

ZAŁĄCZNIKI DO ĆWICZEŃ

ZAŁĄCZNIK 1. MINERALNE ODŻYWIANIE ROŚLIN

Aby przeprowadzić doświadczenie, należy dysponować wystarczającą ilością roślin spirodeli wielokorzeniowej. W tym celu trzeba przygotować 2000 cm³ pożywki pełnej namnażającej, czyli zawierającej wszystkie wymagane do prawidłowego rozwoju rośliny pierwiastki (makro- i mikroelementy – por. tabele 1 i 2). Doprowadzić pH pożywki do wartości 6,4 i rozlać po 100 cm³ do kolb Erlenmeyera o pojemności 300 cm³. Następnie wysterylizować pożywkę w autoklawie. Po schłodzeniu, pracując w warunkach sterylnych (komora z laminarnym przepływem powietrza), wprowadzić za pomocą ezy 10–12 członów pędowych spirodeli wielokorzeniowej do każdej kolby z pożywką. Hodowle prowadzić w pokoju hodowlanym przez 1–2 tygodnie, w temperaturze 23°C ± 2°C, przy fotoperiodzie 16 godzin/8 godzin (światło/ciemność) i natężeniu światła 350 μmol m⁻² s⁻¹. Po uzyskaniu odpowiedniej ilości materiału roślinnego, czyli namnożeniu spirodeli wielokorzeniowej, przygotować pożywkę pełną oraz pożywki niezawierające jednego z pierwiastków, w tym azotu, fosforu, potasu, wapnia, magnezu i żelaza według tabeli 1 i 2. Do kolb Erlenmeyera o pojemności 100 cm³ wlać po 30 cm³ odpowiedniego rodzaju pożywki. Kolby zamknąć folią aluminiową i wysterylizować.

Tabela 1. Skład chemiczny pożywek do hodowli spirodeli wielokorzeniowej

SKŁADNIK [g dm ⁻³] lub [cm ³ dm ⁻³]	POŻYWKA						
	Pełna	– N	– P	– K	– Ca	– Mg	– Fe
(NH ₄) ₂ SO ₄	0,264	–	0,264	0,264	0,264	0,264	0,264
K ₂ HPO ₄	0,174	0,174	–	–	0,174	0,174	0,174
MgSO ₄ × 7H ₂ O	0,492	0,492	0,492	0,492	0,492	–	0,492
CaSO ₄ × 2H ₂ O	0,273	0,273	0,273	0,273	–	0,273	0,273
FeNaEDTA	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	0,025	–
Mikroelementy*	1 cm ³						
Glukoza	10						
pH	6,4						
* Skład roztworu mikroelementów podano w tabeli 2.							

Składnik	Stężenie [mg dm^{-3}]
H_3BO_3	2,86
$\text{MnSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	2,19
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	2,2
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	0,13
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0,079

Tabela 2.

Skład roztworu mikroelementów wg Hoagland i Arnon (1950)

Literatura

Hoagland D. R., Arnon D. I., *The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil*, College of Agriculture, University of California, Berkeley, CA 1950.

ZAŁĄCZNIK 2. AKTYWNOŚĆ BIOLOGICZNA REGULATORÓW WZROSTU ROŚLIN

Tabela 1. Skład pożywki wg Murashige i Skoog (1962) w modyfikacji dla mikrorozmnażania róży

Składniki pożywki [mg dm ⁻³]			
Składnik	K Podłoże kontrolne	U Podłoże ukorzeniające	N Podłoże namnażające
Makroelementy			
NH ₄ NO ₃	825	825	1650
KNO ₃	950	950	1900
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	370	370	740
KH ₂ PO ₄	85	85	170
CaCl ₂ bezwodny	330	330	660
FeNa EDTA	21,5	21,5	43
Sacharoza			
	20 000	20 000	30 000
Regulatory wzrostu			
BAP	–	–	1
IAA	–	–	0,35
GA ₃	–	–	0,5
IBA	–	0,5	–
Mikroelementy			
MnSO ₄ × 4 H ₂ O		22,3	
H ₃ BO ₃		6,2	
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O		8,6	
Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O		0,25	
CuSO ₄ × 5 H ₂ O		0,025	
CoCl ₂ × H ₂ O		0,025	
KI		0,75	
Witaminy			
Tiamina (B ₁)		0,5	
Pirydoksyna (B ₆)		0,5	
Kwas nikotynowy		0,5	
Inozytol		100	
Agar		7000	
pH 5,9			

Roztwory regulatorów wzrostu:

- a)** BAP: w małej zlewce 10 mg BAP rozpuścić dokładnie w kilku kroplach 1 M NaOH, dodać nieco wody i przenieść ilościowo do kolby miarowej na 10 cm³, dopełnić wodą do 10 cm³. Stężenie BAP w roztworze = 1 mg cm⁻³;
- b)** IAA: przygotować jak wyżej. Stężenie IAA w roztworze = 1 mg cm⁻³;
- c)** IBA: przygotować jak wyżej. Stężenie IBA w roztworze = 1 mg cm⁻³;
- d)** GA₃: w małej zlewce 10 mg GA₃ rozpuścić dokładnie w kilku kroplach 96% etanolu, dalej postępować jak wyżej. Stężenie GA₃ w roztworze = 1 mg cm⁻³.

