

# Rostlinné explantáty (kultury *in vitro*) 1.

Jaroslava Dubová

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



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

Tato prezentace je spolufinancována  
Evropským sociálním fondem  
a státním rozpočtem České republiky

# 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.

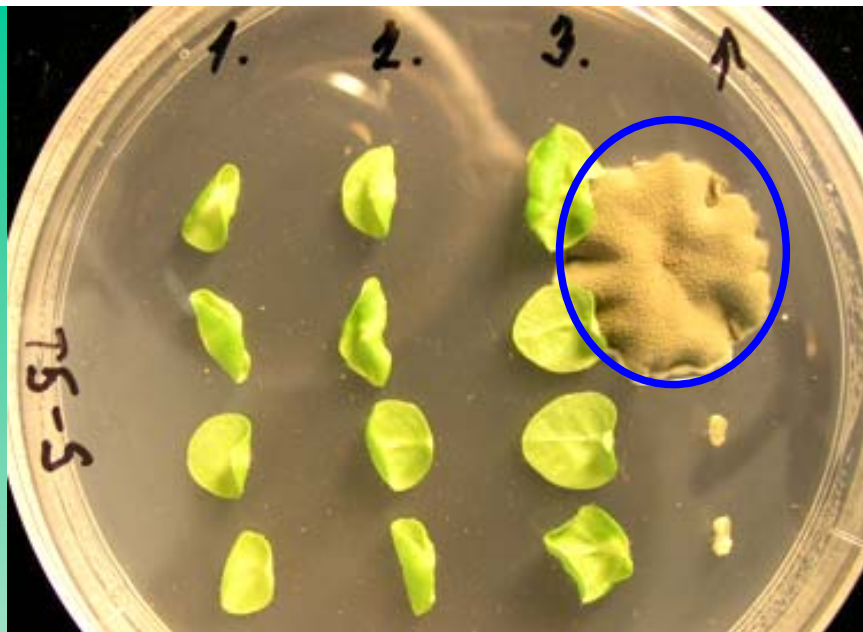
# Definice termínů

- *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

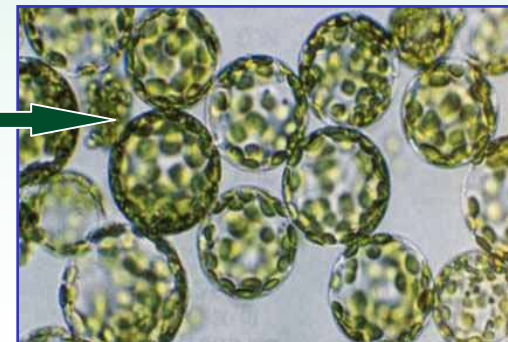
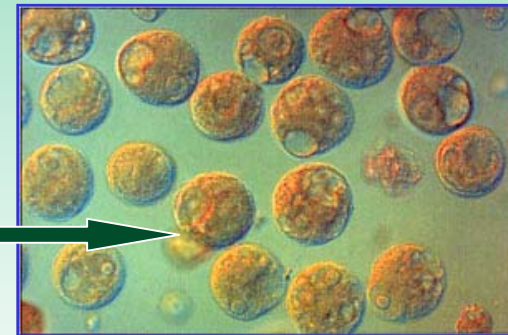
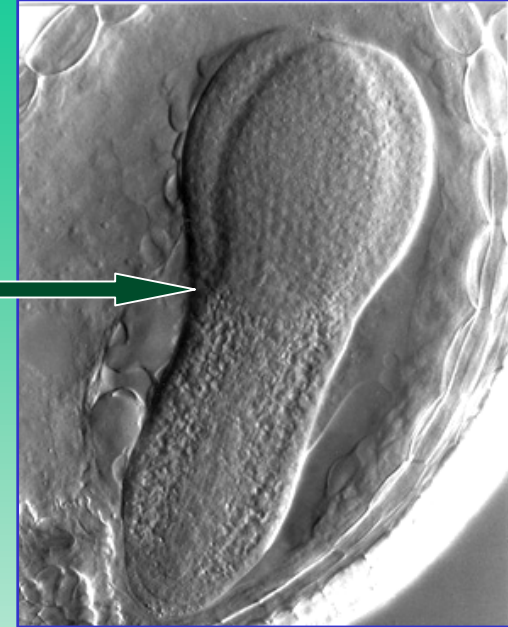


