

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLMOUCI
PŘÍRODOVĚDECKÁ FAKULTA
KATEDRA BOTANIKY

NÁVODY KE CVIČENÍM

TECHNIKY EXPLANTÁTOVÝCH KULTUR

BOT/TEKSB

Studijní předmět: volitelný

LS

Garant RNDr. Božena Navrátilová, PhD.

Formy výuky studijního předmětu: přednášky / praktická cvičení

1 / 2 hod/týden

(dle možností blokováno)

Ukončení studijního předmětu: kolokvium

Počet kreditů: 4

Podpořeno grantem FRVŠ 806/2011

OBSAH

1. Bezpečnost práce	3
2. Příprava kultivačních médií	4
3. Mikropropagace rostlin	5
3.1. Vliv růstových regulátorů na mikropropagaci rostlin	5
3.2. Mikropropagace <i>Saintpaulia</i> sp. z listů	6
3.3. Převod <i>in vitro</i> rostlin do nesterilních podmínek	6
4. Meristémové kultury	8
5. Embryokultury	9
5.1. Izolace a kultivace nezralých embryí	9
5.2. Izolace a kultivace zralých embryí	10
6. Prašnikové kultury	11
7. <i>In vitro</i> opylování	13
7.1. Izolace mikrospór	13
7.2. Izolace nezralých vajíček	13
7.3. Opylování <i>in vitro</i>	14
8. Klíčení semen v podmínkách <i>in vitro</i>	16
9. Izolace a chemická fúze protoplastů	17
9.1. Izolace protoplastů, stanovení životnosti a hustoty	17
9.2. Ovlivnění mezofylových protoplastů UV-C zářením	19
9.3. Lokalizace produkce buněčné stěny u protoplastů	19
9.4. Chemická fúze protoplastů	20

Autoři:

Božena Navrátilová: 1, 2, 3, 4, 5.1, 6, 8, 9

Dagmar Skálová: 5.2, 6, 7

1. BEZPEČNOST PRÁCE

Student je povinen řídit se pokyny vedoucího cvičení - dbát osobní bezpečnosti a bezpečnosti svých kolegů v laboratoři.

Student je povinen přicházet na praktická cvičení včas, seznámen s návodem praktického cvičení a doporučenými pomůckami.

Student musí být vybaven přezůvkami, osobní věci (tašku, batoh, oblečení) si uloží na vyhrazené místo, které je zabezpečeno před odcizením.

Před cvičením si student umyje a desinfikuje ruce určeným desinfekčním prostředkem - OROSEPT.

Při práci ve flowboxu student dodržuje zásady pro aseptickou práci: desinfekčním roztokem vytře box (ISORAPID), spustí box 10 min před zahájením práce, dbá, aby sám nebyl zdrojem kontaminací, při nachlazení použije roušku, udržuje v boxu pořádek.

Student dbá bezpečnosti při práci s ohněm (lihové kahany) a líc ve flowboxu určený k ožehávání používaných nástrojů.

Student dbá bezpečnosti a se zvýšenou opatrností pracuje s řeznými nástroji, se sklem a s elektřinou.

Student zachází se svěřenými přístroji šetrně, jejich závady ihned hlásí vyučujícímu (sám neopravuje).

Student hlásí veškerá poranění vyučujícímu.

Po ukončení cvičení student vypne a uklidí flowbox, uzavře kahan. Zbytky rostlinného materiálu zlikviduje, umyje použité sklo.

2. PŘÍPRAVA KULTIVAČNÍCH MÉDIÍ

Kultivační médium obsahuje veškeré živiny, které umožňují explantátu růst po dobu několika týdnů. Je složeno z makroelementů, mikroelementů, vitamínů, cukru, růstových regulátorů a může být doplněno o další látky. Jako zpevňující složka u pevných médií se používá agar. Při přípravě kultivačních médií používáme čisté sklo, destilovanou vodu, vhodné chemikálie (p.a.) a jejich přesné navážky.

Příprava 1 l média MS (Murashige-Skoog médium, 1962):

MS (DUCHEFA)	4,405 g
sacharosa	30 g
agar	8 g
pH	5,8

Navážku média MS a sacharosy rozpustíme (v 1 l kádince na míchačce) v cca 400 ml destilované vody. Agar vsypeme do 500 ml destilované vody v 1l nádobce a rozvaříme v mikrovlnné troubě (cca 5 min). Oba objemy smícháme, doplníme destilovanou vodou do 1 l objemu a upravíme pH na 5,8. Připravené médium rozlijeme do nádob, které uzavřeme a sterilizujeme autoklávováním.

Pokud přidáváme do média růstové regulátory ze zásobních roztoků, použijeme sterilní plastové pipety s pipetovacím nádstavcem.

Sterilizace médií:

Pevná média zpevněná agarem sterilizujeme autoklávováním (teplota 121°C; přetlak 1,2 kg/cm²) po dobu 30 min. (autokláv obsluhuje pouze proškolená osoba).

Tekutá média sterilizujeme ve flowboxu filtrací a použijeme pro větší objemy filtr STERITOP MILIPORE GP s pevně vestavěnou membránou a velikosti pórů 0,22 μm, které nasadíme na vysterilizované láhve se závitem GL a použijeme vakuovou pumpu. Na sterilizaci menších objemů (do 100 ml) použijeme membránové filtry pro jednorázové použití MILLEX GP s velikosti pórů 0,22 μm, které nasadíme na injekční stříkačku.

