

Rostlinné explantáty (kultury *in vitro*)

Jaroslava Dubová

Ústav experimentální biologie
Oddělení fyziologie a anatomie rostlin a
Laboratoř molekulární fyziologie rostlin
Přírodovědecká fakulta
Masarykova univerzita

Příklady kultur



Cyclamen

Malus

Lilium

z katalogu
firmy
Duchefa

Definice termínů

- ✿ **Explantát** (Bauer 1939) je každý fragment živého pletiva, celý orgán nebo soubor orgánů, který je vytržen z korelačních vztahů celku a je pěstován v umělých podmínkách.

Definice termínů

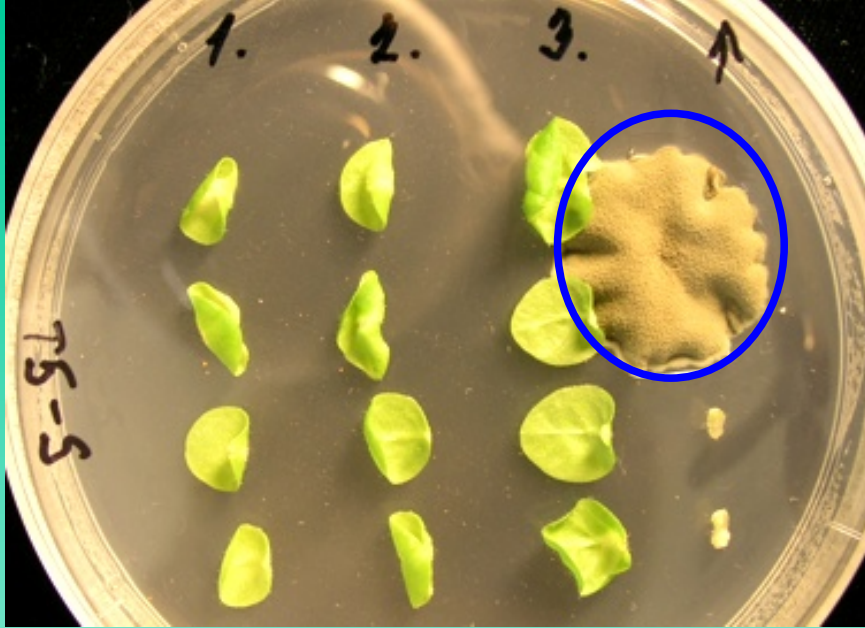
- ☞ ex plantare = pěstovat mimo
- ☞ in vitro = ve skle, v umělých podmínkách
- ☞ aseptická kultura = bez infekce (bakterie, kvasinky, plísně)
- ☞ axenická kultura = kultura jednoho organismu
- ☞ tkáňová kultura = historický pojem, přeneseno z oblasti fyziologie živočichů



z katalogu
firmy
Duchefa

houbová infekce v kultuře

Příklady infikovaných kultur



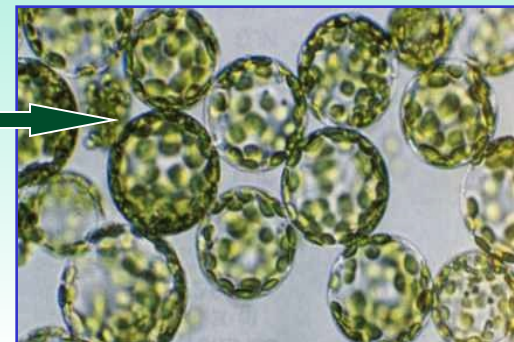
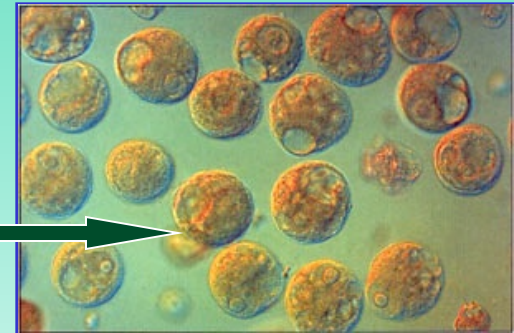
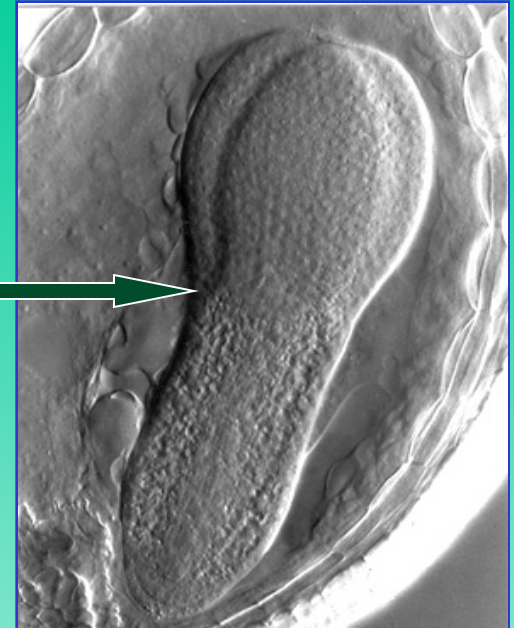
Kultura infikovaná kvasinkami
a bakteriemi

