

# Rostlinné explantáty (kultury *in vitro*)

úvod pro cvičení  
z fyziologie rostlin

Oddělení fyziologie a anatomie rostlin  
Laboratoř rostlinných explantátů a anatomie rostlin  
Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity

**Bi6120** <http://www.sci.muni.cz/explantaty/>

# Příklady kultur



*Cyclamen*

*Malus*

*Lilium*

# Rostlinné explantáty

- zpočátku obor rostlinné fyziologie odlišující se svou vlastní **metodologií**
- později četné aplikace v **genetice a šlechtitelství**
- v současnosti jsou základnou rostlinných **biotechnologií**
- mají využití v **molekulární biologii** - množení rostlin, transformace, selekce...

používají k regulaci procesů fytohormony a růstové regulátory

# Co to jsou fytohormony?

rostlinný hormon = fytohormon

organická sloučenina **syntetizovaná** v jedné části rostliny, zpravidla **translokovaná** do jiné části, kde ve **velmi malé koncentraci** způsobuje fyziologickou odpověď

(Salisbury a Ross 1985)

mohou mít účinky **stimulující**, ale i **inhibující**

# Co to jsou růstové regulátory?

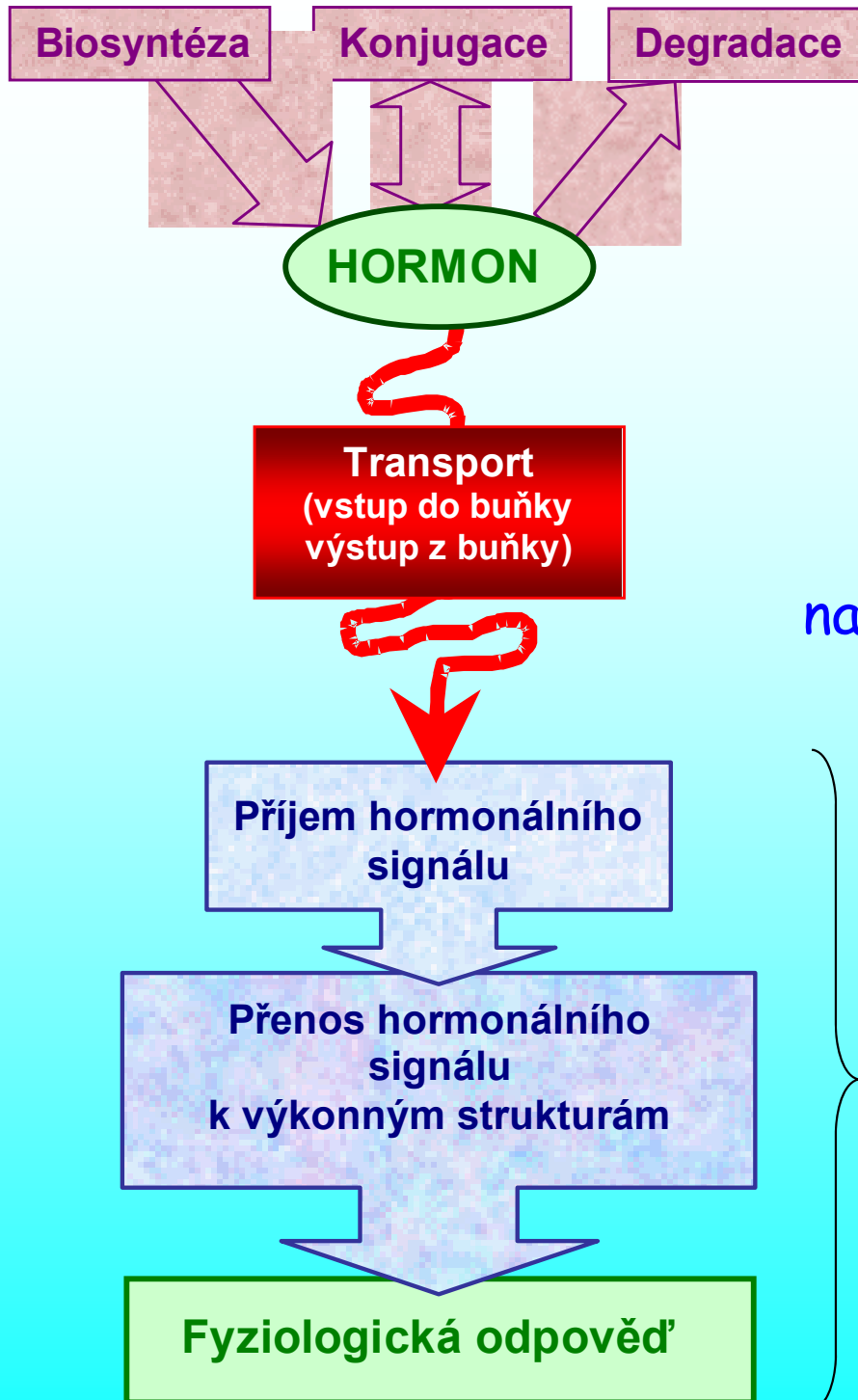
organické sloučeniny **syntetizované chemicky**, které mohou být rostlinnými buňkami přijímány, transportovány a způsobují podobnou fyziologickou odpověď jako fytohormony.

