Kultura animalnih i biljnih stanica

KULTURA BILJNOG TKIVA

Drugo predavanje

- Metode mikropropagacije
  - Aksilarni i adventivni pupovi
  - Kultura sjemena i spašavanje embrija
  - Somatska embriogeneza
  - Kultura haploida
- Aklimatizacija na okolišne uvjete

Mikropropagacija

- Brza metoda umnažanja odabrane biljke u svrhu dobivanja velikog broja istovjetnih potomaka.
- Uključuje tehnike kulture biljnog tkiva, odnosno manipulaciju *in vitro*.
- Umnažanje biljaka slabo vijabilnog sjemena ili biljaka koje se teško vegetativno umnažaju
- Koristi se za umnažanje biljaka s posebnim svojstvima, kao što su biljke dobivene genetičkim inženjerstvom ili drugim, konvencionalnim metodama.
- Koristi se za umnažanje zdravih biljaka oslobođenih od patogena





Komercijalna mikropropagacija orhideja



Eksplantat cvjetne stapke







http://www.phillоflowers.com/blog/phalaenopsis-orchids/

Mikropropagacija

kupine



vrhovi izdanaka i aksilarni pupovi

borovnice



mesožderke



iz sjemena ili iz reznica

Orhideje



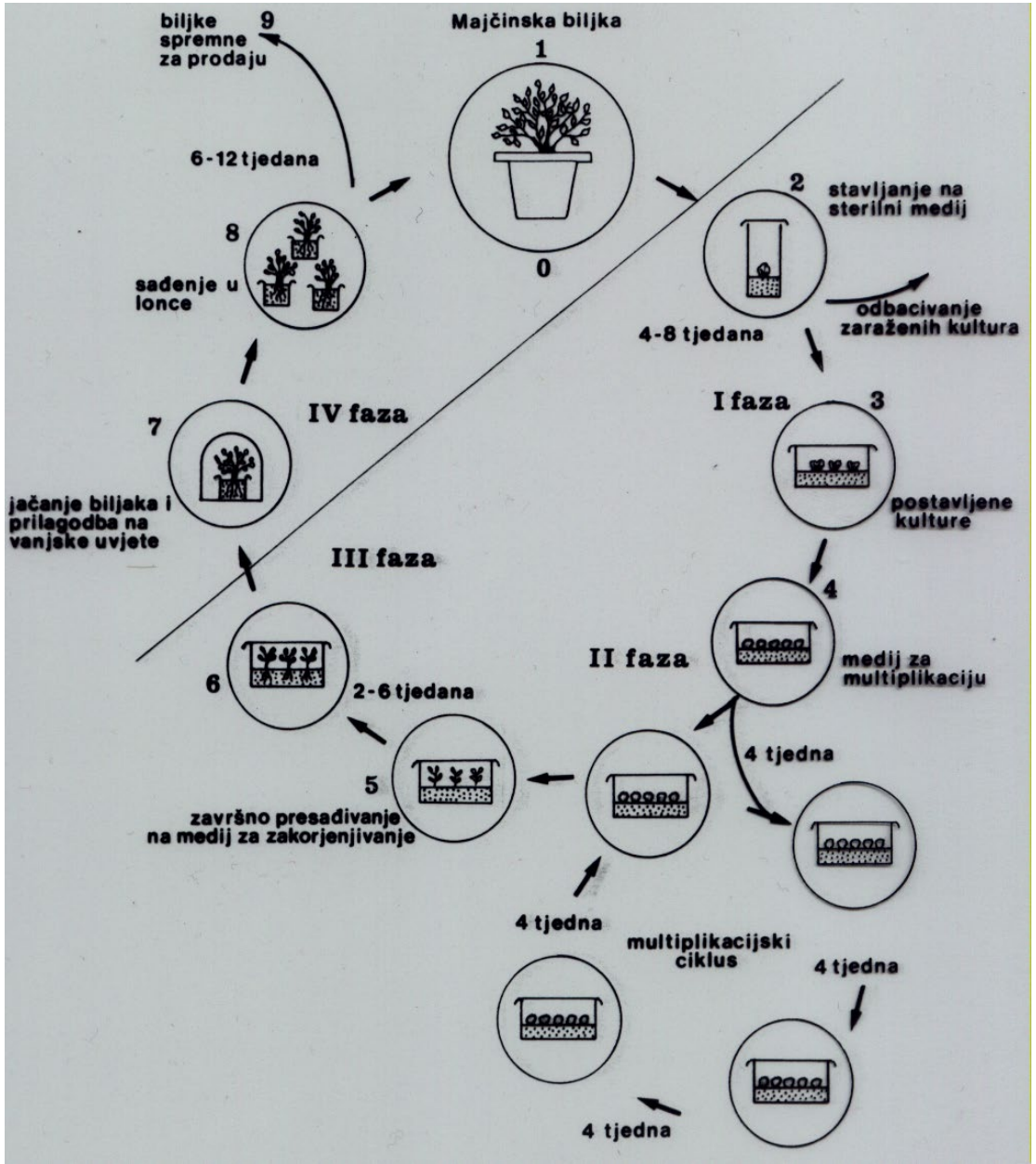
sjeme, listovi, pupovi, dijelovi cvjetne stapke

Bambus



sjeme, cvatovi, vršni meristem, listovi, ali najbolje bočni pupovi mladih biljaka koje ne cvjetaju

Faze mikropropagacije



0. FAZA
Dobivanje biljke donora

1. FAZA
Uvođenje u kulturu *in vitro*

2. FAZA
Umnožavanje

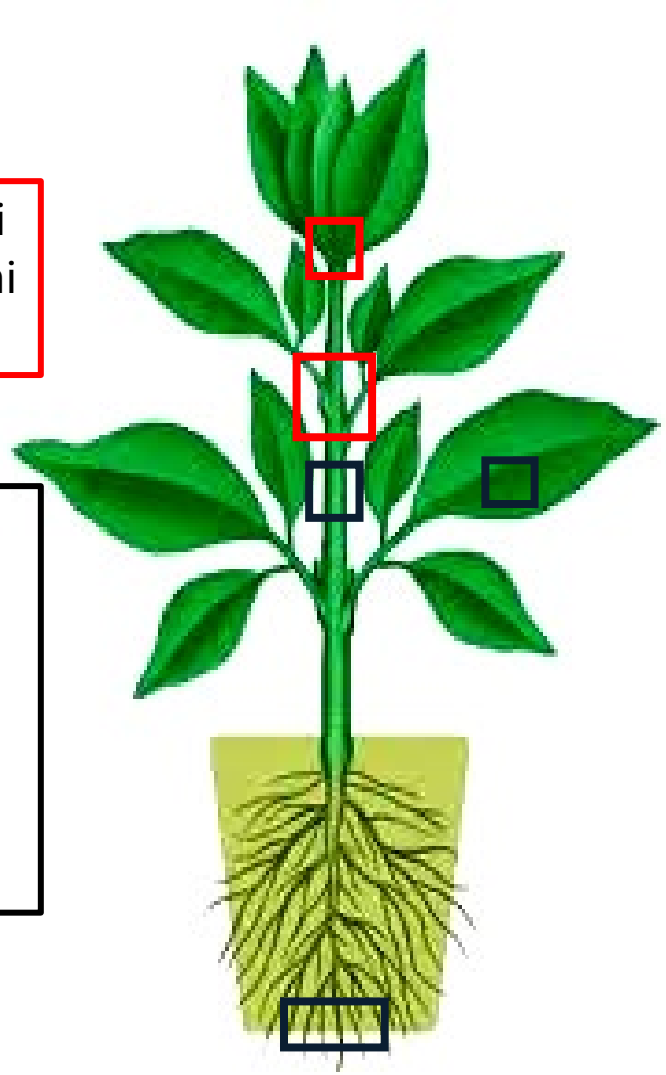
3. FAZA
Zakorjenjivanje

4. FAZA
Prilagodba na vanjske uvjete

Mikropropagacija

Nodalni segmenti – već kompetentni za razvoj izdanka

Adventivni organi – potrebna dediferencijacija pa potom rediferencijacija za razvoj izdanka ili korijena



ORGANOGENEZA

Indukcija izdanaka iz bočnih ili vršnog meristema

Indukcija adventivnih izdanaka na internodiju, listu ili korijenu

EMBRIOGENEZA

Indukcija somatskih embrija

Indukcija haploida

Organogeneza

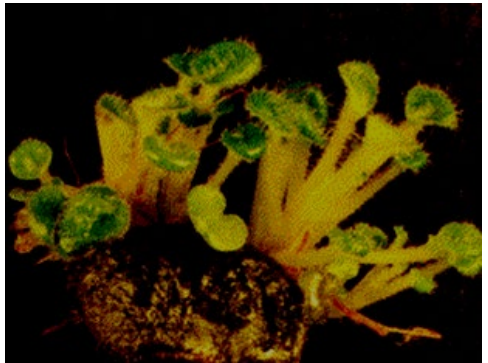
- stvaranje organa *de novo*: inicijacija izdanka i korijenja.
- Kod mikropropagacije nastojimo potaknuti izdanke → najlakše regenerirati kompletnu biljku.
- Biljni regulatori rasta su najvažniji čimbenici organogeneze:

DOGMA ORGANOGENEZE:
citokinin >> auksin = indukcija izdanaka, inhibicija korijenja
auksin >> citokinin = indukcija korijenja i/ili kalusa, inhibicija izdanaka



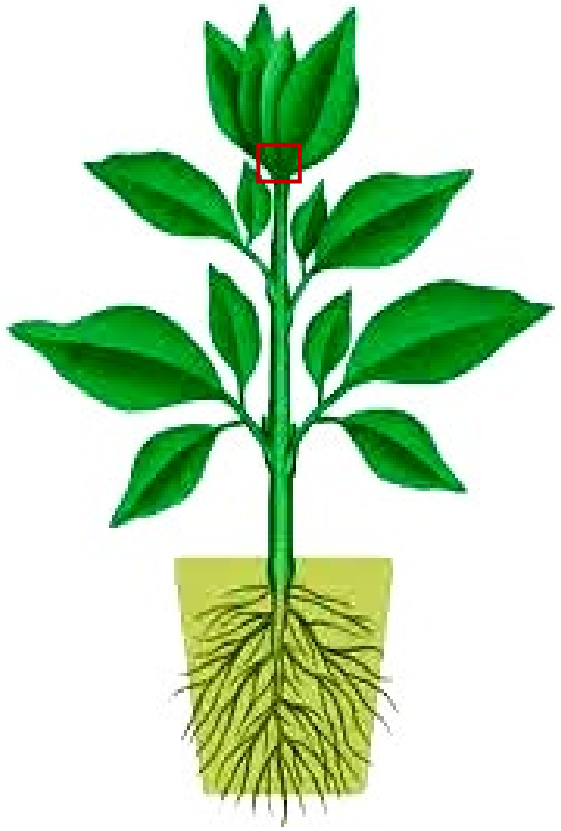
Endogena razina hormona igra važnu ulogu u organogenezi.

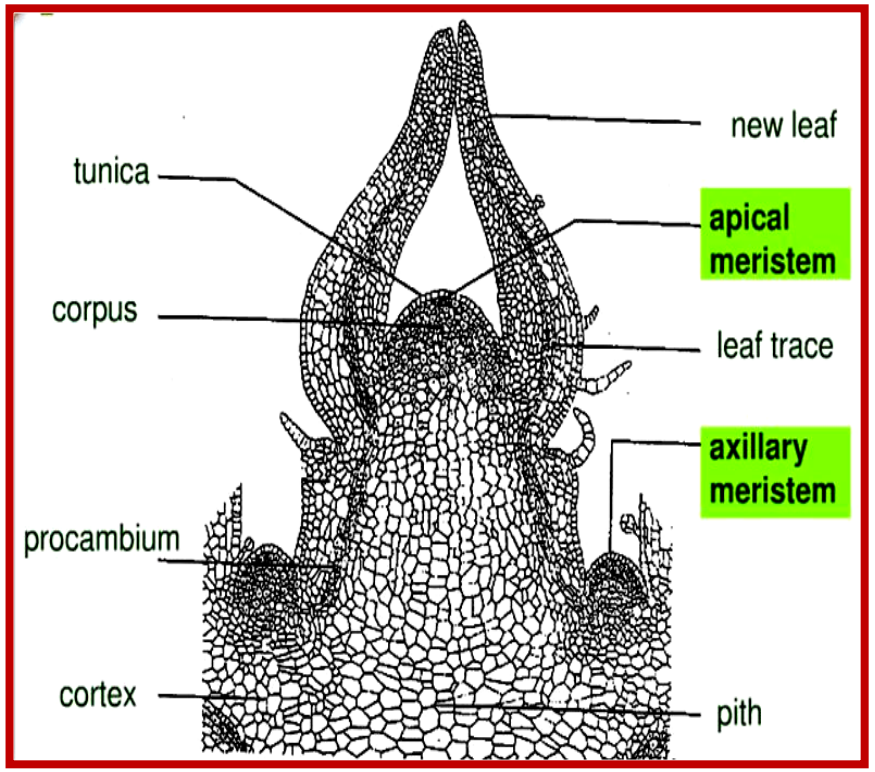
Izdanci mnogih biljaka zakorjenjuju se i bez dodatka auksina.
Nekim biljkama (afrička ljubica) treba dodati više auksina i manje citokinina da bi stvarale izdanke.
Za svaku vrstu/sortu potrebno je razraditi i eksperimentalno utvrditi najbolju metodu umnažanja.



Organogeneza

- Za mikropropagaciju se najčešće koristi vegetacijski vršak (najbolje vršni meristem), bočni (nodalni) pup i list





Kultura nodalnih segmenata

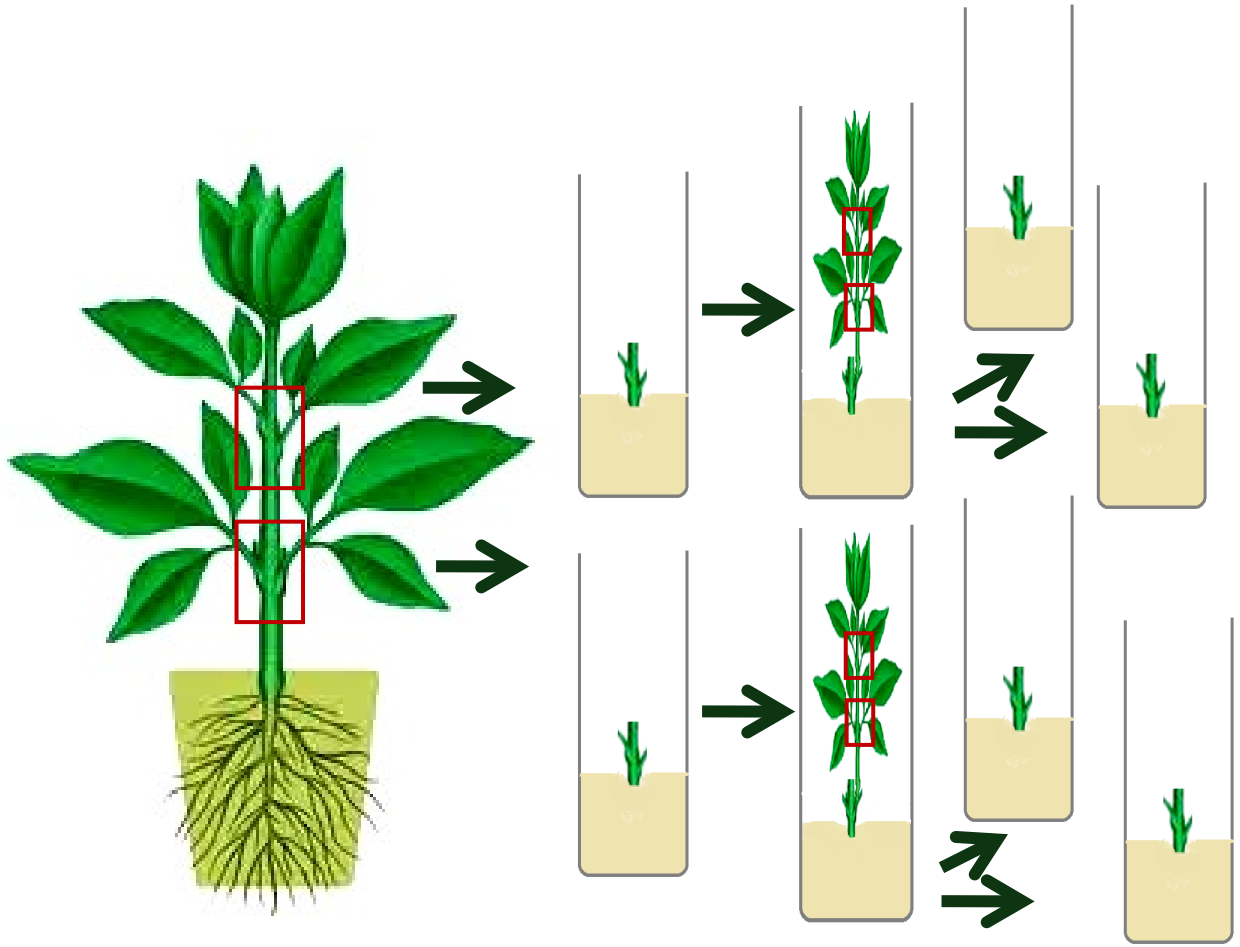
- Nodij = mjesto na stabljici biljke na kojem je prirastao jedan ili više listova.



DOI: 10.1007/s11103-024-01458-5

U pazušcu lista se nalazi bočni pup s meristemom koji je kompetentan za razvoj izdanka.

Kultura nodalnih segmenata
poticanje rasta aksilarnih pupova



Multiplikacija izdanaka

Genetički identične biljke – pravi klonovi

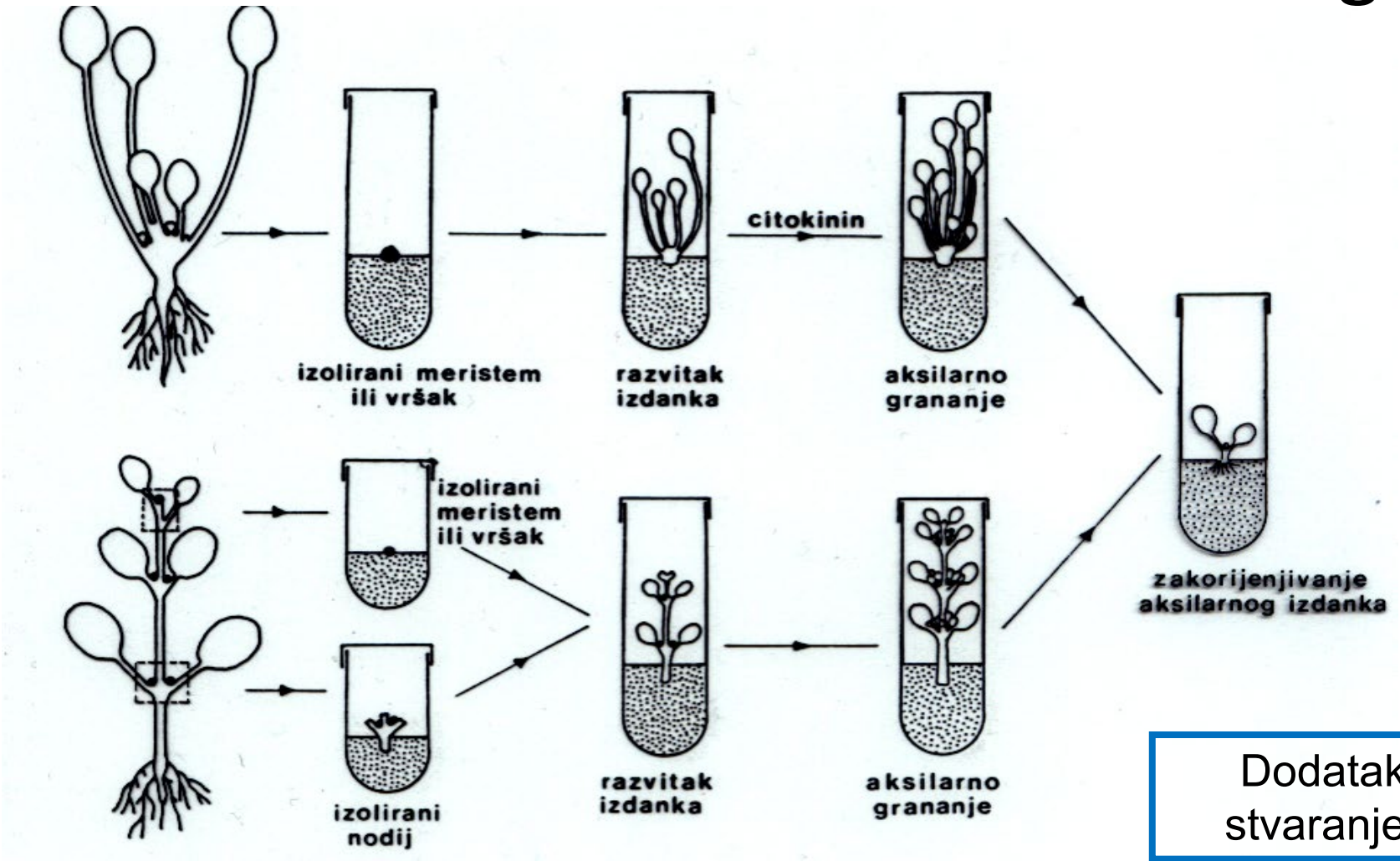
6 izdanaka / pasaži

6 pasaža na godinu

6^6 = 46 656 biljaka na godinu

Iz vršnog ili bočnog meristema se regenerira izdanak koji se zakorijeni i prenese u zemlju

