

UNIVERZITA SV. CYRILA A METODA V TRNAVE

Fakulta prírodných vied



**LABORATÓRNE CVIČENIA Z IN VITRO
SYSTÉMOV RASTLÍN**

Jana Moravčíková, Milan Karas

Trnava 2024

Laboratórne cvičenia z *in vitro* systémov rastlín

Vysokoškolské skriptá

Autorský kolektív:

Doc. Ing. Jana Moravčíková, PhD.

RNDr. Milan Karas, PhD.

Recenzenti:

Prof. RNDr. Zdenka Gálová, CSc.

Ing. Eva Boszorádová, PhD.

Vysokoškolské skriptá boli vypracované v rámci projektu KEGA 001UCM-4/2022.

Vysokoškolské skriptá boli schválené Edičnou radou Univerzity sv. Cyrila a Metoda v Trnave a vedením Fakulty prírodných vied Univerzity sv. Cyrila a Metoda v Trnave pre študentov vysokých škôl.

Rukopis neprešiel jazykovou úpravou.

© Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave

© Ing. Jana Moravčíková, PhD.

© RNDr. Milan Karas, PhD.

Všetky práva vyhradené. Bez súhlasu majiteľa práv toto dielo a ani jeho časti nemožno reprodukovat'.

Vydavateľ: Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, Fakulta prírodných vied, 2024

Vydanie: prvé

ISBN 978-80-572-0459-6

Obsah

Predslov.....	6
Zoznam najviac používaných skratiek.....	7
1 Teoretická príprava.....	8
1.1 Základné vybavenie laboratória pre <i>in vitro</i> systémy.....	8
1.1.1 Laboratórne váhy.....	8
1.1.2 Magnetické miešadlá.....	9
1.1.3 pH meter.....	9
1.1.4 Autokláv.....	10
1.1.5 Laminárne a biologicky bezpečné boxy.....	13
1.1.6 Rastové komory, kultivačné miestnosti, inkubátory.....	16
1.1.7 Laboratórne pomôcky.....	17
1.1.8 Uskladňovanie roztokov, regeneračných médií a biologického materiálu.....	19
1.1.9 Osobné ochranné prostriedky.....	19
1.2 Mikropropagácia rastlín.....	20
1.2.1 Pletivové kultúry.....	22
1.2.2 Prenos rastlinného materiálu do <i>in vitro</i> podmienok.....	25
1.2.3 Kultivačné médiá.....	27
1.2.4 Rastlinné rastové regulátory.....	31
1.2.5 Výber vhodného kultivačného média a zloženia rastových regulátorov.....	35
1.2.6 Antibiotiká v pletivových kultúrach.....	35
1.2.7 Fyzikálne podmienky <i>in vitro</i> kultivácie.....	36
1.3 Fotosyntéza a <i>in vitro</i> kultúra.....	39
1.4 Životaschopnosť peľu <i>in vitro</i>	42
1.5 Hydroponia.....	46
1.5.1 Hydroponické systémy.....	47
1.6 Transformácia rastlín pomocou <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	51
2 Experimentálna časť I.....	58
2.1 Základné pracovné postupy v <i>in vitro</i> laboratóriu.....	58
2.1.1 Sterilizácia laboratórneho materiálu a kultivačných médií.....	58
2.1.2 Príprava kvapalného regeneračného média.....	58
2.1.3 Príprava pevného regeneračného média.....	60
2.1.4 Práca v biologicky bezpečnom boxe triedy II.....	61
2.1.5 Príprava zásobných roztokov rastlinných rastových regulátorov.....	62
2.1.6 Príprava zásobných roztokov antibiotík.....	64

3	Experimentálna časť II	66
3.1	Prenos semien z podmienok <i>in vivo</i> do <i>in vitro</i>	66
3.1.1	Povrchová sterilizácia semien	66
3.1.2	Klíčenie sterilizovaných semien v <i>in vitro</i> podmienkach.....	67
3.1.3	Určenie životaschopnosti semien pomocou testu s 2,3,5 trifenyl tetrazolium chloridom.....	68
3.2	Regenerácia rastlín v <i>in vitro</i> pomocou priamej a nepriamej organogenézy.....	71
3.2.1	Príprava zásobnej koncentrácie rastových regulátorov: kyselina naftyl octová a 6-benzylamínopurín	71
3.2.2	Indukcia tvorby kalusu z listových segmentov <i>in vitro</i> tabaku virgínskeho	71
3.2.3	Indukcia tvorby výhonov z listových segmentov <i>in vitro</i> rosičky okrúhlostej a rosičky kapskej	73
3.2.4	Indukcia tvorby výhonov z listov a stopiek <i>in vivo</i> fialky africkej	75
3.3	Multiplikácia <i>in vitro</i> rastlín a prenos do <i>ex vitro</i> podmienok.....	77
3.3.1	Multiplikácia rastlín tabaku virgínskeho rastúcich v podmienkach <i>in vitro</i>	77
3.3.2	Multiplikácia <i>in vitro</i> rastlín <i>Drosera rotundifolia</i> a <i>Drosera capensis</i>	79
3.3.3	Prenos <i>in vitro</i> rastlín do <i>ex vitro</i>	80
3.4	Vplyv kultivačných podmienok na obsah fotosyntetických pigmentov.....	81
3.4.1	Vplyv svetelných podmienok na obsah fotosyntetických pigmentov	81
3.5	Stanovenie životaschopnosti peľu <i>in vitro</i>	83
3.5.1	Stanovenie životaschopnosti peľu <i>in vitro</i>	83
3.6	Hydropónia	86
3.6.1	Príprava rastlinného materiálu na hydropóniu	86
3.6.2	Prenos rastlín do hydropónie	87
3.6.3	Využitie hydropónie na štúdium vplyvu salinity na rast a vývin rastlín.....	90
3.7	Transformácia rastlín pomocou <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	94
3.7.1	Príprava bakteriálneho inokula	94
3.7.2	Transformácia listových segmentov tabaku virgínskeho pomocou <i>Agrobacterium tumefaciens</i>	96
3.7.3	Histochemické stanovenie aktivity beta glukuronidázového génu	97
4	Výpočty používané v <i>in vitro</i> laboratóriu	99
4.1	Premena jednotiek	99
4.2	Koncentrácia roztokov.....	101
4.3	Príprava regeneračného média	101
4.3.1	Výpočet návažkov jednotlivých komponentov pevného regeneračného média.....	101

4.3.2	Výpočet objemu, ktorý je potrebný zo zásobného roztoku rastového regulátora pridať do regeneračného média, aby sa dosiahla jeho požadovaná koncentrácia v médiu.....	102
4.3.3	Výpočet zásobnej koncentrácie rastového regulátora, aby sa zo zásobného roztoku rastového regulátora do regeneračného média pridal presne určený objem, za účelom dosiahnutia jeho požadovanej koncentrácie v médiu.	104
4.3.4	Riedenie regeneračného média.....	105
4.4	Výpočet regeneračnej účinnosti	106
5	Spracovanie a vyhodnotenie výsledkov	106
5.1	Kvalitatívne vyhodnotenie.....	107
5.2	Kvantitatívne vyhodnotenie.....	108
6	Použitá literatúra.....	111

Predslov

Vysokoškolské skriptá „Laboratórne cvičenia z *in vitro* systémov rastlín“ oboznamuje študentov so základnými princípmi a postupmi, ktoré sa používajú pri práci s rastlinami v podmienkach *in vitro*. Skriptum je primárne určené predovšetkým pre študentov študijného odboru Biotechnológie na UCM v Trnave, ako aj pre všetkých, ktorí majú záujem získať praktické skúsenosti s manipuláciou s rastlinami v podmienkach *in vitro*.

Autori

Zoznam najviac používaných skratiek

BSC	Biologicky bezpečný box/kabinet („Biologically Safety Cabinet“)
MS médium	Murashige a Skoog médium
LB médium	Luria a Bertani médium
KM médium	klíčiace médium
NAA	kyselina 1-naftyl octová
BAP	6-benzylamínopurín
GUS	beta - glukuronidáza
PGR	rastlinné rastové regulátory („Plant growth regulators“)

1 Teoretická príprava

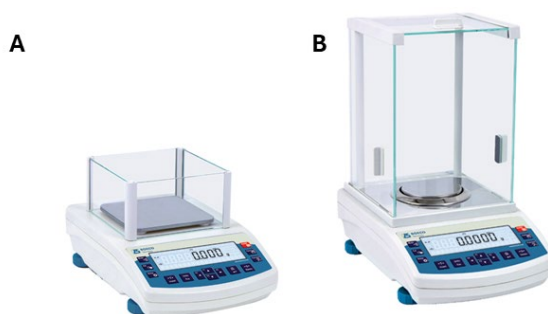
1.1 Základné vybavenie laboratória pre *in vitro* systémy

Práca v laboratóriu určenom pre prácu s rastlinnými pletivovými kultúrami vyžaduje mať k dispozícii niektoré prístroje/zariadenia, ktoré potrebujeme na to, aby sme mohli vykonávať nasledovné úkony súvisiace s pletivovými kultúrami:

- Pripravovať umelé živné médiá (váhy, pH meter, magnetické miešadlá),
- sterilizovať nástroje a pripravené živné médiá (autokláv),
- manipulovať s biologickým materiálom v sterilných podmienkach (biologicky bezpečné boxy, laminárne box),
- kultivovať biologický materiál za presne definovaných podmienok (inkubátory, rastové komory, kultivačné miestnosti).

1.1.1 Laboratórne váhy

Laboratórne váhy sú prístroje, ktoré slúžia na presné naváženie jednotlivých komponentov regeneračného média. V laboratóriu pletivových kultúr sa môžeme stretnúť s dvomi typmi váh a to sú **analytické váhy** (rozlíšenie od 0,01 mg do 1 mg) a **presné váhy** tzv. predvažovačky (rozlíšenie od 0,001 g až po 0,1 g) (Obrázok 1.1). Predvažovačky sa využívajú pri príprave regeneračných médií, zatiaľ čo analytické váhy sa využívajú pri príprave napríklad zásobných roztokov rastových regulátorov, ktoré sú potrebné v nízkej koncentrácii a treba ich čo najpresnejšie navážiť.



Obrázok 1.1 Ukážka presných váh (A) a analytických váh (B) používaných v laboratóriu pletivových kultúr (Zdroj: <https://www.laboratornatechnika.sk>).

1.1.2 Magnetické miešadlá

Magnetické miešadlá umožňujú miešanie roztokov pomocou rotujúceho magnetického poľa okolo stredu plošiny. Toto rotujúce magnetické pole indukuje magnetické pole v miešadielku (Obrázok 1.2), čo spôsobuje jeho otáčanie. Rýchlosť otáčania je možné regulovať. Magnetické miešadlo môže byť s ohrevom alebo bez ohrevu.



Obrázok 1.2 Ukážka magnetického miešadla, rôzne typy miešadielok a vyťahovač magnetických miešadielok. (Zdroj: <https://www.laboratornatechnika.sk>).

1.1.3 pH meter

Prístroj pH meter (Obrázok 1.3) meria kyslosť alebo zásaditosť roztoku. Kyslé roztoky majú kladne nabité vodíkové ióny a alkalické roztoky majú záporne nabité hydroxidové ióny. pH znamená silu vodíka a vypočítava sa na základe počtu vodíkových iónov v kvapaline. Vodíkové ióny vytvárajú kladný náboj, kyslý roztok s mnohými vodíkovými iónmi môže ľahšie viesť elektrický prúd, pH metre merajú schopnosť vodíkových iónov prítomných v roztoku viesť elektrický prúd. pH metre zohrávajú rozhodujúcu úlohu pri udržiavaní optimálnych podmienok pre rast a vývin rastlín v podmienkach *in vitro*. Pred samotným meraním pH, musí byť pH meter kalibrovaný a to pomocou kalibračných roztokov (zvyčajne pH 4.0, pH 7.0 a pH 10.0), ktoré sú zvyčajne dodané spolu s pH metrom predajcom, ale je ich možné aj dokúpiť samostatne. Pred samotným meraním pH v roztoku musia byť všetky jeho zložky úplne rozpustené. Meranie

pH sa uskutočňuje ponorením elektródy do roztoku, pričom sa pH upravuje za neustáleho miešania roztoku na požadovanú hodnotu pomocou zriedenej kyseliny (HCl o koncentrácii 1 mol.dm⁻³ alebo 0,1 mol.dm⁻³) alebo zásady (roztok NaOH, KOH o koncentrácii 1 mol.dm⁻³ alebo 0,1 mol.dm⁻³), podľa toho, či potrebujeme pH znížiť alebo zvýšiť. pH štandardného regeneračného média sa vo všeobecnosti pohybuje od pH 5.6 až pH 5.7, ale závisí to aj od rastlinného druhu, nakoľko niektoré druhy vyžadujú kyslé pH regeneračného média, napríklad pH 4.9 v prípade mäsožravej rastliny rosičky okrúhlostej.



Obrázok 1.3 Ukážka štandardného pH metra so sklenou elektródou používaného v laboratóriu *in vitro* systémov. (Zdroj: autori).

1.1.4 Autokláv

Autokláv známy aj ako parný sterilizátor, je najúčinnjšie zariadenie používané na sterilizáciu vo vedeckých laboratóriách, zdravotníckych zariadeniach a priemyselných prevádzkach na sterilizáciu rôznych nástrojov, nádob, roztokov alebo médií a materiálov. Využíva paru za zvýšeného tlaku na ničenie baktérií, vírusov a spór prítomných na nástrojoch, vo vode, v roztokoch alebo v kultivačných médiách. Prvý autokláv vynášiel Charles Chamberland v roku 1879. Koncept dezinfekcie a sterilizácie však zaviedol v roku 1881 Robert Koch. V roku 1933 prichádza na trh nový moderný autokláv, prvý tlakový parný sterilizátor už s kontrolovaným výkonom. Na trhu sú dostupné autoklávy s horizontálnym a vertikálnym plnením (Obrázok 1.4).



Obrázok 1.4 Ukážka autoklávu s horizontálnym a vertikálnym plnením. (Zdroj: <https://www.ibiotech.sk>).

Autokláv pracuje na princípe sterilizácie vlhkým teplom. Vysoký tlak vo vnútri komory zvyšuje bod varu vody a zároveň zabezpečuje rýchly prienik tepla. Vlhkosť prítomná v pare spôsobuje koaguláciu proteínov mikroorganizmov, čo spôsobuje nevratnú stratu ich aktivity a funkcií a tým sterilitu nástrojov alebo médií. Všetky veľkosti autoklávov pracujú na jedinom princípe, ktorý zahŕňa tri cyklické fázy sterilizácie:

1. **Fáza čistenia** - vzduch prítomný v uzavretej komore je vytlačený parou, ktorá sa pohybuje dovnútra cez sterilizátor;
2. **Fáza expozície** - v tejto fáze je odsávací ventil zatvorený a teplota a tlak vo vnútri uzavretej komory sa zvýšia na požadovanú hodnotu. Teplota sa udržiava počas nastavenej doby;
3. **Fáza odsávania** - odsávací ventil sa otvorí, para sa odstráni a komora sa vráti na normálnu teplotu a tlak.

Sterilizácia regeneračných médií a laboratórneho materiálu prebieha pri teplote 121°C a tlaku 1,05 kg.cm⁻² počas 20 minút.

Štandardný autokláv pozostáva z nasledujúcich častí:

- **Tlaková komora**, ktorá je hlavnou časťou autoklávu. Skladá sa z vnútornej komory a vonkajšieho plášťa. Plášťová komora laboratórných autoklávov je naplnená parou, aby sa skrátil čas a cyklus sterilizácie.
- **Parný generátor**, ktorý sa nachádza pod komorou má elektrický vykurovací systém, ktorý ohrieva vodu a vytvára paru vo vnútri komory.

- **Vákuový generátor** (ak je k dispozícii). Tým sa odstráni vzduch z komory, aby sa zabránilo vytvoreniu vzduchových oblastí, ktoré by mohli byť príčinou nedostatočnej sterilizácie.
- **Chladič odpadovej vody**, ktorý ochladzuje odpadovú vodu (vzduch, paru a kondenzát) predtým, ako vstúpi do odtokového potrubia. Zabráňuje poškodeniu odtokových potrubí, ktoré môže spôsobiť extrémne zahriata voda.

Aby sme zabezpečili sterilitu, nástroje, ktoré chceme sterilizovať musia byť buď v uzavretej nádobe, napríklad z nehrdzavejúcej ocele alebo zabalené v alobal. Nádoby, ktoré sterilizujeme sú buď z laboratórneho skla alebo z takého materiálu, ktorý odolá sterilizačným podmienkam. Kvapalné roztoky alebo živné médiá musia byť v nádobe, ktorá je uzatvorená vrchnákom alebo prípadne alobalom. Nádoby so závitovým uzáverom nesmú byť uzavreté úplne, ale len do polovice. Nikdy nesterilizujeme autoklávaním horľavé, reaktívne, korozívne, toxické alebo rádioaktívne materiály. To, či proces sterilizácie prebehol správne nás informuje aj **špeciálna páska**, ktorú môžeme umiestniť na obal. Táto páska nám umožní kvalitatívne identifikovať, či sterilizačný proces prebehol. Táto páska je ako normálne vyzerajúca páska, avšak obsahuje diagonálne čiary, ktoré sa po úspešnej sterilizácii sfarbia na čierne (Obrázok 1.5). Dnešné autoklávy sú však už vybavené tak, že ak niektorý krok v procese sterilizácie je nedostatočný, jednoducho sa proces zastaví a táto informácia sa objaví na display.



Obrázok 1.5 Ukážka pásky určenej na identifikáciu, že proces sterilizácie prebehol správne. (Zdroj: https://www.tedpella.com/adhesive_html/Autoclave-Steam-Indicator-Tapes.aspx, upravené).

1.1.5 Laminárne a biologicky bezpečné boxy

Na prácu s rastlinami v *in vitro* podmienkach používame laminárne a biologicky bezpečné boxy (BSC, „Biological safety cabinet“).

Laminárne boxy predstavujú uzavreté sterilné pracovné prostredie, ktoré sa zabezpečuje tým, že vzduch do tohoto zariadenia prúdi cez filtre. Na rozdiel od biologicky bezpečných kabinetov boxov, nie je pracovné prostredie oddelené od pracovníka sklom a tak vzduch zo zariadenia sa dostáva priamo k pracovníkovi. Vstupujúci vzduch je filtrovaný cez HEPA (filter 99,99 %, 0,3 μm) alebo ULPA (99,999 %, 0,12 μm) filtre. Prúdenie vzduchu do kabinetu boxu môže byť horizontálne alebo vertikálne (Obrázok 1.6). Pracovná plocha kabinetu je vyrobená z nehrdzavejúcej ocele a musí byť ľahko udržiavateľná.

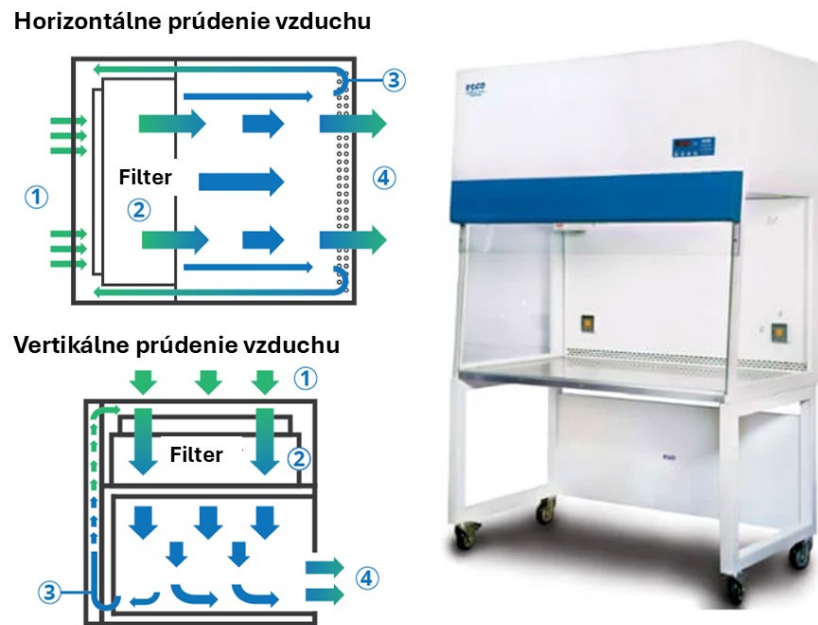
Biologicky bezpečné boxy sú konštrukčne navrhnuté tak, aby bola pracovná plocha oddelená od pracovníka sklom, čím sa zabezpečuje vyšší stupeň ochrany z hľadiska práce s mikroorganizmami a ich zatriedenia do rizikových skupín. Na základe konštrukčného vybavenia ich rozdeľujeme na Biologicky bezpečné boxy triedy I, triedy II a triedy III (Obrázok 1.7).

Biologicky bezpečný kabinet box triedy I je najzakladanejším typom. Neposkytuje však ochranu vzorke, pretože nesterilizovaný vzduch z miestnosti je nasávaný cez pracovnú plochu. Tieto boxy zvyčajne slúžia na uzavretie špecifických zariadení ako je napríklad centrifúga alebo na postupy, ako je prevzdušňovanie kultúr, ktoré môžu potenciálne vytvárať aerosóly. Tieto boxy sú buď napojené na odsávací systém budovy alebo sú odsávané plyny sú filtrované cez HEPA filter späť do laboratória. Týmto spôsobom boxy triedy I chránia pracovníka a životné prostredie pred aerosólom, ale nezabezpečujú sterilitu vzorky.

Biologicky bezpečný box triedy II už zabezpečuje ochranu pracovníka a aj sterilitu vzorky. Vstupujúci a aj vystupujúci vzduch je filtrovaný cez HEPA filter. Princíp činnosti boxu triedy II zahŕňa ventilátor namontovaný v hornej časti zariadenia, ktorý ťahá sterilný vzduch nad pracovnú oblasť, kde sa manipuluje s biologickým materiálom. Vzduch sa potom pohybuje pod pracovnou doskou a späť nahor do hornej časti boxu a potom prechádza cez HEPA filtre. Boxy triedy II sa ďalej delia na päť podtypov v závislosti od odsávacieho systému: typ A1, typ A2, typ B1, typ B2 a typ C1 (Obrázok 1.8). Typ B1 a B2 musia byť napojené na odsávací systém budovy.

Biologicky bezpečný box triedy III sa tiež nazýva aj rukavicový box, nakoľko má pracovný priestor plne uzavretý a so vzorkou sa manipuluje cez zabudované rukavice (Obrázok

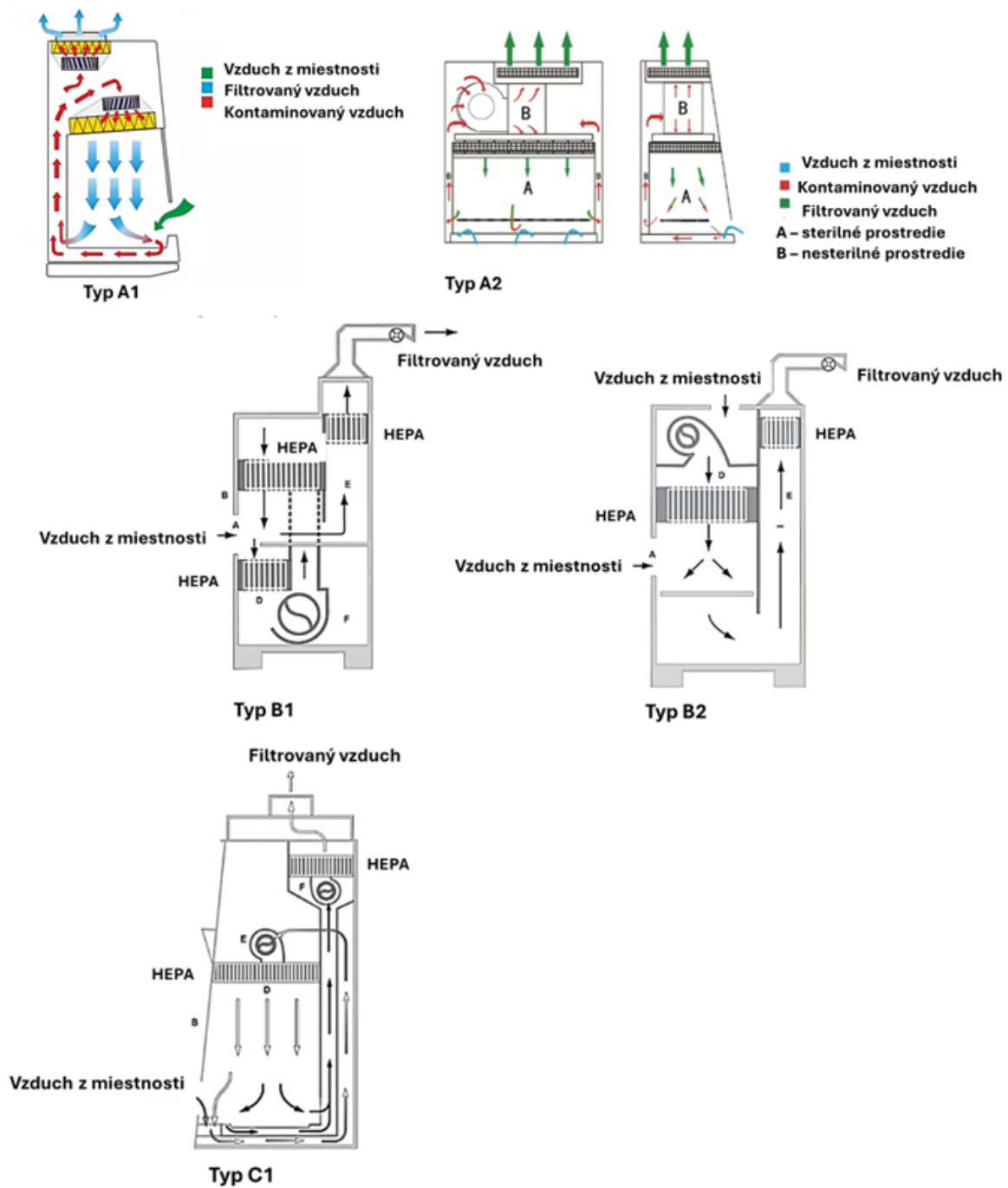
1.9). Slúži na prácu v rizikovej úrovni BSL4. Vnútro boxu je udržiavané pod tlakom. Ku boxu môže byť pripojený aj autokláv s dvojítmymi dverami za účelom dekontaminácie biologického materiálu. Materiál sa vkladá do boxu cez tzv. prenášací box.



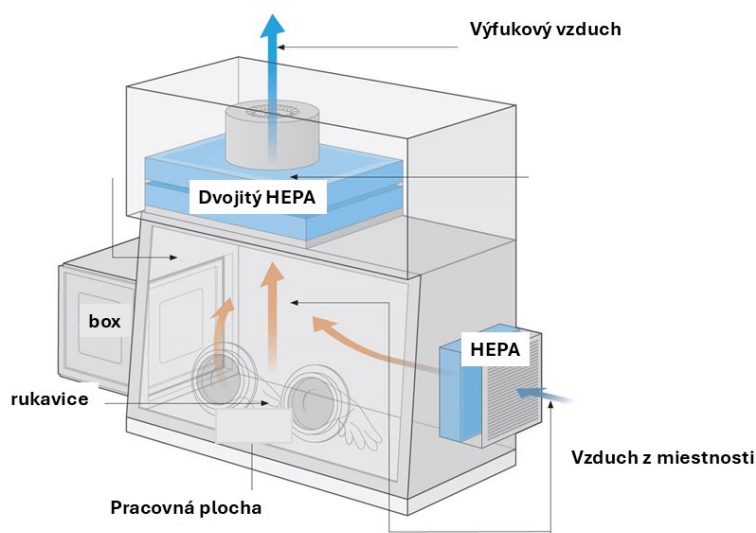
Obrázok 1.6 Ukážka laminárneho boxu s horizontálnym a vertikálnym prúdením vzduchu. 1 – vstup kontaminovaného vzduchu do zariadenia (zelené šípky), 2 – HEPA alebo ULPA filter, 3, 4 – výstup vzduchu zo zariadenia. Modré šípky – sterilný vzduch. (zdroj: <https://www.laboratory-supply.net>, upravené).



Obrázok 1.7 Ukážka biologicky bezpečných kabinetov triedy I, triedy II a triedy III. (Zdroj: <https://microbenotes.com/biosafety-cabinets/>, upravené).



Obrázok 1.8 Ukážka konštrukčného riešenia biologicky bezpečných boxov triedy II, typ A1, typ A2, typ B1, typ B2 a typ C1. (Zdroj: <https://microbenotes.com/biological-safety-cabinets-classes-examples/>, upravené).



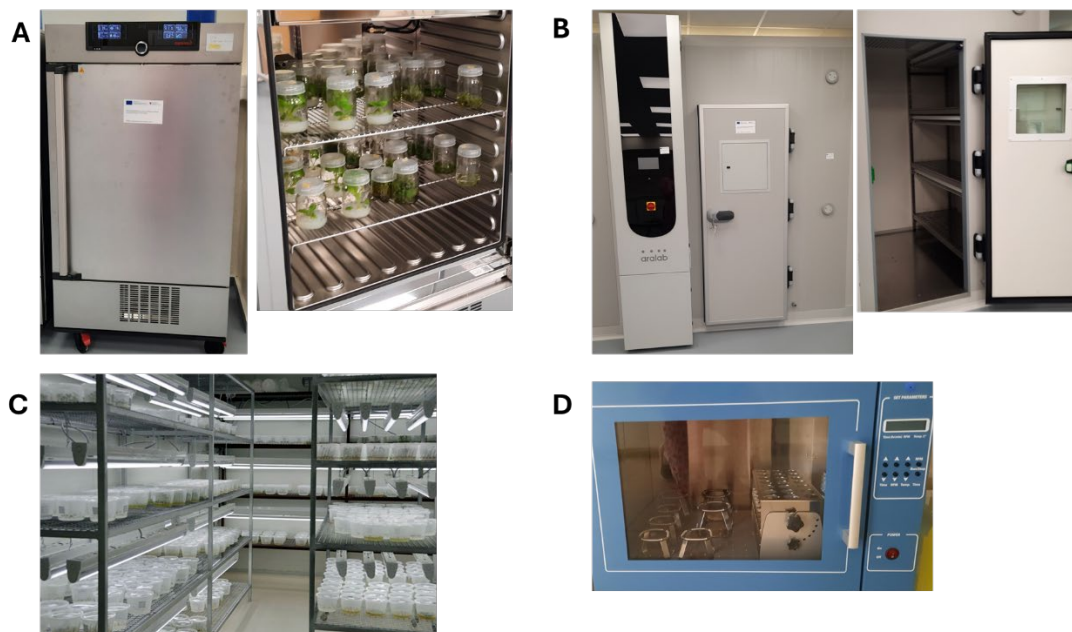
Obrázok 1.9 Ukážka konštrukčného riešenia biologicky bezpečného kabinetu triedy III. (Zdroj: <https://microbenotes.com/biological-safety-cabinets-classes-examples/>, upravené).

1.1.6 Rastové komory, kultivačné miestnosti, inkubátory

Rastové komory umožňujú kontrolovať podmienky (ako vlhkosť, teplota alebo svetlo a iné), v ktorých *in vitro* rastliny rastú. Dôležitým faktorom je reprodukovateľnosť, nakoľko za normálnych podmienok kultivácie vstupujú do tohto procesu aj ďalšie faktory, ako je intenzita slnečného svetla alebo teplota počas dňa. V rastovej komore je zabezpečený svetelný režim, štandardne 16 hodín svetlo a 8 hodín tma, pričom intenzita svetla je počas 16 hodín rovnaká. Podmienky kultivácie je možné upraviť podľa potreby. Na trhu je viacero modelov, v závislosti od ich využitia. Na kultiváciu *in vitro* rastlín sa používajú buď tzv. skrine (Obrázok 1.10A) alebo ak sa prenáša materiál z *in vitro* do *in vivo* podmienok, používajú sa rastové komory väčších rozmerov (tzv. environmentálne komory), ktoré zohľadňujú aj priestor potrebný pre rast rastlín, pričom sa dá do nich aj vstúpiť (Obrázok 1.10B).

Kultivačné miestnosti (Obrázok 1.10C) predstavujú alternatívu k rastovým komorám. Sú to miestnosti, v ktorých sa nachádzajú policové regále, pričom každá polica má svoje osvetlenie. Udržiavanie teploty je zabezpečené klimatizačnou jednotkou.

Inkubátory (Obrázok 1.10D) sú zariadenia, ktoré umožňujú kultivovať biologický materiál (napríklad mikroorganizmy ako *Agrobacterium tumefaciens*, ktorý sa používa na transformáciu rastlinných buniek) za definovaných teplotných podmienok, pričom môžu byť vybavené aj trepačkou s nastaviteľnou intenzitou trepania.



Obrázok 1.10 Ukážka rastových komôr (A, B), kultivačnej miestnosti (C) a inkubátora (D). (Zdroj: A, B a D autori, C <https://www.cabidigitallibrary.org/>).

1.1.7 Laboratórne pomôcky

V laboratóriu *in vitro* systémov sa používa **štandardné laboratórne sklo**, ako sú napríklad kadičky, odmerné valce, Petriho misky alebo fľaše so závitovým uzáverom GL45 (objem 100 ml, 250 ml, 500 ml alebo 1000 ml). Ak sa s nimi má pracovať v sterilných podmienkach, laboratórne sklo sa sterilizuje autoklávaním uzatvorené v alobalom (Petriho misky), so zakrytým otvorom s alobalom (kadičky, odmerné valce) alebo v prípade fliaš uzatvorené vrchnákom. So sterilným laboratórnym sklom sa manipuluje len v BSC.

Z **laboratórnych plastov** sa používajú odmerné a centrifugačné tuby o objeme 15 ml a 50 ml. Tieto tuby sa dodávajú výrobcom uzatvorené vrchnákom už sterilné. Ak sa má zachovať ich sterilita, musí sa s nimi manipulovať v BSC. Mikroskúmavky (objem 1,6 ml a 2 ml) sa pred prácou v BSC musia sterilizovať autoklávaním. Najčastejšie buď v nádobe s uzatvárateľným vrchnákom, alebo zakryté alobalom. Pri manipulácii s nimi v BSC sa nechytajú priamo do ruky, ale používa sa sterilná pinzeta.

Plastové Petriho misky sa dodávajú výrobcom už sterilné uzatvorené v sterilnom plastovom vrecku. Pokiaľ sa s nimi manipuluje v sterilných podmienkach (BSC), zostávajú sterilné pre *in vitro* potreby.

Pipetovacie špičky sa sterilizujú v krabičkách na to určených, ktoré sú zabalené v alobalom. Ak je potrebné zachovať sterilitu, krabička so špičkami sa musí otvoriť len

v sterilných podmienkach, teda v BSC. Sterilné pipetovacie špičky sa nikdy nechytajú do ruky, ale nasadzujú sa pomocou mikropipety. Samotné **mikropipety** nemusia byť sterilné, ale musí sa s nimi v BSC manipulovať tak, aby sa nedotkli steny sterilnej nádoby. Niektoré značky mikropipiet je možné autoklávať.

Laboratórne pomôcky ako **skalpely a pinzety** musia byť z materiálu, ktorý je možné autoklávať pred použitím v BSC a zároveň počas ich opakovaného používania v BSC musia vydržať sterilizáciu nad plameňom.

Kultivačné nádoby používané v *in vitro* podmienkach sú:

- Petriho misky buď sklenené alebo plastové. Plastové sterilné Petriho misky sú určené na jednorazové použitie.
- Nádoby s vrchnákom rôznej veľkosti (Obrázok 1.11) sú buď sklenené, ktoré sa sterilizujú autoklávaním alebo sterilné plastové určené na jednorazové použitie.



Obrázok 1.11 Ukážka komerčne dostupných *in vitro* kultivačných nádob (Zdroj: <https://phytotechlab.com/equipment/culture-vessels>).

1.1.8 Uskladňovanie roztokov, regeneračných médií a biologického materiálu

Chemikálie používané v *in vitro* laboratóriu sa uskladňujú podľa návodu výrobcu a to buď v laboratórnej skrini pri izbovej teplote, v chladničke pri 4°C alebo v mrazničke pri -20°C.

Pripravené regeneračné média sa uskladňujú do použitia v chladničke pri 4°C.

Zásobné roztoky rastových regulátorov a antibiotík používaných pri príprave regeneračných médií sa dlhodobo uskladňujú v mrazničke pri -20°C.

Rastlinný materiál – semená sa dlhodobo uskladňujú v chladničke pri 4°C. Rastlinný materiál, ktorý sa plánuje použiť na molekulárno-biochemické analýzy (v mikroskúmavkách alebo zabalený v alobale) sa najprv zmrazí v tekutom dusíku (-196°C) a až potom sa uskladní v špeciálnej mrazničke (tzv. hlbokomraziaci box) na -80°C.

