

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

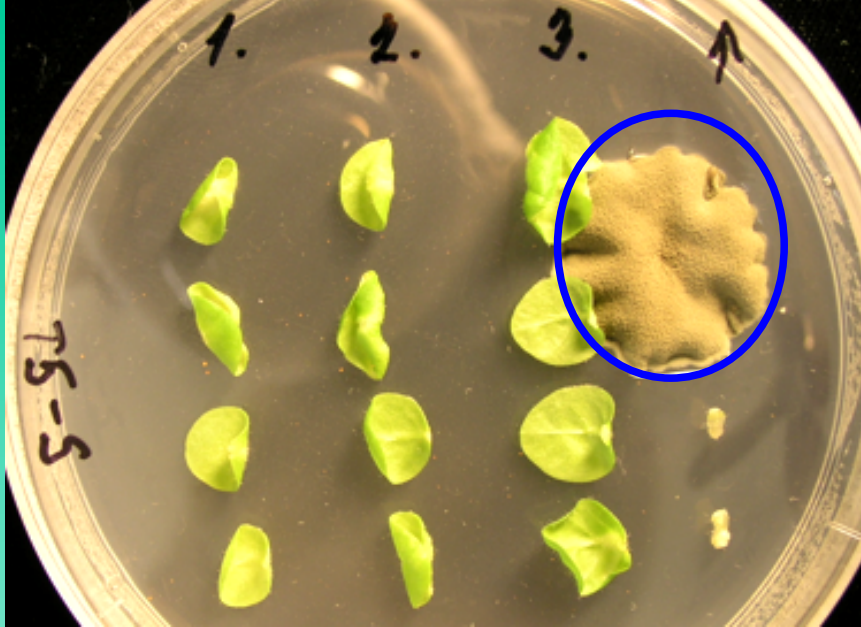
tkáňová kultura = historický pojem, přeneseno z oblasti fyziologie živočichů



z katalogu
firmy
Duchefa

houbová infekce v kultuře

Příklady infikovaných kultur



kultura infikovaná kvasinkami
a bakteriemi

kultury infikované houbami



Úrovně organizace explantátu

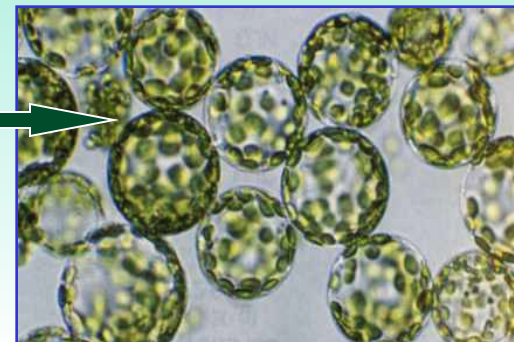
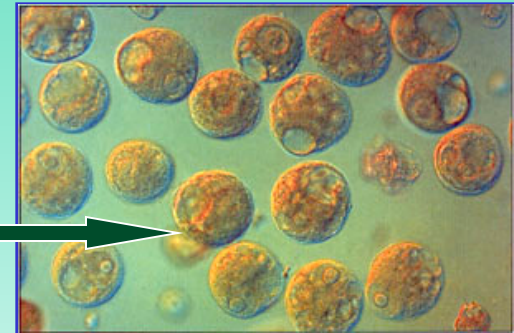
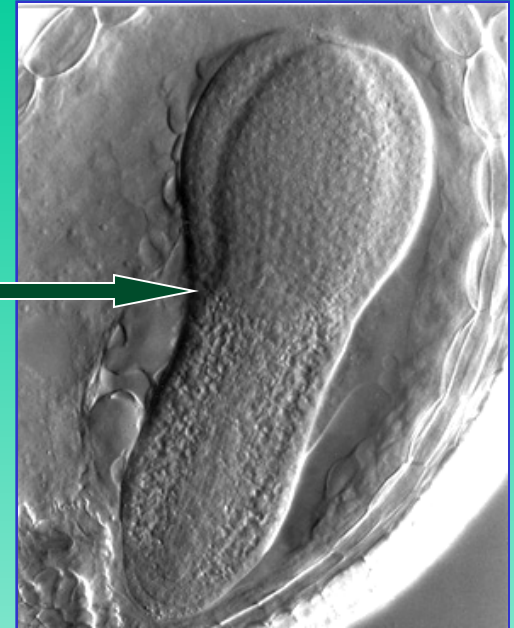
rostlina (klíčící rostlina, embryo)

orgán (kořen, list, řapík, pupen)