Kultura nodalnih segmenata
poticanje rasta aksilarnih pupova
aksilarno grananje

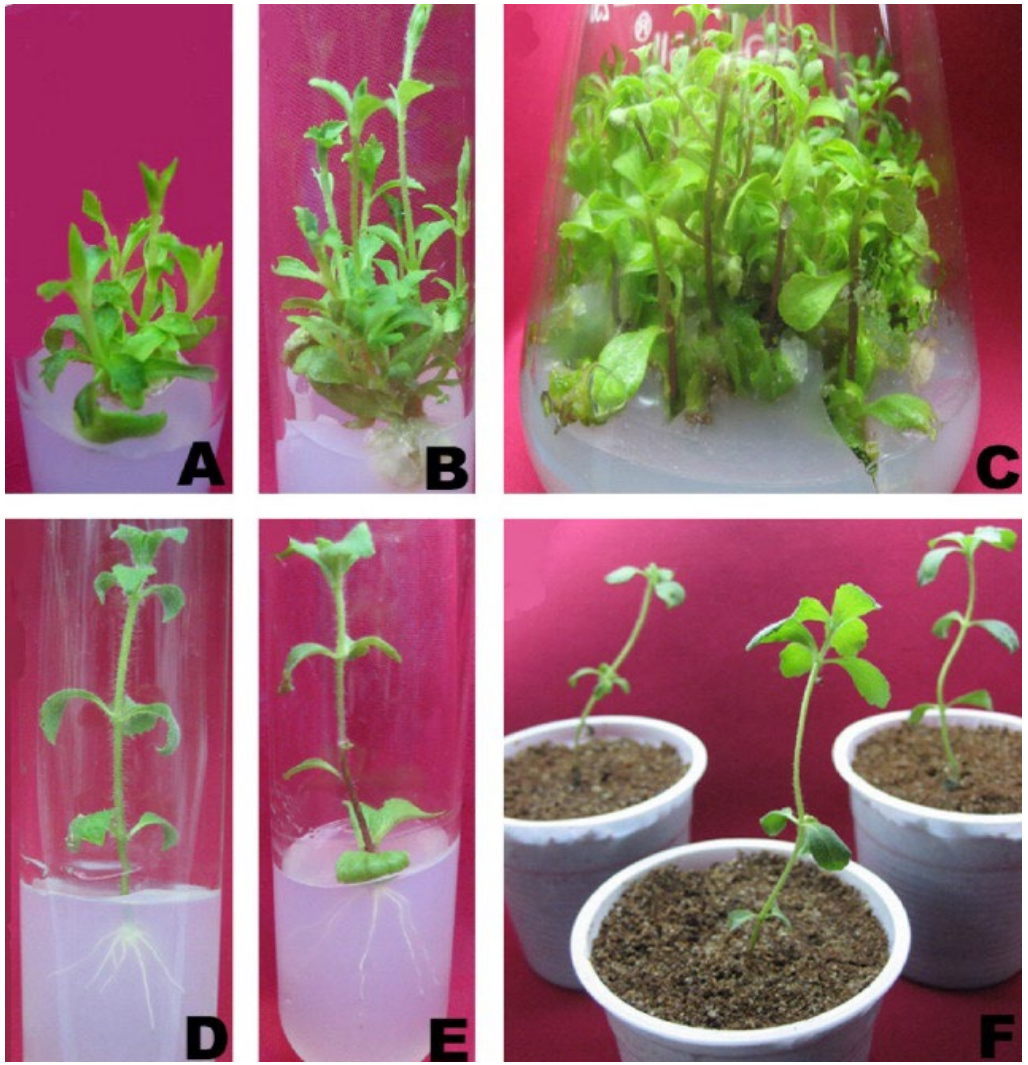


Dodatak **citokinina** potiče stvaranje multiplih izdanaka

Kultura nodalnih segmenata
poticanje rasta aksilarnih pupova

- U prirodi je vršni pup najčešće dominantan
- Aplikacijom citokinina uklanja se dominacija vršnog pupa i potiče razvoj bočnih pupova
- Nastali izdanci se odvajaju i zakorjenjuju
- Nastali izdanci genetički su stabilni i identični majčinskoj biljci
- Umnažanje biljaka metodom aksilarnih pupova je najpogodnija metoda ukoliko želimo regenerirati prave klonove.

Kultura nodalnih segmenata
poticanje rasta aksilarnih pupova



Dodatak citokinina potiče stvaranje multiplih izdanaka na eksplantatu nodalnog segmenta (**C**).

Pojedinačni izdanci se odvajaju i presađuju na medij za zakorjenjivanje (**D** i **E**).
Kompletne biljčice se presađuju u zemlju (**F**).

Large scale *in vitro* propagation of *Stevia rebaudiana*
Industrial Crops and Products 37, 2012

Kultura nodalnih segmenata

Growth Regulator	Conc. (µM)	Average no. of shoots	Average shoot length (cm)	% of explant producing shoots
BA	0.05	2.2 ef	2.6 de	50.0
	0.25	2.6 def	3.1 cde	66.6
	0.50	3.0 de	3.2 cde	72.2
	2.5	5.2 bc	2.8 de	72.2
	5.0	6.3 b	3.4 cde	61.1
	7.0	2.8 def	3.2 cde	55.5
	9.0	2.6 def	2.6 de	33.3
Kn	0.05	1.3 f	2.5 e	61.1
	0.25	1.6 ef	2.6 de	72.2
	0.5	2.6 def	2.5 e	77.7
	2.5	5.6 bc	3.5 cd	83.3
	5.0	4.2 cd	2.8 de	50.0
	7.0	2.2 ef	2.7 de	55.5
	9.0	1.6 ef	3.1 cde	44.4
TDZ	0.05	4.2 cd	3.5 cd	94.4
	0.25	6.6 b	3.7 c	94.4
	0.5	12.6 a	7.1 a	100.0
	2.5	11.1 a	6.1 b	94.4
	5.0	5.8 b	3.2 cde	83.3
	7.0	2.5 def	2.8 cde	77.7
	9.0	1.5 ef	2.5 e	72.2

Uspostavljanje metode mikropropagacije multiplim izdancima

Učinak različitih tipova i koncentracija citokinina na množenje i proliferaciju nodalnih eksplanta kanabisa (*Cannabis sativa*) *in vitro*



Kultura nodalnih segmenata

Growth Regulator	Conc. (µM)	Average no. of shoots	Average shoot length (cm)	% of explant producing shoots
BA	0.05	2.2 ef	2.6 de	50.0
	0.25	2.6 def	3.1 cde	66.6
	0.50	3.0 de	3.2 cde	72.2
	2.5	5.2 bc	2.8 de	72.2
	5.0	6.3 b	3.4 cde	61.1
	7.0	2.8 def	3.2 cde	55.5
	9.0	2.6 def	2.6 de	33.3
Kn	0.05	1.3 f	2.5 e	61.1
	0.25	1.6 ef	2.6 de	72.2
	0.5	2.6 def	2.5 e	77.7
	2.5	5.6 bc	3.5 cd	83.3
	5.0	4.2 cd	2.8 de	50.0
	7.0	2.2 ef	2.7 de	55.5
	9.0	1.6 ef	3.1 cde	44.4
TDZ	0.05	4.2 cd	3.5 cd	94.4
	0.25	6.6 b	3.7 c	94.4
	0.5	12.6 a	7.1 a	100.0
	2.5	11.1 a	6.1 b	94.4
	5.0	5.8 b	3.2 cde	83.3
	7.0	2.5 def	2.8 cde	77.7
	9.0	1.5 ef	2.5 e	72.2

Stvaranje multiplih izdanaka na MS sa 0.5 µM TDZ

Ukorijenjivanje u mediju 1/2 MS uz dodatak 500 mg/L aktivnog ugljena i 2.5 µM IBA



Kultura adventivnih organa

- Adventivno = razvitak struktura iz začetka, na neuobičajenim mjestima, iz nemeristemskih stanica

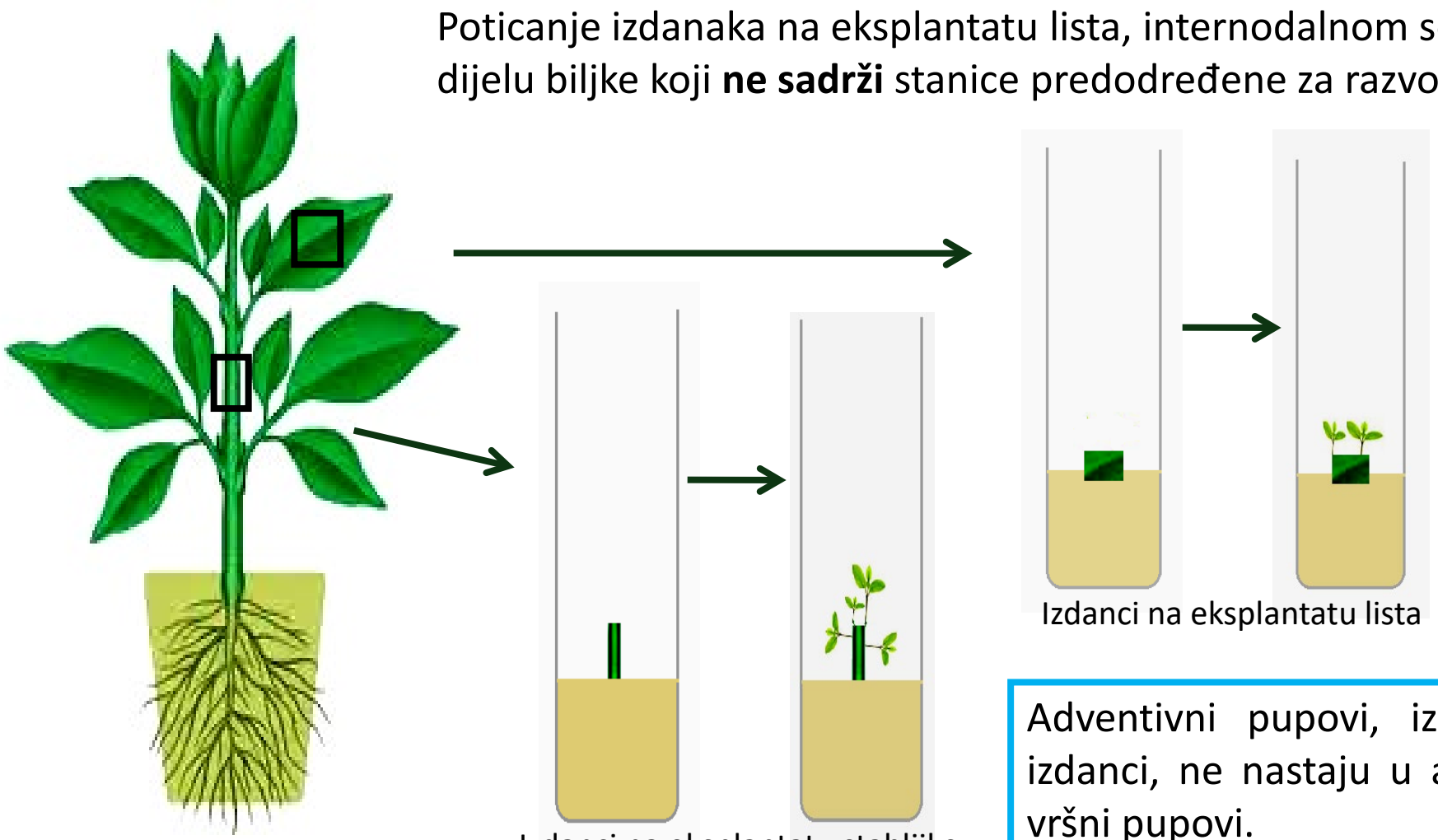






Kultura adventivnih organa
stvaranje adventivnih izdanaka

Poticanje izdanaka na eksplantatu lista, internodalnom segmentu ili nekom drugom dijelu biljke koji **ne sadrži** stanice predodređene za razvoj izdanka.

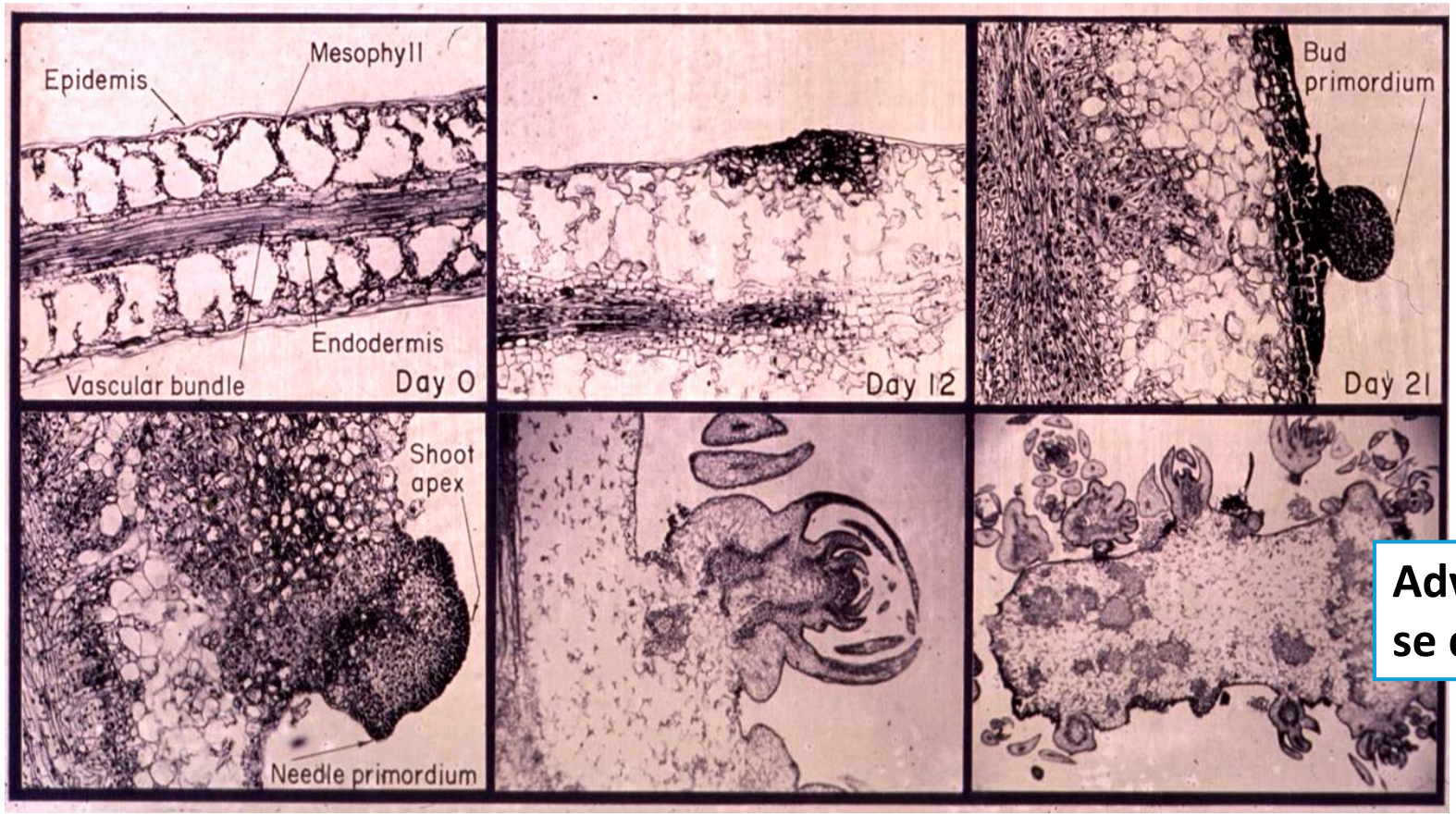


Izdanci na eksplantatu stabljike

Izdanci na eksplantatu lista

Adventivni pupovi, iz kojih se razvijaju adventivni izdanci, ne nastaju u apikalnom vršku, kao aksilarni i vršni pupovi.

Kultura adventivnih organa
stvaranje adventivnih izdanaka

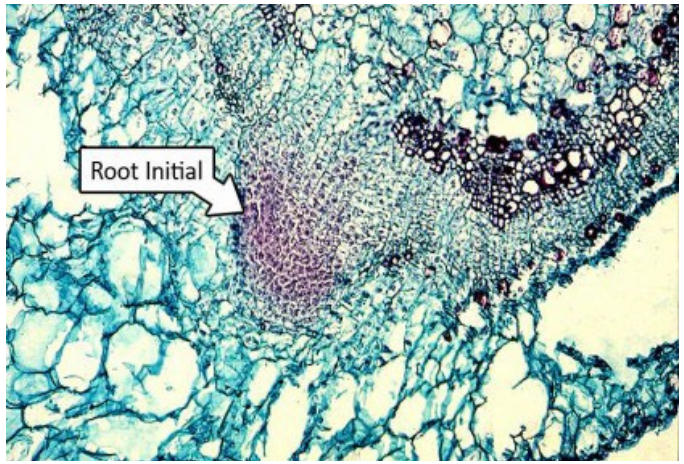


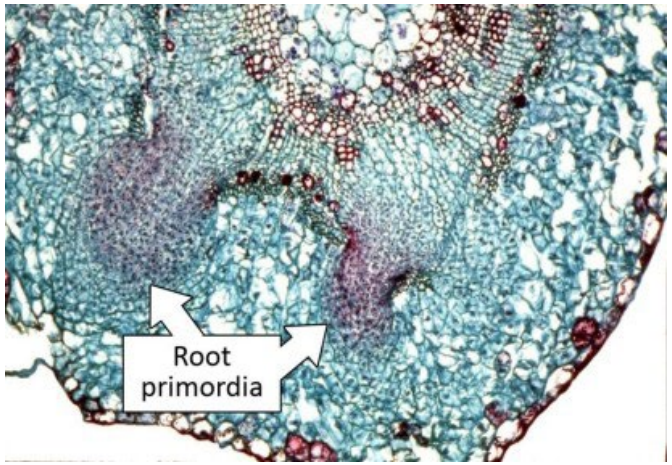
Adventivni izdanci potiču se dodatkom citokinina

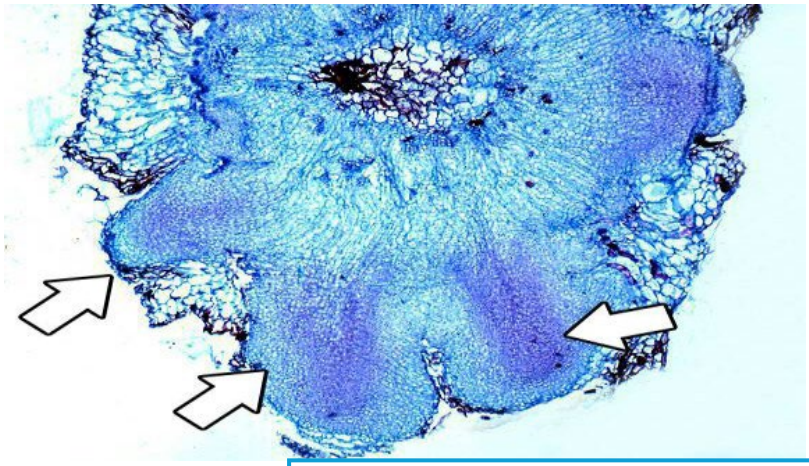
Stanice mezofila lista se dediferenciraju, učestalo se dijele i formiraju pup.
Rediferencijacijom stanica nastaje meristemska struktura iz koje se razvija prvo pup pa izdanak.

