

Vliv cytokininů na obsah pigmentů u ředkvičky seté (*Raphanus sativus*) v podmínkách *in vitro*.

I. Založení experimentu

Fyziologie rostlin pro pokročilé

Mgr. Hana Cempírková, Ph.D.

Co to jsou hormony?

- termín **hormon** - poprvé použitý v medicíně před 100 lety, pochází z řečtiny $\eta\rho\rho\mu\omicron\nu\epsilon$ = stimulovat (ale nezahrnuje transport)
- látky přenášené z jednoho místa na druhé (Went a Thimann, 1937)

Co to jsou fytohormony?

rostlinný hormon = fytohormon

organická sloučenina **syntetizovaná** v jedné části rostliny, zpravidla **translokovaná** do jiné části, kde ve **velmi malé koncentraci** způsobuje fyziologickou odpověď

(Salisbury a Ross 1985)

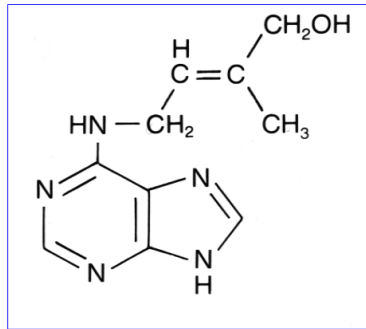
mohou mít účinky **stimulující**, ale i **inhibující**

Co to jsou růstové regulátory?

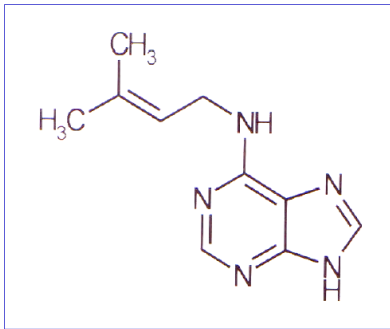
organické sloučeniny **syntetizované chemicky**,
které mohou být rostlinnými buňkami přijímány,
transportovány a způsobují podobnou
fyziologickou odpověď jako fytohormony.

Cytokininy

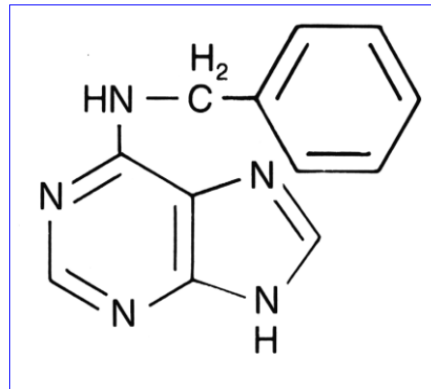
- rostlinné fytohormony odvozené od adeninu
- **izoprenoidní** (zeatin, dihydrozeatin, izopentenyl adenin)
- nebo **aromatické** (benzylaminopurin, m-topolin)



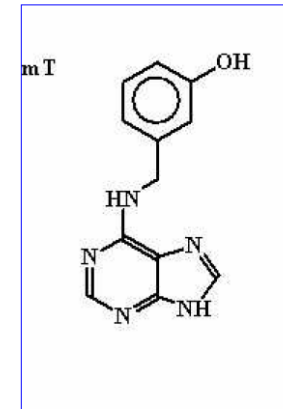
trans - zeatin **Z**
trans - zeatinribosid **ZR**



izopentenyl adenin **iP**



benzyladenin **BA**
(benzylaminopurin **BAP**)



