# Kultura animalnih i biljnih stanica

# KULTURA BILJNOG TKIVA

Dr. sc. Mateja Jagić

mateja.jagic@biol.pmf.hr

Nastava je kondenzirana prema rasporedu na intranetu:

**Predavanja (ZMB seminar)**

- Ponedjeljak, 16.11. od **13 od 15**
- Utorak, 17.11. od **13 od 15**
- Četvrtak, 19.11. od **9 od 12**
- Petak,  20.11. od **14 do 17**

**Praktikum (ZMB2)**

- Četvrtak, 19.11. od **13 od 18**
- Petak,  20.11. od **9 do 14**

Skripta za praktikum je na intranetu.

Pohađanje predavanja i praktikuma je obavezno!

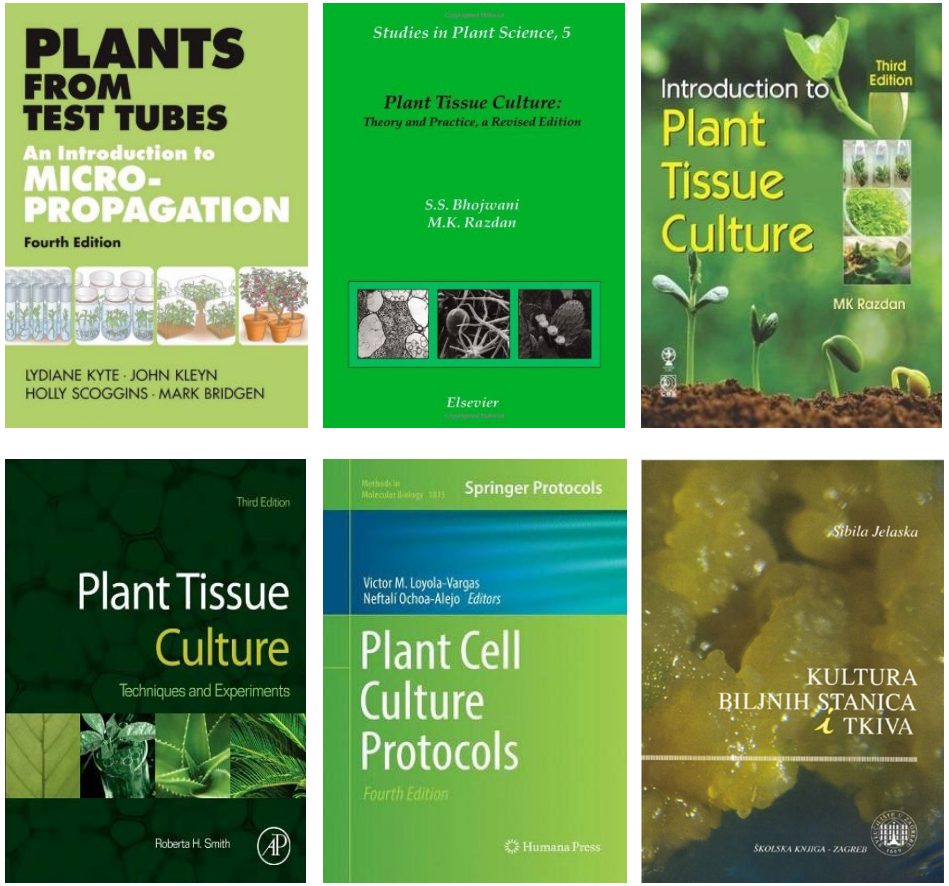
Pokazna vježba i kolokvij u tjednu od 14 – 18.12. (prema dogovoru)

# Literatura

- Trevor Thorpe, History of Plant Tissue Culture

  (PDF dostupan na Intranetu )
- Ikeuchi i sur., Plant regeneration: cellular origins and molecular mechanisms. doi:10.1242/dev.134668

  (PDF dostupan na Intranetu )
- https://plantcelltechnology.com/blogs/blog/tagged/tissue-culture



# Prvo predavanje

- Kultura biljnog tkiva i primjena
- Povijest kulture biljnog tkiva
- Uvjeti za uspostavu kulture biljnih tkiva

# Kultura biljnog tkiva

- aseptična kultura stanica, tkiva, organa i njihovih dijelova
- uzgajana u definiranim fizikalno-kemijskim uvjetima *in vitro* (*u staklu*)
- osnovni alat u biljnoj biologiji



# Primjena kulture biljnog tkiva

- Proučavanje fiziologije i metabolizma pojedinačnih stanica
- Modifikacija i poboljšanje svojstava biljaka
- Regeneracija biljaka bez patogena
- Čuvanje/skladištenje germplazme (vrste/genotipa) kroz dulje vrijeme
- Klonsko razmnožavanje biljaka u kratkom vremenu i tijekom cijele godine
- Proizvodnja korisnih metabolita

# Primjena kulture biljnog tkiva

## Komercijalna primjena

- Brza multiplikacija biljaka
- Brza regeneracija jedinki s poželjnim svojstvima
  - klasične metode mutageneze
  - fuzija protoplasta
  - GMO
- Eliminacija patogena




## Primjena u fundamentalnim istraživanjima

- strogo kontrolirani uvjeti i učestali rad na klonovima omogućuju istraživanja:
  - na razini gena
    - funkcija gena
    - genetičko inženjerstvo
    - mutageneza
    - selekcija staničnih linija s posebnim svojstvima
  - učinak raznih agensa na rast i razvoj
    - na razini stanica
      - učinak na genetiku i epigenetiku te diferencijaciju somatskih stanica
    - Sekundarni metabolizam
      - učinak na sintezu i regulaciju metabolizma
    - Biologija razvoja
      - mehanizam djelovanja hormona
      - mehanizmi diferencijacije i morfogeneze
      - sinteza tvari stanične stjenke (kultura protoplasta)
      - svojstva plazmaleme i transport tvari, međustanično djelovanje

# Kultura biljnog tkiva

## Prednosti

- Brzo umnažanje velikog broja biljaka
- Dobivanje velikog broja klonova iz jedne sjemenke/eksplantata
- Cjelogodišnja proizvodnja
- Brza propagacija problematičnih vrsta (dugi životni ciklus, malo sjemena, slaba klijavost sjemena)
- Potrebno je manje prostora za uzgoj
- Eliminacija bolesti i rad sa zdravim biljnim materijalom
- Čuvanje željenih tkiva kroz dugi vremenski period
- Očuvanje ugroženih biljnih vrsta
- Istraživanje učinka hranjive podloge na rast, diferencijaciju i razvoj
- Genska manipulacija

## Mane

- Visoki početni troškovi ulaganja
- Rizik od kontaminacije
- Smanjena genetska raznolikost
- Potencijalno veća osjetljivost na bolesti
- Ograničenja vezana uz pojedine biljne vrste
- Strogi zahtjevi za kontrolu kvalitete
- Ograničene mogućnosti automatizacije
- Poteškoće pri aklimatizaciji biljaka

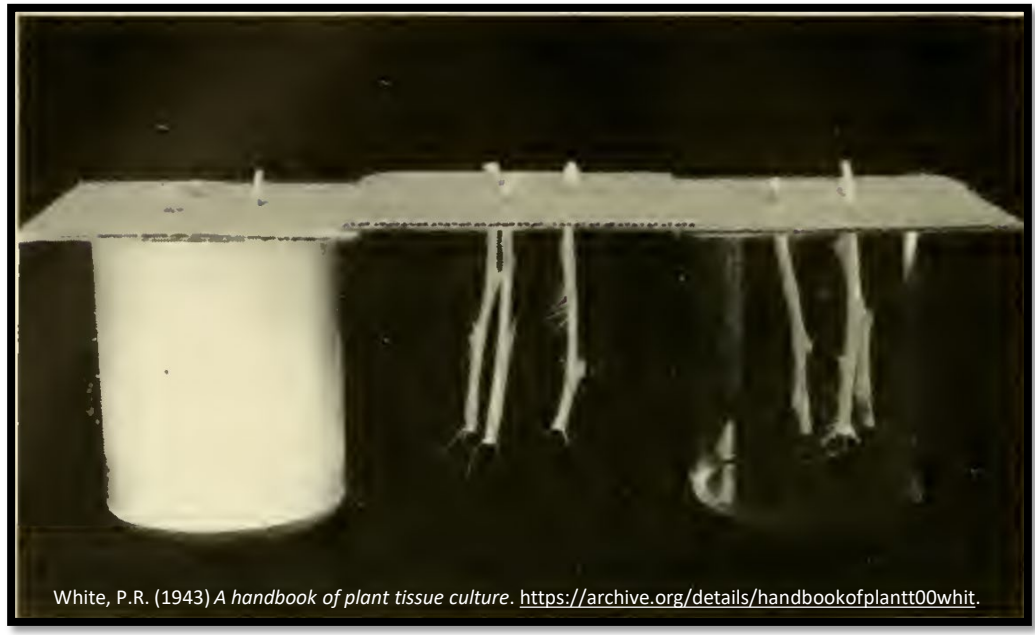
# Povijest kulture biljnog tkiva

- 1902. Haberlandt – teorija totipotentnosti
  - predvidio da se iz vegetativnih stanica mogu uspješno uzgojiti „umjetni” embriji
- 1922. prvi uspješan uzgoj biljnog tkiva
  - Kotte – vršak korijena graška
  - Robbins – vršak korijena kukuruza
- 1934. White
  - postavio i održavao prvu uspješnu kulturu korijena rajčice
- 1934. Gautheret
  - postavio i održavao **prvu uspješnu kulturu kalusa** mrkve
- 1954. Muir
  - postavio kulturu biljnih stanica iz jedne stanice
- 1962. Murashige and Skoog
  - definirali sastav hranjive podloge za rast pojedinačnih stanica i malih nediferenciranih eksplantata (MS medij)

**SUBKULTURA**

- uzgoj tkiva na podlozi je ograničen (hranjive tvari se istroše i medij osuši)
- stanice i tkiva potrebno je subkultivirati na svježu podlogu

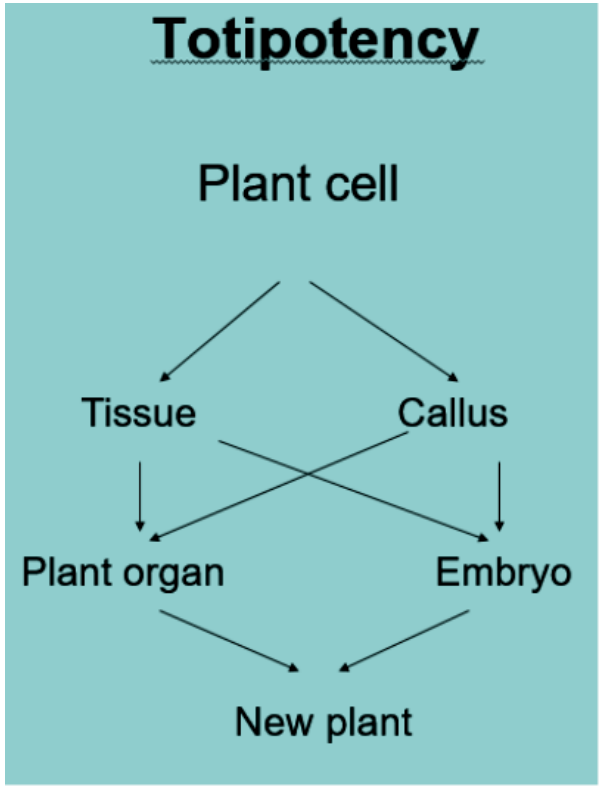
U teoriji: kultura biljnih stanica/tkiva može biti beskonačna ako se redovito subkultivira.



White, P.R. (1943) *A handbook of plant tissue culture*. https://archive.org/details/handbookofplantt00whit.

