

## Claudia Girnth och Anne Heister

Solrød Gymnasium  
Solrød Strand, Denmark

### Kloning av en växt

#### Odling av Saintpaulia med hjälp av kallus

Odling av växter eller delar av växter är en viktig aktivitet inom modern bioteknik. Odlade växter kan t ex samlas i genbanker, där man förvarar många olika sorter av en art med avsikt att använda dem till förädling, men också för att bevara "generna" för framtiden. Odling från kallus kan användas när man framställer kloner – d.v.s. många identiska kopior av en enskild individ med särskilt goda egenskaper. Kommersiellt brukas denna teknik bl.a. vid odling av oljepalmer. Det är först efter många år man kan se egenskaper hos en palm. Eftersom palmer inte förökar sig vegetativt använder man kallusodlingstekniken till att mångfaldiga en särskilt lämplig individ. Tekniken är den samma antingen man använder oljepalmer eller Saintpaulia (*Saintpaulia ionatha*).

#### Målsättning

Denna laboration skall ge eleverna kunskap om kallusbildning; hur den börjar från enskilda celler i bladet och visa hur cellerna snabbt delar sig och bildar en anhopning av icke differentierade celler, en kallus. Cellerna differentieras efter en viss tid och det utvecklas skott och rötter beroende på tillväxthormoner och deras koncentration i näringsmediet. Små plantor kan växa upp inom loppet av två till tre månader. Laborationen har också till syfte att ge eleverna insikt i sterilarbete.



KORRESPONDENS TILL  
Solrød Gymnasium  
Solrød Center 2  
DK 2680 Solrød Strand  
Denmark  
[Claudia.Girnth@newmail.dk](mailto:Claudia.Girnth@newmail.dk)

## Utrustning och material

### Material per elev eller grupp

- Saintpauliablåd, 1 per elev (detta är minimum, eftersom en del kulturer blir infekterade)
- Metallpincett eller ca 12 sterila plastpincetter
- Skalpell med nya blad
- Märkpena
- Små burkar med lock eller bågare förslutna med aluminiumfolie, minst 3 st. *Skall användas till 70% etanol, 10% Klorin (ev 3% natriumhypoklorit NaOCl) och till sterilt vatten*
- Steril petriskål
- Bunsenbrännare eller spritlåga för att sterilisera pincetter och skalpell genom flambering
- Sterila burkar (t.ex. barnmatsburkar) med tillväxtmedium, 2 per blad
- Bägare för avfall
- 70% etanol (**OBS! Ej denaturerad**) till att sterilisera och avvaxa blad
- 10 % Klorin (ev 3% NaOCl) med tillsatts av någon droppe diskmedel eller Tween 20
- Sterilt vatten, ca 500 ml för att skölja sterila blad

### Tillvägagångssätt

#### A Växtmaterialet skall göras sterilt

**(OBS! Arbetet måste ske på en steril plats och under sterila betingelser)**

1. Ta unga blad (ca 2-4 cm långa) från friska växter. Doppa dem med hjälp av en pincett i 70% etanol under 30 sekunder. *Etanol både steriliserar ytan och fungerar som ett diskmedel som rengör ytan från fett och vax.*
2. Lägg bladen i 10% Klorin (eller 3 % NaOCl) under 10 minuter. Rör försiktigt om med en steril pincett eller liknande en gång per minut. *Klorin och natriumhypoklorit dödar både bakterier och svampar.*
3. Tag upp bladen och lägg dem i sterilt vatten i en steril burk eller bägare. *Kom ihåg att sätta på locket för att undvika föroreningar.*

Fig. 1



Fig. 2



Fig. 3



- Häll av vattnet och häll på nytt sterilt vatten. Detta moment utförs ytterligare tre gånger (alltså tillsammans fyra gånger) så att alla spår av Klorinlösningen försvinner. *Bladen kan förvaras i sterilt vatten upp till 4 timmar.*

### B. Växtmaterialet bearbetas

- Tag en steril petriskål och markera med en pil på botten av skålen hur bladet skall orienteras (pilspets = bladstjälk). Om du är högerhänt skall pilspetsen peka åt vänster. *Bladstjälken transporterar vatten och hormoner från tillväxtmediet in i cellerna av det avskurna bladet, därför skall bladets stjälksida vara riktat mot agarn.*
- Öppna den petriskål som du markerat med en pil och lägg bladet i botten av petriskålen i rätt position (OBS! viktigt). Använd petriskålens lock som skydd – en andra person kan hjälpa till att hålla locket, medan du för över bladet. *Observera: föroreningar kan falla ner från olika föremål och kan också föras med luftströmmar från personer i rörelse.*

