KFRI Research Report 159

DEVELOPMENT AND DISSEMINATIONM OF LOW COST TECHINIQUES FOR MICROPROPAGATION OF KAEMPFERIA GALANGA (KACHOLAM)

E.M. Muralidharan

KERALA FOREST RESEARCH INSTITUTE
PEECHI, THRISSUR

December 1998 Pages: 26

ABSTRACT

Cost-reduction and simplfication of conventional tissue culture procedures were applied for the micropropagation of Kaempferia galanga. It was demonstrated that routine plant tissue culture procedures can be carried out by undergraduates with very little training.

A simple sterile hood was used in this study instead of a laminar flow bench and a pressure cooker instead of the autoclave. Laboratory grade chemicals and tap water were used for preparation of tissue culture media. Plantlets could be raised in low-cost polypropylene bags modified in shape and sue using a heat sealer. Liquid medium was found to be adequate for culturing multiple shoots, Incubation of cultures was also carried out at room temperature using sunlight as the only light source. Plantlets were rooted in the multiplication media itself and transferred to soil after a few days of hardening.

All the modified procedures were successfully carried out by an undergraduate technician after about two months of training. Ten selected undergraduate trainees were also given a one-week training course at the end of the project period to disseminate the techniques developed in the project.

INTRODUCTION

Biotechnology is in general perceived as a sophisticated area of scientific research. For the same reason, its commercial applications have remained restricted to capital intensive large-scale entrepreneurship. Plant tissue culture or its application to plant propagation - micropropagation is no exception.

Since the advent of micropropagation technology in the 1960s after G. Morel developed the techniques of mericloning in orchids (Morel, 1964). an industry has emerged throughout the world. A large number of crop plants, ornamental plants and forest trees are being successfully micropropagated on a commercial scale. In the past two decades several corporate firms in India have also entered this area. Although plants like banana, orchids and anthuriums are sold within the country, most of the propagation work is undertaken on contract for the international market. Many laboratories take advantage of the relatively cheaper labour charges available in the country.

The conventional micropropagation laboratory is typically a capital intensive and sophisticated facility. These laboratories have rigorous procedures for maintenance of sterility. The use of high purity chemicals, expensive equipments and specialized labware is the rule. Technically skilled and trained personnel are utilized which makes the technology labour intensive. This adherence to conventional procedures is in some measure justified when critical scientific experiments are being conducted to standardize tissue culture techniques. In the area of large-scale commercial micropropagation also, with its attendant risks of loss ofvaluable cultures through contamination, such precautions are justified.

However, in the context of cost reduction in micropropagation especially on a smaller scale, some degree of relaxation in the stringency is acceptable and may even be desirable for economic reasons. Deviation from the established tenets of research in biotechnology has not been entirely lacking. These have, however, not been given serious deliberation in mainstream scientific fora. The example of Venkatapathy Reddiar. a farmer who developed a simple micropropagation method for *Crossandra infundibuliformis* without any formal training in science (Anonymous. 1994) implies that the technology can be brought out of the confines of the research laboratory and practiced by individuals, Similarly, compelled mostly out of economic necessity, scientists at the Institute of Plant Research and Biotechnology at Villa Clara in Cuba

have developed several non-conventional measures in the micropropagation laboratory (Baeza-Lopez, 1995). Cultures of several species are being grown using sunlight available through the large floor-to- ceiling glass windows. In Australia a commercial firm is reported to grow all cultures in a shaded polythene greenhouse (Hartney and Svensson. 1992). An extreme and non-conventional expedient was adopted by Raju (1994) who simply hung sealed culture bottles on string under the branches of a tree. It is however, more common to find the 'small-scale' micropropagator operating with an investment of more than Rupees one million. The difference from the large biotechnology companies is only in scale of operation rather than any reduction in level of sophistication.

One reason for the inclination towards sophistication is that micropropagation has been the offshoot of academic research in plant morphogenesis where emphasis was given to precise control of the chemical and physical environment in which plant cell. tissues and organs are grown. Research efforts on the factors influencing the cost of micropropagation have therefore not received enough attention. It has been estimated that a 50% reduction in cost of micropropagated plants would increase the market demand by 10 times (Kozai, 1991).

FACTORS INFLUENCING MICROPROPAGATION COSTS

Capital costs

a. Infrastructure

Conventional tissue culturc facilities includes airconditioned culture and inoculation rooms. laboratory area for glassware cleaning, autoclaving, storage of chemicals and for media preparation. To ensure high levels of cleanliness, culturc rooms require to be isolated and with suitable wall and floor material. Electrical wiring, water supply etc. are usually required to be specifically done to cater to rhe different equipment used.

b. Equipments

Equipments commonly used include steam autoclave. laminar flow benches, hot air ovens. electronic analytical balances. pH meter, dissection microscopes and water distillation stills. Besides contributing to the capital cost of establishing a laboratory. the equipments also incur a recurring expenditure for maintenance. Most ol the above equipmcnts are available in India in a broad range of prices.

Recurring costs

a. Energy

The energy requirements of a typical tissue culture facility are large due to the electricity used to operate airconditioners. autoclave, laminar flow benches, hot air ovens and culture room lights.

b. Consumables

Chemicals used for preparation of the culture media are normally of Analytical Reagent (AR)Grade. This quality of chemicals are of very high purity and are expensive when compared with other grades like Laboratory Reagents (LR). Plant growth regulators, agar-agar, cotton wool, Analytical grade filter paper and surgicals are some of the other consumables used in the tissue culture laboratory. Absolute alcohol or rectified spirit. the procurement of which requires special permits, is commonly used for swabbing surfaces of tables and shelves and for surface sterilisation of explants and occasionally for spirit lamps used for flaming equipment and glassware. LPG is used commonly for burners for melting media or for flame sterilisation of surgicals.

c. Culture vessels

Test tubes and conical flasks are the most commonly used culture containers in the research laboratory. These are made of expensive borosilicate glass. Culture vessels made of polypropylene or polycarbonate are also expensive compared to soda glass containers which is the choice of commercial micropropagation units. Non-adsorbent cotton plugs are the most commonly used closures for test tubes and flasks. Polypropylene or metal lids are used for glass bottles.

d. Labour

The single largest component in cost of micropropagation is the labour costs. This is especially high in the larger laboratories if Ph.Ds and other highly qualified persons are employed. Technicians are required to be trained particularly in carrying out the sterile procedures and preparation of media. Other labour requirements include washing and sterilisation of glassware and preparation of culture media and transfer and maintenance of plantlets to soil.

SCOPE OF THIS STUDY

Each of the factors mentioned above offers the possibility of being simplified or made more cost effective. The initial development of a micropropagation method for any plant species mostly involves empirical experimentation and defining the physical and chemical requirements for optimal results becomes a necessity. Thereafter by working down from such a standardised protocol of micropropagation a much simpler and cost-effective method can be achieved. Practical and economical considerations take precedence over accuracy and precision when cost reduction and simplification of large- scale micropropagation are the objectives.

Such an effort at simplification will focus attention on each of the factors that influence *in vitro* culture. For example, an understanding of the level of impurities in the cheaper alternatives to media constituents or the quality of tap water used may be neccessary before adopting the alteration in routine procedures. The use of daylight as the source of light for cultures will encourage studies on the effect of the spectral quality of artificial light on the development of plants *in vitro*.

In the context of commercialisation, the deployment of simple and cost effective techniques will make micropropagation within reach of smaller entrepreneurs. In view of the increasing number of educated unemployed people. including women, in the state, the micropropagation technology if made accessible is expected to contribute to the promotion of the horticulture/floriculture industry.

OBJECTIVE OF THIS STUDY

This study was therefore aimed at addressing the issue of sophistication in infrastructure and techniques and cost of production as a limiting factor in the wider commercial application of micropropagation technology. Special emphasis was given to the potential for adoption of the technology by the small-scale entrepreneurs or at a household level by persons without much formal training in biology.

The specific objectives of this study were to test some of the simple methods and cheaper alternatives in carrying out micropropagation of a herbaceous medicinal plant viz.*Kaempferia galanga.*The strategy adopted was to simplify the techniques starting from the conventional protocol which was available. The criterion for simplicity was the amenability of the techniques in the hands

of an undergraduate technician after a short training of 3-4 weeks. Several cost reduction measures were tested for their efficacy. Towards the end of the study period when most of the modifications in techniques had been standardized, a training course was organised to disseminate the knowledge accrued in the project.

MATERIALS AND METHODS

PLANT MATERIAL

The plants of *Kaempferia galanga* used for this study were grown in the medicinal plant garden of KFRI, Peechi. Rhizomes were dug out in February and stored in polythene bags after washing away the soil. Rhizome buds were excised and used as explants for culture whenever required.

STANDARD MICROPROPAGATION PROCEDURE

The procedure for in vitro culture of rhizome explants and induction of multiple shoots and piantlets of *Kaempferia galanga* were standardised earlier (Muralidharan. 1995: 1997). Modifications in the conventional *in vitro* culture technique were adopted in this study as described below.

Surface sterilization

Rhizome buds of about 1-2 cm were cleaned and washed in tap water to which a few drops of a laboratory detergent (Labolene. Glaxo Ltd.) was added. followed by 3-4 washes with water. Under sterile conditions they were transferred to a autoclaved bottle and treated with 0.1% $HgCI_2$ (w/v) for 10 minutes followed by 3-4 washes with sterile water.

Culture media

All culture media were based on the Murashige and Skoog's (1962) (MS) medium (Table 1). Other additives like sucrose. plant growth regulators were added as required for the different experiments. Stock solutions of various concentrations were prepared and stored in the refrigerator and the required aliquots added and made up with water to formulate different culture media. pH of the media was adjusted using 1 N or 0.1 N HC1 or NaOH and using an electronic pH meter or pH paper strips.

Table 1. Composition of Culture Media

A. Basal Medium (MS*)

No.	Chemical	Concentration in mg/l
1.	KNO_3	1900.00
2.	NH_4NO_3	1650.00
3.	$CaCl_2 . 2H_2O$	440.00
4.	$MgSO_4 . 7H_2O$	370.00
5.	KH_2PO_4	170.00
6.	$MnSO_4 . 4H_2O$	22.30
7.	$ZnSO_4 . 7H_2O$	8.60
Microelements		
8.	H_3BO_3	6.20
9.	KI	0.83
10.	$CuSO_4 .5H_2O$	0.02
11.	$Na_2MoO_4 .2H_2O$	0.25
12.	$CoCl_2 .6H_2O$	0.02
13.	$FeSO_4 . 7H_2O$	27.80
14.	$Na_2EDTA.2H_2O$	37.30
Organic Additives		
15.	Myo inositol	100.00
16.	Thiamine HCl	0.10
17.	Nicotinic acid	0.50
18.		*0.50*

*Mineral salts and vitamins of Murashige and Skoog's Medium(1962)

B. Modifications in Basal Medium (MS) (Low-cost options)

a. MS-1 - MS without Organic Additives

b. MS-2 - MS without Organic Additives or Microelements

C. Bud Sprouting Medium * : Basal Medium + BAF' (3mg/1) + Sucrose 2%

D. Shoot Multiplication Medium* : Basal medium + BAP(1-3mg/1) + Sucrose 2%

*Agar-Agar(Hi-Media Ltd.) added at 0.5% (w/v) for solid media. Sucrose replaced by grocery sugar or deleted in some of the experiments.

Establishment of cultures

Surface sterilised explants were inoculated under sterile conditions provided by a laminar flow bench or sterile hood (described under 2.4.2.) on appropriate pre-sterilised solid or liquid culture media in test tubes and kept in the culture room or under the different conditions to be tested.

Maintenance of cultures

Established shoot culturcs were maintained by subculture to fresh media every 4-6 weeks. Shoots were trimmed by cutting leaves about *3* cm from the base and removing the roots.

LOW-COST OPTIONS USED IN THIS STUDY

Equipment

Sterilization of glassware and culture media was carried out using a large pressure cooker (Make: Prestige. 22 Litrcs capacity) and an LPG burner.

Sterile hood

As an alternative to the conventional Laminar Flow Bench (LAF), a simple and inexpensive sterile hood or sterile chamber was fabricated (Fig. 1). Galvaniscd iron sheet and glass was used to construct the hood.

The dimensions of the hood were 60 cm (L) x 45 cm (w) x 35 cm (H). The top of the hood had a glass window sloping towards the front so as to permit view of the working area inside. Provision was given in Lhe form of openings for hands as well as lor glassware and cultures. The sterile hood was fabricated with the bottom left open since it was intended to be used on a clean table top. The design also facilitated easier introduction of articles into the hood prior to beginning work.

Chemicals

Laboratory Reagent (LR) grade chemicals were used wherever possible as an alternative to Analytical Reagent (AR) Grade chemicals that is used conventionally for micropropagation. Plant growth regulators and organic additives including vitamins were available only in AR grade. Tap water was tested instead of the double glass distilled water used conventionally for preparation of culture media. Sucrose (LR Grade) was added as the carbon source in all

media except where the effect of grocery sugar was being tested and in experiments where shoots were grown in the absence of carbon source.

