

# P4KBTmb 2025

Metode mikropropagacije

Aksilarni pupovi

Adventivni pupovi

Kultura sjemena i spašavanje embrija

Somatska embriogeneza

Kultura haploida

Prijenos i prilagođavanje biljaka iz *in vitro* uvjeta na uvjete okoliša

## MIKROPROPAGACIJA

- ☐ **Brza metoda umnažanja** odabrane biljke, a u svrhu dobivanja velikog broja istovjetnih potomaka. Uključuje tehnike kulture biljnog tkiva odnosno *in vitro* manipulaciju.
- ☐ Koristi se za 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.
- ☐ Uključuje metode za oplemenjivanje - dobivanje biljaka s poželjnim svojstvima
- ☐ Koristi se za umnažanje zdravih biljaka oslobođenih od patogena



## Mikropropagacija



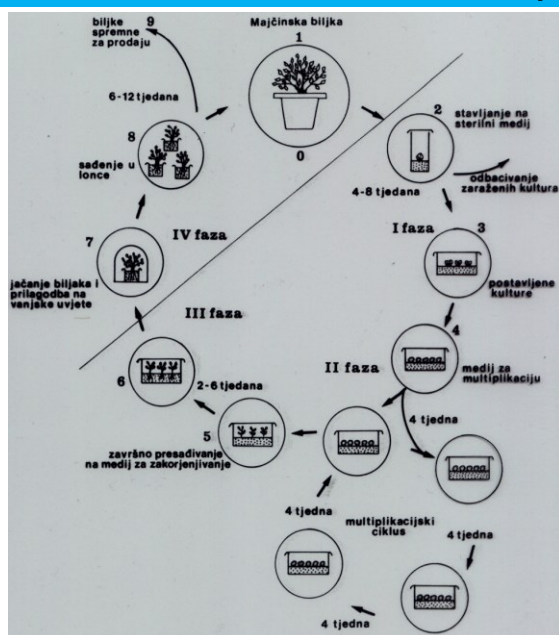
**Kupina i borovnica:** koriste se vrhovi izdanaka i aksilarni pupovi  
Biljke **mesožderke:** iz sjemena ili iz reznica.

**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**  
Odabir/Dobivanje biljke donora

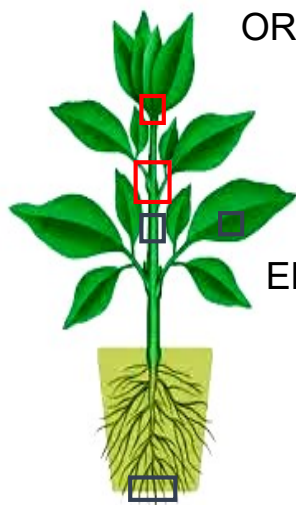
**1. FAZA**  
Uvođenje u kulturu *in vitro*

**2. FAZA**  
Umnažanje biljaka

**3. FAZA**  
Zakorjenjivanje

**4. FAZA**  
Prilagodba na vanjske uvjete

## MIKROPROPAGACIJA – BRZO UMNAŽANJE BILJAKA



### ORGANOGENEZA

Indukcija izdanaka iz bočnih ili vršnog meristema

Indukcija adventivnih izdanaka na internodiju, listu ili korijenu

### EMBRIOGENEZA

Indukcija somatskih embrija

Indukcija haploida

## ORGANOGENEZA

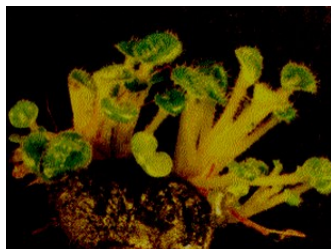
- ☐ *De novo* stvaranje organa, inicijacija izdanka i korijenja.
- ☐ Kod mikropropagacije nastojimo potaknuti izdanke, jer je iz njih najlakše regenerirati kompletnu biljku.
- ☐ **Biljni regulatori rasta su najvažniji čimbenici organogeneze.**

### DOGMA ORGANOGENEZE:

Kad je omjer citokinin:auksin velik induciraju se izdanci, a inhibira nastanak korijena.

Kad je omjer auksin:citokinin velik inducira se korijenje i/ili kalus, a inhibira nastanak izdanaka

**Endogena razina hormona igra važnu ulogu u organogenezi.**

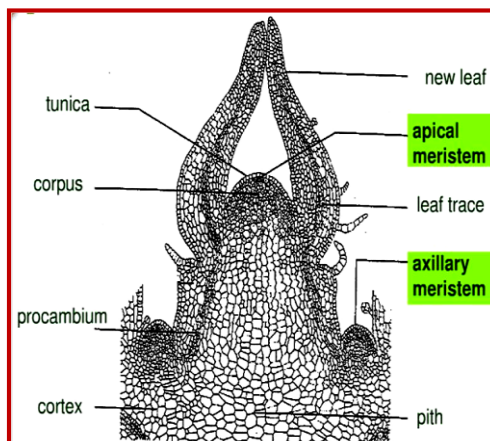


Izdanci mnogih biljaka zakorjenjuju se i bez dodatka auksina.

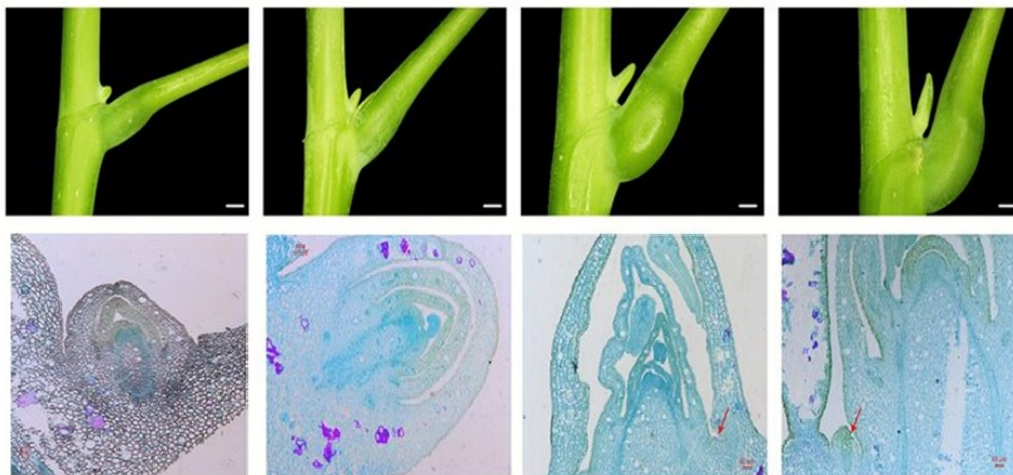
Nekim biljkama (afrička ljubica) treba dodati više auksina i manje citokinina da bi stvarale izdanke. Za svaku vrstu/sortu potrebno je razraditi i eksperimentalno utvrditi najbolju metodu umnažanja

## Eksplantat za mikropogaciju

Najčešće se koristi vegetacijski vršak (najbolje vršni meristem),  
bočni (nodalni) pup i list.

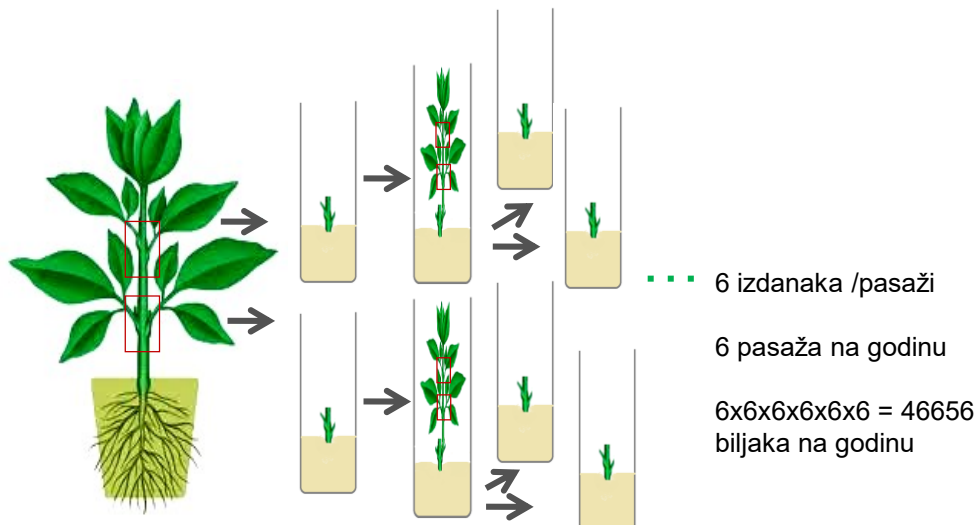


Nodij-mjesto na stabljici biljke na kojem je prirastao jedan ili više listova.