# 5 skupin „klasických“ fytohormonů

- |                      |         |
|----------------------|---------|
| • auxiny             | 4       |
| • cytokininy         | několik |
| • gibereliny         | mnoho   |
| • kyselina abscisová | 1       |
| • etylén             | 1       |

## netradiční fytohormony

- kyselina jasmonová
- brassinosteroidy
- polyaminy
- oligosachariny
- oligopeptidy
- fenolické látky
- strigolaktony, butenolidy...



metabolismus

transport

na dlouhou či krátkou vzdálenost

příjem a přenos  
hormonem neseného signálu

# Definice termínů

- explantát je každý fragment živého pletiva, celý orgán nebo soubor orgánů, který je vytržen z korelačních vztahů celku a je pěstován v umělých podmínkách (Bauer 1939)
- 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



# Olomouc 1984



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

**T. Murashige**

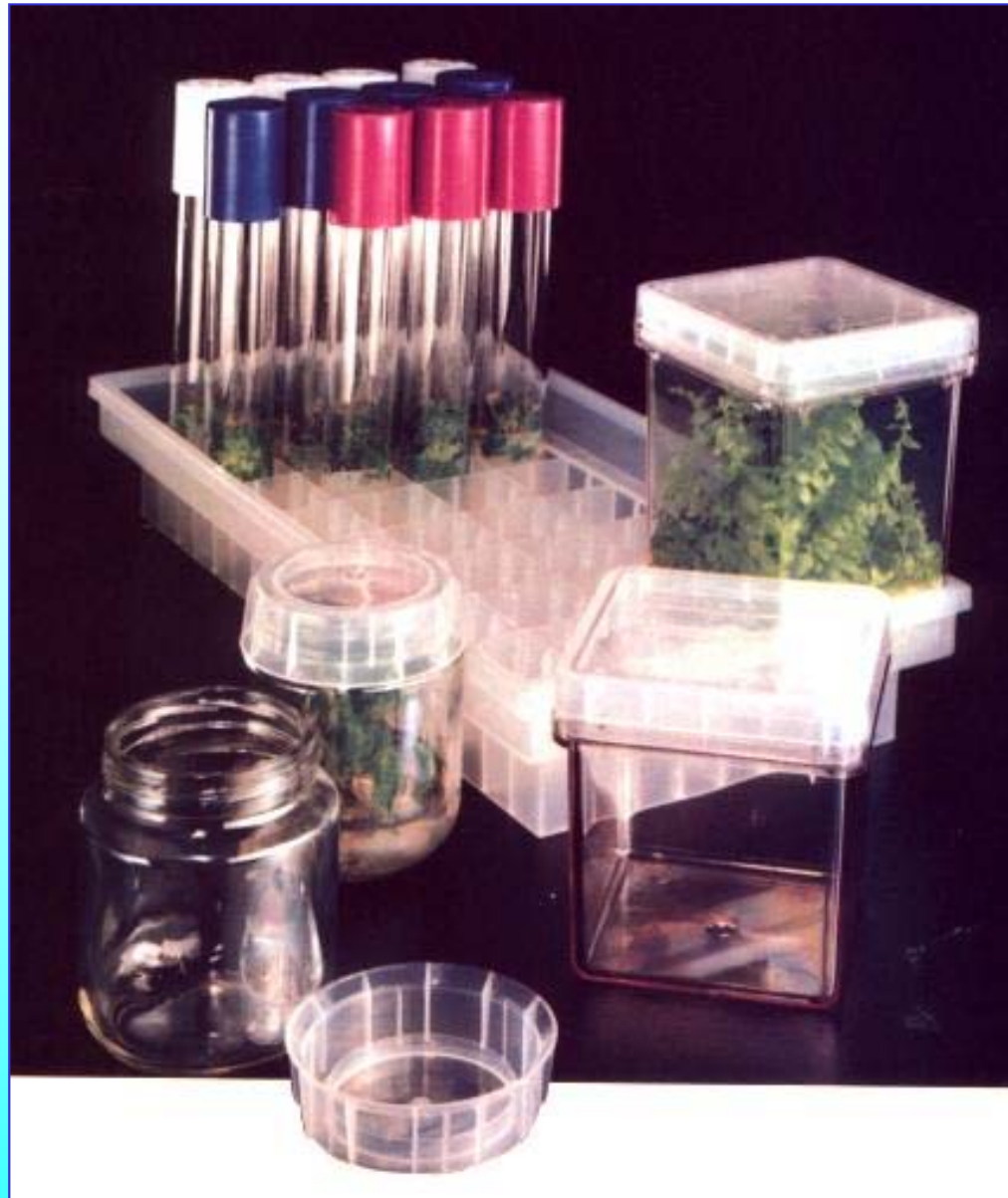
**Z. Sladký**

Foto: M. Griga

# 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

**Kultivační nádoby  
sklo  
nověji i plasty**



**zkumavky, zavařovací lahve, Magenta boxy**

# Sterilizace a desinfekce

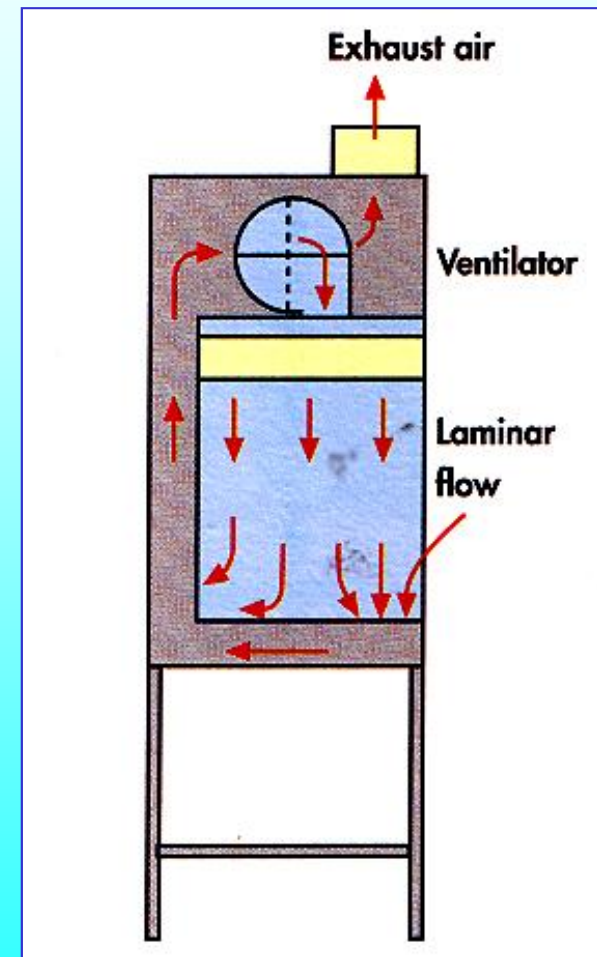
## A. Fyzikální

- 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  
GELAIRE
- vertikální - UNIFLOW  
GELAIRE



