

06_ Kalusové kultury Indukce a jejich využití

Rostlinné explantáty

Mgr. Hana Cempírková, Ph.D.

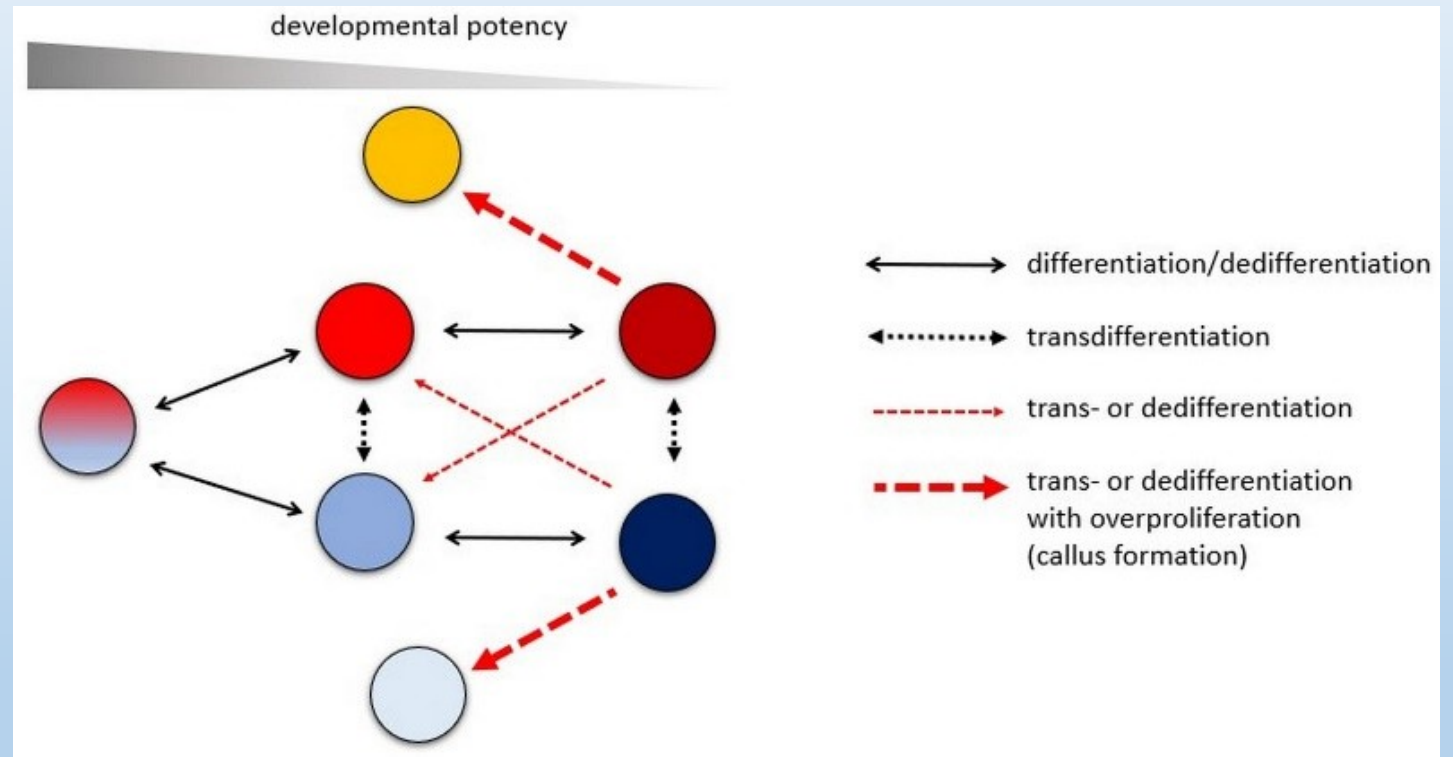
Kalus

- Co je kalus a jak ho vytvořit?
- Jaká jsou stádia vývoje kalusu?
- Jaké je využití kalusu?
- Co jsou suspenzní kultury, jak se vytváří a jaké je jejich využití?

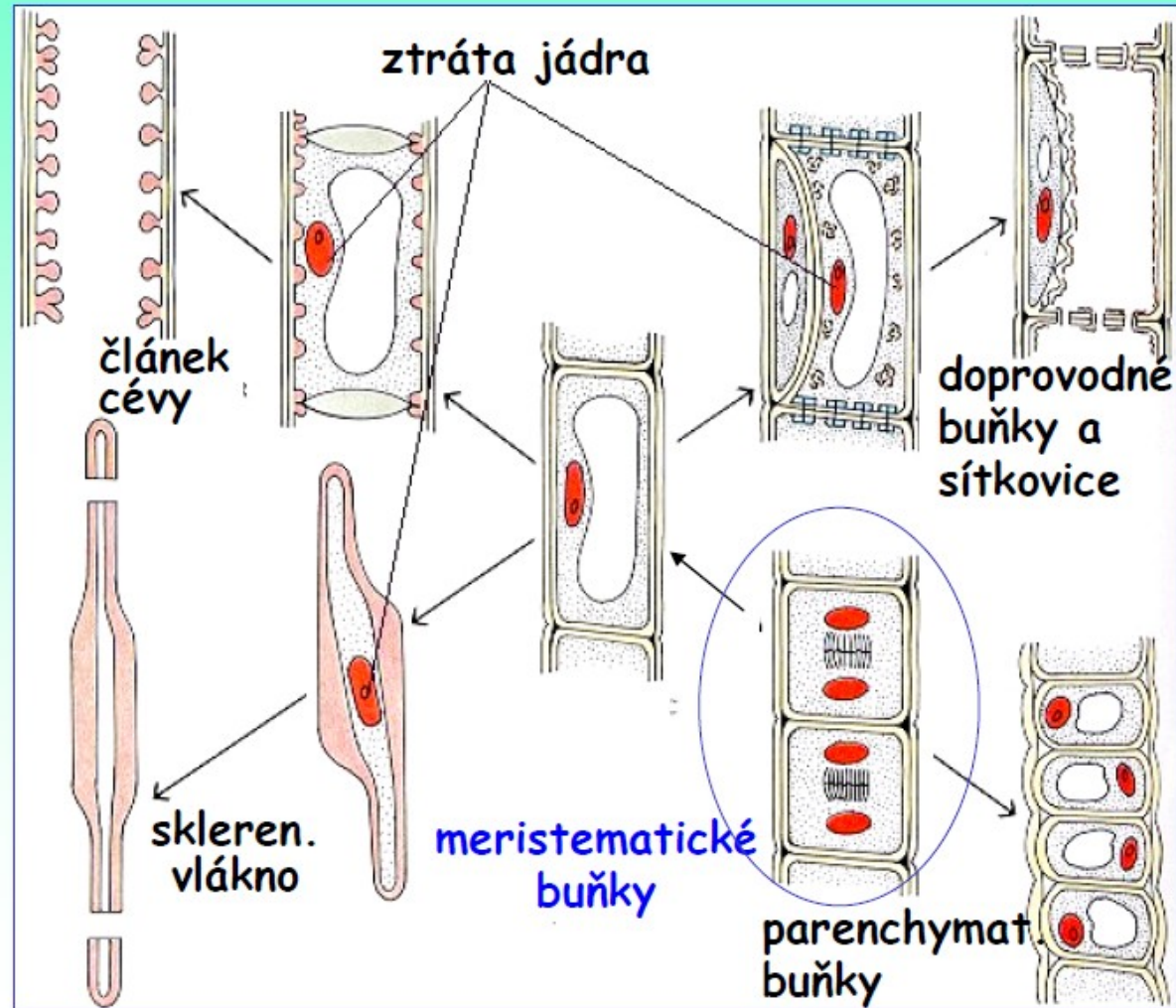
Základní pojmy

- Diferenciace
- Dediferenciace
- Rediferenciace

- Totipotence
- Pluripotence



Diferenciace meristematičké buňek



Dediferenciace buněk v přírodě

háčka žlabatky růžové



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

háčka
korovnice
smrkové



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

nádor na olši



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

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 klíčnicích rostlin = „crown-gall callus“

