

KBT2mb 2025

Hranjivi medij nastavak...

KRUTE PODLOGE

Agar

- polisaharid iz crvene alge (0.6 – 1%)
- različite čistoće na tržištu – značajno utječe na ishod eksperimenta
- skrutnjavanje ovisno o pH i koncentraciji soli
- otapa se na 100 °C, a skrutnjava na 45-50 °C

☐ Gelrite ili Phytigel ili Gellan gum

- polisaharid iz bakterije *Pseudomonas*, čišći od agara
- koristi se 0,2-0,35%, otapa se na 100 °C, a skrutnjava na 55 °C

☐ Agaroza

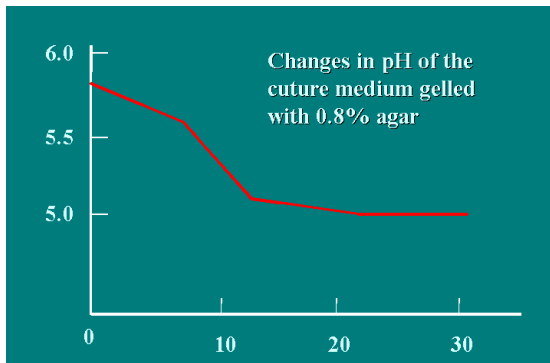
☐ Smjese (Phytagar)

- ☐ Za podupiranje eksplantata koriste se i različita mehanička sredstva – mostovi od filter papira, pijesak, vata, staklena vuna...

pH podloge

Obično 5,0-5,8

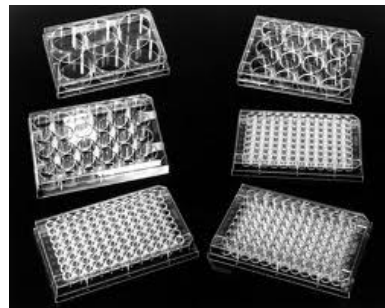
- Mjeri se kad su dodane sve komponente podloge.
- Ukoliko se radi o krutoj podlozi pH se mjeri prije dodavanja agara, jer bi agar mogao začepiti pH elektrodu!!!



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%)

Laboratorijsko posuđe za uzgoj biljaka i biljnog tkiva



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

STERILIZACIJA HRANJIVE PODLOGE

- ☐ Autoklaviranje na 121 °C, visoki tlak (1,5 bar), 10-20 min
- ☐ Hladna, filter sterilizacija
 - ☐ Mnogobrojne komponente hranjive podloge (vitamini, antibiotici...) su termolabilni ili kompleksiraju, pa se steriliziraju hladnom sterilizacijom i naknadno dodaju u rashlađenu autoklavanu smjesu



Za biljnu kulturu se koriste filteri
pora 0,22 µm

UZGOJNI UVJETI

Dobro izveden eksperiment podrazumijeva
strogu kontrolu okolišnih uvjeta!!!

I. Temperatura

A. Konstantna (22-28°C)

B. Dnevne varijacije (noć/dan)

- noću obično niža za 4-6 °C

C. Sezonske varijacije

- ☐ Temperaturu je potrebno održavati na $\pm 1^\circ\text{C}$.
- ☐ 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 embriogeneze i haploida.
- ☐ Trajni uzgoj na nižim temperaturama se koristi kada želimo usporiti rast tkiva i smanjiti učestalost supkultiviranja (usporen rast)



II. Osvjetljenje

- Svjetlost značajno utječe na rast i razvoj, osobito na elongaciju stabljike i veličinu listova, metabolizam i sadržaj klorofila.
- Tijekom mikropropagacije, intenzitet i izvor svjetlosti imaju ključnu ulogu na regeneraciju izdanaka, prirastu svježe mase i biosintezu sekundarnih metabolita.
- Svjetlo utječe na učinkovitost regulatora rasta i razinu endogenih hormona.
- Na tržištu su različiti tipovi lampa, različite jakosti i kvalitete svjetla. Obično se koriste fluorescentne lampe (400-700 nm), no zbog uštede energije sve više su u upotrebi led lampe (kombinacije npr. plavo 450-480 nm i crveno 640-660 nm) pri čemu ključnu ulogu ima postotak pojedinog tipa osvjetljenja.



A. Fotoperiod – obično 16 sati osvjetljenja na dan

Neke kulture (npr. kultura stanica u suspenziji i kultura korijena) se uzgajaju u tami

B. Intenzitet

Mjeri se Lux-ima ili $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ (E= Einstein)

Za uzgoj se koristi od 30-250 $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ ili od 2000-10000 luxa

C. Kvaliteta

Najvažniji je omjer plavo/crveno i crveno/daleko crveno

Izdanci vole plavo svjetlo

<https://plantcelltechnology.com/blogs/blog/blogrole-of-lights-in-plant-tissue-culture>

III. Vlažnost

Obično se ne kontrolira u *in vitro* uvjetima, no moguće ju je regulirati temperaturom i sadržajem agara



Normalno

Hiperhidrirano



- Višak vlage se nakuplja u međustaničnim prostorima i remeti izmjenu plinova, uzrokujući hipoksiju i oksidativni stres. Amonijevi ioni u visokim koncentracijama dovode do poremećaja metabolizma biljke, uzrokujući anatomske poremećaje, a višak citokina pospješuje biosintezu etilena.