Mikroorganizmus *Agrobacterium tumefaciens* (laboratórny odzbrojený kmeň), ktorý sa používa na transformáciu rastlín sa dlhodobo uskladňuje na -80°C v mikroskúmavkách so závitovým uzáverom v špeciálnych zmrazovacích roztokoch. Podobne ako pri rastlinnom materiáli sa najprv mikroskúmavka s biologickým materiálom zmrazí v tekutom dusíku a až potom sa uskladní na -80°C. Pred laboratórnym experimentom sa mikroskúmavka z mrazničky vyberie a po rozmrazení sa *A. tumefaciens* v BSC naočkuje na pevné kultivačné médium a po kultivácii sa uskladňuje krátkodobo (2-3 týždne) pri 4°C. Zvyšok biologického materiálu v mikroskúmavke sa opäť zmrazí v tekutom dusíku a uskladní na -80°C do ďalšieho použitia.

1.1.9 Osobné ochranné prostriedky

Osobné ochranné prostriedky (OOP) predstavujú vo všeobecnosti špecializovaný odev alebo vybavenie, ktoré nosí pracovník na ochranu pred nebezpečenstvom (napr. infekčné látky a toxíny). Medzi štandardné OOP zaradíme ochranné okuliare (ochrana očí), laboratórne rukavice (ochrana rúk) a laboratórny plášť. Pri práci s rastlinami v *in vitro* podmienkach sa štandardne vyžaduje **laboratórny plášť**. Používanie požadovaných OOP sa určuje na základe hodnotenia biologického rizika.

1.2 Mikropropagácia rastlín

Mikrorozmnožovanie alebo mikropropagácia je alternatívna metóda vegetatívneho rozmnožovania rastlín, ktorá zahŕňa vývin rastlinných buniek, pletív alebo orgánov v kontrolovanom laboratórnom prostredí. Mikropropagácia bola prvýkrát komerčne použitá na prípravu klonov orchideí v roku 1960. Odvtedy táto technika bola aplikovaná na značný počet komerčných vegetatívne rozmnožovaných druhov rastlín.

Mikropropagácia umožňuje rýchle množenie rastlín, teda produkciu veľkého množstva rastlín v krátkom čase. Sterilné podmienky pletivových kultúr umožňujú produkciu zdravých rastlín, bez chorôb. Zohráva veľmi dôležitú úlohu pri ochrane vzácnych a ohrozených druhov rastlín. Ak napríklad rastliny nedokážu produkovať životaschopné semená, potom rozmnožovanie prostredníctvom vegetatívnych častí je jedinou metódou na ich rozmnožovanie a zachovanie.

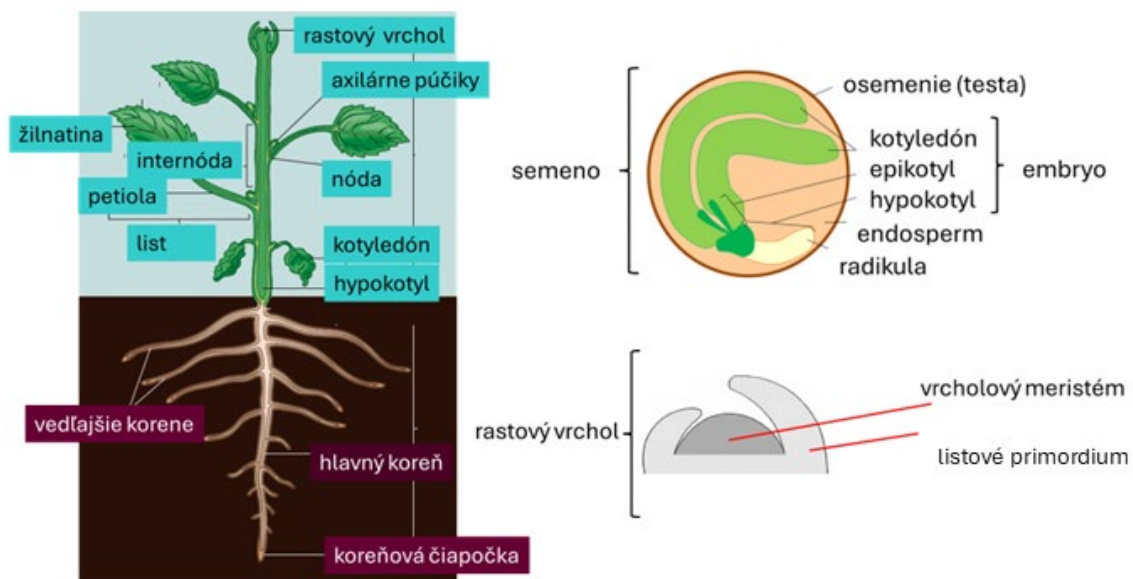
Genetická uniformita rastlín, ktorá je výhodou, môže byť aj nevýhodou mikrorozmnožovania. Strata genetickej diverzity môže obmedziť adaptabilitu rastlín na meniace sa podmienky prostredia, čo môže viesť k strate genetickej diverzity. Rastliny produkované prostredníctvom mikropropagácie sú citlivé na zmeny podmienok prostredia. Zmeny ako teplota, intenzita svetla alebo koncentrácie živín môžu ovplyvniť úspešnosť procesu ich prenosu z *in vitro* do *in vivo* prostredia.

Proces mikropropagácie je viackrokový proces. Pozostáva z piatich krokov, ktorými sú Fáza 0, Fáza 1, Fáza 2, Fáza 3 a Fáza 4. Každý krok má svoje špecifické požiadavky.

Fáza 0 je počiatočná fáza procesu mikropropagácie. Zahŕňa výber materskej (donorovej) rastliny. Pre výber explantátu je prvým a najdôležitejším kritériom, aby donorová rastlina bola v dobrom fyziologickom stave a bez prejavov infekcie. Do úvahy treba brať aj genotyp a jeho responsibilitu na *in vitro* podmienky. Po výbere vhodnej rastliny, materská rastlina rastie asi tri mesiace za aseptických kontrolovaných rastových podmienok. Počas tejto fázy sa udržiavajú svetelné a teplotné režimy vhodné pre jej rast. Anatómia rastliny a stavba semena a rastový vrchol s lokalizáciou meristému a listových primordií je uvedená na Obrázku 1.12.

Fáza 1 zahŕňa prípravu rastlinného materiálu na *in vitro* kultivačné podmienky. Rastlinný materiál alebo explantát (rastový vrchol, meristémy, nodálne segmenty alebo segmenty listov, internód alebo koreňov, atď.) sa musí povrchovo vysterilizovať pomocou rôznych sterilizačných chemikálií (napríklad roztok chlórnanu sodného alebo etanol).

Koncentrácia sterilizačných roztokov a čas sterilizácie sa môže líšiť v závislosti od sterilizačného postupu a typu rastlinného explantátu (Kapitola 1.2.2). Explantáty sa následne prenesú na umelé kultivačné (regeneračné) médiá. Kultivačné médiá obsahujú všetky látky, potrebné pre ich výživu (Kapitola 1.2.3). Pri odbere vhodného rastlinného materiálu vo všeobecnosti platí zásada, že mladé pletivá majú lepší morfogénny potenciál ako staršie. Ďalším faktorom môže byť ročné obdobie odberu alebo pozícia odoberaného explantátu na rastline a účel využitia.



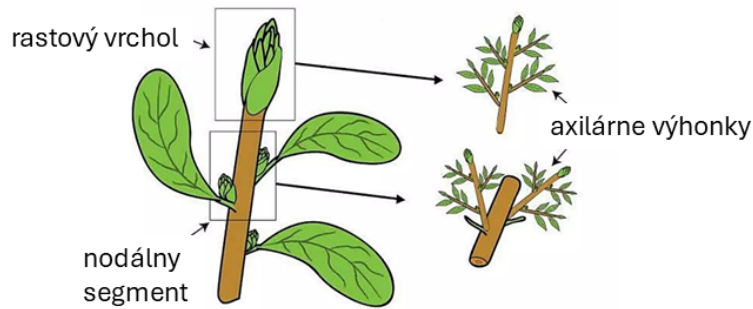
Obrázok 1.12 Anatomia rastliny a stavba semena a rastový vrchol s lokalizáciou meristému a listového primordia (Zdroj: : <https://www.britannica.com/> a Bukdo a kol., 2013; upravené).

Fáza 2 zahŕňa multiplikáciu rastlinného materiálu. V závislosti od typu explantátu použitého vo Fáze 1, sa multiplikujú primárne explantáty (ako napr. vrcholové meristémy z axilárnych a apikálnych púčikov, apikálne a nodálne segmenty s dormantnými púčikmi), alebo vytvorené výhony z listových alebo nodálnych segmentov

Fáza 3 je fáza zakoreňovania. Vytvorené výhony sa prenesú do kultivačného média podporujúceho tvorbu koreňov. Zakoreňovanie môže prebiehať v prítomnosti alebo bez prítomnosti rastových regulátorov, v závislosti od rastlinného druhu. Zakorenené rastliny v *in vitro* podmienkach sa môžu dlhodobo udržiavať pravidelným prenášaním na čerstvé kultivačné médiu prenesením rastových vrcholov, alebo nodálnych segmentov umožňujúcich regeneráciu (Obrázok 1.13).

Fáza 4 zahŕňa aklimatizáciu alebo prenesenie rastlín z *in vitro* podmienok do *in vivo*, teda do pôdy. Rastliny určené na prenos do pôdy musia mať dostatočne vytvorený koreňový

system. Rastliny pestované v podmienkach *in vitro* sú veľmi citlivé na zmenu prostredia a na infekcie. Prenos rastlín do prirodzeného prostredia by sa mal preto vykonávať opatrne. Na ochranu pred náhlym šokom sa musí uskutočniť otužovanie rastlín a to tak, že sa rastliny postupne prispôbujú nižšej vlhkosti a silnejšiemu osvetleniu.



Obrázok 1.13 Rastlinné explantáty, ktoré sa používajú na multiplikáciu a udržiavanie *in vitro* rastlín (Zdroj: <https://www.slideshare.net/slideshow/shoot-tip-culturepptx/252440967>, upravené).

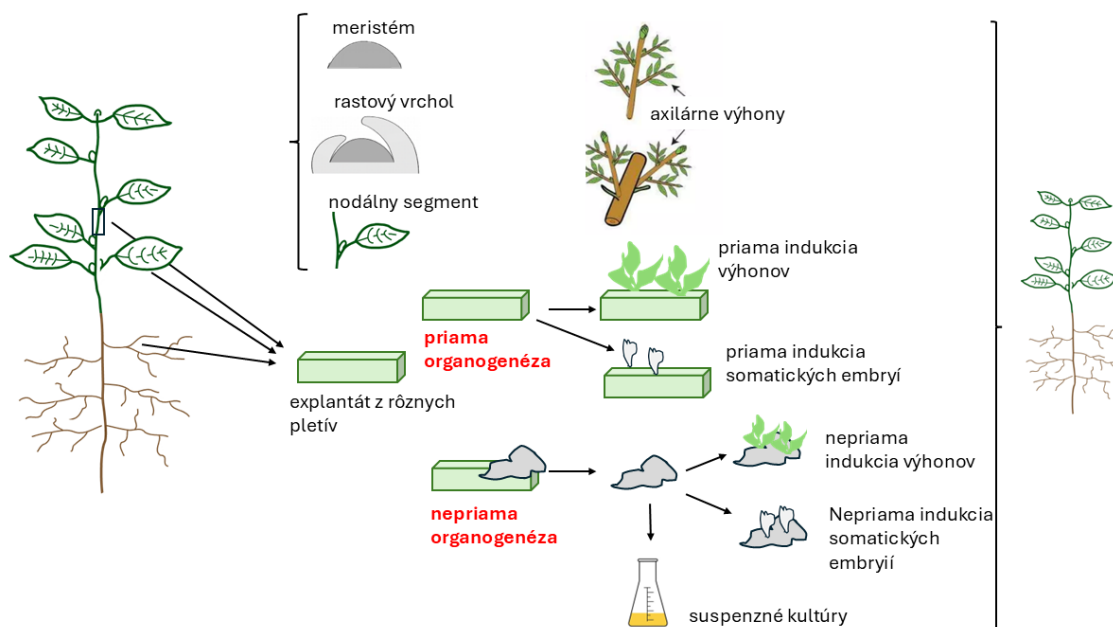
1.2.1 Pletivové kultúry

Pletivové kultúry predstavujú techniky kultivácie rastlinných explantátov na umelom živnom médiu v sterilnom prostredí (Obrázok 1.14).

Explantát je odobratý orgán, skupina orgánov, časť pletiva alebo bunka, ktorý je kultivovaný mimo materského organizmu v podmienkach *in vitro* na regeneračných médiách. Dospelá rastlina pozostáva z pletív a orgánov. **Pletivá** pozostávajú z buniek jednotného tvaru a špecializovanej funkcie. Pletivá, ak sú organizované spolu vytvárajú **orgán** ako sú listy, korene, kvety. Pletivové kultúry sú založené na **totipotencii** rastlinnej bunky, to znamená schopnosti jednej rastlinnej bunky rásť, deliť sa a diferencovať na intaktnú rastlinu. Živočíšne bunky túto schopnosť nemajú. **Morfogenéza** je tvorba a vývin štruktúr (meristémov, výhonkov, koreňov, prípadne somatických embryí), ktoré v pôvodnom pletive neboli. Štruktúry a orgány diferencované *de novo* sa považujú za tzv. prídavné alebo adventívne. Podľa charakteru diferenciácie *de novo* vzniknutých štruktúr rozlišujeme:

- Organogenézu (priama alebo nepriama organogenéza),
- Somatickú embryogenézu (priama alebo nepriama somatická embryogenéza),

- Gametickú embryogenézu, ktorú ďalej rozdeľujeme na androgenézu (diferenciácia z mikrospór) a na gynogenézu (diferenciácia z buniek zárodočného mieška).



Obrázok 1.14 Základné metódy multiplikácie (Zdroj: autori).

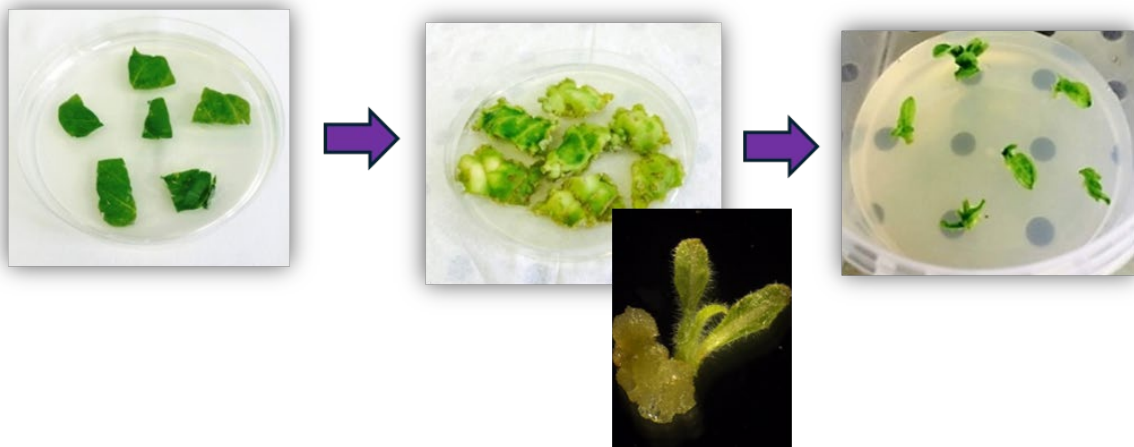
Organogenéza v pletivovej kultúre predstavuje významný spôsob regenerácie rastlín. *In vitro organogenéza* znamená vývin a diferenciáciu orgánov (výhony, resp. korene). Diferenciácia buniek je vývinový proces, ktorým sa špecializuje funkcia a tvar buniek. Dediferenciácia buniek (opak diferenciácie) je vývinový proces, keď sa vysoko diferencovaná bunka mení na nediferencovanú bunku. Organogenéza môže byť priama alebo nepriama, v závislosti od toho, či sa výhony tvoria priamo z explantátov, potom sa jedná o **priamu organogenézu**, alebo sa výhony tvoria z kalusu, potom sa jedná o **nepriamu organogenézu** (Obrázok 1.15).

Kalus je aktívne sa deliaca skupina buniek s rôznym stupňom diferenciácie a schopnosťou spätnej tvorby organizovaných štruktúr. Tvorba kalusu v *in vitro* sa indukuje kombináciou rastových regulátorov (auxínov a cytokinínov) na rezných plochách z akejkoľvek časti rastlinného organizmu, ako napríklad z listu, stonky, stopky alebo koreňa.

Somatická embryogenéza je ďalším dôležitým spôsobom regenerácie *in vitro* rastlín. Embryogenéza je proces, ktorý zahŕňa tvorbu embrya z jednej embryogénnej bunky, ktorou môže byť buď zygota, ktorá vzniká štandardným reprodukčným procesom, alebo nediferencovaná bunka kalusu, ako výsledok umelého asexuálneho procesu. Embryá vyvíjajúce

sa zo zygoty sa nazývajú zygotické embryá, zatiaľ čo tie, ktoré pochádzajú zo somatických buniek, sa nazývajú **somatické embryá**. Somatická embryogenéza môže byť priama alebo nepriama, v závislosti od toho, či sa somatické embryá vytvárajú priamo na explantátoch (**priama somatická embryogenéza**) alebo sa somatické embryá vytvárajú z kalusu (**nepriama somatická organogenéza**). Na rozdiel od zygotického embrya, somatické embryo nemá vaskulárne spojenie s explantátom, z ktorého sa vyvinulo a tak sa somatické embryá nepovažujú za orgány. V somatických embryách sa nevytvára endosperm a osemenie. Vývin embrya je bipolárny.

Meristémová kultúra je typ techniky pletivovej kultúry, ktorá sa využíva na získanie bezvírusových *in vitro* rastlín. **Meristém** predstavuje nediferencované pletivo so schopnosťou aktívne sa deliť a diferencovať sa na špecializované rastlinné pletivá (výhonky alebo korene). Rozlišujeme vrcholový alebo apikálny meristém (Obrázok 1.12), ktorý sa nachádza na rastových vrcholoch rastlín (koreň, stonka) a vmedzerený (interkalárny) meristém, ktorý je uložený na bázach internódií (medzi uzlami). V meristémových kultúrach sa používajú apikálne meristémy.



Obrázok 1.15 Ukážka regenerácie rastlín tabaku virgínskeho (*Nicotiana tabacum* L.) z listových explantátov nepriamou organogenézou (Zdroj: autori).

1.2.2 Prenos rastlinného materiálu do *in vitro* podmienok

Pestovanie rastlín v podmienkach *in vitro* znamená kultiváciu rastlín na umelých živných médiách v sterilných podmienkach. To je možné dosiahnuť len vtedy, ak explantáty pochádzajúce z rastlín z prostredia *in vivo* budú povrchovo sterilné. To sa dá uskutočniť pomocou rôznych chemikálií, ako chlórnan sodný, chlorid ortuťnatý, peroxid vodíka, etanol alebo dusičnan strieborný. Chlorid ortuťnatý sa používa len zriedkavo v *in vitro*, nakoľko je síce vysoko účinný, ale je aj vysoko toxický pre ľudské zdravie a životné prostredie. Najčastejšie sa ako sterilizačné činidlo používa chlórnan sodný (komerčne dostupný aj ako SAVO), etanol a peroxid vodíka. Koncentrácia a dĺžka pôsobenia činidla sa musí experimentálne overiť, nakoľko príliš nízka koncentrácia nemusí byť dostatočná na zabezpečenie povrchovej sterility a zase príliš vysoká koncentrácia môže poškodiť pletivo a regenerácia zlyhá. Podobne je to aj s časom inkubácie v sterilizačnom činidle. Prehľad bežne používaných sterilizačných činidiel, ich koncentrácia a doba inkubácie sú uvedené v Tabuľke 1.

Tabuľka 1 Bežne používané sterilizačné činidlá pre rastlinné pletivá, ich koncentrácia a doba vystavenia (Zdroj: <https://www.sigmaaldrich.com/>).

Sterilizačné činidlá	Koncentrácia [%]	Doba inkubácie [min]
chlórnan vápenatý	9-10	5-30
chlórnan sodný *	0,5-5	5-30
peroxid vodíka	3-12	5-15
etanol	70-95	0,1-5
dusičnan strieborný	1	5-30
chlorid ortuťnatý	0,1-1	2-10

* Komerčné bielicidlo SAVO obsahuje asi 5% chlórnanu sodného, a tak môže byť použité v koncentrácii 10-20%, čo je ekvivalentné 0,5 až 1% chlórnanu sodného.

Do úvahy pri povrchovej sterilizácii treba brať aj typ explantátu a jeho citlivosť na sterilizačné činidlo. Dlhší čas inkubácie alebo vyššia koncentrácia sterilizačného činidla zvyčajne spôsobí poškodenie rastlinných buniek a tým sa zníži šanca na úspešnú *in vitro* regeneráciu. Pred namáčaním v sterilizačnom činidle sa môže explantát namočiť do 70% etanolu, aby sa znížilo povrchové napätie a aby sa činidlo lepšie dostalo do kontaktu s povrchom explantátu. Okrem

toho, účinnosť sterilizácie sa môže ešte zvýšiť aj pridaním zmáčadla, ako je Tween® 20 alebo Tween® 80 do sterilizačných činidiel, čím sa takisto zníži povrchové napätia a umožní sa lepší kontakt s povrchom explantátu. Po sterilizácii v sterilizačnom roztoku sa explantáty niekoľkokrát premyjú v sterilnej destilovanej vode, aby sa odstránili zvyšky činidla, ktoré by mohli brániť regenerácii. Účinnosť sterilizácie sa znásobí premiešavaním (na trepačke) explantátu v sterilizačnom roztoku a aj počas premývania explantátu vo vode. Proces sterilizácie samozrejme musí prebiehať v BSC.

Povrchovo sterilizovať je možné rôzne časti rastliny v závislosti od účelu ich ďalšieho použitia v *in vitro* kultúre. Najčastejšie sú to semená a rastové vrcholy (Obrázok 1.12, Obrázok 1.16), potom nasledujú listy, stonky ale môžu to byť aj korene rastlín. Pri koreňoch, je však riziko kontaminácie omnoho väčšie.



Obrázok 1.16 Ukážka prenosu semien tabaku virgínskeho (*Nicotiana tabacum* L.) do *in vitro* podmienok. Semená tabaku sa povrchovo vysterilizujú a prenesú na Petriho misku s klíčiace regeneračným médiom. Následne po 3 týždňoch, sa vyklíčené rastliny prenesú do kultivačných nádob s regeneračným médiom podporujúcim ich rast a vývin (Zdroj: autori).

Najlepšie kritéria pre prenos rastlinného materiálu do *in vitro* spĺňajú semená. Semená sú relatívne ľahko povrchovo sterilizovateľné, môžu klíčiť za aseptických podmienok a produkujú dobre rastúce mladé pletivo, ktoré už je sterilné a obsahuje vysoký podiel aktívne deliacich buniek. Úspech sterilizácie semien závisí od typu semena. Semená s hrubým povrchom obyčajne vyžadujú dlhší sterilizačný čas a často potrebujú byť ešte pred-ošetrené s ďalším činidlom alebo sa do roztoku sterilizačného činidla musí ešte pridať detergent, aby sa uľahčilo zvlhčenie povrchu semena a aby všetky mikrobiálne kontaminanty prišli do styku s týmto činidlom. Napríklad semená tabaku (*Nicotiana tabacum* L.) sa sterilizujú v 96% etanole počas 1 minúty a následne sa niekoľkokrát premývajú v sterilnej destilovanej vode. Ak sa semená nepoužijú hneď, musia sa voľne vysušiť a to ponechaním v BSC pokiaľ sa neodparí voda. Povrchovo sterilné semená sa potom uchovávajú v sterilnej nádobe v chladničke. Semená sóje

fazuľovej (*Glycine max* L.) sa zase sterilizujú v plynnom chlóre počas 20 hodín a to tak, že sa do desikátora umiestnia otvorené Petriho misky so semenami a do stredu sa umiestni kadička s roztokom chlórnanu sodného (SAVO), do ktorého sa pomaly pridá kyselina chlorovodíková a desikátor sa uzavrie. Reakciou kyseliny chlorovodíkovej s chlórnanom sodným vzniká plynný chlór. Po sterilizácii sa Petriho misky rýchlo uzavrujú, prenesú do BSC a znovu otvoria, aby vyprchali zvyšky chlóru. Takto sterilizované semená sa už nepremývajú v sterilnej vode. Výhodou použitia semien je, že sa môže na jedenkrát vysterilizovať väčšie množstvo rastlinného materiálu a ak sa uchovávajú v sterilných nádobách v chladničke, môžu sa používať aj neskôr. Naproti tomu, použitie listov alebo stoniek ako východiskového materiálu na sterilizáciu, si po ich sterilizácii vyžaduje okamžité využitie v *in vitro* experimentoch, nakoľko takýto rastlinný materiál nie je možné uchovávať.

1.2.3 Kultivačné médiá

Kultivačné médium je najdôležitejšou súčasťou rastlinnej pletivovej kultúry. Úspešný systém kultivácie rastlinných pletív do značnej miery závisí od správneho zloženia kultivačného média. Kultivačné médiá poskytujú kultúram potrebné živiny, ktoré sú zvyčajne dostupné z pôdy. Dôležitou funkciou kultivačného média je aj vytváranie potrebného prostredia pre rast rastlín. Napríklad pevné médiá fungujú ako pôda a poskytujú pletivám fyzickú oporu, aby si udržiavali kontakt so vzduchom, a aby regenerované rastliny dokázali zakoreniť. Kvapalné médium umožňuje explantátom udržiavať stály a maximálny kontakt so zásobami živín. Zloženie kultivačného média sa líši v závislosti od genotypu, typu rastlinného explantátu a účelu kultivácie.

Existuje mnoho komponentov a aditív, ktoré možno použiť v rastlinných regeneračných médiách, ale väčšinu z nich možno rozdeliť do nasledovných kategórií: voda, anorganické soli (tzv. mikro a makroprvky), vitamíny, aminokyseliny, sacharidy, želirujúce látky, regulátory rastu (rastlinné hormóny).

Rastlinné kultivačné médiá sú založené na **vodnej báze**. Pri príprave médií je dôležité používať vodu získanú destiláciou alebo reverznou osmózou.

Soli v médiách možno rozdeliť na **mikroprvky a makroprvky**. Fe, Cu, Mn, Co, Mo, B, I, Ni, Cl a Al sa považujú za mikroprvky a Mg, Ca, P, S, N a K za makroprvky. Toto delenie na mikro- a makroprvky vychádza hlavne z potrieb rastlín. Potreba mikroprvkov je malá, čo sa odráža v nízkej koncentrácii ($0,1-100 \mu\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) týchto prvkov v médiu. Potreba makroprvkov

je oveľa väčšia, a preto sú prítomné v minimolárnych koncentráciách (1-60 mmol.dm⁻³). Makro- a mikro-živiny sa vo všeobecnosti pridávajú do média vo forme solí, ktoré sú v biologicky dostupnej forme. Železo a zinok sa niekedy pridávajú v chelátovej forme, aby sa uľahčila dostupnosť a zabránilo sa zrážaniu týchto prvkov. Bežne používané chelatačné činidlo je EDTA.

Vápnik (Ca) funguje ako kofaktor mnohými enzýmov a je obzvlášť dôležitý pri syntéze buniek. Nedostatok vápnika môže viesť k nekróze hrotu výhonku. Vápnik používaný v rastlinných pletivových kultúrach je väčšinou vo forme chloridu vápenatého a dusičnanu vápenatého.

Horčík (Mg) je rozhodujúci pre fungovanie enzýmov a je neoddeliteľnou súčasťou chlorofylu. Najpoužívanejšou formou horčíka v rastlinných pletivových kultúrach je síran horečnatý.

Dusík (N) je nevyhnutný pre život rastlín. Je zložkou mnohých dôležitých molekúl, vrátane aminokyselín, proteínov, nukleových kyselín, niektorých hormónov a chlorofylu. V rastlinných pletivových kultúrach sa dusík pridáva vo dvoch formách, ako NO₃⁻ a NH₄⁺. Mnohé rastliny rastú najlepšie, ak majú obe formy dusíka. Dusík sa môže pridávať aj v organických formách, ako sú aminokyseliny, hydrolyzáty a organické kyseliny. Organické formy dusíka však nemôžu úplne nahradiť anorganické formy.

Fosfor (P) je neoddeliteľnou súčasťou nukleových kyselín a iných štruktúrnych zlúčenín v rastlinách. Fosfor sa dodáva vo forme (HPO₄²⁻) iónov.

Draslík (K) je v rastlinách hlavným kationom na vyrovnávanie záporných iónov. Množstvo draslíka potrebné v kultivačnom médiu rastlinného tkaniva sa líši v závislosti od druhu rastliny.

Síra (S) je dôležitá v štruktúre proteínov, kde disulfidové väzby medzi susednými cysteínovými a metionínovými zvyškami prispievajú k terciárnej štruktúre. Síra je tiež súčasťou vitamínov tiamínu a biotínu a koenzýmu A, ktorý je dôležitou súčasťou dýchania a metabolizmu mastných kyselín. Vo forme železo-sírových proteínov je dôležitá pri reakciách prenosu elektrónov pri fotosyntéze. Síra sa dodáva vo forme SO₄²⁻, zvyčajne ako síran horečnatý.

Železo (Fe) je potrebné pre syntézu chlorofylu, ako aj pre mnohé oxidačno-redukčné reakcie. Železo v alkalickom pH tvorí nerozpustné zlúčeniny, ktoré sú biologicky nedostupné pre rastlinné pletivo. Pre biologickú dostupnosť železa je stredné pH kritické. Železo sa často pridáva do regeneračných médií v chelátovanej forme ako Fe-EDTA, aby bolo železo biologicky dostupné rastlinným bunkám v širšom rozsahu pH.

Bór (B) je nevyhnutný v enzýmovej aktivite pri biosyntéze lignínu a metabolizme fenolových kyselín. Nedostatok bóru inhibuje bunkové delenie a predlžovanie apikálnych meristémov v koreňoch a výhonkoch. Do regeneračného média sa bór pridáva vo forme kyseliny boritej.

Kobalt (Co) sa síce nepovažuje za základný prvok vo fyziológii rastlín, avšak do regeneračných médií sa pridáva. Vo vyšších koncentráciách však môže byť pre rastlinné bunky toxický.

Meď (Cu) funguje predovšetkým ako kofaktor pre rôzne oxidačné enzýmy. Meď sa používa vo forme síranu meďnatého. Vyššia koncentrácia však môže byť toxická.

Jód (I) nie je základným prvkom, ale pridáva sa do médií na zlepšenie rastu v koreňovej a kalusovej kultúre.

Mangán (Mn) ako kofaktor vyžadujú niektoré enzýmové reakcie, najmä pri dýchaní a procesoch fotosyntézy. Do média sa pridáva vo forme síranu mangánatého.

Molybdén (Mo) je kofaktor enzýmov, ktoré sa podieľajú na premene dusičnanov (NO_3^-) na amónium (NH_4^+). Do média sa pridáva ako molybdénan sodný.

Zinok (Zn) je rastlinami absorbovaný ako dvojmocný kation (Zn^{2+}) najčastejšie vo forme síranu zinočnatého. Je aktivátorom veľkého množstva enzýmov. Medzi typické príznaky nedostatku zinku patria skrátené internódiá a menšie listy.

Na rozdiel od rastlín pestovaných v pôde alebo iných substrátoch, rastliny pestované *in vitro* často nemajú schopnosť syntetizovať **vitamíny**. Takmer vo všetkých médiách pre rastlinné bunkové a pletivové kultúry je prítomný tiamín (vitamín B₁), ktorý je nevyhnutný pre rast. Okrem toho sa do média môže pridávať kyselina nikotínová, pyridoxín a myo-inozitol. Vitamíny sa vo všeobecnosti používajú v dávkach 0,1-10 mg.dm⁻³.

Do kultivačných médií sa pridávajú určité **aminokyseliny**, nakoľko sú ľahko dostupným zdrojom dusíka, ktorý rastliny niekedy ľahšie absorbujú v porovnaní so zdrojom dusíka z anorganických solí. Zmesi aminokyselín, ako je kazeínový hydrolyzát, alebo jednotlivé aminokyseliny ako je glycín, glutamín alebo adenín, sa môžu pridávať do média v koncentráciách v rozsahu od 2 do 1000 mg.dm⁻³.

Väčšina rastlín *in vitro* nie je schopná produkovať svoje vlastné uhľovodíky zo svetla, vody a oxidu uhličitého (fotosyntéza), ako je tomu v štandardných podmienkach, a preto sa do média musí pridávať zdroj **uhlíka**. Najbežnejšie sa do média pridáva (cenovo dostupná) sacharóza, ale môže sa pridať aj glukóza, fruktóza alebo maltóza, v závislosti od rastlinného druhu. Sacharóza sa používa v rozsahu koncentrácie od 10 g.dm⁻³ až po 30 g.dm⁻³. Pri klíčení

semien sa zvyčajne používa koncentrácia sacharózy 10 g.dm^{-3} , pri multiplikácii *in vitro* rastlín 20 g.dm^{-3} a pri navodení regeneračného procesu rastlinných buniek 30 g.dm^{-3} .

Aby sa explantáty neponorili do média, je často potrebná podporná matrica. Nosná matrica môže byť vytvorená stuhnutím **želírujúceho (spevňujúceho) činidla**, ako je agar, agaróza a želatína, alebo mechanickými nosnými materiálmi, ako je filtračný papier alebo polypropylénová membrána. Hlavným problémom pri použití želírujúceho činidla je stupeň vyvolanej hyperhydricity. Niektorým rastlinným druhom môže vyhovovať len určitý druh želírujúceho činidla. Agar je najčastejšou želírujúcou látkou. Je to zmes polysacharidov, ktorá sa získava z rôznych druhov morských rias rodu *Rhodophyta*. Agar vytvára pre pletivá stacionárne prostredie. Pri teplote 100°C sa topí a pri teplote nižšej ako 45°C tuhne. Agar nereaguje so zložkami média ani nie je rozkladaný rastlinnými enzýmami. Agar v kyslom prostredí ($\text{pH} < 4.5$) dobre negéluje. Všetky agary obsahujú nečistoty, ktorých množstvo a čistota sa medzi výrobcami líši. Tieto nečistoty však zvyčajne nemajú vplyv na pletivové kultúry. Používa sa v koncentrácii, ktorá musí byť minimálne $5,5 \text{ g.dm}^{-3}$, aby sa dosiahol spevňujúci efekt.

Ďalším spevňujúcim činidlom je agaróza, ktorá sa extrahuje z agaru. Neobsahuje agaropektín a jeho sulfátové skupiny. Agaróza má vyššiu gélovú pevnosť ako agar. Agaróza sa často používa, keď nečistoty v agare nie sú žiaduce, ako napríklad v protoplastovej kultúre a peľnicovej kultúre. V menšej miere sa používajú gellanové gummy ako gelrit a fytagél pozostávajúce z polysacharidu produkovaného baktériou *Pseudomonas elodea*. Výhodou agaru je, že stuhnuté regeneračné médium vo fľaši je možné rozvariť v mikrovlnnej rúre a následne rozlíať do kultivačných nádob a agar opäť stuhne, zatiaľ čo pri použití fytagélu sa musí médium ihneď rozlíať do kultivačných nádob.

Zloženie kultivačného média má výrazný vplyv na rast a vývin rastlín. Najbežnejšie používaným kultivačným médiom je **Murashige a Skoog (MS) médium s vitamínmi**, označené podobne ako pri ostatných médiách podľa svojich tvorcov. MS médium vytvorili Murashige a Skoog v roku 1962 za účelom optimalizácie kalusovej kultúry tabaku (*Nicotiana tabacum* L.) pre potreby štúdia cytokinínov. MS médium je v súčasnosti najpoužívanejším kultivačným médiom. Médium je tvorené z anorganických solí, vitamínov a aminokyselín. Médium poskytuje všetky základné makroelementy a mikroelementy. Ako zdroj fosforu slúži dihydrogénfosforečnan draselný. Mikroelementy ako bór, mangán, molybdén, meď a zinok hrajú zásadnú úlohu v metabolizme rastlín. Tiamín, kyselina nikotínová, pyridoxín, myoinozitol pôsobia ako enzymatické kofaktory v univerzálnych dráhach vrátane glykolýzy a citrátového cyklu spolu s primárnym a sekundárnym metabolizmom v rastlinách. Glycín slúži ako zdroj

aminokyselín. Médium je veľmi bohaté na makroprvky, čo môže byť problém pre niektoré rastlinné druhy. Aby sa predišlo tomuto problému, MS médium sa často používa s mikroprvkami v plnej koncentrácii, ale s makroprvkami v polovičnej alebo trojštvrťinovej koncentrácii, ako pôvodne publikovali autori. MS médium je teda komerčne dostupné vo viacerých variáciách, je k dispozícii s modifikovanou koncentráciou/obsahom vitamínov alebo aj s modifikovanou koncentráciou/obsahom makroelementov. Základné zloženie MS média je uvedené na Obrázku 1.17.

