Od rostlinné kultury „ *in vitro*“ k biotechnologiím

Jaroslava Dubová
Alexandra Smíšková

Přírodovědecká fakulta Masarykovy univerzity
Ústav experimentální biologie
Oddělení fyziologie a anatomie rostlin

e-mail: dubova@sci.muni.cz, smiskova@sci.muni.cz
http://www.sci.muni.cz/kfar/

Členění prezentace

		snímky
I.	Základní termíny a historický přehled	3 – 21
II.	Základní metody rostlinných buněčných, pletivových a orgánových kultur	22 – 61
III.	Biotechnologické využití metod rostlinných explantátů	62 - 80
IV.	Doporučená literatura	81 - 84

I.
Základní termíny a historický přehled

Základní terminologie

- *ex plantare* = pěstovat mimo
- explantát = každý fragment živého pletiva, celý orgán nebo soubor orgánů, který je vytržen z korelačních vztahů celku a je pěstován v umělých podmínkách (Bauer 1939)
- *in vitro* = ve skle, to znamená v umělých podmínkách
- aseptická kultura = kultura bez infekce (bakterie, kvasinky, plísně)
- axenická kultura = kultura jednoho organismu
- tkáňová kultura = historický termín přenesený z oblasti fyziologie živočichů, není správný pro kultury rostlinných pletiv

Základní terminologie

- totipotence buňky = schopnost somatické buňky regenerovat za vhodných podmínek celou rostlinu
- meristém = dělivé pletivo
- regenerace *de novo* = regenerace rostlinných orgánů (prýtů, kořenů nebo květů) z buněk diferencovaných pletiv
- somatická embryogeneze = vývoj struktur podobných embryu ze somatických buněk bez předchozí fůze gamet
- androgeneze = vývoj haploidních rostlin z mikrospor nebo mladých pylových zrn
- somatická hybridizace = fůze izolovaných protoplastů
- enkapsulace = uzavření explantátu (kalus, somatické embryo, meristém, buněčná suspenze) do gelové kapsle

Rostlinné explantáty

- zpočátku obor rostlinné fyziologie odlišující se svou vlastní metodologií
- později četné aplikace v genetice a šlechtitelství
- v současnosti jsou teoretickou základnou rostlinných biotechnologií
- mají využití v molekulární biologii – jsou součástí metod množení rostlin, transformace, selekce…

Základní podmínky kultivace *in vitro*

- aseptická kultura - nutnost sterilizace živných médií, použitých nástrojů, pracovního prostoru a desinfekce rostlinného materiálu
- přiměřená výživa explantátu = vhodné složení živného média
- vhodné fyzikální podmínky
  - osvětlení (dostatečná intenzita a vhodné spektrální složení)
  - teplota (nutnost řízené klimatizace)
  - koncentrace plynů (správná ventilace kultivačních nádob)
  - vlhkost vzduchu

Složení živných médií

- **anorganické sloučeniny – dodávají ve formě solí:**

makroelementy: **N, P, K, Ca, Mg, S**

mikroelementy: **Fe, B, Cu, Mn, Ni, Co, I,**

- **organické sloučeniny**

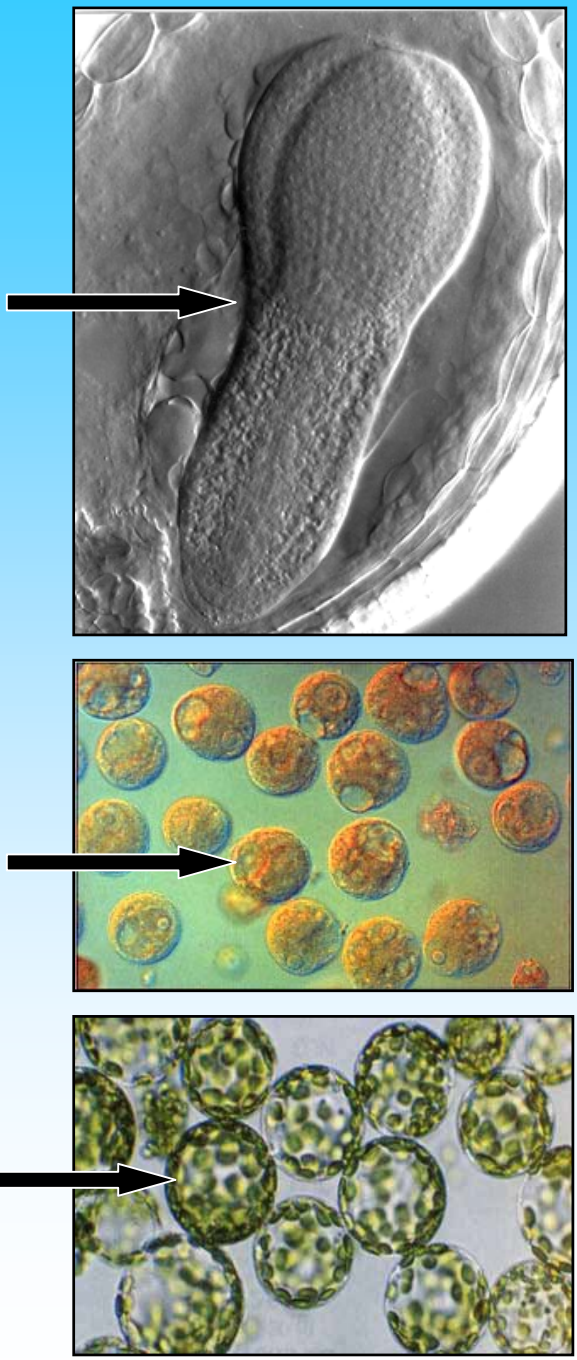
vitamíny: **B1, B6, kys. nikotinová, kys. listová, biotin**
aminokyseliny (zdroj organického dusíku): **směsi (hydrolyzáty proteinů)** nebo **čisté (glycin)**
inositol
polyaminy: **putrescin, spermin, spermidin...**
aktivní uhlí
přírodní látky: **kokosové mléko, rostl. šťávy…**

- **zdroj organického uhlíku** = mono- a disacharidy (sacharóza)
- **růstové regulátory** (auxiny, cytokininy, gibereliny, kys. abscisová)

média jsou buď tekutá nebo se ztužují přidáním agaru, gelritu nebo alginátu

Úrovně organizace explantátu

- rostlina (klíční rostlinka, embryo)
- orgán (kořen, list, řapík, pupen)
- pletivo (dřeňový parenchym, endosperm, kambium = pletivové kultury)
- buňka (mikrospory, pyl. zrna, buněčné suspenze)
- izolovaný protoplast



Historický vývoj *in vitro* kultur

1902 Haberlandt - první kultivace pletiva listového mezofylu, dřeň stonku, svěrací buňky průduchů v podmínkách *in vitro*. Neznalost výživy, nesterilní kultura a použití diferencovaných buňky v kultuře

1922 Knudson - výsevy semen orchidejí

1925 Laibach – izolovaná embrya lnu

1935 White - izolované kořeny rajčat

1937 Gautheret - kalusové kultury z kambia kořene mrkve.

1939 White, Nobécourt - kalusové kultury tabákového nádoru.

1951 Skoog a Tsui - indukce pupenů adenin sulfátem na tabákových segmentech

1957 Skoog a Miller - objev kinetinu.

1957 Stowe a Yamaki - objev giberelinů

Historie experimentů s izolovanými rostlinnými embryi

1754 Bonnet – sledování klíčení zárodků fazolu zbavených děloh

19. stol. Sachs - špatné klíčení embryí bez endospermu

van Tieghem - pěstování izolovaných embryí na rozetřeném endospermu jiného druhu – důkaz významu nutričních látek

1890 Brown a Morris - transplantace embryí ječmene do endospermu pšenice

1904 Hannig – pěstování nezralých i zralých embryí brukvovitých rostlin *Raphanus* a *Cochlearia*

1920 – 1930 Knudson kultivace rostlin ze zárodků *Orchidaceae* na agarovém médiu s cukrem bez přítomnosti symbiotických hub

1924 Dietrich - možnost zkrácení dormance kulturou izolovaných embryí

Historický vývoj meristémových kultur

Ball - regenerace rostliny z izolovaného meristému lupiny (*Lupinus*)

1949 Limmaset a Cornuet – průkaz rozdílné koncentrace virových částic v rostlinných orgánech různého ontogenetického stáří, meristémy téměř viruprosté

1952 Morrel a Martin - ozdravování virózních jiřin (*Dahlia*) regenerací rostlin z izolovaných meristémů

1957 Skoog a Miller - regenerace tabáku z kalusových kultur aplikací cytokininů a auxinů do živného média

1962 Murashige a Skoog - standardní kultivační médium

1964 Morel - regenerace ozdravených orchidejí z izolovaných meristémů



meristémové (meriklonové) množení

Historie suspenzních kultur a somatické embryogeneze

1958 – **Steward a Reinert** - tekuté médium, třepané kultury buněk mrkve a buněčných shluků - růst kalusů i struktur podobných embryím = somatická embrya

1979 **Fujimura a Komamine** - synchronizace somatické embryogeneze v suspenzní kultuře mrkve

2005 **Stasolla a kol.:** popis morfogeneze, fyziologie, biochemie a molekulární biologie somatických embryí jehličnanů

Po 100 letech tak byla experimentálně potvrzena platnost buněčné teorie Schleidena a Schwanna o totipotenci somatických buněk.

Historie rostlinných buněčných suspenzních kultur

1970 Gamborg a Shyluk - vliv auxinu 2,4 – D na růst a vývoj rostlinných buněk v kultuře. Kultivace rostlinných buněk ve fermentorech.

