

DATUM:

JMÉNO:

TÉMA: **SEKUNDÁRNÍ METABOLITY V KALUSOVÉ KULTUŘE *AJUGA SP.***

V kalusové kultuře *Ajuga sp.* se hromadí anthokyanové pigmenty (Callebaut *et al.*, 1997).

Akumulace pigmentů je často odpovědí na stresové kultivační podmínky. Úloha demonstruje vliv sacharidů v médiu na pigmentaci kalusových kultur.

MATERIÁL: Kalus *in vitro* kultury *Ajuga sp.*

MÉDIUM: **WPM** medium + 0,76 mg.l<sup>-1</sup> zeatin, 0,4 mg.l<sup>-1</sup> IAA, pH 5,7.

Čtyři varianty koncentrace sacharidů: 1-3-7 % sacharóza, 3% galaktóza.

#### POSTUP: **A. Příprava kalusů s rozdílnou koncentrací anthokyanů**

1. Přenes kultivační nádoby s kalusovou kulturou *Ajuga sp.* do sterilního laminárního boxu.
2. Příprav kultivační nádoby s čerstvým médiem a sterilní nástroje (pinzety, skalpely).
3. Ožehni hrdlo otevřené nádoby plamenem.
4. Přenes 4 x kalus (ø 2,5 cm) na síťku bioreaktoru RITA, opakuj pro všechny varianty kultivačního média.
5. Kultivuj kultury na světle v bioreaktorovém systému RITA při nastavených podmínkách (cool white, 50μmol.m<sup>-2</sup>.sec<sup>-1</sup>, fotoperioda 16/8hod) při 25°C po dobu dvou týdnů.

HODNOCENÍ:

V následujících týdnech sleduj změnu pigmentace kalusové kultury.

Po dvou týdnech zaznamenej čerstvou hmotnost a hmotnost sušiny kalusových kultur vypěstovaných v jednotlivých kultivačních variantách.

#### **B. Stanovení relativního obsahu anthokyanů v jednotlivých variantách**

1. Rozdrť 200 mg čerstvé kalusové hmoty každé varianty v třecí misce.
2. Extrahuj v 10 ml chladného acidifikovaného metanolu (1% HCl).
3. Přefiltruj extrakt a změř absorbanci filtrátu na spektrofotometru při 535 nm.
4. Porovnej rozdíly relativního obsahu anthokyanů u jednotlivých variant.

LITERATURA:

Callebaut A.N. *et al.*, 1997: Stability of anthocyanin composition in *Ajuga reptans* callus and cell cultures. - Plant Cell Tissue Organ Cult., 50:195-201.