05_Mikropropagace
Množení *in vitro*

Mgr. Hana Cempírková, Ph.D.

Rostlinné explantáty

Definice mikropropagace

- **Micropropagation is the true-to-type propagation of a selected genotype using *in vitro* culture techniques.**
- Micropropagation is a method to produce genetically identical plantlets by using tissue culture techniques
- **High yield plant production, grown in a nutrient rich gel under sterile lab conditions.**

[R. Fenwick 2004]

Micropropagation is an advanced vegetative propagation technology for producing a large number of genetically superior and pathogen-free transplants in a limited time and space.

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)

restituce = 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

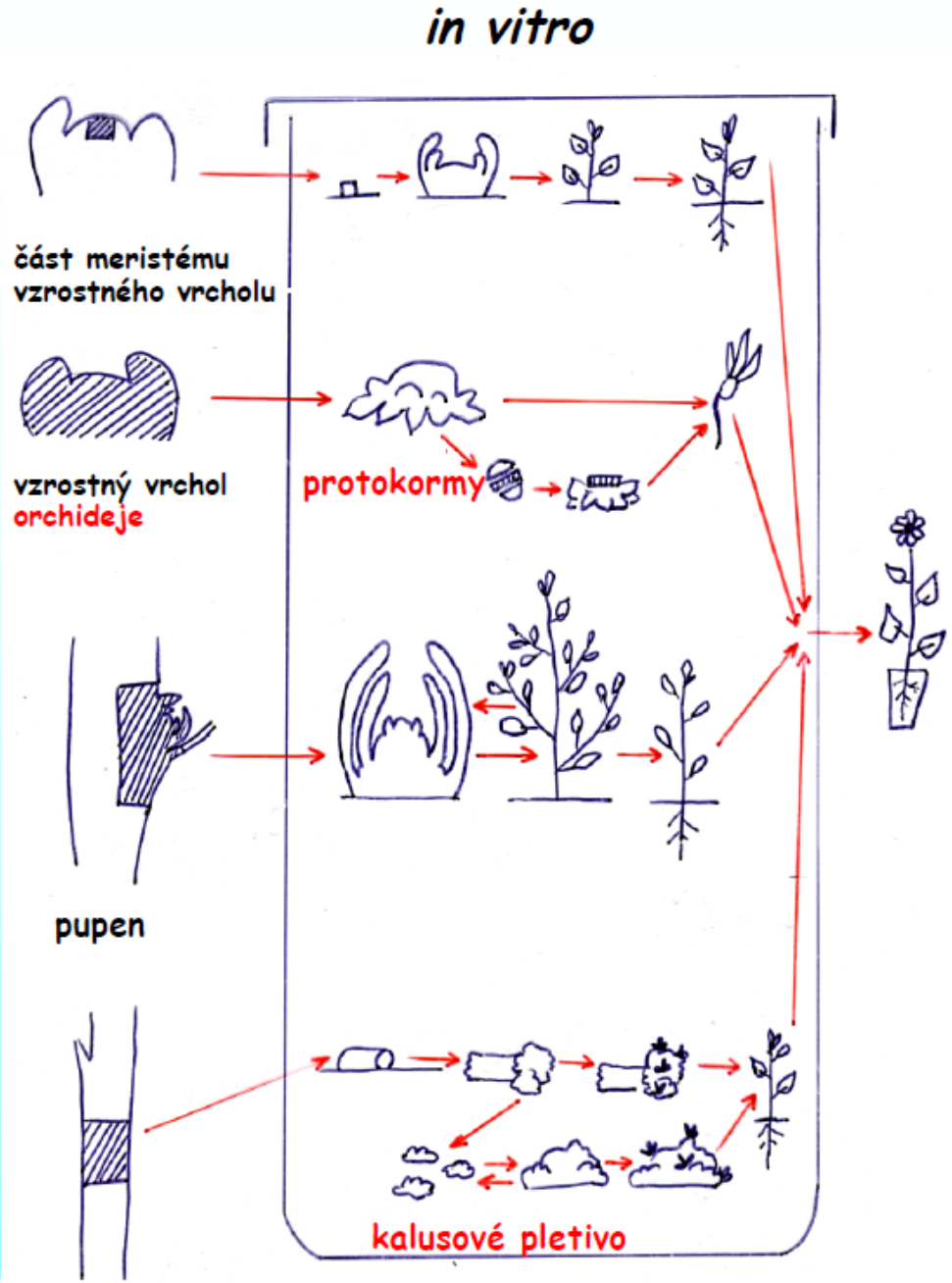
restituce = náhrada odňaté části - meristémy (meriklonové množení)

reprodukce = regenerace z již existujících základů

nodální segmenty

regenerace *de novo* = odvozování přes kalus

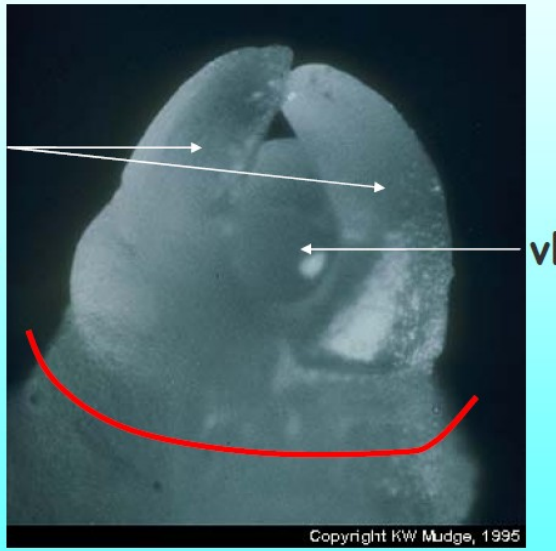
internodální segmenty, diferencované orgány



Apikální stonkový meristém

listová primordia

izolovaný „meristém"



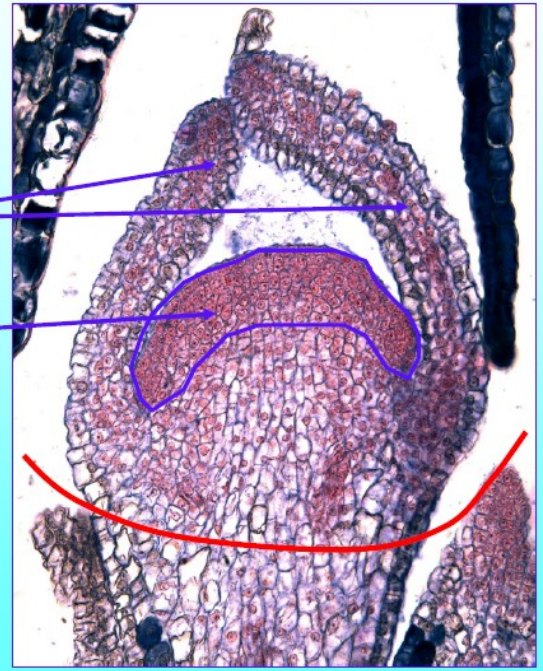
vlastní meristém

Apex stonku *Begonia rex*

listová primordia

apikální meristém

izolovaný „meristém"



