

KBT3 mb 2025

KULTURA STANICA U SUSPENZIJI

Nickell, 1965 – prva
kontinuirana suspenzija,
Phaseolus vulgaris



Kalus i suspenzija ukrasne koprive *Coleus blumei*

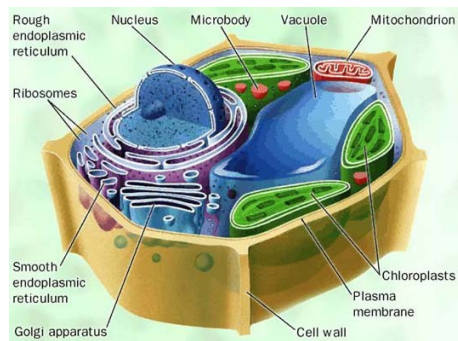
Stanična suspenzija – kultura homogenih pojedinačnih stanica i manjih staničnih nakupina koje rastu u tekućoj podlozi

- ❑ U tekućoj hranjivoj podlozi izmjena hranjivih tvari je bolja nego na krutoj pa stanice i tkivo bolje i brže raste.
- ❑ Zbog brzog rasta stanične suspenzije su pogodne kada je potrebna veća količina biljne mase –biotehnologija.
- ❑ Postavlja se kad je potrebno uspostaviti staničnu liniju
- ❑ Stanice u suspenziji se mogu sinkronizirati pa je stanična suspenzija pogodna za proučavanje regulacije staničnog ciklusa
- ❑ Stanična suspenzija je pogodna za proučavanje i manipulaciju, te proizvodnju sekundarnih metabolita u komercijalne svrhe.



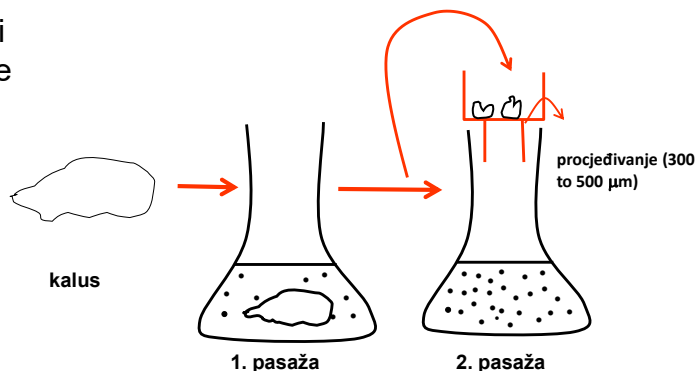
Karakteristike biljnih stanica

- Velike su (10-100 μM)
- Stvaraju agregate
- Osjetljive na mehanička oštećenja
- Sporo rastuće (st. ciklus prosječno 24 h)
- Lako se kontaminiraju
- Ne toleriraju anaerobne uvjete
- Mogu rasti do visoke stanične gustoće (>300g/l svježje tvari).
- Mogu stvarati vrlo viskozne otopine



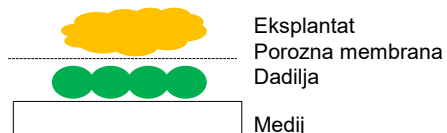
Postupak inicijacije stanične suspenzije iz kalusa

- ❑ Eksplantat za postavljanje stanične suspenzije su najčešće rastresitna kalusna tkiva (2-3 g) prenesena u tekuću podlogu (20-100 mL).
- ❑ Pojedinačne stanice i manje nakupine odvajaju se trešnjom, a stanične diobe osiguravaju prozračivanjem.
- ❑ Nakon prve pasaže (a po potrebi i u nekoliko pasaža), veće nakupine tkiva uklanjaju se filtriranjem, a Stanična suspenzija subkultivira u svježu podlogu.



Stanična suspenzija se može postaviti iz pojedinačnih stanica

- Na krutu hranjivu podlogu nasade se pojedinačne stanice -obično se koristi uzgoj na dadilji ili u krutom mediju

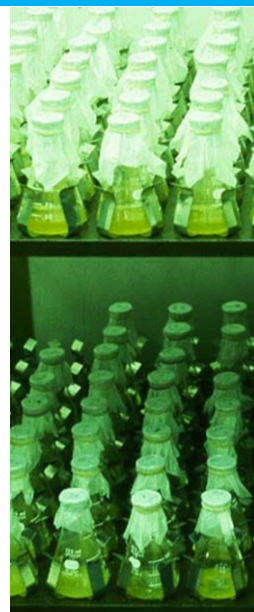


- Nakon dioba razvijaju se protokalusi (stanični klonovi)
- Rast pojedinog klona prati se invertnim mikroskopom

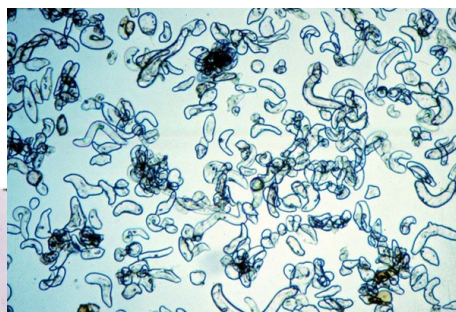
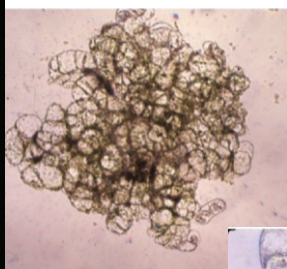


Stanične suspenzije

- ❑ Često se dodaje 2,4-D koji sprečava diferencijaciju stanica te omekšava staničnu stjenku i olakšava odvajanje stanica, no on uzrokuje dediferencijaciju te može uzrokovati prestanak sinteze sekundarnih metabolita
- ❑ IAA i NAA pogoduju odvajanju stanica od st. nakupina i pogodniji su ukoliko postavljamo proizvodnu suspenziju.
- ❑ Malo citokina pogoduje indukciji staničnih dioba i podržava proizvodnju sekundarnih metabolita.
- ❑ Osobito važna kontrola pH.
- ❑ Za dobivanje fine suspenzije može pomoći enzimatska digestija s pektinazom.
- ❑ Stanice u suspenziji se mogu sinkronizirati
 - ❑ Više uzastopnih šok tretmana na 4°C
 - ❑ Izgladnjivanje – uskraćivanje nitrata i/ili fosfata u mediju
 - ❑ Nakon dodatka kompletnih hranjiva ili uspostave povoljnih uvjeta sve stanice istovremeno kreću u stanični ciklus
- ❑ Nužno miješanje.

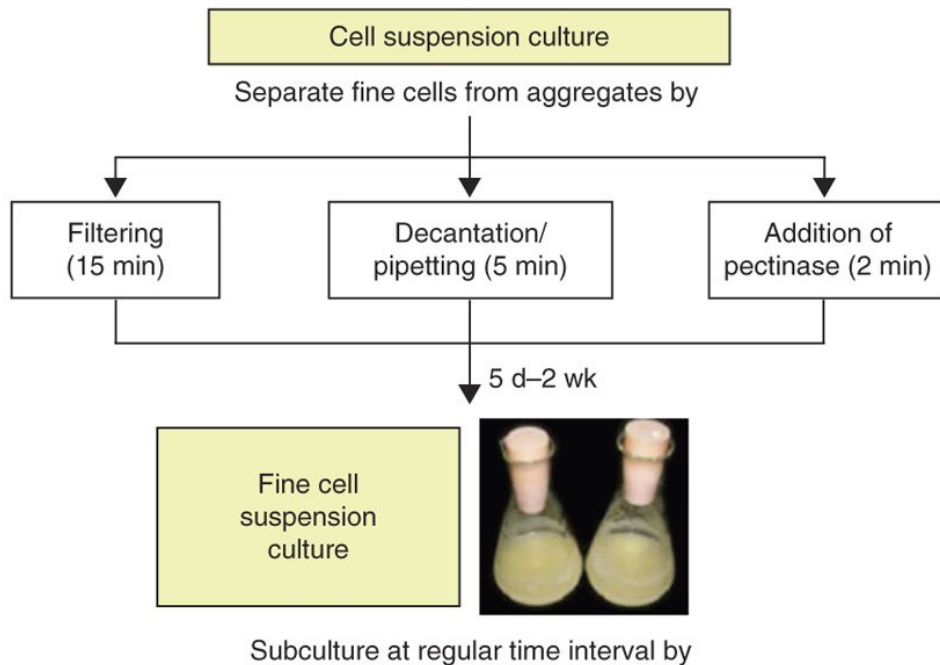
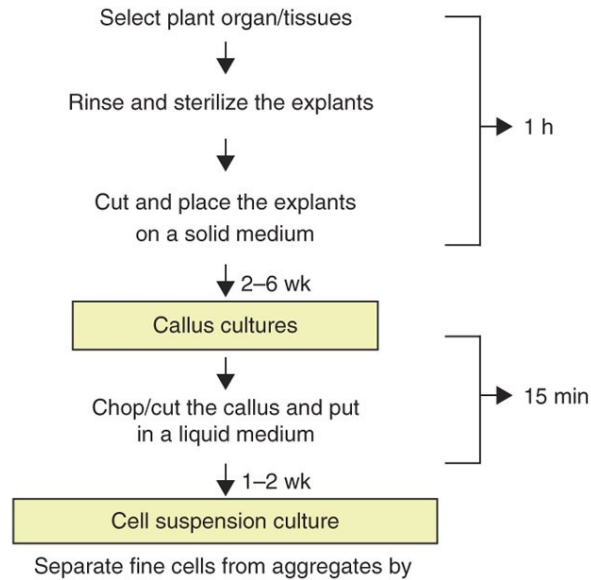


