Množení in vitro

Mikropropagace

Definice mikropropagace

- **Micropropagation is the true-to-type propagation of a selected genotype using *in vitro* culture techniques.**
- **Most often Micropropagation is also associated with mass production at a competitive price.** [P.C. Debergh and R.H. Zimmerman/Eds./:Technology andApplication]

- **High yield plant production, grown in a nutrient rich gel under sterile lab conditions.**

  [R. Fenwick 2004]

Výhody množení *in vitro*

- malý rozměr řízku
- vysoký množitelský koeficient
- zkrácení množitelského cyklu
- možnost použití netradičních orgánů
- možnost načasování na určitý termín
- dobrý zdravotní stav (ozdravování)

Typy regeneračních procesů
(Němec 1905)

restituce = náhrada odňaté části - meristémy (meriklonové množení)

reprodukce = regenerace z již existujících základů

regenerace *de novo* = odvozování přes kalus, v něm diferenciace adventivních pupenů

viz schéma: Opatrný (1988)

Typy regeneračních procesů (Němec 1905)

schéma: Opatrný (1988)

Apikální stonkový meristém

listová primordia

izolovaný „meristém“

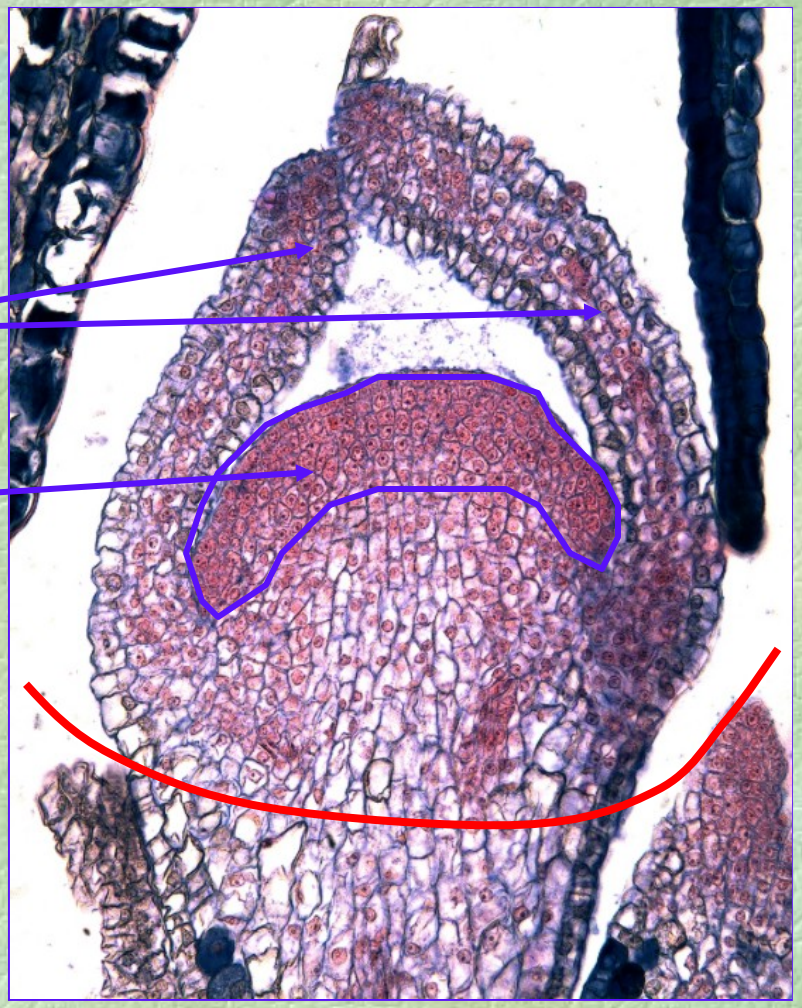
vlastní meristém

Apex stonku *Begonia rex*

listová primordia

apikální meristém

izolovaný „meristém“



Mikropropagace, klonování rostlin *in vitro*

http://www.kitchenculturekit.com/africanviolet.htm

http://www.jmu.edu/biology/biofac/facfro/cloning/cloning.htm

http://aggie-horticulture.tamu.edu/tisscult/microprop/microprop.html

http://www.micropropagation-services.co.uk/

okrasné dřeviny - rododendrony

http://www.janholub.cz/my.html

masožravé rostliny

http://www.darwiniana.cz - vydává pro členy časopis Trifid

http://bestcarnivorousplants.com/dionaea/

kapradiny

www.phytotechlab.com/pdf/FernMicropropagation.pdf

Stadia mikropropagace *in vitro*

Murashige (1974) Debergh *et* Maene (1981)

0. příprava explantátu - ovlivnění mateřské rostliny

I. iniciace

II. propagace (množení)

II.a elongace (prodlužování) prýtů

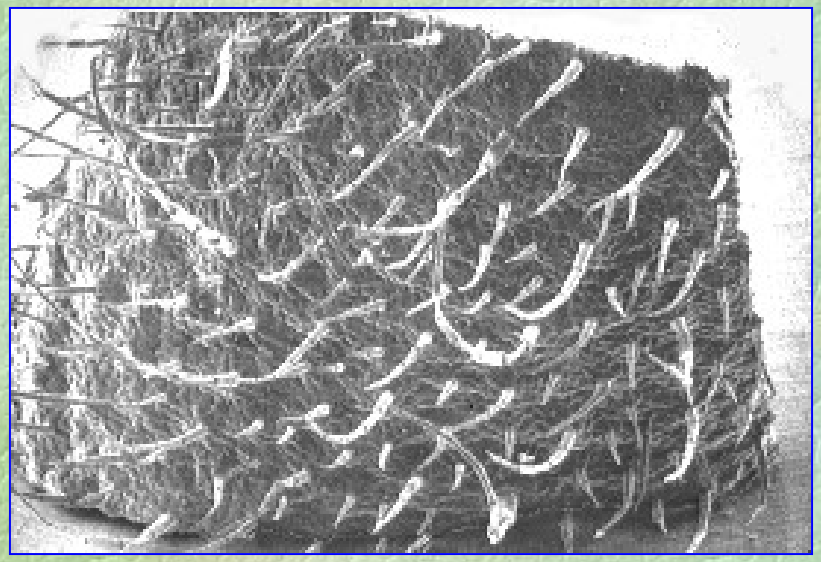
III. zakořeňování

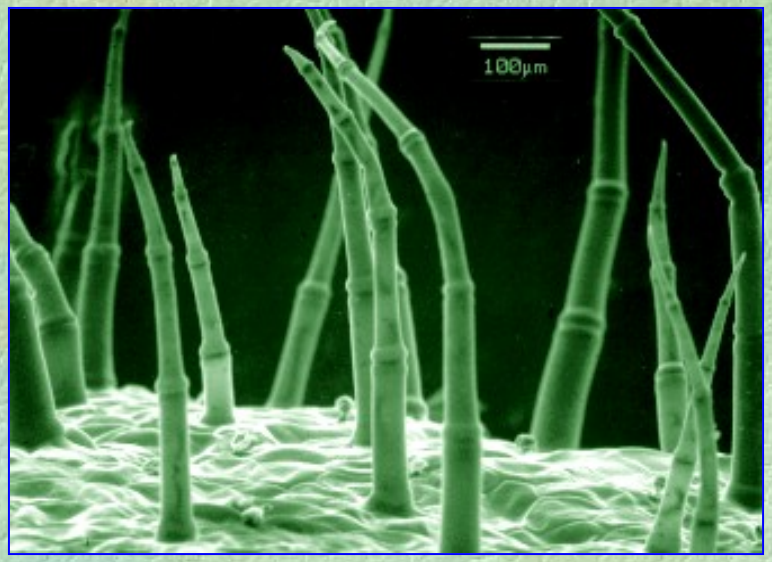
Převádění *ex vitro* do nesterilních podmínek

aklimatizace na nesterilní podmínky (nižší vzdušnou vlhkost, větší kolísání teplot, normální osvětlení)

Stadia mikropropagace *Saintpaulia ionantha* Wendl.