Culture containers

The following alternatives to the test tube and conical flasks were used as culture containers in this study.

i. Polypropylene (PP)culture containers (Phytaconfrom Sigma, USA) with wide mouths and snap-on lids.

ii. Soda glass bottles with PP or stainless steel lids.

iii. Thin walled PP bags of size 22 x 28 cm procured from whole-sale dealers.

Modifications to the PP bags were carried out with a heat sealer to alter the size and shape or to strengthen the bottom seal whenever found necessary. To prevent the sides from sticking together, a piece of paper was inserted into the bag before autoclaving. This was removed when media was dispensed into the bags. Autoclaved liquid media was dispensed into the sterile PP bags by using a sterile glass funnel with a long stem.

During autoclaving and during culture the mouth of the bags were closed by folding it down twice and keeping the fold in place with paper clips (Fig. 21. Care was taken to open the mouth of the bags only partially while dispensing media or during subcultures so as to avoid contamination.

Laboratory facilities

As an alternative to airconditioned culture rooms with artificial (fluorescent) lights, maintenance of cultures under ambient conditions were tested. A part of the laboratory room with windows facing north was used for maintenance of the cultures(Fig.3). Shelves were fixed inside the window to accommodate the cultures and covers of polyethylene were provided to prevent dust settling on the vessels.

LABOUR

A lady undergraduate Project Assistant was appointed in the project. She had some experience of working in a clinical laboratory and was therefore

familiar with handling labware. Procedures described in the study were carried out by the Project Assistant after a short training of 3-4 weeks.

TRANSFER TO SOIL AND HARDENING

Plantlets were removed from the culture container and washed in running tap water to remove traces of media before planting. A mixture of soil with vermiculite (1:1) in plastic disposable cups was used for transfer of plantlets. The cups were covered with polythene bags to maintain high humidity for 2-3 weeks until plantlets were hardened. Hardened plants were planted in soil after 8-10 weeks of growth in cups.

TRAINING COURSE

A one week training course was conducted with ten candidates selected from about 50 applicants from Trichur District. The applications were called for through announcements in newspapers and radio. Selection of participants were done based on a write-up submitted with the applications wherein they gave their reason for the interest in the training course in tissue culture. None of the participants were having educational qualifications higher than Pre-degree. All participants were engaged in full or part-time agricultural activity at their own farms or households.

The training consisted of lectures in Malayalam as well as practical classes. Trainees were given an introduction to various *in vitro* techniques and relevant information on plant structure, nutrition, sexual and clonal propagation. Emphasis was given to the importance of sterile techniques. A handbook in Malayalam on low-cost tissue culture (Appendix 1) was prepared and given to the trainees.

All participants individually carried out the procedures involved in initiating cultures from rhizome buds of *Kaempferia galanga.* Since the duration of the training was short, procedures like subculture of shoots and transfer of plantlets to soil, were carried out using older cultures.

Since the participants showed interest in micropropagation of orchids, banana and anthuriums. the details of media and the different culture techniques for these plants were also discussed.

RESULTS AND DISCUSSION

Successful micropropagation of *Kaempferia galanga* was demonstrated using a combination of the simple and low-cost alternatives in equipment and techniques adopted. The different procedures were also successfully carried out by the technician, after a few weeks of training.

MICROPROPAGATION

Microbial contamination

About 40% of the cultures were lost due to fungal contamination within 10 days of inoculation of rhizome buds. Higher rates of contamination was obtained in the first few attempts by the technician. A progressive decline in contamination was possible when more care was taken in carrying out the sterilization procedure.

During subculture of shoot cultures. contamination was encountered only occasionally (<5%) when bottles or test tubes were used for culture. When PP bags were used for culture the rates were higher (30%) initially. A higher contamination rate for the PP bags is expected due to i. the difficulty in carrying out the manipulations smoothly because of the collapsible nature of the bags and ii. the method of sealing the bags. viz. by folding rather than heat-sealing. Contamination rates could be brought down to the expected level (<5%) when care was taken and the technician gained some experience.

Other chemical sterilants commonly used are calcium or sodium hypochlorite. Since freshly made calcium or sodium hypochlorite is not readily available. mercuric chloride was preferred although it is less safe to use and dispose.

Establishment of shoot cultures

Sprouting of rhizome buds began in a week and shoot formation occured in 3-4 weeks. Sprouting occured in 60% of the explants on solid media. In liquid media sprouting was less than 10%. Multiple shoot formation took place in about 6 weeks during which the explants were subcultured once without excision into fresh media.

Since the effectiveness of BAP on bud sprouting and shoot multiplication in *K. galanga* and other species of Zingeberaceae, has already been established by several reports (Vincent. *et al,* 1992: Muralidharan. 1997) no other hormone was tested in the present study. BAP also is the least expensive of the commonly used cytokinins.

Shoot cultures were subcultured on to fresh media after 6-8 weeks of growth, Explants consisted of at least one shoot and often two to three developing shoot initials. On high BAP (3 mg/l) containing media, 5-6 multiples per shoot was obtained.

Transfer of shoots to low cytokinin media (1 mg/l BAP) resulted in lower multiplication rates (2-3 shoots per culture) but better development and elongation of the shoots. The multiplication occurring on the low cytokinin may also be due to the elongation of meristems that were induced during the earlier culture in the high cytokinin media.

Shoot growth and multiplication were found to be equally good in cultures grown on solid and liquid (unagitated) media. Micropropagation of *Kaempferia* spp. have been reported previously only on solid media and no mention has been made of the use of liquid media at any stage of culture (Vincent *et al..* 1992). The use of liquid media for micropropagation has several advantages. Besides the saving in the cost of the solidifying agent. shoots or plantlets growing on liquid media are easier to handle during subcultures and transfer to soil. Traces of agar remaining on the roots grown in solid media, will encourage microbial infection and mortality of the plantlcts. Shoot cultures in liquid media have been employed successfully for several plant species (George, 1993)and normally such cultures are agitated on rotary shakers to aerate the media. In the present study shoot cultures did not need shaking probably because tissues were not completely sub-merged. Since shakers are expensive and energy intensive to operate, culture procedures involving shaking is a disadvantage.

Omission of vitamins and organic constituents from the basal media (MS-11 or microelements (MS-2) did not appear to have any effect on the shoot multiplication rates or shoot growth. Although organic additives form a constituent of most plant tissue culture media. it is believed that this is not a limiting factor since green tissues are partly autotrophic and can produce the essential vitamins. Cultures in media prepared in tap water also appeared to be normal. Tap water will contain most of the microelements in significant quantities but the actual concentration will vary with location and has to be tested critically before culture media are routinely prepared with it. Similarly.

the presence of other elements in high levels may have an undesirable effect on the cultures.

Plantlet formation

Rooting occured in all the shoots on the multiplication media and hence no separate *in vitro* rooting step was required. Other workers have used a seperate rooting step on a auxin containing media (Agretious *et al,* 1996: Mustafa and Hariharan. 1997: Vincent *et al.,* 1992). Since no specific advantage was reported in plants rooted *in vitro.* the drawback in the method is that the additional culture stage only increases the cost of plant production.

Kaempferia plantlets were very easily transferred to soil and established without much hardening except for maintenance of humidity for 2-3 days using a polythene bag as cover.

Shoot cultures in the elongation phase could be maintained on a sucrose free medium until transfer to soil. It requires further studies to determine whether the plants had become partly autotrophic at this stage. The advantage of having a sugar free medium is that the chances of microbial contamination of shoots are greatly reduced both in culture as well as immediately after transfer to soil.

CULTURE CONTAINERS

The disadvantage in the use of test tubes is that in the later stages of cultures transfers will be impeded by the small diameter of the vessel. Conical flasks, also made of borosilicate, is the commonly used container when larger volumes are required. The narrow neck of such flasks also makes it extremely difficult to carry out transfers. Being expensive makes it unsuited for large scale micropropagation. Cotton plugs used as closures for test tubes and flasks are reusable for a few times if they have not been in contact with media. In long term cultures cotton plugs accumulate dust and spores which will trickle down into the vessel and pose a risk of contamination.

Disposable containers widely used in the western countries are usually those made of heat labile plastics e.g. polystyrene or PVC. Sterilization at factory is therefore done by gamma irradiation. For commercial applications, disposable vessels are expensive. especially when labour for cleaning and autoclaving are not very expensive as in India. The problems of effective disposal is also a disadvantage with disposable plasticware.

Soda glass bottles are the commonly used culture vessels in most commercial micropropagation labs. When used with metal or polypropylene lids the vessel can be stenlised by autoclaving. Although soda glass bottles do not have the chemical inertness of borosilicate glassware. no adverse effects on culture are normally observed. Any influenceon the composition of the culture media may be evident only after they have been used for 12-18 months. Procedures for restoring soda glass bottles to the original conditions have also been suggested (George. 1993).

Clear PP culture bags are commercially available (Sunbags. Sigma Ltd.. USA) but with greater wall thickness. PP bags used in this study were made of thinner material and werc much cheaper.

Use of tight closurcs. especially metal or plastic lids, effects the air exchange between the vessel and atmosphere. Culture containers like Phytacon and Sunbags are also available with an embedded membrane filter to facilitate gaseous exchange. In the present study the method used to close the PP bags without sealing, permitted sufficient gaseous exchange to take place.

EQUIPMENT

The use of a sterile hood was found satisfacton, for carrying nut all the culture manipulations involved in this studv. However. compared to a laminar flow bench the hoods have confined space and restrict the hand movement of the operator. The use of PP bags for culture is particularly rendered more difficult. It required repeated practice to reduce contamination rates in the bags.

Such sterile hoods or chambers iverc in routine use for tissue culture work about 20-25 years ago before the use of laminar flow benches became common. Sterile chambers could be Fabricated out of glass. wood. aluminum. steel or plastic. Glass aquarium tanks can easily be modified to make a simple sterile chamber. Joints in such chambers could be sealed with silicone sealant. Sterility is maintained by wiping the inner surfaces with spirit or chlorine water and the use of UV lamps and hence the material chosen should not be affected by their use. Some laboratories employ a glove box with plastic or rubber sleeves for the operators hands to further minimize contamination but this makes the transler ofobjccts in and out of the chamber more difficult.

WATER QUALITY

Shoot multiplication rates and normal growth was maintained in *Kaempferia* when glass distilled water was replaced with tap water in preparation of

media. Since operating a glass distillation still is highly energy intensive, significant savings in cost of production will result with the use of tap water.

However it has to be anticipated that the quality of tap water will vary with the location and the efficiency of the water treatment system. Dissolved impurities and suspended matter and varying levels of chlorine are to be expected in the tap water. Hence boiling and filtering of the tap water is suggested if required or single distilled or deionised water or stored rain water used instead if easily available. Raju (1994)describes a simple device to obtain distilled water using a pressure cooker. A glass condenser attached to the outlet of the cooker is used to condense the steam to produce water of single distilled quality. He also recommends the use of commercial 'battery water' as a convenient source of distilled water.

CULTURE MANIPULATIONS

A rosette type of growth habit of *Kaempferia* is typical of plants in the family Zingeberaceac and several other monocots. In culture the shoots consist of elongated leaves and an extremely condensed stem which in turn produced shoot clusters during the multiplication stage. Multiplication occured by proliferation of axillary meristems in the condensed stem. Hence division of cultures during subculturcs required only separation at the base. This was facilitated in *Kaempferia* since the shoot clusters fragmented easily without the need to excision with scalpels. The need to make several excisions at specific positions on the shoots (especially of dicots) during subculture, is one of the factors that makes micropropagation highly labour intensive.

On the other hand in *Kaemferia.* it is the relatively large size of leaves in comparison to the highly condensed stem which caused difficulty during subculturcs. Leaves at the end of the usual passage filled up the culture vessel space and the large sizes made it cstrcmely cumbersome to maintain sterility during transfers. Trimming of the leaves from 2-4 cm to isolate the shoot bases facilitate separation of single shoots from the clusters and to transfer to fresh media. In plant sprcies especially dicots with a elongated stem and relatively smaller leaf area such a problem is rarely encountered.

CULTURE UNDER AMBIENT CONDITIONS

Shoot cultures in the multiplication and elongation stages grown under ambient conditions showed no notable differences when compared to those in the culture room, This has earlier been substantiated in the case of four

species of Zingeberaceae including *K. galanga* (Muralidharan. 1997). Shoot cultures and plantlets grown in daylight had a deeper green colour than those grown under fluorescent illumination. Hayashi and Kozai (1987) reported that carnation shoots developed into rooted plants faster under solar radiation, than under artificial illumination. The acclimatization unit used by them had the humidity and light accurately controlled.

Some disparity in culture response and in quality of plantlets produced can be expected when culture conditions especially illumination and temperature fluctuate with the time of the year. Holdgate and Aynsley (1977) report that variation in plant quality can be expected when temperatures fluctuate. However such a variation has not been observed in the *Kaempferia* plantlets (Muralidharan. 19971. However it has to be determined in each case, if a particular plant species is amenable to culture under ambient conditions.

OTHER LOW-COST ALTERNATIVES

Other cheaper alternatives which were found feasible but not routinely used for this study, include the use of indicator solutions or pH paper strips instead of the pH meter for pH measurcmcnt and the use of an ordinary double pan laboratory balance for weighing of chemicals. The small micropropagation lab with only an occasional need for media preparation could use these equipment without compromising greatly on accuracy.