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*

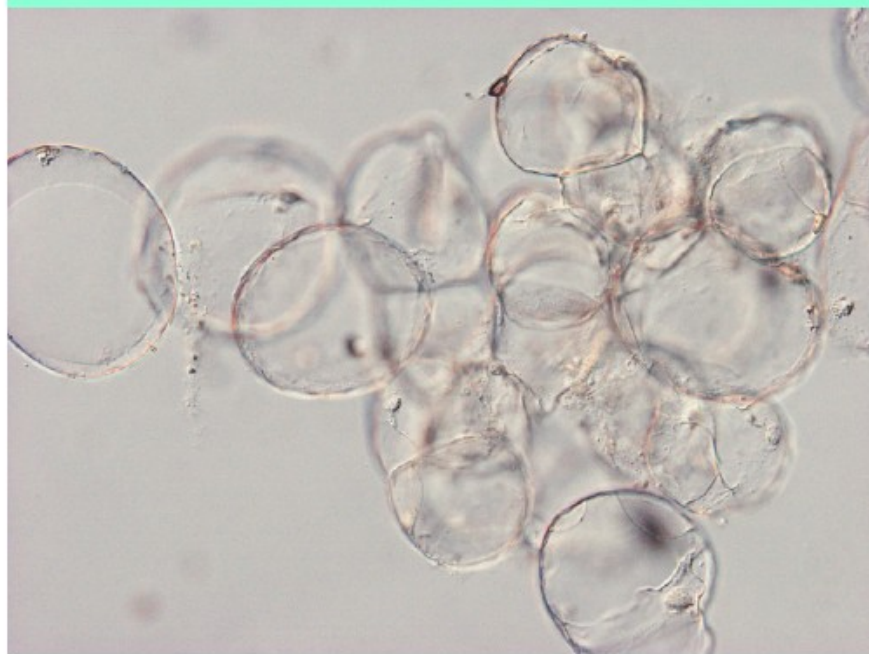
Debergh *et al.*

Definice kalusu

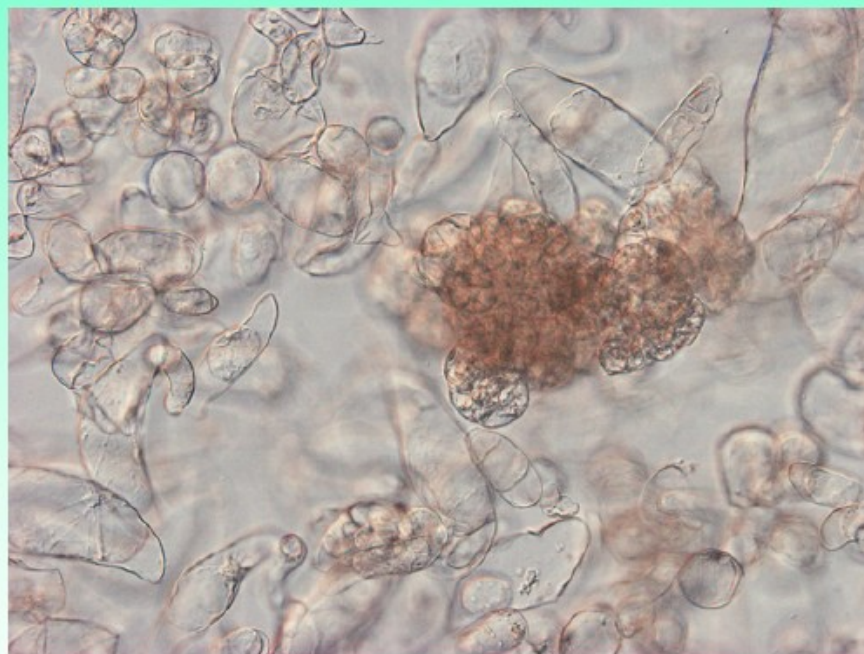
kalus je tvořen
amorfni hmotou
málo organizovaných
tenkostěnných,
parenchymatických
buněk



Fenotyp buněk kalusů



tabák *Nicotiana tabacum* cv. Xantha



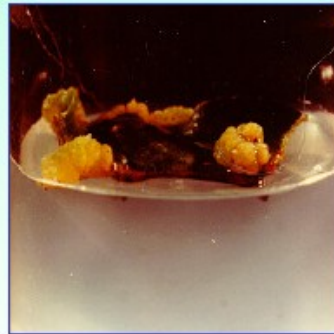
mrkev *Daucus carota* ssp. *carota*

Jak vzniká kalus in vitro a z jakých částí rostlin může pocházet?

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*

Debergh et al.



*kalus vznikající
na embryu*

Stadia založení kalusu *in vitro*

1. indukce
2. buněčné dělení
3. diferenciacce

Debergh *et al.*

Iniciace kalogeneze = indukce tvorby kalusu

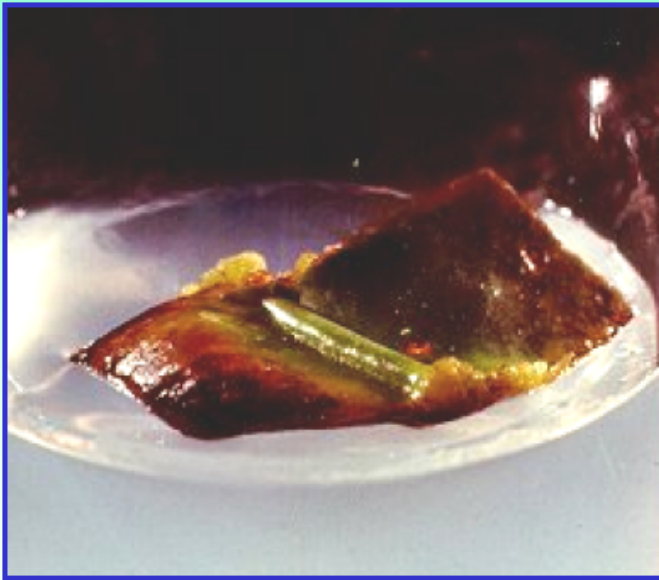
- Střední poměr auxinů k cytokininům → kalus
- Vysoký poměr cytokininů k auxinům → prýt
- Vysoký poměr auxinu k cytokininům → kořeny

auxiny

- 2,4-D
- picloram

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.

2. stadium - buněčné dělení



aktivní dělení buněk vrací
somatické buňky
do meristemického
dediferencovaného stavu

neorganogenní kalus -
produkce sekundárních
metabolitů

3. stadium - diferenciace = organogeneze nebo somatická embryogeneze



v kalusovém pletivu postupně
diferencují orgány:

organogenní kalus:

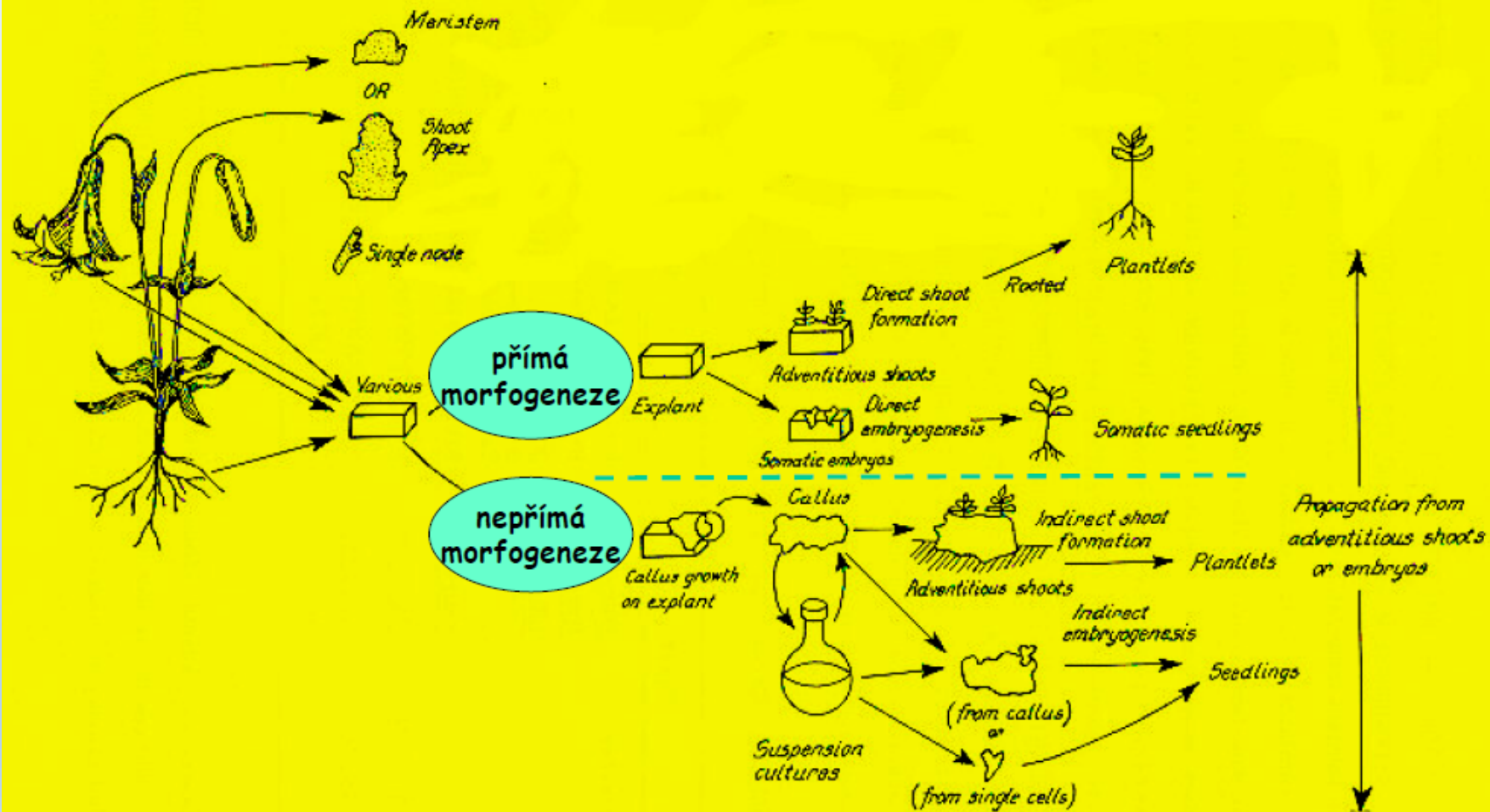
- prýty
- kořeny

embryogenní kalus:

