



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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

Rostlinné biotechnologie

Metody a biotechnologické postupy



Vladislav Čurn



Metody a biotechnologické postupy využívané v rostlinných biotechnologiích – *in vitro* kulturách.

Využití biotechnologických metod a principů je možné rozdělit do dvou zcela odlišných oblastí:

- ***techniky zachovávající původní genotyp***, umožňující krátkodobé i dlouhodobé uchování rostlin v kultuře *in vitro* bez významnějších genetických změn
- ***techniky zvyšující genetickou variabilitu*** během kultivace *in vitro*.



I. Techniky zachovávající původní genotyp:

a/ meristémové kultury

Meristém vhodný na založení kultury *in vitro* je struktura obsahující vlastní apikální meristém a jeden až dva páry listových primordií.

Izolované meristémy se kultivují na běžných médiích - MS (Murashige a Skoog), B (Gamborg), tekutých nebo pevných - ztužených agarem. Po přidání cytokininů do kultivačního média je potlačen inhibiční účinek apikálního vrcholu a je stimulován růst axilárních pupenů, vytváří se velké množství výhonů (*multiple shoot culture*). Výhonky se oddělují, mohou se dále klonovat. Pro zakořeňování se výhony přesazují na médium s přídavkem auxinu.

Výhodný je zejména vysoký množitelský koeficient dosahovaný tímto typem kultury - z primárního explantátu lze získat 500 000 - 1 000 000 geneticky identických rostlin. Problémy může působit převod rostlin kultivovaných *in vitro* do půdy (rostliny nemají kutikulu, mají nižší podíl palisádového parenchymu, převážně heterotrofní způsob výživy).



I. Techniky zachovávající původní genotyp:

a/ meristémové kultury

Epigenetické změny morfologického charakteru vzniklé v meristémové kultuře po převedení do půdy postupně vymizí. Meristémová kultura je geneticky velmi stabilní. Buňky apikálního meristému vytváří integrovaný, geneticky vysoce stabilní systém - vysoká genetická stabilita tohoto systému je zapříčiněna velmi přísnou kontrolou syntézy DNA a mitózy (neumožňující vznik endopolyploidie) a kontinuálním mitotickým dělením meristemických buněk (eliminace spontánních mutací).

Rostliny regenerované z meristémové kultury jsou fenotypově homogenní a geneticky stabilní - identické s výchozím explantátem. Frekvence mutací v potomstvu je srovnatelná s frekvencí mutací při tradičním vegetativním rozmnožování. Kromě možnosti klonování rostlin *in vitro* prostřednictvím meristémové kultury (*mikropropagace*) má z praktického hlediska značný význam možnost eliminace virových chorob a dalších fytopatogenů při kultivaci meristémů.



I. Techniky zachovávající původní genotyp:

b/ embryokultury

Embryokultury se rovněž vyznačují značnou genetickou stabilitou, při odvození (regeneraci) rostlin ze zygotických embryí v embryonální kultuře se neseťkáváme se změnami karyotypu - genetická kontinuita se projeví stabilním genotypem u regenerovaných rostlin, identickým s *in vitro* kultivovaným embryem.

Embryokultury lze rozdělit do 2 základních kategorií:

- kultury *semenných embryí*, jako primární explantát se používá plně vyvinuté embryo (diferencovaná bipolární struktura obsahující kořenový a stonkový meristém)
- kultury *proembryí*, za proembryo považujeme všechna stadia nezralého embrya (zárodku) do fáze diferenciacce děloh.

Zásadní rozdíl je ve způsobu výživy - semenná embrya jsou - □ autotrofní, proembrya naproti tomu heterotrofní. To se v *in vitro* kultuře projevuje různými nároky na výživu. Význam má kys. giberelová (GA), která inicijuje růst embryonální osy a děloh, což vede k překonání dormance.



I. Techniky zachovávající původní genotyp:

b/ embryokultury

Embrya se kultivují na povrchu agarového média, nebo metodou chůvy - drobná embrya u jetelovin, trav.

Mezi hlavní oblasti aplikace embryokultur patří:

možnost získání hybridních embryí (zamezení aborce embryí po vzdálené hybridizaci, při postzygotické inkompatibilitě)

vegetativní množení - SE na nezralých i vyvinutých embryích

eliminace absolutní inhibice klíčení

zkrácení šlechtitelského procesu zkrácením nebo vyloučením období dormance.



