

Kalusové kultury 6.

Indukce a jejich využití



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována
Evropským sociálním fondem
a státním rozpočtem České republiky

Definice kalusu

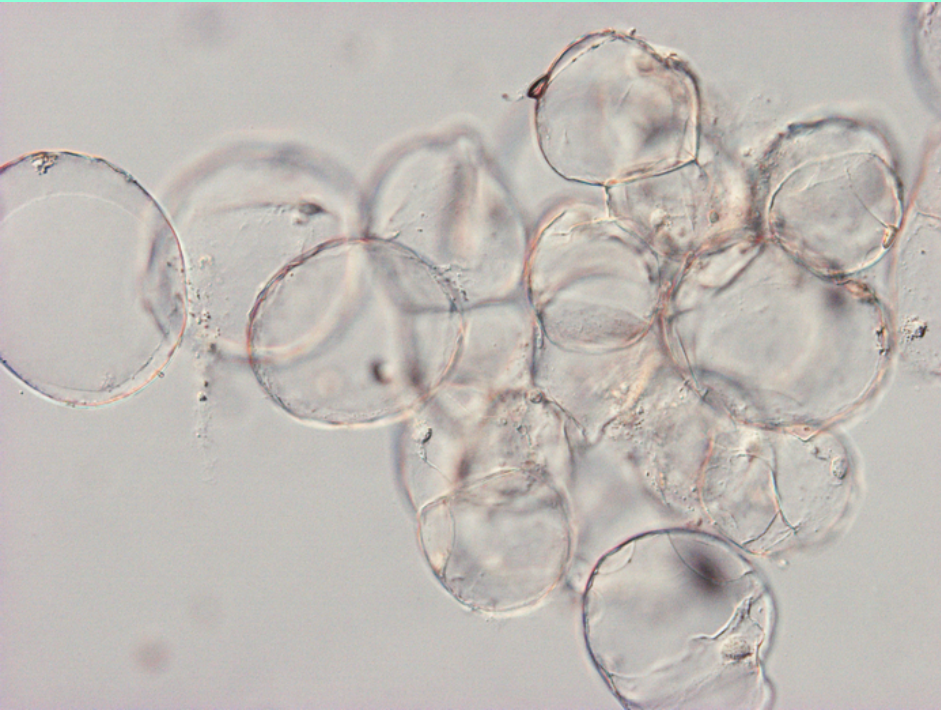
kalus je tvořen
amorfni hmotou
málo organizovaných
tenkostěnných,
parenchymatických
buněk



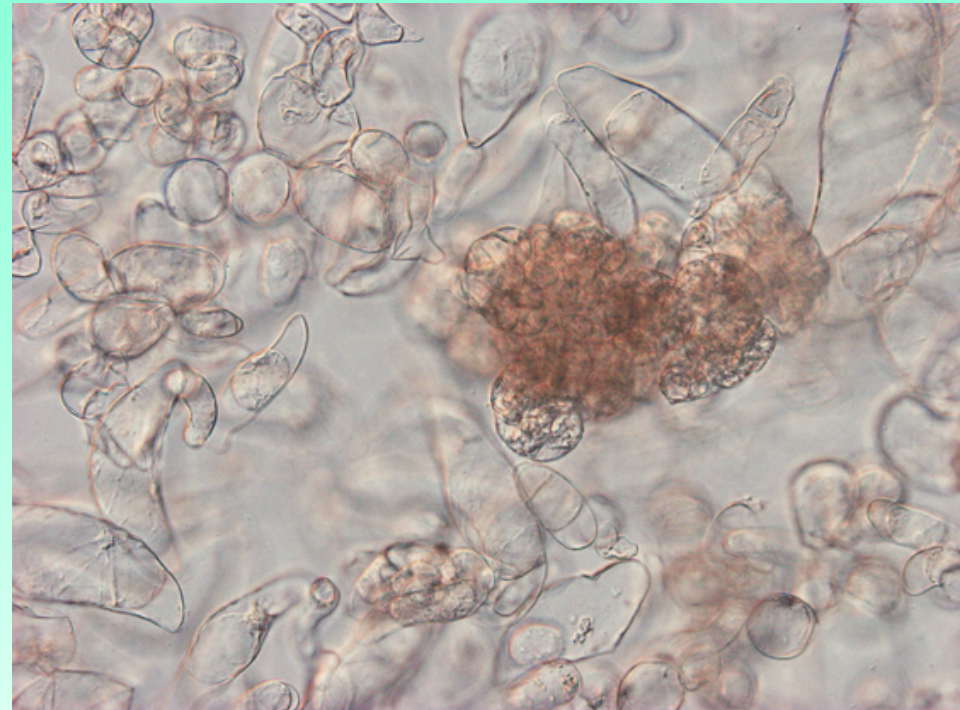
Debergh et al.

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.*

háčka žlabatky růžové



**háčka
korovnice
smrkové**



http://www.bonsai.cz/_oldweb/cl1801736070.htm

nádor na olši



http://www.e-herbar.net/main.php?g2_itemId=27411

http://www.bonsai.cz/_oldweb/cl1801736070.htm

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

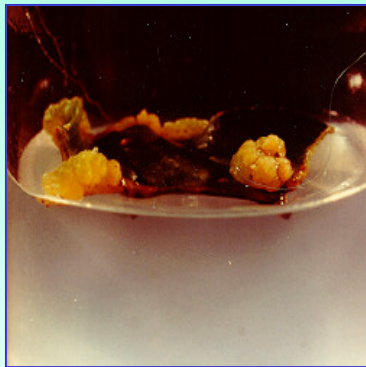
nádory krčku klíčnic rostlin = „crown-gall callus“

Původ kalusu

vzniká proliferací buněk z mateřského pletiva

je iniciován umístěním explantátů na médium, které podporuje dělení a růst buněk

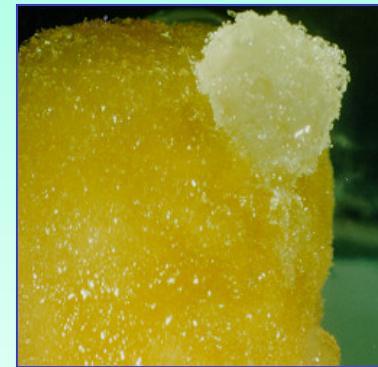
hormony nebo růstové regulátory (auxiny) mění metabolismus buněk, které jsou v klidu na buňky dělicí se
může vznikat z různých pletiv:



*kalus vznikající
z pletiva cévních
svazků listu*



*kalus vznikající
z pletiv kořene*



*kalus vznikající
na embryu*

Debergh et al.

