

ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

**<<ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΜΕ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΤΟ
ΑΜΠΕΛΙ>>**

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΦΥΤΩΝ



ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΠΑΛΑΤΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ
ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ: ΙΩΑΝΝΑ-ΘΕΟΔΩΡΑ ΠΕΤΡΟΥ

ΑΜ:2010/0006

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2017

ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

**<<ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΜΕ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΤΟ
ΑΜΠΕΛΙ>>**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΙΩΑΝΝΑ-ΘΕΟΔΩΡΑ ΠΕΤΡΟΥ
ΑΜ:2010/0006

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία αυτή άρχισε τον Ιανουάριο του 2016 και ολοκληρώθηκε τον Φλεβάρη του 2017. Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που συνέβαλαν στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ και βαθιά εκτίμηση στον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Παλάτο Γεώργιο, για την συνεργασία του, τις οδηγίες και τις συμβουλές του, καθώς επίσης και για την υπομονετική του καθοδήγηση και τον προσωπικό χρόνο που μου διέθεσε όλα τα χρόνια των σπουδών μου, πέραν από το χρονικό διάστημα εκπόνησης της εργασίας αυτής. Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου και τους φίλους μου που με στήριξαν και με βοήθησαν, να κάνω πραγματικότητα τα όνειρά μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	ΣΕΛ.7
Α.ΕΙΣΑΓΩΓΗ	ΣΕΛ. 8
1ΒΑΣΙΚΕΣ ΟΡΟΛΟΓΙΕΣ.....	ΣΕΛ.8
1.1 Ιστοκαλλιέργεια (Tissue culture)	ΣΕΛ.8
1.2 Μικροπολλαπλασιασμός (Micropropagation).....	ΣΕΛ. 8
1.3 Ολοδυναμία (Totipotency).....	ΣΕΛ. 9
1.4 Έκφυτο (Explant).....	ΣΕΛ. 9
1.5 Κάλλος.....	ΣΕΛ. 9
1.6 Οργανογένεση (Organogenesis).....	ΣΕΛ. 9
1.7 Σωματική Εμβρυογένεση (Somatic embryogenesis)	ΣΕΛ. 10
2 ΣΚΟΠΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ.....	ΣΕΛ. 10
2.1 Ιστορική αναδρομή	ΣΕΛ.11
3 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ.....	ΣΕΛ.13
3.1 Πλεονεκτήματα.....	ΣΕΛ.13
3.2 Μειονεκτήματα	ΣΕΛ.14
4 ΣΤΑΔΙΑ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	ΣΕΛ.15
5 ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΣΤΟΝ ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ.....	ΣΕΛ.16
5.1 Μολύνσεις.....	ΣΕΛ.17
5.2 Αναγέννηση.....	ΣΕΛ.18
5.3 Υάλωση.....	ΣΕΛ.19
5.4 Έκκριση φαινολών.....	ΣΕΛ.20
5.5 Νέκρωση της κορυφή.....	ΣΕΛ.21
6 ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΕΚΦΥΤΩΝ	ΣΕΛ.21
7 ΤΥΠΟΙ ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ.....	ΣΕΛ.23
8 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ.....	ΣΕΛ.25
9 ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ.....	ΣΕΛ.31
9.1 Επιλογή του κατάλληλου μέσου καλλιέργειας.....	ΣΕΛ.39
9.2 Παρασκευή του κατάλληλου θρεπτικού υποστρώματος.....	ΣΕΛ.40
10 ΑΣΗΨΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ	ΣΕΛ.40
10.1 Τεχνικές Αποστείρωσης	ΣΕΛ.41
11 ΣΩΜΑΚΛΩΝΙΚΗ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑ.....	ΣΕΛ.44
Β ΑΜΠΕΛΙ	ΣΕΛ.47
1 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ.....	ΣΕΛ.47
1.1 Η άμπελος στην αρχαιότητα και στη μυθολογία.....	ΣΕΛ.47
1.2 Η σύγχρονη ελληνική αμπελουργία.....	ΣΕΛ.50
2 ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ	ΣΕΛ.50
3 ΚΟΡΙΝΘΙΑΚΗ ΣΤΑΦΙΔΑ.....	ΣΕΛ.51
4 ΣΟΥΛΤΑΝΙΝΑ.....	ΣΕΛ.54

5 ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΤΗΝ ΣΟΥΛΤΑΝΙΝΑ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΚΟΡΙΝΘΙΑΚΗ ΣΤΑΦΙΔΑ.....	ΣΕΛ.55
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	ΣΕΛ.65

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πινάκας 9.1: Κοινώς χρησιμοποιούμενες αυξίνες.....	ΣΕΛ. 36
Πινάκας 9.2: Κοινώς χρησιμοποιούμενες κυτοκινίνες.....	ΣΕΛ. 37
Πίνακας 11.1 : Σωματοκλωνική ποικιλομορφία σε φυτά με εμπορική σημασία.....	ΣΕΛ.45
Πίνακας 2.1: Στοιχεία έκτασης και παράγωγης για την Κορινθιακή σταφίδα και την Σουλτανίνας.....	ΣΕΛ .53

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 8.1: Στήλη απιονισμού ύδατος	ΣΕΛ.26
Εικόνα 8.2: Συσκευή απόσταξης ύδατος.....	ΣΕΛ. 26
Εικόνα 8. 3: Κλίβανος ξηρής αποστείρωσης	ΣΛΕ. 27
Εικόνα 8.4:Μαγνητικός αναδευτήρας.....	ΣΕΛ. 29
Εικόνα 8 5: Πεχάμετρο.....	ΣΕΛ. 30
Εικόνα 8.6:Ζυγός ακριβείας.....	ΣΕΛ.30
Εικόνα 10.1: Μολύνσεις σε δοχεία καλλιέργειας.....	ΣΕΛ. 41
Εικόνα1.1: Τιμητική προσφορά κρασιού σε πολεμιστή πριν την αναχώρηση για τη μάχη.....	ΣΕΛ.49
Εικόνα1.2: Η κύλικα του Εξηκία (530 π.Χ.) όπου απεικονίζεται το πλοίο με το οποίο ταξιδεύει ο Διόνυσος και στο κατάρτι του οποίου έχει αναπτυχθεί μια κληματαριά.....	ΣΕΛ. 49
Εικόνα 3: Κορινθιακή σταφίδα.....	ΣΕΛ. 51

Εικόνα 4: Σουλτανίνα.....	ΣΕΛ. 54
Εικόνα 5 : In vitro καλλιέργεια οφθαλμών ποικιλίας αμπέλου Σουλτανίνα.....	ΣΕΛ.60
Εικόνα 5.1: Αριθμός βλαστών και βλαστός μήκους	ΣΕΛ.61
Εικόνα 5.1:Καλλιέργεια μικρομοσχευμάτων σε τροποποιημένο θρεπτικό υπόστρωμα.....	ΣΕΛ.62

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ ΔΙΑΓΡΑΜΜΑΤΩΝ

Διάγραμμα 6.1:Ανάπτυξη εκφύτου μέσα σε δοχείο καλλιέργειας συναρτήσει του χρόνου.....	ΣΕΛ. 22
---	---------

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Ο σκοπός της παρούσας μελέτης είναι η βιβλιογραφική ανασκόπηση της ιστοκαλλιέργειας καθώς και τις ιστοκαλλιέργειες των ποικιλιών αμπέλου Σουλτανίνα και Κορινθιακής σταφίδας.

