

ROZDZIAŁ XIX. **INDUKCJA TKANKI KALUSOWEJ  
I PĘDÓW PRZYBYSZOWYCH  
W KULTURZE *IN VITRO* FIOŁKA  
AFRYKAŃSKIEGO**



## CZĘŚĆ TEORETYCZNA

**Roślinne kultury *in vitro*** oznaczają hodowle protoplastów, komórek, tkanek, organów i ich części wyizolowanych z roślin macierzystych prowadzone *in vitro* (z łac. „w szkłe”), na sztucznych podłożach, w sterylnych, ściśle określonych pod względem fizycznym i chemicznym warunkach. Podstawy rozwoju roślinnych kultur *in vitro* stworzyła ogłoszona przez Gottlieba Haberlanda w 1902 r. **teoria totipotencji komórek roślinnych**, zgodnie z którą każda żywa komórka somatyczna (lub protoplast) w odpowiednich warunkach jest zdolna do odtworzenia (regeneracji) całej rośliny.

Kultury muszą być inicjowane i prowadzone w warunkach sterylnych. Pożywki stosowane w hodowlach *in vitro* zawierają źródło węgla i energii (sacharydy), makro- i mikroelementy, witaminy, regulatory wzrostu i rozwoju, dodatkowe składniki organiczne. Pożywki mogą być płynne (składniki rozpuszczone w wodzie) lub stałe (roztwór wodny zestalony agarą), powinny mieć odpowiednie pH i ciśnienie osmotyczne. W roślinnych kulturach *in vitro* najczęściej stosowane są pożywki: MS (Murashige i Skoog), SH (Schenk i Hildebrandt), B5 (Gamborg), NN (Nitsch i Nitsch).

W celu zainicjowania kultury komórek lub tkanek wyizolowany z rośliny fragment (**eksplantat**) poddaje się procedurze odkażania, a następnie umieszcza się go na odpowiedniej pożywce agarowej. W ciągu 2–3 tygodni na eksplantacie wytwarzana jest słabo zróżnicowana **tkanka kalusowa**. Po uformowaniu na eksplantacie kalus odcina się i przenosi na nowe podłoże (**passuje się**) celem dalszego namnożenia komórek.

**Kultury zawieszinowe (komórkowe)** inicjuje się przez przeniesienie kalusa na pożywkę płynną. Hodowle prowadzi się w odpowiednich naczyniach (np. kolbach stożkowych) umieszczonych na wytrząsarkach. Zawiesina komórkowa składa się

z agregatów i pojedynczych komórek. Pasażowanie polega na rozcieńczeniu zawiesiny świeżym podłożem.

Kultury komórek i tkanek roślinnych mogą być wykorzystywane jako źródło wartościowych produktów roślinnych (np. metabolitów wtórnych), które są stosowane jako leki, naturalne barwniki, środki zapachowe w przemyśle farmaceutycznym, spożywczym i kosmetycznym.

Eksplantaty, kalus lub komórki z hodowli zawiesinowej mogą w odpowiednich warunkach wykazywać zdolność do **somatycznej embriogenezy** i tworzenia **zarodków somatycznych** lub **organogenezy** (powstawanie organów przybyszowych: pąków, pędów, korzeni). Różnicowanie organów zależy od odpowiedniej proporcji auksyn do cytokinin w podłożu.

**Mikrorozmnażanie (rozmnażanie klonalne)** polega na wykorzystaniu techniki kultur *in vitro* do regeneracji z eksplantatu dużej liczby roślin genetycznie identycznych z tą, z której pochodzi eksplantat. Metoda ta jest powszechnie stosowana do produkcji roślin, które trudno rozmnażają się wegetatywnie metodami tradycyjnymi i roślin „elitarnych” o dużej wartości jednostkowej. Pozwala także na produkcję roślin wolnych od chorób (np. wirusowych) oraz stanowi etap eksperymentów prowadzących do otrzymania **roślin modyfikowanych genetycznie**. Zarodki somatyczne kapsułkowane w odpowiednich otoczkach (np. alginianu sodu) służą do produkcji tzw. **sztucznych nasion**.