Kultura adventivnih organa
stvaranje adventivnog korijenja

- Dediferencijacija stanica (obično parenhim floema)
- Dioba stanica – u početku nasumična, a zatim polarna
- Organizacija korijenskog meristema i korijenskog primordija
- Povezivanje korijenskog primordija s provodnim tkivom i razvoj korjenove kape
- Izbijanje korijena kroz epidermu stabljike

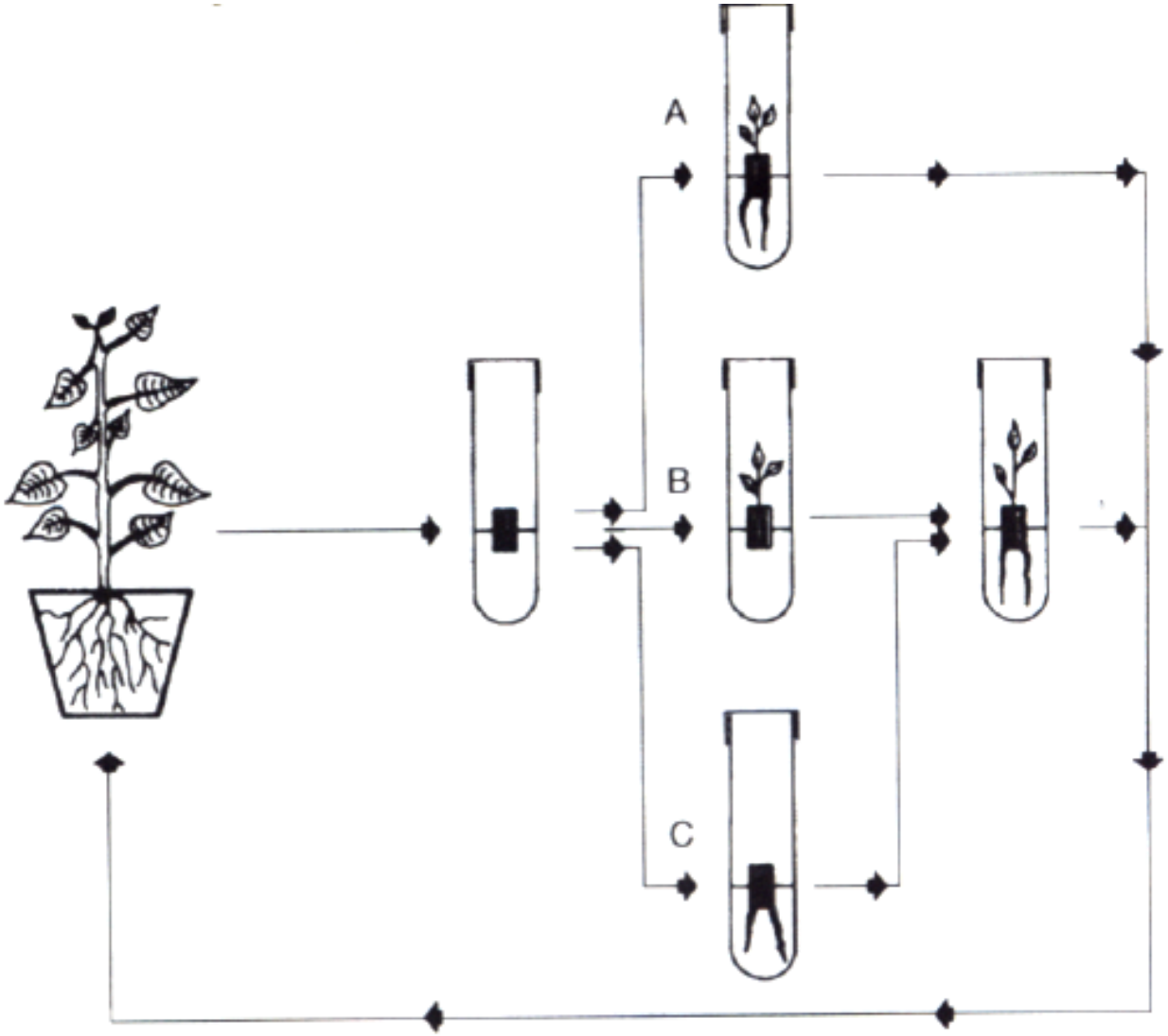






Advenivno korijenje potiče se dodatkom auksina.

Mikropropagacija adventivnim organima



A) Simultana regeneracija izdanka i korijena
B) Regeneracija samo izdanka
C) Regeneracija samo korijena

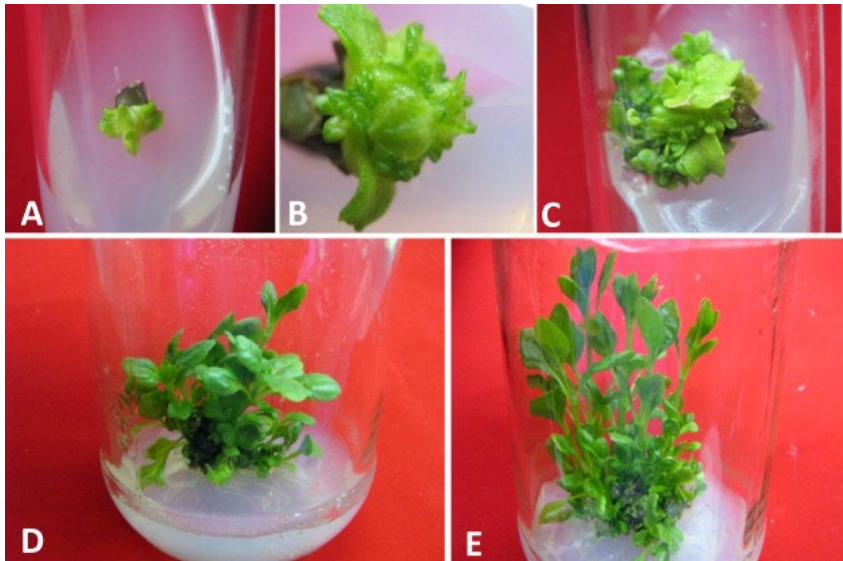
Za B) i C) promjena podloge kako bi se induciralo adventivno korijenje (B) ili adventivni izdanci (C).

Regeneracija kompletne biljke koja se prenosi u vanjske uvjete

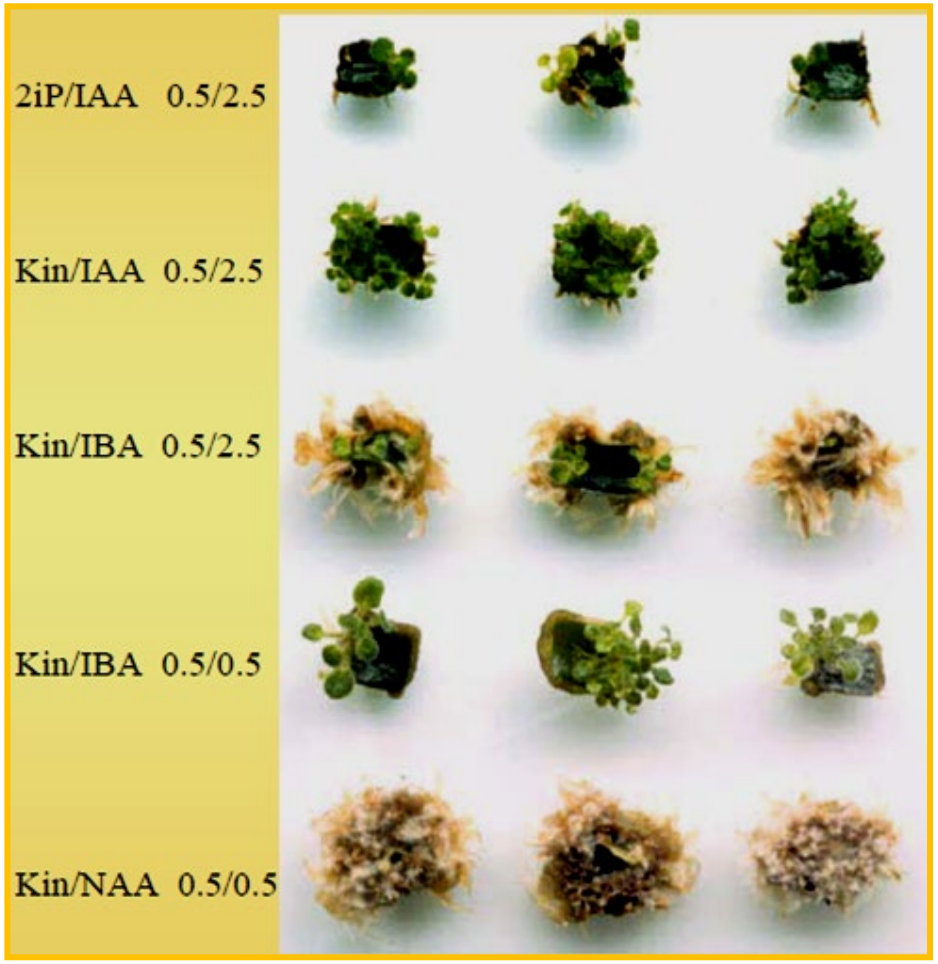
Mikropropagacija adventivnim organima

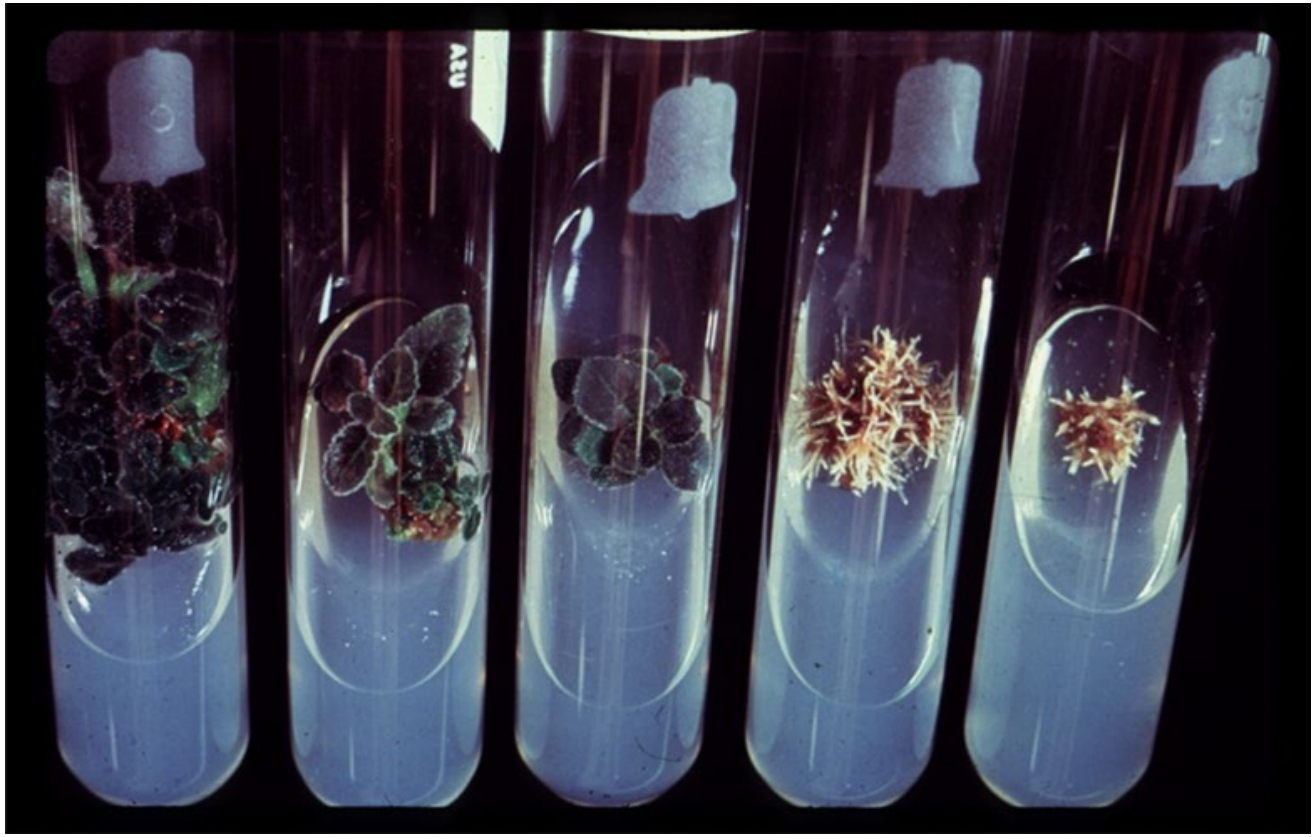


- **U kratkom roku, mikropropagacijom adventivnim izdancima, moguće je proizvesti milijune sadnica.**
- U teoriji, moguće je potaknuti adventivne izdanke na bilo kojem eksplantatu bilo koje biljke, no u praksi je to teško postići.
- Često je traganje za najpogodnijim sastavom hranjive podloge za indukciju adventivnih pupova i najpogodnijim eksplantatom za mikropropagaciju bezuspješno, a uvijek je mukotrpno.



Mikropropagacija adventivnim organima



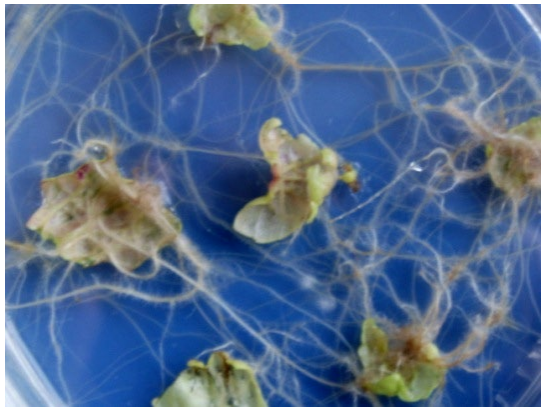


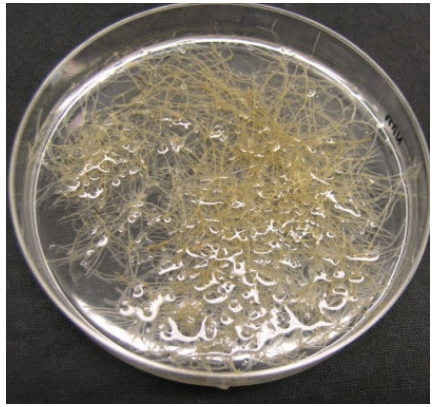
BA	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	mg/L
NAA	0	0.1	0.3	1.0	3.0	

Kultura korijena

Indukcija korijenja: na bilo kojem tipu eksplantata, uz dodatak auksina.







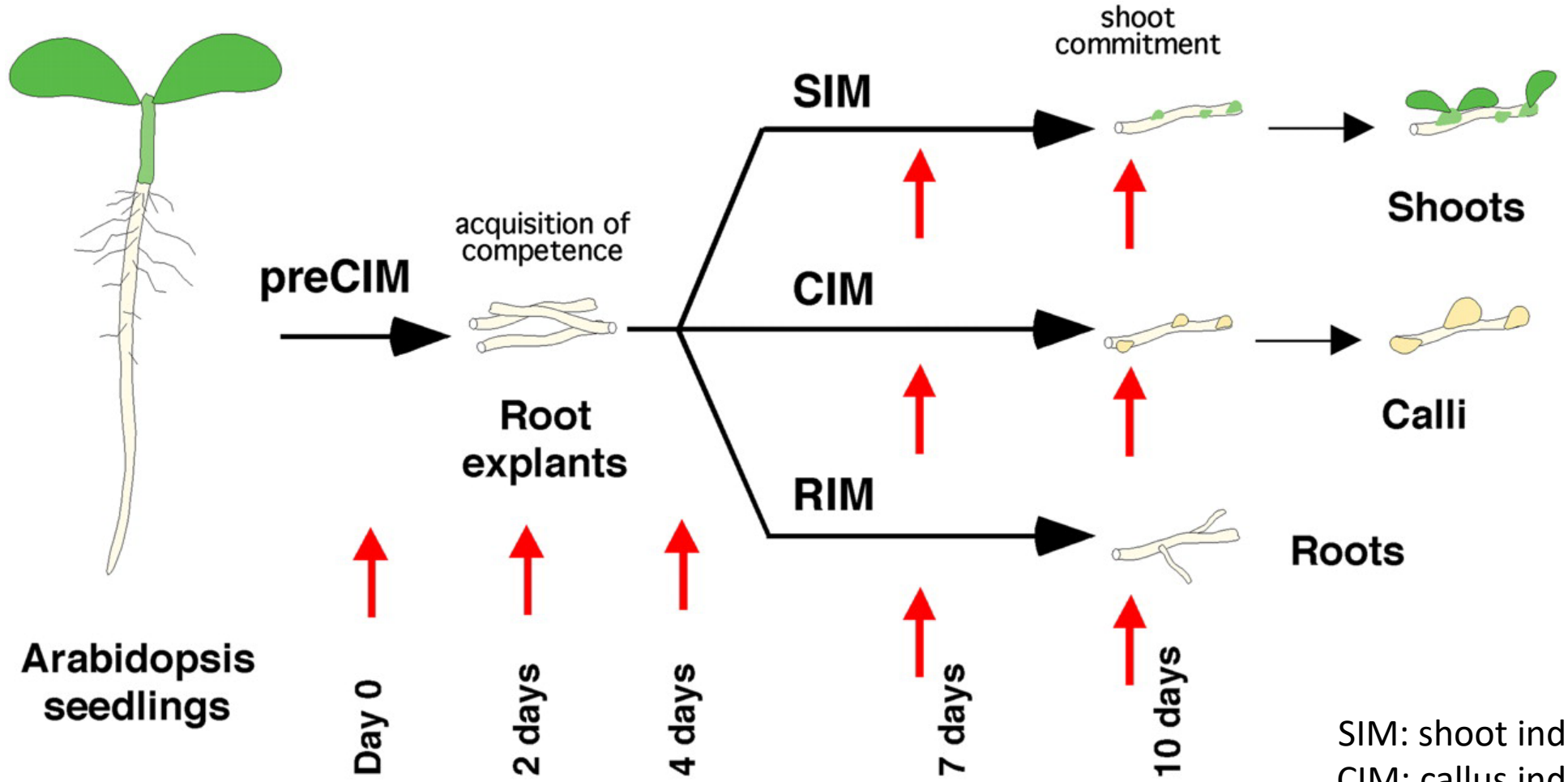


Kultura korijena u bioreaktoru

Uzgoj: kultura korijenja je praktički beskonačna.
Dobro raste u tekućoj podlozi koja se miješa, prozračuje ili je statična.

Korijenje dobro apsorbira hranjive tvari iz podloge i brzo raste – pogodno za biotehnološku proizvodnju biljnih metabolita.

Indukcija adventivnih izdanaka i kalusa na eksplantatu korijena uročnjaka



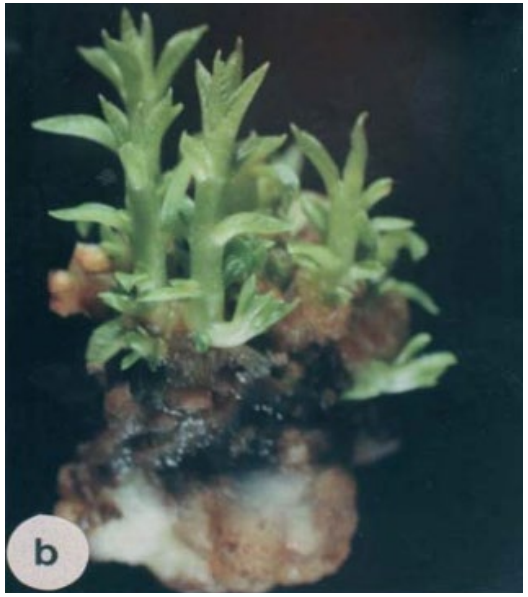
SIM: shoot inducing medium
CIM: callus inducing medium
RIM: root inducing medium

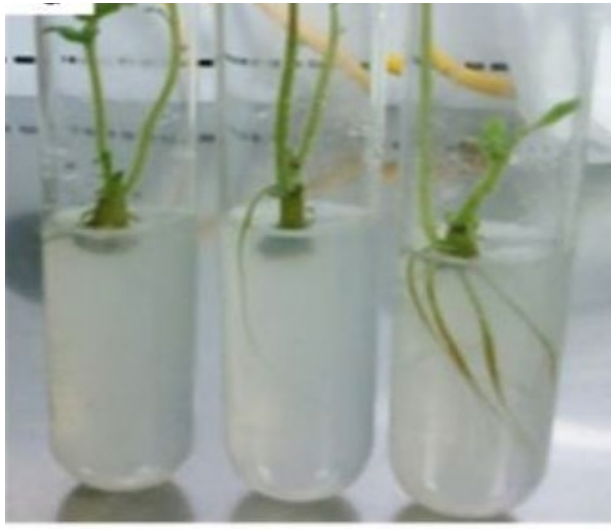
Regeneracija izdanaka

Direktna organogeneza vs. *Indirektna organogeneza*



Zakorijenjivanje

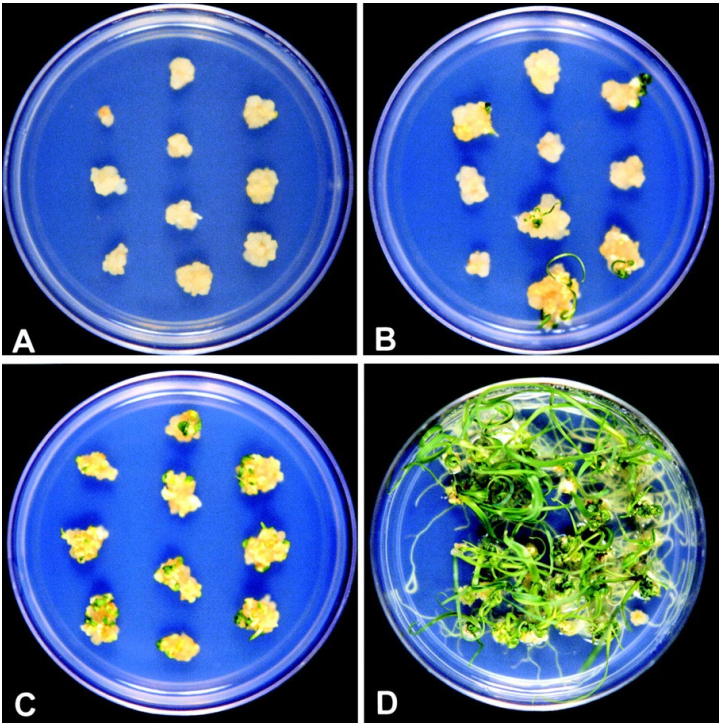




Izdanci regenerirani iz kalusa nisu nužno genetički identični!

