

ROSTLINNÉ EXPLANTÁTY (KULTURY *IN VITRO*)

ÚVOD

HANA CEMPÍRKOVÁ

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



Experimentální
Biologie
Rostlin

CÍLE

- ▶ **Vysvětlení základních pojmů a principů používaných v oblasti rostlinných explantátů**
- ▶ **Shrnutí základních metod v přehledu historického vývoje rostlinných tkáňových kultur**

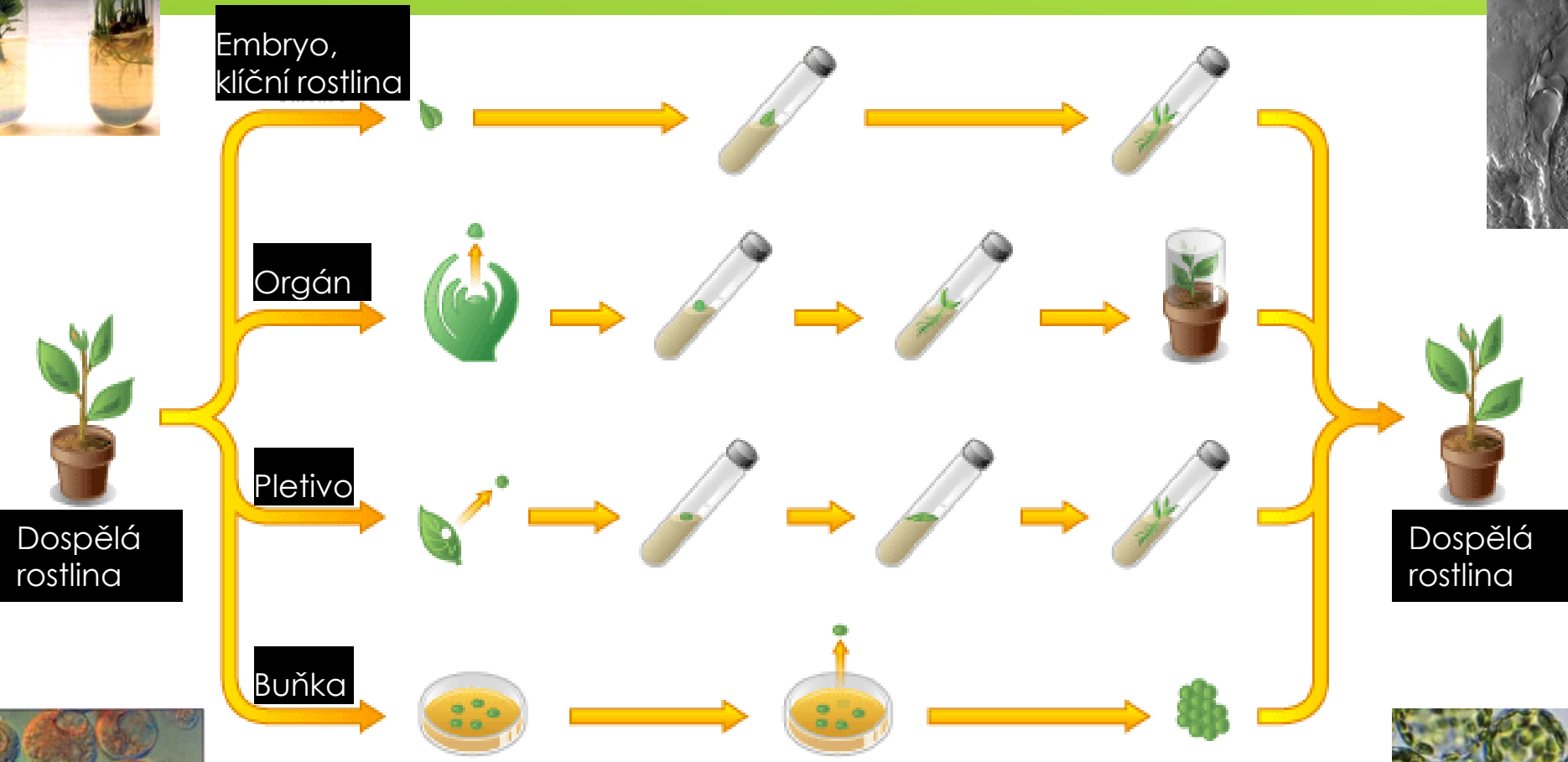
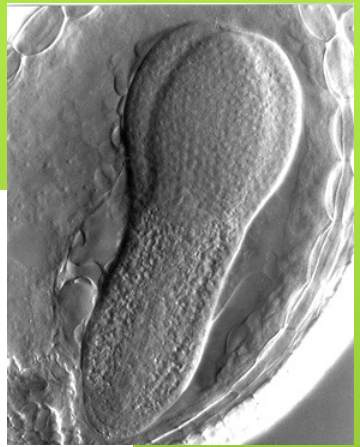
Definice termínů