- somatická embrya

častěji začínají probíhat reakce
drah **sekundárního metabolismu**

Přímá a nepřímá morfogeneze *in vitro*



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*

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



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

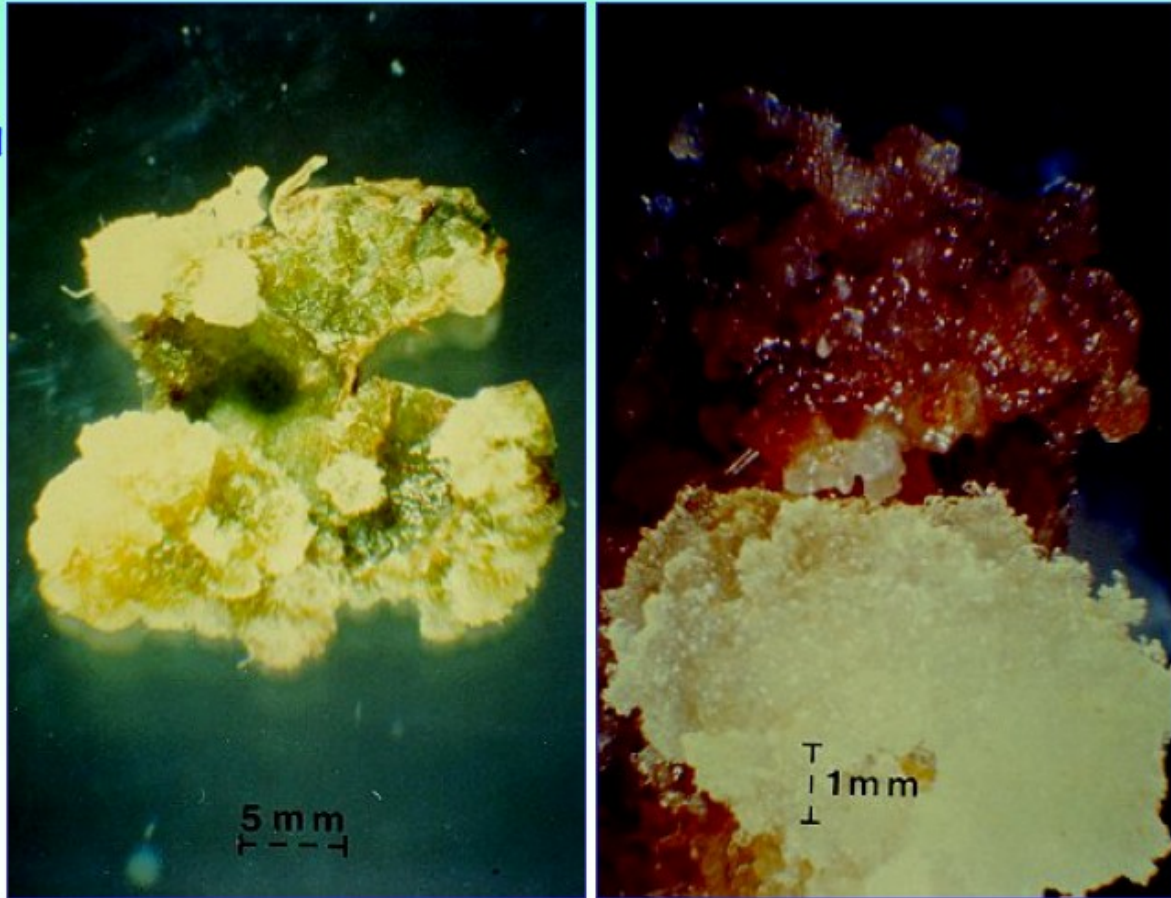
- A. prýtových pupenů
- B. kořenových primordií
- C. somatických embryí

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

= jakékoliv změny fenotypu, které **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.

využití ve šlechtění při hledání nových vlastností

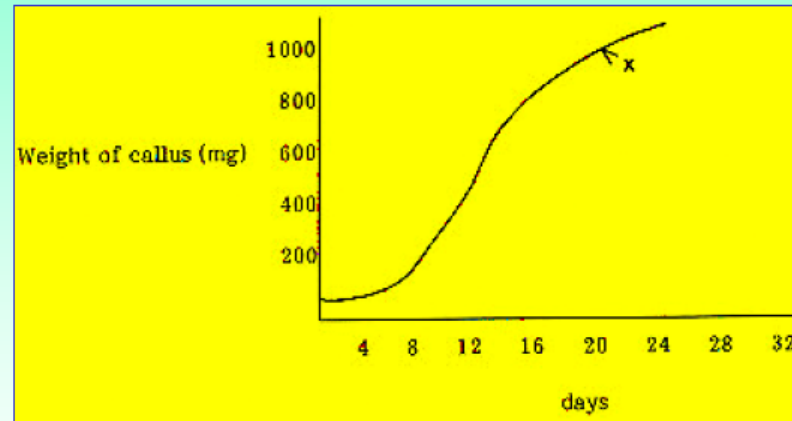
Pasážování kalusu

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**.



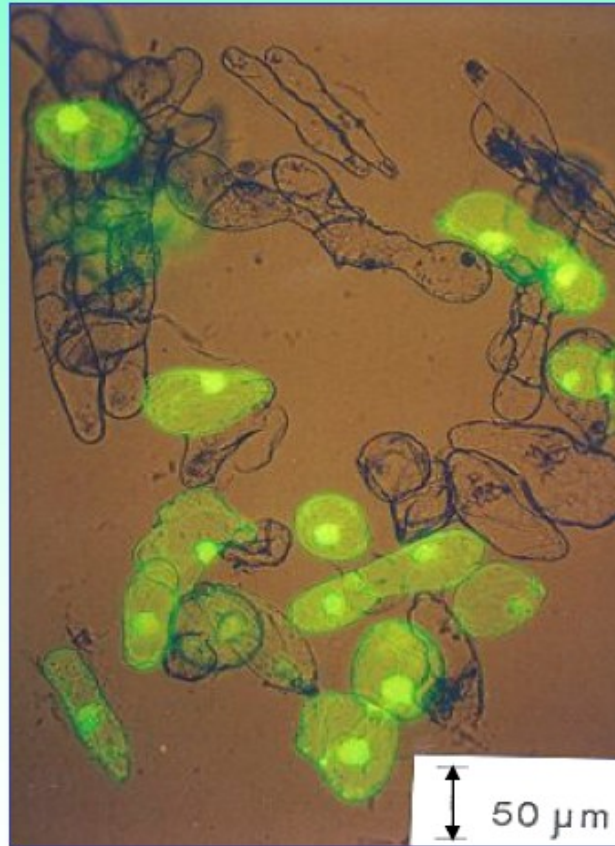
typická růstová křivka

x = doba pasáže

Fáze růstu kalusu:

1. Lag fáze (buňky se připravují na dělení)
2. Exponenciální fáze (buňky se dělí nejrychleji)
3. Lineární fáze (dělení buněk se zpomaluje, buňky se zvětšují)
4. „Zpomalovací“ fáze (zpomaluje se dělení buněk i jejich zvětšování)
5. Stacionární fáze (počet i velikost buněk zůstává konstantní)

Morfologie buněk suspenzí a jejich viabilita



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

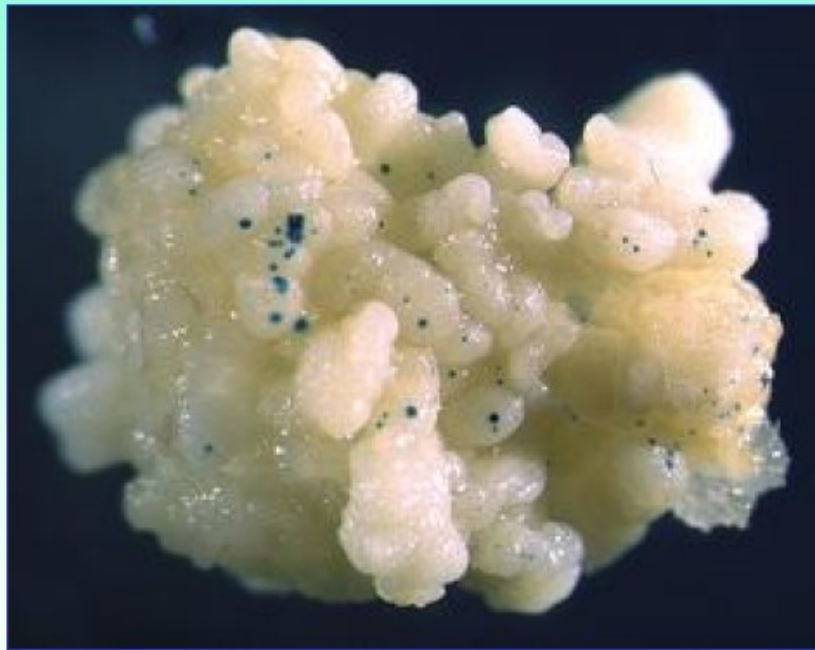
esterázy hydrolyzují FDA a tak
se uvolní *fluorescein*, který
v modrém světle vyzařuje
žlutozelenou fluorescence

Využití kalusových kultur

- informace o schopnostech regenerace rostlin
- izolace protoplastů
- iniciace **suspenzních kultur**
- genetické manipulace
- časově neomezený růst v *in vitro* podmínkách („nesmrtelná kultura“)