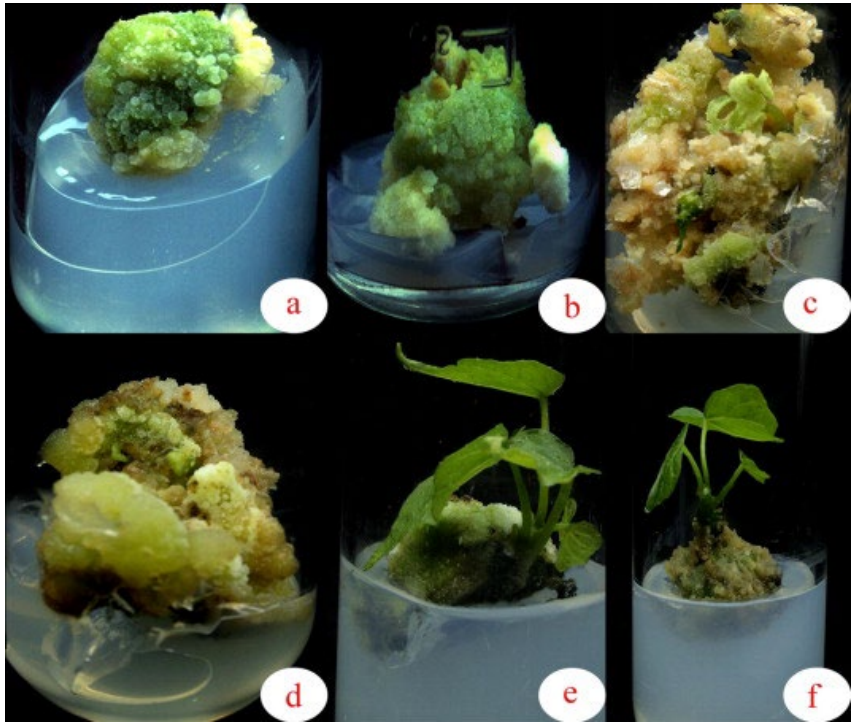
Indirektna (posredna) organogeneza

- Stvaranje adventivnih izdanaka i korijenja iz kalusa
- može biti spontano (zbog endogene razine hormona) ili pod utjecajem egzogeno dodanih regulatora rasta
- Kultura kalusa je podložna različitim genskim modifikacijama, pa biljke regenerirane posrednom organogenezom ne moraju nužno biti pravi klonovi majčinske biljke.



Centar proliferacije stanica u kalusu naziva se meristemoid.

Jedan meristemoid može regenerirati u više adventivnih izdanaka i oni iz istog meristemoida su klonovi. Ukoliko se izdanak razvije iz više meristemoida može biti himera.



Regulacija organogeneze

- Svi dosadašnji pokazatelji upućuju na to da se potpuno diferencirana biljna stanica može dediferencirati, te potom njenom diobom i diferencijacijom stanica kćeri, mogu nastati tkiva, organi i/ili kompletna biljka

Geni važni za stvaranje meristemoida *de novo*

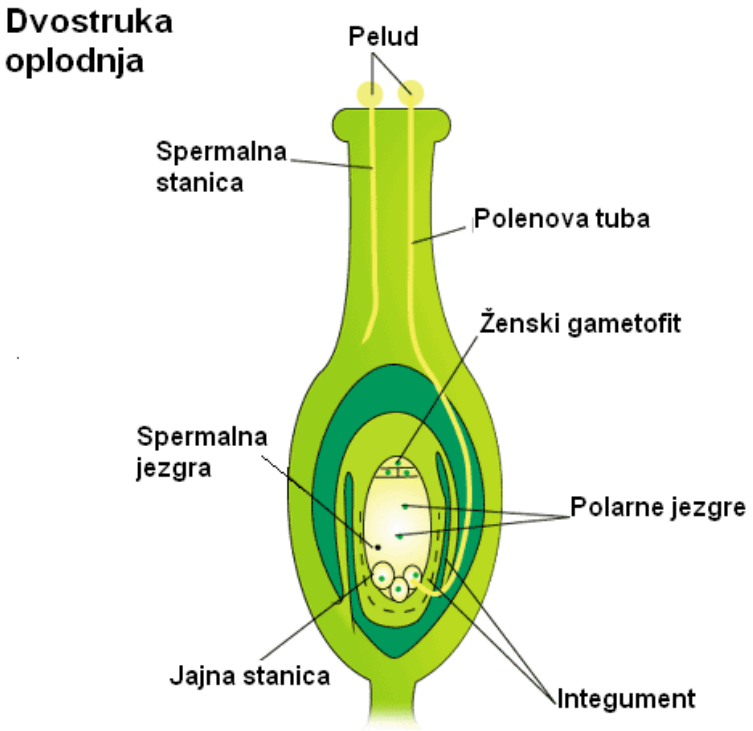
Table 1. List of gene families involved in *de novo* shoot and/or lateral root organogenic processes[a]

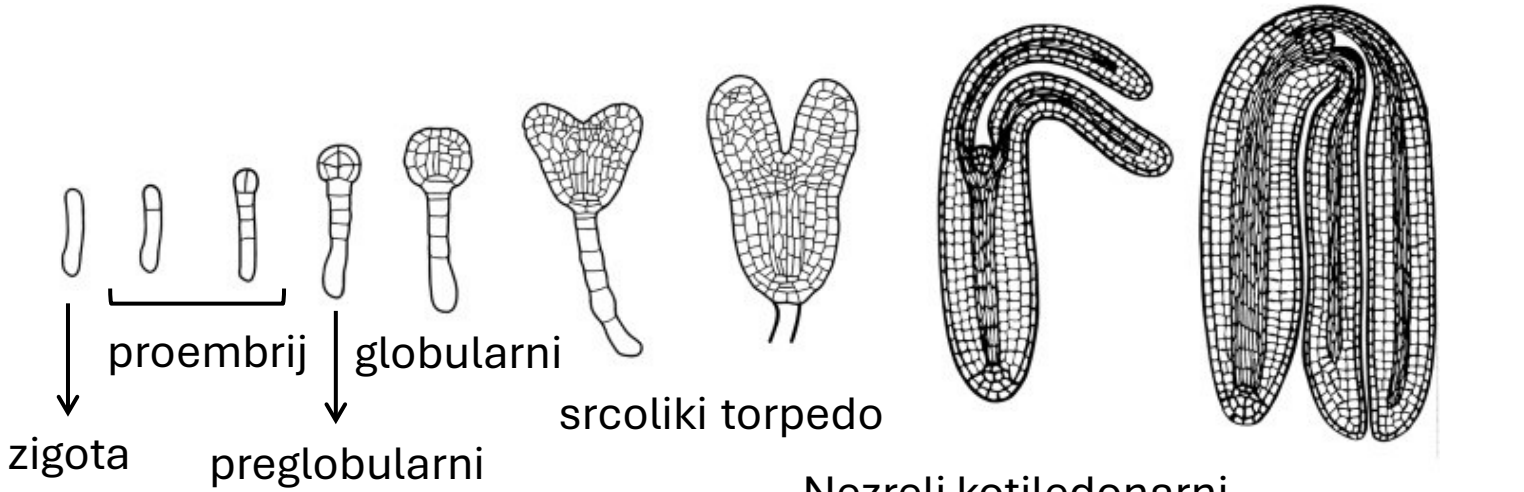
Family	Name	Role during *de novo* shoot organogenesis	Gene expression patterns during *de novo* shoot development	
			CIM	SIM
Cytokinin receptor	AHK2	*ahk* mutants are resistant to *de novo* shoot organogenesis.	Downregulated	Downregulated
	AHK3		No change	Downregulated
	AHK4/CRE1/WOL1		Downregulated	Upregulated
Type A-ARR (negative regulators of cytokinin pathway)	ARR3, ARR5, ARR6, ARR7, ARR16	Cytokinin-induced shoot regeneration capacity is compromised in transgenic *Arabidopsis* plants overexpressing type *A-ARR* genes. *ARR15* is a key gene in the competence acquisition phase and *ARR5* indicates the early stages of callus formation.	No change	Upregulated
	ARR15		Downregulated	Upregulated
Type B-ARR (transcription factors of cytokinin pathway)	ARR1	Ectopic expression of type *B-ARR* genes promotes cytokinin responses and shoots formation without cytokinin.	No change	Downregulated
	ARR2		Downregulated	Downregulated
	ARR10		No change	Upregulated
	ARR11		Downregulated	Downregulated
	ARR12		Downregulated	No change
	ARR14		Upregulated	Upregulated
Auxin related genes	IAA1/AXR5, IAA26, IAA12/BLD	The *AUX/IAA* genes are affected during *de novo* shoot organogenesis.	Upregulated	Upregulated
	IAA2, IAA3/SHY2		Upregulated	No change
	IAA5, IAA14/SLR, IAA19/MSG2, IAA20		Upregulated	Downregulated
	IAA28		Downregulated	No change
Auxin transport	PIN1, PIN4, PIN6, PIN7	Auxin carriers are important for the auxin distribution and patterning of the *de novo* meristem.	Upregulated	Upregulated
	PIN2, PIN5		Downregulated	Downregulated
	PIN3, AUX1		Upregulated	No change
SAM related genes	WUS, STM	The shoot apical meristem-related genes are involved in *de novo* shoot initiation and development.	No change	Upregulated
	CLV3, CUC1, CUC2, RGD3		Upregulated	Upregulated
	CUC3		Downregulated	No change
	RID3		Upregulated	No change
AP2/ERF	ESR1	*ESR2* is involved in shoot formation through transcriptional regulation of CUC1. *ESR1* confer cytokinin-independent shoot formation, could interact with HD-ZIP III proteins and is a direct target of MONOPTEROS. RAP2.6L is a key gene of *de novo* shoot regeneration.	?	?
	ESR2, RAP2.6		Upregulated	Upregulated
	BBM (BABY BOOM), PUCHI		Upregulated	Downregulated
Class III HD-ZIP	ATHB15/HOC, ATHB8, PBV (PHABULOSA), PHV (PHAVOLUTA), REV (REVOLUTA)	The *Arabidopsis* mutant *hoc* overproduces cytokinin and displays the unique capability to regenerate whole plants from root explants grown on medium without added phytohormones.	Upregulated	Upregulated

Duclercq et al. Trends in plant science 2011

Embriogeneza

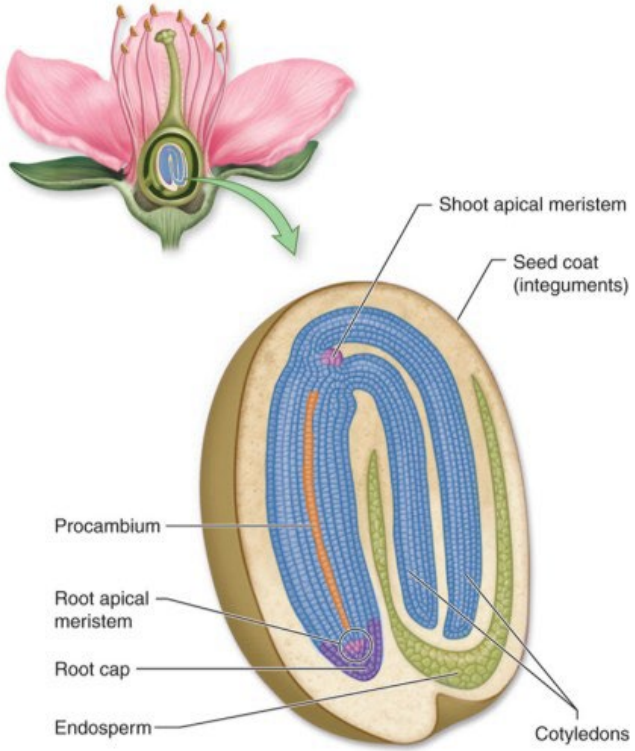
- proces razvoja višestaničnog organizma iz jedne (oplođene) stanice



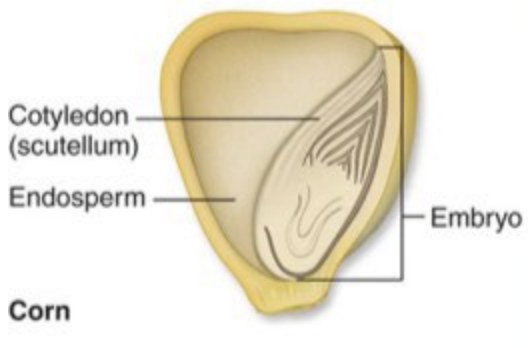


Kultura sjemena

- biljke koje imaju slabo klijavo sjeme (npr. orhideje)
- selekcija i probir biljaka s posebnim svojstvima (npr. transformanti uročnjaka, probir biljaka nakon mutageneze)
- jedinke s posebnim svojstvima koje produciraju malo sjemena (nakon asistiranog oprašivanja)

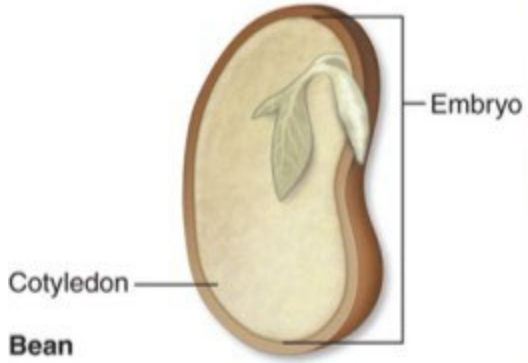


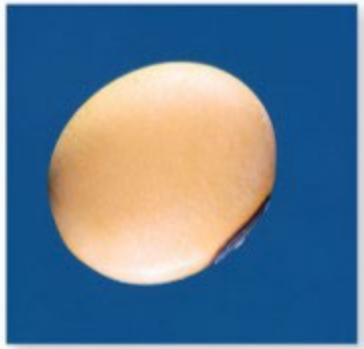
Sjemenke nastaju spolnim razmnožavanjem:
•Embrijo: jajna stanica + spermalna stanica (2n)
•Endosperm: centralna stanica + spermalna stanica (3n)





© photocuisine/Corbis

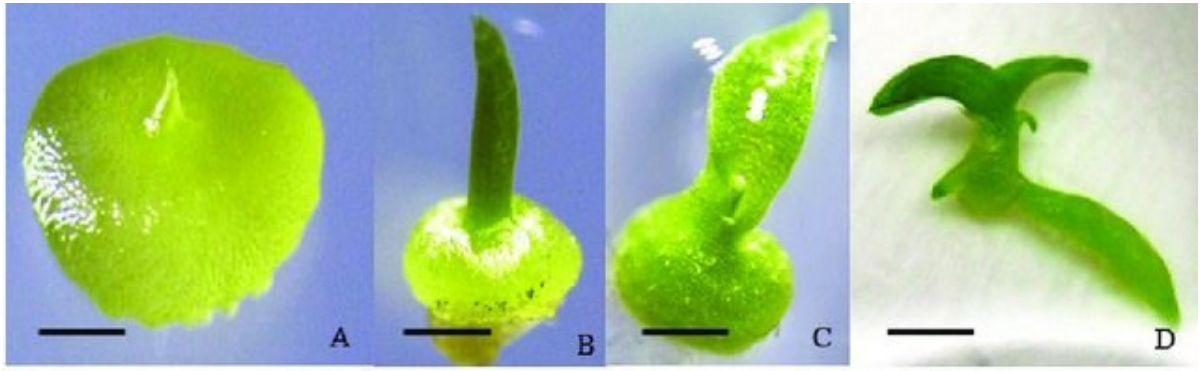




Kultura sjemena

- Omogućava proizvodnju cijele biljke izravno iz sjemena.
- Sjemenke se mogu čuvati kroz dulji vremenski period i sterilizirati agresivnijim sredstvima (otpornije na negativne učinke sterilizacijskih sredstava, npr. isušivanje etanolom) nego svježe/zeleno tkivo.
- Sjeme često zahtijeva kemijske ili mehaničke stimulanse za poticanje klijanja biljaka. Biljke iz sjemena rastu puno brže na umjetnim podlogama nego u zemlji.
- Kada sjeme ima tvrdu vanjsku lupinu treba mu više vremena da proklija u poljskim uvjetima.
- Neke sjemenke ne mogu klijati zbog tvrde sjemene lupine, pa se iz njih mogu izolirati embriji i uzgajati u kulturi *in vitro*

Orhideja je čest primjer biljke koja se u kulturi uzgaja iz sjemena jer u zemlji sjemenke slabo kliju budući da je klijavost ovisna o simbiotskim gljivicama.
Multiplikacija orhideja kulturom organa (iz cvjetne stapke, listova i dr.) je moguća, ali je rast i regeneracija biljaka sporija pa se često sa mikropropagaciju koristi kultura sjemena.



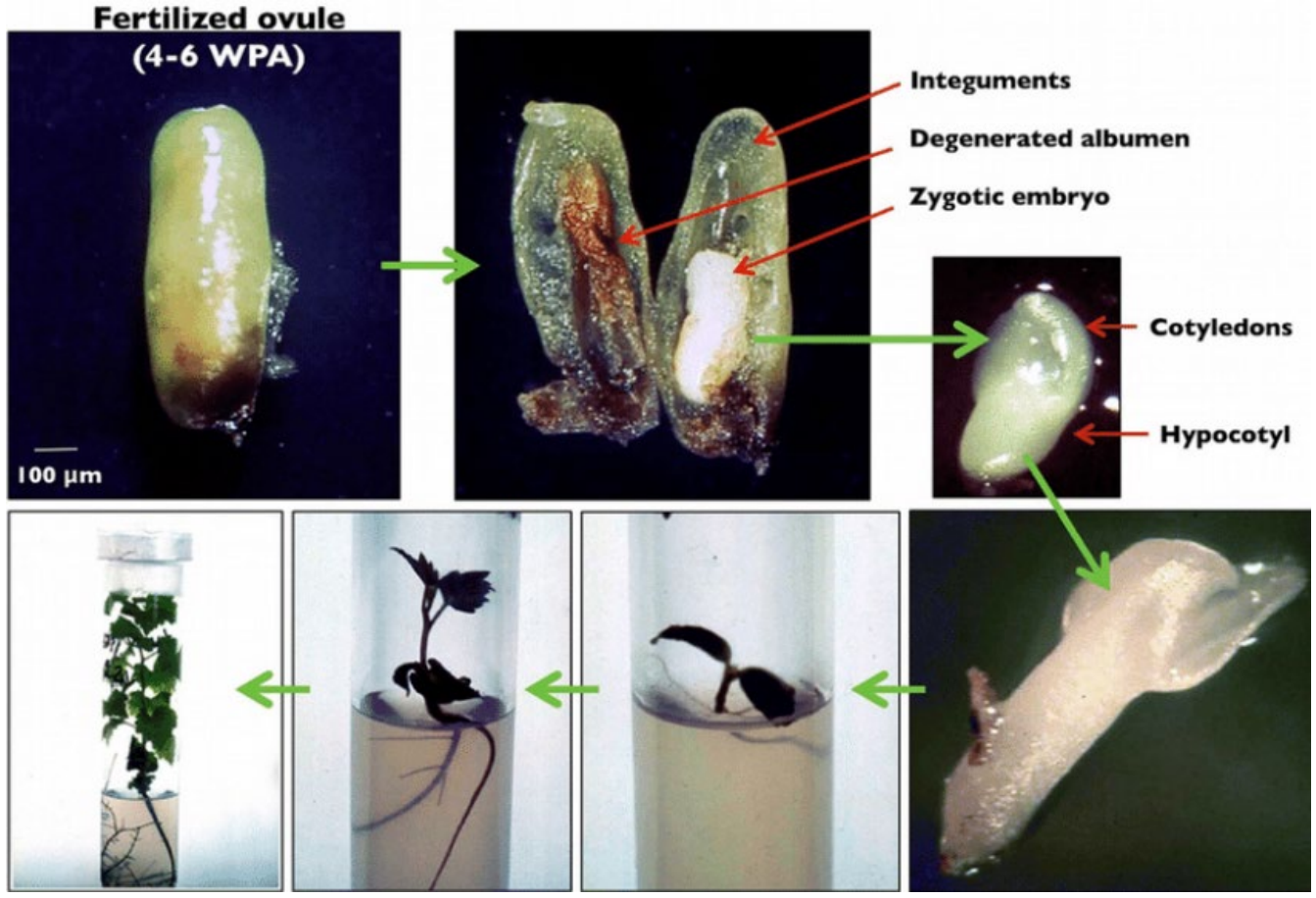
Kultura embrija

- Nakon sterilne izolacije embrija iz zrelih ili nezrelih sjemenki u *invitro*uvjetima regenerira se kompletna biljka.
- Embriji su pogodni za oplemenjivanje: transformacije i mutagenezu
- Ovisno o vrsti embrija koji se unosi u kulturu:
  - **Kultura zrelih embrija**: proces uzgoja zrelih izoliranih embrija u slučaju kada embriji brzo gube vijabilnost u *in vivo* uvjetima, embriji ne mogu probiti tvrdu sjemenu lupinu i izrasti u biljku ili kada je klijanje sjemena inhibirano.
  - **Kultura nezrelih embrija**: uzgoj nezrelih, slabih ili malih embrija koji se u prirodnim uvjetima ne uspijevaju razviti u hibridne biljke zbog zastoja u embrionalnom razvoju ili degeneracije endosperma.
- Tehnika **embryo rescue/spašavanje embrija**, jer se uzgojem embrija *in vitro* potiče razvoj u potpunu biljku.

