

Bi8670 Principy rostlinných biotechnologií

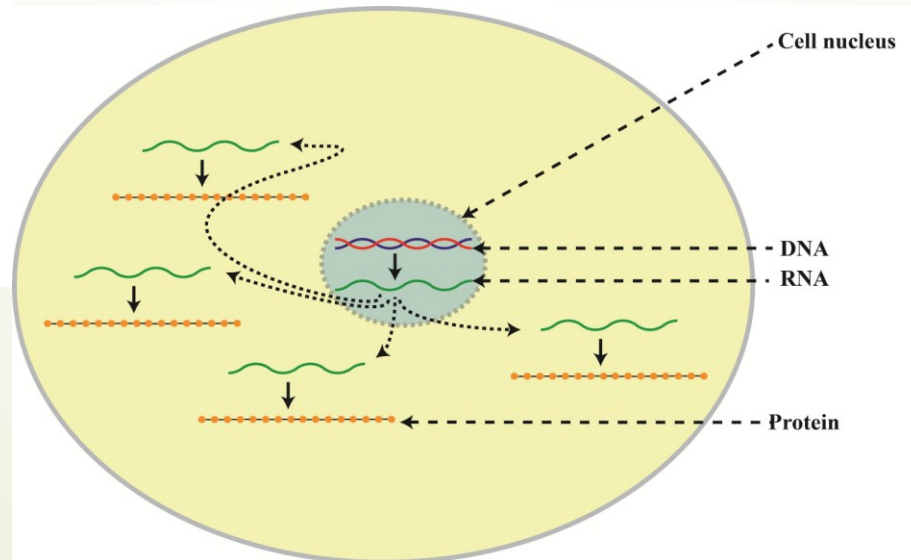
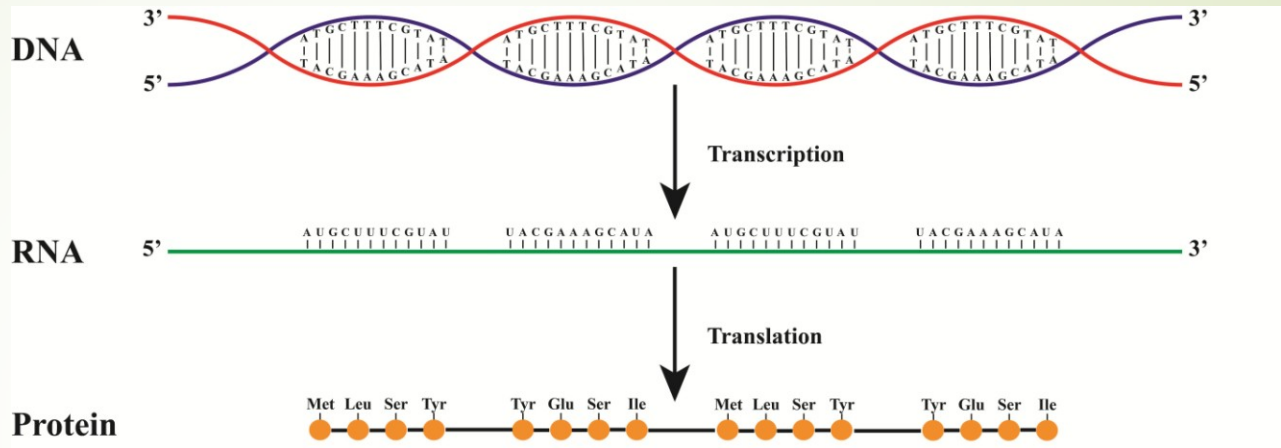
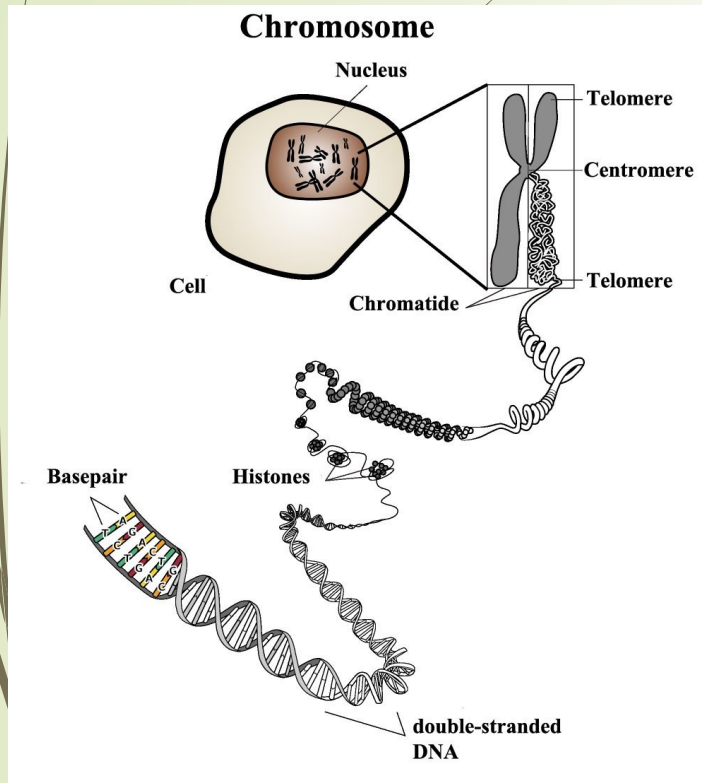
Rostlinný genom

Rostlinné explantáty

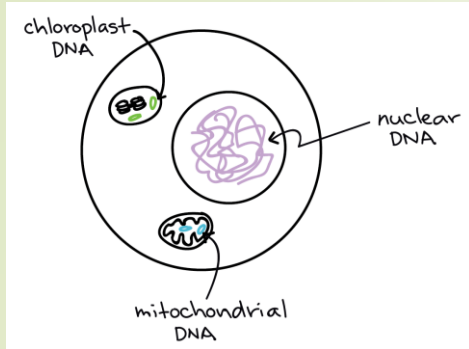
Hana Cempírková, Ph.D.

DNA

<https://science-explained.com/theory/dna-rna-and-protein/>



Chloroplasty a mitochondrie

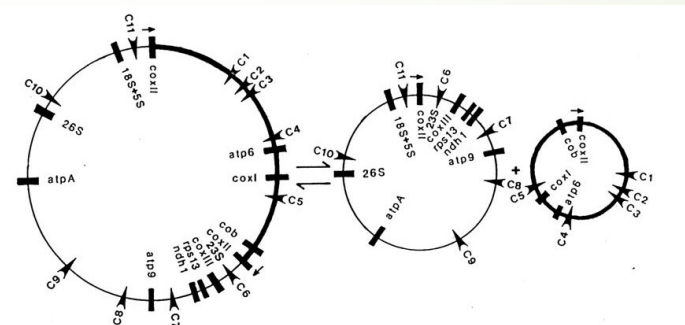
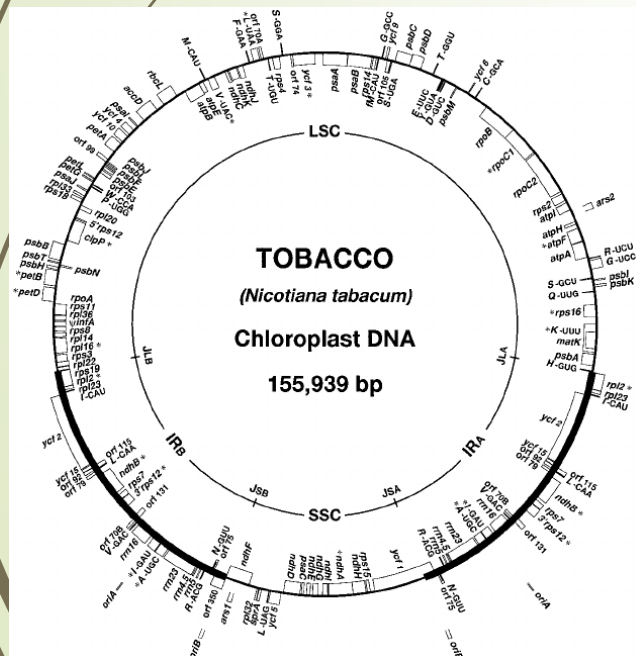


Chloroplasty

- Cirkulární DNA, i další podobnosti s prokaryotickým genomem
- Velikost 120 – 160 kbp, 120 -140 genů; syntéza proteinů a fotosyntéza (ale většina genů pro fotosynt. v jádře)

Mitochondrie

- Struktura proměnlivá, cirkulární, lineární
- Velikost 200 – 2500 kbp (větší než u živočichů), velké části nekódující DNA; syntéza proteinů a respirační řetězec



Charakteristika genů

gen

kódující sekvence (+ repetitivní DNA)

kódující úseky = *exony*

nekódující úseky = *introny*

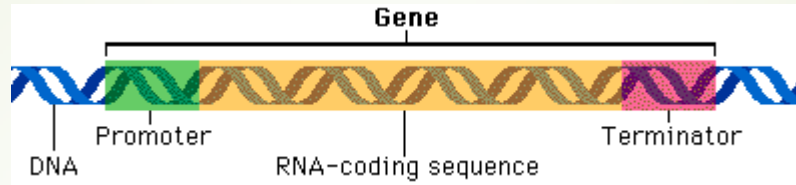
regulační část

promotor

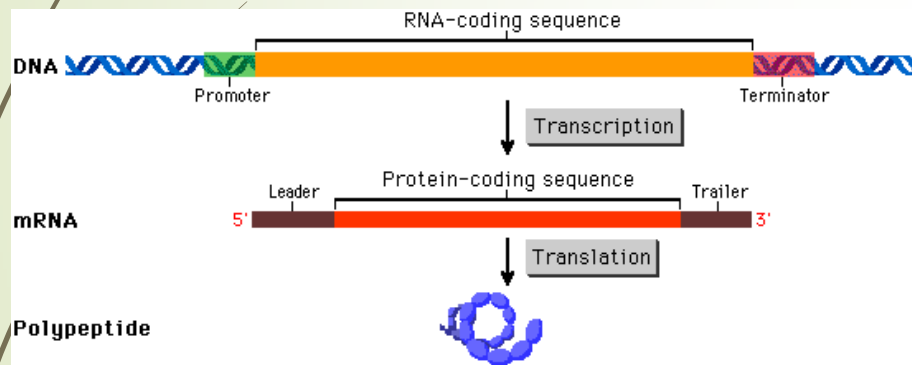
zaváděcí sekvence

terminační sekvence

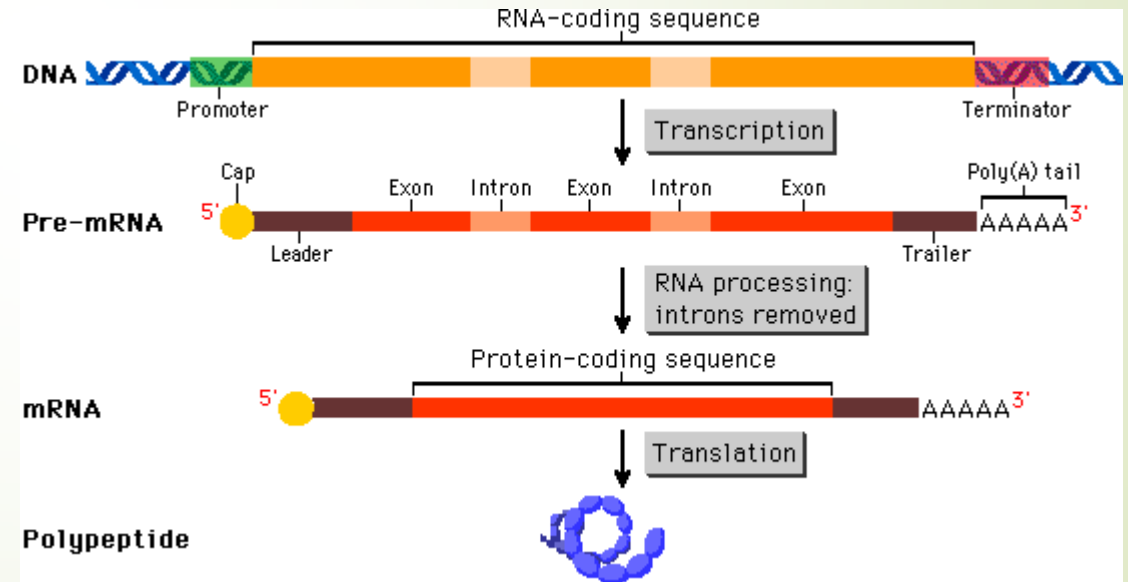
Struktura genu a genová exprese



Prokaryota




Eukaryota



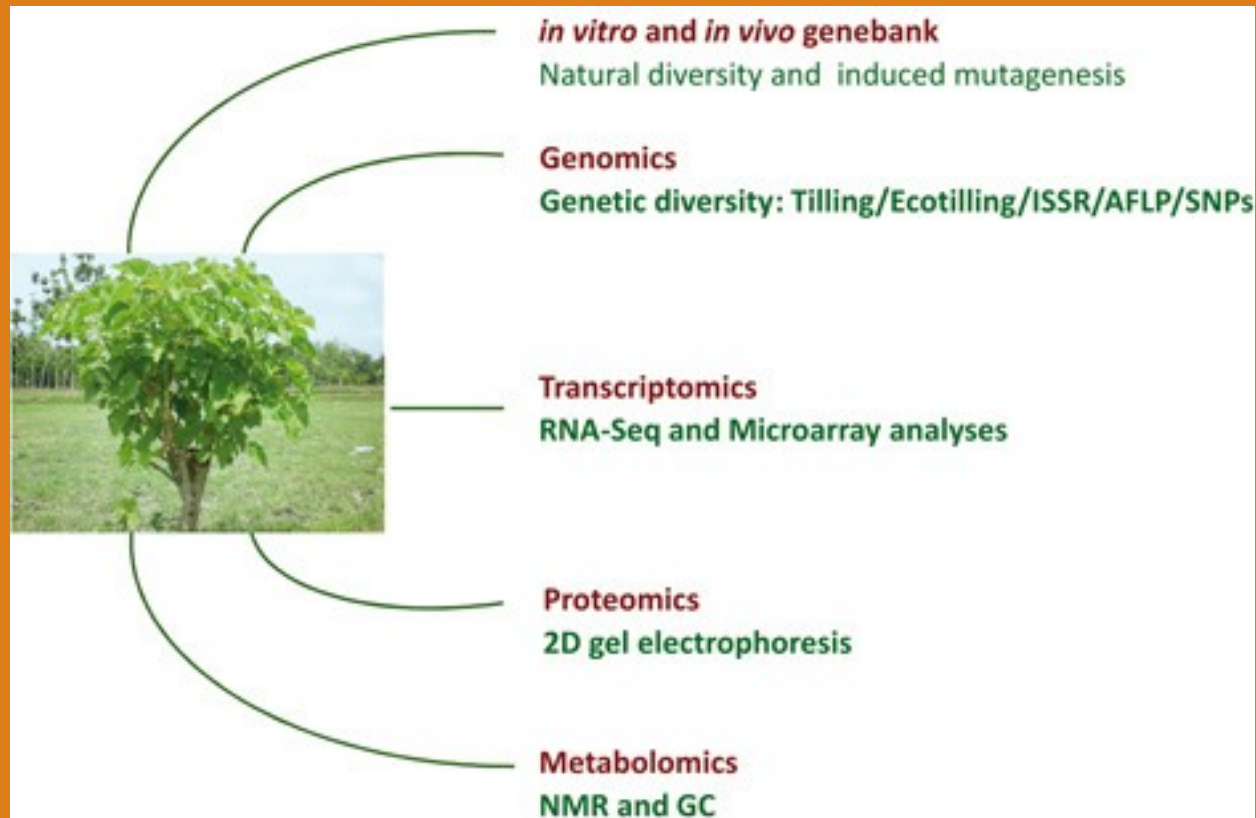




Rostlinný genom, sekvenace

- 2000 - kompletní sekvenace genomu *Arabidopsis thaliana*
 - Od r. 2012 - **1000 Plant Genomes Project** (iniciováno na University of Alberta, Canada)
 - <https://sites.google.com/a/uAlberta.ca/onekp/>
 - 2017 (workshop v China National GeneBank) - rámci **“Earth BioGenome Project (EBP)”** se plánuje sekvenace **10 tis. rostlinných genomů** (<http://www.sciencemag.org/news/2017/07/plant-scientists-plan-massive-effort-sequence-10000-genomes>)
- 

