

VALBONA SOTA, EFIGJENI KONGJIKA, BEKIM GASHI

BIOTEKNOLOGJI BIMORE:
METODOLOGJI DHE PROTOKOLLE *IN VITRO*
MANUAL LABORATORIK
e-Book



Ky publikim është mundësuar me mbështetjen financiare të AKKSHI-së. Përmbajtja e tij është përgjegjësi e autorëve dhe opinioni i shprehur në të nuk është domosdoshmërisht opinion i AKKSHI-së.

AKADEMIA E SHKENCAVE E SHQIPËRISË

VALBONA SOTA, EFIGJENI KONGJIKA, BEKIM
GASHI

BIOTEKNOLOGJI BIMORE:
METODOLOGJI DHE PROTOKOLLE
IN VITRO
MANUAL LABORATORIK
e-Book

Tiranë, 2023

Titulli: Bioteknologji bimore: metodologji dhe protokolle *in vitro*

Autorë:

Prof. asoc. dr. Valbona SOTA

Akad. prof. dr. Efigjeni KONGJIKA Prof. asoc. dr. Bekim GASHI

Arti grafik: Autorët

eISBN: 9789928339997 e-book

© Autorët

Të gjitha të drejtat janë të rezervuara. Nuk lejohet shumëfishimi me çdo mjet apo formë tjetër pa lejen e autorit.

Tiranë, 2023

Pasqyra e lëndës

Parathënie	9
KAPITULLI 1	11
Ngritja e një laboratorit të kulturës qelizore dhe indore të bimëve.....	11
1.1. Projektimi dhe organizimi i laboratorit të kulturave indore të bimëve	11
1.1.1. Zona e larjes.....	11
1.1.2. Zona e përgatitjes së terreneve ushqyese	12
1.1.3. Zona e transferimit aseptik / steril	12
1.1.4. Dhoma e rritjes vegjetative	12
1.2. Pajisjet themelore laboratorike për teknikat <i>in vitro</i> në bimë.....	14
1.2.1. Pajisjet / mjetet kryesore laboratorike	14
1.2.2. Enët për kultivimin <i>in vitro</i> dhe pastrimi i tyre	14
Bibliografia	15
KAPITULLI 2	17
Shkaqet e infektimit të kulturave indore dhe teknikat e asepsisë.....	17
2.1. Ndotësit kryesorë të kulturës indore.....	17
2.1.1. Ndotësit kimikë dhe shkaqet e shfaqjes së tyre	17
2.1.2. Ndotësit biologjikë dhe shkaqet e shfaqjes së tyre	18
2.2. Praktikat për shmangien e infektimit të kulturave indore	20
2.2.1. Përdorimi i teknikave të duhura aseptike.....	20
Bibliografia	23
KAPITULLI 3	25
Elementët e kërkimit <i>in vitro</i>	25
3.1. Metodologjitë e lidhura me kërkimin shkencor	25
3.1.1. Ngritja e hipotezës dhe e objektivave të eksperimentit	25
3.1.2. Përzgjedhja e elementëve kryesorë të planit eksperimental	25
3.1.3. Përcaktimi i përsëritjeve të një eksperimenti	28
3.1.4. Zgjedhja e të dhënave më të mira dhe planifikimi i analizës statistikore	28
3.1.5. Zhvillimi i eksperimentit	28

3.1.6. Regjistrimi i të dhënave	29
3.2. Analizimi, interpretimi dhe paraqitja e të dhënave	29
3.2.1. Analiza e të dhënave	29
3.2.2. Paraqitja e rezultateve	30
Bibliografia	31
 KAPITULLI 4	 32
Terrenet ushqyese: përbërja dhe përgatitja e tyre.....	32
4.1. Koncepte elementare për përgatitjen e tretësirave	32
4.2. Përzgjedhja dhe përbërja e terrenit ushqyes	32
4.2.1. Përzgjedhja e terrenit ushqyes	32
4.2.2. Përbërja e terrenit ushqyes të kulturës indore	33
4.3. Përgatitja e tretësirave stok / rezervë	42
4.3.1. Përgatitja e tretësirave stok / të përqendruara të makro- dhe mikroelementeve	43
4.3.2. Përgatitja e tretësirave stok të kelatit të hekurit	45
4.3.3. Përgatitja e tretësirave stok të vitaminave dhe aminoacideve	46
4.3.4. Përgatitja e tretësirave stok të fitohormoneve / RRB-ve	47
4.4. Përgatitja e terreneve ushqyese.....	49
4.4.1. Përgatitja e terreneve ushqyese nisur nga tretësirat stok	49
4.4.2. Përgatitja e terreneve ushqyese nga paketat e gatshme	51
Bibliografia	51
 KAPITULLI 5	 54
Eksplantet: përzgjedhja, sterilizimi dhe manipulimi në kushte aseptike	54
5.1. Kriteret e përzgjedhjes së eksplanteve fillestare	54
5.2. Kontrolli i nxirjes / Metodatat për shmangien e stresit oksidativ	56
5.3. Trajtimet për nxjerrjen e farave apo sytheve nga gjendja e fjetjes / qetësisë	58
5.4. Dezinfectimi dhe sterilizimi i eksplanteve bimore	58
5.5. Manipulimi i eksplanteve në mjedis aseptik	59
Bibliografia	61

KAPITULLI 6	62
Mikroshumimi / Rigjenerimi <i>in vitro</i> në terrene të xhelifikuara	62
6.1. Domosdoshmëria e mikroshumimit dhe aplikimet e tij	62
6.1.1. Rëndësia dhe avantazhet e mikroshumimit	62
6.1.2. Organogjeneza dhe roli i saj në mikroshumim	63
6.2. Stadet e mikroshumimit	64
6.2.1. Stadi 0 ose përgatitor	64
6.2.2. Stadi I: Inokulimi / stabilizimi i eksplanteve	65
6.2.3. Stadi II: Shumimi i bimëzave me anë të subkulturave	72
6.2.5. Stadi IV: Aklimatizimi / ambientimi	76
Bibliografia	78
 KAPITULLI 7	 80
Mikroshumimi nëpërmjet sistemeve me zhytje të përkohshme.....	80
7.1. Bioreaktorët dhe automatizimi i shumimit <i>in vitro</i>	80
7.2. Bioreaktorët me zhytje së përkohshme	81
7.3. Disa lloje bioreaktorësh që përdoren në teknologjinë TIS	81
7.3.1. Bioreaktori SETIS™	81
7.3.2. Bioreaktori Plantform.....	82
7.3.3. Bioreaktori ElecTIS.....	84
Bibliografia	86
 KAPITULLI 8	 87
Mikroshumimi në terrene me fazë të dyfishtë	87
8.1. Sistemet e kultivimit me fazë të dyfishtë	87
8.2. Avantazhet e kultivimit në sisteme me fazë të dyfishtë	87
Bibliografia	90
 KAPITULLI 9	 91
Mikroshumimi në terrene të lëngëta me urë prej letre filtri.....	91
9.1. Përdorimi i urës prej letre filtri si sistem mbështetës për eksplantet dhe avantazhet e teknikës	91
9.2. Avantazhet e kultivimit në terrene të lëngëta me letër filtri si sistem mbështetës	92
Bibliografia	94

KAPITULLI 10	95
Embriogjeneza somatike.....	95
10.1. Embriogjeneza somatike: rëndësia dhe stadet e saj	95
10.2. Kushtet e nevojshme për induktimin, zhvillimin dhe maturimin e embrioneve somatike.....	96
Bibliografia	100
 KAPITULLI 11	 101
Teknologjia e farave sintetike	101
11.1. Farat sintetike dhe avantazhet e tyre	101
11.2 Formimi i farave sintetike dhe rigjenerimi i bimëve të plota	102
11.2.1. Formimi i farave sintetike	102
11.2.2. Rigjenerimi i farave sintetike dhe shndërrimi në bimë të plota.....	104
Bibliografia	106
 KAPITULLI 12	 108
Konservimi <i>in vitro</i>: rritja minimale dhe kriokonservimi	108
12.1. Domosdoshmëria e aplikimit të metodave të konservimit <i>in vitro</i>	109
12.2. Konservimi me metoda të rritjes minimale.....	109
12.2.1. Inkubimi në temperatura 2 – 8°C	109
12.2.2. Modifikimi i terrenit ushqyes	111
12.2.3. Dehidratimi paraprak i eksplanteve bimore	112
12.3. Kriokonservimi	114
Bibliografia	119
 KAPITULLI 13	 121
Shëndetësimi <i>in vitro</i>: përftimi i bimëve pa viruse	121
13.1. Domosdoshmëria e shëndetësimit të materialit bimore	121
13.2. Metodat e shëndetësimit të materialit bimore	121
13.2.1. Kultura e meristemës	121
13.2.2. Termoterapia <i>in vitro</i>	123
13.2.3. Kimioterapia <i>in vitro</i>	124
13.2.4. Krioterapia <i>in vitro</i>	125
Bibliografia	126

Parathënie

Metodologjitë *in vitro* janë drejtime mjaft të rëndësishme në bioteknologjinë bimore pasi lidhin ngushtë midis tyre kërkimin shkencor dhe sigurimin e prodhimit bioteknologjik me cilësitë e dëshiruara për fermerët dhe konsumatorët. Pjesëzat bimore / eksplantet mund të përdoren për të prodhuar qindra e mijëra bimë në një periudhë relativisht të shkurtër kohore dhe hapësirë të vogël, në kushte të kontrolluara fiziko-kimike, pavarësisht nga sezoni. Shumë nga qasjet që lidhen me kulturat indore dhe qelizore në bimë kërkojnë një sy me përvojë, veçanërisht në përzgjedhjen e kulturave që kanë më shumë mundësi të ruajnë dhe shprehin totipotencën e tyre. Rrjedhimisht, këto metoda konsiderohen në shumë aspekte, *po aq art sa edhe shkencë*.

Sot, nevoja për metoda të përshtatshme të shumimit dhe konservimit *in vitro* të bimëve është themelore si për kërkimin bazë, ashtu dhe për atë të aplikuar me qëllim tejkalimin e problemeve me të cilat përballet mikroshumimi, si: paqëndrueshmëria gjenetike që mund të shfaqet, vitrifikimi i eksplanteve, shfaqja e infeksioneve kërpudhore e bakteriale, probleme të lidhura me stresin oksidativ, me transpirimin e lartë gjatë aklimatizimit, etj. Për sa i takon shtimit në shkallë të gjerë, kjo është një teknologji mjaft e përshtatshme pasi siguron bimëza të shëndetësuar nëse aplikohen teknikat e duhura, mundëson krijimin e koleksioneve klonale nëpërmjet metodave të ruajtjes afatmesme dhe afatgjatë, me mundësi për përfshirjen e tyre në programet e përmirësimit gjenetik. Veç kësaj, në dekadat e fundit, në fushën e bioteknologjisë bimore ka evoluar një epokë e re në drejtim të prodhimit të metabolitëve sekondarë me interes për shkak të përdorimit të gjerë të tyre në farmaceutikë, mjekësi, kozmetikë, etj.

Sigurisht, domosdoshmëri e kohës është optimizimi i teknikave në përputhje me kërkesat e tregut. Fermeri apo fidanrritësi, si njerëz praktikë, janë më të interesuar të dinë nëse shumimi vegjetativ mund të arrihet në mënyrë të kënaqshme me anë të kulturës *in vitro*, veçanërisht në rastet kur klonimi me metoda konvencionale është i vështirë dhe në disa raste, i pamundur.

Në laboratorin e kulturave indore dhe qelizore të Departamentit të Bioteknologjisë, FSHN, UT, që nga koha e themelimit të tij e në vijim, përveçse është punuar për optimizimin e protokolleve ekzistues të mikroshumimit dhe konservimit *in vitro*, janë përdorur dhe optimizuar edhe metoda bashkëkohore si: mikroshumimi nëpërmjet sistemeve me zhytje të përkohshme (bioreaktorët SETIS, ElecTIS, Plantform), mikroshumimi në sisteme kultivimi me fazë të dyfishtë, teknologjia e farave sintetike me aplikime të shumta në shumim dhe konservim, seleksionimi *in vitro* i bimëve rezistente ndaj streseve abiotikë, lulëzimi dhe tuberizimi *in vitro*, etj. Në këtë laborator ka filluar puna për zbatimin dhe optimizimin e prodhimit të metabolitëve sekondarë në specie mjekësore nëpërmjet

kulturës rrënjore dhe asaj të qelizave në suspension, si dhe për kriokonservimin nëpërmjet metodave të inkapsulim – dehidratimit dhe vitrifikimit.

Grupi i autorëve zotëron një eksperiencë mbi 30 vjeçare në përdorimin e teknikave *in vitro* për shumimin dhe konservimin bimor. Mbi këtë eksperiencë, ndër vite, janë botuar tre tekste të rëndësishme, të cilët plotësuan më së miri një boshllëk të kohës në lidhje me informacionin teorik dhe praktik mbi teknikat *in vitro*. Por zhvillimet e reja teorike në bioteknologji dhe domosdoshmëria e përfshirjes së metodave inovative, veçanërisht në kohën kur mikrosaumimi në shkallë industriale po mbizotëron tregun, sollën nevojën e përditësimit dhe të shtimit të njohurive në botimin e ri nën titullin “Bioteknologji bimore: metodologji dhe protokolle *in vitro*”, i cili jo vetëm është i përqendruar në procedura praktike, por në të ndërthuren parimet shkencore me teknikat më moderne të kulturës së indeve bimore.

Vlen të theksohet se të gjitha fotot që shoqërojnë metodat dhe protokollet, janë foto origjinale të realizuara nga kërkimi shkencor i ushtruar në Departamentin e Bioteknologjisë, FSHN, UT. Ky libër është konceptuar në përgjigje të problemeve praktike të hasura nga autorët në aspekte si:

- Së pari, ishte e nevojshme të botohej një libër, veçanërisht për metodat më të reja që kanë shkaktuar revolucion të mirëfilltë në këtë drejtim;
- Së dyti, njohuritë e paraqitura i vlejné studentëve të të gjithave cikleve të studimit që ofrohen nga Departamenti i Bioteknologjisë, FSHN, UT, dhe më gjerë, duke krijuar mundësi mjaft të mira për mësimdhënie dhe kërkim shkencor të avancuar;
- Së treti, botimi do të vlejë në të ardhmen për stafet e laboratoreve të reja të kulturës indore e qelizore (kërkimore ose aplikative), bioteknologëve, kërkuesve shkencorë, si dhe asistentëve teknikë.

Autorët, prej shumë vitesh kanë punuar së bashku në aspekte të ndryshme të fiziologjisë dhe bioteknologjisë bimore, për specie bimore me interes të përhapura në trojet shqiptare. Pa këtë ndërveprim të ngushtë, ky libër nuk do të ishte e mundur të realizohej.

Një falenderim i veçantë shkon për Universitetin e Tiranës dhe Akademinë e Shkencave të Shqipërisë për mbështetjen e vazhdueshme ndër vite, si dhe për Agjencinë Kombëtare të Kërkimit Shkencor, Teknologjisë dhe Inovacionit (AKKSHI).

Autorët

KAPITULLI 1

Ngritja e një laboratorit të kulturës qelizore dhe indore të bimëve

1.1. Projektimi dhe organizimi i laboratorit të kulturave indore të bimëve

Laboraret e kulturave *in vitro* me drejtim bimor kanë kërkesa të veçanta, që ndryshojnë nga tipet e tjerë të laboratorëve. Përcaktimi i vendndodhjes së laboratorit të kulturës së indeve është një vendim i rëndësishëm. Duhet të shmanget vendosja e tij pranë laboratoreve që trajtojnë mikroorganizmat, insektet ose objekteve që përdoren për ruajtjen e farave ose materialeve të tjera bimore. Ndotja nga rrymat e ajrit dhe trafiku i lartë i lëvizjes së njerëzve mund të krijojë probleme në drejtim të infektimit të kulturave bimore.

Në projektimin e një laboratorit për përdorim të kulturës së indeve bimore, duhet të pozicionohen zonat e punës në mënyrë që të ketë një qarkullim të qetë. Këto zakonisht përfshijnë sa vijon:

- Një zonë larëse e përgjithshme;
- Një zonë për përgatitjen e terreneve ushqyese, sterilizimin dhe ruajtjen e tyre;
- Një zonë transferimi aseptike / sterile;
- Inkubatorë ose dhoma kulture me kushte fizike të kontrolluara;
- Miniserra me kushte të kontrolluara të mjedisit për aklimatizimin e bimëve të reja të prodhuara nga kultura *in vitro*;
- Një zonë vëzhgimi / grumbullimi të të dhënave.

1.1.1. Zona e larjes

Zona e larjes duhet të përmbajë lavamanë të mëdhenj, disa të veshur me plumb për t'i rezistuar acideve dhe bazave. Veç kësaj, duhet të përmbajë raftet e kullimit të enëve dhe furnizim të vazhdueshëm me ujë të demineralizuar, ujë të distiluar dhe ujë të bi-distiluar.

Sterilizatorë / furra tharëse, larëse enësh të automatizuara, banja me acid, dhe kabinete magazinimi duhet të jenë gjithashtu të pranishme në zonën e larjes. Duhet të sigurohen të gjithë detergjentët e nevojshëm dhe efektivë për larjen e kategorive të ndryshme të enëve laboratorike. Gjithashtu, nevojitet një set furçash për tuba / provëza me diametër të ndryshëm, që të mundësohet larja në thellësi e këtyre llojeve të kulturës.

1.1.2. Zona e përgatitjes së terreneve ushqyese

Zona e përgatitjes së terreneve duhet të ketë hapësirë të bollshme magazinimi për kimikatat si dhe enë qelqi të nevojshme për përgatitjen dhe shpërndarjen e terreneve ushqyese. Domosdoshmërisht, enët e qelqit duhet të jenë të autoklavueshme.

Hapësira e bangos për përzierësit, matësit e pH, peshoret, banjat e ujit dhe pajisjet për shpërndarjen e terreneve ushqyese duhet të jenë e mjaftueshme. Pajisjet e tjera të nevojshme mund të përfshijnë pompa ultrafiltrimi, distilatorë, ndezës Bunsen me një burim gazi, frigoriferë për ruajtjen e tretësirave dhe kimikateve, një mikrovalë si dhe një autoklavë për sterilizimin e terreneve ushqyese, enëve të qelqit dhe instrumenteve.

1.1.3. Zona e transferimit aseptik / steril

Në këtë zonë, të gjitha veprimet si: izolimi i eksplanteve, inokulimi në terrenin ushqyes, mikroshumimi, etj. duhet të realizohen në një mjedis steril, i cili duhet të sigurojë ndotje minimale ose mungesë totale të mikroorganizmave të ndryshëm.

Mënyra më efektive dhe më e leverdisshme për të siguruar kushte të tilla të sterilitetit është përdorimi i fluksit laminar i cili është një kabinet i mbyllur, i krijuar për të parandaluar ndotjen e mostrave biologjike ose çdo materiali tjetër. Kabineti është zakonisht prej çeliku inoks, pa boshllëqe ose nyje, në mënyrë që të parandalohet grumbullimi i sporeve dhe që sipërfaqet të mund të pastrohen dhe dezinfektohen tërësisht. Në fluksin laminar, janë të inkuorporuara llambat UV që, mbahen të ndezura për disa minuta në mënyrë që të sterilizohet pjesa e brendshme përpara se të përdoret kabineti. Në varësi të drejtimit të rrjedhjes së ajrit të filtruar, fluksi laminar mund të jetë:

- **vertikal:** Këto kabinate jo vetëm që filtrojnë ajrin që vjen nga jashtë, por gjithashtu riqarkullojnë dhe filtrojnë ajrin nga brenda. Megjithatë, ajri i pastër qarkullon vertikalisht mbi hapësirën e punës. Pra, ky drejtëm i rrjedhës së ajrit, përveçse mbron mostrat nga infektimi, mbron dhe operatorin nga infeksionet ose rreziqet gjatë punës me substanca të dëmshme (Fig. 1.1 a).

- **horizontal:** Këto kabinate filtrojnë ajrin nga jashtë dhe fryjnë ajrin e pastër nga pjesa e pasme e kapakut drejt operatorit. Kjo krijon rrjedhjen horizontale të ajrit. Për kultivimin *in vitro*, ky lloj kabineti është më i përshtatshmi pasi siguron kontrollin më të madh mbi ndotjen. Megjithatë, është e rëndësishme të dihet se ky kabinet nuk duhet të përdoret kur punohet me materiale të rrezikshme ose infektive, për shkak se drejtimi horizontal i rrymës bën që këto substanca të rrezikshme të shkojnë drejt operatorit (Fig. 1.1 b).

1.1.4. Dhoma e rritjes vegjetative

Të gjitha bimët kërkojnë mjedisin e duhur, qoftë në fushë apo laborator. Megjithëse përbërja gjenetike e specieve bimore ka një ndikim të madh në rritjen dhe zhvillimin e tyre, suksesi i kulturave të indeve bimore të shumuara *in vitro* përcaktohet kryesisht nga kushtet mjedisore.

Avantazhi i shumimit *in vitro* është se mjedisi është më i lehtë për t'u kontrolluar dhe parametrat fizikë mund të përshtaten në varësi të qëllimit të kulturës. Krijimi dhe mbajtja e një mikromjedisi të qëndrueshëm në shumimin *in vitro* do të thotë ofrimi i kushteve optimale për zhvillimin e qelizave / indeve të bimës me ndihmën e teknikave të kulturës së indeve.

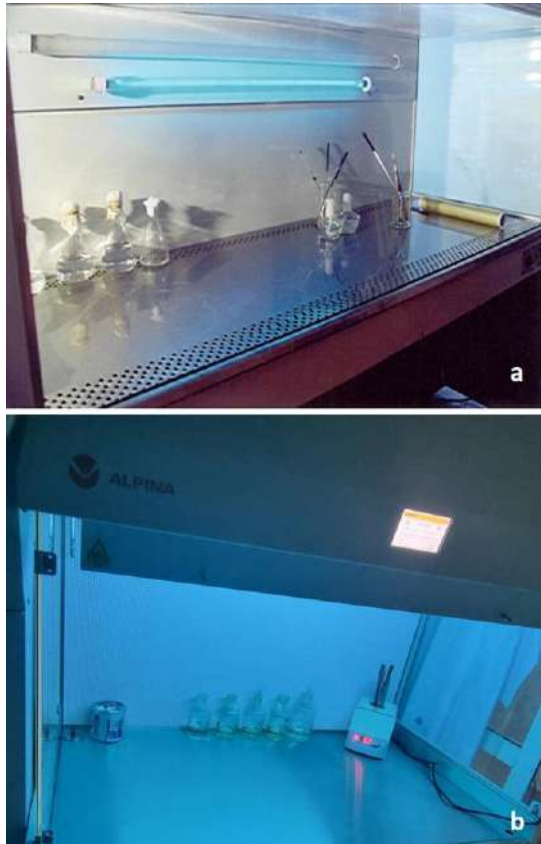


Figura 1.1. a) Fluks laminar vertikal **b)** Fluks laminar horizontal (*Laboratori i kulturave qelizore dhe indore, Departamenti i Bioteknologjisë, FSHN, UT*)

Dhoma e rritjes vegetative duhet të mbahet e pastër gjatë gjithë kohës në mënyrë që të reduktohet infeksioni i kulturave. Duhet të shmangët vendosja e bimëve në vazo në këtë zonë, sepse ato mund të jenë burim i merimangave dhe organizmave të tjerë ndotës.

Dhomat e rritjes vegetative mund të jenë dy llojesh:

- Dhoma vegetative klasike / mjedise brenda laboratorit me mbyllje hermetike, rafte me llamba neoni ose ndriçim LED për vendosjen e enëve të kulturës, programatorë për kontrollin e fotoperiodës, kontroll temperature, etj. Në të tilla dhoma, lagështia ajrore mund të jetë e kontrolluar ose jo. Dhoma të tilla zakonisht përdoren kur nevojiten mjedise kultivimi të mëdha (Fig. 1.2 a);

- *Inkubatorë të rritjes vegjetative*, të cilat janë pajisje me përmasa më të vogla se dhoma klasike e rritjes vegjetative, por janë të optimizuara më mirë përsa i takon kontrollit të parametrave fizikë, duke përfshirë dhe lagështinë ajrore. Këto janë dhoma me kapacitet mbajtës më të vogël dhe përdoren kryesisht në laboratorët shkencorë (Fig. 1.2 b, c).

Inkubatorët e rritjes vegjetative janë më të përshtatshëm për laboratorët shkencorë, ndërsa për mikroshumimin në shkallë të gjerë në sipërmarrje tregtare, përdoren gjerësisht dhomat vegjetative klasike.



Figura 1.2. a) Dhomë vegjetative klasike me parametra fizikë të kontrolluar b, c) Inkubator i rritjes vegjetative (Laboratori i kulturave qelizore dhe indore, Departamenti i Bioteknologjisë, FSHN, UT)

1.2. Pajisjet themelore laboratorike për teknikat *in vitro* në bimë

1.2.1. Pajisjet / mjetet kryesore laboratorike

Shumë teknika të kulturës indore të bimëve kërkojnë pajisje bazë laboratorike të ngjashme. Që një laborator të jetë plotësisht efektiv për teknikat *in vitro*, nevojitet të ketë pajisjet më themelore / bazë. Por prej vitesh metodologjitë kanë avancuar së tepërmi dhe nevojitet përfshirja e teknikave inovative që kërkojnë pajisje bashkëkohore. Procesi i mikroshumimit duhet të përmbyllet plotësisht me pajisjet që gjenden brenda laboratorit përkatës. Kjo është e rëndësishme sepse shmanget lëvizja e enëve të kulturës në mjedise të ndryshme, duke minimizuar kështu mundësitë e shfaqjes së infeksioneve në kulturë.

1.2.2. Enët për kultivimin *in vitro* dhe pastrimi i tyre

Një element shumë i rëndësishëm në aplikimin e teknikave *in vitro* janë dhe enët e kulturës si dhe mjetet ndihmëse të tjera për zbatimin e platformës eksperimentale.

Enët të përdorura në kulturën indore në përgjithësi mund të gjenden në shumicën e laboratorëve. Enët e kultivimit duhet të jenë prej qelqi Pyrex ose borosilikat. Për shkak të shpenzimeve në rritje të këtij lloji të qelqit, shumë laboratorë po përdorin enët me përbërje polipropileni, polikarbonati ose polistireni etj. një- përdorimshe, të cilat janë më pak të kushtueshme. Përdorimi i enëve të tilla, tashmë ka zëvendësuar pothuajse plotësisht qelqin në laboratorët komercialë, dhe po përdoret gjerësisht dhe në laboratorët shkencorë.

Enët e kulturës që mund të përdoren janë të llojeve të ndryshme: balona Erlenmajer (kapaciteti 100-, 125, 250 ml), epruveta me përmasa të ndryshme, pjata Petri, kavanozë me përmasa të ndryshme, shishe qelqi me mbyllje hermetike, etj.

Enët e kulturës duhet të sigurojnë shkëmbimin e gazeve dhe gjithashtu transmetimin e një cilësie të njëtrajtshme dhe të përshtatshme të dritës tek bimët brenda tyre. Lartësia dhe gjerësia e enës është gjithashtu një kriter që duhet të kihet parasysh në stade të ndryshme të platformës eksperimentale, në mënyrë që eksplanteve t'u sigurohet hapësira e nevojshme për rritje.

Bibliografia

Aitken-Christie, J., Kozai, T., & Smith, M. A.L. 1994. Automation and environmental control in plant tissue cultures. Boston: Kluwer;

Bennett, A.B., & O'Neill, S.D. (Eds.), 1991. Horticultural biotechnology. New York: Wiley.
Bhojwani, S. S., Razdan, M. K. 1983. Plant tissue culture: Theory and practice. New York: Elsevier;

Cassells, A.C., & Gahan, P.B. 2006. Dictionary of plant tissue culture. New York, London, Oxford: Food Products Press® (imprint of the Haworth Press, Inc.);

Damiano, C. 1980. Planning and building a tissue culture laboratory. *Annali dell'Istituto Sperimentale per la Frutticoltura*, 9: 3-10;

Davey, M.R., Anthony, P. 2010. Plant cell Culture: Essential methods. Published by Wiley – Blackwell, UK;

Debergh, P.C., & Zimmerman, R.H. Eds.), (1993. Micropropagation technology and application. Boston: Kluwer. DeFossard, R. A. (Ed.), (1976). Tissue culture for plant propagators. Armidale, Australia: University of New England Printery;

Dodds, J.H., & Roberts, L.W. 1985. Experiments in plant tissue culture (2nd ed.). New York: Cambridge Univ. Press;

George, E.F., Hall, M.A., De Klerk, D.J. 2008. Plant Propagation by Tissue Culture. 3rd edition. Published by Springer, Netherland;

Harisha, S. 2007. Biotechnology procedures and experiments handbook. Published by Jones & Bartlett Learning, ISBN 10: 1934015113, 710 Pg.;

Kongjika E., Sota V. 2012. Praktika të kulturave bimore indore dhe qelizore. ISBN 978-99956-10-54-8. Shtëpia botuese “Akademia e Shkencave”, Tiranë, 2012;

Kongjika, E., Zekaj, Zh., Çausi, E., Stamo, I. 2002. Bioteknologjia e bimëve – Kulturat *in vitro*. Akademia e Shkencave, Instituti i Kërkimeve Biologjike, Tiranë;

Kozai, T., Smith, M.A.L. 1995. Environmental control in plant tissue culture – general introduction and overview. In: Automation and Environmental control in plant tissue culture. Pp. 301 – 318. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht – Boston – London;

- Laimer, M., & Rucker, W. 2003.** Plant tissue culture. New York: Springer-Verlag;
- Pierik, R.L. 2002.** *In vitro* culture of higher plants. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer Academic Publishers;
- Razdan, M.K. 2002.** Introduction to plant tissue culture. Enfield, NH: Science Publishers;
- Stafford, A., & Warren, G. (Eds.), 1991.** Plant cell and tissue culture. London: Open Univ. Press;
- Trigiano, R.N., & Gray, D.J. 2000.** Plant tissue culture concepts and laboratory exercises (2nd ed.). Boca Raton, FL: CRC Press;

KAPITULLI 2

Shkaqet e infektimit të kulturave qelizore dhe indore dhe teknikat e asepsisë

2.1. Ndotësit kryesorë të kulturës indore

2.1.1. Ndotësit kimikë dhe shkaqet e shfaqjes së tyre

Ndotja kimike përfshin praninë e çdo substance e cila shkakton një efekt të padëshirueshëm në kulturat indore dhe qelizore. Në shumë raste, edhe elementët esencialë shkaktojnë toksicitet kur shtohen në sasi të tepruara. Disa nga shkaqet e ndotjes kimike janë:

➤ *Terreni ushqyes*

Në terrenin ushqyes të kulturës gjenden shumë ndotës kimikë të cilët vijnë si nga reagentët e përdorur, ashtu dhe nga uji. Për këtë arsye, reagentët duhet të jenë të një cilësie dhe pastërtie sa më të lartë dhe duhet të ruhen në kushte fizike optimale në mënyrë që të parandalohet dëmtimi i tyre. Veç të tjerash, ato duhet të jenë dhe të certifikuar për përdorim për sistemet e kulturës qelizore në mënyrë që të garantohet suksesi i kulturës.

Por, në shumë raste dhe gabimi njerëzor bëhet shkak për ndotjen kimike. Kërkuesit shkencorë dhe teknikët e laboratorit duhet të shmangin gabimet në zbatimin e protokolleve, në etiketimin e shisheve me përmbajtjen cilësore dhe sasiore të tyre dhe duhet të kenë kujdes maksimal në peshimin e reagentëve.

➤ *Uji*

Një burim tjetër i ndotjes kimike është dhe uji i përdorur për përgatitjen e terreneve ushqyese dhe për larjen e enëve të kulturës. Zakonisht, përdoret ujë i bi-distiluar ose i tri-distiluar në mënyrë që të garantohet pastrimi i plotë nga ngarkesat jonike. Gjithsesi, uji mbetet një ndotës i mundshëm, pasi për shkak se ka aftësi tretëse shumë të mira, uji i pastër mund të shkaktojë shkarkimin në kulturën qelizore të joneve nga enët e qelqit, pipetat metalike, enët plastike etj. Edhe uji i përdorur për krijimin e presionit të avullit në autoklavë mund të përmbajë shtesa të padëshirueshme me efekt toksik, të cilat mund të shkarkohen në enët e kulturës.

➤ *Enët e kulturës*

Enët e qelqit apo plastike, të cilat përdoren për mbajtjen e terreneve ushqyese, përmbajnë metale të rënda apo komponime organike. Për këtë arsye, edhe enët e kulturës bëhen shkak për ndotje kimike. Kur enët mbajnë një tretësirë të caktuar, në sipërfaqe të tyre apo në tapat e shisheve mund të përthithen pjesë nga tretësira. Nëse pas përdorimit këto enë nuk pastrohen siç duhet, ato mund të kontaminojnë

një terren ushqyes nëse më vonë përdoren për këtë qëllim. Edhe detergjentët e përdorur për pastrim duhet të shpëlahen mirë nga enët e kulturës, pasi edhe ato bëhen shkak për ndotjen kimike.

➤ ***Inkubatorët dhe dhomat vegetative***

Megjithëse inkubatorët dhe dhomat vegetative konsiderohen si shkaktarë të ndotjes biologjike, në shumë raste ato bëhen shkak dhe për ndotje kimike. Mungesa e ajrosjes, mospastrimi i duhur, mbetjet volatile që mbeten pas pastrimit dhe dezinfektimit, aromat e ndryshme etj. mund të shkaktojnë ndotje kimike të sistemeve të kulturës.

2.1.2. Ndotësit biologjikë dhe shkaqet e shfaqjes së tyre

Ndotja biologjike përfshin praninë e çdo mikroorganizmi në sistemet e kultivimit *in vitro*. Bakteret dhe myqet, janë mikroorganizma shumë të përhapur të cilët kolonizohen shumë shpejt në një mjedis të pasuruar siç është terreni ushqyes i kulturës. Për shkak të përmasës së vogël dhe rritjes së shpejtë, këto mikroorganizma hasen shpesh si ndotës biologjikë. Ato detektohen brenda pak ditëve në kulturë për shkak të turbullirës që shkaktojnë në terrenin ushqyes.

Në çdo stad të kulturës *in vitro*, që të shmanget në mënyrë të kënaqshme ndotja biologjike, duhet të zbatohen protokolle specifike dezinfektimi dhe sterilizimi. Dezinfektimi nënkupton reduktim të ndotësve biologjikë në një masë deri në 70% në një sipërfaqe / mjedis të caktuar, ndërsa sterilizimi nënkupton eliminim të plotë të tyre.

Ajo që duhet të kihet parasysh është se problematikat e infektimit të kulturave lidhen drejtpërsëdrejti me vështirësinë e detektimit të ndotësit. Sa më gjatë të rrinë të padetektuar ndotës të ndryshëm, aq më të rënda janë problemet që ata shkaktojnë. Për të reduktuar shpeshësinë e infektimit biologjik, e rëndësishme nuk është vetëm njohja dhe identiteti i këtyre ndotësve, por edhe identifikimi i rrugëve të hyrjes së tyre në kulturat qelizore. Disa nga burimet e ndotjes biologjike janë:

➤ ***Terrenet, tretësit apo enët josterile***

Përdorimi i enëve, terreneve dhe tretësirave josterile gjatë rutinës ditore në një laborator, bëhet shkak për ndotje biologjike. Në shumë raste mund të vërehen shfaqje infeksioni si rezultat i sterilizimit apo ruajtjes jo të duhur të tyre, apo dhe gjatë përdorimit.

Enët e qelqit apo metalit, pipetat, pincetat etj. sterilizohen me anë të **autoklavimit** apo edhe me anë të **sterilizimit të thatë**. E rëndësishme është që edhe pajisjet që përdoren për sterilizim (autoklavat dhe sterilizatorët) duhet të kontrollohen në mënyrë të vazhdueshme që të garantojnë sterilizimin e saktë të mjeteve.

Mbushja e autoklavës me sasi të tepërt për sterilizim shkakton sterilizim jo të barabartë të përmbajtjes për shkak të shpërndarjes jo të barabartë të nxehtësisë në hapësirat midis objekteve të vendosura brenda saj, dhe si rezultat, mund të shfaqen

shenja infeksioni në kulturë. Edhe përdorimi i një kohe më të shkurtër sterilizimi bëhet shkak për ndotje. P.sh. aplikimi i një kohe më të shkurtër autoklavimi është një procedurë e gabuar që ndiqet në rastet kur autoklavohen enë me vëllim 500 ml, ose më të madh, që përmbajnë dhe material viskoz si agar apo sakarozë. Pra, gjithmonë duhet të kihet parasysh përmasa, natyra (lloji) dhe vëllimi i materialeve që duhet të sterilizohen, dhe të përcaktohet saktësisht cikli / koha e autoklavimit në mënyrë të tillë që të arrihet sterilizimi. Një element tjetër i rëndësishëm është dhe ruajtja në mënyrën e duhur e materialeve të sterilizuara.

Në ditët e sotme gjithnjë e më tepër po përdoren enët e plastikës një-përdorimshme, të cilat sterilizohen në intensitete të larta të **rrezatimit gama** që në momentin e fabrikimit të tyre dhe pastaj mbyllen hermetikisht për të garantuar sterilitetin e brendshëm. Kjo është një metodë shumë e suksesshme sterilizimi, por duhet të tregohet kujdes gjatë hapjes së tyre në mënyrë që të mos infektohen gjatë përdorimit.

Shumë përbërës të terrenit ushqyes nuk mund të sterilizohen me anë të autoklavimit për shkak të degradimit të tyre, por me anë të **membranave mikrofiltruese**. Këto membrana nuk garantojnë eliminim të çdo lloji ndotësi biologjik pasi shumë raportime shkencore deklarojnë se ato nuk janë dhe aq efektive në largimin e viruseve apo mykoplazmave. Në ditët e sotme janë rritur shumë përpjekjet për të përmirësuar filtrimin e tretësirave me membrana mikrofiltruese duke rritur cilësinë e këtyre të fundit.

➤ **Ajri**

Në ajër gjenden shumë ndotës biologjikë të cilët mund të bëhen shkak për infektimin e kulturave. Mjediset laboratorike duhet të jenë të pozicionuar në mënyrë të tillë që të shmangen rrymat e ajrit dhe mundësisht pa dritare. Gjithashtu, shumë pajisje laboratorike si: pompat e vakuumit, frigoriferët, aspiratorët, centrifugat, sterilizatorët etj. mund të rrisin ndotjen mikrobike për shkak të rrymave të ajrit që ato shkaktojnë.

Domosdoshmërisht puna duhet të kryhet në dhoma sterile apo flukse laminare të cilat sterilizohen me **rrezatim UV**, por kjo nuk garanton plotësisht eliminimin e ndotjes biologjike. Nëse në fluksin laminar punohet me material të infektuar me mykoplazma, këto të fundit mund të shpërndahen edhe në sipërfaqen e fluksit..

Edhe inkubatorët apo dhomat e rritjes mund të jenë shkaktarë të ndotjes biologjike. Mjedise të tilla duhet të jenë të pastra dhe pa rryma ajri në mënyrë që të reduktohet shpeshësia e infeksioneve.

➤ **Qelizat apo indet që kultivohen**

Qelizat apo indet që do të kultivohen, pasi merren/izolohen nga kushtet *in vivo* të rritjes, domosdoshmërisht duhet të trajtohen me **reaktivë kimikë, dezinfektantë dhe shkatërrues të mikroorganizmave**, përndryshe kultura do të shfaqë ndotje biologjike sipërfaqësore të natyrës bakteriale ose kërpudhore (Fig. 2.1 a, b).

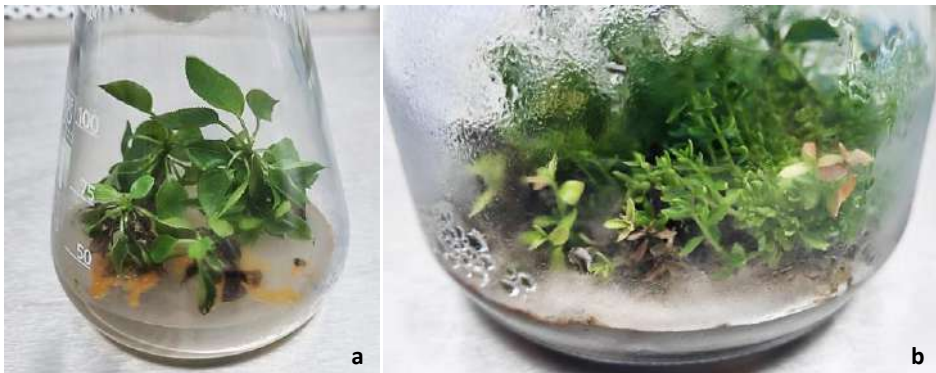


Figura 2.1. Shfaqje e infeksionit në enët e kulturës **a)** bakterial **b)** kërpudhor (*Laboratori i kulturave qelizore dhe indore, Departamenti i Bioteknologjisë, FSHN, UT*)

Reaktivët kimikë përdoren për të larguar të gjithë ndotësit biologjikë, duke shkaktuar një dëmtim minimal të qelizave apo indeve në kulturë. Ato përzgjidhen në varësi të gjenotipit, llojit të eksplantit apo arsye të tjera. Koha e trajtimit dhe përqendrimi i dezinfektantëve varen nga tipi i bimëve, shkaktarët e infeksionit etj. Përdorimi një agjenti kimik në përqendrim apo kohëzgjatje të lartë, përveçse shkakton eliminim të mikroorganizmave, shkakton dhe dëme të mëdha në indet bimore, gjë që rezulton me vdekjen e këtyre të fundit. Nga ana tjetër, një përqendrim i ulët, apo një kohëzgjatje e shkurtër nuk do të siguronte eliminimin e mikroorganizmave, gjë që do të shoqërohej me shfaqjen e infeksioneve në kulturë. Gjatë dezinfektimit të materialit bimore, eksplanti nuk duhet të humbasë aktivitetin e tij biologjik, por duhet të eliminohen vetëm ndotësit bakterialë apo kërpudhorë.

Agjentët kimikë më të përdorshëm për sterilizimin e qelizave dhe indeve bimore janë: hipokloriti i natriumit (NaClO), hipokloriti i kalciumit ($\text{Ca}(\text{ClO})_2$), bikloruri izhivës (HgCl_2) etj. Në kulturat e qelizave apo indeve bimore, këta reaktivë përdoren së bashku me Tween 20 ose 80 si agjentë zvogëlues të tensionit sipërfaqësor.

Antibiotikët në kulturat e qelizave bimore përdoren më pak. Ata shtohen në terrenet ushqyese, veçanërisht për profilaksi, si dhe për të identifikuar infeksionet. Gjithsesi, antibiotikët duhet të përdoren me kujdes, sepse ata ndryshojnë rritjen dhe zhvillimin e bimëve në kulturë.

2.2. Praktikrat për shmangien e infektimit të kulturave indore

2.2.1. Përdorimi i teknikave të duhura aseptike

Për efektivitetin e teknikave aseptike duhet të përdoren, përveç protokolleve përkatës, edhe pajisje të çertifikuara (autoklava, sterilizatorë, flukse laminare etj.) dhe që mirëmbahen e kontrollohen në mënyrë të vazhdueshme. Teknikat e

sterilizimit / vendosjes së asepsisë, përfshijnë si vijon:

- **Sterilizim në nxehtësi me presion avulli / autoklavim:** Sterilizimi me rrymë avulli në autoklavë konsiderohet një metodë shumë efektive. Nëse laboratori nuk ka autoklavë, mund përdoret dhe një tenxhere me presion. Mjafton mbajtja për 20 min. në temperaturë 121°C (250°F) që arrihet në presion avujsh uji prej 1 atm. që të shkatërrohen të gjitha mikroorganizmat dhe sporet e tyre. Përdoret për sterilizimin e qelqurave, instrumentave, letrave të filtrit dhe veçanërisht për terrenet ushqyese të lëngëta apo të ngurta. Autoklavimi indukon disa ndryshime në terrenet ushqyese, p.sh. mund të ulë pH e terrenit me 0.3-0.5 njësi; sakaroza, disa fitohormone dhe vitamina mund të shpërbëhen, por edhe lëndët që fitohen janë të vlefshme në terrenin ushqyes. Kjo metodë mbetet efektive, sepse është e shpejtë, e thjeshtë dhe arrihet shkatërrimi i viruseve.

