



národní  
úložiště  
šedé  
literatury

## **Metodika fotoautotrofní kultivace rostlin za podmínek in vitro**

Ševčíková, Hana

Dostupný z <http://www.nusl.cz/ntk/nusl-263431>

Dílo je chráněno podle autorského zákona č. 121/2000 Sb.

Tento dokument byl stažen z Národního úložiště šedé literatury (NUŠL).

Datum stažení: 16.08.2024

Další dokumenty můžete najít prostřednictvím vyhledávacího rozhraní [nusl.cz](http://www.nusl.cz) .



Univerzita Karlova v Praze, Přírodovědecká fakulta, Katedra experimentální biologie rostlin

## Metodika fotoautotrofní kultivace rostlin za podmínek *in vitro*



Hana Ševčíková, Helena Lipavská, Petra Mašková

duben 2016

## Metodika fotoautotrofní kultivace rostlin za podmínek *in vitro*

Certifikovaná metodika vypracovaná jako výstup projektu MŠMT - Centrum experimentální biologie rostlin UK, LO1417

Autoři:

Mgr. Hana Ševčíková

[hana.sevcikova@natur.cuni.cz](mailto:hana.sevcikova@natur.cuni.cz)

RNDr. Helena Lipavská, Ph.D.

[lipavska@natur.cuni.cz](mailto:lipavska@natur.cuni.cz)

RNDr. Petra Mašková, Ph.D.

[peta\\_maskova@volny.cz](mailto:peta_maskova@volny.cz)

Oponenti:

Ing. Lenka Langhansová, Ph.D.

Ústav experimentální botaniky AVČR v.v.i.

[langhansova@ueb.cas.cz](mailto:langhansova@ueb.cas.cz)

## Obsah

1. Úvod .....	4
2. Cíl metodiky .....	4
3. Dedikace .....	4
4. Stručný popis metodiky .....	4
5. Detailní popis metodiky .....	5
5.1. Použitý rostlinný materiál a jeho kultivace .....	5
5.2. Experimentální design .....	5
5.3. Používané laboratorní pomůcky, sklo a chemikálie .....	6
5.4. Přístroje a ostatní vybavení .....	6
5.5. Ochranné pomůcky .....	6
5.6. Příprava kultivačních médií .....	6
5.7. Příprava víček pro fotoautotrofní kultivaci .....	7
5.7.1. Používané nástroje a pomůcky .....	7
5.7.2. Postup přípravy víček pro fotoautotrofní kultivaci .....	8
5.8. Zakládání fotoautotrofních kultur a péče o ně .....	8
5.8.1. Používaný rostlinný materiál, nástroje a další vybavení .....	8
5.8.2. Postup zakládání fotoautotrofních kultur .....	9
6. Rozdíly mezi heterotrofně a fotoautotrofně kultivovanými rostlinami .....	9
7. Souhrnná tabulka – základní charakteristiky rostlin .....	11
8. Popis uplatnění certifikované metodiky .....	11
9. Srovnání novosti postupů .....	11
10. Ekonomické aspekty .....	12
11. Seznam použité literatury .....	12

## 1. Úvod

Udržování a množení rostlin *in vitro* je široce využívaná technika jak pro výzkumné, tak pro komerční účely. Tento způsob kultivace rostlin má své nesporné výhody, například poměrně malé nároky na prostor, nezávislost na ročním období, vysokou rychlost množení, u endemických či ohrožených druhů možnost pěstování mimo původní lokalitu, kultivaci nezávislou na symbiontech či možnost vegetativního množení u rostlin, které se v přírodě tímto způsobem nemnoží. Navíc v současnosti již existují kultivační protokoly pro širokou škálu rostlin, což dále usnadňuje využití tohoto způsobu kultivace. Nepříliš akcentovaným problémem je výrazné omezení fotosyntézy rostlin kultivovaných *in vitro* při běžně používaném postupu, a to z důvodu nedostatečné výměny plynů mezi kultivační nádobou a okolím. Rostliny proto vyžadují pro svůj růst externí zdroj uhlíku (heterotrofni způsob kultivace). Tento přístup nemusí být příliš vhodný z hlediska vědeckého, zejména pokud chceme zkoumat fotosyntetické procesy či sacharidový metabolismus obecně. S ohledem na praktické využití je významná také skutečnost, že heterotrofně kultivované rostliny mají problém s adaptací po přenosu z podmínek *in vitro* do podmínek *in vivo* (nutnost adaptace fotosyntetického aparátu, náchylnost k houbovým a bakteriálním patogenům a také nutnost vypořádat se se snížením relativní vzdušné vlhkosti po přenosu do *ex vitro* podmínek).

