

Bi6120 Rostlinné explantáty 2.

Základní podmínky kultivace *in vitro*

Požadavky na vybavení laboratoře



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

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 přes filtry:

- horizontální:

FATRAN (JZD Pokrok Žilina)

GELAIRE (AVČR Poříčí)

- vertikální:

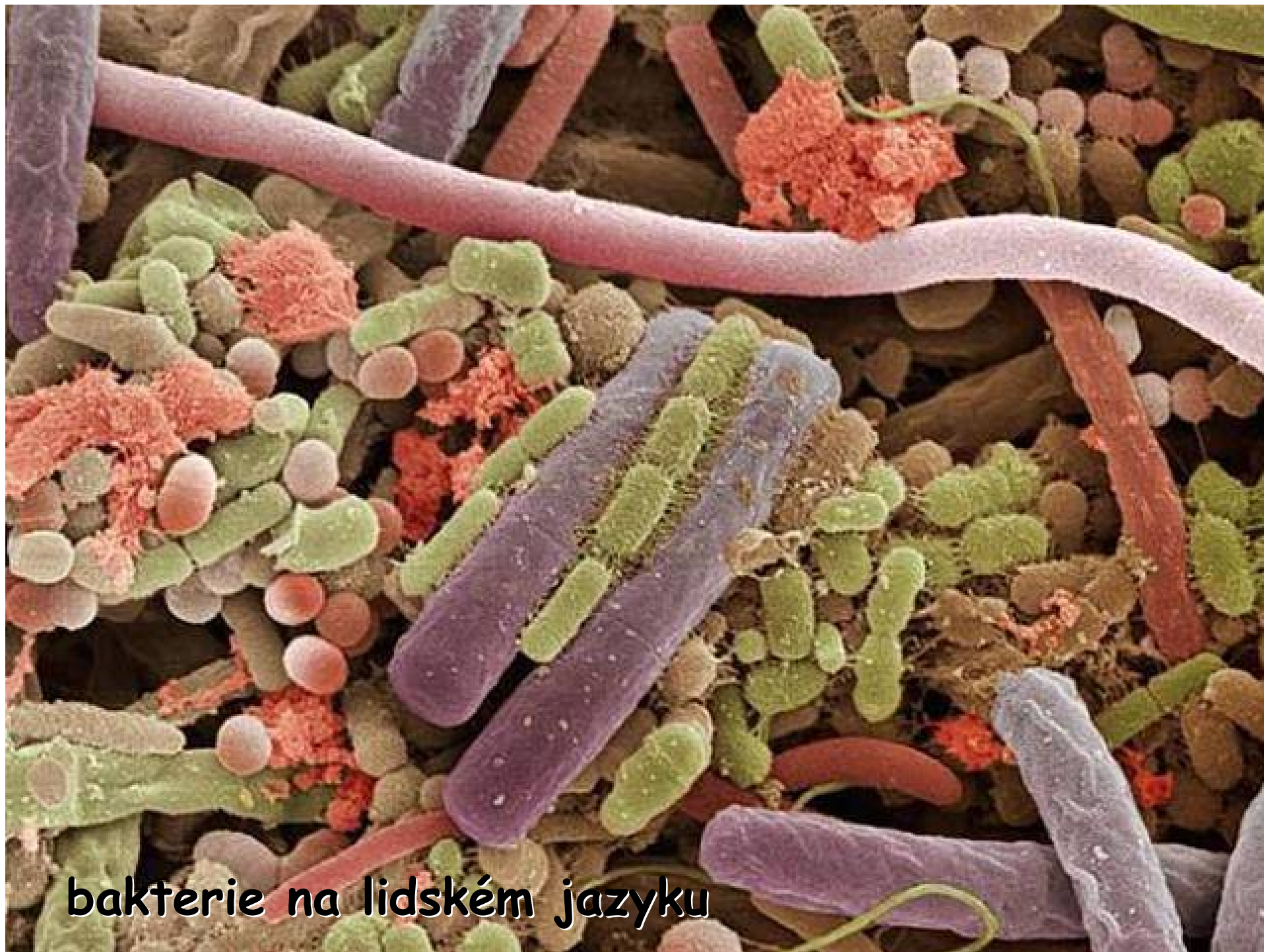
UNIFLOW (z Kolína/n. R.)

AURA (v A2)

