

Volitelný předmět

BOT/TEKSB

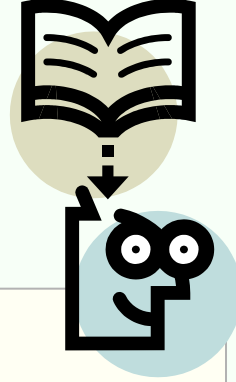
Technika explantátových kultur

Božena Navrátilová
katedra botaniky

2011/2012

Podpořeno grantem FRVŠ 806/2011

Použitá literatura



Bajaj Y.P.S.: Somatic hybridization in crop improvement. 1994

Callaway D.J., Callaway M. B.: Breeding ornamental plants. Timber press, Oregon, 2000

George E.F.: Plant propagation by tissue culture. The technology. Exegetics Limited, Edington, 1993

Hall R.D.: Plant cell culture protocols. Humana Press, Totowa (NJ), 1999

Heldman D.R., Wheeler M.B., Hoover D.G.: Encyclopedia of biotechnology in agriculture and food. CRC Press, 2011

Lindsey K.: Plant tissue culture. Manual. Kluwer Academic Publishers, London, 1992

Novák F.J.: Explantátové kultury a jejich využití ve šlechtění rostlin. Academia, 1990

Ovesná J., Kučera L.: Otázky biologické bezpečnosti GMO a mezinárodní závazky ČR. Sborník ze semináře. VÚRV, Praha, 2004

Pret'ová A.: Embryogenéza vyšších rastlín v *in vitro* podmienkach. Veda, SAV, Bratislava, 1995

Procházka S. a kolektiv: Fyziologie rostlin. Academia, 1998

Smith R.H.: Plant tissue culture. Techniques and experiments. Second Edition. Academic Press, 2000

Smith J.E.: Biotechnology. Cambridge University Press, 2009

Trigiano R.N., Gray D.J.: Plant development and biotechnology. CRC Press, 2005

Historie EK



- I. Fáze: 1900 - 1960: základní techniky**
- II. Fáze: prašňíkové a protoplastové kultury**
- III. Fáze: rozvoj genetického inženýrství a biotechnologií**

kompetentní

Totipotence rostlinné buňky

Každá buňka obsahuje celou sadu genetických informací, které jsou nezbytné k vytvoření celé rostliny.

Časová a prostorová exprese genů je přesně regulována, aby došlo k diferenciaci orgánů.

I. fáze - historie EK

1902 G. Haberlandt: totipotence buněk, **1. úspěšná kultivace**

kultura izolovaných buněk listu (růst) x neúspěch (neznalost fytohormonů)

!!!

1904 E. Hannig: zralá embrya (1. embryokultury) ředkve

1906 Brown: embrya ječmene

1922 W. Kotte, W. J. Robbins: kultivace kořenových špiček ve sterilních podmínkách
(hrách, kukuřice)

1925 F. Laibach: embryokultury v mezidruhovém křížení lnu

1926 F. Went: **AUXIN**

1934 P. White: médium (vitamíny, kvasničný extrakt), *Lycopersicon*, *Nicotiana*

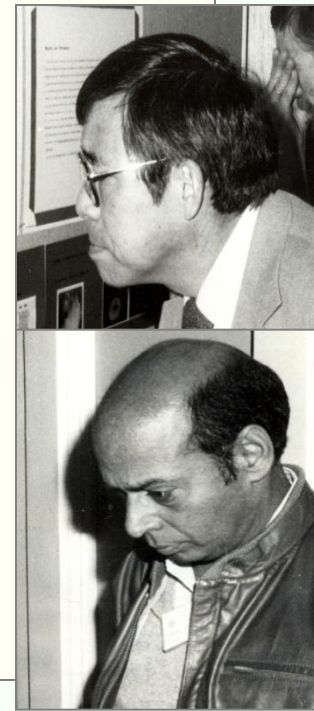
1934 R. Gautheret: kalusy z kambia (*Acer*, *Ulmus*, *Robinia*, *Salix*) médium s IAA

1937 P. Nobecourt: *Daucus*, 1. rostoucí kultura, pasážování, proliferace

1907 Harrison – kultivace lymfatických buněk žab

I. Fáze: historie EK

- 1942** J. Van Overbeeck a kol.: embryokultury - nezralá embrya, kokosové mléko
- 1945** S.W. Loo: vzrostné vrcholy *Asparagus*
- 1948** **ADENIN** v kokosovém mléku
- 1955** C. Miller, F. Skoog a kol.: extrakt z kvasničního extraktu – derivát adeninu
- **KINETIN** (cytokininy)
- 1957** B.B. Stowe, T. Yamaki: **GIBERELINY**
- 1961** C. Miller v endospermu kukuřice – **ZEATIN**
- 1962** M - S médium (tabák) 25 x konc. Knop. roztok + vit. + cukry + regulátory
- 1963** G. Morel: meristém → rostlina (dříve i ozdravování meristémy)
- 1965** L – S médium (tabák)
- 1968** B5 médium (sója)
- 1969** NN (androgeneze, tabák)
- 1965** V. Vasil, A. C. Hildebrant: suspenzní kultury, buněčné kultury (tabák)



II. Fáze: prašníkové kultury, tvorba haploidů

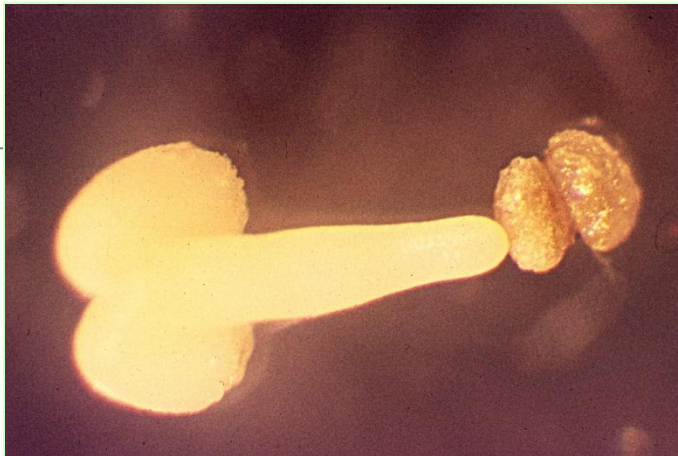
1963 T. Yamada a kol.: *Tradescantia reflexa* (haploidy)

1964 - 1966 S. Guha, S.C. Maheswari: *Datura*, diploidizace kolchicin

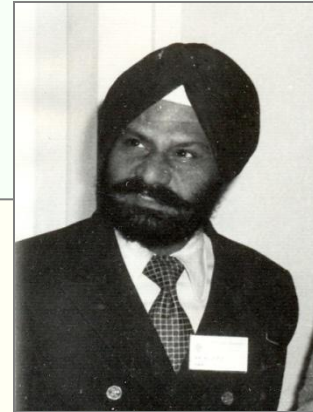
1969 J.P. Nitsch a kol. (tabák)

1973 J.P. Nitsch, Norrel: mikrosporové kultury

.....



II. Fáze: protoplastové kultury



1960 E.C. Cocking: 1. enzymatická izolace protoplastů (tabák)

1970 Kao, Keller, Miller: sója (dělení protoplastů)

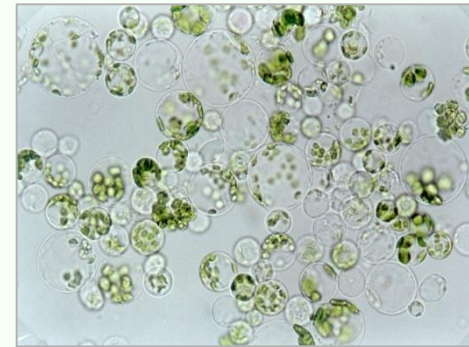
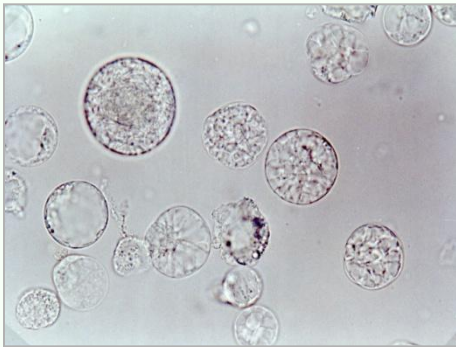
1971 I. Takebe, G. Melchers, C. Labib: rostliny z mezofylových protoplastů tabáku

1972 P. S. Carlson a kol.: somatická hybridizace 1. mezidruhový hybrid *Nicotiana* (tabák)

1978 G. Melchers a kol.: 1. mezirodový hybrid „pomato“ „topato“

Solanum tuberosum x *S. lycopersicon*

.....



III. Fáze: genetické inženýrství a biotechnologie, GM

- 1959** Brown: *Agrobacterium* (půdní bakterie), tvorba nádoru, Ti, Ri plasmid
- Bonner: RNA polymerázy u rostlin, exprese genů
- 1974** Ti plasmid (přenos užitečných genů z prokaryotické, eukaryotické buňky)
- 1980** Ti plasmid (do hostitelského geomu, Ti plasmid jako vektor cizorodé DNA)
- 1983** transgenní tabák (rezistence ke kanamycinu)
- 1985** využití plasmidů *E. coli* pro genetické inženýrství (*Agr.* je nosič pro jiné geny)
- 1986** inkorporace genů rezistence vůči herbicidům do zemědělských plodin
- rezistence vůči hmyzím škůdcům
 - rezistence vůči virovým chorobám
 - rezistence vůči chladu
- 1987** rajčata rezistentní k TMV
- 1988** transgenní sója

.....

Využití EK

- **mikropropagace rostlin**
- **ozdravování rostlin od viróz**
- **genová banka** (uchování starých odrůd, ohrožených druhů,..)
- **modifikace a zlepšení rostlin (netradiční šlechtitelské metody) –**
in vitro opylování
embryokultury, gynogeneze, androgenese
- **studium chování buňky –** cytologie, dělení, výživa, stres
prim. a sek. metabolismus (suspenní kultury)
- **morfologie a patologie kultivovaných pletiv**
- **genetická modifikace rostlin - GMO**
- **kryopreservace**
- **využití sekundárního metabolismu** (alkaloidy, polysacharidy, barviva, capsin, ..)
- **fytopatologie *in vitro***

Práce s rostlinnými explantáty

Vybavená laboratoř – sklo, plasty, chemikálie, přístroje –
termostat, lednice, autokláv,....

Laboratoř pro aseptickou práci - laminární box

binokulární lupa

chirurgické nářadí

centrifuga



Kultivační místnost

světlo **16/8** den/noc, (lux 2000 – 5000)

teplota **22-27** °C,

termostaty, třepačky, inkubátory



Kultivační média

Anorganické soli (makro a mikro)

nezbytné

Rostlinné regulátory

Vitamíny (thiamin B1, pyridoxin B6, kys. nikotinová B3)

Cukry (sacharosa, glukosa, maltosa, 2-5 %)

EK většinou nejsou autotrofní

Hexitoly (myo-inositol, manitol, sorbitol)

AMK, amidy (L formy: glycin; tyrosin, arginin; glutamin, asparagin)

Antibiotika (endogenní kontaminace, transformace s *Agrobacterium*)

Přirozené komplexy (antioxidanty- kys.citronová, askorbová; kokosové mléko; extrakty;
kasein hydrolysat..)

Zpevňující složka (tekutá - bavlna, filtr. papír x pevná- agar, agarosa, gelrit, phytagel)

pH (5,5 - 6)



příprava média,
sterilizace

Složení vybraných médií

Makroprvky (*mmol*):

C, O, H, N, P, S, K, Mg, Ca

Mikroprvky (*μmol*):

Fe, B, Co, Cu, I, Mo, Mn, Zn

Jsou součástí proteinů

Table 1. Plant tissue culture media

Constituent	Conc. (mg liter ⁻¹) in medium*				
	MS	B5	N6	NN	AA**
Macronutrients					
KNO ₃	1900	2500	2830	950	
NH ₄ NO ₃	1650			720	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370	250	185	185	250
KH ₂ PO ₄	170		400	68	
NaH ₂ PO ₄ · H ₂ O		150			150
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440	150	166	166	150
(NH ₄) ₂ · SO ₄		134	463		
KCl					2950
Micronutrients					
H ₂ BO ₃	6.2	3	1.6	10	3.0
MnSO ₄ · 4H ₂ O	15.6	10	3.3	19.0	10.0
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6	2	1.5	10.0	2
NaMoO ₄ · 2H ₂ O	0.25	0.25	0.25	0.25	0.25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025	0.025	0.025	0.025	0.025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025	0.025		0.025	0.025
KI	0.83	0.75	0.8		
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8		27.8		
Disodium EDTA	37.3		37.3		
EDTA sodium ferric salt		40		100	40
Glycine			40	5	
Sucrose	30 × 10 ³	20 × 10 ³	50 × 10 ³	20 × 10 ³	20 × 10 ³
Vitamins					
Thiamine hydrochloride	0.5	10	1	0.5	10
Pyridoxine hydrochloride	0.5	1	0.5	0.5	1
Nicotinic acid	0.5	1	0.5	5.0	1
myo-inositol	100	100		100	100
pH	5.8	5.5	5.8	5.5	5.5

* Source: MS, Murashige and Skoog [2]; B5, Gamborg *et al.* [1]; N6, Chu [7]; NN, Nitsch and Nitsch [5]; AA, Toriyama *et al.* [15].

** The nitrogen source is: mg/l, L-glutamine 730; L-aspartate, 200; L-arginine, 176; Glycine, 7.5. Filter sterilize. Ref: 15.

NOTE: The LS medium used for cereals [18, 19] contain the MS mineral salts, Thiamine; 40 mg/L; and myoinositol; 100 mg/L.

(Převzato Lindsey 1992)

Růstový regulátor - fytohormon

v nízkých koncentracích vyvolává fyziologickou, biochemickou nebo morfologickou reakci v místě vzniku nebo v místech, kam je transportován

může ovlivňovat více fyziologických jevů

Stimulátory – růst podněcují

Inhibitory – růst brzdí

Nativní – produkovány rostlinami (= přirozené metabolity)

Syntetické (tzv. morforegulátory) – vyrobeny průmyslově

Organické sloučeniny, které po syntéze v jedné části rostliny jsou transportovány do jiné části rostliny, kde ve velmi **malé koncentraci** (**1 mmol/l**, **1 μ mol/l**) vyvolávají fyziologickou reakci

Růstové regulátory

působení regulátorů (hormonů) -

**proniknutí do buňky a ovlivnění genové aktivity v jádře
pomocí receptorového systému v plasmatické membráně, ve
spojení s dalšími přenašeči signálu uvnitř buňky**

Projevy celistvosti rostliny *in vivo*

korelace

polarita

regenerace

periodicita (denní, roční)

Rozdělení růstových regulátorů

Klasické:

AUXINY

CYTOKININY

GIBERELINY

KYSELINA ABSCISOVÁ

ETYLÉN

**Ostatní látky s regulační
aktivitou:**

BRASSINOSTEROIDY

KYSELINA JASMONOVÁ

KYSELINA TUBERONOVÁ

POLYAMINY

OLIGOSACHARIDY

FENOLICKÉ LÁTKY

auxano = rostu, zvětšují

Auxiny

Syntéza ve vzrostných vrcholech nadzemních částí a mladých listech,
v kambiu, v oplozeném vajíčku

Went 1926 – název auxin (IAA)

Izolována 1931 (IAA)

Kys. β - indolyloctová – z tryptofanu IAA

Kys. 4- chlorindolyloctová

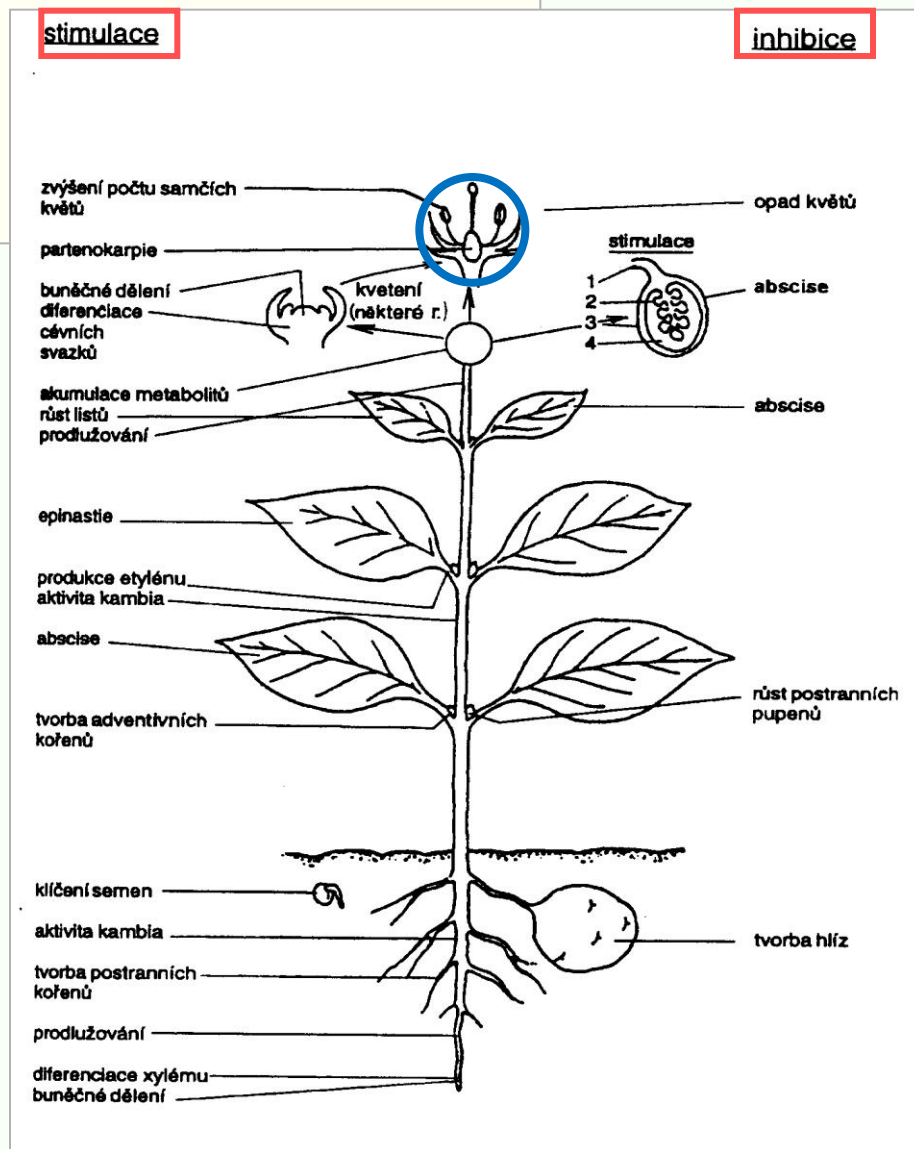
Kys. β - indolylmáselná (syntetická) IBA

Kys. fenyloctová PAA

Kys. naftalenoctová – syntetická NAA

Pomalý transport (vyžaduje energii – ATP)

Rychlý transport - floémem



Auxiny – deriváty indolylu z tryptofanu

Transport - bazipetálně, parenchymatickými buňkami, pasivně asimiláty

Působení - *mnohostranné*

- **stimulace dlouhivého růstu buněk** - plasticity b. stěny, plošný růst
- **rychlost dělení**
- **dělení kambiálních buněk**
- **stimulace růstu kořenů** - větvení
- **tvorba adventivních kořenů**
- **zacelování ran při poranění**
- **apikální dominance** (brzdí růst postranních pupenů)
- **vznik partenokarpických plodů**
- **zakořeňování řízků**
- **tvorba semen**

!!! Ve vyšších koncentracích působí toxicky
Seradex (IBA)

Gibereliny - GA

Syntéza v mladých listech,
klíčících semenech,
kořenech,
mladých plodech

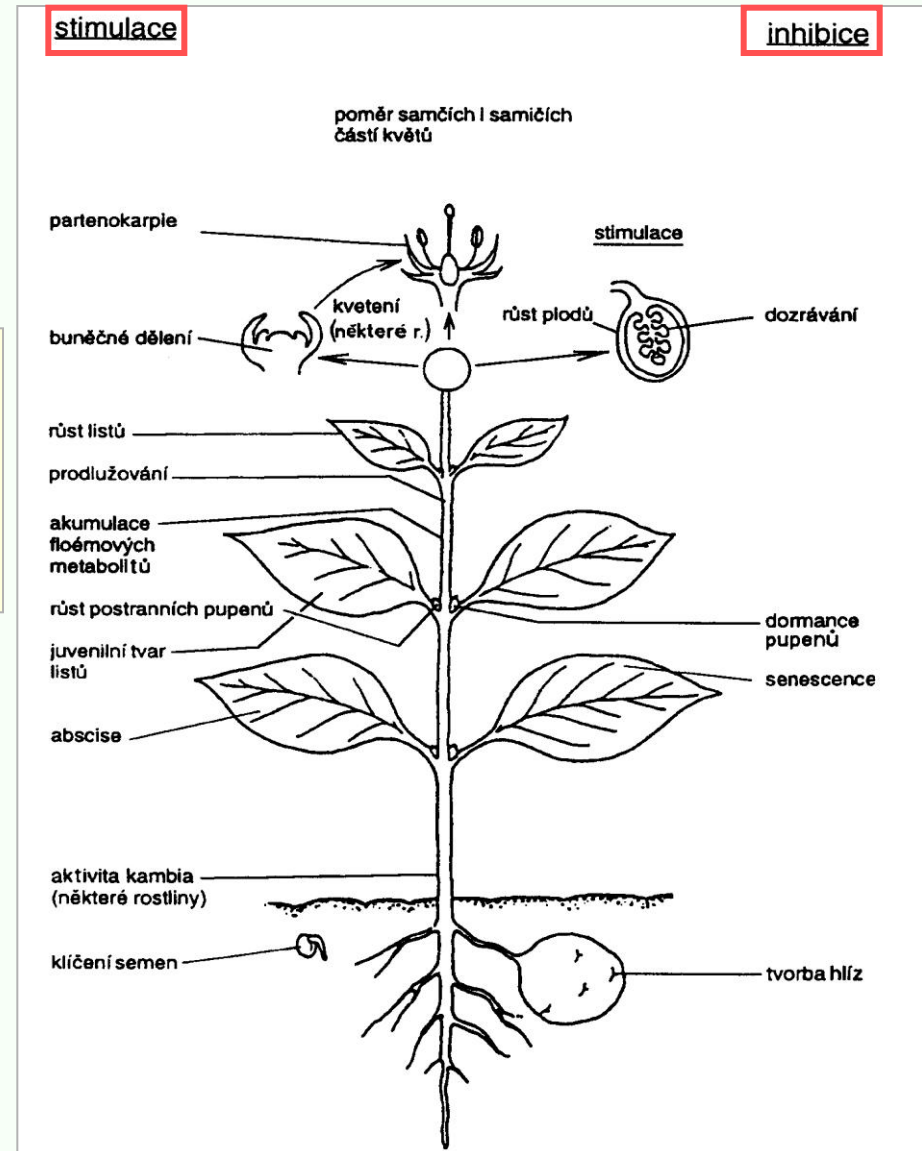
cca 100 giberelinů – GA₃

1938 v Japonsku

Giberella fujikuroi (*Fusarium moniliforme*)

Antigibereliny = retardanty

ANCYMIDOL



Vliv giberelinu na životní pochody v rostlině

Odvozeny z diterpenů

Transport - všestranný – floém, xylém

Působení

- **stimulace růstu x retardanty růstu – CCC, Phosphon, Paclobutrazol**
- **dlouživý růst stonku**
- **klíčení semen**
- **stimulace dělení buněk (zkrácení G1 a S fáze)**
- **plasticita buněčné stěny**
- **zvýšení osmotického tlaku**
- **ruší dormanci semen i pupenů**
- **zvětšení orgánů (vinná réva)**
- **mění fotoperiodickou adaptaci rostlin**

!! Nepůsobí toxicky při vyšších koncentracích

cyto - buňka
kinesis - pohyb

Cytokininy – 1957 (deriváty purinu)

Syntéza v kořenových špičkách, kořenech, nadzemní části - mladé listy, nezralá semena

Transport - rozváděny xylémem
(transpirační proud, rychlý)