Kultury infikované houbami

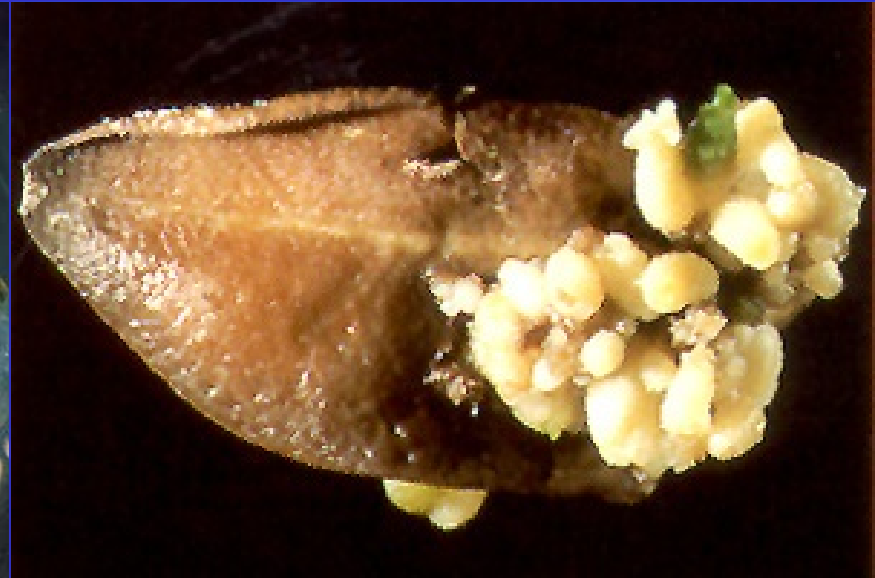


Úrovně organizace explantátu

- ☞ **rostlina** (klíčící rostlina, embryo)
- ☞ **orgán** (kořen, list, řapík, pupen)
- ☞ **pletivo** (dřeňový parenchym, endosperm, kambium - „tkáňové kultury“)
- ☞ **buňka** (mikrospory, pyl. zrna, buněčné suspenze)
- ☞ izolovaný **protoplast**



Příklady různých typů kultur



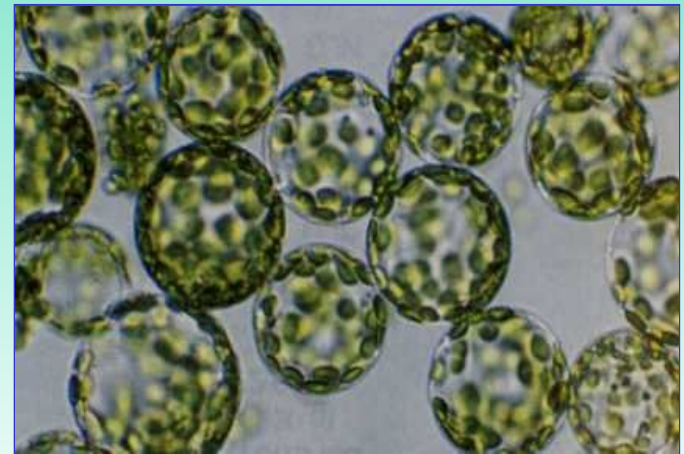
kalusová kultura

mikropropagace jabloně

prašníková kultura tabáku



suspenze buněk vojtěšky



rostlinné protoplasty mezofylu tabáku

Kultivační nádoby
pro kultury *in vitro*
(sklo i plasty)

média ztužená agarem



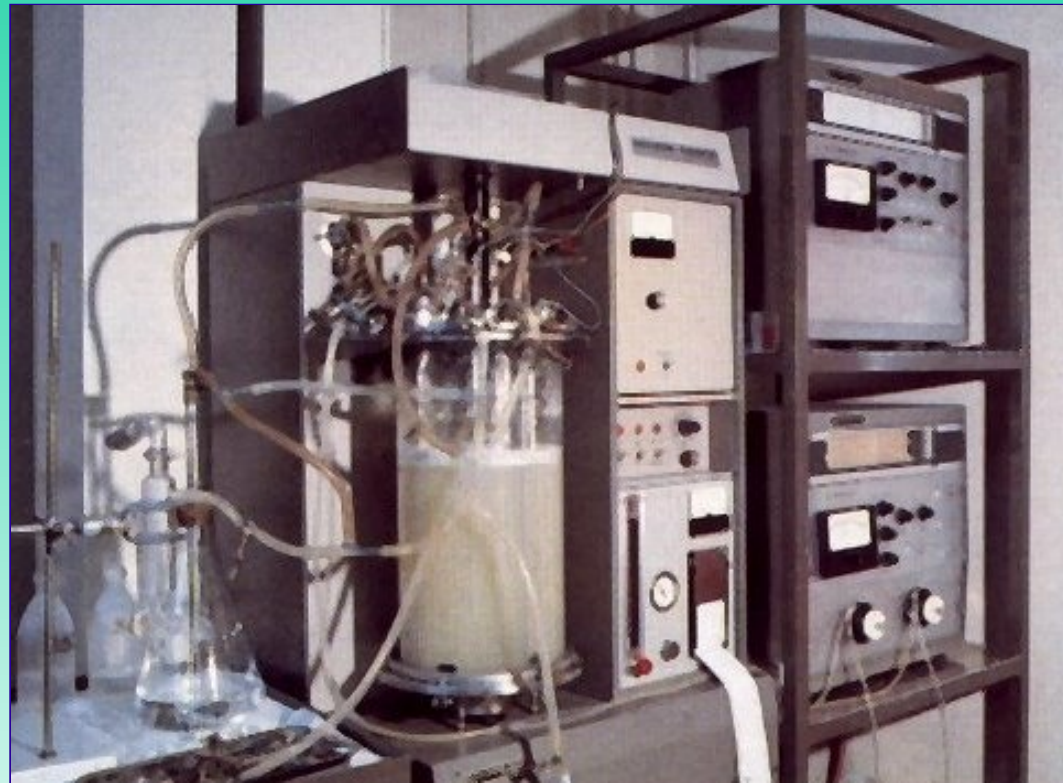
zkumavky, Petriho misky, Erlenmayerovy baňky,
zavařovací lahve, Magenta boxy

