KBT2mb 2025

Hranjivi medij nastavak…

KRUTE PODLOGE

Agar

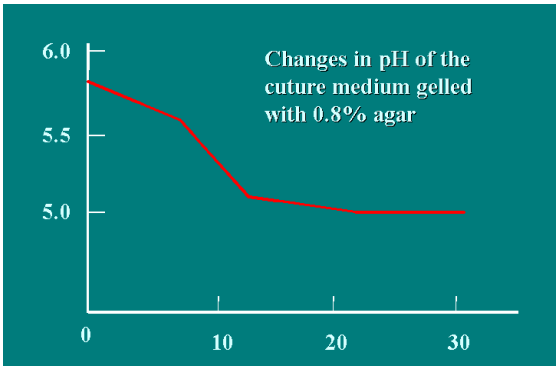
- polisaharid iz crvene alge (0.6 – 1%)
- različite čistoće na tržištu – značajno utječe na ishod eksperimenta
- skrutnjavanje ovisno o pH i koncentraciji soli
- otapa se na 100 °C, a skrutnjava na 45-50 °C

- ❑ **Gelrite ili Phytagel 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 filtar papira, pijesak, vata, staklena vuna…**

pH podloge

Obično 5,0-5,8

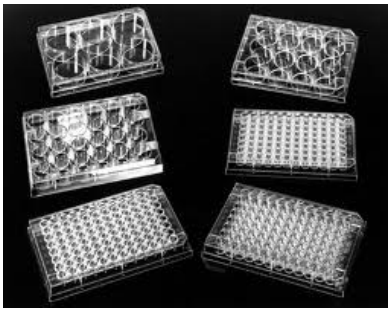
- Mjeri se kad su dodane sve komponente podloge.
- Ukoliko se radi o krutoj podlozi pH se mjeri prije dodavanja agara, jer bi agar mogao začepiti pH elektrodu!!!



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, filtar sterilizacija
  - Mnogobrojne komponente hranjive podloge (vitamini, antibiotici…) su termolabilni ili kompleksiraju, pa se steriliziraju hladnom sterilizacijom i naknadno dodaju u rashlađenu autoklaviranu smjesu

Za biljnu kulturu se koriste filtri 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 ± 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)

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 $\mu E/m^2s$ (E= Einstein)
Za uzgoj se koristi od 30-250 $\mu E/m^2s$ 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 citokinina 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

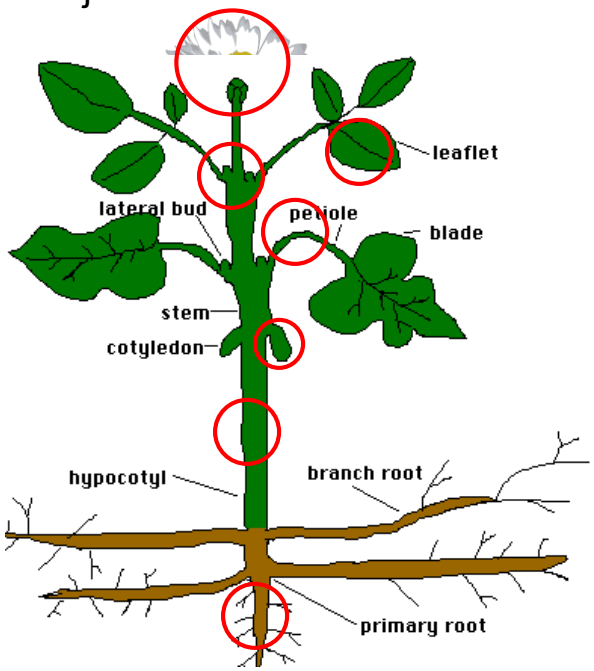
S ciljem što boljeg izjednačavanja sastava plinova posude za uzgoj zatvaramo vatenim čepovima – osiguravaju sterilnu izmjenu zraka

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.



