

PROCEDURE D'IMPEGGO DELLA MISCELA PLANT PRESERVATIVE MIXTURE

La miscela Plant Preservative Mixture o PPM è un biocida-preservante ad ampio spettro che uccide batteri e cellule fungine, previene la germinazione delle spore e a dosi elevate può eliminare la contaminazione endogena degli espianti. Il PPM colpisce enzimi fondamentali della catena del ciclo dell'acido citrico e nella catena di trasporto degli elettroni.

La dose di 0,05 - 0,2 % v/v di PPM aggiunto al terreno colturale prima o dopo la sterilizzazione in autoclave è sufficiente per prevenire la contaminazione ambientale (aria, acqua, mani) e per eliminare contaminazioni endogene di scarsa entità. Per eliminare contaminazioni endogene più alte le procedure di lavoro prevedono dosi di PPM più elevate.

L'eliminazione delle contaminazioni dei semi

Porre i semi in agitazione per 8 - 12 ore in una soluzione di PPM dell'1-2 % v/v, addizionata di 50 mg/1 di sali di magnesio (cloruro di magnesio, solfato di magnesio, nitrato di magnesio). Subito dopo, senza risciacquare, trasferire i semi sul terreno di germinazione addizionato di 0,05 - 1 % di PPM v/v per le piante erbacee; addizionato di 0,2 % di PPM per le piante legnose. I semi con un tegumento molto duro (asparago, lupino, rose, palme ornamentali) dovranno essere lasciati in ammollo in acqua per 2 - 4 ore prima della sterilizzazione con PPM.

L'eliminazione della contaminazione endogena degli espianti

Porre in agitazione dolce espianti di 1 cm o meno di lunghezza in una soluzione di ipoclorito di sodio/calcio per rimuovere la contaminazione superficiale. Risciacquare sotto acqua corrente; non è necessario eseguire questa operazione in condizioni di sterilità. Porre gli espianti in agitazione per 8-12 ore in una soluzione dell'1-2 % di PPM addizionata di 50 mg/1 di sali di magnesio, come descritto in precedenza. Senza risciacquare, trapiantare gli espianti nel terreno colturale addizionato di 0,05-0,1 % di PPM v/v per le piante erbacee e dello 0,2 % di PPM per le piante arboree. Esporre le piastre ad una luce di bassa intensità per i primi 5 giorni.

La sterilizzazione di tuberi, bulbi

Porre in agitazione l'intero tubero/bulbo in una soluzione di ipoclorito di sodio/calcio.

Sciacquare con acqua corrente e tagliare il tubero (il bulbo) a fette sottili. Porre in agitazione per 8 - 12 ore le fette di tessuto vegetale in una soluzione al 2-5 % v/v di PPM, soluzione addizionata di 50 mg/1 di sali di magnesio. Senza risciacquare trapiantare le fette in un terreno addizionato di 0,1-0,2 % di PPM.

Esporre le piastre ad una luce a bassa intensità per i primi 5 giorni.

Nel caso in cui le procedure descritte non producano un risultato soddisfacente, specialmente se si opera con espianti spessi o con espianti gravemente contaminati, allora si suggerisce questa alternativa: porre in agitazione gli espianti in acqua, un'ora per tessuti vegetali teneri, 2 ore per tessuti più duri; porre poi gli espianti in agitazione in una soluzione al 50 % di PPM e acqua sterile per 10-30 minuti. Senza risciacquare trapiantare gli espianti nel terreno. Esporre le piastre a luce a

bassa intensità per i primi 10 giorni. Si suggerisce di aggiungere il terreno di 0,05 - 0,2 % v/v di PPM).

NON eliminare gli espianti con sintomi di forte ossidazione, bruciature; all'incirca il 50 % di questi si riprende dopo 4 - 6 settimane. La soluzione al 50 % di PPM può essere riutilizzata sino a 10 volte.

Colture in vitro contaminate

Con la miscela PPM si può effettuare un trattamento di "salvataggio", purchè le colture non siano state contaminate più a lungo di una settimana.

Il materiale vegetale deve essere ripulito meccanicamente con uno spazzolino sotto acqua corrente. Si prepara una soluzione di PPM al 50 % con acqua sterile e si immergono le piantine o gli espianti per 15 - 30 minuti. Si raccomanda di abbassare il pH fino a valori compresi tra 2,8-3,2, mescolando la miscela PPM con acido citrico. Senza risciacquare, si trapiantano gli espianti o le piantine nel terreno addizionato di 0,05-0,2 % v/v di PPM ; qui sono lasciate per un mese ed esposte ad una luce a bassa intensità per i primi 10 giorni. Aspettare ad eliminare le piante che appaiono ossidate o con bruciature.

Importante

Dopo il trattamento di sterilizzazione con PPM il primo trapianto degli espianti è bene effettuarlo spingendo in profondità gli stessi nell'agar, così che il contatto del tessuto sia completo. Perciò meglio avere disponibile in questa fase un terreno semi solido.

Il Plant Preservative Mixture è pronto all'uso, non è fitotossico alle dosi suggerite si conserva in frigorifero a 4-8 °C.

Il Plant Preservative Mixture è un prodotto approvato dall'EPA: Reg.n.71806-1

Plant Preservative Mixture migliora il livello di sicurezza per gli operatori di laboratorio.