UNIVERZITA JANA EVANGELISTY PURKYNĚ V ÚSTÍ NAD LABEM
FAKULTA PEDAGOGICKÁ

EXPLANTÁTOVÉ KULTURY ROSTLIN

JAROSLAV KOVÁČ

1992

Obsah

1. Explantátové kultury rostlin - základní principy

Explantátové kultury rostlin (kultury rostlinných explantátů) znamenají aseptickou kultivaci izolovaných částí rostlin za umělých podmínek. V praxi to znamená oddělit ze sterilně napěstované nebo povrchově sterilizované rostliny určitou část, umístit ji do sterilního prostředí a kultivovat za více či méně definovaných podmínek.

Základem rostlinného organismu, vznikajícího pohlavním rozmnožováním, je jedna buňka - zygota, která vznikne oplozením vaječné buňky buňkou spermatickou. Zygota obsahuje v jádře kompletní genetickou informaci a v cytoplazmě mechanismy umožňující realizaci této informace. Zygota je totipotentní a mitoticky se dělí. Procesem mitotického dělení vznikají dceřinné buňky, které se dále vyvíjejí a dochází k jejich diferenciaci. Stávají se stavebními jednotkami specializovaných pletiv.

Možnost vegetativního množení rostlin však ukazuje, že rostlinné buňky touto diferenciací nijak nedegenerují, ale že jsou schopny dediferenciace a opětného dělení. Buňky diferencovaných pletiv se totiž ve své genetické výbavě neliší od buněk meristematických. Proces diferenciace je totiž založen na tzv. diferenční genové aktivitě, kdy se specializace buňky vytváří na základě aktivace či inaktivace určitých genů příslušného rostlinného druhu.

V rostlinném organismu je tedy totipotentní nejen zygota a meristematická buňka , ale i kterákoli jiná rostlinná buňka. Změnou podmínek, ve kterých se specializovaná rostlinná buňka nachází, je možné v mnohých případech vyvolat dediferenciaci a neorganizovaný růst. Teoreticky je jakékoliv pletivo obsahující buňky s funkčním jádrem vhodné pro odvození explantátové kultury.

Ve svém principu zahrnují rostlinné explantátové kultury izolaci buněk, pletiv a orgánů a jejich kultivaci ve sterilních podmínkách řízeného prostředí (definovaná kultivační média, teplota, vlhkost, kvalita a kvantita

světla). Vegetační vrcholy, postranní pupeny, části stonků, listů, kořene, reprodukční části jako mikrospory, vajíčka, embrya, semena nebo spory, jakož i jednotlivé buňky a protoplasty mohou být krátkodobě kultivovány in vitro a za určitých podmínek dopěstovány v nové rostliny. To umožňuje uskutečnění cyklu rostlina - explantát - kultura in vitro - organogeneze nebo embryogeneze - intaktní rostlina.

Z výše uvedených principů kultivace izolovaných rostlinných částí vyplývají možnosti jejich aplikace:

1) Kultivace vegetačních vrcholů a pupenů či indukce adventivních pupenů na izolovaných orgánech jako metody vegetativního množení rostlin.

2) Kultivace izolovaných meristémů jako metoda ozdravování rostlin od virových infekcí.

3) Překonávání fyziologických bariér při hybridizaci taxonomicky vzdálených druhů pomocí kultivace izolovaných embryí.

4) Regulace procesu oplození a jeho ovlivnění v podmínkách in vitro.

5) Produkce haploidů při kultivaci prašníků, mikrospor a vajíček.

6) Spontánní výskyt a indukce genových a genomových mutací v buněčných a tkáňových kulturách a jejich selekce na úrovni regenerovaných rostlin. Manipulace s rostlinnou buňkou a vytvoření rostlin s vyšší fotosyntetickou aktivitou a vlastní nebo symbiotickou schopností fixace dusíku.

7) Řízená fúze protoplastů s cílem vytvoření nových hybridů.

8) Inkorporace cizího genetického materiálu do buňky s cílem modifikace rostlinného genomu.

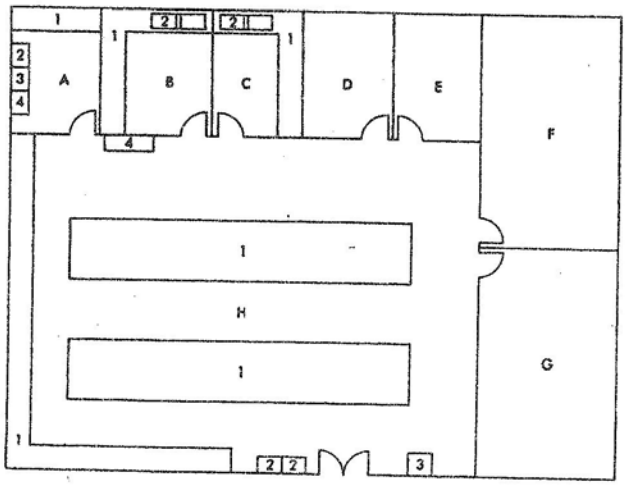
Explantátové kultury představují nejen soubor metod pro vědecké studium, ale jsou využívány i pro praktické účely. Jedná se především o rychlé klonové množení a šlechtění rostlin.

2. Zařízení laboratoře explantátových kultur

Každá laboratoř, ve které se mají realizovat explantátové kultury rostlin musí zahrnovat řadu základních zařízení. Jedná se obvykle o následující:

prostor na mytí skla a laboratorních pomůcek
prostor na přípravu a sterilizaci médií
skladovací prostor na chemikálie a sklo
aseptický prostor pro očkování
kultivační místnost nebo box s řízenými kultivačními podmínkami (teplota, světlo, vlhkost)

Schématický nákres typické laboratoře tkáňových kultur znázorňuje obr.1.



Obr.1. Schématický nákres možného uspořádání místností pracoviště tkáňových kultur rostlin (Torres 1989). A-místnost pro sterilizaci (1-stůl, 2-3 autoklávy, 4-teplovzdušná sterilizace, B-místnost na mytí nádobí(1-laboratorní stůl, 2- dvojité umývadlo) C-temná místnost, D-sklad chemikálií a skla, E-očkovací místnost, F a G-kultivační místnosti, H- hlavní laboratoř s chemickými stoly-1, lednicí-2, centrifugou-3 a destilačním přístrojem-4

K základnímu vybavení patří:

prostor pro mytí skla
- dřezy k mytí skla
- zařízení k sušení skla
- destilační popř. redestilační přístroj

prostor na přípravu a sterilizaci médií
- skříně ke skladování chemikálií a skla
- chemický stůl
- analytické váhy
- elektrický nebo plynový vařič popř. vodní lázeň
- pH metr
- autokláv pro sterilizaci při 121°C
- lednice
- chemické sklo - kádinky, odměrné baňky, pipety
- mezi další zařízení může patřit mikrovlnná trouba, vývěva, dávkovací zařízení, elektromagnetická míchačka, redestilační přístroj

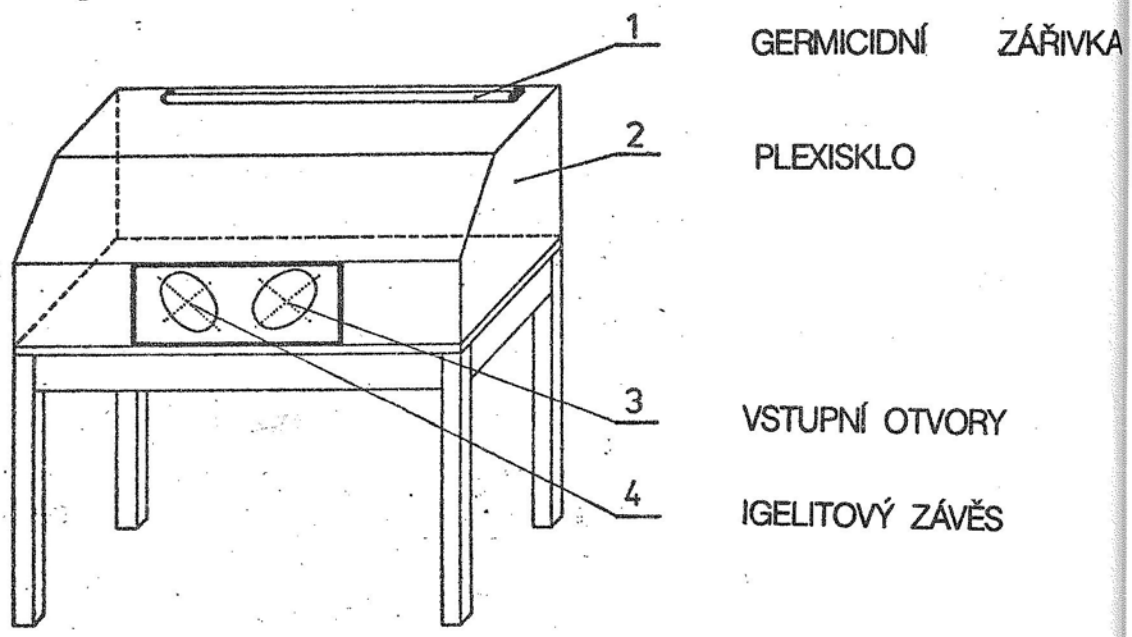
prostor pro očkování
- aseptický očkovací box - flow box
- germicidní zářivka
- preparační mikroskop
- stolní třepačka
- nástroje pro odběr a očkování explantátů
- lihový nebo plynový kahan
- vývěva

kultivační místnost
- kultivační stojany se zářivkovým osvětlením
- klimatizační jednotka
- třepačky popř. roller
- zařízení pro kultivaci ve tmě

Poznámky k zařízení laboratoře pro tkáňové kultury rostlin:

K přípravě živných roztoků je nutné používat chemikálie čistoty p.a. a jejich navážky je nutné vážit na analytických vahách. Voda používaná v laboratoři musí být vysoké kvality. Vodovodní voda není pro přípravu živných roztoků vhodná protože může obsahovat kationty (amonium, vápník, železo, hořčík, sodík atd.), anionty (bikarbonáty, chloridy, fluoridy, fosfáty atd.), mikroorganismy (řasy, houby, bakterie), plyny (kyslík, oxid uhličitý, dusík) a další nečistoty. Voda používaná pro tkáňové kultury by měla být prosta pyrogenů, plynů, organických nečistot a měla by mít menší vodivost než 1,0 umho/cm.

Očkovací box by měl být vybaven HEPA filtrem, který zachycuje nečistoty o velikosti 0,3 um s 99,97 - 99,99% účinností. Je možné používat očkovací boxy s horizontálním i vertikálním prouděním vzduchu. K očkování malého množství explantátů je dostatečný velmi jednoduchý očkovací box, který je opatřen germicidní zářivkou (obr. 2) . Očkování je možné provádět také mezi dvěma sterilními listy papíru přímo na pracovním stole.



Obr. 2. Jednoduchý očkovací box.

Kultivační místost musí mít regulovatelnou teplotu (15 -30°C ±1°C), vlhkost vzduchu (20-98% ± 3%), osvětlení do 5000 lux, programovatelnou délku fotoperiody (do 24 hodin).

K některým úkonům prováděným v laboratoři:

2.1. Mytí skla

Klasický postup mytí skla zahrnuje nejprve mytí v chromsírové směsi, poté opláchnutí ve vodě, opláchnutí v destilované vodě a nakonec opláchnutí v redestilované vodě.

Vzhledem ke korozivním účinkům chromsírové směsi je tato používána pouze v případě silně znečištěného skla. Adekvátní postup mytí skla pro tkáňové kultury zahrnuje mytí v teplé vodě (70°C) s detergenty, opláchnutí v teplé vodě a konečně opláchutí v destilované vodě a redestilované vodě. Pro silně zněčištěné sklo je místo chromsírové směsi možno použít jiné metody čištění jako je například použití ultrazvukové čističky, mytí v difosforečnanu sodném nebo vyvaření skla v metafosfátu, jejich opláchutí ve zředěném roztoku HCl a konečně opláchnutí vodou. Omyté sklo je nutné překontrolovat a nechat vyschnout v horkovzdušném sterilizátoru při teplotě 150°C (nebo pouze při běžné laboratorní teplotě přes noc dnem vzhůru), uzavřít hliníkovou fólií a uchovávat v uzavřené místnosti. Čisté sklo je také možné uchovávat neuzavřené, dnem vzhůru v dobře uzavřené laboratorní skříni.

2.2. Sterilizace

Jednou ze základních podmínek úspěšné kultivace explantátových kultur je zajištění sterility po celý průběh kultivace. Z tohoto důvodu je nezbytné zabývat se sterilitou rostlinného materiálu používaného jako explantát, sterilitou

kultivačních médií a sterilitou prostředí, ve kterém jsou tkáňové kultury realizovány. Při nedodržení sterility v některém stupni kultivace dojde ke kontaminaci kultur plísněmi či bakteriemi. Živná média používaná pro tkáňové kultury rostlin mají totiž vhodné složení pro růst těchto všudypřítomných organismů.

2.2.1. Sterilizace kultivačních místností a očkovacích zařízení

Velké kultivační místnosti popř. očkovací místnosti je nejlépe sterilizovat pomocí ultrafialového záření. Doba sterilizace je dána velikostí místnosti a je ji možné provádět pouze tehdy, nejsou-li přítomny v místnosti žádné kultury. Sterilizace se obvykle provádí v noci před dnem, kdy bude místnost využívána k očkování. Ke sterilizaci se používají germicidní zářivky, je možné použít také "horské slunce". Ultrafialové záření je nebezpečné pro oči.

Očkovací místnosti je také možné sterilizovat omytím jejich stěn bakteriocidním a fungicidním přípravkem. Očkovací boxy se sterilizují tak, že se nejprve spustí proudění vzduchu a poté se otře jeho vnitřní povrch 95% etanolem 15 minut před zahájením práce v boxu.

Kultivační místnosti mohou být nejprve umyty roztokem detergentu a poté vytřeny pečlivě 2% roztokem chlornanu sodného nebo 95% etanolem. Mytí kultivační místnosti je nutné provádět v pravidelných intervalech (týden).

2.2.2. Sterilizace nástrojů a skla

Kovové nástroje, sklo, hliníková fólie atd. mohou být sterilizovány v horkovzdušném sterilizátoru (130°-170°C) po dobu 2-4 hodin. Veškeré předměty, které se takto sterilizují je nutné zabalit popř. uzavřít (např. alobal, ne papír protože ten se spálí při 170°C).

Nástroje, které byly sterilizovány v horkovzdušném

sterilizátoru se při práci opakovaně sterilizují opálením nad plamenem kahanu po jejich předchozím ponoření do 95% etanolu. Při opalování nástrojů je nezbytné se vyvarovat jejich opětnému ponoření do etanolu ještě předtím, než na nich dohoří etanol. V případě, že se toto stane je nutné zachovat klid a uhasit hořící etanol zabráněním přístupu vzduchu.

2.2.3. Autoklávování

Sterilizace autoklávováním se provádí v autoklávu a jedná se o sterilizaci horkou parou za zvýšeného tlaku.Tento způsob sterilizace se používá pro sterilizaci vatových zátek, plastikových uzávěrů, filtrů, skla, pipet a především pro sterilizaci médií. Strerilizace se provádí při teplotě 121 ^{o}C a přetlaku 100 kPa. Délka sterilizace je u médií závislá na jejich objemu (viz níže), u ostatního materiálu se používá doba 15-20 minut.

2.2.4. Sterilizace živných roztoků

Ke sterilizaci živných roztoků se používají dvě metody: autoklávování a sterilizace filtrací. Živné roztoky, voda a další stabilní látky mohou být sterilizovány ve skleněných nádobách uzavřených uzávěrem (alobal, vata, plast).

Jak bylo uvedeno výše, živné roztoky se obvykle autoklávují při teplotě 121°C a přetlaku 100 kPa. Doba sterilizace je závislá na objemu roztoku (tab. 2). Tlak by neměl přesahovat 140 kPa protože vyšší tlak vede k rozkladu sacharidů a dalších termolabilních složek média.

Termolabilní složky živných roztoků jako jsou např. proteiny, některé vitamíny a aminokyseliny, rostlinné extrakty, gibereliny a některé cukry je nutné sterilizovat filtrací. K tomuto účelu se používají speciální membránové filtry, které mají velikost pórů menší než 0,2 um. Filtry se upevňují do filtračního zařízení a spolu s ním se

sterilizují před použitím v autoklávu. Je možné používat jednorázové filtry, které se dodávají již sterilní. Tyto filtry se rozbalí až před použitím ve flowboxu. Roztok se přes ně protlačuje injekční stříkačkou do sterilní nádoby. U složitějších filtračních zařízení se k filtraci využívá vývěvy napojené na sterilní odsávací baňku.

Média, která obsahují termolabilní sloučeniny, je možné připravit tak, že se zvlášť sterilizují jeho termostabilní složky - autoklávováním a zvlášť jeho termolabilní složky - filtrací. Roztok sterilizovaný autoklávováním se nechá ochladit na 50-60°C a ve sterilních podmínkách se do něho přidají termolabilní složky sterilizované filtrací, čímž se získá definitivní sterilní živné médium.

2.2.5. Sterilizace rostlinného materiálu

Při zakládání tkáňové kultury je nutné získat sterilní materiál, což je bez použití různých dezinfekčních postupů téměř nemožné, 95% kultur zkontaminuje pokud není rostlinný materiál sterilizován. Ke sterilizaci rostlinného materiálu není možné používat vysokých teplot a proto se používají různé dezinfekční roztoky. Přehled nejběžnějších prostředků je uveden v tab. 1 . Roztoky, které se používají ke sterilizaci, nesmí poškodit rostlinná pletiva a musí ničit plísně a bakterie. Obvyklý postup získání sterilního materiálu k založení tkáňové kultury zahrnuje : opláchnutí explantátu v roztoku detergentu (např. Tween, Jar), omytí vodou (10-30 minut), ponoření do dezinfekčního roztoku ve sterilních podmínkách, slití dezinfekčního roztoku a opláchnutí explantátu nejméně 3x ve sterilní destilované vodě. K účinější sterilizaci explantátů a vypírání dezinfekčního roztoku se nádoba s roztokem a explantátem umisťuje na třepačku.

Některý rostlinný materiál se velmi obtížně sterilizuje a je nutné např. použít opakované sterilizace - sterilizace se opakuje v intervalu 24-48 hodin a teprve poté se

explantáty očkují na živný roztok. V případě, že ani tento postup nezajistí odvození sterilní kultury a v případech, kdy se jedná o přítomnost endoparazitů, je možné k odvození sterilní kultury použít antibiotika. Antibiotika se dodávají do média primokultury.

2.3. Sterilní práce v očkovacím boxu

Při práci ve sterilním očkovacím boxu je nutné k zajištění sterilních podmínek dodržovat některé zásady:

2. V očkovacím boxu je nutné dbát na správnou manipulaci
b) s nástroji - po použití odkládat do nádoby s etanolem.
a) Omezit množství skla a dalších předmětů umístěných v boxu na minimum.

c) Umístěním kahanu , skla a dalších předmětů v boxu nebránit správnému proudění vzduchu v boxu.

4. Při práci v očkovacím boxu není možné mluvit.

3. Kultivační nádoby otevírat pouze na krátkou dobu nutnou pro naočkování kultury.

1. Před zahájením práce v boxu je nutné si opláchnout ruce mýdlem a poté dezinfekčním roztokem (např. 95% etanol). Předměty, které se přenášejí do boxu je vhodné dezinfikovat dezinfekčním roztokem z rozprašovače.

Pokud je očkovací box vybaven germicidní zářivkou není možné ji mít zapnutou v době, kdy se v boxu očkuje.

3. Kultivační média pro explantátové kultury

3.1. Složení médií

Jedním z nejdůležitějších faktorů ovlivňujících růst a morfogenezi v tkáňových kulturách rostlin je složení kultivačního média.

Média používaná jak pro kultivaci buněk, tak rostlinných pletiv či orgánů obsahují obvykle následující složky: makroelementy, mikroelementy, vitamíny, aminokyseliny nebo další zdroj organického dusíku, sacharid(y), další nedefinované organické složky, zpevňující látku a růstové regulátory. Existuje celá řada médií používaných pro různé druhy rostlin a pro různé účely kultivace. Mezi nejčastěji používaná média patří média, která popsali White (1963), Murashige and Skoog (MS, 1962), Gamborg et al (B5, 1968), Gautheret (1942), Shenk and Hildebrant (SH, 1968), Nitsch and Nitsch (1969) a Lloyd and McCown (1981). Media MS, SH a B5 jsou charakteristická vysokým obsahem makroelementů, zatímco ostatní média obsahují makroelementů podstatně méně.

3.1.1. Makroelementy

Makroelementy dodávané do kultivačních médií zahrnují šest nejdůležitějších prvků: dusík, fosfor, draslík, vápník, hořčík a síru. Optimální koncentrace každého prvku pro dosažení maximální růstové rychlosti je značně závislá na rostlinném druhu.

Kultivační médium by mělo obsahovat přinejmenším 25-60 mM anorganického dusíku. Rostlinné buňky mohou růst na médiu obsahujícím dusík pouze v nitrátové formě, ale mnohem lepšího růstu je většinou dosaženo je-li dusík do média dodáván společně v nitrátové formě a ve formě amonných solí. Redukovaná forma dusíku je pro některé druhy pro zajištění růstu v explantátové kultuře nezbytná. Redukovaný dusík se

může do média dodávat také ve formě organických sloučenin (např. aminokyseliny). Nitráty se dodávají obvykle do média v koncentraci 25-40 mM, amonium se obvykle dodává v koncentraci 2-20 mM. Dusík se do kultivačního média nejčastěji dodává ve formě dusičnanu draselného a dusičnanu amonného.

Draslík se do médií dodává ve formě dusičnanu nebo chloridu v koncentraci 20-30mM. Optimální koncentrace fosforu, hořčíku, síry a vápníku se pohybuje v rozsahu 1-3 mM.

3.1.2. Mikroelementy

Mezi mikroelementy nezbytné pro růst tkáňových kultur rostlin patří železo, mangan, zinek bór, měď a molybden. Železo a zinek se obvykle do médií dodávají v chelátové formě. Do médií se také někdy dodává kobalt, jód, sodík a chlór, ale nemusí být pro růst explantátové kultury nezbytné. Měď a kobalt se obvykle dodávají do médií v koncentraci 0,1 uM, železo a molybdén v koncentraci 1 uM, jód 5 uM, zinek 5-30 uM, mangan 20-90 uM a bór 25-100 uM.

3.1.3. Zdroj uhlíku a energie

Jako nejčastější zdroj uhlíku a energie je používána sacharóza. V některých případech je možné sacharózu nahradit glukózou či fruktózou. V kultivačních médiích byly testovány i jiné sacharidy jako laktóza, galaktóza, rafinóza, maltóza a škrob, ale většinou byly méně efektivní než sacharóza a glukóza. Obvykle používaná koncentrace sacharózy v kultivačním médiu je 2-3%.

Sacharidy se do médií dodávají z důvodu převážně heterotrofní výživy explantátů. Schopnost explantátů vyživovat se autotrofně je totiž velmi omezena.

Sacharóza přítomná v médiu může být rozštěpena na glukózu a fruktózu. K částečné hydrolýze sacharózy dochází také při

autoklávování média.

3.1.4. Vitamíny

Normální rostlina sama syntetizuje vitamíny nezbytné k jejímu růstu a vývoji. Vitamíny jsou pro rostlinu nezbytné jako katalyzátory řady metabolických procesů. Pro rostlinné buňky a pletiva kultivovaná in vitro mohou být některé vitamíny limitujícím faktorem jejich růstu. Mezi vitamíny nejčastěji používané v živných médiích patří thiamin , kyselina nikotinová, pyridoxin a myo-inositol. Thiamin se používá obvykle v koncentraci 0,1 - 10,0 mg/l. Thiamin je součástí většiny médií a je pro růst tkáňových kultur nepostradatelný. Kyselina nikotinová a pyridoxin se rovněž velmi často dodávají do kultivačních médií, ale jejich přítomnost v kultivačním médiu není tak nezbytná jako u thiaminu. Kyselina nikotinová se používá v koncentraci 0,1-5,0 mg/l, pyridoxin v koncentraci 0,1-10,0 mg/l.

Myo-inositol se vyskytuje ve většině živných médií. Jedná se o sacharid, který nemusí být pro růst explantátů nezbytný, ale může tento růst stimulovat. Předpokládá se, že myo-inositol je štěpen na kyselinu askorbovou a pektin a je inkorporován do fosfoinositidů a fosfatidylinositolu, které hrají roli v buněčném dělení. Myo-inositol se v kultivačních médiích používá v koncentraci 50-5000 mg/l.

V kultivačních médiích se někdy používají další vitamíny jako biotin, kyselina listová, kyselina askorbová, kyselina pantotenová, riboflavin atd. Jejich přítomnost v médiích však není většinou nezbytná.

3.1.5. Aminokyseliny a další zdroje organického dusíku

Přestože jsou kultivované rostlinné buňky schopny syntetizovat všechny nezbytné aminokyseliny, může přítomnost některých aminokyselin v živném médiu stimulovat růst explantátů. Aminokyseliny se dodávají do živných médií

především v případě kultivace buněčných suspenzí a protoplastů. Aminokyseliny slouží buňkám jako bezprostřední zdroj dusíku, který je v organické formě využíván rychleji než ve formě anorganické.

Dusík se v organické formě dodává do živných médií nejčastěji ve směsi aminokyselin (např. kasein hydrolyzát). Velmi často se používá také L-glutamin, L-asparagin, glycin a adenin. Kasein hydrolyzát se používá obvykle v koncentraci 0,05 - 0,1%. Pokud se dodávají aminokyseliny samotné je nutné mít na zřeteli, že mohou při vyšších koncentracích také inhibovat růst. Koncentrace aminokyselin stimulující růst závisí na druhu aminokyseliny . Nejčastěji se používá koncentrace v rozsahu 1 - 100 mg/l.

3.1.6. Nedefinované organické složky médií

Růst explantátové kultury je možné často stimulovat přidáním celé řady organických extraktů jako např. protein hydrolyzátu, kokosového mléka, kvasničného extraktu, sladového extraktu, extraktu z banánů, pomerančové či rajčatové šťávy. Použití těchto nedefinovaných směsí je však lépe pokud možno vynechat právě z důvodů jejich nedefinovaného složení. Nejčastěji se používá protein (kasein) hydrolyzát a kokosové mléko. Protein hydrolyzát v koncentraci 0,05-0,1% a kokosové mléko v koncentraci 5-20%.

Do médií se také někdy dodává aktivní uhlí, které může mít jak stimulační, tak inhibiční efekt na růst explantátů. Aktivnímu uhlí se připisují tři základní funkce v živném médiu: absorpce látek inhibujících růst, absorpce růstových regulátorů a ztmavnutí média. Inhibici růstu v přítomnosti aktivního uhlí v médiu je možné vysvětlit absorpcí růstových regulátorů aktivním uhlím. Aktivní uhlí má schopnost vázat BA, NAA, kinetin, IAA, 2iP. Stimulační účinek aktivního uhlí na růst explantátů je připisován jeho schopnosti vázat toxické fenolové sloučeniny produkované rostoucím

explantátem. Aktivní uhlí se před použitím propláchne kyselinou a zneutralizuje. Používá se v koncentraci 0,5-3,0%.

3.1.7. Látky používané pro zpevnění média

Pro přípravu tuhých médií se nejčastěji používá agar. Agar má oproti jiným gelizujícím látkám řadu výhod. Za prvé, je-li agar smíchán s vodou, dojde k vytvoření gelu při teplotě 60-100°C, který tuhne přibližně při 45°C. Agarové gely jsou tedy stabilní při teplotách používaných ke kultivaci. Agar nereaguje s ostatními složkami média a není rozkládán rostlinnými enzymy. Tuhost agarového gelu je možné regulovat použitou koncentrací agaru, druhem agaru a pH média. Agar se obvykle používá v koncentraci 0,8-1,0%.

Velmi důležitá je čistota používaného agaru. Agar obsahuje vápník, hořčík, draslík a sodík, a tak změna koncentrace agaru v médiu může změnit i koncentraci některých prvků v živném médiu. Někteří autoři také uvádí, že agar může obsahovat sacharidy a stopy aminokyselin a vitaminů. Některé nečistoty mohou být z agaru odstraněny jeho namočením do redestilované vody po dobu nejméně 24 hodin, poté propláchnutím v etanolu a vysušením při teplotě 60°C po dobu 24 hodin.

Vedle agaru je možné používat ke zpevnění média také agarózu a Phytagel a Gerlite, které představují syntetické látky. Phytagel a Gerlite se používají v koncentraci 1,25-2,5 g/l, rychle tuhnou a výsledný gel je velmi čistý a usnadňuje detekci případných kontaminací média.

V případě, že není použito pevné médium, je možné explantáty "fixovat" na můstcích z filtračního papíru, polyuretanové pěně, čedičové vatě (rockwool), perforovaném celofánu atd.

3.1.8. Růstové regulátory

Růstové regulátory používané v kultivačních médiích je možné rozdělit do čtyř základních skupin: auxiny, cytokininy, gibereliny a kyselina abscisová. O charakteru růstu explantátové kultury nerozhoduje pouze jenom koncentrace jednotlivých hormonů, ale často jejich vzájemný poměr. To platí především pro auxin a cytokinin ve vztahu k organogenezi - tvorbě kořenů či prýtů. Poměr auxinu a cytokininu, který vede k morfogenezi, závisí na druhu rostliny, kultivaru a explantátu.

Mezi auxiny používané v tkáňových kulturách rostlin patří především kyselina indolyloctová (IAA), kyselina indolyl máselná (IBA), kyselina dichlorfenoxyoctová (2,4-D) a kyselina naftyloctová (NAA). IAA představuje nativní auxin, ostatní jsou látky syntetické. Mezi další syntetické auxiny patří kyselina chlorfenoxyoctová (4-CPA), 2,4,5-trichlorfenoxyoctová kyselina (2,4,5-T), 3,6-dichlor-2-metoxybenzoová kyselina (dicamba) a 4-amino-3,5,6-trichlorpikolinová kyselina (picrolam). Různé druhy auxinů mají různou fyziologickou aktivitu, pohybují se různou rychlostí pletivy, jsou vázány na jiné receptorové buňky a jsou jiným způsobem metabolisovány. Podle ohybového testu je 2,4-D 8-12x aktivnější než IAA, 2,4,5-T 4x, PCPA a picrolam 2-4x a NAA 2x. Přestože se 2,4-D, 2,4,5-T, PCPA a picrolam používají k indukci rychlého buněčného dělení může jejich dlouhodobé používání či jejich vysoká koncentrace (zejména 2,4-D) vést k potlačení morfogenetické aktivity explantátů. Auxiny jsou v kultivačním médiu používány především za účelem stimulace růstu kalusu a buněk, v některých případech k indukci tvorby prýtů a zejména kořenů, k indukci somatické embryogeneze a stimulaci růstu apikálních meristémů.

Mezi cytokininy běžně používané v kultivačních médiích patří především benzylaminopurin (BAP, jinak benzyladenin BA), 6- dimetylaminopurin (2iP či IPA), furfurylaminopurin

(kinetin) a zeatin. Zeatin a 2iP jsou považovány za nativní cytokininy, zatímco kinetin a BAP představují syntetické cytokininy. Adenin, další nativně se vyskytující látka, má podobnou chemickou strukturu jako cytokininy a v některých případech také vykazuje cytokininovou aktivitu.