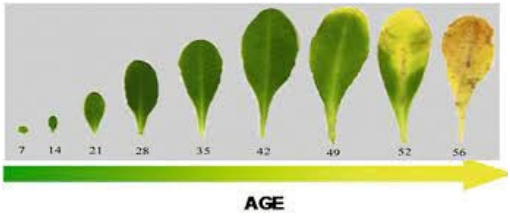
Eksplantat pogodan za kulturu biljnog tkiva

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



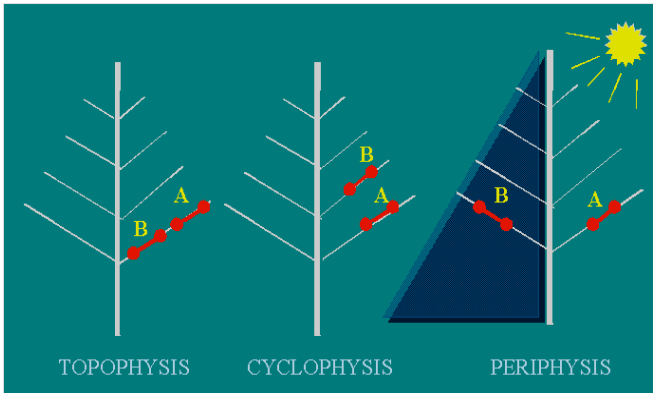
Najčešće korišteni eksplantati:

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

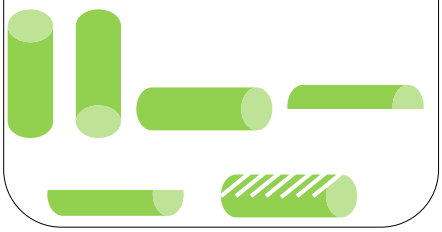
➢ Djelovanje različitih godina i sezone

➢ Uvjeti rasta

➢ Položaj eksplantata na biljci



➢ Način inokulacije eksplantata
➢ Ranjavanje



➢ Učinak uzgoja na dadilji

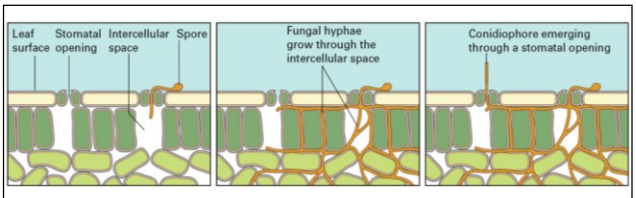
➢ Kondicionirana podloga- upotreba podloge u kojoj je kultivirano dobro rastuće tkivo

- 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.

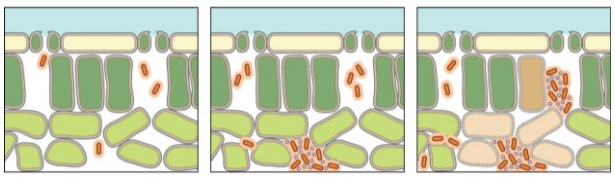
- Što je eksplantat manji medij za uzgoj je kompleksniji.

Prvi i osnovni zahtjev kulture biljnog tkiva: Uspostava aseptične kulture

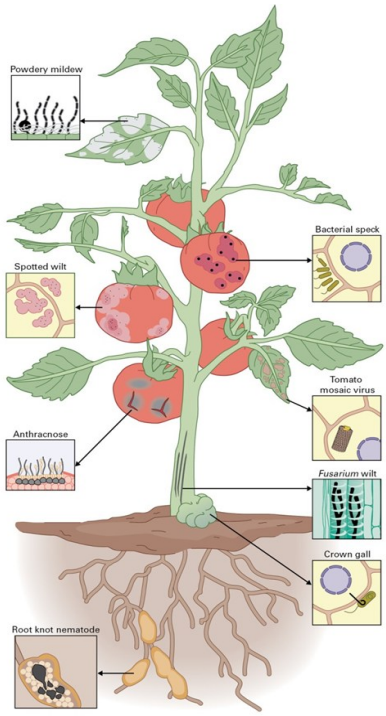
- Odabir pogodne biljke/biljnog materijala koji se uvodi u kulturu *in vitro*
- Odabir pogodnog eksplantata
- Sterilizacija biljnog materijala
- Uspostava aseptične kulture biljnih stanica/tkiva



•Germinacija spora na površini lista
•Hife ulaze kroz 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



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
- ❑ H_2O_2 – 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_2O_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