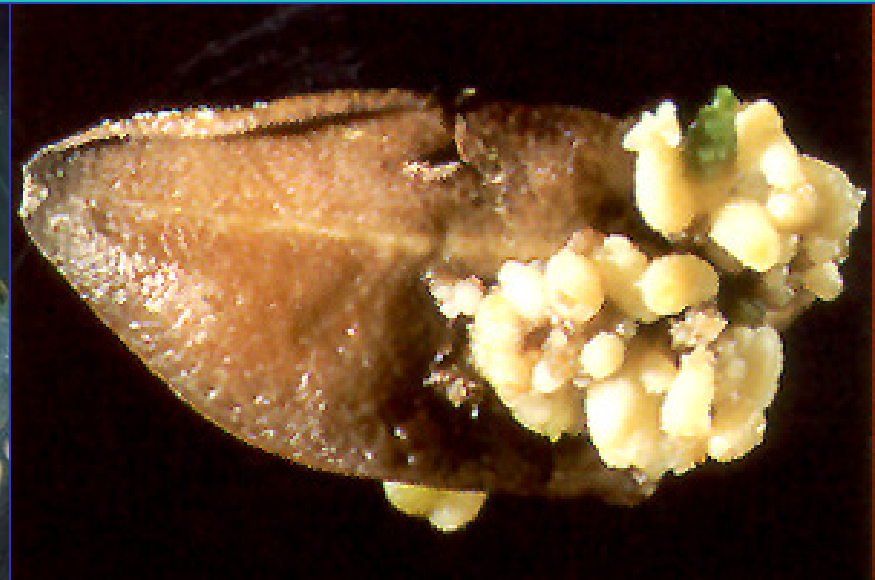
pletivo (dřeňový parenchym, endosperm, kambium - „tkáňové kultury“)

buňka (mikrospory, pyl. zrna, buněčné suspenze)