Suspenzní kultury

tekutá média



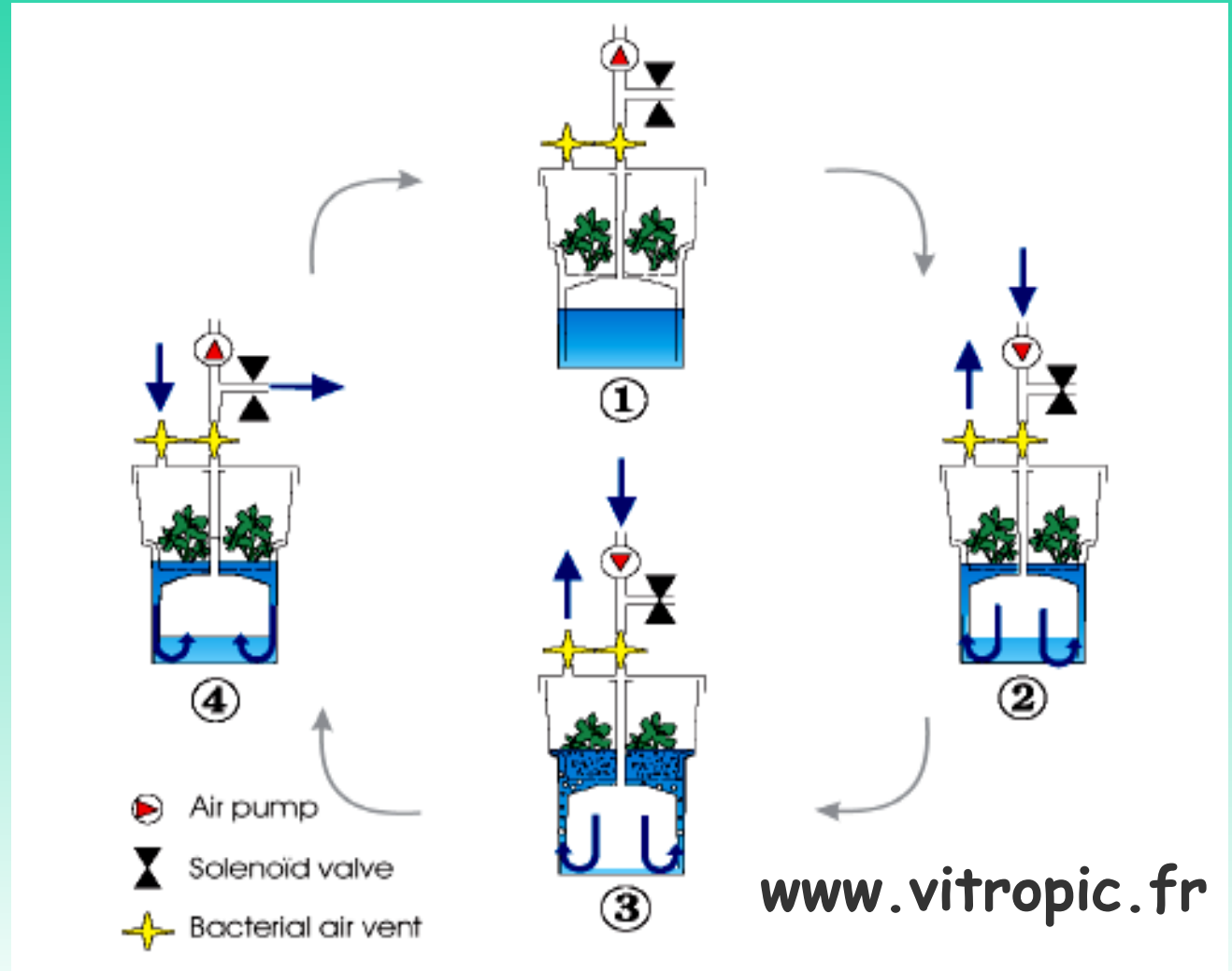
laboratorní třepačka



laboratorní bioreaktor

System RITA® dočasně zaplavované kultury

technická
modifikace pro
pěstování
explantátů v
tekutém médiu



Rostlinné explantáty

- zpočátku obor rostlinné fyziologie odlišující se svou vlastní **metodologií**
- později četné aplikace v **genetice a šlechtitelství**
- v současnosti jsou metodickou základnou rostlinných **biotechnologií**
- mají využití i v **molekulární biologii** - jsou součástí metod množení rostlin, transformace, selekce ...