I.



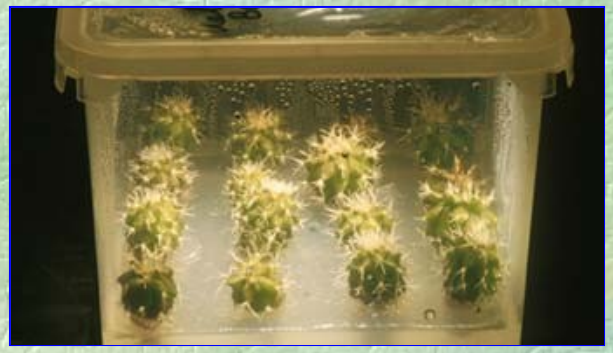


II.

III.

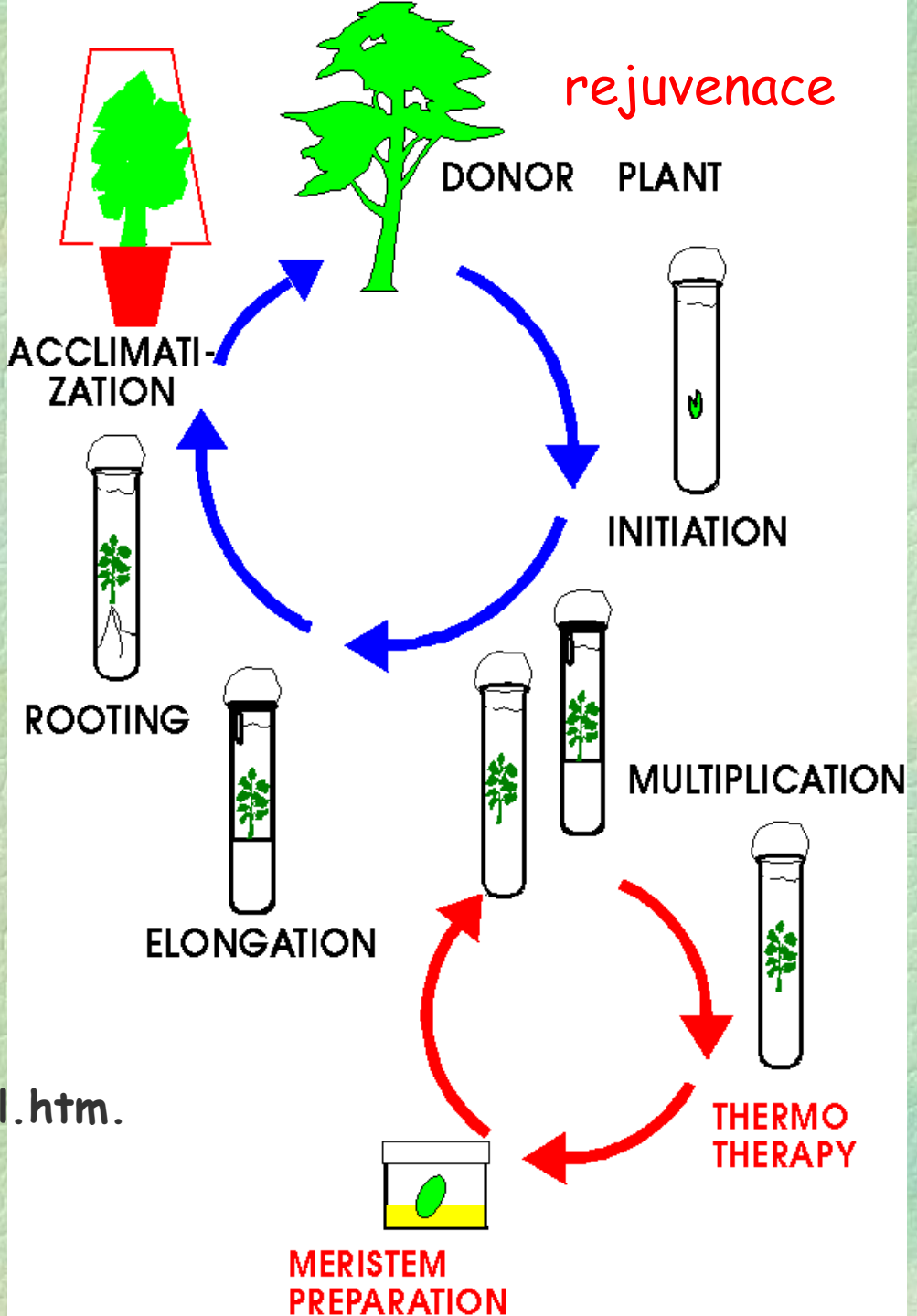
Mikropropagace

sukulenty



masožravé rostliny

Různé fáze mikropropagace dřevin



www.boku.ac.at/iam/poster/revital.htm.

