

# ROSTLINNÉ EXPLANTÁTY (KULTURY *IN VITRO*)

## ÚVOD

HANA CEMPÍRKOVÁ

ÚSTAV EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE  
ODDĚLENÍ FYZIOLOGIE A ANATOMIE ROSTLIN  
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA, MASARYKOVA UNIVERZITA

## 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

# Příklad septické kultury



z katalogu firmy Duchefa

**houbová infekce v kultuře**

# Příklady infikovaných kultur

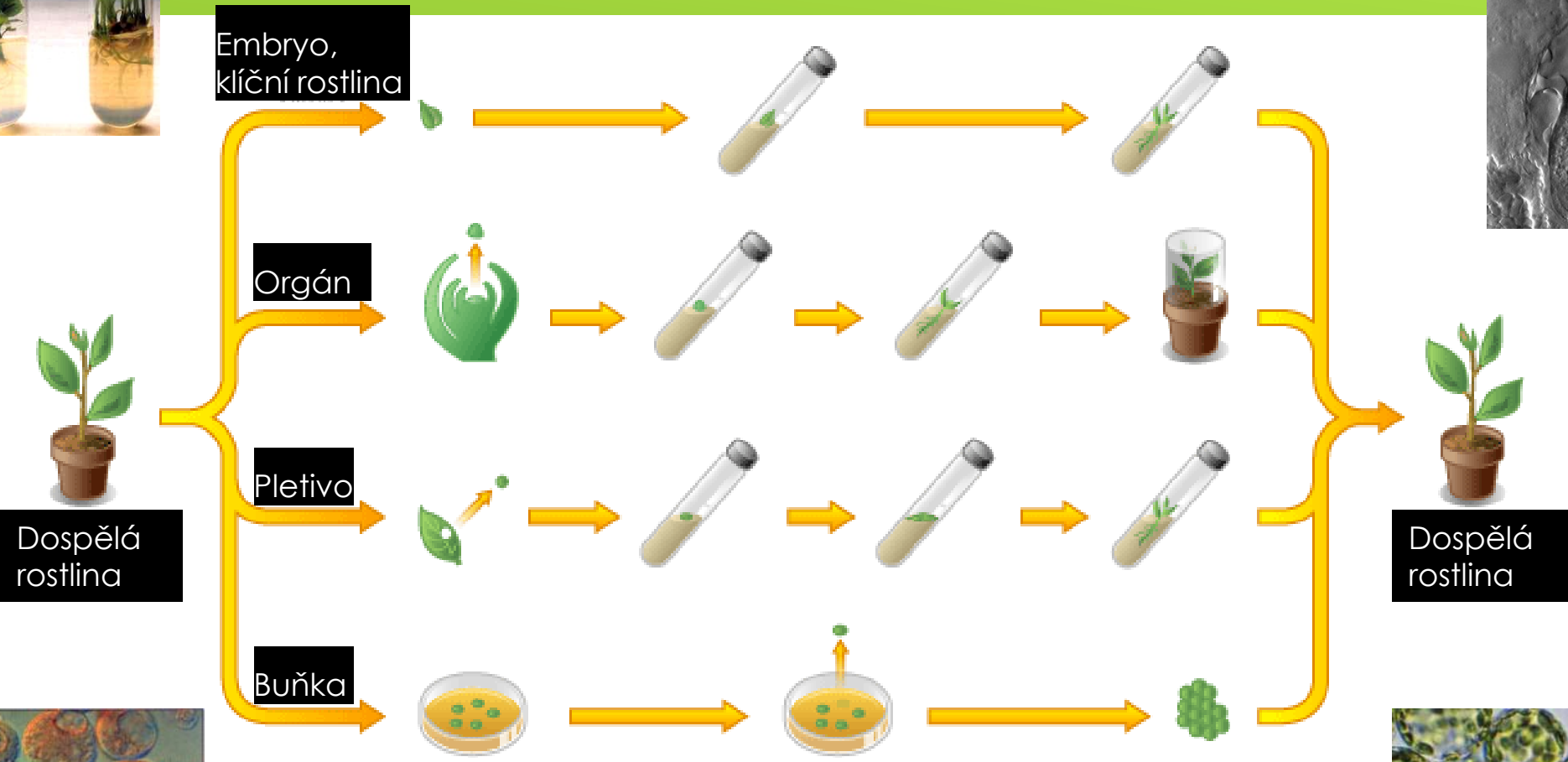
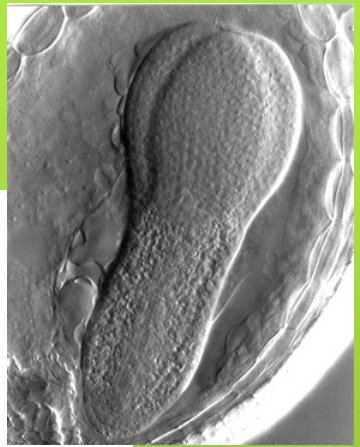