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.

Úrovně organizace explantátu



Dospělá rostlina

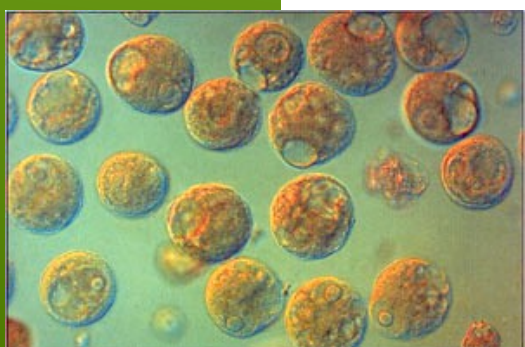
Dospělá rostlina

Embryo, klíčící rostlina

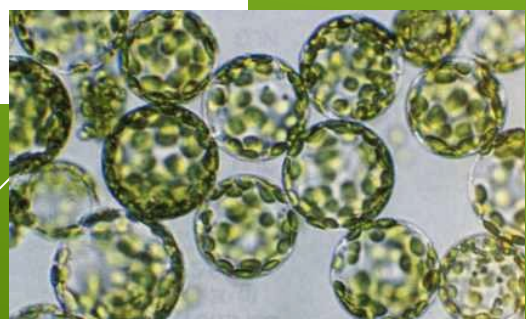
Orgán

Pletivo

Buňka



Buňka: mikrospory, pylová zrna, buněčné suspenze
Izolovaný protoplast



Příklady různých typů kultur



kalusová kultura



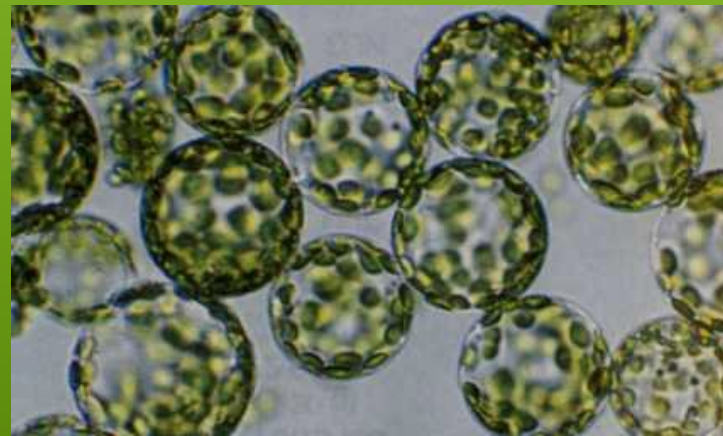
kultura prýtů



prašnicková kultura tabáku



suspenze buněk vojtěšky



roslinné protoplasty mezofylu tabáku

Definice termínů

ex plantare = pěstovat mimo

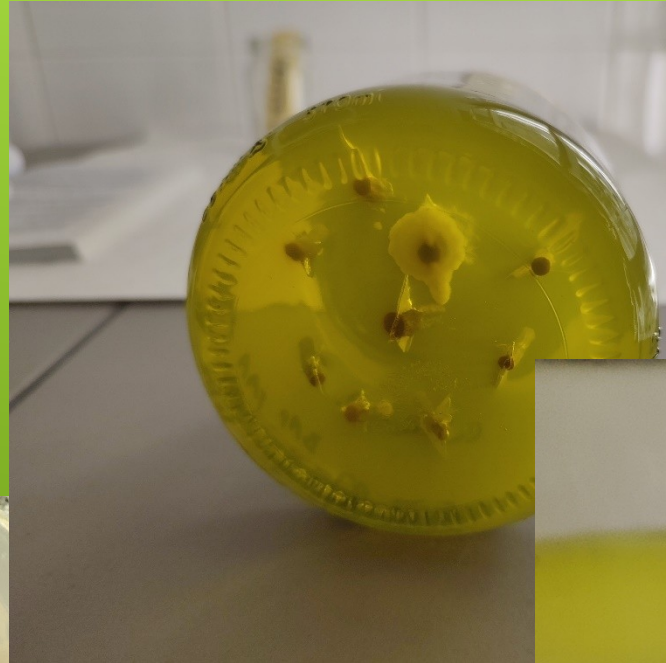
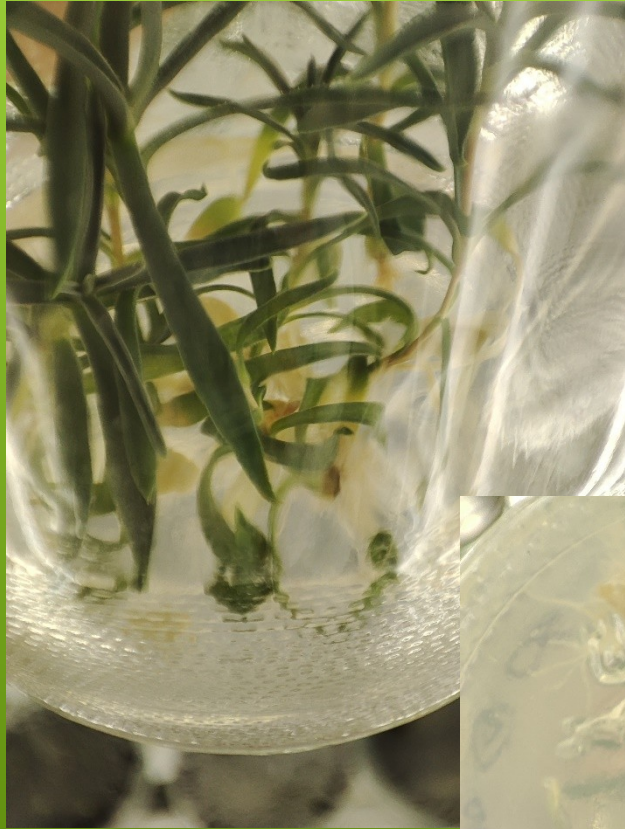
in vitro = ve skle, v umělých podmínkách

