

Εργαστηριακή Άσκηση

«Μικροσκοπική παρατήρηση μιτωτικών φάσεων σε νωπά παρασκευάσματα φυτικών κυττάρων»

Ονοματεπώνυμο	Τάξη- Τμήμα:
----------------------	---------------------

Προκατεργασία υλικού

1. Στην διάρκεια της έντονης βλαστητικής ανάπτυξης των φυτών (πρωί 8:00-9:30 π.μ.), όπου και συμβαίνουν οι περισσότερες μιτωτικές διαιρέσεις των ακρορριζίων, συλλέγουμε ακρορρίζια μήκους 2-3 cm από τα καλλιεργημένα φυτά.
2. Για να παρεμποδιστεί ο σχηματισμός της μιτωτικής ατράκτου τα ακρορρίζια τοποθετούνται σε διάλυμα 0,3% w/v κολχικίνης ή σε μίγμα διαλυμάτων 1/1 v/v 2Mm 8-υδροξυκινολίνης : 0,3% w/v κολχικίνης. Το τελευταίο συνιστάται ιδιαίτερα για τα φυτά με μεγάλα χρωμοσώματα όπως αυτά του γένους *Allium*.
3. Τα ακρορρίζια παραμένουν στα διαλύματα αυτά για 5-6 ώρες σε θερμοκρασία 4 °C.
4. Στην συνέχεια, τα ακρορρίζια μεταφέρονται σε διάλυμα Carnoy (απόλυτη αλκοόλη :παγόμορφο οξικό οξύ 3:1), όπου και παραμένουν για 24 ώρες στους 4 °C. Αυτό το στάδιο της κατεργασίας αποσκοπεί στη στερέωση των φάσεων της μίτωσης.
5. Ακολουθεί μεταφορά των ακρορριζίων σε διάλυμα αλκοόλης 70-75% και διατήρηση τους σε θερμοκρασία χαμηλή (-20 °C), μέχρι το επόμενο στάδιο επεξεργασίας.

Κυτταρογενετική ανάλυση

1. Πριν την χρώση τους, τα ακρορρίζια υδρολύονται σε υδατόλουτρο στους 60 °C. σε διάλυμα M HCl για 10-15 min, ανάλογα με το είδος του φυτού.
2. Μετά το πέρας της υδρολύσεως, τα ακρορρίζια τοποθετούνται στο αντιδραστήριο Feulgen (Feulgen's stain των Darlington & La Cour, 1969) και παραμένουν σ' αυτό για 2-3 ώρες σε σκοτεινό μέρος. Το αντιδραστήριο αυτό βάφει επιλεκτικά το DNA.
3. Το ακραίο τμήμα των ακρορριζίων που αντιστοιχεί στην περιοχή της μεριστωματικής ζώνης (όπου έχουμε πολλές μιτωτικές διαιρέσεις) και που έχει βαφεί καλά, αποκόπτεται και τοποθετείται σε αντικειμενοφόρο πλάκα με μια σταγόνα οξικού οξέος 45%. Εκεί κατατεμαχίζεται και καλύπτεται με υάλινη καλυπτρίδα. Με διηθητικό χαρτί απομακρύνεται η περίσσεια του οξικού οξέος. Το ριζίδιο συνθλίβεται με μηχανικό τρόπο κάτω από στεγνό διηθητικό χαρτί που καλύπτει την καλυπτρίδα. Ασκώντας ισχυρή μηχανική πίεση με τον αντίχειρα σε κατακόρυφη θέση, το υλικό προς παρατήρηση τοποθετείται σε ένα οπτικό επίπεδο.
4. Τα παρασκευάσματα παρατηρούνται σε οπτικό μικροσκόπιο.
5. Αν είναι δυνατόν εστιάζουμε σε κάποιες ευκρινείς μεταφάσεις και τις φωτογραφίζουμε.
6. Μπορεί να ακολουθήσει ανάλυση καρυστύπου από τις φωτογραφίες, μέσα από την οποία προκύπτουν πληροφορίες για το είδος και την εξέλιξη των φυτών που μελετήσαμε.