1978 Hahlbrock – průkaz sekundárních metabolitů v rostlinných buněčných kulturách

1992 Nagata - popsána synchronizovaná buněčná suspenze tabáku linie BY – 2.

Historie haploidních kultur

1964 Guha a Maheshwari - kultivace nezralých prašníků a regenerace homozygotních rostlin durmanu *Datura innoxia* Mill.

1967 Bourghin a Nitsch - kultivace haploidních buněk (mikrospor) a regenerace homozygotních rostlin tabáku *Nicotiana tabacum*

1996 Keller a Korzun - gynogeneze řepy *Beta vulgaris* L., *Allium cepa* L., *Gerbera jamesonii* H. Bolus ex Hook

2000 šlechtitelské programy polních plodin (obiloviny, řepka) využívají haploidní kultury *in vitro*

Historie protoplastových kultur

1960 Cocking - izolace protoplastů a vývoj nových šlechtitelských metod překonávajících inkompatibilitu při křížení (somatická hybridizace)

1970 Takebe a Nagata - regenerace rostlinek tabáku z izolovaných protoplastů

1972 první mezinárodní konference protoplastových technologií ve Francii.

1973 první konference rostlinné molekulární biologie o výzkumu rostlinných pletivových kultur za účasti komerční firmy Monsanto

1977 vznik Mezinárodní komise pro výzkum rostlinné buňky při Mezinárodní organizaci výzkumu buňky (**ICRO**) UNESCO

Historie transformace rostlinného genomu

1965 Morel - studium *Agrobacterium tumefaciens*

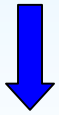
1970 - objev restrikčních endonukleáz.

1974 – Zaenen - důkaz integrace Ti plasmidu do rostlinného genomu

1983 Schell - první transgenní rostliny.

1984 - přímý přenos DNA do rostlinného protoplastu (mikroinjekce DNA do jádra)

1986 - přímý přenos DNA do rostlinných buněk



Geneticky modifikované organismy = GMO

Vznik organizací *in vitro* kultur

1970 založení **Mezinárodní asociace rostlinných pletivových kultur** (**IAPTC** - International Association of Plant Tissue Culture)

1. Kongres rostlinných pletivových kultur ve Štrasburku

1974 **Murashige, Thorpe, Gamborg** - založení Komise pro standardy kultivačních médií pro potřeby výzkumu, vývoje a komerční výrobce

1980 založen časopis **Plant Cell Reports**, Springer Verlag Publikace výsledků výzkumu kultivace rostlin *in vitro*.

České začátky rostlinných explantátů

Rudolf Řetovský, Eva Petrů – AV ČR Praha

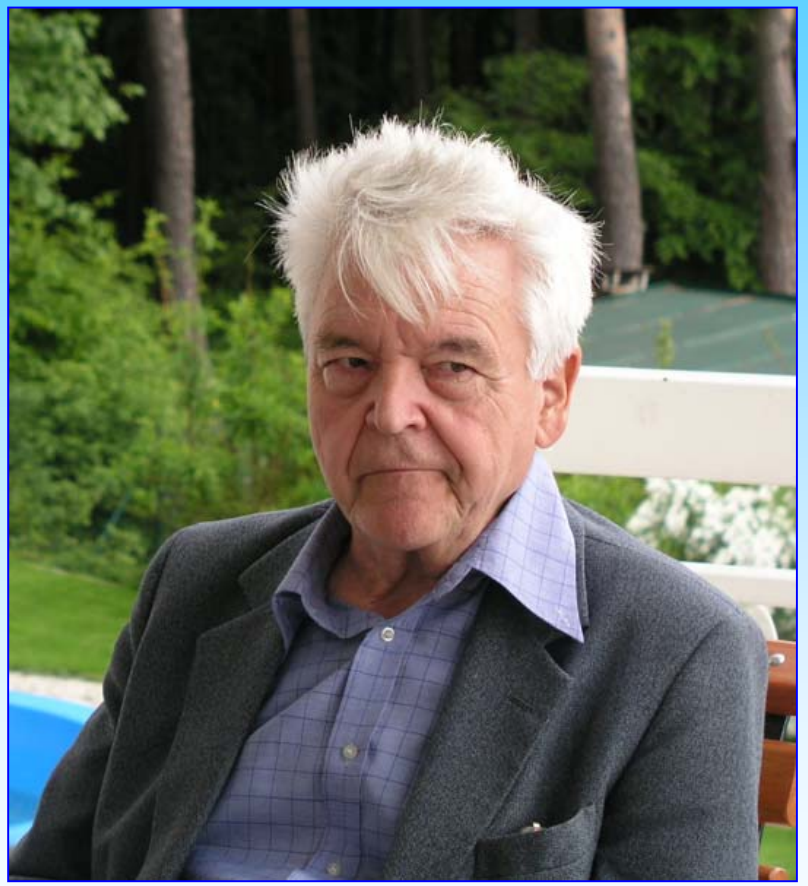
Zdeněk Opatrný – AV ČR, VURV, UK Praha

Boris Vyskot - BFÚ AV ČR Brno

František J. Novák – AV ČR Olomouc, AA Seibersdorf

Jiří Vagera - AV ČR Olomouc

Zdeněk Sladký – MU Brno



Prof. Zdeněk Sladký, DrSc.
Foto: J. Dubová

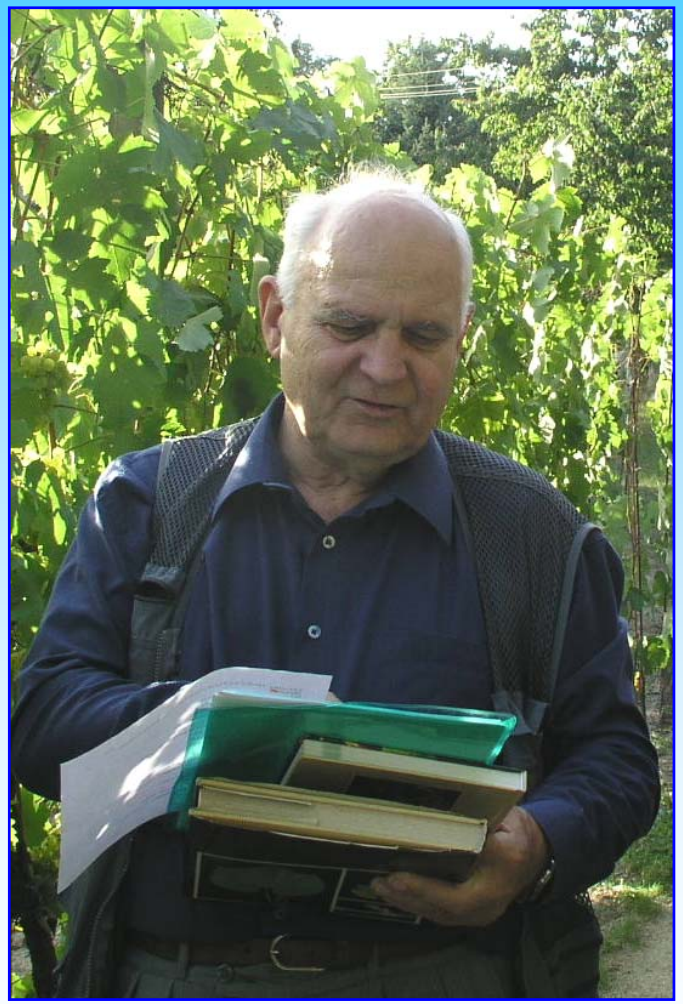
Slovenské začátky rostlinných explantátů

Karol Erdelský – Univerzita Komenského, Bratislava

Aurelie Kamenická – Arboretum Mlyňany

Anna Preťová – SAV Bratislava

Eva Čellárová – Univerzita P.J.Šafárika, Košice



Doc. Karol Erdelský, DrSc.
Foto: J. Dubová

Současná pracoviště rostlinných biotechnologií
Czech Biotech Report 2006

Akademie věd ČR

- Biofyzikální ústav AV ČR Brno
- Ústav experimentální botaniky AV ČR Praha
- Ústav organické chemie a biochemie AV ČR Praha
- Ústav molekulární biologie AV ČR Praha

Univerzity

Výzkumné ústavy

- Výzkumný ústav bramborářský Havlíčkův Brod
- Výzkumný ústav chmelařský Mělník
- Výzkumný ústav krmivářský
- Výzkumný ústav lesnický Znojmo
- Výzkumný ústav olejnin OSEVA PRO s.r.o.
- Výzkumný ústav potravinářský Praha
- Výzkumný ústav obilnářský Kroměříž
- Výzkumný ústav ovocnářský Holovousy
- Výzkumný ústav rostlinné výroby Ruzyň
- Výzkumný ústav včelařský

II.
Základní metody rostlinných buněčných, pletivových a orgánových kultur

Základní metody rostlinných buněčných, pletivových a orgánových kultur

- meristémové kultury
- organogeneze
- somatická embryogeneze
- haploidní kultury
- kultury izolovaných embryí
- protoplastové kultury
- kultury transgenních rostlin
- ozdravování, certifikace a selekce rezistentních rostlin
- kryoprezervace *in vitro* kultur

Aplikace metod rostlinných explantátů v základním výzkumu

získání teoretických poznatků v oblastech

- buněčného dělení
- totipotence rostlinné buňky
- diferenciace rostlinné buňky a pletiva
- metabolismu rostlin
- regulačních mechanismů
- transformace a mutageneze

Meristémové kultury

- Meristematická pletiva jsou okrsky nediferencovaných buněk, které jsou schopny opakovaného dělení.
- Kultury izolovaných vrcholových nebo axilárních meristémů se používají k množení a při eliminaci rostlinných patogenů = ozdravování.
- Při zakládání kultury se izolují prýtové špičky – apikální meristémy s 1-2 listy primordia.
- Takto odvozené kultury jsou geneticky stabilní.

