



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDEM
A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY

Jméno:

Datum:

Téma 12: Přímá somatická embryogeneze z květních lůžek a listů cinerárie (popelivky) (*Senecio x hybridus* Hyl.)

Materiál: úbory s uzavřenými poupaty a listy cinerárie (*Senecio x hybridus* Hyl.)

Média:

iniciační (SE): makro a mikroelementy Murashige a Skoog (1962), s přidavkem: 0,55 mM myoinositol (1 g.l^{-1}), 2,9 μM thiamin-HCl (5 mg.l^{-1}), 13,5 μM 2,4-dichlofenoxyoctová kyselina (2,4-D) (3 mg.l^{-1}), μM 4,5 benzyladenin (1 mg.l^{-1}), 88 mM sacharosa (30 g.l^{-1}), 0,8% agar (8 g.l^{-1}).

kontrolní (MS): makro a mikroelementy Murashige a Skoog (1962), vitamíny B5 (Gamborg *et al.* 1969), 88 mM sacharosa (30 g.l^{-1}), 0,8% agar (8 g.l^{-1}).

Pokus 1. Iniciační somatické embryogeneze 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 SE médium a označí A, druhý explantát na kontrolní médium MS a označí B, pořadovým číslem se pak značí jednotlivé úbory.

2. Listové čepele

1. Listy cinerárie kultivované v *in vitro* podmínkách se vyjmou sterilně na Petriho misku.
2. Listové čepele se rozříznou na dvě stejné poloviny.
3. První explantát se položí na SE médium a označí A, druhý explantát na kontrolní médium MS a označí se B, pořadovým číslem pak značíme explantáty z jednotlivých listů.
4. Kultivuj kultury ve tmě při teplotě 22 - 25°C.
5. Týdně kontroluj průběh kultivace, vyřazuj kontaminované kultury.

- Po 2 a 4 týdnech vyhodnot' četnost somatické embryogeneze a zapiš do protokolu.

Předpokládané výsledky:

Od 2. týdne kultivace se na explantátech kultivovaných na SE médiu se vytvářejí shluky žlutých globulárních embryí.

Ve 4. – 5. týdnu kultivace na SE médiu jsou explantáty pokryty žlutými až 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: Petriho misky s MS médiem + 0,5% aktivní uhlí
Petriho misky s MS médiem bez růstových regulátorů
kultivační nádoby s MS médiem bez růstových regulátorů
rašelinová multiplata, rašelinový substrát, mikrotenové sáčky

Postup:

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

Předpokládané výsledky:

Somatická embrya varianty A se vytvářejí přímo na explantátu a nerovnoměrně se vyvíjejí – pozorujeme všechna vývojová stádia. 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.