Mikro prvky			Vitamíny		
	mg.dm ⁻³	μM		mg.dm ⁻³	μM
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	0.11	Glycín	2.00	26.64
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.10	Myo-inozitol	100.00	554.94
FeNaEDTA	36.70	100.00	Kyselina nikotínová	0.50	4.06
H ₃ BO ₃	6.20	100.27	Pyridoxín HCl	0.50	2.43
KI	0.83	5.00	Tiamín HCl	0.10	0.30
MnSO ₄ ·H ₂ O	16.90	100.00			
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	1.03			
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.60	29.91			

Makro prvky		
	mg.dm ⁻³	mM
CaCl ₂	332.02	2.99
KH ₂ PO ₄	170.00	1.25
KNO ₃	1900.00	18.79
MgSO ₄	180.54	1.50
NH ₄ NO ₃	1650.00	20.61

Obrázok 1.17 Základné zloženie MS média s vitamínmi (Zdroj: <https://www.duchefa-biochemie.com/>).

1.2.4 Rastlinné rastové regulátory

Vo fyziológii zvierat sú hormóny syntetizované vo veľmi malých množstvách v jednej časti organizmu a následne transportované do cieľových tkanív. Na rozdiel od živočíšnych hormónov syntéza rastlinného hormónu sa často neobmedzuje na konkrétne pletivo, ale môže sa vyskytnúť v rôznych pletivách. Okrem toho, rastlinné hormóny môžu byť transportované do vzdialených pletív, ale často pôsobia aj v mieste syntézy. Ďalší rozdiel je v nedostatku špecifickosti. Rastlinné hormóny ovplyvňujú široký rozsah bunkových procesov. Kvôli rozdielom medzi živočíšnymi a rastlinnými hormónmi, sa radšej používa výraz „regulátor rastu rastlín“ alebo „rastlinný rastový regulátor“ (PGR, „Plant growth regulators“). Napriek tomu výraz „rastlinný hormón“ je tiež používaný. U zvierat sa hormóny dostávajú do vzdialených

cieľových tkanív cez kardiovaskulárny systém, zatiaľ čo v rastlinách v *in vitro* prebieha takmer všetok transport na veľké vzdialenosti vodným tokom cez xylém a floém. Výnimku tvorí polárny transport auxínu. PGR môžu pôsobiť na rast a vývin stimulačne (auxíny, cytokiníny a gibberelíny) alebo inhibične, keď zase brzdia rast a vývin (kyselina abscisová, ABA).

Účinok PGR závisí aj od jeho stability v médiu a v pletive; a od citlivosti cieľového pletiva. Rastlinné bunky v určitom pletive alebo v určitom vývinovom štádiu nemusia rozpoznať hormonálne signály, alebo môžu byť neschopné uskutočniť požadovanú reakciu. Exogénne PGR ovplyvňujú syntézu a degradáciu endogénnych hormónov. Napríklad, aplikáciou auxínu sa môže indukovať syntéza etylénu, ktorý je spojený s procesom dozrievania (senescencia).

V pletivových kultúrach sa uplatňujú hlavne dve skupiny PGR a to **auxíny a cytokiníny**. Prehľad rastových regulátorov používaných najčastejšie v *in vitro* kultúre a ich účinok je uvedený v Tabuľke 2.

Tabuľka 2 Prehľad rastových regulátorov používaných najčastejšie v *in vitro* kultúre a ich účinok (Zdroj: <https://www.duchefa-biochemie.com/>).

Rastové regulátory		Efekt na pletivovú kultúru
Auxíny	Kyselina indolyl-3-octová (IAA)	• Tvorba meristémov adventívnych koreňov
	Kyselina indolyl -3-maslová (IBA)	• Indukcia somatických embryí
	Kyselina 1-naftyloctová (NAA)	• Bunkové delenie
	Kyselina 2,4-dichlór-fenoxyoctová (2,4-D)	• Tvorba kalusu a rast
Cytokiníny	Zeatín	• Adventívna tvorba výhonkov
	Zeatínribozid	• Bunkové delenie
	6-benzylamínopurín (BAP)	• Inhibícia adventívnej tvorby koreňov
	6-furfurylamínopurín (kinetín)	• Inhibícia predlžovania výhonov
	Tidiazuron (TDZ)	• Inhibícia senescencie listov
Gibberelíny	Kyselina gibberelínová (GA ₃)	• Predlžovanie výhonov
		• Inhibícia adventívnej tvorby koreňov
Kyselina abscisová	Kyselina abscisová (ABA)	• Dozrievanie somatických embryí
		• Tvorba hlúz
		• Podpora dormancie

Auxíny sú rastové regulátory ovplyvňujúce predlžovanie buniek, hlavne vo výhonoch. Sú zodpovedné za apikálnu dominanciu stonky, podporujú rast adventívnych koreňov. Je potrebné poznamenať, že auxíny sú potrebné iba počas počiatočných fáz tvorby adventívnych koreňov, potom sa stávajú inhibičnými a blokujú ich rast. Medzi hlavné prirodzené (natívne)

auxíny patrí kyselina indolyl-3-octová (IAA), kyselina 4-chlórindolyloctová, kyseliny fenyloctová a indolylbutyloctová. K syntetickým auxínom patria kyselina [indolyl-3-indolyl-maslová (IBA), 1-naftyloctová (NAA) a 2,4-dichlórphenoxyoctová (2,4-D)]. V rastlinách sa auxín syntetizuje prevažne v apikálnej oblasti a je transportovaný smerom nadol.

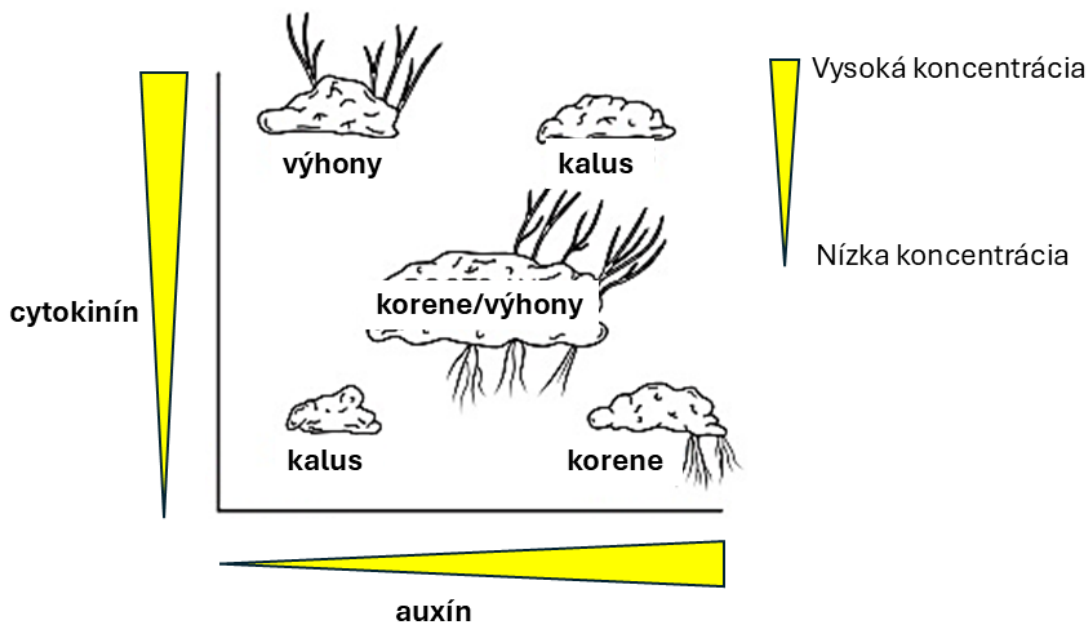
Cytokiníny sú rastové regulátory, ktoré podporujú delenie buniek. Regulujú rast a vývin. Vysoké koncentrácie stimulujú tvorbu adventívnych púčikov a axilárnych výhonkov, inhibujú proces tvorby koreňov, spomaľujú proces starnutia a oddaľujú nástup dormancie. V pletivových kultúrach zvyšujú mitotickú aktivitu. Medzi prirodzené (natívne) cytokiníny patrí zeatín, ktorý bol prvýkrát izolovaný z nezrelého zrna kukurice. Najčastejšie experimentálne používané syntetické cytokiníny sú kinetín, tidiazurón (TDZ) a 6-benzylamínopurín (BAP). Korene sa považujú za hlavné miesto syntézy cytokinínov. Exogénne cytokiníny sú prijímané rastlinnými bunkami s oveľa menšou rýchlosťou (3 až 10-krát pomalšie) ako auxíny.

Kyselina abscisová (ABA) zohráva úlohu v procese dozrievania embryí, pukov a cibúľ a pri opadávaní listov. Keď je ABA prítomná v kultivačnom médiu, inhibuje rast výhonkov, klíčenie embryí a zapríčiňuje uzavretie prieduchov. ABA sa považuje za stresový hormón a spája sa so stresom zo sucha.

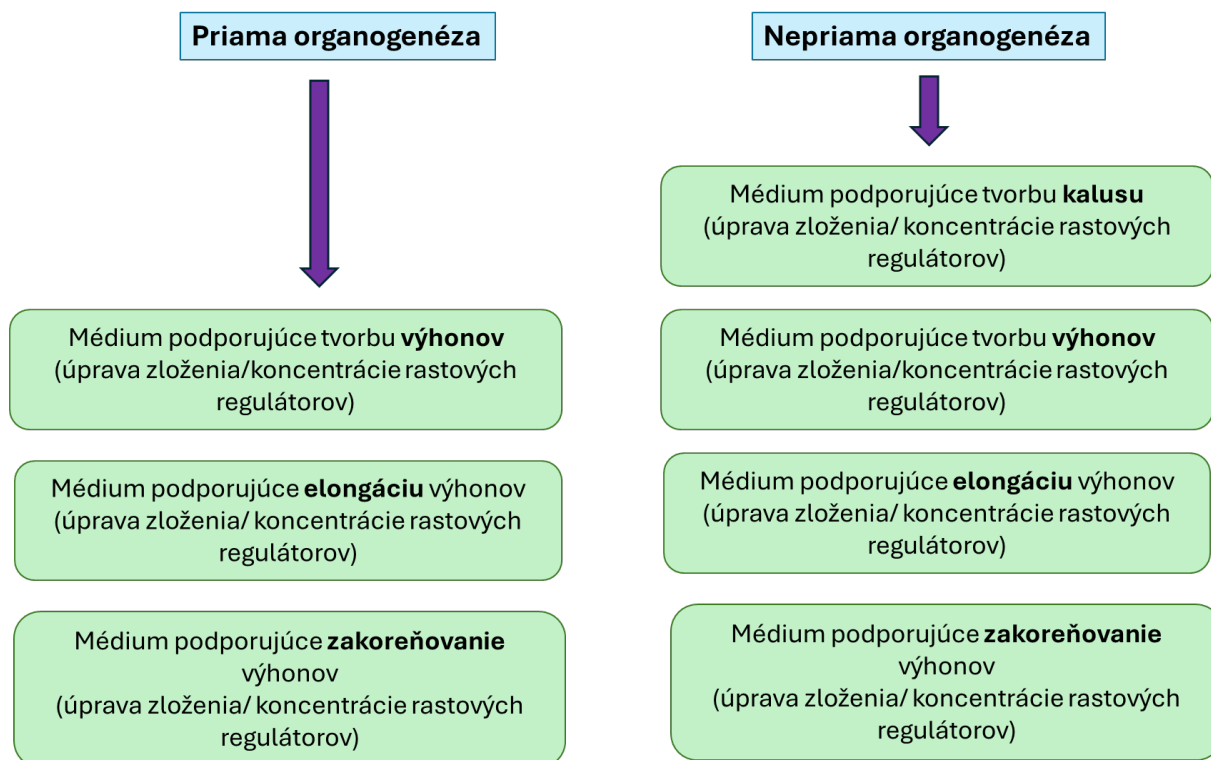
V pletivových kultúrach sa **giberelíny** používajú zriedkavo. Podporujú kvitnutie, ovplyvňujú fázovú zmenu (prechod juvenilných a dospelých stavov) v oboch smeroch v závislosti od druhu, narúšajú dormanciu semien, púčikov, hl'úz a cibúľ, podporujú degradáciu zásob v semenách a spôsobujú predlžovanie stonky. Najčastejšie sa používa kyselina giberelínová (GA₃).

Kombináciou auxínov a cytokinínov v určitom pomere a v určitej koncentrácii je možné v pletivových kultúrach indukovať tvorbu kalusu, výhonov alebo koreňov (Obrázok 1.18). Médium podporujúce indukciu výhonkov by malo mať relatívne nízky obsah auxínov a vysoký obsah cytokinínov (napríklad auxín/cytokinín 1:10 - 1:100). Médium podporujúce indukciu koreňov by malo mať vysoký obsah auxínov a nízky obsah cytokinínov (napríklad auxín/cytokinín 10:1 - 100:1). Médium pre indukciu kalusu by malo mať vyrovnanú hladinu (auxín/cytokinín 1:1).

Pri regenerácii rastlín nepriamou organogéézou, médium musí najprv byť doplnené o rastové regulátory podporujúce kalogéézu (tvorba kalusov) a následne sa kalusové pletivo preniesie na médium doplnené rastovými regulátormi tak, aby sa podporovala tvorba výhonkov (Obrázok 1.19).



Obrázok 1.18 Regulácia tvorby kalusov, výhonov a koreňov v pletivovej kultúre pomocou pomeru cytokinínu a auxínu (Zdroj: https://www.brainkart.com/article/Biochemistry-of-plant-growth-regulation_14117/, upravené).



Obrázok 1.19 Schéma postupu pri navrhovaní zloženia regeneračného média pri priamej a nepriamej organogenéze (Zdroj: autori).

1.2.5 Výber vhodného kultivačného média a zloženia rastových regulátorov

Pri výbere vhodného kultivačného média a zloženia rastových regulátorov sa využívajú v prvom rade poznatky dostupné z vedeckých článkov, týkajúce sa pletivových kultúr daného rastlinného druhu. Zvyčajne sa postupuje tak, že sa až na špeciálne výnimky zvolí štandardne dostupné kultivačné médium a po výbere vhodných rastových regulátorov sa upravuje len koncentrácia týchto rastových regulátorov. Koncentrácia rastových regulátorov sa stanoví experimentálne tak, že sa zvyčajne navrhne 6 koncentrácií auxínu a 6 koncentrácií cytokinínu (Tabuľka 3). Vyhodnotenie sa robí na základe koeficientu účinnosti ako napríklad v prípade kalogenézy sa môže vyhodnocovať množstvo explantátov tvoriacich kalus vzhľadom na celkové množstvo explantátov použitých v experimente. V prípade návrhu média na tvorbu výhonov sa koeficient účinnosti vypočíta ako množstvo explantátov (kalusov pri nepriamej organogenéze) tvoriacich aspoň 1 výhon vzhľadom na celkové množstvo explantátov (kalusov) použitých v experimente. Druhou možnosťou je vyjadrovať koeficient účinnosti ako celkový počet výhonov pripadajúcich na 1 explantát. Podobne sa postupuje aj pri médiách podporujúcich predlžovanie výhonov a podporujúcich zakoreňovanie. Ak koeficient účinnosti je stále nedostatočný, urobí sa nová škála koncentrácií a experiment sa zopakuje.

Tabuľka 3 Ukážka návrhu experimentu pre testovanie optimálnej koncentrácie rastových regulátorov pre daný rastlinný druh.

Cytokinín [mg.dm ⁻³]	Auxín [mg.dm ⁻³]					
	0,0	0,1	0,25	0,5	1,0	5,0
0,0						
0,1						
0,25						
0,5						
1,0						
5,0						

1.2.6 Antibiotiká v pletivových kultúrach

V niektorých prípadoch v pletivových kultúrach sú kultivačné médiá doplnené o selekčné činidlá. Antibiotiká v *in vitro* laboratóriu sa používajú:

- Za účelom potlačenia rastu baktérií, húb a plesní v bunkových kultúrach;
- Ako selekčné markery:
 - V procese regenerácie transformovaných buniek,

- v procese transformácie rastlín pri kultivácii mikroorganizmov (napr. *A. tumefaciens* nesúci binárny vektor), ktoré sa používajú na transformáciu rastlín.

Komerčne dostupné antibiotiká produkujú rôzne druhy mikroorganizmov, ale môžu byť syntetizované aj chemicky. Všetky antibiotiká majú schopnosť inhibovať rast mikroorganizmov. Antibiotiká by sa mali používať v optimálnych koncentráciách a nemôžu mať cytotoxický efekt na rastlinnú bunku.

V *in vitro* laboratóriu sa najčastejšie používajú antibiotiká, ktoré pôsobia ako:

1. Inhibítory syntézy bunkovej steny, ktoré sa väčšinou používajú na elimináciu baktérií, napríklad *Agrobacterium tumefaciens* po transformácii (ampicilín, amoxycilín, karbenicilín, cefotaxín alebo vankomycín)
2. Inhibítory syntézy proteínov, ktoré sa najčastejšie používajú ako selekčné markery
 - bakteriostatické inhibítory syntézy proteínov (chloramfenikol, spektinomycín tetracyklín),
 - baktericídne inhibítory syntézy proteínov, ktoré sú zastúpené hlavne amínoglykozidmi (gentamycín, hygromycín B, kanamycín, streptomycín, G-418)

Niektoré antibiotiká ako napríklad amphotericín B a nystatín sa používajú ako antifungálne antibiotiká.

Pri výbere optimálnej koncentrácie antibiotika v regeneračnom médiu sa využívajú v prvom rade poznatky dostupné z vedeckých článkov, týkajúce sa pletivových kultúr daného rastlinného druhu. Optimálna koncentrácia antibiotika sa zvolí experimentálne testovaním vhodne zvolených koncentrácií antibiotika a sleduje sa ako pletivo reaguje na prítomnosť antibiotika v médiu, či nedochádza k potlačeniu regeneračnej účinnosti.

1.2.7 Fyzikálne podmienky *in vitro* kultivácie

Úspešnosť *in vitro* kultivácie závisí nielen od výberu vhodného regeneračného média, ale aj od vhodne zvolenej teploty kultivácie, intenzity osvetlenia a dĺžky fotoperiody.

Svetlo ovplyvňuje hlavné fyziologické zmeny v rastlinách *in vitro*, ako je ich vývin a rast, morfogéza, metabolizmus a obsah chlorofylu. Okrem toho môže svetlo ovplyvniť účinnosť PGR a hladiny endogénnych hormónov. Pre rastliny je dôležitá správna intenzita svetla, pretože príliš veľa svetla môže spáliť rastlinné pletivá a príliš málo svetla môže ovplyvniť správny rast a vývin rastlín. Experimentálne bolo zistené, že nižšia intenzita svetla

lepšie podporuje tvorbu a rast kalusu, zatiaľ čo vyššia intenzita svetla mení morfológiu listov rastlín. Zistilo sa, že rastliny majú pevnejšie listy a funkčné prieduchy. Pri nižšej intenzite svetla (pod $30 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) sú rastliny obyčajne lámavé, majú predĺžené internódiá a nízky obsah chlorofylov. Rastlinné fotoreceptory zodpovedné za fotosyntézu sú primárne a najvýznamnejšie stimulované červenými a modrými oblasťami svetelného spektra. Najpoužívanejšie LED svetlá pri mikropropagácii rôznych rastlinných druhov sú biele (420 nm), červené (660 nm), modré (460 nm) svetlo a kombinácia modrých a červených LED (1:1) svetiel. Komerčne dostupné rastové komory používajú LED (biele) svetlá. Najčastejšie sa používa režim osvetlenia 16 svetlo a 8 hodín tma.

Teplota vplýva na rýchlosť metabolických procesov v rastlinách, čo sa prejaví buď pozitívne alebo negatívne na ich raste a vývine v *in vitro*. Keď sú teploty veľmi nízke, ich rast sa spomalí. Optimálna teplota pre *in vitro* sa pohybuje v rozmedzí 20°C - 25°C v závislosti od rastlinného druhu a či sa jedná o rastliny mierneho klimatického pásma. Pre rastliny subtropického až tropického pásma to môže byť teplota vyššia 28°C - 30°C . Manipulácia s teplotou počas kultivácie explantátov môže mať inhibičný efekt na regeneračný proces.

Relatívna vlhkosť v kultivačných komorách/miestnostiach alebo v kultivačných nádobách významne ovplyvňuje hospodárenie pletív s vodou, prieduchy a celú fyziologickú aktivitu pletív.

1.2.7.1 Problémy súvisiace s kultiváciou *in vitro*

V *in vitro* kultúre existuje niekoľko problémov, ktoré môžu negatívne ovplyvniť kultiváciu pletív ako je napríklad kontaminácia, hnednutie pletiva, vitifikácia alebo strata organogénnej schopnosti.

Kontamináciu spôsobujú baktérie, huby alebo kvasinky a zvyčajne ju je možné pozorovať už po týždni *in vitro* kultivácie rastlinného materiálu, nakoľko kultivačné média, ktoré sa používajú v *in vitro* kultúre sú vhodné aj pre patogénne mikroorganizmy.

Kontaminácia môže byť:

1. Exogénneho pôvodu v dôsledku:

- Absencie alebo nedostatočnej sterilizácie laboratórných pomôcok, laboratórneho spotrebného materiálu alebo kultivačného média,

- nesterilnej práce v BSC v dôsledku nedôsledne (nad plameňom) vysterilizovaných nástrojov ako pinzeta a skalpel, alebo vlastnou manipuláciou v BSC,
- nedostatočnej povrchovej sterilizácie rastlinného materiálu, ktorý bol prenášaný z *in vivo* do *in vitro* podmienok.

2. Endogénneho pôvodu, ktorá vzniká z mikrobiálnej infekcie prítomnej vo vnútri rastlinného pletiva a nie je možné ju odstrániť povrchovou sterilizáciou. Endogénna kontaminácia je bežná pre rastlinné pletivá/orgány, ktoré pochádzajú z rastlín, ktoré rástli v skleníku alebo boli pestované na poli.

Ak sa kontaminácia neodhalí včas, tak dôjde k redukcii rastu a postupnému hnednutiu pletiva, čo vedie k ukončeniu experimentu a k strate východiskových kultúr. Preto je dôležité venovať veľkú pozornosť výberu zdravých rastlín bez prejavov infekcie, príprave experimentu a dôsledne dodržať laboratórne postupy. Jednou z možností ako minimalizovať endogénnu kontamináciu je pridať do regeneračného média antimikrobiálne látky, ako sú antibiotiká (napr. cefotaxín o koncentrácii 200 až 400 mg.dm⁻³ v závislosti od rastlinného druhu). Optimálnu koncentráciu treba najprv experimentálne otestovať, aby okrem potlačenia rastu baktérií, nedošlo aj k potlačeniu regenerácie rastlinného pletiva.

Hnednutie *in vitro* pletív súvisí s tým, že explantáty v procese regenerácie zo svojich pletív uvoľňujú do regeneračného média fenolové zlúčeniny. Tieto zlúčeniny sa vylučujú v dôsledku obrannej reakcie rastlinných buniek na kultivačné podmienky a ich oxidácia má za následok hnednutie kultivačných médií a rastlinných pletív. Výsledkom je spomalenie rastu, nízka regeneračná efektívnosť až **rekalcitrancia**, to znamená neschopnosť rastlinných buniek, pletiva, orgánov reagovať na *in vitro* regeneračné podmienky. Tento efekt je možné čiastočne eliminovať pridaním látok do média, ktoré adsorbujú takéto zlúčeniny, ako napríklad aktívne uhlie alebo skrátením času medzi jednotlivými subkultiváciami.

Ďalším problémom v *in vitro* kultúre je tzv. **vitrifikácia**. Pletivá sú hyperhydratované, nadobúdajú sklovitý až priehľadný vzhľad. Vitrifikácia súvisí s nepriaznivými kultivačnými podmienkami, kedy dochádza v kultivačnej nádobe k hromadeniu etylénu, CO₂ a vodných pár. Zvyčajne k náprave dôjde upravením kultivačných podmienok (zloženie regeneračného média, úprava koncentrácie PGR, znížením teploty kultivácie atď.).

Ďalším problémom je **strata organogénnej schopnosti** a to v dôsledku veku rastlinnej kultúry a aj tým, že v pletivách dochádza k cytogenetickým zmenám, až pletivo už nie je schopné morfogenézy. Dá sa tomu čiastočne predísť skrátením intervalu subkultivácie na 1 týždeň.

Pri mikropropagácii rastlín je dôležité zachovanie genotypu, ktorý je identický s pôvodným materským (donorovým) genotypom. Problémom môže byť široký rozsah kvantitatívnej a kvalitatívnej variability medzi regenerovanými štruktúrami (orgánmi, somatickými embryami alebo rastlinami), ktorá vzniká počas kultivácie a regenerácie rastlinných buniek. **Somaklonálna variabilita** je definovaná ako genetická variabilita somatických buniek indukovaná pri rastlinách regenerovaných v podmienkach *in vitro*. Všetky tieto zmeny môžu byť výsledkom modifikácie samotnej genetickej informácie bunky na úrovni zmien DNA, alebo môžu byť spôsobené zmenami v expresii génov, kedy sa jedná o epigenetickú variabilitu.

1.3 Fotosyntéza a *in vitro* kultúra

Svetlo hrá kľúčovú úlohu v živote rastliny, a to nielen pre produkciu fotosyntetickej energie, ale aj pre svoju regulačnú úlohu molekulárnych, biochemických a morfológických procesov, ktoré sú základom ich rastu a vývinu. Fotosyntéza je dôležitá aj pre rastliny produkované pomocou pletivových kultúr a pre ich následnú *ex vitro* aklimatizáciu. Proces aklimatizácie nie je ovplyvnený iba prostredím *ex vitro*, ale aj stavom *in vitro*, ktorý sa často považuje za faktor vitality rastliny. Nedostatočne funkčný fotosyntetický systém počas kultivácie *in vitro* môže viesť k sérii morfológických a fyziologických porúch rastlinného pletiva. Aj keď *in vitro* rastliny môžu vyzeráť normálne, je nepravdepodobné, že by aktívne fotosyntetizovali. Je to spôsobené prítomnosťou sacharózy ako zdroja uhlíka v kultivačnom médiu a odlišným prostredím, čo narúša prirodzený vývin fotosyntetického aparátu. Na prekonanie týchto problémov je potrebný systém kontroly *in vitro* podmienok. Na fotosyntézu má významný vplyv zdroj umelého svetla, ktorý sa používa v rastových komorách alebo kultivačných miestnostiach.

Fotosyntéza je biochemický proces zachytávania energie slnečného žiarenia a jej využitie na fixáciu oxidu uhličitého v zelených rastlinách a niektorých prokaryotoch za vzniku sacharidov. Pri fotosyntéze sa v bunkách rastlín, rias a niektorých prokaryotov mení prijatá energia svetelného žiarenia na energiu chemickej väzby a vznikajú z anorganických látok látky organické.

Z chemického hľadiska sa fotosyntéza vyjadruje všeobecnou rovnicou:



Fotosyntéza prebieha v 2 fázach:

1. Svetelná fáza

- zachytenie svetelného kvanta (fotónu)
- konverzia energie fotónu na chemickú energiu
- využitie tejto energie na syntézu NADPH a ATP, ktoré sú potrebné pre tmavú fázu
- produkcia O₂ (sekundárny produkt), ktorý je nevyhnutný pre aeróbne organizmy
- uskutočňuje sa prostredníctvom fotosystému I a fotosystému II

2. tmavá fáza (Calvinov cyklus)

- fixácia CO₂ a syntéza organických látok (glukózy)
- NADPH („redukčná sila“) a ATP („fosforylačná sila“), ktoré sú nevyhnutné pre túto fázu pochádzajú zo svetelnej fázy

U rastlín fotosyntéza prebieha v chloroplastoch. **Chloroplast** je organela v rastlinnej bunke, ktorá obsahuje fotosyntetický pigment chlorofyl (Obrázok 1.20). V tylakoidných membránach sú umiestnené fotosyntetické pigmenty a komponenty prenosu elektrónov, ktoré sa používajú na výrobu energie z fotosyntézy. Nemembránový priestor v chloroplaste sa nazýva stróma, tu sa využíva fotosyntetická energia na premenu CO₂ na sacharidy.

Fotosyntetická jednotka pozostáva z :

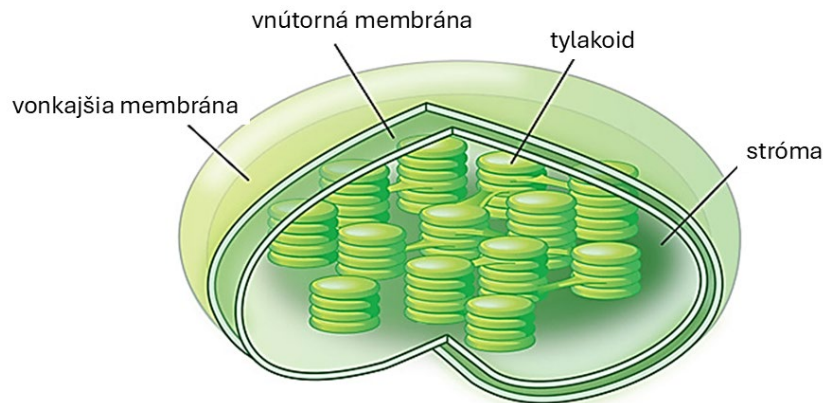
- Anténových svetlozberných komplexov („Light harvesting complexes“) chlorofylu a karotenoidov. Ich úlohou je zachytenie fotónu a postupné odovzdávanie jeho energie reakčnému centru.
- Reakčného centra, ktoré obsahuje 2 špeciálne pigmenty (chlorofyl a) označené P700 (reakčné centrum fotosystému I, ktoré najlepšie absorbuje svetlo pri vlnovej dĺžke 700 nm) a P680 (reakčné centrum fotosystému II, ktoré najlepšie absorbuje svetlo pri vlnovej dĺžke 680 nm).

Vyššie rastliny majú 2 fotosystémy a to fotosystém I (PSI I) a fotosystém II (PSI II). Oba fotosystémy sú kľúčové komponenty fotosyntetického aparátu rastlín.

Fotosystém I absorbuje svetelné žiarenie s maximálnou vlnovou dĺžkou 700 nm. Prijme svetelné žiarenie, prejde do excitovaného stavu a uvoľní elektróny, ktoré môžu buď redukovať NADP⁺ na NADPH alebo sa vrátiť späť, pričom časť ich energie sa využije na tvorbu ATP v procese cyklickej fosforylácie.

Fotosystém II absorbuje svetelné žiarenie s maximálnou vlnovou dĺžkou 680 nm. Prijme svetelné žiarenie, prejde do excitovaného stavu a uvoľní elektróny, ktoré prechádzajú na

fotosystém I, kde nahradia uvoľnené elektróny a okrem toho katalyzuje fotolýzu vody za uvoľnenia molekulového kyslíka.



Obrázok 1.20 Štruktúra chloroplastu (Zdroj: <https://www.nature.com/scitable/topicpage/plant-cells-chloroplasts-and-cell-walls-14053956>, upravené).

Fotosyntetické pigmenty sú pigmenty, ktoré majú schopnosť absorbovať energiu zo slnečného žiarenia a sprístupniť ju fotosyntetickému aparátu. V suchozemských rastlinách existujú dva druhy týchto fotosyntetických pigmentov, a to chlorofyly a karotenoidy. Po absorbovaní energie fotosyntetickým pigmentom, excitácia molekuly pigmentu spôsobí zmenu štandardného redox potenciálu, pigment sa stane ochotnejším donorom elektrónu (silnejšie redukovaadlo) a dôjde k transformácii (transdukcii) svetelnej energie (fotónov) na chemickú energiu.

Chlorofyl je tvorený dvoma formami a to chlorofylom a (*Chl a*) a chlorofylom b (*Chl b*). *Chl a* je modrozelenej farby, *Chl b* je žltozelený. Chlorofyly absorbujú fotóny v modrej (400-500 nm) a červenej (600-700 nm) oblasti.

Pomocné fotosyntetické pigmenty **karotenoidy** absorbujú v iných oblastiach spektra ako chlorofyly, čím zvyšujú účinnosť fotosyntézy. Väčšina karotenoidov absorbuje fotóny v modrej oblasti svetelného spektra (400 až 500 nm). Ďalšou funkciou karotenoidov je odstraňovanie reaktívnych foriem kyslíka (ROS, „Reactive oxygen species“).

Fotosyntetické pigmenty chlorofyl (*Chl a* a *Chl b*) a karotenoidy zohrávajú nezastupiteľnú úlohu v raste a vývine *in vitro* rastlín a zníženie ich obsahu sa považuje za prvý príznak nepriaznivých podmienok regenerácie. Hoci je svetlo pre rastliny zdrojom energie je známe, že príliš málo aj príliš veľa svetla môže byť zdrojom stresu. Zmeny svetelných podmienok menia výkon fotosyntetického aparátu. Fotosyntetická účinnosť je zvyčajne spojená s primeranými hladinami fotosyntetických pigmentov. Za štandardných podmienok je pomer ***Chl a/Chl b*** relatívne stabilný a **zvyčajne okolo 3**. Keď sú však rastliny vystavené stresu, môže

dôjsť k zmenám v tomto pomere. Zvýšený pomer *Chl a/Chl b* naznačuje konverziu *Chl b* na *Chl a*, a tým degradáciu chlorofylu. Za nepriaznivých podmienok alebo v procese senescencie sa *Chl b* rozkladá rýchlejšie ako *Chl a*, čo vedie k zvýšenému pomeru *Chl a/Chl b*. Karotenoidy hrajú zásadnú úlohu pri ochrane pred oxidačným poškodením, optimalizujú zachytávanie svetla a regulujú stresové reakcie. Zníženie pomeru celkového chlorofylu a karotenoidov môže naznačovať fyziologické zmeny v *in vitro* rastlinách spojené s reakciou na nie optimálne kultivačné podmienky.

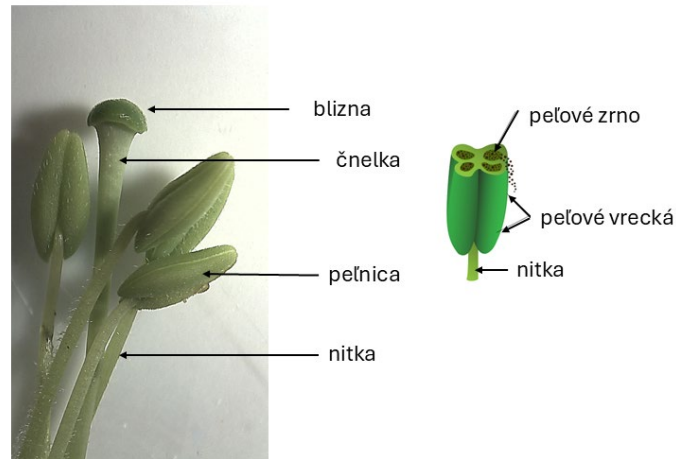
1.4 Životaschopnosť peľu *in vitro*

Peľ predstavuje kritickú fázu v životnom cykle rastlín, pretože životaschopný peľ je rozhodujúci pre efektívne pohlavné rozmnožovanie rastlín. **Životaschopnosť** alebo viabilita peľu je teda schopnosť peľu dozrieť a dokončiť proces opelenia. Je to prenos peľového zrna z peľníc kvetu na bliznu rovnakého alebo iného kvetu, sprostredkovaného abiotickými (vietor, voda) alebo biotickými (hmyz, vtáky, atď.) prostriedkami.

V kvitnúcich rastlinách sú vajíčka obsiahnuté v dutom orgáne, ktorý sa nazýva piestik, a peľ sa ukladá na jeho vrch, bliznu. Na blizne začína klíčenie peľových zŕn absorpciou vody a živín a peľové zrnó vytvára malý peľový váčok (vrecko), ktorý sa postupne zväčšuje. Pri opelení, čiže fyzickom prenose peľového zrna na samičiu časť kvetu, sa rúrkovitým výbežkom peľové zrnó spojí s vajíčkom a dochádza k oplodneniu.

Peľnica (alebo **antéra**) (Obrázok 1.21) sa skladá z dvoch peľových vreciek, v každom sa nachádzajú dve peľové komôrky, v ktorých sa tvoria peľové zrná. Peľové komôrky po dozretí peľu splývajú, priehradka medzi nimi sa rozruší a peľové zrná sa rozsypajú vo vnútri peľového vrecka

Peľové zrná sú samčie pohlavné bunky vyšších (semenných) rastlín. Peľ je nositeľ genetickej informácie a zohráva dôležitú úlohu pri rozmnožovaní rastlín a zachovaní ich genofondu. Vývin peľových zŕn sa pri krytosemenných rastlinách uskutočňuje v samčích generatívnych orgánoch kvetu v tzv. peľniciach procesom nazvaným mikrosporogéza a mikrogametogéza.

