



Zemědělská  
fakulta  
Faculty  
of Agriculture

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

# Metody kultivace tkání a buněk

## Fyzikální podmínky kultivace



**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 genetika rostlinných explantátových kultur  
Fyzikální podmínky kultivace

## Fyzikální podmínky kultivace

Průběh růstových, diferenciačních i morfogenetických procesů je závislý i na fyzikálních podmínkách prostředí obklopujícího pěstované buňky a pletiva.

Důležité jsou zejména:

- teplota,
- světlo,
- vzdušná vlhkost,
- aerace a fyzikální stav živné půdy



## Fyzikální podmínky kultivace

### Teplota

- **teplota** – rostlinné explantáty poměrně dobře snáší teplotní výkyvy, krátkodobě i pod 10°C nebo nad 30°C (limitující teplota je 35°C, kdy dochází k zastavení růstu, nad 45°C dochází ke koagulaci bílkovin, ireverzibilním změnám a zániku kultury)
- teplotní optimum je 24-27°C
- teplotní optimum pro protoplasmové kultury je 25-28°C
- při teplotách pod 20°C již prakticky nedochází k mitotickému dělení, růst je velmi pozvolný, nízké teploty bývají používány jako indukční faktory, mohou indukovat morfogenetickou reakci v kalusech, prašnickových kulturách – nízké teploty = 4°C



## Fyzikální podmínky kultivace

### Světlo

- **světlo** – nemusí být nezbytné pro růst pletiv nebo kultur pěstovaných heterotrofně v *in vitro* podmínkách, při těchto podmínkách je živné medium zdrojem energie – zdrojem C (sacharóza – nejčastěji, někdy glukóza)
- světlo může mít vliv na tyto kultury (na morfogenetické procesy, na morfologický a anatomický stav pěstovaných rostlin)
- osvětlení, které se při *in vitro* kultivaci používá – při nižších intenzitách (500-1000 lux) – i nepřetržité osvětlení, vhodným zdrojem světla jsou zářivky – vyšší podíl záření v červené oblasti světla
- množství světla není dostatečné pro fotosyntézu, rostliny i pod osvětlením musí dostávat zdroj C (uhlíku) v médiu, větší vliv lze spatřovat na morfogenní a organogenní reakce (morfogenní – změna tvaru buněk..., organogenní – dochází ke tvorbě orgánů)



Zemědělská  
fakulta  
Faculty  
of Agriculture

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



Fyziologie a genetika rostlinných explantátových kultur  
Fyzikální podmínky kultivace

## Fyzikální podmínky kultivace

### Vlhkost a aerace

- **vlhkost vzduchu** – je potřebné ji v kultivačních prostorech udržovat na hodnotách 70-75%, jinak dochází k rychlému vysušování kultur, nižší i vyšší vlhkost – nevhodné podmínky pro kultivaci



Zemědělská  
fakulta  
Faculty  
of Agriculture

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



Fyziologie a genetika rostlinných explantátových kultur  
Fyzikální podmínky kultivace

## Fyzikální podmínky kultivace

### Vlhkost a aerace

- **aerace** – provzdušnění, resp. dostupnost vzduchu (kyslíku), kultury pěstované stacionárně, na agarizovaných zpevněných (tuhých) médiích – není třeba se této problematice zvlášť věnovat, nedělají se zvláštní opatření, dochází k přirozené výměně plynů (kultivační nádoby nejsou vzduchotěsně uzavřeny a je zabezpečena dostatečná výměna plynů a komunikace s vnějším prostředím)
- **submerzní kultivace** (suspenní kultivace) – aeraci je třeba věnovat náležitou pozornost, je nutné provzdušňovat medium – míchat, třepat, zabezpečit provzdušnění média a dostupnost kyslíku (ale pozor na podmínky kultivace – míchání a třepání, rostlinné buňky jsou citlivější ke střižným silám)



## Kryoprotekce – kryoprezervace, uchovávání kultur při nízkých teplotách

- V posledních letech se začíná kryologický přístup uplatňovat i při **dlouhodobém uchovávání rostlinného materiálu** - kryokonzervační postupy se kromě semen využívají i při uskladňování (uchovávání) zygotických a somatických embryí, prašníků, pylu, vzrostných vrcholů, meristémů, pupenů, buněčných a kalusových kultur, protoplastů.
- **Základem úspěšnosti** kryokonzervace (kryoprezervace) je poznání fyzikálně - chemických procesů, které probíhají v buňkách v průběhu **ochlazování, zmrazování a rozmrazování**, protože samotné uchovávání biologických objektů při teplotě kapalného dusíku (LN<sub>2</sub> = -196C) nemá podstatný vliv na celistvost buněk.