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

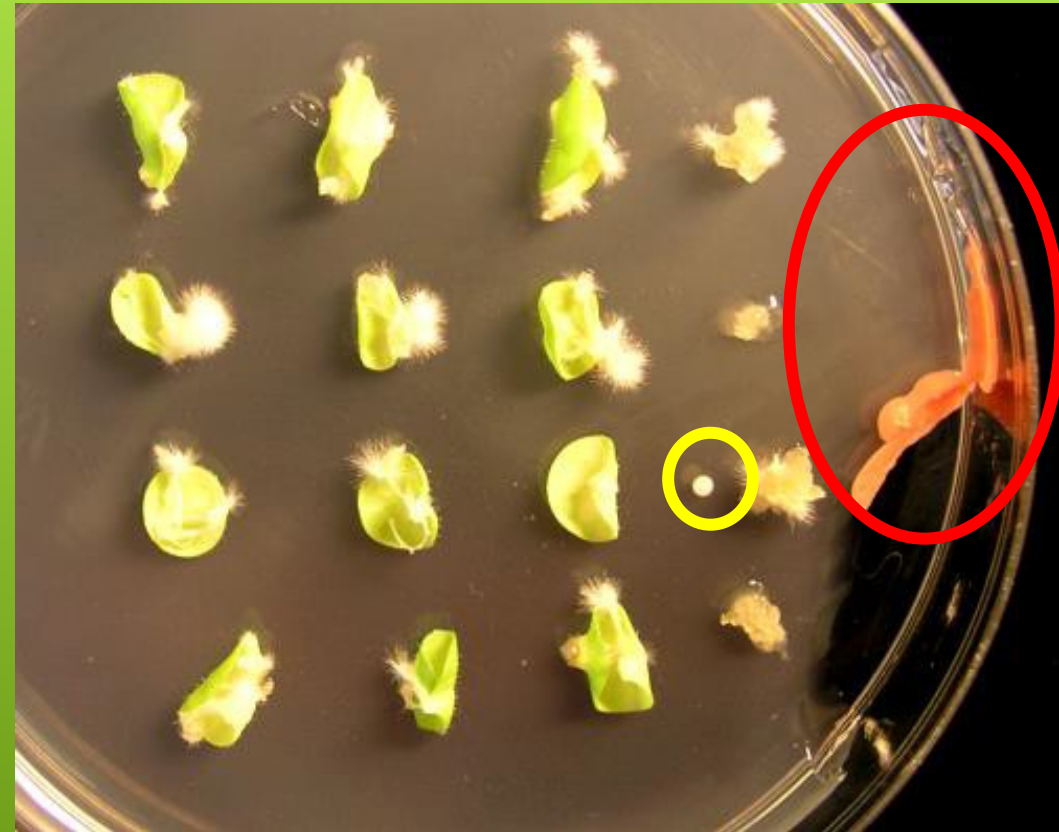
axenická kultura = kultura jednoho organismu

tkáňová kultura = historický pojem, přeneseno z oblasti fyziologie živočichů

Infekce v kulturách



Příklady infikovaných kultur



kultura infikovaná kvasinkami a bakteriemi

kultury infikované houbami

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

média ztužená



zkumavky, Petriho misky, Erlenmayerovy baňky,
zavařovací lahve, sklenice od dětské výživy, Magenta boxy...

Kultivační nádoby pro kultury *in vitro* (plasty)



Suspensní kultury

média tekutá

(nutné zajištění provzdušňování)