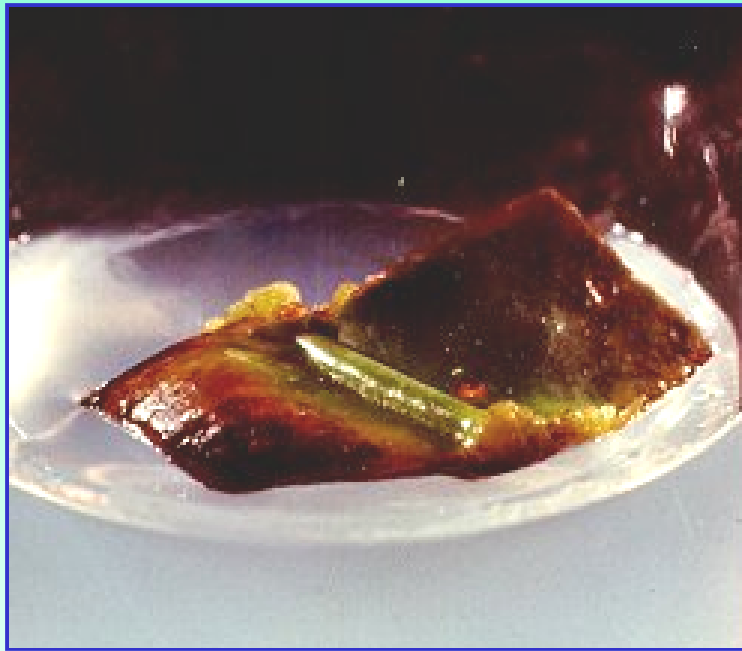
Stadia založení kalusu *in vitro*

- indukce
- buněčné dělení
- diferenciacce

Debergh *et al.*

1. stadium - indukce tvorby kalusu

buňky se dediferencují a připravují na dělení



tvorba kalusu na segmentu listu
v blízkosti cévního svazku

u většiny taxonů (rostliny dvouděložné, jednoděložné, nahosemenné, kapradiny i mechorosty) - **relativně snadná**

pletiva mnohých orgánů mají vlastní **potenciál pro dělení** buněk na vhodném médiu

některá pletiva (např. meristémy - kambium) - lépe disponována pro rychlé dělení buněk než pletiva buněk diferencovaných (jsou již **kompetentní**) - **nemusí se dediferencovat**

Debergh et al.

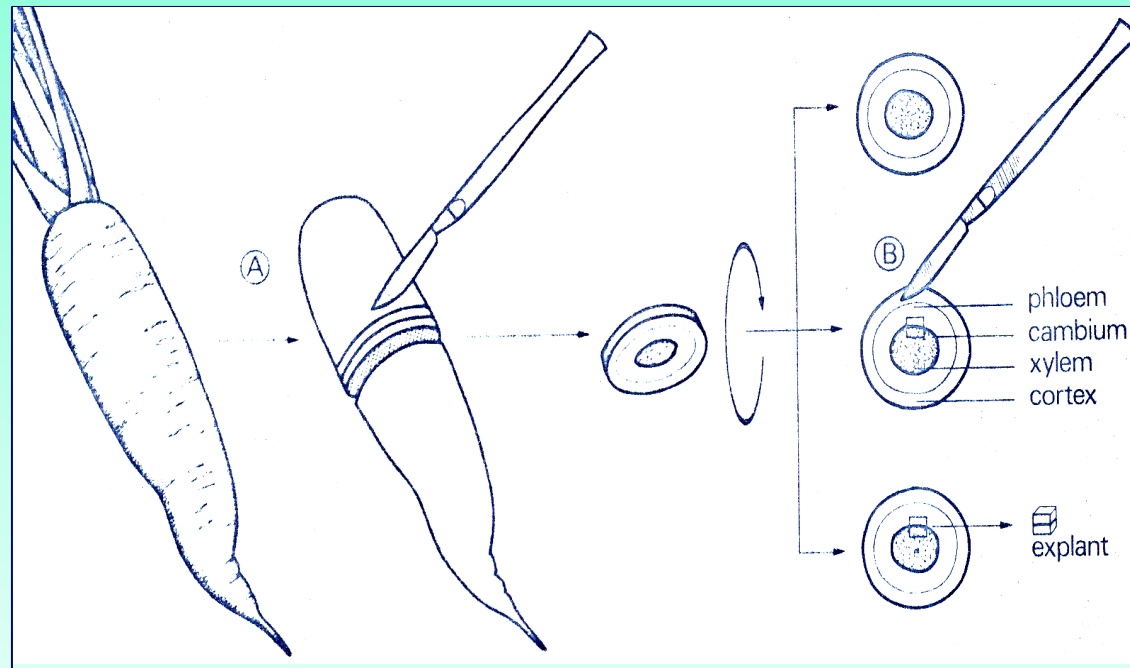
Iniciace kalogeneze
= indukce tvorby kalusu

auxiny

- 2,4-D
- picloram

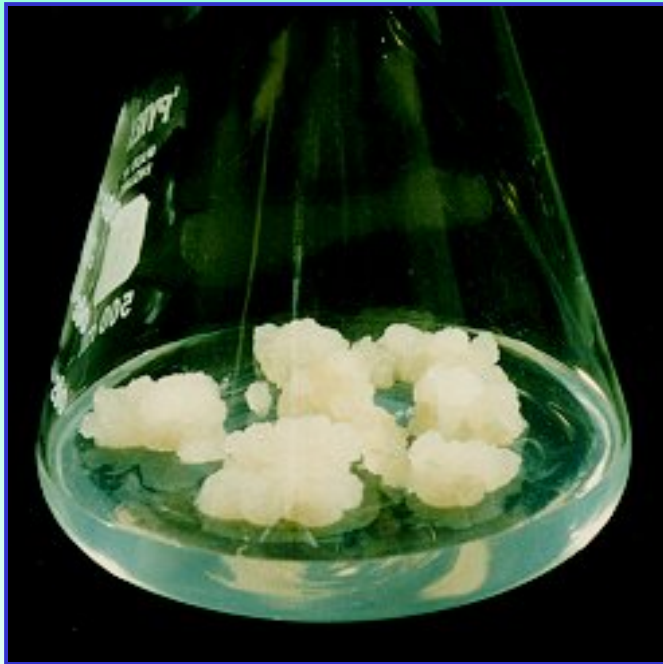
Iniciace kalusu ze segmentů kořene mrkve