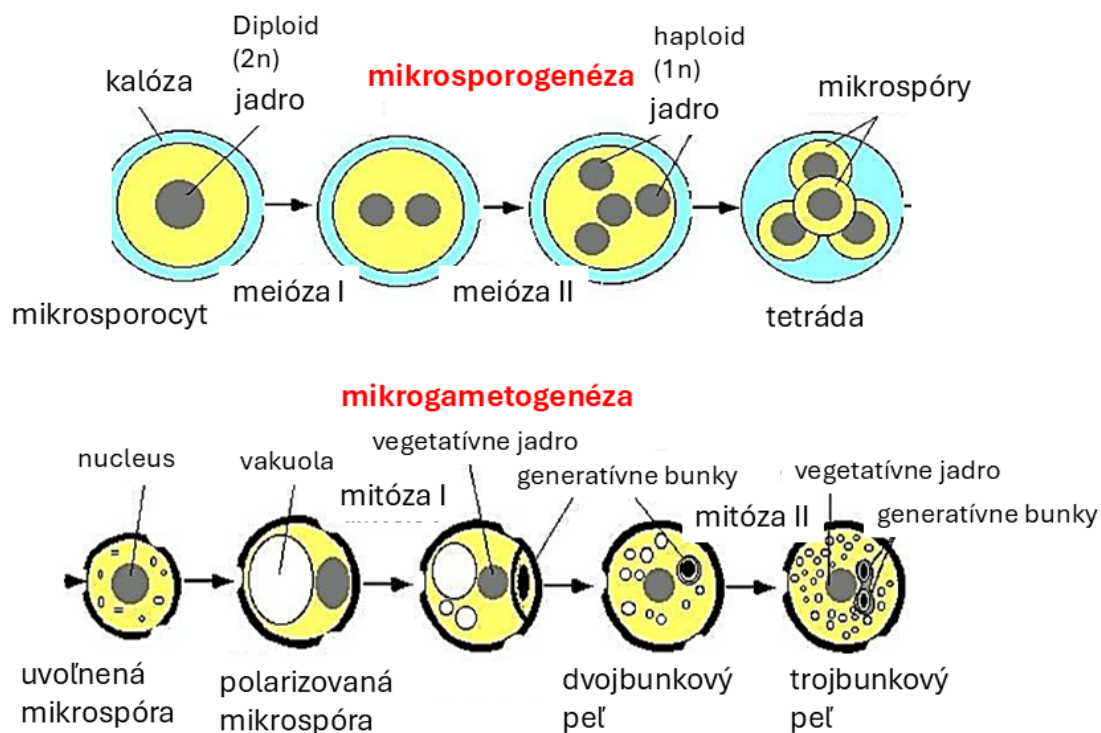


Obrázok 1.21 Peľnica a jej štruktúra (Zdroj: fotografia autori, štruktúra peľnice <https://byjus.com/question-answer/pollen-grains-are-produced-in-stamens-anther/>).

Mikrosporogenéza je proces, počas ktorého z buniek vnútornej vrstvy peľnice, tzv. sporogénnych buniek sa mitotickým delením diferencujú mikrosporocyty – peľové materské bunky. Z nich procesom meiózy vzniká tetráda haploidných mikrospór. Rozpadom tetrád končí mikrosporogenéza. Mikrosporogenéza teda zahŕňa proces tvorby mikrospóry. Následne sa z uvoľnených mikrospór diferencujú peľové zrná procesom nazývaným mikrogametogenéza (Obrázok 1.22).

V druhej etape (**mikrogametogenéza**) sa jadro mikrospóry delí mitoticky. Mitotickým delením vzniknú dve odlišné bunky s haploidným počtom chromozómov a to vegetatívna – vyživovacia a generatívna – rozmnožovacia (Obrázok 1.22), ktoré sú tvarom, veľkosťou, štruktúrou a aj funkčne rozdielne. Jadro vegetatívnej bunky sa prevažne už nedelí. Jadro generatívnej bunky vstupuje do profázy delenia, čím vzniknú dve spermatické pohlavné bunky (gaméty). Mikrospóra po rozdelení jadra s rozlíšenou vegetatívnou a generatívnou bunkou obalenousporodermou sa označuje ako peľové zrno. Zrelé peľové zrná sú v čase zrelosti potom uvoľnené rôznymi spôsobmi, ale najčastejšie prasknutím steny peľnice.

Peľové zrná môžu byť dvojbunkové alebo trojbunkové. Dvojbunkovosť peľových zrn je charakteristická pre väčšinu krytosemenných rastlín. Pri dvojbunkových peľových zrnách sa vytvárajú spermatické bunky (gaméty) až po vyklíčení peľu v peľovom vrecku. Ak sa spermatické bunky (gaméty) diferencujú už v peľovom zrne, vznikajú trojbunkové peľové zrná. Dvojbunkové peľové zrná sa vyznačujú vyššou životaschopnosťou.

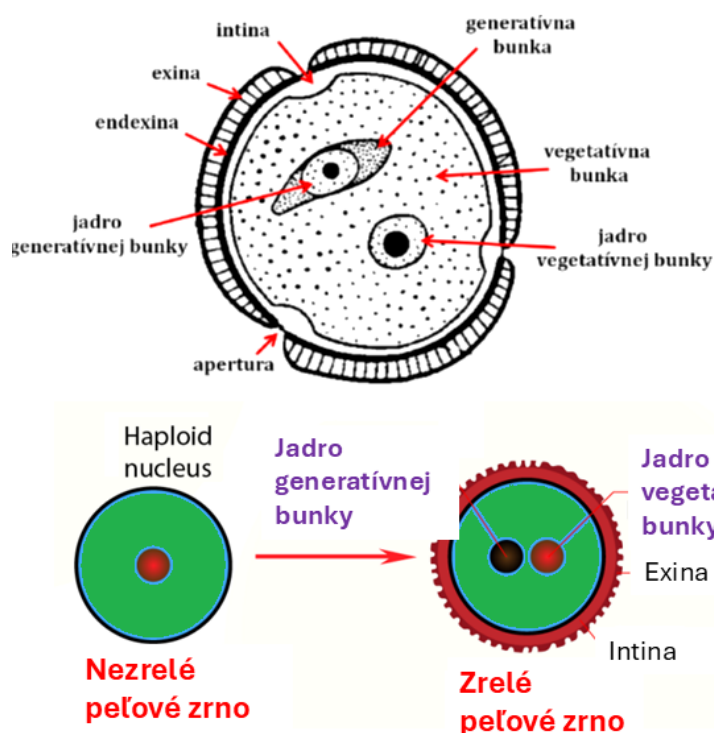


Obrázok 1.22 Mikrosporogenéza a mikrogametogenéza v detaile (Zdroj: <https://www.embibe.com/exams/microsporogenesis/>, upravené).

Peľové zrno má dvojvrstvovú stenu (Obrázok 1.23), pričom exina - vonkajšia vrstva je tvorená sporopolenínom (vysoko odolný biopolymér) a zabezpečuje odolnosť voči vysokým teplotám, silným kyselinám a zásadám. Na niektorých miestach je veľmi tenká, alebo môže aj absentovať (apertura). Vnútrotná vrstva steny intina je tvorená z pektínu a celulózy.

Klasický spôsob testovania životaschopnosť peľu spočíva v použití peľu na opelenie a v následnej analýze životaschopnosti semien. Tento spôsob je však časovo náročný a často aj ťažko realizovateľný. Na vyhodnotenie životaschopnosti peľu existujú viaceré metódy, ktoré sú založené buď na farbení alebo na *in vitro* teste klíčivosti.

Testy farbením sa uskutočňujú pomocou viacerých farbičiek (Tabuľka 4). Testy farbením majú výhody ako ukazovatele životaschopnosti peľu, pretože sú porovnateľne rýchlejšie a jednoduchšie oproti peľovému klíčeniu, ale majú tendenciu preceňovať životaschopnosť. Na druhej strane *in vitro* klíčivosť závisí od genotypu, podmienok prostredia, zrelosti peľu, zloženia a pH média; preto je potrebné určiť optimálne podmienky pre klíčenje peľu. Odporúča sa súčasne kombinovať niekoľko testov. Klíčenje peľu *in vitro* závisí od pridania kľúčových substrátov do klíčiaceho média, ako je dusičnan vápenatý, sacharóza a kyselina boritá.



Obrázok 1.23 Základné časti peľového zrna (Zdroj: <https://sureden.com/topics/12-pmt-biology-sexual-reproduction-in-flowering-plants-pollen-grains-425.html>, upravené).

Tabuľka 4 Využitie farbenia na detekciu životaschopnosti peľových zrn.

Farbenie	Princíp	Sfarbenie životaschopných peľových zrn
I ₂ -KI	Prítomnosť bunkovej steny	Tmavo-hnedé
Acetylovaný karmín (acetokarmín)	Prítomnosť cytoplazmy	Červená
Metylénová modrá	Prítomnosť bunkovej steny a peľového vrecúška	Tmavo modré
Laktofenolová modrá ^a „Lactophenol cotton blue“	Prítomnosť chitínu a celulózy	Tmavo modré

^a Laktofenolová modrá je anilínové farbivo, ktoré farbí chitín a celulózu v bunkových stenách čím zvýrazňuje a kontrastuje štruktúry. Roztok pozostáva z histologického farbiva anilínovej modrej a laktofenolu (roztok fenolu, kyseliny mliečnej a glycerolu vo vode). Používa sa prípravkoch na vizualizáciu štruktúr, najmä v lekárskej mykológii. Glycerol je viskózna látka, ktorá zabraňuje vysychaniu pripravenej podložnej vzorky.

1.5 Hydropónia

Hydropónia je pestovanie rastlín bez pôdy v kvapalnom živnom vodnom roztoku. Slovo hydropónia pochádza z dvoch gréckych slov „hydro“, čo znamená voda a „ponos“, čo znamená práca. Toto slovo prvýkrát použil v roku 1929 Dr. Gericke, kalifornský profesor, ktorý začal vyvíjať laboratórnu techniku na komerčný spôsob pestovania rastlín. Pre zaujímavosť, americká armáda využívala hydroponickú kultúru na pestovanie čerstvých potravín pre jednotky umiestnené na tichomorských ostrovoch počas druhej svetovej vojny. V 50. rokoch 20. storočia v Amerike, Európe, Afrike a Ázii už existovali prvé komerčné firmy.

Výhodou hydroponického pestovania je, že systém môže byť použitý na miestach, kde nie je možné klasické poľnohospodárstvo (napríklad suché púštne oblasti alebo oblasti s chladným podnebím). Systém umožňuje kompletnejšiu kontrolu obsahu živín, pH a pestovateľského prostredia, nižšie náklady na vodu a živiny spojené s recykláciou vody a živín, rýchlejšiu rast vďaka dostupnejšiemu kyslíku v koreňovej oblasti, elimináciu alebo redukciu pôdneho hmyzu, húb a baktérií, vyššie výnosy plodín, nevyžaduje sa odstraňovanie buriny. Jedná sa o vnútorný systém, ktorý umožňuje celoročné pestovanie. Nevýhodou hydroponického pestovania sú počiatkové a prevádzkové náklady, ktoré sú vyššie ako pri kultivácii v pôde a potrebné odborné zručnosti a znalosti pracovníkov. Pre úspech hydroponického pestovania rastlín je dôležité zabezpečiť, v závislosti od rastlinného druhu, dostatočné svetlo (buď prirodzené alebo umelé osvetlenie), živiny v roztokoch prispôbené potrebám jednotlivých rastlinných druhov, optimálne pH (zvyčajne 5.5 až 6.5), optimálnu teplotu (obvyčajne 18°C až 24°C) a vlhkosť (obvyčajne 40% až 70%), prísun kyslíka. Problémom môže byť nadmerné alebo nedostatočné množstvo živín v roztoku, rôzne choroby rastlín (napr. hniloba koreňov), poprípade technické poruchy systému (napr. porucha čerpadla), ktoré narušia optimálny rast a vývin rastlín v hydroponii. Preto je dôležité mať dostatočne zabezpečený systém kontroly jednotlivých parametrov.

Hydropónia je aj hlavným **vedeckým modelovacím nástrojom**, ktorý sa široko využíva na štúdium tolerancie rastlín voči abiotickým stresom spôsobených napríklad salinitou, suchom alebo ťažkými kovmi. Umožňuje presnú kontrolu a konzistentné pozorovanie rastlín v stresových podmienkach. Hydropónia je však do značnej miery umelý systém a pozorovania sa môžu značne líšiť od pozorovaní uskutočnených v pôdnych systémoch. Hlavné výhody hydroponie oproti pôdnym systémom možno zhrnúť nasledovne:

- i) Existuje väčšia miera kontroly nad premennými, a preto sú pozorovania reprodukovateľné.

- ii) Účinky nedostatku živín alebo toxicity na rast rastlín je možné určiť spoľahlivejšie.
- iii) Štúdie zamerané na príjem živín koreňmi a na štúdium určitých koreňových morfológických znakov sú oveľa jednoduchšie, pretože v pôdnych systémoch je často ťažké oddeliť korene od zvyškov pôdy, je možné presne merať koncentrácie živín alebo ich príjem koreňmi.
- iv) Rastliny je možné z hydroponie ľahko odstrániť, rozdeliť ich na jednotlivé orgány ako sú korene a listy a použiť na deštruktívne (molekulárno-biochemické) analýzy a na nedeštruktívne analýzy (získovanie čerstvej hmotnosti alebo meranie dĺžky koreňov).

Hoaglandov roztok je hydroponický živný roztok, ktorý bol novo vyvinutý Hoaglandom a Snyderom v roku 1933, upravený Hoaglandom a Arnonom v roku 1938 a revidovaný Arnonom v roku 1950. Originálny Hoaglandov roztok obsahuje makroprvky ako dusík, fosfor, draslík, vápnik, horčík a síru; a mikroprvky ako železo, mangán, zinok, meď, bór a molybdén. Hoaglandov roztok je všestranný a široko akceptovaný živný roztok pre hydroponiu. Jeho vyvážené zloženie podporuje zdravý rast širokej škály rastlín. Úpravou koncentrácií jednotlivých zložiek možno roztok prispôbiť tak, aby vyhovoval špecifickým potrebám rôznych druhov rastlín. Hoaglandov roztok má veľa N a K, takže je veľmi vhodný na pestovanie veľkých rastlín, ako sú napríklad paradajky a paprika. Pre rast rastlín s nižšími nárokmi na živiny ako je napríklad šalát je vhodné zriediť základné zloženie (napríklad $\frac{1}{2}$ alebo $\frac{1}{4}$, $\frac{1}{5}$ Hoaglandov roztok).

1.5.1 Hydroponické systémy

Pri hydroponickom pestovaní sa koreňový systém rastlín môže vyvíjať:

- Na pevných substrátoch, ktoré majú len funkciu nosiča,
- vo vode,
- vo vlhkom vzduchu (tzv. aeropónia).

Hydroponické systémy (Obrázok 1.24) môžu byť **kvapalné**, ktoré nemajú žiadne podporné médium pre korene rastlín alebo **substrátové**, ktoré majú pevné nosné médium. Hydroponické systémy môžu byť ďalej kategorizované aj ako **otvorené** (akonáhle je živný roztok dodaný ku koreňom rastlín, nie je opätovne použitý) a **uzavreté** (prebytočný roztok sa zberá, dopĺňa a recykluje). Hlavnou nevýhodou uzavretého systému je problém s hospodárením so živinami.

Kvapalný hydroponický systém patrí medzi uzavretý systém a predstavuje ho:

- *Technika nutričného filmu* („Nutrient Film Technique“, NFT) - rastliny sa umiestnia do polyetylénovej trubice, ktorá má v plaste vyrezané štrbiny pre korene. Živný roztok sa čerpá cez túto trubicu.
- *Plávajúca hydroponia* - rastliny sa pestujú na plávajúcej podložke.
- *Aeropónia* - korene rastlín zostávajú zavesené v uzavretej pestovateľskej komore, kde sú v krátkych intervaloch, zvyčajne každých pár minút, postriekané hmlou živného roztoku.

Substrátový hydroponický systém (môže byť otvorený alebo uzavretý systém) zahŕňa:

- *Kultúru využívajúcu minerálnu vlnu* („Rockwool“). Jedná sa o rozomletú čadičovú horninu, ktorá sa zahrieva a potom spriada na vlákna, z ktorých sa vyrába vlna. Je to najrozšírenejší spôsob hydroponie. Dokáže zadržiavať vodu a zadržiavať dostatočný vzduchový priestor na podporu optimálneho rastu koreňov. Jedná sa o otvorený systém.
- *Kultúru využívajúcu štrk*. Jedná sa o uzavretý systém.
- *Kultúru využívajúcu minerálnu vlnu a techniku NFT*. Rastliny sú umiestnené na malých doskách z minerálnej vlny umiestnených v kanáloch obsahujúcich recyklujúci sa živný roztok. Jedná sa o uzavretý systém.

Tieto systémy sa ďalej delia na **pasívne systémy** (napríklad knôtový „wick“ systém, ktorý je najjednoduchším pasívnym hydroponickým systémom) a **aktívne systémy**, kedy sa živný roztok aktívne prenáša ku koreňom rastlín (napríklad systém vodnej kultúry „Water culture system“, systém „Ebb and Flow“, kvapkový „Drip“ systém, systém NFT, aeroponický systém).

Systém vodnej kultúry je najjednoduchší zo všetkých aktívnych hydroponických systémov. Podnos, ktorý drží rastliny, je zvyčajne vyrobený z polystyrénu a pláva priamo na živnom roztoku. Vzduchové čerpadlo dodáva vzduch do vzduchového kameňa, ktorý prebubláva živný roztok a dodáva kyslík ku koreňom rastlín.

Systém „Ebb a Flow“ funguje tak, že sa dočasne zaplaví pestovateľský podnos živným roztokom a potom sa vypustí roztok späť do zásobníka. Táto činnosť sa zvyčajne vykonáva pomocou ponoreného čerpadla, ktoré je pripojené k časovaču. Časovač je nastavený tak, aby sa zapínal niekoľkokrát denne v závislosti od veľkosti a typu rastlín, teploty, vlhkosti a typu použitého pestovateľského média.

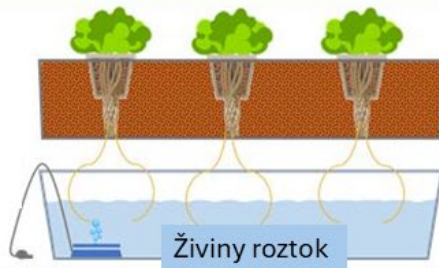
Kvapkový („Drip“) systém je pravdepodobne najpoužívanejším typom hydroponického systému na svete. Časovač ovláda ponorné čerpadlo. Časovač zapne čerpadlo a živný roztok sa nakvapká na základňu každej rastliny malou odkvapkavacou linkou.

Systémy NFT majú konštantný prietok živného roztoku, takže pre ponorné čerpadlo nie je potrebný žiadny časovač.

Aerponický systém je pravdepodobne najmodernejším typom hydroponického pestovania. Aerponický systém potrebuje časovač s krátkym cyklom, ktorý spustí čerpadlo na niekoľko sekúnd každých pár minút.

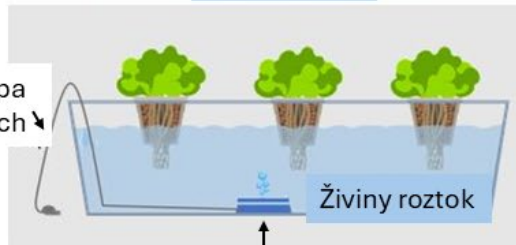
Knôtový systém

Pumpa
vzduch



System vodnej kultúry

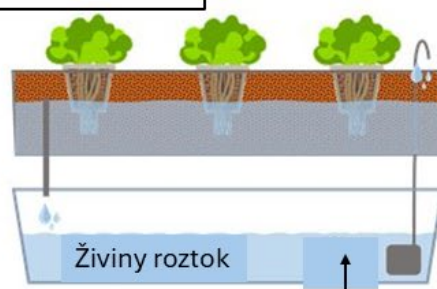
Pumpa
vzduch



Aretačný kameň

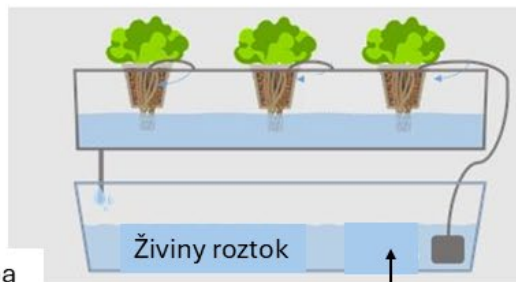
System Ebb a Flow

Pumpa
voda



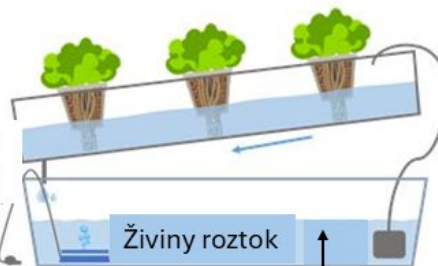
**Drip
(kvapkový)
systém**

Pumpa
voda

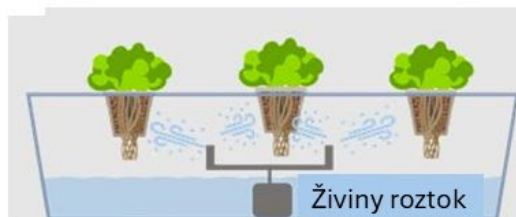


NTF systém

Pumpa
vzduch
Pumpa
voda



**Aeroponický
systém**



Obrázok 1.24 Systémy používané v hydroponii (Zdroj: <https://sk.pinterest.com/pin/761108405754290655/>, upravené).

1.6 Transformácia rastlín pomocou *Agrobacterium tumefaciens*

Baktérie rodu *Agrobacterium* sú Gram-negatívne pôdne baktérie, ktoré vykazujú hlavne saprofytický spôsob života. Avšak len málo z týchto kmeňov dokáže paraziticky rásť na rastlinách, pričom im spôsobuje vlásočnicové ochorenie koreňov („hairy root disease“) (*A. rhizogenes*) alebo nádory („Crown gall disease“) (*A. tumefaciens*, *A. rubi* a *A. vitis*). Pre obe ochorenia je charakteristický neoplastický rast v mieste infekcie, ktorý je výsledkom genetickej modifikácie buniek.

V prírode, miestom vstupu a tým aj infekcie, poranené rastlinné bunky, ktoré produkujú na svoju ochranu látky, ako napríklad nízko-molekulové fenolické zlúčeniny a neutrálne a acidické cukry, ktoré sa dostávajú do rizosféry. Tieto látky, nízky obsah fosfátov a kyslé prostredie rizosféry slúžia ako signálne molekuly pre *Agrobacterium* a sú dôležité pre iniciáciu génov virulencie, ktoré sa nachádzajú na Ti plazmide (tzv. „Tumor inducing plasmid“) a zohrávajú esenciálnu úlohu počas infekcie. Vzhľadom na to, že proces infekcie je pre baktériu energeticky náročný, expresia vir génov je prísne regulovaná. Za normálnych podmienok sú konštitutívne exprimované len gény virA a virG a aj to len na nízkej hladine. VirA a VirG predstavujú dvojzložkový na fosforylácii závislý systém. VirA rozpoznáva v rizosfére látky, ktoré sú produkované poranenými bunkami, dochádza k jeho autofosforylácii a následne k fosforylácii VirG, ktorý potom slúži ako transkripčný faktor. Predpokladom úspešnej infekcie je priamy kontakt baktérie s rastlinnou bunkou. Baktérie rizosféry, medzi ktoré patrí aj *Agrobacterium*, majú vo všeobecnosti schopnosť viazať sa a prežívať na živých alebo neživých povrchoch nachádzajúcich sa v pôde. *Agrobacterium* má minimálne dva mechanizmy, ktorými dokáže priľnúť k rastlinnej bunke. Najčastejšie využíva mechanizmus polárneho priľnutia pomocou unipolárneho extracelulárneho polysacharidu (UPP). Biofilm zabezpečí nielen ireverzibilné priľnutie, ale pravdepodobne aj ochraňuje baktériu pred rôznymi toxickými látkami, nachádzajúcimi sa v pôde. Produkcia UPP nie je závislá od indukcie vir génov a prítomnosti Ti-plazmidu. Druhý spôsob priľnutia je od UPP nezávislý a je sprostredkovaný neznámymi molekulami. Tento spôsob *Agrobacterium* využíva zriedkavo a pravdepodobne je závislý od prítomnosti Ti plazmidu.

Po priľnutí agrobaktérie k rastlinnej bunke dochádza k vytvoreniu transportného komplexu pozostávajúceho z VirB (VirB1-VirB11) a VirD4 proteínov, ktorý má zabezpečiť transport T-DNA (tzv. „Transferred DNA“) z bakteriálnej bunky do cytoplazmy. Komplex VirB sa radí do triedy typu IV sekrečných systémov (T4SS), ktoré sa vyskytujú u Gram-negatívnych baktérií a sú zahrnuté do konjugatívneho prenosu plazmidov medzi baktériami. Proces

vystrihnutia T-vlákná si vyžaduje participáciu VirC1, VirC2, VirD1 a VirD2 proteínov. VirC1 a VirC2 najprv vytvoria komplex v blízkosti RB (tzv. pravá hraničná sekvencia, „Right border“, RB) mimo oblasti T-DNA a následne podporia vystrihnutie T-vlákná. Miesto-špecifické endonukleázy VirD1 a VirD2 rozpoznávajú LB a RB hraničné sekvencie a zabezpečia vystrihnutie spodného T-DNA vlákna. Počas štiepenia sa VirD2 kovalentne naviaže na 5' koniec obnaženého T-vlákná. VirD2 slúži ako pilotný proteín, ktorý má za úlohu transportovať T-komplex cez VirB sekrečný kanál do cytoplazmy a následne do jadra rastlinnej bunky. T-komplex pozostáva z T-vlákná, na ktorom je na 5' konci naviazaný VirD2 a VirE2 proteínu, ktorý obaluje T-vlákná a tým ho ochraňuje pred degradáciou rastlinnými nukleázami počas jeho transportu a integrácie. Spolu s T-komplexom sú do rastlinnej bunky sekretované aj nie esenciálne virulentné bakteriálne proteíny ako VirE3, VirD5 a VirF. Ich úlohou je prebrať funkcie rastlinných proteínov, ktoré sú využívané pri integrácii T-DNA a chýbajú v niektorých rastlinných druhoch; a ochraňovať aktivitu ostatných Vir proteínov sekretovaných do hostiteľskej bunky.

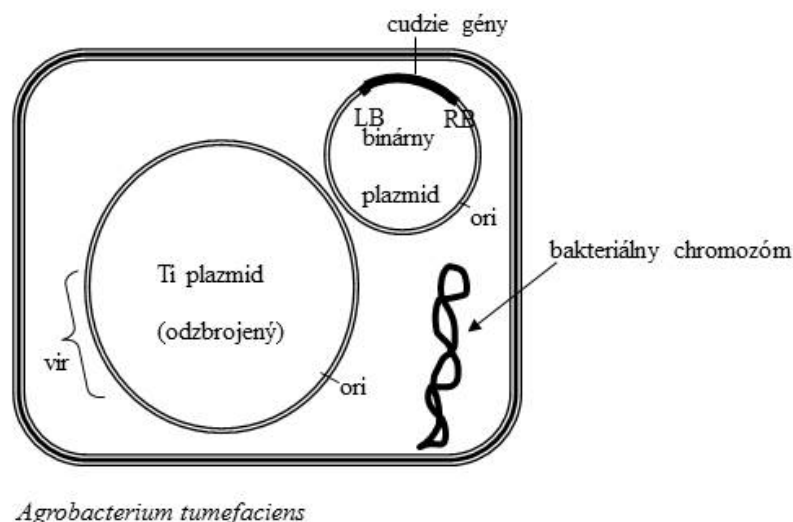
Smerovanie T-komplexu a jeho aktívny transport do jadra umožňuje interakcia bakteriálnych VirD2 a VirE2 proteínov s proteínmi hostiteľskej rastliny. Hlavnú úlohu pri smerovaní do jadra zohráva VirD2 proteín, ktorý samotný obsahuje dva nezávislé eukaryotické jadrové lokalizačné signály („Nuclear localisation signal“, NLS). VirD2 interaguje s rastlinnými proteínmi alfa- importín, čím sa zabezpečuje nukleárny import. VirE2 je DNA-viažuci proteín, ktorý v rastlinnej bunke ochraňuje T-vlákná pred degradáciou rastlinnými nukleázami. Jeho úloha pri nukleárnom smerovaní je však nie celkom objasnená. Počas infekcie rastlinná bunka reaguje na prítomnosť *Agrobacterium* aktiváciou (fosforyláciou) MAP kináz („Mitogen-activated protein kinases“), enzýmov ktoré spúšťajú obranný mechanizmus rastliny, súčasťou ktorého je aj rastlinný proteín ViP1. ViP1 sa nachádza bežne v cytoplazme, po fosforylácii MPK3 kinázou smeruje do jadra, kde má za úlohu aktivovať expresiu obranných proteínov. T-komplex zneužije fosforylovaný rastlinný proteín ViP1 na aktívny transport do jadra. Po prenesení T-komplexu do jadra dochádza k degradácii ViP1 proteínu bakteriálnym proteínom VirF, ktorý takisto sprevádza T-komplex počas jeho transportu z bakteriálnej do rastlinnej bunky.

Po vstupe do jadra je T-komplex nasmerovaný k chromatínu. Pred samotnou integráciou musí byť T-DNA vlákno zbavené VirD2 a VirE2 proteínov, aby mohlo dôjsť k syntéze druhého vlákna. Mechanizmus samotnej integrácie T-DNA vychádza z dvoch modelov. Prvý model vychádza z toho, že integrácia sa uskutočňuje na základe existencie sekvenčnej mikrohomológie medzi T-DNA vláknom a rastlinnou DNA. VirD2 na 5' konci spôsobí

nastrihnutie jedného vlákna rastlinnej DNA, do ktorého je T-DNA vlákno ligované. Počas replikácie je komplementárne T-DNA vlákno potom dosyntetizované. Druhý model je založený na princípe opravy dvojvláknových zlomov (tzv. „Double-strand break repair“, DBS), ktorý rastlinná bunka využíva na opravu svojej poškodenej sekvencie DNA. Pred samotnou integráciou je T-vlákno replikované do dvojvláknovej formy a následne je integrované v mieste dvojvláknových zlomov DNA buď homologickou rekombináciou (HR), pomocou nehomologického spájania koncov („Nonhomologous end-joining“, NHEJ) alebo mikrohomológiou sprostredkované spájanie koncov („Microhomology-mediated end joining“, MMEJ).

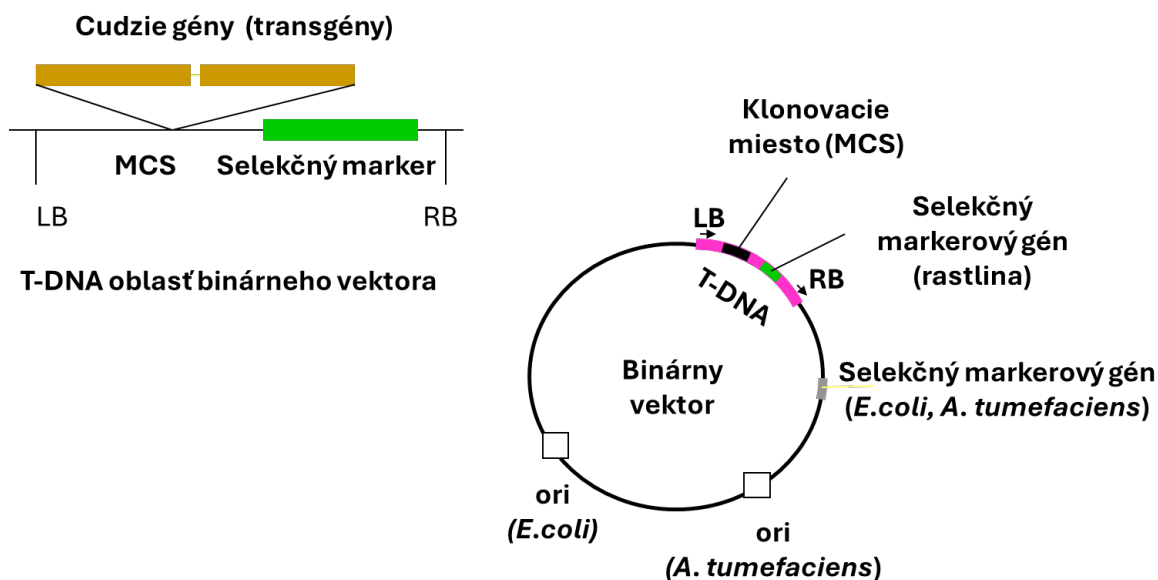
Genetické inžinierstvo využíva *Agrobacterium* ako vektor na prenos cielených génov tzv. transgénov do genómu rastlín. Za týmto účelom sa samotný *Agrobacterium* musel upraviť. V prvom kroku sa z T-DNA oblasti odstránili všetky gény, ktoré spôsobovali ochorenie a ponechali sa gény, ktoré boli dôležité pre prenos T-DNA. Vznikol tzv. **odzbrojený Ti plazmid**, ktorý sa postupne modifikoval tak, aby bolo možné pomocou restriktčných endonukleáz vnášať do T-DNA oblasti ciele transgény.

V súčasnosti sa na transformáciu využívajú najmä **binárne vektory**, ktoré pozostávajú z 2 plazmidov. Prvým je odzbrojený Ti plazmid, ktorý má odstránenú T-DNA oblasť, ale zachované vir a ori oblasti. Druhým je menší vektor obsahujúci RB (pravá hraničná) a LB (ľavá hraničná) sekvencie, medzi ktoré sa umiestňujú transgény. Tento menší vektor má vlastnú (ori) oblasť replikácie, ktorá mu umožňuje replikovať sa nezávisle (Obrázok 1.25).



Obrázok 1.25 *Agrobacterium tumefaciens* obsahujúci binárny vektor. LB a RB – ľavá a pravá hraničná sekvencia, ori – oblasť replikácie, vir – gény virulencie (Zdroj: autori)

T-DNA oblasť rastlinného transformačného vektora (Obrázok 1.26) musí obsahovať **viacnásobné klonovacie miesto** (tzv. „Multicloning site“, MCS) a selekčný markerový gén. MCS je unikátne miesto štiepenia pre vybrané restriktčné endonukleázy. MCS sa využíva ako klonovacie miesto, pomocou ktorého je možné umiestniť do T-DNA oblasti ciele gény.



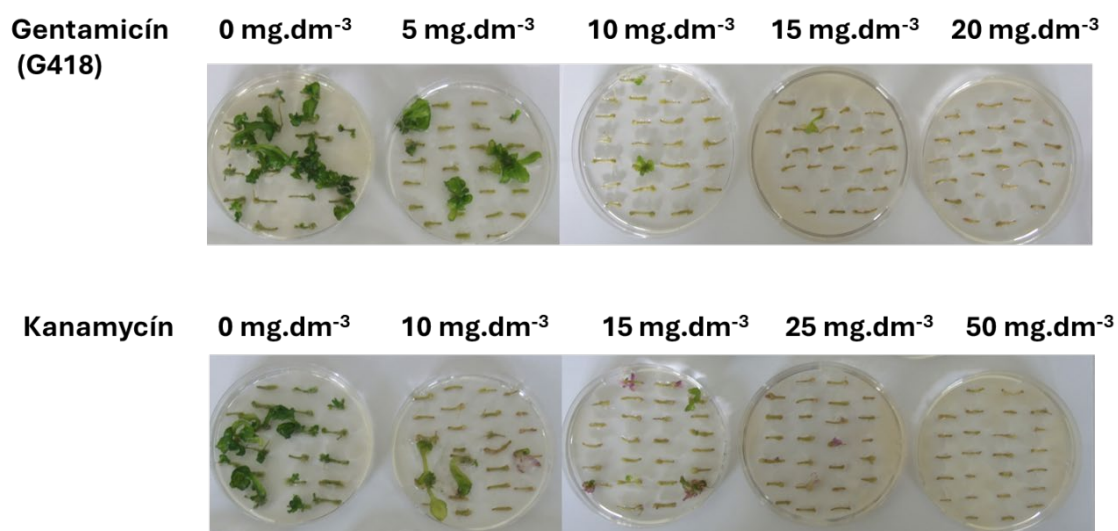
Obrázok 1.26 Štandardný binárny vektor a jeho zloženie (Zdroj: autori).

Transgény (aj selekčné markerové gény) sa do rastlinného genómu zavádzajú vo forme expresnej jednotky, ktorá pozostáva z cieleho génu a z regulačných sekvencií potrebných pre úspešnú expresiu v rastlinnej bunke (Obrázok 1.27). Promótor určuje v akom pletive, v akom čase a aká silná bude expresia transgénu v rastlinách. Promótor používaný v transgenóze rastlín môžu byť konštitutívne (aktívne stále), indukovateľné vplyvom endogénnych alebo exogénnych stimulov (napr. teplo, nízka teplota...) alebo pletivovo-špecifické (aktívne v určitom type pletiva). Najčastejšie sa ako konštitutívny promótor používa promótor CaMV 35S, ktorý bol izolovaný z mozaikového vírusu karfiolu a bol laboratórne upravený.



Obrázok 1.27 Ukážka expresnej kazety, ktorá pozostáva zo sekvencie promótoru, transgénu a terminátora (Zdroj: autori).

Prítomnosť **selekčného markerového génu** v T-DNA oblasti umožní vyselektovať transgénné bunky počas regenerácie, pretože len malá časť buniek dokáže prijať cudziu DNA a byť transformovaná. Ako selekčné markerové gény sa najviac používajú gény kódujúce rezistenciu k antibiotikám (kanamycín, hygromycín, gentamicín atď.) a herbicídum (fosfínotricín, glyfosát atď.). Prítomnosť takýchto látok v regeneračnom médiu je toxická pre netransformované bunky, zatiaľ čo transformované bunky ich dokážu rozkladať a teda detoxifikovať. Najčastejšie sa ako selekčný markerový gén využíva **gén kódujúci neomycín fosfotransferázu II (nptII)**. Tento gén bol izolovaný z transpozónu Tn5 *Escherichia coli* K12. Enzým neomycín fosfotransferáza II fosforyláciou inaktívuje aminoglykozidové antibiotiká ako sú neomycín, paranomycín, kanamycín alebo geneticín. Koncentrácia antibiotika sa určuje experimentálne tak, že sa rastlinné explantáty, ktoré majú byť použité na transformáciu nechajú regenerovať na médiu s rôznou koncentráciou selekčného antibiotika a na základe toho sa vyberie optimálna koncentrácia (Obrázok 1.28).



