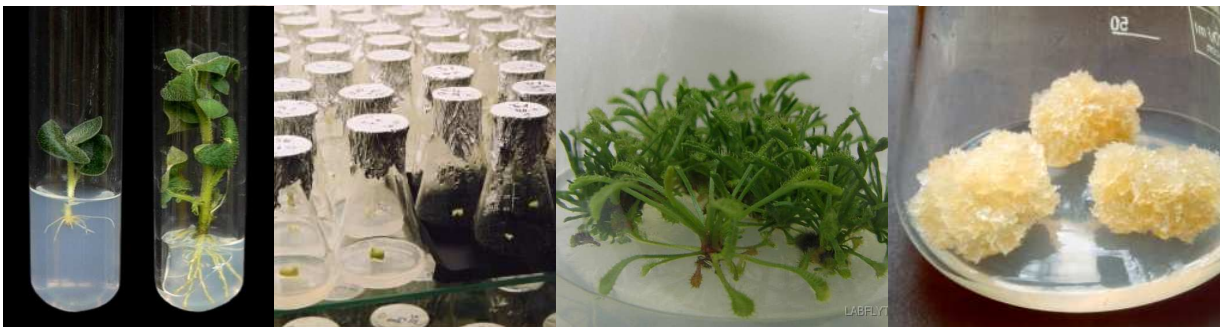




KATEDRA EXPERIMENTÁLNÍ BIOLOGIE ROSTLIN

Téma

# KULTIVACE *IN VITRO*



Praktikum fyziologie rostlin

# Teoretický úvod: KULTIVACE *IN VITRO*

Rostlinný materiál lze kromě přirozených podmínek pěstovat také v různých umělých podmínkách. Jednou z těchto možností je kultivace za specifických podmínek v uzavřených (nejčastěji skleněných) nádobách umožňující mimo pěstování celistvých rostlin také pěstovat jejich oddělené části. Odtud pocházejí i názvy těchto kultur: **kultury *in vitro*** (ve skle) anebo kultury **rostlinných explantátů** (Obr.1). Podle stupně organizovanosti lze rozdělit kultury na orgánové (kultivované kořeny, stonky, listy, části květenství), tkáňové (soubory buněk) a buněčné (jednotlivé buňky, buněčné suspenze, s určitými výhradami lze příp. zařadit i protoplasty – buňky zbavené buněčné stěny).



**Obr.1: Typy rostlinných explantátů**

a,b/ kultury celistvých rostlin a rostlinných částí, c/ kultury rostlinných pletiv - kalus, d/ buněčné kultury- mikrospory, e/ protoplastové kultury

Možnost takto kultivovat rostlinný materiál vychází z faktu, že rostliny disponují vysokou regenerační schopností, která souvisí s možností obnovit buněčné dělení i u buněk somatických. Díky těmto vlastnostem se mohou rostliny vegetativně množit a nebo nahrazovat poškozené orgány. Tato schopnost je založena na tzv. **totipotenci rostlinné buňky**. Téměř každá živá buňka rostlinného těla (i buňka plně diferencovaná) totiž obsahuje kompletní genetickou informaci, kterou je potenciálně schopná realizovat.

## 5.1. Složení kultivačního média a kultivační podmínky

Rostlinné explantáty vyžadují pro kultivaci speciální podmínky. Především je nutné zajistit vhodné kultivační médium, které musí obsahovat všechny potřebné **minerální živiny**, které vyžaduje i celistvá rostlina. Často je třeba do kultivačního média přidat i látky, které si běžně rostlina syntetizuje sama, patří sem hlavně **aminokyseliny a vitamíny**. Velmi důležitou složkou kultivačních médií jsou **sacharidy**. Některé explantátové kultury mohou být totiž nezelené, ale i kultury s kompletním fotosyntetickým aparátem nejsou často schopny samy zajistit dostatečné množství asimilátů pro uspokojivý růst a vývoj. Kultivační média obsahující organické složky na druhé straně představují velmi vhodnou živnou půdu pro mikroorganismy, a proto je nutné médium i kulturu udržovat sterilní a při manipulaci dodržovat zásady **aseptické práce (Obr.2,3)**.



**Obr.2: Laminární box**

Laminární box (flowbox) umožňuje zachovat materiál sterilní při manipulaci mimo kultivační



**Obr.3: Kontaminace *in vitro* kultury**

Přítomnost sacharidů v médiu vyžaduje práci za sterilních podmínek

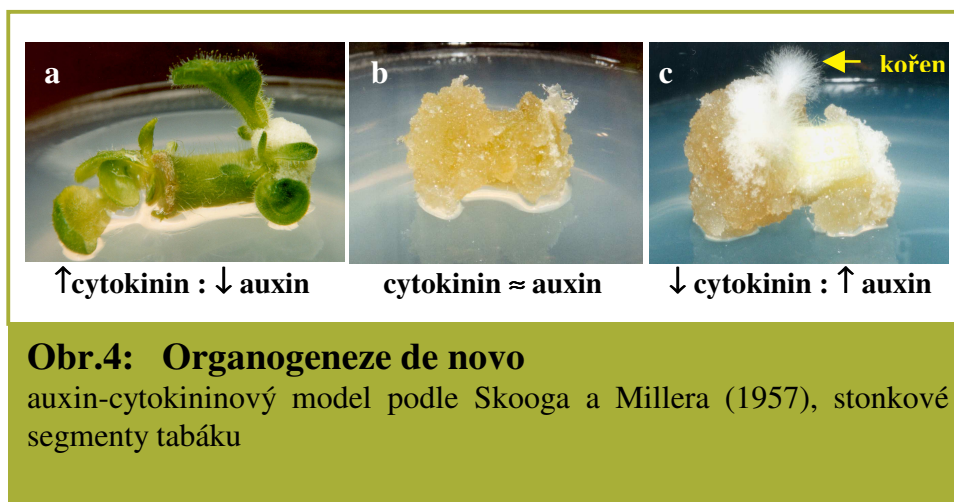
Významnou součástí kultivačních médií explantátových kultur jsou růstové regulátory, nejčastěji **auxiny a cytokininy**. Použitý typ a koncentrace těchto látek v médiu může mít zásadní vliv na vývojový program daného explantátu.

Pro demonstraci regulačních vlastností růstových regulátorů lze použít tzv. **auxin-cytokininový model** regenerace stonkových segmentů tabáku vytvořený Skoogem a Millerem již v roce 1957:

Stonkové segmenty byly vystaveny působení různých kombinací koncentrací auxinů a cytokininů v kultivačním médiu:

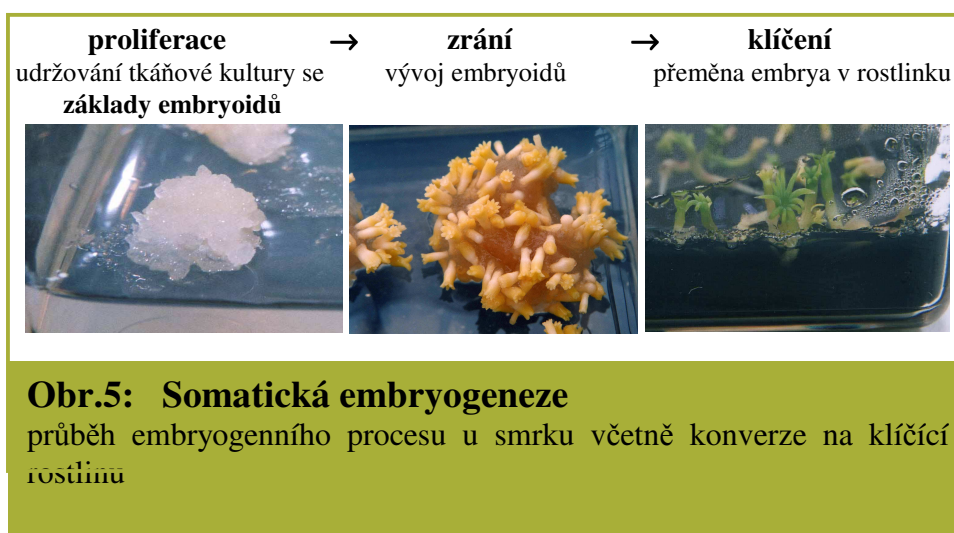
- I. médium obsahovalo vysokou koncentraci auxinu – pro segment bylo letální
- II. médium obsahovalo vysokou koncentraci cytokininu - bylo také letální

- III. médium obsahovalo takovou koncentraci auxinu a cytokininu, že oba růstové regulátory byly v rovnováze (tato rovnováha je pro každý rostlinný materiál specifická a rozhodně to neznamena rovnost koncentrací) - docházelo k produkci kalusu - hojivého pletiva (obrázek 4b). Pokud je zachován stejný poměr auxinu a cytokininu v médiu jako byl ten, který tvorbu kalusu vyvolal, pak je možné udržet tento typ růstu *in vitro* neomezeně dlouho.
- IV. pokud byla posunuta rovnováha auxinu a cytokininu oproti situaci III. ve prospěch cytokininu - na segmentu se tvořily pupeny- tedy základy prýtů (obrázek 4a).
- V. pokud byla posunuta rovnováha oproti situaci III. ve prospěch auxinů - na segmentu se tvořily kořenové základy (obrázek 4c).



Využití kultur rostlinných explantátů:

- **Nástroj studia fyziologie rostlin**
- **Vegetativní množení**
- Ozdravování rostlin
- Výroba „umělých semen“ (obr.5)
- Produkce sekundárních metabolitů
- Šlechtění rostlin-fúze protoplastů, přenos organel, chromozomů
  - transformace přímým a vektorovým (*Agrobacterium*) přenosem DNA





Zadání praktických úloh k tématu:

# KULTIVACE *IN VITRO*

## Přehled úloh k vypracování:

### Úkol 1: Množení rostlin *in vitro*

1a) Namnožte rostliny bramboru metodou pěstování stonkových řízků *in vitro*

### Úkol 2: Kultivace tkáňových kultur

2a) Přeočkujte tkáňovou kulturu tabáku a stanovte viabilitu barvením trypanovou modří

### Úkol 3: Subkultivace rostlin, přenos do podmínek *ex vitro*

3a) Přeočkujte masožravou rostlinu na čerstvé médium. Převeďte rostlinu do podmínek *ex vitro*.

# Praktické úlohy: KULTIVACE *IN VITRO*

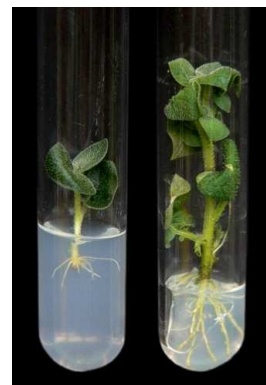
## Úkol č. 1: Množení rostlin *in vitro*

### Cíl:

Demonstrovat možnosti mikropropagace (množení rostlin v *in vitro* podmínkách).

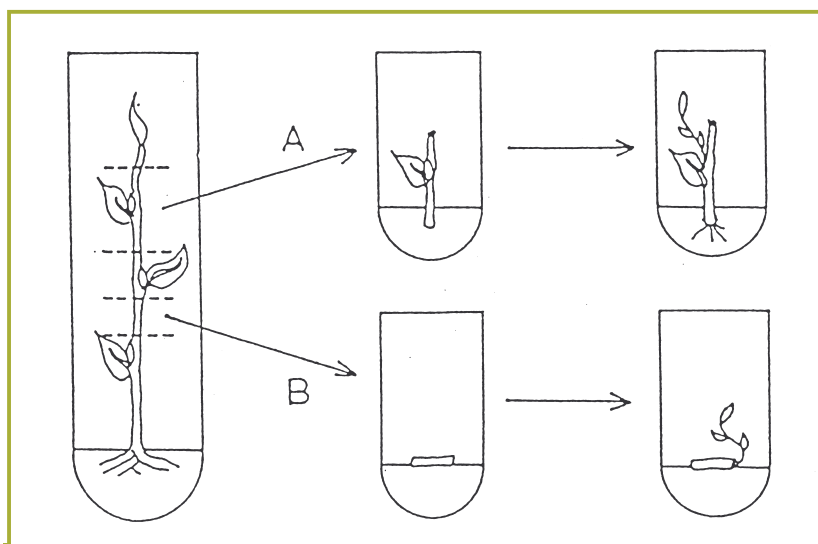
### Hypotéza, kterou v průběhu práce ověříme:

Kultury rostlinných explantátů je možné vegetativně množit. Při práci za aseptických podmínek ověříme možnost množení cestou prosté reprodukce či regenerace *de novo*.



### 1a) Namnožte rostliny bramboru metodou pěstování stonkových řízků *in vitro*

**Princip:** Při množení rostlin *in vitro* (mikropropagaci) se využívá zejména dvou způsobů: **reprodukce** (schéma - část A), kdy se nový prýt rostliny vyvíjí z dormantního úžlabního pupene, a **regenerace *de novo*** (schéma - část B), kdy se nová rostlina vytváří ze somatických diferencovaných buněk, a to buď cestou organogeneze (časově i prostorově oddělený vývoj nadzemní části a kořenů, viz. auxin-cytokininový model) nebo cestou somatické embryogeneze (somatické buňky dávají vznik embryoidu, tedy útvaru, který je tvarem i funkcí obdobou zygotického embrya).



**Obr. 6: Schéma mikropropagace rostlin. A – reprodukce, B – regenerace *de novo***

## Laboratorní postup:

**Potřeby:** rostliny bramboru na agarovém médiu (pěstované 3 týdny *in vitro* z nodálního segmentu), baňka s agarovým médiem bez růstových regulátorů a s růstovými regulátory, box pro práci v aseptickém prostředí (laminární flowbox), sterilní nástroje, kultivační box s teplotou 20°C.



### Provedení úkolu:

1. Seznámíte se se způsobem a podmínkami práce v aseptickém prostředí.
2. V aseptickém boxu **odeberte** z rostlin bramboru **nodální** (obsahují úžlabní pupen) a **internodální stonkové segmenty** a přenesete je na médium: nodální segment s úžlabním pupenem a listem a internodální stonkový segment vždy na takové médium, jež povede ke zdárnému vývoji explantátu.
3. **Zdůvodněte výběr kultivačního média** pro daný typ explantátu.
4. Postup a očekávané **výsledky popište** do protokolu.

---

### Otázky:

Kolik rostlin bramboru je možné maximálně získat cestou reprodukce v podmínkách *in vitro* za půl roku? Subkultivační interval (doba mezi jednotlivými přesazeními) je obvykle 3 týdny.

Pokuste se odhadnout, co by se stalo se segmentem, který by byl umístěný na nevhodné médium, případně v nevhodné orientaci.



## Úkol č. 2: Kultivace tkáňových kultur

### Cíl:

Zaočkovat tkáňovou kulturu a stanovit viabilitu nově založené a starší kultury.



### Hypotéza, kterou v průběhu práce ověříme:

*Jakým způsobem je možné množit a udržovat nediferencované rostlinné pletivo.*

**Princip:** U rostlin v místě poranění dochází k obnově buněčného dělení a dediferenciaci (tedy ztrátě organizovanosti), což vede k vytvoření hojivého pletiva (závalu, kalusu). V podmínkách *in vitro* lze podobnou situaci vyvolat působením vhodné kombinace růstových regulátorů - auxinů a cytokininů. Vytvořený kalus (neorganizovaně rostoucí masu buněk) je možné po

přenesení na živné médium o podobném či stejném složení jako médium, které tvorbu kalusu vyvolalo, pěstovat po neomezeně dlouhou dobu. V některých případech lze v tkáňové kultuře vhodnou změnou kultivačního média (především změnou či vynecháním růstových regulátorů) a dalších kultivačních podmínek znovu navodit diferenciaci žádaných rostlinných pletiv a orgánů.

## 2a) Přeočkejte tkáňovou kulturu tabáku a stanovte viabilitu barvením trypanovou modří

**Princip viabilního barvení:** Povrchové struktury živých buněk představují aktivní bariéru pro vstup látek do buňky, a obsah živých buněk tedy zůstává narozdíl od obsahu mrtvých buněk nezbarvený. K tomuto rozlišení živých a odumřelých buněk budete používat **trypanovou modř**. Pracujte opatrně, **BARVIVO JE KARCINOGENNÍ!!**

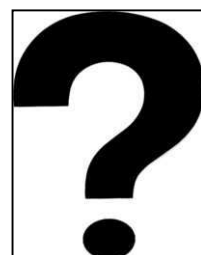
**Potřeby:** Tkáňové kultury tabáku (*Nicotiana tabacum*) různého stáří (liší se délkou poslední subkultivace), médium s růstovými regulátory (auxiny a cytokininy) pro kultivaci tkáňových kultur, roztok trypanové modří, pomůcky pro přípravu nativních preparátů.

### Pracovní postup:

1. Při dodržení podmínek práce v aseptickém prostředí **přeneste část mladé tkáňové kultury tabáku na čerstvé médium.**
2. Další část pletiva odeberte do kádinky a **připravte buněčnou suspenzi** (aseptická práce již není nutná). Obdobně připravte buněčnou suspenzi ze starší kultury.
3. Kapku suspenze přeneste na podložní sklíčko, odsajte vodu kouskem buničiny, přidejte malou kapku trypanové modří a **obarvenou suspenzi pozorujte pod mikroskopem.**
4. **Odhadněte % živých a mrtvých buněk** ve vzorcích z kultur pěstovaných s různým subkultivačním intervalem.
5. Povšimněte si odlišností ve tvaru a upořádání buněk v tkáňové kultuře oproti buňkám v rostlinných pletivech. **Výsledek pozorování schématicky zakreslete, případně přiložte odpovídající fotografii.**

### Vyhodnocení experimentů:

Komentujete viabilitu buněk kultury. Navrhněte způsob(y), jak lze dosáhnout zvýšení viability vybrané kultury.





## Úkol č. 3: Subkultivace rostlin, přenos do podmínek *ex vitro*

### Cíl:

Seznámit se s manipulací a možnostmi udržování rostlin *in vitro* a požadavky rostlin na převod do *ex vitro* podmínek.



### Hypotéza, kterou v průběhu práce ověříme:

Rostliny lze dlouhodobě udržovat v podmínkách *in vitro* a následně převést do „přirozených“ podmínek.

### 3a) Přeočkujte masožravou rostlinu na čerstvé médium. Převeďte rostlinu do podmínek *ex vitro*.

**Úvod:** Přenos do běžných kultivačních podmínek (rostliny rostou v zemině v neaseptických podmínkách) je závěrečnou fází jakékoliv práce s rostlinnými explantáty, která má mít praktický výstup. Někdy však tento krok představuje dosti vážný problém. Rostliny rostoucí v podmínkách *in vitro* jsou totiž adaptovány na odlišné podmínky výživy (snadno dostupné živiny, méně rozvinutý kořenový systém), na nepřítomnost patogenů a zejména na vysokou relativní vlhkost uvnitř kultivačních nádob. Nemají proto dostatečně vyvinuté ty povrchové struktury, které regulují výdej vody do prostředí (na povrchu listů chybí vosky, kutikula je velmi tenká a průduchy zůstávají trvale otevřeny). Proto je třeba poměrně dlouho po přenesení do půdy mimo kultivační box rostliny chránit před vadnutím a relativní vlhkost okolního prostředí snižovat postupně (i několik týdnů).

**Potřeby:** kultura *Drosera capillaris* (nebo *Pinguicula primuliflora*), baňky s kultivačním médiem, sterilní nástroje.

### Pracovní postup:

6. **Rozdělte rostliny** rosnatky (tučnice) **na čerstvá media**. Pracujte pečlivě v aseptických podmínkách, na provedení vaší práce závisí další úspěch pěstování.
7. Na jedné z rostlin si budete moci ověřit výsledek, odnesete si totiž baňku s masožravou rostlinou domů.
8. Pokud později zjistíte infekci na médiu (rozvoj případných bakterií a plísní se projeví asi do 10 dnů), okamžitě **přesaďte rostlinu do rašeliny** (pH asi 4,5).
9. Abyste zajistili vysokou vzdušnou vlhkost, postavte nádobu s přesazenou rostlinou do větší nádoby (zavařovačky apod.), na dno nalijte asi 1 cm vody a nádobu zakryjte (např.

alobalem). **Odkrývejte postupně** asi dva týdny, aby se rostlina mohla na podmínky *ex vitro* dobře adaptovat.

10. I když kultura roste *in vitro* dobře a bez infekce, nejspíše po 3-4 měsících převed'te vyvinuté rostliny popsaným způsobem do rašeliny (živiny v médiu se vyčerpají).

---

### **Vyhodnocení experimentů:**

Zhodno'te úspěšnost vaší práce z hlediska sterility a životaschopnosti rostliny po převedení do *ex vitro* podmínek.

### **Otázky:**

Rostliny je nutné při přesunu z *in vitro* do *ex vitro* podmínek adaptovat. Proč?