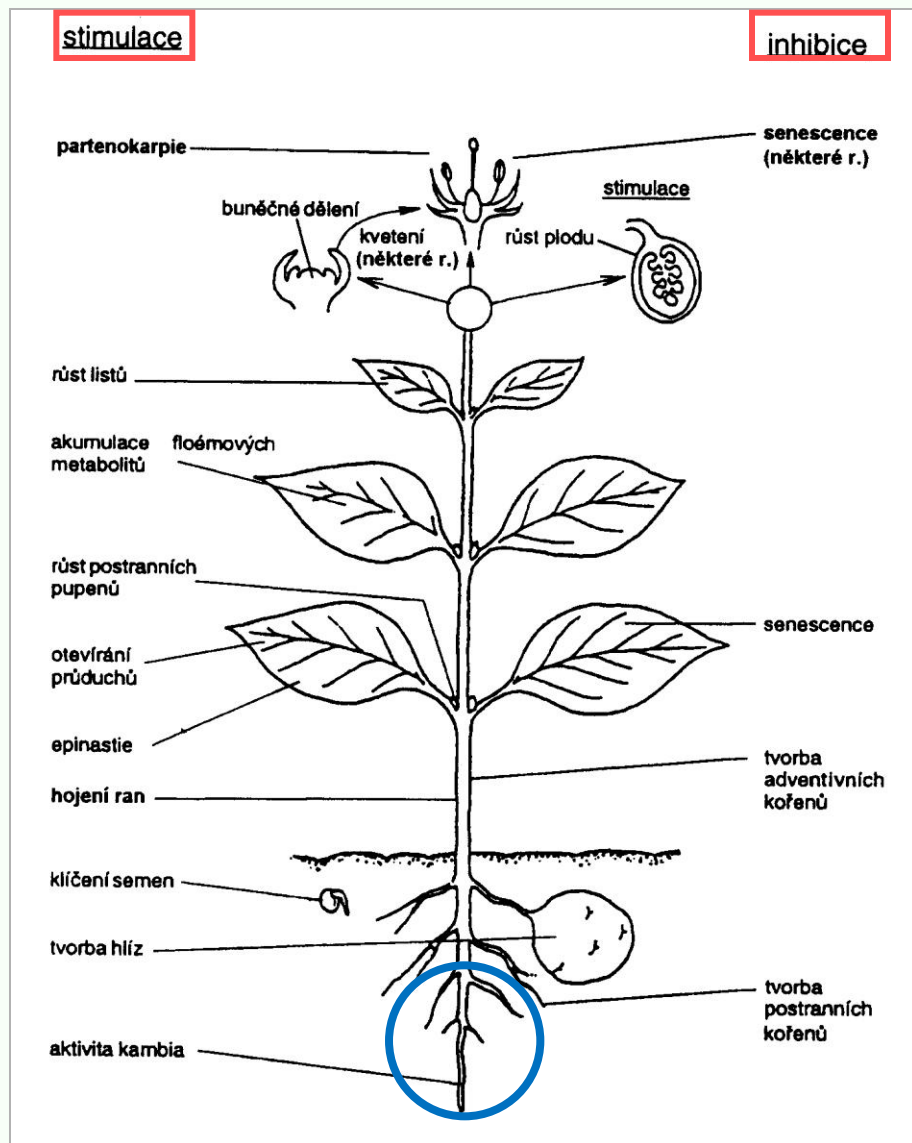
1955 – kinetin (syntetický)

1948 adenin v kokosovém mléku

Přirozené - zeatin, adenin

Umělé - benzyladenin (BA, BAP), kinetin,
topolin, thidiazuron (TDZ)

Analogy – olomoucín, roskovitin



Vliv cytokininů na životní pochody v rostlině

Působení

- zrychlení buněčného cyklu – *podmíněno přítomností auxinu*
- stimulují metabolismus rostlin (RNA, proteosyntézu) –
regenerační procesy *in vitro*
- tvorba pupenů
- ruší apikální dominanci
- zpomalení projevu stárnutí (chlorofyl u starších listů)
- stimulace fotosyntézy (vliv na vývoj chloroplastů)
- chrání membrány před degradací
- stimulace klíčení semen (nahrazují vliv nízkých teplot)

ABA: Kyselina abscisová - 1965

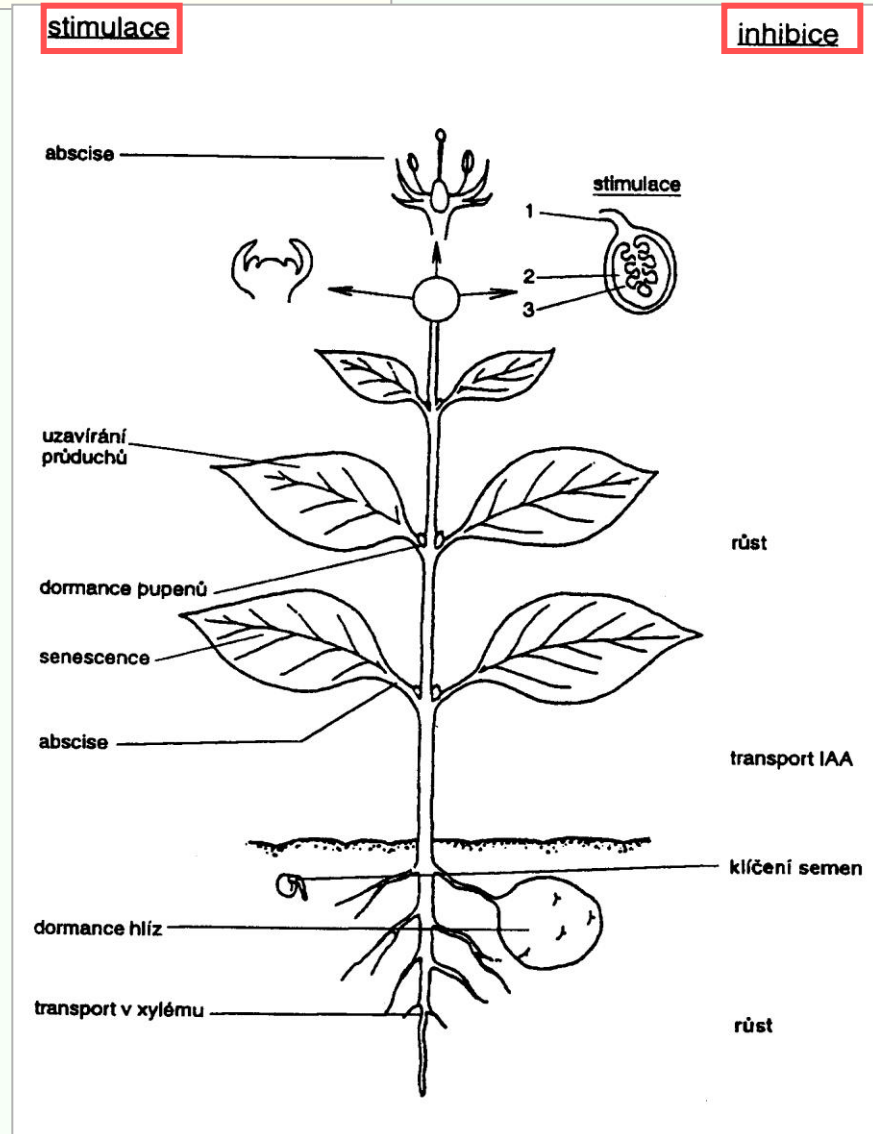
Syntéza ve stárnoucích listech (z kys. mevalonové)

Transport - floémem

Antagonista cytokininů - antistresin
dormin (dormance), abscisin (opad)

Výskyt:

chloroplasty, pupeny, semena, hlízy



Vliv kyseliny abscisové na životní pochody v rostlině

Působení

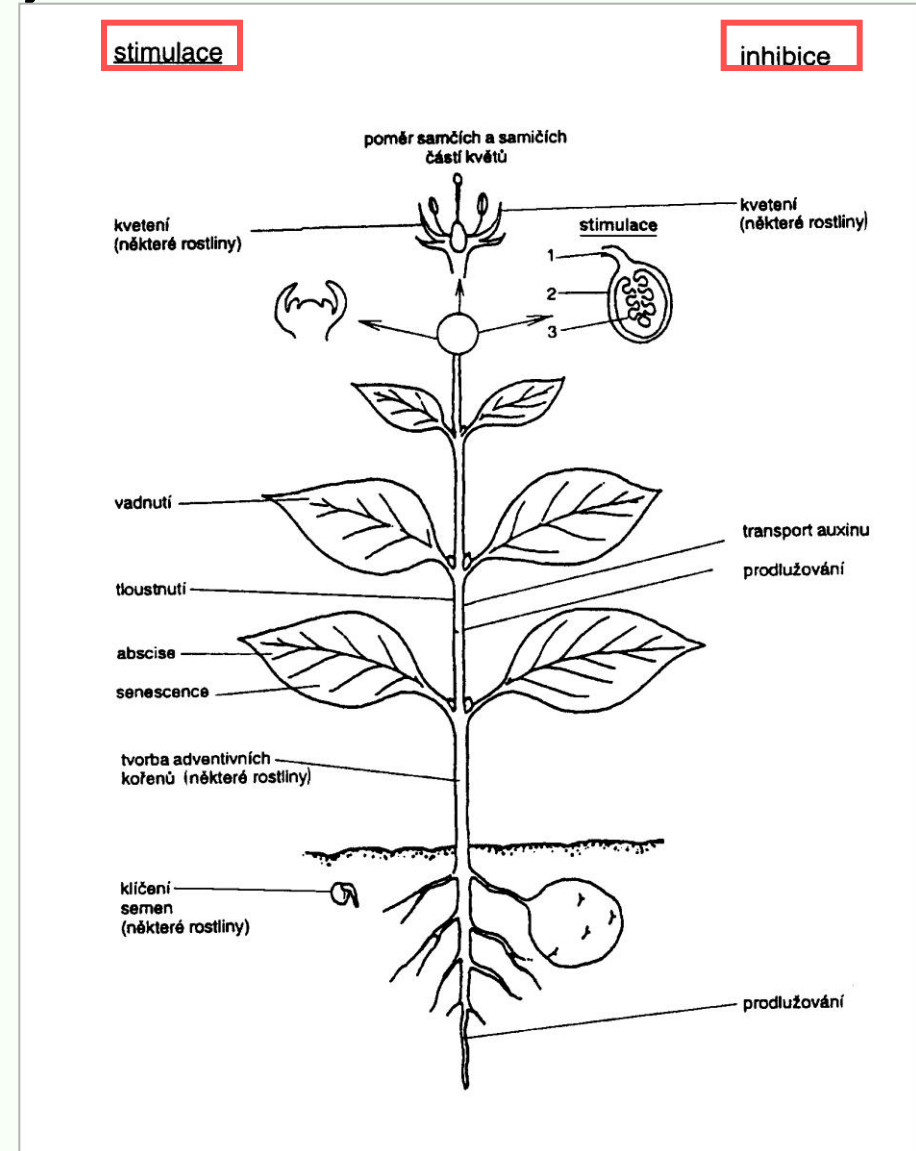
- zpomaluje růstové procesy, růst embrya
- brzdí prodlužovací fázi
- navozuje dormanci (odpočinek) pupenů, semen
- podporuje opad listů, plodů
- brzdí klíčení (předčasný růst embrya v nevyzrálých semenech)
- ovlivňuje pohyby průduchů (zavírání)
- při stresových faktorech na rostlinu (deficit vody, zasolení, nízké teploty,..)
- inhibuje syntézu proteinů, aktivitu enzymů (= brzdí metabolickou aktivitu)

Etylén (C_2H_4)

Fyziologickými účinky patří mezi regulátory

**Syntéza – všechny části rostliny,
u dozrávajících plodů**

Transport – difúzí v intercelulárách



Etylén (C_2H_4)

Působení

- brzdí prodlužování buněk
- zpomalení dlouhivého růstu stonků a kořenů → indukce květů a plodů
- urychluje opad listů, plodů (společně s IAA)
- stimuluje dozrávání plodů a klíčení semen
- stimuluje rašení pupenů
- degraduje chlorofyl a stimuluje biosyntézu karotenoidů

Ethrel, Flordimex - oddalují na jaře kvetení

Ostatní růstové regulátory – látky s růstově regulačním působením

Kys. jasmonová (JA), „smrtící hormony“, *Jasminum grandiflorum*
ve všech orgánech

- urychlující účinky na stárnutí listů
- inhibuje růst hypokotylů, listových pochev
- signál při reakci na dotyk
- signál při reakci na patogeny
- signál při reakci na poranění
- brzdí růst kalusů

Kys. tuberonová

- stimuluje zakládání hlíz u bramboru

Brassinosteroidy (BR) – reprodukční orgány, z pylu řepky (*Brassica napus*)
(1979 brassinolid, asi 30 – castasteron, typhasterol)

- stimulace dlouhivého růstu
- zvyšují odolnost ke stresům (sucho, teplota)
- klíčení semen, růst pylové láčky

Ostatní růstové regulátory – látky s růstově regulačním působením

Fenolické látky – sek. metabolity

der. k. benzoové, skořicové, flavonoidy

- inhibují dlouhivý růst
- ovlivňují dormanci pupenů, semen, hlíz, cibulí
- napomáhají při infekci *Agrobacterium tumefaciens*

Polyaminy

putrescin, spermin, spermidin

v meristémích

- stimují růst v *in vitro*, somatickou embryogenezi
- stimulace prorůstání dormantních hlíz
- účastní se regulace buněčného cyklu
- obrana rostlin vůči stresům (ochrana - stabilizace membrán)

Oligosacharidy = oligosachariny

fragmenty buněčné stěny

- inhibice dlouhivého růstu
- obrana při napadení patogenem

Postup při práci *in vitro*

- **Příprava rostlinného materiálu** (povrchová desinfekce, narušení celistvosti rostliny, reakce na poranění po izolaci)
- **Iniciace explantátové kultury** (izolace explantátu, velikost explantátu, stáří, médium, podmínky kultivace)
- **Mikropropagace** (zmnožování, pasáže, regenerace rostlin)
- **Zakořeňování *in vitro*** (genotyp)
- **Převod do nesterilních podmínek**



**Podmínky kultivace - teplota
světlo (červené nahrazuje cytokinin)**

Příprava explantátu

Stáří explantátu (fyziologický stav donorové rostliny, mladší pletiva lepší sterilizace)

Roční období (kontaminace: jaro x podzim; dormance - pupeny)

Velikost explantátu (čím menší explantát → těžší kultivace)

Cíl

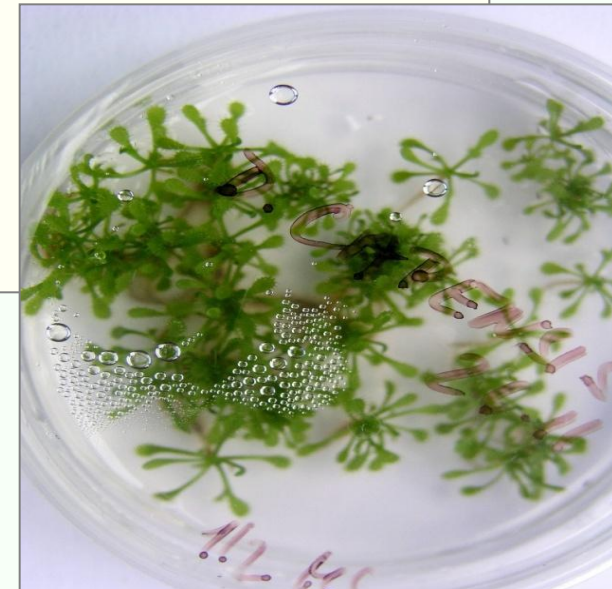
Aseptická technika (= povrchová desinfekce)

opláchnutí vodou (teplá, mýdlová)

opláchnutí alkoholem (70%)

desinfekční prostředek (SAVO, chloramin, HgCl_2)

opláchnutí sterilní vodou (3 - 5 x)



Kontaminace

Explantát

desinfekční prostředek (alkohol, chloramin, Savo, chlorové vápno, H_2O_2 ..)

zdroj explantátu (pole, skleník, fytotron, trichomy, ..)

endogenní kontaminace (hlízy, pupeny, semena x meristém, ...)

Lidský faktor (nářadí,..)

Médium (dostatečná sterilizace)

Hmyz

Antibiotika

Inhibitoři bakteriální b. stěny

Ampicillin, Amoxycillin, Penicilín G

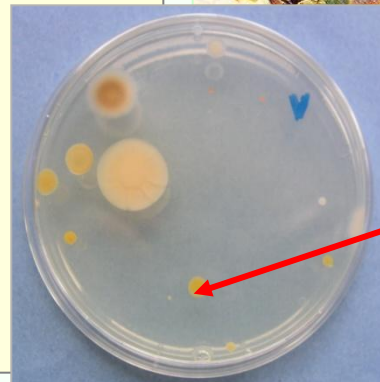
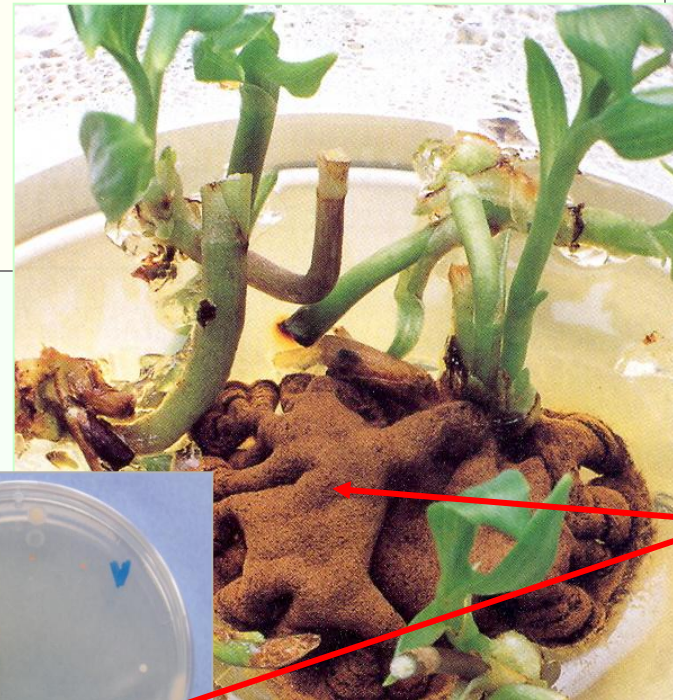
Inhibitoři syntéz proteinů

Chloramphenicol, Erythromycin, Tetracyklin

Gentamycin, Kanamycin, Streptomycin

Antifungální

Amphotericin B, Nystatin,



Regenerace *in vivo*

Fyziologická - náhrada ztracených částí rostliny (jizvy po opadu listů, květů, plodů)

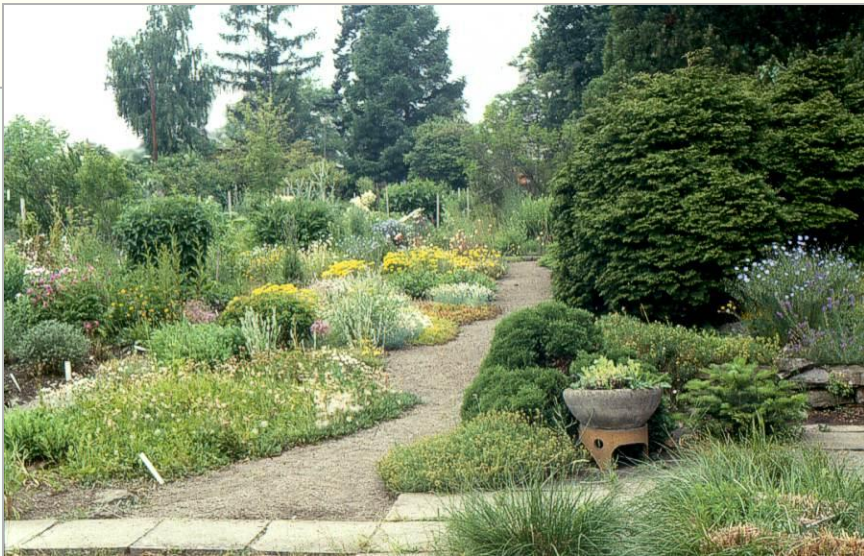
Patologická - reakce rostliny na poranění: hojení ran (zacelení)

restituce (přímo na ráně)

reprodukce (ze základů před poraněním)

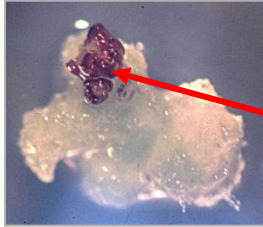
regenerace v užším slova smyslu

(po poranění)



Regenerace *in vitro*

Totipotence buněk



1. přímá
2. nepřímá (kalus)



Faktory:

vnitřní

vnější

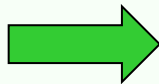
genotyp

růstové podmínky mateřské rostliny

vývojové stádium rostliny

složení média, podmínky kultivace

In vitro



stresová situace

Snížení regenerační schopnosti v *in vitro*:

- odumírání explantátů po izolaci
- dlouhodobá kultivace
- hromadění metabolitů (dlouhodobé působení cytokininů)
- genetické změny (kalusové kultury, buněčné kultury)

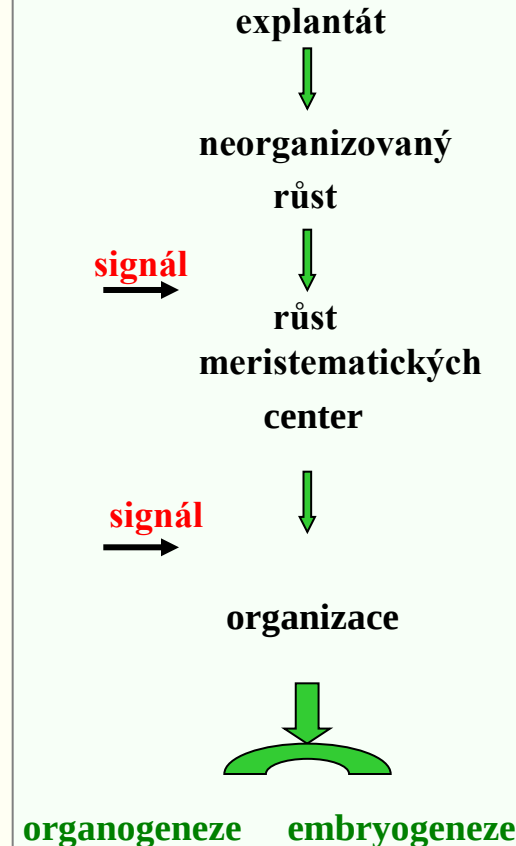
Morfogeneze *in vitro* (regenerace)

○ **Organogeneze** (vznik orgánů, !!! ne celá rostlina)

list, kořen, prýt, květ, hlíza (mikrohlízka)

○ **Embryogeneze**

- zygotická embryogeneze – embryokultury
(embryo ze zygoty)
- gametofytická embryogeneze (prezygotická) haploidi
 - gynogeneze
 - androgeneze
- somatická embryogeneze (postzygotická)
= nepřímá (z diploidní buňky)



Symptoms *in vitro*

1. Atypická anatomie, morfologie a fyziologie - miniaturizace

- změna stavby listů a jejich funkce, bez kutikuly, otevřené průduchy, velké interceluláry
- opuchlé výhony
- listy bledě zelené nebo šedomodré (abnormální barva)
- listy průsvitného (skelnatého) vzhledu, křehké - vitifikace
- listy podlouhlé nebo páskovité
- krabacené nebo zkroucené listy (jeví se jako tmavě zelené)
- kratší internodia
- redukovaný vývoj cévního systému
- fotosyntéza je závislá na exogenním cukru

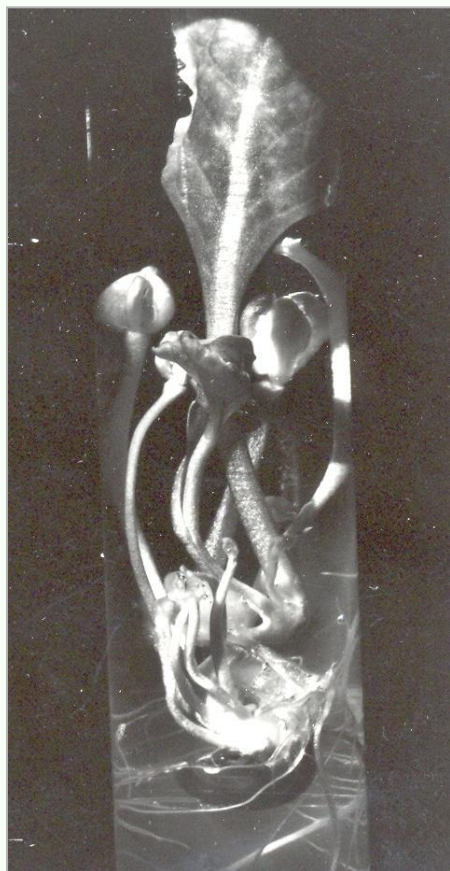
2. Redukce apikální dominance

- trsy výhonů při mikropropagaci

3. Kořenění

- nadměrná produkce adventivních kořenů
- špatná tvorba adventivních kořenů

Vitrifikace (hyperhydricita) – vyjadřuje abnormality růstu *in vitro*
skelnatý syndrom výhonů, křehké
mokrý vzhled prýtů (vodou nasycených)
průsvitný, sukulentní vzhled



nežádoucí



Metody EK

Meristémové kultury

Kalusové kultury

Somatická embryogeneze

Embryokultury

Prašníkové a mikrosporové kultury

Protoplastové kultury a fúze + buněčné inženýrství

Genetické manipulace - transformace

genotyp beze změn - meristémové kultury

embryokultury - semenných embryí

proembryí (nezralá embrya) *x rozdíl ve výživě*

klonování *in vitro*

ozdravování „*virus free*“

zvyšující genetickou variabilitu - kalusové kultury

suspenzní kultury

protoplastové kultury

prašníkové a mikrosporové kultury

Metody EK

Meristémové kultury

Kalusové kultury

Somatická embryogeneze

Embryokultury

Prašníkové a mikrosporové kultury

Protoplastové kultury a fúze + buněčné inženýrství

Genetické manipulace - transformace

Plodina	Technika
ječmen, pšenice, kukuřice, řepka, paprika, brukvovitá zelenina, mrkev	androgeneze
cibule	gynogeneze
jahodník, česnek	ozdravování
brambor, trávy	polyploidizace <i>in vitro</i>
jeteloviny, drobné ovoce, ovocné dřeviny, podnože, trávy	mikropropagace
brambor, řepka	somatická hybridizace
hrách, brambor	rezistence k chorobám
trávy	embryokultury