# Temeljne karakteristike biljnih stanica važne za kulturu *in vitro*

- Totipotentnost
  - Potencijal biljne stanice za regeneraciju cijele biljke.
  - Tijekom rasta i razvoja stanice se diferenciraju, no mnoge biljne stanice nisu terminalno diferencirane i mogu se rediferencirati!
- Dediferencijacija
  - kapacitet i sposobnost diferenciranih biljnih stanica da se vrate u osnovno stanje i da se počnu dijeliti.
  - U pogodnim uvjetima stanice se mogu rediferencirati i stvoriti novi razvojni oblik (npr. razvoj korijenja na eksplantatu lista)
- Kompetentnost
  - endogeni potencijal svake stanice ili tkiva da se razvije  na točno određeni način.
  - Kad se iz meristema počne razvijati korijen ili izdanak obrazac razvoja je fiksiran.
- Plastičnost
  - sposobnost adaptacije biljke na različite uvjete okoliša
  - promjene metaboličke aktivnosti, rasta i razvoja



## Totipotentnost



Razvoj somatskih embrija iz lisne plojke *Kalanchoë*

## Dediferencijacija



Indukcija kalusa na kotiledonu

## Kompetentnost



Indukcija izdanka iz bočnog pupa

## Plastičnost



Razvoj bodljikavih listova božikovine

# Uvjeti za uspostavu kulture biljnog tkiva

- Podloga za rast
  - dodatak hranjivih tvari
  - uklanjanje nepotrebnih/štetnih produkata metabolizma
- Odabir pogodnog eksplantata
- Aseptičnost
  - tkivo treba biti oslobođeno kompeticije za hranjive tvari
- Kontrolirani okoliš
  - komora za rast

# Hranjiva podloga za uzgoj biljnih stanica/tkiva *in vitro*

- Baza za eksplantat
- Izvor vode ($H_20$): redestilirana ili deionizirana
- Izvor mineralnih soli
- Izvor organskih tvari
  - Izvor vitamina
  - Izvor regulatora rasta

- Definirana je tipom i količinom anorganskih komponenata
- Kompleksan sastav

# Mineralne soli

## Makroelementi

- **Dušik (N)** – kritičan za sintezu proteina
  - $NO_3^-$ (oksidiran) ili $NH_4^+$ (reduciran) ili organski
  - 25-60 mM; $KNO_3$, $NH_4NO_3$, $Ca(NO_3)_2$ itd.
- **Kalij (K)** – glavni stanični ion, odgovoran za stanični vodni status
  - 20-30 mM; KCl ili $K_2HPO_4$
- **Fosfor (P)** – važan za aktivaciju enzima i sintezu DNA i RNA
  - 1-3 mM; $K_2HPO_4$ ili $KH_2PO_4$, ili Na soli
- **Kalcij (Ca) –** važan za strukturu stanične stijenke i aktivnost enzima
  - 1-3 mM; $CaCl_2$ ili $Ca(NO_3)_2$
- **Magnezij (Mg)** – sastavni dio klorofila i kofaktor enzima
  - 1-3 mM; $MgSO_4$
- **Sumpor (S) –** važna komponenta proteina
  - 1-3 mM; u obliku sulfata $SO_4^{2-}$

## Mikroelementi

- **Željezo (Fe)** – važno za fotosintezu i respiraciju
  - 1 µM
- **Mangan (Mn)** – važan za membranske strukture kloroplasta i aktivnost enzima
  - 5-30 µM
- **Cink (Zn)** – važan za stvaranje klorofila i kofaktor enzima
- **Bor (B)** – važan za transport šećera
- **Bakar (Cu)** – važan za sintezu klorofila i respiraciju
  - 0.1 µM
- **Molibden (Mo)** –uključen u konverziju nitrata u amonijeve ione
  - 1 µM
- **Kobalt (Co)** – neophodan za fiksaciju dušika
  - 0.1 µM
- **Nikal (Ni)** – osigurava normalnu aktivnost ureaze i metabolizam dušika
- **Jod (I)**
- **Aluminij (Al)**
- **Silicij (Si)**

# Organski dodaci

- Šećer
  - Saharoza – glavni transportni oblik šećera u biljaka, prilikom autoklaviranja se raspada na glukozu i fruktozu
  - Glukoza, fruktoza, maltoza…
  - 20 – 40 g/L medija
- Vitamini
  - **Tiamin (vitamin B1)** – jedini nužan, koenzim, važan za sintezu nekih aminokiselina i za Krebsov ciklus
  - Nikotinska kiselina (niacin, B3) – važna u fotosintezi
  - Piridoksin (B6) – stimulira rast
  - Askorbinska kiselina (vitamin C) – antioksidans

- Šećerni alkoholi (npr. inozitol, manitol…)

**INOZITOL** – ključna komponenta hranjive podloge

- uloga u rastu i razvoju biljaka (biosinteza stanične stijenke, odgovor na stres, osmotolerancija, te skladištenje i transport regulatora rasta i hormona)
- zaštitna uloga od solnog stresa (štiti od ROS, regulira razinu vode)
- spremište fosfata (veže 6 fosfata)
- važan za međustaničnu komunikaciju
- vezanjem inaktivira auksine te stvara brzo dostupnu pričuvu auksina koji nakon hidrolize inozitola postaju aktivni

# Aktivni ugljen

- Ireverzibilno apsorbira različite spojeve koji remete rast



Rast biljčica sekvoje bolji je na podlozi s aktivnim ugljenom jer on veže tanine i druge metabolite koji djeluju inhibitorski



# Ostali organski dodaci

- Ostali vitamini
  - Biotin(vitamin H),
  - Ca pantotenat (vitamin B5),
  - Cianokobalamin (vitamin B12),
  - folna kiselina (vitamin B9),
  - riboflavin(vitamin B2),
  - tokoferol(vitamin E)
- Aminokiseline
  - često se dodaju glicin (Gly) i glutamin (Gln)

- Prirodni dodaci
  - Kokosovo mlijeko
  - Voćni ekstrakti
  - Hidrolizat proteina, npr. kazein hidrolizat

- Biljni regulatori rasta
  - Auksini
  - Citokinini
  - Giberelini
  - Abscizinska kiselina (ABA)
  - finalne koncentracije: 0,001 – 10 µM
  - otapanje u etanolu, KOH ili DMSO te potom razrjeđenje u vodi
  - neki su vrlo termolabilni!

# Biljni regulatori rasta

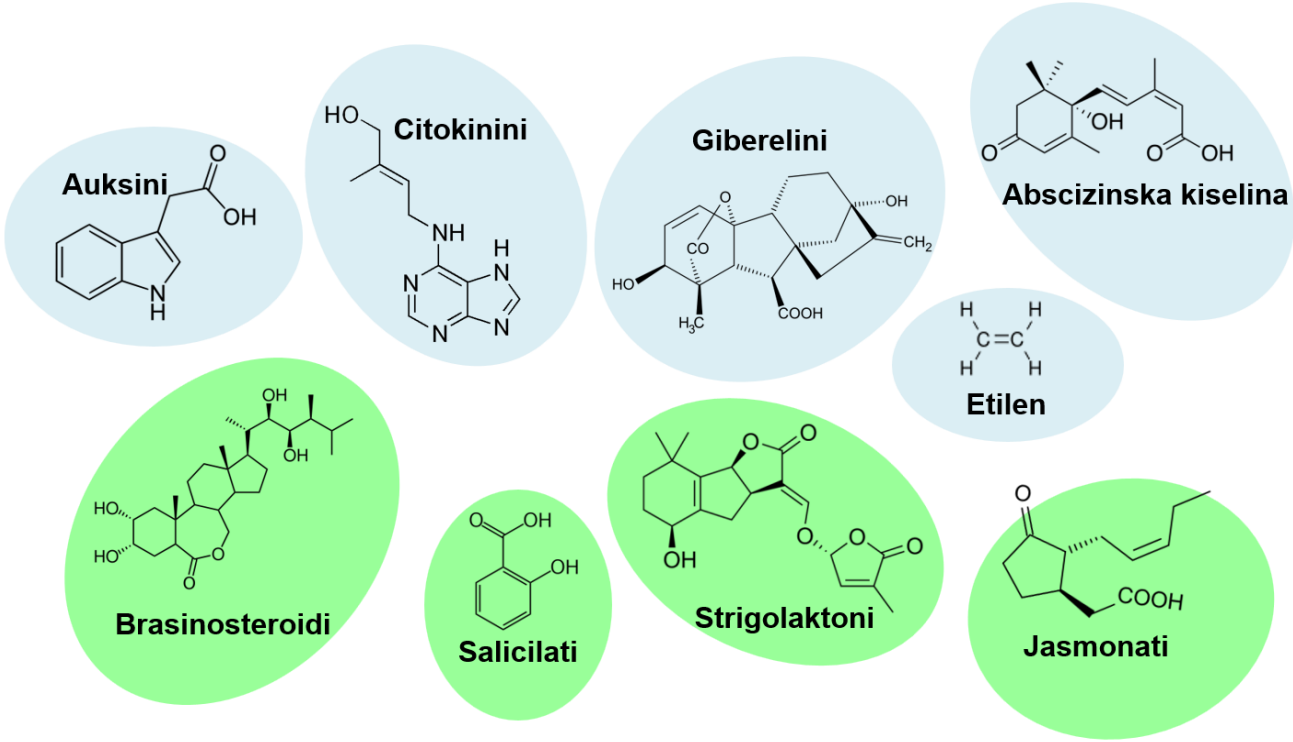
- Fitohormoni
  - glavni pokretači biljnog rasta i razvoja
  - sintetiziraju se u biljci u niskim koncentracijama potiču, inhibiraju ili na bilo koji način kvantitativno mijenjaju rast
  - Obično djeluju na mjestu koje nije mjesto sinteze.

- Regulatori rasta = fitohormoni i sintetske komponente koje djeluju poput (ili slično) prirodnim hormonima

# Biljni regulatori rasta

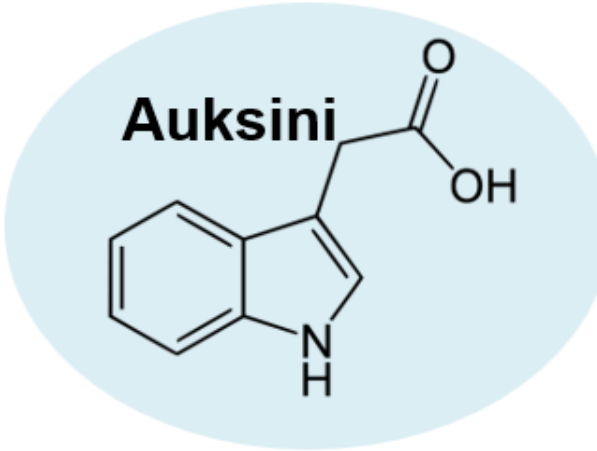
Fitohormoni reguliraju:

- stanične aktivnosti – diobu, produljenje (rast) stanice i diferencijaciju,
- formiranje tijela biljke,
- organogenezu,
- reprodukciju,
- određivanje spola,
- odgovore na abiotički i biotički stres.



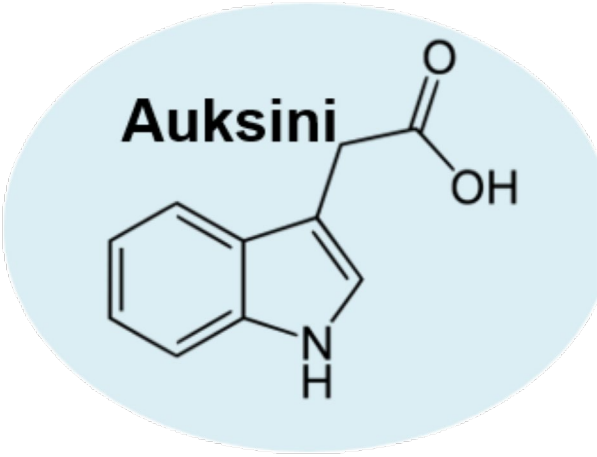

https://academic.oup.com/plcell/pages/hormones

# Biljni regulatori rasta - auksini

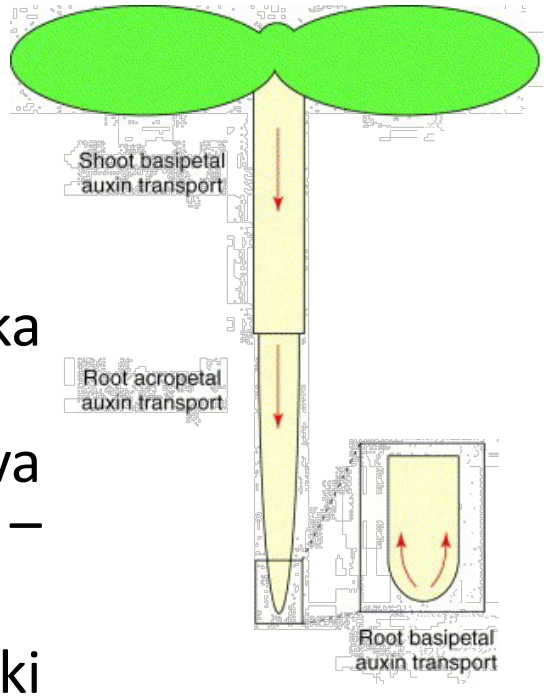



- Prirodne i sintetske molekule koje:
  - stimuliraju **elongaciju stanica koleoptila i stabljike**,
  - **potiču stvaranje korijena**
  - **koče rast korijena u dužinu** (osim u vrlo niskim koncentracijama)
  - **potiču stvaranje bočnog korijenja**
  - Potiču **dormanciju bočnih pupova**
  - Induciraju stanične diobe i diferencijaciju provodnih tkiva
- Primarni auksin u biljkama je **indol-3-octena kiselina (IAA)**.
  - Slobodni IAA u biljci je kemijski osjetljiv i enzimi ga brzo razgrađuju.
  - Pretvorbom IAA u indol-3 maslačnu kiselinu (IBA) biljka dobiva stabilniji oblik hormona koji se ne veže izravno na glavne auksinske receptore (TIR1/AFB), već služi kao pričuva.