Fig. 4



Fig. 5

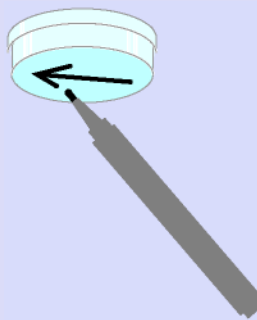


Fig. 6



- Doppa en skalpell i 70 % etanol och bränn av med en bunsen- eller spritlåga. **OBS! Håll lågan borta från bägaren med etanol.** Skär med den sterila skalpellen ut ett stycke, ca 15 x 15 mm, av bladets mitt. Mittnerven i bladet skall vara i mitten av den utskurna delen. Resten av bladet kastas. Skär därefter bladbiten i två delar tvärs genom mittnerven (se Fig. 7)
- Placera därefter bitarna i växtmediet på följande sätt: Öppna odlingsburken med växtmediet och sätt ner bladbiten lodrätt i agarn till ca 1/3. *Var noga med att den sida som vetter mot bladstjälken sticks ner i agarn (dvs i pilriktningen).* Förslut odlingsburken igen. Upprepa förfarandet med den andra biten och med en ny odlingsburk. *Använder du aluminiumfolie som lock skall du sätta tejp omkring för att förhindra att förore-*

ningar tränger in och att mediet torkar ut. Kulturerna kan förslutas relativt tätt för att bibehålla en god fuktighet.

**C. Växtmaterialet växer**

9. Ställ odlingsburkarna ljusst, men inte i direkt solljus. Om näringsmediet torkar ut tillsätts lite sterilt vatten. Under loppet av 6-9 veckor utvecklar växten en kallus, som man känner igen som små ljusgröna (eller bruna) cellklumpar av oregelbunden växt.

Fig. 7

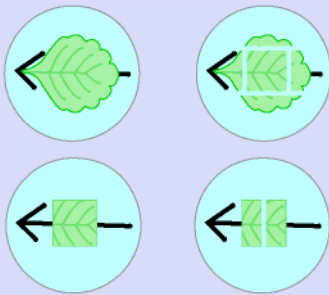
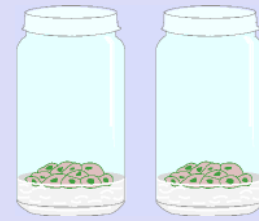


Fig. 8



Fig. 9



10. Kalluskulturen regenererar spontant små blad och rötter.
11. När dessa små plantor är ca 2 cm höga kan de planteras i krukor med planteringsjord. *OBS: Täck krukorna med plastpåsar så att de inte torkar ut. De är mycket känsliga, när de är så här små, eftersom de ännu inte har någon kutikula som förhindrar uttorkning.*

Fig. 10



Fig. 11



Fig. 12



## Resultat

Plantorna ses till åtminstone en gång i veckan. Förändringar kan fotograferas och/eller antecknas i en dagbok, som förses med namn och datum. Den kan ha följande utseende: :

**Växtmaterial:**  
**Datum för behandling:**  
**Typ av behandling:**  
**Namn på observatör:**

Beskrivning av förändring	Datum för observation	Anmärkningar

## Säkerhet

### Etanol

Största försiktighet måste iakttas med etanol och brinnande låga! Ställ etanolen på en sida av bordet och brännaren på den andra – långt ifrån varandra.

### Klorlösningar

Försiktighet skall iakttas med Klorin eller natriumhypokloritlösningar. De är giftiga och verkar irriterande på hud, ögon och andningsorgan. Om de blandas med syror eller ammoniak kan giftig gas bildas.

Vid användning måste man undvika att de kommer i ögonen, på huden eller på kläderna. Använd skyddskläder och skyddsglasögon. Vid stänk i ögon - skölj i rikligt med vatten, vid förtäring - kontakta läkare.

### Tillväxsubstanser (hormoner)

**OBS!: Läraren, inte eleverna, skall framställa stamlösningarna.** Växthormonerna IBA (Indole-3-Butyric Acid) och BAP (6-BenzylAminoPurine) verkar irriterande på hud, ögon och andningsorgan.

Använd skyddskläder, skyddsglasögon och skyddshandskar vid hantering av dessa kemikalier.