Využití kalusové kultury pro transformace

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

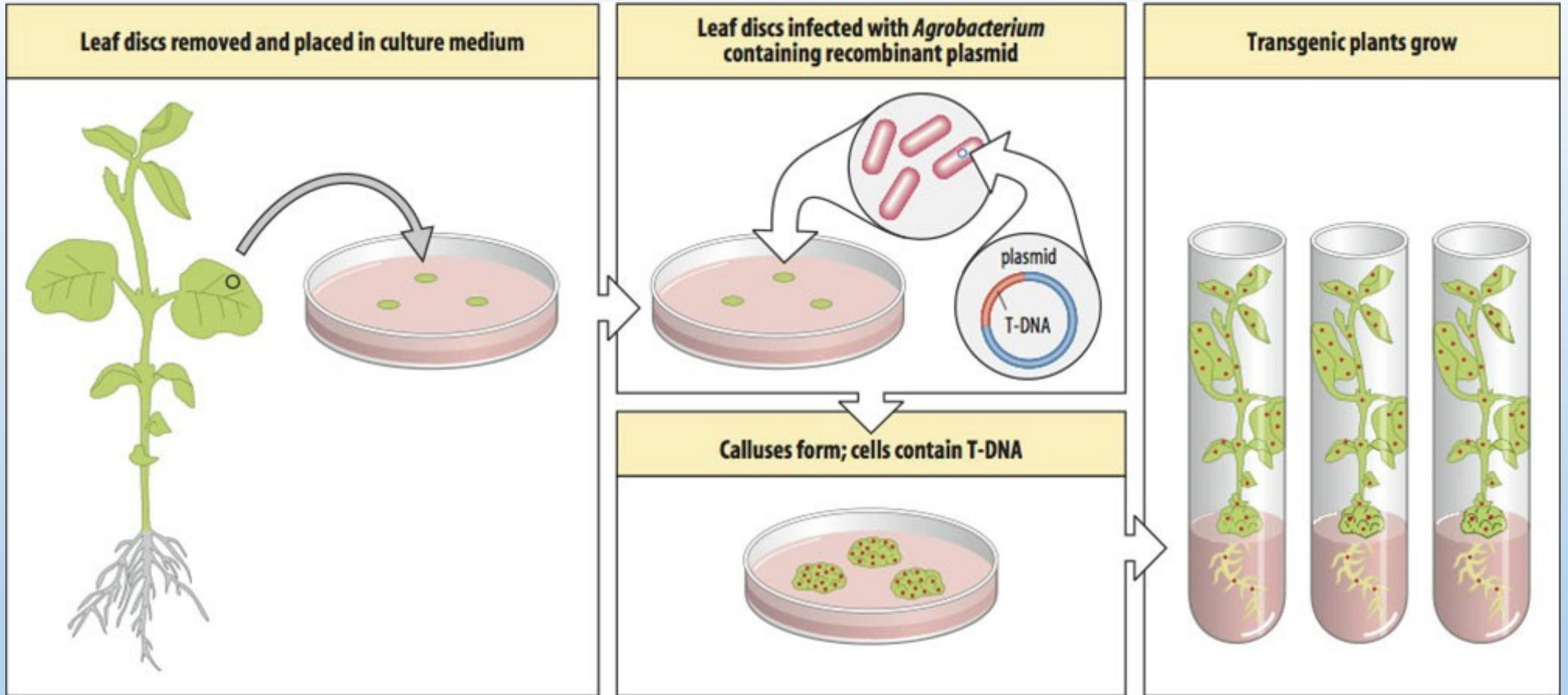


účinnost transformace
demonstrována expresí
aktivity enzymu
 β -glukuronidázy

prokázána indigogenní
histochemickou reakcí

kalus trávy válečky *Brachypodium sp.*

www.aber.ac.uk/plantpathol/brachytransform.htm

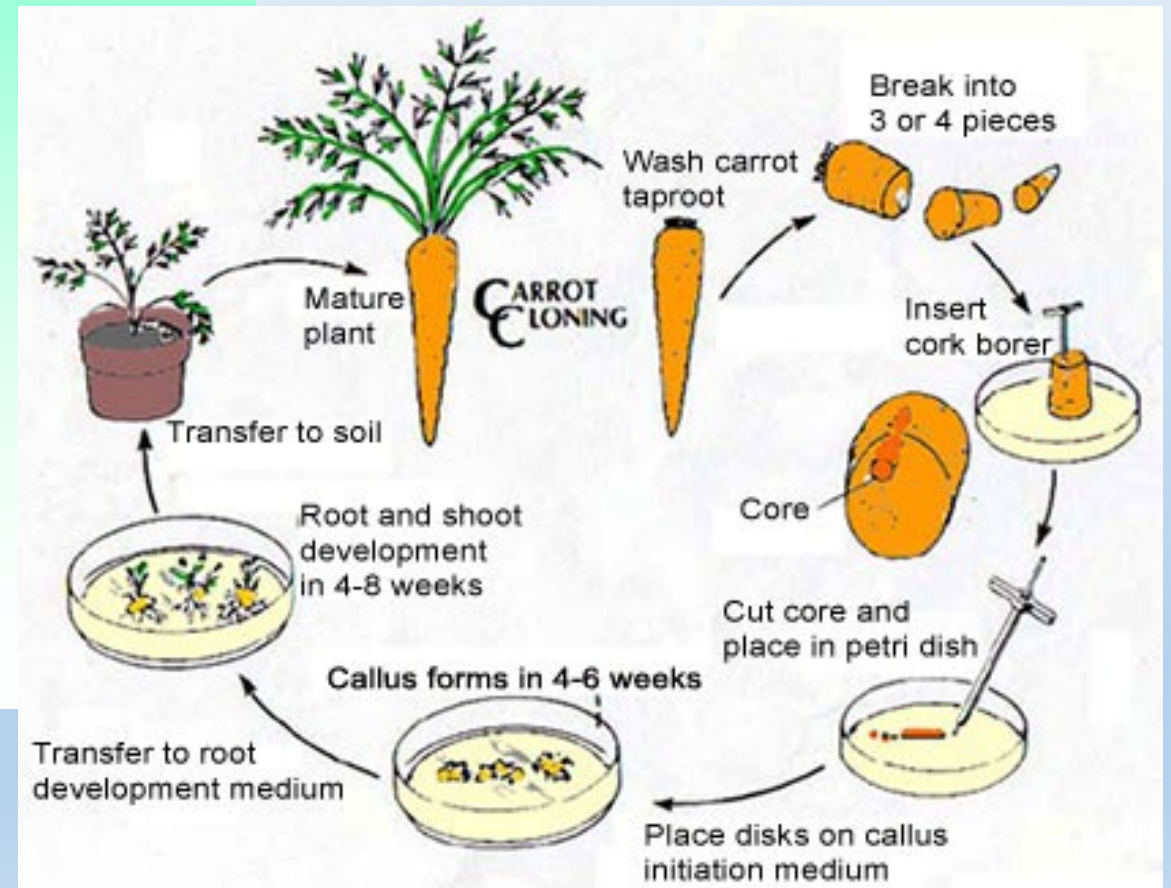
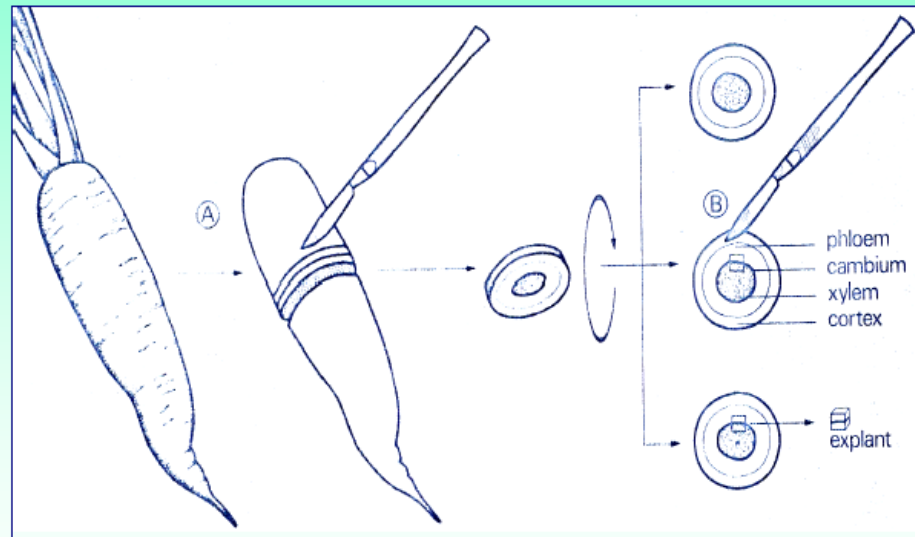


Zajímavé stránky

- <http://www.theraderm.co.kr/program/program3.htm> 😊
- https://ddd.uab.cat/pub/tfg/2014/119249/TFG_javierlidoylogrono.pdf
- <https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2019.00536/full>

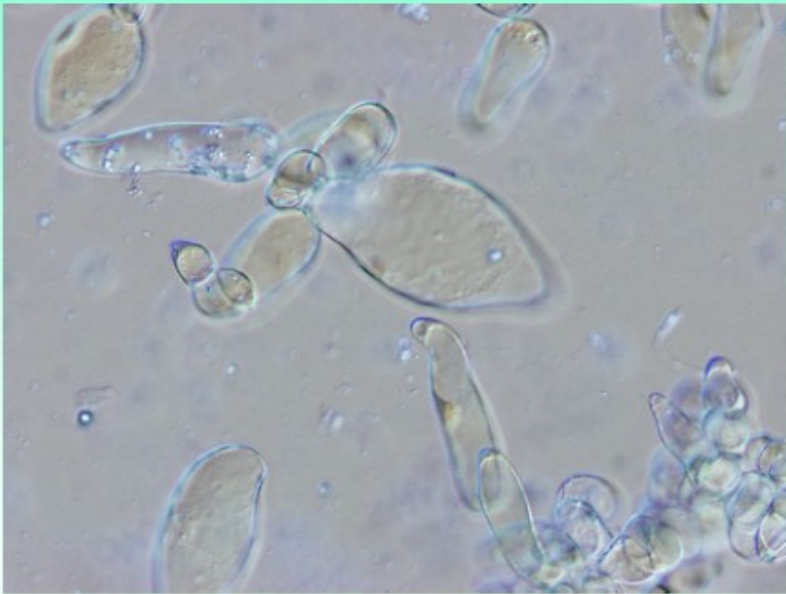
Iniciace kalusu ze segmentů kořene mrkve

Reinert and Yeomann (1981)

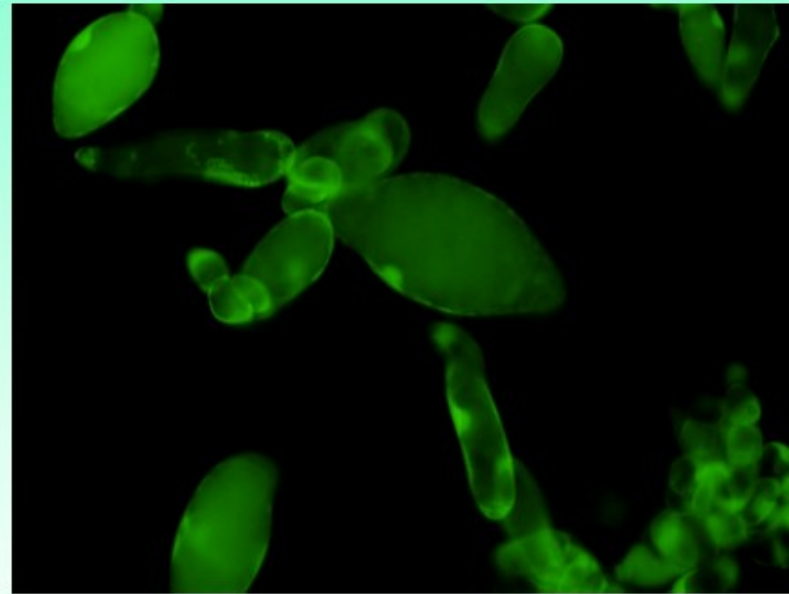


Buňky kalusu mrkve

Daucus carota ssp. carota

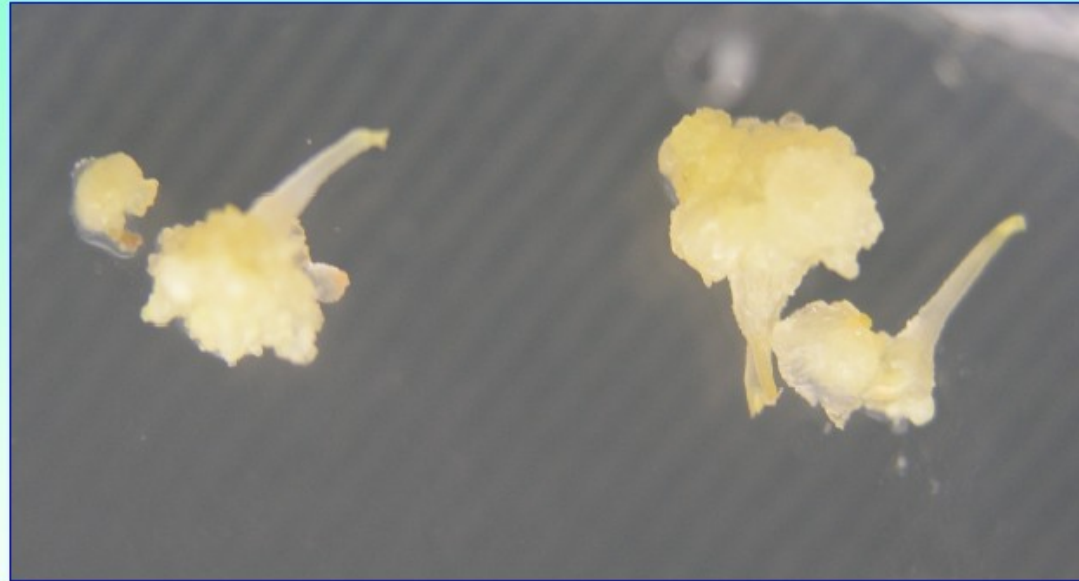


Nomarského diferenciální
interferenční kontrast (DIC)