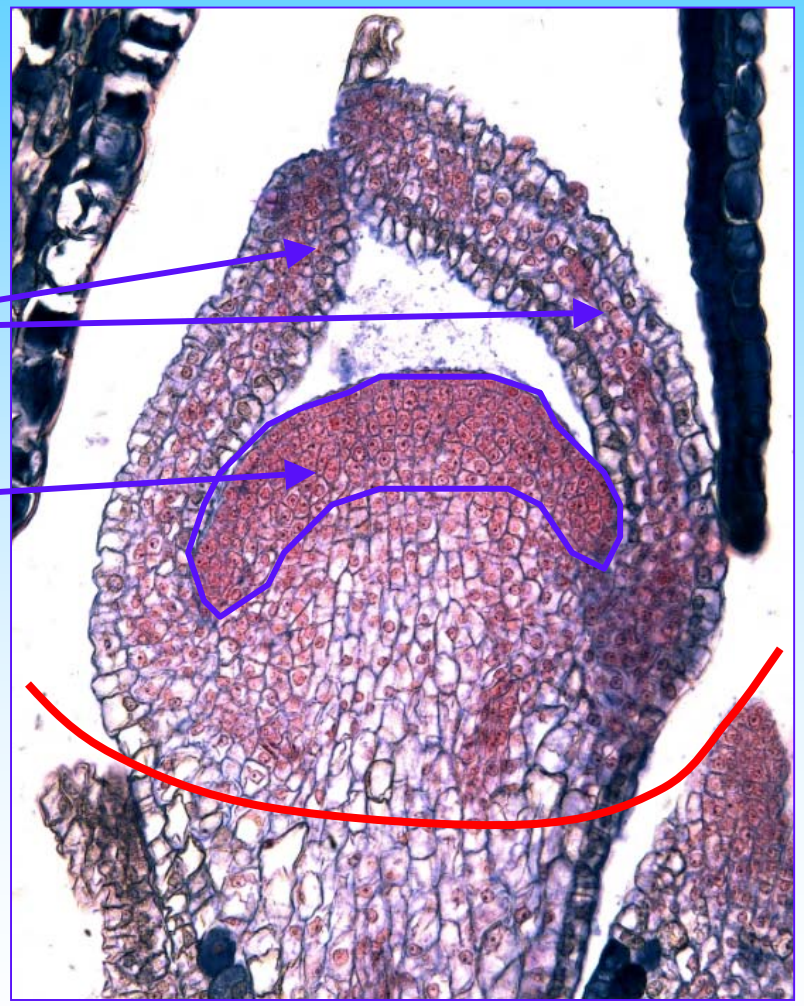
Stavba stonkového apikálního meristému

mezi jednotlivými taxony
existují rozdíly
ve stavbě a velikosti
meristémů

listová primordia

apikální meristém

izolovaný „meristém"



Podélný parafínový řez apexem stonku begonie *Begonia rex* PUTZ.
Foto: J.Dubová

Meristémové kultury

- Meristémové kultury = kultury opakovaně se vyvíjejících prýtů z apikálních nebo axilárních meristémů pěstovaných na mediích doplněných růstovými regulátory, především auxinem a cytokininem.
- Nodální kultury = kultury odvozené z prýtů, které regenerovaly v meristémových kulturách, odběrem jednonodálních segmentů prýtů s axilárním meristémem.



Klonální množení gerber
Gerbera jamesonii H. Bolus ex Hook,
var. Starlight
Foto: A.Smíšková

Stadia mikropropagace *in vitro*

Murashige (1974) Debergh *et* Maene (1981)

0. příprava explantátu - ovlivnění mateřské rostliny

I. iniciace

II. propagace (množení)

II.a elongace (prodlužování) prýtů

III. zakořeňování

převádění *ex vitro* do nesterilních podmínek =

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

Stadia mikropropagace *Saintpaulia ionantha* Wendl.

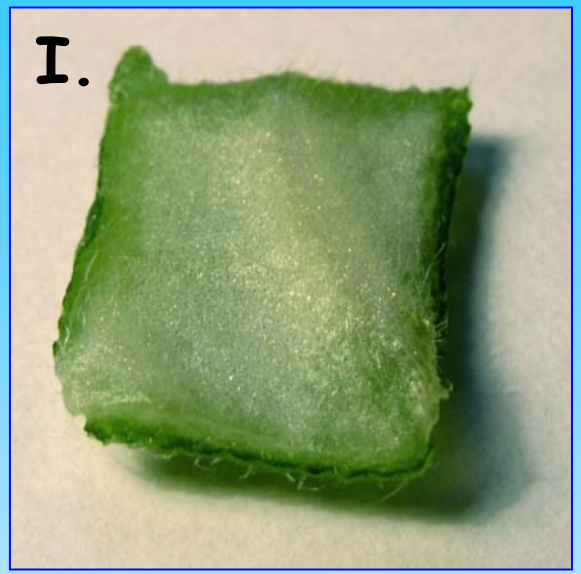


Foto: J. Dubová





Aklimatizace regenerantů fialek *Saintpaulia ionantha* Wendl. ze segmentů listových čepelí





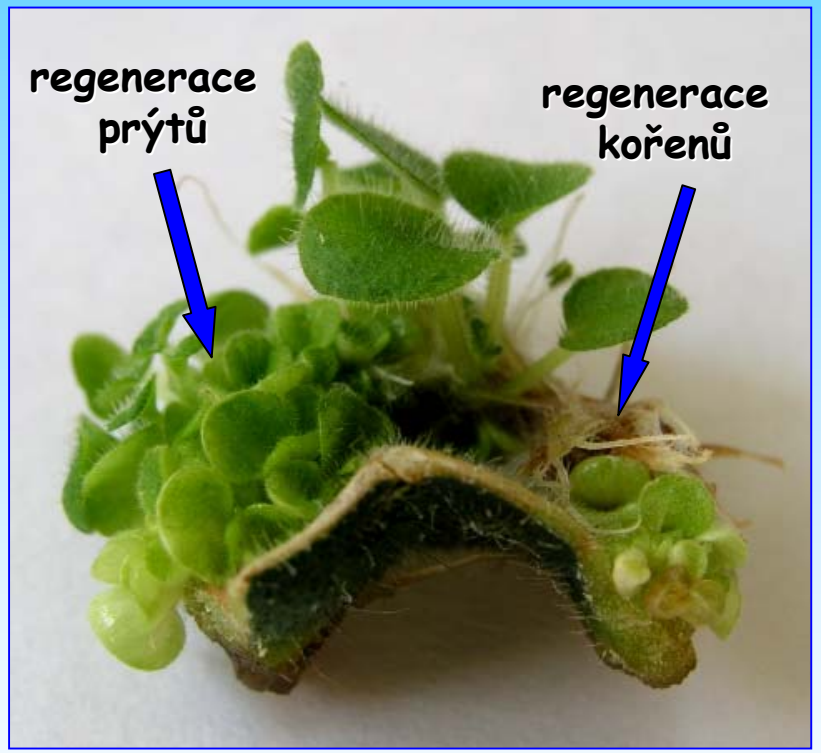


Foto: J. Dubová

Typy organogeneze

přímá organogeneze:
explantát → meristemoid →
primordium orgánu →
rostlina

nepřímá organogeneze:
explantát → **kalus** →
meristemoid →
primordium orgánu →
rostlina

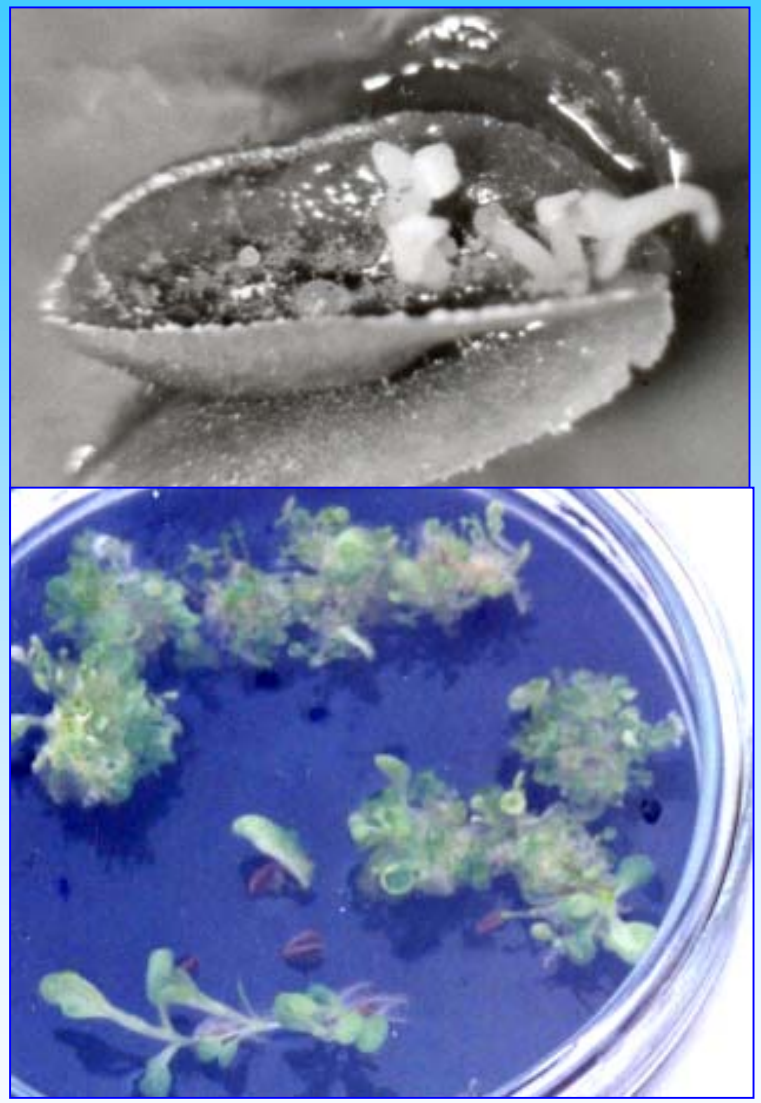


Organogeze na segmentu listové čepele *Saintpaulia ionantha* Wendl.
Foto: J.Dubová

Haploidní kultury

♂ **Androgeneze** = regenerace haploidních rostlin ze samčího gametofytu - kultury nezralých prašníků nebo izolovaných mikrospor

♀ **Gynogeneze** = regenerace haploidních rostlin ze samičího gametofytu - kultury neoplodněných vajíček