kultura infikovaná kvasinkami a bakteriemi

kultury infikované houbami

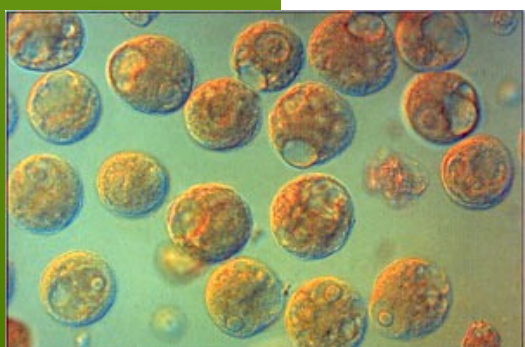


# Úrovně organizace explantátu

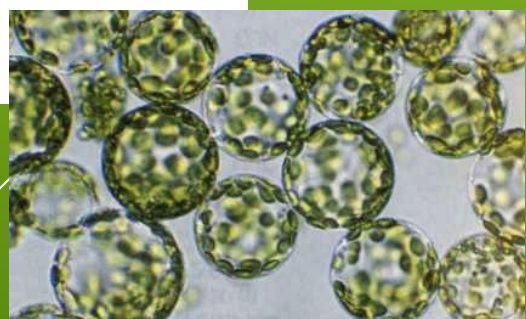


Dospělá rostlina

Dospělá rostlina



Buňka: mikrospory, pylová zrna, buněčné suspenze  
Izolovaný protoplast



# Příklady různých typů kultur



kalusová kultura



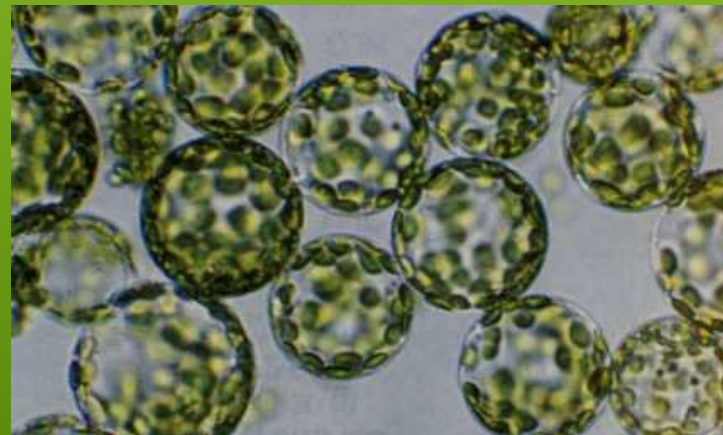
kultura prýtů



prašnicková kultura tabáku



suspenze buněk vojtěšky



roslinné protoplasty mezofylu tabáku



# Kultivační nádoby pro kultury *in vitro* (sklo i plasty)

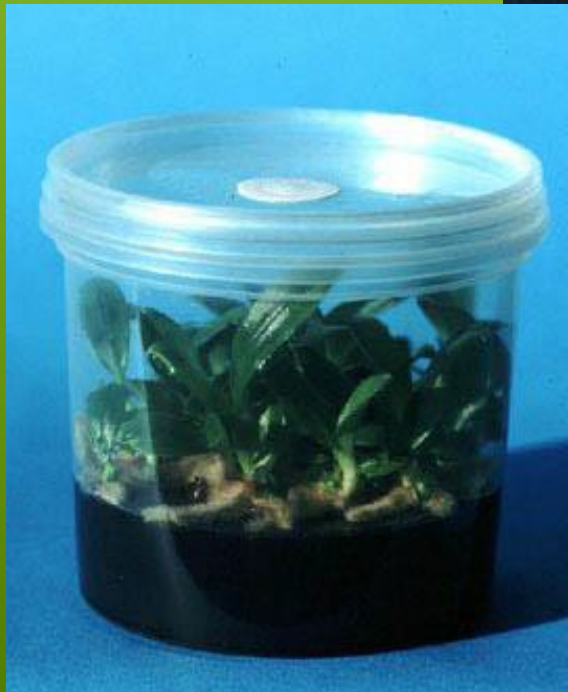
média ztužená



zkumavky, Petriho misky, Erlenmayerovy baňky,  
zavařovací lahve, Magenta boxy



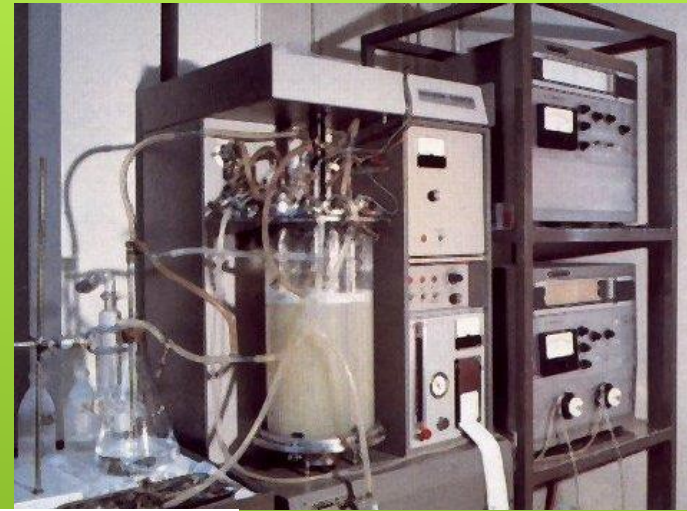
## Kultivační nádoby pro kultury *in vitro* (plasty)



# Suspenzní kultury

média tekutá

(nutné zajištění provzdušňování)