- ☐ Previsoka vlažnost uzrokuje hiperhidriranost tkiva i pogoduje kontaminacijama
 - Hiperhidriranost je važan, nepoželjan i najčešći fiziološki poremećaj u *in vitro* uzgoju biljaka. Značajno remeti rast i regeneraciju.
- ☐ Preniska vlažnost uzrokuje isušivanje eksplantata i usporeni rast

<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9738826/>

IV. 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

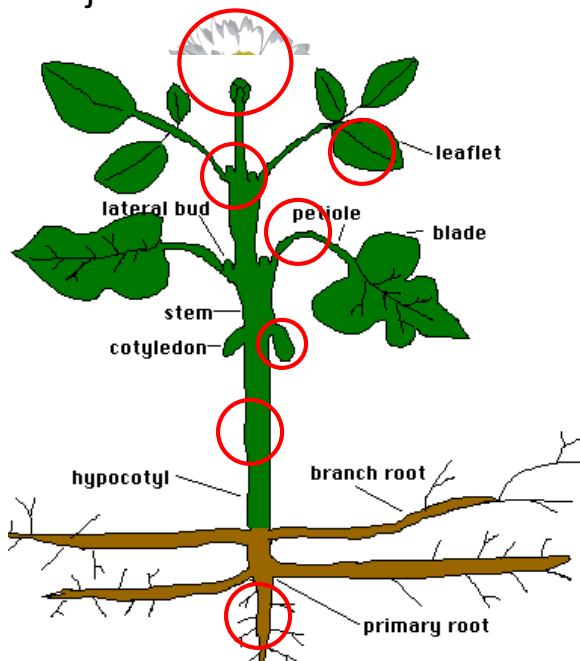
S ciljem što boljeg izjednačavanja sastava plinova posude za uzgoj zatvaramo vatenim čepovima – osiguravaju sterilnu izmjenu zraka

Eksplantat : dio koji se izolira iz biljke i uvodi u kulturu

Nisu sve biljne stanice totipotentne, no tijekom cijelog životnog ciklusa, u svim biljnim tkivima/organima, postoje totipotentne stanice ili stanice koje mogu postati totipotentne!

- Biokemijski/genetski mehanizmi odgovorni za sposobnost matičnih stanica da ostanu "zauvijek mlade" su se tek počeli razotkrivati!

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



Eksplantat pogodan za kulturu biljnog tkiva

1. Različite biljne vrste pokazuju razlike u podložnosti za kulturu tkiva
2. U mnogim slučajevima različiti genotipovi unutar vrste drugačije reagiraju na kulturu tkiva

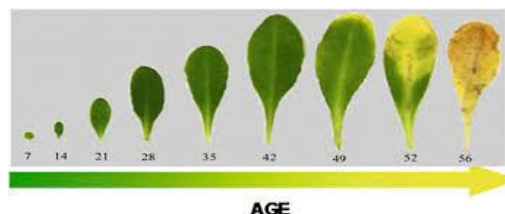
➤ **Općenito, što je eksplant mlađi, manje diferenciran, to je bolji za kulturu tkiva**

➤ **Poželjna svojstva eksplantata:**

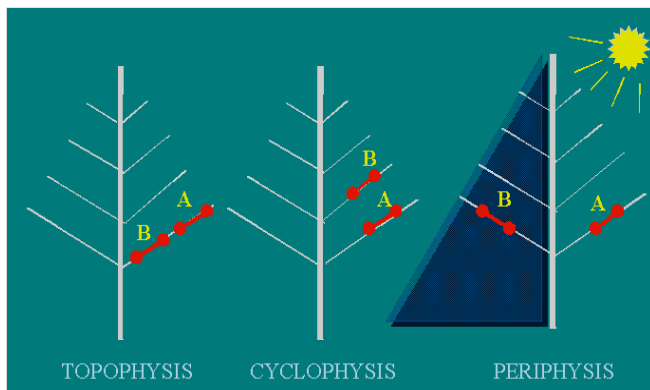
- Lako se sterilizira
- Mlado, juvenilno tkivo
- Reaktivan – pogodan za rast i manipulaciju razvoja

Najčešće korišteni eksplantati:

- Vršak izdanka
- Bočni pup
- Sjemenke
- Hipokotil (izoliran iz klijanca proklijalog *in vitro*)
- Listovi



