

**Instrukcja do ćwiczeń**

**KULTURY  
TKANKOWE I KOMÓRKOWE  
ROŚLIN**

II rok Biotechnologia

---

imię i nazwisko studenta



# ĆWICZENIE 1

## Przygotowanie podłoża do hodowli kultur *in vitro*

### Informacje wstępne do zadań 1A i B

Skład roztworów wyjściowych do pożywki MS (wg Murashige i Skooga, 1962)

Makroelementy	g·dm <sup>-3</sup>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	16,5
KNO <sub>3</sub>	19,0
MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	3,7
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,7

Wapń	g·dm <sup>-3</sup>
CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O	4,4

Mikroelementy	mg·dm <sup>-3</sup>
MnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O	4460,0
KJ	166,0
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	1720,0
CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	5,0
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	5,0
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	1240,0
Na <sub>2</sub> MO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	50,0

Fe EDTA	g·dm <sup>-3</sup>
FeSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	5,560
Na <sub>2</sub> EDTA x 2H <sub>2</sub> O	7,472

Witaminy	mg·dm <sup>-3</sup>
Kwas nikotynowy	100,0
Pirydoksyna HCl	100,0
Tiamina HCl	20,0
Glicyna	400,0
Inozytol	20.000,0

**Uwaga!**

Roztwór wyjściowy makroelementów jest 10x stężony.

Roztwory wyjściowe: mikroelementy, Fe EDTA, witaminy i wapń 200x stężone.

Skład roztworów wyjściowych do pożywki R (dla roślin mięszożernych)

A	mg·dm <sup>-3</sup>
Fe EDTA	4006,8
H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	628
MnSO <sub>4</sub> x 4H <sub>2</sub> O	2412
ZnSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O	84
KJ	8

B	mg·dm <sup>-3</sup>
CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	28
CuSO <sub>4</sub> x 5H <sub>2</sub> O	24
Na <sub>2</sub> MO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O	240

C	g·dm <sup>-3</sup>
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	16,5
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1,7
KNO <sub>3</sub>	19,0

D	g·dm <sup>-3</sup>
CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O	5392
KJ	166,0
ZnSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	1720,0
CoCl <sub>2</sub> x6H <sub>2</sub> O	5,0

D'	mg·dm <sup>-3</sup>
MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	7400

E	mg·dm <sup>-3</sup>
Kwas nikotynowy	50
Pirydoksyna HCl	50
Tiamina HCl	1000
Glicyna	200
Inozytol	10000

**Uwaga!**

Roztwory wyjściowe są: A- 333,3x stężony, B- 3333,3x stężony, C- 33,3x stężony, D- 60,6x stężony, D'- 60,6x stężony, E- 100x stężony.

Pożywki stosowane na zajęciach z roślinnych kultur *in vitro*

Rodzaj oraz symbol pożywki	Skład hormonów	Zastosowanie
MSO	bez regulatorów wzrostu	Kiełkowanie nasion, kultury wierzchołkowe pędów
MS <sub>NAA</sub>	NAA [0,1 mg·dm <sup>-3</sup> ]	Ukorzenianie pędów po mikronamnarzaniu
MS <sub>BAP</sub>	BAP [5 mg·dm <sup>-3</sup> ] oraz NAA [1 mg·dm <sup>-3</sup> ]	Indukcja kalusa ( <i>Pharbitis nil</i> )
MS (G)	BAP [5 mg·dm <sup>-3</sup> ] oraz NAA [0,1 mg·dm <sup>-3</sup> ] uzupełniona 3% sterylną glukozą	Rozwój pąków kwiatowych ( <i>Pharbitis nil</i> )
MS (F)	BAP [5 mg·dm <sup>-3</sup> ] oraz NAA [0,1 mg·dm <sup>-3</sup> ] uzupełniona 3% sterylną fruktozą	Rozwój pąków kwiatowych ( <i>Pharbitis nil</i> )
MS (S)	BAP [5 mg·dm <sup>-3</sup> ] oraz NAA [0,1 mg·dm <sup>-3</sup> ] i uzupełniona 3% sterylną sacharozą	Rozwój pąków kwiatowych ( <i>Pharbitis nil</i> )
MS <sub>Kin 0,3</sub>	kinetyna [0,3 mg·dm <sup>-3</sup> ] i NAA [0,1 mg·dm <sup>-3</sup> ]	Organogeneza pędów ( <i>Nicotiana tabacum</i> )
MS <sub>Kin 0,1</sub>	kinetyna [0,1 mg·dm <sup>-3</sup> ] i NAA [0,5 mg·dm <sup>-3</sup> ]	Organogeneza korzeni ( <i>Nicotiana tabacum</i> )
MS <sub>2,4D</sub>	2,4D [0,125 mg·dm <sup>-3</sup> ]	Somatyczna embriogeneza ( <i>Nicotiana tabacum</i> )
F	BAP [2 mg·dm <sup>-3</sup> ]	Mikropropagacja ( <i>Petunia hybrida</i> )
P	BAP [0,3 mg·dm <sup>-3</sup> ] i IAA [1 mg·dm <sup>-3</sup> ]	Mikropropagacja ( <i>Ficus elastica</i> )
G	Kinetyna [2 mg·dm <sup>-3</sup> ] i IAA [0,1 mg·dm <sup>-3</sup> ]	Mikropropagacja ( <i>Gerbera jasmoni</i> )
R	bez regulatorów wzrostu	Mikropropagacja ( <i>Drosera rotundifolia</i> )

ZADANIE 1A

**Przygotowanie pożywki MS (wg Murashige i Skooga, 1962)**

**Procedura na 1 dm<sup>3</sup>**

- |   |   |                      |
|---|---|----------------------|
| 1) Do butelki Schotta wlać niewielką ilość wody bidestylowanej. | → | <b>Makroelementy</b> |
| 2) Dodać odpowiednią naważkę sacharozy (stężenie końcowe 3%).   |   | <b>100 ml</b>        |
| 3) Dodać odpowiednie objętości roztworów wyjściowych.           |   |                      |
| 4) Wszystkie składniki dobrze wymieszać.                        |   | <b>Mikroelementy</b> |
| 5) Dodać odpowiednie ilości regulatorów wzrostu.                |   | <b>Fe EDTA</b>       |
| 6) Uzpełnić wodą bidestylowaną do 1000 ml.                      |   | <b>Wapń</b>          |
| 7) Doprowadź pH uzyskanej mieszaniny do 5,7.                    |   | <b>Witaminy</b>      |
| 8) Dodać odpowiednią naważkę agaru (stężenie końcowe 0,6%).     |   | <b>5 ml</b>          |
|   |   | <b>5 ml</b>          |
|   |   | <b>5 ml</b>          |
|   |   | <b>5 ml</b>          |