## 2. Cíl metodiky

Cílem metodiky je vytvoření snadno dostupného, efektivního a ekonomicky výhodného systému umožňujícího fotoautotrofni kultivaci *in vitro* u hospodářsky i výzkumně významných druhů rostlin, lilku bramboru (*Solanum tuberosum* L.), tabáku viržinského (*Nicotiana tabacum* L.) a řepky olejky (*Brassica napus* L.) s potenciálem k využití u dalších rostlinných druhů.

## 3. Dedikace

Tato certifikovaná metodika vznikla za podpory MŠMT jako součást řešení projektu NPU: Centrum experimentální biologie rostlin UK (LO 1417).

## 4. Stručný popis metodiky

Rostliny jsou kultivovány *in vitro* na standardním kultivačním médiu doporučeném pro daný rostlinný druh, bez přidání sacharidů v kultivačním médiu. Kultivační nádoby jsou uzavřené polypropylenovou (PP) autoklávovatelnou fólií s dvěma PP filtračními terčíky zajišťujícími výměnu plynů bez rizika proniknutí patogenů. PP fólie zároveň zaručuje dostatečnou ozářenost umožňující rostlinám fotosyntetizovat při kultivaci za standardních podmínek.

## 5. Detailní popis metodiky

### 5.1. Použitý rostlinný materiál a jeho kultivace

Při vývoji a ověřování metodiky byly použity rostliny bramboru *Solanum tuberosum* L. cv. Lada, rostliny tabáku *Nicotiana tabacum* L. cv. Samsun a řepky olejky *Brassica napus* L. cv. Asgard. Kultivace rostlin probíhala v podmínkách *in vitro* na MS médiu (Murashige & Skoog, 1962). Složení média viz Tabulka č. 1. Se stejnými výsledky bylo používáno jak médium míchané ze zásobních roztoků jednotlivých sloučenin, tak z komerčně dodávané směsi MS solí (Murashige and Skoog Basal Salt Mixture, plant cell culture tested, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA), v obou případech s přidavkem roztoku vitamínů (roztok D v Tab. 1). pH kultivačního média bylo upravováno na hodnotu 5,75 za použití 10mM KOH.

### 5.2. Experimentální design

Rostliny bramboru byly množeny na MS médiu s 2,5 % sacharózy pomocí nodálních segmentů, které byly kultivovány ve 100ml Erlenmayerových baňkách (3 segmenty na baňku). Nodální segmenty 3-4 týdny starých rostlin byly přenášeny do 250 ml Erlenmayerových baněk na 50 ml MS média bez sacharózy zakrytých víčky pro fotoautotrofni kultivaci a do 250 ml Erlenmayerových baněk na 50 ml MS média s 3 % sacharózy zakrytých PP fólií (vždy 3 segmenty na baňku). Kultivace probíhala za teploty 21-24 °C při dlouhodobé fotoperiodě - 16 hod světla a 8 hod tmy, ozáření 400-500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (použité zářivky - daylight fluorescent tubes; Osram, Wintherthur, Switzerland).

Sterilizovaná semena tabáku byla vyseta na MS médium s 3 % sacharózy. Získané 1 týdenní klíčící rostliny byly sterilně přeneseny do 250 ml Erlenmayerových baněk na 50 ml MS média bez sacharózy zakrytých víčky pro fotoautotrofni kultivaci a do 250 ml Erlenmayerových baněk na 50 ml MS média s 3 % sacharózy zakrytých PP fólií (vždy 1 rostlina na baňku). Rostliny byly kultivovány za teploty 25-27 °C při dlouhodobé fotoperiodě - 16 hod světla a 8 hod tmy, ozáření 400-500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (použité zářivky - daylight fluorescent tubes; Osram, Wintherthur, Switzerland).