Στην παρακάτω εργασία γίνεται ανασκόπηση στις βασικές ορολογίες της τεχνικής της ιστοκαλλιέργειας, στα πλεονεκτήματα της μεθόδου, στα μειονεκτήματα, στα στάδια το μικροπολλαπλασιασμού. Επίσης αναλύονται τα βασικά προβλήματα της ιστοκαλλιέργειας, το θρεπτικό υπόστρωμα όπως και η σωμακλωνική παραλλακτικότητα καθώς και οι τεχνικές αποστείρωσης. Μελετήθηκε η χρήση της ιστοκαλλιέργειας στο αμπέλι στις ποικιλία της Σουλτανίνας και τις Κορινθιακής σταφίδας. Αναλύονται τα βασικά χαρακτηριστικά των παραπάνω ποικιλιών, το θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιείτε καθώς και τα μέρη του εκφύτου.

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1 ΒΑΣΙΚΕΣ ΟΡΟΛΟΓΙΕΣ

1.1 Ιστοκαλλιέργεια (*Tissue culture*)

Η ιστοκαλλιέργεια είναι κάθε διαδικασία αναφερόμενη στην καλλιέργεια κυττάρων, ιστών ή οργάνων σε θρεπτικό μέσο, κάτω από τεχνητά ελεγχόμενες συνθήκες. Η ιστοκαλλιέργεια είναι επίσης γνωστή και ως καλλιέργεια *in vitro* (καλλιέργεια σε ένα γυάλινο δοχείο). (Κίντζιος 2015) Η ιστοκαλλιέργεια βασίζεται στις δύο σημαντικές ιδιότητες του φυτικού κυττάρου, στην ολοδυναμικότητα (*totipotency*) και στην ικανότητα αποδιαφοροποίησης (*de-differentiation*) του. Η ολοδυναμικότητα αναφέρεται στη μοναδική ικανότητα του φυτικού κυττάρου να μπορεί να αναγεννήσει ολόκληρο το φυτό από το οποίο προήλθε ανεξάρτητα από το βαθμό διαφοροποίησης στον οποίο βρίσκεται εκείνη τη στιγμή, ενώ η αποδιαφοροποίηση αναφέρεται στην ικανότητα πλήρως διαφοροποιημένων και ώριμων φυτικών κυττάρων να επαναποκτήσουν μεριστωματικές ιδιότητες. Τα νέα κύτταρα μπορούν με νέα τροποποίηση να αποκτήσουν την απαιτούμενη εξειδίκευση για να εκτελέσουν τον ειδικό τους ρόλο στο σύνολο του φυτικού οργανισμού (Ελευθερίου 1994, Hartmann *et al.* 1997).

1.2 Μικροπολλαπλασιασμός (*Micropropagation*)

Ο μικροπολλαπλασιασμός είναι η σπουδαιότερη εφαρμογή της ολοδυναμίας στη γεωπονική πράξη, καθώς επιτρέπει την αναπαραγωγή ενός ολόκληρου φυτού από δυνητικά κάθε κύτταρο κάθε φυτικού τμήματος, όσο μικρό και αν είναι αυτό. Θεωρητικά, λοιπόν, θα μπορούσαμε να παραλάβουμε δισεκατομμύρια φυτά με την ιστοκαλλιέργεια ενός και μόνο φυτού. Συνήθως ολόκληρα φυτά αναγεννώνται από ομάδες μερικών

χιλιάδων κυττάρων που έχουν συνολικά πολύ μικρή επιφάνεια Η επιφάνεια αυτή είναι ένας ιστός, δηλαδή μια ομάδα κυττάρων με εξειδικευμένη λειτουργία, όπως φύλλο, ρίζα κ.λπ. (Κίντζιος 2015)

1.3 Ολοδυναμία (Totipotency)

Ολοδυναμία είναι η μοναδική ιδιότητα των μεμονωμένων φυτικών κυττάρων να αναγεννώνται σε ολόκληρο φυτό.

1.4 Έκφυτο (Explant)

Έκφυτο είναι οποιοδήποτε κύτταρο, κυτταρικό συσσωμάτωμα, ιστός ή και όργανο (ρίζα, φύλλο, βλαστός ή άνθος) που μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην ιστοκαλλιέργεια.

1.5 Κάλλος

Κάλλος είναι η μάζα αδιαφοροποίητων κυττάρων. Τα κύτταρα του κάλλου είναι ζωντανές μονάδες που διαιωνίζουν το γενετικό υλικό. Η αλόγιστη διαίρεση καταλήγει σε μια άμορφη μάζα κυττάρων, τον κάλλο. Με περιοδικές ανακαλλιέργειες, ο κάλλος μπορεί να διατηρείται συνεχώς. Ο κάλλος που καλλιεργείται στο ίδιο θρεπτικό μέσο συνήθως δεν διαφοροποιείται. Σε ορισμένες περιπτώσεις μπορεί ο κάλλο να δημιουργήσει ορισμένα όργανα ή σωματικά έμβρυα παρ'όλο που οι συνθήκες παραμένουν ίδιες. (Χατζόπουλος 2001)

1.6 Οργανογένεση (Organogenesis)

Οργανογένεση είναι η διαδικασία η οποία τελικά οδηγεί στο σχηματισμό καταβολών οργάνων πάνω στα καλλιεργούμενα έκφυτα. Τα όργανα αυτά μπορεί να ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες οπότε και η οργανογένεση προσδιορίζεται ανάλογα με τον τύπο του παραγόμενου οργάνου. Έτσι διακρίνεται σε βλαστογένεση, ριζογένεση, οφθαλμογένεση, κ.λπ. (Κίντζιος 2015)

1.7 Σωματική Εμβρυογένεση (*Somatic embryogenesis*)

Η σωματική εμβρυογένεση είναι η διαδικασία εκείνη με την οποία δημιουργούνται εμβρυακές δομές πάνω στα καλλιεργούμενα έκφυτα χωρίς να έχει προηγηθεί η φάση της γονιμοποίησης. Τα έμβρυα που δημιουργούνται ονομάζονται σωματικά επειδή προέρχονται από σωματικά κύτταρα (όπως π.χ. τα κύτταρα του φύλλου, του βλαστού ή της ρίζας) τα οποία δεν μπορούν να γονιμοποιηθούν. (Κίντζιος 2015)