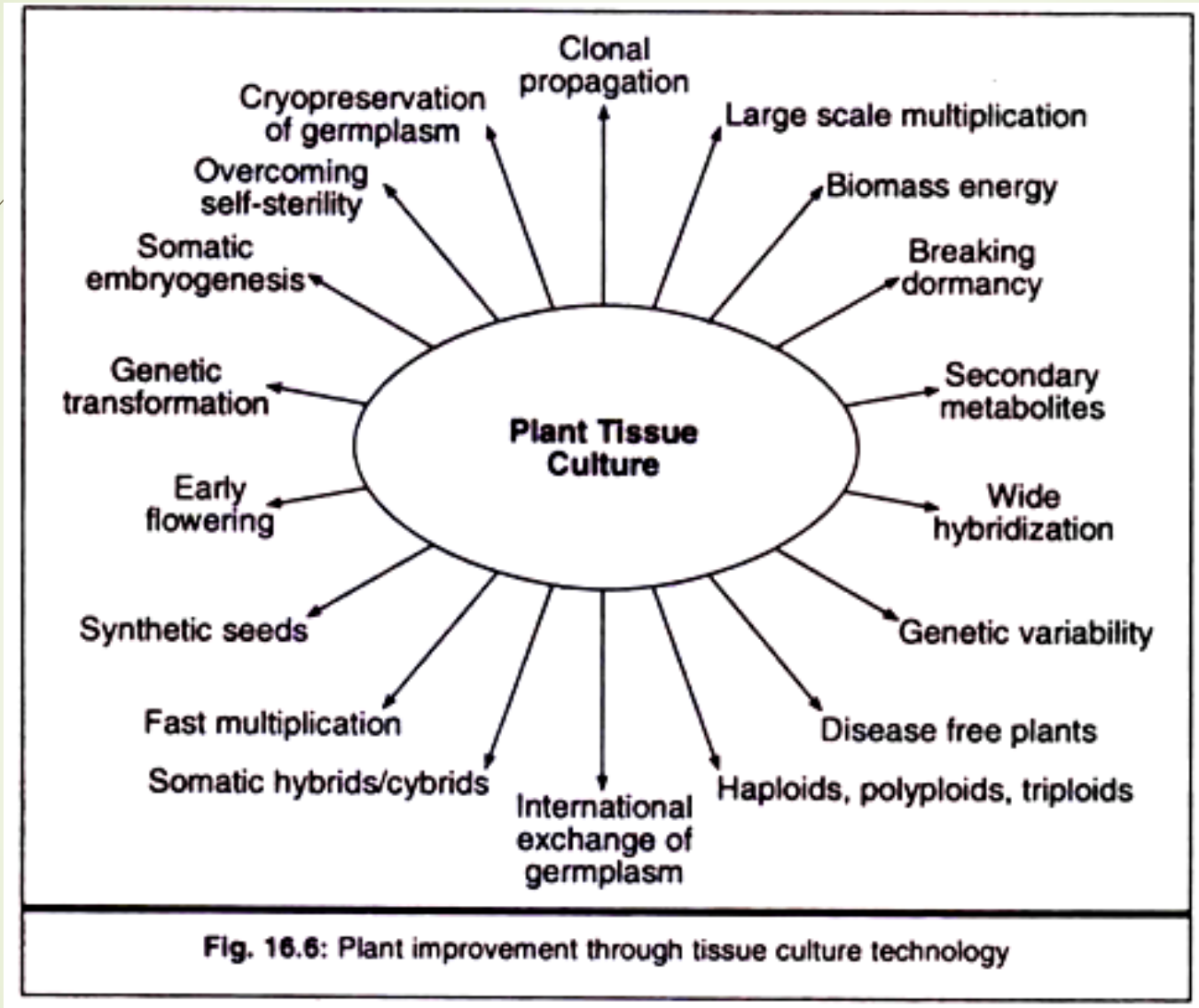
Rostlinné biotechnologie a propojení technik

Jatropha curcas, a biofuel crop: Functional genomics for understanding metabolic pathways and genetic improvement (Maghluly et Laimer 2013)






Rostlinné explantáty
***In vitro* rostlinné kultury**
Rostlinné tkáňové kultury





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

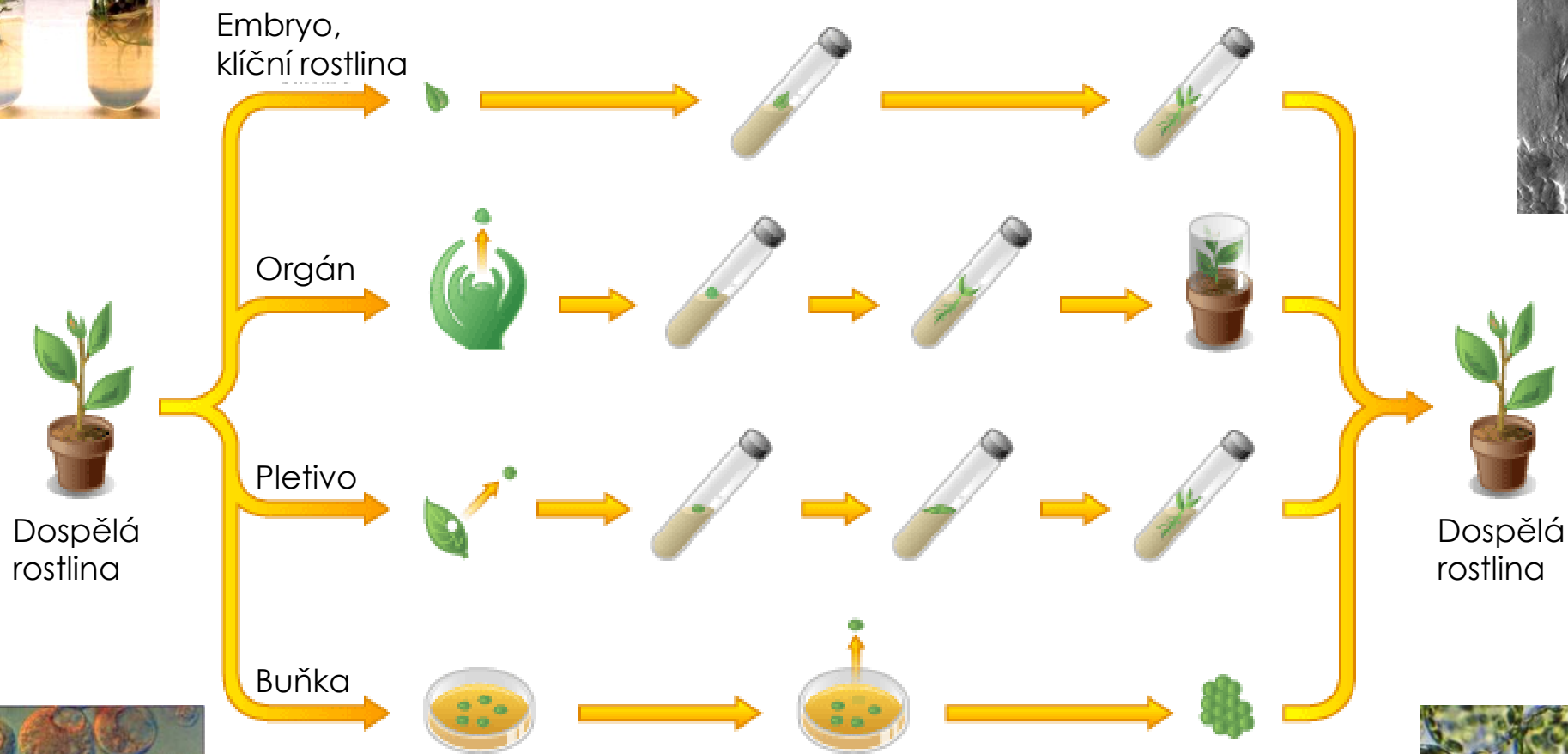
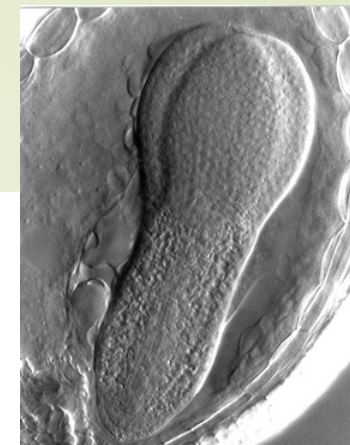
in vitro = ve skle, v umělých podmínkách

aseptická kultura = bez infekce (bakterie, kvasinky, plísně)

axenická kultura = kultura jednoho organismu

tkáňová kultura = historický pojem, přeneseno z oblasti fyziologie živočichů

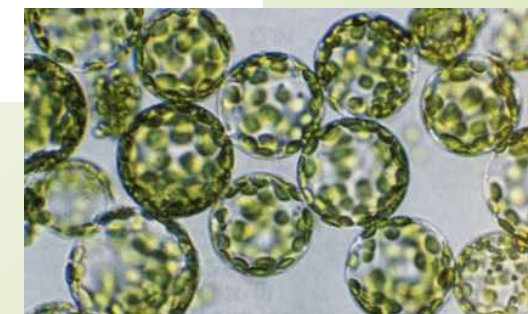
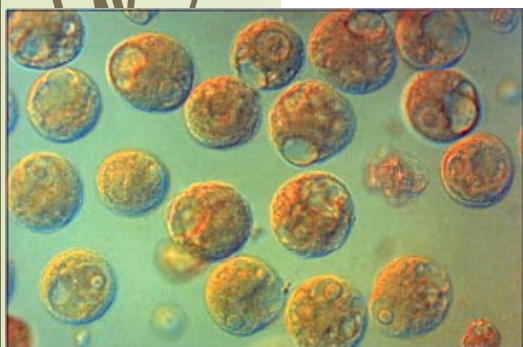
Úrovně organizace explantátu



Dospělá
rostlina

Dospělá
rostlina

Buňka: mikrospory, pylová zrna, buněčné suspenze
Izolovaný protoplast



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

média ztužená



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

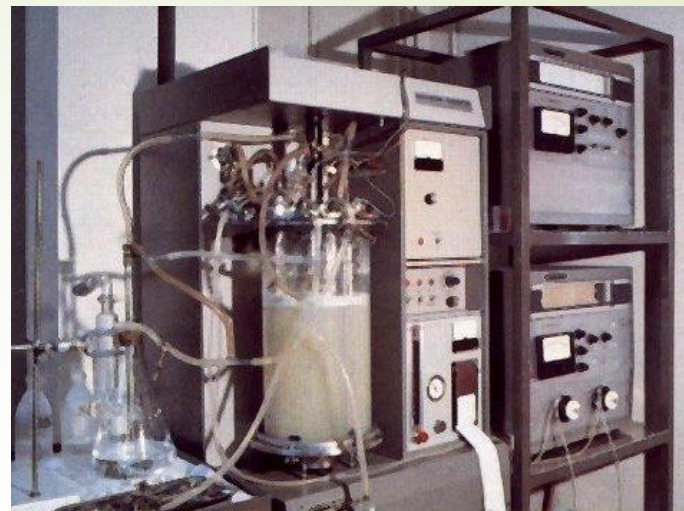
Suspenzní kultury

média tekutá

(nutné zajištění provzdušňování)



laboratorní třepačka



laboratorní bioreaktor

Základní podmínky kultivace *in vitro*

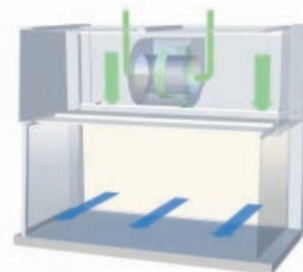
- ▶ aseptická kultura → nutnost sterilizace a desinfekce
- vhodná výživa explantátu → živná média
- vhodné fyzikální podmínky
 - osvětlení
 - teplota
 - koncentrace plynů
 - vlhkost vzduchu

Laminární box, flowbox, očkovací box

- Pro zajištění sterility prostředí
- Vzduch je veden přes HEPA filtr a plynulým laminárním prouděním směrem k uživateli
- Obvykle z nerezavějící oceli bez mezer nebo spojů, kde by se mohly usazovat spory
- Horizontální a vertikální

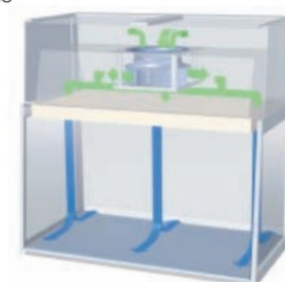
HLAF horizontal flow

- Open-fronted cabinet
- Germicidal UV, power outlet and front cover standard fitting



