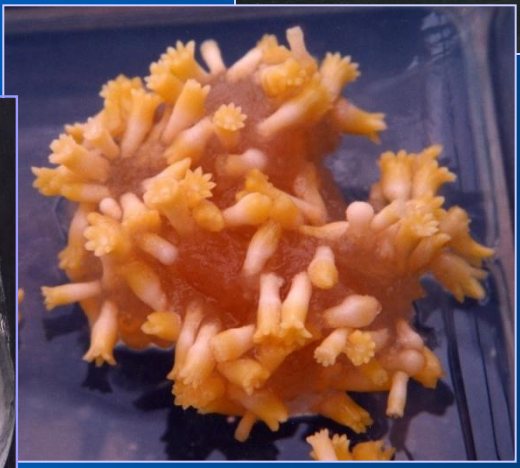
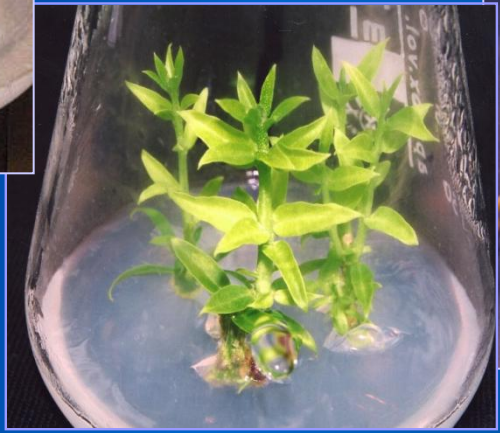
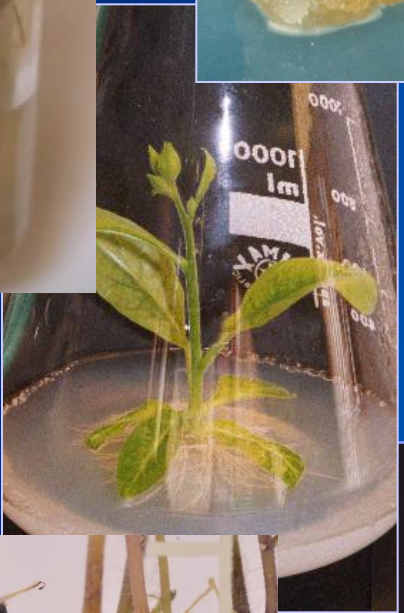
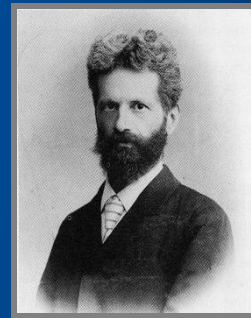


Rostliny *in vitro*





Rostlinné explantáty



G. Haberlandt

❖ Co jsou to rostlinné explantáty ?



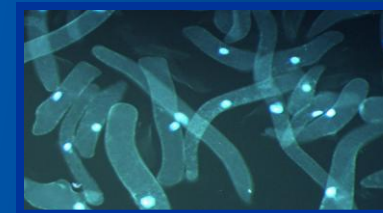
❖ Jaké specifické vlastnosti rostlin umožňují jejich kultivaci *in vitro* ?



❖ Jaké podmínky zajistit, aby kultivace byla úspěšná ?

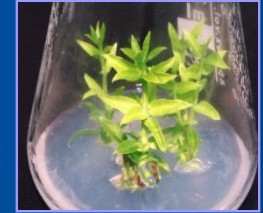


❖ K čemu je to všechno dobré ? –
teoretické i praktické aplikace



Co je to rostlinný explantát ???

Na čem je založena možnost pěstování R.E. ???



Strategie boje o přežití

- ❑ mikroorganismy --- počet jedinců v populaci
- ❑ živočichové --- aktivní boj s podmínkami prostředí
- ❑ **rostliny** --- vysoká regenerační schopnost - hojení ran, náhrada poškozených orgánů, vegetativní množení

Co je podstatou vysoké regenerační schopnosti rostlin ???

➤ **Neukončený růst rostlin**

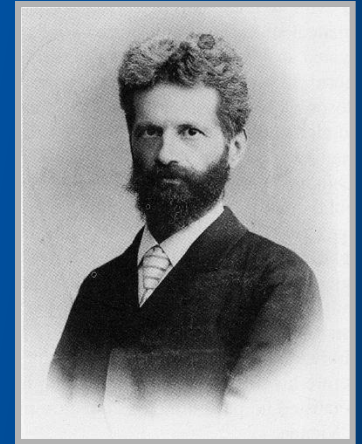
- ❖ zralé buňky
- ❖ dozrávající buňky
- ❖ buňky s velkou schopností růst a dělit se - meristemy
 - produkce nových buněk
 - zajištění stability genetické informace

➤ **Totipotence rostlinné buňky**

- existence kompletní genetické informace ve většině somatických buněk
- možnost její realizace x živočišné b.

1838 Schwann a Schleiden - buněčná teorie

1902 Myšlenka využití ↑ k regeneraci rostliny z jedné somatické buňky
- Gottlieb Haberlandt



1854-1945

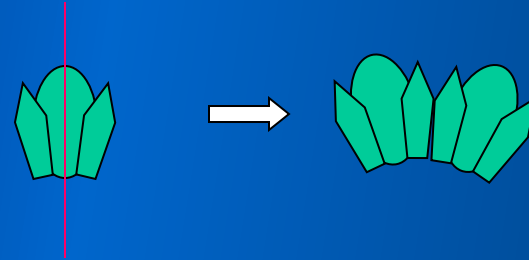
? Představa: Všechny buňky mají jádro \Rightarrow jsou totipotentní
↓ indukce \Rightarrow vytvoření nového jedince

Neplatí !!!

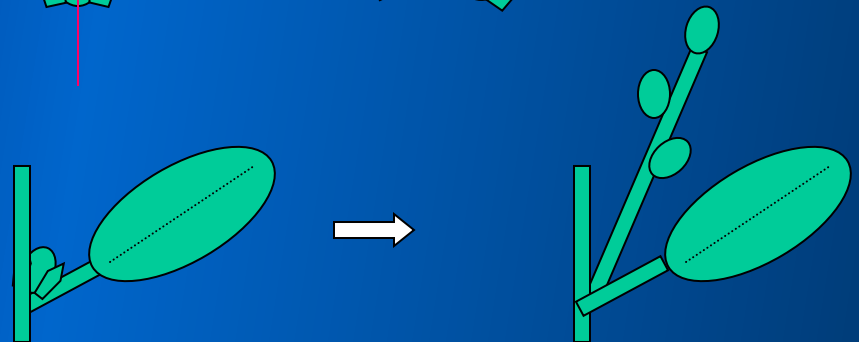
Totipotence buňky nestačí, je třeba - aby buňka byla kompetentní

Regenerace nového prýtu:

restitucí



reprodukcí



regenerací de novo



(Organogeneze, somatická embryogeneze)

Podmínky pěstování kultur in vitro

- Stresové situace, se kterými se celistvá rostlina vypořádá, není často explantát schopen řešit a zvládnout.
- Potřebné chemické sloučeniny, které je celistvá rostlina schopna syntetizovat v dostatečném množství a transportovat na místo určení, mohou být explantátem syntetizovány v nedostatečné míře nebo vůbec (je třeba dodat z vnějšku).
- Nutnost indukce organogenních změn vyžaduje zabezpečení indukčních podmínek jak fyzikálních, tak chemických.



Kultury vyžadují pro svůj zdárný vývoj specifické podmínky jak fyzikální, tak chemické



Nutnost věnovat značné úsilí a péči stanovení optimálních podmínek, které vedou k požadovanému růstu a vývoji kultur *in vitro*.