Η επιλογή του εκφύτου, του γενοτύπου, η σύσταση του θρεπτικού μέσου και η συγκέντρωση διαφόρων φυτορμονών είναι ουσιαστικοί παράμετροι για την επιτυχημένη σωματική εμβρυογένεση. Η εμβρυογένεση, για το ζυγωτικό αρχίζει με το σχηματισμό του ζυγώτη και τελειώνει κατά την ωρίμανση του σπέρματος. Τα ακραία μεριστώματα του βλαστού εγκαθίστανται και έτσι προκαθορίζεται το μορφολογικό πρότυπο ανάπτυξης και διάπλασης του φυτού. Στη σωματική εμβρυογένεση σχηματίζεται ένα έμβρυο παρόμοιο με το ζυγωτικό που περιέχει τα μεριστώματα, πάνω στον άξονα βλαστού, ρίζας απ' όπου εκπτύσσεται ένα φυτάριο. (Χατζόπουλος 2001)

2 ΣΚΟΠΙΜΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

Ιστοκαλλιέργεια φυτών είναι η επιστήμη της ανάπτυξης φυτικών κυττάρων, ιστών ή οργάνων απομονωμένων από το μητρικό φυτό, μέσα σε ένα δοχείο που περιέχει κατάλληλο τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα σε αποστειρωμένες και ελεγχόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες (George 2008). Διαχωρίζεται από αυτήν των ζωικών στο ότι τα ζωικά κύτταρα μπορούν να διαιωνίζουν το φαινότυπο τους και τα χαρακτηριστικά τους. Έτσι δεν αποδιαφοροποιούνται. Τα φυτικά κύτταρα που προέρχονται από κάποιον ιστό ή από κάποιο όργανο είναι τελείως διαφοροποιημένα. (Χατζόπουλος 2001) Έκφυτο ή μικρομόσχευμα ονομάζεται το μικρό όργανο ή τμήμα ιστού που απομακρύνεται από το μητρικό φυτό και από το οποίο πρόκειται να εγκατασταθεί όλη η καλλιέργεια in vitro. Η

ιστοκαλλιέργεια βασίζεται στις δύο σημαντικές ιδιότητες του φυτικού κυττάρου, στην ολοδυναμία και στην ικανότητα αποδιαφοροποίησης. Η ολοδυναμία αναφέρεται στη μοναδική ικανότητα του φυτικού κυττάρου να μπορεί να αναγεννήσει ολόκληρο το φυτό από το οποίο προήλθε, ενώ η αποδιαφοροποίηση στην ικανότητα πλήρως διαφοροποιημένων και ώριμων φυτικών κυττάρων να ανακτήσουν μεριστωματικές ιδιότητες. Τα νέα κύτταρα μπορούν με νέα διαφοροποίηση να αποκτήσουν την απαιτούμενη εξειδίκευση για να εκτελέσουν τον ειδικό τους ρόλο στο σύνολο του φυτικού οργανισμού (Ελευθερίου 1994, Hartmann et al. 1997).

2.1 Ιστορική αναδρομή

Μερικά από τα πιο σημαντικά γεγονότα στην ιστορία της ανάπτυξης του μικροπολλαπλασιασμού αναφέρονται παρακάτω:

- **1838:** Διατύπωση της θεωρίας της ολοδυναμικότητας από τους Theodor Schwan και Matthias Jacob Schleiden.
- **1865:** Ανάπτυξη του πρώτου διατροφικού διαλύματος βασισμένου σε ανάλυση εδάφους από τον Johann Knop. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε από τους πρώιμους πειραματιστές σε καλλιέργειες χωρίς χόμα και χρησιμοποιείται ακόμα και σήμερα.
- **1902:** Πρώτη απόπειρα ιστοκαλλιέργειας από τον Gottlieb Haberlandt, ο οποίος χρησιμοποίησε το διάλυμα του Knop ενισχυμένο με σακχαρόζη, ασπαραγίνη και πεπτόνη για να αναπτύξει κύτταρα.
- **1904:** Ο E. Hanning καλλιέργησε επιτυχώς ανώριμα έμβρυα.
- **1909:** Πρώτη απόπειρα σύντηξης πρωτοπλαστών από τον Kuster.
- **1920:** Ανάπτυξη σε ασηπτική καλλιέργεια σπόρων και φυταρίων ορχιδέας, σε ένα διατροφικό μέσο με άγαρ. Το γεγονός αυτό ανακοινώθηκε ανεξάρτητα, αλλά σχεδόν ταυτόχρονα, από τους L. Knudson, Noel Bernard και H. Burgeff. Ακόμη, πραγματοποιήθηκε η πρώτη προσπάθεια καλλιέργειας ακρορριζίων από τους W. Kotte και William J. Robbins, η οποία είχε περιορισμένη επιτυχία.
- **1924:** Καλλιέργεια κάλων καρότου από τους R. Blumenthal και P. Meyer.

- **1934:** Ο R. J. Gautheret ήταν ο πρώτος που καλλιέργησε επιτυχώς φυτικό ιστό καμβίου, ενώ ο P. R. White ήταν πρώτος που καλλιέργησε κομμένα ακρορρίζια από τομάτες σε συνεχή καλλιέργεια.
- **1939:** Οι R. J. Gautheret και P. Nocesourt ανακοίνωσαν απεριόριστη ανάπτυξη κάλου από κάμβια καρότου, όταν χρησιμοποίησαν αυξίνη μέσα στο υπόστρωμα, ενώ ο P. R. White ανακοίνωσε επιτυχή καλλιέργεια κάλων καπνού.
- **1941:** Χρήση για πρώτη φορά του γάλακτος καρύδας, το οποίο χρησιμοποιήθηκε από τους J. Van Overbeek, M. E. Conklin και Albert F. Blakeslee, οι οποίοι ανακάλυψαν ότι προκαλούσε σχηματισμό κάλου σε καλλιέργειες εμβρύων. Ανάμεσα στα ενεργά συστατικά που εξήχθησαν από το γάλα καρύδας ήταν διάφορες ουσίες που σήμερα χρησιμοποιούνται συχνά σε καθαρή μορφή σε πολλά υποστρώματα ιστοκαλλιιεργειών.
- **1948:** Σχηματισμός τυχαίων ριζών και βλαστών σε κυτταροκαλλιέργειες καπνού με έλεγχο της σχετικής συγκέντρωσης αυξίνης/αδενίνης (κυτοκινίνης) από τους και Skoog και Tsui.
- **1952:** Παραγωγή φυτών ντάλιας απαλλαγμένων από ιούς, μέσω καλλιέργειας μεριστωμάτων από τους Morel και Martin.
- **1954:** Πρώτη αναγέννηση φυτού από ένα και μόνο κύτταρο από τον Muir.
- **1955:** Ο C. O. Miller ανακάλυψε την κινετίνη, μια ορμόνη που προάγει το σχηματισμό οφθαλμών και ήταν η πρώτη από μια ομάδα ρυθμιστών ανάπτυξης των φυτών, γνωστών πλέον ως κυτοκινίνες. Ακόμη, οι Went και Kenneth V. Alfermann απέδειξαν ότι η αυξίνη IAA προκαλεί ριζογένεση.
- **1956:** Παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών από κυτταροκαλλιέργειες από τους Tulecke και Nickell.
- **1958:** Αναγέννηση φυτών μέσω σωματικής εμβρυογένεσης από το ενδοσπέρμιο του είδους *Citrus ovules* από τους Maheshwari και Rangaswamy.
- **1960:** Οι Morel και Martin καλλιέργησαν ορχιδέες απαλλαγμένες από ιούς, αλλά ταυτόχρονα παρατήρησαν και πολλαπλασιασμό των καλλιιεργειών τους. Ακόμη, ο E. C. Cocking ανέπτυξε μια μέθοδο για την απομάκρυνση του κυτταρικού τοιχώματος με χημικές ενζυμικές μεθόδους.

