



## INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

**Jméno:**

**Datum:**

### **Téma 14: Testování bakteriální a houbové kontaminace kultur explantátů**

Přítomnost latentních mikroorganismů v kultuře *in vitro* ovlivňuje její růst a vývoj, množitelý koeficient i aklimatizaci. Při kultivaci na klasických médiích používaných pro explantáty se kontaminace mikroorganismy nemusí vždy hned projevit. Často se kontaminace manifestuje až při dlouhodobé kultivaci. Segmenty listů, kořenů nebo prýtů pěstovaných kultur se proto při testování inkubují na různých selekčních médiích, které jsou pro rozvoj mikroorganismů příhodnější.

Bakteriální kontaminaci kultur testujeme na širokospektrém médiu Leifert and Waites Sterility Test Medium (Leifert *et al.* 1989) nebo na médiu B523 (Viss *et al.* 1991).

**Materiál:** Nodální segmenty kultur prýtů africké fialky (*Saintpaulia ionantha* Wendl.) brambor (*Solanum tuberosum* L.), karafiátů (*Dianthus* sp.) a orchidejí (*Potinara* hybr.) apod.

**Média:**

testovací medium B523 (Viss *et al.* 1991) = kaseinhydrolyzát 8 g.l<sup>-1</sup>, MgSO<sub>4</sub> · 7 H<sub>2</sub>O 0,15 g.l<sup>-1</sup>, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 2 g.l<sup>-1</sup>, kvasničný extrakt 4 g.l<sup>-1</sup>, 1% sacharosa, 1% agar  
kontrola = MS medium: makro a mikroelementy MS, vitamíny B5, 2% sacharosa, 0,7% agar, pH 5,7

**Postup:**

1. Vyjmi prýty sterilní pinzetou z kultivační lahve a polož je na sterilní Petriho misku v aseptických podmínkách laminárního boxu.
2. Odděl apikální segmenty prýtů a inokuluj je do udržovacího média pro další kultivaci.
3. Rozřež zbylé prýty na jednotlivé nodální segmenty a tenké řezy.
4. Do agarového B523 média zanoř segment (řez), pomalu jej vytáhni, polož na povrch média a misku uzavři. Tímto postupem se inokulují i spodní vrstvy média s nízkou koncentrací O<sub>2</sub>, která podporuje růst některých anaerobních mikroorganismů.
5. Stejným způsobem inokuluj i kontrolní misku s udržovacím MS médiem.
6. Popiš misky s odpovídajícími segmenty, disky a apikálními segmenty prýtů.
7. Inkubuj inokulované Petriho misky **ve tmě** při 22-30°C po 3 týdny.

**Hodnocení:**

V následujících týdnech kontroluj čistotu kultur.

Kolonie na povrchu pevného média nebo halo v médiu indikují přítomnost kultivovatelných mikroorganismů v kultuře.

Porovnej projevy kontaminace odpovídajících testovaných kultur na testovacím a MS médiu.

Zapiš výsledky do protokolu.

**Literatura:**

Leifert *et al.* (1989): J. Appl. Bacter. 67: 351 – 361.

Viss *et al.* (1991): In Vitro Cell Dev. Biol.-Pl. 27P,42.