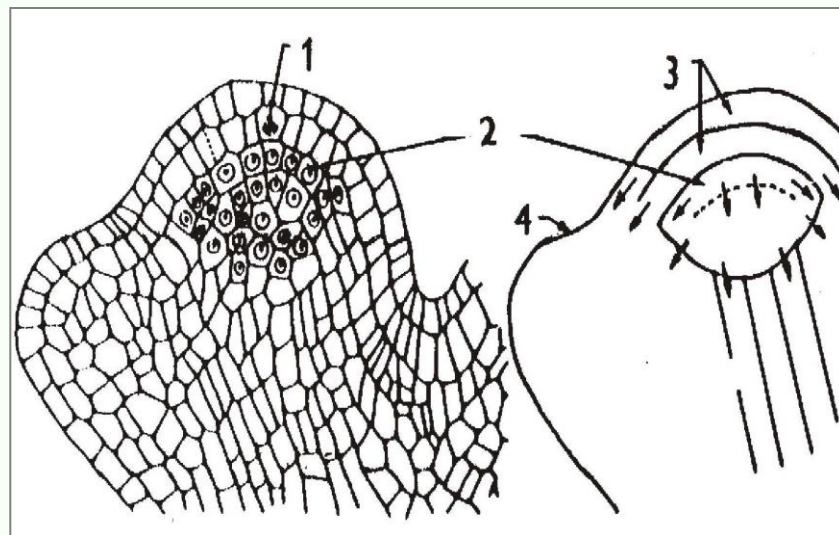
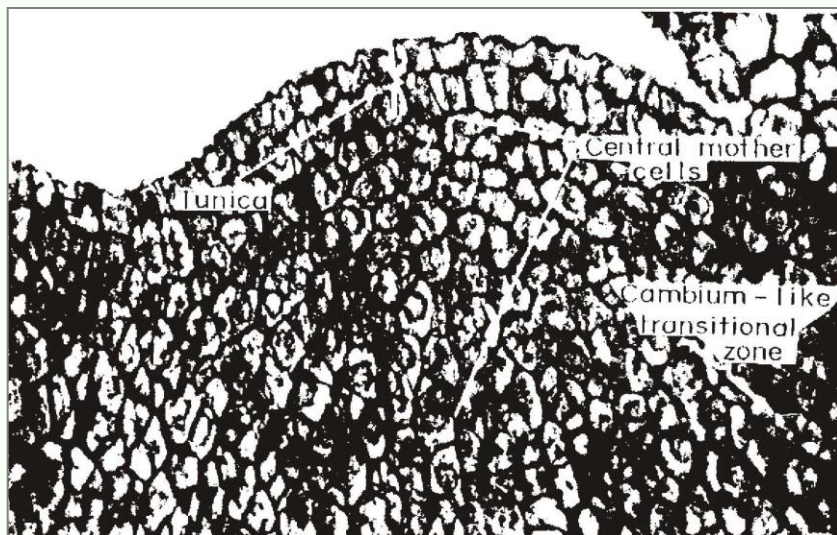
Meristémové kultury



Meristém

ozdravování rostlin (0,2 - 0,5 mm)

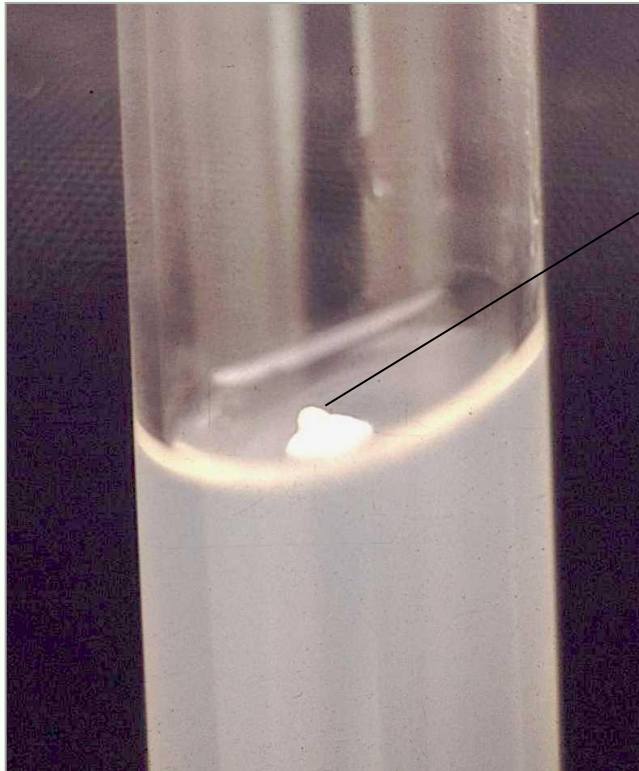
mikropropagace rostlin (0,5 - 1,0 mm)



Meristém – dělivé, parenchymatické nediferencované pletivo

Primární - histogeny

Ozdravování - **eliminace patogenů**



Tvorba bezvirózních rostlin

1 meristém = 1 rostlina → testování

Ozdravování

Termoterapie (vyšší teplota)

Meristémová kultura

Chemoterapie (antibiotika)

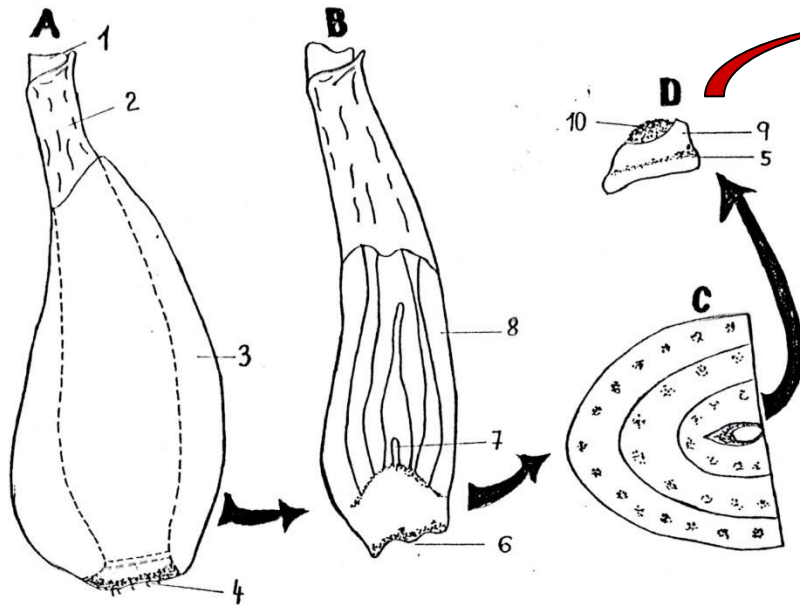
! Reinfekce po 2 - 3 letech!

Využití

*jahodník, česnek, zeleniny, květiny,
okrasné dřeviny, banánovník, ...*

1952 Morel a Martin u jirín

Postup izolace u česneku



SCHEMA IZOLACE MERISTÉMU:

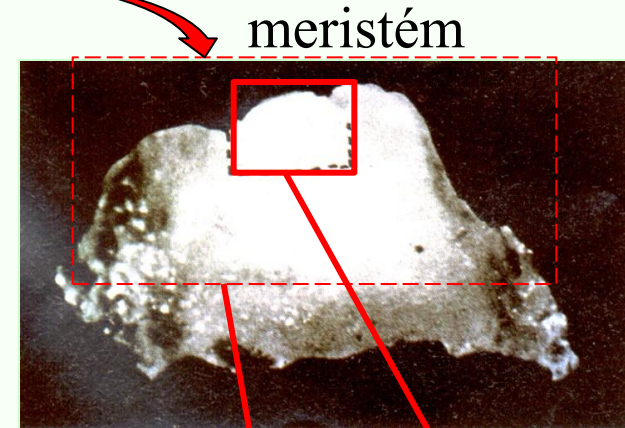
A: Bazální část listových pochev s mateřským stroužkem

B: Srdéčko rostliny

C: Disk listových pletiv s růstovým vrcholkem

D: Izolovaný růstový vrcholek

- 1- rašící pravý list
- 2- bezčepelná pochva
- 3- stroužek
- 4- podpučí
- 5- zkrácený stonek
- 6- oddělovací zóna
- 7- primordium prvního listu a růstový vrcholek
- 8- báze listu
- 9- primordium nejmladšího listu
- 10- růstový vrcholek



meristém

ozdravování

mikropropagace

Bertaccini A. et al. 1986: Shoot-tip culture of different garlic lines for virus elimination. Riv. Ortoflorofruit, It. 70: 97-105

Meristémové kultury - mikropopagace

Klon - kolekce geneticky identických individuí, původem z jediného rodiče

Přerušení korelačních vztahů (AD,..)

Izolace meristémů pod binokulární lupou

Izolujeme meristém se založenými listovými primordii

Výhody meristémové kultury

- * Geneticky stabilní (regenerované rostliny jsou identické - klony)
- * Vypěstování množství rostlin stejné kvality v krátké době, nezávisle na ročním období
- * Malé nároky na prostor

komerčně je metoda používána od 1960



Salix sp.



Cephalotus sp.

In vitro meristémové kultury - využití

- **záchrana a množení ohrožených druhů:** kaktusy,...
- **záchranné množení cenných genotypů a linií**
- **udržení rodičovských komponent pro tvorbu hybridních odrůd**
- **zachycení a klonování nově nalezených mutantů při šlechtění**
- **klonování nejlepších jedinců pro produkci elitního osiva**
- **vegetativní množení okrasných rostlin:** karafiát, gerbera, anthurie, orchideje, sanpaulie, kapradiny,...
- **množení drobného ovoce:** jahodník, maliník, ostružiník,...
- **množení dřevin:** podnože pro školkařství, lesní dřeviny, tropické dřeviny
- **v zelinářství:** množení brambor, zelí, ...
- **množení pouze samičích rostlin:** datlová palma
- **kryoprezervace (-196 °C):** jahodník, maliník, hrách, brambor, karafiát

**Genové
banky**

Chryzantéma - řízkováním za 1 rok 1:30 000

- meristémy za 1 rok 1: 1 000 000

v ideálním případě

Meristémové kultury - množení

získ geneticky identické rostliny vegetativním množením



Schéma postupu:

Mateřská rostlina



Odběr meristému



Mikropropagace (velký počet rostlin)



Kořenění *in vitro* x *ex vitro*



Aklimatizace

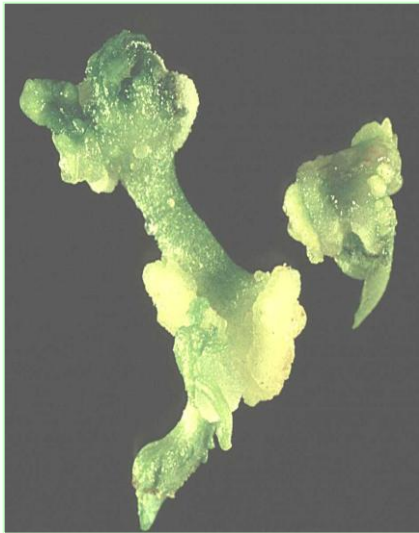


Celá rostlina

Mikropropagace, multiplikace, klonování

nejen z meristémů

Schopnost regenerace, tvorba identických rostlin = přímá somatická embryogeneze



Zdroje odchylek

- vysoké dávky růstových regulátorů, typ regulátoru
- rostliny regenerují z basálního kalusu (možnost gen. změn)

Meristémy

Prýtové segmenty

Kalusy

Embrya

Solanum tuberosum, *Cucumis sativus*,
Olea europea, *Eucalyptus grandis*, *Salix*
sp., *Syringa sp.*, *Juglans regia*

Mikropropagace

I. Odvození aseptické kultury (vhodný explantát, kontaminace, fenolické látky)

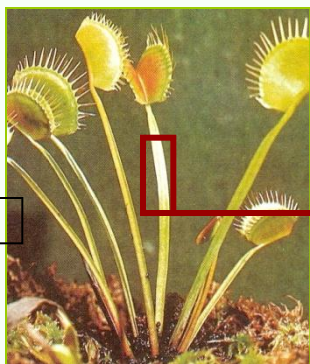


II. Multiplikace (médium, vhodný poměr hormonů, pasáž 3 - 6 x)

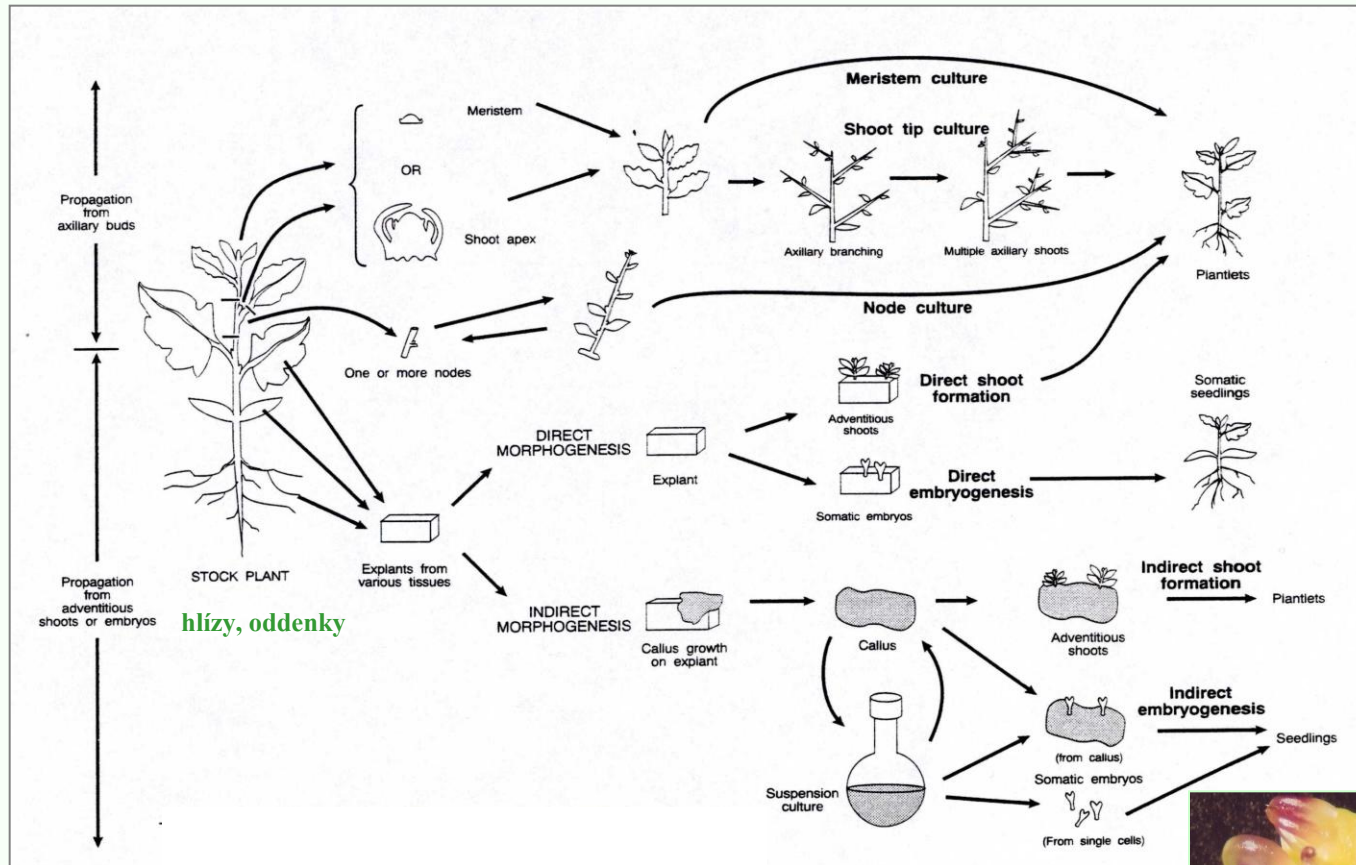


není vhodný kalus

III. Přenos rostlin do substrátu (auxin v médiu)



Mikropropagace



1. Holandsko
2. Itálie
3. Francie
4. Španělsko
5. Německo

1. množení
2. ozdravování
3. genofond
4. gen. manipulace
5. šlechtění
6. sekundární metabolit



Embryokultury

= kultivace zralých nebo nezralých embryí *in vitro*

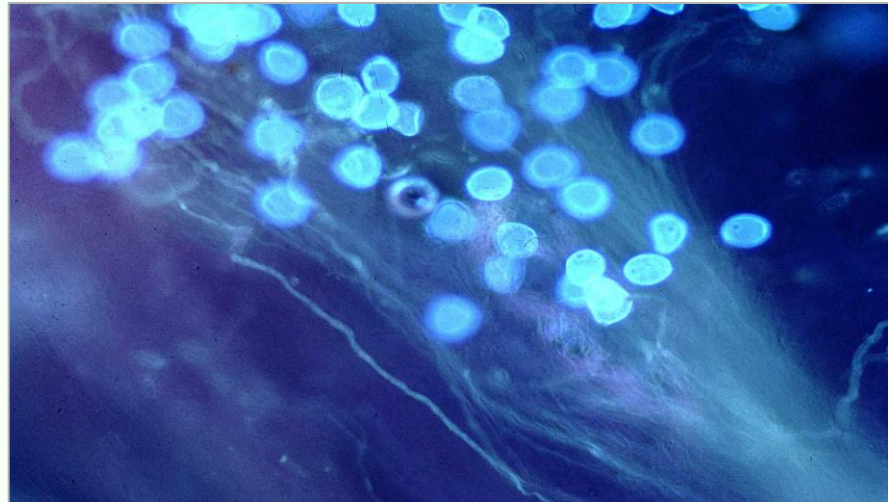
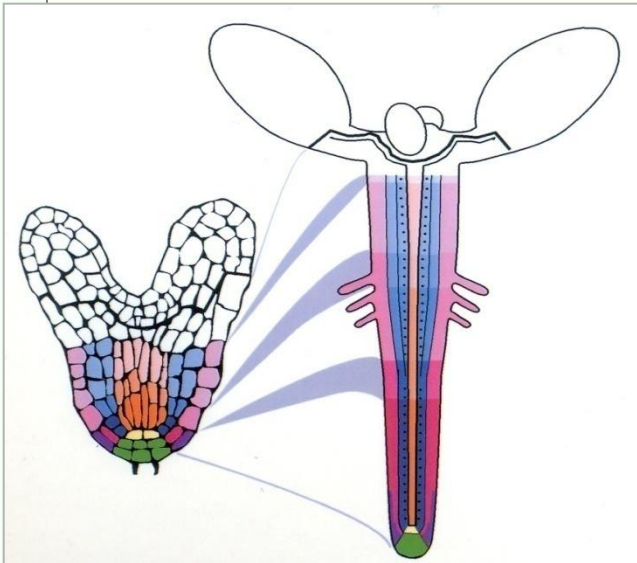
1904 Hannig - embrya u ředkve

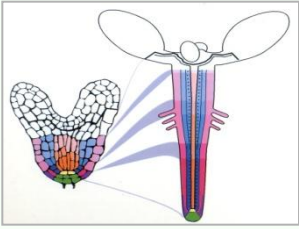
1925 Laibach - aplikace v mezidruhovém křížení r. *Linum* sp.

1945 Randolph - zkrácení šlechtitelského cyklu u r. *Iris* sp.

1970 Kasha, Kao - získání haplodů u ječmene

Hordeum vulgare (zůstává) x *Hordeum bulbosum* (eliminace chromozómů)





Embryokultury – *in vivo*

Embryogeneze zygotického embrya (*in vivo*):

zygota (příprava na 1. dělení)

fáze pomalého vývinu embrya po oplození

fáze rychlého vývinu, růstu a diferenciaci embrya

fáze dozrávání embrya

fáze přechodu embrya do dormance (ABA)

**Zygota → lineární fáze → globule → srdce →
→ torpédo → vycházková hůl → kroužek**

Bariéry opylení a oplození → vnější (teplota, vlhkost,..)
→ vnitřní (inkompatibilita, samčí nebo samičí sterilita)

Embryokultury- *in vitro*

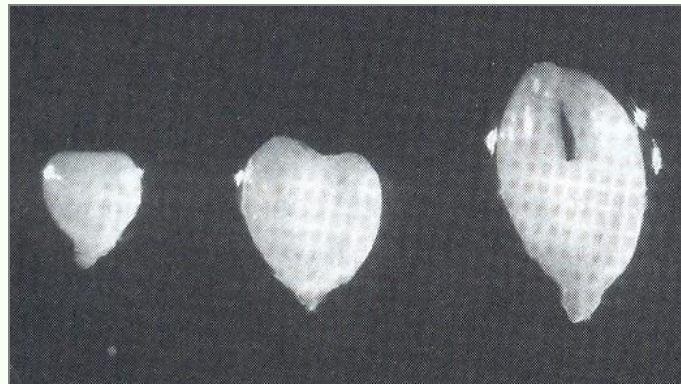
I. Kultura semenných embryí, tj. izolace plně vyvinutých

bipolárních struktur obsahujících kořenový a stonkový systém

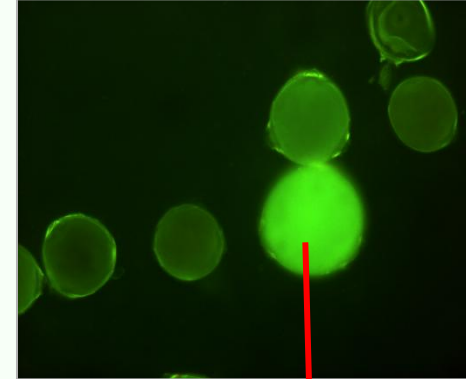
II. Kultura proembryí, tj. izolace nezralých zárodků předcházejících
diferenciaci děloh

Zygotická embrya → výživa z endospermu (heterotrofni)

Embrya *in vitro* → výživa z kultivačního média



Embryogeneze *in vitro*



zygotická embryogeneze → embryokultury
(embryo ze zygoty)

gametofytická embryogeneze (prezygotická) haploidní rostliny

→ gynogeneze (vaječná buňka)

→ androgeneze (pylové embryogeneze)

somatická embryogeneze (postzygotická)

= nepřímá (z diploidní buňky)

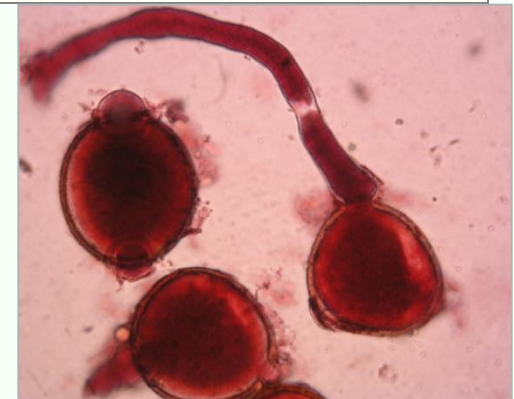
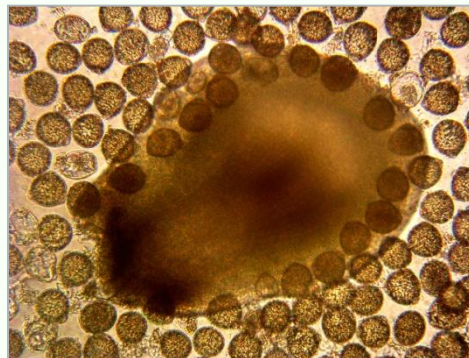
Embryokultury

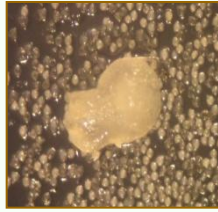
1. Překonání bariér vzdáleného křížení (aborce hybridních embryí, sterility semen)
2. Zkrácení šlechtitelského cyklu (více generací za rok)
3. Řešení jarovizačního stádia
4. Primární explantát pro další kultury
5. Eliminace inhibice klíčení
6. Studium minerální výživy
7. Umělá semena
8. Studium metabolických vztahů mezi embryem a endospermem,
embryem a dělohami
9. Získání haploidních rostlin



★ Inkompatibilita rostlin
(zaručuje stabilitu druhu)