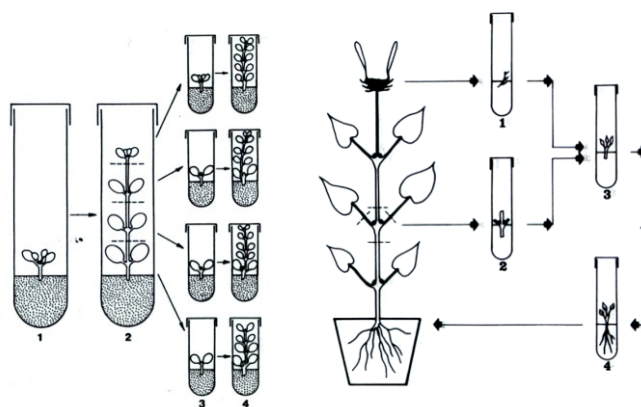


U pazušcu lista se nalazi bočni pup s meristemom koji je kompetentan za razvoj izdanka.

## KULTURA NODALNIH SEGMENTATA - Poticanje rasta aksilarnih pupova



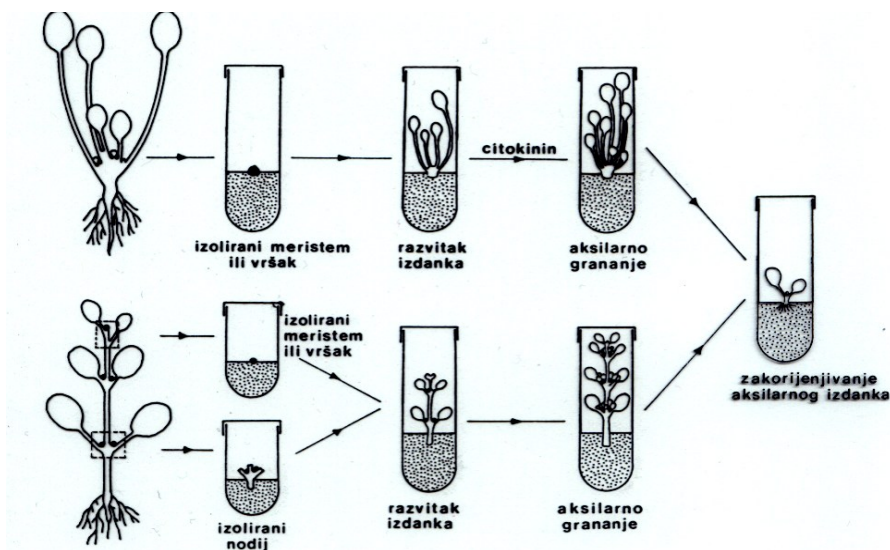
## Mikropropagacija aksilarnim pupovima



Multiplikacija izdanaka

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

## Poticanje rasta aksilarnih pupova – aksilarno grananje

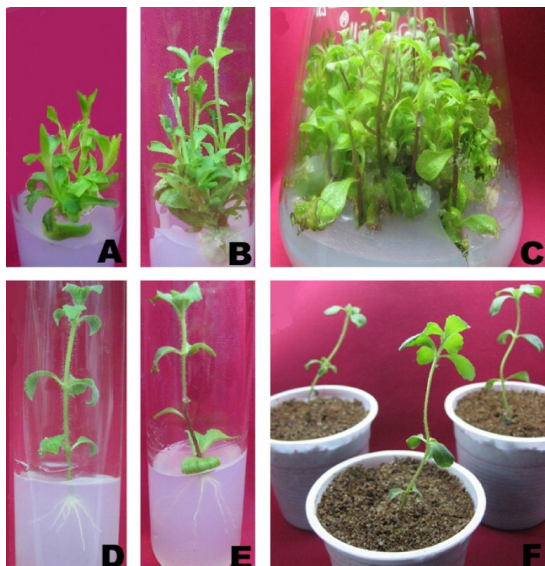


Dodatak **citokinina** potiče stvaranje multiplih izdanaka

## Umnažanje biljaka aksilarnim pupovima

- ☐ U prirodi je vršni pup najčešće dominantan
- ☐ Aplikacijom citokinina uklanja se dominacija vršnog pupa i potiče razvoj bočnih pupova
- ☐ Nastali izdanci se odvajaju i naknadno zakorjenjuju na mediju bez citokinina i/ili uz smanjenje anorganskih soli u mediju (npr.  $\frac{1}{2}$  MS medij), i /ili uz dodatak auksina
- ☐ Nastali izdanci genetički su stabilni i identični majčinskoj biljci
- ☐ **Umnažanje biljaka metodom aksilarnih pupova je najpogodnija metoda ukoliko želimo regenerirati prave klonove.**

## Mikropropagacija stevije



Dodatak citokinina potiče stvaranje multiplih izdanaka na eksplantatu nodalnog segmenta.

Pojedini izdanci se odvajaju i presađuju na medij za zakorjenjivanje.  
Kompletne biljčice se presađuju u zemlju.

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

## Mikropropagacija kanabisa

### Citokinini potiču stvaranje multiplih izdanaka

Umnožavanje vrste *Cannabis sativa* na mediju MS s 0,5  $\mu$ M TDZ

### Auksini potiču razvoj korijena

Ukorjenjivanje na mediju 1/2MS uz dodatak 500 mg/L aktivnog ugljena i 2,5  $\mu$ M IBA



## Uspostavljanje metode mikropropagacije multiplim izdancima

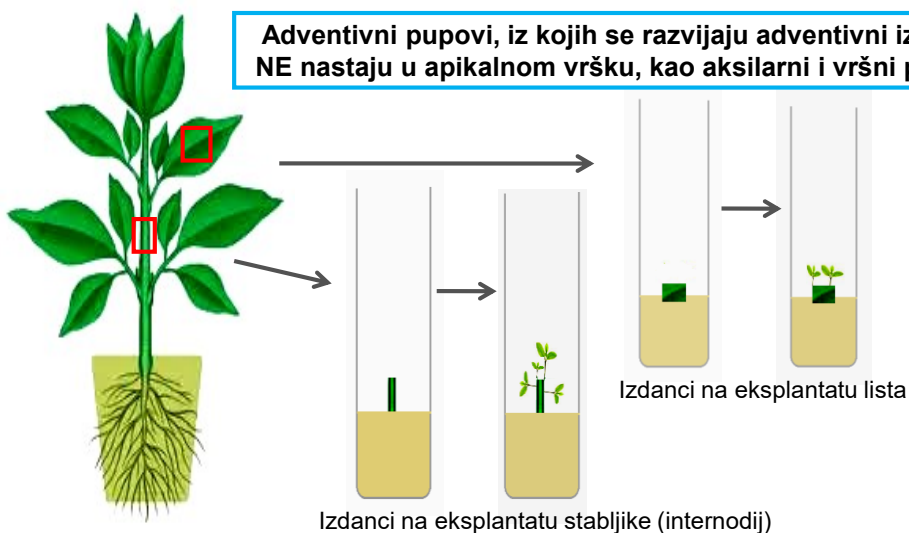
Učinak različitih tipova i koncentracije citokinina na množenje i proliferaciju nodalnih eksplanta u *C. sativa in vitro*

| Growth Regulator | Conc. ( $\mu\text{M}$ ) | 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 ADVENTIVNIH IZDANAKA

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

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

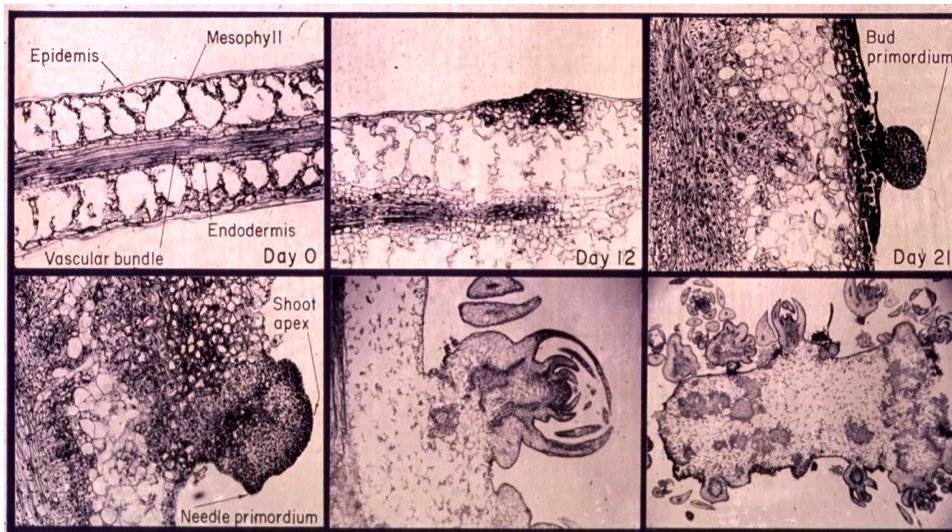


## Adventivni izdanci

Adventivno = razvitak struktura iz začetka, na neuobičajenim mjestima, **iz nemeristemske stanice**



## Razvoj adventivnih pupova iz tkiva lista



Stanice mezofila lista se dediferenciraju, učestalo se dijele i formiraju pup.