kultura infikovaná kvasinkami  
a bakteriemi

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



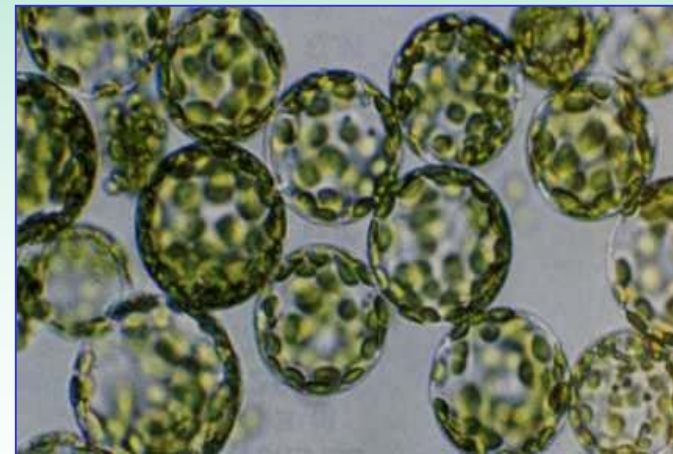
mikropropagace jabloně



prašниковá kultura tabáku



suspenze buněk vojtěšky

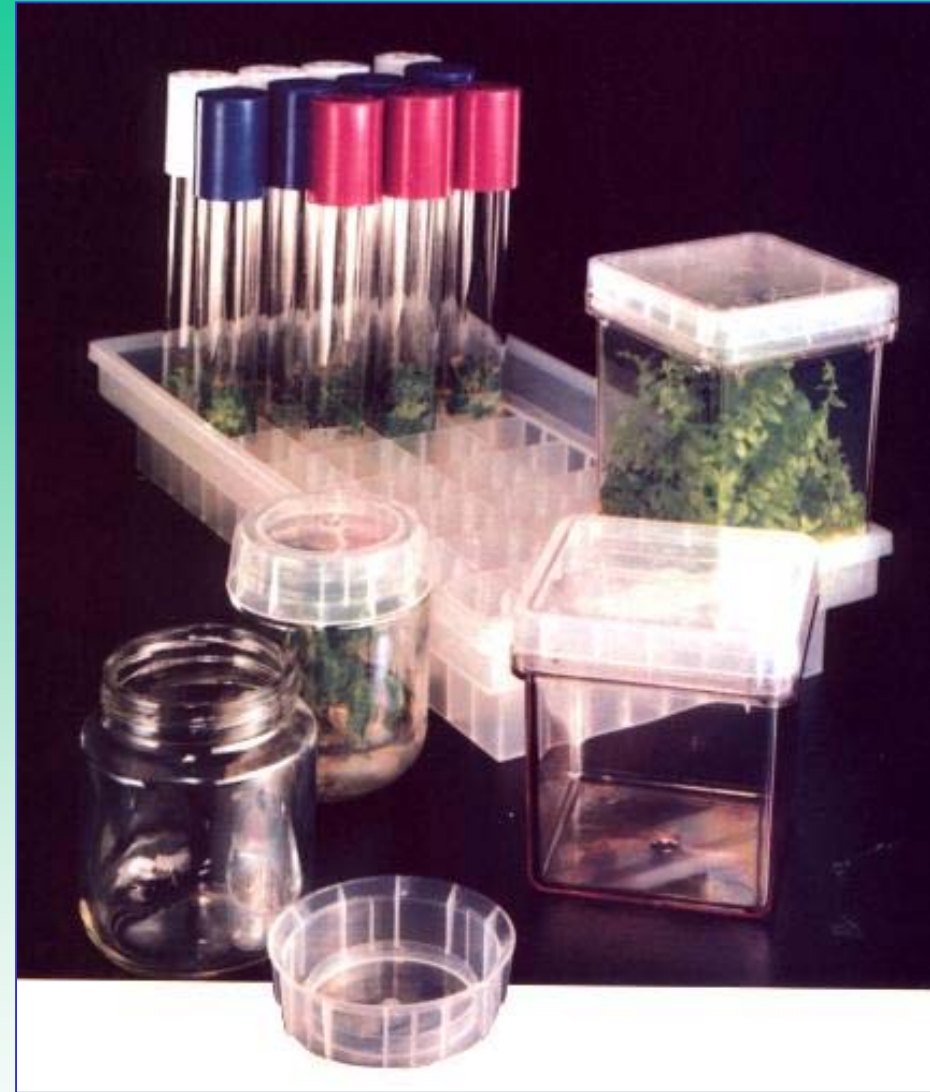


rostlinné protoplasty mezofylu tabáku



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

média ztužená



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