# Složení živných médií I.

- **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** nebo **čisté**

inositol

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

aktivní uhlí

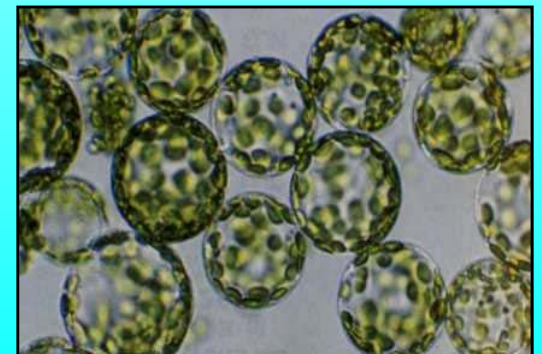
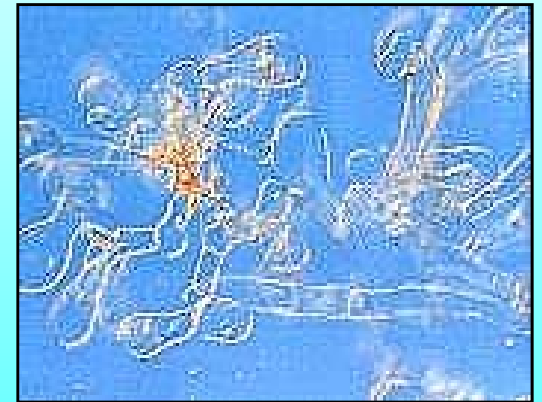
přírodní látky: **kokosové mléko, rostl. šťávy...**

# Složení živných médií II.

- Zdroj organického uhlíku = sacharidy  
mono- a disacharidy (sacharóza)
- Růstové regulátory
  - auxiny
  - cytokininy
  - gibereliny
  - kys. abscisová
- Ztužování médií - agar, Gelrite

# Úrovně organizace explantátu

- **rostlina** ( semenáček, embryo)
- **orgán** (kořen, list, řapík, pupen)
- **pletivo** (dřeňový parenchym, endosperm, kambium - „tkáňové kultury“)
- **buňka** (mikrospory, pyl. zrna, suspenze)
- izolovaný **protoplast**





# Indukce tvorby adventivních kořenů auxinem



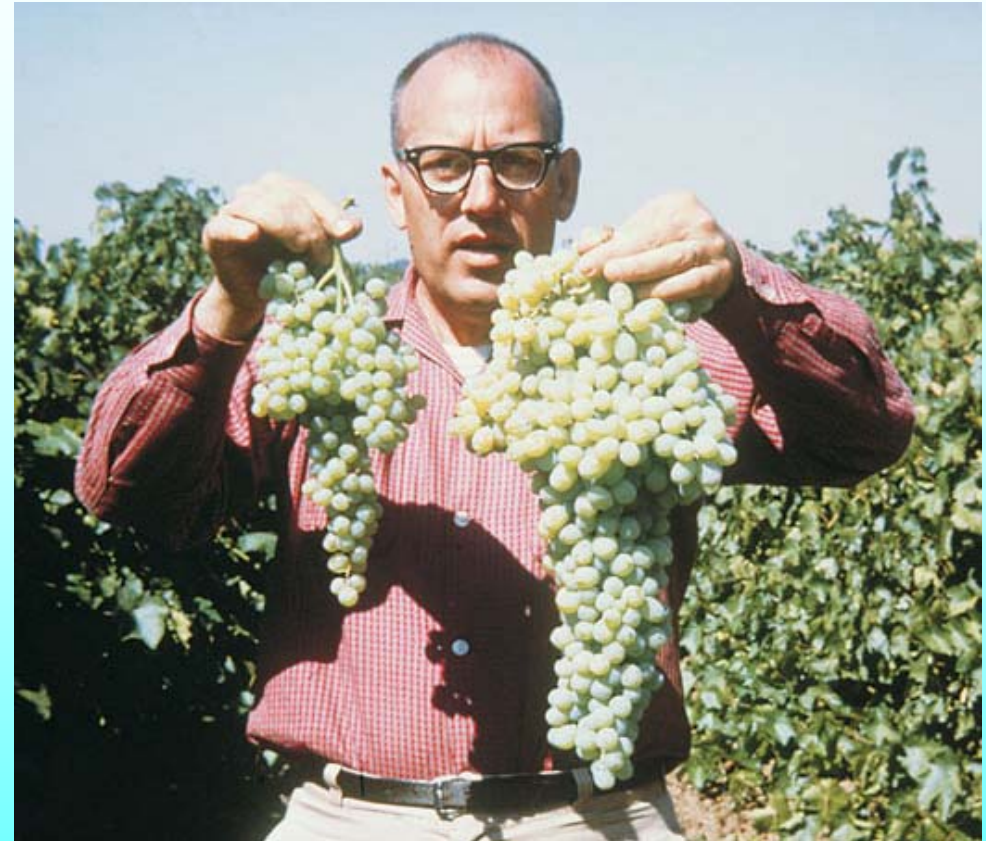
vliv **IBA**

**kontrola** bez IBA

zakořeňování řízků kopřivěnky (*Coleus*)