- Teplota • Světlo • Vlhkost • Složení plynné fáze • Složení médií • Aseptická kultivace • Ošetření mateřských rostlin • Typ explantátu

Teplota

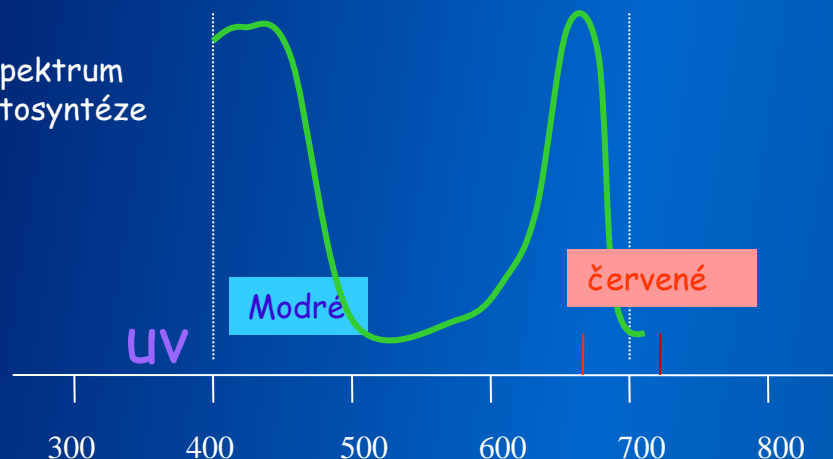
- Teploty vyšší X in vivo : r. mírného pásma $\approx 25\text{ }^{\circ}\text{C}$ (rozmezí 17-28 $^{\circ}\text{C}$), r. tropické a subtropické $\approx 28\text{ }^{\circ}\text{C}$ (24-32 $^{\circ}\text{C}$)
- Stejná teplota noc a den (ale někdy denní změny teplot - denní o něco vyšší než optimální teplota *in vivo*, noční o 4-8 $^{\circ}\text{C}$ méně než denní) změny teplot vedou k výměně vzduchu mezi vnitřkem nádoby a okolím.

Světlo

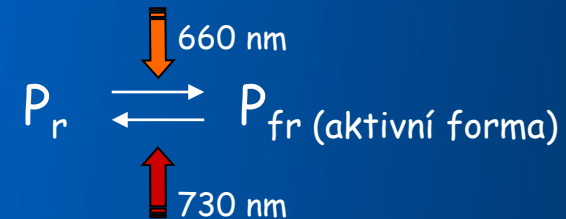
Růst a vývoj jsou závislé na světle prostřednictvím: 1) Fotosyntézy 2) Fotomorfogeneze

1. Rychlost fotosyntézy in vitro - často relativně nízká \rightarrow závislost na exogenním cukru nezelené kultury, mixotrofie, \uparrow CO_2 autotrofie
2. Fotomorfogeneze - významná *in vitro*

Účinnostní spektrum světla při fotosyntéze



Fytochrom



(Prodloužená temnostní fáze)

Kryptochrom

Vlhkost

Kultivace v uzavřených nádobách \Rightarrow vyšší relativní vlhkost - optimální vlhkost \approx 70 %

- ❑ nižší vlhkost \Rightarrow vysychání média, špatný růst explantátů
- ❑ vyšší vlhkost \Rightarrow vitrifikace / hyperhydricita



Složení médií

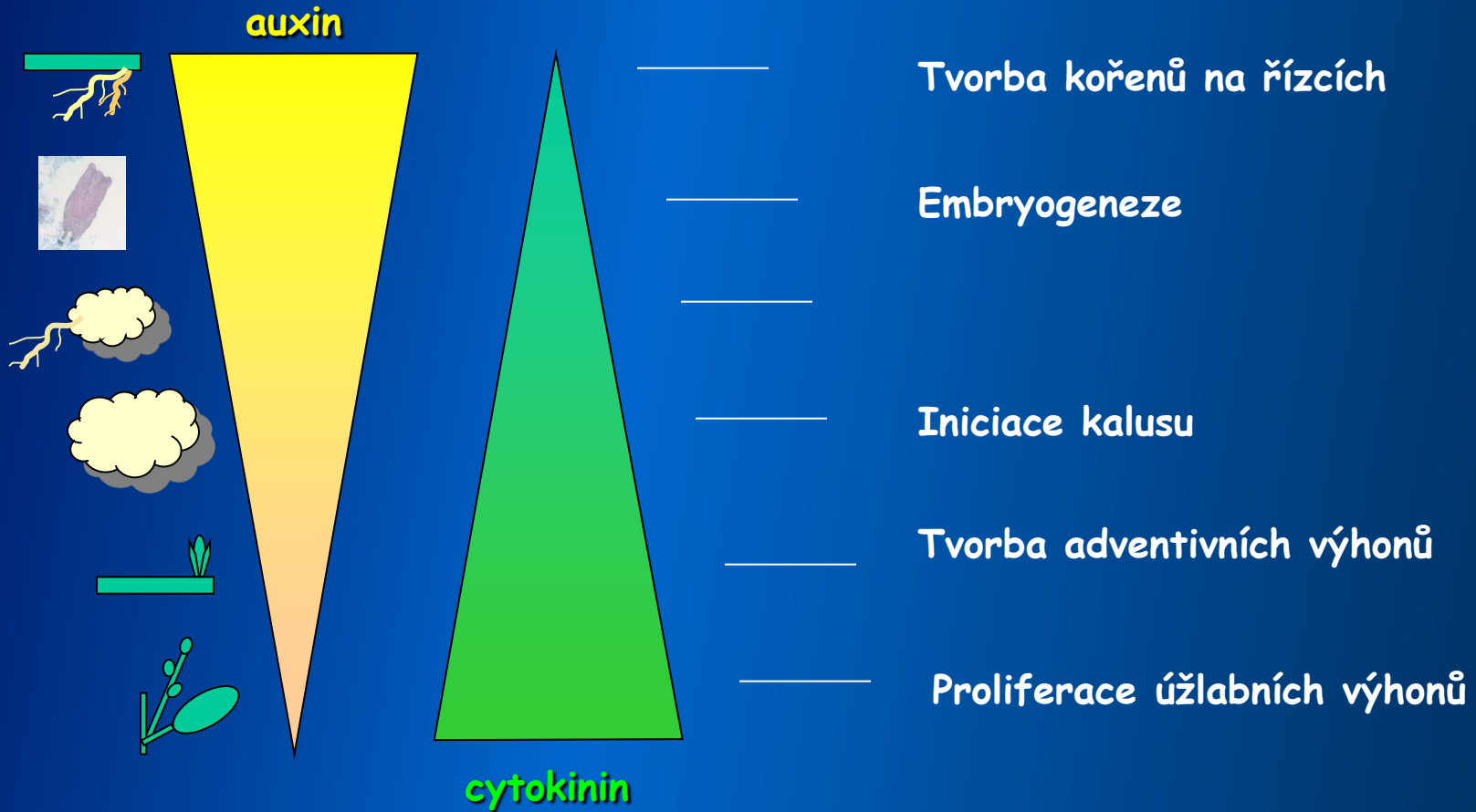
- a) Makroprvky
- b) Mikroprvky
- c) Vitaminy
- d) Aminokyseliny
- e) Cukry
- f) Doplnky
- g) Pufry
- h) Růstové regulátory
- i) Zpevňující složky

Nezbytné

Prospěšné až nezbytné

Jako základ pro vývoj kultivačních médií posloužily znalosti o složení roztoků pro hydroponické kultivace intaktních rostlin.