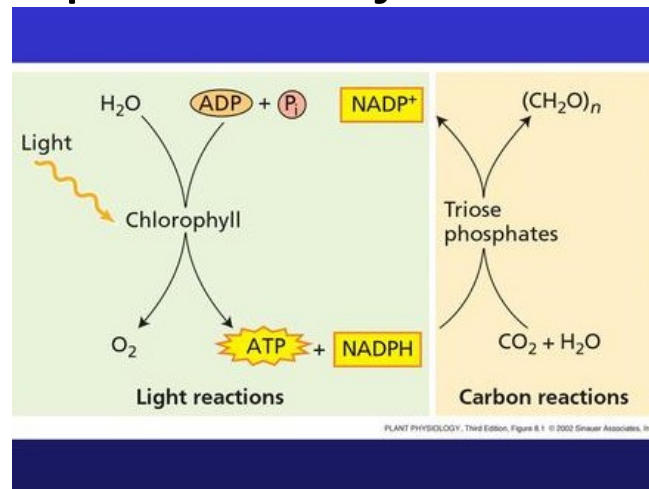
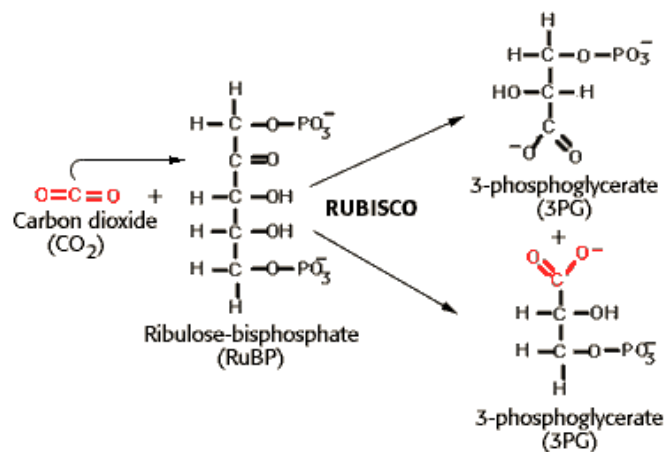
6-(3-hydroxybenzylamino)purin
meta-topolin **mT**
poprvé izolován z listů topolu

Funkce cytokininů v rostlinách

- stimulace buněčného dělení
- potlačení apikální dominance → podpora růstu axilárních meristémů, iniciace adventivních pupenů
- stimulace vývoje chloroplastů
- aktivace syntézy RNA a proteinů
→ oddálení senescence
- zvýšení odolnosti ke stresům (zasolení, sucho, vysoká teplota, vlhkost)

Vliv cytokininů na syntézu chlorofylu

- Stimulují: - tvorbu chloroplastů
 - syntézu chlorofylu přes podporování syntézy RuBisCo
 - diferenciaci chloroplastů
 - expresi genů kódujících malou podjednotku RuBisCo a světlosběrných komplexů vázajících chl a/b



Rostliny pěstované „in vitro“ = rostlinné explantáty

- *ex plantare* = pěstovat mimo
- *in vitro* = ve skle, v umělých podmínkách
- **aseptická kultura** = bez infekce (bakterie, kvasinky, plísně)
- **axenická kultura** = kultura jednoho organismu
- **tkáňová kultura** = historický pojem, přeneseno z oblasti fyziologie živočichů



Rostliny pěstované „in vitro“ = rostlinné explantáty

- zpočátku obor rostlinné fyziologie odlišující se svou **vlastní metodologií**
- později četné aplikace v **genetice a šlechtitelství**
- v současnosti jsou metodickou základnou **rostlinných biotechnologií**
- mají využití i v **molekulární biologii** –jsou součástí metod množení rostlin, transformace, selekce ...