# Praktické využití giberelinů

- $GA_3$  - indukce růstu bobulí bezsemenných hroznů - odrůda Thompson
- $GA_4$  - redukce střídavé plodnosti u jabloní a hrušní
- $GA_3$  - u citrusů - synchronizace dozrávání plodů



kontrola

ošetřeno  $GA_3$   
během vývoje plodů

# Typy regeneračních procesů (Němec 1905)

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

**reprodukce** = regenerace z již existujících základů

**regenerace de novo** = odvozování  
nejčastěji přes kalus, v něm  
diferenciace adventivních pupenů  
nebo embryí

→ organogeneze

→ somatická embryogeneze

# Apikální stonkový meristém

listová primordia

izolovaný „meristém“



vlastní meristém

# Růst izolovaného meristému karafiátu

médium  
bez RR



# Vliv nadprodukce endogenních cytokininů

transgenní tabák s aktivním *ipt* genem z *Agrobacterium tumefaciens*

velká  
nadprodukce  
endogenních  
cytokininů



potlačení  
apikální  
dominance



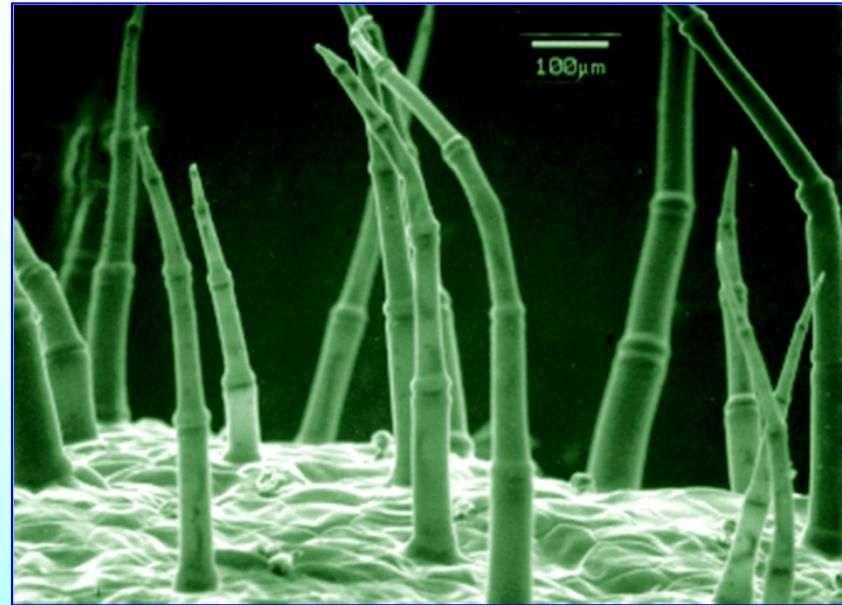
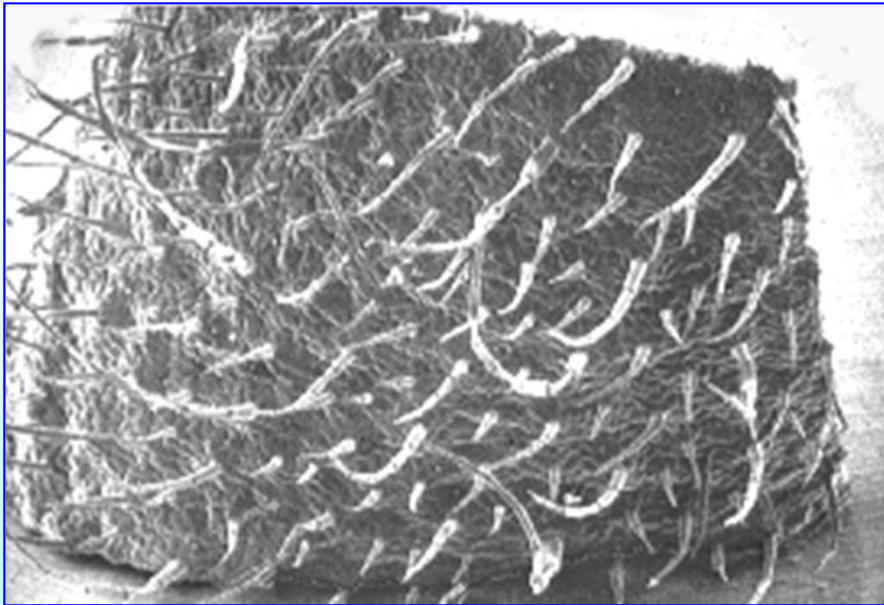
teratomy neschopné tvorby kořenů,  
květů a semen

# 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)

# Stadia mikropropagace *Saintpaulia ionantha* Wendl.

I.



II.



organogeneze

III.