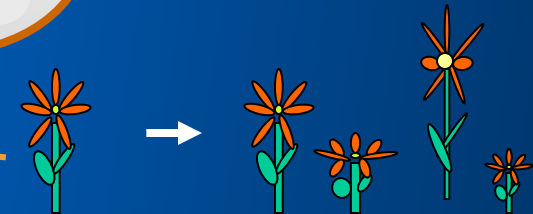
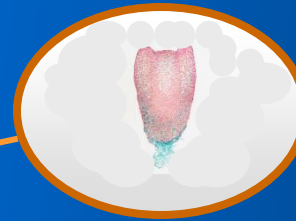
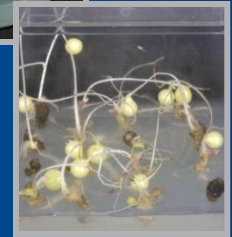
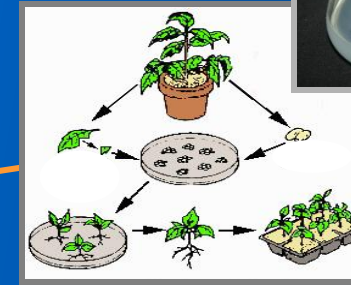
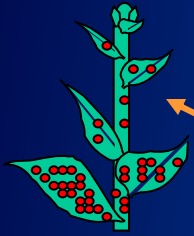
Auxin cytokininový model



Příklady využití explantátových kultur

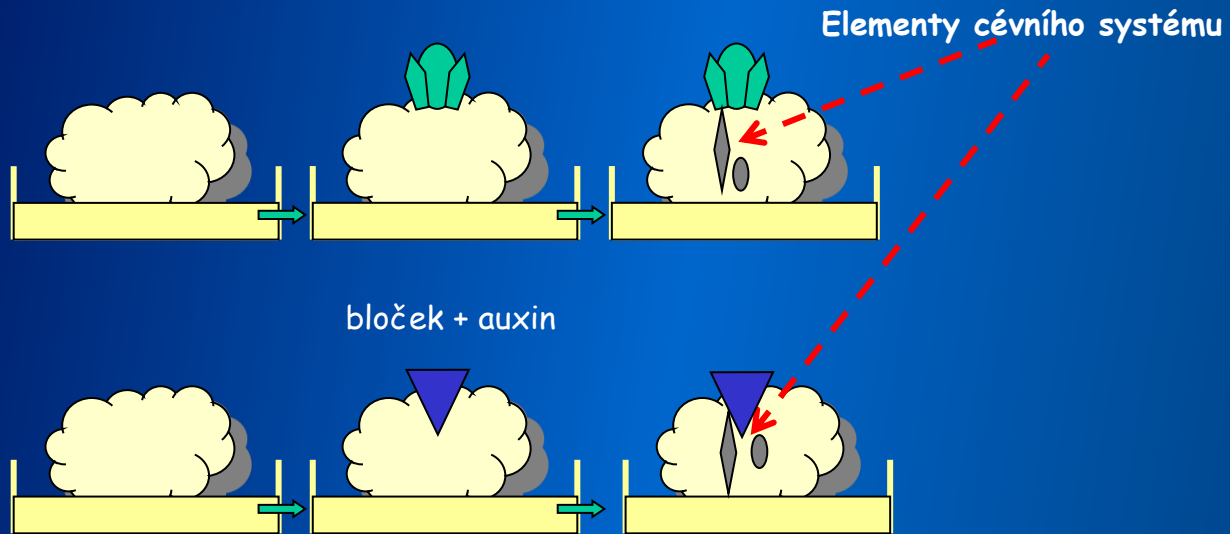
□ Studium problémů fyziologie rostlin

- Množení rostlin
- Ozdravování rostlinného materiálu
- Produkce sekundárních metabolitů
- Biotransformace
- Produkce umělých semen
- Šlechtění rostlin



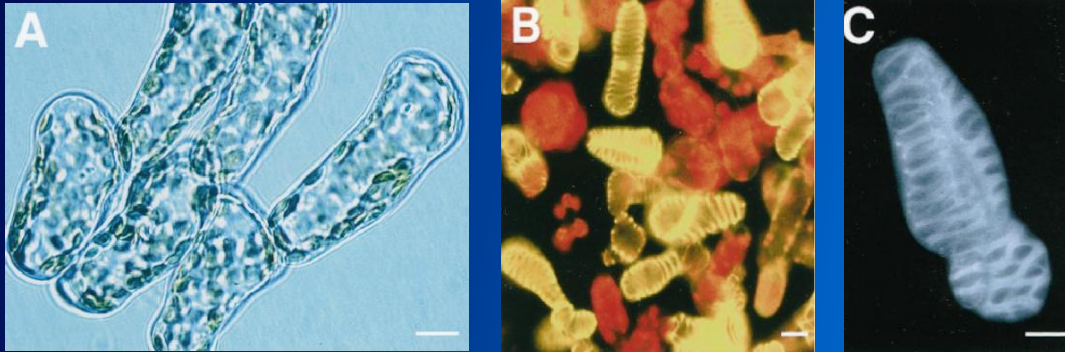
□ Studium základních problémů fyziologie rostlin

❖ Indukce tvorby elementů cévního systému



❖ Studium buněčné morfogeneze

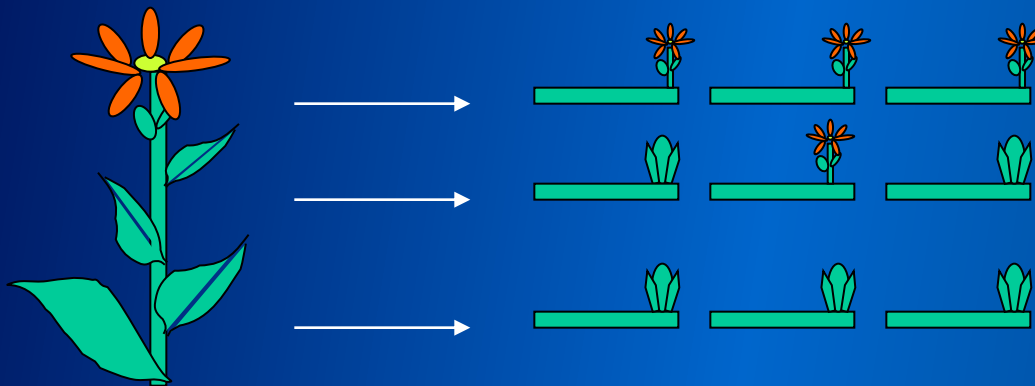
mezofylové buňky (*Zinnia elegans*) $\xrightarrow[\text{NAA + BA}]{96 \text{ hod}}$ Xylémové buňky



A - izolované mezofylové buňky
 B - kultivované buňky 96 h po izolaci, žlutá autofluorescence lignifikovaných sekundárních buněčných stěn, červená autofluorescence chloroplastů
 C - diferencovaná xylémová buňka, celulóza sekundární buněčné stěny

Groover and Jones, 1999

❖ Studium kompetence buněk k navození kvetení v závislosti na poloze



Systém tenkých vrstev
 (TCL- thin cell layers)

Studium regulace tuberizace u bramboru (*Solanum tuberosum*)



+ cukr
Krátký den
Nízká teplota
...



□ Množení rostlin v podmínkách *in vitro*

- Množení rostlin : 1) generativní
2) vegetativní

Generativní množení

Nevýhody

- ❑ malé nasazení semen
- ❑ dlouhý generativní cyklus
- ❑ rychlá ztráta klíčivosti
- ❑ dormance semen
- ❑ genetická heterogenita

Výhody

- ❑ semena bez patogenů
- ❑ snadné skladování, transport, manipulace

Vegetativní množení

- ❑ pomalé množení
- ❑ často obtížné
- ❑ u řady druhů nemožné
- ❑ infekce

- ❑ rychlý cyklus množení
- ❑ genetická uniformita

Výhody

Vegetativní množení *in vitro*

- ❑ velký počet jedinců v krátkém čase
- ❑ genetická uniformita
- ❑ u druhů, kde *in vivo* není možné
- ❑ bez patogenů
- ❑ nezávislost na vegetačním období
- ❑ možnost množení: haploidi, sterilní, mutanti
- ❑ zachování spec. genové kombinace

