02.03.2018

Temat ustalono na:

Badanie nad mikrorozmnażaniem gatunków ginących na przykładzie Śnieżycy karpackiej oraz Szachownicy kostkowatej.

Pobrane zostaną:

- dla Leucojum vernum var. carpaticum

* Łuski (zewnętrzne, wewnętrzne)
* Liście po około 0,5 cm
* Merystem wierzchołkowy
* Piętka

- dla Fritillaria melaegris

* Łuski (zewnętrzne, wewnętrzne) lub tkanka zapasonośna?
* Liście po około 0,5 cm
* Merystem wierzchołkowy
* Piętka
* Nasiona - hypokotyle

Co do pożywek to wykonane zostaną badania na pożywce dla śnieżycy wiosennej oraz na pożywce dla szachownicy kostkowatej.

1. Przygotowanie pożywki dla Leucojum vernum var. carpaticum

MS + 3% sacharoza = 30g

250 mg hydrolizat kazeiny

250 mg Lprolina

1 mg TDZ – to zostanie dodane przez prowadzaca po autoklawowaniu

Agar 6,5 g

pH = 6,0

1. Najpierw odmierzyć 600 ml wody destylowanej do zlewki 1l
2. Wode umieszczono na mieszadle magnetycznym
3. Odmierzono 6,5 g agaru? Jakoś 4,405g ?
4. Dalej 250 mg kazeiny odmierzono na dokładniejszej wadze i dodano do zlewki
5. Dalej 250 mg LProiliny na dokładniejszej wadze i do zlewki
6. Dalej odmierzono 30 g sacharozy na mniej dokładnej wadze i dodano do zlewki na mieszadle
7. Zmierozno Ph phmetrem, ph ziwekszano za pomocą roztowru NaOH oraz HCL o stężeniach ?
8. Ph pożywki ustalono na 6,0
9. Przelano do kolby miarowej 1l, dopełniono wodą destylowaną do 1l
10. Umieszczono w dwóch zlewkach po 0,5l.
11. Umieszczono w autoklawie
12. Wysiew nasion *Fritillaria meleagris L.* – nasiona z handlu
13. Płukanie nasion – prowadzącą wykonała w czasie przygotowania pożywki
    1. Nasiona umieszczono w zaparzaczu do herbaty
    2. 1 min w 70% etanolu
    3. 30 min w roztworze fungicydu ( 1ml fungicydu na 200 ml wody destylowanej) na wytrząsarce
    4. Odlewamy fungicyd
    5. 30 min w 20% roztworze chloraminy plus kropla Tween

Dalej pod komorą z laminarnym przepływem sterylnego powietrza:

1. 3 krotnie płukanie nasion w wodzie destylowanej – jeden cykl 5 min, później wymiana wody
2. Dalej nasiona umieszczono na dużej szalce petriego na dwóch bibułach w celu osuszenia
3. Nasiono umieszczono w szlakach z pożywką do wysiewu nasion MS (standardowe szlaki petriego)
4. Nasiona umieszczono w fitotronie, 2 szalki w ciemnym miejscu (szafa), dwie szalki w jasnym. Temepratura 21 stopnie cejslusza.

Pożywka do wysiewu nasion:

MS czysta:

pH 5,7-5,8

30 g cukru (sacharoza)

Standardowa pożywka do wysiewu nasion

Do zrobienia:

1. Zebrać po 10 sztuk pąków obu gatunków
2. Zweryfikować czy samopylne czy obcopylne

Sniezyca karpacka jest obcopylna (termin kwitnienia marzec-kwiecień), zapylana przesz pszczoły (marzec pierwszy oblot). Szachownica kostkowata kwitnie kwiecień - maj, zapylana głównie przez trzmiele.

1. Warunki kiełkowania dla nasion szachownicy kostkowatej

Nasiona szachownicy kostowatej muszę przejść stratyfikacje - zimną. Doświadczenie <link> wykazało że nasiona w warunkach braku wilgotności bądź zbyt wysokiej temperratury nie kiełkują. Warunkami w których w doświadczeniu udało się uzyskać wysokiu współczynnik kiełkowania były wysoka wilgotność oraz temperatura około 8-10 stopni celsjusza. W temperaturze około 20 stopni przy wysokiej wilgoptności kiełkowanie nie udawało się. W fitotronie na uczelni temperatura - 21 stopnie celsjusza, za ciepło! Stratyfikacja trwała 40 dni!

09.03.2018

Przygotowano ekslpantaty z 3 cebul sniezycy karpackiej. Dla kazdej z cebul pryzgootwano po dwie szalki na eskplantat.

Przed wykonaniem rośliny usunięto z podłoża, wymyto pod bieżąca woda, na koniec przemyto płynem do mycia naczyń. Usunięto zewnętrzne suche łuski, korzenie przybuszowe oraz uszkodzone fragmenty liści z rośliny. Pędy kwiatostanowe (jak nazywaja sie u jendoliściennych??) usunięto. Liście oddzielono od cebul. Liście oraz cebule trafiły do dwóch rożnych zlewek (500 ml) w których przeprowadzono odkażanie. Przeprowadzono odkażanie według następującej procedury.

