

Άσκηση 7^η

Ιστοκαλλιέργεια – Παρασκευή και αποστείρωση υποστρώματος

Η μέθοδος της ιστοκαλλιέργειας βασίζεται στην ολοδυναμικότητα του κυττάρου, την ικανότητα δηλαδή να αναγεννά το φυτό από το οποίο προήλθε. Η ιστοκαλλιέργεια είναι ουσιαστικά η καλλιέργεια οποιουδήποτε μέρους του φυτού το οποίο υπό κατάλληλους χειρισμούς και υπό κατάλληλες συνθήκες μπορεί να αναπαραγάγει το μητρικό φυτό. Το τμήμα του φυτού που χρησιμοποιείται ονομάζεται έκφυτο, και μπορεί να είναι οφθαλμός, φύλλο, κόμβος, επικοτύλιο (Εικόνα 1), ρίζα, κώτταρο, πρωτοπλάστης, γυρεόκοκκος κτλ (Εικόνα 2).

Η καλλιέργεια των εκφύτων γίνεται στο εργαστήριο σε ειδικούς θαλάμους ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία περί τους 22-25 °C ή και διαφορετική ανάλογα με το είδος, φωτοπερίοδος 8 ώρες σκοτάδι 16 ώρες φως) και για αυτό τον λόγο αναφέρεται η τεχνική και ως πολλαπλασιασμός *in vitro* (Εικόνες 3-4).

Τα έκφυτα καλλιεργούνται σε θρεπτικά υποστρώματα, τα οποία περιέχουν όλα εκείνα τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία (μάκρο και ιχνο- στοιχεία) για τα φυτά. Επιπλέον λόγω της αδυναμίας των εκφύτων αυτών να φωτοσυνθέσουν επαρκώς, ώστε να υποστηρίξουν την αύξηση βλαστών και ριζών, προστίθεται στο υπόστρωμα και κάποιο σάκχαρο ως πηγή ενέργειας και άνθρακα. Λόγω επίσης της μειωμένης ικανότητας σύνθεσης πολύπλοκων οργανικών ενώσεων προσθέτονται επίσης και αμινοξέα (για σύνθεση πρωτεϊνών και ως πηγές ανηγμένου αζώτου) καθώς επίσης και βιταμίνες κ.ά.

Στη βιβλιογραφία παρουσιάζονται πάρα πολλά υποστρώματα, τα οποία συνήθως αναφέρονται συντομογραφικά, είτε από τα ονόματα των ερευνητών οι οποίοι τα συνέθεσαν, είτε από το φυτό για το οποίο προορίζονται είτε συνδυασμό των παραπάνω, π.χ. MS (υπόστρωμα των Murashige & Skoog), OM (olive medium), DKW (Driver and Kuniyuki medium for Walnut).

Υπάρχει στη βιβλιογραφία σίγουρα ένα υπόστρωμα το οποίο να έχει χρησιμοποιηθεί για ένα φυτό. Από τα πλέον όμως γνωστά και συχνά χρησιμοποιούμενα υποστρώματα είναι τα MS και WPM (Woody Plant Medium). Το πρώτο αποτελεί ουσιαστικά το υπόβαθρο πάνω στο οποίο βασίστηκε η σύγχρονη ιστοκαλλιέργεια από το 1960 και μετά, και έχει χρησιμοποιηθεί αυτούσιο ή παραλλαγές του, στην καλλιέργεια *in vitro* πάρα πολλών φυτών.

Εκτός όμως από τα παραπάνω στο υπόστρωμα ανάλογα με το αν θα είναι στερεό ή υγρό, προστίθεται και άγαρ, ένας στερεοποιητικός παράγοντας ο οποίος προστίθεται όταν δουλεύουμε με στερεό ή ημι-στερεό υπόστρωμα.

Έναν από τους σπουδαιότερους ρόλους όμως στην ιστοκαλλιέργεια ενός φυτικού είδους τον παίζουν οι φυτορρυθμιστικές ουσίες. Από αυτές στην ιστοκαλλιέργεια χρησιμοποιούνται κυρίως οι κυτοκινίνες, οι αυξίνες, οι γιββερελλίνες και δευτερευόντως το αμπισικό οξύ. Κάθε μία από τις ομάδες αυτές παίζει σημαντικό και καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη των εκφύτων και ουσιαστικά καθορίζουν και την πορεία ανάπτυξης αυτού, όπως θα δούμε παρακάτω.

Στα πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής καταγράφονται η ταχύτητα παραγωγής πολλαπλασιαστικού υλικού, η παραγωγή ανεξαρτήτου της εποχής του χρόνου, η παραγωγή μεγάλου αριθμού φυτών σε περιορισμένο σχετικά χώρο, η δυνατότητα εξυγίανσης του πολλαπλασιαστικού υλικού κτλ. Στα μειονεκτήματα της μεθόδου

καταγράφεται το υψηλό κόστος εξοπλισμού και η ανάγκη εξειδικευμένου προσωπικού.