Uobičajeni postupak sterilizacije biljnog tkiva

70% EtOH

Sterilizacijsko sredstvo

Ispiranje sterilnom vodom

Nasađivanje na sterilni medij i uzgoj

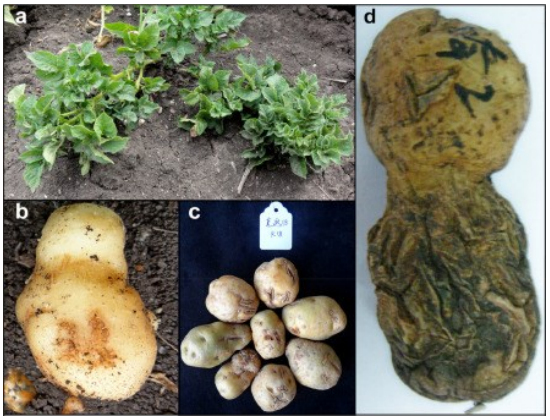
VIRUSNE INFEKCIJE SMANJUJU PRINOSE

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

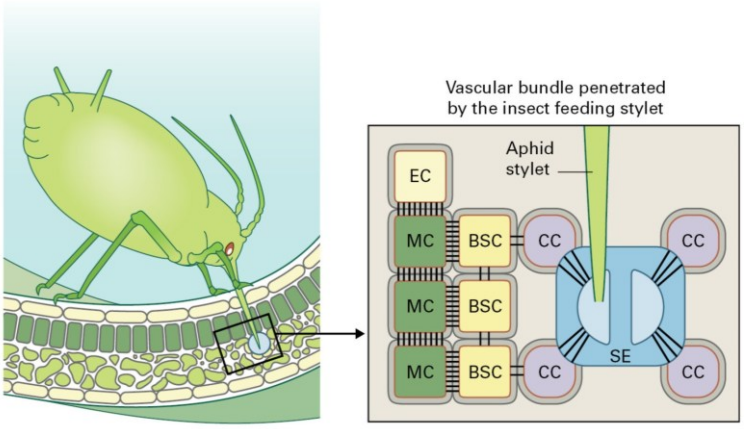
Strawberry field exhibiting stunting symptoms associated with SPaV in mixed infections with other viruses.

Candidatus Phytoplasma solani (Stolbur phytoplasma)

Potato Spindle Tuber Viroid



Unutarstanične infekcije: virusi, viroidi, fitoplazme

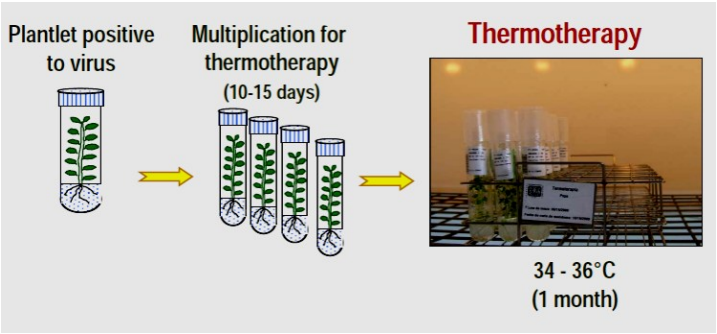


- Ulaze u biljku preko površinskih rana i/ili organizama koji ih prenose (npr. insekata)
- Virusi se ulaskom u floem brzo se šire kroz biljku
- Ne mogu prolaziti kroz plazma membranu, ali se lokalno šire plazmodezmijima
- Neravnomjerna distribucija u biljkama

UNUTARSTANIČNA STERILIZACIJA I OZDRAVLJIVANJE BILJAKA

Za eliminaciju virusa, viroida i fitoplazmi…

A. Termoterapija - smanjuje koncentraciju virusnih čestica



- 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

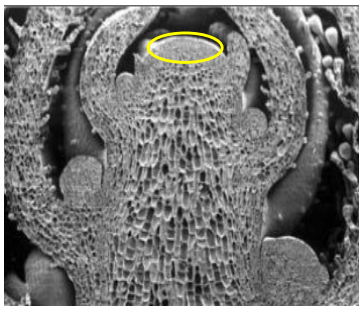
- Za uklanjanje viroida koristi se izlaganje sniženoj temperaturi (5-8 °C)