fluorescence živých buněk
po inkubaci s FDA

Kalus iniciovaný z kambálních segmentů kořene mrkve se somatickými embryi

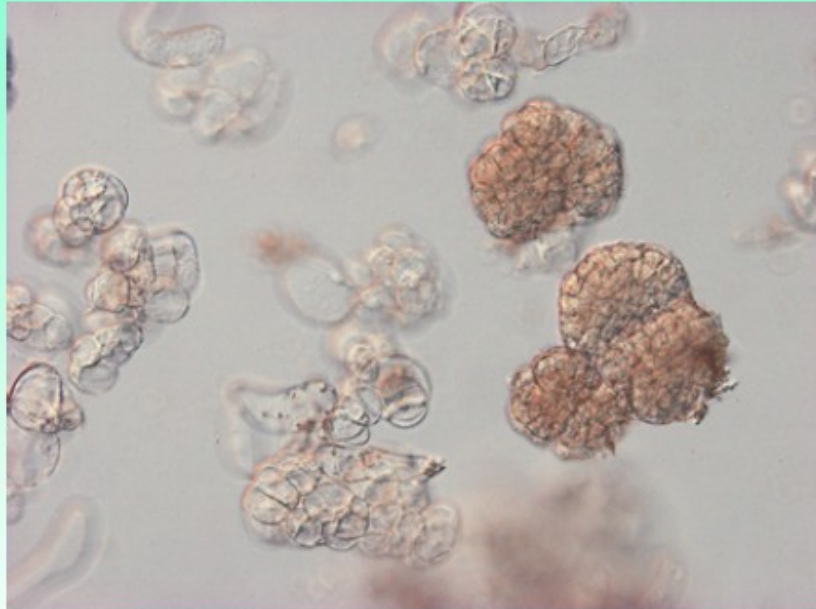


kalogeneze a jeho udržování:
indukce SE:

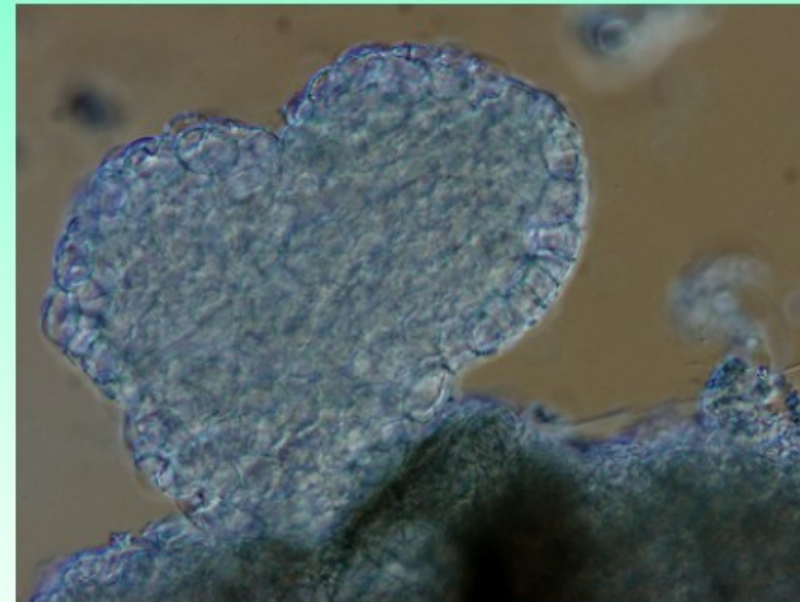
MS s 0.1 mg/l 2,4-D
MS bez auxinu

Somatic embrya v kalusové kultuře

Daucus carota ssp. carota



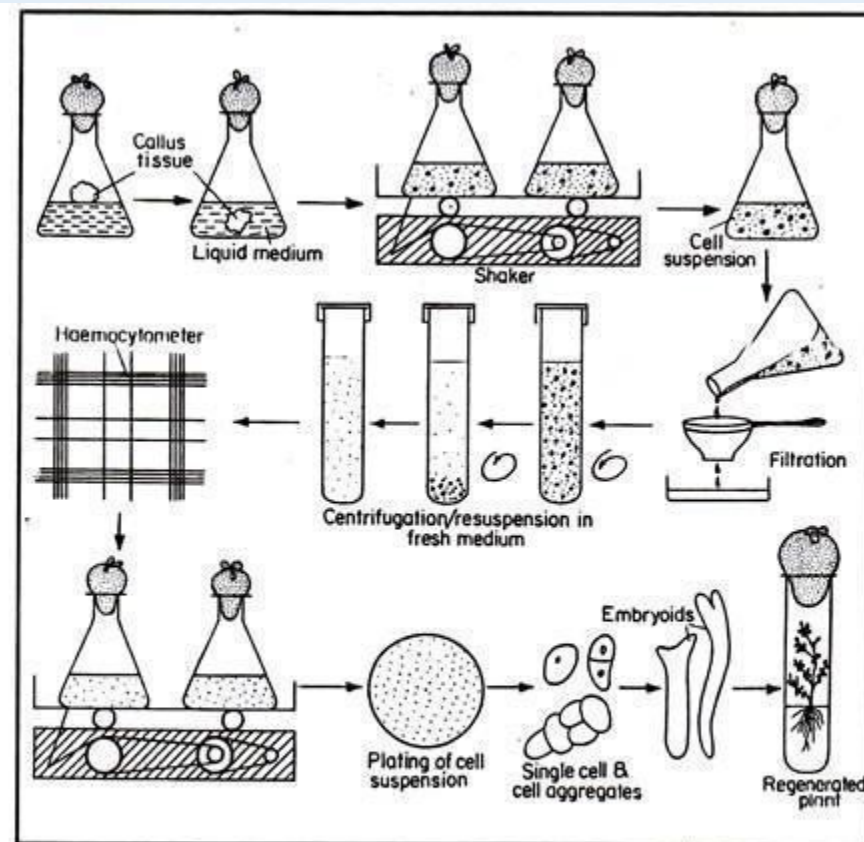
globulární somatická embrya
v kalusové kultuře



srdčité somatické embryó
v kalusové kultuře

Suspenzní kultury

- rychle rostoucí buňky
- homogenní nebo buněčné agregáty
- rozmíchání v tekutém médium
- možnost odvození buněčné linie („cell line“)



□ Fig 4.1

Flow diagram illustrating the method of cell suspension culture and regeneration of plant through embryogenesis



Iniciace suspenzní kultury buněk

fragmenty nediferencovaného kalusu

2 - 3 g / 100 mL

↓
tekuté medium

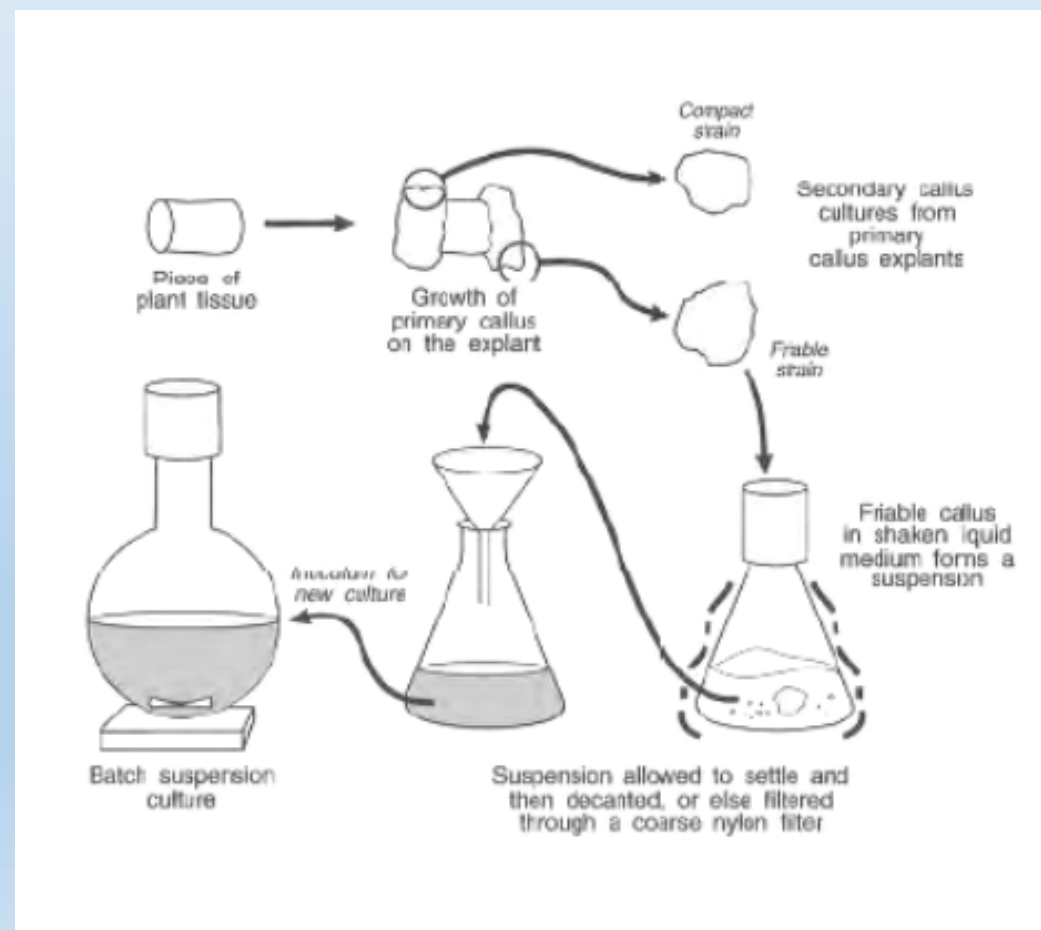
↓
aerace

↓
míchání (agitace)