Suspenzija stanica

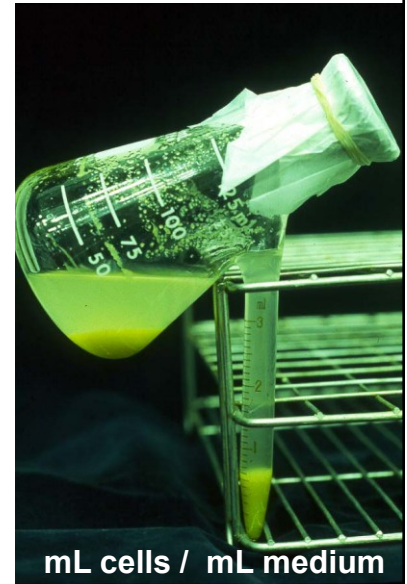
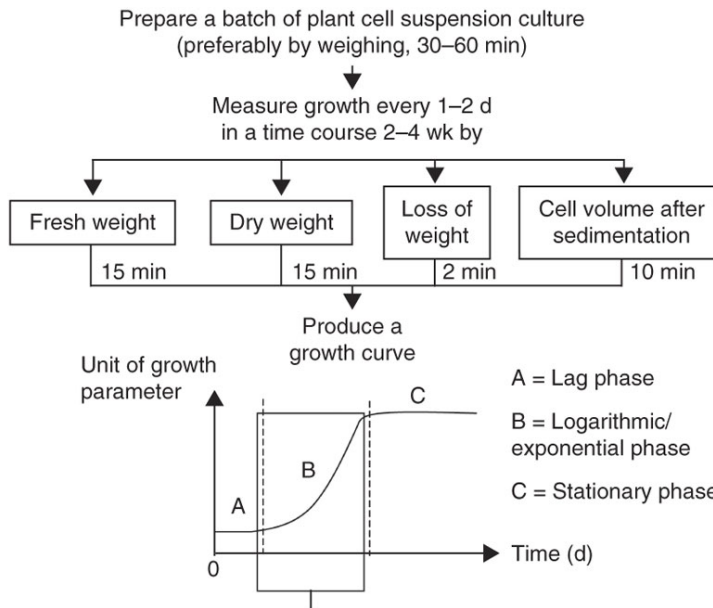


- ❑ Idealna stanične suspenzije – morfološka i biokemijska homogenost stanica (NE POSTOJI !)
- ❑ STANICE U SUSPENZIJI SE MOGU SINHRONIZIRATI – većina stanica je istovremeno u istoj fazi staničnog ciklusa: ODLIČAN MODEL ZA PROUČAVANJE STANIČNOG CIKLUSA

Postavljanje stanične suspenzije - protokol



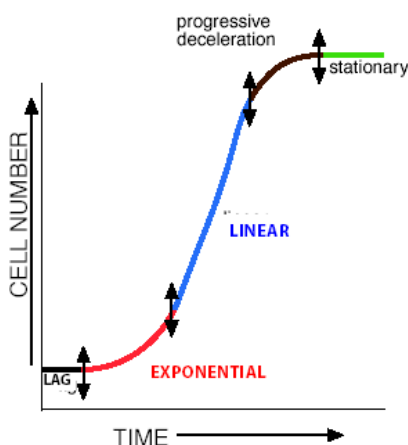
Određivanje krivulje rasta



Krivulja rasta stanične suspenzije

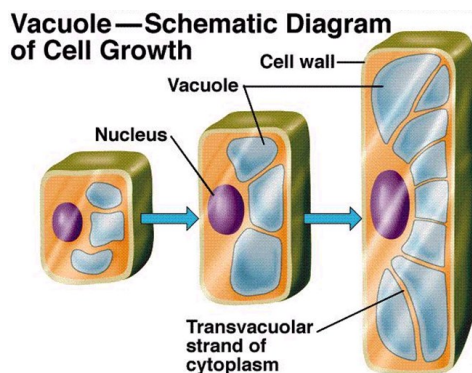
❑ Za svaki tip stanične suspenzije postoji **MINIMALNI POČETNI INOKULUM**

– početna gustoća stanica mora biti veća od kritične (najmanja koja će omogućiti rast kulture)



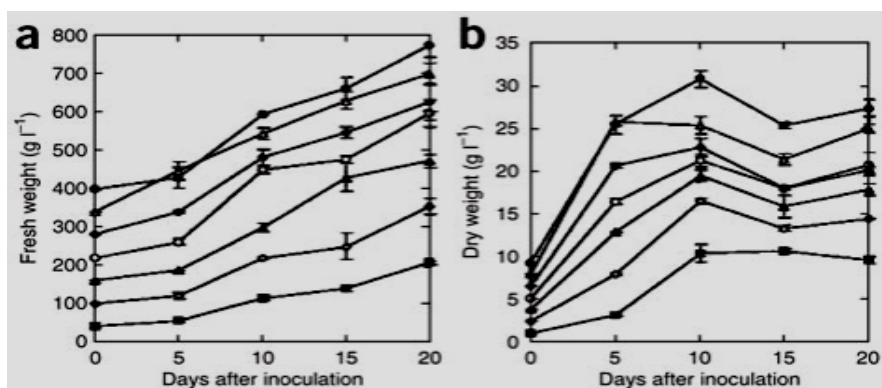
- ❑ Duljina LAG faze ovisi o broju stanica u početnom inokulumu.
- ❑ Eksponecialna faza – faza brzih dioba stanica.
- ❑ Linearna/usporevajuća faza- dolazi do smanjenja nutrijenata u mediju.
- ❑ Faza usporenih dioba – zbog istrošenosti hranjive podloge diobe se postupno zaustavljaju, no stanice rastu (produžni rast stanica)
- ❑ Stacionarna faza - medij je istrošen, diobe prestaju i rast stanica je smanjen. Može doći do raspadanja stanica i do ulaska u apoptozu.

Osim zbog diobe, biljne stanice značajno povećavaju volumen i time doprinose povećanju svježe mase



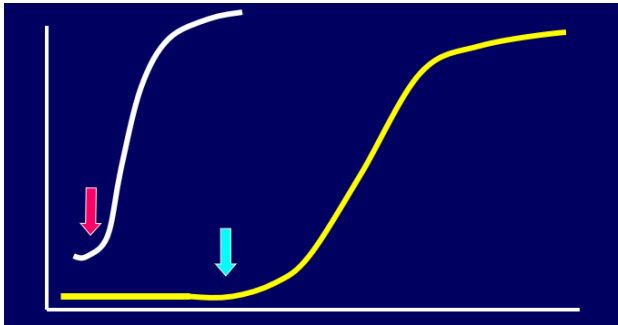
Nakon prestanka dioba masa stanica može višestruko rasti zbog ekstenzije stijenke i povećanja vakuole zbog nakupljanja vode (i metabolita)

Krivulja rasta stanične suspenzije



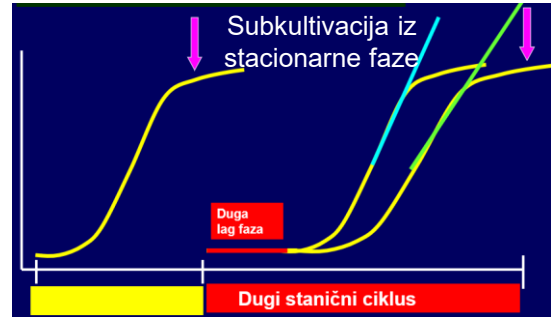
- Početni inokulum značajno utječe na prinos mase
- Nakon što prestanu stanične diobe, svježa masa se povećava zahvaljujući produžnom rastu stanica