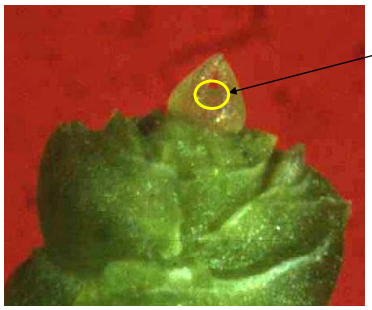
UNUTARSTANIČNA STERILIZACIJA

Za eliminaciju virusa, viroida i fitoplazmi…

B. Korištenje kulture meristema

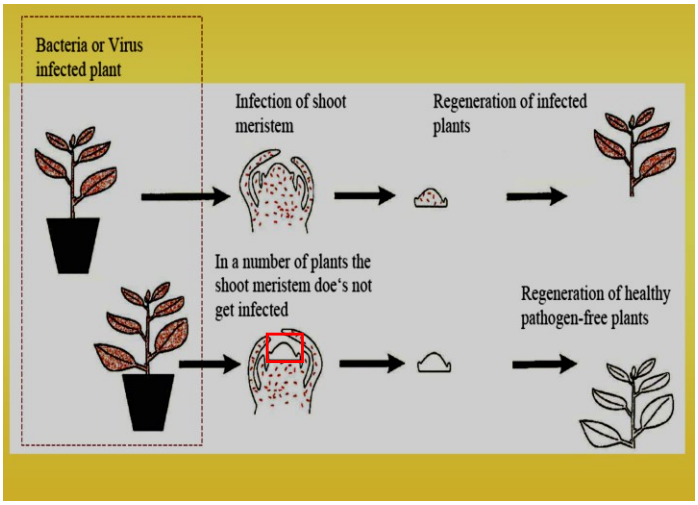
- Dijelovi biljke koji ne sadrže provodna tkiva imaju znatno manju zastupljenost virusa
- Najmanje virusa u meristemu vrha izdanka i korijena, zbog visoke koncentracija hormona u meristemu, te zbog intenzivnih staničnih dioba
  - Meristem se izolira i nasađuje na hranjivi medij te se regenerira kompletna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





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

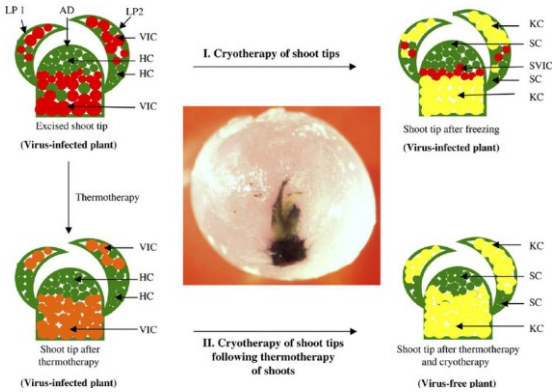
UNUTARSTANIČNA STERILIZACIJA

Za eliminaciju virusa, viroida i fitoplazmi…

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

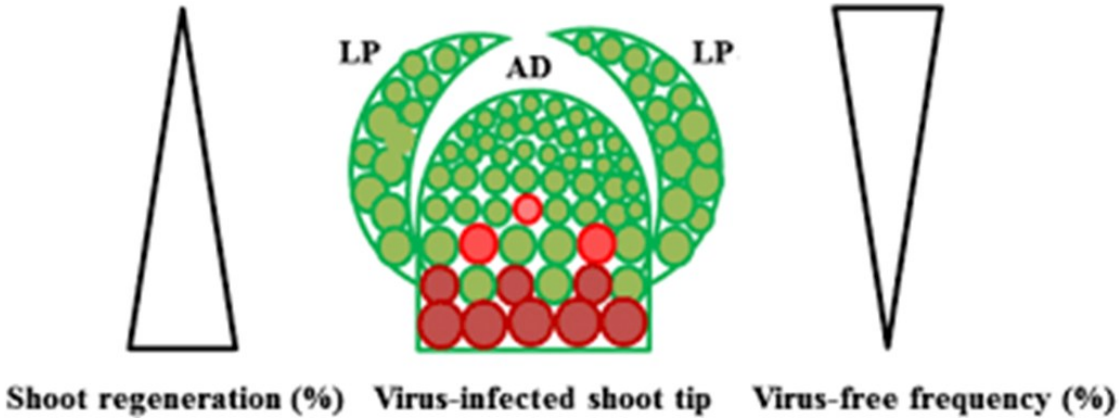
Npr. acikloguanosin, azidotimidin, aciklovir, ribavirin (virazol), itd.

