimentaci buněk