Využití explantátů

A. Získání teoretických poznatků

- buněčné dělení
- totipotence rostlinné buňky
- diferenciace rostlinné buňky a pletiva
- metabolismus
- regulační mechanismy
- transformace a mutageneze

Využití explantátů

B. Praktické aplikace

- rychlé množení ve velkých kvantech
- urychlování šlechtitelských cyklů
- získávání vzdálených hybridů („embryo rescue“, opylení *in vitro*)
- získávání haploidů a dihaploidů
- ozdravování od virů
- umělá semena
- genové banky, kryoprezervace

Zajímavá adresa:

<http://users.ugent.be/~pdebergh/content.htm>

Department of Plant Production
Horticulture University
Horticulture, Univ. Gent
Coupure links 653
653 9000 Gent
Belgium

Prof. Dr. Pierre Debergh
Dr. Johan Van Huylenbroeck
Dr. Stefaan Werbrouck

Department of Botany
University of Natal
Pietermaritzburg
Scottsville
Pietermaritzburg 3209
Republic of South Africa

Prof. Dr. Johannes Van Staden
Dr. Jeff Finnie
Dr. Anna Jäger

cd-ROM bylo vytvořeno jako pomůcka pro studenty pro kurzy kultur rostlinných buněk a pletiv i biotechnologie.

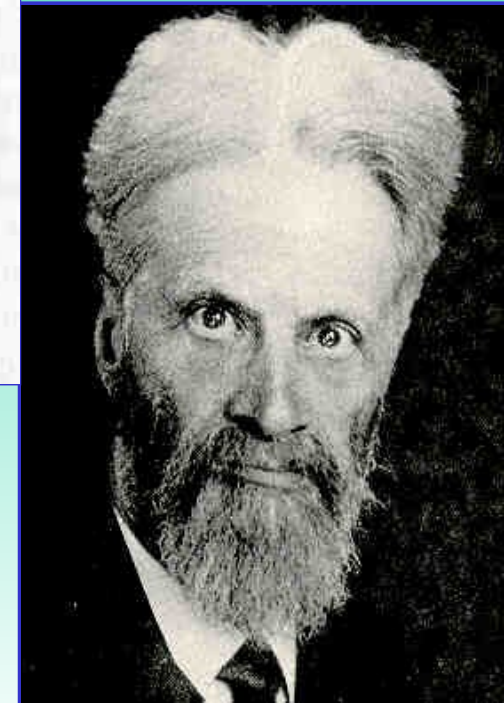
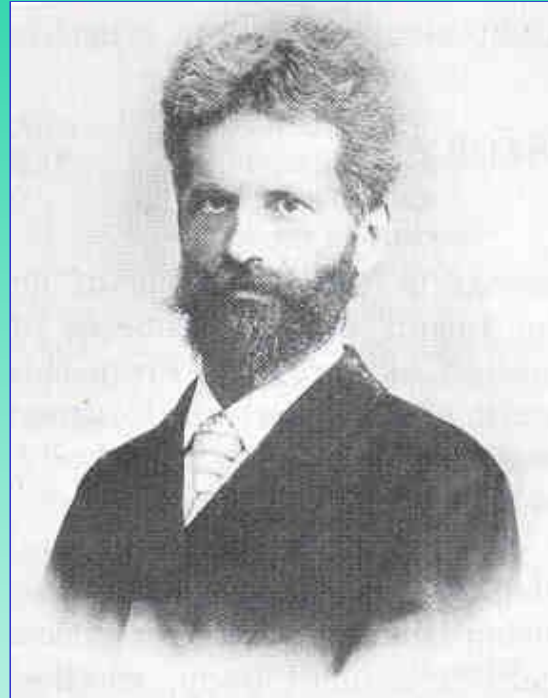
Podle autorů to není kompletní kurz, ale poskytuje hypertextové stránky s množstvím obrázků a krátkých textů.

Historický přehled - počátky

- ☞ **Gottlieb Haberlandt**
- ☞ *** 1854 Altenburg**
považovaný za otce kultur
rostlinných explantátů

Kultivoval explantáty:

- ☞ parenchym listů
- ☞ dřev stonku
- ☞ svěrací buňky průduchů



neznalost výživy, nesterilní kultura,
vysoce diferencované buňky v kultuře



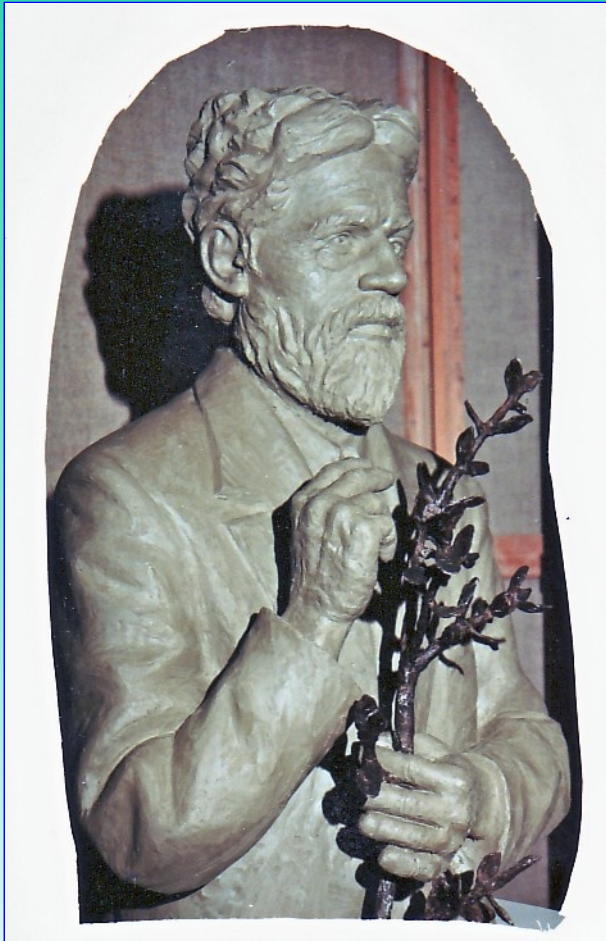
krátkodobé přežívání kultur

přesto **Haberlandt** věřil v budoucnost kultur *in vitro*
a formuloval **1902** teorii o totipotenci rostlinné buňky
(Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen)