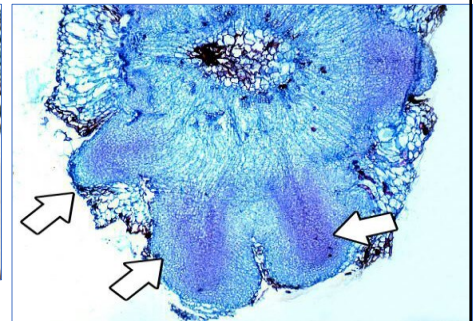
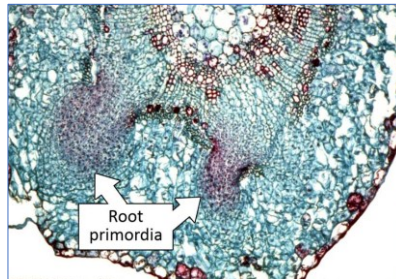
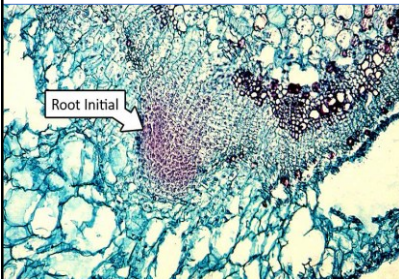
Rediferencijacijom stanica nastaje meristemska struktura iz koje se razvija pup, pa izdanak.

**Adventivni izdanci potiču se dodatkom citokina**

## Stvaranje adventivnog korijena na izdancima/reznicama

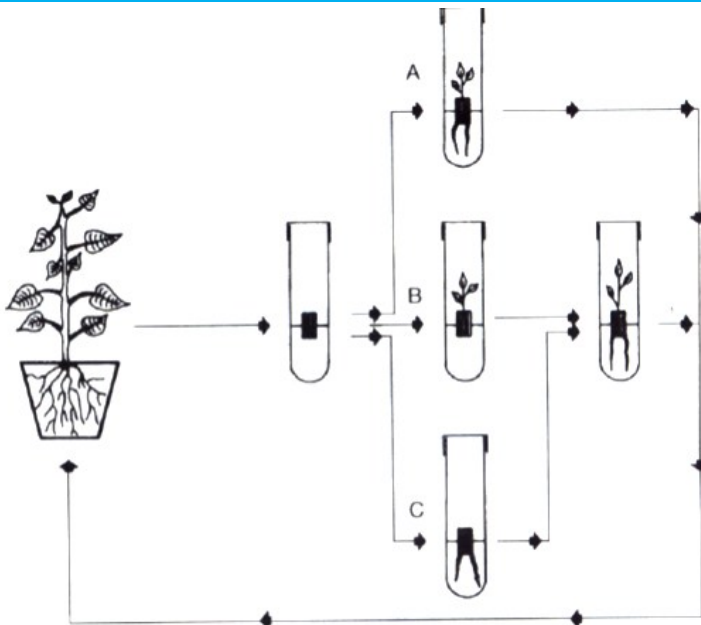
Stvaranje adventivnog korijena uključuje:

- 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



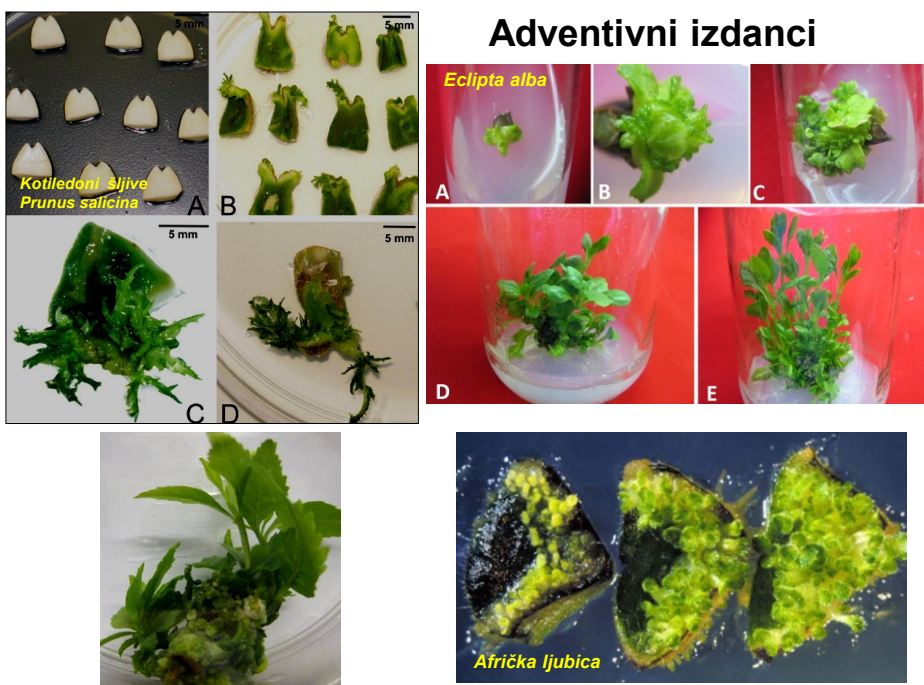
Adventivno korijenje potiče se dodatkom auksina.

## Mikropropagacija adventivnim izdancima



1. Indukcija adventivnih izdanaka.
  2. Indukcija adventivnog korijenja na svakom izdanku.
- Regeneracija kompletne biljke koja se prenosi u vanjske uvjete.

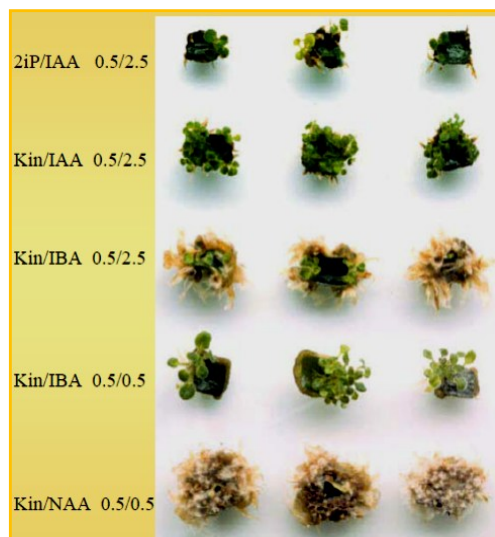
## Adventivni izdanci



## U kratkom roku, mikropropagacijom adventivnim izdancima, moguće je proizvesti milijune sadnica



- ❑ Teoretski, moguće je potaknuti adventivne izdanke na bilo kojem eksplantatu bilo koje biljke, no u praksi je to teško postići.
- ❑ Često je traganje za najpogodnijim medijem za indukciju adventivnih pupova i najpogodnijim eksplantatom za mikropropagaciju bezuspješno, a uvijek je mukotrpno.



