



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

Metody kultivace tkání a buněk

Charakteristika explantátových kultur



prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.

University of South Bohemia

Faculty of Agriculture, Biotechnological Centre

Na Sádkách 1780, 370 05 České Budějovice, CZ



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice



Fyziologie a genetik a rostlinných explantátových kultur
Charakteristika explantátových kultur

Kultury rostlinných explantátů *in vitro*: Charakteristika explantátových kultur

- explantátové kultury rostlin vznikají aseptickou kultivací izolovaných částí rostlin za umělých podmínek
- oddělení určité části ze sterilně napěstované nebo povrchově sterilizované rostliny a umístění této části rostliny do sterilního prostředí, kde se kultivuje
- v rostlinném organismu jsou všechny buňky totipotentní
- pro odvození explantátové kultury je tedy vhodné jakékoliv pletivo obsahující buňky s funkčním jádrem
- rostlinné explantátové kultury zahrnují izolaci buněk, pletiv a orgánů a jejich kultivaci ve sterilních podmínkách



Kultury rostlinných explantátů *in vitro*: Charakteristika explantátových kultur

- růst a vývoj explantátových kultur umožňují kultivační podmínky:
 - ✓ kultivační médium - zdroj energie, výživy a regulačních látek
 - ✓ světelný režim - intenzita a kvalita světla a fotoperioda
 - ✓ teplota
 - ✓ vlhkost
- za určitých podmínek mohou být z explantátových kultur dopěstovány nové rostliny (cíl většiny manipulací *in vitro*)
- tento proces je uskutečněn podle následujícího cyklu: rostlina – explantát – kultura *in vitro* - organogeneze nebo embryogeneze – intaktní rostlina
- v explantátové kultuře lze vyvolat růst a další vývoj základů orgánů, které již byly založeny na donorové rostlině



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice



Fyziologie a genetika rostlinných explantátových kultur
Charakteristika explantátových kultur

Kultury rostlinných explantátů *in vitro*: Charakteristika explantátových kultur

- podmínky kultivace mohou stimulovat a urychlovat průběh morfogenního procesu; dochází k dokončení vývinu izolovaného embrya a k jeho klíčení, nebo vytváření postranních větví z axilárních pupenů a k tvorbě nových axilárních pupenů na těchto větvích
- podle charakteru nově vzniklých struktur rozlišujeme organogenezi, somatickou embryogenezi (popř. somatickou polyembryogenezi) a pylovou embryogenezi či androgenezi



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice



Fyziologie a genetika rostlinných explantátových kultur
Charakteristika explantátových kultur

Kultury rostlinných explantátů *in vitro*: Charakteristika explantátových kultur

- úspěšnost kultivace explantátových kultur je ovlivněna četnými faktory (Murashige, 1974; George, Sherrington, 1984);
- mezi nejdůležitější faktory patří:
 - ✓ orgán, ze kterého byl izolován explantát
 - ✓ fyziologické a ontogenetické stádium rostliny
 - ✓ období odběru explantátu
 - ✓ velikost explantátu
 - ✓ zdravotní stav donorové rostliny
 - ✓ genotyp
 - ✓ orientace explantátu
 - ✓ inokulační hustota



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice



Fyziologie a genetik rostlinných explantátových kultur
Charakteristika explantátových kultur

Laboratoř explantátových kultur : Zařízení laboratoře explantátových kultur

- prostor pro mytí skla a laboratorních pomůcek
 - ✓ dřezy k mytí skla
 - ✓ zařízení k sušení skla
 - ✓ destilační přístroj
- prostor pro přípravu a sterilizaci médií
 - ✓ chemický stůl
 - ✓ analytické váhy
 - ✓ vaříč (popř. vodní lázeň)
 - ✓ pH metr
 - ✓ autokláv pro sterilizaci při 121 °C
 - ✓ lednice, mraznička
- skladovací prostor na chemikálie a sklo
- prostor pro aseptickou manipulaci se sterilní kulturou



Laboratoř explantátových kultur : Zařízení laboratoře explantátových kultur

- prostor pro aseptickou manipulaci se sterilní kulturou
 - ✓ aseptický box (flow box)
 - ✓ germicidní zářivka
 - ✓ preparační mikroskop
 - ✓ stolní třepačka
 - ✓ nástroje pro odběr preparátů
 - ✓ kahan
- kultivační místnost s řízenými kultivačními podmínkami (teplo, světlo, vlhkost)
 - ✓ klimatizační jednotka
 - ✓ třepačky



Laboratoř explantátových kultur : Základní úkony prováděné v laboratoři

- mytí skla
- sterilizace
 - ✓ sterilizace kultivační místnosti
 - ✓ sterilizace nástrojů a skla
 - ✓ autoklávování
 - ✓ sterilizace živných roztoků
 - ✓ sterilizace rostlinného materiálu
- práce ve flow boxu
 - ✓ před prací v boxu je nutné jeho vnitřní strany vytřít dezinfekčním roztokem (70% ethanol)
 - ✓ box je nutné pustit 15 minut před prací (ustálení proudu vzduchu)
 - ✓ veškeré předměty používané v boxu musí být sterilní
 - ✓ je vhodné pracovat s rukavicemi