

# Kalusové kultury

Indukce a jejich využití

# Definice kalusu

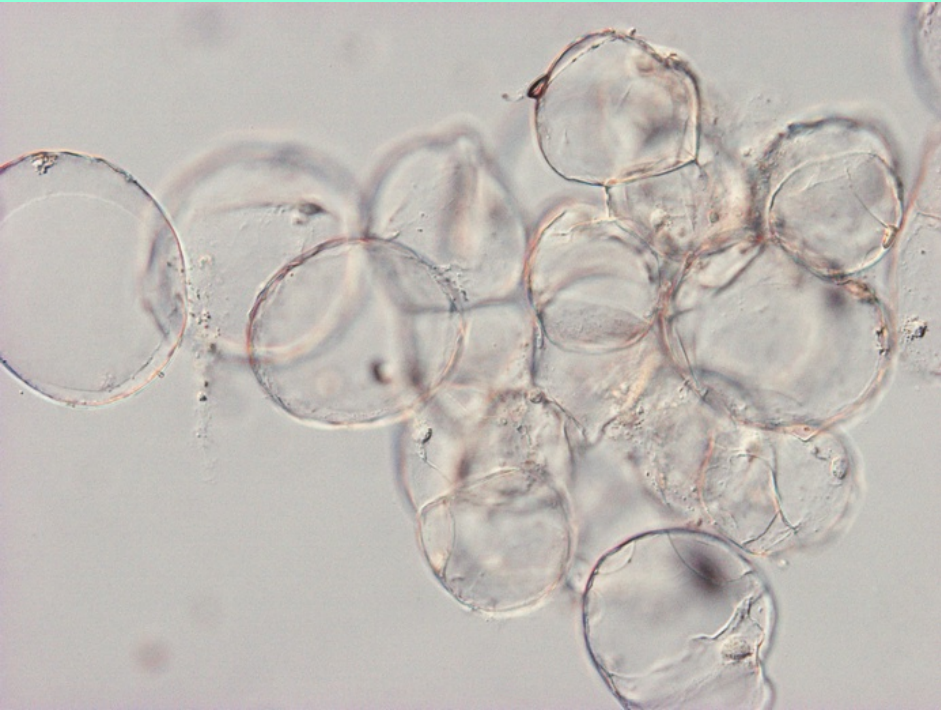
kalus je tvořen  
amorfni hmotou  
málo organizovaných  
tenkostěnných,  
parenchymatických  
buněk



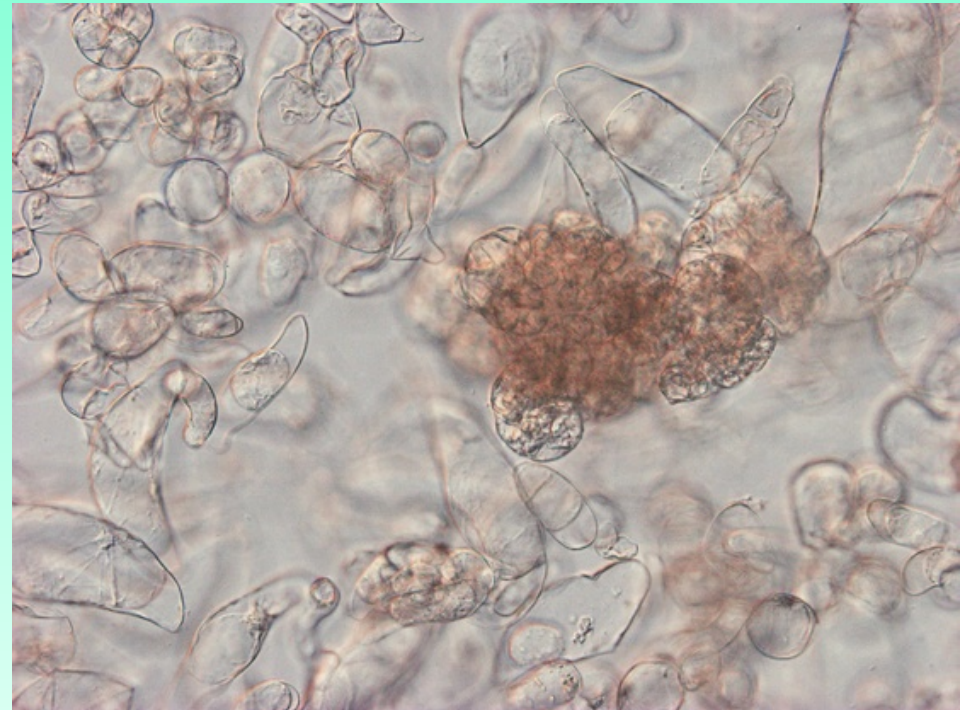
*Debergh et al.*

[http://users.ugent.be/~pdebergh/cal1\\_p1.htm](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



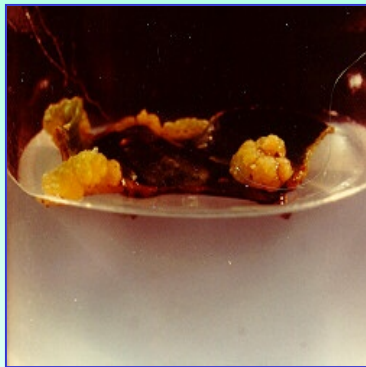
Ránový kalus na kmeni stromu *Erythrina*

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.