Učinak staničnog inokuluma na stanični rast

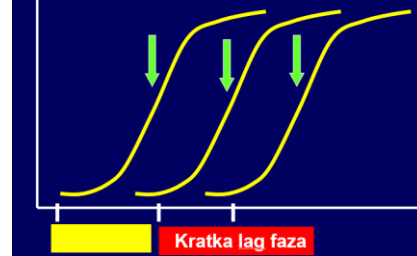


Veći početni inokulum, kraća lag faza, brži stanični ciklus

Učinak faze staničnog ciklusa u kojoj se stanice presađuju



Subkultivacija iz log faze



Kraća lag faza, brži stanični ciklusi

Upotreba staničnih suspenzija

Stanična suspenzija

Embriogeneza

Mutagenеза

Protoplasti

Sekundarni metabolizam

Umjetno sjeme

Mutante

Modifikacija stanica

Sekundarni metaboliti

Transfer gena

Fuzija stanica

Tipovi staničnih suspenzija

I. Šaržne (nekontinuirane)

- Određeni broj stanica se inokulira u određeni volumen podloge

Nakon nekog vremena prestaje rast stanica u određenom volumenu podloge (iscrpljivanje podloge-najčešće manjak dušika ili fosfata) – prijenos stanica u svježu podlogu

Završni broj stanica ovisi o limitirajućoj hranjivoj komponenti podloge

- Najčešće u tikvicama ili bioreaktorima zatvorenog tipa
 - Erlenmeyerove tikvice: volumen suspenzije zbog aeracije ne smije premašiti **20%** kapaciteta tikvice

Ciklus rasta - 3 do 6 st. dioba svake stanice početnog inokuluma, 12-25 dana

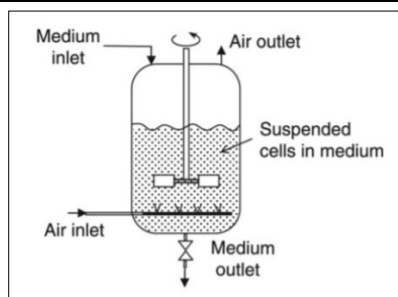


II. Kontinuirane kulture

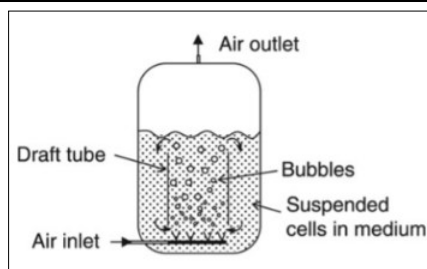
Bioreaktori

- ☐ Zatvoreni tip: kontinuirano ili povremeno odvođenje dijela istrošene podloge i dovođenje svježe.
- ☐ Kulture imaju produženu eksponencijalnu fazu, fazu linearnog rasta i stacionarnu fazu. Korisne za proizvodnju sekundarnih metabolita
- ☐ Otvoreni tip: uz podlogu odvodi se i određena količina stanice te se stanična gustoća održava konstantnom i optimalnom.
- ☐ Mogu trajati godinama.

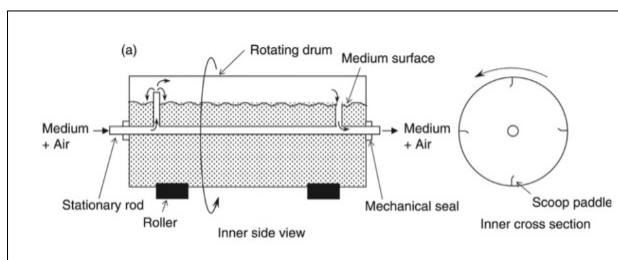




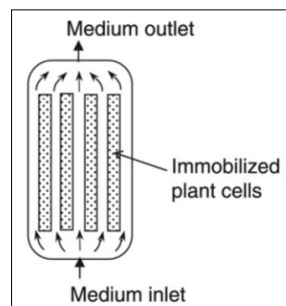
Stirred Tank Reactor



Air-lift Bioreactor

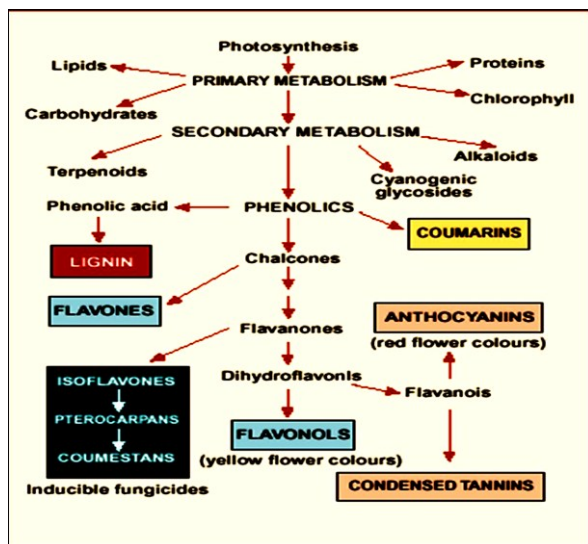


Rotary Bioreactor



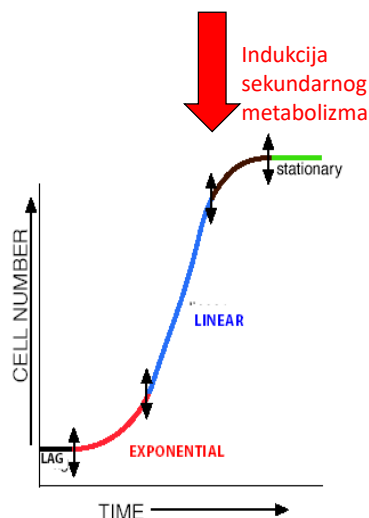
Membrane Bioreactor

Sinteza sekundarnih metabolita u biljnoj staničnoj suspenziji



- Ljekovito djelovanje biljke imaju zahvaljujući sintezi sekundarnih metabolita koji se proizvode u biljkama za sekundarne funkcije, uključujući zaštitu od napada patogena i privlačenje oprašivača.
- Ovi kemijski spojevi nastaju samo u biljkama i stoga prekomjerno iskorištavanje ljekovitog bilja u razne svrhe uzrokuje izumiranje nekih ljekovitih biljnih vrsta.
- Kultura tkiva bila je učinkovita alternativa za sintezu i modulaciju sinteze sekundarnih metabolita s ciljem povećanja proizvodnje u komercijalne svrhe.

Proizvodnja sekundarnih metabolita u kulturi biljnih stanica



- Primarni cilj: učinkoviti i brzi rast stanica (veliki prinos biomase) i učinkovita sinteza sekundarnog metabolita
- Sekundarni metaboliti biljkama većino služe kao zaštita od nepovoljnih uvjeta okoliša ili od predatora

Prilikom obrane od stresa biljka usporava/zaustavlja stanične diobe i rast i reprogramira se za proizvodnju sekundarnih metabolita

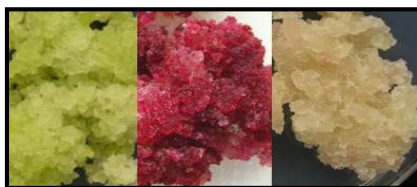
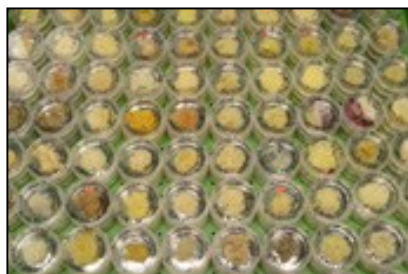
Većina sekundarnih metabolita nepovoljno djeluje na rast i stanične diobe pa se sinteza u staničnoj suspenziji potiče u stacionarnoj fazi rasta

Elicitacija: proces izazivanja učinaka poput napada patogena u biljkama kako bi se potaknula ekspresija i funkcioniranje gena koji su odgovorni za sintezu sekundarnih metabolita. U tu svrhu koriste se i biotički i abiotički elicitori (jasmonska kiselina, polimeri glukana, glikoproteini, stanične ekstrakte gljivica, UV zračenje, soli teških metala...).