The availability of commercial ready-made culture media would be of great advantage for small scale operators by saving on capital costs of some of the laboratory equipment required for media preparation. Currently these are available only in a small range and are expensive.

TECHNICAL EXPERTISE

The Project Assistant appointed lor the study had no experience related to plant tissue culture. She had however worked in a clinical laboratory of a hospital as a technician and *was* familiar with cleaning of glassware.

Among the different aspects the most difficult to impart to the technician was how the different techniques influcnccd the rate of contamination of cultures. Only with an experience of several months. an acceptable level of sterility could be achieved when the sterile hood and PP bags were used. It also required some effort to familiarise the technician with the calculations involved in preparation of culture media using stock solutions.

A great advantage that developing countries like India has today is the availability of relatively cheap technically skilled labour. In contrast, in the developed countries the high cost of labour has even been a reason for research into automation and use of robotics in micropropagation.

This study indicates that it is feasible to impart sufficient skills to an apprentice in a few months to permit him/her to carry out all the stages of micropropagation based on a standard protocol.

TRAINING COURSE

In spite of selcction based on evaluation of the write-up submitted with the applications, it was found that some of the trainees had only a superficial interest and aptitude in the course. It was apparent that some of the trainees expected a simple rechniquc which could immediately be put to practice like conventional plant propagation: Some of ihcm assumed that any of the vegetable crops could be micropropagated. Most trainees were disappointed that plants of commercial porcntial like orchids, anthurium or banana were not included in the course.

The short duration of rhc training course was a drawback because the trainees could not observe the results of the procedures carried out by them during thr iraining. One possibility of overcoming this could be to have a course split into two or three installments and spread over a period of three to four months with a break of few weeks in between. It should also be feasible for trainees to repeat the different procedures several times during the course *so* as to have a thorough understanding.

Many of ihc trainees experienced some difficulty with the calculations involved in preparation of culture media using stock solutions. Hence to avoid errors it will be useful for beginners to have a chart prepared of standardized stock solution concentrations and volumes lo be added for specific media.

CONCLUSIONS

The techniques of cost-reduction and simplification that has been attempted in the study has been successfull in the micropropagation of *K. galanga.* It has also been demonstrated that routine plant tissue culture procedures can be carried out by persons without any great emphasis on the theoretical basis of the techniques.

For setting up a less expensive micropropagation facility the following facilities and procedures are suggested for the beginner.

a. The use of a simple locally fabricated sterile hood made of galvanised iron sheer and glass for aseptic work.

b. Cost savings could be effected by avoiding horosilicate glassware as culture containers. Glass jam bottles with metal caps can be used when only a small number is needed. At appropriate culture stages polypropylene bags could be used for shoot cultures.

c. Liquid media is to be used whereever found feasible instead of agar solidified media.

d. Windows receiving sufficient sunlight throughout the day or a room with provision for sufficient light through the ceiling could be converted to a culturc incubarion area.

e. Laboratory, grade mineral salts and grocery sugar may be used instead of AR Grade chemicals lor preparation of media.

f. Filtered tap water may be used for preparation of culture media after adequate tests.

g. The use of a chart of standardised stock solution concentrations and volumes to be added. is reccommended for the beginner until he/she is more conversant with the procedures.

Although formulation of new media and innovations in culture techniques is not normally expected of a person trained in the low-cost micropropagation technique. some modifications in techniques especially for surface sterilisation and hardening of plantlets or optimization of hormone levels can be done, rather than adhering to the protocols strictly. Only a person with some experience could develop and put to practice a micropropagation protocol for

a new species. from the information available in a typical report published in scientific journals.

Setting up and operating a micropropagation unit successfully requires involvement and more than a casual interest. The cost-effectiveness of micropropagation of any species needs to be demonstrated before embarking on it on a commercial scale. For that reason it perhaps can be recommended only for entrepreneurs who have the patience and inclination to familiarise with the techniques and then fine tune it for a particular plant species.

It will be beneficial to potential entrepreneurs if under the auspices of STEC or the State Horticultural Development Corporation, small-scale ventures in micropropagation are supported by easy loans and subsidies and help provided for distribution of mother plants and buy-back arrangements.

REFERENCES

Agretious T.K. Martin. K.P. and Hariharan. M. 1996 *In vitro* clonal multiplication of *Alpinia calcarata* Rosc. Phytomorphology, 46: 133-138.

Anonymous, 1994. Tissue culture technology for Crossandra, Science and Technology Supplement, The Hindu. November 2, 1994:28.

Baeza-Lopez. P. 1995. Cubans enlist the sun in virus free propagation. *Ceres.* 156: 15-16.

George, E.F. 1993. Plant Propagation by Tissue Culture. Part 1. The Technology. Exegetics Ltd. England.

Hartney. V.J. and Svensson. J.G.P., 1992. The role ofmicropropagalion for Australian trees species. *In:* Baker, F.W.G. led.) Rapid Propagation of Fast-growing Woody species. CAB International:7-28.

Hayashi. M. and Kozai. T. 1987. Development of a facility for accelerating the acclimatization of tissue- cultured plantlets and the performance of test cultivations. *In:* Ducate. *G.*. Jacob, M. and Simeon. A. (Eds.). Plant Micropropagation in Horticultural industries. Preparation, Hardening and Acclimatization Processes. Belgian Plant Tissue Culture Group. Symposium Florizel 87. Arlon Belgium:123-134.

Holdgate. D.P. and Aynsley. J.S. 1977. The development and establishment of a commercial tissue culture laboratory Acta Hort.. *78.* 31-36.

Kozai, T. 1991. Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: Debergh. P.C. and Zimmerman. R.H (eds.) Micropropagation. Technology and Application. Kluwer. 447-469.

Morel. G. 1964. Tissue culture- A new means of clonal propagation in orchids. Am Orchid Soc. Bull.. 33: 473-478.

Muralidharan. E.M. 1995. An evaluation of cost reduction measures in micropropagation. Proc. of Seventh Kerala Science Congress. Palakkad. January 27-29. : 17-19.

Muralidharan. E.M. 1997. Low-input micropropagation of some species of Zingeberaceae. *In:* Proc. of The*All* india Symp. on Recent Advances in the Biotechnological Applications of Plant Tissue and Cell Culture. June 23-25. CFTRI. Mysore.

Murashige. T. and Skoog. F. 1962. A revised medium for rapid growth and bio-assays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant.. 15: 473-497.

Mustafa Anand. P.H. and Hariharan. M. 1997. *In* vitro multiplication of greater galangal *(Alpinia galanga* (Linn.)Willd) - a medicinal plant. Phytomorphology. 47(1): 45-50.

Raju. C.R. 1994. Simplified tissue culture method for self employment. In Proc. Sixth Kerala Science Congress. January 1994. Thiruvananthapuram:465-467.

Vincent. K.A.. Mathew K.M. and Hariharan. M. 1992. Micropropagation of *Knempferia galanga* L. a medicinal plant. Plant Cell Tissue Org. Cult. 28:

ABBREVIATIONS

AR	-	Analytical Reagent Grade
BAP	-	6-Benzylaminopurine
Kin.	-	Kinetin
LR	-	Laboratory Reagent
PA	-	Project Assistant
PP	-	Polypropylene