- 9) Pożywkę ogrzać do rozpuszczenia agaru (mikrofalówka). **UWAGA! Pozostaw rozszczelnioną butelkę.**
- 10) Rozlać do odpowiednich naczyń (próbówki lub kolbki, zawinąć folią aluminiową i pisakiem napisać symbol pożywki). **UWAGA! Pożywki przeznaczone do rozlania na szalki pozostaw w butelkach.**
- 11) Pożywkę wyjałowić przez autoklawowanie w temperaturze 121°C przez 20 minut.

Po uważnym przeczytaniu powyższej procedury wykonaj obliczenia i wpisz do tabelki, zamieszczonej poniżej, ilości potrzebnych składników do przygotowania 2 pożywek wskazanych przez prowadzącego. Następnie przygotuj te pożywki i rozlej do wskazanych przez prowadzącego naczyń.

**Wykonaj obliczenia:**

Składniki	Jednostka	Symbol pożywki	
Makroelementy	ml		
Mikroelementy	ml		
Fe EDTA	ml		
CaCl <sub>2</sub>	ml		
Witaminy	ml		
Źródło węgla: ..... (podaj rodzaj)	g/ml		
Agar	g		
Regulatory wzrostu	Kinetyna	µl	
	BAP	µl	
	NAA	µl	
	IAA	µl	
	2,4D	µl	
Objętość końcowa	ml		

## Regulatory wzrostu

	<b>Substancja</b>	<b>Rozpuszczalnik</b>	<b>Masa molowa</b>
auksyny	2,4-D – kwas dwuchlorofenoksyoctowy	50% EtOH lub 1 N KOH	221,0 g/mol
	NAA – kwas 3-naftylooctowy	1 N KOH	186,2 g/mol
	IAA – kwas 3-indoliloctowy	1 N KOH	175,2 g/mol
	IBA - kwas 3-indolilobutyrylowy	1 N KOH	203,2 g/mol
cytokininy	Zea – zeatyna	1 N HCL	219,2 g/mol
	Kin - kinetyna	1 N HCL	215,2 g/mol
	BAP – 6-benzyloaminopuryna	1 N HCL	225,3 g/mol
	2iP – 2-izopentyloadenina	1 N HCL	203,3 g/mol
gibereliny	GA <sub>3</sub> – kwas giberelinowy	50% EtOH	346,4 g/mol

### ZADANIE 2

#### Przygotowanie roztworów wyjściowych regulatorów wzrostu

Po analizie informacji wstępnych opisz dokładnie jak przygotujesz roztwór wyjściowy regulatora wzrostu, którego użyjesz aby przygotować pożywkę na zajęciach (podaj wielkość naważki, określ rodzaj naczynia laboratoryjnego jakiego użyjesz aby przygotować roztwór, w czym rozpuścisz związek oraz objętość rozpuszczalnika). Przygotuj 10 ml roztworu określonego regulatora wzrostu (podanego przez prowadzącego) o stężeniach: A -1mg/ml oraz B - 10 mmol/ml

### ZADANIE 3

#### Przygotowanie sterylnego roztworu sacharozy, fruktozy lub glukozy przy użyciu filtra mikrobiologicznego

1. Przygotuj 25ml 12% roztworu sacharozy/fruktozy/ glukozy)\*.

**Wykonaj obliczenia:**

2. Przygotuj zestaw do filtrowania (strzykawka, filtr mikrobiologiczny jednorazowego lub wielokrotnego użytku) oraz sterylną butelkę 100 ml.
  3. Filtrowania dokonaj pod komorą laminarną.
- )\* - skreśl niepotrzebne

### ZADANIE 4

#### Przygotowanie pożywki MS ze składnikiem rozkładającym się w autoklawie

W przypadku pożywki z zastosowaniem glukozy lub fruktozy jako źródła węgla roztwór tych związków powinien być dodany po autoklawowaniu, gdyż rozkładają się one pod wpływem wysokiej temperatury. Dlatego przy ustalaniu objętości końcowej przygotowywanej pożywki należy to uwzględnić i rozpuścić wszystkie składniki w mniejszej ilości roztworu. Dodatkowo do pożywki można także dodać sterylnie przygotowanych roztworów regulatorów wzrostu.

**Wykonaj obliczenia:** Ile ml 12% glukozy lub fruktozy należy dodać do wcześniej przygotowanej pożywki aby stężenie końcowe wynosiło 3% a objętość końcowa pożywki wynosiła 100 ml. Dodatkowo podaj w ilu ml należy rozpuścić poszczególne składniki pożywki przed dodaniem tego cukru prostego.

### PRACA WŁASNA STUDENTA

**Wykonaj obliczenia:** Ile  $\mu\text{l}$  BAP i NAA (sterylnych roztworów) należy dodać do 100 ml pożywki aby stężenie końcowe wynosiło odpowiednio  $5\text{mg}/\text{dm}^{-3}$  i  $0,1\text{ mg}/\text{dm}^{-3}$  (stężenie wyjściowe wszystkich regulatorów wzrostu wynosi  $1\text{mg}/\text{ml}$ ).