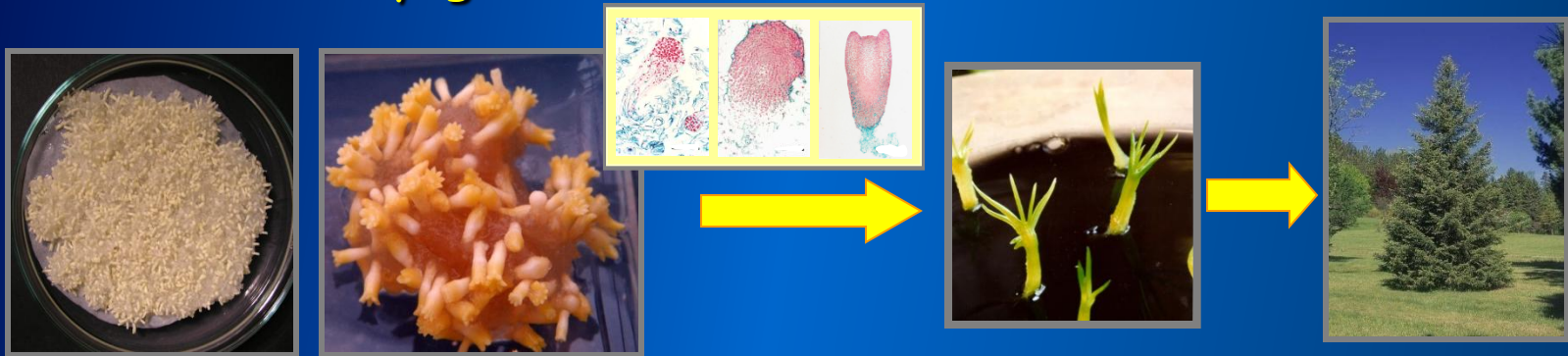
Nevýhody

- ❑ slabá genetická stabilita
- ❑ postupná ztráta regenerační kapacity
- ❑ aseptická kultivace, pracnost
- ❑ problémy s přenosem do *ex vitro*

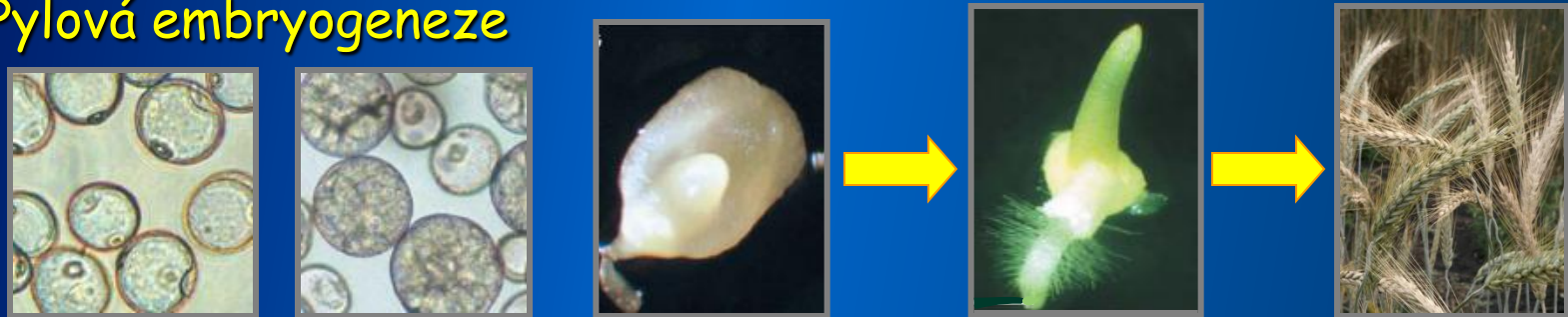
Organogeneze in vitro



Somatická embryogeneze



Pylová embryogeneze



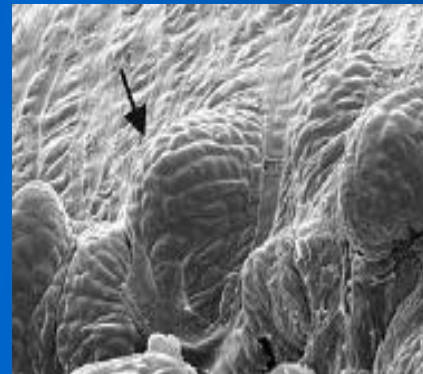
Organogeneze

Přímá - vývoj prýtů, resp. kořenů přímo z indukovaných buněk primárního explantátu

Nepřímá - odvození kalusu - tkáňové kultury a následně indukce vývoje prýtu resp. kořenů

Počáteční fáze - tvorba meristemoidu.. soubor malých izodiametrických buněk, Ø vakuoly, vysoký podíl obsahu jaderného materiálu

→ Unipolární útvar



Passiflora edulis



Fernando et al., 2007

Vliv růstových regulátorů: auxiny, cytokininy, rozhoduje konečná endogenní rovnováha - interakce počáteční endogenní hladiny a vlivu exogenních růstových regulátorů

Somatická embryogeneze

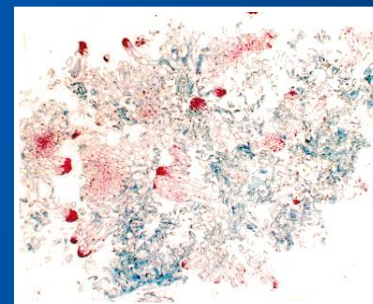
Př: smrk ztepilý

Iniciace → Proliferace → Zrání + Desikace → Klíčení

Proliferace: 5 μM 2,4-D, 2 μM KIN, 2 μM BAP;

Maturace: bez auxinů a cytokininů, 20 μM ABA

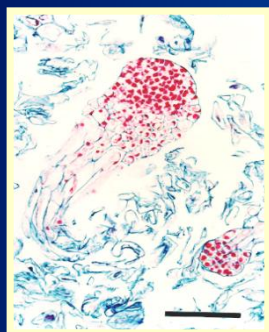
Proliferace
embryogenní kultury



500 μm

Zrání somatických embryí

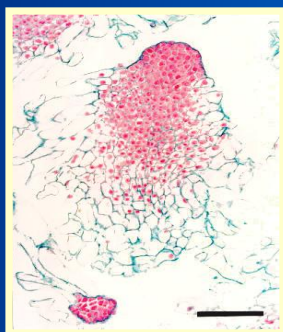
1. týden



150 μm

Rané somatické
embryo

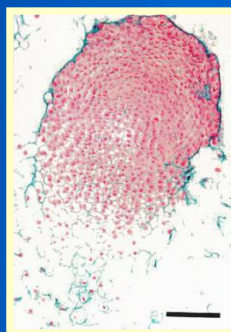
2. týden



200 μm

Cylindrické
stádium

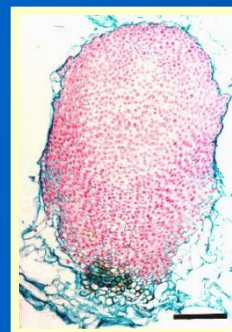
3. týden



200 μm

Prekotyledonární
stádium

4. týden



200 μm

5. týden



500 μm

Kotyledonární stádium

6. týden



500 μm



Pylová embryogeneze - androgeneze

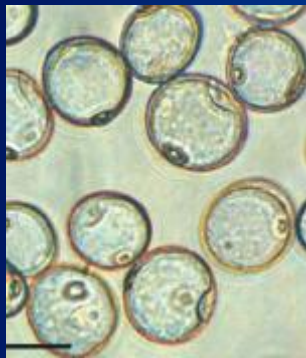
(Gynogeneze- možná, ale málo používaná)

Výchozí materiál - izolované prašníky

izolovaná (nezralá) pylová zrna

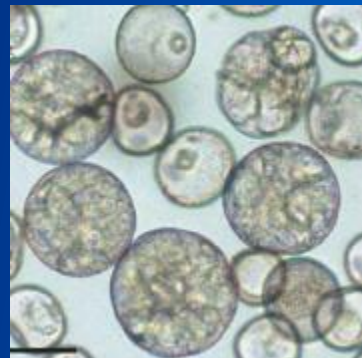
Indukční působení - Různé typy stresu --- teplotní šok, osmotický šok, hladovění

⇒ Vznik haploidních rostlin



60 μ m

mikrospory



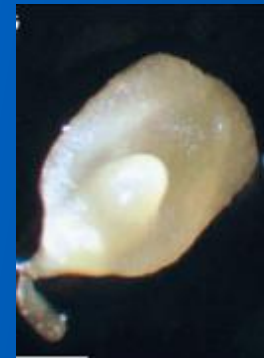
60 μ m

Dělicí se buňky



200 μ m

Pro-embryo



2,5 mm

Embryo



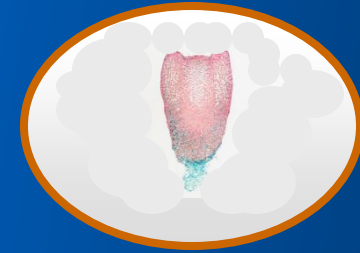
1,5 cm

Regenerující
rostlina

Umělá semena (syntetická semena, SS)