Dodatak prekursora za biosintezu sekundarnih metabolita: **precursor feeding**

Sinteza sekundarnih metabolita u biljnoj staničnoj suspenziji

- # Odabir stanične linije
- # Odabir najpovoljnije podloge za rast stanica
- # Odabir najpovoljnijeg induktora sekundarnog metabolizma

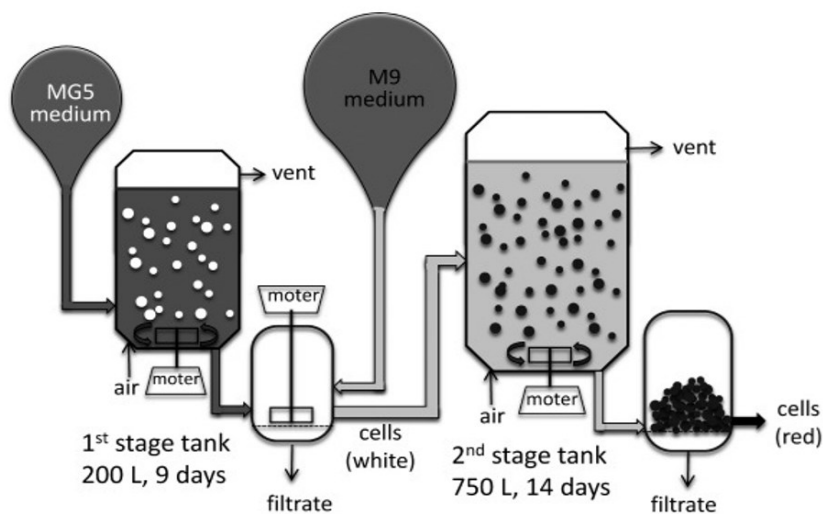


Kalus šećerne repe



Proizvodnja šikonina u staničnoj suspenziji *Lithospermum erythrorhizon*

Sinteza šikonina



1. high cell growth

2. production tank

Metaboliti koji se proizvode u biljnoj staničnoj kulturi

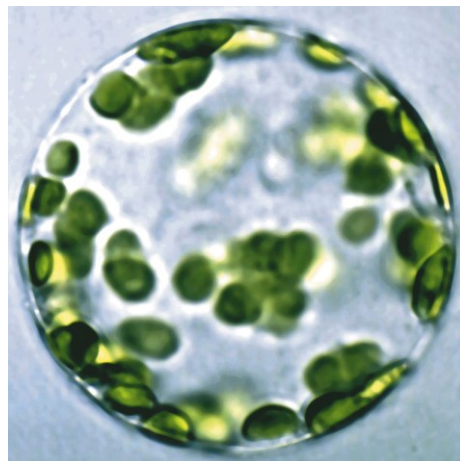
Metabolite	Usage	Plant species
Ajmalicine	Antihypertensive	<i>Cath. roseus</i>
Artemisinin	Antimalarial	<i>Artemisia annua</i>
Ajmaline	-	<i>Ra. serpentina</i>
Acinitine	-	<i>Acotinum spp.</i>
Berberine	Intestinal ailment	<i>C. japonica</i>
Camptothecin	Antitumour	<i>Camptotheca acuminata</i>
Capsaicin	Counterirritant	<i>Ca. frutescens</i>
Castanospermine	Glycoside inhibitor	<i>Castanospermum australe</i>
Codeine	Sedative	<i>P. somniferum</i>
Colchicine	Antitumour	<i>Colchium autumnale</i>
Digoxin	Heart stimulant	<i>Di. lanata</i>
Diosgenin	Steroidal precursor	<i>Dioscorea deltoidea</i>
Ellipticine	Antitumour	<i>Orchrosia elliptica</i>
Emetine	-	<i>Cephaelis ipecacuanha</i>
Forskolin	Bronchial asthma	<i>Coleus forskolii</i>
Ginsenosides	Health tonic	<i>Panax ginseng</i>
Morphine	Sedative	<i>P. somniferum</i>
Podophyllotoxin	Antitumour	<i>Podophyllum petalum</i>
Quinine	Antimalarial	<i>Cinchon. ledgeriana</i>
Sanguinarine	Antiplateque	<i>Sanguinaria canadensis</i>
Shikonin	Antibacterial	<i>P. somniferum</i>
Taxol	Anticancer	<i>L. erythrorhizon</i>
Vincristine	Antileukemic	<i>Taxus spp.</i>
Vinblastine	Antileukemic	<i>Cath. roseus</i>

KULTURA PROTOPLASTA

PROTOPLASTI – stanice bakterija, gljiva i biljaka sa kompletno uklonjenom staničnom stjenkom

SFEROPLASTI – stanice sa djelomično uklonjenom staničnom stjenkom

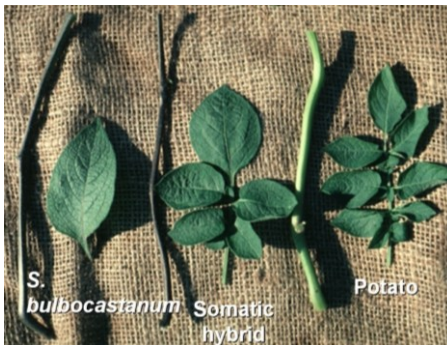
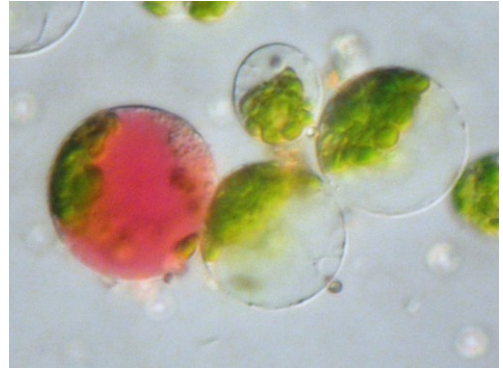
Biljni protoplasti su izrazito osmotski osjetljivi!



PROTOPLASTI

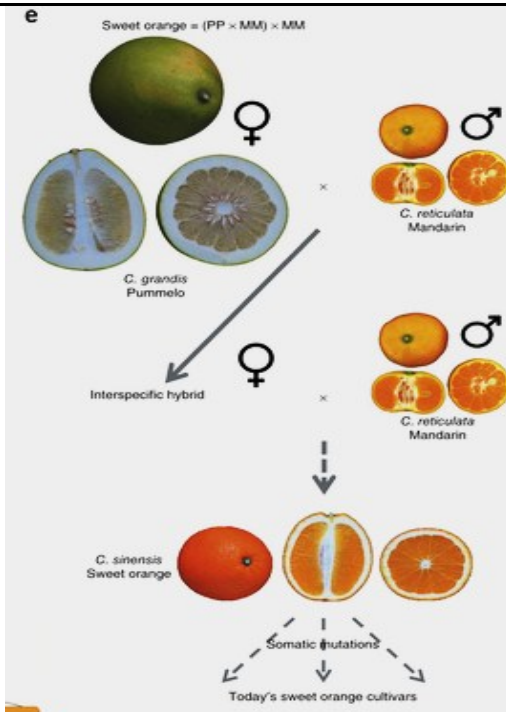
- ❑ Koriste se za proučavanje biologije membrane, osobito za proučavanje unosa makromolekula i virusa
- ❑ Upotreba u genetičkim transformacijama
- ❑ Primjena u oplemenjivanju
 - transformacija protoplasta
 - fuzija protoplasta
 - važni za prijenos rezistencije sa divljih na kultivirane vrste
Solanum tuberosum
 + *Solanum brevidens*

Somatski hibrid je kao i divlji *S. brevidens* otporan na virus koji uzrokuje frkanje listova i znatno smanjuje prinose.



FUZIJA PROTOPLASTA
 Somatski hibridi imaju svojstva obje vrste iz kojih su nastali

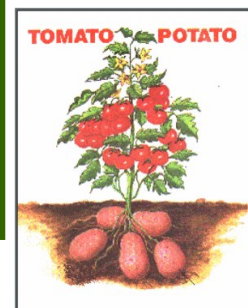
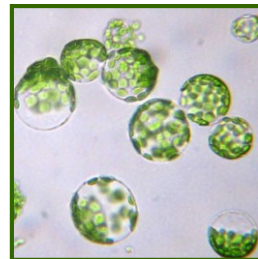




- Različiti citrusi koje konzumiramo i uzgajamo su somatski hibridi.

Zbog muške sterilnosti, često prisutne kod citrusa, križanje sorti i vrsta tog roda se provodi fuzijom protoplasta.