Στάδια ιστοκαλλιέργειας και απαιτήσεις σε φυτορρυθμιστικές ενώσεις κάθε σταδίου.

Ο Murashige ήταν αυτός που όχι μόνο σύνθεσε το κυριότερο υπόστρωμα ιστοκαλλιέργειας μέχρι σήμερα (μαζί με τον Skoog, το MS) αλλά και που καθόρισε ουσιαστικά τα στάδια της *in vitro* καλλιέργειας των φυτών. Σύμφωνα λοιπόν με τον Murashige τα στάδια της ιστοκαλλιέργειας είναι τα ακόλουθα:

Στάδιο εγκατάστασης (Εικόνες 5-6): κατά το στάδιο αυτό, μετά τη επιλογή του φυτού που θα πολλαπλασιάσουμε *in vitro* και το είδος του εκφύτου που θα καλλιεργήσουμε, ακολουθεί η κοπή των εκφύτων, η απολύμανση αυτών και η φύτευσή τους *in vitro* σε υπόστρωμα ιστοκαλλιέργειας, ώστε να εγκαταστήσουμε το φυτικό είδος σε *in vitro* συνθήκες. Στο στάδιο αυτό προσθέτονται στο υπόστρωμα κυρίως κυτοκινίνες μόνες τους ή σε συνδυασμό με κάποια άλλη φυτορρυθμιστική ουσία (αυξίνη, γιββερελλίνη) που προστίθενται όμως σε πολύ μικρότερες όμως συγκεντρώσεις, σε σύγκριση με τις κυτοκινίνες ή δεν προστίθεται καμία φυτορρυθμιστική ουσία. Απαιτείται μεγάλη προσοχή στο στάδιο αυτό και από πολλούς, όχι άδικα, θεωρείται το κρισιμότερο στάδιο της ιστοκαλλιέργειας, αφού αν δεν επιτευχθεί εγκατάσταση *in vitro*, τότε δεν μπορούμε να μιλάμε και για ιστοκαλλιέργεια του φυτικού είδους. Τα πιθανά προβλήματα που συναντάμε στο στάδιο αυτό είναι η ανεπιτυχής απολύμανση του εκφύτου. Λόγω του ότι το υπόστρωμα της ιστοκαλλιέργειας είναι πλούσιο σε σάκχαρα και άλλα οργανικά υλικά (αμινοξέα, βιταμίνες), αναπτύσσονται σε αυτό πολλοί μικροοργανισμοί, οι οποίοι μεγαλώνουν εις βάρος των εκφύτων και πολλές φορές τα καταστρέφουν. Ως απολυμαντικά χρησιμοποιούνται κυρίως διαλύματα χλωρίου, όπως υποχλωριώδες νάτριο, υποχλωριώδες ασβέστιο, χλωριούχος υδράργυρος (ιδιαίτερα τοξικός τόσο για τον άνθρωπο όσο και για τα έκφυτα), αλλά και αιθανόλη, υπεροξείδιο του υδρογόνου και διάφορα μυκητοκτόνα κ.ά. Κυριότερο απολυμαντικό με ευρεία χρήση έχει αποδειχθεί το υποχλωριώδες νάτριο.

Ένα άλλο πρόβλημα που συχνά συναντάμε είναι η νέκρωση των εκφύτων, από την υψηλή συγκέντρωση του απολυμαντικού ή την πολύ δραστική απολύμανση. Σε αυτήν την περίπτωση πρέπει να γίνουν διάφορες δοκιμές ώστε να επιτύχουμε την καλύτερη απολύμανση με το μικρότερο ποσοστό ζημίας στα έκφυτα. Στο στάδιο της εγκατάστασης συνήθως τα έκφυτα παραμένουν για 4 εβδομάδες, προτού μεταφυτευθούν - μεταφερθούν στο επόμενο στάδιο.

Στάδιο βλαστογένεσης (Εικόνα 7): στόχος του σταδίου αυτού είναι η παραγωγή όσο το δυνατόν περισσότερων βλαστών. Σε αυτό το στάδιο προσθέτονται στο υπόστρωμα κυρίως κυτοκινίνες, οι οποίες προωθούν το σχηματισμό βλαστών, και δευτερευόντως και αυξίνες και γιββερελλίνες. Στο στάδιο αυτό ανάλογα με το είδος, τα έκφυτα παραμένουν συνήθως από 4-8 εβδομάδες.

