ĆWICZENIE 3

Androgeneza *in vitro*-zakładanie hodowli pylników i mikrospor (Brassicaceae).

Ćwiczenie wykonuje się pod wyciągiem laminarnym z nawiewem sterylnego powietrza.

A. Materiał roślinny należy wysterylizować powierzchniowo. W tym celu świeżo pobrane pąki z roślin donorowych umieszczamy w sitkach (zaparzaczki do herbaty). Następnie należy:
   1) Umieścić materiał roślinny (w sitkach) do 70 % alkoholu etylowego na 30 s
   2) Umieścić materiał roślinny w mieszaninie ACE (komercyjny wybielacz) i wody destylowanej w stosunku 4:1 na 10 min
   3) Przepłukać materiał roślinny w uprzednio poddanej autoklawowaniu wodzie destylowanej, 3 zmiany po 5 min.

B. Z wysterylizowanych pąków izolujemy sterylnymi narzędziami w komorze laminarnej pylniki (6 lub więcej pylników) i przekładamy na szalkę z porcją (1-2ml) sterylnej pożywki NLN-13

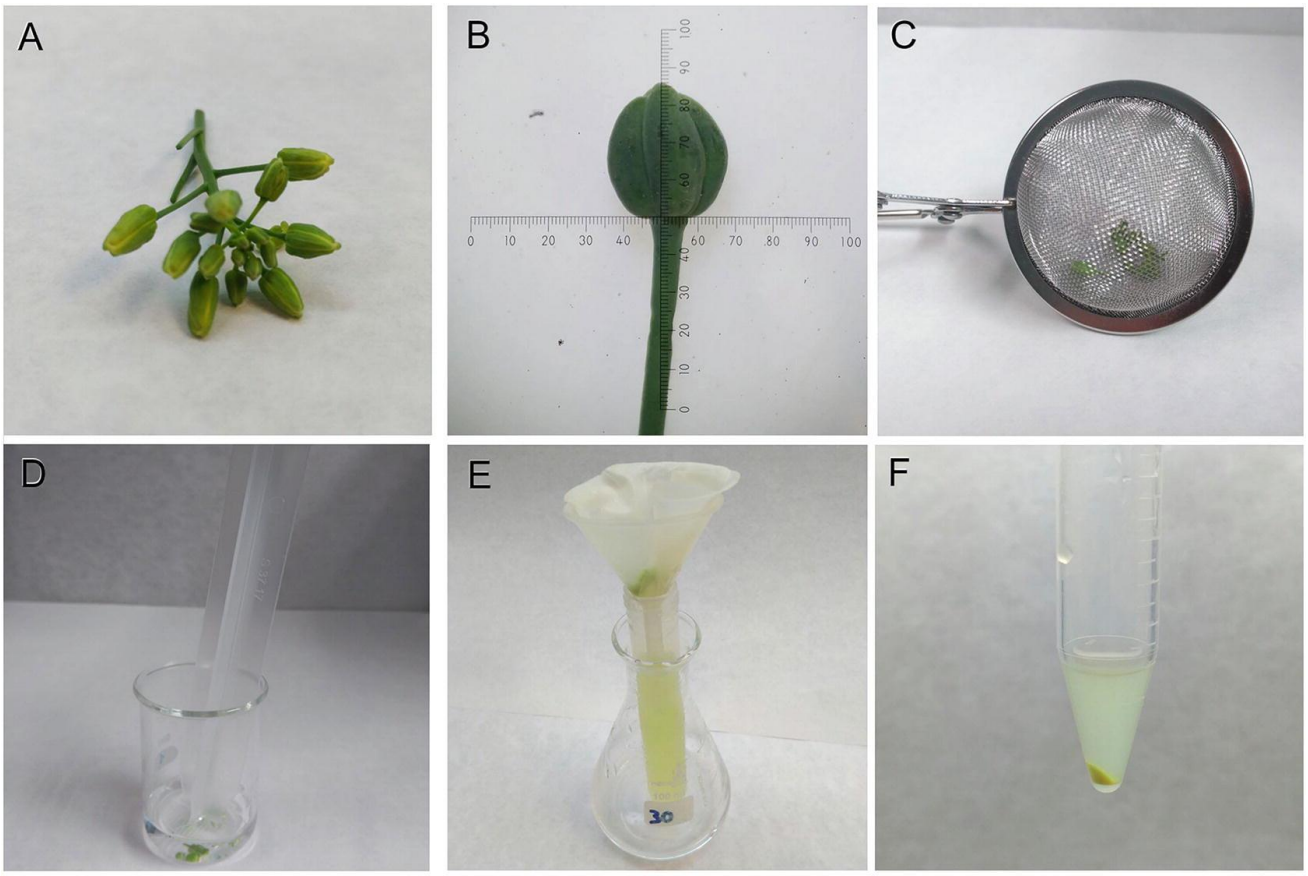
I. Hodowla pylników na pożywce stałej:

Wylizolowane pylniki (6) wykładamy na pożywkę stałą (MS+6% st. sacharozy, lub NLN13), delikatnie wciskając pylniki dłużą krawędzią w pożywkę; zamykamy szalkę parafilmem.

II. Hodowla izolowanych mikrospor na pożywce płynnej:

C. Wyizolowane pylniki gnieciemy tłokiem sterylnej strzykawki w porcji pożywki NLN13. Uzyskaną zawiesinę (fragmenty tkanek pylników i mikrospory) przesączamy przez sterylne sitka nylonowe o średnicy 41 µm do sterylnej probówki typu falkon. Po otrzymaniu przesączu- sitko usuwamy z falkonu.
D. Otrzymaną zawiesinę samych mikrospor w pożywce NLN-13 porcjujemy do sterylnych probówek typu eppendorf (po 1 ml zawiesiny na eppendorf). Wirujemy na niższych obrotach (ok. 1000 rpm) przez ok. 2 min. Supernatant odciągamy i pellet mikrospor zawieszamy w 1 ml świeżej porcji pożywki NLN-13. Czynność powtarzamy 3x
E. Zawiesinę mikrospor w świeżej porcji pożywki umieszczamy na szalkach Petriego i zamykamy parafilmem M. Każdą z szalek podpisujemy datą i inicjałami.

F. Dla gotowych hodowli pylników i mikrospor zostanie zastosowany umiarkowany szok temperaturowy (32,5 °C przez 12 godzin). Po tym czasie hodowle zostaną umieszczone w cieplarce na okres 25 dni, w temperaturze 25 °C i w ciemności.



https://images.app.goo.gl/QVtYR5zHfwQeDpHXA