- Somatski hibridi
 - Spajanje protoplasta taksonomski bliskih ili različitih jedinki
- Za prenošenje poligenskih svojstava (tolerancija na hladnoću, otpornost, boja cvijeta...)
 - Uspješno: duhan DELGOLD
N. tabacum × *N. rustica*
 - Slatke mini rajčice *Summer Sun*
- Neuspješno: POMATO

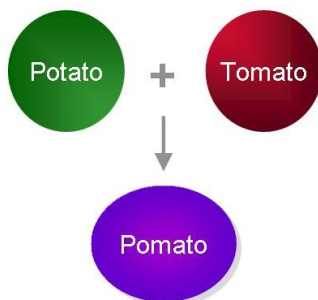


1960-tih počinje razvoj tehnika s ciljem primjene u oplemenjivanju (prve uspješne regeneracije biljaka iz protoplasta 1971., 1972.)

POMATO

1978. g. Fuzionirani protoplasti mezofila lista rajčice i stanične suspenzija krumpira - nepoželjne karakteristike hibrida

1986. g. uspješna regeneracija željenog hibrida, ali prinos neznatan



2013. g. **Nacjepljivanjem** rajčice na krumpir dobivena biljka TomTato – komercijalna proizvodnja rajčica i krumpira na jednoj jedinki
NIJE REZULTAT FUZIJE PROTOPLASTA!

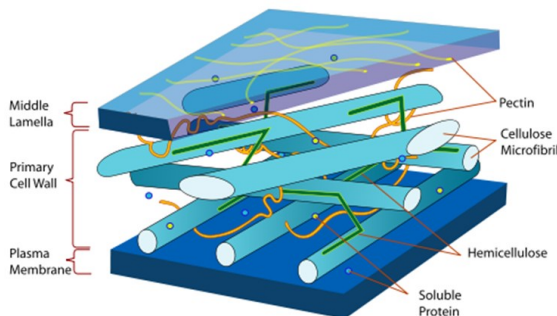


- ❑ Protoplasti se koriste za transformaciju i/ili za fuziju.
 - Metoda za međuvrsni transfer organela
- ❑ Moguća je regeneracija kompletne biljke: iz protoplasta nastaju mutante (transformacijom) i/ili somatski hibridi (fuzijom)

Stadiji kulture protoplasta:

- ❑ izolacija protoplasta
- ❑ kultivacija (fuzija i/ili transformacija)
- ❑ regeneracija nove stanične stjenke
- ❑ stanične diobe – nastaju protoklonovi (protokalusi)
- ❑ regeneracija biljaka (iz protokalusa/kalusa!) TEŠKO!
- ❑ karakterizacija transformanata i/ili hibrida

Stanična stjenka biljaka

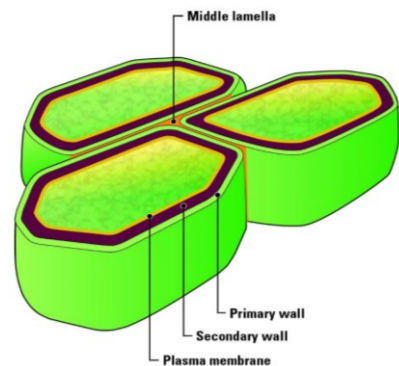


Središnja lamela

“Ljepilo” – pektinski sloj bogat Ca^{2+} i Mg^{2+}

Sekundarna stjenka

Fiksni sloj koji se (ponekad) ulaže između primarne stjenke i st. membrane
 Celuloza, hemiceluloza (ksilan), pektin, lignin



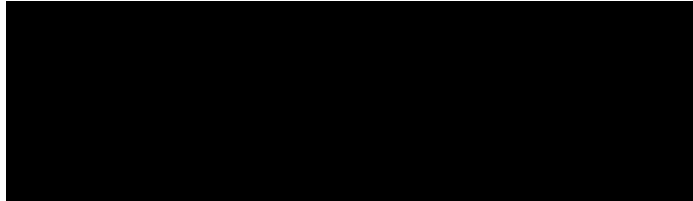
Primarna stjenka

Fleksibilni sloj
 Celuloza, hemiceluloza (većinom ksiloglukan),
 pektin, proteini ekspanzini,
 enzimi (hidrolaze, esteraze, peroksidaze)
 Na površini biljke kutikula (kutin i voskovi)

IZOLACIJA PROTOPLASTA

IZBOR TKIVA ZA KULTURU:

listovi, kalus, kultura stanica u suspenziji, embriji itd.



IZOLACIJA PROTOPLASTA:

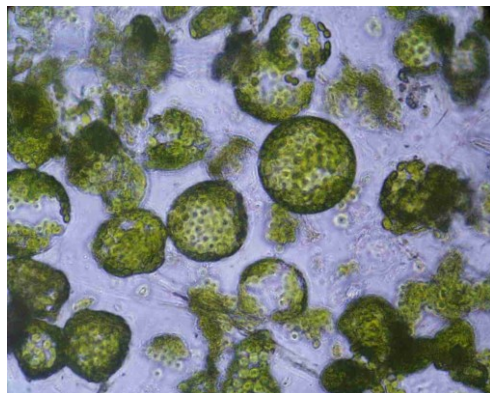
Plazmolitici: glukoza, manitol, sorbitol, saharoza, $\text{CaCl}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, MES, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$

Enzimi za izolaciju: celulaza (1-10%), hemicelulaza (0,1-1%), pektinaza (0,1-1%)

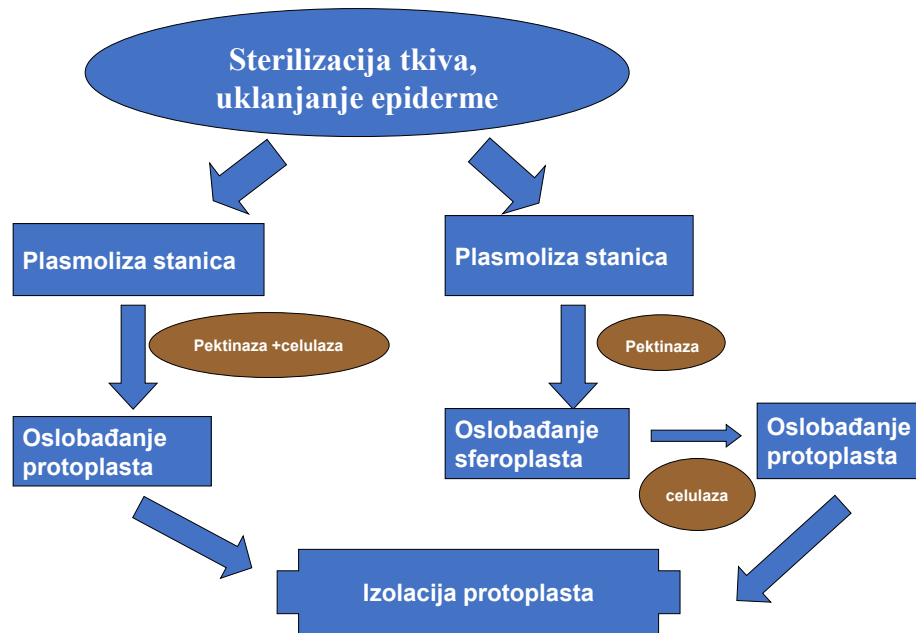
Vrijeme inkubacije: 4-16 sati (ovisno o temperaturi)

INKUBACIJSKE METODE:

- Jednofazni postupak
- Dvofazni postupak
 - pektinaza, pročišćavanje
 - celulaza, pročišćavanje

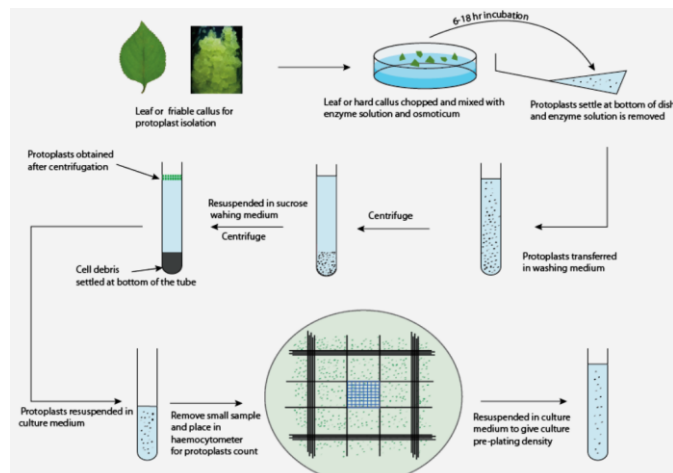


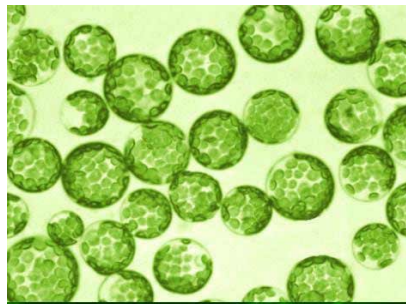
Enzimatska metoda izolacije protoplasta



Pročišćavanje protoplasta

- Filtracija kroz pore 40-100 μm : protoplasti prolaze kroz filtar, a veće nakupine zaostaju
- Centrifugiranje (100 g), protoplasti se talože, a manje stanične komponente (organeli) zaostaju u supernatantu (oprez - protoplasti lako pucaju !)
- Pročišćavanje u gradijentu saharoze ili sorbitola (0,4 – 0,6 M)