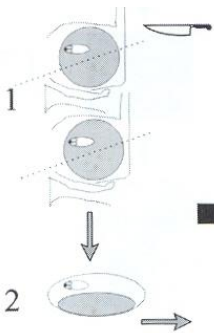
Opylování → *in situ*
 → *in vitro*



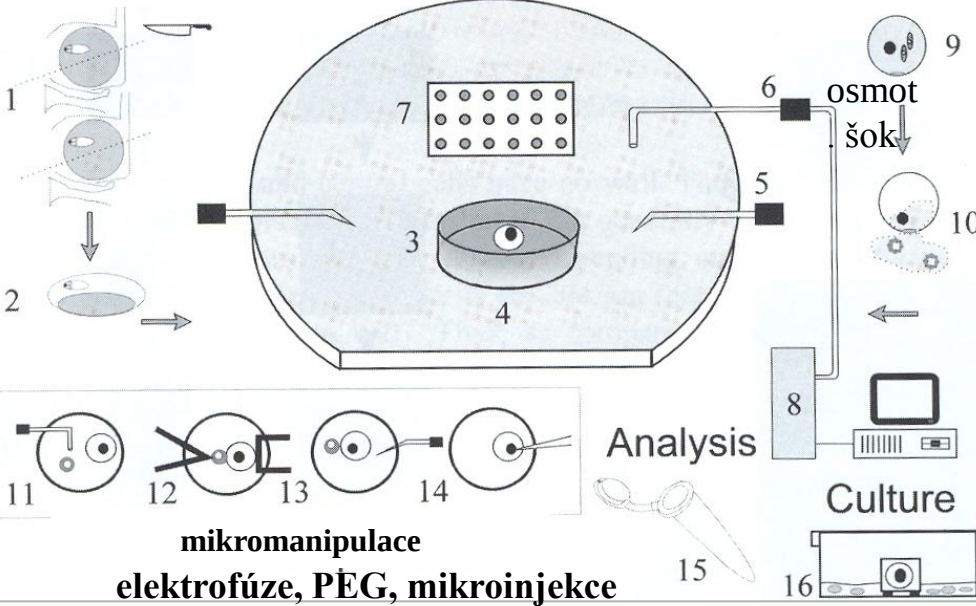


In vitro opylování

izolace vajíček



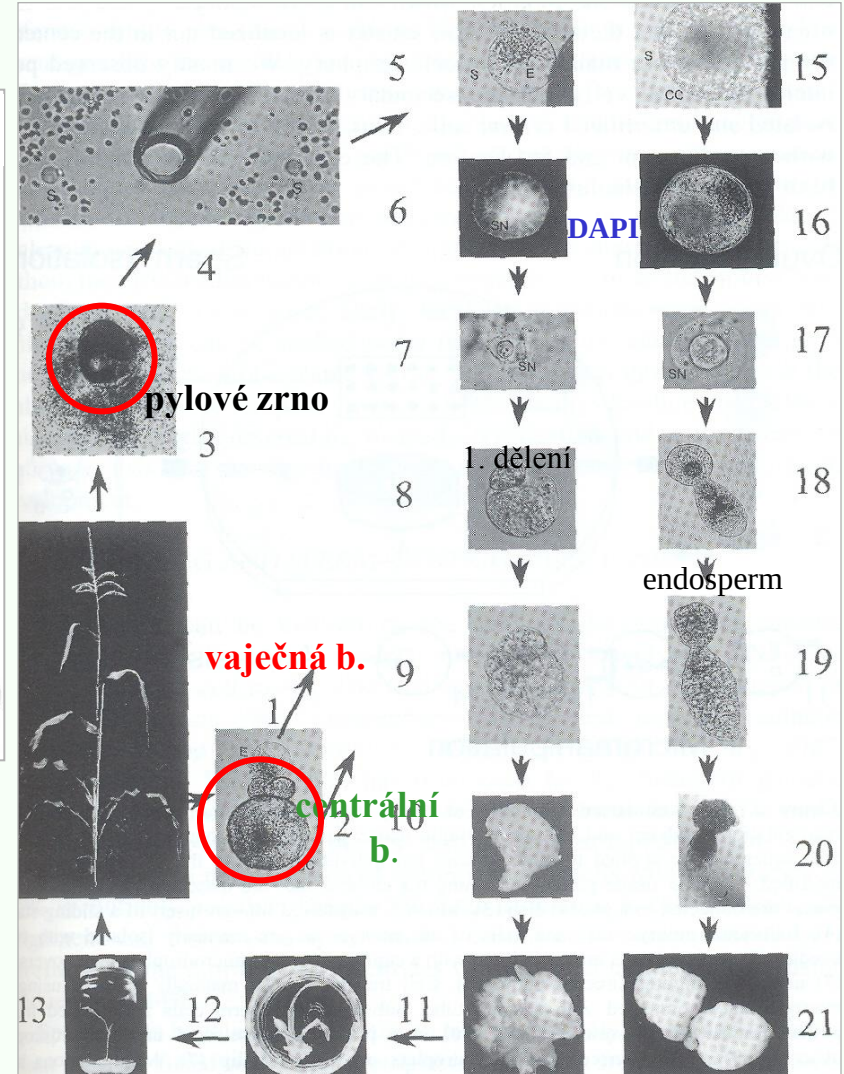
izolace mikrospór



Allium cepa, Beta vulgaris, Brassica oleracea, Cucumis melo, Gerbera sp., Helianthus annuus, Lilium sp., Nicotiana tabacum, Oryza sativa, Solanum tuberosum, Zea mays

pyl.zrno
+ vaj. b.

pyl. zrno +
centrální b.



Hybridizace

rezistence vůči abiotickému stresu
rezistence vůči škůdcům
vyšší výnos

přenos znaku z jiného druhu

Bariéry

Technika překonání

Před oplodněním

selhání klíčení pylu
pomalý růst pylové láčky
pylová láčka neroste
selhání získání sexuálních hybridů
odlišné číslo chromozomů

odstranění blizny pestíku
chemické předpůsobení fytohormony
opylování *in vitro*
fúze protoplastů
chemické navození duplicitychromozomů

Po oplodnění

abortace embrya
sterilní hybridy

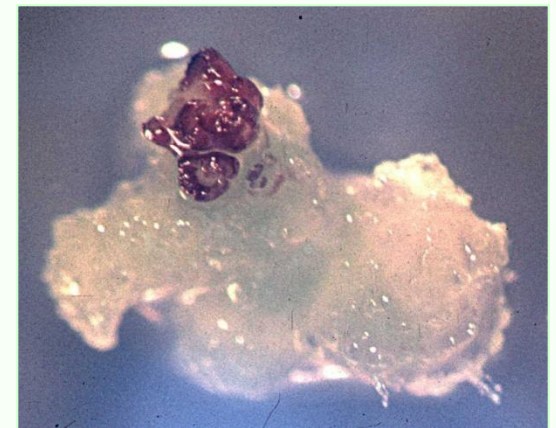
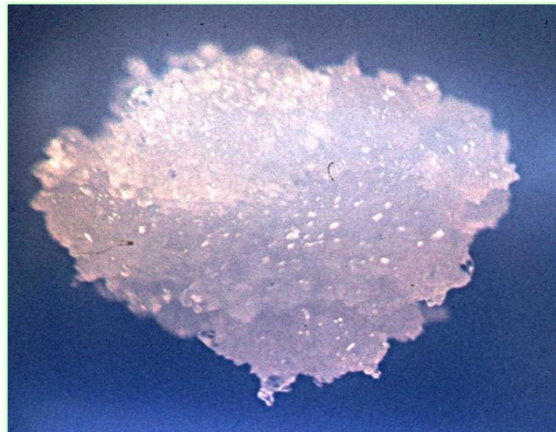
in vivo/in vitro embryokultutry
chemická diploidizace (zdvojení chromozómů)

Kalusové kultury

Kalus = masa dělících se a rostoucích buněk

- za určitých podmínek regenerace prýtů a kořínků

Primární explantát → kalus → **meristemoid** → orgánové primordium



Masa buněk, které nejsou uniformní, mohou se lišit velikostí, tvarem, pigmentací, metabolismem nebo počtem chromosomů

Kalusové kultury



- somaklonální variabilita – spontánní mutace a nové znaky
- mikropropagace – cibule, žen-šen
- výchozí materiál pro suspenzní kulturu (mrkev) a protoplastů
- **materiál pro indukované mutace** (záření, chemomutageny)
- **sekundární metabolity** (alkaloidy, AMK, saponiny, oleje, složky vůní, protinádorové látky, steroidy, ...)

polyploidie
aneuploidie

Selekce mutantů se zlepšenou nutriční hodnotou (více bílkovin v zrna)

Rezistence vůči zasolení (vysoký turgor v buňkách, akumulace NaCl ve vakuolách)

Rezistence vůči chorobám (syntéza fytotoxinů, fytoalexinů)

Sekundární metabolity

(= chemické individuality v rostlinách – barviva, vůně, chuti, obrana)

Capsicum sp. - capsaicin

Papaver somniferum - codein

Vanilla planifolia - vanilín

Kalusové kultury

I. izolace explantátu = orgánová kultura



II. **dediferenciace** již specializovaných buněk pletiva

(ztráta funkcí a struktur, změna metabolismu)



tvorba kalusu

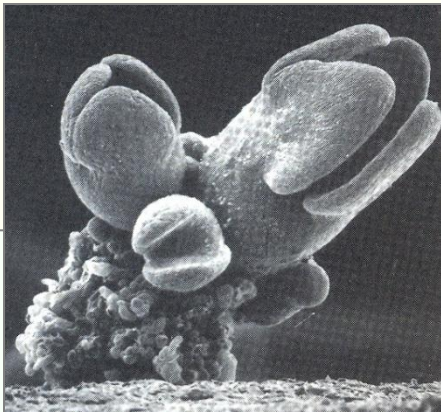
růstové regulátory
kultivační podmínky

III. regenerace rostlin z kalusu - organogeneze

(postupná diferenciací prýtů a kořenů)

- somatická embryogeneze nepřímá

(vznik celé rostliny ze somatické buňky)

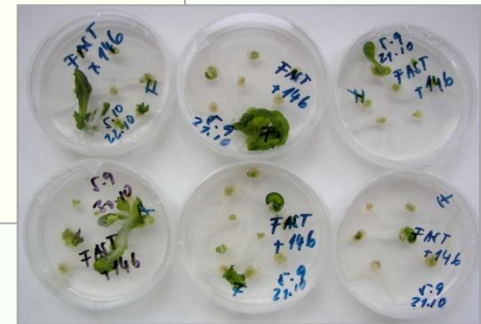


Karyologická variabilita (proměnlivost)

1. primární explantát (typ pletiva, stáří,..)
2. efekt růstových regulátorů (2,4-D)

Genetická variabilita

1. spojená s dediferenciací a tvorbou kalusu
2. růst a diferenciaci
3. somaklonální variabilita (**SV**)



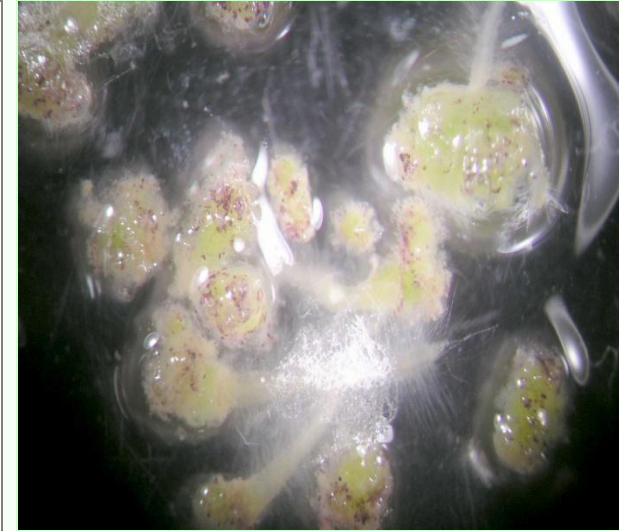
SV je vlastností EKR odvozených z diferencovaných pletiv
zahrnující proces **dediferenciace**

Variabilita detekovaná u rostlin regenerovaných z buněčné nebo kalusové kultury.

Kalusové kultury

Selekce mutantů *in vitro* (projev mutace):

- znak je stabilní i v nepřítomnosti selekčního faktoru
- projeví se za daných podmínek
- projeví se v nízké frekvenci
- exprese na úrovni regenerovaných rostlin
- sexuální přenos v následných generacích



Sekundární metabolity (= chemické individuality v rostlinách – barviva, vůně, chuti, obrana,..)

Artemisia annua - artemisin (antimalarika)

Coptis japonica - berberin

Lithospermum erythrorhizon - šikonin

Panax ginseng - (imunitní systém)

Vanilla planifolia - vanilín (aroma)

Capsicum sp. - capsaicin (protinádorové)

Digitalis lanata - digoxin (srdeční stimulanty)

Papaver somniferum - codein (sedativa)

Taxus brevifolia - taxol (protinádorové)

Zingiber officinale - gingerol (antioxidant)

Perspektivy - extrakty získané za reprodukovatelných podmínek, spolehlivé zdroje, médium
- množství čistého produktu

Sekundární metabolity (SM)



buňky rostou v
tekutém médiu
- *ne rozlina*

	produkt	rozlina	in vitro (%)	rozlina (%)	poměr
antioxydanty	ginsenoside	<i>Panax ginseng</i>	27	4,5	6 x
	rosmarinic acid	<i>Coleus blumei</i>	27	3	9 x
	caffeic acid	<i>Vanilla planifolia</i>	0,02	0,005	4 x
	shikonin	<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	20	1,5	13,5 x
	ubiquinon-10	<i>Nicotiana tabacum</i>	0,036	0,003	12 x

v
sušině

Sekundární metabolity (SM)

Rostlina		Účinná látka	Účinek
<i>Artemisia annua</i>	pelyněk roční	artemisinin	antimalarikum
<i>Digitalis lanata</i>	náprstník vlnatý	digoxin	srdeční stimulants
<i>Dubosia myoporoides</i>	lilkovité	atropin, scopolamin	oční přípravky, mořská nemoc
<i>Lithospermum erythrorhizon</i>	kamejka rudokořenná	shikonin	protinádorové
<i>Panax ginseng</i>	ženšen pravý	ginsenosidy	stimulant imunitního systému
<i>Salix alba</i>	vrba bílá	salicin	antirevmatikum, proti horečce
<i>Taxus brevifolia</i>	tis západoamerický	baccatin, taxol	protinádorové
<i>Vinca rosea</i>	barvínek růžový	vinblastin vinkristin	protinádorové alkaloidy leukémie

buněčná kultura

Rostlina		Extrakt	Účinek
<i>Linum usitatissimum</i>	len setý	olej	
<i>Mentha piperita</i>	máta peprná	mátový olej - mentol	žaludeční potíže
<i>Mentha spicata</i>	máta klasnatá	mentol	žaludeční potíže
<i>Zingiber officinale</i>	zázvor obecný	gingerol	antioxidant

informace z tradiční lidové medicíny - použití extraktů a purifikace
zdroje z nedotčeného ekosystému

kalusová kultura

buněčná suspenze

orgánová kultura - *Artemisia*, *Mentha* - prýty

Sekundární metabolity (SM)

Strategie tvorby SM

výběr donorových rostlin - biochemické testy
iniciace kalusů

výběr buněčné linie - rychle rostoucí, vysoká produkce

cílený metabolismus - kultivační médium (složení, koncentrace, proporcionalita)
kultivační podmínky (teplota, světlo, pH)
zvláštní požadavky (prekurzor, simulace stresu - napadení patogenem)

uvolnění do média

výhody buněčné kultury

nezávislé na geografických podmínkách
nezávislé na sezónních podmínkách
v kontrolovaných podmínkách
v přírodě kontrolováno množství, *in vitro* ne
nepřetržitá dodávka produktu
uniformní kvalita produktu
uniformní výtěžnost produktu (průběžně)
výběr vhodné linie s vyšší produkcí produktu
možnost tvorby nových látek, nenormálních u donora

nevýhody buněčné kultury

stále se vyvíjející

překážky - pomalý růst
genetická nestabilita
různorodost
nízký obsah metabolitu
produkty vylučování

provozní- světelné podmínky
aseptické podmínky

Somatic embryogenesis and suspension culture

Buněčná suspenze = převedeme **kalus** do tekutého média

a provzdušňujeme (kontakt buněk a shluků buněk s médiem)



auxin (2,4-D)

vzniká bipolární struktura obsahující kořen a prýt

Využití:

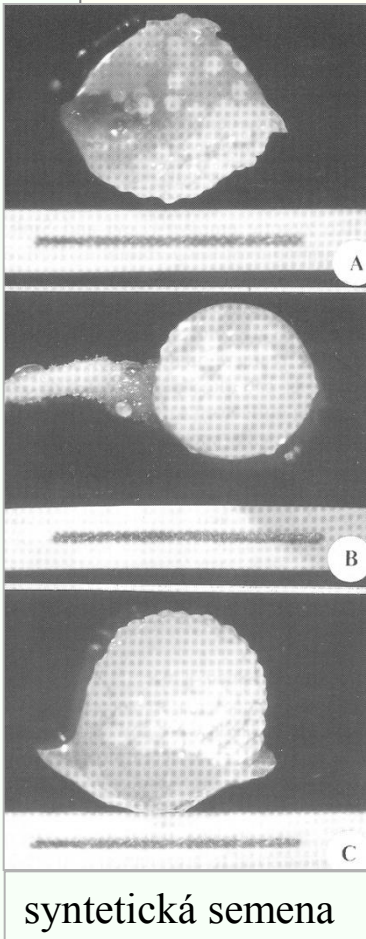
umělá semena (enkapsulace som. embryí)

využití somatické variability

klonové množení

sekundární metabolismus (suspenze)

kryoprezervace



syntetická semena

Somatická embryogeneze a suspenzní kultura

Stejná vývojová stádia jako embryogeneze *in vivo*:

globule → srdce → torpédo → vych. hůl → kroužek
→ rostlina



1958 Reinert, Smith u mrkve

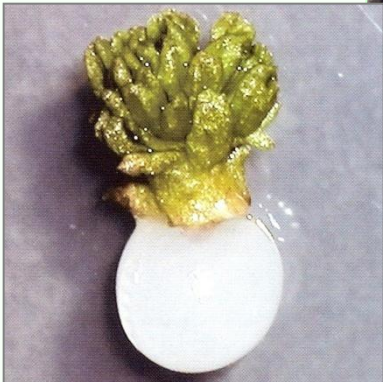
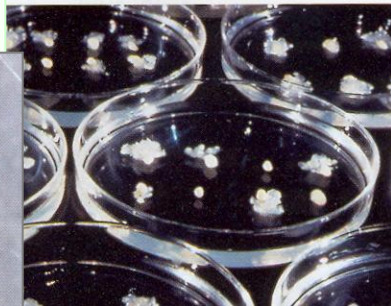
1 g mrkve → 1000 embryí



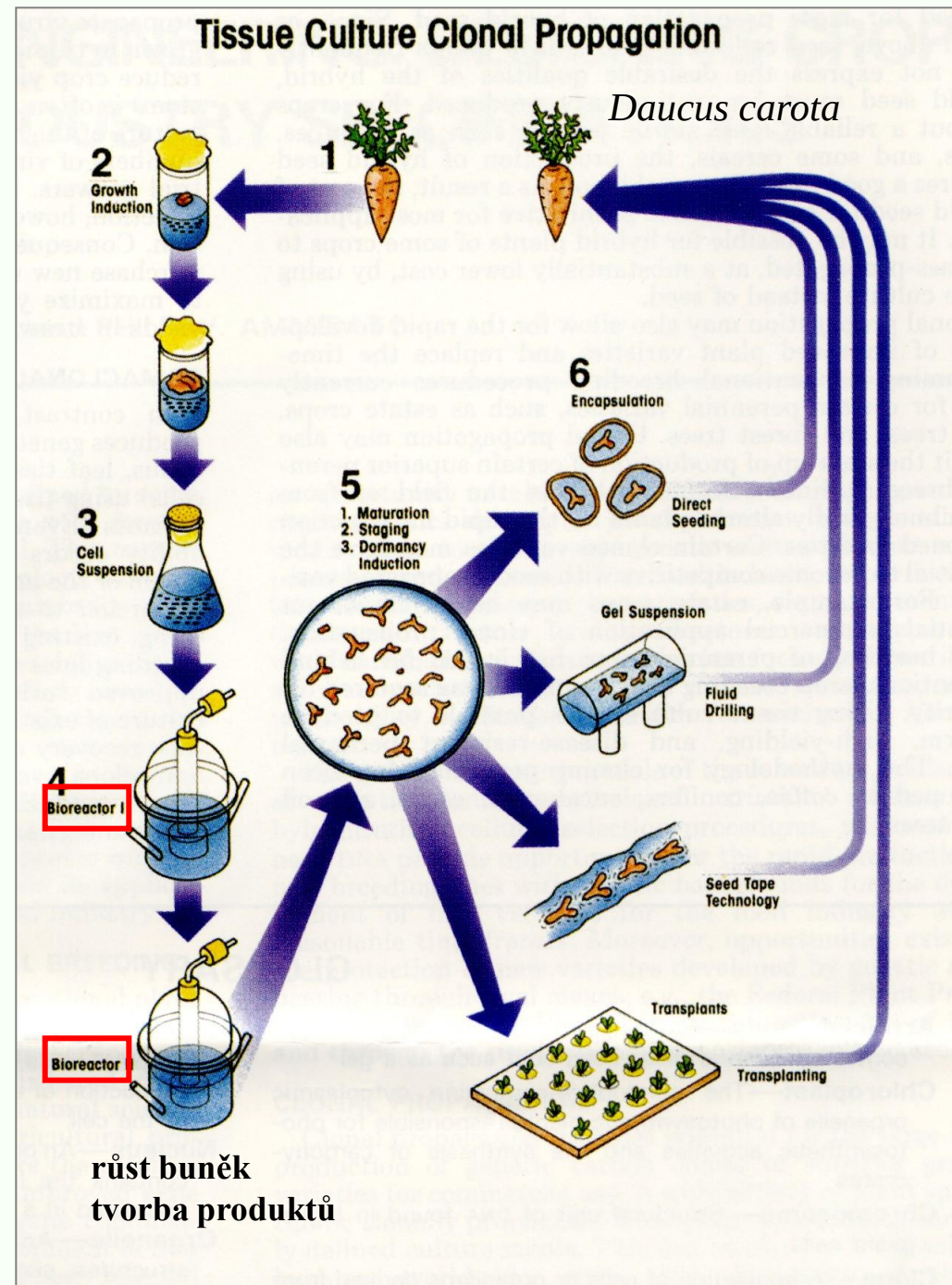
Mikropropagace obilovin, jehličnanů

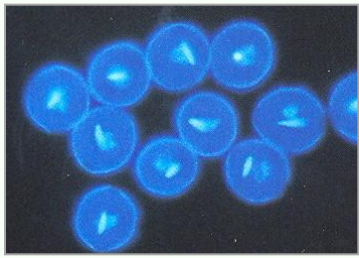
Transformace – 1. transgenní jehličnany – bombardování SE

Vznik suspenzní kultury a umělých semen



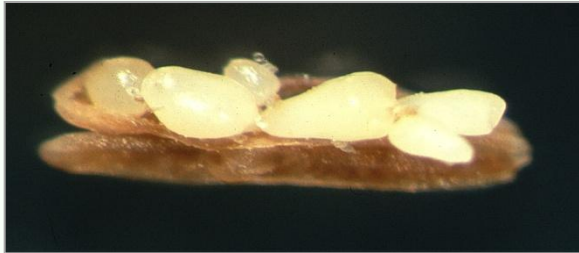
Sequoia sempervirens





Androgeneze

prašníkové a mikrosporové kultury



Androgeneze - kultivace prašníků, pyl. zrn, mikrospor,
= samčí genotyp

Gynogeneze - kultivace neoplozených vajíček

Haploidie - **spontánní** = haploidní partenogeneze (gynogeneze, androgeneze) 10^{-6}

- **indukovaná** = eliminace genomu, inkompatibilita

- **experimentální:**

fyzikální faktory = UV, γ -záření, X-paprsky, teplotní šoky

chemické faktory = kolchicin,....

zásahy do procesů opylení a oplození (inaktivní pyl)

explantátové metody = prašníkové a pylové kultury, kultivace
semeníků a vajíček, chromosomální redukce u kalusové,
buněčné a protoplastové kultury

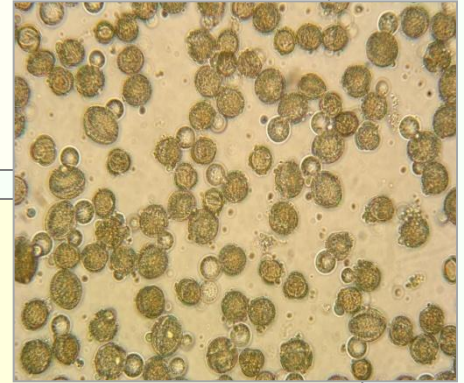
Prašníkové a mikrosporové kultury

Důkaz totipotence buňky:

mikrospora → celá rostlina

Faktory ovlivňující pylovou embryogenezi:

- fyziologická stav donorové rostliny a její gen. zvláštnosti
- vývojové stádium pylu
- předpůsobení na poupata (chlad, heat shock)
- metoda izolace mikrospor, pylu
- kultivační podmínky
- vyšší osmotická hodnota média



prašníkové x mikrosporové kultury

tabák cv. SAMSUN

Prašníkové a mikrosporové kultury

Stádium pylu *in vivo*

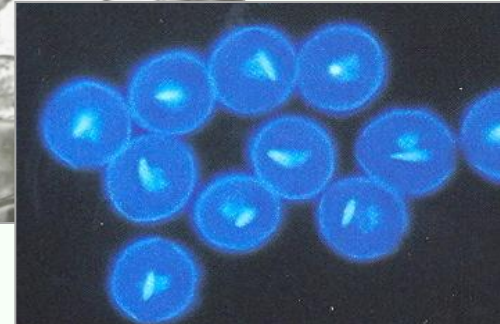
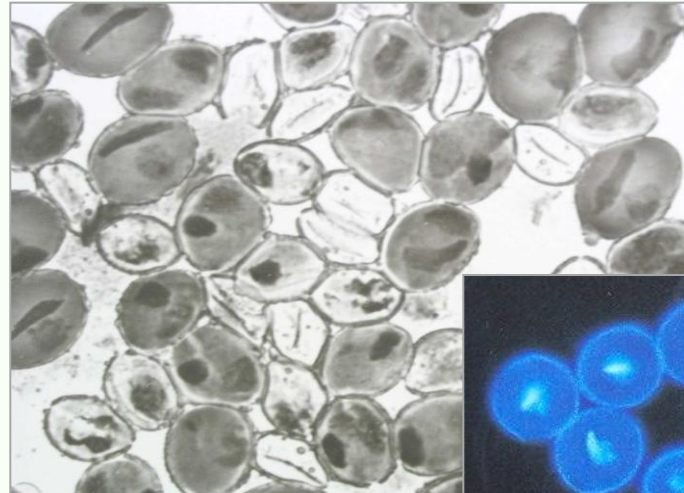
Tetrády a mladé mikrospory (jádro v G1 fázi)

Střední fáze, vyvinuta exina, vakuola, jádro v G1

Pozdní fáze mikrospor (jádro v S fázi nebo G2)

Pylová mitóza

Dvoujaderné stádium - **vegetativní** a **generativní** jádro



Prašníkové a mikrosporové kultury

Ontogeneze pylu

In vivo: mikrosporogeneze

Pylová mateřská buňka

Meiosa

Pylové tetrády

Vývoj mikrospory (1. pyl. mitóza)

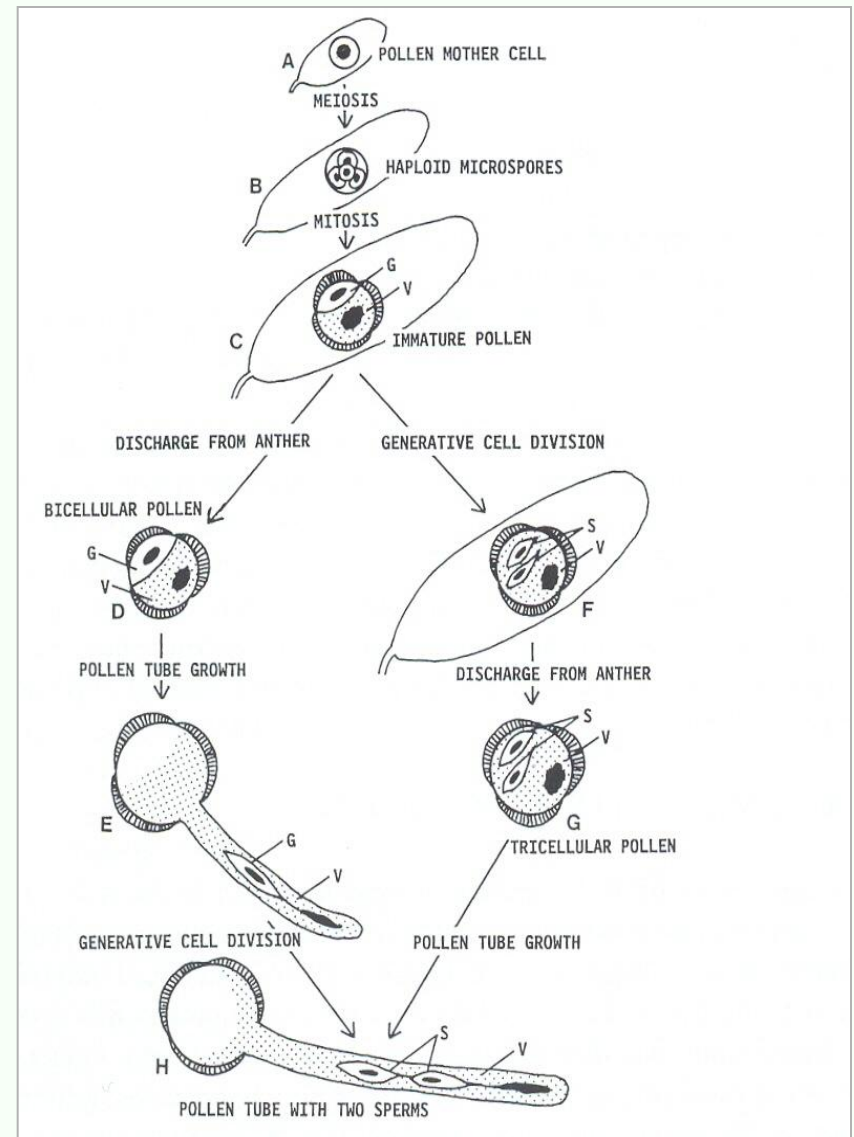
Pylový dimorfismus

In vitro vývoj embryoidu z:

(vegetativní, generativní buňka)

-přímá embryogeneze

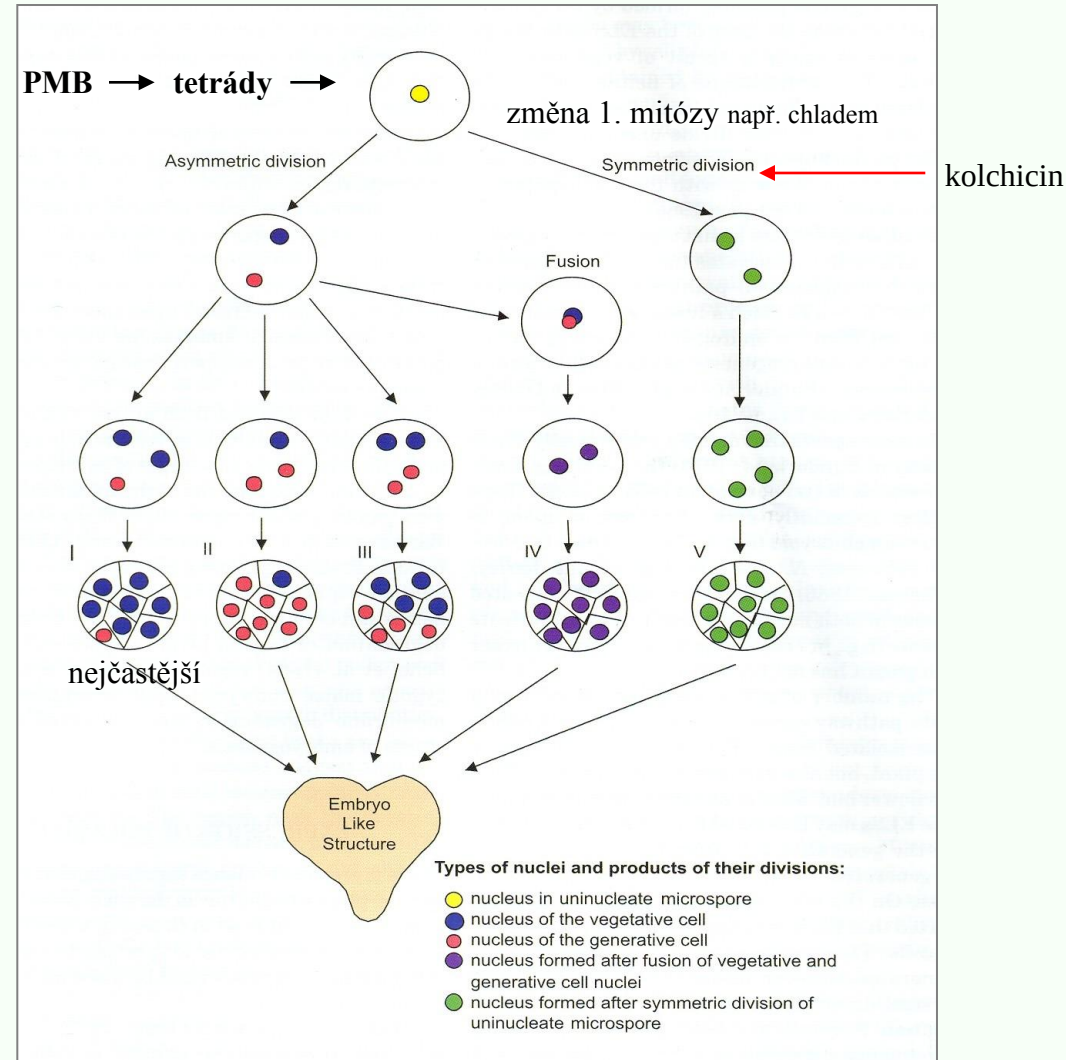
-nepřímá embryogeneze



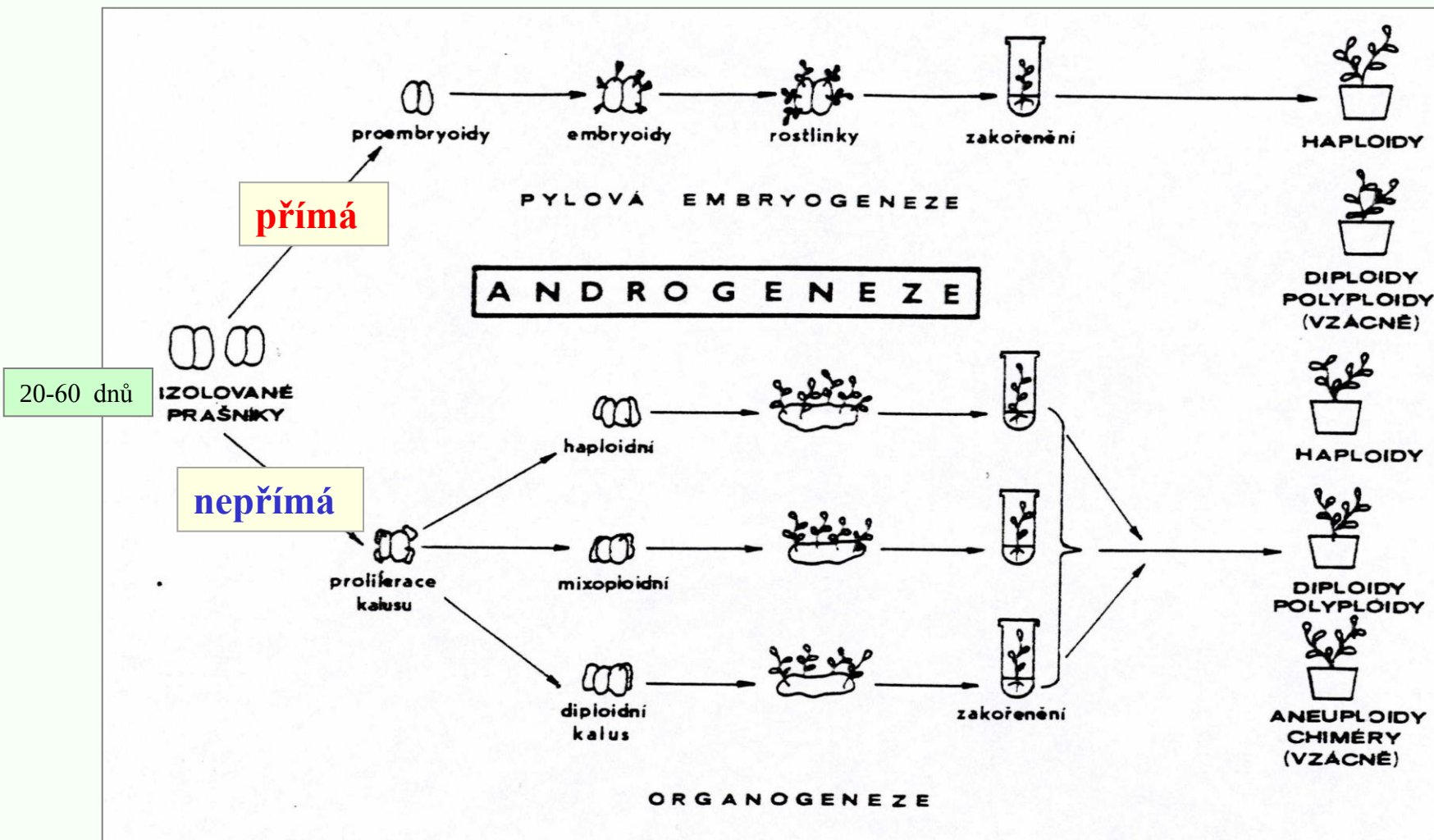
Prašníkové a mikrosporové kultury

In vitro vývoj **embryoidu**

- před dělením
- vegetativní
- generativní buňka
- fúze buněk



Prašníkové a mikrosporové kultury



Více než 200 druhů (řepka, rýže, kukuřice, obiloviny,..)

Prašníkové a mikrosporové kultury

Využití haploidů (mají jen jednu sadu chromosomů)

Segregace vloh na gametické úrovni – homozygótní stav (čisté linie v F2 generaci)

Detekce recesivních mutací (fenotypický projev)

Trpasličí varieta – u okrasných rostlin

Dihaploidizace

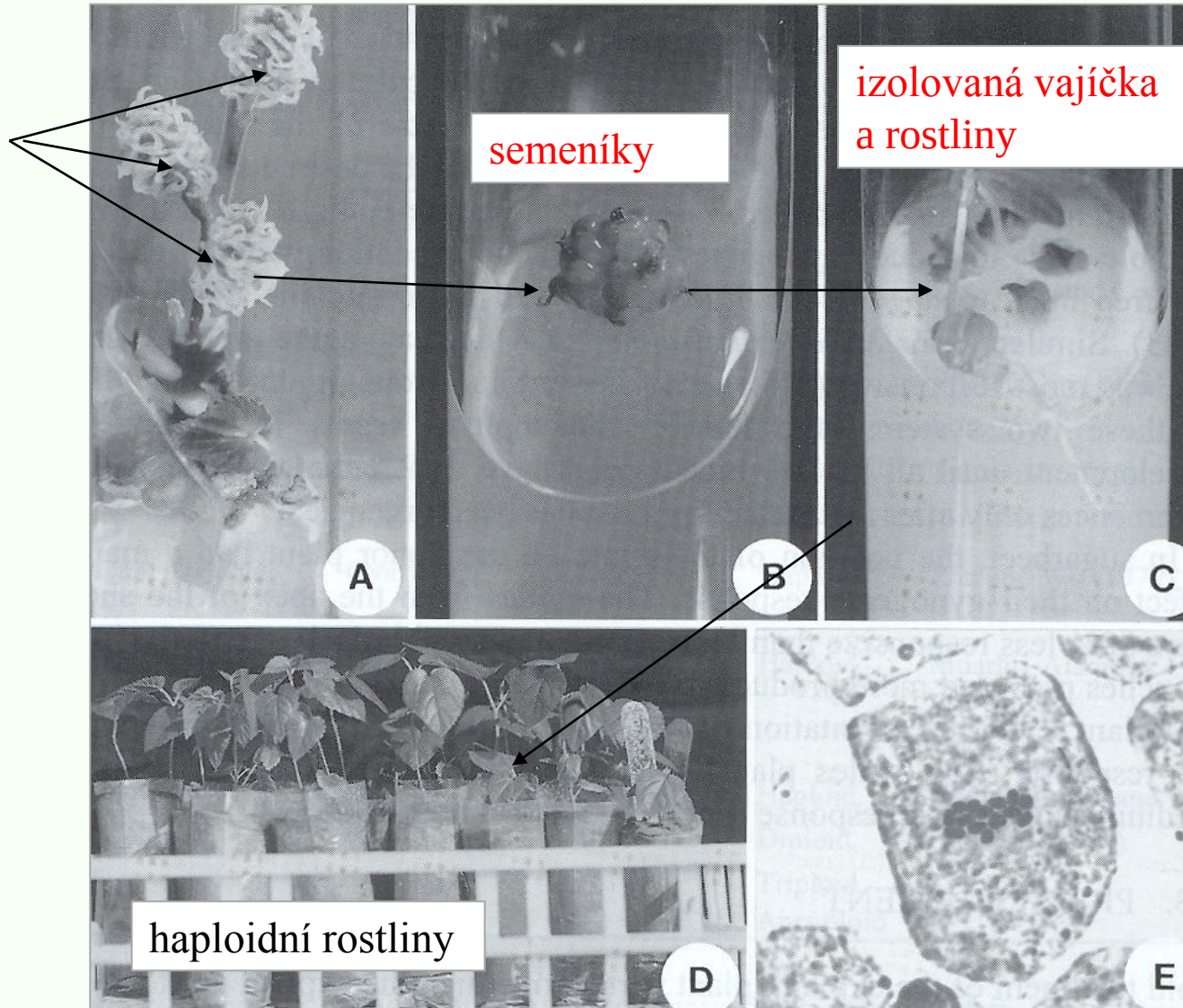
n rostliny - **sterilní**



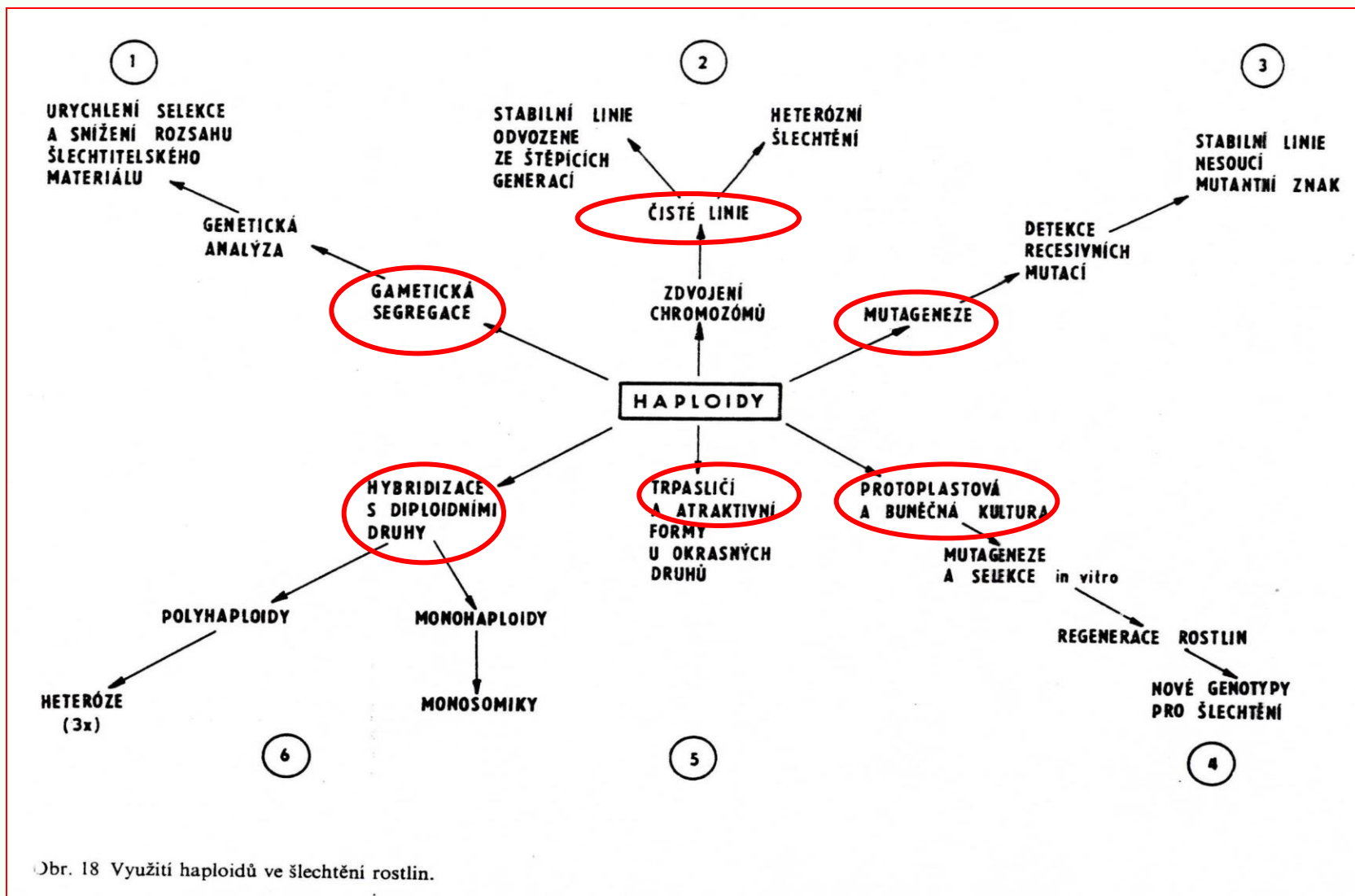
$10^4 - 10^5$ mikrospór/ml média

Gynogeneze - kultury izolovaných vajíček květenství *in vitro* (moruše)

Samičí
květenství

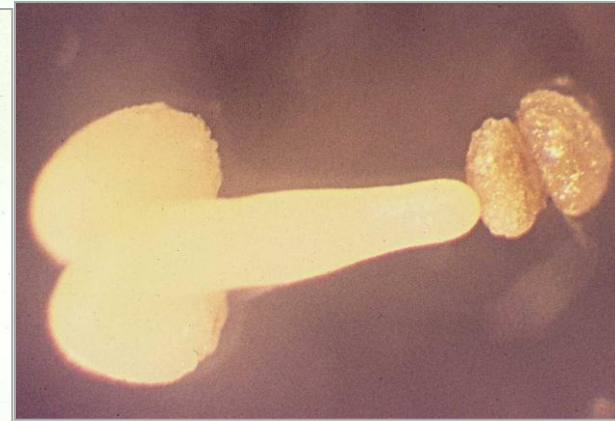
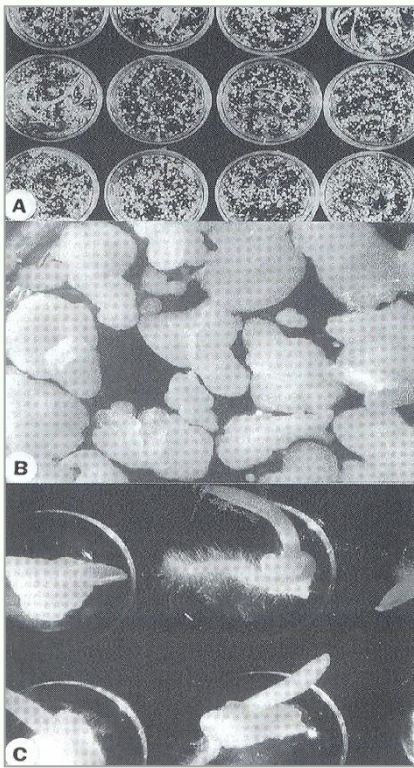


Využití haploidů v praxi



Gynogeneze – *Beta vulgaris*, *Gerbera jamesonii*, *Allium cepa*

Androgeneze



Androgeneze

***Beta vulgaris* - homozygotní linie**

***Brassica napus* - nová odrůda, linie**

***Lycopersicon* - nová odrůda**

***Nicotiana* - nové odrůdy**

***Oryza* - nové odrůdy**

***Pelargonium* - trpasličí variety**

***Triticum* – cv. Florin, Huapei**

Výzkumný ústav rostlinné výroby Praha
Výzkumný ústav obilnářský Kroměříž
Výzkumný ústav olejnin Oseva

Protoplastové kultury

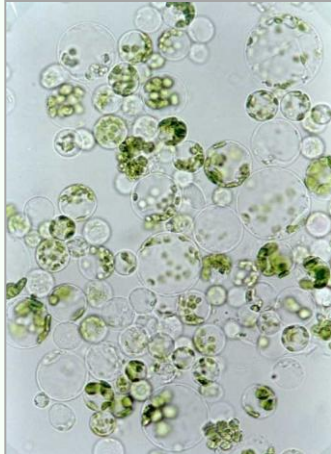
= kultivace rostlinných buněk zbavených buněčné stěny

Protoplast = rostlinná buňka bez buněčné stěny, její povrch tvoří cytoplazmatická membrána, má kulovitý tvar



Stupně somatické hybridizace:

- Izolace protoplastů
- Fúze protoplastů (typ)
- Selekcce a regenerace rostlin
- Analýza regenerovaných rostlin



Protoplastové kultury - izolace

1. **mechanická**
2. **chemická – enzymy (celulasa, hemicelulasa, pektinasa,...)**

jednostupňová x dvoustupňová

spontánní x indukovaná

Faktory ovlivňující izolaci protoplastů:

- **rostlinný materiál – genotyp**
- **zdroj pletiva**
- **fyziologický stav donorové rostliny**
- **složení enzymatické směsi a doba působení**
- **osmotické podmínky (470 – 700 mOsm)**
- **kroky v průběhu izolace protoplastů (postup)**

Protoplastové kultury - kultivace, regenerace

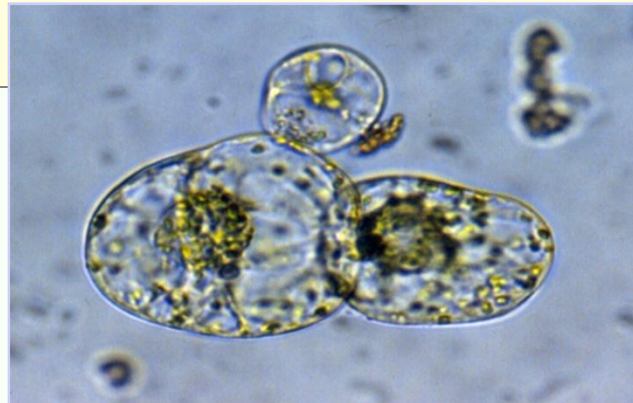
Médium (kapková kultura, tekutá média, mikrokomůrky,..)