Reinert and Yeomann (1981)



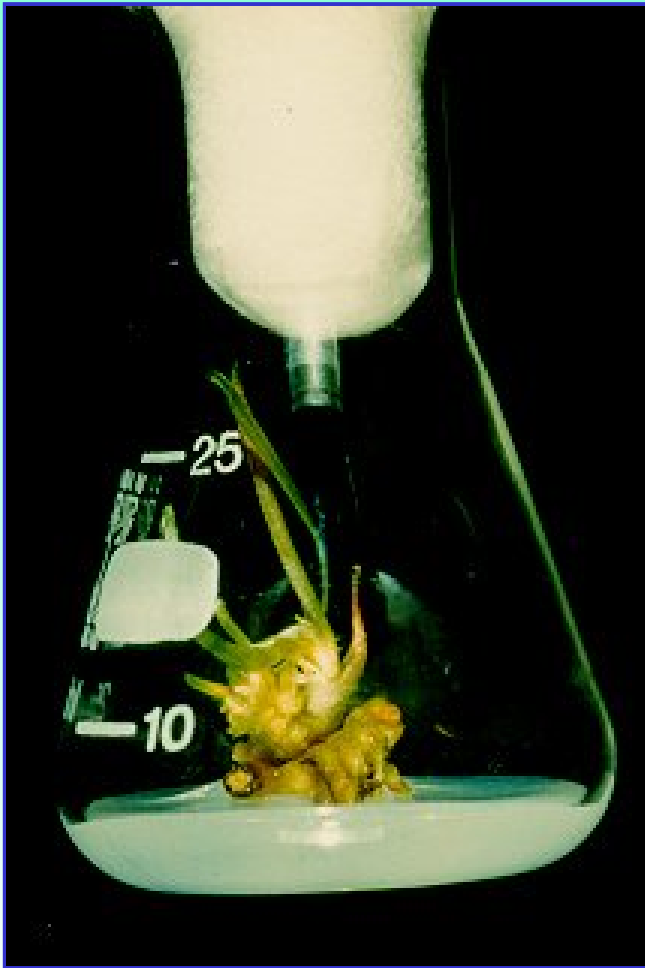
2. stadium - buněčné dělení

aktivní dělení buněk vrací
somatické buňky
do meristematického
dediferencovaného stavu



neorganogenní kalus -
produkce sekundárních
metabolitů

3. stadium - diferenciace = organogeneze nebo somatická embryogeneze



v kalusovém pletivu postupně
diferencují orgány:

organogenní kalus:

- prýty
- kořeny

embryogenní kalus:

- somatická embrya

častěji začínají probíhat reakce
drah **sekundárního metabolismu**

Typy kalusů - podle struktury

Kalusy mohou mít strukturu:

- **pevnou** = tvořené buňkami se silně lignifikovanými stěnami - zpravidla pomalu rostoucí kalusy
- **snadno se rozpadající** na malé fragmenty („friable callus“) - rychle rostoucí kalusy