- Djelovanje različitih godina i sezone
- Uvjeti rasta
- Položaj eksplantata na biljci



- Način inokulacije eksplantata
- Ranjavanje



- Učinak uzgoja na dadilji



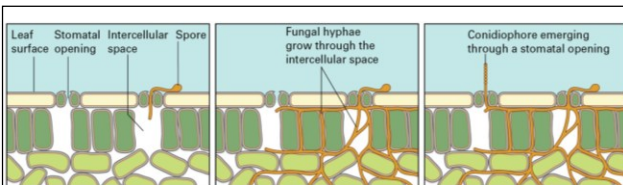
- Kondicionirana podloga-
upotreba podloge u kojoj je
kultivirano dobro rastuće tkivo

- Kada se napravi eksplant, kao što je nodalni eksplantat, eksplantat lista, vršni ili korijenski vršak, uklanjaju se izvori mnogih kemikalija i hranjiva, te se oni trebaju dodati u hranjivi medij kako bismo omogućili rast i razvoj.
- Što je eksplantat manji medij za uzgoj je kompleksniji.

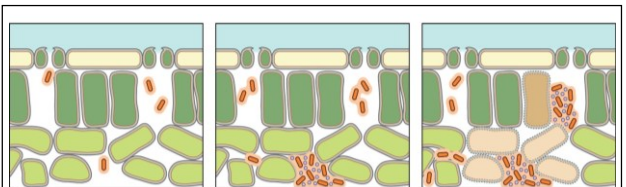


Prvi i osnovni zahtjev kulture bilnog tkiva: Uspostava aseptične kulture

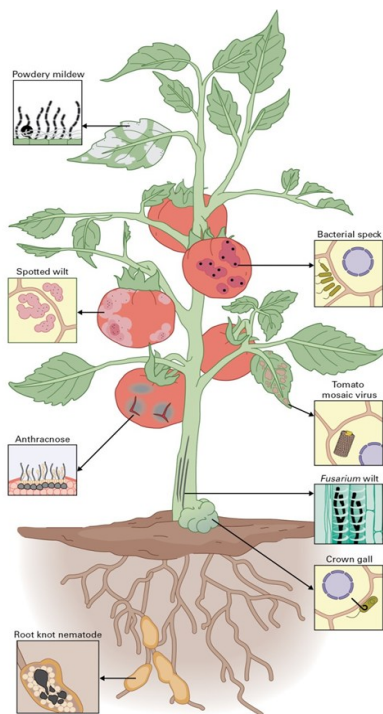
- Odabir pogodne biljke/biljnog materijala koji se uvodi u kulturu *in vitro*
- Odabir pogodnog eksplantata
- Sterilizacija biljnog materijala
- Uspostava aseptične kulture biljnih stanica/tkiva



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



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



Biljni patogeni:

- Bakterije
- Gljivice
- Virusi
- Viroidi
- Fitoplazme
- Nematode

- ☐ Mikroorganizmi nastanjuju površinu, međustanične prostore, provodna tkiva, i stanice biljaka
- ☐ Mikroorganizmi rastu značajno brže od biljnih stanica i tkiva
- ☐ Mikroorganizmi ispuštaju toksine koji usporavaju/sprečavaju rast biljnog tkiva



Površinska sterilizacija biljnog tkiva

- ☐ 70%-tni etanol: uklanja zračne mjehuriće i masne kapljice, ali dehidrira tkivo
- ☐ klorno vapno
- ☐ kalcij hipoklorit: sporije prodire u biljno tkivo
- ☐ natrij hipoklorit
- ☐ Izosan G
- ☐ H₂O₂ – koristi se uvijek u kombinaciji s drugim sredstvima
- ☐ PPM (Plant Preservative Mixture) pogodan za sterilizaciju i kao dodatak u medij. Termostabilan.
- ☐ živa-klorid: VRLO TOKSIČNA!!!



Izosan G, Pliva
100% natrij diklorizocijanurat dihidrat



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 ₂ O ₂	3-10%	Velika	5-20
Alkohol (EtOH)	70%	Velika	max 1

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

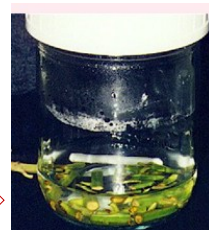
Sterilizacija biljaka koje rastu u kontroliranim uvjetima je lakša pa se uvijek nastoji izbjeći uzimanje uzoraka s livade/polja/šume



70% EtOH



Sterilizacijsko sredstvo



Ispiranje sterilnom vodom



Nasađivanje
na sterilni
medij i uzgoj

Uobičajeni postupak sterilizacije biljnog tkiva

VIRUSNE INFEKCIJE SMANJUJU PRINOSE



TICV symptoms in a field of severely infected tomatoes (*Lycopersicon esculentum*).