## KULTURA KORJENA

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



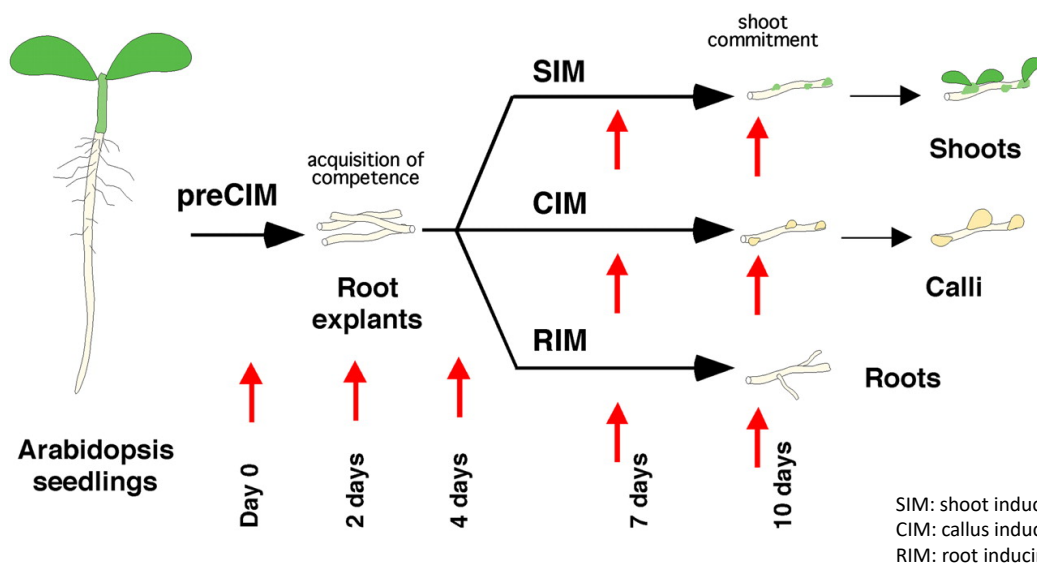
Kultura korijena u bioreaktoru

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 biotehnošku proizvodnju biljnih metabolita



## Indukcija adventivnih izdanaka i kalusa na eksplantatu korijena uročnjaka



## 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\*

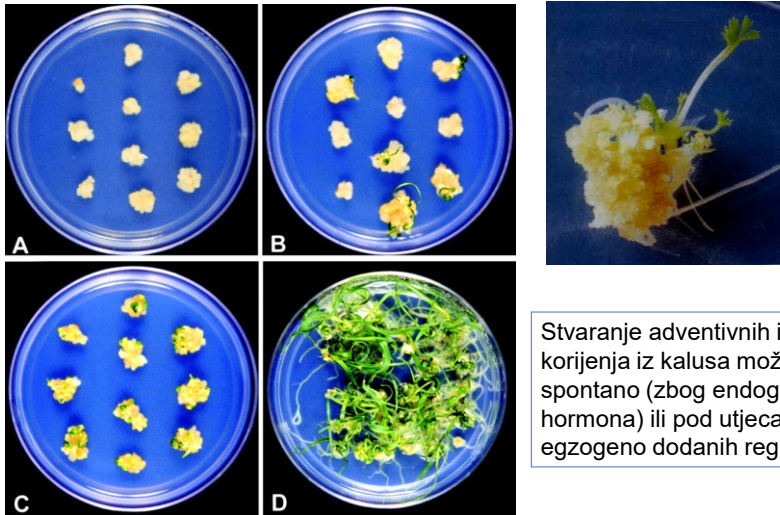
| Family                                                  | Name                               | Role during <i>de novo</i> shoot organogenesis                                                                                                                                                                                                                       | Gene expression patterns during <i>de novo</i> shoot development |               | Refs       |
|---------------------------------------------------------|------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------|---------------|------------|
|                                                         |                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                      | CIM                                                              | SIM           |            |
| Cytokinin receptor                                      | AHK2                               | <i>ahk</i> mutants are resistant to <i>de novo</i> shoot organogenesis.                                                                                                                                                                                              | Downregulated                                                    | Downregulated | [27,36,89] |
|                                                         | AHK3                               |                                                                                                                                                                                                                                                                      | No change                                                        | Downregulated |            |
| Type A-ARR (negative regulators of cytokinin pathway)   | AHK4/CRE1/WOL1                     |                                                                                                                                                                                                                                                                      | Downregulated                                                    | Upregulated   |            |
|                                                         | ARR3, ARR5, ARR6, ARR7, ARR16      | Cytokinin-induced shoot regeneration capacity is compromised in transgenic <i>Arabidopsis</i> plants overexpressing type A-ARR genes. <i>ARR15</i> is a key gene in the competence acquisition phase and <i>ARR5</i> indicates the early stages of callus formation. | No change                                                        | Upregulated   | [36,45,90] |
|                                                         | ARR15                              |                                                                                                                                                                                                                                                                      | Downregulated                                                    | Upregulated   |            |
|                                                         | ARR1                               | Ectopic expression of type B-ARR genes promotes cytokinin responses and shoots formation without cytokinin.                                                                                                                                                          | No change                                                        | Downregulated | [91,92]    |
| Type B-ARR (transcription factors of cytokinin pathway) | 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 <i>AUX/IAA</i> genes are affected during <i>de novo</i> shoot organogenesis.                                                                                                                                                                                     | Upregulated                                                      | Upregulated   | [37]       |
|                                                         | 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 <i>de novo</i> meristem.                                                                                                                                                                                            | Upregulated   | Upregulated   | [6,9,20–25, 27,50,79]      |
|                   | PIN2, PIN5                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Downregulated | Downregulated |                            |
|                   | PIN3, AUX1                                                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Upregulated   | No change     |                            |
| SAM related genes | WUS, STM                                                            | The shoot apical meristem-related genes are involved in <i>de novo</i> shoot initiation and development.                                                                                                                                                                                          | No change     | Upregulated   | [39,40,46,47, 50,54,72–81] |
|                   | CLV3, CUC1, CUC2, RGD3                                              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Upregulated   | Upregulated   |                            |
|                   | CUC3                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Downregulated | No change     |                            |
|                   | RID3                                                                |                                                                                                                                                                                                                                                                                                   | Upregulated   | No change     |                            |
| AP2/ERF           | ESR1                                                                | <i>ESR2</i> is involved in shoot formation through transcriptional regulation of CUC1. <i>ESR1</i> confer cytokinin-independent shoot formation, could interact with HD-ZIP III proteins and is a direct target of MONOPTEROS. <i>RAP2.6L</i> is a key gene of <i>de novo</i> shoot regeneration. | ?             | ?             | [35,37,54–56, 58–60]       |
|                   | 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 <i>Arabidopsis</i> mutant <i>hoc</i> overproduces cytokinin and displays the unique capability to regenerate whole plants from root explants grown on medium without added phytohormones.                                                                                                     | Upregulated   | Upregulated   | [41,49,55,60]              |

\*List of genes and/or families involved in the different phases of DNSO with their expression profiles and roles during this organogenetic process. The expression profiling was done using available data [37].

doi: 10.1016/j.tplants.2011.08.004

## Stvaranje adventivnih izdanaka i korijenja iz kalusa = **POSREDNA ORGANOGENEZA**

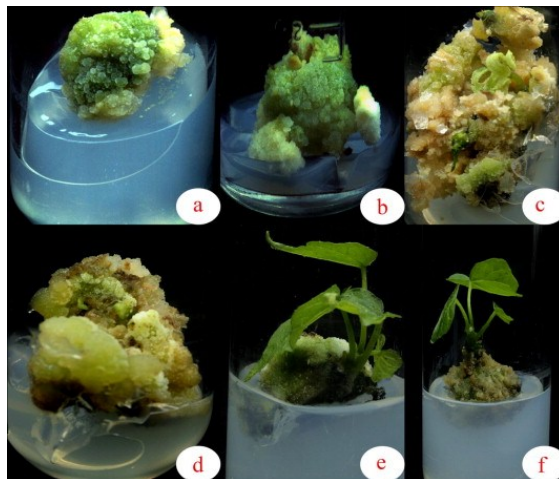


Stvaranje adventivnih izdanaka i korijenja iz kalusa može biti spontano (zbog endogene razine hormona) ili pod utjecajem egzogeno dodanih regulatora rasta.

Kultura kalusa je podložna različitim genskim modifikacijama, pa biljke regenerirane posrednom organogenezom ne moraju nužno biti pravi klonovi majčinske biljke!

### Indirektno (posredno) stvaranje adventivnih izdanaka

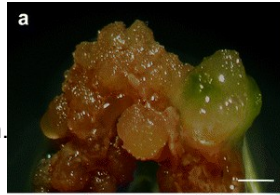
- na primarnom eksplantatu proliferira kalus, koji potom diferencira u izdanak



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.

### Indirektna organogeneza izdanaka *Dieffenbachia* cv. *Camille*

1. Induction of calli on leaf explants on MS medium supplemented with 5  $\mu\text{M}$  TDZ and 1  $\mu\text{M}$  2,4-D. Bar = 500  $\mu\text{m}$ .



2. Small green meristems (arrows) formed on the surface of calli on the shoot induction medium containing 80  $\mu\text{M}$  2iP and 2  $\mu\text{M}$  IAA within 4 wk.

Shoot buds (arrow) formed from these meristems by the sixth week.



Leaf formation and shoot elongation occurred.

