

# Bi6120 Rostlinné explantáty 2.

Základní podmínky  
kultivace *in vitro*

Požadavky na vybavení laboratoře

# Základní podmínky kultivace *in vitro*

- aseptická kultura → nutnost sterilizace a desinfekce
- vhodná výživa explantátu → živná média
- vhodné fyzikální podmínky
  - osvětlení (intenzita, fotoperioda...)
  - teplota
  - koncentrace plynů
  - vlhkost vzduchu

# Sterilizace a desinfekce

## ► A. Fyzikální

- mechanická a elektrostatická  
vzduch očkovacích boxů (laminární, 2. třída)  
filtrace termolabilních látek - filtry:
  - skleněné (frity G5, S4)
  - membránové (Seitz, Millipore, Sartorius) 0,22mm
- UV záření (kultivační místnosti, boxy)
- teplota
  - suché nebo vlhké teplo



**Millipore®**  
**Filtration**



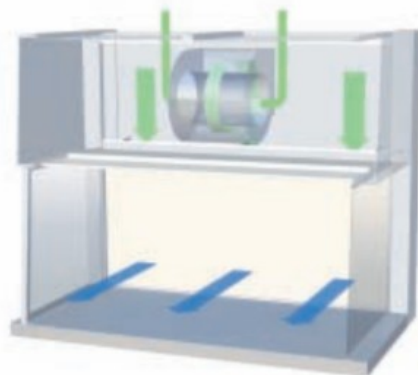
# Laminární box, flowbox, očkovací box

- ▶ Pro zajištění sterility prostředí
- ▶ Vzduch je veden přes HEPA filtr a plynulým laminárním prouděním směrem k uživateli
- ▶ Obvykle z nerezavějící oceli bez mezer nebo spojů, kde by se mohly usazovat spory
- ▶ Horizontální a vertikální

---

## HAAF horizontal flow

- Open-fronted cabinet
- Germicidal UV, power outlet and front cover standard fitting



## VLAF vertical flow

- Increased work zone height and depth
- Germicidal UV, power outlet and front cover standard fitting
- Less airflow turbulence when large objects are placed in work zone



**horizontální:**

**FATRAN (JZD Pokrok Žilina)**

**GELAIRE (AV ČR Poříčí)**

**• vertikální:**

**UNIFLOW (z Kolína/n. R.)**

**GELAIRE, AURA (v A2)**

**FATRAN - laminární box I. tř.**

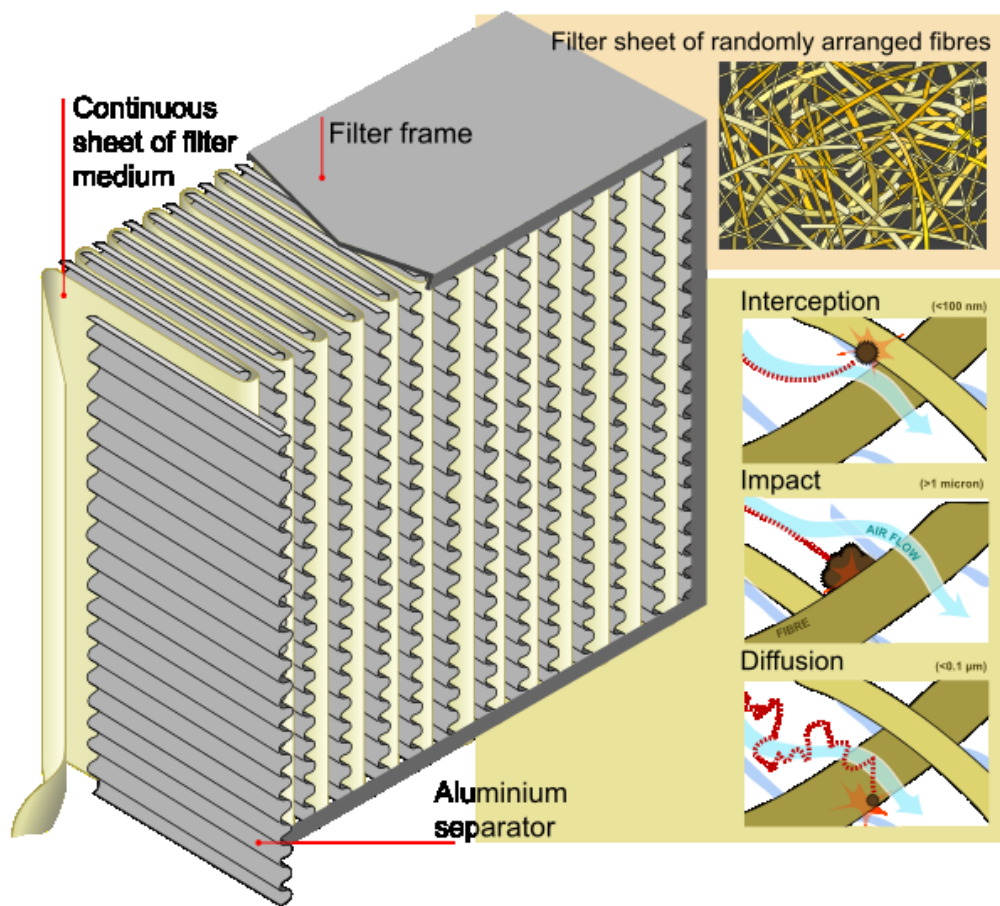
- ochrana vzorku, vodorovné proudění. Nerezová konstrukce.
- Osvětlení pracovní plochy. Použitý, zachovalý, po kontrole a údržbě.
- Vysokonapěťový ionizační filtr, uhlíkový filtr, předfiltr.
- **Nabídková cena 22.000 Kč**



<http://www.labo-ms.cz/pouzite-laboratorni-vybaveni/laminarni-boxy/337>

# HEPA - filtr

„High Efficiency Particulate Air“



Mechanisms zadržení částic

1. efekt síta = **velké částice**
2. **menší částice** = inertní k proudění
3. **nejmenší částice** = Brownův pohyb