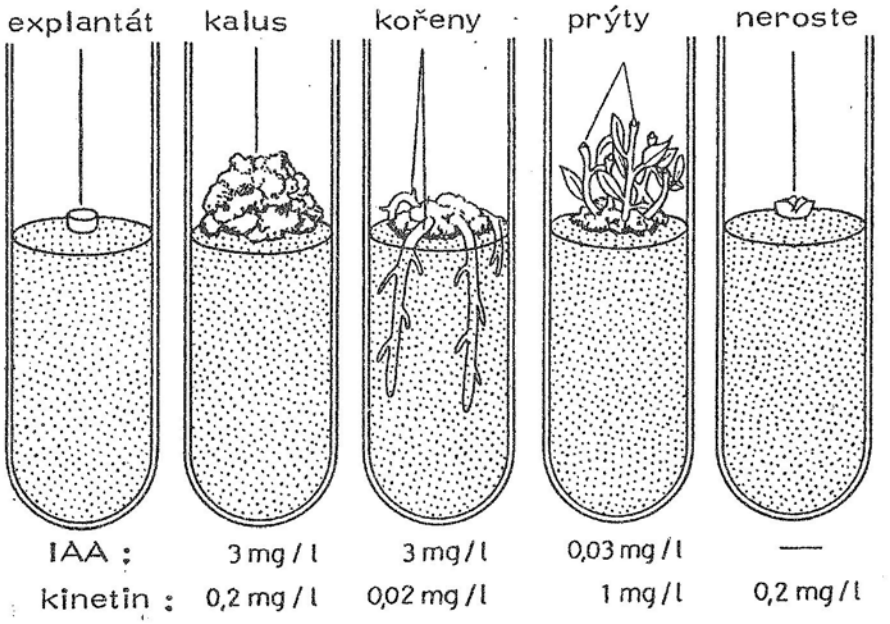
Cytokininy se používají v kultivačních médiích za účelem stimulace buněčného dělení, k indukci tvorby prýtů a inhibici tvorby kořenů.

Morfogenetická reakce v explantátové kultuře je značně závislá na vzájemném poměru auxinu a cytokininu v kultivačním médiu. Iniciace tvorby kořenů, embryogeneze a iniciace tvorby kalusu je stimulována, je-li poměr auxinu k cytokininu vysoký. Je-li tento poměr nízký, je indukována tvorba adventivních či axilárních prýtů. Např. použije-li se 0,1 až 10 $mg.l^{-1}$ kinetinu spolu s IAA v poměru 1:1, dojde v kultuře tabákové dřeně k silné proliferaci pletiva. Jakmile se zvýší poměr auxinu, dojde k tvorbě kořenů, když se naopak zvýší množství kinetinu, indukuje se tak tvorba prýtů (obr. 3).

Koncentrace auxinu a cytokininu je stejně významná jako jejich vzájemný poměr. Např. při použití 2,4-D a BAP ve stejné koncentraci dojde při koncentraci 5,0 mg/l ke stimulaci růstu kalusu u Agrostis, při použití koncentrace 0,1 mg/l je ze stejného pletiva stimulována tvorba prýtů. V obou případech je poměr mezi auxinem a cytokininem jedna, ale v prvním případě je koncentrace auxinu příliš vysoká a vyvolá tvorbu kalusu bez ohledu na přítomnost cytokininu.

Další skupinou rostlinných regulátorů, které se do kultivačních médií dodávají, jsou gibereliny (především se jedná o GA_3 a GA_7) a kyselina abscisová (ABA). Většina explantátů jejich přítomnost pro svůj růst v médiu nevyžaduje, ale u některých druhů mohou stimulovat jejich růst. GA_3 se přidává většinou do média za účelem stimulace růstu buněčných kultur při nízké hustotě suspenze, ke stimulaci růstu kalusu a ke stimulaci růstu zakrslých rostlin. Abscisová kyselina se dodává za účelem stimulace

i inhibice růstu kalusu v závislosti na rostlinném druhu, ke stimulaci proliferace prýtů a k inhibici pozdějších fází embryogeneze.



Obr. 3. Vliv různé koncentrace auxinu a cytokininu (IAA, kinetin) na vývoj explantátu tabáku. (podle JACOBA a kol. 1987)

Ve všech případech je třeba při zhotovení živného média věnovat pozornost koncentraci vodíkových iontů. Obyčejně se doporučuje pH 5,5 až 6,0, v některých případech 6,0 až 7,0. Příslušná hodnota pH se v případě potřeby upraví hydroxidem draselným, nebo kyselinou chlorovodíkovou (1M).

Chemické složení a fyzikální vlastnosti média musí odpovídat požadavkům rostliny v různých fázích rozmnožovacího cyklu. V první etapě (založení kultury) se do média přidávají někdy antioxidanty, které zabraňují aktivaci hydrolytických enzymů a hynutí explantátů. Ve druhé etapě se médium často obohacuje o látky, které stimulují tkáňovou

proliferaci. Jedná se především o vyšší koncentrace cytokininů. Ve třetí etapě množení se do média přidávají především auxiny podporující tkáňovou diferenciaci a elongační fázi růstu.

3.2. Příprava živných médií

K přípravě živných médií je nutné používat čisté sklo, vodu o vysoké kvalitě, čisté chemikálie a pečlivé, přesné navážky všech komponent média. Redestilovaná voda se používá pro přípravu médií používaných ve výzkumu. Pro komerční využití tkáňových kultur stačí používat demineralizovanou vodu. V žádném případě však není možné používat vodovodní vodu, která obsahuje velmi mnoho chemických a mechanických nečistot. Chemikálie používané pro přípravu kultivačních roztoků by měly mít čistotu p.a.. Tento požadavek nemusí byt splněn u sacharózy, kde je čistota cukru používaného v potravinářství většinou dostatečná.

Kultivační médium, jak bylo uvedeno výše, obsahuje makroelementy, mikroelementy, vitamíny, cukr a růstové regulátory. Úplné kultivační médium se připravuje většinou ze zásobních roztoků jeho jednotlivých složek. Některé firmy (SERVA, SIGMA) dodávají již připravené koncentráty médií a to buď v kapalném nebo pevném skupenství. Tyto koncentráty se rozpustí ve vodě na požadovanou koncentraci. V tomto případě se potom ze zásobních roztoků přidávají pouze růstové regulátory popř. sacharóza a agar.

3.2.1. Zásobní roztoky

Používání zásobních roztoků redukuje počet nezbytných operací nutných při přípravě kultivačních médií a tím i možnost vzniku chyb. Kromě toho však není ani technicky možné přímo např. navažovat mikroelementy, které se dodávají do médií v miligramech či mikrogramech. Příprava zásobních roztoků a jejich zředění ve finálním médiu je proto

standardním postupem. Výhodou koncentrovaných zásobních roztoků je také to, že jsou často stabilnější než roztoky zředěné.

Zásobní roztoky se připravují navážením příslušného množství chemikálie, která se nejprve v odměrné baňce rozpustí v malém množství vody, etanolu, 1M NaOH či 1M HCl. Po rozpuštění se postupně za stálého míchání přidává redestilovaná voda až po dosažení žádaného objemu roztoku. Zásobní roztoky se většinou připravují 10x až 100x koncentrované. Nádobu se zásobním roztokem je nezbytné označit nápisem označujícím její obsah, datum přípravy, popř. jméno pracovníka, který roztok připravil. Některé roztoky musí být uchovávány v tmavé láhvi (např. IAA), aby se zabránilo jejich rozkladu světlem.

3.2.1.1. Makroelementy

Zásobní roztok makroelementů se většinou připravuje 10x koncentrovaný. Je výhodné uchovávat zvlášť zásobní roztok solí vápníku, což zabraňuje jejich vysrážení. Zásobní roztoky makroelementů mohou být uchovávány ve tmě po dobu několika týdnů v lednici při teplotě 2-4°C.

3.2.1.2. Mikroelementy

Zásobní roztoky mikroelementů jsou většinou připravovány 100x koncentrované. Zásobní roztoky je opět nutné uchovávat ve tmě při teplotě 2-4°C. Zásobní roztoky je možné uchovávat poměrně dlouhou dobu (až jeden rok), ale je nutné vždy před použitím kontrolovat, zda nedošlo k vysrážení roztoku či jeho kontaminaci. Někdy se doporučuje připravit zvlášť zásobní roztok KI namísto jeho přidání do zásobního roztoku ostatních mikroelementů. Zásobní roztok solí železa se rovněž připravuje a uchovává samostatně ve tmě nebo tmavé láhvi. Nejjednodušším způsobem dodání železa do kultivačního média je přímé navážení NaFeEDTA. Příprava zásobních roztoků

železa bude popsána dále.

3.2.1.3. Vitamíny

Zásobní roztoky vitamínů se připravují koncentrované 100x nebo 1000x a uchovávají se v mrazničce (-20°C) až do doby použití. Zásobní roztoky vitamínů je možné také uchovávat v normální lednici při teplotě 2-4°C, ale je nutné je obměnit za 2-3 měsíce.

3.2.1.4. Růstové regulátory

Auxiny NAA a 2,4-D jsou považovány za stabilní a jejich roztoky je možné uchovávat při teplotě 4°C po několik měsíců. IAA je velmi nestabilní a její zásobní roztok je možné uchovávat v lednici pouze jeden týden. Nejlepší je připravovat vždy čerstvý roztok IAA. Při přípravě zásobních roztoků mohou vzniknout problémy s rozpouštěním hormonů. Zásobní roztok 2,4-D a IAA se připraví nejprve jejich rozpuštěním v malém množství 95% etanolu a poté se doplní redestilovanou vodou na patřičný objem. NAA je možné rozpustit v malém množství 1M NaOH (KOH), který také může být použit k rozpuštění IAA a 2,4-D. V případě, že se používá NaOH (KOH), je nutné před doplněním roztoku na výsledný objem upravit jeho pH na hodnotu 5,5 - 5,8.

Cytokininy jsou stabilní a je možné je uchovávat při teplotě -20°C. Zásobní roztoky cytokininů se obvykle připravují 100x až 1000x koncentrované. Většina cytokininů se špatně rozpouští ve vodě a je nutné je nejprve rozpustit v malém množství 1M NaOH nebo 1M HCl. Cytokininy je možné také rozpouštět v dimetylsulfoxidu (DMSO). DMSO působí rovněž jako sterilizační látka a zásobní roztoky cytokininů obsahující DMSO není nutné sterilizovat a je možné je přímo přidávat ke sterilnímu médiu.

3.2.1.5. Uchovávání zásobních roztoků

Některé podmínky uchovávání zásobních roztoků již byly jmenovány výše, ale je možné doplnit některé další poznatky. Ve většině laboratoří tkáňových kultur se zásobní roztoky po jejich připravení rozdělí do menších objemů, které stačí k přípravě 1 až 10 l média (podle velikosti laboratoře). Zásobní roztoky se potom uchovávají v plastikových nádobách v mrazničce ve zmraženém stavu. Při přípravě vlastních živných médií není nutné potom vždy rozmrazovat celý objem původního zásobního roztoku, ale pouze nezbytné menší množství. Takto je možné uchovávat i hotové živné roztoky 10x koncentrované. Po jejich roztavení (např. s použitím mikrovlnné trouby) se doplní jenom agar, růstové regulátory a redestilovaná voda na požadovaný objem.

3.2.1.6. Sterilizace médií

Média používaná pro rostlinné explantátové kultury se většinou sterilizují autoklávováním při teplotě 121°C a přetlaku 100 kPa. K této sterilizaci se používá autokláv. Doba sterilizace je závislá na objemu sterilizovaného média v jednotlivých nádobách. Minimální doby sterilizace pro různé objemy média jsou uvedeny v tab. 2.

Doporučuje se spíše rozlít médium do více nádob a používat tím kratší dobu sterilizace než sterilizovat větší objemy po delší dobu. Řada složek médií je totiž termolabilní a při delší době sterilizace je větší pravděpodobnost jejich rozkladu.

V poslední době se objevují možnosti sterilizovat menší objemy média v mikrovlnné troubě, ale tento způsob není hojně používán. V běžně dostupných mikrovlnných troubách je totiž dosaženo varu v jednotlivých nádobách v jinou dobu a je proto obtížné naráz sterilizovat větší počet nádob. Doba sterilizace se pohybuje v tomto případě 2-4 minuty.

Tab. 2. Minimální doba sterilizace pro příslušný objem kultivačního média v kultivační nádobě (121 °C, 100 kPa).

Objem média v jedné kultivační nádobě (ml)	Minimální doba sterilizace (min)
20 - 50	15
75	20
250 - 500	25
1000	30
1500	35
2000	40

Některé složky médií však jsou velmi termolabilní a není je možné sterilizovat autoklávováním. Mezi termolabilní komponenty živných médií patří fruktóza, glukóza, kalcium pantotenát, gibereliny, riboflavin, kyselina listová, močovia, asparagin, adenin sulfát a enzymy používané k izolaci protoplastů. Zásobní roztoky těchto látek se sterilizují filtrací a ve sterilním prostředí se pipetují sterilní pipetou do média, které se ochladilo na 45 - 50°C. Ke sterilizaci filtrací se používají membránové nebo skleněné filtry o velikosti pórů 0,22 um. Přes tyto filtry se zásobní roztok látky filtruje do sterilní nádoby. Ke sterilizaci filtrací se používají jednorázové filtry, které se nasazují na stříkačku nebo se roztoky mohou filtrovat pomocí složitějšího filtračního zařízení napojeného na vývěvu.

3.2.1.7. Používaná kultivační média

V literatuře byla popsána celá řada kultivačních médií, která jsou označována podle jejich autorů. Cílem tohoto textu není podat úplnou informaci o všech publikovaných médiích a proto bude uvedeno složení (tab. 3) a příprava těch nejznámnějších. Přehled většiny používaných kultivačních médií a jejich složení uvádí např. Conger (1981), George and Sherrington (1984), George et al (1987), Herman (1991).

MS (Murashige and Skoog, 1962) nebo LS (Lindsmaier and Skoog, 1965) médium se používá velmi často, zejména tehdy, kdy je cílem kultivace regenerace rostlin. B5 médium a jeho různé deriváty se používá především pro kultivaci protoplastů a buněčných suspenzí. Je však také často používáno pro regenerace rostlin. Hlavní rozdíl mezi MS a B5 médiem je mnohem nižší obsah dusíku, zejména nitrátu, v B5 médiu. Médium N6 bylo odvozeno pro prašníkové kultury obilovin (Chu, 1978) a je u obilovin využíváno s úspěchem i v ostatních typech tkáňových kultur.

3.2.1.8. Příprava některých kultivačních médií

Pro vlastní přípravu kultivačních médií se používá pro totéž médium často několik postupů. Budou uvedeny pouze některé postupy přípravy médií MS (tab. 4, 5).

Tab. 3. Složení vybraných kultivačních médií .

Sloučenina	Množství (mg/l)				
	MS	B5	N6	SH	White
makroelementy					
$MgSO_4.7H_2O$	370	250	185	400	74
KH_2PO_4	170	-	400	-	12
$NaH_2PO_4.H_2O$	-	150	-	-	-
KNO_3	1900	2500	2830	2500	81
NH_4NO_3	1650	-	-	-	-
$CaCl_2.2\ H_2O$	440	150	166	200	-
$(NH_4)\ SO_4$	-	134	463	-	-
$Ca(NO_3)_2$	-	-	-	-	142
KCl	-	-	-	-	65
mikroelementy					
H_3BO_3	6,2	3	1,6	5	-
$MnSO_4.H_2O$	15,6	10	3,3	-	-
$ZnSO_4.7H_2O$	8,6	2	1,5	1	-
$NaMoO_4.2H_2O$	0,25	0,25	-	0,1	-
$CuSO_4.5H_2O$	0,025	0,02	-	0,2*	-
$CoCl_2.6H_2O$	0,025	0,02	-	0,1	-
KI	0,83	0,75	0,8	1	-
$FeSO_4.7H_2O$	27,8	-	27,8	15	-
Na_2EDTA	37,3	-	37,3	20	-
EDTA Na ferric salt	-	43	-	-	-
$Fe_2(SO_4)_3$	-	-	-	-	2,46
sacharóza(g)	30	20	50	30	20
vitamíny					
thiamin HCl	0,5	10	1	5	-
pyridoxin HCl	0,5	1	0,5	0,5	-
kyselina nikotinová	0,05	1	0,5	5	-
kvasnicový extrakt	-	-	-	-	100
myo-inositol	100	100	-	1000	-
pH	5,8	5,5	5,8	5,9	5,8

Tab. 4. Příprava MS média (varianta 1, Helgeson 1979).

Zásobní roztoky	příprava 1 litru
zásobní roztok A NH_4NO_3 82,5g/l	do litrové kádinky na magnetické míchačce nalijte asi 500 ml RDV
	navažte a přidejte 30g sacharózy
zásobní roztok B KNO_3 95g/l	navažte, rozpusťte a přidejte: myo-inositol 100,0mg thiamin-HCl 0,1mg pyridoxin-HCl 0,5mg glycin 2,0mg kys. nikotinová 0,5mg
zásobní roztok G $Na_2EDTA.2H_2O$ 1,865g/l $FeSO_4.7H_2O$	
	přidejte 20 ml zásobního roztoku A, B, G
zásobní roztok C $CaCl_2.2H_2O$ 88g/l	
	přidejte 5ml zásobního roztoku C, D, E a F
zásobní roztok D KH_2PO_4 34g/l	
	navažte , rozpusťte a přidejte přímo auxin nebo cytokinin
zásobní roztok E H_3BO_3 1,24g/l $Na_2MoO_4.2H_2O$ 0,05 $CoCl_2.6H_2O$ 0,005 KI 0,166	
	doplňte roztok na 900ml a upravte pH na 5,8
	slijte médium do odměrné baňky a doplňte na 1 litr nebo o něco méně
zásobní roztok F $MnSO_4.H_2O$ 3,38g/l $MgSO_4.7H_2O$ 74,0 $CuSO_4.5H_2O$ 0,005 $ZnSO_4.7H_2O$ 1,725	
	přelijte médium do 2l EM baňky, přidejte 10g agaru zahřívejte médium při 100°C v autoklávu 25 minut
	nechte ochladit na 90°C a promíchejte
	slijte autoklávujte
	po vychladnutí přidejte termolabilní sloučeniny a doplňte na 1 litr
	autvujte rozlijte

zkratky:
RDV - redestilovaná voda
EM - Erlenmeyerova

Tab. 5. Příprava 1 litru MS média (varianta 2).

makroelementy	mg/1000 ml
$MgSO_4.7H_2O$	3700
KH_2PO_4	1700
KNO_3	16500
NH_4NO_3	19000
$CaCl_2.2\ H_2O$	4400

mikroelementy I	mg/100ml
H_3BO_3	62
$MnSO_4.H_2O$	156
$ZnSO_4.7H_2$	86

mikroelementy II	mg/100ml
$NaMoO_4$.	25
$CuSO_4.5H_2O$	2,5
$CoCl_2.6H_2O$	2,5
KI	8,3

železo	mg/100ml
$FeSO_4.7H_2O$	556
Na_2EDTA	746

thiamin HCl	50mg/100ml

do litrové kádinky nalijte asi 500ml RDV, přidejte 10g agaru a dejte agar rozvařit

do litrové kádinky na magnetické míchačce nalijte asi 200 ml RDV

přidejte 100 ml zásobního roztoku makroelementů

pipetujte 10 ml zásobního roztoku mikroelementů I

pipetujte 1 ml zásobního roztoku mikroelementů II

pipetujte 5 ml zásobního roztoku železa

pipetujte 0,2 ml zásobního roztoku thiaminu

navažte a přidejte:
sacharóza 30 g
myo-inositol 100 mg

ze zásobních roztoků pipetujte růst. regulátory

slijte médium do odměrné baňky 1 litr a přilijte rozvařený agar, doplňte na téměř 1 litr

upravte pH na 5,8

doplňte na 1 litr

rozlijte do kultiv. nádob

autoklávujte

Zásobní roztok železa se připraví tak, že se nejprve rozpustí jednotlivě obě soli ($FeSO_4.7H_2O$ a Na_2EDTA) v malém množství RDV (15 - 20 ml). Potom se oba roztoky slijí a zahřívají na elektromagnetické míchačce za stálého míchání do té doby, dokud nemá roztok hnědožlutou barvu. Potom se roztok doplní na 100ml v odměrné baňce.

4. Explantátové kultury a jejich využití k mikropropagaci rostlin

K tradičním způsobům vegetativního množení rostlin se v posledních desetiletích řadí metoda tkáňových kultur - tzv. mikropropagace. Mikropropagace má oproti běžněji používaným postupům makropropagace rostlin řadu výhod:

1) Kultura se odvozuje z velmi malých částí rostlin (explantátů) na nichž regenerují malé rostliny. Tato metoda vyžaduje tedy málo prostoru k produkci velkého počtu rostlin. Např.Mc COWN and LlOYD (1982) uvádí pro rododendron možnost produkovat 75 000 rostlin z m^2 kultivační plochy za rok, SECKINGER and AMOS (1982) uvádí pro růži 20 - 100 000 rostlin.

2) Rozmnožování se provádí ve sterilních podmínkách. Jakmile je tedy kultura in vitro odvozena, nedochází zde při množení k úhynu rostlin v důsledku onemocnění a odvozené rostliny jsou prosté bakteriálních a houbových nákaz.

3) Metoda je aplikovatelná na produkci bezvirózních rostlin. Je-li k založení kultury použit bezvirózní materiál, budou i regenerované rostliny bezvirózní. V kultuře in vitro je také možné úpravou kultivačních podmínek virové částice přítomné v explantátu eliminovat. Produkce viruprostých rostlin a rostlin prostých jiných patogenů usnadňuje mezinárodní výměnu rostlin vzhledem k sanitárním opatřením jednotlivých států.

4) Podmínky množení jsou přesně definovány a jednotlivé faktory ovlivňující rozmnožování je možné za účelem zvýšení koeficientu množení přesně regulovat. Rychlost mikropropagace je proto mnohem vyšší, než u tradičních metod. Např. průměrná teoretická výtěžnost meristémových kultur je 10^6 rostlin za rok z jednoho původního explantátu.

pro vinnou révu uvádí např. NOZERAN anda BANCILHON (1972) 10^6, pro olši GARTON et al. (1981) 10^9 rostlin a HUSSEY (1978) $6x10^4$ rostlin cibule.

5) Je možné produkovat některé klony či některé druhy rostlin, které se tradičními metodami vegetativního množení množí velmi pomalu nebo vůbec. Cena rostlin produkovaných mikropropagací může být potom srovnatelná s cenou rostlin množených tradičními postupy.

6) V porovnání s klasickými metodami klonového množení je možné klonování in vitro provádět celoročně bez ohledu na meteorologické podmínky.

7) Vzhledem k malé velikosti výchozího rostlinného materiálu nejsou kladeny velké nároky na skleníkové plochy pro uchovávání matečných rostlin.

8) Rostliny in vitro v období mezi pasážemi nevyžadují prakticky žádnou péči jako např. zálivku, pletí, chemické ošetření, atd.

9) V in vitro kultuře je možné dosáhnout rejuvenilizace, což je např. jedním z předpokladů klonování dřevin.

10) In vitro kultury je možné uchovávat dlouhou dobu při nízké teplotě a v prostředí prostém patogenů což je možné využívat k uchovávání výchozího matečného materiálu bez velkých nároků na prostor a pracnost. Kultivace při nízké teplotě umožňuje také rovnoměrně načasovat celý produkční systém na jednotlivá období roku.

11) Mikropropagace umožňuje vzhledem k vysokým koeficientům množení zkrátit šlechtitelský cyklus a rychlé namnožení nově vyšlechtěných odrůd.

12) In vitro systém umožňuje genetické manipulace, které jsou významné z hlediska novošlechtění rostlin.

Mezi hlavní nevýhody mikropropagace patří především relativně drahé laboratorní vybavení a poměrně vysoká pracnost metody, která zatím neumožňuje využití mechanizace v průběhu jednotlivých fází kultivace. Další nevýhodou je poměrně drahý provoz laboratoře explantátových kultur (energie, chemikálie atd.)

Jako problematické se může také jevit:

a) získané rostliny nejsou v in vitro kultuře autotrofní.

b) množení probíhá v kultivačních nádobách při vysoké relativní vlhkosti a odvozené rostliny je nutné při přenosu z kultivačních nádob do podmínek extra vitrum (např. do skleníku) aklimatizovat. (Při relativně vysoké vlhkosti se projevuje u in vitro kultivovaných rostlin tzv. vitrifikace - rostliny nemají vyvinuté průduchy, nebo tyto nefungují, není vytvořena vosková vrstva kutikuly atd.)

c) existuje určité nebezpečí vzniku geneticky aberantních rostlin.

Metody teoreticky použitelné k mikropropagaci znázorňuje obr. 4.

Jedná se v podstatě:

1) o množení rostlin indukcí tvorby prýtů z axilárních (úžlabních) pupenů

2) o tvorbu adventivních prýtů nebo adventivních somatických embryí buď:

a) přímou morfogenezí, při které výše uvedené struktury vznikají přímo na částech orgánu, nebo pletiv

b) nepřímou morfogenezí, kdy uvedené struktury vznikají z kalusového pletiva, nebo v suspenzní kultuře

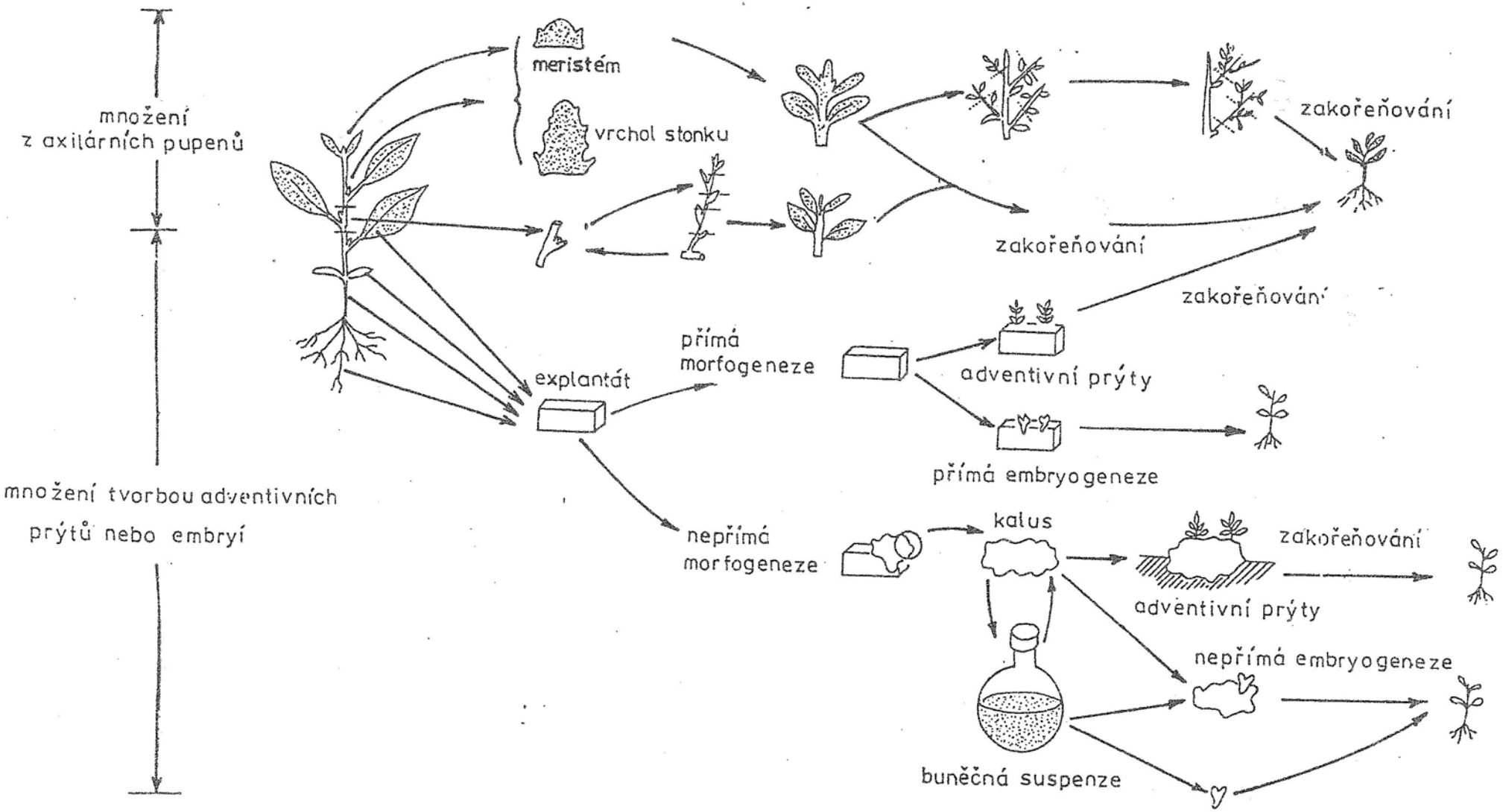
4.1. Produkce rostlin z axilárních pupenů

Tato metoda představuje nejrozšířenější metodu kultivace in vitro. Její varianty představuje metoda kultivace vzrostných vrcholů a metoda kultivace jednonodálních stonkových segmentů. Obě jsou založeny na stimulaci růstu axilárních pupenů při potlačení apikální dominance.

4.1.1. Metoda kultivace vzrostných vrcholů

Hovoříme-li o kulturách vzrostných vrcholů, rozumíme tím kultivaci apikální části stonků (resp. kořenů), která se skládá z vlastní meristematické zóny vrcholu a několika listových primordií (základů). Explantáty používané k mikropropagaci mají velikost 0,5-3 mm.

V podmínkách in vitro je možné kultivovat i samotnou meristematickou zónu. Potom je velikost primárního explantátu mnohem menší (0,1-0,5 mm). Tohoto způsobu kultivace se však používá spíše pro teoretická studia a při ozdravování kultur. Klonové množení založené na kultivaci apikálních částí stonků vychází z toho, že v úžlabí listů (listových základů) dochází za určitých podmínek k zakládání postranních větví z axilárních pupenů. Jejich zakládání je však většinou inhibováno v důsledku apikální dominace. V kulturách in vitro je však možné vliv apikální dominace zrušit, přidá-li se do kultivačního média vhodné množství cytokininu. Tím dochází k rychlému prorůstání postranních stonků, které mohou být po jejich izolaci a přenesení na médium podporující prodloužení a diferenciaci orgánů dopěstovány v normální rostliny.



Obr. 4. Metody mikropropagace rostlin.
(Upraveno podle GEORGEHO a SHERRINGTONA 1984.)

Jakmile dojde k vytvoření axilárních prýtů je možné jejich vrcholy izolovat a pasážovat opět na médium s cytokininy, a tak zajistit množení kultury. Jakmile je vytvořeno dostatečné množství prýtů je možné proces axilárního větvení zastavit pasážováním prýtů na médium s nižším obsahem cytokininů (popř. bez cytokininů) a s vyšším obsahem auxinů a dosáhnout jejich zakořenění popř. po aplikaci auxinu zakořeňovat prýty in vivo.

Metoda axilárního větvení je relativně jednoduchá, poměrně bezpečná a velmi často používaná. Pokud nedojde k tvorbě adventivních prýtů, nedojde většinou ke vzniku mutantů. Tvorba adventivních prýtů je ve většině případů nežádoucím vedlejším účinkem vysoké koncentrace cytokininů používané ke stimulaci axilárního větvení.

Předpokládá se,že vzrostné vrcholy, které byly izolovány z adultních rostlin postupně přecházejí opakovaným axilárním větvením v juvenilní stádium (rejuvenilizace). Rejuvenilizace se projevuje ve schopnosti prýtů tvořit kořeny. Prýty odvozené v primokultuře totiž většinou obtížně zakořeňují a po několika pasážích se schopnost tvořit kořeny zvyšuje. Rejuvenilizace však doposud nebylo tímto způsobem dosaženo u většiny dřevin. Pomocí izolovaných vzrostných vrcholů a axilárního větvení je možné množit celou řadu druhů rostlin z nichž je možné pouze jako příklad uvést jahodník, chrysantému, hvozdík, gladiolus, pelargónii, fuchsii, růži, jabloň atd. Přehled problematiky o druzích množených v explantátové kultuře axilárním větvením uvádí např. George and Sherrington (1984), Pierik (1991), Bajaj (1986, 1988).