Autoklava është një pajisje themelore dhe që të funksionojë në mënyrë efektive, ajo kërkon mirëmbajtje të vazhdueshme. Disa nga teknikat që duhet të kihen parasysh për këtë qëllim, janë:

- Kur kryhet një cikël sterilizimi, është shumë e rëndësishme të mos mbingarkohen koshat / raftet mbajtëse të sterilizimit sepse kjo do të shkaktojë sterilizim joefektiv.

- Në mënyrë të vazhdueshme duhet të përdoret një shirit testimi për t'u siguruar se janë përmbushur parametrat e duhur për të arritur sterilizimin.

- Mbajtja pastër e autoklavës është një nga pikat më të rëndësishme. Koshat dhe raftet mbajtëse duhet të pastrohen pa gërvishtje duke përdorur një detergjent të butë jo gërryes. Nuk duhet përdorur lësh çeliku, furçë teli ose zbardhues.

- Duhet inspektuar periodikisht kordoni dhe spina për mbinxheje dhe konsum të tepërt, pasi kjo mund të përbëjë rrezik zjarri. Nëse është kështu, kordoni i rrymës duhet të zëvendësohet. Disa kablllo të energjisë shkëputen shpejt dhe zëvendësohen lehtësisht. Nëse jo, zëvendësimi do të duhet të bëhet nga një kompani riparimi e certifikuar.

- **Sterilizim me nxehtësi të thatë:** Përdoret për qelqurinat, instrumentet metalike dhe materiale të tjera që nuk prishen në temperatura të larta të termostateve apo sterilizatorëve. Objektet që do të sterilizohen, mbështillen të veçuara me letër ambalazhi ose letër alumini. Duke llogaritur kohën që duhet për sterilizimin e thatë, dallohen 3 periudha kohe:

- Duhet një kohë e caktuar për të arritur temperatura e sterilizimit mbi 180°C, e cila varion nga përmasa e sterilizatorit si dhe nga lloji i tij;

- Duhet një minimum prej 2 orësh në këtë temperaturë për të shkatërruar të gjitha mikroorganizmat duke përfshirë dhe sporet e tyre;

- Së fundi, një periudhë ftohjeje parashikohet për të mbrojtur qelqurinat nga thyerja prej rënies së shpejtë të temperaturës;

Sterilizatorët që veprojnë me nxehtësi të thatë, mund të jenë të pajisur ose jo me rryma ajri. Më të preferuar janë ato që punojnë me qarkullim ajri të nxehtë pasi nxehtësia shpërndahet në mënyrë të barabartë në mjetet që duhet të sterilizohen. Meqenëse është teknikë që realizohet në temperatura të larta pa lagështi, materialet metalike nuk shfaqin shenja të korrozionit.

- **Filtrimi:** Ky proces, që realizohet kryesisht nën gradient presioni prej 1-3 bar, përdor membrana mikrofiltrimi me madhësi mesatare të poreve midis 0.025-10 µm, ku poret shpërndahen në mënyrë uniforme në të gjithë membranën. Këta filtra janë porozë dhe lejojnë që tretësira të kalojë nëpër to, duke parandaluar kalimin e grimcave të ngurta, koloideve të vogla, baktereve dhe turbullirës. Mikrofiltrimi aplikohet për sterilizimin e përbërësve të terreneve që janë të paqëndrueshëm në temperaturë të lartë, të cilët shpërbëhen gjatë autoklavimit dhe duhet të sterilizohen në temperaturën e dhomës.

- **Reagentët kimikë:** Këto lëndë përdoren gjerësisht për sterilizimin e eksplanteve bimore. Ndër më të përdorshmit për stabilizimin e asepsisë në laboratorët ku aplikohen teknikat *in vitro*, përmenden:

a. Hipokloriti i natriumit NaClO , zakonisht 0.5-1%. Gjendet në treg si zbardhues, ujë Zhaveli, Ace, Clorox etj. Këto produkte tregtare përmbajnë rreth 5% NaClO si agjent aktiv, prandaj hollohen deri në përqendrimet 10- 20% (v/v), d.m.th 100-200 ml zbardhues në 800 ml ujë të distiluar.

b. Hipokloriti i kalciumit $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ përdoret për bimë të ndjeshme ndaj zbardhuesve, sepse ky dezinfektant është më pak toksik, pasi depërton shumë ngadalë në brendësi të indeve. Veçanërisht për sterilizimin e sipërfaqes së farave, $\text{Ca}(\text{ClO})_2$ është agjenti më efektiv dhe me më pak dëmtime. Përdoret në përqendrime 30-100 g l⁻¹.

c. Bikloruri i zhivës HgCl_2 është reagent shumë toksik, prandaj përdoret në doza shumë të vogla, 0.01-0.05% dhe shpëlahet shumë herë nga indet. Nuk rekomandohet të dezinfektohen farat me biklorur zhive, sepse frenohet mbirja e tyre në terrenin ushqyes. Gjatë punës me biklorur zhive, nevojitet kujdes maksimal pasi edhe personeli është mjaft i rrezikuar për shkak të shkallës së lartë të helmimit të këtij reagenti.

d. Etanoli 70°-80° përdoret për dezinfektimin e materialit bimor në bashkëshoqërim me dezinfektuesit e përmendur më lart, proces që zhvillohet me një kohëzgjatje të caktuar. Etanoli 90° i dehidraton indet, prandaj përdoret vetëm për dezinfektimin e mjeteve të punës para kalimit në flakë, si dhe për spërkatjen e mjediseve të punës dhe të duarve.

e. Antibiotikët përdoren vetëm në raste specifike. Ato asnjëherë nuk duhet të përdoren në mënyrë rutinë në eksperiment, pasi raportimet tregojnë se sa më shumë të përdoren antibiotikët, aq më e lartë është përqindja e kulturave të infektuara me mykoplasma. Kjo ndodh pasi ndotës biologjikë si baktere apo kërpudha (që janë dhe më lehtë të detektueshëm) janë të ndjeshëm ndaj trajtimit

me antibiotikë në krahasim me mykoplazmat (të cilat as nuk detektohen lehtë).

Këta reaktivë përdoren së bashku me *Tween 20 ose 80* si agjentë zvogëlues të tensionit sipërfaqësor. Gjatë dezinfektimit të materialit bimor, eksplanti nuk duhet të humbasë aktivitetin e tij biologjik, por duhet të eliminohen vetëm ndotësit bakterialë dhe kërpudhorë. Indet ose organet bimore janë të ndjeshme, prandaj përdoren dezinfektantë me një përqindje dhe me kohëzgjatje të caktuar.

- **Rrezatimi:** Rrezet UV, rrezet X dhe rrezet Gama janë llojet e rrezatimit elektromagnetik që gjejnë përdorim mjaft të gjerë për sterilizim për shkak të efektit shkatërrues që kanë në ADN. Dallimi kryesor midis tyre, për sa i përket efektivitetit, është depërtimi i tyre.

Rrezatimi UV ka depërtim të kufizuar në ajër, kështu që sterilizimi ndodh vetëm në një zonë mjaft të vogël rreth llambës. Megjithatë, është rrezatim relativisht i sigurt dhe është mjaft i dobishëm për sterilizimin e zonave me sipërfaqe të vogla, siç janë flukset laminare. Rrezet X dhe rrezet Gama janë shumë më depërtuese, gjë që i bën ato më të rrezikshme, por shumë efektive për sterilizimin e ftohtë në shkallë të gjerë të sendeve plastike (p.sh. shiringa; enë kulture, pjata Petri) gjatë prodhimit.

Fluksi laminar sterilizohet me rrezatim UV. Pasi pastrohet me etanol 70°, ndizet llamba UV dhe sistemi i filtrimit. Nevojitet një kohëzgjatje prej 20 – 30 min. dhe vijohet me inokulimin e eksplanteve në mjedisin brenda fluksit, pasi ai tashmë siguron kushtet e aseptisë.

Bibliografia

- Cassell, A.C. 1997.** Pathogen and microbial contamination management in micropropagation. Kluwer, Dordrecht;
- Cassell, A.C., Doyle, B.M. 2005.** Pathogen and biological contamination management. pp. 35 – 50. Plant cell and tissue culture. Humana Press, New York;
- Davey, M.R., Anthony, P. 2010.** Plant cell Culture: Essential methods. Published by Wiley–Blackwell, UK;
- Harisha, S. 2006.** Biotechnology procedures and experiments handbook. Laxmi Publication, ISBN-13: 978-1-934015-11-7;
- Hartman, H.D., Kester, D.E. 1982.** Principles of Tissue Culture for Micropropagation. Ne: Plant Propagation. Principles and Practices, Prentice/Hall International, Inc., 523-544;
- Laimer, M., Rucker, W. 2003.** Plant tissue culture. New York: Springer-Verlag;
- Mohan Jain, S., Haggman, H. 2007.** Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits. Published by Springer, Netherland;
- Odutayo, O.I., Amusa, N.A., Okutade, O.O., Ogunsanwo, Y.R. 2007.** Determination of the sources of microbial contaminants of cultured plant tissues. *Plant Pathol J.* 6:77–81;
- Peiris, S.E., de Silva, E.D.U.D., Edussuriya, M., Attanayake, A.M.U.R.K., Peiris, B.C.N. 2012.** CSUP technique: A low cost sterilization method using sodium hypochlorite to replace the use of expensive equipment in micropropagation. *J. Natl. Sci. Found.*, 40, 49–54;

- Rottem, S., Barile, M.F. 1993.** Beware of Mycoplasmas. *Trends in Biotechnology* 11:143-150.
- Smith, R.H. 2006.** Plant Tissue Culture Techniques and Experiments. 2nd edition. San Diego, CA 92101-4495, USA. 185 pg.
- Thomas, P. 2004.** A three-step screening procedure for detection of covert and endophytic bacteria in plant tissue cultures. *Curr Sci.*, 87:67–72;
- Trigiano, R.N., Gray, D.J. 2000.** Plant tissue culture concepts and laboratory exercises (2nd ed.). Boca Raton, FL: CRC Press

KAPITULLI 3

Elementët e kërkimit *in vitro*

3.1. Metodologjitë e lidhura me kërkimin shkencor

Projektet e kërkimit fillojnë me një ide që ka për qëllim zgjidhjen e një problemi specifik. Nga kjo ide fillestare, dalin një sërë eksperimentesh të planifikuara, në të cilat trajtimet testohen në kushte të kontrolluara. Nga vëzhgimet e eksperimenteve, grumbullohen dhe vlerësohen të dhëna, përpunime që bazohen në analiza statistikore, me qëllim vlerësimin e efektivitetit të secilit trajtim për të zgjidhur problemin fillestar.

3.1.1. Ngritja e hipotezës dhe e objektivave të eksperimentit

Në shkencë, rruga më e mirë për zgjidhjen e problemeve është ndjekja logjike dhe hap pas hapi e çështjeve të ndryshme. Fillimisht ngrihet një pyetje apo identifikohet një problem, i cili mund të hetohet me mjetet që janë në dispozicion. Më pas vlerësohet ajo se çfarë është e ditur për problemin në fjalë nga literatura ekzistuese dhe eksperienca personale. Pas kësaj, formulohet një hipotezë dhe përcaktohen disa objektiva kërkimore, të cilat mund të testohen nëpërmjet procedurave përkatëse. Në këtë këndvështrim, është mjaft i rëndësishëm hartimi i këtyre elementëve themelorë të kërkimit shkencor, si dhe ndërtimi i skicës fillestare të platformës eksperimentale.

Hipoteza më e përdorshme në kërkimet *in vitro* është hipoteza ‘nul’, e cila përmbahet në vlerësimin se të gjitha trajtimet do të shfaqin të njëjtën përgjigje në të gjitha llojet e indeve bimore.

3.1.2. Përzgjedhja e elementëve kryesorë të planit eksperimental

Pasi janë përcaktuar hipoteza dhe objektivat eksperimentale, duhet të përzgjidhen komponentët kryesorë të eksperimentit. Kjo përfshin seleksionimin e trajtimeve dhe materialeve ndihmëse që nevojiten për zhvillimin e eksperimentit.

‘**Trajtime**’ quhen kushtet që mund të maten apo testohen eksperimentalisht dhe që kanë efekt themelor në zgjidhjen e problemit apo pyetjes së ngritur, nëpërmjet vërtetimit apo rrëzimit të hipotezës.

‘**Materialet ndihmëse**’ janë elementë të nevojshëm në kushtet në të cilat realizohet eksperimenti, por nuk janë ‘trajtime’. Në kulturën *in vitro* të bimëve, materiale të tilla mund të jenë enët e kulturës, elementë të ndryshëm të terrenit ushqyes, tipe apo përqendrime të rregullatorëve të rritjes, elementë xhelifikues të

terrenit, faktorë fizikë (temperatura, fotoperioda, intensiteti i ndriçimit) apo çdo mjet tjetër i rëndësishëm për realizimin e eksperimentit.

Pasi zgjidhen trajtimet dhe materialet ndihmëse, përcaktohet njësia eksperimentale, njësia e vëzhguar dhe përpilohet plani eksperimental. Njësia eksperimentale (NE) është njësia më e vogël që i nënshtrohet një trajtimi. Në kulturë *in vitro*, NE është ena e kulturës. Njësia e vëzhguar (NV) është objekti i cili vrojtohet apo matet. Zakonisht, në NV bëjnë pjesë eksplantet.

Në kërkimet *in vitro* përdoren skema të ndryshme të realizimit të matjeve apo vëzhgimeve, ku shumica prej të cilave bazohen në përzgjedhjen rastësore (randomizimin) si më poshtë:

- randomizim i plotë - *completely randomized (CR)*;
- bllok i plotë i randomizuar - *randomized complete block (RCB)*;
- bllok i paplotë - *incomplete block (IB)*;
- skemë e ndarë - *split plot (SP)*;

Këto skema dallojnë për nga mënyra e randomizimit / përzgjedhjes rastësore dhe e kërkesave të eksperimentit. Përzgjedhja rastësore lejon kërkuesit të përcaktojnë qartë dhe të llogarisin variacionin e lidhur me ‘trajtimet’ dhe ‘materialet ndihmëse’. Kur përzgjidhet një skemë eksperimentale, është e rëndësishme që të përcaktohen ‘materialet ndihmëse’ dhe popullata me interes për ndonjë variacion të mundshëm dhe pas kësaj të zgjidhet skema më e thjeshtë në realizim.

1) Skema CR përdoret gjerësisht në kërkimet *in vitro*, pasi është e thjeshtë për t’u zbatuar dhe bazohet në një randomizim (përzgjedhje rastësore) pa një model të paracaktuar. Kjo u mundëson kërkuesve të maksimizojnë numrin e përsëritjeve dhe të aplikojnë si përsëritje të barabarta, ashtu edhe të pabarabarta për trajtime të ndryshme. Një fleksibilitet i tillë është veçanërisht i rëndësishëm në studimet *in vitro*, ku shpesh vërehet një numër i pabarabartë përsëritjesh si pasojë e infektimit ose vdekjes së eksplanteve (Fig. 3.1a).

2) Skemat që përfshijnë blloqe përdoren në rastet kur vërehet një shkallë e lartë heterogjeniteti midis njësive eksperimentale (NE). Parametrat mjedisorë të ndryshëm në dhomën vegjetative, diferencat midis bimëve mëma nga të cilat merren eksplantet etj. shkaktojnë heterogjenitet. Kur përdoren blloqet, mund të përfshihen në to vetëm faktorë që janë të matshëm. Skema RCB përmbledh përsëritje të çdo trajtimi në blloqe. E rëndësishme është që të gjithë eksplantet e përfshirë në një bllok të jenë sa më uniformë. Kjo mundëson verifikim më të saktë të ndryshueshmërisë midis trajtimeve brenda një blloku. P.sh. eksplantet e izoluar nga e njëjta gjethë ose bimë mëmë shfaqin shkallë të ngjashme rigjenerimi. Prandaj, eksplantet mund të grupohen në mënyrë të tillë që ato të marra nga e njëjta gjethë apo bimë mëmë të përfshihen në një bllok me të paktën një përsëritje për secilin trajtim. Në këtë mënyrë mund të përcaktohet saktë variacioni i induktuar nga trajtimi.

a) randomizim i plotë - *completely randomized (CR)*

①	⑤	④	⑤	③	⑥	④	⑤	③	④
⑤	③	②	①	⑤	①	②	⑥	①	②
②	⑥	④	③	④	⑤	③	④	③	②
⑥	④	①	①	②	⑥	④	②	①	①
②	③	⑤	⑥	⑥	②	①	⑤	⑤	③
③	①	⑥	②	④	⑤	⑥	③	④	⑥

b) bllok i plotë randomizuar - *randomized complete block (RCB)*

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
①	②	④	③	⑤	⑥	①	④	③	⑤
②	④	⑥	①	⑥	②	④	③	⑥	②
③	①	③	⑥	③	④	⑤	①	⑤	③
④	⑤	②	⑤	①	③	⑥	②	①	④
⑤	⑥	⑤	④	②	①	②	⑤	④	⑥
⑥	③	①	②	④	⑤	③	⑥	②	①

c) bllok i paplotë - *incomplete block (IB)*

1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
①	②	②	③	④	⑤	①	⑥	②	⑥	④	⑤	③	④	①
②	③	④	⑥	⑥	④	③	⑤	①	③	⑥	②	⑤	③	④
③	④	①	⑤	②	①	⑥	③	⑤	④	②	①	④	⑤	⑥
④	⑤	⑤	②	①	⑥	②	①	③	②	⑤	⑥	⑥	①	③

Figura 3.1. Skemat e randomizimit për a) CR, b) RCB c) IB (sipas Compton, 2015)

3) Ka raste kur ka shumë pak material burimor për të prodhuar një numër të tillë eksplantesh të mjaftueshëm për ngritur blloqe të plota, secili me nga një përsëritje të çdo trajtimi. Në këto raste skema më e përshtatshme është ajo e blloqeve të paplota (IB). Ashtu sikurse RCB, edhe skema IB përdor blloqe për të ruajtur homogjenitetin, por ndryshimi qëndron në faktin se në këtë skemë, jo të gjitha trajtimet paraqiten në një bllok.

4) Një skemë tjetër është ajo që përdor blloqet e ndara (SP), e cila përdoret shumë në rastet kur përdoren njëkohësisht dy trajtime me shkallë të ndryshme variacioni. Skema SP përdor dy nivele të veçanta randomizimi për secilin faktor trajtimi. Faktori me shkallën më të lartë variacionit përbën ‘bllokun kryesor’, ndërsa faktori me shkallën më të ulët të variacionit përbën ‘nënblokun’.

Gjenotipi	1 ₁	3 ₁	4 ₁	2 ₁	5 ₁		4 ₃	3 ₃	2 ₃	5 ₃	1 ₃
Tipi i citokininave	①	④	②	③	⑤		④	①	⑥	②	③
	③	⑥	⑤	⑥	①		③	④	①	⑥	⑤
	⑤	②	③	①	④		⑤	②	③	④	⑥
	②	⑤	⑥	④	②		①	③	④	①	①
	⑥	③	④	⑤	⑥		⑥	⑤	②	③	④
	④	①	①	②	③		②	⑥	⑤	⑤	②

Figura 3.2. Skema e randomizimit për blloqet e ndara (SP) (sipas *Compton, 2015*)

3.1.3. Përcaktimi i përsëritjeve të një eksperimenti

Shumë statisticienë dhe kërkues mendojnë se një eksperiment duhet të realizohet minimumi dy herë në mënyrë që rezultatet të jenë të vlefshme, por numri i përsëritjeve përcaktohet që në planifikim të eksperimentit. Përsëritjet e vazhdueshme nuk garantojnë marrjen e të njëjtave rezultate, edhe pse mund të përdoret i njëjti stok i bimëve mëmë. Madje, përsëritjet bëjnë që edhe ‘koha’ të përfshihet si një faktor jotrajtues, por që mund të ndikojë në rezultat pasi ndërkohë mund të kenë ndodhur ndryshime në fiziologjinë e bimëve mëma (mosha, sezoni etj.). Diçka e tillë shkakton marrjen e rezultateve krejt të ndryshme nga një përsëritje në tjetrën.

3.1.4. Zgjedhja e të dhënave më të mira dhe planifikimi i analizës statistikore

Të dhënat e përftuara ndikojnë në vlerësimin e efektit të çdo trajtimi në përputhje me objektivat e eksperimentit. Është e rëndësishme që të përcaktohet se çfarë do të vëzhgohet apo do të matet periodikisht në mënyrë që të nxirren saktë dhe përfundimet e eksperimentit. Shumë kërkues shkencorë shfrytëzojnë literaturën me studime të mëparshme, si dhe eksperiencën personale të tyre. Në shumicën e rasteve vlerësohet numri dhe përqindja e eksplanteve që formojnë sythe, numri i sytheve për eksplant, gjatësia e kërcellit, gjatësia dhe/ose numri i rrënjëve, përqindja e eksplanteve që rrënjëzojnë etj.

3.1.5. Zhvillimi i eksperimentit

Eksperimentimi mund të fillojë menjëherë sapo përfundon planifikimi. Në çdo moment duhet të shmangen gjykimet personale, pasi mund të ndikojnë në

besueshmërinë e sistemit eksperimental.

Nuk duhet të përdoren njëkohësisht të gjithë eksplantet për të njëjtin trajtim, por enët e kulturës duhet të organizohen në mënyrë rastësore në përputhje me skemën e përgatitur. Gjithashtu, duhet të shmangen të gjitha rrethanat që mund të shtojnë gabimin në eksperiment. Shumë gabime bëhen edhe nga lodhja, prandaj duhet përcaktuar saktë që në planifikim koha e nevojshme për çdo fazë të eksperimentit. Gabimet mund të ndodhin edhe kur eksplantet transferohen në terren të freskët, prandaj manipulimet në fluksin laminar duhet të jenë të kujdesshme.

3.1.6. Regjistrimi i të dhënave

Regjistrimi i të dhënave duhet të realizohet në përputhje me strukturën e eksperimentit dhe në mënyrë tepër të kujdesshme. Të dhënat e eksplanteve në një enë kulture duhet të regjistrohen para transferimit në enë të re. Shumë matje mund të jenë të lodhshme për sytë, prandaj nevojiten periudha çlodhjeje gjatë procesit. Pas regjistrimit të të dhënave, duhet bërë verifikimi i tyre për gabime.

Duhet siguruar që të dhënat e regjistruara të shtrihen brenda kufijve të pranimit. Të dhëna jashtë kufijve quhen ‘të veçuara’ (*outliers*) dhe mund të jenë si pasojë e gabimeve në regjistrim, ose mund të jenë vlera të përfutuara nga inde bimore me probleme të trashëguara apo mutacione gjenetike. Zakonisht, të dhënat e veçuara, pas shqyrtimit të saktë të tyre, eliminohen.

3.2. Analizimi, interpretimi dhe paraqitja e të dhënave

3.2.1. Analiza e të dhënave

Të dhënat e përfutuara duhet të analizohen dhe të interpretohen me kujdes në përputhje me objektivat eksperimentale. Siç u tha më lart, natyra e të dhënave ndikon shumë jo vetëm interpretimin e rezultateve, por edhe në diskutimet mbi to dhe gjetjen e një zgjidhjeje apo arritjen në një përfundim objektiv në lidhje me çështjet e parashtruara në fillim të platformës eksperimentale.

Kërkuesit shkencorë duhet të përzgjedhin një procedurë të tillë analizimi që i përshtatet më së miri vëzhgimeve të matura dhe objektivave eksperimentalë. Kur analizohen të dhëna, fillimisht realizohet një analizë e përgjithshme për të vlerësuar nëse ka apo jo diferenca midis trajtimeve të ndryshme. Nëse rezultojnë diferenca, realizohen dhe analizime të tjera më specifike të të dhënave të përfutuara deri sa të arrihet bindja e plotë mbi rezultatet.

Analiza e të dhënave të vazhdueshme: Në këtë lloj të dhënash bëjnë pjesë matje të tilla si p.sh. gjatësia e kërcellit, rrënjëve, etj. Për analizën e këtyre lloj matjeve përdoret Analiza e Variancës (ANOVA). Variablat e varura konsiderohen vrojtimit apo matjet, ndërsa variablat e pavarura konsiderohen trajtimet dhe ndërveprimet midis trajtimeve. Pas kësaj, testohet ndikimi që kanë variablat e pavarura në ato të varura.

Analiza e të dhënave të numërueshme: Shumë kërkues përdorin ANOVA për të analizuar të dhëna të numërueshme, por kjo lloj analize nuk ka besueshmëri nëse ka më pak se 10 matje të numëruara. Për shkak të shpërndarjes së tyre, të dhënat e numërueshme duhet të analizohen duke përdorur Shpërndarjen Puasonike (*Poisson regression*).

Analiza e të dhënave binomiale: Në të dhënat binomiale bëjnë pjesë ato të dhëna që tregojnë aftësinë e një eksplanti për të reaguar apo përgjigjur ndaj një trajtimi (p.sh. aftësia rigjeneruese, fuqia mbirëse etj.). Këto të dhëna kanë një shpërndarje binomiale pasi variancat e trajtimeve janë të varura nga suksesi i eksplantit. Përqindjet e përllogaritura nga të tilla matje janë të rëndësishme pasi kërkuesit shkencorë duan të identifikojnë trajtimin që optimizon përgjigjen e eksplantit.

3.2.2. Paraqitja e rezultateve

Të dhënat eksperimentale paraqiten në forma të ndryshme në mënyrë që të krijohet një ide e qartë për rezultatet e arritura dhe që të lehtësohet interpretimi i tyre. Disa nga mënyrat e paraqitjes së të dhënave janë: ilustrimet në formën e pasqyrave, grafikëve, diagramave, fotove, hartave etj., të cilat janë thelbësore në paraqitjen e një punimi shkencor. Ato nuk përdoren thjesht për të përmirësuar prezantimin apo për të shtuar faqet në një punim shkencor të shkurtër, por ato duhet të përdoren në mënyrë që të lehtësohet paraqitja dhe interpretimi i të dhënave. Domosdoshmërisht ilustrimet duhet të përmenden / citohen në material / tekst para se ato të shfaqen. Më tej ato duhet të vendosen / shfaqen në tekst sa më pranë përmendjes fillestare dhe nuk duhet të përmbajnë informacion të paraqitur më parë në punim.

Të dhënat eksperimentale paraqiten në forma të ndryshme në mënyrë që të krijohet një ide e qartë për rezultatet e arritura dhe që të lehtësohet interpretimi i tyre. Disa nga mënyrat e paraqitjes së të dhënave janë:

➤ Pasqyrat

- Pasqyrat përdoren për paraqitjen e të dhënave numerike. Në to nuk vendoset informacion që mund të jetë i vendosur në tekst.
- Zakonisht pasqyrat paraqiten me numra arabë dhe me një titull të shkurtër për përmbajtjen e tyre, i cili vendoset sipër tabelës. Shënime të tjera ndihmëse në lidhje me të dhënat e pasqyrës vendosen poshtë saj.
- Në krye të çdo kolone apo grupi kolonash duhet të vendosen njësitë matëse.

➤ Grafikët

- Grafikët mund të përmbledhin të dhëna, të cilat për shkak të sasisë së madhe nuk mund të interpretohen lehtë në pasqyrë. Veç të tjerash, grafikët mund të paraqesin një marrëdhënie empirike midis dy sasive.
- Çdo bosht i grafikut duhet të emërtohet me emrin dhe njësinë matëse të variablit që paraqet. Në grafik emrat e variablave duhet të paraqiten sa më shkurt dhe duhet të shmangët përdorimi i të dhënave me më shumë se tre shifra.

➤ **Fotografitë**

- Duhet të jenë të qarta, të kontrastuara në vlerë optimale, duke pasur kujdes që të pasqyrohet çdo stad i punës ekperimentale.
- Fotografitë paraqiten me numra arabë dhe me një titull të shkurtër për përmbajtjen e tyre, i cili vendoset poshtë fotografisë.

Bibliografia

Beyl, C.A., Trigiano R.N. 2015. Plant Propagation Concepts and Laboratory Exercises. 2nd edition, ISBN 13: 978-1-4665-0388-5, CRC Press Taylor & Francis Group, 497 pg.;

Compton, M.E. 1994. Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 37:217–242;

Compton, M.E. 2015. Evaluation of Data from Propagation Experiments. In: Beyl & Trigiano (eds) *Plant Propagation Concepts and Laboratory Exercises*. 2nd edition, ISBN 13: 978-1-4665-0388-5, CRC Press Taylor & Francis Group, fq. 203 – 216;

Lambardi, M., Ozodogru, E.A., Jain, S.M. 2013. *Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plant*; New York, Heidelberg, Dordrecht, London: Springer), pp.490, DOI 10.1007/978-1-62703-074-8;

Mize, C.W., K.J. Koehler, Compton, M.E. 1999. Statistical considerations for *in vitro* research: II - Data to presentation. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.* 35:122–126;

Trigiano, R.N., Gray, D.J. 20005. *Plant Development and Biotechnology*. CRC Press LLC. ISBN: r 0-8493-1614-6, 348 PG;

KAPITULLI 4

Terrenet ushqyese: përbërja dhe përgatitja e tyre

4.1. Koncepte elementare për përgatitjen e tretësirave

Tretësirat janë përzierje homogjene të dy ose më shumë përbërësve, ku një përbërës është tretësi, ndërsa të tjerat janë lëndët e tretura. Hapi i parë është përcaktimi se sa e fortë / përqendruar duhet të jetë tretësira. Një tretësirë stok (me një përqendrim të caktuar) përgatitet duke peshuar sasinë e duhur të lëndës së ngurtë, duke e tretur me një tretës të përshtatshëm dhe më tej, duke e taruar deri në vëllimin e dëshiruar. Tretësirat mund të përgatiten edhe duke marrë vëllimin e dëshiruar të një lëngu dhe duke e holluar atë deri në një vëllim të caktuar.

Tretshmëria e një lënde shpreh sasinë maksimale të një lënde të tretur që mund të tretet në një tretës në një temperaturë dhe presion të caktuar. Edhe për substancat shumë të tretshme, zakonisht, ekziston një kufi se sa lëndë e tretur mund të tretet në një sasi të caktuar tretësi. Një tretësirë me sasinë maksimale të mundshme të lëndës së tretur është e ngopur. Nëse një tretësirë përmban më pak se sasia maksimale e lëndës së tretur, ajo është e pangopur.

Edhe për procesin e tretjes duhet të respektohet një procedurë e caktuar, që siguron saktësi dhe tretje të shpejtë të lëndës. Lëndë të ndryshme kanë veçantitë e tyre dhe, rrjedhimisht, procesi i tretjes është në varësi të tyre. Shpejtësia me të cilën tretet një lëndë e caktuar mund të përshpejtohet me metodat e mëposhtme:

- Grimcim ose bluarje e lëndës së ngurtë për të rritur kontaktin / sipërfaqen e lëndës së ngurtë me lëngun / tretësin;
- Ngrohje e vazhdueshme gjatë tretjes për të rritur shpejtësinë e tretjes sepse molekulat e tretësit dhe e tretësirës lëvizin më shpejt. Për shkak se tretshmëria e shumicës së lëndëve të ngurta rritet me rritjen e temperaturës, një tretësirë e ngopur e përgatitur në një temperaturë më të lartë zakonisht përmban më shumë lëndë të tretur se sa po të përgatitej në një temperaturë më të ulët.
- Përzierje e shpejtë / e fuqishme në përzierës magnetik;

4.2. Përzgjedhja dhe përbërja e terrenit ushqyes

4.2.1. Përzgjedhja e terrenit ushqyes

Zgjedhja e terrenit ushqyes të duhur është ndër detyrat themelore për suksesin e një platforme eksperimentale në kulturën indore të bimëve. Kjo varet nga specia

bimore, indi apo organi në kulturë, nga qëllimi i kulturës, si dhe nga njohja e nevojave ushqyese të indeve. Në stade të ndryshme të kulturës, përbërja e terrenit mund të ndryshohet në përputhje me tipet e ndryshme të rritjes që synohen të induktohen dhe produkti bioteknologjik që duhet të merret.

Veç kësaj, themelore është të kihet parasysh fakti që eksplanti i përzgjedhur duhet domosdoshmërisht të përmbushë qëllimin që ka në thelb platforma eksperimentale e ngritur, por me koston më minimale të mundshme.

Deri më sot është zhvilluar një numër i madh formulimesh për terrene ushqyese, të cilët janë raportuar shumë të sukseshëm për gjenotipe të shumtë dhe për lloje të ndryshme eksplantesh. Këto njihen si **terrene ushqyese bazë**, të cilët përzgjidhen në varësi të qëllimit.

Duhet theksuar se zgjedhja e përbërjes inorganike është e vështirë dhe duhet të kihet parasysh njohja e fiziologjisë së bimës për të ushqyerit mineral. Sigurisht që vetëm një terren ushqyes bazë nuk mjafton për të siguruar rigjenerim efektiv në kulturë indore. Terreni duhet të pasurohet me hormone bimore, shtesa të tjera organike, një burim karboni, etj., të gjitha këto në përputhje me qëllimin e eksperimentit dhe llojin e eksplantit. Një terren ushqyes që ka përplotësime të tilla, quhet **terren ushqyes i plotë**.

4.2.2. Përbërja e terrenit ushqyes të kulturës indore

Suksesi i kulturës *in vitro* varet mjaft nga përbërja kimike e terrenit të kulturës. Për rritjen optimale të bimëve kërkohet prania në terren e sasive optimale e përbërësve themelore të kulturës qelizore dhe indore. Si të tillë cilësohen:

- makroushqyesit (gjithmonë të pranishëm); mikroushqyesit (gjithmonë të pranishëm);
- sheqeri (pothuajse gjithmonë i pranishëm; nuk shtohet vetëm në raste specifike); rregullatorët e rritjes (pothuajse gjithmonë të pranishëm);
- vitaminat (zakonisht janë të pranishme, megjithëse numri i përbërësve që shtohen në terren varion shumë në varësi të species bimore apo të qëllimit të platformës eksperimentale *in vitro*);
- aminoacidet apo komponime të tjera azotike (të pranishme në raste specifike);
- përbërës të papërcaktuar (të pranishëm në raste specifike);

Elementet minerale themelore / esenciale janë shumë të rëndësishme në jetën e një bime. Një element konsiderohet esencial në rritje nëse:

- bima nuk mund të plotësojë ciklin jetësor të saj në mungesë të atij elementi;
- veprimi i tij është specifik dhe nuk mund të zëvendësohet plotësisht nga asnjë element tjetër;

- elementi shfaq efektin e tij në mënyrë direkte në rritje ose në metabolizëm dhe mundëson që një element tjetër të përthithet më kollaj nga bima ose eleminon efektin toksik të ndonjë elementi;

Përveç C, H dhe O që janë pjesë e ushqimit jomineral, 15 elemente minerale janë të njohur si thelbësorë për rritjen e bimëve: azoti, fosfori, squfuri, kalciumi, kaliumi, magnezi, hekuri, mangani, bakri, zinku, bori dhe molibdeni. Gjashtë elementet e para kërkohen normalisht në sasi të mëdha dhe përbëjnë minimalisht 1000 mg/kg (0.1%) të peshës së thatë të bimës dhe për rrjedhojë quhen *makroelemente* (N, P, S, Ca, K, Mg). Nëntë elementet e tjera janë të domosdoshme në sasi relativisht të vogla dhe përbëjnë më pak se 500 mg/kg (0.05%) të peshës së thatë të bimës dhe për rrjedhojë quhen *mikroelemente* (B, Cu, Fe, Mn, Zn, Mo, Cl, Co, Ni).

Sot ekzistojnë shumë formulime makroelementesh dhe mikroelementesh (Pasqyra 4.1), pasi specie bimore të ndryshme dallojnë nga kërkesat që kanë për elemente të caktuara inorganike. Tretësira bazale që konsiderohet universale dhe që gjen përdorimin më të gjerë në krahasim me tretësirat e tjera, është ajo Murashige & Skoog, e cila dallohet për efektivitetin në respektimin optimal të të gjitha kriterëve që duhet të përmbajë një recepturë efektive për kultivimin *in vitro* të bimëve.

Vitaminat kryesore si: acidi nikotink, piridoksina dhe tiamina, përgjithësisht janë pjesë e terreneve ushqyese bazë dhe janë të domosdoshme për zhvillimin *in vitro*. Shumë të tjera si: biotina, acidi folik, acidi askorbik, acidi pantotik, tokoferoli (vitamina E), riboflavina, acidi p-amino-benzoik, etj. përdoren në raste specifike pasi ato nuk janë faktorë kufizues të rritjes. Zakonisht, vitaminat shtohen në terrenin ushqyes gjatë përgatitjes së tij dhe autoklavohen. Megjithatë, këto komponime ndryshojnë sipas shkallës së qëndrueshmërisë ndaj temperaturës së lartë. Më rezistente ndaj autoklavimit janë acidi nikotink, piridoksina dhe tiamina. Vitaminat që nuk mund të autoklavohen, kalohen në mikrofiltrim.

Terrene të ndryshme bazale dallojnë jo vetëm për nga lloji i vitaminave dhe aminoacideve që përmbajnë, por edhe nga përqendrimi i tyre. Pasqyra 4.2 paraqet përmbajtjen në vitamina dhe aminoacide për disa terrene ushqyese bazë që përdoren gjerësisht në sistemet e kultivimit *in vitro* të bimëve. Vitaminat dhe aminoacidet të paraqitura në pasqyrë, janë pjesë e terrenit bazë specifik të raportuar nga autori / autorët përkatës. Por, nëse për qëllime të caktuara kërkohen vitamina apo aminoacide të tjera, ato shtohen gjatë përgatitjes së terrenit të plotë. Edhe vitaminat apo aminoacidet jo domosdoshmërisht duhet të kombinojnë me recepturën specifike. Kështu, ka raste që përdoret tretësira minerale MS, e kombinuar me tretësirën e vitaminave dhe aminoacideve të terrenit Gamborg, etj.

Përdorimi i **aminoacideve** dhe shtesave të tjera azotike si burim i formave organike të azotit nuk është i domosdoshëm, pasi raporti i balancuar i joneve NO_3^- / NH_4^+ në terren siguron kërkesat e bimës për azot. Pavarësisht kësaj, aminoacidet dhe aminat mund të jenë shumë të rëndësishme në morfogjenezë.

Pasqyra 4.1. Përbërja e disa tretësirave bazale të përdorura në kultivimin *in vitro* të specieve bimore

Përqendrimi (mg/l)	Anderson, 1975	B-5 (Gamborg et al., 1968)	Chee & Pool, 1987	DCR (Gupta & Durzan, 1985)	DKW (Driver & Kuniyuki, 1984)	ER (Eriksson, 1965)	Gautheret, 1937	Gresshoff & Doy, 1974	Heller, 1953	Hoagland & Arnon, 1938	Kao & Michayluk, 1975	Linsmaier & Skoog (Lichter, 1965)	LP (Long & Preece, 1995)
$\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$									0.054				
BeSO_4							0.01						
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$			492	386.3	1960			241.2		656.4			1262
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	332	150		64.14	144	332.2			75		453	332.2	122.5
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0.03	0.025	0.03	0.025	0.05	0.003	0.05	0.025			0.025	0.025	
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0.03	0.025	0.03	0.25	0.05	0.003	0.05	0.025	0.03	0.08	0.025	0.025	0.25
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$							50						
FeCl_3									1				
Fe-Na-EDTA													
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	55.7	27.85	27.8	27.85	33.8	27.8		27.85		2.5	27.85	27.8	30.8
H_3BO_3	6.2		6.2	6.2	12.4	0.63	0.1	0.3	1	2.86		6.2	5.5
K_2SO_4					559								1275
KCl								65	750		300		

KH₂PO₄			70	258	265	340	125				70	70	217.5
KI	0.3	0.75		1.6			0.5	0.8	0.01		0.75	0.83	
KNO₃	480	2500	900			1900	125	0		606.6	900	900	
MgSO₄ x 7H₂O	80.7	250	80.6	743	361.5	180.7	125	7.099	250	240.8	46.55	80.7	555
MnSO₄ x H₂O	6.9	10	0.85	32	33.5	1.689	3		0.1			6.9	27.9
MoO₃ x (H₂O)_n										0.016			
Na₂EDTA x 2H₂O	74.5	37.26	37.3	37.3	37.25	37.3		37.25		3.35	37.26	37.26	41.35
Na₂MoO₄ x 2H₂O	0.25	0.25	0.25	5	0.39	0.021		0.025			0.25	0.25	0.32
Na₂SO₄													
NaNO₃									600				
NH₄H₂PO₄										15.03			
(NH₄)₂MoO₄													
NH₄NO₃	400	150	650	400	1416	1200	500		125		600	650	908
(NH₄)₂SO₄		134											
NiCl₂·x 6H₂O									0.03				
NiSO₄ x 6H₂O					0.005		0.05						
Ti(SO₄)₃							0.2						
Zn(NO₃)₂ x·6H₂O					7								8.5
ZnSO₄ x 7H₂O	8.6	2	8.6	8.6			0.18	0.3	1	0.22	2	8.6	4.3

Pasqyra 4.1 vazhdim

Përqendrimi (mg/l)	Monnier, 1995	MS (Murashige & Skoog, 1962)	N6 (Chu, 1975)	Nitsch & Nitsch, 1969	NLN (Lichter, 1982)	Olive medium (OM) (Rugini, 1984)	Parker-Thompson (Hickok, et al., 1995)	QL (Quoirin & Lepoivre, 1977)	Schenk & Hildebrandt, 1972	White, 1963	WPM (Lloyd & McKown, 1981)	WV3 (Coke, 1996b)	WV5 (Coke, 1996a)
$\text{AlCl}_3 \times 6\text{H}_2\text{O}$													
BeSO_4													
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$					347	600				208.5	556		
$\text{CaCl}_2 \times 2\text{H}_2\text{O}$	880	440	125.3	66		440	9.628	150	5		96	452.9	452.9
$\text{CoCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$	0.05	0.025			0.025	0.025		0.025				0.025	0.025
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0.05	0.025		0.025	0.025	0.25	0.37	0.025	0.2		0.25	0.25	0.25
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$													
FeCl_3													
Fe-Na-EDTA					36.7							36.7	36.7
$\text{FeSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	14.9	27.85	27.8	27.8		27.8	27.8	27.85	5	2.5	27.85		
H_3BO_3	12	6.2	1.6			12.4	0.86	6.2	5	0.5	6.2	31	31
K_2SO_4			1560								990		
KCl	350					500				0.75		0.83	0.83

KH₂PO₄	170	170	400	68	25	340	500	170			170	270	270
KI	1.66	0.83	0.8			0.83		0.83		80		910.1	84.06
KNO₃	1900	1900	2830	950	25	1100		900	2500				
MgSO₄ x 7H₂O	370	370	90.37	90.37	6	1500	58.57	180	95.4	351.6	370	903.8	903.8
MnSO₄ x H₂O	33.6	16.9	3.33	8.9	8.95	22.3	0.25	22.3		5.3	22.3	5.16	5.16
MoO₃ x (H₂O)_n													
Na₂EDTA x 2H₂O	11.1	37.25	37.3	37.26		37.5	37.3	37.3	20		37.3		
Na₂MoO₄ x 2H₂O	0.5	0.25		0.25	0.25	0.25		0.25		0.25	0.25	0.25	0.25
Na₂SO₄	21									200			
NaNO₃													
NH₄H₂PO₄									300				
(NH₄)₂MoO₄							0.037						
NH₄NO₃	825	1650		720		412	25	400		6.5	400		700
(NH₄)₂SO₄			463										
NiCl₂·x 6H₂O													
NiSO₄ x 6H₂O													
Ti(SO₄)₃													
Zn(NO₃)₂ x·6H₂O										3		8.6	8.6
ZnSO₄ x 7H₂O		8.6	1.5	0	0	14.3	0.52	8.6			8.6		

Pasqyra 4.2. Përmbajtja e vitaminave dhe aminoacideve të disa terreneve bazë të përdorur gjerësisht

Përqendrimi (mg/l)	DKW (Driver & Kuniyuki, 1984)	ER (Eriksson, 1965)	Kao & Michayluk, 1975	LP (Long & Preece, 1995)	MS (Murashige & Skoog, 1962)	N6 (Chu, 1975)	NLN (Lichter, 1982)	Nitsch & Nitsch, 1969	OM (Rugini, 1984)	QL (Quoirin & Lepoivre, 1977)	Schenk & Hildebrandt, 1972	WPM (Lloyd & McKown, 1981)
Acid citrik			40									
Acid folik			0.4				0.5	0.5	0.5	2		
Acid fumarik			40									
Acid L-askorbik												
Acid nikotinik	1	0.5		0.75	0.5	0.5	5		5	1	5	0.5
Acid p-aminobenzoik			0.02									
Acid piruvik			20									
Ciancobalaminë			0.02									
Cisteinë	1											
D-Biotinë	0.05		0					0.05	0.05			
D-Ca pantoteinat	1											
Glicinë	1	2		2	2	2	30	2	2			2
L-Glutaminë							800		2190			
mio-Inozitol	100			100	100				100	100	100	100
Piridoksinë HCl	1	0.5		0.25	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1	0.5	0.5
Riboflavinë			0.2									
Tiaminë HCl	1	0.5		1.5	0.1	0	0.5	0.5	0.5	1	5	1

Hormonet bimore / Rregullatorët e rritjes në bimë: Në kulturë indore ose qelizore kërkohet shpesh kombinimi i klasave të ndryshme hormonale. Termi “fitohormon” përdoret për hormonet bimore natyrale. Rregullatorë të Rritjes Bimore (RRB) quhen ato sintetike / të prodhuara artificialisht. Fitohormonet dhe rregullatorët e rritjes përdoren në sasi tepër të vogla, të rendit 0.01-10 mg/l dhe përcaktojnë në masë të madhe dhe vendimtare rritjen gjatë embriogjenezës apo organogjenezës.