Typy mikropropagace

- 1) **meristémové množení** (apikální nebo axilární meristémy)
- 2) **tvorba adventivních prýtů** (z již diferencovaných orgánů, např. listy, internodia, listy cibulových hlíz, květenství, dělohy… - přes kalus nebo přímo)
- 3) **kalusové, suspenzní a protoplastové** kultury
- 4) **somatická embrya** a umělá semena

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

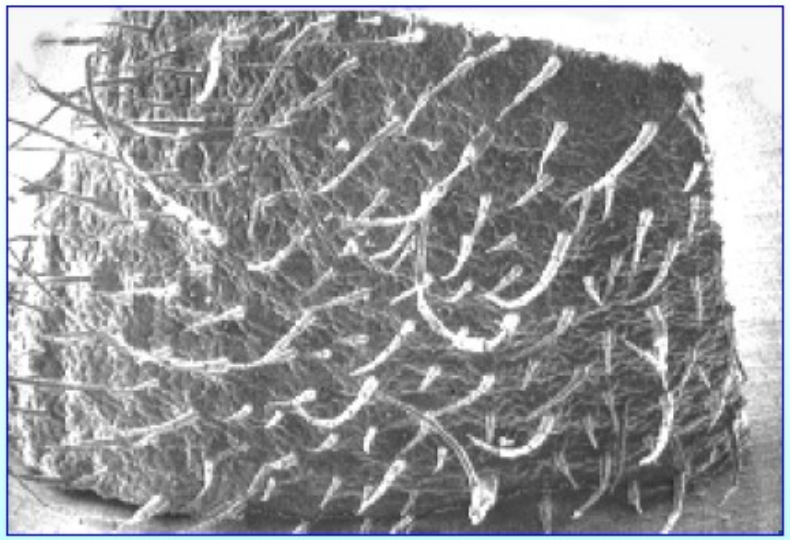
III. zakořeňování

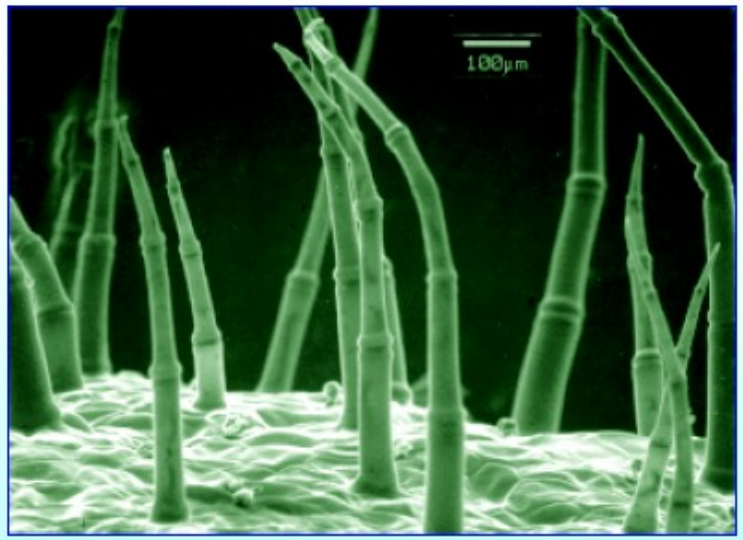
IV. Převádění do nesterilních podmínek *ex vitro*

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

Stadia mikropropagace *Saintpaulia ionantha* Wendl.

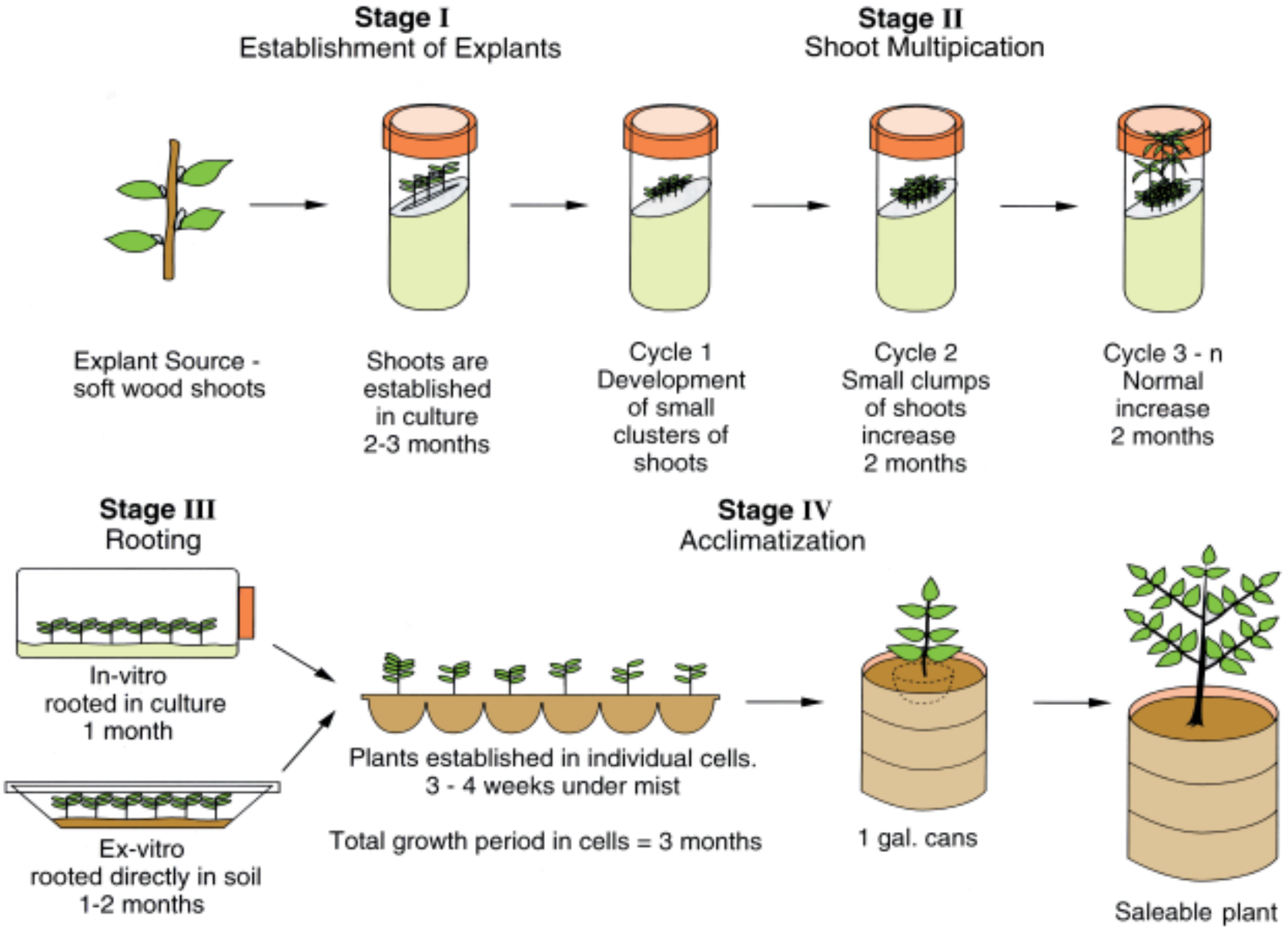
I.