D. Krioterapija, ili zamrzavanje vegetacijskog vrška u tekućem N_2.
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



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

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

Različite vrste kultura biljnih tkiva

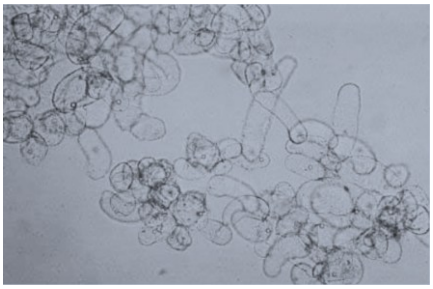
- **Kultura kalusa**
- **Kultura stanica u suspenziji**
- **Kultura embrija**
- **Kultura sjemenki**
- **Kultura protoplasta**
- **Kultura organa**
- **Kultura pojedinačne stanice**
- **Kultura polena**
- **Kultura antera**

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**.

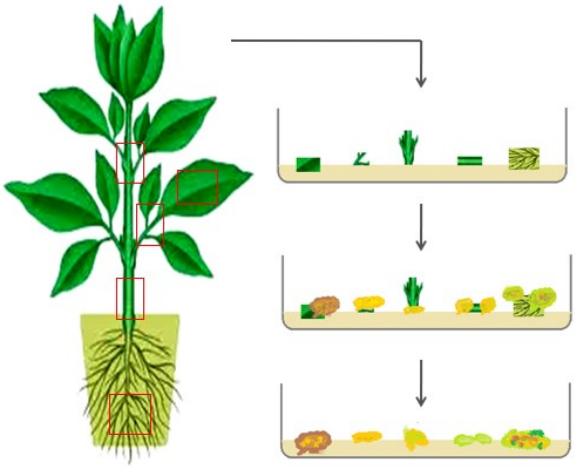
U prirodi mu je uloga zaštita ozlijeđenog mjesta.

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



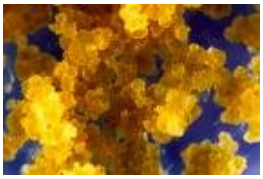
- Kultura kalusa prvi put je inducirana 1920-ih.
- Kultura kalusa je ključni dio gotovo svakog biokemijskog, fiziološkog i genetičkog eksperimenta.
- Kultura kalusa izvrstan je način za postizanje genetičke varijabilnosti u biljkama.
- Kalus se koristi za postavljanje kulture stanične suspenzije, *in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

Indukcija kalusa

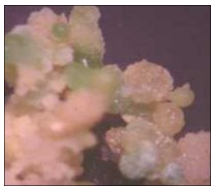


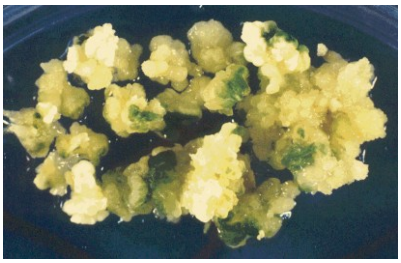
Kalus se može potaknuti na svim tipovima eksplantata. Pogodnije je mlado tkivo.

Fenotipski različite stanice mogu dati fenotipski i morfološki drugačiji kalus.



Kalus *in vitro*



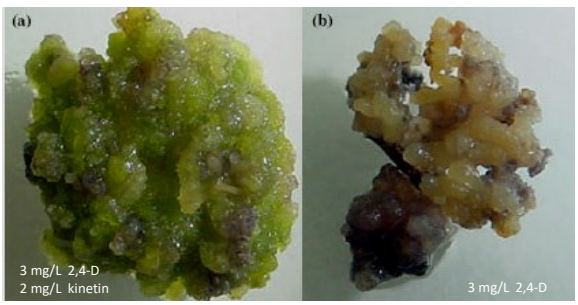


Razlozi razvoja/proliferacije kalusa

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 incijaciju 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.

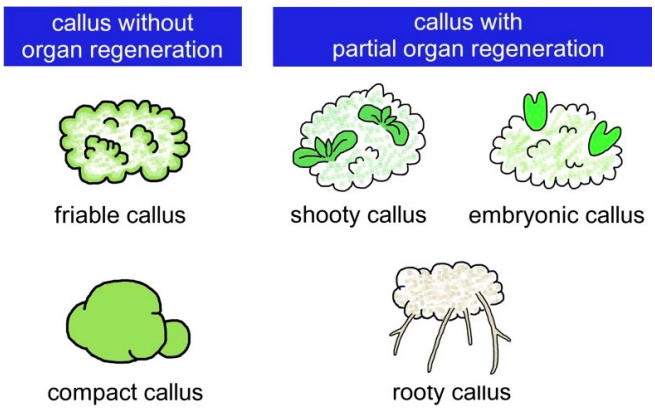
Iz stanica kalusa moguće je potaknuti razvoj izdanaka, korijena ili embrija



