

KBT3 mb 2026

Biljna stanična suspenzija
Protoplasti

KULTURA STANICA U SUSPENZIJI

Nickell, 1965 – prva
kontinuirana suspenzija,
Phaseolus vulgaris



Kalus i suspenzija ukrasne koprive *Coleus blumei*

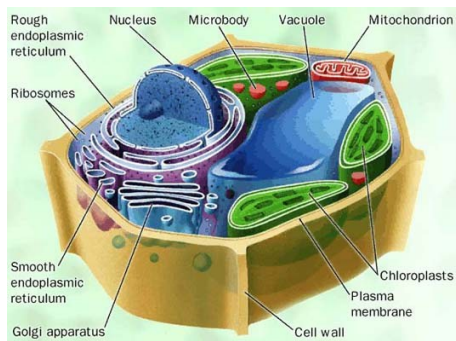
Stanična suspenzija – kultura homogenih pojedinačnih stanica i manjih staničnih nakupina koje rastu u tekućoj podlozi

- ❑ U tekućoj hranjivoj podlozi izmjena hranjivih tvari je bolja nego na krutoj pa stanice i tkivo bolje i brže rastu.
- ❑ 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.



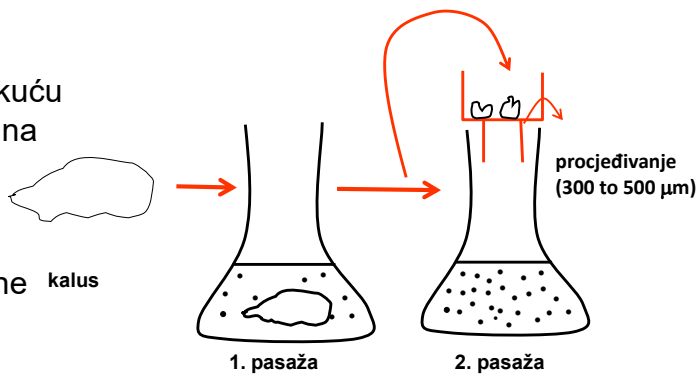
Karakteristike biljnih stanica

- Velike su (10-100 μm)
- Zbog stanične stijenke agregiraju
- 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 suspenzije



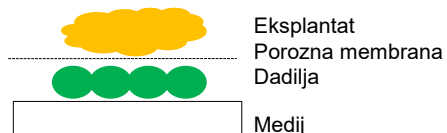
Postupak inicijacije stanične suspenzije iz kalusa

- ❑ Eksplantat za postavljanje stanične suspenzije su najčešće rastresita kalusna tkiva (2-3 g) prenesena u tekuću podlogu (20-100 mL) koja se miješa na tresilici.
- ❑ Stanične diobe osiguravaju prozračivanjem podloge (zbog miješanja), te se odvajaju pojedinačne stanice i manje nakupine.
- ❑ Nakon prve pasaža (a po potrebi i u nekoliko pasaža), veće nakupine stanica uklanjaju se filtriranjem
- ❑ Stanična suspenzija se subkultivira u svježju 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

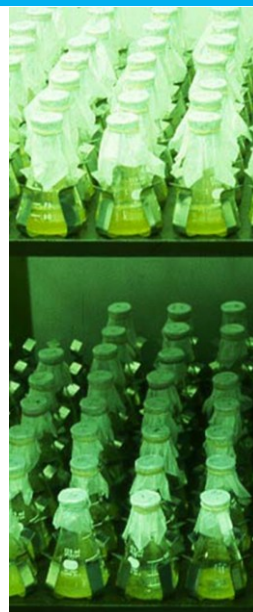


- Nakon dioba razvijaju se protokalusi (stanični klonovi)
- Rast pojedinog klona prati se invertnim mikroskopom

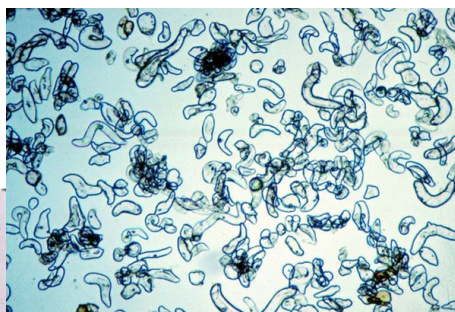
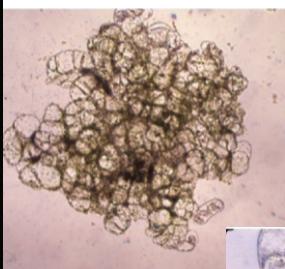


Stanične suspenzije

- ❑ 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.

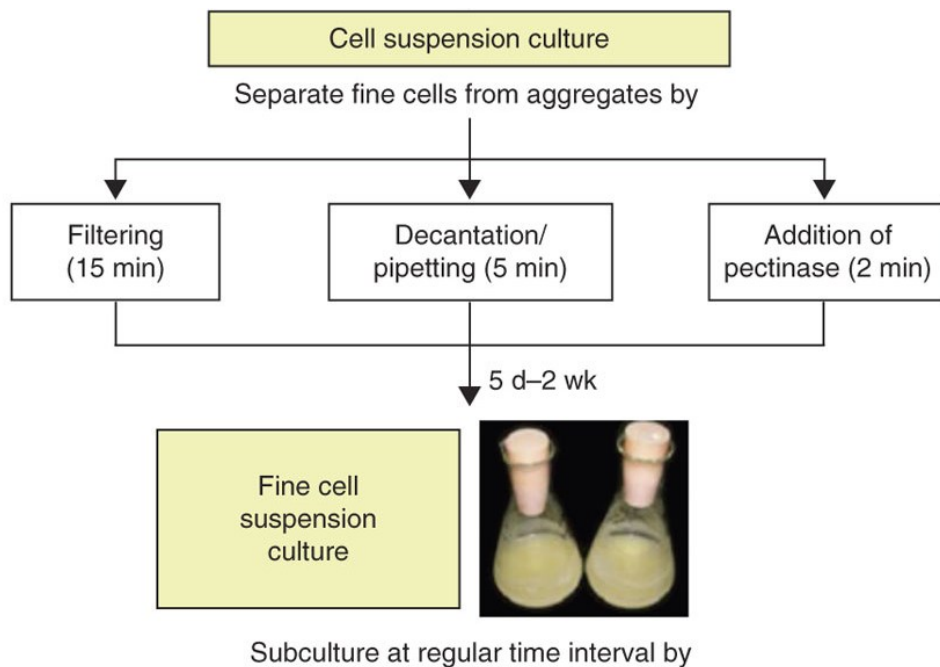
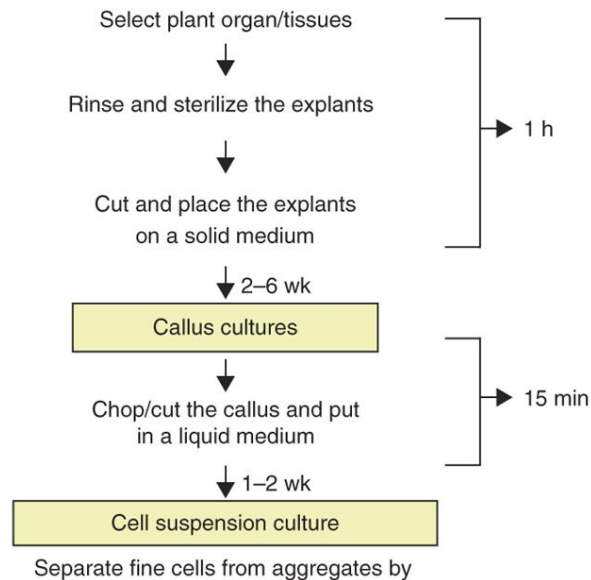