Literatura

Murashige T., Skoog F., *A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures*, „Physiologia Plantarum” 1962, vol. 15, s. 473–479.

ZAŁĄCZNIK 3. TEST TOLERANCJI KOMÓREK ROŚLINNYCH NA ABIOTYCZNE CZYNNIKI STRESOWE

Składniki pożywki [mg dm ⁻³]	
Makroelementy	
KNO ₃	126
MgSO ₄ × 7H ₂ O	123
KH ₂ PO ₄	34
Ca(NO ₃) ₂ × 4H ₂ O	295
FeNa-EDTA	10
Mikroelementy	
CuSO ₄ × 5H ₂ O	0,079
H ₃ BO ₄	2,86
MnSO ₄ × 5H ₂ O	2,19
Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O	0,13
ZnSO ₄ × 7H ₂ O	2,2
pH 5,8	

Tabela 1. Skład pożywki wg Hoagland i Arnon (1950) w modyfikacji dla hodowli hydroponicznej pszenicy

Literatura

Hoagland D. R., Arnon D. I., *The Water-Culture Method for Growing Plants without Soil*, College of Agriculture, University of California, Berkeley, CA 1950.

ZAŁĄCZNIK 4. ZAWARTOŚĆ KWASU ASKORBINOWEGO (WITAMINY C) W WARZYSWACH I OWOCACH

Przykład obliczenia zawartości kwasu askorbinowego [mg] w przeliczeniu na 100 g ś. m. materiału roślinnego [mg 100 g⁻¹ ś. m.]:

Stężenie wzorcowego roztworu kwasu askorbinowego wynosi 0,05 mg cm⁻³. Do miareczkowania pobrano 5 cm³ tego roztworu, tj. $5 \times 0,05 \text{ mg} = 0,25 \text{ mg}$.

Na zmiareczkowanie 0,25 mg wzorca kwasu askorbinowego zużyto średnio np. 5,1 cm³ 0,001 M roztworu I w KI:

5,1 cm³ I w KI → 0,25 mg kwasu askorbinowego

1 cm³ I w KI → 0,049 mg kwasu askorbinowego

Na zmiareczkowanie 5 cm³ ekstraktu zużyto średnio np. 12,4 cm³ 0,001 M I w KI:

1 cm³ I w KI → 0,049 mg kwasu askorbinowego

12,4 cm³ I w KI → x₁

x₁ = 0,608 mg kwasu askorbinowego 5 cm⁻³ ekstraktu

Ponieważ 5 cm³ badanego ekstraktu pobranego do miareczkowania odpowiada 0,5 g ś. m. materiału roślinnego:

50 cm³ ekstraktu → 5 g świeżej masy

5 cm³ ekstraktu → 0,5 g świeżej masy

dlatego:

0,5 g świeżej masy zawiera x₁ = 0,608 mg kwasu askorbinowego

czyli:

0,5 g świeżej masy → 0,608 mg kwasu askorbinowego

100 g świeżej masy → x₂ mg kwasu askorbinowego

x₂ = 121,6 mg kwasu askorbinowego 100 g⁻¹ ś. m.

Produkty spożywcze	Zawartość witaminy C [mg 100 g ⁻¹ ś. m.]
OWOCE	
agrest	30
ananas	20
banan	10
brzoskwinia	10
cytryna	40
czereśnia	15
dzika róża	250–1000
głóg	160–800
grapefruit	45
gruszka	5
jabłko	10
jarzębina	100
kiwi	100
malina	25
mandarynka	38
melon	20
morela	10
pomarańcza	60
porzeczka biała	40
porzeczka czarna	200
porzeczka czerwona	25
śliwka	10
truskawka	60
winogrono	6
wiśnia	15
żurawina	15
WARZYWA	
brokuł	120
brukselka	120
burak	10
cebula	10
czosnek	16
chrzan	120
dynia	8
fasola	20
groszek zielony	25
groszek zielony konserwowy	10

Tabela 1. Zawartość kwasu askorbinowego w wybranych produktach wg Moszczyński, Pyć (1999)

jarmuż	150
kalafior	70
kapusta	45
marchew	5
ogórek	10
papryka zielona	175
pietruska korzeń	100
pietruska nać	150
pomidor	25
por	35
rabarbar	10
rzeżucha	79
rzodkiewka	25
sałata	15
seler	10
szpinak	55
ziemniak	20
INNE PRODUKTY	
igliwie sosny i świerka	150–250
lucerna	200
orzechy włoskie (niedojrzałe)	3000
pokrzywa	100

Literatura

Moszczyński P., Pyć R., *Biochemia witamin*, cz. 2: *Witaminami lipofilnymi i kwas askorbinowy*, Wydawnictwo Naukowe PWN, Warszawa 1999.