Tekutá média filtrujeme vždy do sterilních (např. plastových zkumavek) nebo již vysterilizovaných nádob.

Důležité:

Sklo a nástroje potřebné pro aseptickou práci zabalíme do alobalu nebo sterilizačních sáčků a sterilizujeme při 180 °C po dobu 30 min v horkovzdušné sušárně.

Potřebné plasty pro cvičení jsou již sterilizovány výrobcem.

3. MIKROPROPAGACE ROSTLIN

3.1 VLIV RŮSTOVÝCH REGULÁTORŮ NA MIKROPROPAGACI ROSTLIN

Rostlinný materiál: *Dianthus* sp., *Dionea* sp., *Drosera* sp., *Fragaria* sp., *Nephrolepis* sp., *Solanum* sp., ...další dle dostupného materiálu

Postup k založení vlastní kultury:

1. ve sterilním boxu otevřeme *in vitro* kulturu, rostlinky nebo shluk rostlinek vytáhneme pinzetou a přeneseme na sterilní filtrační papír, odstraníme staré listy a kořínky
2. pomocí pinzety a skalpelu rozřežeme rostlinky tak, že získáme např. u r. *Dionea* jednotlivé rostlinky nebo u rodu *Dianthus*, *Solanum* stonkové segmenty s 2 - 3 lístky
3. rostlinky - 4 ks nebo stonkové segmenty – 6 ks (bazálním koncem) sadíme pinzetou na agarové médium (OK, 1C, 1O) na jednu baňku (100 ml, 30 ml média)
4. baňku uzavřeme, označíme a přeneseme do kultivační místnosti s teplotou 22 ± 2 °C a fotorežimem den/noc 16/8h

Vyhodnocení: Růst kultury pozorujeme v týdenních intervalech (kontaminace průběžně likvidujeme), zaznamenáváme prorůstání úžlabních pupenů, vznik prýtů, tvorbu kořenů, rozdíly v habitu rostlin regenerovaných na médiu OK, 1C, 1O. Vyhodnotíme a srovnáme genotypy po 4 - 6 týdnech kultivace.

Tabulka: Zmnožení rostlin na médiích (průměrné hodnoty zmnožení, tj. počet rostlin na původní vysazenou) vložíme pouze použité genotypy (Celá skupina společně vyhodnotí a doplní do tabulky)

genotyp/médium	OK	1C	1O
<i>Brassica</i>			
<i>Dianthus</i>			
<i>Dionea</i>			
<i>Nephrolepis</i>			

MS (Murashige-Skoog médium 1962, DUCHEFA)

IBA, BAP (SIGMA-ALDRICH)

OK MS + 0,01 mg/l IBA + 0,01 mg/l BAP

1C MS + 0,1 mg/l IBA + 0,1 mg/l BAP

1O MS + 1,0 mg/l IBA + 1,0 mg/l BAP

Závěr: hodnocení vlastních výsledků (hodnocení rozdílů mezi jednotlivými médii pro každý genotyp, rozdíly mezi genotypy, kontaminace,...).

3.2. MIKROPROPAGACE *SAINPAULIA* SP. Z LISTŮ

Rostlinný materiál: *in vitro* rostoucí rostliny *Sainpaulia* sp.

Vzhledem k vyhodnocení experimentu jsou listy *in vitro* rostoucích rostlin vhodnější než listy z *in vivo* rostoucích rostlin (vyhneme se kontaminacím a regenerace rostlin je rychlejší).

1. rostlinky vyjmeme pinzetou z kultivační baňky a položíme na sterilní filtrační papír, skalpelem odřežeme plně vyvinuté listy, odstraníme řapík s bazální částí čepele a listy umístíme do média MS v Petriho miskách (6 cm, 6 lístků) tak, aby řeznou stranou byly v médiu
2. misky umístíme do kultivační místnosti s teplotou 22 ± 2 °C a fotorežimem den/noc 16/8h
3. po 4 – 6 týdnech vyhodnotíme prorůstání rostlinek

Závěr: hodnotíme regeneraci, zjistíme počet nových rostlin na jeden list, nekrotizaci listů

Celá skupina (max. 6 studentů) vyhodnotí společně.

3.3 PŘEVOD *IN VITRO* ROSTLIN DO NESTERILNÍCH PODMÍNEK

Rostlinný materiál: *Dianthus* sp., *Dionea* sp., *Drosera* sp., *Fragaria* sp., *Nephrolepis* sp.,
Solanum sp....další dle dostupného materiálu

Postup:

1. baňky nebo kultivační nádoby s rostlinkami pro převod do nesterilních podmínek přetáhneme fólií (1 - 2 týdny pro aklimatizaci)
2. rostlinky pinzetou vyjmeme z kultivačních nádob a pod tekoucí vodou důkladně propereme a vymyjeme zbytky agarů z kořínků, odstraníme staré listy (popř. ulámané), zkrátíme příliš dlouhé kořínky
3. vysazujeme a) do připravených květináčků s perlitem umístěných v lódnách min 5 rostlin od každého genotypu
b) do rašelinových jiffů (sadbovacích válečků) umístěných v plastových miniskleničkách min 5 rostlin od každého genotypu
4. lódný překryjeme fólií a plastové miniskleničky uzavřeme, umístíme ve fytotronu, fotorežim 12/12h den/noc, teplota 22 ± 2 °C

