

ROSTLINNÉ EXPLANTÁTY (KULTURY *IN VITRO*)

ÚVOD

HANA CEMPÍRKOVÁ

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



CÍLE

- ▶ pochopení základních pojmů a principů používaných v oblasti rostlinných explantátů

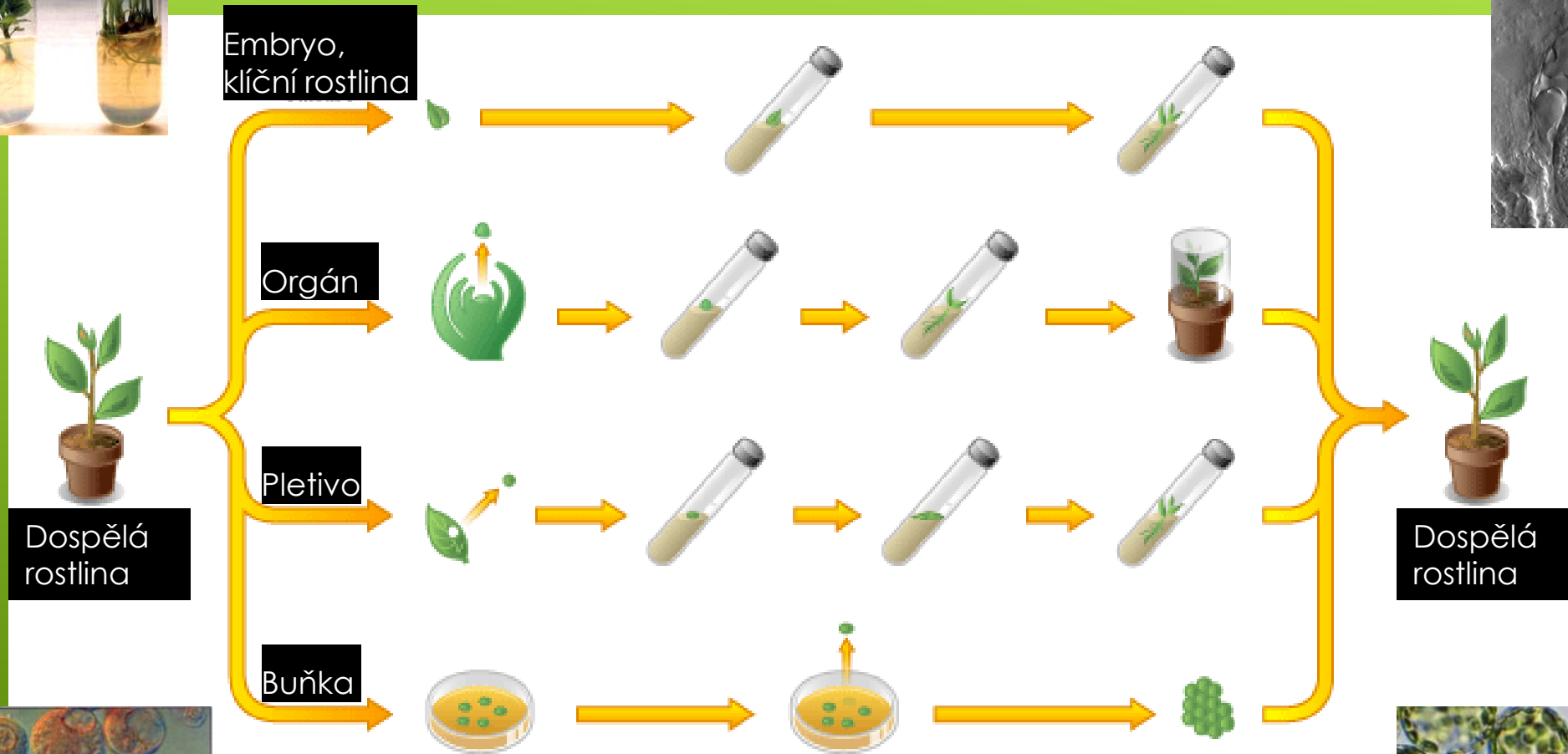
Definice termínů

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

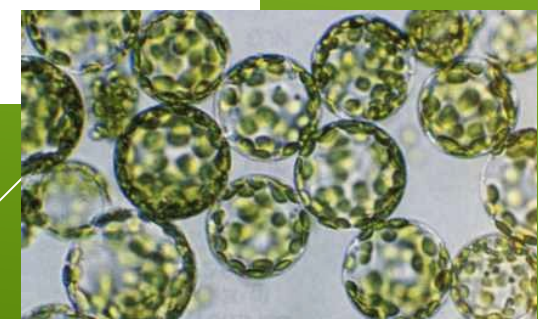
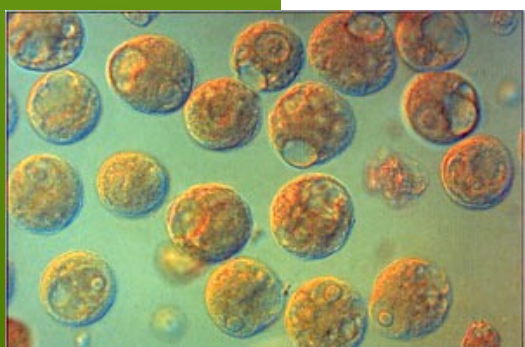
