



METODIKA TESTOVÁNÍ TOXICITY TĚŽKÝCH KOVŮ POMOCÍ SUSPENZNÍCH KULTUR KONOPÍ SETÉHO (CANNABIS SATIVA ssp. SATIVA L.)



Autorky:

Magdalena Cvečková, Iva Smýkalová, Martina Větrovcová, Miroslava Vrbová

2015

METODIKA TESTOVÁNÍ TOXICITY TĚŽKÝCH KOVŮ POMOCÍ SUSPENZNÍCH KULTUR KONOPÍ SETÉHO (*CANNABIS SATIVA* ssp. *SATIVA* L.)

Metodika vypracovaná jako výstup projektu MŠMT:

COST Action 905 Mineral-improved crop production for healthy food and feed.

Číslo a název projektu: LD 11053 – Minerální obohacení vybraných rostlinných komodit a eliminace kadmia pro produkci krmiv a potravin.

Autorský kolektiv:

RNDr. Magdalena Cvečková (autorský podíl 40 %)

cveckova@agritec.cz

Ing. Iva Smýkalová, Ph.D. (autorský podíl 20 %)

smykalova@agritec.cz

Ing. Martina Větrovcová (autorský podíl 20 %)

vetrovcova@agritec.cz

Ing. Miroslava Vrbová, Ph.D. (autorský podíl 20 %)

vrbova@agritec.cz

Oponenti:

Ing. Markéta Pospíchalová, ÚKZÚZ – Národní referenční laboratoř, Hroznová 2, 656 06 Brno

RNDr. Hana Konrádová, Ph.D., Katedra experimentální biologie rostlin, Přírodovědecká fakulta Univerzity Karlovy v Praze, Viničná 5, 128 43 Praha 2

Vydal:

Agritec Plant Research s.r.o. v nakladatelství AGRITEC, výzkum, šlechtění a služby, s.r.o. Šumperk, 2015

<http://www.agritec.cz>

© Foto – RNDr. M. Griga, CSc., RNDr. M. Cvečková, Ing. I. Smýkalová, Ph.D.

© Agritec Plant Research s.r.o., Šumperk 2015

Tato publikace nesmí být přetiskována vcelku ani po částech, uchovávána v médiích, přenášena nebo uváděna do oběhu pomocí elektronických, mechanických, fotografických či jiných prostředků bez uvedení osoby, která má k publikaci práva podle autorského zákona nebo bez jejího výslovného souhlasu. S případnými náměty na jakékoliv změny nebo úpravy se obraťte písemně na autorky.

ISBN 978-80-87360-35-4

OBSAH

1. ÚVOD	5
1.1 Cíl metodiky.....	5
1.2 Dedikace	5
2. SCHEMATICKÉ ZNÁZORNĚNÍ POSTUPU ODVOZENÍ SUSPENZNÍCH KULTUR KONOPÍ, TESTOVÁNÍ TK A HODNOCENÍ VIABILITY POMOCÍ TTC	6
3. PŘÍPRAVA MÉDIÍ PRO KLÍČENÍ OSIVA A ODVOZENÍ KALUSOVÝCH KULTUR V TEKUTÉM MÉDIU	7
3.1 Pomůcky a chemikálie.....	7
3.2 Sterilní nástroje a pomůcky.....	7
3.3 Přístroje a ostatní vybavení.....	7
3.4 Ochranné pomůcky.....	7
3.5 Postup pro přípravu média C0 – klíčení osiva	7
3.6 Postup pro přípravu média indukujícího tvorbu kalusu – MSK.....	8
4. PŘÍPRAVA A STERILIZACE OSIVA, IZOLACE HYPOKOTYLŮ PRO ODVOZENÍ KALUSU <i>IN VITRO</i>	8
4.1 Pomůcky a chemikálie.....	8
4.2 Sterilní nástroje a pomůcky.....	8
4.3 Přístroje a ostatní vybavení.....	8
4.4 Ochranné pomůcky	9
4.5 Postup sterilizace osiva a izolace hypokotylů z klíčenců.....	9
5. ZALOŽENÍ KALUSOVÉ KULTURY KONOPÍ V TEKUTÉM MÉDIU	11
5.1 Sterilní laboratorní pomůcky	11
5.2 Přístroje a ostatní vybavení.....	11
5.3 Ochranné pomůcky.....	11
5.4 Postup.....	11
6. TESTY TOXICITY	12

6.1 Sterilní laboratorní pomůcky	12
6.2 přístroje a ostatní vybavení.....	12
6.3 Ochranné pomůcky	12
6.4 Chemikálie	12
6.5 Postup výměny tekutého média.....	12
7. TESTOVÁNÍ VIABILITY KALUSOVÝCH KULTUR PO EXPOZICI TK POMOCÍ TTC TESTU VIABILITY	13
7.1 Laboratorní pomůcky (nesterilní)	13
7.2 Přístroje a ostatní vybavení.....	13
7.3 Ochranné pomůcky	13
7.4 Chemikálie	13
7.5 Příprava barvicího roztoku TTC pro testy viability	13
7.6 Postup barvení vzorků kalusových kultur	13
7.7 Vyhodnocení viability kalusových kultur pomocí obrazové analýzy	14
8. SEZNAM RESPONZIVNÍCH GENOTYPŮ KONOPÍ POUŽITÝCH K ODVOZENÍ KALUSOVÝCH KULTUR.....	15
9. SEZNAM POUŽITÝCH SPECIÁLNÍCH CHEMIKÁLIÍ.....	15
10. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK.....	16
11. SOUHRNNÉ TABULKY	16
12. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ	19
13. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY	19
14. EKONOMICKÉ ASPEKTY.....	19
15. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY	19
16. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE	20

1. ÚVOD

Narůstající zatížení životního prostředí těžkými kovy a jejich negativní dopad na zdraví člověka se v současné době řadí celosvětově k nejzávažnějším problémům. Aktuálním úkolem pro současnou vědu a výzkum je proto řešení způsobů efektivní a ekologicky únosné dekontaminace půd, vodních sedimentů a vod. Vhodné řešení nabízí koncept fytořemediace. Jako slibné pro tuto technologii se jeví mnohé zemědělské plodiny, pro něž jsou agrotechnické metodiky již rutinní záležitostí a navíc skýtají možnost dalšího využití biomasy pro technické účely. Mezi ně patří i konopí. Proto je zapotřebí mít k dispozici efektivní systém k otestování co největšího počtu druhů/kultivarů plodin na odolnost vůči rizikovým prvkům i jejich případný akumulací potenciál ve vztahu k těmto prvkům, resp. jejich sloučeninám vyskytujícím se v kontaminovaných substrátech. Jako kandidátní plodina pro fytořemediace je dlouhodobě studováno konopí seté (*Cannabis sativa* ssp. *sativa* L.).