Klasa të ndryshme hormonale kanë efekte të ndryshme në bimë. Ky efekt është në varësi të strukturës kimike të hormonit, të eksplantit dhe të gjenotipit.

Megjithëse roli i RRB në kulturën indore dhe qelizore është i domosdoshëm, ata ndërveprojnë me faktorë biologjikë themelorë. Faktori më i rëndësishëm në kulturën indore bimore është gjenotipi, pra, nëse materiali bimor ka aftësinë gjenetike të shfaqë përgjigjen e dëshiruar apo jo. Gjithashtu, gjendja fiziologjike e materialit bimor, përcakton përgjigjen biologjike. Disa eksplante bimore janë shumë më tepër të afta të japin një përgjigje të caktuar sesa lloje të tjera eksplantesh. Në disa raste, gjendja fiziologjike e një eksplanti mund të ndryshohet duke e paratrajtuar atë me një tjetër RRB. Një listë e fitohormoneve dhe RRB-ve më të përdorur në kulturat indore, klasa hormonale ku bëjnë pjesë, shkurtetat / akronimi dhe pesha e tyre molekulare është dhënë në pasqyrën 4.3.

Pasqyra 4.3. Fitohormonet / RRB-të më të përdorur në kulturën indore të bimëve

Klasa hormonale	Hormoni bimor / Rregullatori i rritjes	Shkurtimi	Masa molekulare
Auksina	Acidi indol-3-acetik	AIA	175.2
	Acidi naftalenacetik	ANA	186.2
	Acidi 2,4-diklorofenoksiacetik	2,4-D	221.0
	Acidi indol-3-butirik	AIB / IBA	203.2
Citokinina	6-furfurilaminopurina	Kinetinë	215.2
	6-benzil-aminopurina ose 6-benziladenina	BAP / BA	225.2
	N ⁶ (2-izopentil)-adenina	2iP	203.3
	Trans-6-(4-hidroksil-3-metilbut- 2-enil) amino purina	Zeatinë	219.2
	Tidiazuroni ose 1-fenil-3-(1,2,3-tiadiazol-5-il)-urea	TDZ	220.2
Giberelina	Acidi giberelik	GA ₃	346.4
Acidi abshisik	Acidi abshisik	ABA	264.3

Karbohidratet si burim karboni dhe energjie: Qelizat dhe indet bimore në kulturë përgjithësisht nuk janë aktive fotosintetike dhe kërkojnë një burim karboni. Kryesisht ato klasifikohen si miksotrofe, ku autotrofia ndodh në vlera shumë të ulëta. Përqendrimi i ulët i CO₂ në provëzat apo enët e tjera të kulturës, gjithashtu kufizon fotosintezën, por në praktikë është shumë e vështirë dhe e kushtueshme të furnizohen bimët me gazin CO₂.

Sasia e sheqerit në terren duhet të sigurojë rritje të shpejtë të indeve bimore në kulturë. Zakonisht në sistemet e kultivimit *in vitro* përdoret sakaroza ose glukozja në sasinë 2% - 5%. Mund të përdoren gjithashtu burime të tjera karbohidratesh, të tilla si fruktoza dhe niseshteja. Sheqernat i nënshtrohen karamelizimit nëse autoklavohen shumë gjatë dhe reagojnë me amino-komponimet (reaksioni Maillard). Karamelizimi ndodh kur sheqernat nxehen, degradohen dhe formojnë melanoidinat, të cilat janë përbërje me peshë të lartë molekulare që mund të pengojnë rritjen e qelizave. Një ngjyrë e verdhë në kafe e çelur e një terreni të autoklavuar është një tregues se procesi ka ndodhur shumë gjatë. Në të tilla raste, terreni ushqyes nuk duhet përdorur.

Alkoolet sheqerore: Ndër alkoolet sheqerore që përdoren për qëllime specifike në kulturën indore, përmenden si vijon:

Mioinozitoli është i rëndësishëm në kulturat e indeve i përfshirë në mbirjen e farave, metabolizmin dhe transportin e karbohidrateve, ushqimin mineral, strukturën e membranës, formimin e murit qelizor, homeostazën hormonale, fiziologjinë e stresit, etj. Mioinozitoli konsiderohet gjithashtu si një përmirësues i rritjes *in vitro* dhe mund të jetë një burim karbohidratesh, por kryesisht, veprimi i tij ngjason me ato të vitaminave. Gjithsesi, jo të gjitha formulimet (Pasqyra 4.4) përfshijnë mioinozitolin si pjesë të terreneve ushqyese bazë.

Manitoli dhe *sorbitoli* janë alkoole sheqerore, të cilët luajnë rol të madh në rregullimin e potencialit të jashtëm osmotik. Thithja e ujit nga qelizat bimore drejtohen nga vlerat e potencialit uhor midis lëngut qelizor dhe mjedisit të jashtëm. Komponentët kryesorë të terrenit ushqyes që ndikojnë në lëvizjen e ujit janë përqendrimi i agarit, sasia e sheqerit, etj. Këto alkoole sheqerore përdoren në proceset e izolimit dhe të fuzionimit të protoplasteve, në maturimin e embrioneve somatikë, në teknikat *in vitro* të përfshira në konservimin me metoda të rritjes minimale, në teknikat e lidhura me androgjenezën dhe gjinogjenezën, etj.

Sistemi mbështetës për eksplantet bimore: Përgjithësisht, kultivimi i eksplanteve, në shumë eksperimente të kulturës indore, kërkon një mbështetje të qëndrueshme dhe efektive të tyre brenda enës së kulturës. Shkalla në të cilën kulturat rriten dhe prodhojnë sythe gjatë mikroshumimit ndikohet nga natyra fizike e terrenit ushqyes. Sistemet e mbështetjes klasifikohen në:

- *Mbështetës të natyrës kimike:* Për këtë qëllim, zakonisht në terrenin ushqyes, shtohet një agjent xhelifikues. Një agjent i tillë, që gjen përdorimin më të madh në sistemet e kultivimit *in vitro*, është agar-agari, i cili përdoret kryesisht në përqendrime 0.5-1.0%. Agari formon një xhel me ujin që shkrin në 100°C dhe ngurtësohet rreth

temperaturës 45°C, gjë që lejon edhe sterilizimin efikas në temperatura të larta. Ka qëndrueshmëri në një kufi të gjerë të vlerave të pH (5 – 8), dhe në disa raste edhe mbi këto limite. Nëse agari është i papastër, ai krijon problematika në terrenin ushqyes dhe rrjedhimisht, në rritjen bimore. Ndonjëherë vërehen ndryshime të thella në përgjigjen e eksplantit vetëm duke ndryshuar markën e agarit të përdorur. Përveç agarit, si agjentë xhelifikues mund të përdoren algjinati, xhelriti, fitaxheli, karraxhinani, niseshteja, etj. Algjinati përdoret gjerësisht në procedurat e inkapsulimit dhe formimit të farave sintetike, për shkak të aftësisë së tij xhelifikuese kur bie në kontakt me jonet dyvalente të magnezit, kalciumit, etj.

- *Mbështetës të natyrës fizike:* Në këto raste përdoren letra filtri të vendosura mbi një shtresë poliuretani të mbingopur me terren ushqyes ose në formë ure mbi terrenin e lëngët. Mbështetës të tjerë që mund të përdoren janë membranat e polipropilenit, fije poliestre, pëlhura të holla, lloje gomash, etj.

pH i terrenit ushqyes të një kulture indore duhet të jetë në një vlerë të tillë që të mos shkatërrojë indin bimore. Zakonisht, terrenet ushqyese përgatiten me një pH fillestar rreth vlerave 5.5 – 6.0. Për stabilizimin e pH përdoren tretësirat buferike, të cilat janë substanca që çojnë pH në vlerën e dëshiruar. Zakonisht, vlera e pH rregullohet me acid apo bazë para autoklavimit të terreneve ushqyese.

pH i terrenit ushqyes, në përgjithësi, bie me 0.6 - 1.3 njësi pas autoklavimit. Kulturat e disa indeve bimore shkaktojnë një rënie të pH me kalimin e kohës për shkak të prodhimit të acideve organike si dhe përthithjes së formave të caktuara burimore të azotit. Vlera e pH ndikohet mjaft nga kripërat inorganike, burimi i karbohidrateve, agjenti xhelifikues, qymyri i aktivizuar, kohëzgjatja e kulturës, etj.

4.3. Përgatitja e tretësirave stok / rezervë

Përgatitja e tretësirave stok / rezervë / të përqendruara, është një praktikë mëse e zakonshme në teknikat e kultivimit *in vitro*. Nuk është e mundur të peshohen dhe të përzihen të gjithë përbërësit pak para përgatitjes së terrenit ushqyes. Është një punë e lodhshme dhe që kërkon kohë. Gjithashtu, nëse do të përgatitet 100 ml ose 200 ml terren ushqyes, atëherë është shumë e vështirë të peshohen disa përbërës që përdoren në sasi shumë të vogël për një litër terren.

Një arsye tjetër shumë e rëndësishme, është që shumë nga kripërat duhet të treten paraprakisht veçmas me një përqendrim të caktuar, pasi nëse do të bashkohen me grupin pa u tretur, ato nuk do të mund të treten dhe krijojnë precipitat. Pra, është e përshtatshme dhe mëse e domosdoshme që të përgatiten tretësirat e përqendruara të makrokripërave, mikrokripërave, vitaminave, aminoacideve, hormoneve etj.

Praktika e punës në Laboratorin e Kulturave Qelizore dhe Indore, FSHN, UT, është përzgjedhur e tillë që për tretësirat e makro- dhe mikroelementëve përgatiten tretësira stok / të përqendruara 10x, ndërsa për ato të kelatit të hekurit, vitaminave e aminoacideve dhe fitohormoneve / RRB-ve përgatiten tretësira stok / të përqendruara

100x. Detyrim i rëndësishëm është respektimi i përqendrimeve specifike me të cilat përgatiten tretësirat stok, ndërsa sasia / vëllimi i çdo tretësire stok të përgatitur në një moment të caktuar, mund të ndryshojë në varësi të nevojës së paraqitur në përputhje me veprimtarinë eksperimentale të planifikuar.

4.3.1. Përgatitja e tretësirave stok / të përqendruara të makro- dhe mikroelementeve

Tretësirat stok / të përqendruara të makro- dhe mikroelementëve përgatiten si tretësira më vete. Ndër makroelementët, rekomandohet që edhe kripërat që furnizojnë me sulfate, të përgatiten si tretësira stok të veçanta, pasi nëse bashkohen me kripërat e tjera, shpesh herë ndodh që të krijojnë precipitate. Për sa i takon mikroelementëve, ato të gjithë grupohen në një tretësirë stok, me përjashtim të hekurit i cili përgatitet i kelatuar si tretësirë stok më vete.

Më poshtë paraqitet protokoli përkatës (Protokolli 4.1) për përgatitjen e tretësirave stok të kripërave inorganike, pjesë përbërëse të një terreni ushqyes. Në pasqyrën 4.4 paraqiten formulimet për makroelementë dhe mikroelementët si dhe nevoja për njehsimin e përqendrimit në rastin kur tretësira stok do të jetë 10x e përqendruar.

Protokolli 4.1: Përgatitja dhe ruajtja e tretësirave stok / të përqendruara të makro- dhe mikroelementëve

Metoda e ndjekur:

- Për të përgatitur një tretësirë stok, fillimisht përllogaritet sasia e dëshiruar e reagentit në përqendrimin e kërkuar për vëllimin e kërkuar;
- Duhet bërë kujdes për peshimin e saktë në peshoren elektronike. Për këtë proces përdoren vasketa / enë mbajtëse silikonit ose xhami (Fig. 4.1a);
- Pas vendosjes së enës mbajtëse, domosdoshmërisht duhet bërë tarimi / zerimi i peshores. Më tej, me anë të një spatule metalike ose plastike, shtohet gradualisht sasia e reagentit derisa merret pesha e dëshiruar;
- Reagenti i peshuar vendoset në një gotë kimike apo enë tjetër të përshtatshme dhe në të shtohet tretësi. Për kripërat e makro- dhe mikroelementëve, tretësi është uji i distiluar;
- Kripërat peshohen dhe treten veçmas, në përputhje me përqendrimin përkatës;
- Pasi peshohet dhe tretet kripa e parë përmbajtja shtohet në një balonë qelqi me vëllim 1 litër
- Gota kimike ku është bërë tretja, shpëlahet tri herë me ujë të distiluar në mënyrë që e gjithë përmbajtja të kalojë në balonën e qelqit;
- **Kujdes!!** Tarimi deri në 1 litër nuk bëhet në këtë fazë, por vijohet me peshimin e kripës së dytë dhe tretjen e saj. Edhe kjo përmbajtje, pas tretjes së plotë, shtohet në të njëjtën balonë qelqi dhe përziehet mirë me tretësirën që gjendet në të. Në këtë mënyrë vijohet me të gjitha kripërat përbërëse të një tretësire stok;

- Pasi janë tretur dhe bashkuar të gjithë përbërësit në balonën e qelqit, bëhet tarimi deri në vëllimin përkatës (1 litër) me ujë të distiluar (Fig. 4.1d);
- Në këtë mënyrë përgatiten tretësirat stok të makroelementëve dhe të mikroelementëve (sepse këto janë tretësira stok që përgatiten veçmas). Zakonisht, edhe kripërat e sulfatëve përgatiten si tretësira stok më vete, pasi nëse bashkohen me grupin e makrokripërave mund të ndodhë që të formohet precipitat shumë shpejt pas përgatitjes së tretësirës;
- Gjithmonë duhet bërë etiketimi i enëve mbajtëse të tretësirave stok të makro- dhe mikroelementëve mbi përmbajtjen, datën e përgatitjes dhe shënime të tjera të nevojshme (Fig. 4.1e);
- Këto tretësira stok ruhen në 4°C dhe mund të përdoren edhe deri në një vit pas përgatitjes, por në mënyrë të vazhdueshme duhet bërë vërtetimi i tyre për shenja të precipitimit.

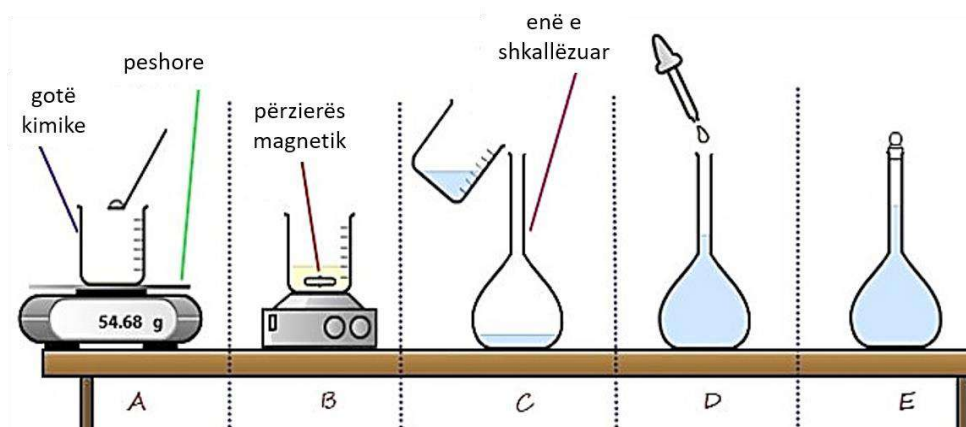


Figura 4.1. Paraqitje skematike e thjeshtuar e hapave të punës për përgatitjen e një tretësire, pjesë e procesit për përgatitjen e tretësirave stok / të përqendruara (www.google.com)

Pasqyra 4.4. Përgatitja e tretësirave stok / të përqendruara të kripërave të makro- dhe mikroelementëve për terrenet ushqyese LP, MS, WPM dhe DKW

Përbërësit	MS		LP		WPM		DKW	
	mg/l	1 litër 10X (g/l)	mg/l	1 litër 10X (g/l)	mg/l	1 litër 10X (g/l)	mg/l	1 litër 10X (g/l)
KNO ₃	1900	19	-	-	-	-	-	-
NH ₄ NO ₃	1650	16.5	908	9.08	400	4	1416	14.16
K ₂ SO ₄	-	-	1274.5	12.745	990	9.9	1560	15.60
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	3.7	555	5.55	370	3.7	743	7.43
KH ₂ PO ₄	170	1.7	217.5	2.175	170	1.7	258	2.58

$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	-	-	1262	12.62	556	5.56	1960	19.6
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	4.4	122.5	1.225	96	0.96	144	1.44
Mikro- elementët	mg/l	1 litër 10X (g/l)	mg/l	1 litër 10X (g/l)	mg/l	1 litër 10X (g/l)	mg/l	1 litër 10X (g/l)
H_3BO_3	6.20	0.062	5.50	0.055	6.2	0.062	12.4	0.124
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16.9	0.169	27.9	0.279	22.3	0.223	32.0	0.320
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.00025	0.25	0.0025	0.25	0.0025	0.05	0.0005
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	0.0025	0.32	0.0032	0.25	0.0025	5.0	0.05
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.60	0.086	4.30	0.043	8.60	0.086	21.2	0.212
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.00025	-	-	-	-	0.05	0.0005
KJ	0.83	0.0083	-	-	-	-	1.60	0.016
$\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	-	-	8.50	0.085	-	-	-	-

4.3.2. Përgatitja e tretësirave stok të kelatit të hekurit

Një problem në solucionet ushqyese është ruajtja e formës së përdorshme të hekurit. Nëse në solucion shtohen kripëra inorganike të hekurit si FeSO_4 ose $\text{Fe}(\text{NO}_3)_2$, hekuri precipiton në solucion në trajtën e $\text{Fe}(\text{OH})_3$. Për këtë arsye, hekuri shtohet i lidhur një kelator. Këto të fundit janë përbërje të afta të krijojnë komponime komplekse të tretshme me katione si hekuri apo kalciumi në të cilët kationi mbahet i lidhur më fort me forca jonike sesa me lidhje kovalente. Përgjithësisht, në terrenet ushqyese të kulturave *in vitro*, hekuri shtohet i kelatuar në formën e Fe-EDTA (kripë ferrike e acidit etilendiamintetraacetik). Unaza komplekse bën që jonet hekur të përthithen në mënyrë optimale nga bima edhe në sasi të vogla.

Më poshtë paraqitet Protokoli 4.2 për përgatitjen e tretësirës stok të kelatit të hekurit. Në pasqyrën 4.5 paraqiten formulimet për përgatitjen e tretësirave së kelatit të hekurit, kur nevojitet të përgatitet 100 ml tretësirë 100x e përqendruar.

Protokoli 4.2: Përgatita dhe ruajtja e tretësirave stok të Fe- EDTA

- Peshohen sasi të përkatëse të $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ dhe të $\text{Na}_2\text{-EDTA}$ për 100 ml tretësirë 100x të përqendruar, vendoset secila sasi e peshuar në gotë kimike të veçantë dhe shtohen 20 - 30 ml ujë në secilën;
- Treten më vete me nxehtësi në një përzierës magnetik;
- Kur të vlojë tretësira e $\text{Na}_2\text{-EDTA}$, në të shtohet tretësira e $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$;
- Lihen të vlojnë së bashku për rreth 30 min. Tretësira e përfutur ka ngjyrë të verdhë të lehtë;
- Më pas shtohet gradualisht ujë i distiluar deri sa të arrihet vëllimi 100 ml;

- Gjithmonë duhet bërë etiketimi i enëve mbajtëse të tretësirave stok të kelatit të hekurit mbi përmbytjen, datën e përgatitjes, etj.;
- Kjo tretësirë ruhet në temperaturë 4°C që të mos kryhet oksidimi i Fe^{2+} në Fe^{3+} dhe këshillohet mbajtja e saj në një shishe me ngjyrë të errët.

Pasqyra 4.5. Përgatitja e tretësirave stok të kelatit të hekurit për terrenet ushqyese LP, MS, WPM dhe DKW

Përbërësit	MS		LP		WPM		DKW	
Kelati i hekurit	mg/l	100 ml 100X (g/l)	mg/l	100 ml 100X (g/l)	mg/l	100 ml 100X (g/l)	mg/l	100 ml 100X (g/l)
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.85	0.2785	30.80	0.308	27.8	0.278	27.85	0.2785
$\text{Na}_2 \text{ EDTA}$	37.3	0.373	41.35	0.4135	37.3	0.373	37.25	0.3725

4.3.3. Përgatitja e tretësirave stok të vitaminave dhe aminoacideve

Për të rritur efektivitetin gjatë shumimit *in vitro*, në terrenet ushqyese shtohen dhe disa vitamina e aminoacide (Pasqyra 4.6). Përveç tyre, terreni ushqyes i plotë mund të përmbahet dhe shtesa të vitaminave dhe aminoacideve të tjerë.

Vitaminat dhe aminoacidet që janë pjesë e terrreneve ushqyes bazë, përgatiten si tretësira stok me një vëllim dhe përqendrim të caktuar (Pasqyra 4.6). Më poshtë paraqitet protokoli përkatës (Protokolli 4.3) për përgatitjen e tretësirave stok të këtyre përbërësve.

Protokolli 4.3: Përgatitja dhe ruajtja e tretësirave stok vitaminave dhe aminoacideve

- Peshohen sasitë përkatëse të vitaminave dhe aminoacideve për 100 ml tretësirë stok 100x të përqendruar sipas Pasqyrës 4.6;
- Tretet me ujë të distiluar secila më vete dhe më pas, bashkohen të gjitha së bashku në një balonë qelqi të graduar, me vëllim 100 ml dhe shtohet ujë i distiluar deri në vëllimin 100 ml;
- Mioinozitoli, në formulimet ku është i pranishëm, mund të përfshihet në tretësirat stok pasi peshohet në përqendrimin e duhur për vëllimin e kërkuar. Gjithsesi, në shumë raste, ai nuk përfshihet në këto tretësira për shkak se mund të bëhet i paqëndrueshëm, por peshohet sipas vlerës standard të përqendrimit dhe shtohet sa herë që përgatitet terreni ushqyes;
- Gjithmonë duhet bërë etiketimi i enëve mbajtëse të tretësirave stok të vitaminave dhe aminoacideve mbi përmbytjen, datën e përgatitjes dhe shënime të tjera të nevojshme;
- Tretësirat stok të vitaminave dhe aminoacideve ruhen në temperaturë 4°C dhe mund të përdoren deri në dy muaj;

- Nëse në terrenet ushqyese do të nevojitet shtimi i vitaminave apo aminoacideve të tjera që nuk janë pjesë e terrenit ushqyes bazë, ato peshohen në kohën e përgatitjes së terrenit dhe shtohen në të;
- Shumë vitamina dhe aminoacide janë lëndë termolabile / të paqëndrueshme nën ndikimin e temperaturave të larta. Në këto raste nevojitet që ato të shtohen në terrenin ushqyes nëpërmjet mikrofiltrimit, pas sterilizimit të terrenit;
- Për këtë arsye, rekomandohet që gjithmonë para përgatitjes së terrenit ushqyes, pasi specifikohet në detaje përbërja e tij, të merret një informacion mbi shtesat e vitaminave që nuk janë pjesë e bazës apo e përbërësve të tjerë të papërcaktuar mbi qëndrueshmërinë e tyre në temperaturave të larta. Kjo është themelore për zbatimin e protokollit të sterilizimit të këtyre lëndëve.

Pasqyra 4.6. Përgatitja e tretësirave stok të vitaminave dhe aminoacideve për terrenet ushqyese LP, MS, WPM dhe DKW

Përbërësit	MS		LP		WPM		DKW	
Vitaminat	mg/l	100 ml 100X (g/l)	mg/l	100 ml 100X (g/l)	mg/l	100 ml 100X (g/l)	mg/l	100 ml 100X (g/l)
Acid nikotinic	0.5	0.005	0.75	0.0075	0.5	0.005	1.0	0.01
Piridoksinë HCl	0.5	0.005	0.25	0.0025	0.5	0.005	1.0	0.01
Tiaminë HCl	0.1	0.001	1.5	0.015	1	0.01	1.0	0.01
Pantoteinat Ca	-	-	-	-	-	-	1.0	0.01
Glicinë	2	0.02	2	0.02	2	0.02	1.0	0.01
Cisteinë	-	-	-	-	-	-	1.0	0.01
Biotinë	-	-	-	-	-	-	0.05	0.0005
Mio-inozitol	100	1	100	1	100	1	100	1

4.3.4. Përgatitja e tretësirave stok të fitohormoneve / RRB-ve

Për shkak të rolit madhor që ato kanë në morfogjenezë, në terrenet ushqyese të kulturës *in vitro*, pothuajse gjithmonë është i pranishëm një ose disa fitohormone / RRB, të kombinuar sipas përkatësisë klasore dhe përqendrimit në përputhje me qëllimin që ka platforma eksperimentale.

Çdo fitohormon / RRB përgatitet si tretësirë stok më vete. Në Laboratorin e Kulturave Qelizore dhe Indore, Departamenti i Bioteknologjisë, FSHN, UT, si vlerë standard është përcaktuar ajo 1 mg/l. Mbi këtë vlerë fillestare përgatiten tretësirat stok për secilin fitohormon / RRB në një përqendrim dhe vëllim të përcaktuar (Pasqyra 4.7). Çdo klasë hormonale ka specifikat e veta përsa i takon tretësit. Në vijim paraqitet protokollit i përgatitjes së tretësirave stok të fitohormoneve me veçantitë përkatëse sipas klasave hormonale (Protokollit 4.4).

Pasqyra 4.7. Përgatitja e tretësirave stok të hormoneve bimore

Fitohormonet	mg/l	100 ml 100X (g/l)	200 ml 100X (g/l)	200 ml 50X (g/l)
Auksinat				
Acidi indol-3-acetik (AIA)	1	0.01	0.02	0.01
Acidi indol-3-butirik (AIB)	1	0.01	0.02	0.01
Acidi naftalenacetik (ANA)	1	0.01	0.02	0.01
Citokininat				
6-benzilaminopurina (BAP)	1	0.01	0.02	0.01
Giberelinat				
Acidi giberelik (GA ₃)	1	0.01	0.02	0.01

Protokolli 4.4: Përgatitja dhe ruajtja e tretësirave stok të fitohormoneve / RRB-ve

Tretësirat stok të auksinave:

- Peshohen sasi të përkatëse sipas pasqyrës 4.7 për të përgatitur 100 ml tretësirë 100x të përqendruar;
- Treten auksinat (ANA, AIA, IBA dhe 2,4-D) paraprakisht në disa pika NaOH ose KOH 1 N (jo më shumë se 0,3 ml). Shtohet me shpejtësi ujë i distiluar deri në vëllimin në 100 ml për të shmangur precipitimin;
- Auksinat gjithashtu mund të treten në 95% etanol dhe të hollohen në vëllim; megjithatë, etanoli është toksik për indet bimore dhe krijon një precipitat të auksinës pas disa javësh në frigorifer;
- Stoqet e auksinave ruhen në 4°C dhe duhet të përgatiten të freskëta çdo javë, veçanërisht tretësira stok e auksinës AIA;

Tretësirat stok të citokininave:

- Peshohen sasi të përkatëse sipas pasqyrës 4.6 për të përgatitur 100 ml tretësirë 100x të përqendruar;
- Citokininat (kinetinë, zeatinë, BAP, 2-iP) treten në 1 ml HCl 1N dhe disa pika ujë. Zakonisht kërkohet ngrohje e butë për të tretur plotësisht kristalet. Shtohet shpejt ujë i distiluar deri në vëllimin në 100 ml për të shmangur precipitimin;
- Stoqet e citokininës mund të ruhen për disa muaj në frigorifer;
- Citokininat janë mjaft të qëndrueshme nga ana termike dhe nuk degradohen gjatë autoklavimit;

Tretësirat stok të giberelinave:

- Peshohen sasi të përkatëse sipas pasqyrës 4.6 për të përgatitur 100 ml tretësirë 100x

të përqendruar;

- Tretësirat stok të GA_3 mund të përgatiten duke tretur kristalet në ujë dhe duke rregulluar pH në 5.7;
- Në një pH alkaline / bazik, acidi giberelik shndërrohet në një izomer joaktiv, por edhe në një pH acid dhe temperaturë të lartë, GA_3 gjithashtu shndërrohet në formë biologjikisht joaktive;
- Tretësirat e giberelinave nuk janë të qëndrueshme pas autoklavimit. Ato duhet të përgatiten të freskëta dhe duhet të shtohen në terrenin ushqyes nëpërmjet mikrofiltrimit duke përdorur një filtër 0,22 μm ;

4.4. Përgatitja e terreneve ushqyese

Terrenet ushqyese mund të përgatiten duke u nisur nga tretësirat stok të parapërgatitura ose nga paketa të gatshme që tregtohen nga firma tregtare. Në secilin rast, paraprakisht duhet të përpilohet përbërja e terrenit ushqyes në mënyrë të saktë, në përputhje me qëllimin e kulturës dhe llojin e eksplantit. Në lidhje me këto përcaktime, shtohen veçanërisht hormone bimore dhe lëndë të tjera të papërcaktuara.

Eksplantet mund të kultivohen në terrere të xhelifikuara, ose në terrere të lëngëta me mbështetës fizikë. Në rastin e fundit, si mbështetës mund të përdoret letra e filtrit, pambuka, napa, ndonjë lloj gome, etj.

4.4.1. Përgatitja e terreneve ushqyese nisur nga tretësirat stok

Terrenet ushqyese kanë në përbërje shumë lëndë inorganike dhe organike, të cilat janë parapërgatitur si tretësira stok. Në përputhje me përqendrimet me të cilat janë përgatitur këto tretësira (Pasqyrat 4.4 – 4.7), merren vëllimet përkatëse të secilës, në mënyrë që në sasinë prej 1 litri të terrenit përfundimtar, të gjenden sasitë sipas përqendrimeve tabelare të çdo elementi përbërës (Pasqyra 4.8).

Llogaritjet e gabuara, mund të shkaktojnë përgatitjen e një terreni ushqyes me përmbajtje më të lartë të përbërësve sesa vlera e lejuar, ose me përmbajtje më të ulët. Të dyja këto situata sjellin një përgjigje të dobët të eksplanteve në kulturë.

Pasqyra 4.8. Sasitë e përbërësve të tretësirave stok / të përqendruara për përgatitjen e terreneve ushqyese

Përbërja e tretësirave stok	1000 ml terren MS	1000 ml terren LP	1000 ml terren WPM	1000 ml terren DKW
Makroelementë 10x	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml
Mikroelementë 10x	100 ml	100 ml	100 ml	100 ml
Kelati i hekurit 100x	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Vitaminat 100x	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Mio inozitol	100 mg/l	-	-	100 mg/l

Protokolli 4.5: Përgatitja e 1000 ml terren ushqyes nisur nga tretësirat stok

Metoda e ndjekur:

- Fillimisht duhet të përgatitet me përpikmëri formulimi i terrenit ushqyes që do të përgatitet (terreni bazë + shtesat e nevojshme në përputhje me qëllimin);
- Duhet kontrolluar me saktësi maksimale përbërësit ndërsa shtohen në enën në të cilën terreni po përgatitet. Ky kontroll duhet bërë për të evidentuar nëse ndonjë prej tyre shfaq shenja të precipitimit apo ndotjes biologjike;
- Duhet shtuar me saktësi të gjithë përbërësit e tretësirave stok, ku kujdes maksimal duhet të tregohet me përlogaritjen e vëllimeve të marra për çdo tretësirë në përputhje me përqendrimin me të cilën ajo është përgatitur dhe me sasinë e terrenit ushqyes që do të përgatitet (Pasqyra 4.8);
- Në një enë qelqi me vëllim rreth 2 litra, shtohen njëra pas tjetrës tretësirat stok të makro- dhe mikroelementëve, ajo e kelatit të hekurit, vitaminave e aminoacideve, dhe ato të fitohormoneve / RRB-ve. Nga secila tretësirë stok, merret një sasi e vogël në një gotë kimike, dhe me anë të një cilindri apo pipete automatike (varet nga sasia e kërkuar) shtohet vëllimi i dëshiruar në enën e përgatitjes së terrenit ushqyes;
- Cilindri i përdorur për marrjen e sasisë së dëshiruar, shpëlahet tri herë me ujë të distiluar dhe në të gjitha rastet përmbajtja derdhet në enën ku po përgatitet terreni ushqyes, në mënyrë që e gjithë sasia e tretësirës të kalojë në të;
- Nëse për marrjen e vëllimeve të vogla përdoren pipeta automatike, maja e përdorur për marrjen e një tretësire stok, nuk duhet ripërdorur;
- Asnjëherë nuk duhen kthyer tretësirat stok të mbetura në enën origjinale të tyre, pasi kjo rrit rrezikun për ndotje kimike të tyre;
- Nëse në terrenet ushqyese do të nevojitet shtimi i vitaminave apo aminoacideve të tjera që nuk janë pjesë e terrenit ushqyes bazë, apo shtesa të tjera të papërcaktuara ato peshohen / përgatiten në kohën e përgatitjes së terrenit dhe shtohen në të;
- Shtohet zakonisht 3% sakarozë në terrenin ushqyes. Mund të testohen përqendrime të ndryshme të sakarozës. por gjithashtu mund të shtohen dhe forma të tjera të burimit të karbonit;
- Matet pH dhe saktësohet në vlerën e dëshiruar zakonisht (5.5 – 6.0) me HCl 1N ose KOH 1N. Vlera e pH mund të matet në mënyrë manuale duke përdorur letra pH ose në mënyrë elektronike nëpërmjet një pH-metri, në të dyja rastet në kushtet kur terreni ushqyes është duke u përzier në një përzierës magnetik;
- Gjithmonë vlera e pH duhet të saktësohet përpara se të shtohet agari apo agjenti xhelifikues;
- Shtohet zakonisht agar në përqendrimin 0.57 – 0.8%, në varësi kjo të llojit të eksplantit apo enës së kulturës;
- Shtohet ujë i distiluar deri në vëllimin 1000 ml;

4.4.2. Përgatitja e terreneve ushqyese nga paketat e gatshme

Nga kompani të mëdha tregtohen terrene ushqyese të gatshme në formë pluhuri të cilat kanë në përmbajtje kryesisht përbërjen e terrenit ushqyes bazë sipas Pasqyrës 4.3. Ndonjëherë, mund të ketë edhe shtesa të tjera, të cilat specifikohen qartë në etiketimin e produktit. Këto paketa kanë të përcaktuar edhe se për sa litra terren ushqyes vlen përmbajtja brenda tyre.

Produkte të tilla kanë avantazhin sepse shkurtojnë kohën e përgatitjes së terrenit ushqyes, pasi përgjithësisht nevojitet vetëm shtimi i fitohormoneve / RRB-ve, sheqerit dhe agarit, si dhe saktësimi i pH, duke shmangur kështu të gjithë procedurën paraprake të përgatitjes dhe shtimit të tretësirave stok.

Një disavantazh i këtyre paketave është se në përgjithësi, ato e kanë shumë të ngushtë periudhën e skadencës. Për këtë arsye, nëse blihen, ato duhet të përdoren shpejt në laborator. Veç kësaj, ato kërkojnë dhe kushte ruajtje në temperaturë 4°C dhe në mjedise pa lagështi, kushte të cilat nëse nuk respektohen, sjellin problematika në rritjen e kulturave indore të bimëve. Më poshtë paraqitet protokoli përkatës (Protokolli 4.6) për përgatitjen e terreneve ushqyese nisur nga paketat e gatshme.

Protokolli 4.6: Përgatitja e terreneve ushqyese nga paketat e gatshme / pluhur)

- Fillimisht duhet bërë kujdes i veçantë në inspektimin e gjendjes së terrenit pluhur për aromë specifike, ngjitje të grimcave të pluhurit, lëngëzim të tij, ndryshim ngjyre apo çdo problematikë tjetër, para se të vijohet me pjesën tjetër të procedurës;
- Për përgatitjen e 1 litri terren ushqyes përdoret një enë kimike me vëllim 2 litra dhe mbushet me 800 ml ujë të distiluar;
- Më pas merret një paketë me terren ushqyes të gatshëm / pluhur të një prej formulimeve të Pasqyrës 4.3, paketë e cila përmban të gjithë përbërësit e terrenit ushqyes bazë (makro- dhe mikroelementë, kelat hekuri dhe vitamina e aminoacide) dhe shtohet në enën kimike me ujë. Ky proces realizohet në përzierësin magnetik me përzierje dhe ngrohje të vazhdueshme;
- Shtohen në enën e terrenit ushqyes sasi të duhura të fitohormoneve / RRB- ve nga tretësirat stok të parapërgatitura dhe sasia e duhur e sakarozës apo burimit të karbonit të përzgjedhur;
- Procedura më tej vijon si në protokollin 4.5;

Bibliografia

Anderson, W.C. 1975. Propagation of rhododendron: Part 1. Development of culture medium for multiplication of shoots. *Proc. Int. Plant Prop. Soc.* 25:129–134.

Chee, R., Pool, R.M. 1987. Improved inorganic media constituents for *in vitro* shoot multiplication of *Vitis*. *Scientia Horticulturae*, 32: 85–95

- Chu, C.C., Wang, C.C., Sun, C.S., Hsu, C., Yin, K.C., Chu, C.Y., Bi, E.Y. (1975).** Establishment of an efficient medium for anther culture of rice, through comparative experiments on the nitrogen sources. *Scientia Sinica*, 18: 659–668;
- Cutler, S., Bonetta, D. 2009.** Plant Hormones. Methods and Protocols. Second edition. Humana Press. ISSN 1064-3745; **Davey, M.R., Anthony, P. 2010.** Plant cell Culture: Essential methods. Published by Wiley – Blackwell, UK;
- Dodds, J.H., Roberts, L.W. 1995.** Micropropagation by bud proliferation. Experiments in Plant Tissue Culture, 126-135;
- Driver, J.A., Kuniyuki, A.H. 1984.** *In vitro* propagation of Paradox walnut *Juglans hindsii* × *Juglans regia* rootstock. *HortScience*, 19: 507-509;
- Gamborg, O.L., Miller, R.A., Ojima, K. (1968).** Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. *Exp Cell Res.*, 50: 151–158;
- Gautheret, R.J. 1937.** Nouvelles recherches sur la culture de tissu cambial, *C.R. Acad. Sc.* 20, 5, 572;
- Gresshoff, P.M., Doy, C.H. 1974.** Derivation of a haploid cell line from *Vitis vinifera* and the importance of the stage of meiotic development of anthers for haploid culture of this and other genera. *Z Pflanzenphysiol*, 73: 132–141;
- Gupta, P.K., Durzan, D.J. 1985.** Shoot multiplication from mature trees of Douglas-fir (*Pseudotsuga menziesii*) and sugar pine (*Pinus lambertiana*). *Plant Cell Reports*, 4: 177–179.
- Heller, R. 1953.** Recherches sur la nutrition minerale des tissus vgtaux cultivés *in vitro*. *Ann. Sci. Nat. Bot. Biol. Veg.* 14:1-223;
- Hickok, L.G., Warne, T.R., Fribourg R.S. 1995.** The biology of the fern *Ceratopteris* and its use as a model system. *International Journal of Plant Science*, 156: 332–345;
- Hoagland, D.R., Arnon, D.I. 1938.** The water culture method for growing plants without soil. California Agricultural Experiment Station Circulation, 347, 32;
- Jungnickel, F. 1988.** Strawberries (*Fragaria* spp. and hybrids). In: Bajaj Y. P. S. (Ed.) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, v. 6, Springer-Verlag Berlin Heidelberg. pp. 38-103.
- Kao, K.N., Michayluk, M.R. 1975.** Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at very low population density in liquid media. *Planta* (Berl.) 126:105–110.
- Lichter, R. 1982.** *Z. Planzephysiol.*, 105, 427-434;
- Linsmaier, E.M., Skoog, F. 1965.** *Organic Growth Factor Requirements of Tobacco Tissue Cultures.* *Physiologia Plantarum*, 18, 100-127;
- Lloyd, G., McCown, B. 1980.** Commercially feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*). *International Plant Propagation Society, Comb. Proc.* 30: 421–427;
- Monnier, M. 1995.** Culture of Zygotic Embryos. In: Thorpe, T.A. (eds) *In vitro* Embryogenesis in Plants. Current Plant Science and Biotechnology in Agriculture, vol 20. Springer, Dordrecht;
- Murashige, T., Skoog, F. 1962.** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiology Plantarum*, 15: 473 – 497;
- Nitsch, J.P., Nitsch, C. 1969.** Haploid plants from pollen grains. *Science*, 163(3862):85-87. DOI: 10.1126/science.163.3862.85. PMID: 17780179.
- Pierik, R.L.M. 1988.** Vegetative propagation. *In vitro* Culture of Higher Plants, Martinus Nijhoff Publishers, 183-230;
- Quoirin, M., Lepoivre, P. 1977.** Etudes de milieux adaptés aux cultures *in vitro* de *Prunus*, *Acta Horticultura*, 78: 437 – 442;
- Rugini, E., 1984.** *In vitro* propagation of some olive cultivars with different root ability, and

medium development using analytical data from shoot and embryos. *Sci. Hort.*, 24, 123-134;

Schenk, R.V. Hildebrandt, A.C. 1972. Medium and Techniques for Induction and Growth of Monocotyledonous and Dicotyledonous Plant Cell Cultures. *Canadian Journal of Botany*, 50: 199-204;

Smith, R.H. 2006. Plant Tissue Culture Techniques and Experiments. 2nd edition. San Diego, CA 92101-4495, USA. 185 pg.;

Sota, V., Shuka, D., Bekheet, Sh., Kongjika E. 2023. Establishment of an in vitro method for micropropagation of ironwort (*Sideritis raeseri* Boiss. & Heldr.) *Acta agriculturae Slovenica*, 119/2, 1–10, Ljubljana 2023

White, P.R. 1963. The Cultivation of Animal and Plant Cells. 2nd ed. Ronald Press, New York.

KAPITULLI 5

Eksplantet: përzgjedhja, sterilizimi dhe manipulimi i tyre në kushte aseptike

5.1. Kriteret e përzgjedhjes së eksplanteve fillestare

Eksplant quhet çdo pjesë e materialit bimor (organe, inde, qeliza, protoplaste) e vendosur në kulturën *in vitro* për të arritur një qëllim të caktuar në drejtim të përfuturit të një produkti bioteknologjik bimor me cilësitë e dëshiruara.

Eksplantet mund të zhvillojnë në mënyrë të menjëhershme organe në kulturë nëpërmjet organogjenezës direkte, ose ata mund të formojnë fillimisht një kallus, masë qelizash që kanë rifituar totipotencën, e më tej të formojnë organe prej tij (organe adventive), proces i quajtur organogjenezë indirekte.

Gjithsesi, *gjithmonë eksplanti i përzgjedhur duhet të përmbushë qëllimin e platformës eksperimentale me koston më minimale të mundshme*. Kjo është e rëndësishme sepse teorikisht, çdo qelizë bimore mund të japë bimën e plotë nëse vendoset në kushte të posaçme fiziko-kimike, por nëse qëllimi është vetëm mikroshumimi, nuk ka përse të zgjidhet ‘qeliza’ si eksplant fillestar kur këtë kërkesë e përmbushim me efektivitet maksimal ‘sythet’. Këto të fundit zhvillohen më lehtë dhe kanë më pak kërkesa për kushtet e kulturës.

Tipet e kulturave klasifikohen bazuar në llojin e eksplantit të përzgjedhur (Fig. 5.1). Potencialisht, çdo eksplant mund të përdoret në teknikat *in vitro* dhe të mund të kalojë në morfogjenezë.

