



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDEM
A STÁTNÍM ROZPOČTEM ČESKÉ REPUBLIKY

Jméno:

Datum:

Téma 11: Kryoprezervace izolovaných meristémů brambor

Kryoprezervace je neletální skladování pletiv při ultranízkých teplotách. Využívá se pro minimalizace růstu a vývoje *in vitro*, k uchování životaschopnosti a genetické stability šlechtitelských materiálů, k zachování plného vývojového a funkčního potenciálu materiálu i pro šetření pracnosti manipulací. Jednou z používaných metod je kryoprezervace s použitím **enkapsulace a dehydratace** (Benson 1993). K enkapsulaci se používá alginát sodný. Touto metodou lze enkapsulovat izolované meristémy, kalusy, suspenzní kultury apod.

Obecný postup při enkapsulaci/dehydrataci (Benson 1993)

1. Kultura prýtů
- ↓
2. Aklimatizace kultury (nižší teplota, vyšší osmotická hodnota média)
- ↓
3. Izolace meristémů
- ↓
4. Přenos meristémů do 3% alginátu
- ↓
5. Nasátí alginátu s meristémy do špičky pipety
- ↓
6. Kapání kapek do roztoku s Ca^{2+} ionty
- ↓
7. Polymerace alginátu (enkapsulace)
- ↓
8. Přenos alginátových kuliček s meristémy do roztoku sacharózy (dehydratace, 1-5 dní)
- ↓
9. Vysušení na Petriho misce v proudu vzduchu (laminární box, 1-4 hod)
- ↓
10. Rychlé zmrazení v tekutém dusíku (-196°C)
- ↓
11. Rychlé rozmrazení (vodní lázeň 37°C)
- ↓
12. Testování životaschopnosti materiálu

Testování vlivu izolace a enkapsulace na životaschopnost meristémů *Solanum tuberosum*

Při používání metody kryoprezervace je nutno pro každý rostlinný materiál otestovat jednotlivé kroky, aby bylo jisté, zda některý z nich nezpůsobuje ztrátu životaschopnosti materiálu. Tímto postupem ověříme, zda izolace a enkapsulace meristému nebude pro ně letální.

Materiál:

Kultura prýtů *Solanum tuberosum*, 3% alginát sodný v médiu bez Ca^{2+} iontů, 0,1M $\text{Ca}^{2+}\text{Cl}_2$, Petriho misky s navlhčeným filtračním papírem, skalpel a pinzeta, kahan, laminární box, preparační mikroskop, automatická pipeta, sterilní modré špičky se seříznutou špičkou

Postup:

(body 3. – 7. z výše uvedeného pracovního schématu)

1. Z prýtů sterilní kultury *Solanum tuberosum* izolujte na navlhčeném filtračním papíru s použitím preparačního mikroskopu axilární meristémy.
2. Izolované meristémy vložte do roztoku alginátu sodného.
3. Pipetou se seříznutou modrou špičkou nasajte alginát s meristémy.
4. Kolmo postavenou pipetou pomalu odkapávejte alginát do roztoku $\text{Ca}^{2+}\text{Cl}_2$, tak aby se vytvářely kapky s centrálně umístěným meristémem.
5. Ponechte 30 minut polymerizovat.
6. Vytvořené kuličky alginátu obsahující meristém přeneste na povrch M-S media do Petriho misky.

Hodnocení

V následujících týdnech vyhodnoťte růst meristému.

Literatura:

- Benson E. E. (1993): Cryopreservation. – In Dixon R.A. and Gonzales R.A. /Eds. /: Plant Cell Culture: A Practical Approach. - ILR Press, Oxford University Press.
- Kováč J. (1995): The use of *in vitro* methods for plant genetic conservation (Využití kultur *in vitro* k uchování genových zdrojů rostlin). – Zahradnictví, 22: 143 – 148.