1.1 Cíl metodiky

Cílem metodiky je praktické uplatnění systému suspenzních kultur (SK) konopí v tekutých médiích jako biotestu pro rychlé otestování těžkých kovů: a) k testování viability kalusových kultur, b) k nalezení tzv. selekční koncentrace testovaného prvku, c) ke stanovení/srovnání akumulací potenciálu jednotlivých odrůd konopí, d) k nalezení odrůd s vysokým fytořemediálním potenciálem.

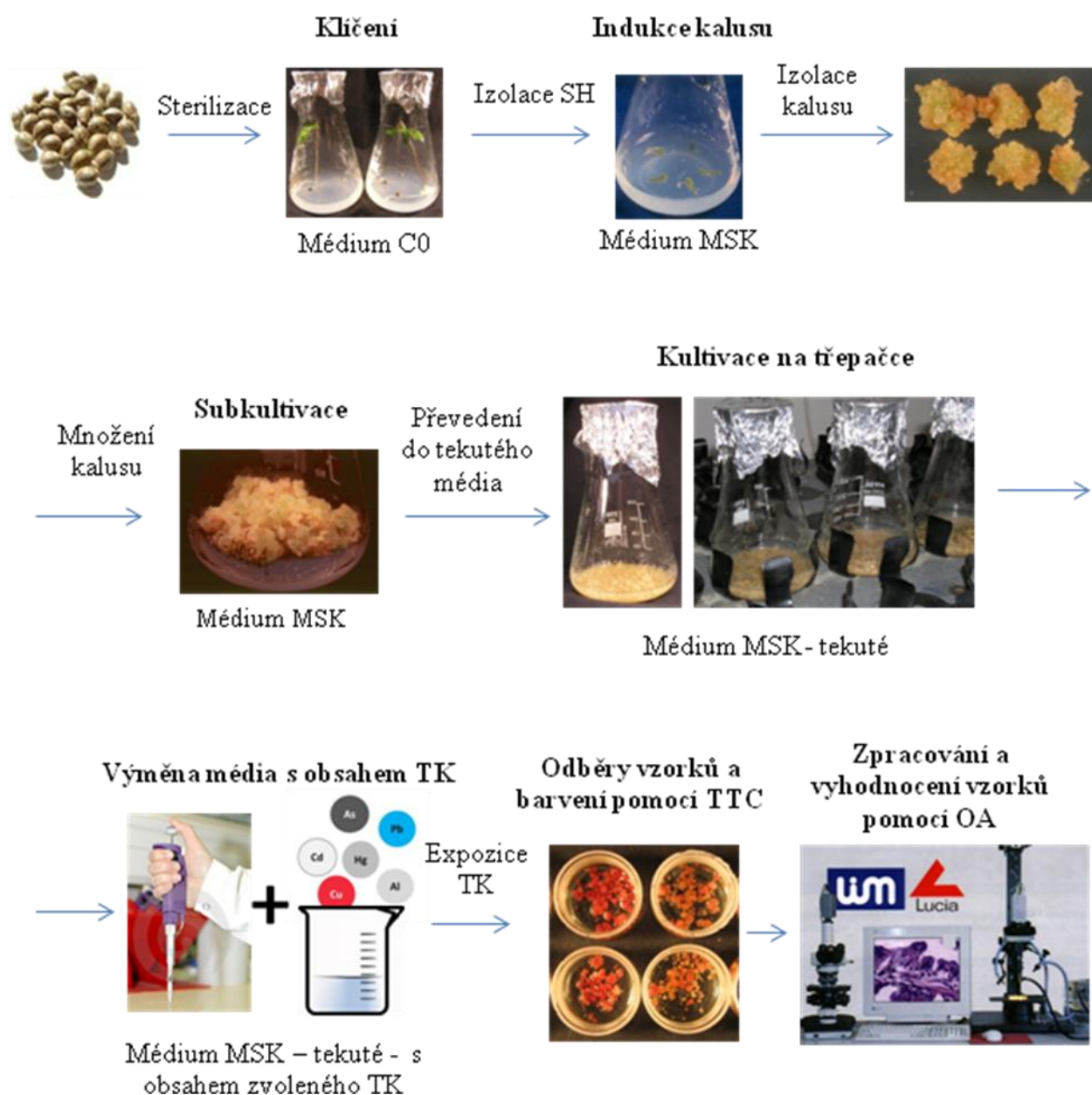
1.2 Dedikace

Certifikovaná metodika vznikla za podpory MŠMT jako součást řešení projektu COST Action 905 Mineral-improved crop production for healthy food and feed.

Číslo a název projektu: LD 11053 – Minerální obohacení vybraných rostlinných komodit a eliminace kadmia pro produkci krmiv a potravin.

Děkujeme RNDr. Miroslavu Grigovi, CSc. za provedení precizní fotodokumentace kultur pro publikační účely a kritické poznámky k odborné stránce textu metodiky.

2. SCHEMATICKÉ ZNÁZORNĚNÍ POSTUPU ODVOZENÍ SUSPENZNÍCH KULTUR KONOPÍ, TESTOVÁNÍ TK A HODNOCENÍ VIABILITY POMOCÍ TTC



Vysvětlivky: SH – segmenty hypokotylů, OA – obrazová analýza, TK – těžké kovy, TTC – barvivo 2,3,5-triphenyltetrazolium chlorid. Složení jednotlivých médií je uvedeno v kap. 11.

3. PŘÍPRAVA MÉDIÍ PRO KLÍČENÍ OSIVA A ODVOZENÍ KALUSOVÝCH KULTUR V TEKUTÉM MÉDIU

3.1 Pomůcky a chemikálie

- a) 100 ml Erlenmayerovy baňky
- b) agar
- c) sacharóza
- d) kádinky, nálevky, odměrné válce, pipety
- e) deionizovaná voda
- f) chemikálie dle rozpisu jednotlivých druhů médií (makro-mikro prvky, vitamíny, myo-inozitol, glycin, apod.)
- g) fytohormony dle rozpisu jednotlivých druhů médií

3.2 Sterilní nástroje a pomůcky

- a) kádinky
- b) odměrný válec

3.3 Přístroje a ostatní vybavení

- a) laboratorní váhy
- b) elektromagnetická míchačka
- c) pH metr
- d) autokláv
- e) sušička
- f) flow-box

3.4 Ochranné pomůcky

Pláště, rukavice.