Suspenzija stanica



- ❑ 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

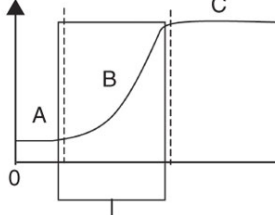
Prepare a batch of plant cell suspension culture
(preferably by weighing, 30–60 min)

Measure growth every 1–2 d
in a time course 2–4 wk by



Produce a
growth curve

Unit of growth
parameter



A = Lag phase

B = Logarithmic/
exponential phase

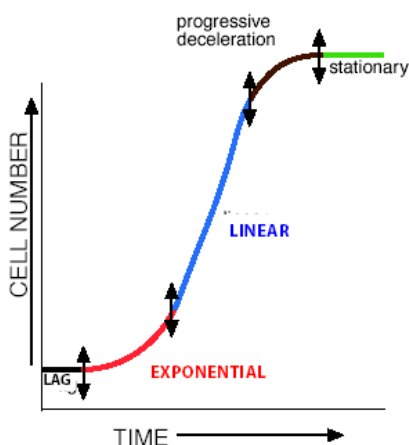
C = Stationary phase



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.

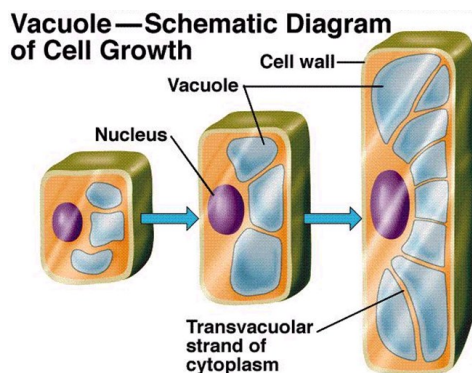
❑ Eksponencijalna faza – sve veći broj stanica se dijeli.

❑ Linearna faza- sve stanice su u diobi.

❑ Faza usporenih dioba – zbog istrošenosti hranjive podloge diobe se postupno zaustavljaju, no stanice rastu (produžni rast stanica).

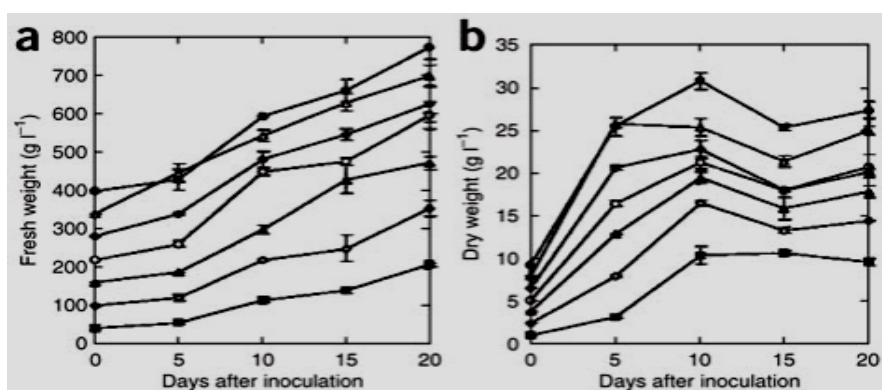
❑ Stacionarna faza - medij je istrošen, diobe prestaju i rast stanica je smanjen. Može doći do apoptoze i raspadanja stanica.

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



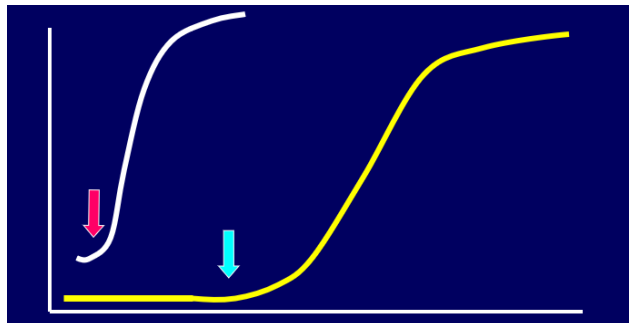
Nakon prestanka dioba masa stanica može višestruko rasti zbog ekstenzije stijenke i povećanja vakuole zbog nakupljanja vode (i metabolita)

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

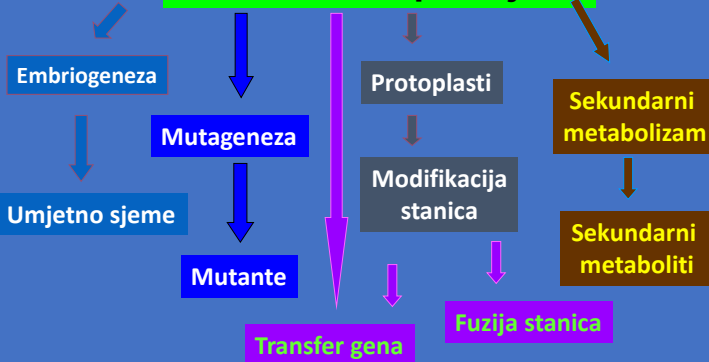
Učinak faze staničnog ciklusa u kojoj se stanice presađuju



Kraća lag faza, brži stanični ciklusi

Upotreba staničnih suspenzija

Stanična suspenzija



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 svježju 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

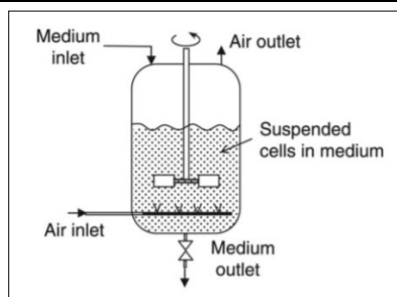


II. Kontinuirane kulture

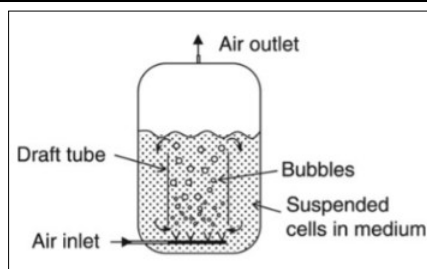
Bioreaktori

- ☐ Zatvoreni tip: kontinuirano ili povremeno odvođenje dijela istrošene podloge i dovođenje svježje.
- ☐ 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.

