

Úvod do studia vlivu toxických látek na rostliny

Praktikum 1 – Vliv léčiv na růst *Lemna minor*.

Praktikum 2 – Využití BY-2 k posouzení fytotoxicity léčiv

Anotace: Cílem obou úloh je posouzení vlivu nesteroidního protizánětlivého léčiva (diklofenak (DCF), naproxen (NPX)) při zvyšujícím se stupni zatížení prostředí na růst rostlin jak na úrovni celého organismu (*Lemna minor*), tak i na úrovni buňky (suspenze *Nicotiana tabacum* BY-2). *L. minor* je využívána v oficiálních testech fytotoxicity (OECD, US EPA). Koncentrační řada léčiv simuluje běžné až vyšší zatížení prostředí.

Praktikum 1 - Vliv léčiv na růst *Lemna minor*.

Provedení:

- 1) Příprava Steinbergova kultivačního média (SM) pro *L. minor*: výpočet potřebného objemu média (2 L), příprava ze zásobních roztoků, úprava pH.
- 2) Příprava roztoků léčiv: výpočet navážky, příprava zásobního roztoku, ředění v SM médiu na aplikované koncentrace (0, 0,01, 0,1, 1 a 10 mg/L).
 - **Zásobní roztok:** navážit 10 mg léčiva, rozpustit v 2 mL acetonu, přidat 5 mL dest. H₂O, doplnit do 100 mL SM médiem
 - **Konc. 10 mg/L:** odpipetovat 10 mL do 100 mL baňky, doplnit SM médiem
 - **Konc. 1 mg/L :** z roztoku 10 mg/L odpipetovat 10 mL do 100 mL baňky, doplnit SM médiem
 - **Konc. 0.1 mg/L :** z roztoku 1 mg/L odpipetovat 10 mL do 100 mL baňky, doplnit SM médiem
 - **Konc. 0.01 mg/L :** z roztoku 0.1 mg/L odpipetovat 10 mL do 100 mL baňky, doplnit SM médiem
 - **Konc. 0 mg/L :** kontrola, pouze SM médium
- 3) Příprava kultivačních destiček: popis, napipetování (10 mL/jamka) příslušných roztoků
- 4) Umístění rostlin: 6 lístků do každé jamky (1 rostlina = 1 lístek)
- 5) Kultivace: 7 dní při teplotě 23±2°C, fotoperiodě 14/10, ozáření 200 μmol/m².s
- 6) Vyhodnocení: fotodokumentace pro výpočet listové plochy, stanovení počtu rostlin, stanovení čerstvé hmotnosti a sušiny, doplnění hodnot do výsledkové tabulky.
- 7) Vypracování protokolu: Průměrné hodnoty ze všech sledovaných parametrů budou prezentovány v protokolu v tabulkách a grafech. Bude formulován Závěr.

Praktikum 2 – Využití BY-2 k posouzení fytotoxicity léčiv

Zvoleným modelovým organismem je tabáková buněčná suspenze BY-2, iniciovaná z kalusu založeného na tabáku *Nicotiana tabacum* L. cv. „Bright Yellow 2“. Díky svým charakteristickým vlastnostem, jako je např. tvorba dlouhých vícebuněčných řetízků, mimořádně vysoká rychlost růstu, viabilita a vysoká homogenita buněk, se stala velmi populárním modelem pro studium buněčné biologie a biochemie na vyšších rostlinách. Využívá se např. pro studium PCD, studium biosyntetických drah různých látek, produkce sekundárních metabolitů, signalizace v rostlinných buňkách, regulace buněčného cyklu a projevů genové exprese.

Základními parametry, kterými lze hodnotit vliv stresového faktoru na buněčnou suspenzi jsou stanovení její viability (životaschopnosti) vyjádřené poměrem živých a mrtvých buněk, a sledování změn hustoty suspenze (celkový počet buněk). Test viability lze využít i při kontrole životaschopnosti buněk během kultivace. Princip je založen na intaktnosti a selektivní propustnosti cytoplazmatické membrány živých buněk. K barvení se používají netoxická barviva.

