



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

**Jméno:**

**Datum:**

### **Téma 01: 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  $\gamma$ -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)

<b>Tab. 1. Složení živných médií</b>			
	<b>M-S (1962)</b>	<b>B5 (1968)</b>	<b>N (1969)</b>
<b>Anorganické soli</b>	/mg/l/	/mg/l/	/mg/l/
<i><b>Makroelementy</b></i>			
KNO <sub>3</sub>	<b>1 900</b>	<b>2 500</b>	<b>950</b>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	<b>1 650</b>		<b>720</b>
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>		<b>134</b>	<b>166</b>
CaCl <sub>2</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	<b>440</b>	<b>150</b>	
MgSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	<b>370</b>	<b>250</b>	<b>185</b>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	<b>170</b>		<b>68</b>
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>		<b>150</b>	
<i><b>Železo:</b></i>			
Na <sub>2</sub> EDTA	<b>37,3</b>	<b>37,3</b>	<b>37,3</b>
FeSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	<b>27,8</b>	<b>27,8</b>	<b>27,8</b>
<i><b>Mikroelementy</b></i>			
MnSO <sub>4</sub> . 4 H <sub>2</sub> O	<b>22,3</b>	<b>10</b>	<b>25</b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	<b>6,2</b>	<b>3</b>	<b>10</b>
ZnSO <sub>4</sub> . 7 H <sub>2</sub> O	<b>8,6</b>	<b>3</b>	<b>10</b>
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> . 2 H <sub>2</sub> O	<b>0,25</b>	<b>0,25</b>	<b>0,25</b>
CuSO <sub>4</sub> . 5 H <sub>2</sub> O	<b>0,025</b>	<b>0,025</b>	<b>0,025</b>
CoCl <sub>2</sub> . 6 H <sub>2</sub> O	<b>0,025</b>	<b>0,025</b>	
KI	<b>0,83</b>	<b>0,75</b>	
<b>Organická složka</b>			
<i><b>Vitamíny</b></i>			
inositol	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
kys. nikotinová	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>5</b>
thiamin.HCl (B <sub>1</sub> )	<b>0,1</b>	<b>10</b>	<b>0,5</b>
pyridoxin . HCl (B <sub>6</sub> )	<b>0,5</b>	<b>1</b>	<b>0,5</b>
glycin	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>2</b>
kyselina listová			<b>0,5</b>
biotin			<b>0,05</b>
<b>sacharosa</b>	<b>15 000-30 000</b>		
<b>agar</b>	<b>7 000</b>	<b>7 000</b>	<b>7 000</b>
pH	<b>5,7</b>	<b>5,7</b>	<b>5,8</b>