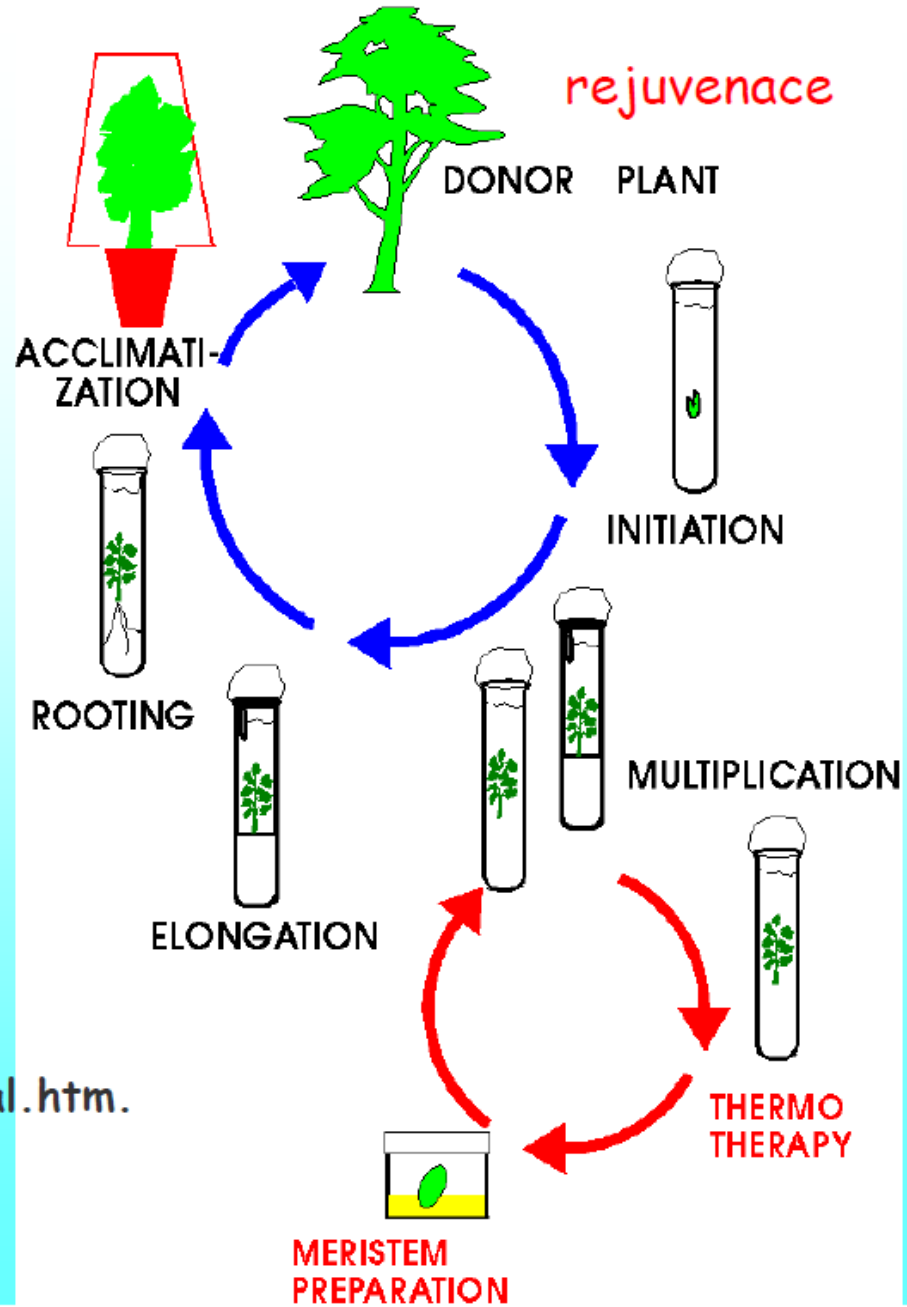
II.

III.



http://irrecenvhort.ifas.ufl.edu/plant-prop-glossary/09-tissue-culture/01-types/04-tctypes-micropropagation.html

fáze mikropropagace dřevin



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

Rejuvenace dřevin

- Methods Mol Biol. 2013;11013:383-95. doi: 10.1007/978-1-62703-074-8_30.
- **In vitro rejuvenation of woody species.**
- Read PE[1], Bavougian CM.
- **Author information**
- **Abstract**
- Juvenility and phase change in woody plant species exert profound impacts on plant morphology and the ability of explants to be successfully propagated in vitro. Morphological characteristics such as leaf shape modifications, thorniness, and the inability to initiate flowers are associated with juvenility. Physiological maturity, that is the ability to reproduce sexually, is reached by many woody species only after many years of juvenile growth. As a result, micropropagation of woody species has historically been difficult with many plant species proving to be exceedingly **recalcitrant**. The importance of juvenility and its impact on successful vegetative reproduction in vitro has therefore received much research attention. In vitro technologies that have been demonstrated to induce **rejuvenation** include meristem culture, chemical treatments, pruning and hedging, forcing new growth, and taking advantage of epicormic buds, grafting and micrografting, and somatic embryogenesis. Applications of these technologies are discussed in this chapter.

Meristémové kultury a termoterapie

Kombinace *in vitro* termoterapie a meristémové kultury - nejúčinější 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).

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

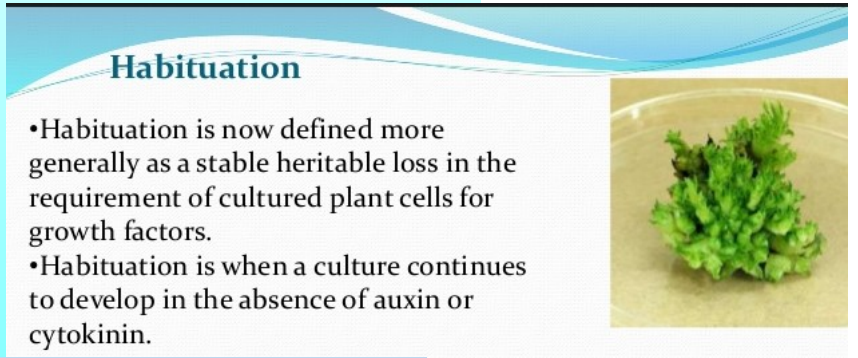
médium se **sníženou koncentrací regulátorů** nebo bez nich, možný přídavek giberelinů

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

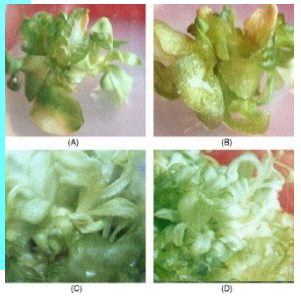
pak je nutné nové založení kultury

možné problémy:

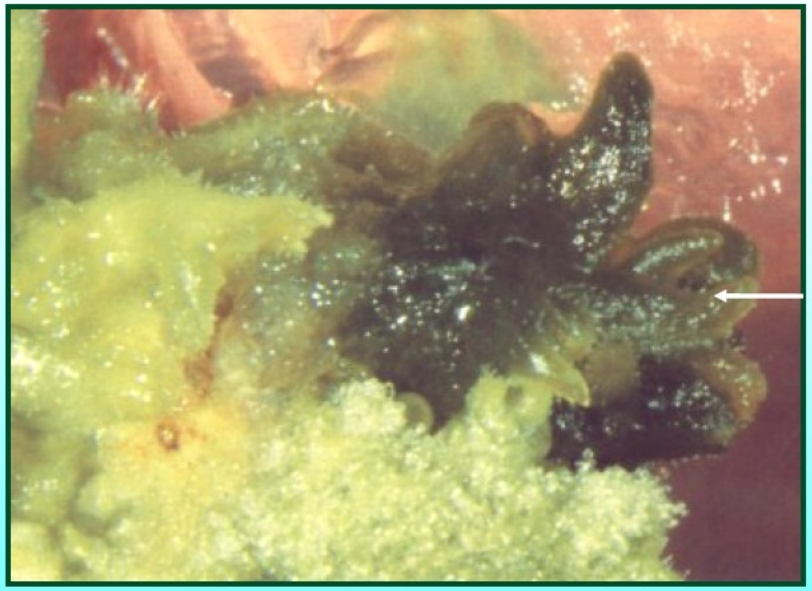
habituace Kultura pokračuje ve vývoji i přes nepřítomnost auxinů nebo cytokininů



vitrifikace (hyperhydratace) – převodnění pletiv



II. stadium mikropropagace



adventivní prýty

Debergh *et al.*

mikropropagace melounu *Cucumis melo* L.

mikropropagace ananasu

http://www.micronesialandgrant.org/in-vitro-mass-scale-disease-free-pineapple-seedling-production-research-and-multiple-demonstrations-on-sustainable-climate-smart-and-organic-commercial-cultivation/

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 mykorhizy 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

Habituace = 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)

Znaky vitrifikace

morfologické

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

anatomické

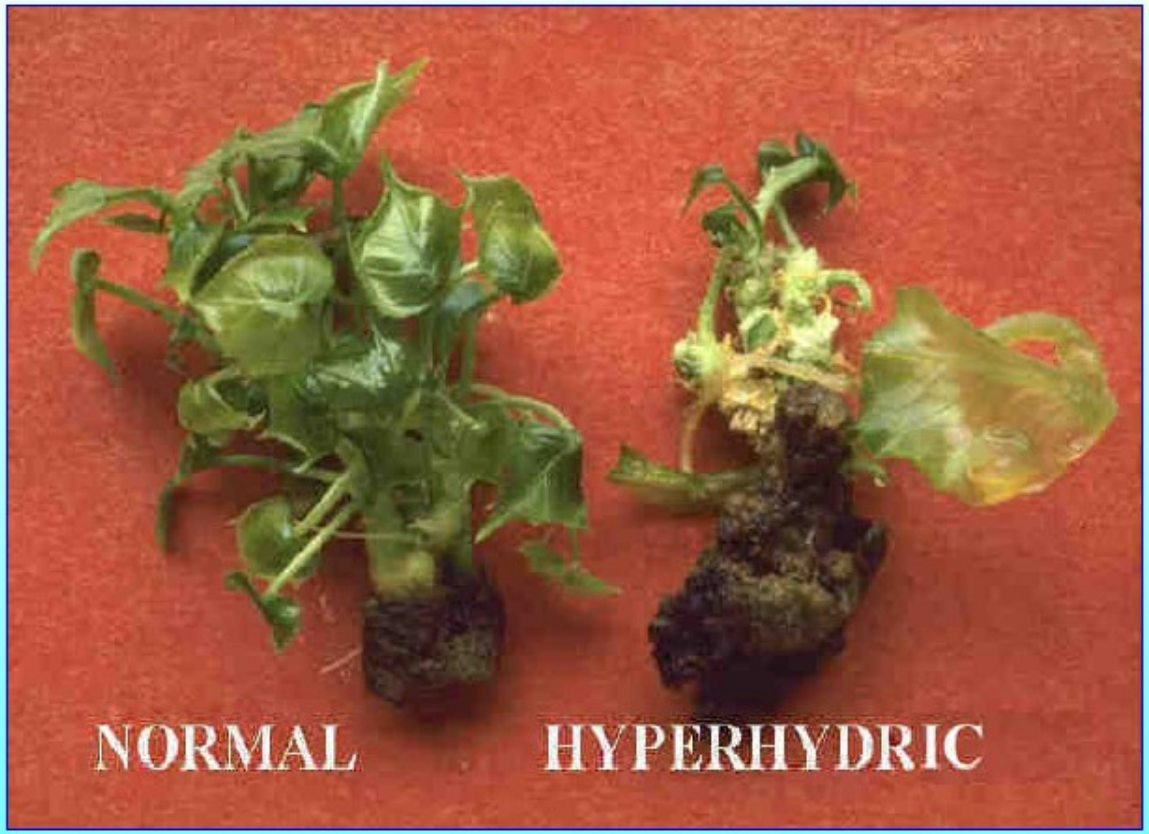
1. velké interceluláry
2. hypolignifikace
3. redukovaný vývoj cévního systému
4. defektní epidermis
5. změněné ukládání vosků
6. snížená funkce průduchů