laboratorní třepačka

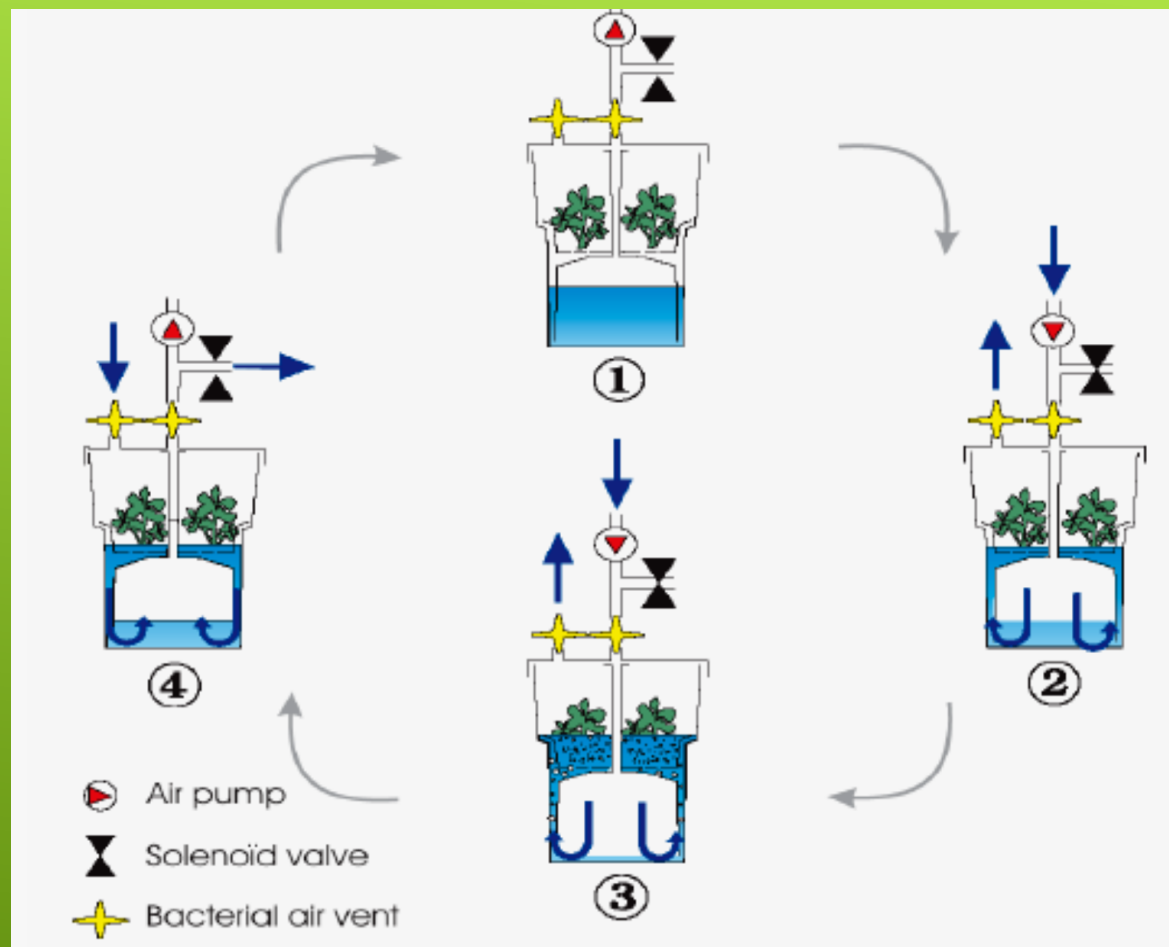


laboratorní bioreaktor



System Rita® dočasně zaplavované kultury

technická modifikace pro
pěstování explantátů v tekutém
médiu



www.vitropic.fr



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 ...

Využití explantátů

A. Získání teoretických poznatků

- buněčné dělení
- totipotence rostlinné buňky
- diferenciaci rostlinné buňky a pletiva
- metabolismus
- regulační mechanismy
- transformace a mutageneze

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

Příklady výzkumných laboratoří v ČR:

- **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** - <https://www.vubhb.cz/cs/laborator-tkanovych-kultur>