1922 **Knudson** - výsevy orchidejí *in vitro*

1925 **Laibach** - izolovaná embrya lnu (*Linum*)

Totipotence rostlinné buňky

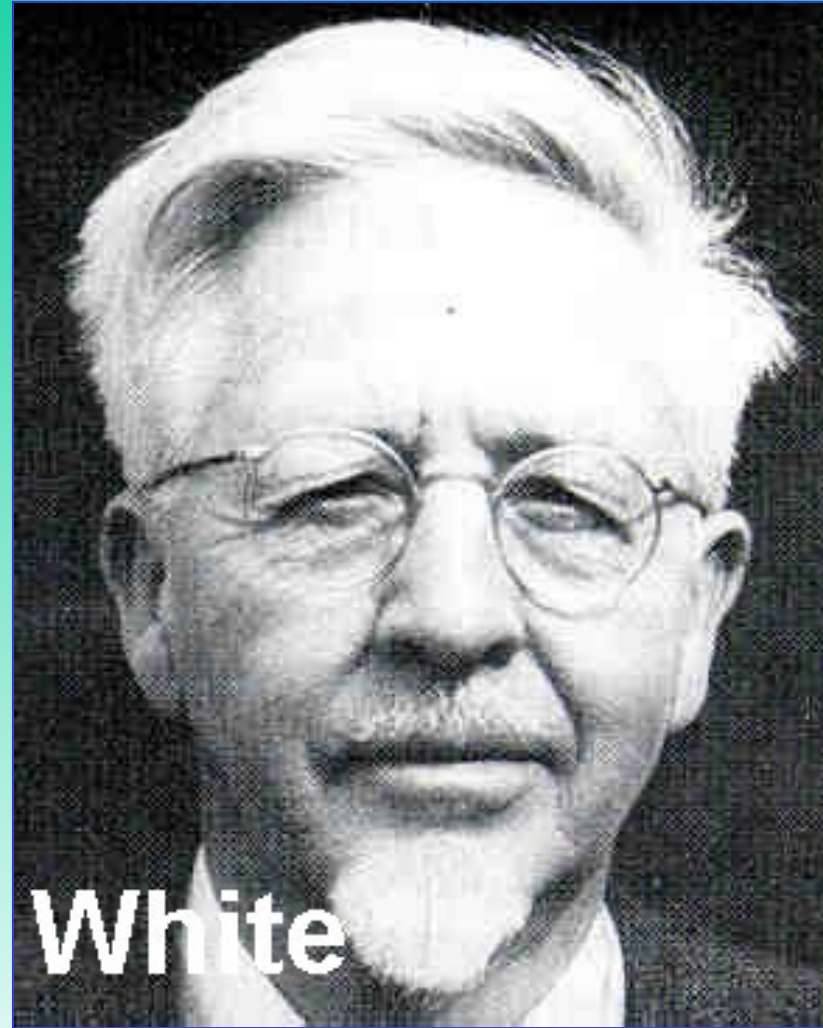


totipotence diferencovaných
rostlinných buněk byla
předpovězena v roce 1902
Gottliebem Haberlandtem
(1854 - 1945)

a v roce 1958 experimentálně
potvrzena Reinertem a Stewardem
somatickou embryogenezí u mrkve

Haberlandtova socha na jeho pomníku v rodišti v Altenburgu

První pravé „tkáňové kultury“



americký rostlinný fyziolog P.R.White

První pravé „tkáňové kultury“

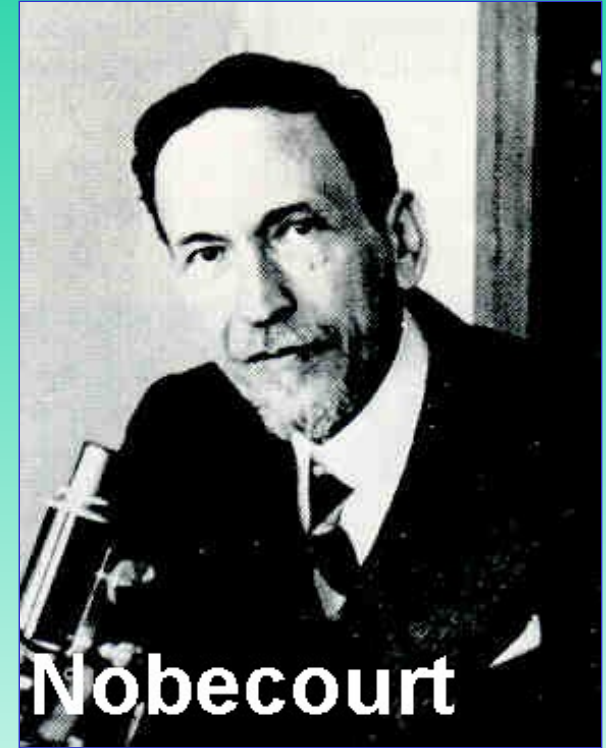
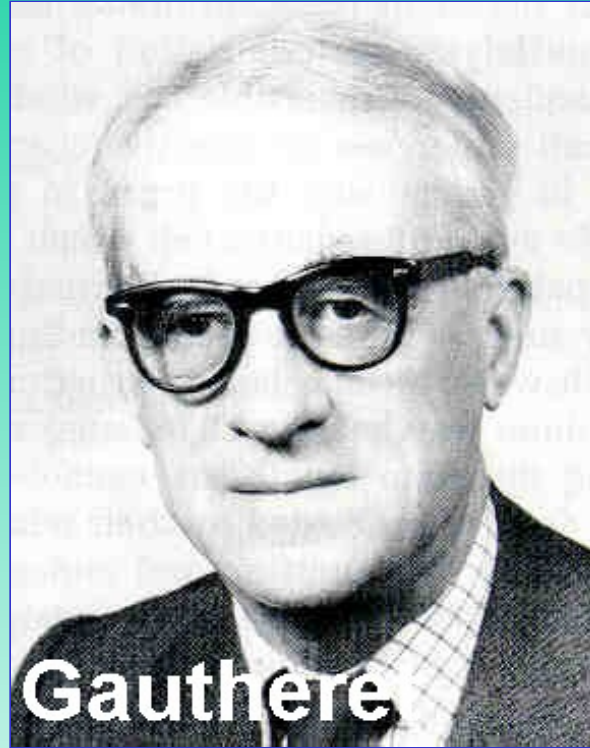
1935 **P.R.White** - izolované kořeny rajčat