# Biljni regulatori rasta - auksini

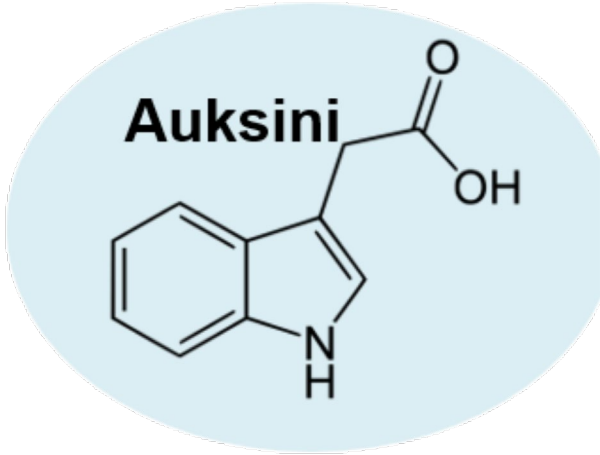



- Biosinteza auksina:
  - iz **triptofana** (ili indola)
  - kontrolirana je okolišnim i razvojnim faktorima koji utječu na regulaciju ekspresije gena važnih za biosintezu IAA i IBA
  - u vršnim i bočnim meristemima, mladim listovima i lisnim primordijima, embrijima i sjemenkama u razvoju.
- Razgradnja auksina - peroksidaze
- Transport auksina
  - Pasivno: konjugati i slobodna IAA → bazipetalno floemom iz izdanka u korijen i akropetalno centralnim cilindrom prema vrhu korijena.
  - Aktivno: polarni transport slobodne IAA od mjesta gdje završava floem prema vršku korijena (te nazad prema zoni izdužívanja) – proteini transporteri iz porodica PIN, ABCB i AUX1/LAX.
- **Najveća koncentracija auksina u biljci je u vršku korijena** (auksinski maksimum u stanicama mirujućeg centra)



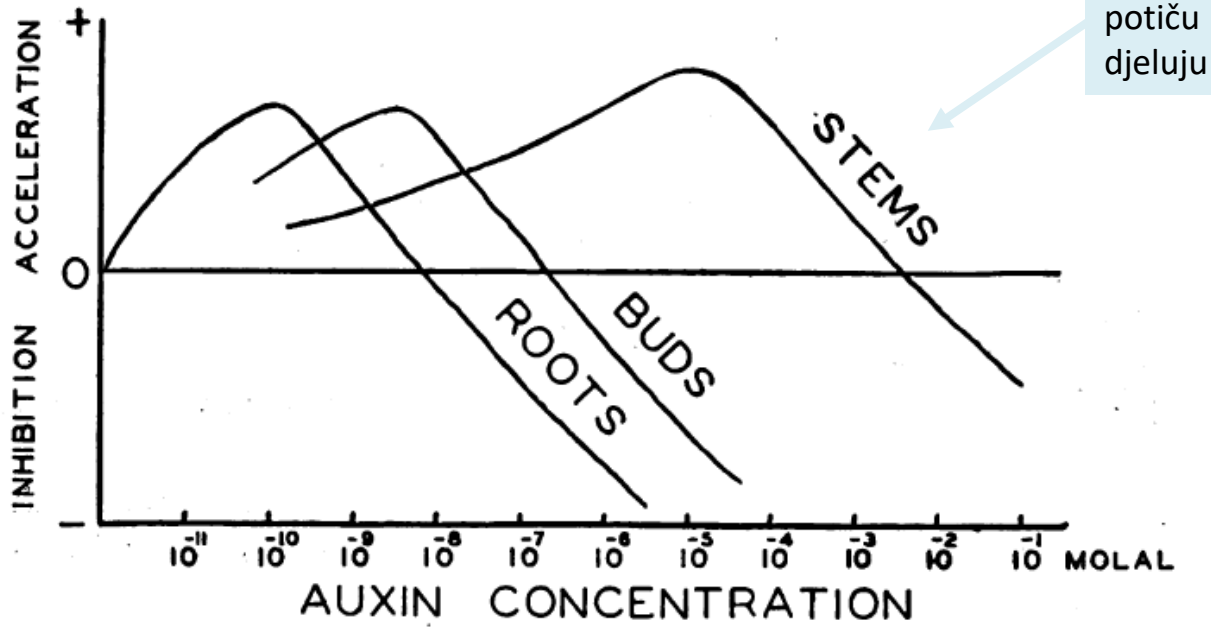

Muday & DeLong (2001) Polar auxin transport: controlling where and how much.Trends in Plant Science, 6, 535-542

# Biljni regulatori rasta - auksini



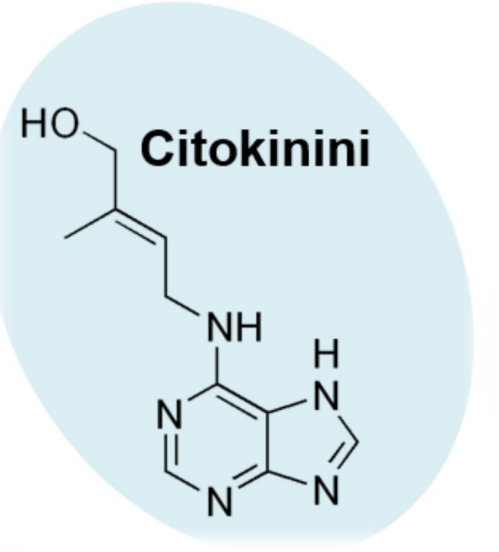

- različita tkiva imaju različitu osjetljivost na auksin
- dodatak istog hormona uzrokuje drukčije efekte, ovisne o tipu stanica/tkiva koje tretiramo
- aktivni u malim koncentracijama: $10^{-6}$do $10^{-10}$ M

Koncentracije auksina koje potiču izduživanje stabljike djeluju inhibicijski na korijenje.




Thimann, K.V. (1938). Hormones and the analysis of growth. Plant Physiol. 13: 437-449.

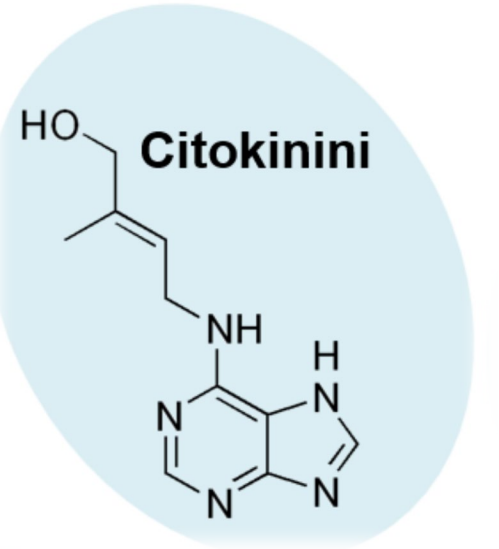
# Biljni regulatori rasta - citokinini




- potiču **diobe stanica** (citokinezu)
- potiču **rast bočnih pupova** (ukidanje apikalne dominacije)
- odgoda starenja (senescencije) listova
- **kočenje rasta korijena**

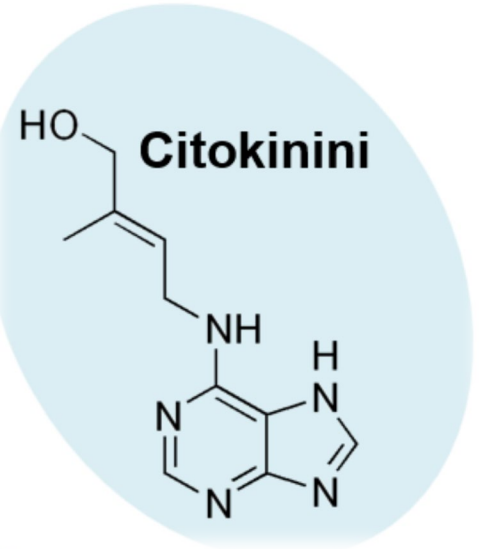
- Glavni i najaktivniji prirodni citokinin u biljkama – **zeatin**
- Prvi otkriven (ali sintetski) citokinin **- kinetin**

# Biljni regulatori rasta - citokinini




- Biosinteza citokinina
  - modifikacijom adenina (svi prirodni citokinini derivati su $N^6$ supstituiranog adenina)
  - u vršnom meristemu korijena, ali i kambiju, mladim listovima i sjemenkama u razvoju.
- Razgradnja citokinina – citokinin oksidaza (CKX)
- Transport citokinina
  - Većina citokinina se u biljnim tkivima brzo pretvara u nukleozide, nukleotide i glikozide značajno smanjene hormonske aktivnosti (rezervni i transportni oblik jer ih ne cijepa CKX)
  - Iz korijena u izdanak ksilemom (u obliku ribozida), a iz izdanka u korijen floemom u formi nukleotida
  - na mjestu djelovanja prelaze u nukleozid ili glikozilirane forme

# Međudjelovanje auksina i citokinina




## Balans regulatora rasta

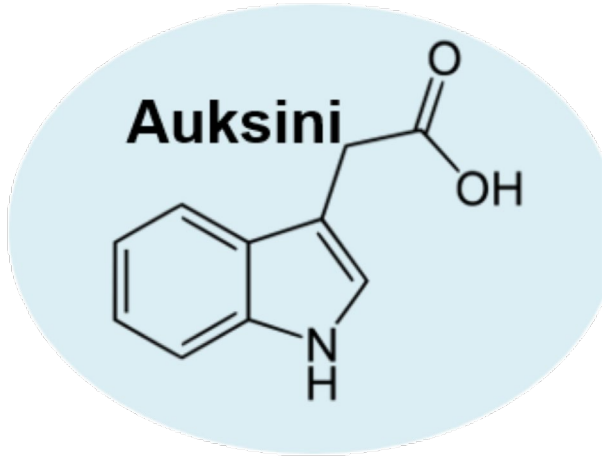
Stvaranje korijena na reznicama

Embriogeneza

Adventivno korijenje iz kalusa

Inicijacija kalusa

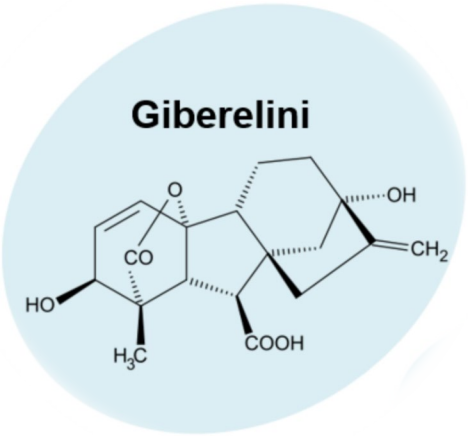
Indukcija aksilarnih izdanaka




Za pojedinu vrstu/genotip/tip eksplantata medij za uzgoj i regeneraciju je potrebno standardizirati metodom pokušaja i pogreške!

