

# 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

vzduch očkovacích boxů (laminární, 2. třída)

filtrace termolabilních látek - filtry:

skleněné (frity G5, S4)

membránové (Seitz, Millipore, Sartorius)

0,22mm

- UV záření (kultivační místnosti, boxy)

- teplota

suché nebo vlhké teplo

# Očkovací boxy

laminární proudění vzduchu do pracovního prostoru přes filtry:

předfiltry

HEPA-filtry („High Efficiency Particulate Air“)

- horizontální proudění

**FATRAN** (Slovensko)

**GELAIRE** (Itálie)

- vertikální proudění

**UNIFLOW** (z Kolína/n. R.)

**HOLTEN** (Německo) **AURA** (Itálie) **A2**

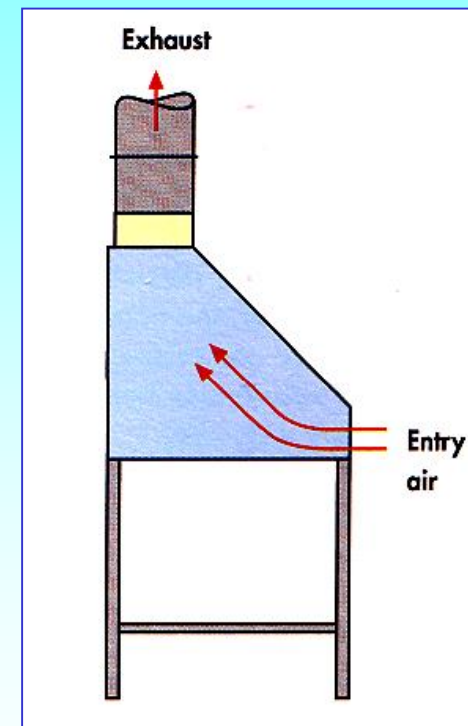
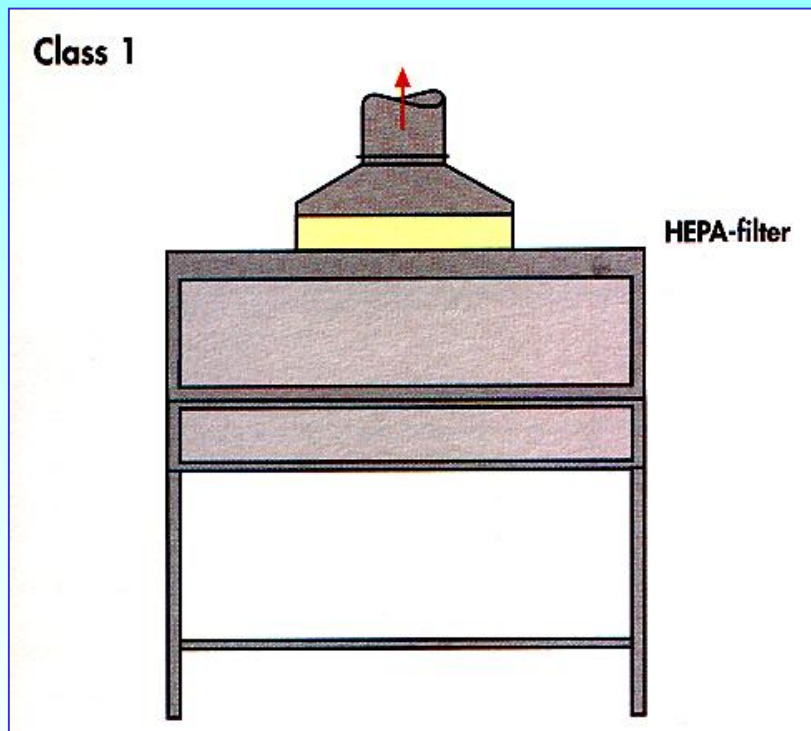
## Vitro Centre International, Nizozemí



horizontální proudění filtrovaného vzduchu (*Fatran, Gelaire*)  
chrání materiál, ale ne pracovníka a prostředí