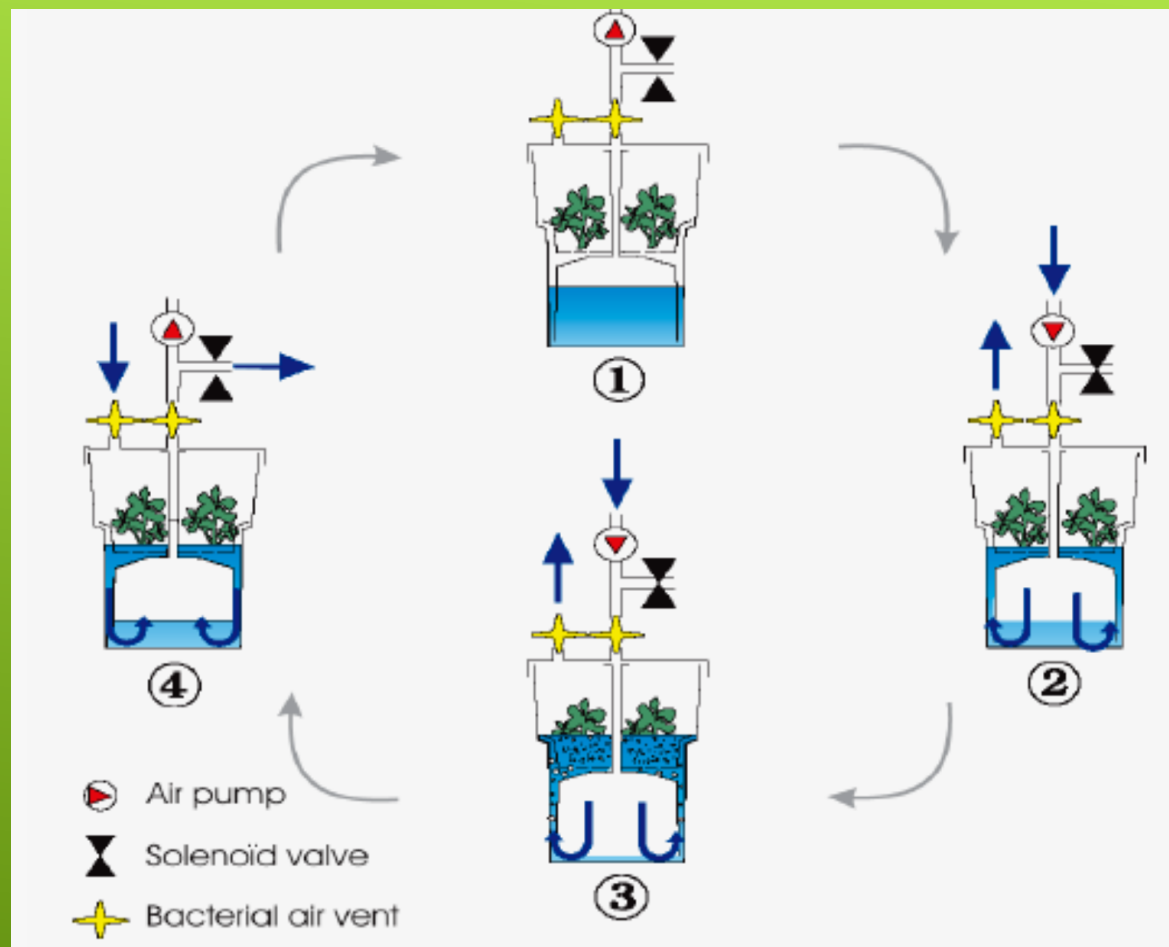
laboratorní třepačka



laboratorní bioreaktor

# System Rita® dočasně zaplavované kultury

technická modifikace pro  
pěstování explantátů v tekutém  
médiu



[www.vitropic.fr](http://www.vitropic.fr)




# Rostlinné explantáty

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

Totipotence = schopnost jedné buňky dát vznik všem typům buněk  
Pluripotence = schopnost dělení kmenové buňky a její schopnost diferenciac

# Využití explantátů

## A. Získání teoretických poznatků

- buněčné dělení
  - totipotence rostlinné buňky
  - diferenciací 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



## Zajímavé adresy:

<http://users.ugent.be/~pdebergh/ind/content.htm>

- Univerzita Karlova (Praha):  
<https://sites.google.com/a/natur.cuni.cz/lab007/>
- ČZU, Fakulta tropického zemědělství (Praha): <https://www.ftz.czu.cz/en/r-9419-departments/r-10236-laboratories/r-10239-laboratory-of-plant-tissue-cultures>