lignif. kalus *Gloriosa*

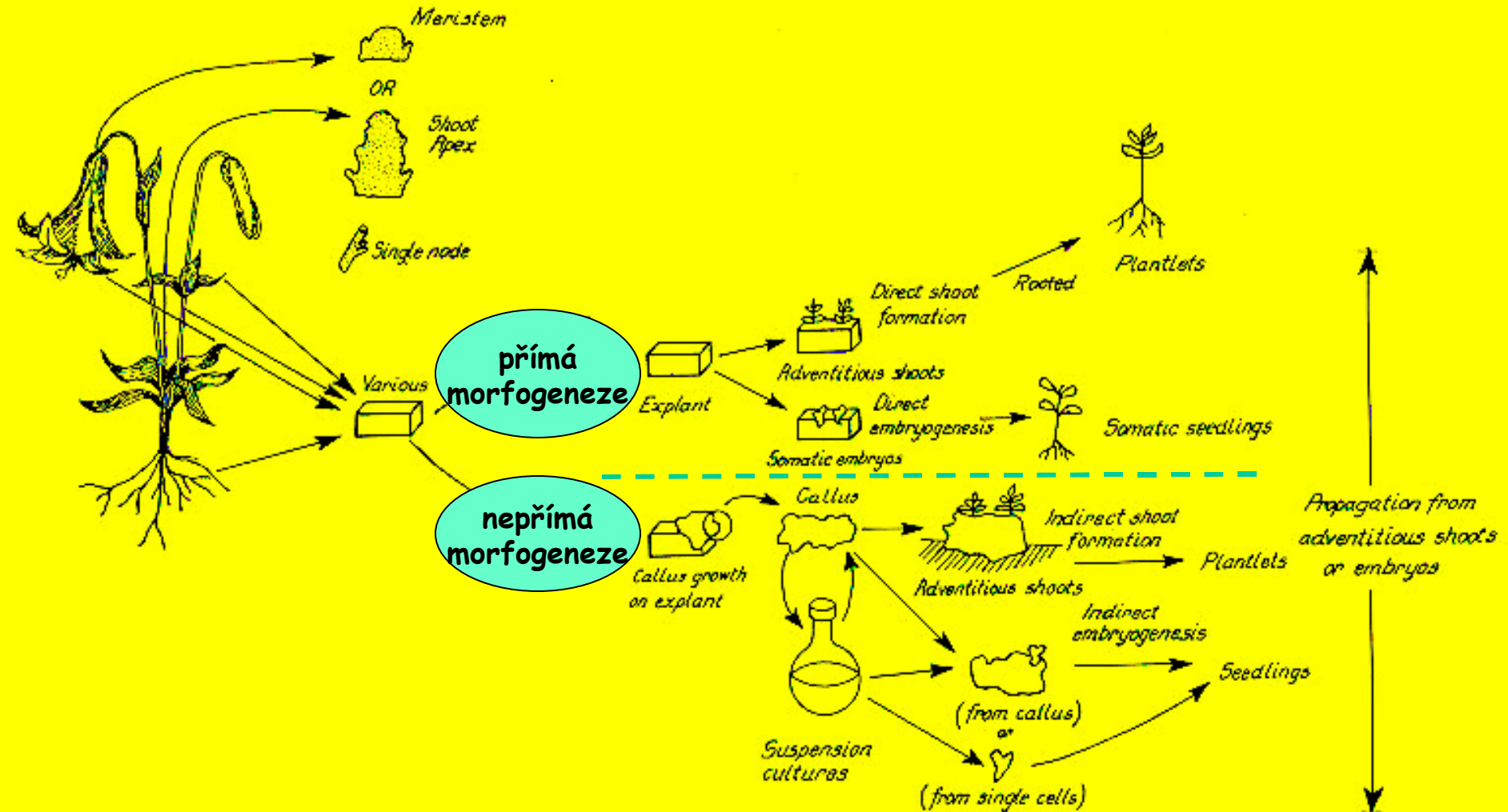


rozpadavý kalus *Gloriosa*



rozpadavý kalus *Vinca*

Přímá a nepřímá morfogeneze *in vitro*



George a Sherrington (1984), upraveno

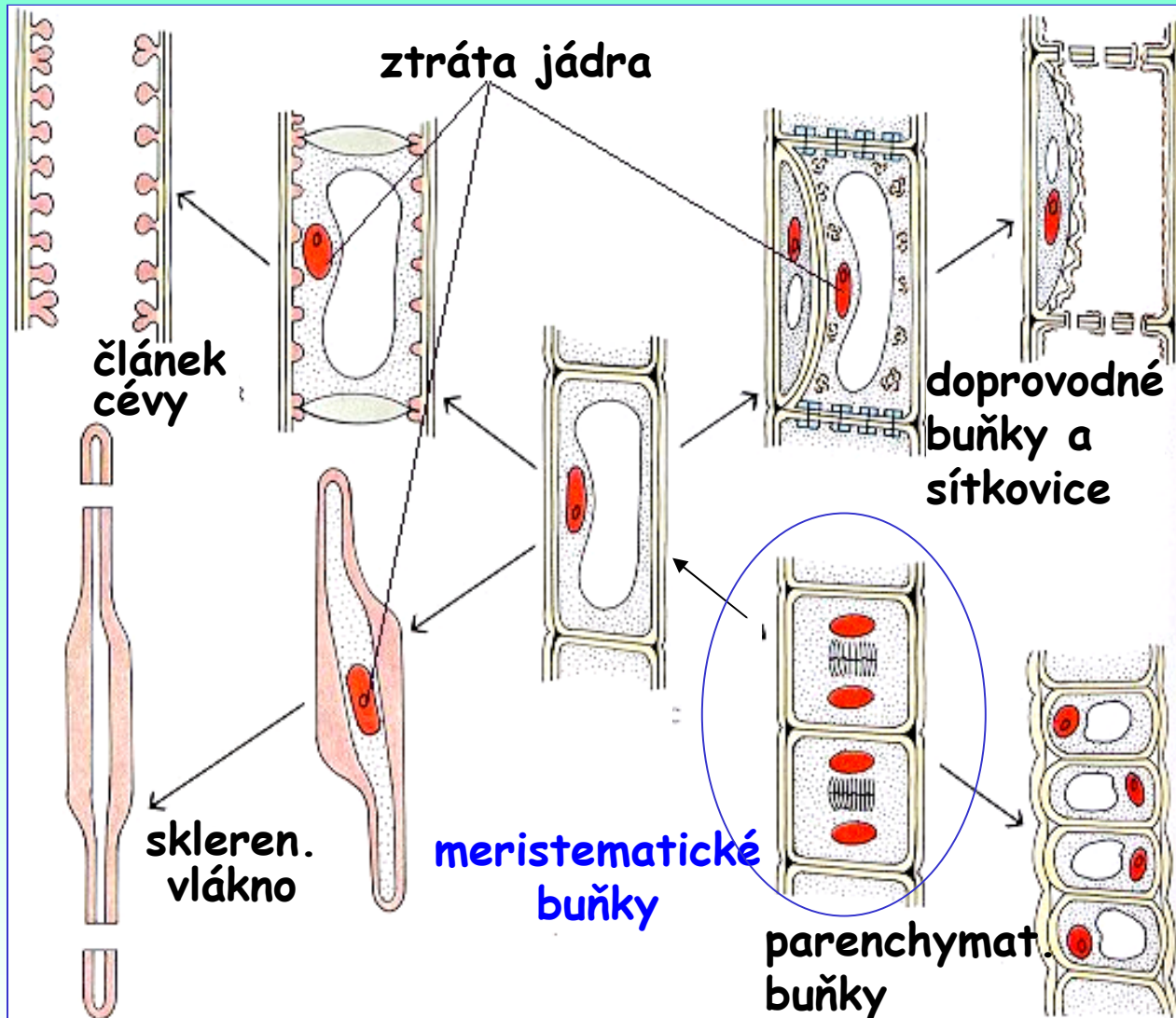
Diferenciace buněk kalusu

kalusové kultury jsou význačné pozoruhodnou **variabilitou** typů buněčné diferenciace