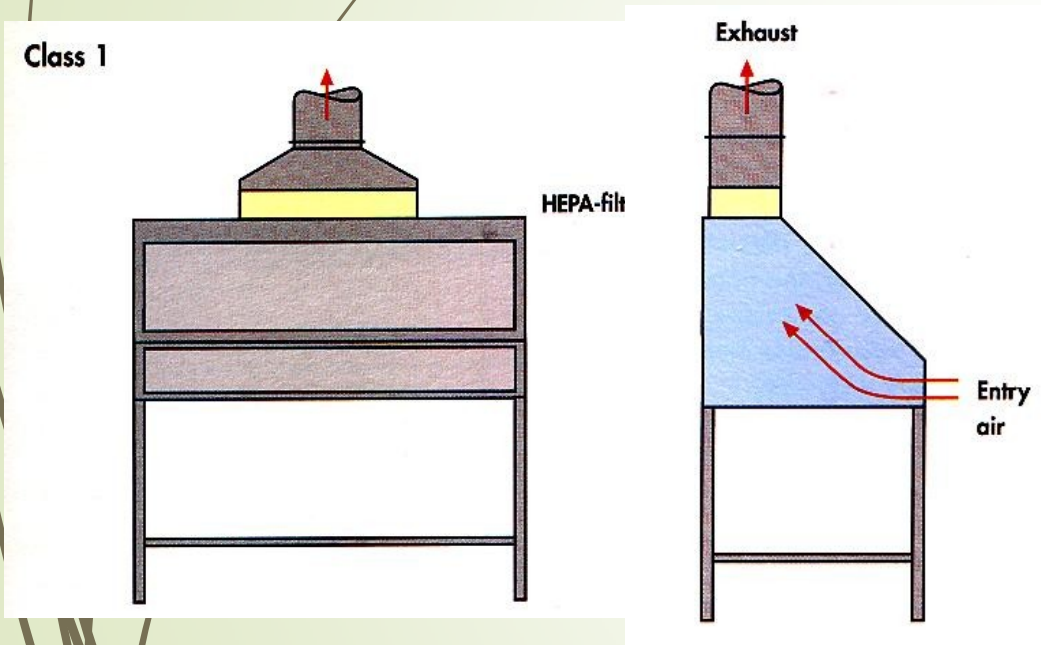
VLAF vertical flow

- Increased work zone height and depth
- Germicidal UV, power outlet and front cover standard fitting
- Less airflow turbulence when large objects are placed in work zone



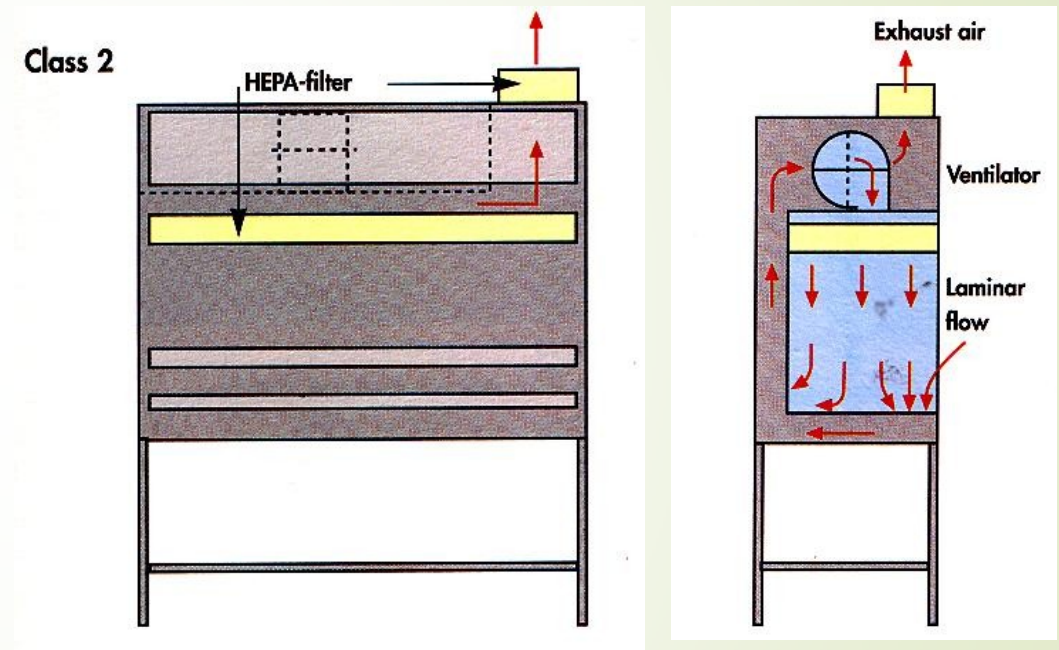
External Air → Sterile Air →

Očkovací box 1. bezpečnostní třída (digestoř)



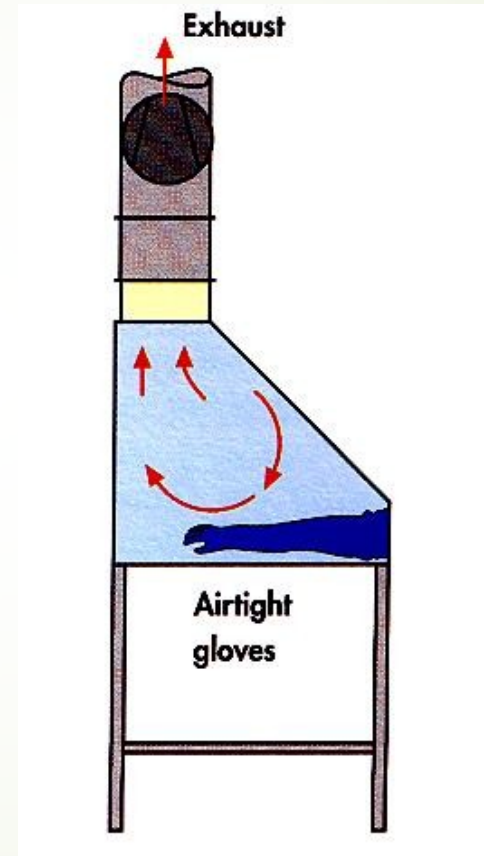
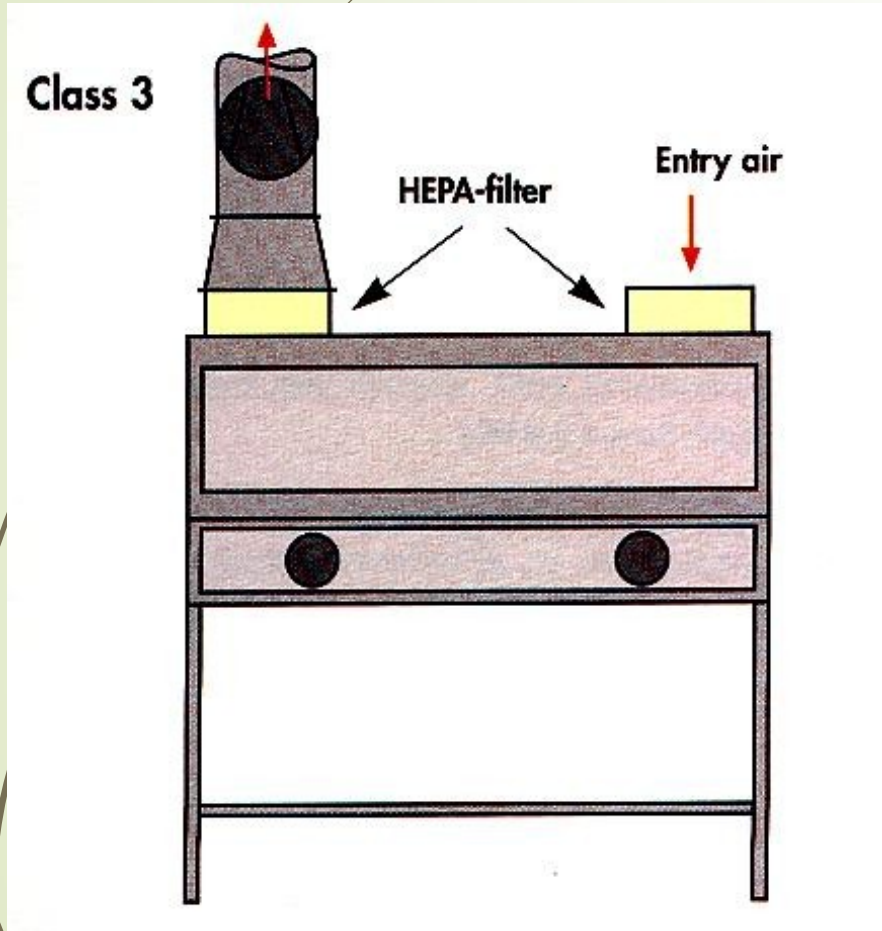
box nezajišťuje podmínky pro sterilní práci

Očkovací box 2. bezpečnostní třída



je možné pracovat i s GMO

Očkovací box 3. bezpečnostní třída



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

Sterilizace a desinfekce

► A. Fyzikální

- mechanická a elektrostatická
vzduch očkovacích boxů (laminární, 2. třída)
filtrace termolabilních látek - filtry:
 - skleněné (fity G5, S4)
 - membránové (Seitz, Millipore, Sartorius)**0,22mm**
- UV záření (kultivační místnosti, boxy)
- teplota
 - suché nebo vlhké teplo (kahan, sušárny, autoklávy...)

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 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)

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

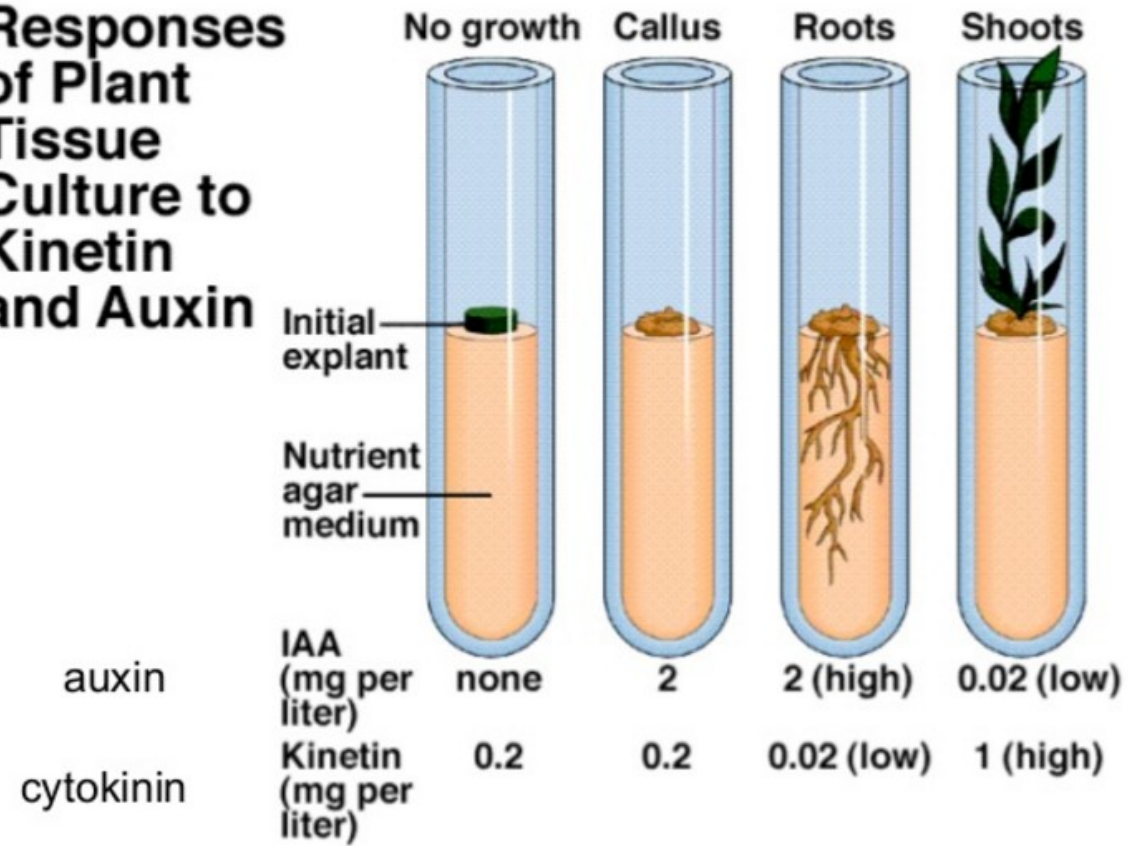
přírodní látky: kokosové mléko, rostl. šťávy, banány...

Složení živných médií - pokračování

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

Rostlinné hormony a růstové regulátory

Responses of Plant Tissue Culture to Kinetin and Auxin



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

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

Definice kalusu

kalus je tvořen
amorfni hmotou
málo organizovaných
tenkostěnných,
parenchymatických
buněk

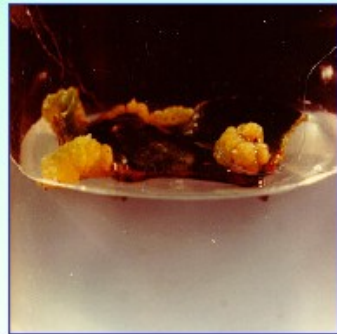


Původ kalusu

vzniká proliferací buněk z mateřského pletiva

je iniciován umístěním explantátů na médium, které podporuje dělení a růst buněk

hormony nebo růstové regulátory (auxiny) mění metabolismus buněk, které jsou v klidu na buňky dělicí se
může vznikat z různých pletiv:



*kalus vznikající
z pletiva cévních
svazků listu*



*kalus vznikající
z pletiv kořene*



*kalus vznikající
na embryu*

Debergh et al.



Iniciace kalogeneze = indukce tvorby kalusu

auxiny

- 2,4-D
- picloram

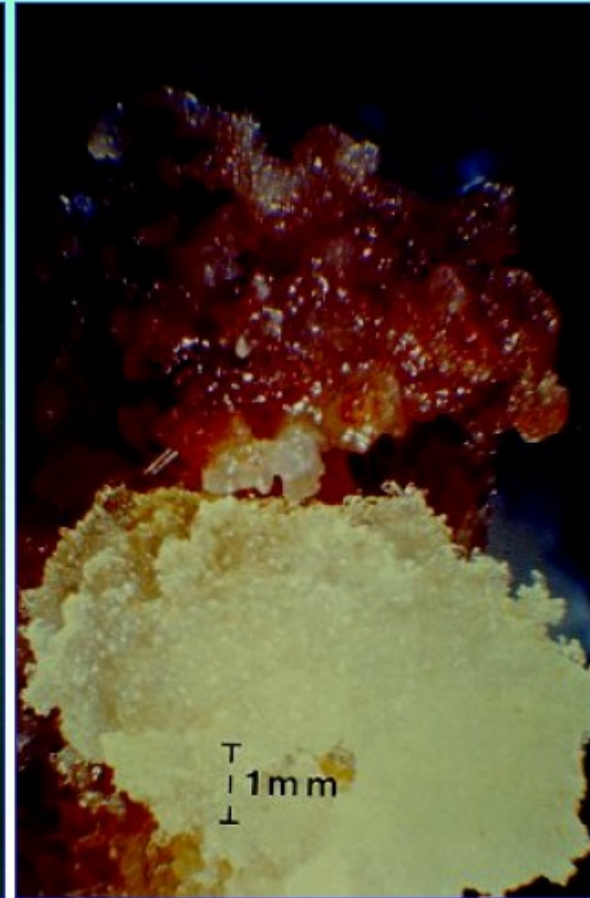
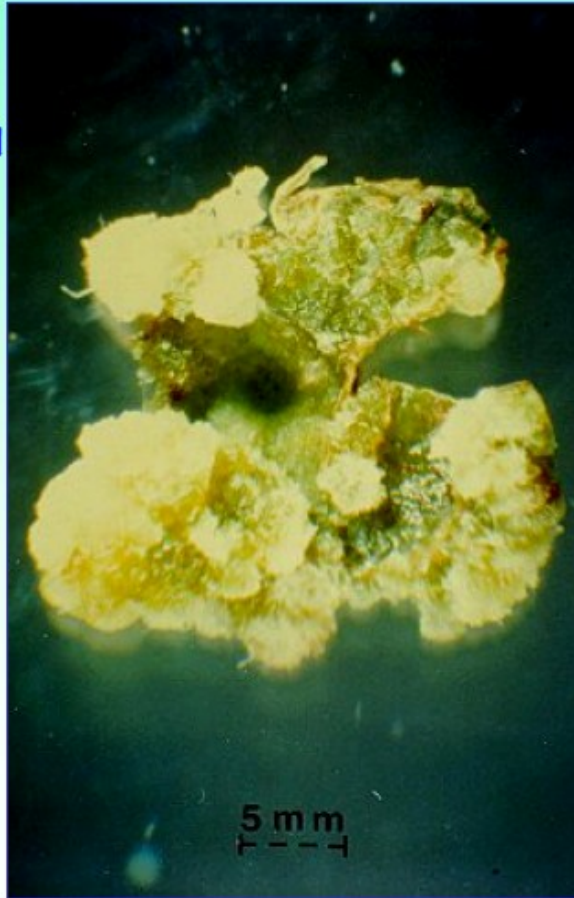
- Střední poměr auxinů k cytokininům → kalus
- Vysoký poměr cytokininů k auxinům → prýt
- Vysoký poměr auxinu k cytokininům → kořeny

Kalusy = genetická nestabilita

Kalusové kultury jsou charakteristické genetickou nestabilitou. Takto mohou vznikat fenotypové rozdíly v jedné kultuře.

variace mohou mít základ

- epigenetický
- genetický



Epigenetické změny

= jakékoliv změny fenotypu, které **nejsou výsledkem změny DNA** (selektivní genová exprese)

Tyto změny jsou **nedědičné**, tj. nedochází k přenosu změn na meiotické potomstvo, ale jsou stabilní a jsou přenášeny z jedné buněčné generace na generaci další **vegetativně**.