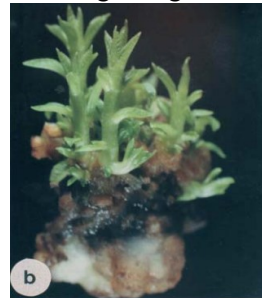
Well-developed shoots with roots within 8 wk of culture



### Regeneracija izdanaka *Direktna organogeneza* vs. *Indirektna organogeneza*

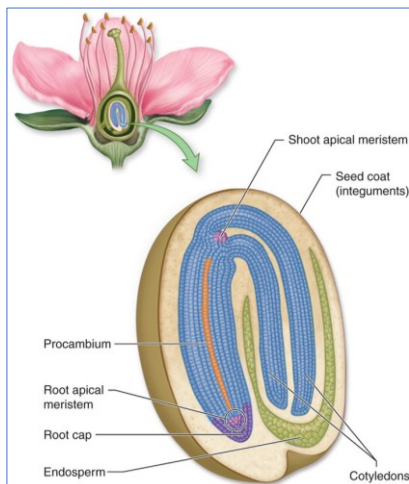


Zakorijenjivanje



Izdanci  
regenerirani iz  
kalusa nisu nužno  
genetički identični!

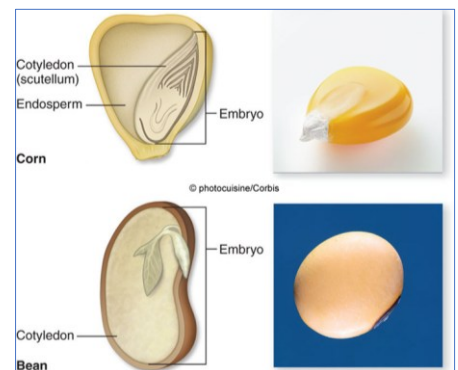
## KULTURA SJEMENA



-za biljke koje imaju slabo klijavo sjeme (npr. orhideje)  
 -za selekciju i probir biljaka s posebnim svojstvima (npr. transformanti uročnjaka, probir biljaka nakon mutageneze)  
 -za 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 ( $3n$ )

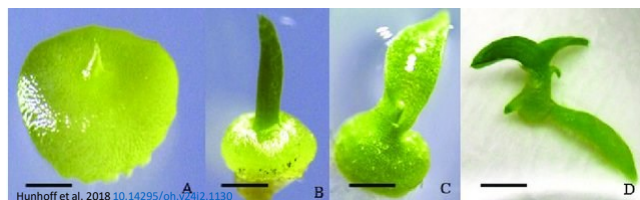


## KULTURA SJEMENA

- ❑ 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 tvrdi vanjski lupin treba mu više vremena da proklija u poljskim uvjetima. Neke sjemenke ne mogu klijati zbog tvrde sjemenke lupine, pa se iz njih mogu izolirati embriji i uzgajati u kulturi *in vitro*.

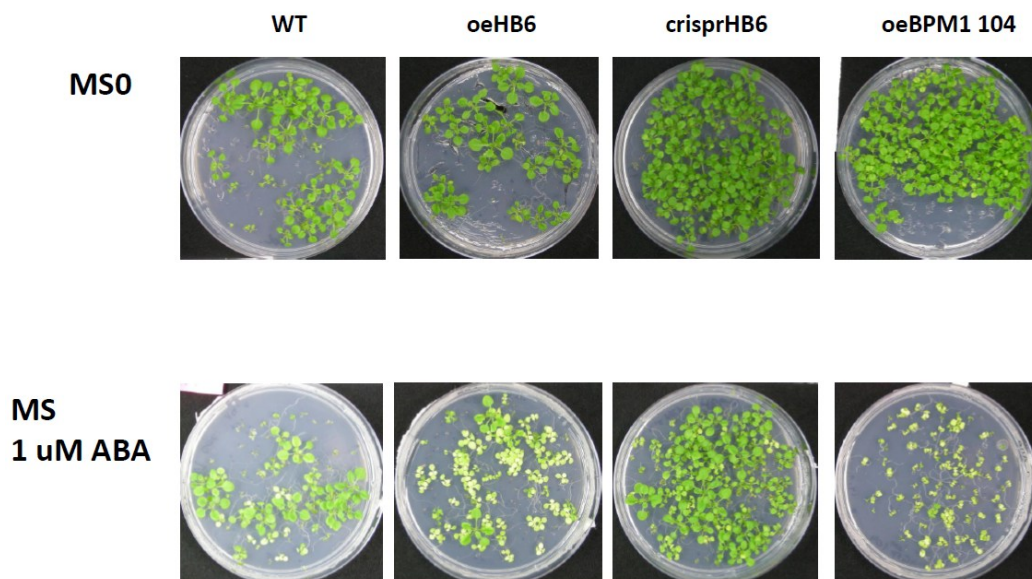
### SULTURA SJEMENA ORHIDEJE

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.

## Istraživanja funkcije gena: testovi germinacije sjemenki

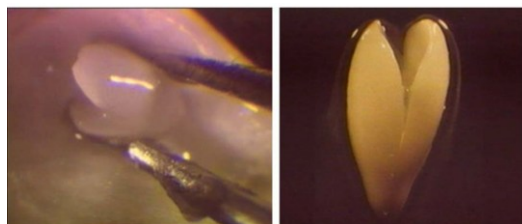
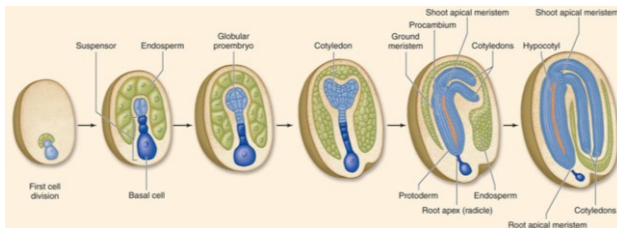


## KULTURA EMBRIJA

Nakon sterilne izolacije embrija iz zrelih ili nezrelih sjemenki u *in vitro* uvjetima regenerira se kompletna biljka. Embriji su pogodni za oplemenjivanje: transformacije i mutagenezu

Ovisno o vrsti embrija koji se unosi u kulturu:

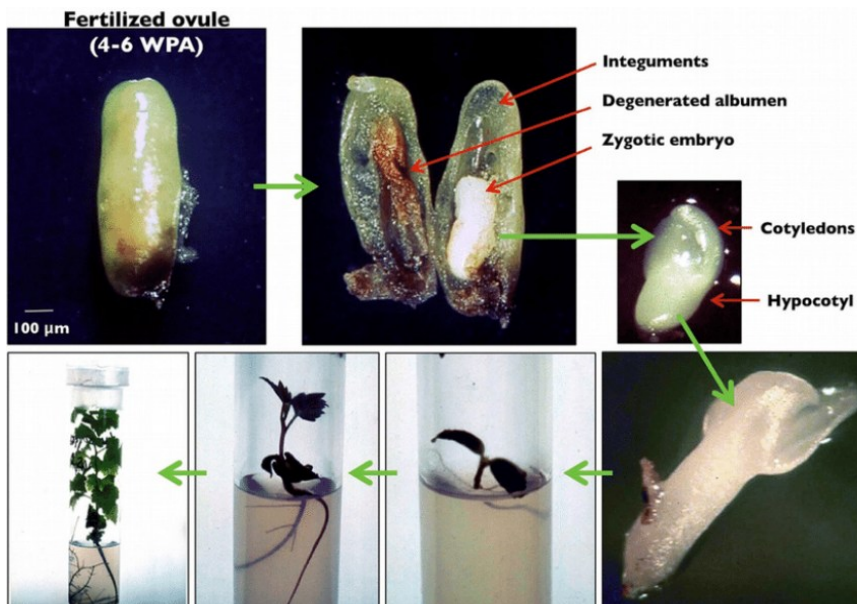
- ❑ **Kultura zrelih embrija:** proces uzgoja zrelih izoliranih embrija. Radi se kada embriji brzo gube vijabilnost u *in vivo* uvjetima, embriji ne mogu probiti tvrdnu sjemenu lupinu i izrasti u biljku ili kada je klijanje sjemena inhibirano.
- ❑ **Kultura nezrelih embrija:** Koristi se za uzgoj nezrelih, slabih ili malih embrija koji se u prirodnim uvjetima ne uspijevaju razviti u hibridne biljke zbog zastoja u embrionalnom razvoju ili degeneracije endosperma. Tehnika poznata kao **SPAŠAVANJE EMBRIJA**, jer se uzgojem embrija *in vitro* potiče razvoj u potpunu biljku.