# Suspenzní kultury

média tekutá



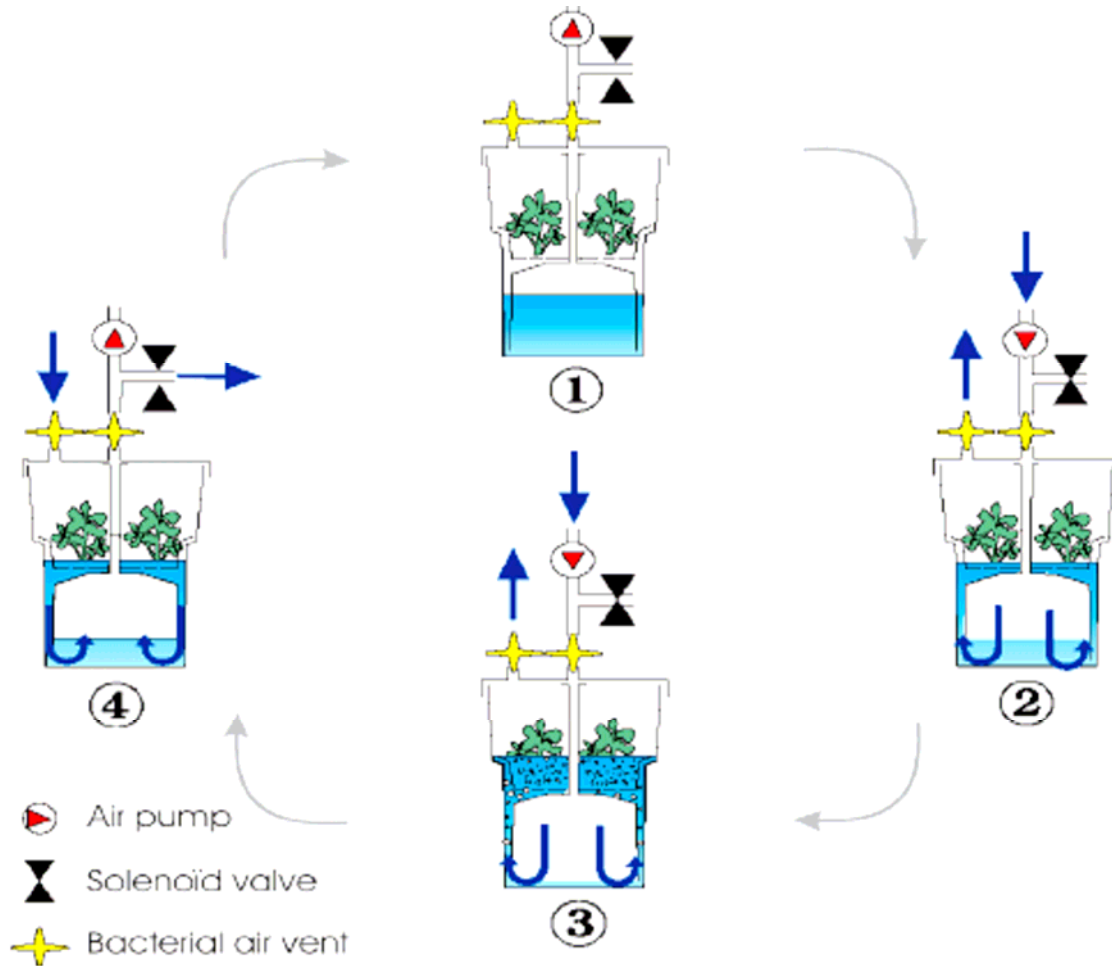
**laboratorní třepačka**



**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/ind/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

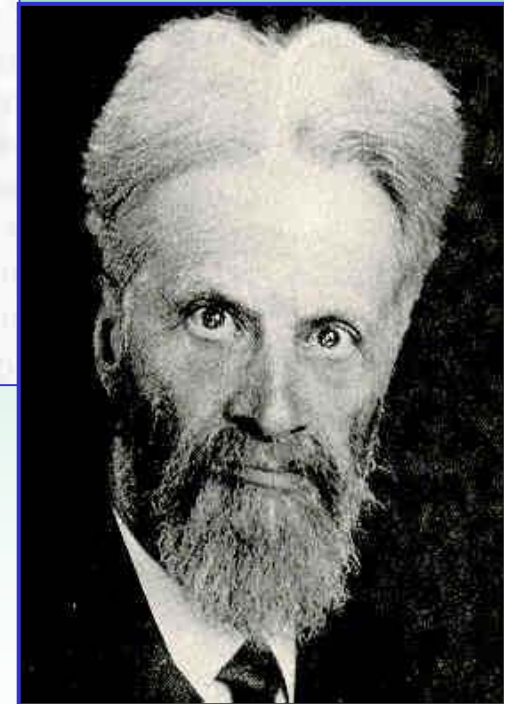
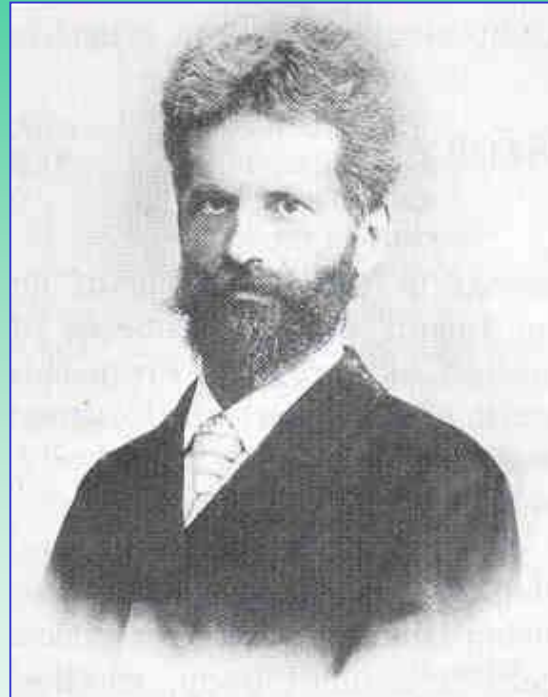
cd-ROM bylo vytvořeno jako pomůcka pro studenty kurzů kultur rostlinných buněk a pletiv i biotechnologie. Podle autorů to není kompletní kurz, ale poskytuje hypertextové stránky s množstvím obrázků a krátkých textů.

# Historický přehled - počátky

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

Kultivoval explantáty:

- parenchym listů
- dřev stonku
- svěrací buňky průduchů





- neznalost výživy a fytohormonů
- nesterilní kultura
- vysoce diferencované buňky v kultuře