(např. habituace na cytokinin).

Genetické změny

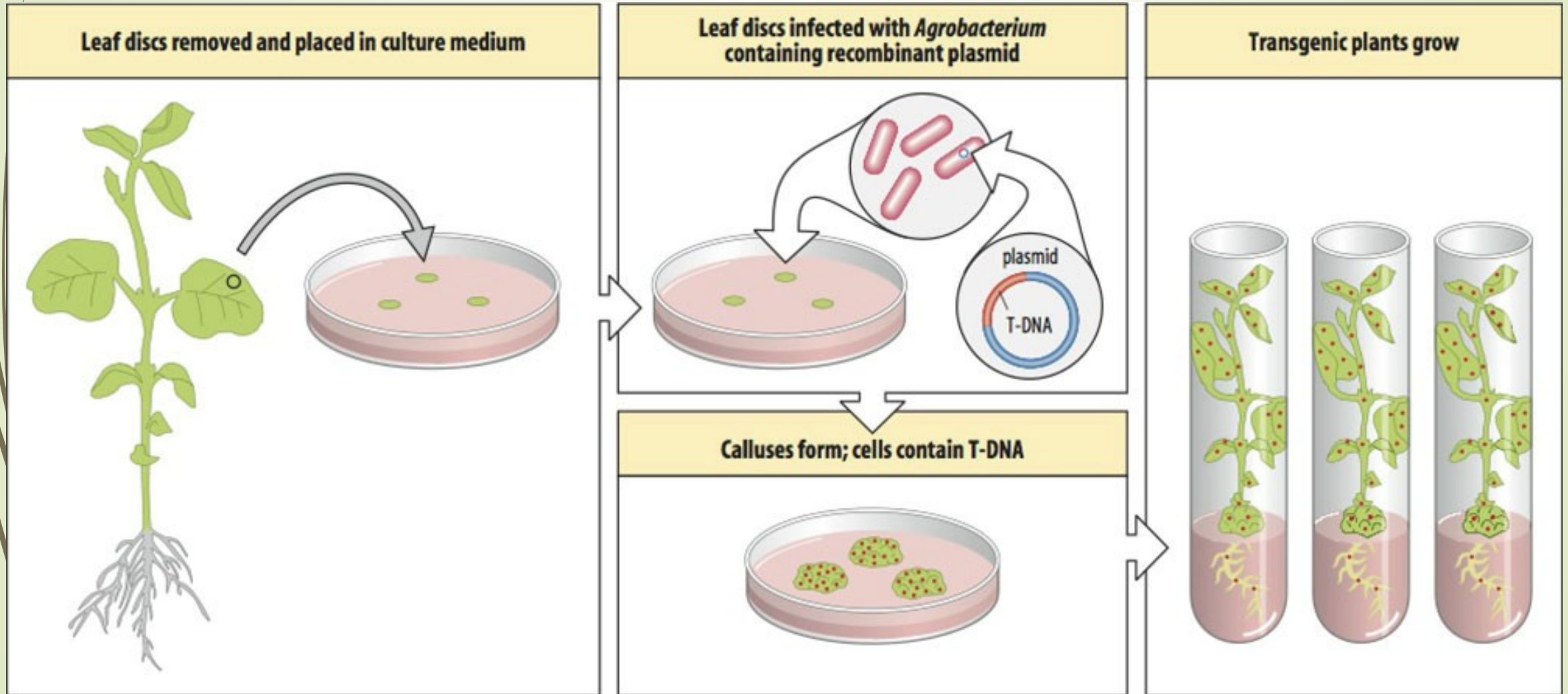
= chromosomové aberace, jaderná fragmentace a endoreduplikace (vede k polyploidii)

Četnost těchto abnormalit obvykle **vzrůstá s rostoucím stářím** kultury. Kultivační podmínky mohou působit selektivně.

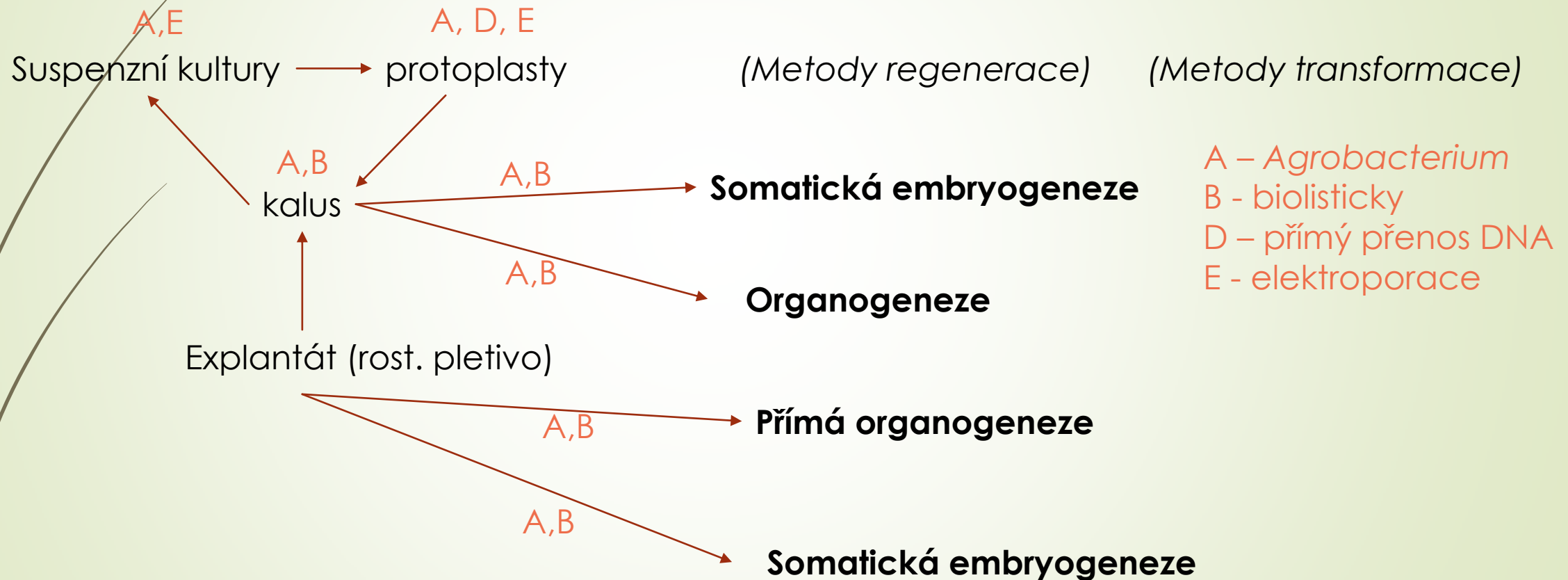
Určité **aneuploidní** nebo **polyploidní** buňky mohou získat výhodu v rychlosti dělení nad normálními buňkami a mohou proliferovat rychleji.

využití ve šlechtění při hledání nových vlastností

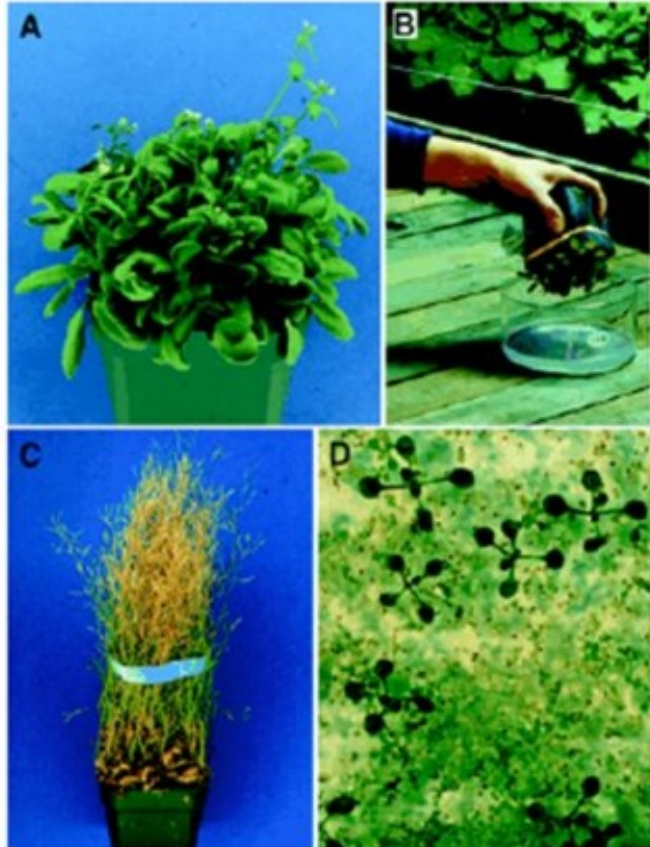
Kalus a transformace



Integrace tkáňových kultur do protokolů rostlinné transformace



Arabidopsis floral dip transformation



Floral Dip (Vacuum infiltration) for Arabidopsis

- (A) Plants are grown to just flowering.
(B) Plants are dipped briefly in a suspension of *Agrobacterium*.
(C) Plants are grown until mature and then progeny seeds are harvested.
(D) Seeds are germinated on selective medium (e.g. containing kanamycin) to identify successfully transformed progeny.

- Pouze *Arabidopsis* a některé Brassicaceae
- Princip: *Agrobacterium* osídlí vyvíjející se vajíčka a tam způsobí transformaci
- Velmi snadné a vysoká úspěšnost

A. Bent (2000). Plant physiology
vol 124, pp 1540-1547.



Suspenzní kultury buněk

- rychle se dělicí buňky
- homogenní buňky nebo buněčné agregáty
- rozmíchání v tekutém médiu
- odvození buněčné linie (“cell line”)

klony jedné buňky :

buněčné linie odvozené z jedné buňky

Iniciace suspenzní kultury buněk

fragmenty nediferencovaného kalusu 2 - 3 g / 100 mL



tekuté medium



pasáže



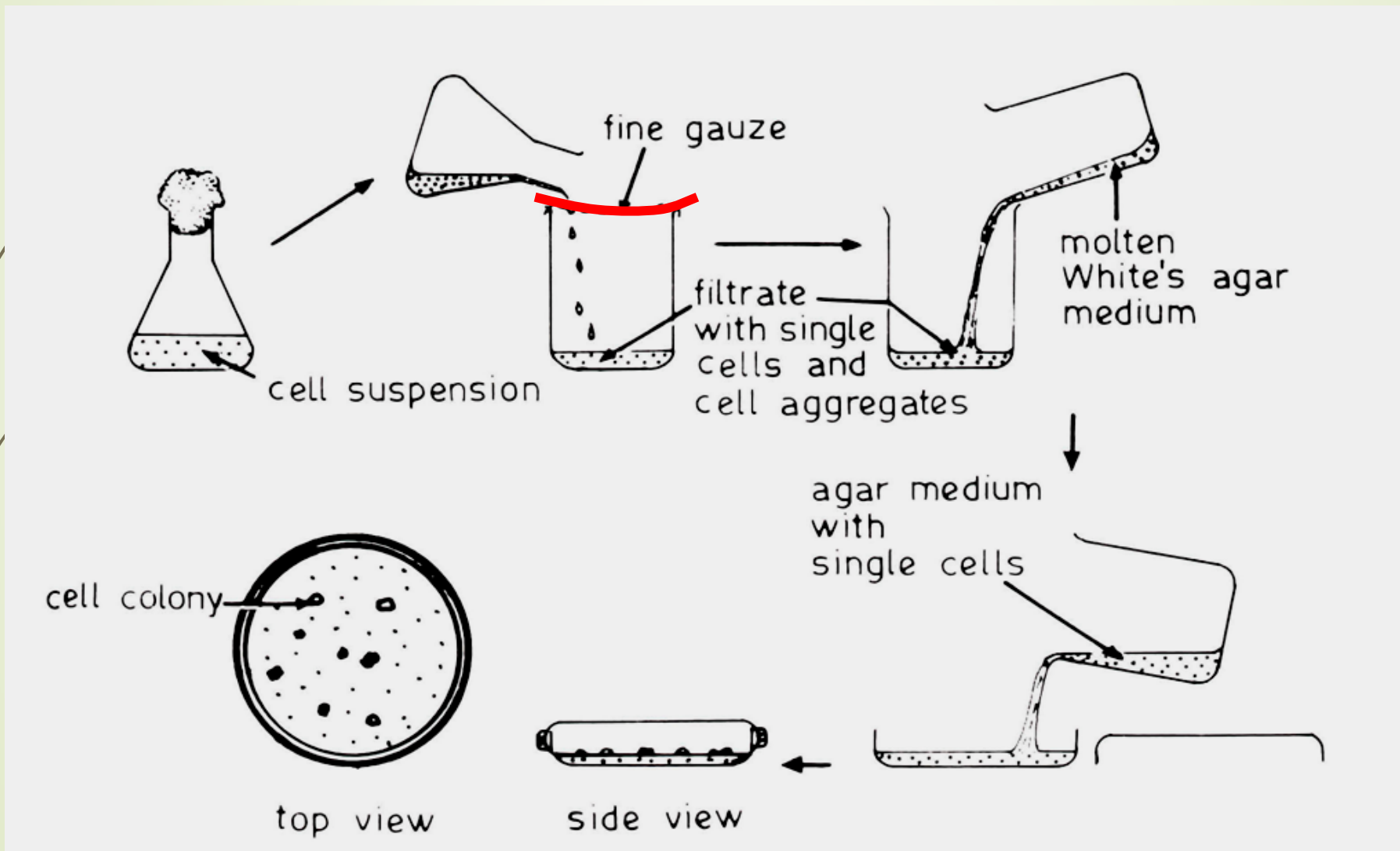
kultura suspenze buněk

aerace -----

míchání (agitace) -----

výběr malých shluků buněk

Schéma Bergmannovy techniky výsevu buněk (Konar 1960)