Izolacija nezrelog embrija krumpira

## Embryo rescue / Spašavanje embrija

- Jedna od najranijih uspješnih tehnika *in vitro* kulture
- Nezreli embriji, koji obično ne bi preživjeli do zrelosti *in situ* se izoliraju i uzgajaju *in vitro* u normalnu biljčicu.



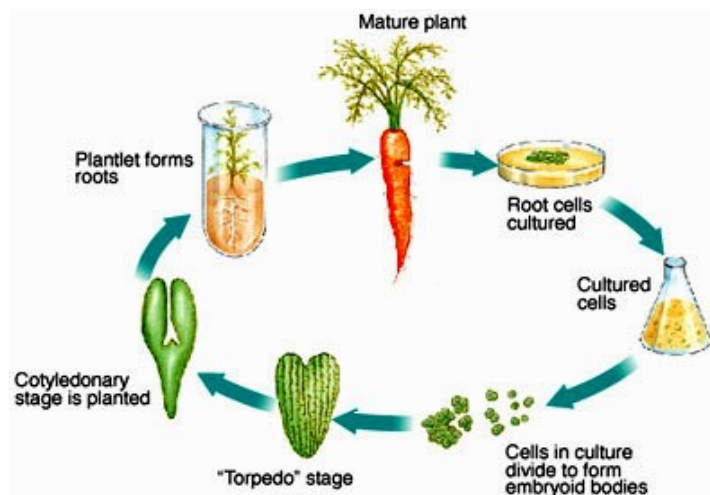
## Primjena kulture embrija

- ☐ Za regeneraciju biljaka nakon križanja diploida i tetraploida.
- ☐ Regeneracija biljaka nakon križanja različitih vrsta
- ☐ Za bržu multiplikaciju, naročito za razmnožavanje 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



## RAZVOJ EMBRIJA IZ SOMATSKIH STANICA

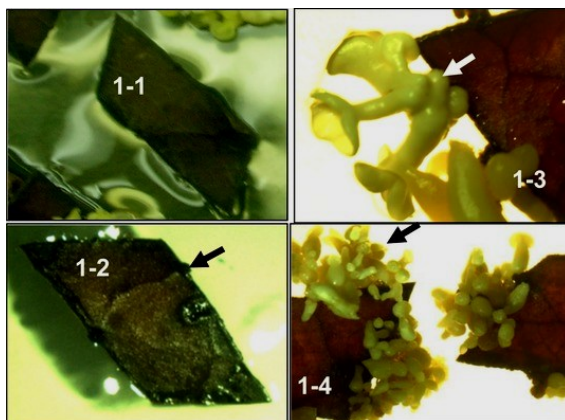
- ❑ Najnovija istraživanja ukazuju na to da je evolucijski somatska embriogeneza primarni način umnažanja biljaka i da se zigotna embriogeneza razvila naknadno (Koska et al. 2025)
- ❑ **Partenogeneza** je proces koji se odvija u prirodi i uključuje rast i razvoj embrija bez oplodnje ženske spolne stanice.
- ❑ Tkiva koja su dio embrijonske vreće ili ona koja je okružuju (diploidna majčinska tkiva; somatske stanice) mogu se razviti u embrij.
- ❑ To je odličan način prirodnog klonalnog razmnožavanja biljaka!
- ❑ Somatska embriogeneza je razvoj embrija iz somatskih stanica u odgovarajućem okruženju *in vitro*. 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, srčoliki, torpedni (ili skutelarni stadij u jednosupnica) i kotiledonarni stadij razvoja.



## SOMATSKA EMBRIOGENEZA

**Somatska embriogeneza je 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

## KAKO POTAKNUTI SOMATSKU STANICU DA SE PONAŠA KAO OPLOĐENA JAJNA STANICA?

Somatska embriogeneza započinje **inicijacijom** - dolazi do dediferencijacije pojedinih stanica koje postaju kompetentne za embriogenezu.

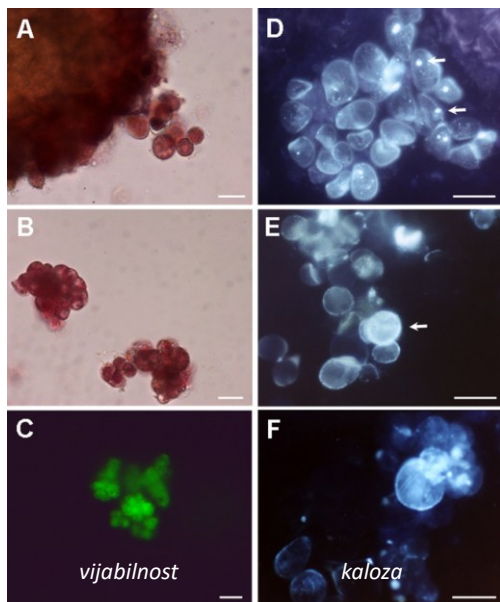
- Stanice prelaze iz somatskog u embriogeno stanje.
- Biljka nastaje embriogenezom iz jedne somatske stanice!

### ❑ 1. Inicijacija i indukcija somatske embriogeneze

- 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.  $\text{NH}_4^+$ ) 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 podrazumijeva dediferencijaciju pojedinih stanica eksplantata
- ❑ Stanice postaju kompetentne za embriogenezu (prijelaz u embriogeno stanje)

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 st. stjenke....
- ❑ Embriogene stanice nakupljaju kalozu u st.st.

## ❑ 2. Ekspresija embriogenog potencijala

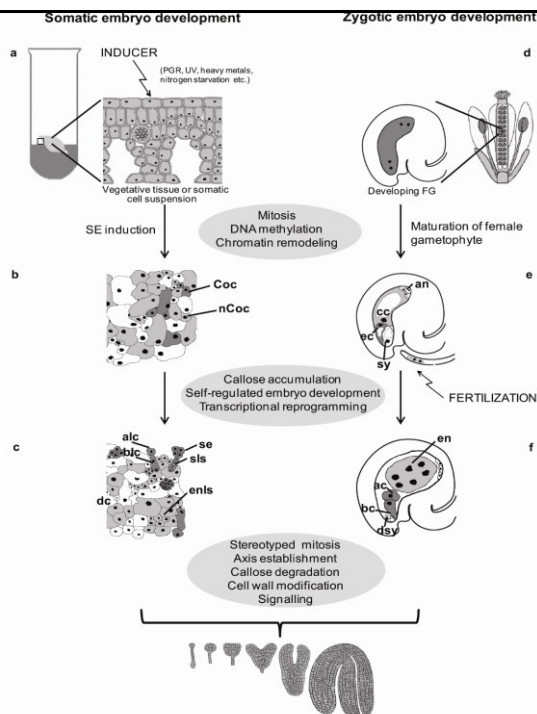
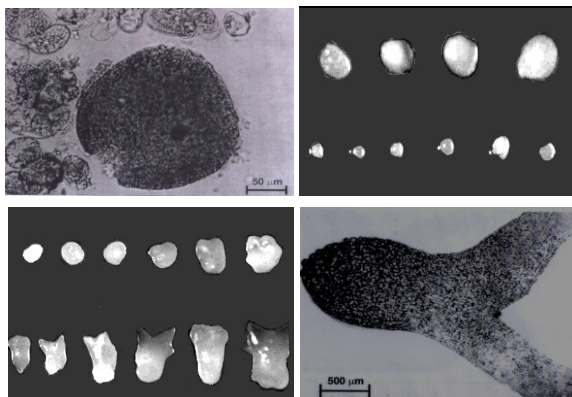
Dolazi do razvoja embrija iz embriogeno determiniranih stanica.

Razvoj embrija ide spontano, no najčešće tek nakon uklanjanja čimbenika važnih za indukciju embriogeneze (npr. presađivanje na podlogu bez 2,4D).