Vitro Centre International, Nizozemí



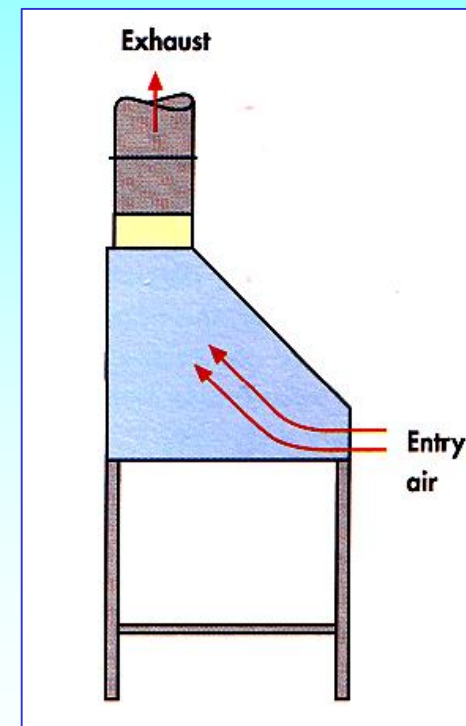
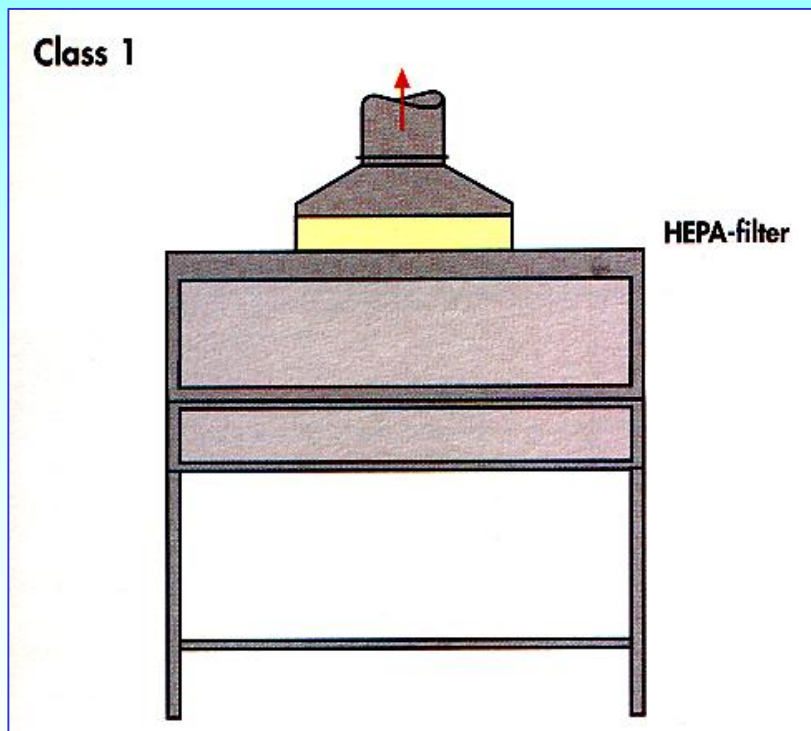
horizontální proudění filtrovaného vzduchu



bakterie na lidském jazyku

Očkovací box 1. bezpečnostní třída (digestoř)

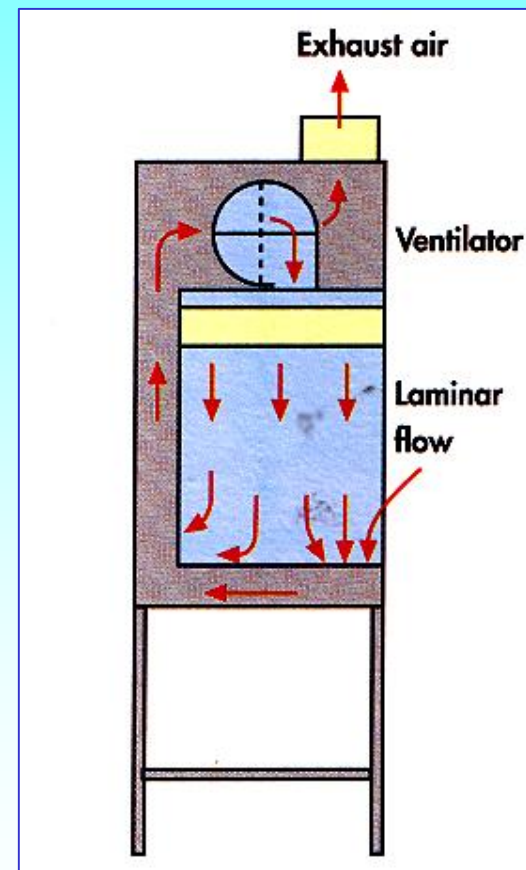
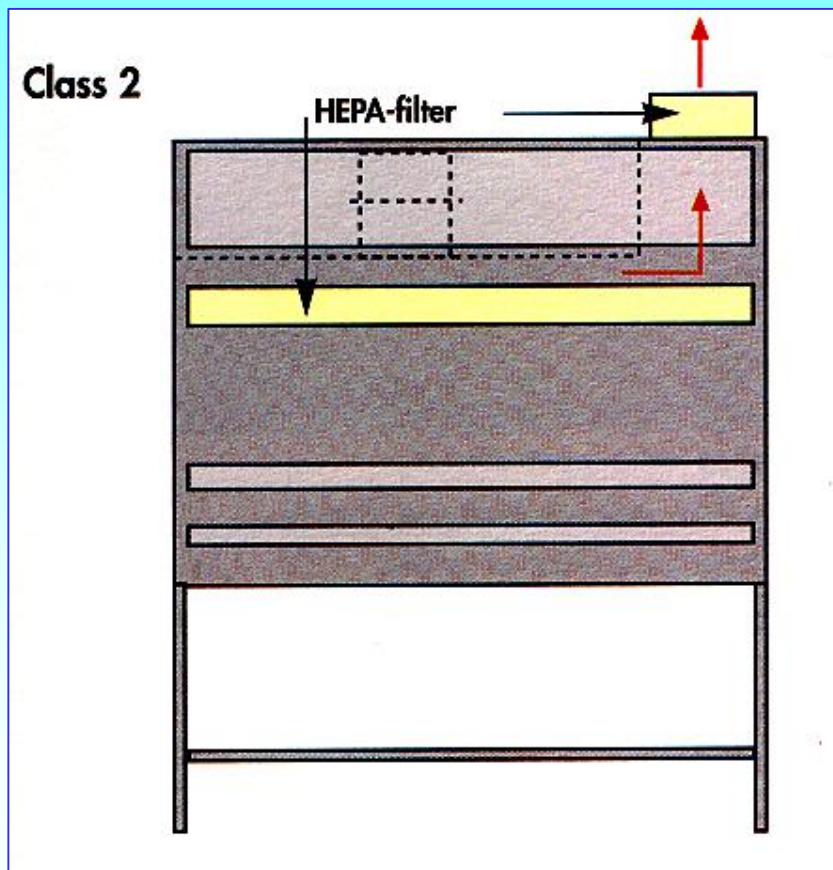
HEPA-filtr = „High Efficiency Particulate Air“