Prašníkové kultury tabáku
***Nicotiana tabacum* L.**
Foto: J. Dubová

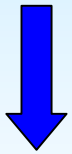
Androgeneze

= vývoj rostlin ze samčího gametofytu

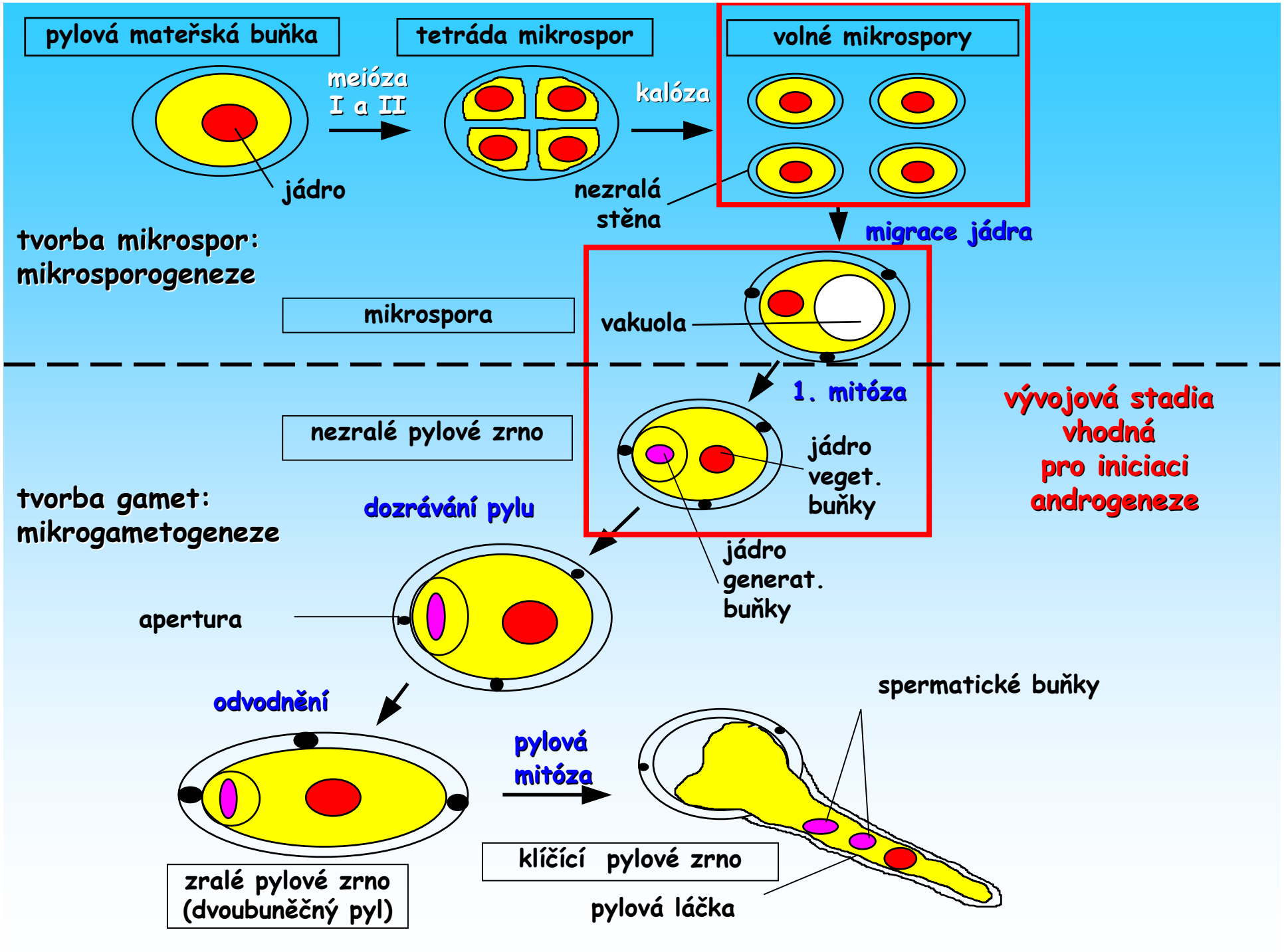
umožňuje manipulace se stupněm ploidie
a rychlejší získání homozygotních rostlin

1. regenerace haploidních rostlin z mikrospor nebo mladých pylových zrn = mikrosporové nebo prašníkové kultury

2. zdvojení haploidního genomu = dihaploidizace



získání homozygotního materiálu v kratší době
ve srovnání s klasickou genetickou metodou


pylová mateřská buňka
tetráda mikrospor
volné mikrospory
meióza I a II
kalóza
jádro
nezralá stěna
tvorba mikrospor: mikrosporogeneze
migrace jádra
mikrospora
vakuola
1. mitóza
nezralé pylové zrno
jádro veget. buňky
vývojová stadia vhodná pro iniciaci androgeneze
tvorba gamet: mikrogametogeneze
dozrávání pylu
jádro generat. buňky
apertura
odvodnění
spermatické buňky
pylová mitóza
klíčící pylové zrno
zralé pylové zrno (dvoubuněčný pyl)
pylová láčka

Typy androgeneze

přímá androgeneze =

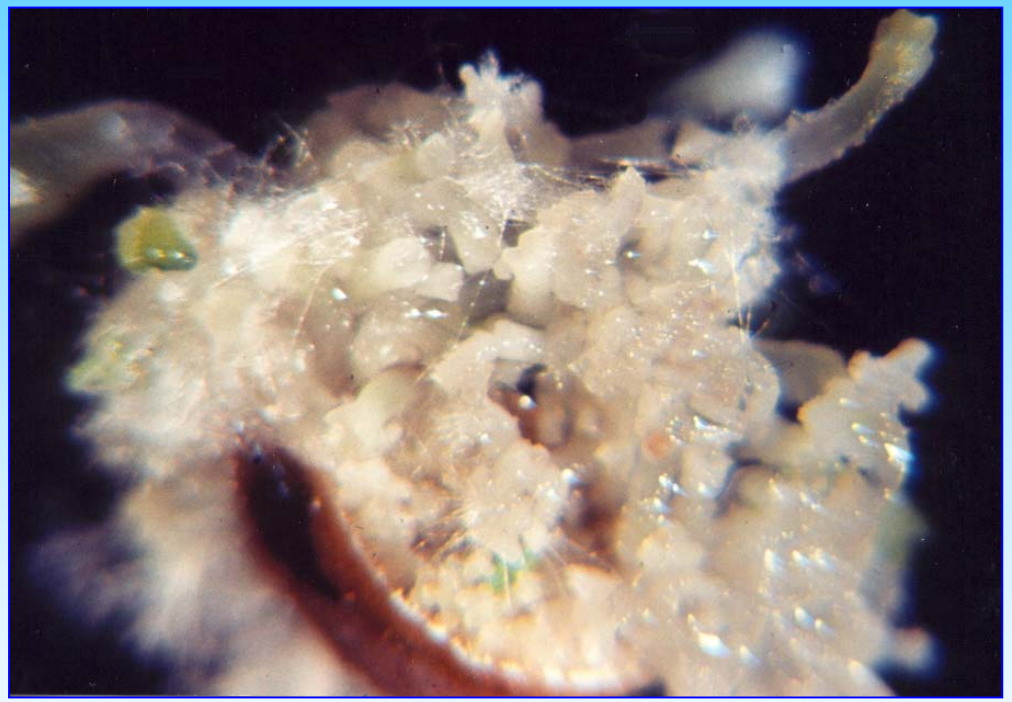
vývoj globulárního embrya a následně haploidní rostliny přímo z pylového zrna nebo mikrospory

nepřímá androgeneze =

z pylového zrna nebo mikrospory se vyvine napřed haploidní kalus

→v něm indukce organogeneze

→ regenerace haploidní rostliny



přímá androgeneze na prašníku tabáku *Nicotiana tabacum* L.
Foto: J. Dubová

Kultura izolovaných embryí

= aseptické vyjmutí embrya a jeho přenos na vhodné médium a optimální kultivační podmínky

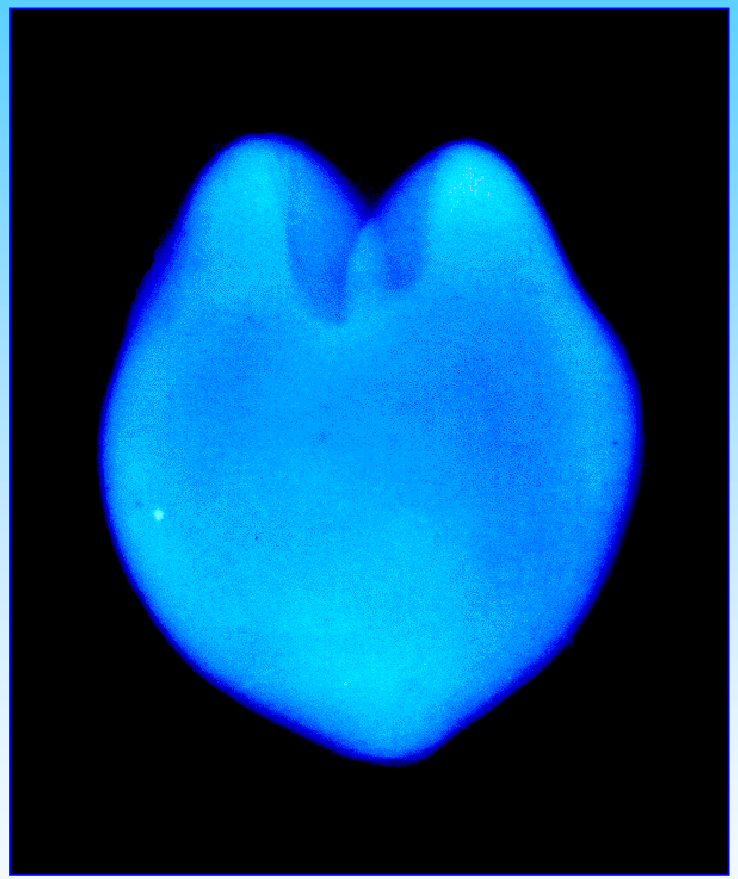
- relativní snadnost získání embryí bez patogenů (povrchová desinfekce semen nebo plodů může být razantní)
- semena s tvrdým osemením – nutno měkčit máčením ve vodě, pak následuje opakovaná desinfekce
- podmínky nutné pro správný vývoj izolovaných embryí:
  - nepoškození embrya včetně suspenzoru – izolace většinou vyžaduje použití preparačního mikroskopu
  - výběr vhodného kultivačního média - čím je izolované embryo mladší, tím jsou jeho nároky větší

Kultury izolovaných embryí

Využití kultur izolovaných embryí:

1. překonání dormance
2. získávání vzdálených kříženců (mezidruhových a mezirodových, např. *Triticum* x *Secale* = Triticale)
3. zdroj ontogeneticky mladého pletiva pro množení

raná vývojová stádia embryí (proembrya) se kultivují na médiích s vysokým osmotickým potenciálem.