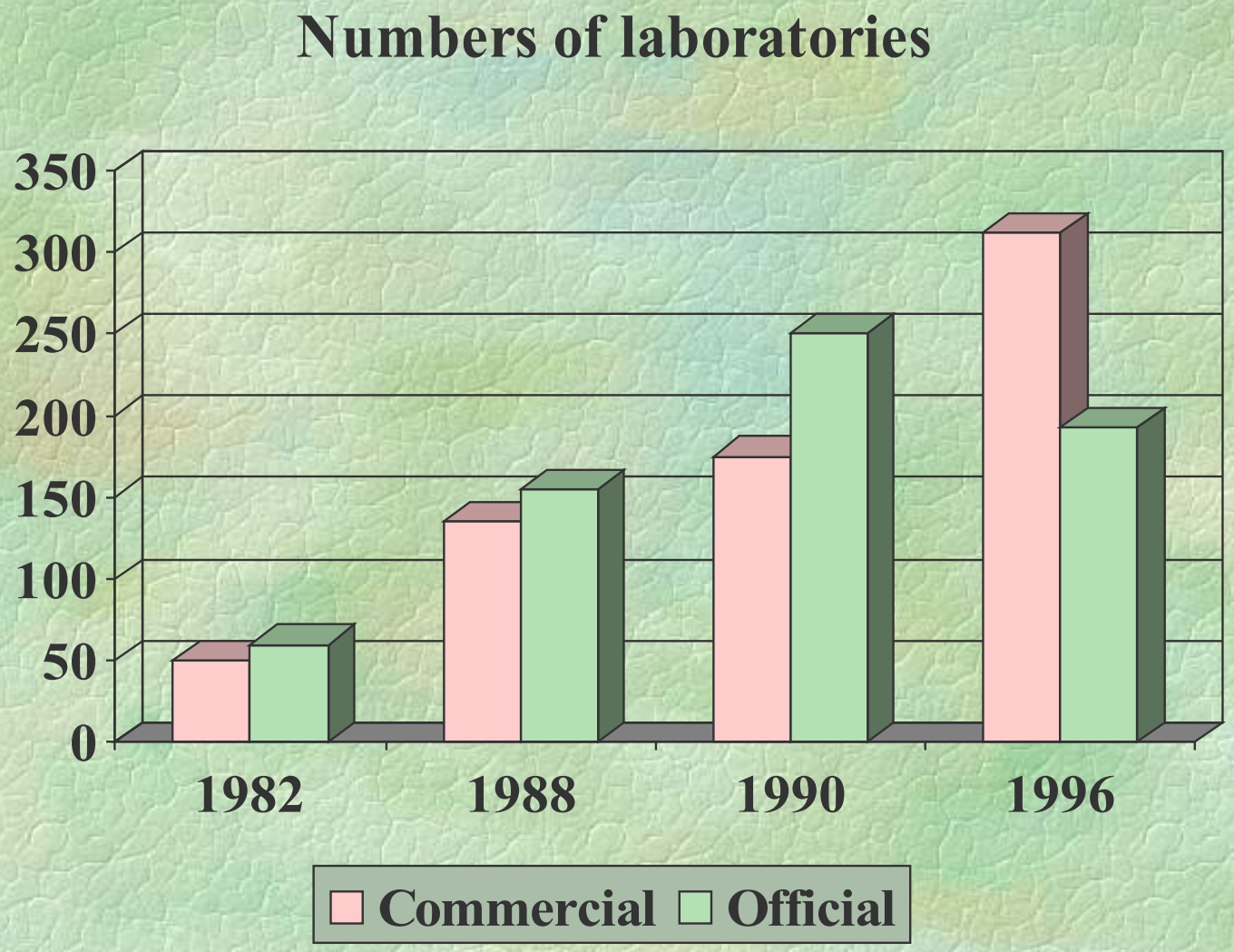
Termoterapie a meristémové kultury

Kombinace *in vitro* termoterapie a meristémové kultury - nejúčinější metoda eliminace virů. Aktivně rostoucí rostlinný materiál je umístěný do termoterapeutické komory.

Expozice 3 týdny nebo déle, fotoperioda 16 h 38°C, 8 h tma 36°C.

Teplota a doba expozice jsou limitovány tolerancí rostliny (závisí na druhu a varietě).

The European Plant Tissue Culture Industry
COST meeting 1992, COST 822



The European Plant Tissue Culture Industry

COST 87, COST 822

Country	Official		Commercial	
Year	1992	1996	1992	1996
Austria	6	5	0	1
Belgium	22	22	11	14
Denmark	6	8	6	8
Czech Rep.	18	18	2	3
Finland	21	13	6	8
France	33	18	0	12
Germany	28	40	25	31
Netherlands	19	9	35	36
Poland		24		7
Slovakia	9	7	3	4
Sweden	3	3	4	3
U.K.	36	31	7	18

Rostlinné taxony v komerčních laboratořích

COST meeting 1992, Dijon

Rod	Počet laboratoří
Prunus	107
Ficus	82
Philodendron	56
Spathiphyllum	46
Nephrolepis	44
Rosa	41
Syngonium	37
Malus	35
Orchidaceae	31
Solanum	30
Gerbera, Begonia, Fragaria	26

Celkový počet rostlin produkovaných v komerčních laboratořích v Evropě (x1000)

COST meeting 1992, Dijon

Gerbera	18 383	*Solanum tuber.*	2 817
Nephrolepis	14 517	*Orchidaceae*	2 162
Prunus	10 725	*Citrus*	2 061
Spathiphyllum	9 827	*Actinidia*	1 112
Lilium	7 112	*Betula*	842
Fragaria	7 040	*Nicotiana*	704
Ficus	7 002	*Platycerium*	700
Saintpaulia	5 696	*Diffenbachia*	82

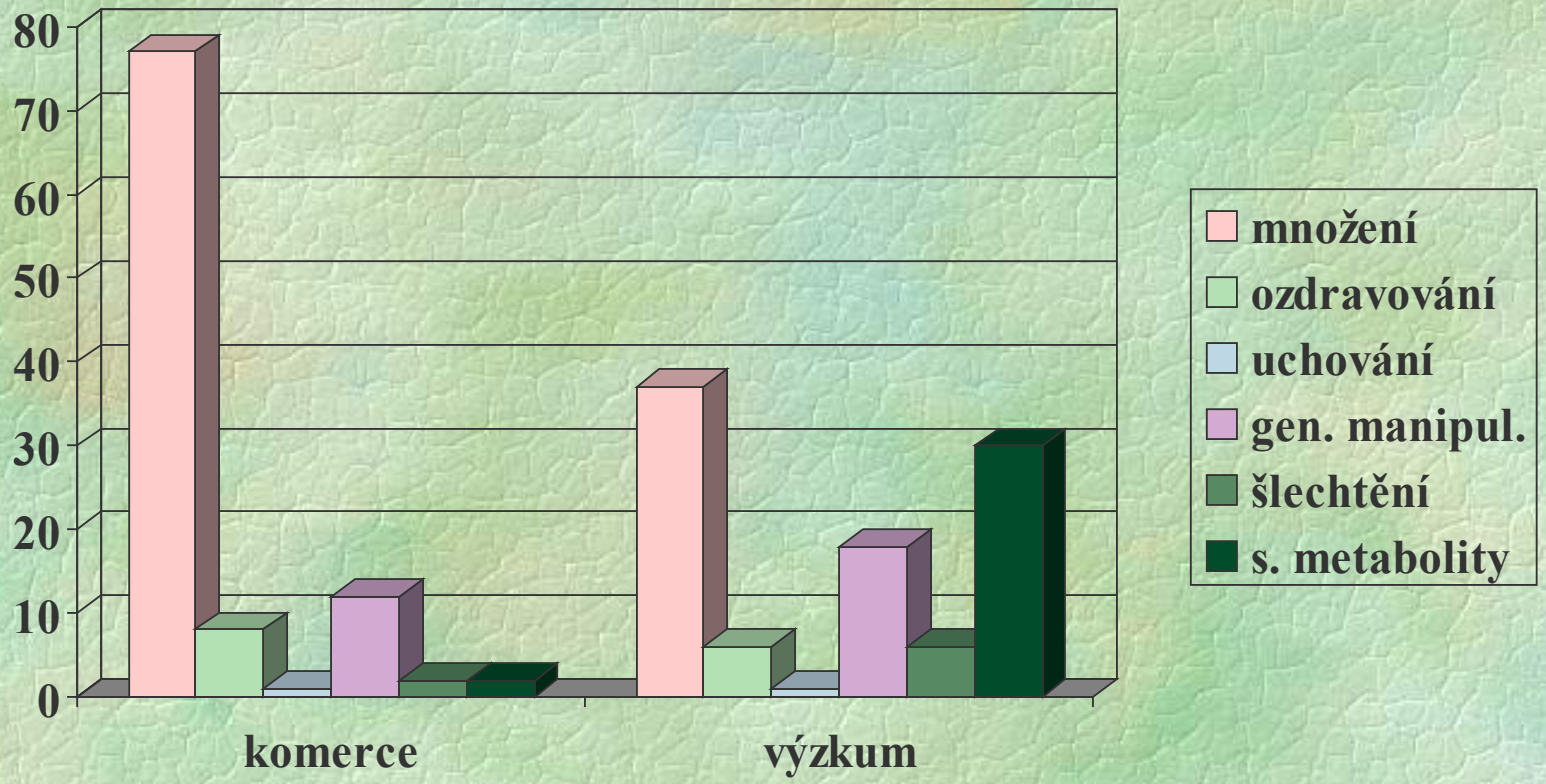
Rostlinné taxony ve výzkum. laboratořích