3.5 Postup pro přípravu média C0 – klíčení osiva

Do vhodné nádoby (A) – kádinka, Erlenmayerova baňka – objem 1 litr, navážíme agar. Do menší kádinky (B) (cca 250 ml) navážíme sacharózu a postupně smícháme ostatní potřebné chemikálie dle rozpisu jednotlivých médií, růstové regulátory a případně speciální složky médií, mícháme na elektromagnetické míchačce, změříme a upravíme pH na 5,8. Používáme předem připravené zásobní roztoky uchovávané v lednici, množství přepočteme dle konkrétního rozpisu. Do nádoby s agarem (A) vlijeme obsah menší kádinky (B), doplníme po značku, důkladně promícháme. Médium rozlijeme po 25 ml do nesterilních Erlenmayerových baněk o objemu 100 ml. Zavíčkujeme alobalem. Sterilizujeme v autoklávu, necháme zvolna chladnout. Médium uchováváme při pokojové teplotě bez přístupu přímého slunečního záření max. 4 týdny.

3.6 Postup pro přípravu média indukujícího tvorbu kalusu – MSK

Pevné médium: Do vhodné nádoby (A) – kádinka, Erlenmayerova baňka – objem 1 litr, navážíme agar. Do menší kádinky (B) (cca 250 ml) navážíme sacharózu a postupně smícháme ostatní potřebné chemikálie dle rozpisu jednotlivých médií, růstové regulátory a případně speciální složky médií, mícháme na míchačce, změříme a upravíme pH na 5,8.

Používáme předem připravené zásobní roztoky uchovávané v lednici, množství přepočteme dle konkrétního rozpisu. Do nádoby s agarem (A) vlijeme obsah menší kádinky (B), doplníme po rysku, důkladně promícháme. Médium rozlijeme po 25 ml do nesterilních Erlenmayerových baněk o objemu 100 ml. Zavíčkujeme alobalem. Popíšeme stabilním fixem, značíme zkratkou média. Sterilizujeme v autoklávu, necháme zvolna chladnout. Médium uchováváme při pokojové teplotě bez přístupu přímého slunečního záření max. 4 týdny.

Tekuté médium: Postup je stejný, jen s vynecháním zpevňující složky. Tekuté médium připravujeme do větších Erl. baněk po 0,5 l objemu dle plánovaného rozsahu testu. Tekuté médium se pak přidává z celého objemu pomocí pipety k připravené kalusové kultuře. Tekuté médium je nutno připravovat bezprostředně před použitím, po 2 týdnech dochází k vysrážení či usazení některých složek v tomto typu média a nelze jej již použít.

4. PŘÍPRAVA A STERILIZACE OSIVA, IZOLACE HYPOKOTYLŮ PRO ODVOZENÍ KALUSU *IN VITRO*

4.1 Pomůcky a chemikálie

- a) 100 ml Erlenmayerovy baňky
- b) filtrační papír
- c) kádinka (0,5 l), sítko (velikost ok 1 mm)
- d) čtverce alobalové fólie
- e) sterilní destilovaná voda v Erlenmayerových baňkách (1–1,5 l) na oplach
- f) osivo
- g) 98% etanol
- h) 10% chloramin
- i) detergent

4.2 Sterilní nástroje a pomůcky

- a) pinzety
- b) nerezová lžička s dlouhou rukojetí
- c) nerezová sítko (velikost ok 1 mm)
- d) kádinky (0,5 l)
- e) Petriho misky (9 cm)

4.3 Přístroje a ostatní vybavení

- a) autokláv
- b) termostat – sušička
- c) třepačka s temperovaným inkubátorem
- d) flow-box
- e) lihový kahan
- f) kultivační místnost

4.4 Ochranné pomůcky

Plášť, jednorázové chirurgické rukavice.

4.5 Postup sterilizace osiva a izolace hypokotylů z klíčenců

Z 1 litru nakličovacího média C0 připravíme 40 Erlenmayerových baněk (100 ml) a rozlijeme nesterilně médium po 25 ml do každé baňky. Do 2 – 3 Erlenmayerových baněk o objemu 0,5 l nachystáme destilovanou vodu na oplach. Vše autoklávuujeme 15 minut při teplotě 120 °C a tlaku 120 kPa, necháme vychladnout.

Nachystáme nástroje a pomůcky (skleněná Petriho miska s několika vrstvami filtračního papíru zabalená do alobalu) ke sterilizaci. Necháme vychladnout.

Osivo přebereme, odstraníme napadená a nestandardní semena (odlišná barvou a tvarem), odpočítáme požadovaný počet + rezerva cca 20 %. Semena dáme do nesterilní kádinky, přelijeme destilovanou vodou s kapkou detergentu, uzavřeme alobalovou fólií a necháme 1 h na třepačce při 110 rpm a pokojové teplotě. Dále již provádíme veškeré kroky ve flow-boxu. Osivo scedíme, opláchneme sterilní destilovanou vodou, v kádince zalijeme 96% etanolem a 2 minuty protřepáváme ručně. Opláchneme a v kádince zalijeme 10% chloraminem s kapkou detergentu a mícháme na třepačce 1 h (110 rpm) při pokojové teplotě.

Sterilní Erlenmayerovy baňky s nakličovacím médiem C0 a sterilní vodu připravíme do flow-boxu. Osivo ve flowboxu slijeme a třikrát opláchneme sterilní vodou přes sítko. Nakonec osivo vyklepneme ze sítka na sterilní filtrační papír v Petriho misce a necháme cca 5 minut oschnout. Pinzetou rozmístíme semena do Erlenmayerovy baňky (po pěti semelech na baňku), zavíčujeme alobalem a označíme.

Erlenmayerovy baňky se semeny umístíme do kultivační místnosti na 7–9 dní při teplotě 22 °C. První 3 dny jsou semena umístěna ve tmě, poté mají světelný režim den/noc 16/8. Po 7–9 dnech nakličování vyjmeme klíčence konopí z baněk a sterilním skalpelem odstraníme kořen a děložní listy s vrcholovým pupenem. Dále odřezáváme segmenty hypokotylů o délce 0,5–1 cm. Z jednoho klíčence lze použít i více segmentů. Hypokotylы umístíme na iniciační médium MSK v počtu 15 hypokotylů/1 baňku a kultivujeme 14 dnů (nebo do vytvoření kalusů na koncích segmentů) ve tmě při teplotě 22–25 °C.