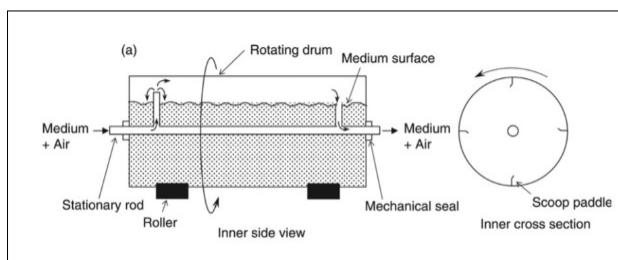




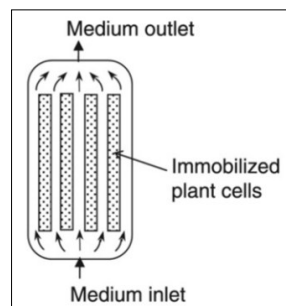
Stirred Tank Reactor



Air-lift Bioreactor

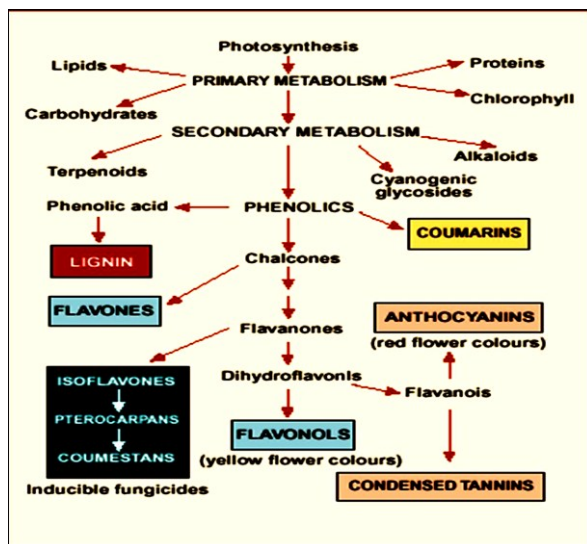


Rotary Bioreactor



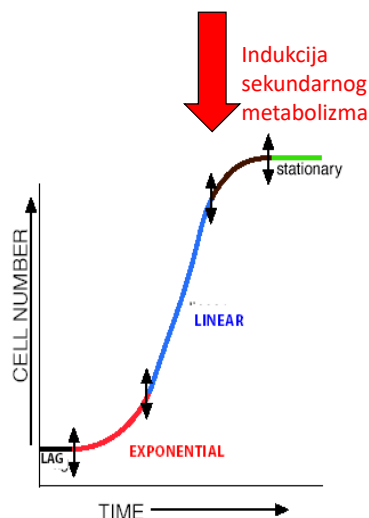
Membrane Bioreactor

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 većinom 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

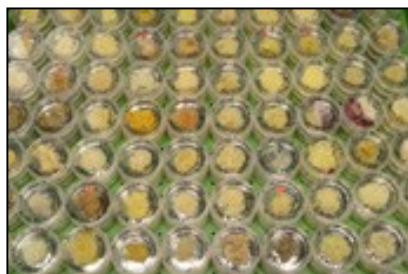
Većina sekundarnih metabolita nepovoljno djeluje na rast i stanične diobe pa se sinteza u staničnoj suspenziji potiče u stacionarnoj fazi rasta

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

2.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

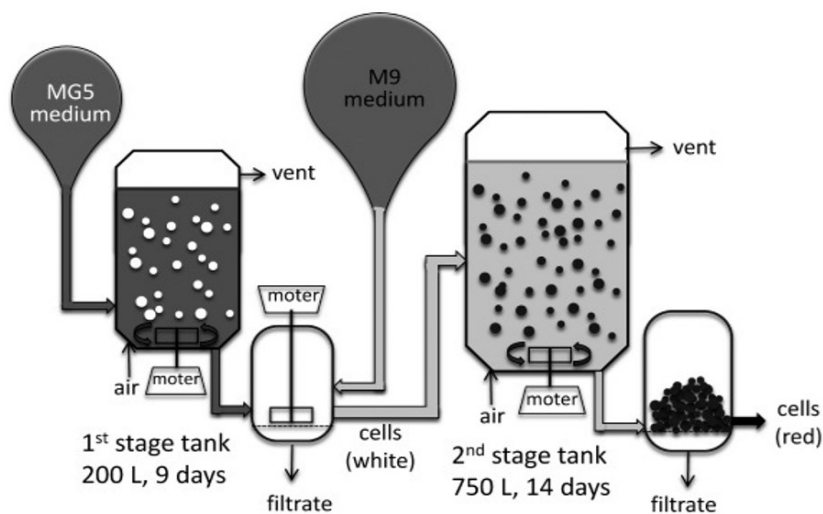


Kalus šećerne repe



Proizvodnja šikonina u staničnoj suspenziji *Lithospermum erythrorhizon*

Sinteza šikonina



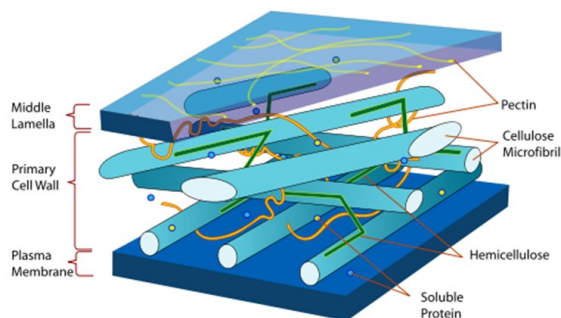
1. high cell growth

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>

Stanična stjenka biljaka

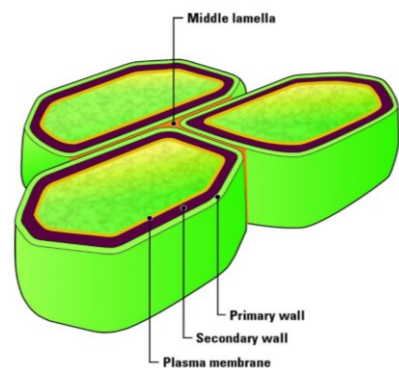


Središnja lamela

“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

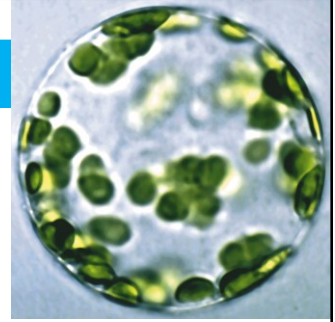
Fleksibilni sloj
Celuloza, hemiceluloza (većinom ksiloglukan),
pektin, proteini ekspanzini,
enzimi (hidrolaze, esteraze, peroksidaze)
Na površini biljke kutikula (kutin i voskovi)