biochemické

žádné obecné závěry

Debergh *et al.*

Příklad jasných vizuálních symptomů vitrifikace u *Oreopanax nymphaefolia*



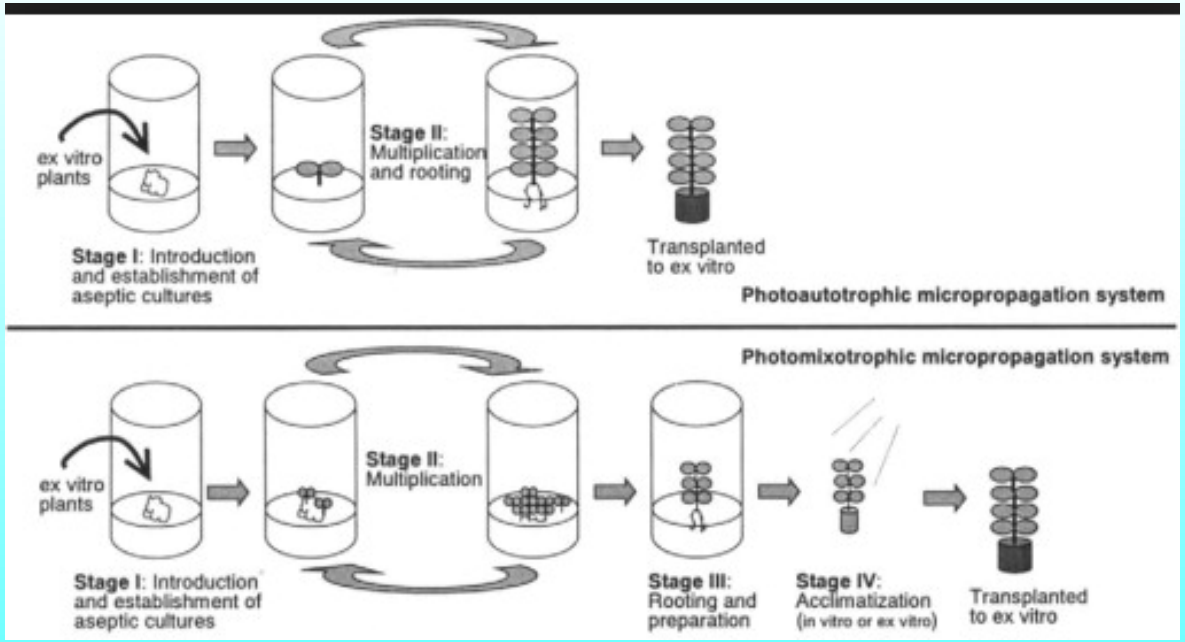
Debergh *et al.*

Srovnání atmosféry ve skleníku a kultivační nádobě

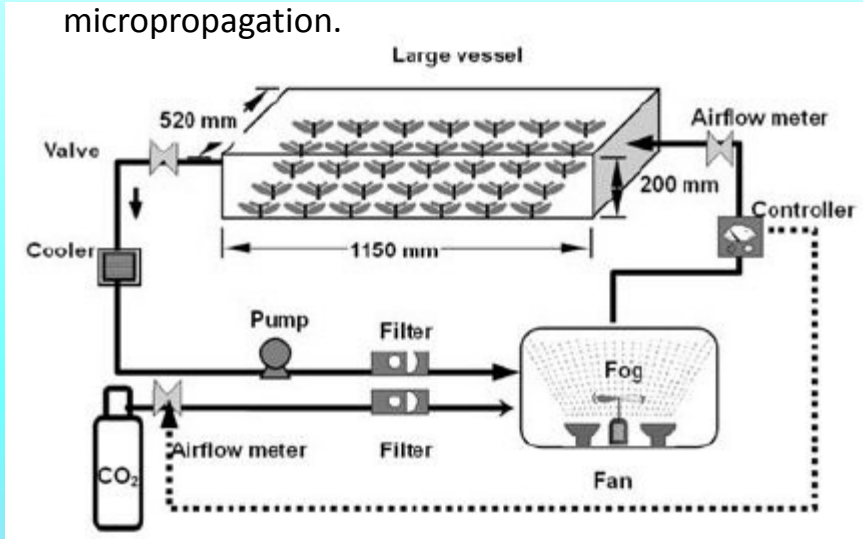
složka	skleník	kultivační nádoba
O_2	22 %	až 4 %
N_2	77 %	až 87 %
CO_2	365 - 1000 ppm	0,1 – 0,2 %
vodní pára	60-85 %	± 100 %
ethylen	5 ppb - 100 ppb	větší než 2 ppm

Fotoautotrofní mikropropagace

- bez dodání exogenních organických látek (cukry, vitamíny…)



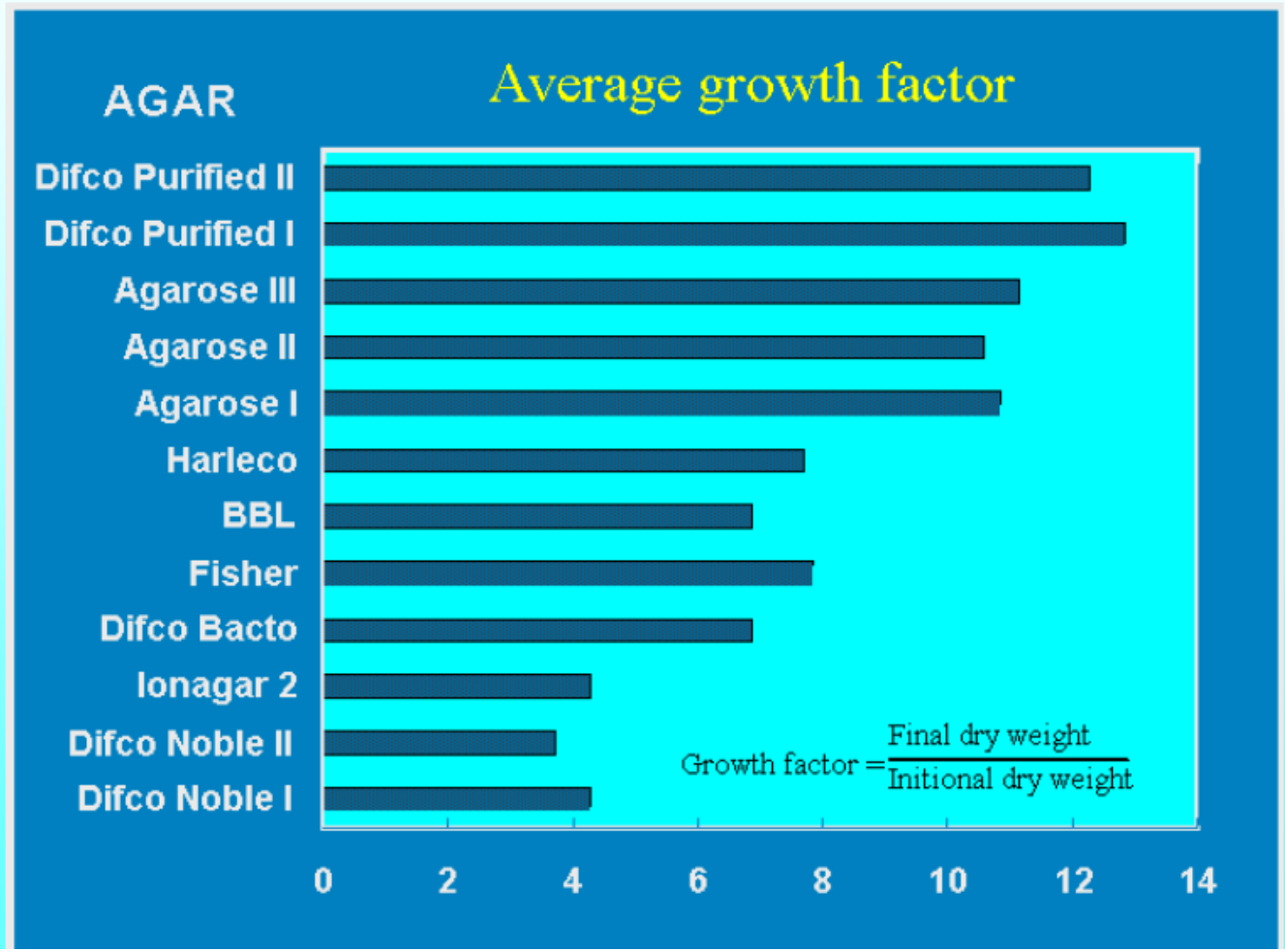
A schematic diagram of the forced ventilation unit for supplying CO 2 -enriched, humidified, and cooled air for photoautotrophic micropropagation.