COST meeting 1992, Dijon

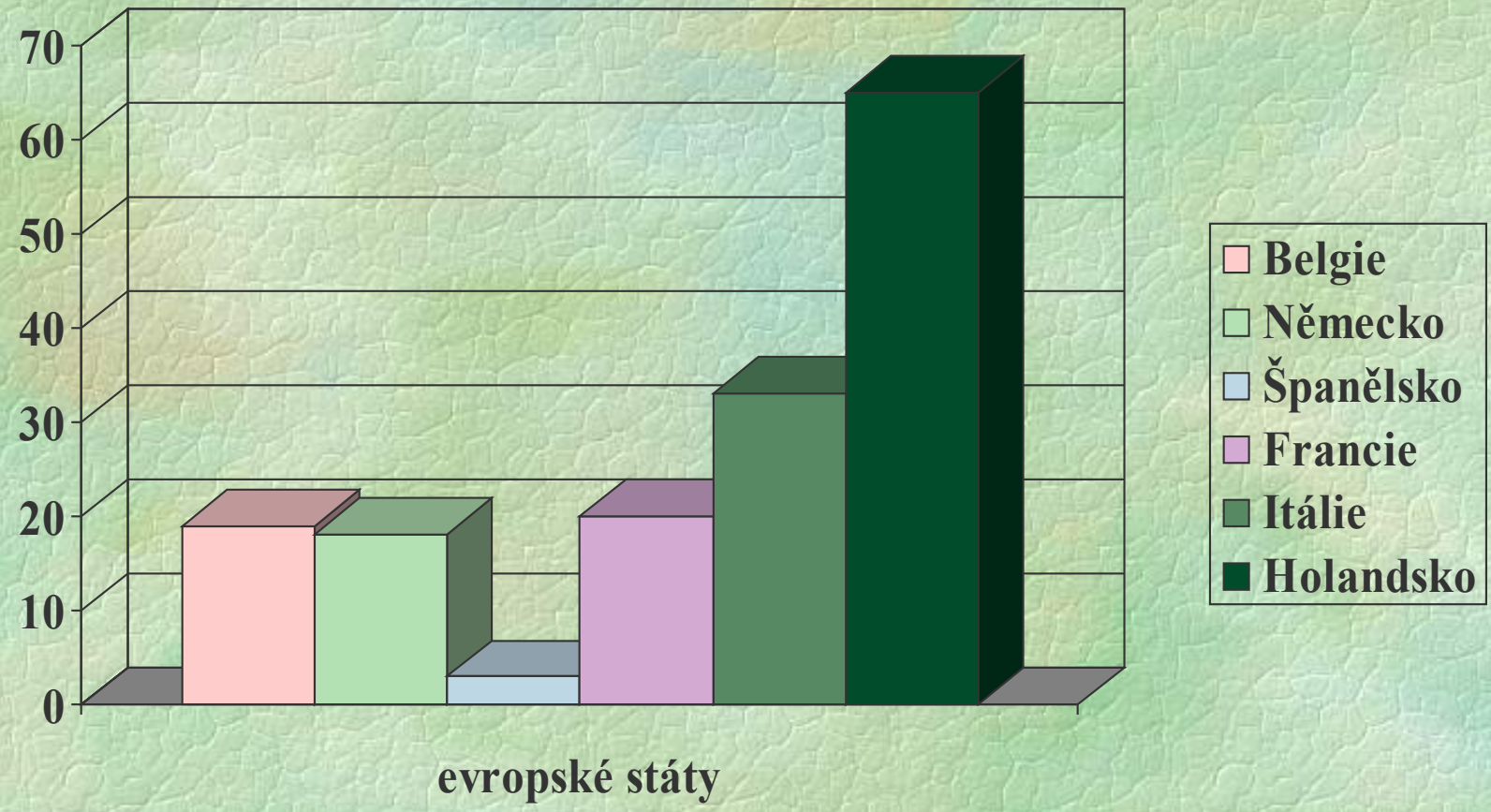
Rod	Počet laboratoří
Prunus	78
Solanum	66
Malus	62
Vitis	42
Brassica	40
Nicotiana	39
Betula	37
Rosa	35
Quercus	32
Fragaria	25
Orchidaceae	13

Hlavní zájmy evropských laboratoří *in vitro*

COST meeting 1992, Dijon



Produkce rostlin *in vitro* podle zemí (miliony ks.)
COST meeting 1992, Dijon



I. stadium: Iniciace mikropropagace

1. výběr materiálu:
   - zdravotní stav matečných rostlin
   - ontogenetické stáří (rejuvenilizace)
   - vliv genotypu
2. desinfekce
3. výběr typu explantátu
4. přítomnost cytokininu a auxinu v médiu

II. Stadium mikropropagace: propagace

médium se **sníženou koncentrací regulátorů** nebo bez nich, možný přídavek giberelinů

Opakované rozdělování vzniklých prýtů **není neomezené:** většinou 10 – 15 pasáží