- **1962:** Δημιουργία του θρεπτικού υποστρώματος Murashige και Skoog, του διασημότερου και πλέον χρησιμοποιημένου βασικού θρεπτικού μέσου για την ιστοκαλλιέργεια των φυτών.
- **1967:** Παραγωγή απλοειδών φυτών από γυρεόκοκκους καπνού από τους Bourgin και Nitsch.
- **1970:** Πρώτη επιτυχημένη χημική σύντηξη πρωτοπλαστών από τον Power.
- **1980:** Ο Kary B. Mullis εφηύρε την PCR (αντίδραση αλυσιδωτής πολυμεράσης).
- **1984:** Μεταμόρφωση φυτικών κυττάρων με πλασμιδιακό DNA από τον Paszkowski και καλλιέργεια φυτικών κυττάρων σε βιοαντιδραστήρα από τους Smart και Fowler.
- **1991:** Μικροπολλαπλασιασμός φυτών σε βιοαντιδραστήρα από τον Ziv. (Κίντζιος 2014, Hartmann et al. 2002, Pierik 1997, Kyte and Kleyn 1996)

3 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΜΕΘΟΔΟΥ

3.1 Πλεονεκτήματα

Η μέθοδος πολλαπλασιασμού in vitro παρουσιάζει πληθώρα πλεονεκτημάτων, τόσο στο αμπέλι όσο και σε άλλα φυτικά είδη και εξυπηρετεί αρκετούς σκοπούς όπως (George 1993, George et al. 2008, Μετζάκης 2005):

1. Εξυγίανση ποικιλιών που έχουν προσβληθεί από ιούς (γίνεται με μεριστωματικό πολλαπλασιασμό σε συνδυασμό με θερμοθεραπεία ή χημειοθεραπεία
2. Παραγωγή πολλαπλασιαστικού υλικού ή κλώνων των οποίων τα μητρικά φυτά πολλαπλασιάζονται δύσκολα ή με βραδύ ρυθμό με τις κλασικές μεθόδους.
3. Γενετική βελτίωση και δημιουργία νέων γονοτύπων από τυχαίες μεταλλάξεις ή από κατευθυνόμενες και προκαθορισμένες αλλαγές στο γενετικό κώδικα.
4. Μαζική παραγωγή φυτών γενετικώς πανομοιότυπων του μητρικού. Ο θεωρητικός ρυθμός πολλαπλασιασμού με την τεχνική αυτή είναι εξαιρετικά μεγάλος. Από ένα φυτό μπορεί να προκύψουν ως και ένα εκατομμύριο φυτά στο χρονικό διάστημα ενός εξαμήνου.

5. Απόκτηση μεγάλου αριθμού φυτών από κλώνους και ποικιλίες όπου ο αριθμός των μητρικών φυτών είναι περιορισμένος.
6. Δημιουργία τράπεζας γενετικού υλικού σε *in vitro* συνθήκες(με τη διατήρηση μεριστωμάτων ή σωματικών εμβρύων
7. Αποφεύγονται ορισμένες καλλιεργητικές τεχνικές, όπως άρδευση, ζιζανιοκτονία, καταπολέμηση εντόμων και ασθενειών κ.α.
8. Το υλικό που αναπαράγεται βλαστικά μπορεί να διατηρηθεί επί μακρό χρονικό διάστημα.
9. Η αναπαραγωγή μπορεί να συνεχιστεί καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου ανεξάρτητα τις καιρικές συνθήκες.

3.2 Μειονεκτήματα

Τα μειονεκτήματα του μικροπολλαπλασιασμού είναι τα παρακάτω (Ελευθερίου.,1994,Μετζάκης 2005):

1. Απαιτείται προχωρημένη εκπαίδευση για να είναι εξασφαλισμένη η επιτυχία της καλλιέργειας
2. Το υψηλό κόστος που απαιτείται για την δημιουργία των εξειδικευμένων εγκαταστάσεων, την προμήθεια του εξοπλισμού και τη λειτουργία τους. Το πρόβλημα αυτό αντιμετωπίζεται με τη μαζικοποίηση της παραγωγής και με την παραγωγή φυταρίων υψηλής προστιθέμενης αξίας.
3. Απαιτείται εξειδικευμένο προσωπικό που θα είναι υπεύθυνο για τις εργασίες, οι οποίες πρέπει να πραγματοποιούνται σε ασηπτικές συνθήκες.
4. 4.Για να επιβιώσουν τα νεαρά φυτάρια πρέπει να καλλιεργηθούν σε θρεπτικό διάλυμα, το οποίοπεριέχει ζαχαρόζη ή μια άλλη πηγή άνθρακα. Έτσι , τα φυτά που παράγονται αρχικά δεν είναι αυτότροφα και πρέπει να περάσουν μια μεταβατική περίοδο, προτού αποκτήσουν τροφική ανεξαρτησία .
5. Η αναπαραγωγή πρέπει να γίνεται σε συνθήκες που εξασφαλίζουν τη γενετική σταθερότητα των αναπαραγόμενων φυτών. Για αυτό το σκοπό θα πρέπει να λειτουργεί ένα αδιάκοπο σύστημα ελέγχου και αξιολόγησης των ποικιλιών που αναπαράγονται.

6. Εάν η διαδικασία της ιστοκαλλιέργειας περάσει από το στάδιο του κάλλου τότε είναι πολύ πιθανό να δημιουργηθούν μεταλλάξεις στα έκφυτα (σωμακλωνική παραλλακτικότητα).

4 ΣΤΑΔΙΑ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Τα στάδια του μικροπολλαπλασιασμού όπως αυτά έχουν περιγραφεί από τον Murashige (1974) είναι πέντε(George et al. 2008):

Στάδιο 0: Επιλογή μητρικών φυτών και προετοιμασία.

Το μητρικό φυτό από το οποίο θα ληφθούν τα έκφυτα είναι αναγκαίο να επιλεγεί πολύ προσεκτικά και να είναι τυπικό του είδους ή της ποικιλίας. Η διατήρηση συνθηκών με μειωμένο φόρτο παθογόνων χρήζει ιδιαίτερης σημασίας (Deberg and Zimmerman, 1993) Σε περίπτωση που είναι επιθυμητό να αναπαραχθούν φυτά απαλλαγμένα από ιούς, είναι απαραίτητο πριν την παραλαβή εκφύτων να πραγματοποιούνται ιολογικοί έλεγχοι. Παράλειψη αυτού του ελέγχου συχνά ελλοχεύει δυσάρεστες συνέπειες.

Στάδιο I: Εγκατάσταση της ασηπτικής καλλιέργειας.