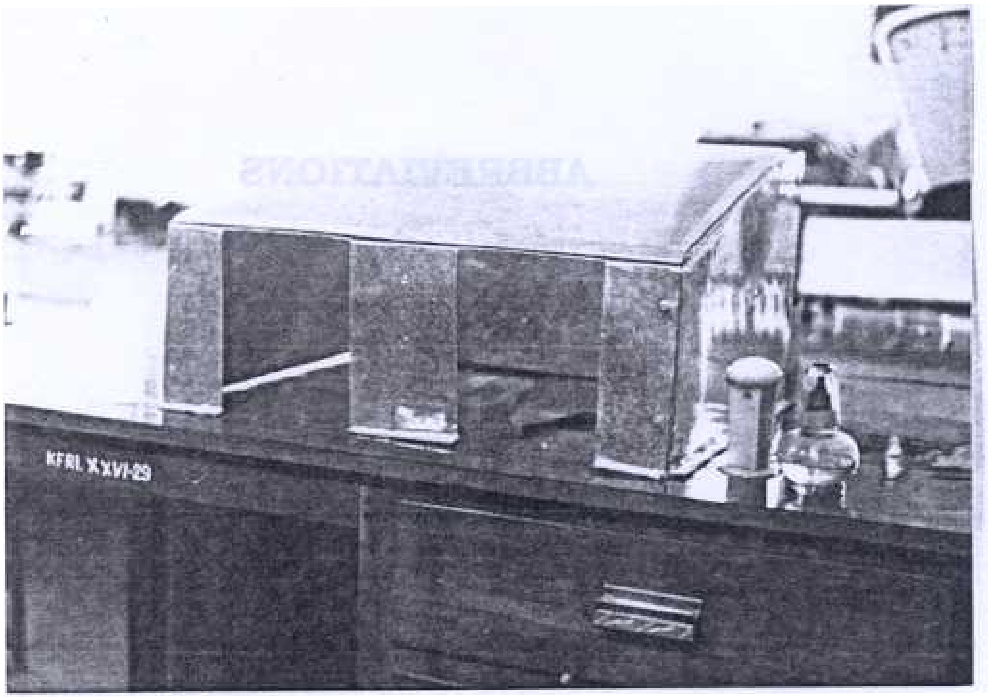


Fig. 1. The sterile hood used for culture work in this study

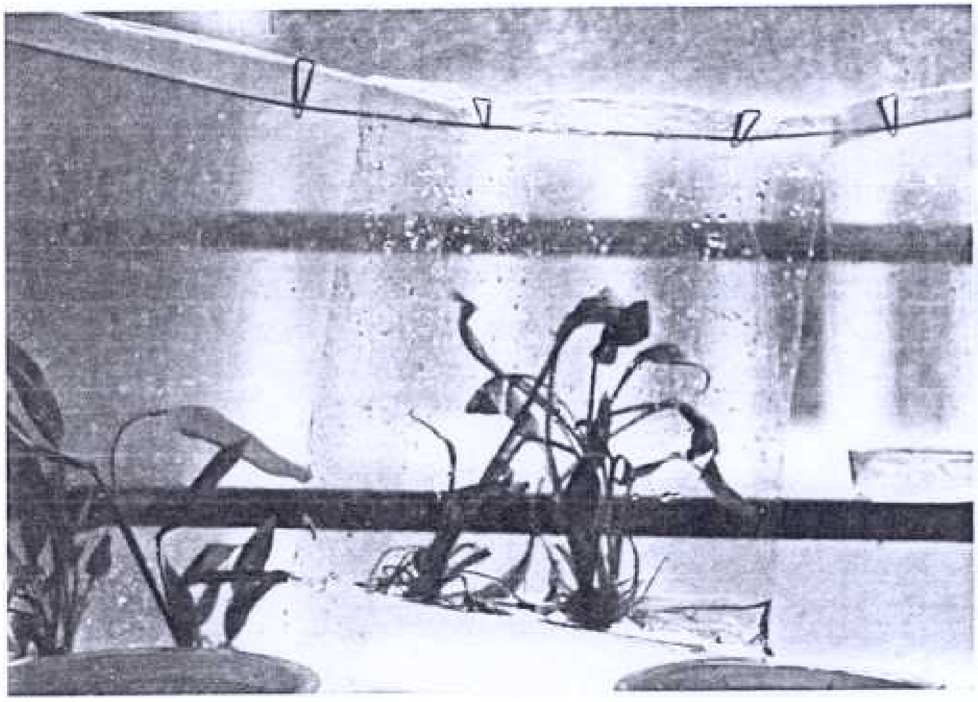


Fig. 2. Polypropylene bags used as culture container

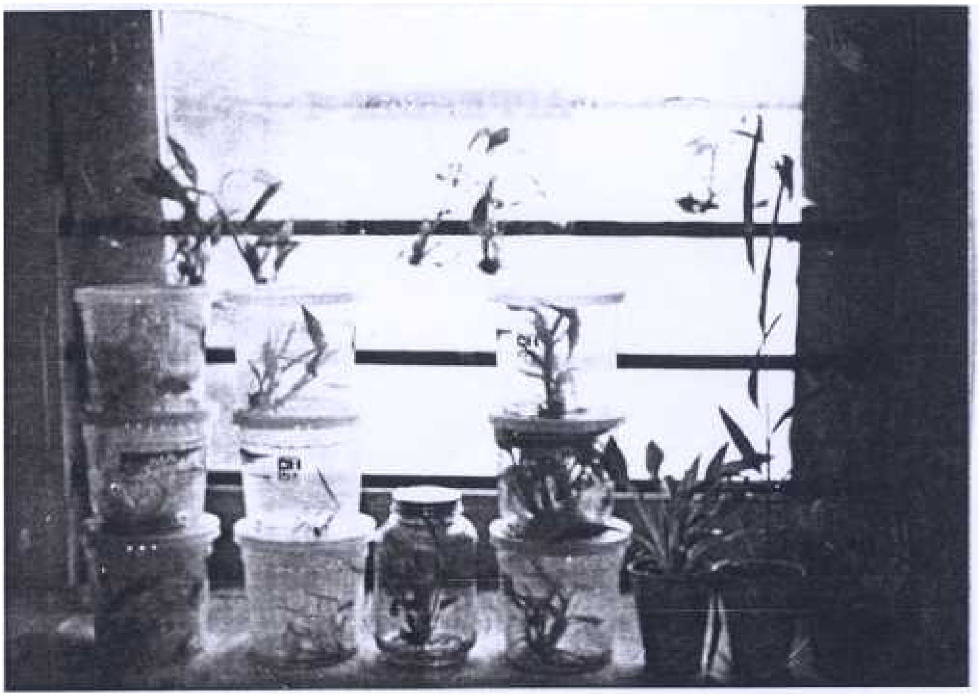


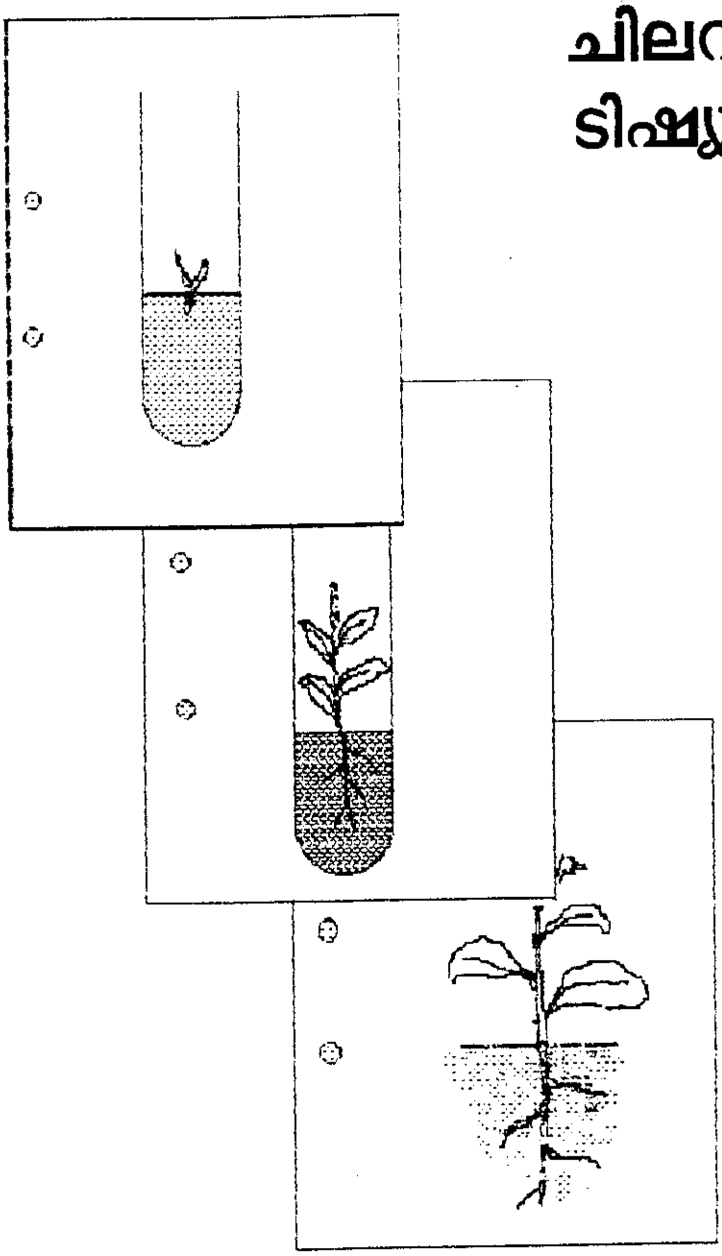
Fig. 3. PP bags and other culture vessels kept under ambient conditions near the window

CONTENTS

		Page	File
	Abstract	I	r.159.2
1	Introduction	1	r.159.3
2	Materials and Methods	6	r.159.4
3	Results and Discussion	11	r.159.5
4	Conclusion	18	r.159.6
5	References	21	r.159.7
6	Abbreviations	23	r.159.8
7	Figures	24	r.159.9
8	Appendices	26	r.159.10

APPENDIX -I

ചിലവുകുറഞ്ഞ ടിഷ്യു കൾച്ചർ



കേരള വനഗവേഷണ ഇൻസ്റ്റിറ്റ്യൂട്ട്
പീച്ചി, തൃശ്ശൂർ

ഈ കൈപുസ്തകം തയ്യാറാക്കിയയത് ഡോ. ഇ.എം. മുരളീധരൻ, ഡോ. യു.എം. ചന്ദ്രശേഖര, ഡോ. എസ്. ശങ്കർ, സത്യൻ. പി. ജോസഫ്, അജിത. എസ്, എം. കെ. വത്സല, ടി.ബി. സുമ, സി.കെ. സുനന്ദ, സോണിയ സി. തോമസ് എന്നിവരുടെ സഹായസഹകരണത്തോടെയാണ്. STECന്റെ ധനസഹായത്തോടെ നടപ്പാക്കിയ ഒരു ഗവേഷണ പദ്ധതിയുടെ ഭാഗമായിട്ടാണ് ഈകൈപ്പുസ്തകം തയ്യാറാക്കിയിരിക്കുന്നത്.

ആമുഖം

സസ്യങ്ങളിലെ ടിഷ്യുകൾച്ചർ ശാസ്ത്രജ്ഞൻമാർക്കും സാങ്കേതികവിദഗ്ദ്ധർക്കും മാത്രം ചെയ്യാൻ പറ്റുന്ന ഒരു വിദ്യയായിട്ടാണ് ഇതുവരെ കരുതിയിരുന്നത്. സ്വകാര്യസ്ഥാപനങ്ങൾ ടിഷ്യുകൾച്ചർ വഴി ഉല്പാദിപ്പിച്ച വാഴയും ഓർക്കിഡും കേരളത്തിലെ ജനങ്ങൾക്ക് സുപരിചിതമാണ്. വാണിജ്യാടിസ്ഥാനത്തിലുള്ള ടിഷ്യുകൾച്ചർ കമ്പനികൾ സംസ്ഥാനത്ത് ആരംഭിച്ചിട്ട് ഒരു ദശാബ്ദത്തിലേറെയായെങ്കിലും പ്രതീക്ഷിച്ചതുപോലെ ഈ വ്യവസായം വിജയിച്ചിട്ടില്ല.

അടിസ്ഥാന വിദ്യാഭ്യാസം മാത്രം ഉള്ളവർക്ക് ടിഷ്യുകൾച്ചറിൻെറ തത്വങ്ങൾ പരിചയപ്പെടുത്തുന്നതിനും, വിലകൂടിയ ഉപകരണങ്ങളോ ലാബോറട്ടറി സൗകര്യങ്ങളോ കൂടാതെ പ്രാവർത്തികമാക്കുന്നതിനും വേണ്ടിയാണ് ഈ ലഘുലേഖ തയ്യാറാക്കിയിരിക്കുന്നത്. ഇതിന് വേണ്ടി സസ്യഭാഗങ്ങളുടെ ഘടനയേയും ധർമ്മത്തേയും കുറിച്ചുള്ള അറിവ് അത്യാവശ്യമാണ്. ടിഷ്യുകൾച്ചറിനെക്കുറിച്ച് അവശ്യം അറിഞ്ഞിരിക്കേണ്ട വസ്തുതകളാണ് ഇതിൽ പ്രതിപാദിച്ചിരിക്കുന്നത്.

1. സസ്യങ്ങളുടെ ഘടന

സസ്യങ്ങളുടെ ഏതെല്ലാം ഭാഗങ്ങൾ ടിഷ്യുകൾച്ചർ ചെയ്യാൻ യോജിച്ചതാണ്?

വളരുന്ന ഭാഗങ്ങളിൽമാത്രം കാണുന്നവയും തുടർച്ചയായിവിഭജിച്ചുകൊണ്ടിരിക്കുന്നവയുമായ ഇളം കോശങ്ങൾക്ക് മെരിസ്റ്റം (Meristem) എന്നു പറയുന്നു. മെരിസ്റ്റമുകൾ പ്രധാനമായി മൂന്നു തരമുണ്ട്. അഗ്രമെരിസ്റ്റവും (apical meristem), കക്ഷമുകുളങ്ങൾ (Axillary meristem)വും, വേരിലെ മെരിസ്റ്റവും (Root meristem). സസ്യത്തിൻെറ വളർച്ച പ്രധാനമായും കാണ്ഡത്തിൻെറയും വേരിൻെറയും അഗ്രഭാഗങ്ങളിൽ കാണുന്ന മെരിസ്റ്റത്തിൽ കേന്ദ്രീകരിച്ചിരിക്കുന്നു. അഗ്രമെരിസ്റ്റം കാണ്ഡത്തിൻെറയും അതിലെ ശാഖകളുടെയും അഗ്രത്തിലാണ് സ്ഥിതി ചെയ്യുന്നത്. ഇതിനുപുറമേ സസ്യത്തിൻെറ ഇലകളുണ്ടാക്കുന്ന ഭാഗത്തുകാണുന്ന മെരിസ്റ്റമാണ് കക്ഷമുകുളം. ഈ മെരിസ്റ്റം പിന്നീട് തുടർച്ചയായി വിഭജിച്ച് ശാഖകളായി മാറുന്നു. ചെടിയുടെ അഗ്രഭാഗം മുറിച്ചുകളഞ്ഞാലും ഈ മെരിസ്റ്റം വിഭജിച്ചാണ് ചെടി വളരുന്നത്. വളരുവാനും, വിഭജിച്ച് തൈച്ചെടിയാകുവാനുമുള്ള കഴിവ് അഗ്രമുകുളത്തിനും കക്ഷമുകുളത്തിനും ഉള്ളതുകൊണ്ട് കൾച്ചർ ചെയ്യുവാൻ ഇവയാണ് യോഗ്യം.

ഏകബീജപത്രമുള്ള (monocot) മിക്ക ചെടികളിലും കക്ഷമുകുളങ്ങൾ കാണപ്പെടുന്നില്ല. എങ്കിലും ഇവയിൽ തണ്ടിൻെറ അടിഭാഗത്തുള്ള സക്കേർസും (suckers), ഭൂകാണ്ഡങ്ങളും (rhizome) ടിഷ്യുകൾച്ചറിന് വേണ്ടി ഉപയോഗിക്കുന്നു.

2. അന്നജത്തിൻെറ ആവശ്യം

സൂര്യപ്രകാശത്തിൻെറ സാന്നിദ്ധ്യത്തിൽ കാർബൺഡയോക്സൈഡും ജലവും ഉപയോഗിച്ച് ഇലകളിൽ കാണുന്ന ഹരിതകത്തിൻെറ (chlorophyll)) സഹായത്താൽ പഞ്ചസാര(Sugar) ഉണ്ടാക്കുന്ന പ്രക്രിയയ്ക്കാണ് പ്രകാശസംശ്ളേഷണം എന്നുപറയുന്നത്. ചെടികളുടെ വളർച്ചക്കും ഉപാപചയ (metabolism) പ്രവർത്തനങ്ങൾക്കും ആവശ്യമായ പ്രധാനപ്പെട്ട ഊർജ്ജസ്രോതസ്സാണ് അന്നജം. ടിഷ്യുകൾച്ചർ ചെയ്യപ്പെടുന്ന ചെടികളിൽ പ്രകാശസംശ്ളേഷണം തുലോം കുറവാണ്. ആയതിനാൽ പഞ്ചസാര പുറമേനിന്ന് കൊടുക്കേണ്ടിവരും.

3. ജലനഷ്ടം

സസ്യഭാഗങ്ങളുടെ ഉപരിതലാവരണമായ ക്യൂട്ടിക്കിൾ ജലനഷ്ടം തടയുന്നു. ചെടികളുടെ ഇലകളിലും ഒരു പരിധിവരെ മറ്റു ബാഹ്യഭാഗങ്ങളിലും കാണുന്ന ആസ്യരന്ധ്രങ്ങൾ (stomata) സ്വേദനത്തേയും വായുവിനിമയത്തേയും നിയന്ത്രിക്കുന്നു. സ്വേദനം മൂലമുള്ള അമിത ജലനഷ്ടം ചെടി വാടുന്നതിനു കാരണമാക്കുന്നു. ഒരു പരിധി കവിഞ്ഞ് വാടിയാൽ വീണ്ടും ജലലഭ്യതയുണ്ടായാലും ചെടികൾ പൂർവ്വസ്ഥിതിയിലാവുകയില്ല. ടിഷ്യൂകൾച്ചർ ചെടികളെ ജലനഷ്ടം തീവ്രമായി ബാധിക്കുന്നതിനാൽ കൂടുതൽ ശ്രദ്ധ വേണം.