- cukry
- vitamíny - B1, B6, kyselina nikotinová
- glycin
- meristem kořenové špičky



produkce fytohormonů

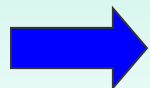
Kalusové kultury



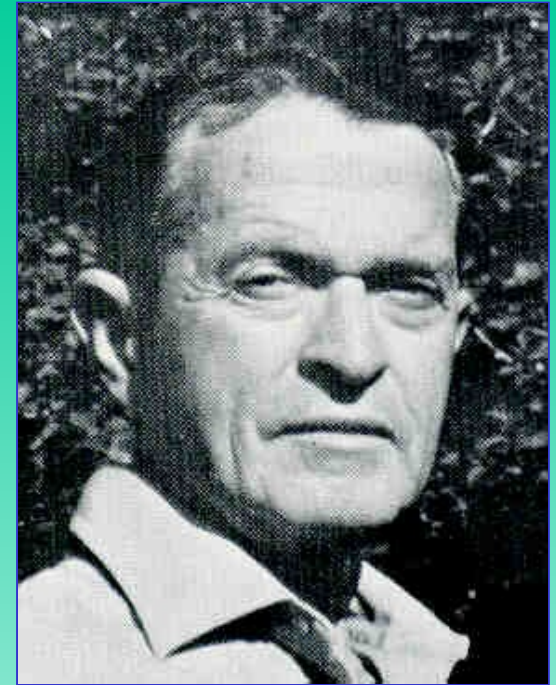
1939 **Gautheret** - kalus mrkve,
Nobecourt - kalus tabáku, **White** - nádory tabáku

Meristémové kultury

- ☞ 1944 - **Ernest Ball** - regenerace rostliny z izolovaného meristému (*Lupinus*)
- ☞ 1949 - **Limmaset a Cornuet** - rozdílné koncentrace virových částic v rostlinných orgánech, meristémy téměř viruprosté
- ☞ 1952 - **Morrel a Martin** - ozdravování virózních jiřin (*Dahlia*)



meriklonové množení



Suspenzní kultury

1958 - **Steward, Reinert** - tekuté médium, třepané kultury buněk a buněčných shluků



kalusy i regenerace rostlin

somatická embryogeneze

Po 100 letech pokusné potvrzení platnosti buněčné teorie Schleidena a Schwannaa i Haberlandtovy teorie o totipotenci somatických buněk.