Nezralé embryo schizandry
***Schisandra chinensis* (TURCZ.) BAILLON**
Foto: A. Smíšková

Kultury izolovaných embryí

pokročilejší vývojová stadia embryí jsou autotrofní a vyvíjejí se na jednoduchých anorganických mediích s nižším osmotickýcm potenciálem (58 – 88 mM sacharóza)

Růstové regulátory v mediích pro izolovaná embrya

1. nízké koncentrace auxinu podporují normální vývoj
2. kyselina giberelová zvětšuje objem embryí
3. cytokininy růst a vývoj inhibují

Dříve používané přírodní extrakty (kokosové mléko) dnes již nahrazují růstové regulátory.

Suspenzní kultury

kultury buněk a rostlinných protoplastů v tekutém médiu

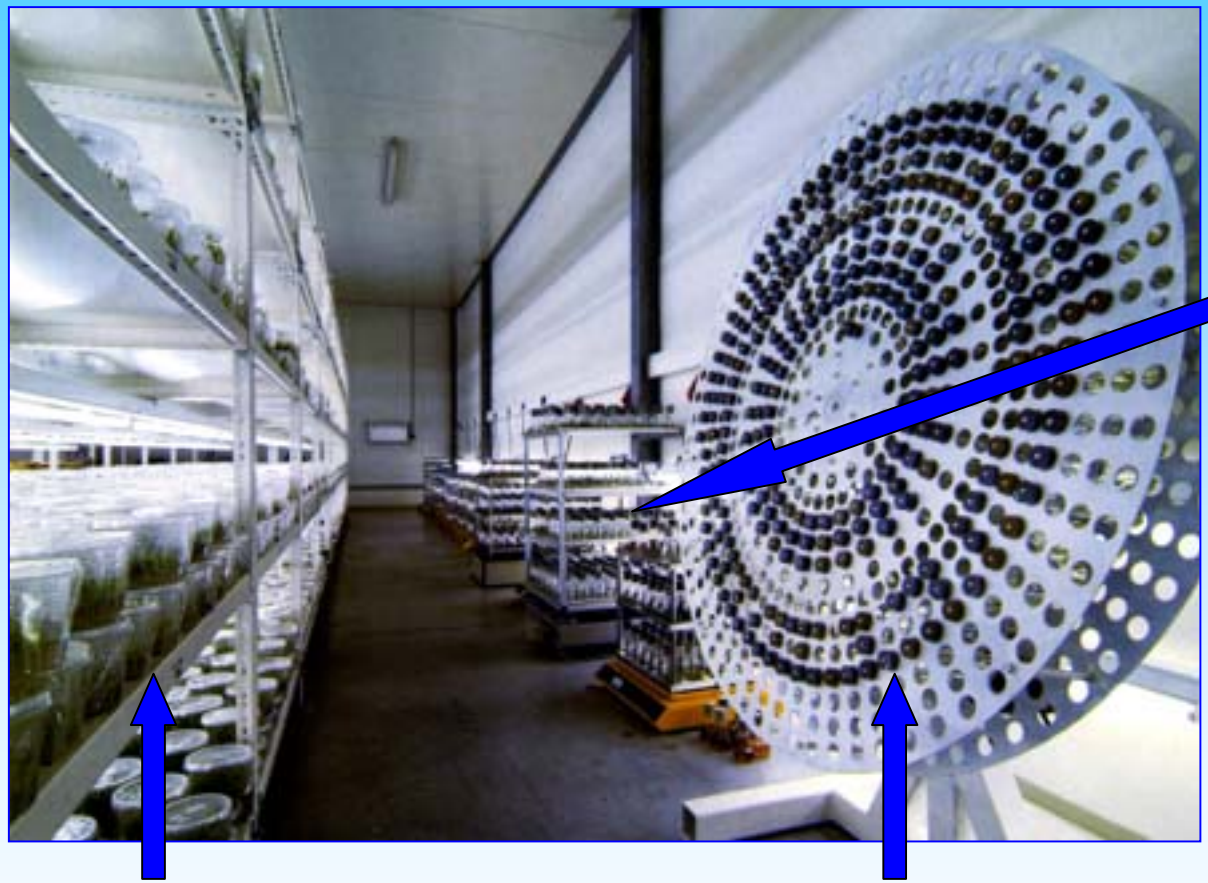


laboratorní třepačka



laboratorní bioreaktor

Různé možnosti kultivace *in vitro*



horizontální třepačky pro kultivace v tekutém médiu

Hark Orchideen GmbHC
Lipstaadt, Německo
Katalog Duchefa

kultivační regály pro kultury na agarem ztuženém médiu

rotační kultivační systém pro kultivace v tekutém médiu

Somatická embryogeneze (SE)

přímá SE:

embryogenní buněčná suspenze nebo explantát

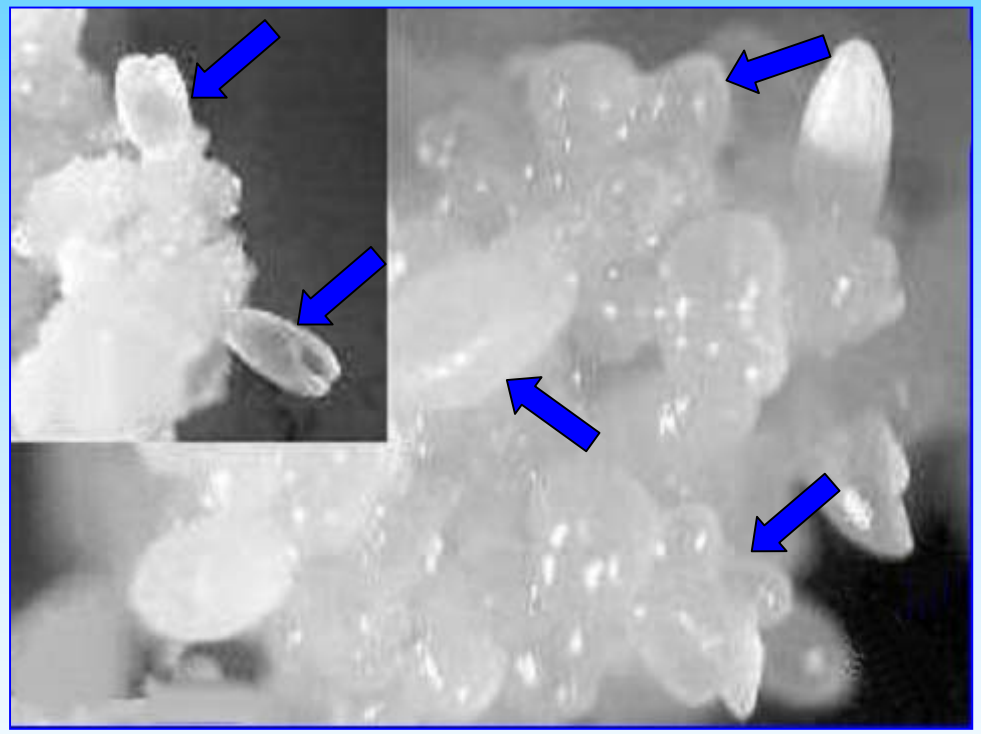
→ vývoj somatického embrya

nepřímá SE:

diferencované pletivo

→ embryogenní kalus

→ vývoj somatického embrya



Somatická embrya javoru
Acer palmatum Thunberg.
Foto: A.Smíšková

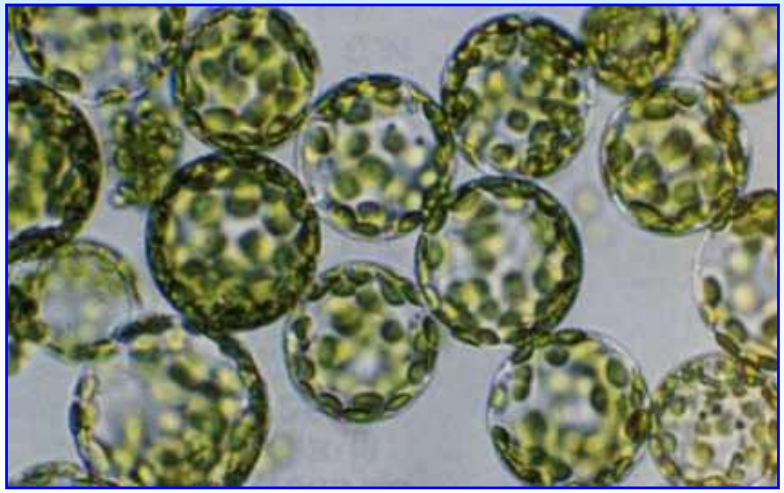
Kultury protoplastů

= suspenzní kultury rostlinných buněk, u nichž byla pomocí směsi enzymů (celuláza, hemiceluláza, pektináza) odstraněna buněčná stěna

izolace protoplastů při použití kombinace těchto enzymů při pH 5,5 – 5,8 trvá 3-18 hod.

fragmenty buněk a buněčných stěn se od celistvých protoplastů odstraní opakovaným promýváním a centrifugací

suspenze protoplastů z mezofylu listu katalog firmy Duchefa



Průběh kultury protoplastů

1. Izolované protoplasty o hustotě 10^4-10^6 buněk/ml se kultivují v tekutém médiu, v agarózových kapkách rozptýlených v tekutém médiu nebo v tenké vrstvě tekutého média na agaróze.
2. Životnost protoplastů se sleduje pomocí fluorescenčního barviva fluorescein diacetátu (FDA), ze kterého pouze živé buňky uvolní fluorescein, který ve fluorescenčním mikroskopu po ozáření modrým světlem o vlnové délce 488 nm vydává žlutozelené záření v oblasti 530 nm.
3. První dělení protoplastů nastává za 48 – 96 hod po izolaci.
4. Mnohobuněčné kolonie se vyvíjejí během 14 - 21 dní a makroskopický kalus během 4 týdnů.
5. První regenerující rostliny se objevují 1 měsíc po izolaci.