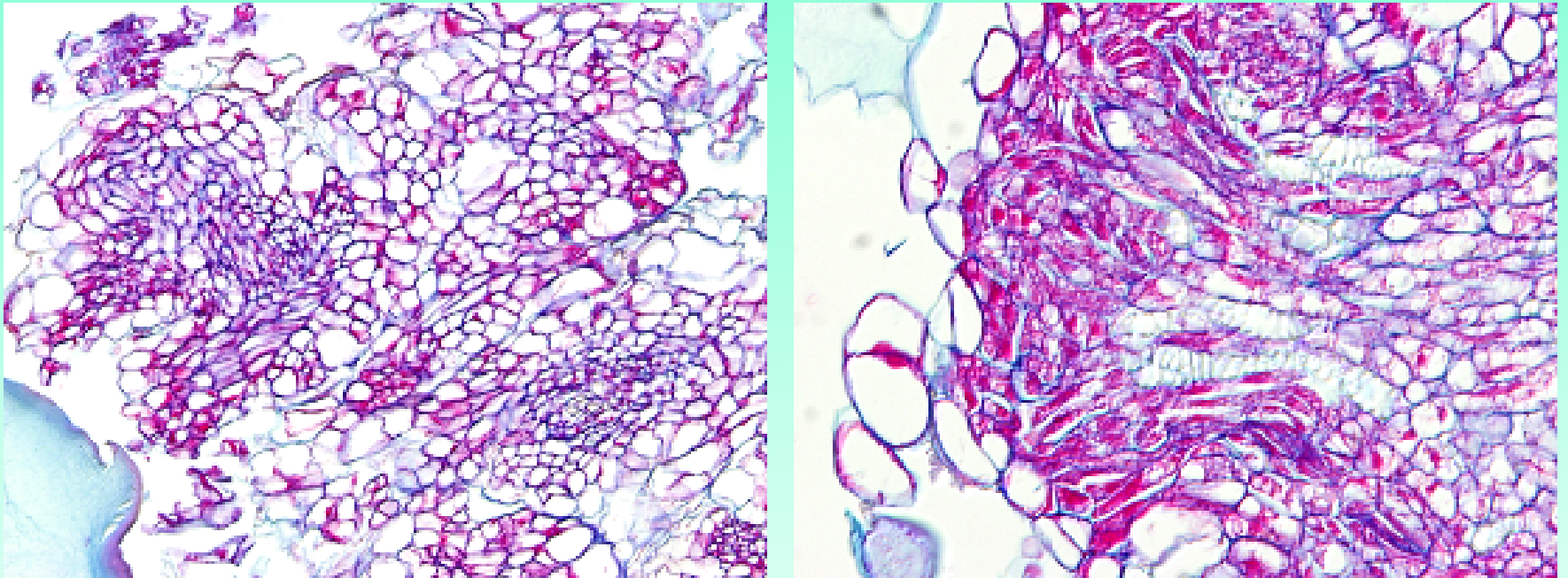
homogenní kalus tvořený pouze parenchymatickými buňkami se vyskytuje pouze **zřídka**

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

Diferenciace meristematických buněk



Diferenciace buněk v kalusu



kalus na řezu hypokotylu *Arabidopsis*

Diferenciace meristematických buněk

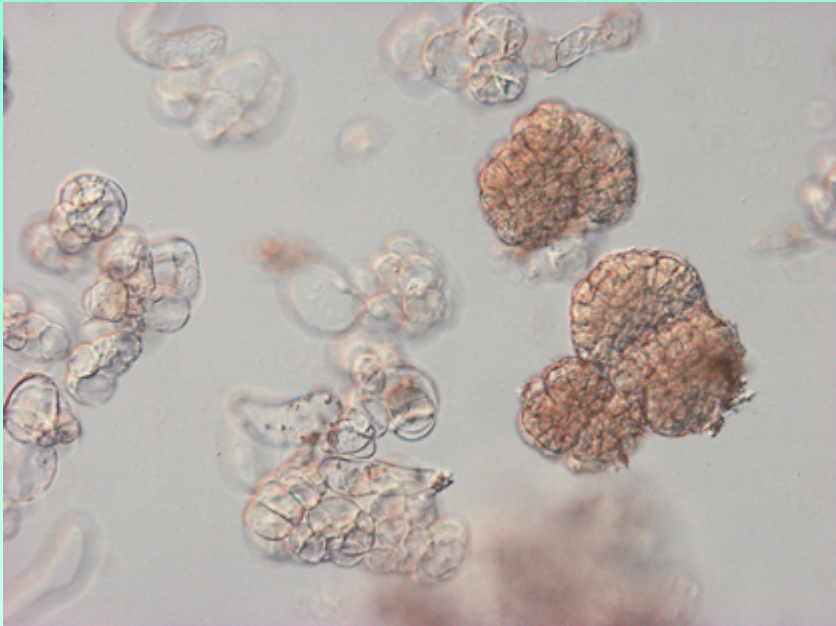


malá oblast dělicích se buněk meristemoidů nebo nodulů cév se může stát centrem pro tvorbu:

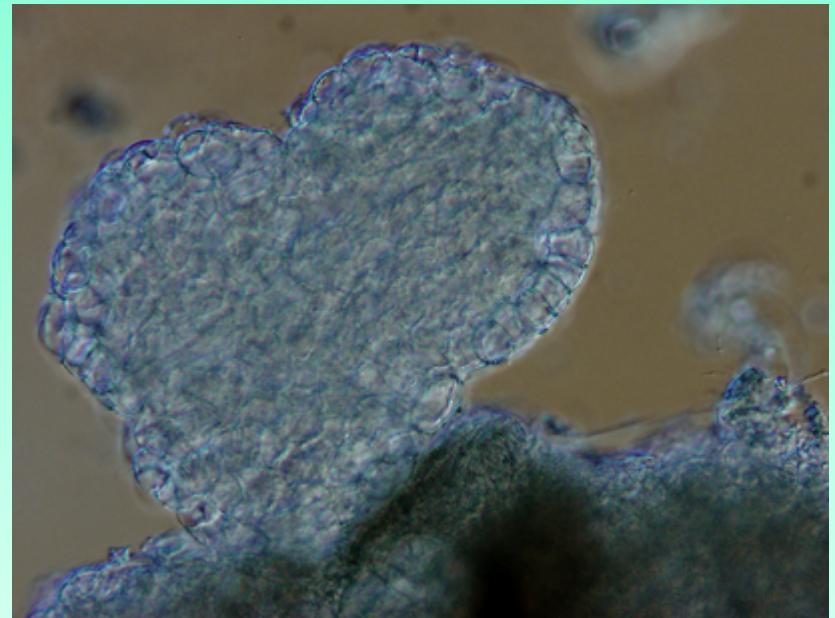
- A. prýtvových pupenů
- B. kořenových primordií
- C. somatických embryí