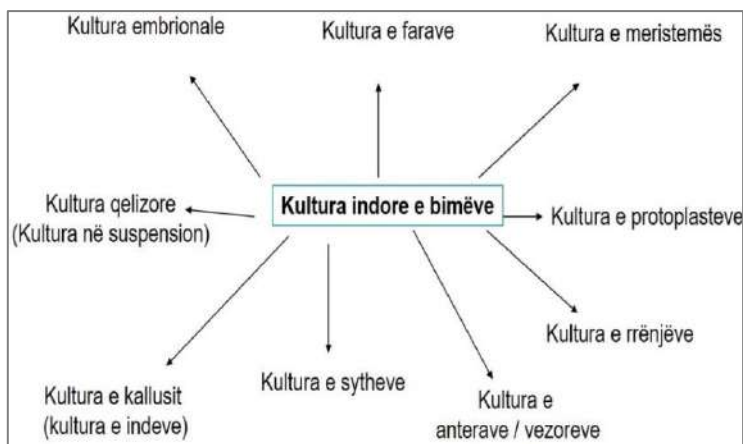


Figura 5.1. Tipet kryesore të kulturave bazuar në llojin e eksplantit

Faktorët themelorë që ndikojnë në suksesin e platformës eksperimentale dhe që duhet të kihet parasysh për përzgjedhjen e eksplanteve, renditen si vijon:

- **Qëllimi i kulturës:**

Zgjedhja e llojit të eksplantit varet nga lloji i përgjigjes që dëshirohet të merret nga kultura qelizore dhe indore. Kështu p.sh. nëse qëllimi është shumimi klonal, atëherë eksplanti zakonisht do të jetë një syth anësor ose i majës; për induktimin e kallusit, zakonisht përdoren pjesëza indore (pjesë nga kotiledoni, hipokotili, kërcelli, gjethja ose embrioni); për të prodhuar bimë haploide, kultivohet antera / pjalmi ose vezorja / veza; për bimë të shëndetësuar përdoren meristemat; etj.

- **Mosha e eksplantit / juveniliteti:**

Ky është një kriter shumë i rëndësishëm, pasi indi fiziologjikisht më i ri shfaq përgjithësisht potencial më të lartë rigjenerues në kushte *in vitro*. Përveç kësaj, indet më të reja janë më të lehta për t'u sterilizuar në sipërfaqe duke stabilizuar kështu më lehtë kulturat aseptike.

- **Sezoni i izolimit të eksplanteve:**

Stina e vitit mund të ketë efekte madhore në reagimin e eksplanteve në kulturë. Sythet e izoluar gjatë pranverës kanë potencial rigjenerues shumë më të lartë sesa sythet e fjetura. Për më tepër, shkalla e ndotjes rritet gjithashtu me përparimin e verës dhe stabilizimi i kulturave aseptike në kulturë, bëhet shumë i vështirë. Pavarësisht kësaj, sezoni i izolimit të eksplanteve bëhet edhe në varësi të llojit të eksplantit.

- **Madhësia e eksplantit:**

Madhësia e eksplantit ndikon në reagimin e tyre në kulturë. Në përgjithësi, sa më i vogël të jetë eksplanti, aq më i vështirë është kultivimi dhe terreni ushqyes zakonisht duhet të ketë përbërës shtesë të shumtë. Eksplantet më të mëdhenj janë më të organizuar si dhe përmbajnë më shumë rezerva ushqyese dhe fitohormone, faktorë që mbështesin rritjen më të mirë të tyre në kulturë. Gjithsesi, përmasa e eksplantit varet shumë nga qëllimi i kulturës.

- **Cilësia e bimëve:**

Këshillohet që të merren eksplante nga bimë që janë të mirëushqyera në krahasim me bimët që shfaqin mungesa ushqimore ose bimë që shfaqin simptoma të sëmundjeve të ndryshme. Kështu p.sh. në shumë raste, më të preferuara janë bimët e serrës sesa ato të fushës, pasi të parat rriten në kushte më të kontrolluara fiziko-kimike.

- **Gjenotipi:**

Midis çdo specie bimore, ka dallime të mëdha në përgjigjen e tyre në kulturën qelizore dhe indore. Disa gjenotipe reagojnë më me vështirësi në kulturë, ndërsa të tjerë reagojnë lehtësisht. Testimi i gjenotipeve të shumta është përgjithësisht një parametër kryesor eksperimental për të identifikuar ato që do të përgjigjen më me efektivitet në trajtimet e përzgjedhura për një qëllim të caktuar.

5.2. Kontrolli i nxirjes / Metodatat për shmangien e stresit oksidativ

Proceset e lidhura me sintezën e lëndëve oksigjen-reaktive, shkaktojnë **stres oksidativ** për eksplantet në kulturë. Ky proces quhet ndryshe dhe **oksidim fenolik**. Çlirimi i të tilla lëndëve, për shkak të kushteve artificiale të rritjes, shkakton nxirjen (nekrozën) e eksplanteve në kulturë dhe të terrenit ushqyes. Kjo nxirje shkaktohet nga oksidimi i polifenoleve, si dhe nga formimi i kinoneve të cilat janë lëndë mjaft reaktive dhe toksike për indet bimore.

Me shpëputjen mekanike të eksplanteve nga indet mëma, fillon dhe procesi i oksidimit, i cili shton vështirësinë e stabilizimit të kulturave *in vitro* të bimëve. Edhe trajtimi me agjentë sterilizues për të ngritur kulturat aseptike, prania e shumë metabolitëve në terrenin ushqyes, si dhe aplikimi i kushteve fizike jo të përshtatshme janë faktorë të cilët rrisin stresin oksidativ në kulturë.

Për të kontrolluar nxirjen e eksplanteve në kulturë indore si pasojë e oksidimit polifenolik (Fig. 5.2), janë bërë përpjekje të shumta, duke aplikuar teknika të ndryshme që lehtësojnë këtë problematikë.

Veçanërisht gjenotipi, por dhe shumë arsye të tjera që lidhen me të, si p.sh. mosha, lloji i eksplantit apo sezoni i izolimit të tij, janë faktorë vendimtarë që lidhen me këtë fenomen, dhe rrjedhimisht, është mjaft e vështirë të standardizohet një protokoll universal për këtë çështje.

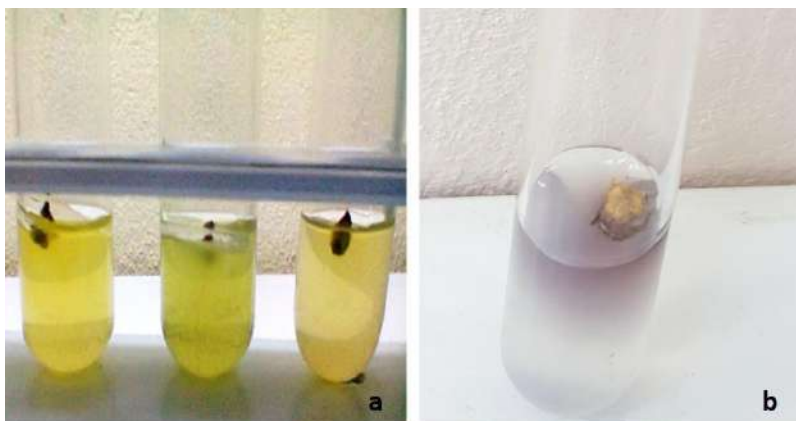


Figura 5.2. Eksplante të cilët paraqesin shenja të stresit oksidativ a) sythe të mollës b) embrione zigotikë të arrës (Laboratori i kulturave qelizore dhe indore, Departamenti i Bioteknologjisë, FSHN, UT)

Disa nga metodatat më të zakonshme që përdoren për këtë qëllim janë:

- Shpëlarja e eksplanteve para inokulimit në terren ushqyes në ujë të rrjedhshëm për 30 – 60 min.
- Përdorimi i tretësirave të kombinuara të antioksidantëve dhe / ose lëndëve përthithëse. Këto zakonisht përdoren në përqendrimin 0.1 – 0.5% si tretësira

shpëlarëse para sterilizimit të eksplanteve. Antioksidantët që përdoren më shumë janë acidi citrik dhe acidi askorbik. Në këtë rast, eksplantet trajtohen me tretësirë me përmbajtje antioksidantësh, për një kohëzgjatje të caktuar. Antioksidantët mund të përdoren veçmas ose tretësira mund të jetë e kombinuar me përqendrime të ndryshme të tyre. Zakonisht, përdoren përqendrime të antioksidantëve 0.1 – 0.5 % në mënyrë që të parandalohet çlirimi i polifenoleve në terrenin ushqyes dhe kohëzgjatja e trajtimit varion nga disa minuta deri në disa orë. Aplikim tjetër efektiv është dhe përdorimi i lëndëve përthithëse. Në këtë kategori, përdorim të gjerë gjen PVP (polivinilpirrolidoni) në masën 1%. Edhe paratrajtimi me nitrat argjendi është raportuar mjaft efektiv në kontrollin e nxirjes së indeve.

- Përfshirja e antioksidantëve dhe / ose lëndëve përthithëse në terrenin ushqyes: Në shumë raste, antioksidantët si acidi citrik dhe acidi askorbik përfshihen në terrenin ushqyes, veçmas ose të kombinuar në masën (0.1 – 0.5%). Sipas raportimeve, vetëm shtimi i antioksidantëve në terrenin ushqyes nuk parandalon nxirjen e eksplanteve, por kjo duhet të paraprihet nga paratrajtimi me një tretësirë antioksidante në një përqendrim dhe kohëzgjatje të caktuar. Edhe PVP (polivinilpirrolidoni) në masën 0.05% mund të shtohet në terrenin ushqyes të kulturës si përthithës mjaft efektiv i polifenoleve të çliruara. Përdorimi i pantoteinatit të kalciumit si shtesë në terrenin ushqyes redukton nxirjen e indeve në kulturë. Për këtë qëllim përdoren përqendrime deri në 200 mg/l të pantoteinatit të kalciumit, dhe përsëri, domosdoshmëri është paratrajtimi me tretësirë të kombinuar antioksidantësh. Në shumë raste edhe nitrati i argjendit përfshihet në përbërjen e terrenit ushqyes për të shmangur stresin oksidativ. Aftësia e karbonit aktiv (1%) për të përthithur substanca me efekt inhibitor është e dokumentuar më së miri. Karboni aktiv ka pore të imëta, sipërfaqe të madhe veprimi dhe në këtë mënyrë është mjaft efektiv në përthithjen në mënyrë të pakthyeshme të komponimeve fenolike. Ai përdoret shpesh në kulturë indore për të përmirësuar rritjen dhe zhvillimin e eksplanteve në stade të ndryshme.

- Efekti i subkulturave të vazhdueshme: Në rastin e çlirimit të polifenoleve në terrenin ushqyes, aplikohen dhe subkulturat e njëpasnjëshme me qëllim mosekspozimin e eksplanteve në sasi të larta polifenolesh. Koha e transferimit të eksplanteve në terren të freskët mund të jetë e domosdoshme që pas disa minutash nga koha e inokulimit në terrenin ushqyes ose dhe më vonë. Diçka e tillë lidhet me paratrajtimin ose jo me tretësirë antioksidantësh. Në rastin e paratrajtimit, transferimi në terren ushqyes të freskët është i nevojshëm pas disa ditësh nga koha e inokulimit, mesatarisht çdo 3 – 4 ditë. Mostraajtimi me tretësirë antioksidantësh e bën domosdoshmëri të menjëhershme këtë proces. Zakonisht, pas 5 – 6 pasazhesh, kultura stabilizohet dhe eksplantet nuk paraqesin nekroza.

- Përzierja e lehtë e eksplanteve gjatë paratrajtimit me tretësirën me antioksidantë apo lëndë përthithëse në përzierës magnetik;

5.3. Trajtimet për nxjerrjen e farave apo sytheve nga gjendja e fjetjes / qetësisë

Eksplante të tilla si sythe të fjetura apo fara, zhvillohen / mbijnë me vështirësi në kulturë *in vitro*, nëse ata nuk paratrajtohen me protokolle të posaçme për të prishur fjetjen / qetësinë e tyre. Edhe në këtë rast, është e vështirë të standardizohet një protokoll universal, pasi gjenotipi dhe lloji i eksplantit janë faktorë vendimtarë që paraqesin mjaft dallime brenda kategorisë. **Paratrajtimet më të zakonshme** për këtë qëllim përfshijnë metodat e mëposhtme:

- Gjerësisht për këtë qëllim përdoren giberelinat. Kohëzgjatja e paratrajtit mund të variojë nga disa orë deri në 1 ditë, kjo e lidhur dhe me përqendrimin e aplikuar (p.sh. 250 ppm, 500 ppm, 1000 ppm, etj.). Giberelinat janë të paqëndrueshme në autoklavim. Për këtë arsye, ky paratrajtim realizohet para sterilizimit të eksplanteve. Nëse tretësira e giberelinave sterilizohet nëpërmjet mikrofiltrimit, paratrajtimi mund të realizohet edhe pas sterilizimit të materialeve bimore;
- Aplikimi i tretësirës së nitratis të kaliumit (KNO_3) në përqendrime që variojnë midis 0.2 – 0.5%, dhe me një kohëzgjatje të caktuar në varësi të përqendrimit dhe llojit të eksplantit, është raportuar gjerësisht si metodë efektive për nxjerrjen nga gjendja e fjetjes së sytheve dhe farave;
- Përdorimi i përzierjeve të GA_3 dhe KNO_3 në raporte / përqendrime të caktuara dhe me një kohëzgjatje specifike paratrajtimi, gjithashtu rezulton metodë efektive për këtë qëllim;

5.4. Dezinfektimi dhe sterilizimi i eksplanteve bimore

Proces mjaft i rëndësishëm është dezinfektimi dhe sterilizimi i eksplanteve para kultivimit në mënyrë që të eliminohen të gjithë ndotësit (baktere, spore kërpudhore etj.) që gjenden në sipërfaqe të eksplanteve. Protokoll i sterilizimit të eksplanteve duhet të përmbushë dy kritere themelore:

I. Të eliminohen plotësisht të gjithë mikroorganizmat në sipërfaqe të eksplanteve bimore;

II. Të sigurojë efekte anësore minimale në indet bimore;

Protokoll i sterilizimit duhet të garantojë eliminimin e ndotësve biologjikë në kulturë dhe ruajtjen e potencialit rigjenerues të qelizave dhe indeve.

Duhet të kihet parasysh që tretësirat sterilizuese janë mjaft toksike edhe për personelin që kryen procedurën, prandaj duhet bërë kujdes gjatë këtyre manipulimeve.

Më poshtë paraqitet një protokoll i përgjithshëm (Protokoll i 5.1) mbi sterilizimin e eksplanteve duke u përqendruar tek procedurat dhe rregullat bazë. Për eksplante specifike, mund të shtohen hallka shtesë të domosdoshme në procedurë.

Protokolli 5.1: Dezinfektimi dhe sterilizimi i eksplanteve

- Vendosen eksplantet në ujë të rrjedhshëm çezme për 20 - 30 min., në mënyrë që të shpëlahen nga papastërtitë dhe të hidratohen indet bimore. Pjesë të vogla të bimëve, si p.sh. sythe apo fara të imëta, vendosen në qese garze për të lehtësuar manipulimin gjatë dezinfektimit;
- Eksplantet dezinfektohen dhe sterilizohen vetëm brenda fluksit laminar. Ato vendosen në një gotë kimike të autoklavuar dhe vijohet me procedurat pasuese;
- Fillimisht dezinfektohen në etanol 70° (v/v) (2 min) dhe shpëlahen 3 deri 4 herë me ujë të distiluar dhe të sterilizuar;
- Më pas trajtohen me tretësirë 5% hipoklorit natriumi ose kalciumi, që përmban 20 pika / litër Tween 20 për 15-30 min. Mund të përdoret edhe tretësirë ujore e biklorurit të mërkurit (HgCl_2) 0.1% për 1 – 3 min për gjethe dhe kërcëj të specieve barishtore, 8 – 10 min për copa me nyje apo të majës së specieve drunore, etj. Për fara me tegument të fortë përdoret tretësirë H_2SO_4 96% për 4 – 5 min.;
- Në shumë raste, veçanërisht për specie frutore, realizohet edhe trajtimi me antifungicidë të ndryshëm. Një i tillë është Bavistina që përdoret në përqendrimin 0.2 – 0.4% për një kohë trajtimi 5 – 10 min.;
- Sidoqoftë, lloji i reagentit, kohëzgjatja e trajtimit dhe përqendrimi i tretësirës sterilizuese janë faktorë që mund të modifikohen dhe duhet të optimizohen në mënyrë specifike rast pas rasti;
- Rekomandohet që gjatë kohës së sterilizimit, eksplantet në tretësirën sterilizuese të përziehen me përzierës magnetik, pasi kjo procedurë rrit sipërfaqen e kontaktit të eksplanteve bimore me tretësirën sterilizuese;
- Pas trajtimit me tretësirën sterilizuese, eksplantet shpëlahen 3 - 4 herë me ujë të distiluar dhe të sterilizuar, në mënyrë që të largohet çdo mbetje e tretësirës nga indet bimore. Nëse kjo fazë nuk realizohet, tretësira sterilizuese do të vazhdojë të ushtrojë efektin e vet toksik në eksplante dhe kjo mund të shkaktojë nekroza të thella;
- Pas sterilizimit sipërfaqësor, materiali bimor mbahet në ujë të distiluar dhe të sterilizuar në pjata Petri në fluks laminar për të parandaluar tharjen e tij;
- Më tej vijohet me procedurat për inokulimin e eksplanteve në terrenet ushqyese të parapërgatitura dhe të sterilizuara (*shih: Protokolli 4.7*);

5.5. Manipulimi i eksplanteve në mjedis aseptik

Siç është thënë më herët, rritja dhe zhvillimi i eksplanteve në kushte *in vitro* duhet domosdoshmërisht të bëhet në kushte aseptike. Të gjitha hallkat e një platforme eksperimentale që përfshijnë teknikat *in vitro*, kërkojnë realizimin e proceseve të punës në mjedise sterile. Për këtë qëllim, përdoret fluksi laminar me rrezatim UV, por puna në të duhet të jetë e kujdesshme dhe deyrimisht duhet të respektohen disa rregulla bazë. Në vijim paraqitet protokoli (Protokolli 5.2) mbi rregullat e punës në fluksin laminar.

Protokolli 5.2: Përgatitja e fluksit laminar dhe praktika e punës në të

- Kryhet ajrosja dhe pastrimi i fluksit laminar me etanol 70% dhe mbahet për 20 – 30 min. e ndezur llamba me rrezatim ultravjollcë;
- Pas sterilizimit të fluksit, vijohet me procedurat e transferimit apo të manipulimit të materialit bimor, gjithmonë nën rrymat e ajrit steril që kalon nëpërmjet filtrave sterilizues HEPA;
- Në fluksin laminar punohet pranë flakës së llambës me alkool ose me gaz (Fig. 5.3). Enët e kulturës, terrenet ushqyese, instrumentet, letrat e filtrit, etj. duhet të jenë të sterilizuara;
- Duhet pasur kujdes që nëse mjetet nxirren jashtë mjedisit steril, nuk mund të futen më brenda pa u sterilizuar;
- Duhet të vishen rroba të pastra të punës dhe të mbahet maskë sterile;
- Mbahen flokët e gjata larg nga kulturat indore dhe nga sipërfaqja e punës së fluksit laminar. Diçka e tillë është e nevojshme jo vetëm sepse flokët mbajnë mikroorganizma të shumtë që mund të ndotin indet bimore apo terrenet ushqyese, por edhe sepse në brendësi të fluksit qëndron e ndezur llamba e alkoolit që mund të shkaktojë flakë dhe djegie;
- Mbahen duart gjithmonë brenda rrymës së ajrit steril. Terrenet ushqyese duhet të përdoren me kujdes dhe hapja e tyre duhet të realizohet në brendësi të fluksit;
- Mbahen dhe përdoren instrumentet sterile: pinceta, bisturi etj. gjithmonë në brendësi të ajrit steril. Këto mjete duhet të sterilizohen në mënyrë të vazhdueshme në sterilizatorin me rruaza qelqi, ose të digjen në flakën e llambës me alkool dhe të zhyten vazhdimisht në etanol 70%;



Figura 5.3. Puna në fluksin laminar për të ruajtur asepsinë (*Laboratori i kulturave qelizore dhe indore, Departamenti i Bioteknologjisë, FSHN, UT*)

Bibliografia

- Abdelwahd, R., Hakam, N., Labhilili, M., & Udupa, S.M. 2008.** Use of an adsorbent and antioxidants to reduce the effects of leached phenolics in *in vitro* plantlet regeneration of faba bean. *African Journal of Biotechnology* 7(8): 997—1002;
- Aké, A. P., Maust, B., Orozco-Segovia, A., Oropeza, C. 2007.** The effect of gibberellic acid on the *in vitro* germination of coconut zygotic embryos and their conversion into plantlets. *In vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 43, 247-253;
- Amente, G., Chimdessa, E. 2021.** Control of browning in plant tissue culture: A review. *J. Sci. Agric.*, 5, 67–71.
- Arabaci, O., Öğretmen, N. G., Tan, U., Yaşa, F. 2014.** Effect of some seed treatments on germination of *Sideritis perfoliata* L. *Trakya University Journal of Natural Sciences*, 15(2), 83-87.
- Berger, F., Waites, W.M., Leifert, C. 1994.** An improved surface disinfection method for shoot explants from *Iris* rhizomes infected with bacterial soft rot (*Erwinia carotovora* sp. *Carotovora*). *Journal of Horticultural Sciences*, 69: 491-494;
- Cassell, A.C., Doyle, B.M. 2005.** Pathogen and biological contamination management. pp. 35 – 50. Plant cell and tissue culture. Humana Press, New York;
- Chikezie, U.N.Y. 2012.** Effect of ascorbic acid on blackening and sprouting of *Musa* spp shoot tips. *Journal of Biotechnology and Bioinformatics*, Vol. 2(2): 11 – 17;
- Dodds, J.H., Roberts, L.W. 1995.** Experiments in Plant Tissue Culture. Cambridge Univ. Press, 69-113;
- Gashi, B., Abdullai, K., Mata, V., Kongjika, E. 2012.** Effect of gibberellic acid and potassium nitrate on seed germination of the resurrection plants *Ramonda serbica* and *Ramonda nathaliae*. *African Journal of Biotechnology*, 11(20), 4537-4542.
- Laukkanen, H. Haggman, H., Kontunen-Scoppia, S., Hohtola. A. 1999.** Tissue browning of *in vitro* culture of Scot pine: Role of peroxidase and polyphenol oxidase. *Physiological Plantarum* 106: 337—343;
- Ndکیدemi, C.F., Mneney, E., Ndکیدemi, P.A. 2014.** Effects of ascorbic acid in controlling lethal browning *in vitro* culture of *Brahylaena* using nodal segments. *Am. J. Plant Sci.* 2014, 05, 187–191;
- Noctor, G., Foyer, C.H. 1998.** Ascorbate and glutathione: keeping active oxygen under control,” *Annual Review of Plant Biology*, vol. 49, pp. 249–279, 1998.
- Smith, R.H. 2006.** Plant Tissue Culture Techniques and Experiments. 2nd edition. San Diego, CA 92101-4495, USA. 185 pg.
- Thomas, T.D. 2008.** The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances* 26(6): 618—631;
- Thorpe, T.A., Harry, I.S. 1997.** Application of plant tissue culture to horticulture. In: Altman A, Ziv M (eds) *Proceedings of the Third International ISHS Symposium on In vitro Culture and Horticulture Breeding*, Ministry of Flemish Community, Israel. pp 39-49
- Wang, Q.C., Tang, H.R., Quan, Q. and Zhou, G.R. 1994.** Phenol induced browning and establishment of shoot tip explants of Fuji apple and Junhua pear cultured *in vitro*. *J. Hortic. Sci.* 69, pp. 833–839;

KAPITULLI 6

Mikroshumimi / Rigjenerimi *in vitro* në terrene të xhelifikuara

6.1. Domosdoshmëria e mikroshumimit dhe aplikimet e tij

6.1.1. Rëndësia dhe avantazhet e mikroshumimit

Bimët shumohen në dy mënyra, me anë të shumimit vegetativ, aseksual ose të klonimit dhe me anë të shumimit gjenerativ, seksual ose me farë. Të dy tipet e shumimit mund të jenë të pamundura në disa kushte të caktuara. Shumimi seksual jep rezultate të pakënaqshme p.sh. kur nuk formohen fara ose formohen shumë pak fara, kur ato janë sterile, kur humbasin shpejt aftësinë mbirëse, në rastin e bimëve dioike etj. Në këto raste shumimi vegetativ është shumë efektiv. Shumimi vegetativ *in vivo* me copa, shartim, rizome, bulbe, zardhokë, stolone etj. luan rol të madh në bujqësi, por këto metoda janë të ngadalshme, të vështira, me kosto të lartë dhe shpesh të pamundura. Pas viteve 80 me zbulimin e faktit se bimët mund të shumohen më shpejt *in vitro* sesa *in vivo*, mikroshumimi është futur në rutinën tregtare.

Mikroshumimi përdoret gjerësisht, madje ka marrë dhe përmasa komerciale prej shumë vitesh në mjaft vende të botës, për shkak të avantazheve të shumta që paraqet. Ky proces siguron sasi gjermoplazme shumë më të madhe sesa shumimi *in vivo* pasi eliminohet efekti i sezoneve dhe prodhohen bimë gjatë gjithë vitit si pasojë e kushteve të optimizuara. Veç kësaj, mikroshumimi rezulton dhe me kosto të ulët, gjë që arrihet nga kursimi në sipërfaqe pasi kultura *in vitro* kryhet në laboratore.

Mikroshumimi sot ka dalë në plan të parë në krahasim me shumimin *in vivo* për arsye të avantazheve të mëposhtme:

- Prodhohen bimë identike me bimët mëma në një numër jashtëzakonisht të madh;
- Shumimi *in vitro* është shumë më i shpejtë se ai *in vivo*;
- Mund të shumohen disa specie që nuk shumohen *in vivo*;
- Rritja e bimëve *in vitro* është më e fuqishme për shkak të juvenilitetit dhe mungesës së patogjenëve;
- Lehtësohet transporti i bimëzave “pa tokë” ndërmjet shteteve të ndryshme duke evituar karantinën;
- Mikroshumimi rezulton me kosto të ulët që arrihet nga kursimi në sipërfaqe të bimëve mëma dhe të vetë kulturës *in vitro* që kryhet në laboratore;
- Eliminohet efekti i sezoneve dhe prodhohen bimë gjatë të gjithë vitit si pasojë e kushteve të optimizuara (terrenet ushqyese dhe kushtet fizike);

- Një kultivar i ri komercializohet më shpejt *in vitro* sesa *in vivo*;
- Mund të shumohen dhe bimë sterile nga ana seksuale si haploidët, mutantët sterile, linjat mashkullore sterile për prodhim hibridesh, si dhe bimët me kombinime të veçanta të kromozomeve që mund të humbin gjatë shumimit me farë dhe kombinimeve të gjeneve specifike heterozigote;

Megjithatë në disa raste, klonimi *in vitro* paraqet edhe disavantazhe:

- Në disa sisteme shumimi *in vitro* ku ndërhyrja faza e kallusimit, stabiliteti gjenetik është i dobët;
- Bimët e prodhuara *in vitro* mund të shfaqin efekte negative *in vivo* si p.sh. kthim i plotë në fazën juvenile etj.
- Veçanërisht për speciet drurore, induktimi i rrënjëzimit është shumë i vështirë;
- Transferimi i disa bimëve në tokë në disa raste paraqitet me humbje të mëdha për shkak të mospërshtatjes efektive gjatë stadiit të aklimatizimit;
- Në disa raste izolimi steril është i vështirë të realizohet;

Përmasat mjaft të mëdha që ka marrë mikroshumimi në nivel botëror, dëshmojnë për përdorim mjaft efektiv të teknikave *in vitro* për prodhim në shkallë të gjerë, nga i cili rrjedhin edhe shumë përfitime ekonomike.

6.1.2. Organogjeneza dhe roli i saj në mikroshumim

Organogjeneza është aftësia e indeve bimore për të formuar organe *de novo*. Ky është një proces që ka rëndësi të madhe praktike, pasi siguron bazat për shumimin aseksual të bimëve nga inde somatike jo meristematike. Klonimi i gjenotipeve të dëshiruara mund të realizohet nëpërmjet organogjenezës *in vivo* ose asaj *in vitro*.

Në eksplante që përmbajnë qendra meristematike vërehet formimi i organeve (sythe apo rrënjë) drejtpërdrejtë nga zhvillimi i këtyre meristemave. Ky proces mbështetet nga faktorët e jashtëm fiziko-kimikë të cilët janë të optimizuar për kanalizimin drejt një procesi organogjenik të caktuar. Kështu, nëse duhet të formohen sythe anësorë, nevojitet përqendrim më i lartë i citokininave në terrenin ushqyes, ndërsa nëse do të nxitet formimi i rrënjëve, nevojitet përqendrim më i lartë i auksinave. Formimi i organeve nëpërmjet një rruge të tillë njihet si organogjeneza direkte.

Por, organet e reja mund të formohen nga inde bimore nëse në këta të fundit nuk ekzistojnë meristemat fillestare. Indet bimore të kultivuar *in vitro* mund të formojnë primordiume të cilat më pas mund të diferencohen në organe. Ky origjinim i ri i organeve (sythe dhe rrënjë) quhet rritje adventive, ose organogjeneza adventive dhe këto quhen organe adventive. Një ngjarje e tillë kërkon domosdoshmërisht dediferencimin e qelizave të eksplantit të përzgjedhur dhe ridiferencimin e tyre drejt formimit të organeve që kërkohen, ngjarje këto që nxiten nga shtesa të auksinave në terrenin ushqyes. Zakonisht, ky proces zhvillimor përfshin fazën e kallusogjenezës dhe quhet organogjeneza indirekte.

6.2. Stadet e mikroshumimit

Kulturën indore përfaqësojnë sistemet eksperimentale më madhore të përdorura në inxhinierinë gjenetike të bimëve, si dhe për studimin e fazave të rritjes dhe zhvillimit të organizuar nëpërmjet ekzaminimeve strukturore, fiziologjike, biokimike dhe molekulare të proceseve të zhvillimit bimor. Mikroshumimi është bërë pjesë e rëndësishme e shumimit tregtar të shumë bimëve me interes ekonomik. Progresi i shpejtë i teknikave të mikroshumimit i detyrohet përcaktimit konkret të 5 stadeve:

Stadi 0: Stad përgatitor ku përcaktohet skeleti i platformës eksperimentale dhe veçanërisht përzgjedhja e bimëve mëma;

Stadi I: Inokulimi / Stabilizimi i eksplanteve;

Stadi II: Shumimi i bimëzave me anë të subkulturave;

Stadi III: Rrënjëzimi (*in vitro* ose *ex vitro*);

Stadi IV: Aklimatizimi / ambientimi

6.2.1. Stadi 0 ose përgatitor

Ky stad përfshin punën për përgatitjen e bimëve mëma për marrjen e eksplantit në përputhje me qëllimin e platformës eksperimentale (*shih: Kapitulli 5*).

Disa eksplante reagojnë më mirë se të tjera në kulturë dhe kjo varet nga shumë faktorë. Sa më juvenil, i fuqishëm dhe i shëndetshëm të jetë një eksplant aq më e lartë është përgjigja e tij në kulturë *in vitro*. Eksplantet më të përshtatshme për kultivim *in vitro* janë ato që izolohehen nga bimë të cilat janë furnizuar me sasi të përshtatshme të ushqimit mineral dhe të ujit gjatë rritjes *in vivo*, si dhe nëse janë rritur në kushte optimale të ndriçimit dhe të temperaturës.

Përgjithësisht, është më vështirë të induktohet rritje në struktura të vogla si qeliza, grupe qelizash dhe meristemash sesa nga pjesë gjetheje, kërcelli, zhardhokësh, etj. Por, përmasa e eksplantit është në varësi të stadi të kulturës. Teorikisht, edhe një qelizë e vetme ka potencial të japë bimën e plotë, por praktikisht, ajo që gjithmonë mbahet në vëmendje kur përpilohet një platformë eksperimentale është '*përzgjedhja e eksplantit që jep produktin e dëshiruar me koston më minimale dhe në rrugën më të thjeshtë të mundshme*'.

Kështu p.sh. nëse qëllimi është mikroshumimi për shtim të shpejtë në kulturë, sigurisht që edhe vetëm qelizat apo protoplastet mund të japin bimët e plota, por këto qëllim e përmbush më së miri dhe shumë shpejt kultura e sytheve, të cilat janë eksplante më të organizuara dhe kanë kërkesa të thjeshta në kulturë. Ndërsa nëse qëllimi është p.sh. shëndetësimi, izolohehen meristemët sepse këto janë eksplantet e vetme nga të cilat mund të fitohen bimë të shëndetshme.

Përveç kësaj, në këtë stad përpilohen të gjitha detajet që kanë të bëjnë me stadet pasuese të platformës eksperimentale. Bëhet një parashikim i saktë i kohës së marrjes së mostrave bimore, vendodhjet dhe sasi të tyre, mënyra e kampionimit, paratrajtimet ndryshme, protokollet në çdo stad të mikroshumimit, etj.

6.2.2. Stadi I: Inokulimi / stabilizimi i eksplanteve

Objektivi i këtij stadi është vendosja e eksplantit të përzgjedhur në kulturë duke parandaluar ndotjen dhe duke siguruar një mjedis të përshtatshëm, që nxit prodhimin e sytheve të shumëfishtë. Në varësi të eksplantit, formimi i sytheve të reja mund të nisë:

- Nëpërmjet organogenezës direkte nga sythe apikalë ose anësorë, nga embrione zigotike, fara, etj.
- Nëpërmjet organogenezës indirekte nga kalluse që zhvillohen si rrjedhojë e dediferencimit të copëzave / pjesëzave indore.

Stadi I quhet ndryshe dhe *Stadi i stabilizimit*, pasi ky stad është vendimtar jo vetëm përsa i përket stabilizimit të kulturave aseptike, por gjithashtu dhe për shmangien / reduktimin e problematikave të lidhura me stresin oksidativ që eksplantet shfaqin në kulturë.

Më poshtë paraqitet protokoli i përgjithshëm (*Protokolli 6.1*) i inokulimit të eksplanteve në terrene ushqyese, dhe protokollat specifike (6.1.1 – 6.1.4) në varësi të llojit të eksplantit të përzgjedhur për mikroshumim.

Protokolli 6.1: Inokulimi i eksplanteve sterile në terrenin ushqyes

- I gjithë procesi realizohet brenda fluksit laminar, i cili është pastruar dhe sterilizuar paraprakisht (*shih: Protokolli 5.2*);
- Përpara punës, bisturitë dhe pincetat sterilizohen në sterilizator me rruaza qelqi, ose duke i kaluar në flakën e llambës me alkool për 25 - 30 sek.;
- Pranë fluksit laminar merren dhe terrenet ushqyese të parapërgatitura sipas formulimit të kërkuar në përputhje me qëllimin, të cilat janë edhe këto të sterilizuara (*shih: Protokolli 4.5, 4.6*);
- Paraprakisht është realizuar dhe procedura e sterilizimit të eksplanteve në përputhje me një protokoll specifik në varësi të eksplantit (*shih: Protokolli 5.1*);
- Priten / izolohen eksplantet e sterilizuara në madhësinë e dëshiruar, pa i dëmtuar ato, me anë të një bisturie sterile. Kjo procedurë kryhet në fluksin laminar në letra filtri sterile ose në një pjatë Petri sterile;
- Bëhet inokulimi i tyre në terrenin ushqyes duke zhytur bazën e sythit apo embrionit zigotik, ose duke mbështetur horizontalisht pjesëzën indore brenda minimumit të kohës në terrenin ushqyes në mënyrë që të parandalohet tharja;
- Gjatë inokulimit, ena e kulturës mbahet sa më horizontalisht me qëllim reduktimin e infeksioneve;
- Në rastet e izolimit të eksplanteve me madhësi të kufizuar, siç janë p.sh. meristemat, përdoret stereomikroskopi me zmadhim 40x;
- Duhet shmangur me çdo kusht prekja me dorë e eksplanteve, pasi në të kundërt kulturat bimore do të infektohen;

• **Kultura e sytheve**

Sythet anësorë dhe ata të majës përdoren gjerësisht si eksplante fillestare në mikroshumim, sepse ato kryesisht zhvillohen sipas organogjenezës direkte. Sidoqoftë, rrallë herë ndodh që në bazën e sythit të formohet edhe kallus, i cili menjëherë duhet të ndahet nga pjesa tjetër e eksplantit. Sythet zhvillohen nga ndarje të shumë qelizave, pra kanë origjinë shumëqelizore. Qendrat e ndarjeve qelizore në eksplante të ndryshme ndodhen në zona të ndryshme. Në disa raste mund të jenë thellë në brendësi të eksplantit ose më në sipërfaqe.

Organogjeneza e sythit mundëson origjinimin e meristemave nga qeliza somatike dhe jo nga qeliza embriogjenike siç ndodh ghatë embriogjenezës. Formimi i sytheve *in vitro* është një proces që kalon në disa faza si vijon: përgjigje e qelizave somatike në hormonin bimor, ndarja qelizore e qelizave që përgjigjen, fillimi dhe zhvillimi i sytheve të reja. Citokininat janë një ndër RRB më efikasë, në kombinim me auksinat, për induktimin e organogjenezës së sytheve. Meqenëse sythet janë struktura të organizuara dhe, qëllimi, kryesisht, është rigjenerim i shpejt i bimëzave, përdoret një raport hormonal në favor të citokininave me qëllim frenimin e dominancës apikale dhe zhvillimin e sytheve anësorë të shumëfishtë.

Protokolli 6.1.1: Kultura e sytheve të majës dhe anësore

- Përgjithësisht izolimi i eksplanteve të tilla bëhet në periudhën Mars – Prill kur sythet fillojnë të dalin nga gjendja e qetësisë. Merren sythe nga specie të përzgjedhura në studim p.sh. *Malus* sp., *Pyrus* sp., *Prunus* sp., *Punica* sp., *Origanum* sp., *Salvia* sp., etj.;
- Seleksionohen eksplantet nga bimë juvenile për shkak të potencialit të lartë rigjenerues që ato kanë dhe stabilizimit më të lehtë të kushteve të asepsisë;
- Nëse gjykohet si e domosdoshme, eksplantet mund të paratrajtohen me tretësirë antioksidantësh për të minimizuar problematikat e lidhura me stresin oksidativ. Ato mund të paratrajtohen edhe me GA_3 ose KNO_3 për të ndihmuar daljen nga gjendja e fjetjes (shih: Seksioni 5.2);
- Në fluksin laminar, në pjata Petri sterile priten sythet nga eksplantet e sterilizuara, secili me madhësi rreth 2 cm duke hequr gjethet e tepërta dhe inokulohen në enë kulture me terren ushqyes duke zhytur pjesën bazale të eksplantit disa mm në terrenin ushqyes;
- Terreni ushqyes bazë i përzgjedhur është i pasuruar me vitamina, komponentë organikë dhe fitohormone apo rregullatorë rritjeje në përqendrimet të tilla, specifike për çdo specie në studim;
- Optimizohet eksperimentalisht raporti auksinë : citokininë në favor të citokininave pasi sythet e majës dhe ato anësorë janë struktura të organizuara dhe zhvillohen nëpërmjet organogjenezës direkte. Ky raport favorizon zhvillimin e sytheve anësorë. Përqendrimi i secilit fitohormon / RRB në kombinimin auksinë/citokininë, varet nga

specia bimore në studim;

- Në këtë stad, mund të testohet efekti i protokolleve të ndryshme të sterilizimit, të paratrajtit, të terreneve bazë të përzgjedhur, të raportit dhe / ose kombinimit hormonal, burimit të karbonit, etj. në mënyrë që të gjendet protokollin më efektiv për mikroshumimin e specieve të përzgjedhur;
- Eksplantet kultivohen për rreth 4 javë në dhomën vegetative në temperaturë $23 \pm 2^\circ\text{C}$ në një fotoperiodë 16 ndriçim / 24 orë;
- Gjatë kësaj kohe bimëzat monitorohen në mënyrë të vazhdueshme për shenja të infeksionit dhe të stresit oksidativ. Në rast se shfaqet infeksion, ato enë kulture eliminohen, ndërsa nëse shfaqet stres oksidativ që shoqërohet me zverdhje terreni ushqyes, bëhet ndërrimi i menjëhershëm i terrenit ushqyes;
- Në mënyrë të vazhdueshme realizohen matje, vrojtime dhe fotografi që do të shërbejnë për paraqitjen e rezultateve, interpretimin e tyre dhe krahasimet midis trajtimeve të ndryshme për të evidentuar protokollin optimal që mundëson arritjen e koeficientit më të lartë të rigjenerimit në këtë stad;

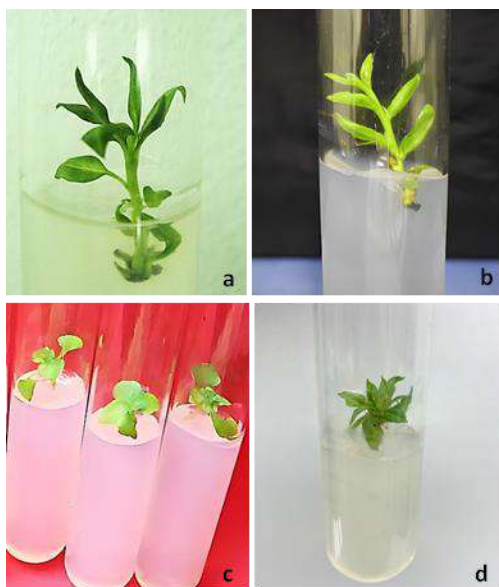


Figura 6.1. Stadi i inokulimit / stabilizimit të sytheve për specie bimore të ndryshme **a)** *Pyrus amygdaliformis* Vill. **b)** *Zizyphus jujuba* Mill. **c)** *Ocimum basilicum* L **d)** *Pyrus communis* L (Laboratori i kulturave qelizore dhe indore, Departamenti i Bioteknologjisë, FSHN, UT)

• **Kultura e farave**

Për ruajtjen e biodiversitetit, veçanërisht për speciet e rrezikuara, duhet të hetohet dhe mbirja e farës. Në Departamentin e Bioteknologjisë, FSHN, UT është punuar ndër vite me specie endemike dhe të rrezikuara për zhdukje, ku përdorimi i farave si eksplante fillestare ka rezultuar metodë mjaft efektive në shumicën e rasteve, për

shkak të avantazheve që ato paraqesin në manipulimet praktike. Farat konsiderohen eksplante që proliferojnë relativisht lehtë në kulturë. Sigurisht, kjo varet nga koha e izolimit, kushtet e ruajtjes në laborator dhe ruajtja e fuqisë mbirëse të tyre. Zakonisht, kultura e farave përdoret në rastin kur është e pamundur të izolohet embrioni zigotik, për shkak të përmasave shumë të vogla.

Faza më e rëndësishme gjatë kultivimit *in vitro* është arritja e një fuqie mbirëse optimale, e cila është specifike në varësi të gjenotipit, por sigurisht dhe të faktorëve të jashtëm fiziko-kimikë gjatë ditëve të kulturës.

Kur farat inokulohen në terren ushqyes, ato fillojnë të përthithin përbërësit e tij, embrioni zigotik brenda saj fillon të proliferojë dhe fara mbin. Meqë embrionet zigotike janë struktura bipolare, vërehet organogjenezë e sythit të majës dhe organogjenezë e rrënjës. Në disa raste mund të ndodhë që të proliferojnë dhe strukturat rrethuese të farës. Në këtë rast, sapo vërehet ky proces, ato duhet të shkëputen nga pjesa tjetër e eksplantit.

Për të nxitur një frekuencë sa më të lartë të mbirjes së farave, zakonisht këto paratrajtohen me GA_3 , përqendrimi i të cilit dhe kohëzgjatja e trajtimit varet nga specia bimore. Në varësi të species bimore, mund të nevojitet një inkubim në errësirë në ditët e para të kulturës, ose ekspozim në ndriçim të vazhdueshëm për një periudhë 2 – 3 javore.