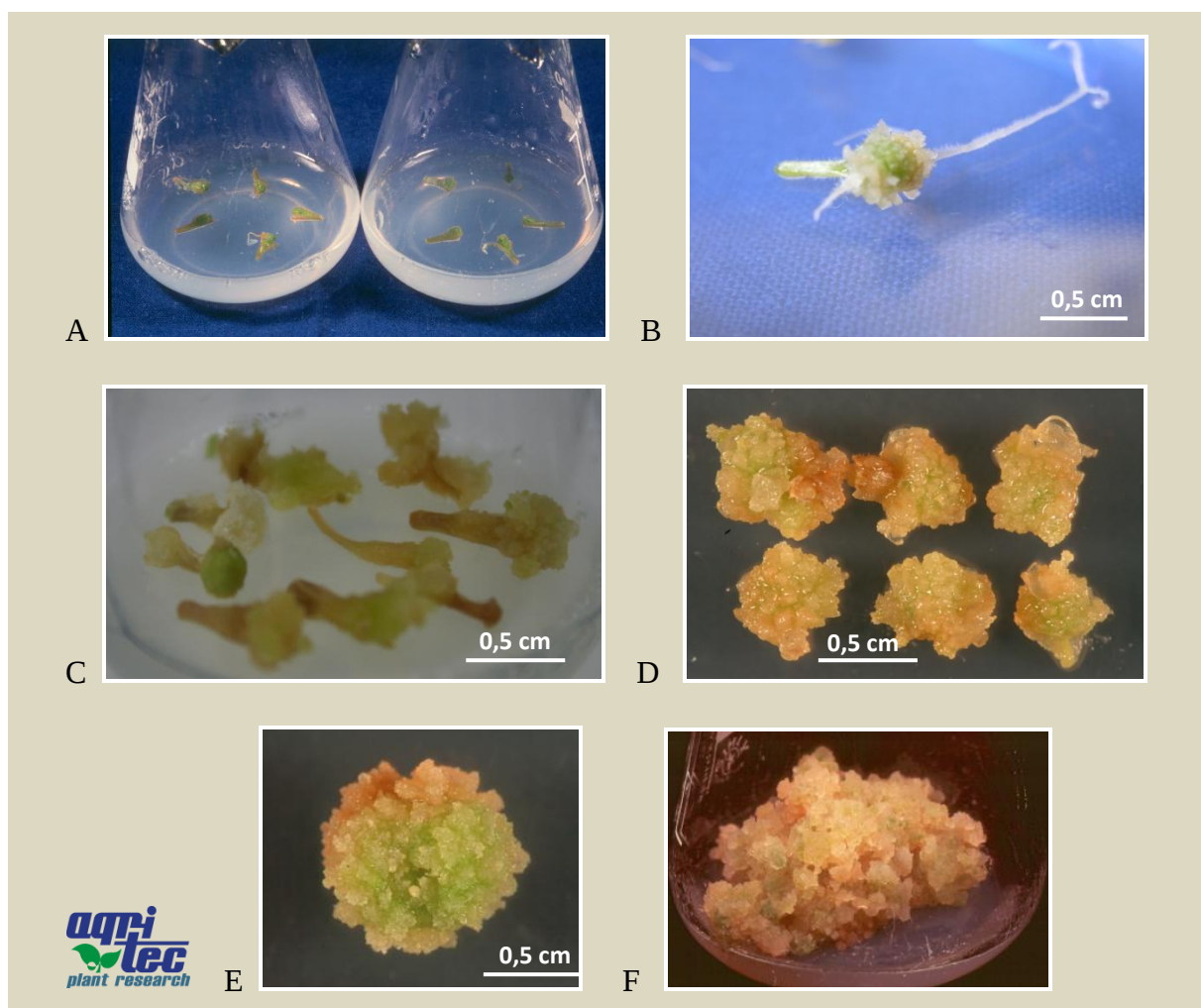
Poznámka: Specifikem klíčení osiva konopí je nevyrovnané klíčení semen. To je dáno přítomností semen v různém stádiu zralosti, což lze přebráním osiva eliminovat jen částečně. Jedná se o přirozený charakter postupného dozrávání semen na rostlinách konopí a tedy jejich různém stádiu zralosti v době sklizně. Proto je při výsevu do *in vitro* podmínek nutno počítat s větší rezervou semen (cca 20 %).



Obr. 1: Ideální vzhled klíčících rostlin konopí pro izolaci segmentů z hypokotylů.

Po cca 14 dnech odřízneme kalusovou hmotu tvořící se na koncích segmentů hypokotylů a přeneseme sterilně na čerstvé pevné MSK médium. Pro získání dostatečného množství kalusu je zapotřebí provést min 2–3 subkultivace po 14 dnech (ve tmě). Narůstající kalusovou hmotu je vhodné postupně množit rozdělením do většího počtu baněk. Zavádění kalusu do tekutého média je možné nejdříve po dvou týdnech od poslední subkultivace.

Poznámka: V počátcích tvorby kalusu a někdy i během prvních subkultivací je možno zaznamenat prorůstání kořenů. Tyto je nutné při pasážování pečlivě odstraňovat. Jejich tvorba postupně vymizí.



Obr. 2: Indukce tvorby kalusu na segmentech hypokotylů konopí. A) Segmenty hypokotylů po 1 týdnu kultivace na médiu MSK ve tmě. Patrná je výrazná polarita v produkci kalusu, a to na bazálním konci segmentů. B) V počátcích tvorby kalusu i během prvních subkultivací je možno zaznamenat prorůstání kořenů. C) Segmenty hypokotylů konopí připravené k odřezání a přenesení vytvořených kalusů na čerstvé médium. D) Detail kalusů po 1. týdnu samostatné kultivace na pevném MSK. E) Kompaktní kalusový útvar, který je možno postupně rozdělit a množit. F) Sypký kalus zaplňující 100ml Erlenmayerovu baňku.

5. ZALOŽENÍ KALUSOVÉ KULTURY KONOPÍ V TEKUTÉM MÉDIU

Předem připravené: Tekuté médium MSK (kap. 2.6), kalusové kultury na pevném MSK médiu (kap. 3.5).

5.1 Sterilní laboratorní pomůcky

- a) špičky (5 ml)
- b) Erlenmayerovy baňky 250 ml
- c) nerez lžička s dlouhou rukojetí

5.2 Přístroje a ostatní vybavení

- a) kahan
- b) pipetman (5 ml)
- c) flow-box
- d) váhy (pro navážky cca 10 g + váha baňky)
- e) třepačka s temperovaným inkubátorem
- f) sušička

5.3 Ochranné pomůcky

Plášť, rukavice.