## CZĘŚĆ PRAKTYCZNA

---

### Cel ćwiczenia

1. Zapoznanie z podstawami teoretycznymi i zasadami pracy obowiązującymi przy inicjowaniu i prowadzeniu roślinnych kultur *in vitro*.
  2. Zbadanie wpływu regulatorów wzrostu na indukcję tkanki kalusowej i mikrorozmnażanie fiołka afrykańskiego.
- 

### Materiał

rośliny fiołka afrykańskiego hodowane *in vivo* lub *in vitro*

## Odczynniki

70%  $C_2H_5OH$ , 50% (v/v) wodny roztwór preparatu handlowego zawierającego podchloryn sodu (np. Ace, Domestos) z kilkoma kroplami detergentu, agarowa pożywka MS (por. załącznik 5, tabela 1) w następujących wariantach różniących się stężeniem [ $mg\ dm^{-3}$ ] regulatorów wzrostu: kwasu  $\alpha$ -naftalenooctowego (NAA) i kinetyny (KIN) (por. załącznik 5, tabela 2):

- a) wariant I –  $MS_{1,0\ NAA + 0,2\ KIN}$
- b) wariant II –  $MS_{2,0\ NAA + 0,2\ KIN}$
- c) wariant III –  $MS_{0,4\ NAA + 0,8\ KIN}$
- d) wariant IV –  $MS_{0,2\ NAA + 0,5\ KIN}$

## Sprzęt laboratoryjny

komora z laminarnym przepływem powietrza

### Sterylny sprzęt laboratoryjny

szerokoszyjna kolba Erlenmeyera (200–300  $cm^3$ ), kolby ze sterylną wodą, pęsety, skalpele, szalki Petriego z bibułą, szalki Petriego (puste)

## Wykonanie doświadczenia

### 1. Sterylizacja materiału roślinnego

Zdrowe, w pełni rozwinięte liście odciąć od roślin hodowanych *in vivo* i przemyć pod bieżącą wodą. Ogonki liściowe z fragmentem blaszki liściowej umieścić w sterylnej kolbie, zalać 70%  $C_2H_5OH$  na 1 minutę. Po usunięciu etanolu ogonki liściowe zalać roztworem podchlorynu sodu z detergentem, sterylizować 10 minut. Po zlaniu podchlorynu sodu materiał płukać pięciokrotnie sterylną wodą.

### 2. Założenie kultury *in vitro*

Wysterylizowane ogonki liściowe z fragmentem blaszki liściowej lub liście odcięte z roślin hodowanych *in vitro* przenieść na sterylną szalkę z bibułą, osuszyć, odciąć brzeżne końce, przenosić pojedynczo do kolejnych szalek, ciąć na odcinki (eksplantaty) długości około 3 mm. Eksplantaty umieszczać na przygotowanej pożywce w kolbach Erlenmeyera zgodnie z kierunkiem wzrostu (po 3 eksplantaty w kolbie). Hodowle umieścić w pokoju hodowlanym w temperaturze 23–25°C, w stałym oświetleniu około 130  $\mu mol\ m^{-2}s^{-1}$ .

## Opracowanie wyników

Prowadzić obserwacje hodowli w odstępach dwutygodniowych. Po około 60 dniach od założenia kultury określić świeżą masę tkanek kalusowych i liczbę pędów powstałych na eksplantatach w zależności od zawartości auksyny (NAA) i cytokininy (KIN) w pożywce.

### Literatura

Malepszy S. (red.), *Biotechnologia roślin*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 2009.

Woźny A., Przybył K. (red.), *Komórki roślinne w warunkach stresu*, t. 2: *Komórki in vitro*, Wydawnictwo UAM, Poznań 2004.