Kalus sadrži:

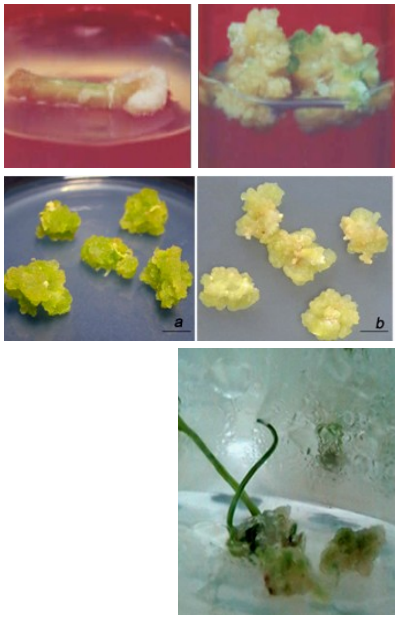
- ❑ Totipotentne stanice
- ❑ Nediferencirane stanice – meristemske, male, okrugle stanice s malim vakuolama
- ❑ Diferencirane stanice – specifični tipovi stanica s točno određenom funkcijom, veće, vakuolizirane stanice, dijelovi provodnih elemenata, vršakovi korijena

- ❑ 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

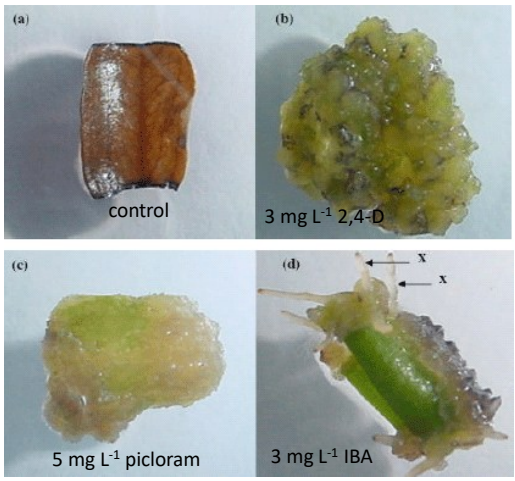
Tri stadija kulture kalusa

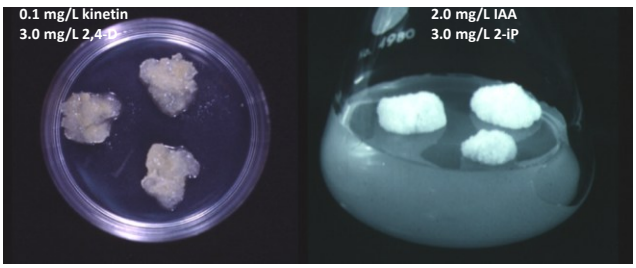


- **Poticanje**/indukcija kalusa: stanice eksplantata su inducirane na diobu
- **Održavanje** i rast: brze diobe stanica. Niski stupanj diferencijacije
- **Regeneracija** biljaka iz kalusa

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

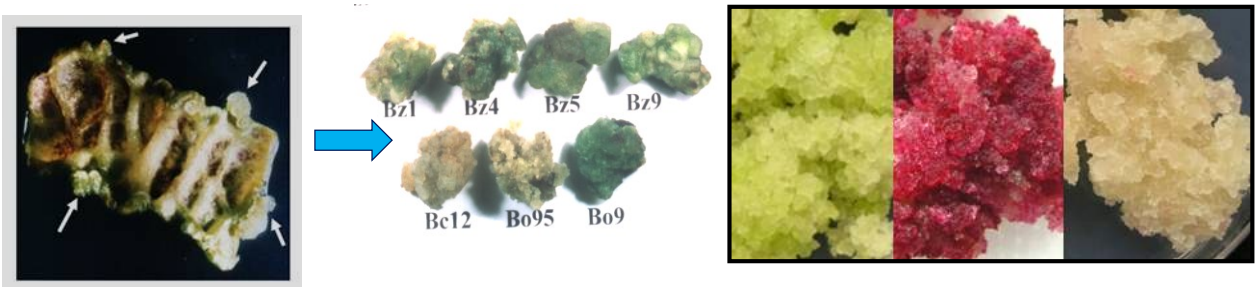
Održavanje kalusne kulture





meki čvrsti

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