Protokolli 6.1.2: Kultura e farave

- Si material fillestar përdoren fara nga specie bimore të përzgjedhura për platformën eksperimentale. Farat në kapsula ruhen në vende të thata dhe të freskëta;
- Bëhet shkoqja e kapsulës dhe materiali kalohet në sitë meqenëse farat janë tepër të imëta;
- Farat e fituara pas sitjes mund t'i nënshtrohen edhe një procedure paratrajtimi me tretësirë GA_3 ose KNO_3 , ose një kombinim i këtyre dy përbërësve, në mënyrë që të rritet fuqia mbirëse e tyre;
- Më tej, farat kalohen në provëza të sterilizuara dhe të mbyllura, ku fillimisht, dezinfektohen me etanol 70% për 3 min., duke u tundur vazhdimisht për dezinfektim homogjen. Shpëlarja e farave kryhet 3 herë me ujë të distiluar dhe të sterilizuar;
- Pas kësaj procedure, farat dezinfektohen me tretësirë 5.20% hipoklorit natriumi për 15 min. ose biklorur mërkuri $HgCl_2$ 0.01% për 5 min. Përsëri shpëlahen 3 herë me ujë të distiluar dhe të sterilizuar;
- Pas sterilizimit, farat inokulohen në terrenet ushqyese të përgatitura sipas specifikave të species bimore në studim. Procesi i inokulimit mund të bëhet nëpërmjet një spatule ose anse sterile për farat e imëta, ose nëpërmjet një pincete sterile për farat pak më të mëdha;
- Meqë farat janë struktura të organizuara optimizohet raporti auksinë : citokininë në favor të citokininave pasi këto eksplante zhvillohen nëpërmjet organogjenezës

direkte. Përqendrimi i secilit fitohormon / RRB në kombinimin auksinë/citokininë, varet nga specia bimore në studim;

- Për shumë specie bimore, nevojitet një inkubim në errësirë, në temperaturë 25°C në mënyrë që të nxitet mbirja e tyre. Kjo sigurisht varet edhe nga koha e izolimit të farave. Në raste të tjera, mund të nevojitet mbajtje në ndriçim të vazhduar. Në lidhje me këtë faktor themelor fizik, siç është ndriçimi, raportimet në literaturë për fara të izoluara nga specie të ndryshme bimore, janë të ndryshme;

- Vëzhgohet mbirja e farave për të përcaktuar datën e fillimit të mbirjes si dhe dinamikën e mbirjes së farave (Fig. 6.2). Në rast se shfaqet infeksion, ato enë kulture eliminohen;



Figura 6.2. Bimëza nga fara të mbira në kushte *in vitro* **a)** *Ramonda serbica* Pančić **b)** *Alyssum murale* Waldst. & Kit. **c)** *Sideritis raeseri* Boiss & Heldr (Laboratori i kulturave qelizore dhe indore, Departamenti i Bioteknologjisë, FSHN, UT)

• **Kultura e embrioneve zigotike**

Kultura e embrioneve zigotike ka si objekt izolimin steril dhe rritjen e embrioneve mature / të pjekura dhe imature / të papjekura *in vitro* për të fituar bimë të fuqishme, si dhe për të ndjekur zhvillimin dhe më tej mbirjen e tyre.

Për qëllime të mikروشumimit zgjidhen embrionet mature pasi ata kanë potencial të lartë rigjenerimi në kulturë, madje dhe në terren ushqyes pa shtesa hormonale. Kjo metodë është e vlefshme, sepse embrionet kanë karakteristika juvenile dhe rrjedhimisht, potencial të lartë rigjenerimi.

Në rastet e humbjes së fuqisë mbirëse të farave në faza të mëtejshme të zhvillimit, si dhe veçanërisht në rastet e papajtueshmërisë zigotike, domosdoshmërisht duhet të përzgjidhet një embrion imatur si eksplant fillestar. Optimizohen kushtet e kulturës në një mënyrë të tillë që ky embrion zigotik imatur të arrijë të zhvillohet duke dhënë bimën e plotë. Kjo teknikë njihet gjerësisht me termin 'shpëtim i embrionit' dhe gjen aplikime të mëdha praktike.

Aspekti më i rëndësishëm për kulturën embrionale është përzgjedhja e një terreni ushqyes që plotëson nevojat e embrioneve të izoluara për rritje efektive. Në përgjithësi, embrionet e papjekura kanë kërkesa ushqyese më komplekse, ndërsa

embrionet e pjekura mund të rriten në terrene ushqyese të thjeshta duke dhënë një shkallë të kënaqshme proliferimi në kulturë. Madje parakusht për embrionet imature është kultivimi në terrene ushqyese që sigurojnë vlera të tilla të potencialit osmotik për të mundësuar pjekjen / maturimin e tyre dhe shmangien e mbirjes së parakohshme në kulturë. Kjo arrihet duke shtuar përqendrimin e sakarozës në terrenin ushqyes, ose duke shtuar lëndë të tjera si manitoli, sorbitoli, polietilen glikoli, etj. Domosdoshmërisht nevojitet të optimizohet përqendrimi dhe kohëzgjatja e kultivimit në të tilla terrene ushqyese.

Protokolli 6.1.3: Kultura e embrioneve zigotike

- Si eksplante fillestare mund të përdoren embrione mature ose immature të specieve bimore të ndryshme. Para sterilizimit, farat lihen 12- 24 orë në ujë të rrjedhshëm që të fryhen embrionet, gjë që lehtëson izolimin e tyre;
- Në rastin e specieve bërthamore, përgjithësisht realizohet sterilizim i dyfishtë: Sterilizimi i parë realizohet para zhveshjes së mbulesës së farës me HgCl_2 0,01% për 20 min. dhe shpëlahen me ujë steril. Pas këtij stadi hiqen mbulesat e jashtme të farës duke përdorur një pincetë; Sterilizimi i dytë realizohet pas zhveshjes së mbulesës së farës duke përdorur HgCl_2 0,01% për 20 min. Eksplantet shpëlahen tre herë me ujë të distiluar dhe të sterilizuar;
- Në shumë raste, embrionet e izoluar, para sterilizimit të tyre i nënshtrohen protokolleve të paratrajtimeve, jo vetëm për të shmangur shfaqjen e stresit oksidativ, por edhe për të rritur fuqinë proliferuese të tyre në kulturë;
- Në varësi të përmasës, embrionet mund të izoloohen me sy të lirë ose me stereomikroskop (Fig. 6.3) dhe vetëm 1/3 e eksplantit zhytet në terrenin ushqyes;
- Përsa i përket përmbajtjes hormonale, embrionet e izoluar, si struktura të organizuara që zhvillohen nëpërmjet organigjenezës direkte, mund të inokulohen në terrene pa hormone / RRB, ose në terrene ku raporti auksinë : citokininë është në favor të citokininave. Përgjithësisht, preferohet një terren ushues me përmbajtje hormonesh, për të përshpejtuar proliferimin e embrioneve zigotikë në kulturë;
- Kulturat inkubohen në temperaturë rreth 25°C, në fotoperiodë 16 ndriçim / 24 orë ose në errësirë të plotë, në varësi të species bimore. Nëse inkubohen në errësirë, procedurë kjo që realizohet për shkak të stresit oksidativ në eksplante, sapo fillon të duket gjithja e parë, kulturat kalohen në fotoperiodë 16 ndriçim / 24 orë;
- Në rast se vërehen shenja të stresit oksidativ, ngjarje që shoqërohet me zverdhje / nxirje të terrenit ushqyes dhe të eksplanteve, duhet të realizohet menjëherë transferim në terren të freskët;
- Një pjesë e bimëzave rrënjëzojnë në stadin e parë të kultivimit *in vitro*. Në stadin pasardhës, atë të subkulturës, transferohen vetëm sythet.

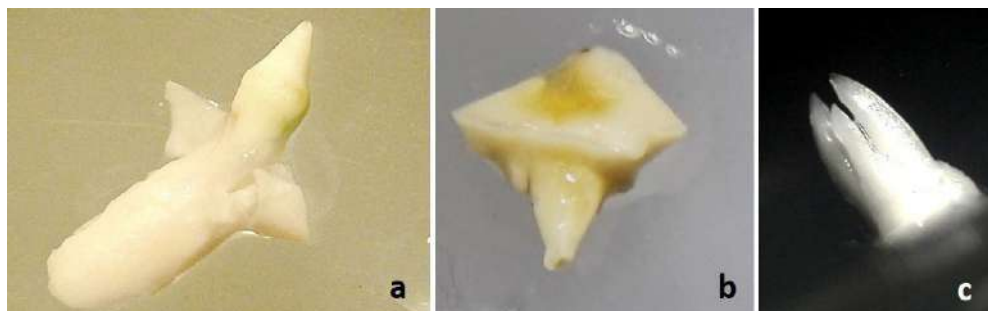


Figura 6.3. Izolimi i embrioneve nga specie të ndryshme bimore dhe inokulimi i tyre në terrene ushqyese **a)** *Punica granatum* L **b)** *Juglans regia* L **c)** *Prunus webbii* (Spach) Viehr (Laboratori i kulturave qelizore dhe indore, Departamenti i Bioteknologjisë, FSHN, UT)

• **Kultura e indeve gjethore apo kërcellore**

Qelizat bimore të diferencuara nuk e humbasin aftësinë e tyre për t'u dediferencuar dhe për të rimarrë cilësi të reja. Dediferencimi është një aspekt i plasticitetit qelizor që mundëson rimarrjen e gjendjes pluripotente, duke mundësuar ridiferencimin në një drejtim tjetër.

Bimët, në përgjigje të streseve të tilla si dëmtimi apo patogjenët, formojnë një masë qelizash të paorganizuara të quajtur kallus. Kjo fjalë origjinohet nga fjala latine 'callum', që do të thotë 'i fortë', dhe në mjekësi i referohet trashjes së indeve dermalë. Kallusi, në kohët më të hershme të biologjisë bimore, i referohej rritjes masive të qelizave dhe grumbullimit të kallozës pas dëmtimit mekanik të bimëve. Në kohët e sotme, fjala 'kallus' merr një kuptim më të gjerë, veçanërisht në bioteknologjinë bimore *in vitro*.

Protokolli 6.1.4: Kultura e indeve / kallusit

- Si eksplante fillestare, përzgjidhen copa gjethesh ose kërcelli, të cilat merren nga specie bimore të ndryshme (*Aster* sp., *Actinidia* sp., etj.);
- Eksplantet e përzgjedhura sterilizohen duke ndjekur një protokoll specifik sterilizimi të tyre, në varësi të eksplantit, species bimore, sezonit të izolimit, etj. Kjo procedurë realizohet në fluksin laminar;
- Në rastin kur përzgjidhen copat e gjetheve si eksplante fillestare, pas sterilizimit të tyre, në çdo gjethë, largohen skajet e indit gjethor. Në varësi të madhësisë fillestare të llapës së gjethes, priten copëza të vogla drejtkëndëshe. Rekomandohet që në këto copëza gjethore të mos përfshihen nervurat e gjethes. Madhësia e secilit eksplant varion 5-10 x 3-5 mm;
- Në rastin kur përzgjidhen copat nga kërcelli si eksplante fillestare, pas sterilizimit të tyre, bishtat priten për së gjati në madhësi 7 – 10 mm;
- Eksplantet e fituara inokulohen me shpejtësi në terren ushqyes ku copat e gjetheve

vendosen të shtrira në kontakt me terrenin ushqyes, ndërsa bishtat e kërcejve vendosen të shtrira nga ana e pjesës së prerë;

- Nëse eksplantet lëshojnë në ditët e para në terrenin ushqyes lëndë në ngjyrë të verdhë dhe të murrme si pasojë e stresit oksidativ, ato kalohen shumë shpejt në terrene të freskëta ushqyese. Ky veprim përsëritet deri sa të mos shfaqen njolla të tilla në terren;

Terreni ushqyes për induktimin e kallusogjenezës

- Për induktimin e kallusogjenezës, rekomandohet që terreni ushqyes të ketë një raport auksinë : citokininë pothuajse të barabartë, ose lehtësisht në favor të auksinave për speciet dikotiledone. Për speciet monokotiledone, rekomandohet që përqendrimi i auksinave të jetë shumë më i lartë në krahasim me atë të citokininave, për shkak se auksinat janë përgjegjëse për riprogramimin qelizor dhe dediferencimin;

- Për çdo trajtim duhet të vendosen minimalisht 20 enë kulture. Këto duhet të etiketohen me llojin e bimës, terrenin ushqyes, datën e ngritjes së eksperimentit dhe të dhëna të tjera të rëndësishme;

- Gjatë këtij stadi vëzhgohet fillimi i kallusimit si fryrja e eksplanteve deri në kallusimin e plotë në sipërfaqe të eksplantit. Duhet të realizohen vrojtime të shpeshta, matje, fotografime, etj. për fazat e ndyshme të kallusogjenezës;

Terreni ushqyes për formimin e meristemoideve dhe diferencimin e sytheve

- Pasi formohet, kallusi (Fig. 6.4 a) transferohet më tej në terren ushqyes për të stimuluar formimin e meristemoideve dhe organeve të reja. Duke qenë se qëllimi është diferencimi i sytheve adventivë, në këtë stad terreni ushqyes duhet të ketë përmbajtje hormonale lehtësisht në favor të citokininave, ose dhe më të lartë. Kjo bëhet për faktin se citokininat janë përgjegjëse për diferencimin e sytheve anësore, një antagonizëm ky i klasave hormonale citokininë : auksinë;

- Pas pak javësh, nga meristemoidet, vëzhgohet një numër i madh sythesh të reja të zhvilluara mirë dhe me gjethe karakteristike në varësi të species bimore (Fig. 6.4b);

- Sythet e reja të përfutuara dhe që rriten në sipërfaqe të kallusit janë gati për t'u kaluar në stadin e subkulturës;

6.2.3. Stadi II: Shumimi i bimëzave me anë të subkulturave

Funksioni i këtij stadi është shtimi i numrit të bimëzave të prodhuara. Për këtë stad përdoren të njëjtat kushte fizike si për Stadin I. Kujdes i veçantë duhet pasur në zgjedhjen e përqëndrimeve të rregullatorëve të rritjes. Zakonisht nevojitet një përqëndrim i lartë i citokininave në krahasim me auksinat në mënyrë që të stimulohet formimi i një numri të madh sythesh anësorë.

Në këtë stad çdo eksplant jep një numër të madh sythesh anësorë gjatë subkulturave në terren shumimi me përmbajtje të lartë të citokininave. Sythet e reja ndahen dhe kultivohen në terrene të freskëta ushqyese. Subkulturat realizohen çdo 2 – 8 javë në varësi të specieve bimore.

Më poshtë paraqitet protokoli i stadit të subkulturës (Protokolli 6.2). Vlen të theksohet që, pavarësisht se cili është lloji i eksplantit i përdorur në Stadin e parë të mikroshumimit (Stadi i inokulimit / stabilizimit të eksplanteve), në stadin e subkulturës transferohen vetëm sythet të përftuara nga stadi pararendës. Nëse në bazën e eksplantit ka formim kallusi, ky i fundit duhet të hiqet para inokulimit në terrenin ushqyes të freskët në mënyrë që të ruhet stabiliteti gjenetik i bimëzave në kulturë.

Përmbajtja hormonale duhet të mbështesë zhvillimin e sytheve anësorë të shumëfishtë. Për këtë, terrenet ushqyese në këtë fazë duhet të përmbajnë sasi të lartë citokininash. Tipi i citokininës dhe përqendrimi i saj është në varësi të gjenotipit, dhe pikërisht optimizimi i terrenit ushqyes në këtë drejtim, përbën sfidën themelore të këtij stadi. Gjithmonë rekomandohet shoqërimi me një auksinë (raport hormonal në favor të citokininave), për të mbështetur zhvillimin e sytheve anësorë të shumtë, në përputhje kjo me ndërveprimin antagonist ndërmjet këtyre dy klasave hormone.

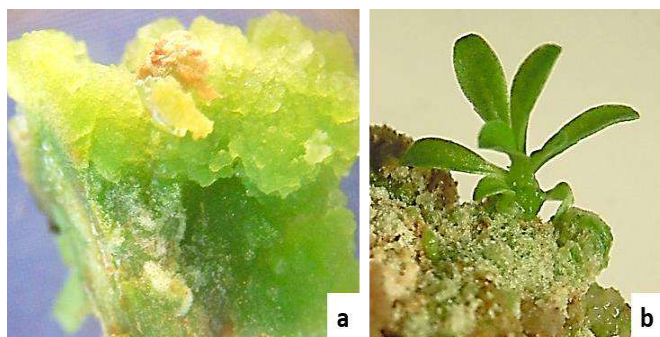


Figura 6.4. Induktimi i kallusogjenezës në copat e gjetheve të *Aster albanicus* Degen. **a)** Formimi i kallusit **b)** Diferencimi i sytheve nga kallusi (Laboratori i kulturave qelizore dhe indore, Departamenti i Bioteknologjisë, FSHN, UT)

Protokolli 6.2: Shtimi në masë i bimëzave nëpërmjet subkulturave

- Nxirren bimëzat nga enët e kulturës dhe vendosen në pjatë Petri brenda mjedisit steril të fluksit laminar. Bimëzat në enët e kulturës janë sterile, prandaj në këtë stad nuk nevojitet sterilizimi i tyre;
- Me ndihmën e pincetës dhe bisturisë ndahen sythet anësore të formuara dhe vendosen në terrenin ushqyes me përmbajtje specifike për subkulturën. Nëse eksplantet paraqesin pjesë nekrotike apo kallus të formuar, këto duhet të hiqen para transferimit të tyre në terrenin e subkulturës;
- Zakonisht terreni ushqyes për subkulturën është terren i thjeshtë në përmbajtje. Kjo vjen për faktin se sythet që transferohen në subkulturë janë përshtatur me kushtet e rritjes *in vitro*, dhe ato, si struktura të organizuara, proliferojnë më së miri me pak shtesa të jashtme;
- Raporti auksinë : citokininë në subkulturë është gjithmonë në favor të citokininave, kryesisht 1 : 10 – 1 : 100, pasi ato janë përgjegjëse për formimin e

sytheve anësorë të shumtë, që është dhe qëllimi i mikroshumimit;

- Ndonjëherë ndodh që gjatë stadi të subkulturës të formohet edhe kallus në bazën e sytheve, ose të shfaqen pjesë nekrotike. Këto domosdoshmërisht duhet të hiqen gjatë transferimit të sytheve për shtim të mëtejshëm në subkulturën pasardhëse;

- Realizohen disa subkultura deri sa të fitohet një numër i madh bimëzash. Rekomandohet që numri i subkulturave të mos jetë më shumë se 4 – 5, pasi ekziston rreziku që sythet të kthehen në juvenilë të përhershëm;

- Enët e kulturës etiketohen përsëri me emrin e species, datën e kalimit në terrenin e freskët, llojin e trajtimit, etj.

- Të gjitha kulturat kalohen në dhomën e kultivimit *in vitro* në temperaturë $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ në regjim ndriçimi 16/24 orë me tuba fluoreshente me dritë të ftohtë të bardhë me intensitet $43.4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$.

- Në fund të çdo subkulture kryhen matje morfo-biometrike dhe vrojtime të shumta për të njohur dhe analizuar dinamikën e zhvillimit të bimëzave të reja. Duke patur parasysh numrin fillestar të bimëzave që i nënshtrohen subkulturës dhe atë të fituar pas mikroshumimit, njehsohet koeficienti i mikroshumimit për bimëzat e formuara;

- Pas përfundimit të një numri konsiderueshëm bimëzash gjatë subkulturës (Fig. 6.5), ato transferohen në stadin pasardhës që është ai i rrënjëzimit. Vlen të theksohet, që ndonjëherë, vërehet rrënjëzim spontan i bimëzave gjatë stadi të subkulturës, veçanërisht në specie aromatiko-mjekësore. Në këtë rast, bimë të tilla kalojnë në stadin e aklimatizimit;

6.2.4. Stadi III: Rrënjëzimi

Rrallë ndodh që bisqet e mikroshumuar të rrënjëzojnë spontanisht gjatë subkulturave. Për këtë arsye, është e nevojshme që bisqet e mikroshumuar që nuk shfaqin rizogjeneze spontane, t'i nënshtrohen Stadi të rrënjëzimit, i cili është i nevojshëm për zhvillimin e sistemit rrënjor. Stadi i rrënjëzimit përgatit bimëzat për kalimin në kushte *ex vitro* në një mjedis me kushte të kontrolluara, në serrë apo në ndonjë mjedis tjetër të përshtatshëm.

Seleksionimi i bimëzave në një stad të përshtatshëm zhvillimi si dhe ekspozim në një mjedis *in vitro* që siguron zhvillimin e ngjarjeve të mëtejshme, mundëson formimin e një sistemi rrënjor funksional me origjinë adventive. Ky stad mund të përfshijë jo vetëm zgjatjen e rrënjëve, por dhe fillimin e procedurave për ambientimin e bimëve në kushte të caktuara lagështie dhe temperature në mënyrë që të rritet potenciali rigjenerues gjatë aklimatizimit të tyre.

Prodhimi i rrënjëve të reja mund të realizohet në kushte *in vitro* ose *ex vitro* në prani të përqendrimeve të larta të auksinave, të cilat nxisin këtë proces, efekt antagonist ky me citokininat për sa i takon rizogjenezës. Edhe në këtë stad, sfidë mbetet gjetja e tipit dhe përqendrimit optimal të auksinës që indukon me efektivitet rizogjenezën për një gjenotip të caktuar. Avantazhi kryesor i rrënjëzimit *ex vitro* në krahasim me atë *in*

vitro është se gjatë transferimit në tokë rrënjët dëmtohen më pak. Gjithashtu, përqindja e prodhimit të rrënjëve dhe cilësia e tyre shpesh është më e lartë kur rrënjëzimi realizohet *ex vitro*.

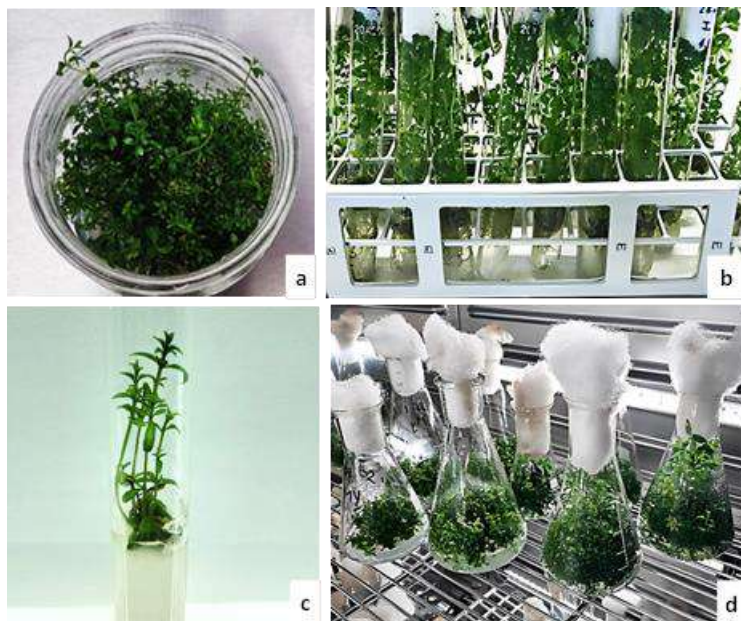


Figura 6.5. Stadi i subkulturës a) Bimëza të *Mentha piperita* L b) Bimëza të *Ocimum basilicum* L. c) Bimëza të *Punica granatum* L d) Bimëza të *Myrtus communis* L (Laboratori i kulturave qelizore dhe indore, Departamenti i Bioteknologjisë, FSHN, UT)

Protokolli 6.3: Rrënjëzimi i bimëzave

- Nxirren bimëzat nga enët e kulturës dhe vendosen në pjatë Petri në kushte aseptike. Terreni ushqyes, i parapërgatitur dhe i sterilizuar, duhet të përmbajë përqendrime të larta të njëjës prej auksinave (AIB, ANA, AIA, etj.), fitohormone/RRB përgjegjëse për inductimin e rrënjëzimit (Fig. 6.6 a, b);
- Në shumë raste, përveç shtesës së auksinave, errësohet terreni ushqyes duke shtuar Fe-sekuestren si formë e kelatimit të hekurit, i cili i jep terrenit ngjyrë të kuqe të errët (Fig. 6.7 c). Metodë tjetër e errësimit të terrenit ushqyes është dhe përdorimi i karbonit aktiv në përqendrimin $1 - 10 \text{ g l}^{-1}$ (Fig. 6.7 d). Në shumë raste mund të inkubohen kulturat në errësi gjatë ditëve të para të këtij stadi. Është me rëndësi të realizohet të paktën njëri prej këtyre aplikimeve pasi errësira stimulon sintezën e auksinave nga vetë eksplantet, të cilat mbështesin rrënjëzimin;
- Për çdo trajtim duhet të vendosen minimalisht 20 enë kulture. Këto duhet të etiketohen me llojin e bimës, terrenin ushqyes, datën e ngritjes së eksperimentit dhe të dhëna të tjera të rëndësishme;
- Të gjitha kulturat kalohen në dhomën e kultivimit *in vitro* në temperaturë $23^{\circ}\text{C} \pm$

2°C në regjim ndriçimi 16/24 orë me tuba fluoreshente me dritë të ftohtë të bardhë me intensitet $43.4 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (në rastet kur protokollin e aplikuar nuk parashikon inkubim në errësirë);

- Përgjigja e rrënjëzimit vlerësohet pas 4 – 5 javësh kultivim. Në mënyrë të vazhdueshme duhet të realizohen vërtetimet, matjet dhe fotografi për të kuptuar dhe analizuar dinamikën e procesit të rrënjëzimit;

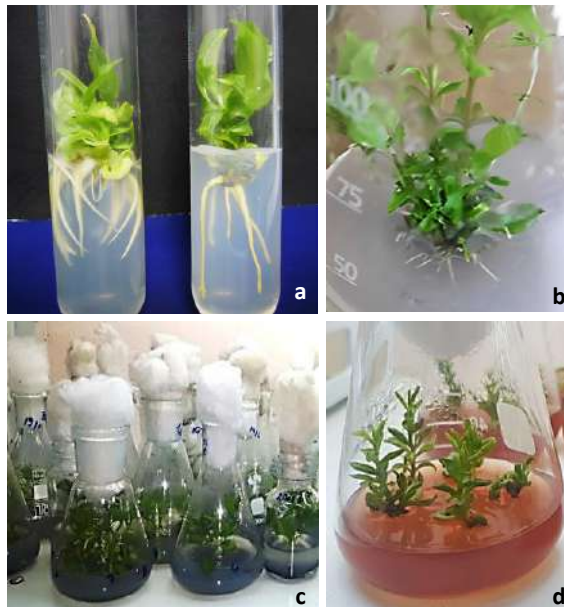


Figura 6.6. Stadi i rrënjëzimit: **a)** Rrënjëzimi i bimëzave të *Prunus* sp. **b)** Rrënjëzimi i bimëzave të *Punica granatum* L. **c)** Kultivimi i bimëzave të *Malus* sp. në terren me karbon aktiv dhe përmbajtje auksinash **d)** Kultivimi i bimëzave të *Aster* sp. në terren me Fe-sekuestren dhe përmbajtje auksinash (*Laboratori i kulturave qelizore dhe indore, Departamenti i Bioteknologjisë, FSHN, UT*)

6.2.5. Stadi IV: Aklimatizimi / ambientimi

Bimëzat duhet t'i nënshtrohen aklimatizimit në kushte *in vivo*. Ky është një stad mjaft i rëndësishëm dhe i vështirë pasi, nëse nuk realizohet siç duhet, mund të shkaktohen humbje të mëdha në materialin bimor të mikroshumuar. Problemet themelore që vështirësojnë efikasitetin e këtij stadi janë:

- Lagështia e madhe në enët e kulturës;
- Intensiteti i ulët i ndriçimit gjatë rritjes *in vitro*;
- Mënyra heterotrofe e të ushqyerit në kulturë;
- Anatomia e gjetheve, kërcellit dhe rrënjëve në bimëzat e mikroshumara;

Transferimi në tokë i bimëzave të prodhuara *in vitro* shpesh është tepër i vështirë dhe karakterizohet nga përqindje të ulëta të mbijetesës. Një ndër shkaqet që shkakton

humbje të mëdha në aklimatizim është **stresi ujqor**. Ky stres rezulton nga transpirimi intensiv i bimëzave të fituara nga kultura *in vitro*, kur këto dalin në kushte *ex vitro*. Duke qenë se rriten në mikromjedise, brenda enëve të kulturës lagështia ajrore është shumë e lartë, dhe, rrjedhimisht, shumë struktura si p.sh. gojëzat, kutikula, etj., kanë një formim morfo-anatomik që i përshtatet këtyre kushteve. Duke reduktuar lagështirën relative në enët e kulturës në vlerën 35% mund të formohen bimë me kutikulë normale dhe shtresë dyllore të strukturuar mirë. Lagështira relative mund të ulët duke përdorur lëndë desikante (tharëse) të cilat shtohen në terrenin ushqyes, si p.sh. PEG (polietilen glikol).

Gjatë procesit të aklimatizimit, bimët e transferuara në kushte *ex vitro* i nënshtrohen ndryshimeve graduale të anatomisë dhe morfologjisë së gjetheve. Gjithashtu edhe gojëzat fillojnë të hapen e mbyllen në mënyrë periodike. Bimëzat gjithashtu formojnë një shtresë dyllore epikutikulare në sipërfaqe të gjetheve.

Gjatë aklimatizimit, bimëzat mbillen në vazo të mbushura me materiale të tilla si dhé, torfë e perlit. Në këto kushte, sistemi rrënjor do të përshtatet e fuqizohet, dhe kjo siguron ambientim efektiv të bimëzave në të tilla kushte. Duhet theksuar se në këtë fazë mund të kryhet dhe rrënjëzim, që për disa specie bimore, është më efektiv se rrënjëzimi *in vitro*. Duke qenë se rrënjët e bimëzave të formuara *in vitro* janë mjaft delikate, ndodh që ato të dëmtohen gjatë mbjelljes në tokë ose të mos përshtaten me kushtet e aklimatizimit në vazo me dhé. Për këtë arsye, si sistem alternativ ka filluar të përdoret edhe hidroponika / kultura ujore.

Protokolli 6.4: Aklimatizimi në vazo me dhé, torfë dhe perlit

- Ky stad i mikroshumimit nuk realizohet në kushte aseptike, por rekomandohet që mjedisi ku realizohet puna të jetë në kushte të pëlqyeshme higjieno-sanitare;
- Nxirren bimëzat nga terrenet ushqyese dhe shpëlahen me ujë të distiluar dhe të sterilizuar që të eliminohen mbetjet e agarit dhe përbërësve të tjerë të terrenit;
- Kujdes i veçantë duhet treguar me dëmtimet mekanike që mund të ndodhin në pjesë të ndryshme të bimëve dhe veçanërisht në rrënjë;
- Mjedisi ku mbillen bimëzat e rrënjëzuara është i rëndësishëm për mbijetesë. Ai duhet të jetë poroz për të lehtësuar drenazhimin dhe ajrimin. Substrati përbëhet nga dhé, torfë dhe perlit në raport 2:1:1;
- Më tej, pas ujitjes së mirë, enët e mbjella mbahen për rreth 4 javë në kushte të “mjegullimit” artificial duke u mbuluar me gota kimike apo këmbana qelqi me përmasë të përshtatshme në mënyrë që të krijohet një mikromjedis (Fig. 6.7 a), ose me qese plasmasi transparente (Fig. 6.8 b). Këto kushte janë të nevojshme për të siguruar lagështi relative ajrore të lartë në temperaturë 22°C. Kjo procedurë është e nevojshme për stabilizimin e bimëzave, të cilat në enët ekulturës *in vitro* janë rritur në kushtet e lagështisë së lartë;
- Gjatë aklimatizimit, enët lihen për 4 javë në hijëzim 80 - 90%, për të imituar deri

diku kushtet e rritjes *in vitro*. Hijëzimi redukton transpirimin, nga ana tjetër ndriçimi i lartë mund të shkatërrojë klorofilin nga fotooksidimi. Zakonisht inkubimi gjatë aklimatizimit bëhet në fotoperiodë 16 orë ndriçim / 24 orë;

- Pas një periudhe 3 – 4 javore zbulohen duke nisur nga pak minuta në ditë bimëzat në mënyrë periodike, duke rritur në mënyrë graduale kohën e të mbajturit zbuluar. Nuk rekomandohet nxjerrja në diell gjatë procesit të aklimatizimit, pasi intensiteti i lartë i ndriçimit mund t'i dëmtojë bimëzat;
- Në qeset e përdorura për aklimatizim hapen vrimëza, përmasa dhe numri i të cilave shtohet gradualisht me kalimin e ditëve;
- Zakonisht aklimatizimi kryhet në miniserra të veçanta me sisteme avujsh uji ose pulverizatorë, që sigurojnë një minimum prej 85% lagështi relative në javët e para. Në rastet më të thjeshta, bimëzat vendosen në mjedise të mbyllura për të ruajtur densitetin e rritur të avujve, duke i mbuluar bimët me qese transparente apo enë qelqi;
- Pas rreth dy muajsh bimëzat mund të qëndrojnë të zbuluara në kushtet e ndriçimit dhe të temperaturës së mjedisit ku gjenden (Fig. 6.7 b; c). Në këtë stad, ato janë gati të transferohen në tokë;



Figura 6.7. Stadi i aklimatizimit: **a)** Mjegullim artificial me gota kimike **b)** Mjegullim artificial me qese plastmase **c)** Bimëza të aklimatizuara të *Prunus* sp. **d)** Bimëza të *Malus* sp. (Laboratori i kulturave qelizore dhe indore, Departamenti i Bioteknologjisë, FSHN, UT)

Bibliografia

Apter, R.C., McWilliams, E.L., Davis F.T. 1993. *In vitro* and *ex vitro* adventitious root formation in asian jasmine I. Comparative morphology. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 118, 902 – 905;

Avilés, F., Ríos D., González, R., Sánchez-Olate, M. 2009. Effect of culture medium in callogenesis from adult walnut leaves (*Juglans Regia* L.). *Chilean Journal of Agricultural Research* 69(3):460-467;

Bell, R.L., Srinivasan, C., Lomberg, D. 2009. Effect of nutrient media on axillary shoot

- proliferation and preconditioning for adventitious shoot regeneration of pears. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* DOI 10.1007/s11627-009-9196-8;
- Colijn, C.M., Kool, A.J., Nijkamp, H.J.J. 1979.** Induction of root and shoot formation from root meristems of *Petunia hybrida*. *Protoplasma*, 99: 335 - 340;
- Damiano, C., Arias Padro, M.D., Frattarelli, A. 2008.** Propagation and establishment *in vitro* of myrtle (*Myrtus communis* L.), pomegranate (*Punica granatum* L.) and mulberry (*Morus alba* L.), *Propagation of Ornamental Plants*, 8 (1): 3-8;
- Davey, M.R., Anthony, P. 2010.** Plant cell Culture: Essential methods. Published by Wiley – Blackwell, UK;
- De Paoli, G., Rossi, V., Scozzoli, A. 1994.** Micropropagazione delle piante ortoflorofrutticole, 151-154;
- Drew, A.P., Kavanagh, K.L., Maynard, C.A. 1992.** Acclimatizing micropropagated black cherry by comparison with half-sib seedlings. - *Physiol. Plant.* 86: 459-464;
- Durzan, D. 1985.** Tissue culture and improvement of woody perennials: An overview. In *Tissue cultures in Forestry & Agriculture* (Eds. Henke, R., Hughes, K., Constavtin, H. and Hollander, A.); Plenum Press, New York; p. 233 – 256;
- Gaspar, T., Franck, T., Bisbis, B., Kevers, C., Jouve, L., Hausman, J.F., Dommes, J. 2002.** Concepts in plant stress physiology. Application to plant tissue cultures. *Plant Growth Regulation*, 37: 263–285;
- Gashi, B., Osmani, M., & Aliu, S. 2019.** Breaking seed dormancy of *Tulipa scardica* Bornm. and *Tulipa kosovarica* Kit Tan, Shuka & Krasniqi by pre-chilling, plant growth regulators and some chemical treatments. *Acta Agriculturae Slovenica*, 113(2), 203–210.
- Gashi, B., Abdullai, K., Sota, V., Kongjika, E. 2015.** Micropropagation and *in vitro* conservation of the rare and threatened plants *Ramonda serbica* and *Ramonda nathaliae*. *Physiol Mol Biol Plants*. 21(1):123-36;
- Goleniowski, M.E., Flamarique, C., Bima, P. 2003.** Micropropagation of *Origanum vulgare* from meristem tips. *In vitro Cellular and Developmental biology-Plant*. 39: 125 - 128 (4);
- Grant, N.J., Hammat, N. 1999.** Increased root and shoot production during micropropagation of cherry and apple rootstocks: effect of subculture frequency. *Tree Physiol*. 19: 899–903;
- Kozai, T. 1991.** Acclimatization of Micropropagated Plants. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol.17, High Tech and Micropropagation I, 127 - 141.
- Mohan Jain, S., Haggman, H. 2007.** Protocols for Micropropagation of Woody Trees and Fruits. Published by Springer, Netherland;
- Neuman, K.H., Kumar, A., Omani, J. 2009.** Plant cell and tissue culture – A tool in Biotechnology. Basics and Application. Springer – Verlag, Berlin Heidelberg, Germany;
- Ramming, D.W. 1990.** The use of embryo culture in fruit breeding. *HortScience*, 25:393-398;
- Sota, V., Kongjika, E. 2013.** Kulturat bimore indore dhe qelizore. ISBN: 978-99956-10- 59-3. Shtëpia botuese “Akademia e Shkencave”, Tiranë, 2013;

KAPITULLI 7

Mikroshumimi nëpërmjet sistemeve me zhytje të përkohshme - bioreaktorët TIS (SETIS, ElecTIS, Plantform)

7.1. Bioreaktorët dhe automatizimi i shumimit *in vitro*

Metodat e kulturës së indeve bimore janë përdorur për më shumë se 30 vjet për të klonuar një shumëllojshmëri specimesh bimore. Metoda konvencionale, duke përdorur terrene ushqyese të xhelifikuara, është përdorur gjerësisht për shkak të thjeshtësisë dhe efektivitetit të saj. Megjithatë, nevojitet punë intensive pasi kërkohet mirëmbajtje e një numri të madh enësh kultivimi, terrene të xhelifikuara dhe transferim periodik të materialit bimor në terrene të freskëta çdo 4-6 javë, për shkak të shterimit të lëndëve ushqyese në terren. Agjentët xhelifikues gjithashtu, rrisin ndjeshëm shpenzimet e prodhimit *in vitro*. Rrjedhimisht, është punuar shumë për teknika të automatizuara me qëllim rritjen e rendimentit të shumimit *in vitro* dhe për të minimizuar kostot e prodhimit.

Bioreaktorët janë pajisje të automatizuara të cilat përdorin terrene ushqyese të lëngëta si dhe sisteme të hyrjes dhe daljes së lëngjeve dhe ajrit në kushte aseptike. Ato ofrojnë mundësinë për monitorim dhe kontroll të kushteve mikromjedisore si tundja, ajrimi, temperatura, pH, etj. Përdorimi i bioreaktorëve konsiderohet alternativë më efektive në krahasim me metoda konvencionale të shumimit *in vitro*. Bioreaktorët janë pajisje laboratorike me mjaft avantazhe dhe lehtësira, ku ndër më themeloret përmenden:

- Përdorimi i terrenit ushqyes të lëngët ndikon në ulje të kostos së punës laboratorike, pasi agari përbën një agjent xhelifikues të kushtueshëm;
- Përdorimi i terrenit ushqyes të lëngët e bën më të thjeshtë procesin e përgatitjes së tij pasi merr më pak kohë, si dhe lehtëson dhe procesin e larjes së enëve të kulturës pas transferimit të kulturave në terrene të freskëta;
- Koha e inokulimit të eksplanteve në bioreaktor është më e shkurtër se koha e nevojshme për inokulimin e eksplanteve nëpër enë të vogla kulture, pasi i gjithë materiali bimor inokulohet në të njëjtën kohë në bioreaktor. Kur eksplantet inokulohen nëpër enë kulture më përmasa të vogla, secili prej eksplanteve do kohën e tij të inokulimit;
- Në terren të lëngët, thithen dhe shfrytëzohen më mirë substancat ushqyese;
- Ndodh hollimi i fenoleve dhe substancave toksike në terren dhe si rrjedhojë, reduktohen shumë pasojat e stresit oksidativ;

- Eksplantet e mikroshumuara në bioreaktor kanë normë më të lartë shumimi.

Llojet e ndryshme bimore kanë kërkesa të ndryshme që diktojnë cilësime specifike për mjedisin e brendshëm të bioreaktorëve dhe përcaktojnë modelin më të përshtatshëm të bioreaktorit për t'u përdorur. Bioreaktorët klasifikohen gjerësisht në katër lloje: në fazë të lëngshme, në fazë të gaztë, me zhytje të përkohshme dhe bioreaktorë të modifikuar.

7.2. Bioreaktorët me zhytje së përkohshme

Për të shmangur problematika të tilla si asfiksia, hiperhidratimi dhe çrregullimet fiziologjike të shfaqura nga kulturat e zhytura vazhdimisht në terrenin e lëngët në bioreaktor, janë modeluar bioreaktorë specifikë. Sistemi me Zhytje të Përkohshme (*Temporary Immersion system - TIS*), i quajtur gjithashtu Bioreaktor me Zhytje të Përkohshme (*Temporary Immersion Bioreactors - TIB*), është teknologji që konsiderohet inovative dhe që ka rritur në mënyrë të kënaqshme koeficientin e mikroshumimit për specie të ndryshme bimore.

Parimi i teknologjisë TIS është që materiali bimor të zhytet në mjedise të lëngshme të rritjes për periudha të shkurtra dhe në intervale të rregullta. Këto zhytje janë të mjaftueshme që bimët të marrin lëndët ushqyese. Teknologjia TIS përdor avantazhet e kulturave të lëngëta, ndërkohë që rrit materialin bimor në mjedis me shkëmbim të lartë të gazeve.

Efektet pozitive të zhytjes së përkohshme në mikroshumim tregohen nëpërmjet rritjes së proliferimit të sytheve, rrënjëve, mikrotuberizimit dhe embriogenezës somatike. Koha e zhytjes (kohëzgjatja dhe frekuenca / shpeshtësia e saj) është parametri më vendimtar që përcakton efikasitetin e sistemit. Optimizimi i vëllimit të lëndëve ushqyese dhe vëllimit të enës së kulturës gjithashtu përmirëson ndjeshëm shumimin e sytheve të shumfishtë. Gjithashtu, zhytja e përkohshme, në përgjithësi, përmirëson cilësinë e materialit bimor. Kjo rezulton në rritjen e fuqisë së potencialit rigjenerues të sytheve dhe në frekuencën e embrioneve somatike morfologjikisht normale.

7.3. Disa lloje bioreaktorësh që përdoren në teknologjinë TIS

Ekzistojnë modele të ndryshme të bioreaktorëve TIS, të cilët kanë filluar të përdoren gjerësisht. Më poshtë përshkruhen shkurtimisht tri modele të bioreaktorëve TIS, të cilat janë funksionale edhe në Laboratorin e Kulturave Qelizore, Departamenti i Bioteknologjisë, FSHN, UT.

7.3.1. Bioreaktori SETIS™

Bioreaktori SETIS™ është bioreaktor i përshtatshëm për përdorim në mikroshumimin e bimëve në shkallë të gjerë. Ky bioreaktor përbëhet nga vetëm tre materiale, polikarbonat (enët), polipropilen (kapakët dhe filtrat e ajrit) dhe silikoni (rondelet dhe

tubat). Të gjitha këto materiale përballojnë autoklavimin dhe rrezatimin γ . Bioreaktori SETIS™ përbëhet nga dy enë, transparenca e lartë e të cilave, lejon një ndriçim maksimal të bimëve:

Secila enë e bioreaktorit ka dy dalje. Në njërën prej tyre / dalja e pjesës së poshtme të secilës enë, vendoset tubi i silikonit që lidhet me daljen e enës tjetër / daljen e pjesës së poshtme. Kjo shërben për të kaluar terrenin ushqyes të lëngët nga ena e poshtme, në atë të sipërme, nëpërmjet një pompe e cila funksionon mbi bazën e një programimi të caktuar. Kur pompa pushon së funksionuari, terreni ushqyes kalon sërish në enën e poshtme. Në dy daljet e tjera të lira (nga një për secilën enë) vendosen filtra që të mundësohet shkëmbimi i ajrit. Filtri i daljes së enës së sipërme qëndron i lirë, ndërsa në anën tjetër të filtrit të enës së poshtme bëhet lidhja me pompën nëpërmjet një tjetër tubi silikonit. Pompa është e lidhur me një programator dhe në varësi të kohës së programuar, ajo fillon funksionon duke ngjitur terrenin ushqyes nga pjesa e poshtme e enës, në atë të sipërmen. Kur pompa ndalon së funksionuari, terreni i lëngët rrjedh sërish në enën e poshtme.