Somatické embrya v kalusové kultuře

Daucus carota ssp. carota

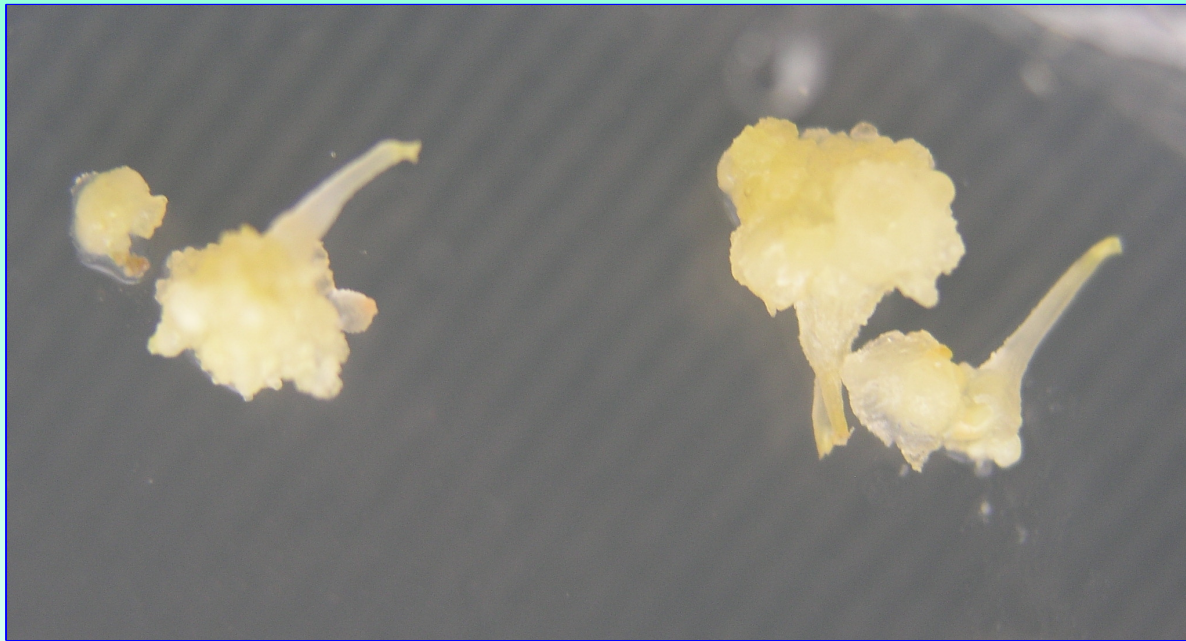


globulární somatická embrya
v kalusové kultuře



srdčité somatické embrya
v kalusové kultuře

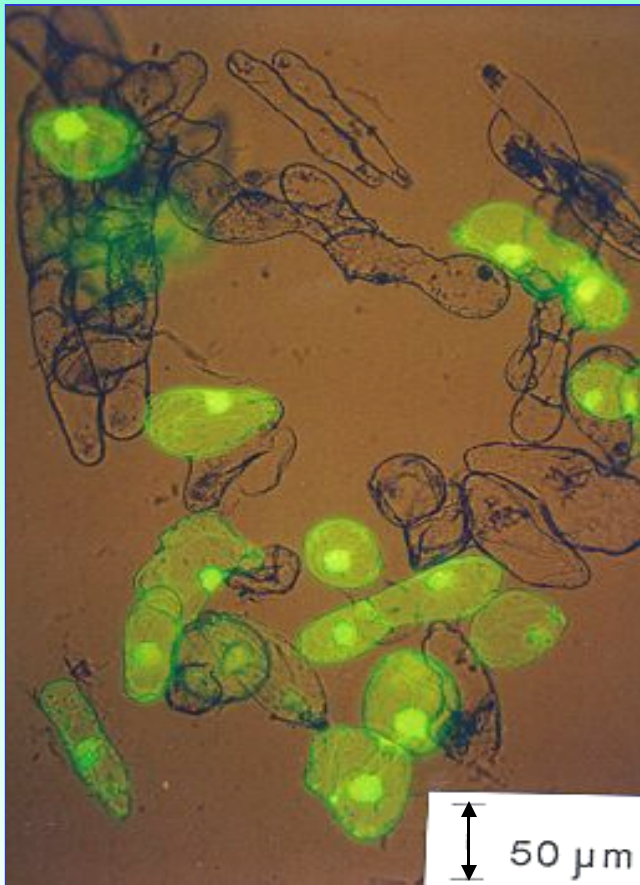
Kalus iniciovaný z kambiálních segmentů kořene mrkve se somatickými embryi



kalogeneze a jeho udržování:
indukce SE:

MS s 0.1 mg/l 2,4-D
MS bez auxinu

Morfologie buněk suspenzí a jejich viabilita

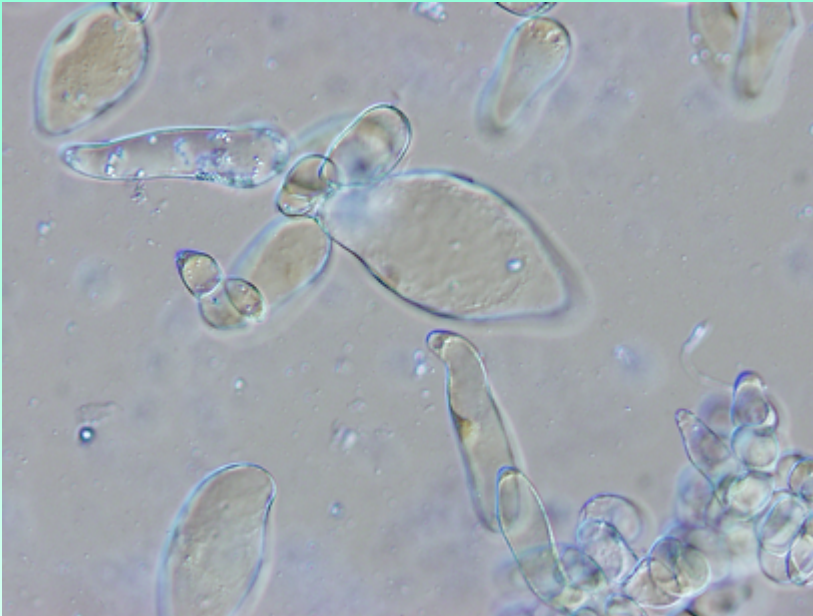


fluorescein diacetát (**FDA**)
= substrát pro **esterázy**, které
jsou aktivní pouze v buňkách
s nepoškozenou plazmatickou
membránou