izolovaný **protoplast**



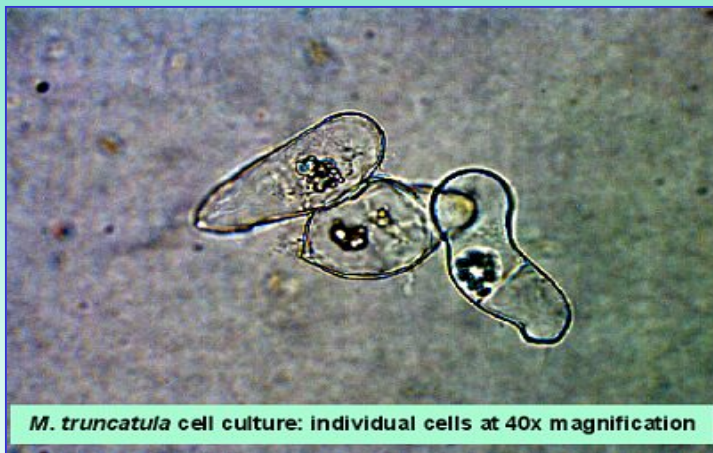
Příklady různých typů kultur



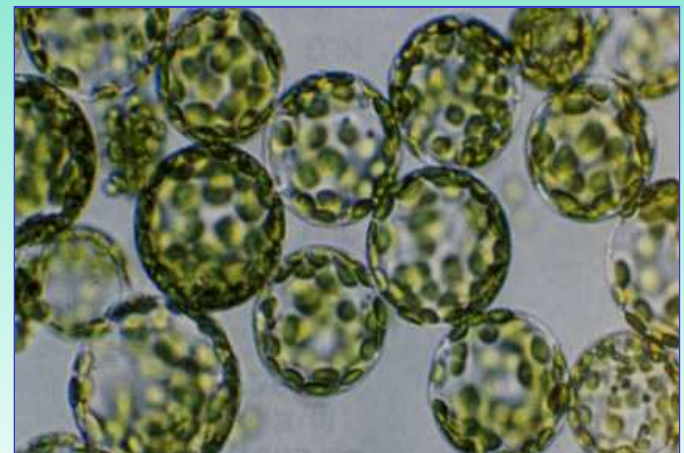
kalusová kultura

mikropropagace jabloně

prašnicková 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



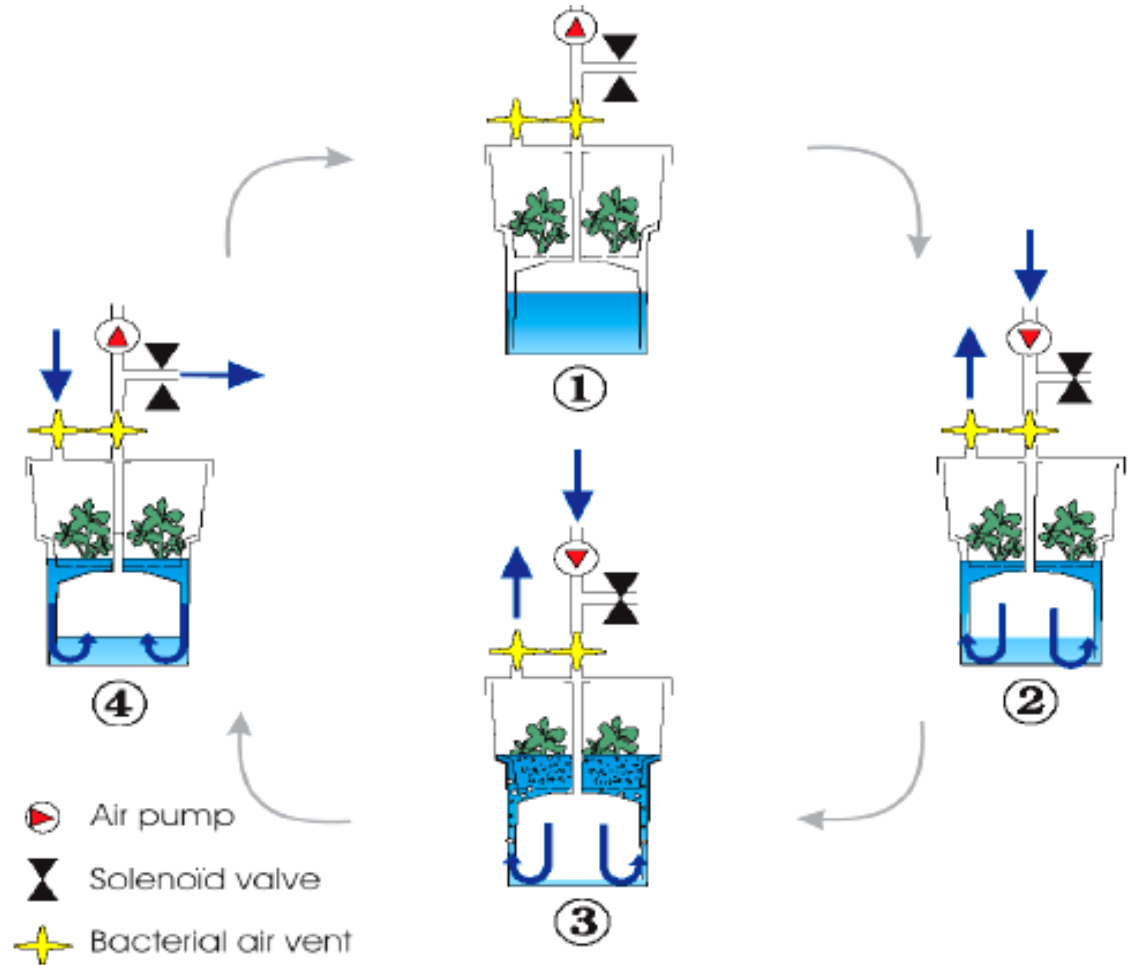
laboratorní třepačka



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.

Georg Albrecht Klebs



1857 - 1918

- německý rostlinný fyziolog
- asistent u Antona de Bary ve Strassburgu
- po vojně asistent u Julia Sachse ve Würzburgu a Wilhelma Pfefferera v Tübingenu
- profesor v Bazileji, v Halle a v Heidelbergu (založil botanickou zahradu)
- 1887 - pěstoval **buňky vláknitých řas** izolované po plazmolytické maceraci