# Očkovací box 1. bezpečnostní třída (lepší digestoř)

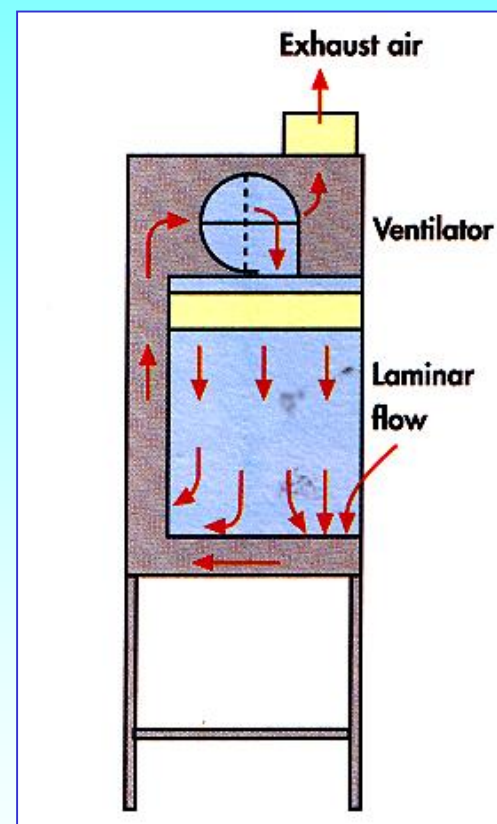
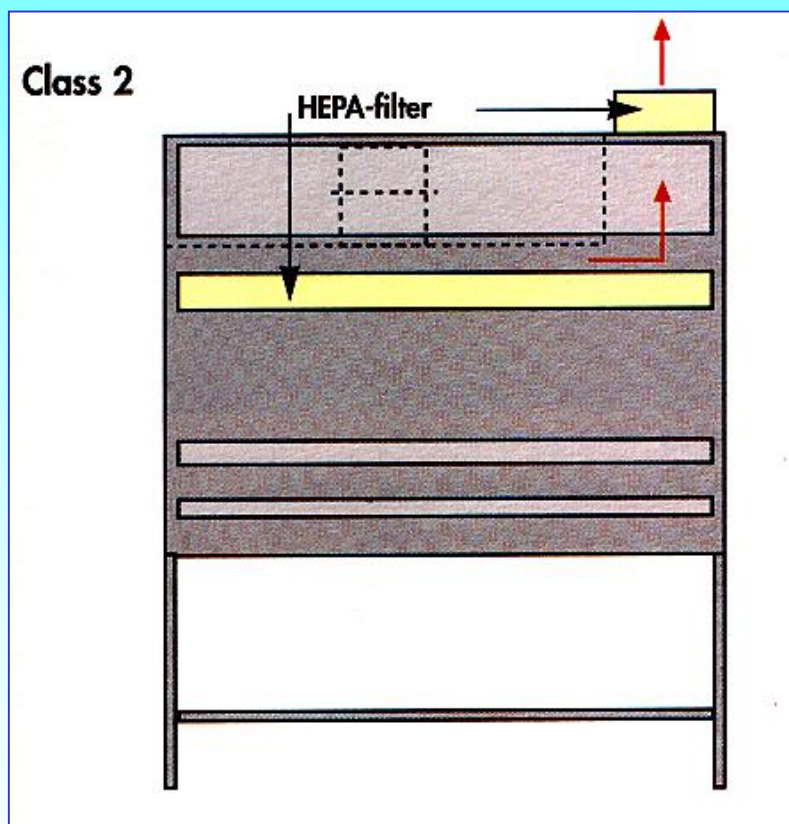
HEPA-filtr = „High Efficiency Particulate Air“