Obrázok 1.28 Ukážka testu regenerácie explantátov repky olejnej (*Brassica napus* L.) v prítomnosti rôznej koncentrácie selekčného antibiotika gentamicínu a kanamycínu (Zdroj: autori).

Príliš vysoká koncentrácia môže byť toxická aj pre transformované bunky, zatiaľ čo príliš nízka koncentrácia umožní regeneráciu aj netransformovaných buniek. Ak by sa v procese regenerácie nepoužila selekcia, netransformované rastlinné bunky majú prirodzenú tendenciu potláčať regeneráciu transformovaných buniek. Navyše, stúpajú finančné náklady na analýzu veľkého množstva regenerovaných rastlín. Schopnosť transgénnnej bunky detoxifikovať selekčné antibiotikum závisí od expície selekčného markerového génu, ktorá môže byť

vysoká, nízka alebo potlačená, v závislosti od miesta integrácie T-DNA a počtu integrovaných kópií.

Mimo T-DNA oblasti sa nachádza selekčný markerový gén, ktorý je určený pre selekciu bakteriálnych buniek (*E. coli* a *A. tumefaciens*) obsahujúci binárny vektor. Je dôležitý v procese prípravy binárneho vektora. Nachádza sa mimo T-DNA a teda do rastlinnej bunky sa tento selekčný markerový gén neprenáša; a má priradené regulačné sekvencie zabezpečujúce expresiu v prokaryotických organizmoch.

Ďalšou skupinou génov sú tzv. **reportérové gény**. Tieto gény sa využívajú na overenie funkčnosti zvoleného transformačného procesu, nakoľko ich aktivita je ľahko detekovateľná či už kvalitatívne alebo kvantitatívne v pletivách transgénnych rastlín. **β-glukuronidázový (gus)** gén je jeden z najviac využívaných reportérových génov. Tento gén bol izolovaný z baktérie *E. coli* K12.

Mimo T-DNA oblasti sa nachádzajú vir gény (dôležité pre proces transformácie) a 2 oblasti replikácie ori umožňujúce replikáciu binárneho vektora v baktériách *A. tumefaciens* a *E. coli*. Je to z toho dôvodu, že manipulácia s binárnym vektorom (klonovanie sekvencií DNA) sa uskutočňuje v *E. coli* a až potom sa finálny binárny vektor prenáša do *A. tumefaciens*.

Proces transformácie rastlín pomocou *A. tumefaciens* v podmienkach *in vitro* pozostáva z nasledovných krokov:

1. Poranenie rastlinného pletiva

Poranenie pletiva je základným krokom, nakoľko poranené bunky produkujú nízkomolekulové fenolické látky, ktoré sú dôležité pre nasmerovanie agrobaktéria k poraneným bunkám. Vo všeobecnosti rastlinné druhy, ktoré patria do hostiteľského radu *Agrobacterium*, produkujú dostatočné množstvo týchto látok. V prípade, že sa jedná o rastlinné druhy, ktoré neprodukujú ich dostatočné množstvo (napríklad jednoklíčnolistové rastliny), potom sa do ko-kultivačného média štandardne pridáva komerčne dostupná fenolická látka acetosyringón. Poranenie rastlinného pletiva sa uskutočňuje skalpelom narezaním na menšie segmenty (explantáty). Ako rastlinné explantáty sa najčastejšie používajú listové alebo nodálne segmenty *in vitro* rastlín.

2. Infikovanie rastlinných explantátov ko-kultiváciou s bakteriálnym inokulom

Bakteriálne inokulum sa pripravuje zriedením nočnej kultúry *A. tumefaciens*. Nočná kultúra sa zbaví zvyškov kultivačného média centrifugáciou a bakteriálne bunky sa rozsuspendujú v regeneračnom médiu určenom pre regeneráciu rastlinných buniek, tak aby $OD_{620} = 0,6$. Infekcia sa uskutočňuje ko-kultiváciou čerstvo narezaných rastlinných explantátov s bakteriálnym inokulom, pričom doba ko-kultivácie môže byť rôzna, najčastejšie 48 hodín.

3. Odstránenie zvyškov buniek agrobaktéria

Po ko-kultivácii sa explantáty zbavia zvyškov bakteriálnych buniek, nakoľko by mohli v procese regenerácie prerastať rastlinné pletivo a bol by problém s regeneráciou transformovaných buniek. V prvom kroku sa rastlinné explantáty buď premyjú v sterilnej vode (napríklad nodálne segmenty), alebo, ak je pletivo krehkejšie, ako napríklad listové segmenty, tak sa tieto segmenty krátko osušia na sterilnom filtračnom papieri. Navyše, do regeneračného média sa pridávajú antibiotiká, ktoré zabraňujú množeniu bakteriálnych buniek, ako napríklad cefotaxím (kapitola 1.2.6). Antibiotiká musia byť netoxické pre rastlinnú bunku a nesmú negatívne ovplyvňovať regeneračný proces. Ich optimálna koncentrácia sa určí experimentálne.

4. Regenerácia transformovaných buniek v intaktné rastliny

Úspešnosť transformácie závisí od dostupného efektívneho *in vitro* regeneračného protokolu. Regeneračná schopnosť je genotypovo závislá a niektoré rastlinné druhy môžu byť rekalcitrantné vzhľadom na transformáciu pomocou *A. tumefaciens*. Do úvahy treba brať aj vek rastliny, nakoľko mladé pletivo regeneruje lepšie, a typ použitého explantátu. Vzhľadom na to, že len malá časť rastlinných buniek dokáže prijať cudziu DNA a byť transformovaná, do regeneračného média sa pridávajú ešte selekčné antibiotiká (v závislosti od toho aký selekčný markerový gén sa nachádza v T-DNA oblasti). Ich optimálna koncentrácia sa určí experimentálne. Niektoré transformované bunky majú problém regenerovať aj v prítomnosti selekčného antibiotika, vtedy sa pristupuje k dvojkrokovej selekcii. Prvý týždeň rastlinné explantáty regenerujú pri zníženej koncentrácii antibiotika a potom sa koncentrácia antibiotika zvýši.

5. Molekulárno-biochemické analýzy transgénnych rastlín

Napriek pôsobeniu selekčného tlaku, môže dôjsť počas regenerácie k tzv. únikom („Escapes“), čiže zregenerujú sa aj netransformované bunky. Príčinou môže byť príliš nízka koncentrácia antibiotika, nedostatočný kontakt rastlinnej bunky s regeneračným médiom atď. Regenerované rastliny, ktoré zakorenili v prítomnosti selekčného antibiotika sa preto považujú za potenciálne transgénne a ich transgénny charakter je potrebné dokázať molekulárno-biochemickými analýzami. Analýzy na úrovni DNA zahrňujú PCR a Southern blot analýzy. PCR analýzami sa dokáže prítomnosť transgénu. Southern blot analýzou sa dokazuje prítomnosť transgénu a počet integrovaných kópií transgénu. Analýzy na úrovni RNA zahŕňajú RT-PCR, qPCR a Northern blot analýzy. Metódou RT-PCR a Northern blot analýzou sa dokazuje, že vzniká mRNA transgénu a metódou qPCR sa kvantifikuje mRNA transkript transgénu. Analýzami na úrovni proteínov (Western blot analýza a ELISA) sa dokáže, že vzniká funkčný proteín.

2 Experimentálna časť I

2.1 Základné pracovné postupy v *in vitro* laboratóriu

2.1.1 Sterilizácia laboratórneho materiálu a kultivačných médií

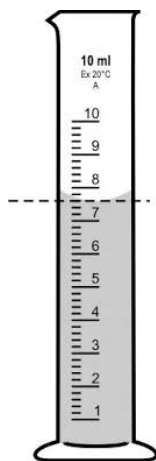
1. Pripraviť si materiál a médiá na sterilizáciu. Kvapalné médiá musia byť vo fľaši uzatvorenej buď vrchnákom alebo alobalom. Vrchnák nesmie byť dotiahnutý na doraz. Kvapalina nesmie siahať až po hrdlo fľaše, ale má byť ~~tak~~ cca do 2/3 objemu fľaše. Pevný materiál musí byť buď v uzatvorenej nádobe, alebo zabalený v alobale.
2. Pred autoklávovaním skontrolovať, či je možné materiál a roztoky sterilizovať v autokláve.
3. Zapnúť autokláv a zapnúť prívod vody.
4. Vložiť materiál do autoklávu a uzatvoriť dvere autoklávu.
5. Vybrať vhodný program a zapnúť ho. K dispozícii je program určený pre kvapaliny a program pre pevný laboratórny materiál. Ak sa autoklávuje pevný laboratórny materiál spolu s roztokmi, VŽDY zvoliť program pre kvapaliny. NIKDY nezvoliť program pre pevný materiál a sterilizovať ním kvapaliny.
6. Po skončení procesu sterilizácie treba počkať kým klesne tlak a systém umožní otvoriť dvierka. Autokláv je tlaková nádoba a nikdy sa nesmie násilne otvárať.
7. Vybrať sterilizovaný materiál/médiá z autoklávu.
8. Autokláv vypnúť a uzavrieť prívod vody.

2.1.2 Príprava kvapalného regeneračného média

1. Vypočítať navážky jednotlivých zložiek potrebných na prípravu regeneračného média podľa požadovaného objemu.
(MS médium sa dodáva výrobcom v práškovej forme, pričom na obale je uvedené aké množstvo je potrebné na prípravu 1 dm³ média. V prípade MS média s vitamínmi je to 4,4 g na 1 dm³.)
2. Vhodne si zvoliť veľkosť fľaše. Prípadne, ak je požadovaný objem väčší ako je kapacita dostupnej fľaše, alebo kapacita autoklávu, je možné kvapalné médium zarobiť naraz

a potom ho rozdeliť do viacerých fliaš s menším objemom. Napríklad, ak je potrebné pripraviť 1 liter média, tak sa môže použiť 5 fliaš s objemom 250 ml, pričom sa do jednej fľaše dá 200 ml média.

3. S použitím magnetického miešadla postupne rozpustiť jednotlivé návažky v destilovanej vode v menšom objeme ako je výsledný.
4. Upraviť pH na požadovanú hodnotu pomocou pH metra.
5. Roztok preliať do odmerného valca a doplniť destilovanou vodou do požadovaného objemu. Odmerné valce sú kalibrované na odčítanie tzv. spodného okraja menisku (Obrázok 2.1). Meniskom sa nazýva oblúkovité prehnutie kvapaliny, ktoré vzniká na rozhraní kvapaliny, steny nádoby a vzduchu vplyvom povrchového napätia.
6. Zariadené médium preliať naspäť do kadičky a premiešať na magnetickom miešadle.
7. Preliať do pripravenej fľaše alebo rozdeliť presne určený objem do jednotlivých fliaš s menším objemom. Je potrebné pracovať s presnými objemami, nakoľko sa do média po autoklávaní zvyčajne pridávajú ešte rastové regulátory o presnej koncentrácii.
8. Fľaše uzavrieť uzáverom, ale nie natesno, zakryť vrchnák alobalom a sterilizovať autoklávaním. Poznámka: objem média musí predstavovať cca 2/3 objemu fľaše.
9. Vrchnák fľaše po sterilizácii opäť utiahnuť a médium nechať vychladnúť pri izbovej teplote. Médium sa uchováva zvyčajne v chladničke pri 4°C. Krátkodobo sa môže uchovávať pri laboratórnej teplote.



Obrázok 2.1 Ukážka ako odčítať správny objem v odmernom valci. (Zdroj: https://www.google.com/url?sa=i&url=https%3A%2F%2Fanorganika.online%2Fsemester%2Fprace%2Fflab_5.pdf&psig=AOvVaw12L0yw7KfRt302ou9T0mC4&ust=1720603854944000&source=images&cd=vfe&opi=89978449&ved=0CBEQjRxqFwoTCNCo_6DUmYcDFQAAAAAdAAAAABAE).

2.1.3 Príprava pevného regeneračného média

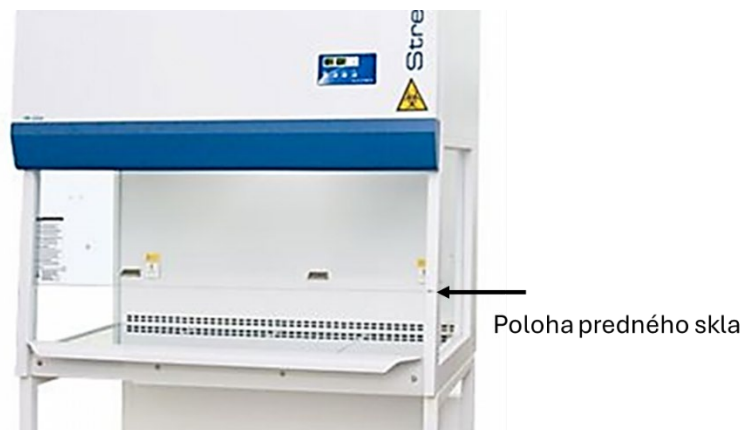
1. Vypočítať návažky jednotlivých zložiek potrebných na prípravu regeneračného média podľa požadovaného objemu. Ak sa pripravuje médium väčšieho objemu, ktoré sa bude rozlievať do viacerých fliaš s menším objemom, treba prepočítať množstvo agaru na objem média v týchto jednotlivých fľašiach.
2. Vhodne si zvolíť veľkosť fľaše. Prípadne, ak je požadovaný objem väčší ako je kapacita dostupnej fľaše alebo kapacita autoklávu, je možné médium zarobiť naraz a potom ho rozdeliť do fliaš s menším objemom. Napríklad, ak je potrebné pripraviť 1 liter média, tak sa môže použiť 5 fliaš s objemom 250 ml, pričom sa do jednej fľaše dá 200 ml média.
3. S použitím magnetického miešadla, postupne rozpustiť jednotlivé návažky (**OKREM AGARU**) v destilovanej vode v menšom objeme ako je výsledný.
4. Upraviť pH na požadovanú hodnotu pomocou pH metra.
5. Roztok preliať do odmerného valca a doplniť destilovanou vodou do požadovaného objemu.
6. Pripravené médium preliať naspäť do kadičky a premiešať na magnetickom miešadle.
7. Preliať do fľaše alebo rozdeliť presne určený objem do jednotlivých fliaš s menším objemom. Je potrebné pracovať s presnými objemami, nakoľko sa do média po autoklávaní zvyčajne pridávajú ešte rastové regulátory o určitej koncentrácii.
8. Do jednotlivých fliaš nakoniec pridať navážený agar. Netreba agar rozpúšťať, nakoľko sa agar rozpustí počas autoklávania.
9. Fľaše uzavrieť uzáverom, ale **nie natesno**, zakryť vrchnák alobalom a sterilizovať autoklávaním. Poznámka: objem média musí predstavovať cca 2/3 objemu fľaše.
10. Vrchnák fľaše po sterilizácii opäť utiahnuť, médium opatrne premiešať a nechať vychladnúť pri izbovej teplote. Médium sa uchováva zvyčajne v chladničke pri 4°C. Krátkodobo sa môže uchovávať pri laboratórnej teplote.

2.1.4 Práca v biologicky bezpečnom boxe triedy II

1. Na display stlačiť označenie UV.

UV lampa sa automaticky zapne, pričom je nastavená od výrobcu na určitý čas, zvyčajne 10 minút. Po tomto čase sa UV lampa automaticky vypne sama. UV lampu je možné vypnúť aj manuálne stlačením tlačidla s označením UV.

2. Zapnúť BSC tak, že sa predné sklo vertikálne posunie do výrobcom určenej polohy (Obrázok 2.2). Ak je sklo v nesprávnej výške, zariadenie vydáva zvukový signál. O tom, že zariadenie je plne funkčné nám dá informácia na display. Treba brať do úvahy, že zariadenie bude plne funkčné za určitý čas, cca 10 minút. Svetlo v boxe sa automaticky zapína s posunutím predného skla.
3. Vydezinfikovať pracovnú plochu 70 % etanolom.
4. S rastlinným materiálom manipulovať pomocou vhodne zvolenej pinzety a skalpela, oba nástroje je treba priebežne sterilizovať ich ponorením v 96% etanole a vyžíhaním nad plameňom. Na tento účel sa používajú liehové alebo plynové kahany. Ako správne držať pinzetu/skalpel nad plameňom je znázornené na Obrázku 2.3. Všetok materiál (Petriho misky, kultivačné nádoby, pipetovacie špičky atď.) a regeneračné médiá, s ktorými sa manipuluje v BSC musia byť sterilné.
5. Po skončení práce v BSC opäť vydezinfikovať pracovnú plochu 70% etanolom.
6. Zasunúť sklo do pôvodnej polohy. Zariadenie sa vypne.



Obrázok 2.2 Poloha predného skla v biologicky bezpečnom boxe triedy II potrebná na spustenie zariadenia do prevádzky (Zdroj: autori).



Obrázok 2.3 Ukážka nesprávneho a správneho držania pinzety pri sterilizácii nad plameňom. Pri nesprávnom držaní pinzety môže dôjsť k tomu, že etanol stečie po pinzete na ruku a dôjde počas jeho horenia k popáleniu ruky (Zdroj: autori).

2.1.5 Príprava zásobných roztokov rastlinných rastových regulátorov

Rastové regulátory sa používajú v *in vitro* laboratóriu vo forme sterilných roztokov. Vzhľadom na to, že mnohé rastové regulátory sú citlivé na vyššie teploty, sterilita sa dosahuje filtráciou cez 0,2 μm filtračnú jednotku (Obrázok 2.4). Zo zásobných roztokov sa potom odoberá (v BSC) určitý objem (mikropipetami), ktorý sa pridáva do pripraveného regeneračného média v takom objeme, aby sa dosiahla požadovaná výsledná koncentrácia v regeneračnom médiu, teda je potrebné mať zásobný roztok s vyššou koncentráciou. V Tabuľke 5 je uvedený prehľad niektorých rastových regulátorov vzhľadom na ich rozpustnosť.



Obrázok 2.4 Ukážka filtra o veľkosti pórov 0,2 μm určeného pre injekčné použitie. Filtre sú určené na jednorazové použitie a sú sterilne zabalené. (Zdroj: <https://www.sarstedt.com/>, upravené).

Tabuľka 5 Prehľad rastových regulátorov vzhľadom na ich rozpustnosť.

Rastový regulátor	Rozpustnosť	Riedidlo
Kyselina indolyl-3-octová (IAA)	96% etanol/ 1 mol.dm ⁻³ NaOH	voda
Kyselina naftyl octová (NAA)	1 mol.dm ⁻³ NaOH	voda
Kyselina 2,4-dichlór-fenoxyoctová (2,4-D)	Vodavoda	-
Kyselina gibberelínová (GA3)	96% etanol	voda
6-benzylamínopurín (BAP)	1 mol.dm ⁻³ NaOH	voda
Zeatínzeatín	1 mol.dm ⁻³ NaOH	voda
Kyselina abscisová	1 mol.dm ⁻³ NaOH	voda

*A - sterilizácia autoklávovaním; F - sterilizácia 0,2 µm filtrom. A/F = spoluautoklávovateľné s inými zložkami médií, môže však dôjsť k určitej strate aktivity.

Postup:

1. Zvoliť vhodnú zásobnú koncentráciu, tak aby objem odobratý zo zásobného roztoku potrebný na zabezpečenie požadovanej koncentrácie v regeneračnom médiu sa pohyboval (zvyčajne) v rozsahu od 10 µl do 200 µl. Koncentrácia zásobného roztoku rastového regulátora sa pohybuje v mg.cm⁻³, zatiaľ čo jeho koncentrácia v regeneračnom médiu sa pohybuje mg.dm⁻³.
2. Po zvolení koncentrácie zásobného roztoku vypočítať návažok rastového regulátora potrebného na prípravu 1 ml. Zásobné roztoky sa pripravujú zvyčajne v objeme 10 ml.
3. Zvoliť vhodné rozpúšťadlo (Tabuľka 5).
 - a. Ak sa rastový regulátor rozpúšťa vo vode, tak návažok rozpustiť v menšom objeme destilovanej vody a po jeho úplnom rozpustení doplniť vodou do finálneho objemu (10 ml).
 - b. Ak sa rastový regulátor rozpúšťa v 96% etanole alebo v 1 mol.dm⁻³ NaOH, tak návažok najprv rozpustiť v čo najmenšom objeme (cca 1 ml) etanolu alebo NaOH a po jeho úplnom rozpustení doplniť vodou do finálneho objemu (10 ml).
4. Pripravený roztok preliať do vhodnej kadičky tak, aby ho bolo možné nabrat' injekčnou striekačkou.
5. V BSC do plastového stojana preniesť sterilnou pinzetou sterilné mikroskúmavky (objem 1,6 ml, cca 9-10 ks).
6. V BSC otvoriť sterilný filter a nasadiť naň naplnenú striekačku a pretlačiť cez ňu zásobný roztok do jednotlivých mikroskúmaviek.

7. Mikroskúmavky opatrne uzavrieť tak, aby sa zachovala sterilita a označiť skratkou názvu rastového regulátora a jeho koncentráciu. Napríklad, pre zásobný roztok kyseliny 1-naftyl octovej (NAA) o koncentrácii $10 \text{ mg}\cdot\text{cm}^{-3}$ to bude: NAA 10/1 (10 mg na 1 ml).
8. Mikroskúmavky sa ešte uzavruť parafilmom a do ďalšieho použitia použitia sa skladujú v mrazničke pri -20°C .

2.1.6 Príprava zásobných roztokov antibiotík

Antibiotiká sa používajú v *in vitro* laboratóriu vo forme sterilných roztokov. Antibiotiká sú citlivé na vyššiu teplotu, sterilita sa uskutočňuje filtráciou cez $0,2 \mu\text{m}$ filtračnú jednotku. Zo zásobných roztokov sa potom odoberá (v BSC) určitý objem (mikropipetami), ktorý sa pridáva do pripraveného kultivačného média v takom objeme, aby sa dosiahla požadovaná výsledná koncentrácia v kultivačnom médiu, teda je potrebné mať zásobný roztok s vyššou koncentráciou. Výrobca uvádza maximálnu koncentráciu, ktorú je možné pripraviť. V Tabuľke 6 je uvedený prehľad niektorých antibiotík a ich rozpustnosť.

Postup:

1. Zvoliť vhodnú zásobnú koncentráciu tak, aby objem odobratý zo zásobného roztoku potrebný na zabezpečenie požadovanej koncentrácie v kultivačnom médiu sa pohyboval (zvyčajne) v rozsahu od $10 \mu\text{l}$ do $200 \mu\text{l}$. Koncentrácia zásobného roztoku antibiotika sa pohybuje v $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}$, zatiaľ čo jeho koncentrácia v kultivačnom médiu sa pohybuje $\text{mg}\cdot\text{dm}^{-3}$.
2. Po zvolení koncentrácie zásobného roztoku vypočítať návažok antibiotika potrebného na prípravu 1 ml. Zásobné roztoky sa pripravujú zvyčajne v objeme 10 ml.
3. Zvoliť vhodné rozpúšťadlo (Tabuľka 6).
 - a. Ak sa antibiotikum rozpúšťa vo vode, tak návažok rozpustiť v menšom objeme destilovanej vody a po jeho úplnom rozpustení doplniť vodou do finálneho objemu (10 ml).
 - b. Ak sa rastový regulátor rozpúšťa v inom rozpúšťadle ako napríklad DMSO, tak návažok najprv rozpustiť v čo najmenšom objeme (cca 1 ml) tohto rozpúšťadla a po jeho úplnom rozpustení doplniť vodou do finálneho objemu (10 ml).
4. Pripravený roztok preliať do vhodnej kadičky tak, aby ho bolo možné nabráť injekčnou striekačkou.

5. V BSC do plastového stojana preniesť sterilnou pinzetou sterilné mikroskúmavky (objem 1,6 ml, cca 9-10 ks).
6. V BSC otvoriť sterilný filter a nasadiť naň naplnenú striekačku a pretlačiť cez ňu zásobný roztok do jednotlivých mikroskúmaviek.
7. Mikroskúmavky opatrne uzavrieť tak, aby sa zachovala sterilita a označiť skratkou názvu antibiotika a jeho koncentráciu. Napríklad, pre zásobný roztok antibiotika kanamycínu o koncentrácii $100 \text{ mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ to bude: Km 100/1 (100 mg na 1 ml).
8. Mikroskúmavky sa ešte uzavrú parafilmom a do ďalšieho použitia sa skladujú v mrazničke pri -20°C .

Tabuľka 6 Prehľad niektorých antibiotík, ich účinok voči gram pozitívnym (G+) a gram negatívnym baktériám, ich rozpustnosť (Zdroj: <https://www.sigmaaldrich.com>).

Antibiotikum	Gram (+)	Gram (-)	Rozpustnosť	Riedidlo	Aplikácia
Carbenicilín	+	++	voda	-	RR
Cefotaxím	+	++	voda	-	RR
Gentamicín	+	++	voda	-	RR
Hygromycin B			voda	-	RR
Kanamycin	+	++	voda	-	RR, KB
Vankomycín	++		voda	-	RR
Rifampicín	++	++	DMSO	voda	KB

++ efektívne voči väčšine bakteriálnych druhov, + efektívne voči niektorým bakteriálnym druhom, RR – regenerácia rastlín *in vitro*, KB – kultivácia buniek odzbrojeného kmeňa *A. tumefaciens* pre potreby transformácie rastlín, DMSO – dimetyl sulfoxid

3 Experimentálna časť II

3.1 Prenos semien z podmienok *in vivo* do *in vitro*

Cieľ: Otestovať vplyv rôznych koncentrácií sterilizačného činidla na sterilitu a klíčenie semien v *in vitro*.

3.1.1 Povrchová sterilizácia semien

Princíp: Kapitola 1.1 a Kapitola 1.2

Rastlinný materiál: Semená repky olejnej (*Brassica napus* L.)

Pomôcky: Sterilné Petriho misky, gáza, pinzeta, kadičky, odmerný valec, nožnice, sterilné nádoby s vrchnákom, rôznofarebné nitky, sterilný filtračný papier

Prístroje: BSC, trepačka

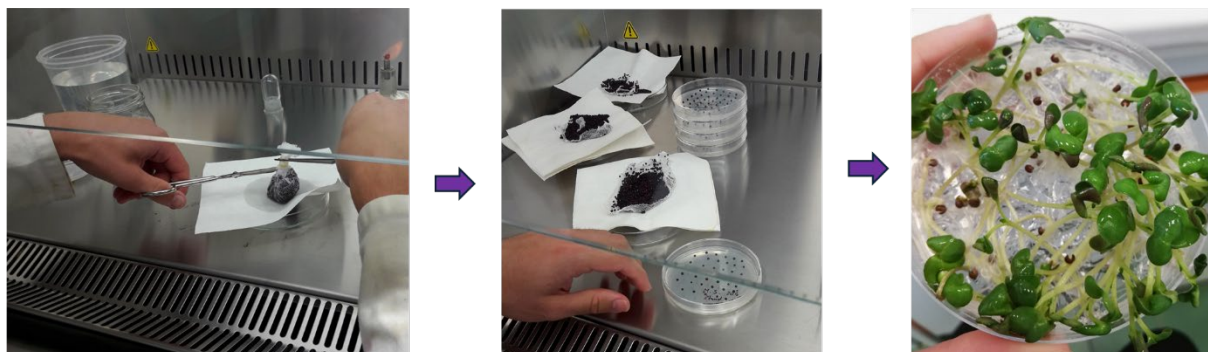
Chemikálie: Destilovaná voda, sterilná destilovaná voda, 96% etanol, SAVO, TWEEN 20

Postup:

1. Pripraviť roztoky (roztok I, II, III a IV) na sterilizáciu (150 ml):
 - Roztok I: sterilná voda (0% SAVO) + 0,1% (v/v) TWEEN 20
 - Roztok II: 10% (v/v) SAVO + 0,1% (v/v) TWEEN 20
 - Roztok III: 50% (v/v) SAVO + 0,1% (v/v) TWEEN 20
 - Roztok IV: 100% (v/v) SAVO + 0,1% (v/v) TWEEN 20
1. Vystrihnúť si štvorec z gázy (cca 10 x 10 cm)
2. Do stredu štvorca umiestniť semená
3. Štvorec gázy so semenami poskladať do batôžteka a zaviazať nitkou tak, aby sa semená nevysypali (1 batôžtek na študenta).
4. V sterilnom prostredí (BSC) preniesť batôžteky do sterilnej nádoby s 96% etanolom, uzatvoriť vrchnákom a batôžteky v etanole premiešavať 1 min.
5. Etanol v BSC zliať do pripravenej zbernej nádoby (batôžteky zostávajú v nádobe) a naliať do nádoby sterilizačný roztok (I, II, III alebo IV). Uzatvoriť vrchnákom.
6. Nádoby s batôžkami premiešavať na trepačke 5 minút.
7. V BSC nádobu otvoriť, batôžtek sterilnou pinzetou vybrať a preniesť do novej sterilnej nádoby so 100 ml sterilnej destilovanej vody, a uzavrieť vrchnákom.
8. Nádoby s batôžkami premiešavať na trepačke 5 minút.
9. V BSC nádobu otvoriť, vodu zliať do zbernej nádoby a pridať novú sterilnú vodu a proces opakovať ešte 3-krát.

10. Batôžtky preniesť v sterilnom prostredí na sterilnú PM so sterilným filtračným papierom, otvoriť batôžtek pomocou (nad plameňom) vysterilizovaných nožníc a pinzety (Obrázok 3.1)

11. Preniesť na sterilnú Petriho misku a nechať voľne vysušiť v BSC. Po vysušení v BSC uzavrieť Petriho misku so semenami a uskladniť v chladničke pri 4°C.



Obrázok 3.1 Ukážka postupu pri prenose semien repky olejnej do *in vitro* podmienok (Zdroj: autori).

3.1.2 Klíčenie sterilizovaných semien v *in vitro* podmienkach

Princíp: Kapitola 1.1 a Kapitola 1.2.2

Rastlinný materiál: Sterilné semená repky olejnej (*Brassica napus* L.) (úloha 3.1.1)

Pomôcky: Petriho misky, parafilm, pinzeta, skalpel, kadičky, odmerný valec, fľaša s GL45 uzáverom

Prístroje: BSC, rastová komora, váhy, pH meter, magnetické miešadlo, autokláv

Chemikálie: Sterilná destilovaná voda, MS médium s vitamínmi, sacharóza, agar

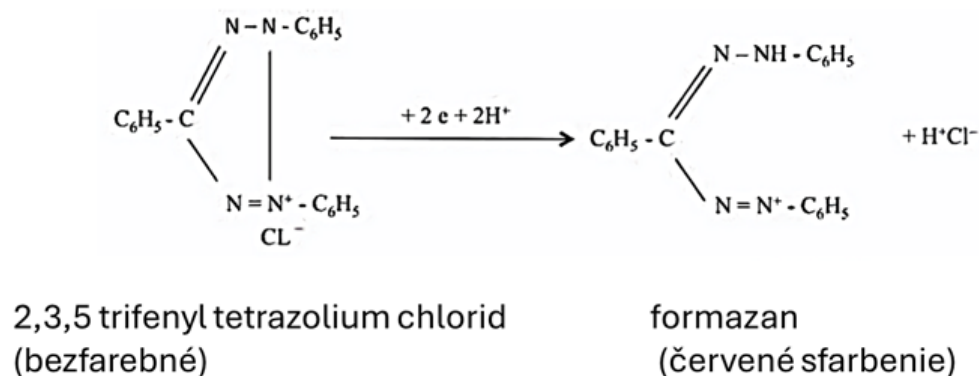
Postup:

1. Pripraviť klíčiace médium (KM) [MS médium s vitamínmi, 1% (w/v) sacharóza, 0,8% (w/v) agar, pH 5.7].
 - a. Vypočítať návažky a pripraviť regeneračné médium objemu určeného na laboratórnom cvičení, postupovať podľa kapitoly 2.1.3 a kapitoly 4.3.
 - b. Rozvariť KM v mikrovlnnej rúre (ak je stuhnuté) a po dostatočnom vychladnutí rozliať do sterilných Petriho misiek v BSC.
2. Priprava rastlinného materiálu na kultiváciu:
 - a. Pomocou sterilnej pinzety poukladať vysterilizované semená z batôžteka na pripravené Petriho misky s KM médiom (Obrázok 3.1).
 - b. Petriho misky zaparafilmoviť a odfotiť.

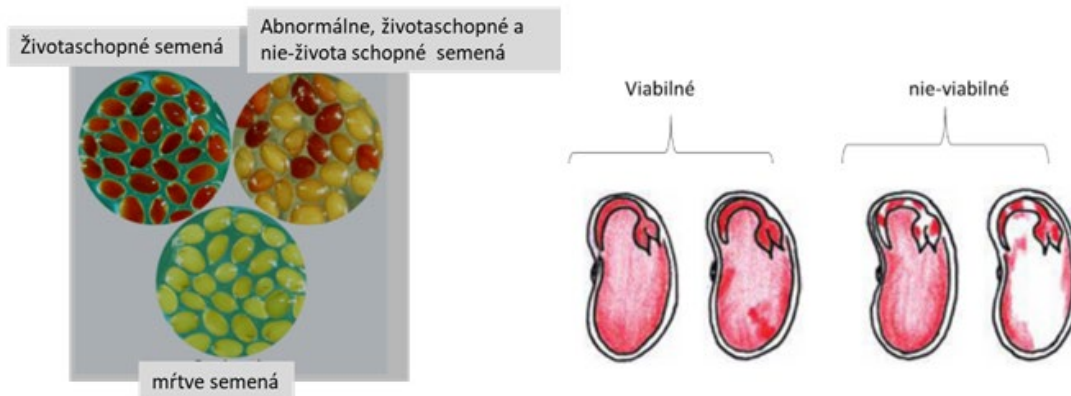
- c. Kultivovať v rastovej komore 7 dní za kultivačných podmienok 23°C, 16h svetlo/8 hodín tma.
3. Po 7. dňoch vyhodnotiť:
- Či bola sterilizácia dostatočná (Petriho misky bez znakov infekcie) alebo nie,
 - Či mali samotné sterilizačné podmienky vplyv na klíčivosť semien.
 - Vypočítať účinnosť klíčenia (pri jednotlivých sterilizačných postupoch) v percentách ako počet vyklíčených semien vzhľadom na celkový počet semien použitých v experimente a prezentovať vo forme grafu.
 - Fotograficky zdokumentovať a urobiť tzv. zrkadlo, kde budú fotky Petriho misiek s rastlinným materiálom na začiatku experimentu a v čase.

3.1.3 Určenie životaschopnosti semien pomocou testu s 2,3,5 trifenyl tetrazolium chloridom

Princíp: 2,3,5 trifenyl tetrazolium chlorid (TZ) test je rýchlym hodnotením životaschopnosti semien a alternatívnou rýchlou metódou testu klíčivosti semien. Semená sa pred stanovením hydratujú (namočenie semien vo vode na 24 hodín), aby sa aktivovali dýchacie enzýmy a zmäkčili pletivá. Po preniknutí TZ do živých buniek je redukovaný dehydrogenázovými enzýmami prítomnými v živom tkanive na karmínovo-červený vo vode nerozpustný formazán (Obrázok 3.2). Nie viabilné (mŕtve) pletivá sa nefarbí a zostávajú v pôvodnej farbe. TZ sa síce dostáva do živých aj mŕtvych buniek, ale iba živé bunky katalyzujú tvorbu formazanu. Absencia dýchania bráni produkcii formazanu, mŕtve semená (starnúce pletivo) zostane bez farebnej zmeny (Obrázok 3.3).



Obrázok 3.2 Tvorba formazanu (Zdroj: <https://www.scielo.br/j/jss/a/P9ngBnMTcCcrW7n85v89jnR/>, upravené).



Obrázok 3.3 Ukážka stanovenia životaschopnosti semien pomocou 2,3,5 trifenyl tetrazolium chloridu. (Zdroj: <https://www.lifeasible.com/custom-solutions/plant/analytical-services/seed-testing-services/tetrazolium-testing/>, upravené).

Rastlinný materiál: Semená repky olejnej (*Brassica napus* L.), ktoré boli namočené v sterilnej destilovanej vode 24 hodín

Prístroje: BSC, trepačka, binokulárna lupa, elektrický varič, pH meter, magnetické miešadlo, váhy

Pomôcky: Petriho misky, pinzeta, kadičky, odmerný valec, fľaša s GL45 uzáverom

Chemikálie: Sterilná destilovaná voda, 2,3,5 trifenyl tetrazolium chlorid

Postup:

1. Príprava rastlinného materiálu:

a. Semená repky olejnej namočiť na 24 hodín do sterilnej destilovanej vody.