Historický přehled - počátky

Gottlieb Haberlandt

*** 1854 Altenburg**

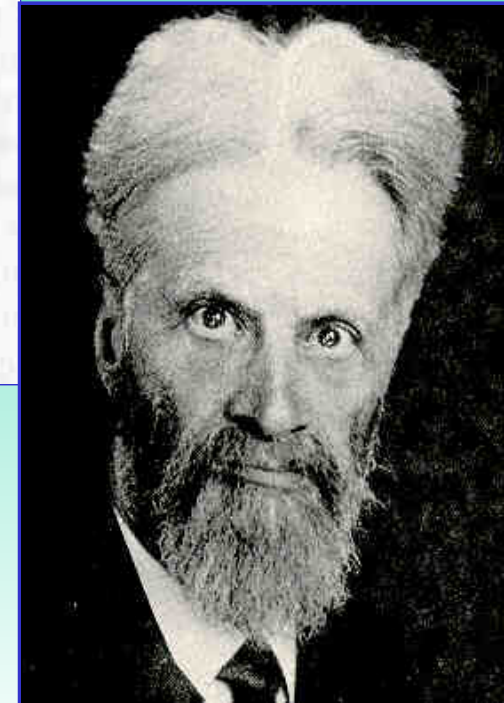
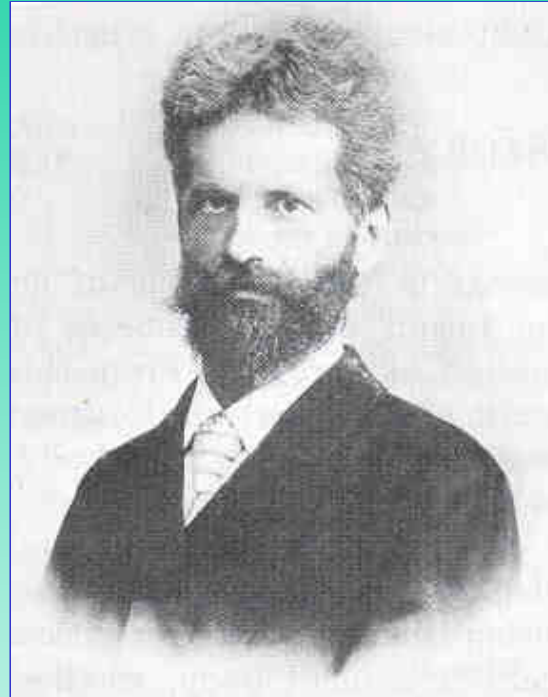
považovaný za otce kultur
rostlinných explantátů

Kultivoval explantáty:

parenchym listů

dřeň stonku

svěrací buňky průduchů



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



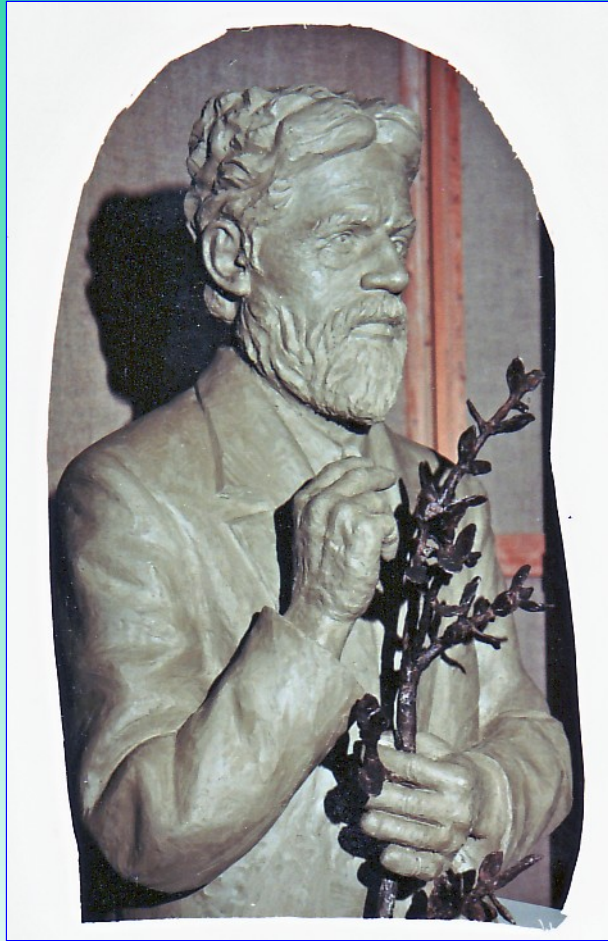
krátkodobé přežívání kultur

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

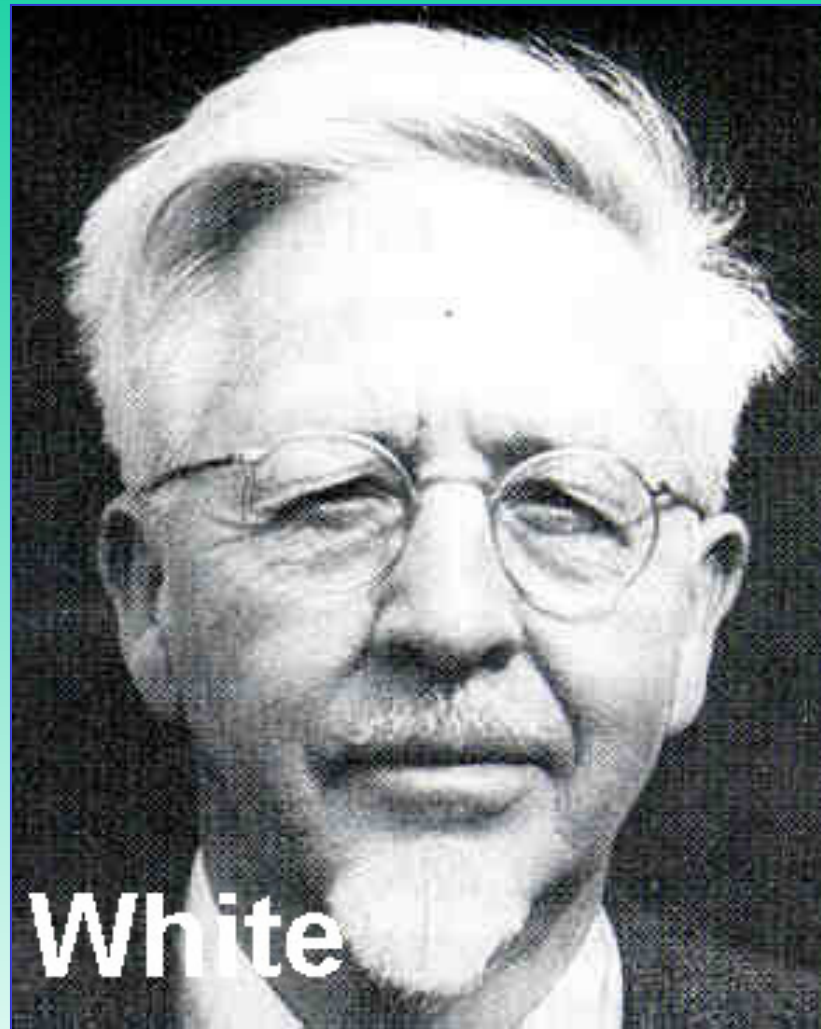


totipotence diferencovaných
rostlinných buněk předpovězena
v roce 1902 **Gottliebem**
Haberlandtem (1854 - 1945)

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“

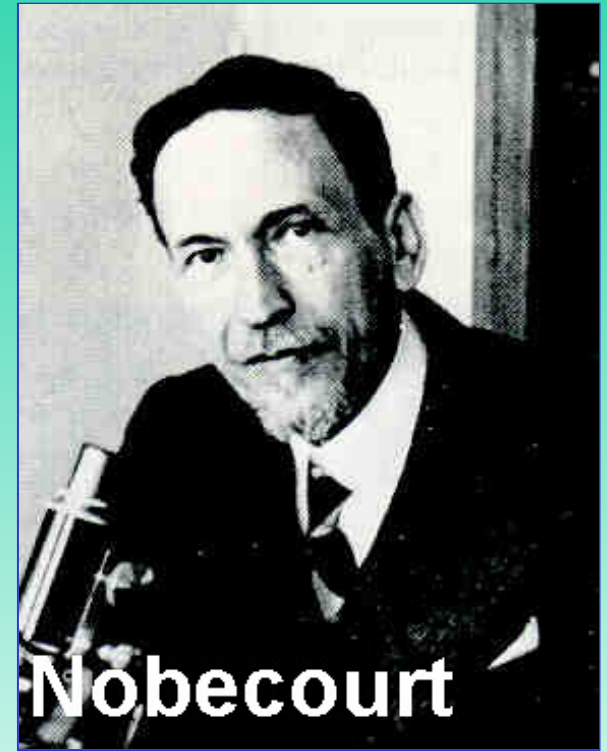
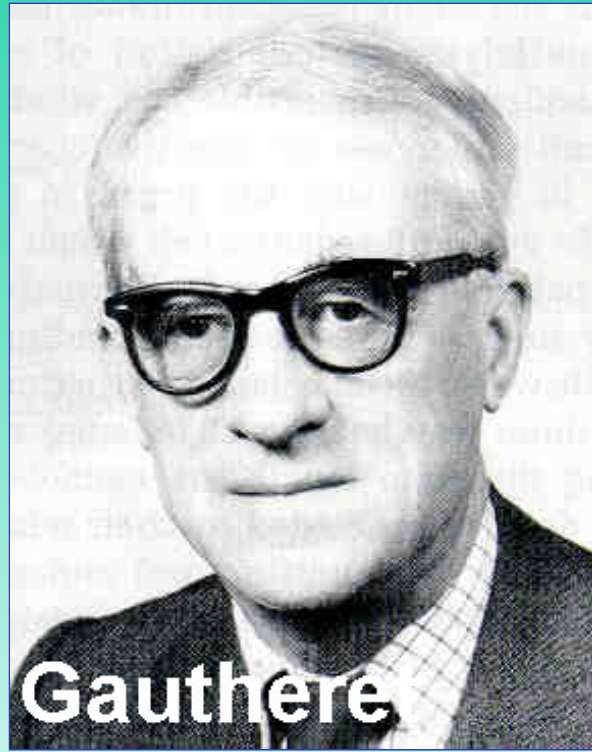
1935 **P.R.White** - izolované kořeny rajčat