# Biljni regulatori rasta - giberelini

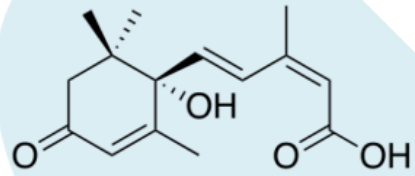
- Tetraciklički diterpeni (oko 130 spojeva), no samo nekoliko ima hormonsko djelovanje
- sinteza iz gliceraldehid trifosfata u mladim tkivima izdanka
- transport ksilemom i floemom
- **potiču germinaciju** (nekih) sjemenki
- **GA3 (giberelinska kiselina) uzrokuje hiperelongaciju stabljike stimulirajući diobe i produžni rast stanica**



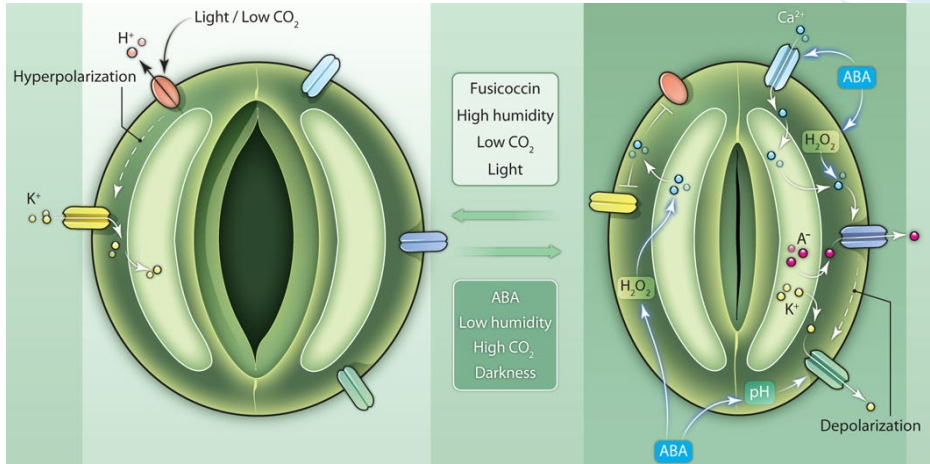



# Biljni regulatori rasta – apscizinska kiselina (ABA)

- hormon stresa i mirovanja (dormantnosti)
- sintetizira se iz gliceraldehid-3-fosfata preko izopentenil difosfata i karotenoida u korijenu i zrelom lišću
- prenosi se ksilemom, a iz lišća i floemom.
- povišene koncentracije uzrokuju zatvaranje puči
- **inhibira rast izdanka, ali može potaknuti rast korijena**
- održava dormanciju sjemenki sprečavajući preuranjeno klijanje
- koristi se za poticanje sazrijevanja embrija



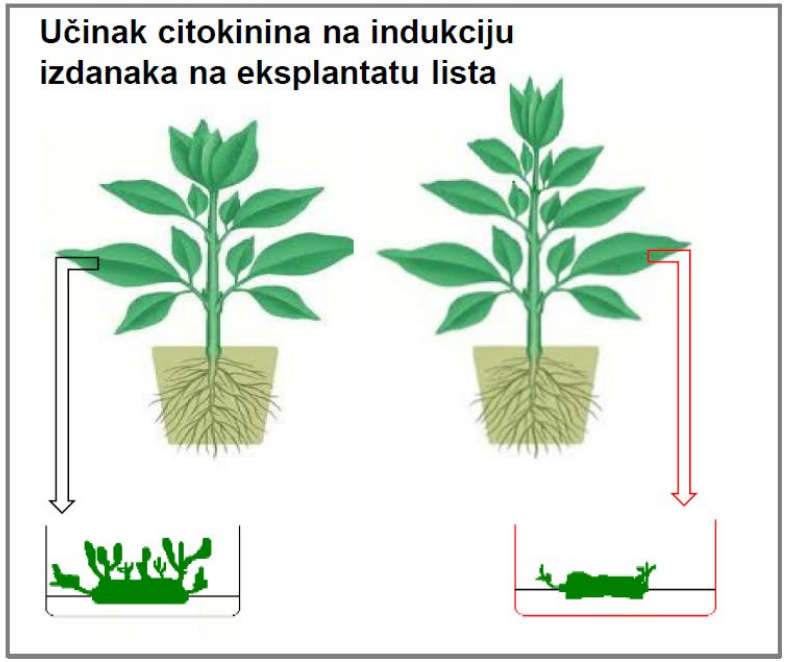

**Abscizinska kiselina**



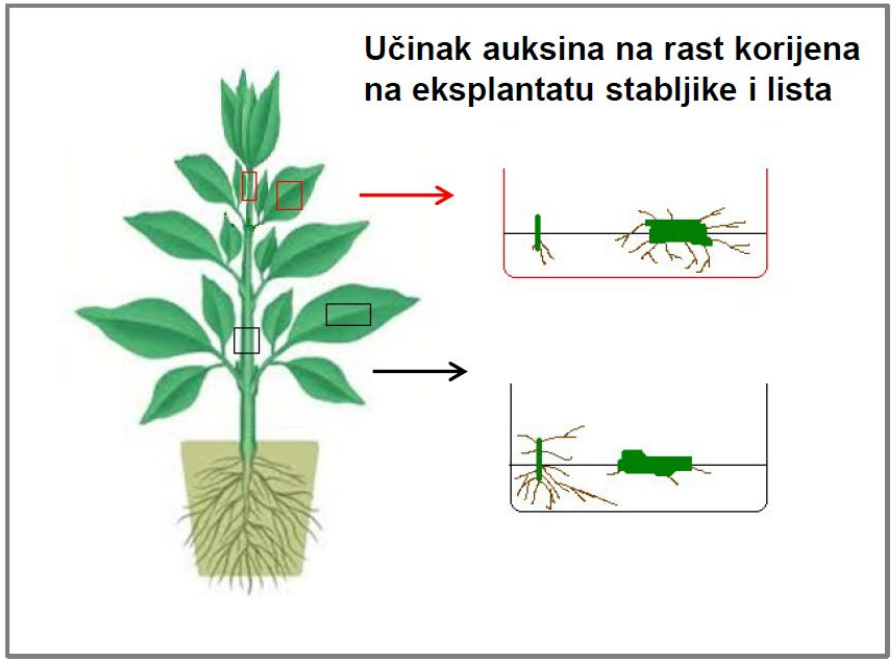

Joshi-Saha et al. (2011) Science Signaling 4
doi:10.1126/scisignal.2002164

# Biljni regulatori rasta

- Aktivnost hormona/regulatora rasta nije uvijek ista:
  - Ista kemikalija može prouzročiti drugačiji odgovor na različitim biljkama.
  - Pojedini dijelovi iste biljke različito reagiraju na istu kemikaliju.




*Drukčiji odgovor različitih biljaka*




*Odgovor ovisi o starosti i položaju eksplantata*

| Hormone | Product Name | Function in Plant Tissue Culture |
|---|---|---|
| Auxins | Indole-3-Acetic Acid<br>Indole-3-Butyric Acid<br>Indole-3-Butyric Acid, Potassium Salt<br>α-Naphthaleneacetic Acid<br>2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid<br>p-Chlorophenoxyacetic acid<br>Picloram<br>Dicamba | Adventitous root formation (high concen)<br>Adventitious shoot formation (low concen)<br>Induction of somatic embryos<br>Cell Division<br>Callus formation and growth<br>Inhibition of axillary buds<br>Inhibition of root elongation |
| Cytokinins | 6-Benzylaminopurine<br>6-γ,γ-Dimethylallylaminopurine (2iP)<br>Kinetin<br>Thidiazuron (TDZ)<br>N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'Phenylurea<br>Zeatin<br>Zeatin Riboside | Adventitious shoot formation<br>Inhibition of root formation<br>Promotes cell division<br>Modulates callus initiation and growth<br>Stimulation of axillary's bud breaking and growth<br>Inhibition of shoot elongation<br>Inhibition of leaf senescence |
| Gibberellins | Gibberellic Acid | Stimulates shoot elongation<br>Release seeds, embryos, and apical buds from dormancy<br>Inhibits adventitious root formation<br>Paclobutrazol and ancymidol inhibit gibberellin synthesis thus resulting in shorter shoots, and promoting tuber, corm, and bulb formation. |
| Abscisic Acid | Abscisic Acid | Stimulates bulb and tuber formation<br>Stimulates the maturation of embryos<br>Promotes the start of dormancy |
| Polyamines | Putrescine<br>Spermidine | Promotes adventitious root formation<br>Promotes somatic embryogenesis<br>Promotes shoot formation |

# Hranjiva podloga za uzgoj biljnih stanica/tkiva *in vitro*

**Tekuća hranjiva podloga**

- brz rast
- ravnomjerna opskrba hranjivima
- odvajanje pojedinačnih stanica (stanične suspenzije)
- tretmani (teškim metalima, nanočesticama poput nanosrebra, mikroplastikom, solima, pesticidima)
- Brzo umnožavanje i proizvodnja sekundarnih metabolita
- Kultura korijena i dlakavog korijenja (hairy roots)

**Kruta hranjiva podloga**

- kad je biljnom tkivu potreban fizički oslonac i kontakt sa zrakom
- uspostava kulture *in vitro*
- indukcija i održavanje kalusa
- organogeneza
- mikropropagacija i ukorijenjivanje izdanaka
- kultura meristema i sjemenki

# Krute hranjive podloge

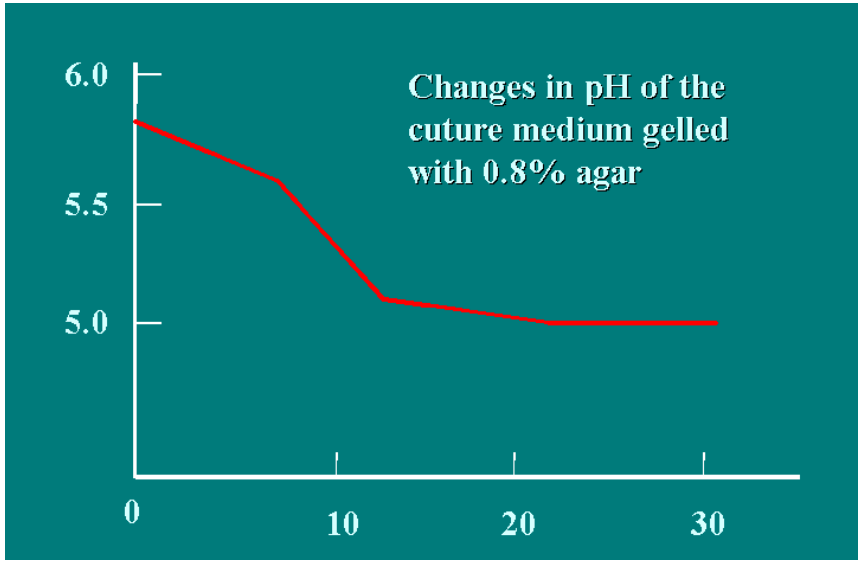
Dodaju se učvršćivači:

- **Agar** – polisaharid iz crvene alge (0.6 – 1%)
  - različite čistoće na tržištu – značajno utječe na ishod eksperimenta
  - skrutnjavanje ovisno o pH (optimalan pH 5,5 – 6) i koncentraciji soli
  - otapa se na 100 °C, a skrutnjava na 45-50 °C
- **Gelrite** ili **Phytagel** ili **Gellan gum**
  - polisaharid iz bakterije *Sphingomonas elodea*, čišći od agara
  - koristi se 0,2-0,35%, otapa se na 100 °C, a skrutnjava na 55 °C
  - skrutnjavanje ovisi o prisutnosti kationa ($Ca^{2+}$, $Mg^{2+}$)
  - otporniji na nizak pH (skrutnjava se do pH 4,8)
  - Proziran – pogodniji za praćenje rasta korijenja
- **Agaroza**
- Smjese (**Phytagar**)
- Za podupiranje eksplantata koriste se i različita mehanička sredstva – mostovi od filtar papira, pijesak, vata, staklena vuna…

# pH hranjive podloge



- Obično pH 5,0-5,7
- mjeri se kad su dodane sve komponente podloge.
- ukoliko se radi o krutoj podlozi, pH se mjeri **prije** dodavanja agara, jer bi agar mogao začepiti pH elektrodu!




Autoklaviranjem i tijekom uzgoja pH podloge postepeno pada. Ukoliko pH želimo održavati konstantnim u podlogu se mogu dodati tvari puferskog djelovanja, npr. MES

- Agar se ne skrutnjava kada je pH ispod 5
- Gelrite se skrutnjava kod niskog pH (4) ali mu treba povećati koncentraciju (0,5%)

# Sterilizacija hranjive podloge

**Autoklaviranje**

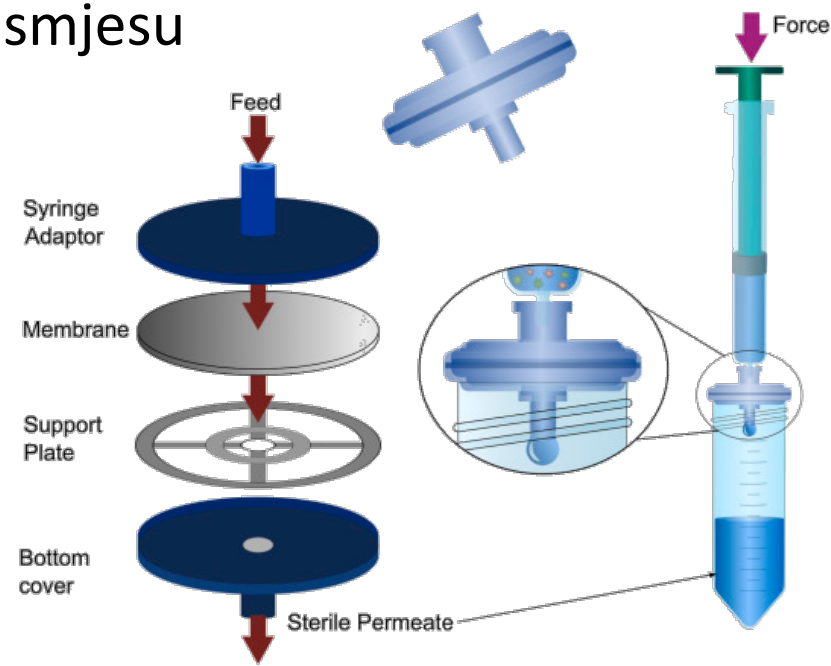
- Visoka temperatura (121°C)
- Visoki tlak (1,5 bar)
- 10-20 min



**Hladna filtar sterilizacija (0,22 µm)**

- Termolabilne komponente (vitamini, antibiotici…) ili one koje kompleksiraju (teški metali, aminokiseline…)
- naknadno se dodaju u rashlađenu autoklaviranu smjesu



# Priprema podloge s termolabilnom komponentom



Sterilna podloga nakon autoklaviranja ili naknadno rastopljena u mikrovalnoj pećnici pusti se da se ohladi na oko 50 °C.