2. Pripraviť 1% (w/v) roztok 2,3,5 trifenyl tetrazolium chloridu (TZ) pH 7.0 (objem bude určený na cvičení):

a. Vypočítať, rozpustiť v kadičke na magnetickom miešadle v menšom objeme sterilnej destilovanej vody.

b. Upraviť pH pomocou pH metra na pH 7.0 (s roztokom NaOH alebo HCl).

c. Doplniť sterilnou vodou do požadovaného objemu v odmernom valci.

d. Premiešať ešte raz v kadičke na magnetickom miešadle a preliať do zásobnej fľaše (roztok sa skladuje v tme pri teplote 4 °C, v takýchto podmienkach možno skladovať niekoľko mesiacov).

3. Pripraviť negatívnu kontrolu:

a. Zobrat' časť pripravených (vo vode namočených) semien, preniesť do kadičky alebo do inej vhodnej nádoby s destilovanou vodou.

b. Vystaviť varu 5 minút, potom ich vybrať a nechať vychladnúť.

4. Pripravené (vo vode namočené) semená preniesť do Petriho misiek resp. iných vhodných nádob a inkubovať za premiešavania (na trepačke) v 1% roztoku TZ pri teplote 30 °C počas 1 hodiny v tme.
5. Ako negatívnu kontrolu použiť semená vystavené varu (tzv. mŕtve semená), ktoré sa nezafarbia.
6. Po zafarbení semená 2-3 krát premyť sterilnou destilovanou vodou.
7. Vyhodnotiť:
 - a. Semená na základe sfarbenia. Semená s červeným sfarbením sú úplne životaschopné, zatiaľ čo semená slabo zafarbené môžu produkovať normálne alebo abnormálne klíčence. Úplne nezafarbené semená nie sú životaschopné (Obrázok 3.4).
 - b. Zosumarizovať údaje a vypočítať percento životaschopnosti ako pomer počtu viabilných, na červeno sfarbených, semien vzhľadom na celkový počet semien použitých v experimente.
 - c. Fotograficky zdokumentovať.



Obrázok 3.4 Ukážka výsledku testu životaschopnosti semien repky olejnej pomocou 2,3,5 trifenyl tetrazolium chloridu (Zdroj: autori).

3.2 Regenerácia rastlín v *in vitro* pomocou priamej a nepriamej organogenézy

Cieľ: Otestovať vplyv rastových regulátorov na indukciu tvorby de-diferencovaných a diferencovaných pletív.

3.2.1 Príprava zásobnej koncentrácie rastových regulátorov: kyselina naftyl octová a 6-benzylamínopurín

Princíp: Kapitola 1.2.4

Pomôcky: Kadičky, odmerný valec, sterilné mikroskúmavky, mikropipety, sterilné pipetovacie špice, laboratórny stojan na mikroskúmavky, 0,2 µm filtračný systém

Prístroje: BSC, analytické váhy, magnetické miešadlo

Chemikálie: Rastové regulátory kyselina naftyl octová (NAA) a 6-benzylamínopurín (BAP), destilovaná voda, NaOH

Postup:

1. Vypočítať návažky na prípravu zásobných roztokov o objeme 10 ml a koncentrácii 10 mg.cm⁻³ BAP a 10 mg.cm⁻³ NAA.
2. Pripraviť si 10 ml 1 mol.dm⁻³ NaOH (rozpúšťadlo na základe Tabuľky 5).
3. Návažky rozpustiť v malom množstve roztoku NaOH a doplniť destilovanou vodou do objemu 10 ml.
4. Postupovať podľa pokynov v kapitole 2.1.5 a 2.1.6

3.2.2 Indukcia tvorby kalusu z listových segmentov *in vitro* tabaku virgínskeho

Princíp: Kapitola 1.2

Rastlinný materiál: 6 týždňov staré *in vitro* listy tabaku virgínskeho (*Nicotiana tabacum* L.)

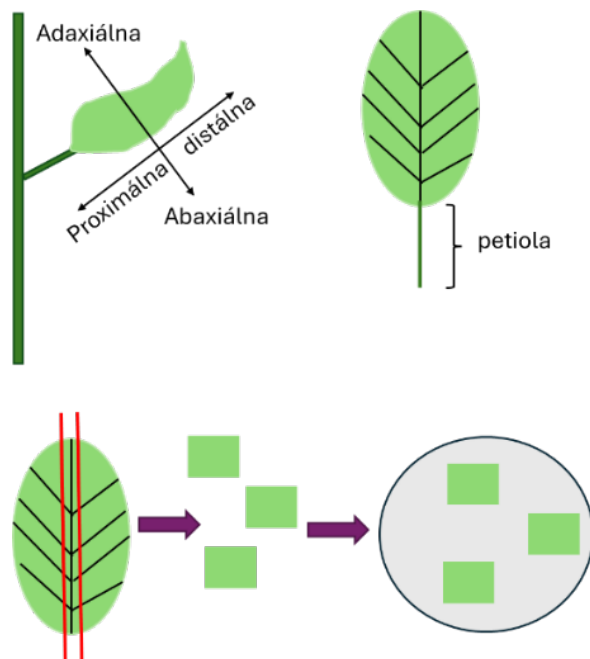
Pomôcky: Skalpel, pinzeta, sterilné Petriho misky, mikropipety, pipetovacie špice, sterilné kultivačné nádoby, kadičky, odmerný valec, fľaša s GL45 uzáverom

Prístroje: BSC, rastová komora, váhy, magnetické miešadlo, autokláv

Chemikálie: MS médium s vitamínmi, sacharóza, agar, destilovaná voda, rastové regulátory o zásobnej koncentrácii 10 mg.cm⁻³ NAA a 10 mg.cm⁻³ BAP

Postup:

1. Pripraviť regeneračné médium [MS médium s vitamínmi, 3% (w/v) sacharóza, 0,8% (w/v) agar, pH 5.7]:
 - a. Vypočítať návažky a pripraviť regeneračné médium objemu určeného na laboratórnom cvičení, postupovať podľa kapitoly 2.1.3 a kapitoly 4.3.
 - i. Vypočítať si koľko (μl) rastových regulátorov je potrebné pridať do média určitého objemu, aby sa získala výsledná koncentrácia $1 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ NAA + $0,2 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$ BAP, ostatné kombinácie si zvolia študenti, postupovať pri výpočte podľa kapitoly 4.3.2.
 - b. Regeneračné (ak je stuhnuté) médium rozvariť v mikrovlnnej rúre a nechať čiastočne ochladiť.
 - c. Do chladnúceho média v BSC pridať rastové regulátory a následne rozlitať do sterilných Petriho misiek podľa nasledovného:
 - i. Petriho miska (25 ml média) – bez rastových regulátorov,
 - ii. Petriho miska (25 ml média) – $1 \text{ mg} / \text{dm}^{-3}$ NAA + $0,2 \text{ mg} / \text{dm}^{-3}$ BAP,
 - iii. Petriho miska (25 ml média) – koncentrácia bude určené na cvičení,
 - iv. Petriho miska (25 ml média) – koncentrácia bude určené na cvičení.
 - d. Nechať médiá úplne vychladnúť v BSC.
2. Pripraviť rastlinné explantáty:
 - a. List tabaku z kultivačnej nádoby preniesť pomocou sterilnej pinzety a skalpela do otvorenej prázdnej sterilnej Petriho misky (v BSC).
 - b. V Petriho miske zbaviť list hlavnej žilnatinu sterilným skalpelom, narezať na menšie segmenty a preniesť sterilnou pinzetou na pripravené regeneračné médium. Listové segmenty sa musia abaxiálnou stranou dotýkať média (Obrázok 3.5).
 - c. Uzavrieť Petriho misku s parafilmom a fotograficky zdokumentovať.
 - d. Kultivovať v rastovej komore 2 až 3 týždne.
3. Vyhodnotiť (po 2-3 týždňoch):
 - a. Či listové pletivo regeneruje a tvoria sa kalusy, určiť, ktorá z použitej kombinácie rastových regulátorov je najvhodnejšia na tvorbu kalusov, či sa tvoria aj výhony a/alebo korene a ak áno z akého dôvodu.
 - b. Či nedošlo ku kontaminácii a ak áno uviesť pravdepodobnú príčinu.
 - c. Fotograficky zdokumentovať a urobiť tzv. zrkadlo, kde budú fotky Petriho misiek s explantátmi na začiatku experimentu a v čase.



Obrázok 3.5 Štruktúra listu a príprava listových segmentov (Zdroj: autori).

3.2.3 Indukcia tvorby výhonov z listových segmentov *in vitro* rosičky okrúhlostej a rosičky kapskej

Princíp: Kapitola 1.2

Drosera rotundifolia (rosička okrúhloistá) a *D. capensis* (rosička kapská) sú mäsožravé rastliny z rodu *Drosera* (Obrázok 3.6A a 3.6B, príslušne). Mäsožravé rastliny sú také rastliny, ktoré lapajú alebo lovia korisť, prijímajú z koristi živiny a využívajú tieto živiny pre svoj rast a vývin. Rosička okrúhloistá a rosička kapská patria medzi hmyzožravé rastliny. Hmyzožravosť týchto rastlín súvisí s tým, že rastú v prírode na kyslých na živiny chudobných pôdach (rašeliniská). Nedostatok minerálnych látok, ako je dusík a fosfor, si nahrádzajú lapaním drobného hmyzu, ako zdroju týchto látok. Na svojich listoch majú lepkavé žľazové chlípky (tentakuly) na zachytávanie a trávenie hmyzu. Tentakuly sú ukončené globulárnymi útvarmi, tzv. hlavičkami, ktoré produkujú lepkavú tekutinu na zachytenie koristi a takisto obsahujú aj tráviace enzýmy. V prípade, ak je pôda pre ich potreby, ktoré nie sú veľmi veľké, dostatočne bohatá na minerálne látky, hmyzožravosť nevyužívajú. Podobne ako v prírode, aj v *in vitro* podmienkach pre svoj optimálny rast a vývin, vyžadujú kyslé pH regeneračného média (pH 4.9 až 5.2) a polovičné množstvo makro a mikro elementov (tzv. $\frac{1}{2}$ MS). *D. rotundifolia* a aj *D. capensis* patria k rastlinným druhom, ktoré je možné využiť regeneráciu pomocou priamej organogenézy.

Rastlinný materiál: Listy *in vitro* rosičky okrúhlostej (*Drosera rotundifolia*), listy *in vitro* rosičky kapskej (*Drosera capensis*) (Obrázok 3.6).

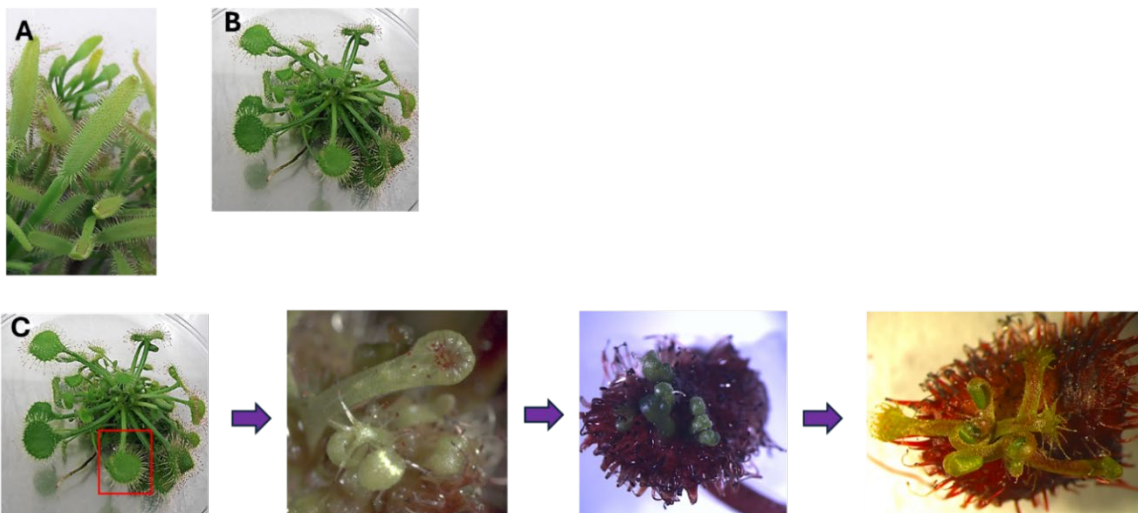
Pomôcky: Skalpel, pinzeta, sterilné Petriho misky, sterilné kultivačné nádoby, kadičky, odmerný valec, fľaša s GL45 uzáverom.

Prístroje: BSC, rastová komora, váhy, magnetické miešadlo, pH meter, autokláv.

Chemikálie: MS médium s vitamínmi, sacharóza, destilovaná voda.

Postup:

1. Pripraviť kvapalnú regeneračnú kultúru [$\frac{1}{2}$ MS médium s vitamínmi, 1% (w/v) sacharóza, pH 4.9]:
 - a. Vypočítať návažky a pripraviť kvapalnú regeneračnú kultúru objemu určeného na laboratórnom cvičení, postupovať podľa kapitoly 2.1.2 a kapitoly 4.3.
 - b. Kvapalnú kultúru rozlitať do sterilných kultivačných nádob (50 ml/nádobu) v BSC a ak je médium horúce, treba ho nechať vychladnúť.
2. Pripraviť rastlinné explantáty:
 - a. Sterilnou pinzetou vybrať rastlinu z kultivačnej nádoby a preniesť na sterilnú Petriho misku (v BSC).
 - b. Sterilným skalpelom odrezat' listy a preniesť pinzetou do regeneračného média v kultivačnej nádobe.
 - c. Kultivovať v rastovej komore 3 až 4 týždne.



Obrázok 3.6 Ukážka *in vitro* rastlín *D. capensis* (A) a *D. rotundifolia* (B). Ukážka *in vitro* regenerácie *D. rotundifolia* priamou organogenezou s využitím listov ako rastlinných explantátov (C) (Zdroj: autori).

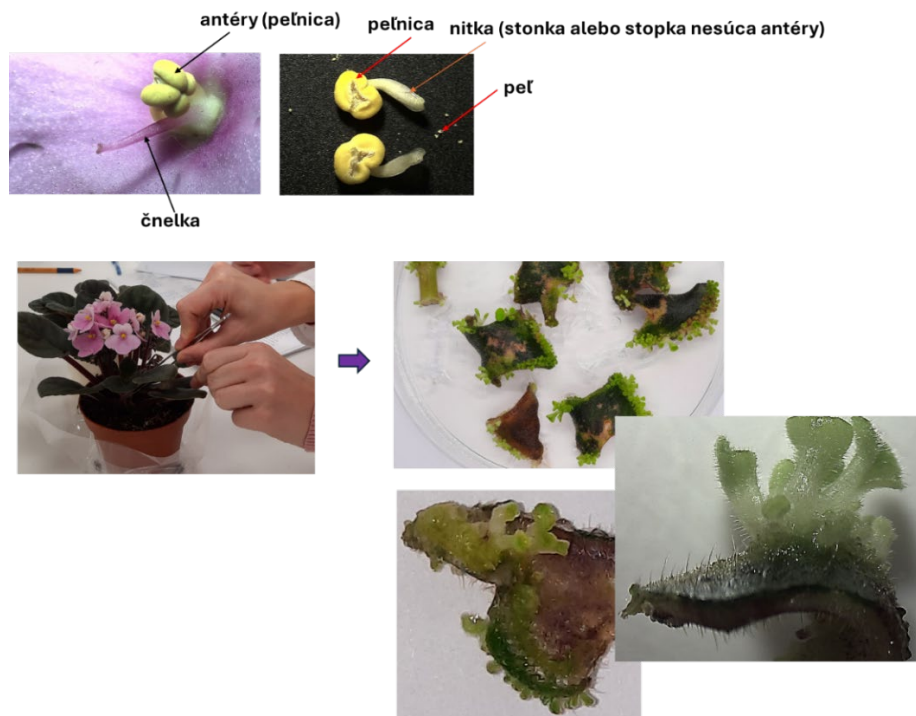
3. Vyhodnotiť:

- a. Či pletivo regeneruje – tvoria sa priamo výhony (Obrázok 3.6C),
- b. či nedošlo ku kontaminácii.
- c. Fotograficky zdokumentovať a urobiť tzv. zrkadlo, kde budú fotky Petriho misiek s explantátmi na začiatku experimentu a v čase.

3.2.4 Indukcia tvorby výhonov z listov a stopiek *in vivo* fialky africkej

Princíp: Kapitola 1.2

Fialka africká (*Saintpaulia ionantha*) je obľúbená okrasná črepníková rastlina, ktorú je ľahké pestovať v *in vivo* a aj v *in vitro* v porovnaní s inými bylinnými okrasnými rastlinami. Táto kvalita z nej robí ideálny systém pre experimenty s regeneráciou *in vitro*. Rod *Saintpaulia* patrí do čeľade *Gesneriaceae*, ktorá pozostáva hlavne z tropických kríkov a bylinných rastlín. Medzi ďalšie obľúbené okrasné rastliny z rovnakej čeľade patria prvosenky kapské a gloxínie. Rod *Saintpaulia* bol pomenovaný po barónovi von Saint-Paul-Illaire, ktorý túto rastlinu priniesol z Tanzánie do Európy v roku 1892. Fialka africká sa stala obľúbenou izbovou rastlinou vďaka jej vizuálnej príťažlivosti, tolerancie tieňa a schopnosti kvitnúť pod umelým svetlom. Jedným z dôvodov popularity tejto rastliny je aj jej ľahké rozmnožovanie. Korene sa môžu tvoriť z listov alebo stopiek, ktoré sa umiestnia do vody.



Obrázok 3.7 Fialka africká, časti jej reprodukčného orgánu a ukážka regenerácie listových segmentov a segmentov stopky fialky africkej (Zdroj: autori).

Mikropropagáciu fialky africkej je možné dosiahnuť z rôznych typov explantátov ako sú listové segmenty, petioly, okvetné lístky alebo antéry (peľnice). Peľnice sú podlhovasté žlté vaky, v ktorých sa tvoria peľové zrná (Obrázok 3.7).

Regenerácia môže byť indukovaná buď pomocou priamej alebo nepriamej organogenézy, alebo pomocou priamej alebo nepriamej somatickej embryogenézy. V prípade *in vitro* regenerácie s využitím peľníc sa využívajú puky kvetov s priemerom 3-5 mm.

Rastlinný materiál: Listy fialky africkej rastúcej v *in vivo* podmienkach (v kvetináči).

Pomôcky: Sklená fľaša z GL 45 uzáverom, kadičky, odmerný valec, skalpel, pinzeta, sterilné pipetovacie špičky, mikropipety, sterilné Petriho misky, sterilné nádoby s uzáverom.

Prístroje: pH meter, váhy, autokláv, BSC, magnetické miešadlo, trepačka, rastová komora.

Chemikálie: Sterilná destilovaná voda, MS médium s vitamínmi, agar, sacharóza, 96% etanol, SAVO, Tween 20, zásobné roztoky rastových regulátorov kyselina naftyl octová (NAA) a 6-benzylamínopurín (BAP).

Postup:

1. Pripraviť regeneračné médium [MS médium s vitamínmi, 3% (w/v) sacharóza a 0,8% (w/v) agar, pH 5.7]:
 - a. Vypočítať návažky a pripraviť regeneračné médium objemu určeného na laboratórnom cvičení, postupovať podľa kapitoly 2.1.3 a kapitoly 4.3.
 - a. Vypočítať si koľko (μl) rastových regulátorov je potrebné pridať do média určeného objemu, aby sa získala výsledná koncentrácia $0,1 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ NAA a $1 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$ BAP, postupovať pri výpočte podľa kapitoly 4.3.
 - b. Regeneračné médium (ak je stuhnuté) rozvariť v mikrovlnnej rúre a nechať čiastočne ochladiť.
 - c. Do chladného regeneračného média v BSC pridať potrebný objem rastových regulátorov a následne rozlíať do sterilných Petriho misiek a nechať vychladnúť.
2. Prenos rastlinného materiálu do *in vitro* podmienok:
 - a. Vybrať stredne veľký zdravý list a odrezať skalpelom stopku blízko miesta, kde sa pripája k stonke.
 - b. Pripraviť si roztok 70% (v/v) etanolu (objem bude určený na cvičení) a naliať do sterilnej nádoby s uzáverom.
 - c. Preniesť list do roztoku 70% (v/v) etanolu, nádobu uzavrieť vrchnákom a premiešavať cca 1 minútu na trepačke.

- d. V BSC zliať 70% etanol do zbernej kadičky a pridať 10% (v/v) SAVO s 2-3 kvapkami Tweenu (list musí byť celý namočený v roztokoch) a premiešavať v uzavretej nádobe na trepačke 15 minút.
 - e. Preniesť (v BSC) list do novej sterilnej nádoby a 3 x 5 minút premyť so sterilnou destilovanou vodou, premiešavať na trepačke..
3. Príprava rastlinného materiálu:
- a. Preniesť (v BSC) povrchovo sterilizovaný list do sterilnej Petriho misky a oddeliť stopku od listu pomocou skalpela.
 - b. Po rozrezaní listu na segmenty tieto segmenty preniesť na regeneračné médium tak, aby sa abaxiálnou stranou dotýkali média.
 - c. Stopku narezať aj na 3-5 mm časti a preniesť na regeneračné médium.
 - d. Petriho misky s rastlinnými explantátami fotograficky zdokumentovať.
 - e. Kultivovať v rastovej komore 4 týždne.
4. Vyhodnotiť v čase (po 1., 2., 3. a 4. týždni kultivácie):
- a. Či sterilizácia bola dostatočná a nedošlo ku kontaminácii.,
 - b. či pletivo reagovalo na regeneračné médium.
 - c. Fotograficky dokumentovať v čase.

3.3 Multiplikácia *in vitro* rastlín a prenos do *ex vitro* podmienok

Cieľ: Otestovať možnosti multiplikácie *in vitro* rastlín a ich prenosu z *in vitro* do kvetináčov.

3.3.1 Multiplikácia rastlín tabaku virgínskeho rastúcich v podmienkach *in vitro*

Princíp: Kapitola 1.2

Rastlinný materiál: *In vitro* rastliny tabaku virgínskeho *Nicotiana tabacum* L.

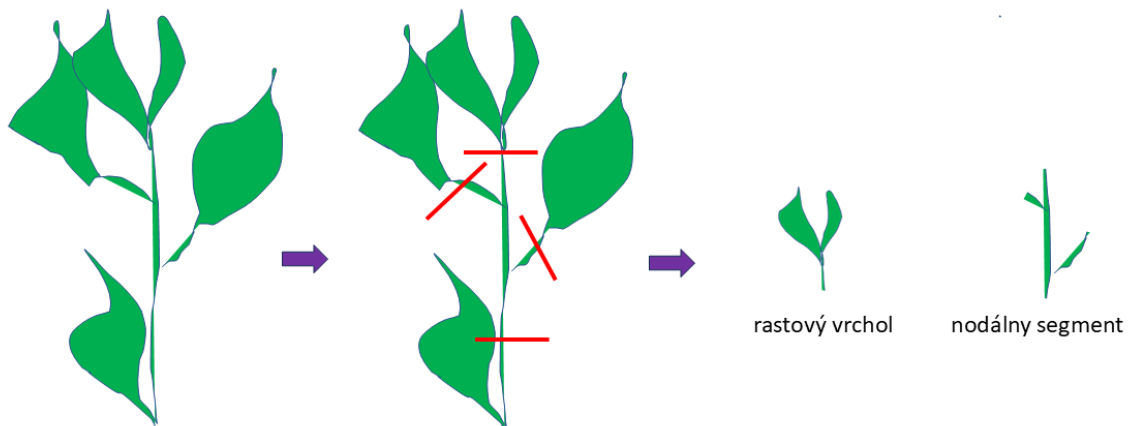
Pomôcky: Sterilné kultivačné nádoby s uzáverom, pinzeta, skalpel, sterilné Petriho misky, sklená fľaša s GL45 uzáverom.

Prístroje: BSC, rastová komora, autokláv, pH meter, váhy, magnetické miešadlo, mikrovlnná rúra.

Chemikálie: MS médium s vitamínmi, agar, sacharóza, destilovaná voda.

Postup:

1. Pripraviť regeneračné médium [MS médium s vitamínmi, 2% (w/v) sacharóza, 0,8% (w/v) agar, pH 5.7]:
 - b. Vypočítať návažky a pripraviť regeneračné médium objemu určeného na laboratórnom cvičení, postupovať podľa kapitoly 2.1.3 a kapitoly 4.3.
 - a. MS médium rozliať do kultivačných nádob, nechať stuhnúť. (V prípade, že médium už stuhlo, pred rozliatím do kultivačných nádob rozvariť v mikrovlnnej rúre).
2. Priprava rastlinného materiálu:
 - a. Rastlinu vybrať sterilnou pinzetou z kultivačnej nádoby a preniesť na sterilnú Petriho misku.
 - b. Na Petriho miske pomocou sterilnej pinzety a skalpelu oddeliť listy (Obrázok 3.8) a preniesť explantáty do pripravených kultivačných nádob s médiom.
 - c. Nádoby uzavrieť a preniesť do rastovej komory.
3. Vyhodnotiť po 7. a 14. dňoch:
 - a. Či pletivo regeneruje,
 - b. či nedošlo ku kontaminácii.
 - c. Fotograficky zdokumentovať



Obrázok 3.8 Postup pri multiplikácii *in vitro* rastlín tabaku virgínskeho (Zdroj: autori).

3.3.2 Multiplikácia *in vitro* rastlín *Drosera rotundifolia* a *Drosera capensis*

Princíp: Kapitola 1.2

Rastlinný materiál: *In vitro* rastliny rosičky okrúhlostej *Drosera rotundifolia* a rosičky kapskej *Drosera capensis*.

Pomôcky: Sterilné kultivačné nádoby s uzáverom, pinzeta, skalpel, sterilné Petriho misky, sklená fľaša s GL45 uzáverom.

Prístroje: BSC, rastová komora, autokláv, pH meter, váhy, magnetické miešadlo, mikrovlnná rúra.

Chemikálie: MS médium s vitamínmi, agar, sacharóza, destilovaná voda.

Postup:

1. Prípraviť regeneračné médium [1/2 MS médium s vitamínmi, 1% (w/v) sacharóza, 0,8% (w/v) agar, pH 4.9]:
 - a. Vypočítať návažky a pripraviť regeneračné médium objemu určeného na laboratórnom cvičení, postupovať podľa kapitoly 2.1.3 a kapitoly 4.3.
 - b. MS médium rozlíať do kultivačných nádob, nechať stuhnúť. (V prípade, že médium už stuhlo, pred rozliatím do kultivačných nádob rozvariť v mikrovlnnej rúre).
2. Príprava rastlinného materiálu:
 - a. Rastliny (Obrázok 3.9) v BSC vybrať sterilnou pinzetou z nádoby a preniesť na sterilnú Petriho misku.
 - b. Na Petriho miske pomocou pinzety a skalpelu rozobrať na jednotlivé malé rastlinky.
 - c. Preniesť malé rastlinky do pripravených kultivačných nádob s médiom.
 - d. Uzavrieť nádoby a dať do rastovej komory.
3. Vyhodnotiť po 7. a 14. dňoch:
 - a. či pletivo regeneruje,
 - b. či nedošlo ku kontaminácii.
 - c. Fotograficky zdokumentovať.



Obrázok 3.9 Rosička okrúhlostá v *in vitro* podmienkach (Zdroj: autori).

3.3.3 Prenos *in vitro* rastlín do *ex vitro*

Princíp: Kapitola 1.2

Rastlinný materiál: *In vitro* rastliny tabaku virgínskeho *Nicotiana tabacum* L.

Pomôcky: Kvetináč s podnosom, pinzeta, sklený zaváraninový pohár na prikrytie.

Prístroje: Kultivačná miestnosť.

Chemikálie: Sterilná destilovaná voda, záhradný substrát, odstáta voda na polievanie.

Postup:

1. Zdravé rastliny s dobrým koreňovým systémom v laboratóriu opatrne vybrať pomocou pinzety tak, aby nedošlo k poškodeniu rastliny.
2. Opatrne zbaviť rastlinu zvyškov agaru a premyť korene sterilnou destilovanou vodou.
3. Opatrne rastlinu zasadiť do kvetináča so zeminou.
4. Prikryť rastlinu skleným pohárom a poliať odstátou vodou.
5. Preniesť do kultivačnej miestnosti a pravidelne kontrolovať vlhkosť zeminy.
6. Po týždni opatrne odstrániť pohár a pravidelne zavlažovať.
7. Vyhodnotiť:
 - a. Či prenos do *ex vitro* bol úspešný,
 - b. či nedošlo ku kontaminácii.
 - c. Fotograficky zdokumentovať v čase.

3.4 Vplyv kultivačných podmienok na obsah fotosyntetických pigmentov

Cieľ: Otestovať vplyv svetelných podmienok na obsah fotosyntetických pigmentov.

3.4.1 Vplyv svetelných podmienok na obsah fotosyntetických pigmentov

Princíp: Kapitola 1.3

Rastlinný materiál: Sterilné semená repky olejnej (*Brassica napus* L.), 7-dňové listy *in vitro* klíčencov repky olejnej.

Pomôcky: Petriho misky, parafilm, pinzeta, skalpel, kadičky, odmerný valec, fľaša s GL45 uzáverom, trečia miska, mikroskúmavky, mikropipety, pipetovacie špičky, kadičky, kvety.

Prístroje: BSC, rastová komora, váhy, pH meter, magnetické miešadlo, autokláv, spektrofotometer.

Chemikálie: Destilovaná voda, MS médium s vitamínmi, sacharóza, agar, acetón, morský piesok.

Postup:

1. Pripraviť médium (KM) podporujúce klíčenie semien [MS médium s vitamínmi, 1% (w/v) sacharóza, 0,8% (w/v) agar, pH 5.7]:
 - a. Vypočítať návažky a pripraviť regeneračné KM médium objemu určeného na laboratórnom cvičení, postupovať podľa kapitoly 2.1.3 a kapitoly 4.3.
 - a. b. Rozvariť KM (ak je stuhnuté) v mikrovlnnej rúre a po dostatočnom vychladnutí rozliať do sterilných Petriho misiek v BSC a nechať stuhnúť.
2. Pripraviť rastlinný materiál na analýzu:
 - a. Pomocou sterilnej pinzety poukladať vysterilizované semená na pripravené Petriho misky s KM médiom.
 - b. Petriho misky zaparafilovať a fotograficky zdokumentovať.
 - c. Kultivovať v rastovej komore 7 dní za kultivačných podmienok 23°C:
 - i. Štandardné svetelné podmienky,
 - ii. pološero (Petriho misky umiestniť v rastovej komore tak, aby na ne nedopadalo svetlo v plnej miere.),
 - iii. tma (Petriho misky zabaliť do alobalu a tak umiestniť do rastovej komory).
3. Stanovenie obsahu fotosyntetických pigmentov:
 - a. Po 7. dňoch kultivácie fotograficky zdokumentovať.

- b. Otvoriť Petriho misky a odobrať 50 mg rastlinného materiálu (listy) na analýzu.
- c. V tretej miske zhomogenizovať 50 mg rastlinného materiálu s trochou morského piesku a s 5 ml 80% (v/v) acetónu.
- d. Zhomogenizovanú zmes preniesť do mikroskúmavky a centrifugovať 2 minúty pri 4000 rpm a laboratórnej teplote.
- e. Supernatant preniesť do novej mikroskúmavky a znova centrifugovať 2 minúty pri 4000 rpm a laboratórnej teplote.
- f. Supernatant preniesť do čistej mikroskúmavky a následne do kyvety.
- g. Pomocou spektrofotometra zmerať absorbanciu (A) v kyvete pri rôznych vlnových dĺžkach:
 - i. 663nm,
 - ii. 646nm,
 - iii. 470nm.

4. Vypočítať obsah fotosyntetických pigmentov:

- a. Vypočítať koncentráciu chlorofylu a podľa vzorca:

$$C_{Chla} = 12,21 \cdot A_{663} - 2,81 \cdot A_{646} \text{ (mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{)}$$

- b. Vypočítať koncentráciu chlorofylu b podľa vzorca:

$$C_{Chlb} = 20,13 \cdot A_{646} - 5,03 \cdot A_{663} \text{ (mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{)}$$

- c. Vypočítať koncentráciu karotenoidov podľa vzorca:

$$C_{karotenoidov} = \frac{(1000 \cdot A_{470} - 3,27 \cdot C_{Chla} - 104 \cdot C_{Chlb})}{229} \text{ [mg}\cdot\text{g}^{-1}\text{]}$$

- d. Vypočítať obsah:

- i. Celkového chlorofylu ($Chl a + Chl b$) [$\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$],
- ii. pomer $Chl a/Chl b$,
- iii. pomer celkový chlorofyl/karotenoidy.

5. Vyhodnotenie:

- a. Kvalitatívne: fotograficky zdokumentovať, zhodnotiť, či boli fenotypové rozdiely pri kultivácii v rôznych svetelných podmienkach a ak áno aké.
- b. Kvantitatívne: zostrojiť jednotlivé grafy ($Chl a$ vs. svetelné podmienky, $Chl b$ vs. svetelné podmienky, celkový chlorofyl vs. svetelné podmienky, karotenoidy vs. svetelné podmienky, pomer $Chl a/Chl b$ vs. svetelné podmienky, pomer celkový chlorofyl/karotenoidy vs. svetelné podmienky) a na základe pomerov fotosyntetických pigmentov zhodnotiť do akej miery svetelné podmienky kultivácie boli pre klíčenie rastlín stresové.

3.5 Stanovenie životaschopnosti peľu *in vitro*

Cieľ: Otestovať životaschopnosť peľu pomocou testu farbenia bunkovej steny a testu *in vitro* klíčivosti.

3.5.1 Stanovenie životaschopnosti peľu *in vitro*

Princíp: Kapitola 1.4

Rastlinný materiál: Kvetý tabaku virgínskeho (*Nicotiana tabacum* L.) v rôznom štádiu vývinu.

Pomôcky: Skalpel, pinzeta, filtračný papier, Petriho misky, pravítko, mikroskúmavky, gáza, podložné a krycie sklá, mikropipety, pipetovacie špičky, špáradlo, kvapkadlo

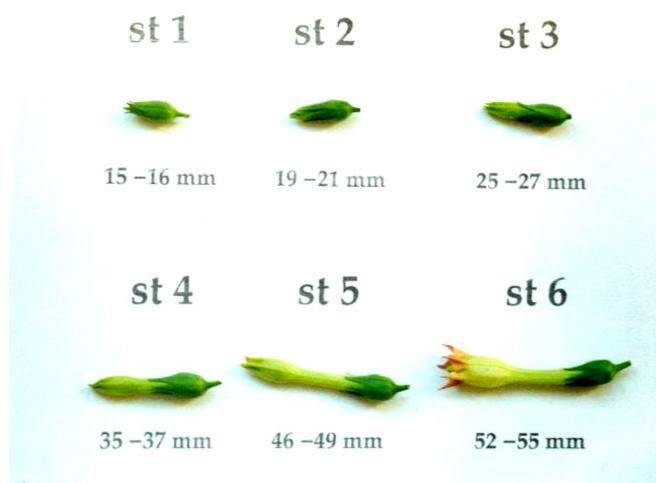
Prístroje: Mikroskop, binokulárny mikroskop.

Chemikálie: Sterilná destilovaná voda, roztok I₂-KI (0,5% (w/v) I₂ v 1% (w/v) KI), 1% (w/v) roztok metylénovej modrej, sacharóza, kyselina boritá, dusičnan vápenatý, komerčne dostupný roztok laktofenolovej modrej.

Postup:

1. Izolácia peľových zŕn:

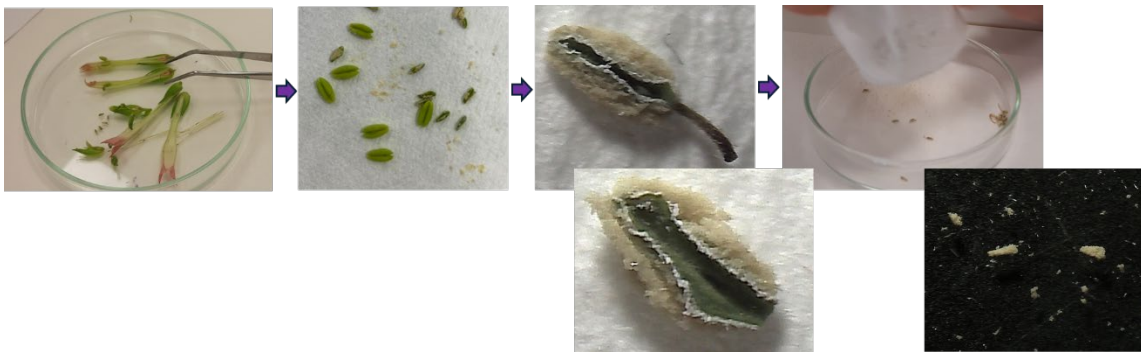
- a. Pomocou pravítka a vizuálnej pomôcky (štádium 6, Obrázok 3.10) vybrať vhodné kvety na zber zrelého peľu.



Obrázok 3.10 Štádiá vývinu kvetov tabaku. Zrelý peľ sa produkuje v štádiu 6 (Zdroj: <http://www.ueb.cas.cz/cs/content/jak-se-sklizi-pyl>).