5. kontrolujeme a doplňujeme vodu (přidáme hnojivo – *Kristalon start*)
6. po 2 - 3 týdnech odstraníme fólii z lóden a větráme miniskleníčky
7. pozorujeme 1x týdně a před kolokviem hodnotíme úspěšnost převodu:
 - srovnáme perlit x jiffy
 - srovnáme genotypy (úhyn rostlin), vybereme nejvhodnější genotyp

Tabulka: Převod rostlin do nesterilních podmínek (vložíme pouze použité genotypy)

genotyp/médium	perlit vysazeno/úhyn	jiffy vysazeno/úhyn
<i>Fragaria</i>		
<i>Dianthus</i>		
<i>Dionea</i>		
<i>Nephrolepis</i>		

**Závěr: srovnání úspěšnosti převodu do nesterilních podmínek mezi genotypy
srovnání převodu v rámci genotypu mezi perlitem a jitry**

Celá skupina (max. 6 studentů) společně vyhodnotí a doplní do tabulky.

4. MERISTÉMOVÉ KULTURY

Meristém – apikální část vrcholu prýtu, kořene rostliny a jeho kultivace na vhodném médiu

Rostlinný materiál: růžice *Brassica oleracea* var. *botrytis* (květák)
(zdužnatělé stopky květenství tvoří polokulovitou kytku s nevyvinutými květy)

Postup:

1. z růžice intaktní rostliny nařezeme skalpelem explantáty 0,5 - 1,0 cm velké (10 - 15 ks)
2. explantáty umístíme do injekční stříkačky a sterilizujeme:
 - opláchneme v 70 % etanolu
 - sterilizujeme ve 2, 5 % roztoku chloraminu (s kapkou Tween 20) po dobu 10 min
 - promyjeme 3 x ve sterilní destilované vodě (již v aseptickém prostředí)
3. ve flowboxu na sterilním filtračním papíře pomocí pinzety a skalpelu odřezeme bazální část explantátu a nařezeme na menší části
4. části přeneseme pomocí jehly na médium MS v Petriho misce (5 explantátů/1 miska)
5. misky umístíme v kultivační místnosti při 22 ± 2 °C při fotoperiodě den/noc 16/8h
6. po 4 - 6 týdnech vyhodnocujeme prorůstání mladých rostlin, kontaminace a nekrotizace (vyjádříme v %)

Tabulka: Vyhodnocení experimentu

celkový počet vysazených explantátů	prorůstající explantáty (%)	nekrotizace %	kontaminace %

Závěr: vyhodnotíme prorůstání rostlinek, případné kontaminace nebo nekrotizace vyjádříme v %

Poznámky:

Kultivační médium MS (bez růstových regulátorů)

Pro použití meristému k procesu ozdravování rostlin musí být meristém zbaven listových primordií a jeho velikost je 0,2 mm

Celá skupina (max. 6 studentů) společně vyhodnotí a doplní do tabulky.

5. EMBRYOKULTURY

5.1 IZOLACE A KULTIVACE NEZRALÝCH EMBRYÍ

Rostlinný materiál: nezralé plody *Capsicum annuum* (paprika roční)

Postup: ve cvičení začínáme od bodu 3 - 5

1. Kastrace poupat na mateřské rostlině

z neporušeného poupěte preparační jehlou odstraníme všechny prašníky (poupata, která nebudeme potřebovat průběžně odstraňujeme)

2. Opylování

z plně rozkvetlých květů otcovské rostliny sklepeme preparační jehlou pyl na podložní sklíčko, tento pyl nanese opatrně na bliznu mateřské rostliny nebo bliznu ponoříme do pylu (opylovaný květ označíme štítkem, na kterém je rodičovská kombinace a datum opylování)

! Neopylujeme, když je příliš vlhko, horko nebo zima!

3. Odběr a sterilizace plodů

vývojové stádium (globule, srdce, torpédo, vycházková hůl, kroužek) odpovídá časovému intervalu po opylování, neporušené plody povrchově desinfikujeme tak, že je držíme pinzetou, celé ponoříme do 96 % etanolu, necháme okapat a ožehneme nad plamenem (již v aseptickém prostředí)

4. Extirpace embryí

povrchově desinfikovaný plod položíme na dno sterilní Petriho misky a skalpelem nařízneme perikarp plodu, pinzetou vybíráme semena (hybridní plody mají obvykle menší počet semen), která pokládáme na podložní sklíčko pod binokulární lupou, ostrými preparačními jehlami natrháme osemení a vyjmeme endosperm (pokud je vyvinut), ve kterém je uloženo embryo a to jemně vypreparujeme (nebo vytlačíme)

5. Kultivace embryí *in vitro*

izolované embryo nalepíme na jehlu a přeneseme na médium do Petriho misky, rostoucí embryo můžeme pasážovat po několika dnech do Erlenmayerovy baňky s médiem MS

Tabulka: Vyhodnocení experimentu (celá skupina společně vyhodnotí a doplní do tabulky).

vývojová stádia embryí	médium	počet embryí celkem/ počet prorůstajících embryí	prorůstajících embrya (%)
globule, srdce, torpédo	MS + 0,1 mg/l IBA + 0,1 mg/l BAP		
vycházková hůl, kroužek, zralé embryo	MS		

Embrya izolovaná ve stádiu torpéda prorostou v rostliny s pravými listy a kořeny během 4 týdnů, ve stádiu kroužku prorostou za 2 týdny.