Στο στάδιο αυτό παραλαμβάνεται το έκφυτο από το μητρικό φυτό, αφού απολυμανθούν με διάφορα απολυμαντικά μέσα για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, τοποθετούνται συνήθως σε δοκιμαστικούς σωλήνες με κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα. Η επιλογή του πιο κατάλληλου απολυμαντικού μέσου, της συγκέντρωσης και της διαδικασίας καθορίζεται από πολλούς παράγοντες, ιδιαίτερα τον τύπο του εκφύτου και την εποχή του έτους. Ο στόχος του σταδίου είναι η επιτυχής εγκατάσταση απολυμασμένου φυτικού υλικού σε ασηπτικές συνθήκες και η έναρξη της διαδικασίας ανάπτυξής του. Η φάση αυτή τελειώνει μόλις το έκφυτο αρχίσει να βλαστάνει. (Μετζάκης 2005)

Στάδιο II: Βλαστικός πολλαπλασιασμός.

Στο στάδιο αυτό το φυτικό υλικό που εγκαταστάθηκε με επιτυχία μεταφέρεται σε νέο θρεπτικό υπόστρωμα με κατάλληλες αναλογίες ρυθμιστών ανάπτυξης που ελέγχουν τον ρυθμό παραγωγής των νέων μικροβλαστών. Οι νέοι μικροβλαστοί σε συγκεκριμένα

χρονικά διαστήματα διαχωρίζονται, κόβονται σε μικρομοσχεύματα και επανακαλλιεργούνται με αποτέλεσμα να αυξάνεται ο αριθμός του φυτικού υλικού με γεωμετρική πρόοδο. Το στάδιο αυτό συνεχίζεται μέχρι να εξασφαλιστεί ο απαιτούμενος αριθμός βλαστών.

Στάδιο III: Ριζοβολία μικροβλαστών.

Μπορεί να επιτευχθεί in vitro ή ex vitro. Οι μικροβλαστοί που σχηματίστηκαν, αφού διαχωριστούν, είτε τοποθετούνται κάτω από ασηπτικές συνθήκες σε νέο θρεπτικό υπόστρωμα με αυξημένη την αναλογία των αυξινών, είτε μεταφυτεύονται σε θερμοκήπιο κάτω από συνθήκες υψηλής σχετικής υγρασίας για να σχηματίσουν εκεί ρίζες. (Παπαχατζής και Καλορίζου 2008)

Στάδιο IV: Προσαρμογή στις φυσικές συνθήκες του περιβάλλοντος (εγκλιματισμός ή σκληραγώγηση).

Είναι το στάδιο εκείνο κατά το οποίο γίνεται η μετάβαση των φυταρίων από συνθήκες in vitro σε πραγματικές. Τα φυτάρια μεταφυτεύονται σε ατομικό γλαστράκι και τα γλαστράκια τοποθετούνται για 10-15 ημέρες σε θάλαμο υδρονέφωσης ή σε κατάλληλα διαμορφωμένο θερμοκήπιο. Στην αρχή τοποθετούνται κάτω από συνθήκες πολύ υψηλής σχετικής υγρασίας και χαμηλής έντασης φωτός, σταδιακά όμως περνούν σε κανονικές συνθήκες περιβάλλοντος όπου και συνεχίζουν την ανάπτυξή τους μέχρι να είναι έτοιμα για τη μεταφύτευση στην τελική θέση ανάπτυξής τους. Ίσως είναι το δυσκολότερο στάδιο στην όλη διαδικασία γιατί φυτάρια που μέχρι τώρα είναι ετερότροφα και αναπτύσσονται κάτω από ιδανικές θρεπτικές συνθήκες μέσα στο εργαστήριο, θα πρέπει σταδιακά να επιβιώσουν σε κανονικές συνθήκες. Διαρκεί συνολικά 30-40 ημέρες. (Μετζάκης 2005, Hartmann et al. 2002)

5 ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΣΤΟΝ ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ

Πολλές φορές κατά την διάρκεια της φάσης του μικροπολλαπλασιασμού, συναντάμε ορισμένα προβλήματα, τα οποία πρέπει να επιλυθούν, αν θέλουμε να έχουμε επιτυχία στην καλλιέργεια. Τα πιο σημαντικά είναι (Μετζάκης, 2005):

5.1 Μολύνσεις

Αν και ο μικροπολλαπλασιασμός είναι ένα σύστημα απαλλαγμένο από μόλυνσης, είναι συχνό φαινόμενο, η εμφάνιση μολύνσεων σε διάφορα στάδια κατά την διάρκεια μιας καλλιέργειας, όπως:

1. Κατά την απολύμανση του έκφυτου. Με την απολύμανση καταστρέφονται μόνο έντομα και μικροοργανισμοί που βρίσκονται στην επιφάνειά του έκφυτου. Συνεπώς είναι δυνατόν κάποιοι μικροοργανισμοί που βρίσκονται και κινούνται μέσα στο φυτό να επιζήσουν. Ορισμένοι τύποι μικροβίων, είναι δυνατόν να παραμείνουν στην επιφάνεια του εκφύτου και μετά την απολύμανση, διατηρημένοι σε λανθάνουσα κατάσταση, για πολλές γενεές. Χωρίς να γίνουν αντιληπτοί και να προκαλέσουν κάποια υστέρηση στην ανάπτυξη. Με την χρήση αντιβιοτικά ή μυκητοκτόνα στο υπόστρωμα μπορούμε να ελέγξουμε τέτοιες καταστάσεις. Η καλύτερη λύση είναι η διατήρηση αμόλυντων μητρικών φυτών στο εργαστήριο.(KnaussandMiller, 1987).
2. Κατά την υποκαλλιέργεια ήδη μολυσμένων φυτών. Τα έκφυτα μπορεί να διατηρούν κάποιο μολυσματικό οργανισμό σε λανθάνουσα κατάσταση τα οποία δεν έχουν εκδηλώσει κάποια ασθένεια. Κατά την υποκαλλιέργεια, πρέπει να μεταφέρουμε μόνο καλλιέργειες που να είμαστε απόλυτα σίγουροι ότι είναι αμόλυντες.
3. Κατά την διάρκεια των εργασιών του εμβολιασμού . Είναι ο συνηθέστερος τρόπος μεταφοράς μολυσματικών οργανισμών στα έκφυτα, γι' αυτό θα πρέπει να τηρούνται αυστηρά τα μέτρα που υπάρχουν για την χρήση του εμβολιασμού. Οι μολύνσεις από τους μύκητες όταν αναπτυχθούν, είναι ορατές με γυμνό μάτι. Οι μολύνσεις από βακτήρια όμως είναι δυσκολότερο να διαπιστωθούν γιατί σε ορισμένα φυτικά είδη, παραμένουν στον φυτικό ιστό σε λανθάνουσα κατάσταση για καιρό, μέχρι κάποιος περιβαλλοντολογικός παράγοντας (αλλαγή στην σύνθεση υποστρώματος, θερμοκρασίας) να προκαλέσει την ανάπτυξή τους. Οι αιτίες των μολύνσεων, τα συμπτώματα και η αντιμετώπισή τους, αναλύονται στο πειραματικό μέρος της εργασίας. Για να έχουμε λοιπόν επιτυχία στις καλλιέργειες θα πρέπει να δώσουμε προσοχή στα παρακάτω:
 - Να χρησιμοποιούμε τις υπεριώδεις ακτίνες και τους ανεμιστήρες του θαλάμου.