5.4 Postup

Do flow-boxu zapojíme váhy a nachystáme si všechny sterilní pomůcky, materiál a *in vitro* kultury.

Prázdnou sterilní 250ml baňku postavíme na váhy, a opatrně pomocí lžičky do ní přemístíme kalus. Navážka je ± 10 g. Nikdy nemícháme obsah dvou malých baněk do jedné suspenze, raději ponecháme nižší navážku, než je optimum. Poté přidáme pomocí pipetmanu 30 ml tekutého MSK. Kalus by neměl být zcela ponořen, nijak jej neroztíráme ani neroztřepáváme v ruce. Baňku sterilně uzavřeme a na víčko poznačíme počáteční navážku kalusu. Takto postupujeme dle množství materiálu či pracovního záměru se všemi baňkami. Baňky s SK umístíme na třepačku při intenzitě otáček 80 rpm, aby nedošlo k rozmělnění SK na příliš malé buněčné shluky. Světelný režim stejný jako při odvozování kultury, teplota 22–25 °C, kultivace 14 dnů. Vitální a proliferující kalusová kultura je charakterizována stabilním zabarvením a mírným nárůstem biomasy. Vstupní test viability (TTC) u takovéto kultury by měl představovat 65 % živé rostoucí biomasy (červené zbarvení) (kap. 6.5). Tato kultura je vhodná pro další experimenty, založení testu na těžké kovy.

6. TESTY TOXICITY

Předem připravené: Tekuté médium MSK (postup 2.6), přesně definovaný zásobní roztok testovaného TK.

6.1 Sterilní laboratorní pomůcky

- a) kádinky dle počtu zvolených testovaných koncentrací + kontrola + malá na roztok TK
- b) špičky na pipetování pro výměnu tekutého média (5 ml)
- c) špičky na pipetování zásobního roztoku TK (5 ml)
- d) mikrofiltry (0,22 μm) a stříkačka (5 ml)
- e) odpadní kádinka na vyčerpané médium (750 ml)

6.2 přístroje a ostatní vybavení

- a) kahan
- b) pipetman (5 ml)
- c) flow-box
- d) třepačka s temperovaným inkubátorem

6.3 Ochranné pomůcky

Dle bezpečnostních pokynů k danému testovanému TK od výrobce. Rukavice, laboratorní plášť.

6.4 Chemikálie

Definovaný roztok zvoleného TK, přidává se sterilně do hotového média přímo před zaočkováním nebo přidáním kultury.

6.5 Postup výměny tekutého média

Do flow-boxu si nachystáme všechny potřebné pomůcky a *in vitro* kultury. Do malé kádinky dáme sterilně pomocí mikrofiltru odpovídající objem zásobního roztoku TK. Do sterilních kádinek dle počtu variant testovaných koncentrací TK si nachystáme tekuté MSK médium podle předem připraveného rozpisu (plánovaného objemu spotřebovaného média) a sterilně pipetujeme příslušná množství roztoku TK. Promícháme a označíme jednotlivé baňky – varianty. Z baňky s kalusovou kulturou odpipetujeme vyčerpané živné médium a novou špičkou (5 ml) přidáme objem shodný s původním objemem tekutého média již s koncentrací testovaného TK. Baňku sterilně uzavřeme, popíšeme. Dbáme na to, abychom pro každou koncentrační variantu používali čistou špičku. Kultivujeme dle stejných parametrů jako v předešlém kroku.

Poznámka: Volba intervalu pro odběry vzorků je individuální dle použitého typu TK a koncentrace. V tomto bodě je vhodné vycházet z literárních údajů k příslušné problematice. Z experimentálních zkušeností odběry vzorků zahájujeme 3.–5. den po expozici TK.

7. TESTOVÁNÍ VIABILITY KALUSOVÝCH KULTUR PO EXPOZICI TK POMOCÍ TTC TESTU VIABILITY

7.1 Laboratorní pomůcky (nesterilní)

- a) sítko
- b) kádinka na odpadní médium a proplach vzorků (kalusů)
- c) lžička s dlouhou rukojetí
- d) pipetmany (pro 5 ml a 1 ml)
- e) špičky (5 ml a 1 ml)
- f) skleněné kalibrační nádobky – shodný průměr a objem

7.2 Přístroje a ostatní vybavení

- a) lednice
- b) sušička
- c) vybavení pro obrazovou analýzu, PC

7.3 Ochranné pomůcky

Plášť, rukavice.

7.4 Chemikálie

- a) KH_2PO_4
- b) $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$
- c) destilovaná voda
- d) 2,3,5-triphenyltetrazolium chlorid (TTC)

7.5 Příprava barvicího roztoku TTC pro testy viability

Příprava pufru pro TTC (tzv. Sørensenův pufr):

Roztok č. 1 4,539 g KH_2PO_4 na 0,5 l

Roztok č. 2 12 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ na 0,5 l

Roztok č. 3 50 ml roztoku č. 1 + 300 ml roztoku č. 2

Úprava pH na 7,5: pro snížení použít roztok č. 1, pro zvýšení roztok č. 2.

Příprava vlastního barviva:

125 ml pufru č. 3

1 g TTC (2,3,5-triphenyltetrazolium chlorid)

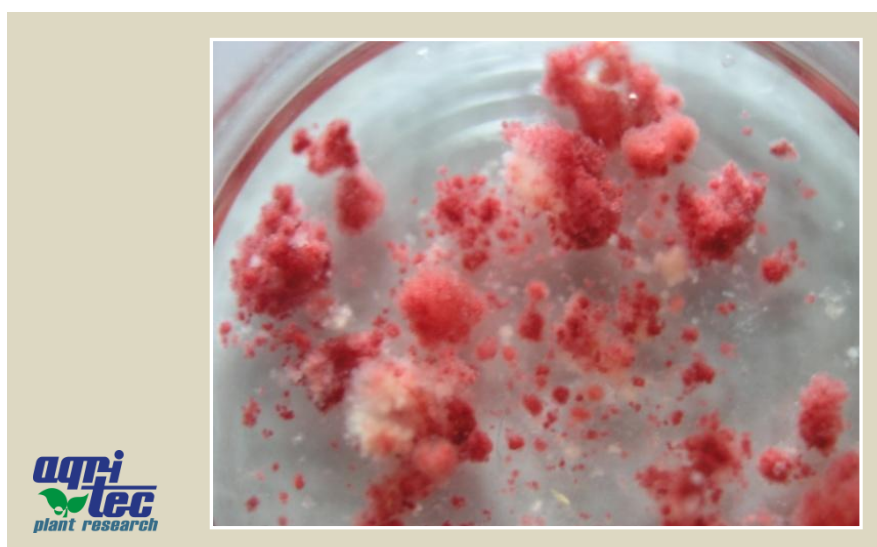
Barvicí roztok má být téměř čirý a bezbarvý. Je nutné jej uchovávat v chladnu a temnu! Barvivo je citlivé na světlo. I během barvení vzorků uchovávat láhev v alobalu bez přístupu přímého světla.