Závěr: zaznamenáme vývojová stádia izolovaných embryí a jejich prorůstání, případně kontaminace nebo nekrotizace vyjádříme v %

5.2 IZOLACE A KULTIVACE ZRALÝCH EMBRYÍ

Rostlinný materiál: zralá semena *Cucumis sativus* (okurka setá)

Postup:

1. Sterilizace semen

neporušená semena vložíme do injekční stříkačky a sterilizujeme:

- opláchneme v 70 % etanolu 2 min
- sterilizujeme v 8% roztoku chloraminu (s kapkou Tween 20) po dobu 30 min
- opláchneme 3 x ve sterilní destilované vodě (již v aseptickém prostředí)
- necháme ve sterilní vodě bobtnat 1 hodinu

2. Exstirpace embryí

na podložní sklíčko pod binokulární lupou umístíme semeno, pinzetou přidržujeme a pomocí preparační jehly natrháme osemení a extirpujeme embryo

3. Kultivace embryí

embrya umístíme na médium MS v Petriho misce (9 cm, 5 – 10 embryí), kterou uzavřeme parafilmem a umístíme do termostatu (25 °C, tma)

4. Pasáž a další využití

po 7 dnech pasážujeme do kultivačních boxů s médiem OK (MS + 0,01 mg/l IBA a 0,01 mg/l BAP a doplněném 20 mg/l kys. askorbové), přeneseme do kultivační místnosti (22 ± 2 °C, fotoperioda den/noc 16/8h)

Závěr: po 3-4 týdnech jsou listy z rostlin vhodné jako zdroj mezofylových protoplastů nebo pro odvození kalusů (pro kalusové protoplasty)

6. PRAŠNÍKOVÉ KULTURY

Rostlinný materiál: uzavřená poupata r. *Brassica* sp. (brokolice), *Nicotiana* sp. (tabák)
samčí jehnědy *Salix* sp. (vrba)

Postup: **ve cvičení začínáme od bodu 2**

1. Výběr poupat

prašníky izolujeme ve vývojovém stádiu 1-jaderných mikrospor (velikost poupat a velikost prašníků odpovídající 1-jadernému stádiu mikrospor stanovíme barvením železitým acetokarmínem), nebo rychleji vybereme poupata o velikosti, kde je poměr jejich korunních lístků k délce prašníků (petal/anther: P/A < 1)

2. Sterilizace poupat/jehněd

neporušená poupata/jehnědy určené velikosti vložíme do injekční stříkačky a sterilizujeme:

- opláchneme v 70 % etanolu
- desinfikujeme 20 min ve 2,5 % roztoku chloraminu
- opláchneme 3-5 x sterilní destilovanou vodou (*již v aseptickém prostředí*)

poupata/jehnědy pinzetou přeneseme na dno sterilní Petriho misky a přikryjeme její druhou částí (chráníme před zavadnutím)

3. Izolace prašníků z poupat/jehněd

na podložní sklíčko pod binokulární lupou umístíme poupě/jehnědu, jednou rukou přidržujeme pinzetou poupě/jehnědu a druhou pomocí preparační jehly vylamujeme prašníky (! bez nitek!), které jehlou přeneseme na živné médium

4. Kultivace prašníků

prašníky kultivujeme na modifikovaném B5 médiu (Gamborg médium - DUCHEFA) s 10 % sacharosou, doplněném 2 mg/l NAA a 1 mg/l BAP v Petriho miskách (6 cm, 25 prašníků v misce), misky umístíme na 18 hod (přes nos) do termostatu s teplotou 35 - 37 °C ve tmě, pak do termostatu s 25 °C (nepřetržitě ve tmě)

5. Embryogeneze (= androgeneze)

vznik embryoidů vyhodnocujeme po 2, 3, 4, 5, 6 týdnech kultivace, při hodnocení jsou embryogenní prašníky přenášeny na svěží médium a označeny, embryoidy izolujeme a kultivujeme zvlášť ve zkumavkách s B5 médiem na světle den/noc 16/8 hod v kultivační místnosti při teplotě 22 ± 2 °C

6. Regenerace rostlin (z časových důvodů neprovádíme)

embryoidy dopěstujeme v rostliny, morfologicky vyhodnotíme, pomocí izoenzymů ověříme jejich původ z mikrospor a karyologicky vyhodnotíme počet chromozómů (n, 2n)

Tabulka: Hodnocení prašnickové kultury (hodnocení celé skupiny)

genotyp	počet izolovaných prašníků	nekrotizace %	androgeneze %

Závěr: vyhodnotíme po 4 - 6 týdnech tvorbu kalusů, nekrotizaci prašníků a vznik embryoidů v %

Pozn.

Při regeneraci embryoidů v rostliny mohou nastat případy: embryoid nekrotizuje
 prorůstá pouze kořínek
 vzniká pevný útvar s kořínkem
 vitrifikované nadzemní části
 prorůstá celá rostlinka

Habituálně se od sebe liší diploidní rostliny původem z různých embryoidů, rostliny haploidní od diploidních, polyploidní od diploidních.

Acetokarmín (železitý acetokarmín)

1,5 g karmínu (SERVA) přidáme do 100 ml 45% kyseliny octové a zvolna vaříme v Erlenmayerové baňce jednu hodinu. Po vychladnutí přefiltrujeme. K jedné polovině připraveného acetokarmínu přidáme několik kapek nasyceného roztoku chloridu železitého ve 45 % kyselině octové až je barvivo modravě-červené a pak přidáme zbytek neupraveného acetokarmín (uchovááme v tmavé láhvi).