Historický přehled počátků rostlinných tkáňových kultur



Gottlieb Haberlandt

* 1854 Altenburg (Mosonmagyaróvár)

† 1945 Berlín

☐ považovaný za

Kultivoval exp

- parenchym listu
- dřevní stonku
- svěrací buňky
- trichomy *Tradescantia virginiana*

ale i sběratel

- neznalost výživy (Knoppův roztok, sacharóza, asparagin a pepton) a fytohormonů
- nesterilní kultura
- vysoce diferencované buňky v kultuře

➔ krátkodobé přežívání kultur

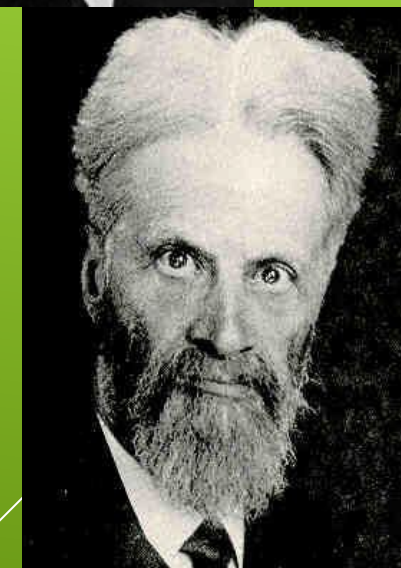
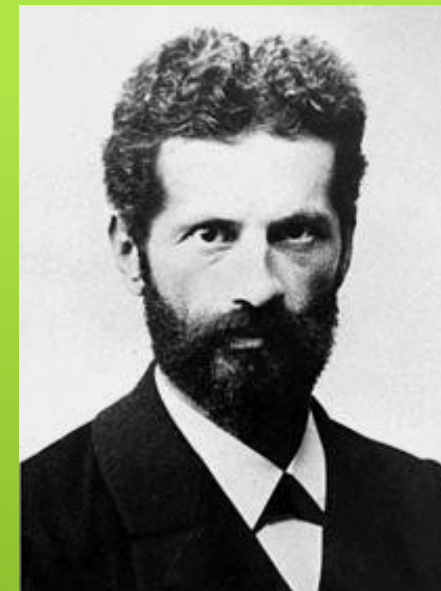
přesto Haberlandt věřil v budoucnost kultur *in vitro*