<https://en.wikipedia.org/wiki/HEPA>

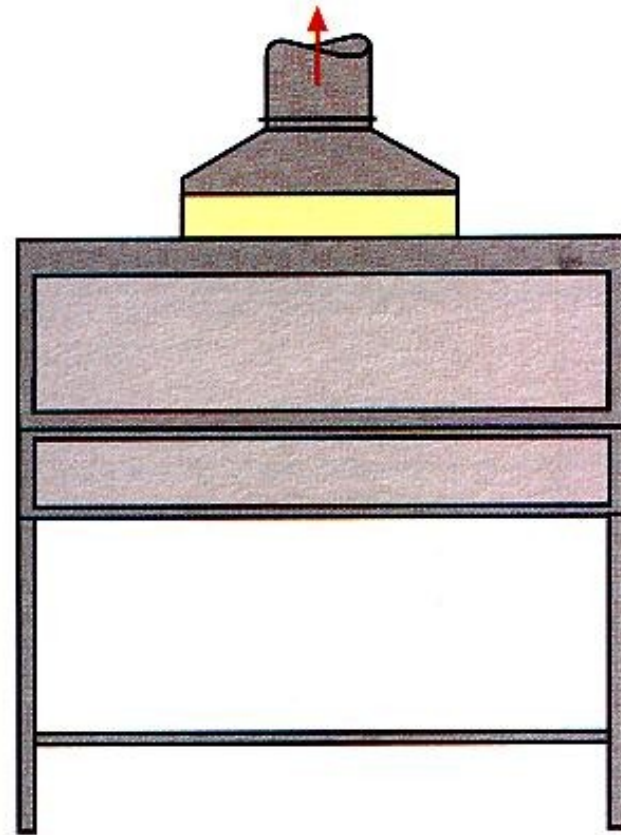


bakterie a  
kvasinky na  
lidském jazyku

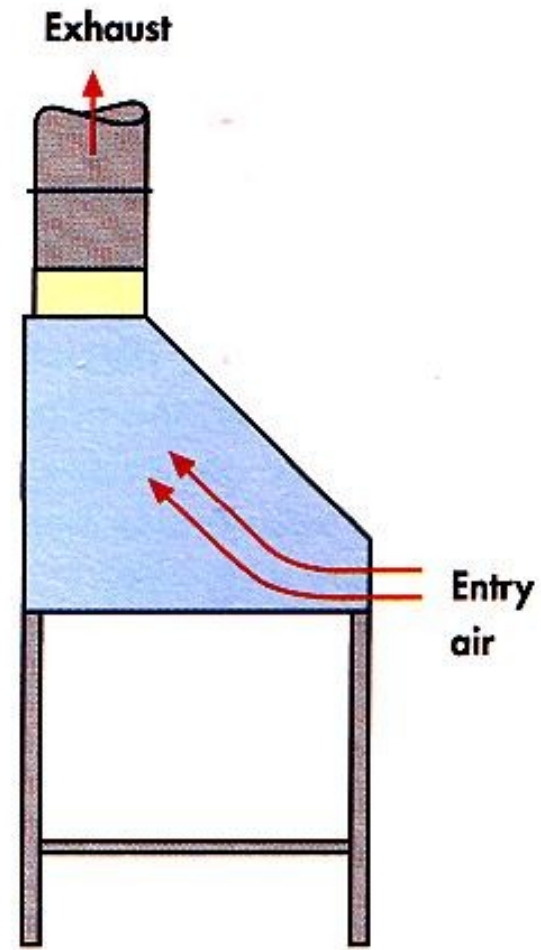


# Očkovací box 1. bezpečnostní třída (digestoř)

Class 1



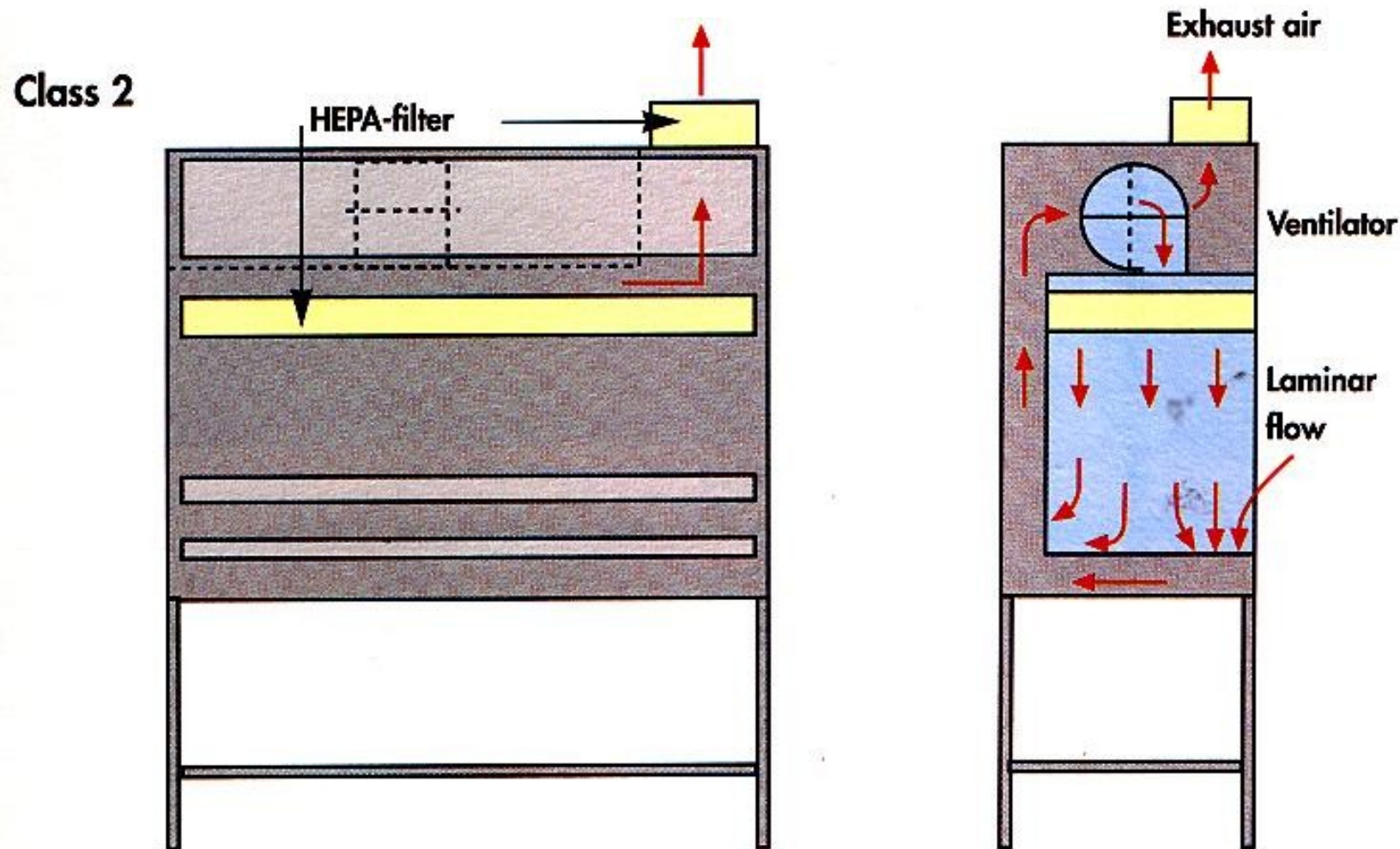
HEPA-filter