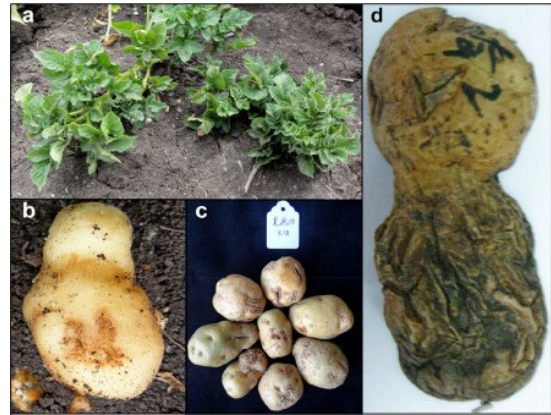


Strawberry field exhibiting stunting symptoms associated with SPaV in mixed infections with other viruses.

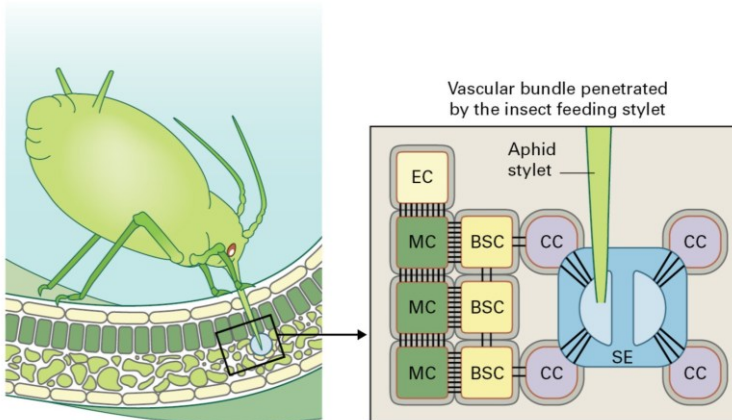
Candidatus Phytoplasma solani
(Stolbur phytoplasma)



Potato Spindle Tuber Viroid



Unutarstanične infekcije: virusi, viroidi, fitoplazme

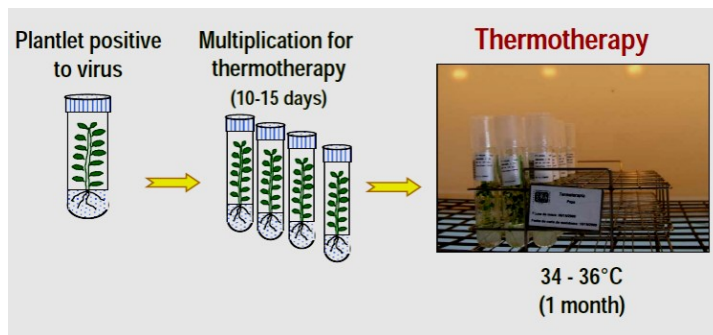


- Ulaze u biljku preko površinskih rana i/ili organizama koji ih prenose (npr. insekata)
- Virusi se ulaskom u floem brzo se šire kroz biljku
- Ne mogu prolaziti kroz plazma membranu, ali se lokalno šire plazmodezmijima
- Neravnomjerna distribucija u biljkama

UNUTARSTANIČNA STERILIZACIJA I OZDRAVLJIVANJE BILJAKA

Za eliminaciju virusa, viroida i fitoplazmi...

A. Termoterapija - smanjuje koncentraciju virusnih čestica



- Za uklanjanje viroida koristi se izlaganje sniženoj temperaturi (5-8 °C)

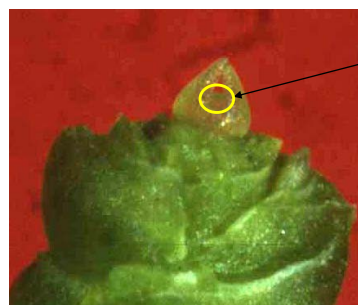
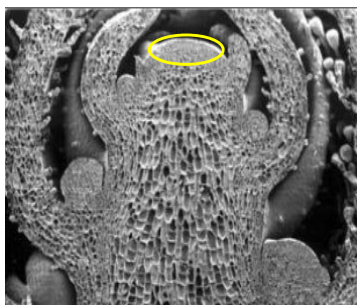
- Matična biljka se tretira povišenom temperaturom (35-42 °C) tijekom 4-6 tjedana.
- Trajanje tretmana i temperatura ovise o tipu virusa i zaraženoj vrsti.
- Koristi za smanjivanje razine i uklanjanje virusa iz biljaka kao što su krumpir, vinova loza, koštuničavo voće, agrumi, jabučasto voće i jagode.
- Ključni čimbenici: temperatura i trajanje tretmana, izvor i veličina eksplantata, vrsta virusa i status infekcije te genotip

UNUTARSTANIČNA STERILIZACIJA

Za eliminaciju virusa, viroida i fitoplazmi...