Princip: vytvoření umělých semen zapouzdřením somatických embryí vzniklých při kultivaci *in vitro* (vzrostlé vrcholy, úžlabní pupeny, segmenty stonku s pupenem)

- | | |
|--------------------------------|------|
| 1. somatická embryogeneze | 1958 |
| 1. myšlenka na umělá semena | 1978 |
| 1. úspěchy při konstrukci „SS“ | 1984 |



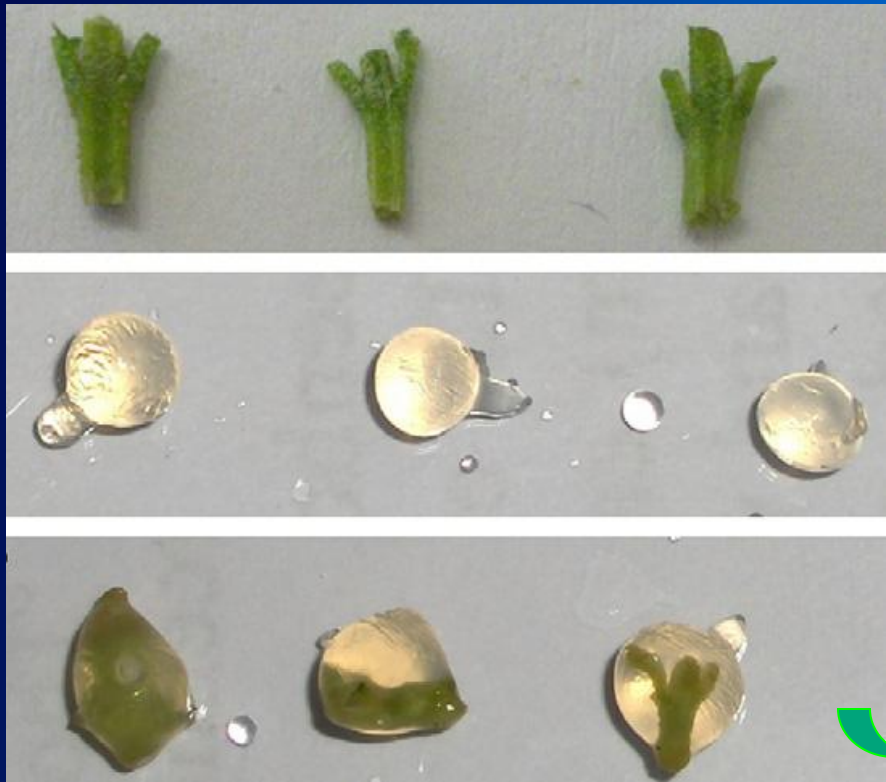
Důvody snahy o vývoj „SS“:

- výhody vegetativního množení
- vysoké ceny semen některých rostlin (slabé nasazení semen, fertilita, nestabilita gamet)
- hybridy pocházející z mezidruhových křížení --- hybrid životaschopný, semeno abortuje

Některé nadějné plodiny:

- vojtěška, mrkev, kmín - dobře zvládnutá somatická embryogeneze
- květák, bavlna, salát, tabák, rajče - silný ekonomický tlak
- celer, káva

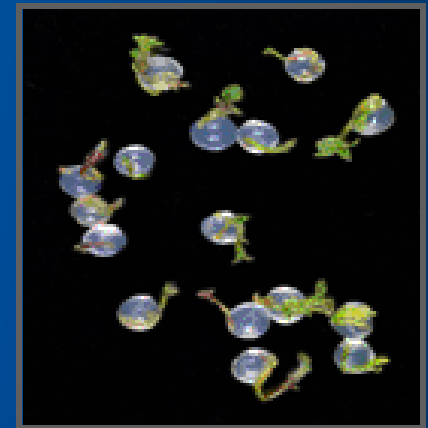
Př: nodální segmenty olivy (*Olea europaea*)



uloženy do mikrokyvet (15mmx 15mm x45 mm)
asi po 10 a s přidavkem umělého endospermu
(kultivační médium se zeatinem a sacharózou)

Př:

Klíčící somatická
embrya bramboru
odvozená ze
somatických embryí

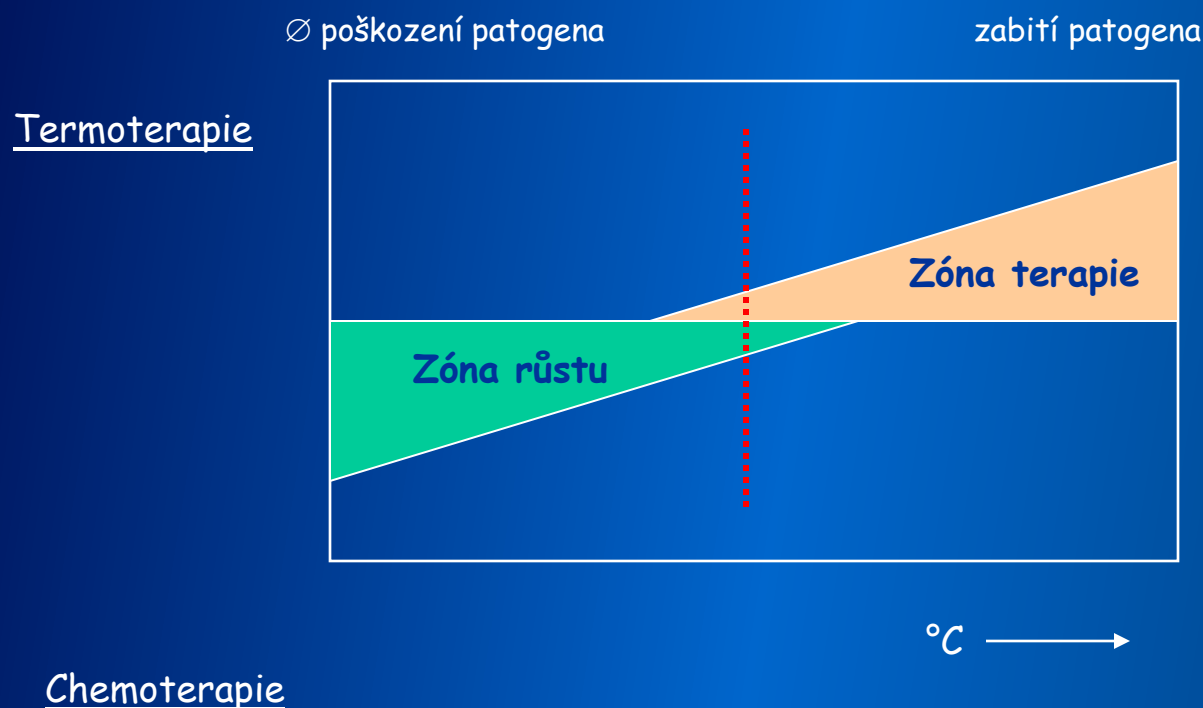


Možnost uchování 30 dní při normální teplotě

Ozdravení pomocí kultivace explantátů

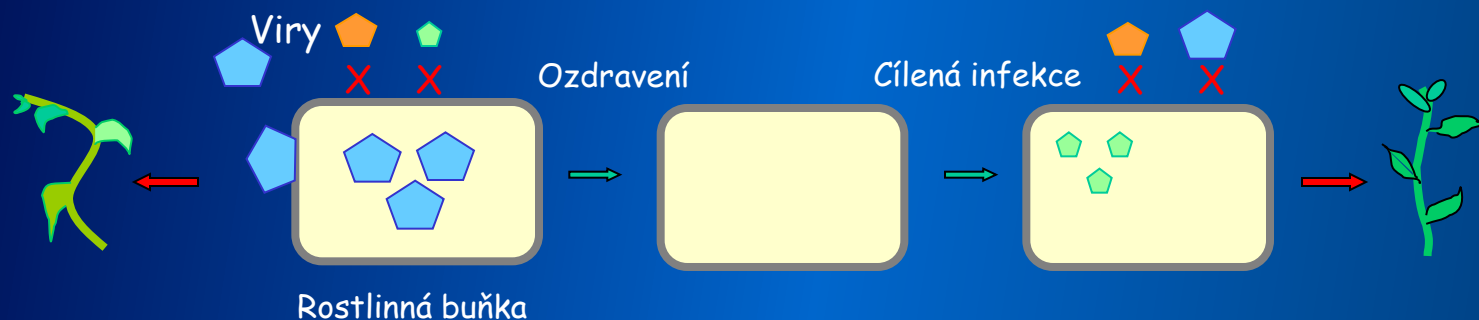
- Kultivace meristemových kultur $\Rightarrow\Rightarrow$ větší šance na získání bezvirózní rostliny,
- Kultivace vzrostných vrcholů (apikální meristem + 1-3 listová primordia) $\Rightarrow\Rightarrow$ větší šance na přežití