box nezajišťuje podmínky pro sterilní práci

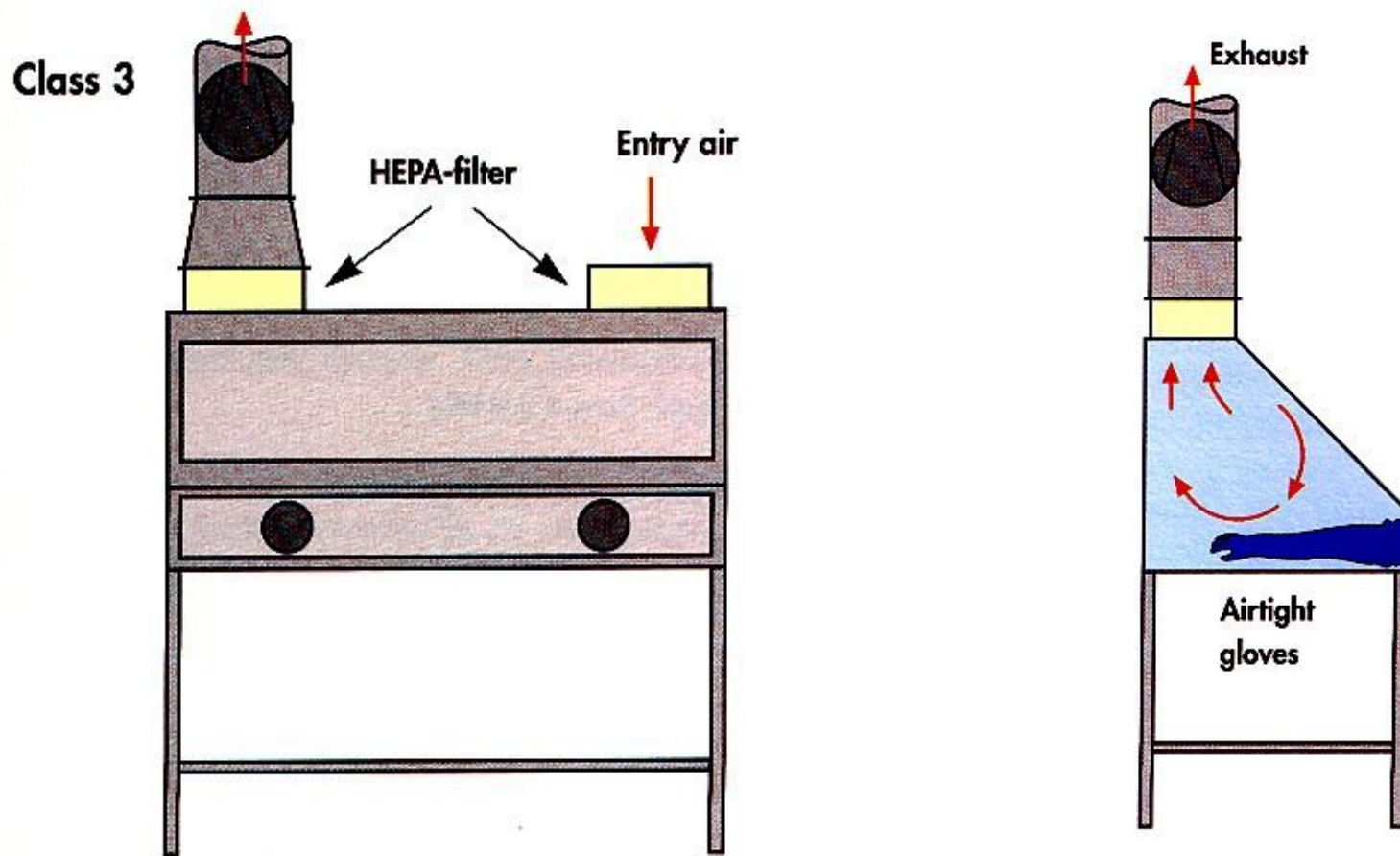


# Očkovací box 2. bezpečnostní třída



GELAIRE, AURA – je možné pracovat i s GMO

# Očkovací box 3. bezpečnostní třída



užití pro práci s vysoce infekčními, toxickými nebo radioaktivními materiály apod.