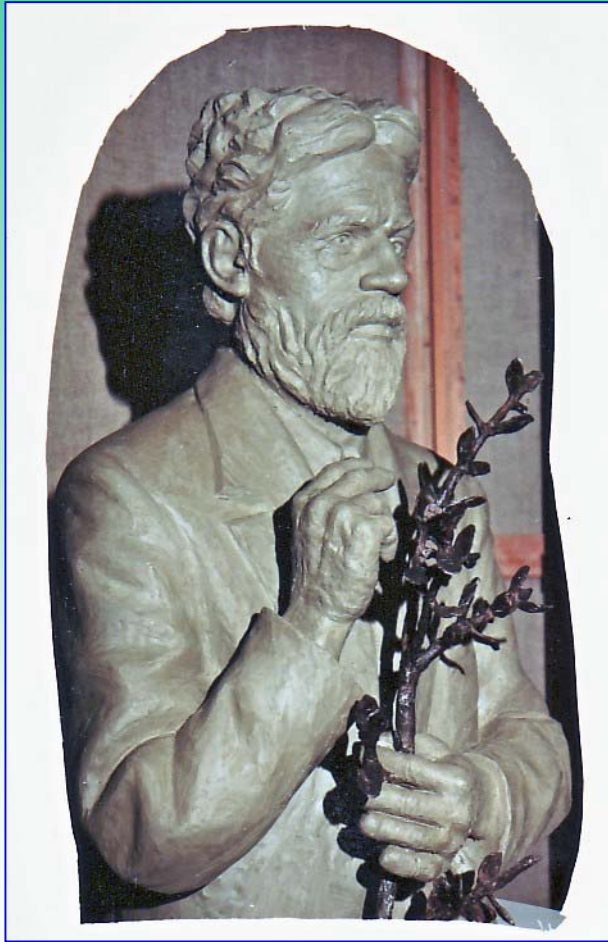
krátkodobé přežívání kultur

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

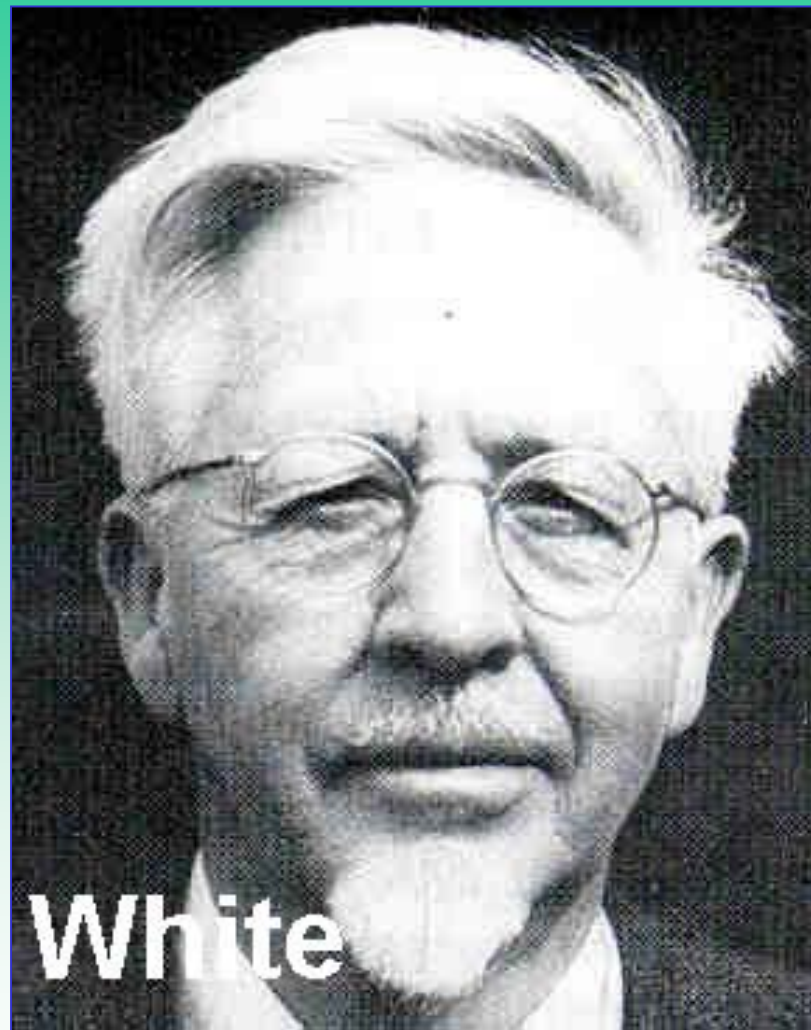


totipotence diferencovaných  
rostlinných buněk  
předpovězena v roce 1902  
Gottliebem Haberlandtem  
(1854 - 1945)

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

foto Haberlandtovy sochy na jeho pomníku v rodišti v Altenburgu

# První pravé „tkáňové kultury“



**americký rostlinný fyziolog P.R.White**

# První pravé „tkáňové kultury“

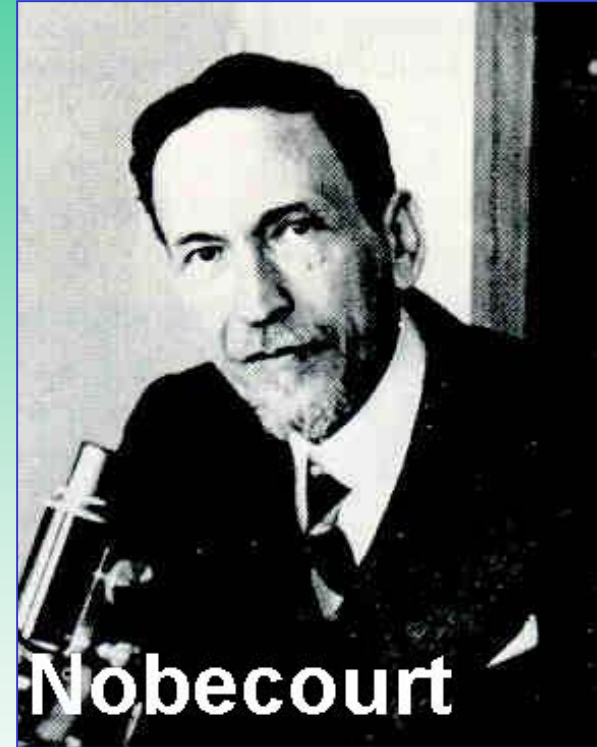
1935 **P.R.White** - izolované kořeny rajčat