4.1.2. Metoda kultivace jednonodálních segmentů

Nejčastěji používanou , nejjednodušší a bezpečnou metodou klonování in vitro je metoda kultivace jednonodálních stonkových segmentů. Při této metodě se jako výchozí materiál používá nevětvených prýtů, tvořených několika

nodálními úseky odvozených in vitro. Prýt se rozřeže na jednonodové úseky, z nichž každý nese alespoň jeden axilární pupen, listy se obvykle odříznou. Axilární pupen(y) nodálních segmentů dávají za vhodných kultivačních podmínek vznik novým prýtům, které jsou potom zakořeněny in vitro nebo in vivo.

Tato metoda je obtížně použitelná pro rostliny tvořící přízemní růžici, protože se velmi nesnadno odvozuje sterilní kultura. Druhy, které tvoří protáhlý stonek s listy a pupeny v jejich úžlabí se tímto způsobem množí relativně snadno. Nově vytvořené prýty jsou při této metodě opakovaně rozřezávány na nodální segmenty až po dosažení žádaného počtu prýtů. Apikální část může být zakořeněna. Rychlost mikropropagace je u této metody závislá na počtu nodů (listů) vytvořených za určitou časovou periodu.

Tato metoda představuje nejpřirozenější metodu mikropropagace. Metoda je rovněž velmi bezpečná z hlediska genetické stability regenerantů, protože není porušena integrita rostliny (meristémů a pupenů). Je možné říci, že tato metoda je velmi úspěšná u bylin. U dřevin vznikají často komplikace spojené s dormancí pupenů a prodlužováním prýtů (internodií).

4.2. Množení přímou morfogenezí

4.2.1. Přímá tvorba adventivních pupenů

Třetí důležitou metodou používanou k mikropropagaci je metoda založená na indukci tvorby adventivních pupenů resp. prýtů. Podstatou metody je vznik pupenů resp. prýtů z předem nediferencovaných struktur typu axilárních či apikálních pupenů. Adventivní pupeny vznikají z buněk explantátu (list, řapík, stonek, oddenek, šupina cibule atd.) po jejich dediferenciaci. Adventivní pupeny dávají vznik adventivním prýtům, které je možné množit buď stejným způsobem nebo nodálními segmenty nebo pomocí axilárního větvení.

Pokud je možné snadno indukovat tvorbu adventivních pupenů, je tato metoda velmi atraktivní pro komerční využití, protože koeficient množení u této metody je většinou větší než u metod předchozích. Počet druhů, které jsou schopny regenerovat adventivní prýty, je však relativně nízký a většinou se jedná o byliny. Tvorba adventivních pupenů je poměrně vzácná u dřevin, zejména jsou-li v adultní fázi vývoje.

Největší nevýhodou metody tvorby adventivních pupenů je oproti předchozím metodám podstatně vyšší pravděpodobnost tvorby mutantních regenerantů, zejména pokud vznikají z jedné buňky nebo pokud matečná rostlina byla chiméra.

Tvorbou adventivních pupenů se úspěšně množí např. lilie, africká fialka, begónie, hyacint atd.

Tvorba adventivních pupenů může být stimulována cytokininy i auxiny v závislosti na druhu, kultivaru popř. výchozím explantátu. Většina druhů, které tvoří adventivní pupeny vyžaduje k tvorbě adventivních pupenů cytokinin popř. jeho kombinaci s nízkou koncentrací auxinu. Lilie a hyacint představují rostliny, kde je tvorba adventivních pupenů stimulována auxinem.

K indukci adventivních pupenů je možné použít kousků pletiv a orgánů. Po umístění explantátu na živné médium dochází za určitých podmínek k prorůstání těchto pupenů v nové rostliny. Výtěžnost tohoto způsobu rozmnožování je velmi vysoká. Na explantátu nemusí vždy vznikat rostliny, ale mohou se přímo vyvíjet rozmnožovací částice, např. cibulky. Tento jev můžeme pozorovat např. u lilií.

4.2.2. Přímá embryogeneze

Tento způsob množení je charakterizován přímým vznikem somatických embryí na primárních explanátech. Embrya vznikají z pletiv označovaných jako pre-embryogeneticky determinovaná. Jedná se např. o pletiva zygotických embryí,

děloh klíčních rostlin, hypokotylu klíčních rostlin atd. Tento způsob množení byl popsán např. u vojtěšky, vinné révy, mrkve, citrusů, petržele atd.

4.3. Množení nepřímou organogenezí

Tato metoda je charakteristická vznikem kořenů, stonků, popř. celých rostlin z neorganizovaného kalusového pletiva. Protože tyto orgány nevznikají z původního pletiva mateřské rostliny označuje se tato organogeneze jako nepřímá. Množení probíhá v několika etapách:

a) Odvození kalusu

Kalus představuje soubor nediferencovaných buněk. U většiny dvouděložných bylin je možné odvodit kalus z různých explantátů jako např. ze segmentu listů, stonků, kořenů, kousků zásobních orgánů, vzrostných vrcholů, embryí atd. U jednoděložných je výběr pletiv vhodných k odvození kalusu menší. Je možné použít embrya, velmi mladé listy, nodální segmenty stonků, popř. květní základy. Ještě problematičtější je odvození kalusu u dřevin.

Růst kalusu je ve většině případů indukován umístěním explantátu na médium s relativně vysokou koncentrací auxinu (1-10 mg/l) v přítomnosti nižší koncentrace cytokininu. Kalus může být použit k odvození suspenzní kultury v tekutém médiu po jeho umístěním na třepačku. Hlavní výhodou suspenzních kultur je velmi rychlý růst buněk, což je způsobeno jejich lepším kontaktem s živným médiem . Z hlediska mikropropagace rostlin je nevýhodné, že kalusová kultura s opakovanými pasážemi ztrácí morfogenní schopnost a stoupá u ní pravděpodobnost genetických změn.

Kalusové kultury se v poslední době začínají používat i k propagaci některých lesních dřevin, zejména konifer. U těchto rostlin je velmi silná tendence k uchování diploidního stavu v buňkách, což umožňuje eliminaci změn

karyotypu rostlin regenerovaných z kalusu. Normální rostliny byly např. odvozeny z kalusu smrku, který byl kultivován déle než jeden rok (DURZAN and GUPTA 1988).

b) Organogeneze v kalusové kultuře

Vytvořený kalus resp. buňky suspenzní kultury jsou přeneseny na médium s nižší koncentrací auxinu a dochází k vytvoření orgánových základů. Významná je především produkce prýtů, protože kořeny, které v kalusové kultuře vznikají nemají většinou vaskulární spojení s prýty. Proto často musí následovat třetí fáze - zakořeňování. Je realizována buď ve sterilních podmínkách nebo jsou prýty po aplikaci auxinu na jejich bázi přeneseny do nesterilního substrátu.

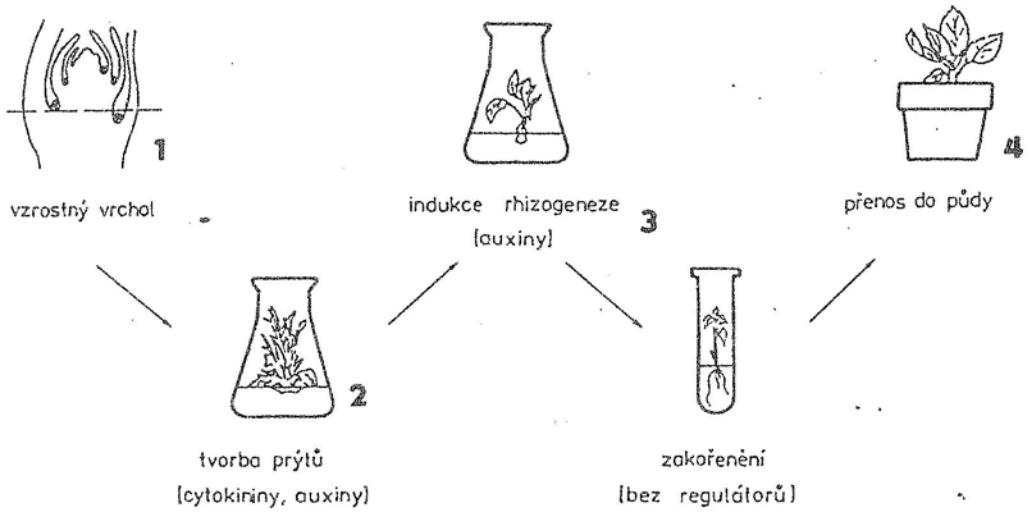
Proces mikropropagace cestou organogeneze je možné rozdělit do několika základních stádií (obr. 5).

1) Odběr materiálu a založení kultury. V tomto stádiu je nutné získat explantáty prosté infekce a zabezpečit jejich správný růst v umělých podmínkách.

2) Vlastní mikropropagace. V tomto stádiu dochází ke stimulaci maximální proliferace (dělení) explantátové kultury a ke vzniku základů prýtů.

3) Diferenciace jednotlivých orgánů. Zde je nutné zabezpečit normální rozvoj kořenové soustavy a tím připravit rostliny pro přenos do zeminy.

4) Přenos rostlin do zeminy. Jedná se o velmi důležité stádium, při které je nutné zvýšit odolnost rostlin k patogenům a dalším negativním vlivům vnějšího prostředí. Před přenesením rostlin do půdy jsou tyto kultivovány při vyšší světelné intenzitě, zvýšené vlhkosti vzduchu a snížené teplotě.



Obr. 5. Stádia mikropropagace přímou organogenezí.

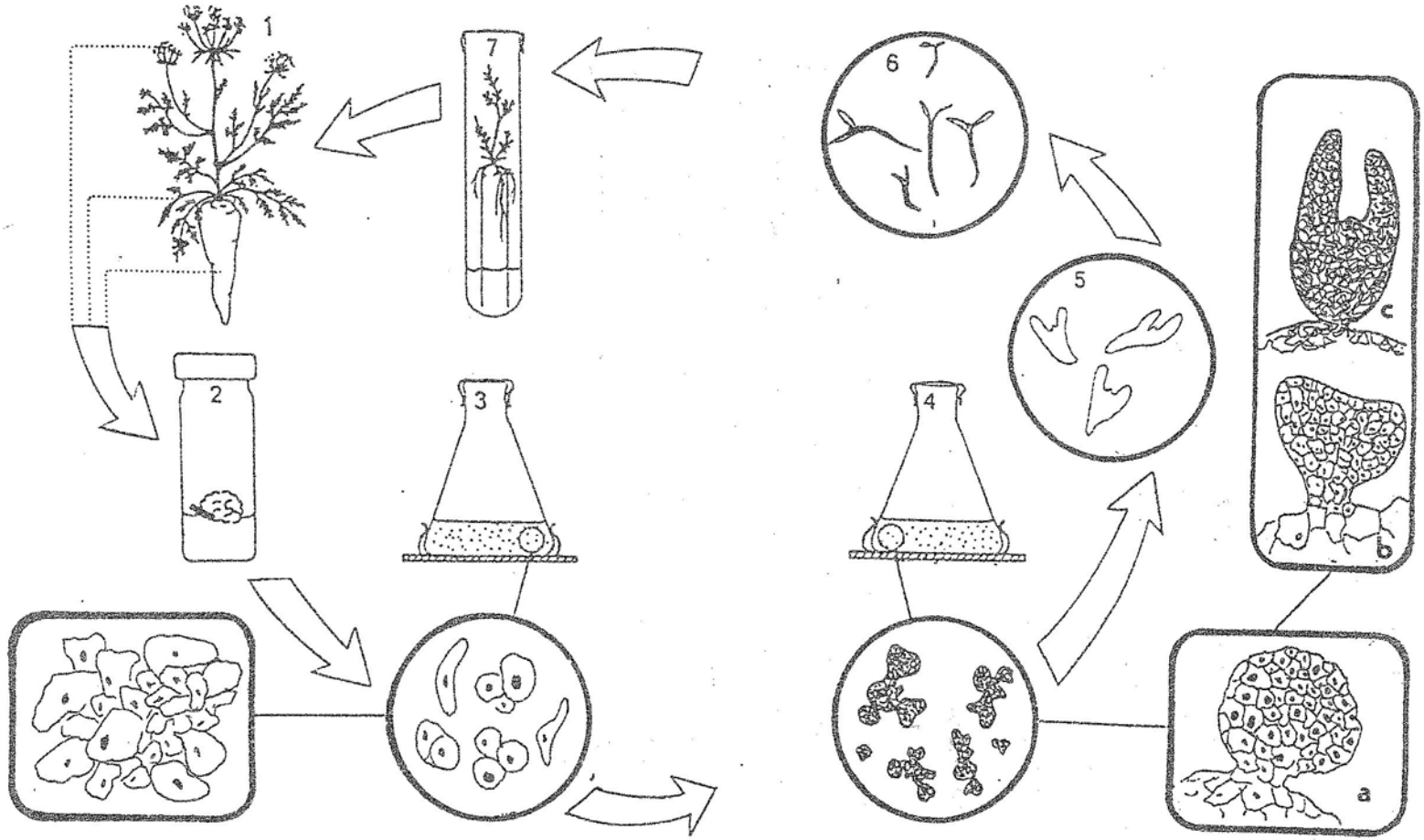
4.4. Množení rostlin nepřímou somatickou embryogenezí

Somatická embryogeneze je proces, při kterém vzniká úplná rostlina (resp. embryo) z jiné buňky než z oplozeného vajíčka resp. zygoty. Při tomto způsobu množení je nejprve nutné z diferencovaného pletiva odvodit tzv. embryogenní kalus, který je tvořen malými, cytoplazmou bohatými buňkami. Indukce embryogenního kalusu se většinou dosahuje kultivací primárního explantátu na médiu s vysokou koncentrací auxinu (nejpoužívanější je 2,4-D). Pro odvození embryogenního kalusu jsou většinou vhodná mladá (juvenilní) pletiva jako např. endosperm, zygotická embrya, květní primordia, části klíčních rostlin, prašníky, pylová zrna atd. Další vývoj embryí z embryogenních buněk probíhá většinou na médiu neobsahujícím auxin. Pro vývoj somatických embryí je

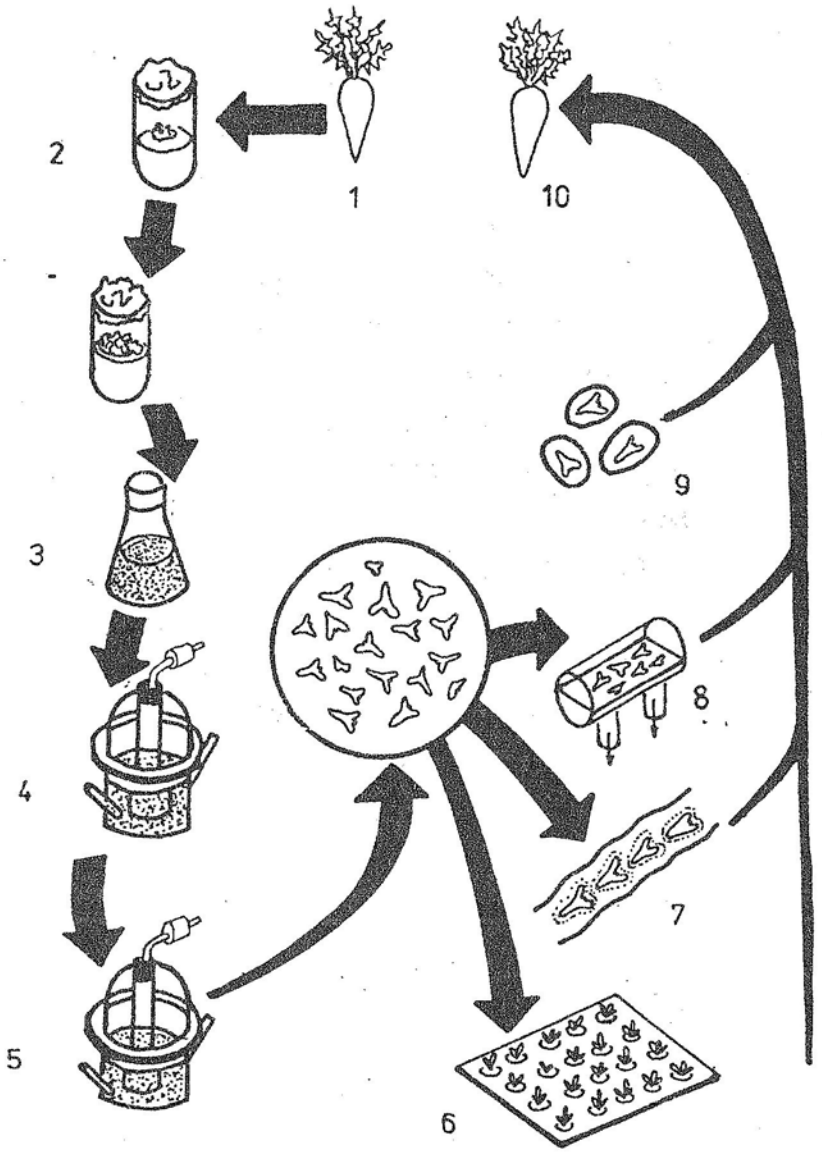
významná také přítomnost dusíku v redukované formě (často se do média přidávají aminokyseliny, kokosové mléko či kasein hydrolyzát). V některých případech se pro normální vývoj somatických embryí přidává kyselina abscisová (ABA). Somatická embrya během svého vývoje procházejí stejnými vývojovými fázemi jako embrya zygotická (obr. 6).

První somatická embrya byla odvozena v suspenzních kulturách mrkve v roce 1958 STEWARDEM. Zdá se, že tvorba somatických embryí je druhově specifická. Zatímco se využívá tkáňových kultur k množení asi 3 000 druhů rostlin, byla somatická embryogeneze popsána asi u 130 rostlinných druhů patřících do 32 čeledí.

Somatická embryogeneze i přes svá úskalí představuje velmi perspektivní metodu množení rostlin. Např.z jednoho gramu buněčné suspenze mrkve je možné získat až 1 000 somatických embryí, z 5 ml suspenze smrku získal DURZAN a GUPTA (1988) 285 rostlin. Proces somatické embryogeneze představuje do budoucna ve spojení se suspenzní kulturou velmi perspektivní metodu vegetativního množení rostlin. Suspenzní kultury jsou totiž vhodné pro využití bioreaktorů a somatická embrya pro produkci umělých semen, což by umožnilo zavedení mechanizace do celého procesu množení (obr.7).



Obr. 6. Proces nepřímé somatické embryogeneze u mrkve.
Z matečné rostliny (1) se odvodí kalusová kultura (2) umístěním explantátu na médium obsahující 2,4-D, kalus se umístí do tekutého média (opět s 2,4-D) na třepačku, kde vznikne buněčná suspenze (3). Buněčná suspenze je přenesena na médium bez 2,4-D, kde dojde k tvorbě somatických embryí (4 - 5). Somatická embrya mohou být dopěstována v normální rostliny (6 - 7). Obrázek také znázorňuje stadia vývoje embrya
a - globulární, b - srdcovité, c - torpédovité



Obr. 7. Schéma mikropropagace rostlin somatickou embryogenezí při využití bioreaktoru. Nejprve se vybere vhodná mateřská rostlina (1), z níž je odebrán explantát,

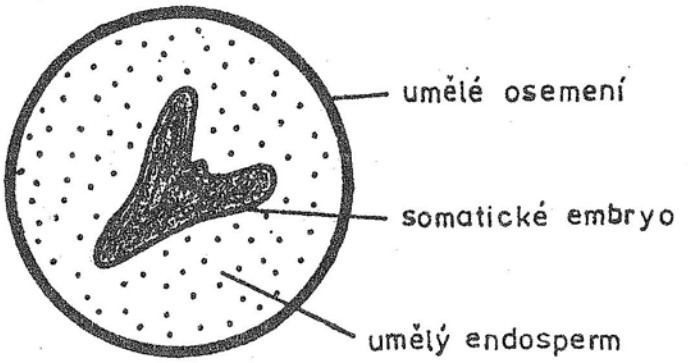
který je použit k založení explantátové kultury (2). Vzniklé kalusové pletivo je přeneseno do tekutého média na třepačku, kde dojde k odvození buněčné suspenze (3). Buněčná suspenze je dále kultivována v bioreaktoru v médiu obsahujícím auxin, který podporuje dělení buněk bez jejich následné diferenciace (4). Část buněčné suspenze je poté přenesena do bioreaktoru, který obsahuje médium bez auxinu (5), což vede k tvorbě somatických embryí z jednotlivých buněk suspenze nebo z malých buněčných agregátů. Po vytvoření dospělých somatických embryí je možné tyto dopěstovat v kultuře v malé rostliny, které se přenesou do půdy (6), což je postup neumožňující použití mechanizace. Perspektivnější je využití "výsevu" somatických embryí metodou tzv. tekutého výsevu (anglicky fluid drilling), kdy se embrya vysévají v gelové hmotě na povrch půdy (8). Obdobou této metody je vysévání somatických embryí uzavřených v určitém gelu neseným vysévacím páskem (7) (anglicky seed tape technology). Velmi perspektivní je uzavírání somatických embryí do umělých semen (9). Ze somatických embryí vznikají potom dospělé rostliny (10), které mají stejné vlastnosti jako rostlina mateřská. (Upraveno podle STEYERA 1984).

4.4.1. Umělá semena

Techniky používané k produkci rostlin tkáňovými kulturami mají některé nevýhody v porovnání s tradičními postupy vegetativního množení rostlin. Mezi největší z nich patří zatím malá možnost použití mechanizace a automatizace při manipulaci s rostlinami v průběhu celého produkčního procesu. Tento problém může být v budoucnu řešen produkcí umělých semen.

Umělá semena je možné získat uzavřením somatických embryí do ochranného obalu. V současné době se používají především hydrogely, z nichž nejvýznamnější je alginát sodný, který se získává z hnědých řas. Somatická embrya se suspendují

v alginátu sodném, který se spolu s nimi nechá kapat do roztoku chloridu vápenatého. Výsledkem je vznik průhledných kuliček (asi 4 mm velkých), v nichž je uzavřeno embryo (obr.8).



Obr. 8. Schématické znázornění umělého semene.

Kolem embrya tak vznikne gelovitý obal, který zabraňuje mechanickému poškození embrya a po přidání dalších komponent může obalový gel sloužit jako umělý endosperm umožňující klíčení embrya. Tento "endosperm" může být obalen umělým osemením zajišťujícím mechanickou ochranu, zabraňující vysušení semene a umožňující použití běžných secích strojů při jejich vysévání. Vedle hydratovaných umělých semen se používají tzv. suchá umělá semena nebo vysušená somatická embrya neopatřená obalem.

Největší problémy, doposud bránící komerčnímu využití umělých semen je možné shrnout následovně:

a) jen malé procento umělých semen klíčí v polních podmínkách. Např. umělá semena vojtěšky měla v in vitro podmínkách klíčivost 80% a ve skleníku jenom 20%. U ostatních zkoumaných rostlin je tato klíčivost podstatně nižší (např. mrkev 3-10%).

b) u rostlin u nichž byla produkce umělých semen žádoucí se nedaří odvodit vhodný systém pro produkci somatických embryí

c) umělá semena mají kratší životnost než semena normální

Jako perspektivní se pro odvození umělých semen jeví rostliny, u nichž byla dobře zvládnuta problematika somatické embryogeneze. Např. vojtěška, kmín, mrkev, celer, kávovník, pomerančovník, ořešák. Druhou skupinu rostlin představují druhy u nichž by bylo vegetativní množení ekonomicky velmi výhodné, ale u nichž není dořešen problém somatické embryogeneze např. květák, kukuřice, soja, bavlník, gerbera, brambor, rýže, cukrová třtina, rajče, špenát, tabák, jehličnany, česnek atd.

5. Fáze mikropropagace

Vývoj rostlin v podmínkách in vitro je možné rozdělit do 4 základních stádií či fází. Ve prvním stádiu jde o odvození sterilní kultury - primokultury a spočívá v odebrání vhodného explantátu a jeho sterilizaci a kultivaci na živném médiu. Materiál odvozený v prvním stádiu - v primokultuře je potom využíván vdruhém stádiu, která se označuje jako stádium multiplikační či proliferační. Cílem druhé fáze je dosáhnout vysokého koeficientu množení a získat co největší počet nových rostlin resp. nových explantátů cestou somatické embryogeneze, axilárního větvení, tvorby adventivních pupenů atd. Tato fáze může být opakována pasážováním na téže proliferační médium nebo může následovat třetí stádium, které je většinou spojeno se zakořeňováním. Poslední , čtvrté stadium představuje stádium převodu rostlin z kultury in vitro do podmínek in vivo a je spojeno někdy se zakořeňováním in vivo.

Tato stádia jsou charakteristická určitým vývojem kultury in vitro, který je ovlivněn změnou kultivačních podmínek v těchto jednotlivých stádiích. K těmto základním stádiím je někdy zařazováno stadium 0, které představuje fázi, kdy je určitým způsobem připravován matečný materiál (rostlina) k odběru explantátu.

5.1. Stádium 0 - výběr matečné rostliny a její příprava pro odběr explanátu

Při odběru výchozího materiálu pro odvození explantátové kultury je nutné přesně znát původ matečné rostliny - o jakou varietu či kultivar se jedná. Výchozí rostlina by měla být zdravá a pěstovaná v optimálních podmínkách - nejlépe skleník nebo fytotron.

Úspěch odvození sterilní kultury a růst explantátů je ovlivňován obdobím roku, kdy je explantát odebírán. Změny teploty, délky dne,hladiny osvětlení , dostupnosti vody

v průběhu roku ovlivňují obsah sacharidů, proteinů a růstových látek v rostlinách a mají tak vliv i na růst explantátů, z nich odebraných. Nejlepších výsledků je dosahováno, je-li explantát odebrán z rostliny v aktivní fázi růstu. Vyjímku v tomto případě představuje odběr explantátů ze zásobních orgánů. Explantáty je však možné také odebírat z rostlin v dormantním stádiu, ale potom je nutné nejprve zrušit tuto dormanci a potom stimulovat růst. K přerušení dormance se nejčastěji používá působení nízké teploty, kdy se výchozí materiál nebo již naočkovaný explantát uchovává po určitou dobu v lednici za nízké teploty (4°C) nebo se dormance ruší aplikací giberelinů.

5.2. Stádium I - odvození aseptické kultury

Prvním předpokladem úspěšné kultivace in vitro je výběr vhodné rostliny, která bude použita k odběru explantátů. Teoreticky je k odvození explantátové kultury možné použít jakoukoliv část rostliny (explantát).

Hlavním cílem tohoto stádia je odvodit sterilní kulturu s co největším procentem úspěšnosti. Odvození sterilní primokultury je spojeno s povrchovou dezinfekcí materiálu používaného jako explantát. Tento proces zahrnuje opláchnutí explantátu vodou a jeho povrchovou dezinfekci pomocí jednoho nebo více dezinfekčních činidel.

Oplachování explantátu pod tekoucí vodou po dobu 30 minut až dvou hodin redukuje počet mikroorganismů přítomných na povrchu rostlin původně rostoucích v polních podmínkách, na povrchu podzemních orgánů a orgánů, které mají na svém povrchu velké množství trichomů. Redukci počtu mikroorganismů na povrchu explantátů také napomáhá jejich omytí v saponátu následované proplachováním tekoucí vodou. Saponát také zvyšuje účinek dezinfekčních činidel, protože zvyšuje smáčivost povrchu explantátu. Zvýšení smáčivosti povrchu explantátů pro dezinfekční činidla se také dosahuje

krátkodobým ponořením (2 minuty) explantátu do 70% etanolu. Po opláchnutí se explantáty ponoří do dezinfekčního roztoku. Dezinfekční roztok má usmrtit mikroorganismy přítomné na povrchu explantátu a nemá poškodit vlastní explantát. Nejpoužívanějšími dezinfekčními činidly jsou chlorové vápno (zfiltrovaný 4-5% roztok), 10-15% roztok SAVO Super a Chloramin B. Z dalších používaných dezinfekčních činidel je možné jmenovat etanol, chlornan vápenatý, dusičnan stříbrný, chlorid rtuťnatý, peroxid vodíku (tab. X. ukazuje používané koncentrace a dobu působení). Účinnost dezinfekce je možné také zvýšit přidáním několika kapek detergentu (Jar, Tween-20) do dezinfekčního roztoku. K povrchové dezinfekci se může používat buď pouze jedno dezinfekční činidlo nebo je možné někdy zvýšit úspěšnost dezinfekce opakovanou dezinfekcí v různých dezinfekčních prostředcích.

Tab. 6. Roztoky používané ke sterilizaci explantátů (Podle Torres 1989).

sloučenina	koncentrace	doba působení (minut)
chlornan vápenatý	9 - 10%	5 - 30
chlornan sodný	0,5 - 5%	5 - 30
peroxid vodíku	3 - 12%	5 - 15
etanol	75 - 95%	s - min
dusičnan stříbrný	1%	5 - 30
bromová voda	1 - 2%	2 - 10
chlorid rtuťnatý	0,1 - 1%	2 - 10
antibiotika	4 - 5 mg/l	30 - 60

Po dezinfekci resp. sterilizaci je nutné dezinfekční roztok z explantátu dokonale odstranit opakovaným vypíráním ve sterilní destilované vodě. Poškozené konce explantátu se odstraní skalpelem a explantát se upraví do požadované velikosti popř. se z něho izolují vlastní explantáty (embrya ze semen, meristémy ze stonků, prašníky z květů atd.). Explantát se potom umístí do kultivační nádoby na povrch média popř. do média (tekuté), které by mělo zajistit maximální růst explantátu.

Standardní techniky používané pro desinfekci nejsou schopny eliminovat endogenní (interní) kontaminace - přítomnost např. baktérií či plísní v buňkách pletiv explantátu. Pro tyto účely, a v případech neúspěšnosti klasických metod sterilizace, se používají antibiotika. Antibiotika se buď aplikují na povrch explantátu nebo se přidávají do kultivačních médií. Z nejpoužívanějších antibiotik je možné jmenovat vankomycin, rifampicin, kanamycin a chloramfenikol. Používaní antibiotik je však třeba vzhledem k jejich toxicitě pro rostlinné buňky snížit na minimum.

V případě, že dezinfekce resp. sterilizace explantátu nebyla dokonalá, projeví se kontaminací kultury během 3-5 dní po naočkování. Pokud se kontaminace objeví přibližně až po 10 dnech je možné usuzovat o endogenní kontaminaci explantátu nebo o přítomnosti např. roztočů v explantátu. Kontaminace kultury způsobená kontaminací explantátu se projevuje přímo v místě, kde je naočkován explantát. Pokud se kontaminace objeví mimo explantát je způsobena např. špatnou sterilizací média, nesterilním prostředím očkovacího boxu či očkovací místnosti.

Explantáty některých rostlin mohou několik dní po naočkování primokultury začít hnědnout nebo černat. Pokud k tomuto dojde hrozí zastavení růstu a odumření explantátu. Toto hnědnutí explantátu je časté především u druhů, které obsahují velké množství taninů a hydroxyfenolů. Mladá pletiva mají menší sklon k hnědnutí než stará. Nekróza nebo

hnědnutí je způsobeno enzymy - oxidázami obsahujícími měď (např. polyfenoloxidáza a tyrosináza), které jsou syntetizovány nebo uvolňovány v důsledku poranění pletiv při izolaci explantátu nebo jeho sterilizaci. Tomuto hnědnutí pletiv je možné zabránit několika způsoby: 1) odstraněním fenolových sloučenin , 2) změnou redoxního potenciálu, 3) inaktivací fenoláz a 4) redukcí aktivity fenoláz nebo dostupnosti jejich substrátů. V praxi se nejčastěji zabraňuje hnědnutí explantátů odstraněním fenolů z média a změnou redoxního potenciálu média.

