

Mikrorozmnožovanie rastlín (ihličnatých drevín) metódou somatickej embryogenézy

J. Salaj, R. Matúšová, T. Salaj

Protokol

Materiál: Megagametofyty izolované z nezrelých semien

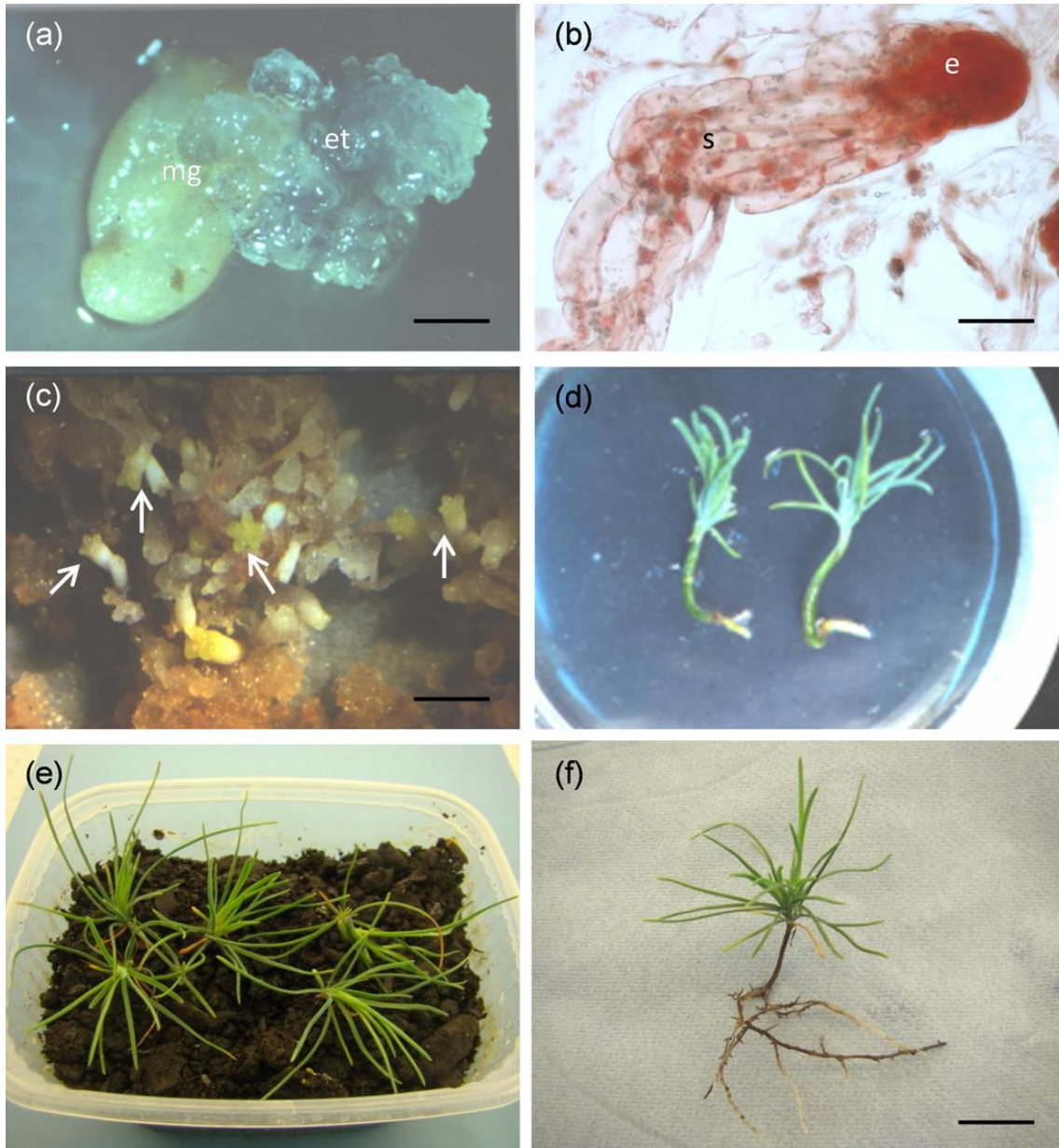
Postup: V prvej polovici júna zo stromov borovice čiernej odoberáme nezrelé šišky, ktoré v papierových vreckách umiestnime do teploty okolo 4 °C po dobu 1 týždňa. Po uplynutí tejto doby šišky dôkladne umyjeme pod tečúcou vodou a vysušíme filtračným papierom. Zo šišiek izolujeme nezrelé semená, ktoré následne sterilizujeme 10% H₂O₂ po dobu 10 minút. Následne semená prepláchneme v sterilnej destilovanej vode. Po sterilizovaní zo semien odstránime integument a megagametofyty s nezrelými embryami ukladáme na živné médium.

Živné médium: DCR (Gupta a Durzan 1985)

Kultivácia explantátov: 23-25 °C v tme. Vizuálne pozorovania pod lupou robíme v 2-3 dňových intervaloch. Po indukcii pletiva (veľkosť 0,5 mm) pletivo oddelíme od explantátu a kultivujeme ako individuálnu bunkovú líniu. Pletivá kultivujeme v pravidelných 2-týždňových intervaloch za účelom ich dlhodobého udržiavania. Embryogénnu kapacitu pletiva určujeme histologicky farbením 2% acetokarmínom a pozorovaním svetelným mikroskopom. Somatické embryá sa nám javia ako bipolárne útvary zložené zo suspenzorových a meristemických buniek.

Maturácia somatických embryí: Približne 0,5 g embryogenného pletiva prenesieme na maturačné médium (DRC médium s obsahom 25 mg.l⁻¹ kyseliny abscisovej - ABA) a kultivujeme v tme. Kontrolujeme pravidelne v 3-4 dňových intervaloch. Asi po 4-5 týždňoch sa na povrchu objavia vyvíjajúce sa somatické embryá, ktoré sú pripojené k základnému pletivu mohutným susepnzorom. Kotyledonárne somatické embryá sa objavia po 7-8 týždňoch kultivácie na maturačnom médiu.

Klíčenie a regenerácia rastlín: Jednotlivé somatické embryá pod lupou oddelíme a preložíme na DCR médium bez ABA a rastových regulátorov a obsahom 1% aktívneho uhlia. Embryá kultivujeme v tme a po predĺžení hypokotyly a kotyledonov sa embryá prenesú na svetlo v kultivačnej miestnosti. Keď somatické semenáče dosiahnu dĺžku približne 2 cm, prenesieme ich do kultivačných nádob Magenta, kde rastú približne 3-4 týždne. Ak sa na rastlinkách vytvoria funkčné korene, prenesú sa do pôdy v malých kontajneroch za účelom ďalšieho vývinu.



Mikroozmnožovanie ihličnatých drevín metódou somatickej embryogenézy (na príklade borovice): (a) – embryogénne pletivo (et) vznikajúce na megagametofyte (mg), (b) - skoré bipolárne somatické embryo v štádiu 1 (e – embryonálne bunky, s – suspensor), (c) - kotyledonárne somatické embryá (šípky), (d) - somatické semenáčky, (e) - somatické semenáčky prenesené do pôdy, (f) - somatické semenáčky rastúce v pôde po 3 týždňoch. Mierky: (a) – 1.2 mm, (b) – 200 μ m, (c) – 5 mm, (f) – 15 mm. Podľa Salaj T. et al. 2015: *Denrobiology Vol. 74*.