* Do zlewki dodano 70 % etanol na czas 1 min
* Etanol usunięto, wlano 10% roztwór chloraminy oraz umieszczno na wytrząsarce na czas 20 min.
* Po wytrząsaniu chloraminę usunięto, zlewki przeniesiono pod komorę z laminarnym przepływem sterylnego powietrza, dalsze czynności przeporwadzano pod komorą.
* Wykonano 3 krotne płukanie materiału roślinnego w sterylizowanej wodzie destylowanej. Każde płukanie trwało 5 min. Po każdym płukaniu wymieniano wodę w zlewce.
* W ostatnim cyklu powyższego kroku wody już nie usuwano, materiał roślinny przez cały czas znajdował się w sterylizowanej wodzie destylowanej z trzeciego cyklu płukania.

Pod komorą z laminarnym przepływem steruylengo powietrz znajdowały sie:

-> 18 szalek petriego z tworzywa sztucznego z pozywka dla sniezyce karpackiej

-> zlewka z etanolem 70% do odkażania

-> dwie duże szklane szalki petriego, jedna z arkuszami bibuły, druga na której wykonywano pobrania eskplantatów

-> stoper

-> palnik gazowy do sterylizacji

-> paski parafilmu do zabezpieczania szalek petriego

-> marker do oznaczania szalek

-> arkusz do notatek

Przebieg ćwiczenia:

Zdecydowano się na podział eskplantatów z liści na dwie kategorie

* Część balszki która znajdowała sie bliżej cebuli pod górną częścią suchych łusek. W naturalny sposób ta część blaszi była etiolowana przez co jej kolor jest bladożółty, zółtozielony.
* Pozostała część blaszki liściowej ktora była wystawiona na działnie promieni słonecznych przez co jej kolor jest zielony.

W pierwszej kolejnosci przygotowano szlaki petriego z eksplantatami liścioweymi. Do pozyskania eksplantatów wybrano gragmenty lisci nieuszkodzonych. Skrajne częsci liści które były najmocniej wystawione na działanie chloraminy usunięto. Wycięto fragmenty mniej więcej rownej wielkości o długości około 0,5-1,0 cm.

Dalej wykonywano eskplantaty z piętek oraz łusek liściowych dla kazdej z cebul osobno. W przypadku eskplantatów z piętek usunięto za pomoca skalpela częśc mocno zbrązowiałą wskutek dziąłnia chloraminy. Pozyskane fragmenty były podobnej wielkości, długosc jednego boku poniżej 0,5 cm. Fragmenty pozyskane z każdej cebuli umieszczono w osobnych szalkach. I tak w szalkach (1-2) znajdują sie fragmenty z cebuli średniej wielkości, w szkalach (3-4) znajduja sie fragmenty pozyskane z cebuli o największej wielkosci a wszalkach (5-6) fragmenty pozyskane z cebuli najmniejszej. Łuski do wykonania eksplantatów pobrano z wewnętrznej części cebuli. Zewnętrzne wystawione na działanie chloraminu odrzucono. Przed umieszczeniem w pożywce usunieto pergaminową błonę z łusek. Po każdej szalce narzędzia odkażano w alkoholu i płomieniu palnika.

Wykaz szalek:

|  |  |  |  |  |  |
| --- | --- | --- | --- | --- | --- |
| Data wykonania | Gatunek | Rodzaj eksplantatu | Liczba szalek | Oznaczania na szalkach | Liczba eksplantatów |
| 09.03.2018 | Snieżyca karpacka | Liść etiolowany | 3 | ŚK/L/1 | I II III IV V |
| ŚK/L/2 | I II III IV V |
| ŚK/L/3 | I II III IV V |
| Liść zielony | 3 | ŚK/L/4 | I II III IV V |
| ŚK/L/5 | I II III IV V |
| ŚK/L/6 | I II III IV V |
| Łuska | 6 | ŚK/Ł/1 | I II III IV V |
| ŚK/Ł/2 | I II III IV V |
| ŚK/Ł/3 | I II III IV V |
| ŚK/Ł/4 | I II III IV V |
| ŚK/Ł/5 | I II III IV V |
| ŚK/Ł/6 | I II III IV V |
| Piętka | 6 | ŚK/P/1 | I II III IV V |
| ŚK/P/2 | I II III IV V |
| ŚK/P/3 | I II III IV V |
| ŚK/P/4 | I II III IV V |
| ŚK/P/5 | I II III IV V |
| ŚK/P/6 | I II III IV V |

Na kolejny raz przygotowano do autoklawowania:

* + 3 zlewki
  + 5 szklanych szalek petriego z bibułą

Następny raz 16.03.2018:

* Kolejne partie cebul śnieżycy - tworzenie eksplantatów na tej samej pożywce co 09.03.2018
* Dowiedzieć sie kiedy moge zebrać szachownice
* Możliwość zaproponowania swojej pożywki do śniezycy
* Minimum miesiąc na ocenę efektów
* Na ten czas dośiwadczenie obejmuje badanie współczynnika rozmnażania dla różnych rodzajów eksplantatów (liscie, łuski, piętka) dla obu gatunków. Kazdy z gatunków jest rozmnażany na dedykowanej dla niego pożywce
* Do zastanowienia czy nie warto byłoby pociągnąć hodowli dalej to jest pasażowanie, wzrost cebulek, ukorzenianie.