

Základní podmínky kultivace *in vitro*

Požadavky na vybavení laboratoře
Živná média

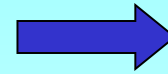
Základní podmínky kultivace *in vitro*

- aseptická kultura



nutnost sterilizace a desinfekce

- vhodná výživa explantátu



živná média

- vhodné fyzikální podmínky

- osvětlení
- teplota
- koncentrace plynů
- vlhkost vzduchu

Sterilizace a desinfekce

A. Fyzikální

- mechanická a elektrostatická

filtrace vzduchu očkovacích boxů (laminární proudění, 2. třída)

filtrace roztoků termolabilních látek -

filtry: skleněné (frity G5, S4)

membránové (Seitz, Millipore, Sartorius)

0,22 μ m

- UV záření (kultivační místnosti, boxy)

- teplota

suché nebo vlhké teplo

Očkovací boxy

laminární proudění vzduchu do pracovního prostoru
přes filtry:

předfiltry a HEPA-filtry („High Efficiency
Particulate Air“)

horizontální proudění:

FATRAN (Slovensko) UKB 3.37

GELAIRE (Itálie) UKB 3.37

vertikální proudění:

UNIFLOW (z Kolína/n. R.) - Řečkovice

HOLTEN (Německo) UKB 3.37 **AURA** UKB suterén

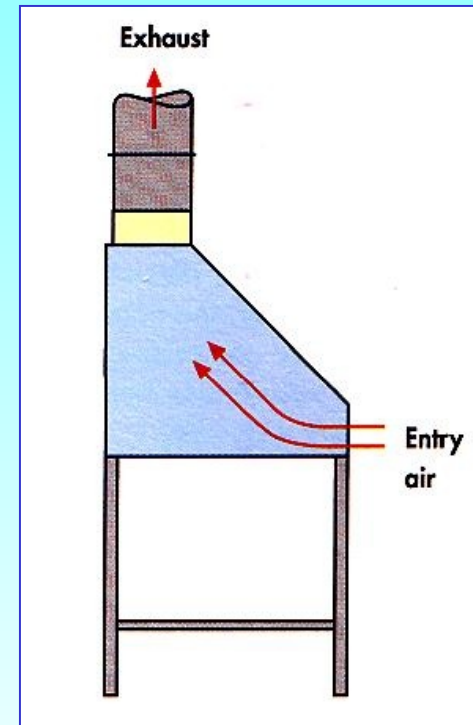
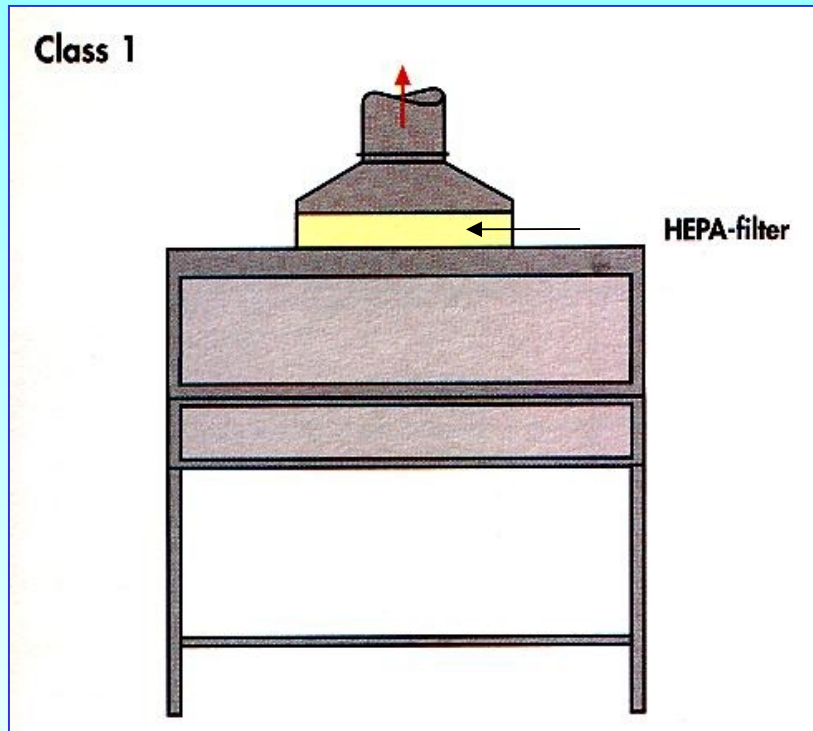
Vitro Centre International, Nizozemí



horizontální proudění filtrovaného vzduchu =
chrání materiál, ale ne pracovníka a prostředí

Očkovací box 1. bezpečnostní třída (lepší digestoř)