I. Techniky zachovávající původní genotyp:

c/ klonování in vitro

Cílem této techniky (resp. celého technologického postupu) je získání velkého počtu geneticky identických rostlin, shodných s výchozím materiálem. Klonování v podmínkách kultur *in vitro* (mikropropagace) se může již počítat k běžným metodám klonového (vegetativního) rozmnožování rostlin.

Hlavní přednosti klonového množení rostlin *in vitro* oproti klasickým metodám jsou následující:

na rozmnožování se používá menší část rostliny

rozmnožování probíhá v axenickém prostředí, za přesně definovaných kultivačních podmínek

heterotrofní charakter růstu

podstatně rychlejší rozmnožování rostlin (množitelský koeficient dosahuje hodnot až 1:500 000 - 1:1 000 000, potenciální hodnota u některých druhů je až 1:10⁹).



I. Techniky zachovávající původní genotyp:

c/ klonování in vitro

Další předností je i ta skutečnost, že na klonování lze využít i takové části rostliny, které klasické vegetativní množení neumožňují, klonovat je možné v jakémkoli období či vývojové fázi, současně je zde i možnost ozdravování rostlin od patogenů.

Rozmnožování v podmínkách *in vitro* probíhá:

- indukci axilárních meristémů při kultivaci izolovaných vrcholů (meristémové kultury)
- adventivních meristémů a pupenů
- diferenciací rostlin *de novo* procesem organogeneze nebo somatické embryogeneze.



I. Techniky zachovávající původní genotyp:

c/ klonování in vitro

Regenerace cestou organogeneze nebo somatické embryogeneze:

Při *organogenezi* vzniká nová rostlina z několika buněk (i o různém karyologickém stavu) a existuje zde možnost vzniku chimér, mixoploidních pletiv - tento způsob regenerace zcela nezabezpečuje genetickou identitu regenerovaných rostlin.



I. Techniky zachovávající původní genotyp:

c/ klonování in vitro

Při regeneraci rostlin cestou *somatické embryogeneze* vzniká nová rostlina (resp. embryoid - somatické embryo, ze kterého se vyvíjí nová rostlina) z jediné buňky nebo u velmi mladých pletiv z kompaktního shluku embryogenních buněk, proembryonálního komplexu, který pravděpodobně vzniká z jediné buňky.

Panuje názor, že tento způsob regenerace rostlin (SE) zabezpečuje genetickou stabilitu. Záleží samozřejmě na podmínkách kultivace explantátu a na podmínkách navození regenerace - stabilita genotypu je zachována při přímé SE (tj. bez fáze kalusu, suspenzní, buněčné, protoplastové kultury), když embrya vznikají na mladých hypokotylech, embryích, meristému, či jiných orgánech rostlinného těla.

S určitým rizikem vzniku genetické variability je možné množit rostlinný materiál cestou somatické embryogeneze v kalusových nebo suspenzních kulturách.



I. Techniky zachovávající původní genotyp:

c/ klonování in vitro

Obecnou metodu klonování *in vitro* lze rozdělit do 5 fází:

- příprava výchozího materiálu v optimálních podmínkách, různá fyto-sanitární opatření
- izolace primárního explantátu a jeho zavedení do kultury *in vitro*, zabezpečení nekontaminovaného růstu a vývoje explantátu
- vlastní rozmnožování - masové množení materiálu, zachování genetické stability
- příprava regenerovaných výhonků a rostlin na přenos do půdy, ukončení tvorby axilárních výhonů, elongace výhonů (prýtů), zakořenění zvýšením intenzity světelného záření, adaptace pro přechod od heterotrofní k autotrofní výživě
- přenos rostlin do nesterilních podmínek



I. Techniky zachovávající původní genotyp:

Významnou součástí při udržovacím šlechtění u vegetativně množených druhů (brambory, česnek, ovocné dřeviny, jahodník, okrasné rostliny, řada významných subtropických a tropických vegetativně množených plodin - banány, kasava...) je ozdravování rostlin od původců chorob pomocí meristémových kultur a možnost uchovávání genových zdrojů v podmínkách *in vitro*.