↓
pasáže

↓
výběr malých shluků buněk

↓
kultura suspenze buněk

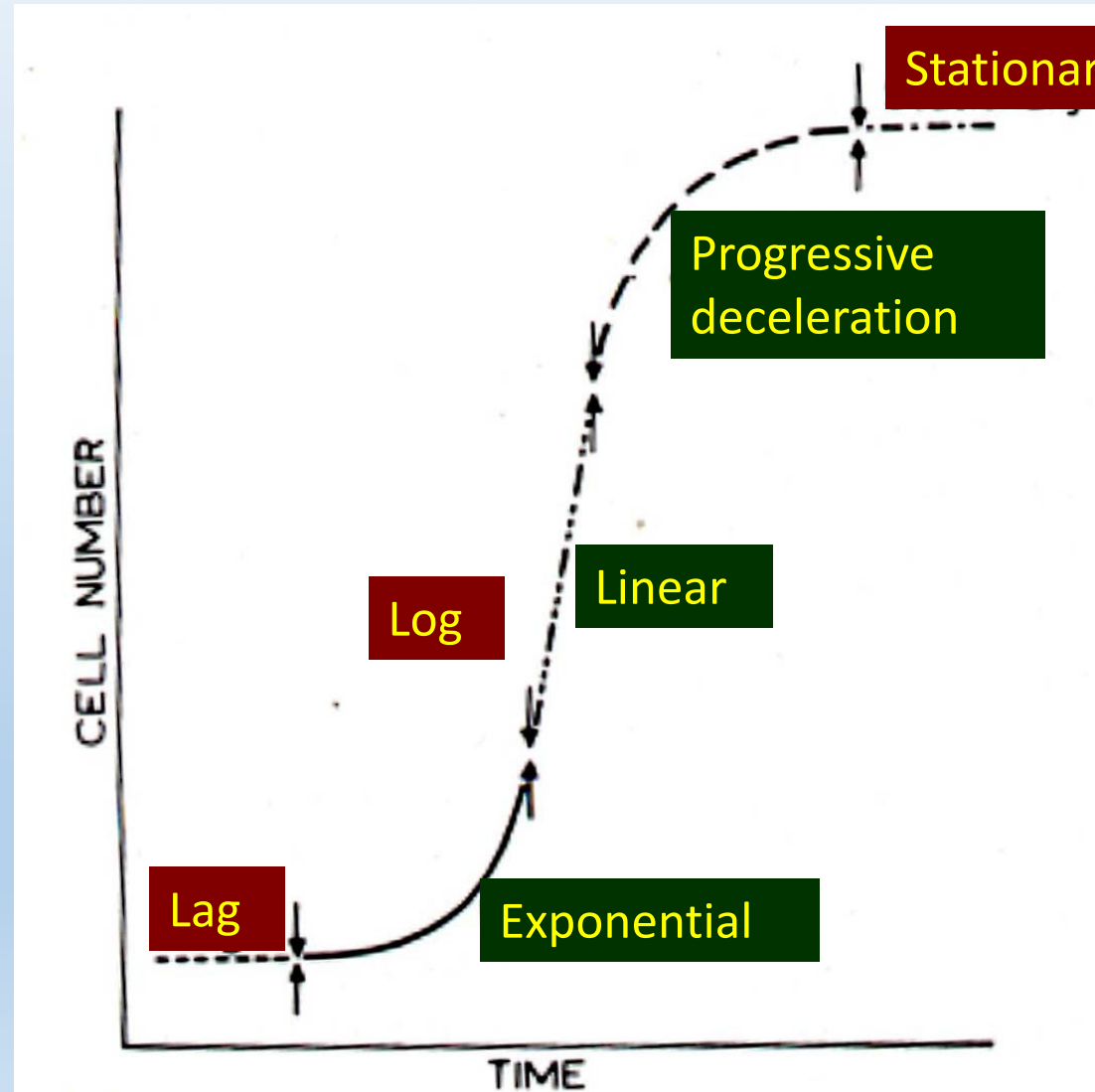


Charakter růstu suspenzní kultury buněk

Sigmoidální růst (S):

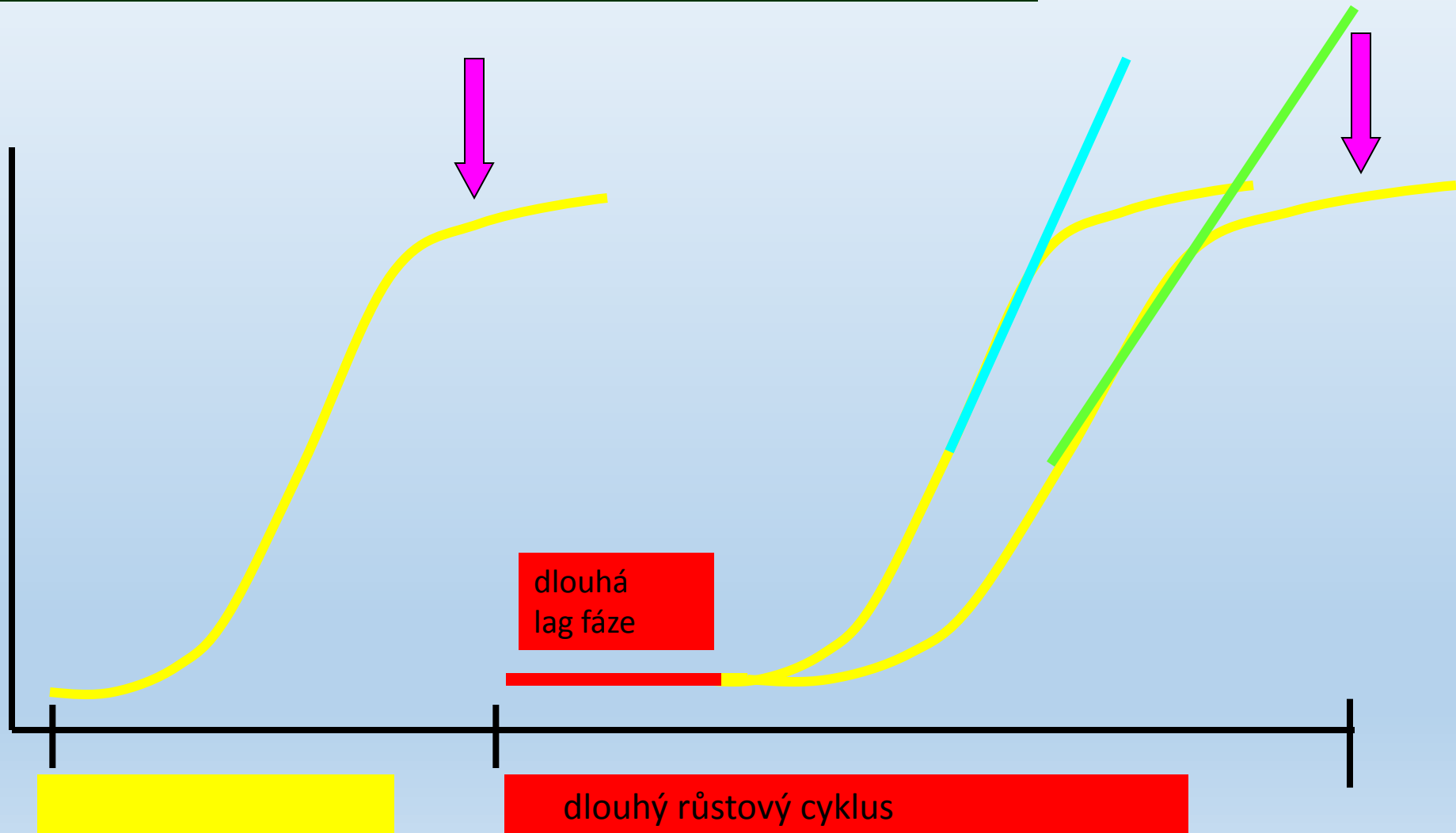
Lag fáze -- logaritmická (log, exponenciální) -- Stationary phase