box nezajišťuje podmínky pro sterilní práci  
chrání jen životní prostředí

# Očkovací box

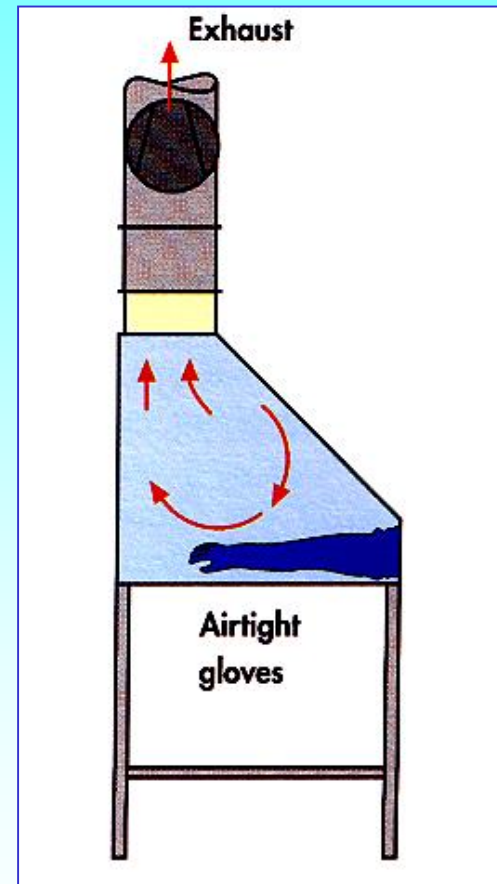
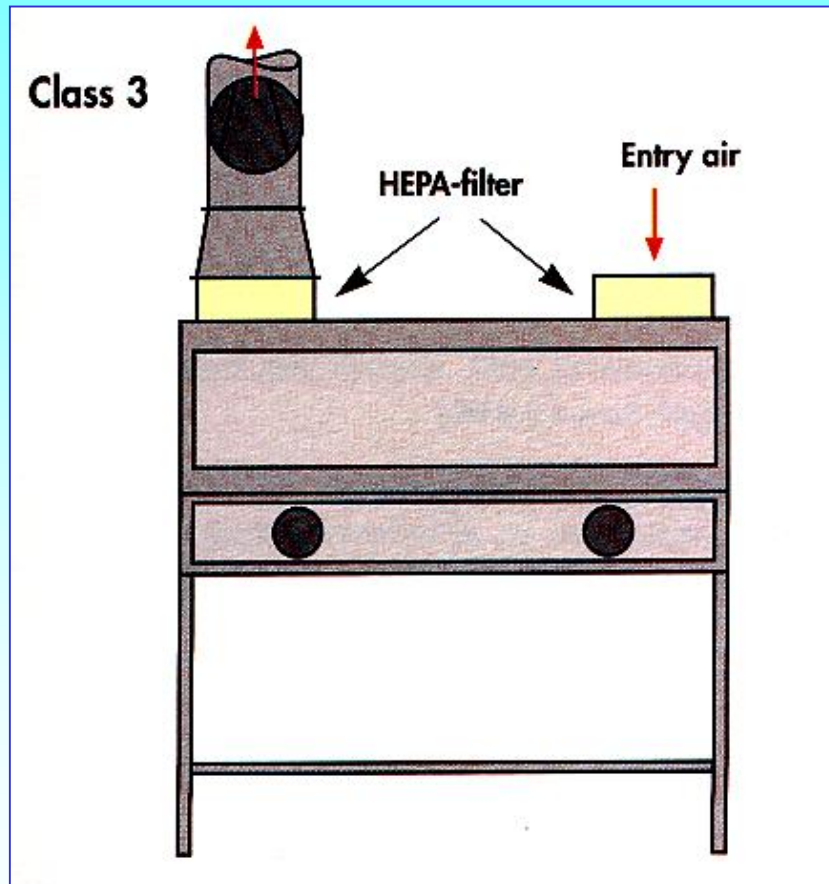
## 2. bezpečnostní třída