Growth promotion of Gerbera plantlets in large vessels by using photoautotrophic micropropagation system with forced ventilation, PROPAGATION OF ORNAMENTAL PLANTS 5(4):179-185

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

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



Komerční mikropropagace

- http://www.micropropagation-services.co.uk/
- http://bestcarnivorousplants.com/dionaea/
- http://www.monfori.com/

Source : Cadila pharmaceuticals limited

Rostlinné taxony v komerčních laboratořích

COST meeting 1992, Dijon

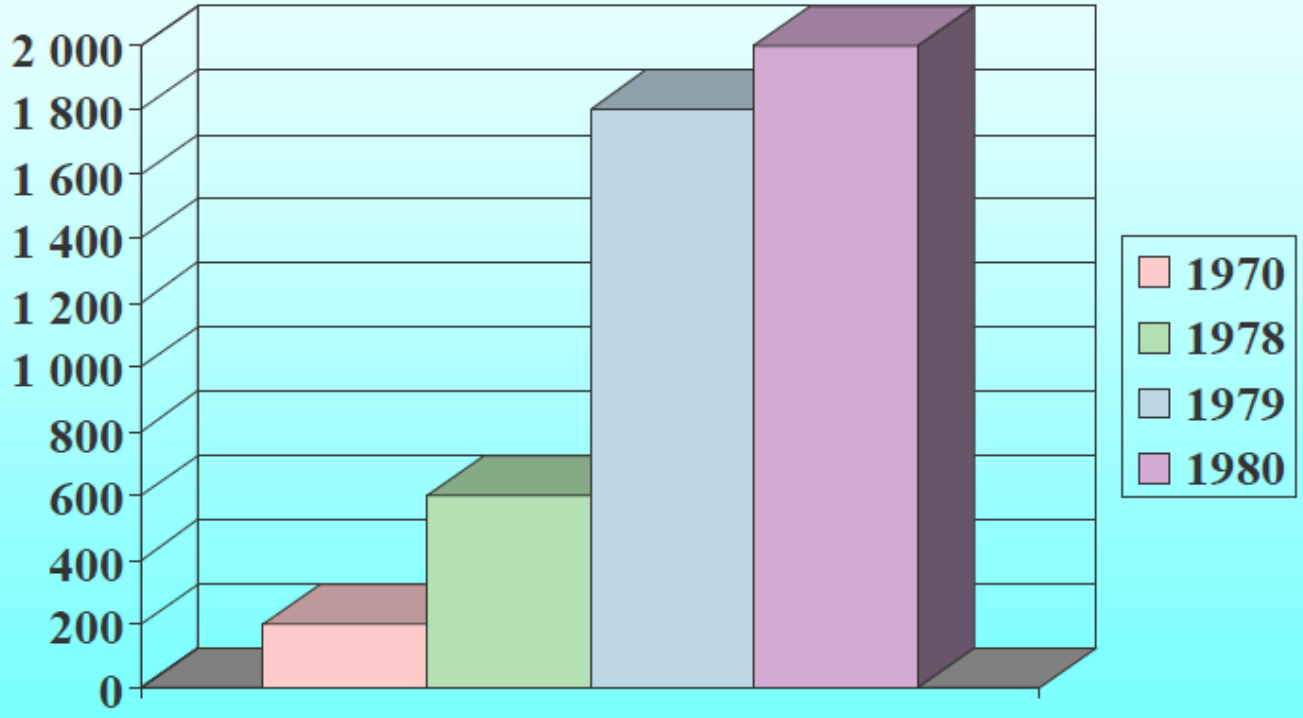
Rod	Počet laboratoří
Prunus	107
Ficus	82
Philodendron	56
Spathiphyllum	46
Nephrolepis	44
Rosa	41
Syngonium	37
Malus	35
Orchidaceae	31
Solanum	30
Gerbera, Begonia, Fragaria	26

Innovative techniques of micropropagation

- http://www.ivalsa.cnr.it/en/research/innovative-techniques-of-micropropagation-in-vitro-propagation.html
- almost 25 millions the plants produced by micropropagation
- many **fruit** species, but also **ornamental** plants and some **vegetables**
- the optimization of specific microproagation protocols in **semi-solid media**, and the **development of innovative tissue culture systems**, such as **somatic embryogenesis**, the production and regeneration of encapsulated explants (**synthetic seeds**), the liquid culture in **temporary immersion system** (TIS)

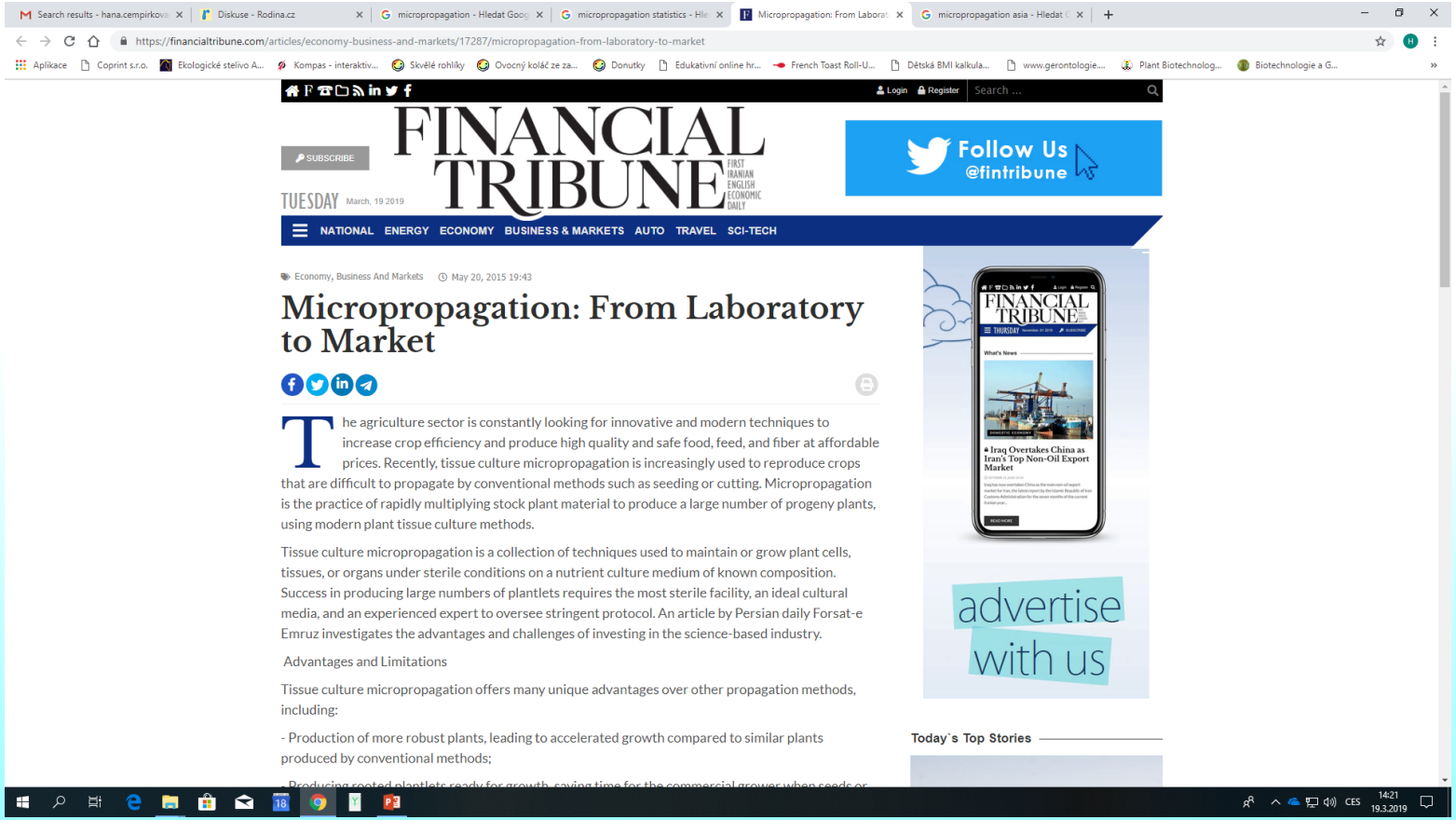
Produkce sazenic *in vitro* (x 1000)