Embryo,
klíčící rostlina

Orgán

Pletivo

Buňka

Buňka: mikrospory, pylová zrna, buněčné suspenze
Izolovaný protoplast



Příklady různých typů kultur



kalusová kultura



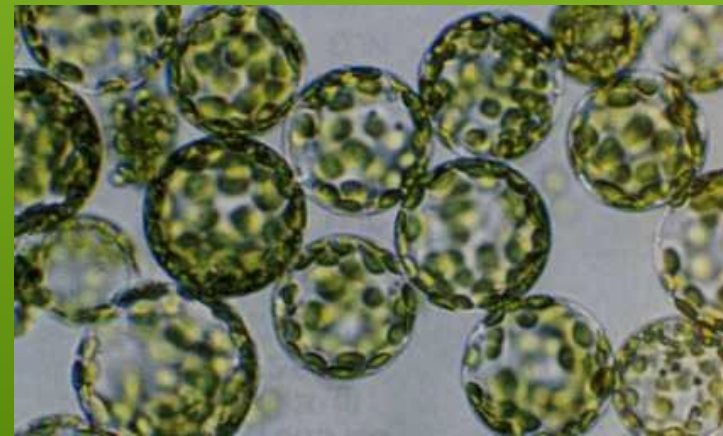
kultura prýtů



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)

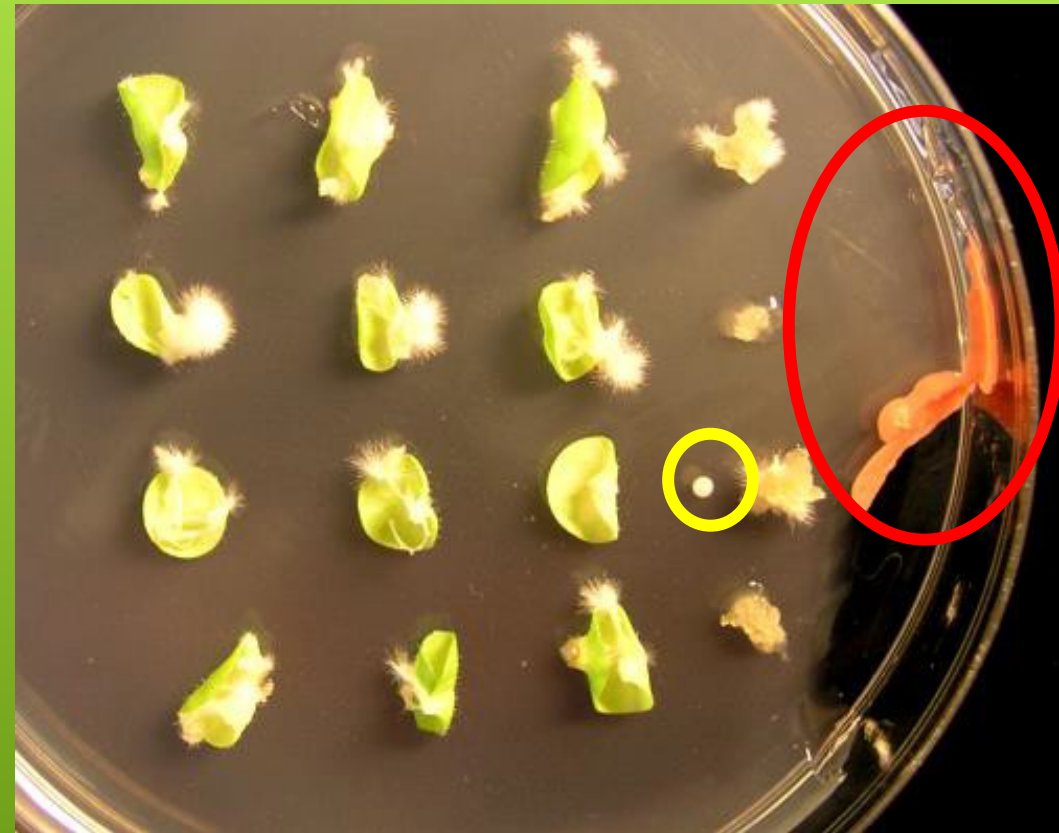
axenická kultura = kultura jednoho organismu