Kultura embrija – embryo rescue

- Tehnika koja se koristi za uzgoj biljaka iz embrija nastalih križanjem različitih vrsta ili hibrida.
- Nezreli embriji, koji obično ne bi preživjeli do zrelosti *in situ* se izoliraju i uzgajaju *in vitro* u normalnu biljčicu.

- Koristi se za spašavanje zametaka iz ranih sorti voća.



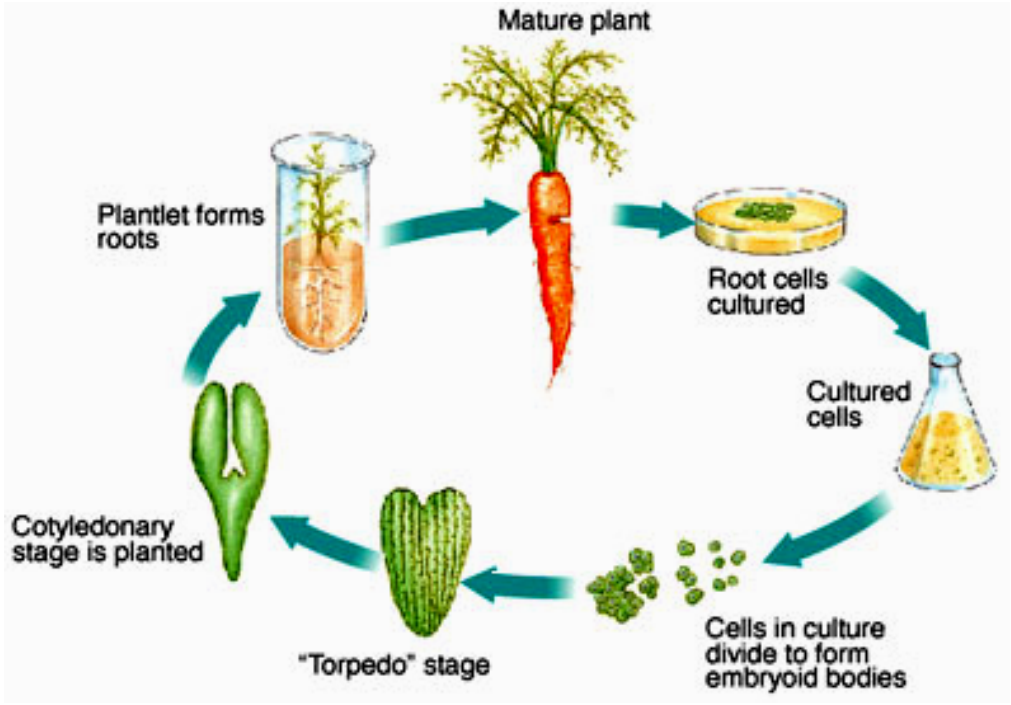
Kultura embrija – primjena

- Za regeneraciju biljaka nakon križanja diploida i tetraploida
- Regeneracija biljaka nakon križanja različitih vrsta
- Za bržu multiplikaciju, naročito za razmnožavanja listopadnog drveća.
- Za *in vitro* klonalnu propagaciju razmnožavanje biljaka, posebno četinjača (indukcija somatske embriogeneze)
- Proučavanje potrebe za hranjivim tvarima, morfogeneze i genske ekspresije.
- Za klijanje sjemena koje je ovisno o mikroorganizmima, procesiranju (prolazak kroz probavni trakt ptica, spaljivanje sjemenki četinjača)



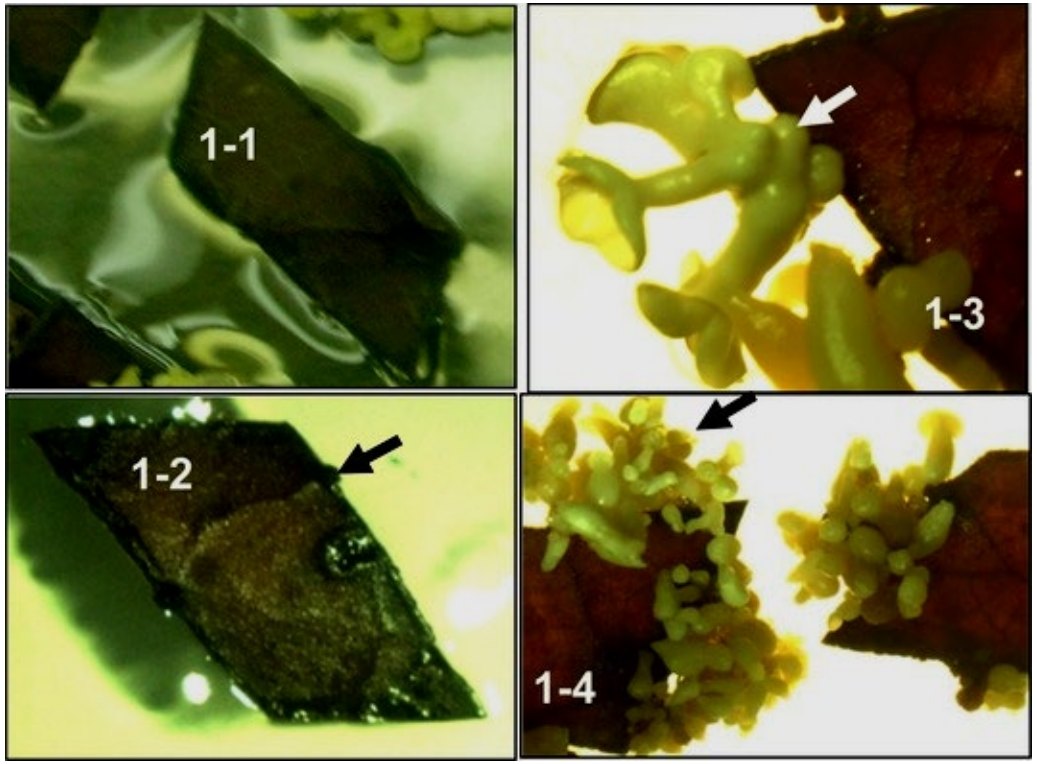
Somatska embriogeneza

- Proces sličan zigotnoj embriogenezi prvi puta bio je potaknut na somatskim stanicama mrkve u uvjetima *in vitro* (Reinert, 1958; Stewart i sur. 1958) čime je eksperimentalno potvrđena Haberlandtova teorija (1902) o totipotentnosti biljnih stanica.



Somatska embriogeneza

- razvoj embrija iz somatskih stanica u odgovarajućem okruženju *in vitro*.
- proces u kojem somatske stanice prolaze karakteristične stadije embrijskog razvoja i mogu stvoriti kompletne biljke.



Može se potaknuti na velikom broju biljnih vrsta i na različitim tipovima eksplantata – često se kao eksplantat *in vitro* koriste zigotni embriji.

Nema stvaranja endosperma i sjemene lupine

Indukcija somatske embriogeneze na eksplantatu lista biljke *Coffea canephora*
1-1 Leaf explant with any *in vitro* response,
1-2 explant produced micro calli without somatic embryogenesis,
1-3 explant produced primary somatic embryos
1-4 secondary somatic embryogenesis formed from primary embryos

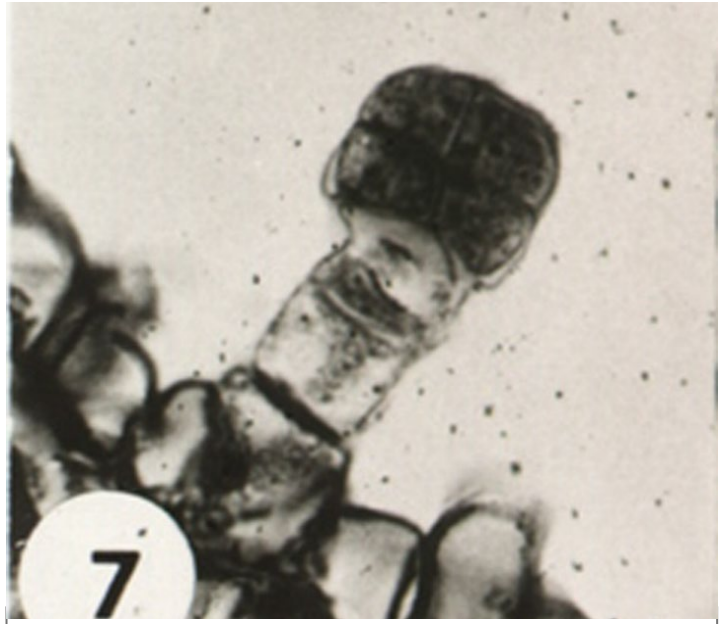
Somatska embriogeneza



- Najnovija istraživanja ukazuju na to da je evolucijski somatska embriogeneza primarni način umnažanja biljaka i da se zigotna embriogeneza razvila naknadno (Koska et al. 2025)
- Tkiva koja su dio embrijonske vreće ili ona koja je okružuju (diploidna majčinska tkiva; somatske stanice) mogu se razviti u embrij.
- Odličan način prirodnog klonalnog razmnožavanja biljaka!
- Značajan proces kulture tkiva jer nudi brzi sustav klonalnog razmnožavanja velikih razmjera i omogućava oplemenjivanje biljaka.
- Somatski embriji se razvijaju i diferenciraju na isti način kao i zigotni embriji, te prolaze kroz karakteristične faze razvoja: proembrij, globularni, srcoliki, torpedni (ili skutelarni stadij u jednosupnica) i kotiledonarni stadij razvoja.

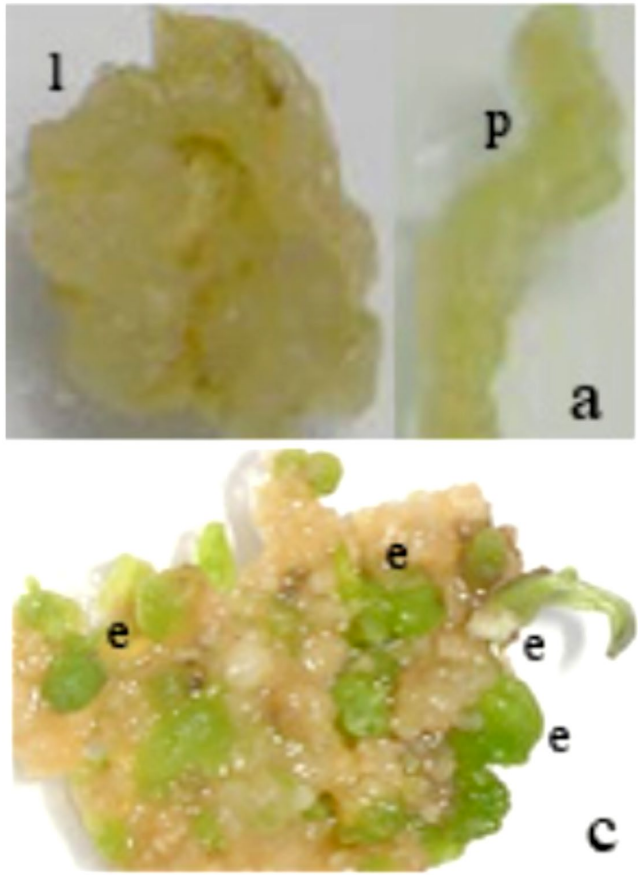
Somatska embriogeneza

Direktna (neposredno iz eksplantata)



Kakao: direktna embriogeneza iz epiderme kotiledona

Indirektna (posredna) - kalus



Indirektna somatska embriogeneza lucerne

Somatska embriogeneza

- Somatska embriogeneza započinje **inicijacijom** - dolazi do dediferencijacije pojedinih stanica koje postaju kompetentne za embriogenezu.
  - Stanice prelaze iz somatskog u embriogeno stanje.
  - Biljka nastaje embriogenezom **iz jedne stanice**.

Dvije faze somatske embriogeneze:

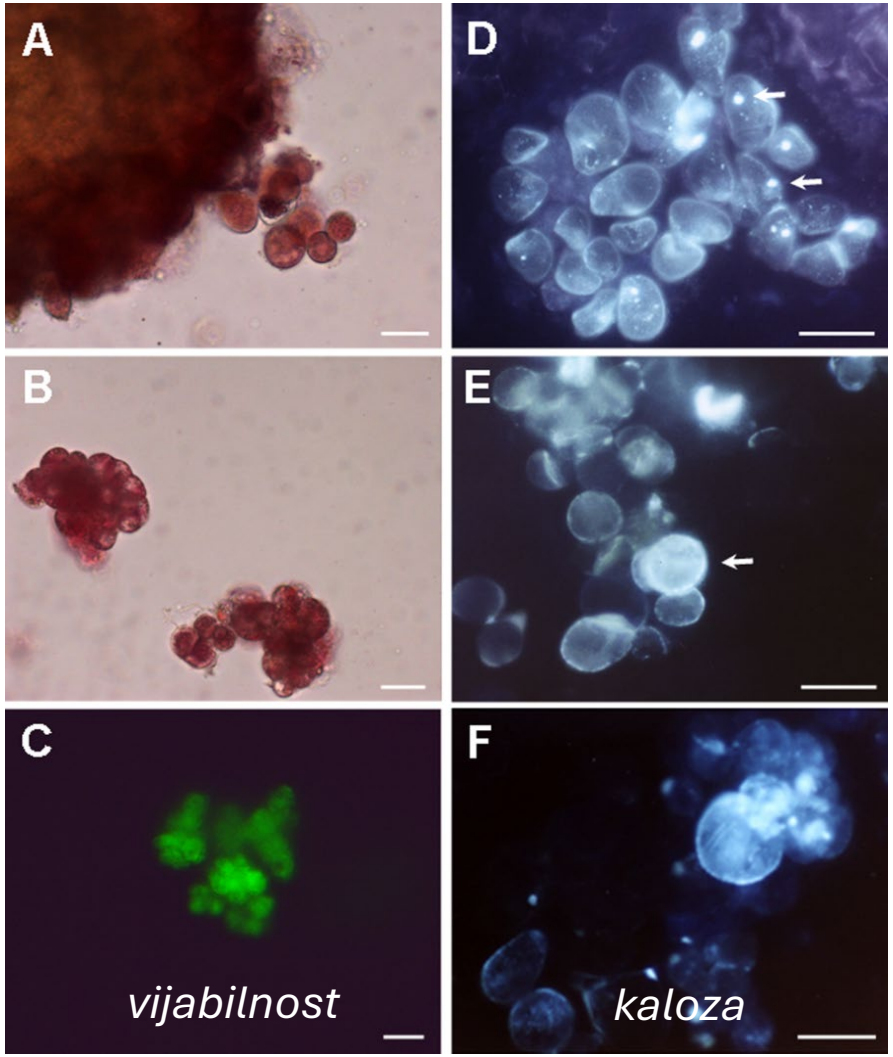
1. Inicijacija i indukcija somatske embriogeneza
2. Ekspresija embriogenog potencijala

Somatska embriogeneza – inicijacija i indukcija

- Stanje inicijacije somatskih stanica na embriogenezu može se postići pomoću različitih vanjskih i unutarnjih čimbenika.
- Za somatsku embriogenezu nije nužna primjena regulatora rasta, već se može potaknuti promjenom sastava soli (npr. NH_4^+) ili ugljikohidrata u hranjivoj podlozi, pH vrijednošću, mehaničkim ozljeđivanjem, izgladnjivanjem na siromašnom mediju, djelovanjem električnog polja, teških metala i visokog saliniteta.
- Regulatori rasta koji se najčešće primjenjuju su:
  - Auksini: 2,4-D, NAA i dikamba
- Inicijacija podrazumjeva dediferencijaciju pojedinih stanica
- Stanice postaju kompetentne za embriogenezu (prijelaz u embriogeno stanje)

Somatska embriogeneza – inicijacija i indukcija

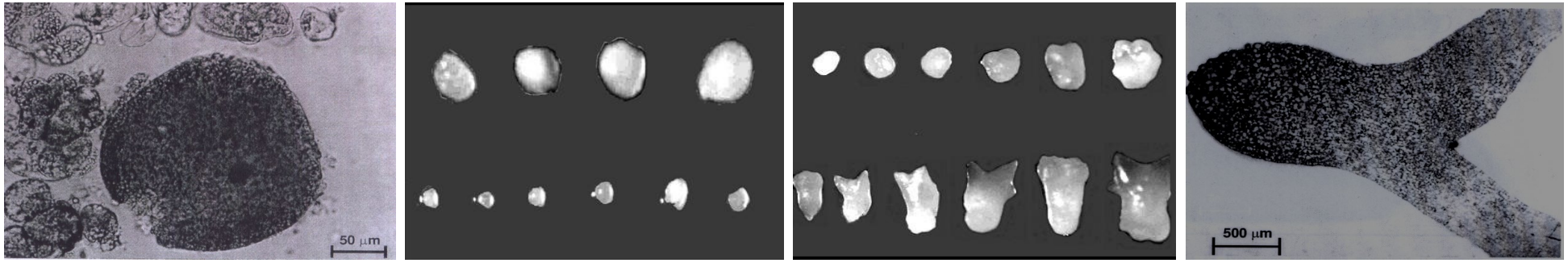
Proembriogeno tkivo

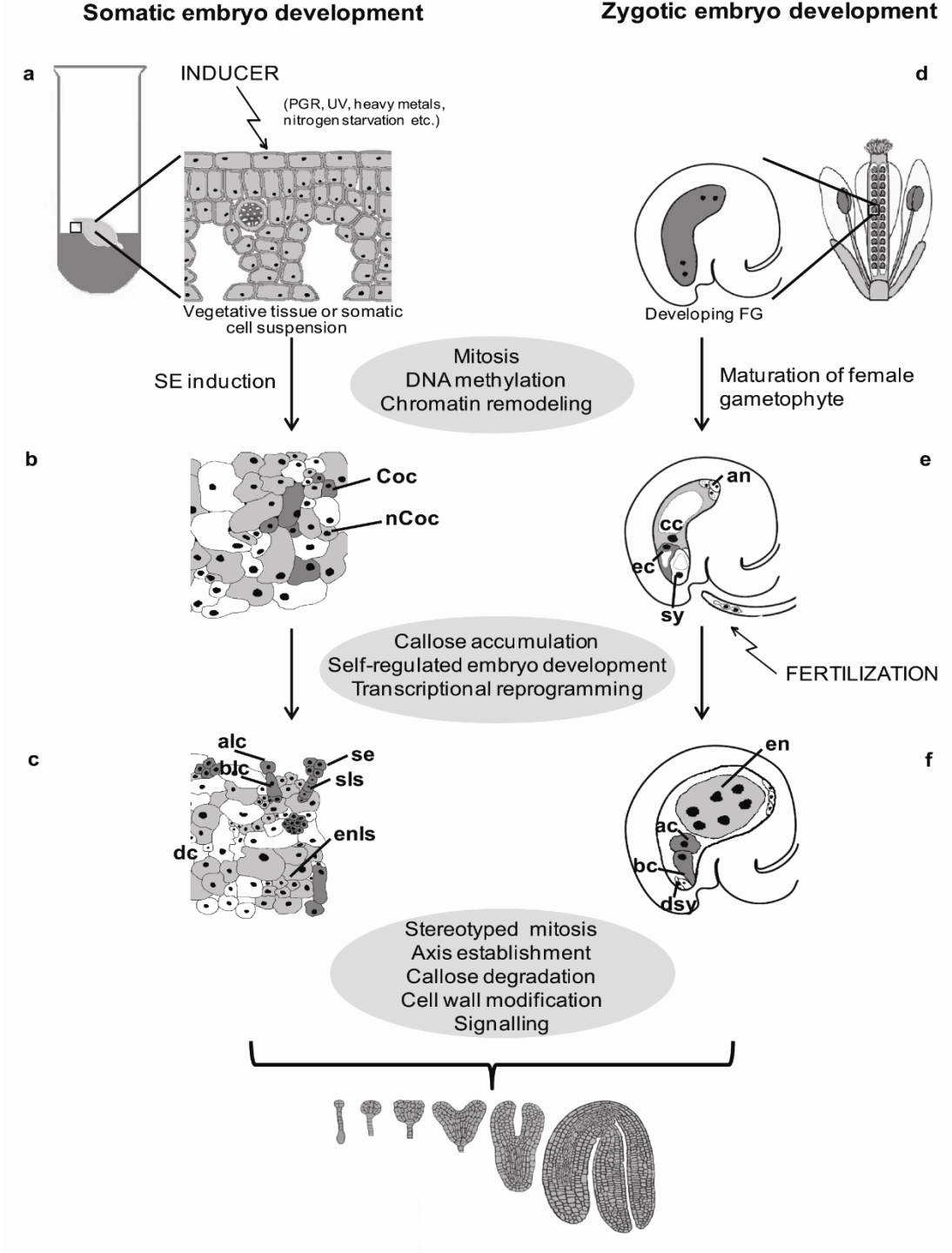


- U cilju smanjenja genetske varijabilnosti embriogeneza se često potiče na eksplantatima izoliranih zigotnih embrija, posebno nezrelih (totipotentne stanice u eksplantatu).
- Eksplantati embrija pogodni su za poticanje somatske embriogeneze jer brzo dijeljenje njihovih nediferenciranih embriogenih stanica često rezultira razvojem embrija. Takav razvoj ne uključuje fazu dediferencijacije što smanjuje genetičku nestabilnost u kulturi.
- Tijekom indukcije događaju se brojne epigenetičke promjene: promjena obrasca metilacije, promjena ekspresije gena, promjena glikozilacije proteina, promjena sastava stanične stijenke….
- Embriogene stanice nakupljaju kalozu u staničnoj stijenci