II. Techniky zvyšující genetickou variabilitu:

Podle původních představ měly být kultury rostlinných explantátů *in vitro* vhodným prostředkem pro stabilní dlouhodobé rozmnožování rostlin. Tato představa se ale ukázala být ne zcela správnou - u regenerovaných rostlin se nacházely větší či menší odchylky od původního genotypu, časem se i schopnost regenerovat rostliny *in vitro* u některých typů kultur ztrácí. O genetické stabilitě rozhoduje totiž průběh morfogeneze - a geneticky stabilní systém *in vitro* je vázaný jen na organizovaný typ vývinu (tzn. při eliminaci fáze dediferenciace a kalogeneze). Tato podmínka organizovaného růstu a vývoje je splněna jen při kulturách embryí a meristémů, případně při regeneraci rostlin cestou přímé somatické embryogeneze. Variabilita v kalusových, buněčných a protoplastových kulturách se vyskytuje spontánně, nebo může být indukována. Část variability nalézané v těchto kulturách *in vitro* je geneticky podmíněná, část má charakter epigenetické variability.



II. Techniky zvyšující genetickou variabilitu:

a/ kalusové kultury

V povrchových vrstvách buněk explantátu se při přenosu do *in vitro* podmínek indukuje mitotické dělení. Diferencované buňky trvalých pletiv přechází do meristemického stavu - dediferencují. Vytváří se neorganizovaná hmota buněk - kalus.

Výsledkem procesu dediferenciace je vznik heterogenního systému - geneticky i morfogeneticky. Při neorganizovaném růstu dochází ke změnám buněčného cyklu - projevují se chromozómové a jaderné nestability, projevují se i změny odrážející cytogenetickou heterogenitu výchozího explantátu *in situ* (diferencovaný primární explantát obsahuje buňky i pletiva různého typu).

Protože většina rostlinných druhů je polysomatických (dif. buňky obsahují větší počet chromozómů než $2n$), je i karyologický stav buněk dediferencovaného pletiva různý. *Polysomatie = endoreduplikace provázená diferenciací, úroveň endoreduplikace může značně kolísat, není v pletivu uniformní, buňky meristemických pletiv zůstávají diploidní.*



II. Techniky zvyšující genetickou variabilitu:

a/ kalusové kultury

Při indukci kalusu v kultuře *in vitro* mohou v explantátu probíhat 4 odlišné procesy (odděleně nebo se mohou různě kombinovat) - mitóza, endoreduplikace následovaná mitózou, fragmentace chromozómů (amitóza) a amplifikace DNA.

U nepolysomatických druhů (asi jen 20% rostlin - nahosemenné, mrkvovité...) je explantát uniformě euploidní, a proto je relativně vysoká pravděpodobnost zachování genetické stability v kultuře *in vitro*. U polysomatických druhů postihuje počáteční mitotická stimulace diploidní i endoreduplikované buňky a tvoří se odlišné buněčné linie, kalus je od počátku mixoploidní. Při endoreduplikaci a amitotických procesech dochází ke vzniku euploidních i aneuploidních buněk, variabilita v počtu chromozómů je velmi vysoká. Je tedy vidět, že primární kalus může obsahovat velmi heterogenní buněčnou populaci, která částečně odráží preexistující cytogenní podmínky a částečně výsledky procesů, které probíhají během indukce kalusu.



II. Techniky zvyšující genetickou variabilitu:

a/ kalusové kultury

Během *in vitro* růstu kalusových a suspenzních kultur se naskýtají dostatečné možnosti pro další cytogenetickou a genetickou variabilitu záviselící na mnoha faktorech: např. na genetické konstituci druhu, hormonálním složení kultivačního média, typu kultury a kultivačním režimu. Lze pak sledovat výskyt haploidních, diploidních a polyploidních buněk. Rozsah polyploidie je někdy omezen možností indukovat mitózu u endoreduplikovaných buněk. V kultuře se mohou vyskytnout i buňky aneuploidní, dvoj- a více jaderné, vzrůstá frekvence chromozómových strukturálních změn.