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

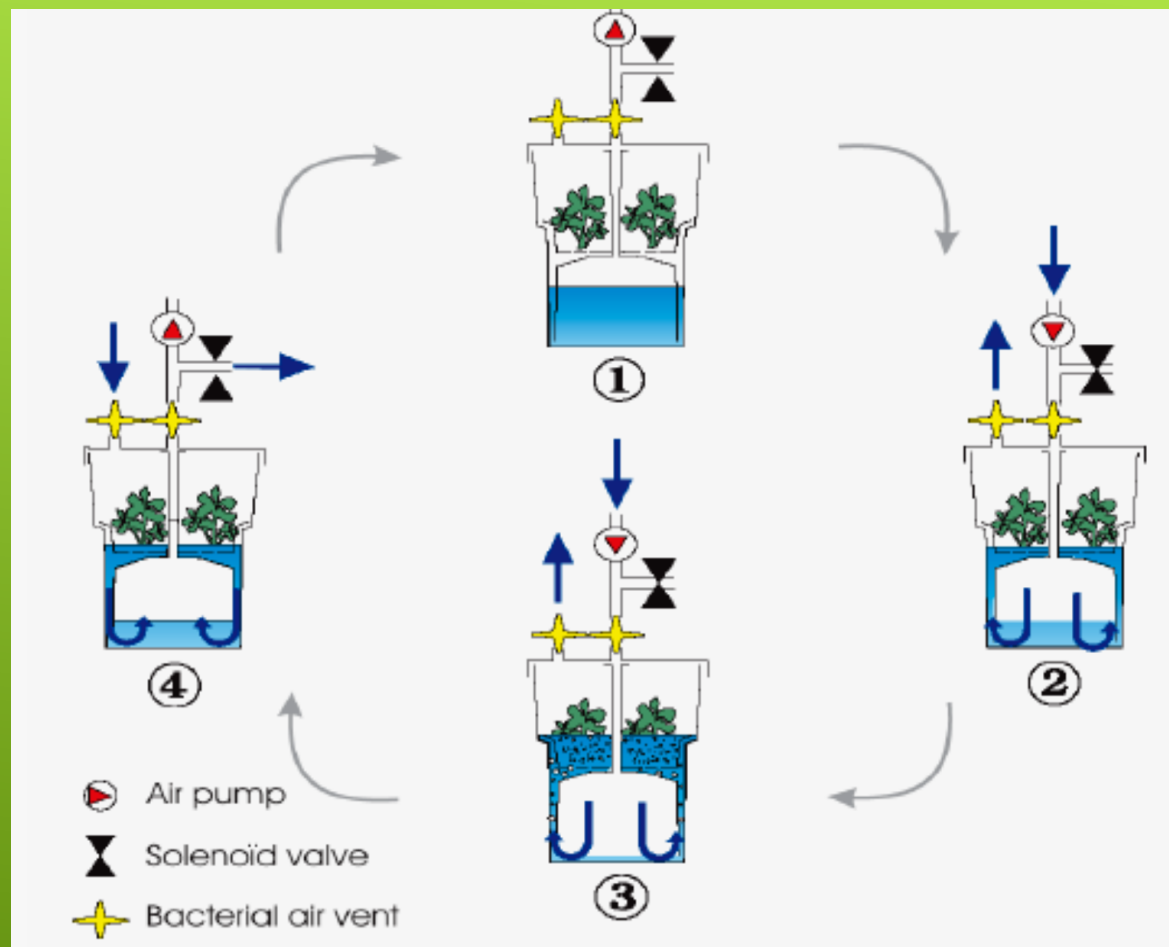


laboratorní bioreaktor



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 mutagenese

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

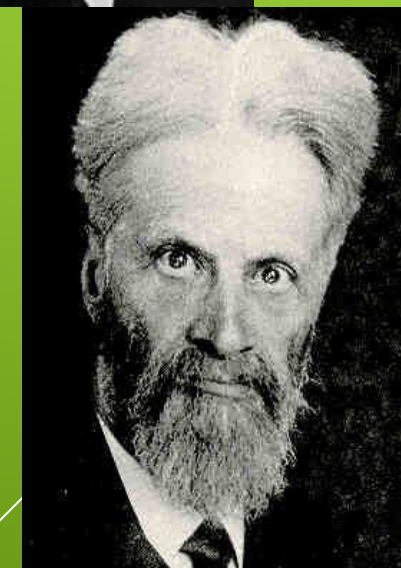
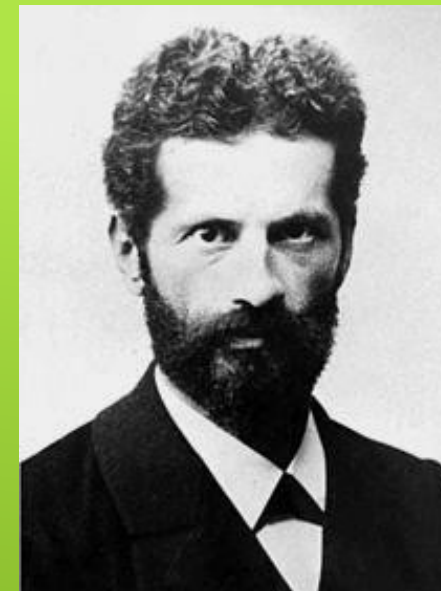