Somatska embriogeneza – ekspresija endogenog potencijala

- Dolazi do razvoja embrija iz embriogeno determiniranih stanica.
- Razvoj embrija ide spontano, no najčešće tek nakon uklanjanja čimbenika važnih za indukciju embriogeneze (npr. presađivanje na podlogu bez 2,4-D)
    - učestalim i pravilnim diobama nastaje globularni embrio
    - pojavljuju se mala izbočenja na mjestima gdje će se razviti kotiledoni – srcoliki embrio
    - izduživanje embrija izrastanjem začetka korijena na suprotnom polu – torpedo
    - razvijaju se jasno prepoznatljive supke i korjenčić – kotiledonarni embrio

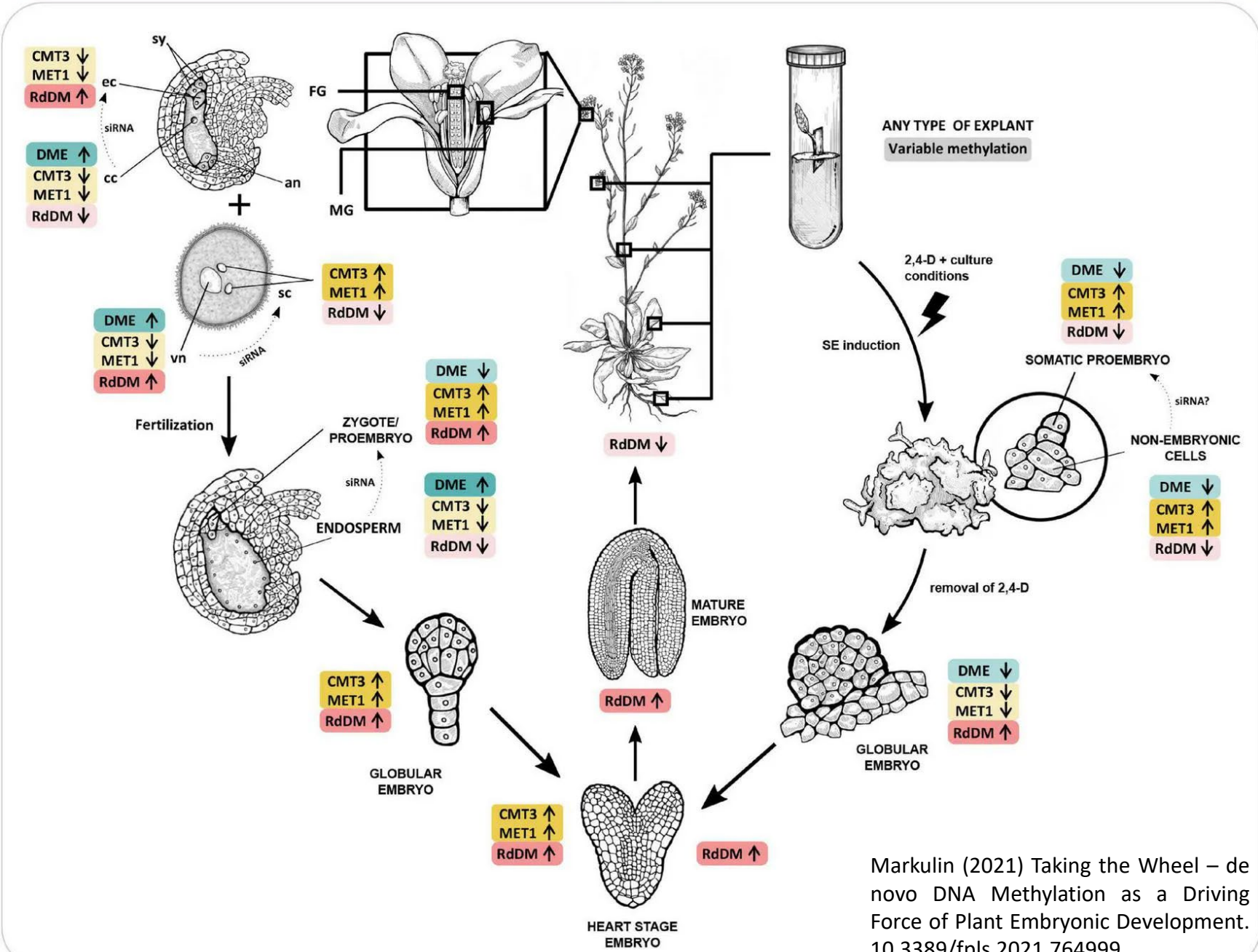




Leljak-Levanić et al. 2015: Somatic and zygotic embryos share common developmental features at the onset of plant embryogenesis. 10.1007/s11738-015-1875-y

Zygotic embryogenesis

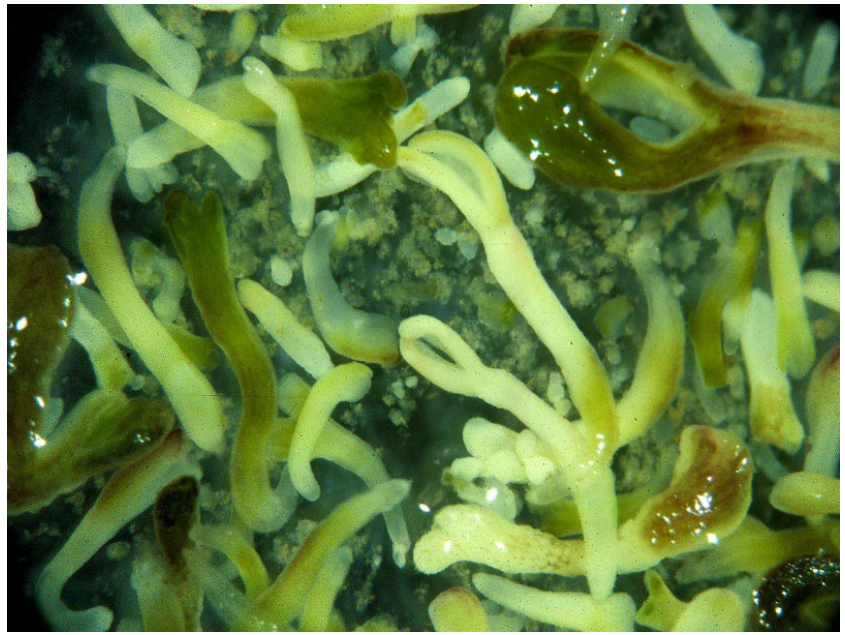
Somatic embryogenesis

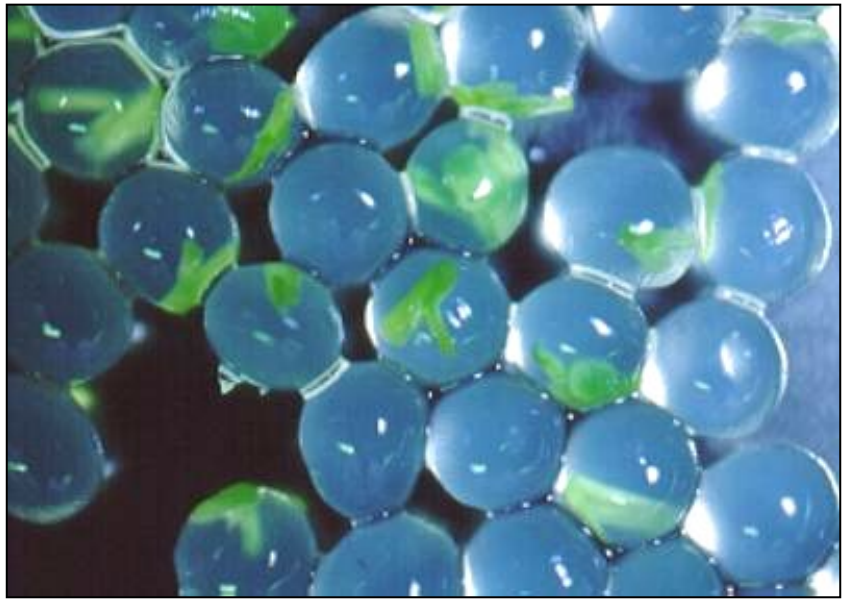


Markulin (2021) Taking the Wheel – de novo DNA Methylation as a Driving Force of Plant Embryonic Development. 10.3389/fpls.2021.764999

Somatska embriogeneza

- Omogućuje regeneraciju kompletne biljke
- Brzo i učinkovito umnažanje
- Dobivanje sintetskog sjemena
- Dobivanje embriogenih protoplasta
- Proizvodnja embrio specifičnih metabolita





Somatska embriogeneza - mikropropagacija

- Iz nekoliko grama embriogenog kalusa moguće je regenerirati milijune embrija.
- Uspješnost kulture podrazumijeva povoljan omjer embriogenih i neembriogenih stanica, te genetsku stabilnost somatskih embrija.



Embriogeni kalus = Stanice kalusa + Proembriogene stanice + Somatski embriji

Somatska embriogeneza - mikropropagacija

- Somatska embriogeneza – formiranje bipolarnih struktura (za razliku od adventivne organogeneze).
- Za somatsku embriogenezu važna je uspostava polarnosti.





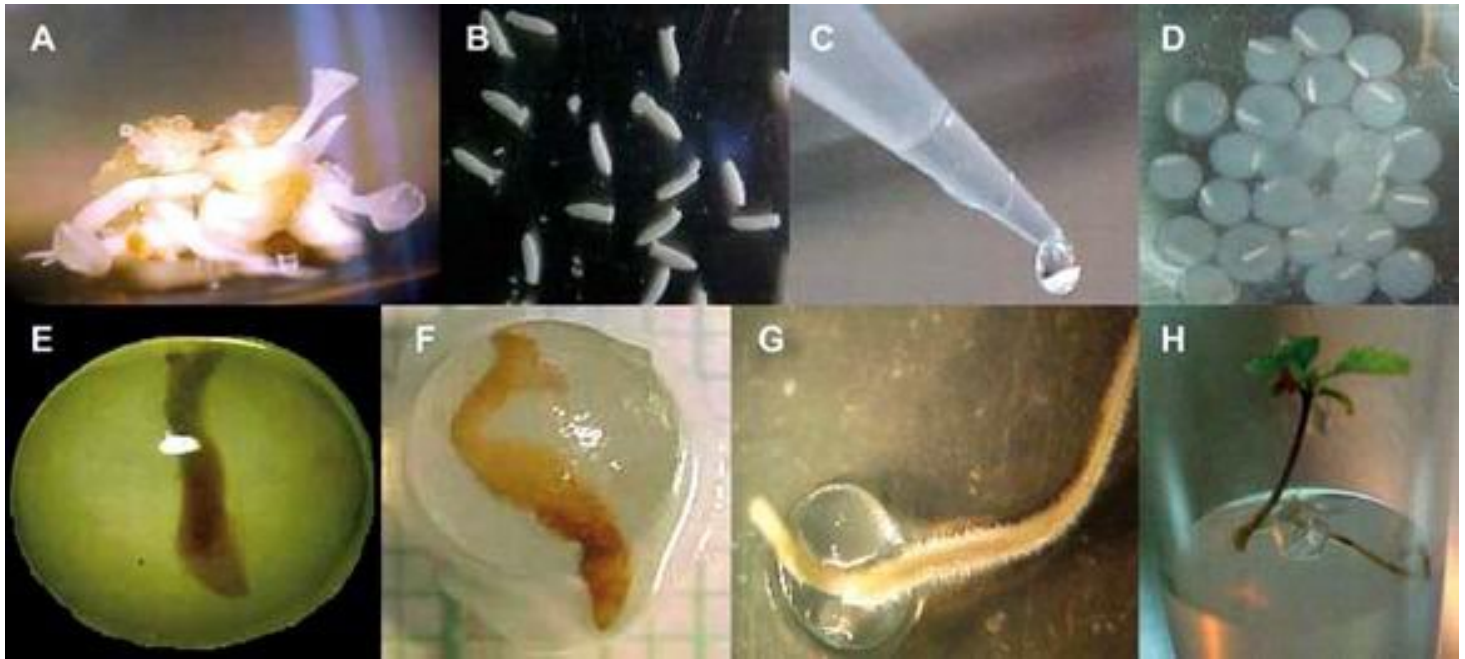
Embriji četinjača u kulturi

Somatska embriogeneza

- Umjetno (sintetsko) sjeme
  - Klijavost do 50%
  - u biotehnologiji bilja kako bi se osjetljivi somatski embriji dobiveni *in vitro* zaštitili i mogli posijati slično pravom sjemenu
  - Omogućuje lakše rukovanje, skladištenje i mehaničku sjetvu kloniranih biljaka (npr. kod vrsta koje slabo stvaraju pravo sjeme ili kod vrijednih hibrida)

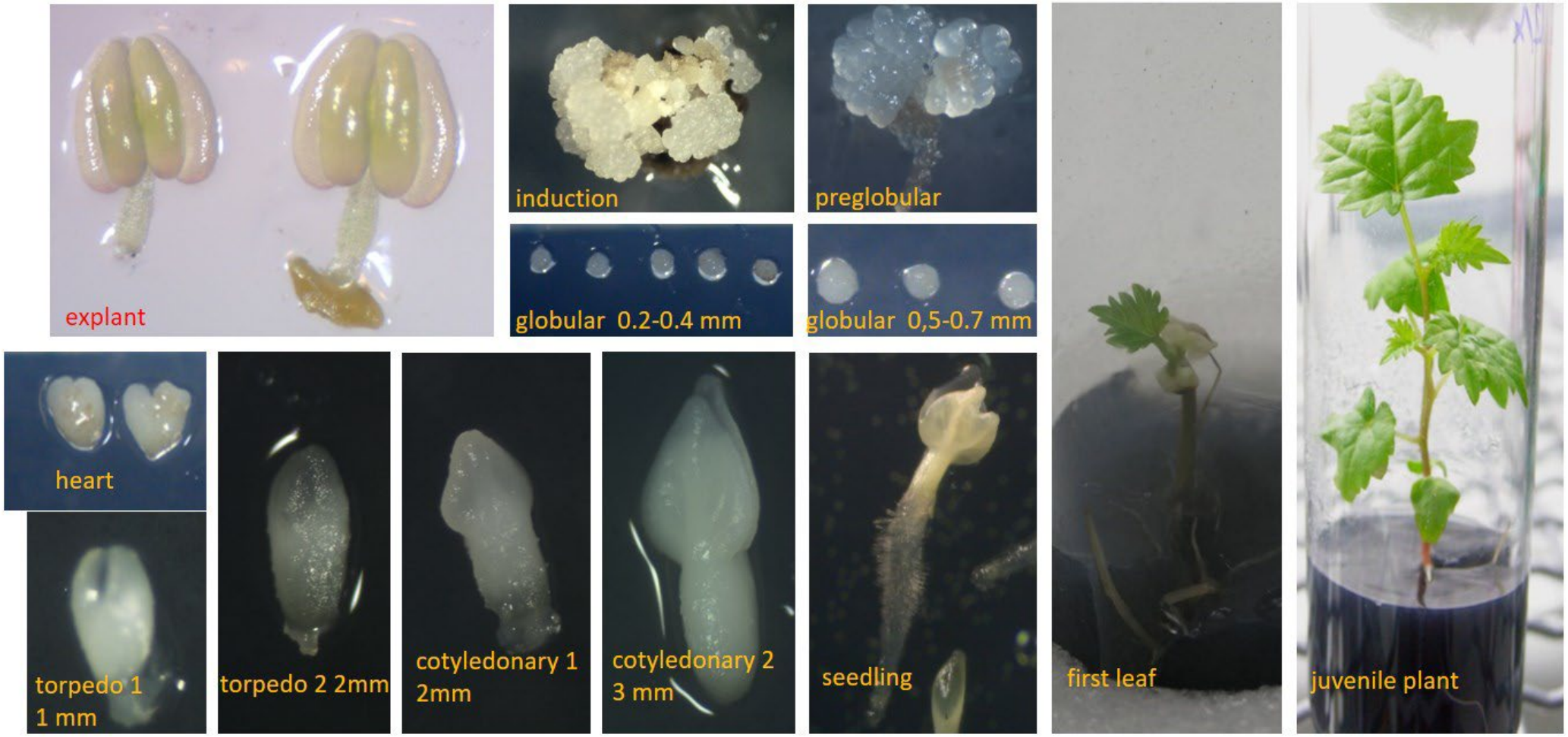
Inkapsulirani somatski embriji, vrškovi izdanaka, stanični agregati ili bilo koje drugo meristematsko tkivo koje ima potencijal za ponovni rast.

Osušeno (u polioksietilenu) ili hidratizirano sintetsko sjeme



Encapsulated in different artificial endosperms: components of the MS medium, 0.5 mg L^{-1} IAA, 0.5 mg L^{-1} NAA, 2 mg L^{-1} BAP and 30 g L^{-1} sucrose, 2 – 5% sodium alginate, $CaCl_2$.

Somatska embriogeneza – ozdravljivanje vinove loze



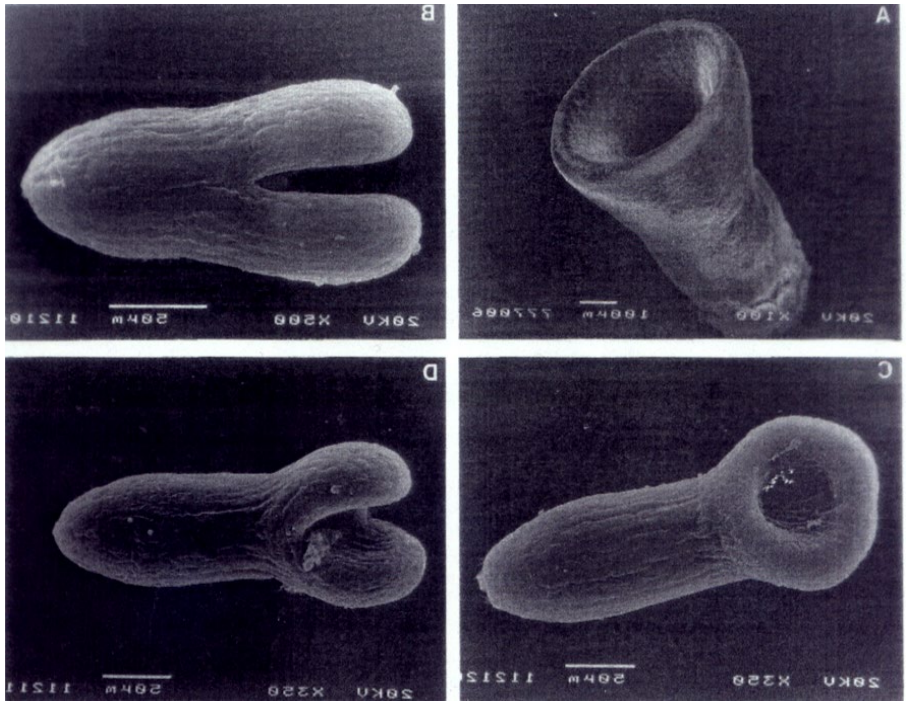
Malenica, N (2020). Somatic embryogenesis as a tool for virus elimination in Croatian indigenous grapevine cultivars. https://doi.org/10.37427/botcro-2020-008

Somatska embriogeneza - problemi

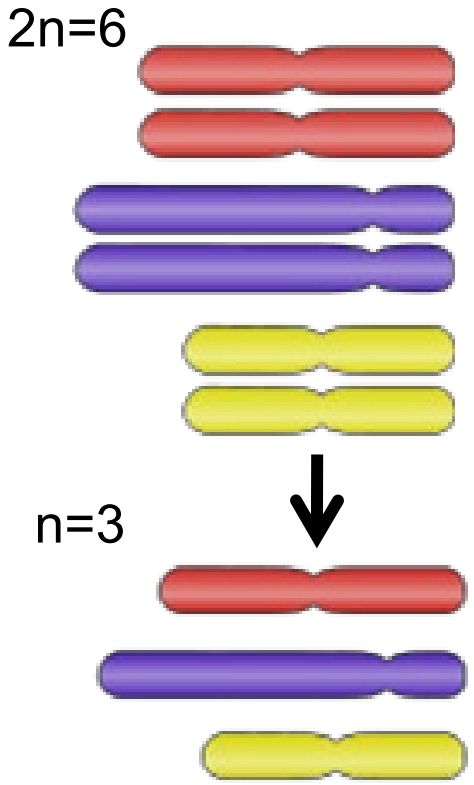
- Sinkronizacija kulture
- Dodatna (repetitivna) embriogeneza
- Genske i morfološke promjene u kulturi
- Kontrola sazrijevanja i klijanja embrija
- Problem isušivanja (tretiranje s ABA!)