**Wykonaj obliczenia:** Ile  $\mu\text{l}$  IAA i BAP (sterylnych roztworów) należy dodać do 500 ml pożywki aby stężenie w pożywce wynosiło odpowiednio  $10\text{ }\mu\text{M}$  i  $25\text{ }\mu\text{M}$ . Dane do obliczeń: stężenie wyjściowe wszystkich regulatorów wzrostu wynosi  $1\text{mg}/\text{ml}$ , masy molowe: IAA= $175,2\text{ g}/\text{mol}$ ; BAP= $225,3\text{g}/\text{mol}$

## ĆWICZENIE 2

### Sterylizacja różnorodnego materiału roślinnego (fragmentów roślin – korzeń, łodyga, pąki kwiatowe)

#### ZADANIE 1

##### Założenie kultury kalusa z korzenia marchwi (*Daucus carota*) lub łodygi tytoniu (*Nicotiana tabacum*)

##### Procedura

- 1) Korzeń marchwi lub łodygę tytoniu oczyść z ziemi i umyj detergentem.
- 2) Pokrój organy na 3-4 cm fragmenty i włóż do butelki Schotta.
- 3) Dokonaj wstępnej sterylizacji **70% alkoholem przez 30 s** (ciągle mieszając).
- 4) Następnie wysterylizuj materiał **20%** r-rem podchlorynu sodu (AChE) przez **30 min** (ciągle mieszając).
- 5) Co najmniej 4x dokładnie wypłucz materiał destylowaną, sterylną H<sub>2</sub>O, pracując w warunkach sterylnych (pod nawiewem).
- 6) Wyizoluj tkankę mięksiszową z rdzenia wysterylizowanych organów i przygotuj eksplantaty wielkości 0,5/0,5/0,5cm. (czynności te należy wykonać wykorzystując sterylne szalki, pensety i skalpele).
- 7) Fragmenty wyizolowanej tkanki mięksiszowej wyłóż do kolbek Erlenmajera, zawierających 100 ml pożywki do indukcji kalusa (MS<sub>Kin 0,3/NAA 0,1</sub>).
- 8) Hodowlę kalusa należy prowadzić **w ciemności**, w temperaturze 24°C przez 2-6 tygodni. Po upływie 2 tygodni dokonaj analizy stopnia sterylności oraz oceń ilość utworzonego kalusa.

**Wykonaj obliczenia:** Jaka objętość ACHE (roztwór wyjściowy jest 100%) i jaka objętość sterylnej wody należy pobrać aby przygotować 200 ml sterylizatora o stężeniu 20%. Wyniki zapisz w tabeli poniżej.

Stężenie sterylizatora	ACHE / Domestos [ml]	H <sub>2</sub> O [ml]	Objętość końcowa
20%			200 ml

##### Analiza wyników:

Efekt indukcji	korzeń marchwi - MS <sub>Kin 0,3/NAA0,1</sub>	łodyga tytoniu - MS <sub>Kin 0,3/NAA0,1</sub>
rozwój kalusa		
liczba niezainfekowanych eksplantatów/całkowitą liczbę eksplantatów		
% sterylności		

##### Wnioski:

#### ZADANIE 2

##### Sterylizacja pąków kwiatowych i założenie kultury pąków kwiatowych wilca kwiatowego (*Pharbitis nil*)

##### Przygotowania wstępne

- 1) Rozgrzej w mikrofalówce pożywkę MS (wcześniej przez Ciebie przygotowaną) tak aby agar uległ całkowitemu rozpuszczeniu.
- 2) Do schłodzonej do temperatury pokojowej pożywki dodaj odpowiednią objętość sterylnego roztworu fruktozy, glukozy lub sacharozy (patrz ćw. 1. zad.4A i B, stężenie wyjściowe 12%, stężenie końcowe 3%) oraz odpowiednią objętość sterylnych roztworów regulatorów wzrostu: BAP i NAA (stężenie wyjściowe 1mg/ml, stężenie końcowe odpowiednio 5mg/dm<sup>-3</sup> i 0,1 mg/dm<sup>-3</sup>. Objętość końcowa pożywki 100ml).
- 3) Następnie rozlej pożywki do sterylnych szalek Petriego o średnicy 5 cm (około 10 ml pożywki na szalkę), na które będą wykładane pąki kwiatowe.
- 4) Oznacz za pomocą pisaka na brzegu szalki odpowiedni wariant pożywek: MS<sub>BAP5/NAA0,1</sub> (F) (źródło węgla – fruktoza), MS<sub>BAP5/NAA0,1</sub> (G) (źródło węgla – glukoza) lub MS<sub>BAP5/NAA0,1</sub> (S) (źródło węgla – sacharoza). Pozostaw przykryte szalki na kilkanaście minut do zastygnięcia.

### Procedura sterylizacja materiału

- 1) Z 3-tygodniowych roślin *P. nil* hodowanych w warunkach *in vivo* odizolować wierzchołki wzrostu oraz fragmenty pędu, zawierające węzeł wraz z pękiem kwiatowym (liść usunąć pozostawiając 2-3 mm ogonek liściowy).
- 2) 20-30 wyizolowanych fragmentów pędu umieścić w butelce Schotta.
- 3) Dokonać wstępnej sterylizacji **70% etanolem przez 30s.**
- 4) Następnie sterylizować **15% r-rem ACHE** przez **20 min** (cały czas wytrząsając).
- 5) W warunkach sterylnych (pod nawiewem) usunąć sterylizator, wykorzystując sterylne sitko z gazy młyńskiej.
- 6) Materiał przepłukać 4-krotnie sterylną wodą destylowaną (500-600 ml).

**Wykonaj obliczenia:** Jaką objętość ACHE (roztwór wyjściowy jest 100%) i jaką objętość sterylnej wody należy pobrać aby przygotować 100 ml sterylizatora o stężeniu 15%. Wyniki zapisz w tabeli poniżej.

Stężenie sterylizatora	ACHE / Domestos [ml]	H <sub>2</sub> O [ml]	Objętość końcowa
15%			50 ml

### Procedura założenia kultury paków kwiatowych

- 1) Z wysterylizowanych fragmentów pędów należy wyizolować pąki kwiatowe (na sterylnej suchej szalce) i wyłożyć na szalki zawierające pożywki: MS<sub>BAP5/NAA0,1</sub> (S), MS<sub>BAP5/NAA0,1</sub> (F) oraz MS<sub>BAP5/NAA0,1</sub> (G) (około 15 sztuk na szalkę).
- 2) Szalki starannie owinąć parafilmem (odpowiednio go rozciągając, 1 pasek 1cm szerokości na 2 szalki), podpisać odpowiedni wariant i przenieść do komory hodowlanej (ciągle światło białe, 25°C).
- 3) Po 7-dniach hodowli oceń sterylność kultury a po 3 i 5 tygodniach określ stopień rozwoju paków kwiatowych i ilość kalusa w obu wariantach doświadczenia.