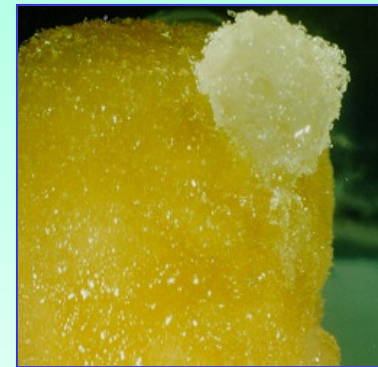
Hormony (auxiny) mění metabolismus buněk, které jsou v klidu  
na buňky aktivní.



*kalus vznikající  
z pletiva cévních  
svazků*



*kalus vznikající  
z pletiv kořene*



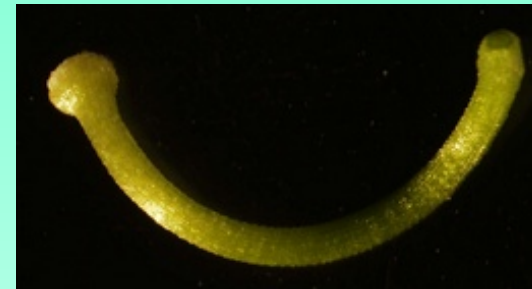
*kalus vznikající  
z embrya*

*Debergh et al.*

# Stadia založení kalusu *in vitro*

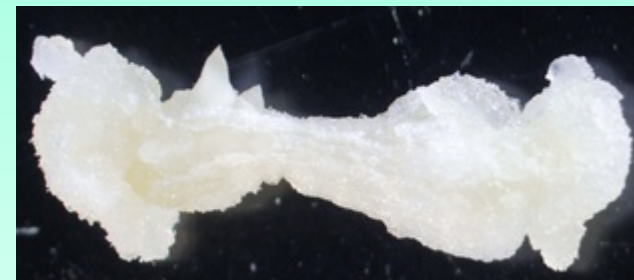
Kalogeneze na segmentech  
hypokotylů lnu

1. Indukce



1 TK

2. Buněčné dělení



2 TK

3. Diferenciace



4 TK

Debergh *et al.*

Iniciace kalogeneze  
= indukce tvorby kalusu

## Auxiny

- 2,4-D
- picloram

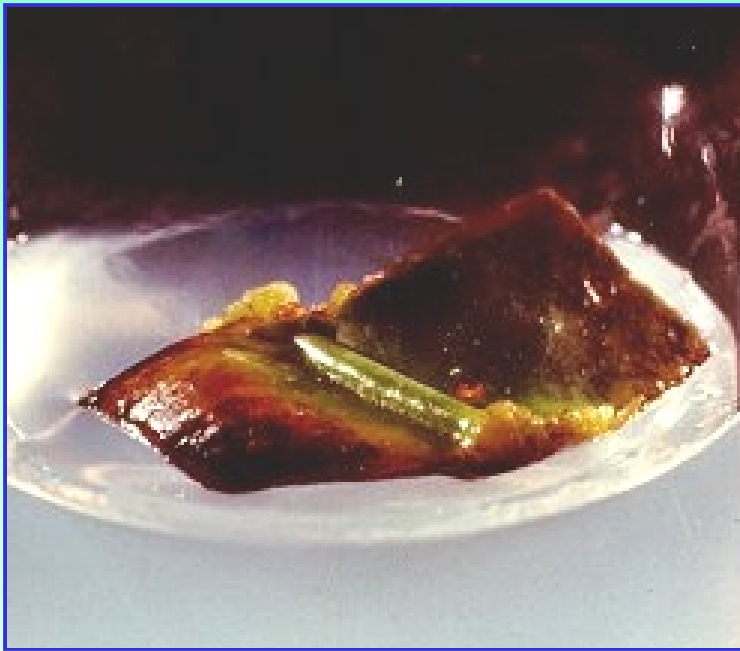
# 1. Indukce kalusu

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.

Některá pletiva (primární i sekundární meristémy = kambium) jsou lépe disponována pro rychlé dělení buněk než pletiva diferencovaných buněk.