Na podložní skličko do kapky média NLN přeneseme preparační jehlou mikrospóry (z poupat určité velikosti), přikápneme acetokarmín, opatrně nahřejeme nad kahanem (barvivo se nesmí srážet), necháme 2 min. stát a přikryjeme krycím sklíčkem, pozorujeme pod mikroskopem a zjistíme vývojové stádium pylových zrn

7. IN VITRO OPYLOVÁNÍ

Rostlinný materiál: uzavřená poupata *Cucumis sativus* (okurka setá),
Cucumis melo (meloun cukrový)

7.1 IZOLACE MIKROSPÓR

Odběr a povrchová sterilizace poupat - SAMČÍ KVĚTY

- a) poupata odebíráme neporušená nezralá (uzavřená, odpovídá stádiu pozdně jednojaderných až časně dvoujaderných mikrospor) a umístíme hned do kádinky obklopené ledem (odebíráme 10 - 15 poupat)
- b) sterilizujeme v injekční stříkačce: 70 % etanol (2 min); 2,5 % chloramin (10 min) a 3 x propláchneme ve sterilní destilované vodě (ve flowboxu)

Extrakce mikrospor

- a) prašníky izolujeme z poupat pomocí nástrojů na sterilním papíře pod binokulární lupou, vložíme do centrifugační zkumavky s vychlazeným NLN médiem (modifikované NLN 13 médium) a opatrně rozdrtíme skleněnou tyčinkou
- b) k suspenzi přidáme cca 2 - 5 ml vychlazeného NLN média, filtrujeme přes 72 μm nylonový filtr (podíl na filtru a případně zkumavku proplachujeme vychlazeným NLN médiem aby výsledný objem byl 8 - 10 ml), přepipetujeme do čisté zkumavky
- c) centrifugujeme 3 x při 900 rpm (10 - 5 - 5 min), po každé centrifugaci odstraníme supernatant a k sedimentu přidáme médium NLN na původní objem a resuspendujeme
- d) po poslední centrifugaci přidáme 1-2 ml NLN média (kolik vajíček budeme chtít opylovat), stanovujeme životnost pylových zrn pomocí FDA a hustotu pylových zrn pomocí Bürkerovi komůrky

7.2 IZOLACE NEZRALÝCH VAJÍČEK

Odběr a povrchová sterilizace poupat - SAMIČÍ KVĚTY

- a) poupata odebíráme nezralá (uzavřená) a umístíme do kádinky s ledem (10 – 15 poupat)
- b) sterilizujeme v injekční stříkačce (jako samčí poupata, 1b)

Extirpace vajíček / zárodečných vaků

- a) na sterilním papíře rozřežeme poupata na $\frac{1}{2}$ či $\frac{1}{4}$ (dle velikosti) a pod binokulární lupou pomocí nástrojů izolujeme vajíčka (zárodečné vaky) a jehlou je přenášíme (zárodečné vaky) na médium pro IVP (*in vitro* opylování; médium CP, YS)
- b) na jednu Petriho misku (6 cm průměr) sadíme 10 – 15 vajíček (zárodečných vaků)

7.3 OPYLOVÁNÍ *IN VITRO*

In vitro opylování (IVP):

- a) Pasteurovou pipetou se směsí pylových zrn v NLN médiu zakápneme izolovaná vajíčka (zárodečné vaky), ke každému vajíčku (zárodečnému vaku) jedna kapka (podle hustoty pylových zrn)
- b) Petriho misky s izolovanými vajíčky (zárodečnými vaky) a pylovými zrny kultivujeme v termostatu (27 °C) po dobu vzniku mikrokalusů, pak přeneseme do kultivační místnosti
- c) mikrokalusy (1-2 mm) přeneseme na pevné médium MSN

Závěr: po 3-4 týdnech vyhodnocujeme vznik mikrokalusů

MÉDIA:

NLN MEDIUM (Lichter 1981, makro- a mikroelementy s vitamíny, DUCHEFA)

NLN 1,04 g/l
sacharosa 10 g/l
pH 5,8
sterilizace filtrací

YS (*in vitro* opylování)

Ca(NO₃)₂ · H₂O 600 mg/l
H₃BO₃ 100 mg/l
sacharosa 80 g/l
agar 10 g/l
pH 5,8
autoklávováno

CP (*in vitro* opylování):

MS 4,405 g/l
glycin 9,5 mg/l
kaseinhydrolyzát 500 mg/l
sacharosa 40 g/l
agar 8 g/l
IAA 4 mg/l
KIN 0,5 mg/l
GA₃ 4 mg/l
pH 5,8
autoklávováno

MSN (organogeneze mikrokalusů po *in vitro* opylování)

MS 4,405 g/l
sacharosa 30 g/l
agar 8 g/l
NAA 0,5 mg/l NAA
KIN 1 mg/l
pH 5,8
autoklávováno

Fluorescein diacetát - FDA

zásobní roztok: 5 mg fluorescein diacetátu (SIGMA-ALDRICH) rozpustíme v 1 ml acetonu, uchovááme při - 20 °C v dobře uzavřené lahvičce (před použitím protřepeme)

pracovní roztok: 20 µl zásobního roztoku přidáme do 1 ml NLN média

Do kapky pylové suspenze (50µl) na podložním sklíčku přidáme 20 µl pracovního roztoku FDA, necháme 1-2 min., přikryjeme krycím sklíčkem a pozorujeme fluorescenčním mikroskopem (BX60, hranol WB)