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

# Očkovací box

## 3. bezpečnostní třída



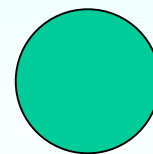
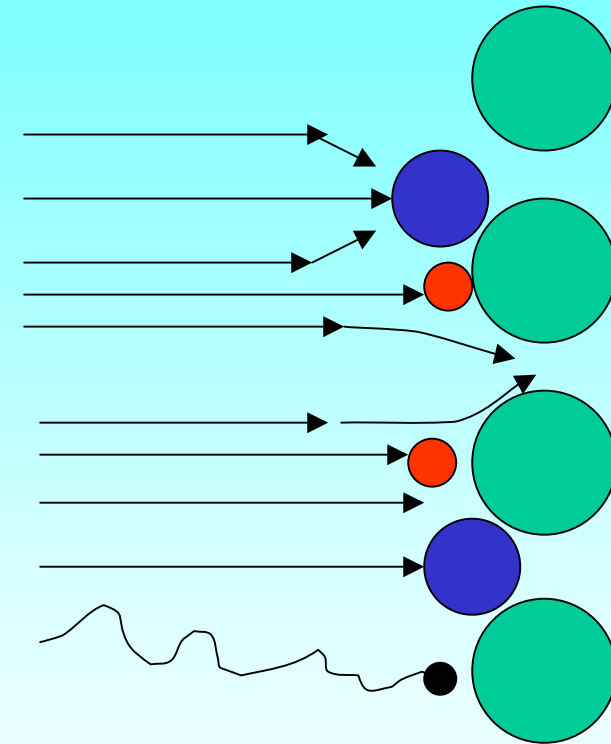
užití pro práci s vysoce infekčními, toxickými nebo radioaktivními materiály apod.



# Velikost filtrem zadržených 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** voda, živná média, roztoky, filtrační papír

**normální tlak**

- zavařovací hrnec
- Kochův sterilizační přístroj vodou chlazený plášť

**zvýšený tlak** - tlakový hrnec  
- autokláv

100kPa, 121°C

## Sterilizace při zvýšeném tlaku vztah mezi teplotou a tlakem

<b>°C</b>	<b>115</b>	<b>120</b>	<b>134</b>	<b>143</b>
<b>kPa</b>	<b>70</b>	<b>100</b>	<b>200</b>	<b>300</b>

(autokláv Chirana, 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)

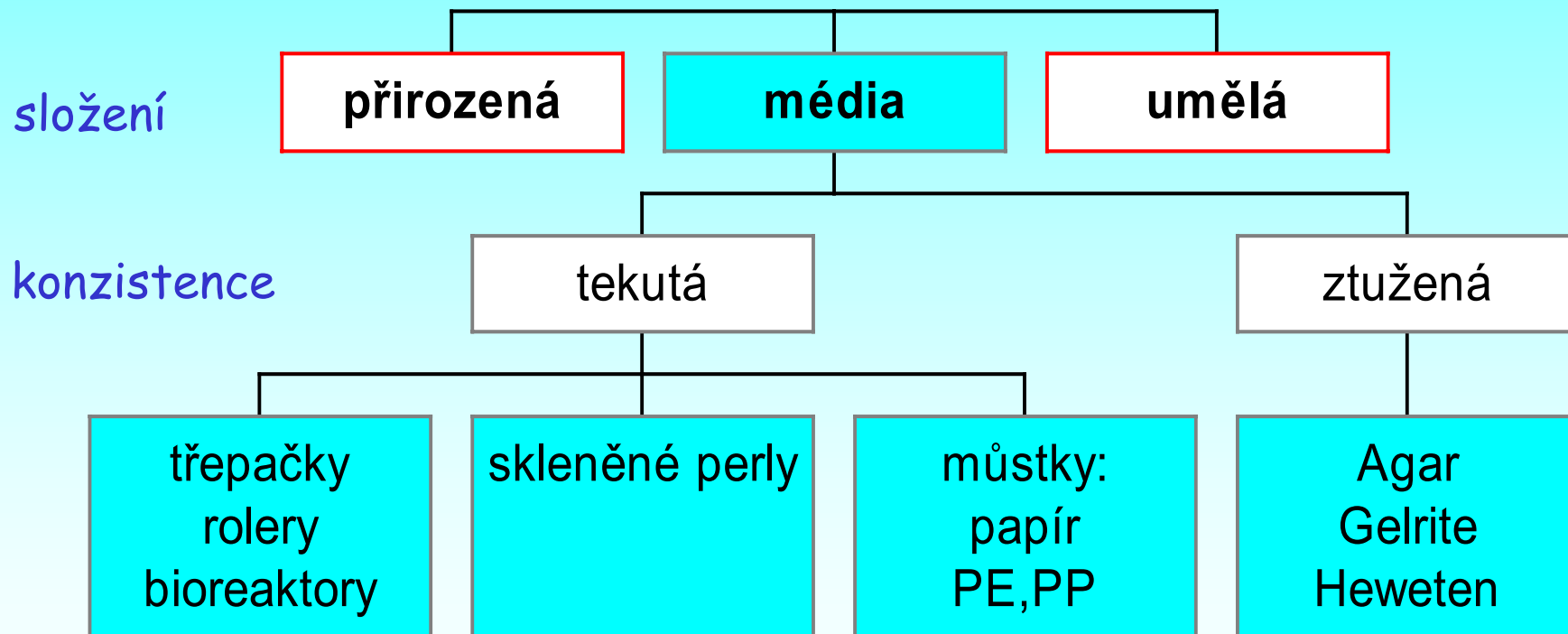
b) element. halogeny (chlorové vápno, chlornany  
Chloramin B, SAVO, Ajatin, Decidin)