II. Techniky zvyšující genetickou variabilitu:

a/ kalusové kultury

Polyploidní a aneuploidní buňky, produkované *in vitro*, mohou být eliminovány nebo mohou i získávat převahu v závislosti na selekčním tlaku. Svoji roli zde hraje i doba kultivace. V průběhu dlouhodobé kultivace *in vitro* se kumulují cytologické nepravidelnosti, které mohou být příčinou snížení nebo i úplné ztráty organogenní schopnosti. S dobou kultivace kalusu *in vitro* rovněž roste podíl cytologicky odlišných rostlin, které z kultury regenerovaly, vzrůstá podíl polyploidních, chimérických a aneuploidních rostlin. Ale na druhou stranu se také někdy zdá, že rostliny jsou schopny regenerovat jen z pupenů odvozených z těch buněk, které mají počet chromozómů relativně vyvážený.

Obecně se dá vyjádřit - čím déle prochází kultura fází kalusu (resp. neorganizovaného růstu), tím větší genetická variabilita se projeví u regenerovaných rostlin - a i když můžeme považovat všechny buňky kalusu za totipotentní, ne všechny jsou pak z morfogenetického hlediska schopné regenerovat v intaktní rostlinu.



II. Techniky zvyšující genetickou variabilitu:

b/ buněčné (suspenzní) kultury

Tyto kultury jsou tvořeny dediferencovanými buňkami v tekutém médiu. Tento typ kultury lze založit po přenesení rozpadavého kalusu do tekutého media a jeho roztřepáváním. Kulturu tvoří drobné shluky dělících se buněk. Lze vyselektovat genotypy, které jsou embryogenní a tuto schopnost si udrží po dlouhou dobu kultivace *in vitro*. Vzhledem k tomu, že kultura nemusí být geneticky stabilní (dlouhá fáze neorganizovaného růstu) mohou se rostliny vzniklé SE od sebe odlišovat. Tohoto faktu se ale může využívat při šlechtění - rozšiřování genetické variability - vznik odlišných somaklonů, nebo přímo v systému selekce *in vitro*.

Suspenzní kultury se kromě možnosti množení materiálu používají i k selekci (nebo navození mutací) na buněčné úrovni.



II. Techniky zvyšující genetickou variabilitu:

c/ protoplastové kultury

Protoplasty lze získávat ve velkých množstvích z různých pletiv nebo i buněčných kultur. Kultury rostlinných protoplastů lze ovlivňovat různými mutageny, jsou vypracovány metody přímého vnášení genů (cizorodé DNA) do protoplastů, zkouší se fúze protoplastů.

Protoplasty po určité době vytváří buněčnou stěnu, buňky se dělí, embryogenní genotypy mohou vytvářet som. embrya, nebo se vytváří mikrokalusy - kalusy - regenerace rostlin.



II. Techniky zvyšující genetickou variabilitu:

d/ kultury prašníků a mikrospor

Haploidní rostliny představují neobyčejně cenný materiál pro genetický výzkum i šlechtění. Použití haploidního materiálu umožňuje sledování segregace genů (alel) na gametické úrovni a současně dovoluje získat dokonale homozygotní rostliny už v F1 generaci.

Frekvence výskytu spontánních haploidů je ale velmi nízká a je geneticky determinovaná. Experimentální metody produkce haploidů jsou založené na ovlivnění procesů opylení a oplození fyzikálními a chemickými faktory, využívají vzdálenou hybridizaci, stimulační genotypy...

Metody *in vitro* indukce haploidů jsou následující:

- indukovaná androgeneze v prašниковých a pylových kulturách (jediný způsob, jak lze získat haploidní organismus bez účasti cytoplasmy vajíčka)
- selektivní eliminace chromozómů v hybridním zárodku
- indukovaná gynogeneze v neoplodněných vajíčkách *in vitro*



II. Techniky zvyšující genetickou variabilitu:

d/ kultury prašníků a mikrospor

Mikrospory (i vajíčka) kultivované *in vitro* se mohou vyvíjet dvěma způsoby - je navozena embryogeneze, nebo dochází k neorganizovanému růstu, tvorbě haploidního kalusu, ze kterého regenerují rostliny.

V prvním případě vzniká převážně haploidní potomstvo - a naopak u rostlin vzniklých nepřímou androgenézí (resp. gynogenezí) se vyskytuje značná cytogenetická variabilita, kromě haploidů regenerují diploidní, polyploidní a mixoploidní rostliny.

Schopnost regenerovat haploidní rostliny je silně geneticky závislá a je řízena pravděpodobně třístupňově:

- dědičně je řízen počet prašníků, jejichž mikrospory jsou schopny androgeneze
- řízena je schopnost regenerace
- a frekvence albinózních rostlin.