box nezajišťuje podmínky pro sterilní práci

Očkovací box

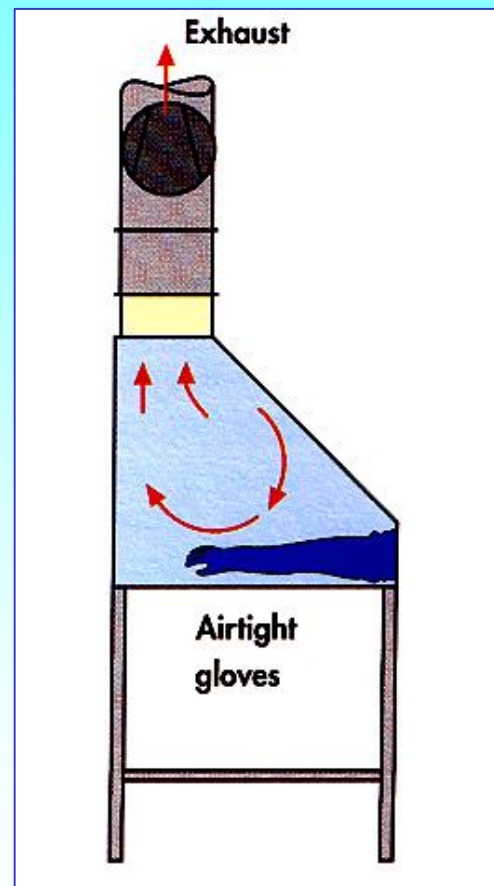
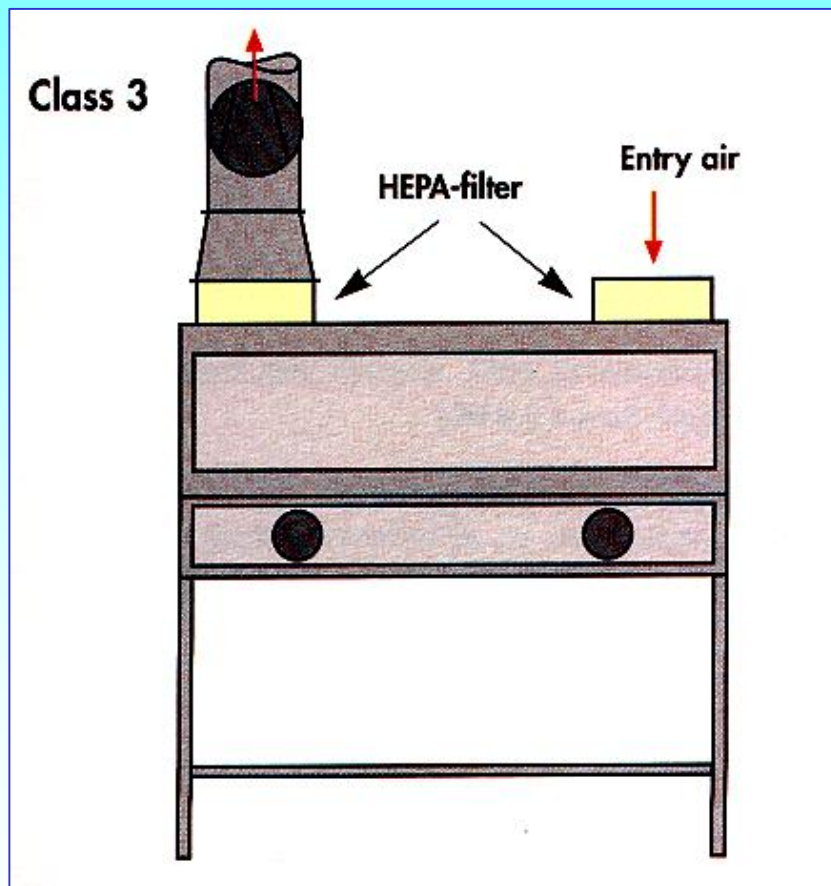
2. bezpečnostní třída