Bürgerova komůrka

Do střední rýhy kápneme suspenzi mikrospór, přiklopíme krycím sklem, které upevníme pomocí držáků počítáme hustotu pylových zrn (mikrospor) podle vzorce:

$$P = \frac{p \cdot v \cdot h \cdot z}{y}$$

P = celkový počet pylových zrn (mikrospor)

p = počet celkem počítaných pylových zrn (mikrospór)

v = převrácená hodnota plochy jednoho políčka, ve kterém jsou protoplasty počítány

h = převrácená hodnota hloubky komůrky

z = ředění vzorku

y = počet celkem počítaných políček

P = celkový počet pylových zrn (mikrospór) v 1 mm³ (násobíme 10³, aby byl výsledek v cm³ = 1 ml)

8. KLÍČENÍ SEMEN V PODMÍNKÁCH *IN VITRO*

Příprava etiolovaných hypokotylů pro izolaci protoplastů a *in vitro* rostlinek pro izolaci protoplastů

Rostlinný materiál: semena *Brassica oleracea* var. *botrytis* (květák)
Cucumis sativus (okurka setá)

Postup:

1. Příprava semen

vybereme nepoškozená semena a vložíme do injekční stříkačky, kterou si označíme

2. Sterilizace semen

- opláchneme v 70 % etanolu
- sterilizujeme v 36 % roztoku SAVO (s kapkou Tweenu) po dobu 30 min
- propláchneme 3 x sterilní destilovanou vodou (již v aseptickém prostředí)

3. Výsev semen

semena jehlou přeneseme pinzetou na ½ M - S médium v Petriho miskách (6 cm, *Brassica* - 10 semen) nebo v Petriho miskách (9 cm, *Cucumis* - 10 semen)
! semena musí ležet na povrchu média !

4. Kultivace semen

Petriho misky se semeny umístíme v termostatu a kultivujeme ve tmě při 25 °C po dobu 5 - 7 dnů

5. Výběr semenáčků pro izolace hypokotylových protoplastů

před izolací důkladně kontrolujeme výskyt kontaminací
(semenáčky s kontaminací nepoužíváme)

6. Příprava explantátu pro izolaci hypokotylových protoplastů

jako explantát použijeme jen hypokotyly, vytáhneme semenáčky z kultivačních nádob, položíme na sterilní filtrační papír, odřízneme hypokotyl 0,5 cm nad kořínek a 0,5 cm pod dělohami

7. Příprava rostlinek pro mezofylové protoplasty

ze semenáčků odřízneme nadzemní část a přeneseme do Erlenmayerovy baňky (objem 100 ml, s médiem M-S, 30 ml, 4 explantáty) a umístíme v kultivační místnosti, po 3 týdnech použijeme pro izolace mezofylových protoplastů

Závěr: etiolované hypokotyly ze semenáčků jsou vhodné pro izolace hypokotylových protoplastů, listy rostlinek rostoucích v in vitro podmínkách jsou vhodné pro izolaci a kultivaci mezofylových protoplastů (odpadá povrchová sterilizace listů) nebo odvození kalusů na médiu MSC (MS + 2,5 mg/l NAA + 1 mg/l BAP)

9. IZOLACE A CHEMICKÁ FÚZE PROTOPLASTŮ

9.1 IZOLACE PROTOPLASTŮ, STANOVENÍ ŽIVOTNOSTI A HUSTOTY

Rostlinný materiál: *in vitro* rostoucí rostlinky r. *Brassica* sp., *Cucumis* sp.,
(úloha 8, dobře rostoucí a kořenící)
etiolované hypokotyly (z 5 - 7 denních semenáčků) r. *Brassica*
nebo z listů odvozené kalusy r. *Cucumis*

Postup: ve cvičení začínáme od bodu 3)

1. hypokotyly a mladé listy (každý zvlášť) nařežeme na 1 mm proužky a umístíme do enzymatického roztoku v Petriho miskách, které zalepíme parafilmem (cca 500 mg rostlinného materiálu na 5 ml enzymatického roztoku):

listy, hypokotyl: 1 % celulosa Onozuka R 10 0,25 % macerozym R 10 v promývacím roztoku pH 5,8 (sterilizace filtrací)	kalus: 2% celulosa Onozuka R 10 1% macerozym R 10 v promývacím roztoku pH 5,8 (sterilizace filtrací)
--	--