Sterilizovaná semena řepky byla vyseta na MS médium s 3 % sacharózy. Získané 1 týdenní klíčící rostliny byly sterilně přeneseny do 250 ml Erlenmayerových baněk na 50 ml MS média bez sacharózy zakrytých víčky pro fotoautotrofni kultivaci a do 250 ml Erlenmayerových baněk na 50 ml MS média s 3 % sacharózy zakrytých PP fólií (vždy 1 rostlina na baňku). Rostliny byly kultivovány za teploty 25-27 °C při dlouhodobé fotoperiodě - 16 hod světla a 8 hod tmy, ozáření 400-500  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (použité zářivky - daylight fluorescent tubes; Osram, Wintherthur, Switzerland).

### 5.3. Používané laboratorní pomůcky, sklo a chemikálie

- Automatická pipeta
- Kádinky různých velikostí
- Erlenmeyerovy baňky – objem 100 ml, 250 ml
- Alobal
- Víčka pro fotoautotrofní kultivaci (viz Kapitola č. 5.6. Příprava víček pro fotoautotrofní kultivaci) a materiál pro upevnění víček
- Pinzety, skalpel, Petriho misky
- Odměrný válec
- Roztoky pro přípravu MS média připravené podle Tab. 1 nebo komerčně dostupné MS soli
- Agar, sacharóza

### 5.4. Přístroje a ostatní vybavení

- Elektromagnetické míchadlo
- pH metr
- Autokláv, sušárna
- Mikrovlnná trouba
- Flow box, kahan
- Kultivační boxy s vhodnými podmínkami pro kultivaci vybraných rostlin

### 5.5. Ochranné pomůcky

- Laboratorní plášť

### 5.6. Příprava kultivačních médií

#### **Příprava MS média:**

**A) Ze zásobních roztoků namíchaných v laboratoři** podle rozpisu v Tab. 1 a uchovávaných v lednici při 4 °C (roztok D je uchován v mrazáku při -20 °C). Do kádinky o odpovídajícím objemu bylo napipetováno množství zásobních roztoků dle Tab. 1, přidán agar v množství 8 g/l a sacharóza v množství 30 g/l (do média bez sacharózy nebyla přidávána sacharóza ani jiný cukr). Roztok byl míchán na elektromagnetickém míchadle, po rozpuštění všech složek doplněn na požadovaný objem v odměrném válci pomocí destilované vody. Následně bylo upraveno pH na hodnotu 5,75 a obsah nádoby přiveden k varu v mikrovlnné troubě. Po převaření bylo médium rozlito do připravených nesterilních Erlenmayerových baněk, které byly následně zakryty alobalovým víčkem a sterilizovány v autoklávu (20 min při teplotě 121 °C a tlaku 121 kPa). Sterilní média mohou být uchována po dobu až jednoho měsíce za pokojové teploty.

**B) Z komerčně dodávané směsi solí** pro MS média. Do kádinky o odpovídajícím objemu bylo naváženo množství solí stanovené výrobcem a napipetováno odpovídající množství roztoku vitamínů (roztok D viz Tab. 1). Poté byl přidán agar v množství 8 g/l a sacharóza v množství 30 g/l (do média bez sacharózy nebyla přidávána sacharóza ani jiný cukr). Dále bylo postupováno jako v případě A.

zásobní roztok	složka	zásobní roztok (500 ml) [g]	1 l média [ml]
A	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	16,50	50
	KNO <sub>3</sub>	19,00	
	CaCl <sub>2</sub>	3,31	
	MgSO <sub>4</sub> · 7 H <sub>2</sub> O	3,70	
	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,70	
B	KI	0,08	5
	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,62	
	MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O (H <sub>2</sub> O)	2,23 (1,69)	
	ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,86	
	Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0,03	
	CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,00	
	CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O (bezv.)	0,0025 (0,0013)	
C	FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2,78	5
	Na <sub>2</sub> EDTA·2H <sub>2</sub> O	3,73	
D	inozitol	10,00	5
	kys. nikotinová	0,05	
	pyridoxin - HCl	0,05	
	thiamin - HCl	0,05	
	glycin	0,20	

**Tab. 1: Roztoky solí používané při přípravě MS média.** V tabulce je uvedeno složení a objem zásobních roztoků pipetovaných pro přípravu 1 litru média.