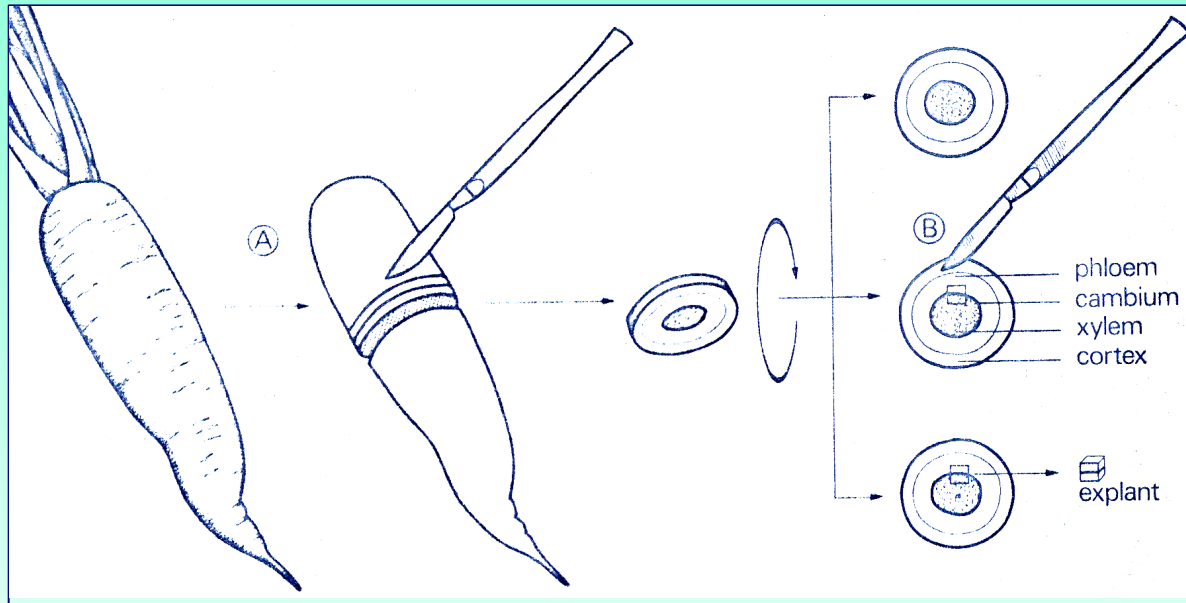


Tvorba kalusu na segmentu listu v blízkosti cévního svazku



# Iniciace kalusu ze segmentů kořene mrkve

Reinert and Yeomann (1981)



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

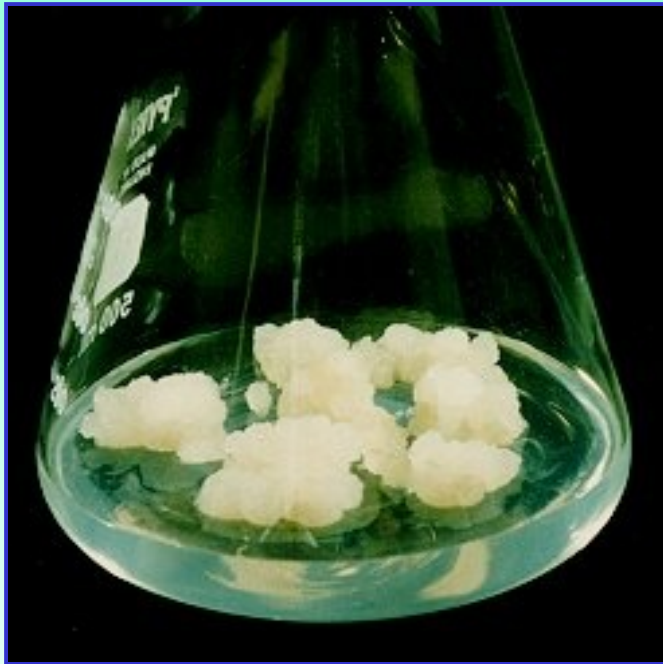


Tacchini a Walbot  
1987

nádory krčku klíčnic rostlin = „crown-gall callus“

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

## 2. Buněčné dělení



Aktivní dělení buněk vrací  
buňky do meristematického  
**dediferencovaného** stavu.