- Univerzita Palackého (Olomouc): <http://www.rustreg.upol.cz/o-nas/>
- Laboratoř tkáňových kultur rostlin na MENDELU: Agronomická fakulta (Brno), Zahradnická fakulta (Lednice), Botanická zahrada a arboretum (Brno: <https://web2.mendelu.cz/arboretum/>)
  - <https://ucb.af.mendelu.cz/veda-a-vyzkum/vyzkumna-skupina-nanobiotech-rostlin-a-mikroras/laborator-rostlin/>
- Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod

# Historický přehled počátky kultur



# Gottlieb Haberlandt

\* 1854 Altenburg (Mosonmagyaróvár)

† 1945 Berlín

☐ považovaný za otce kultur rostlinných explantátů

Kultivoval explantáty:

- parenchym listů
- dřev stonku
- svěrací buňky průduchů
- trichomy *Tradescantia*

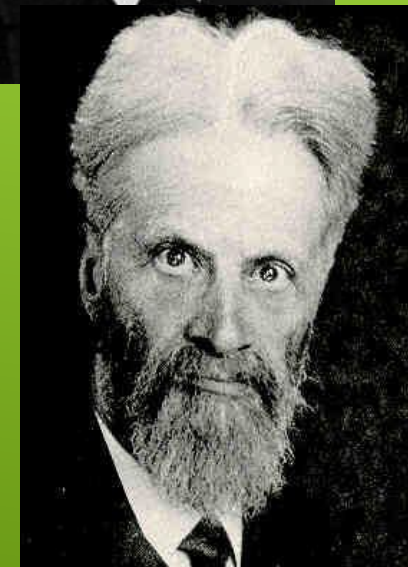
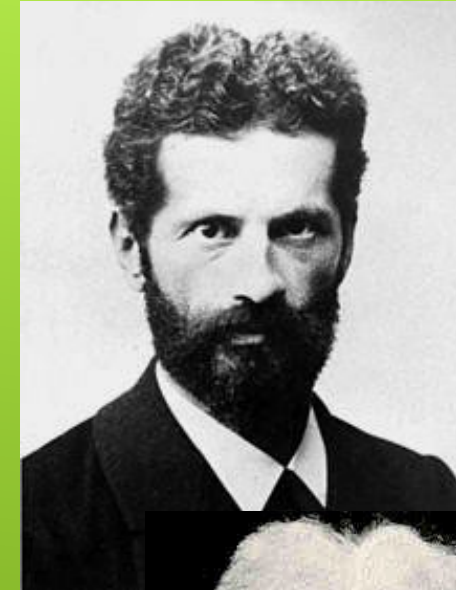
ale i sběratel prvních zklamání