2. inkubujeme v termostatu 18 hod ve tmě při 27 °C (přes noc)
3. hrubou protoplastovou suspenzi filtrujeme přes sítko (uhelon 72µm), které pak promyjeme promývacím roztokem (W5- *Brassica* nebo PGly - *Cucumis*), přeneseme suspenzi (Pasteurovou pipetou) do centrifugační zkumavky (do objemu 10 ml, doplníme promývacím roztokem)
4. centrifugujeme při 800 ot/min 5 min (*Cucumis*; pro *Brassica* 700 ot/min)
5. odstraníme supernatant a sediment resuspendujeme ve 4 ml 20 % sacharosy a opatrně převrstvíme 2 ml promývacího roztoku (nemíchat) (celkem 6 ml)
6. centrifugujeme při 800 ot/min 10 min (*Brassica* 700 ot/min)
7. flotující proroplasty (kroužek na rozhraní sacharosy a promývacího roztoku) opatrně odebereme Pasteurovou pipetou do čisté centrifugační zkumavky a resuspendujeme je v promývacím roztoku (4 ml)
8. centrifugujeme při 800 ot/min 5 min (*Brassica* 700 ot/min)
9. supernatant odstraníme a protoplasty v sedimentu resuspendujeme do 1 ml v tekutém kultivačním médiu LCM1 (Debeaujon a Branchard 1992; *Brassica* v B kultivačním médiu Pelletier et al. 1991) a stanovíme životnost protoplastů fluorescencí pomocí FDA (fluoresceindiacetát) a hustotu protoplastů
část suspenze (0,5 ml) použijeme v úloze FÚZE PROTOPLASTŮ
10. podle zjištěné výtěžnosti upravíme výslednou hustotu na $1 - 2 \cdot 10^5$ protoplastů na 1 ml rozpipetujeme do Petriho misek a kultivujeme 2 ml suspenze protoplastů (v 6 cm Petriho misce, zalepené parafilmem) nebo 1 ml (3 cm misky)

11. kultivace protoplastů probíhá 2 týdny v termostatu (tma, teplota 27 °C), pak na světle v kultivační místnosti (fotoperioda den/noc 16/8 hod)

Závěr: stanovíme hustotu protoplastů na 1 g svěží váhy, životnost protoplastů (v %), při vyhodnocení pozorujeme resyntézu buněčné stěny, dělení buněk, tvorbu mikrokalusů...

Fluorescein diacetát - FDA

zásobní roztok: 5 mg fluoesciein diacetátu (SIGMA-ALDRICH) rozpustíme v 1 ml acetonu, uchovááme při - 20 °C v dobře uzavřené lahvičce (před požitím protřepeme)

pracovní roztok: 20 µl zásobního roztoku přidáme do 1 ml promývacího roztoku (připravujeme před použitím)

Do kapky suspenze protoplastů přikápneme 20 µl pracovního roztoku, necháme 1-2 min., přikryjeme krycím sklíčkem a pozorujeme fluorescenčním mikroskopem (BX60, hranol WB)

Calcofluor white - CW (FLUORESCENT BRIGHTENER 28, SIGMA-ALDRICH)

zásobní roztok: 10 mg Calcofluor white rozpustíme v 10 ml destilované vody (sterilizujeme filtrací, rozpipetujeme do mikrozkuavek, udržujeme v lednici)

Na kapku suspenze protoplastů (50 - 100 µl) přidáme 10 µl roztoku CW, necháme 1-2 min, přikryjeme krycím sklíčkem a pozorujeme fluorescenčním mikroskopem (BX 60, filtr WU)

Bürgerova komůrka

Do střední rýhy kápneme suspenzi protoplastů, přiklopíme krycím sklem, které upevníme pomocí držáků a počítáme hustotu protoplastů podle vzorce:

$$P = \frac{p \cdot v \cdot h \cdot z}{y}$$

P = celkový počet protoplastů

p = počet celkem počítaných protoplastů

v = převrácená hodnota plochy jednoho políčka, ve kterém jsou protoplasty počítány

h = převrácená hodnota hloubky komůrky

z = ředění vzorku

y = počet celkem počítaných políček

P = celkový počet protoplastů v 1 mm³ (násobíme 10³, aby byl výsledek v cm³ = 1 ml)

9.2 OVLIVNĚNÍ MEZOFYLOVÝCH PROTOPLASTŮ UV-C ZÁŘENÍM

Rostlinný materiál: suspenze mezofylových protoplastů *Cucumis sativus*, *Brassica oleracea*

Postup: pokračujeme s úlohou 9.1 od bodu 10

1. ihned po izolaci dáme Petriho misku (3 cm) s 1 ml protoplastové suspenze (hustota 1 - 2 . 10⁵ protoplastů na 1 ml) do flowboxu a otevřeme (vzdálenost od UV-C germicidní zářivky 58 cm), flowbox uzavřeme vestavěnou roletkou
2. pod UV-C germicidní zářivkou necháme otevřené misky se suspenzí po dobu 10 min
3. vypneme germicidní zářivku, otevřeme flowbox a odebereme vzorek pro stanovení životnosti protoplastů po ovlivnění UV-C ozáření pomocí FDA
4. Petriho misku zalepíme parafilmem a kultivujeme jako protoplasty, které ovlivněné nebyly (úloha 9.1), 2 týdny v termostatu (tma, teplota 27 °C)

Závěr: zjistíme, o kolik % byla snížena životnost protoplastů srovnáním s protoplastovou suspenzí, která nebyla UV-C zářením ovlivněna

Pozn.

UV-C germicidní zářivku (SANKYO DENKI G307T, 254 nm) pustíme již 10 min před ovlivněním protoplastové suspenze (flowbox uzavřeme roletkou).

UV-C záření je absorbováno nukleovými kyselinami (DNA, RNA) a jinými biologicky důležitými molekulami, v důsledku poškození genetického materiálu dojde k eliminaci buněčného jádra.

UV-C záření je škodlivé i v malých dávkách. Při zásahu oka může vyvolat zánět spojivek, proto použijeme při práci jako ochrannou pomůcku skleněné brýle.