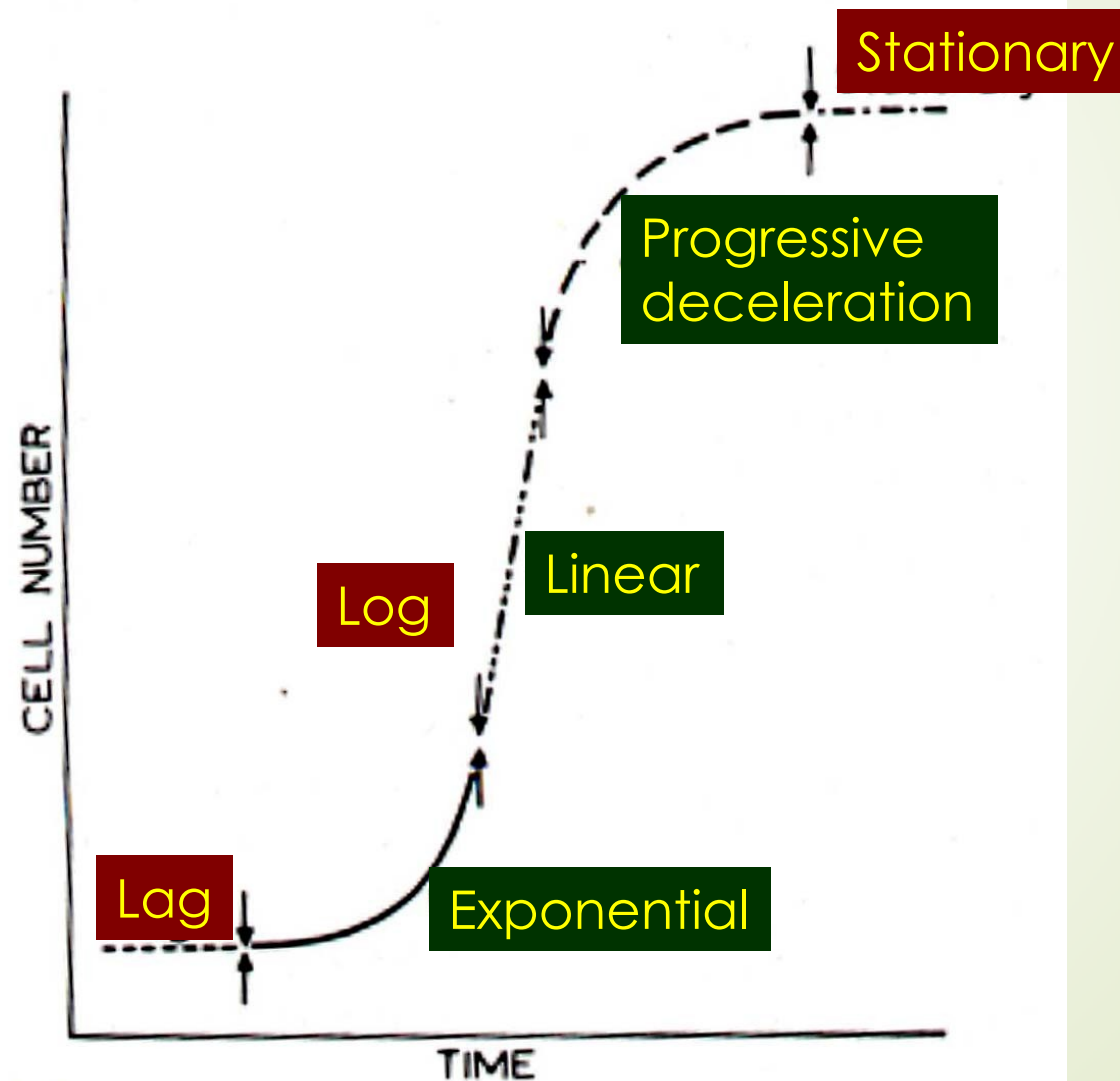


Charakter růstu suspenzní kultury buněk

Sigmoidální růst (S):

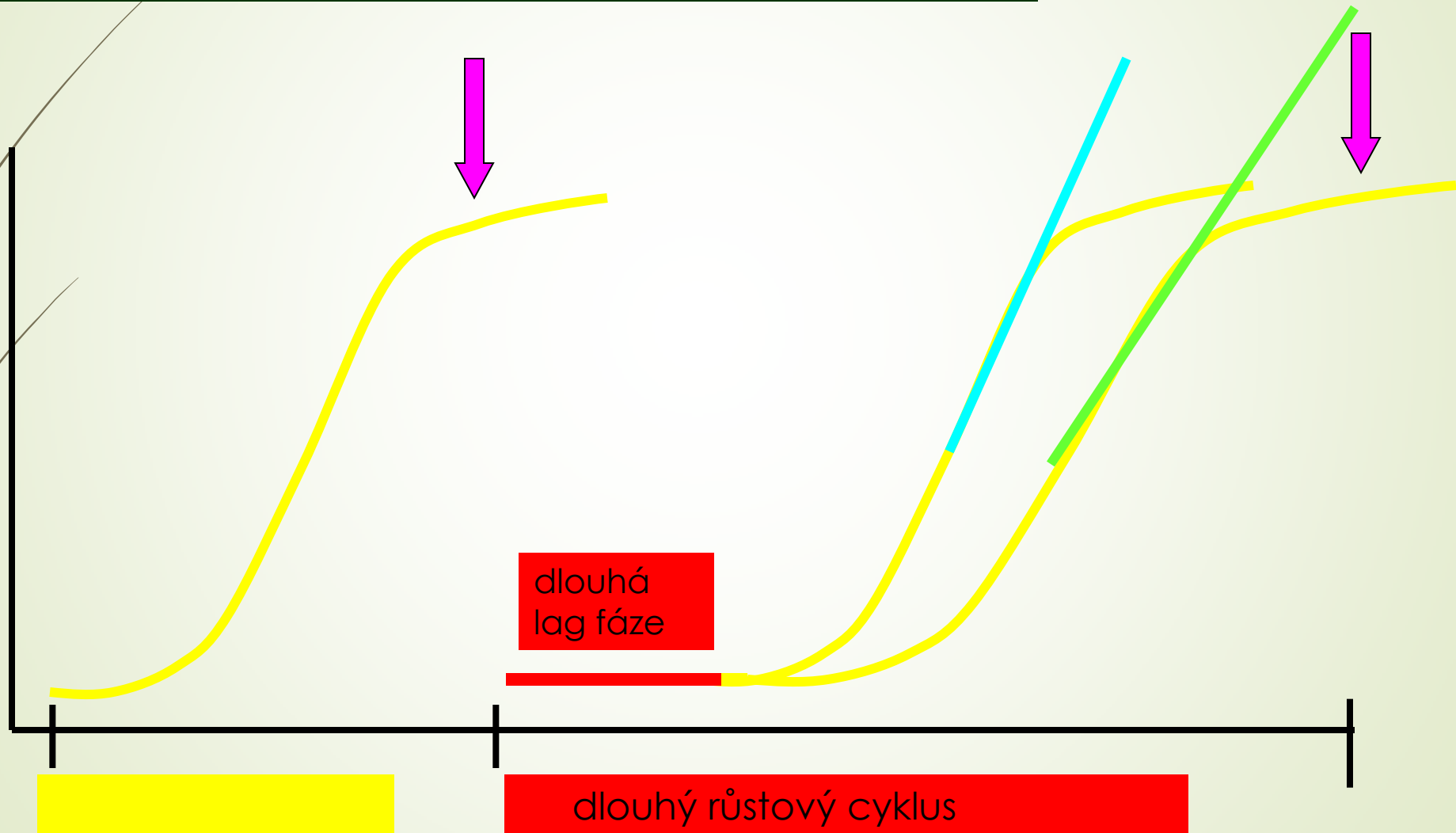
Lag fáze -- logaritmická (log, exponenciální) -- Stationary phase

FW
DW

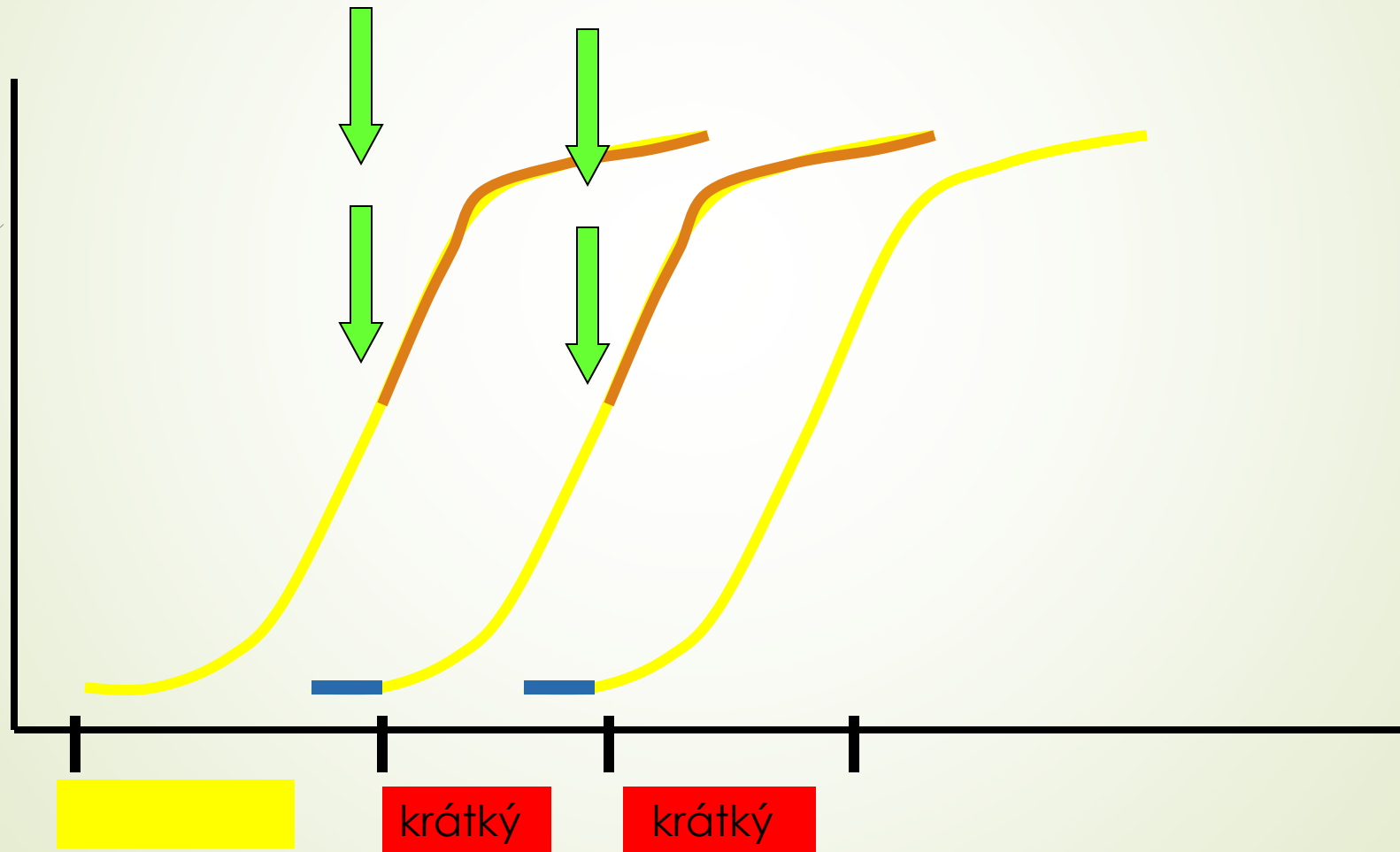


Faktory ovlivňující růst

1. interval subkultivace
pasáž ve stacionární fázi



1. interval subkultivace
pasáž v log fázi -->



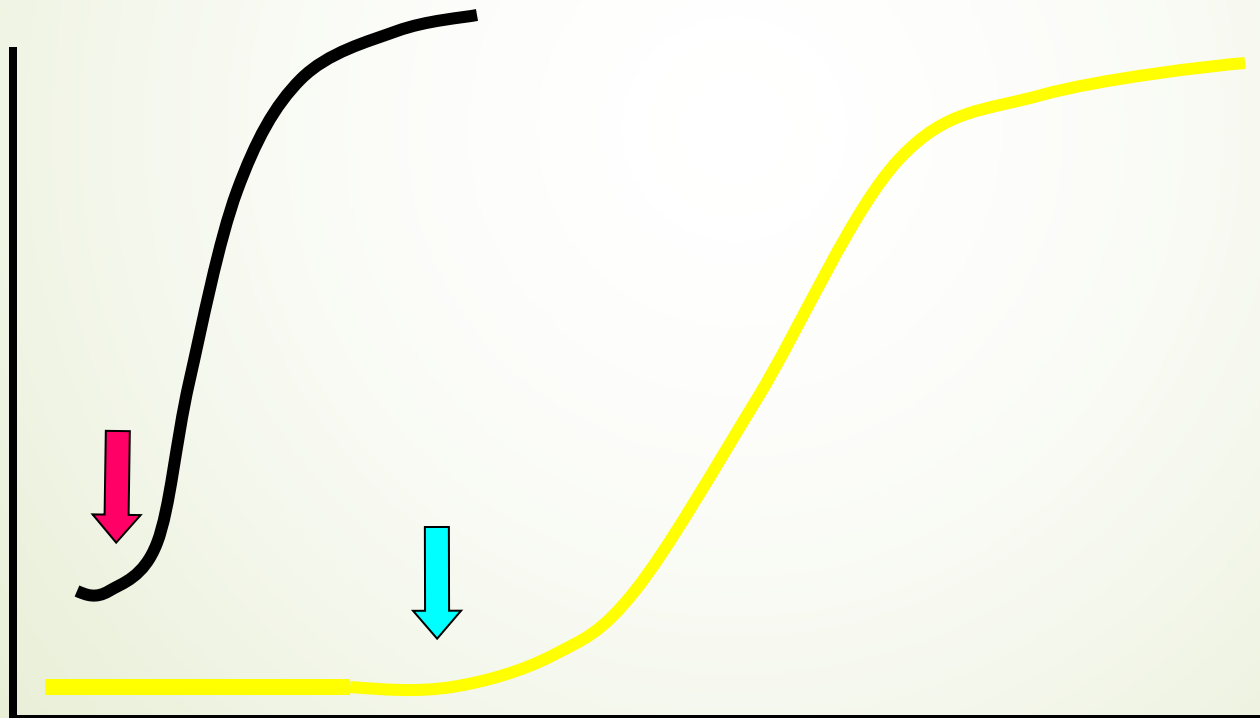
Faktory ovlivňující růst:

2. Hustota buněk při iniciaci
vysoká hustota buněk

nízká počáteční hustota
buněk -->

krátká lag fáze
málo buněčných dělení

dlouhá lag fáze
dlouhý exponenciální růst



Faktory ovlivňující růst:

2. Iničiální hustota buněk

kritická iničiální hustota -->

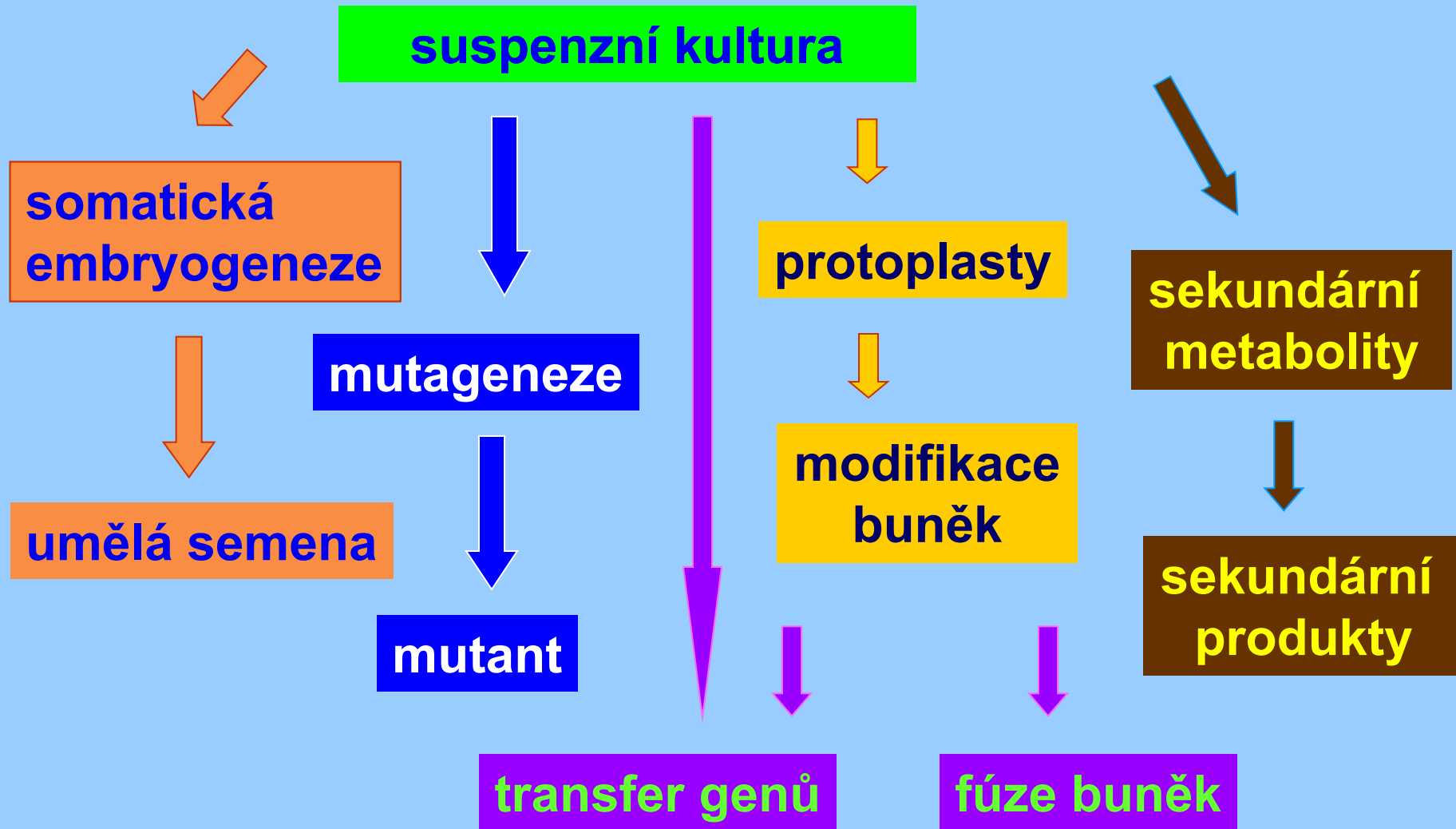
obecně $0.5 - 2.5 \times 10^5$ buněk / ml



4 – 6 dělení

$1 - 4 \times 10^6$ buněk / ml

Použití kultur rostlinných buněk

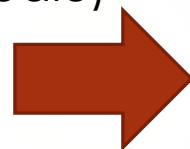


Rostlinné buněčné (suspenní) kultury a tvorba sekundárních metabolitů

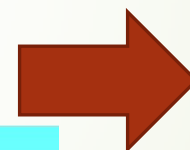
Část rostliny
(list, stonek, kořen, embryo)



Kalusová kultura
(na pevném médiu)



Suspenní kultura
(v tekutém médiu)



Bioreaktor

Laboratorní bioreaktor



Průmyslový bioreaktor

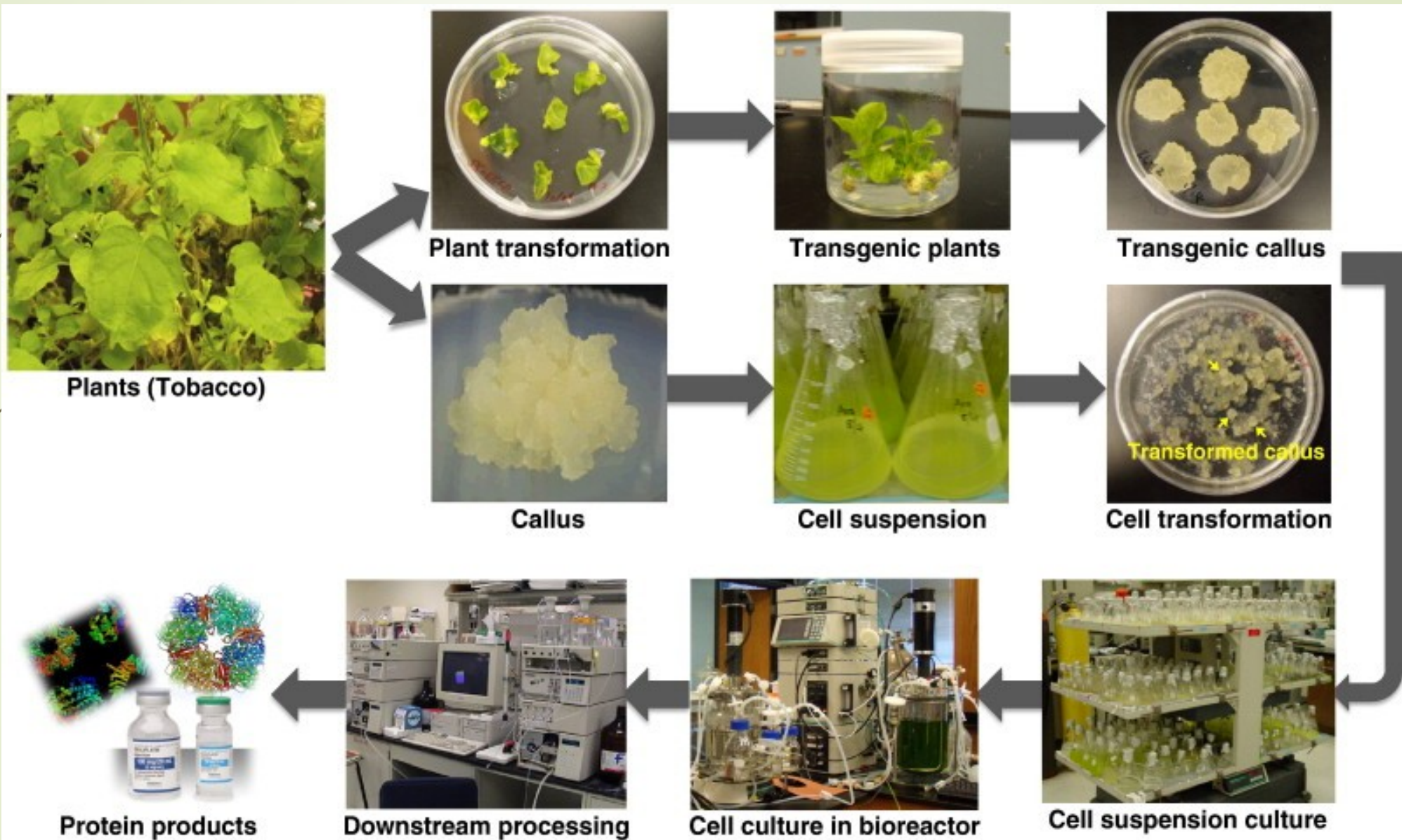


v roce 2005 největší
automatický provzdušňovaný
bioreaktor pro pěstování
rostlinných buněk a orgánů
na světě

pracovní objem každého
tanku 20 000 l (20 tun)

celkový objem 160 000 l
(160 tun)

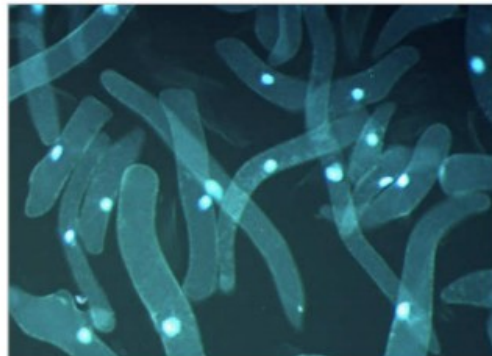
Foto: Sung Ho Son
VitroSys Inc., Korea



Tkáňové a buněčné kultury

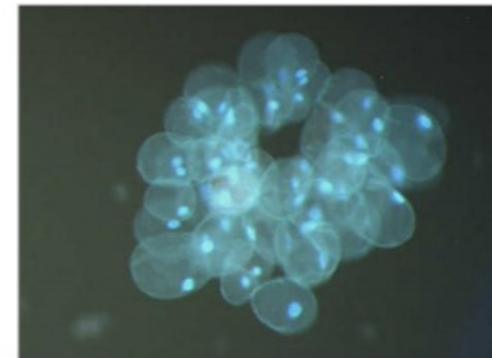
Požadavky na ideální buněčnou kulturu:

- homogenní suspenze jednotlivých buněk
- genetická, fyziologická, biochemická uniformita
- synchronizace buněčného dělení, prodlužování, diferenciace
- zachování regenerační schopnosti



Realita:

- agregace, diferenciace
- polyploidie, aneuploidie, chromozomové nepravidelnosti
- špatná synchronizace buněk
- ztráta morfogenetického potenciálu
- habituace





Orgánové kultury

- ▶ „**hairy roots**“ kultury získané pomocí infekcí bakterie *Agrobacterium rhizogenes*
 - ▶ Rostou bez rostlinných hormonů a mají rychlost růstu podobnou buněčným suspenzím
 - ▶ Jsou dobrými producenty kořenových sekundárních metabolitů
- ▶ **Prýtové kultury** mohou produkovat sekundární metabolity syntetizované v nadzemních částech rostlin, např. esenciální oleje, terpenoidy, alkaloidy apod.



Regenerace rostlinných buněk

Totipotence

Totipotence

schopnost jednotlivé buňky se dělit a vytvořit veškeré diferencované buňky organismu, včetně extraembryonálních tkání/pletiv. Typická pro **zygoty a spory**, u člověka pro prvá dělení zygoty, až po 16-buněčnou morulu. Další dělení už vede k funkční diferenciaci, odlišení vnitřních blastocystů a vnějších trofoblastů, vzniku tří základních zárodečných listů...

Po desetiletích víry v dogma „regenerační totipotence“
pohled současný :

I u rostlin probíhají zakládání i vývoj nových orgánů
jak *in vivo*, tak *in vitro* téměř výhradně z
buněk kmenových, většinou sdružených v
PLANT STEM CELL NICHES (PSCN)

Čtyři základní typy PSCN:

Shoot Apical Meristem SAM

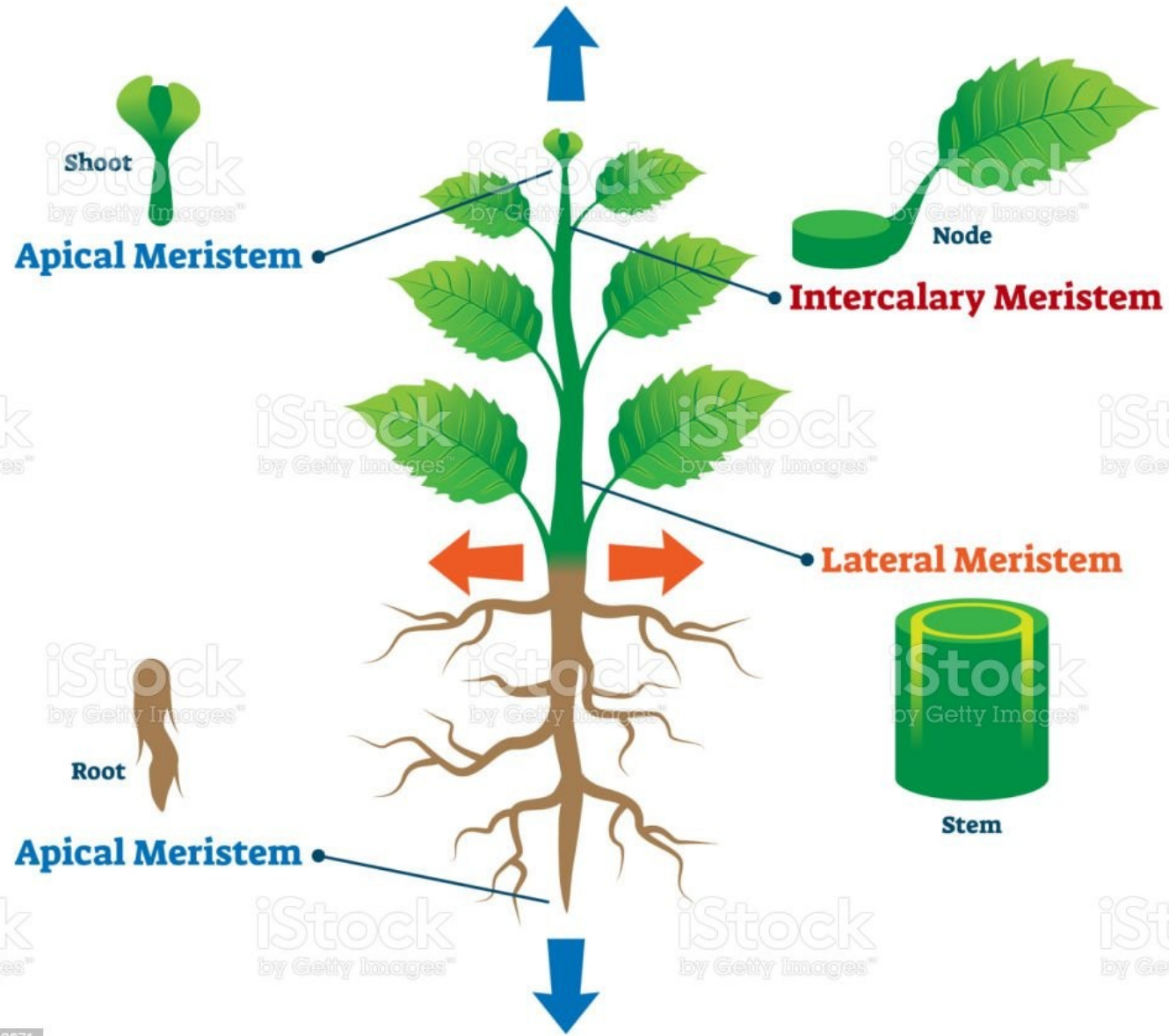
Root Apical Meristem RAM

Cambium

Phellogen

každá produkuje vlastní „germ lines“

MERISTEMATIC TISSUE





REALITA :

Navzdory všem hormonálním působkům vykazuje řada rostlinných objektů (řízků/explantátů) bylin i dřevin jak *in vivo*, tak *in vitro*, nízkou až nulovou regenerační schopnost.

