

JMÉNO:

DATUM:

**TÉMA: Přímá somatická embryogeneze z květních lůžek a listů cinerárie (popelivky) (*Senecio x hybridus* Hyl.).**

**MATERIÁL:** uzavřená poupata a listové čepele cinerárie

**MÉDIA:**

Murashige nad Skoog (1962) makro a mikroelementy (**MS**) s přídavkem: 0,55 mM (1 g.l<sup>-1</sup>) myoinositol, 2,9 μM (5 mg.l<sup>-1</sup>) thiamin-HCl, 13,5 μM (3 mg.l<sup>-1</sup>) 2,4-dichlofenoxycetová kyselina (2,4-D), μM 4,5 (1 mg.l<sup>-1</sup>) benzyladenin, 88 mM (30 g.l<sup>-1</sup>) sacharosa, 8g.l<sup>-1</sup> agar.

Schenk and Hildebrandt (1972) makro a mikroelementy (**SH**) se stejnými doplňky jako MS.

### **Povrchová desinfekce a příprava explantátu.**

**POSTUP:**

#### **1. Lůžka květenství (úborů)**

1. Úbory s uzavřenými poupaty s 2 cm stonkem se ponoří do 70% etanolu a ožehnou rychlým protažením plamenem kahanu.
2. Následuje desinfekce v roztoku 20% SAVO + 0,1% Triton X-100 po dobu 10 min. a trojí máchání ve sterilní destilované vodě.
3. Asepticky se odstraní lístky zákrovu a všechny květy a lůžko úboru se rozřízne vertikálně na poloviny.
4. (Při silné kontaminaci poupat se doporučuje použít opakovanou desinfekci (květní lůžko se znovu ponoří do 10% roztoku SAVO na 5 min a 3x máchá ve sterilní destilované vodě).
5. První explantát se položí na MS medium a označí A, druhý explantát na médium SH a označí B, pořadovým číslem se pak značí jednotlivé úbory.

#### **2. Listové čepele**

Listové čepele prvních pravých listů asepticky vypěstovaných klíčnicích rostlin a nebo čepele cinerárie kultivované v *in vitro* podmínkách se rozříznou na dvě stejné poloviny.

První explantát se položí na MS medium a označí A, druhý explantát na médium SH a označí B, pořadovým číslem pak jednotlivé listy.

### **Pokus 1. Vliv základního média na iniciaci somatických embryí.**

**MEDIUM:** Petriho misky s SH médiem + 13,5 μM 2,4-D + 4,5 μM BA  
Petriho misky s MS médiem + 13,5 μM 2,4-D + 4,5 μM BA

**POSTUP:**

1. Povrchově sterilizuj explantáty tak, jak je popsáno výše.
2. Rozřízni lůžka úborů nebo listové čepele na identické poloviny a polož první polovinu na SH médium a označ An (n = 1 – x), druhou na MS médium a označ Bn (n = 1 – x).
3. Kultivuj kultury ve tmě při teplotě 22 - 25°C.
4. Týdně kontroluj průběh kultivace, vyražuj kontaminované kultury.
5. Po 2 a 4 týdnech vyhodnoť četnost somatické embryogeneze a zapiš do protokolu.

**Předpokládané výsledky:**

Od 2. týdne kultivace se na explantátech kultivovaných na SH médiu vytváří bílý krystalický kalus a zřídka somatické embryo. Na explantátech kultivovaných na MS médiu se vytváří shluky žlutých globulárních embryí.

Ve 4. – 5. týdnu kultivace na SH médiu se na listových čepelích rozrůstá bílý kalus, květní lůžka jsou zduřelá, bez somatických embryí. Explantáty kultivované na MS médiu jsou pokryty žlutými-žlutozelenými somatickými embryi v globulárním až srdčitém vývojovém stadiu.

## **Pokus 2. Dozrávání (maturace) somatických embryí a regenerace rostlin**

Iniciace a vývoj somatických embryí jsou často ovlivněny výživou a růstovými regulátory. Složení indukčních, udržovacích, maturačních a zakořeňovacích médií se často liší. Např. iniciační média obsahují vysoké koncentrace auxinů a nebo auxinům podobných komponent. Naproti tomu maturační média neobsahují růstové regulátory nebo jen jejich velmi nízké koncentrace. Zakořeňovací média mají často redukovanou koncentraci základních solí a cukru.

**MATERIÁL:** Petri misky s MS médiem + 0,5% aktivní uhlí  
Petri misky s MS médiem bez růstových regulátorů  
kultivační nádoby Magenta s MS médiem bez růstových regulátorů  
rašelinová multiplata, rašelinový substrát, mikrotenové sáčky

**POSTUP:**

1. Založ experiment, jak je popsáno výše.
2. Přenes explantáty označené písmenem A na MS medium obsahující aktivní uhlí a označ jako variantu C, po 3 dnech kultivace je přenes na MS medium bez růstových regulátorů.
3. Paralelně s bodem 2. přenes další explantáty označené písmenem A na čerstvé MS médium bez růstových regulátorů a označ jako variantu D.
4. Kultivuj všechny kultury za stejných podmínek popsaných výše. Rozděl somatická embryo podle kategorií (globulární, srdčitá, kotyledonární), spočítej a zapiš do protokolu.
5. Odděl kotyledonární embryo od explantátu a přenes do MS média bez růstových regulátorů v nádobách Magenta. Kultivuj na světle ( $25 - 75 \mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ ) ve  $22^\circ\text{C}$ .
6. Rostliny 2 cm vysoké přenes do skleníku do vlhkého rašelinového substrátu a překryj mikrotenovým sáčkem (nebo vlož do mikropařeniště).
7. Po 2 – 3 týdnech aklimatizace (postupné větrání rostlin) přesaď rostliny do květináčů a dále pěstuj podle požadavků kultury.

### Předpokládané výsledky:

Somatická embryo varianty A se vytváří přímo na explantátu a nerovnoměrně se vyvíjejí – pozorujeme všechna vývojová stadia. Asi 1/3 kotyledonárních embryí přenesená na MS médium s aktivním uhlím vytvoří kořínky a prýty v průběhu 10 dní, ostatní přenesená přímo na M-S bez růstových regulátorů vytvoří pouze kořínek a nebo neklíčí.

Většina rostlinek cinerárie odvozených ze somatických embryí se lehce aklimatizuje. Květy jsou sice menší, ale normálně tvarované a vybarvené.

### **Literatura:**

Malueg K.R. *et al.* (1994): A three media transfer system for direct somatic embryogenesis from leaves of *Senecio x hybridus* Hyl. – Plant Cell Tissue, Organ Culture 36: 249 – 253.