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



**produkce fytohormonů**

# Kalusové kultury



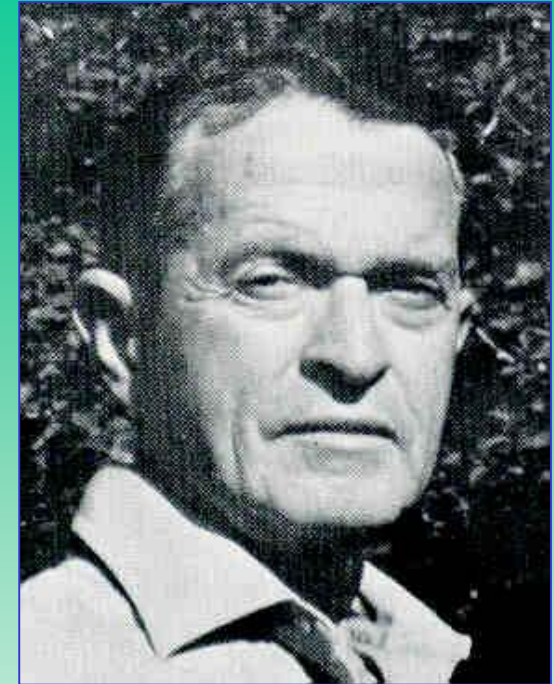
1939 **Gautheret** - kalus mrkve,  
**Nobecourt** - kalus tabáku, **White** - nádory tabáku

# 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 **Schwanna** i **Haberladtovy**  
teorie o totipotenci **somatických buněk**.

# České začátky používání metodik rostlinných explantátů

**Rudolf Řetovský, Eva Petrů** - AV ČR Praha

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

**Boris Vyskot** - BFÚ AV ČR Brno

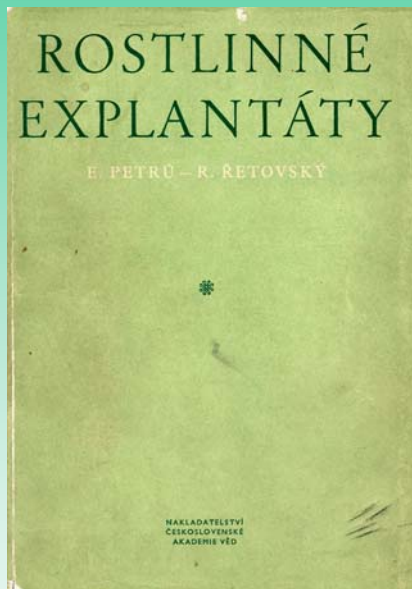
**František J. Novák** - AV ČR Olomouc, AA  
Seibersdorf

**Jiří Vagera** - AV ČR Olomouc

**Zdeněk Sladký** - MU Brno



# České začátky používání metodik rostlinných explantátů



ČSAV 1956



1963 Pennsylvania  
State University

- 1 E. Petrů
- 2 H. E. Street
- 3 Karstens
- 4 I. K. Vasil
- 5 J. Reinert



## Prof. Zdeněk Opatrný, DrSc.

25 let v AV ČR  
10 let VÚRV-Ruzyně  
nyní PřF UK Praha



Jeden z prvních „rostlinných biotechnologů“ v ČR.  
Zastupoval ČR v evropském programu **COST/ESF** - výbor pro  
**potravinu a zemědělství**.

Vědecky pracuje, publikuje a přednáší pro odborníky i laiky.  
Spolupracuje s tiskem, rozhlasem i TV.

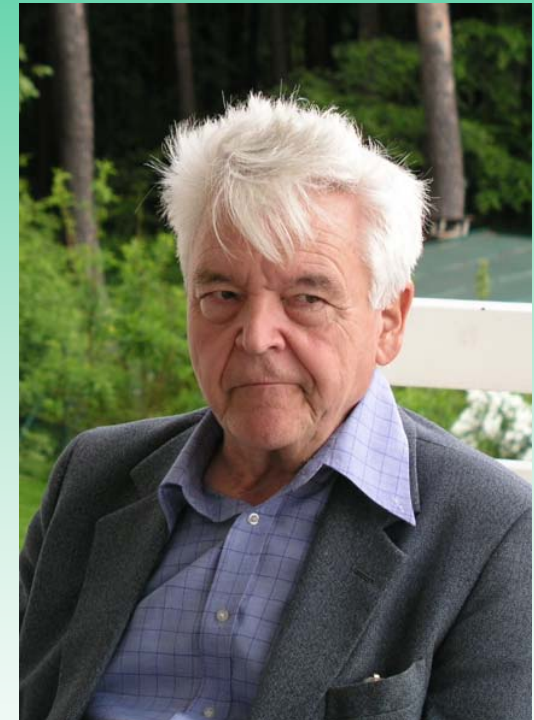
Jeden ze zakladatelů organizace **Biotrin**.