rychlý růst hmoty  
nediferencovaného  
pletiva

### 3. Diferenciace - organogeneze



v kalusovém pletivu postupně  
**diferencují orgány:**

- prýty
- kořeny
- somatická embrya

a začínají probíhat reakce drah  
**sekundárního metabolismu**

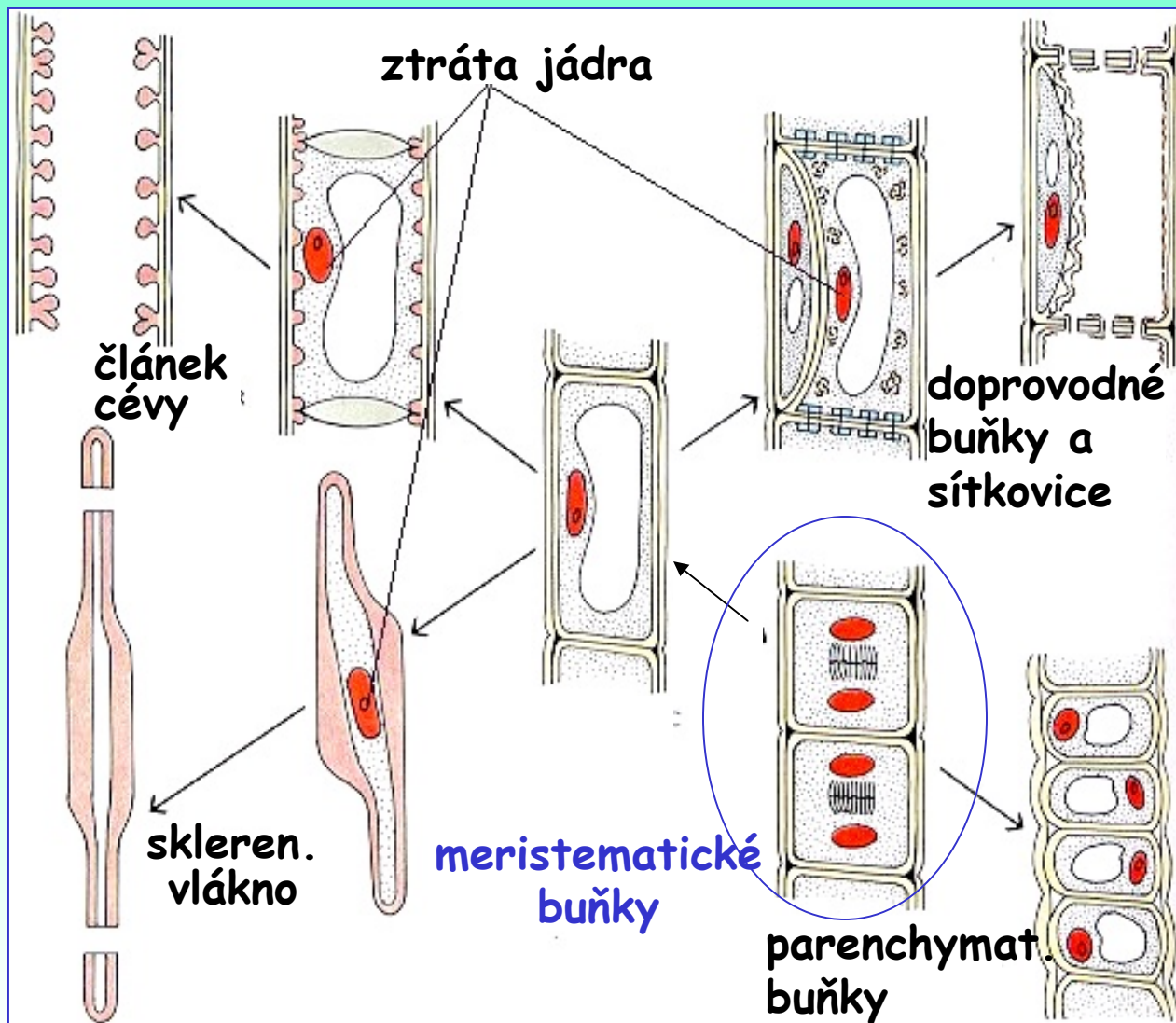
# Diferenciace buněk kalusu

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*