KULTURA PROTOPLASTA

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

SFEROPLASTI – stanice sa djelomično uklonjenom staničnom stjenkom

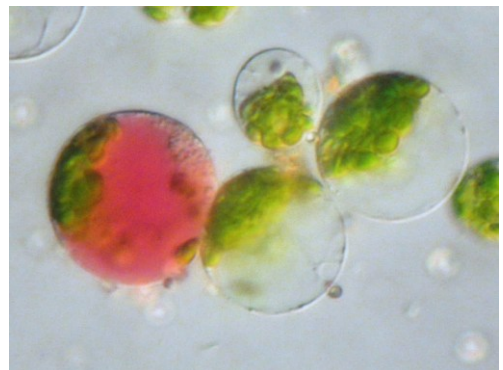
Biljni protoplasti su izrazito osmotski osjetljivi!



PROTOPLASTI

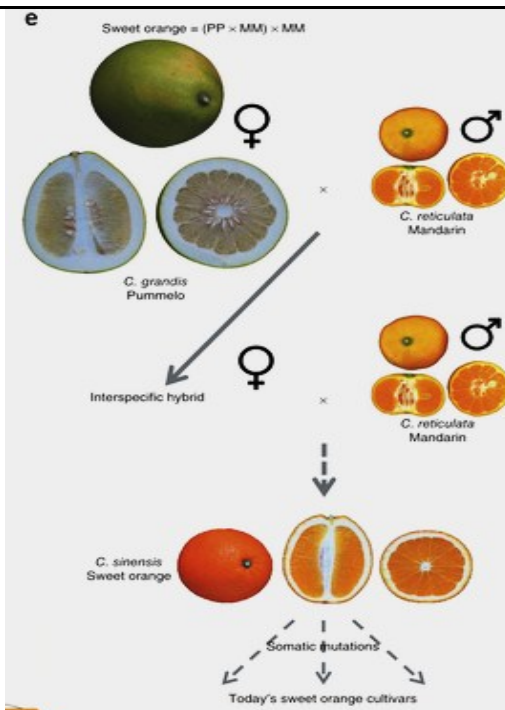
- ❑ Koriste se za proučavanje biologije membrane, osobito za proučavanje unosa makromolekula i virusa
- ❑ Upotreba za genetičke transformacije u znanstvenim istraživanjima
- ❑ Primjena u oplemenjivanju
 - transformacija protoplasta
 - fuzija protoplasta
 - važni za prijenos rezistencije sa divljih na 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.





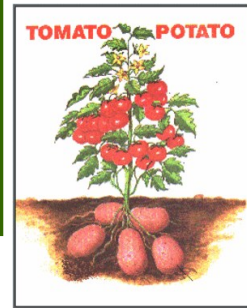
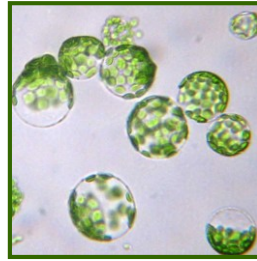
FUZIJA PROTOPLASTA
Somatski hibridi imaju svojstva obje vrste iz kojih su nastali



- 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 poligenih svojstava (tolerancija na hladnoću, otpornost na bolesti, boja cvijeta...)
 - Uspješno: duhan DELGOLD
N. tabacum X *N. rustica*
 - Slatke mini rajčice *Summer Sun*
- Neuspješno?: POMATO

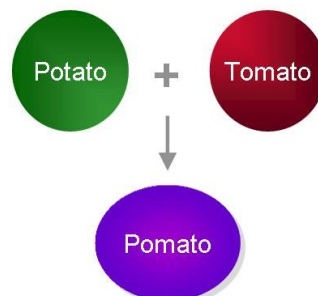


1960-ih počinje razvoj tehnika s ciljem primjene u oplemenjivanju (prve uspješne regeneracije biljaka iz protoplasta 1971., 1972.)

POMATO

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

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



- ❑ 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:

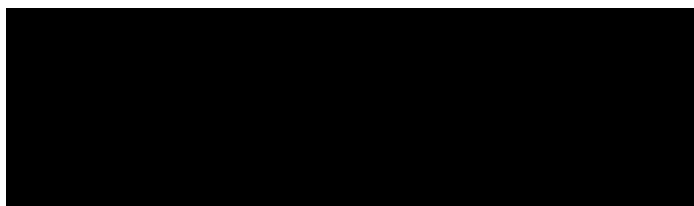
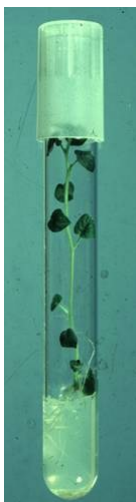
- ❑ izolacija protoplasta
- ❑ kultivacija (fuzija i/ili transformacija)
- ❑ regeneracija nove stanične stijenke
- ❑ stanične diobe – nastaju protoklonovi (protokalusi)
- ❑ regeneracija biljaka (iz protokalusa/kalusa!)
- ❑ karakterizacija transformanata i/ili hibrida

IZOLACIJA PROTOPLASTA

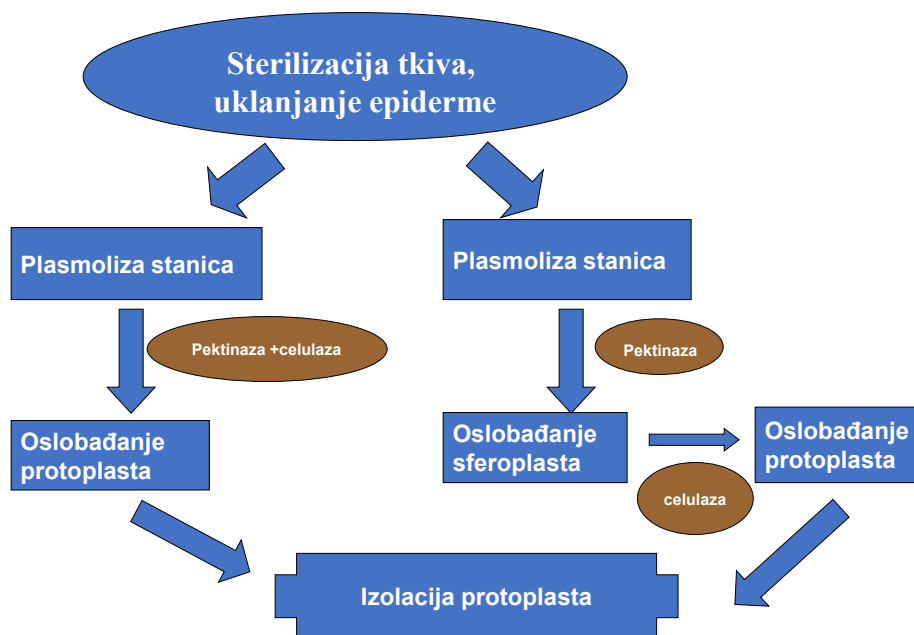
IZBOR TKIVA ZA KULTURU:

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

1. Sterilizacija tkiva ili korištenje tkiva iz kulture *in vitro*
2. Mehaničko usitnjavanje tkiva
3. Inkubacija u plazmolitiku
4. Tretiranje enzimima za razgradnju stijenke
5. Odvajanje protoplasta od nerazgrađenih dijelova tkiva
6. Odvajanje protoplasta od raspadnutih dijelova stanica



Enzimatska metoda izolacije protoplasta



IZOLACIJA PROTOPLASTA:

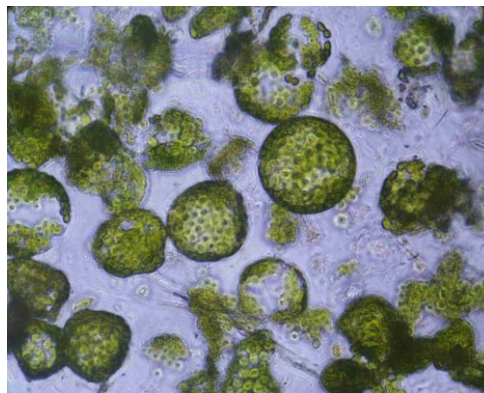
Plazmolitici: glukoza, manitol, sorbitol, saharoza, $\text{CaCl}_2 \cdot x\text{H}_2\text{O}$, MES, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot x\text{H}_2\text{O}$

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

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

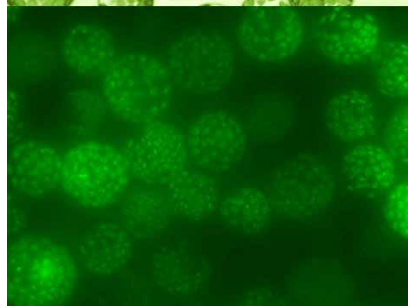
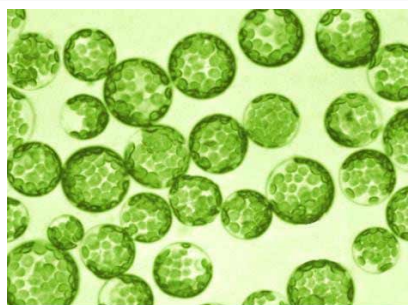
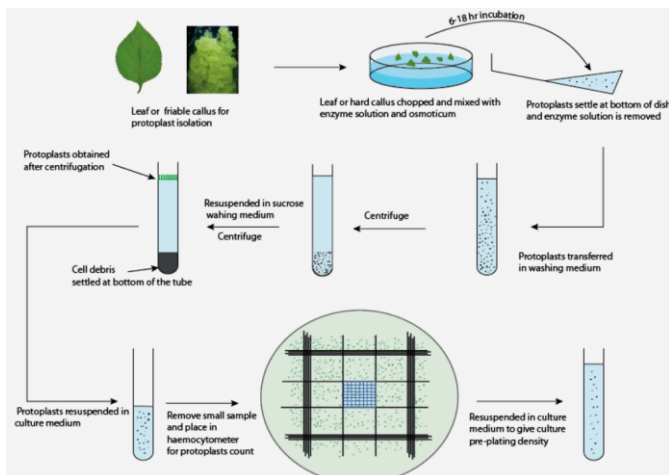
INKUBACIJSKE METODE:

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



Pročišćavanje protoplasta

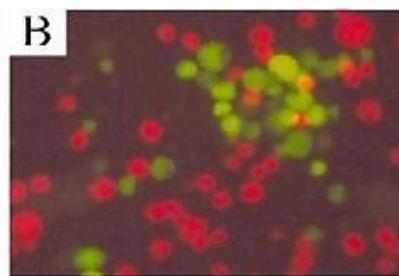
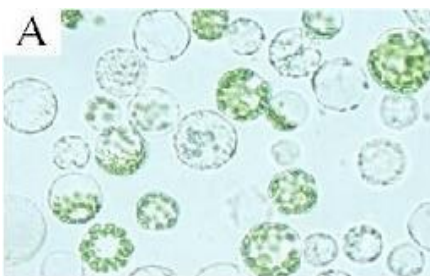
- Filtracija kroz pore 40-100 μm : protoplasti prolaze kroz filter, a veće nakupine zaostaju
- Centrifugiranje (100 g), protoplasti se talože, a manje stanične komponente (organeli) zaostaju u supernatantu (oprez - protoplasti lako pucaju !)
- Pročišćavanje u gradijentu saharoze ili sorbitola (0,4 –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