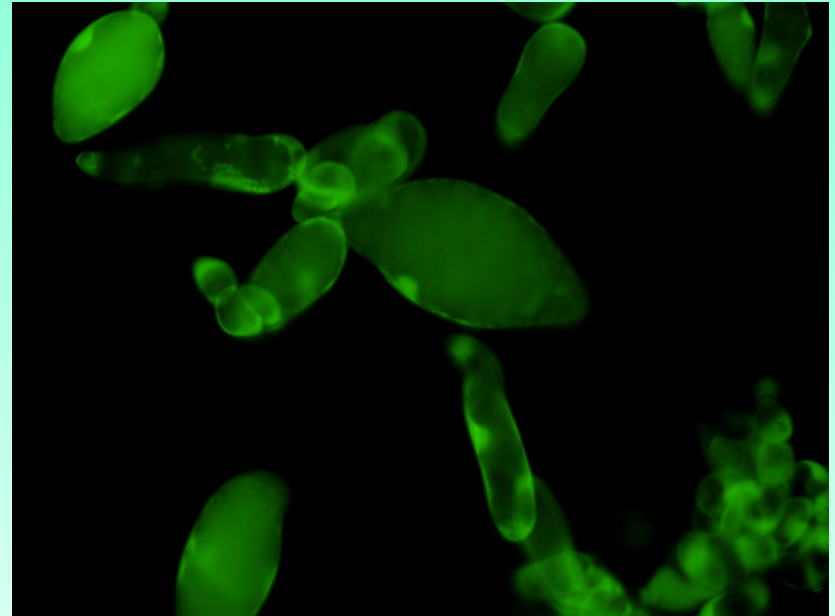
esterázy hydrolyzují FDA a tak
se uvolní **fluorescein**, který
v modrém světle vyzařuje
žlutozelenou fluorescenci

Buňky kalusu mrkve

Daucus carota ssp. carota



Nomarského diferenciální
interferenční kontrast (DIC)



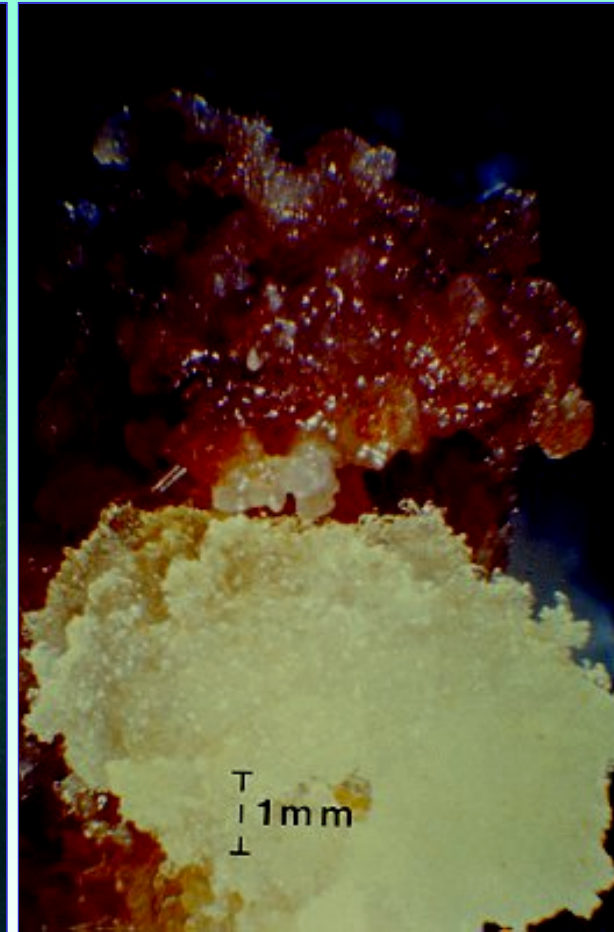
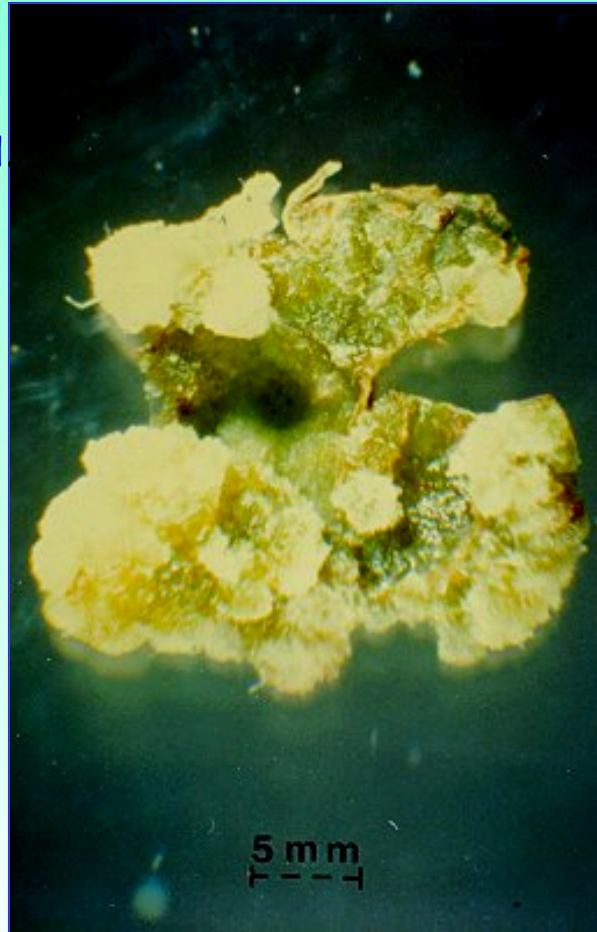
fluorescence živých buněk
po inkubaci s FDA

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 změny fenotypu, která **nejsou 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.

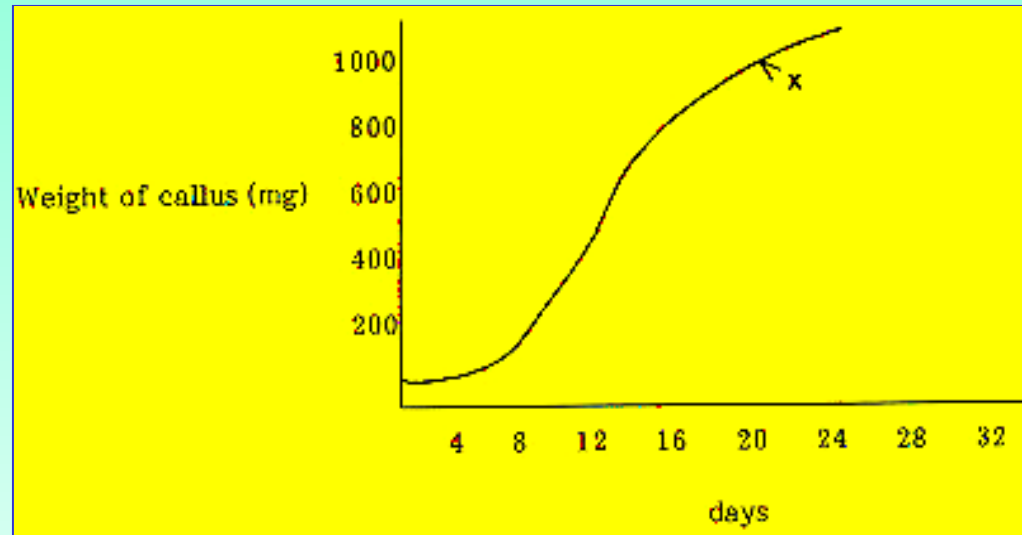
Pasážování kalusu

Po určité periodě kultivace je nezbytné **pasážovat** kalus na čerstvé médium, 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