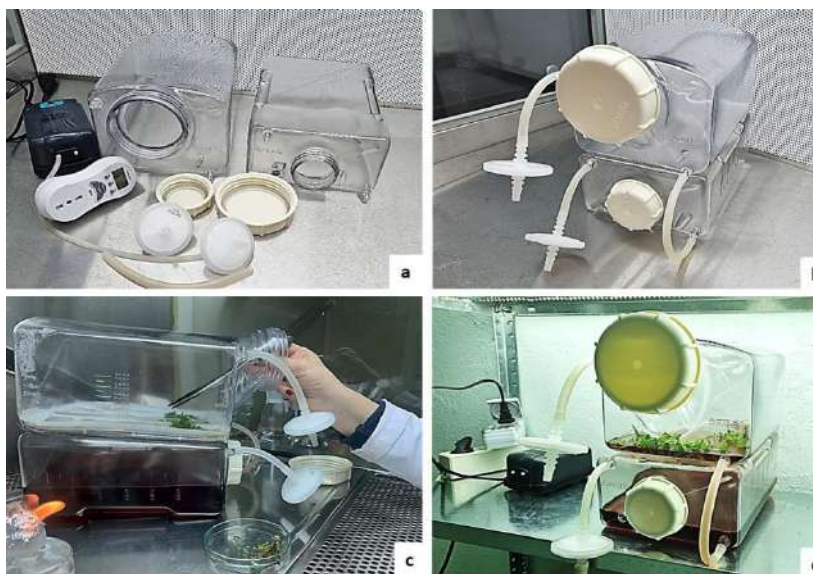


Figura 7.1. a) Pjesët përbërëse të bioreaktorit SETIS™ b) montimi i tij c) inokulimi i eksplanteve në kushte aseptike d) Kultivimi në dhomën vegjetative dhe lidhja me pompën (Laboratori i kulturave qelizore dhe indore, Departamenti i Bioteknologjisë, FSHN, UT)

7.3.2. Bioreaktori Plantform

Bioreaktori Plantform përbëhet nga një trup me përmbajtje polipropileni, i cili është transparent dhe mund të durojë temperatura deri në 130°C. Përmasat e tij janë 180 x 150 x 150 mm. Shkëmbimi i gazit kontrollonhet përmes tre hyrje- daljeve, tre tubave të posaçëm, të cilat janë të pozicionuar në njërën anë të bioreaktorit dhe të mbyllura në mënyrë hermetike nëpërmjet tre unazave me përbërje silikonit, të cilat janë rezistente

ndaj nxehtësisë. Gazet kalojnë përmes filtrave sterilë, të pozicionuar në pjesën brendshme të tubave, ku bëhet lidhja me trupin e bioreaktorit. Filtri i mesit është i lidhur me një tub silikoni, i cili futet deri në pjesën e brendshme të enës (Fig. 7.2).

Në pjesën e poshtme të bioreaktorit është e vendosur një dhomë e brendshme me 3 vrima në anën e gjatë të saj dhe 2 vrima në anën e shkurtër të saj, në të cilën vendosen eksplantet bimore. Ajo është projektuar në një mënyrë të tillë që të lejojë që përqendrimi i lëndëve ushqyese të rritet në mënyrë efikase sa herë ndryshon presioni në bioreaktor. Një kosh, i cili përmban materialin bimor, vendoset mbi dhomën e brendshme. Në pjesën e poshtme të këtij koshi gjenden tre rreshta me vrima të vogla, të cilat lejojnë që lëndët ushqyese të rrjedhin në mënyrë efikase në brendësi të koshit. Një kornizë me katër këmbë vendoset mbi kosh, ku këmbët fiksohen në bazamentin e tij, për ta mbajtur atë të palëvizshëm / të fiksuar në momentin kur rritet presioni dhe fillon ngjitja e terrenit ushqyes të lëngët. Trupi është i mbyllur nga një kapak. Midis dhomës dhe kapakut, vendoset një tub gome për mbyllje sa më hermetike. Dhoma, koshi, këmbët dhe kapaku kanë përbërje polipropilene, që janë më fleksibël dhe mund të autoklavohen në 120°C.

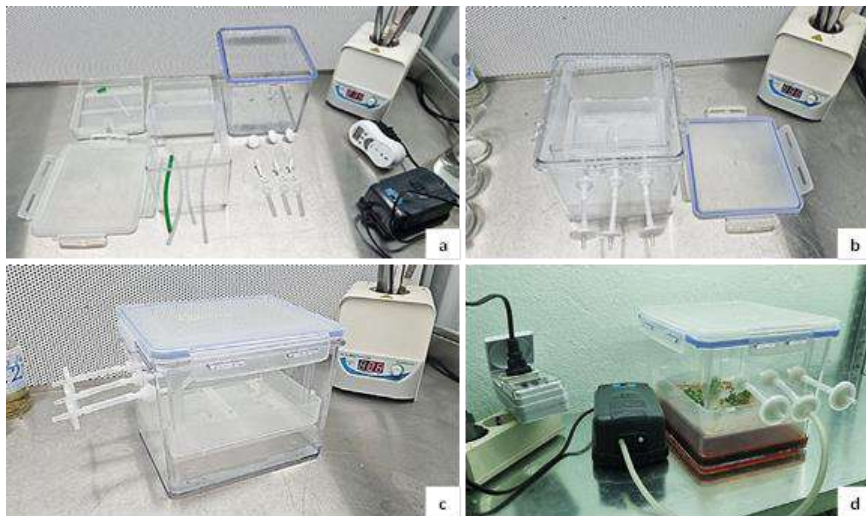


Figura 7.2. a) Pjesët përbërëse të bioreaktorit Plantform b, c) montimi i tij d) Kultivimi në dhomën vegetative dhe lidhja me pompën (Laboratori i kulturave qelizore dhe indore, Departamenti i Bioteknologjisë, FSHN, UT)

Pasi bëhet sterilizimi i të gjitha pjesëve të tij, bioreaktori është i gatshëm për t'u përdorur. Nën dhomën e brendshme, trupi i bioreaktorit mbushet përgjithësisht me 500 ml terren ushqyes. Pastaj eksplantet bimore sterile vendosen në kosh. Korniza me katër këmbë vendoset në kosh dhe kapaku mbyllet hermetikisht në pjesën e sipërme. Tubi i pompës lidhet me filtrin e mesit. Pompa është e lidhur me një programator dhe kur ajo fillon të funksionojë, terreni ushqyes i lëngët shkon lart duke mbuluar kështu materialin bimor. Kur presioni bie, lëndët ushqyese kullojnë përmes vrimave të

dhomës së brendshme në drejtim të koshit. Nëse nevojitet që terreni ushqyes të zbresë poshtë menjëherë, tubi i pompës shkëputet nga filtri i mesit dhe vendoset në një nga filtrat anësorë.

7.3.3. Bioreaktori ElecTIS

Bioreaktori ElecTIS cilësohet si më inovativ në funksionimin e tij të brendshëm. Ai përbëhet nga një material polipropileni transparent, rezistent ndaj nxehtësisë dhe mund të autoklavohet lehtësisht.

Ky bioreaktor përbëhet nga dy enë, ku e para përmban terrenin ushqyes të lëngshëm, ndërsa e dyta, që është më e vogël se e para dhe futet në këtë të fundit, është ena ku vendosen eksplantet bimore (Fig. 7.3). Pjesët përbërëse të këtij bioreaktori kanë kryesisht përbërje polipropileni.

Parimi i këtij bioreaktori qëndron në faktin se nuk është terreni ushqyes ai që lëviz nga poshtë lart, por është ena e vogël që ulet poshtë dhe zhytet në terrenin ushqyes për disa minuta sipas programimit. Ena e vogël me materialin bimor zhytet periodikisht në mjedisin ushqyes nga lëvizja vertikale e dy pistonëve të lidhur me një pompë ajri.

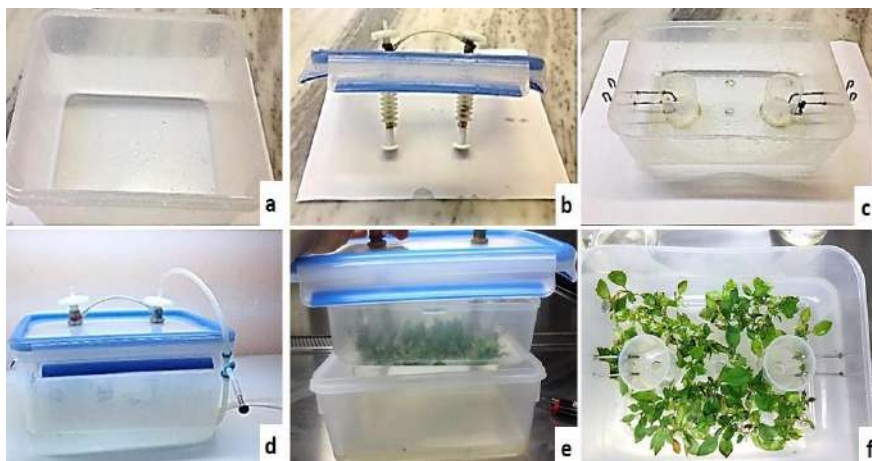


Figura 7.3. a, b, c) Pjesët përbërëse të bioreaktorit ElecTIS d) Bioreaktori ElecTIS në dhomën vegetative e, f) Pamje të bimëzave të kultivuara në të (*Laboratori i kulturave qelizore dhe indore, Departamenti i Bioteknologjisë, FSHN, UT*)

Zhytja e eksplanteve në terrenin e lëngët bëhet në sajë të një sistemi pneumatik, duke shmangur në këtë mënyrë futjen e ajrit të jashtëm në brendësi të bioreaktorit. Kjo metodë bën të mundur zhytjen e kontrolluar të kulturës në terrenin ushqyes. Zhytja e enës mbajtëse të eksplanteve, bëhet në saj të një pompe ajri që është e lidhur me bioreaktorin ElecTIS, dhe nga ana e tjetër është e lidhur me programatorin e kohës. Ky i fundit përcakton kohën e zhytjes dhe intervalet e ekspozimit të eksplanteve në terrenin ushqyes.

Protokolli 7.1: Mikroshumimi në bioreaktorët TIS

- Pjesët e bioreaktorit ambalazhohen secila më vete dhe bëhet sterilizimi i tyre në autoklavë. Për bioreaktorin SETIS™, kapakët mbyllen që përpara autoklavimit. Për bioreaktorët Plantform dhe ElecTIS, vetëm dy nga katër anët e kapakut mbyllen para autoklavimit, ndërsa dy anët e tjera të kapakut qëndrojnë të lira që të mos dëmtohet bioreaktori.
- Për secilin bioreaktor, daljet e filtrave apo tubave të vendosur nëpër kapakët apo trupin e bioreaktorit, mbështillen me letër alumini;
- Tubat e silikonit dhe filtrat sterilizohen më vete duke u vendosur në një kavanoz ose gotë kimike të mbyllur me kapak apo të paketuara me letër alumini ose ambalazhi;
- Pa u zhveshur nga ambalazhimi, pjesët e sterilizuara transferohen në fluksin laminar dhe montimi i tyre bëhet në këtë mjedis steril;
- Ena mbajtëse e terrenit mbushet me terren ushqyes, sasia e të cilit varet nga lloji i bioreaktorit. Kështu, kjo sasi është afërsisht 500 ml për bioreaktorin Plantform 750 ml për atë SETIS dhe 250 ml për atë ElecTIS;
- Terreni ushqyes është i optimizuar për stadin e subkulturës, por mund të testohen terrene të ndryshme, si në drejtim të përbërjes së tretësirave bazë, ashtu dhe raportit apo llojit të fitohormoneve / RRB-ve, shtesave të tjera të papërcaktuara, burimit të karbonit, etj.
- Merren eksplantet bimore nga bimëza të rritura *in vitro*, pra të stabilizuara përsa i përket asepsisë, dhe vendosen në enën / koshin mbajtës përkatës në përputhje me bioreaktorin që do të përdoret;
- Eksplantet peshohen para futjes në bioreaktor, si dhe pas nxjerrjes prej tij, për një periudhë të paktën 28 ditore;
- Procesi i mësipërm është i rëndësishëm për të përcaktuar Vlerën Relative të Rritjes (*Relative Growth Rate* – RGR), i cili është parametër që shërben për vlerësimin e dinamikës së rritjes në bioreaktor;
- Kapakët e bioreaktorëve mbyllen hermetikisht në mënyrë që të ruhen kushtet e asepsisë në brendësi të enëve dhe strukturave të brendshme;
- Lidhet filtri i ajrit me një tub silikonit me daljen përkatëse brenda fluksit laminar dhe pas kësaj bioreaktori transferohet në dhomën e kulturës me parametra fizikë të kontrolluar;
- Filtrat lidhen me pompa ajri nëpërmjet tubave të silikonit për të mundësuar shkëmbimin e gazeve;
- Pompat e ajrit janë të lidhura dhe me programatorët e kohës për të funksionuar sipas kohës së përzgjedhur;
- Përcaktohet ora dhe frekuenca / shpeshtësia e zhytjes në 24 orë, si dhe kohëzgjatja dhe frekuenca e ventilimit të cilat aplikohen në mënyrë automatike nëpërmjet programatorit të kohës;

Bibliografia

- Benelli, C., De Carlo, A. 2018.** *In vitro* multiplication and growth improvement of *Olea europaea* L. cv Canino with temporary immersion system (Plantform™). *3 Biotech*, 8(7), 317;
- Bhatt, A., Kansal, S., Singh, R., Sood, Ch. 2012.** Low-cost tissue culture procedures for micropropagation of apple root stocks. *International Journal of Developmental Biology*, 6(1), 67-72;
- Capuana, M., Depaoli, C., Ozudogru, A., Lambardi M. 2017.** Una nuova proposta per la coltura liquida in immersione temporanea: il bioreattore 'ElecTIS'. *Atti III Convegno Nazionale sulla Micropropagazione in Italia*, Pescia (PT), Italy;
- Etienne, H. & Berthouly, M. 2002.** Temporary immersion systems in plant micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 69(3), 215-231;
- Gatti E., Sgarbi E., Ozudogru E.A., Lambardi M. 2017.** The effect of Plantform™ bioreactor on micropropagation of *Quercus robur* in comparison to a conventional *in vitro* culture system on gelled medium, and assessment of the microenvironment influence on leaf structure. *Plant Biosystems*, 151, 1129-1136;
- Georgiev, V., Schumann, A., Pavlov, A., Bley, T. 2014.** Temporary immersion systems in plant biotechnology. *Engineering in Life Sciences*, 14, 607–621; <https://www.explanta.com/bioreactor-electis/> <https://www.plantform.se/pub/> <https://www.setis-systems.be/tis-technology>
- Lambardi, M. 2012.** Micropropagazione in coltura liquida con sistema ad immersione temporanea. *Rivista di Frutticoltura e Ortofloricoltura*, 12, 32-38;
- Mbiyu, M., Muthoni M., Kabira, J., Muchira C.H., Pwaiswai P., Ngaruiya J., John Onditi J., Otieno, S. 2012.** Comparing liquid and solid media on the growth of plantlets from three Kenyan potato cultivars. *American Journal of Experimental Agriculture*, 2(1), 81-89, 2012;
- Sota V., Benelli C., Çuko B., Papakosta E., Depaoli C., Lambardi M., Kongjika E. 2021.** Evaluation of ElecTIS bioreactor for the micropropagation of *Malus sylvestris* (L.) Mill., an important autochthonous species of Albania. *Hort. Sci. (Prague)*, 48: 12–21;
- Takayama, S., Akita, M. 1994.** The types of bioreactors used for shoots and embryos. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 39, 147-156;
- Teixeira Da Silva, J.A., Dobránszki, J. 2013.** How timing of sampling can affect the outcome of the quantitative assessment of plant organogenesis. *Scientia Horticulturae*, 159, 59–66. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2013.05.001>;
- Venutolo, S.A., Aguilar, T.S. 2015.** Mass micropropagation of *Stevia rebaudiana* Bertoni in Temporary immersion systems. *Cultivos tropicales*, 36(3), 50 – 57;
- Vyas, S. H., Rao, M. S., Suthar, R. K., Purohit, S. D. 2008.** Liquid culture system stimulates *in vitro* growth and shoot multiplication in four medicinally important plants. *Medicinal and Aromatic Plant Science and Biotechnology*, 2(2), 96-100;
- Ziv, M. 2005.** Simple bioreactors for mass propagation of plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81(3), 277;

KAPITULLI 8

Mikroshumimi në terrene me fazë të dyfishtë

8.1. Sistemet e kultivimit me fazë të dyfishtë

Gjetja dhe aplikimi i teknikave të reja për kulturat indore konsiderohet përparësi dhe prej kohësh ka marrë një vëmendje të veçantë me qëllim rritjen e efektivitetit të mikroshumimit. Pavarësisht avantazheve, prodhimi i bimëve nëpërmjet metodave konvencionale të mikroshumimit ka ende një kosto të lartë.

Një nga strategjitë e përdorura për të mikroshumuar bimë me interes është përdorimi i terrenit në fazë të dyfishtë (TFD). Metoda konsiston në shtimin periodikisht të një sasive të caktuar terreni të lëngët mbi terrenin e xhelifikuar (Fig 8.1a) në të njëjtën enë kulture. Në këtë mënyrë, zgjatet koha e nevojshme për ndërrimin e enëve dhe bimëzat nuk vuajnë mungesa ushqimore pasi terreni i lëngët i konsumuar largohet dhe terreni i ri që shtohet është i optimizuar për sa i përket përmbajtjes cilësore dhe sasiore të ushqyesve në të.

8.2. Avantazhet e kultivimit në sisteme me fazë të dyfishtë

Të tilla sisteme kultivimi rezultojnë shumë më efektive në disa raste për shkak të disa përparësive si:

- Eksplantet qëndrojnë në të njëjtën enë për një kohë më të gjatë, duke krijuar kështu mundësinë e *eliminimit ose reduktimit të numrit të subkulturave*. Subkulturat e shumta janë një ndër shkaqet kryesore të shfaqjes së infeksioneve gjatë kultivimit *in vitro*. Koha e manipulimit të eksplanteve në fluksin laminar gjatë ndërrimit të enëve të kulturës është shumë më e gjatë sesa koha e nevojshme për hedhjen e terrenit të lëngët në sistemin TFD. Kjo diferencë në kohë manipulimi bëhet shkak për rritjen e bimëve të infektuara gjatë kultivimit në terrene të xhelifikuara.
- Sa më të pakta të jenë subkulturat, *aq më e pakët është sasia e reagentëve të harxhuar* për përgatitjen e terreneve ushqyese dhe aq më e pakët është puna e personelit të laboratorit në këtë aspekt.
- *Sasia totale e terrenit ushqyes* të përdorur për kultivim në terrenet e xhelifikuara është mesatarisht 3 herë më e lartë në krahasim me atë të përdorur për kultivim në TFD. Arsyeja kryesore është eliminimi i subkulturave gjatë kultivimit në TFD, duke mbajtur të njëjtin terren të fazës së ngurtë për 50 - 60 ditë pa ndërruar enën e kulturës.
- Një aspekt tjetër i rëndësishëm është dhe *sasia totale e agarit* të përdorur gjatë ditëve të kultivimit. Për kultivimin në terrene të xhelifikuara përdoret mesatarisht 4 – 5 herë më tepër agar sesa gjatë kultivimit në TFD. Siç u theksua më lart, agari është

ndër përbërësit më të shtrenjtë të terrenit ushqyes. Tendencat më të reja sot, në drejtim të përmirësimit të teknikave të kulturës indore përfshijnë strategji të mirëfillta për pakësimin apo edhe deri në eliminimin e përdorimit të agarit për shkak të kostos së lartë.

- Realizimi i subkulturave të shpeshta kërkon sasi më të mëdha terreni ushqyes, gjë që rrit koston si për sa i përket konsumit të reagentëve, ashtu dhe *konsumit të energjisë elektrike*.
- Ndërrimi i shpeshtë i enëve të kulturës rrit edhe *kohën e punës së personelit* për këtë qëllim. Për përgatitjen e terreneve të xhelifikuara kërkohet minimalisht 1 orë pune, kjo për shkak të kohës së nevojshme për tretjen e agarit dhe shpërndarjen në enët e kulturës. Për përgatitjen e terreneve të lëngëta nevojiten mesatarisht 20 minuta punë laboratorike.
- *Sasia e enëve të kulturës* të përdorur në secilin terren kultivimi është një tjetër element i rëndësishëm që tregon efikasitetin e sistemit me fazë të dyfishtë për kultivimin *in vitro*.
- Edhe *koha e nevojshme* për larjen e enëve laboratorike shkurtohet shumë, gjë që sjell reduktim të kostos energjitiqe.

Ekzistojnë shumë pak raportime për përdorimin e terreneve me fazë të dyfishtë në kulturë *in vitro*, raportime të cilat kanë treguar efikasitetin e teknikës në fjalë për qëllime të mikroshumimit në bimë të tilla si ananasi, koniferet, dardha, etj. Në të gjitha këto raportime është përdorur i njëjti terren ushqyes si në fazën e xhelifikuar, ashtu dhe në atë të lëngët (me përjashtim të agarit), me qëllim shtimin në masë të sytheve gjatë subkulturave.

Me interes do të ishte do të ishte dhe testimi i terreneve të ndryshme për shtimin dhe rrënjëzimin në të njëjtën enë kulture. Në këtë rast, terreni i xhelifikuar duhet të ketë përmbajtje hormonale që indukon rrënjëzimin, ndërsa ai i lëngët duhet të ketë përmbajtje që indukon shtimin vegjetativ të sytheve. Një proces i tillë rezulton me kosto të reduktuar pasi njëkohësisht aplikohen dy stade të mikroshumimit, duke kursyer jo vetëm kohë pune dhe lodhje fizike, por dhe përdorim më të pakët reagentësh, enësh kulture, etj.

Protokolli 8.1: Mikroshumimi në terrene me fazë të dyfishtë

- Për të vlerësuar efektivitetin e sistemit të kultivimit me fazë të dyfishtë, zakonisht ngrihen eksperimente paralele të kultivimit në sistem njëfazor (teren ushqyes i xhelifikuar);
- Përgatitet terreni ushqyes me përmbajtje agari dhe pasi shpërndahet në enët e kulturës (epruveta, balona Erlenmajer) sterilizohet në autoklavë. Pas ftohjes së enëve të kulturës, agari xhelifikohet. Terreni ushqyes i xhelifikuar për sistemet e kultivimit me fazë të dyfishtë mund të përgatitet me përmbajtje hormonale në favor të citokininave (për të favorizuar shtimin e sytheve anësore) ose në favor të auksinave

(për të favorizuar rizogjenezën);

- Në një enë kimike përgatitet terren ushqyes pa përmbajtje agari, por me të gjitha shtesat e përbërësve të tjerë të domosdoshëm. Kjo përmbajtje sterilizohet në autoklavë. Zakonisht, terreni ushqyes i lëngët për sistemet e kultivimit me fazë të dyfishtë përgatitet me përmbajtje hormonale në favor të citokininave për të favorizuar shtimin e sytheve anësore;

- Gjithsesi, si për terrenin e xhelifikuar, ashtu dhe për atë të lëngët, mund të testohen trajtime të ndryshme, si për sa i përket tretësirave bazë, ashtu dhe raportit apo llojit të fitohormoneve / RRB-ve, shtesave të tjera të papërcaktuara, burimit të karbonit, etj.

- Si eksplante fillestare përdoren bimëza të rigjeneruara *in vitro* të cilat kanë kaluar me sukses stadin e parë të mikroshumimit, dhe janë tashmë të stabilizuara në drejtim të asepsisë dhe stresit oksidativ fillestar;

- Maten parametra morfometrikë të ndryshëm para nisjes së eksperimentit, si dhe në përfundim të tij, për të vlerësuar sistemin më efektiv të mikroshumimit apo dhe për të krahasuar efektin e trajtimeve të ndryshme të aplikuara, nëse ka të tjera të tilla;

- Pasi inokulohen eksplantet në enët e kulturës me terren të xhelifikuar, brenda enës shtohet terreni i lëngët, i cili shpërndahet mbi terrenin e xhelifikuar. Në këtë mënyrë ngrihen sistemet e kultivimit me fazë të dyfishtë;

- Nëse përdoren epruveta si enë kulture, në to shtohet 1 ml terren i lëngët, ndërsa nëse përdoren balona Erlenmayer, shtohen 3 ml. E gjithë procedura kryhet në fluksin laminar duke zbatuar rregullat e sigurimit të asepsisë;

- Gjatë stadi të subkulturës, faza e xhelifikuar dhe ajo e lëngët, kanë të njëjtin raport dhe përmbajtje hormonale pasi qëllimi në këtë fazë është rigjenerim i shpejtë dhe përftimi i një koeficienti të lartë mikroshumimi;

- Gjatë stadi të rrënjëzimit, faza e xhelifikuar përmban raport të lartë hormonal në favor të auksinave, gjë që ndihmon dediferencimin dhe shfaqjen e meristemave rrënjore në bazën e sytheve, ndërsa faza e lëngët përmban raport të lartë hormonal në favor të citokininave gjë që ndihmon zhvillimin e sytheve anësorë nga ndërrnyjet. Në shumë raste rekomandohet që terreni i fazës së xhelifikuar të errësohet duke shtuar karbon të aktivizuar në të, gjë që rrit indeksin e rizogjenezës së eksplanteve në kulturë;

- Në fillim të çdo jave, merren enët e kulturës me sistem kultivimi në fazë të dyfishtë dhe brenda fluksit laminar, largohet nëpërmjet një pipete terreni i lëngët që ndodhet brenda enës, dhe shtohet terren i lëngët i ri, i cili është i optimizuar për sa i përket përmbajtjes së ushqyesve. Kjo praktikë siguron që bimët të mos vuajnë mungesa ushqimore;

- Në mënyrë të vazhdueshme realizohen vërtetime dhe fotografime për të analizuar më mirë dinamikën e rritjes në sistemet e kultivimit të testuara;

- Gjatë eksperimenteve paralele të kultivimit në sisteme me fazë të dyfishtë (Fig. 8.1 a, b) dhe në sisteme të xhelifikuara (njëfazore) (Fig. 8.1 c, d), bëhen krahasime të të dhënave të fituara për të vlerësuar efektivitetin e sistemit të mikroshumimit;



Figura 8.1. Rigjenerimi *in vitro* i sytheve të mollës së egër (*Malus sylvestris* L) në **a, b)** Terren ushqyes me fazë të dyfishtë **c, d)** Terren ushqyes të xhelifikuar (njëfazor) (Laboratori i kulturave gelizore dhe indore, FSHN, UT)

Bibliografia

- Couselo, J.L., Varela, P., Rey, M. 2006.** Effect of benzyladenine concentration and double- phase culture system on *in vitro* multiplication of adult Albari plants. *American Journal of Enology and Viticulture*, 57: 109-112;
- Gupta, N., Jain, V., Joseph, M., Devi, S. 2020.** A Review on micropropagation culture method. *Asian J. Pharm.* 8: 86-93;
- Lopez, C., Suarez, I. 2018.** *In vitro* arrow cane (*Gynerium sagittatum* Aubl.) multiplication in double phase médium. *Revista de Ciencias Agrícolas*, 35(2): 5-13;
- Mahmad, N., Taha, R.M., Othman, R., Saleh, A., Hasbullah, N.A., Elias, H. 2014.** Effects of NAA and BAP, double-layered media, and light distance on *in vitro* regeneration of *Nelumbo nucifera* Gaertn. (Lotus), an aquatic edible plant. - *The Scientific World Journal*, 2014, 1 – 8;
- Oliveira, S.O.D., Saydb, R.M., Balzonc, T.A., Scherwinski-Pereira, J.E. 2013.** A new procedure for *in vitro* propagation of vanilla (*Vanilla planifolia*) using a double-phase culture system. *Scientia Horticulturae*, 161: 204–209;
- Rodriguez, R., Diaz-Sala, C., Cuozzo, L., Ancora G. 1991.** Pear *in vitro* propagation using a double-phase culture system. *HortScience*, 26(1): 62-64. 1991;
- Scherwinski-Pereira, J.E., Lima, .Ec.A., Da Silva, T.L., Mesquita, A.G.G., Maciel, S.A., Costa, F.H.S. 2012.** Double-phase culture system for large scale production of pineapple. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 109 (2): 263-269;
- Senapati, S.K. 2015.** A double phase culture system: an economic and time saving protocol for *in vitro* propagation of plant. *SAJ Biotechnol.* 2: 101. doi: 10.18875/2375-6713.1.301;
- Sota, V., Benelli, C., Çuko, B., Kongjika, E. 2021.** “Effective use of a double phase culture system and activated charcoal on *in vitro* propagation of *Malus sylvestris* (L) Mill.” *Advances in horticultural Science*, 35(4): 361 – 365.

KAPITULLI 9

Mikroshumimi në terrene të lëngëta me urë prej letre filtri

9.1. Përdorimi i urës prej letre filtri si sistem mbështetës për eksplantet dhe avantazhet e teknikës

Siç u përmend në kapitujt e mëparshëm, përveç sistemeve të kultivimit në terren të xhelifikuar, gjerësisht përdoren me efektivitet edhe sistemet e kultivimit në terrene të lëngëta, siç është kultivimi në bioreaktorë apo në sistemet me fazë të dyfishtë. Në shumë raste, terrenet e lëngëta paraqesin avantazhe në krahasim me ato të xhelifikuara, veçanërisht në drejtim të përthithjes më të lehtë të lëndëve ushqyese nga terreni. Por, pavarësisht avantazheve të secilës formë kultivimi, është e ditur se reagimi i gjenotipeve të caktuar është i ndryshëm në sisteme të ndryshme të kultivimit dhe në shumë specie bimore, këto forma kultivimi mund të paraqesin disa kufizime. Kështu p.sh. në disa gjenotipe, vërehet dukuria e hiperhidratimit si pasojë e përbërjes së terrenit ushqyes, zhytjes së plotë apo të pjesshme të eksplanteve në terrenin ushqyes të lëngët, formës dhe përmasës së enës së kulturës, etj.

Hiperhidratimi është çrregullimi fiziologjik më i zakonshëm në kultivimin *in vitro* të bimëve që rezulton në hidratim të tepërt të indeve bimore, linjifikim të ulët, aparat stomatal jo funksional dhe reduktim të forcës mekanike të bimëve të krijuara nga kultura indore. Kjo gjendje karakterizohet nga disa çrregullime anatomike, morfologjike, fiziologjike dhe metabolike. Faktorët kryesorë që ndikojnë në nivelin e hiperhidratimit të bimëve të kultivuara *in vitro* janë përbërja minerale dhe hormonale e një mjedisi dhe kushtet e kultivimit, veçanërisht ajrimi i enëve të kultivimit.

Kur përdoren terrene të lëngëta, për fiksimin e eksplanteve mund të përdoren mbështetës të natyrës fizike që sigurojnë një përthithje efektive të terrenit ushqyes të lëngët. Një teknikë e tillë është dhe vendosja në enën e kulturës të një shiriti letre filtri në formë ure, ku ‘këmbët’ e urës janë të zhytura në terrenin e lëngët, ndërsa në pjesën e ‘bazës’ së urës pozicionohet eksplanti bimore. Letra e filtrit, një mjet i përbërë nga fibra pambuku, gjendet pothuajse në shumicën e laboratorëve shkencorë e didaktikë dhe përveçse për të ndarë lëngun nga grimcat, përdoret gjerësisht për qëllime të ndryshme. Për shkak të kapilaritetit që ka letra e filtrit, terreni ushqyes përthithet fillimisht prej saj dhe më tej nga eksplanti. Fakti që përdoret terren i lëngët, mundëson që eksplantet të stabilizohen më lehtë dhe në lidhje me stresin oksidativ. Lëndët e formuara si pasojë e këtij procesi mund të shpërndahen më me lehtësi duke u larguar nga eksplanti, duke favorizuar kështu proliferimin e tyre në kulturë. Veç kësaj,

fakti që eksplanti nuk është i zhytur në terren të lëngët, por e përthith atë gradualisht nëpërmjet letrës së filtrit, redukton ndjeshëm dukurinë e hiperhidratimit në shumë specie bimore.

Kjo teknikë fillimisht është përdorur për raste të veçanta, por tashmë ka filluar të aplikohet gjerësisht në laboratorët e kulturave *in vitro*. Zakonisht, teknika me letër filtri si sistem mbështetës aplikohet në stadin e parë të mikroshumimit, me qëllim stabilizimin efektiv të eksplanteve në kulturë për sa i takon kapërcimit të stresit oksidativ, si dhe ruajtjes së potencialit rigjenerues të eksplanteve delikate, siç janë p.sh. meristemat apo embrionet e pamaturuar. Deri më sot ekzistojnë shumë raportime për përdorimin e teknikës së urës së filtrit për mikroshumimin dhe konservimin e specieve të ndryshme bimore, duke theksuar efektivitetin e kësaj teknike në proceset e lartpërmendura. Kjo teknikë është përdorur me efektivitet në proliferimin e disa eksplanteve në Laboratorin e Kulturave Qelizore dhe Indore, FSHN, UT.

9.2. Avantazhet e kultivimit në terrene të lëngëta me letër filtri si sistem mbështetës

Duke qenë se përdoren terrene të lëngëta, edhe në këtë sistem kultivimi vërehen pothuajse të njëjtat avantazhe si në rastet e tjera të përdorimit të terreneve të tilla, pavarësisht teknikës së përdorur. Në mënyrë të përmblodhur, disa nga avantazhet e kultivimit në terrene të lëngëta me letër filtri si sistem mbështetës janë:

- Nuk është nevoja që materiali bimor të kalohet nga një enë kulture në tjetrën, por mjafton të largohet nëpërmjet një pipete terreni i enës ku eksplanti ndodhet dhe të zëvendësohet me terrenin e ri duke shmangur kështu mundësinë e dëmtimit apo infektimit të mundshëm të materialit.
- Duke u reduktuar nevoja për subkultura të vazhdueshme të materialit në enë të reja kulture të cilat duhen sterilizuar para përdorimit, reduktohet akoma më shumë kostoja e teknikës së aplikuar.
- Edhe kostoja në përdorimin e reagentëve kimikë rezulton më e ulët pasi terreni ushqyes nuk përmban agar.

Pavarësisht avantazheve, duhet thënë se nevojitet kujdes dhe një kohë pune e caktuar për futjen e letrave prej filtri në enët e kulturës para shtimit të terrenit ushqyes, si dhe para sterilizimit të tyre.

Protokolli 9.1: Mikroshumimi në terrene të lëngëta me urë filtri si sistem mbështetës të eksplanteve

- Në një gotë kimike përgatitet terren ushqyes i lëngët (pa përmbajtje agari), por me të gjitha shtesat e përbërësve të tjerë të domosdoshëm;
- Zakonisht, ky lloj terreni ushqyes përgatitet me përmbajtje hormonale në favor të

citokininave për të favorizuar shtimin e sytheve anësore. Gjithsesi, mund të testohen trajtime të ndryshme të tretësirave bazë, raportit apo llojit të hormoneve, shtesave të tjera të papërcaktuara, burimit të karbonit, etj.;

- Kur përdoret letra e filtrit si sistem mbështetës, terreni i lëngët shpërndahet në enët e kulturës para autoklavimit të tij. Zakonisht, në këtë teknikë, si enë kulture përdoren shishe të vogla ose epruveta, me qëllim inokulimin e vetëm të një eksplanti në një enë kulture;
- Merren tabakët e filtrit dhe priten në shirita me gjerësi të tillë që të mund të futen lehtësisht në enën e kulturës, dhe mundësisht skajet të prekin paretet anësore të enës për të siguruar qëndrueshmëri më të lartë.
- Letrat e filtrit futen në enët e kulturës duke u pozicionuar në formën e një ure me trashësi 1 cm dhe lartësi 6-7 cm (Fig. 9.1 a);
- Më pas, nëpër enë bëhet shpërndarja e terrenit ushqyes në një sasi të tillë që të paktën 1/3 e lartësisë së urës prej filtri të qëndrojnë mbi tretësirën ushqyese;
- Pasi mbyllen me kapakët përkatës apo me pambuk jo hidrophil, enët e kulturës sterilizohen në autoklavë (121°C / 20min);
- Si eksplante fillestare përdoren embrione zigotike ose meristema, pasi të parat zakonisht shfaqin shenja të stresit oksidativ të cilat reduktohen me këtë teknikë, ndërsa të dytat janë eksplante delikatë dhe kjo teknikë mundëson ruajtjen e potencialit rigjenerues të tyre;
- Pas zbatimit të protokollit të sterilizimit të eksplanteve, këto të fundit inokulohen në terrenet e përgatitura. E gjithë procedura kryhet në kushte aseptike në fluksin laminar (Fig. 9.1 b);
- Për të verifikuar efektivitetin e kësaj teknike, rekomandohet që së paku në fazën fillestare të stabilizimit të protokollit, të ngrihet paralelisht një tjetër eksperiment me terren të xhelifikuar, por me përmbajtje të njëjtë për sa i takon shtesave të tjera;



Figura 9.1. a) Pajisja e enëve të kulturës me urat e filtrit **b)** Inokulimi i embrioneve të grurir (*Triticum aestivum* L) në terrenet e lëngëta mbi 'bazën e urës së letrës së filtrit (Laboratori i kulturave qelizore dhe indore, Departamenti i Bioteknologjisë, FSHN, UT)

Bibliografia

- Alam, I., Sharmin, S.A., Naher, K., Alam, J., Anisuzzaman, M., Alam, M.F. 2013.** Elimination and detection of viruses in meristem-derived plantlets of sweetpotato as a low- cost option toward commercialization. *3 Biotech.* 3(2): 153-164;
- Blidar, C.F., Ardelean, A., Turcus, V. 2012.** Using The Filter Paper Bridge technique for the initiation of *in vitro* cultures of Maize. *Analele Universitatii din Oradea- Fascicula Biologie*, 19(1): 17-22;
- Lal, N., Ahuja, P. S. 1993.** Assessment of liquid culture procedures for *in vitro* propagation of *Rheum emodi*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 34(2): 223-226.
- Mbiyu, M., Muthoni, J., Kabira, J., Muchira, C., Pwaipwai, P., Ngaruiya, J., Onditi, J., Otieno, S. 2012.** Comparing liquid and solid media on the growth of plantlets from three Kenyan potato cultivars. *American Journal of Experimental Agriculture*, 2(1): 81-89.
- Mohmand, S.A., Nabors, M.W. 1991.** Comparison of two methods for callus culture and plant regeneration in wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 26(3): 185-187;
- Preil, W., Eide, A.K.H. 2005.** Liquid Culture Systems for *in vitro* Plant Propagation. Springer; 1st ed. 2005, 606 pg.;
- Sarker, I., Islam, J., Shaekh, M.P.E., Rahman, M. M., Khan, H., Mukim, M.S. I., Islam, R., Haque, R. 2015.** Establishment of a standart protocol for *in vitro* meristem culture and plant regeneration of *Citrus aurantifolia*. *Journal of Pharmacy and Biological Sciences*, 10(2): 61-69;
- Shetty, K., Paliyath, G., Pometto, A., Levin, R.E. 2005.** Food Biotechnology. Second Edition, pp. 582-583;
- Smith. S. H., Hilton, R. E., Frazier, N.W. 1970.** Meristem culture for elimination of strawberry viruses. *Californian Agriculture*, 24(8): 9-10;
- Sutan, A.N., Popescu, A., Isac, V. 2012.** The effect of *in vitro* environmental condition on organogenetic potential of two intergeneric hybrids *Fragaria X Potentilla*. *Analele Universitatii din Oradea- Fascicula Biologie*, 19(1): 48-54;

KAPITULLI 10

Embriogjeneza somatike

10.1. Embriogjeneza somatike: rëndësia dhe stadet e saj

Embriogjeneza somatike është procesi i formimit të embrioneve somatike nga një qelizë e vetme ose nga një grup qelizash me origjinë somatike. Rrjedhimisht, klasifikohet si formë e shumimit aseksual duke mundësuar formimin e bimëve identike nga bima mëmë. Embriogjeneza somatike ngjason me atë zigotike për sa i përket stadeve nëpër të cilat kalon zhvillimi embrional deri në marrjen e morfologjisë finale të tij.

Ky konsiderohet si një proces i rëndësishëm për shkak të efikasitetit të lartë të rigjenerimit, si dhe frekuencës së ulët të shfaqjes së variacioneve somaklonale. Embriogjeneza somatike luan një rol kyç në shumimin klonal *in vitro*, si dhe për ruajtjen dhe shkëmbimin e gjermoplazmës, shëndetësimin e materialit bimor, prodhimin e metabolitëve sekondarë dhe prodhimin e farave sintetike. Embriogjeneza somatike, ashtu sikurse organogjeneza, mund të përfshijë ose jo fazën e kallusogjenezës. Procesi i embriogjenezës somatike ndahet në tri stade:

- (i) induktimi i qelizave kompetente të eksplantit,
- (ii) zhvillimi i embrioneve somatike;
- (iii) maturimi i tyre.

Induktimi i procesit kërkon si parakusht të domosdoshëm dediferencimin e qelizave të eksplantit, në mënyrë që ato të fitojnë kompetencë embriogjenike. Ky riprogramim qelizor do të mundësojë kanalizimin drejt rrugës embriogjenike, nëse këto qeliza do të vendosen në kushte të përshtatshme për këtë qëllim. Stresi për shkak të plagosjes, kushtet e kulturës *in vitro* janë faktorë që luajnë rol kryesor në dediferencim..

Zhvillimi i embrioneve somatike fillon me fazën globulare dhe më tej kalon nëpër fazat tipike të embriogjenezës, përkatësisht stadi globular, stadi në formë zemre, stadi i torpedos dhe stadi kotiledonar. Me arritjen e formës përfundimtare, përfundon procesi i formimit të embrioneve somatike.

Maturimi përfshin grumbullimin e lëndëve rezervë, ndalimin e rritjes dhe fitimin e tolerancës ndaj tharjes. Ndryshe nga embriogjeneza zigotike ku maturimi ndodh spontanisht, në embriogjenezën somatike ky proces nxitet duke vendosur embrionet somatikë në tretësira me potencial osmotik të ulët, të cilat shkaktojnë dehidratim të tyre (p.sh. tretësira me përqendrim të lartë të karbohidrateve, alkooleve sheqerore, etj.), ose duke aplikuar acidin abshisik (ABA).

10.2. Kushtet e nevojshme për induktimin, zhvillimin dhe maturimin e embrioneve somatike

Për një specie të caktuar, efektiviteti në formimin e embrioneve somatike varet nga gjenotipi, pasi vërehet një variacion i madh në përgjigjet midis kultivarëve.

Faktor ndikues i rëndësishëm është dhe përzgjedhja e eksplantit më efektiv për këtë qëllim. Embrionet zigotike (ose indet e tjera në gjendje meristematike) janë burimet më të kërkuara të indeve, megjithatë në disa raste, këto eksplante mund të jenë të vështirë për t'u izoluar. Në specie që rigjenerohen lehtë, dhe pjesë bimore të tjera, si p.sh. gjethet, rrënjët, bishtat e gjetheve, kërcejt, etj. mund të përdoren me mjaft efektivitet si eksplante fillestare.

Terrenet ushqyese duhet të kenë përbërësit kryesorë për rritjen e bimëve, një burim karboni dhe fitohormonet e përshtatshëm për rritjen e eksplantit dhe për induktimin e embrioneve somatike. Megjithëse janë përdorur shumë terrene ushqyese, disa prej tyre janë më efektive, si Gamborg (terreni B5), Murashige & Skoog (MS), Nitsch & Nitsch ose Schenk & Hildebrandt (SH). Pavarësisht se terreni bazë mund të ndikojë në përgjigjen e hormoneve, rregullatorët bimore të rritjes janë faktorët vendimtarë të embriogjenezës somatike. Hormonet më të rëndësishme për induktimin e embriogjenezës somatike janë auksinat, të cilat stimulojnë formimin e masave paraembriogjenike, grumbuj qelizash brenda popullatës qelizore që fitojnë kompetencën për të formuar embrionet somatike. Disa specie bimore formojnë embrione somatike duke përdorur vetëm auksina si rregullatorë të rritjes, por specie të tjera kërkojnë edhe citokinina. Acidi abshisik përdoret gjerësisht në stadin e maturimit të embrioneve somatikë, ndërsa acidi giberelik (GA₃), në stadin e mbirjes së tyre dhe fitimit të bimëve të plota.

