



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Jméno:

Datum:

Téma 02: Sterilní výsev a nakličování semen

Výsev povrchově desinfikovaných semen je relativně nejjednodušším způsobem, jak založit kulturu *in vitro*, protože na semena je možné použít razantnější desinfekční postupy než na rostlinné orgány, jako jsou listy nebo květní poupata.

Malá semena vyséváme (pomocí navlhčených špejlí nebo párátek) na povrch agarem nebo Gelritem ztuženého média, které má většinou sníženou koncentraci anorganických solí i sacharosy. Velká semena, jako hrách, okurky apod., je možné vysévat na povrch navlhčené buničité vaty nebo na povrch skleněných perel s tekutým médiem.

Materiál: (vypsat podle vlastních experimentů)

semena různých linií tabáku *Nicotiana tabacum* L. SR1, len setý *Linum usitatissimum* L., spory kapradin – např. křídelnice krétská (*Pteris cretica*), rumora (*Rumohra adiantiformis*), ledviník (*Nephrolepis exaltata*), semena orchidejí (*Phalaenopsis* hybr.) apod.

Pomůcky: (vypsat)

A. Desinfekce větších semen

1. Uzavření semen do skleněné epruvety nebo gázového váčku (podle velikosti semen)
2. Desinfekce v 50% etanolu a 3% peroxidu vodíku 1 minuta
3. Oplach sterilní destilovanou vodou (SDV)
4. Desinfekce ve 20% roztoku SAVO v SDV (v/v) 20 minut
5. 3x po dobu 3 - 5 minut oplachování SDV, poslední vodu slít a nechat uzavřeno v boxu
6. Bobtnání 24 hodin
7. Opakovaná desinfekce ve 20% roztoku SAVO v SDV (v/v) 20 minut
8. 3x po dobu 3 - 5 minut oplach SDV
9. Desinfikovaná semena přeneseme v laminárním boxu do sterilní Petriho misky s filtračním papírem.



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Sterilní výsev

10. Provedeme sterilně výsev semen pomocí pinzety nebo sterilního párátko do Petriho misek na povrch agarem ztuženého média (MS médium, 2% sacharosa, 0,65% agar). Víko misky zajistíme proti otevření proužkem fólie.
11. Označíme kultury popisem (datum, materiál), poznamenáme si počet semen vysetých na misku.
12. Nakličování provádíme ve tmě v termostatu, při teplotě 25°C nebo na světle v kultivačním regálu.

B. Desinfekce malých semen nebo spor kapradin

1. Suspendování semen nebo spor ve sterilní destilované vodě a jejich krátké nabobtnání (ve Falkon. zkumavce)
2. Centrifugace na ruční centrifuze 1 minuta
3. Dekantace vody
4. Desinfekce v 7% chlornanu vápenatém (*Phalaenopsis*) 10 minut
5. Centrifugace na ruční centrifuze 1 minuta
6. Dekantace desinfekčního roztoku
7. Oplachování sterilní destilovanou vodou (SDV) 3 – 4x, mezi každou výměnou vody centrifugujeme suspenzi a sléváme supernatant
8. Poslední oplachovací vody přidáváme menší množství a po resuspendování sedimentu naléváme malé množství suspenze na povrch agarového média.

Hodnocení:

První kontrola kultur by měla probíhat již po několika dnech. Zpravidla již 3. den od počátku experimentu je patrná přítomnost nežádoucích infekcí (týdenní interval mezi praktiky může být příliš dlouhý). Pokud je výskyt infekcí limitovaný a kulturu kontrolujeme včas, je možné pasážovat neinfikovaná semena na čerstvé médium.

V případě, že je desinfekce nedostatečná a infekce se projevuje u mnoha semen, je nutné provést razantnější desinfekci (opakováním desinfekce, prodloužením doby působení desinfekční látky nebo použitím jiné desinfikující látky)

V následujících týdnech vyhodnotíme % klíčivosti osiva, kontrolujeme čistotu kultur a sledujeme vývoj klíčících rostlin nebo případné projevy sensitivity pokud jsme vysévali semena na selekční médium.

Podle dalších pokynů pracujeme s klíčovými rostlinkami v dalších úlohách.