4.പോഷക മൂല്യങ്ങൾ (Nutrition)

ചെടികൾക്ക് അതിൻെറ സന്തുലിത വളർച്ചയ്ക്കും നിലനിൽപ്പിനും വേണ്ടി പലതരത്തിലുള്ള ധാതുക്കൾ ആവശ്യമാണ്. ഇവ ലവണങ്ങളുടെ രൂപത്തിൽ മണ്ണിൽനിന്നും വേരുകൾ വഴി സസ്യങ്ങൾ വലിച്ചെടുക്കുന്നു. ചെടികൾക്ക് ധാരാളമായി ആവശ്യമുള്ള മൂലകങ്ങളെ പ്രധാനമൂലകങ്ങൾ (Major elements) എന്ന് പറയുന്നു. (നൈട്രജൻ, ഫോസ്ഫറസ്, പൊട്ടാസ്യം). കുറഞ്ഞ അളവിൽ ആവശ്യമുള്ള മൂലകങ്ങളെ (Minor elements) എന്നു പറയുന്നു. വളരെ കുറഞ്ഞ തോതിൽ മാത്രം വേണ്ട മൂലകങ്ങളെ സൂഷ്മമൂലകങ്ങൾ (Trace elements) എന്നുപറയുന്നു. ടിഷ്യൂകൾച്ചർ ചെടികൾക്ക് ഇവ ആവശ്യമാണ്.

5. അണുവിമുക്തമാക്കൽ (Sterilisation)

ഏകകോശ ബഹുകോശ സൂക്ഷ്മജിവികളായ കുമിളുകളും ബാക്ടീരിയകളുമാണ് ടിഷ്യൂകൾച്ചറിൽ പ്രാധാന്യമർഹിക്കുന്നത്. സ്വതന്ത്ര രേണുക്കളായി നമ്മുടെ ചുറ്റുപാടിൽ കാണപ്പെടുന്ന ഇവ ഉപകരണങ്ങൾ, വസ്ത്രങ്ങൾ, ചർമ്മം എന്നിവയെ മലിനീകരിക്കും. കുറഞ്ഞ ജലാംശത്തിലും, പോഷകാംശത്തിലും ഇവയ്ക്ക് വളരാൻ സാധിക്കും. ടിഷ്യൂകൾച്ചർ മാധ്യമത്തിൽ ഇവയുടെ അധികവളർച്ചമൂലം കൾച്ചറുകൾ ഉപേക്ഷിക്കേണ്ടതായി പോലും വരാറുണ്ട്. അതിനാൽ ടിഷ്യൂകൾച്ചറിൽ ഇവയെ നശിപ്പിക്കുക എന്നത് ഒരു പ്രധാന ഘട്ടമാണ്. ഈ പ്രക്രിയയ്ക്ക് അണുവിമുക്തമാക്കൽ അഥവാ സ്റ്റെറിലൈസേഷൻ എന്നു വിളിക്കുന്നു.

പല രാസവസ്തുക്കൾക്കും സമ്പർക്കത്തിലൂടെയോ നിരന്തര ഉപയോഗത്തിലൂടെയോ അണുനശീകരണത്തിനുള്ള കഴിവുണ്ട്. മെർക്കുറിക് ക്ലോറൈഡ്, ബ്ലീച്ചിംഗ് പൗഡർ, സ്പിരിറ്റ്, സിൽവർ നൈട്രേറ്റ് മുതലായവയ്ക്ക് സൂക്ഷ്മജിവികളെ ഉടനടി നശിപ്പിക്കുന്നതിനുള്ള കഴിവുണ്ട്. എന്നാൽ പെൻസിലിൻ, സ്ട്രെപ്റ്റോമൈസിൻ മുതലായ ആൻറിബയോട്ടിക്കുകൾക്ക് അണുനാശത്തിന് ഒരു നിശ്ചിതകാലയളവ് ആവശ്യമാണ്. അണുവിമുക്തമാക്കുന്നതിന് ഉപയോഗിക്കുന്ന മിക്ക രാസ പദാർത്ഥങ്ങളും സസ്യകോശങ്ങളെ പ്രതികൂലമായി ബാധിക്കും. എന്നിരുന്നാലും സസ്യമൃഗാദികളിലുള്ള ഉപരിവൃതി (epidermis), ക്യൂട്ടിക്കിൾ, ചർമ്മം എന്നിവ രാസവസ്തുക്കളുടെ വേഗത്തിലുള്ള ആഗിരണത്തെ തടയുന്നു.

ചൂടും, അൾട്രാവയലറ്റ് രശ്മികളും കൊണ്ട് സൂക്ഷ്മ ജീവികളെ നശിപ്പിക്കുവാൻ സാധിക്കും. ഉയർന്ന സമ്മർദ്ദമുള്ള ആവികൊണ്ടും, ജലാംശമില്ലാത്ത ഉയർന്ന ചൂടുകൊണ്ടുമാണ് ടിഷ്യൂകൾച്ചറിന് ഉപയോഗിക്കുന്ന സ്ഫടിക പാത്രങ്ങളെ അണുവിമുക്തമാക്കുന്നത്. ഇതിനുവേണ്ടി ഉപയോഗിക്കുന്ന ഉപകരണമാണ് ഓട്ടോക്ലേവ് (Autoclave). ഇതിൽ 15 പൗണ്ട്/ചതുരശ്ര ഇഞ്ച് സമ്മർദ്ദവും $121^{0}C$ ചൂടും അരമണിക്കൂർ സമയത്തേക്ക് നിലനിർത്തി ടിഷ്യൂകൾച്ചറിന് ഉപയോഗിക്കുന്ന ഉപകരണങ്ങളും മാധ്യമങ്ങളും അണുവിമുക്തമാക്കുന്നു.

6. സസ്യപ്രജനനം

സാധാരണയായി ഭൂരിഭാഗം സസ്യങ്ങളിലും ലൈംഗിക പ്രത്യുൽപ്പാദനമാണ് നടക്കുന്നത്. ഈ രീതിയിലുള്ള പ്രത്യുത്പാദനത്തിൽ പുംബീജകോശവും (male gamete) സ്ത്രീ ബീജകോശവും (female gamete) തമ്മിൽ ബീജസംയോഗം (fertilisation) നടന്നുണ്ടാകുന്ന കോശമാണ് സിക്താണ്ഡം (zygote). ഇത് ഭ്രൂണമായും (embryo) പിന്നീട് ചെടിയായും രൂപാന്തരപ്പെടുന്നു. പുഷ്പങ്ങൾ രണ്ടുതരം ഉണ്ട്. ഏകലിംഗം(unisexual), ഉഭയലിംഗം(bisexual). ആൺപെൺപുഷ്പങ്ങൾ ഒരേ ചെടിയിലോ വെവ്വേറെ ചെടികളിലോ കാണപ്പെടുന്നതിനെയാണ് ഏകലിംഗ പുഷ്പങ്ങൾ എന്നു പറയുന്നത്.

സസ്യങ്ങളിൽ ജനിതക വൈവിധ്യം പുലർത്തുന്നതിനും, ജീനുകൾക്ക് വിവിധ പ്രകാരത്തിൽ വേർതിരിഞ്ഞ് സംയോജിക്കുന്നതിനും പ്രകൃതി ഒരുക്കിയിരിക്കുന്ന ഒരു ഉപാധിയാണ് ലൈംഗികപ്രത്യുത്പാദനം. ഇത് മൂലം സസ്യങ്ങൾക്ക് വൈവിധ്യമാർന്ന ചുറ്റുപാടുകളെയും രോഗാണുക്കളെയും അതിജീവിച്ച് നിലനിൽക്കുവാൻ സാധിക്കുന്നു. മേല്പറഞ്ഞ ഉല്പാദനം വഴി വിത്തിൽ നിന്നും ഉണ്ടാകുന്ന ചെടി മാതൃ സസ്യത്തിൻെറ സ്വഭാവങ്ങൾ കാണിക്കണമെന്നില്ല.

7. കായിക പ്രജനനം (Clonal/vegetative propagation)

ഇതുപ്രകാരമുള്ള സസ്യപ്രജനനത്തിൽ ബീജസംയോഗം നടക്കാത്തതു കൊണ്ട് ഉല്പാദിപ്പിക്കപ്പെടുന്ന സസ്യങ്ങൾക്കെല്ലാം മാതൃസസ്യങ്ങളുടെ ജനിതക ഘടനതന്നെ ഉണ്ടായിരിക്കും. സ്വയം വളരാനുതകുന്ന വിധത്തിൽ വേരോടുകൂടിയ ഒരു കാണ്ഡം (stem) മാതൃസസ്യത്തിൽ നിന്ന് ഉണ്ടാക്കുന്ന രീതിയാണ് കായിക പ്രജനനം.

കായികപ്രജനനം വഴിയുണ്ടാകുന്ന സസ്യങ്ങൾക്കെല്ലാം മാതൃസസ്യത്തിൻെറ ജനിതക ഘടന ആയതുകൊണ്ട് ഏകീകൃത അനുപാതത്തിലും രൂപത്തിലും ഉള്ള വളർച്ച പ്രതീക്ഷിക്കാം. ഈ പ്രജനന രീതിയിൽ ചെടികൾ കായ്ക്കുന്ന കാലവും, വിത്തുമുളയ്ക്കാൻ എടുക്കുന്ന സമയവും പരിഗണിക്കേണ്ട ആവശ്യമില്ലാത്തതു കൊണ്ട്, വർഷം മുഴുവനും ചെടികൾ ഉല്പാദിപ്പിക്കുവാൻ കഴിയും.

ധാരാളമായി ഒരേ ജനിതക ഘടനയുള്ള സസ്യങ്ങൾ ഉണ്ടാക്കുന്നതു കൊണ്ട് ചില ദോഷങ്ങൾ ഉണ്ട്. ഒരേ സ്ഥലത്ത് സമാന ജനിതക സ്വഭാവമുള്ള ചെടികൾ ധാരാളമായി നട്ടുപിടിപ്പിച്ചാൽ, ഏതെങ്കിലും കീടത്തിൻെറ ആക്രമണമുണ്ടായാൽ മുഴുവൻ സസ്യങ്ങളും നശിച്ചു പോകുവാൻ സാധ്യതയുണ്ട്. മറിച്ച് വിത്തുമുളച്ചുണ്ടായ തൈകളിൽ ജനിതക വൈവിധ്യം ഉള്ളതുകൊണ്ട് ചിലതെങ്കിലും കീടരോഗബാധയെ അതിജീവിക്കും. സമാന ജനിതക ഘടനയുള്ള ചെടികളുടെ വൻതോതിലുള്ള നടിൽ ജനിതകവൈവിധ്യം നഷ്ടപ്പെടുത്തുന്നു.

കായിക പ്രജനന രീതികൾ:

ഒട്ടിക്കൽ (grafting), മുകുളനം(budding), പതിവെയ്ക്കൽ(layering), കമ്പുവേരു് പിടിപ്പിക്കൽ തുടങ്ങിയവ കായിക പ്രജനനവുമായി ബന്ധപ്പെട്ട ഉല്പാദനരീതികളാണ്. അലങ്കാരചെടികളിലും, ഫലവൃക്ഷങ്ങളിലും മാതൃസസ്യത്തിൻെറ നല്ല ഗുണങ്ങളെ നിലനിർത്തുന്നതിന് ഈ രീതി ഉപയോഗിക്കുന്നു. കായിക പ്രജനനരീതി മാതൃസസ്യത്തിൽ നിന്ന് എടുക്കാവുന്ന കായികഭാഗങ്ങളുടെ പരമാവധി എണ്ണത്തെ ആശ്രയിച്ചിരിക്കും. ഒട്ടിക്കൽ, മുകുളനം, പതിവെയ്ക്കൽ എന്നിവ സമയം എടുക്കുന്നതും സാങ്കേതിക വൈദഗ്ദ്ധ്യം ആവശ്യവുമായ രീതികളാണ്.

ചെടികളിലെ ടിഷ്യുകൾച്ചർ:

കൃത്രിമമായി പരീക്ഷണശാലയ്ക്കകത്ത് ചെടികളുടെ കോശങ്ങളും(cells), കലകളും(tissues), അവയവങ്ങളും(organs),കൾച്ചർ ചെയ്യുന്ന പ്രക്രിയയ്ക്കാണ് ടിഷ്യു കൾച്ചർ എന്ന് പറയുന്നത്.

സസ്യങ്ങളുടെ കോശപ്രജനനമാണ് ടിഷ്യു കൾച്ചറിൻെറ അനേകം ഉപയോഗങ്ങളിൽ ഒന്ന്: ചെടികളുടെ ചെറിയ ഭാഗങ്ങൾ കൃത്രിമമായ പോഷണ മാധ്യമത്തിൽ അണുവിമുക്തവും, നിയന്ത്രിതവുമായ സാഹചര്യത്തിൽ വളർത്തുന്നതാണ് ഈ പ്രജനനരീതി. ഈ പ്രക്രിയയെ മൈക്രോ പ്രൊപ്പഗേഷൻ എന്നു പറയുന്നു.