České začátky používání metodik rostlinných explantátů

Rudolf Řetovský, Eva Petruš - AV ČR
Praha

Zdeněk Opatrný - AV ČR, VÚRV-
Ruzyně (Výzkumný ústav rostlinné
výroby), UK Praha

Boris Vyskot - BFÚ AV ČR Brno

František J. Novák - AV ČR
Olomouc, AA Seibersdorf

Jiří Vagera - AV ČR Olomouc

Zdeněk Sladký - MU Brno



Prof. Zdeněk Sladký, DrSc.
Foto: J. Dubová

III. Dny rostlinné fyziologie VŠZ Praha-Suchdol 1983



J. Vagera
UEB Olomouc

K. Erdelský
UKom Bratislava

V. Kozinka
SAV Bratislava

Z. Sladký O. Erdelská
MU Brno SAV Bratislava

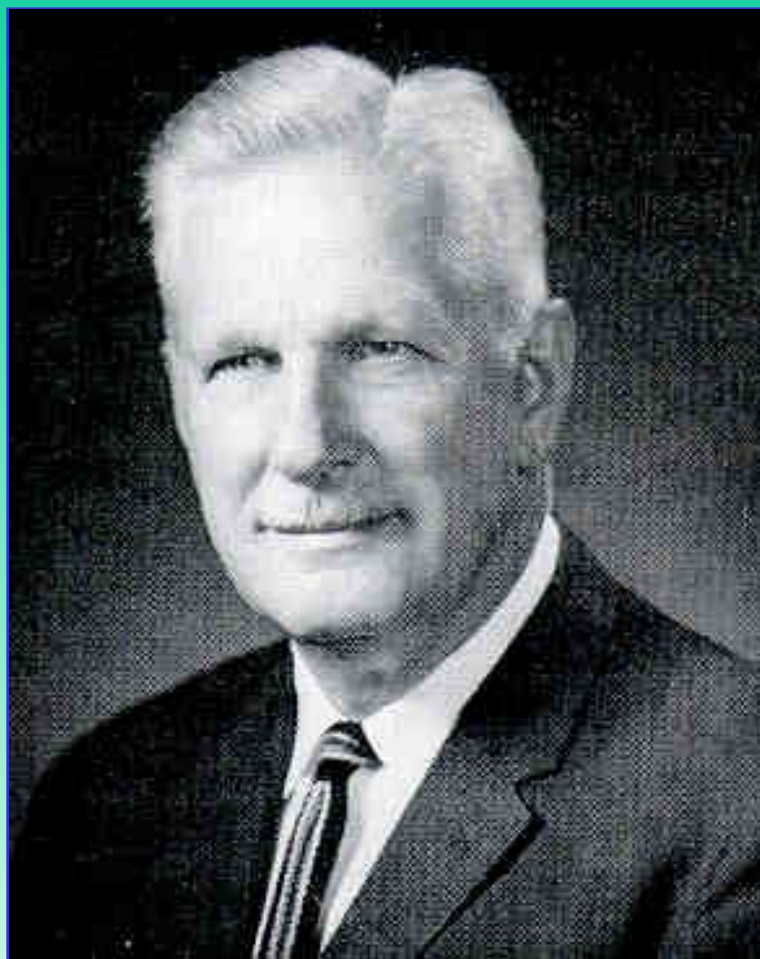
Olomouc 1984



Plant Tissue and Cell Culture - Application to Crop
Improvement • International Symposium • Olomouc
24-29 September 1984

T. Murashige

Z. Sladký



F. K. Skoog
objevitel kinetinu

Brno 1985 **Regulation of Plant Integrity**



Galston **F. K. Skoog**
L. Čulafič

Slovenské začátky rostlinných explantátů

Karol Erdelský - UKom
Bratislava

Anna Preťová - SAV
Nitra

Aurélie Kamenická -
Arboretum Mlyňany

Eva Čellárová - UJPŠ
Košice



Foto: J. Dubová

Opylení a oplození in vitro

1960 - indická škola: **Kanta, Maheshwari, Rangaswami**

1965 - polská škola: **Zenkteler**

1965 - české pokusy:

Tupý, Balatková (ČSAV Praha), **Sladký** (MU Brno)

různé metody aplikace pylu na explantát



Představitel indické
školy experimentální
embryologie

1966 prašníkové kultury
a odvození haploidních
rostlin (*Datura*)

P. Maheshwari

Profesor Maciej Zenkteler

Univerzita A. Mickiewicza
Poznań, Polsko

Experimentální embryologie,
opylování in vitro

Foto: J. Dubová



Smolenice 2001 - s prof. M. Zenktelerem



M. Griga

z exkurze na X. embryologické konferenci Nitra 2001

Prašníkové kultury

manipulace se stupněm ploidie:

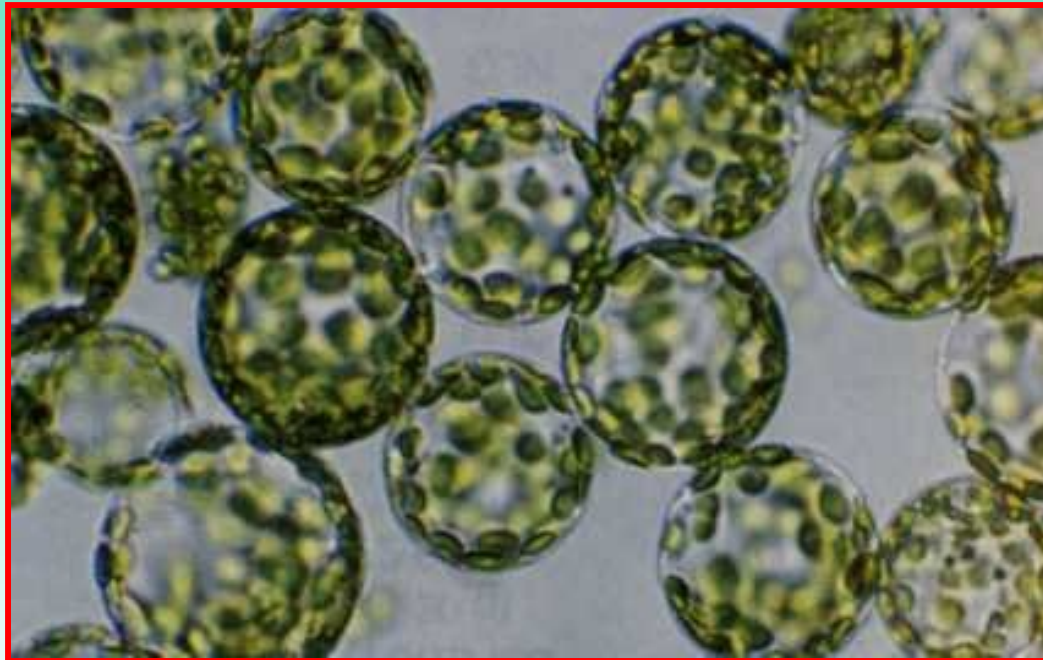
1. regenerace haploidních rostlin
z mikrospor nebo pylových zrn:
prašníkové nebo mikrosporové kultury
2. zdvojení haploidního genomu regenerantů
= dihaploidizace