Požadavky na výživu

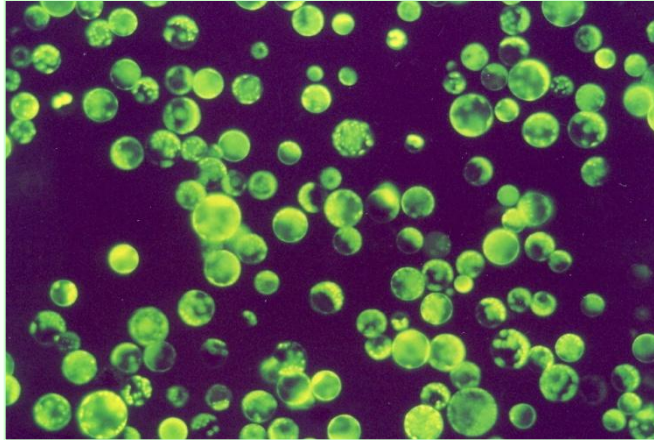
Vnější podmínky kultivace

Regenerace:

- 1. Stupeň - iniciační = syntéza buněčné stěny, iniciace buněčného dělení,
vznik kolonií, mikrokalusů**
- 2. Stupeň - diferenciační = indukce výhonů na kalusech**
- 3. Stupeň - koření = indukce tvorby kořenů na výhonech oddělených
z kalusů**



Protoplastové kultury - regenerace



Faktory ovlivňující kultivaci a regeneraci

Hustota (počet protoplastů v 1 ml)

Životnost (%)

Podmínky kultivace a médium

Využití

- Studium syntézy buněčné stěny
- Studium transportu látek přes cytoplasmatickou membránu
- Somatická hybridizace (fúze protoplastů)
- Inkorporace exogenního genetického materiálu – organel, cybridizace
- Genové transformace (cizorodá DNA z bakteriálního plasmidu)

Přirozená mezidruhová hybridizace stála za vznikem některých kulturních plodin:

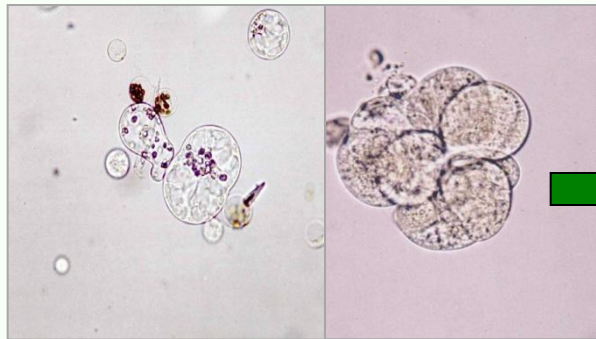
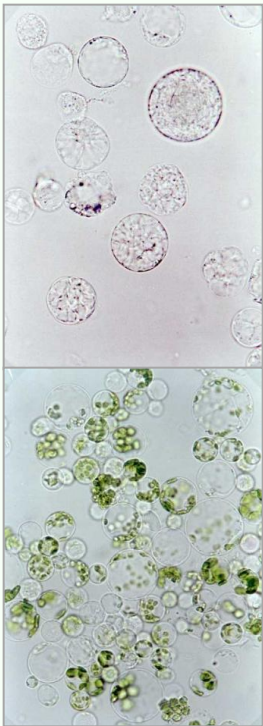
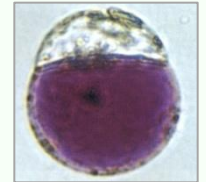
B. oleracea + *B. campestris* = *Brassica napus*

Nicotiana sylvestris + *N. tomentosa* = *Nicotiana tabacum*

Protoplastové kultury - chemická fúze

indukovaná

PEG, NaNO_3 , Ca_2NO_3
polyvinylalkohol, dextran



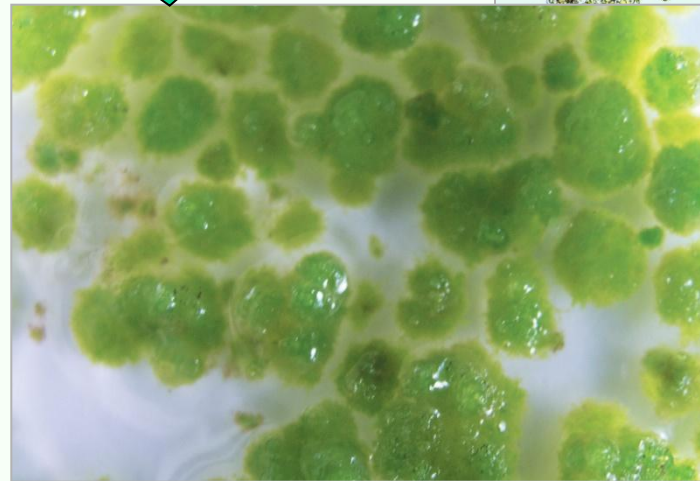
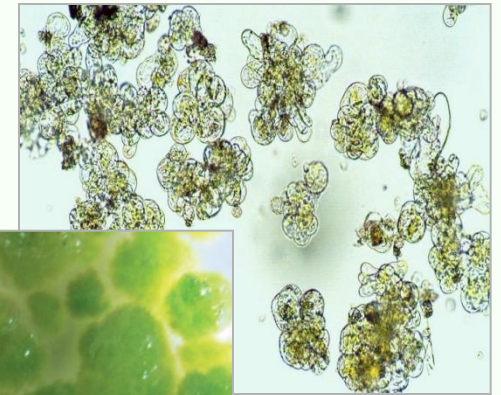
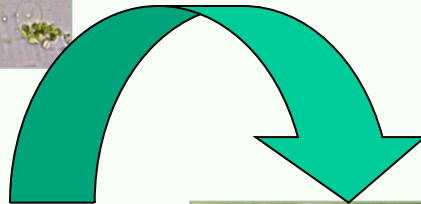
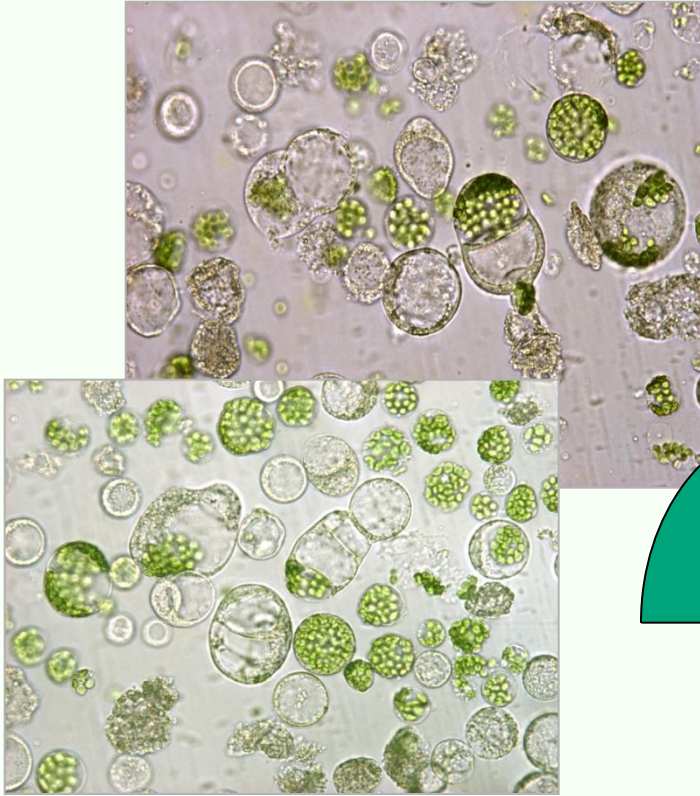
Stupně somatické hybridizace

- izolace protoplastů
- fúze protoplastů (typ)
- selekce a regenerace rostlin
- analýza regenerovaných rostlin

Charakterizace hybridů
morfologicky
cytologicky
molekulární analýzy

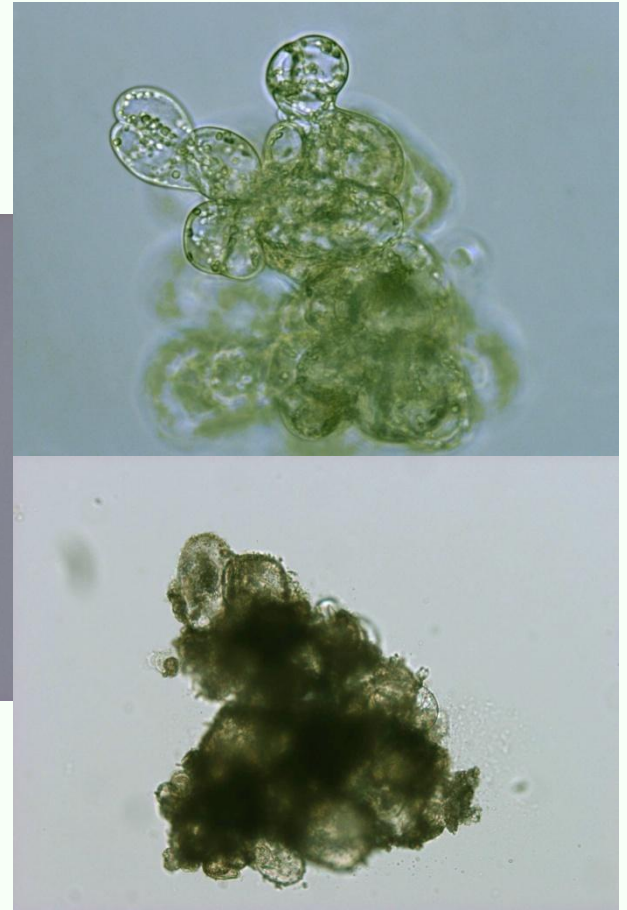
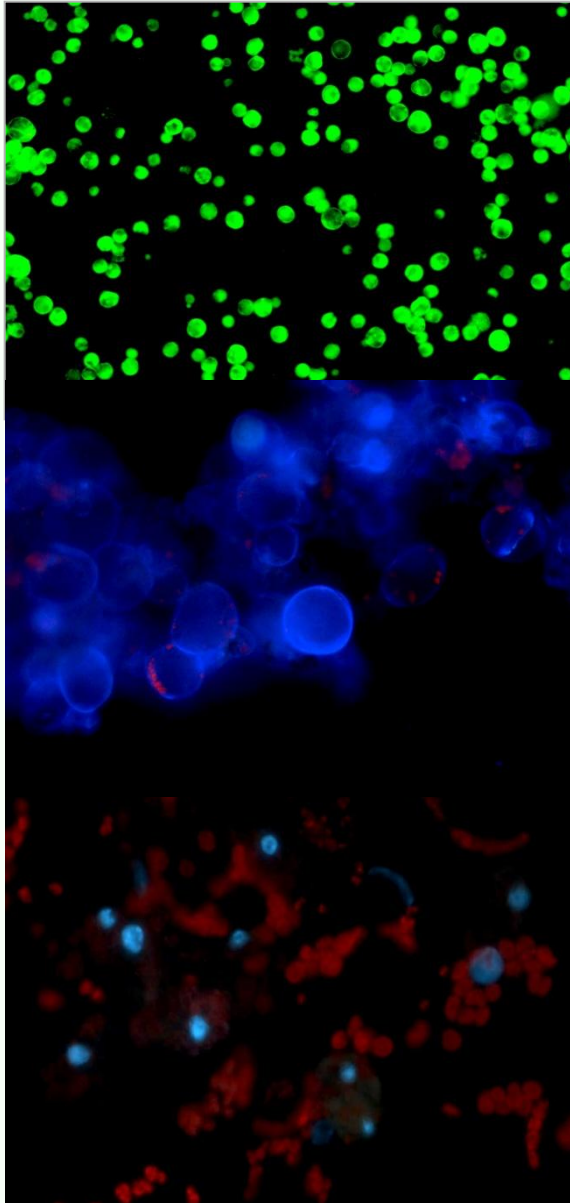
Protoplastové kultury – chemické fúze

10-20 min



10^6 protoplastů/ml

Protoplastové kultury

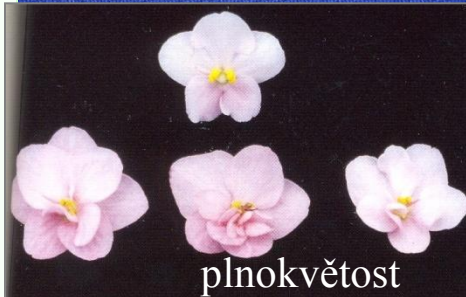
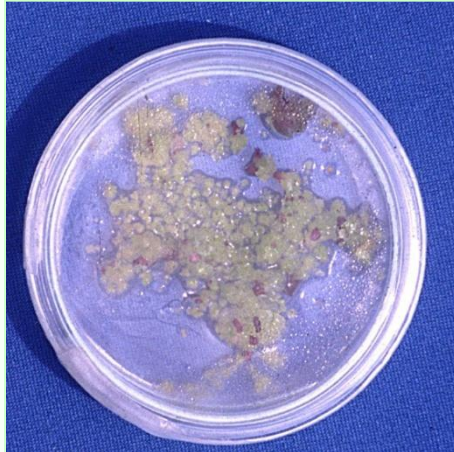
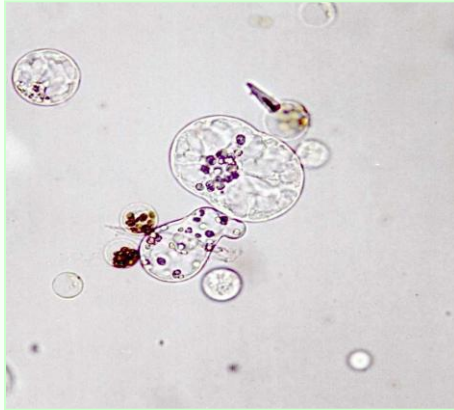


Protoplastové kultury- fúze protoplastů

Přenos jaderné a cytoplazmatické genetické informace mezi rostlinnými druhy, rody

Využití

- překonání sexuální inkompatibility
- přenos genů rezistence vůči virovým, houbovým chorobám
- přenos cytoplazmatické samčí sterility
- přenos rezistence vůči stresům (teplotním, zasolení,..)
- přenos rezistence vůči hmyzím škůdcům
(syntéza fytoalexinů)
- přenos genů pro syntézu zásobních proteinů, vitamínů, alkaloidů

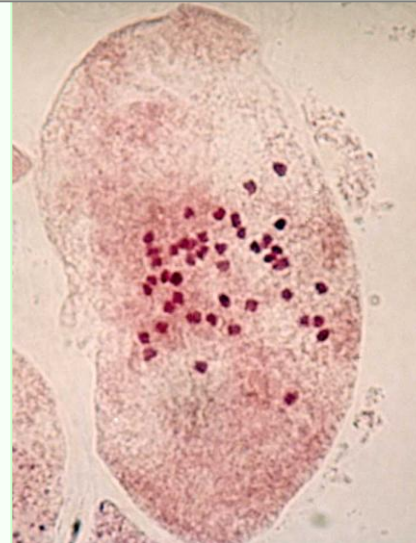
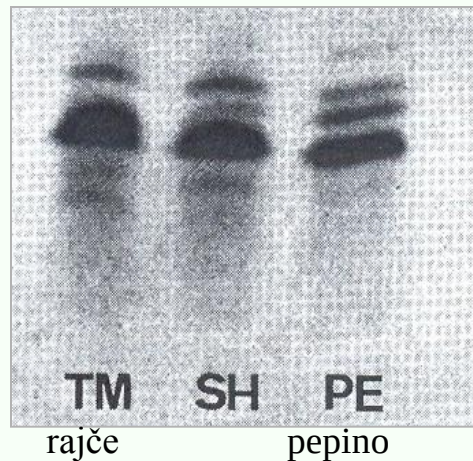


Protoplastové kultury- fúze protoplastů

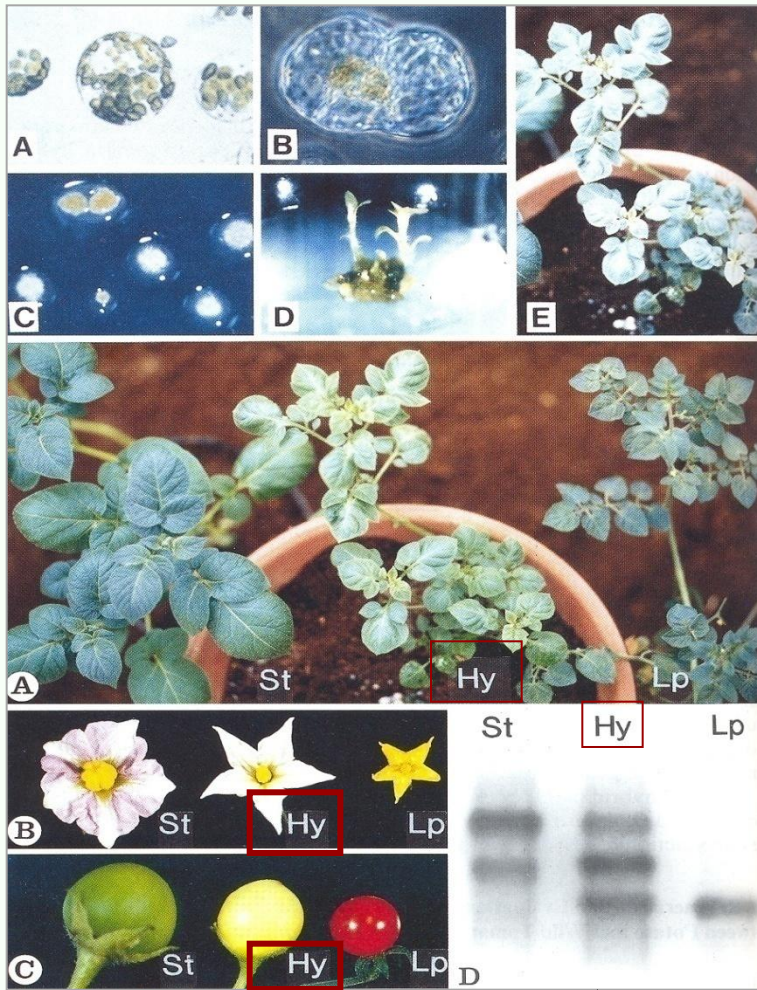
Identifikace somatických hybridů

- morfologicky (habitus, životnost pylu)
- karyologicky
- použití sond s DNA sekvencí (DNA-DNA hybridizace, RFLP analýzy)
- biochemicky (izoenzymy, dílčí proteiny, sekundární metabolity)
- plastidová, mitochondriální DNA

fosfoglukomutasa



Protoplastové kultury- fúze protoplastů

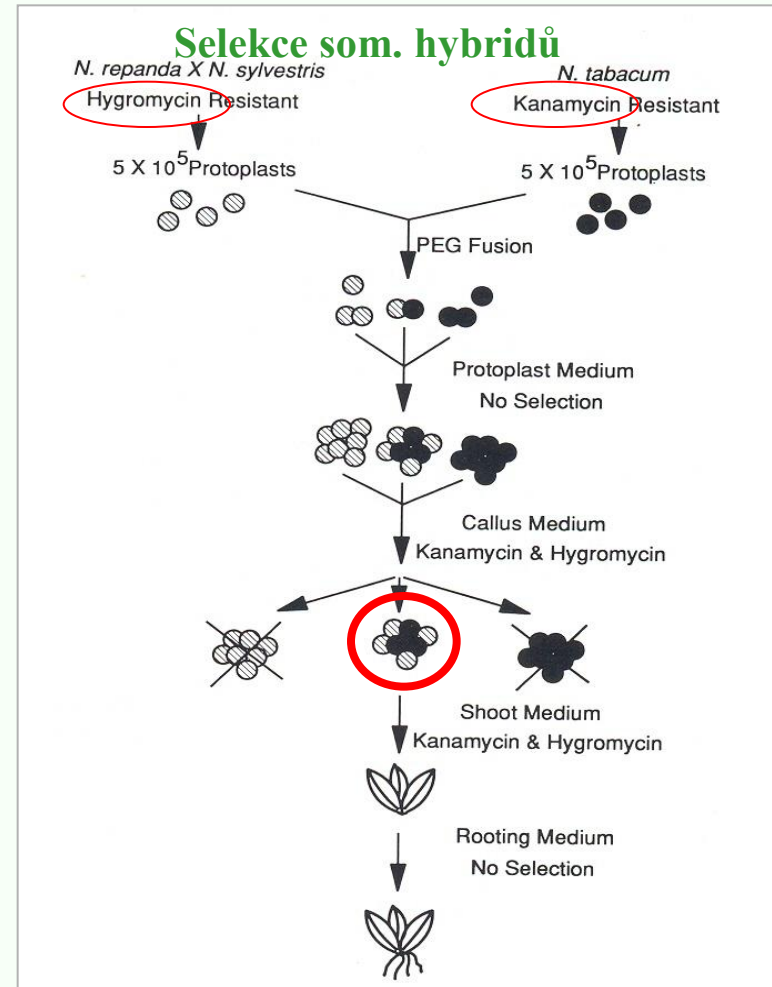


Solanum tuberosum

Lycopersicon pimpinellifolium

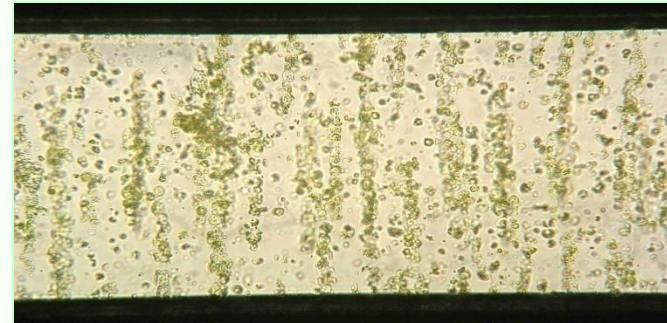
rezistentní planý druh

malatdehydrogenasa

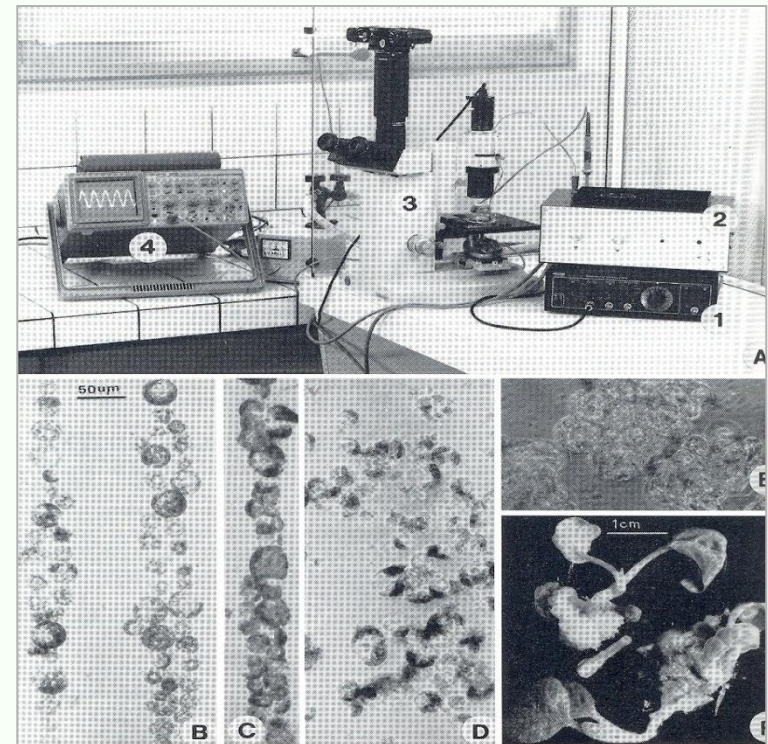
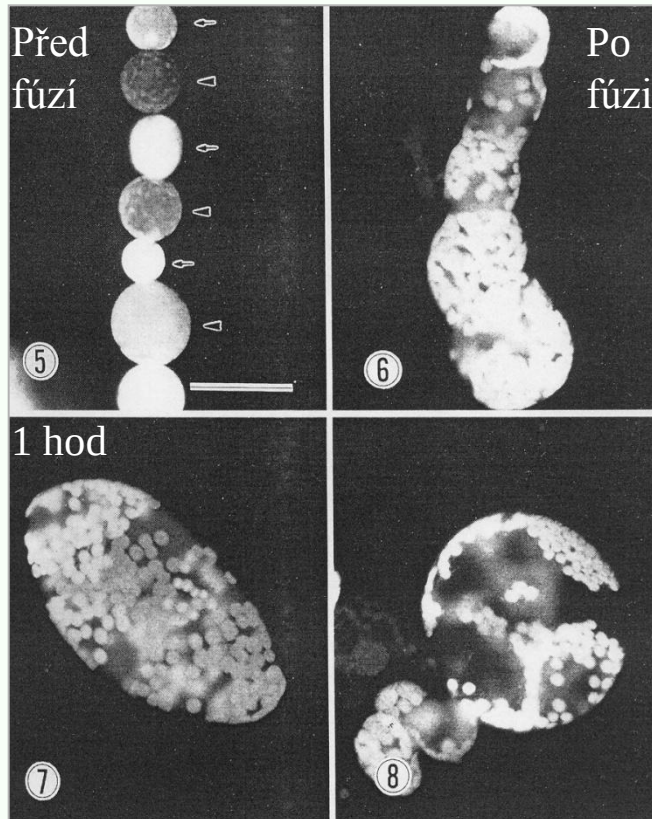


