

Mikropropagace

Množení *in vitro*

5.

Jaroslava Dubová



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Definice mikropropagace

- **Micropropagation is the true-to-type propagation of a selected genotype using *in vitro* culture techniques.**

- **Most often micropropagation is also associated with mass production at a competitive price.**

[P.C. Debergh and R.H. Zimmerman /Eds./:Technology and Application]

- **High yield plant production, grown in a nutrient rich gel under sterile lab conditions.**

[R. Fenwick 2004]

Výhody množení *in vitro*

- malý rozměr řízku
- vysoký množitelský koeficient
- zkrácení množitelského cyklu
- možnost použití netradičních orgánů
- možnost načasování na určitý termín
- dobrý zdravotní stav (ozdravování)

Typy regeneračních procesů

(Němec 1905)

restituace = náhrada odňaté části - meristémy
(meriklonové množení)

reprodukce = regenerace z již existujících základů

regenerace de novo = odvozování přes kalus, v něm
diferenciace adventivních pupenů

viz schéma: Opatrný (1988)

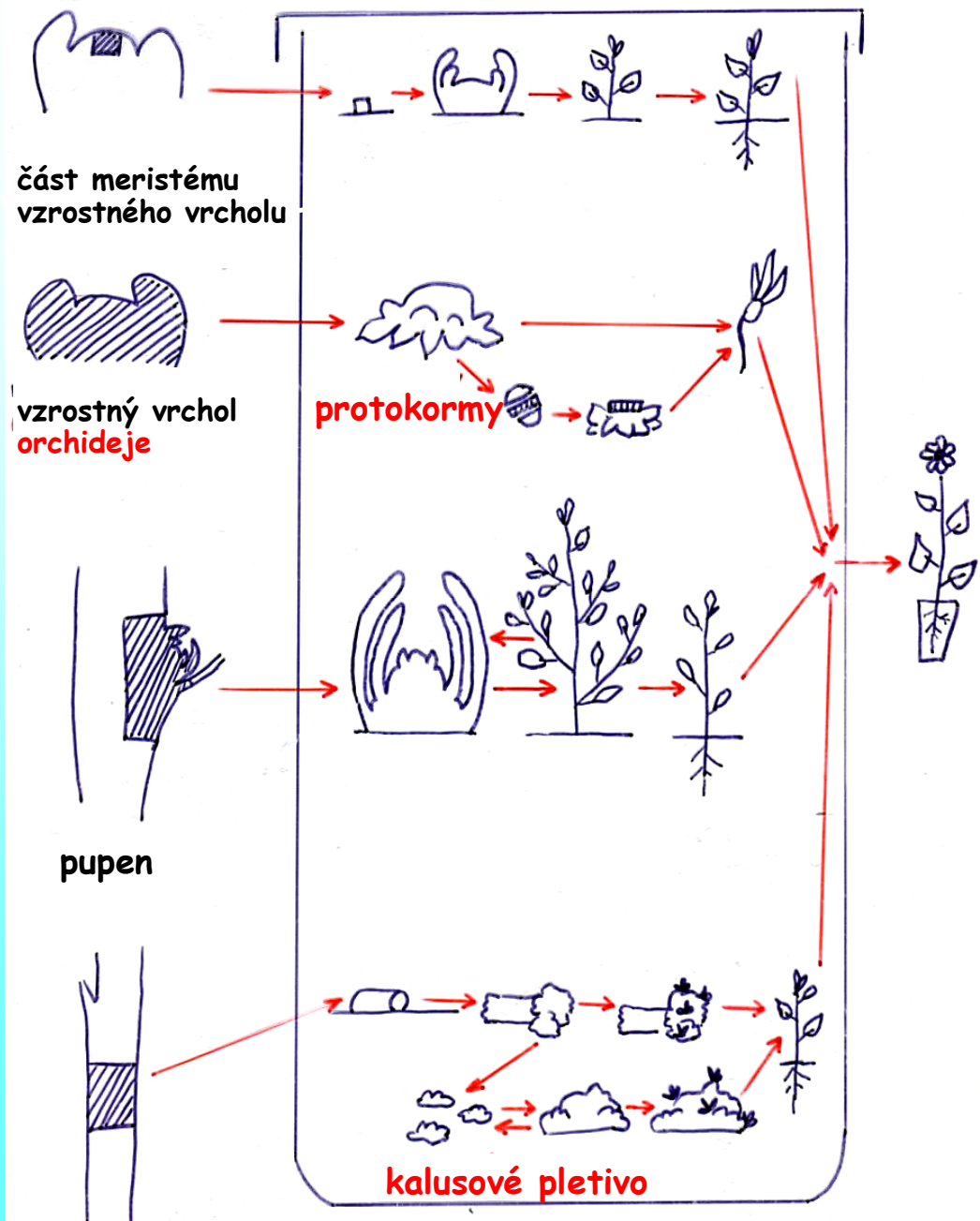
Opatrný 1988

restituce = náhrada odňaté části - **meristémy** (meriklonové množení)

reprodukce = regenerace z již existujících základů **nodální segmenty**

regenerace de novo = odvozování přes kalus **internodální segmenty, diferencované orgány**

in vitro



Apikální stonkový meristém

listová primordia

izolovaný „meristém“



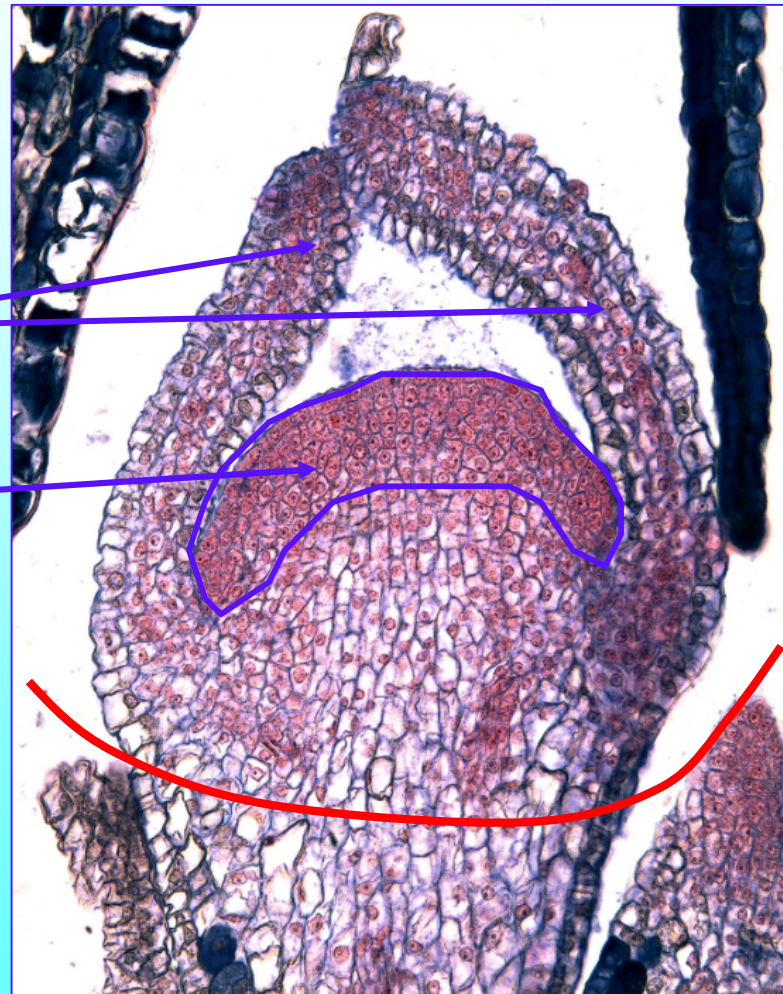
vlastní meristém

Apex stonku *Begonia rex*

listová primordia

apikální meristém

izolovaný „meristém“



Mikropropagace, klonování rostlin *in vitro*

<http://www.kitchenculturekit.com/africanviolet.htm>

<http://www.jmu.edu/biology/biofac/facfro/cloning/cloning.htm>

<http://aggie-horticulture.tamu.edu/tisscult/microprop/microprop.html>

<http://www.micropropagation-services.co.uk/>

okrasné dřeviny - rododendrony

<http://www.janholub.cz/my.html>

masožravé rostliny

<http://www.darwiniana.cz> - vydává pro členy časopis Trifid

<http://bestcarnivorousplants.com/dionaea/>

kapradiny

www.phytotechlab.com/pdf/FernMicropropagation.pdf

Stadia mikropropagace *in vitro*

Murashige (1974)

Debergh *et* Maene (1981)

0. příprava explantátu - ovlivnění mateřské rostliny

I. iniciace

II. propagace (množení)

II.a elongace (prodlužování) prýtů

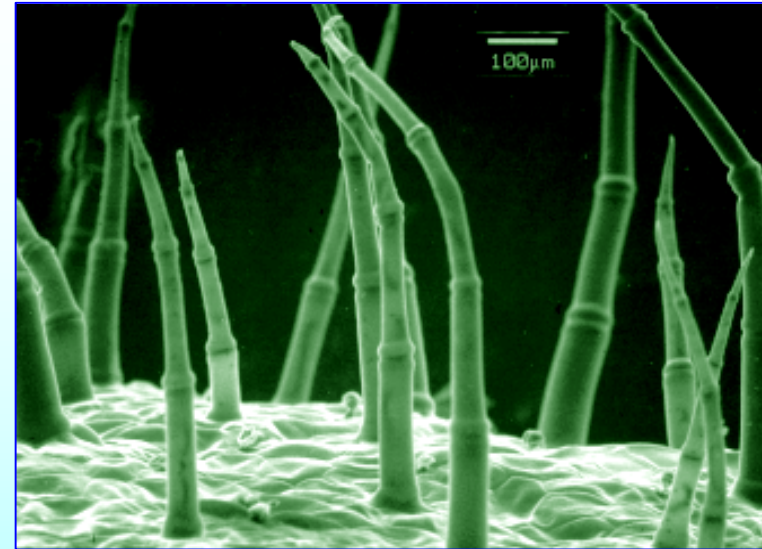
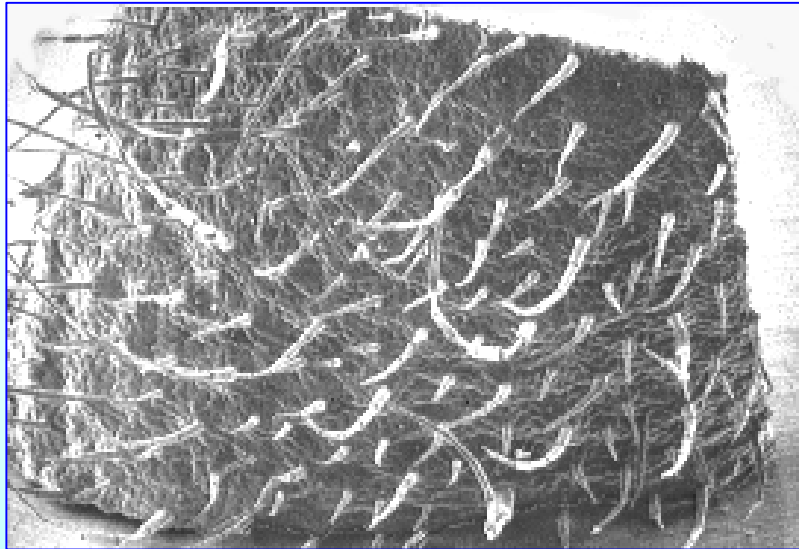
III. zakořeňování

Převádění do nesterilních podmínek *ex vitro*

aklimatizace na nesterilní podmínky (nižší vzdušnou vlhkost, větší kolísání teplot, normální osvětlení)

Stadia mikropropagace *Saintpaulia ionantha* Wendl.

I.



II.

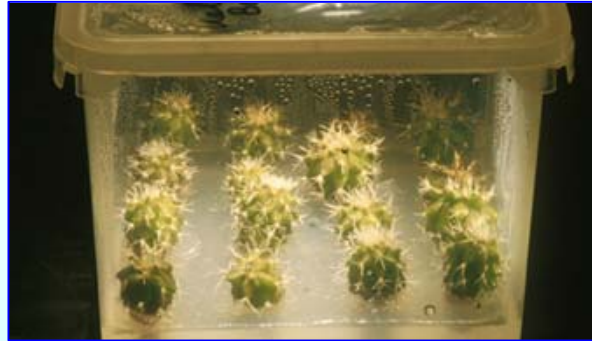


III.



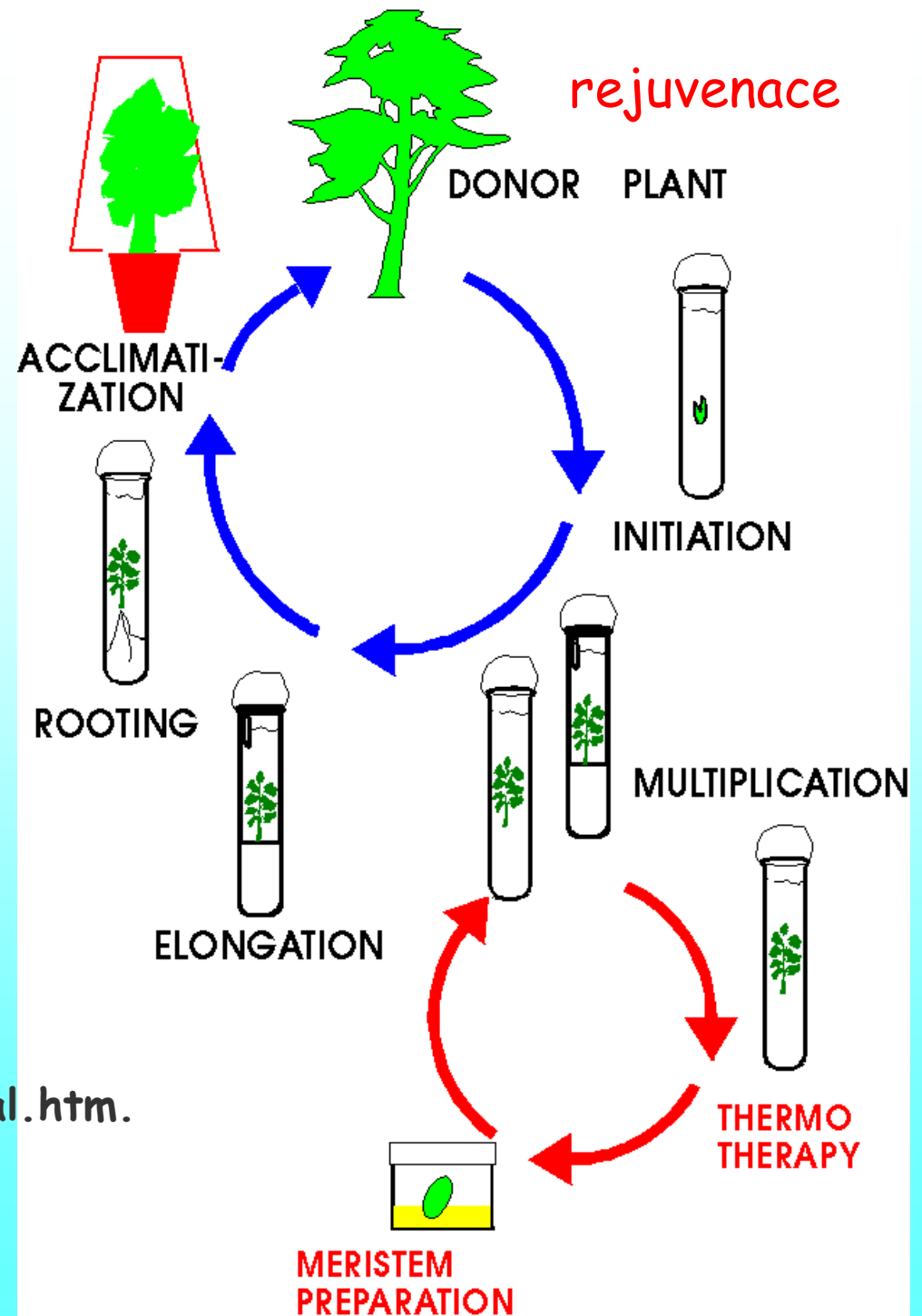
Mikropropagace

sukulenty
z výsevu



aklimatizované
masožravé rostliny

fáze mikropropagace dřevin



www.boku.ac.at/iam/poster/revital.htm

Meristémové kultury a termoterapie



Kombinace *in vitro* termoterapie a meristémové kultury - nejúčinnější metoda eliminace virů. Aktivně rostoucí rostlinný materiál je umístěný do termoterapeutické komory.

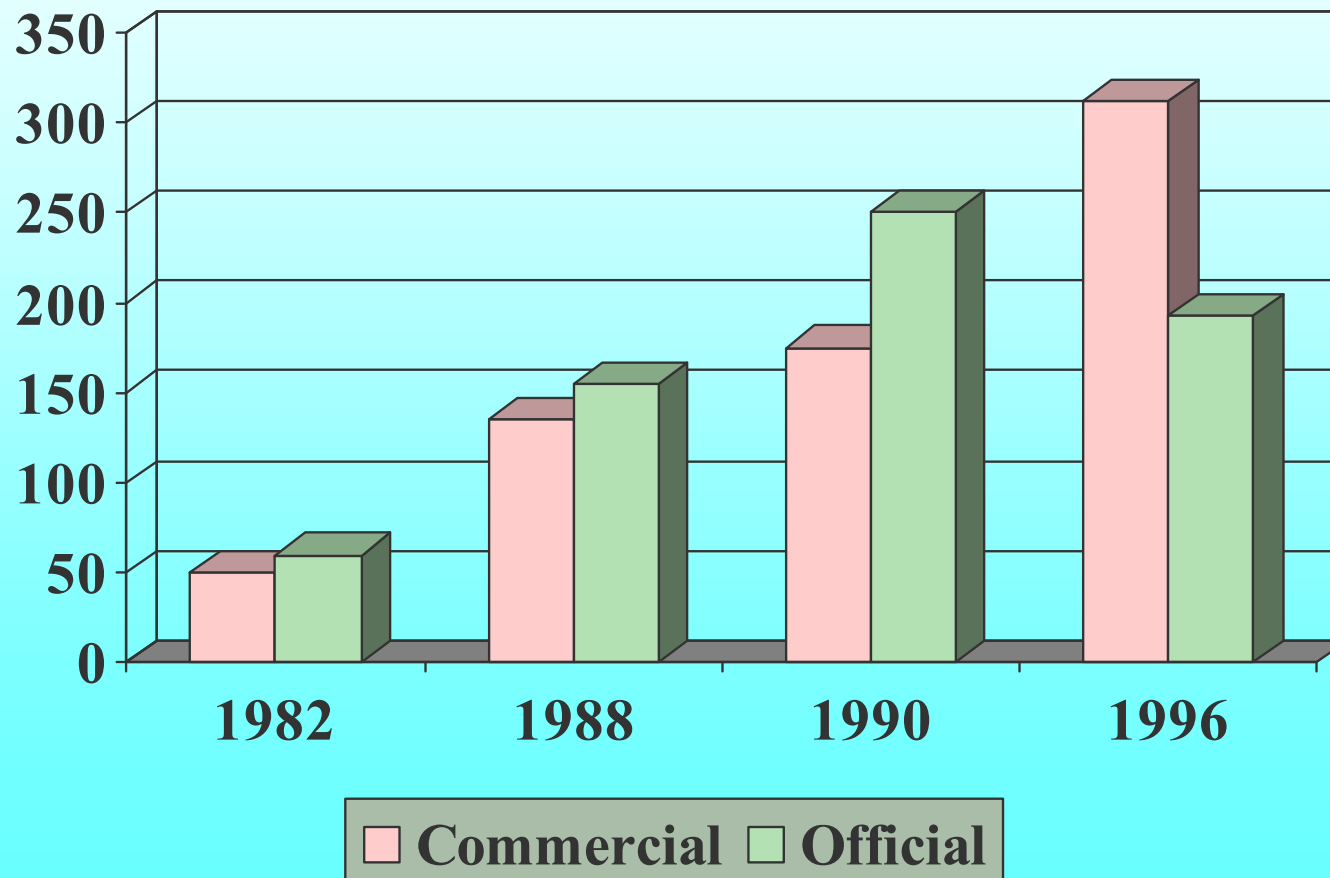
Expozice 3 týdny nebo déle, fotoperioda 16 h 38°C, 8 h tma 36°C.

Teplota a doba expozice jsou limitovány tolerancí rostliny (závisí na druhu a varietě).

The European Plant Tissue Culture Industry

COST meeting 1992, COST 822

Numbers of laboratories



The European Plant Tissue Culture Industry

COST 87, COST 822

Country	Official		Commercial	
Year	1992	1996	1992	1996
Austria	6	5	0	1
Belgium	22	22	11	14
Denmark	6	8	6	8
Czech Rep.	18	18	2	3
Finland	21	13	6	8
France	33	18	0	12
Germany	28	40	25	31
Netherlands	19	9	35	36
Poland		24		7
Slovakia	9	7	3	4
Sweden	3	3	4	3
U.K.	36	31	7	18

Rostlinné taxony v komerčních laboratořích

COST meeting 1992, Dijon

Rod	Počet laboratoří
<i>Prunus</i>	107
<i>Ficus</i>	82
<i>Philodendron</i>	56
<i>Spathiphyllum</i>	46
<i>Nephrolepis</i>	44
<i>Rosa</i>	41
<i>Syngonium</i>	37
<i>Malus</i>	35
<i>Orchidaceae</i>	31
<i>Solanum</i>	30
<i>Gerbera, Begonia, Fragaria</i>	26

Celkový počet rostlin produkovanych v komerčních laboratorích v Evropě (x1000)

COST meeting 1992, Dijon

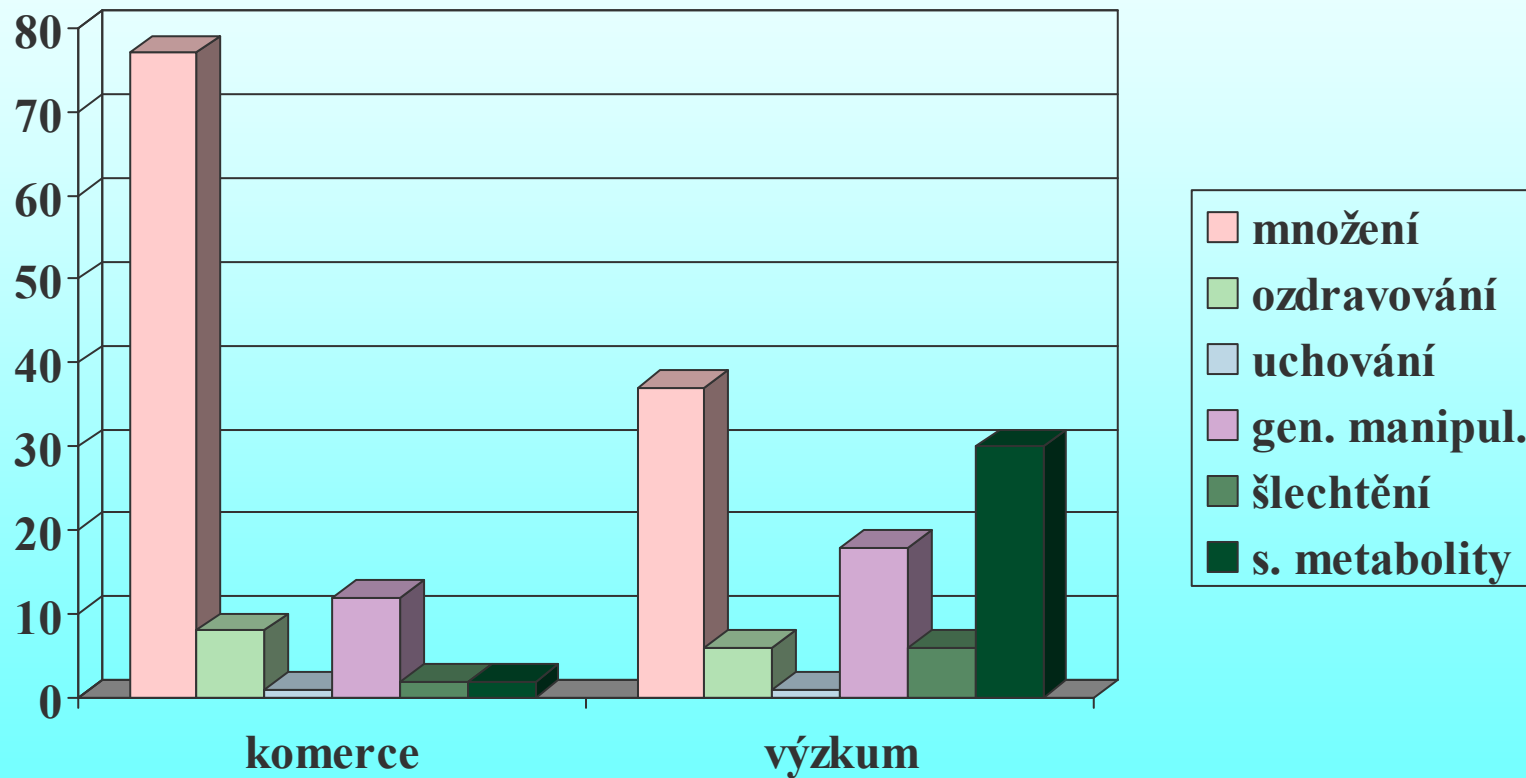
<i>Gerbera</i>	18 383	<i>Solanum tuber.</i>	2 817
<i>Nephrolepis</i>	14 517	<i>Orchidaceae</i>	2 162
<i>Prunus</i>	10 725	<i>Citrus</i>	2 061
<i>Spathiphyllum</i>	9 827	<i>Actinidia</i>	1 112
<i>Lilium</i>	7 112	<i>Betula</i>	842
<i>Fragaria</i>	7 040	<i>Nicotiana</i>	704
<i>Ficus</i>	7 002	<i>Platyserium</i>	700
<i>Saintpaulia</i>	5 696	<i>Diffenbachia</i>	82

Rostlinné taxony ve výzkum. laboratořích

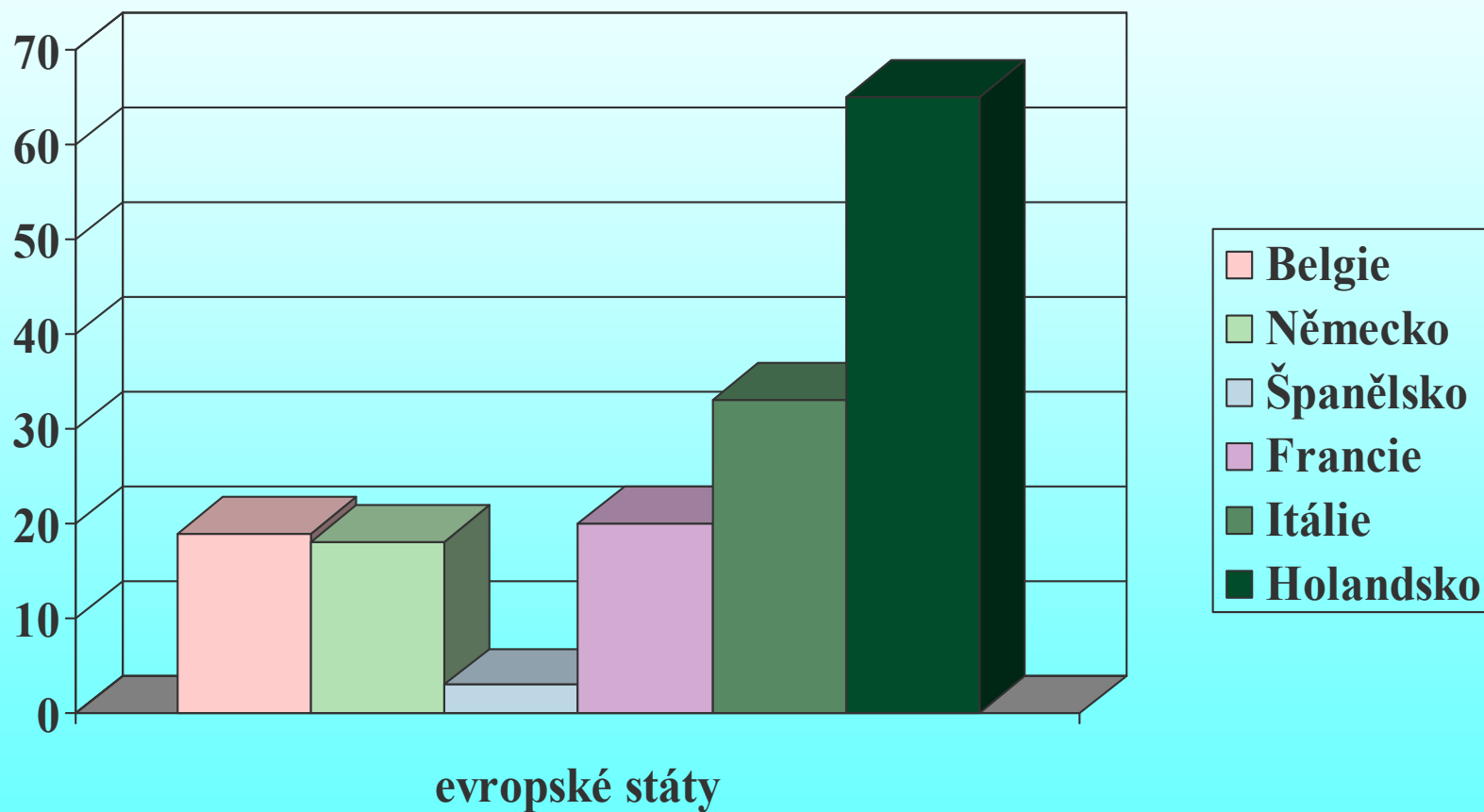
COST meeting 1992, Dijon

Rod	Počet laboratoří
<i>Prunus</i>	78
<i>Solanum</i>	66
<i>Malus</i>	62
<i>Vitis</i>	42
<i>Brassica</i>	40
<i>Nicotiana</i>	39
<i>Betula</i>	37
<i>Rosa</i>	35
<i>Quercus</i>	32
<i>Fragaria</i>	25
<i>Orchidaceae</i>	13

Hlavní zájmy evropských laboratoří *in vitro* COST meeting 1992, Dijon



Produkce rostlin *in vitro* podle zemí (miliony ks.) COST meeting 1992, Dijon



I. stadium: Iniciace mikropropagace

1. výběr materiálu:

zdravotní stav matečných rostlin

ontogenetické stáří (rejuvenilizace)

vliv genotypu

2. desinfekce

3. výběr typu explantátu

4. přítomnost **cytokininu a auxinu** v médiu

II. Stadium mikropropagace: propagace

médium se sníženou koncentrací regulátorů
nebo bez nich, možný přídavek giberelinů

Opakované rozdělování vzniklých prýtů **není**
neomezené: většinou 10 - 15 pasáží

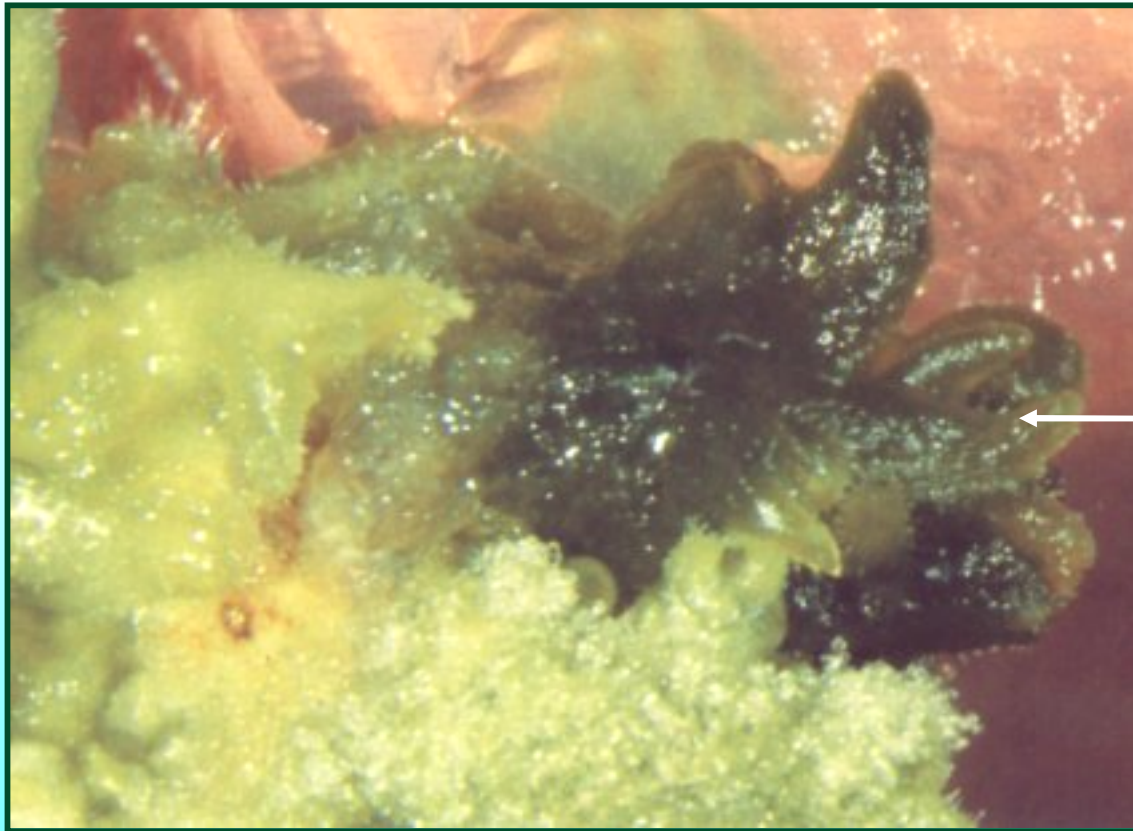
pak je nutné nové založení kultury

možné problémy:

habituače

vitifikace

II. stadium mikropropagace



adventivní
prýty

Debergh *et al.*

mikropropagace melounu *Cucumis melo* L.

III. Stadium mikropropagace: zakořeňování

- snížení koncentrace minerálních solí
- možná indukce auxinem (pulsní - vysokou koncentrací nebo dlouhodobější působení nízkou koncentrací) pro tvorbu funkčních kořenů = vhodnější tekuté médium
- absence mykorrhizy inokulace kulturami hub



Mikropropagace - stadium III. zakořeňování



mikropropagace *Lilium*
katalog firmy



mikropropagace
Malus

Aklimatizace

problémy:

nedostatečně vyvinutá kutikula (vosky)

nefunkční stomata

odumírají kořeny vyvinuté *in vitro*



Snižování relativní vlhkosti *in vitro* - „bottom cooling“

Zvyšování vlhkosti - tunely nebo mlžení

Zabránění infekci po převodu:

pečlivé odstranění zbytků agaru

desinfekce substrátu - Previcur-N (0,15-0,25%)

Aklimatizace *Saintpaulia ionantha* Wendl.

skleněné akvárium



regenerované rostliny



Aklimatizace

sadbovače s nezakořeněnými
mikrořízky přeneseny do mlžné
komory ve skleníku



vyvíječ mlhy

<http://instruct1.cit.cornell.edu/courses/hort400/raspberry/stageIV.html>

Nevýhody množení *in vitro*

- možnost nežádoucího zvětšení variability (tzv. somaklonální variabilita)
- nebezpečí genetické degradace
- protokoly nejsou optimalizované pro všechny druhy
- problémy s vitrifikací a habituací
- pracnost a energetická náročnost - cena

Habituaace = forma zkušenosti, která vede k vymizení reakce živočicha nebo rostliny na neškodný, dlouho opakovaný podnět nebo skupinu podnětů = **snížení odpovědi**

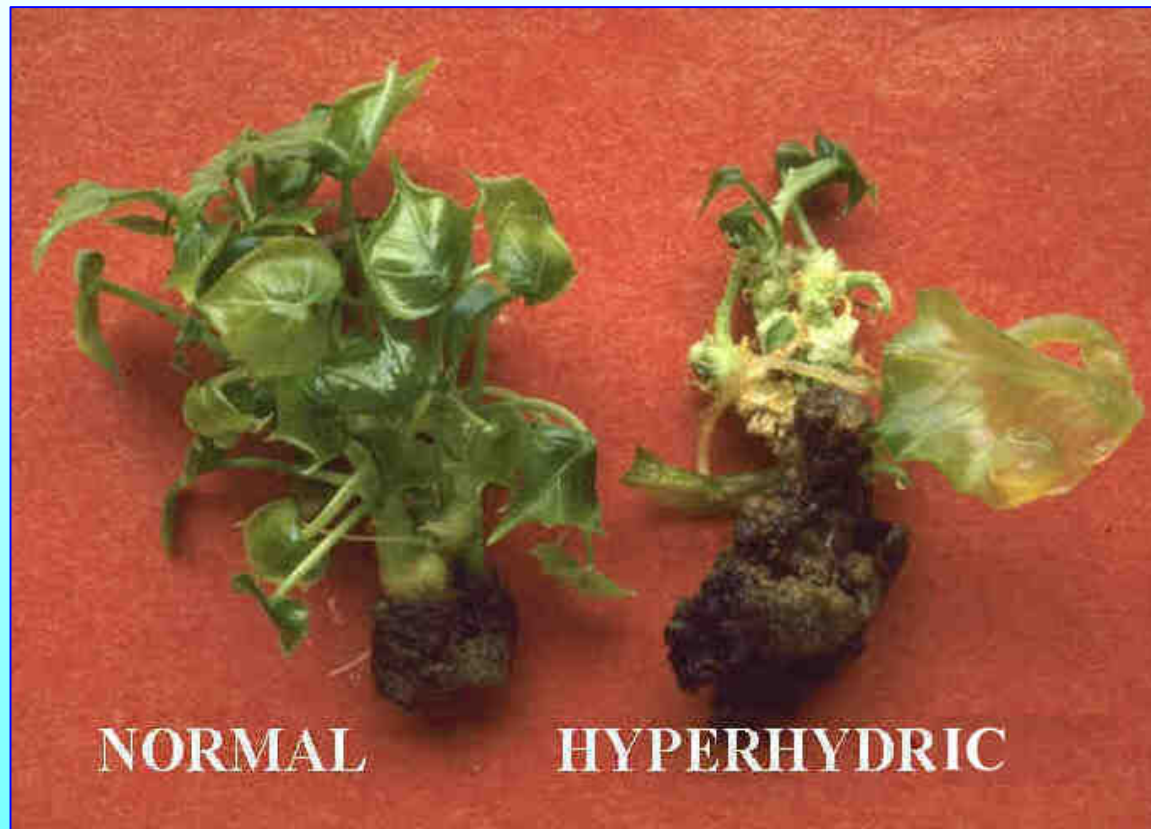
Vitrifikace („hyperhydricity“)

Symptomy vitrifikace nemusí být vždy viditelné pouhým okem. Viditelné příznaky se mohou objevit u citlivějších taxonů nebo v případě nepříznivějších podmínek.

Příklady nepříznivých podmínek:

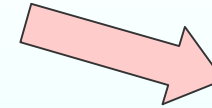
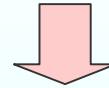
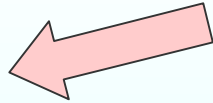
- příliš vysoká koncentrace cytokininu
- vysoká kapacita retence vody
- příliš těsně uzavřené kultivační nádoby
- příliš nízká koncentrace gelujících látek (agar)

Příklad jasných vizuálních symptomů vitrifikace u *Oreopanax nymphaefolia*



Debergh *et al.*

Znaky vitrifikace



morfologické

anatomické

biochemické

1. kratší internodia
2. tvorba růžic
3. průhledné, křehké a zkroucené listy
4. abnormální barva
5. slepené jehlice u konifer

1. velké interceluláry
2. hypolignifikace
3. redukovaný vývoj cévního systému
4. defektní epidermis
5. změněné ukládání vosků
6. snížená funkce průduchů

žádné
obecné
závěry

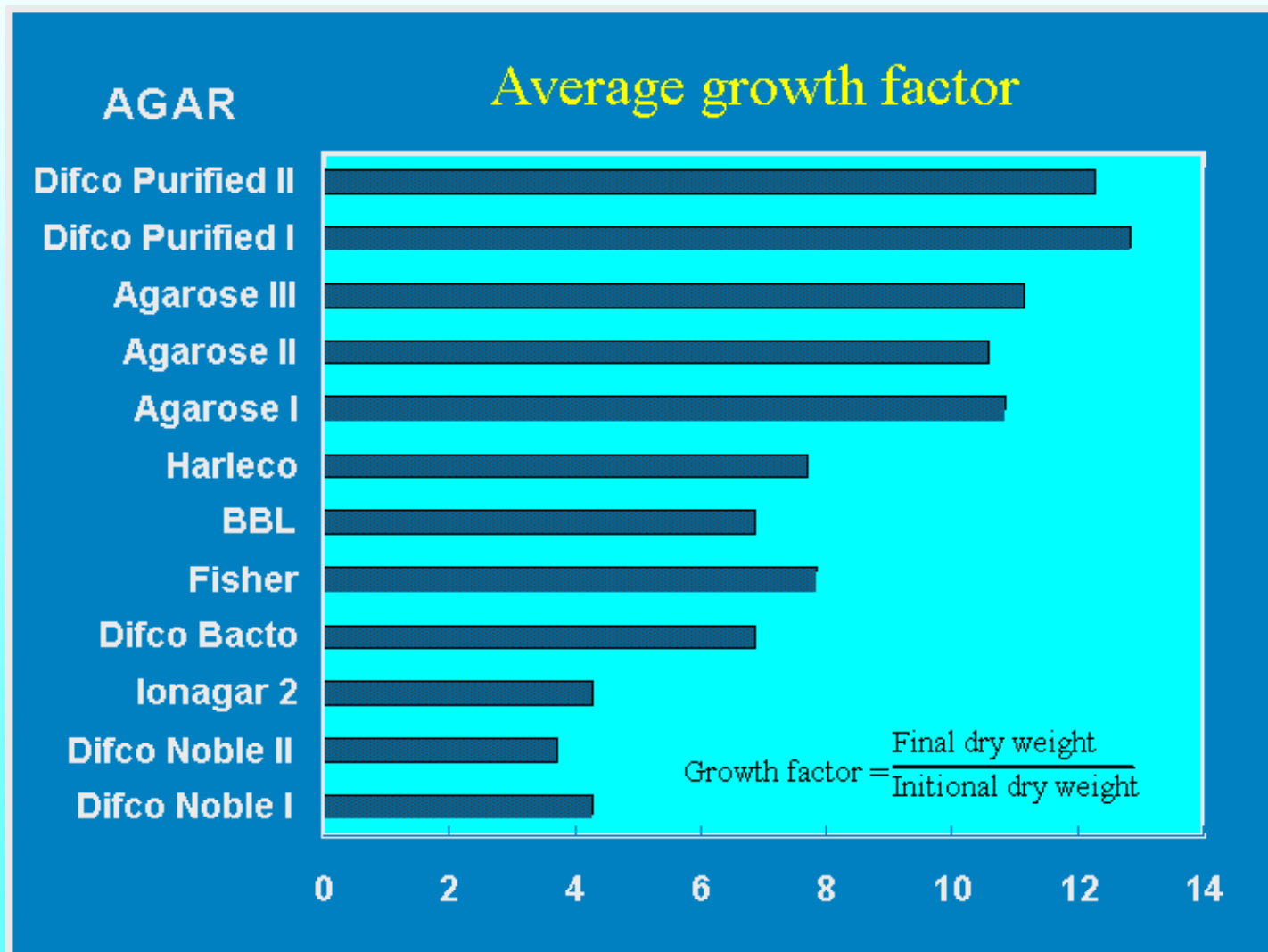
Debergh et al.

Srovnání atmosféry ve skleníku a kultivační nádobě

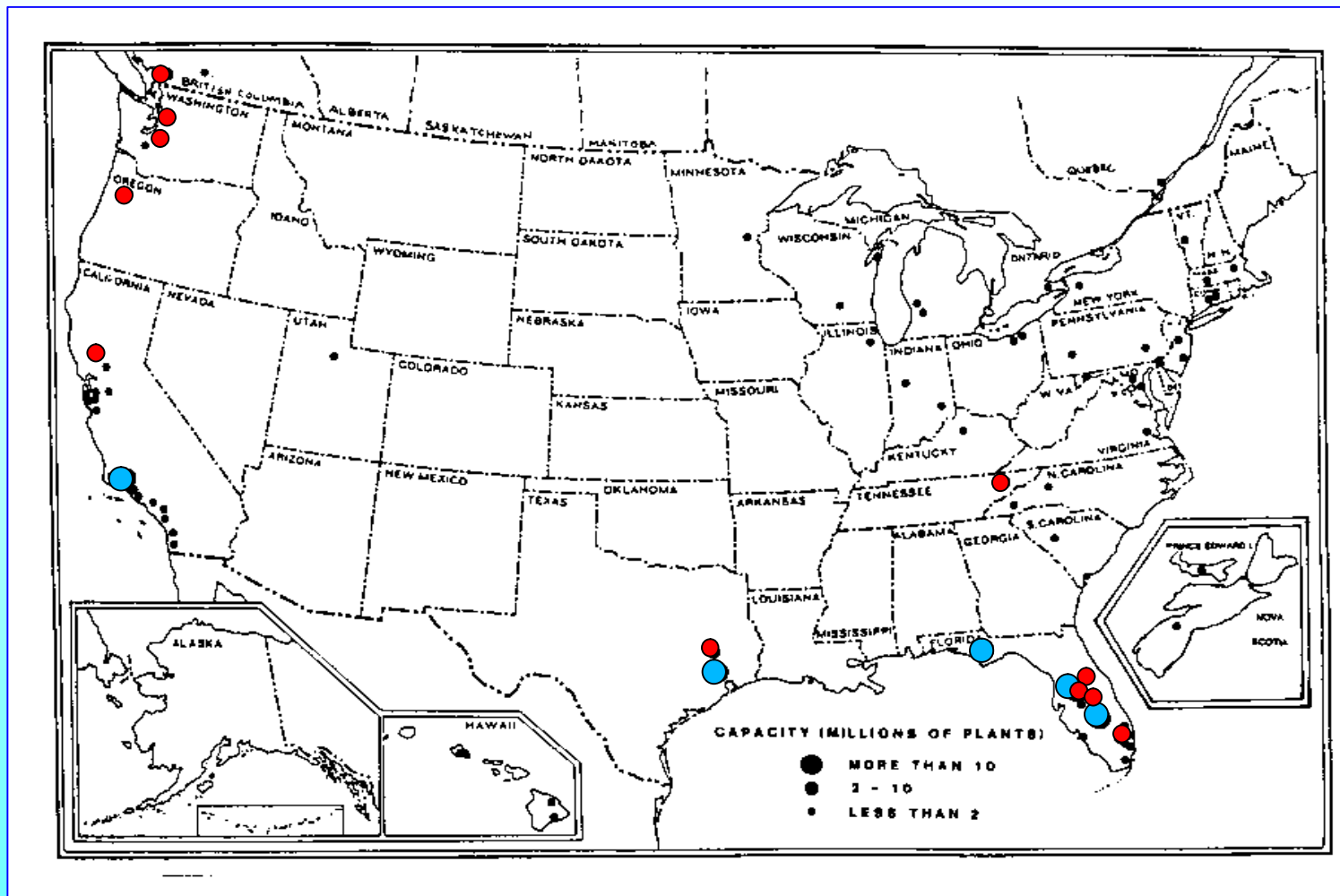
složka	skleník	kultivační nádoba
O_2	22 %	až 4 %
N_2	77 %	až 87 %
CO_2	365 - 1000 ppm	až 20 %
vodní pára	60-85 %	± 100 %
ethylen	5 ppb - 100 ppb	větší než 2 ppm

Vliv různých druhů agaru na růst apikálních prýtů *Picea abies*

(koncentrace agaru 1%) (Romberger and Tabor, 1971)