# Sterilizace teplem

## suché teplo

120 - 170°C

- horkovzdušné sušárny
- kahan
- sterilizační přístroj

sklo, nástroje

## vlhké teplo

voda, živná média, roztoky, filtrační papír

normální tlak

- zavařovací hrnec
- Kochův sterilizační přístroj

vodou chlazený plášť



zvýšený tlak

- tlakový hrnec
- autokláv

**100kPa, 121°C**



## Sterilizace při zvýšeném tlaku vztah mezi teplotou a tlakem

<b>°C</b>	<b>115</b>	<b>120</b>	<b>134</b>	<b>143</b>
<b>kPa</b>	<b>70</b>	<b>100</b>	<b>200</b>	<b>300</b>

(autokláv Chirana, PS 20)

## Minimální doba pro sterilizace médií v autoklávu (katalog Sigma)

objem média /ml/	doba /min/	teplota /°C/
20 - 50	20	121
50 - 500	25	121
500 - 5 000	35	121
prázdné sklo filtr. papír	30	130

## Změny v médiu při autoklávování (Pierik 1987)

- snižování pH o 0,3 - 0,5
- štěpení sacharózy → glukóza a fruktóza
- při dlouhé době → precipitace solí  
depolymerace agaru
- rozklad termolabilních látek

zeatin, GA, etylén

kolchicin

antibiotika

rostlinné extrakty



# Sterilizace a desinfekce

## B. Chemická

**Oxidace** - látky uvolňující:

a) kyslík ( $H_2O_2$ , Persteril)

b) element. halogeny (chlorové vápno, chlornany  
Chloramin B, SAVO, Ajatin, Decidin)

**Koagulace bílkovin ionty kovů** - Hg, Sn, Ag

Sublimát  $HgCl_2$ , Famosept SPOFA

**Detergencia** - snížení povrch. napětí, smáčení  
hydrofóbních povrchů a poškození membrán  
(70% EtOH, Citowet, Tween, Triton-X100,  
Jar)

# Povrchová desinfekce semen

Uzavření semen do epruvety nebo gázy

**1. roztok:** 50 ml sterilní destil. vody      **1 minuta**  
50 ml 96% EtOH  
10 ml 30% peroxidu vodíku

Oplach sterilní destil. vodou


**2. roztok**      20% SAVO (v/v)      **15 - 20 minut**

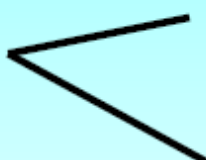

3x oplach sterilní destil. vodou      **vždy 3 - 5 minut**

Výsev na Petriho misky

**buničitá vata, skleněné perly + voda, médium**

# Fyzikální podmínky kultivace

**osvětlení**  intenzita, vlnová délka, fotoperioda  
tma

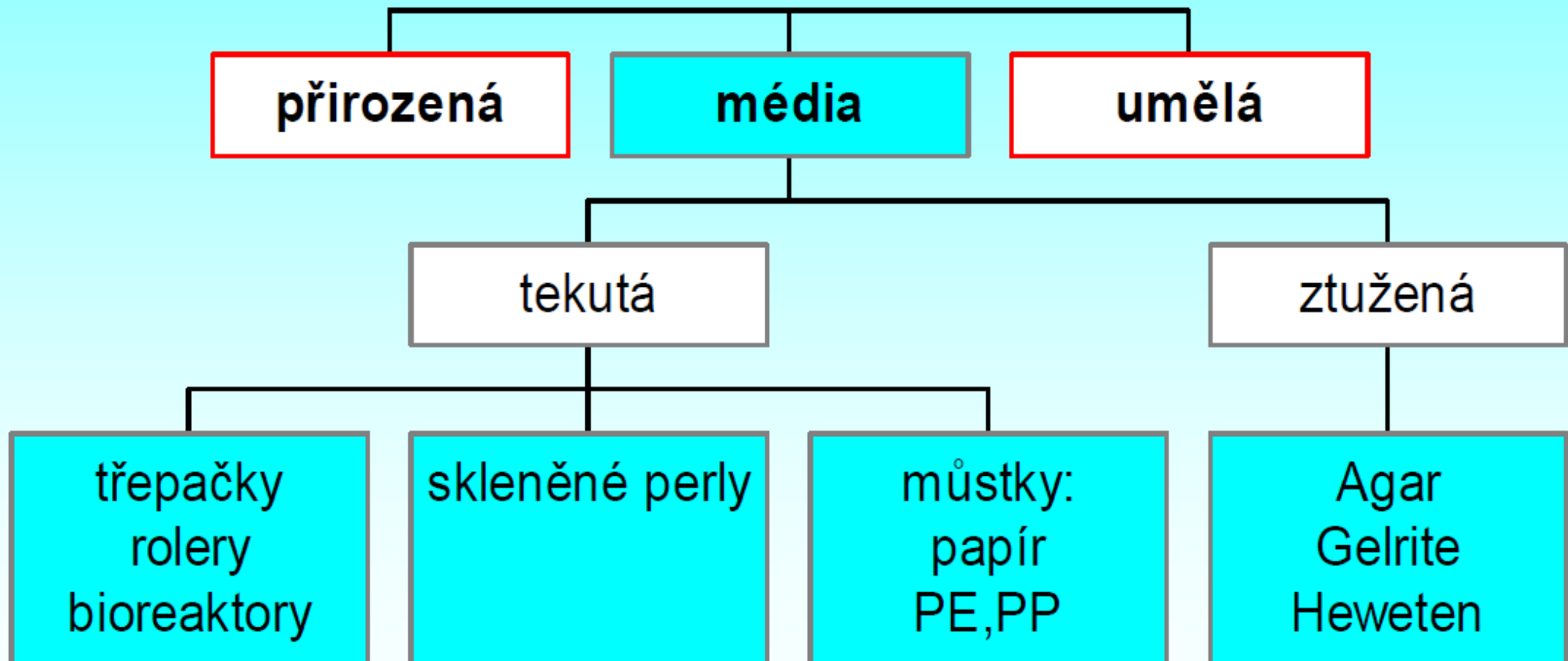
**teplota**  konstantní  klimatizace  
kolísavá (den x noc)

