



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

TENTO PROJEKT JE SPOLUFINANCOVÁN EVROPSKÝM SOCIÁLNÍM FONDĚM
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. Příprava 1 litru agarem ztuženého média s použitím koncentrátů (neděláme)

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 navázkou 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) – **N6**
 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/
<i>Makroelementy</i>			
KNO ₃	1 900	2 500	950
NH ₄ NO ₃	1 650		720
(NH ₄) ₂ SO ₄		134	166
CaCl ₂ . 2 H ₂ O	440	150	
MgSO ₄ . 7 H ₂ O	370	250	185
KH ₂ PO ₄	170		68
NaH ₂ PO ₄		150	
<i>Železo:</i>			
Na ₂ EDTA	37,3	37,3	37,3
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	27,8	27,8	27,8
<i>Mikroelementy</i>			
MnSO ₄ . 4 H ₂ O	22,3	10	25
H ₃ BO ₃	6,2	3	10
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	8,6	3	10
Na ₂ MoO ₄ . 2 H ₂ O	0,25	0,25	0,25
CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,025	0,025	0,025
CoCl ₂ . 6 H ₂ O	0,025	0,025	
KI	0,83	0,75	
Organická složka			
<i>Vitamíny</i>			
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