7.6 Postup barvení vzorků kalusových kultur

Pracujeme nesterilně při běžných laboratorních podmínkách. Nachystáme si kalibrační kádinky, do kterých budeme umisťovat vzorky z SK. Z kultur šetrně odpipetujeme médium

a po ukončení práce jej deponujeme na místě určeném na pracovišti k ukládání toxického odpadu. Obsah baňky přemístíme opatrně na sítko a propláchneme pomocí pipety Sørensenovým pufrem. Z propláchnuté kultury odebereme pomocí lžičky cca 1 g kalusové biomasy a umístíme do kalibrační kádinky. Přidáme barvicí roztok TTC tak, aby byla kalusová biomasa zcela ponořená do roztoku. Odebraný vzorek kalusové biomasy označíme a umístíme do tmny při pokojové teplotě. Z každé baňky odebíráme dva vzorky. Barvení probíhá během prvních 24 hodin při pokojové teplotě. Vzorky uchováváme v lednici, nejdéle však 4 dny před vlastním vyhodnocením (kontrolovat, zda nedošlo k vyschnutí barvicího roztoku). Zbylou kalusovou biomasu použijeme pro stanovení celkového obsahu TK pomocí příslušných analytických metod (ukazatel pro vyhodnocení akumulčního potenciálu daného genotypu).

Analýza obsahu sledovaných kovových elementů je na našem pracovišti prováděna pomocí atomové absorpční spektroskopie (AAS). Vzorky rostlinného materiálu jsou vysušeny, homogenizovány. Celkový obsah jednotlivých prvků je stanoven v mineralizátech získaných předchozím rozkladem ve směsi 65% HNO_3 a 30% H_2O_2 v mikrovlnném zařízení s uzavřeným systémem rozkladu (Milestone, ETHOS D). Po převedení do definovaného objemu je rozložený vzorek analyzován na duálním atomovém absorpčním spektrometru (SOLLAR M, Unicam Ltd., Cambridge, U.K.) vybaveném QuadLine (D2) a Zeemanovou korekcí pozadí. Kvalita analýz je ověřována pomocí interního referenčního materiálu IRM ÚKZÚZ, přesnost metody je zajištěna opakovaným měřením vzorku se srovnatelným obsahem sledovaného prvku. Statistické vyhodnocení je prováděno pomocí softwaru Statistika 10.

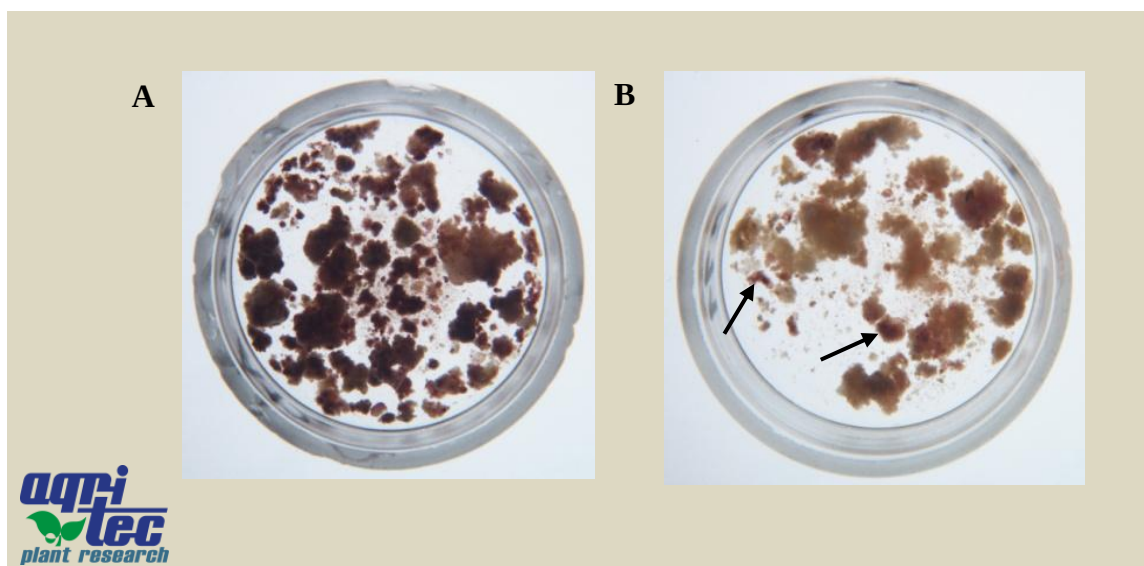


Obr. 3: Ukázka vzhledu kalusové kultury po barvení pomocí TTC. Živé buňky váží TTC a barví se v závislosti na genotypu červeně až červenohnědě. Foto – digitální aparát OLYMPUS CAMEDIA C-5060 Wide Zoom.

7.7 Vyhodnocení viability kalusových kultur pomocí obrazové analýzy

Viabilita buněk v kalusové kultuře *in vitro* byla vyhodnocena technikou digitální obrazové analýzy (DOA). V naší laboratoři je používáno zařízení pro digitální obrazovou analýzu firmy LIM (Laboratory Imaging Prague, ČR). Vzorky kalusů jsou snímány makrooptikou Navitar (0.58x + 0,25x předsádka, prosvětlení, 1/20 s, gain 1.0x), napojenou na barevnou digitální kameru Nikon DS-5M. Specializovaný software NIS-ELEMENTS ver. 3.1.firmy LIM

je používán k analýze parametru Area, plocha analyzovaných objektů. Detekce je založena na tvorbě binární vrstvy (0,1), detekce objektů a měření, detekce objektů a měření. Výsledkem měření je celková plocha kalusu (celkový objekt) v kalibrační kádince a plošný podíl karmínově zabarvených buněk na digitálním snímku. Měření je provedeno v pixelech a výsledky jsou vyjádřeny v procentech. Plošné zkreslení vlivem digitalizace objektu a vyhodnocení za těchto podmínek je provedeno objektivně a automatizováno prostřednictvím vytvořeného makra. Digitální snímky pořízené za identických podmínek jsou uchovány pro případné další hodnocení nebo přeměření.