ZAŁĄCZNIK 5. INDUKCJA TKANKI KALUSOWEJ I PĘDÓW PRZYBYSZOWYCH W KULTURZE IN VITRO FIOŁKA AFRYKAŃSKIEGO

Składniki pożywki [mg dm ⁻³]	
Makroelementy	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
KH ₂ PO ₄	170
CaCl ₂	332
FeNaEDTA	43
Mikroelementy	
Na ₂ MoO ₄ × 2H ₂ O	0,025
CoCl ₂ × 6H ₂ O	0,025
H ₃ BO ₃	6,2
MgSO ₄ × 7H ₂ O	370
MnSO ₄ × 4H ₂ O	22,3
ZnSO ₄ × 7H ₂ O	8,6
CuSO ₄ × 5H ₂ O	0,025
KI	0,83
Witaminy	
Tiamina (B ₁)	0,4
Pirydoksyna (B ₆)	0,5
Kwas nikotynowy	0,5
Inozytol	100
Inne	
Sacharoza	30 000
Agar	7000
pH 5,7	

Tabela 1. Pożywka wg Murashige i Skoog (1962), zmodyfikowana

Przygotować roztwory wyjściowe witamin o stężeniu 10 mg 100 cm⁻³ i odmierzyć odpowiednią objętość na 1 dm⁻³ pożywki (por. tabela 1).

Przygotować roztwory wyjściowe regulatorów wzrostu: kwasu α -naftalenooctowego (NAA) i kinetyny (KIN) o stężeniu

0,1 mg cm⁻³. KIN rozpuścić w kropli 1 M HCl, NAA – w kropli 1 M NaOH i dopełnić wodą do określonej objętości. Przygotować 4 warianty agarowej pożywki MS (po 500 cm³), różniące się między sobą zawartością regulatorów wzrostu (por. tabela 2), odmierzając odpowiednią objętość roztworów wyjściowych.

Wariant pożywki	Stężenie regulatorów wzrostu [mg dm ⁻³]	
	NAA	KIN
MS _{1,0 NAA + 0,2 KIN}	1,0	0,2
MS _{2,0 NAA + 0,2 KIN}	2,0	0,2
MS _{0,4 NAA + 0,8 KIN}	0,4	0,8
MS _{0,2 NAA + 0,5 KIN}	0,2	0,5

Tabela 2. Stężenie regulatorów wzrostu – kwasu α -naftalenooctowego (NAA) i kinetyny (KIN) w pożywce MS

Doprowadzić wartość pH pożywek do 5,7. Pożywki rozlewać po 40 cm³ do szerokoszyjnych kolb Erlenmeyera o objętości 100 cm³, zakryć kolby kapsłami foliowymi z płatkami ligniny i wysterylizować.

Literatura

Murashige T., Skoog F., *A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures*, „Physiologia Plantarum” 1962, vol. 15, s. 473–479.

ZAŁĄCZNIK 6. METABOLITY WTÓRNE O ZNACZENIU PROZDROWOTNYM. ANTRAZWIAZKI LIŚCI I KULTUR *IN VITRO* ALOESU

Składniki pożywki [mg dm ⁻³]	
Makroelementy	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
MgSO ₄ × 7 H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
CaCl ₂ bezwodny	330
FeNa EDTA	43
Mikroelementy	
MnSO ₄ × 4 H ₂ O	22,3
H ₃ BO ₃	6,2
ZnSO ₄ × 7 H ₂ O	8,6
Na ₂ MoO ₄ × 2 H ₂ O	0,25
CuSO ₄ × 5 H ₂ O	0,025
CoCl ₂ × H ₂ O	0,025
KI	0,75
Witaminy wg Gamborg i in. (1968)	
<i>mio</i> -inozytol	100
kwask nikotynowy	1
pantotenian wapnia	0,874
pirydoksyna-HCl	1
ryboflawina	0,015
tiamina	10
Regulatory wzrostu	
IAA	1,5
BAP	0,3
Sacharoza	30 000
Agar (dla hodowli kalusa)	7000
pH 5,8	

Tabela 1. Skład pożywki MS wg Murashige i Skoog (1962) w modyfikacji dla hodowli kultur kalusowych i zawieszinowych aloesu

Roztwory regulatorów wzrostu BAP i IAA o stężeniu 1 mg cm⁻³ przygotować tak jak opisano w załączniku 2.

Literatura

Gamborg O. L., Miller R. A., Ojima K., *Nutrient Requirements of Suspension Cultures of Soybean Root Cells*, „Experimental Cell Research” 1968, vol. 50, s. 151–158.

Murashige T., Skoog F., *A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassays with Tobacco Tissue Cultures*, „Physiologia Plantarum” 1962, vol. 15, s. 473–479.