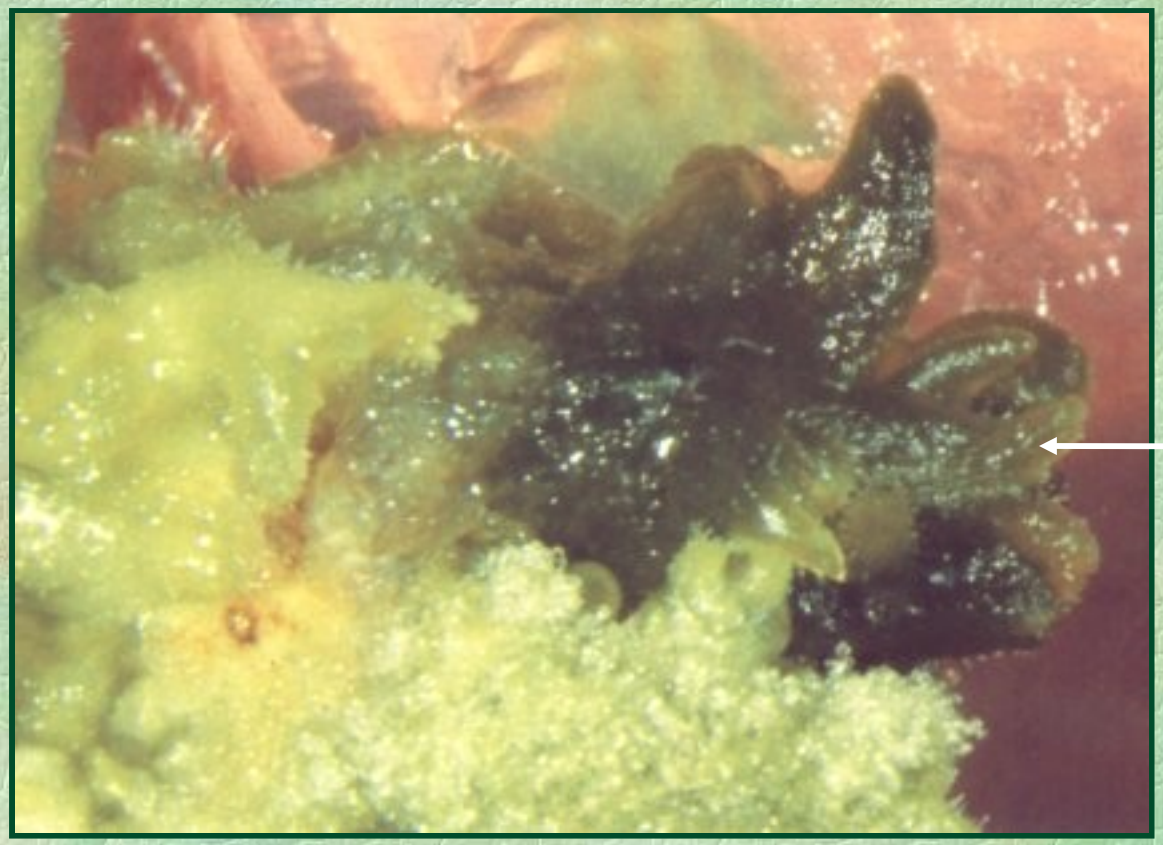
pak je nutné nové založení kultury

možné problémy:

habituace

vitrifikace

II. stadium mikropropagace



adventivní prýty

mikropropagace melounu *Cucumis melo* L.

III. Stadium mikropropagace: zakořeňování

- snížení koncentrace minerálních solí
- možná indukce auxinem (pulsní - vysokou koncentrací nebo dlouhodobější působení nízkou koncentrací)
- pro tvorbu funkčních kořenů = vhodnější tekuté médium
- absence mykorhizy ➡ inokulace kulturami hub

Mikropropagace - stadium III. zakořeňování

mikropropagace *Lilium*

mikropropagace *Malus*

Aklimatizace

nedostatečně vyvinutá kutikula (vosky)

nefunkční stomata

kořeny vyvinuté *in vitro* odumírají

Snižování relativní vlhkosti *in vitro* – „bottom cooling"

Zvyšování vlhkosti – tunely nebo mlžení

Zabránění infekci po převodu:

pečlivé odstranění zbytků agaru

desinfekce substrátu - Previcur-N (0,15-0,25%)

Aklimatizace *Saintpaulia ionantha* Wendl.

skleněné akvárium

regenerované rostliny

Aklimatizace

sadbovače s nezakořeněnými mikrořízky přeneseny do mlžné komory ve skleníku

vyvíječ mlhy

http://instruct1.cit.cornell.edu/courses/hort400/raspberry/stageIV.html

Nevýhody množení *in vitro*

- možnost nežádoucího zvětšení variability (tzv. somaklonální variabilita)
- nebezpečí genetické degradace
- protokoly nejsou optimalizované pro všechny druhy
- problémy s vitrifikací a habituací
- pracnost a energetická náročnost - cena

Habituace = forma zkušenosti, která vede k vymizení reakce živočicha nebo rostliny na neškodný, dlouho opakovaný podnět nebo skupinu podnětů = snížení odpovědi

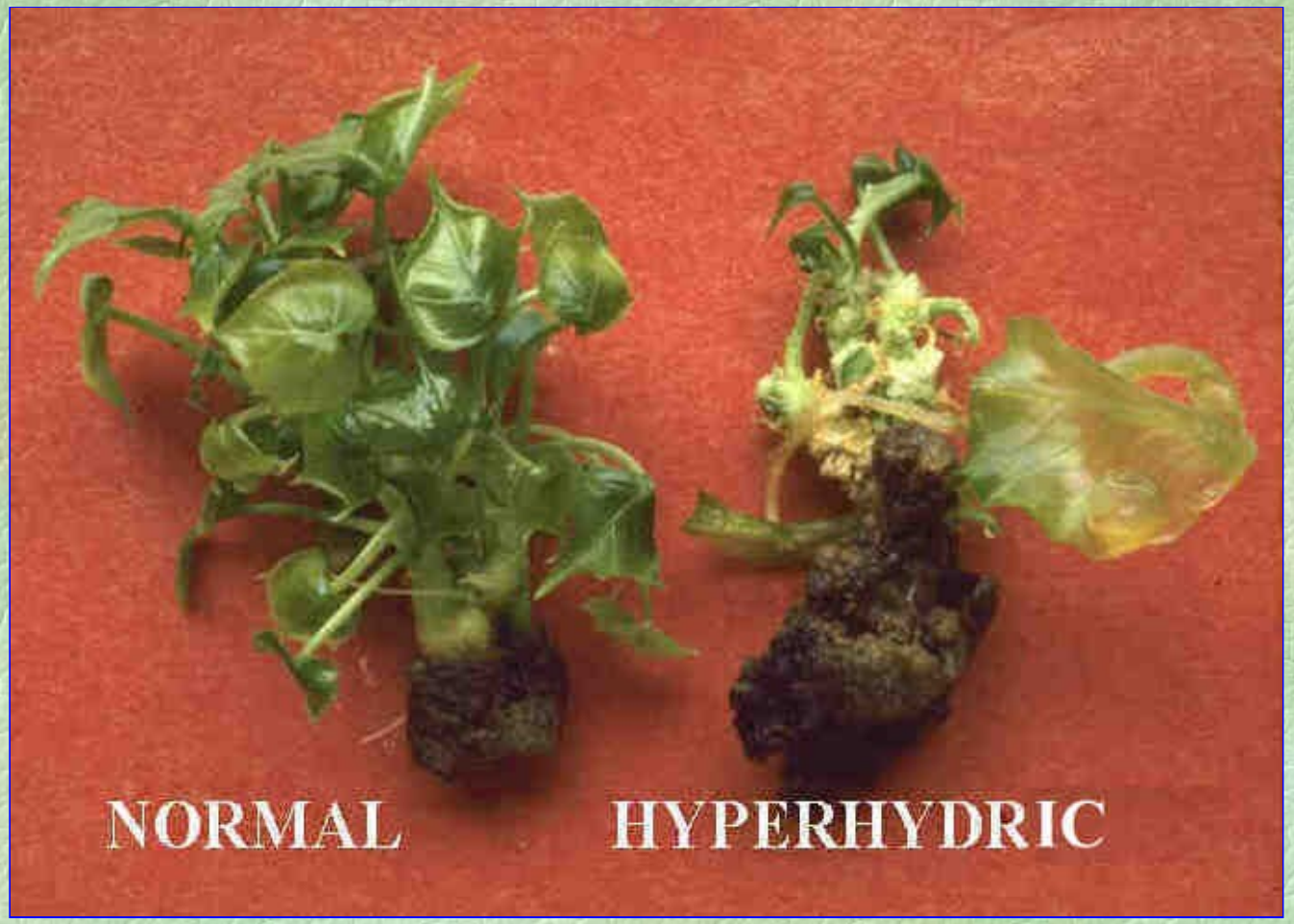
Vitrifikace („hyperhydricity“)

Symptomy vitrifikace nemusí být vždy viditelné pouhým okem. Viditelné příznaky se mohou objevit u citlivějších taxonů nebo v případě nepříznivějších podmínek.