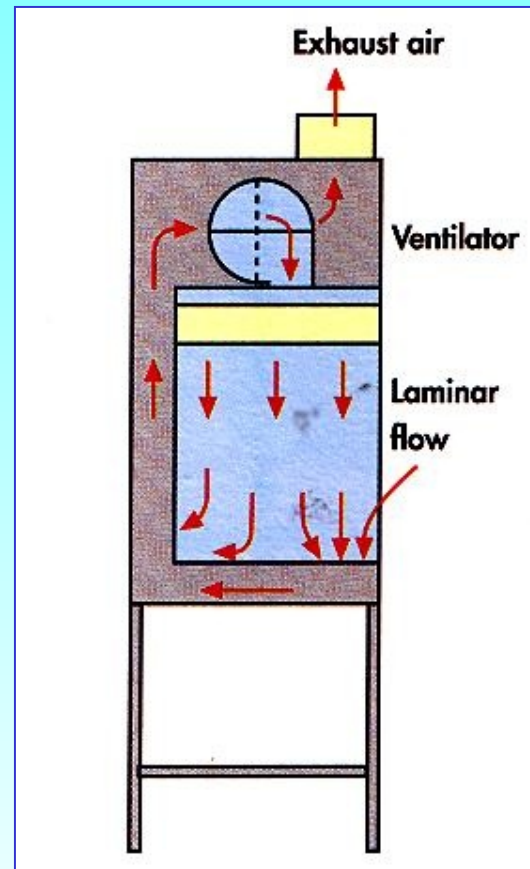
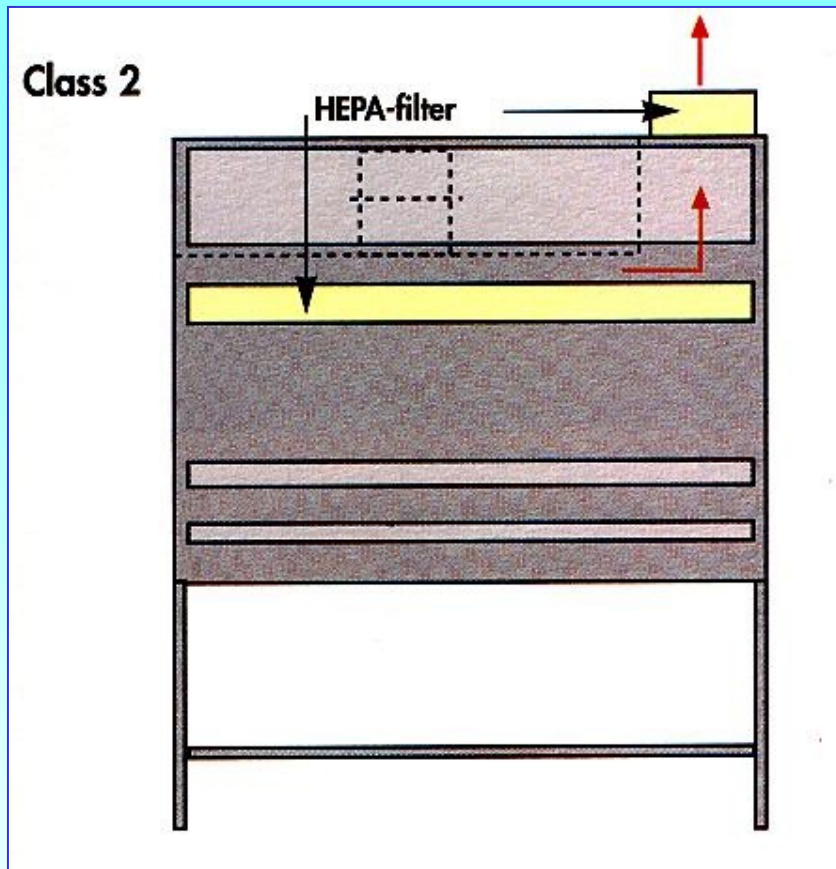
HEPA-filtr = „High Efficiency Particulate Air“



box nezajišťuje podmínky pro sterilní práci -
chrání jen životní prostředí

Očkovací box

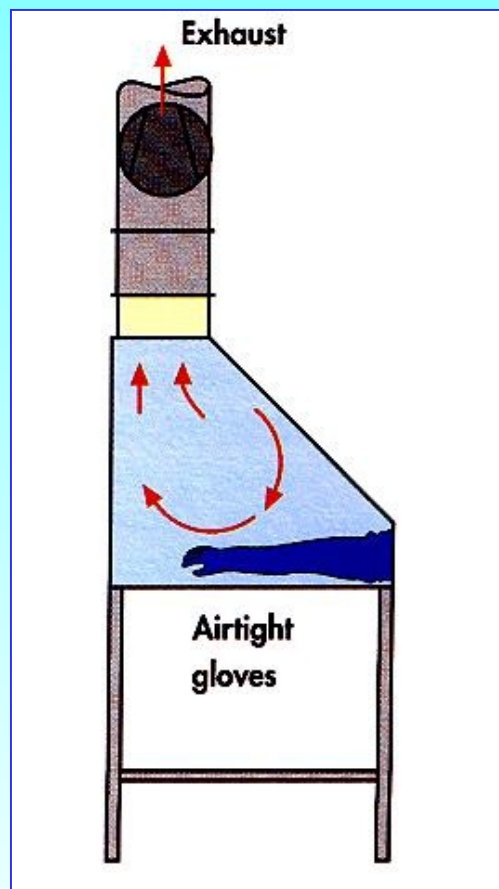
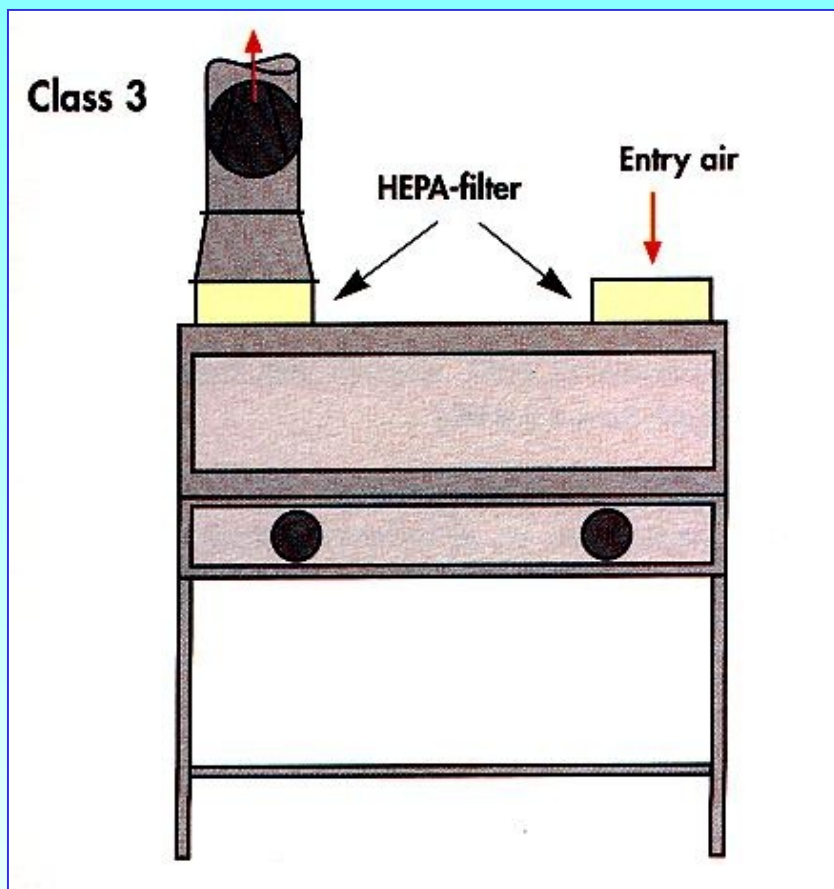
2. bezpečnostní třída
vertikální proudění vzduchu



HOLTEN, AURA - je možné pracovat i s GMO
= ochrana materiálu, pracovníka i prostředí

Očkovací box

3. bezpečnostní třída



užití pro práci s vysoce infekčními, toxickými nebo radioaktivními materiály apod.