➔ krátkodobé přežívání kultur

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)



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

„Totipotence“ rostlinné buňky

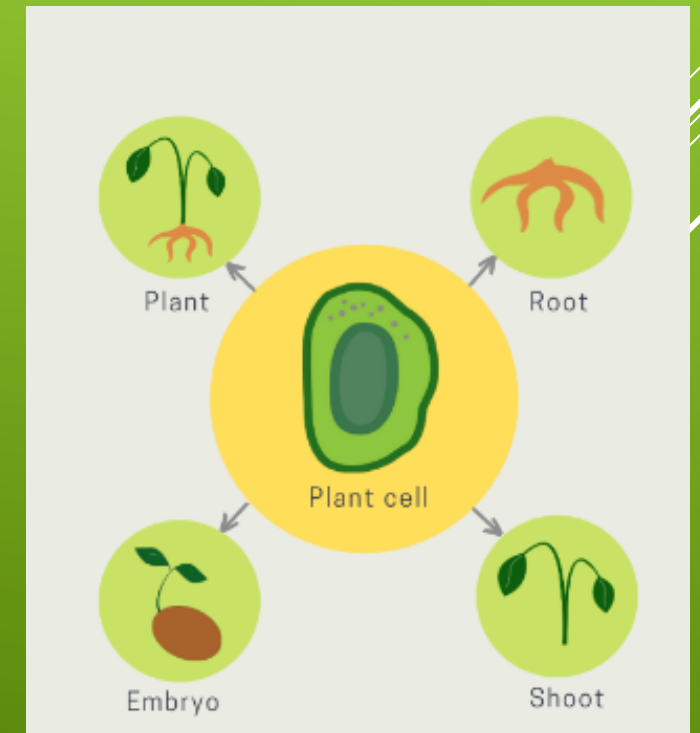
totipotence diferencovaných rostlinných buněk předpovězena v roce 1902 **Gottliebem Haberlandtem** (1854 –1945)