**koncentrace plynů:**  $\text{CO}_2$ , etylén

**vlhkost vzduchu**

  
 těsnost uzavírání  
kultivačních nádob

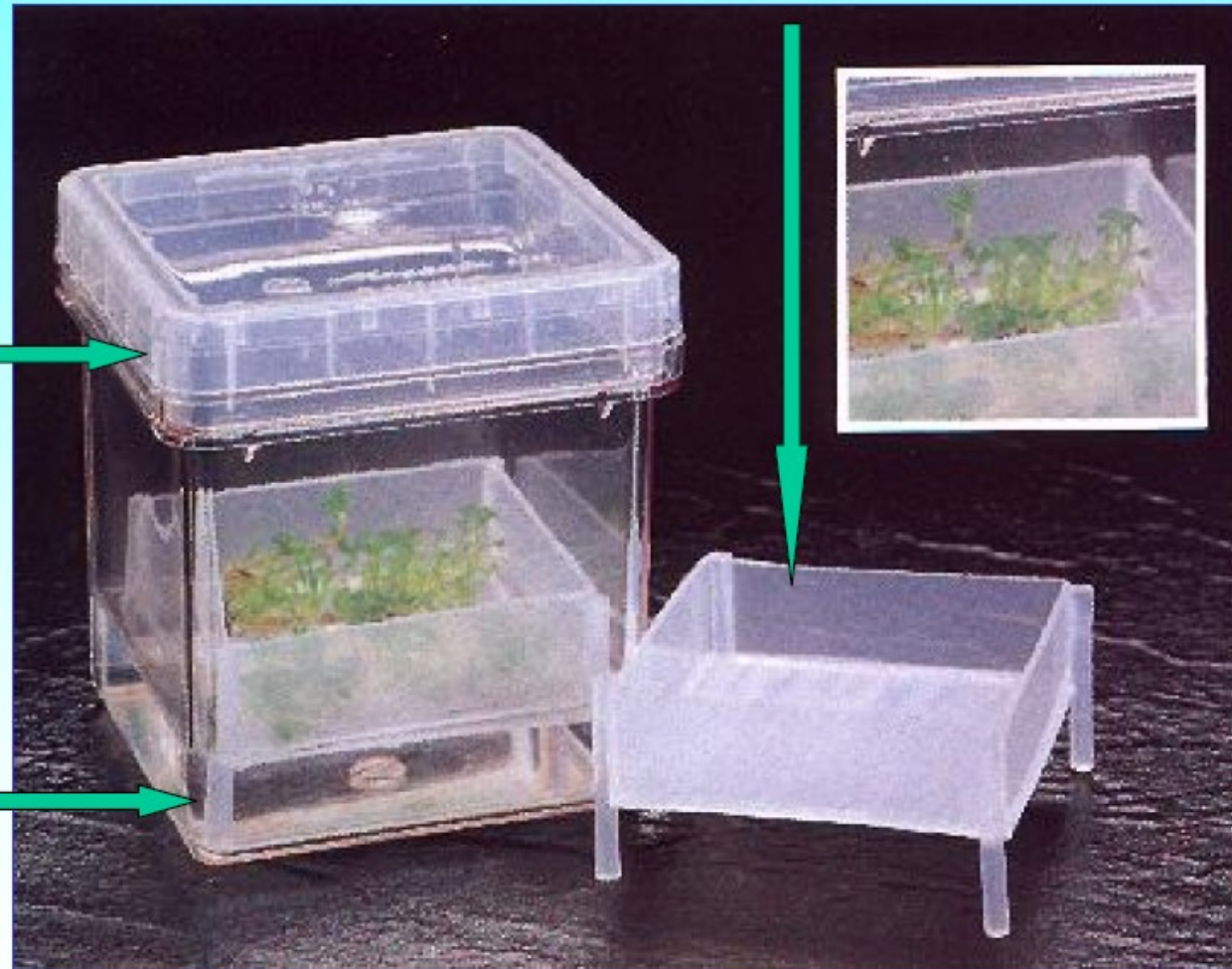
# Živná média



# Kultivace v tekutém médiu - permanentní imerze - polypropylenová membrána (můstek)

Magenta box

tekuté médium



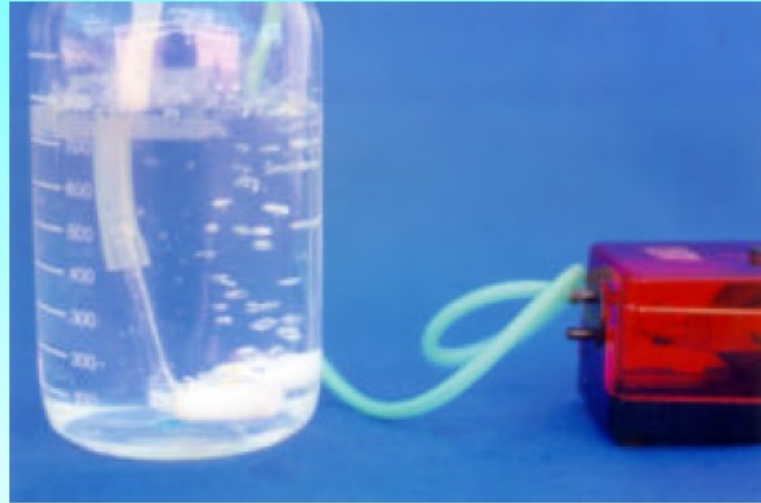
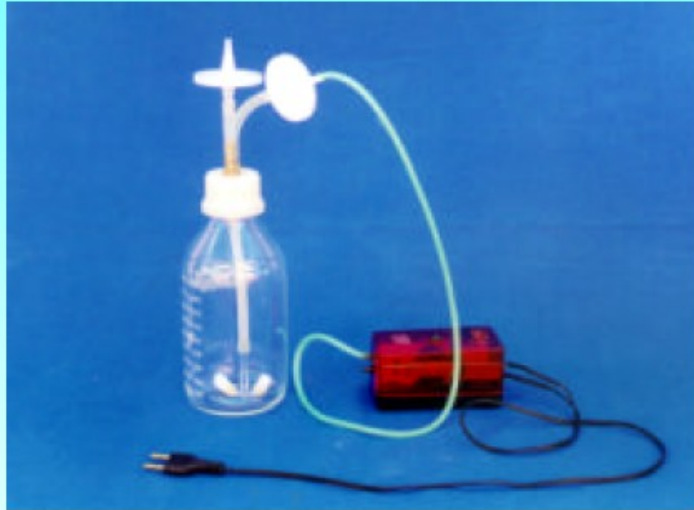
Papírový můstek