Ne vždy je meristem viruprostý $\Rightarrow\Rightarrow$ kombinace metod termoterapie a kultivace apikálních meristemů



Uchovávání bezvirózních rostlin

- Nebezpečí nové infekce- množení ve sklenicích nebo v oblastech s \emptyset výskytem patogena
- Zvýšená citlivost, křížová ochrana, řízená reinfekce



Význam eliminace virů

- Materiál pro studium interakce virus-rostlina
- Zlepšení výnosu a kvality potravin
- Splnění požadavku pro vývoz plodin

Produkce sekundárních metabolitů, biotransformace

Př: Produkce sekundárního metabolitu

1969 - objeveno nové protinádorové antibiotikum - TAXOL produkuje *Taxus brevifolia*

1983 - 1.fáze klinických testů - v současnosti jedno z nejdůležitějších antibiotik

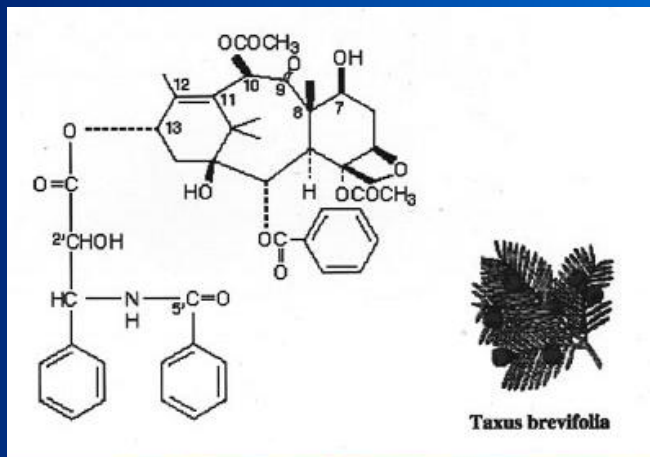
Ale !!! K získání 1 kg taxolu je třeba 700 - 900 kg kůry tisu

⇒ Snaha o produkci látky kulturami in vitro

..... založení tkáňových kultur - různé typy primárních explantátů.. média.. růstové regulátory, sacharidy, antioxidanty - adsorbenty fenolických látek - světelné podmínky - teplota --- elicítace --- přídavky prekurzorů ---infekce *Agrobacterium*...

⇒ Odvozeny linie s 40x vyšším obsahem taxolu než je v kůře *T. brevifolia*, suspenzní kultury produkující 20 mg taxolu v 1l média

⇒ 2002 zahájení komerční produkce taxolu



Produkce sekundárních metabolitů, biotransformace



Př: Biotransformace

digitoxin → digoxin

Obě látky produkuje *Digitalis lanata*, ale účinné kardiotonikum je digoxin, rostlina produkuje zejména digitoxin

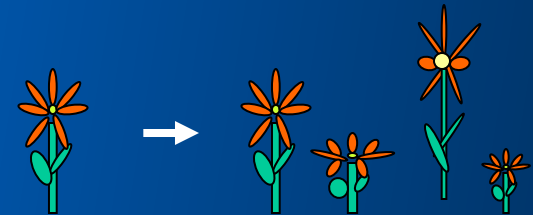
Zvládnuta biotransformace digitoxinu suspenzními buněčnými kulturami nebo imobilizovanými buňkami *D. lanata*

Použití tkáňových / buněčných kultur pro šlechtění

- využití somaklonální variability
- působení mutageny

Selekce pozitivní - rezistence

- k analogům aminokyselin
- solím
- těžkým kovům
- herbicidům
- toxinům
- chladu
- osmotickému stresu
- antibiotikům

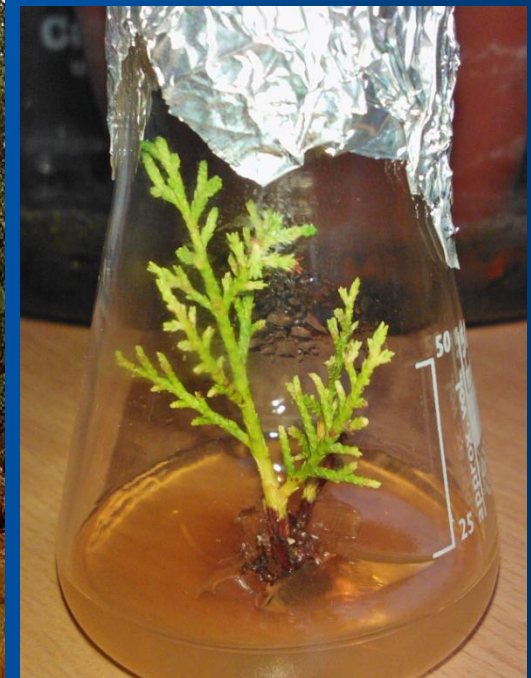


- Využití v genovém inženýrství

Záchrana ohrožených druhů

příklad *Cupressus dupreziana* (Cypřiš duprézův)