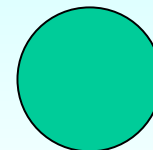
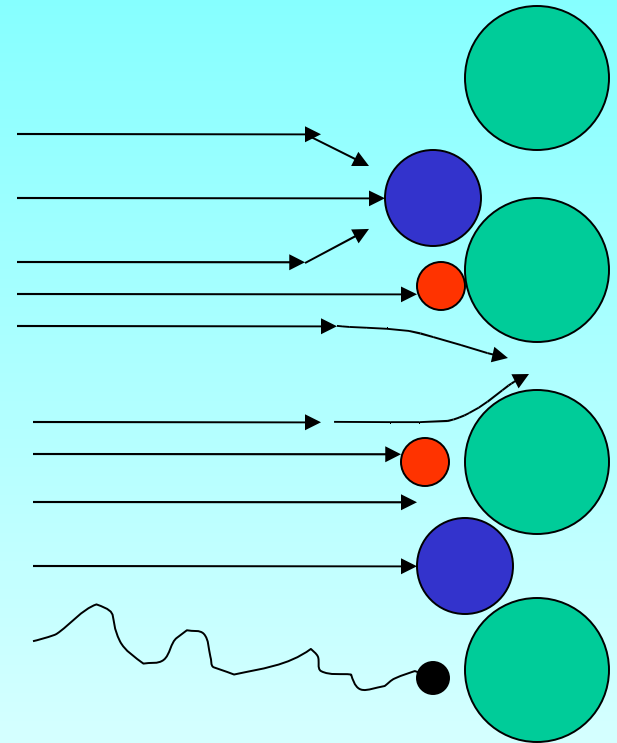
Velikost filtrem zadržovaných částic $> 0,1\mu\text{m}$

Mechanismy zadržení částic:

1. efekt síta = **velké částice**

2. **menší částice** =
inertní k proudění

3. **nejmenší částice** =
Brownův pohyb



= vlákna filtru

Sterilizace teplem

suché teplo

120 - 170°C

- horkovzdušné sušárny
- kahan
- sterilizační přístroj

sklo
nástroje

vlhké teplo

100 - 121°C

normální tlak

- zavařovací hrnec
- Kochův sterilizační přístroj vodou chlazený plášť

voda, živná média, roztoky,
filtrační papír, párátka

zvýšený tlak

- tlakový hrnec
- autokláv

100kPa, 121°C

Sterilizace při zvýšeném tlaku

vztah mezi teplotou a tlakem

°C	115	120	134	143
kPa	70	100	200	300

(autokláv Chirana Brno, PS 20)

Minimální doba pro sterilizace médií v autoklávu (katalog Sigma)

objem média /ml/	doba /min/	teplota /°C/
20 - 50	20	121
50 - 500	25	121
500 - 5 000	35	121
prázdné sklo filtr. papír	30	130

Změny v médiu při autoklávování (Pierik 1987)

- snižování pH o 0,3 - 0,5
- štěpení sacharózy → glukóza a fruktóza
- při dlouhé době → precipitace solí
depolymerace agaru
- rozklad termolabilních látek

zeatin, GA, etylén

kolchicin

antibiotika

rostlinné extrakty

Sterilizace a desinfekce

B. Chemická

Oxidace - látky uvolňující:

a) kyslík (H_2O_2 , Persteril)

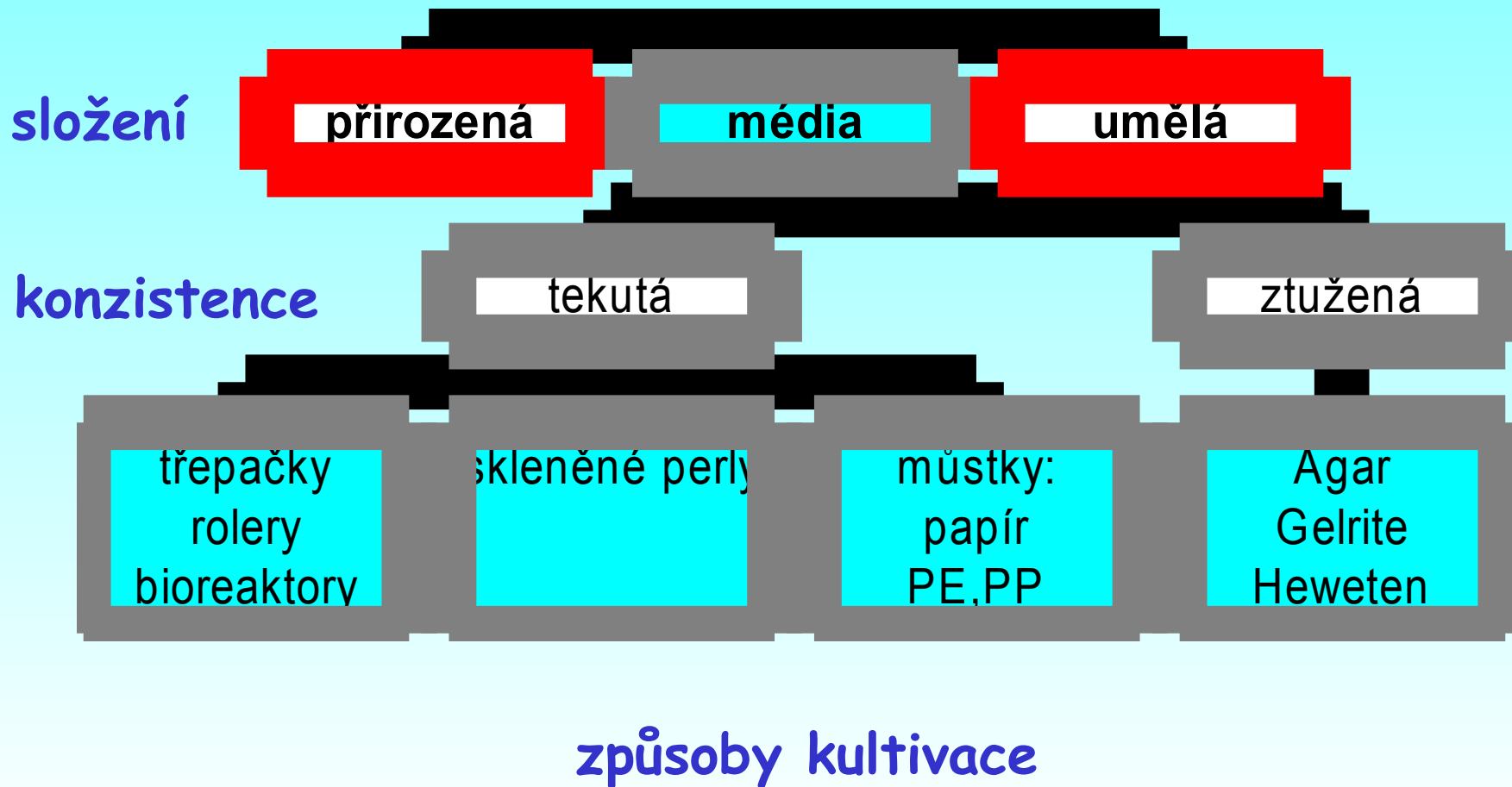
b) element. halogeny (chlorové vápno, chlornany
Chloramin B, SAVO, Ajatin, Decidin)