Obr. 4: Vzorky kalusové kultury konopí po barvení pomocí TTC. A) Kontrola – bez přídavku As. B) 25μM koncentrace As v médiu. Živé buňky se barví červeně (viz šipka). Odrůda FIBROL. 3 dny expozice As. Arsen ve formě roztoku NaAsO₂.

8. SEZNAM RESPONZIVNÍCH GENOTYPŮ KONOPÍ POUŽITÝCH K ODVOZENÍ KALUSOVÝCH KULTUR

Odrůdy evropské provenience – BIALOBRZESKIE (FR), FIBROL (FR), KC-DÓRA (HU), MONOICA (HU), TYGRA (PL).

9. SEZNAM POUŽITÝCH SPECIÁLNÍCH CHEMIKáliÍ

BAP:	Duchefa, Haarlem, Netherlands, k.č. B0904.0005
NAA:	Duchefa, Haarlem, Netherlands, k.č. N0903.0025
TTC:	SIGMA Aldrich, k.č. T8877
NaAsO ₂ :	MERCK, k.č. 1062771000

10. SEZNAM POUŽITÝCH ZKRATEK

BAP	6-benzylaminopurin
MS	Murashige and Skoog médium
NAA	kyselina naftyloctová
OA	obrazová analýza
SH	segmenty hypokotylů
TTC	triphenyltetrazolium chlorid
TK	těžké kovy

11. SOUHRNNÉ TABULKY

Přehled kultur, médií a podmínek při postupu zavádění kalusových kultur do tekutého média a testování toxicity těžkých kovů prostřednictvím vitálního barvení pomocí TTC.

Tabulka 1:

Kultura	Média	Podmínky	Trvání
Klíčení	C0 médium (pevné)	Kultivační místnost, 3 dny ve tmě, dále osvětlení 40–70 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}\text{PAR}$, 19–22 °C	7–9 dnů
Indukce tvorby kalusu	MSK (pevné): (MS médium, 5 ml/l KINETIN, 5 ml/l 2,4-D)	Kultivační box, tma 22–25 °C	14 dnů
Subkultivace kalusů odřezaných od hypokotylů, množení kalusu	MSK (pevné): (MS médium, 5 ml/l KINETIN, 5 ml/l 2,4-D)	Přenesení na světlo – např. kultivační místnost, osvětlení 40–70 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}\text{PAR}$, 22–25 °C	2–3 x 14 dní
Zavedení kalusů do tekutého média	MSK (tekuté) (MS médium bez agaru, 5 ml/l KINETIN, 5 ml/l 2,4-D) ; $\pm$ 10g kalusu + 30 ml média	Třepačka, osvětlení 40–70 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}\text{PAR}$, 22–25 °C	10–14 dnů
Výměna média + přidavek TK – testování toxicity	MSK (tekuté) (MS médium bez agaru, 5 ml/l KINETIN, 5 ml/l 2,4-D) + příslušná koncentrace TK	Třepačka, osvětlení 40–70 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}\text{PAR}$, 22–25 °C	2–4 dny podle typu TK
Testování viability – barvení pomocí TTC	Roztok barviva TTC + Sørensenův pufr	Běžné laboratorní podmínky, nesterilní Bez přístupu světla, pokojová teplota	24 h Do doby digitálního zpracování možno uchovat v lednici max. 5 dnů.

Tabulka 2:

C0 médium				
Složky média	mg.l⁻¹ kult. média	Zásobní roztok		Postup
Ca(NO ₃) ₂ nebo Ca(NO ₃) ₂ .4H ₂ O	572 823	5,72 8,23	g	Zásobní roztok dle Knopa (1965): Jednotlivé chemikálie navažovat, rozpouštět v malém množství vody a slévat do litrové odměrné baňky. Přidáváme 100 ml na 1 l média.
KNO ₃	143	1,43	g	
KCl	71	0,71	g	
KH ₂ PO ₄	132	1,32	g	
MgSO ₄ nebo MgSO ₄ .7H ₂ O	143 294	1,43	g	
		2,94		
Na ₂ EDTA	37,3	7,45	g	FeEDTA: Chemikálie rozpustit každou zvlášť, pak smíchat, doplnit do 1000 ml, zahřívát pomalu za stálého míchání, až je roztok tmavožlutý, opaleskující. Nesmí se vařit. Používá se 5 ml na 1 litr kultivačního média.
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	5,57	g	
kyselina nikotinová	0,5	50	mg	Jednotlivé složky rozpouštíme ve vodě a sléváme do 100 ml baňky, doplníme do 100 ml vodou. Vznikne tak zásobní roztok vitamínů, ze kterého se používá 1 ml na 1 litr kultivačního média.
pyridoxin HCl	0,5	50	mg	
thiamin HCl	0,1	100	mg	
sacharóza	10 000			Navází se a přidá přímo do kultivačního média.
Agar Difco Bacto	7 000			Navází se a dá se rozvařit do asi polovičního množství vody z celkového množství média.
pH			5,8	Upravuje se 1N KOH.

Tabulka 3:

MSK médium (upraveno dle MURASHIGE a SKOOG, 1962)				
Složky média	mg.l⁻¹ kult. média	Zásobní roztok		Postup
NH ₄ NO ₃	1650	16,5	g	Roztok A Jednotlivé chemikálie navažovat, rozpouštět v malém množství vody a slévat do litrové odměrné baňky.
KNO ₃	1900	19,0	g	
CaCl ₂ .2H ₂ O	440	440	g	
MgSO ₄ .7H ₂ O	370	3,7	g	
KH ₂ PO ₄	170	1,7	g	
H ₃ BO ₃	6,2	62	g	
MnSO ₄ .4H ₂ O	22,3	223	g	
ZnSO ₄ .7H ₂ O	8,6	86	mg	
KI	0,83	83	mg	Jednotlivé chemikálie navažovat, rozpouštět v malém množství vody a slévat do 100ml odměrné baňky. Doplnit vodou do 100 ml, odebrat 10 ml a odebranou část nalít do litrové baňky s roztokem A. Doplnit vodou do 1000 ml a tím se získá zásobní roztok makro- a mikroprvků. Používá se 100 ml zásobního roztoku na 1 litr kultivačního média.
Na ₂ MoO ₄ .2H ₂ O	0,25	25	mg	
CoCl ₂ .6H ₂ O	0,025	2,5	mg	
CuSO ₄ .5H ₂ O	0,025	2,5	mg	
Na ₂ EDTA	37,3	7,45	g	Chemikálie rozpustit každou zvlášť, pak smíchat, doplnit do 1000 ml, zahřívát pomalu za stálého míchání, až je roztok tmavožlutý, opaleskující. Nevařit! Používá se 5 ml na 1 litr kultivačního média.
FeSO ₄ .7H ₂ O	27,8	5,57	g	
kyselina nikotinová	0,5	50	mg	Jednotlivé složky rozpouštíme ve vodě a sléváme do 100 ml baňky, doplníme do 100 ml vodou. Vznikne tak zásobní roztok vitamínů, ze kterého se používá 1 ml na 1 litr kultivačního média.
pyridoxin HCl	0,5	50	mg	
thiamin HCl	0,1	100	mg	
myo-Inositol	100	1	g	Rozpustit ve 100 ml vody, do kultivačního média používat 10 ml.
glycin	2	20	mg	Rozpustit ve 100 ml vody, do kultivačního média používat 10 ml.
sacharóza	30 000			Naváží se a přidá přímo do kultivačního média.
Agar Difco Bacto	8 000			Naváží se a dá se rozvařit do asi polovičního množství vody z celkového množství kultivačního média.
pH			5,8	Upravuje se 1N KOH.