Příklady nepříznivých podmínek:

- příliš vysoká koncentrace cytokininu
- vysoká kapacita retence vody
- příliš těsně uzavřené kultivační nádoby
- příliš nízká koncentrace gelujících látek (agar)

Příklad jasných vizuálních symptomů vitrifikace u *Oreopanax nymphaefolia*



Znaky vitrifikace

morfologické

1. kratší internodia
2. tvorba růžic
3. průhledné, křehké, zkroucené listy
4. abnormální barva
5. slepené jehlice u konifer

anatomické

1. velké interceluláry
2. hypolignifikace
3. redukovaný vývoj cévního systému
4. defektní epidermis
5. změněné ukládání vosků
6. snížená funkce průduchů

biochemické

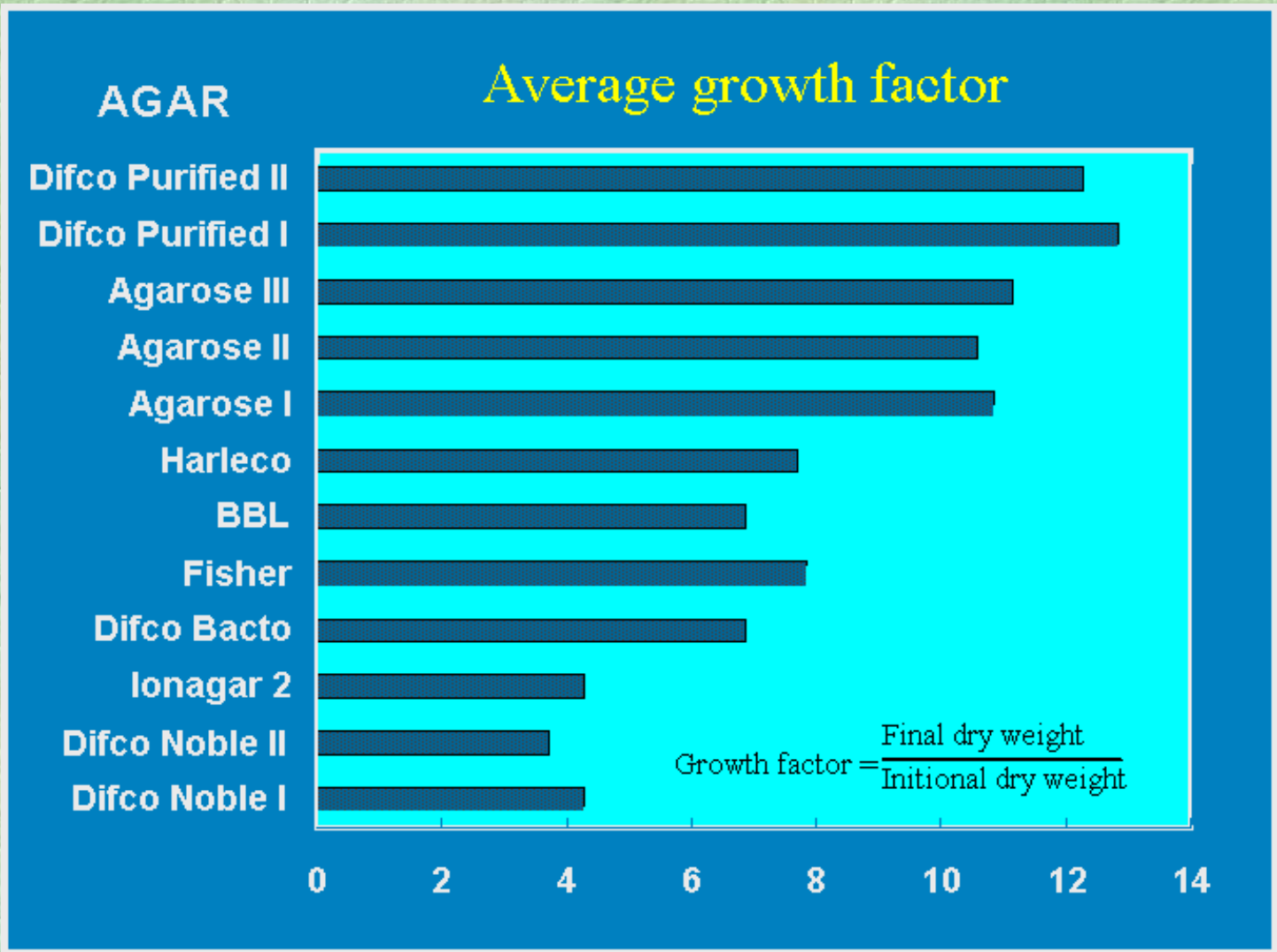
žádné obecné závěry

Srovnání atmosféry ve skleníku a kultivační nádobě

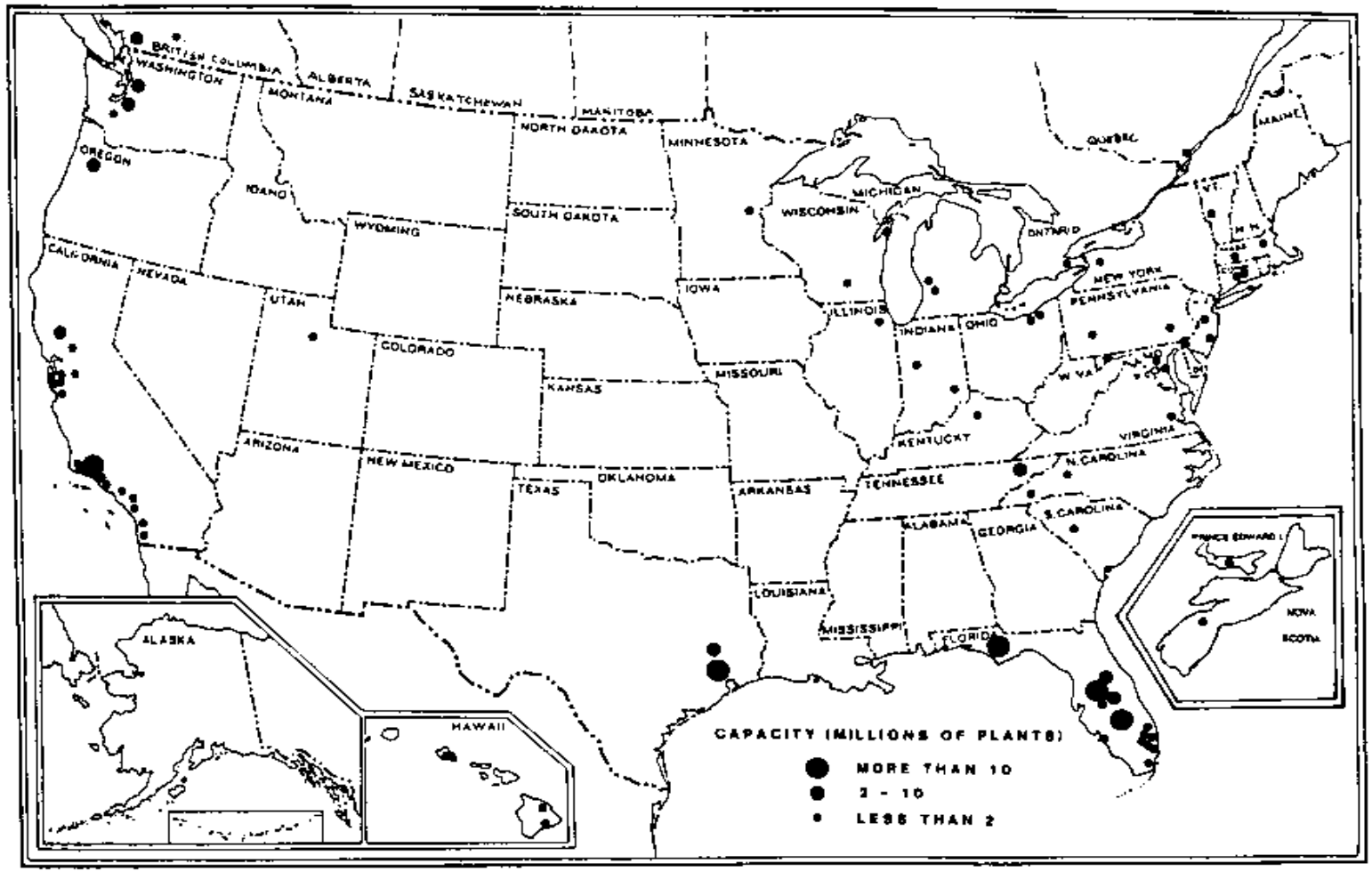
složka	skleník	kultivační nádoba
O_2	22 %	až 4 %
N_2	77 %	až 87 %
CO_2	365 - 1000 ppm	až 20 %
vodní pára	60-85 %	± 100 %
etylén	5 ppb - 100 ppb	větší než 2 ppm