Využití kalusové kultury pro transformace

biolistická transformace trav (nejsou citlivé na *Agrobacterium*) -
marker transformace = gen *uidA* pro β -glukuronidázu



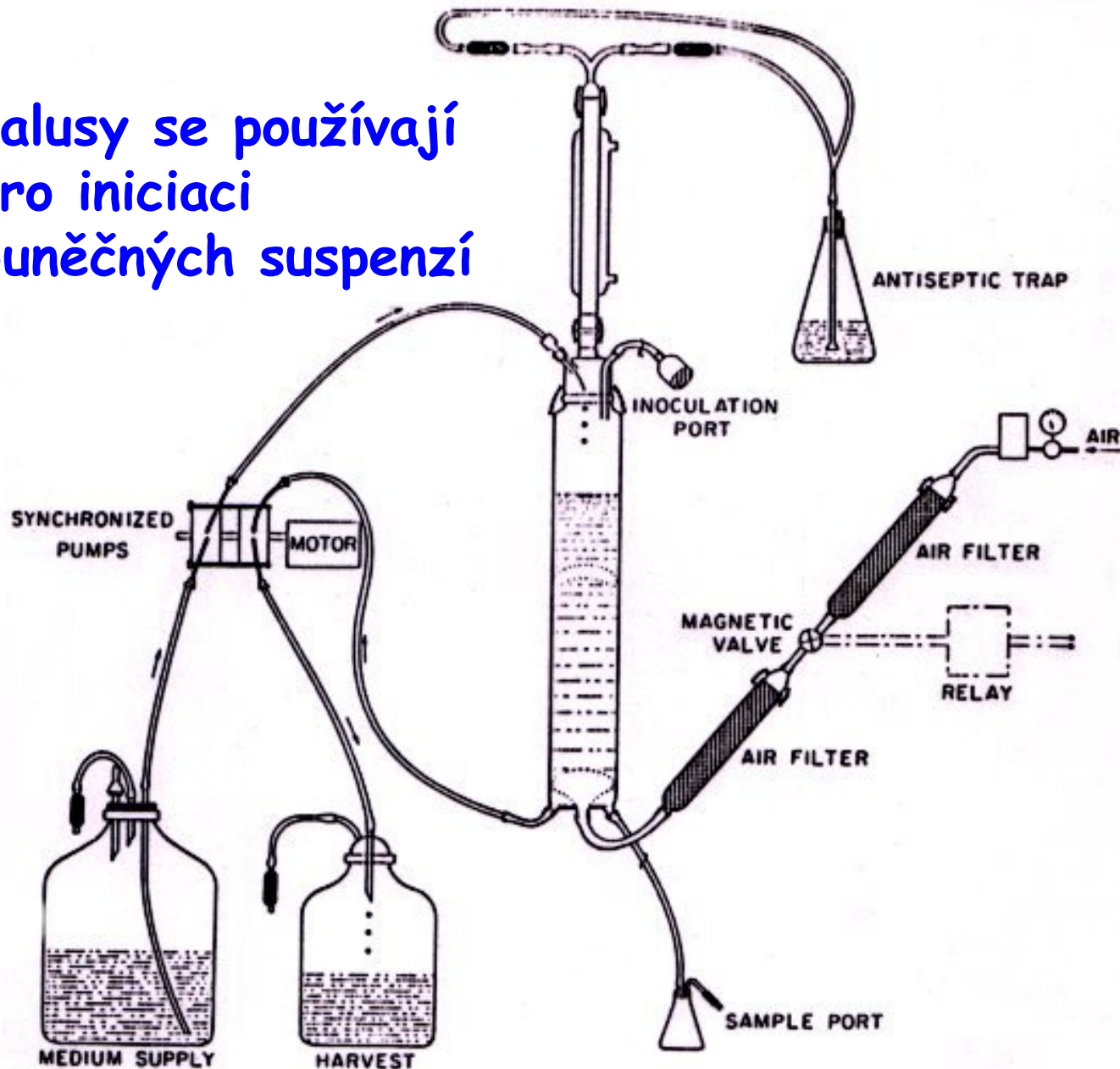
kalus válečky *Brachypodium*

účinnost transformace
demonstrována expresí
aktivity enzymu
 β -glukuronidázy

prokázána indigogenní
histochemickou reakcí

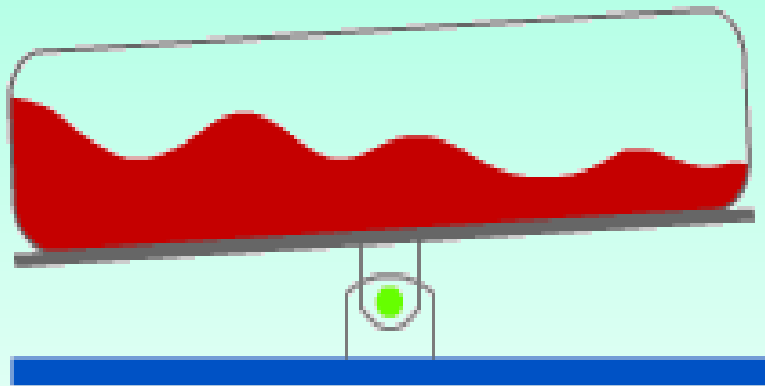
Schéma bioreaktoru

kalusy se používají
pro iniciaci
buněčných suspenzí



Bioreaktor s hydrodynamickým promícháváním

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



jiná varianta kultivace
suspenze v tekutém médiu

nafouknuté plastické sáčky
tvoří kultivační komoru

vlnění vytvářené houpáním:
a) zvětšuje povrch rozhraní
vzduch - tekutina pro přenos
kyslíku
b) zabraňuje sedimentaci
buněk