# Přímá somatická embryogeneze

na listu africké fialky



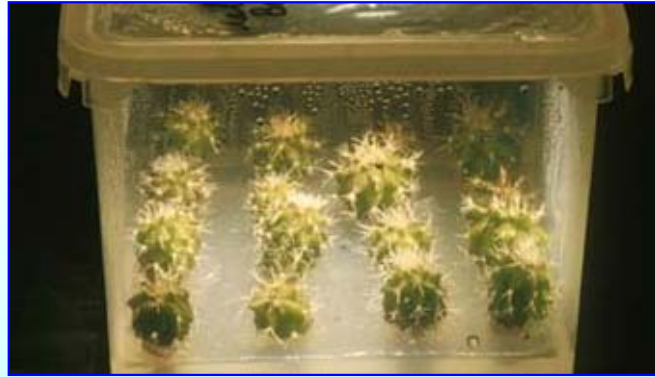
auxin NAA  
cytokinin BA

# Aklimatizace regenerantů africké fialky *Saintpaulia ionantha* Wendl.



# Mikropropagace

sukulenty



*Drosera*



*Dionea*

masožravé rostliny

# Mikropropagace okrasných rostlin i dřevin

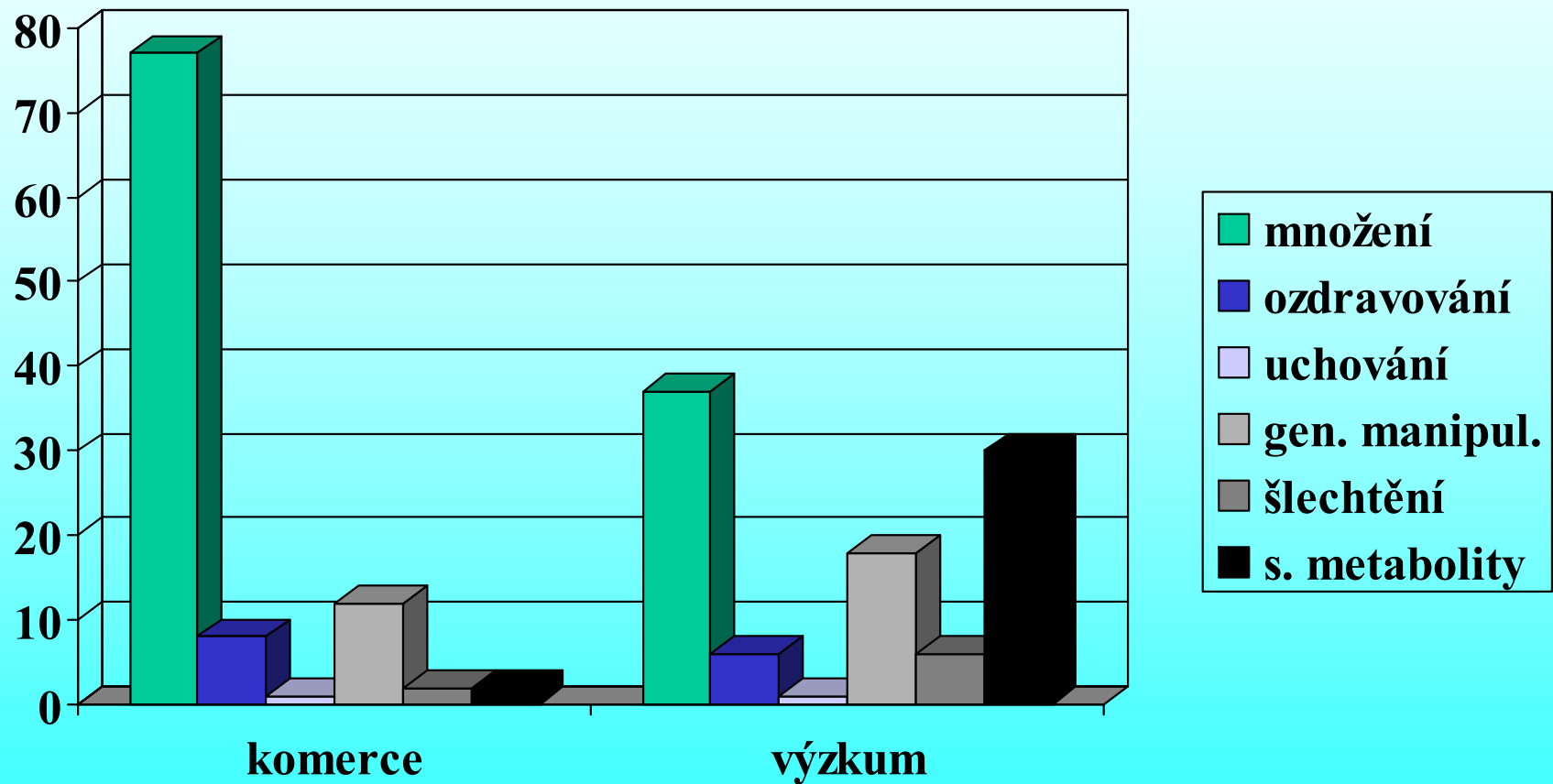


mikropropagace *Lilium*



mikropropagace  
*Malus*

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



Jan Holub, Olomouc  