Koagulace bílkovin ionty kovů - Hg, Sn, Ag

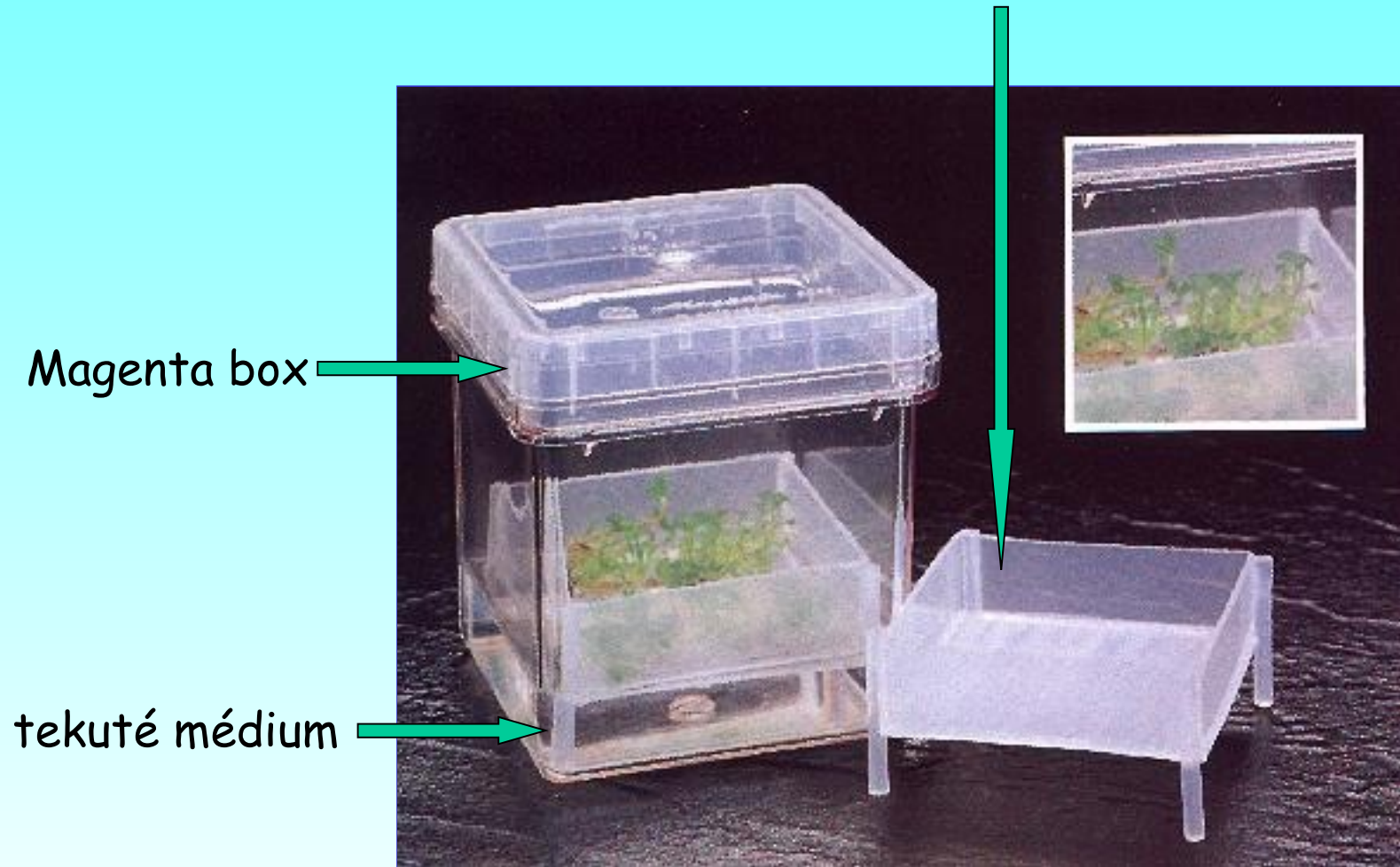
Sublimát $HgCl_2$, Famosept SPOFA

Detergencia - snížení povrchního napětí, smáčení
hydrofóbních povrchů a poškození membrán
(70% EtOH, Citowet, Tween, Triton-X100,
Jar)