získání homozygotního materiálu v kratší době

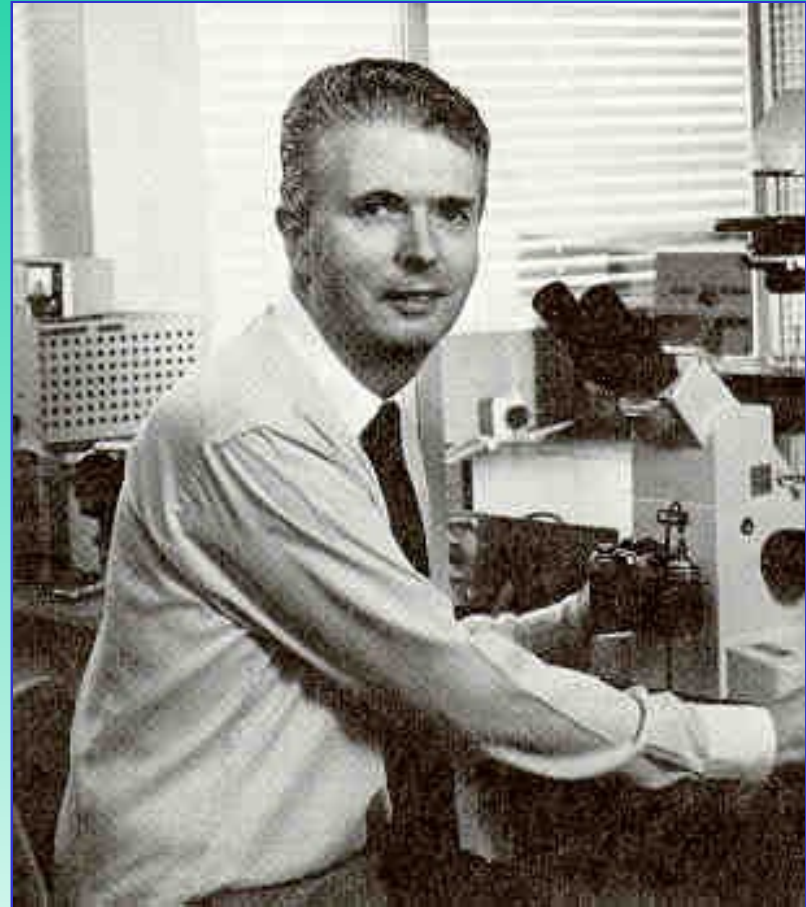
Rostlinné protoplasty

1970 - **Takebe a Nagata** - regenerace rostlinek tabáku z izolovaných protoplastů



Rostlinné protoplasty

- ☞ Carlson
- ☞ Butěnko, Gleba
- ☞ Dudits
- ☞ Potrykus
- ☞ Coocking



fúze protoplastů - somatická hybridizace - cybridy

Transformace rostlinného genomu

1974 - důkaz integrace **Ti plasmidu** do rostlinného genomu

1984 - přímý přenos **DNA** do rostlinného protoplastu (mikro-injekce)

1986 - přímý přenos **DNA** do rostlinných buněk



Geneticky modifikované organismy = GMO

„Biotrend“ BIOTRIN

je česká nezisková organizace
vytvořená vědeckými pracovníky pro šíření

informací o moderních biotechnologiích

<http://www.biotrin.cz/>

informace nejen o českých biotechnologiích

<http://www.gate2biotech.cz/>

Zajímavé webové adresy

Přehledné a názorné výukové stránky

<http://users.ugent.be/~pdebergh/ind/content.htm>

ukázka didaktiky rostlinných explantátů

http://www.liv.ac.uk/~sd21/tisscult/case_study_3.htm

jednoduché postupy

<http://www.home.turbonet.com/kitchenculture/begin.htm>

Doporučená literatura

- **DROBNÍK, J. et ŠTĚPÁNKOVÁ, H.** /eds./ (1997): Harmonizace pravidel práce v biologii a chemii. I. Bezpečnost biotechnologií. Series in Natural History, 6, PERES, Praha. (Skriptum UK).
- **ONDŘEJ, M.** (1985): Cytogenetika a molekulární genetika rostlin. - Academia, Praha.
- **ONDŘEJ, M.** (1992): Genové inženýrství kulturních rostlin.- Academia, Praha.

Doporučená literatura

- ☞ **GAMBORG, O. L. et PHILLIPS, G. C. (1995):** Plant cell, tissue and organ culture. Fundamental methods, Springer Berlin. Heidelberg.
- ☞ **PIERIK, R.L.M. (1987):** *In vitro* culture of higher plants. - Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster.
- ☞ **REINERT, J. et BAJAJ, Y.P.S./eds./ (1977):** Applied and fundamental aspects of plant cell, tissue and organ culture.- Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.

Doporučená literatura - skripta

- **KOVÁČ, J.** (1992): Explantátové kultury rostlin. - Ústí n. Labem (Skriptum UJEP).
- **VOTRUBA, M. et al.** (1987): Explantátové techniky (pro biotechnology a šlechtitele). - Praha (Skriptum VŠZ Praha).
- **ŠEBÁNEK, J. et SLADKÝ, Z.** (1988): Biotechnologie rostlinných explantátů. - Brno (Skriptum VŠZ). (nyní MZLU)

Časopisy

Plant Cell, Tissue and Organ Culture
Springer Netherlands

Plant Cell Reports
Springer Berlin / Heidelberg

Adresa stránek kurzu (v úpravě)
Bi6120 Rostlinné explantáty

<http://www.sci.muni.cz/explantaty/>

Školní vzdělávací programy MU

3. Střední školy,

3.3. Člověk a příroda,

3.3.3. Biologie

<http://svp.muni.cz/mapa-webu.php>

Od rostlinné kultury „in vitro“ k biotechnologiím

J. Dubová, A. Smíšková