AURA - je možné pracovat i s GMO

Očkovací box

3. bezpečnostní třída

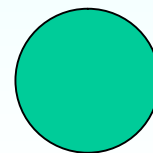
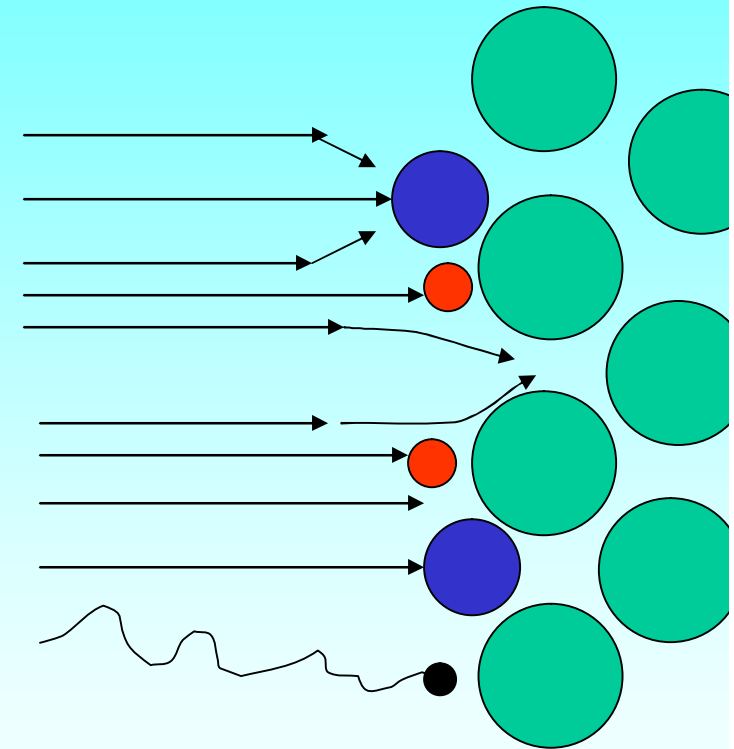


užití pro práci s vysoce infekčními, toxickými nebo radioaktivními materiály apod.

Velikost filtrem zadržených částic <math>< 0,1\mu\text{m}</math>

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

°C	115	120	134	143
kPa	70	100	200	300

(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)

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**

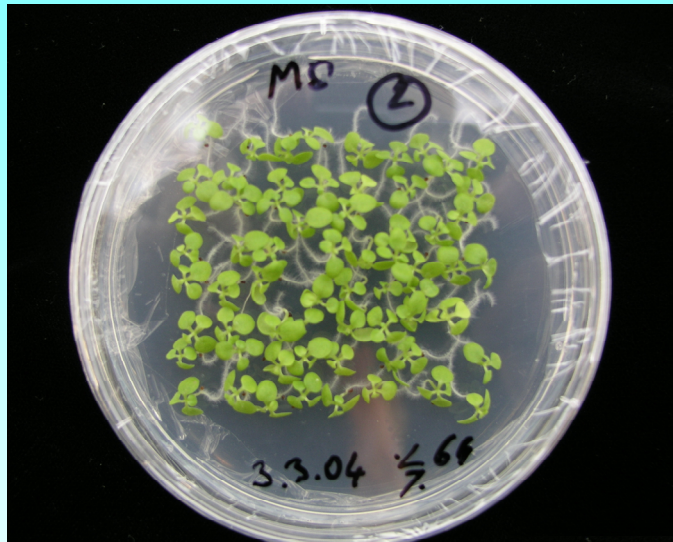
Výsev na Petriho misky

buničitá vata, skleněné perly + voda, médium

Vzorky semen na výsev – praktikum 2004

číslo vzorku	označení	popis	rok sklizně	médium
1	N.t. SR1	netransformovaná kontrola	2004	MS MS+MTX
2	N.t. M I	dhfr = gen pro rezistenci na MTX	2004	MS MS+MTX
3	N.t. 1-3A1-7 heterozygot	dhfr Zm-p60.1 = gen pro β -glukosidasu	2004	MS MS+MTX
4	N.t. 1-3A1-7 homozygot	dhfr Zm-p60.1 = gen pro β -glukosidasu	2004	MS MS+MTX
5	Daucus carota	cv. Tip-Top	2002	MS