B. Korištenje kulture meristema

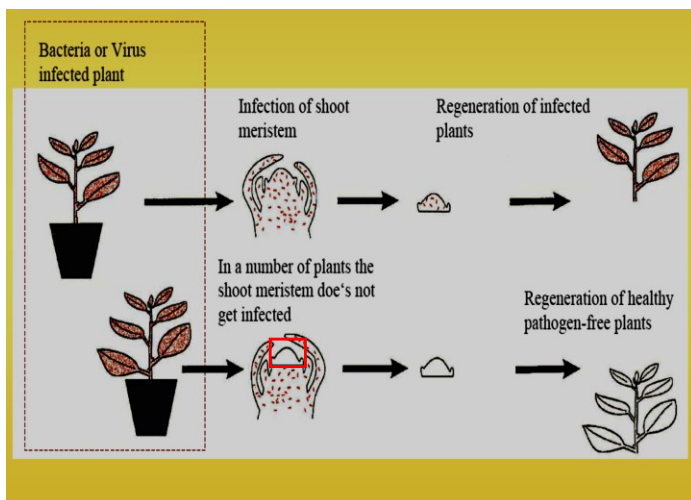
- Dijelovi biljke koji ne sadrže provodna tkiva imaju znatno manju zastupljenost virusa
- Najmanje virusa u meristemu vrha izdanka i korijena, zbog visoke koncentracija hormona u meristemu, te zbog intenzivnih staničnih dioba
 - Meristem se izolira i nasađuje na hranjivi medij te se regenerira kompletna biljka.
 - Veličina eksplantata igra glavnu ulogu u kulturi meristema - što je eksplantat manji sigurnije je ozdravljenje, ali je teža regeneracija kompletne biljke



Vršni
meristem

KULTURA MERISTEMA

- ❑ U meristemu nema provodnih elemenata i biljne stanice se intenzivno dijele. Mikroorganizmi teško dopiru do meristema pa on predstavlja najzdraviji dio biljke.
- ❑ U meristemu se nalaze stanice koje su determinirane za razvoj izdanka.



-Uzgoj meristema uključuje izolaciju i *in vitro* postavljanje kupolastog meristematskog tkiva na medij za razvoj cijele biljke.

- Za ozdravljanje biljaka kultura meristema se često koristi u kombinaciji s termoterapijom

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

UNUTARSTANIČNA STERILIZACIJA

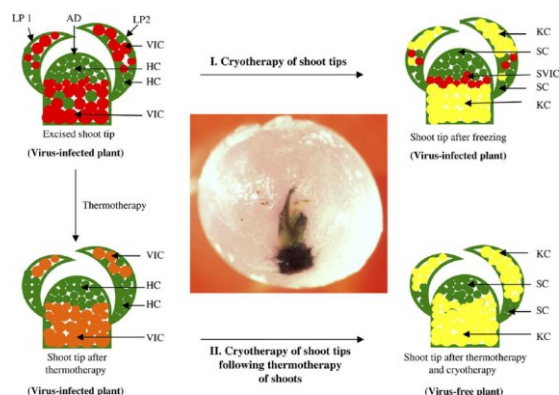
Za eliminaciju virusa, viroida i fitoplazmi...

C. Upotreba antiviralnih i antimikrobnih kemikalija u mediju za rast.

Npr. acikloguanosin, azidotimidin, aciklovir, ribavirin (virazol), itd.

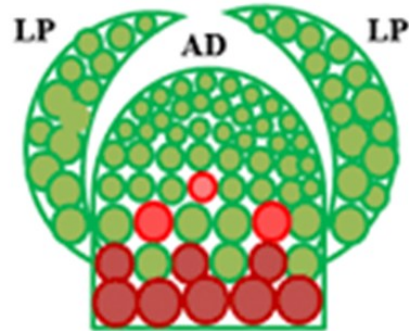
D. Krioterapija, ili zamrzavanje vegetacijskog vrška u tekućem N₂.

Kristali leda ne oštećuju male meristematske stanice, dok .



Kombinacija termoterapije i krioterapije uništava stanice zaražene virusom i dodatno uzrokuje degradaciju virusne RNA

Wang et al. 2009. Cryotherapy of shoot tips: A technique for pathogen eradication to produce healthy planting materials and prepare healthy plant genetic resources for cryopreservation



Shoot regeneration (%)	Virus-infected shoot tip	Virus-free frequency (%)
90	8	76
80	10	70
70	12	64
60	15	58
50	18	52
40	20	46
30	22	40
20	25	34
10	28	28
0	30	22