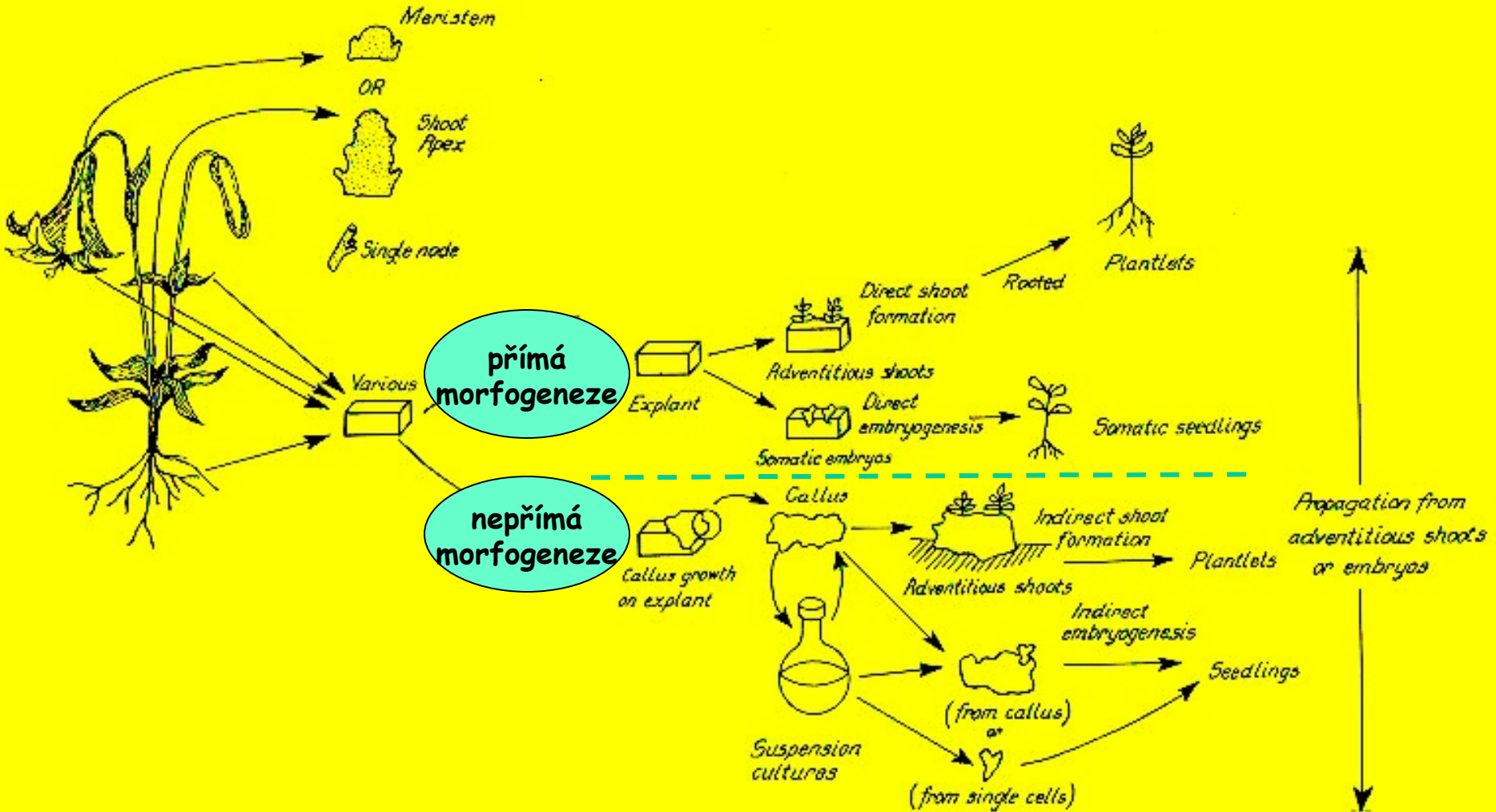


rozpadavý kalus *Gloriosa*



rozpadavý kalus *Vinca*

# Přímá a nepřímá morfogeneze *in vitro*





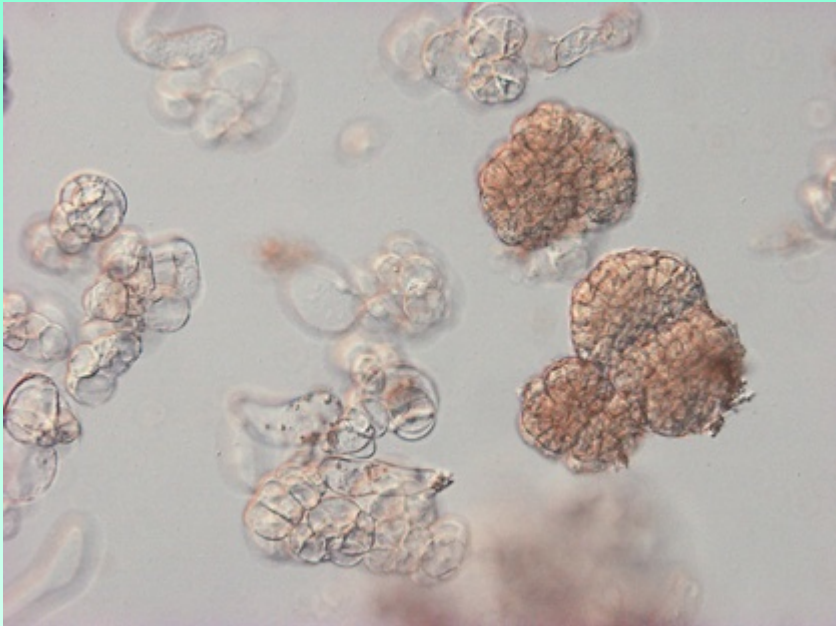
# Diferenciace meristematických buněk



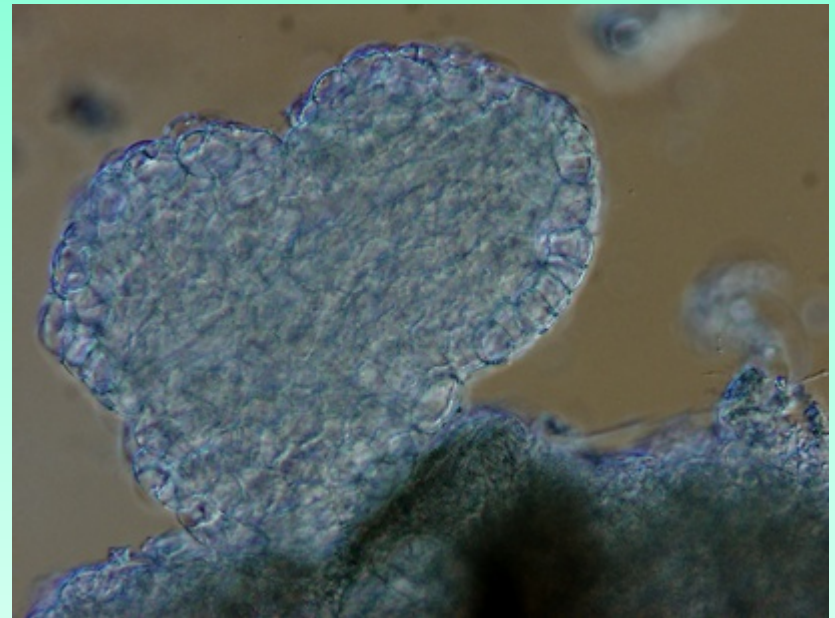
malá oblast dělicích se buněk meristemoidů nebo nodulů cév se může stát centrem pro tvorbu:

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

# *Daucus carota ssp. carota*

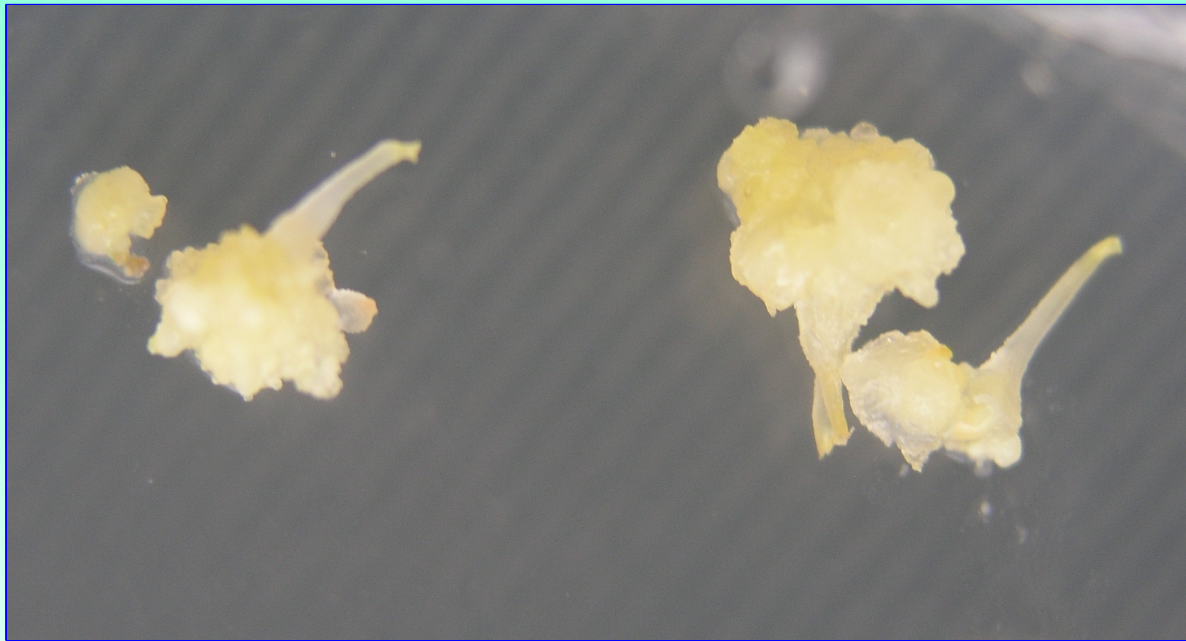


globulární somatická embrya  
v kalusové kultuře



srdčité somatické embrya  
v kalusové kultuře

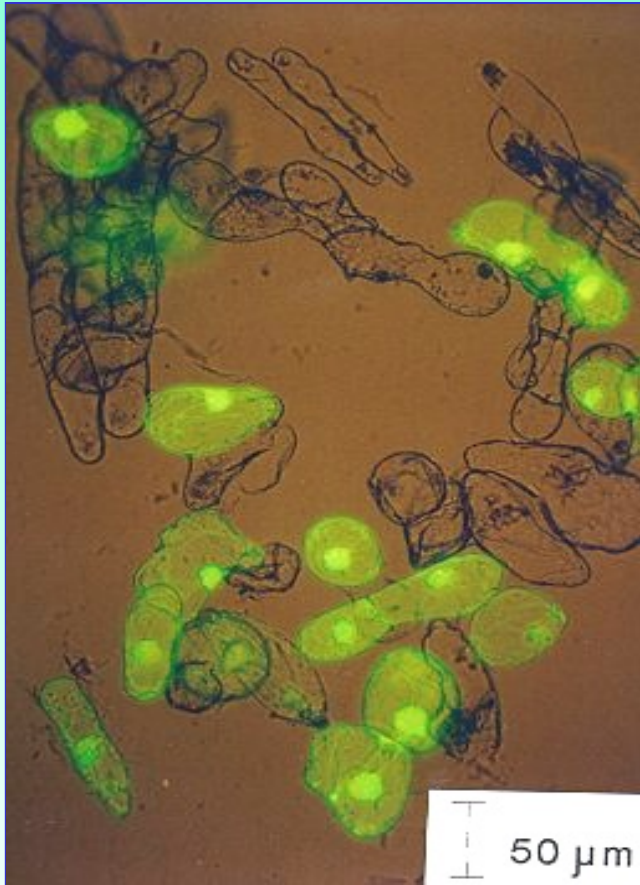
# Kalus iniciovaný z kambiálních segmentů kořene mrkve se somatickými embryi