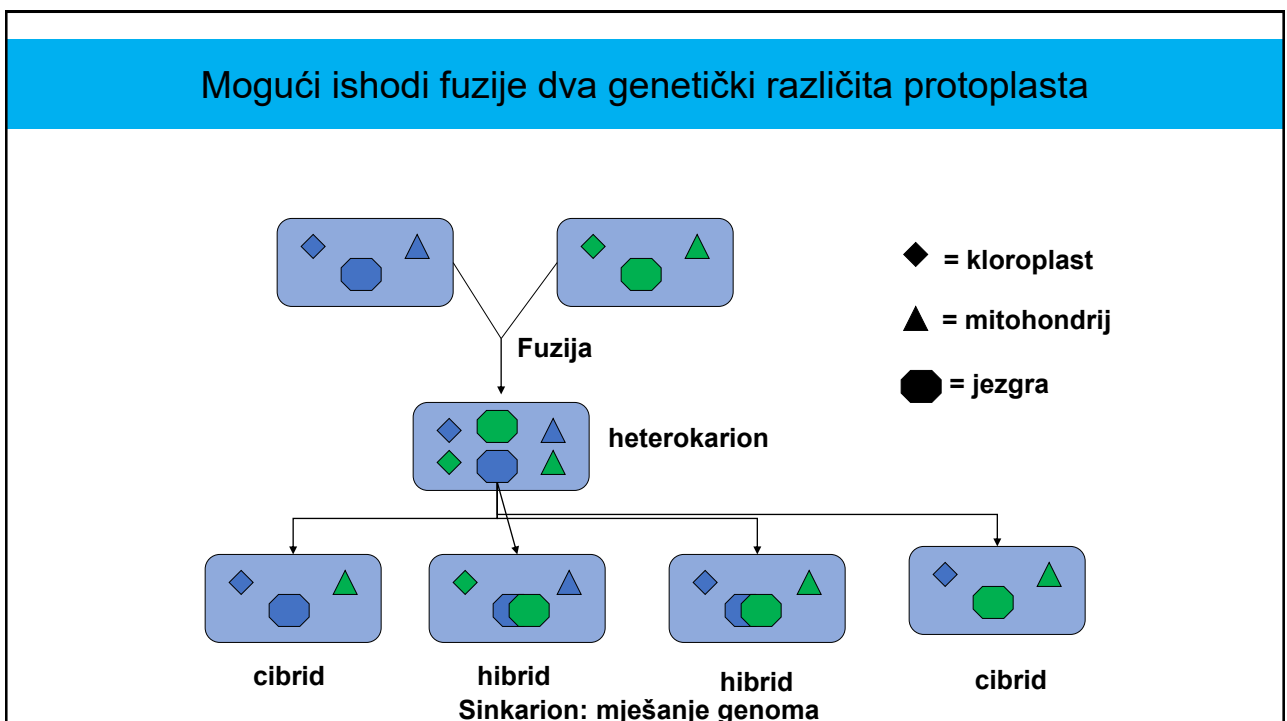
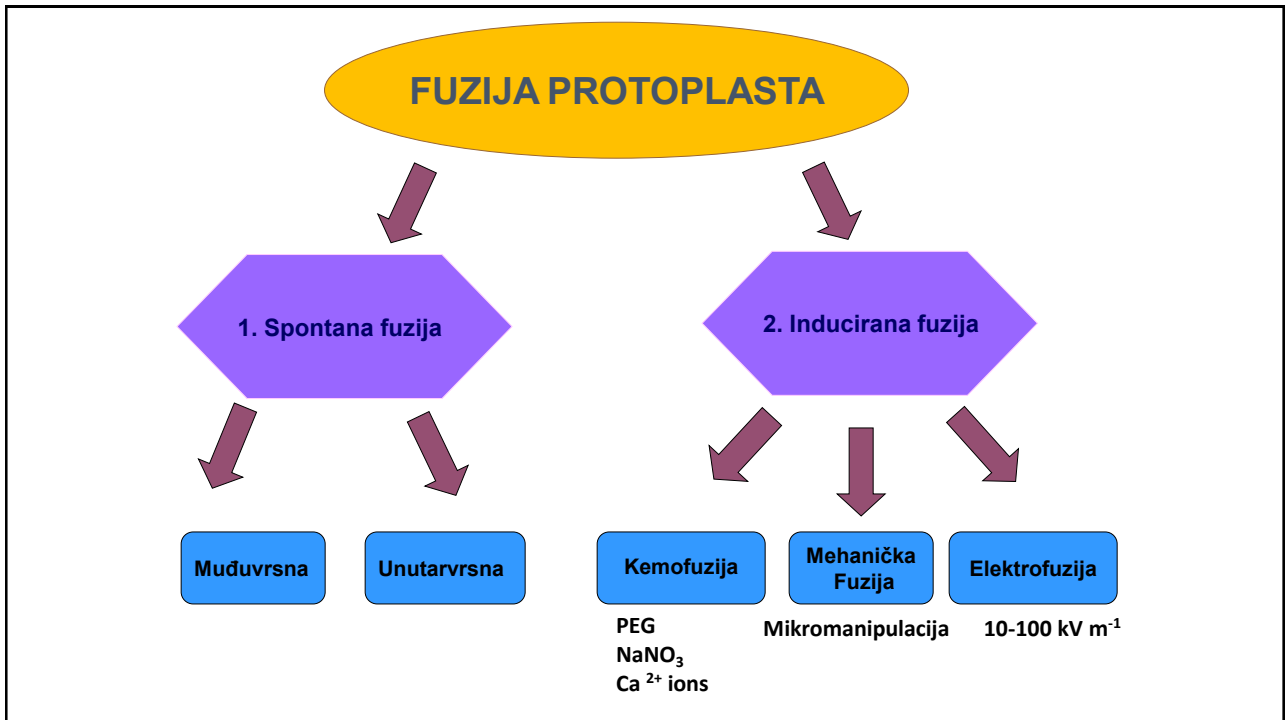