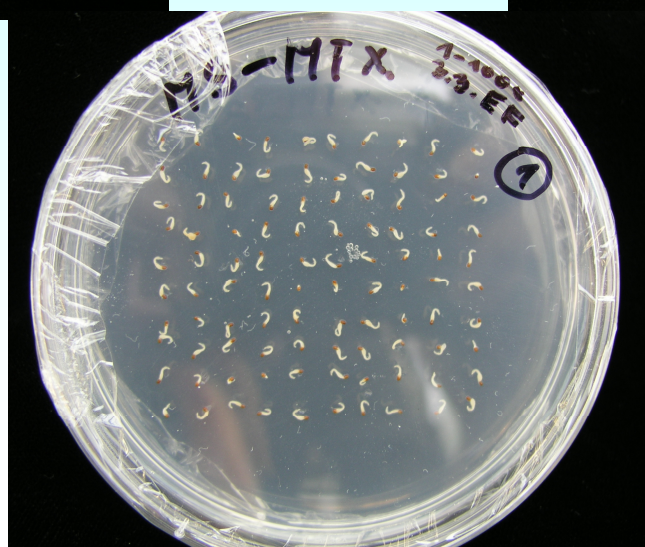
Nicotiana tabacum L. - výsev semen



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

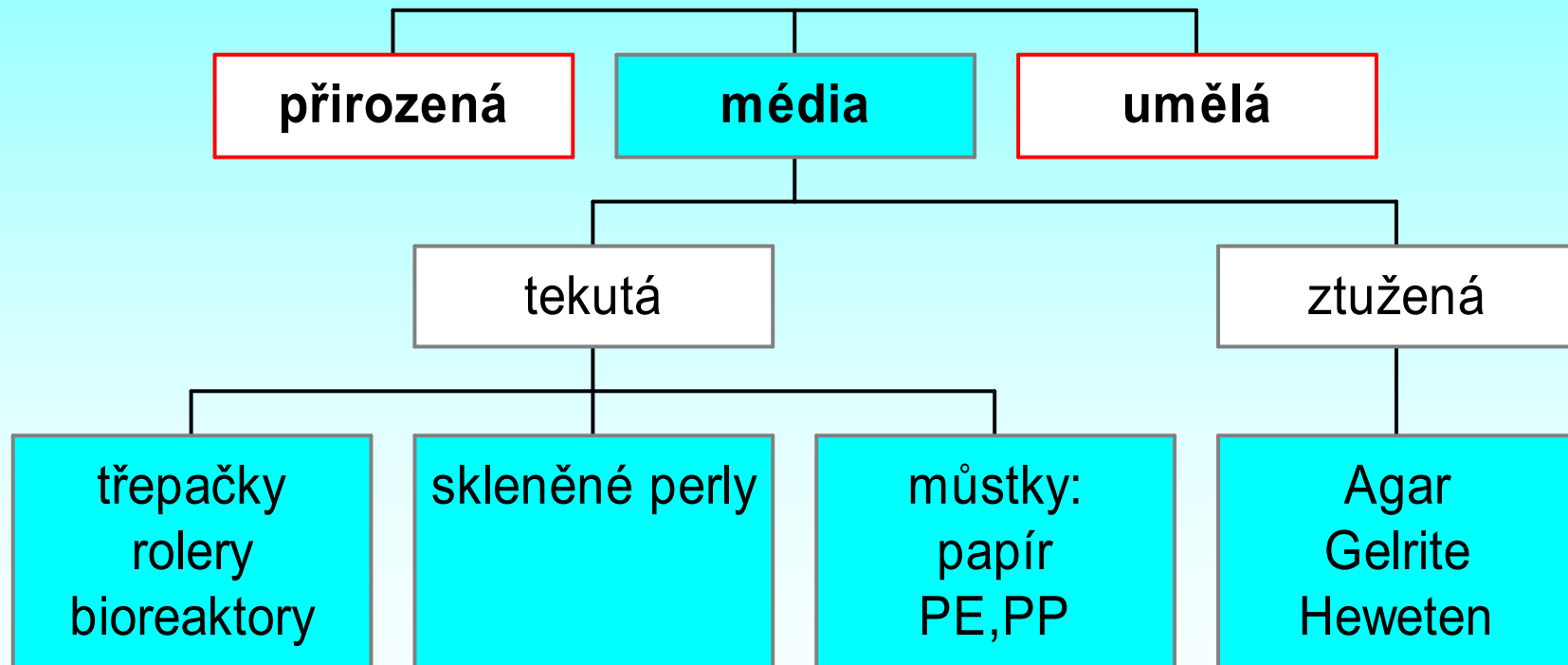


heterozygotní 1-3AI-7