**Koagulace bílkovin ionty kovů** - Hg, Sn, Ag

Sublimát  $HgCl_2$ , Famosept SPOFA

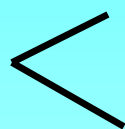
**Detergencia** - snížení povrch. napětí, smáčení  
hydrofóbních povrchů a poškození membrán  
(70% EtOH, Citowet, Tween, Triton-X100,  
Jar)

# Živná média



způsoby kultivace

# Fyzikální podmínky kultivace

**osvětlení**  intenzita, vlnová délka, fotoperioda  
tma

**teplota**  konstantní  klimatizace  
kolísavá (den x noc)

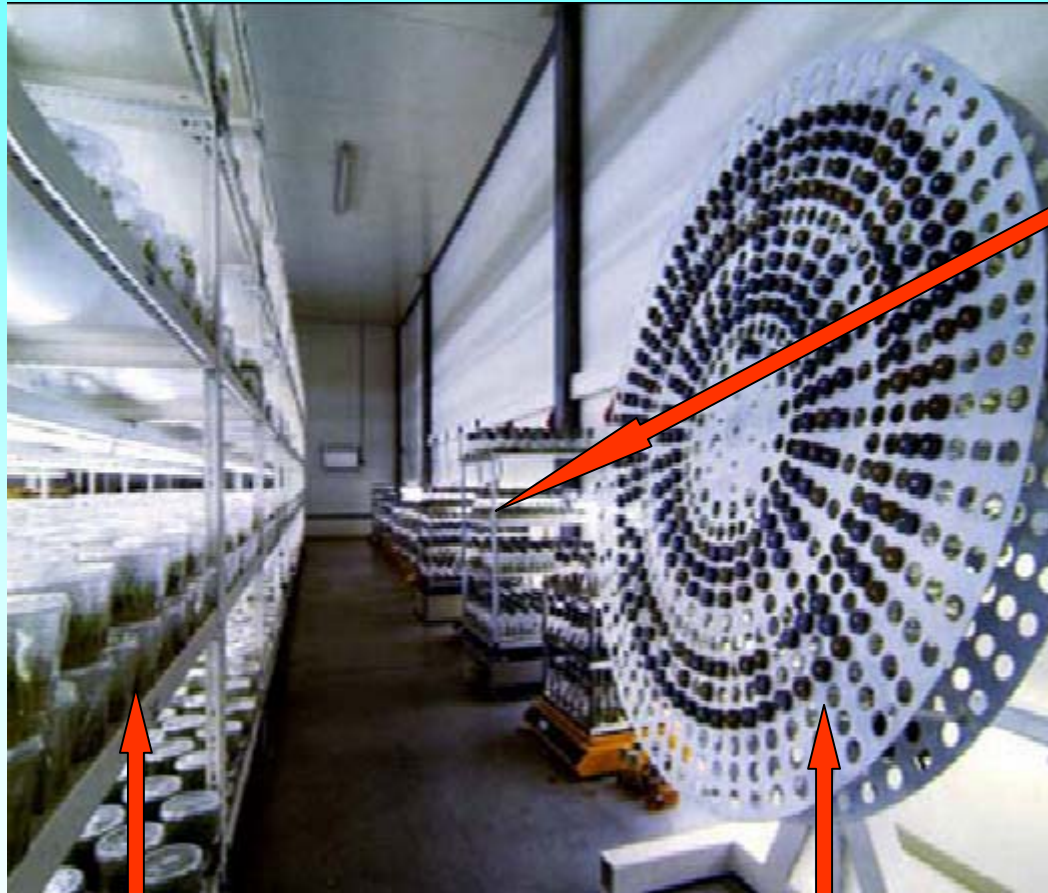
**koncentrace plynů:**  $\text{CO}_2$ , etylén