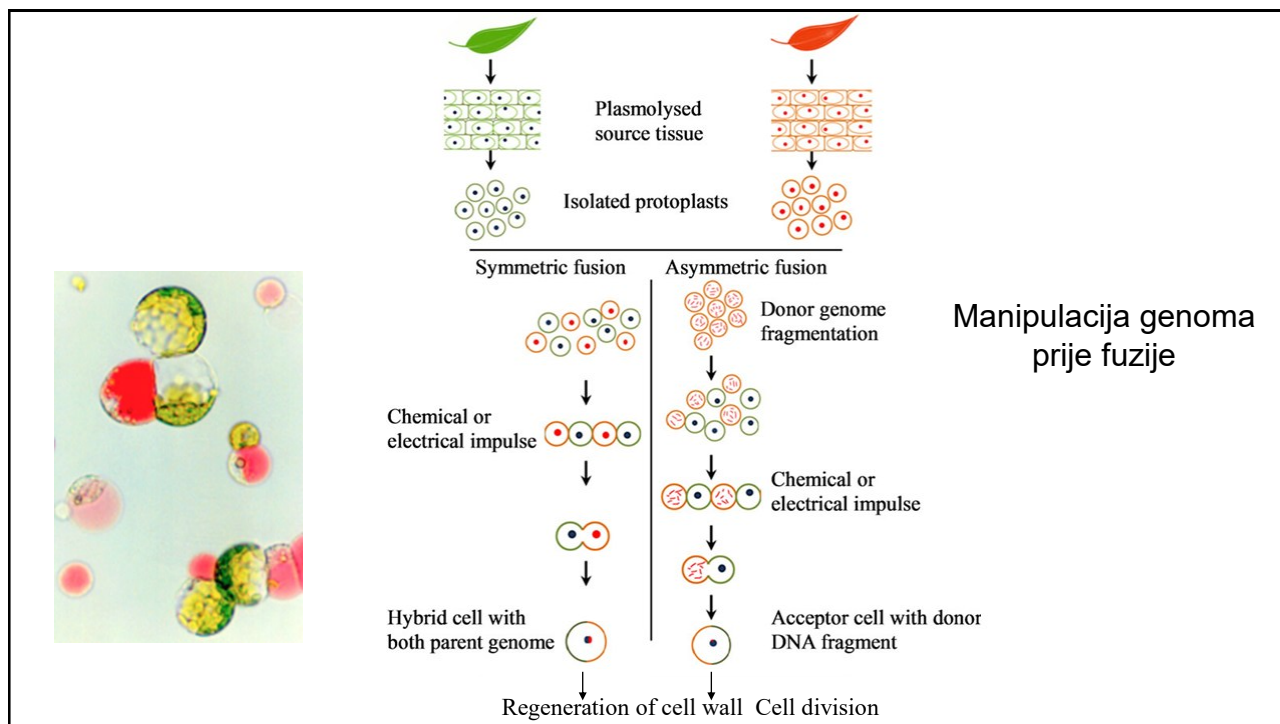
TEST VIJABILNOSTI STANICA

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

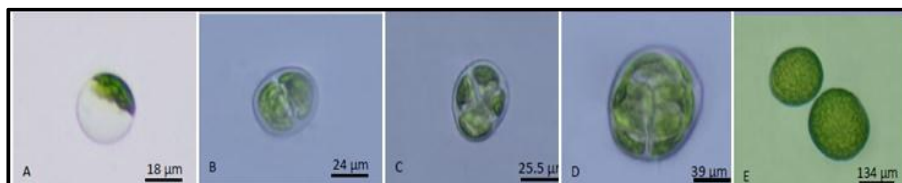
OPREZ! Protoplasti i stanice koje sadrže klorofil autofluoresciraju crveno







Postavljanje kulture protoplasta i regeneracija biljaka



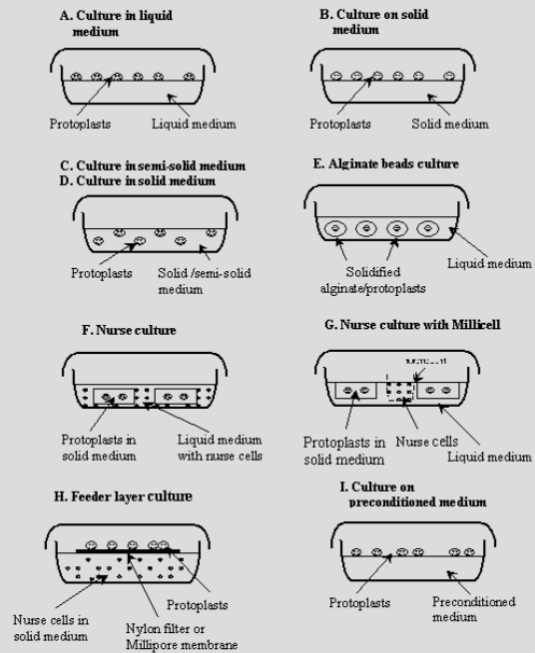
- minimalni početni inokulum
- mogućnost selekcije hibrida

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

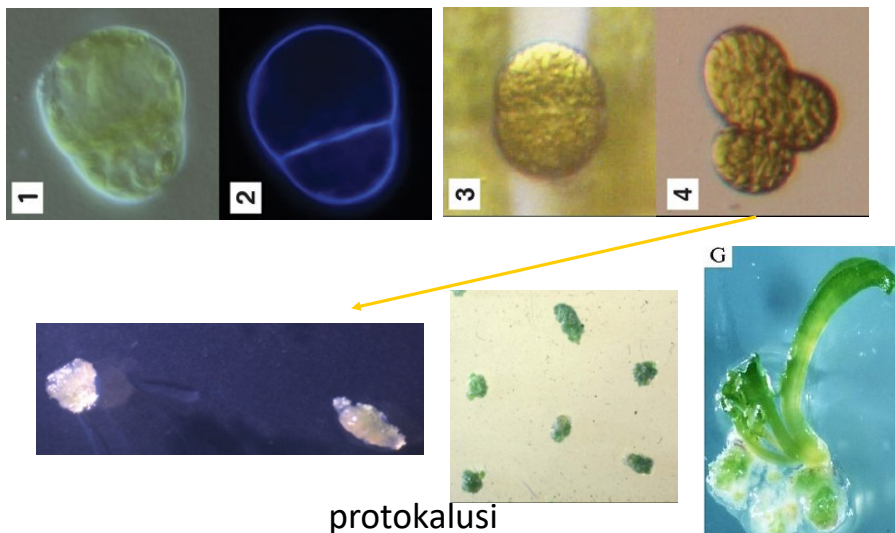
- uzgoj u kapi podloge, viseća kap, "uzgoj na dadilji" ...

Modificiran sastav hranjivih podloga

Figure 2 The different protoplast culture techniques (modified from Matsumoto and Oka 1998).

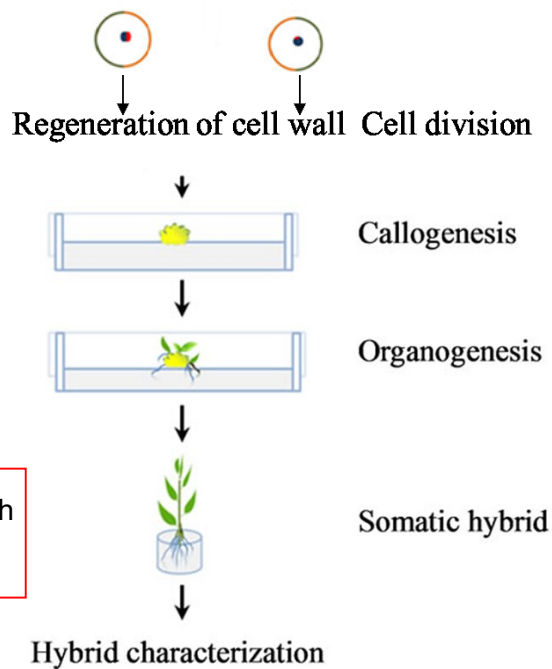
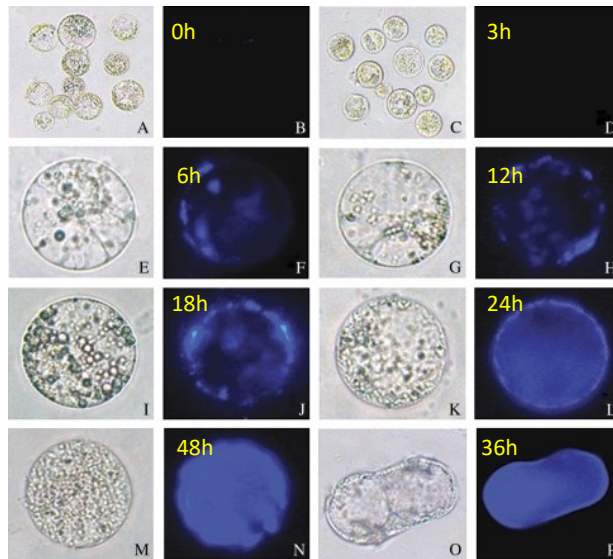