Termolabilna, filtar sterilizirana komponenta dodaje se u rashlađenu podlogu **u sterilnim uvjetima**.



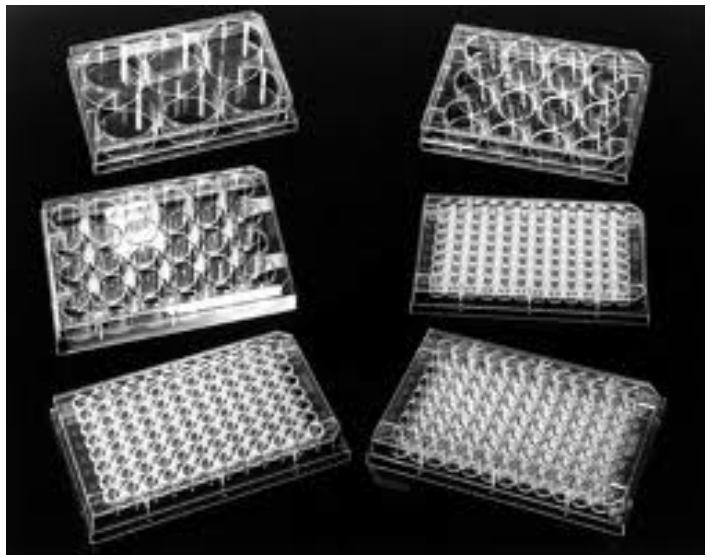
Spremna podloga razlijeva se u npr. sterilne Petrijeve zdjelice **u sterilnim uvjetima**.

# Laboratorijsko posuđe za uzgoj biljaka i biljnog tkiva

- Plastično posuđe se kupuje sterilno (sterilizirano gama zračenjem).
  - Otvara se i puni isključivo u sterilnim uvjetima.
- Stakleno posuđe se sterilizira u pećnici (200 °C, 60 min) ili u autoklavu.







# Čuvanje pripremljenih hranjivih podloga



- Manji volumeni (do 100 mL) čuvaju se na sobnoj temperaturi do 2 tjedna ili u frižideru do 6 tjedana.
- Veći volumeni (500 mL i više) čuvaju se na sobnoj temperaturi do 6 tjedana ili u frižideru do 3 mjeseca.
- Podloge sa termolabilnim komponentama čuvaju se uvijek u frižideru kraće vrijeme (do 4 tjedna).
- Termolabilne komponente najbolje je dodavati u hranjivu podlogu neposredno prije korištenja podloge. U tom slučaju se sterilna hranjiva podloga rastopi u mikrovalnoj pećnici ili vodenoj kupelji te se u rashlađenu (60 °C) doda termolabilna komponenta.
- Podloge sa agarom se mogu višekratno rastapati, dok se one skrutnute s Gelritom ne mogu.



# Priprema hranjive podloge za kulturu biljnog tkiva

**Makroelementi**
(npr. N, P, K, Ca, Mg, S) – soli poput $NH_4NO_3$, $KNO_3$, $CaCl_2$, $MgSO_4$

**Mikroelementi**
(npr. Fe, Mn, Zn, Cu, B, Mo, I, Ni) – soli u tragovima

**Saharoza**
(izvor ugljika i energije)



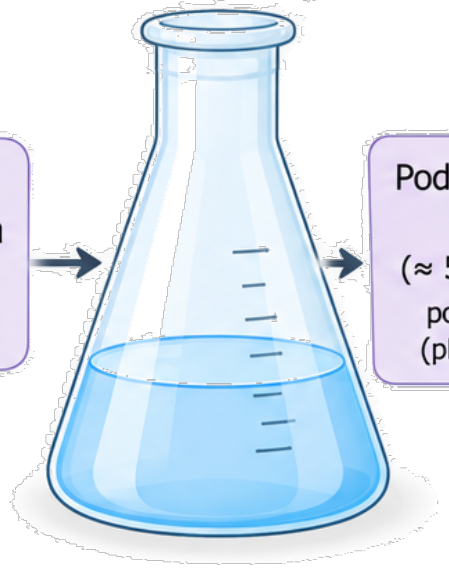
**Vitamini**
(npr. tiamin – vitamin B1)

**Aminokiseline**
(npr. glicin, glutamin)

**Biljni hormoni**
(npr. auksini, citokinini)

**Ostali dodaci**
(npr. aktivni ugljen, askorbinska kiselina)

Otapanje i miješanje sastojaka u destiliranoj vodi



Podesavanje pH
(≈ 5,7 – 5,8)
po potrebi
(pH metar)

Lijevanje u posude za uzgoj



Sterilizacija (autoklaviranje)
121 °C,
15–20 min



Gotova hranjiva podloga

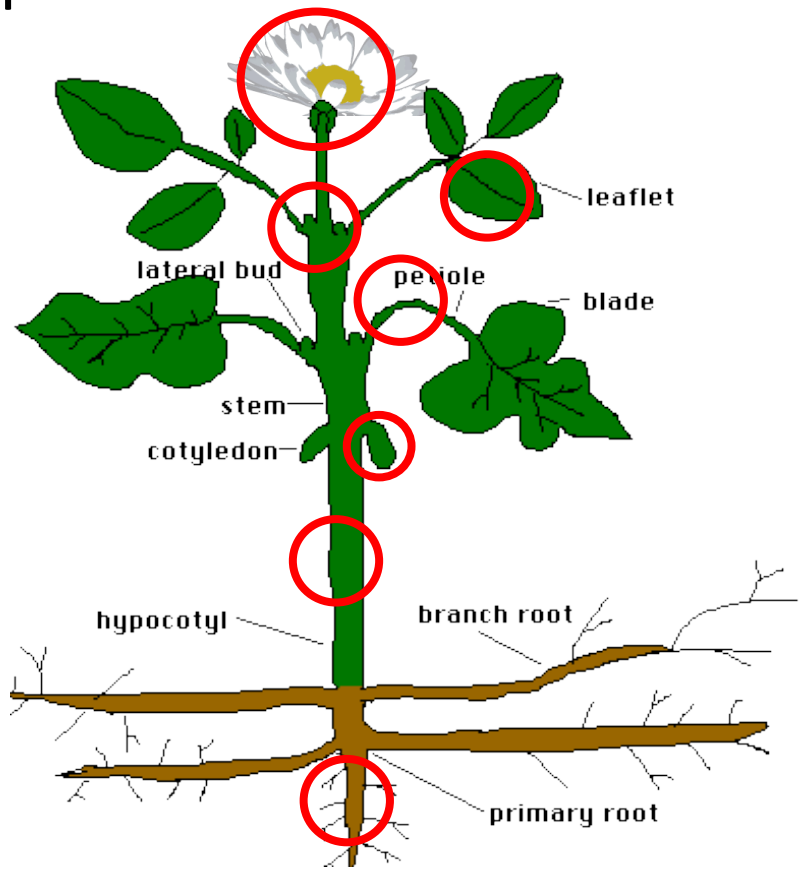


# Odabir pogodnog eksplantata

- **Eksplantat** – dio koji se izolira iz biljke i uvodi u kulturu
- Primarni eksplantat → subkultivacija eksplantata

Nisu sve biljne stanice totipotentne, no tijekom cijelog životnog ciklusa, u svim biljnim tkivima/organima, postoje totipotentne stanice i/ili stanice koje se mogu potaknuti na dijeljenje i diferencijaciju organa!

Sve biljke u svim fazama životnog ciklusa imaju neke populacije stanica koje su ili mogu postati totipotentne.

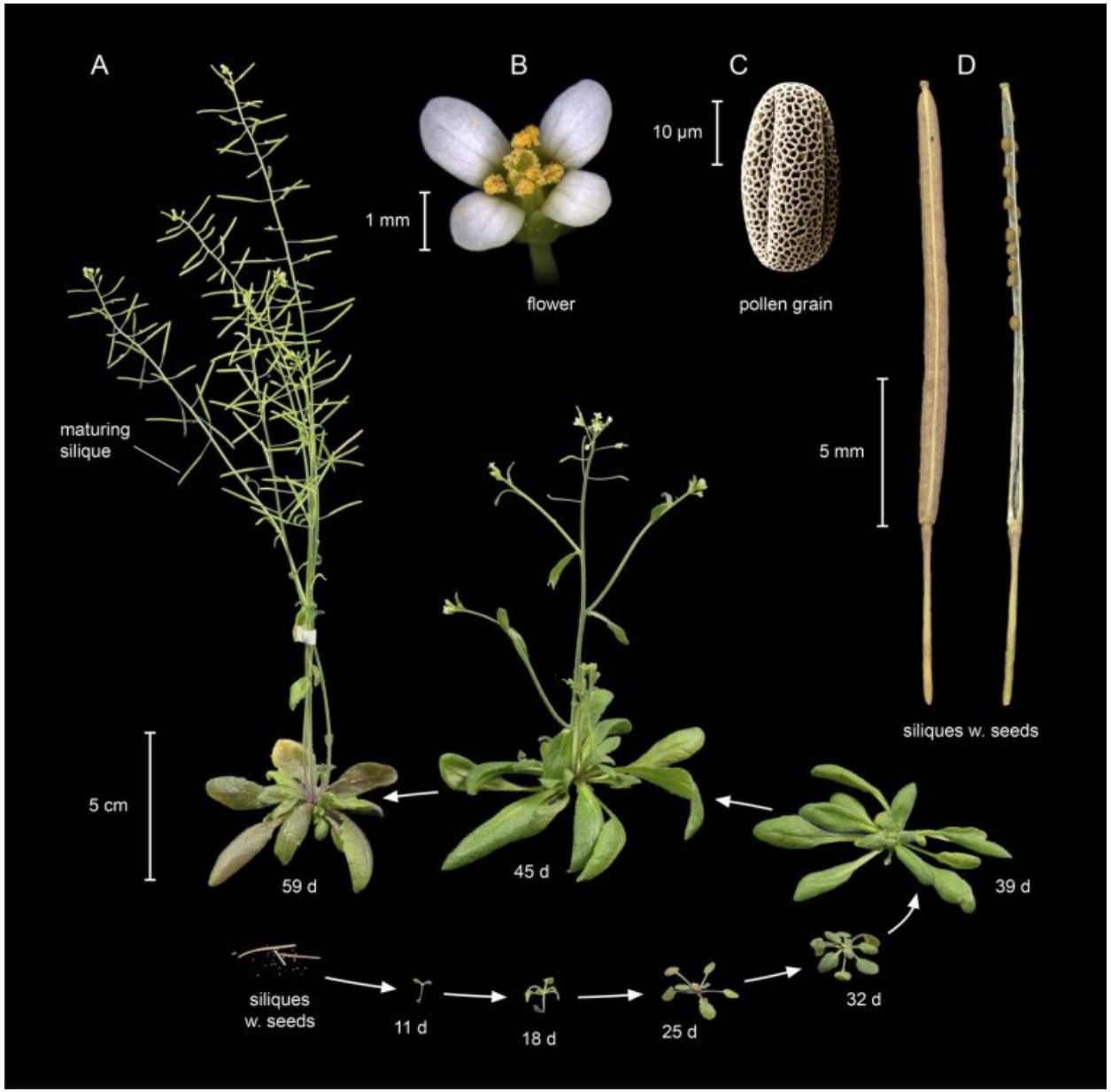


# Biljna tkiva

- **MERISTEM** iz kojeg se diferenciraju trajna, specijalizirana tkiva
- **Trajna tkiva** nastaju diferenciranjem stanica meristema čime gube sposobnost staničnih dioba.
  - provodna tkiva: KSILEM (voda i mineralne tvari) i FLOEM (asimilati)
  - Pokrovno tkivo (epiderma i rizoderma),
  - **PARENHIM** – većina unutrašnjosti biljnog organizma, stanice mogu ponovno pokrenuti meristematsku aktivnost ili mogu diferencirati u potporno tkivo
  - Žljezdano tkivo
  - potporno tkivo – **KOLENHIM** (stanice s debelim primarnim stjenkama koje mogu ponovno pokrenuti meristematsku aktivnost i početi se dijeliti)
    - SKLERENHIM (čvrste stjenke, mrtve stanice).