മൈക്രോ പ്രൊപഗേഷൻെറ വിജയംതാഴെപറയുന്ന ഘടകങ്ങളെ ആശ്രയിച്ചിരിക്കുന്നു:

1. കൾച്ചർ മാധ്യമത്തിൻെറ ചേരുവകൾ
2. മാധ്യമത്തിൽ ഉപയോഗിച്ചിരിക്കുന്ന സസ്യ ഹോർമോണുകൾ
3. ഉപയോഗിക്കുന്ന സസ്യഭാഗങ്ങളുടെ പ്രായം (ഇളം തണ്ട്/മൂത്ത തണ്ട്)
4. സസ്യഭാഗങ്ങൾ ശേഖരിക്കുന്ന കാലം
5. അണുവിമുക്ത അന്തരീക്ഷം
6. ഊഷ്മാവ്
7. പ്രകാശവത്ക്കരണത്തിൻെറ തീവ്രതയും, കാലയളവും
8. ഈർപ്പം

1. മൈക്രോ പ്രൊപഗേഷൻെറ വിവിധ ഘട്ടങ്ങൾ:

a. കൾച്ചറിനുപയോഗിക്കുന്ന സസ്യഭാഗങ്ങളുടെഉപരിതലം അണുവിമുക്തമാക്കുന്ന രീതി:

കൾച്ചറിനനുയോജ്യമായ സസ്യഭാഗങ്ങൾ (explant) മാതൃസസ്യത്തിൽ നിന്നും മുറിച്ചെടുത്ത് ജലാംശം നഷ്ടപ്പെടാതെ ഒരു വൃത്തിയുള്ള പ്ളാസ്റ്റിക്ക് കവറിൽ ലബോറട്ടറിയിലേക്ക് കൊണ്ടുവരുന്നു. ഇങ്ങനെ കൊണ്ടുവരുന്ന എക്സ്പ്ളാൻറിൻെറ ഉപരിതലത്തിലുള്ള അഴുക്കും പൊടിയും കളയുന്നതിനു വേണ്ടി പൈപ്പ് വെള്ളത്തിൽ കഴുകുന്നു. നന്നായി വൃത്തിയാവുന്നതിനുവേണ്ടി കുറച്ച് സോപ്പുപൊടി കലർത്തിയ വെള്ളത്തിൽ വീണ്ടും കഴുകുന്നു. ഇതിനുശേഷം അണുനാശനം ചെയ്ത ചേംബറിൽവെച്ചിട്ടുള്ള, അണുവിമുക്തമായകുപ്പിയിലേക്ക് ഇതിനെ മാറ്റുകയും മെർക്കുറിക്ക്ളോറൈഡോ മറ്റേതെങ്കിലും അണുനാശിനിയോ സസ്യഭാഗങ്ങൾ മുങ്ങും വിധം ഒഴിക്കുകയും ചെയ്യുന്നു. അണുവിമുക്തമാക്കുന്നതിനുള്ള സമയം കഴിയുന്നതുവരെ തുടർച്ചയായി കുപ്പി ഇളക്കുകയും വേണം. അണുനാശിനി അതിനുശേഷം ഒഴിച്ചുകളയുകയും അണുവിമുക്തമാക്കിയ വെള്ളംകൊണ്ട് എക്സ്പ്ളാൻറ്സ് രണ്ടോ മൂന്നോ പ്രാവശ്യം കഴുകുകയും ചെയ്യുന്നു.

b. കൾച്ചർ വളർത്തുന്ന രിതി:

സസ്യങ്ങളുടെ അണുവിമുക്തമാക്കിയ ഭാഗങ്ങൾ ഓട്ടോക്ലേവ് ചെയ്ത സ്ക്കാൽപലും (scalpel), ഫോർസെപ്സും (forceps) ഉപയോഗിച്ച് ആവശ്യമായ അളവിൽ മുറിച്ചെടുത്ത് കൾച്ചർ മാധ്യമത്തിൻെറ ഉപരിതലത്തിൽ വെയ്ക്കുന്നു. സാധാരണയായി ഒരാഴ്ചയ്ക്കുള്ളിൽ വളർച്ച തുടങ്ങുന്നു. പല ചെടികളിലും വളർച്ച തുടങ്ങാൻ കാലതാമസമെടുക്കും.

c. സംവർദ്ധനം (Multiplication)

പുതിയ മുളകൾ ഉണ്ടായിക്കഴിഞ്ഞാൽ അവയെ പഴയ മാധ്യമത്തിൽ നിന്ന് പുതുതായി തയ്യാറാക്കിയതിലേക്കു മാറ്റാവുന്നതാണ്. പ്രത്യേകംഓരോസബ്കൾച്ചറിലും (കൾച്ചർ പുതിയ മാധ്യമത്തിലേക്ക് മാറ്റുന്ന രീതി) പുതിയ മുളകളുടെ എണ്ണം പെരുകിത്തുടങ്ങിയാൽ അവയെ ഓരോന്നായി വിഭജിച്ച് പുത്തൻ മാധ്യമങ്ങളിലേക്ക് മാറ്റി മുളകളുടെ സംവർദ്ധനം തുടരാനനുവദിക്കാം.

d. വേരുപിടിപ്പിക്കൽ

കാണ്ഡങ്ങൾ, മുളകൾ, സബ്കൾച്ചർ വഴി ഉണ്ടാക്കിക്കഴിഞ്ഞാൽ അവയിൽ നീളമുള്ള തണ്ടുകളെ വേർതിരിച്ച് വേരുപിടിപ്പിക്കാവുന്നതാണ്. വേരുപിടിപ്പിക്കൽ രണ്ടുതരത്തിൽ ചെയ്യാം. ഒന്നുകിൽ ഒരേ മാധ്യമത്തിൽ അല്ലെങ്കിൽ മേൽപ്പറഞ്ഞ പ്രക്രിയകൾ വെവ്വേറെ മാധ്യമത്തിൽ വേരുണ്ടാക്കുകയും വളർത്തുകയും ചെയ്യുന്നു.

e. ലാബിനകത്തെ ക്രിത്രിമ സാഹചര്യത്തിൽ വളരുന്ന ടിഷ്യൂകൾച്ചർ ചെടികളെ പുറത്തുള്ള അന്തരീക്ഷത്തിൽ വളരുവാൻ സജ്ജമാക്കുന്ന രീതി (ഹാർഡനിങ്ങ് - Hardening)

മേല്പ്രകാരം വേരുപിടിപ്പിച്ച തൈകൾ മണ്ണിലേക്കോ മറ്റു ഘടകങ്ങൾ (ഉദാഹരണത്തിന് വെർമിക്കുലൈറ്റ്, പെർലൈറ്റ്, മണൽ) ചേർത്ത മണ്ണിലേയ്ക്കോ മാറ്റാവുന്നതാണ്. ഈ മാധ്യമം ഉപയോഗത്തിന് മുമ്പ് അണുവിമുക്തമാക്കാം. മണ്ണിലേക്ക് മാറ്റിയ സസ്യങ്ങൾക്ക് ലാബിനുപുറത്തെ കുറഞ്ഞ അളവിലുള്ള ഈർപ്പത്തേയും കീടങ്ങളുടെ ആക്രമണത്തേയും അതിജീവിക്കാനുള്ള കഴിവ് തുലോം കുറവാണ്. അതുകൊണ്ട് മണ്ണിലേക്ക് മാറ്റുന്ന ടിഷ്യൂകൾച്ചർ ചെയ്ത സസ്യങ്ങൾക്ക് കുറച്ചുകാലത്തേക്ക് കൂടുതൽ ഈർപ്പവും അണുവിമുക്തമായ അന്തരീക്ഷവും നൽകേണ്ടതാണ്. ഇങ്ങനെ അധികമായി നൽകുന്ന ഈർപ്പം ക്രമമായി കുറച്ച് സസ്യങ്ങളെ പുറത്തുള്ള പരിത:സ്ഥിതിയിൽ വളരുവാൻ അനുയോ ജ്യമാക്കുന്നു.

ഈ പരിത:സ്ഥിതിയിൽ പുതിയ ഇലകൾ വന്നുതുടങ്ങി വളർച്ച ആരംഭിച്ച ചെടികളെ തോട്ടത്തിലേക്ക് (വളപ്പിലേക്ക്) മാറ്റാവുന്നതാണ്.

2. ടിഷ്യൂ കൾച്ചർ മാധ്യമങ്ങൾ

ടിഷ്യൂകൾച്ചറിന്റെ വിജയം അതിനുപയോഗിക്കുന്ന മാധ്യമങ്ങളെ ആശ്രയിച്ചിരിക്കും. ചെടികളുടെ ആരോഗ്യപരമായ വളർച്ചക്ക് മണ്ണിൽ ചില പ്രധാന മൂലകങ്ങളുടെ (നൈട്രജൻ, പൊട്ടാസ്യം, കാൽസ്യം, ഫോസ്ഫറസ്, മഗ്നീഷ്യം, സൾഫർ എന്നിവയുടെ ലവണങ്ങൾ) ചെറിയ അളവിൽ ആവശ്യമുള്ള മൂലകങ്ങളുടെയും (ഇരുമ്പ്, മാംഗനിസ്, സിങ്ക്, ബോറോൺ, ചെമ്പ്, മോളിബ്ഡിനം, കോബാൾട്ട് എന്നിവയുടെ ലവണങ്ങൾ) സാന്നിദ്ധ്യം ആവശ്യമുള്ളതുപോലെ ടിഷ്യൂകൾച്ചർ മാധ്യമത്തിലും ഇവ ഉണ്ടായിരിക്കണം. ഇവയ്ക്കുപുറമേ ഊർജ്ജം കിട്ടുന്നതിനുവേണ്ടി പഞ്ചസാര ചേർക്കേണ്ടതുണ്ട്. എന്തുകൊണ്ടെന്നാൽ ടിഷ്യൂകൾച്ചർ സസ്യങ്ങൾക്ക് മണ്ണിൽ വളരുന്നവയെപ്പോലെ പ്രകാശസംശ്ലേഷണം വഴി അന്തരീക്ഷത്തിൽ നിന്ന് കാർബൺ വലിച്ചെടുക്കുവാൻ കഴിയില്ല. സസ്യങ്ങളുടെ മെച്ചപ്പെട്ട വളർച്ചക്കുവേണ്ടി ചില ഓർഗാനിക് മിശ്രിതങ്ങളും (വിറ്റാമിനുകൾ, അമിനോ-അമ്ളങ്ങൾ, ചെടിയുടെ വളർച്ചയെ നിയന്ത്രിക്കുന്ന ഹോർമോണുകൾ) സങ്കീർണ്ണവും അനിർവ്വചനീയവുമായ ഘടകങ്ങളുള്ള ചില

മിശ്രിതങ്ങളും (undefined additives) (പഴച്ചാറുകൾ, കെസീൻ ഹൈഡ്രോളിസേറ്റ്, കരിക്കിൻ വെള്ളം, വാഴയ്ക്കാപ്പൊടി എന്നിവ) മാധ്യമത്തിൽ ചേർക്കാറുണ്ട്.

സസ്യങ്ങളുടെ വളർച്ച നിയന്ത്രിക്കുന്ന ഹോർമോണുകൾ പ്രധാനമായും ഓക്സിനുകൾ (auxins) എന്നും സൈറ്റോകൈനിനുകൾ (cytokinins) എന്നും രണ്ടായി തരം തിരിച്ചിരിക്കുന്നു. ഇവ കൂടാതെ ജിബ്ബറെലിൻസ് (gibberellins), ചില ഇനം ചെടികളിൽ പ്രത്യേകതരം വളർച്ചക്കുവേണ്ടി ഉപയോഗിക്കുന്നു.

കൾച്ചറിനുപയോഗിക്കുന്ന സസ്യഭാഗങ്ങൾ മാധ്യമത്തിൽനേരേ നിൽക്കുന്നതിനുവേണ്ടി ഉപയോഗിക്കുന്നത്. സാധാരണയായി അഗർ (agar) എന്ന പദാർത്ഥമാണ. അഗറിൻെറ അളവ് അനുസരിച്ച് മാധ്യമത്തിൻെറ ഖരാവസ്ഥയിൽ ഏറ്റക്കുറച്ചിലുകളുണ്ടാവും. ദ്രവാവസ്ഥയിലുള്ള മാധ്യമമാണ് ഉപയോഗിക്കുന്നതെങ്കിൽ സസ്യഭാഗങ്ങൾ മാധ്യമത്തിൽ താഴ്ന്നുപോകാതിരിക്കുവാൻ ഫിൽറ്റർ പേപ്പർ (filter paper) ഉപയോഗിക്കുന്നു.

ചെടികളുടെ ദ്രുതഗതിയിലുള്ള വളർച്ചക്ക് ഒരു ഫലപ്രദമായ pH നില മാധ്യമത്തിനാവശ്യമാണ് (5.0-6.00). pH മീറ്റർ ഉപയോഗിച്ചാണ് മാധ്യമത്തിൻെറ pH അളക്കുന്നത്. മാധ്യമത്തിൻെറ എല്ലാ ഘടകങ്ങളും ചേർത്ത് ഓട്ടോക്ളേവു ചെയ്യുന്നതിന് മുൻമ്പായി ക്ഷാരം (Alkali) ഉപയോഗിച്ചും/അമ്ളം (acid) ഉപയോഗിച്ചും ഫലപ്രദമായ pH നിലനിർത്തുന്നു.

മുറാഷിഗെ-സ്കൂഗ് (Murashige-Skoog) (MS) എന്ന മാധ്യമമാണ് സാധാരണയായി സസ്യങ്ങളിൽ ഉപയോഗിച്ചു വരുന്നത്. ടിഷ്യുകൾച്ചർ സംബന്ധിയായ പുസ്തകങ്ങളിൽ മറ്റു മാധ്യമങ്ങളെക്കുറിച്ചും പ്രതിപാദിക്കുന്നുണ്ട്.