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

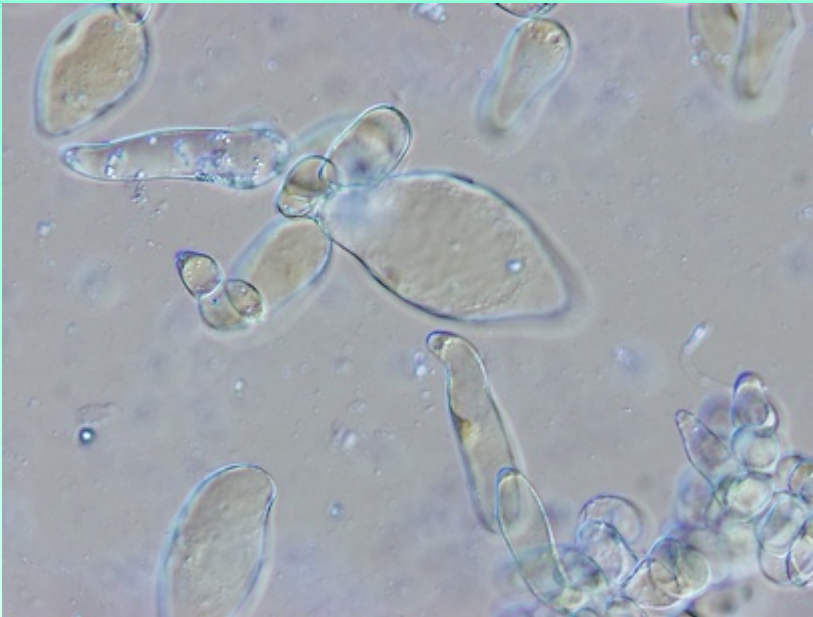


fluorescein diacetát (FDA)  
= substrát pro esterázy, které  
aktivní pouze v buňkách  
s nepoškozenou plazmatickou  
membránou

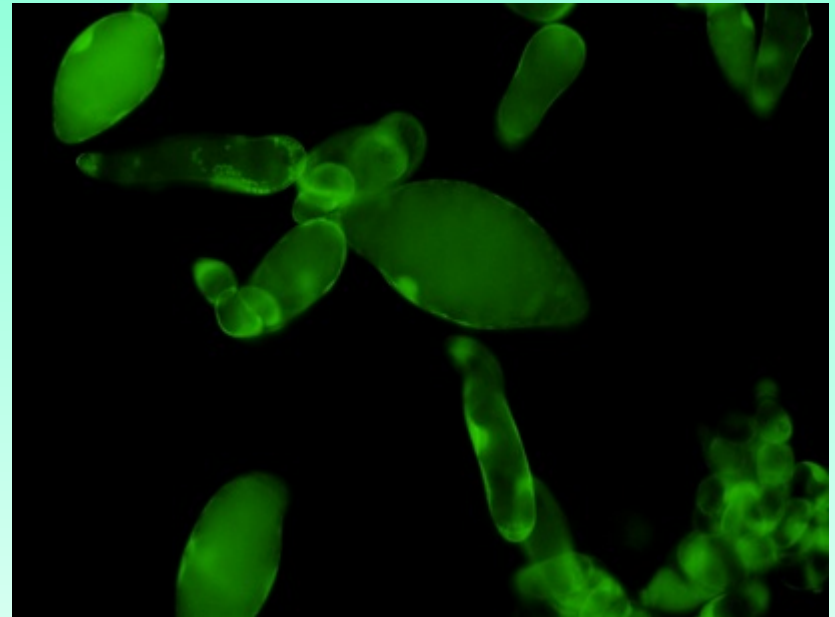
Esterázy hydrolyzují FDA a tak  
se uvolní fluorescein, který v  
modrém světle vyzařuje  
žlutozelenou fluorecenci

# Buňky kalusu mrkve

## *Daucus carota ssp. carota*



Nomarského diferenciální  
interferenční kontrast (DIC)