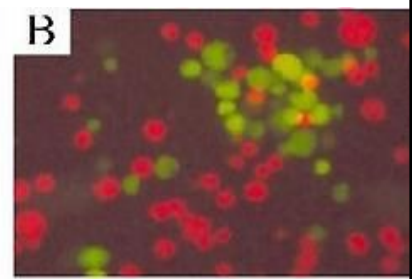
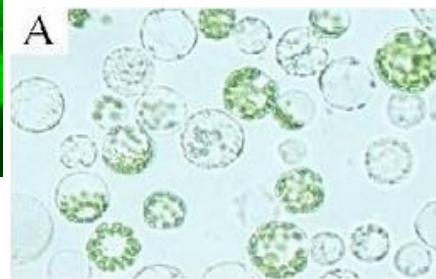
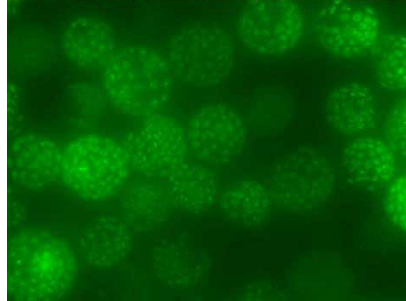




TEST VIJABILNOSTI STANICA

- ❑ Fluorescein diacetat, FDA
živi protoplasti/stanice = **zelena fluorescencija**
- ❑ Propidij jodid (ulazi u mrtve stanice) pa jezgre mrtvih protoplasta fluoresciraju **crveno**