Fenolové sloučeniny produkované v procesu hnědnutí explantátu je možné odstranit několika způsoby. První představuje časté přepasážování explantátů na čerstvé médium v průběhu prvních 2-4 týdnů kultivace, čímž se zabrání přílišnému zvýšení koncentrace fenolových sloučenin v médiu. Interval mezi pasážemi je potom 1-5 dní. Obměnu média je možné usnadnit použitím tekutých médií namísto pevných médií. Staré médium se pouze slije či odsaje z kultivační nádoby a nahradí se novým a není nutné manipulovat s explantátem.

Druhým způsobem, který se používá k odstranění fenolových sloučenin z média je jejich vazba na některou ze složek kultivačního média. Pro tento účel se do kultivačního média přidává aktivní uhlí nebo polyvinylpyrrolidon (PVP). Vázané fenolové sloučeniny nejsou toxické pro rostlinná pletiva. Aktivní uhlí se do médií přidává v koncentraci 0,05-0,5% a PVP v koncentraci 0,01-2%. Jestliže se používá aktivní uhlí je nutné věnovat péči dokonalému promíchání aktivního uhlí v médiu po autoklávování protože při autoklávování dochází k usazení aktivního uhlí na dně kultivační nádoby.

Hnědnutí pletiv je možné rovněž eliminovat snížením redoxního potenciálu aplikací redukčních činidel či antioxidantů . Pletiva, která jsou náchylná k hnědnutí se namočí po jejich sterilizaci a izolaci do sterilního roztoku antioxidantu. Jako antioxidanty se pro tento účel používají kyselina askorbová, kyselina citrónová, L-cystein,

hydrochlorid, glutathion a merkaptoetanol. Nejčastěji se používá kyselina askorbová a citrónová. Používají se často společně v koncentraci 50-1 mg/l.

5.3. Stádium II - fáze proliferace explantátové kultury

Hlavním cílem stádia II je namnožení explantátů . Rostlinný materiál ze stádia I (primokultury) je opakovaně pasážován na čerstvé médium, přičemž se v závislosti na dosaženém koeficientu množení zvyšuje počet explantátů v kultuře. Tento proces množení trvá až do dosažení žádaného počtu explantátů (prýtů, buněk, somatických embryí, pacibulek atd.). Klonového množení může probíhat několika způsoby z nichž vzhledem k mikropropagaci budou uvedeny tři z nich - stimulace axilárního větvení, tvorba adventivních prýtů a somatická embryogeneze.

5.3.1. Somatická embryogeneze

Somatická embryogeneze byla prokázána u řady rostlinných druhů mezi nimiž je možné jmenovat mrkev, celer, vojtěšku, kmín, kávovník, citrónovník atd. (blíže viz kapitola 4.4.). Koeficient množení v případě somatické embryogeneze je obrovský a není nic mimořádného získat z jednoho gramu kalusu až 500 somatických embryí za měsíc. Somatická embrya mohou vznikat v kalusových nebo v suspenzních kulturách.

Somatická embryogeneze v buněčné kultuře zahrnuje několik fází: 1) odvození aktivně rostoucí kalusové kultury na médiu obsahujícím redukovaný dusík (např.NH_4NO_3) a auxin (např. 2,4-D), 2) odvození aktivně rostoucí suspenzní kultury v tekutém médiu stejného složení jako pro kultivaci kalusu, 3) vynechání nebo redukci auxinu v kultivačním médiu a 4) pasážování somatických embryí na médium, které zajistí jejich klíčení a další vývoj.

5.3.2. Stimulace axilárního větvení

Jako explantátů se při této metodě mikropropagace využívá vzrostných vrcholů stonků nebo axilárních pupenů, Explantát, který obsahuje vzrostný vrchol může v závislosti na kultivačních podmínkách dávat vznik jednomu nebo velkému počtu nových prýtů. Nově vzniklý prýt opět zahrnuje apikální pupen a úžlabní pupeny a jeho rozřezáním na jednotlivé části je možné rostliny v explantátové kultuře dále množit. Tvorba axilárních prýtů je většinou stimulována dodáním relativně vyššího množství cytokininů do kultivačního média. Používané koncentrace cytokininů se pohybují v rozmezí 1-30 mg/l. Podstatou axilárního větvení je inhibice apikální dominance cytokininy.

Po namnožení požadovaného množství prýtů jsou prýty pasážovány na médium stimulující zakořeňování (stádium III). Stimulace axilárního větvení představuje nejpomalejší metodu množení in vitro, ale vzhledem k řadě jiných výhod (především genetická stabilita regenerantů) je k mikropropagaci nejčastěji využívána. U řady druhů , kde nebyla doposud realizována somatická embryogeneze či adventivní tvorba prýtů (především dřeviny), je jedinou možností mikropropagace.

5.3.3. Tvorba adventivních prýtů

Adventivní prýty a obdobné orgány jsou struktury, které vznikají z jiných základů než z axilárních pupenů a vrcholových meristémů. Adventivní prýty, kořeny, cibulky a další orgány mohou vznikat ze stonků, listů, hlíz, cibulí atd. Adventivní orgány mohou také vznikat z kalusu, který představuje mezistupeň mezi výchozím explantátem a nově vzniklou rostlinou v procesu nepřímé organogeneze. Mikropropagace v tomto případě představuje opakované pasážování adventivně vzniklých orgánů, které opět produkují adventivní orgány. Orgány, které jsou produkovány tímto

způsobem jsou poté převedeny do stádia III k zakořenění a vytvoření kompletní rostliny.

Používání nepřímé morfogeneze - stádia kalusu k produkci adventivních prýtů resp. orgánů může vést ke ztrátě morfogenetické kapacity pletiv a ke zvýšení genetické variability regenerantů. Ztráta morfogenetické kapacity může být způsobena několika faktory z nichž je možné jmenovat např. změnu popř. redukci obsahu endogenních růstových hormonů, která nemůže být nahrazena exogenními regulátory a akumulací genetických změn (změny ploidie, chromozomové mutace atd.).

5.4. Stádium III - zakořeňování in vitro

Prýty odvozené in vitro mohou tvořit kořeny buď in vitro ve stádiu III nebo in vivo ve stádiu IV. Stádium III představuje většinou jednorázovou kultivaci prýtů odvozených ve stádiu II po dobu 2-4 týdnů. V průběhu této kultivace prýty zakoření . Zakořeňování rostlin představuje jednu z nejobtížnějších etap mikropropagace celé řady rostlin.

V současné době se však, pokud je to možné, více využívá zakořeňování in vivo. Je to způsobeno především velmi vysokou cenou a pracností sterilního zakořeňování. Dalším důvodem je častá nefunkčnost kořenů odvozených in vitro po přenesení rostlin do půdy. Kořeny odvozené in vitro totiž postrádají velmi často kořenové vlásky a jsou velmi křehké a při přenosu rostlin do půdy se lámou. Sterilního zakořeňování se však nadále často využívá v řadě výzkumných a komerčních laboratoří. U některých druhů rostlin je zakořeňování in vitro také jedinou úspěšnou metodou zakořeňování in vitro odvozených prýtů. Poškození kořenů při přenosu rostlin z explantátové kultury do půdy je možné zabránit jejich zakořeňováním v molitanu či čedičové vatě. Rostliny se ze sterilních podmínek přenášejí do půdy společně s tímto materiálem.

Pouze malé množství druhů rostlin tvoří kořeny ve stádiu II na médiích s relativně vysokou koncentrací cytokininů, protože tato inhibuje tvorbu kořenů. K zakořeňování je proto nutné používat ve stádiu III jiné kultivační médium. Tvorbu kořenů ovlivňují nejenom růstové regulátory, ale i makroelementy, mikroelementy, organické komponenty, světlo, teplota atd.

U některých druhů je možné vyvolat tvorbu kořenů pouze přenesením prýtů či shluků prýtů na médium prosté cytokininů (např. hvozdík). U většiny druhů však indukce tvorby kořenů vyžaduje navíc přítomnost auxinu. Mezi auxiny, které se používají k zakořeňování patří IAA (0,1-10,0 mg/l), NAA (0,05-1,0 mg/l) a IBA (0,5-3,0 mg/l). Druh a koncentrace auxinu nutného pro zakořeňování je velmi závislá na druhu rostliny.

Auxin může být nezbytný pouze k indukci tvorby kořenů a jeho další přítomnost v kultivačním médiu může naopak růst kořenů inhibovat. V tomto případě se používá pouze krátkodobé působení auxinu na prýty, a to buď jejich pouhým ponořením do sterilního roztoku auxinu (o vyšší koncentraci) nebo krátkodobé kultivace (1-5 dní) na médiu obsahujícím auxin. Vlastní kultivační médium používané ve stádiu III potom auxin neobsahuje nebo jej obsahuje ve velmi nízké koncentraci.

Pro zakořeňování se u některých druhů používá také médium s redukovaným (např. 50%) obsahem makro a mikroelementů. Tento efekt je vysvětlován sníženou potřebou dusíku ve fázi zakořeňování. Nižší koncentrace živin v médiu může také představovat určitý stres, který stimuluje růst kořenů. Zakořeňování může být také ovlivněno obsahem sacharidů v médiu.

Tvorbu kořenů může také ovlivňovat způsob "fixace" explantátu (prýtu) v médiu. U pevných médií, které obsahují agar dochází totiž velmi často ke vzniku kořenů bez kořenových vlásků. Může to být způsobeno špatnou aerací média. Kořenové vlásky se tvoří v tekutém médiu a to zejména

při kultivaci prýtů na můstcích z filtračního papíru, kterými k explantátu vzlíná kultivační médium. Tak jako ostatní procesy morfogeneze in vitro je i zakořeňování ovlivňováno dále světlem a teplotou. Některé druhy rostlin vyžadují k zakořeňování vyšší světelnou intenzitu, u jiných může světlo naopak zakládání či růst kořenů inhibovat. Teploty, které stimulují tvorbu kořenů se obecně pohybují v rozmezí 25-28°C.

5.5 Stádium IV - zakořeňování in vivo a aklimatizace

Zakořeňováním in vivo se rozumí zakořeňování prýtů odvozených in vitro v nesterilních podmínkách na substrátech, jiných než jsou kultivační média. Jedná se o různé umělé půdy popř. porézní materiály. Příkladem mohou být perlit, vermikulit, směsi obsahující písek, rašelinu, čedičová vata atd. Substrát používaný k zakořeňování in vivo by měl být slabě kyselý až neutrální, měl by zajišťovat dostatečnou aeraci a měl by mít vysokou vodní kapacitu. Ke splnění těchto podmínek je někdy nutné používat směsi jednotlivých substrátů (např. samotná rašelina je příliš kyselá, vermikulit příliš alkalický).

Zakořeňování prýtů v nesterilních podmínkách se provádí tak, že se prýty pocházející ze stádia II jednotlivě izolují, ponoří se na několik sekund do roztoku auxinu (pulsní stimulace, např. 0,05% IBA 5 s) a poté se zanoří svou bází do vlhkého substrátu. Prýty zakořeněné in vitro se opatrně přesadí do vlhkého substrátu po předchozím důkladném opláchnutí zbytků živného média ulpělého na kořenech (jinak nebezpečí kontaminace). Kontaminaci rostlin po jejich přenosu do nesterilních podmínek je možné zabránit aplikací fungicidů na rostliny popř. do substrátu.

Ve stádiu IV je kromě dokonalého zakořenění rostlin nezbytná jejich aklimatizace na změněné podmínky zevního prostředí. Aklimatizace se především týká snížené vzdušné vlhkosti a přechodu na autotrofní způsob výživy.

K aklimatizaci je nutné přistoupit až u rostlin s dostatečně vyvinutým kořenovým systémem a listy.

K aklimatizaci na sníženou vzdušnou vlhkost se rostliny uzavírají do průhledných boxů nebo se přikrývají fólií nebo se pěstují ve skleníku , který je vybaven zařízením s programovatelným rosením rostlin. Vlhkost vzduchu v okolí rostlin se postupně snižuje a to buď postupným otevíráním boxů či odhrnováním krycí fólie nebo nastavením nižší požadované vlhkosti na rosícím zařízení. K zabránění nadměrné transpirace rostlin je možné také v tomto stádiu používat antitranspiranty.

Požadavek na postupnou aklimatizaci na nižší vlhkost vzduchu vychází z toho, že rostliny rostoucí v kultuře in vitro nemají vytvořenou dostatečně silnou kutikulu a mají velmi často nefunkční průduchy. Tento jev se označuje vitrifikace a je způsobena vysokou vlhkostí v kultivačních nádobách a malou intenzitou světla používaného v kultivačních místnostech. Je však nutné říci, že ne u všech rostlin dochází při kultivaci v explantátové kultuře k vitrifikaci.

Druhým problémem, se kterým se musí rostliny po převedení do nesterilních podmínek vyrovnat, je přechod z heterotrofie popř. mixotrofie na autotrofii. Rostliny v explantátové kultuře rostou na médiu, které poskytuje uhlík již v organické formě (sacharidy) a nemusí tedy organické sloučeniny vytvářet v závislosti na fotosyntéze. Pokud probíhá fotosyntéza v explantátové kultuře, nikdy nepředstavuje hlavní zdroj organického uhlíku. Listy rostlin rostoucích v explantátové kultuře mají odlišnou vnitřní strukturu - mají např. tenčí vrstvu palisádového parenchymu, což znemožňuje intenzivní fotosyntézu. Cukry přijímané z živného média navíc inhibují fotosyntetický aparát. Rostliny přenesené z in vitro podmínek do nesterilního prostředí vykazují v důsledku nedostatečně rozvinutého fotosyntetického aparátu negativní uhlíkovou bilanci. Negativní uhlíková bilance je také spojena se zvýšenou

intenzitou respirace v počátečních etapách aklimatizace.

Vzhledem k praktické nefunkčnosti listů vzniklých v explantátové kultuře je možné tyto listy považovat spíše za jakési zásobní orgány, které poskytují organické látky pro růst nových listů, které již budou schopné fotosyntézy a regulace výdeje vody rostlinou. Tomuto předpokladu odpovídá také fakt, že po vytvoření nových listů, listy vzniklé v explantátové kultuře odumírají a opadnou.

6. Buněčné suspenzní kultury

Buněčné suspenzní kultury rostlin představují relativně homogenní populaci buněk nebo malých buněčných agregátů, které jsou kultivovány v pohybujícím se tekutém živném médiu. Buňky suspenze jsou kultivovány v kontrolovaných aseptických podmínkách a jednotlivé buňky jsou v přímém kontaktu s živným médiem, takže jeho jednotlivé složky jsou jim rychle přístupné. Snadný přístup živin a dobrá výměna dýchacích plynů v pohybujícím se médiu umožňuje velmi rychlý růst buněčné suspenze.

Buněčné kultury se hojně využívají jako modelový systém při studiu procesů sekundárního metabolismu, indukci enzymů, genové exprese a jako výchozí materiál pro přípravu enzymů. Většina buněčných suspenzí v buňkách neobsahuje karotenoidy a chlorofyl, což je z hlediska izolace enzymů a sekundárních metabolitů velmi výhodné. Buněčné suspenzní kultury se také využívají jako výchozí materiál pro mutační šlechtění rostlin a k produkci somatických embryí.

Ideální buněčná suspenze je morfologicky a biochemicky homogenní. Při dlouhodobé kultivaci se však buněčná suspenze stává značně heterogenní. Heterogenita je způsobena genetickými změnami, které jsou v suspenzních kulturách poměrně časté (viz kap. 11). Ve staré buněčné suspenzi je možné např. kromě tvorby buněčných agregátů pozorovat i tvorbu protáhlých vakuolizovaných buněk, které se nedělí.

6.1. Metody kultivace buněčných suspenzí

Ke kultivaci buněčných suspenzí se používají různé kultivační systémy. Pro všechny kultivační systémy je společné používání tekutých živných médií, která se pohybují. Pohybem média se dosahuje jeho aerace, zajišťuje se lepší přístup živin k jednotlivým buňkám a napomáhá se rozpadu buněčných shluků, které vznikají při dělení buněk. Pohyb média je zajišťován umístěním kultivačních nádob

(např. 100-500 ml EM baňky) na roller (v šikmé rovině se otáčející plocha) nebo na třepačku (pohyb baněk v horizontální rovině). Počet otáček rolleru je v závislosti na zařízení 1-10 otáček za minutu a u třepačky je to 30-150 ot/min při amplitudě výkyvu 2-5 cm. Při použití rolleru se mechanické separaci buněk napomáhá speciální úpravou kultivačních baněk (mají různé výstupky). Při kultivaci na rolleru či třepačce se kultivační nádoby naplňují médiem pouze z jedné pětiny či jedné čtvrtiny.

Pro kontinuální kultivace buněčných suspenzí se používají různé typy bioreaktorů . Pohyb média je zde zajišťován buď míchadlem nebo probubláváním sterilního vzduchu. Nejmodernější bioreaktory mají mnoho automatických prvků, které zajišťují stálé složení živného roztoku, stálou hustotu buněčné suspenze (přebytek biomasy je odváděn z bioreaktoru), regulaci pH, stálou koncentraci plynů, umožňují monitorování růstu buněčné kultury atd. Nejčastěji používaná kapacita bioreaktorů pro rostlinné buněčné suspenze je 5-10 litrů.

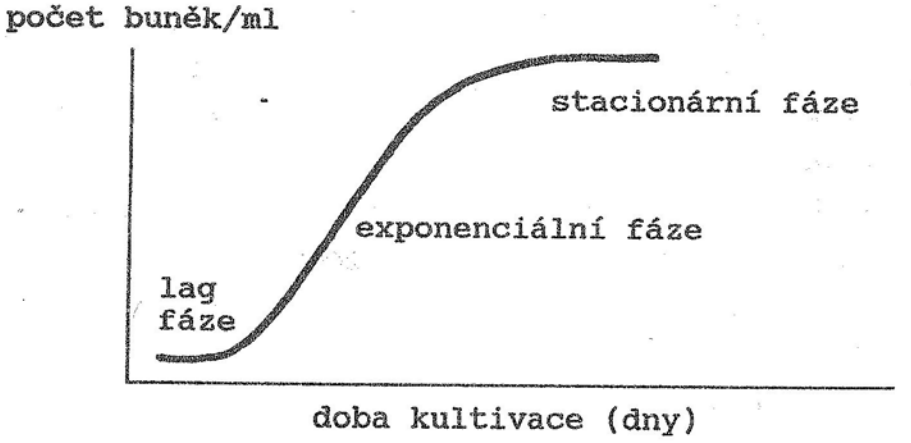
6.2. Růst a pasážování suspenzních kultur

Růst buněčné suspenze je v porovnání s růstem kalusu na pevném médiu mnohem rychlejší. Rychlý růst buněk způsobuje rychlé odčerpávání živin z kultivačního média a k zajištění stálého růstu kultury je nutné proto buněčné suspenze poměrně často pasážovat na čerstvé médium.

Pasážování je nutné provádět na konci exponenciální fáze růstu, která je charakteristická aktivním dělením a růstem buněk. V exponenciální fázi není růst buněk limitován exogenními faktory. Exponenciální fáze růstu je jednou z fází růstové křivky, kterou je možné charakterizovat růst kultury v uzavřeném systému, kde se mění podmínky kultivace (složení média, hustota buněčné suspenze atd.).

Pokud se graficky znázorní závislost některé z růstových

charakteristik suspenze (PCV, čerstvá hmotnost, počet buněk, sušina atd.) na čase, vznikne tzv. růstová křivka (obr. 9).



Obr. 9. Růstová křivka buněčné suspenze.

Průběh křivky je charakteristický pomalým růstem buněčné suspenze těsně po naočkování (lag fáze), velmi intenzivním nárůstem v exponenciální fázi a poklesem popř. úplným zastavením růstu ve stacionární fázi. Růst buněk ve stacionární fázi je především limitován nedostatkem živin, které byly vyčerpány z média v průběhu exponenciálního růstu.

Délka doby mezi založením buněčné kultury a stacionární fází záleží na několika faktorech: na počáteční hustotě suspenze, době trvání lag fáze a růstové rychlosti buněčné linie (délce buněčného cyklu). Obvykle se počáteční hustota buněčné suspenze pohybuje mezi $0,5-2,5.10^5$ buněk/ml. Tato hustota se před nástupem stacionární fáze zvýší na $1-4.10^6$ buněk/ml. Tento nárůst počtu buněk odpovídá 4-6 dělením každé buňky inokula. Průměrná inkubační doba je potom 18-25 dní. Jestliže se buňky dělí velmi aktivně inkubační doba se zkracuje na 6-9 dní.

Při použití velmi nízké počáteční hustoty buněk dochází

k prodloužení lag fáze a exponenciální fáze. Pro klasická syntetická média je za kritickou počáteční hustotu suspenze považována hustota 9-15.10^3 buněk/ml. Růst buněčné suspenze je při její malé počáteční hustotě možné stimulovat jejím "kontaktem" s kulturou o vysoké hustotě buněk resp. s metabolity, které intenzivně se dělící buňky uvolňují do okolního média. Aktivně se dělící buňky totiž produkují doposud nedefinované substance, které stimulují růst okolních buněk.

Pasážování buněčné suspenze se provádí tak, že se suspenze centrifuguje ve zkumavce při 200-1000xg (5 minut), supernatant se odpipetuje, sedimentované buňky se resuspendují v živném roztoku. Nová suspenze se zcedí přes sterilní sítko (velikost pórů 250 um), aby se odstranily velké buněčné agregáty a stanoví se počet buněk v 1 ml suspenze. Suspenze se potom rozpipetuje v určitém objemu (podle počtu buněk v inokulu) do baněk s kultivačním médiem.

Pokud je cílem kultivace buněčné suspenze regenerace rostlin popř. selekce mutantů, převádí se buňky suspenze na agarové médium v Petriho miskách. Postup spočívá v tom, že se suspenze nejprve zfiltruje přes sítko, aby se vyloučily buněčné agregáty větší než 5-10 buněk, poté se určitý objem suspenze smíchá s tekutým agarovým médiem o teplotě 30-35°C a po důkladném promíchání se tato nová suspenze rozlije do tenké vrstvy v Petriho misce. Po utuhnutí média jsou v něm jednotlivé buňky fixovány ve stálé pozici.

Při míchání suspenze s agarovým médiem je nutné zředit výchozí inokulum tak, aby výsledná hustota buněk v agarovém médiu měla tu nejmenší hodnotu, která ještě umožňuje růst buněk a zajišťuje , že buněčné kolonie budou vznikat dělením jedné buňky za vzniku buněčného klonu.

Růst buněčné suspenze v agarovém médiu se určuje pomocí tzv. plotnové výtěžnosti. Plotnová výtěžnost se stanoví tak, že po rozlití teplého média se suspenzí do P. misky a jeho utuhnutí se stanoví počet buněk na jednotku plochy agarové plotny. Po určité době kultivace vzniknou dělením

jednotlivých buněk buněčné kolonie jejichž počet se opět určí vzhledem k ploše agarové plotny. Plotnová výtěžnost se stanoví jako podíl:

$$PE = \frac{\text{konečný počet kolonií /plocha}}{\text{počáteční počet buněk /plocha}} \cdot 100\ (\%)$$

Plotnová výtěžnost je velmi závislá na hustotě buněčné suspenze. K dosažení vysoké plotnové výtěžnosti je nutné obvykle používat hustotu 10^3-10^4 buněk/ml. Minimální hustotu buněk je možné snížit použitím určitého množství starého média (conditioned medium).

Kultivace buněčných suspenzí v agarových plotnách se používá především k selekci mutantních buněčných klonů (resistence k antibiotikům, vysoké koncentraci solí, těžkým kovům, k selekci autotrofních mutantů atd.)

6.3. Měření růstu buněčné suspenze

Jak již bylo částečně uvedeno výše, lze měřit růst buněk suspenze pomocí několika parametrů: čerstvé hmotnosti, hmotnosti sušiny, počtu buněk , mitotického indexu, objemu sedimentované kultury vzhledem k celkovému množství suspenze v % (PCV), vodivosti média a celkového obsahu bílkovin či DNA.

Čerstvá hmotnost se určí tak, že se suspenze přefiltruje přes předem zvážený filtrační papír, potom se na filtračním papíru opláchne vodou s použitím odsávačky a filtr se

s buňkami znovu zváží. Rozdíl v hmotnosti filtru bez suspenze a se suspenzí udává čerstvou hmotnost. Sušina se stanoví obdobně - váží se nejprve suchý filtrační papír, poté se stanoví hmotnost filtru s buňkami po vysušení do konstantní hmotnosti v horkovzdušné sušárně při teplotě 60°C. Čerstvá hmotnost a sušina se obvykle vyjadřují v gramech na 1 ml suspenze nebo v gramech na 10^6 buněk.

PCV (packed cell volume) se stanoví tak, že se do 10-15 ml kalibrované centrifugační zkumavky asepticky napipetuje známé množství suspenze. Zkumavky se suspenzí jsou poté centrifugovány při 200xg 5 minut a je stanoven objem sedimentu (PCV) v ml vzhledem k celkovému množství odebrané suspenze (ml). PCV se obvykle vyjadřuje v procentech. K posouzení růstové křivky suspenze jsou vzorky odebírány v pravidelných intervalech kultivace.

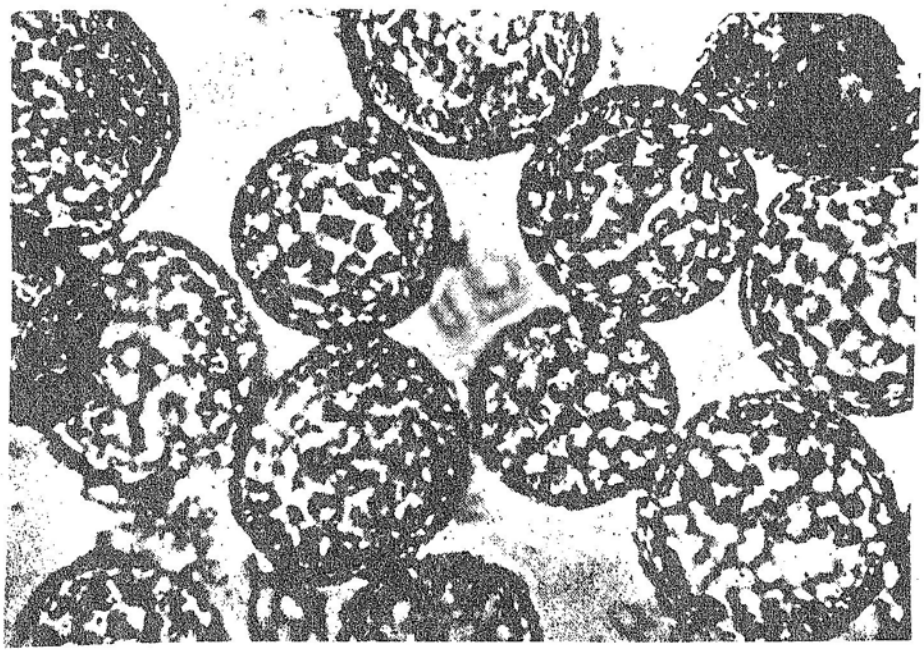
Nejpřesnější metodou měření růstu buněčné suspenze je stanovení počtu buněk pomocí cytometru. Protože buněčná suspenze obsahuje často buněčné agregáty, je nutné před počítáním buněk v cytometru tyto agregáty rozdělit na jednotlivé buňky. To se provádí smícháním 1 dílu suspenze se 2 díly 5-15% vodného roztoku oxidu chromového, následným zahřátím na 70°C (2-15 minut). Následuje ochlazení vzorku a jeho protřepávání(10 minut). Takto upravená suspenze se nanese pipetou do cytometru a je stanoven počet buněk v 1 ml suspenze. Někdy se suspenze před nanesením do cytometru ještě centrifuguje a sediment buněk se resuspenduje v 8% roztoku NaCl. K rozrušení buněčných agregátů je možné také použít 0,25% roztok pektinázy.

Při posouzení růstu buněčné suspenze je někdy výhodné stanovit vitalitu buněk suspenze. Kromě mikroskopického pozorování např. proudění cytoplazmy a přítomnosti intaktního jádra je možné použít vitální barvení. K tomuto účelu se používají vitální barviva jako Evansova modř (barví mrtvé buňky), fluorescein diacetát (je metabolizován živými

buňkami na fluorescein, který pod UV světlem fluoreskuje) a soli tetrazolia, které barví živé buňky.

7. Kultury rostlinných protoplastů a somatická hybridizace

Typická rostlinná buňka je ohraničena pevnou buněčnou stěnou. Technika tkáňových kultur umožňuje kultivovat i rostlinné buňky zbavené buněčné stěny - tzv. rostlinné protoplasty. Rostlinný protoplast je tedy rostlinná buňka, která nemá buněčnou stěnu a její povrch tvoří pouze cytoplazmatická membrána. V tomto ohledu tedy rostlinné protoplasty připomínají buňky živočišné. Rostlinné protoplasty mají sférický tvar (obr. 10).



Obr. 10. Protoplasty izolované z listového mezofylu náprstníku vlnatého. Zvětšeno 600x.

Nepřítomnost buněčné stěny a zachování metabolické a funkční kapacity umožňuje studium transportu látek přes cytoplazmatickou membránu, studium biosyntéz spojených s regenerací buněčné stěny, dovoluje izolaci organel. Na protoplastových kulturách je možné sledovat proces obnovy buněčné stěny, inkorporovat (vnášet) do buněk větší částice - organely, molekuly nukleových kyselin a bílkovin. Je možné uměle zvýšit fúzi protoplastů, a tak získat cestou tzv.

somatické hybridizace mezidruhové hybridy (viz níže).

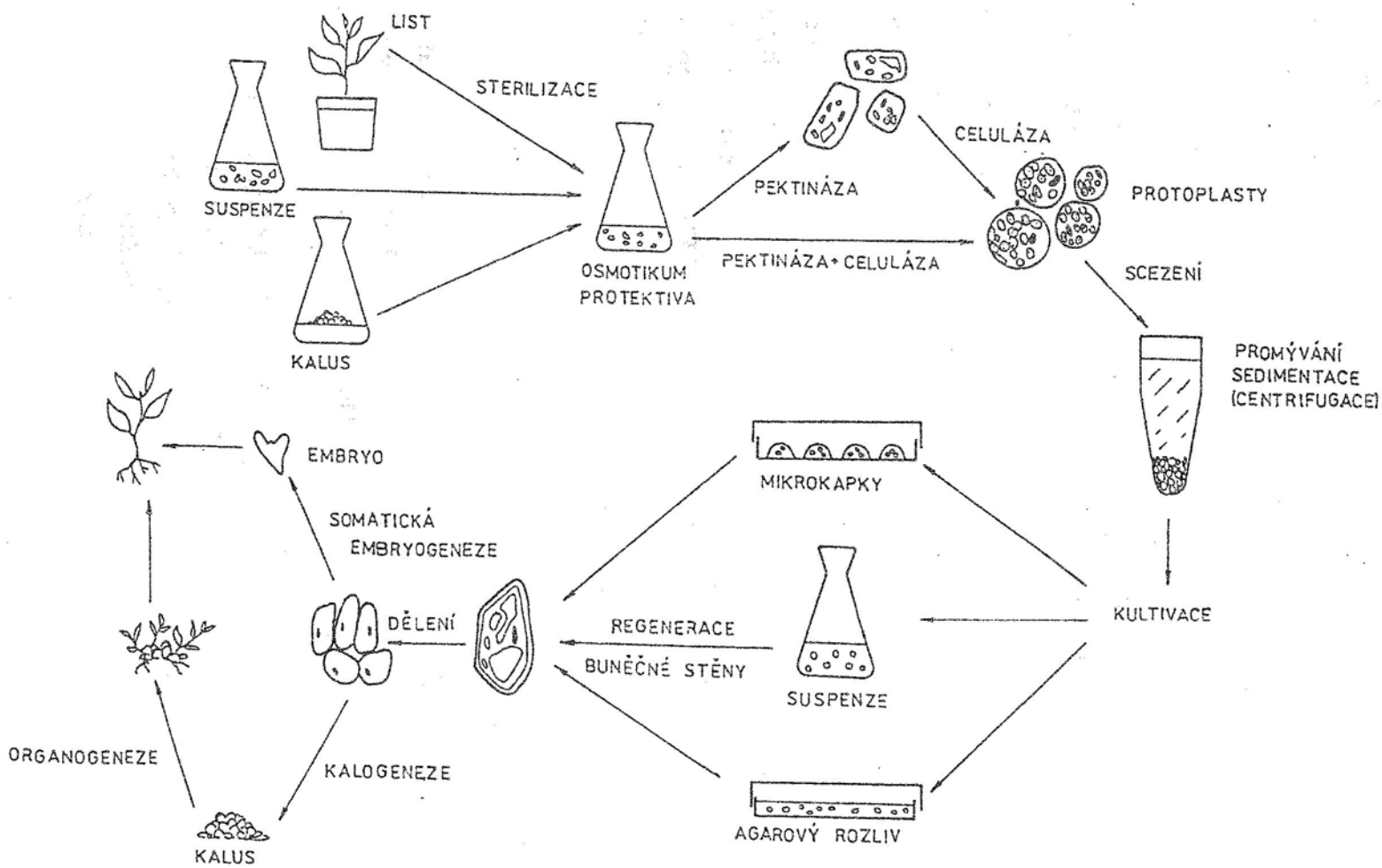
Protoplasty je možné izolovat z různých rostlinných pletiv. Nejčastěji se používají buňky listového mezofylu, kalusové buňky či buňky buněčné suspenze. Izolaci protoplastů je možné provést mechanicky nebo enzymaticky. Mechanická izolace se však pro její pracnost a malou výtěžnost již prakticky nepoužívá, proto o ní nebude pojednáno.