Využití explantátů

A. Získání teoretických poznatků

- buněčné dělení
- totipotence rostlinné buňky
- diferenciaci rostlinné buňky a pletiva
- metabolismus
- regulační mechanismy
- transformace a mutageneze

Využití explantátů

B. Praktické aplikace

- rychlé množení ve velkých kvantech
- urychlování šlechtitelských cyklů
- získávání vzdálených hybridů („embryo rescue“, opylení *in vitro*)
- získávání haploidů a dihaploidů
- ozdravování od virů
- umělá semena
- genové banky, kryoprezervace

Složení živných médií

- **anorganické sloučeniny**

makroelementy: **N, P, K, Ca, Mg, S**

mikroelementy: **Fe, B, Cu, Mn, Ni, Co, I,**

- **organické sloučeniny**

vitamíny: **B1, B6, kys. nikotinová, kys. listová, biotin**

aminokyseliny: **směsi** (kaseinhydrolyzát, kvasničný hydrolyzát)

čisté (glycin)

inositol

polyaminy: **putrescin, spermin, spermidin...**

aktivní uhlí

přírodní látky: **kokosové mléko, rostl. šťávy, banány...**

Složení živných médií - pokračování

- zdroj organického uhlíku = sacharidy
mono- a disacharidy (sacharóza)
- růstové regulátory
 - auxiny
 - cytokininy
 - gibereliny
 - kys. abscisová
- ztužování médií - agar, Gelrite®,

Příprava živného média (1l)

1. 6,5 g **agaru** vsypeme do 300 ml destilované vody v SIMAX láhvi a rozvaříme v autoklávu.
2. Do Erlenmeyerovy baňky odměříme 500 ml **destilované vody**.
3. Přidáme koncentráty **makroelementů** (100 ml), **mikroelementů** (10ml) a chelát železa (5 ml).
4. Přidáme **vitamíny** (1 ml zamražené směsi).
5. Navážíme 100 mg **inositolu**.
6. Navážíme 20 g **sacharózy**.

nebo Příprava živného média (1 l)

1. 5,5 g **agaru** vsypeme do 300 ml destilované vody v SIMAX láhvi a rozvaříme v autoklávu.
2. Do Erlenmeyerovy baňky odměříme 500 ml destilované vody.
3.

4. navážíme 4,4 g směsi MS média s vitamíny podle Gamborga
- 5.
6. Navážíme **20 g sacharosy**.

Příprava živného média (1I)

7. Podle potřeby doplníme další látky jako **aktivní uhlí, růstové regulátory** a pod.
8. Slijeme rozvařený agar s roztokem v EM baňce a **doplníme** v odměrném válci **na 1000 ml**.
9. Pomocí Phan papírků **změříme pH** a upravíme na 5,7 pomocí 0,1 M KOH nebo 0,1 M HCl.
10. Médium dobře **promícháme** přeléváním z válce do EM baňky a **rozlijeme** asi po 40 ml do kultivačních nádob.

Příprava živného média (1I)

11. Kultivační nádoby s médiem **uzavřeme** vhodným uzávěrem
12. Následující den **sterilizujeme** při 121°C v autoklávu po dobu 20 minut
13. Krátkodobě média **uchováváme** při laboratorní teplotě, při skladování po delší dobu používáme lednici

při kultivaci v Petriho miskách rozléváme sterilně v očkovacím boxu médium až po sterilizaci

1F médium

- MS + fytohormony (1 mg/l BAP + 1 mg/l NAA)
- Mikropropagace (množení *in vitro*)

Založení experimentu

1. uvaření médií
2. Pasážování klíčnicích rostlinek ředkvičky (předpěstovány ze sterilních semen) na médium bez cytokininu a s cytokininem (1F)
3. Kultivace: A. na světle (16 hod světlo, 8 hodin tma)
B. na nízkém světle

Úkol: V protokolu popište kultivační podmínky souvislým textem (světlo – délka, intenzita, teplota, délka kultivace...)

Vyhodnocení experimentu

- 1. Analýza růstu: posouzení morfologie a čerstvá hmotnost
- 2. Analýza pigmentů spektrofotometricky a pomocí HPLC
 - 1. extrakce pigmentů
 - 2. analýza pigmentů na spektrofotometru a výpočet obsahu chlorofylů a karotenoidů pomocí vzorců
 - 3. analýza pigmentů pomocí HPLC a výpočet obsahu pigmentů z chromatogramů za použití standardů