a formuloval 1902 teorii o totipotenci rostlinné buňky

(“one could successfully cultivate artificial embryos from vegetative cells.”)

(Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen)

“my knowledge, no systematically organized attempts to culture isolated vegetative cells from higher plants have been made. Yet the results of such culture experiments should give some interesting insight to the properties and potentialities which the cell as an elementary organism possesses. Moreover, it would provide information about the inter-relationships and complementary influences to which cells within a multicellular whole organism are exposed” (from the English translation by Krikorian & Berquam, 1969)



1922 **Knudson** - výsevy orchidejí *in vitro*
1925 **Laibach** – izolovaná embrya lnu (*Linum*)

„Totipotence“ rostlinné buňky

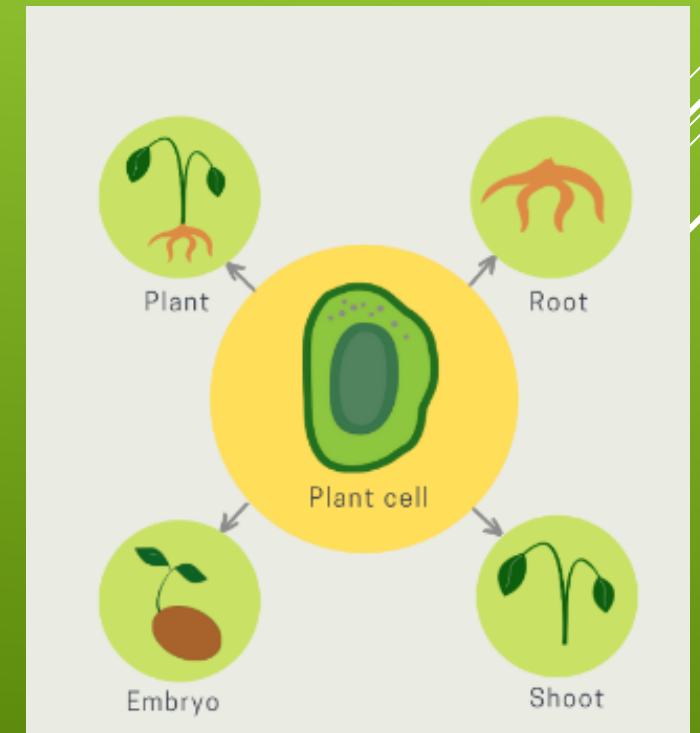
totipotence diferencovaných rostlinných buněk předpovězena v roce 1902 **Gottliebem Haberlandtem** (1854 –1945)

a v roce 1958 experimentálně potvrzena **Reinertem** a **Stewardem** somatickou embryogenezí u mrkve