- neznalost výživy (Knoppův roztok, sacharóza, asparagin a pepton) 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*)

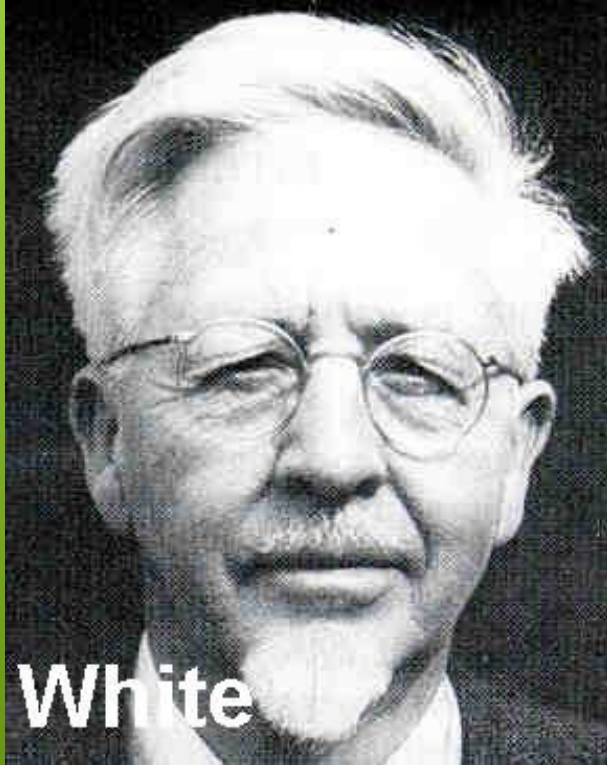
## „Totipotence“ rostlinné buňky

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

dnes se doporučuje termín totipotence nepoužívat  
nahradit jeho význam termínem **pluripotence**

# První pravé „tkáňové kultury“



americký rostlinný fyziolog **Philip Robert White** (1901 –1968)

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

- cukry
- **vitamíny -B1, B6, kyselina nikotinová**
- glycin
- meristém kořenové špičky

produkce fytohormonů

## Kalusové kultury

1938 **P. Nobécourt** - kalus tabáku

1938 **White** – kalus tabáku (*N. glauca* x *N. langsdorfii*)

1939 **R. J. Gautheret** - kalus vrby



## 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



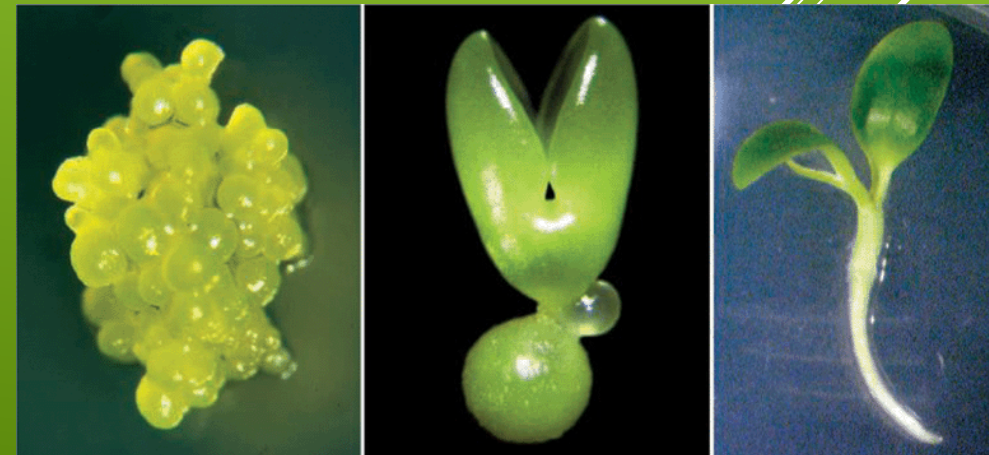
# Suspenzní kultury

1958 – **Steward a Reinert** - tekuté médium, třepané kultury buněk a buněčných shluků