Živná média - klasifikace

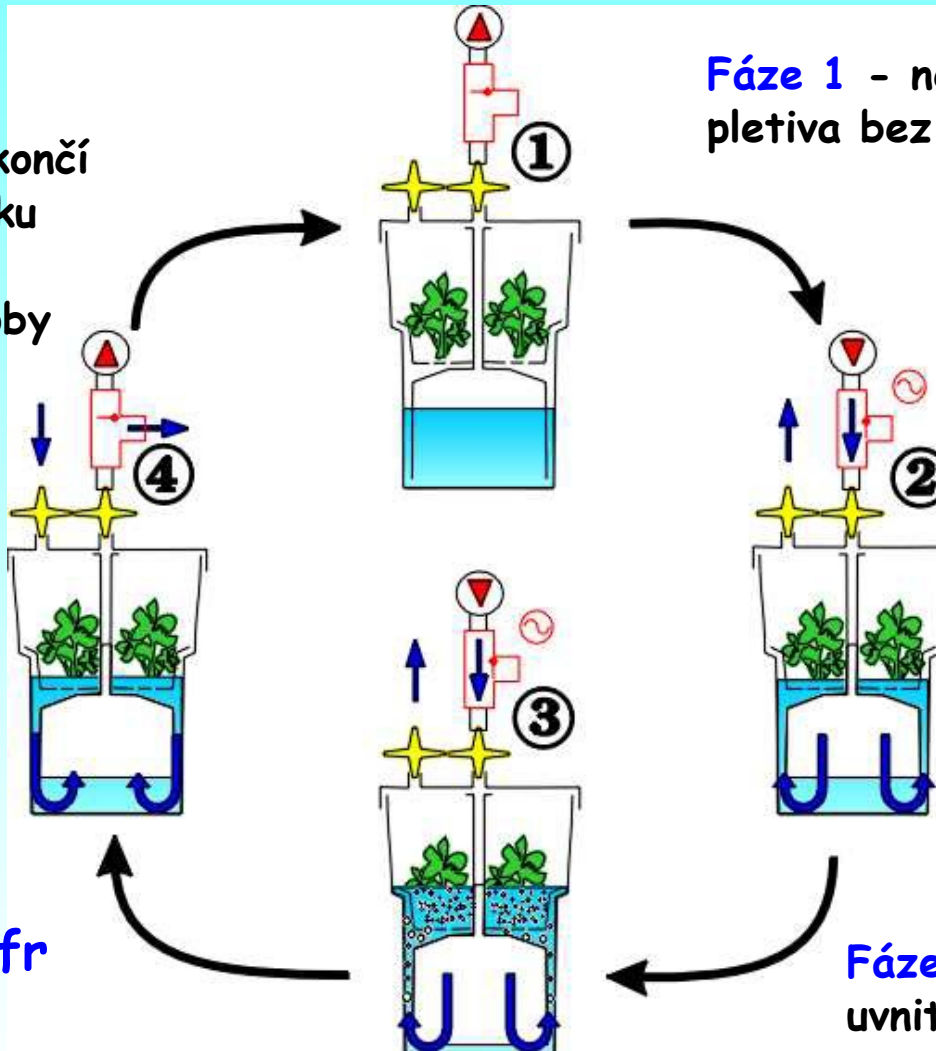


Polypropylenová (PP) membrána (můstek)



RITA® - občasně zaplavovaný systém

Fáze 4 - cyklus končí
ukončením přetlaku
medium stéká do
spodní části nádoby



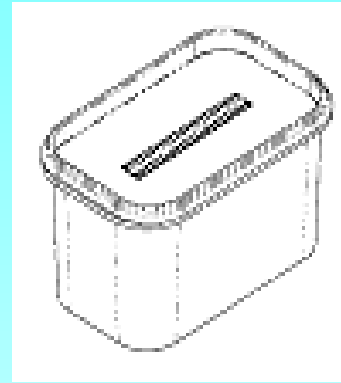
Fáze 1 - nejdelší trvání,
pletiva bez imerze médiem

Fáze 2 - začíná imerze,
médiem, tlak vzduchu,
který vstoupí přes
filtr, vytlačuje tekuté
médiem k explantátům

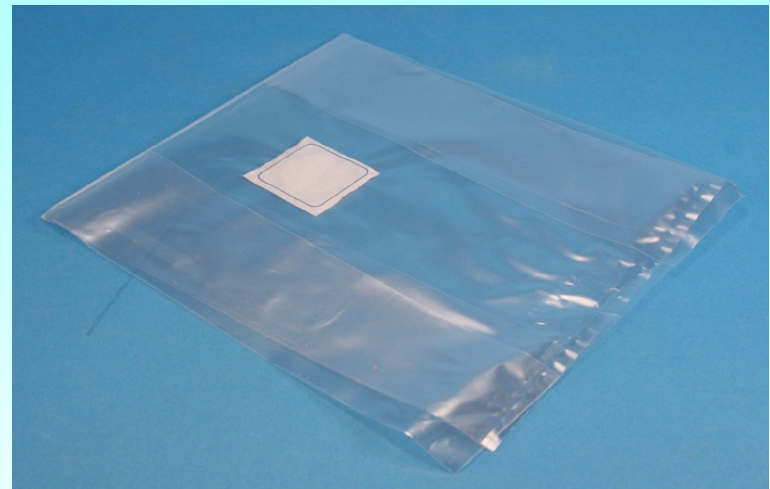
Fáze 3 - výměna vzduchu
uvnitř reaktoru

Kultivační nádoby s ventilací

- víčka se speciální membránou propustnou pro plyny
- kultivační sáčky se speciální membránou propustnou pro plyny (Sigma) původně pro kultivaci hub

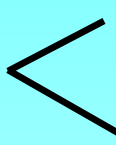


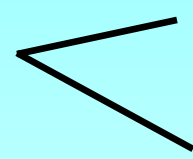
na jedno použití
sterilizace γ zářením



velikost pórů $0.02 \mu\text{m}$,
autoklávovatelný

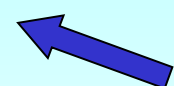
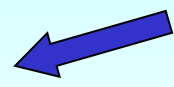
Fyzikální podmínky kultivace