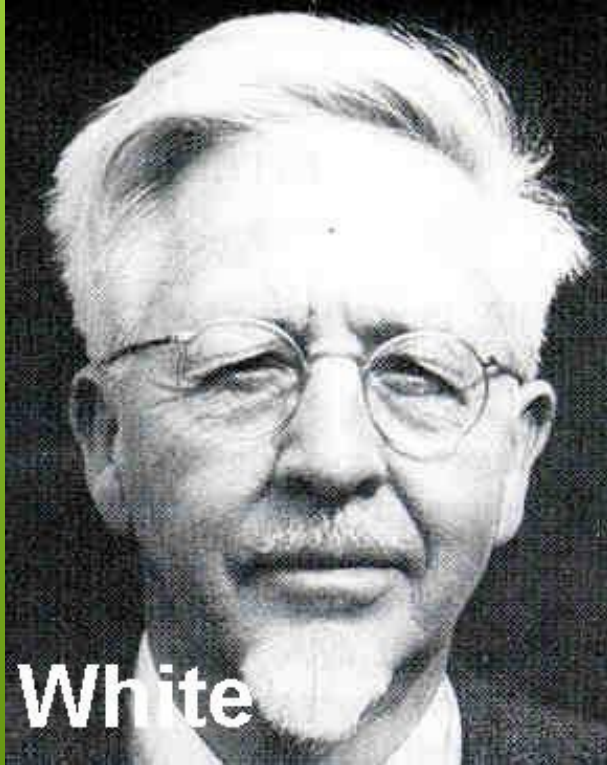
dnes se doporučuje termín totipotence nepoužívat
nahradit jeho význam termínem **pluripotence**

Totipotence =
schopnost jedné buňky
dát vznik všem typům
buněk

Pluripotence =
schopnost dělení
kmenové buňky a její
schopnost diferenciaci



První pravé „tkáňové kultury“



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

1935 **P.R.White** – kultura izolovaných kořenů rajčat

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

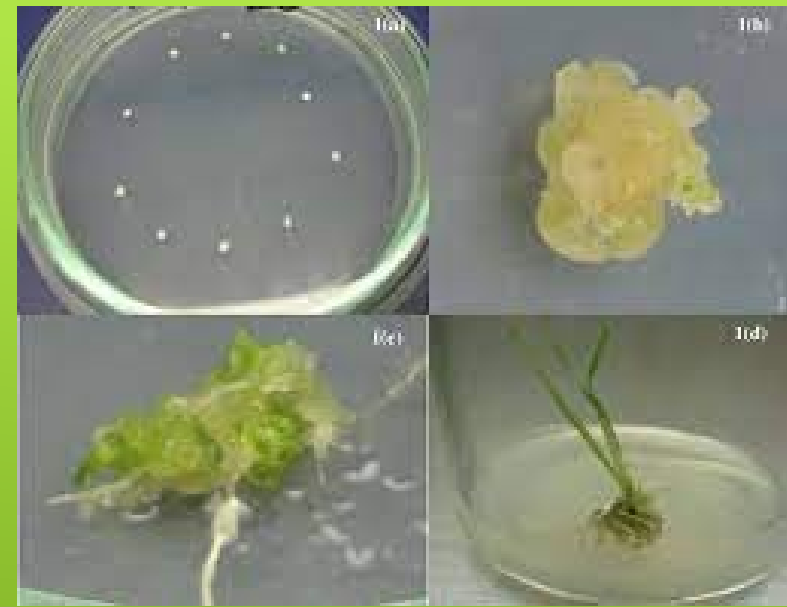
produkce fytohormonů

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



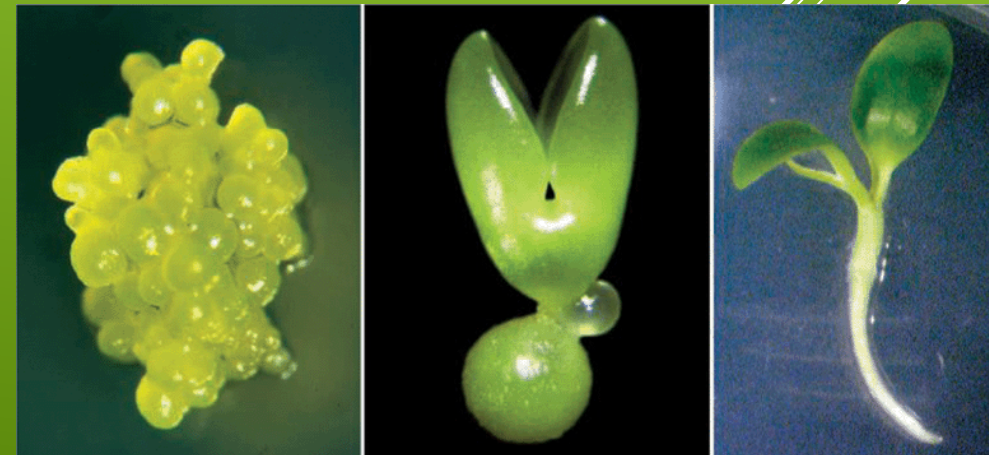
Suspenzní kultury

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



Haploidní techniky

1942 – LeRue – první pokus o kulturu vajíček

1949 - LaRue – první kontinuálně rostoucí pletivo z endospermu nezralých semen kukuřice