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



produkce fytohormonů

Kalusové kultury



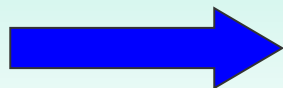
1939 **Gautheret** - kalus mrkve,
Nobecourt - kalus tabáku, **White** - nádory tabáku

Meristémové kultury

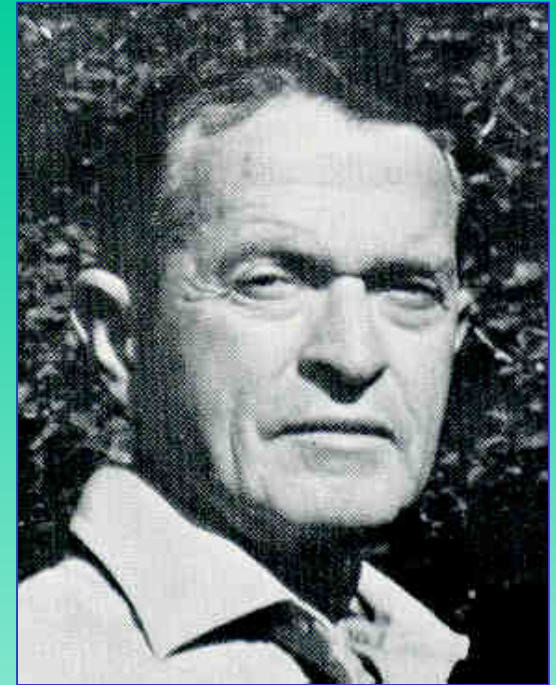
1944 - **Ernest Ball** - regenerace rostliny z izolovaného meristému (*Lupinus*)

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 Schwannaa 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