# Kultivace v tekutém médiu - permanentní imerze

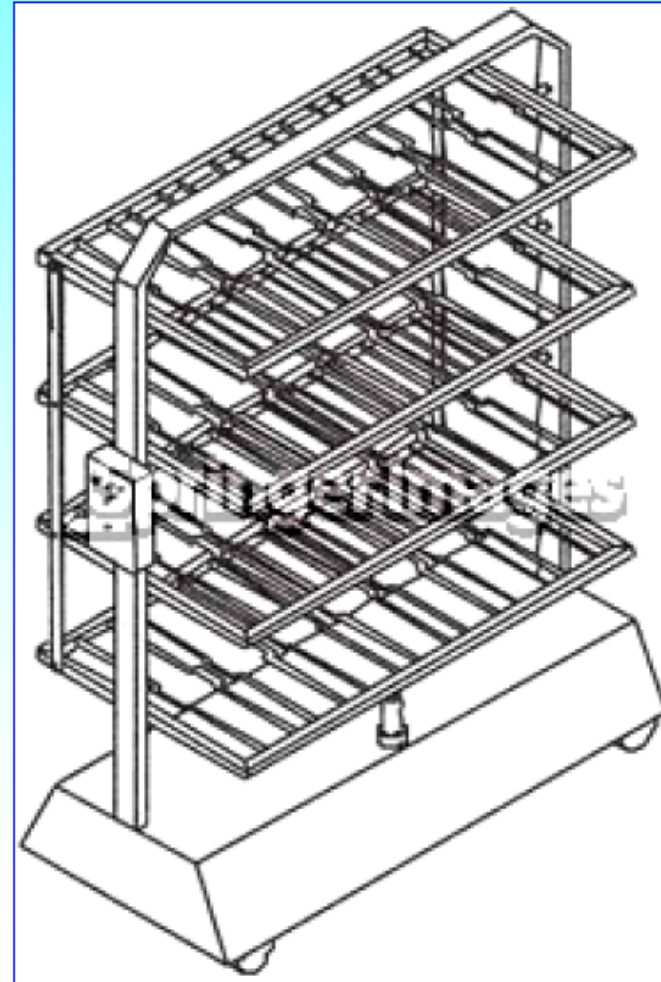
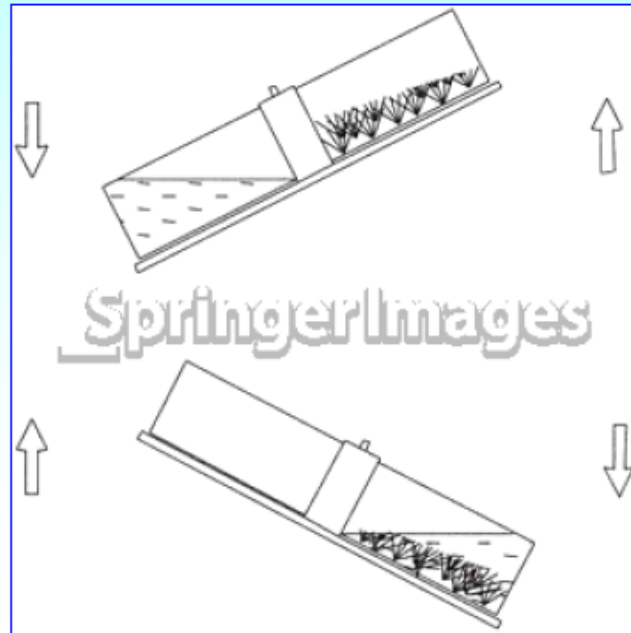
Barrueto et Cruz: Emprapa Recursos Genéticos e Biotecnologia, CP 02372





# Kultivace v tekutém médiu - dočasné imerze (Temporary Immersion Culture TIC)

- RITA®
- Bio-Mint



# Složení živných médií

# Složení živných médií

- **anorganické sloučeniny**

makroelementy: **N, P, K, Ca, Mg, S**

mikroelementy: **Fe, B, Cu, Mn, Ni, Co, I,**

- **organické sloučeniny**

vitamíny: **B1, B6, kys. nikotinová, kys. listová, biotin**

aminokyseliny: **směsi** (kaseinhydrolyzát, kvasničný hydrolyzát)

**čisté** (glycin)

inositol

polyaminy: **putrescin, spermin, spermidin...**

aktivní uhlí

přírodní látky: **kokosové mléko, rostl. šťávy, banány...**

*Biotechnol Adv.* 2008 Nov-Dec;26(6):618-31. doi: 10.1016/j.biotechadv.2008.08.003. Epub 2008 Aug 22.

## **The role of activated charcoal in plant tissue culture.**

Thomas TD<sup>1</sup>.

### **+ Author information**

#### **Abstract**

Activated charcoal has a very fine network of pores with large inner surface area on which many substances can be adsorbed. Activated charcoal is often used in tissue culture to improve cell growth and development. It plays a critical role in micropropagation, orchid seed germination, somatic embryogenesis, anther culture, synthetic seed production, protoplast culture, rooting, stem elongation, bulb formation etc. The promotary effects of AC on morphogenesis may be mainly due to its irreversible adsorption of inhibitory compounds in the culture medium and substancially decreasing the toxic metabolites, phenolic exudation and brown exudate accumulation. In addition to this activated charcoal is involved in a number of stimulatory and inhibitory activities including the release of substances naturally present in AC which promote growth, alteration and darkening of culture media, and adsorption of vitamins, metal ions and plant growth regulators, including abscisic acid and gaseous ethylene. The effect of AC on growth regulator uptake is still unclear but some workers believe that AC may gradually release certain adsorbed products, such as nutrients and growth regulators which become available to plants. This review focuses on the various roles of activated charcoal in plant tissue culture and the recent developments in this area.