ആസ്ഥാന മൈക്രോ പ്രൊപഗേഷൻെറ സാമ്പത്തിക വശങ്ങൾ

മറ്റു പ്രജനനരീതികളുമായി താരതമ്യപ്പെടുത്തുമ്പോൾ മൈക്രോപ്രൊപഗേഷൻ ചിലവേറിയ ഒരു സമ്പ്രദായമാണ്.ഇതു പ്രധാനമായും താഴെ പറയുന്ന കാരണങ്ങൾ കൊണ്ടാണ്.

1. ഉയർന്ന തൊഴിൽ വേതനം

മറ്റു വികസിത രാജ്യങ്ങളെ അപേക്ഷിച്ച് ഇന്ത്യയിൽ തൊഴിൽ വേതനം കുറവാണെങ്കിലും ടിഷ്യു കൾച്ചർ രീതികൾ പ്രാവർത്തികമാക്കുവാൻ ശാസ്ത്രീയമായി പരിശീലനം നേടിയവരെ ആവശ്യമുള്ളതിനാൽ വേതനം കൂടുതലാകുവാൻ ഇടയുണ്ട്.

കുറച്ചു പരിശീലനം സിദ്ധിച്ച അടിസ്ഥാന വിദ്യാഭ്യാസമുള്ള ഏതൊരു വ്യക്തിയ്ക്കും മൈക്രോപ്രൊപഗേഷൻെറ വിവിധ ഘട്ടങ്ങൾ വിശദമായി പ്രതിപാദിയ്ക്കുന്ന ഒരു ലഘു ലേഖ കൈവശമുണ്ടെങ്കിൽ ടിഷ്യു കൾച്ചർ അനായസേന ചെയ്യാവുന്നതാണ്. ലഘുലേഖയിൽ നിന്ന് മാധ്യമങ്ങളുടെ രാസഘടന മനസ്സിലാക്കുവാൻ രസതന്ത്രത്തിലുള്ള അടിസ്ഥാന ജ്ഞാനം ഒരു ടെക്നീഷ്യന് ആവശ്യമുണ്ട്.

2. ലാബ് സജ്ജീകരിക്കുന്നതിനുള്ള ചിലവ്:

സാധാരണയായി മൈക്രോപ്രൊപഗേഷൻ ചിലവ് കൂടിയ ഉപകരണങ്ങൾ ഉപയോഗിച്ചാണ് ചെയ്യാറുള്ളത്. ക്രിത്രിമമായി പ്രകാശവൽക്കരിച്ചതും,

ശീതീകരിച്ചതുമായ ഒരു മുറിയാണ് കൾചർറൂം. ലാബിൽ ഉപയോഗിക്കുന്ന മറ്റുപകരണങ്ങൾ താഴെ പറയുന്നവയാണ്.

ഇലക്ട്രോണിക് ബാലൻസ്, ഡിസ്റ്റിലേഷൻ യൂണിറ്റ്, ഓട്ടോക്ലേവ്, pH മീറ്റർ, റോട്ടറി ഷേക്കേർസ്. മേല്പറഞ്ഞ തരത്തിലുള്ള ലാബിൽ വൈദ്യുതി ചിലവ് വളരെ അധികമായിരിക്കും.

3. ആവർത്തന ചിലവ്:

സ്ഫടിക നിർമ്മിതവും പ്ളാസ്റ്റിക് നിർമ്മിതവുമായലാബ് ഉപകരണങ്ങ ൾക്ക് പെട്ടെന്ന് കേടുപാടുകൾ സംഭവിക്കുന്നതിനാൽ അവ വാങ്ങുന്നതിനുള്ള ചിലവ് എപ്പോഴും ഉണ്ടായി കൊണ്ടിരിക്കും. ആയതിനാൽ ഇന്ന് ടിഷ്യൂകൾച്ചർ വഴിയുള്ള സസ്യപ്രജനന സംവിധാനം വളരെ ചിലവ് കൂടിയതാണ്.

ചിലവ് കുറഞ്ഞ ടിഷ്യൂകൾച്ചർ രീതി

1. ചിലവുകുറഞ്ഞ ടിഷ്യൂകൾച്ചറിന് ഉപയോഗിക്കുന്ന പാത്രങ്ങൾ

സാധാരണയായി ടിഷ്യൂകൾച്ചർ ലാബുകളിൽ രാസപദാർത്ഥങ്ങളുമായി പ്രതിപ്രവർത്തിക്കാത്തതും അതിനാൽതന്നെ ചിലവേറിയതുമായ ബോറോസിലിക്കേറ്റുകൊണ്ട് നിർമ്മിതമായ ടെസ്റ്റ് ട്യൂബുകളും കോണിക്കൽ ഫ്ളാസ്ക്കുകളും ആണ് ഉപയോഗിക്കുന്നത്. അതുകൊണ്ട് വൻതോതിൽ മൈക്രോപ്രൊപഗേഷൻ നടക്കുന്ന വാണിജ്യാടിസ്ഥാനത്തിലുള്ള ലാബുകളിൽ വില കുറഞ്ഞതും എളുപ്പം ലഭിക്കുന്നതുമായ സോഡാലൈം (Soda-lime) കൊണ്ടുണ്ടാക്കിയ, പോളിപ്രൊപ്പലീൻ (Polypropylene) അടപ്പുകളുമുള്ള ജാം കുപ്പികളാണ് ഉപയോഗിക്കുന്നത്.

അണുവിമുക്ത കൾച്ചറുകൾ ഉണ്ടാക്കുന്നതിന് പോളിപ്രൊപ്പലിൻ (പി.പി), ബാഗുകൾ ഉപയോഗിക്കാമെന്ന് പരീക്ഷണത്തിലൂടെ കണ്ടെത്തിയിട്ടുണ്ട്. ഇതിന്റെ ഗുണങ്ങൾ താഴെ പറയുന്നവയാണ്.

കുറഞ്ഞ വില, എളുപ്പത്തിലുള്ള ലഭ്യത, പ്രകാശ സുതാര്യത, ഓട്ടോക്ലേവ് ചെയ്യുവാൻ പറ്റുന്നത്, ചൂടുപയോഗിച്ച് വലിപ്പവും ആകൃതിയും മാറ്റുവാനുള്ള സാധ്യത എന്നത്. ഈ പി.പി. ബാഗുകൾ മൊത്ത വ്യാപാരികളിൽ നിന്നും, നിർമ്മാതാക്കളിൽ നിന്നും ലഭ്യമാണ്.

കടകളിൽ സാധാരണയായി ഉപയോഗിക്കുന്നതും വൈദ്യുതിയിൽ പ്രവർത്തിക്കുന്നതുമായ സീലറുകൾ (Sealers) പി.പി ബാഗുകൾ സീലു ചെയ്യാൻ ഉപയോഗിക്കാവുന്നതാണ്. ചോർച്ച തടയുന്നതിനായി ബാഗുകളുടെ അടിഭാഗം വീണ്ടും സീലു ചെയ്യുന്നു. ബാഗുകളുടെ ആകൃതിയിൽ ഇഷ്ടാനുസരണം മാറ്റങ്ങൾ വരുത്താവുന്നതാണ്. ഓട്ടോക്ലേവ് ചെയ്യുമ്പോൾ ബാഗുകളുടെ വശങ്ങൾ തമ്മിൽ ഒട്ടിച്ചേരുവാൻ സാധ്യതയുള്ളതുകൊണ്ട് ഒരു പേപ്പർ കഷണം വശങ്ങളുടെ ഇടയിൽ വെച്ച് ഓട്ടോക്ലേവ് ചെയ്യുന്നതു നന്നായിരിക്കും. ഈ പി.പി. ബാഗുകൾ മാധ്യമം ഒഴിച്ച് ഓട്ടോക്ലേവ് ചെയ്യുന്നത് നന്നായിരിക്കുകയില്ല, മറിച്ച് ഓട്ടോക്ലേവ് ചെയ്ത മാധ്യമം അണുവിമുക്ത സാഹചര്യത്തിൽ ഒരു ഫണൽ (funnel) ഉപയോഗിച്ച് ബാഗിലേക്ക് ഒഴിയ്ക്കുന്നു. ബാഗിന്റെ തുറന്ന ഭാഗം താഴേയ്ക്ക് മടക്കി പേപ്പർ ക്ലിപ്പുകൾ ഉപയോഗിച്ച് സീലു ചെയ്യുന്നു.

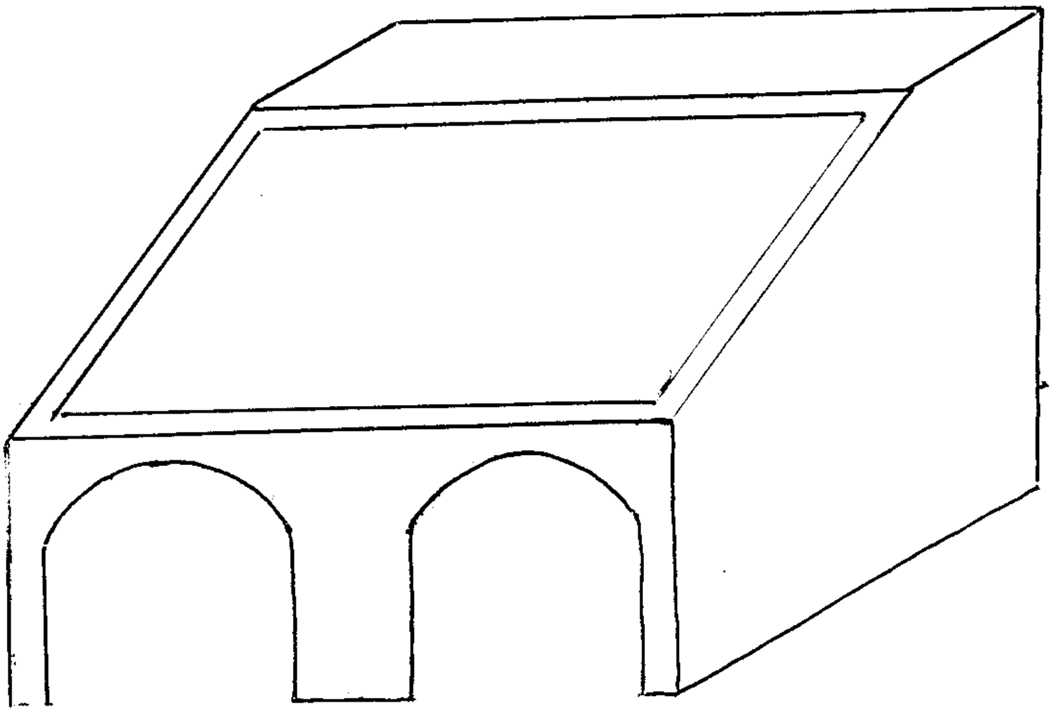
പി.പി. ബാഗിന്റെ വശങ്ങൾ ഉറപ്പില്ലാത്തതുകൊണ്ട് അവയെ കൾച്ചർ മുറിയിലെ ഷെൽഫുകളിൽ താങ്ങില്ലാതെ വെയ്ക്കുവാൻ സാധിക്കുകയില്ല. മറിച്ച് കേബിൾ/നൂല്കൊണ്ടുണ്ടാക്കിയ അയകളിൽ ക്ലിപ്പുപയോഗിച്ച് തൂക്കിയിടാവുന്ന

താണ്. ഇങ്ങനെ ചെയ്യുന്നതുകൊണ്ട് മറ്റ് കൾച്ചർ ഉപകരണങ്ങളെ അപേക്ഷിച്ച് പി.പി. ബാഗുകൾ കുറച്ചു സ്ഥലം മാത്രമേ ആവശ്യമുള്ളൂ.

2.അണുവിമുക്ത പ്രവർത്തന മേഖല

സാധാരണയായി ടിഷ്യുകൾച്ചർ ലാബുകളിൽ ലാമിനാർ എയർഫ്ളോ ബെഞ്ച് (LAF) ആണ് ഉപയോഗിക്കുന്നത്. ഏതാണ്ട് രണ്ട് ദശാബ്ദകാലം മുൻപ്വരെ LAF നു പകരം ലളിതമായ അണുവിമുക്ത ഹുഡ് ആണ് ഉപയോഗിച്ചുകൊണ്ടിരുന്നത്. എന്നാൽ ഹുഡിനെ അപേക്ഷിച്ച് LAF ന് നല്ലസ്ഥലസൗകര്യവും, വെളിച്ചവും ഉണ്ടെന്ന് മാത്രമല്ല സൂക്ഷ്മജീവി, പൊടിപടലങ്ങൾ ആദിയായവയെ അരിച്ചെടുത്ത് മാറ്റിയ ശുദ്ധവായുവും ലഭ്യമാക്കും. LAF ൽ ശുദ്ധവായു ലഭ്യമാക്കുന്നതിന് ഉപയോഗിക്കുന്ന HEPA ഫിൽട്ടർ ഇറക്കുമതി ചെയ്യുന്നതിനും അത് പ്രവർത്തനസജ്ജമാക്കുന്നതിനും വേണ്ടി ഏകദേശം 50,000 രൂപയുടെ ചിലവുണ്ട്.