II. Techniky zvyšující genetickou variabilitu:

d/ kultury prašníků a mikrospor

U dvoudomých rostlin (např. knotovka bílá) se při regeneraci haploidních rostlin projevuje silná selekce vůči chromozómu Y - vznikají jen diploidi XX (samičí), nevzniká nadsamec - projevuje se selekce na úrovni prorůstání embryoidů. Pak je otázkou, zda-li to, co regeneruje je reprezentativním vzorkem kultury *in vitro*.

Metoda selektivní eliminace chromozómů se využívá při křížení ječmene s planým druhem *Hordeum bulbosum*. Během vývinu zárodku (během několika prvních mitotických dělení u vzniklé hybridní zygoty) dochází k eliminaci chromozómů *H. bulbosum*, haploidní rostliny se dopěstovávají *in vitro* v embryokultuře.



II. Techniky zvyšující genetickou variabilitu:

e/ selekce na buněčné úrovni

Jedním z nadějným směrů výzkumu v oblasti explantátových kultur je selekce žádaných genotypů v podmínkách *in vitro* - cílem je získání materiálů s geneticky podmíněnou rezistencí (proti různým patogenům, zasolení půdy, suchu, herbicidům), se stabilním projevem znaku a se současným zachováním hospodářských vlastností původního genotypu.

Selekci rezistentních rostlin lze provádět podle následujícího schématu:

- založení buněčné kultury
- kultivace na médiu se selekčním faktorem (toxiny, nadfyziologická koncentrace NaCl, herbicid...)
- kultivace přežívajících buněk na standardním médiu
- retestování rezistence kultury na selekčním médiu
- regenerace rostlin, testy rezistence, genetická analýza
- využití nového zdroje rezistence ve šlechtění.



II. Techniky zvyšující genetickou variabilitu:

f/ využití somaklonální variability

Jak je tedy vidět, rostliny regenerované z kultur *in vitro* nejsou vždy geneticky a morfologicky uniformní. Genetická variabilita *in vitro*, projevující se na úrovni regenerovaných rostlin jako somaklonální variabilita, odráží jak genetickou konstituci výchozího explantátu (genetickou mozaiku pletiv primárního explantátu), tak i možnost vzniku nových genotypů v průběhu kultivace *in vitro*.

Během kultivace *in vitro* dochází k následujícím typům změn:

- změny v počtu chromozómů, regenerace aneuploidních rostlin, frekvence změn roste s dobou kultivace *in vitro*
- změny struktury chromozómů, patrné při chování chromozómů v meióze, nehomologní translokace, inverze, delece
- deamplifikace a amplifikace genů
- genové mutace
- změněná exprese multigenních rodin
- mobilizace transponovatelných elementů



II. Techniky zvyšující genetickou variabilitu:

f/ využití somaklonální variability

Míra proměnlivosti je v některých případech vyšší než variabilita rostlin M generace po aplikaci mutagenů, ačkoli v explantátové kultuře nebyly mutageny aplikovány. O mechanismech vzniku somaklonální variability a možnostech řízené kontroly se v současné době ví jen málo, ale je zřejmé, že vznik somaklonální variability je spojen s neorganizovaným růstem *in vitro*.

Možné příčiny vzniku somaklonální variability jsou:

- existence genetických změn v buňkách diferencovaných pletiv intaktních rostlin
- karyologické změny v *in vitro* kultuře
- mutace major a minor genů v *in vitro* kultuře
- změny regulace exprese genů, transpozómy, mitotický crossing-over



II. Techniky zvyšující genetickou variabilitu:

f/ využití somaklonální variability

Geneticky nestabilní jsou kalusové, buněčné a protoplastové kultury a v některých případech rostliny z nich regenerované. Pokud kultura projde fází kalusu, vzrůstá cytogenetická variabilita. Tyto kultury jsou pak rezervoáry rozsáhlé variability, jejíž projev závisí ještě na mnoha faktorech.

Naopak kultury intaktních orgánů, vyznačujících se růstem organizovaným struktur (meristémů, embryí), jsou do značné míry geneticky stabilní a rostliny z nich regenerované mají charakter klonu (geneticky uniformního potomstva). Tyto dva různé systémy stability, resp. variability, poskytují významné možnosti pro současné šlechtitelské biotechnologie.