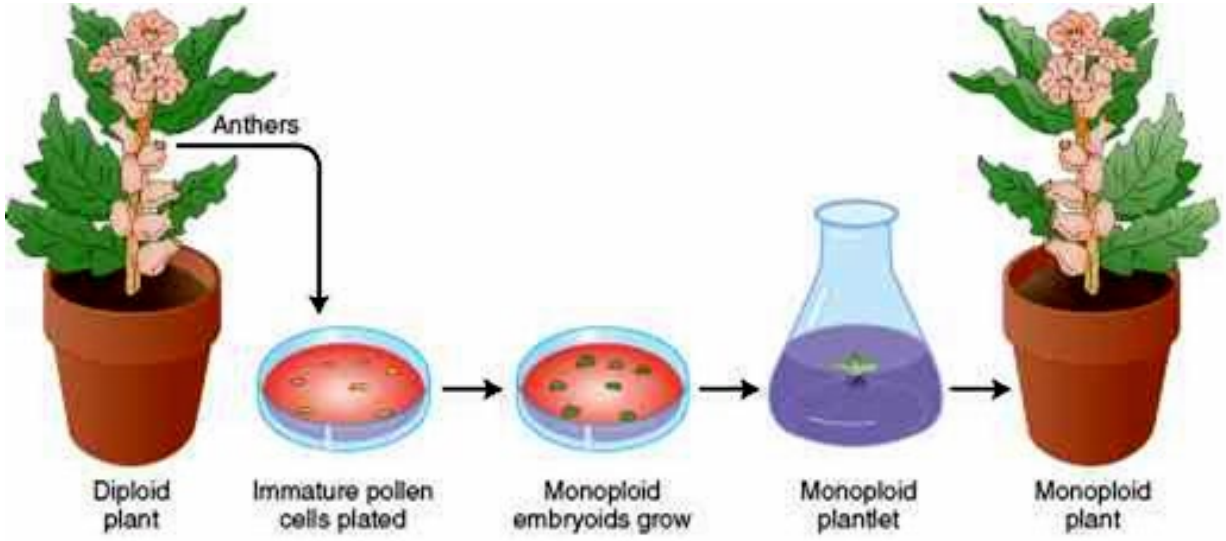
Normalno Aberantno

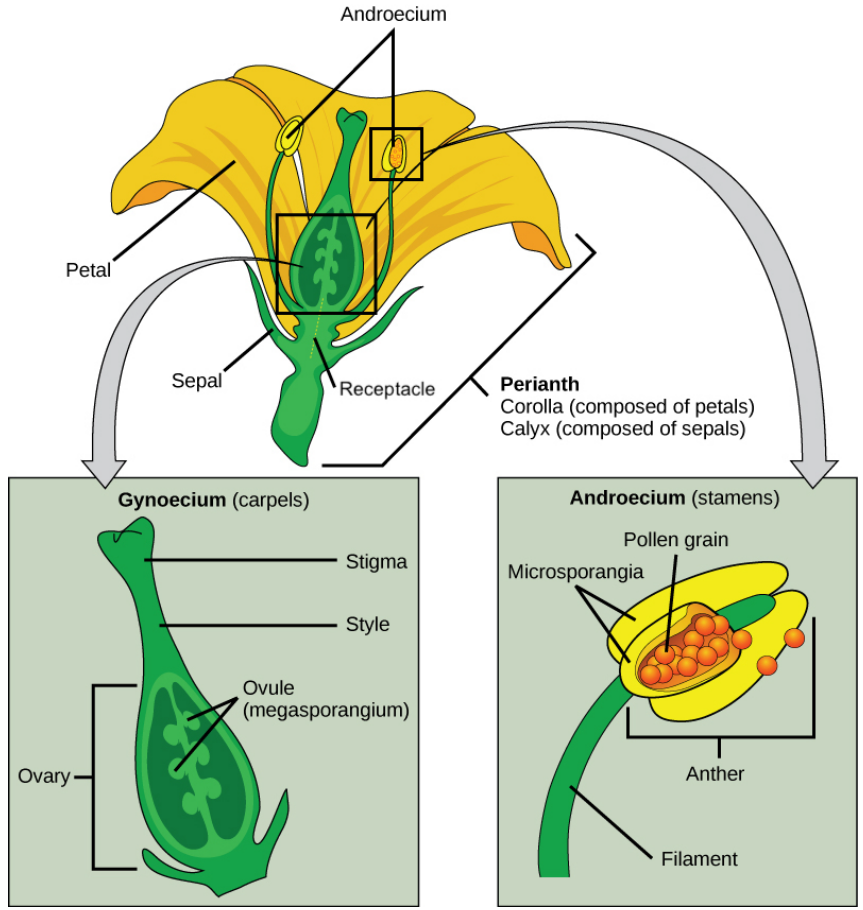


Haploidi

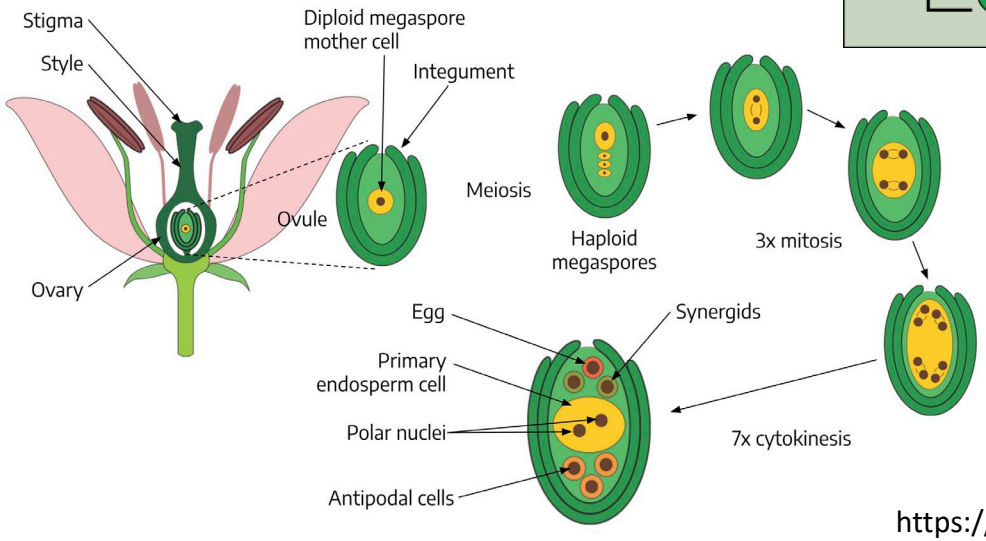


- Biljke koje u sporofitu imaju gametofitski broj kromosoma
- Biljke vrlo dobro podnašaju promjene u broju kromosoma – poliploidiju, aneuploidiju, haploidiju…
- Haploidi se (najčešće) razvijaju iz gameta embriogenezom.

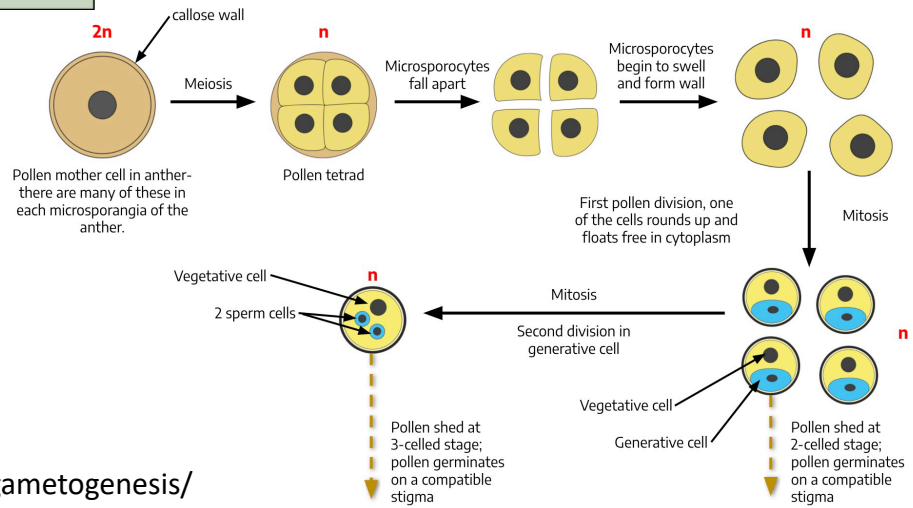




Ženski gametofit
= embrionska vreća



Muški gametofit
= peludno zrnce

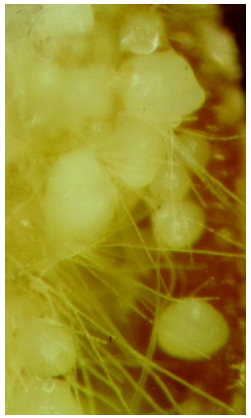


https://open.lib.umn.edu/horticulture/chapter/14-1-gametogenesis/

Dobivanje haploida

- **Androgeneza** – stvaranje gametskih embrija iz muške gamete
  - Najčešća *in vitro* metoda za dobivanje haploidnih biljaka
  - Mikrosporogeneza/mikrogametogeneza vode do formiranja haploidnih


Antera u kulturi

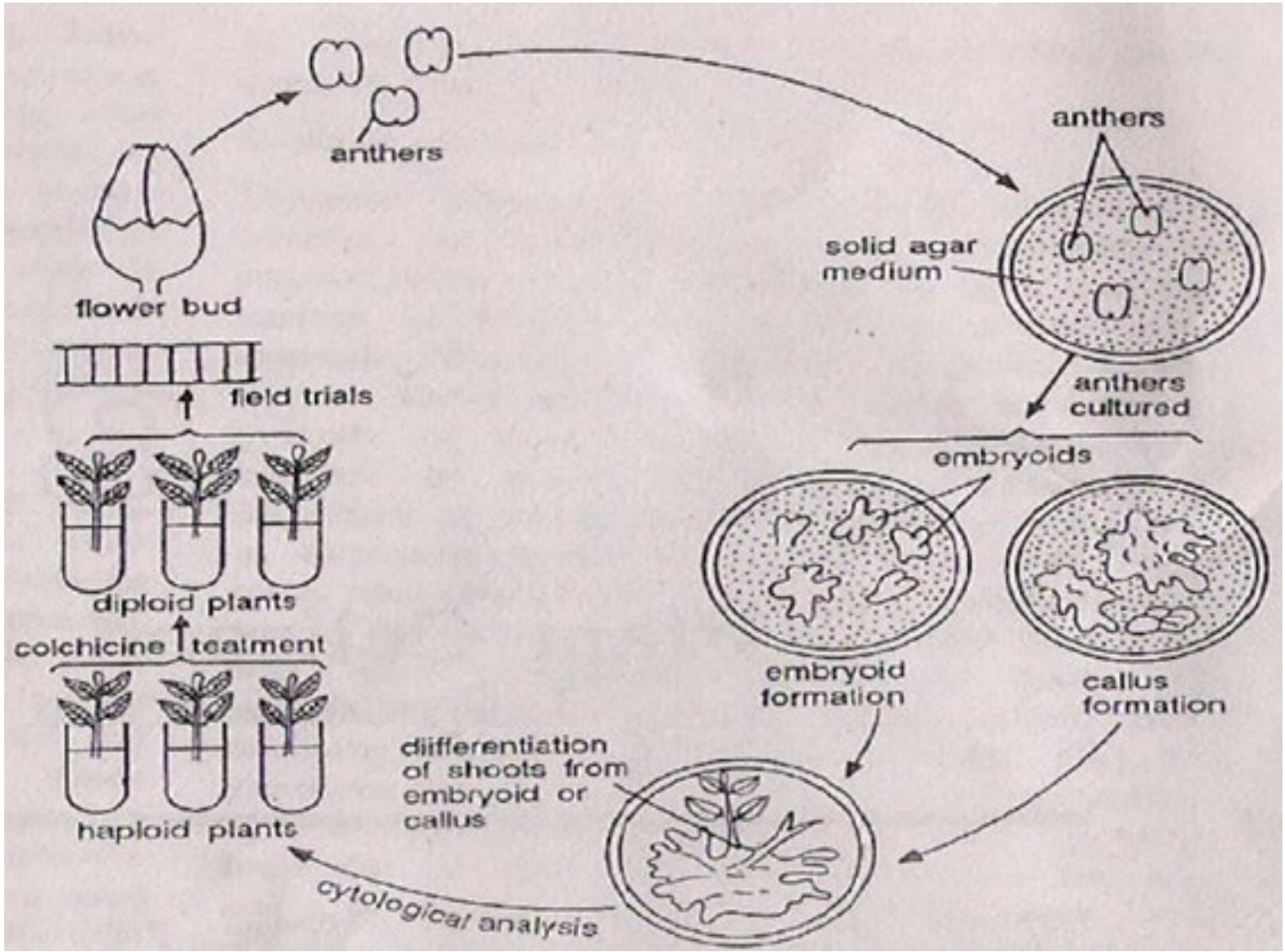

Globularni haploid


Srcoliki haploid

- **Partenogeneza** – iz neoplođene jajne stanice (najčešći haploidi u prirodi)
- **Apogamija** – iz drugih stanica mega-gametofita (sinergide)

Apomiksija: stvaranje sjemena bez oplodnje, iz **diploidnih** stanica sjemenog zametka

Kultura antera/prašnica

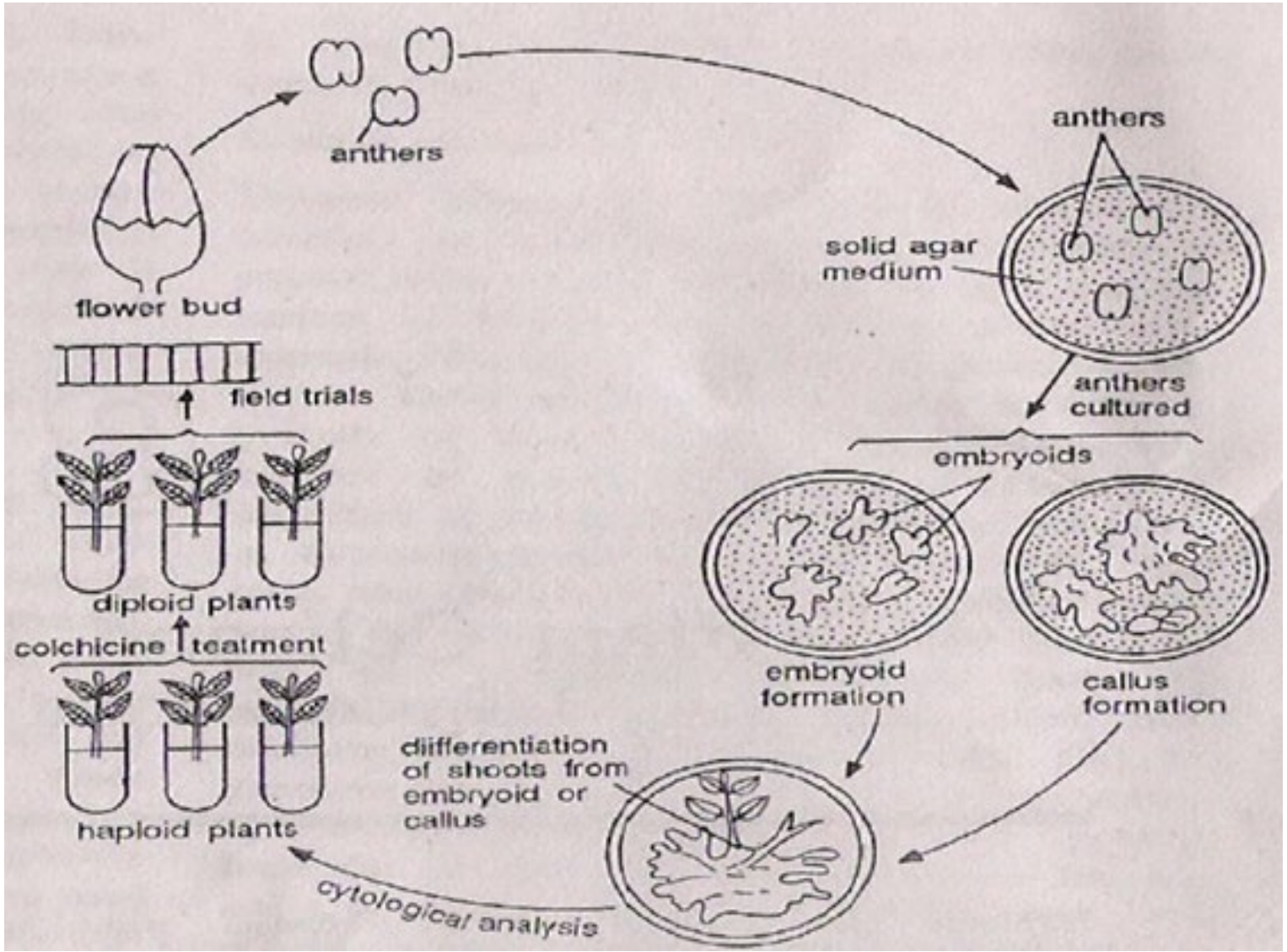




- Jednostavna.
- Brza regeneracija haploida.
- Nedostatak – veliki broj regeneriranih biljaka je diploidan (razvoj iz tkiva prašnice).

Kultura polena





- Visoki prinos.
- Idealna za mutagenezu.
- Eliminirano stvaranje diploidnih biljčica iz diploidnog tkiva prašnika.

Čimbenici koji utječu na razvoj haploida *in vitro*

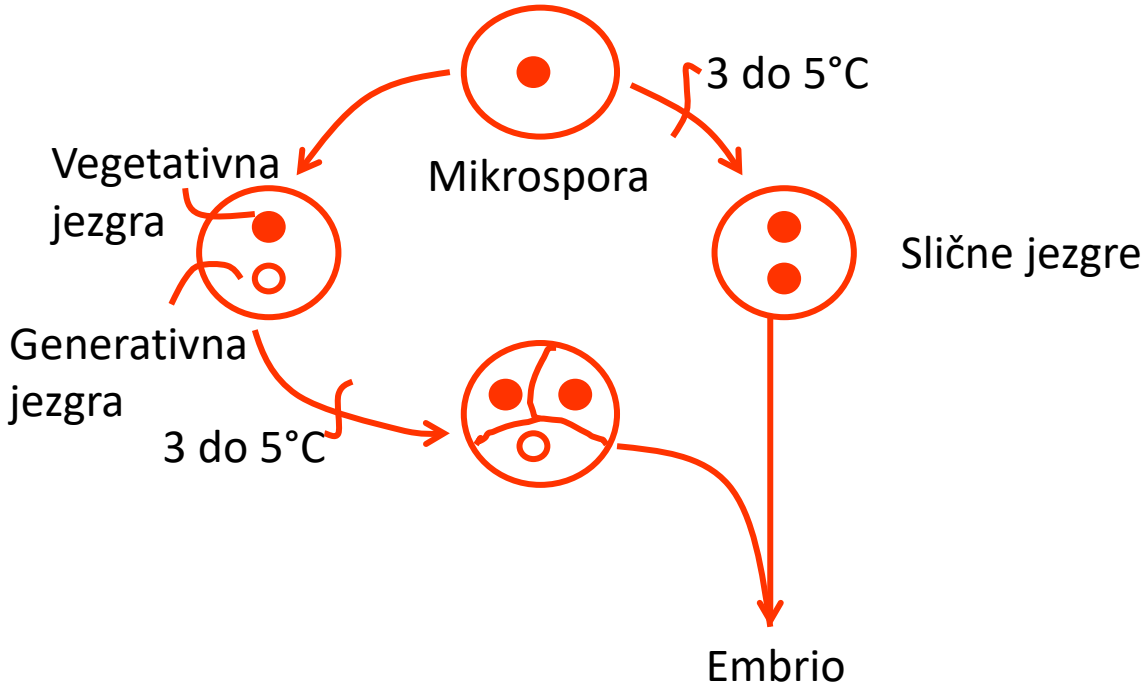
- Vrlo su važni uvjeti uzgoja biljke donora (uzgoj u kratkom danu uz visoki intenzitet osvjetljenja i bez pesticida).
- Najreaktivniji su prvo razvijeni cvjetići na aktivno rastućim biljkama.
- Stadij antera – najreaktivniji za razvoj haploidnih embrija je između tetrada i prve mitoze u polenu.