### Analiza wyników:

Efekt	Warianty pożywek		
	MS <sub>BAP5/NAA0,1</sub> (S)	MS <sub>BAP5/NAA0,1</sub> (F)	MS <sub>BAP5/NAA0,1</sub> (G)
liczba niezainfekowanych eksplantatów/ całkowitą liczbę eksplantatów			
% sterylności			
rozwój elementów kwiatów (dziątki kielicha, płatki korony)			
masa kalusa *)			
liczba eksplantatów z korzeniami / całkowitą liczbę eksplantatów			
% organogenezy korzeni			
liczba eksplantatów z pędami/ całkowitą liczbę eksplantatów			
% organogenezy pędów			

\*) porównaj ilość kalusa na poszczególnych wariantach pożywek i oceń używając następujących znaków („+”- niewielka ilość, „++” – intensywny rozwój, „+++” – najintensywniejszy rozwój)

### Wnioski:

## ĆWICZENIE 3

### Sterylizacja różnorodnego materiału roślinnego - nasion o różnej wielkości

#### ZADANIE 1

#### Wpływ stężenia sterylizatora na sterylność i siłę kiełkowania nasion *A. thaliana*

##### Przygotowania wstępne

- 1) Rozgrzej w mikrofalówce pożywkę: MSO, tak aby agar uległ całkowitemu rozpuszczeniu.
- 2) Następnie schłodzoną do temp. pokojowej pożywkę MSO rozlej do sterylnych szalek Petriego o średnicy 9 cm (około 20 ml pożywkę na szalkę) – do kiełkowania nasion *A. thaliana*. Czynność wykonuj w sterylnych warunkach - pod nawiewem.
- 3) Pozostaw przykryte szalki na kilkanaście minut do zastygnięcia.

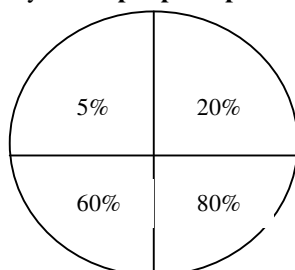
##### Procedura sterylizacji materiału

- 1) Przygotuj w 4 różnych probówkach typu Falcon roztwory podchlorynu sodu (ACHE lub Domestos) o stężeniach: **5%, 20%, 60% i 80%**.

**Wykonaj obliczenia:** Jaka objętość ACHE (roztwór wyjściowy jest 100%) i jaką objętość sterylnej wody należy pobrać aby przygotować 5 ml sterylizatora o wyżej wymienionych stężeniach. Wyniki zapisz w tabeli poniżej.

Stężenie sterylizatora	ACHE / Domestos [ml]	H <sub>2</sub> O [ml]	Objętość końcowa
5%			
20%			
60%			
80%			

- 2) Za pomocą pipety wlej 1 ml sterylizatora do odpowiednio oznakowanych probówek Eppendorfa z nasionami *A. thaliana* (do każdej probówki inne stężenie sterylizatora) i mieszając od czasu do czasu odczekaj **10 min. Pamiętaj odpowiednio oznacz probówki.**
- 3) Probówki Eppendorfa włóż do wirówki i odwiruj 30 sekund przy max. przyspieszeniu aby nasiona opadły na dno.
- 4) W warunkach sterylnych (pod nawiewem) usuń sterylizator za pomocą pipety i sterylnych tipsów. Czynność wykonaj ostrożnie aby nie pozbyć się nasion.
- 5) Dodaj 1 ml sterylnej wody do każdej probówki, kilkakrotnie zamieszaj, odwiruj (30 sekund, max. przyspieszenie), usuń za pomocą pipety roztwór. Czynność powtórz jeszcze 2-3 krotnie (wypłukiwanie sterylizatora). **Pamiętaj o zachowaniu aseptyczności.**
- 6) Wysterylizowane przez Ciebie nasiona *A. thaliana* należy sterylną wykałaczką nanieść na pożywkę w szalkach, według poniższego schematu (pamiętaj aby **szalki podpisać pisakiem na denku** a nie na wieczku szalki).



- 7) Szalki szczelnie owiń parafilmem i pozostaw w lodówce na 24h (stratyfikacja). Następnie przenieś szalki z nasionami do komory hodowlanej (ciągłe światło białe, 25°C) na około 7 dni.

## Analiza wyników:

Stężenie sterylizatora	Sterylność hodowli	Liczba skielkowanych nasion/ całkowitą liczbę nasion	% skielkowanych nasion	Morfologia siewek
5%				
20%				
60%				
80%				

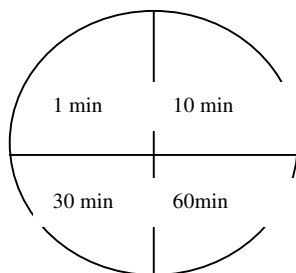
## Wnioski:

## ZADANIE 2

### Wpływ czasu sterylizacji na sterylność i siłę kiełkowania nasion *A. thaliana*

#### Procedura

- 1) Przygotuj w probówce typu Falcon r-r podchlorynu sodu (ACHE) o stężeniu **20%** (patrz zadanie 1).
- 2) Za pomocą pipety wlej 1 ml sterylizatora do 4 odpowiednio oznakowanych probówek Eppendorfa z nasionami *A. thaliana* i mieszając od czasu do czasu odczekaj: **60min** (1 probówka), **30 min** (2 probówka), **10 min** (3 probówka), **1 min** (4 probówka).
- 3) Probówki Eppendorfa włóż do wirówki i odwiruj 30 sekund przy max. przyspieszeniu aby nasiona opadły na dno.
- 4) W warunkach sterylnych (pod nawiewem) usuń sterylizator za pomocą pipety i sterylnych tipsów. Czynność wykonaj ostrożnie aby nie pozbyć się nasion.
- 5) Dodaj 1 ml sterylnej wody do każdej probówki, kilkakrotnie zamieszaj, odwiruj (30 sekund, max. przyspieszenie), usuń za pomocą pipety roztwór. Czynność powtórz jeszcze 2-3 krotnie (wyplukiwanie sterylizatora). **Pamiętaj o zachowaniu aseptyczności.**
- 6) Wysterylizowane przez Ciebie nasiona *A. thaliana* należy sterylną wykałaczką nanieść na pożywkę w szalkach, według schematu.