## 5.7. Příprava víček pro fotoautotrofni kultivaci

### 5.7.1. Používané nástroje a pomůcky

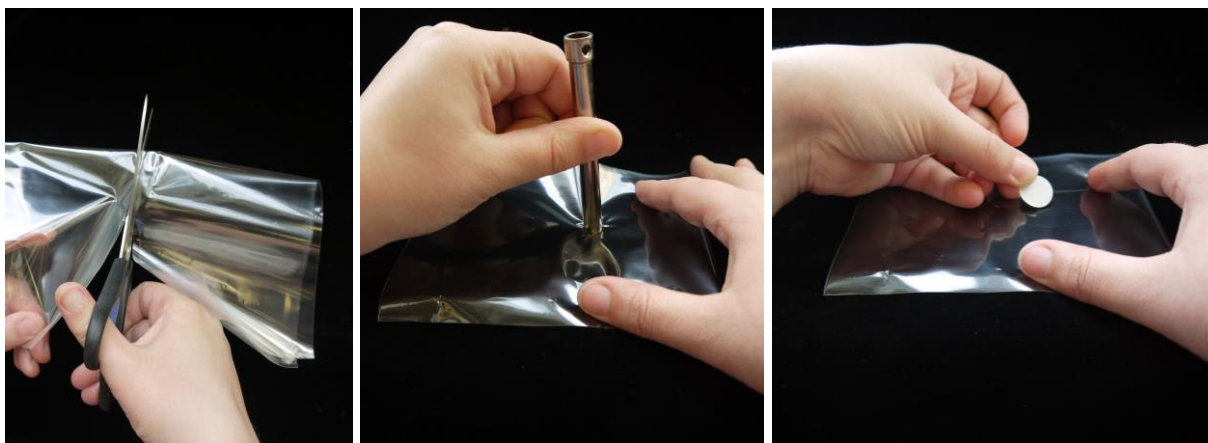
- Autoklávovatelná polypropylenová fólie (autoklávovatelný sáček na kontaminovaný materiál – Merci, Brno, Česká republika)
- Samolepicí polypropylenové filtry o průměru 8 mm a porozitě 0.04 μm (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA, kat. č. S5939-500EA)



- Nůžky
- Korkovrt o průměru 8 mm
- Filtrační papír – kulaté výřezy o průměru 10 cm
- Stříčka s destilovanou vodou
- Skleněné Petriho misky o průměru 12 cm

### 5.7.2. Postup přípravy víček pro fotoautotrofni kultivaci

PP fólie byla nastříhána na čtverce o hraně 15 cm, do kterých byly následně pomocí korkovrtu vyraženy dva otvory cca 2 cm vzdálené. Otvory byly přelepeny samolepicími filtry. Takto připravená víčka byla nechána alespoň 2 hodiny zatížená, aby filtry dobře přilnuly a lepidlo dostatečně ztuhlo. Poté bylo nutné víčka vysterilizovat. Do skleněných Petriho misek byly skládány na sebe vždy navlhčený filtrační papír – PP víčko – navlhčený filtrační papír. V jedné Petriho misce lze sterilizovat max. 12 víček. Připravené misky byly sterilizovány autoklávováním (20 min při teplotě 121 °C a tlaku 121 kPa) a víčka uchovávána za pokojové teploty a použita do 48 hodin po sterilizaci.