# Biljni organi

- **Vegetativni organi**
  - **Korijen –** učvršćuje biljku za podlogu, opskrbljuje vodom i mineralima.
  - **Stabljika –** nosi biljne organe poput listova i cvjetova, sadrži provodne žile koji osiguravaju protok tvari kroz čitavo tijelo biljke.
  - **List** – organ u kojem se odvija fotosinteza i transpiracija.
  - **Cvijet –** sadrži reproduktivne organe
- **Reproduktivni organi**
  - **Prašnici –** u peludnici mejozom nastaju mikrospore
  - **Tučak** – u sjemenim zamecima mejozom nastaju megaspore
- Nakon oplodnje se dijelovi cvijeta razvijaju u **plod sa sjemenkama =** nova generacija potomaka.




Životni ciklus modelne biljke *Arabidopsis thaliana* L.

# Odabir pogodnog eksplantata

- Različite biljne vrste pokazuju razlike u podložnosti za kulturu tkiva
- U mnogim slučajevima različiti genotipovi unutar vrste drukčije reagiraju na kulturu tkiva
- Općenito, što je eksplantat mlađi, manje diferenciran, to je bolji za kulturu tkiva
- Poželjna svojstva eksplantata
  - Lako se sterilizira
  - Mlado, juvenilno tkivo
  - Reaktivan – pogodan za rast i manipulaciju razvoja
- Najčešće korišteni eksplantati
  - Vršak izdanka
  - Bočni pup
  - Sjemenke
  - Hipokotil (izoliran iz klijanca proklijalog *in vitro*)
  - Listovi

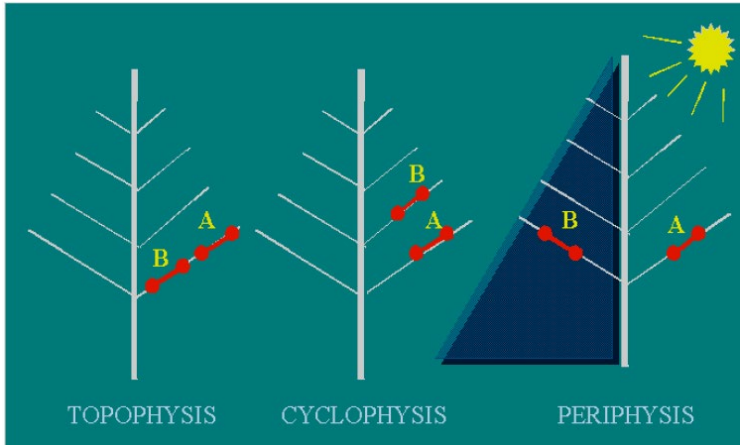


*Coleus blumei* Benth.

# Odabir pogodnog eksplantata

- Ovisnost kulture o biljci davatelju
  - Genotip
  - Dob
  - Fiziološko i zdravstveno stanje
- Ovisnost kulture o uvjetima rasta roditeljske biljke
  - Djelovanje različitih godina i sezone
  - Uvjeti rasta
  - Položaj eksplantata na biljci
- Ovisnost kulture o obradi i veličini eksplantata
  - Što je eksplantat manji, medij za uzgoj je kompleksniji

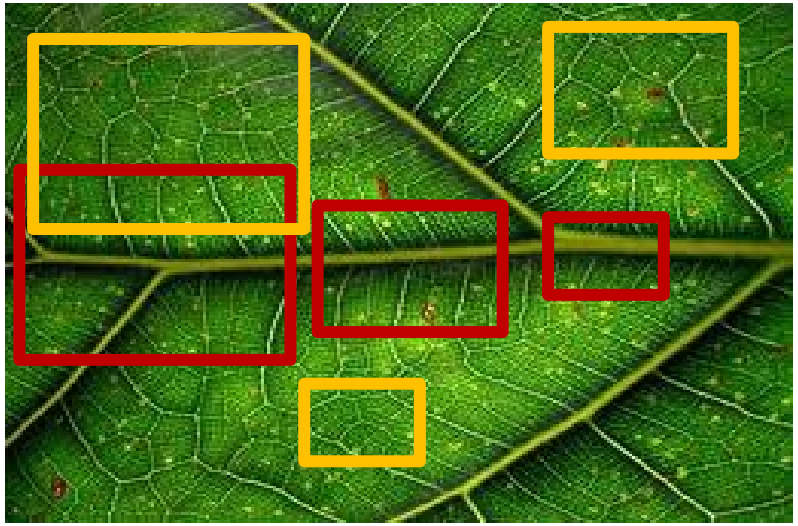


# Odabir pogodnog eksplantata

- Ovisnost kulture o obradi i veličini eksplantata
  - Što je eksplantat manji, medij za uzgoj je kompleksniji

A) Veličina i izolacija eksplantata

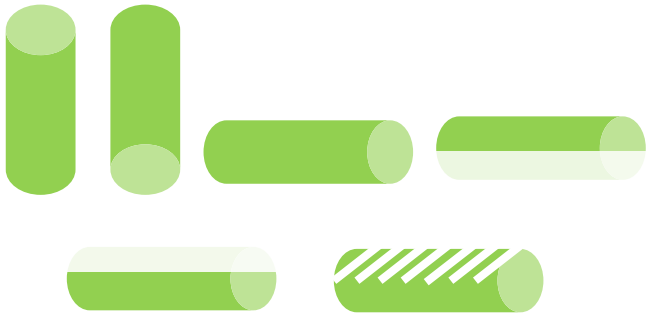


Lisna plojka

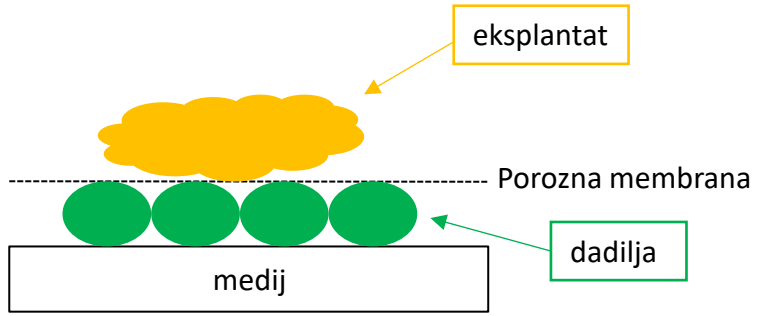
Lisna plojka + glavne lisne žile

B) Način inokulacije

C) Ranjavanje



D) Učinak uzgoja na dadilji

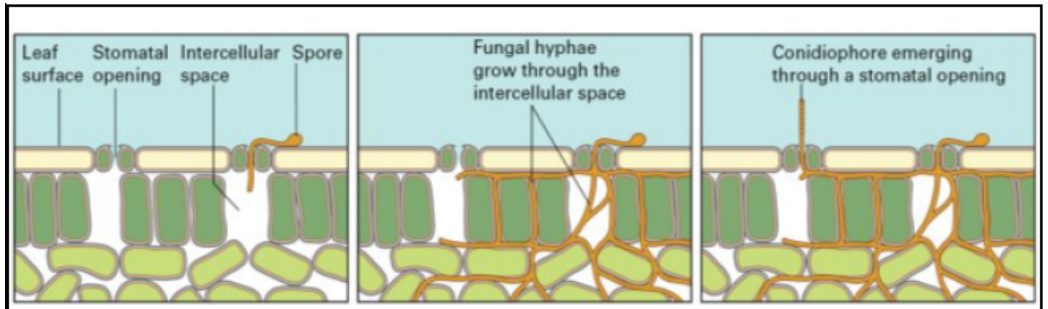



E) Kondicionirana podloga

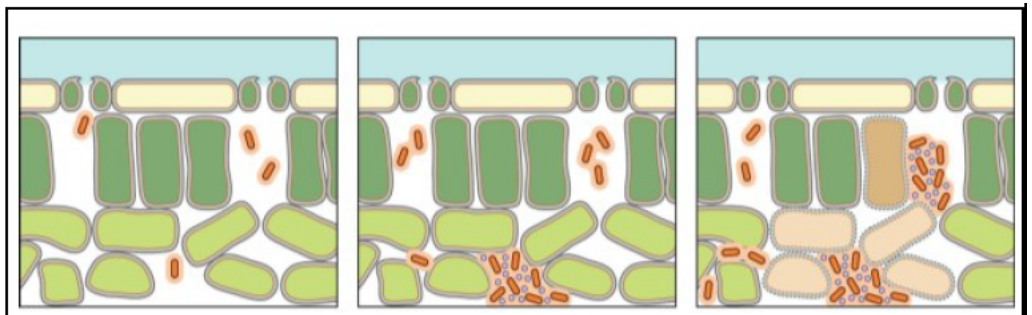
– upotreba podloge u kojoj je kultivirano dobro rastuće tkivo

# Uspostava aseptične kulture

- Jedan od glavnih zahtjeva uspješne kulture je dobiti aseptični eksplantat
- Mikroorganizmi nastanjuju površinu, međustanične prostore, provodna tkiva, i stanice biljaka
- Mikroorganizmi rastu značajno brže od biljnih stanica i tkiva
- Mikroorganizmi ispuštaju toksine koji sprečavaju rast biljnog tkiva




•Germinacija spora na površini lista
•Hife ulaze kroz pući u intercelulare
•Vidljivi simptomi infekcije biljke tek nakon što se sporulacijske strukture pojave na površini lista



•Bakterije u biljku ulaze kroz pući i većinom se umnažaju u inercelularama
•Samo visoke koncentracije bakterija u intercelularama uzrokuju propadanje tkiva i nastanak vidljivih simptoma infekcije

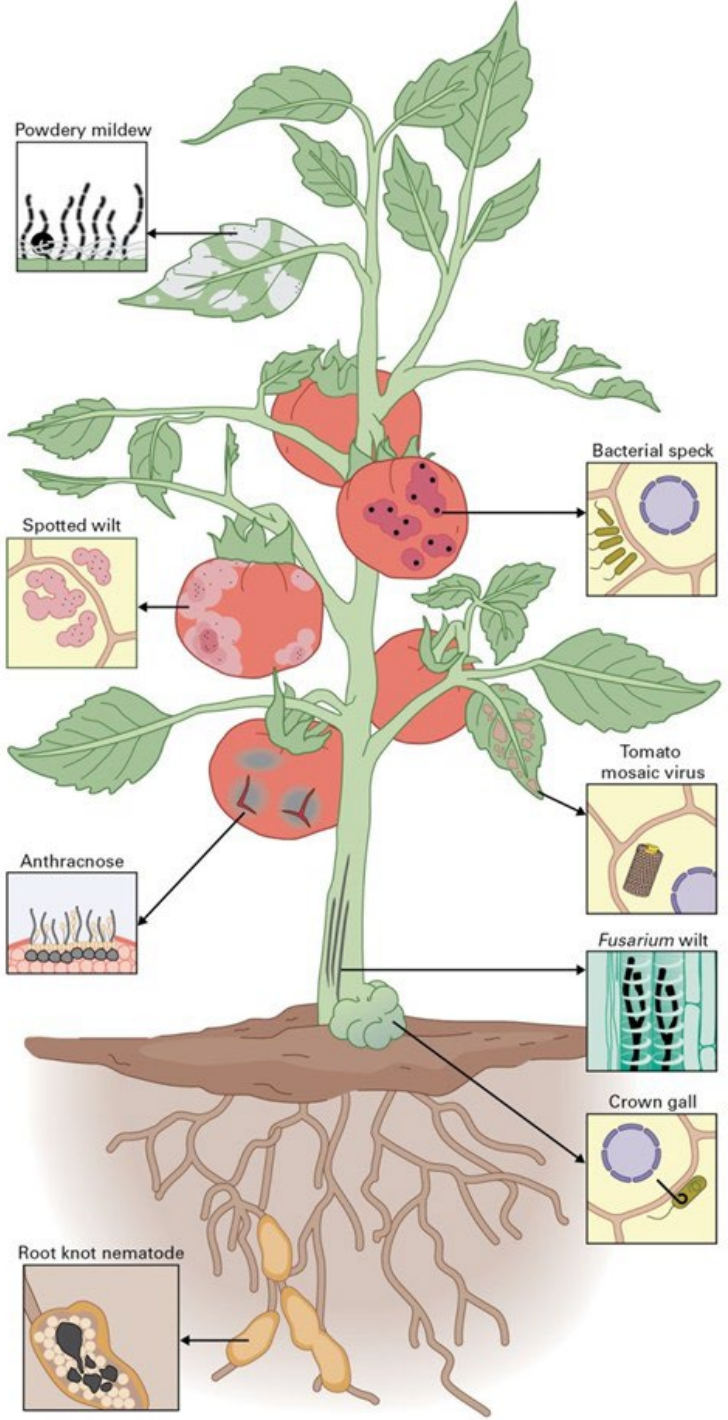
# Uspostava aseptične kulture

- Biljni patogeni i onečišćivači kulture *in vitro*
  - Bakterije
  - Gljivice
  - Virusi
  - Viroidi
  - Fitoplazme
  - Nematode
  - Kukci