Species	Procedure	Virus	Reference
<i>Alstromeria</i> sp.	meristem culture	<i>Alstroemeria mosaic virus</i> (AlMV)	Chiari and Bridgen, 2002
<i>Chrysanthemum</i> sp.	meristem culture	<i>Cucumber mosaic virus</i> (CMV)	Verma et al., 2004
<i>Chrysanthemum morifolium</i> cv. Regol Time	meristem culture, chemotherapy and thermotherapy	<i>Chrysanthemum B Carla virus</i> (CVB)	Ram et al., 2005
<i>Chrysanthemum morifolium</i>	meristem culture	mixed infection by CMV and <i>Tomato aspermy virus</i> (TAV)	Kumar et al., 2009
<i>Chrysanthemum</i> sp.	meristem culture	<i>Tomato spotted wilt virus</i> (TSWV), <i>Impatiens necrotic spot virus</i> (INSV), <i>Iris yellow spot virus</i> (IYSV)	Balukiewicz and Kryczynski, 2005
<i>Dianthus gratianopolitanus</i>	meristem culture	<i>Carnation mottle virus</i> (CarMV), <i>Carnation latent virus</i> (CLV), potyviruses	Fraga et al, 2004a
<i>Lilium</i> sp.	meristem culture	<i>Lily symptomless virus</i> (LSV)	Allen, 1975
<i>L. x elegans</i>	meristem culture and thermotherapy	LSV	Nesi et al., 2009
New Guinea Impatiens (<i>I. hawkerii</i>)	meristem culture	mixed infection by TSWV and CMV	Gera and Dehan, 1992
<i>I. hawkerii</i>	meristem culture	TSWV	Milošević et al., 2011
<i>Phlox paniculata</i>	meristem culture and thermotherapy	CLV, CarMV, CMV, <i>Tobacco mosaic virus</i> (TMV), <i>Tospoviruses</i> (subgroups I, II and III), <i>Potyviruses</i>	Fraga et al., 2004b
<i>Viola odorata</i>	meristem culture	<i>Viola mottle virus</i> (VMV), CMV, <i>Bean yellow mosaic virus</i> (BYMV)	Van Caneghem et al., 1997



Simptomi virusne infekcije
Strawberry vein banding virus



Chrysanthemum stuntet viroid

Testiranje biljaka na prisustvo virusa

- Vizualni pregledi i biljke indikatori
 - Utrljavanje biljnog pripravka u indikator biljku koja nakon infekcije pokazuje dobro vidljive simptome (npr. mlade biljke duhana (*Nicotiana glutinosa*) mogu poslužiti kao indikator virusa aspermije rajčice, a listovi *Gomphrena globosa* za dijagnostiku X-virusa krumpira).
- Mikroskopske metode detekcije virusnih čestica
 - Virusi kao što su bolest žutog uvijanja lišća rajčice (TYLCD), virus krumpira S (PVS), virus prugastog mozaika riže (RSMV), virus smeđe naboranog ploda rajčice (ToBRFV), virus Pepino mozaika (PepMV) i virus krumpira M mogu se detektirati elektronskom mikroskopijom
- Serološke metode (ELISA)- potrebna antitijela na virus
- Detekcija nukleinskih kiselina virusa pomoću metode PCR
 - obično RT-PCR jer biljni virusi pretežno imaju RNA genom. Potrebne specifične početnice za virusne gene
- Imunopročišćavanje virusa i PCR (Immunocapture-PCR; IC-PCR)
 - Izdvajanje virusa iz biljnog ekstrakta imunovezanjem na antitijelo, (reverzna transkripcija), Umnazanje virusnih gena metodom PCR
- Sekvenciranje metodama nove generacije

<https://www.mdpi.com/1999-4915/13/3/412>

Različite vrste kultura biljnih tkiva

- ☐ Kultura kalusa
- ☐ Kultura stanica u suspenziji
 - ☐ Kultura embrija
 - ☐ Kultura sjemenki
 - ☐ Kultura protoplasta
 - ☐ Kultura organa
- ☐ Kultura pojedinačne stanice
 - ☐ Kultura polena
 - ☐ Kultura antera

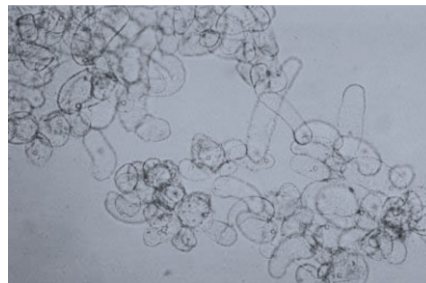
Kultura kalusa

KALUS (staničje) – Neorganizirana rastuća masa stanica. Tkivo koje se razvija kao odgovor na ozljeđivanje. Stanice mogu biti diferencirane ili nediferencirane a rast je neorganiziran.



U prirodi mu je uloga zaštita ozlijeđenog mjesta.