Regenerační schopnost závisí na:

- DRUHU, VARIETĚ
- STÁŘÍ ORGANIZMU, ORGÁNU
- TYPU PLETIVA, ORGÁNU

kategorie „REKALCITRANTNÍCH“ materiálů



Rekalcitrance

Nežádoucí a většinou ireverzibilní stav nastávající u kultur *in vitro*, kdy buňky, pletiva nebo orgány ustrnou ve vývoji i růstu a ač jsou živé, nereagují ani na změněné kultivační podmínky (*recalcitro* = přístup odpírám, vyhazuji – o koni).

Rekalcitrantní genotypy

Příčiny

- jsou spatřovány v ekologické konstituci rostlinného materiálu (donora), manipulacích *in vitro* a stresorech *in vitro*. Vážný problém v biotechnologii.

Hypotéza: neexistují

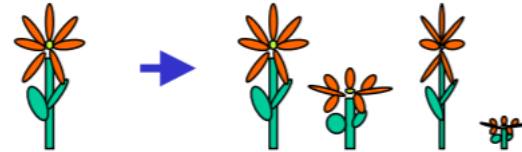
(jen zatím nevíme jak na to)

Somaklonální variabilita



Rhododendron

Def. : Fenotypová variabilita **genetického** nebo **epigenetického** původu, zejména u rostlin odvozených z buněčných kultur *in vitro*. vysoký výskyt odchylek od původního fenotypu



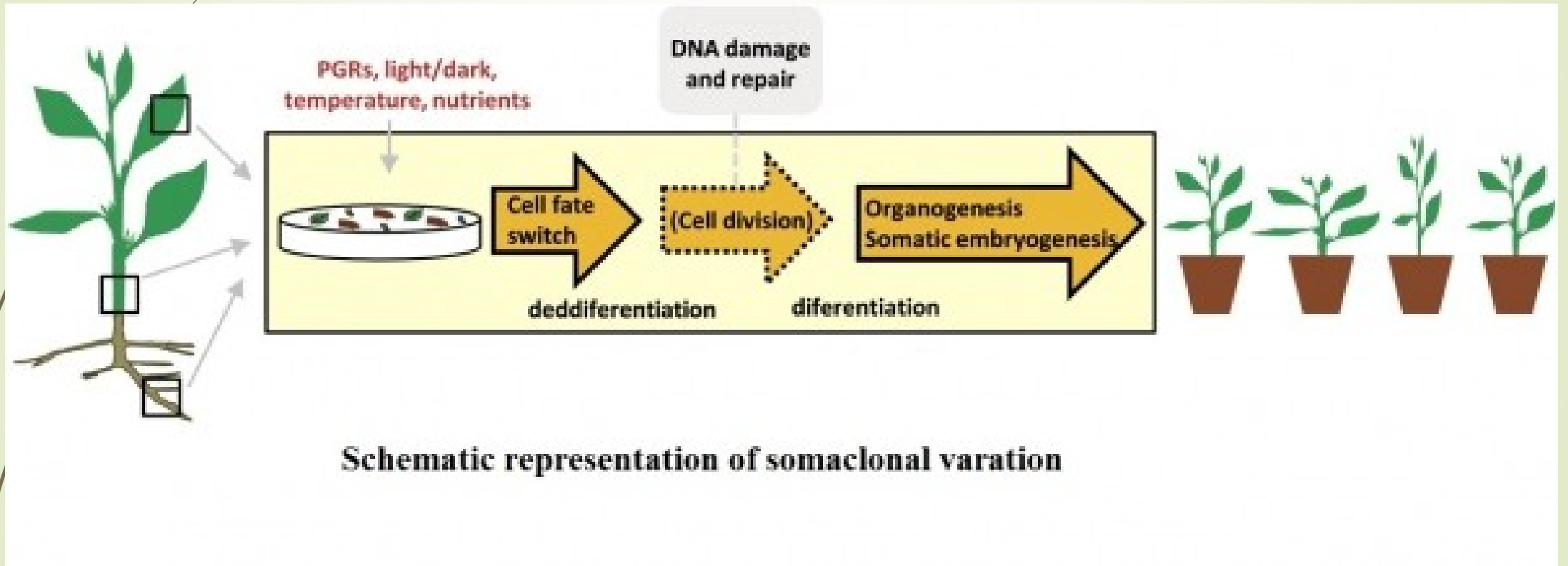
Příčiny zvyšující SV:

Dlouhá expozice fytohormony (!2,4-D)

Dlouhé intervaly mezi subkulturami

Větší riziko při tvorbě adventivních než při množení z axilárních pupenů (a meristémů)

Somaklonální variabilita






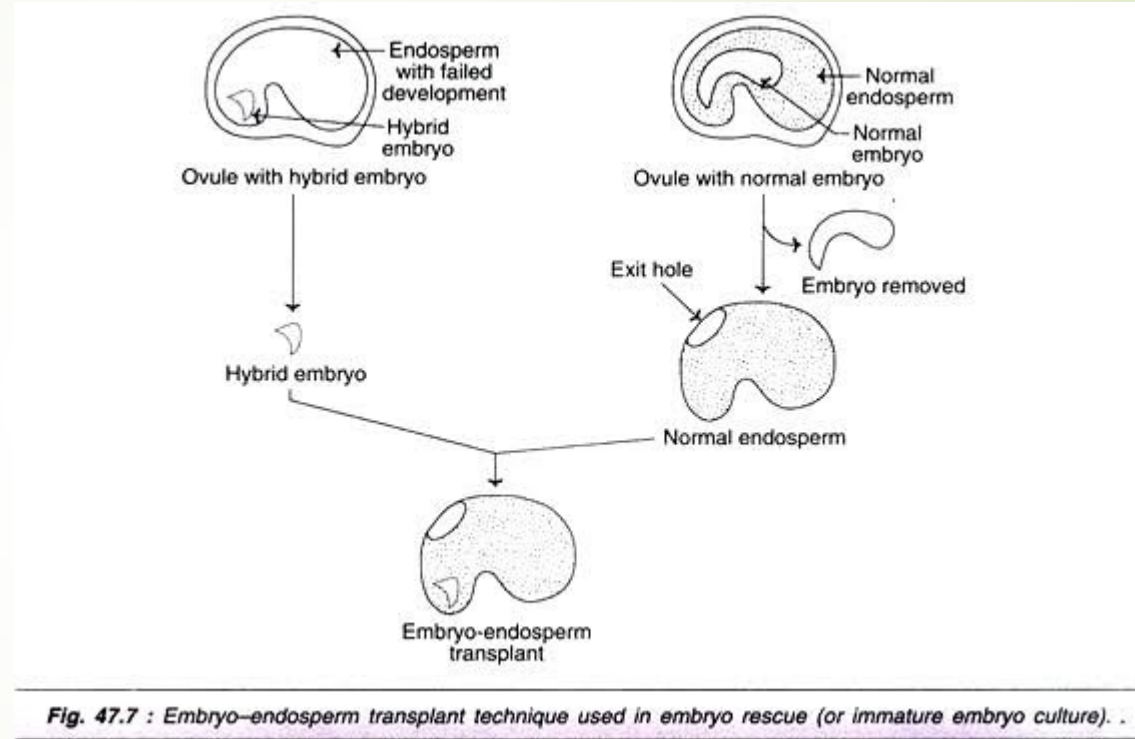
EMBRYOGENEZE *in vitro*:

- * zygotická (zejm. oplození *in vitro*)
- * pylová
- * somatická

účel:

- překonání bariér nekřížitelnosti
 - produkce haploidů/dihaploidů
 - mikropropagace
 - umělá semena
- 

„Embryo rescue“



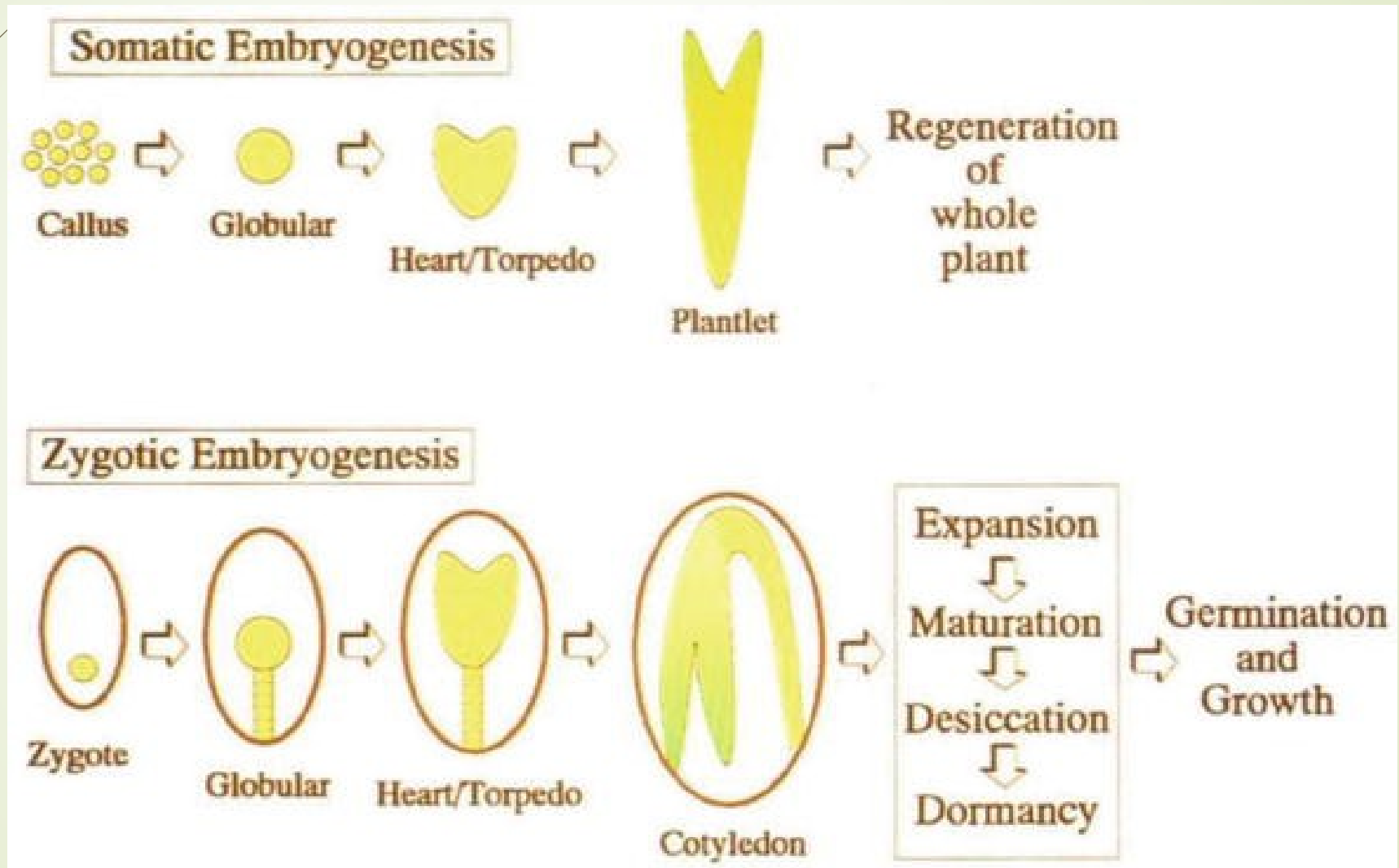
Improved in vitro *Vitis vinifera* L. embryo development of F1 progeny of 'Delight' × 'Ruby seedless' using putrescine and marker-assisted selection

Somatická embryogeneze (SE)

od mrkve přes pšenici po smrk

- * 2,4-D klíčový morfogenní faktor, součinnost s CK, ABA
- * rychle stoupá počet druhů vykazujících schopnost SE
- * poměrně nízký výskyt genotypů realizujících jak organogenezi tak i SE. Některé klasické regenerační modely (tabák, brambor) v realizaci SE neúspěšné.
- * často striktní limit regenerační kompetence souvisí s orgánovou specifitou, stářím

Somatic embryogenesis



Somatic embryogenesis *Larix decidua*,
agarové medium



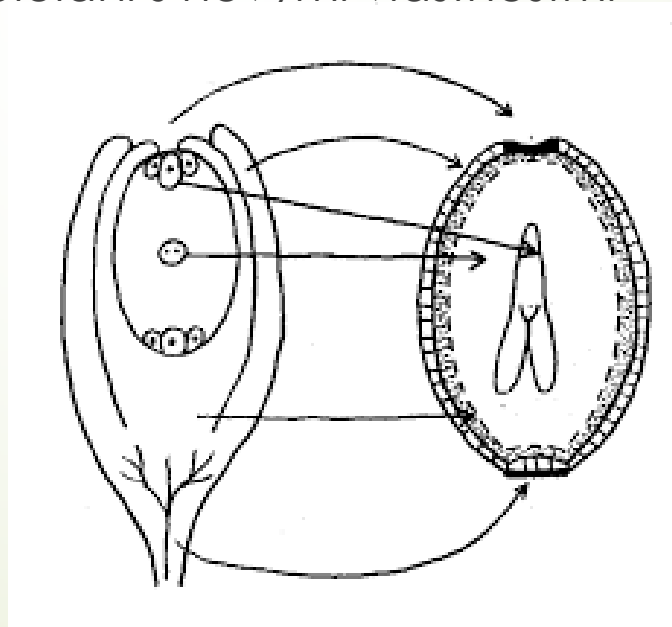
Somatic embryogenesis *Cucumis sativus*,
tekuté medium