<http://www.volny.cz/in-vitro/my.html>



mikropropagace  
rododendronů a  
jiných okrasných  
rostlin

aklimatizace  
regenerantů

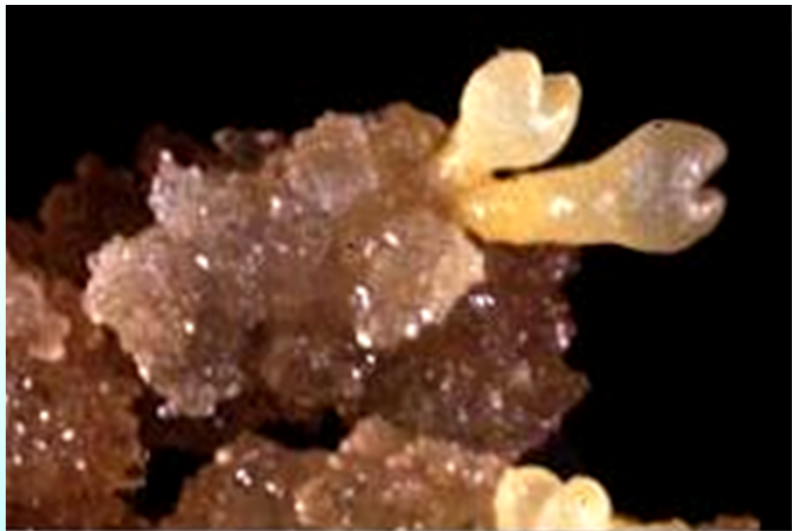


# Nepřímá somatická embryogeneze

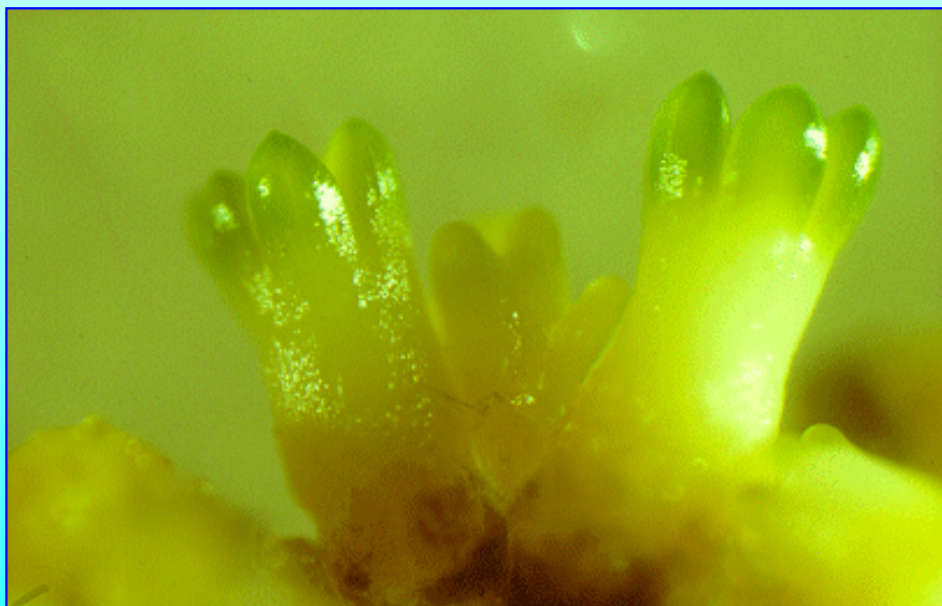
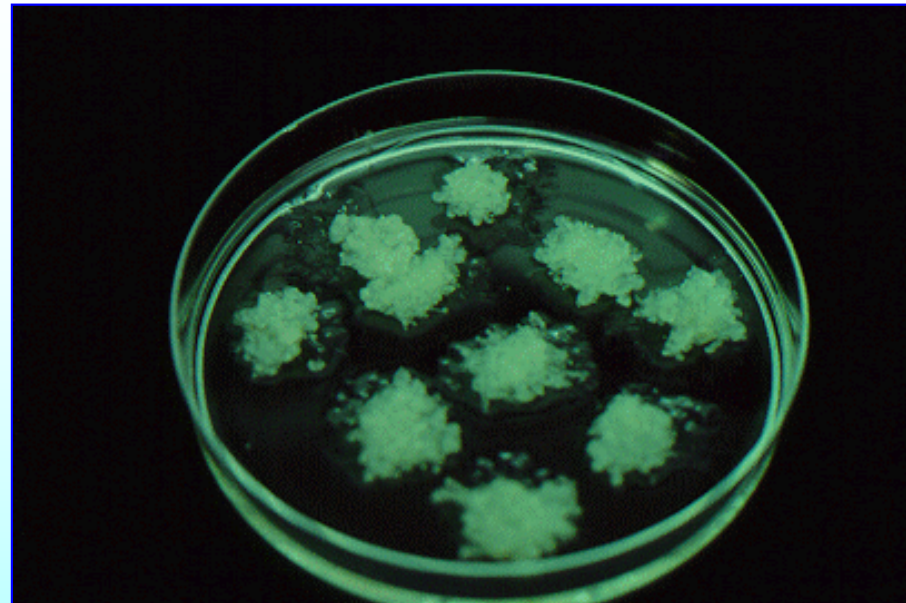


somatická embrya *Aesculus hippocastaneum*  
odvozená na kalusu z květenství

# Somatic embryogenesis in trees



*Hevea brasiliensis*



spruce ( *Picea sitchensis* ) (Foto: P. Krogstrup)