Somatická hybridizace

= splývání (fůze) protoplastů somatických buněk

indukuje se v elektrickém poli

umožňuje získávání vzdálených hybridů



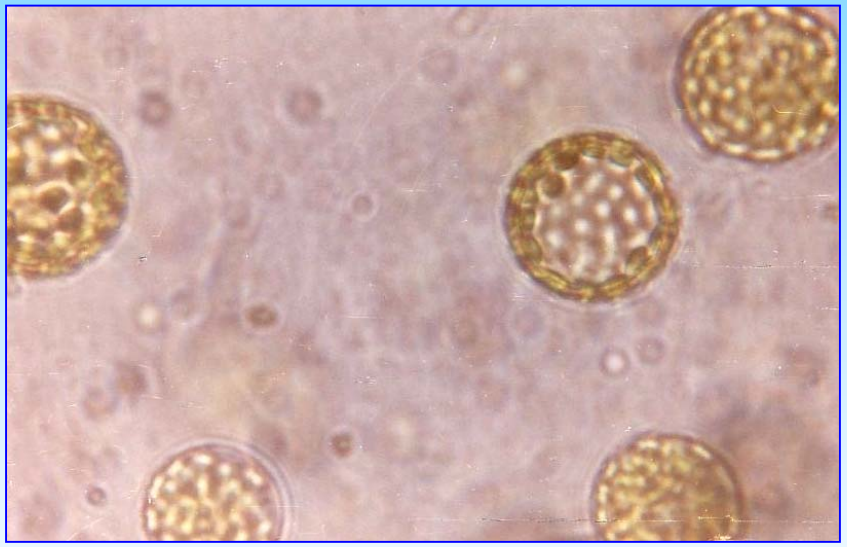
Fůze protoplastů *Episcia cupreata* a *Saintpaulia ionantha*
Univerzita Hannover, Německo

Využití protoplastových kultur ve šlechtění rostlin

selekce somaklonů se zlepšenými charakteristikami indukovaných kulturou

somatickou hybridizací lze překonat mezidruhovou nebo vnitrodruhovou inkompatibilitu

izolované protoplasty se využívají při přímých metodách genetických transformací



protoplasty ječmene *Hordeum vulgare* L.
Foto: M. Kumerová

Techniky genetických manipulací

Transformace = integrace cizího genetického materiálu (DNA) do rostlinného organismu a vznik transgenní rostliny s novými vlastnostmi.

Obecné schéma transformace

1. Příprava rekombinantní DNA (konstrukt)
2. Vnesení DNA do rostlinné buňky
3. Testování exprese vnesených genů
4. Dokazování stability vnesené DNA v rostlinném genomu

Metody transformace

1. přímé = vnesení DNA do jádra pomocí:
   - elektroporace protoplastů
   - mikroinjekce do jádra buňky
   - vakuová infiltrace
   - lipozomy uzavírající DNA
   - bombardování mikročásticemi

2. nepřímé = využití různých vektorů
   - bakterie rodu *Agrobacterium*
   - rostlinné viry
   - modifikovaný bakteriofág Λ

Využití GMO pro studium metabolismu fytohormonů

Aktivní ipt gen z *Agrobacterium tumefaciens* způsobuje nadprodukci cytokininů a vznik teratomů s drobnými listy a mnohonásobně větveným stonkem, který není schopen zakořenit.



Teratomy tabáku
***Nicotiana tabacum* L.**
Foto: J.Dubová

Fytopatologie *in vitro*

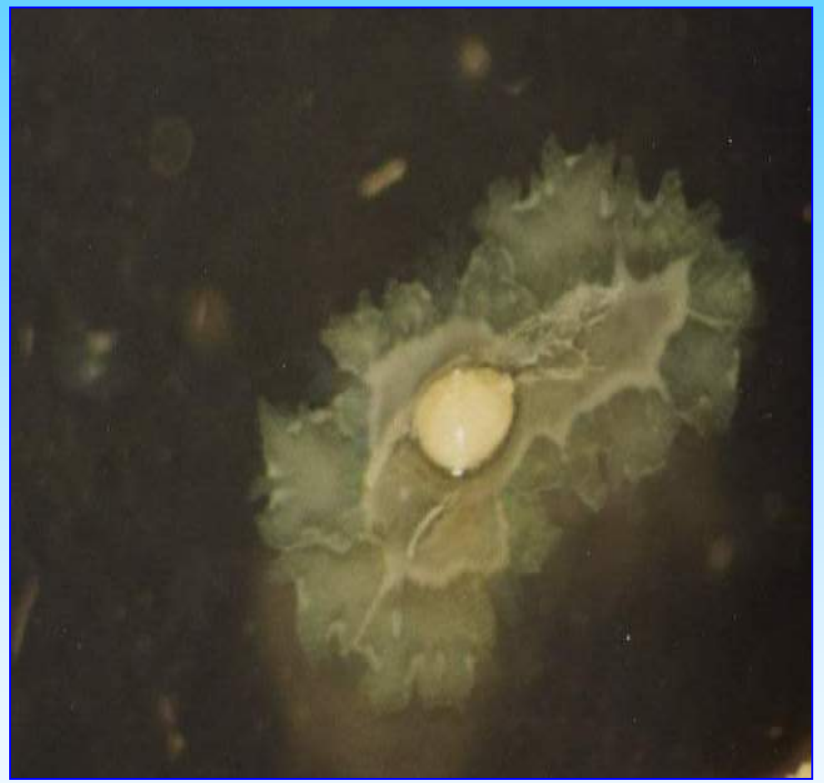
ozdravování rostlin = pětiletý proces izolace meristémů, termoterapie, množení, a následné kultivace a certifikace ozdravených rostlin

2002 Gamborg – touto metodou bylo vyprodukováno 30 milionů certifikovaných mladých rostlin jahodníku /rok pro výsadbu ve Watsoville, střední Kalifornie, USA (tj. území produkce 80% jahod v USA)

Certifikace rostlin *in vitro*

= detekce a identifikace

- virů
- viroidů
- bakteriálních patogenů
- houbových patogenů



bakteriální kontaminace nezralého zygotického embrya *Schisandra chinensis* (TURCZ.) BAILLON
Foto: A.Smíšková

In vitro selekce rezistentních rostlin a studium vztahů mezi rostlinou a patogenem

Kultivace buněčných suspenzí a kalusových kultur a regenerace rezistentních rostlin na mediích se selekčními fytotoxiny.

Aplikace čistého toxinu nebo filtrátu z patogenní kultury do media.



Selekce rezistentních transgenních rostlin tabáku na M-S médiu s přídavkem metotrexátu
Foto: J.Dubová

Příklady selekce rezistentních klonů rostlin *in vitro*

kokultivace explantátů s toxiny patogenů

- kalusové kultury *Citrus limon* kultivované na mediích s filtrátem *Phoma trachiphila*
- kultury listových segmentů *Lycopersicon esculentum na* mediích s *Alternaria alternata f.* sp.*lycopersici*
- embryogenní kultury *Vitis vinifera* inokulované *Elsinoe campeline*
- nodální kultury *Glycine max.* kultivované na médiu s filtrátem *Fusarium solani f. sp. glycines*
- kultury klíčních rostlin a listových segmentů *Triticum aestivum* na mediích s *Microdochium nivale*

Sekundární metabolity (SM)

= vedlejší produkty metabolismu rostlin, jejichž biosyntéza navazuje na základní metabolismus

funkce SM:

1. ochrana rostlin proti chorobám a škůdcům
2. regulace
3. detoxifikace zplodin metabolismu

produkce sekundárních metabolitů *in vitro* = kultivace vybraných linií rostlinných buněčných a orgánových kultur s vysokou produkcí sekundárního metabolitu, probíhá v bioreaktorech

množství a kvalitu metabolitů ovlivňují:

kultivační podmínky bioreaktorů (složení medií, provzdušnění, teplota a pohyb buněčné suspenze)

tzv. elicitory = doplňky medií, které stresují kultivované buňky

Elicitace

Určité sekundární metabolity, **fytoalexiny**, jsou akumulovány v rostlinách po infekci mikroorganismy.
Tyto látky mají antimikrobiální aktivitu, a tak fungují jako chemická ochrana rostlin.
Sloučeniny podporující tvorbu fytoalexinů (filtrát z patogenní houby nebo toxin) byly nazvány **elicitory** a proces produkce fytoalexinů **elicitace**.

elicitor → **rozpoznání elicitoru** → **syntéza enzymů** → **produkce fytoalexinů**

Akumulace fytoalexinů může být indukovaná rovněž jinými **stresovými faktory**: UV- radiace, expozice chladu nebo horka, etylen, fungicidy, antibiotika, soli těžkých kovů, vysoká koncentrace solí.

Elicitory sekundárních metabolitů

elicitor (filtrát z houby)	kultura	produkt
Phytophthora megasperma	***Glycine max***	**glykolin**
houbové homogenáty	***Ruta gravolens***	**epoxidy**
Phytium aphanidermatum	***Catharanthus roseus***	**ajmalicin** **katharanthin**
Botrytis *Colleotrichum* *Verticillium* *Altenaria*	***Papaver somniferum***	**sanguinarin**

Uchovávání genofondu

1. **uchování semen** = nejběžnější a nejstarší metoda
    1. uchování semen **klasicky** = při normální teplotě – zachování klíčivosti max. 1 – 5 let
    2. semenné banky = **uchování semen na delší dobu** = při – 20°C, nelze použít pro všechny taxony
2. **uchování vegetativních orgánů** – hlízy, kořeny, cibule, řízky

    rizika a nevýhody:

    - choroby (houbové, virózy)
    - škůdci (ztráty při skladování)
    - nevhodné podmínky (teplota, vlhkost…)
    - pracné a nákladné - prostory, manipulace

Uchovávání genofondu formou *in vitro* kultur

krátkodobé uchovávání:

- **uchování aktivně rostoucích kultur** = vzhledem k nutnosti pravidelných pasáží na nové médium = pracné a nákladné, opakovaná manipulace zvyšuje nebezpečí kontaminace
- **uchování kultur v minimálním růstu**
  - metody založené na kultivaci explantátů při minimálních teplotách 4 - 10°C (rostliny mírného pásma), 15-20°C (tropické rostliny) - prodlužuje se interval pasáží
  - metody založené na modifikaci složení kultivačního média – snížení koncentrace solí (1/2 – 1/4), zvýšení osmotické hodnoty média – 3% manitol, 5% sacharóza, kyselina abscisová

Uchovávání genofondu formou *in vitro* kultur

dlouhodobé uchovávání za velmi nízkých teplot (kryoprezervace):

skladování upravených kultur (vrcholových nebo axilárních pupenů, somatických embryí, suspenzí buněk nebo protoplastů) při teplotě -196°C.