- b. Pomocou skalpelu odrezat' stopky, na ktorých sú kvety tesne pod kvetným lôžkom, pričom treba dávať pozor, aby nedošlo k poškodeniu kvetov.

- c. Opatrne otvoriť korunné lupienky a skalpelom odrezat' tyčinky s peľnicami.
- d. Peľnice odrezat' a poukladať na Petriho misku s filtračným papierom a nechať sušiť do druhého dňa (Obrázok 3.11).
- e. Na druhý deň popraskané peľnice so zrelým peľom na povrchu preniesť do kadičky a zakryť gázou. (Gáza bude fungovať ako sito, cez ktoré sa oddelia peľnice od peľu.).
- f. Peľ oddeliť pomocou gázového sita na Petriho miske.



Obrázok 3.11 Ukážka postupu pri izolácii peľových zŕn (Zdroj: autori).

2. Stanovenie viability peľu farbením pomocou jodidového (I_2 -KI) farbenia:

- a. Na čisté podložné sklo si kvapátkom kvapnúť jednu kvapku roztoku I_2 -KI.
- b. Pomocou špáradla preniesť malé množstvo peľových zŕn do kvapky na podložnom skle.
- c. Takto pripravené podložné sklo prekryť krycím sklíčkom a nechať 5 minút na laboratórnom stole.
- d. Na jednu stranu skla priložiť filtračný papier a na druhú stranu kvapátkom pridávať vodu, kým sa roztok pod krycím sklom úplne neodfarbí.
- e. Preparát vložiť pod mikroskop a pozorovať sfarbenie peľových zŕn.
- f. Viabilný peľ bude tmavo-hnedo sfarbený.

3. Stanovenie viability peľu farbením pomocou metylénovej modrej:

- a. Na čisté podložné sklo si kvapkadlom kvapnúť jednu kvapku roztoku metylénovej modrej.
- b. Pomocou špáradla preniesť malé množstvo peľových zŕn do kvapky na podložnom skle.
- c. Takto pripravené podložné sklo prekryť krycím sklom a nechať 5 minút na laboratórnom stole.

- d. Na jednu stranu skla priložiť filtračný papier a na druhú stranu kvapátkom pridávať vodu, kým sa roztok pod krycím sklom úplne neodfarbí.
- e. Preparát vložiť pod mikroskop a pozorovať sfarbenie peľových zrn.
- f. Viabilný peľ bude tmavo modro sfarbený.

4. Stanovenie viability peľu testom klíčivosti:

- a. Zarobiť klíčiaci roztok [10% (w/v) sacharóza, $1,62 \text{ mmol.dm}^{-3}$ kyselina boritá ($M_w=61.83 \text{ g/mol}$), $1,829 \text{ mmol.dm}^{-3}$ dusičnan vápenatý ($M_w=164.088 \text{ g/mol}$)]. Objem bude určený na cvičení.
- a. Na čisté podložné sklo si kvapkadlom kvapnúť jednu kvapku klíčiaceho roztoku.
- b. Pomocou špáradla preniesť malé množstvo peľových zrn do kvapky na podložnom skle.
- c. Takto pripravené podložné sklo prekryť krycím sklom a nechať minimálne 30 minút na laboratórnom stole uzatvorené v Petriho miske, aby nedošlo k vysychaniu klíčiaceho roztoku.
- d. Po 30 minútach pridať kvapku roztoku laktofenolovej modrej.
- e. Rast peľových vačkov pozorovať pod mikroskopom.

5. Vyhodnotiť:

- a. Určiť v akých vývinových štádiách boli puky tabaku a fotograficky zdokumentovať.
- b. Vypočítať klíčivosť peľu v % (počet klíčiaceho peľu vzhľadom k celkovému počtu peľových zrn na fotke z mikroskopu).
- c. Vypočítať viabilitu peľu pri jednotlivých farbeniach v % (počet viabilného peľu vzhľadom k celkovému počtu na fotke z mikroskopu).
- a. Porovnať výsledky z týchto stanovení, vyhodnotiť, ktoré stanovenie sa ukazuje ako najvhodnejšie.
- b. Súčasťou budú fotky z binokulárneho mikroskopu a z mikroskopu.

3.6 Hydropónia

Cieľ: Osvojiť si techniku hydropónie a otestovať možnosti využitia hydropónie pri štúdiu vplyvu stresových podmienok na rast rastlín.

3.6.1 Príprava rastlinného materiálu na hydropóniu

Princíp: Kapitola 1.2 a Kapitola 1.5

Rastlinný materiál: Semená tabaku virgínskeho (*Nicotiana tabacum* L.).

Pomôcky: Sterilné Petriho misky, parafilm, pinzeta, kadičky, odmerný valec, fľaša s GL45 uzáverom, mikropipety, pipetovacie špičky, kadičky, sterilné kultivačné nádoby s vrchnákom, Miracloth, nožnice, sterilné špáradlá.

Prístroje: BSC, rastová komora, kultivačná miestnosť, váhy, pH meter, magnetické miešadlo, autokláv, trepačka.

Chemikálie: Destilovaná voda, MS médium s vitamínmi, sacharóza, agar, 96% etanol, sterilná destilovaná voda.

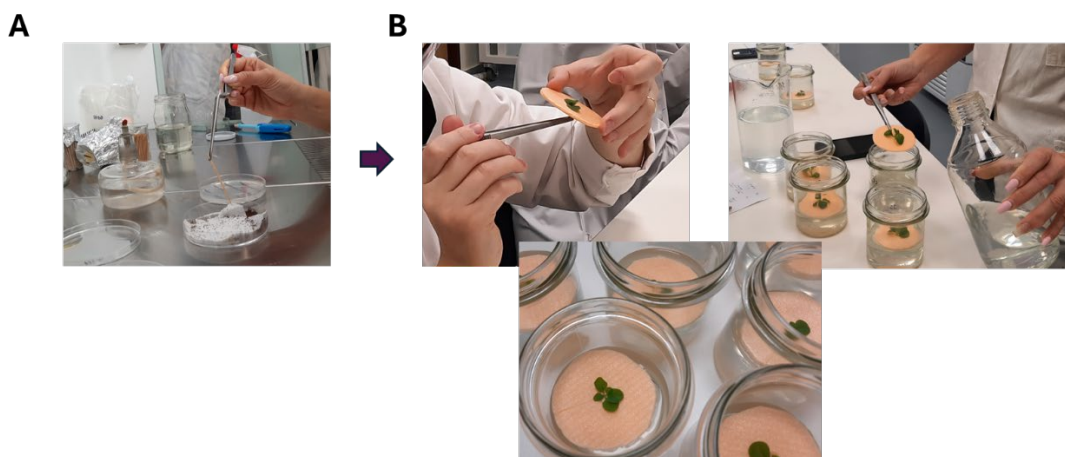
Postup:

1. Pripraviť kľúčiacie médium (KM) [MS médium s vitamínmi, 1% (w/v) sacharóza, 0,8% (w/v) agar, pH 5.7].
 - a. Vypočítať návažky a pripraviť regeneračné médium objemu určeného na laboratórnom cvičení, postupovať podľa kapitoly 2.1.3 a kapitoly 4.3.
 - b. Rozvariť KM v mikrovlnnej rúre (ak je stuhnuté) a po dostatočnom vychladnutí rozliať do sterilných Petriho misiek v BSC.
2. Povrchovo sterilizovať semená tabaku virgínskeho:
 - a. Pripraviť 70% (v/v) etanol objemu určeného na cvičení.
 - b. Semená tabaku zabalíť do filtračného materiálu Miracloth a zaviazať nitkou tak, aby semená počas sterilizácie nevyplávali do sterilizačného roztoku.
 - c. Batôžtek v BSC ponoriť do sterilnej kultivačnej nádoby so 70% etanolom a na trepačke premiešavať 5 minút.
 - d. V BSC nádobu otvoriť, batôžtek sterilnou pinzetou vybrať a preniesť do novej sterilnej kultivačnej nádoby so 150 ml sterilnej destilovanej vody a uzavrieť vrchnákom. Premiešavať na trepačke 5 minút.
 - e. V BSC nádobu otvoriť, vodu zliať do zbernej nádoby a pridať novú sterilnú vodu a proces opakovať ešte 3-krát.

- f. Batôžtek preniesť v sterilnom prostredí na sterilnú PM so sterilným filtračným papierom, otvoriť batôžtek pomocou (nad plameňom) vysterilizovaných nožníc a pinzety.
- g. Preniesť batôžtek na sterilnú Petriho misku a nechať voľne vysušiť v BSC.
- h. Po vysušení v BSC uzavrieť Petriho misku so semenami a uskladniť v chladničke pri 4°C.

3. Preniesť semená na klíčiace médium:

- a. Pomocou pinzety a sterilného špáradla poprenášať jednotlivé sterilné semená tabaku na Petriho misku s médiom a to tak, že špáradlo sa odoberie zo sterilnej nádoby sterilnou pinzetou a krátko zľahka sa zapichne do média. Následne sa špáradlo dotkne sterilného semena a preniesie na klíčiace médium (Obrázok 3.12A).
- b. Petriho misky so semenami na klíčovom médiu uzavrieť parafilmom a kultivovať 2-3 týždne v rastovej komore.



Obrázok 3.12 Ukážka prenosu povrchovo sterilných semien tabaku virgínskeho na klíčiace médium (A). Prenos rastlín do hydropónie (B) (Zdroj: autori).

3.6.2 Prenos rastlín do hydropónie

Princíp: Kapitola 1.5

Rastlinný materiál: 2-3 týždne staré *in vitro* rastliny tabaku virgínskeho (*Nicotiana tabacum* L.).

Pomôcky: Petriho misky, pinzeta, kadičky, odmerný valec, fľaša s GL45 uzáverom, mikropipety, pipetovacie špičky kultivačné nádoby bez vrchnáku, nožnice, plastové plaváky.

Prístroje: Kultivačná miestnosť, váhy, pH meter, magnetické miešadlo, autokláv, termostat.

Chemikálie: Sterilná destilovaná voda, chemikálie potrebné pre hydroponiu (Tabuľka 7 a Tabuľka 8).

Postup:

1. Vypočítať koncentrácie na základe návažok a zapísať do Tabuľky 7 a Tabuľky 8:
 - a. Zistiť molekulové hmotnosti jednotlivých makro- a mikro-prvkov a zapísať do Tabuľky 7 a Tabuľky 8.
2. Pripraviť zásobný roztok makro-prvkov:
 - a. Navážiť jednotlivé komponenty makro-prvkov a rozpustiť v sterilnej vode do objemu 2 dm³, pričom roztok bude 2x koncentrovaný oproti základnému.
3. Pripraviť zásobný roztok mikro-prvkov:
 - a. Navážiť jednotlivé komponenty mikro-prvkov a rozpustiť v sterilnej vode do objemu 0,5 dm³, pričom roztok bude 100 x koncentrovaný.
 - b. Zásobné roztoky makro-prvkov a mikro-prvkov sterilizovať autoklávovaním.
4. Pripraviť ½ Hoaglandov roztok obsahujúci makro- a mikro- prvky zo zásobných roztokov s využitím sterilnej destilovanej vody:
 - a. Zásobný roztok makroprvkov je 2 x koncentrovaný (oproti základnému Hoaglandovmu roztoku) – vypočítať koľko ml bude potrebné na prípravu ½ Hoagland roztoku, objem bude určený na cvičení.
 - b. Zásobný roztok mikroprvkov je 100 x koncentrovaný (oproti základnému Hoaglandovmu roztoku) – vypočítať koľko ml bude potrebné na prípravu ½ Hoagland roztoku, objem bude určený na cvičení.
5. Preniesť rastliny tabaku virgínskeho do hydroponie:
 - a. Kultivačné nádoby na hydroponiu pred použitím dať na 2 hodiny do termostatu pri teplote 80°C a následne nechať vychladnúť.
 - b. Nožnicami vystrihnúť plaváky podľa priemeru pohára s otvorom pre korene.
 - c. Rozliať ½ roztok Hoaglandu do pohárov (150 ml roztoku/pohár).
 - d. Z Petriho misiek opatrne vybrať klíčence aj s koreňmi (rovnomerného vzrastu), zbaviť zvyškov agaru a umiestniť do plaváku tak, aby korene prešli cez otvor a vložiť na hladinu roztoku v nádobe (Obrázok 3.12B).
 - e. Fotograficky zdokumentovať.
 - f. Preniesť do kultivačnej miestnosti.
6. Po týždni fotograficky zdokumentovať, vymeniť ½ Hoaglandov roztok za čerstvý a nechať rásť ešte týždeň v kultivačnej miestnosti.
7. Vyhodnotiť po 2 týždňoch rastu:

- Či rastliny v hydroponii rástli,
- či nedošlo ku kontaminácii,
- fotograficky zdokumentovať v čase.

Tabuľka 7 Výpočet finálnej koncentrácie 2x koncentrovaného Hoaglandovho roztoku makroprvkov.

Makroprvky	1x koncentrovaný návažok [g] objem [1 dm ³]	2x koncentrovaný návažok [g] objem [2 dm ³]	Mw [g.mol ⁻¹]	2x Hoagland koncentrovaný koncentrácia [mol.dm ⁻³]
MgSO₄ . 7 H₂O	0,3697			
KNO₃	0,4044			
CaCl₂ .2H₂O	0,4439			
NaH₂PO₄ . 2H₂O	0,2917			
Na₂HPO₄ . 12H₂O	0,0465			
FeSO₄ . 7 H₂O	0,0179			
NaNO₃	0,3399			
NH₄Cl	0,2139			
NH₄NO₃	0,1601			

Tabuľka 8 Výpočet finálnej koncentrácie 100 x koncentrovaného Hoaglandovho roztoku mikroprvkov.

Mikroprvky	1x koncentrovaný návažok [g] objem [1 dm ³]	100x koncentrovaný návažok g] objem [0,5 dm ³]	Mw [g.mol ⁻¹]	100x koncentrovaný koncentrácia [mol.dm ⁻³]
H₃BO₃	0,0085	0,425		
Na₂MoO₄ . 2 H₂O	0,00006	0,003		
MnSO₄ . 5 H₂O	0,005	0,25		
ZnSO₄ . 7 H₂O	0,00066	0,033		
CuSO₄ . 5 H₂O	0,0008	0,04		

Poznámka: Mikro-prvky sa pripravujú vo forme zásobného roztoku 100-krát koncentrovaného.

3.6.3 Využitie hydroponie na štúdium vplyvu salinity na rast a vývin rastlín

Princíp: Kapitola 1.5

Salinita je hlavným abiotickým stresom v poľnohospodárskych regiónoch na celom svete s významným vplyvom na produkciu kultúrnych plodín. Slanosť vzniká buď ako dôsledok odlesňovania a stúpajúcej hladiny slanej vody (tzv. slanosť suchých oblastí), alebo ako dôsledok zavlažovania slanou vodou (tzv. zavlažovacia salinita). Zatiaľ čo slanosť pôdy je komplexná, NaCl sa považuje za primárnu soľ prispievajúcu k salinite, pretože sa hojne vyskytuje v mnohých pôdach a má veľmi vysokú rozpustnosť. V závislosti od rastlinného druhu a typu experimentu sa môže aplikovať nízky, stredný alebo silný soľný stres. Koncentrácia NaCl sa najčastejšie aplikuje v rozsahu od $100 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$ do $300 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$, takisto v závislosti od rastlinného druhu a od trvania experimentu; a to buď počas krátkého obdobia (obvykle 7 - 10 dní) a dlhodobého obdobia (až do dospelosti rastliny).

Slanosť vytvára pre rastliny dilemu; zvýšené hladiny anorganických minerálov v prostredí vytvárajú osmotický a vodný stres, ale zároveň poskytujú lacné osmotikum na zníženie osmotického potenciálu buniek a tým zabraňujú strate vody.

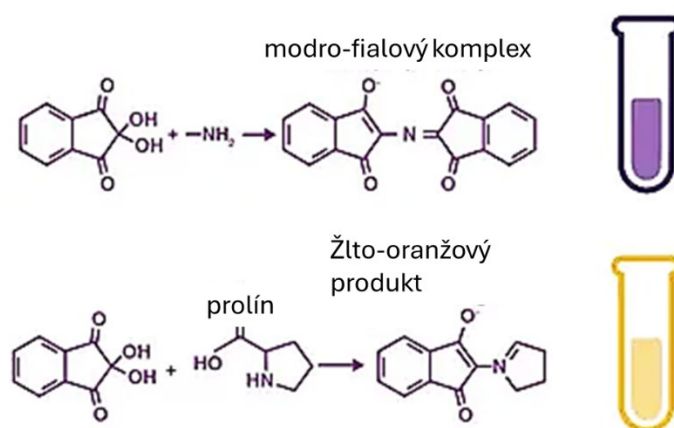
Reakciu rastlín na slanosť rozdelíme do dvoch hlavných fáz. V priebehu niekoľkých minút až dní dochádza k redukcii rastu nezávislej od iónov, dochádza k uzavretiu prieduchov a inhibícii bunkového rastu hlavne vo výhonkoch. Druhá fáza prebieha v priebehu dní alebo dokonca týždňov a týka sa hromadenia hladín cytotoxických iónov, ktoré spomaľujú metabolické procesy, spôsobujú predčasné starnutie a nakoniec bunkovú smrť. Tolerancia voči salinite je riadená množstvom fyziologických a molekulárnych mechanizmov, ako osmotická tolerancia, iónová tolerancia a pletivová tolerancia. Osmotická tolerancia nastupuje pomerne rýchlo a zahŕňa rýchly pokles vodivosti prieduchov na zachovanie vody. Využíva rýchle signalizačné mechanizmy na veľké vzdialenosti (od koreňa k výhonku). Vstup soli do koreňového systému spúšťa aktiváciu niekoľkých signálnych kaskád, ktoré generujú iónovú toleranciu a to obmedzením prítoku iónov Na^+ do koreňa a znížením translokácie iónov Na^+ do ďalších častí rastliny. Pletivová tolerancia predstavuje kompartmentáciu toxických iónov do vakuol, aby sa zabránilo škodlivým účinkom na cytoplazmatické procesy.

Prolín je jeden z najviac študovaných osmoprotektantov v rastlinách. Prolín pôsobí ako chelátor, môže chelátovať ťažké kovy v rastlinách, pričom dochádza k tvorbe netoxického komplexu kov-prolín. Taktiež pôsobí ako antioxidant, molekulárny šaperón a urýchľuje aktivitu mnohých enzýmov. Prolín znižuje škodlivé účinky mnohých abiotických stresorov a ťažké kovy. Rastliny rozpoznávajú stres prostredníctvom svojich koreňových systémov a prenášajú signály, aby došlo k produkcii ochranných komponentov. Jednou z najdôležitejších reakcií

rastlín na osmotický a oxidačný stres je biosyntéza prolínu. Zvýšená akumulácia prolínu je považovaná za odraz tolerance rastliny voči abiotického stresu.

Obsah prolínu v rastlinných pletivách môže byť stanovený viacerými metódami, medzi ktoré patrí aj kolorimetrické stanovenie. V roku 1952 Chinard publikoval prácu, v ktorej uviedol, že pri kyslom pH ninhydrín môže tvoriť červený produkt s prolínom a ornitínom, čo je možné použiť na odhad koncentrácie týchto aminokyselín v roztoku (Obrázok 3.13).

Pôvodný kolorimetrický test na báze ninhydrínu sa neskôr ešte vylepšil a stal sa štandardnou metódou na stanovenie obsahu prolínu pre mnohé laboratóriá. Tento test je jednoduchý, spoľahlivý a je kvantitatívny.



Obrázok 3.13 Ninhydrínový test je chemický test vykonávaný na zistenie prítomnosti amoniaku, primárnych/sekundárnych amínov alebo aminokyselín. Tento test zahŕňa prídanie ninhydrínového činidla do testovanej vzorky, čo vedie k vytvoreniu farebného komplexu, ktorý je zvyčajne fialový alebo modrý a často sa označuje ako „Ruhemannova fialová“. Intenzita sfarbenia je priamo úmerná koncentrácii aminokyselín prítomných vo vzorke. Ak je vo vzorke prolín (sekundárny amín), prolín reaguje s ninhydrínom za vzniku žltého sfarbenia. Pri vyšších teplotách (~100°C) sa žltá zlúčenina transformuje na purpurovočervenú (Zdroj: <https://byjus.com/chemistry/ninhydrin-test/>, upravené).

Rastlinný materiál: Rastliny tabaku virgínskeho *Nicotiana tabacum* L. po 1 týždni v hydroponii.

Pomôcky: Petriho misky, pinzeta, kadičky, odmerný valec, fľaša s GL45 uzáverom, mikropipety, pipetovacie špičky pravítko, mikroskúmavky (objem 2 ml), stojan na mikroskúpavky, spektrofotometrické kyvety, tretia miska, špachtľa.

Prístroje: Kultivačná miestnosť, váhy, magnetické miešadlo, UV-VIS spektrofotometer, centrifúga, termoblok, vortex.

Chemikálie: Sterilná destilovaná voda, NaCl, zásobné roztoky makro a mikro prvkov potrebné pre prípravu Hoaglandovho roztoku (Tabuľka 7 a Tabuľka 8), ninhydrín, 96% etanol, kyselina octová, tekutý dusík.

Postup:

1. Aplikácia soľného stresu v hydroponii:

- a. Zo zásobných roztokov makro a mikro prvkov (úloha 3.6.2) pripraviť $\frac{1}{2}$ Hoaglandov roztok, objem bude určený na základe počtu rastlín v hydroponii tak, aby polovica tohto objemu obsahovala NaCl o koncentrácii $250 \text{ mmol} \cdot \text{dm}^{-3}$.
- b. Rastliny v hydroponii rozdeliť na 2 skupiny s rovnakým počtom. Jedna skupina rastlín bude rásť bez stresu a druhá skupina rastlín bude rásť v podmienkach soľného stresu.
- c. Opatrne pinzetou chytiť plavák, v ktorom sú umiestnené rastliny a vyliatť z kultivačnej nádoby $\frac{1}{2}$ Hoaglandový roztok s/bez NaCl a nahradiť ho čerstvým.
- d. Rastliny nechať rásť 1 týždeň v kultivačnej miestnosti.
- e. Fotograficky zdokumentovať.

2. Analýza stresovaných a nestresovaných (kontrolných) rastlín:

- a. Opatrne odobrať rastliny s plavákom, ktoré rástli v hydroponii 1 týždeň v/bez prítomnosti NaCl.
- b. Odstrániť nožnicami plavák a fotograficky zdokumentovať.
 - i. Zmerať dĺžku koreňov u stresovaných a nestresovaných rastlín a fotograficky zdokumentovať veľkosť rastlín.
- c. Spektrofotometrické stanovenie obsahu prolínu:
 - i. Pripraviť reakčnú zmes obsahujúcu: 1% (w/v) ninhydrín, 20% (v/v) etanol a 60% (v/v) kyselinu octovú. Objem bude určený na cvičení v závislosti od počtu vzoriek.
 - ii. Odobrať 200 mg rastlinného materiálu (listy), a vložiť do tretej misky s tekutým dusíkom.
 - iii. Homogenizovať pletivo v tekutom dusíku (Obrázok 3.14).
 - iv. Zmes preniesť do mikroskúmavky a následne okamžite pridať 1,5 ml 96% etanolu.
 - v. Dobre premiešať pomocou vortexu.
 - vi. Zmes centrifugovať 10 min. pri 14000 rpm, pri laboratórnej teplote.
 - vii. Odobrať supernatant (500 μl) do novej mikroskúmavky.

- viii. Pridať 1000 μ l reakčnej zmesi.
- ix. Pripraviť blank: Do prázdnej mikroskúmavky napipetovať 500 μ l 96% etanolu a 1000 μ l reakčnej zmesi.
- x. Inkubovať vzorky a blank v termobloku pri teplote 95°C 20 minút.
- xi. Po inkubácii vzorky ochladiť na ľade a následne centrifugovať 1 minútu pri laboratórnej teplote a pri 14 000 rpm.
- xii. Preniesť mikropipetou roztok z mikroskúmavky do 1 ml kyvety a spektrofotometricky merať absorbanciu pri 520 nm oproti blanku.
- xiii. Vypočítať obsah prolínu v 200 mg pletiva na základe kalibračnej krivky. Obsah prolínu vyjadriť v mg pripadajúcich na gram pletiva [mg/g].
- xiv. Porovnať obsah prolínu v stresovaných vzorkách v porovnaní s nestresovanými vzorkami a vyjadriť formou grafu.

8. Vyhodnotiť:

- a. Či bol rozdiel medzi rastlinami, ktoré rástli v/bez prítomnosti NaCl vzhľadom na:
 - i. Celkový vzhľad (fotograficky) a dĺžku koreňov (formou grafu).
 - ii. na celkový obsah prolínu (formou grafu).
- b. Či nedošlo ku kontaminácii počas kultivácie v hydroponii, ak áno uviesť prečo.



Obrázok 3.14 Ukážka prípravy rastlinného materiálu na analýzu (Zdroj: autori).

Pomôcky: Kadičky, odmerný valec, fľaša s GL45 uzáverom, mikropipety, pipetovacie špičky, špáradlá, pinzeta, Erlenmayerove banky s uzáverom.

Prístroje: BSC, váhy, pH meter, magnetické miešadlo, autokláv, termostat, spektrofotometer, kyvety, sterilné centrifugačné tuby o objeme 50 ml, centrifúga.

Chemikálie: Destilovaná voda, MS médium s vitamínmi, sacharóza, agar, peptón, kvasničný autolyzát, NaCl, sterilný zásobný roztok antibiotika rifampicínu (25 mg.cm^{-3}) a kanamycínu (100 mg.cm^{-3}), sterilné rastové regulátory o zásobnej koncentrácii 10 mg.cm^{-3} NAA a 10 mg.cm^{-3} BAP.

Postup:

1. Pripraviť kvapalné Luria a Bertani (LB) médium [1% (w/v) peptón, 0,5% (w/v) kvasničný autolyzát, 1,5% (w/v) NaCl, pH 6.9; 25 mg.dm^{-3} rifampicín, a 100 mg.dm^{-3} kanamycín] v objeme určenom na cvičení:
 - a. Vypočítať návažky a pripraviť médium objemu určeného na laboratórnom cvičení, postupovať podľa kapitoly 2.1.2 a kapitoly 4.3.
 - b. Médium rozlíať do Erlenmayerových baniek (20 ml/banku), uzavrieť a sterilizovať autoklávaním.
 - c. Vypočítať si koľko (μl) antibiotík je potrebné pridať do média určeného objemu, aby sa získala výsledná koncentrácia rifampicínu (25 mg.dm^{-3}) a kanamycínu (100 mg.dm^{-3}), postupovať pri výpočte podľa kapitoly 2.1.7, kapitoly 2.1.8 a kapitoly 4.3.
 - d. Do vychladnutého LB média v BSC pridať antibiotiká príslušného objemu.
2. Pripraviť kvapalné kalus indukčné médium [MS médium s vitamínmi (MS), 3% (w/v) sacharóza, 0,8% (w/v), pH 5.7; 1 mg.dm^{-3} NAA, $0,2 \text{ mg.dm}^{-3}$ BAP]:
 - a. Vypočítať návažky a pripraviť regeneračné médium objemu určeného na laboratórnom cvičení, postupovať podľa kapitoly 2.1.2 a kapitoly 4.3.
 - a. Vypočítať si koľko (μl) rastových regulátorov je potrebné pridať do média určeného objemu, aby sa získala výsledná koncentrácia 1 mg.dm^{-3} NAA a $0,2 \text{ mg.dm}^{-3}$ BAP, postupovať pri výpočte podľa kapitoly 4.3.
 - b. Do vychladnutého média v BSC pridať potrebný objem rastových regulátorov.
3. Príprava nočnej kultúry agrobaktéria:
 - a. Do pripraveného kvapalného LB média s antibiotikami v BSC pridať mikropipetou $20 \mu\text{l}$ kvapalnej bakteriálnej kultúry (*A. tumefaciens* nesúci binárny vektor).
 - b. Kultivovať na trepačke pri 200 rpm v tme pri teplote 27°C . (Poznámka: vyššia teplota sa neodporúča, nakoľko pri vyššej teplote sa *Agrobacterium* dostáva do stresu a zbavuje sa binárneho vektora).

- c. Na druhý deň vyrastenú kultúru buniek centrifugovať v sterilnej centrifugačnej tube (objem 50 ml) 10 min pri 4000 rpm a teplote 4°C.
- d. Supernatant zliať a bunky následne rozuspendovať v 20 ml tekutého kalus indukčného média.

4. Príprava bakteriálneho inokula:

- a. Rozsuspendovanú bunkovú kultúru nariediť na $OD_{620} = 0,6$ s kvapalným kalus indukčným médiom (spektrofotometricky zistením absorbancie pri 620 nm), pričom riedenie urobiť na celkový objem bakteriálneho inokula 100 ml.

3.7.2 Transformácia listových segmentov tabaku virgínskeho pomocou *Agrobacterium tumefaciens*

Princíp: Kapitola 1.6

Rastlinný materiál: 6 týždňov staré *in vitro* listy tabaku virgínskeho (*Nicotiana tabacum* L.).

Bakteriálny kmeň a plazmid: Bakteriálne inokulum (Kapitola 3.7.1).

Pomôcky: Skalpel, pinzeta, sterilné Petriho misky, mikropipety, sterilné pipetovacie špičky kadičky, odmerný valec, fľaša s GL45 uzáverom, sterilný filtračný papier.

Prístroje: BSC, rastová komora, váhy, magnetické miešadlo, autokláv.

Chemikálie: MS médium s vitamínmi, sacharóza, agar, destilovaná voda, rastové regulátory o zásobnej koncentrácii 10 mg.cm^{-3} NAA a 10 mg.cm^{-3} BAP, sterilný zásobný roztok antibiotika kanamycínu (100 mg.cm^{-3}) a cefotaxínu (100 mg.cm^{-3}). (Poznámka: kanamycín v médiu má za úlohu vytvoriť selekčný tlak, cefotaxín v médiu ma za úlohu zabrániť prerastaniu agrobaktéria počas regenerácie transformovaných buniek).

Postup:

1. Prípraviť pevné kalus indukčné médium [MS médium s vitamínmi (MS), 3% (w/v) sacharóza, 0,8% (w/v) agar, pH 5.7; 1 mg.dm^{-3} NAA, $0,2 \text{ mg.dm}^{-3}$ BAP; 100 mg.dm^{-3} kanamycín, 500 mg.dm^{-3} cefotaxím]:
 - a. Vypočítať návažky a pripraviť regeneračné médium objemu určeného na laboratórnom cvičení, postupovať podľa kapitoly 2.1.3 a kapitoly 4.3.
 - b. Vypočítať si koľko (μl) rastových regulátorov je potrebné pridať do média určeného objemu, aby sa získala výsledná koncentrácia 1 mg.dm^{-3} NAA a $0,2 \text{ mg.dm}^{-3}$ BAP, postupovať pri výpočte podľa kapitoly 4.3.

- c. Vypočítať si koľko (μl) antibiotík je potrebné pridať do média určeného objemu, aby sa získala výsledná koncentrácia kanamycínu ($100 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$) a cefotaxímu ($500 \text{ mg}\cdot\text{dm}^{-3}$), postupovať pri výpočte podľa kapitoly 4.3.
 - d. Médium, ak je stuhnuté, rozvariť v mikrovlnnej rúre a do chladného média v BSC pridať potrebný objem rastových regulátorov a antibiotík.
 - e. Rozliať do sterilných Petriho misiek a po vychladnutí uzavrieť.
2. Transformácia rastlinných buniek:
- a. V BSC sterilnou pinzetou odobrať list a na sterilnej Petriho miske narezať na segmenty (pozri úlohu 3.2.2).
 - b. Podliať listové segmenty [umiestnené adaxiálnou stranou dole, (Obrázok 3.5) bakteriálnym inokulom tak, aby plávali, ale sa celé nezmáčali.
 - c. Uzavrieť do alobalu, preniesť do rastovej komory a ko-kultivovať 2-3 dni.
 - d. Po ko-kultivácii Petriho misky v BSC otvoriť, vybrať listové segmenty a krátko osušiť ich prenesením (adaxiálnou stranou dole) na sterilný filtračný papier.
 - e. Po osušení preniesť listové segmenty na Petriho misky s kalus-indukčným médiom, ale umiestniť už adaxiálnou stranou hore.
 - f. Kultivovať v rastovej komore 2-3 týždne.
3. Vyhodnotiť v čase (po 1., 2. a 3. týždni):
- a. Fotograficky zdokumentovať v čase.
 - b. vyhodnotiť či nedošlo ku kontaminácii,
 - c. či bola koncentrácia cefotaxínu dostatočná na zabránenie prerastania agrobaktéria,
 - d. či došlo k tvorbe potenciálne transgénnych kalusov.

3.7.3 Histochemické stanovenie aktivity beta-glukuronidázového génu

Princíp: Kapitola 1.6

Histochemické stanovenie aktivity GUS (β -glukuronidázy) je široko používaná technika v rastlinných biotechnológiách za účelom:

- i. Dôkazu úspešnej transformačnej udalosti,
- ii. štúdia aktivity študovaného promotora v rastlinách nielen počas ich rastu a vývinu, ale aj v podmienkach environmentálneho stresu.

Gén kódujúci enzým beta glukuronidázu bol izolovaný z *E. coli*. *Gus* gén sa používa ako reportérový gén v rastlinách, pretože sa prirodzene v nich nevyskytuje, čo uľahčuje detekciu jeho aktivity. Najčastejšie používaným substrátom na detekciu aktivity GUS je 5-bróm-4-

chlór-3-indoly- β -D-glukuronid (X-Gluc). X-Gluc je bezfarebný a rozpustný vo vode. Enzým β -glukuronidáza hydrolyzuje substrát X-Gluc za vzniku kyseliny glukurónovej a 5-bróm-4-chlór-3-indolylu. Ten podlieha oxidačnej dimerizácii za vzniku nerozpustného modrého farbiva, 5,5'-dibróm-4,4'-dichlór-indiga. Modrá zrazenina sa tvorí priamo v mieste aktivity GUS, čo umožňuje vizuálne detegovať miesto expresie *gus* génu (Obrázok 3.16). Táto zmena farby je zvyčajne viditeľná voľným okom v závislosti od toho, ako je expresia beta-glukuronidázy silná. Enzymatická reakcia prebieha v tlmivom fosfátovom roztoku, pričom pre lepšiu permeabilizáciu do buniek sa môže ešte do reakčnej zmesi pridať detergent Triton X-100. Reakcia prebieha pri teplote 37°C.

Rastlinný materiál: Potenciálne transgénne kalusové pletivo tabaku virgínskeho (*Nicotiana tabacum* L.) (úloha 3.7.2).

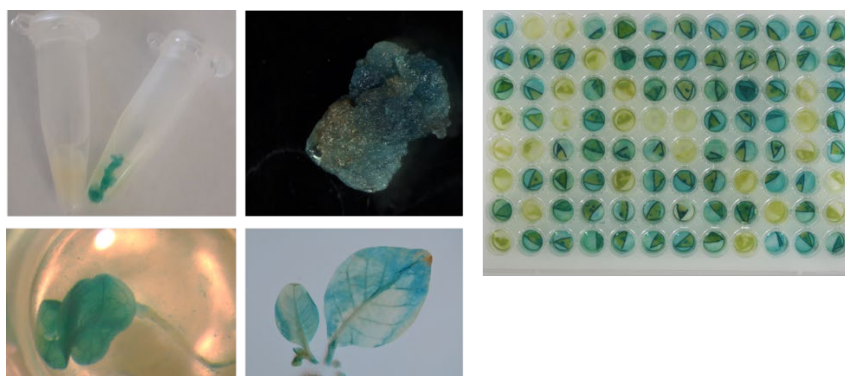
Pomôcky: Skalpel, pinzeta, mikropipeta, sterilné pipetovacie špičky, stojan na mikroskúmavky, mikroskúmavky.

Prístroje: BSC, termostat.

Chemikálie: Reakčný roztok [50 mmol.dm⁻³ fosfátový tlmivý roztok (pH 7.0) s obsahom 2 mmol.dm⁻³ 5-bromo-4-chloro-3-indoly- β -glukuronidu (X-Gluc, Duchefa)], 96% etanol.

Postup:

1. Pripraviť 70% (v/v) etanol objemu určeného na cvičení.
2. Čerstvo narezané kalusové pletivo inkubovať v 200 μ l reakčného roztoku v termostate 24 hodín pri teplote 37°C.
3. Na druhý deň reakčný roztok odstrániť a nahradiť 70% roztokom etanolu.
4. GUS aktivitu detegovať ako modré sfarbenie pletiva v oblasti enzýmovej aktivity.
5. Fotograficky zdokumentovať.