Při enzymatické izolaci protoplastů se buňky resp. pletiva umísťují do roztoku, který obsahuje enzymy zajišťující rozpuštění buněčné stěny - pektinázu a celulázu. Pektináza rozpouští střední lamelu a zajišťuje tak maceraci pletiva (jeho rozpad na jednotlivé buňky) a celuláza rozrušuje vlastní buněčnou stěnu. Roztoky, které se k izolaci protoplastů používají kromě enzymů obsahují i osmoticky aktivní látky snižující turgor buněk (např. manitol). V praxi se používá jednostupňová a dvoustupňová izolace protoplastů (obr. 11). V kulturách protoplastů bylo prokázáno, že jsou schopny fúze, že jsou po regeneraci buněčné stěny schopné jaderného a buněčného dělení, že mohou vytvářet kalusy, a že v těchto kalusech je možné dosáhnout organogeneze a regenerovat celé rostliny.

7.1. Izolace protoplastů z listů

Izolace protoplastů z listů zahrnuje čtyři základní etapy: sterilizaci listů, odstranění epidermis, inkubaci segmentů listů v roztoku enzymů s osmotikem a vlastní izolaci protoplastů filtrací a centrifugací (obr. 11).

Izolované listy se povrchově sterilizují běžným postupem (70% etanol, 1-2% chlornan sodný popř. Savo Super 10%, propláchnutí sterilní vodou 3x). V aseptických podmínkách se odstraní stažením nebo seškrábnutím spodní epidermis. Epidermis se snáze odstraňuje z listů, které byly před jejich izolací nebo v průběhu dezinfekce vystaveny vodnímu stresu. Listy jsou poté nařezány na úzké proužky pomocí



Obr. 11. Izolace a kultivace rostlinných protoplastů.

skalpelu nebo speciálního nástroje s více břity na proužky 2 mm široké. Segmenty listů jsou potom přeneseny do enzymatického roztoku s osmotikem.

Jako osmotikum , které zabraňuje prasknutí cytoplazmatické membrány protoplastů, se používá sacharóza, glukóza, sorbitol nebo manitol v koncentraci 0,3 - 0,5 M. Jako osmotikum je možné také použít anorganické soli jako KNO_3, KH_2PO_4, $MgSO_4$ a $CaCl_2$. Běžně se užívá např. 0,1 - 1,0 mM roztoku $CaCl_2$ a $MgSO_4$.

Enzymatický roztok obsahuje vedle osmotika jeden nebo více enzymů.: pektinázu (0,1-1,0%), celulázu(1,0-10%) a hemicelulázu 0,1-1,0%). Jak již bylo uvedeno výše, pektináza rozpouští střední lamelu a zajišťuje maceraci pletiva (jeho rozpad na jednotlivé buňky) a celuláza rozrušuje vlastní buněčnou stěnu. Pro optimální funkci enzymů je nutné upravit pH enzymatického roztoku na 5,4-5,7.

V praxi se používá jednostupňové nebo dvoustupňové izolace protoplastů.

7.1.1. Jednostupňová izolace protoplastů

Při jednostupňové izolaci se listové segmenty zbavené spodní epidermis umístí svojí spodní stranou do Petriho misky obsahující asi 10 ml sterilního enzymatického roztoku (sterilizován filtrací) obsahujícího pektinázu a celulázu popř. hemicelulázu. Segmenty se dále inkubují 15-18 hodin při teplotě 25°C. Po inkubaci se roztok se zbytky listů a s protoplasty zfiltruje přes ocelové sítko nebo nylonovou látku s velikostí pórů 63-69 um aby se odstranily větší zbytky listů. Filtrát obsahující protoplasty se potom pipetuje do sterilních centrifugačních zkumavek a centrifuguje se při 100xg 1 - 5 minutu. Protoplasty představují sediment, supernatant představuje enzymatický roztok se zbytky buněk. Supernatant se odsaje pipetou a následuje několikanásobné promývání (3-4x) protoplastů . Dokonalé odstranění enzymů z inkubačního média je pro další

kultivaci protoplastů nezbytné.

Promývací roztok obvykle obsahuje osmotikum a anorganické soli - např. zředěný roztok solí MS média (10-50%). Při posledním promývání je osmotikum nahrazeno 20% sacharózou. Při konečné centrifugaci při 200xg 1 minutu budou protoplasty tvořit prstenec plovoucí na povrchu supernatantu. Protoplasty se izolují z centrifugační zkumavky pipetou a kultivují se s použitím různých kultivačních technik (viz dále).

7.1.2. Dvoustupňová izolace

Při tomto způsobu izolace jsou nejprve listové segmenty svojí spodní stranou umístěny do odsávací baňky s 0,5-2% roztokem pektinázy v osmotiku. Infiltraci enzymatického roztoku do listových pletiv je možno napomoci použitím vakua (5 minut). Segmenty listů jsou poté inkubovány na vodní lázni při teplotě 25°C při současném protřepávání roztoku (15 minut) a dalších 60 minut bez třepání. V průběhu inkubace je možné odebírat vzorky suspenze a pod mikroskopem sledovat, zda již došlo k rozpadu (maceraci) pletiv na jednotlivé buňky. Podle výsledku těchto mikroskopických vyšetření je možné dobu inkubace zkrátit či naopak prodloužit. Po dokonalé separaci buněk je tato suspenze přefiltrována přes sítko (63-69 um) a filtrát pročištěn centrifugací.

Sediment listových buněk je po vymytí prvního enzymatického roztoku přenesen do roztoku celulázy (1-4%) s osmotikem (13%) a hodnotou pH 5,4 a inkubován 90 minut při teplotě 30°C. Po inkubaci se suspenze centrifuguje při 100xg 1 minutu. Sediment protoplastů se potom 3x promyje roztokem osmotika. Posledním krokem promývání protoplastů je centrifugace protoplastů v 20% sacharóze, tak jako u jednostupňové metody.

Věší výtěžnost izolace je dosahováno při jednostupňové izolaci. Při dvoustupňové izolaci však dochází k menšímu poškození protoplastů protože doba izolace je oproti jednostupňové izolaci (15-18 hodin) mnohem kratší (3 hodiny).

7.2. Izolace protoplastů z kalusové kultury

Aktivně rostoucí kalusová kultura představuje ideální materiál pro izolaci velkého množství protoplastů. Postup izolace protoplastů z kalusové kultury je obdobný postupu pro izolaci z listového mezofylu. Optimální koncentrace enzymů však mohou být nižší, což platí zejména pro celulázu. Rovněž doba izolace může být kratší. Izolace se také často provádí při vyšší teplotě (30-33°C).

Kalusová kultura by měla být před izolací protoplastů pravidelně pasážována na čerstvé médium a to nejdéle 2 týdny před použitím.

7.3. Izolace protoplastů z buněčné suspenze

Buněčná suspenze představuje velmi výhodný materiál pro izolaci protoplastů. K izolaci se používá buněčné suspenze o vysoké hustotě (10^6buněk/ml). Asi 5 ml suspenze se centrifuguje při 100xg 1-2 minuty. Po odsátí supernatantu se buňky resuspendují v 5 ml enzymatického roztoku (4% celuláza, 0,5-2% pektináza) v Petriho misce (dále P. miska). P. miska se uzavře Parafilmem, umístí se na třepačku (30-75 ot/min) a inkubuje se 2-6 hodin. Pročištění protoplastů je obdobné jako u předchozích postupů.

7.4. Kultivace a regenerace protoplastů

Cílem kultivace protoplastů je obnovení buněčné stěny, dělení buněk vedoucí k tvorbě kalusu a následná regenerace rostlin.

V první fázi kultivace dochází k regeneraci buněčné stěny, jejíž přítomnost je pro dělení buněk nezbytná. Protoplasty - buňky bez buněčné stěny se obvykle nedělí. Pokud je pozorováno dělení protoplastů, jedná se o buňky, které vstoupily do mitózy ještě před izolací buněčné stěny a po ukončení dělení se bez regenerace buněčné stěny dále nedělí.

Po vytvoření buněčné stěny dochází k dělení buněk, které dávají vznik buněčné kolonii - mikrokalusu. Na tvorbu mikrokalusu navazuje v optimálních podmínkách regenerace rostlin cestou organogeneze či somatické embryogeneze.

Celý cyklus - izolace protoplastů - regenerace buněčné stěny - mikrokalus - rostlina se podařilo realizovat asi u 150 druhů rostlin. U podstatně většího počtu druhů bylo dosaženo tvorby kalusu bez regenerace rostlin. Rostliny se podařilo regenerovat např. z protoplastů mrkve, tabáku, rajčete, bramboru, okurky, rýže, náprstníku, pomerančovníku, kiwi atd.

7.5. Faktory ovlivňující kultivaci protoplastů

Na průběh kultivace protoplastů a jejich vývoj má vliv celá řada faktorů.

7.5.1. Hustota protoplastů a jejich vitalita

Tak jako pro suspenzní buněčné kultury, tak i pro kultury protoplastů je důležitá jejich hustota v kultivačním médiu. Před přenosem izolovaných protoplastů do kultivačního média je proto nutné stanovit počet protoplastů v použitém inokulu. Výsledná koncentrace protoplastů po jejich smíchání s médiem by neměla být nižší než $2,5.10^4$/ml (optimální je 10^5/ml). K počítání protoplastů se používá hemocytometr (Burkerova komůrka). Pro posouzení vhodnosti inokula pro další kultivace je možné také stanovit vitalitu protoplastů. Vitalita protoplastů se zjišťuje pomocí vitálního barvení např. fluorescein diacetátem, který je z roztoku přijímán

přes buněčnou membránu do protoplastu a pouze v živých protoplastech je metabolizován na fluorescein, který lze detegovat UV zářením (fluorescence).

7.5.2. Metody kultivace protoplastů

Metoda kultivace protoplastů závisí na tom, zda se používá tekuté nebo pevné kultivační médium.

Při použití tekutého média je možné protoplasty kultivovat několika způsoby. Protoplasty je možné kultivovat v tenké vrstvě tekutého média v P. misce uzavřené Parafilmem nebo v uzavřených 50-100 ml EM baňkách s 5 ml média. Protoplasty mohou být také kultivovány v kapce v P. misce nebo ve visící mikrokapce v tzv. mikrokomůrce (speciálně upravené podložní sklo).

Protoplasty jsou kultivovány při nízkém osvětlení nebo ve tmě. Teplota se pohybuje v rozsahu 25-28°C. Pro kultivaci je nutné zajistit vysokou vlhkost vzduchu v kultivační nádobě.

Při použití pevného média se buď protoplasty v tekutém médiu rozlijí do tenké vrstvy na agarové médium v P. misce nebo se uzavírají přímo do agarového média před jeho utuhnutím. V druhém případě se suspenze protoplastů (asi 2 ml) smíchá v malé P. misce se stejným množstvím teplého (max. 45°C) neutuhlého agarového média a agar se nechá utuhnout. Kultura se potom inkubuje v převrácené poloze (dnem vzhůru). Protoplasty je možné také uzavřít do média s agarózou. Po utuhnutí se vrstva agarózy s protoplasty rozřeže na bločky, které se kultivují v tenké vrstvě protoplastového média v P. misce na třepačce.

7.5.3. Média používaná ke kultivaci protoplastů

Protoplasty se kultivují na médiích obdobných složení jako média používaná pro kalusové a suspenzní kultury. Jedná se o média jejichž základ tvoří velmi často složky MS média.

Hlavní odlišností protoplastových médií od médií používaných např. k mikropropagaci je přítomnost osmotika. Osmotikum je součástí jak médií používaných k izolaci protoplastů, tak médií používaných pro jejich kultivaci.

Osmotikum nahrazuje funkci buněčné stěny. Pokud by v kultivačním médiu nebylo přítomno osmotikum (manitol, sorbitol, glukóza, sacharóza), došlo by k prasknutí protoplastu plazmoptýzou. Koncentrace osmotika se po obnovení buněčné stěny postupně snižuje až na nulovou hodnotu (ředěním média čerstvým živným roztokem bez osmotika).

Protoplastová média obsahují velmi často dusík v organické formě (např. kasein hydrolyzát), mohou obsahovat vyšší koncentraci vápenatých iontů a většinou obsahují auxin a cytokinin v různých koncentracích.

7.6. Dělení a růst protoplastů

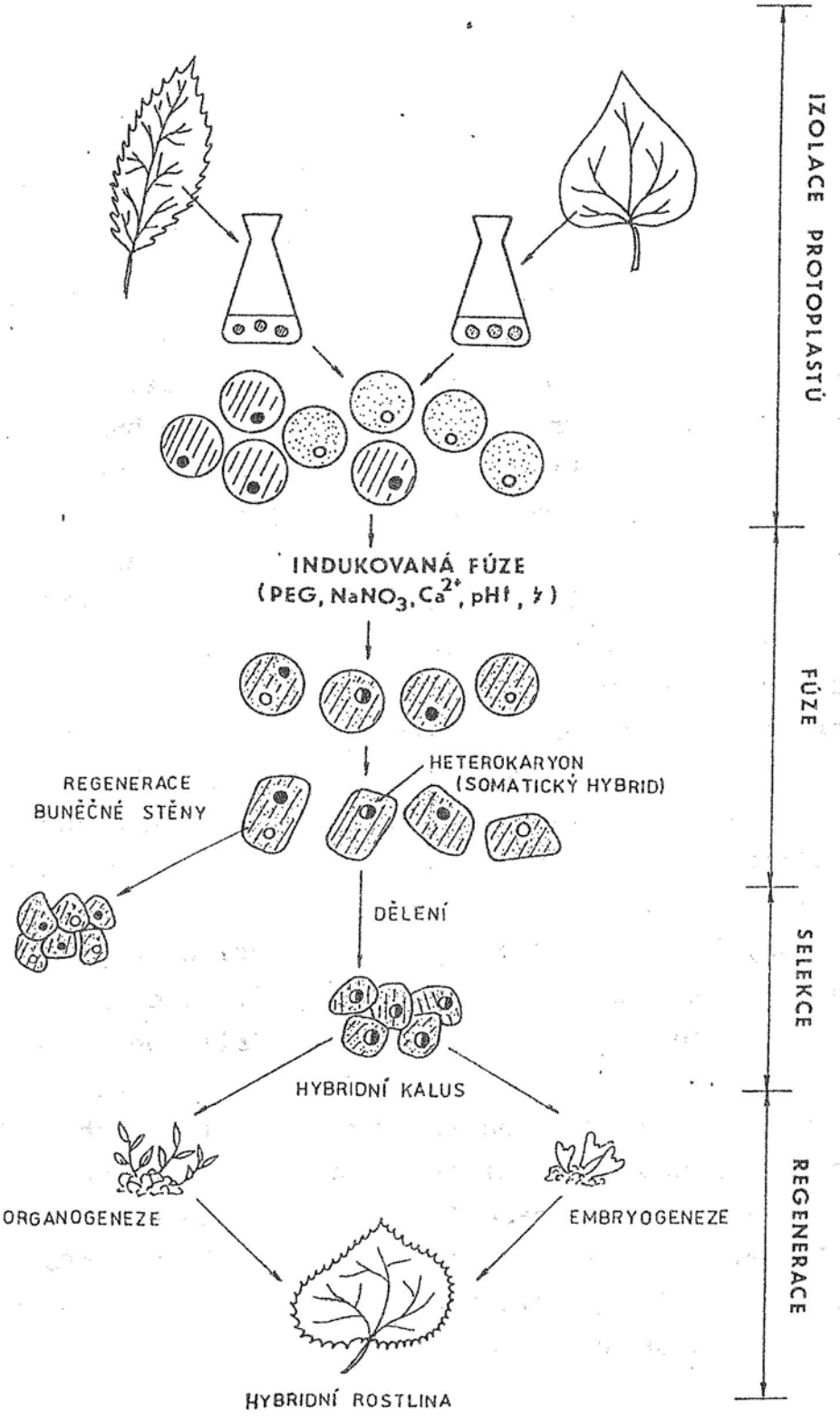
Za optimálních podmínek protoplasty regenerují buněčnou stěnu již během několika dní. Vznik buněčné stěny je nezbytnou podmínkou pro další vývoj protoplastů. Vytvořením buněčné stěny ztrácejí protoplasty svůj typický sférický tvar. Vznik buněčné stěny je možné prokázat barvením fluorescenčním barvivem Calcofluor white. Obnovení buněčné stěny není nezbytné pro jaderné dělení, ale je nezbytné pro vlastní dělení buňky - cytokinezi. Po vytvoření buněčné stěny se buňky v průběhu 3-5 dní poprvé dělí. Ke druhému dělení dochází v průběhu týdne a na konci druhého týdne kultivace je možné pod mikroskopem pozorovat malé buněčné agregáty. Po 6 týdnech kultivace je možné pozorovat kolonie o velikosti 1 mm. V tomto stádiu je nutné pasážovat mikrokolonie na médium bez osmotika, které by jinak inhibovalo jejich další růst.

7.7. Somatická hybridizace

Práce s rostlinnými protoplasty nalézá celý komplex zajímavých aplikací především v oblasti šlechtění rostlin. Izolované protoplasty mohou vzájemně fúzovat (slévat se). Kultivují-li se za určitých podmínek protoplasty odvozené z různých rostlinných druhů, je možné jejich splynutím získat hybridní buňky, které mohou mít vlastnosti obou rodičovských buněk. Tento proces připomíná splývání buněk při pohlavním rozmnožování. Protože se ho účastní buňky somatické, označuje se tento způsob hybridizace jako hybridizace somatická a hybridní buňky resp. rostliny z nich regenerované jako somatické hybridy (obr. 12).

Pouze u poměrně malého počtu rostlinných druhů se z fúzovaných protoplastů podařilo regenerovat celé rostliny. Klasickým příkladem somatického hybrida je např. kříženec rajčete a bramboru.

Fúze protoplastů může být spontánní, ale její frekvenci je možné zvýšit úpravou chemického složení kultivačního média (např. polyetylenglykol, dextran, vysoká koncentrace Ca^{2+} a alkalické prostředí) nebo fyzikálními metodami (puls elektrického proudu). Zvláštností rostlin pocházejících z fúzovaných protoplastů je, že při fúzi protoplastů dochází nejen ke smíchání jaderných genomů, ale i ke smíchání organel - chloroplastů a mitochondrií obou somatických rodičovských buněk. Přitom je možno eliminovat buněčné jádro jednoho z rodičů ionizujícím zářením nebo chemickým působením. Mohou tak vznikat rostliny, které obsahují jeden z obou výchozích genomů v nezměněné podobě, ale cytoplazmatické organely a jejich genetická informace jsou promíchány. Cytoplazmatické hybridy se označují jako cybridy. Cybridní buňka obsahuje různé kombinace chloroplastové či mitochondriální DNA pocházející z různých buněk. Takovéto buňky není možné získat běžnou sexuální hybridizací, protože samčí pohlavní buňky velmi zřídka vnášejí do vaječné buňky mitochondrie či plastidy. Genetická



Obr.12 . Somatická hybridizace.

informace mitochondrií a plastidů byla přesně zmapována a bylo prokázáno, že mitochondrie a plastidy obsahují šlechtitelsky významné geny (např. mitochondrie obsahují geny pylové sterility, chloroplasty geny pro rezistenci k některým herbicidům atd.).

Rostlinné protoplasty mohou být také použity ke genovým transformacím, kdy je do nich možné vnášet cizorodou DNA kódující žádané vlastnosti. Příjem molekul DNA rostlinnými protoplasty se může stimulovat některými chemickými sloučeninami přidávanými do kultivačního média (např. již výše zmíněný polyetylenglykol), pulsem elektrického proudu. pomocí lipozómů, nebo se DNA vpravuje přímo do jader protoplastů mikroinjekcemi či mikroprojektily (particle gun, particle bombarding).

V poslední době se jako vektoru pro přenos genetické informace do genomu rostlinných buněk nejčastěji používá plazmid půdní bakterie Agrobacterium tumefaciens - plazmid Ti. Tento plazmid má schopnost se po infekci rostlinných buněk začleňovat do struktury chromozómů.

Jednou z nejdůležitějších etap somatické hybridizace popř. buněčných transformací je vlastní selekce protoplastů resp. buněk a z nich vznikajících kalusů, které mají změněnou genetickou informaci. K tomuto účelu se používá celá řada metod specifické a nespecifické selekce založených na fyzikálních či biochemických postupech (fluorescenční značení, selektivní kultivační podmínky, biochemické rozbory, RFLP mapování , PCR atd.).

Většímu praktickému využití protoplastových kultur ve šlechtitelských programech doposud brání řada nevyřešených teoretických a metodologických problémů spojených s indukcí organogeneze v kalusových a suspenzních kulturách, se zvýšením heterologní fúze (fúze protoplastů pocházejících z různých druhů) a se selekcí hybridních buněk na úrovni buněčné kultury.

8. Ozdravování rostlin

Explantátové kultury mohou být využity k ozdravování rostlin, tzn. k produkci bezvirózních, popřípadě bakteriálních a houbových nákaz prostých rostlin. Řada bakteriálních a houbových infekcí je eliminována již při vlastním zakládání sterilní kultury. K eliminaci bakteriální infekce také dochází při kultivaci izolovaných meristémů, které postrádají cévní svazky, představující hlavní dráhu šíření řady rostlinných patogenů. Bakteriální kontaminaci explantátu je také možné eliminovat přidáním antibiotik do kultivačního média. Tohoto postupu se však vzhledem k toxickému působení antibiotik na buňky explantátu používá méně často než jednodušších postupů povrchové sterilizace explantátu.

Velmi významná je produkce bezvirózních rostlin. Pěstování viruprostých rostlin se osvědčilo ve většině zemí a to především u rostlin množených vegetativně. Šlechtitelé produkují každým rokem výnosnější nebo chuťově kvalitnější odrůdy užitkových rostlin. Většina odrůd, a to obvykle těch, které mají největší výnosy, se však neudrží dlouho. Výnosy brzy klesnou a už po určité době musí být tyto odrůdy pro napadení virovými chorobami škrtnuty ze seznamu povolených odrůd. Při řešení tohoto problému se stále více uplatňují rostlinné explantáty.

Virová onemocnění se většinou nepřenášejí při generativním množení pomocí semen. Při tradičních postupech vegetativního množení, které se u řady ekonomicky významných druhů rostlin používá, je možnost virové nákazy značná. Při aplikaci meristémového množení dochází v průběhu krátké doby kultivace k eliminaci virových částic v buňkách explantátu. V řadě případů však buňky samotného meristému virové částice neobsahují v důsledku neexistujícího vaskulárního spojení s ostatními částmi rostliny.

K ozdravení rostlin se používá jako výchozí explantát vlastní meristematický vrchol bez přilehlých listových

primordií o velikosti 0,2 - 1,0 mm. Explantát je tedy podstatně menší než v případě, kdy se jedná o pouhé meristémové množení.

V explantátové kultuře je možné také virózy eliminovat působením vyšších teplot (termoterapie). V takovém případě se explantáty vystaví působení vyšších teplot, které nejsou pro rostlinné buňky letální, ale letálně působí na viry. Nejčastěji se používají teploty 50 - 52°C působící po dobu 10 - 30 minut. Jsou-li tímto postupem ozdravovány celé rostliny, používají se teploty nižší (32 - 40°C) působící po dobu 4 - 30 dnů v závislosti na druhu rostliny. Velmi výhodný se pro získání bezvirózních rostlin jeví postup, kdy je nejprve matečná rostlina podrobena nesterilně tepelné terapii a poté je z ní odvozena meristémová kultura.

Bezvirózní materiál je také možné získat, jsou-li do živného roztoku aplikovány antivirózně působící látky. Ze sloučenin, které se k tomuto účelu používají je možné jmenovat např. ribavirin a 2 - thiouracil.

Kombinace tepelné terapie a meristémových kultur se již běžně využívá k produkci bezvirózních rostlin jahodníku, bramboru, jabloní, chryzantém, karafiátu, česneku atd.

Jednou z dalších výhod produkce bezvirózních rostlin tkáňovými kulturami je také jejich využití při výměně genetických zdrojů mezi různými státy . Jednak vzhledem k jejich "zdravotní nezávadnosti", jednak vzhledem k poměrně malému a lehkému "balení" v kultivačních nádobách a delší životnosti v porovnání s intaktními rostlinami.

9. Kryoprezervace rostlinného materiálu a uchovávání genofondu rostlin

Explantátové kultury nacházejí rozsáhlé uplatnění v oblasti uchovávání genofondu rostlinných druhů, které jsou ohrožené vyhynutím v důsledku destrukce jejich přirozených stanovišť nebo rostlinných druhů, které jsou ekonomicky významné a je možné je množit pouze vegetativně. K tomuto účelu se využívá možnosti zpomalení růstu explantátové kultury kultivací při nízké teplotě (1 - 14°C), zvýšením osmotického potenciálu média, kultivací na minimálních médiích či při sníženém osvětlení.

Změnou kultivačních podmínek je možné podstatně prodloužit subkultivační interval. Např. meristémové kultury jahodníku a jabloní bylo možné kultivovat bez pasážování při teplotě 2°C po dobu jednoho roku (běžný interval jeden měsíc). Po přenesení do normální teploty (25°C) tyto kultury vykazovaly nezměněnou schopnost regenerovat nové rostliny.

Jako perspektivní se z hlediska uchovávání rostlinného genofondu při aplikaci tkáňových kultur jeví kryoprezervace (uchovávání kultur ve zmraženém stavu). Kryoprezervace představuje obecně velmi účinnou metodu uchování rostlinného materiálu při teplotě kapalného dusíku tj. při -196°C. Metodicky nejjednodušší je uskladňování semen, protože neobsahují velké množství vody. Rostlinná pletiva (meristémy, kalusové buňky, buněčné suspenze) obsahující větší množství vody vyžadují před kryoprezervací tzv. kryoprotekci, která má zabránit poškození buněk v důsledku vzniku ledových krystalů. Při kryoprotekci se do živného média přidávají kryoprotektivní látky, jako např. dimethylsulfoxid (DMSO), glycerol, etylenglykol, prolin, manitol, sorbitol, sacharóza. Výhodnější je použít směsi několika kryoprotektivních látek než pouze jediné.

Při zmrazování může také negativně působit vzestup koncentrace buněčných roztoků, který je výsledkem

dehydratace či vznik krystalů ledu, které rozruší buněčné membrány . Z výše uvedeného je zřejmé, že ke kryoprezervaci budou vhodnější pletiva tvořená malými buňkami, s nízkým obsahem vakuol a hustou cytoplazmou (např. meristematické buňky), než buňky se silnou stěnou a velkou centrální vakuolou. Organizovaná pletiva se většinou zmrazují rychlým způsobem, tj. přímým ponořením do kapalného dusíku. V některých případech se používá postupné zmrazování rychlostí 1 - 5°C/min. a to až do dosažení teploty -40°C, poté se ponoří do tekutého dusíku.

Rozmrazování uskladněných pletiv se uskutečňuje co nejrychleji při teplotě do 40°C.

Využívání kryoprezervace rostlinného materiálu je spíše zatím v experimentálním stádiu. Doposud se podařilo úspěšně zmrazovat explantáty několika desítek rostlinných druhů. Po vyřešení existujících problémů se může kryoprezervace stát velmi významnou metodou uchovávání v přírodě vzácně se vyskytujících genomů stejně jako genomů získaných genetickými manipulacemi.

10. Produkce sekundárních metabolitů

Rostliny mají schopnost syntetizovat ze živin kromě nepostradatelných složek svého těla (aminokyselin, vitamínů, nukleových bází atd.) i přepestrou paletu nejrozmanitějších látek, jejichž funkce není zřejmá, a jež jsou pravděpodobně pro vlastní růst rostliny postradatelné. Označují se proto na rozdíl od primárních nepostradatelných metabolitů jako metabolicky sekundární a metabolismus vedoucí k jejich vzniku z primárních metabolitů se nazývá metabolismus sekundární. Sekundární metabolity jsou specifické pro určitý biologický druh. Pro sekundární metabolity je charakteristická téměř nepřeberná rozmanitost jejich chemických struktur. Molekuly sekundárních metabolitů jsou z hlediska organického chemika velice exotické a z hlediska biochemika neobvyklé. Sekundární metabolity se však přesto dají uspořádat podle chemické příbuznosti asi do padesáti skupin, z nichž je možné uvést např. flavonoidy, glykosidy, salicyláty, terpenoidy, naftaleny atd. O funkci sekundárních metabolitů se doposud polemizuje. Někteří autoři preferují ekologickou funkci (sekundární metabolity působí jako repelenty proti predátorům či parazitům příslušného druhu rostliny), jiní uvažují o jejich regulační funkci v metabolismu, někdy jsou považovány za látky, jež jsou produktem detoxikačního metabolismu.

Velmi dobře známá a komerčně využívaná je produkce sekundárních metabolitů u mikroorganismů (např. produkce antibiotik). Intaktní rostliny produkují ve srovnání s mikroorganismy mnohem širší škálu sekundárních metabolitů, z nichž mnohé mají význam ve farmacii, potravinářství, kosmetickém průmyslu atd. Sekundární metabolity se většinou doposud získávají z intaktních rostlin, popř. chemickou syntézou. Hlavním problémem získávání žádaných látek z intaktních rostlin je to, že velká část druhů takto významných rostlin v současné době přichází o své životní

prostředí a s jejich úbytkem a obtížností při pěstování roste i jejich cena. Další nevýhodou je velká závislost obsahu žádaných látek na klimatických podmínkách, na postupu sušení a skladování rostlin. Chemické syntézy jsou často obtížné a drahé a u složitějších látek zatím neuskutečnitelné. Konečný produkt chemických syntéz je také obvykle směsí izomerů, zatímco buňka produkuje jediný stereoizomer.

Tkáňové kultury rostlin se mohou v průmyslové produkci sekundárních metabolitů uplatnit na několika úrovních. Předně je možné využít tkáňových kultur k vlastnímu množení rostlin významných z hlediska produkce sekundárních metabolitů. Pomocí tkáňových kultur je možné selektovat kultivary s vysokou produkcí sekundárních metabolitů. Po zjištění, že rostlinné tkáňové kultury mohou tyto látky produkovat také, byla a je snaha je využít stejně jako kultury mikroorganismů. Pro průmyslové využití tkáňových kultur jako nového zdroje sekundárních metabolitů je třeba, aby jejich produkce byla ekonomičtější než tradiční postupy získávání těchto látek.