# Složení živných médií - pokračování

- zdroj organického uhlíku = sacharidy  
mono- a disacharidy (sacharóza)
- růstové regulátory
  - auxiny
  - cytokininy
  - gibereliny
  - kys. abscisová
- ztužování médií - agar, Gelrite®,

# Makroelementy

N, P, K, Ca, Mg, S

- důležité jak kationty, tak anionty
- živná média obsahují řádově mM koncentrace

Gamborg *et* Phillips (1995):

**anorganický dusík a draslík** alespoň 30mM

**amonné soli** 2-20 mM

**sulfáty, fosfáty, vápník a hořčík** 1-3 mM

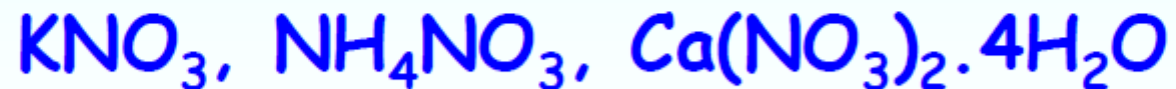


# Dusík

hlavní složkou všech médií je **anorganický dusík**

používá se ve dvou formách:

- **nitráty**
- **amonné ionty**



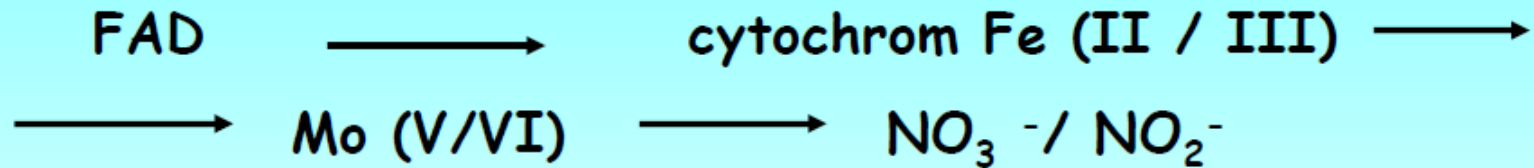
# Dusičnany (nitráty)

- **transportovány xylémem** do jiných částí rostliny, kde probíhá jejich asimilace
- nemohou být použity k syntéze organických molekul přímo, ale **musí být postupně redukovány** (ve dvou krocích) - napřed na dusitany a pak až na amonné ionty
- mohou být **skladovány** ve vakuolách buněk a plní důležitou funkci osmoregulace a rovnováhy mezi kationty a anionty

# Asimilace dusíku

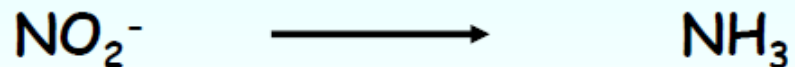
## 1. krok - konverze nitrátu na nitrit

nitrátreduktáza (v cytoplazmě) katalyzuje přenos  $e^-$  z NADPH



## 2. krok - redukce nitritu na čpavek

nitritreduktáza (v plastidech) katalyzuje redukci



elektrony pro tuto redukci se získávají ve fotosystému I  
přenašečem je ferredoxin

## Amonné ionty

- volný čpavek nebo amonné ionty jsou pro rostliny **toxické** i v nízkých koncentracích (inhibice tvorby ATP)
- jsou rychle převáděny na **nízkomolekulární organické sloučeniny** (glutamin, glutamát, asparagin, arginin, alantoin...)
- skladování v kořenech rostlin a zásobních orgánech

# Fosfor

- je přijímán jako **dihydrogenfosforečnan**
- může být přítomen v rostlinách jako **anorganický fosfát (Pi)** - po vstupu do cytoplazmy je rychle esterifikován na **ATP**
- je nezbytný pro stavbu DNA, RNA, fosfolipidů biomembrán a pro energetický metabolismus
- energie uvolněná glykolýzou nebo získaná fotosyntézou nebo oxidativní fosforylací se ukládá do ATP a může být později uvolňována hydrolýzou ATP na **ADP a Pi**

# Draslík

- má velkou **pohyblivost** - jak na buněčné úrovni, tak na dlouhé vzdálenosti ve floému a xylému. Je iontem s **nejvyšší koncentrací** v buňce (100 - 200 mM v cytopl.)
- význam pro **osmoregulaci**
- funguje jako protiváha při **udržování optimálního pH**
- **aktivuje** mnoho **enzymů** (vazba  $K^+$  indukuje konformační změny proteinů)
- aktivuje rovněž membrány pro **vazbu ATPáz**



# Vápník

- většinou **vázán** na buněčné stěny (Ca pektáty) a buněčné membrány
- **transport**  $\text{Ca}^{2+}$  floémem i z buňky do buňky je **velmi omezený**
- $\text{Ca}^{2+}$  velmi ovlivňuje **stabilitu buněčné membrány** interakcí s fosfáty, karboxylovými skupinami fosfolipidů a proteinů
- Ca vazebný protein **kalmodulin** - role v regulaci intracelulární koncentrace  $\text{Ca}^{2+}$

# Hořčík

- **velmi mobilní**, schopný tvořit komplexy
- esenciální pro četné enzymatické reakce
- fotosyntéza, regulace pH a rovnováhu iontů
- syntéza proteinů (tvoří můstek mezi podjednotkami ribozómů - při nedostatku Mg se podjednotky rozpadnou a proteosyntéza je zastavena)
- energetický metabolismus

# Mikroelementy

používají se mikromolární koncentrace  
mají význam především jako kofaktory

- bór
- chlór, jód
- železo
- kobalt
- měď
- mangan
- molybden
- zinek

# Organické sloučeniny - „vitamíny“

- B1 thiamin
- B6 pyridoxin
- kyselina nikotinová  
(biotin, kyselina listová, D, pantotenát vápenatý...)
- **myo-inositol** - stavební jednotka inositolfosfatidů  
role při tvorbě a metabolismu membrán

# Organické sloučeniny - org. uhlík

- metabolizovatelné cukry:
  - sacharosa
  - glukosa
  - fruktosa
- nemetabolizovatelné cukry
  - manitol
  - sorbitol

