INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Jméno: **Datum:**

Téma 03: Příprava živného média

Živné médium vhodného složení je jednou ze základních podmínek úspěšné *in vitro* kultury. Může se používat ve formě tekuté nebo ztužené různými gelujícími přípravky jako je agar, Gelrit® nebo karagenan. Média pro kultivaci explantátů obsahují živiny - makroelementy a mikroelementy ve formě anorganických solí, organické látky jako cukry, vitamíny a aminokyseliny, eventuálně růstové regulátory a ztužovací látky. Důležité je také optimální pH, které bývá v rozsahu 5,5 – 5,8. Média je možné připravovat smícháním jednotlivých složek (pro usnadnění práce se používají koncentráty) nebo navážením z hotové směsi. Pokud používáme ke kultivaci Petriho misky, rozléváme rozvařené a vysterilizované médium sterilně v laminárním boxu. V případě větších kultivačních nádob je možné rozlít rozvařené médium a následně je teprve vysterilizovat v autoklávu. Termolabilní látky vysterilizované filtrací přidáváme do mírně vychladlého média až po autoklávování a musíme pak médium rozlévat do sterilních nádob v laminárním boxu.

Nejčastěji používaným médiem je univerzální médium podle autorů Murashige a Skoog (1962), které se používá v mnoha různých modifikacích. Další varianty živných médií se pro speciální účely nebo rostliny také používají (např. Gamborg *et al*. 1968, Nitsch *et* Nitsch 1969, Lloyd *et* McCown 1980, Chu *et al*. 1975).

Materiál: (vypsat podle vlastní připravované varianty)

Pomůcky: (vypsat)

Postup práce:

A. <u>Příprava 1 litru agarem ztuženého média s použitím koncentrátů</u>

1. Navážíme 5,5 g agaru, vsypeme do 300 ml destilované vody v SIMAX láhvi, promícháme a necháme rozvařit v autoklávu. (Potřebné množství agaru je třeba u každé šarže otestovat).
2. Do Erlenmeyerovy baňky odměříme 500 ml destilované vody.
3. Přidáme koncentrát makroelementů (100 ml), mikroelementů (10ml) a chelát železa (5 ml).
4. Přidáme vitamíny (1 ml zamraženého koncentrátu).

5. Navážíme 100 mg inositolu.
6. Navážíme 20 g sacharózy.
7. Podle potřeby doplníme další látky jako aktivní uhlí, růstové regulátory apod.
8. Slijeme rozvařený agar se zahřátým roztokem v EM baňce a doplníme v odměrném válci na 1000 ml ohřátou destilovanou vodou.
9. Pomocí Phan papírků nebo pH metru změříme pH a upravíme na 5,8 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.
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.

B. Příprava 1 litru agarem ztuženého média s použitím hotové směsi

1. Navážíme 5,5 g agaru, vsypeme do 300 ml destilované vody v SIMAX láhvi, promícháme a necháme rozvařit v autoklávu.
2. Do Erlenmeyerovy baňky odměříme 600 ml destilované vody.
3. Přidáme odvážené množství média (podle údajů výrobce na etiketě).
4. Navážíme 20 g sacharózy.
5. Podle potřeby doplníme další látky jako aktivní uhlí, růstové regulátory apod.
6. Slijeme rozvařený agar se zahřátým roztokem v EM baňce a doplníme v odměrném válci na 1000 ml.
7. Pomocí Phan papírků nebo pH metru změříme pH a upravíme na 5,8 pomocí 0,1 M KOH nebo 0,1 M HCl.
8. Další postup je shodný jako u A. varianty.

Poznámka: Pokud jako kultivační nádoby používáme Petriho misky, mícháme médium i s navážkou agaru, sterilizujeme médium v celém objemu a rozléváme do sterilních misek v laminárním boxu. Skleněné Petriho misky předem sterilizujeme v sušárně nebo autoklávu, plastové misky jsou v uzavřeném sáčku sterilní, jsou sterilizované γ-zářením při výrobě.

Reference:

Gamborg O.L., Miller R.A. et Ojima K., Exp. Cell Res. **50**, 151 (1968) – **B5**

Chu C.C. *et al.,.* Scientia Sinic., **18**, 659 (1975) – **N_6**

Lloyd G. *et* McCown B., Int. Plant Prop Soc. Proc. **30**, 421 (1980) - **WPM**

Murashige T. *et* Skoog F., Physiol. Plant. **15**, 473 (1962) - **MS**

Nitsch J.P. *et* Nitsch C., Science **169**, 85 (1969) - **N**

Van der Salm T.M.P. *et al.,* Plant Cell Tissue and Organ Cult., **37**: 73-77 (1994)

Tab. 1. Složení živných médií			
	M-S (1962)	**B5 (1968)**	**N (1969)**
Anorganické soli	/mg/l/	/mg/l/	/mg/l/
Makroelementy			
KNO_3	**1 900**	**2 500**	**950**
NH_4NO_3	**1 650**		**720**
$(NH_4)_2SO_4$		**134**	**166**
$CaCl_2$. 2 H_2O	**440**	**150**	
$MgSO_4$. 7 H_2O	**370**	**250**	**185**
KH_2PO_4	**170**		**68**
NaH_2PO_4		**150**	
Železo:			
Na_2EDTA	**37,3**	**37,3**	**37,3**
$FeSO_4$. 7 H_2O	**27,8**	**27,8**	**27,8**
Mikroelementy			
$MnSO_4$. 4 H_2O	**22,3**	**10**	**25**
H_3BO_3	**6,2**	**3**	**10**
$ZnSO_4$. 7 H_2O	**8,6**	**3**	**10**
Na_2MoO_4 . 2 H_2O	**0,25**	**0,25**	**0,25**
$CuSO_4$. 5 H_2O	**0,025**	**0,025**	**0,025**
$CoCl_2$. 6 H_2O	**0,025**	**0,025**	
KI	**0,83**	**0,75**	
Organická složka			
Vitamíny			
inositol	**100**	**100**	**100**
kys. nikotinová	**0,5**	**1**	**5**
thiamin.HCl (B_1)	**0,1**	**10**	**0,5**
pyridoxin . HCl (B_6)	**0,5**	**1**	**0,5**
glycin	**2**	**2**	**2**
kyselina listová			**0,5**
biotin			**0,05**
sacharosa	**15 000-30 000**		
agar	**7 000**	**7 000**	**7 000**
pH	**5,7**	**5,7**	**5,8**