Στάδιο ριζοβολίας (Εικόνα 8): όπου πραγματοποιείται η ριζοβολία των βλαστών που παρήχθησαν κατά το προηγούμενο στάδιο. Σε αυτό το στάδιο χρησιμοποιούνται κυρίως αυξίνες. Στο στάδιο αυτό τα έκφυτα παραμένουν για περίπου 4-6 εβδομάδες, ανάλογα με το είδος και την ευκολία με την οποία ριζοβολεί.

Στάδιο εγκλιματισμού – σκληραγώγησης (Εικόνα 9): όπου στο στάδιο αυτό είναι πλέον καιρός να μεταφερθούν τα έρριζα έκφυτα σε συνθήκες *ex vitro*.

Και αυτό το στάδιο είναι καθοριστικό, αφού η επιτυχία της ιστοκαλλιέργειας ολοκληρώνεται με την επιτυχία αυτού του σταδίου. Ο εγκλιματισμός των εκφύτων γίνεται σταδιακά και συνήθως σε μονάδες υδρονέφωσης.

Παραγωγή υποστρώματος ιστοκαλλιέργειας.

Όπως ήδη αναφέρθηκε το υπόστρωμα αποτελείται από διάφορα υλικά, τα οποία περιέχουν απαραίτητα στοιχεία για την ανάπτυξη των εκφύτων. Ουσιαστικά λοιπόν το υπόστρωμα δεν είναι τίποτε άλλο παρά μια συνταγή.

Για την παρασκευή του υποστρώματος χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι. Υπάρχει λοιπόν η δυνατότητα να:

- Φτιάχνουμε το υπόστρωμα προσθέτοντας ένα ένα τα υλικά (τις ενώσεις) που απαιτούνται
- Φτιάχνουμε πυκνά διαλύματα από μίγματα διαφόρων ενώσεων και να τα αναμιγνύουμε κάθε φορά με συγκεκριμένη αναλογία ώστε να επιτύχουμε το τελικό υπόστρωμα
- Φτιάχνουμε ένα πυκνό υπόστρωμα το οποίο θα το συντηρούμε στην κατάψυξη και κάθε φορά που θα θέλουμε να φτιάξουμε υπόστρωμα θα το αποψύχουμε και θα το αραιώνουμε με απεσταγμένο νερό
- Αγοράσουμε σε σκόνη το υπόστρωμα και να το διαλύουμε κάθε φορά σε συγκεκριμένο όγκο νερού ώστε να φτιάξουμε το τελικό υπόστρωμα.

Η επιλογή κάθε φορά της μεθόδου που θα ακολουθηθεί είναι κατεξοχήν στην ευχέρεια του εργαστηρίου και στην ευκολία ή μη πολλαπλασιασμού του είδους που το ενδιαφέρει. Κάθε μέθοδος έχει τα θετικά και τα αρνητικά της (χρόνος παρασκευής, παρουσία ιζημάτων, πολυπλοκότητα, αδυναμία αλλαγής μέρους του υποστρώματος κτλ), τα οποία θα πρέπει να αξιολογηθούν από το φυτώριο και να αποφασισθεί ποια μέθοδος θα ακολουθηθεί.

Τα στάδια παρασκευής του υποστρώματος παρουσιάζονται κατωτέρω:

1. Προσθέτουμε νερό σε ένα ποτήρι ζέσεως, σε όγκο περίπου το μισό από αυτόν που θα χρησιμοποιήσουμε.
2. Προσθέτουμε τις απαραίτητες ενώσεις, όπως αυτές υπαγορεύονται από το υπόστρωμά μας (σύμφωνα με τον τρόπο που έχουμε επιλέξει και αναφέρθηκενωρίτερα).
3. Προσθέτουμε την πηγή άνθρακα
4. Ρυθμίζουμε το pH του υποστρώματος στην επιθυμητή τιμή
5. Ογκομετρούμε το υπόστρωμα
6. Ξεκινάμε τη θέρμανση του υποστρώματος (είναι απαραίτητη για την καλή διάλυση των ενώσεων καθώς και τη διάλυση το άγαρ).
7. Προσθέτουμε το άγαρ (εφόσον πρόκειται για στερεό ή ημι-στερεό υπόστρωμα)

Το υπόστρωμα είναι ουσιαστικά έτοιμο όταν μετά την προσθήκη του άγαρ αυτό καταστεί διαυγές (συμπίπτει με τη στιγμή που το υπόστρωμα βράζει). Καθ' όλη αυτή τη διάρκεια το υπόστρωμα θερμαίνεται σε θερμοκραστικό στοιχείο και αναδεύεται ταυτόχρονα προς διάλυση των ενώσεων και ομογενοποίηση του διαλύματος.

Στη συνέχεια το διαυγές πλέον υπόστρωμα είτε χωρίζεται σε μέρη είτε σε ολόκληρο το υπόστρωμα προσθέτονται οι απαραίτητες φυτορρυθμιστικές ουσίες (αυτό μόνον εφόσον οι φυτορρυθμιστικές αυτές ουσίες μπορούν να αποστειρωθούν χωρίς να καταστραφούν, πληροφορία που τη βρίσκουμε στη βιβλιογραφία). Ακολούθως το υπόστρωμα τοποθετείται είτε σε σωλήνες, είτε σε κωνικές φιάλες, είτε σε άλλα

δοχεία, τα οποία κλείνονται και οδηγούνται προς αποστείρωση. Όλα τα δοχεία που χρησιμοποιούμε πρέπει να είναι θερμοάντοχα (pyrex), αφού η αποστείρωση του υποστρώματος πραγματοποιείται στον κλίβανο υπό πίεση στους 121 °C. Ο χρόνος αποστείρωσης εξαρτάται από τον όγκο του υποστρώματος ανά δοχείο. Όσο μεγαλύτερος ο όγκος τόσο μεγαλύτερος ο χρόνος αποστείρωσης. Συνήθως για σωλήνες (10 ml υπόστρωμα) απαιτείται χρόνος 20 λεπτών ενώ για 100 ml υπόστρωμα χρόνος 30 λεπτών.

Όσες από τις φυτορρυθμιστικές ουσίες δεν μπορούν να αποστειρωθούν με το υπόστρωμα, αποστειρώνονται περνώντας τες από αντι-μικροβιακό φίλτρο (διάμετρος πόρων 0.2 μm) αφού προηγουμένως τα φίλτρα έχουν αποστειρωθεί. Στη συνέχεια το αποστειρωμένο διάλυμα της φυτορρυθμιστικής ουσίας προστίθεται στο αποστειρωμένο υπόστρωμα.

Το υπόστρωμα αφού βγει από τον κλίβανο αφήνεται να κρυώσει και να στερεοποιηθεί (αν χρησιμοποιήσαμε άγαρ) και στη συνέχεια ακολουθεί φύτευση των εκφύτων υπό ασηπτικές συνθήκες στο θάλαμο νηματικής ροής.

Σημαντικές λεπτομέρειες

Πολλές από τις ενώσεις που απαιτούνται για την παρασκευή ενός υποστρώματος βρίσκονται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, π.χ. 0.025 mg/l. Αυτό σημαίνει ότι είναι αδύνατον για αυτές τις ενώσεις να χρησιμοποιήσουμε το ζυγό, ώστε να ζυγίσουμε μια τόσο μικρή ποσότητα. Για το λόγο αυτό φτιάχνουμε διαλύματα των ενώσεων αυτών (αποθέματα) ώστε να μπορούμε να παίρνουμε την ποσότητα της ένωσης που απαιτείται υπό μορφή διαλύματος (με τη χρήση πλέον μηχανικών πιπετών είμαστε σε θέση να παραλάβουμε ποσότητες της τάξης των μl).

Φτιάχνουμε λοιπόν διαλύματα αποθεμάτων αυτών των ουσιών της τάξης των 1000 ή 10000 ppm (mg/l). Έτσι για την παρασκευή ενός διαλύματος 1000 ppm ζυγίζουμε μια ποσότητα της ουσίας 100 mg και τη διαλύουμε σε 100 ml απεσταγμένο νερό, ώστε να έχουμε ένα αποθεματικό διάλυμα συγκέντρωσης 1000 ppm. Η συγκέντρωση αυτή μας επιτρέπει να πάρουμε τόσο όγκο διαλύματος σε ml όσα mg απαιτούνται για την παρασκευή του υποστρώματος, δηλ. αν χρειαζόμαστε 0.025 mg τότε μπορούμε να πάρουμε 0.025 ml, δηλαδή 25 μl, το οποίο είναι εφικτό με τη χρήση μιας μηχανικής πιπέτας. Όταν πρόκειται για λίγο μεγαλύτερες ποσότητες, της τάξης των 6.2 mg/l τότε επιλέγουμε τη δημιουργία αποθεματικού διαλύματος συγκέντρωσης 10000 ppm, οπότε σε αυτήν την περίπτωση παίρνουμε τόσα ml από το αποθεματικό διάλυμα όσα είναι το 1/10 των mg της ουσία που απαιτούνται, δηλαδή θα πάρουμε 0.62 ml, πάλι με τη βοήθεια μηχανικής πιπέτας.

Θα πρέπει επίσης να γνωρίζουμε ότι δεν είναι όλες οι ενώσεις διαλυτές στο νερό. Έτσι η κυστεΐνη θα πρέπει πρώτα να διαλυθεί σε μικρή ποσότητα (σταγόνες) καυστικού νατρίου και μετά να αραιωθεί με νερό, ώστε να επιτύχουμε την επιθυμητή συγκέντρωση. Οι φυτορρυθμιστικές ενώσεις επίσης διαλύονται είτε σε καυστικό νάτριο είτε σε αιθυλική αλκοόλη προτού συμπληρωθεί το υπόλοιπο με νερό. Στην περίπτωση όμως των φυτορρυθμιστικών ουσιών και άλλων ουσιών που προσθέτονται μετά τη ρύθμιση του pH του υποστρώματος, υπάρχει κίνδυνος, αν η διάλυση έχει γίνει με μεγάλη ποσότητα καυστικού νατρίου, η προσθήκη της φυτορρυθμιστικής ουσίας να αλλάξει (αυξήσει) το pH του υποστρώματος.

Όταν φτιάχνουμε τα αποθεματικά διαλύματα, όλες οι ογκομετρήσεις γίνονται με ογκομετρικές φιάλες και στη θερμοκρασία που αναγράφεται επάνω στη φιάλη

(συνήθως 20 ή 25 °C). Πολλές αντιδράσεις είναι εξώθερμες, με αποτέλεσμα να ανεβαίνει η θερμοκρασία του διαλύματος. Θα πρέπει λοιπόν πριν την τελική ογκομέτρηση να περιμένουμε να πέσει η θερμοκρασία αυτού. Αυτό συνήθως γίνεται με την τοποθέτηση του διαλύματος σε λουτρό νερού, σε θερμοκρασία δωματίου.

Πολλές φορές απαιτείται σε πειράματα η προσθήκη διαφορετικών ποσοτήτων φυτορρυθμιστικών ουσιών από τα αποθεματικά διαλύματα. Τις περισσότερες φορές και για τις πιο κοινές φυτορρυθμιστικές ενώσεις η συγκέντρωση των αποθεματικών διαλυμάτων είναι 1000 ppm. Ας υποθέσουμε ότι μοιράζουμε το υπόστρωμά μας σε ποτήρια ζέσεως και προσθέτουμε σε κάθε ποτήρι ζέσεως 200 ml υποστρώματος. Θέλουμε να κάνουμε ένα πείραμα όπου θα δοκιμάσουμε της επίδραση της κυτοκινίνης βεζυλάμινο-πουρίνης (BA) σε συγκεντρώσεις 1, 2 και 4 ppm. Για να υπολογίσουμε τον όγκο του αποθεματικού διαλύματος που θα προσθέσουμε στα 200 ml υποστρώματος θα χρησιμοποιήσουμε τον παρακάτω τύπο:

$$\text{Όγκος αποθεματικού διαλύματος που θα προστεθεί} = \frac{C \times V}{Ca}$$

Όπου C: η συγκέντρωση της φυτορρυθμιστικής ουσίας που θέλουμε να επιτύχουμε στο υπόστρωμα, V: ο όγκος του υποστρώματος στον οποίο θα προστεθεί η φυτορρυθμιστική ουσία σε ml και Ca: η συγκέντρωση της φυτορρυθμιστικής ουσίας στο αποθεματικό διάλυμα.

Έτσι για C=2 ppm, V= 200 ml και Ca= 1000 ppm, τότε θα πρέπει να προσθέσουμε 0.4 ml από το αποθεματικό διάλυμα στα 200 ml υποστρώματος για να επιτύχουμε συγκέντρωση 2 ppm της φυτορρυθμιστικής ουσίας.

Πρακτικό μέρος

- Παρασκευή διαλύματος υποστρώματος
- Παρασκευή αποθεματικών διαλυμάτων 1000 και 10000 ppm
- Παρασκευή υποστρώματος (προσθήκη άγαρ, βράσιμο, προσθήκη φυτορρυθμιστικών ουσιών κτλ)
- Αποστείρωση υποστρώματος.

**Πίνακας 1. ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ
MS (MURASHIGE & SKOOG)
ΜΕ ½ NO₃**

	mg/l	mg/5l	mg/10l	mg/20l
NH₄NO₃	825	4125	8250	16500
KNO₃	950	4750	9500	19000
CaCl₂ 2H₂O	440	2200	4400	8800
MgSO₄ 7H₂O	370	1850	3700	7400
KH₂PO₄	170	850	1700	3400
NA₂EDTA	37.25	186.25	372.5	745
FeSO₄ 7 H₂O	27.85	139.25	278.5	557
MnSO₄ H₂O	22.3	111.5	223	446
Inositol	100	500	1000	2000
H₃BO₃ **	6.2	31	62	124
ZnSO₄ 7 H₂O **	8.6	43	86	172
Na₂MoO₄ *	0.25	1.25	2.5	5
CuSO₄ 5 H₂O *	0.025	0.125	0.25	0.5
CoCl₂ 6 H₂O *	0.025	0.125	0.25	0.5
KI *	0.83	4.15	8.3	16.6
Nicotinic Acid *	0.5	2.5	5	10
Pyridoxine Hydrochlorite *	0.5	2.5	5	10
Thiamine Hydrochloride *	0.1	0.5	1	2
Glycine *	2	10	20	40

Για αυτά τα στοιχεία φτιάχνουμε «αποθέματα» σε μορφή διαλυμάτων
(1.000*-10.000** ppm)

ppm = mg / l (1000 ppm = 1000 mg/l ή 100 mg/100ml) (1:1) mg : ml

10000 ppm = 1g/l ή 1000 mg/100ml) (1:0.1) mg : ml

Auxins									
Αυξίνη									
		M.B.	μM for 1mg/L	Διαλύτης	Διάλυμα	Αποθ. σκόνης	Αποθ. διαλύμ.	Αποστείρωση	Συγκ. mg/l
p-Chlorophenoxyacetic acid (4-CPA)	C0413	186.6	5.36	EtOH	—	RT	2-8°C	CA	0.1-10.0
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid	D7299	221	4.53	—	—	RT	2-8°C	CA	0.01-6.0
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid Sodium salt	D6679	243	4.12	Water	—	RT	2-8°C	CA	0.01-6.0
Indole-3-acetic acid Free acid (IAA)	I2886	175.2	5.71	EtOH/1N NaOH	Water	-0°C	-0°C	CA/F	0.01-3.0
Indole-3-acetic acid Sodium salt	I5148	197.2	5.07	Water	Water	2-8°C	-0°C	CA/F	0.01-3.0
Indole-3-acetic acid methyl ester	I9770	189.2	5.29	—	—	2-8°C	2-8°C	—	—
Indole-3-acetyl-L-aspartic acid	I9387	290.3	3.45	0.5N NaOH	Water	-0°C	-0°C	F	0.01-5.0
Indole-3-butyric acid (IBA)	I5386	203.2	4.90	EtOH/1N NaOH	Water	2-8°C	-0°C	CA/F	0.1-10.0
Indole-3-butyric acid Potassium salt (K-IBA)	I7512	241.3	4.14	Water	—	2-8°C	-0°C	CA/F	0.1-10.0
alpha-Naphthaleneacetic acid Free acid (NAA)	N0640	186.2	5.37	1N NaOH	Water	RT	2-8°C	CA	0.1-10.0
beta-Naphthoxyacetic acid Free acid (NOA)	N3019	202.2	4.95	1N NaOH	Water	RT	2-8°C	CA	0.1-10.0
Phenylacetic acid (PAA)	P6061	136.2	7.34	EtOH	—	RT	2-8°C	CA/F	0.1-50.0
Picloram	P5575	241.5	4.14	DMSO	—	RT	2-8°C	CA	0.01-10.0
2,4,5-Trichlorophenoxyacetic acid (2,4,5-T)	T5785	255.5	3.91	EtOH	—	RT	2-8°C	CA	0.01-5.0
2,3,5-Triiodobenzoic acid Free acid (TIBA)	T5910	499.8	2.00	1N NaOH	Water	-0°C	-0°C	F	0.05-5.0

Πίνακας 2. Αυξίνες που χρησιμοποιούνται συνήθως στην ιστοκαλλιέργεια, διαλύτης που χρησιμοποιείται για την αρχική διάλυσή τους, αποθήκευση διαλύματος, τρόπος αποστείρωσης και συνήθεις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται. (Αποστείρωση: CA, κλίβανο, F: μόνο με φίλτρο, CA/F: τόσο με κλίβανο όσο και με φίλτρο, αλλά με τον κλίβανο πιθανόν να καταστραφεί μικρό ποσοστό της αυξίνης).

Κυτοκινίνες									
		M.B.	μM for 1mg/L	Διαλύτης	Διάλυμα	Αποθ. σκόνης	Αποθ. διαλύμ.	Αποστείρωση	Συγκ. mg/l
Adenine Free base	A 5665	135.1	7.40	1.0 HCl	Water	RT	2-8°C	CA	50-250
Adenine hemisulfate Hemisulfate salt	A 2545	184.2	5.43	Water	—	RT	2-8°C	CA	50-250
6-Benzylaminopurine (BA)	B 3408	225.3	4.44	1N NaOH	Water	RT	2-8°C	CA/F	0.1-5.0
6-Benzylaminopurine Hydrochloride	B 5920	261.7	3.82	Water	—	RT	2-8°C	CA/F	0.1-5.0
6-Benzylaminopurine (BA)	B 3274	225.3	4.44	1N NaOH	Water	RT	2-8°C	CA/F	0.1-5.0
N-Benzyl-9-(2-tetrahydropyranyl)adenine (BPA)	B 2275	309.4	3.23	EtOH	—	-0°C	-0°C	CA/F	0.1-5.0
N-(2-Chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea (4-CPPU)	C 2791	247.7	4.04	DMSO	—	2-8°C	2-8°C	F	0.001-1.0
6-(gamma,gamma-Dimethylallylamino)purine (2iP)	D 7674	203.2	4.92	1N NaOH	Water	-0°C	-0°C	CA/F	1.0-30.0
6-(gamma,gamma-Dimethylallylamino)purine (2iP)	D 5912	203.2	4.92	1N NaOH	Water	-0°C	-0°C	CA/F	1.0-30.0
1,3-Diphenylurea (DPU)	D 7535	212.3	4.71	DMSO	—	RT	2-8°C	F	0.1-1.0
Kinetin	K 0753	215.2	4.65	1N NaOH	Water	-0°C	-0°C	CA/F	0.1-5.0
Kinetin	K 3378	215.2	4.65	1N NaOH	Water	-0°C	-0°C	CA/F	0.1-5.0
Kinetin	K 3253	215.2	4.65	1N NaOH	Water	-0°C	-0°C	CA/F	0.1-5.0
Kinetin Hydrochloride	K 1885	251.7	3.97	Water	—	-0°C	-0°C	CA/F	0.1-5.0
1-Phenyl-3-(1,2,3-thiadiazol-5-yl)urea	P 6186	220.2	4.54	DMSO	—	RT	2-8°C	CA/F	0.001-0.05
trans-Zeatin Free base	Z 0876	219.2	4.56	1N NaOH	Water	-0°C	-0°C	CA/F	0.01-5.0
Zeatin	Z 0164	219.2	4.56	1N NaOH	Water	-0°C	-0°C	CA/F	0.01-5.0
trans-Zeatin Hydrochloride	Z 2753	255.7	3.91	Water	—	-0°C	-0°C	CA/F	0.01-5.0
trans-Zeatin riboside	Z 3541	351.4	2.85	1N NaOH	Water	-0°C	-0°C	F	0.01-5.0

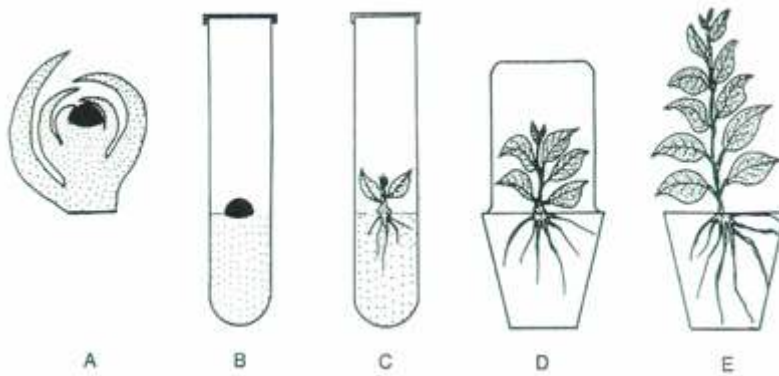
Πίνακας 3. Κυτοκινίνες που χρησιμοποιούνται συνήθως στην ιστοκαλλιέργεια, διαλύτης που χρησιμοποιείται για την αρχική διάλυσή τους, αποθήκευση διαλύματος, τρόπος αποστείρωσης και συνήθεις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται. (Αποστείρωση: CA, κλίβανο, F: μόνο με φίλτρο, CA/F: τόσο με κλίβανο όσο και με φίλτρο, αλλά με τον κλίβανο πιθανόν να καταστραφεί μικρό ποσοστό της κυτοκινίνης).

Διάφορες φυτορρυθμιστικές ουσίες									
		M.B.	μM for 1mg/L	Διαλύτης	Διάλυμα	Αποθ. σκόνης	Αποθ. διαλύμ.	Αποστείρωση	Συγκ. mg/l
(±)-cis,trans-Abscisic acid (ABA)	A 1049	264.3	3.78	1N NaOH	Water	-0°C	-0°C	CA/F	0.1-10.0
Ancymidol	A 9431	256.3	3.90	DMSO	—	2-8°C	-0°C	CA/F	1.0-10.0
Chlorocholine chloride (CCC)	C 4049	158.1	6.33	Water	—	RT	2-8°C	F	up to 500
3,6-Dichloro-o-anisic acid (Dicamba)	D 5417	221.0	4.52	EtOH/Water	—	2-8°C	2-8°C	F	0.01-10.0
Gibberellic acid (GA ₃)	G 7645	346.4	2.89	EtOH	—	RT	2-8°C	CA/F	0.01-5.0
Gibberellic acid Potassium salt (K-GA ₃)	G 1025	384.5	2.60	Water	—	2-8°C	-0°C	CA/F	0.01-5.0
Gibberellin A ₄ Free acid (GA ₄)	G 7276	332.4	3.01	EtOH	—	-0°C	-0°C	F	0.01-5.0
(±)-Jasmonic acid	J 2500	210.3	4.76	EtOH	—	2-8°C	-0°C	F	0.01-100.0
Phloroglucinol	P 1178	126.1	7.93	Water	—	RT	2-8°C	CA/F	up to 162
N-(Phosphonomethyl)glycine (Glyphosate)	P 9556	169.1	5.91	1N NaOH	Water	RT	2-8°C	F	—
Succinic acid 2,2-dimethylhydrazide	S 2022	160.2	6.24	Water	—	2-8°C	2-8°C	CA/F	0.1-10.0

Πίνακας 4. Διάφορες άλλες φυτορρυθμιστικές ουσίες που χρησιμοποιούνται συνήθως στην ιστοκαλλιέργεια, διαλύτης που χρησιμοποιείται για την αρχική διάλυσή τους, αποθήκευση διαλύματος, τρόπος αποστείρωσης και συνήθεις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται. (Αποστείρωση: CA, κλίβανο, F: μόνο με φίλτρο, CA/F: τόσο με κλίβανο όσο και με φίλτρο, αλλά με τον κλίβανο πιθανόν να καταστραφεί μικρό ποσοστό).



Εικόνα 1. Άμεση οργανογένεση βλαστού σε υποκοτύλιο εσπεριδοειδών



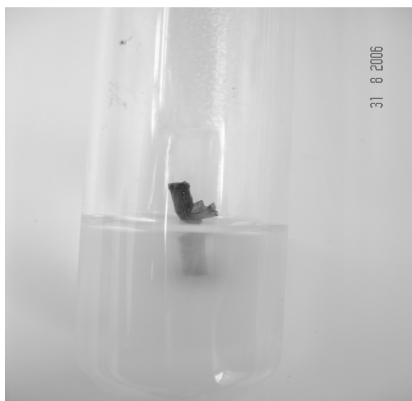
Εικόνα 2. Σχεδιαγματική απεικόνιση ιστοκαλλιέργειας βλαστοκορυφής.



Εικόνα 3. Θάλαμος ανάπτυξης.



Εικόνα 4. Δοχεία ανάπτυξης μέσα στο θάλαμο.



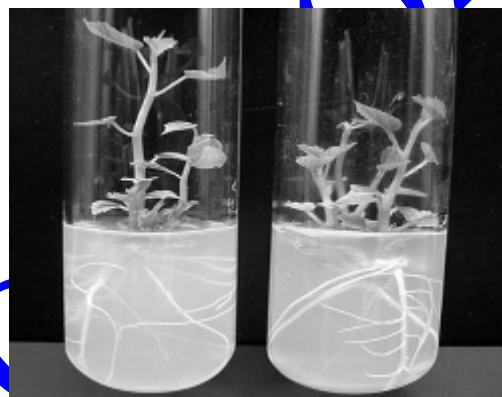
Εικόνα 5. Στάδιο εγκατάστασης (κομβικό έκφυτο)



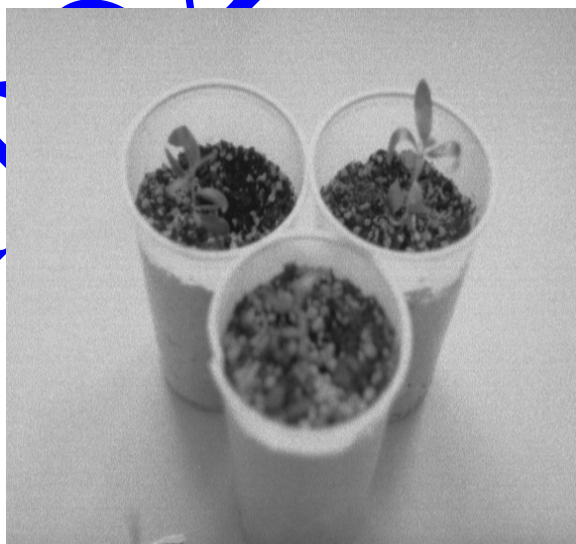
Εικόνα 6. Τέσσερις εβδομάδες στο στάδιο εγκατάστασης



Εικόνα 7. Στάδιο βλαστογένεσης (οκτώ εβδομάδες μετά)



Εικόνα 8. Στάδιο ριζοβολίας.



Εικόνα 9. Εγκλιματισμένα έρριζα έκφυτα.