\* 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

Faze embrija:  
Globuli  
Srcoliki  
Torpedo  
Kotiledonarni



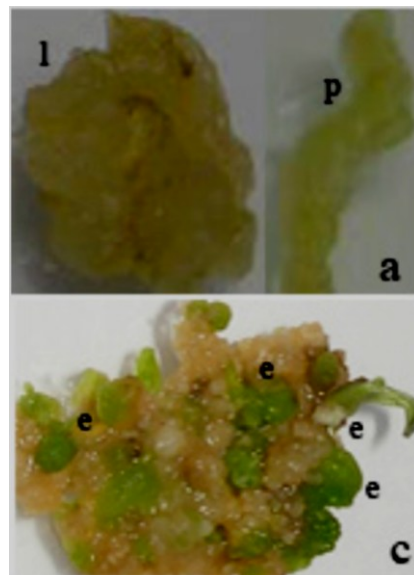
Leljak-Levanić et al. 2015

## Somatska embriogeneza može biti:

- ❑ Direktna – neposredno iz eksplantata
- ❑ Posredna (indirektna) – najprije dolazi do indukcije embriogenog kalusa, u kojem se uz ostale stanice nalaze i stanice koje su totipotentne i spremne za embriogenezu



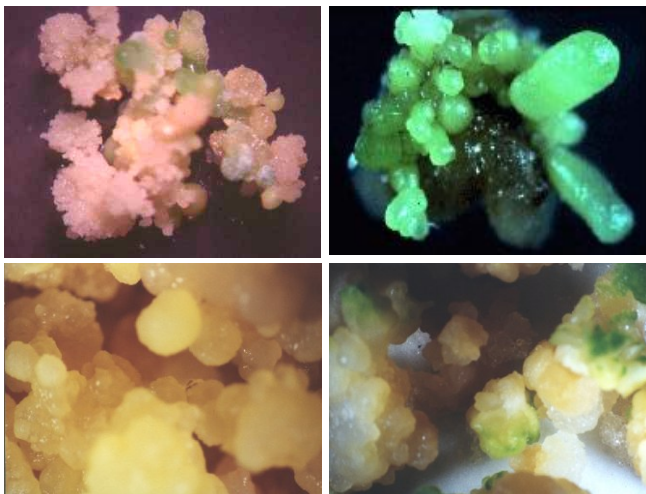
Kakao: direktna embriogeneza iz epiderme kotiledona



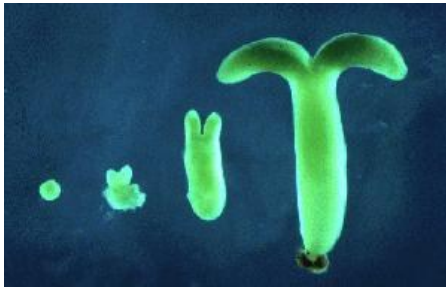
Indirektna somatska embriogeneza lucerne

## MIKROPROPAGACIJA SOMATSKOM EMBRIOGENEZOM

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



Embriogeni kalus =  
Stanice kalusa +  
Proembriogene  
stanice + Somatski  
embriji



❑ Somatska embriogeneza – formiranje bipolarnih struktura (za razliku od adventivne organogeneze).

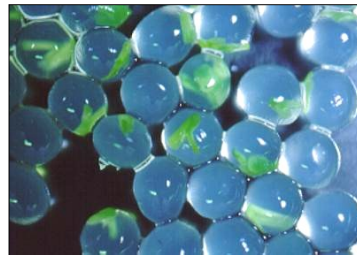
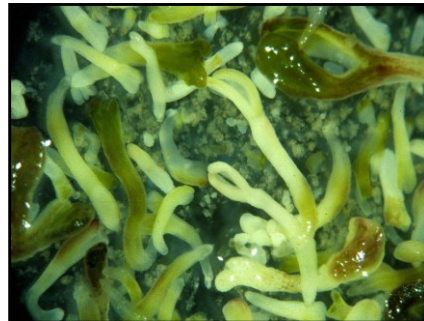
❑ Za somatsku embriogenezu važna je uspostava polarnosti.



*Embriji četinjača u kulturi*

## Somatska embriogeneza

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



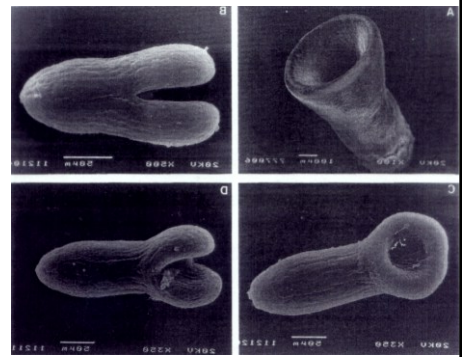
## Problemi u somatskoj embriogenezi:

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



Normalno

Aberantno

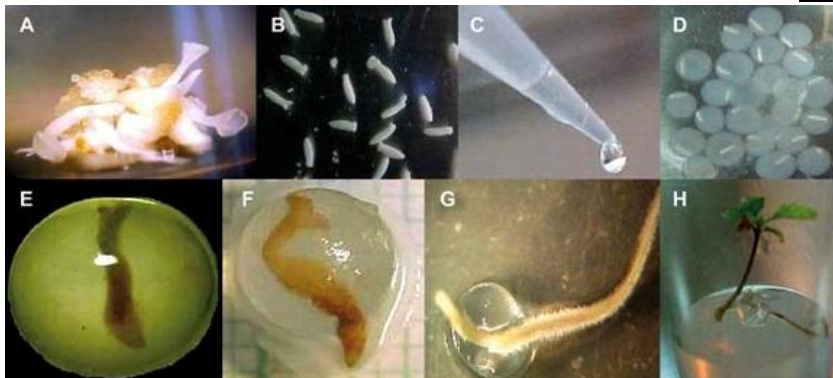


## Umjetno sjeme

- klijavost do 50%

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

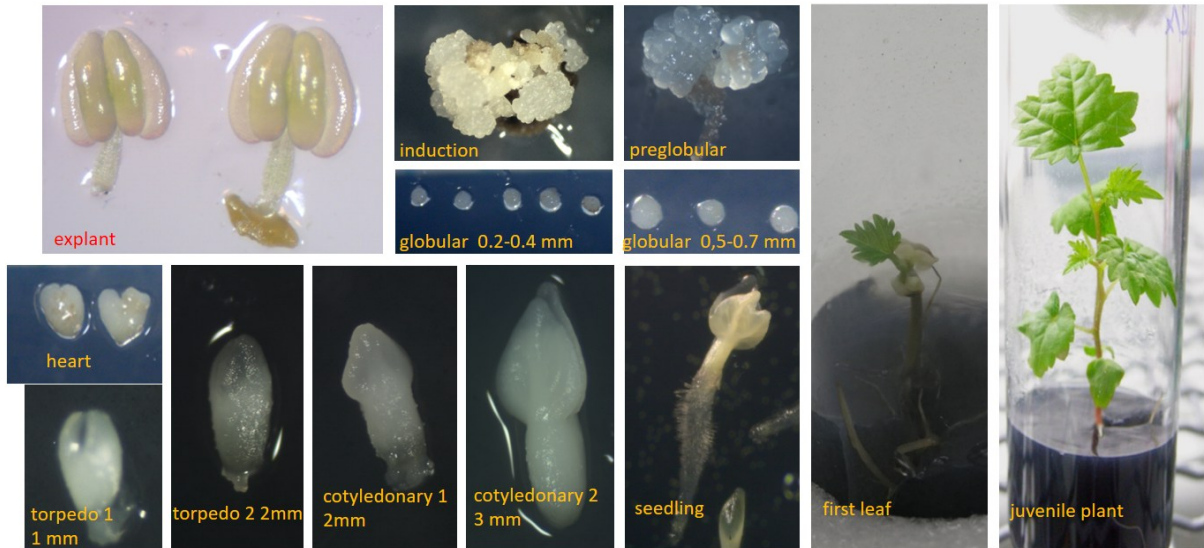
- Osušeno (u polioksietilenu) ili hidratizirano sintetsko sjeme



Encapsulated in different artificial endosperms: components of the Murashige and Skoog medium,  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  IAA,  $0.5 \text{ mg L}^{-1}$  NAA,  $2 \text{ mg L}^{-1}$  BAP and  $30 \text{ g L}^{-1}$  sucrose, 2 – 5% sodium alginate,  $\text{CaCl}_2$ .