Vid stänk i ögonen, spola med rikligt av vatten i åtminstone 15 min och sök läkare. Vid hudkontakt, skölj med tvål och vatten under minst 15 min. Om ämnena svalts eller andats in, skölj omedelbart munnen och sök läkare.

### Tidsåtgång

Experimentet tar ca 2 timmar för en grupp med 4 elever. Utvecklingen av kulturen tar upp till 3 månader.

Uppsvällning av växtmaterialet	1-2 veckor
Synlig kallusbildning	2-3 veckor
Rötter och rothårsbildning	3-5 veckor
Gröna skottspetsar synliga	4-6 veckor
Synliga bladskott	6-7 veckor
Överföring till jord	8-10 veckor
Det första nya bladet	12-14 veckor

### Felsökning

Växtvävnadskulturer innehåller stora mängder sackaros som kolkälla. Sådant medium är ett medium som lätt blir förorenat av mikroorganismer. Den vanligaste orsaken till misslyckande är därför dålig sterilteknik. Det är därför mycket viktigt att eleverna känner till grunderna i sterilarbete.

Arbetsplatsen skall torkas av innan man startar experimentet. Dörrar och fönster skall vara stängda. Man skall röra sig i lokalen så lite som möjligt och därför skall utrustningen som behövs finnas inom räckhåll. Pincetter måste brännas av genom att de först doppas i 70 % etanol och därefter bränns av i en låga. Bägare skall steriliseras genom upphettning i en ugn eller värmeskåp under 2 timmar vid 160°C, täckta med aluminiumfolie. Locket på en petriskål tjänar som skydd mot luftburna föroreningar – en elev kan hjälpa till med att hålla locket medan den andra utför arbetet med bladen.

### Fler undersökningar

#### Förslag på kvantitativt arbete

Detta kan endast göras när man har tillräckligt med material – minimum 20 kulturer på samma sorts medium.

- **Diagram över tillväxtstadier (y-axel) mot tid (x-axel).** Man kan anteckna när man kan se det första tecknet av ett stadium som beskrivs i tabellen ovan. Stadierna i tabellen är ordnade efter stigande specialisering.
- **Stapeldiagram med tillväxtstadium som y-axel och tid som x-axel.** Man kan observera något eller några stadier som är lätta att känna igen, t.ex. när det första bladet syns.
- **Diagram över sterilarbetet.** Man kan räkna antalet döda eller infekterade kulturer vid olika tidpunkter (t.ex. en gång i veckan) och rita upp ett diagram med tiden som x-axel och antalet levande kulturer (som % av det totala antalet) på y-axeln.

- **Diagram över antalet blad/skott/rötter.** Man räknar antalet organ vid olika tidpunkter och av-sätter dem i ett diagram med antalet på y-axeln och tiden på x-axeln.

### Andra växtarter

Andra växter som tobaksplantor eller blomkål kan användas (se "Mer att läsa"). Eleverna kan givetvis prova många olika arters blad med samma hormonblandning som till Saintpaulia. Tyvärr blir resultaten oftast inte bra, vilket kan utgöra underlag för fortsatta diskussioner.

### Kemikaliefirmor

Kemikalier för växtvävnadsodling och hormoner kan köpas bl.a. från Sigma-Aldrich. Man kan blanda ihop kemikalierna från början (se "Recept"), men det är ofta både billigare och bekvämare att köpa färdigblandade media där makronäringsämnen och hormon är blandade.

Ett kit som innehåller en biocid som dramatiskt reducerar risken för kontamination kan köpas från "Kitchen culture kits" i USA: <http://www.kitchenculturekit.com>

### Mer att läsa

Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davies, F.T. and Geneve, R.L (2001) *Hartmann and Kester's Plant propagation: principles and practices*, 7<sup>th</sup> edition. Prentice Hall. ISBN: 0 13 679235 9.

*Plant tissue culture* by Tony Storr (1985) Hatfield: Association for Science Education. ISBN: 0 86357 031 3.

*Boken är slutsåld, men en kopia av originalet kan laddas ner från NCBE's hemsida:*

<http://www.ncbe.reading.ac.uk/NCBE/PROTOCOLS/planttissue.html>

## Recept

### Steriliseringslösning

Till 1000 ml 10% Klorin (eller 3% natriumhypoklorit NaOCl) sätts 2 droppar Tween eller något diskmedel.

### Växtmedium för kallusodling av *Saintpaulia*

Till 1000 ml Murashige och Skoog- (M&S) medium sätts 8-10 gram agar, 5 ml IBA stamlösning och 15 ml BAP stamlösning (se nedan).