OPREZ! Protoplasti i stanice koje sadrže klorofil autofluoresciraju crveno



FUZIJA PROTOPLASTA

1. Spontana fuzija

Muđuvrsna

Unutarvrsna

2. Inducirana fuzija

Kemofuzija

PEG
NaNO₃
Ca²⁺ ions

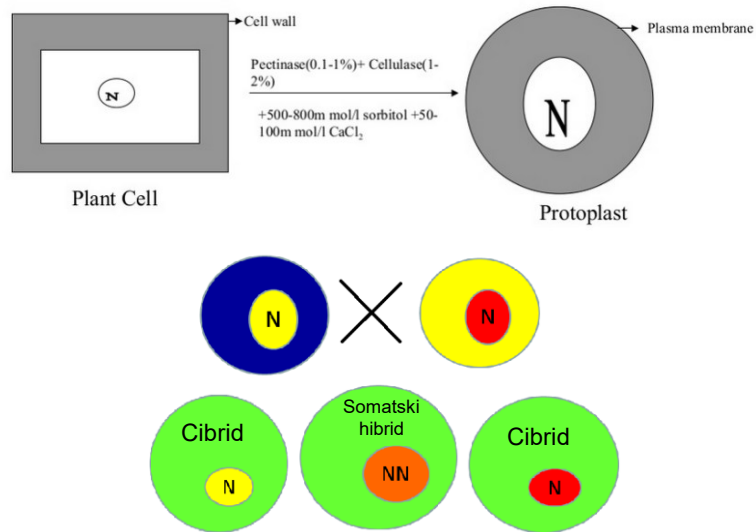
Mehanička
Fuzija

Mikromanipulacija

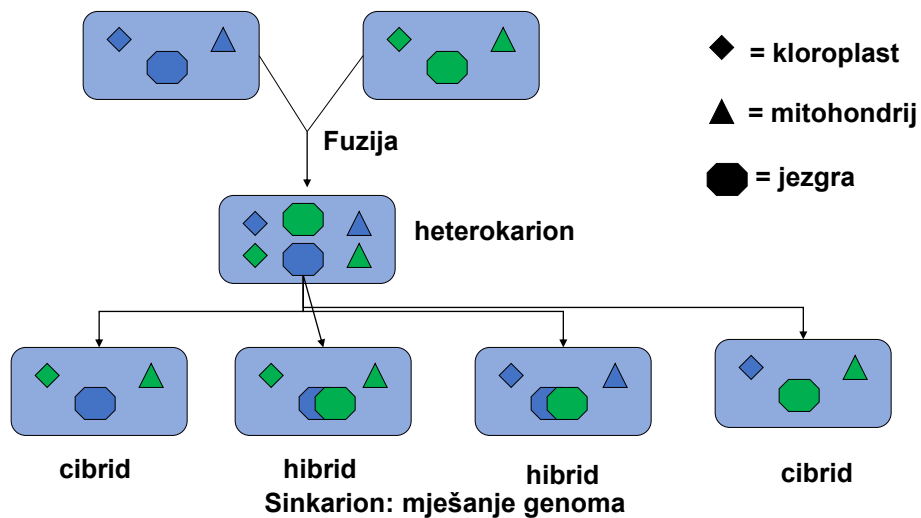
Elektrofuzija

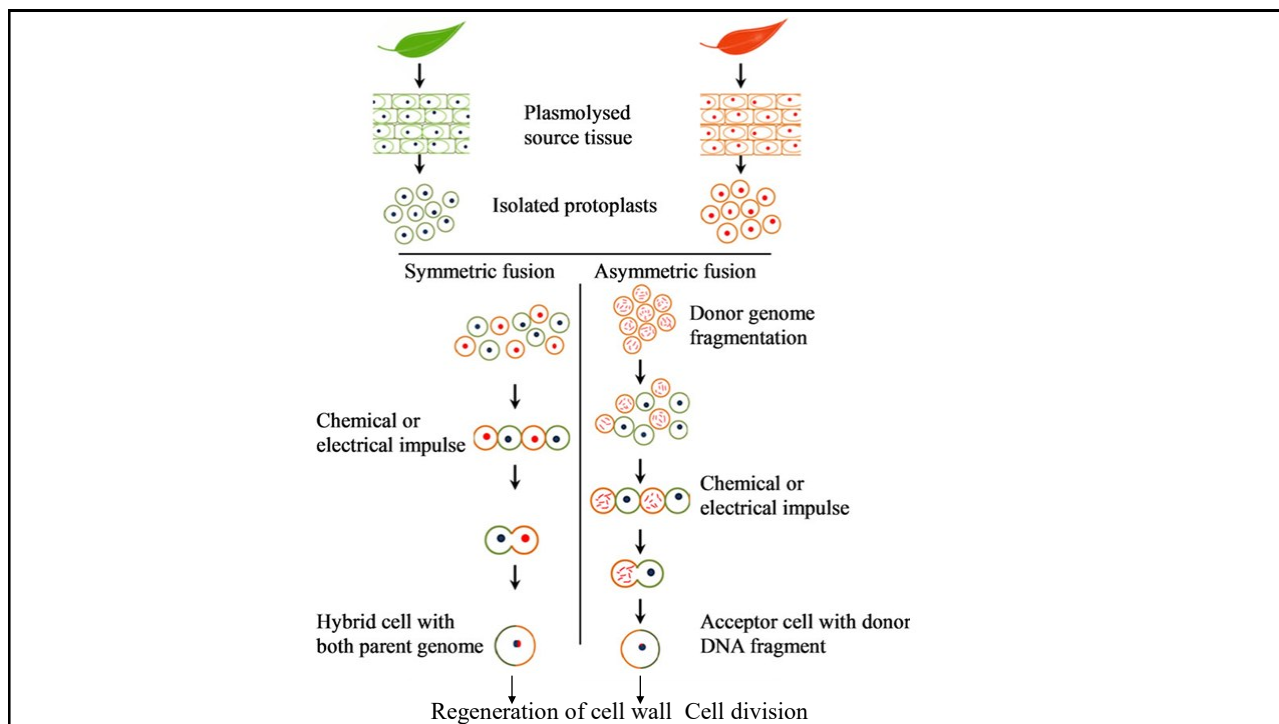
10-100 kV m⁻¹

Prijenos genetičkog materijala : fuzija biljnih protoplasta

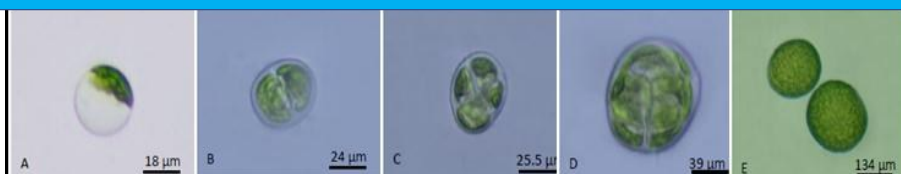


Mogući ishodi fuzije dva genetički različita protoplasta





Postavljanje kulture protoplasta



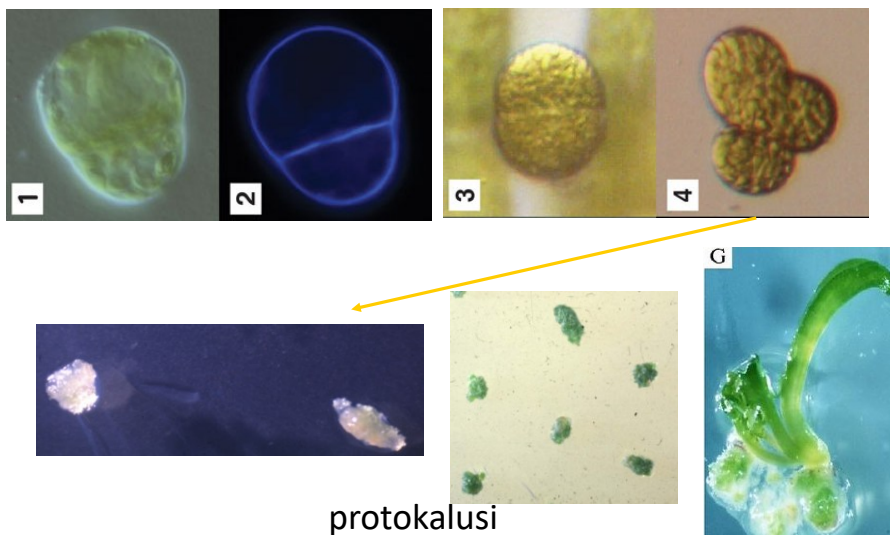
- minimalni početni inokulum
- mogućnost selekcije hibrida

dodatni tipovi kultivacije: (smanjenje broja (gustoće) protoplasta zbog lakše selekcije)

- uzgoj u kapi podloge, viseća kap, "uzgoj na dadilji" ...

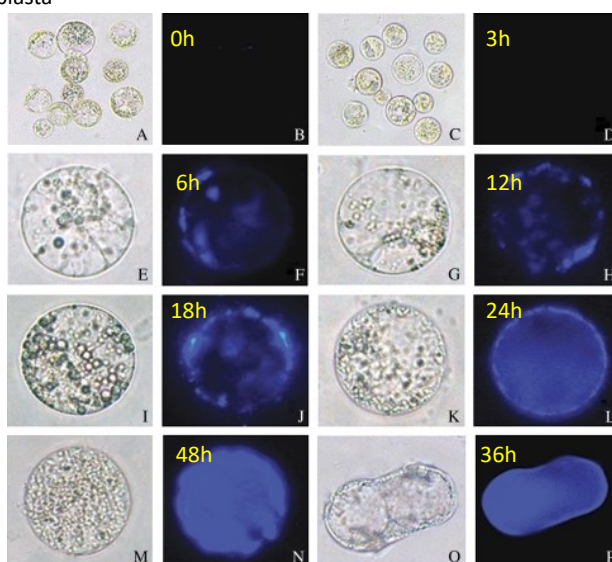
Modificiran sastav hranjivih podloga

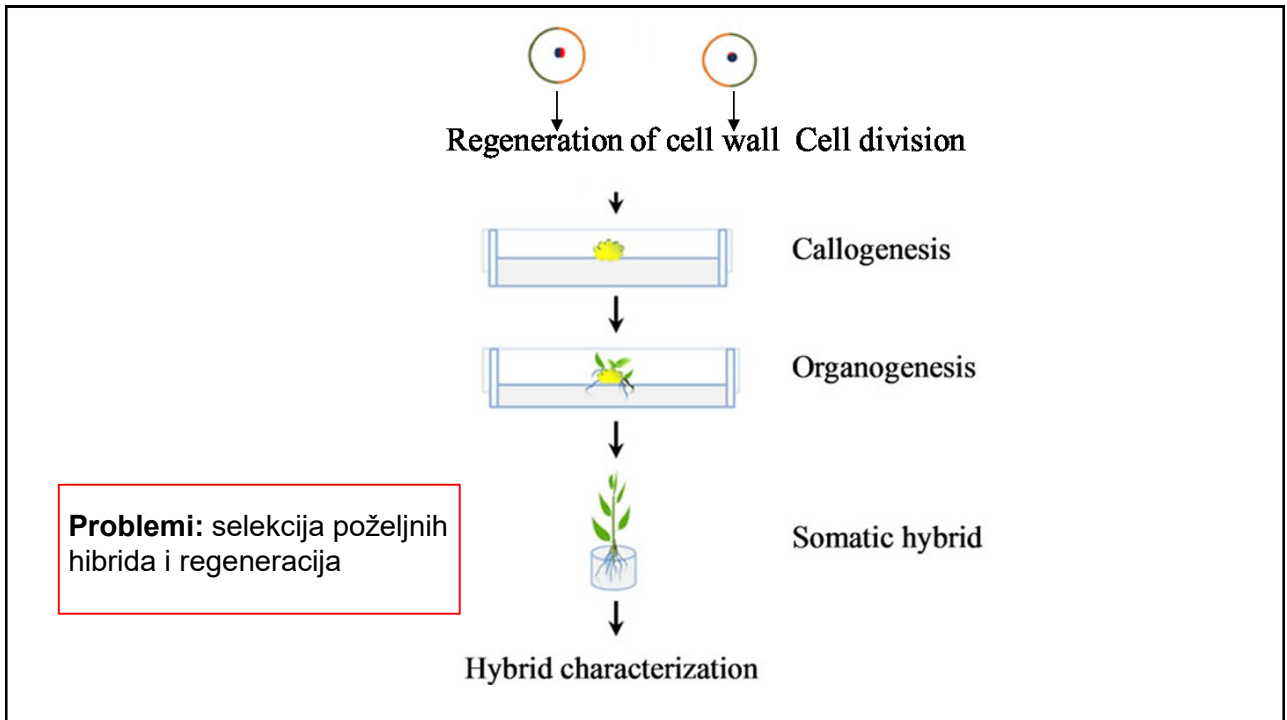
Regeneracija stanične stijenke – preduvjet za daljnje diobe



- kalkoflor bijeli: čvrsto se veže i boji st.st. (novostvorena **stjenka** prstenasto fluorescira)