Firma Miyoshi (Japonsko)



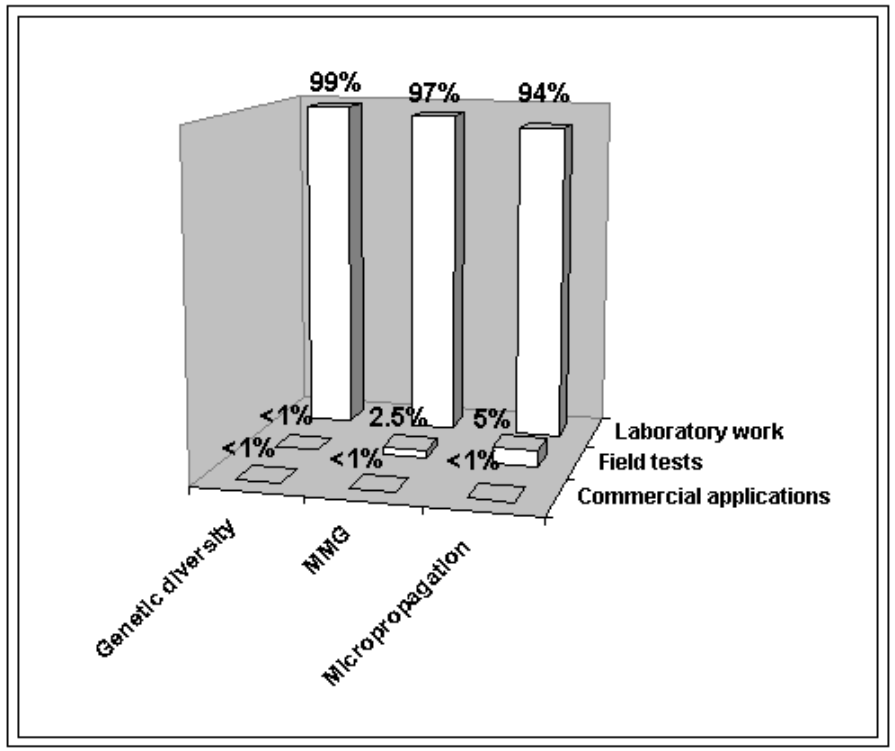

Laminární boxy
komerční laboratoře
katalog firmy

Kultivace - komerční laboratoře



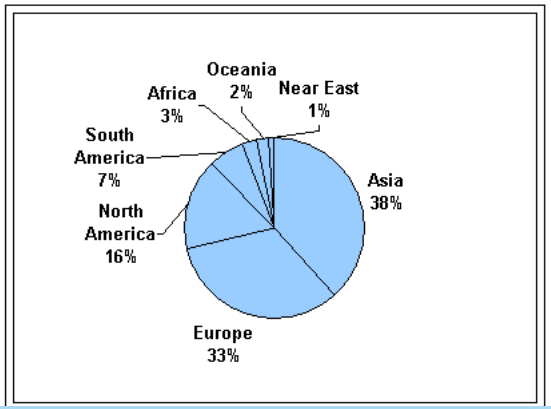
Despite the many advantages**, high production costs**, **labor-intensive process**, requirement of **sophisticated facilities and skills** and the **vulnerability of progeny plants to infections** are among major limitation in the use of micropropagation. Unavailability of immediate market for the produced crops and the **high cost of export and transportation** are among other limitations while considering investment in the sector. Experts believe micropropagation is not economically feasible when practiced in small areas, suggesting **the establishment of large-scale micropropagation plants for generating reasonable profits**.

Figure 2.1.5. Distribution of reported forest biotechnology activities, excluding genetic modification, by category and applications (laboratory studies, field trials and commercial deployments)[1]



[1]MMG: mapping, marker-assisted selection and genomics.

Figure 2.1.13A. Distribution of micropropagation activities by region of activity



http://www.fao.org/3/ae574e/AE574E06.htm

Clip slide

Micro-propagation a tool for commercialization (Taiwan story)

According to Taiwan Today, Jan 1, 2016

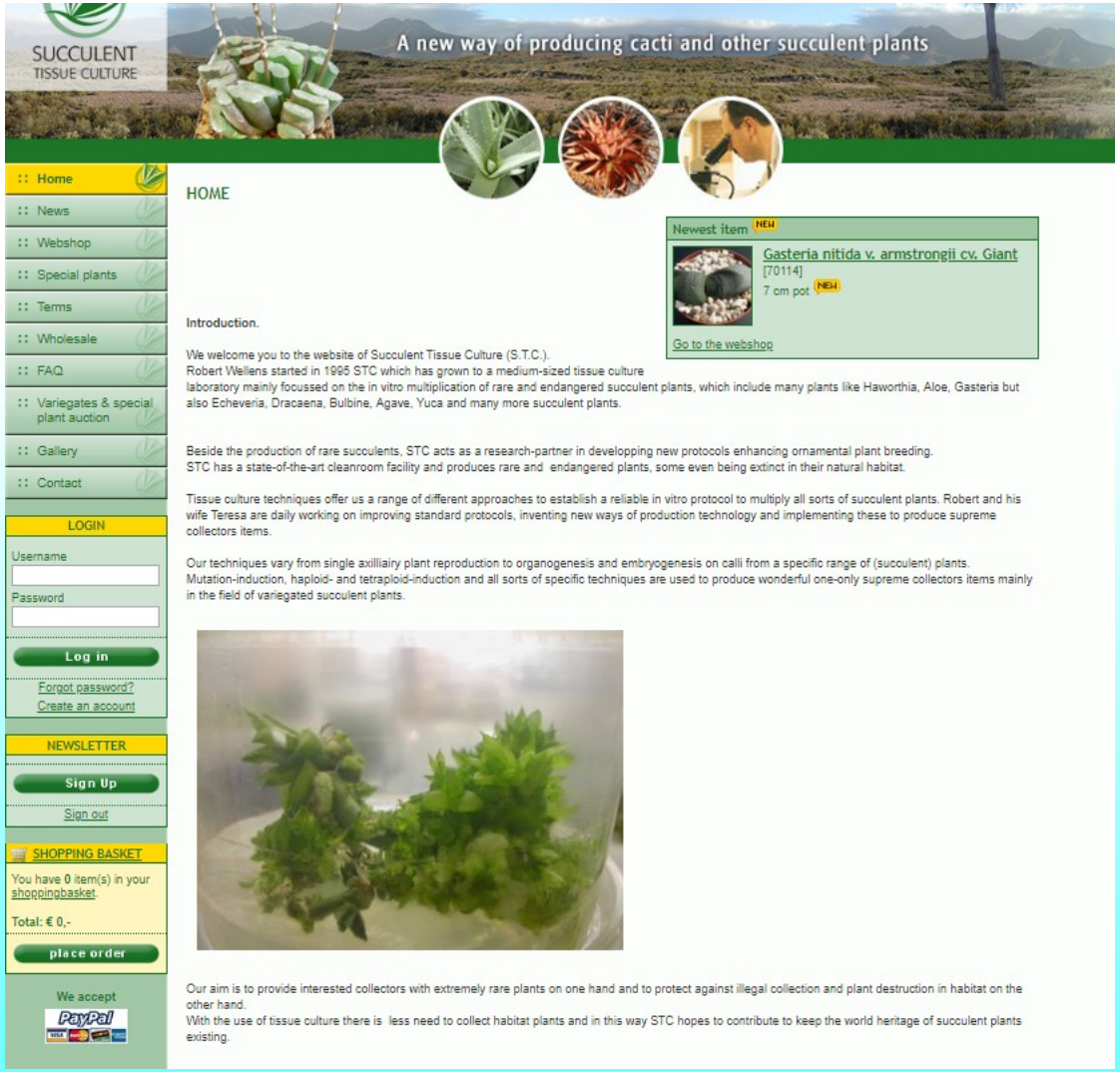
- The nation's orchids are exported to 36 countries in Northern America, Northern Europe and South Africa.
- This country began the export with US $ 23 million in 2004 but in 2015 they have exported with worth US $ 130 million.
- They are selling a Phalaenopsis or moth orchid in Dubai at the price of US $ 1,000.
- Won the bid to host the 23rd World Orchid Conference in 2020.