# Organické sloučeniny - aminokyseliny

- směsi
  - kvasničný hydrolyzát („yeast extract“)
  - hydrolyzát kaseinu
- čisté aminokyseliny: L-formy
  - L-glycin



# Organické sloučeniny - polyaminy

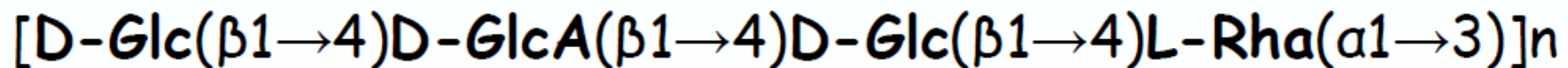
- putrescin
  - spermidin
  - spermin
1. podpora tvorby adventivních kořenů
  2. podpora tvorby prýtlů
  3. podpora somatické embryogeneze

# Ztužování médií

- **agar** - polysacharid extrahovaný z různých druhů mořských řas (často obsahuje velké množství solí)
- **karagenan** - polysacharidy z ruduch, po ochlazení tvoří dvojitý helix v přítomnosti kationtů (Kappa typ tvoří gel v přítomnosti  $K^+$ , Iota typ geluje v přítomnosti  $Ca^{2+}$  )
- **alginát sodný** - kyselé polysacharidy extrahované z hnědých řas. Tvoří **zastudena** gely rozpustné vodou, **geluje v přítomnosti  $Ca^{2+}$**

# Náhrady agaru

- **Phytigel®** (Sigma), **Gelrite®** (Merck) - přírodní anionický polysacharid produkovaný bakteriální fermentací = polymer tetrasacharidu (glukosa - glukuronová kyselina - glukosa - rhamnosa)
- poskytuje pevný průhledný gel (vhodný pro detekci mikrobiální kontaminace) v přítomnosti  $Mg^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$
- používá se v **poloviční koncentraci** ve srovnání s agarem, není vhodné opakované autoklávování



Sign In or Register

Order Center | Czech Republic



Search bar with a magnifying glass icon and a red outline.

200,000+ PRODUCTS

500+ SERVICES

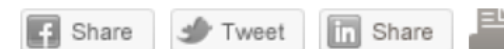
Featured INDUSTRIES

Hello. Sign in. ACCOUNT

SUPPORT

0 Items ORDER

Life Science > Molecular Biology > Plant Biotechnology > Tissue Culture Protocols



- Life Science Home
- Life Science Products
- + In Vitro Safety Systems - ADME, DMPK, Tox
- Antibiotics
- Antibodies
- + Avanti® Polar Lipids
- + BioAnalysis
- Biosimilars
- + Biochemicals
- Biological Buffers
- + Curiosity Labs™ at Home

## Plant Biotechnology

### Tissue Culture Protocols

These Plant Tissue Culture Protocols are part of our growing offer in Plant Biotechnology.

We have added helpful information in each protocol including:

- Media Preparation
- Media Formulation
- Sterilization Techniques
- Storage

To view any protocol listed, simply click on the link below.

- Antibiotics
- Classic Plant Media
- Explant Sterilization
- Gelling Agents
- Growth Regulators
- Iron Chelate Solution
- Media Preparation
- Media Sterilization
- Murashige and Skoog Media Variations
- Orchid Culture Media
- Plant Pathology Media
- Phycology and Aquatic Plant Media
- Silver Thiosulfate Solution
- Sunbag Vessels
- Vitamin Mixtures

# Sigma - Aldrich média

- *Chu* basal salt mixture (N6)
- *DKW/Juglans* basal salt mixture
- *Gamborg's B-5* basal salt mixture (B5)
- *Gamborg's B-5* basal salt mixture with minimal organics
- *Hoagland's No. 2* basal salt mixture
- *McCown's* woody plant basal salt mixture (WPM)
- *Murashige and Skoog* basal salt mixture (MS)
- *Quoirin and Lepoivre* basal salt mixture
- *Schenk and Hildebrandt* basal salt mixture (SH)
- *White's* basal salt mixture

<http://www.sigmaaldrich.com/life-science/molecular-biology/plant-biotechnology/tissue-culture-protocols/classic-plant-media.html>

# Příprava živného média (1I)

1. 6,5 g **agaru** vsypeme do 300 ml destilované vody v SIMAX láhvi a rozvaříme v autoklávu.
2. Do Erlenmeyerovy baňky odměříme 500 ml **destilované vody**.
3. Přidáme koncentráty **makroelementů** (100 ml), **mikroelementů** (10ml) a chelát železa (5 ml).
4. Přidáme **vitamíny** (1 ml zamražené směsi).
5. Navážíme 100 mg **inositolu**.
6. Navážíme 20 g **sacharózy**.



## nebo Příprava živného média (1 l)

1. 5,5 g **agaru** vsypeme do 300 ml destilované vody v SIMAX láhvi a rozvaříme v autoklávu.
2. Do Erlenmeyerovy baňky odměříme 500 ml destilované vody.
3. 

4. navážíme 4,4 g směsi MS média s vitamíny podle Gamborga
- 5.
6. Navážíme **20 g sacharosy**.

# Příprava živného média (1)

7. Podle potřeby doplníme další látky jako **aktivní uhlí, růstové regulátory** a pod.
8. Slijeme rozvařený agar s roztokem v EM baňce a **doplníme** v odměrném válci **na 1000 ml**.
9. Pomocí Phan papírků **změříme pH** a upravíme na 5,7 pomocí 0,1 M KOH nebo 0,1 M HCl.
10. Médium dobře **promícháme** přeléváním z válce do EM baňky a **rozlijeme** asi po 40 ml do kultivačních nádob.

## Příprava živného média (1I)

11. Kultivační nádoby s médiem **uzavřeme** vhodným uzávěrem
12. Následující den **sterilizujeme** při 121°C v autoklávu po dobu 20 minut
13. Krátkodobě média **uchováváme** při laboratorní teplotě, při skladování po delší dobu používáme lednici

**při kultivaci v Petriho miskách rozléváme sterilně v očkovacím boxu médium až po sterilizaci**