<http://opatrny.bigblogger.lidovky.cz/>

# Prof. Zdeněk Sladký, DrSc.



s diplomanty katedry fyziologie rostlin, 1973



2004

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



**T. Murashige**

**Z. Sladký**

Foto: M. Griga

Brno 1985  
Regulation of Plant Integrity



F. K. Skoog  
objevitel kinetinu



Galston      F. K. Skoog  
L. Čulafič

# Slovenské začátky rostlinných explantátů

**Karol Erdelský** - UKom  
Bratislava

**Anna Pret'ová** - SAV  
Nitra

**Aurélie Kamenická** -  
Arboretum Mlyňany

**Eva Čellárová** - UJPŠ  
Košice

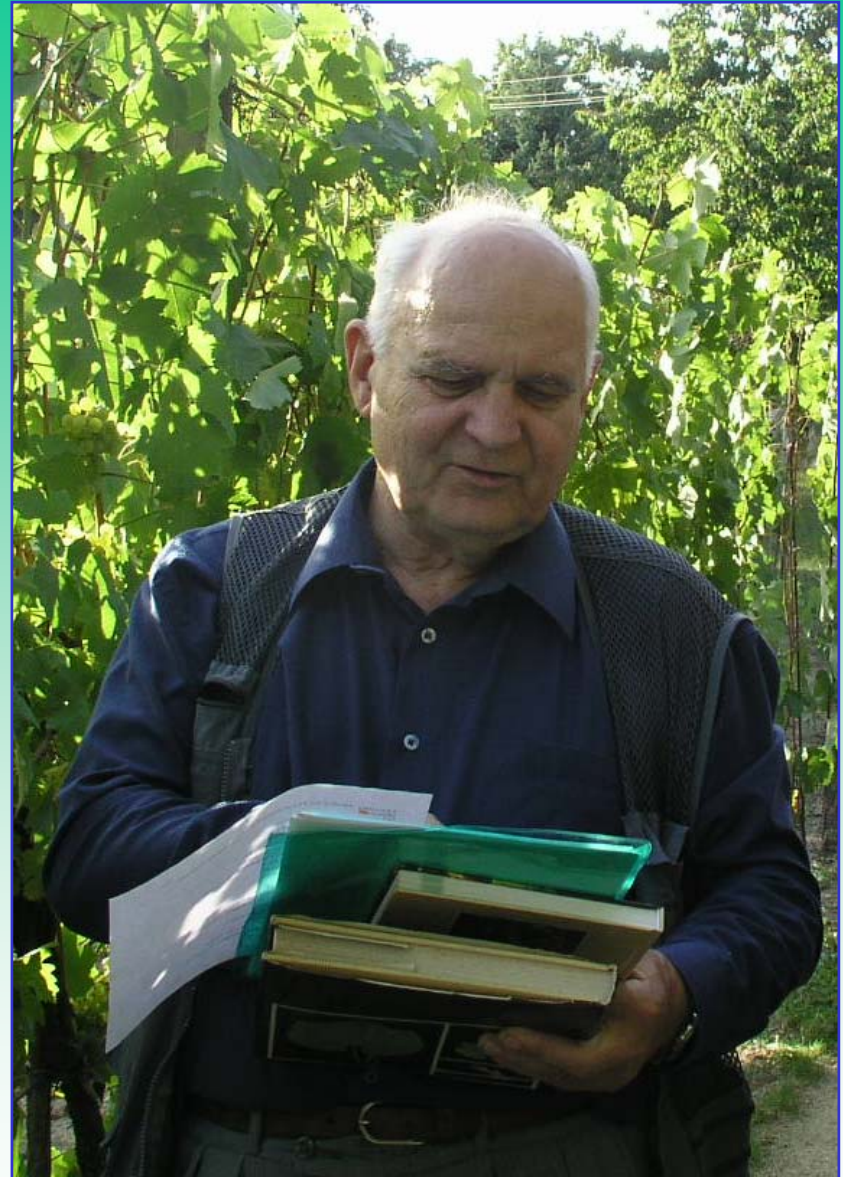


Foto: J. Dubová

# Opylení a oplození in vitro

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

1965 - polská škola: **Zenkeler**

1965 - české pokusy:

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

**různé metody aplikace pylu na explantát**





představitel indické školy  
experimentální embryologie

1964 prašnickové kultury a  
odvození haploidních rostlin  
(*Datura*)