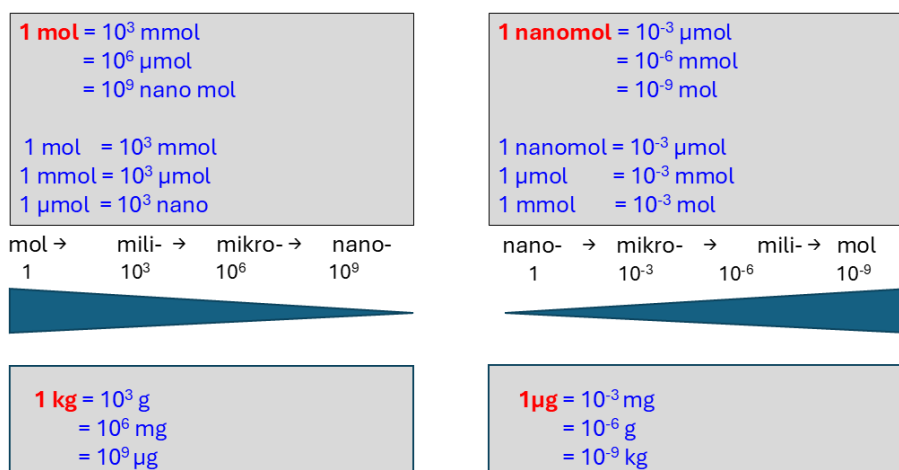


Obrázok 3.16 Ukážka histochemického stanovenia GUS aktivity v rastlinnom pletive. Modré sfarbenie pletiva indikuje transgénnu udalosť, zatiaľ čo bledé pletivo sa považuje za netransgénne (Zdroj: autori).

4 Výpočty používané v *in vitro* laboratóriu

4.1 Premena jednotiek

Medzinárodná sústava SI definuje 7 základných veličín a im zodpovedajúcich SI jednotiek (hmotnosť, látkové množstvo, termodynamická teplota Kelvin, čas, dĺžka, svietivosť, elektrický prúd). Zavádza tiež jednotky odvodené a jednotky násobné, dielčie a vedľajšie. Značka jednotky definovaná v sústave SI je záväzná. Symbol však jednoznačne daný nie je a môže sa odlišovať. Odvodené veličiny vznikli kombináciou základných veličín (napr. hustota, koncentrácia, tlak...). Odvodené veličiny umožňujú priame vyjadrenie konkrétnej vlastnosti. Hodnota danej veličiny je tvorená číslom a jednotkou, pričom rovnakú hodnotu je možné vyjadriť viacerými spôsobmi. Napríklad, hmotnosť $12,25 \text{ mg} = 0,01225 \text{ g} = 0,00001225 \text{ kg}$. Pre čísla príliš veľké alebo malé sa používa tvar s dekadickým exponentom (Obrázok 4.1, Tabuľka 9). Napríklad $0,01225 \text{ g} = 0,00001225 \text{ kg} = 1,225 \cdot 10^{-5} \text{ kg}$



Obrázok 4.1 Ukážka premeny jednotiek.

Tabuľka 9 Najpoužívanejšie násobky a diely.

Predpona	Značka	Násobok (mocnina)	Násobok (číselne)
Tera	T	10^{12}	1 000 000 000 000
Giga	G	10^9	1 000 000 000
Mega	M	10^6	1 000 000
Kilo	K	10^3	1 000
Mili	M	10^{-3}	0,001
Mikro	μ	10^{-6}	0,000 001
Nano	N	10^{-9}	0,000 000 001
Piko	P	10^{-12}	0,000 000 000 001

Pri premieňaní zlomkových hodnôt sa postupuje nasledovne:

Príklad: Treba premeniť $5 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3}$ na $\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$.

- Uvedomiť si koľko má 1 gram miligramov:

$$1000 \text{ mg} = 1 \text{ g} \text{ alebo } 1 \text{ mg} = 0,001 \text{ g} = 10^{-3} \text{ g}$$

- Uvedomiť si koľko cm^3 je 1 m^3 :

$$1 \text{ m}^3 = 10^6 \text{ cm}^3$$

Potom:

$$5 \text{ mg} \cdot \text{m}^{-3} = 5 \cdot (10^{-3}/10^6) = \underline{5 \cdot 10^{-9} \text{ g} \cdot \text{cm}^{-3}}$$

$$\frac{\frac{10^{-3}}{1}}{10^6} = 10^{-9} \qquad \frac{1}{10^6} = 10^{-6}$$

Príklad 1. Preved'te $0,252 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ na základné jednotky $\text{mol} \cdot \text{m}^{-3}$.

$$1 \text{ mmol} = 10^{-3} \text{ mol} \text{ a teda } 0,252 \text{ mmol} = 0,252 \cdot 10^{-3} \text{ mol}$$

$$1 \text{ l} = 10^{-3} \text{ m}^3$$

$$0,252 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1} = (0,252 \text{ mmol}) / (10^{-3} \text{ m}^3) = (0,252 \cdot 10^{-3} \text{ mol}) / (10^{-3} \text{ m}^3) = \underline{0,252 \text{ mol} / \text{m}^3}$$

$$\text{alebo } \underline{0,252 \text{ mol} \cdot \text{m}^{-3}}$$

$$C = \frac{0,252 \cdot 10^{-3}}{1 \cdot 10^{-3}}$$

Príklad 2. Preved'te $21,1 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3}$ na $\text{kg} \cdot \text{m}^{-3}$.

$$21,1 \mu\text{g} \cdot \text{cm}^{-3} = 21,1 \cdot 10^{-9} \text{ kg} / 10^{-6} \text{ m}^3 = \underline{21,1 \cdot 10^{-3} \text{ kg} \cdot \text{m}^{-3}}$$

$\mu\text{g} \rightarrow \text{mg} \rightarrow \text{g} \rightarrow \text{kg}$

$$1 \mu\text{g} = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mg} = 1 \cdot 10^{-6} \text{ g} = 1 \cdot 10^{-9} \text{ kg} \qquad (1 \text{ kg} = 10^3 \text{ g} = 10^6 \text{ mg} = 10^9 \mu\text{g})$$

$$21,1 \mu\text{g} = 21,1 \cdot 10^{-3} \text{ mg} = 21,1 \cdot 10^{-6} \text{ g} = 21,1 \cdot 10^{-9} \text{ kg}$$

$$\frac{10^{-9}}{10^{-6}} = 10^{-9 - (-6)} = 10^{(-9)+6} = 10^{-3}$$

$$1 \text{ cm} = 0,01 \text{ m} \quad (1 \text{ m} = 100 \text{ cm})$$

$$1 \text{ cm}^3 = 0,01 \cdot 0,01 \cdot 0,01 = 1 \cdot 10^{-6} \text{ m}^3$$

$$1 \text{ cm}^3 = 10^{-6} \text{ m}^3 \qquad (1 \text{ m}^3 = 100 \cdot 100 \cdot 100 = 1000000 = 10^6 \text{ cm}^3)$$

4.2 Koncentrácia roztokov

Percentuálna koncentrácia vyjadruje počet dielov látky rozpustnej v 100 dieloch roztoku. Môže byť vyjadrená pomocou:

- **Hmotnostných percent (w/w)**, ktoré sú definované ako množstvo látky [g] v 100 g výsledného roztoku. Napríklad: Treba pripraviť 10% (w/w) KCl, to znamená, že sa rozpustí 10 g v 100 g výsledného roztoku [$10 \text{ g}/100 \text{ g} = 0,1$ a $0,1 \cdot 100 = 10\%$]
- **Objemových percent (v/v)**, ktoré sú definované ako množstvo mililitrov látky na 100 ml výsledného roztoku. Napríklad: Treba pripraviť 70% (v/v) roztok izopropanolu, to znamená, že 70 ml izopropanolu sa doplní s rozpúšťadlom do celkového objemu 100 ml [$70 \text{ ml}/100 \text{ ml} = 0,7$ a $0,7 \cdot 100 = 70\%$].
- **Hmotnostno-objemových percent (w/v)**, ktoré sú definované ako množstvo gramov látky na 100 ml výsledného roztoku. Napríklad: Treba pripraviť 10% (w/v) KCl, to znamená, že 10 g KCl sa rozpustí v menšom objeme rozpúšťadla a po rozpustení doplní do objemu 100 ml [$10 \text{ g}/100 \text{ ml} = 0,1$ a $0,1 \cdot 100 = 10\%$]

Koncentráciu látok je možné vyjadriť aj pomocou:

- **Hmotnostnej koncentrácie** (napr. $\text{mg}\cdot\text{cm}^{-3}$) a teda $\mathbf{c} = \frac{\mathbf{m}}{\mathbf{V}}$

(m – hmotnosť, V – objem), potom $m = c \cdot V$,

- **mólovej koncentrácie** (napr. $\text{mol}\cdot\text{dm}^{-3}$) $\mathbf{c} = \frac{\mathbf{n}}{\mathbf{V}}$ a teda $\mathbf{c} = \frac{\mathbf{m}}{\mathbf{M}_w \cdot \mathbf{V}}$

(M_w - molekulová hmotnosť chemickej látky, V – objem roztoku), potom $m = c \cdot M_w \cdot V$.

Poznámka: V *in vitro* laboratóriu sa zvyčajne používa hmotnostná koncentrácia.

4.3 Príprava regeneračného média

4.3.1 Výpočet návažkov jednotlivých komponentov pevného regeneračného média

Príklad 3. Treba pripraviť 200 ml pevného regeneračného média: MS médium s vitamínmi, 2% (w/v) sacharóza a 0,8% (w/v) agar; pH 5.7.

MS médium s vitamínmi sa dodáva v práškovej forme a výrobca na obale vždy uvádza koncentráciu (v tomto prípade koncentráciu $4,4 \text{ g}\cdot\text{dm}^{-3}$). To znamená, že na prípravu 1 litra

média je potrebné navážiť 4,4 g. Na základe toho sa prepočíta koľko gramov bude potrebné navážiť pre prípravu 200 ml média:

200 ml média: 0,88 g MS média s vitamínmi [$4,4 \text{ g}/1000 \text{ ml}=0,0044 \text{ g/ml}$
a teda na 200 ml: $0,00844*200 =0,88$]

2% sacharóza: 4 g sacharózy [$4 \text{ g}/200 \text{ ml}=0,02$ a teda $0,02*100=2\%$]

0,8% agar: 1,6 g agaru [$1,6 \text{ g}/200 \text{ ml} = 0,008$ a teda $0,008*100=0,8\%$]

Príklad 4. Treba pripraviť 200 ml pevného regeneračného média zloženia: ½ MS médium s vitamínmi, 2% sacharóza a 0,8%, pH 5.7

Poznámka: Niekedy sa na prípravu média nepoužíva MS médium s vitamínmi v koncentrácii odporúčanej výrobcom ($4,4 \text{ g.dm}^{-3}$), ale používa sa v polovičnej koncentrácii, čo sa označuje ako ½ MS. To znamená, že na prípravu 1 litra média je pri ½ MS potrebné navážiť 2,2 g. Na základe toho sa prepočíta koľko gramov bude potrebné navážiť pre prípravu 200 ml média:

200 ml média: 0,44 g MS média s vitamínmi [$(2,2/1000)*200=0,44$]

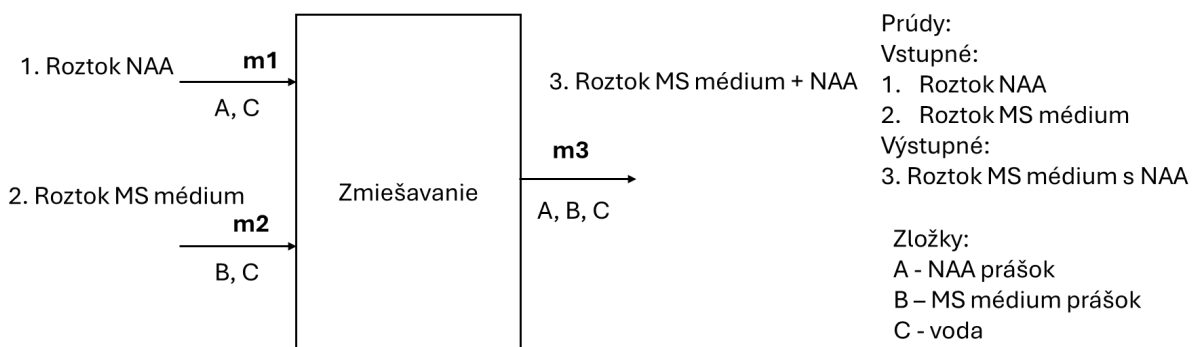
2% sacharóza: 4 g sacharózy [$4 \text{ g}/200 \text{ ml}=0,02$ a teda $0,02*100=2\%$]

0,8% agar: 1,6 g agaru [$1,6 \text{ g}/200 \text{ ml} = 0,008$ a teda $0,008*100=0,8\%$]

4.3.2 Výpočet objemu, ktorý je potrebný zo zásobného roztoku rastového regulátora pridať do regeneračného média, aby sa dosiahla jeho požadovaná koncentrácia v médiu

Príklad 5. Regeneračné médium má obsahovať rastový regulátor NAA o koncentrácii 100 mg.dm^{-3} . K dispozícii je zásobný roztok NAA o koncentrácii $0,1 \text{ g.cm}^{-3}$. Treba vypočítať aký objem zo zásobného roztoku NAA treba pridať do regeneračného média o objeme 200 ml.

Bilančná schéma



Zložka	Prúd 1	Prúd 2	Prúd 3
A (NAA práškové)	m_{1A}	-	m_{3A} $m_{1A} = m_{3A}$ $c_{1A} \cdot V_1 = c_{3A} \cdot V_3$
B (MS médium práškové)	-	m_{2B}	m_{3B} $m_{2B} = m_{3B}$
C (voda)	m_{1C}	m_{2C}	m_{3C} $m_{3C} = m_{1C} + m_{2C}$
Spolu	m_1 $m_1 = m_{1A} + m_{1C}$	m_2 $m_2 = m_{2B} + m_{2C}$	m_3 $m_3 = m_1 + m_2$ $m_3 = m_{3A} + m_{3B} + m_{3C}$

Pri materiálovej bilancii bez chemickej reakcie platí zákon zachovania hmotnosti:

$$m_1 + m_2 = m_3$$

$$\text{Prúd 1 (roztok NAA): } m_1 = m_{1A} + m_{1C}$$

$$\text{Prúd 2 (roztok MS): } m_2 = m_{2B} + m_{2C}$$

$$\text{Prúd 3 (roztok MS + NAA): } m_3 = m_{3A} + m_{3B} + m_{3C}$$

Pre práškové NAA (zložka A): $m_{1A} + m_{2A} = m_{3A}$ (prúd 2 neobsahuje zložku A teda NAA a preto $m_{2A}=0$)

$$m_{1A} = m_{3A} \quad \text{a teda} \quad c_{1A} \cdot V_1 = c_{3A} \cdot V_3 \quad (c = m/V, \text{ hmotnostná koncentrácia})$$

Výpočet potrebného objemu: $V_1 = \frac{c_3 \cdot V_3}{c_1}$

V_1 – objem, ktorý treba pridať do roztok MS média zo zásobnej koncentrácie

c_1 – koncentrácia zásobného roztoku NAA

c_3 – koncentrácia v regeneračnom médiu

V_3 - objem výsledného roztoku MS média aj s NAA

Poznámka: Koncentrácia rastových látok je v príklade udaná vo forme hmotnostnej koncentrácie.

Riešenie príkladu:

$$c_1 = 0,1 \text{ g.cm}^{-3} = 100 \text{ mg.cm}^{-3}$$

$$c_3 = 100 \text{ mg.dm}^{-3} = 0,1 \text{ mg.cm}^{-3}$$

$$V_3 = 200 \text{ ml} = 200 \text{ cm}^3$$

$$V_1 = ?$$

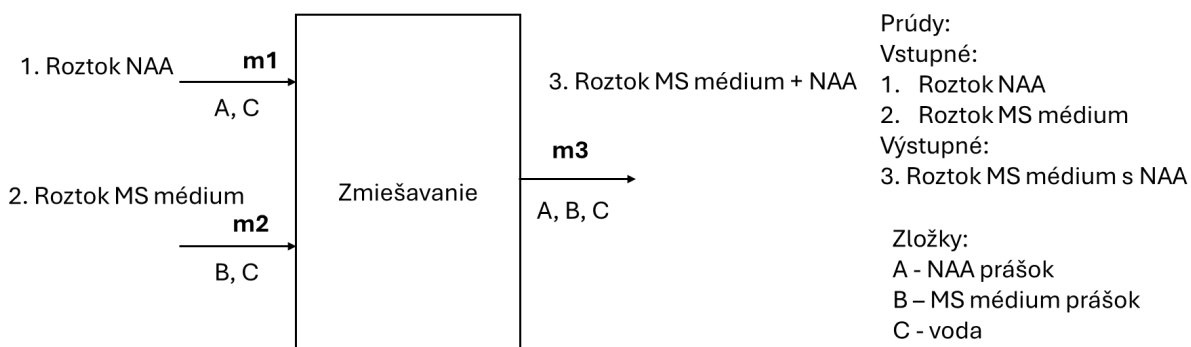
V prvom kroku treba zjednotiť jednotky (premeniť dm^3 na cm^3 alebo opačne, podobne mg na gramy alebo opačne) a dosadiť do vzorca: $V_1 = (c_3 * V_3) / c_1 = (0,1 * 200) / 100 = 20 / 100 = 0,2 \text{ cm}^3 = 0,2 \text{ ml} = 200 \text{ } \mu\text{l}$

Odpoveď: Do regeneračného média treba pridať 200 μl zo zásobného roztoku NAA.

4.3.3 Výpočet zásobnej koncentrácie rastového regulátora, aby sa zo zásobného roztoku rastového regulátora do regeneračného média pridal presne určený objem, za účelom dosiahnutia jeho požadovanej koncentrácie v médiu.

Príklad 6. Regeneračné médium má obsahovať rastový regulátor NAA o koncentrácii $50 \text{ mg} \cdot \text{dm}^{-3}$. Treba vypočítať, akú zásobnú koncentráciu NAA je potrebné pripraviť, aby sa do regeneračného média o objeme 200 ml pridalo 50 μl zo zásobného roztoku.

Bilančná schéma



Zložka	Prúd 1	Prúd 2	Prúd 3
A (NAA práškové)	m_{1A}	-	m_{3A} $m_{1A} = m_{3A}$ $c_{1A} * V_1 = c_{3A} * V_3$
B (MS médium práškové)	-	m_{2B}	m_{3B} $m_{2B} = m_{3B}$
C (voda)	m_{1C}	m_{2C}	m_{3C} $m_{3C} = m_{1C} + m_{2C}$
spolu	m_1 $m_1 = m_{1A} + m_{1C}$	m_2 $m_2 = m_{2B} + m_{2C}$	m_3 $m_3 = m_1 + m_2$ $m_3 = m_{3A} + m_{3B} + m_{3C}$

Výpočet potrebnej koncentrácie: $c_1 = \frac{c_3 \cdot V_3}{V_1}$

c_1 – koncentrácia zásobného roztoku NAA, ktorý treba pripraviť

V_1 – objem, ktorý treba pridať do roztok MS média zo zásobnej koncentrácie

c_3 – koncentrácia v regeneračnom médiu

V_3 - objem roztoku MS média s NAA

Poznámka: Koncentrácia rastových látok je v príklade udaná vo forme hmotnostnej koncentrácie

Riešenie príkladu:

$$c_3 = 50 \text{ mg.dm}^{-3} = 0,05 \text{ mg.cm}^{-3}$$

$$V_3 = 200 \text{ ml} = 200 \text{ cm}^3$$

$$V_1 = 50 \text{ } \mu\text{l} = 0,05 \text{ ml} = 0,05 \text{ cm}^3$$

$$c_1 = ?$$

V prvom kroku treba zjednotiť jednotky (premeniť dm^3 na cm^3 alebo opačne, podobne mg na gramy alebo opačne)

Použiť na výpočet vzorec: $c_1 \cdot V_1 = c_3 \cdot V_3$ $c_1 = (c_3 \cdot V_3) / V_1$

a dosadiť do vzorca: $c_1 = (c_3 \cdot V_3) / V_1 = (0,05 \cdot 200) / 0,05 = 200 \text{ mg.cm}^{-3}$

Odpoveď: Zásobný roztok NAA má byť pripravený o koncentrácii 200 mg.cm^{-3} .

4.3.4 Riedenie regeneračného média

Niekedy je potrebné pripraviť zásobný roztok (napríklad Hoaglandov roztok), ktorého zásobná koncentrácia je vyjadrená tým, že je napríklad 2-krát koncentrovanej. Potom sa pracovný roztok pripraví nasledovne: zmieša sa 1 diel zásobného roztoku s 1 dielom riedidla (vody). Podmienkou sú rovnaké objemové jednotky.

Príklad 7. Vypočítajte koľko ml zásobného Hoaglandovho roztoku mikroelementov treba použiť na prípravu 200 ml roztoku, ak zásobný roztok mikroelementov je 50-krát koncentrovanej.

Riešenie: 50-krát koncentrovanej znamená, že na 1 diel zásobného roztoku pripadá 49 dielov riedidla (vody).

Výpočet pre 200 ml roztoku: $200 : 50 = 4 \text{ ml}$

Riedidlo: $200 - 4 = 196 \text{ ml}$

Odpoveď: Na prípravu 200 ml roztoku bude potrebné zmiešať 4 ml zásobného roztoku a 196 ml vody.

4.4 Výpočet regeneračnej účinnosti

Pri výpočte regeneračnej účinnosti (RU) v percentách sa vychádza z celkového počtu explantátov, ktoré sa použili v experimente a z počtu explantátov, ktoré reagovali na zloženie regeneračného média tvorbou kalusov alebo výhonov.

$$RU = \frac{\text{počet explantátov tvoriacich kalus/výhon}}{\text{celkový počet explantátov}} * 100\%$$

Ak sa stane, že počas regenerácie časť explantátov skontaminuje, potom sa tieto explantáty do výpočtu nezarátavajú.

Príklad 8. *Vypočítajte regeneračnú účinnosť v %, ak sa v experimente použilo 150 explantátov, pričom len 40 explantátov tvorilo aspoň 1 kalus.*

Výpočet: $(40/150) * 100 = 26,7\%$

Odpoveď: Regeneračná účinnosť je 26,7%.

Príklad 9. *Vypočítajte regeneračnú účinnosť v %, ak sa v experimente použilo 150 explantátov, z toho 50 explantátov po týždni skontaminovalo, pričom len 40 explantátov tvorilo aspoň 1 kalus.*

Riešenie: Treba si uvedomiť, že časť explantátov skontaminovala a tak sa musí tento počet odčítať od celkového počtu použitých explantátov: $150 - 50 = 100$

$(40/100) * 100 = 40,0\%$

Odpoveď: Regeneračná účinnosť je 40,0%.

5 Spracovanie a vyhodnotenie výsledkov

Získané výsledky sa vyhodnocujú buď kvalitatívne formou fotografickej dokumentácie experimentu v čase a/alebo kvantitatívne formou grafov alebo tabuliek. Nie je možné však uvádzať tie isté výsledky vo forme tabuľky a aj vo forme grafu, nakoľko by sa jednalo o duplicitu výsledkov. Obrázky, tabuľky a grafy sa umiestňujú až za textom, kde sa prvýkrát uvádzajú, pričom je potrebné sa na ne v texte odvolávať. Nie je možné použiť obrázky, tabuľky

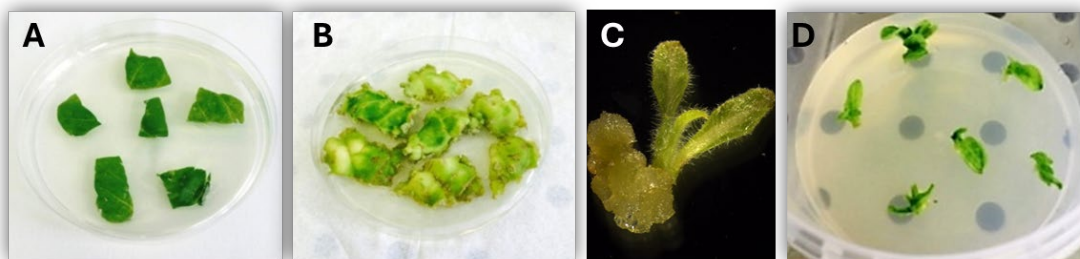
alebo grafy a v samotnom texte ich neuvádzať. V prípade, že by obrázky, tabuľky alebo grafy narúšali kontinuitu textu a zbytočne zväčšovali plochu protokolu, je možné ich umiestniť až na koniec celého textu. Legenda v obrázkoch, tabuľkách a grafoch musí byť dostatočne rozpísaná, aby boli samo vysvetliteľné pre čitateľa. Veľkosť obrázkov a grafov má byť primeraná, aby boli dobre čitateľné, ale zároveň nezaberali príliš veľkú plochu.

5.1 Kvalitatívne vyhodnotenie

Kvalitatívne vyhodnotenie zahŕňa fotografické zdokumentovanie experimentu na jeho začiatku a potom po určitom časovom období napríklad po jednom týždni, po dvoch alebo troch týždňoch atď., v závislosti od typu experimentu. Fotografickým zdokumentovaním je možné sledovať, či pletivo reaguje pozitívne alebo negatívne na regeneračné podmienky a po akom časovom období dochádza napríklad k tvorbe kalusov alebo výhonov. Pri takomto type dokumentovania sa štandardne využíva fotografický aparát a v prípade, že je potrebné urobiť detailnejší záber, je možné použiť laboratórnu binokulárnu lupu, resp. laboratórny mikroskop. Obrázok môže zahŕňať buď len jednu fotografiu (Obrázok 5.1), avšak často sa používa aj tzv. zrkadlo (Obrázok 5.2). Zrkadlo predstavuje súbor fotografií, pričom každá fotografia v ňom musí byť označená buď veľkým alebo malým písmenom (napr. A, B... alebo a, b...). Pre lepšiu orientáciu v legende obrázka sa tieto písmená označujú tučným písmom. V texte protokolu sa potom treba odvolávať už na konkrétnu fotografiu v obrázku (napr. Obrázok5A alebo Obrázok 5B).



Obrázok 5.1 Rastlina tabaku (*Nicotiana tabacum* L.) po týždni v hydroponii (Zdroj: autori).



Obrázok 5.2 *In vitro* regenerácia tabaku (*Nicotiana tabacum* L.). (A) Listové explantáty použité v experimente. (B) Tvorba kalusov po 3 týždňoch regenerácie na médiu podporujúceho tvorbu kalusov. (C) Tvorba výhonu. (D) Vytvorené výhony prenesené na médium podporujúce ich elongáciu (Zdroj: autori).

5.2 Kvantitatívne vyhodnotenie

Kvantitatívne vyhodnotenie sa vyjadruje formou tabuliek alebo grafov. Odporúča sa navrhnuť experiment s minimálne 3 biologickými replikátmi a z nich potom urobiť aritmetický priemer.

Biologický replikát je termín používaný na označenie nezávislých vzoriek, ktoré sú spracované a analyzované rovnakým spôsobom v rámci jedného experimentu. Jeho účelom je zachytiť biologickú variabilitu.

Technický replikát je opakované meranie tej istej vzorky pomocou rovnakého protokolu a podmienok, pričom zohľadňuje variabilitu v meraní tej istej vzorky.

„**Outliers**“ alebo **odľahlé hodnoty** sú dáta, ktorých hodnota sa významne líši od ostatných hodnôt v analyzovanom súbore. Takéto hodnoty môžu ovplyvniť interpretáciu výsledkov. Môže to byť spôsobené variabilitou merania alebo výsledkom experimentálnej chyby, a preto sú tieto hodnoty niekedy vylúčené z analyzovaného súboru hodnôt.

Variabilitu v dátach je možné vyjadriť pomocou strednej chyby priemeru alebo pomocou smerodajnej odchýlky. **Stredná chyba priemeru** („Standard Error of the Mean“, SEM) je štatistický ukazovateľ, ktorý vyjadruje, aká je pravdepodobná variabilita priemeru. Menšia hodnota SEM hovorí, že priemer vzorky je presnejším odhadom skutočného priemeru populácie, zatiaľ čo väčšia hodnota SEM naznačuje väčšiu neistotu v odhade priemeru. **Smerodajná odchýlka** („Standard Deviation“, SD) je štatistický ukazovateľ, ktorý vyjadruje, ako sú hodnoty rozptýlené okolo jej priemeru, teda aká je variabilita v dátach.

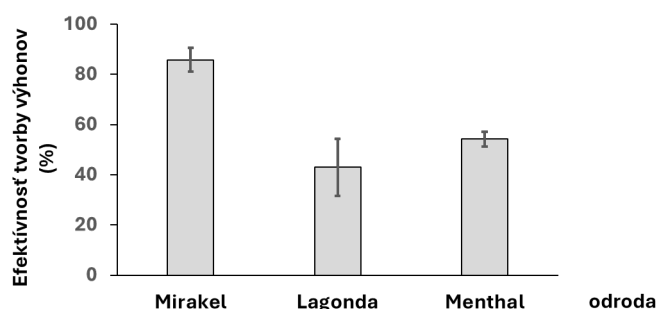
Spracované výsledky sa uvádzajú vo forme aritmetického priemeru \pm SEM alebo \pm SD. Pri experimentoch, kde sú k dispozícii len jeden alebo dva biologické replikáty, SEM alebo SD sa neuvádzajú.

Získané výsledky sa môžu vyjadriť vo forme tabuľky (Tabuľka 10), samostatného grafu (Obrázok 5.3) alebo sa môžu vyjadriť vo forme súboru grafov a vtedy sa označia ako obrázok (Obrázok 5.4). V grafe musí byť uvedený názov osí x a y.

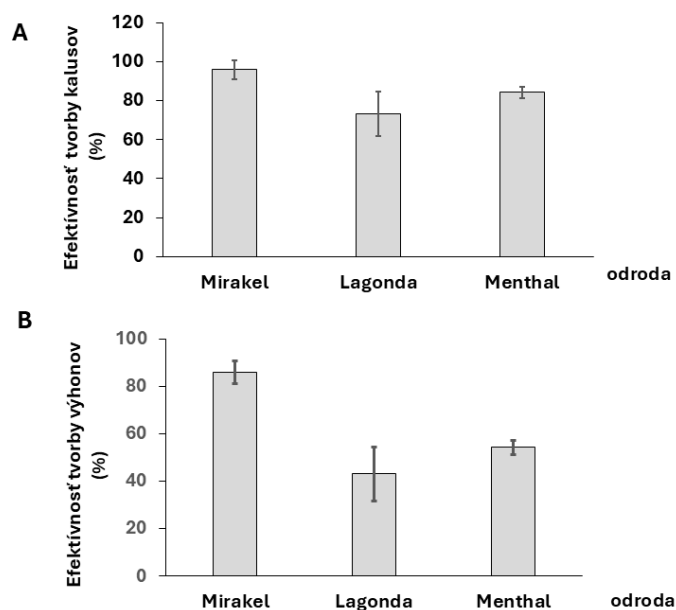
Tabuľka 10 Efektívnosť tvorby výhonov repky olejnej (*Brassica napus* L.).

Odroda	Efektívnosť tvorby výhonov(%)	SEM (%)
Mirakel	85,8	4,8
Lagonda	43,0	11,4
Menthal	54,2	2,9

SEM – stredná chyba priemeru, Efektívnosť tvorby výhonov (%) - počet explantátov tvoriacich aspoň jeden výhon pripadajúci na celkový počet explantátov použitých v experimente.



Obrázok 5.3 Efektívnosť tvorby výhonov repky olejnej (*Brassica napus* L.) v % vyjadrená ako počet explantátov tvoriacich aspoň jeden výhon pripadajúci na celkový počet explantátov použitých v experimente. Údaje predstavujú aritmetický priemer \pm strednú chybu priemeru (Zdroj: autori).



Obrázok 5.4 Efektívnosť tvorby kalusov (**A**) a výhonov (**B**) repky olejnej (*Brassica napus* L.) v % vyjadrená ako počet explantátov tvoriacich aspoň jeden kalus/výhon pripadajúci na celkový počet explantátov použitých v experimente. Údaje predstavujú aritmetický priemer \pm strednú chybu priemeru (Zdroj: autori).

6 Použitá literatúra

- Budko, N., Corbetta, A., Duijn, van, B., Hille, S. C., Krehel, O., Rottschäfer, V., Wiegman, L., & Zhelyazov, D. (2013). Oxygen transport and consumption in germinating seeds. In M. O. Heydenreich, S. C. Hille, V. Rottschäfer, F. Spijksma, & E. Verbitskiy (Eds.), Proceedings of the 90th European Study Group Mathematics in Industry (SWI 2013, Leiden, The Netherlands, pp. 5-30, Lorentz Center.
- Cavallaro V., Pellegrino A., Muleo R., Forgione I. (2022). Light and plant growth regulators on *in vitro* proliferation. *Plants* 11(7):844, <https://doi.org/10.3390/plants11070844>
- Collins, H.A., Edwards, G.S. (1998). *Plant Cell Culture*. BIOS Scientific Publishers Limited. pp. 155., ISBN 187248473
- da Silva J.A.T., Zeng S., Wicaksono A., Kher M.M., Kim H., Hosokawa M. and Dewir Y.H., (2017). In vitro propagation of African violet: a review. *South African Journal of Botany*, 112, pp.501-507. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2017.05.018>
- Gemechu E.C., Amante G. (2021). Control of browning in plant tissue culture: A Review. *Journal of Scientific and Innovative Research*10(4):89-93, <https://doi.org/10.25081/jsa.2021.v5.7266>
- George E.F., Hall M.A., De Klerk GJ. (2008). *Plant propagation by tissue culture* 3rd Edition. The Netherland, The BackGround Springer, 65-175. ISBN 978-1-4020-5005-3
- Jones Jr J.B. (2014). *Complete guide for growing plants hydroponically*. CRC Press; pp. 179, ISBN 9780429187995
- Kormuťák, A., Matúšová R., Salaj T., Ostrolucká M.G., Gajdošová A. Libiaková, G., Libantová J., Autori, J. (2010). Využitie inovatívnych vedeckých prístupov na zvýšenie efektívnosti lesného hospodárstva. Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV, 87 p. ISBN 978-80-970498-8-1
- Long Y, Yang Y. Pan G., Shen Y. (2022). New insights into tissue culture plant-regeneration mechanisms. *Frontiers in Plant Science* 13:926752, <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.926752>
- Loyola-Vargas, V.M., Ochoa-Alejo N. (2018). An Introduction to Plant Tissue Culture: Advances and Perspectives. In: Loyola-Vargas, V., Ochoa-Alejo, N. (eds) *Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology*, vol 1815. Humana Press, New York, NY. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8594-4_1
- Nhut D.T., Tung, H.T., Yeung, E.C.T. (2022). *Plant Tissue Culture: New techniques and application in horticultural species of tropical region*, pp. 383-397. Singapore Springer. ISBN 978-981-16-6498-4
- Ordoñez B. (2014). Brochure: Pollen Viability Assessment. International Potato Center (CIP), Lima
- Patel P., Sarswat S.K., Modi A. (2022). Strategies to overcome explant recalcitrance under in vitro conditions. In *Advances in Plant Tissue Culture*, pp. 283-294, Academic Press. ISBN 9780323907958
- Phillips G.C., Garda M. (2019). Plant tissue culture media and practices: an overview. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 55:242-57. <https://doi.org/10.1007/s11627-019-09983-5>

- Pret'ová A., Obert B., Hricová A., Klubicová K., Hajduch M., Uvačková L., Libantová J., Autori J., Matušíková I. (2011). Biotechnologie ako nástroj moderného poľnohospodára na prekonanie predvídaných klimatických zmien (sucho, zvýšená teplota). Ústav genetiky a biotechnológií rastlín SAV, 138 s. ISBN 978-80-970662-0-8
- Rathod V., Behera T.K., Munshi A.D., Durgesh K., Jat G.S., Krishnan B.G., Sharma N. (2018.) Pollen viability and in vitro pollen germination studies in Momordica species and their intra and interspecific hybrids. Inter. J. Chem. Studies, 6(6):32-40, ISSN: 2321-4902
- Sharma G., Jagetiya S., Dashora R. (2015). General Techniques of Plant Tissue Culture. Lulu Press Inc. Raleigh, North Carolina, United States. ISBN 978-1-329-73251-3.
- Shrestha A., Dunn B. (2010). Hydroponics. Oklahoma Cooperative Extension Service, <https://extension.okstate.edu/fact-sheets/hydroponics.html>
- Shukla M., Sullivan J.A., Jain S.M., Murch S.J., Saxena P.K. (2013) Micropropagation of African violet (*saintpaulia ionantha* Wendl.). Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants, 279-89, https://doi.org/10.1007/978-1-62703-074-8_22
- Smith RH. (2013). Plant tissue culture: techniques and experiments. academic press, pp. 188, ISBN 978-0-12-415920-4

Laboratorne cvičenia z *in vitro* systémov rastlín

Vysokoškolské skriptá

Autori:

Doc. Ing. Jana Moravčíková, PhD. (4 AH)

RNDr. Milan Karas, PhD. (1 AH)

Recenzenti:

Prof. RNDr. Zdenka Gálová, CSc.

Ing. Eva Boszorádová, PhD.

Návrh obálky: doc. Ing. Jana Moravčíková, PhD.

Vydavateľ: Univerzita sv. Cyrila a Metoda v Trnave, Fakulta prírodných vied, 2024

Vydanie: prvé, online: <https://www.ucm.sk/files/sk/ine-pracoviska/centrum-informacnych-zdrojov-ucm-trnave/referat-informacnych-sluzieb/e-zdroje/ucebne-texty-k-stiahnutiu/lab-cv-z-invitro-systemov-rastlin.pdf>

Počet strán: 113 (5 AH)

ISBN 978-80-572-0459-6