Posledních 231 jedinců, Tassilská náhorní plošina, Alžír

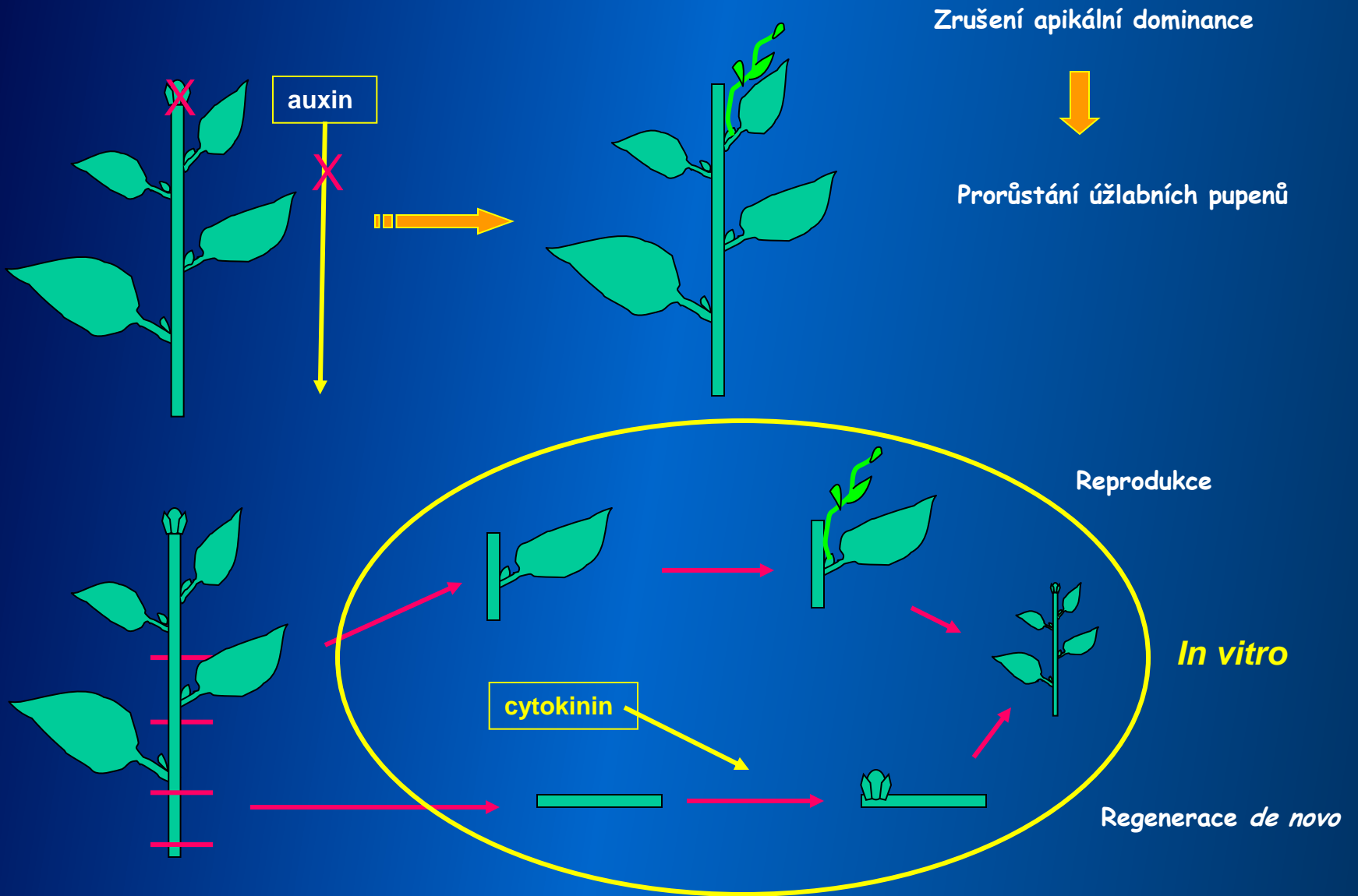


...pěstování rostlinných explantátů je „jen“ možností rozšíření spektra podmínek prostředí ...
ochrana před patogeny, abnormální fyzikální, chemické podmínky (zejména rovnováha
fytohormonů) ⇒ ⇒ rozvinutí okrajových jevů...

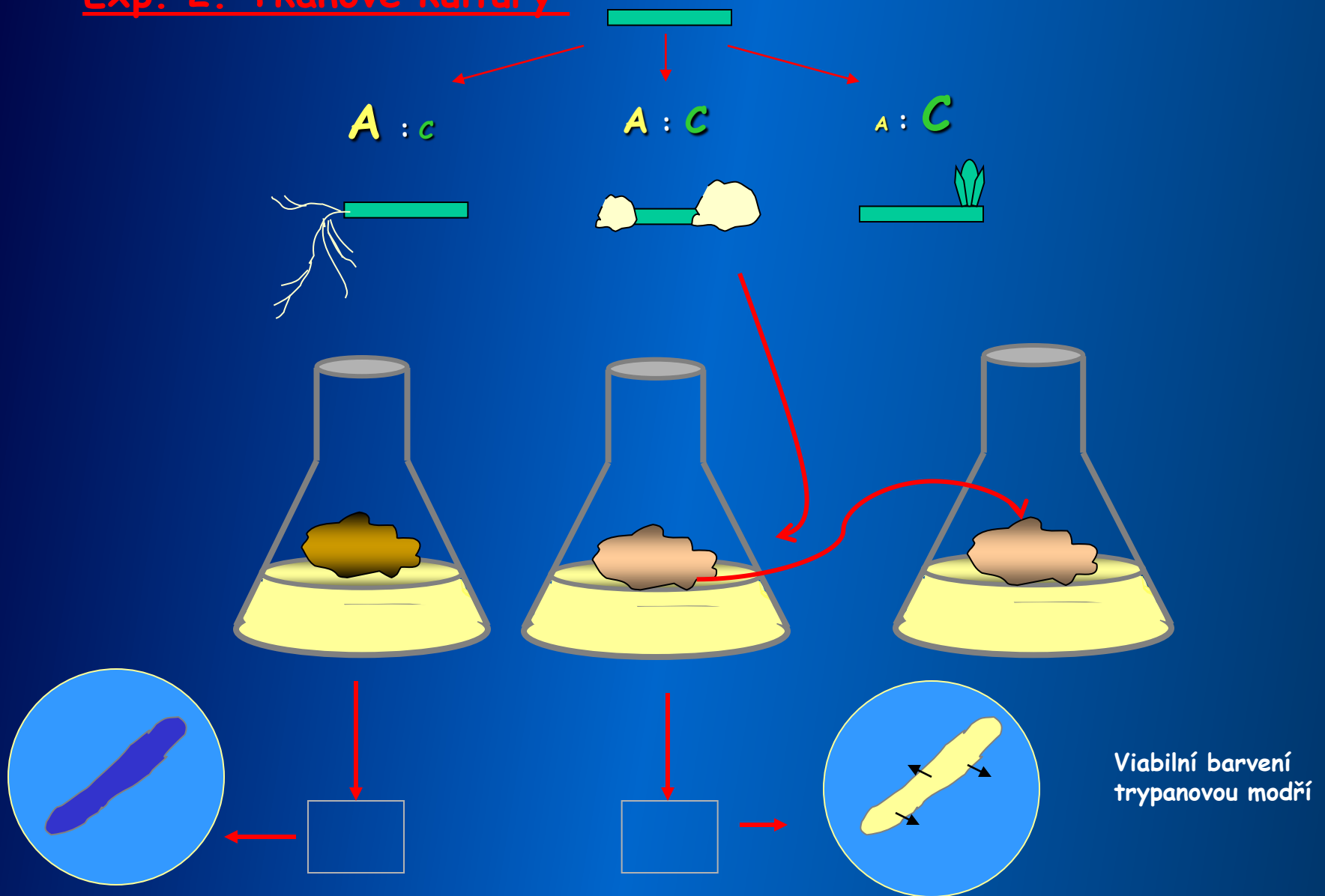
Trochu historie

- 1934 kultura kořenů (White)
- 1935 kultivace embryí (La Rue)
- 1936 Gautheret - kultury odvozené z mrkvového kořene (podobně Nobécourt)
- 1939 dlouhodobě rostoucí kalusové kultury (Gautheret, Nobécourt, White)
- 1955 objev kinetinu (Miller)
- 1957 auxin - cytokininový model regulace tvorby orgánů (Skoog a Miller)
- 1958 regenerace proembryí z kalusové kultury mrkve (Reinert a Steward)
- 1959 enzymatická izolace protoplastů
- 1962 kultivační medium Murashige a Skooga
- 1965 vypěstování rostliny tabáku z izolované buňky
- 1970 protoplastová fúze
- 1971 regenerace rostlin z protoplastů
- 1972 mezidruhová hybridizace pomocí fúze protoplastů druhů *Nicotiana*
- 1973 objev Ti -plazmidu
- 1978 somatická hybridizace rajčete a bramboru
- 1980 použití imobilizovaných buněk k transformaci digitoxinu na digoxin
- 1982 inkorporace izolované DNA do protoplastů
- 1985 transformace listových disků pomocí *A. tumefaciens*