**Uklanjanje mikrobne kontaminacije**

- osobito teško za biljke koje rastu u vanjskim uvjetima



# Uspostava aseptične kulture

## Površinska sterilizacija biljnog materijala

- eliminacija mikroorganizama s površine biljnog tkiva
- najveći problem predstavljaju mikroorganizmi u intercelularama i u stanicama
- 70%-tni etanol – miče zračne mjehuriće, uklanja masne kapljice
- klorno vapno
- kalcij hipoklorit (manje toksičan za biljno tkivo jer sporije prodire od natrij hipoklorita)
- $H_2O_2$ – uvijek u kombinaciji s drugim sredstvima
- živa-klorid - VRLO TOKSIČNA!
  - sterilizacija sjemenki i drvenastih dijelova biljaka

## Unutarstanična sterilizacija i ozdravljivanje

- Eliminacija virusa, viroida, fitoplazmi…
  - Termoterapija
  - Kemoterapija
  - Kultura meristema
  - Krioterapija




Izosan G, Pliva

100% natrij dikloroizocijanurat dihidrat



# Uspostava aseptične kulture – površinska sterilizacija

## Sredstva za sterilizaciju biljnog materijala

| Agens | Koncentracija | Fitotoksičnost | Vrijeme (min) |
|---|---|---|---|
| Na hipoklorit | 0,25-1% | Mala | 5-20 |
| Ca hipoklorit | 9-10% | Mala | 5-20 |
| $HgCl_2$ | 0,01-1% | Velika | 1-10 |
| $H_2O_2$ | 3-10% | Velika | 5-20 |
| Alkohol (EtOH) | 70% | Velika | max 1 |

Često se dodaju deterdženti koji pojačavaju djelovanje dezinficijensa (Tween 20, Mucasol).

# Uobičajeni postupak sterilizacije biljnog tkiva








EtOH




Sterilizacijsko sredstvo



Ispiranje sterilnom vodom

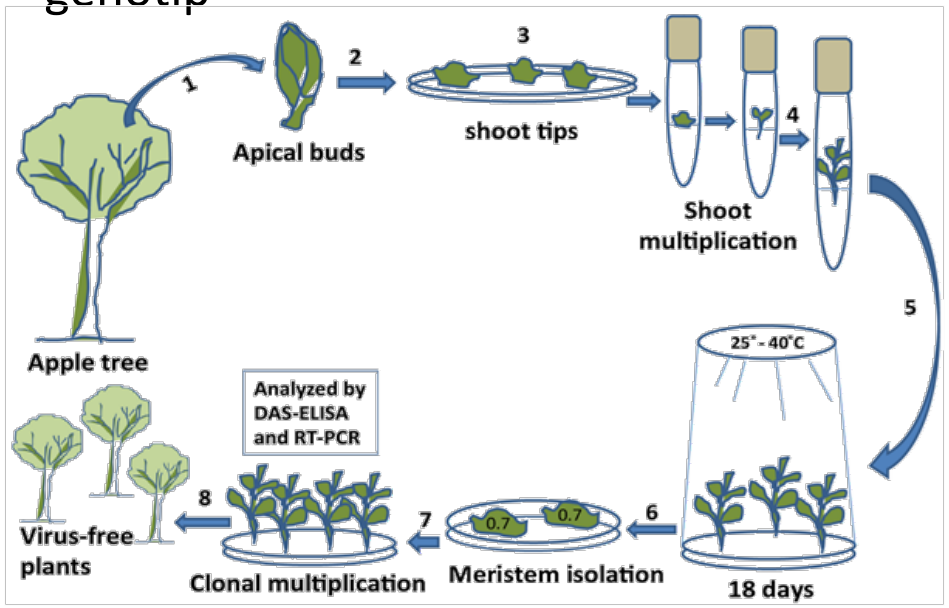


Uzgoj

# Uspostava aseptične kulture – unutarstanična sterilizacija

## Termoterapija

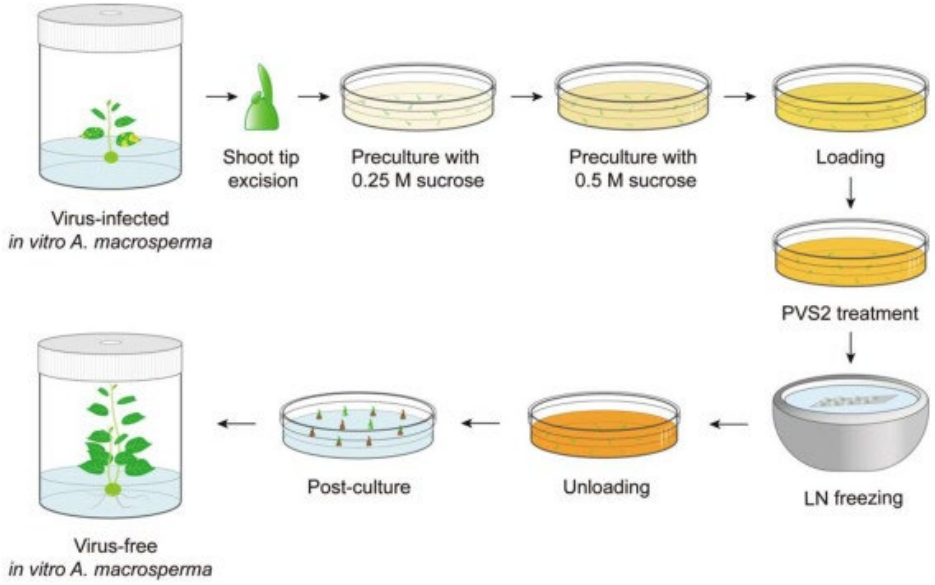
- Ključni čimbenici:
  - temperatura i trajanje tretmana
  - izvor i veličina eksplantata
  - vrsta virusa i status infekcije
  - genotip




Lizárraga et al. (2017) *American Journal of Plant Sciences*, 8(10), 2474–2482.

## Kemoterapija

- Upotreba antiviralnih i antimikrobnih kemikalija u hranjivoj podlozi
- Npr. acikloguanosin, azidotimidin, aciklovir

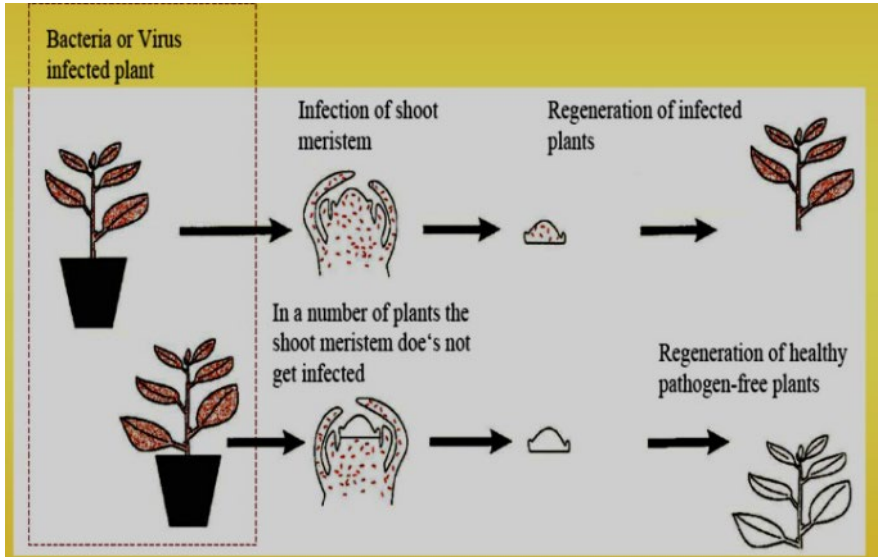



Zhang et al. (2024) *Scientia Horticulturae*, *337*, Article 113543.

# Uspostava aseptične kulture – unutarstanična sterilizacija

## Kultura meristema

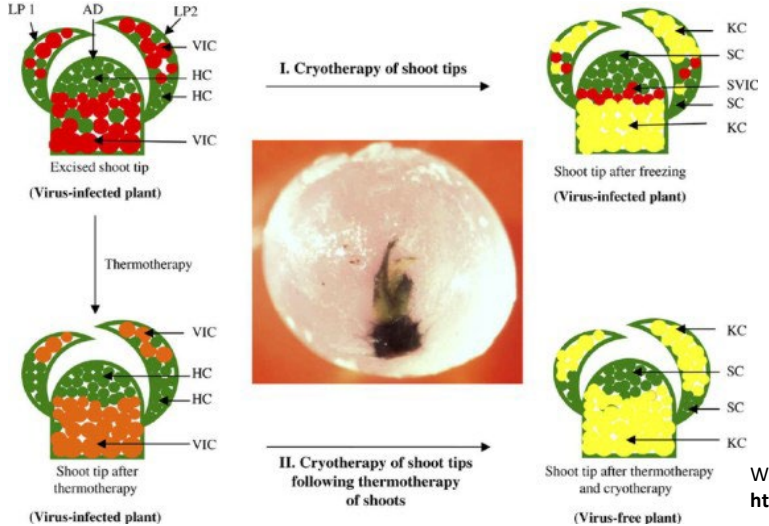
- Dijelovi biljke koji ne sadrže provodna tkiva imaju znatno manju zastupljenost virusa
- Najmanje virusa - meristemsko tkivo
  - vršni meristem izdanka (SAM) i korijena (RAM)
  - zbog visoke koncentracija hormona u meristemu, te zbog intenzivnih staničnih dioba




Šparoge
Rabarbara
Banana
Hren
Jagoda
Manioka
Grašak
Šećerna trska
Cvjetača
Krumpir
Češnjak
Malina

## Krioterapija

- zamrzavanje vegetacijskog vrška u tekućem dušiku.
- Kristali leda ne oštećuju male meristematske stanice, dok stanice s većim vakuolama (u kojima se stvaraju veliki kristali leda) propadaju
- Kombiniranje krioterapije i kulture meristema
- Kombiniranje termoterapije i krioterapije – dodatno uzrokuje degradaciju virusne RNA

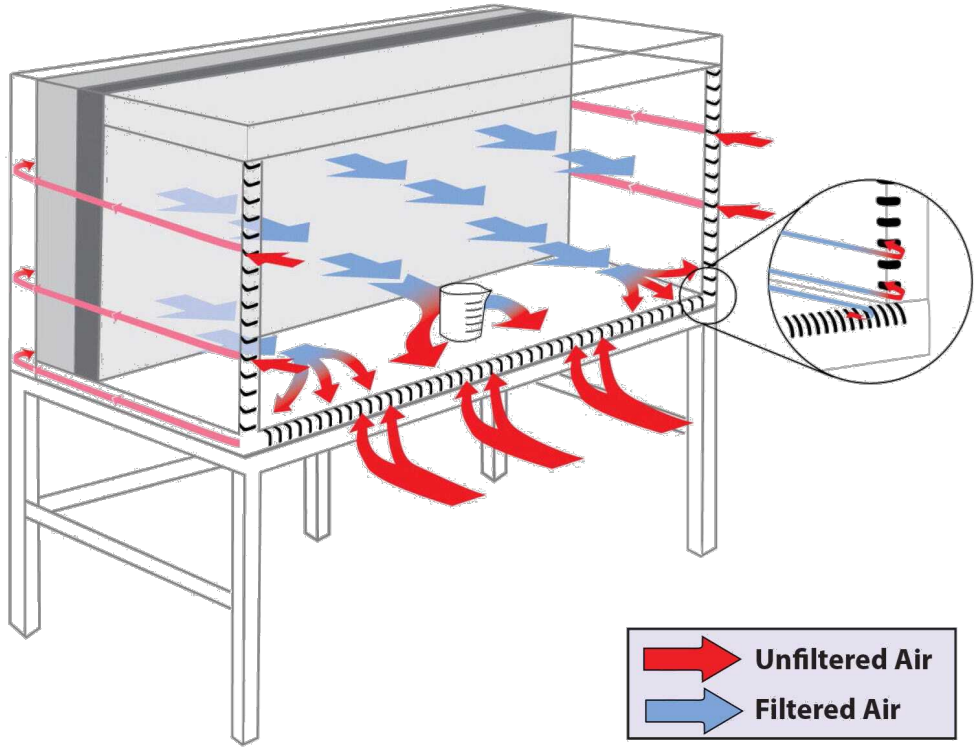



Wang et al. 2009.
**https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2008.00308.x**

# Uspostava aseptične kulture
# - sterilna manipulacija biljnim materijalom

## Laminar

- zatvorena laboratorijska radna komora koja osigurava potpuno sterilan radni prostor pomoću neprekidnog, jednosmjernog strujanja pročišćenog zraka.