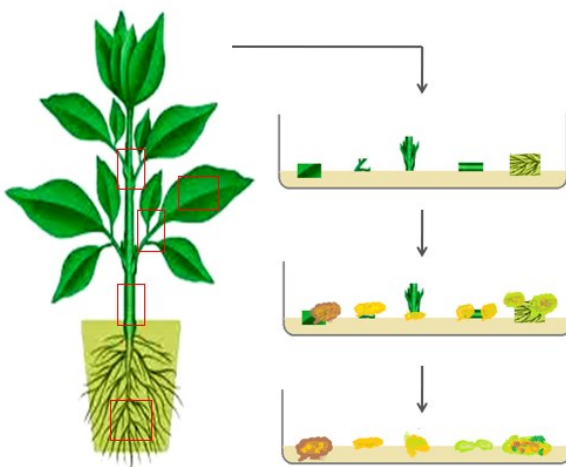
Kalus je neorganizirana masa stanica koja ima potencijal za razvoj bilo kojeg dijela biljke.



- ❑ Kultura kalusa prvi put je inducirana 1920-ih.
- ❑ Kultura kalusa je ključni dio gotovo svakog biokemijskog, fiziološkog i genetičkog eksperimenta.
- ❑ Kultura kalusa izvrstan je način za postizanje genetičke varijabilnosti u biljkama.
- ❑ Kalus se koristi za postavljanje kulture stanične suspenzije, *in vitro* razvoj somatskih embrija, *in vitro* razvoj organa i dobivanje sekundarnih metabolita za komercijalnu upotrebu.

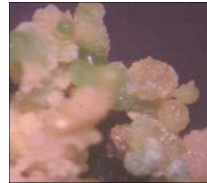


Indukcija kalusa



Kalus se može potaknuti na svim tipovima eksplantata. Pogodnije je mlado tkivo.

Fenotipski različite stanice mogu dati fenotipski i morfološki drugačiji kalus.

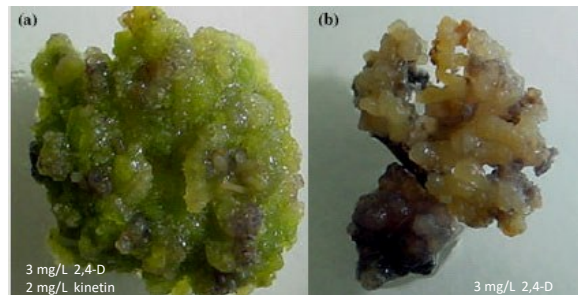
Kalus *in vitro*

Razlozi razvoja/proliferacije kalusa

1. Biljke stvaraju kalus kao odgovor na ranjavanje tkiva. Pri tome u inicijaciji i rastu kalusa sudjeluju endogeno sintetizirani hormoni.
2. Egzogeno dodani auksini i citokinini potrebni su za inicijaciju kalusa u kulturi *in vitro*. Dodatak hormona utječe na promjene u signalnim putevima i potiče diobe stanica.
3. Kalus mogu potaknuti bakterije (npr. Agrobakterije, *Pantoea agglomerans*), virusi, protisti, nematode i insekti

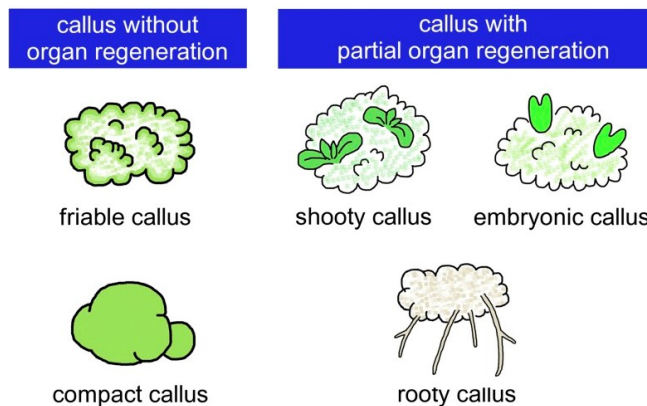
Tipični eksplantati za inicijaciju kalusa:
provodna tkiva, skladišni parenhim, pericikl
korijena, kotiledoni, lisni mezofil.

Iz stanica kalusa moguće je potaknuti razvoj izdanaka, korijena ili embrija



Kalus sadrži:

- ☐ Totipotentne stanice
- ☐ Nediferencirane stanice – meristemske, male, okrugle stanice s malim vakuolama
- ☐ Diferencirane stanice – specifični tipovi stanica s točno određenom funkcijom, veće, vakuolizirane stanice, dijelovi provodnih elemenata, vrškovi korijena
- ☐ Struktura i način rasta kalusa razlikuju se ovisno o vrsti.
- ☐ Kalus je većinom brzo-rastuće tkivo
- ☐ Nakon indukcije, kalus se subkulturira i održava prenošenjem na svježi medij svakih 28 dana.
- ☐ Subkultivacija osigurava hranjive tvari te eliminaciju toksičnih metabolita.