Zemědělská  
fakulta  
Faculty  
of Agriculture

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



Fyziologie a genetika rostlinných explantátových kultur  
Fyzikální podmínky kultivace

## Kryoprotekce – kryoprezervace, uchovávání kultur při nízkých teplotách

Při ochlazování z fyziologických teplot na teplotu LN<sub>2</sub> se buňky zmrazují jedním z následujících způsobů:

- extracelulární zmrazování - pomalé ochlazování, volná voda přechází z vnitrobuněčného do mezibuněčného prostoru, vznikají extracelulární krystaly ledu a uvnitř dehydrovaných buněk se krystaly netvoří
- intracelulární zmrazování - buňky se ochlazují takovou rychlostí, že voda z nich nevystupuje dostatečně rychle, krystaly vznikají uvnitř i mimo buňky
- vitifikace - vysoká rychlost ochlazování, až 10<sup>2</sup> C/s a intracelulární voda tuhne bez vytvoření krystalů





## Kryoprotekce – kryoprezervace, uchovávání kultur při nízkých teplotách

- Rostlinné buňky mají v porovnání se živočišnými nebo mikrobiálními specifické znaky a vlastnosti (vysoká morfoloická variabilita, silná vakuolizace + vysoký obsah vody, velký rozsah a plastičnost membrán) - a vhodný kryokonzervační postup se musí určovat empiricky.
- Při kryoprezervaci rostlinných buněk je zpravidla nutné dodržet úplný postup, který zohledňuje:
  - ✓ - výběr materiálu
  - ✓ - prekultivace
  - ✓ - kryoprotekce
  - ✓ - způsob a režim ochlazování
  - ✓ - uchovávání v LN<sub>2</sub>
  - ✓ - režim rozmrazování



## Kryoprotekce – kryoprezervace, uchovávání kultur při nízkých teplotách

- **Volba materiálu** - odolnost negativním vlivům ochlazování, která je závislá na morfofunkčním stavu buněk. Vhodné jsou tenkostěnné meristematické buňky s vysokou mitotickou aktivitou a nízkou vakuolizací (apikální meristém, buněčná suspenze od konce lag fáze po střed exponenciální fáze růstu).
- Fyziologický význam **prekultivace** spočívá v iniciaci takových morfologických a fyziologických změn, které zvyšují mrazovou toleranci buněk - chladová adaptace buněk, použití osmoticky aktivních látek (sacharóza), aplikace aminokyselin (prolinu), použití kryoprotektiv (DMSO), růstových regulátorů (ABA, GA3).
- Ochranný účinek **kryoprotektiv** (alkoholy, amidy, oxidy, cukry, chloridy, aminokyseliny, acetáty, umělé polymery... - penetrující nebo nepenetrující do buněk) má za následek redukci tvorby a rychlosti růstu ledových krystalů, vázání volné vody, zvýšení permeability membrán, osmotickou dehydrataci, zpomalení enzymatické kinetiky .... Doba ekvilibrace bývá do 60 min.



## Kryoprotekce – kryoprezervace, uchovávání kultur při nízkých teplotách

- Volba **režimu ochlazování** závisí na použitém rostlinném materiálu. Pomalé ochlazování - rychlost do 10 C/min - u buněčných a kalusových kultur, somatických embryí, meristémů, semena s obsahem vody nad 30 %. Rychlé zmrazování - 10 C/min - se používá u semen s obsahem vody do 15 %, meristémů, vzrostných vrcholů, somatických a zygotických embryí.
- **Uchovávání** rostlinného materiálu v LN2 předpokládá zastavení metabolických procesů a uchování genetické stability. Tyto požadavky splňuje uchovávání v kapalném dusíku (-196C) nebo v parách dusíku (-120 - -150C). Délka uchovávání neovlivňuje viabilitu buněk.



## Kryoprotekce – kryoprezervace, uchovávání kultur při nízkých teplotách

- Úspěšné **rozmrazování** buněk předpokládá takovou rychlost ohřívání, která eliminuje rekrystalizaci vnitrobuněčného ledu a další dehydrataci buněk. Nejčastějším způsobem rozmrazování je rychlé rozmrazení ponořením do vodní lázně o teplotě 34 – 40C, používá se i pomalé ohřívání - např. u kalusových kultur.
- Dlouhodobá kryokonzervace rostlinného materiálu musí splňovat dvě základní podmínky:
  - ✓ - vysokou viabilitu buněk bez přítomnosti selekčního tlaku
  - ✓ - absenci genetických změn a zachování kvalitativních vlastností zárodečné plazmy.



## Kryoprotekce – kryoprezervace, uchovávání kultur při nízkých teplotách

- Objektivním určením viability buněk po kryokonzervaci je **obnovení** jejich **růstu** charakterizované obnovou normálních metabolických funkcí. Obnovení růstu zpravidla nastává po několikadenní až několikaměsíční lag fázi, během které pravděpodobně dochází k reparaci buněčných poškození. Pro okamžité stanovení viability buněk je možné použít některých testů - vitální barvení, aktivita enzymů...
- Genetické změny v důsledku kryokonzervace se u rostlinných buněk nesledovaly (ale např. v živočišných buňkách může dojít k fragmentaci jader, vzniku chromozómových zlomů, výskytu aneuploidie).
- Z praktického hlediska spočívá hlavní význam kryokonzervace v uchování cenných genetických zdrojů ve formě semen nebo i částí vegetativních orgánů.