- 7) Szalki szczelnie owiń parafilmem i pozostaw w lodówce na 24h (stratyfikacja). Następnie przenieś do komory hodowlanej (ciągłe światło białe, 25°C) na około 7dni.

## Analiza wyników:

Czas sterylizacji 20% sterylizatorem	Sterylność hodowli	Liczba skielkowanych nasion/ całkowitą liczbę nasion	% skielkowanych nasion	Morfologia siewek
1 min				
10 min				
30 min				
60 min				

Wnioski:

### ZADANIE 3

#### Wpływ stężenia sterylizatora na sterylność i siłę kiełkowania nasion *Pharbitis nil*

##### Procedura

- 1) Około 10 nasion *P. nil* po uprzednim zeskaryfikowaniu skalpelem (należy uszkodzić łupinę nasienną po przeciwnym biegunie niż znaczek) wsyp do butelki Schotta.
- 2) Przygotuj w 3 różnych menzurkach roztwory podchlorynu sodu (ACHE) o stężeniach: **10%, 40%, 80%**.

**Wykonaj obliczenia:** Jaką objętość ACHE (roztwór wyjściowy jest 100%) i jaką objętość sterylnej wody należy pobrać aby przygotować 50 ml sterylizatora o wyżej wymienionych stężeniach. Wyniki zapisz w tabeli poniżej.

Stężenie sterylizatora	ACHE / Domestos [ml]	H <sub>2</sub> O [ml]	Objętość końcowa
10%			
40%			
80%			

- 3) Następnie nasiona wysterylizuj powierzchniowo **70% etanolem przez 30s**
- 4) Usuń alkohol i wlej 50 ml sterylizatora, dodając **1kroplę Tween 20**, mieszając od czasu do czasu odczekaj **20 min.**
- 5) W warunkach sterylnych (pod nawiewem) usuń sterylizator. Czynność wykonaj ostrożnie aby nie pozbyć się nasion.
- 6) Wypłucz sterylizator dodając sterylnej wody, wymieszaj, usuń - czynność powtórz 3-4 krotnie, aż do usunięcia piany. **Pamiętaj o zachowaniu aseptyczności.**
- 7) Nasiona w wodzie destylowanej pozostaw do spęcznienia na 24h w temperaturze 24°C.
- 8) Sterylne, spęczniałe nasiona należy sterylną pensetą przełożyć pojedynczo do probówek, zawierających 10 ml pożywki MSO. Następnie szczelnie zawiń folią aluminiową probówki i podpisz statyw (wariant doświadczenia). Przenieś do komory hodowlanej (ciągłe światło białe, 25°C) na około 7dni.

##### Analiza wyników:

Stężenie sterylizatora	Sterylność hodowli	Liczba siewkowanych nasion/ całkowitą liczbę nasion	% siewkowanych nasion	Morfologia siewek
10%				
40%				
80%				

Wnioski:

## ĆWICZENIE 4

### Analiza sterility nasion i ocena ich żywotności

### Zakładanie kultury kalusa z materiału pochodzącego z siewek

#### ZADANIE 1A

#### Zakładanie kultury kalusa z liścieni wilca (*Pharbitis nil*)

##### Przygotowanie wstępne

- 1) Rozgrzej w mikrofalówce pożywkę: MS<sub>BAP5/NAA0,1</sub> (przygotowaną na ćwiczeniach 1) do indukcji kalusa u wilca, tak aby agar uległ całkowitemu rozpuszczeniu.
- 2) Następnie schłodzoną do temp. pokojowej pożywkę rozlej do sterylnych szalek Petriego (około 10ml na szalkę) i poczekaj aż zastygnie. Oznacz za pomocą pisaka na brzegu szalki rodzaj pożywki.

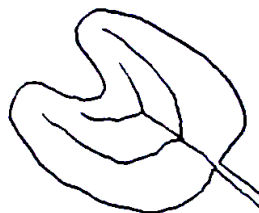
##### Procedura

- 1) Ze sterylnych 7-dniowych siewek *Pharbitis nil* odizolować liścienie.
- 2) Liścienie pociąć na sterylnej szalce:  
I wariant- na fragmenty o powierzchni 0,3-0,5 cm<sup>2</sup>  
II wariant – na pół wzdłuż nerwu głównego usuwając ten nerw

Zaznacz linią przerywaną miejsca cięcia skalpelem.



I wariant



II wariant

- 3) Eksplantaty wyłóż na pożywkę MS<sub>BAP5/NAA0,1</sub>
- 4) Szalki zawiń parafilmem.
- 5) Hodowlę kalusa prowadź na ciągłym świetle w temperaturze 24°C przez 2 tygodnie. Następnie dokonaj obserwacji: określ miejsce w którym następuje indukcja kalusa.

Wnioski:

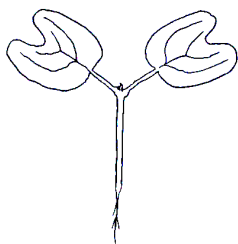
#### ZADANIE 1B

#### Zakładanie kultury kalusa z hypokotyla wilca (*Pharbitis nil*)

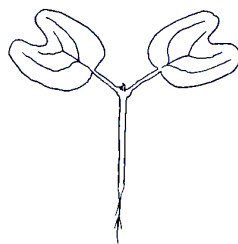
##### Procedura

- 1) Ze sterylnych 7-dniowych siewek *Pharbitis nil* odizolować fragment hypokotyla o długości 2-3 cm bezpośrednio pod węzłem liścieniowym.
- 2) Hypokotyl pociąć na sterylnej szalce:  
I wariant- na fragmenty o długości 8-10 mm  
II wariant – na fragmenty o długości 1 mm

Zaznacz linią przerywaną miejsca cięcia skalpelem hypokotyla siewki *Pharbitis nil*.



I wariant



II wariant

3) Eksplantaty wyłożyć na pożywki MS<sub>BAP5/NAA0,1</sub>

I wariant - horyzontalnie

II wariant - powierzchnią cięcia do pożywki (**Uwaga! Zachowaj naturalną biegunowość eksplantatu.**)

4) Szalki zawinąć parafilmem.

5) Hodowlę kalusa prowadzić na ciągłym świetle w temperaturze 24°C przez 2 tygodnie a następnie dokonać obserwacji:  
określ miejsce w którym następuje indukcja kalusa.