**P. Maheshwari**

**Prof. Maciej Zenkteler**

**Katedra obecné botaniky**

**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:

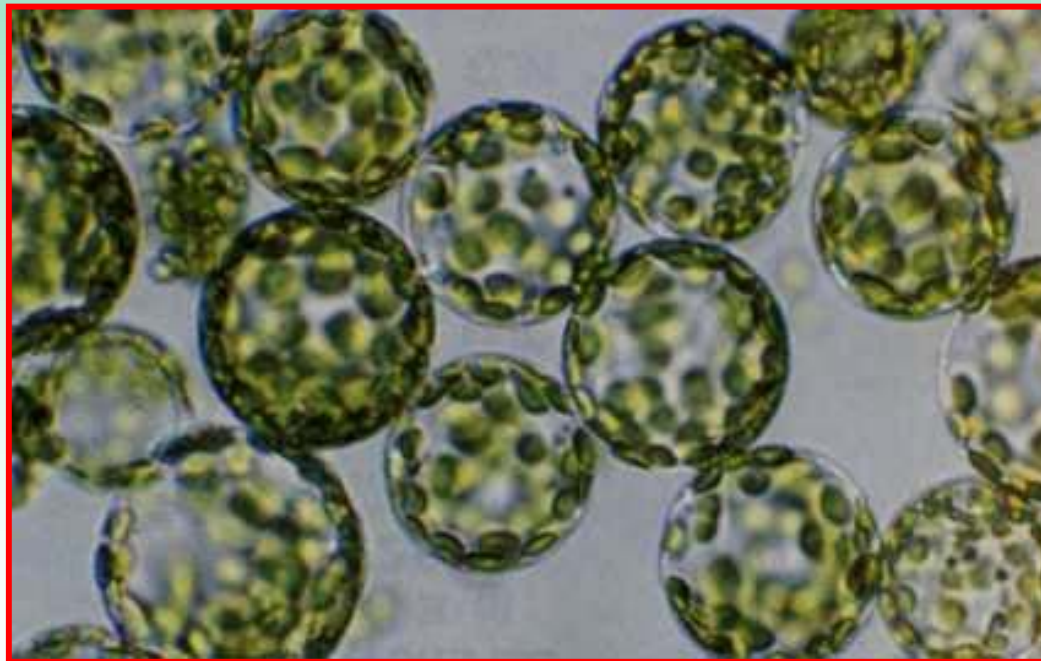
1. regenerace haploidních rostlin  
z mikrospor nebo pylových zrn:  
prašníkové nebo mikrosporové kultury
2. zdvojení haploidního genomu regenerantů  
= dihaploidizace



získání homozygotního materiálu v kratší době

# Rostlinné protoplasty

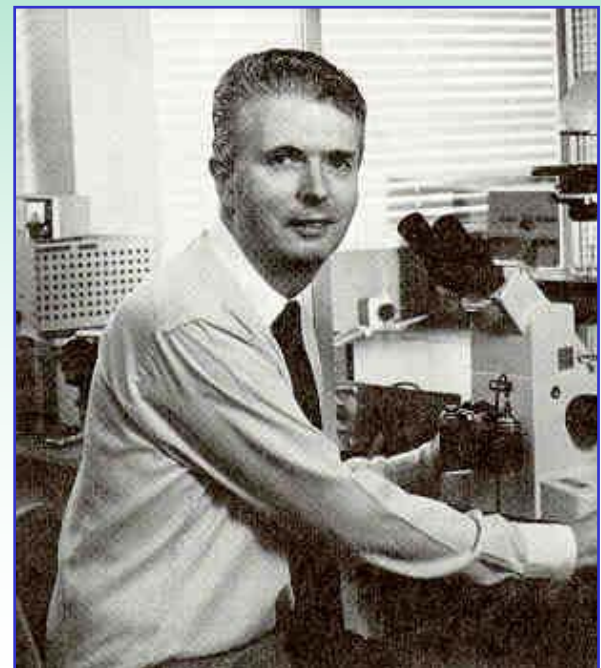
1970 - **Takebe a Nagata** - regenerace  
rostlinek tabáku z izolovaných protoplastů



# Rostlinné protoplasty

- P.S. Carlson
- Y.Y. Gleba, R. G. Butěnko →
- D. Dudits
- I. Potrykus
- E.C. 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**



**Marc van  
Montagu**

# „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](http://www.liv.ac.uk/~sd21/tisscult/case_study_3.htm)

## jednoduché postupy

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

<http://www.une.edu.au/agss/hort/horticultural-science.php>

## 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

Editor-in-Chief: Schuyler S. Korban

**Plant Cell Reports**  
Springer Berlin / Heidelberg  
Editors-in-Chief: G. Hahne; M.E. Horn

**Plant Growth Regulation**  
Springer Berlin / Heidelberg  
Editor-in-Chief: Johannes van Staden



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