Vliv různých druhů agaru na růst apikálních prýtů *Picea abies*

(koncentrace agaru 1%) (Romberger and Tabor, 1971)



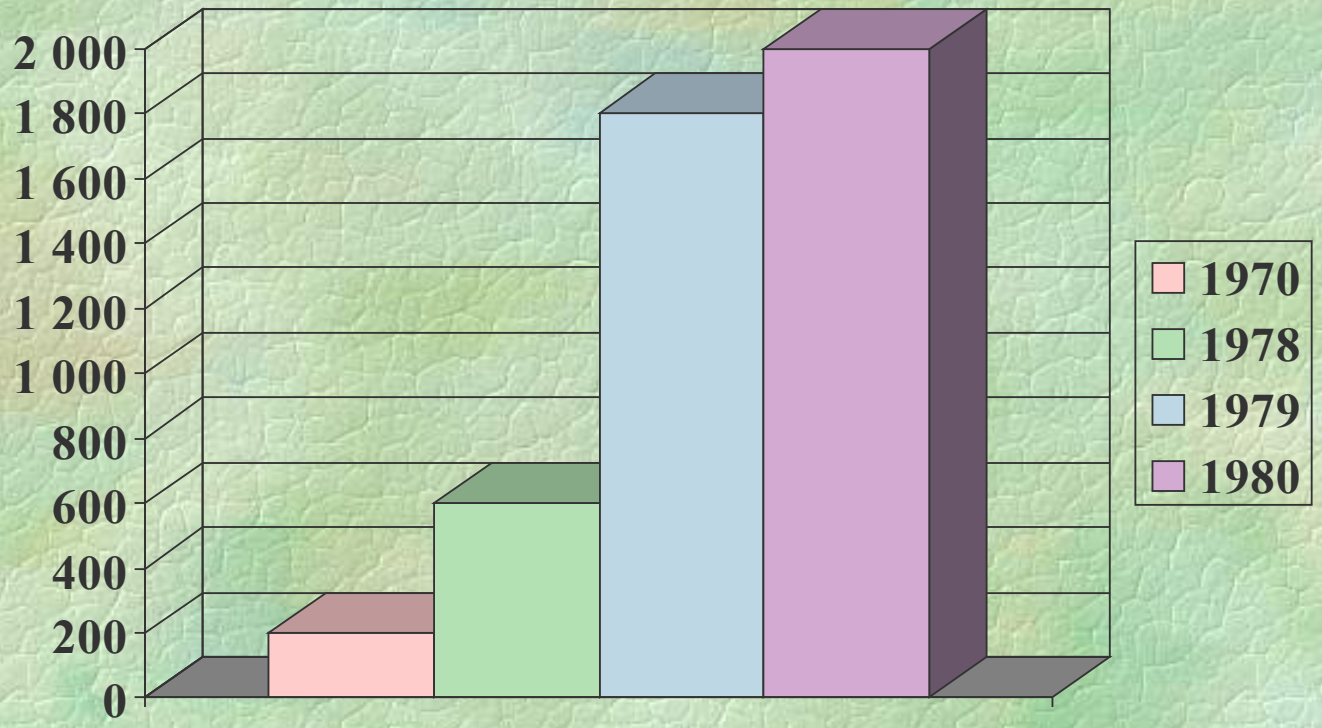
Komerční laboratoře v USA



Komerční laboratoře ve vybraných zemích Asie (1988)

Země	Počet laboratoří	Produkce (v mil.)
Bhútán	1	0,1 - 0,2
Indie	4	4 - 5
Indonésie	8	3 - 6
Japonsko	30	10
Korea	10	3
Malajsie	8	6 - 8
Nepál	1	0,1 - 0,5
Filipíny	2	0,5 - 1,0
Singapur	4	3 - 4
Srí Lanka	1	2 - 4
Thajsko	18	35
Celkem	105	65 - 86

Produkce sazenic *in vitro* (x 1000)
Firma Miyoshi (Japonsko)



komerční laboratoře

komerční laboratoře

Hlavní skupiny rostlin produkované *in vitro* v Asii (1987 - 88)

Table 2. Major crops produced by tissue culture in selected Asian countries, 1987-88.

Major crops	No. of Units (millions)	%	Future trend
Ornamental foliage plants	7.0	9	Moderate increase
Flowering crops:			
Orchids	44.0	60	Stagnating/slight increase
Tropical flowers	NIL	NIL	Slight increase
Temperate flowers	13	17	Moderate increase
Fruit crops	5	8	Significant increase
Spices	1.0	1	Moderate increase
Plantation crops	4.0	5	Slight increase
Forestry	NIL	NIL	Moderate increase
Total	74.0	100.0	

Sources: Interviews and quastionnaire responses.

Hlavní skupiny rostlin produkované *in vitro* v Asii (1987 - 88)

Druh	Počet v mil.	%	Prognóza
Ozdobné listem	7	9	mírný nárůst
Orchideje	44	60	stagnace
Tropické květy	0	0	mírný nárůst
Květy mírného pásma	13	17	mírný nárůst
Ovoce	5	8	výrazný nárůst
Koření	1	1	mírný nárůst
Plodiny plantáží	4	5	mírný nárůst
Lesnictví	0	0	střední nárůst
Celkem	74	100	

Kategorie rostlin

Table 3. Leading countries in Western Europe in the various categories of plants. Numbers in brackets are in millions. No data were available for the U.K.