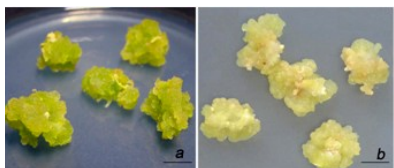


- ☐ Prema makroskopskim karakteristikama kalusna se tkiva mogu značajno razlikovati pa kalus možemo klasificirati ovisno o vanjskom izgledu:
 - Kalus bez znakova regeneracije: rastresiti ili kompaktni
 - Kalus sa dijelovima regeneriranih organa
- ☐ Stanice različitih tipova kalusa imaju različitu ekspresiju gena, i kalus sadrži stanice različitog stupnja diferencijacije

Tri stadija kulture kalusa



- ❑ **Poticanje**/indukcija kalusa: stanice eksplantata su inducirane na diobu



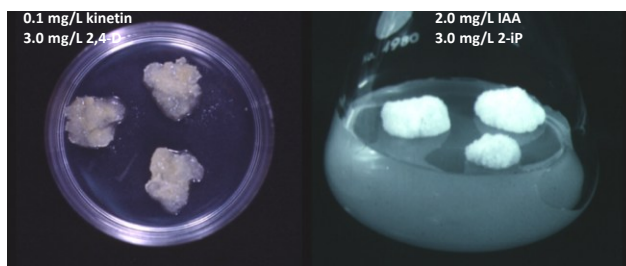
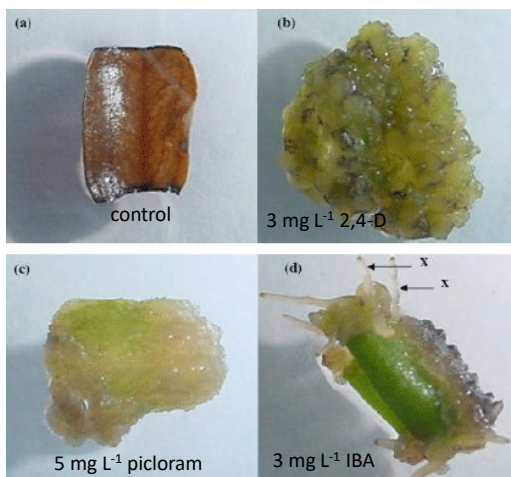
- ❑ **Održavanje** i rast: brze diobe stanica. Niski stupanj diferencijacije



- ❑ **Regeneracija** biljaka iz kalusa

Organogeneza ili somatska embriogeneza: regeneracija organa ili indukcija stvaranja somatskih embrija

Održavanje kalusne kulture



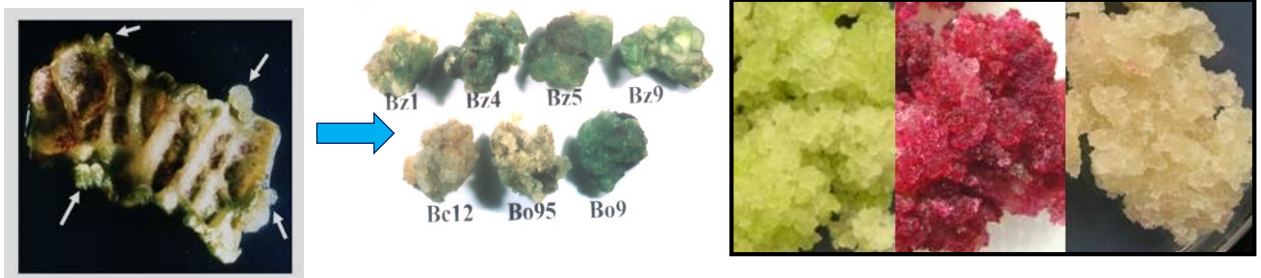
meki

čvrsti

Regulatori rasta značajno utječu na strukturu, prirast mase i staničnu diferencijaciju kalusa.

Supkultivacija kalusa provodi se nakon prirasta tkiva 4-6 X. Taj interval naziva se **PASAŽA**.

Kalusne se kulture razlikuju po intenzitetu rasta, boji, kompaktnosti i građi staničja. Na morfologiju utječe genotip i sastav medija.



- ☐ Stvaranje specijaliziranih stanica u kalusnom staničju nastaje KALUSNO TKIVO.
- ☐ Kalusno tkivo nije jednoliko, različita genetska aktivnost izvornih stanica može biti zadržana u kalusu pa nastaju fenotipski različite stanične linije.
- ☐ Neke stanice kalusa diferenciraju, a druge ostaju u dediferenciranom stanju i intenzivno se dijele.
- ☐ Manipulacijom hranjive podloge, uzgojnih uvjeta i pažljivom subkultivacijom uz odvajanje specijaliziranih linija možemo ustaliti linije kalusnog tkiva sa specijaliziranom funkcijom

☐ **Značajke kalusa određene su statusom stanica iz kojih je kalus induciran i promjenjive su (genetičke i epigenetičke promijene)!**