**vlhkost vzduchu**

 těsnost uzavírání  
kultivačních nádob



# Různé možnosti kultivace *in vitro*



kultivační regály pro kultury  
na agarem ztuženém médiu

rotační kultivační systém  
pro kultivace v tekutém médiu

horizontální  
třepačky  
pro kultivace v  
tekutém médiu

Hark Orchideen GmbH  
Lipstadt, Německo  
Katalog Duchefa

# Komerční kultivační místnost

InVitro, Nizozemí  
z katalogu Duchefa



# Kultivační nádoby s ventilací

víčka na plastové krabičky  
se speciální membránou  
propustnou pro plyny

kultivační sáčky se  
speciální membránou  
propustnou pro plyny  
(Sun bag, Sigma)  
původně pro kultivaci hub

na jedno použití  
sterilizace  $\gamma$  zářením



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

## Polypropylenová membrána (můstek)

Magenta box

tekuté médium



podle katalogu Sigma

# Bioreaktory laboratorní



objem  
3 litry



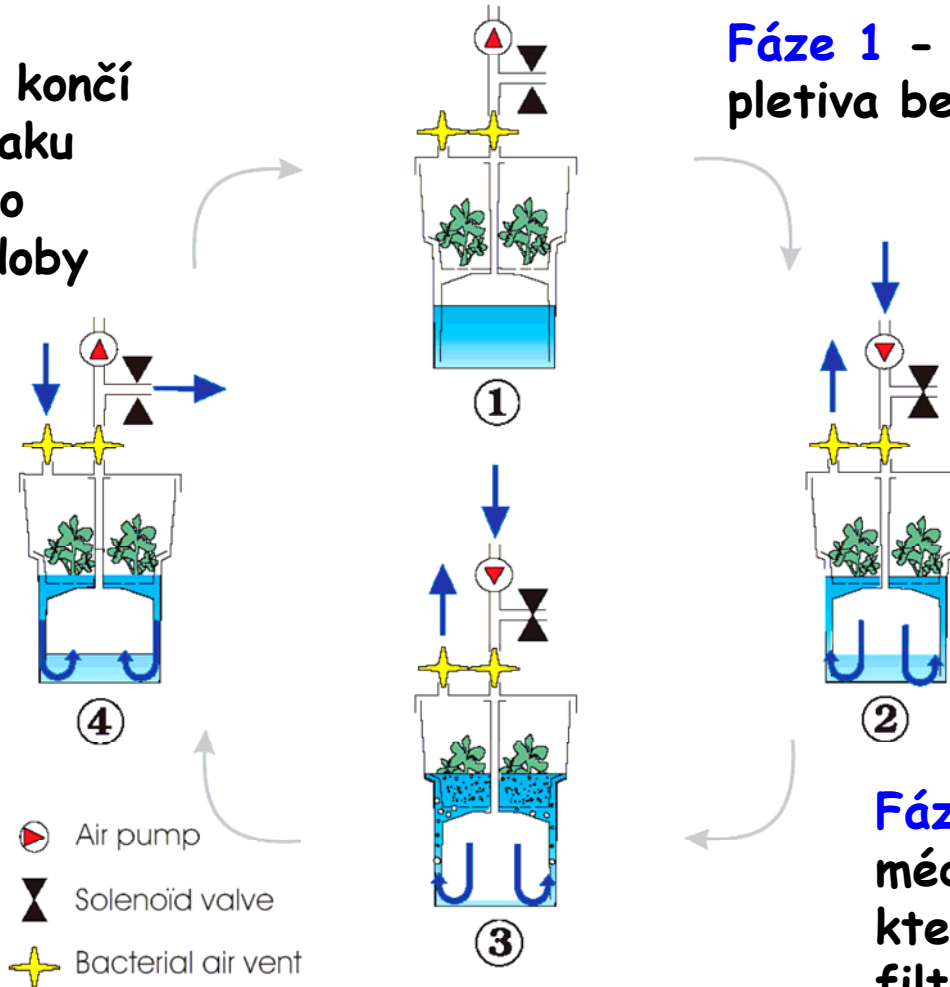
objem  
15 litrů



objem  
80 litrů

# 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 vstupuje přes  
filtr, vytlačuje tekuté  
médiem k explantátům