Metody kryoprezervace

1. **tradiční = metoda pomalého, kontrolovaného ochlazování:**

   explantát → kryoprotektant (DMSO, etylenglykol) a pomalé ochlazování (1°C/min.) na -35°C (je nutný speciální přístroj), pak přenos do -196°C (tekutý dusík)

2. **novější = rychlé zmrazování**

   - **metoda vitrifikační:** izolace pupenu - vysoká koncentrace kryoprotektantu a rychlé zmrazení z +22°C na -196°C (tekutý dusík)
   - **metoda enkapsulace/dehydratace:** aklimatizace kultur při nižších teplotách, izolace explantátů, jejich enkapsulace do alginátových perel, osmotická a vzdušná dehydratace, přenos do kryozkumavek a rychlé zchlazení v tekutém dusíku (-196°C)

Metoda enkapsulace/dehydratace

alginát sodný je
polysacharid izolovaný z červených řas, který je rozpustný za normální teploty a v přítomnosti Ca^{2+} iontů vytváří gel

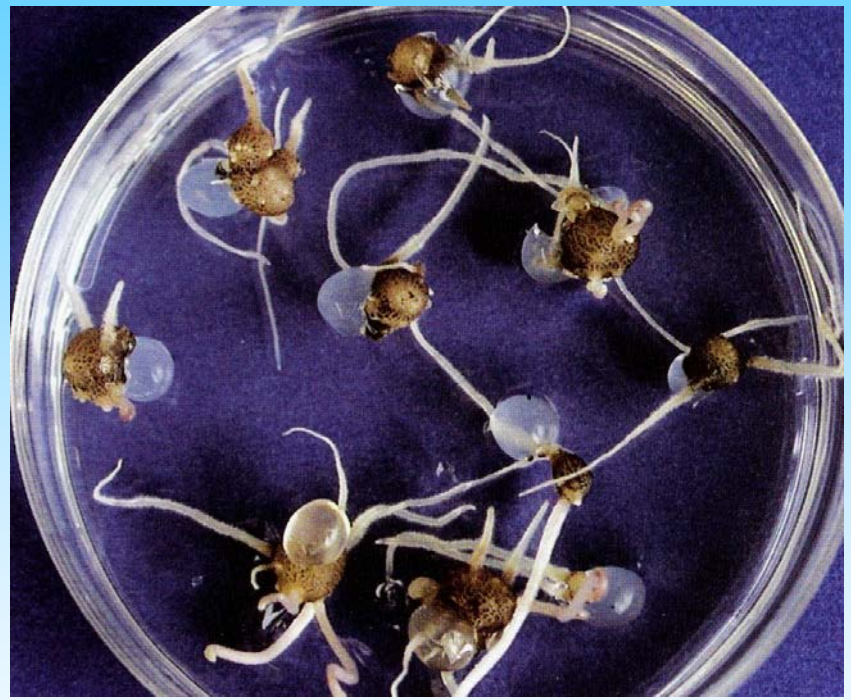
používá se k tvorbě perel

- uzavírajících meristémy nebo buněčné suspenze při kryoprezervaci
- při kultivaci protoplastů
- při imobilizaci buněk pro produkci sekundárních metabolitů
- při tvorbě umělých semen



vývoj axilárního meristému bramboru *Solanum tuberosum* L. enkapsulovaného do 3% alginátu sodného
Foto: J.Dubová

Metoda enkapsulace/dehydratace



klíčení umělých semen *Cyclamen persicum*
Foto: T. Winkelmann
Univerzita Hannover, Německo

vývoj enkapsulovaného vrcholového meristému *Sequoia sempervirens*
M. Lambardi, CNR-IVALSA, Itálie



III.
Biotechnologické využití metod rostlinných explantátů

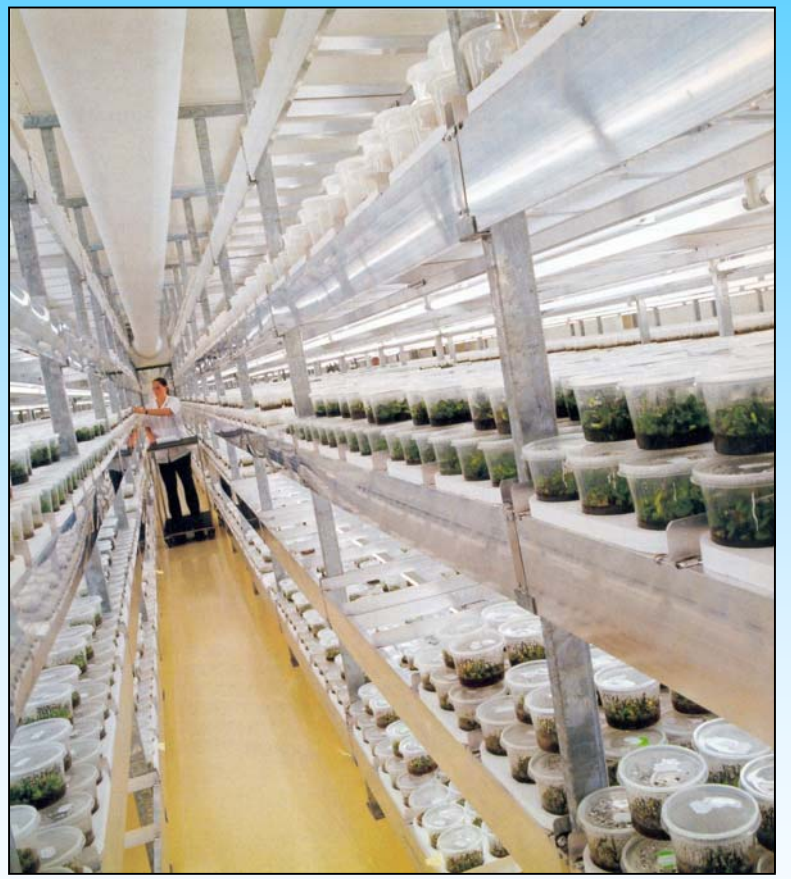
Tři hlavní směry rostlinných biotechnologií

1. Kontrola růstu a vývoje (vegetativní růst, generativní vývoj a klonální množení) - regenerace rostlin
2. Ochrana rostlin proti fytopatogenům (viry, bakterie, houby), škůdcům a herbicidům - fytopatologie *in vitro*
3. Výroba potravin, biochemikálií a léků – produkce sekundárních metabolitů

Komerční využití meristémových kultur, organogeneze a somatické embryogeneze

Množením *in vitro* se ročně na světě vyrobí více než 350 milionů mladých rostlin:

- Hrnkové okrasné listem a květem
- Řezané okrasné květem
- Ovocné dřeviny
- Cibuloviny a hlíznaté rostliny
- Orchideje
- Okrasné dřeviny a keře
- Zelenina a polní plodiny
- Aromatické rostliny a léčivky



Komerční kultivační místnost InVitro, Nizozemí z katalogu Duchefa

Příklady komerčního využití kryoprezervace meristémů

Biotechnologická laboratoř Nestlé uchovává buněčné embryogenní linie kávy, kakaa a banánů.

Německá sbírka mikroorganismů a buněčných kultur (DSMZ, Braunschweig, Německo) - meristémy 519 starých kultivarů brambor – metoda mrazení alginátových perel

International Potato Centre (CIP, Lima, Peru) - 345 kultivarů brambor – metoda vitrifikace

INIBAP Leuven, Belgie - 306 kultivarů banánu (1/4 ze světového počtu kultivarů) – metoda vitrifikace

Národní genobanka klonů NCGR, USA uvádí roční náklady na udržování jedné položky v sadu (hrušně) 77 dolarů, na skladování in vitro 23 dolarů, na kryoprezervaci 1 dolar (při počáteční investici na kryometodu 50 dolarů za uchovávanou jednotku).

Komerční využití GMO

1994 první povolená GM zelenina – **rajčata Flavr-Savr** se zablokovanou biosyntézou etylénu (= zpomalené dozrávání a dlouhodobá trvanlivost v obchodě)

1996 první komerční osivo GM kukuřice v USA s rezistencí vůči zavíječi kukuřičnému

2000 Walmsley a Arntzen - vakcína proti průjmovému onemocnění (diarrhoea) v GM plodech banánů

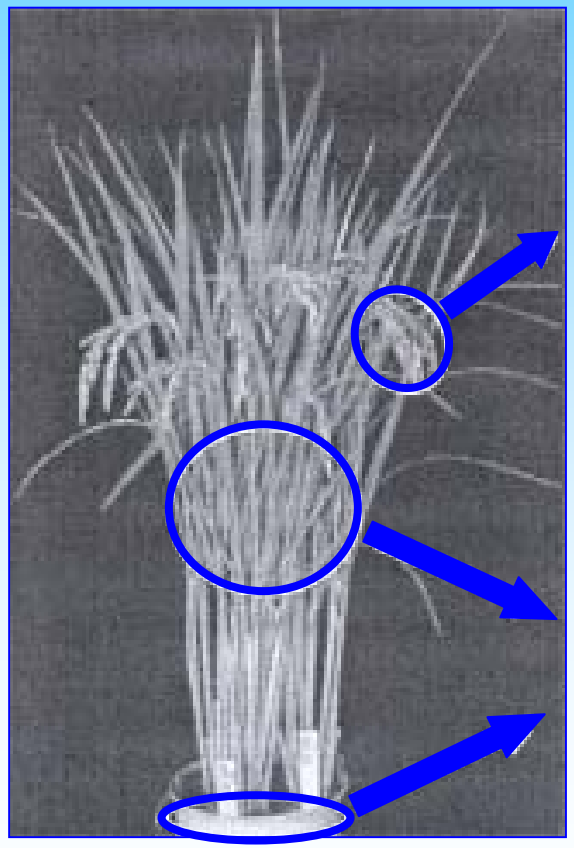
2001 Potrykus - GM „zlatá rýže" s vyšší schopností akumulovat β-karoten a železo

Transgenní plodiny

- geneticky manipulované hospodářské a průmyslové plodiny kukuřice, pšenice, řepka, cukrovka, slunečnice, brambory, soja a bavlna mají zvýšený výnos a jsou rezistentní proti některým herbicidům a škůdcům

- transgenní „ Zlatá rýže " nese gen kukuřice pro tvorbu β-karotenu (provitamin A) a má zvýšený obsah železa v přijatelné formě

Zlatá rýže



nese gen kukuřice pro tvorbu β-karotenu (provitamin A) a gen pro feritin

zrno má vyšší obsah β-karotenu a zvýšený obsah železa v přijatelné formě

konstitutivní ukládání železa do stébel

zvýšený příjem železa kořeny

pěstování zlaté rýže má ohromný význam pro zlepšení výživy, především u obyvatel Asie

Komerční využití GM rostlin

Komerční využití GM rostlin je doposud omezeno naší nedostatečnou znalostí kontroly exprese genů a jejich vzájemných interakcí a regulací jednotlivých metabolických cest v rámci celé rostliny, málo účinnými protokoly regenerace rostlin *in vitro* a především vysokými náklady na technologii genetické transformace rostlin.