Tkáňové kultury mají oproti tradičním způsobům získávání sekundárních metabolitů podstatné výhody:

a) syntéza probíhá řízeně v umělém prostředí nezávisle na klimatu a půdních podmínkách

b) produkčním systémem jsou vyloučeny negativní biologické vlivy (mikroorganismy, hmyz) v přírodě měnící produkci sekundárních metabolitů

c) v tkáňové kultuře je možné selektovat kultivary s vyšší produkcí sekundárních metabolitů

d) automatizací řízení buněčného růstu a regulací metabolických procesů může klesat výrobní cena a stoupat produkce.

Jako perspektivní a také zřejmě jedinou rentabilní cestou produkce sekundárních metabolitů tkáňovými kulturami se jeví využití buněčných kultur a jejich kontinuální kultivace ve fermentorech. Vzdor intenzivnímu výzkumu, který v této oblasti probíhá se však doposud prakticky nepodařilo kultivovat jakoukoli rostlinnou suspenzi ve velkém objemu dostatečně rentabilní tak, aby ji bylo možné srovnat s rutinně používanými kulturami mikrobiálními. Jedním ze základních problémů je relativně pomalý růst rostlinných buněčných kultur a nízká produktivita tvorby sekundárních metabolitů. Navíc jen u malého počtu tkáňových kultur se podařilo dosáhnout produkce sekundárních metabolitů vyšší než v intaktní rostlině.

Jako velmi perspektivní pro zvýšení produkce sekundárních metabolitů tkáňovými kulturami se jeví využití imobilizovaných rostlinných buněk, u nichž byla v některých případech, v porovnání s běžnými buněčnými kulturami, prokázána vyšší produkce sekundárních metabolitů. Další výhodou imobilizovaných buněk je jejich snazší využití pro kontinuální produkci žádaných látek.

Imobilizace buněk spočívá v jejich uzavření do určitého nosného inertního materiálu. Existují v podstatě dva druhy imobilizace - aktivní a pasivní. Při aktivní imobilizaci se buňky uzavírají do polymerů, k jejichž polymeraci dochází až po smíchání buněk s monomery. Vlastní polymerace vede potom k imobilizaci buněk. Mezi nejvíce používané látky patří alginát sodný, agar, agaróza, polyakrylamid a želatina. Pasivní imobilizace je založena na vcestování (popř. sedimantaci) buněk do porézního materiálu. Nejvíce se k tomuto účelu používá polyuretanová pěna (molitan).

Imobilizované buňky jsou potom kultivovány v bioreaktorech a mohou se používat buď k biotransformacím, nebo komlexním syntézám. Biotransformační reakce umožňují dokončení syntéz finálních látek, které není možné syntetizovat uměle. V tomto případě se do kultivačního média dodávají prekursory těchto látek (vyráběné např. synteticky) a rostlinné buňky

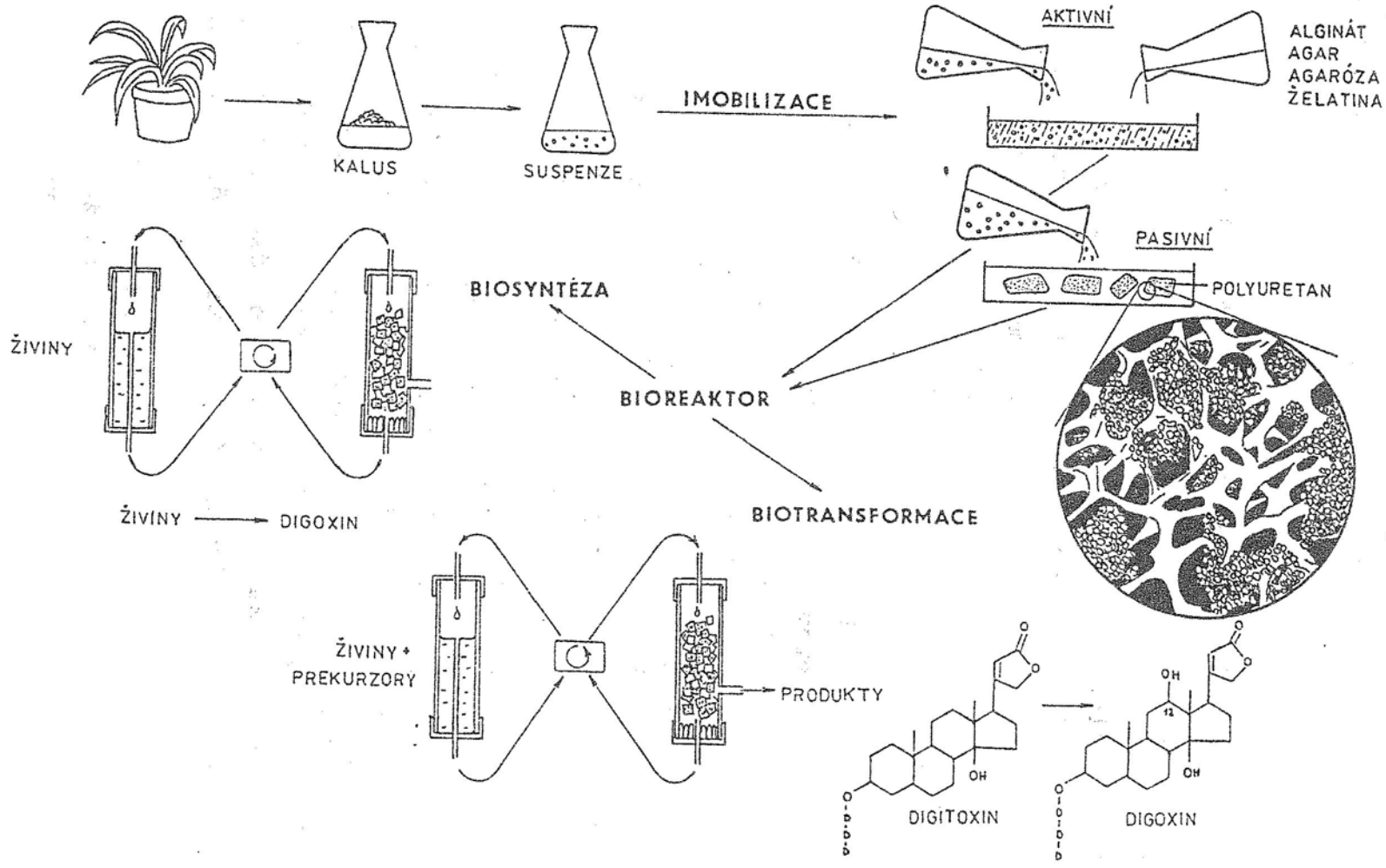
vykonají jejich "úpravu". V podstatě se jedná o reakci hydroxylační, glykosilační, metylační atd.

Cílem výzkumu v oblasti produkce sekundárních metabolitů tkáňovými kulturami je však dosažení komplexní syntézy žádaných produktů z dodaných živin. K dosažení tohoto cíle je však nutné nejprve dosáhnout zvýšení produkce sekundárních metabolitů v buněčných kulturách a dále také zajistit, aby tyto buňky syntetizované látky uvolňovaly do živného média. K dosažení pokroku v této oblasti je nutné určit, které faktory ovlivňují metabolickou diferenciaci buněk.

Syntézu a akumulaci sekundárních metabolitů je možné považovat za aspekt diferenciace, jev, který je charakterizován biochemicky, histochemicky a morfologicky. Bylo demonstrováno, že v rychle rostoucích rozpadavých suspenzních kulturách se akumuluje malé množství sekundárních metabolitů a že při procesech cytodiferenciace, buněčné agregace a morfologické organizace dochází ke zpomalení růstu, což přímo koreluje se vzestupem syntézy sekundárních metabolitů v tkáňové kultuře. Ukazuje se, že faktory zpomalující růst buněčných kultur působí také často stimulačně na produkci sekundárních metabolitů, především cestou omezení primárního metabolismu. Tento poznatek naznačuje určitý antagonismus primárního a sekundárního metabolismu, což na molekulární úrovni představuje rozdílné využívání společných prekursorů. Za podmínek rychlého růstu a dělení jsou tyto látky využívány např. k syntéze proteinů, ale za podmínek inhibice růstu jsou tyto využity k syntéze sekundárních metabolitů (např. fenolů a alkaloidů). Stimulačně na produkci sekundárních metabolitů může působit i vliv určitého stresu - např. snížení koncentrace živin v živném roztoku, vynechání růstového regulátoru, nebo aplikace prekursorů či tzv. elicitorů do média.

Tkáňové kultury mohou být v budoucnu významným zdrojem např. kardiakálních glykosidů (digoxin, lanatosid) používaných při léčbě srdečních chorob, ajamicinu (léčba

vysokého krevního tlaku), chininu, efedrinu, peprmitu, jasmínu atd. Jsou také perspektivní pro biotransformace různých sloučenin. Ekonomicky aplikovatelné jsou především kontinuální kultivace buněčných suspenzí a kultivace imobilizovaných buněk. Tyto kultivační systémy jsou však použitelné jen u buněk produkčních v morfologicky nediferencovaném stavu, zatímco u mnoha rostlinných druhů je diferenciace metabolická s diferenciací anatomickou pevně spojena. Pro získání jejich sekundárních metabolitů je tady nezbytné najít kultivační podmínky indukující anatomickou diferenciaci a kultivovat diferencovaná pletiva. Možnosti využití tkáňových kultur pro produkci sekundárních metabolitů ukazuje obr. 13.



Obr. 13. Produkce sekundárních metabolitů imobilizovanými rostlinnými buňkami.

11. Genetická charakteristika explantátových kultur

Kultury somatických buněk kultivovaných in vitro (kalusové a suspenzní kultury) vykazují při dlouhodobější kultivaci nestabilitu. Cytologicky stabilní buněčné kultury jsou výjimečné a krátkodobé. Geneticky velmi stabilní jsou naopak rostliny produkované klasickými technikami mikropropagace - - pomocí jednonodálních segmentů a vzrostných vrcholů (viz kap. 4).

K nejčastějším genetickým odchylkám v kulturách in vitro patří polyploidie, aneuploidie, častý je výskyt chimér. V průběhu kultivace in vitro může docházet rovněž k somatické redukci počtu chromozómů.

Cytologická nestabilita kalusových a buněčných kultur do jisté míry ohrozila původní představy o využití kalusových kultur jako "genových bank" .

U rostlin regenerovaných in vitro byly také popsány změny morfologické, fyziologické či biochemické. U řady druhů jsou známy změny v morfologii listů, květů, intenzitě růstu a odnožování. K výše uvedeným změnám může docházet postupně v průběhu po sobě následujících pasáží. To se projevuje např. ztrátou nároků na přítomnost exogenních fytohormonů (tzv. habituace). Další změnou v kalusové kultuře může být ztráta její morfogenní schopnosti. Nejprve obvykle mizí v kalusové kultuře schopnost vytvářet prýty, později schopnost tvořit kořeny. Ztráta organogenní a embryogenní schopnosti většinou koreluje se změnou ploidie buněk, které se staly polyploidními, popřípadě aneuploidními. Ztráta morfogenní schopnosti však nemusí mít vždy povahu genetickou, ale pouze fyziologickou, o čemž svědčí případy obnovení morfogeneze kalusové kultury změnou původních podmínek.

Cytogenetické změny ke kterým dochází při kultivaci in vitro jsou např. z hlediska klonového množení nežádoucí. Z hlediska šlechtění jsou však tyto změny velmi významné a to zejména u těch druhů, které se množí pouze vegetativně.

Úpravou kultivačních podmínek je možné na populaci buněk působit selekčním tlakem. Selektivní podmínky zvýhodňují ty buňky, kterým nejlépe vyhovují a ty poměrně brzy v kultuře převládnou. Z hlediska praktického využití je významná selekce rostlin rezistentních vůči patogenům, s vyšším obsahem aminokyselin, selekce rostlin rezistentních k herbicidům, zasolení či nízké teplotě atd.

Fenotypové změny v in vitro kulturách

Mezi fenotypové změny pozorované v tkáňových kulturách patří přítomnost či nepřítomnost ochlupení (trichomů), změny v morfologii listů, zakrslý růst, ztráta pigmentace (albinismus), změny morfologie květů, snížení schopnosti regenerace, snížená tvorba kořenů, nadměrné větvení stonků atd. Mnoho těchto změn má epigenetickou nebo fyziologickou podstatu a jsou tedy reversibilní.

Vznik těchto abnormalit velmi často souvisí se složením kultivačního média. Např. cytokininy, které se používají v relativně vyšších koncentracích k indukci tvorby prýtů, mohou inhibovat zakořeňování, mohou stimulovat tvorbu rostlin se silným stonkem a krátkými internodii, popř. stonků, které se nadměrně větví. Auxiny mohou způsobit abnormality ve fertilitě květů, abnormální tvar částí květů, malformaci listů, sníženou vitalitu rostlin atd.

12. Aplikace explantátových kultur rostlin v zemědělství

Explantátové kultury nacházejí stále větší uplatnění v zemědělské praxi a stávají se postupně neoddělitelnou součástí moderních zemědělských technologií. Jejich využití v zemědělské oblasti je možné především v následujících oblastech:

1) ozdravování rostlin a produkce bezvirózního rostlinného materiálu

2) masová produkce geneticky identického materiálu cestou mikropropagace

3) rychlé namnožení nově vyšlechtěných odrůd

4) uchovávání genobanky jednotlivých druhů, kultivarů atd.

5) produkce haploidních rostlin jako výchozího materiálu pro šlechtitelské programy

V budoucnu jistě nalezne širší využití v zemědělské praxi také somatická hybridizace, kultivace vajíček a embryí a metody genového inženýrství, které pracují s tkáňovými kulturami rostlin.

Tkáňové kultury se komerčně v zemědělství využívají především k mikropropagaci. Mikropropagace našla své uplatnění zejména v produkci okrasných druhů rostlin, ale je také využívána k množení ovocnářsky významných druhů rostlin a zeleniny.

Podle analýzy komerčního využití mikropropagace v Evropě (Pierik 1991) bylo v roce 1988 v západní Evropě 37 laboratoří, které produkovaly více než 1 milión rostlin za rok. Celková produkce v roce 1988 v západní Evropě byla

212,5 miliónů rostlin. Mezi nejvýznamnější kategorie mikropropagací množených rostlin patří: hrnkové květiny (92,2 miliónů), květiny k řezu (37,8 miliónů), ovocné dřeviny (19,4 mil.) a cibuloviny (13,2 mil.). Mezi největší producenty v Evropě patří Nizozemí (v roce 1991 94,5 mil.), Francie a Itálie, které produkují asi 62% evropské produkce.

Množství rostlin produkovaných mikropropagací se rok od roku neustále zvyšuje. Tento nárůst je možné demonstrovat na některých číslech z Nizozemí. V roce 1988 se mikropropagací vyprodukovalo 62.10^6 rostlin a v roce 1990 již $94,5.10^6$ rostlin (Pierik 1991). Stoupl i počet firem, které se komerčně mikropropagací zabývají - 67 v roce 1988 a 78 v roce 1990. Přestože je možné pozorovat obdobný trend i v jiných zemích, je zde stále velká mezera mezi poznatky teoretického výzkumu a praktickou aplikací tkáňových kultur. Počet komerčně množených druhů je totiž podstatně nižší než počet druhů u nichž byly odvozeny technologie množení in vitro na úrovni výzkumu.

Existuje celá řada souborných prací (např. Conger 1981, George and Sherrington 1984, Bhojwani 1990, Pierik 1991, Debergh and Zimmerman 1991), které podávají přehled o druzích, u nichž se komerčně mikropropagace využívá, popř. u kterých byl v laboratorních podmínkách odvozen postup mikropropagace.

Pro představu čtenáře je možné uvést stručný přehled druhů (rodů), které jsou nejčastěji množeny in vitro v Evropě (Pierik 1991): Ficus, Solanum tuberosum, Fragaria ananasa, Gerbera, Rosa, Philodendron, Saintpaulia, Nephrolepis, Cordyline, Prunus, Musa, Anthurium, Calathea, Dieffenbachia, Betula, Malus, Rhododendron.

Z výše uvedených rodů (druhů) rostlin vyplývá, že se mikropropagace především využívá k produkci okrasných druhů rostlin a jedním z hlavních důvodů tohoto stavu bude jistě poměrně vysoká prodejní cena těchto rostlin.

U ovocných druhů se v Evropě mikropropagace používá k množení jahodníku, jabloní, broskvoní, třešní, meruněk, vinné révy, borůvek, beztrnných ostružin, maliníku, kiwi a citrusů. Většímu využití mikropropagace u ovocných dřevin brání velmi často problémy spojené se zakořeňováním prýtů a jejich převodem do in vivo podmínek (viz dále).

Co se týče zeleniny, našla mikropropagace uplatnění především u květáku, celeru, chřestu, rajčat, okurek, zelí, salátu, bramboru, papriky, česneku a růžičkové kapusty.

Širšímu využití tkáňových kultur v komerční sféře brání některé nevýhody mikropropagace oproti klasickým metodám klonového množení rostlin:

1) Mikropropagace je realizovatelná především u bylin. U dřevin jsou výsledky mnohem horší. Větší aplikaci mikropropagace u dřevin brání jejich obecně horší regenerační schopnost a problémy spojené s rejuvenilizací.

2) Systémy mikropropagace popsané v odborných separátech nejsou plně optimalizovány pro masovou produkci a nejsou tedy bez další optimalizace a tím dalších finančních nákladů v komerční sféře použitelné.

3) Ve vědeckých pracích je většinou testován systém mikroprapagace pro jeden genotyp (kultivar). Tento systém nemusí fungovat pro jiný kultivar, protože se požadavky na kultivační podmínky u explantátů odebraných z jiných kultivarů mohou značně lišit.

4) Rostliny odvozené na médiích s vyšším obsahem cytokininů se po převedení do půdy mohou nadále nadměrně větvit. K zabránění tohoto jevu je mj. nutné snižovat koncentraci cytokininů v proliferačním médiu, čímž se původně popsaný vysoký koeficient množení může podstatně snížit a komerční využití systému není potom tak lukrativní.

5) Velká část systémů mikroprapagace uváděných v odborné literatuře používá zakořeňování rostlin v podmínkách in vitro. Tím se podstatně zvyšují náklady produkce a navíc kořeny vytvořené in vitro nemusí být funkční a po přenosu do půdy dochází k velkým úhynům rostlin nebo je nutné tyto opět zakořeňovat in vivo. Je nutné proto odvodit levnější a efektivnější systémy, které využívají zakořeňování v nesterilních podmínkách.

S dokonalým zakořeněním rostlin souvisí i úspěšnost jejich aklimatizace na podmínky in vivo.

6) Je nutné také snížit ztráty rostlin v procesu aklimatizace odvozením vhodných kultivačních systémů, které by eliminovaly nadměrnou transpiraci rostlin v počátečních fázích aklimatizace (systém rosení kultur a postupná redukce vzdušné vlhkosti, regulace světelné intenzity a teploty atd.). Je také nutné zajistit optimální postupy ochrany rostlin před napadením mikroorganismy po jejich převodu ze sterilních podmínek do podmínek nesterilních. Sterilizace půdy (gama záření, sterilizace parou) a aplikace fungicidů a bakteriocidních látek může značně zvýšit počet aklimatizovaných rostlin.

7) Zařízení laboratoří pro explantátové kultury je poměrně nákladné a nároky na pracovní kvalifikaci personálu laboratoře jsou vyšší než v případě běžných metod množení rostlin.

8) Je nutné optimalizovat celý systém mikropropagace tak, aby nedocházelo ke kumulaci vytížení laboratoře v určitém období roku. Aby bylo zařízení pro mikropropagaci plynule využíváno celoročně je nutné zvládnout problematiku uchovávání a kultivace kultur při nižších teplotách. Tento problém je možné řešit také širším sortimentem produkovaných rostlin.

9) Výrobní cena rostlin produkovaných tkáňovou kulturou je většinou vyšší než cena rostlin produkovaných klasickými postupy.

Vysoká cena in vitro množených rostlin je především dána nevyřešenou mechanizací a automatizací systému mikropropagace a tím vysokým podílem manuální práce v procesu mikropropagace. Náklady na pracovní sílu představují až 70% ceny rostliny.

Odvození systémů využívajících prvků mechanizace a automatizace je jednou z podmínek širšího využití mikropropagace i u těch druhů rostlin, kde cena in vitro množených rostlin doposud nemůže konkurovat ceně rostlin množených tradičními technologiemi. Ve světě již pracují různé poloautomatizované či plně automatizované systémy, ale jejich používání není doposud běžné.

Příkladem poloautomatického systému je systém firmy PermX Multiplant (Wageningen, Nizozemí, obr. 14)

V tomto systému je zcela automatizována příprava živného média a jeho sterilizace (4), příprava a sterilizace kultivačních "nádob" (1-3), systém využívá poloautomatického očkování kultur (8-9). Systém však nadále vyžaduje ruční řezání explantátů (7) , tento proces je však urychlen zavedením sterilního běžícího pásu, na který se explantáty pokládají, a oddělení řezání explantátů od jejich očkování. Systém nepracuje se skleněnými kultivačními nádobami, ale s pásem "kapes" z plastikové fólie. Pásy "kapes" se přímo ve firmě vyrábějí ze základní fólie (1) na speciálním zařízení (2), které umožňuje výrobu "kapes" v různých velikostech. Připravené pásy jsou potom sterilizovány gama zářením (3). Do těchto "kapes" je automaticky dávkováno živné médium (5) podle nastaveného objemu. Očkování spočívá v přenesení explantátů ze sterilního běžícího pásu na očkovací jehly (8), vlastní naočkování provede stroj. Po naočkování jsou "kapsy" zavařeny teplem (9). Naočkované kultury jsou potom přeneseny do kultivační místnosti a kultivovány v řízeném

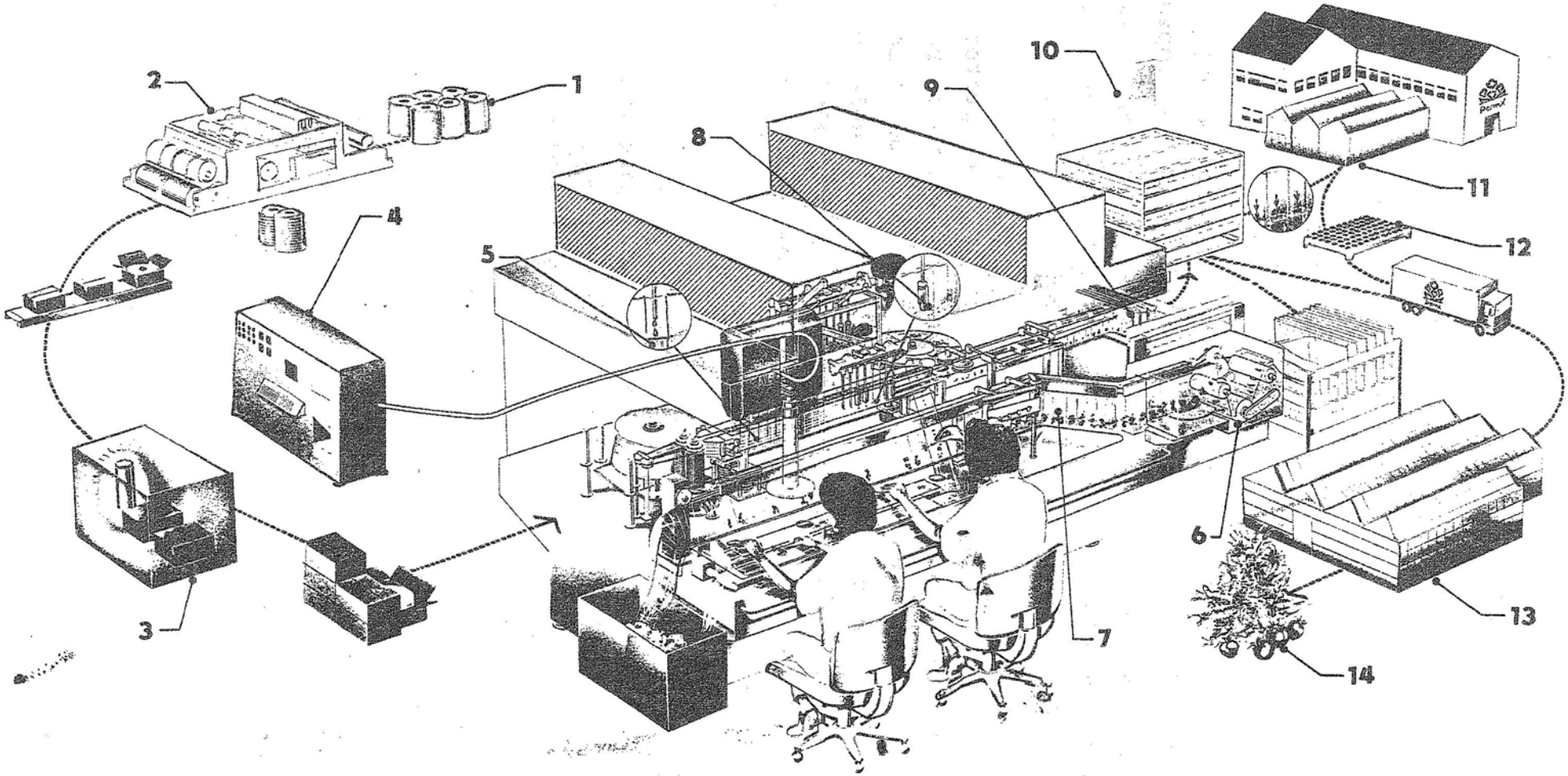
prostředí (10). Z kultivační místnosti se rostliny převádějí do in vivo podmínek ve skleníku k aklimatizaci, případně na zakořenění (11). Ve skleníku , kde aklimatizace probíhá, je postupně snižována vlhkost vzduchu.

Po aklimatizaci jsou dopěstovány do prodejní velikosti ve skleníku s řízenými kultivačními podmínkami (12-14) a exportovány.

Optimalizaci procesu mikroprapagace také umožňuje použití hydroponického systému pro zakořeňování a dopěstování rostlin odvozených in vitro. Prýty odvozené in vitro se převádí do bločku čedičové vaty (Grodan, rockwool) a po zakořenění se postupně převádí do bloků větších.

V posledním období se objevuje stále více prototypů plně automatických systémů, které např. využívají robotizace k pasážování explantátů (Japonsko) nebo bioreaktorů k produkci umělých semen (viz kap. 4). Přehled moderních automatických systémů, které zřejmě naleznou větší uplatnění v příštím desetiletí uvádí např. Debergh and Zimmerman (1991), Herman (1991) a Vasil (1991).

V Československu se pomocí tkáňových kultur již částečně množí materiál řady rostlinných druhů jako lilek brambor, jahodník, vinná réva, maliník, jabloň, řepa, bříza, javor, topol, dub, mnoho druhů okrasných rostlin jako např. hledíky, gerbery, karafiáty, rododendrony a mnoho dalších. Celkové počty in vitro produkovaných rostlin jsou však v porovnání s vyspělými státy Evropy zanedbatelné a mikropropagace v našem státě na komerční expanzi teprve čeká.



Obr. 14. Schématické znázornění cyklu mikropropagace při použití systému PermX Multiplant.

Protokoly laboratorních cvičení z explantátových kultur rostlin

Regenerace rostlin z nodálních segmentů

Experiment 1

Mikropropagace hvozdíku (Dianthus arenarius bohemicus)

Postup:

A) Příprava média

Budete připravovat dvě média H1 a H3.

1) Navažte 2,0 g agaru a dejte jej rozvařit do 150 ml redestilované vody na vodní lázni, topném hnízdu či v mikrovlnné troubě (platí pro obě média)

2) Do kádinky 300 ml pipetujte:

	H1	H3
MS makroelementy	25 ml	12,5 ml
MS mikroelementy I	2,5 ml	1,25 ml
MS mikroelementy II	0.25 ml	0,25 ml
Fe MS	1.25 ml	0,625 ml
thiamin	5 ml	-
kyselina nikotinová	2,5 ml	-
glycin	2,5 ml (2 mg/l)	2,5 ml
IBA	0,125 ml	-
BA	2,5 ml	-
přidejte:		
myo-inositol	25 mg	-
sacharóza	7,5 g	3,75 g

3) Slijte horký roztok agaru a připravený roztok v kádince, doplňte redestilovanou vodou (dále RDV) téměř na 250 ml s použitím odměrného válce. Pomocí pH metru za stálého míchání upravte pH na 5,5 (pomocí 0,1 M KOH nebo 0,1M HCl). Buďte opatrní při manipulaci s elektrodami pH metru. Elektrody je nutné ihned po použití opláchnout v destilované vodě.

4) Po nastavení pH doplňte médium přesně na 250 ml a rozlejte jej po 25 ml do kultivačních nádob. Nádoby uzavřete uzávěrem z plastu a fixem označte na víčko o jaké médium se jedná.

5) Médium sterilizujte při 121 °C v autoklávu po dobu 20 minut (provede laborant).

B) Vlastní mikropropagace

1) Ve sterilním očkovacím boxu otevřete kultivační baňku s kulturou hvozdíku a pinzetou přeneste rostliny z baňky na P. misku.

2) Pomocí skalpelu a pinzety rozřežte rostlinu tak, aby jste získali jednonodální stonkové segmenty se dvěma listy (vstřícné listy) o velikosti asi 0,5 cm.

3) Jednonodální segmenty očkujte jejich bazálním koncem na agarové médium - střídavě H1 a H3. Do jedné kultivační baňky očkujte 3 explantáty.

4) Kultivační baňku uzavřete a popište. Po naočkování všech připravených baněk tyto přeneste do kultivační místnosti s teplotou 25°C, osvětlením 2000 lux a fotoperiodou 16 hodin.

Pozorování:

Růst kultury pozorujte v týdenních intervalech po dobu 4 týdnů a zaznamenejte, kdy došlo k prvním projevům růstu úžlabního pupenu, kolik prýtů vzniká z jednoho nodu, zda dochází k tvorbě kořenů, zda dochází k tvorbě kalusu, jaké jsou rozdíly v habitu rostlin regenerovaných na médiu H1 a H3 a čím jsou případné rozdíly způsobeny.

Zakořeněné rostliny je možné přenést z kultivačních baněk do směsi perlit : písek : štěrk (1:2:1) v plastikovém boxu a dopěstovat až do stádia schopného přenosu do půdy ve skleníku nebo do volné půdy.

Experiment 2

Mikropropagace aktinídie čínské (Actinidia chinensis)

Postup:

A) Příprava média

1) Navažte 1.75 g agaru a dejte jej rozvařit do 150 ml redestilované vody na vodní lázni, topném hnízdu či v mikrovlnné troubě.

2) Do kádinky 300 ml pipetujte:

MS makroelementy	25 ml
MS mikroelementy I	2,5 ml
MS mikroelementy II	0.25 ml
Fe MS	1.25 ml
thiamin	0,2
pyridoxin	0,25 ml
kys. nikotinová	0,25 ml
IBA	0,25 (0,23 mg/l)

BA	2,5 ml (2,25 mg/l)
navažte:	
myo-inositol	25 mg
$NaH_2PO_4 \cdot H_2O$	42,5 mg
sacharóza	7,5 g

3) Slijte horký roztok agaru a připravený roztok v kádince, doplňte téměř na 250 ml s použitím odměrného válce. Pomocí pH metru za stálého míchání upravte pH na 5,7 (pomocí 0,1 M KOH nebo 0,1M HCl). Buďte opatrní při manipulaci s elektrodami pH metru. Elektrody je nutné ihned po použití opláchnout v destilované vodě.

4) Po upravení pH doplňte médium přesně na 250 ml a rozlejte jej po 25 ml do kultivačních nádob. Nádoby uzavřete uzávěrem z plastu a fixem označte na víčko o jaké médium se jedná.

5) Médium sterilizujte při 121 °C v autoklávu po dobu 20 minut.