**Fáze 3** - výměna vzduchu  
uvnitř reaktoru

# Bioreaktory produkční



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**

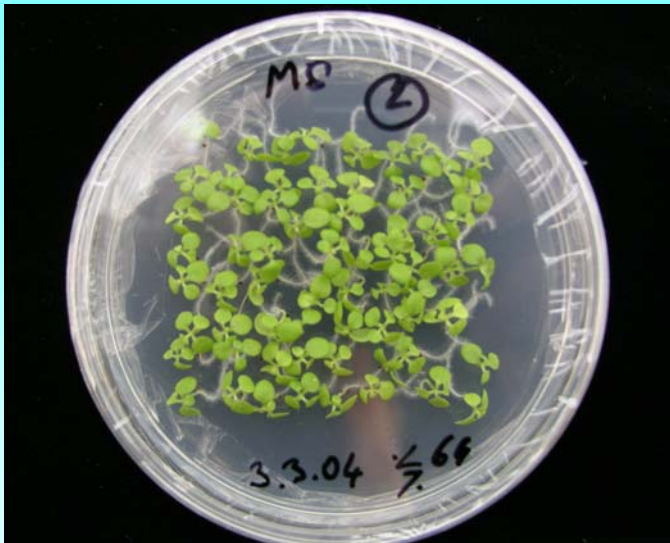
3x oplach sterilní destil. vodou      **vždy 3 - 5 minut**

Výsev na Petriho misky

**buničitá vata, skleněné perly + voda, médium**



# *Nicotiana tabacum* L. - výsev semen



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

# Živná média

# Složení živných médií

## kultury jsou většinou heterotrofní

- **anorganické sloučeniny (minerální výživa)**
  - makroelementy: **N, P, K, Ca, Mg, S**
  - mikroelementy: **Fe, B, Cu, Mn, Ni, Co, I,**
- **organické sloučeniny (organická výživa)**
  - zdroje organického uhlíku: mono- a disacharidy (sacharóza)
  - zdroje organického dusíku: aminokyseliny, polyaminy
  - vitamíny
  - inositol (cyklický šestisytný alkohol)
- **růstové regulátory** (hlavně auxiny a cytokininy, dříve přírodní látky)
- **ztužování médií** (agar, Gelrite®)
- **regulace pH** (MES, PIPES)

# Makroelementy

N, P, K, Ca, Mg, S

- důležité jak kationty, tak anionty
- živná média obsahují řádově mM koncentrace