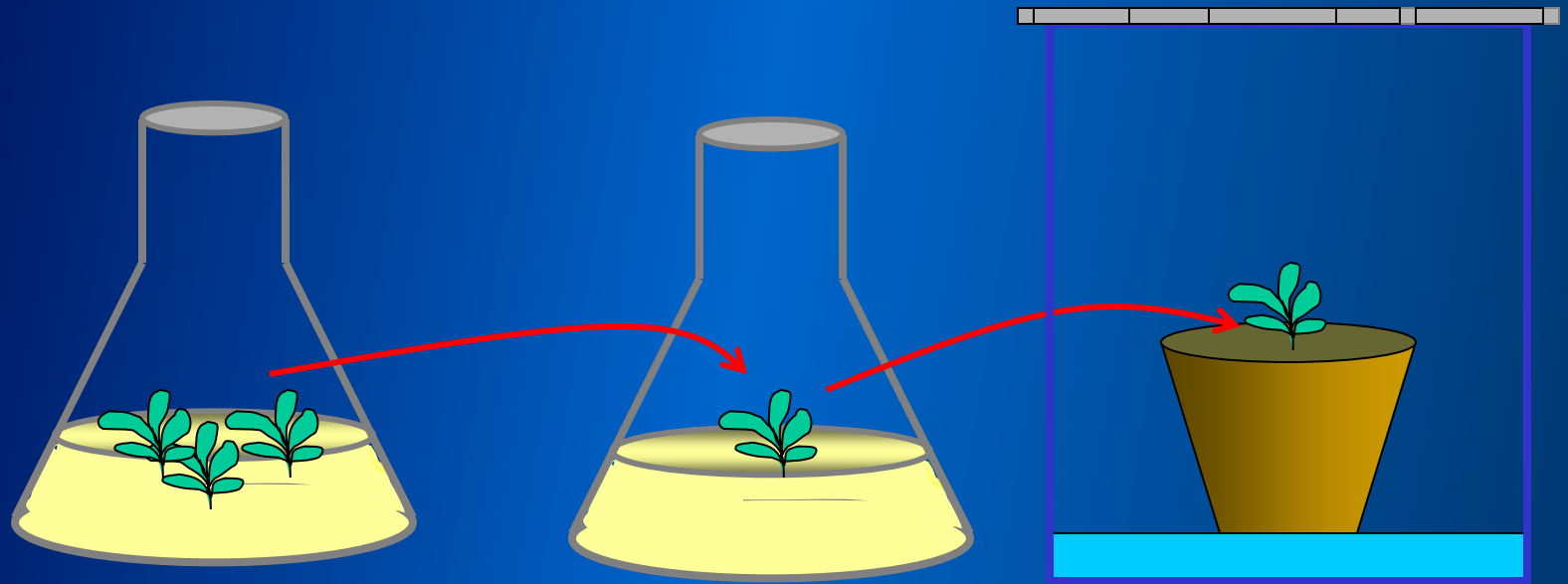
Exp. 1. Množení rostlin



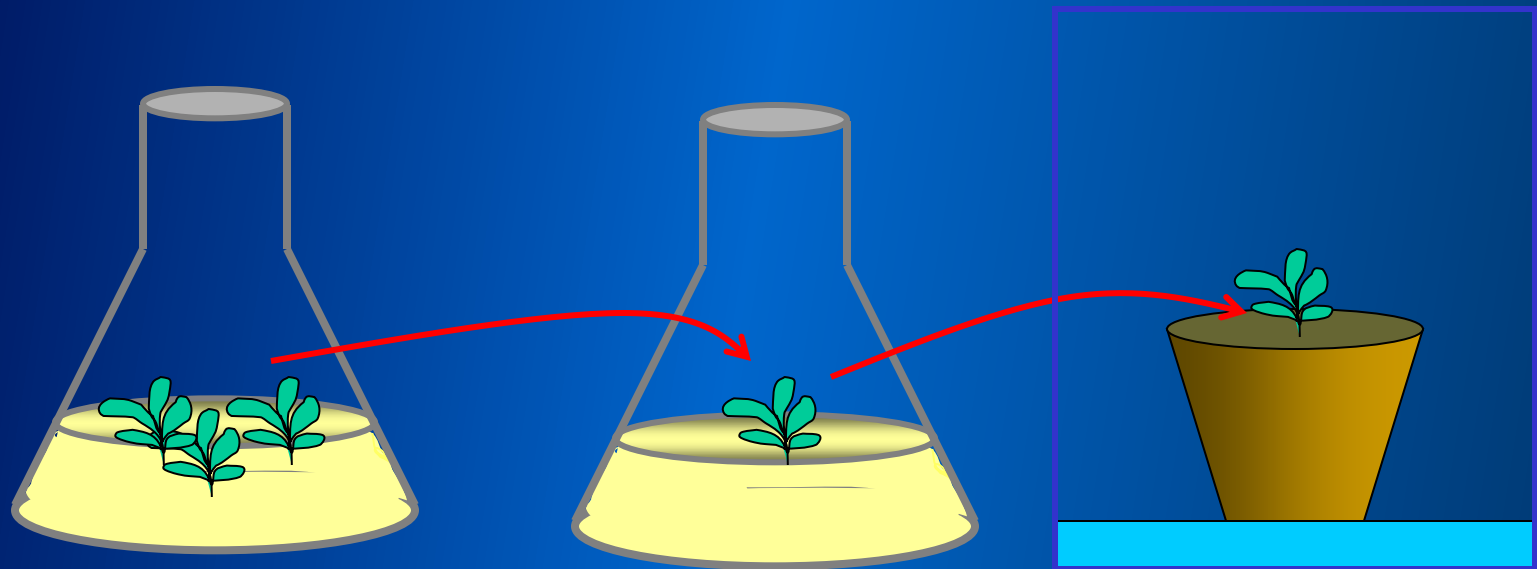
Exp. 2. Tkáňové kultury



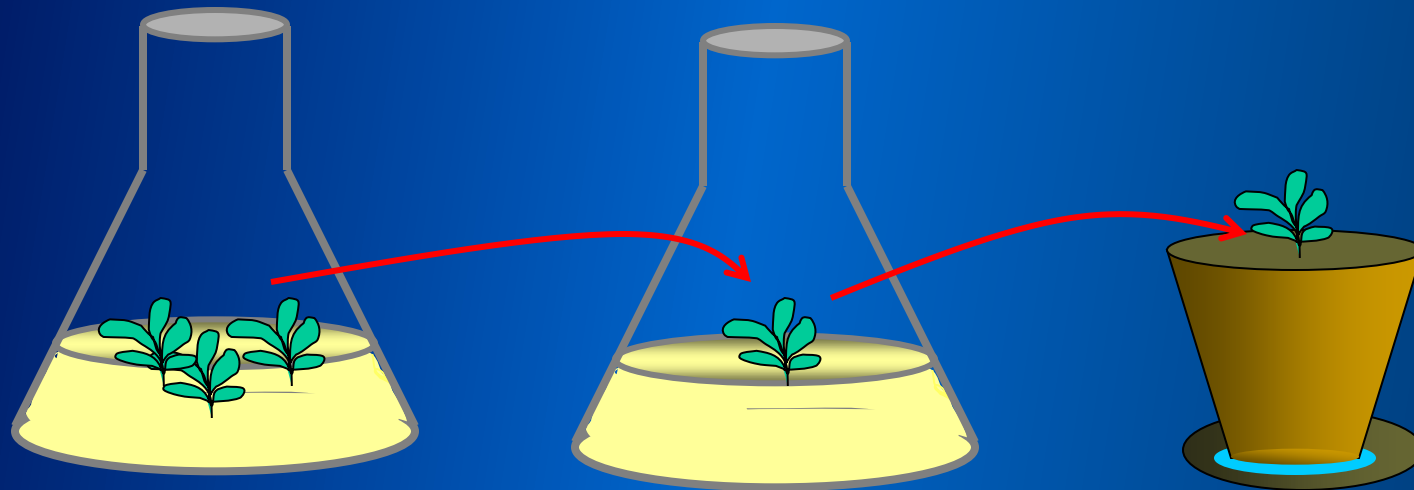
Exp. 3. Přesazení masožravé rostliny

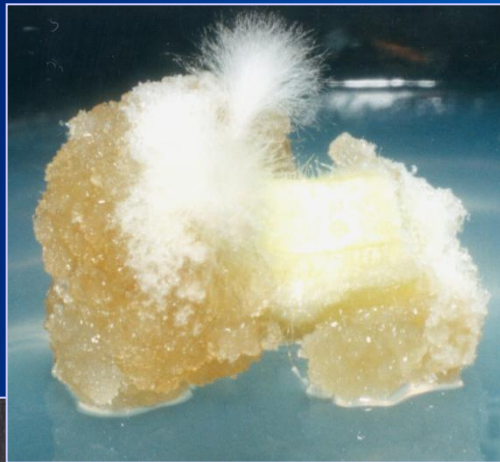


Exp. 3. Přesazení masožravé rostliny



Exp. 3. Přesazení masožravé rostliny





Děkuji za pozornost