M&S-medium kan förvaras upp till 3 månader, om det återupphettas innan användning.

**OBS!** M&S-medium i odlingsburken skall vara åtminstone 20 mm tjockt, eftersom kulturer ofta odlas under långa perioder och lätt kan torka ut. Det kan då bli alltför lite medium för växten att rota sig i.

### Framställning av stamlösningar och tillväxtmedium för kallus

- I. Alla kemikalier och deras koncentrationer finns angivna i tabellen.
- II. Gör lösningarna nr 1-6 och nr 8-14 genom att väga upp massan som anges under rubriken "stamlösning g/100 ml" och lös dem i 100 ml vatten. En del lösningar (nr 1 och 2) är mycket koncentrerade, vilket gör att de löses mycket långsamt även om man hela tiden skakar eller rör om.
  - a. 100 ml av lösningarna nr 1-6 är tillräckligt för 10 preparationer, medan 100 ml av lösningarna nr 8-14 räcker till 40 preparationer.
  - b. Lösning nr 14 skall förvaras i en brun flaska.
- III. Stamlösningarna nr 11-14 innehåller mikronäringsämnen och därför är mängden av de olika kemikalerna mycket liten.
  - a. Lägg märke till anmärkningarna utmärkta med \* i tabellen.
- IV. Stamlösningarna nr 15-18 är organiska ämnen som nyttjas av växtkulturen som vitaminer. Dessa lösningar kan inte förvaras vid rumstemperatur. Man måste göra nya varje gång eller frysa lösningarna i lagom volymer för senare användning. Lagom volymer kan till exempel vara: 1 ml av lösning nr 15 + 1 ml av lösning nr 16 + 1 ml av lösning nr 17 + 1 ml av lösning nr 18; alla dessa blandas och fryses. En sådan blandning kan direkt sättas till 1 liter M&S.



- V. De hormoner som används vid dessa försök tål upphettning vid autoklavering. Använd inga andra hormoner, eftersom olika hormoner skiljer sig bl a vad beträffar dos.



**Observera:** Stamlösningarna med hormoner måste göras av läraren, eftersom hormonerna är giftiga. IBA är märkt med en dödskele och BAP är hälsofarlig. Se också under rubriken "Säkerhet".

**Stamlösning nr 22:** 20 mg IBA löses i ca 1 ml absolut alkohol i en liten bägare. Vätskan suggs upp med en pasteurpipett och överföres i 100 ml avjoniserat vatten under omröring. Lösningen kan förvaras i kylskåp under några veckor. Om man vill förvara lösningen under en längre tid (1-2 år) skall lösningen frysas, lämpligen i mindre volymer. Lösningen måste skakas om noggrant innan användning, så alla hormonkristaller är lösta.

**Stamlösning nr 23:** 20 mg BAP löses i ca 1 ml 1 M NaOH i en liten bägare. Vätskan suggs upp med en pasteurpipett och överföres i 100 ml avjoniserat vatten under omröring. Lösningen kan förvaras i kylskåp under några veckor. Om man vill förvara lösningen under en längre tid (1-2 år) skall lösningen frysas, lämpligen i mindre volymer. Lösningen måste skakas om noggrant innan användning, så alla hormonkristaller är lösta.

- VI. Alla andra kemikalier (nr 7, 19, 20, 21) tillsätts som fasta ämnen

#### **Framställning av M&S-medium när stamlösningar används:**

Mediet skall blandas i en 1 liters glasflaska med tjocka väggar och lock som tål autoklavering.

1. Tillsätt 10 ml vardera av lösningarna nr 1-6.
2. Tillsätt 2,5 ml vardera av lösningarna nr 8-14.
3. Tillsätt vatten till 1000 ml volym och skaka om.
4. Tillsätt 1 ml av vardera lösningarna nr 15-18 (nyttillverkade eller upptinade -frysförvarade se IV).
5. Substanserna nr 7 och 19 väges och tillsättes i fast form. Skaka om så att de löses ordentligt.
6. Tillsätt hormonerna nr 22 och 23, så att de passar den växt man skall odla.
7. Justera pH till 6-7 med 1,0 eller 0,1 M HCl eller NaOH.
8. Tillsätt nr 20, sackaros, och nr 21, agar, och skaka om.
9. Autoklavera vid 120°C under 20 minuter.
10. Låt lösningen svalna något (inte till under 60°C) och håll mediet i sterila flaskor eller burkar. Om du inte förbrukar allt medium, så går det bra att spara det till ett senare tillfälle. Mediet kan smältas 2-3 gånger och an-

vändas om det hålls sterilt. Mediet skall vara ca 2 cm tjockt på botten av odlingsburken.