**Wnioski:**

## Ćwiczenie 5

### Zadanie 1.

#### Namnażanie kalusa pochodzącego z rdzenia korzenia marchwi i łądygi tytoniu.

Rośliny posiadają bardzo duże zdolności do regeneracji. Zgodnie z koncepcją totipotencji, każda komórka posiada zdolność różnicowania tkanek, organów a następnie całego organizmu. Metoda hodowli tkanek pozwala w pełni wykorzystać naturalny potencjał regeneracyjny, jakim cechuje się każdy organ roślinny.

Opracowano technikę, nazwaną później rozmnażaniem klonalnym lub mikrorozmnażaniem, dzięki której z pojedynczej rośliny matecznej można otrzymać dużą liczbę roślin potomnych o tych samych cechach.

Jest kilka metod rozmnażania klonalnego, m.in.

- różnicowanie pąków przybyszowych w hodowli tkanki kalusowej oraz
- rozwój pąków bocznych w hodowli fragmentów pędów.

#### Wykonanie

##### Zakładanie kultury.

Fragmety pędu młodej rośliny tytoniu lub korzenie marchwi wysterylizować powierzchniowo 70% etanolem przez 1-3 min. następnie 3-5 min. w podchlorynie Ca, po czym materiał przemyć 4x w sterylnej wodzie destylowanej.

Wyizolować rdzeń i przenieść sterylnie fragmenty tej tkanki do kolb zawierających 50 cm<sup>3</sup> pożywki MS z dodatkiem

- kinetyny (0,1 mg dm<sup>-3</sup>) i NAA (0,3 mg dm<sup>-3</sup>) lub
- 2,4-D (0,05 mg dm<sup>-3</sup>)

Inkubację eksplantaów prowadzić w ciemności, w temp. 27°C przy wilgotności względnej ok. 70% aż do wytworzenia kalusa. Namnażanie kalusa.

Po upływie ok. 4 tygodni, przenieść jasną tkankę kalusa na pożywkę MS z dodatkiem

- kinetyny (0,2 mg dm<sup>-3</sup>) i IAA (2 mg dm<sup>-3</sup>) lub
- 2,4-D (0,05 mg dm<sup>-3</sup>).

Inkubację prowadzić jak wyżej.

Po trzech tygodniach fragmenty kalusa przenieść na pożywkę MS zawierającą kinetynę i IAA w następujących stężeniach:

- kinetyna – 0,05; 0,5; 1,0; 3,0 mg dm<sup>-3</sup>
- IAA – 1,0; 2,0; 3,0 mg dm<sup>-3</sup>

Przeprowadzić obserwację wzrostu i organogenezy kalusa.

**Tabela 1. Kalus tytoniu inkubowany przy różnych stężeniach IAA i kinetyny.**

IAA mg dm <sup>-3</sup>	Kinetyna mg dm <sup>-3</sup>			
	0,05	0,5	1,0	3,0
1,0				
2,0				
3,0				

**Tabela 2. Kalus marchwi inkubowany przy różnych stężeniach IAA i kinetyny.**

IAA mg dm <sup>-3</sup>	Kinetyna mg dm <sup>-3</sup>			
	0,05	0,5	1,0	3,0
1,0				
2,0				
3,0				

Wnioski.

## **Zadanie2**

### **Regeneracja roślin *Pharbitis nil* z pąków, w zależności od ich lokalizacji na pędzie.**

#### Wykonanie

Nasiona *Pharbitis nil* poddać mechanicznej skaryfikacji i wysterylizować podchlorynem Ca. Po kilkakrotnym przepłukaniu w wodzie sterylnej, pozostawić je do spęcznienia w warunkach sterylnych, w wodzie, w temp. 27<sup>0</sup>C na 24 godziny.

Spęczniałe nasiona wysiać na pożywkę MS i umieścić w komorze hodowlanej, w temp. 27<sup>0</sup>C, przy nieindukcyjnym 16h fotoperiodzie

Część siewek poddać indukcji fotoperiodycznej, przez wystawienie ich na działanie 16 godzinnego okresu ciemności.

Po 3-4 tygodniach hodowli, gdy rośliny wytworzą kilka węzłów, pęd należy podzielić na fragmenty składające się z węzła oraz dolnej części międzywęzła.

Kolejne fragmenty umieścić w opisanych (numer kolejny węzła) probówkach, zawierających pożywkę MS bez dodatku substancji wzrostowych. Hodowlę prowadzić w komorze, w warunkach dnia długiego.

Po 3-4 tygodniach hodowli przeprowadzić obserwację zregenerowanych roślin, określając ich wzrost oraz zdolność do rozwoju generatywnego, w zależności od warunków hodowli oraz ułożenia eksplantatów na roślinie macierzystej.

#### Wyniki i wnioski.

## ĆWICZENIE 6

### Organogeneza pędów i korzeni oraz somatyczna embriogeneza u tytoniu (*Nicotiana tabacum*)

#### ZADANIE 1

##### Zakładanie kultury wierzchołków wzrostu tytoniu (*Nicotiana tabacum*)

###### Procedura

- 1) Ze sterylnej 12-tygodniowej kultury tytoniu odizolować wierzchołki pędu zawierające 1-2 liście i przepasażować na świeżą pożywkę MSO w magentach.
- 2) Dokonać analizy sterylności kultury i określić czas ukorzenia się pędów.

###### Wniosek:

#### ZADANIE 2

##### Wpływ światła na indukcję kalusa i somatyczną embriogenezę na fragmentach łodygi tytoniu (*Nicotiana tabacum*)

###### A. Wpływ warunków świetlnych na indukcję kalusa

###### Procedura

- 1) Ze sterylnej kultury tytoniu wyizolować fragmenty łodygi i na sterylnej szalce pociąć je na fragmenty o długości 2-3 mm
- 2) Eksplantaty po 3-4 wyłożyć na pożywki z 2,4-D
- 3) Hodowlę kalusa prowadzić w ciemności i na ciągłym świetle w temperaturze 24°C przez 4-6 tygodnie
- 4) Dokonać makroskopowej oceny ilości rozwijającego się kalusa („-” – brak, „+” – niewielka ilość, „++” – intensywny rozwój) i jego morfologii – obecność chlorofilu, spoistość (zbity lub luźny), brunatnienie tkanki).
- 5) Przy użyciu lupy binokularowej porównaj kalus hodowany na świetle i ciemności.