osvětlení  intenzita, vlnová délka, fotoperioda
tma

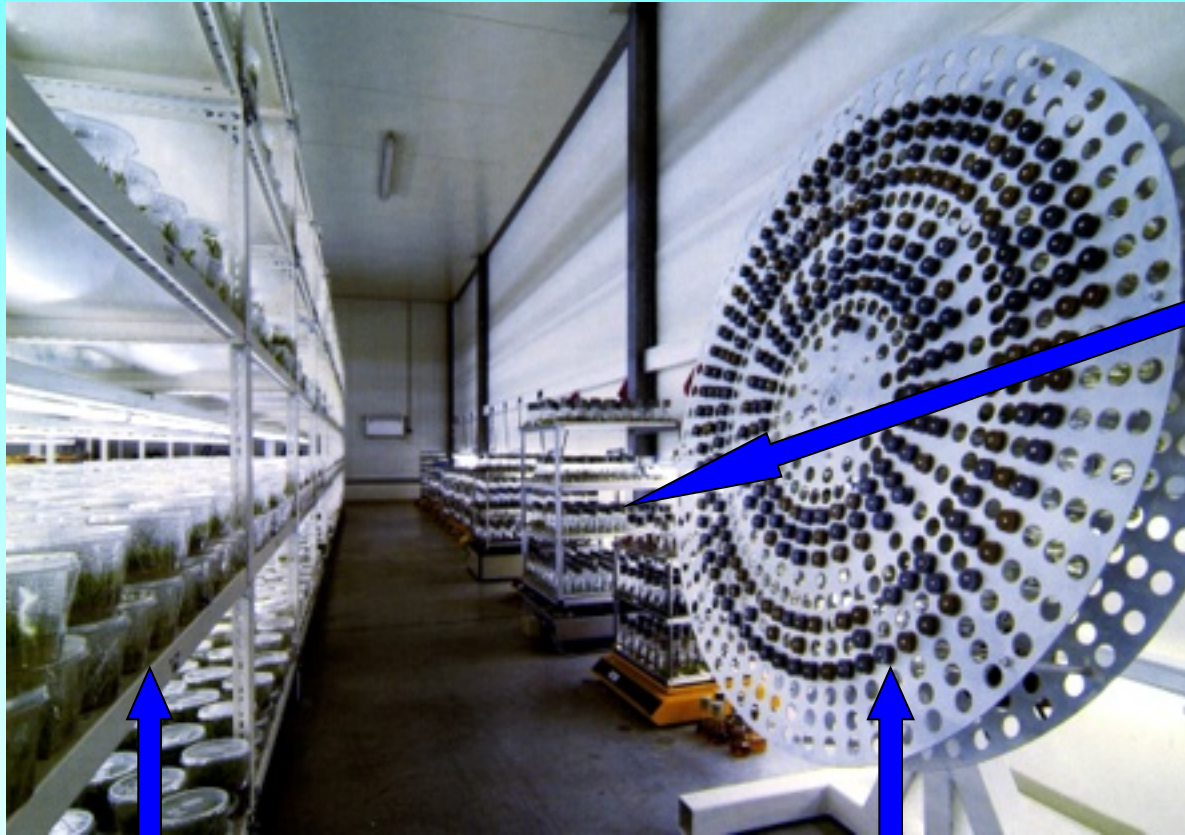
teplota  konstantní  klimatizace
kolísavá (den x noc)

koncentrace plynů: CO_2 , etylén, O_2

vlhkost vzduchu


 těsnost uzavírání
kultivačních nádob

Různé možnosti kultivace *in vitro*



horizontální
třepačky
pro kultivace v
tekutém médiu

Hark Orchideen GmbH
Lipstaadt, Německo
Katalog Duchefa

kultivační regály pro kultury
na agarem ztuženém médiu

rotační kultivační systém
pro kultivace v tekutém médiu

Komerční kultivační místnost

InVitro, Nizozemí
z katalogu Duchefa



Bioreaktory



v roce 2005 největší
automatický provzdušňovaný
bioreaktor pro pěstování
rostlinných buněk a orgánů
na světě

pracovní objem každého
tanku 20 000 l (20 tun)

celkový objem 160 000 l
(160 tun)

Foto: Sung Ho Son
VitroSys Inc., Korea

Povrchová desinfekce semen

Uzavření semen do epruvety nebo gázy

1. roztok: 50 ml sterilní destil. vody **1 minuta**
50 ml 96% EtOH
10 ml 30% peroxidu vodíku

Oplach sterilní destil. vodou

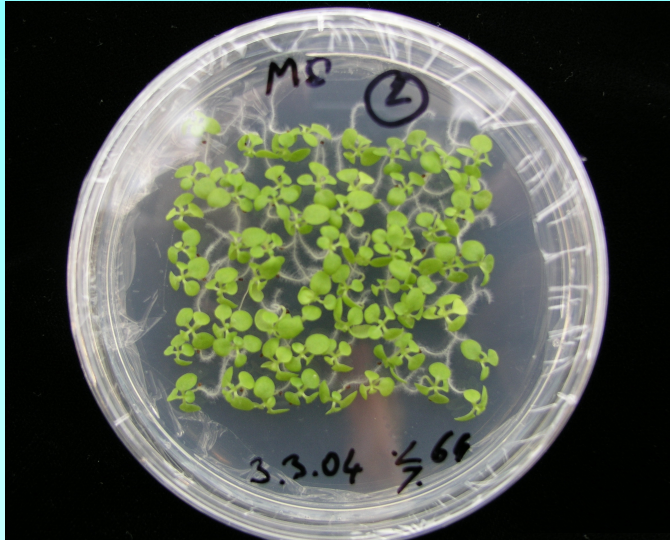
2. roztok 20% SAVO (v/v) **15 - 20 minut**

3x oplach sterilní destil. vodou **vždy 3 - 5 minut**

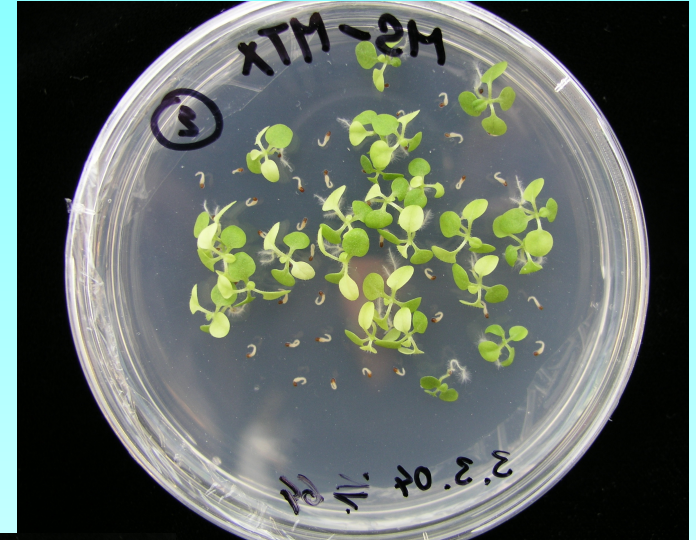
Výsev na Petriho misky

vlhká buničitá vata
skleněné perly + voda
médium ztužené agarem

Nicotiana tabacum L. - výsev semen selektce transgenních rostlin



heterozygotní 1-3AI-7
na MS médiu bez MTX



heterozygotní 1-3AI-7
na MS médiu s MTX



kontrola SR1
na MS médiu s MTX

Složení živných médií

(kultury jsou většinou heterotrofní)

- **anorganické sloučeniny (minerální výživa)**
 - makroelementy
 - mikroelementy
- **organické sloučeniny (organická výživa)**
 - zdroj organického uhlíku - sacharidy
 - zdroj organického dusíku - aminokyseliny, polyaminy
 - vitamíny
 - inositol (cyklický šestisytýný alkohol)
- **růstové regulátory (hlavně auxiny a cytokininy)**
- **ztužování médií (agar, Gelrite®)**
- **regulace pH (MES)**

Složení živných médií anorganické sloučeniny

makroelementy: N, P, K, Ca, Mg, S

mikroelementy: Fe, B, Cu, Mn, Ni, Co, I,

dodávají se ve formě solí:

sírany

dusičnany

fosforečnany

chloridy

Fe ve formě chelátu s EDTA

Složení živných médií organické sloučeniny

- zdroj organického uhlíku = sacharidy
 - mono- a disacharidy (glukosa, fruktosa a sacharosa)
- zdroj organického dusíku = aminokyseliny:
 - směsi (kaseinhydrolyzát, kvasničný hydrolyzát)
 - čisté (glycin)
 - polyaminy (putrescin, spermin, spermidin...)
- vitamíny: B1, B6, kys. nikotinová, kys. listová, biotin
- inositol
- aktivní uhlí
- přírodní látky
 - kokosové mléko
 - rostlinné šťávy
 - rostlinné drtě

Složení živných médií

růstové regulátory a ztužování

- **růstové regulátory**

- **auxiny (NAA, IBA, 2,4-D, Picloram)**
- **cytokininy (kinetin, BAP, TDZ)**
- **gibereliny (GA_3)**
- **kyselina abscisová (ABA)**

- **ztužování médií**

- **agar = polysacharid izolovaný z mořských řas**
- **gelrit = přírodní polysacharid produkovaný mikrobiální fermentací**

Makroelementy

N, P, K, Ca, Mg, S

- jsou důležité jak ve formě kationtů, tak aniontů
- živná média jich obsahují řádově **mM koncentrace**

Gamborg *et* Phillips (1995):

anorganický dusík a draslík

NO_3^- K^+ 30 mM

amonné soli NH_4^+ 2-20 mM

sulfáty, fosfáty, vápník a hořčík

SO_4^{2-} PO_4^{3-} Ca^{2+} Mg^{2+} 1-3 mM

Dusík

hlavní složkou všech médií je anorganický dusík
používá se ve dvou formách:

- dusičnany (nitráty)
- amonné ionty



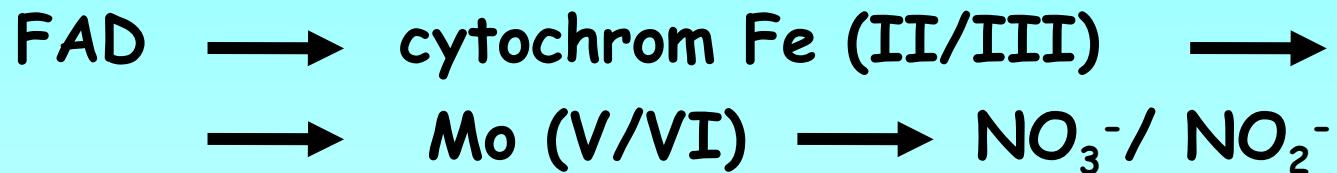
Dusičnany (nitráty)

- mohou být **transportovány xylémem** do jiných částí rostliny, kde probíhá jejich asimilace
- nemohou být použity k syntéze organických molekul přímo, ale **musí být postupně redukovány** napřed na dusitany a pak až na amonné ionty
- mohou být **skladovány** ve vakuolách buněk a plní důležitou funkci osmoregulace a rovnováhy mezi kationty a anionty

Asimilace dusičnanů

1. krok - konverze nitrátu na nitrit

nitrátreduktáza (v cytoplazmě) katalyzuje přenos e^- z NADPH



2. krok - redukce nitritu na čpavek

nitritreduktáza (v plastidech) katalyzuje redukci



elektrony pro tuto redukci se získávají ve fotosystému I, přenašečem je ferredoxin

Amonné ionty

- volný čpavek nebo amonné ionty jsou pro rostliny **toxické** i v nízkých koncentracích (inhibice tvorby ATP)
- jsou rychle převáděny na nízkomolekulární organické sloučeniny (**glutamin, glutamát, asparagin, arginin, alantoin...**)
- skladování v kořenech rostlin a zásobních orgánech

Fosfor

- je přijímán jako **dihydrogenfosforečnan**
- může být přítomen v rostlinách jako anorganický fosfát (**P_i**), po vstupu do cytoplazmy je rychle esterifikován na **ATP**
- je nezbytný
 - pro stavbu **DNA, RNA, fosfolipidů** biomembrán
 - pro **energetický metabolismus** - energie uvolněná glykolýzou nebo získaná fotosyntézou nebo oxidativní fosforylací se ukládá do **ATP** a může být později uvolňována hydrolýzou na **ADP** a na **P_i**

Draslík

- má **velkou pohyblivost** - na buněčné úrovni i na dlouhé vzdálenosti ve floému a xylému
- je iontem s **nejvyšší koncentrací** v buňce (100 - 200 mM v cytoplazmě)
- význam pro **osmoregulaci**
- funguje jako protiváha při **udržování optimálního pH**
- **aktivuje mnoho enzymů** (vazba K^+ indukuje konformační změny proteinů), aktivuje rovněž membrány pro vazbu ATPáz

Vápník

- **většinou vázán** na buněčné stěny (Ca pektáty) a buněčné membrány
- **transport Ca^{2+}** floémem i z buňky do buňky je velmi **omezený**
- **Ca^{2+}** velmi ovlivňuje **stabilitu buněčné membrány** interakcí s fosfáty, karboxylovými skupinami fosfolipidů a proteinů
- vazebný protein vápníku **kalmodulin** - role v regulaci intracelulární koncentrace Ca^{2+}

Hořčík

- velmi mobilní, schopný tvořit komplexy
- je nezbytný
 - pro četné enzymatické reakce
 - fotosyntéza
 - regulace pH a rovnováhu iontů
 - syntéza proteinů (tvoří můstek mezi podjednotkami ribozómů), při nedostatku hořčíku se podjednotky rozpadnou a proteosyntéza je zastavena
 - energetický metabolismus

Mikroelementy

používají se mikromolární koncentrace
mají význam především jako kofaktory

- bór B
- chlór, jód Cl, I
- železo Fe
- kobalt Co
- měď Cu
- mangan Mn
- molybden Mo
- zinek Zn

Organické sloučeniny - „vitamíny“

- B1 thiamin
- B6 pyridoxin
- kyselina nikotinová
(biotin, kyselina listová, D, pantotenát vápenatý...)
- myo-inositol - stavební jednotka inositolfosfatidů, role při tvorbě a metabolismu membrán, u rostlin i jako fytinová kyselina = se 6 zbytky kys. fosforečné

Organické sloučeniny uhlíku

sacharidy

- **metabolizovatelné cukry = organická forma uhlíku**
 - sacharosa
 - glukosa
 - fruktosa
- **nemetabolizovatelné cukry = změny osmotické hodnoty média**
 - manitol
 - sorbitol

Dusíkaté organické sloučeniny - aminokyseliny

- směsi
 - kvasničný hydrolyzát („yeast extract“)
 - hydrolyzát kaseinu (aminokyseliny mléčného proteinu)
- čisté aminokyseliny (L-formy)
 - L-glycin

Dusíkaté organické sloučeniny - polyaminy

- putrescin
- spermidin
- spermin

mají nejen funkci nutriční, ale hlavně regulační:

- podpora tvorby adventivních kořenů
- podpora tvorby prýtlů
- podpora somatické embryogeneze

Ztužování médií

- **agar** - polysacharid extrahovaný z různých druhů mořských řas (často obsahuje velké množství solí)
- **karagenan** - polysacharidy z ruduch, po ochlazení tvoří dvojitý helix v přítomnosti kationtů (**Kappa typ** tvoří gel v přítomnosti K^+ , **Iota typ** geluje v přítomnosti Ca^{2+})
- **Gelrite®** - přírodní polysacharid produkovaný mikrobiální fermentací (glukosa, glukuronová kyselina, glukosa a rhamnosa). Poskytuje pevný průhledný gel v přítomnosti Mg^{2+} , Ca^{2+} . Používá se v **poloviční koncentraci** ve srovnání s agarem
- **alginát sodný** - směs polyuronových kyselin, extrahován z hnědých řas. Tvoří **zastudena** gely rozpustné vodou, geluje v přítomnosti Ca^{2+}

Plant Biotechnology - Sigma Aldrich

http://www.sigmaaldrich.com/Area_of_Interest/Life_Science/Plant_Biotechnology/Tissue_Culture_Protocols.html

The Plant Tissue Culture Protocols are part of Sigma's growing offer in Plant Biotechnology.

We have added helpful information in each protocol including:

- Media Preparation
- Media Formulation
- Sterilization Techniques
- Storage

Plant Biotechnology - Sigma Aldrich

Plant Tissue Culture Protocols

Antibiotics

Gelling Agents

Murashige and Skoog Media Variations

Phycology and Aquatic Plant Media

Plant Pathology Media

Silver Thiosulfate Solution

Sunbag Vessels

Surface Sterilization of Plant Explants and Orchid Seed

Classic Plant Media

Iron Chelate Solution

Orchid Culture Media

Plant Growth Regulators

Plant Tissue Culture Media

Sterilization of Culture Media

Vitamin Mixtures

Nejčastěji používaná média

- **Murashige et Skoog (1962)** MS
- **Gamborg, Miller et Ojima (1968)** B5
- **Schenk et Hildebrandt (1972)** SH
- **White (1963)**
- **Nitsch (1951), Nitsch et Nitsch (1967)**
- **Lloyd et McCown (1981)** WPM
- **Kao et Michayluk (1975)**
- **Chu (1975)** N6

<http://www.hos.ufl.edu/mooreweb/TissueCulture/tcclass.htm>

Murashige - Skoogovo základní médium (1962)

Inorganics	(mg/L)	M 0404
Potassium nitrate		1900.0
Sodium nitrate		1751.0
Ammonium nitrate		1650.0
Magnesium sulfate		180.7
Potassium phosphate monobasic		170.0
Calcium chloride anhydrous		332.2
Na ₂ -EDTA		37.26
Ferrous sulfate · 7H ₂ O		27.8
Cobalt chloride · 6H ₂ O		0.025
Cupric sulfate · 5H ₂ O		0.025
Boric acid		6.2
Manganese sulfate · H ₂ O		16.9
Molybdic acid (sodium salt) · 2H ₂ O		0.25
Potassium iodide		0.83
Zinc sulfate · 7H ₂ O		8.6

Vitamíny podle Gamborga

Organics (mg/L)	M 0404
myo-Inositol	100.0
Nicotinic acid (free acid)	1.0
Pyridoxine · HCl	1.0
Thiamine · HCl	10.0

Příprava živného média (1 I)

- 6,5 g **agaru** vsypeme do 300 ml destilované vody v SIMAX láhvi a rozvaříme v autoklávu
- do Erlenmeyerovy baňky odměříme 500 ml **destilované vody**.

nebo navážíme 4 413 mg sypké směsi:
Murashige-Skoogovo médium s vitamíny podle Gamborga
(Duchefa)

- navážíme 20 g **sacharózy**

Příprava živného média (1 I)

- podle potřeby doplníme další látky jako **aktivní uhlí**, **růstové regulátory** a pod.
- slijeme rozvařený agar s roztokem v EM baňce a **doplníme** v odměrném válci **na 1000 ml**
- pomocí Phan papírků **změříme pH** a upravíme na 5,7 pomocí 0,1 M KOH nebo 0,1 M HCl
- médium dobře **promícháme** přeléváním z válce do EM baňky a **rozlijeme** asi po 40 ml do kultivačních nádob

Příprava živného média (1 I)

- kultivační nádoby s médiem **uzavřeme** vhodným uzávěrem
- následující den **sterilizujeme** při 121°C v autoklávu po dobu 20 minut (médium s přídavkem aktivního uhlí při chladnutí promícháváme)
- krátkodobě média **uchováváme** při laboratorní teplotě, při skladování po delší dobu používáme lednici

při kultivaci v Petriho miskách rozléváme médium sterilně v očkovacím boxu až po jeho sterilizaci