Komerčně úspěšné GM plodiny

- Zlatá rýže se komerčně pěstuje v jihovýchodní Asii a významně přispívá k zlepšení zdravotního stavu populace v rozvojových zemích
- V roce 2001 pěstovaly USA 68% světové výroby GM plodin, Argentina 22%, Kanada 6% a Čína 3%
- Transgenní plodiny jsou důvodem dlouholetého sporu mezi EU a USA. Modifikované kukuřici, řepce a soji s rezistencí proti herbicidu Round-up (glyphosate) spotřebitelé v EU stále nedůvěřují.

Trendy výzkumu GM okrasných rostlin a lesních dřevin

okrasné rostliny

- oddálení stárnutí květů: změna biosyntézy etylénu
- změny barvy květu: manipulace s geny pro biosyntézu antokyanů
- změny vůně: manipulace s geny kodující S-linalolsyntázu
- modifikace rezistence vůči patogenům a herbicidům

lesní dřeviny

- modifikace obsahu celulózy, snížení obsahu ligninu a změna jeho struktury – využití v papírenském průmyslu
- rezistence proti fytopatogenním houbám (manipulace s geny kódujícími peptidy) a škůdcům
- rezistence proti herbicidu Buster – méně pracné pěstování

Komerčně úspěšné GM dřeviny a okrasné rostliny

- *Populus nigra* tranformovaný genem CryAC (bakteriální toxin *Bacillus thuringiensis*) účinný proti housenkám motýlů (*Lepidoptera*).
- Čína komerčně vysazuje a pěstuje porosty *Populus nigra* a *Pinus nigra* pro průmysl papírenský a textilní.

- růže a karafiáty serie Moon, s modifikovanou vůní, firmy Suntory Ltd. (Japonsko) a Florigene Ltd. (Austrálie) jsou pěstovány v jižní Americe a prodávány v Evropě, USA, Kanadě, Japonsku, Austrálii.
- transgenní modrá růže firmy Suntory byla získána přenosem genů pro tvorbu modrého barviva *delfinidinu*.

Využití sekundárních metabolitů

- farmaceutický průmysl: kultury *Cataranthus roseus*- **ajmalicin** (léčba vaskulárních onemocnění), kultury *Taxus brevifolia* - cytostatikum **taxol**, kultury *Panax ginseng* – **saponiny**
- textilní průmysl: kultury *Lithospermum erythrorhizon* - barvivo **šikonin** a kultury *Thalictrum minus, Coptis japonica* - **berberin**
- kosmetický průmysl: vůně a esenciální oleje (*Lavandulla oficinalis)*
- potravinářský průmysl: barviva, příchutě, vůně (**antokyany, betalainy)**
- zemědělský průmysl: bioaktivní přírodní insekticidy **pyretroidy** a **fytoalexiny** pro integrovanou ochranu rostlin

Farmaceuticky využívané SM produkované buněčnými nebo orgánovými kulturami

druh SM	SM	využití	kultura
alkaloid	ajmalicin	antihypertensivum	*Catharanthus roseus*
alkaloid	berberin	antimikrobiální účinek	*Coptis japonica* *Thalictrum minus*
diterpen	taxol	cytostatikum	*Taxus brevifolia*
alkaloid	kodein, morfin	analgetika antitusika	*Papaver somniferum*
alkaloid	atropin skopolamin	sympatolytikum	*Atropa bella-donna*
glykosid	digoxin digitoxin	kardiotonikum	*Digitalis lanata*
saponin	panaxozid	tonikum	*Panax ginseng*
alkaloid	vinkristin vinblastin	cytostatikum	*Vinca rosea*

Příklady komerčního využití sekundárních metabolitů

Mitsui Petrochemical Industries, Japonsko:

- kontinuální kultivace suspenzí *Thalictrum minus, Coptis japonica v* rotačním bioreaktoru *(*4000 l) → **berberin**
- kultivace *Lithospermum erythrorhizon* → **šikonin**

Nitto Denko, Japonsko:

- kultivace buněčných a orgánových kultur ženšenu *Panax ginseng* ve stacionárním bioreaktoru (20 000 l) → **saponiny**

Nippon Pain Company, Japonsko:

- rotační kultivační systém kultivace pryšce *Euphorbia millii* → **antokyany**

Příklady komerčního využití sekundárních metabolitů

Vipont Research Labs, USA

Kultivace buněčných suspenzí *Papaver somniferum* ve stacionárních bioreaktorech (300 l) promíchávaných proudem vzduchu → **sanguinarin**

ESCAgenetics, USA

2- fázová kultivace suspenze tisu *Taxus brevifolia* v bioreaktorech (25 000 /75 000 l)→**taxol**

kultivace buněk vanilky *Vanilla planifolia* v rotačním bioreaktoru (75 l)→**vanilin**

Bioreaktory



v roce 2005 největší automatický provzdušňovaný bioreaktor pro pěstování rostlinných buněk a orgánů na světě

pracovní objem každého tanku 20 000 l (20 tun)

celkový objem 160 000 l (160 tun)

Foto: Sung Ho Son
VitroSys Inc., Korea

Kategorie biotechnologií v ČR

Czech Biotech Report 2006

1. Rostlinné biotechnologie
2. Živočišné biotechnologie
3. Biotechnologie životního prostředí
4. Biotechnologie enzymů
5. Mikrobiální a buněčné biotechnologie
6. Vývoj diagnostických a terapeutických systémů
7. Vývoj základních biotechnologií (nanotechnologie, analýza genomů, bioinformatika, struktura a interakce biomolekul)

tyto kategorie jsou dále členěny do 46 sekcí

Sekce rostlinných biotechnologií
Czech Biotech Report 2006

a) Reprodukce a množení rostlin
b) Genetické modifikace
c) Kultivační podmínky rostlin
d) Ochrana rostlin
e) Detekce rostlinných patogenů
f) Mapování genomu
g) Biodiverzita rostlin





Chiméra
Gerbera jamesonii H. Bolus ex Hook,
Foto: A.Smíšková

Výzkumné trendy pro další desetiletí

- výzkum abiotického stresu, především vlivu zasolení, sucha, extrémních teplot, chemotoxicity a oxidativního stresu
- zlepšení ochrany rostlin proti škůdcům
- ochrana a udržitelný rozvoj životního prostředí
- zlepšení kvality potravin
- produkce biomateriálů
- zařazení staronových technik (apomixis a mutační šlechtění) pro vyšlechtění nových odrůd

Doporučená literatura

- **GAMBORG O. L. et PHILLIPS G. C.** (1995): **Plant Cell, Tissue and Organ Culture. Fundamental Methods**, Springer-Verlag, Berlin. Heidelberg.
- **PIERIK R.L.M.** (1987): ***In vitro* Culture of Higher Plants.** - Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht, Boston, Lancaster.
- **REINERT J. et BAJAJ Y.P.S.**/eds./ (1977): **Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture.** – Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York.
- **GEORGE E.F.,HALL M.A. and de KLERK G.J.** (2005): **Plant Propagation by Tissue Culture.** - Springer-Verlag, Berlin.
- **TOWILL L.E. and BAJAJ Y.P.S.** /Eds./ (2002): **Cryopreservation of Plant Germplasm II.** Springer-Verlag, Berlin.
- **CASSELLS A.C.** (2000): **Contamination Detection and Elimination.** In: R .E.Spier / Ed. /Encyclopedia. of Plant Cell Biology, John Wiley and Sons.

Doporučená literatura

- **DROBNÍK, J. et ŠTĚPÁNKOVÁ, H.** /eds./ (1997): **Harmonizace pravidel práce v biologii a chemii. I. Bezpečnost biotechnologií.** Series in Natural History, 6, PERES, Praha. (Skriptum UK).
- **ONDŘEJ, M.** (1992): **Genové inženýrství kulturních rostlin.**- Academia, Praha.
- **PROCHÁZKA S. et al.** (1997): **Regulárory rostlinného růstu.** – Academia Praha.
- **ENGELMANN** (1991): **Kryoprezervace rostlinného materiálu.**
- **TOURTE Y.** (2005): **Genetic Engineering and Biotechnology, Concepts, Methods and Agronomic Applications.** Science Publ.

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)

Zajímavé webové adresy

přehledné a názorné výukové stránky o metodách *in vitro* kultur

http://allserv.rug.ac.be/~pdebergh/ind/content.htm

stránky české neziskové organizace Biotrend tvořené vědeckými pracovníky pro šíření informací o moderní biotechnologii a GMO

http://www.biotrin.cz/

kryoprezervace

http://scieng.abertay.ac.uk/plant/genebanking.htm
http://www.ars.usda.gov/Main/docs.htm?docid=8100
http://www.ars-grin.gov/ncgrp/volk_lab.htm