###### Analiza wyników:

Efekty	MS <sub>2,4D</sub>	
	światło	ciemność
Ilość kalusa		
Morfologia kalusa		

###### Wnioski:

###### B. Wpływ warunków świetlnych na somatyczną embriogenezę

###### Procedura

1. Dokonać analizy materiału pod kątem obecności zarodków somatycznych (wypełnij tabelę poniżej).
2. Przy użyciu lupy binokularowej porównaj kalus hodowany na świetle na pożywkach: MS<sub>2,4D</sub> i MS<sub>Kin0,1/NAA0,5</sub>.

###### Analiza wyników:

Efekty	MS <sub>2,4D</sub>	
	światło	ciemność
% eksplantatów wykazujących somatyczną embriogenezę		
średnia liczba zarodków na 1 eksplantat		

**Wnioski:**

### ZADANIE 3

#### **Wpływ stosunku cytokinin do auksyn w pożywce na indukcję kalusa i proces organogenezy na fragmentach liści tytoniu (*Nicotiana tabacum*)**

##### **Procedura**

- 1) Ze sterylnej kultury tytoniu odizolować pojedyncze liście i na sterylnej szalce pociąć je na fragmenty o powierzchni 0,3-0,5 cm<sup>2</sup>.
- 2) Eksplantaty po 4-5 wyłożyć na pożywki do indukcji kalusa MS<sub>Kin0,1/NAA0,5</sub> i MS<sub>Kin0,3/NAA0,1</sub>.
- 3) Hodowlę kalusa prowadzić na ciągłym świetle w temperaturze 24°C przez 4 tygodnie a następnie dokonać analizy doświadczenia.

##### **Analiza wyników:**

Rodzaj pożywki	Typ regeneracji			
	organogeneza pędów		organogeneza korzeni	
	% eksplantatów z pędami	średnia liczba pędów na 1 eksplant	% eksplantatów z korzeniami	średnia liczba korzeni na 1 eksplantat
MS Kin 0,1/NAA 0,5				
MS Kin 0,3/NAA 0,1				

**Wnioski:**

## ĆWICZENIE 7

### Techniki klonowania i mikropropagacji roślin - uzyskiwanie materiału genetycznie jednorodnego. Zmienność somaklonalna

#### ZADANIE 1

#### Klonowanie roślin

#### A. Klonowanie roślin o łodygach wzniesionych - fikusa (*Ficus beniamina*) lub petuni (*Petunia hybrida*)

Narysuj schematy: rośliny macierzystej wykorzystanej do klonowania (A) oraz eksplantat wykładany na pożywkę (B)

A

B

### Wpływ cytokinin

#### Przygotowania wstępne

- 1) Pobrać rośliny ze sterylnej kultury.
- 2) Wyizolować fragmenty pędów zawierające 1-2 węzły liściowe.
- 3) Umieścić eksplantaty, zachowując biegunowość, w kolbach Erlenmajera lub meagentach, zawierających pożywki F (fikus) lub P (petunia) umożliwiające mikropropagację tych roślin.
- 4) Po 6-8 tygodniach hodowli dokonaj analizy materiału roślinnego.

#### Analiza wyników:

<b>Efekty</b>	<b>Gatunek rośliny</b> .....
<b>obecność kalusa</b>	
<b>obecność korzeni</b>	
<b>średnia liczba pędów przybyszowych/eksplantat</b>	

#### Wnioski:

### Wpływ auksyn

#### Procedura

- 1) Pobrać rośliny ze sterylnej 6-8 tygodniowej kultury (materiał analizowany powyżej).
- 2) Wyizolować fragmenty pędów zawierające 1-2 węzły liściowe.
- 3) Umieścić eksplantaty w kolbach Erlenmajera lub meagentach, zawierających pożywki ukorzeniające (z auksyną), zachowując biegunowość.
- 4) Po 4 tygodniach hodowli dokonaj analizy materiału roślinnego.

**Analiza wyników:**

<b>Efekty</b>	<b>Gatunek rośliny</b> .....
<b>% ukorzenionych eksplantatów</b>	
<b>analiza rozwoju pędu (średnia liczba nowo utworzonych węzłów i liści)</b>	

**Wnioski:****B. Klonowanie roślin rozetowych - rosiczki (*Drosera rotundifolia*) lub gerbery (*Gerbera jamesonii*)**

- 1) Pobrać rozetki potomne ze sterylnej 12-tygodniowej kultury.
- 2) Odizolować pojedyncze rozetki z kultury macierzystej.
- 3) Umieścić rozetki w kolbach Erlenmajera lub słoikach na pożywce R (rosiczka) lub G (gerbera) zachowując biegunowość.
- 4) Dokonać obliczenia wskaźnika namnażania po 2, 4 i 8 tygodniach kultury oraz określić warunki i czas ukorzeniania.

**Analiza wyników:**

<b>Efekty</b>	<b>Czas w tygodniach</b>		
	<b>2</b>	<b>4</b>	<b>8</b>
<b>wskaźnik namnażania (średnia ilość rozet potomnych bez rozety macierzystej)</b>			
<b>% ukorzenionych eksplantatów</b>			

**Wnioski:**

## ZADANIE 2

### Zmienność somaklonalna

#### Ocena parametrów morfologicznych liści w kulturze *in vitro* i *in vivo* dziewięćciła bezłodygowego (*Carlina acaulis*)

Po analizie pędów przybyszowych uzyskanych w kulturze *in vitro* i *in vivo* (patrz kolorowe plansze) oceń zmienność następujących parameteów:

- kształt liści
- ilość włosków kutnerowych.

Wyniki umieść w tabeli.

**Analiza wyników:**

Parametry	<i>Carlina acaulis</i> w kulturze <i>in vitro</i>	<i>Carlina acaulis</i> w kulturze <i>in vivo</i>
Kształt liści		
Obecność włosków		

**Wnioski:**

## ZADANIE 3

### Zmienność somaklonalna

Zanalizuj fotografie A, B, C, D (patrz kolorowe plansze) przedstawiające komórki kalusa w trakcie podziału i wpisz do tabeli jakie zaobserwowałeś anomalie.