- Τα μητρικά φυτά πρέπει να είναι απαλλαγμένα από διασυστηματικούς μικροοργανισμούς.
- Το υπόστρωμα της καλλιέργειας θα πρέπει να είναι αποστειρωμένο και απαλλαγμένο από μικροοργανισμούς.
- Το έκφυτο, είτε πρόκειται περί ακραίου μεριστώματος είτε περί βλαστού, πρέπει να απολυμανθεί προτού τοποθετηθεί στο υπόστρωμα.
- Η μεταφορά των εκφύτων από το ένα δοχείο στο άλλο, να γίνεται μέσα στην τράπεζα νηματικής ροής, χρησιμοποιώντας πάντα αποστειρωμένα εργαλεία.
- Οι μολυσμένες καλλιέργειες πρέπει να απομακρύνονται το γρηγορότερο δυνατόν και να καταστρέφονται
- Να χρησιμοποιούμε αλκοόλη 95% για την αποστείρωση των επιφανειών του θαλάμου εμβολιασμού πριν και μετά το τέλος του εμβολιασμού
- Οι λαβίδες και τα νυστέρια που χρησιμοποιούμε να καίγονται στη φλόγα που υπάρχει στον θάλαμο για μερικά δευτερόλεπτα
- Να αποστειρώνουμε τα χεριά μας πριν από κάθε εμβολιασμό σε διαφορετικό δοχείο

5.2 Αναγέννηση

Αποτελεί χαρακτηριστικό των φυτών όταν ένα τμήμα του ιστού τους, μπορεί να δημιουργήσει *in vitro* νέους βλαστούς ή έμβρυα. Για να είναι επιτυχής ο μικροπολλαπλασιασμός, το έκφυτο που θα τοποθετηθεί σε συνθήκες *in vitro*, πρέπει να προσαρμοστεί στις νέες τεχνητές συνθήκες και να αρχίσει να πολλαπλασιάζεται σε σύντομο χρονικό διάστημα. Το φαινόμενο αυτό της δημιουργίας νέων βλαστών επιτυγχάνεται, μόνο όταν το έκφυτο ενεργοποιήσει τον μηχανισμό αναγέννησης, ο οποίος περιλαμβάνει την διακοπή της κυριαρχίας της κορυφής και μια ολόκληρη σειρά φυσιολογικών, μορφολογικών και βιοχημικών τροποποιήσεων. Η αναγέννηση των φυτών εξαρτάται από ενδογενείς παράγοντες (τη γενετική σύνθεση φυτού και είδος εκφύτου) και εξωγενείς παράγοντες (φύση και σύνθεση θρεπτικού υποστρώματος, θερμοκρασία και φωτισμός του θαλάμου ανάπτυξης και το μικροκλίμα μέσα στα δοχεία καλλιέργειας). Για την επιτύχει αναγέννηση του έκφυτο όταν παραμένει κοιμώμενο για αρκετές

επανακαλλιέργειες, μπορούμε να επιταχύνουμε τον χρόνο αντίδρασης, εφαρμόζοντας τα παρακάτω:

- Αύξηση της γιββεριλίνης στο υπόστρωμα
- Μεταφορά σε διάλυμα με αυξημένη δόση κυτοκινίνης
- Βύθιση των βλαστών σε μεγαλύτερο βάθος στο υπόστρωμα
- Αύξηση του αριθμού των επανακαλλιεργειών

Στα μητρικά φυτά, μπορούμε να βοηθήσουμε το πρόβλημα της αναγέννησης με επαναλαμβανόμενο ψεκασμό με BAP (50 mg/l), 5-6 φορές την εβδομάδα και αφαίρεση των πιο ηλικιωμένων οργάνων, για τη δημιουργία νέας βλάστησης. Επίσης πειράματα έδειξαν, ότι η χρήση του θειαζουρόν (TDZ), αυξάνει την ικανότητα αναγέννησης ορισμένων φυτών (Shan et al., 2000).

5.3 Υάλωση

Είναι μια φυσιολογική ανωμαλία, για την οποία ευθύνονται εκτός από τις κυτοκινίνες, η συγκέντρωση του παράγοντα πήξης του μέσου (άγαρ), των ιόντων NH_4^+ (Ziv 1991, Mhatre et al. 2000), αλλά και των ιόντων Cl^- (Quoirin and Lepoivre 1977, Paques and Boxus 1987) στο θρεπτικό υπόστρωμα. Παρατηρείται συχνότερα σε καλλιέργειες του φυτικού υλικού σε υδαρές υπόστρωμα. Το φαινόμενο αυτό, το οποίο συχνά ακολουθείται από νέκρωση της κορυφής, έχει ως αποτέλεσμα την νέκρωση του φυτικού υλικού και μπορεί να προκαλέσει μια απώλεια της τάξεως του 20-50%. Οι βλαστοί που έχουν υποστεί υάλωση, αναγνωρίζονται από τα φύλλα, τα οποία έχουν διάφανη όψη, είναι παχύτερα, υδαρή, κατσαρωμένα και σπάζουν με μεγάλη ευκολία και οι βλαστοί γίνονται υπερτροφικοί ενώ η ξυλοποίηση τους είναι ελλειμματική. Σε κάποια είδη υπάρχει μεγάλος αριθμός από μη φυσιολογικά στόματα με δύσμορφα καταφρακτικά κύτταρα (Miguens et al. 1993) Οι παράγοντες οι οποίοι συμβάλλουν στην εκδήλωση αυτού του φαινομένου είναι ο γενότυπος, ο τύπος και η συγκέντρωση του άγαρος, η σύνθεση του υποστρώματος, οι συνθήκες του περιβάλλοντος, συμπεριλαμβανομένης της συγκέντρωσης μεθυλενίου στο δοχείο καλλιέργειας και η μεταχείριση των νεαρών βλαστών. Περιορισμός της υάλωσης μπορεί να επιτευχθεί με την συνεχή μεταφορά σε νέο υπόστρωμα (υποκαλλιέργεια) το οποίο στερείται κυτοκινίνης και έχει προστεθεί πηκτίνη. Το επειδή

περιεχόμενο του διαλύματος σε ανόργανα άλατα παίζει σημαντικό ρόλο, χρήσιμη είναι η μείωση της αναλογία των μακροστοιχείων. Σημαντικό ρολό φαίνεται να έχει ο τύπος του δοχείου και πιο συγκεκριμένα του πώματός του, στην εκδήλωση του φαινομένου. Η συγκέντρωση αιθυλενίου στο εσωτερικό του δοχείου επιτείνει την υάλωση. Άρα το δοχείο δεν πρέπει να κλείνει αεροστεγώς, ώστε να επιτρέπεται η ανταλλαγή αερίων μεταξύ του εσωτερικού και του εξωτερικού χώρου (Paoli et al., 1994). Σε μερικές περιπτώσεις η προσθήκη ενεργού άνθρακα σε δόση 100-500 mg/l μειώνει το ποσοστό της υάλωσης, ίσως επειδή ο ενεργός άνθρακας απορροφά ορισμένες τοξικές ουσίες, οι οποίες συγκεντρώνονται μέσα στο δοχείο καλλιέργειας. Ακόμη, η υποβολή των καλλιεργειών σε χαμηλή θερμοκρασία μπορεί να βελτιώσει την κατάσταση για τα έκφυτα οπωροφόρων. Όλα τα παραπάνω θα πρέπει να αξιολογηθούν και να δοκιμασθούν πειραματικά, ακόμα και σε συνδυασμό μεταξύ τους, ώστε να βρεθεί κάποια λύση για κάθε είδος, σε αυτό το πολύπλοκο πρόβλημα το οποίο δυστυχώς, είναι ένα αρκετά συχνό φαινόμενο κατά τον μικροπολλαπλασιασμό.