Kultura protoplasta

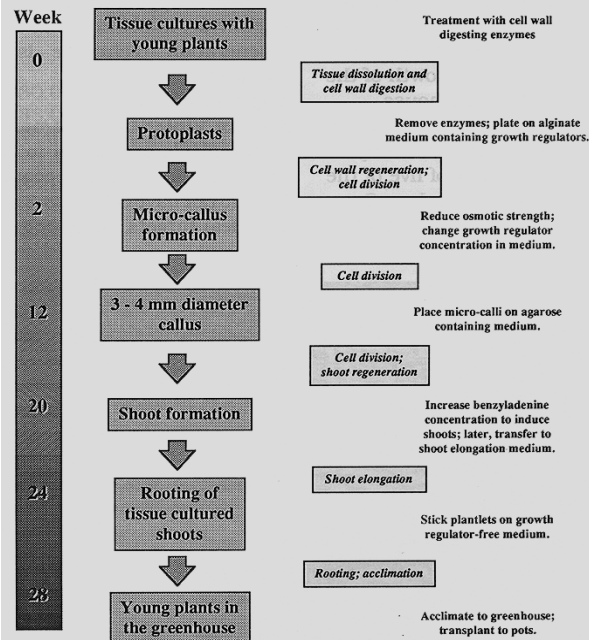




Identifikacija poželjnih fuzijskih varijanti

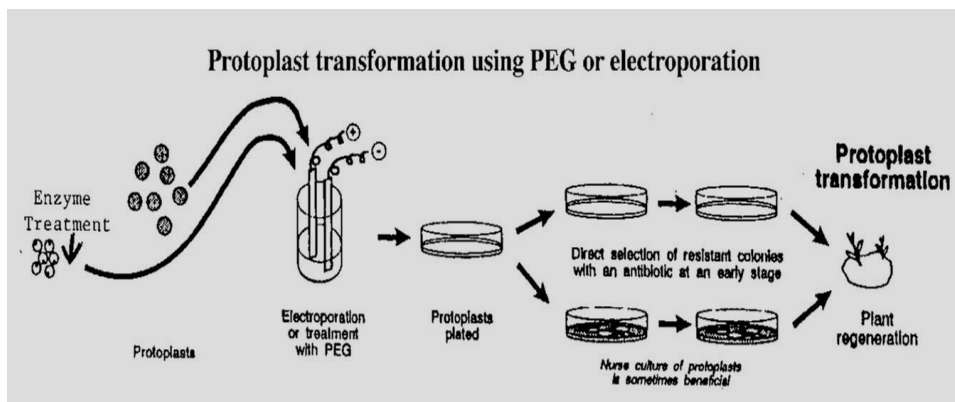
- Komplementacijska selekcija
 - Moguća ako donori imaju različite selekcijske markere (otpornost na antibiotik ili herbicid). Protoplast nastao fuzijom mora imati oba svojstva.
- Fluorescencijsko obilježavanje stanica
 - Svaki donor se obilježava posebnom bojom, fuzijski produkt mora sadržavati obje boje
- Mehanička izolacija i mikromanipulacija
 - Sporo ali učinkovito, naročito za različite stanične tipove
- Masovna regeneracija biljaka iz fuzijskih produkata
 - Regeneracija bez selekcije, a potom pregled i determinacija poželjnih svojstava u fuzijskim produktima.
 - Molekularno-biokemijske analize i/ili fenotipska karakterizacija.

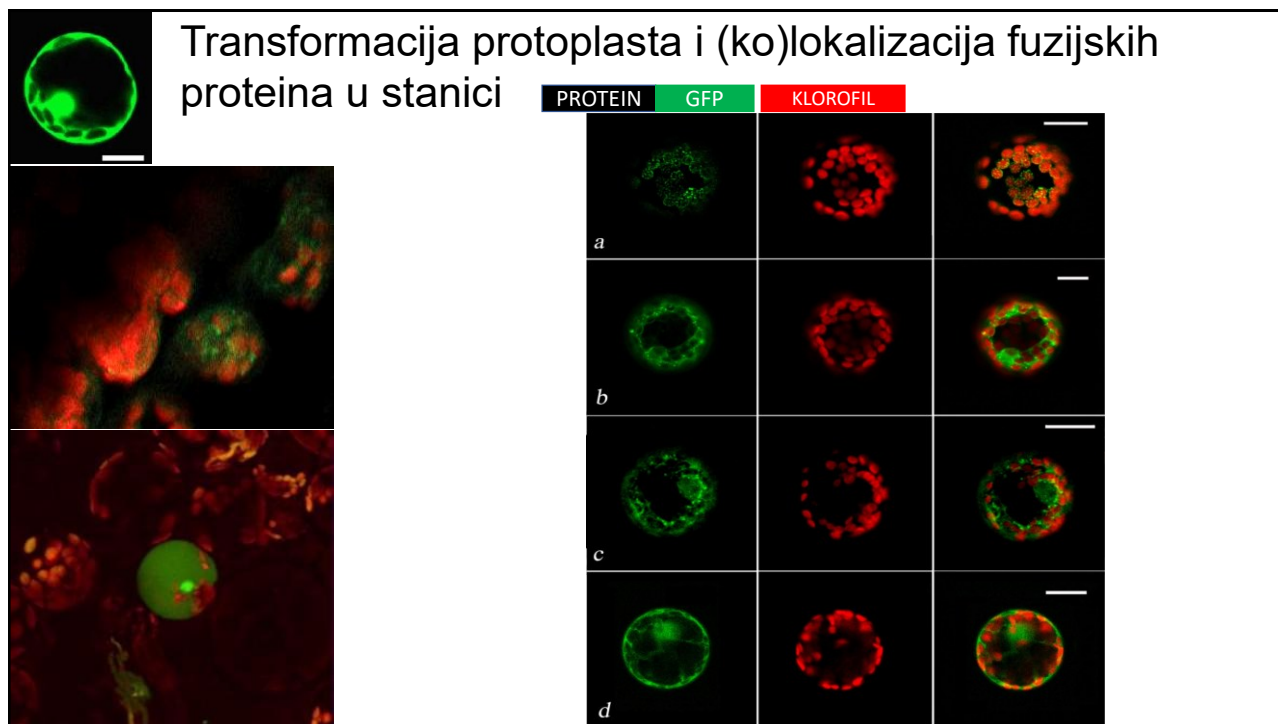
Plant Regeneration from African Violet Protoplasts



TRANSFORMACIJA PROTOPLASTA-UNOS STRANE DNA

- * elektroporacija
- * PEG

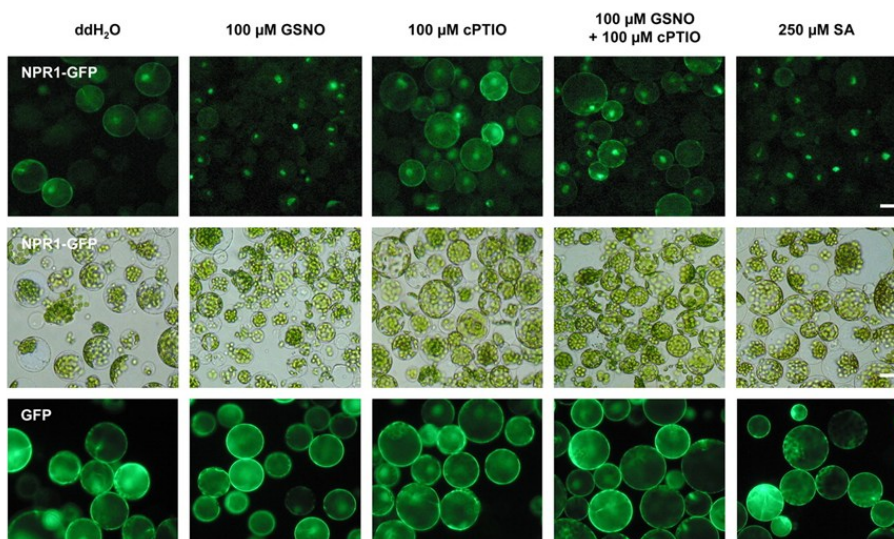




Istraživanja funkcije gena:

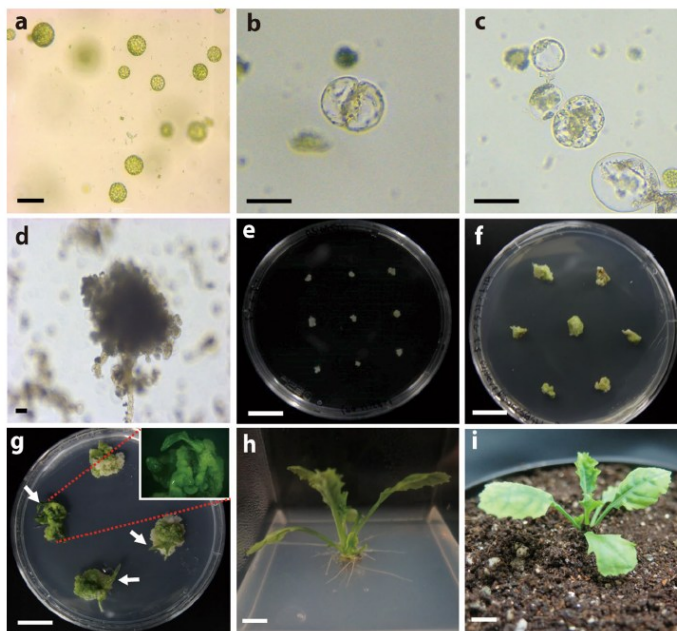
PRIVREMENA TRANSFORMACIJA PROTOPLASTA uročnjaka ili duhana

Protein NPR1 nakon dodatka induktora ulazi u jezgru:



Regeneracija modificirane brokole s **editiranim** genom *MYB58*

Fig. 3 Plant regeneration from protoplast culture of broccoli. **a** Freshly isolated protoplasts from cotyledon of broccoli. **b** First cell division from protoplasts after 4 days of culture. **c** Second cell division from protoplasts after 1 week of culture. **d** Microcolony formation from protoplasts after 6 weeks of culture. **e** Microcallus formation from protoplasts. **f** Greening of calluses in the light culture. **g** Adventitious shoot formation from green calluses in the light culture. Emergence of first leaf from protoplast-derived shoot of broccoli is shown in the inset. **h** Rooting from protoplast-derived shoot of broccoli. **i** Transgenic plant in potting soil for acclimation. Scale bars represent 50 μ m (**a–d**) and 1 cm (**e–i**), respectively. Arrows indicate newly formed adventitious shoot



Kim et al. *Plant Biotechnology Reports* (2022)