→ kalusy i regenerace rostlin

## Somatická embryogeneze

pokusné potvrzení platnosti buněčné teorie **Schleidena** (1838) a **Schwanna** (1839) i **Haberladtovy** teorie o totipotenci somatických buněk



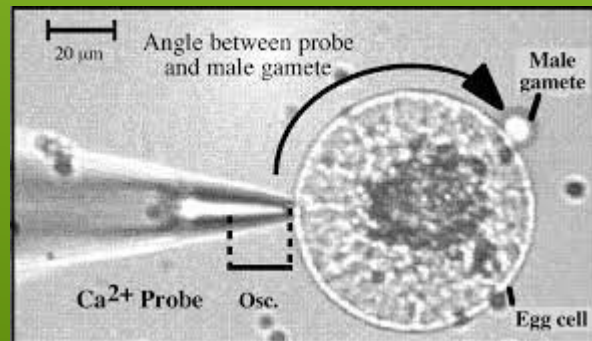


# Opylení a oplození *in vitro*

1960 - indická škola: **Kanta, Maheshwari, Rangaswami**  
různé metody aplikace pylu na explantát

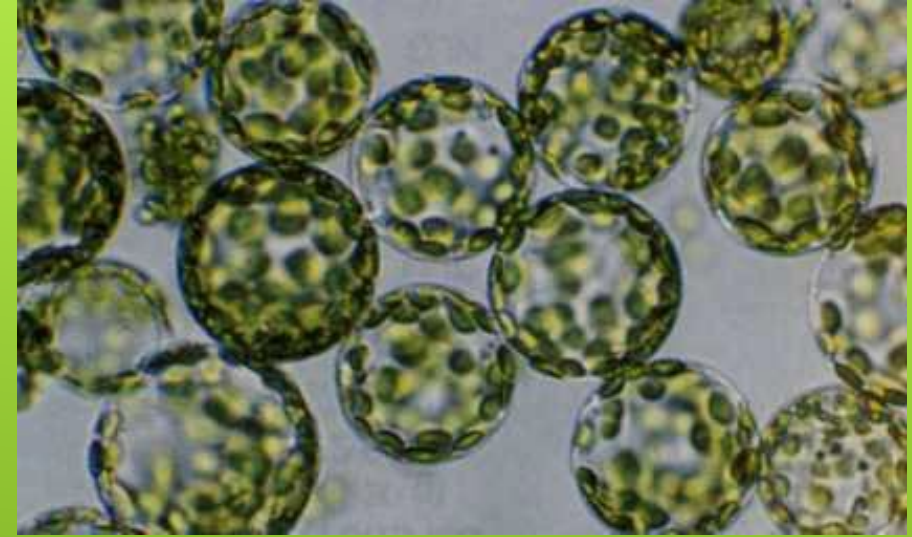
1965 - polská škola: **Zenkteler**

1965 - české pokusy: **Tupý, Balatková (ČSAV Praha), Sladký (MU Brno)**



# Rostlinné protoplasty

1970 - **Takebe a Nagata** - regenerace rostlinek tabáku z izolovaných protoplastů  
- fúze protoplastů - somatická hybridizace = cybridy



Transformace rostlinného genomu

**Marc van Montagu**  
s **Jeffem Schellem**

1974 - důkaz integrace Ti plasmidu do rostlinného genomu  
1984 - přímý přenos DNA do rostlinného protoplastu (mikroinjekce)  
1986 - přímý přenos DNA do rostlinných buněk



**Geneticky modifikované organismy = GMO**

Ti .... Tumor indukující (*Agrobacillus tumefaciens*)

## „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/>

**Užitečné stránky (angl.):**

<https://www.plantcelltechnology.com/blog/>

## 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)