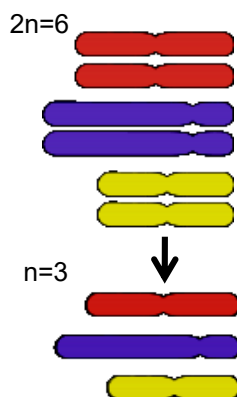
# Inicijacija, indukcija i ekspresija somatske embriogeneza u vinovoj lozi

doi.org/10.1038/s42003-025-07712-w

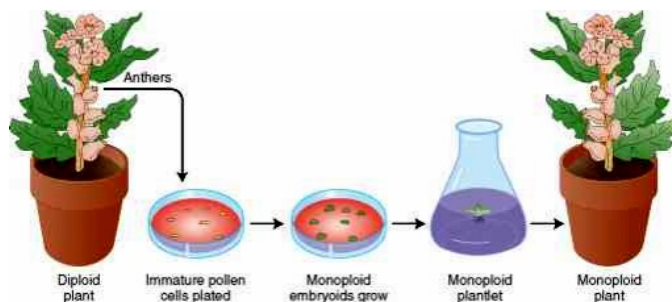


## HAPLOIDI

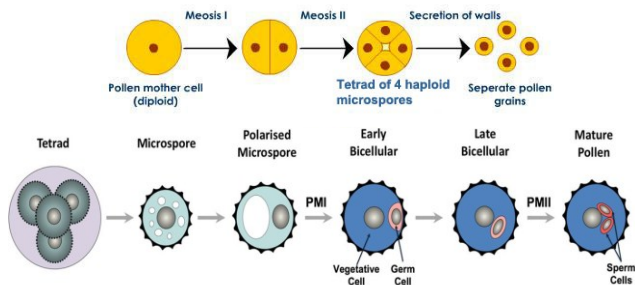
Biljke koje u sporofitu imaju gametofitski broj kromosoma



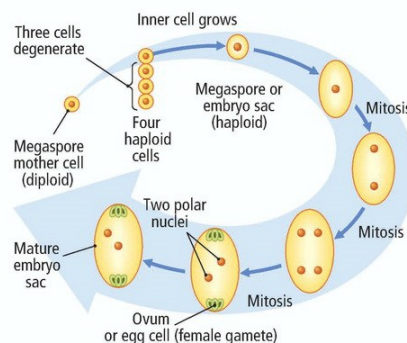
- ☐ Haploidan broj kromosoma je onaj broj kromosoma koliki je u gametama.
- ☐ Biljke vrlo dobro podnašaju promjene u broju kromosoma – poliploidiju, aneuploidiju, haploidiju...
- ☐ Haploidi se (najčešće) razvijaju iz gameta embriogenezom



Muški gametofit  
= peludno zrnce



Ženski gametofit  
= embrionska vreća



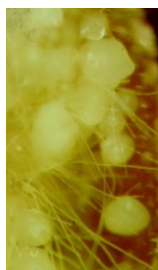
## DOBIVANJE HAPLOIDA

**Androgeneza** – stvaranje embrija iz muške gamete

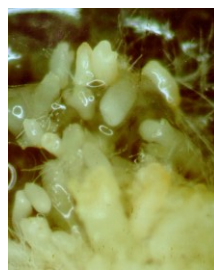
- ☐ Najčešća *in vitro* metoda za dobivanje haploidnih biljaka
- ☐ Mikrosporogeneza/mikrogametogeneza vode do formiranja haploidnih embrija



Antera u kulturi



Globularni haploid



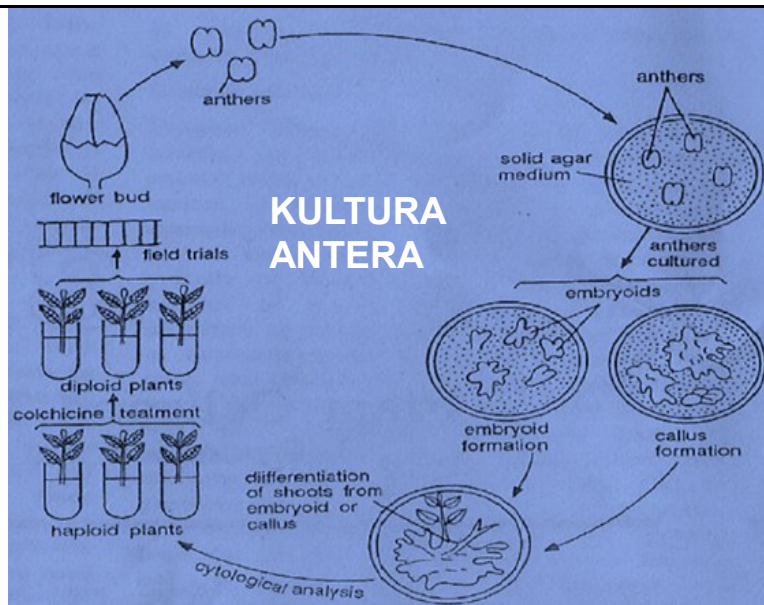
Scoliki haploid

**Partenogeneza** – iz neoplođene jajne stanice

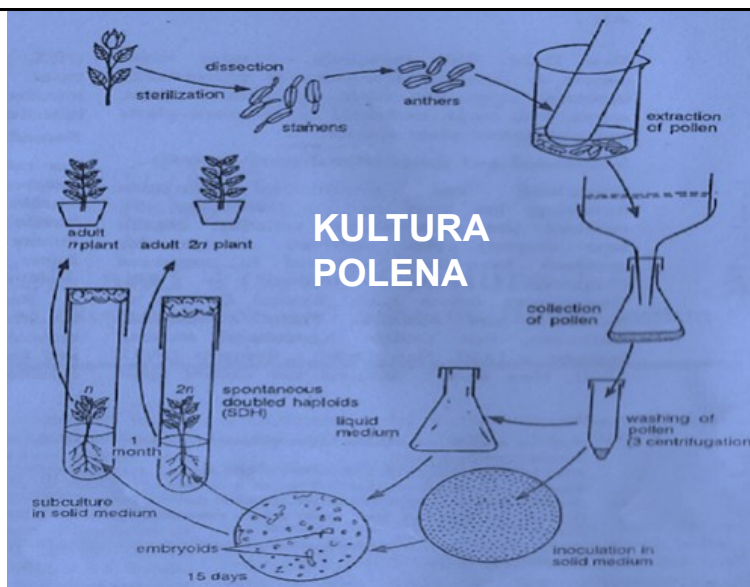
- haploidi u prirodi najčešće nastaju partenogenezom

**Apogamija** – iz drugih stanica mega-gametofita (sinergide)

**APOMIKSIJA**: stvaranje embrija bez oplodnje, iz DIPLOIDNIH stanica sjemenog zametka



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



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

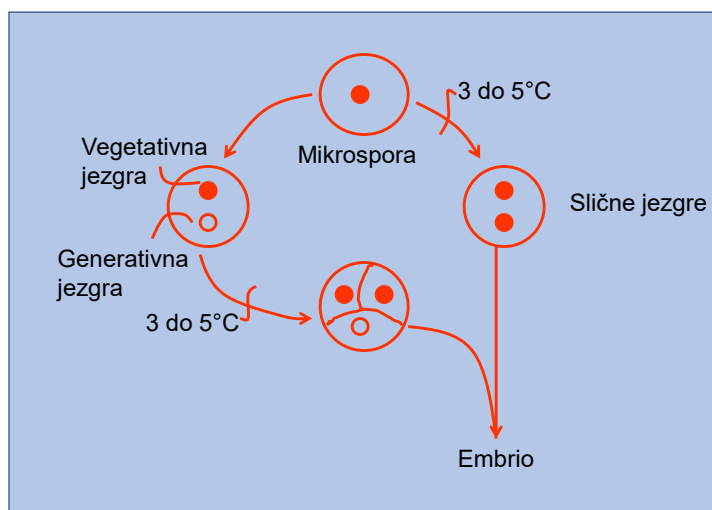
## Čimbenici koji utječu na razvoj haploida *in vitro*

- ❑ 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.
- ❑ Hladni predtretman, od 3 - 5 °C, 2 do 4 dana, potiče simetrične diobe i nastanak haploida.

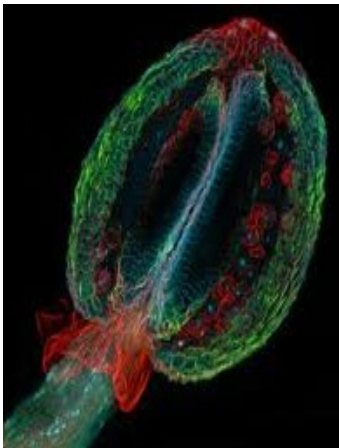


Razvojni stadiji cvjeta duhana.  
Najpogodniji za dobivanje  
haploida je stadij 2.

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



## Hranjiva podloga



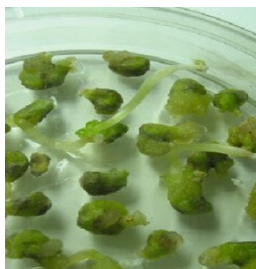
i. Kultura antera – osnovne komponente mikro- i makro soli, šećer (ponekad povišene konc. 8-12%) i vitamini;  
Regulatori rasta:

- a. **nepotrebni** – direktan razvoj embrija iz mikroskore (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 mikroskora/polena – dodatak glutamina, serina i inozitola

## Kultura plodnica - dobivanje haploida iz ženskih gameta



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

# HAPLOIDI

- ☐ 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**
- ☐ Nakon diploidizacije nastaju homozigotne 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.

