

ĆWICZENIE 1

Przygotowanie podłoża, szkła hodowlanego i narzędzi do hodowli kultur *in vitro*

I. Przygotowanie roztworów wyjściowe do pożywki MS.

Skład pożywki MS (wg Murashige i Skooga, 1962) stosowanej w kulturach *in vitro* (mg/l):

Makroelementy:

KNO_3 – 1900

KH_2PO_4 – 170

NH_4NO_3 – 1650

$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 370

$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 440

Mikroelementy:

H_3BO_3 – 6,2

$\text{MnSO}_4 \times 4\text{H}_2\text{O}$ – 22,3

$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$ – 0,025

$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$ – 0,025

$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$ – 8,6

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 0,25

KJ – 0,83

Fe-EDTA – 27,8

$\text{Na}_2\text{EDTA} \times 2\text{H}_2\text{O}$ – 37,3

Związki organiczne:

Mezo-inozytol – 100

Sacharoza – 30 000

Glicyna – 2

Witaminy:

Tiamina – 0,1

Pirydoksyna – 0,5

Kwas nikotynowy – 0,5

Agar – 1,5%

pH – 5,8

Regulatory wzrostu stosowane na zajęciach:

Auksyny:

IAA – kwas 3-indoliloctowy

Cytokininy:

BAP – 6-benzyloaminopuryna

A. Przygotowanie 100 ml pożywki MS:

1. Do kolby stożkowej (kolba Erlenmeyera) dodać odpowiednią objętość roztworów wyjściowych mikro i makroelementów (po 1 ml), żelaza (1 ml) oraz witamin (po 0,1 ml) – patrz opis na butelce/probówce.
2. Naważyć i dodać odpowiednią ilość sacharozy
3. Dopełnić wodą redestylowaną do 100 ml.
4. Dobrze wymieszać i ustalić pH pożywki do wartości 5,8.
5. Dodać agar (końcowe stężenie 1,5%).
6. Pożywkę ogrzać do rozpuszczenia agaru (wrząca łaźnia wodna); zabezpieczyć kolbę folią aluminiową przed nadmiernym parowaniem.
7. Rozlać pożywkę do słoików i kolbek, dodać odpowiednie ilości roztworów regulatorów wzrostu, opisać rodzaje pożywki.

B. Do naczyń hodowlanych rozlać po 20 ml pożywki/naczynie.

C. Pozostałą część pożywki rozlać po probówek o obj. 10 ml – po około 2 -2.5 ml/probówkę. Probówki zamknąć korkami wykonanymi z ligniny i gazy.

Pożywkę wyjałowić przez autoklawowanie parą wodną pod ciśnieniem 1 atm, w temperaturze 121°C przez 30 minut.

D. Przygotować po 5 ml wyjściowych roztworów regulatorów wzrostu IAA i BAP o stężeniu 1 mg/ml.

IAA rozpuścić w 0,5 ml 96% etanolu, dodawać kroplami wodę redestylowaną do 5 ml. Rozlać po 1 ml do probówek Eppendorfa. Przechowywać w – 20°C.

BAP rozpuścić w 1 ml 1 M HCl a następnie uzupełnić do 5 ml. Rozlać po 1 ml do probówek Eppendorfa. Przechowywać w – 20°C.