Při práci s germicidní zářivkou vždy uzavřeme flowbox vestavěnou roletkou.

9.3 LOKALIZACE BUNĚČNÉ STĚNY U PROTOPLASTŮ

Rostlinný materiál: mezofylové protoplasty neovlivněné UV-C zářením (úloha 9.1)
mezofylové protoplasty ovlivněné UV-C zářením (úloha 9.2)

Postup:

- 1) odebereme vzorek (0,5 ml) z kultivované suspenze ovlivněné zářením a vzorek (0,5 ml) ze suspenze neovlivněné UV-C zářením do centrifugační zkumavky (každý zvlášť)
- 2) centrifugujeme 1 min při 500 ot/min
- 3) ze sedimentu odebereme 50 - 100 µl, kápneme na podložní sklo a přidáme 50 µl ze zásobního roztoku Calcofluor white
- 4) po 2 min. přikryjeme krycím sklíčkem a pozorujeme v preparátu resyntézu buněčných stěn pod fluorescenčním mikroskopem (BX 60, filtr WU)

Závěr: srovnáme resyntézu buněčné stěny, následné dělení a vysvětlíme, pro jaký typ fúzí lze ozářené protoplasty využít

9.4 CHEMICKÁ FÚZE PROTOPLASTŮ

Rostlinný materiál: izolované protoplasty (mezofylové, hypokotylové, kalusové)
dle návodu: 9.1 Izolace a purifikace protoplastů po bod 9

Postup:

1. izolujeme a purifikujeme protoplasty (hypokotylové, kalusové a mezofylové, každý materiál zvlášť) po bod 8
2. sediment resuspendujeme v centrifugační zkumavce, každý materiál zvlášť, v roztoku M+C (dle množství protoplastů asi 0,1 – 1,0 ml) a stanovíme hustotu a životnost protoplastů
3. mezofylové a hypokotylové nebo mezofylové a kalusové protoplasty smícháme ve zkumavce v poměru 1:1 o konečné hustotě $1 \cdot 10^6$ protoplastů na 1 ml
4. směs protoplastů nakapeme na dno Petriho misky (průměr 3 cm) jako 4 malé kapky (100 μ l) a necháme 20 min sedimentovat (*každý student má 2 Petriho misky*)
5. do každé kapky směsi protoplastů přikápneme roztok PEG (50 μ l) a necháme působit 15 min
6. odebereme mikropipetou roztok PEG (nebo necháme), přikápneme roztok STOP (200 μ l) a necháme působit 20 min
7. odebereme roztok STOP a necháme 10 min stát
8. přidáme 1 - 2 ml tekutého LCM1 média (podle počtu kapek na dně Petriho misky a podle hustoty protoplastů) a přelepíme parafilmem
9. kultivace protoplastů probíhá 2 týdny ve tmě a teplotě 27 °C, pak na světle v kultivační místnosti (fotoperioda den/noc 16/8 hod)

Závěr: rozdíl mezi hypokotylovými a mezofylovými nebo kalusovými a mezofylovými protoplasty, zda byl pozorován vznik heterofúzantů po fúzi, první dělení

Složení použitých roztoků pro izolace a fúze protoplastů:

Roztok	Složení	množství g / l
W5	NaCl	9,0
	KCl	0,8
	CaCl ₂ . 6H ₂ O	27,4
	glukosa	1,0
	pH 5,8 sterilizace filtrací	
Gradient	sacharosa	200,0
	pH 5,8 autoklávováno	
PGLy	KH ₂ PO ₄	0,0272
	KNO ₃	0,101
	CaCl ₂ (bezvodý)	1,1176
	MgSO ₄ . 7H ₂ O	0,246
	KI	0,00016
	CuSO ₄ . 5 H ₂ O	0,000025
	glycin	11,15
	glukosa	18,016
	MES	0,5857
	manitol	65,58
	pH 5,8 sterilizace filtrací	
M + C	manitol	36,44
	CaCl ₂ . 6H ₂ O	17,52
	pH 5,7 sterilizace filtrací	
PEG	PEG (6000)	330,0
	glukosa	36,04
	CaCl ₂ . 6H ₂ O	2,19
	MES	0,976
	KH ₂ PO ₄	0,095
	pH 6,0 sterilizace filtrací	
STOP	sorbitol	91,1
	CaCl ₂ . 6H ₂ O	21,9
	MES	0,976
	pH 7,0 sterilizace filtrací	

LCM1 médium (Debeaujon a Branchard 1992), složení na 1 l média:

Makro- a mikro- elementy s vitamíny: B5 médium (DUCHEFA)

+ doplňky :

inositol	900 mg/l
k. askorbová	2 mg/l
glycin	8 mg/l
glutamin	20 mg/l
kasein hydrolysát	100 mg/l
MES	586 mg/l

+ cukry:

manitol	70 g/l
sacharosa	10 g/l
glukosa	5 g/l

+ růstové regulátory:

NAA	1 mg/l
2,4-D	0,5 mg/l
BAP	0,75 mg/l

pH 5,8

sterilizace filtrací

B médium (Pelletier et al. 1991)

Makro- a mikro- elementy s vitamíny: B5 médium (DUCHEFA)

+ cukry:

manitol	70 g/l
glukosa	20 g/l

+ růstové regulátory:

NAA	1 mg/l
2,4-D	0,25mg/l
BAP	1 mg/l

pH 5,8

sterilizace filtrací