Regeneracija stanične stjenke – preduvjet za daljnje diobe



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

Kultura protoplasta

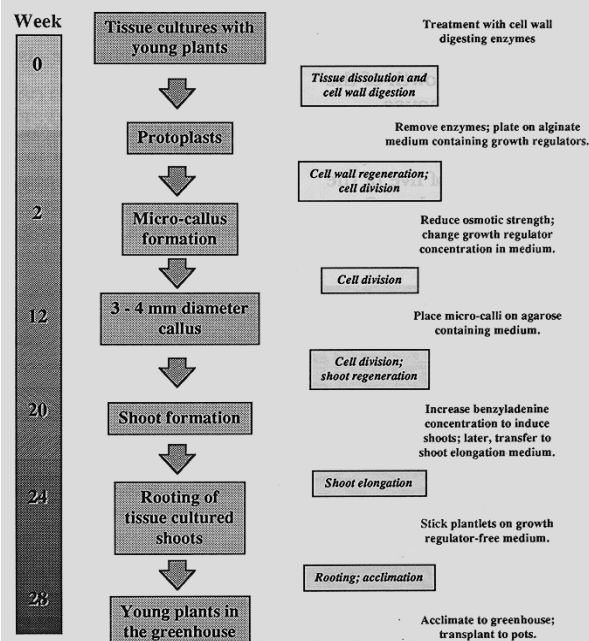


Problemi: selekcija poželjnih hibrida i regeneracija

Identifikacija poželjnih fuzijskih varijanti

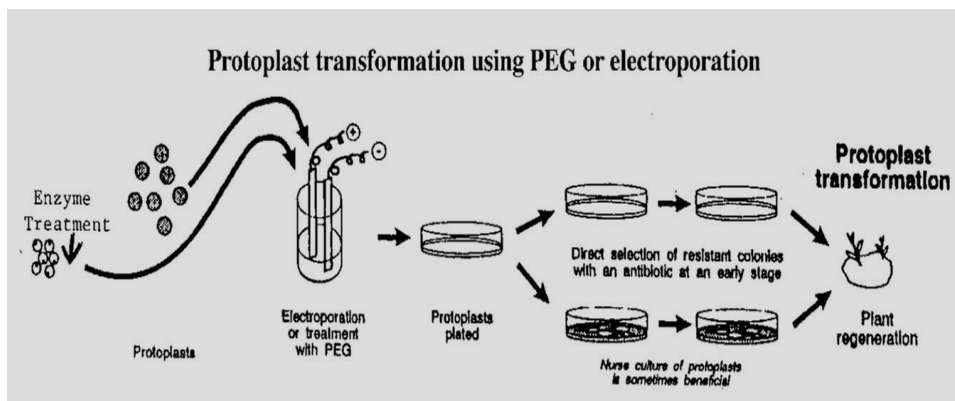
- Komplementacijska selekcija
 - Moguća ako donori imaju različite selekcijske markere (otpornost na antibiotik ili herbicid). Protoplast nastao fuzijom mora imati oba svojstva.
- Fluorescencijsko obilježavanje stanica
 - Svaki donor se obilježava posebnom bojom, fuzijski produkt mora sadržavati obje 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

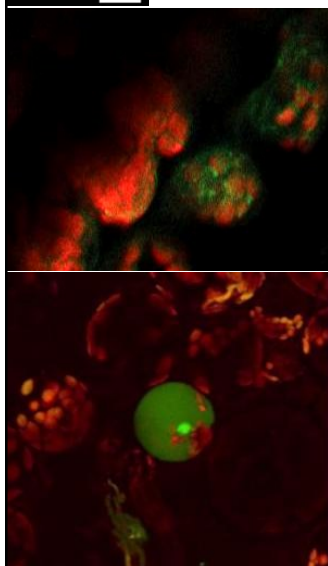
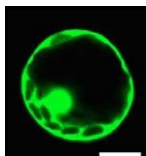


TRANSFORMACIJA PROTOPLASTA-UNOS STRANE DNA

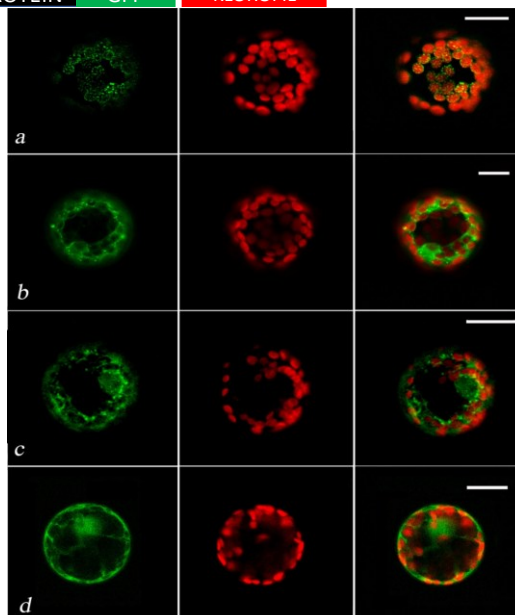
- * elektroporacija
- * PEG



Transformacija protoplasta i (ko)lokalizacija fuzijskih proteina u stanici



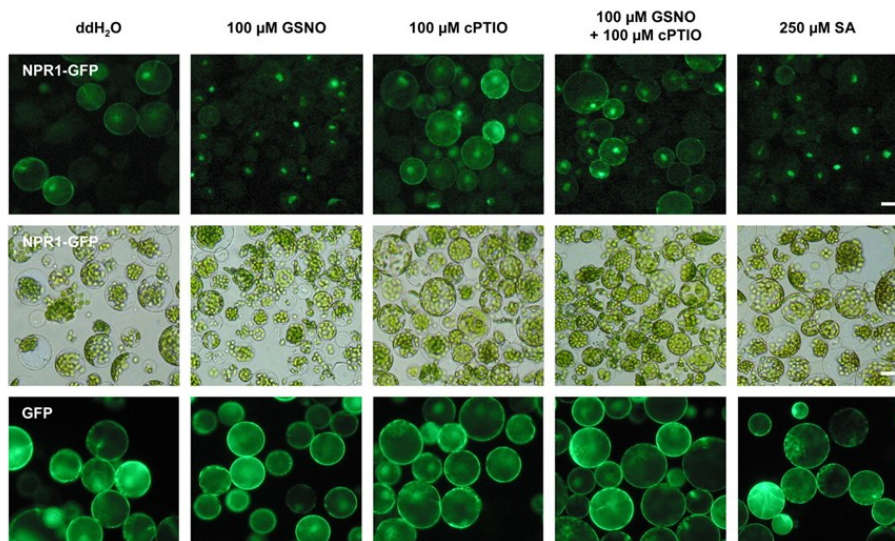
PROTEIN GFP KLOROFIL



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 μm (**a–d**) and 1 cm (**e–i**), respectively. Arrows indicate newly formed adventitious shoot