Raportime të ndryshme paraqesin modifikime të shumta për sa i takon përmbajtjes së terrenit ushqyes në tipe dhe raporte përbërësish organikë dhe inorganikë, apo përdorimit të stimujve të ndryshëm të natyrës fizike apo kimike, në mënyrë që të optimizohet një protokoll në varësi të gjenotipit, sepse riprogramimi i qelizave të specieve bimore të ndryshme është mjaft specifik për secilin rast.

Protokolli 10.1: Induktimi i embriogjenezës somatike

- Fillimisht përgatitet terreni ushqyes sipas procedurës së paraqitur në Kapitullin 4.
- Për sa i përket përmbajtjes minerale dhe vitaminike, mund të përdoren dhe të testohen tretësira bazale të ndryshme, për të gjetur tretësirën më efektive në varësi të gjenotipit të përzgjedhur. Në shumë raste, kripërat e makro- dhe mikroelementëve janë të përgjysmuara në përqendrimin e tyre;
- Raportimet e shumë autorëve tregojnë një kufi mjaft të gjerë të auksinave të përdorura për induktimin e embriogjenezës somatike në shumë specie bimore. Kështu, përqendrimi i acidit 2,4-diklorofenoksiacetik (2,4-D) mund të variojë 5 - 60 mg/l dhe ai i acidit naftaleneacetik (ANA) mund të jetë 20 - 50 mg/l. Në disa raste

shtohet dhe benzil amino purinë (BAP) përqendrimi i së cilës gjithashtu mund të variojë në vlerat 0.05 – 10 mg/l.. Përveç përqendrimit, edhe tipi dhe raporti hormonal mund të ndryshojë në varësi të species bimore;

- Prandaj, është e nevojshme të testohen dhe të krahasohen kombinime dhe tipe të ndryshme rregullatorësh rritjeje për këtë qëllim. Por, e rëndësishme është të përdoret një përqendrim mjaft i lartë i auksinave, të cilat mundësojnë riprogramimin e qelizave somatike për t'u kthyer në embriogjenike;

- Shtohet burimi i karbonit, agjenti xhelifikues, si dhe standardizohet vlera e pH në 5.7 – 5.8. Pas kësaj, terreni sterilizohet në autoklavë dhe më tej shpërndahet në pjatë Petri në fluksin laminar;

- Si eksplante fillestare, mund të përzgjidhen inde nga bimëza të rritura *in vitro*, të cilat janë të stabilizuara përsa i përket asepsisë dhe stresit oksidativ. Sidoqoftë, në raste specifike mund të përdoren dhe inde të marra nga bimë të rritura *in vivo*, të cilat duhet t'i nënshtrohen procedurave të sterilizimit të eksplanteve (Shih: Protokoll 5.1);

- Për induktimin e embriogjenezës somatike mund të përdoren shumë lloje eksplantesh si: embrione zigotike, kotiledone, inde gjetnore e kërcellore, pjesë rrënjore, etj.;

- Inokulohen eksplantet në pjatë Petri që përmbajnë terrenin ushqyes. Vendosen rreth 6 eksplante në çdo pjatë, duke u pozicionuar mbi terrenin ushqyes në mënyrë të tillë që të mos zhyten thellë në të;

- Mbështillen pjatat me parafilm dhe vendosen në errësirë në temperaturë 27°C për 4 - 5 javë;

- Pas 4 - 5 javësh, kulturat transferohen në dritë ($50 - 60 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ dhe fotoperiodë 16 orë ndriçim / 24 orë) dhe në temperaturë 26°C për 5 javë;

- Kulturat e kalluseve monitorohen në mënyrë të vazhdueshme për rritjen dhe ndotjen / infektimin e mundshëm;

- Gjatë qëndrimit në këto kushte, eksplantet formojnë kalluse (Fig. 10.1 a, b). Mund të ndodhë që në eksplant të vërehet formimi i kalluseve të ndryshme: embriogjenike dhe joembriogjenike. Të parat dallohen sepse kanë një ngjyrë kremi / të zbardhur të lehtë, ndërsa të dytat kanë ngjyrë kafe të errët;

Protokoll 10.2: Zhvillimi i embrioneve somatike

- Përgatitet terreni ushqyes i përshtatshëm për zhvillimin e embrioneve somatike. Ekzistojnë modifikime të ndryshme të terrenit në këtë fazë, në varësi kjo të gjenotipit, por kryesisht, ato karakterizohen nga mungesa e fitohormoneve dhe rregullatorëve të rritjes;

- Një karakteristikë tjetër që bashkon terrenet në këtë fazë është rritja e përqendrimit të sakarozës, si dhe shtimi i karbonit aktiv në përqendrimin 0.5 g/l. pH stabilizohet në vlerën 5.8;

- Zakonisht, terreni në këtë fazë është i xhelifikuar, por mund të përdoret edhe terren

i lëngët në tundje të vazhdueshme nëpërmjet një tundësi orbital;

- Nëpërmjet stereomikroskopit, izolohehen kalluset embriogjenike dhe transferohen në terrenin e zhvillimit të embrioneve somatike. Kjo është e domosdoshme për kanalizimin e masave paraembrionale dhe shndërrimin e tyre në masa qelizore embriogjenike;

- Këto masa qelizore mbahen në këtë terren për 3 – 4 javë. Pas kësaj, ato transferohen në terren të freskët. Embrionet mund të mbahen në këtë terren për një periudhë disa muaj duke realizuar vrojtime dhe monitorime të vazhdueshme për të parë nevojën e transferimit në terrene të tjera;

- Embrionet e para zakonisht shfaqen pas rreth 5 javësh. Formimi i embrioneve somatike nuk është proces i sinkronizuar dhe në të njëjtin eksplant mund të vërehen embrione në faza të ndryshme zhvillimi (nga stadi globular në atë kotiledonar). Për këtë arsye, duhet bërë ndarja e tyre në varësi të stadi të zhvillimit që ata paraqesin;

- Në stadin pasues, atë të maturimit, duhet të transferohen vetëm embrione që kanë arritur fazën kotiledonare (Fig. 10.1 c) pasi në këtë mënyrë shmanget mbirja e parakohshme në kulturë, gjë që do të sillte vlerë të ulët të potencialit rigjenerues të bimëzave të fituara;

Protokolli 10.3: Maturimi i embrioneve somatike dhe mbirja e tyre

- Për maturimin e embrioneve somatike, fillimisht përgatitet terreni ushqyes që mundëson këtë proces.

- **Terreni i maturimit të embrioneve somatike:** Mund të përzgjidhen tretësira bazale të ndryshme për këtë stad, por në to shtohet:

- 18 mg/l acid abshisik (ABA);
- % (g/v) polietilen glikol (PEG) 4000;
- 0.05 % (g/v) hidrolizat kazeine;
- 250 – 1000 mg/l L-glutaminë;
- 1,5 g/l karbon aktiv;
- 30 g/l sakarozë ose maltozë.

Sidoqoftë, këta përbërës mund të variojnë midis protokolleve të ndryshme, kushtëzuar nga gjenotipi;

- Embrionet somatike në fazën kotiledonare transferohen në terrenin ushqyes të maturimit, në kushte aseptike në fluksin laminar (Fig. 10.1 c);

- Përgjithësisht, kulturat në këtë fazë inkubohen në errësirë në temperaturë 24°C për 4 javë. Nëse është e nevojshme, gjatë kësaj kohe mund të transferohen në terrene ushqyese të freskëta me të njëjtën përmbajtje;

- Për të shndërruar embrionet somatike të maturuara në bimë të plota, ato transferohen në terrenin ushqyes të mbirjes;

- **Terreni i mbirjes së embrioneve somatike të maturuara:** Në këtë stad, terreni ushqyes ka një përmbajtje mjaft të thjeshtë. Zakonisht është pa hormone ose rregullatorë rritjeje, por ndonjëherë mund të shtohet citokininë dhe auksinë në raportin 10 : 1. Burimi i karbonit (sakarozë, glukozë ose maltozë) mund të shtohet në vlerën 20 – 30 g/l, dhe zakonisht ky është terren i xhelifikuar me agar ose ndonjë agjent tjetër xhelifikues;
- Embrionet somatike të maturuara transferohen në terrenin e mbirjes dhe këto kultura inkubohen për rreth 4 javë në temperaturë $25 \pm 2^\circ\text{C}$ nën një fotoperiodë 16-orëshe, me intensitet ndriçimi $50\text{-}60 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ të siguruara nga llambat fluoreshente të bardha);
- Gjatë kësaj periudhe embrionet somatike do të proliferojnë. Duke qenë se janë struktura bipolare, do të vërehet organogjenezë e sythit të majës dhe organogjenezë e rrënjës, duke formuar kështu bimë të plota (Fig. 10.1 d);
- Pas kësaj periudhe, bimëzat e fituara i nënshtrohen procesit të aklimatizimit sipas procedurave të trajtuara në protokolli përkatës;
- Përpara transferimit në vazo me dhë të lagur, rrënjët e bimëzave pastrohen me kujdes nga agari me ujë çezme. Pas mbjelljes, ato mbulohen me polietilen. Vazot vendosen në dritë (12 -14 orë fotoperiodë) në dhomën e kulturës ose në një mjedis të kontrolluar (Shih: Protokolli 6.4);
- Për çdo stad realizohen fotografi me ndihmën e aparatit fotografik apo stereomikroskopit. Të dhënat për numrin e embrioneve somatikë në çdo eksplant fillestar, madhësia e embrioneve dhe bimëzave të reja paraqiten nëpër pasqyra dhe ndërtohen grafikët përkatës, mbi bazën e të cilëve bëhet interpretimi dhe diskutimi mbi të dhënat e fituara;

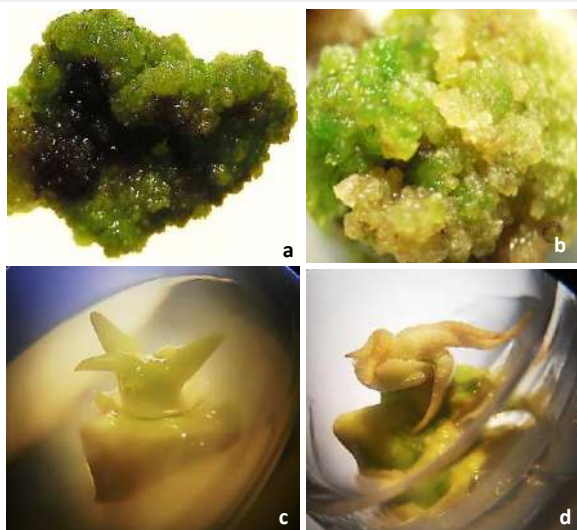


Figura 10.1. a, b) Kalluse embriogjenikë nga kulturat rrënjore të shegës (*Punica granatum* L.) c) Embrion somatik në stadin kotiledonar i bajames së egër (*Prunus webbii* L.) d) Mbirja e embrioneve somatikë të bajames së egër (Laboratori i kulturave qelizore dhe indore, Departamenti i Bioteknologjisë, FSHN, UT)

Bibliografia

- Dhekney, S.A., Li Z.H.T., Grant, T.N.L., Gray, D.J. 2016.** Somatic Embryogenesis and Genetic Modification of Vitis. In: *In vitro* Embryogenesis in Higher Plants, Springer New York Heidelberg Dordrecht London, pg. 263 – 278;
- Dhekney, S.A., Li, Z.T., Gray, D.J. 2011.** Factors influencing induction and maintenance of Vitis rotundifolia Michx. embryogenic cultures. *Plant Cell Tissue Organ Cult* 105: 175–180;
- Feher, A., Pasternak, T., Otvos, K., Miskolczi, P., Dudits, D. 2002.** Induction of embryogenic competence in somatic plant cells: a review. *Biologia* 57:5–12;
- Krajňáková, J., Häggman, H., Gömöry, D. 2009.** Effect of sucrose concentration, polyethylene glycol and activated charcoal on maturation and regeneration of Abies cephalonica somatic embryos. *Plant Cell Tiss Org Cult.*, 96: 251–262;
- Kumria, R., Sunnichan, V.G., Das, D.K., Gupta, S.K., Reddy, V.S., Bhatnagar, R.K. et al. 2003.** High-frequency somatic embryo production and maturation into normal plants in cotton (*Gossypium hirsutum*) through metabolic stress. *Plant Cell Rep* 21: 635–639;
- Namasivayam, P. 2007.** Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Org Cult* 90:1–8;
- Williams, E.G., Maheswaran, G. 1986.** Somatic embryogenesis: factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. *Ann Bot* 57:443–462;
- Zavattieri, M.A., Frederico, A.M., Lima, M., Sabino, R., Arnholdt-Schmitt, B. 2010.** Induction of somatic embryogenesis as an example of stress-related plant reactions. *Electronic Journal of Biotechnology* 13(1);
- Perez-Nunez, M.T., Chan, J.L., Saenz, L., Gonzalez, T., Verdeil, J.L., Oropeza, C. 2006.** Improved somatic embryogenesis from Cocos nucifera (L.) plumule explants. *In vitro Cell Dev Biol Plant*, 42:37–43;

KAPITULLI 11

Teknologjia e farave sintetike

11.1. Farat sintetike dhe avantazhet e tyre

Farat sintetike, të quajtura dhe fara artificiale, janë zakonisht embrione somatike apo çdo lloj materiali vegjetativ bimor i inkapsuluar. Eksplantet inkapsulohen brenda një kapsule prej algjinati, që i mbron nga kontaminimi ose dëmtimi dhe i furnizon me lëndë ushqyese, duke favorizuar mbirjen. Për këtë qëllim janë testuar shumë agjentë xhelifikues, por algjinati i natriumit është ai më efektiv për shkak të kostos së ulët, natyrës jotoksike të tij, si dhe cilësive xhelifikuese.

Zhvillimi i teknologjisë së prodhimit të farave sintetike aktualisht konsiderohet si një metodë efektive dhe alternative e shumimit dhe e konservimit të specieve bimore me interes, dhe është aplikuar në shumë specie bimore me rëndësi si: bimët frutore, drithërat, erëzat, bimët zbukuruese, bimët mjekësore, etj. Teknologjia e inkapsulimit (fara sintetike) konsiderohet një metodë me shumë avantazhe, që mund të përdoret për transportin dhe shkëmbimin e materialeve bimore midis laboratoreve të kulturës indore dhe gjithashtu, për konservimin e gjermoplazmës e specieve me rëndësi ekonomike.

Parametrat e inkapsulimit, dehidratimit, temperatura e ruajtjes dhe koha e ruajtjes, janë parametra që duhet të optimizohen për speciet e përzgjedhura, pasi për konservimin e gjermoplazmës bimore është e rëndësishme të arrihet një optimum midis zgjatjes së kohës së konservimit, ruajtjes së gjallërisë dhe stabilitetit gjenetik të eksplanteve. Disa nga përparësitë kryesore të farave sintetike janë:

- Kanë përmasa të vogla, prandaj nuk kërkojnë hapësira të mëdha për ruajtje;
- Prodhohen në kushte aseptike dhe brenda tyre mund të inkapsulohen eksplante të shëndetësuar;
- Transportohen lehtësisht dhe kostoja e transportit është e ulët;
- Përdoren për ruajtjen e specieve bimore të rrezikuara dhe për ruajtjen e varieteteve që nuk prodhojnë farë;
- Prodhohen gjatë gjithë vitit në kushte laboratorike, duke eliminuar efektin e sezoneve;
- Përdoren për ruajtjen afatshkurtër, afatmesme dhe afatgjatë të gjermoplazmës;
- Ruajnë stabilitetin gjenetik të bimëve;
- Përdoren për përhapjen e bimëve në shkallë të gjerë;

11.2 Formimi i farave sintetike dhe rigjenerimi i bimëve të plota

11.2.1. Formimi i farave sintetike

Prodhimi i farave sintetike është një proces mjaft kompleks dhe përfshin këto stade:

- Përzgjedhja e materialit bimore;
- Formimi i embrioneve somatike ose organeve nëpërmjet embriogjenezës somatike ose organogjenezës;
- Inkapsulimi ose ndërfutja në kapsula algjinati;
- Prodhimi i farave sintetike;
- Testimi i aftësisë së farave sintetike për të rigjeneruar bimët;
- Ruajtja ruajtja, nëse qëllimi i formimit të tyre është konservimi afatmesëm ose afatgjatë i bimëve.

Që të optimizohet një proces inkapsulimi, nevojitet përzgjedhja dhe vlerësimi i shumë faktorëve, disa prej të cilëve janë:

a) Eksplantet bimore: eksplantet bimore të përdorura fillimisht për prodhimin e farave sintetike kanë qenë embrionet somatike, por në ditët e sotme, për këtë qëllim, mund të përdoren pjesë të ndryshme vegjetative. Për prodhimin e farave sintetike, gjithmonë përdoren struktura të organizuara në mënyrë që të ruhet stabiliteti gjenetik i bimëve. Pavarësisht se sythet e majës apo ato anësorë të përdorur nuk kanë rrënjë, ato mund të rigjenerohen në bimë të plota në kushte *in vitro*.

b) Agjentët xhelifikues: Thelbi i teknikës qëndron në futjen e materialeve bimore brenda kapsulave të xhelifikuara. Prej vitesh është përdorur një numër i madh agjentësh xhelifikues, secili me avantazhet apo disavantazhet e veta. Është mjaft e rëndësishme që kapsula prej xheli të sigurojë qëndrueshmëri në vetvete, dhe të mundësojë rigjenerimin e eksplanteve duke lejuar çarjen e kapsulës.

Në fillimet e kësaj teknologjie është përdorur oksidi i polietilenit (polioksi) dhe në vitet e mëtejshme filluan gjerësisht të përdoren hidrokshelet duke përdorur agjentë të ndryshëm xhelifikues që arrinin këtë gjendje në tretësira ujore, por vetëm nëse ekspozoheshin në kushte specifike. Gjithashtu, është raportuar dhe përdorimi i xheleve organikë dhe proteinikë për këtë qëllim. Të gjithë këta agjentë të ndryshëm xhelifikues, paraqesin avantazhe dhe disavantazhe specifike.

Nëse agar-agari konsiderohet ai më efektiv për terrenet ushqyese të metodologjive *in vitro* për qëllime mikroshumimi, konservimi etj. ku nuk përfshihet veshje e eksplanteve, algjinati i natriumit është ai më i përdorshmi për ato teknika ku nevojitet veshje apo inkapsulim eksplantesh, pavarësisht se për çfarë qëllimi madhor realizohet kjo teknikë. Ky agjent xhelifikues nuk shkakton toksicitet në eksplante, është mjaft i qëndrueshëm në kushte të ndryshme rritjeje apo ruajtje, është pa ngjyrë, pa erë, xhelifikohet shpejt në prani të joneve dy valente të kalciumit etj. duke plotësuar kështu një sërë kriteresh që justifikojnë përdorimin efektiv të tij.

Protokolli 11.1: Përgatitja e tretësirave paraprake të domosdoshme për inkapsulimin e eksplanteve

- Fillimisht përgatitet terren i lëngët, i modifikuar pasi janë eliminuar kripërat e Ca^{2+} (në mënyrë që të parandalohet xhelifikimi i terrenit pas shtimit të algjinatit të natriumit);
- Ky terren i lëngët (tretësira bazale zgjidhet në varësi të qëllimit dhe të species bimore që do të përdoret) mund të përmbajë ose jo hormone të shtuara. Diçka e tillë vendoset në varësi të protokollit specifik dhe qëllimit se përse do të përdoren këto fara sintetike;
- **Tretësira 1:** Në një enë kimike me vëllim 200 ml, merren 80 ml nga terreni i lëngët i përgatitur më lart, dhe në të shtohet sakarozë 3% dhe algjinat natriumi 3% me viskozitet të mesëm (Pasqyra 11.1 / tretësira 1). Pas kësaj bëhet tarimi në 100 ml duke shtuar terren të lëngët MS.
- **Tretësira 2:** Në një enë kimike me vëllim 200 ml, merren 80 ml nga terreni i lëngët i përgatitur më lart, dhe në të shtohet sakarozë 3 % dhe klorur kalciumi 1.1g (100 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$) (Pasqyra 11.1 / tretësira 2). Pas kësaj bëhet tarimi në 100 ml duke shtuar terren të lëngët MS.
- Shtimi i glicerolit si agjent kriombrojtës, nevojitet vetëm në rastet kur farat sintetike do të inkubohen në ngrirje të thellë (*shih: Protokolli 12.4*).
- Për secilën tretësirë, matet pH dhe stabilizohet vlera e tij në 5.5;
- Të dyja këto tretësira treten mirë dhe sterilizohen në autoklavë;
- Pas ftohjes, Tretësira 1 vendoset në një pjatë Petri, ndërsa Tretësira 2 në një gotë kimike në kushte aseptike, brenda fluksit laminar;

Pasqyra 11.1. Përbërja e tretësirave që nevojiten për inkapsulimin e eksplanteve

Përbërësit	Sasia (për 100 ml)	
	Tretësira 1	Tretësira 2
Makroelementë (10x)	10 ml	10 ml
Mikroelementë (10x)	10 ml	10 ml
Kelati i hekuri (100x)	1 ml	1 ml
Vitamina (100x)	1 ml	1 ml
Sakarozë	3 g	3 g
Glicerol	1ml	1ml
Alginat natriumi	3 g	-
$\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	-	1,1 g
pH	5,5	5,5

Protokolli 11.2: Formimi i farave sintetike me anë të teknikës së inkapsulimit

- Si material fillestar përdoren bimëzat të rigjeneruara *in vitro*. Puna kryhet në kushte aseptike në fluks laminar. Me anë të një pincete dhe të bisturisë, bëhet prerja me kujdes e sytheve;
- Sythet izoloohen me përmasë 1 – 5 mm dhe vendosen në pjatën e Petrit që përmban Tretësirën 1. Bëhet kujdes në vendosjen e eksplanteve në pjatën e Petrit, duke i vënë në distancë nga njëri - tjetri në mënyrë që të shmanget bashkimi i dy ose më shumë sytheve bashkë (Fig. 11.1 a);
- Me një pipetë sterile *Pasteur* 10 ml, të cilës i është prerë maja, merret sythi bashkë me një sasi nga Tretësira 1 që përmban algjinat natriumi (Fig. 11.1 b), dhe përmbajtja e pipetës derdhet në gotën kimike ku gjendet Tretësira 2 (Fig. 2.3 c), me klorur kalciumi 100 mM;
- Është mjaft e rëndësishme që tretësira 2 të vendoset në një gotë kimike me hapësirë të mjaftueshme dhe mëse të lirshme për pikëzat, të cilat zhyten plotësisht në këtë tretësirë. Kjo mundëson që ato të marrin formë plotësisht të rrumbullakët;
- Algjinati i natriumit xhelifikohet në prani të joneve dyvalente të Ca^{2+} , si pasojë e një shkëmbimi të joneve Na^+ dhe Ca^{2+} . Fortësia e xhelit varet sigurisht nga sasia e algjinatit të natriumit, por mbi të gjitha, varet nga sasia e joneve Ca^{2+} , pra nga përqendrimi i tretësisës $\text{CaCl} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, të përdorur për xhelifikim;
- Sythet lihen në këtë tretësirë për rreth 30 minuta në mënyrë që të formohet struktura përfundimtare e kapsulave xhelatinoze (Fig. 11.1 c, d);
- Secila prej tyre do të jetë me përmasa rreth 5 mm dhe do të ketë një eksplant në brendësi. Mund të ndodhë që gjatë marrjes së eksplanteve me tretësirën e algjinatit, të përfshihen në pipetë dy eksplante të vegjël. Kjo do të çojë në formimin e një fare sintetike me dy eksplante brenda saj, por kjo nuk përbën problem nëse inkapsulimi ka ndodhur plotësisht dhe të dy eksplantet janë përfshirë brenda kapsulës së xhelit;

11.2.2. Rigjenerimi i farave sintetike dhe shndërrimi në bimë të plota

Teknologjia e farave sintetike konsiderohet efektive nëse ato kanë fuqi mbirëse dhe arrijnë të shndërrohen në bimë të plota. Pavarësisht qëllimit se përse ato krijohen: mikroshumim, konservim, shkëmbim gjermoplazme, etj., kusht themelor është rirritja optimale pa cënuar potencialin rigjenerues të tyre, duke mundësuar formimin e bimëve të plota (Fig. 11.2).

Protokolli 11.3: Rirritja e farave sintetike dhe formimi i bimëve të plota

- Farat sintetike të krijuara mund të përdoren për qëllime të ndryshme si: mikroshumim, konservim, transport në laboratore të tjera, etj.

- Ato etiketohen me të dhënat specifike, inokulohen në terrene ushqyese dhe inkubohen në dhomë vegjetative me parametra fizikë të kontrolluar;
 - Nëse qëllimi është mikroshumimi, ato inokulohen në terrene ushqyese të optimizuara për këtë proces. Në këtë fazë mund të testohen tretësira bazale të ndryshme, raporte ose lloje të ndryshëm të rregullatorëve të rritjes, burimeve të karbonit, etj. Ky stad realizohet në temperaturë 25°C;
 - Farat sintetike të prodhuara mund të përdoren për shumë qëllime, një prej të cilëve është dhe konservimi i gjermpoplazmës bimore me interes. Drejtimet kryesore të ruajtjes që përfshijnë teknikat *in vitro*, janë ato të rritjes minimale dhe kriokonservimi. Edhe farat sintetike përfshihen për ruajtje afatshkurtër / afatmesme dhe afatgjatë, duke aplikuar të gjitha teknikat që kanë rezultuar të suksesshme dhe për konservimin e formave të tjera të materialeve bimore.
 - Nëse qëllimi është konservimi afatmesëm, paraprakisht mund të testohen temperatura të ndryshme të inkubimit (zakonisht 4 - 8°C) për një periudhë të caktuar (Shih: Protokoli 12.1), ose dehidratim paraprak me tretësira me përqendrim të ndryshme sakaroze, manitoli, sorbitoli, etj. (shih: Protokoli 12.2), ose modifikim i një prej përbërësve të terrenit ushqyes, shtimi i vonuesëve të rritjes, reduktim i sasisë së oksigjenit, ulje e intensitetit të ndriçimit, etj.
 - Nëse qëllimi është konservimi afatgjatë, kriokonservimi nëpërmjet inkapsulim - dehidratimit ndiqet protokoli përkatës (shih: Protokoli 12.4);
 - Në çdo rast, farave i testohet potenciali rigjenerues nëpërmjet vlerësimit të rirritjes në kushtet optimale të dhomës vegjetative;
- Kryhet vëzhgimi periodik për të parë vijueshmërinë e çarjes së farës / kapsulës xhelatinoze dhe mbirjes së sytheve, si dhe vlerësohen për shfaqje të infeksioneve të mundshme.

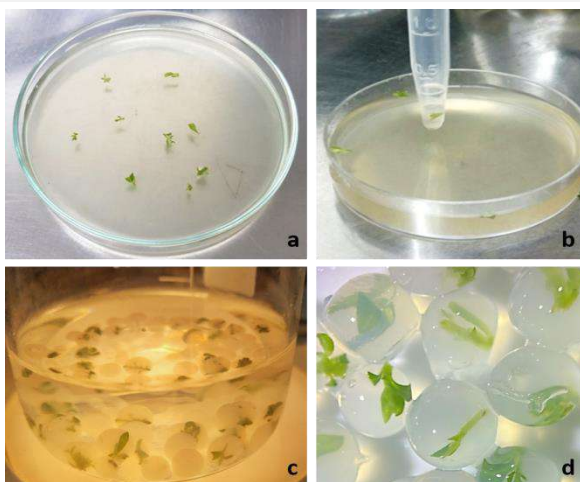


Figura 11.1. a) Transferimi i sytheve të arrës (*Juglans regia* L) në tretësirë algjinati; b) Marrja me pipetë e tretësirës me përmbajtje algjinati së bashku me një syth c) Pipetimi në tretësirën që përmban klorur kalciumi dhe formimi i farave sintetike d) Pamje e plotë e farave sintetike (Laboratori i kulturave qelizore dhe indore, Departamenti i Bioteknologjisë, FSHN, UT)

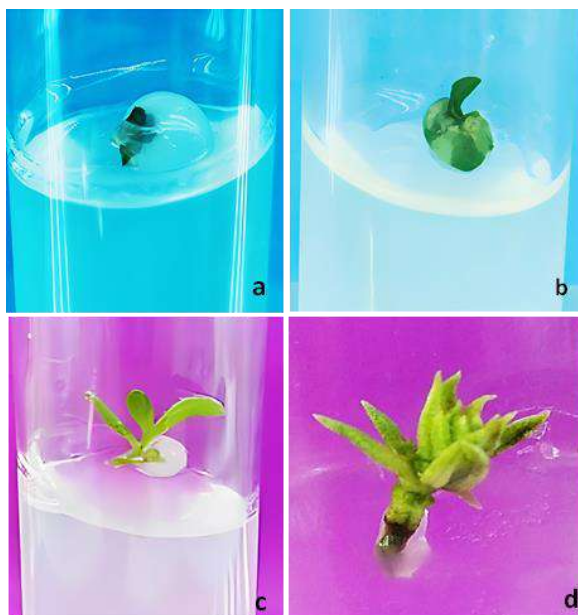


Figura 11.2. a, b) Rigjenerimi i bimëzave të arrës (*Juglans regia* L.) **c, d)** Rigjenerimi i bimëzave të asterit (*Galatella albanica* L.) (Laboratori i kulturave qelizore dhe indore, Departamenti i Bioteknologjisë, FSHN, UT)

Bibliografia

- Ara, H., Jaiswal, U., Jaiswal, V.S. 2000.** Synthetic seed: prospects and limitations. *Curr Sci*; 78(12):1438-44;
- Benelli, C., Micheli, M., De Carlo, A. 2017.** An improved encapsulation protocol for regrowth and conservation of four ornamental species. *Acta Soc. Bot. Pol.* 86(3), 1 – 12;
- Cuko, B., Sota, V., Bekheet, S.A., Kongjika, E. 2021.** *In vitro* propagation and encapsulation of *Galatella albanica* Degen shoot tips. *Journal of Applied Biological Sciences*, 15(2): 157- 168, 2021, E-ISSN: 2146-0108.
- Katouzi S.S.S., Majd A., Fallahian F., Bernard F. 2011.** Encapsulation of shoot tips in alginate beads containing salicylic acid for cold preservation and plant regeneration in sunflower (*Helianthus annuus* L.) *AJCS*; 11:1469-74;
- Kikowska, M., Thiem, B. 2011.** Alginate-encapsulated shoot tips and nodal segments in micropropagation of medicinal plants. A review, *Herba Polonica*. 57 (4): 45-57;
- Lambardi, M., Ozodogru, E.A., Jain, S.M. 2013.** Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plant; New York, Heidelberg, Dordrecht, London: Springer), pp.490, DOI 10.1007/978-1-62703-074-8;
- Micheli, M., Hafiz, I.A., Standardi, A. 2007.** Encapsulation of *in vitro*-derived explants of olive (*Olea europaea* L. cv. Moraiolo) II. Effects of storage on capsule and derived shoots performance. *Sci Hort*, 113, 286-92;
- Micheli, M., Standardi, A., Fernandes da Silva, D. 2019.** Encapsulation and synthetic seeds of olive (*Olea europaea* L.): experiences and overview. In *Synthetic Seeds* (pp. 347- 361), Springer, Cham;

- Rai, M.K., Asthana, P., Singh, S.K., Jaiswal, V.S., Jaiswal, U. 2009.** The encapsulation technology in fruit plants—A review. *Biotechnol. Adv.* 27, 671–679.
- Ravi, D., Anand, P. 2012.** Production and applications of artificial seeds: A review. *Int. Res. Biol. Sci.*, 1, 74-78.
- Saiprasad G.V.S. 2001.** Artificial Seeds and their Applications. *Resonance*. 5, 39-47;
- Singh, A.K., Chand, S. 2010.** Plant regeneration from alginate encapsulated somatic embryos of *Dalbergia sissoo* Roxb. *Indian J. Biotechnol.*, 9, 319-324;
- Singh, S.K., Rai, M.K., Asthana, P., Sahoo, L. 2010.** Alginate-encapsulation of nodal segments for propagation, short term conservation and germplasm exchange and distribution of *Eclipta alba* (L.) *Acta Physiol Plant*, 32, 607-10;
- Sota, V., Benelli, C., Myrselaj, M., Kongjika, E., Gruda, N.S. 2023.** Short-Term Conservation of *Juglans regia* L. via Synthetic Seed Technology. *Horticulturae* 2023, 9(559): 1 – 13, <https://doi.org/10.3390/horticulturae905055>;
- Suprasanna, P., Ganapathi, TR., Bapat, VA. 2006.** Synthetic seeds technology. In: Basra AS (ed) Handbook of seed science and technology. CRC, New York, pp 227–267.
- Standardi A., Micheli M. 2013.** Encapsulation of *in vitro*-derived explants: An innovative tool for nurseries. *Methods Mol. Biol.* 11013, 397-418;

KAPITULLI 12

Konservimi *in vitro*: rritja minimale dhe kriokonservimi

12.1. Domosdoshmëria e aplikimit të metodave të konservimit *in vitro*

Resurset (burimet) gjenetike bimore përfshijnë të gjitha kombinimet e gjeneve që rrjedhin nga evoluimi i specieve bimore të konservimit bimor. Në resurset gjenetike bimore përfshihen si format me rritje spontane (të egra), ashtu dhe ato të kultivuara me interes ekonomik, ekologjik etj. Më të rëndësishmet janë ato specie që përbëjnë bazën ushqimore në mbarë botën, dhe që domosdoshmërisht duhet të përfshihen në programet e përmirësimit dhe të konservimit bimor.

Nga konservimi i resurseve gjenetike bimore, njerëzimi është përfitues i drejtpërdrejtë. Për këtë arsye, investimi në konservim siguron përfitime për shoqërinë. Mendohet që në 30 vitet e ardhshme popullsia në botë t'i tejkalojë 8 miliardë njerëz. Bimët sigurojnë nevojat më elementare për ushqim dhe strehim. Veç të tjerash, shtetet që investojnë në konservimin e resurseve gjenetike bimore, kanë zhvillim më të mirë socio-ekonomik dhe bëhen të fuqishëm në nivel global. Për këtë arsye duhet të themelohen programe që përcaktojnë në mënyrë të detajuar nevojën dhe strategjitë për konservim.

Ruajtja *in vivo* paraqet avantazhe të shumta, por në disa raste, kjo strategji e konservimit të resurseve bimore është e rrezikuar nga katastrofa natyrore të ndryshme si pasojë e ndërveprimit të faktorëve të shumtë abiotikë dhe biotikë. Me zhvillimin e bioteknologjisë, teknikat *in vitro* janë zhvilluar shumë dhe mundësojnë shumimin e shpejtë dhe konservimin e gjermoplazmës bimore.

Qëllimi themelor i aplikimit të këtyre metodologjive është zgjatja sa më shumë e periudhës së konservimit, por duke ruajtur stabilitetin gjenetik të materialit bimor. Element i rëndësishëm është dhe fakti që zakonisht, me këto metoda, ruhen bimëza që gjenden në kushtet e kultivimit *in vitro*, pra është kapërcyer problematika e stabilizimit të asesisë dhe e stresit oksidativ. Teknikat e konservimit *in vitro* klasifikohen në dy grupmetoda që janë:

- (i) *rritja minimale*, metodë që garanton konservimin për një periudhë disa mujore deri në dy vjeçare, që njihen përkatësisht si ruajtje afatshkurtër dhe afatmesme;
- (ii) *kriokonservimi* që garanton ruajtjen afatgjatë, apo shumëvjeçare;

12.2. Konservimi me metoda të rritjes minimale

Në bazë të strategjisë së ruajtjes së bimëve spontane, si qëllim kryesor i mikroshumimit të tyre konsiderohet mundësia e ruajtjes së gjermoplazmës me metodën e rritjes minimale. Kjo metodë përdoret sot me sukses për ruajtjen e specieve bimore me rëndësi ekonomike, vlera mjekësore, të rralla, endemike dhe të kërcënuara për zhdukje, etj.

Metodat e rritjes minimale konsistojnë në aplikimin e protokolleve specifike duke modifikuar faktorë fiziko-kimikë me qëllim ngadalësimin e metabolizmit qelizor. Kjo do të mundësonte realizimin e subkulturave në një distancë kohore të konsiderueshme nga njëra – tjetra. Në këto kushte, periudhat mes subkulturave mund të arrijnë nga disa muaj, deri në 1 – 2 vjet. Ajo çfarë është e rëndësishme është fakti se duke marrë struktura të organizuara si eksplante fillestare, ruhet stabiliteti gjenetik i materialeve bimore të konservuara. Ekzistojnë disa metoda që përdoren për konservimin afatshkurtër dhe afatmesëm, por më poshtë paraqiten protokollat e metodave më efektive, të cilat janë aplikuar me sukses dhe për konservimin e shumë specieve autoktone shqiptare.

12.2.1. Inkubimi në temperatura 2 – 8°C

Temperaturat $25 \pm 2^\circ\text{C}$ konsiderohen si optimale për realizimin me efektivitet të shumë reaksioneve metabolike në qelizë. Reduktimi i vlerave të temperaturës dhe inkubimi në 2 – 8°C, shkakton ngadalësim të metabolizmit, pasi një sërë reaksionesh të varura nga ky faktor realizohen në minimumin e tyre apo pësojnë ndërprerje të plotë. Në disa raste, inkubimi mund të realizohet në fotoperiodë 16 orë ndriçim / 24 orë, ose inkubimi në këto vlera temperature (2 – 8°C) mund të bëhet edhe në errësirë të vazhdueshme.

Reduktimi i temperaturës konsiderohet si një nga metodat më efektive të rritjes minimale, që për shumë specie bimore, ka rezultuar efektive për një periudhë konservimi afatmesëm, deri në dy vjeçare. Për këtë arsye, shumica e laboratorëve që përdorin teknika *in vitro*, janë të pajisur me inkubatorë specifik, të cilët ofrojnë programimin e dëshiruar për konservim në temperatura të ulëta, pak mbi vlerën zero, me kontroll ndriçimi ose jo. Në të tillë inkubatorë ruhen stoqet bimore me interes, të përdorshëm në çdo kohë që nevojitet.

Protokolli 12.1: Konservimi në temperaturë 2 – 8°C

- Fillimisht, duhet të stabilizohet protokollin e mikroshumimit për specien bimore që do të konservohet, pavarësisht se cila do të jetë metoda e konservimit që do të aplikohet (*Shih: Kapitulli 6*);
- Përgatitet terren ushqyes i xhelifikuar i optimizuar për fazën e subkulturës (tretësira bazale zgjidhet në varësi të species bimore që do të konservohet) dhe sterilizohet në autoklavë;

- Si material fillestar për konservim, merren bimëza të rigjeneruara *in vitro*, të cilat ruhen në dhomën vegetative. Këto bimëza duhet të kenë kaluar stadin e inokulimit / stabilizimit dhe të jenë të gatshme për të kaluar në subkulturë;
- Bimëzat *in vitro* të prodhuara gjatë subkulturave mbahen për rreth dy javë në dhomën vegetative në kushtet normale: fotoperiodë 16 orë ndriçim / 24 orë dhe temperaturë $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$;
- Pas kësaj periudhe, bimëzat *in vitro*, inokulohen në kushte aseptike në terrenet e përgatitura paraprakisht dhe inkubohen në kushte të errësirës së plotë dhe të reduktimit të temperaturës ($2 - 8^{\circ}\text{C}$) në inkubator biologjik që plotëson këto kushte ruajtjeje (Fig. 12.1). Bimëzat mund të inkubohen edhe në fotoperiodë 16 orë ndriçim / 24 orë në temperaturë ($2 - 8^{\circ}\text{C}$);
- Inkubimi në kushte të tilla temperature shkakton një gjendje stresi për eksplantet bimore, prandaj është e domosdoshme që terreni ushqyes të jetë i optimizuar për stadin e subkulturës, në mënyrë që bimëzat të mos përballen edhe me stres kimik, përveç atij fizik;
- Në të tilla kushte mund të vendosen për ruajtje afashkurtër ose afatmesme edhe farat sintetike (shih: *Protokolli 11.3*); Kulturat testohen për periudha të ndryshme ruajtjeje (3, 6, 10, 14 muaj);
- Për secilën periudhë konservimi analizohet përqindja e mbijetesës duke vrojtuar në mënyrë periodike gjendjen e bimëzave në kushtet specifike të inkubimit. Në qoftë se eksplantet paraqesin nekroza të thella, ato konsiderohen si të pambijetuar;
- Për rigjenerimin e bimëzave, enët e kulturës nxirren nga inkubimi në temperaturë $2 - 8^{\circ}\text{C}$ dhe menjëherë kalohen në kushte të inkubimit në temperaturë 25°C ;
- Pas 3 – 4 ditësh, këto bimëza inokulohen në terrene ushqyese të freskëta, të optimizuara për stadin e subkulturës, përbërje terreni që është stabilizuar dhe paracaktuar që gjatë mikroshumimit fillestar të eksplanteve në kulturë;
- Pas kësaj, analizohet përqindja e rigjenerimit pas rikultivimit të eksplanteve në terrenin përkatës të mikroshumimit;



Figura 12.1. Konservimi në temperaturë $2 - 8^{\circ}\text{C}$ në errësirë **a)** Enë kulture të inkubuara në këto kushte **b)** Inkubatori i konservimit në $2 - 8^{\circ}\text{C}$ (Laboratori i kulturave qelizore dhe indore, Departamenti i Bioteknologjisë, FSHN, UT)

12.2.2. Modifikimi i terrenit ushqyes

Për të siguruar një rritje optimale të bimëve, terreni ushqyes i kulturës duhet të jetë i optimizuar në të gjitha kategoritë e përbërësve të tij. Reduktimi i përqendrimit të një përbërësi apo shtimi tej normave do të shkaktonte deficienca / mungesa ushqimore në rastin e parë dhe shfaqje të simptomave të lidhura me toksicitetin në rastin e dytë. Shumë nga përbërësit themelorë të terrenit ushqyes (makroelementë, mikroelementë, përbërës organikë, burimi i karbonit, fitohormonet, etj.) mund të shtohen nën vlerën optimale, gjë që do të shkaktonte një stres kimik, dhe do të ngadalësohej rritja. Toleranca e specieve bimore për strese kimike varion shumë, gjë që kërkon optimizim protokollit rast pas rasti. Raportohet se metoda të tilla të rritjes minimale, më së shumti sigurojnë ruajtje për periudha afatshkurtra.

Protokolli 12.2: Konservimi duke modifikuar terrenin ushqyes

- Si material fillestar për konservim, merren bimëza të rigjeneruara *in vitro*, të cilat ruhen në dhomën vegetative. Këto bimëza duhet të kenë kaluar stadin e inokulimit / stabilizimit dhe të jenë të gatshme për të kaluar në subkulturë;
- Përgatitet terreni ushqyes sipas një protokollit specifik, duke modifikuar përbërjen kimike sipas metodës së zgjedhur;
- Duhet të kihet parasysh që vetëm 1 - 2 përbërës mund të modifikohen, pasi nëse reduktohen njëkohësisht shumë përbërës të terrenit ushqyes, kjo do të shkaktonte një stres shumë të fortë për eksplantet dhe ato zor se do të mbijetonin.
- Eksplantet inokulohen në kushte aseptike në terrenet e përgatitura paraprakisht dhe inkubohen në fotoperiodë 16 orë ndriçim / 24 orë dhe temperaturë 25°C. Nuk nevojitet sterilizimi i eksplanteve, pasi ato gjenden në kushte aseptike;
- Është e nevojshme që kushtet fizike të jenë ato që i përgjigjen mikroshumimit, pasi nuk paraqet efektivitet aplikimi i shumë streseve njëkohësisht;
- Disa nga metodat efektive të modifikimit të terrenit ushqyes janë:
 - Tretësirë bazale 50% pa sakarozë.
 - Terren ushqyes pa fitohormone.
 - Eliminim i vitaminave nga tretësira bazale;
 - Reduktim i një kripe që furnizon me një element mineral esencial në tretësirën bazale;
 - Shtimi i vonuesve të rritjes (ABA, hidrazidë maleike, paklobutrazol etj.);
 - Shtimi i alkooleve sheqerore (manitol, sorbitol, etj.) në terrenin ushqyes;
 - Shtimi i burimit të karbonit mbi vlerën optimale;
 - etj.
- Në të gjitha metodat e lartpërmendura, të gjithë përbërësit e tjerë të terrenit, me përjashtim të përbërësit që modifikohet, janë të njëjtë me stadin e subkulturës;
- Kulturat testohen për ruajtje për periudha të ndryshme ruajtjeje (3, 6, 10, 14 muaj).

Për secilën periudhë konservimi analizohet përqindja e mbijetesës duke vërtetuar në mënyrë periodike gjendjen e bimëzave në kushtet specifike të inkubimit;

- Për rigjenerimin e bimëzave, këto të fundit kalohen në terrene të freskëta me përbërje të tillë të stabilizuar dhe të paracaktuar që gjatë mikroshumimit fillestar të eksplanteve në kulturë;
- Pas kësaj, analizohet përqindja e rigjenerimit pas rikultivimit të eksplanteve në terrenin përkatës të subkulturës;
- Në mënyrë të vazhdueshme realizohen vërtetimet dhe fotografime për të analizuar dinamikën e parametrave të ndryshëm gjatë konservimit.

12.2.3. Dehidratimi paraprak i eksplanteve bimore

Me qëllim konservimin afatshkurtër ose afatmesëm të eksplanteve të ndryshme bimore, një metodë tjetër është dehidratimi paraprak duke përdorur tretësira hipertoniqe, kryesisht me përmbajtje karbohidratesh ose alkoolesh sheqerore. Në këto kushte, për shkak të diferencave në vlerën e potencialit ujor, uji lëviz nëpërmjet osmozës, nga zona me potencial ujor më të lartë (që është brenda qelizave), drejt zonës me potencial më të ulët (mjedisi i jashtëm). Si rrjedhim, qelizat humbasin ujë duke kaluar në plazmolizë.

Dehidratimi i eksplanteve është proces mjaft delikat, i cili duhet aplikuar me kujdes të veçantë. Shkalla e dehidratimit ndikon shumë në potencialin rigjenerues të indeve që i janë nënshtruar këtij procesi. Në shumë raste, shkalla e dehidratimit është kaq e lartë sa qelizat pësojnë plazmolizë mjaft të thellë, aq sa nuk mund të kalojnë më në deplazmolizë e të arrijnë gjendjen e mëparshme. Procedura konsiderohet efektive në rastet kur eksplantet, pas rihidratimit të tyre në kushte optimale, arrijnë të rigjenerojmë bimë të plota. Përgjithësisht, kjo teknikë vlerësohet si metodë efektive e ruajtjes për periudha disa mujore.

Pas procedurës së dehidratimit, vijon inokulimi i eksplanteve të dehidratuar në terrenet ushqyese të optimizuara për stadin e subkulturës, specifik për specien bimore që do të konservohet. Një nga llojet e eksplanteve që më së shumti konservohen nëpërmjet kësaj metode janë farat sintetike.

Protokolli 12.3: Konservimi afatshkurtër ose afatmesëm i farave sintetike nëpërmjet dehidratimit paraprak

- Fillimisht formohen farat sintetike sipas *Protokollit 11.1*. Farat sintetike të formuara vendosen në serinë e tretësirave dehidratuese / terrene të lëngëta me përmbajtje sakaroze, manitoli, sorbitoli, etj. me përqendrime në rritje 0.25 M, 0.5 M, 0.75 M, dhe 1M për 16 – 24 orë në secilën tretësirë (Pasqyra 12.1);
- Rekomandohet që ky proces të zhvillohet në një tundës orbital, gjë që mundëson një dehidratim optimal të eksplanteve;
- Më tej, farat sintetike të dehidratuara, shpëlahen me ujë steril në mënyrë që të

largohen mbetjet e tretësirës dehidratuese nga sipërfaqja e tyre;

- Pas kësaj, ato inokulohen në terrenin përkatës të subkulturës, dhe vlerësohet në mënyrë periodike përqindja e rirritjes dhe e rigjenerimit pas dehidratimit në secilin përqendrim të agjentit dehidratues (Fig. 12.2);

- Testimi i përqendrimeve të ndryshme të tretësirës dehidratuese është një procedurë e domosdoshme për të vlerësuar trajtimin më efektiv që siguron përqindje më të lartë rigjeneruese dhe mbijetese të eksplanteve pas këtij stadi (shih: Protokoli 11.3);

- Sa më i lartë të jetë përqendrimi i tretësirës dehidratuese efektive, aq më e gjatë rezulton dhe koha e konservimit afatmesëm. Por, në përqendrime të larta ekziston dhe rreziku i humbjes së aftësisë rigjeneruese të eksplanteve.

- Në disa raste, dehidratimi mund të bëhet dhe vetëm në një përqendrim të ulët të tretësirës dehidratuese, dhe kohëzgjatja e trajtimit mund të vazhdojë dhe deri në 72 orë. Pas kësaj, vlerësohet potenciali rigjenerues i farave sintetike të dehidratuara dhe formimi i bimëve të plota nga to (shih: Protokoli 11.3);

- Kulturat testohen për ruajtje për periudha të ndryshme (3, 6, 10, 14 muaj); Për secilën perudhë konservimi analizohet përqindja e mbijetesës duke vrojtuar në mënyrë periodike gjendjen e bimëzave në kushtet specifike të inkubimit pas dehidratimit të tyre;

- Ajo që mund të ndodhë gjatë konservimit të farave sintetike është se këto të fundit, mund të paraqesin fuqi mbirëse të lartë, por potencial rigjenerues mjaft të ulët. Kjo rezulton me një koeficient mikroshumimi që nuk realizon objektivin e kërkuar në lidhje me biomasën e krijuar nëpërmjet subkulturave në statet pasuese;

Pasqyra 12.1. Terrenet e lëngëta të fazës së dehidratimit

Përbërësit	TRETËSIRA			
	0.25 M (100 ml)	0.50 M (100 ml)	0.75 M (100 ml)	1 M (100 ml)
Makroelementë (10x)	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Mikro elementë (10x)	10 ml	10 ml	10 ml	10 ml
Kelati i hekurit (100x)	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Vitaminat (100x)	1 ml	1 ml	1 ml	1 ml
Sakarozë	8,5 g	17,1 g	25,6 g	34,2 g
pH	5,5	5,5	5,5	5,5

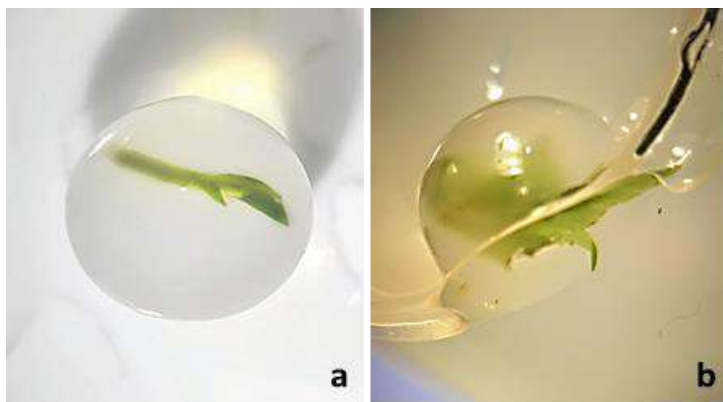


Figura 12.2. Fara sintetike të **a)** *Juglans regia* L **b)** *Prunus* sp. pas dehidratimit paraprak (Laboratori i kulturave qelizore dhe indore, Departamenti i Bioteknologjisë, FSHN, UT)

12.3. Kriokonservimi

Nëpërmjet metodës së kriokonservimit, materiali gjenetik ngrin në temperaturën e azotit të lëngët (-196°C) dhe metabolizmi ndërpritet pothuajse plotësisht, por materialet bimore mbeten të qëndrueshme gjenetikisht dhe ruajnë aftësinë rigjeneruese. Ngrirja e bën ujin të papërshtatshëm për proceset metabolike. Reaksionet biokimike dhe difuzioni ndërpriten nga shndërrimi i ujit në akull në temperatura tepër të ulëta, gjë që shkakton ndërprerjen pothuajse të plotë të metabolizmit qelizor, duke mundësuar kështu që eksplantet të ndërpresin rritjen e tyre në të tilla kushte. Për këtë arsye, trajtimi me tretësira kriombrojtëse, të cilat ulin pikën e ngrirjes së lëngjeve qelizore, është një fazë e rëndësishme gjatë procedurës së kriokonservimit. Lloji i agjentëve kriombrojtës që përdoren, si dhe përqendrimi i tretësirës kriombrojtëse, janë faktorë vendimtarë për suksesin e ruajtjes në temperaturë -196°C të azotit të lëngët.

- Teknikat e ngrirjes në azot të lëngët bazohen në përdorimin e disa metodave;
- Metodatat fizike (inkapsulim-dehidratimi);
- Metodatat kimike (vitifikimi);
- Kombinim i dy metodave (inkapsulim-vitifikimi);
- Ngrirja e pikëzave të DMSO-së;
- Etj.

a) Metoda e inkapsulim – dehidratimit përdoret për ruajtjen e eksplanteve në temperatura kriogjenike pasi mundëson mbijetesë të lartë dhe ruajtje të potencialit rigjenerues pas ringrohjes së kapsulave xhelatinoze dhe rikultivimit të tyre në kushtet standarde të mikroshumimit. Kjo metodë bazohet në aftësinë xhelifikuese dhe sferifikimin e pikëzave të algjinatit me një eksplant në brendësi kur ato bien në kontakt me jonet e kalciumit apo magnezit (Shih: Kapitulli 11).

b) Vitrifikimi vlerësohet si një metodë mjaft efektive për kriokonservim që mundëson ruajtjen në temperatura kriogjenike të qelizave të gjalla të hidratuara në mungesë të akullit. Vitrifikimi thjeshton dhe përmirëson shpesh krioruajtjen sepse eliminon dëmtimet mekanike nga akulli, shmang nevojën për të gjetur shkallët optimale të ftohjes dhe ngrohjes, shkallën e dehidratimit, etj. Formimi i ‘qelqit’ pa kristalizim, është një nga parimet bazë të përdorur në metodat e krioruajtjes së bimëve.

Tretësirat kriombrojtëse të vitrifikimit zvogëlojnë rrezikun e dëmtimit të strukturave të organeleve duke shmangur formimin e kristaleve të akullit. Kjo arrihet duke rritur viskozitetin e qelizës deri në pikën në të cilën formimi i akullit pengohet si brenda ashtu edhe jashtë saj. Ky proces ndihmon bimët të mbijetojnë në temperatura kriogjenike. V etëm disa bimë mund të formojnë një gjendje qelqore në mënyrë natyrale. Shumica e bimëve nuk mund të vitrifikohen sepse u mungojnë substancat që shkaktajnë gjendjen e qelqit dhe / ose kanë përmbajtje të lartë uji.

Substanca të tilla janë: gliceroli, dimetil sulfoksidi (DMSO), etilen glikoli (EG), propilen glikoli (PG), sakaroza, sorbitoli, etj. të cilët përdoren në përqendrimet të ndryshme në kombinim me terrenin MS për të lejuar dehidratim të mjaftueshëm të materialit bimor dhe gjithashtu nxisin procese kriombrojtëse tek qelizat. Pavarësisht se në disa raste Solucioni i Vitrifikimit të Bimëve 2 (Plant Vitrification Solution 2 - PVS2) shkaktonte toksicitet në eksplante, ai mbetet një zgjidhje shumë efektive e paratrazimit për ruajtjen kriogjenike të shumë specieve bimore. Toleranca ndaj toksicitetit është ngushtësisht e lidhur me gjenotipin.

Protokolli 12.4: Kriokonservimi nëpërmjet metodës së inkapsulim-dehidratimit

Inkapsulim – dehidratimi i eksplanteve

Inkapsulimi:

- Eksplantet inkapsulohen duke shfrytëzuar aftësinë xhelifikuese të algjinateve në prani të joneve të kalciumit (Ca^{2+}) (Shih: Protokolli 11.1);

Dehidratimi I:

- Pas formimit, eksplantet e inkapsuluar dehidratohen në tretësira me përmbajtje agjentësh dehidratues (sakarozë, manitol, sorbitol, etj.) me përqendrimet të ndryshme 0.25 M, 0.5 M, 0.75 M, dhe 1M për 16 – 24 orë (Shih: protokollin 12.3);

- Hapat 1 – 5 të Protokollit 12.3 janë të nevojshëm për të vlerësuar përqendrimin e sakarozës, që siguron përqindje më të lartë rigjeneruese pas këtij stadi dehidratimi;

- Përqendrimet të larta të tretësirës dehidratuese mund të shkaktojnë humbje të potencialit rigjenerues të eksplanteve. Përqendrimet e ulëta nuk do të realizonin dehidratimin maksimal të eksplanteve, gjë që do të shkaktonte formimin e kristaleve të akullit gjatë zhytjes në -196°C , dhe vdekje të tyre gjatë inkubimit në këto kushte;

Dehidratimi II:

- Eksplantet e inkapsuluar pas stadi I të dehidratimit, nxirren nga tretësira dehidratuese dhe thahen me një letër filtri sterile, në mënyrë që të largohet teprica e lagështisë në sipërfaqen e tyre;
- Vendosen eksplantet e inkapsuluar në pjata Petri që përmbajnë rreth 30 g silika xhel dhe thahen në rrymën e fluksit laminar për rreth 4 orë;
- Duhet të kihet parasysh që çdo procedurë të kryhet në kushte aseptike;

Ngrirja:

- Vendosen sferat xhelatinoze (pas dehidratimit në dy stade) në kriotuba me vëllim 1.8 – 2.0 ml. (rreth 5 për çdo kriotub) dhe zhyten në azot të lëngët, në kriokonservator.
- Lihen për ruajtje afatgjatë në të tilla kushte, por në mënyrë periodike testohen për potencialin e mbijetesës dhe atë rigjenerues, duke u kultivuar në terrenin e mikroshumimit dhe në kushtet optimale të faktorëve fizikë që i përgjigjen stadi të subkulturës;

Shkrirja

- Ngrohen kriotubat (pasi nxirren nga kriokonservatori) në temperaturë 35 – 40°C për rreth 5 - 10 min;
- Shpëlahen me një tretësirë sterilizuese për të eliminuar ndotës të mundshëm nga sipërfaqja e tyre gjatë kohës që kanë qenë në kriokonservator;
- Nxirren eksplantet e inkapsuluar dhe shpëlahen me ujë steril në mënyrë që të largohen mbetjet e tretësirës dehidratuese nga sipërfaqja e tyre;
- Transferohen në terrenin e subkulturës dhe inkubohen në temperaturë 25°C me fotoperiodë 16 orë;
- Testohet përqindja e mbijetesës dhe e rigjenerimit të eksplanteve të inkapsuluar pas daljes nga azoti i lëngët;
- Më tej vijohet me statet e tjera të mikroshumimit;
- Në mënyrë të vazhdueshme realizohen vrojtime, matje, fotografime, etj., për të vlerësuar efektivitetin e procedurës dhe gjetjen e trajtimit optimal;

Protokolli 12.5: Kriokonservimi nëpërmjet metodës së vitrifikimit

Tretësirat kriombrojtëse:

- Përgatitet 250 ml terren i lëngët MS (ose ndonjë tretësirë tjetër bazale);
- Tretësira **MS me sakarozë 1.2 M (tretësirë shpëlarëse / jo mbushëse)**: peshohen 20.5 g sakarozë, treten dhe çohen në vëllim 50 ml me terren të lëngët MS të përgatitur në hapin e mësipërm. Stabilizohet vlera e pH në 5.8;
- Tretësira **MS me sakarozë 0.4 M**: peshohen 6.85 g sakarozë, treten dhe çohen në

vëllim 50 ml me terren të lëngët MS të përgatitur në hapin e parë. Stabilizohet vlera e pH në 5.8;

- **Tretësira PVS2 – Përgatitja e 100 ml:** (30 % di glicerol (g/v) + 15 % (g/v) polietilen glikol + 15 % DMSO (g/v) në terren MS me sakarozë 0.4 M).

Përzihen së bashku 27 ml glicerol + 16 ml polietilen glikol (PEG) + 16 ml DMSO (dimetilsulfoksid). Shtohet 41 ml tretësirë MS 0.4 M sakarozë. Stabilizohet vlera e pH në 5.8;

- **Tretësira kriombrojtëse (Tretësira mbushëse) – Përgatitja e 75 ml (2 M glicerol + tretësirë MS 0.4 M sakarozë)**

a. Peshohet 13.8 g glicerol dhe çohet në vëllim 37.5 ml me ujë të distiluar;

b. Peshohet 10.27 g sakarozë dhe çohet në vëllim 37.5 ml me ujë të distiluar;

c. Bashkohen dy tretësirat dhe rregullohet vlera e pH në 5.8.

Procedura e vitrifikimit

- Vendosen eksplantet (sythe me përmasë 1 – 5 mm) në kriotuba me vëllim 1.8 – 2.0 ml. Në 1 kriotub mund të vendosen deri në 10 eksplante, në varësi kjo të përmasës së eksplanteve;

- Trajtohen eksplantet në kriotub me tretësirën mbushëse / kriombrojtëse (2M glicerol + tretësirë MS 0,4 M sakarozë) për 20 – 30 min. Ky trajtim realizohet në temperaturë rreth 25°C;

- Largohet tretësira mbushëse nëpërmjet një shiringe;

- Eksplantet ndahen në tre grupe. Shtohet tretësira PVS2 derisa të mbulohen eksplantet dhe lihet secili grup në këto kushte, përkatësisht për 30, 60 dhe 90 min. Ky trajtim realizohet në temperaturë 0°C:

- Pas çdo trajtimi, largohet nëpërmjet një shiringe tretësira PVS2, dhe:

a. Eksplantet nga çdo trajtim, shpëlahen 2 – 3 herë me tretësirën jo mbushëse MS me sakarozë 1.2 M. Mbahen në këtë tretësirë për 20 – 30 min.;

b. Më tej, largohet tretësira jo mbushëse / shpëlarëse nëpërmjet një shiringe dhe eksplantet kultivohen në terren mikroshumimi për të testuar përqindjen e mbijetesës dhe të rigjenerimit;

c. Ky stad vlen për të evidentuar trajtimin që siguron mbijetesë dhe kriombrojtje më të lartë duke vlerësuar potencialin rigjenerues të eksplanteve;

- Pas optimizimit të stadi të mësipërm, kriotubat me eksplantet e zhytur në PVS2 vendosen në azot të lëngët;

- Lihen në të tilla kushte për sa kohë që gjykohet e nevojshme, duke qenë se qëllimi është ruajtja afatgjatë. Sidoqoftë, në mënyrë periodike kryhen monitorime të vazhdueshme për të verifikuar mbijetesën e eksplanteve të kriokonservuar;

- Kriotubat nxirren nga azoti i lëngët dhe zhyten në banjo uji në 40°C derisa të shkrijë akulli;

- Pas kësaj ndiqet procedura në stadin 5 (a – c);

- Të gjitha manipulimet kryhen në kushte aseptike. Të gjitha mjetet dhe tretësirat e përdorura duhet të jenë sterile (Fig. 12.3);
- Për çdo stad duhet të realizohen vrojtime periodike, matje dhe fotografime;



Figura 12.3. a) Izolimi i sytheve b) Trajtimi sipas protokollit në kriotuba c) Manipulimi në kushte aseptike d) Kriokonservator për ngrirje të thellë në azot të lëngët (-196°C) (Laboratori i kulturave qelizore dhe indore, Departamenti i Bioteknologjisë, FSHN, UT)

Protokolli 12.6: Kriokonservimi nëpërmjet metodës së inkapsulim - vitrifikimit

- Stadi i parë është inkapsulimi i eksplanteve që si procedurë, ngjason me atë të përshkruar në protokollin 11.2, por me disa modifikime të vogla si vijon:
- a.** Vendosen eksplantet (sythe të majës me përmasë 1 – 5 mm) në tretësirë 3% (g/v) algjinat natriumi dhe 0.4 M sakarozë, ose një përzierje të 2 M glicerol dhe 0.4 M sakarozë;
- b.** Pikohen eksplantet me tretësirën e mësipërme si pikëza në tretësirë 100 mM CaCl_2 të përzier me 0.4 M sakarozë ose një përzierje të 2 M glicerol dhe 0.4 M sakarozë;
- c.** Lihen në këto kushte për rreth 30 min., në temperaturë 25°C, derisa të formohen rruazat e xhelifikuara të cilat kanë eksplantet brenda tyre;
- Eksplantet e inkapsuluara vendosen në gota kimike që përmbajnë tretësirë mbushëse PVS2, dhe lihen në të për rreth 1 orë duke u tundur në tundës orbital me rreth 60 rrot./min.;
- Më tej, eksplantet e inkapsuluara dhe të vitrifikuara vendosen në kriotuba me vëllim 1.8 – 2.0 ml, dhe në to shtohet rreth 1 ml tretësirë PVS2. Në 1 kriotub mund të vendosen 5 - 10 sfera të xhelifikuara;
- Pas kësaj, kriotubat vendosen në enët mbajtëse dhe zhyten në azot të lëngët;
- Më tej procedura vijon si në Protokollin 12.5;

Protokolli 12.7: Kriokonservimi nëpërmjet ngrirjes së pikëzave të DMSO-së

- Përgatitet terren ushyes i lëngët, i përshtatshëm për stadin e subkulturës, me përmbajtje 10 % (v/v) DMSO;
- Në kushte aseptike, brenda fluksit laminar, priten shirita letre alumini me përmasë 2 x 6 cm. Letra e aluminit duhet të jetë e sterilizuar paraprakisht;
- Pikohen 2.5–20 µl nga tretësira e përgatitur në pikën 1 të këtij protokolli. Në një shirit letre alumini mund të vendosen disa pika në distancë rreth 1 —1.5 cm nga njëra – tjetra; Në çdo pikë vendoset nga një meristemë e izoluar në kushte aseptike nga bimëza të rritura *in vitro*;
- Duke përdorur pinceta sterile tolerante ndaj azotit të lëngët, fletët e aluminit vendosen direkt në azot të lëngët, në enë mbajtëse të azotit me përmasa të vogla që ndodhen brenda fluksit laminar;
- Më tej, letrat e aluminit me pikëzat e DMSO dhe eksplantet brenda tyre, vendosen në kriotuba me vëllim 1.8 – 2.0 ml;
- Në çdo kriotub mund të vendosen 2 shirita flete alumini; Pas kësaj, kriotubat vendosen në enët mbajtëse dhe zhyten në azot të lëngët;
- Zakonisht shkrirja bëhet në temperaturë rreth 45°C, duke zhytur shiritat e fletës së aluminit në terren ushqyes të lëngët;
- Më tej procedura vijon si në Protokollin 12.4;

Bibliografia

- Babaj. Y.P.S. 1995.** Cryopreservation of plant cell, tissue, and organ culture for the conservation of germplasm and biodiversity. *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol. 32: 3-20. Springer Verlag, Berlin, Heidelberg;
- Barlass, M. & Skene, K.G.M. 1983.** Long term storage of grape *in vitro*. *Plant Genetic Resources Newsl*, 53: 19-21;
- Bekheet, S.A., Sota, V., El-Shabrawi, H.M., El-Minisy A.M. 2020.** Cryopreservation of shoot apices and callus cultures of globe artichoke using vitrification method. *J Genet Eng Biotechnol* **18**, 2 (2020) doi:10.1186/s43141-019-0016-1
- Engelmann, F. & Engels, J.M.M. 2002.** Technologies and strategies for *ex situ* conservation. In Engels, JMM, Ramanatha Rao, V, Brown, AHD and Jackson, MT (eds) *Managing Plant Genetic Diversity*. Wallingford and Rome, CAB International and IPGRI, pp 89-104;
- Engelmann, F. 1991.** *In vitro* conservation of horticultural species. *Acta Horticulturae*, 298: 327-334.;
- Faisal, M., Ahmad, N., Anis, M. 2006.** *In vitro* Plant Regeneration from Alginate - Enkapsulated Microcuttings of *Rauvolfia tetraphylla* L. *American-Eurasian Journal of Agriculture and Environment Sci.*, 1 (1): 01-06;
- Gashi, B., Millaku, F., Abdullai, K., Daskalova, E., Dontcheva, S., Krasniqi, E., Mata, V., Kongjika, E. 2013.** Ecological and Morphological Characteristics and *in vitro* Conservation of *Ramonda serbica* Panc in Kosovo. *Ekoloji* 22(89): 19-28.

- George, E.F. 1996.** Plant Propagation by Tissue Culture. Part 2, In Practice, 725-730;
- Holobiuc, I., Mitoi, M., Blindu R., Helepciuc F., Cristea V. 2009.** The establishment of an *in vitro* gene bank in *Dianthus spiculifolius* Schur. and *D. glacialis* ssp. *gelidus* (Schott Nym. et Kotschy) Tutin: I. Mediumterm cultures characterization in minimal growth conditions. *Annals of Forest Research*. 52: 117-128;
- Lambardi, M., Benelli, C., Ozudogru, E.A. 2006.** Synthetic seed technology in ornamental plants. In Teixeira da Silva JA (ed), *Floriculture, ornamental and plant biotechnology*. Global Science books. UK. 2: 347-354;
- Neveen, A.H. & Bekheet S.A. 2008.** Mid-term storage and genetic stability of Strawberry tissue cultures. *Research Journal of Agriculture and Biological Sciences*, 4(5): 505 – 511;
- Orlikowska, T. 1992.** Effect of *in vitro* storage at 4°C on survival and proliferation of two apple rootstocks. *Plant Cell, Tissue and Organ Cult.*, 31: 1–7;
- Perez – Tornero, O., Ortin – Parraga, F., Egea, J., Burgos L. 1999.** Medium term storage of apricot shoot tips *in vitro* minimal growth methods. *Hort. Science*, 34: 1277 – 1278;
- Rao, N.K. 2004.** Plant genetic resources: Advancing conservation and use through biotechnology. *African Journal of Biotechnology*, 3: 136 – 145;
- Sota, V., Kongjika, E. 2014.** Slow growth *in vitro* conservation of *Zizyphus jujuba* Mill. *Agriculture & Forestry*, Vol. 60. Issue 1: 27 - 37, 2014, Podgorica. UDK 634.662. ISSN 1800-9492;
- Sota, V., Kongjika, E. 2014.** The effect of nutrient media in micropropagation and *in vitro* conservation of wild population of mahaleb cherry (*Prunus mahaleb* L.). *J Microbiol Biotech Food Sci*: 3(6) 453 – 456;
- Shibli, R.A., Smith, M.A.L., Spomer, L.A. 1992.** Osmotic adjustment and growth responses of three (*Crysanthemum morifolium*) cultivars to osmotic stress induced *in vitro*. *J. Plant Nutr.*, 15: 1373 – 1381;

KAPITULLI 13

Shëndetësimi *in vitro*: përfitimi i bimëve pa viruse

13.1. Domosdoshmëria e shëndetësimit të materialit bimor

Sëmundjet virusale kanë qenë një kërcënim i madh për prodhimin e kulturave me rëndësi ekonomike dhe rrjedhimisht, një kufizim për zhvillimet e qëndrueshme të prodhimit bujqësor. Përdorimi i materialit mbjellës pa viruse është një strategji efektive për të kontrolluar sëmundjet virale. Viruset bimore janë parazitë të detyrueshëm ndërqelizorë, që kolonizohen vetëm brenda qelizave të gjalla të bujtësit dhe mund të transmetohen me shumim vegjetativ apo dhe nga insekte të ndryshme, nga bimët me virus tek ato të shëndetshmet. Prej vitesh Bashkimi Evropian (BE) ka nxjerrë direktiva të cilat kërkojnë që kulturat frutore duhet të plotësojnë kërkesat fitosanitare të përcaktuara qartë.

Infeksionet e brendshme të shkaktuara nga viruset, kërpudhat apo bakteret tek bimët janë shumë të vështira për t'u luftuar dhe me përdorimin e pesticideve. Bimët e infektuara me baktere dhe kërpudha zakonisht u përgjigjen trajtimeve me lëndë kimike baktericide ose fungicide, por kjo nuk ndodh me sëmundjet virusale të bimëve, për të cilat asnjë trajtim i tillë nuk ka dhënë rezultat.

Teknikat e kulturës *in vitro* konsiderohen strategji efektive për prodhimin e bimëve të shëndetësuar. Deri më tani, janë krijuar metoda të ndryshme për zhdukjen e viruseve të bimëve, duke përfshirë kulturën e meristemës, mikroshartimin, kimioterapinë, termoterapinë, krioterapinë dhe elektroterapinë. Secila nga këto metoda është efektive në kushte specifike, pra suksesi i saj varet jo vetëm nga specia bimore që duhet të shëndetësohet, por edhe nga virusi që e infekton atë.

13.2. Metodat e shëndetësimit të materialit bimor

13.2.1. Kultura e meristemës

Kultura e meristemës është një teknikë, në të cilën pjesa e sipërme e zonës meristematike të majës së kërcellit izolohet nga një bimë mëmë e zgjedhur dhe inokulohet në një terren ushqyes. Eksplanti fillestar duhet të përfshijë vetëm pjesën e majës të kërcellit, deri në gjethen më të re primordiale. Një pjesë e tillë është afërsisht 0.08 - 0.15 mm në diametër dhe 0.4 - 0.8 mm në gjatësi. Kjo zonë nuk është e lidhur nëpërmjet sistemit enëzor me prokambiumin, gjethen e re primordiale dhe sythin e ri anësor. Mungesa e lidhjes enëzore është përcaktuar si bazë për përdorimin e teknikës

së kulturës së meristemës për eliminimin e patogjenëve.

Për këto arsye, meristemat konsiderohen si eksplante efektive për prodhimin e bimëve të shëndetësuar, por gjithashtu ato janë mjaft delikate dhe dëmtohen lehtë gjatë izolimit. Në këto kushte, për shumë specie bimore, numri i eksplantëve që arrijnë të mbijetojnë në ditët e para pas izolimit të meristemës është mjaft i vogël. Pavarësisht kësaj, këto bimë të shëndetësuar të përfutuara, mund të shumohen lehtë nëpërmjet subkulturave.

Avantazhi kryesor i punës me meristemat është mundësia e lartë për të përjashtuar organizmat patogjene me anë të kulturës *in vitro*. Madhësia e eksplantit të izoluar është faktor kryesor për mbijetesën dhe rigjenerimin. Vetëm meristema e izoluar ka shanse të ulëta për mbijetesë. Sidoqoftë, prodhimi i bimëve të pa infektuar nga viruset është i mundshëm duke përdorur kulturën e meristemës.

Kushtet fiziko-kimike të kulturës kontrollohen për të lejuar vetëm rritjen e organizuar të majës në një bisk të ri, pa formim të ndonjë organi shtesë, gjë që siguron qëndrueshmërinë gjenetike të bimëve të rigjeneruara. Kultura e meristemës, ashtu si ajo e sytheve, është metoda më e përshtatshme për prodhimin e bimëve “identike” me bimën mëmë.

Shpesh, për të gjeneruar bimë pa viruse, kultura e meristemës gërshehet me termoterapinë, kimioterapinë, krioterapinë, elektroterapinë ose nanoterapinë.

Protokolli 13.1: Kultura e meristemës

- Zgjidhen eksplantet, fragmente me një ose më shumë nyje. Preferohen nga bimë juvenile, bimë me origjinë nga bimëza *in vitro*, degë me sythe të fjetur në rastin e specieve drunore;
- Dezinfektohen dhe sterilizohen eksplantet sipas Protokollit 5.1. Eksplantet nga bimët *in vitro* nuk dezinfektohen, sepse ato janë të stabilizuara në kushte aseptike;
- Dezinfektohen rregullisht mjetet (bisturitë, pincetat, ansat) gjatë kësaj procedure duke përdorur llambën me alkool. Izolohet çdo meristemë në stereomikroskop (shpesh 0.1 mm diametër; 0.2 – 0.5 mm gjatësi) me një deri në dy gjethe primordiale dhe transferohen në terrenet ushqyese përkatëse (Fig. 13.1);
- Terrenet ushqyese janë përgatitur dhe sterilizuar paraprakisht. Mund të testohen trajtime të ndryshme si për sa i përket tretësirave bazë, ashtu dhe raportit apo llojit të fitohormoneve / RRB-ve, shtesave të tjera të papërcaktuara, burimit të karbonit, etj.
- Kulturat ruhen për 6 – 8 javë në dhomën vegetative me parametra fizikë të kontrolluar: temperaturë $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ dhe në fotoperiodë 16 orë dritë / 24 orë;
- Në specie bimore që shfaqin shenja të theksuara të stresit oksidativ, për 7 ditët e para të kulturës pas izolimit të meristemës, mund të aplikohet inkubimi në errësirë të plotë, e më tej kalimi në fotoperiodë 16 orë dritë / 24 orë;

- Para kalimit në stadin e subkulturës, bimëzat e reja i nënshtrohen matjeve morfometrike për të dy llojet e terreneve ushqyese;
- Për statet e mëtejshme të mikroshumimit shih *Protokollet 6.2, 6.3 dhe 6.4*;
- Pas kalimit *ex vitro*, është i domosdoshëm kontrolli fitosanitar për të vlerësuar efikasitetin e protokollit të shëndetësisimit nëpërmjet kulturës së meristemës;



Figura 13.1. Izolimi i meristemës **a)** Stereomikroskopi i vendosur në fluksin lëminar për izolimin e meristemave në kushte aseptike **b)** Izolimi i meristemës së *Prunus domestica* L. var Tropojane **c)** Rigjenerimi i bimëzave nga meristemmat e izoluar (Laboratori i kulturave qelizore dhe indore, Departamenti i Bioteknologjisë, FSHN, UT)

13.2.2. Termoterapia *in vitro*

Termoterapia është procesi i trajtimit me temperatura të larta, mbi temperaturat mesatare efektive të rritjes së bimëve, me qëllim eliminimin e viruseve të ndjeshëm ndaj këtij faktori fizik. Termoterapia nuk ka rezultat në rastet kur vetë bima është e ndjeshme ndaj temperaturave të larta ose kur viruset apo disa mykoplasma nuk ndikohen nga këto temperatura. Temperatura dhe kohëzgjatja e procesit duhet të jenë në vlera të tilla që viruset të inaktivizohen, por pa çënuar potencialin rigjenerues të bimëve. Termoterapia *in vitro* mund të aplikohet si teknikë më vete ose e kombinuar me kulturën e meristemës, kjo në varësi të gjenotipit dhe llojit të viruseve të pranishëm në bimën mëmë.

Protokolli 13.2: Termoterapia *in vitro*

- Zgjidhen eksplantet, fragmente me një ose më shumë nyje, nga bimë juvenile, me përmasë rreth 3 - 4 cm. Hiqen gjethet e mëdha dhe më tej eksplantet dezinfektohen dhe sterilizohen sipas Protokollit 5.1. Pas kësaj inokulohen në terrenet ushqyese dhe vendosen në dhomën vegjetative në temperaturë $23^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ dhe në fotoperiodë 16 orë dritë / 24 orë për rreth 4 javë;
- Pasi stabilizohen në kushtet e kultivimit *in vitro*, sythet nga bimëzat e rigjeneruara, inokulohen në terrene ushqyese të reja dhe inkubohen në temperaturë 38 - 40°C për 30 ditë. Sidoqoftë, vlera e temperaturës mund të pësojë ndonjë variacion të lehtë sipas

specieve bimore. Në disa raste, inkubimi fillestar mund të bëhet në temperaturë 28°C, vlerë e cila duhet të rritet gradualisht me 2°C çdo ditë, derisa të arrijë vlerën 40°C. Protokolle specifike mund të kërkojnë inkubimin për 16 orët e dritës në temperaturë 40°C, dhe për 8 orët e errësirës në temperaturë 25°C;

- Gjatë kësaj periudhe, enët e kulturës duhet të qëndrojnë brenda vaskave me ujë në mënyrë që të mbahet më e ulët temperatura e terrenit ushqyes, me qëllim shmangien e ndryshimeve kimike që mund të pësojë ky i fundit në temperaturë të lartë;
- Pas 30 ditëve inkubim në kushtet e mësipërme, izolohen sythet e majës dhe ato anësorë, inokulohen në terrenin përkatës të subkulturës dhe inkubohen në temperaturë 23°C ± 2°C për rreth 4 javë;
- Më tej, është i domosdoshëm kontrolli fitosanitar për të vlerësuar efikasitetin e protokollit të shëndetësimit nëpërmjet termoterapisë *in vitro*;
- Pas kësaj periudhe, bimëzat e fituara i nënshtrohen stadi të aklimatizimit (*shih Protokollin 6.4*). Në shumë raste, kontrolli fitosanitar realizohet dhe pas aklimatizimit të bimëzave;

13.2.3. Kimioterapia *in vitro*

Kjo procedurë ka për qëllim përdorimin e agentëve antiviralë, në mënyrë që të eliminohen viruse të ndjeshëm ndaj agentit të përzgjedhur dhe të arrihet shëndetësimi i materialit bimor me interes.

Përzgjedhja e agentit viral varet nga bima që do të shëndetësohet dhe lloji i virusit që do të eliminohet. Lloji i agentit antiviral dhe përqendrimi i përdorur, janë faktorë themelorë që diktojnë suksesin e shëndetësimit të materialit bimor nëpërmjet kësaj procedure. Në shumë raste, një agent antiviral që mund të rezultojë shumë efektiv në një gjenotip të caktuar, mund të shkaktojë shkallë të lartë toksiciteti në një tjetër.

Protokolli 13.3: Kimioterapia *in vitro*

- Në një enë Erlenmayer përgatitet terreni ushqyes i optimizuar për stadin e subkulturës për specien bimore që do të shëndetësohet. Pasi rregullohet vlera e pH në 5.8, ky terren ushqyes sterilizohet në autoklavë pa u shpërndarë në enët e kulturës (*Shih: Protokolli 4.7: Metoda I*);
- Përgatitet tretësira antivirale duke tretur reagentin e përzgjedhur (virazol, ribavirinë, acid salicilik, oseltamivir, 2-tiouracil, etj.) në ujë të distiluar;
- Kjo tretësirë antivirale shpërndahet nëpërmjet shiringës mikrofiltrue 0.2 µm në terrenin ushqyes të autoklavuar, para se të xhelifikohet agari;
- Mund të testohen përqendrime të ndryshme të tretësirës antivirale (5, 10, 15, 20, 40, 60, 80 mg/l, etj.), duke pasur kujdes që në terrenin ushqyes të shtohet sasia e saktë që i përgjigjet secilit përqendrim që do të testohet;
- Më tej, pas përzierjes, terreni ushqyes antiviral shpërndahet në enët e kulturës;

- Izolohen eksplante (sythe të majës) me përmasa 1 – 2 mm nga bimë të rigjeneruara *in vitro* për specien bimore që do të shëndetësohet;
- Këto eksplante inokulohen në terrenin ushqyes antiviral, në kushte aseptike në fluksin laminar;
- Enët e kulturës, pas etiketimit me informacionin e nevojshëm, inkubohen në temperaturë 25°C dhe fotoperiodë 16 orë ndriçim / 24 orë;
- Lihen eksplantet të rriten në këto kushte për rreth 4 javë;
- Më pas matet pesha e freskët për të vlerësuar shkallën e fitotoksicitetit që mund të ketë shkaktuar agjenti antiviral, si dhe vlerësohet përqindja e mbijetesës dhe e rigjenerimit të eksplanteve në çdo trajtim;
- Paralelisht ngrihet ekperiment i ngjashëm duke përdorur një grup kontrolli që përfshin eksplante të kultivuar në të tilla kushte, por pa përqendrim të agjentit viral në terrenin ushqyes;
- Menjëherë pas kësaj, i domosdoshëm është aplikimi i testeve (ELISA, PCR, etj.) për të përcaktuar gjendjen fitosanitare të eksplanteve të trajtuar me agjentë antiviralë;
- Kur eksplantet izolohen në përmasë meristemmatike, është e nevojshme që pas rreth 4 javësh kultivim në terrenin ushqyes me tretësirë antivirale, bimëzat të transferohen në terrene ushqyese pa këtë shtesë. Më tej kur formojnë 4 – 5 gjetheza, ato i nënshtrohen testeve të lartpërmendura për verifikimin e gjendjes fitosanitare;
- Bimëzat e shëndetësuar, pasi i nënshtrohen shumimit të mëtejshëm nëpërmjet subkulturave dhe rrënjëzimit, kalojnë në kushte *ex vitro*;
- Në çdo stad realizohen vrojtime dhe matje për të përcaktuar përqendrimin optimal të agjentit antiviral që mundëson përftim të bimëve të shëndetësuar për një virus apo grup specifik virusesh, por që nga ana tjetër shkakton efekte anësore të papërfillshme në rritjen bimore;

13.2.4. Krioterapia *in vitro*

Krioterapia e majave të sytheve, është një teknikë që mundëson eliminimin e viruseve specifike të ndjeshëm ndaj temperaturave të ulëta të azotit të lëngshëm (–196°C) nga indet bimore. Krioterapia përfshin të gjitha stadet e procedurës së kriokonservimit, por me ndryshimin se koha e mbajtjes në azot të lëngët varion nga disa minuta, deri në 1 orë.

Protokolli 13.4: Krioterapia e sytheve të majës

- Krioterapia bazohet në metodologjitë e kriokonservimit, prandaj të gjitha procedurat e përfshira në krioterapi janë ato të trajtuara në Seksionin 12.3;
- Përcaktohet metodologjia e përzgjedhur e paratrajtimeve për zhytje në azot të lëngët (shih: Protokolli 12.4 – 12.7);

- Eksplantet që i janë nënshtruar një procedure specifike si më lart, vendosen në kriotuba dhe këto të fundit zhyten në azot të lëngët;
- Lihen kriotubat në këto kushte inkubimi për rreth 1 orë dhe më pas vendosen në banjo uji në temperaturë 45°C për shkrirje të menjëhershme;
- E gjithë procedura e mëtejshme deri në rigjenerimin e bimëzave vijon si në protokollin 12.4 - 12.7;
- Bimëzat e rigjeneruara duhet t'i nënshtrohen testeve (ELISA, PCR, etj.) për të përcaktuar gjendjen fitosanitare të eksplanteve pas krioterapisë;
- Bimëzat e shëndetësuar, pasi i nënshtrohen shumimit nëpërmjet subkulturave, kalojnë në stadet e mëtejshme të mikroshumimit;

Bibliografia

- Bettoni, J.C., Fazio, G., Carvalho Costa, L., Hurtado-Gonzales, O.P., Rwahnih, M.A., Nedrow, A., Volk, G.M. 2022.** Thermotherapy followed by shoot tip cryotherapy eradicates latent viruses and apple hammerhead viroid from *in vitro* apple rootstocks. *Plants* 2022, 11, 582;
- Bhat, A.I., Rao, G.P. 2020.** Virus Elimination by Meristem-Tip Culture. In: Characterization of Plant Viruses. Springer Protocols Handbooks. Humana, New York, NY;
- Bhojwani, S.S., Dantu, P.K. 2013.** Production of Virus-Free Plants. In: Plant Tissue Culture: An Introductory Text. Springer, India.
- Feng, C., Wang, R., Li, J., Wang, B., Yin, Z., Cui, Z., , B., Bi, W., Zhang, Z., Li, M., Wang, Q. 2013.** Production of pathogen-free horticultural crops by cryotherapy of *in vitro*- grown shoot tips. *Methods Mol Biol.* 2013; 11013:463-82.;
- Grout, B.W. 1999.** Meristem-tip culture for propagation and virus elimination. *Methods Mol Biol.* 1999; 111:115-25. doi: 10.1385/1-59259-583-9:115. PMID: 10080981.
- Krishna, R., Ansari, W.A., Khandagale, K., Benke, A.P., et al. 2022.** Meristem culture: A potential technique for *in vitro* virus-free plants production in vegetatively propagated crops. In: Rai, C.H., Kumar, A., Modi, A., Singh, M. (eds.) *Advances in Plant Tissue Culture*, Academic Press, 2022, Pages 325-343, ISBN 9780323907958;
- Lassois, L., Lepoivre, P., Swennen, R., van den Houwe, I., Panis, B. 2013.** Thermotherapy, chemotherapy, and meristem culture in banana. *Methods Mol Biol.* 2013; 11013:419-33. doi: 10.1007/978-1-62703-074-8_32. PMID: 23179717;
- Simpkins, I., Walkey, D.G.A., Neely, H.A. 1981.** Chemical suppression of virus in cultured plant tissues. *Ann Appl Biol*, 99:161–169;
- Verma, N., Ram, R., Zaidi, A. 2005.** *In vitro* production of Prunus necrotic ringspot virus- free begonias through chemo- and thermotherapy. *Sci Hortic* 103:239–247;
- Wang, M.R., Chen, L., Zhang, Z., Blystad, DR., Wang, Q.C. 2018.** Cryotherapy: A Novel Method for Virus Eradication in Economically Important Plant Species. In: Loyola-Vargas, V., Ochoa-Alejo, N. (eds) *Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology*, vol 1815. Humana Press, New York, NY;
- Wang, M.R., Cui, ZH., Li, J.W., et al. 2018.** *In vitro* thermotherapy-based methods for plant virus eradication. *Plant Methods*, 14, 87;