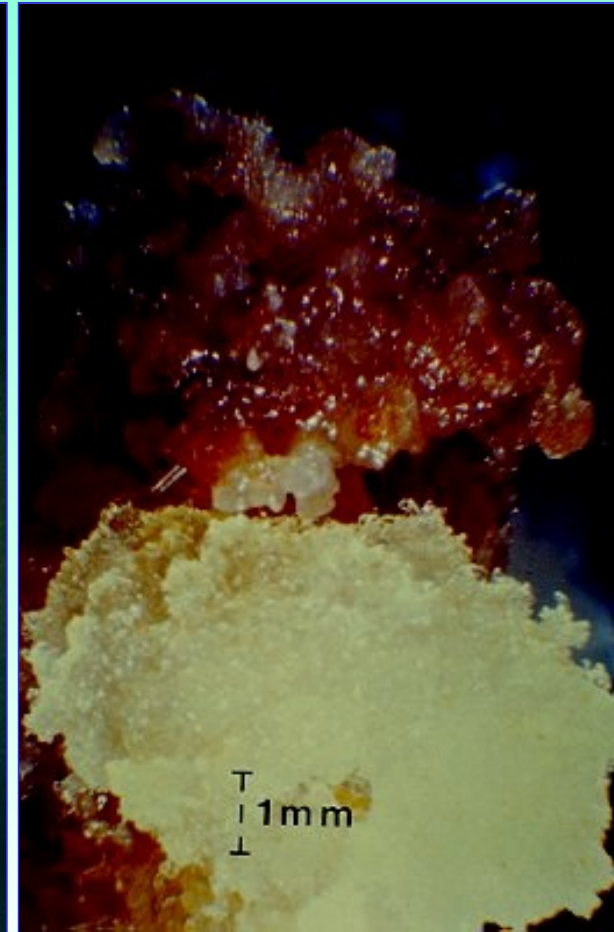
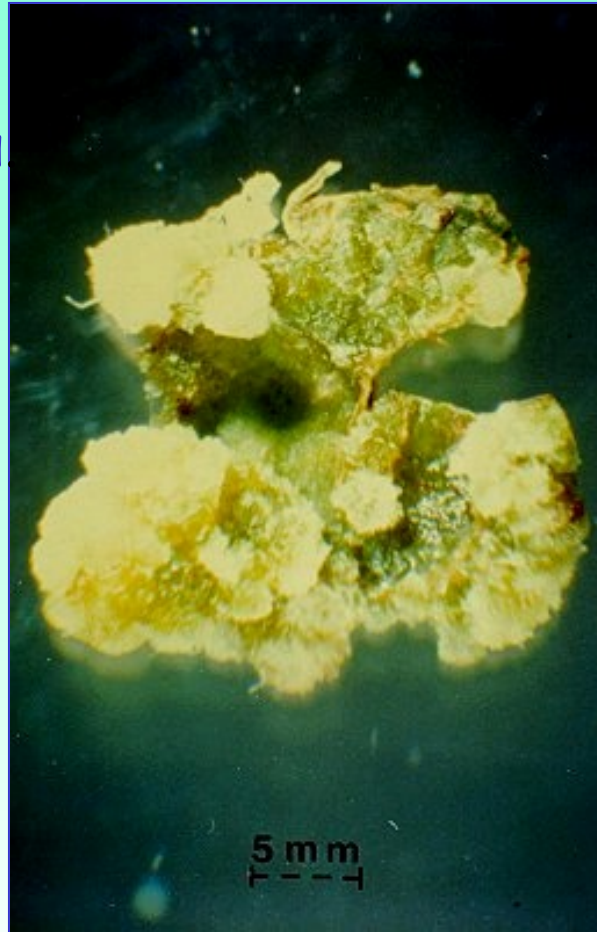
Fluorescence živých buněk  
po inkubaci s FDA

# 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.



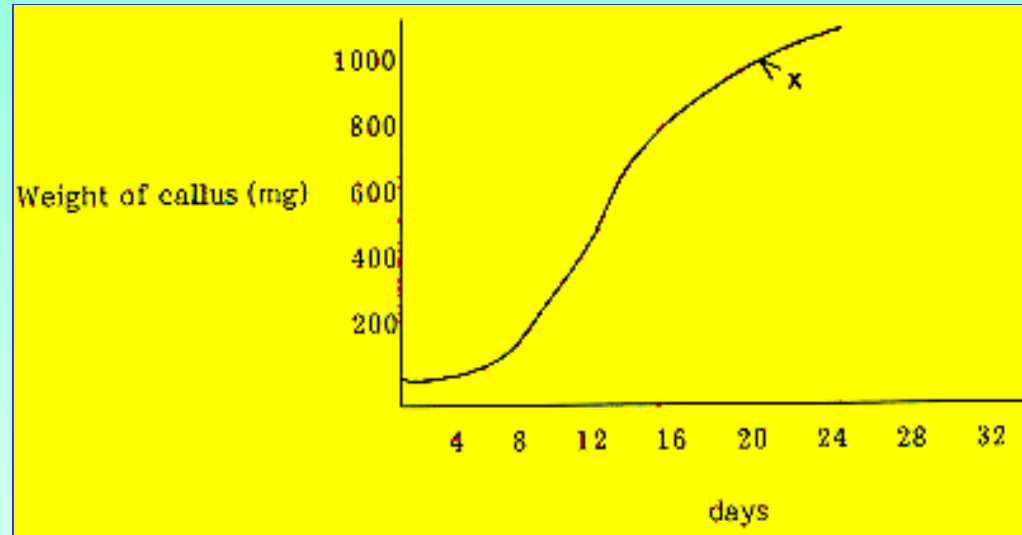
# Pasážování kalusu

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

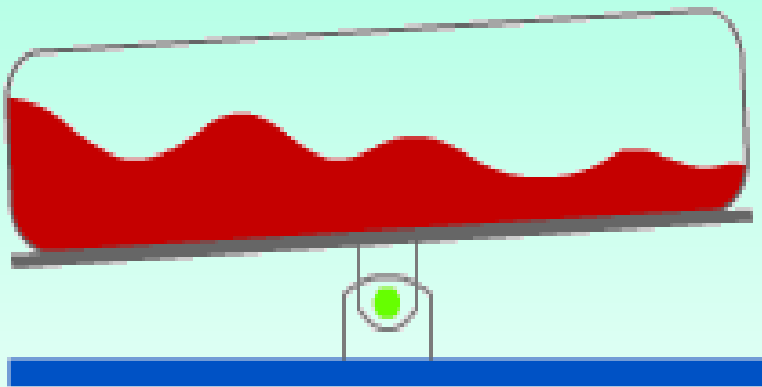


exprese aktivity  
enzymu glukuronidázy  
po bombardování kalusu  
*Brachypodium*

prokázána indigogenní  
histochemickou reakcí

# 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

# Schéma bioreaktoru

kalusy se používají  
po roztřepání  
pro iniciaci buněčných  
suspenzí