Protoplastové kultury- fúze protoplastů

Fúze indukovaná - **elektrofúze**



salát

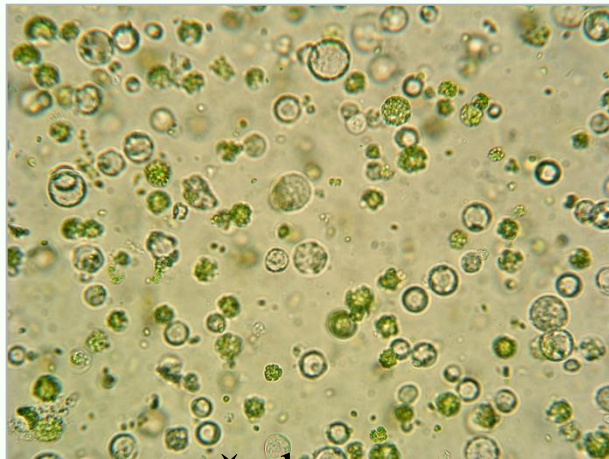
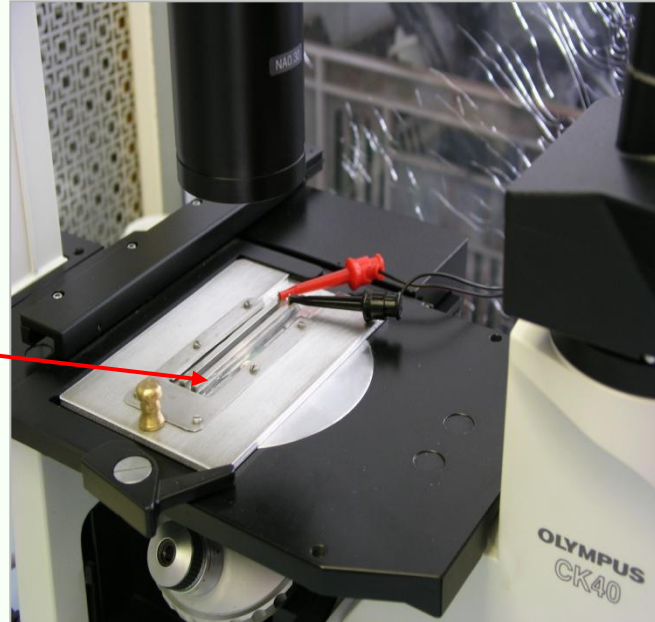


AC řetízování protoplastů - střídavý

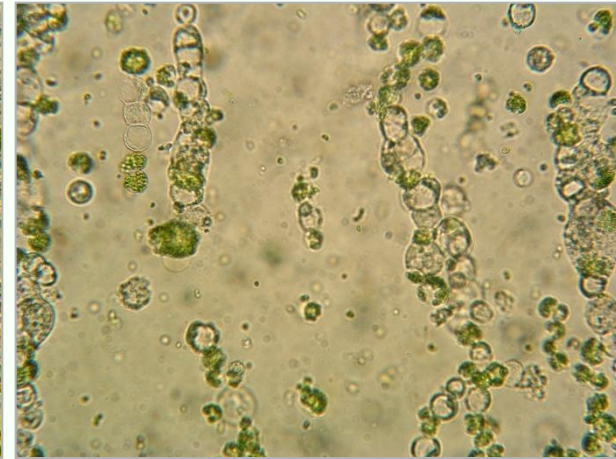
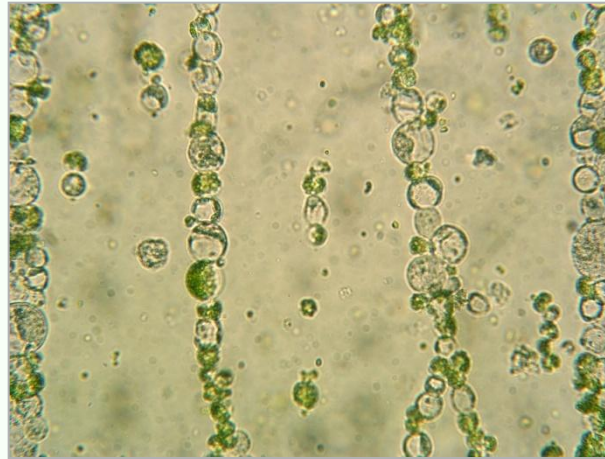
DC pro fúzi - stejnosměrný

V přírodě blesky → do půdy modifikace bakterií???

Protoplastové kultury - elektrofúze

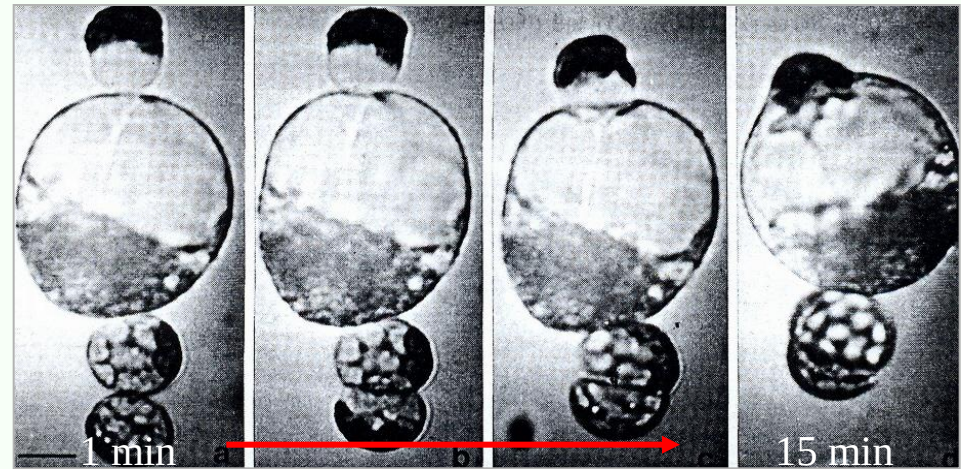
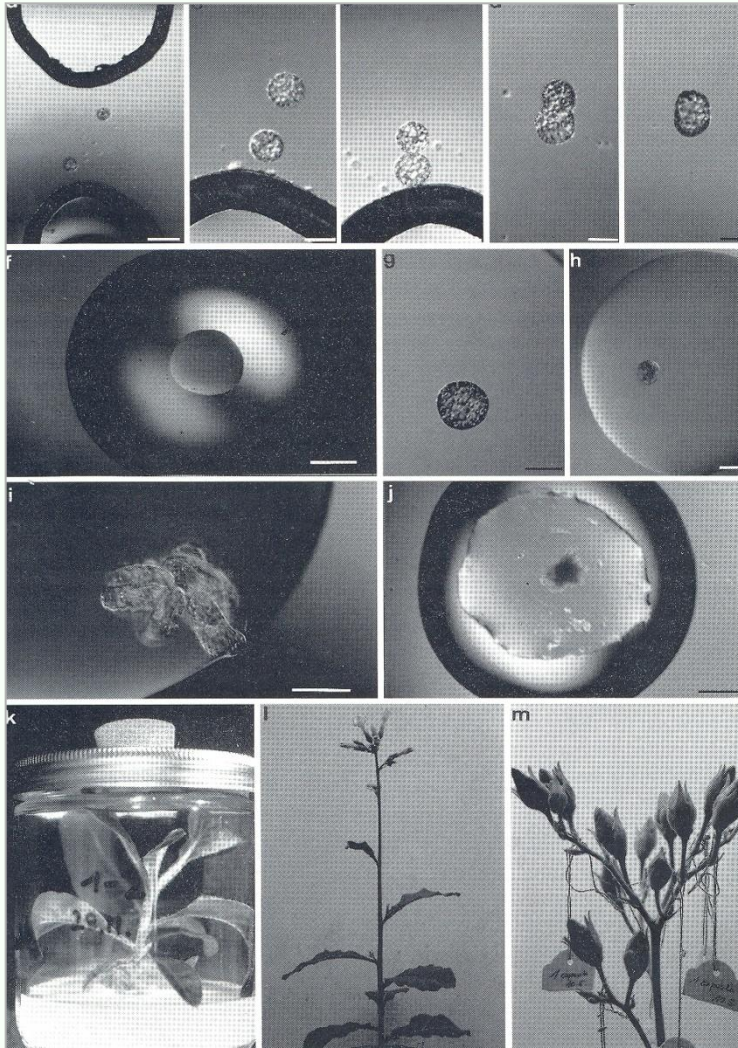


před



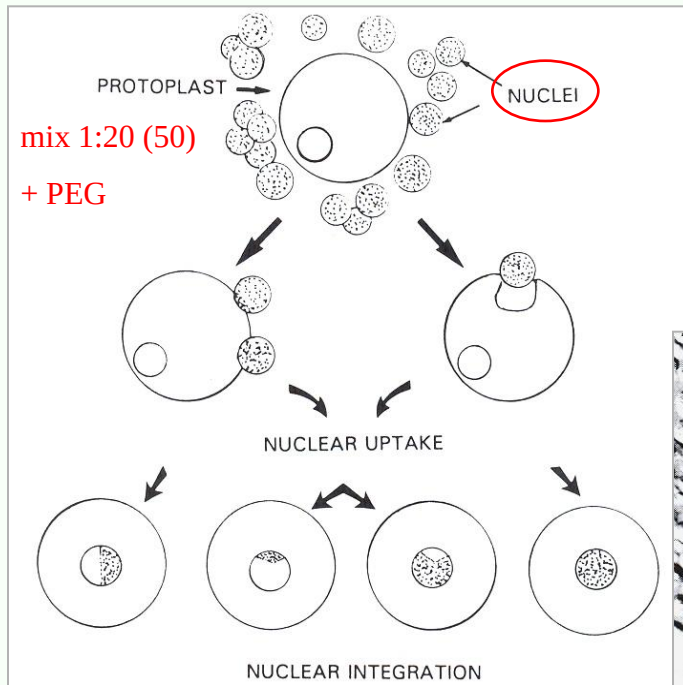
po

Protoplastové kultury- **mikrofúze** protoplastů

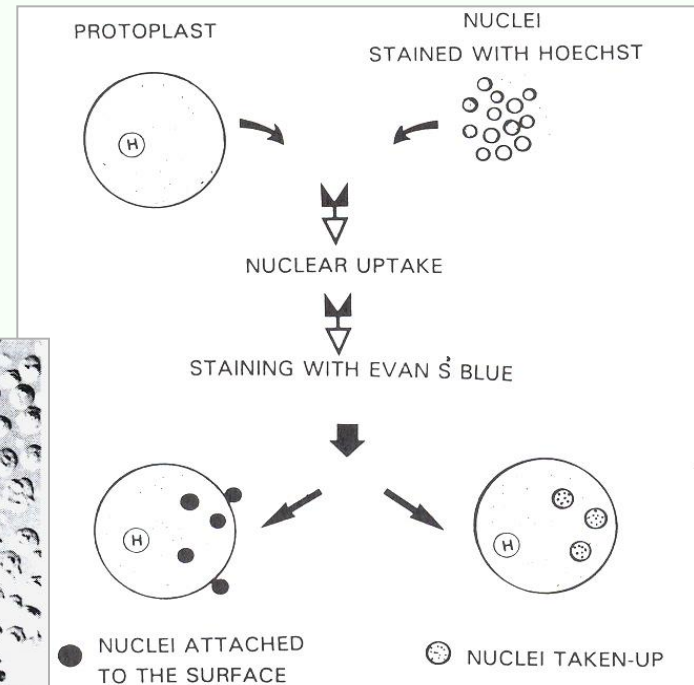
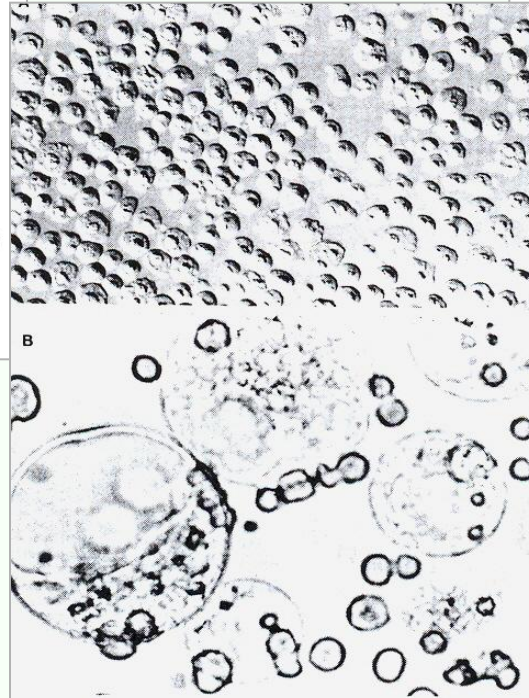


kultivace v mikrokapkách

Protoplastové kultury



mikroprotoplasty



suspenze protoplastů $10^6/\text{ml}$
pro izolace jader $10^8/\text{ml}$

mikroprotoplast - chromozóm

Protoplastové kultury- fúze protoplastů

Fúze protoplastů rodu *Brassica* s planými druhy

Armoracia rusticana
Barbarea vulgaris
Camelina sativa
Capsella bursa pastoris
Diplotaxis catholica
Diplotaxis muralis
Diplotaxis harra
Eruca sativa
Lesquerella fendleri
Mathiola incana
Moricandia arvensis **C4**
Moricandia nitens **C4**
Raphanus sativus
Sinapis alba
Sinapis arvensis
Thlaspi perfoliatum
Thlaspi caerulescens



využití pro
fytoremediace

Brassica juncea
akumulace Pb

Thlaspi caerulescens
akumulace Zn a Ni

hybrid se zvýšenou rezistencí k Pb, Zn a Ni

rychlý nárůst
biomasy

Brassica napus

Thlaspi caerulescens

hybridi rostly na vysokém obsahu Zn

Cybridizace - asymetrické hybridy

cytoplasmické hybridy

1. Inaktivace nebo odstranění jádra jednoho rodiče (UV, X-ozáření)
2. Fuzí protoplastu a subprotoplastu nebo mikroprotoplastu
3. Eliminace chromosomů jednoho rodiče během proliferace

brambor, brusnice, rajče, mrkev, tabák, citrusy, rýže

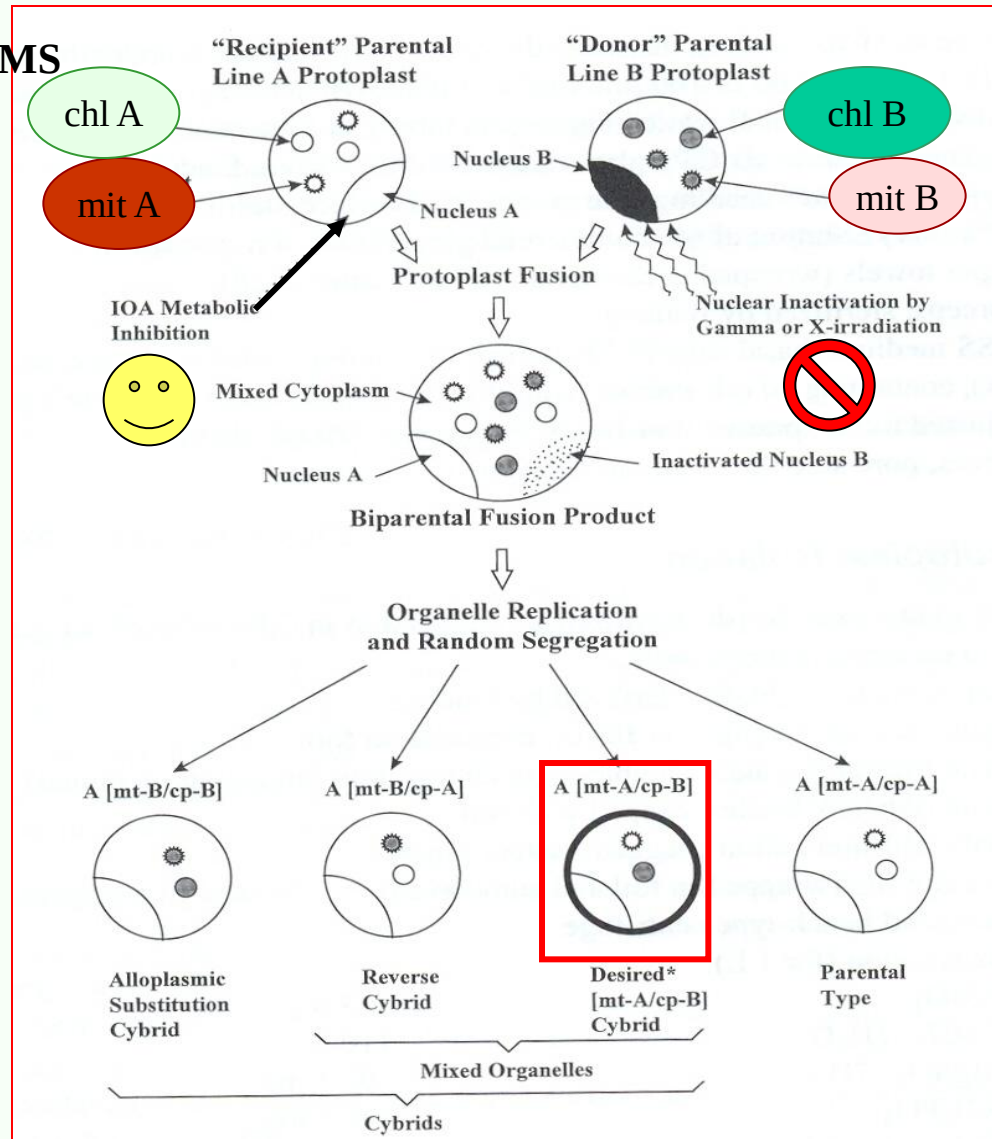
CMS, tolerance k herbicidům

cybridy nelze získat klasickou hybridizací (křížením) –
samčí pohlavní buňky (pyl. zrna) nemají plastidy a mitochondrie

Cybridizace - asymetrické hybridy

hypok. protoplasty s CMS
na mitochondriích

Brassica napus
řepka



mesofyl. protoplasty
CTT na chloroplastech

CTT = cytoplasmic
triazine tolerance

CMS = cytoplasmic
male sterility

u 150 druhů
k produkci heterózního osiva, odpadá kastrace poupat

GMO - transgenní rostliny

Transgenoze – vnášení známých jednotlivých genů do dědičného základu (poprvé 1978)

Pro přenos - *Agrobacterium tumefaciens*, *A. rhizogenes*, *E. coli*

Metody transformace podle přenosu DNA do buněk

Přímé: mikroinjekce DNA

bombardování mikroprojektily

elektroporace protoplastů

Nepřímé: *Agrobacterium* sp.

Diagram illustrating the indirect transformation of *Agrobacterium* sp. into various plant tissues. A single line from the text "Nepřímé: *Agrobacterium* sp." branches into five arrows pointing to the following tissues: emena, embrya, listové disky, kořeny, and protoplasty.

emena, embrya, listové disky, kořeny, protoplasty

GMO - transgenní rostliny

- 1994 povolená zelenina - rajčata
- 1996 komerční osivo GM kukuřice
- 2000 vakcína v GM plodech banánů
- 2001 zlatá rýže (schopnost akumulovat karoten a železo)
- 2007 na 42 mil. ha světa (22 zemí, pěstována Bt kukuřice a Bt bavlník)
- 2010 1. transgenní hrách v Evropě (ČR, Agritec Šumperk)

Okrasné rostliny

- oddálení stárnutí květů
- změny barvy květů
- změny vůně
- modifikace rezistence

růže, karafiáty

Lesní dřeviny

- modifikace obsahu celulosy, snížení obsahu ligninu
- rezistence vůči patogenním houbám

topol
borovice → (Čína)

GMO - transgenní rostliny

- **rajče** - zvýšená trvanlivost plodů (1994)
- **kukuřice** - odolnost k zavíječi kukuřičnému (endotoxin), tolerance k herbicidu
- **sója** - tolerance k herbicidu ROUNDAP, zvýšený obsah k. olejové
- **řepka olejná** - tolerance k herbicidu ROUNDAP, zvýšený obsah k. laurové
- **brambor** - tolerance k hmyzím škůdcům (mandelinka bramborová), k PVY
- **cukrovka** - tolerance k herbicidu ROUNDAP
- **bavlník** - k hmyzím škůdcům, geny toxinu z *B. thuringiensis*
- **pšenice** - tolerance k herbicidu, rezistence k abiotickým stresům
- **rýže** - s dlouhým zrnem, tolerance k soli, tolerance k herbicidům
- **len** - odolnost k herbicidu
- **tykev** - odolnost k virům CMV, ZYMV

Vkládají se i signální nebo selekční geny (jsou nežádoucí v odrůdě)

GMO - transgenní rostliny

Cartagenský protokol o biologické bezpečnosti 29. 1. 2000 Montreal
(OSN – program pro životní prostředí UNEP) platnost 11. 9. 2003

ČR podepsala 24. 5. 2000 (gmo.vscht.cz) nyní více než 100 států

- opatření ve státech, které se připojí k projektu (dovoz, vývoz, transport)
- vzdělání odborníků a informování veřejnosti
- vytvoření nové legislativy GMO (www.env.cz)
- spolupráce při výměně zkušeností

Pro vegetační části
nebo plody

Experimenty probíhají

- *in vitro* kulturách v uzavřeném laboratorním systému
- experimenty s transgenními rostlinami v uzavřeném skleníku
- označené pozemky

MZe – kontrola potravin

USA, Kanada, Brazílie, Argentina, Brazílie, Čína
Německo, Španělsko, Rumunsko, Bulharsko

ČR 2007:

71 organizací uzavřené nakládání s GMO

11 organizací uvedení do životního prostředí

Svět-více než 90 mil. ha, více než 20 zemí

Perspektivy GMO rostlin

Přínos → snížení chemické zátěže v prostředí, pokles insekticidů, herbicidů

Uvolnění do oběhu

- testy zdravotní nezávadnosti
- zápis do seznamu odrůd
- označení potravin (sledovatelnost), souhlas dovážející strany

Co není dovoleno je zakázáno

GMM (bakterie, kvasinky, vláknité houby) → výroba antibiotik, hormonů, enzymů

GMŽ (mají nižší schopnost ve volné přírodě přežít)

drápatka (není schopna přežít)

myš (produkce farmaceutických proteinů, studium vývoje chorob a léků)

ryby (růstový hormon v játrech, 3 - 4x zvýšený růst: kapr - Čína, losos - USA)

riziko vysoká plodnost, životaschopnost

makak ANDI – studium dědičných defektů u člověka (genové vylepšení např. pro hemofylii)

Perspektivy GMO rostlin

Geneticky modifikované organismy (GMO)

- zlepšení genetické výbavy kulturních rostlin
 - zlatá rýže - pro syntézu β -karotenu, zvýšení iontů Fe - vnesení genů pro ferritin ze sóji do rýže
- jedlé vakcíny
 - produkce antigenů, které jsou v těle schopné vytvářet protilátky vůči nakažlivým chorobám (transgenní banány, rýže, pšenice, rajče, brambor ...)
- odolnost kulturních rostlin vůči abiotickým stresům, škodlivým organismům, př. virům, houbovým patog., hmyzím škůdcům
- látky s farmaceutickým účinkem
- produkce olejů (řepka olejná)
- rychle rostoucí stromy pro výrobu papíru
- biodegradovatelné plasty, náprava kontaminace
- boj s podvýživou
- plodiny bez alergenů

Perspektivy GMO rostlin

Při hodnocení GMO se zvažuje:

rizika z uvedení GMO do prostředí

- poškození životního prostředí
- snížení biologické diverzity
- poškození zdraví člověka a zvířat
- přenos pylu
- likvidace zbytků GMO

www.env.cz

užitečné vlastnosti GMO

- efektivita
- snížení ztrát
- produkce farmak (humanní inzulin pomocí *E. coli*)
- nutriční hodnoty

Fytopatologie *in vitro*

Ozdravování rostlin

Klonové množení rezistentních taxonů

in vitro selekce = kultivace buněk se selekčním činitelem (fitrát, inoculum, toxin)