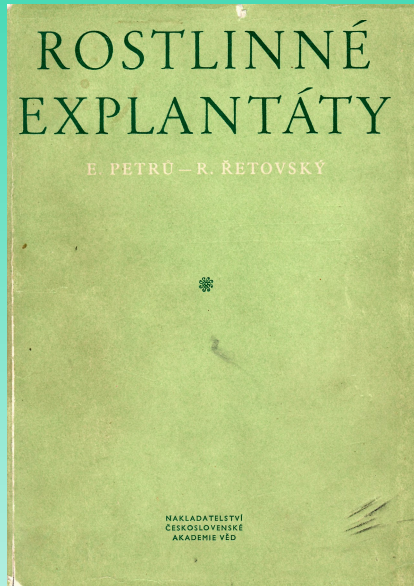
Boris Vyskot - BFÚ AV ČR Brno

František J. Novák - AV ČR Olomouc, AA
Seibersdorf

Jiří Vagera - AV ČR Olomouc

Zdeněk Sladký - MU Brno

České začátky používání metodik rostlinných explantátů

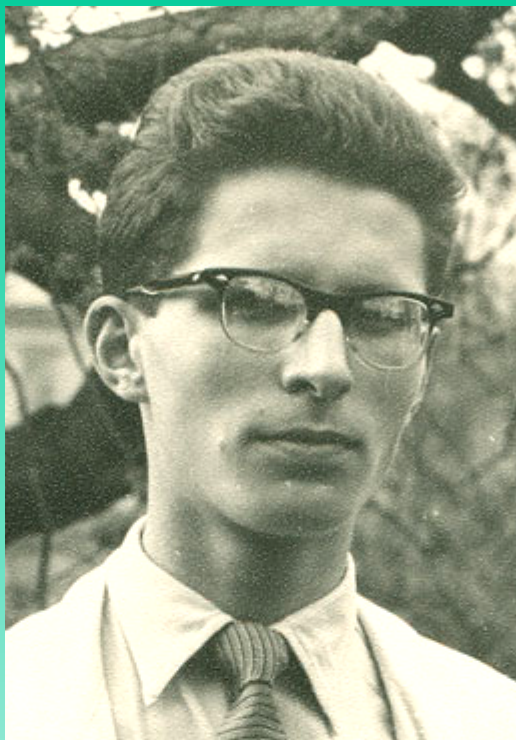


ČSAV 1956



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



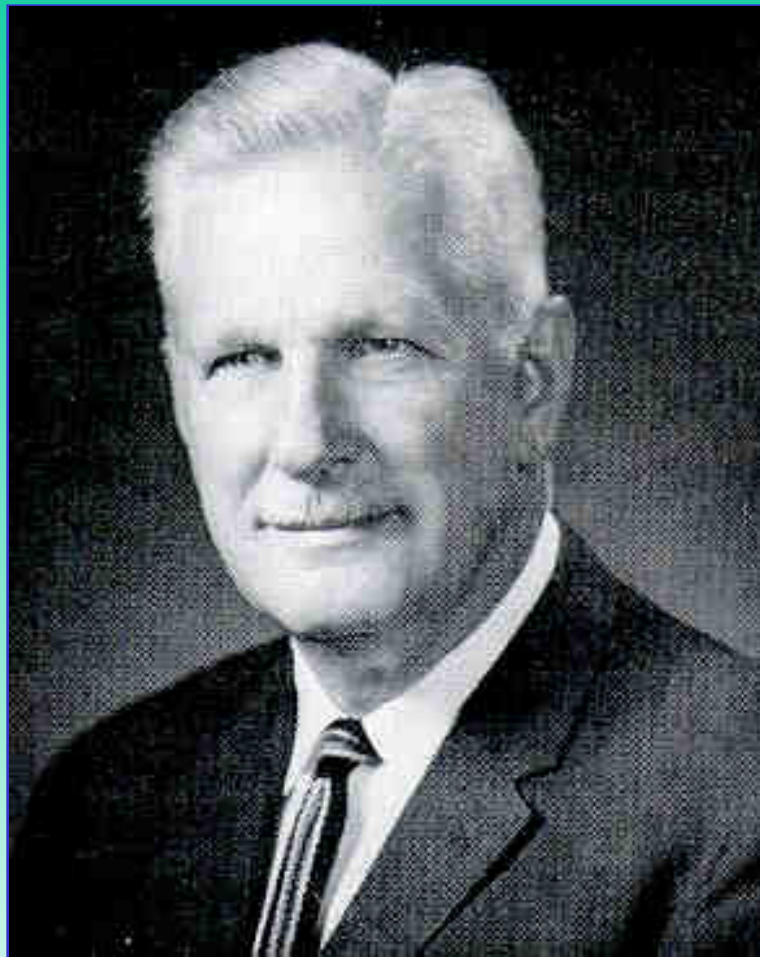
Plant Tissue and Cell Culture - Application to Crop
Improvement • International Symposium • Olomouc
24-29 September 1984

T. Murashige

Z. Sladký

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

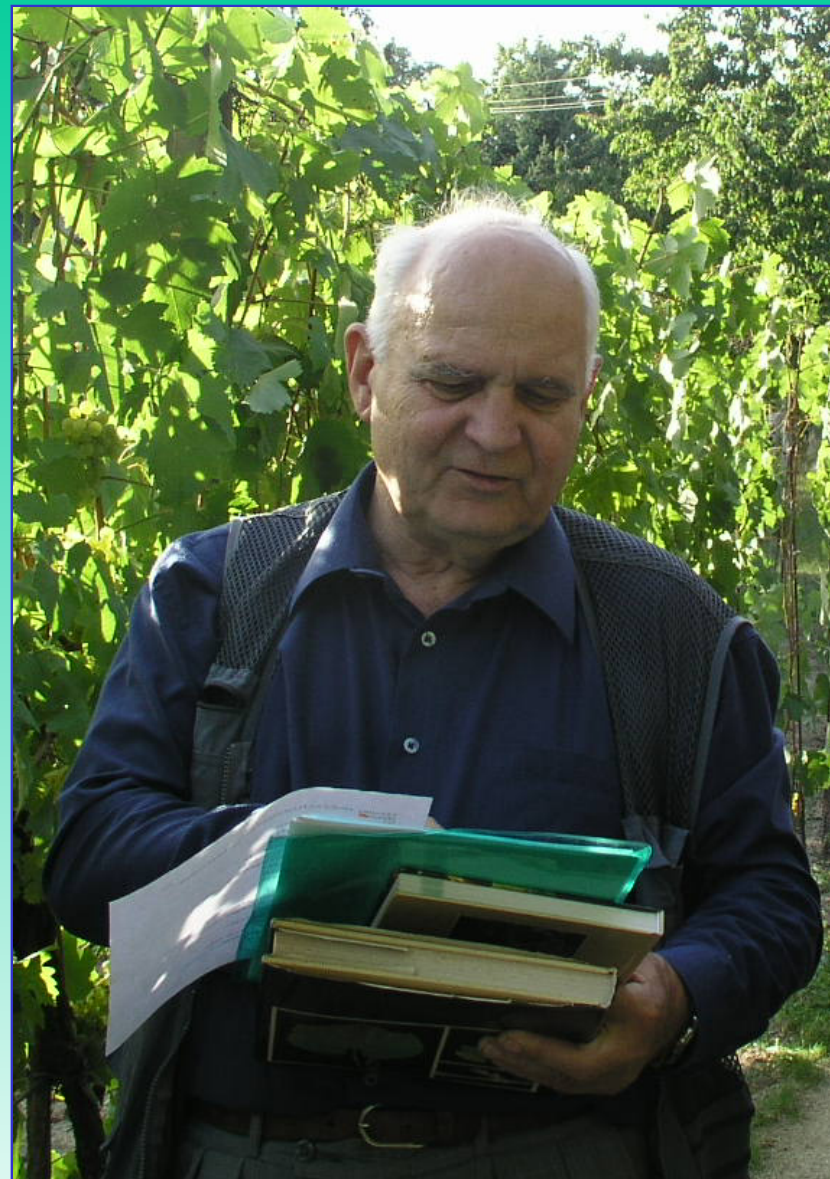


Foto: J. Dubová

Opylení a oplození in vitro

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

1965 - polská škola: **Zenkteler**

1965 - české pokusy:

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

různé metody aplikace pylu na explantát



představitel indické školy
experimentální embryologie

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

P. Maheshwari

Prof. Maciej Zenkteler

Katedra obecné botaniky

**Univerzita A. Mickiewicza
Poznaň, 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:

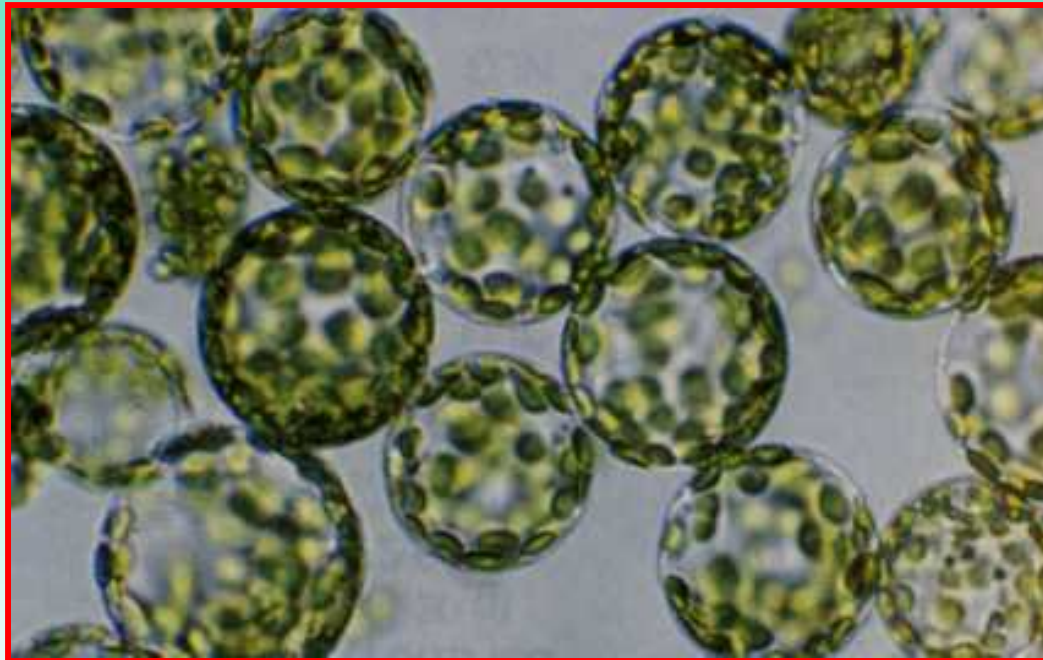
1. regenerace haploidních rostlin
z mikrospor nebo pylových zrn:
prašníkové nebo mikrosporové kultury
2. zdvojení haploidního genomu regenerantů
= dihaploidizace



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



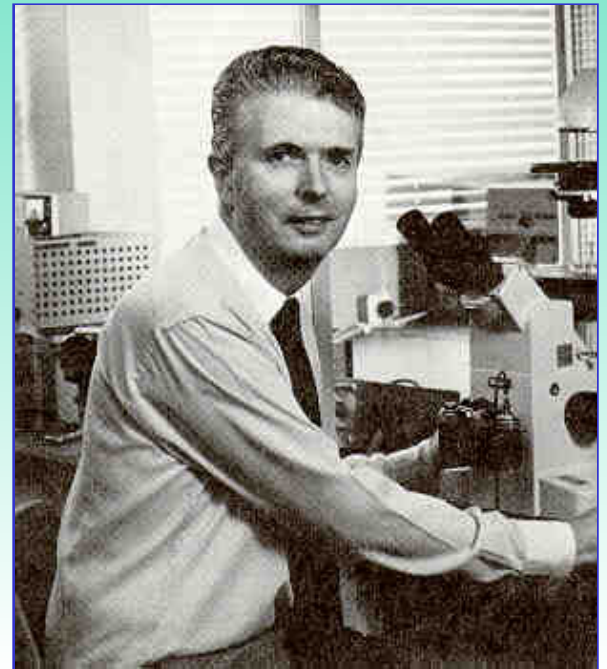
D. Dudits

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

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



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