Komerční laboratoře v USA



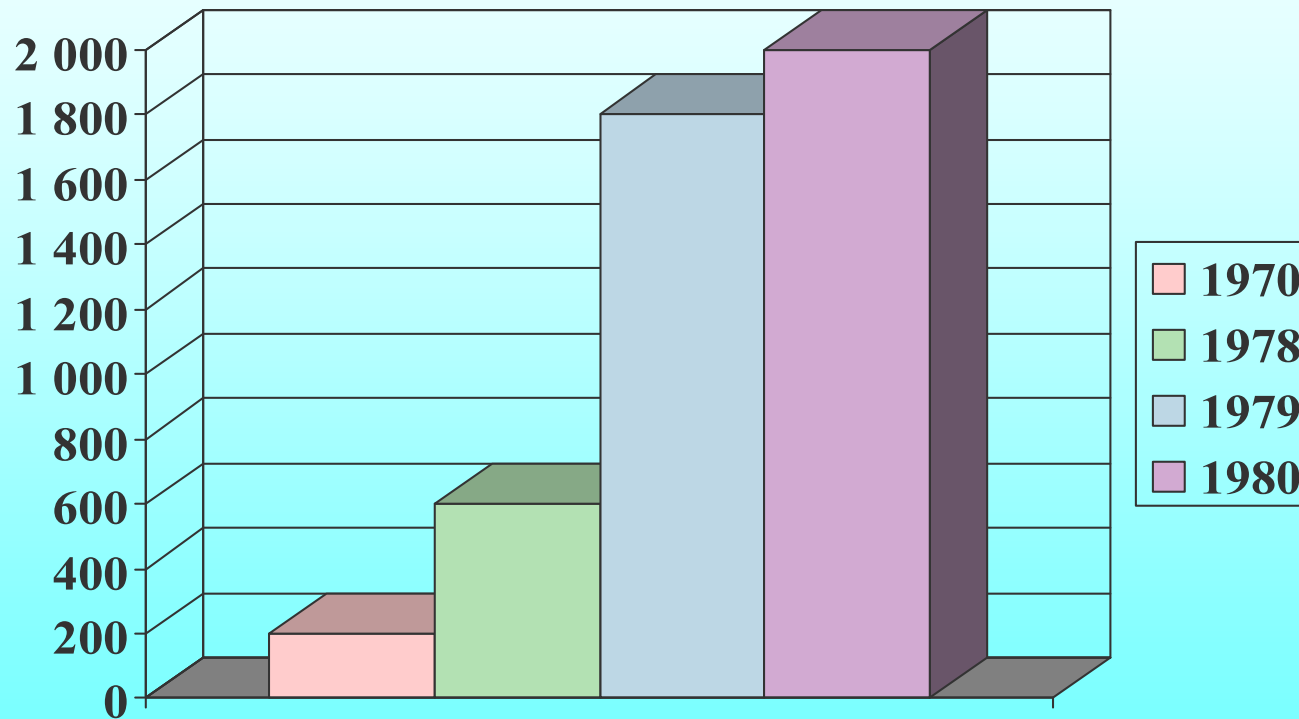
● více než 10 mil. rostlin

● 2 až 10 mil. rostlin

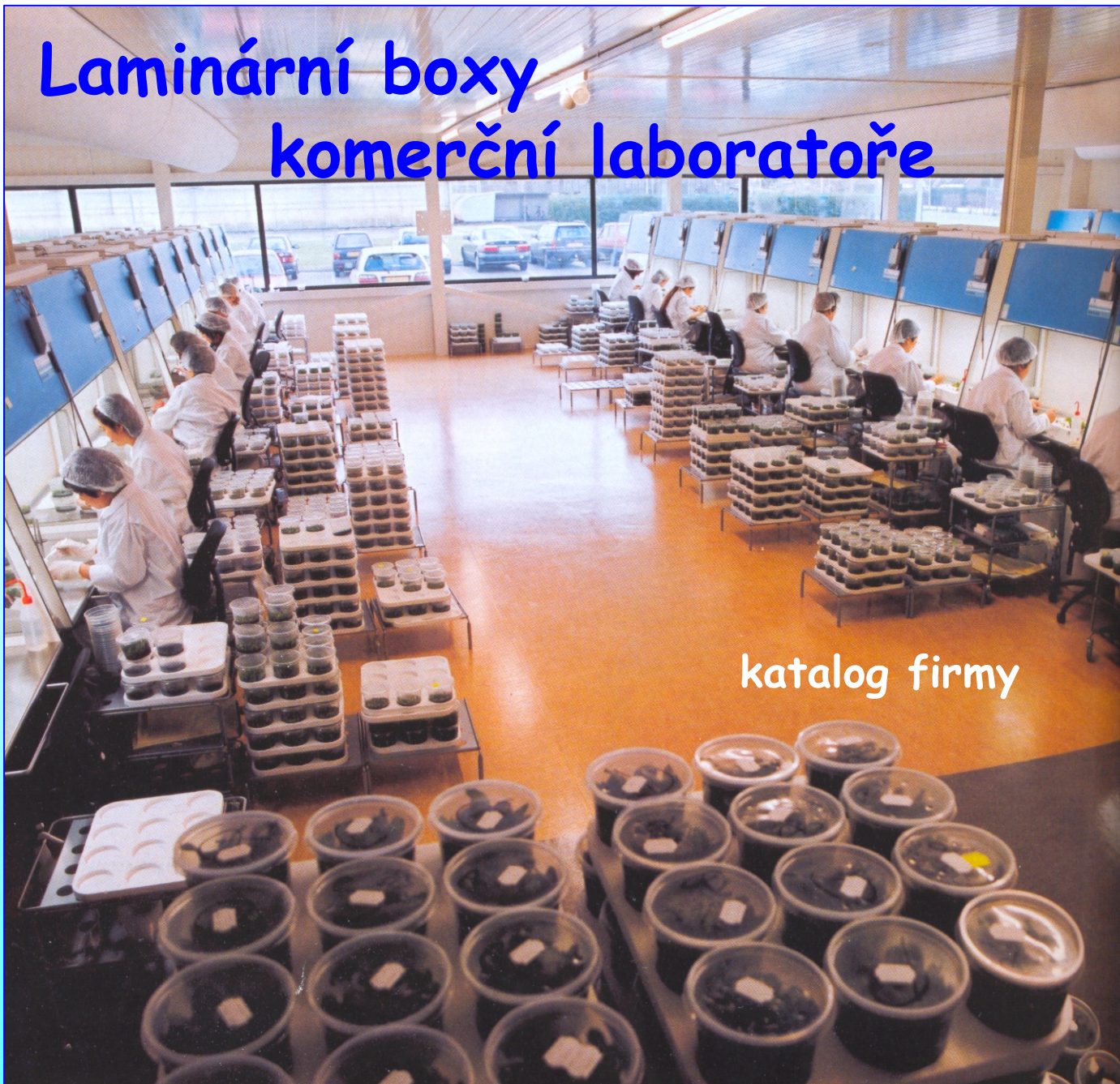
Komerční laboratoře ve vybraných zemích Asie (1988)

Země	Počet laboratoří	Produkce (v mil.)
Bhútán	1	0,1 - 0,2
Indie	4	4 - 5
Indonésie	8	3 - 6
Japonsko	30	10
Korea	10	3
Malajsie	8	6 - 8
Nepál	1	0,1 - 0,5
Filipíny	2	0,5 - 1,0
Singapur	4	3 - 4
Srí Lanka	1	2 - 4
Thajsko	18	35
Celkem	105	65 - 86

Produkcje sazenic *in vitro* (x 1000) Firma Miyoshi (Japonsko)



Laminární boxy komerční laboratoře



katalog firmy

Kultivace - komerční laboratoře



katalog firmy

Hlavní skupiny rostlin produkované *in vitro* v Asii (1987 - 88)

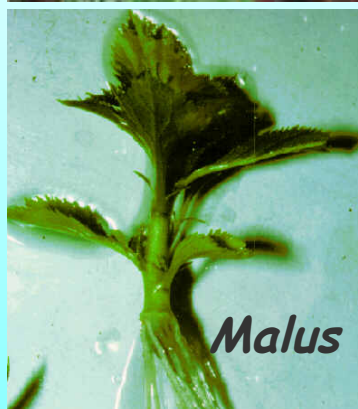
Druh	Počet v mil.	%	Prognóza
ozdobné listem	7	9	mírný nárůst
orchideje	44	60	stagnace
tropické květy	0	0	mírný nárůst
květy mírného pásma	13	17	mírný nárůst
ovoce	5	8	výrazný nárůst
koření	1	1	mírný nárůst
plodiny plantáží	4	5	mírný nárůst
lesnictví	0	0	střední nárůst
celkem	74	100	

Produkce rostlin *in vitro* (mil.) kategorie

- **Hrnkové rostliny (92,3)**
 1. Nizozemí (26,7)
 2. Francie (22,6)
 3. Belgie (16,6)
- **Řezané květy (37,8)**
 1. Nizozemí (18,2)
 2. Francie (10,1)
 3. Itálie (4,9)
- **Ovocné stromy (19,4)**
 1. Itálie (14,6)
 2. Španělsko (1,9)
 3. Francie (1,7)
- **Okrasné cibuloviny (13,2)**
 1. Nizozemí (13,0)
 2. Itálie (0,2)
 3. Finsko (0,01)



Alocasia sanderiana var. *nobilis* pochází z Filipín, kde je údajně vyhubená nebo velmi vzácná



Malus



Calathea



Crinum lugardiae