– přežívající buňky jsou regenerovány do rostlin resistantního fenotypu

Studium interakce **rostlina** X **patogen** v kontrolovaných podmínkách

Druh	Patogen	Typ biologického testu	Cíl
<i>Coffea arabica</i>	<i>Colletotrichum kahawae</i>	růst houby na kalusech	výběr rez. genotypů
<i>Vitis vinifera</i>	<i>Elsinoe ampelina</i>	růst kalusu na médiu s pat.	testy rezistence
<i>Lycopersicon aes.</i>	<i>Alternaria alternata</i>	testy na izol.listech <i>in vitro</i>	hodnocení toxicity
<i>Pinus taeda</i>	<i>Cronartium quercuum</i>	embryokultury s houbami	výběr rezist. embryí
<i>Triticum aestivum</i>	<i>Microdochium nivale</i>	listy, semenáčky <i>in vitro</i>	výběr rezist. kultivarů

Fytopatologie *in vitro*



Embrya
a
in vitro selekce
rezistentních
rostlin
(embryí)
toxin nebo filtrát
v médiu

Testy - médium s filtrátem z houbového patogena



testy na listech

Fytopatologie *in vitro*

4: Selection of plant cells for desirable characteristics

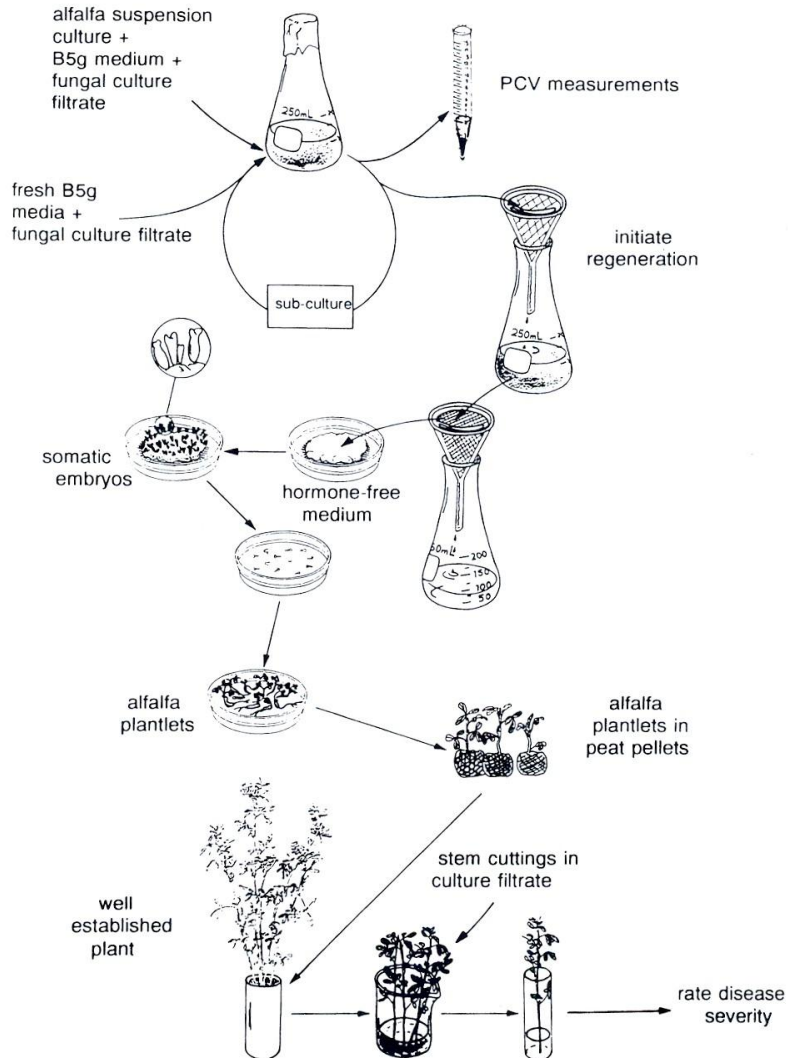
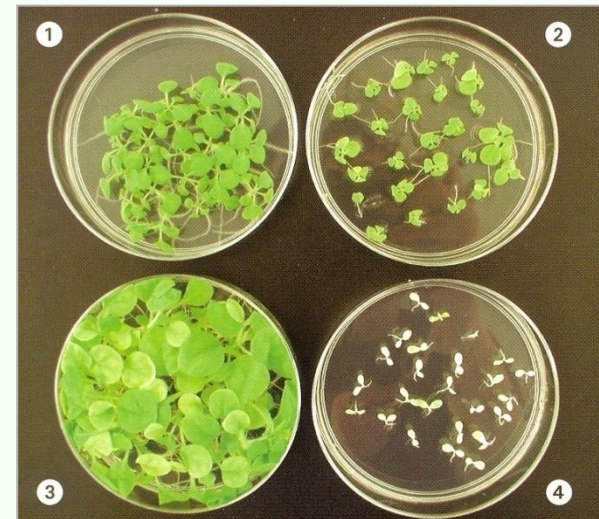


Figure 2. *In vitro* selection and regeneration of alfalfa plantlets resistant to *V. alboatruncum* fungal culture filtrate.

Verticillium

Klíčení semen s toxinem nebo filtrátem

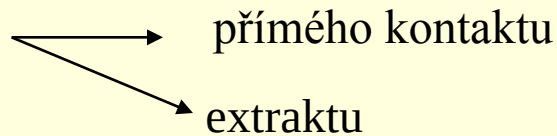
in vitro selekce k toxinům



Toxikologie *in vitro*

***In vitro* testy** pro hodnocení toxicity (pesticidů, herbicidů, odpadů,...)
bez pokusů na zvířatech v kontrolovaných podmínkách

Testy



Využití prokaryotické a eukaryotické rostlinné buňky

sinice

řasy, rostliny, kalusy, buněčné kultury

**toxikologické laboratorní zkoušky v modelových biologických systémech
alternativními metodami *in vitro***

Ovlivnění signálních drah apoptózy

Účinek látek na buňky v oxidačním stresu

Biologická aktivita látek

zatím na kultivovaných baktériích nebo savčích buňkách

In vitro selekce k abiotickým stresům

Teplota, voda, kyslík, nedostatek nebo nadbytek živin

stres → aklimatizace → rezistence

Využití pro testování- zjištění tolerance k soli (NaCl), těžkým kovům, toxinům, herbicidům

Plodina	Selekční faktor	Cíl
<i>Citrus sinensis</i>	NaCl	rezistentní rostliny
<i>Nicotiana tabacum</i>	NaCl	tolerantní rostliny
<i>Oryza sativa</i>	NaCl	rezistentní rostliny
<i>Solanum tuberosum</i>	NaCl	rezistentní kalusy

tolerance a rezistence k salinitě

Uchovávání genofondu *in vivo*

Genové banky

Špicberky

1. Uchovávání semen – semenné banky (od 1 roku -)
2. Uchovávání vegetativních orgánů – hlízy, cibule, řízky

1996 FAO (*Food Agricultural Organization*) - celosvětový plán pro záchranu a konzervaci genetických zdrojů pro potraviny a zemědělství

Genobanka (*Genetic resources centres*)

- shromažďuje, udržováním, studiem, dokumentací a využitím rostlinných genetických zdrojů
- soustřeďuje primitivní a poloplané formy kulturních rostlin, plané příbuzné kulturních rostlin, krajové, staré a současné odrůdy, mutace, zdroje cenných genů a cenný šlechtitelský materiál
- zachování mizející a ohrožený rostlinný genofond pro budoucí potřeby šlechtění
- zachování diverzity pro zemědělství a potraviny budoucích generací

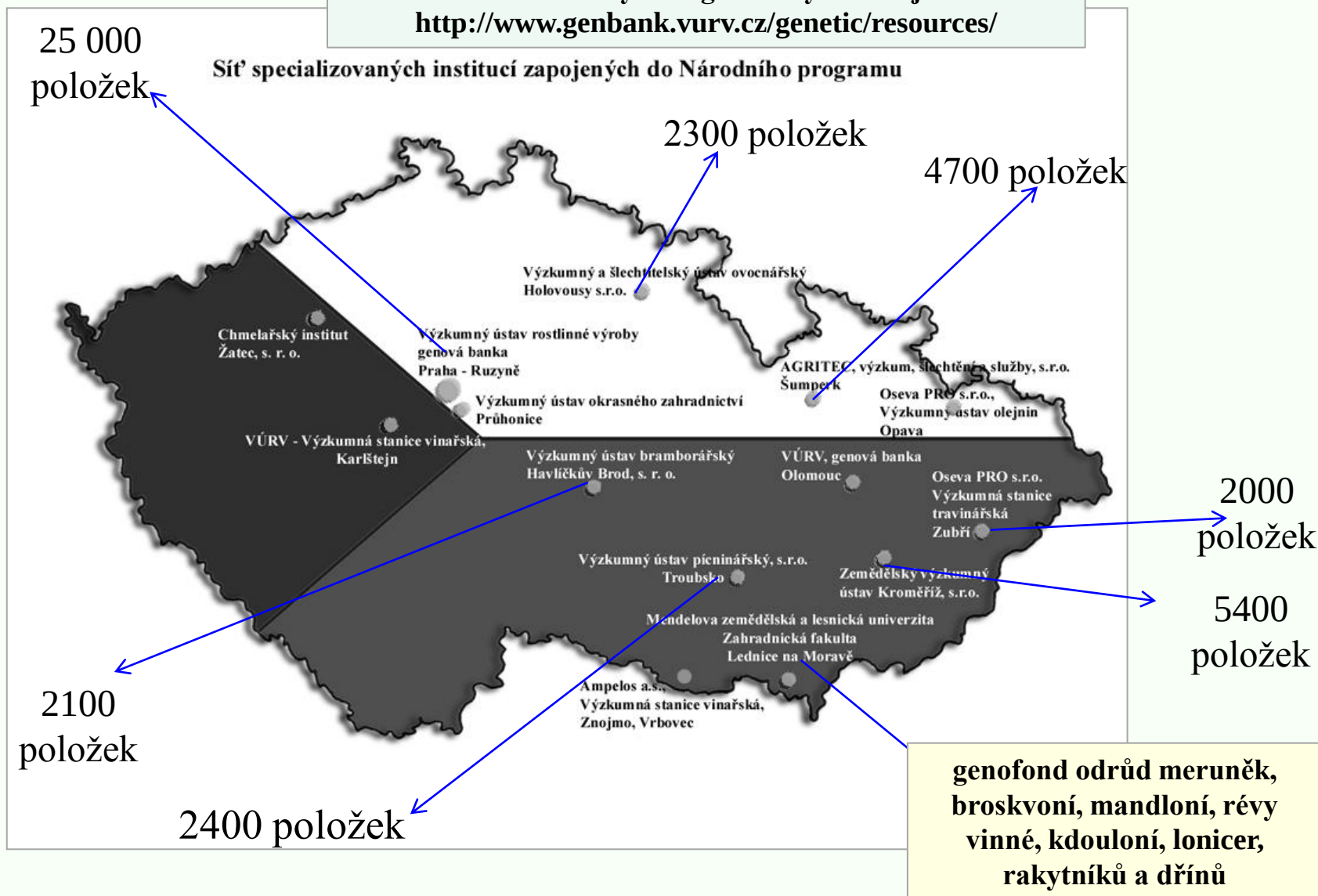
Databáze – přístupné z celého světa

Uchovávání genofondů ČR

Národní informační systém genetických zdrojů EVIGEZ

<http://www.genbank.vurv.cz/genetic/resources/>

Síť specializovaných institucí zapojených do Národního programu



Uchovávání genofondu *in vitro*

Krátkodobé

- aktivně rostoucí kultury (pravidelné pasáže)
- uchování kultur v minimálním růstu nižší teploty kultivace
- vizuální kontrola vzorků
- rychlé namnožení rostlin podle potřeby
- není reinfekce bezvirózního materiálu

nebezpečí v případě havárií -
ztráta kolekce

VÚB HB - 1548 položek v *in vitro* bance

Dlouhodobé

- za velmi nízkých teplot (-196°C) = **kryobanka**

Kryoprezervace

skladování pletiv při ultranízkých teplotách

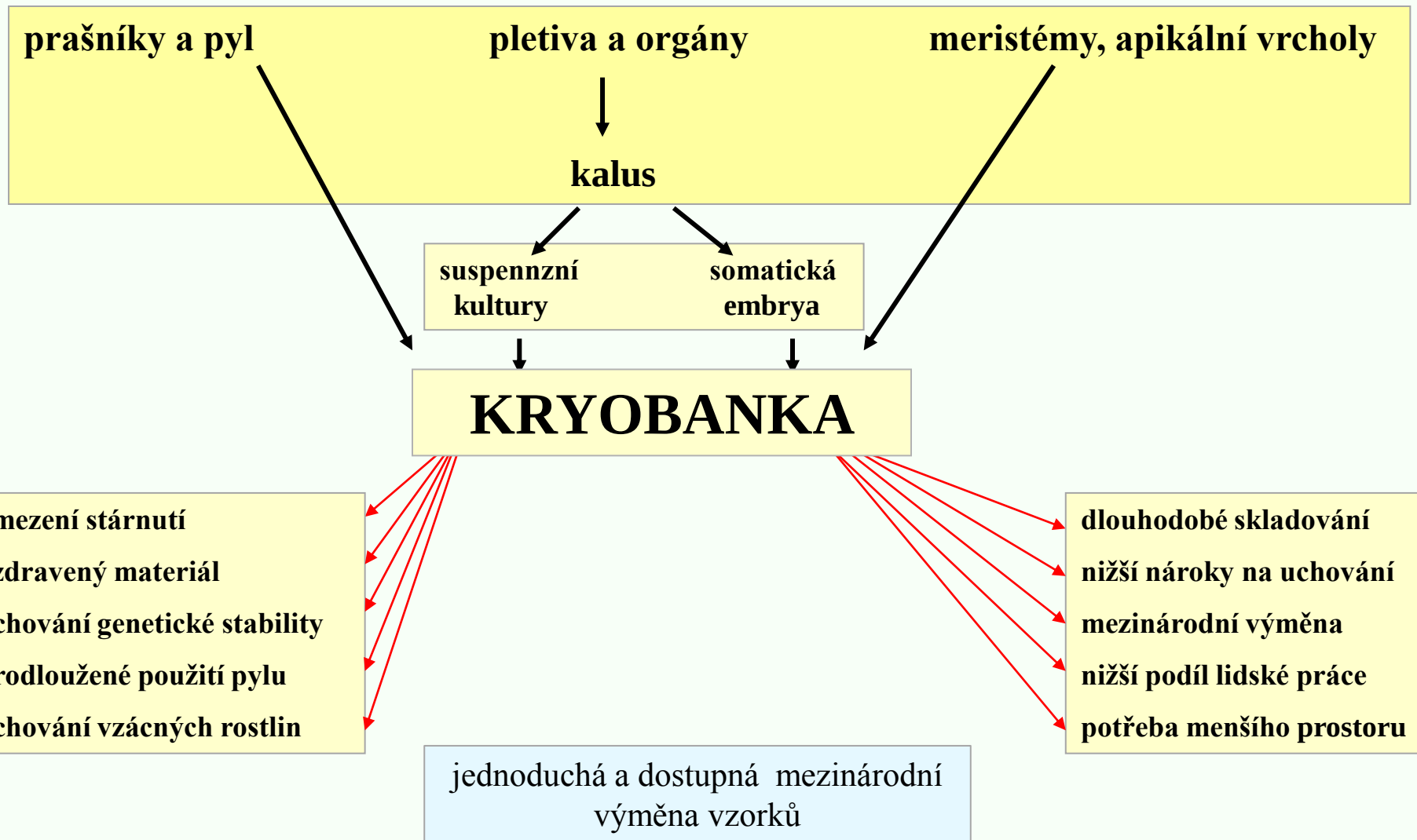
minimalizace růstu a vývoje *in vitro*

uchování životaschopnosti a genetické stability šlechtitelských materiálů zachování plného vývojového a funkčního potenciálu

postup

- obalení pletiva ochrannou vrstvou (enkapsulace), používá alginát sodný -
(izolované meristémy, kalusy, suspenzní kultury, veg. množené rostliny)
- odvodnění (dehydratace)

Uchovávání genofondu *in vitro*



Terminologický slovník

Adventivní embryo - embryo vyvinuté z nepohlavních buněk

Adventivní orgán - vytváří se na neobvyklém místě (z kalusu)

Alginát - výtažek z řas

Antiauxiny - látky protikladné auxinu (TIBA)

Apikální - vrcholový

**Apikální dominance - nadvláda vrcholu nad postranními větvemi
(u prýtu zeslabuje větvení auxin a zesiluje cytokinin, u kořenů opačně)**

Aplikace - použití

Apoptóza - programované odumírání buňky

Aseptický - stav bez přítomnosti mikroorganismů v kulturách *in vitro*

Auxin - rostlinný hormon tvořící se v dělivých pletivech ve vrcholech

Bazální - spodní

BA = BAP - cytokinin

Buněčná kultura - buňky nejsou organizovány do pletiv

Celistvost rostlin - sladění rostlinných částí v harmonický celek

Cybrid - hybrid, který vznikl fúzí cytoplastu s protoplastem

Cytokinin - rostlinný hormon tvořící se hlavně v kořenech

Dediferenciace - opak diferenciace pletiv, buněk

Diferenciace - fyziologické a morfologické změny vedoucí ke specializaci

Dormance - odpočinek

Embryo - základ rostliny uložený v semeni

Embryoid - útvar strukturně a funkčně podobný embryu, nevyvíjí se z oplozené vaječné buňky, ale z buňky somatické

Embryogeneze - tvorba embrya

Etiolizace - růst, vytahování ve tmě, prodloužení prýtů a zakrtnění listů

Etylén - rostlinný hormon

Explantace - izolace části rostlinného těla

Explantát - uměle odebraná, izolovaná část rostliny za účelem kultivace

Giberelin - rostlinný hormon tvořící se v kořenech, nejmladších listech, pupenech, klíčních semenech

Hormóny rostlinné - látky, kt. se v malých množstvích v urč. části rostliny tvoří a v jiné zprostředkovávají procesy....

Hybridní buňka - vznikla fúzí dvou odlišných protoplastů

Indukce - vyvolání

Inhibice - zadržení, zabránění

Inhibitor - růstový regulátor brzdící růst

***In vitro* - ve skle, kultivace rostlinných částí za sterilních podmínek**

***In vivo* - procesy probíhající v organismu v řízených podmínkách**

Kalus - masa parenchymatických buněk tvořící se na poraněném povrchu

Klonování - nepohlavní rozmnožování rostlin, odvozených z jednoho explantátu

Korelace růstové - vzájemné růstové vztahy mezi částmi rostlinného těla

Kryoprezervace - uchovávání rostl. materiálu při teplotách kapalného dusíku

**Kys. abscisová - (ABA) - přirozená hormonální látka inhibiční povahy,
v dospělých listech, vzniká z kys. mevalonové**

**Kys. gibberelová - (GA) - přirozená hormonální látka stimulační povahy, vzniká
z kys. mevalonové**

Laterální pupen - postranní, boční pupen

Macerace - separace jednotlivých buněk z pletiva, narušení střední lamely

Meristém - dělivé pletivo, primární, sekundární

Meristemoid - shluk mer. buněk uvnitř kalusu s možností diferenciací

Morfogeneze - vývoj a diferenciací pletiv a orgánů

Morforegulátory - látky regulující růstové procesy

Partenogeneze - vývin vaječné buňky v embryu bez oplození

Primární kultura - od izolace do prvního pasážování

Regenerace - obnova narušené celistvosti rostlin

Retardace - brzdění (zadržování růstu)

Retardant - látka brzdící růst (CCC, TIBA)

Rhizogeneze - zakořeňování

Senescence - stárnutí

Somaklonální variabilita - rostlin regenerovaných z buněk nebo z kalusů

Somatický hybrid - buňka nebo rostlina, která vznikla fúzí protoplastů

Somatická hybridizace - fúze protoplastů izolovaných ze somatických buněk

Somatická embryogeneze - vznik embrya z jiných buněk než zygot

Stimulace - povzbuzení

Stimulátor - růstový regulátor povzbuzující růst

Subkultura - převedení na svěží médium

Totipotence - schopnost rostlinné buňky diferenciací všech pletiv i organismu

Transgenóze - vnášení jednotlivých genů do genomu

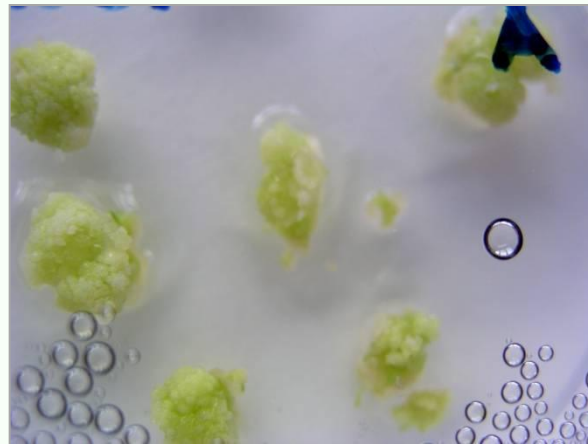
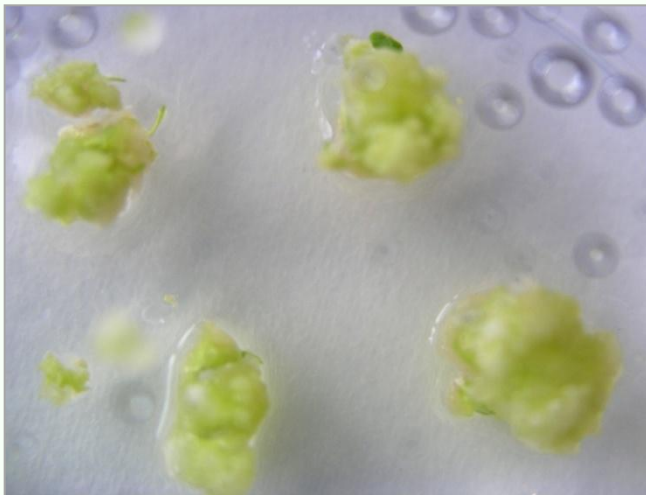
UKÁZKY ZE CVIČENÍ



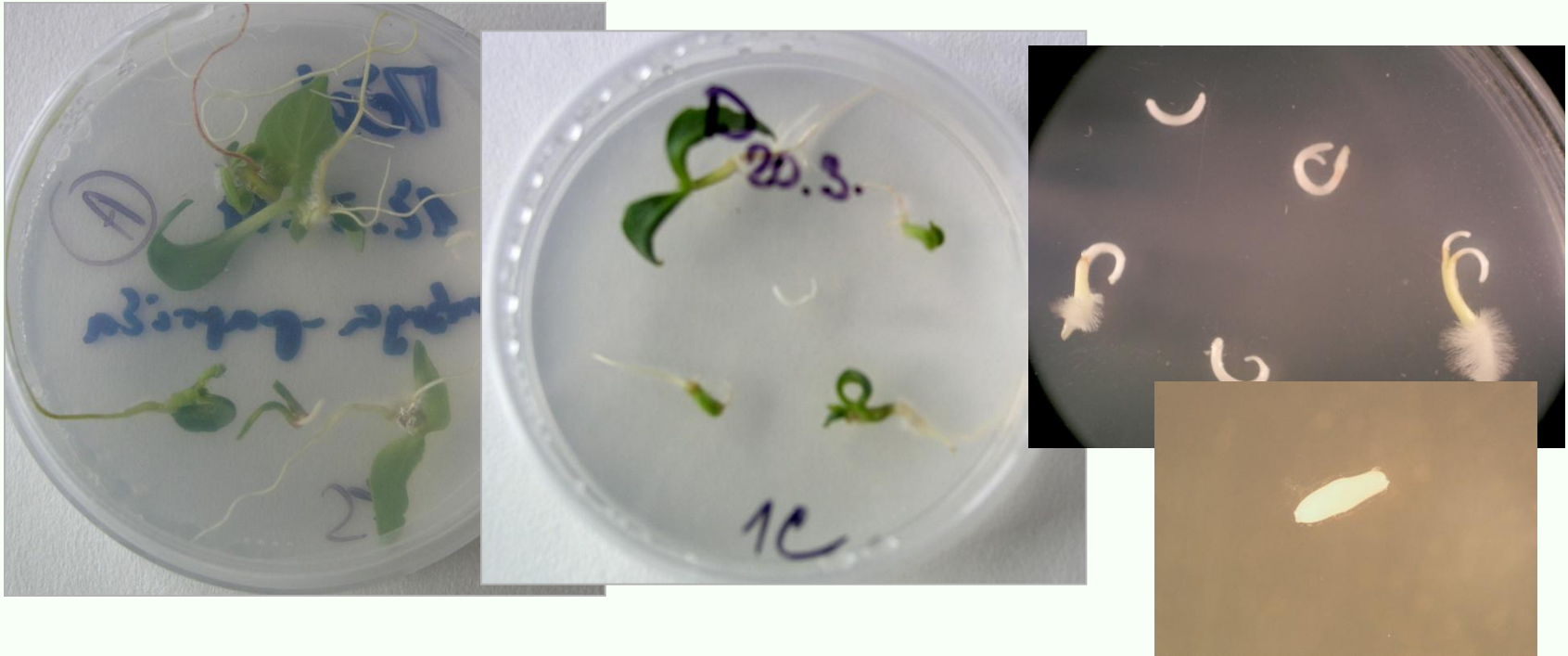
Převod rostlin do nesterilních podmínek



Meristémové kultury - mikropropagace



Embryokultury



Prašníkové kultury