Gamborg *et* Phillips (1995):

anorganický dusík a draslík alespoň 30mM

$\text{NO}_3^-$        $\text{K}^+$

amonné soli  $\text{NH}_4^+$       2-20 mM

sulfáty, fosfáty, vápník a hořčík      1-3 mM

$\text{SO}_4^{2-}$        $\text{PO}_4^{3-}$        $\text{Ca}^{2+}$        $\text{Mg}^{2+}$

# Dusík

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

- nitráty
- amonné ionty



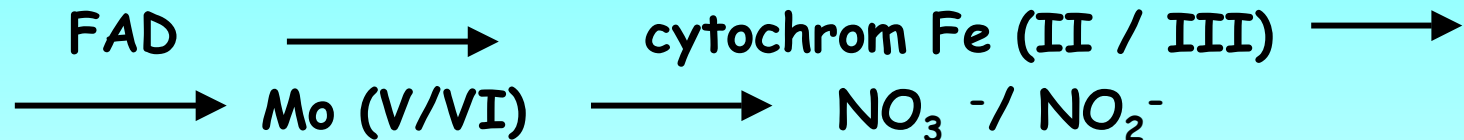
## Dusičnany (nitráty)

- 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** (ve dvou krocích) - 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 dusíku

## 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 feredoxin

## 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 (**Pi**), 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 **Pi**

# Draslík

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

# Vápník

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

# Hořčík

- velmi mobilní, schopný tvořit komplexy
- je nezbytný pro
  - pro četné enzymatické reakce
  - fotosyntéza, regulace pH a rovnováhu iontů
  - syntéza proteinů (tvoří můstek mezi podjednotkami ribozómů - při jeho nedostatku 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

Fe ve formě chelátu s EDTA nebo EDDHA

# 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: zdroj organického uhlíku
  - sacharosa
  - glukosa
  - fruktosa
- nemetabolizovatelné cukry: změny osmotické hodnoty média
  - manitol
  - sorbitol

# Organické sloučeniny dusíku 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**:

1. podpora tvorby adventivních kořenů
2. podpora tvorby prýtlů
3. podpora somatické embryogeneze

# Růstové regulátory

## růst stimuluující

- auxiny (NAA, IBA, 2,4-D, Picloram)
- cytokininy (kinetin, BAP, 2-iP, TDZ)
- gibereliny (GA3)

## růst ihibující

- kyselina abscisová (ABA)

# 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 anionický polysacharid produkovaný mikrobiální fermentací (glukosa, glukuron. 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](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.

- 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

Media

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

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 sulphate	180.7
• Potassium phosphate monobasic	170.0
• Calcium chloride anhydrous	332.2
• Na <sub>2</sub> -EDTA	37.26
• Ferrous sulphate · 7H <sub>2</sub> O	27.8
• Cobalt chloride · 6H <sub>2</sub> O	0.025
• Cupric sulphate · 5H <sub>2</sub> O	0.025
• Boric acid	6.2
• Manganese sulphate · H <sub>2</sub> O	16.9
• Molybdic acid (sodium salt) · 2H <sub>2</sub> O	0.25
• Potassium iodide	0.83
• Zinc sulphate · 7H <sub>2</sub> O	8.6

# Vitamíny podle Gamborga (B5)

## 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 l)

1. 6,5 g **agaru** vsypeme do 300 ml destilované vody v SIMAX láhvi a rozvaříme v autoklávu.
2. Do Erlenmeyerovy baňky odměříme 500 ml **destilované vody**.
3. Přidáme koncentráty **makroelementů** (100 ml), **mikroelementů** (10ml) a chelát železa (5 ml).
4. Přidáme **vitamíny** (1 ml zamražené směsi).
5. Navážíme 100 mg **inositolu**.
6. Navážíme 20 g **sacharózy**.

## Příprava živného média (1 I)

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

## Příprava živného média (1 I)

11. Kultivační nádoby s médiem **uzavřeme** vhodným uzávěrem
12. Následující den **sterilizujeme** při 121°C v autoklávu po dobu 20 minut
13. 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 sterilizaci