Obr. 1: Postup přípravy víček pro fotoautotrofni kultivaci

## 5.8. Zakládání fotoautotrofních kultur a péče o ně

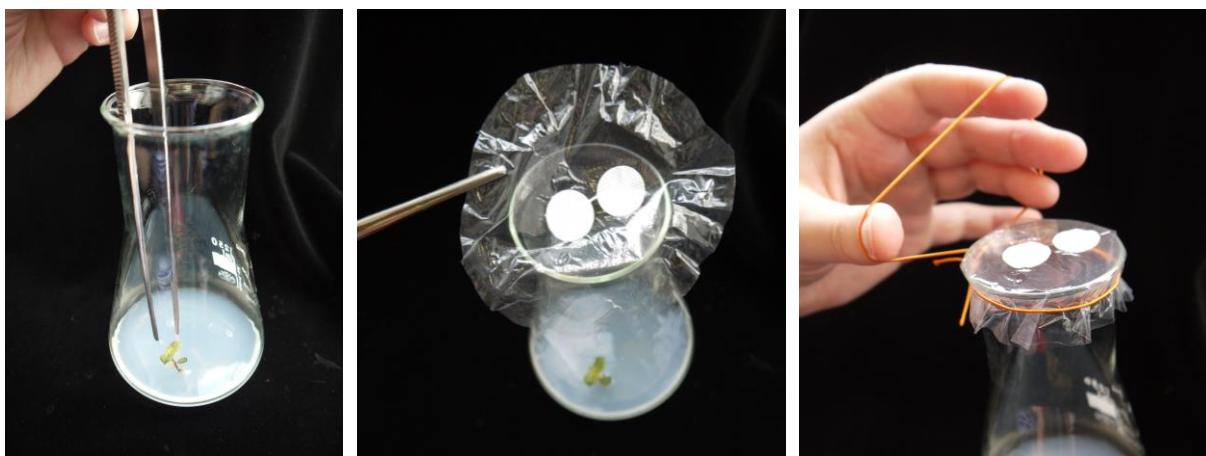
### 5.8.1. Používaný rostlinný materiál, nástroje a další vybavení

- Napěstované rostlinné kultury / vyklíčené semenáče
- 250 ml Erlenmeyerovy baňky se sterilním MS médiem bez sacharózy
- Sterilní víčka pro fotoautotrofni kultivaci (viz Kapitola 5.6. Příprava víček pro fotoautotrofni kultivaci)
- Gumičky pro připevnění víček pro fotoautotrofni kultivaci
- Sterilní pinzety a skalpel
- Flow box

### 5.8.2. Postup zakládání fotoautotrofních kultur

Práce probíhala sterilně ve flow boxu. Nodální segment / klíčící rostlina byl/a pomocí sterilní pinzety přemístěn/a na MS médium bez sacharózy a baňka zakryta sterilním víčkem pro fotoautotrofni kultivaci. Víčko bylo připevněno gumičkou (viz poznámka) a rostliny umístěny do kultivační místnosti s odpovídajícími kultivačními podmínkami. Rostliny byly pravidelně kontrolovány a v závislosti na relativní vzdušné vlhkosti v kultivační místnosti po cca 3 týdnech kultivace byla provedena sterilní zálivka. Ve flow boxu byla sejmuta víčka pro fotoautotrofni kultivaci a pomocí automatické pipety se sterilní špičkou bylo do baňky opatrně nanášeno 10 ml sterilní vody tak, aby nedošlo k mechanickému rozrušení média. Poté byla baňka opět zakryta víčkem pro fotoautotrofni kultivaci.

Pozn.: Testovali jsme různé způsoby upevnění víček pro fotoautotrofni kultivaci – např. pomocí laboratorního parafilmu či klasických kancelářských kaučukových gumiček. Nejlépe se ale osvědčila gumička klobouková nastříhaná na cca 20 cm pásy a následně svázaná. Tento typ gumičky v podmínkách kultivačních boxů nepuchne tak jako kaučukové gumičky a na rozdíl od parafilmu ho lze použít opakovaně.



**Obr. 2: Postup zakládání fotoautotrofních kultur**

## 6. Rozdíly mezi heterotrofně a fotoautotrofně kultivovanými rostlinami

V průběhu vývoje této metodiky byly pozorovány a vyhodnocovány rozdíly mezi rostlinami kultivovanými za standardních (heterotrofních) podmínek (3% sacharózy v médiu, průsvitné PP víčko bez filtru zajišťujícího ventilaci) a za fotoautotrofních podmínek. Fotoautotrofni rostliny vykazovaly větší listovou plochu a větší čerstvou hmotnost než heterotrofně kultivované rostliny (viz Obr. 3 Rozdíly mezi heterotrofně a fotoautotrofně kultivovanými rostlinami a Tab. 2 Srovnání základních charakteristik rostlin).

A)



B)



C)



**Obr. 3: Rozdíly mezi heterotrofně a fotoautotrofně kultivovanými rostlinami.** A) Rostliny řepky po 3 týdnech kultivace, vlevo heterotrofní kontrola, vpravo fotoautotrofní rostlina. B) Rostliny tabáku po 4 týdnech kultivace, vlevo heterotrofní kontrola, vpravo fotoautotrofní rostlina. C) Rostliny bramboru po 5 týdnech kultivace, vlevo heterotrofní kontrola, vpravo fotoautotrofní rostlina.