12. SROVNÁNÍ NOVOSTI POSTUPŮ

Metoda odvození SK obecně u různých rostlinných druhů je již poměrně známá, nicméně výrazné mezidruhové i meziodrůdové rozdíly v citlivosti na kultivační podmínky vyžadují individuální řešení specifík kultivace pro daný rostlinný druh/genotyp. Tato metodika nabízí kultivační protokol pro plodinu s vysokým fytoimediačním potenciálem, jakou je konopí seté, pro niž efektivní a optimalizovaný protokol nebyl dosud v odborné literatuře publikován. Navíc je zde navrženo využití tohoto relativně rychlého, technicky nenáročného a citlivého systému pro testování vlivu arsenu a dalších těžkých kovů („biotest“).

13. POPIS UPLATNĚNÍ CERTIFIKOVANÉ METODIKY

Uplatnění metodiky přináší optimalizaci *in vitro* podmínek pro výzkum daného rostlinného druhu. Metodika je určena jak pro pracoviště, která se zabývají teoretickým studiem problematiky těžkých kovů či dalších rizikových prvků a jejich vlivem na rostliny, tak pro aplikovaný zemědělský i environmentální výzkum či pro výuku studentů v oboru biotechnologií, ekotoxikologie apod.

Při práci je nutno respektovat příslušné předpisy pro nakládání s toxickými látkami (pro nakládání s vysoce toxickými látkami a přípravky jsou dány ustanoveními zákona č. 258/2000 Sb., o ochraně veřejného zdraví a o změně některých souvisejících zákonů, ve znění pozdějších předpisů), což zahrnuje mj. zajištění bezpečnosti pracovníků při manipulaci s toxickými látkami (školení bezpečnosti práce, použití ochranných pomůcek) a také zajistit bezpečné uložení a likvidaci odpadního materiálu akreditovanou firmou.

14. EKONOMICKÉ ASPEKTY

Na zavedení postupů uvedených v metodice není třeba žádných zvláštních nákladů a vybavení, jedná se o využití klasických biotechnologických laboratorních postupů a materiálu. Ekonomický přínos pro uživatele spočívá v možnosti získání poměrně rozsáhlého množství informací a výsledků v relativně krátkém čase, konkrétně: 1) možnost rychlého a sezónně nezávislého otestování širokého spektra vybraného rostlinného materiálu, 2) exaktní zvolení selekční koncentrace daného prvku pro další experimentální účely, 3) možnost srovnávání účinku různých chemických forem téhož prvku (vliv speciace na toxicitu, biodostupnost případně akumulaci v rostlinné biomase), 4) urychlení řešení problematiky dekontaminace znečištěných substrátů prostřednictvím fytoimediací. Na základě výše uvedených bodů se eliminují náklady na hledání vhodného postupu.

15. SEZNAM POUŽITÉ SOUVISEJÍCÍ LITERATURY

Feeney M, Punja ZK. (2003). Tissue culture and *Agrobacterium*-mediated transformation of hemp (*Cannabis sativa* L.). In Vitro Cell. Dev. Biol. – Plant. 39: 578–585.

Knop W. (1965). Quantitative untersuchungen uber die Ernährungsprozesse der pflanzen. Landwirtsch Verso stn. 7:93.

Murashige T, Skoog F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays for Tobacco tissue cultures. Physiol Plant 115: 473–479.

16. SEZNAM PUBLIKACÍ, KTERÉ PŘEDCHÁZELY METODICE

Cvečková M, Vrbová M, Pavelková M, Větrovcová M, Smýkalová I, Griga M. Transgenic linseed (*Linum usitatissimum* L.) WITH alphaHMT1a: the effect on the accumulation of several metal elements. 11th International Phytotechnologies Conference 2014, Heraklion (Crete), Greece, Sept. 30. – Oct. 3. 2014, Book of abstr. Pg 155.

Cvečková M, Griga M. Testing arsenic (As) resistance and accumulation potential by in vitro system of hemp (*Cannabis sativa* ssp. *sativa* L.) for phytoremediation purposes. Poster presentation on NAROSSA – 19th International Conference for Renewable Resources and Plant Biotechnology. 16. – 17.6.2014 Poznań, Poland.

Cvečková M, Větrovcová M, Griga M. Impact of different selenium forms on accumulation potential by *in vitro* cultures of linseed (*Linum usitatissimum* L.) for biofortification purposes. Poster presentation on NAROSSA – 19th International Conference for Renewable Resources and Plant Biotechnology. 16. – 17.6.2014 Poznań, Poland.

Vrbová M, Kotrba P, Horáček J, Smýkal P, Švábová L, Větrovcová M, Smýkalová I, Griga M. (2013). Enhanced accumulation of cadmium in *Linum usitatissimum* L. plants due to overproduction of metallothionein α -domain as a fusion to β -glucuronidase protein. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 112: 321–330.

Hradilová J, Řehulka P, Řehulková H, Vrbová M, Griga M, Brzobohatý B. (2010). Comparative analysis of proteomic changes in contrasting flax cultivars upon cadmium exposure. Electrophoresis 31, 421–431.

Smýkalová I, Vrbová M, Tejklová E, Větrovcová M, Griga M. (2010). Large scale screening of heavy metal tolerance in flax/linseed (*Linum usitatissimum* L.) tested *in vitro*. Industr. Crops Prod. 32, 527–533.