എളുപ്പം ഉണ്ടാക്കാവുന്ന ഹുഡിൻെറ രേഖാചിത്രമാണ് താഴെ കൊടുത്തിട്ടുള്ളത്.



തീപിടിക്കാത്തതും സ്പിരിറ്റുകൊണ്ട് വൃത്തിയാക്കാൻ പറ്റുന്നതുമായ കട്ടിയുള്ള വസ്തുകൊണ്ട് ഹുഡ് ഉണ്ടാക്കാം. തുരുമ്പുപിടിക്കാത്തതും ഇഷ്ടാനുസരണം വളയ്ക്കാവുന്നതും ആയ ഗാൽവനൈസ്ഡ് അയൺ (GI) ഷീറ്റുകൾആണ് ഉത്തമം. അണുനാശനത്തിനുപയോഗിക്കുന്ന മെർക്കുറിക്ക് ക്ലോറൈഡുമായി രാസപ്രവർത്തനം നടത്തുമെന്നതിനാൽ സാധാരണയായി ഹുഡ് ഉണ്ടാക്കുവാൻ അലുമിനിയം ഉപയോഗിക്കുന്നില്ല. ഈർപ്പം വലിച്ചെടുക്കുന്നതും സൂക്ഷ്മാണുക്കളുടെ വളർച്ചയ്ക്ക് സഹായിക്കുന്നതുമായ മരമോ പ്ളൈവുഡോ ഇതിന് പറ്റില്ല. ലാമിനേറ്റഡ് ഷീറ്റുകളും (ഫോമിക്ക) ഉപയോഗിക്കാവുന്നതാണ്.

ആൾപെരുമാറ്റവും വായുസഞ്ചാരവും അധികം ഇല്ലാത്തതും വൃത്തിയുള്ളതുമായ ഒരു മുറിയിൽ വേണം ഹുഡ് ഉപയോഗിക്കുവാൻ. ഇതിനുവേണ്ടി പ്രത്യേകം മാറ്റിവെച്ചതായ ഒരു മുറിയിൽ തിരഞ്ഞെടുക്കുകയായിരിക്കും ഉത്തമം. ഹുഡ് വെയ്ക്കുന്ന മേശയും, മുറിയുടെ ചുമരുകളും കൂടെക്കൂടെ വൃത്തിയാക്കാൻ പറ്റുന്നതായിരിക്കാൻ ശ്രദ്ധിക്കണം.

3.കൾച്ചറിന് ആവശ്യമായ കാലാവസ്ഥ

കൾച്ചറിനുവേണ്ട നിയന്ത്രിതാന്തരീക്ഷം ലഭ്യമാക്കുന്നതിന് ശീതീകരിച്ചമുറി ഉപയോഗിക്കുന്നു. സാധാരണയായി ഊഷ്മാവ് 25°c ഉം ഈർപ്പം 50 മുതൽ 60% വരെയും ആണ് വേണ്ടത്. കേരളത്തിലെ ഒട്ടുമിക്ക പ്രദേശങ്ങളിലും ഉയർന്ന താപനിലയും, മഴക്കാലത്ത് കൂടിയ ഈർപ്പവും ഉണ്ടാകുന്നതുകൊണ്ട് പ്രശ്നങ്ങൾ സൃഷ്ടിക്കപ്പെടുന്നു. ശീതികരണയന്ത്രം (Air conditioner) ഘടിപ്പിക്കുന്നതും നിലനിർത്തികൊണ്ടുപോകുന്നതും വളരെ ചെലവേറിയ കാര്യമാണ്. കൾച്ചറിനു വേണ്ട മുറിക്ക് പ്രത്യേകം സജ്ജമാക്കിയ വാതിലുകൾ, ജനലുകൾ, മേൽക്കൂര മുതലായവ ആവശ്യമാണ്. മുറിക്ക് ശുചിത്വവും താപനിയന്ത്രണവും വേണ്ടത് അത്യാവശ്യമാണ്. എന്നിരുന്നാലും ടിഷ്യുകൾച്ചർ ശീതീകരിച്ച മുറിയില്ലാതെയും ചെയ്യാവുന്നതാണ്. ഇതിനനുയോജ്യമായ ഒരു മുറി തെരഞ്ഞെടുക്കുകയാണ് ആദ്യം ചെയ്യേണ്ടത്. ഈ മുറിക്ക് വലിയ ജനലുകളും നല്ല വായു സഞ്ചാരവും ഉണ്ടാകേണ്ടതാണ്. എന്നിരുന്നാലും പൊടി കടക്കാതെ സൂക്ഷിക്കേണ്ടത് അത്യാവശ്യമാണ്. ഇങ്ങനെ സജ്ജമാക്കിയ മുറിയിൽ ശരാശരി ഊഷ്മാവ് മദ്ധ്യാഹ്നത്തിൽ ഉയർന്ന് കാണപ്പെടുമെങ്കിലും (പ്രത്യേകിച്ച് വേനൽക്കാലത്ത്) മിക്ക സസ്യങ്ങൾക്കും ഇത് താങ്ങുവാനുള്ളശേഷി ഉണ്ട്.

4. പ്രകാശവത്ക്കരണം (Illumination)

പ്രകാശത്തിനുവേണ്ടി സാധാരണയായി ഫ്ളൂറസൻറ് ട്യൂബുകൾ ആണ് ഉപയോഗിക്കുന്നത്. ഈ ട്യൂബകൾ സാധാരണ ബൾബുകളെ (Incandescent bulbs) അപേക്ഷിച്ച് സൂര്യപ്രകാശത്തിൻെറ ഗുണം പ്രദാനം ചെയ്യും. മാത്രമല്ല ഇവ കുറഞ്ഞ വൈദ്യുതിയിൽ പ്രവർത്തിക്കുകയും വളരെ കുറവ് ചൂട് പുറത്തേക്ക് വിടുകയും ചെയ്യുന്നു. ഇലക്ട്രോണിക് ചോക്കുകളുടേയും കോംപാക്ട് ഫ്ളൂറസൻറ് ലാംപ് (CFL) കളുടെയും ഉപയോഗം വൈദ്യുതി ചെലവ് കുറയ്ക്കുന്നു. ചോക്കുകൾ ചൂട് ഉണ്ടാക്കുന്നതിനാൽ മുറിക്ക് പുറത്താണ് ഘടിപ്പിക്കേണ്ടത്. ക്രിത്രിമ പ്രകാശത്തിനു പകരം പകൽവെളിച്ചം ഉപയോഗിക്കാം (Day light). ഇങ്ങനെയായാൽ പ്രകൃത്യാലുള്ള വളർച്ചതന്നെ ചെടികൾക്ക് ലഭിക്കുമെന്നുള്ള സവിശേഷതയുണ്ടെങ്കിലും നേരിട്ടുള്ള സൂര്യതാപം ടിഷ്യുകൾച്ചർ ചെടികൾക്ക് ദോഷകരമാണ്. നേരിട്ട് സൂര്യപ്രകാശം പതിക്കാത്ത ജനാലകൾക്കരികിൽ കൾച്ചറുകൾ വെയ്ക്കുന്നതാണ് ഉത്തമം. പല നിരകളിലായി കൾച്ചറുകൾ വെയ്ക്കുന്നതിന് ഉതകുന്ന വിധത്തിലാണ് ഷെൽഫുകൾ പണിയേണ്ടത്.

പ്രകാശവൽക്കരണത്തിന് സൂര്യപ്രകാശം മാത്രം ഉപയോഗിച്ചാൽ ഉണ്ടാകുന്ന ദോഷങ്ങളാണ് താഴെപറയുന്നവ. സൂര്യപ്രകാശത്തിൻെറ തീവ്രതയ്ക്ക് ദിവസേനയും കാലാനുസൃതമായും വ്യതിയാനം സംഭവിക്കാം. മഴക്കാലത്തിൽ വെളിച്ചം ആഴ്ചകളോളം കിട്ടിയില്ലെന്നും ഇരിക്കും. ഈ കാരണങ്ങളാൽ വെളിച്ചത്തിനുവേണ്ടി മറ്റൊരു ക്രിത്രിമ സ്രോതസ്സ് ഉണ്ടാക്കേണ്ടിവരും.

5. വെള്ളത്തിൻെറ ഗുണനിലവാരം

പോഷകമാധ്യമത്തിനുപയോഗിക്കുന്ന വെള്ളത്തിൻെറ ഗുണനിലവാരം വളരെ ശ്രദ്ധിക്കേണ്ട ഒരു കാര്യമാണ്. രണ്ടുപ്രാവശ്യം ഡിസ്റ്റിൽ ചെയ്തു ശുദ്ധീകരിച്ച വെള്ളമാണ് സാധാരണഗവേഷണശാലകളിൽ ഇക്കാര്യത്തിനുപയോഗിക്കാറ്. വെള്ളത്തിലുള്ള ലോഹ അയണുകളേയും മാലിന്യങ്ങളേയും മാറ്റുന്നതിനുവേണ്ടിയാണ് ഡിസ്റ്റിലേഷൻ നടത്തുന്നത്. ഗ്ളാസ്സുകൊണ്ടുണ്ടാക്കിയ ഡിസ്റ്റിലേഷൻ യന്ത്രം വിലപിടിച്ചതും, വൈദ്യുതി കൂടുതൽ ഉപയോഗിക്കുന്നതും ആണ്. കൂടാതെ ഇത് പ്രവർത്തിപ്പിക്കുമ്പോൾ വെള്ളം തിളച്ച് ഉണ്ടാകുന്ന നിരാവിയെ തണുപ്പിക്കുന്നതിന് എല്ലായ്പ്പോഴും ട്യൂബിലൂടെ വെള്ളം കടത്തി വിട്ടുകൊണ്ടിരിക്കണം.

എന്നിരുന്നാലും ഇത്രയും ശുദ്ധീകരിച്ച ജലം ഇല്ലാതെയും ടിഷ്യൂകൾച്ചർ ചെയ്യാൻ സാധിക്കും. ഒരു പ്രാവശ്യം ഡിസ്റ്റിൽ ചെയ്തതോ അയേണുകളെ മാറ്റിയ വെള്ളമോ ഉപയോഗിക്കാം. സാധാരണ ലഭ്യമാകുന്ന ജലം പരിശോധിച്ച് ശുദ്ധമാണെന്നുണ്ടെങ്കിൽ ഫിൽട്ടർ ചെയ്ത് കൾച്ചറിനുപയോഗിക്കാം.

6. അണുവിമുക്തമാക്കൽ (Sterilization)

ലാബുകളിൽ ഉപകരണങ്ങളിലും, മാധ്യമങ്ങളും സാധാരണയായി അണുവിമുക്തമാക്കുന്നതിന് ഓട്ടോക്ലേവ് ആണ് ഉപയോഗിക്കുന്നത്. ഓട്ടോക്ലേവിനുപകരം പ്രഷർകുക്കർ ഉപയോഗിക്കാം.

പ്രഷർകുക്കർ ഉപയോഗിക്കുമ്പോൾ ആദ്യത്തെ ചൂളമടി വന്നതിനുശേഷം തീ കുറച്ച്, കുറച്ച് സമയംകൂടി തിളപ്പിക്കേണ്ടതാണ്. ഗ്ളാസ്സുപകരണങ്ങൾക്ക് 30 മിനിറ്റും, മാധ്യമത്തിന് 20 മിനിറ്റും ആണ് അണുവിമുക്തനത്തിന് വേണ്ട സമയം. അതുകഴിഞ്ഞാൽ തീ കെടുത്തി മർദ്ദം മുഴുവൻ പോയെന്ന് ഉറപ്പാക്കിയ ഉടനെ കുക്കറിൻെറ അടപ്പ് തുറന്ന് മാറ്റേണ്ടതാണ്. ഇങ്ങനെ ചെയ്തില്ലെങ്കിൽ നീരാവി തണുത്ത് മാധ്യമത്തിലും ഗ്ളാസ്സുപകരണങ്ങളിലും വെള്ളം വീഴും. മർദ്ദം പെട്ടെന്ന് കളയാനും പാടില്ല.

7. ഹാർഡനിങ്ങ് (Hardening)

ഈർപ്പമുള്ള ഗ്രീൻഹൗസ് ആണ് ഹാർഡനിങ്ങിന് ആവശ്യം. ലളിതമായി ഗ്രീൻഹൗസ് ഉണ്ടാക്കുന്നതിന് പോളിത്തീൻ ഷീറ്റുകൾ ഉപയോഗിക്കാം. മണ്ണിലുറപ്പിച്ചിട്ടുള്ള അർദ്ധവൃത്താകൃതിയിലുള്ള ലോഹത്തിൻെറ താങ്ങുകളിന്മേലാണ് ഈ ഷീറ്റുകൾ ഇടേണ്ടത്. ഈർപ്പം നിലനിർത്തുന്നതിനായി sprayer കൊണ്ട് വെള്ളം തളിച്ചുകൊടുക്കാം. ഇതിനു പകരമായി ചെടികളെ പ്രത്യേകം പ്ളാസ്റ്റിക് കവറുകളിലാക്കി, തണൽ നൽകുന്ന ഒരു നെറ്റിനു താഴെ വെക്കാം. ഈർപ്പം കുറയ്ക്കുവാൻ വേണ്ടി ഈ കവറുകളിൽ ദ്വാരം ഇടാം.