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

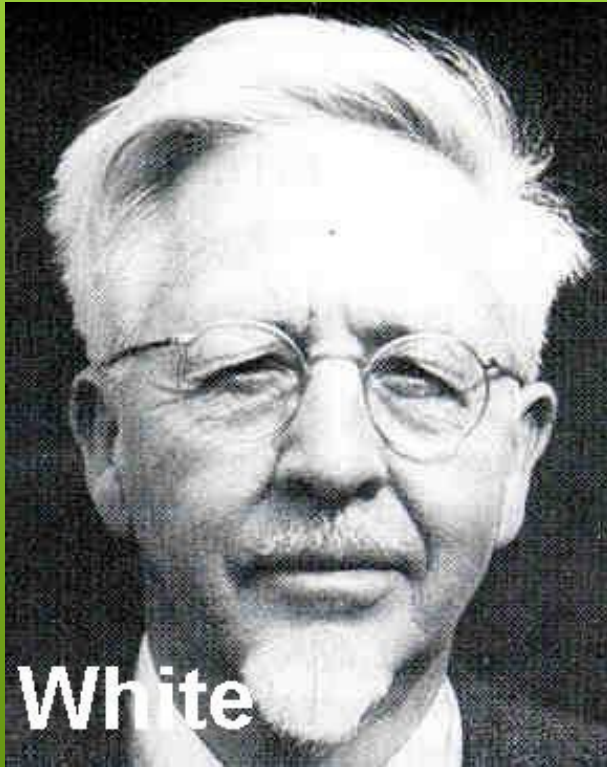
dnes se doporučuje termín totipotence nepoužívat
nahradit jeho význam termínem **pluripotence**