5.4 Έκκριση φαινολών

Ορισμένες καλλιέργειες *in vitro* εκκρίνουν φαινολικές ουσίες (τανίνες ή υδροξυφαινόλες), οι οποίες κατά την εγκατάσταση του εκφύτου διαχέονται στο υπόστρωμα. Στην περίπτωση αυτή, η αύξηση του φυτικού ιστού παρεμποδίζεται και αρχίζει μια διαδικασία αποδιοργάνωσης. Η παραγωγή φαινολών, είναι πιο εμφανής στα είδη εκείνα τα οποία περιέχουν τέτοιες ουσίες σε μεγάλο ποσοστό στην φύση (δενδρώδη και ποώδη φυτά). Ακόμα και η χρονική περίοδος που λαμβάνονται τα έκφυτα φαίνεται να παίζει ρόλο. Η μέθοδος που εφαρμόζεται περισσότερο είναι η υποκαλλιέργεια σε νέο υπόστρωμα, αμέσως μόλις γίνει αντιληπτή η έκκριση φαινολών 2-3 φορές κάθε μέρα. Μπορούμε να εφαρμόσουμε και προληπτικά μέτρα. Θα πρέπει να φροντίσουμε να περιορίσουμε την συγκέντρωση των φαινολών, πλένοντας τους βλαστούς με αποστειρωμένο νερό για μερικές ώρες, πριν από την καλλιέργειά τους *in vitro*. Η έναρξη της καλλιέργειας σε υγρό θρεπτικό διάλυμα, μπορεί να συμβάλει σημαντικά στην επιτυχία της καλλιέργειας. Η προσθήκη στο υπόστρωμα ορισμένων ουσιών όπως PVP (polyvinylpyrrolidone) που απορροφούν ή αδρανοποιούν τις πολυφαινόλες, βρίσκει ευρεία εφαρμογή. Επίσης, η

προσθήκη ενεργού άνθρακα μπορεί να βελτιώσει την κατάσταση, μειώνοντας όμως τον ρυθμό πολλαπλασιασμού. Ακόμαορισμένες αντιοξειδωτικές ουσίες (ασκορβικό οξύ, κιτρικό οξύ,μερκαπτοαιθανόλη), μπορούν να χρησιμοποιηθούν με καλά αποτελέσματα.(Hartman and Kester, 1997., Πλαστήρα, 1990).

5.5 Νέκρωση της κορυφή

Πρόκειται για μία εκφυλιστική εξέλιξη, η οποία εμφανίζεται αρκετά συχνά στα δενδρώδη είδη και μπορεί να προκαλέσει σοβαρές απώλειες σε πολλαπλασιαστικό υλικό. Εμφανίζεται ως αποξήρανση της κορυφής του βλαστού του κεντρικού στελέχους και προοδευτικά των πλευρικών. Οι κύριες αιτίες της νέκρωσης της κορυφής είναι:

- Συνέπεια της υάλωσης του βλαστού.
- Ελλιπής ανταλλαγή αερίων με το εξωτερικό περιβάλλον, με αποτέλεσμα την συγκέντρωση αιθυλενίου στο εσωτερικό του δοχείου καλλιέργειας, το οποίο προκαλεί τοξικά φαινόμενα.
- Η ύπαρξη βλαστών προερχόμενων από αναγέννηση (τρυφεροί βλαστοί), οι οποίοι είναι ευαίσθητοι στο φως του θαλάμου ανάπτυξης.
- Αυξημένη δόση των ορμονών ριζοβολίας, οι οποίες εμποδίζουν την βλάστηση.

Το φαινόμενο αυτό εκδηλώνεται σε όλες τις φάσεις του μικροπολλαπλασιασμού (ιδιαίτερα κατά το στάδιο ριζοβολίας). Τα μέτρα που πρέπει να πάρουμε είναι να μειώσουμε τον φωτισμό και την θερμοκρασία στον θάλαμο ανάπτυξης και κατά την διάρκεια της ριζοβολίας να περιορίσουμε την δόση της αυξίνης.

6 ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΕΚΦΥΤΩΝ

Από τη στιγμή που το έκφυτο εγκατασταθεί in vitro, διεγείρεται ο σχηματισμός νέων βλαστών. Ο πολλαπλασιασμός, μέσω του σχηματισμού μασχαλιαίων ή και επίκτητων βλαστών, έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη μεγάλου αριθμού φυταρίων, σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα. Η ικανότητα των εκφύτων να πολλαπλασιάζονται in vitro

επιηρεάζεται από τον γονότυπο του φυτού, το είδος του εκφύτου και την ηλικία του μητρικού φυτού από το οποίο πήραμε το έκφυτο, αφού γενικά νεότερα τμήματα αντιδρούν καλύτερα σε συνθήκες μικροπολλαπλασιασμού.

Γενικά, η ανάπτυξη του εκφύτου, από τη στιγμή της τοποθέτησής του στο θρεπτικό υπόστρωμα:

ΦΑΣΗ I: Φάση προσαρμογής

Το έκφυτο έρχεται σε επαφή με το υπόστρωμα και προσαρμόζεται στις νέες συνθήκες. Στη φάση αυτή δεν παρατηρείται καμία ανάπτυξη.

