



INVESTICE DO ROZVOJE VZDĚLÁVÁNÍ

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

Jméno:

Datum:

Téma 9: Testování bakteriální a houbové kontaminace kultur explantátů

Přítomnost latentních mikroorganismů v kultuře *in vitro* ovlivňuje její růst a vývoj, množitelýský koeficient i aklimatizaci.

Při kultivaci na klasických médiích používaných pro explantáty se kontaminace mikroorganismy nemusí vždy hned projevit. Často se kontaminace manifestuje až po dlouhodobé kultivaci. Segmenty listů, kořenů nebo prýtů pěstovaných kultur se proto při testování inkubují na různých selekčních médiích, které jsou pro rozvoj mikroorganismů příhodnější.

Testování infekcí v *in vitro* kulturách je nutné i pro certifikaci těchto kultur, která je požadovaná při prodeji nebo výměnách.

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

Materiál:

Segmenty kultur prýtů africké fialky (*Saintpaulia ionantha* Wendl.), orchidejí (*Potinara* hybr.), nodální segmenty bramboru (*Solanum tuberosum* L.), karafiátů (*Dianthus* sp.) a apod.

Média:

LW testovací medium = MS médium + vitamíny 2,2 g.l⁻¹, masový extrakt 7,0 g.l⁻¹, pepton 4 g.l⁻¹, NaCl 2,0 g.l⁻¹, glukosa 5 g.l⁻¹, sacharosa 15 g.l⁻¹, kvasniční extrakt 10 g.l⁻¹, 0,8% agar

testovací medium B523 = kaseinhydrolyzát 8 g.l⁻¹, MgSO₄ · 7 H₂O 0,15 g.l⁻¹, K₂HPO₄ 2 g.l⁻¹, kvasničný extrakt 4 g.l⁻¹, 1% sacharosa, 0,8% agar

kontrola = MS médium: makro a mikroelementy MS, vitamíny B5, 2% sacharosa, 0,6% 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 O₂, 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 dobu 3 týdny.
8. Po inkubaci vyhodnoť kontaminace sledovaných kultur.

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 C., Waites W. M. *et* Nicholas, J. R. (1989): Bacterial contaminants of micropropagated plant cultures. - *J. Appl. Bact.* 67:353-361.

Leifert C. *et* Cassels A.C. (2001): Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. - *In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant* 37:133-138.

Viss P.R., Brooks E.M. *et* Driver J.A. (1991): A simplified method for the control of bacterial contamination in woody plant tissue culture. - *In Vitro Cell Dev. Biol. - Plant* 27: 42- .