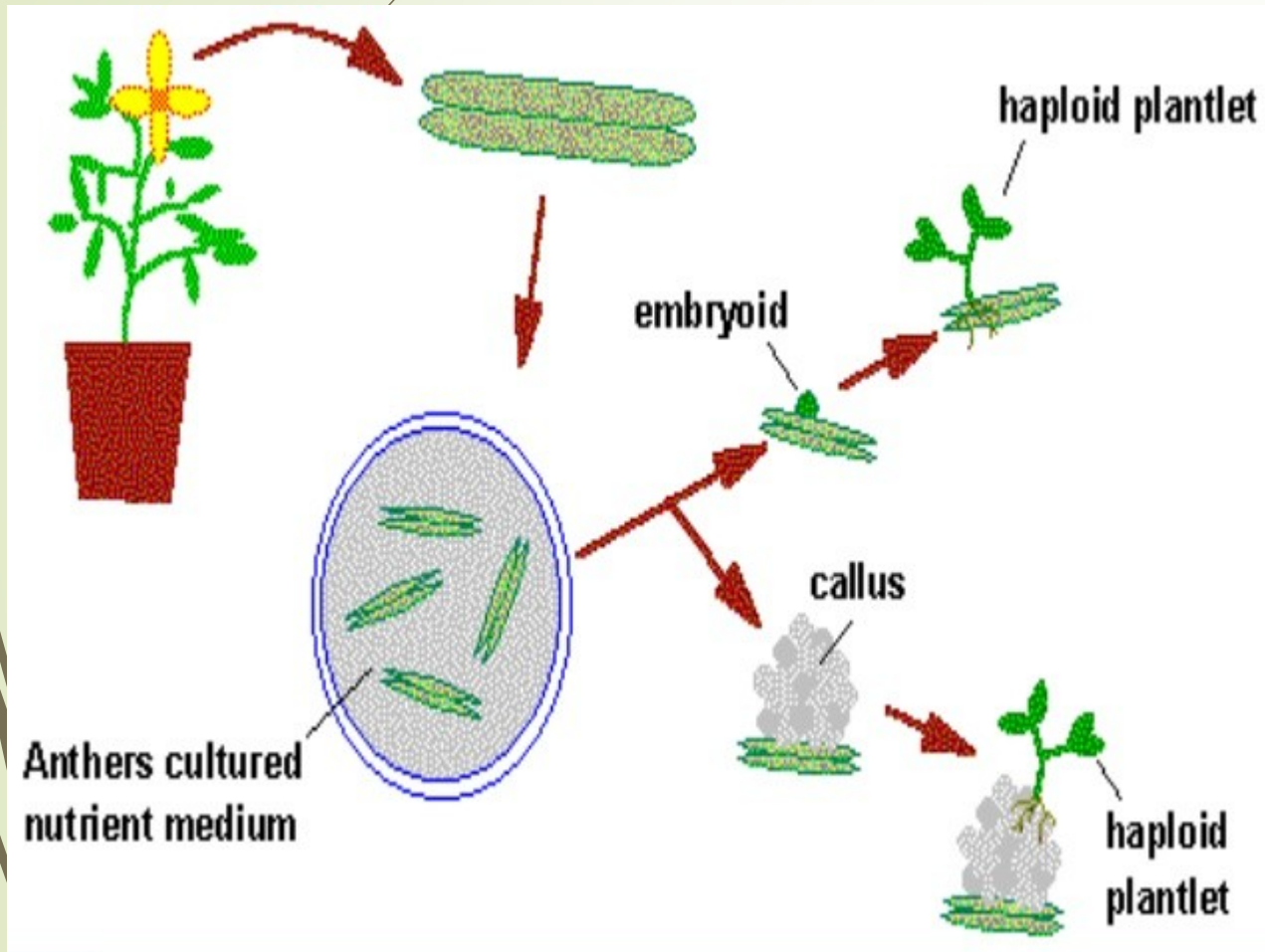
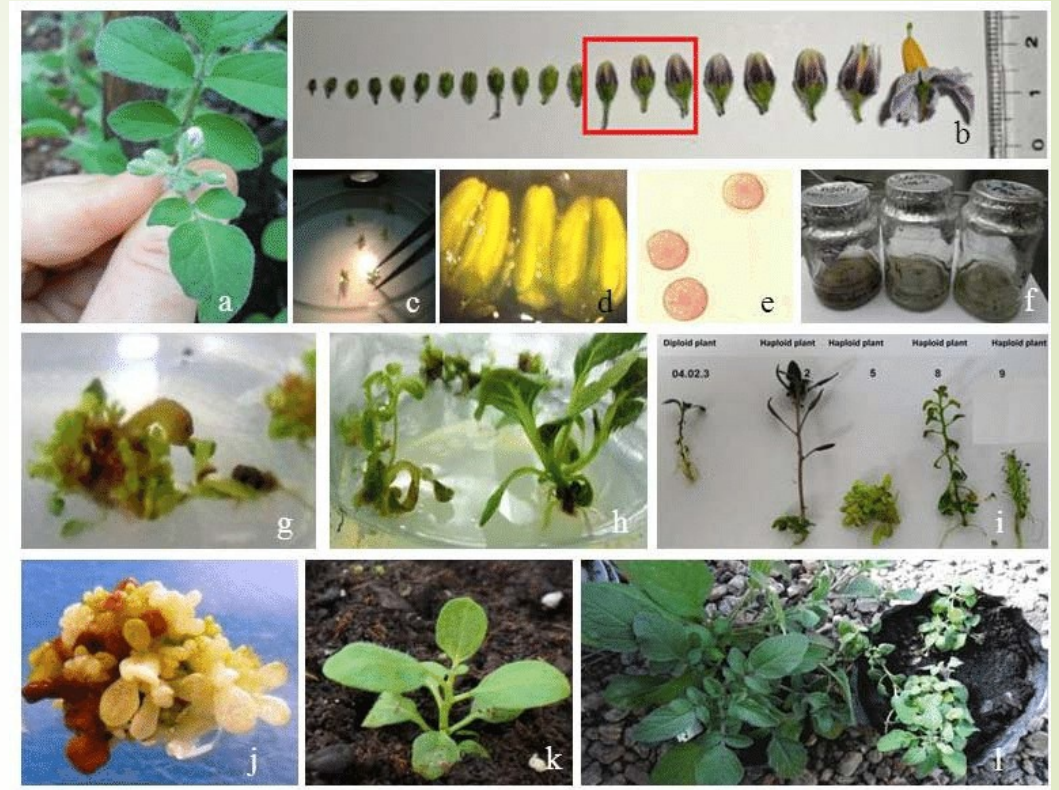
katalog firmy ...

Endospermové kultury

- ▶ Endosperm vyjmut z nezralého semena a pěstován na vhodném médiu bez embrya
- ▶ vytvoří se kalus, který může regenerovat přímou organogenezí nebo přes SE
- ▶ nové rostliny jsou triploidní s novými vlastnostmi

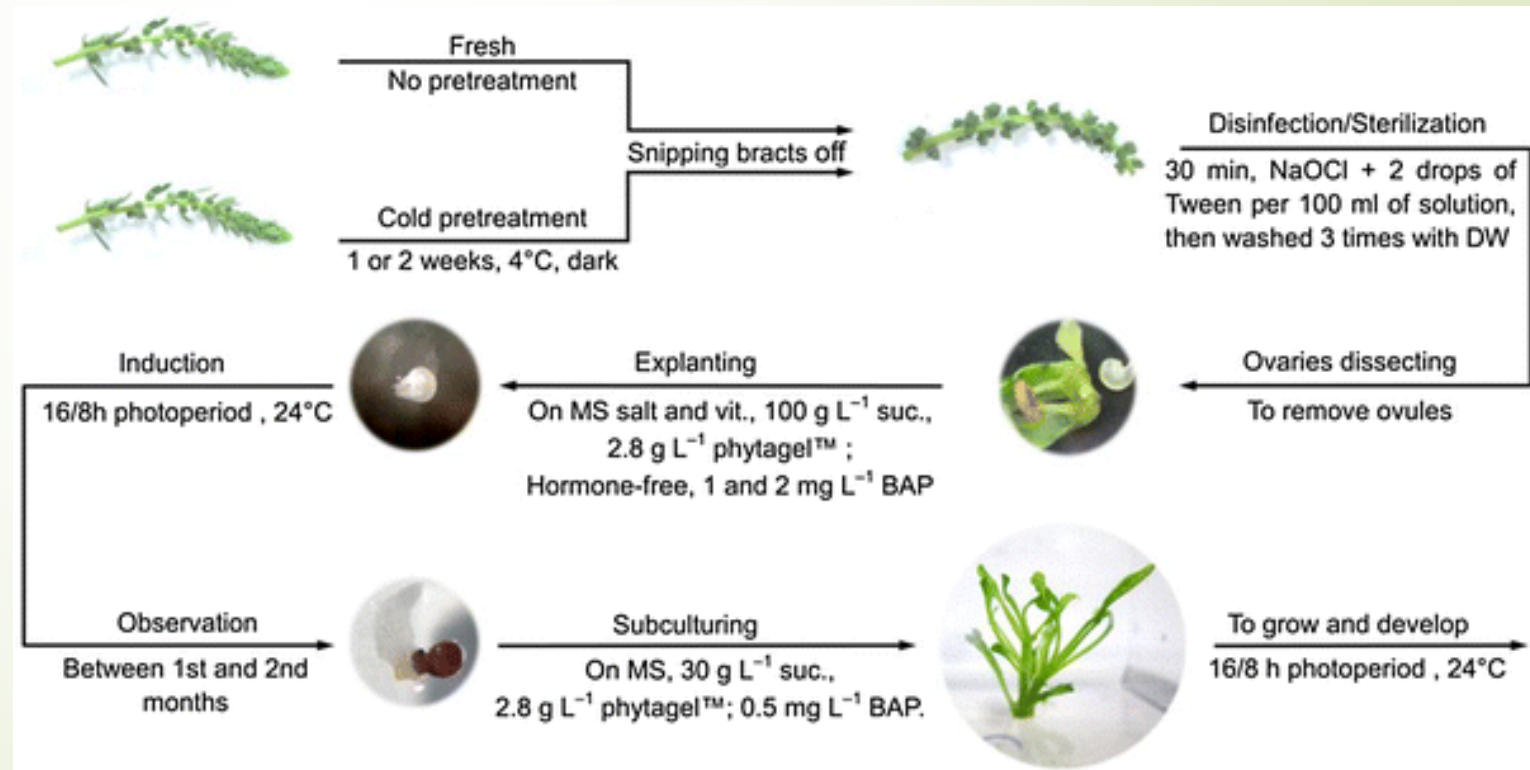
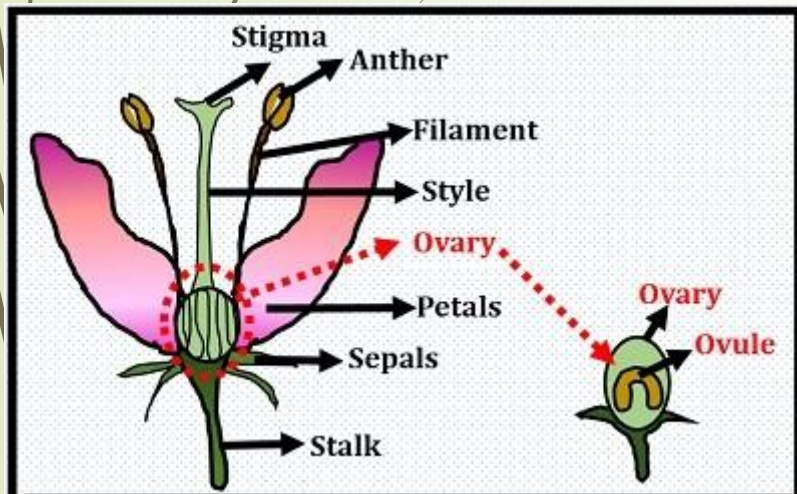


Prašníkové kultury



Kultury vajíček, semeníků (ovule, ovary culture)

- Méně časté než prašниковé kultury (tam, kde prašnikové nejdou)



Protoplastové kultury

- Protoplast means - cells without cell wall so it generally used for fungi, bacteria, plant cells
- Protoplast may be cultured through various ways such as hanging drop cultures, micro culture chambers, soft agars matrix

Phase of Protoplast culture

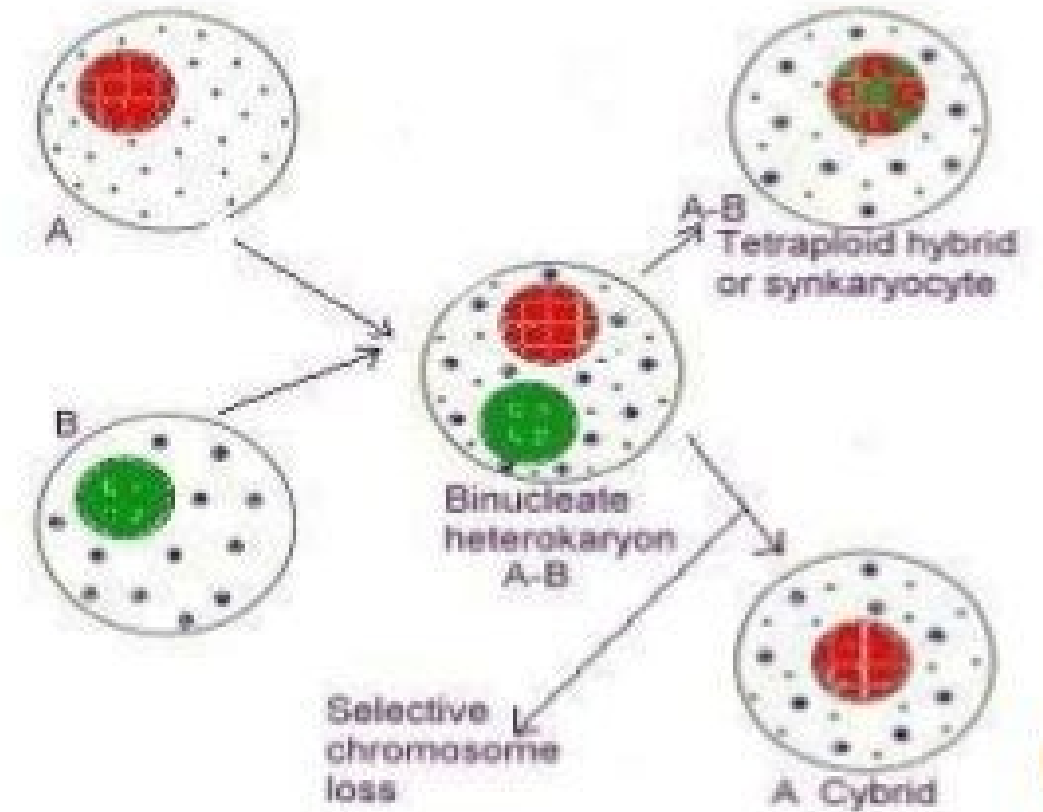
- Development of cell wall
- Cell division
- Continuous growth or regeneration to a whole plant

Uses of Protoplast culture

- For the regeneration of complete plant
- Development of hybrids
- Cell cloning
- Genetic transformations
- Membrane studies

Fúze protoplastů

- spontánní
- indukovaná (chemicky, elektrickým polem - elektroporace)





Děkuji za pozornost