Totipotence =
schopnost jedné buňky
dát vznik všem typům
buněk

Pluripotence =
schopnost dělení
kmenové buňky a její
schopnost diferenciacce



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

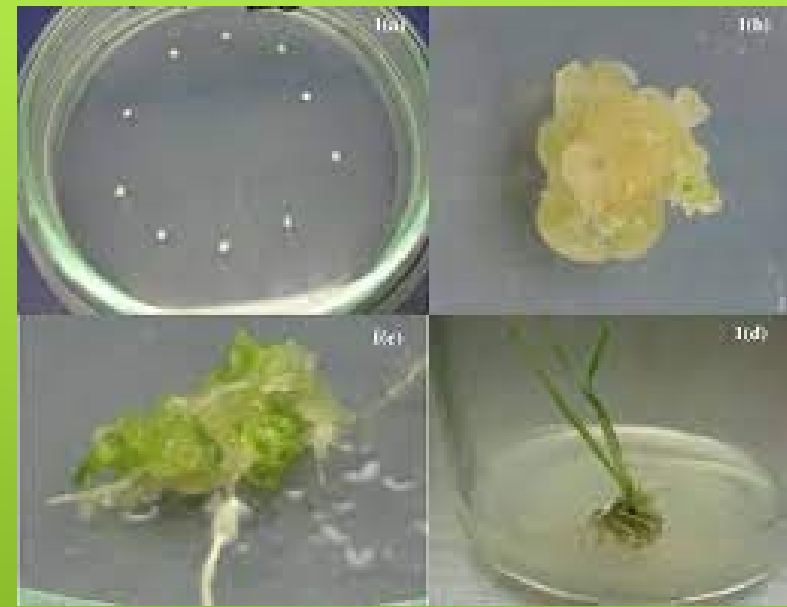
produkce fytohormonů

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



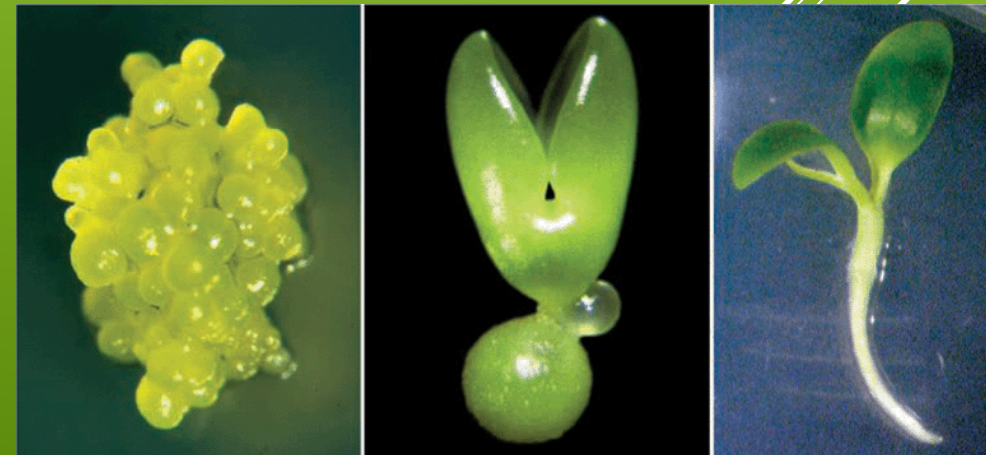
Suspenzní kultury

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

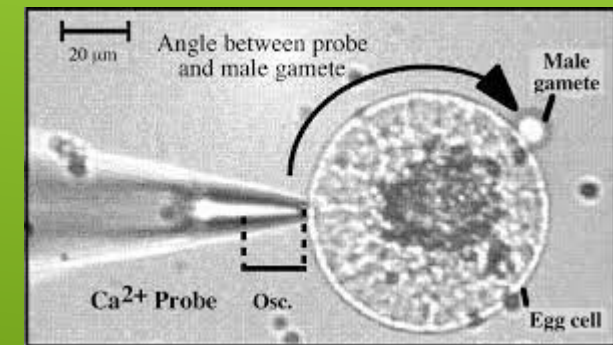


Opylení a oplození *in vitro*

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

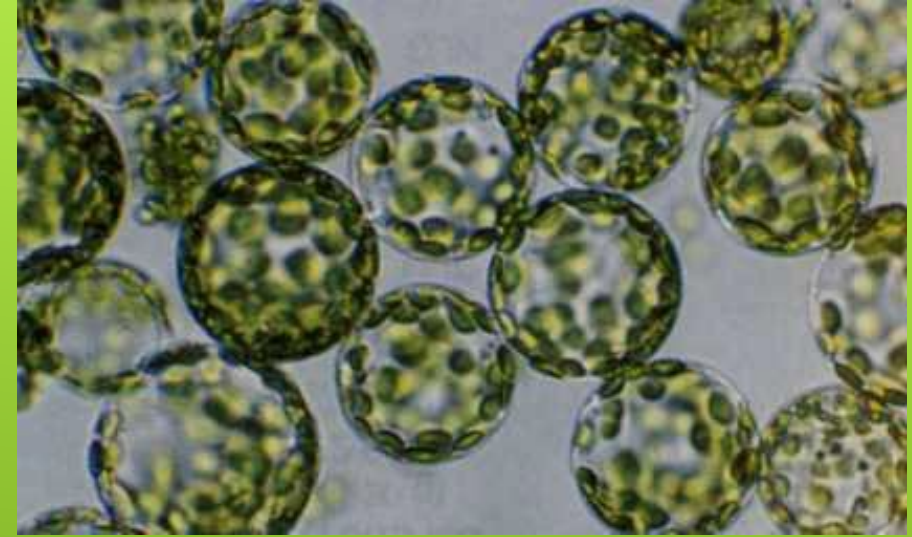
1965 - polská škola: **Zenkter** – společná kultivace pylových zrn a vajíček – vznik mezidruhových a mezirodových hybridů

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“