

Jméno:

Datum:

### Téma 1: Iniciace kalusové kultury mrkve *Daucus carota ssp. sativus*

Na segmentech různých orgánů většiny dvouděložných rostlin, obzvláště pokud jsou v segmentech přítomny meristematické buňky primárního nebo sekundárního meristému (stonkový nebo kořenový apikální meristém, kambium, felogén), se po inokulaci do vhodného média začnou buňky poměrně rychle dělit a vznikají neorganizované shluky buněk, tzv. kalus. Méně často se na tvorbě kalusu podílejí zralé, diferencované buňky.

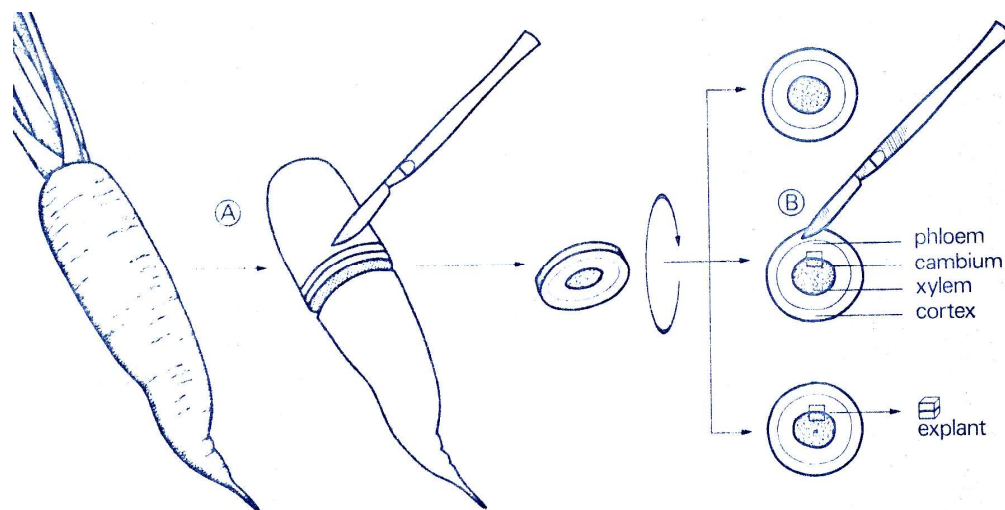
Materiál: kořeny mrkve (karotky) *Daucus carota ssp. sativus* (Hoffm.) Arcang.

Pomůcky:

Médium: **1D** = M-S ztužené 0,7% agarem s přidavkem auxinu 2,4-D (0,1 mg/l)

Postup práce:

1. Odstranit všechny nemocné, poškozené nebo nepravidelně utvářené kořeny.
2. Vydrhnout kořeny mrkve malým kartáčkem a mýdlem pod tekoucí vodou, odstranit veškeré povrchové nečistoty.
3. Segmenty kořenů asi 10 cm dlouhé desinfikovat ve 20% roztoku SAVO v SDV (v/v) za mírného míchání 20 minut (třepačka)
4. Oplachování 3x po dobu 3 minut v SDV, pro dostatečné odstranění desinfekčního roztoku
5. Přenos desinfikovaných segmentů ožihanou pinzetou do sterilní Petriho misky
6. Sterilně v laminárním boxu ožihaným skalpelem odříznout z každé strany kořenového segmentu 1 cm a segment přenést do další Petriho misky.



7. Krájejte příčné řezy kořenem o tloušťce asi 2 mm a z nich připravte díly o velikosti asi 5x5 mm tak, aby obsahovaly ve střední části kambium. Velikost a tloušťka explantátů by měla být jednotná. Tento postup opakujte, až získáte dostatečný počet explantátů pro pokus. Po každé manipulaci uzavírejte víčko Petriho misky.
8. Ožihnete okraj alobalového krytu a po jeho sejmutí i okraj zkumavky. Do každé zkumavky vložte 4 explantáty bazální řeznou plochou do agarového média D1 (M-S, 2% sacharóza, 0,1 mg/l 2,4-D, 0,7% agar).
9. Mezi jednotlivými operacemi odkládejte skalpel a pinzetu do 96% ethanolu a opakovaně nástroje ožehávejte. Každý připraví 20 explantátů.

10. Po inokulaci ožehněte opět okraj zkumavky a uzavřete krytem z alobalu a znovu ožehněte.
11. Zaznamenejte si počet segmentů v kultuře (v kultivační nádobě a počet nádob).
12. Zkumavky umístěte do termostatu a kultivujte ve tmě při teplotě 25°C.

Hodnocení:

V následujících týdnech kontrolujeme čistotu kultur a vyhodnotíme četnost segmentů, na kterých došlo k iniciaci tvorby kalusu.

Téma 2: Pasážování kalusové kultury mrkve *Daucus carota ssp. sativus*

Za 4 týdny se většinou na explantátu vytvoří výrazný kalus a každý explantát by měl být rozdělen na 2 – 3 části ne menší než 5 x 5 mm a přenesen na čerstvé médium. Buňky na spodní straně explantátu jsou často nekrotické a nejsou vhodné pro další kultivaci. Tyto nekrotické části oddělte a odstraňte.

Pomůcky:

Postup:

1. Přenést kultury z termostatu do laminárního boxu.
2. Ožehnout alobal a po jeho sejmutí i okraj zkumavky.
3. Ožíhanou pinzetou vyjmout explantát a přenést jej do sterilní Petriho misky.
4. Po rozdělení inokulovat explantáty do zkumavky s čerstvým médiem.
5. Ožehnout hrdlo zkumavky a dobře uzavřít alobalem.

Plánovaný postup	Dny od počátku pokusu
Izolace čerstvých explantátů z kořene	0
První pasáž	28
Výrazná proliferace kalusu	42 – 48
Izolace vlastního kalusu	91 – 98
Perioda pasážování kalusu	4 týdny

Výsledky:

Zaznamenejte do protokolu detaily pokusu – datum počátku iniciace kalusové kultury, počet explantátů, počet kultur, četnost infekcí, různé použité postupy. Kultury kontrolujte v pravidelných týdenních intervalech a zaznamenejte změny v morfologii.

Otázky:

1. Ze kterého pletiva primárního explantátu pochází kalus?
2. Rostou všechny explantáty stejně? Jaké důvody mohou vést k rozdílnému vývoji explantátů?

Literatura:

Reinert J. et Yeoman M.M. (1982) Plant Cell and Tissue Culture. – Springer-Verlag, Berlin