FW
DW



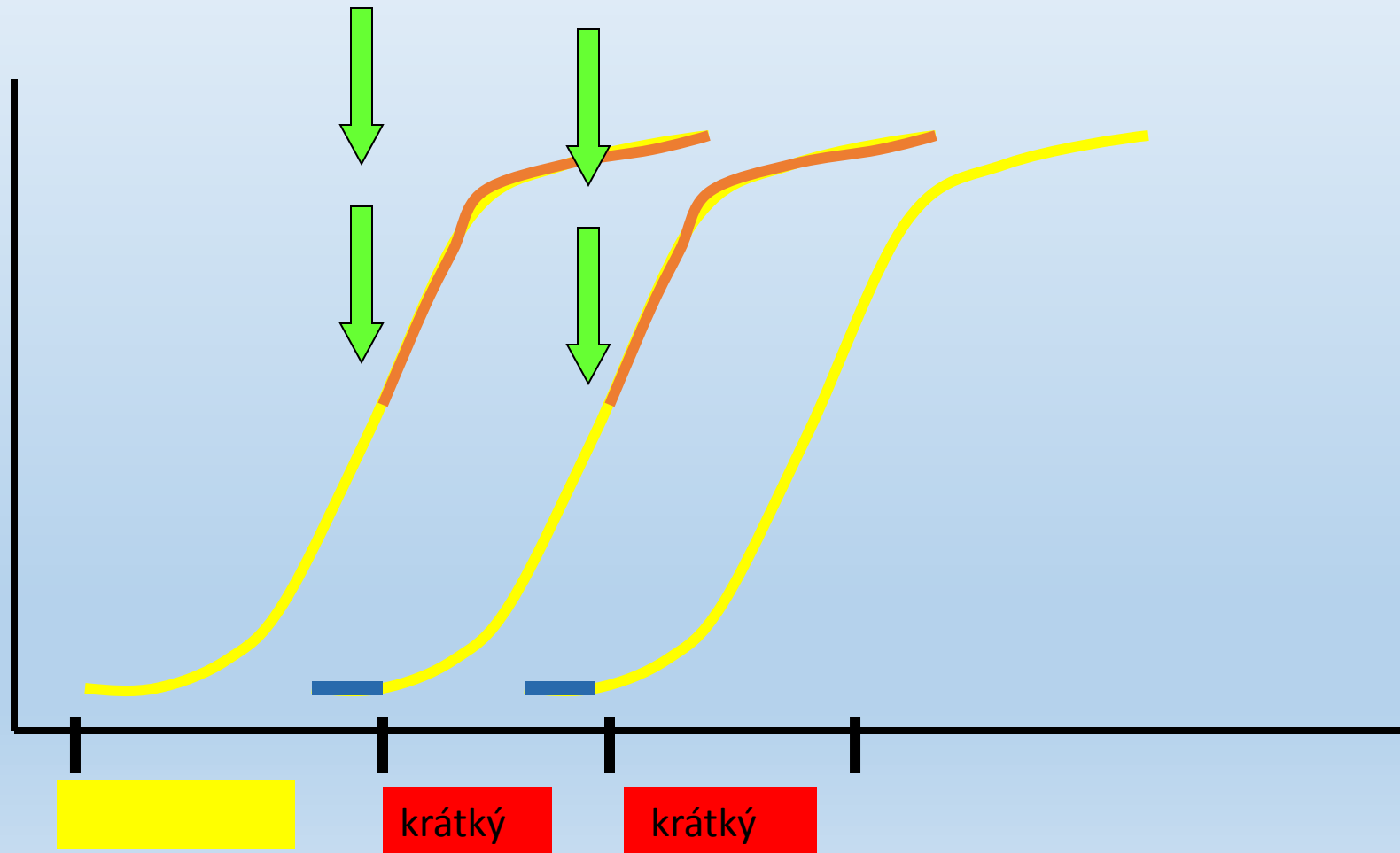
Faktory ovlivňující růst

1. interval subkultivace pasáž ve stacionární fázi

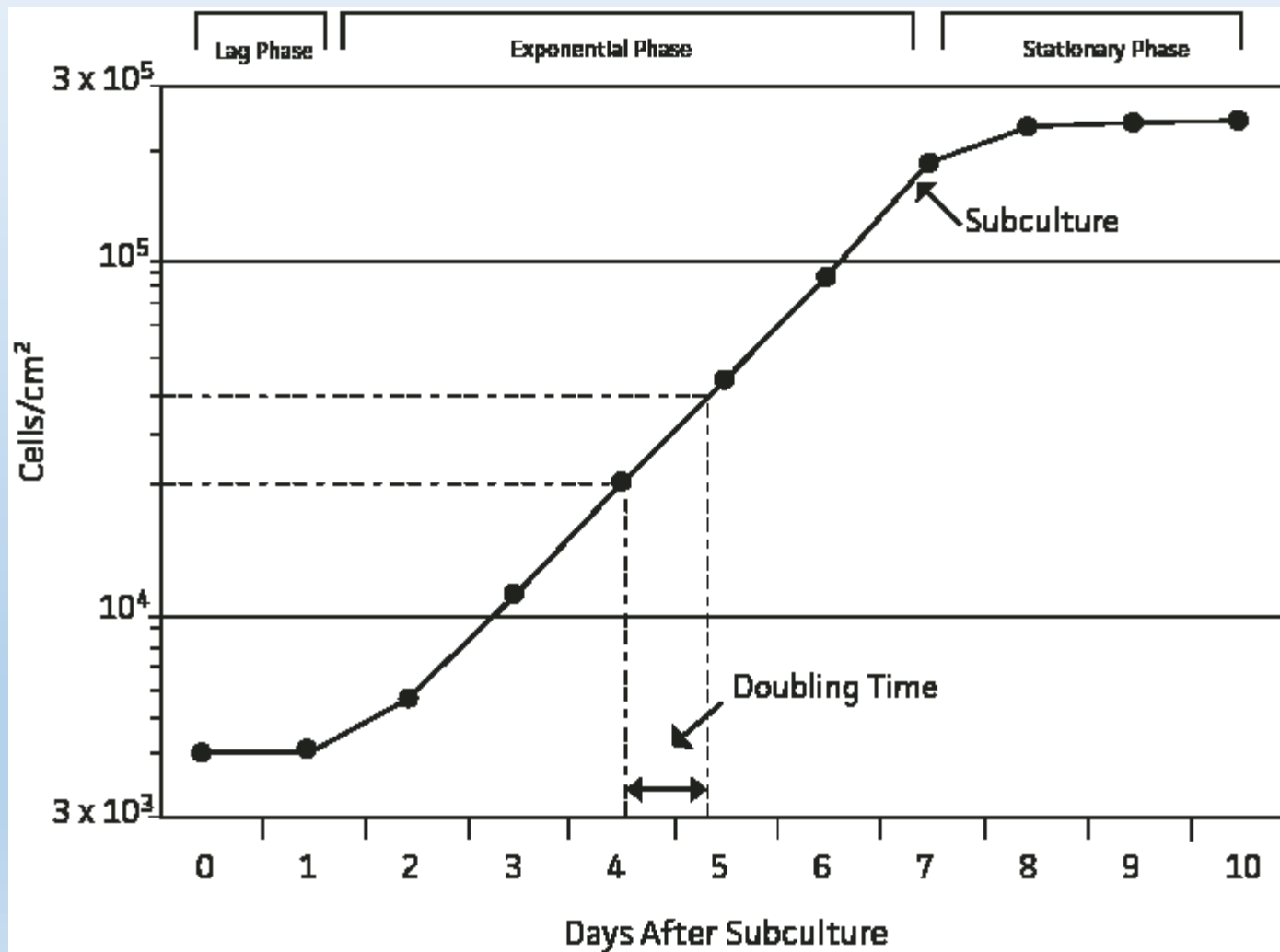


1. interval subkultivace

pasáž v log fázi -->



Kdy do nového média? (pasážování)



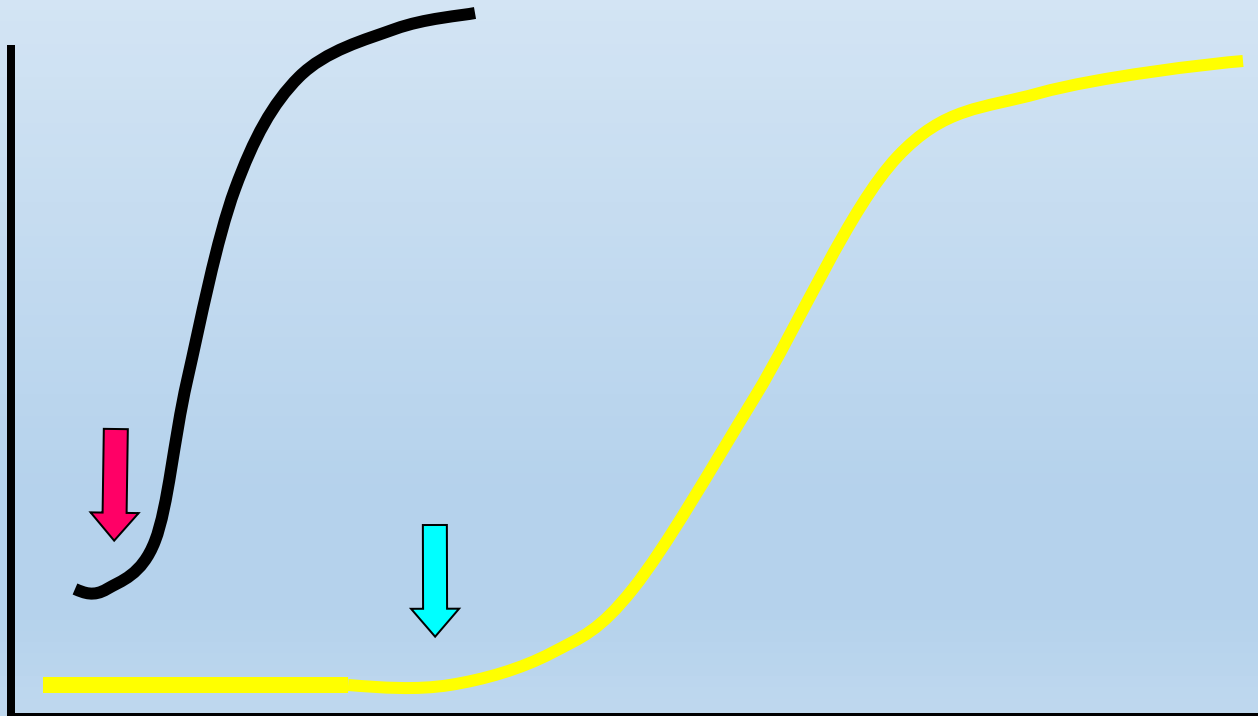
Faktory ovlivňující růst:

2. Hustota buněk při iniciaci
vysoká hustota buněk

nízká počáteční hustota
buněk -->

krátká lag fáze
málo buněčných dělení

dlouhá lag fáze
dlouhý exponenciální růst



Faktory ovlivňující růst:

2. Iniciální hustota buněk

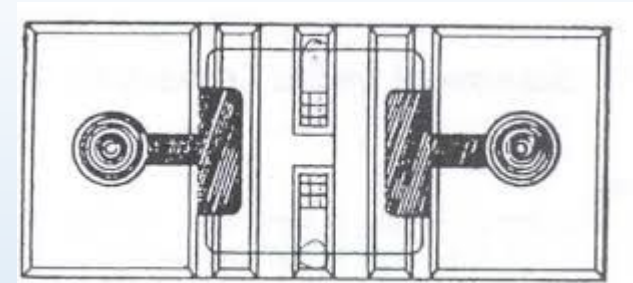
kritická iniciální hustota -->

obecně $0.5 - 2.5 \times 10^5$ buněk / ml



4 – 6 dělení

$1 - 4 \times 10^6$ buněk / ml



Využití rostlinných suspenzních kultur

- tvorba klonů jedné buňky (klonování)
- studium morfologických a biochemických změn během růstových a vývojových fází
- studium buněčného metabolismu
- kultury jednotlivých buněk umožňují rychlý a zjednodušený výběr buněk s různými vlastnostmi
- produkce kultur s vysokým výtěžkem i s výhodnými agronomickými znaky
- tvorba sekundárních metabolitů
- ve studiu mutageneze lze mutagen přidat rovnou do tekutého média

Regenerating plants from a single cell

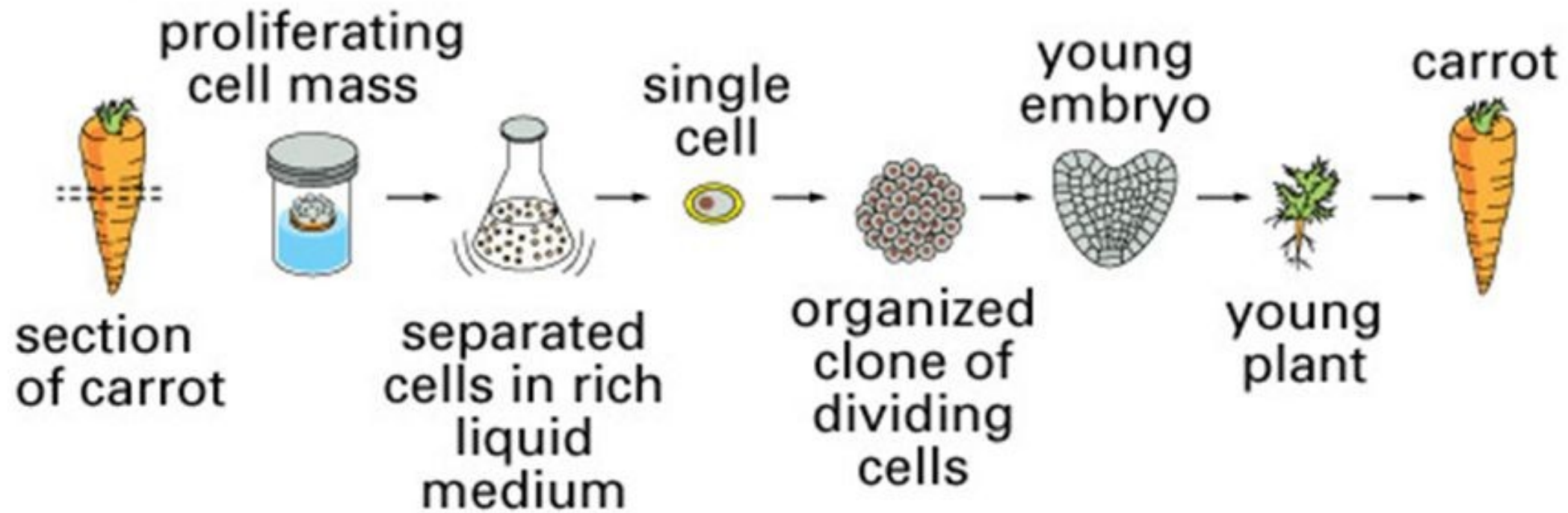
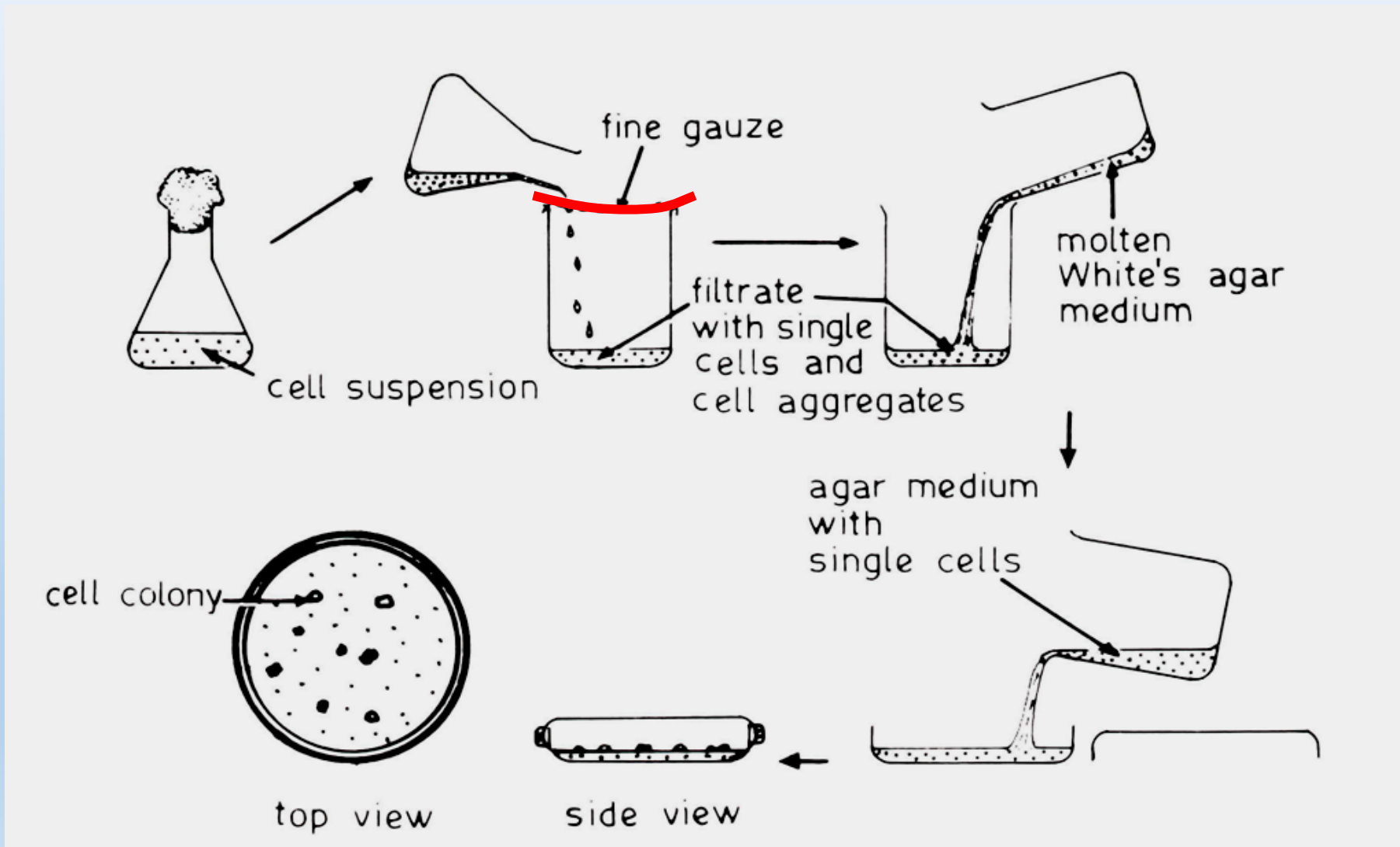
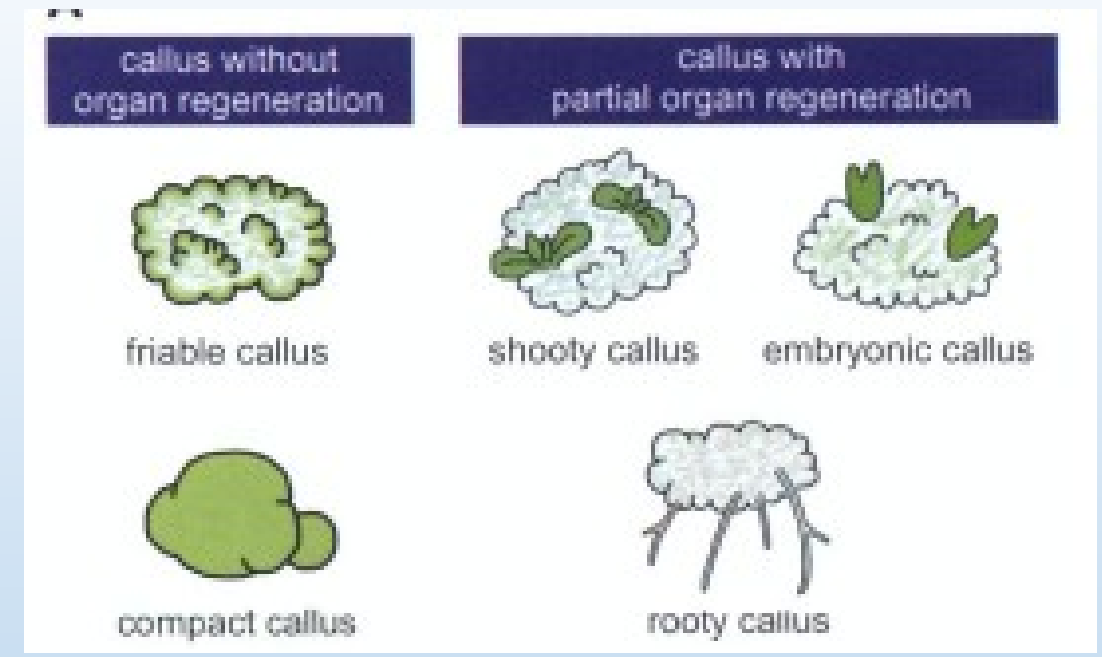


Schéma Bergmannovy techniky výsevu buněk
(Konar 1960)



Kalus - shrnutí

- CIM (callus inducing medium)
 - Auxiny a cytokininy ve středním poměru
 - auxin 2,4-D
- Indukce – růst - organogeneze



DEDIFERENCIACE vs. DIFERENCIACE