What may be the reason for this achievement ?

- According to John Feng, CEO of SOGO TEAM CO LTD., they are exploiting micro-propagation as a technique in mass production as well as in variety improvement.
- In I-Hsin Biotechnology Corp's Tissue Culture Lab only, they have conducted 12,000 breeding experiments which have yielded 2,300 Phalaenopsis varieties.
- This all is being possible through tissue culture.

Commercial Production of Ornamental Tropical Foliage Plants: Microp

- https://edis.ifas.ufl.edu/ep520



- https://www.succulent-tissue-culture.com/EN/home

***In vitro* propagation of endangered *Mammillaria* genus (Cactaceae) species** and genetic stability assessment using SSR markers, In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant
October 2018, Volume 54, Issue 5, pp 518–529

Table 3. Projected multiplication rate of banana under of tissue culture from a single explant

Particulars Stage		Duration (days)	No. of plants
Initiation		25	1
Subculture stages	1st	50	3
	2nd	75-80	12
	3rd	100-110	48
	4th	125-130	192
	5th	175-180	760
	6th	200-210	3,040
	7th	225-230	12,160
Rooting		255-260	11-12,000
Primary hardening		270-280	11,500-11,000*
Secondary hardening		310-320	10,000-10,500**

*Success depends on the sophistication of the hardening structure
**Somaclones and off-types constitute the major discards

Příklady využití in vitro rostlin v ČR

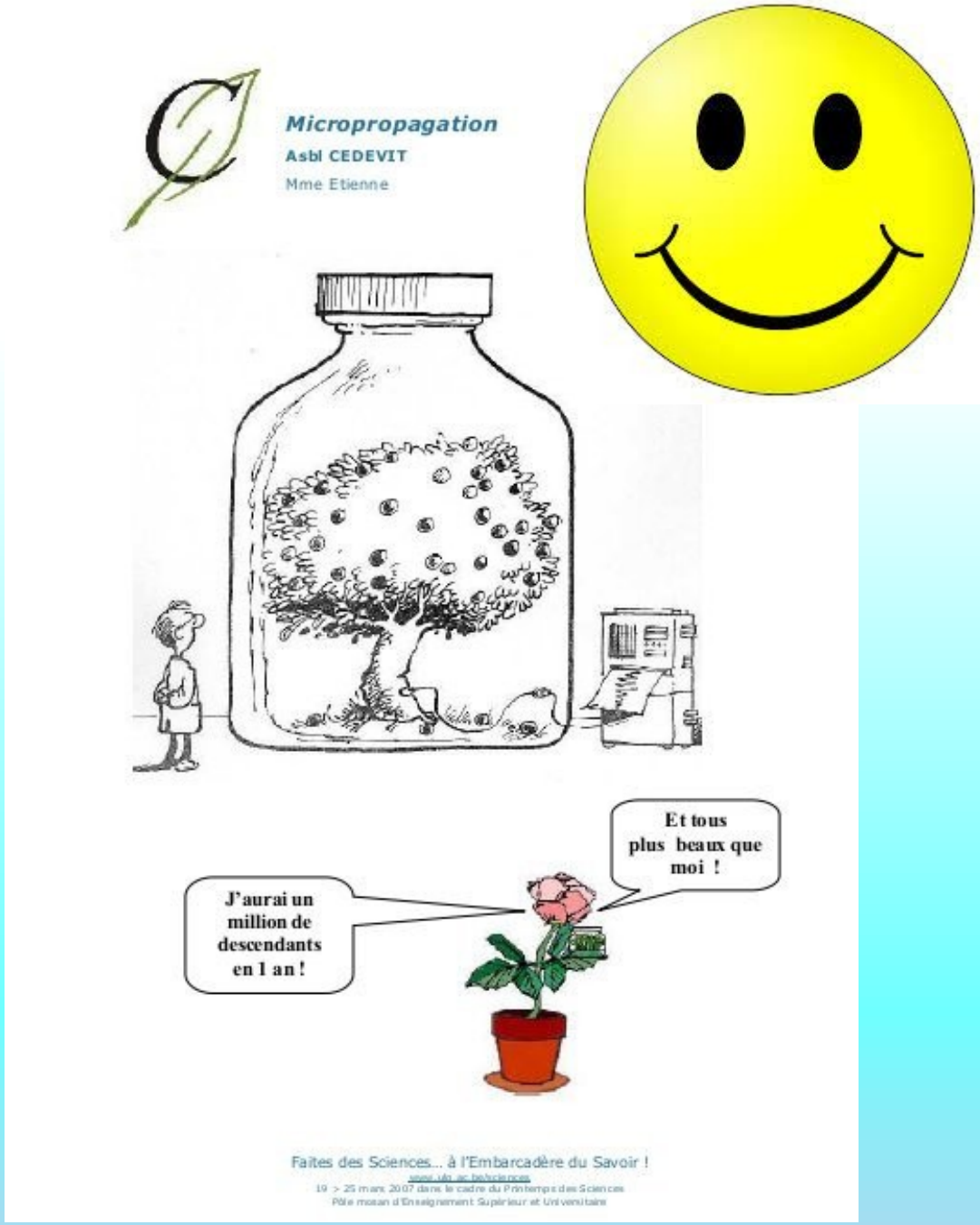
- http://zahradaweb.cz/rozmnozovani-okrasnych-drevin-mikropropagaci/
- http://www.janholub.cz

- http://www.profiplants.cz/kategorie/akvarijni-rostliny

- http://www.lesaktualne.cz/vyzkum/vedci-prispivaji-k-udrzeni-biologicke-rozmanitosti-drevin

- http://www.agris.cz/clanek/190191

- **Plant culture is used commercially**
- Culturing plants in the laboratory has become common practice, and this technique is used commercially to produce plants for the agricultural and horticultural industries. You may be surprised to learn that most of our **native carnivorous plants** that can be purchased legally are the products of tissue culture. It is illegal to collect most species in the wild, so producers pay for licenses to collect a limited number of specimens that they then use to establish tissue culture lines. Periodically, some of the descendent cultures from a line are subjected to growth regulators which cause them to develop into young plants that can be sold.



https://www.amazon.com/Microclone-Tissue-Culture-Starter-Kit/dp/B01M7NDE10