1965 – úspěšná regenerace rostlinek organogenezí

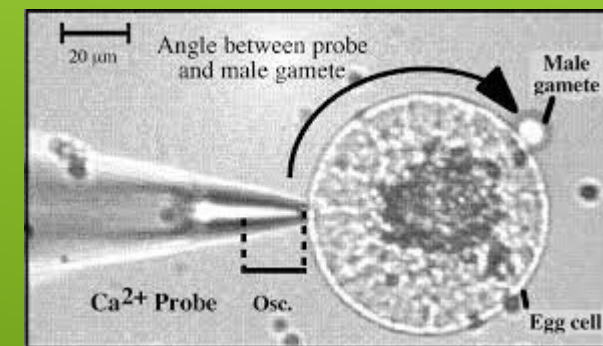


Opylení a oplození *in vitro*

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

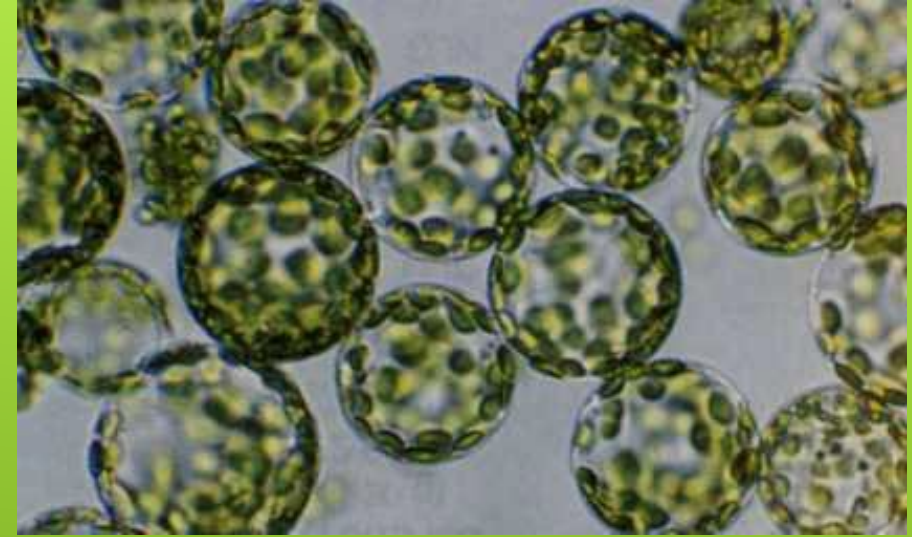
1965 - polská škola: **Zenkter** – společná kultivace pylových zrn a vajíček – vznik mezidruhových a mezirodových hybridů

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*)

Vývoj živných médií

- V počátcích živné roztoky (např. Knopův), které obsahovaly méně než 200 mg/l solí (minerálních)
- Heller (1953) zdvojnásobil množství na základě zkušeností
- Nitsch a Nitsch (1956) zvýšili až na ca 4 g/l
- nebylo to pořád optimální: proto přídavky kvasničného extraktu, bílkovinných hydrolysátů, kokosové vody

- **Murashige a Skoog (1962)** – mj. analýza popela z kalusu tabáku: médium s koncentrací některých solí 25x větším než Knopův roztok, vysoká koncentrace NO_3^- a NH_4^+ a více druhů mikroprvků

tzv. MS médium

(makro- a mikroživiny, zdroj uhlíku, redukovaný dusík, B vitamíny, příp. růstové regulátory)

„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/>

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)

Užitečné stránky (angl.):

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

„Plant tissue culture“