Categories	Leading countries	Categories	Leading countries
1. Pot plants (92.3)	1. The Netherlands (26.7) 2. France (22.6) 3. Belgium (16.6)	8. Perennial garden plants (3.0)	1. France (2.2) 2. Belgium (0.5) 3. The Netherlands (0.1)
2. Cut flowers (37.8)	1. The Netherlands (18.2) 2. France (10.1) 3. Italy (4.9)	9. Agricultural crops (2.4)	1. Belgium (0.5) 2. The Netherlands (0.4) 3. Spain (0.4)
3. Fruit trees (19.4)	1. Italy (14.6) 2. Spain (1.9) 3. France (1.7)	10. Miscellaneous ornamentals (1.9)	1. France (0.7) 2. Spain (0.5) 3. The Netherlands (0.4)
4. Ornamental bulbs/corms (13.2)	1. The Netherlands (13.0) 2. Italy (0.2) 3. Finland (0.01)	11. Vegetables (1.4)	1. Italy (0.7) 2. France (0.5) 3. The Netherlands (0.1)
5. Small fruits (9.4)	1. West Germany (3.4) 2. Finland (1.2) 3. France (1.0)	12. Trees (forestry) (1.3)	1. France (0.6) 2. Finland (0.5) 3. West Germany (0.2)
6. Orchids (5.3)	1. The Netherlands (2.4) 2. West Germany (1.9) 3. France (0.5)	13. Herbs (0.03)	1. Belgium (0.03) 2. – 3. –
7. Ornamental trees/shrubs (3.9)	1. Belgium (2.6) 2. West Germany (0.4) 3. France (0.3)		

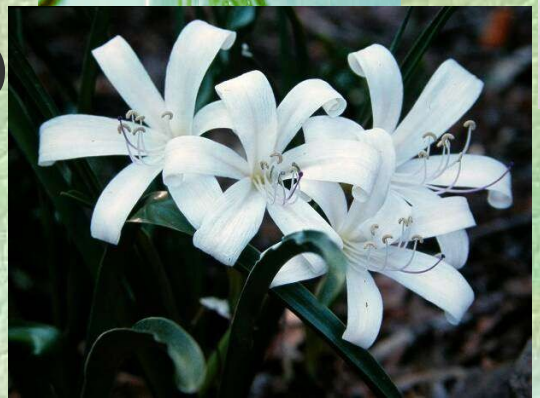
Produkce rostlin *in vitro* (mil.) kategorie

- **Hrnkové rostliny (92,3)**
  1. Nizozemí (26,7)
  2. Francie (22,6)
  3. Belgie (16,6)
- **Řezané květy (37.8)**
  1. Nizozemí (18.2)
  2. Francie (10,1)
  3. Itálie (4,9)
- **Ovocné stromy (19,4)**
  1. Itálie (14.6)
  2. Španělsko (1,9)
  3. Francie (1,7)
- **Okrasné cibuloviny (13,2)**
  1. Nizozemí (13,0)
  2. Itálie (0,2)
  3. Finsko (0,01)

Alocasia sanderiana* var. *nobilis pochází z Filipín, kde je údajně vyhubená nebo velmi vzácná

Malus

Calathea



Crinum lugardiae

Klonální množení rostlin – řezané květy

Agro Brno - Tuřany
licenční množení gerber (*Gerbera jamesonii*)

Produkce rostlin *in vitro* (mil.) kategorie

- **Drobné ovoce (9,4)**
  1. Německo (3,4)
  2. Finsko (1,2)
  3. Francie (1,0)
- **Orchideje (5,3)**
  1. Nizozemí (2,4)
  2. Německo (1,9)
  3. Francie (0,5)
- **Ozdobné keře (3,9)**
  1. Belgie (2,6)
  2. Německo (0,4)
  3. Francie (0,3)

http://www.janholub.cz/my.html

Rododendrony
Azalky
Hosta
Kalmia

Produkce rostlin *in vitro* (mil.) kategorie

- **Zahradní trvalky (3,0)**
  1. Francie (2,2)
  2. Belgie (0,5)
  3. Nizozemí (0,1)
- **Zemědělské plodiny (2,4)**
  1. Belgie (0,5)
  2. Nizozemí (0,4)
  3. Španělsko (0,4)
- **Zelenina (1,4)**
  1. Itálie (0,7)
  2. Francie (0,5)
  3. Nizozemí (0,1)
- **Lesnictví (1,3)**
  1. Francie (0,6)
  2. Finsko (0,5)
  3. Německo (0,2)

Echinacea purpurea 'Lilliput' PPAF PVR

Hosta 'Lacy Belle'

mikropropagovaná bříza

Statistika FloraCulture Int.2004 (mil.EUR)

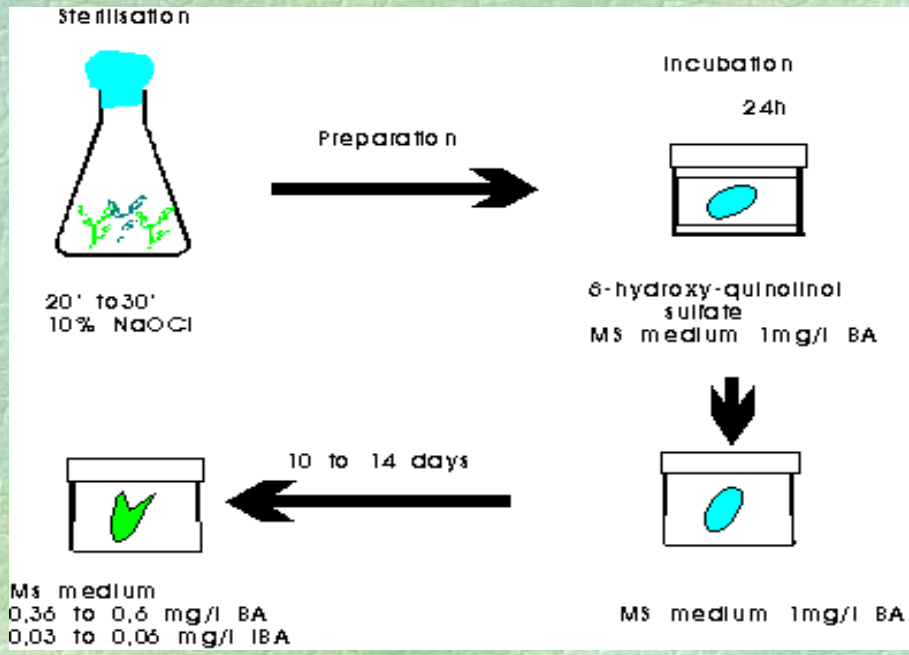
Celkové tržby za prodané okrasné rostliny dosáhly v Evropě 9 996 milionů EURO

Holandsko	3 542	Rakousko	240
Itálie	1 826	Polsko	186
Německo	1 174	Maďarsko	95
Španělsko	345	Česko	43

USA a Kanada	5 861
Japonsko	3 147
Jižní Amerika	1 180
Korea	568
Austrálie	335

Metoda pro iniciaci kultur z dospělých stromů jabloní s použitím 8-HQS

- aktivně rostoucí vrcholy *Malus domestica*
- desinfekce a izolace 2-3 mm explantátů
- kultivace - modif. MS medium s 4.4 μM BA
- překrytí explantátů po dobu 24 h 200 μl 0.1 % roztokem 8-HQS
- přenos na čerstvé médium
- za 2 týdny pasáž explantátů na medium s auxinem a cytokininem (Laimer *et al.* 1991b)
- 50 -90 % sterilních explantátů získali ve srovnání se 100 % ztrátou u neošetřených vrcholků



Statistika FloraCulture Int.2004

- prodej množitelského materiálu: + 5%
- jednoleté okrasné 56,2%
- pereny +17,3%
- hrnkové +12,5%
- řezané květiny + 1,8%
- řezaná zeleň +0,02%

Dutch Wholesale Board Statistika 2004

Holandský export okrasných rostlin do nových zemí EU se zvýšil o 8%; maďarský export o 19,4% a polský o 10%.

Česká republika je

- cílovou zemí pro polské hrnkové rostliny a sadbu jednoletých okrasných rostlin;
- řezané květiny přes holandské obchodní firmy dováženy z Kolumbie, Equadoru, Itálie a Holandska.