**Analiza wyników:**

Nr fotografii	Wynik obserwacji
A	
B	
C	
D	

**Wnioski:**

## ĆWICZENIE 8

### Kultury korzeniowe pomidora (*Lycopersicon esculentum*)

#### ZADANIE 1

##### Przygotowanie podłoża do hodowli wierzchołków korzeni

10 ml płynnej pożywki MS przelać sterylnie do sterylnej probówki typu Falcon. Do odmierzonej objętości podłoża dodać sterylnego roztworu glutationu (GSH) o stężeniu 0,06 M tak aby otrzymać w pożywce:

- a) 1mM
- b) 0,5 mM
- c) 0,25 mM stężenie tej substancji.

Następnie pożywkę rozlać do szalek Petriego o średnicy 5 cm. Do czwartej szalki dodać 10 ml MS – próba kontrolna, bez GSH.

**Przedstaw obliczenia.**

#### ZADANIE 2

##### Założenie hodowli wierzchołków korzeni pomidora (*Lycopersicon esculentum*)

Kiełkujące nasiona pomidora (*Lycopersicon esculentum*) przenieść na szalkę Petriego (na szalce powinna znajdować się niewielka ilość pożywki MS w celu zapobieżenia wysychaniu korzeni). Końcowy fragment korzenia głównego o długości 1 cm odciąć i przenieść do szalki z odpowiednim wariantem pożywki posługując się sterylnym skalpelem i pęsetą. Szalkę zaparafilmować, zawinąć folią. Hodowlę prowadzić w ciemności w temperaturze 25 °C.

##### Analiza wyników:

	Kontrola	0,25 mM GSH	0,5 mM GSH	1 mM GSH
Długość korzenia głównego				
Długość korzeni bocznych				
Liczba korzeni bocznych				

##### Wnioski:

## ĆWICZENIE 9

### Zawiesina komórkowa tytoniu (*Nicotiana tabaccum*)

#### ZADANIE 1

##### Założenie kultury zawiesinowej tytoniu (*Nicotiana tabaccum*)

Porcję tkanki kalusowej tytoniu przenieść za pomocą sterylnej pęsety na sterylną szalkę Petriego. 3-5 g tkanki umieścić w kolbie o pojemności 300 ml (zawierającej 100 ml pożywki do hodowli zawiesiny). Do założenia kultury wykorzystać tylko żywą (zieloną lub jasną) tkankę kalusową.

#### ZADANIE 2

##### Pasaż kultury zawiesinowej

W warunkach sterylnych przelać 50 ml kultury zawiesinowej tytoniu do sterylnej probówki typu Falcon o poj. 50 ml. Zawartość probówki przelać sterylnie do kolby o pojemności 300 ml, zawierającej 250 ml pożywki do hodowli zawiesiny. Po zakorkowaniu kolbę ustawić na wytrząsarce. Hodowlę utrzymywać w 25C° w warunkach stałego wytrząsania (150 rpm).

**Uwaga! Aby uniknąć sedimentacji komórek w kolbie należy ją od czasu do czasu delikatnie zamieszać!**

#### ZADANIE 3

##### Ocena gęstości zawiesiny

W warunkach sterylnych otworzyć kolbę z zawiesiną, delikatnie zamieszać. Sterylnie pobrać próbkę zawiesiny o objętości 500  $\mu$ l. Do pobrania zawiesiny należy użyć sterylnych końcówek do pipety o pojemności 1 ml z obciążonym końcem. Pobraną próbkę umieścić w probówce typu eppendorf. Próbkę w razie potrzeby rozcieńczyć i umieścić w komorze Thoma. Zliczyć komórki z 10 pól. Uśrednić wyniki. Obliczyć gęstość zawiesiny i wyrazić ją jako liczbę komórek/cm<sup>3</sup> pożywki, wiedząc, że jedno pole w komorze Thoma odpowiada 4 mm<sup>3</sup>. Na podstawie uzyskanych wyników obliczyć objętość inokulum, które zapewni minimalną efektywną gęstość przepasażowanej zawiesiny.

**Przedstaw obliczenia i ich wyniki.**

## ĆWICZENIE 10

### Aklimatyzacja regenerantów do warunków kultury *in vivo*

#### ZADANIE 1

#### Aklimatyzacja regenerantów do warunków kultury *in vivo*.

##### Procedura:

- 1 Dobrze ukorzenione regeneranty (uzyskane w ćwiczeniu 8, zadanie 1) wyjąć z kultury i starannie, ale bardzo delikatnie usunąć pożywkę z korzeni (opłukać w wodzie sterylnej, starając się nie uszkodzić korzeni)
- 2 Rośliny przenieść do doniczek wypełnionych sterylnym podłożem: wermikulit:piasek w proporcjach 1:1 i kloszować przez 4-5 dni (hodowlę prowadzić w komorze hodowlanej o fotoperiodzie 16 godzin światła i 8 godzin ciemności)
- 3 Rośliny kloszować, a następnie hartować przez usunięcie klosza przez kolejnych kilka dni według schematu:

Dni hodowli	Czas hartowania
6	30 min.
7	1 godz.
8	2 godz.
9	3 godz.
10	4 godz.
11	6 godz.
12	8 godz (NOC)

**Uwaga! Każdy ze studentów zobowiązany jest do uczestniczenia w procesie hartowania. Harmonogram zostanie ustalony na ćwiczeniach.**

- 4 Rośliny podlewać przez 4 dni wodą sterylną, a następnie pożywką Knoppa przez kolejnych 7 dni.
- 5 Przesadzić do ziemi ogrodniczej po 7 dniach od zakończenia procesu hartowania.
- 6 Zahartowane rośliny przenieść do szklarni (zaindukować, jeżeli wymagają indukcji fotoperiodycznej do zaindukowania kwitnienia). Hodowlę prowadzić do momentu wydania nasion.

Przenieść zgodnie z procedurą powyżej regeneranty z kultury *in vitro* do warunków *in vivo* następujących gatunków roślin wskazanych przez prowadzącego: tytoń (*Nicotiana tabaccum*), szarotka alpejska (*Leontopodium alpinum*), petunia (*Petunia hybrida*), fikus (*Ficus beniamina*), dziewięćcił bezłodygowy (*Carlina acaulis*).

##### Analiza wyników:

Podaj procent zaaklimatyzowanych regenerantów poszczególnych gatunków roślin.

##### Wnioski: