

Άσκηση 8^η

Ιστοκαλλιέργεια – Απολύμανση και φύτευση εκφύτων – Μεταφορά εκφύτων σε επόμενο στάδιο

Όπως αναφέρθηκε και στην προηγούμενη άσκηση, το σημαντικότερο ίσως στάδιο της ιστοκαλλιέργειας είναι αυτό της εγκατάστασης. Βασικό σημείο στο στάδιο αυτό αποτελεί η απολύμανση των εκφύτων. Πάρα πολλές φορές αποτυγχάνει η προσπάθεια καλλιέργειας *in vitro* ενός είδους, λόγω της αδυναμίας επιτυχούς απολύμανσης των εκφύτων.

Κοπή και απολύμανση εκφύτων.

Λαμβάνουμε από φυτά που αναπτύσσονται *ex vitro* νεαρή βλάστηση, η οποία μεταφέρεται στο εργαστήριο για τις περαιτέρω μεταχειρίσεις. Η μεταφορά γίνεται είτε υπό χαμηλή θερμοκρασία και υψηλή σχετική υγρασία είτε μέσα σε νερό, προς αποφυγή μύρανσης. Ανανεώνονται στο εργαστήριο οι τομές των βλαστών και κόβονται τα έκφυτα. Συνήθως τα έκφυτα προς πολλαπλασιασμό καρποφόρων δένδρων είναι είτε βλαστοκορυφές είτε κομβικά έκφυτα (με ένα ή περισσότερους κόμβους). Συνήθως κόβονται τα φύλλα, γιατί αποτελούν εστία μόλυνσης ενώ παράλληλα με την κοπή των φύλλων δημιουργείται το ερέθισμα προς έκπτυξη του εν μασχάλη οφθαλμού. Καθώς κόβονται τα έκφυτα τοποθετούνται μέσα σε νερό προς αποφυγή αφυδάτωσης. Όταν ολοκληρωθεί η κοπή μπορεί να ακολουθήσει, πριν την απολύμανση, πλύσιμο των εκφύτων με τρεχούμενο νερό βρύσης, για να ξεπλυθούν τυχόν σκόνες, μικροοργανισμοί και γενικά βρωμιές που μπορεί να αποτελέσουν εστία μόλυνσης. Η διάρκεια αυτής της πλύσης κυμαίνεται από μερικά λεπτά έως και λίγες ώρες. Στη συνέχεια ακολουθεί απολύμανση των εκφύτων.

Όπως αναφέρθηκε στην προηγούμενη άσκηση τα απολυμαντικά που χρησιμοποιούμε στην ιστοκαλλιέργεια έχουν ως βάση την απολυμαντική ικανότητα του χλωρίου ή του οξυγόνου ή της αλκοόλης. Μπορεί βέβαια να γίνει και συνδυασμός όλων αυτών, όταν οι πιο ήπιες μέθοδοι απολύμανσης αποτυγχάνουν.

Το πιο σύνηθες απολυμαντικό είναι το υποχλωριώδες νάτριο, το οποίο χρησιμοποιείται σε διάφορες συγκεντρώσεις και σε διάφορους χρόνους. Συνήθως οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται κυμαίνονται από 8-12% κ.ό. ετοιμόχρηστο υποχλωριώδες νάτριο, ενώ αυξάνονται σημαντικά όταν πρόκειται για απολύμανση σπόρων και μπορούν να φτάσουν το 30-60% κ.ό. λόγω του ότι οι σπόροι αντέχουν περισσότερο σε υψηλότερη συγκέντρωση απολυμαντικού, ενώ λόγω των περιβλημάτων τους είναι και πιο δύσκολη η απολύμανσή τους. Ο χρόνος που παραμένουν τα έκφυτα στο διάλυμα του απολυμαντικού κυμαίνεται και αυτός από μερικά λεπτά έως και μισή ώρα. Συνήθως στο εργαστήριό μας χρησιμοποιούμε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται από 10-15% κ.ό. για 10-12 λεπτά της ώρας υπό συνεχή ανάδευση. Καλό είναι στο διάλυμα του απολυμαντικού να προστίθεται και κάποιο προσκολλητικό, προς μείωση της επιφανειακής τάσης του διαλύματος όταν έρθει σε επαφή με το έκφυτο, ώστε να έχουμε πληρέστερη και ομοιόμορφη κάλυψη της επιφάνειάς του. Συνήθως χρησιμοποιείται το προσκολλητικό Tween 20 σε συγκέντρωση 2-3 σταγόνων ανά 100 ml. Τα έκφυτα αναδεύονται συνεχώς μέσα στο διάλυμα, προς αποφυγή εγκλωβισμού αέρα και δημιουργία θύλακα, που θα αποτρέψει την καλή εφαρμογή του απολυμαντικού. Πολλές φορές καταφεύγουμε και σε απολύμανση υπό κενό ή σε λουτρό υπερήχων, με μη σταθερά όμως μέχρι στιγμής αποτελέσματα.

Η αιθανόλη (αιθυλική αλκοόλη) χρησιμοποιείται συνήθως σε συνδυασμό με το υποχλωριώδες νάτριο και πριν από αυτό. Η συγκέντρωση που χρησιμοποιούμε είναι συνήθως 75% κ.ό. για 10-30 sec. Η αιθανόλη βοηθά στην μερική απομάκρυνση των κηρών από το έκφυτο με αποτέλεσμα την καλύτερη επαφή του απολυμαντικού με όλη την επιφάνεια του εκφύτου, ενώ παράλληλα δρα η ίδια ως απολυμαντικό.

Αμέσως μετά την απολύμανση ακολουθεί καλό ξέπλυμα (τουλάχιστον τρεις φορές) με απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό, προς ξέπλυμα της περισσειας του απολυμαντικού, η οποία μπορεί να προκαλέσει τοξικότητα. Γίνεται αντιληπτό πλέον, ότι από τη στιγμή που απολυμανθούν τα έκφυτα όλες οι εργασίες πρέπει να γίνονται με αποστειρωμένα υλικά και μέσα στο θάλαμο νηματικής ροής (Εικόνα 1), υπό ασηπτικές συνθήκες. Τα απολυμασμένα πλέον έκφυτα είναι έτοιμα να φυτευτούν στο υπόστρωμα εγκατάστασης.

Φύτευση εκφύτων.

Η φύτευση των εκφύτων στο στάδιο εγκατάστασης καλό είναι να γίνεται σε σωλήνες, ώστε να φυτεύουμε ένα έκφυτο ανά σωλήνα. Αυτό είναι πολύ σημαντικό αφού αν κάποιο από τα έκφυτα δεν έχει απολυμανθεί σωστά, τότε αυτό απορρίπτεται. Αν το έκφυτο αυτό βρίσκονταν στην ίδια κωνική φιάλη ή δοχείο με άλλα έκφυτα θα απορρίπτονταν και αυτά, άσχετα αν εμφάνιζαν συμπτώματα μόλυνσης ή όχι. Με αυτόν τον τρόπο κάνουμε οικονομία στα έκφυτα και στο υπόστρωμα.

Τα έκφυτα λαμβάνονται από το ποτήρι ζέσεως όπου βρίσκονται με απολυμασμένη λαβίδα και φυτεύονται με τη σωστή πολικότητα στο υπόστρωμα, συνήθως μέχρι τη μέση του μήκους των. Στη συνέχεια μεταφέρονται στο θάλαμο ιστοκαλλιέργειας, όπου θα παραμείνουν για ένα διάστημα περίπου 4 εβδομάδων.

Με το πέρας των 4 εβδομάδων τα έκφυτα μεταφέρονται σε νέο υπόστρωμα, συνήθως σε κωνικές φιάλες ή βάζα (στάδιο βλαστογένεσης), με περισσότερο υπόστρωμα και συνήθως περισσότερα έκφυτα ανά φιάλη ή βάζο. Σε αυτό το στάδιο παραμένουν τα έκφυτα για περίπου 8 εβδομάδες. Για φυτικά είδη που χαρακτηρίζονται από μικρή ανάπτυξη πλάγιων βλαστών *in vitro* όπως είναι η ελιά, λόγω της ισχυρής κυριαρχίας κορυφής, η μεταφύτευση μπορεί να γίνει και πάλι σε σωλήνες, ατομικά κάθε έκφυτο. Σε είδη που η ανάπτυξη είναι ταχεία, ο χρόνος παραμονής στο στάδιο αυτό μπορεί να μειωθεί, πχ. ακτινίδιο. Αν μετά το τέλος του σταδίου εγκατάστασης παρατηρείται νέκρωση του κάτω μέρους του εκφύτου, μπορούμε να προχωρήσουμε σε ανανέωση της τομής πριν τη φύτευση στο νέο υπόστρωμα. Αυτό βέβαια αυξάνει το χρόνο που απαιτείται για τη μεταφύτευση, αφού η όλη διαδικασία γίνεται πιο πολύπλοκη.

Με το πέρας των 8 εβδομάδων κόβονται νέοι βλαστοί μήκους περί το 1 εκατοστό και μεταφέρονται σε υπόστρωμα ριζοβολίας, σε ατομικούς σωλήνες ή βάζα-κωνικές καλλιέργειας (στάδιο ριζοβολίας). Στο στάδιο αυτό τα έκφυτα παραμένουν για περίπου 4-6 εβδομάδες, ανάλογα την ευκολία ριζοβολίας.

Με το πέρας της ριζοβολίας τα έριζα πλέον έκφυτα πρέπει να σκληραγωγηθούν και να εγκλιματιστούν σε *ex vitro* συνθήκες. Επειδή τα έκφυτα μεγαλώνουν μέσα στους σωλήνες ή στις κωνικές σε ένα περιβάλλον κεκορεσμένης ατμόσφαιρας, δεν είναι απαραίτητο να σχηματιστεί κηρός στην επιφάνεια των φύλλων. Επίσης έχει παρατηρηθεί ότι οι ρίζες των εκφύτων δεν χαρακτηρίζονται από την παρουσία πολλών ριζικών τριχιδίων, αφού το υπόστρωμα ανάπτυξης αποτελείται σχεδόν κατά 98% από νερό, και έτσι δεν είναι απαραίτητη η παρουσία τριχιδίων προς απορρόφηση. Αυτές οι δύο μορφολογικές και ανατομικές καταστάσεις των εκφύτων επιβάλλουν τον εγκλιματισμό τους σε *ex vitro* συνθήκες σταδιακά, ώστε να μην έχουμε απώλειες από αφυδάτωση, μάρανση και τελικώς νέκρωση, τόσο λόγω αδυναμίας απορρόφησης νερού από τα λιγιστά ριζικά τριχίδια όσο και από την

ταχύτατη απώλεια νερού από τα φύλλα, λόγω έλλειψης προστατευτικού κηρού. Η σκληραγώγηση καλό είναι να γίνεται σε μονάδα υδρονέφωσης ή να φροντίζουμε ώστε να ψεκάζουμε τα έκφυτα συχνά με νερό με ένα ψεκαστηράκι μέσα στο θάλαμο ιστοκαλλιέργειας ή εκτός αυτού. Η μεταφορά των έρριζων εκφύτων γίνεται αφού βγάλουμε τα έκφυτα από το δοχείο καλλιέργειας, απομακρύνουμε με ξέπλυμα το υπόστρωμα από τις ρίζες και φυτεύσουμε τα έκφυτα σε υπόστρωμα, συνήθως μείγμα τύρφης – περλίτη ή μόνο βερμικουλίτη. Φροντίζουμε ώστε τα φύλλα των εκφύτων να είναι μονίμως καλυμμένα με ένα στρώμα νερού προς αποφυγή απώλειας νερού και αφυδάτωσης. Ο εγκλιματισμός έχει πετύχει όταν διαπιστωθεί ανάπτυξη νέας βλάστησης οπότε τα φυτά πλέον μεταφέρονται εκτός θερμοκηπίου ή θαλάμου και αναπτύσσονται στο ύπαιθρο.

Πολλές φορές στο υπόστρωμα που χρησιμοποιούμε κατά τη σκληραγώγηση μπορούμε να εμβολιάσουμε μυκόρριζες οι οποίες μπορούν να αυξήσουν τα ποσοστά επιτυχούς σκληραγώγησης των εκφύτων.

Πρακτικό μέρος.

- Γνωριμία των φοιτητών με το θάλαμο ιστοκαλλιέργειας και με ήδη καλλιεργούμενα *in vitro* φυτά στα διάφορα στάδια ιστοκαλλιέργειας
- Απολύμανση εκφύτων
- Φύτευση εκφύτων σε υπόστρωμα εγκατάστασης
- Μεταφορά εκφύτων από υπόστρωμα εγκατάστασης σε υπόστρωμα βλαστογένεσης
- Μεταφορά εκφύτων από υπόστρωμα βλαστογένεσης σε υπόστρωμα ριζοβολίας
- Παρακολούθηση εγκλιματισμού έρριζων εκφύτων



Εικόνα 1. Θάλαμος νηματικής ροής (συνεχούς ροής αέρα).

ΠΕΤΡΟΣ ΡΟΚΚΩΣ