## 7. Souhrnná tabulka – základní charakteristiky rostlin

Rostlina	Způsob kultivace	Průměrná čerstvá hmotnost prýtu / g	Průměrná čerstvá hmotnost kořene / g
Brambor	heterotrofni	1,02	0,223
	fotoautotrofni	1,175	0,518
Tabák	heterotrofni	1	0,931
	fotoautotrofni	3,186	5,623
Řepka	heterotrofni	0,582	0,097
	fotoautotrofni	1,19	0,155

**Tab. 2: Srovnání základních charakteristik rostlin** používaných při vývoji metodiky. Váženo: řepka po 3 týdnech kultivace, tabák po 4 týdnech kultivace, brambor po 5 týdnech kultivace.

## 8. Popis uplatnění certifikované metodiky

Metodika je optimalizací a vylepšením stávajících metod fotoautotrofni kultivace rostlin v podmínkách *in vitro*. Dříve používaná komerčně prodávaná víčka (Sigma-Aldrich) pro fotoautotrofni kultivaci již nejsou dostupná a tato metodika je plně nahrazuje a dokonce vylepšuje tím, že dává možnost upravit počet filtrů ve víčku s ohledem na velikost kultivační nádoby a požadavky dané rostliny na výměnu plynů.

Metodika je určena jak pro pracoviště zabývající se teoretickým výzkumem fyziologie rostlin, tak pro aplikovaný zemědělský výzkum či komerční množení.

## 9. Srovnání novosti postupů

Publikací zabývajících se fotoautotrofni kultivací rostlin v podmínkách *in vitro* je velmi málo a vždy využívají některou z komerčně dostupných variant víček umožňujících fotoautotrofni kultivaci (dnes již často nevyroběných a nedostupných) (Ticha *et al.*, 1998) nebo pracují s komplikovanějšími systémy umožňujícími vyšší výměnu plynů v kultivační nádobě (Schmildt *et al.*, 2015). Tato metodika nabízí jednoduchý protokol k výrobě vlastních víček umožňujících fotoautotrofni kultivaci za podmínek *in vitro* jak u hospodářsky významných rostlin, tak u dalších rostlinných druhů, např. u rostlin s potenciálem využití v komerční sféře. Pomocí drobných úprav lze vyrobit víčka na různé typy používaných kultivačních nádob. Touto metodou vyrobená víčka lze použít opakovaně (vydrží v průměru 5 sterilizací v autoklávu).

## 10. Ekonomické aspekty

Metoda předpokládá zavedenou laboratoř pro práci s kulturami *in vitro* s běžným vybavením. Je třeba zakoupit pouze samolepicí filtry na výrobu víček, např. Sigma-Aldrich Sun cap closures Biofilter, O.D. 18 mm, 500 filtrů v ceně 2700 Kč + DPH (ceník Sigma Aldrich 2016). Na Erlenmeyerovu baňku o objemu 250 ml jsou třeba dva filtry, jedno víčko je možné použít přibližně 5x. Autoklávovatelný sáček na kontaminovaný materiál bývá v laboratořích běžně k dispozici, z jednoho sáčku lze udělat několik víček (v závislosti na velikosti), cena 500 sáčků o objemu 3l je 1359 Kč + DPH (ceník – Merci 2016). Cena jednoho víčka tedy vychází na cca 2 Kč (bez DPH) / použití.

## 11. Seznam použité literatury

- Murashige T, Skoog F. 1962.** A REVISED MEDIUM FOR RAPID GROWTH AND BIO ASSAYS WITH TOBACCO TISSUE CULTURES. *Physiologia Plantarum* **15**(3): 473-497.
- Schmidt O, Netto AT, Schmidt ER, Carvalho VS, Otoni WC, Campostrini E. 2015.** Photosynthetic capacity, growth and water relations in 'Golden' papaya cultivated *in vitro* with modifications in light quality, sucrose concentration and ventilation. *Theoretical and Experimental Plant Physiology* **27**(1): 7-18.
- Ticha I, Cap F, Pacovska D, Hofman P, Haisel D, Capkova V, Schafer C. 1998.** Culture on sugar medium enhances photosynthetic capacity and high light resistance of plantlets grown *in vitro*. *Physiologia Plantarum* **102**(2): 155-162.