Flambiranje metalnog pribora

# Kontrolirani okoliš – uzgojni uvjeti

- Temperatura
- Osvjetljenje
- Vlažnost
- Plinovi




**Fitotron** – specijalizirana zatvorena komora u kojoj se svi okolišni čimbenici precizno nadziru i reguliraju kako bi se proučavao rast i razvoj biljaka

Dobro izveden eksperiment podrazumijeva strogu kontrolu okolišnih uvjeta!

# Kontrolirani okoliš – Temperatura

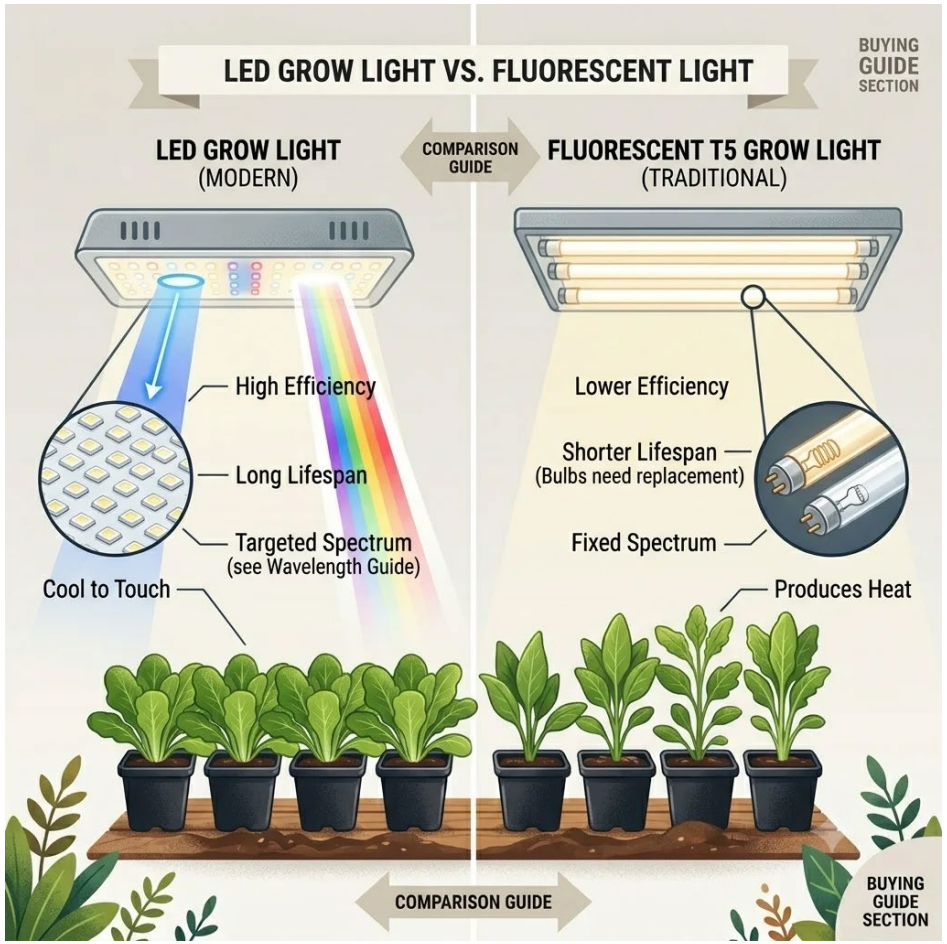
- Konstantna, 22-28 °C
- Dnevne varijacije (noć/dan) – noću je obično niža 4-6 °C
- Sezonske varijacije




- Temperaturu je potrebno održavati na ± 1°C.
- Unutar posudice za uzgoj temperatura je, zbog efekta staklenika, čak i do 5 °C viša od okolišne.
- Privremeni uzgoj na povišenim temperaturama se koristi za eliminaciju virusa.
- Privremeni uzgoj na nižim temperaturama se koristi za poticanje kalusa, somatske embrigeneze i haploida.
- Trajni uzgoj na nižim temperaturama se koristi kada želimo usporiti rast tkiva i smanjiti učestalost supkultiviranja (usporen rast)

# Kontrolirani okoliš – Osvjetljenje

- Fotoperiod (obično 16 h dan / 8 h noć)
  - Neke kulture (npr. kultura stanica u suspenziji i kultura korijena) ne vole svjetlo pa ih je potrebno zaštititi od osvjetljenja
- Intenzitet
  - Za uzgoj: 30-250 µE/$m^2$s  ili od 2000-10000 lux-a
- Kvaliteta – valna duljina (ovisi o tipu lampe)
  - Najvažniji je omjer plavo/crveno i crveno/daleko crveno
  - Korijenje voli crveno, a izdanci plavo svjetlo

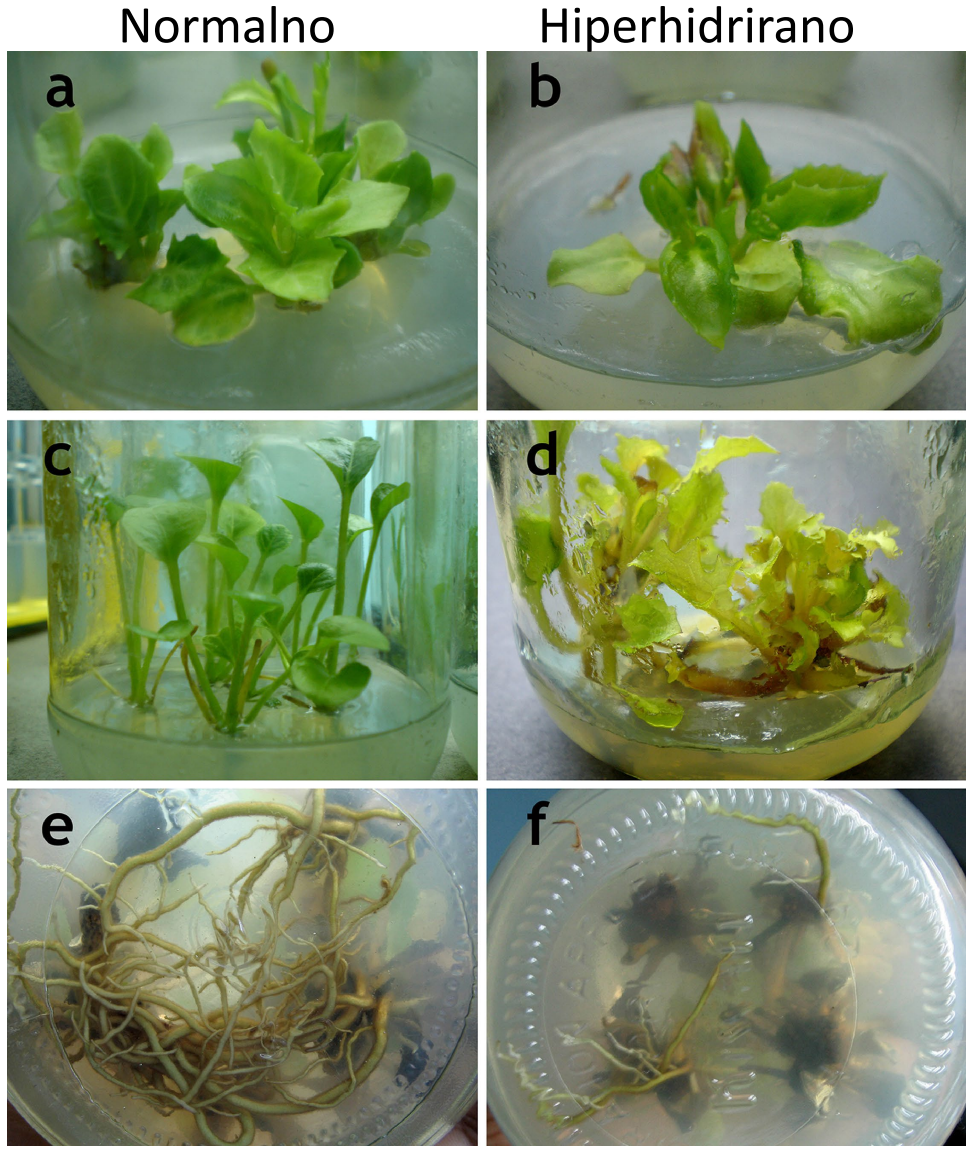


ediblegardentips.com

Svjetlost značajno utječe na rast i razvoj, osobito na elongaciju stabljike i veličinu listova, metabolizam i sadržaj klorofila.
Svjetlost utječe na učinkovitost regulatora rasta i razinu endogenih hormona.
Tijekom mikropropagacije, intenzitet i izvor svjetlosti imaju ključnu ulogu u regeneraciji izdanaka, prirastu svježe mase i biosintezi sekundarnih metabolita.

# Kontrolirani okoliš – Vlažnost

- U uvjetima *in vitro* je oko 100%
- Obično se ne kontrolira u uvjetima *in vitro*, no moguće ju je regulirati temperaturom i sadržajem agara
- Previsoka vlažnost uzrokuje hiperhidriranost tkiva i pogoduje kontaminacijama
  - Hiperhidriranost je važan, nepoželjan i najčešći fiziološki poremećaj u uzgoju biljaka *in vitro.* Značajno remeti rast i regeneraciju.
- Preniska vlažnost uzrokuje isušivanje eksplantata i usporeni rast




Gantait & Mahanta (2022) https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.06.038

# Kontrolirani okoliš – Plinovi

- Sastav plinova u posudicama za uzgoj značajno varira od sastava atmosfere i može utjecati na rast i razvoj.

| Komponenta | Atmosfera | Posudica za uzgoj |
|---|---|---|
| $O_2$ | 22 % | Čak i ispod 4 % |
| $N_2$ | 77 % | do 87 % |
| $CO_2$ | 365 - 1000 ppm | do 20 % |
| Vodena para | 60-85 % | ± 100 % |
| Etilen | 5 ppb - 100 ppb | > 2 ppm |

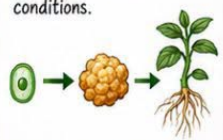
**Etilen**

- Plin koji se u većini tkiva sintetizira kao odgovor na stres, te tijekom dozrijevanja plodova i starenja
- Uzrokuje produljenje hipokotila, inducira razvoj adventivnog korijenja, dozrijevanje plodova, odbacivanje listova i plodova, otvaranje cvjetova

# PLANT TISSUE CULTURE

## 1 Totipotency

A single plant cell or tissue can regenerate into a whole plant under suitable conditions.



## 2 Explant

An explant is the small plant tissue used to start a culture.




## 3 Sterile Technique

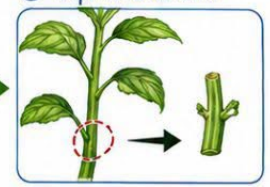
Contamination is prevented by sterilized tools, sterile media, and aseptic handling.



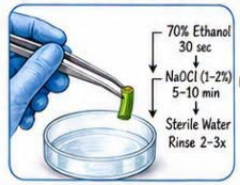

## 1 Parent Plant



## 2 Explant Collection



## 3 Surface Sterilization




## 4 Culture Medium



## 5 Callus Formation



## 6 Shoot Induction



## 7 Root Induction



## 8 Plantlet



## 9 Acclimatization



## 10 Mature Plant

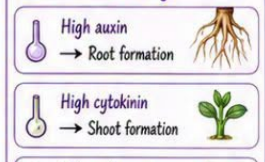


## 4 Growth Medium




The medium supplies nutrients and growth signals.

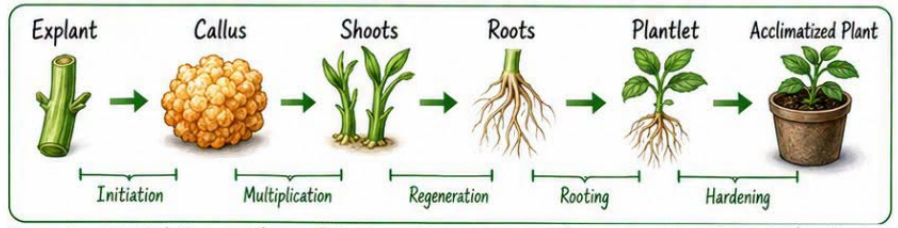
## 5 Auxin & Cytokinin




*Plant hormones guide tissue development.*

## 6 Uses




## Common Risk

Bacterial or fungal contamination can destroy the culture.



SCOOLAM FOUNDATION

If you found this **infographic useful**, please like, share, and follow **Scoolam Foundation** for more educational content.