A. Provedení testu viability

1) Příprava roztoků **léčiva DCF**: výpočet navážky pro koncentráty, ředění na aplikované koncentrace (0, 0,001, 0,01, 0,1 a 1 mg/L).

- **Zásobní roztok**: navážit 5 mg léčiva, rozpustit v 2 mL acetonu, doplnit dest. H₂O do 100 mL
- **Konc. 1 mg/L**: odpipetovat 10 mL ze zásobního roztoku do zkumavky
- **Konc. 0.1 mg/L**: z roztoku 1 mg/L odpipetovat 1 mL do zkumavky, doplnit doplnit dest. H₂O do 10 mL
- **Konc. 0.01 mg/L**: z roztoku 0.1 mg/L odpipetovat 1 mL do zkumavky, doplnit doplnit dest. H₂O do 10 mL
- **Konc. 0.001 mg/L**: z roztoku 0.01 mg/L odpipetovat 1 mL do zkumavky, doplnit doplnit dest. H₂O do 10 mL
- **Konc. 0 mg/L**: kontrola, pouze 10 mL dest. H₂O
- **Všechny výsledné roztoky sterilně zfiltrovat přes stříkačkové filtry !!!**

2) Předkultivace suspenze BY-2: příprava baněk s čerstvou suspenzí (22 ml média + 2.5 ml suspenze), kultivace po dobu 4 dnů při 27°C ve tmě.

3) Expozice suspenze: přidání příslušné koncentrace léčiva DCF (0,5 ml), inkubace po dobu 1 hod.

4) Příprava suspenze k pozorování: odběr suspenze (5 ml), naředění suspenze (5-10x) kultivačním médiem.

5) Barvení suspenze: odebrat 50 µL suspenze do mikrozkušavky, přidá se 10 µL roztoku propidium jodidu (PI), 3 µL roztoku fluorescein diacetátu (FDA), promíchá se a 3 minuty se inkubuje.

6) Pozorování: Pasteurovou pipetou se odebere kapka suspenze na podložní sklo počítací komůrky. Po přikrytí krycím sklem se ve fluorescenčním mikroskopu pozoruje poměr živých (zelených) a mrtvých (červených) buněk v zorném poli (filtr FITC). Vyfotí se zorná pole a následně se na fotografiích zjišťují počty živých (zelených) a mrtvých (červených) buněk v mřížce. Počítá se pouze každá druhá mřížka (počítací rámeček!).

7) Vyhodnocení: z dat se vypočítá poměr živých a mrtvých buněk. Získané výsledky prezentujte formou grafu.

Cvičení z Fyziologie rostlin pro pokročilé

B. Stanovení hustoty suspenze

- 1) Příprava roztoků **léčiva DCF**: výpočet koncentrace pro koncentráty, ředění na aplikované koncentrace (0, 0,001, 0,01, 0,1 a 1 mg/L), viz výše.
- 2) Založení experimentu: napipetování 22 ml média + 2.5 ml suspenze + 0.5 ml příslušného koncentrátu léčiva.
- 3) Kultivace suspenze: 4 dny na třepačce při 27°C ve tmě.
- 4) Příprava suspenze k pozorování: odběr suspenze (5 ml), naředění médiem (2 až 10x).
- 5) Pozorování: Pasteurovou pipetou se odebere kapka suspenze na podložní sklo počítací komůrky, přikryje krycím sklem a pozoruje pod světelným mikroskopem. Vyfotí se zorná pole a následně se na fotografiích zjišťují počty buněk. Počítá se pouze každá druhá mřížka (počítací rámeček!!).
- 6) Vyhodnocení: přepočet počtu buněk s ohledem na ředění na počet buněk v 1 ml suspenze, výsledky prezentovat formou grafu.

Závěr: Ze získaných výsledků porovnejte odezvu rostlinných organismů na úrovni celých rostlin a buněk.