Razvojni stadiji cvjeta duhana. Najpogodniji za dobivanje haploida je stadij 2.

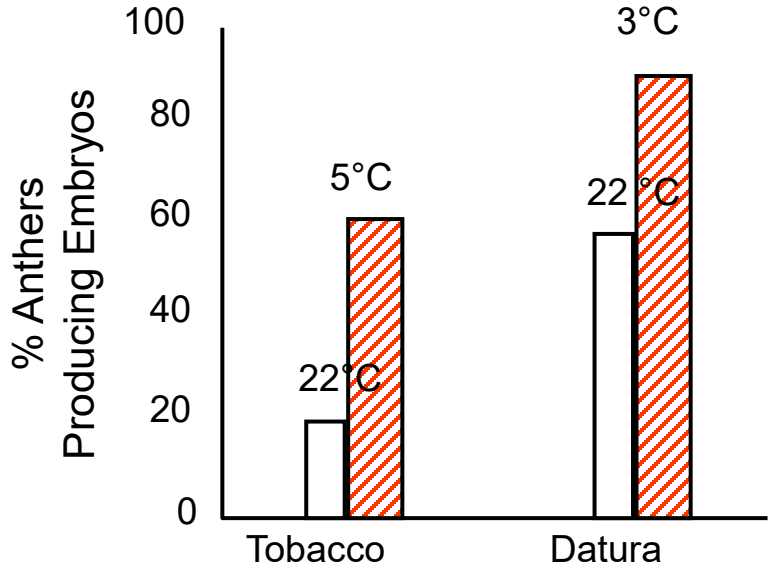
Čimbenici koji utječu na razvoj haploida *in vitro*

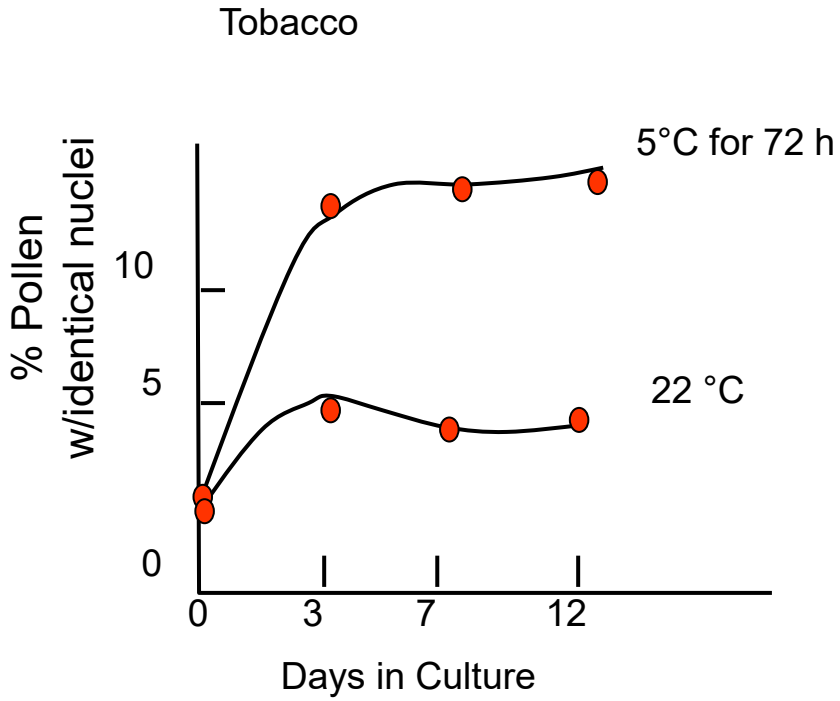
- Hladni tretman (3 - 5°C) potiče simetrične diobe mikrospore ili diobe vegetativne jezgre



Čimbenici koji utječu na razvoj haploida *in vitro*

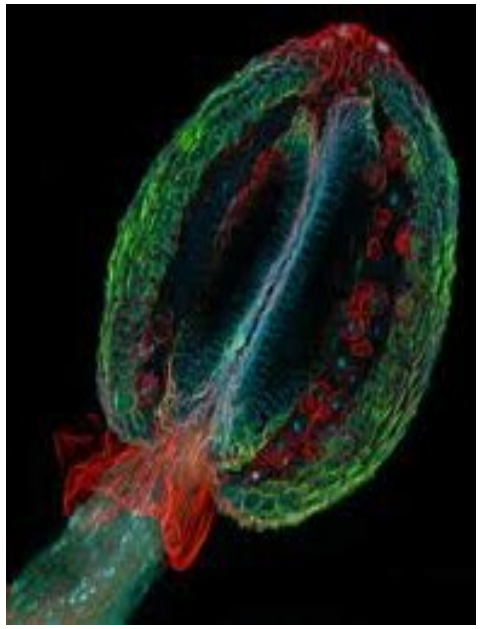
- Hladni predtretman antera pojačava embriogeni odgovor
- Predtretman prije prve mitoze nakon formiranja tetrada povećava učestalost simetričnih dioba mikrospore i formiranje embrija





Čimbenici koji utječu na razvoj haploida *in vitro*

Hranjiva podloga



i. Kultura antera – osnovne komponente mikro- i makro soli, šećer (ponekad povišene konc. 8-12%) i vitamini;

Regulatori rasta:

a. **nepotrebni** – direktan razvoj embrija iz mikrospore (neposredna androgeneza), bez kalusa kod duhana

- regulatori rasta potiču rast diploidnog tkiva, npr. stjenka prašnice

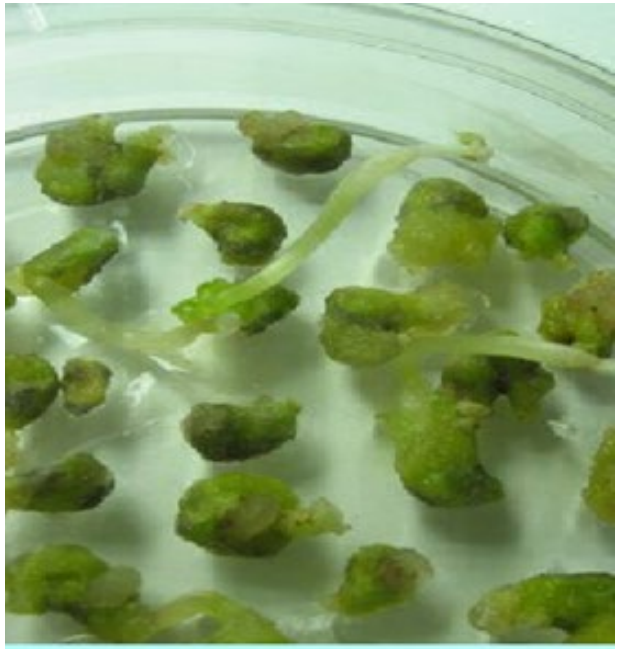
b. ovisnost o regulatorima rasta – dodaju se auksin i ponekad citokinin.

ii. Pozitivan utjecaj aktivnog ugljena, temperaturnog šoka…

iii. Kultura mikrospora/polena – dodatak glutamina, serina i inozitola

Kultura plodnica

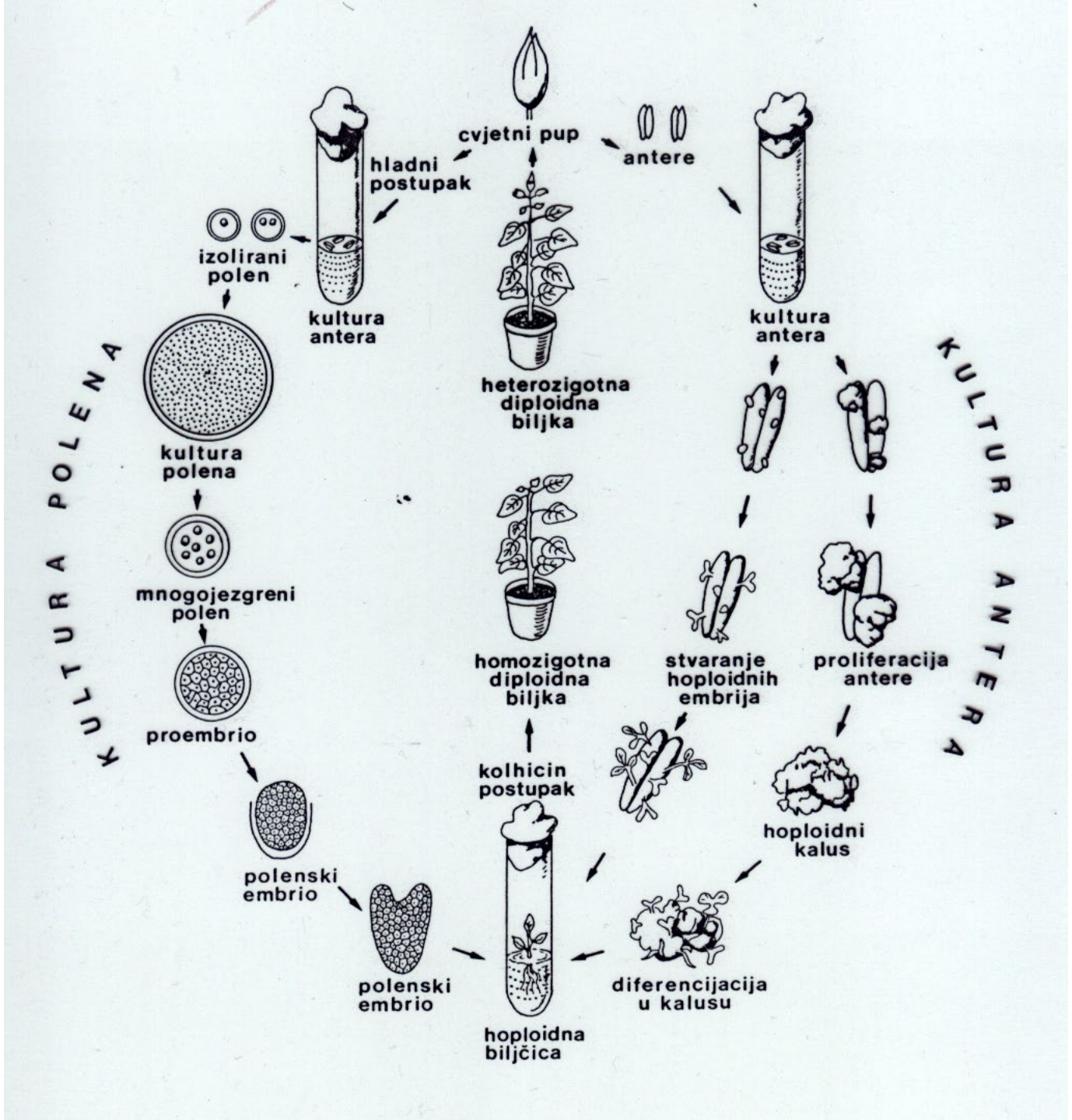
- Haploid iz ženskih gameta
- Zahtjevnija od kulture polena i/ili antera
- Dosada regeneriran mali broj haploida iz megagametofita (pšenica, riža, kukuruz, duhan)
- Jedina metoda za dobivanja haploida kod muško-sterilnih biljaka

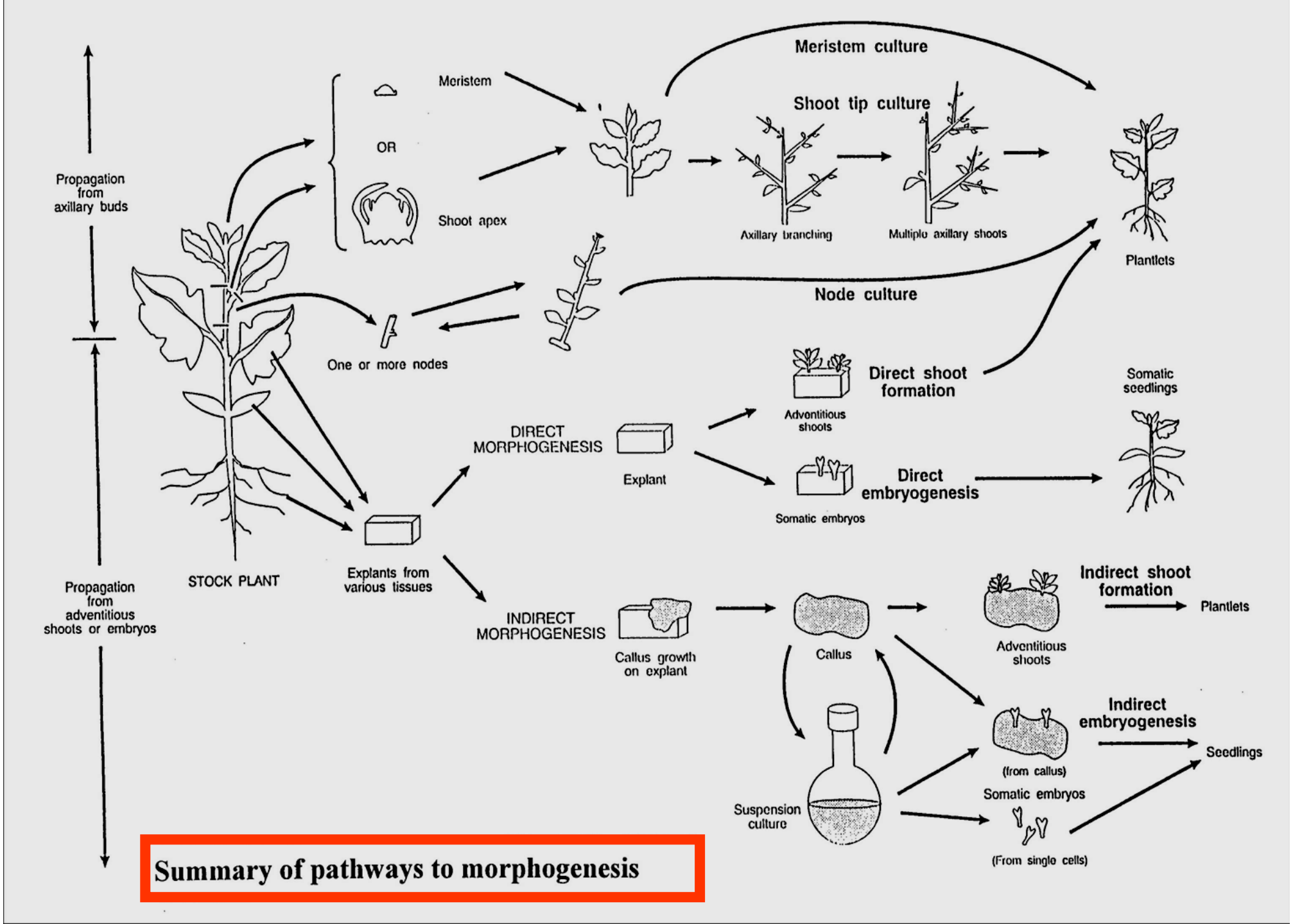




Haploidi - prednosti

- Važni za oplemenjivanje
  - Ukoliko je resecivno svojstvo poželjno haploidi će ga ispoljiti.
- Utvrđivanje mutacija
  - Prisustvo jednog seta kromosoma olakšava utvrđivanje mutacija.
  - Ukoliko je neki mutirani gen neophodan za razvoj neće doći do stvaranja haploida.
- Haploide možemo diploidizirati i dobiti **homozigotne** diploidne biljke
  - Konvencionalnim metodama moguće je dobiti homozigotne linije, no to traje nekoliko godina, dok se regeneracijom haploida čiste linije dobivaju u nekoliko tjedana.
  - Poželjna svojstva često proizlaze iz kombinacije određenih alela na različitim lokusima. Kod homozigotne biljke s poželjnim svojstvima nema miješanja alela – zadržava se svojstvo.


cvjetni pup
antere
hladni postupak
izolirani polen
kultura antera
heterozigotna diploidna biljka
kultura antera
KULTURA POLENA
KULTURA ANTERA
kultura polena
mnogojezgreni polen
proembrio
homozigotna diploidna biljka
stvaranje haploidnih embrija
proliferacija antere
kolhicin postupak
hoploidni kalus
polenski embrio
polenski embrio
diferencijacija u kalusu
hoploidna biljčica



Summary of pathways to morphogenesis

Aklimatizacija biljaka iz *in vitro* uvjeta na vanjske uvjete rasta

Priprema za prijenos u vanjske uvjete

- kompletne biljke koje imaju **razvijeni korijen**
- smanjenje razine anorganskih soli u hranjivoj podlozi

  → bolji razvoj korijena
- smanjenje koncentracije šećera

  → potiče fotosintezu što pomaže aklimatizaciji
- dodatak ABA

  → potiče zatvaranje puči i osigurava brže uspostavljanje stomatalne regulacije







Aklimatizacija biljaka iz *in vitro* uvjeta na vanjske uvjete rasta






- Imaju vrlo tanku kutikulu i nisku razinu klorofila - potrebna postepena prilagodba na vanjske uvjete.
- Nakon što se izvade iz posudice za uzgoj potrebno je odstraniti sav hranjivi medij (agar) – biljčice se peru tekućom vodom
- Biljčice, **s korijenom** se moraju prebaciti u vlažnu atmosferu (perlit ili sterilna zemlja natopljeni destiliranom vodom) u uvjete laganog osvjetljenja.

Aklimatizacija biljaka iz *in vitro* uvjeta na vanjske uvjete rasta

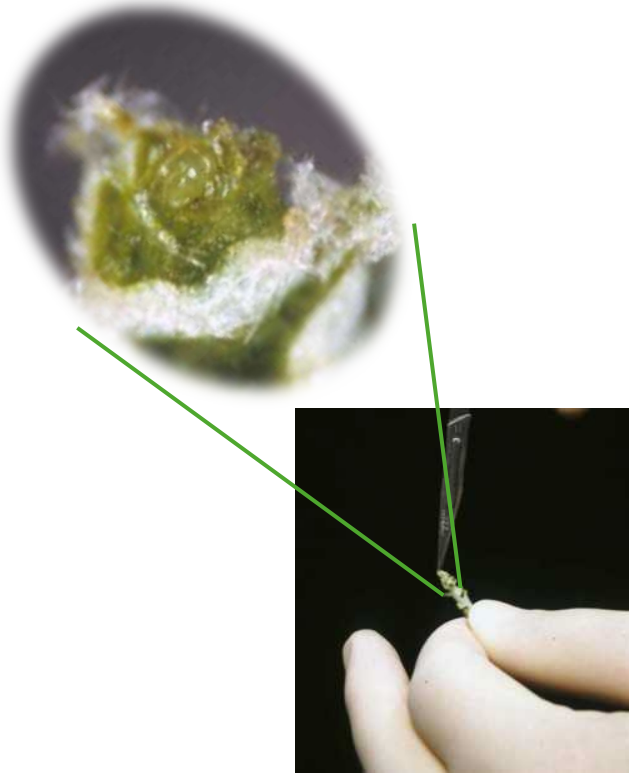




- U posudici za uzgoj možemo imati do nekoliko stotina biljčica.
- S biljčica se odstranjuju svi nekrotizirani i oštećeni dijelovi.
- Svaka pojedina biljčica se odvaja i sadi u vlažnu podlogu.
- Posađene biljčice se uzgajaju prekrivene najlonom, uz stalno zalijevanje.
- Nakon 3 - 4 dana postepeno se otkrivaju, 7. dan se pokrivalo miče. Dotad bi trebale razviti korijen i uspostaviti stomatalnu regulaciju.
- Ukoliko se biljčice sade na danje svjetlo potrebno ih je prilagođavati vanjskim uvjetima osvjetljenja postepeno prilagođavajući valne duljine i jakost svjetlosti.

Proizvodnja biljaka
-primjer virusno oslobođene jagode

1.Izolacija vršnog meristema



2. Indukcija i umnažanje izdanaka, zakorjenjivanje.





3. Aklimatizacija biljaka na vanjske uvjete i uzgoj u stakleniku (super-elita).

4. Vriježe super-elite se sade za urod.