### **Användning av färdigtillverkat M&S-medium:**

Flera kemikaliefirmor bl.a. Sigma säljer M&S-medium (Sigma M9274). En del av dessa innehåller alla ämnen som ingår utom hormoner. Dessa produkter kan givetvis också användas. Var försiktig med att använda de produkter som innehåller hormoner, eftersom olika växter fordrar olika koncentration av hormoner och olika hormoner. Koncentrationen i det färdigköpta mediet kanske inte passar ditt växtmaterial. Dessa medier kan givetvis passa bra för test med olika växter - du kan bli förvånad över resultaten.

### **Odlingsglas**

Det finns i princip tre typer:

- Gjorda av glas, antingen små sylt- eller barnmatsburkar (eleverna får samla dem innan försöken startas) eller sådana som köps från någon firma som säljer laboriematerial. Det är viktigt att locket kan autoklaveras. Denna typ av glas kan återanvändas.
- sterila engångsplastkoppar som vanligen används till blod- eller urinprover. Säljs från olika firmor med laboriematerial - det måste vara genomskinlig plast annars kan man inte se växten som växer inuti koppen. Dessa används endast en gång.
- återanvändbara plastkoppar, som kan autoklaveras flera gånger finns till försäljning från vissa firmor.

### Stamlösningar och kemikalier för framställning av MS-medium

Nr (conc.)	kemisk formel	namn	stamlösning g/100 ml	ml till 1 liter medium	mg/liter
1 (100x)	KNO <sub>3</sub>	kaliumnitrat	19,0	10	1900,00
2 (100x)	NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	ammoniumnitrat	16,5	10	1650,00
3 (100x)	CaCl <sub>2</sub> x2H <sub>2</sub> O	kalciumklorid	4,4	10	440,00
4 (100x)	MgSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	magnesiumsulfat	3,7	10	370,00
5 (100x)	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	kaliumdivätefosfat	1,7	10	170,00
6 (100x)	(EDTA)Na <sub>2</sub>	natrium-EDTA	0,37	10	37,30
7 (fast)	FeSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	järn(II)sulfat	tillsätts direkt i fast form	*** 30 mg	27,80
8 (400x)	MnSO <sub>4</sub> xH <sub>2</sub> O	mangansulfat	0,68	2,5	17,00
9 (400x)	ZnSO <sub>4</sub> x7H <sub>2</sub> O	zinksulfat	0,344	2,5	8,60
10 (400x)	H <sub>3</sub> BO <sub>4</sub>	borsyra	0,248	2,5	0,83
11 (400x)	CoCl <sub>2</sub> x 6H <sub>2</sub> O	kobolt(II)klorid	** 10 mg/1000 ml	2,5	0,025
12 (400x)	NaMoO <sub>4</sub> x2H <sub>2</sub> O	natriummolybdat	* 10 mg/100 ml	2,5	0,25
13 (400)	CuSO <sub>4</sub> x5H <sub>2</sub> O	koppar(II)sulfat	** 10 mg/1000 ml	2,5	0,025
14 (400x)	KI	kaliumjodid	* 33 mg/100 ml	2,5	0,83
15 (konc)		glycin	* 200 mg/100 ml	1,0	2,00
16 (konc)		nikotinsyra	* 50 mg/100 ml	1,0	0,50
17 (konc)		pyridoxin HCl	* 50 mg/100 ml	1,0	0,50
18 (konc)		thiamin HCl	* 10 mg/100 ml	1,0	0,10
19 (fast)		m-inositol	tillsätts direkt i fast form	*** 100 mg	100,00
20 (fast)		sackaros	tillsätts direkt i fast form	*** 30 g	30000,00
21 (fast)		agar	tillsätts direkt i fast form	*** 8-10 g	10000,00
22 (konc)		IBA	* 20 mg/100 ml	varierar	
23 (konc)		BAP	* 20 mg/100 ml	varierar	

**Lägg märke till** de med \* markerade lösningarna – här gäller särskilda förhållanden, som beskrivs nedan.

- \* Mängden som löses är liten, 10 mg är den minsta mängd som lämpligen kan vägas.
- \*\* Observera att volymen är 1000 ml och inte 100 ml.
- \*\*\* Man gör ingen stamlösning, utan mängden som utläses från tabellen, sätts direkt till 1000 ml MS-medium.