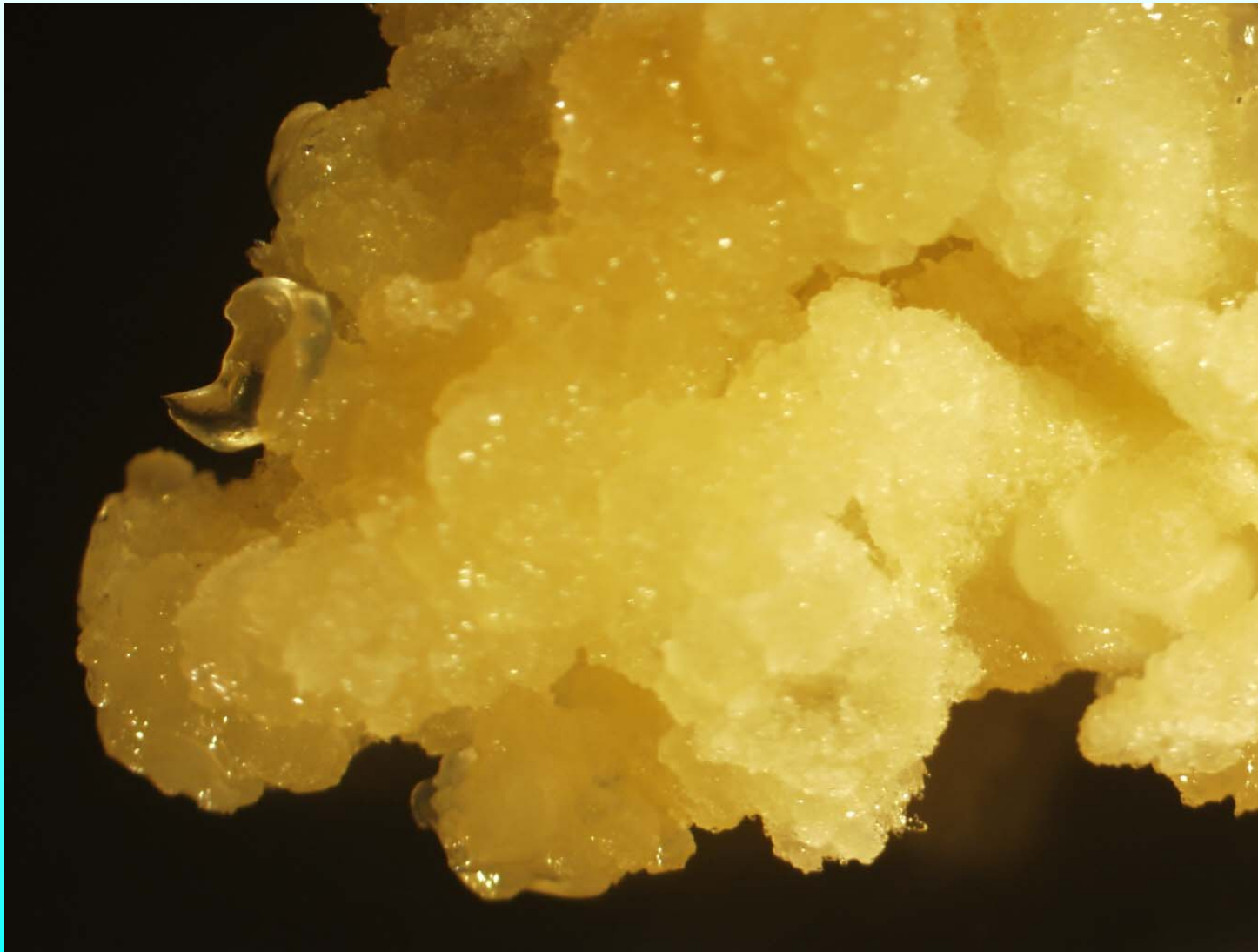
# Kalusy na segmentu kořene mrkve

auxin  
2,4-D



*regenerace de novo*

# Somatic embryogenesis on the hypocotyl of *Inu*



auxin  
2,4-D

# Nepřímá somatická embryogeneze

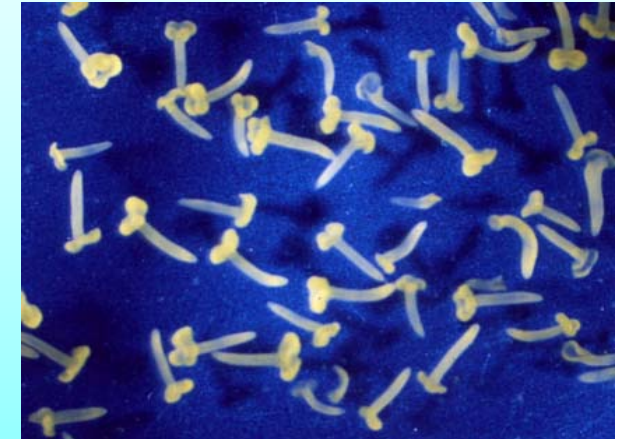
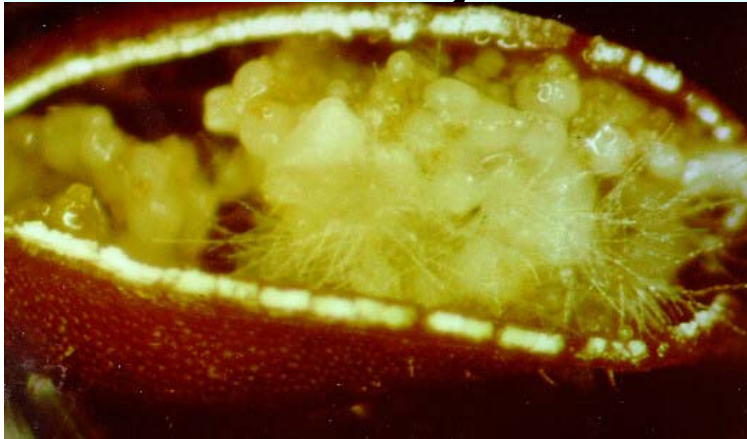
na kalusu Inu  
- indukce auxinem 2,4-D



# Manipulace se stupněm ploidie umožňují:

A. Prašниковé či mikrosporové kultury (androgeneze) nebo kultury neoplozených vajíček (gynogeneze)

1. regenerace **haploidních** rostlin



2. **zdvojení** haploidního genomu = dihaploidizace



**získání homozygotního materiálu v kratší době**

B. Regenerace *de novo* - možné změny počtu chromosomů

# Použití kultur izolovaných embryí

- překonání dormance semen
- překonání aborce embryí („embryo rescue“)

mezidruhové hybridy: bavlník, ječmen, rýže, juta

mezirodové hybridy: *Hordeum x Secale*, *Triticum x Secale*, *Hordeum x Hordelymus*, *Tripsacum x Zea*

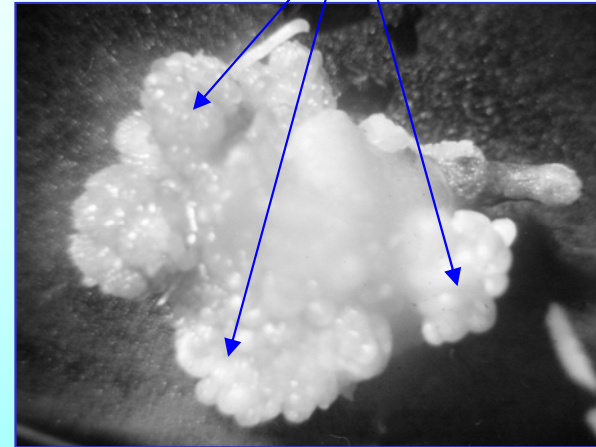
- studie experimentální embryogeneze
- zdroj mladého materiálu pro mikropropagaci