B) Očkování a kultivace

1) Ve sterilním očkovacím boxu otevřete kultivační baňku s kulturou aktinidie čínské a rostliny z baňky přeneste postupně na P. misku.

2) Pomocí skalpelu a pinzety rozřežte rostlinu tak, aby jste získali jednonodální stonkové segmenty o velikosti asi 0,5 - 1 cm. Listy odřízněte asi 1-2 mm od úžlabního pupenu.

3) Jednonodální segmenty očkujte jejich bazálním koncem na agarové médium . Do jedné kultivační baňky očkujte 3 explantáty.

4) Kultivační baňku uzavřete a popište. Po naočkování všech

připravených baněk je přeneste do kultivační místnosti s teplotou 25°C, osvětlením 2000 lux a fotoperiodou 16 hodin.

Pozorování:

Zaznamenejte, kdy došlo k prvním projevům růstu úžlabního pupenu, zda vznikají kořeny, je-li patrná tvorba kalusu, zda vzniká více prýtů z jednoho pupenu a jaký je koeficient množení - počet nově vytvořených nodů (listů) za 4 popř. 6 týdnů kultivace.

Zakořeňování regenerovaných prýtů in vivo:

a) Jednotlivé prýty izolujte od případného kalusu a opláchněte ve vlažné vodě.

b) Bázi rostlin ponořte do 0,05% roztoku IBA na 5s a rostliny přeneste do substrátu v plastikovém boxu (prýt zanořte asi 1 cm do substrátu). Substrát musí být vlhký.

c) Box uzavřete průhledným víkem a umístěte do kultivační místnosti (teplota 25°C, osvětlení 2-3000 lux, fotoperioda 16 hodin).

d) Po 3-4 týdnech vyhodnoťte procento kořenících rostlin, délku a počet kořenů a případnou tvorbu nových listů.

e) Zakořeněné rostliny přeneste do rašelinového substrátu a po postupném odkrývání víka a otužení rostlin je přeneste k dalšímu pěstování do skleníku.

Axilární větvení

Experiment 3

Mikropropagace gerbery (Gerbera sp.)

Postup:

A) Příprava média:

Pro experiment budou použita tři média G1,G2 a G3. Média mají společný základ a liší se pouze v obsahu růstových regulátorů - kinetinu.

1) Navažte 1.75 g agaru a dejte jej rozvařit do 150 ml redestilované vody na vodní lázni, topném hnízdu či v mikrovlnné troubě.

2) Do každé kádinky 300 ml pipetujte:

MS makroelementy	25 ml
MS mikroelementy I	2,5 ml
MS mikroelementy II	0.25 ml
Fe MS	1.25 ml
thiamin	15 ml
pyridoxin	0,5 ml
kys. nikotinová	5 ml
přidejte:	
myo-inositol	25 mg
$NaH_2PO_4 .H_2O$	9,4 mg
sacharóza	11,25 g

dále pipetujte:

médium	G1	G2	G3
kinetin (ml)	1,25	6,25	12,5
(mg/l)	1,0	5,0	10,0

3) Slijte horký roztok agaru a připravený roztok v kádince, doplňte téměř na 250 ml s použitím odměrného válce. Pomocí pH metru za stálého míchání upravte pH na 5,8 (pomocí 0,1M KOH nebo 0,1M HCl). Buďte opatrní při manipulaci s elektrodami pH metru. Elektrody je nutné ihned po použití opláchnout v destilované vodě.

4) Po upravení pH na 5,8 doplňte médium přesně na 250 ml a rozlejte jej po 25 ml do kultivačních nádob. Nádoby uzavřete uzávěrem z plastu a fixem označte na víčko o jaké médium se jedná.

5) Médium sterilizujte při 121 ^{o}C v autoklávu po dobu 20 minut.

B) Očkování a kultivace

1) Sterilní pipetou přeneste rostliny z kultivační nádoby na sterilní P. misku.

2) Pomocí skalpelu izolujte jednotlivé prýty. Listy mladých prýtů, které jsou delší než 1 cm zkraťte.

3) Izolované prýty umístěte na čerstvé médium. Jeden prýt do jedné kultivační nádoby. Nádoby ihned po naočkování uzavřete víčkem. Očkujte postupně vždy po jedné nádobě od každého média.

4) Kulturu umístěte do kultivační místnosti (fotoperioda 16

hodin, osvětlení 2000 lux, teplota 22 - 25°C).

Pozorování:

Po několika týdnech je možné pozorovat prorůstání axilárních prýtů. Popište vývoj prýtů v průběhu experimentu (1-8. týden).

Na konci experimentu stanovte počet nově vytvořených prýtů na jeden explantát. Explantáty, které uhynuly a které jsou kontaminovány se nezapočítávají. Stanovte procento prýtů tvořících kořeny.

Meristémové kultury

Experiment 4

Meristémová kultura jahodníku

Postup:

A) Příprava živného roztoku

1) Navažte 1.75 g agaru a dejte jej rozvařit do 150 ml redestilované vody na vodní lázni, topném hnízdu či v mikrovlnné troubě.

2) Do každé kádinky 300 ml pipetujte:

MS makroelementy	25 ml
MS mikroelementy I	2,5 ml
MS mikroelementy II	0.25 ml
Fe MS	1.25 ml
thiamin	0,25 ml (0,5 mg/l)

pyridoxin	1,125 ml	(2,5 mg/l)
kys. nikotinová	1,125 ml	(2,5 mg/l)
IBA	5 ml	(4,6 mg/l)
BA	0,5 ml	(0,5 mg/l)
přidejte:		
glycin	0,5 mg	
myo-inositol	25 mg	
kyselina askorbová	5 mg	
sacharóza	11,25 g	

3) Slijte horký roztok agaru a připravený roztok v kádince, doplňte téměř na 250 ml s použitím odměrného válce. Pomocí pH metru za stálého míchání upravte pH na 5,8 (pomocí 0,1M KOH nebo 0,1M HCl). Buďte opatrní při manipulaci s elektrodami pH metru. Elektrody je nutné ihned po použití opláchnout v destilované vodě.

4) Po upravení pH na 5,8 doplňte médium přesně na 250 ml a rozlejte jej po 10 ml do zkumavek. Zkumavky uzavřete kovovým uzávěrem a fixem označte na víčko o jaké médium se jedná.

5) Médium sterilizujte při 121 ^{o}C v autoklávu po dobu 20 minut.

B) Odvození a kultivace kultury

1) Z rostlin jahodníku izolujte vzrostné vrcholy v délce asi 2 cm , vrcholy opláchněte v tekoucí vodě.

2) Ze vzrostného vrcholu ve sterilních podmínkách izolujte pinzetou listy a ponechte pouze jeden pár mladých listů kryjících vzrostný vrchol.

3) Vzrostný vrchol přeneste na 2 minuty do 70% etanolu a poté ve sterilních podmínkách do roztoku Sava Super v 250 ml

EM baňce, baňku uzavřete alobalem a umístěte na třepačku na 10 minut.

4) V očkovacím boxu slijte roztok Sava Super do připravené kádinky a do EM baňky se vzrostými vrcholy nalijte asi 150 ml sterilní destilované vody, baňku uzavřete a umístěte na 5 minut na třepačku.

5) Vypírání dezinfekčního roztoku opakujte ještě 2x - vždy novou sterilní vodou (150 ml).

6) Po třetím vyprání ve sterilní vodě přeneste vzrostné vrcholy do P. misky s malým množstvím sterilní vody (proti vyschnutí) a pod preparačním mikroskopem odpreparujte listy kryjící vzrostný vrchol a samotný vrchol izolujte (velikost 0,3 -0,5 cm) a naočkujte polárně (spodní stranou) na povrch živného roztoku ve zkumavce. Do zkumavky očkujte vždy pouze jeden vrchol.

7) Naočkované kultury kultivujte v kultivační místnosti (23-25°C, 2000 lux, 16 hodin fotoperioda) po dobu 4-8 týdnů.

Pozorování a záznam výsledků:

1) Zaznamenejte počet vrcholů, které tvoří prýty a počet vrcholů tvořících kalus a vyjádřete procentem.

2) Zaznamenejte počet prýtů vzniklých na jeden vzrostný vrchol a jejich průměrnou délku.

3) Zaznamenejte procentem případnou tvorbu kořenů u regenerovaných prýtů.

Poznámka:

Regenerované prýty je dále možné množit dělením trsů rostlin (viz experiment gerbera) a jejich kultivací na médiu stejného složení jako u primokultury s tím, že obsah růstových regulátorů se liší v obsahu BA (místo 0,5 mg/l je 5 mg/l).

Regenerované prýty je možné zakořenit na zakořeňovacím médiu, které představuje vlastně MS médium obohacené o kyselinu nikotinovou 0,5 mg/l, pyridoxin 0,5 mg/l a IBA 1,0 mg/l.

Postup:

Izolujte prýty o velikosti 2 cm a očkujte je na zakořeňovací médium ve zkumavce . Kultury kultivujte v kultivační místnosti 1-2 měsíce za stejných kultivačních podmínek jako v případě kultivace vzrostných vrcholů. Po zakořenění přeneste rostliny do vlhkého substrátu (perlit - písek, propařená zemina s perlitem, rašelina) v plastikovém boxu. Otužování je možné provést také tak, že se nejprve otevřou závěry kultivačních baněk na 1 týden a teprve potom se rostliny přenesou do semisterilního substrátu. V průběhu 3-4 týdnů postupně snižujte vlhkost v boxu odklápěním jeho víka. Po otužení přeneste rostliny do skleníku.

Experiment 5

Meristémová kultura Gladiolus

Postup:

A) Příprava médií:

Bude použito 6 médií, každá skupina připraví jeden druh (25 zkumavek)

1) Navažte 1.75 g agaru a dejte jej rozvařit do 150 ml redestilované vody na vodní lázni, topném hnízdu či v mikrovlnné troubě.

2) Do kádinky 300 ml pipetujte:

MS makroelementy	25 ml
MS mikroelementy I	2,5 ml
MS mikroelementy II	0.25 ml
Fe MS	1.25 ml
thiamin	0.5 ml
pyridoxin	0.25 ml
kys. nikotinová	0.25 ml

přidejte:

myo-inositol	25 mg
sacharóza	7.5 g !

dále pipetujte:

médium	GL1	GL2	GL3	GL4	GL5	GL6
BA (ml)	0,006	0,06	0,25	-	-	-
(mg/l)	0,005	0,05	0,2	-	-	-
IAA (ml)	-	-	-	0,125	0,625	6,25
(mg/l)	-	-	-	0,1	0,5	5,0

3) Slijte horký roztok agaru a připravený roztok v kádince, doplňte téměř na 250 ml s použitím odměrného válce. Pomocí pH metru za stálého míchání upravte pH na 6.0 (pomocí 0,1M KOH nebo 0,1M HCl). Buďte opatrní při manipulaci s elektrodami pH metru. Elektrody je nutné ihned po použití opláchnout v destilované vodě.

4) Po upravení pH doplňte médium přesně na 250 ml a rozlijte jej po 30 ml do kultivačních nádob. Nádoby uzavřete uzávěrem z plastu a fixem označte na víčko o jaké médium se jedná.

5) Médium sterilizujte při 121 °C v autoklávu po dobu 20 minut.

B) Očkování a kultivace

1) Meristémy se izolují z mladých pacibulek gladiolu o velikosti 0.5 cm. Před izolací meristémů je nutné tyto sterilizovat následujícím postupem:

a) odstraňte zevní hnědou šupinu
b) pacibulky poté ponořte na 5-10 sekund do 70% etanolu
c) pacibulky přeneste do 10% roztoku Savo Super ve sterilní EM baňce 250 ml a na 15 minut umístěte na třepačku
d) roztok Sava Super slijte a nahraďte jej 150 ml sterilní destilované vody, baňku uzavřete a na 5 minut umístěte na třepačku
e) vodu slijte a proplachování vodou opakujte ještě 2x.

2) Omyjte si ruce mýdlem a dezinfikujte je 96% etanolem. Pacibulku uchopte do prstů levé ruky(pravák).

3) Sterilní pinzetou odstraňte hnědou čepičku z vrcholu.

4) Sterilním skalpelem izolujte meristém - pacibulkou pomalu v prstech otáčejte a řežte. Meristém je možné izolovat také pomocí pinzety a skalpelu.

5) Kónický explantát očkujte polárně (bazální pól dolů) na médium (do zkumavky očkujte jeden explantát, střídavě očkujte na jednotlivé druhy médií).
6) Kulturu kultivujte v kultivační místnosti (25°C, 16 hod.,

2000 lux) 5-7 týdnů.

Pozorování:

Pozorujte po 14 dnech a měsíci kultivace a zaznamenejte, zda se tvoří prýty, kořeny, kalus, jaký je koeficient množení (počet regenerovaných prýtů z jednoho meristému), jak se liší růst explantátů na jednotlivých médiích.

Experiment 6

Mikropropagace banánovníku (Musa cavendish)

Postup:

A) Příprava média

Budete připravovat dvě média B1 a B2. B1 je tekuté médium bez agaru a B2 je zpevněno agarem.

1) Pro médium B2 navažte 1.75 g agaru a dejte jej rozvařit do 150 ml redestilované vody v mikrovlnné troubě (asi 6 minut) nebo na topném hnízdě použijte 250 ml resp. 500 ml varnou baňku. Médium B1 je bez agaru !

2) Do kádinky 300 ml pipetujte:

MS makroelementy	25 ml
MS mikroelementy I	2,5 ml
MS mikroelementy II	0.25 ml
Fe MS	1.25 ml
thiamin	0.5 ml
pyridoxin	0.25 ml
kys. nikotinová	0.25 ml

navažte:

myo-inositol	25 mg
sacharóza	7.5 g !

do média B1 pipetujte 5ml zásobního roztoku BA (4,5 mg/l)
do média B2 pipetujte 1,25 ml zásobního roztoku IBA (1mg/l).

3) Slijte horký roztok agaru a připravený roztok v kádince, doplňte téměř na 250 ml s použitím odměrného válce. Pomocí pH metru za stálého míchání upravte pH na 5.8 (pomocí 0,1M KOH nebo 0,1M HCl). Buďte opatrní při manipulaci s elektrodami pH metru. Elektrody je nutné ihned po použití opláchnout v destilované vodě.

4) Po upravení pH doplňte médium přesně na 250 ml a rozlijte jej po 30 ml do kultivačních nádob. Nádoby uzavřete uzávěrem z plastu a fixem označte na víčko o jaké médium se jedná. Tekuté médium B1 rozlijte do tří 250 ml EM baněk (asi 80 ml média) a baňky uzavřete alobalem.

5) Médium sterilizujte při 121 ^{o}C v autoklávu po dobu 20 minut.

B) Očkování a kultivace

1) Z EM baňky vyjměte sterilní pinzetou trs rostlin na P. misku, skalpelem oddělte jednotlivé rostliny od sebe.

2) Listy delší než 1 cm seřízněte a ponechte pouze bazální část prýtu, která obsahuje vzrostný vrchol.

3) V případě očkování na médium B1 explantát rozřízněte skalpelem na polovinu (uvidíte příčný řez vzrostným vrcholem). Na tekuté médium očkujte 4 explantáty, na pevné (B2) médium 2-3 explantáty. Nádobu ihned uzavřete a popište. Očkujte střídavě na B1 a B2 médium.

4) Kultury kultivujte v kultivační místnosti (25°C, 16 hodin 2000 lux) a jejich růst v průběhu 4 týdnů vyhodnocujte. Kultura v B1 médiu se kultivuje na třepačce (100 ot/min)

Pozorování:

Vyhodnoťte koeficient množení na obou médiích, porovnejte růst rostlin na obou médiích - tvorba kořenů, kalusu, proliferace prýtů.

Experiment 7

Meristémová kultura bramboru

Postup:

A) Příprava média:

1) Navažte 1.75 g agaru a dejte jej rozvařit do 150 ml redestilované vody v mikrovlnné troubě (asi 6 minut). Použijte 250 ml EM baňku.

2) Navažte 1.175 g koncentrátu MS média a rozpusťte jej v 50 ml redestilované vody.

3) Navažte a přidejte 7,5 g sacharózy.

3) Slijte horký roztok agaru a připravený roztok v kádince, doplňte téměř na 250 ml s použitím odměrného válce. Pomocí pH metru za stálého míchání upravte pH na 5.8 (pomocí 0,1M KOH nebo 0,1M HCl). Buďte opatrní při manipulaci s elektrodami pH metru. Elektrody je nutné ihned po použití opláchnout v destilované vodě.

4) Po upravení pH doplňte médium přesně na 250 ml a rozlijte jej po 10 ml do zkumavek. Zkumavky uzavřete

kovovým uzávěrem a fixem označte na víčko o jaké médium se jedná.

5) Médium sterilizujte při 121 °C v autoklávu po dobu 20 minut.

B) Založení kultury a kultivace

1) Z naklíčených bramborových hlíz oddělte výhony 3-5 cm dlouhé, opláchněte je vodou a sterilizujte 10 minut v 10% roztoku Savo Super (150 ml v EM baňce 250 ml).

2) Výhony přeneste na 2 minuty do 100 ml 70% etanolu v kádince 250 ml a poté ve sterilních podmínkách do roztoku Sava Super v 250 ml EM baňce, baňku uzavřete alobalem a umístěte na třepačku na 10 minut.

3) V očkovacím boxu slijte roztok Sava Super do připravené kádinky a do EM baňky s výhony nalijte asi 150 ml sterilní destilované vody, baňku uzavřete a umístěte na 5 minut na třepačku.

4) Vypírání dezinfekčního roztoku opakujte ještě 2x - vždy novou sterilní vodou (150 ml).

5) Po třetím vyprání ve sterilní vodě přeneste výhony do P. misky s malým množstvím sterilní vody (proti vyschnutí) a pod preparačním mikroskopem odpreparujte vzrostný vrchol (velikost 0,3-0,5 cm) a naočkujte polárně (spodní stranou) na povrch živného roztoku ve zkumavce. Do zkumavky očkujte vždy pouze jeden vrchol. Zkumavku uzavřete kovovým uzávěrem. Na každý výhon použijte novou P. misku.

6) Kulturu kultivujte v kultivační místnosti při teplotě 25°C, fotoperiodě 12 hodin (1500 lux) po dobu 30 dní a poté dalších 30 dní při nižším osvětlení (500 lux). Po této době

by se měly vytvořit prýty dlouhé asi 3 cm.

Další postup mikropropagace je založen na tvorbě nových prýtů z jednonodálních stonkových segmentů, popř. na tvorbě mikrohlízek.

7) Regenerované prýty přeneste na agarové MS médium obsahujícím 0,05 uM NAA (100 ml v EM baňce 250 ml). Kulturu kultivujte při teplotě 25°C a osvětlení 500 lux.

8) Po 20 dnech by měly prorůst úžlabní pupeny v axilární prýty s kořeny. Tyto prýty položte v téže kultivační baňce horizontálně na povrch média, čímž dojde k dalšímu axilárnímu větvení.

9) Tento postup opakujte několikrát (přeneste izolované prýty na nové médium), až je dosaženo žádaného počtu rostlin. Rostliny o velikosti 10 cm je možné přenést do půdy a dále pěstovat ve skleníku (nutno zajistit adaptaci na nižší vzdušnou vlhkost).

10) V případě, že chcete dosáhnout tvorby mikrohlízek, očkujte adventivní prýty na MS médium s agarem a 22-44 uM BA, 0,23 M sacharózy (použijte EM baňku 500 ml s 200 ml média).

12) Kulturu kultivujte při 18-30°C při fotoperiodě 8 hodin (1000-5000 lux). Mikrohlízky by měly vzniknout do 4 měsíců.

Pozorování:

V případě vyhodnocení primokultury vyhodnoťte úspěšnost sterilizace (% nekontaminovaných explantátů), kdy došlo k prvnímu projevu růstu meristémů, kolik prýtů vznikalo z jednoho meristému, jaká byla velikost prýtů a kolika nody byly prýty tvořeny na konci kultivace (8 týdnů).

U následujících kultur vyhodnoťte koeficient množení - počet axilárních prýtů na explantát, popř. počet nově vzniklých prýtů, přítomnost kořenů a počet vytvořených mikrohlízek na jeden explantát.

Tvorba adventivních orgánů

Experiment 8

Tvorba adventivních prýtů v kultuře Saintpaulia ionantha

Postup:

A) Příprava médií
Budete připravovat tři média po 250 ml a od každého média připravíte 10 baněk (100 ml) s 25 ml média.

1) Navažte 2 g agaru a dejte jej rozvařit do 150 ml redestilované vody v mikrovlnné troubě (asi 6 minut). Použijte 250 ml EM baňku.

2) Navažte 1.175 g koncentrátu MS média a rozpusťte jej v 50 ml redestilované vody.

3) Přidejte a rozpusťte 7.5 g sacharózy.

4) Do jednotlivých označených kádinek pipetujte zásobní roztoky růstových regulátorů:

médium	Sa1	Sa2	Sa3
BA (ml)	-	0,125	1,25
(mg/l)	-	0,1	1,0
NAA (ml)	-	0,125	1,25
(mg/l)	-	0,1	1,0

5) Obsah v kádinkách promíchejte na elektromagnetické míchačce.

6) rozvařený agar slijte s roztokem v kádince do odměrného válce 250ml, doplňte téměř na 250ml slijte zpět do kádinky 250ml.

7) Pomocí pH metru upravte pH média na 5,8 (pomocí 1M HCl resp. KOH).

8) V odměrném válci doplňte objem média přesně na 250ml.

9) Médium za tepla rozlijte po 25 ml pomocí malého odměrného válce do kultivačních baněk a baňky uzavřete alobalem.

10) Na alobal označte fixem o jaké médium se jedná a číslo skupiny.

11) Médium v baňkách sterilizujte v autoklávu 20 minut při teplotě 121°C.

B) Očkování a kultivace

1) V očkovacím boxu nalijte do sterilní 250ml EM baňky 10% roztok Sava Super se 3 kapkami Jaru.

2) 4 izolované listy saintpaulie přeneste na 2 minuty do kádinky s 70% etanolem (kádinkou pohybujte).

3) Opálenou pinzetou přeneste listy do EM baňky s roztokem Sava Super, baňku uzavřete alobalem a umístěte na třepačku na 10 minut.

4) V očkovacím boxu slijte roztok Sava Super do připravené kádinky a do EM baňky s listy nalijte asi 150 ml sterilní destilované vody, baňku uzavřete a umístěte na 5 minut na

třepačku.

5) Vypírání dezinfekčního roztoku opakujte ještě 2x - vždy novou sterilní vodou (150 ml).

6) Po třetím vyprání ve sterilní vodě přeneste listy postupně do sterilní P. misky.

7) Z listu odřízněte jeho okrajové části, tak aby vznikl čtverec o straně 3-4 cm, čtverec rozřežte 4 řezy na 9 malých čtverců.

8) Jednotlivé malé čtverce očkujte jejich spodní stranou na povrch média v kultivační baňce, po naočkování baňku ihned uzavřete a pinzetu před očkováním další baňky opalte.

9) Kultury kultivujte v kultivační místnosti (23°C, 16 hod. 2000 lux) 60 dní (růst explantátu sledujte každých 14 dní).

Pozorování:

Po 60 dnech kultivace stanovte počet prýtů vzniklých na jeden explantát popř. stanovte čerstvou hmotnost biomasy v kultivační baňce a porovnejte výsledky z různých médií.

Experiment 9

Mikropropagace lilií tvorbou adventivních cibulek

Postup:

A) Příprava živného média:
Bude se připravovat 5 různých médií pro 8 variant kultivačních podmínek.

1) Navažte 1.75 g agaru a dejte jej rozvařit do 150 ml redestilované vody na vodní lázni, topném hnízdu či v mikrovlnné troubě.

2) Do každé kádinky 300 ml pipetujte:
(společný základ všech médií)

MS makroelementy	25 ml
MS mikroelementy I	2,5 ml
MS mikroelementy II	0.25 ml
Fe MS	1.25 ml
thiamin	0,5 ml
přidejte:	
myo-inositol	25 mg
NAA	0,125 ml
	(0,1 mg/l)

dále přidejte (podle skupin):

médium L1, L2, L3, L7	12,5 g sacharózy
médium L4	17,5 g sacharózy
médiu, L5	7,5 g sacharózy
médium L6	2,5 g sacharózy

3) Slijte horký roztok agaru a připravený roztok v kádince, doplňte téměř na 250 ml s použitím odměrného válce. Pomocí pH metru za stálého míchání upravte pH na 5,8 (pomocí 0,1M KOH nebo 0,1M HCl). Buďte opatrní při manipulaci s elektrodami pH metru. Elektrody je nutné ihned po použití opláchnout v destilované vodě.

4) Po upravení pH doplňte médium přesně na 250 ml a rozlejte jej po 10 ml do kultivačních zkumavek. Zkumavky uzavřete kovovým uzávěrem a fixem označte na víčko o jaké médium (číslo skupiny) se jedná. Zkumavky narovnejte do sklenic po 10 kusech.

5) Médium sterilizujte při 121 °C v autoklávu po dobu 20 minut.

B) Očkování

1) Z cibule, která byla uchovávána v chladu (5°C), odstraňte zevní poškozené šupiny, tak aby byly odstraněny také zbytky půdy na cibuli.

2) Pod tekoucí vodou oddělujte postupně jednotlivé šupiny a vložte je do 250 ml kádinky s vodou. Příliš malé šupiny nepoužívejte (střední část cibule). Šupiny proplachujte v tekoucí vodě 10-15 minut.

3) Vodu z kádinky slijte a kádinku se šupinami přeneste do očkovacího boxu.

4) Do kádinky nalijte asi 100 ml 70% etanolu a nechte jej působit 2 minuty.

5) Šupiny přeneste do sterilní EM baňky se 150 ml 10% Sava Super a sterilizujte je 15 minut. Použijte třepačku.

6) V očkovacím boxu slijte roztok Sava Super do připravené kádinky a do EM baňky se šupinami nalijte asi 150 ml sterilní destilované vody, baňku uzavřete a umístěte na 5 minut na třepačku.

7) Vypírání dezinfekčního roztoku opakujte ještě 2x - vždy novou sterilní vodou (150 ml).

8) Po třetím vyprání ve sterilní vodě přeneste šupiny do sterilní P. misky.

9) Budete očkovat 7x 4 zkumavky. Zkumavky označené číslem 1

a 2 se očkují polárně (bazální stranou segmentu šupiny na povrch média), do ostatních zkumavek se očkuje apolárně (apikální řeznou plochou na povrch média). Do dvou zkumavek se očkuje explantát z apikální části šupiny a do dvou z bazální části šupiny.

10) Pomocí skalpelu nařežte příčně jednotlivé šupiny na plátky široké 2-4 mm. Je nutné zaznamenat, který explantát je z apikální (horní) části šupiny, a který z bazální části. Je nutné rovněž poznačit, který explantát byl očkován polárně či apolárně (zkumavky 1 a 2).

10) Naočkované zkumavky se kultivují v kultivační místnosti při 23-25°C a to :
zkumavky 1, 3, 4, 5, 6 na světle a zkumavky 7 a 2 ve tmě.
V obou případech jsou zkumavky v téže kultivační místnosti.

Pozorování:

Zaznamenejte, kdy se objeví první cibulky, zda dochází k tvorbě kalusu, tvoří-li se prýty a kořeny, zda je možné pozorovat rozdíly mezi apolárně a polárně očkovanými explantáty, je-li zde závislost na původu explantátu (apikální, bazální část šupiny). Na závěr experimentu 4-8 týdnů určete počet cibulek vytvořených na jeden explantát a jejich čerstvou hmotnost.

Nepřímá organogeneze

Experiment 10

Organogeneze v tkáňové kultuře tabáku.

Postup:

K experimentu budou použita média T1 - T6, každá skupina připravuje jedno médium.

1) Navažte 1.75 g agaru a dejte jej rozvařit do 150 ml redestilované vody v mikrovlnné troubě (asi 6 minut). Použijte 250 ml EM baňku.

2) Navažte 1.175 g koncentrátu MS média a rozpusťte jej v 50 ml redestilované vody.

navažte:

sacharóza 7.5 g

pipetujte:

médium		T1	T2	T3	T4	T5	T6
kinetin	(ml)	-	-	0,25	0,25	3,75	3,75
	(mg/l	-	-	0,2	0,2	3,0	3,0)
IAA	(ml)	-	0,25	-	3,75	0,25	0,025
	(mg/l	-	0,2	-	3,0	0,2	0,02)

3) Slijte horký roztok agaru a připravený roztok v kádince, doplňte téměř na 250 ml s použitím odměrného válce. Pomocí pH metru za stálého míchání upravte pH na 5.8 (pomocí 0,1M

KOH nebo 0,1M HCl). Buďte opatrní při manipulaci s elektrodami pH metru. Elektrody je nutné ihned po použití opláchnout v destilované vodě.

4) Po upravení pH doplňte médium přesně na 250 ml a rozlejte jej po 10 ml do zkumavek. Zkumavky uzavřete kovovým uzávěrem a fixem označte na víčko o jaké médium se jedná.

5) Médium sterilizujte při 121 °C v autoklávu po dobu 20 minut.

Očkování a kultivace:

1) Z rostliny tabáku izolujte 4 segmenty hlavního stonku v délce 3 cm. Odstraňte listy a úžlabní pupeny a konce stonku (asi 0,5 cm) ponořte do rozehřátého vosku.

2) Stonkové segmenty ponořte na 2 minuty do 70% etanolu a poté přeneste do sterilní EM baňky se 150 ml 10% Sava Super a sterilizujte je 15 minut. Použijte třepačku.

3) V očkovacím boxu slijte roztok Sava Super do připravené kádinky a do EM baňky se segmenty stonku nalijte asi 150 ml sterilní destilované vody, baňku uzavřete a umístěte na 5 minut na třepačku.

4) Vypírání dezinfekčního roztoku opakujte ještě 2x - vždy novou sterilní vodou (150 ml).

5) Po třetím vyprání ve sterilní vodě přeneste segmenty stonku do sterilní P. misky.

6) Skalpelem seřízněte oba konce segmentu (asi 1 cm). Pomocí korkovrtu vysekněte ze stonku váleček dřeně.

7) Váleček dřeně rozřežte skalpelem na plátky široké 2-3 mm a jednotlivé explantáty očkujte po jednom do zkumavek na povrch kultivačního média. Explantát očkujte polárně - bazální stranou do média. Očkujte postupně do všech zkumavek (6x4).

8) Kultury kultivujte v kultivační místnosti při teplotě 25°C, při stálém osvětlení (2000 lux).

9) Po 2-3 týdnech dojde k tvorbě kalusu na povrchu explantátu. Po 4 týdnech pasážujte kalus na médium stejného složení (do 100 baněk s 25 ml média) a dále kultivujte za stejných podmínek. Prýty a kořeny se na některých médiích objeví v průběhu dalších 35-60 dní.

Pozorování:

Zaznamenejte procentuálně úspěšnost odvození primokultury, dobu, kdy bylo možné poprvé pozorovat tvorbu kalusu, morfologické změny v kalusové kultuře po prvním očkování v průběhu další kultivace. Zaznamenejte jaký má vliv hormonální složení média na růst explantátu resp. kalusu.

Experiment 11

Organogeneze v kalusové kultuře anturie (Anthurium sp.)

Postup:

1) Navažte 1.75 g agaru a dejte jej rozvařit do 150 ml redestilované nody v mikrovlnné troubě (asi 6 minut). Použijte 250 ml EM baňku nebo agar rozvařte v 500 ml varné baňce na topném hnízdě.