na MS médiu s MTX

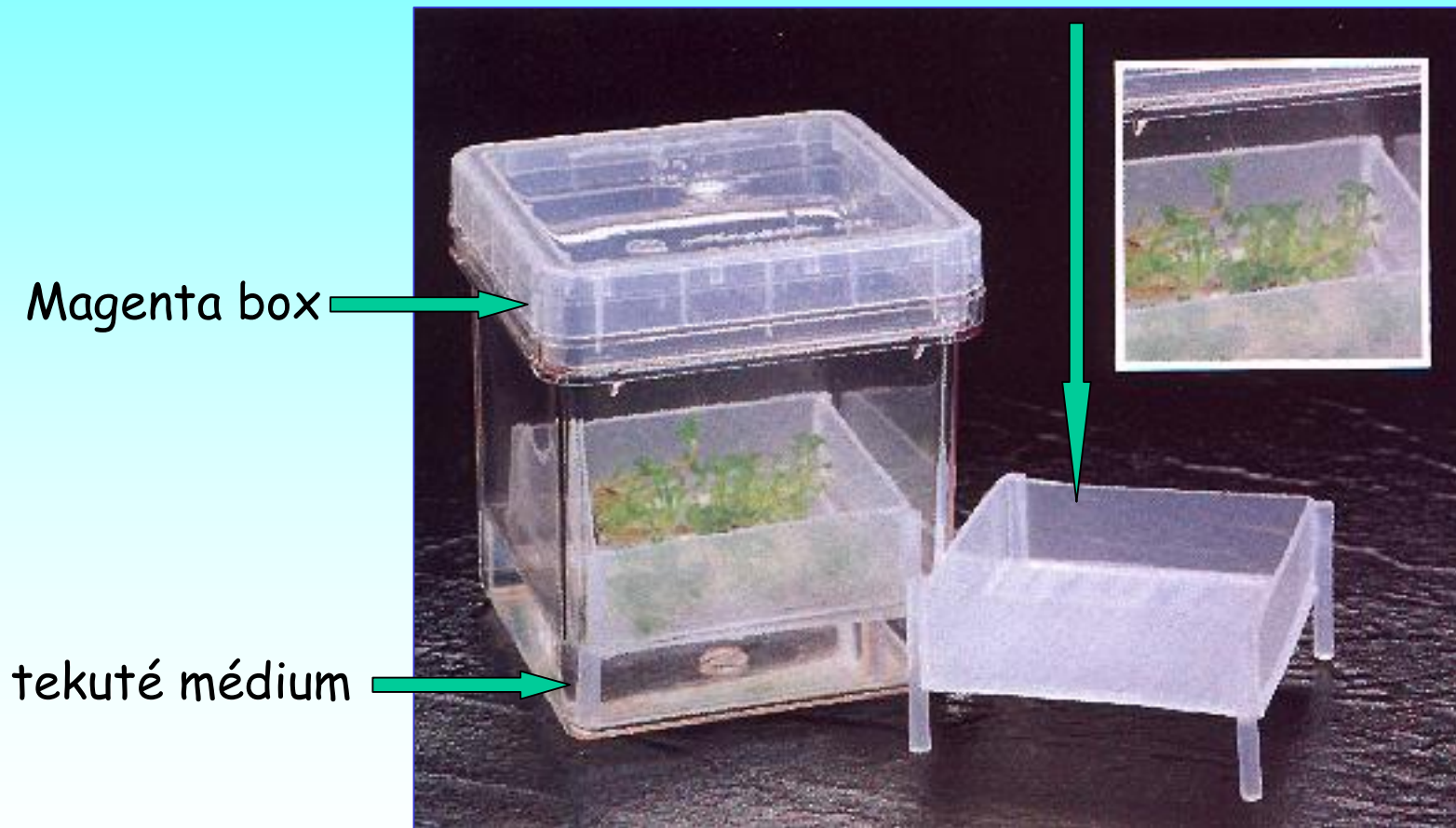


kontrola SR1
na MS médiu s MTX

Živná média

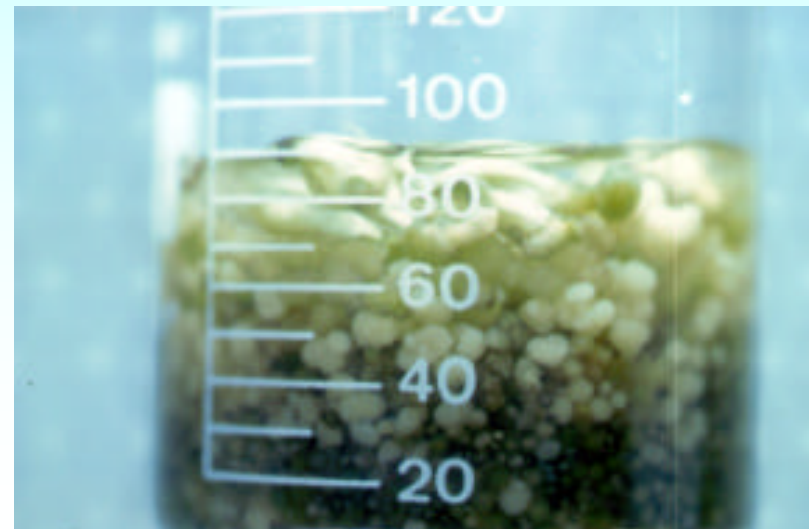
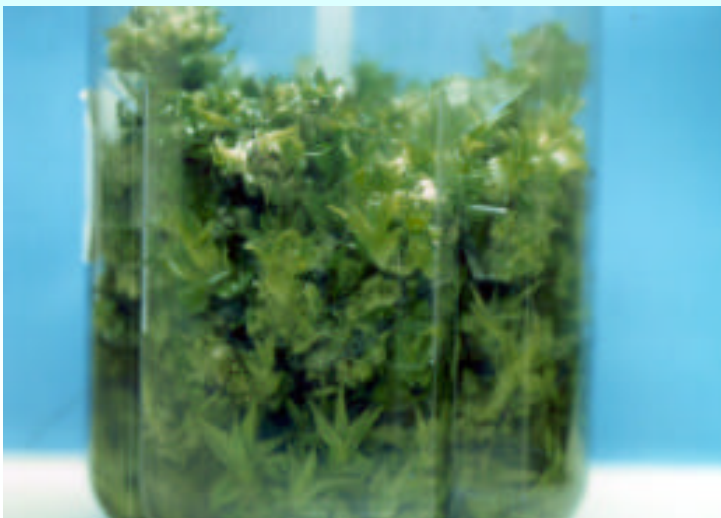


Kultivace v tekutém médiu - permanentní imerze - polypropylenová membrána (můstek)



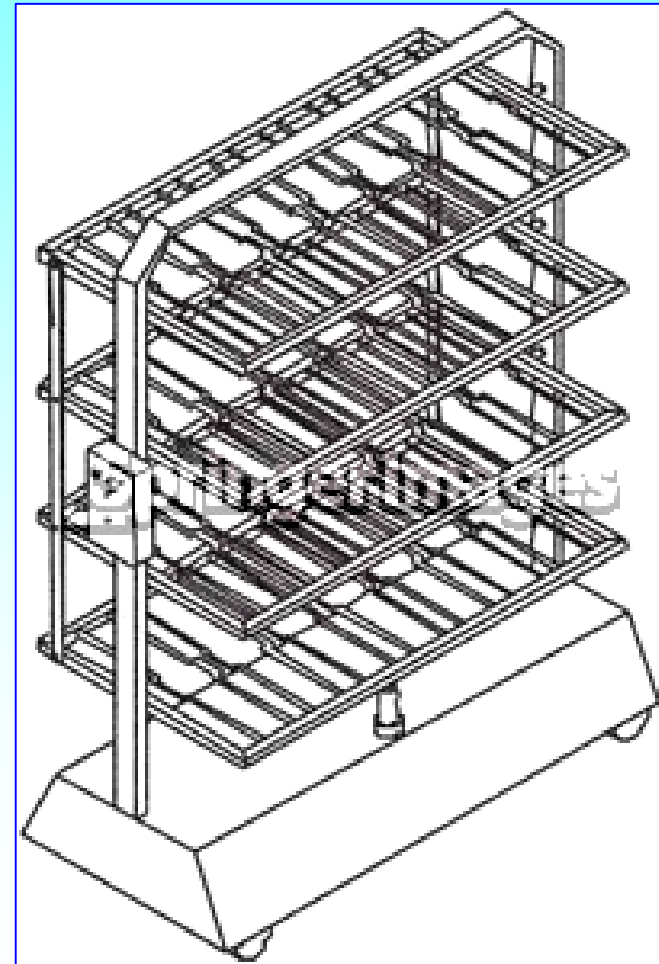
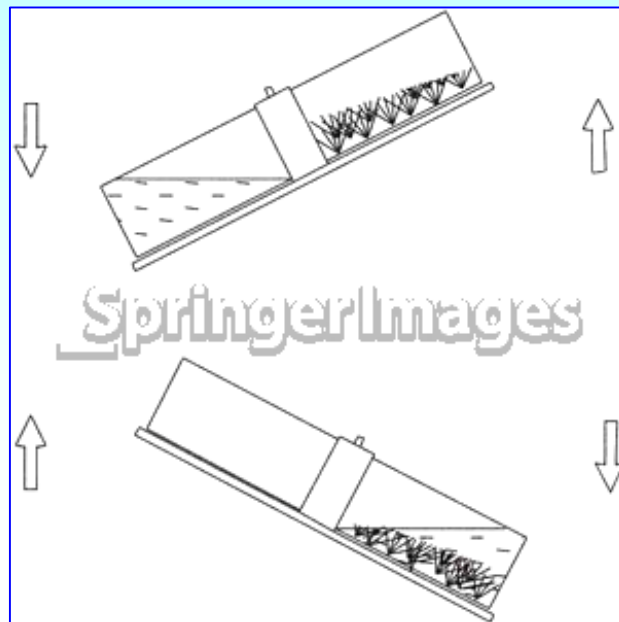
podle katalogu Sigma

Kultivace v tekutém médiu - permanentní imerze




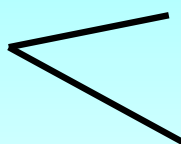

Kultivace v tekutém médiu - dočasné imerze (TIC)

- RITA®
- Bio-Mint



Fyzikální podmínky kultivace

osvětlení  intenzita, vlnová délka, fotoperioda
tma

teplota  konstantní  klimatizace
kolísavá (den x noc)

koncentrace plynů: CO_2 , etylén

vlhkost vzduchu

**těsnost uzavírání
kultivačních nádob**



Složení živných médií

- anorganické sloučeniny

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

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

- organické sloučeniny

vitamíny: **B1, B6, kys. nikotinová, kys. listová, biotin**

aminokyseliny: **směsi** (kaseinhydrolyzát, kvasničný hydrolyzát)
čisté (glycin)

inositol

polyaminy: **putrescin, spermin, spermidin...**

aktivní uhlí

přírodní látky: **kokosové mléko, rostl. šťávy...**

Složení živných médií - pokračování

- zdroj organického uhlíku = sacharidy
mono- a disacharidy (sacharóza)
- růstové regulátory
 - auxiny
 - cytokininy
 - gibereliny
 - kys. abscisová
- ztužování médií - agar, Gelrite, Phytigel,

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

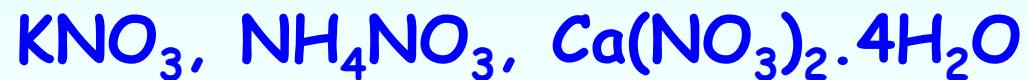
amonné soli 2-20 mM

sulfáty, fosfáty, vápník a hořčík 1-3 mM

Dusík

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

- **nitráty**
- **amonné ionty**



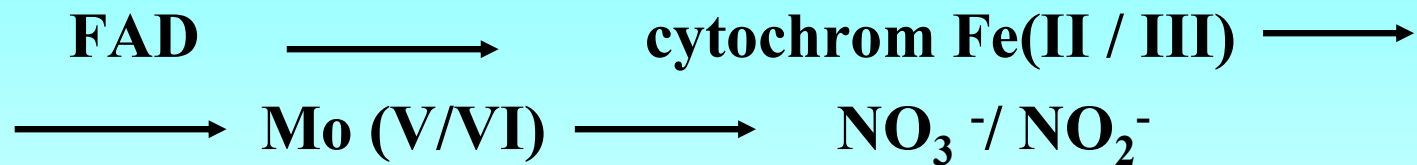
Dusičnany (nitráty)

- **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

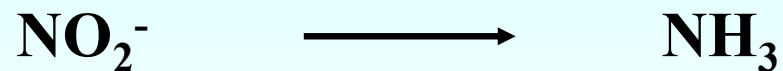
1. krok - konverze nitrátu na nitrit

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 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** (Pi) - po vstupu do cytoplazmy je rychle esterifikován na **ATP**
- je nezbytný pro stavbu **DNA, RNA, fosfolipidů biomembrán** a pro **energetický metabolismus**
- energie uvolněná glykolýzou nebo získaná fotosyntézou nebo oxidativní fosforylací se ukládá do ATP a může být později uvolňována hydrolýzou ATP 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**

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
- Ca vazebný protein **kalmodulin** - role v regulaci intracelulární koncentrace Ca^{2+}

Hořčík

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

Mikroelementy

používají se mikromolární koncentrace
mají význam především jako kofaktory

- bór
- chlór, jód
- železo
- kobalt
- měď
- mangan
- molybden
- zinek

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

Organické sloučeniny - org. uhlík

- metabolizovatelné cukry:
 - sacharosa
 - glukosa
 - fruktosa
- nemetabolizovatelné cukry
 - manitol
 - sorbitol

Organické sloučeniny - aminokyseliny

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

Organické sloučeniny - polyaminy

- putrescin
 - spermidin
 - spermin
1. podpora tvorby adventivních kořenů
 2. podpora tvorby prýtlů
 3. 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 dvojité helix v přítomnosti kationtů (Kappa typ tvoří gel v přítomnosti K^+ , Iota typ geluje v přítomnosti Ca^{2+})
- **Alginát sodný** - kyselé polysacharidy extrahované z hnědých řas. Tvoří **zastudena** gely rozpustné vodou, geluje v přítomnosti Ca^{2+}

Náhrady agaru

- **Phytigel®** (Sigma), **Gelrite®** (Merck) - přírodní anionický polysacharid produkovaný bakteriální fermentací = polymer tetrasacharidu (glukosa - glukuronová kyselina - glukosa - rhamnosa)
- poskytuje pevný průhledný gel (vhodný pro detekci mikrobiální kontaminace) v přítomnosti Mg^{2+} , Ca^{2+}
- používá se v **poloviční koncentraci** ve srovnání s agarem



Sigma - Aldrich Tissue Culture Protocols

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**

<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/molecular-biology/plant-biotechnology/tissue-culture-protocols.html>

Sigma - Aldrich média

- *Chu* basal salt mixture (N6)
- *DKW/Juglans* basal salt mixture
- *Gamborg's B-5* basal salt mixture (B5)
- *Gamborg's B-5* basal salt mixture with minimal organics
- *Hoagland's No. 2* basal salt mixture
- *McCown's* woody plant basal salt mixture (WPM)
- *Murashige and Skoog* basal salt mixture (MS)
- *Quoirin and Lepoivre* basal salt mixture
- *Schenk and Hildebrandt* basal salt mixture (SH)
- *White's* basal salt mixture

<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/molecular-biology/plant-biotechnology/tissue-culture-protocols/classic-plant-media.html>

Sigma - Aldrich Tissue Culture Protocols

Antibiotics

Classic Plant Media

Explant Sterilization

Gelling Agents

Growth Regulators

Iron Chelate Solution

Media Preparation

Media Sterilization

Murashige and Skoog Media Variations

Orchid Culture Media

Plant Pathology Media

Phycology and Aquatic Plant Media

Silver Thiosulfate Solution

Sunbag Vessels

Vitamin Mixtures

<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/molecular-biology/plant-biotechnology/tissue-culture-protocols.html>

Příprava živného média (1 l)

1. 5,5 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.

nebo Příprava živného média (1 l)

1. 5,5 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.

navážíme 4,4 g směsi MS média
s vitamíny podle Gamborga
- 4.
- 5.
6. Navážíme **20 g sacharosy**.

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 sterilně v očkovacím boxu médium až po sterilizaci