# Indukce adventivních pupenů na izolovaných embryích konifer

adventivní pupeny na hypokotylu

smrk

14 DC  
médium s  
cytokininem  
BA



modřín



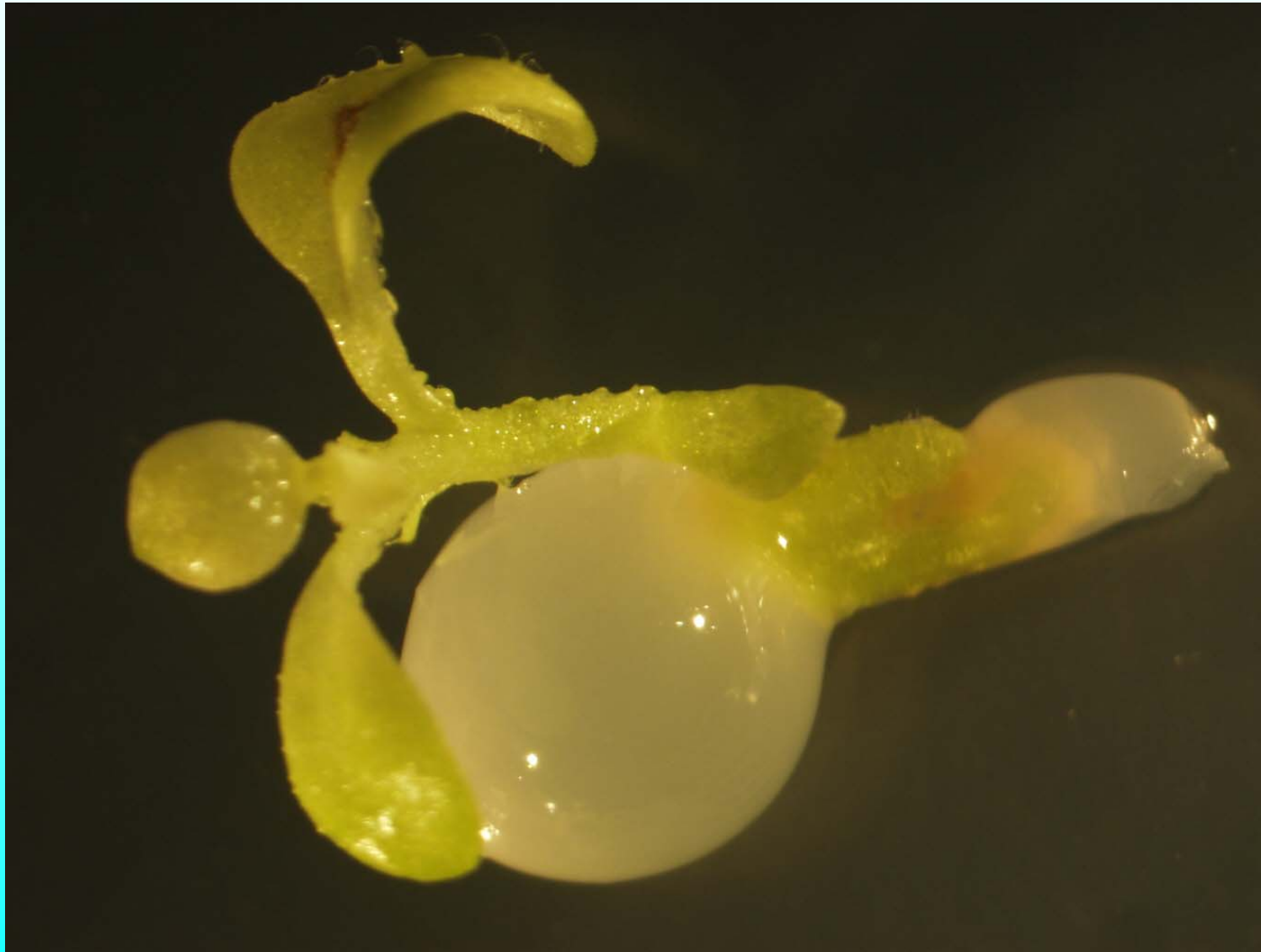
smrk

adventivní prýty

# Praktické využití explantátů

- 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
- získávání sekundárních metabolitů
- transgenoze

# Rostoucí prýt z izolovaného meristému bramboru enkapsulovaného v alginátu





# Zajímavé odkazy

**přehledné a názorné výukové stránky**

<http://allserv.rug.ac.be/~pdebergh/ind/content.htm>

**Jak začít s tkáňovými kulturami?:**

<http://www.jmu.edu/biology/pctc/tcstart.htm>

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

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

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

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

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

<http://www.geocities.com/RainForest/2011/MicropropSHF.html>

**informace o moderních biotechnologiích a GMO**

<http://www.biotrin.cz/>

# Doporučená literatura

- **DROBNÍK J. a 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.** (1992): *Genové inženýrství kulturních rostlin.*- Academia, Praha.
- **ONDŘEJ M. a Drobník J.**(2002): *Transgenoze rostlin.* - Academia, Praha.

# Doporučená literatura

- **GAMBORG O.L. a 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. a 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. a kol.** (1987): Explantátové techniky (pro biotechnology a šlechtitele). - Praha (Skriptum VŠZ Praha).
- **ŠEBÁNEK J. a SLADKÝ Z.** (1988): Biotechnologie rostlinných explantátů. - Brno (Skriptum VŠZ). (nyní MZLU)