2) Do kádinky 300 ml pipetujte a navažte:

MS makroelementy	25 ml
MS mikroelementy I	2,5 ml
MS mikroelementy II	0.25 ml
Fe MS	1.25 ml
thiamin	0.05 ml
pyridoxin	0.25 ml
kys. nikotinová	0.25 ml

přidejte:

myo-inositol	25 mg
glukózu	5 g

dále pipetujte:

médium	A1	A2	A3
BA (ml)	-	0,5	5,0
(mg/l)		(0,5)	(5,0)

3) Slijte horký roztok agaru a připravený roztok v kádince, doplňte téměř na 250 ml s použitím odměrného válce. Pomocí pH metru za stálého míchání upravte pH na 6.0 (pomocí 0,1M KOH nebo 0,1M HCl). Buďte opatrní při manipulaci s elektrodami pH metru. Elektrody je nutné ihned po použití opláchnout v destilované vodě.

4) Po upravení pH doplňte médium přesně na 250 ml a rozlejte jej po 30 ml do kultivačních nádob.

5) Nádoby uzavřete uzávěrem z plastu a fixem označte na víčko o jaké médium se jedná.

6) Médium sterilizujte při 121 ^{o}C v autoklávu po dobu 20 minut.

Očkování a kultivace:

EM baňku s kalusem anturie v tekutém médium ostříkejte etanolem, sejměte hliníkovou fólii a tekuté médium opatrně slijte do kádinky . Malé kousky kalusu přeneste na sterilní P. misku. Do každé kultivační nádoby naočkujte 4 kousky kalusu o velikosti asi 0.5 cm. Po naočkování uzavřete nádobu ihned uzávěrem. Kultury kultivujte v kultivační místnosti na světle (25°C, 2000 lux).

Pozorování:

Pozorujte v průběhu kultivace (1-8. týden) a popište:
- jaký je vzhled kalusu
- dochází k regeneraci či nekróze
- zezelenal kalus
- je možné pozorovat prýty či kořeny
- jaké je procento explantátů tvořících prýty a kořeny

Poznámka:
Kalusová kultura anturie se kultivuje v tekutém médiu s dvojnásobným obsahem makroelementů a s 0,5 mg/l BA ve tmě na třepačce. Kalusová kultura se odvozuje z listových segmentů po jejich předchozí povrchové sterilizaci běžnou metodou (viz jiné experimenty).

Klíčení in vitro

Experiment 12

Klíčení semen Silene armeria v podmínkách in vitro

Postup:

A) Příprava živného roztoku:

K experimentu bude použito 6 různých živných roztoků S1-S6, každý bude připravovat pouze jeden a to pro všechny ostatní skupiny (celkem 6 skupin). Pro každou skupinu 6 kultivačních baněk.

1) Navažte 3,5 g agaru a rozvařte jej v 350 ml redestilované vody v 500 ml kádince popř. varné baňce (autokláv, topné hnízdo).

2) Do 300 ml kádinky pipetujte a navažte:

MS makroelementy
MS mikroelementy I
MS mikroelementy II
Fe MS

dále podle jednotlivých skupin přidejte:

skupina 1:
glukóza 30 g

skupina 2:
glukóza 50g

skupina 3:
glukóza 30 g + 1,125 ml zásobního roztoku NAA (1mg/l)

skupina 4:
glukóza 30g + 6,25 ml zásobního roztoku NAA (5mg/l)

skupina 5:
glukóza 30g + 0,125 ml zásobního roztoku BA (0,1 mg/l)

skupina 6:
glukóza 30 g + 1,25 ml zásobního roztoku BA (1,0 mg/l)

4) Rozvařený agar slijte s roztokem v 300 ml kádince do odměrného válce 500ml, doplňte téměř na 500ml a slijte zpět do kádinky 500 ml.

5) Pomocí pH metru upravte pH média na 6,0 (pomocí 1M HCl resp. 1M KOH).

6) V odměrném válci doplňte objem média přesně na 500ml.

7) Médium za tepla rozlijte po 25 ml pomocí malého odměrného válce do kultivačních baněk a baňky uzavřete alobalem.

8) Na alobal označte fixem o jaké médium se jedná (Sx) .

9) Médium v baňkách sterilizujte v autoklávu 20 minut při teplotě 121°C (provede laborant)

B) Sterilizace a očkování semen

1) Semena (asi 100) zabalte do chromatografického papíru a uzavřete jej svorkou.

2) v očkovacím boxu nalijte do sterilní 250ml EM baňky 10% roztok Sava Super se 3 kapkami Jaru.

3) Zabalená semena přeneste do 300 ml kádinky s 50 ml 70% etanolu a promíchávejte 2 minuty, možno použít třepačku.
4) opálenou pinzetou přeneste zabalená semena do EM baňky s roztokem Sava Super, baňku uzavřete alobalem a umístěte na třepačku na 15 minut.

5) V očkovacím boxu slijte roztok Sava Super do připravené kádinky a do EM baňky se semeny nalijte asi 150 ml sterilní destilované vody, baňku uzavřete a umístěte na 5 minut na třepačku.

6) Vypírání dezinfekčního roztoku opakujte ještě 2x - vždy novou sterilní vodou (150 ml).

7) Po třetím vyprání ve sterilní vodě přeneste semena v chromatochrafickém papíru na P. misku v očkovacím boxu a opálenými nástroji otevřete balení.

8) Špičkou skalpelu očkujte na povrch média každé baňky 4 semena. Je výhodné nejprve ponořit špičku skalpelu do média a poté se na ní nalepí snadno semena, která je nutné přenést do kultivační baňky. Semeno musí ležet na povrchu média (přístup vzduchu).

9) Naočkovaná semena nechte klíčit v kultivační místnosti na světle.

Pozorování:

Zaznamenejte minimálně v týdenních intervalech procento klíčících semen na jednotlivých médiích, porovnejte vývoj kořenového systému a nadzemní části, prodlužování prýtu, konečnou délku prýtu po 2 měsících kultivace a případnou tvorbu květů.

Kalusové a suspenzní kultury

Experiment 13

Odvození kalusové kultury mrkve

Postup:

A) Příprava médií

1) do 100 ml kádinky postupně pipetujte a navažte:

MS makroelementy	25 ml
MS mikroelementy I	2,5 ml
MS mikroelementy II	0.25 ml
Fe MS	1.25 ml
thiamin	5,0 ml
pyridoxin	0,5 ml
kys. nikotinová	0,5 ml
zásobního roztoku 2,4-D	0,125 ml

navažte:

myo-inositol	25 mg
sacharóza	7.5 g

2) Obsah v kádinkách promíchejte na elektromagnetické míchačce.

3) Navažte 2 g agaru a ve 200 ml redestilované vody rozvařte na vodní lázni, topném hnízdě nebo v mikrovlnné troubě.

4) Rozvařený agar slijte s roztokem ve 100 ml kádince do odměrného válce 250ml, doplňte téměř na 250ml a slijte zpět do kádinky 250ml.

5) Pomocí pH metru upravte pH média na 5,5 (pomocí 1M HCl resp. KOH).

6) V odměrném válci doplňte objem média přesně na 250ml.

7) Médium za tepla rozlijte po 25 ml pomocí malého odměrného válce do kultivačních baněk a baňky uzavřete alobalem.

8) Na alobal označte fixem o jaké médium se jedná (M1) a číslo skupiny.

9) Médium v baňkách sterilizujte v autoklávu 20 minut při teplotě 121°C .

B) Založení kultury a kultivace

1) V očkovacím boxu nalijte do sterilní 250ml EM baňky 10% roztok Sava Super se 3 kapkami Jaru.

2) Dobře omytý kořen mrkve nařežte na plátky asi 1cm silné a přeneste je na 2 minuty do kádinky s 70% etanolem (kádinkou pohybujte).

3) Opálenou pinzetou přeneste segmenty kořene do EM baňky s roztokem Sava Super, baňku uzavřete alobalem a umístěte na třepačku na 10 minut.

4) V očkovacím boxu slijte roztok Sava Super do připravené kádinky a do EM baňky s segmenty kořene nalijte asi 150 ml sterilní destilované vody, baňku uzavřete a umístěte na 5 minut na třepačku.

5) Vypírání dezinfekčního roztoku opakujte ještě 2x - vždy novou sterilní vodou (150 ml).

6) Po třetím vyprání ve sterilní vodě přeneste segmenty

kořene postupně do sterilní P. misky.

7) Ze segmentu kořene vysekněte sterilním korkovrtem váleček pletiva tak, aby byl tvořen z poloviny pletivem kůry a z poloviny pletivem středního válce (explantát bude obsahovat kambium), z každého segmentu vysekněte 3-4 válečky, na každý segment použijte novou P. misku. Po naočkování baňku ihned uzavřete a pinzetu před očkováním další baňky opalte, explantát očkujte plochou na povrch média.

10) Naočkovanou baňku ihned uzavřete alobalem a označte fixem.

11) Kultury kultivujte v kultivační místnosti (23°C, tma) 60 dní (růst explantátu sledujte každý týden).

12) po 60 dnech kultivace stanovte čerstvou hmotnost kalusu.

Experiment lze modifikovat použitím médií s různou koncentrací růstových regulátorů a sledovat růst kalusu (jeho čerstvou hmotnost, sušinu) vzhledem k různému složení média. Je možné např. testovat vliv 2.4-D a BA popř. kinetinu v různých koncentracích - 2.4-D/BA(kinetin) - 0.1/0.1, 0.1/1,0, 1.0/0.1, 1.0/1.0 mg/l atd.

Kalus odvozený v tomto experimentu je vhodný pro založení suspenzní kultury mrkve (viz dále).

Experiment 14

Suspenzní kultura mrkve

Postup:

a) Příprava média:

Jedná se o stejné médium jako v experimentu 13 s tím rozdílem, že se do média nepřidává agar - jedná se o tekuté médium.

Médium rozlijte po 50 ml do 250 ml EM baněk, baňky uzavřete alobalem a sterilizujte v autoklávu 20 minut při 121°C.

B) založení suspenzní kultury a její kultivace

1) Přeneste rozpadavý kalus mrkve z kultivační baňky do P. misky. Do každé kultivační baňky očkujte 3-4 kousky kalusu (každý asi 1g). Baňky ihned uzavřete a označte.

2) Baňky přeneste do kultivační místnosti a kultivujte na třepačce (80-100 ot/min) při teplotě 25°C a ve tmě.

3) Po sedmi dnech přeneste baňky do očkovacího boxu a jejich obsah slijte přes sterilní sítko do sterilní kádinky. Kádinku uzavřete a buňky nechte sedimentovat ke dnu asi 10 minut. Sedimentaci buněk je možné usnadnit centrifugací suspenze ve sterilní centrifugační zkumavce při 1000 xg 5 minut.

4) Po 10 minutách slijte supernatant a sediment resuspendujte v 50 ml čerstvého média. Hrdlo kultivační baňky opalte nad kahanem a baňku uzavřete alobalem.

5) Kulturu opět kultivujte na třepačce v kultivační místnosti.

6) Po sedmi dnech opět opakujte obměnu média postupem uvedeným v bodě 3-4 s tím rozdílem, že jako inokulum do čerstvého roztoku použijete pouze 1/5 -1/4 sedimentu. Tento postup opakujte celkem 3-4x.

Další pasážování budete provádět pomocí sterilní pipety, kdy jako inokulum použijete 10 ml suspenze (před nasátím suspenze do pipety suspenzi promíchejte!), které budete pipetovat do 50 ml čerstvého média. Tento objem (10 ml) je orientační a před vlastním pasážováním je nutné stanovit hustotu buněk v suspenzi, kterou chcete pasážovat - hustota nově napasážované suspenze by neměla klesnout pod 10^4 buněk/ml. Optimum pro suspenze mrkve je 10^5 buněk/ml.

Hustota buněk se stanoví pomocí hemocytometru a podle zjištěné hustoty buněk ve výchozí suspenzi je možné modifikovat objem inokula pro suspenzi novou.

7) V očkovacím boxu dobře promíchejte obsah kultivační baňky a sterilní pipetou odeberte vzorek (asi 0,5 ml), který přeneste do připraveného hemocytometru (vzorek nakápnete na okraj krycího skla a ten se dostane do měřícího prostoru cytometru).

8) Stanovte počet buněk ve 25 malých čtvercích a vypočtěte průměrný počet buněk na jeden čtverec. Tuto hodnotu násobte 4000x a získáte počet buněk v 1 ml suspenze. Pokud je suspenze tvořena většími buňkami je možné k počítání použít velké čtverce a průměrná hodnota počtu buněk se potom násobí pouze 250 x.

9) Do čerstvého média pipetujte takové množství původní suspenze aby hustota suspenze byla v rozsahu 10^5 - 3.10^5

buněk/ml.

10) Růst suspenzní kultury vyhodnoťte také v průběhu týdenní kultivace, kdy budete odebírat vzorky každý druhý den a hodnoty hustoty buněk zaneste do grafu - růstové křivky - postup viz bod 7). Současně odeberte 2 ml suspenze do kalibrované centrifugační zkumavky, zkumavku centrifugujte při 1000x g 5 minut a stanovte PCV (kolik procent z celkového objemu suspenze představuje sediment).

11) Podle získané křivky stanovte optimální dobu pasážování suspenze v použitých podmínkách experimentu (kultivar mrkve, médium, kultivační podmínky). Optimální doba pro pasážování suspenze je v druhé části exponenciální fáze růstu.

12) Porovnejte cytologické rozdíly mezi kulturou ve stacionární fázi růstu a kulturou v exponenciální fázi růstu.

Somatická embryogeneze

Experiment 15

Somatická embryogeneze v suspenzní kultuře mrkve

Postup:

A) Příprava média

Jedná se o totéž médium jako v experimentu 14 s tím rozdílem, že médium pro indukci somatických embryí neobsahuje 2,4-D.

B) Očkování a kultivace

1) Přelijte suspenzi odvozenou v experimentu do sterilní 50 ml centrifugační zkumavky a buňky sedimentujte centrifugací při 1000 x g 5 minut.

2) Sedimentované buňky resuspendujte v 10-20 ml média pro indukci embryogeneze a po 2-4 ml této suspenze rozpipetujte do 250 ml EM baněk s 50 ml média pro indukci embryogeneze.

3) Kultury inkubujte na třepačce v kultivační místnosti (25°C) na světle (1000 lux) 10-18 dní.

4) V očkovacím boxu rozlijte po 10 ml do P. misek (15x100 mm) teplé (30-35°C) agarové médium.

5) Před tím než agarové médium v P. misce utuhne pipetujte do P. misky 5 ml suspenze a misku uzavřete. Suspenzi dokonale promíchejte s agarovým médiem a nechte médium utuhnout. P. misky zalepte Parafilmem.

6) Kulturu kultivujte za stejných podmínek jako v bodu 3).

7) V průběhu 30 dní pozorujte s použitím mikroskopu vývoj somatických embryí.

Pozorování:

Zaznamenejte dobu, kdy je možné pozorovat jednotlivá stádia vývoje embrya _ globulární, srdčité torpédovité popř. kdy je možné pozorovat klíčení embryí. Pozorovaná stádia vývoje embryí zakreslete do pracovního protokolu.

Protoplastové kultury

Experiment 16

Izolace a kultivace protoplastů z listového mezofylu tabáku

Postup:

A) Složení a příprava médií:

Médium CPW (100x konc.)	na 1 litr
KH_2PO_4	2,72 g
KNO_3	10,1 g
$MgSO_4.7H_2O$	24,6 g
KI	16,0 mg
$CuSO_4.5H_2O$	2,5 mg

pH = 5,8

AS médium	na 1 litr
0,4 M sacharóza	136,92 g
CPW (100x konc.)	10 ml
10 mM $CaCl_2.2H_2O$	1,48 g
MES	100 mg

pH = 5,8 před autoklávováním

(MES = 2(N-morfolino) - etan-sulfonát)

AM médium
místo sacharózy
0,4 M manitol
(72,88 g/l)
ostatní jako AS

AS-E (enzymatický roztok)	100 ml
AS médium	100 ml
1% celuláza R10	1,0 g
0,2% macerozym R10	0,2 g

pH = 5,6 před sterilizací filtrací

W5 médium	na 1 litr
154 mM NaCl	9,0 g
125 mM $CaCl_2.2H_2O$	18,38 g
5 mM KCl	0,37 g
5 mM glukóza	0,99 g

pH = 5,8 před autoklávováním

Mprot (TM2G)

	mg/l		mg/l
$MgSO_4.7H_2O$	1233	H_3BO_3	6,2
KH_2PO_4	680	$MnSO_4.4H_2O$	22,3
KNO_3	950	$ZnSO_4.7H_2O$	8,6
NH_4NO_3	825	$NaMoO_4.2H_2O$	0,25
$CaCl_2.2\ H_2O$	220	$CuSO_4.5H_2O$	0,025
$FeSO_4.7H_2O$	27,8	$CoCl_2.6H_2O$	0,025
Na_2EDTA	37,3	KI	0,83

sacharóza	10,0 g/l
D-manitol	109,3 g/l
myo-inositol	100,0 mg/l
thiamin HCl	1,0 mg/l
NAA	1,0 mg/l
BA	1,0 mg/l

pH = 5,8

Poznámka:

Roztok enzymů připravujte tak, že nejprve rozpusťte osmotikum a teprve potom přidejte enzymy. K rozpuštění použijte elektromagnetickou míchačku, ale nepoužívejte vysokých otáček protože zpěnění roztoku vede k omezení aktivity enzymů. Rozpouštění enzymů je rychlejší při teplotě 4°C v lednici než na míchačce při 25°C. Enzymatický roztok se musí sterilizovat filtrací. Sterilní roztok enzymů je možné uchovávat při teplotě -20°C po dobu asi 6 měsíců.

B) Izolace protoplastů z rostlin v tkáňové kultuře:

1) Rostliny, z nichž chcete izolovat protoplasty, umístěte do lednice (4°C). Toto se provede většinou ráno.

2) Do P. misky (90 mm) pipetujte 10 ml AS média s enzymy. Toto se provádí většinou odpoledne (17 hodin).

3) Do P. misky přeneste ze sterilní kultury asi 1 g listů a rozřežte je skalpelem na malé kousky (5x5 mm).

4) Uzavřete P. misku a zalepte ji Parafilmem . P. misku s listy a roztokem inkubujte ve tmě při 25°C 16 hodin.

5) Druhý den ráno kontrolujte izolaci protoplastů pomocí inverzního mikroskopu. Pokud nedošlo k dostatečnému uvolnění protoplastů lze mu napomoci v této fázi mechanicky (pohybem P. miskou nebo opakovaným nasátím a vypuštěním suspenze do sterilní pipety).

6) V očkovacím boxu rozbalte a připravte sítko (50um) a sterilní kádinku k filtraci suspenze protoplastů.

7) 10 ml pipetou postupně odpipetujte obsah P. misky přes sítko do kádinky.

8) Pipetujte 10 ml AS média do P. misky k jejímu propláchnutí a i tuto suspenzi zfiltrujte přes sítko do sterilní kádinky. V kádince bude nyní asi 40 ml suspenze.

9) Filtrát pipetujte do 4 centrifugačních zkumavek a zkumavky doplňte na 10 ml médiem AS.

10) Zkumavky centrifugujte při 1000 ot/min 10 minut. Po centrifugaci budou protoplasty tvořit prstenec plovoucí na povrchu supernatantu.

11) Opatrně odpipetujte pruh protoplastů Pasteurovou pipetou a pipetujte je do nové centrifugační zkumavky (ve zkumavce maximálně 2 ml suspenze protoplastů).

12) Pipetujte médium W5 do centrifugační zkumavky se suspenzí protoplastů do celkového objemu 10 ml. Uzavřete zkumavku uzávěrem a její obsah promíchejte opakovaným překlopením zkumavky.

13) Centrifugujte při 600 ot/min 5 minut.

14) Odpipetujte supernatant a opět sediment resuspendujte v médiu W5 (do 10 ml).

15) Odeberte malý vzorek protoplastů a určete jejich počet (protoplastů/10 ml) pomocí hemocytometru.

16) Po stanovení počtu protoplastů centrifugujte suspenzi opět při 600 ot/min 5 minut.

17) Odpipetujte supernatant a sediment resuspendujte v takovém objemu kultivačního média (TM2G), aby hustota protoplastů byla 10^5 - 5.10^5/ml.

18) Suspenzi protoplastů pipetujte po 2 ml do P. misek (60

mm). P. misky zalepte Parafilmem a kultivujte ve tmě při teplotě 28°C, poté 2 dny na světle 500 lux a konečně až do závěru experimentu při osvětlení 2000 lux (fotoperioda 16 hodin).

Protoplasty regenerují buněčnou stěnu a počnou se dělit asi za 5 dní - pozorujte každý den změny v kultuře protoplastů pomocí inverzího mikroskopu.

C) Izolace z rostlin rostoucích in vivo:

1) Z horní části rostliny tabáku izolujte plně rozvinuté listy a ponořte je do 150 ml 70% etanolu v P. misce (140 mm).

2) Po 1 minutě slijte etanol a nalijte 150 ml sterilní destilované vody.

3) Po dvou minutách listy přeneste do EM baňky (250 ml) se 150 ml 10% Sava Super a 2 kapkami Jaru , baňku uzavřete alobalem a umístěte na 15 minut na třepačku.

4) V očkovacím boxu slijte roztok z baňky a listy opakovaně vypírejte ve sterilní destilované vodě - 3x 5 minut.

5) Listy přeneste na sterilní P. misku a pomocí skalpelu popř. speciálního nástroje je rozřežte na kousky asi 5x5 mm (listy je možné rozřezat na větší pruhy po předchozím stažení spodní epidermis)

6) Do P. misky (10 mm) pipetujte 20 ml roztoku 13% manitolu a solí CPW a inkubujte v laboratoři 1 hodinu (plazmolýza). Odstraňte roztok s manitolem Pasteurovou pipetou a nahraďte jej enzymatickým roztokem (AS -E , 20 ml).

7) Inkubujte přes noc (cca 16 hodin) při teplotě 20-25°C. Po inkubaci obsah misky lehce promíchejte, aby se usnadnilo

uvolnění izolovaných protoplastů. Pomocí inverzního mikroskopu překontrolujte (v uzavřené P. misce!), zda došlo k uvolnění protoplastů (mají sférický tvar).

8) Pinzetou odstraňte větší zbytky listů a suspenzi pipetujte Pasteurovou pipetou přes sterilní sítko (látku) s velikostí pórů 50 um do sterilní kádinky (100 ml).

9) Suspenzi protoplastů rozpipetujte do 10 ml centrifugačních zkumavek (asi 1 cm pod jejich okraj) a zkumavky uzavřete víčkem.

10) Zkumavky se suspenzí centrifugujte při 50xg 10 minut. Supernatant odsajte opatrně P. pipetou a do zkumavky pipetujte roztok 20% sacharózy + CPW a opět centrifugujte při 50xg 10 minut.

11) Živé protoplasty budou tvořit prstenec plovoucí na povrchu roztoku ve zkumavce, zatímco ostatní buňky a jejich části se budou nacházet v sedimentu (centrifugace v tomto případě zajistí pročištění vzorku protoplastů). P. pipetou odpipetujte prstenec protoplastů a pipetujte jej do nové centrifugační zkumavky. Zkumavku doplňte 1 cm pod okraj roztokem manitolu 10% + CPW a opět centrifugujte 10 minut při 50 g.

12) Protoplasty se budou nyní nacházet v sedimentu. Promývání protoplastů opakujte 3x. Před třetí centrifugací stanovte hustotu protoplastů a jejich počet v centrifugační zkumavce tak, že po opatrném protřepání obsahu centrifugační zkumavky odeberte P. pipetou malé množství suspenze a stanovte počet protoplastů pomocí hemocytometru.

13) Nakonec pipetujte P. pipetou asi 1,5 ml suspenze protoplastů do 1,5 ml média M-prot v P. misce (3,5 cm). Hustota protoplastů by měla být v této chvíli $5x10^5$/ml.

Zalepte P. misku Parafilmem a kultivujte ve tmě při teplotě 28°C, poté 2 dny na světle 500 lux a konečně až do závěru experimentu při osvětlení 2000 lux (fotoperioda 16 hodin).

Protoplasty regenerují buněčnou stěnu a počnou se dělit asi za 5 dní - pozorujte každý den změny v kultuře protoplastů pomocí inverzního mikroskopu.

Poznámka:

Protoplasty je možné kultivovat v agarové plotně. V tomto případě se smíchá asi 1,5 ml suspenze protoplastů (10^5/ml) se stejným množstvím 1,2% agarového média (M-prot) teplého 40-45°C v P. misce (35 mm). Podmínky kultivace jsou potom stejné jako při použití tekutého média.

14) Kultura bude pokračovat v růstu a po 3-4 týdnech bude možné pozorovat mikrokalusy - malé kolonie buněk vzniklých dělením jednotlivých protoplastů (resp. buněk). V tomto stádiu přeneste mikrokalus na médium s redukovaným obsahem manitolu (0,2M). V případě tabáku je možné regenerovat z protoplastové kultury celé rostliny. V tomto případě kultivujte kalus na médiu MS s 0,5 uM BA.

Pozorování:

Zaznamenejte charakteristický tvar a velikost protoplastů, dobu, kdy byla pozorována regenerace buněčné stěny - změna tvaru protoplastu, kdy došlo k prvním dělením v kultuře, jaká byla plotnová výtěžnost s ohledem na počet mikrokolonií.

Experiment 17

Izolace protoplastů z buněčné suspenze tabáku a regenerace rostlin - dlouhodobá izolace

Postup:

1) Do 10 ml centrifugační zkumavky pipetujte 10 ml suspenze, zkumavku uzavřete a centrifugujte při 600 ot/min 5 minut.

2) Určete PCV - pro izolaci protoplastů je nezbytné minimálně 1-3 ml PCV v 12 ml zkumavce.

3) Odpipetujte supernatant Pasteurovou pipetou. Sediment resuspendujte v 10 ml AM média s enzymy (AM-E).

4) Obsah dvou zkumavek slijte do P. misky (15x100).

5) Zalepte P. misku Parafilmem nebo plastickou fólií, umístěte do krabice a kultivujte 16 hodin ve tmě při teplotě 25°C.

6) Příští den pomocí inverzního mikroskopu pozorujte v P. misce uvolněné protoplasty. Pokud v suspenzi není přítomno mnoho protoplastů je možné napomoci jejich uvolnění mechanicky - opakovaným nasátím suspenze do pipety (10 ml).

7) Suspenzi protoplastů se zbytky buněk zfiltrujte přes sítko (50um) do sterilní kádinky. Pracujte sterilně!

8) Opláchněte P. misku 10 ml AM nebo W5 médiem a opět pipetujte přes sítko do kádinky.

9) Pipetujte suspenzi protoplastů do 12 ml centrifugačních zkumavek a případně doplňte obsah zkumavek médiem AM nebo W5. Uzavřete zkumavky a obsah promíchejte jejich opakovaným

převrácením.

10) Zkumavky centrifugujte při 600 ot/min 5 minut. Protoplasty se po centrifugaci budou nacházet v sedimentu.

11) Supernatant odpipetujte Pasteurovou pipetou a protoplasty resuspendujte v 10 ml AS média.

12) Zkumavky centrifugujte při 1000 ot/min 10 minut. Protoplasty budou po centrifugaci tvořit plovoucí prstenec na povrchu supernatantu.

13) Prstenec tvořený protoplasty opatrně odpipetujte do nové centrifugační zkumavky (maximálně 2 ml na 12 ml zkumavku) a zkumavku doplňte na 10 ml médiem W5. Zkumavku uzavřete a její obsah opatrně překlopením promíchejte.

14) Zkumavku centrifugujte při 600 ot/min 5 minut.

15) Odpipetujte supernatant (protoplasty se nacházejí v sedimentu) a protoplasty resuspendujte v kultivačním médiu (TM2G) - hustota protoplastů v kultivačním médiu by měla být 10^5 - 5.10^5 a kultivujte za podmínek uvedených v experimentu 17 bod 13).

Experiment 18

Izolace protoplastů z buněčné suspenze tabáku - krátkodobá izolace

Postup:

Postup izolace se pouze v některých bodech liší od postupu v experimentu 18 :

1 - 2) stejný postup

3) Použijte 2x koncentrovanější AM-E médium (tj. 2% celuláza R10 + 0,4% macerozym R10).

4) stejný postup

5) Uzavřené P. misky umístěte do tmy (v boxu) na třepačku (40 ot/min) na 3-4 hodiny při teplotě 25°C.

6 - 15) stejný postup

Poznámka:

Tvorbu prýtů z kalusu dosáhnete při kultivaci kalusu v tekutém MS médiu s 0,5 uM BA (je možné pasážovat kalus na pevné agarové médium stejného složení). Tekuté médium obměňujte po dvou týdnech kultivace. Prýty by měly regenerovat v průběhu 6 týdnů.

LITERATURA

BAJAJ,Y.P.S. (Ed.): Biotechnology in Agriculture and Forestry: Vol. 2. Crops I. Springer Verlag, 1986.

BAJAJ,Y.P.S. (Ed.): Biotechnology in Agriculture and Forestry: Vol. 6. Crops II. Springer Verlag, 1988.

BHJWANI, S.S: Developments in Crop Science 19. Plant Tissue Culture: Applications and Limitations. Elsvier, 1990.

CONGER, B.V. (Ed.): Cloning Agricultural Plants via in vitro Techniques. Chemical Rubber Co. Press, Inc. Boca Raton, Florida: str. 51 - 74, 1981.

DEBERGH, P.C. and ZIMMERMAN, R.H.(Eds.): Micropropagation: Technology and Aplication. Kluwer Academic Publishers, 1991.

GAMBORG, O.L., MILLER and OJIMA, K.: Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50: 151 -158, 1968.

GAUTHERET, R.J.: Manuel Technique de Culture des Tissue Vegetaux. Masson Cie, Paris, 1942.

GEORGE, E.F. and SHERRINGTON, P.D.: Plant propagation by Tissue Culture, Eastern Press, Eversley, 1984.

GEORGE, E.F, PUTTOCK, D.J.M. and GEORGE, J.H.: Plant Culture Media: Vol. 1. Formulation and Uses. Exgetics Limited, Edington, 1987.

HERMAN, E.B. (Ed.): Recent Advances in Plant Tissue Culture. Regeneration, Micropropagation and Media 1988 - 1991. Agricell Report, 1991.

JACOB,F., JAGER,E. and OHMAN, E.: Botanik, VEB Gustav Fischer, Verlag Jena, 1987.

LLOYD, G. and MC COWN, B.:Use of microculture for production and improvement of Rhododendron spp. HortScience 15: 416, 1980.

MC COWN, B.H. and LLOYD, G.B.: Plant Cell Tiss. Organ Cult., 2: 75 - 85, 1982.

MURASHIGE, T. and SKOOG, F.: A revised medium for rapid growth and bioassays with tabacco cultures. Physiol Plant 15: 473, 1962.

NITSCH, J.O. and NITSCH, C.: Haploid plants from pollen grains. Science 163: 389, 1969.

NOZERAN, R. and BANCILHON, L.: Ann. Amel. Plantes, 22: 167 - 185, 1972.

PIERIK, R.L.M.: In vitro culture of higher plants. Bibliography. Ponsen en Looijen, Wageningen, 1991.

PIERIK, R.L.M.: Commercial micropropagation in Western Europe and Israel.
In: DEBERGH, P.C. and ZIMMERMAN, R.H.(Eds.): Micropropagation: Technology and Aplication. Kluwer Academic Publishers: 155 - 165, 1991.

SECKINGER, G.R. and AMOS, R: In vitro, 18: 293, 1982.

SCHENK, R.V. and HILDEBRANT, A.C.: Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledononous plant cell cultures. Can. J. Bot. 50: 199 - 204, 1972.

STEYER, D.J.: In: HENKE, R.(Ed.): Tissue Culture in Forestry and Agriculture, Plenum Press, New York, London, 1984.

STREET, H.E., OPIK, H.: The Physiology of Flowering Plants: Their Growth and Development. 3. vydání, Edward Arnold, Baltimore, str. 88, 232, 1984.

TORRES, K.C.: Tissue Culture Techniques for Horticultural Crops. Van Nostrand Reinhold Co., New York: str. 5, 1988.

VASIL, I.K. (Ed.): Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants: Volume 8. Scale-Up and Automation in Plant Propagation. Academic Press, 1991.