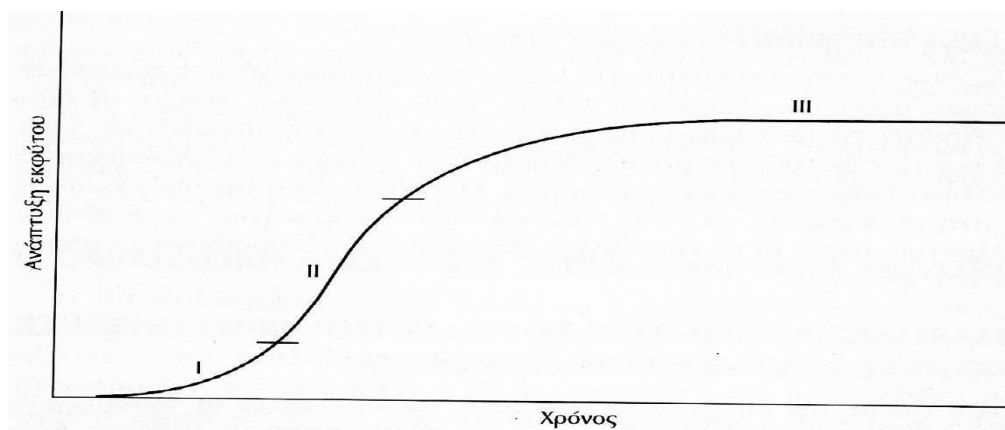
ΦΑΣΗ II: Φάση εκθετικής ανάπτυξης

Η φάση αυτή χαρακτηρίζεται από έντονη κυτταροδιαίρεση και ταχεία, εκθετική ανάπτυξη του εκφύτου. Έχουμε ανάπτυξη κάλου ή/και βλαστών ή/και ριζών.

ΦΑΣΗ III: Φάση ηρεμίας ή στατική φάση

Σταματά η ανάπτυξη του φυταρίου, λόγω της εξάντλησης των θρεπτικών στοιχείων, της έλλειψης οξυγόνου και της συγκέντρωσης τοξικών μεταβολιτών.

Η ανάπτυξη του εκφύτου σε συνάρτηση με τον χρόνο φαίνεται στο παρακάτω διάγραμμα.



Διάγραμμα 6. I: Ανάπτυξη εκφύτου μέσα σε δοχείο καλλιέργειας συναρτήσει του χρόνου (Μετζάκης 2005)

Για να μην ανασταλεί η ανάπτυξη των φυταρίων που έχουν ήδη σχηματιστεί, θα πρέπει να μεταφερθούν σε νέο υπόστρωμα στο τέλος της εκθετικής φάσης. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται *υποκαλλιέργεια*. Κατά την υποκαλλιέργεια οι σχηματισμένοι βλαστοί διαχωρίζονται, διαιρούνται και μεταφέρονται σε νέο θρεπτικό υπόστρωμα. Για να μειωθεί ο κίνδυνος μολύνσεων, θα πρέπει η υποκαλλιέργεια να γίνεται στο θάλαμο εμβολιασμού και τα εργαλεία να αποστειρώνονται μετά από κάθε κοπή. Ακόμη, θα πρέπει να καίγεται ο λαιμός του δοχείου πριν από την εξαγωγή του εκφύτου και τέλος, δεν θα πρέπει να μεταφέρονται στο ίδιο δοχείο έκφυτα που προέρχονται από διαφορετικά δοχεία.

Η υποκαλλιέργεια μπορεί να συνεχιστεί χωρίς την εμφάνιση δυσμενών αποτελεσμάτων, αλλά συνήθως κατά τις υποκαλλιέργειες των περισσότερων μη οργανωμένων, αλλά και μερικών οργανωμένων κυττάρων, συγκεντρώνονται κύτταρα με γενετικές μεταλλάξεις (σωμακλωνική παραλλακτικότητα). Το φαινόμενο αυτό οδηγεί στην τροποποίηση των χαρακτήρων της καλλιέργειας, δηλαδή κάποια από τα παραγόμενα φυτά δεν θα είναι πιστά αντίγραφα του μητρικού. (Μετζάκης 2005)

7 ΤΥΠΟΙ ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ

Στο σύνολο των μεθόδων του μικροπολλαπλασιασμού, ένα μικρό τμήμα του μητρικού φυτού αποκόπτεται από αυτό, αποστειρώνεται για να απαλλαγεί από μικροοργανισμούς και τοποθετείται σε δοχείο με θρεπτικό υπόστρωμα για καλλιέργεια. Το τμήμα αυτό του μητρικού φυτού ονομάζεται *έκφυτο* και μπορεί να είναι οποιοδήποτε τμήμα του μητρικού φυτού, το οποίο μπορεί να το αναπαράξει πιστά. (Ελευθερίου 1994). Έτσι, οι τύποι του μικροπολλαπλασιασμού, ανάλογα με το είδος του εκφύτου, διακρίνονται ως εξής:

Α) *Καλλιέργεια τμημάτων με οργανωμένη ανάπτυξη*, όπου χρησιμοποιούνται οργανωμένα τμήματα φυτών ή όργανα, τα οποία αναπτύσσονται και δίνουν γένεση σε ολοκληρωμένα φυτά.

Στο είδος αυτής της καλλιέργειας περιλαμβάνονται:

- Καλλιέργεια σπόρων ή μικρών καρπών
- Καλλιέργεια εμβρύων

- Καλλιέργεια βλαστικών κορυφών
- Καλλιέργεια ακραίων μεριστωμάτων
- Καλλιέργεια ανθικών μεριστωμάτων
- Καλλιέργεια ριζών

B) Καλλιέργεια τμημάτων με μη οργανωμένη ανάπτυξη, όπου χρησιμοποιούνται τμήματα με περιορισμένο αριθμό εξειδικευμένων κυττάρων και δεν διαθέτουν κάποια εμφανή δομή. Από τέτοιους, μη οργανωμένους ιστούς, με κατάλληλες μεταχειρίσεις μπορούμε να αναπτύξουμε οργανωμένους ιστούς. Η διαδικασία της δημιουργίας τέτοιων οργάνων ονομάζεται *οργανογένεση* ή *μορφογένεση*.

Στο είδος αυτής της καλλιέργειας περιλαμβάνονται:

- Καλλιέργεια κυττάρων
- Καλλιέργεια ανθών
- Καλλιέργεια στύλων
- Καλλιέργεια κάλου

Η επιλογή του κατάλληλου εκφύτου, με το οποίο θα αρχίσουμε την καλλιέργεια, εξαρτάται από το είδος και την ποικιλία του φυτού καθώς και από το σκοπό της καλλιέργειας. (Μετζάκης 2005)

Γ) Καλλιέργειες που προέρχονται από μεμονωμένα κύτταρα περιλαμβάνουν τις:

- Καλλιέργειες σειρών που προέρχονται από μεμονωμένα κύτταρα: Η διαδικασία αποτελεί ένα τρόπο διαχωρισμού γενετικά διαφορετικών κυτταρικών σειρών από έναν μικτό πληθυσμό. Προκαλώντας τεχνητά γενετική διαφοροποίηση μεταξύ των κυττάρων μιας καλλιέργειας και κατόπιν εφαρμόζοντας συγκεκριμένη διαδικασία επιλογής μπορούν να προκύψουν ανθεκτικές σειρές κυττάρων και στη συνέχεια να αναγεννηθούν φυτά με όμοια χαρακτηριστικά (Bellcampi et al. 1985).
- Καλλιέργειες πρωτοπλαστών: Οι πρωτοπλάστες, που είναι το ζωντανό μέρος του φυτικού κυττάρου αποτελούμενο από τα οργανίδια και τις δομές εκτός από το κυτταρικό τοίχωμα, απομονώνονται με ενζυμική συνήθως απομάκρυνση του κυτταρικού τοιχώματος σε διάλυμα με κατάλληλη ωσμωτική πίεση και μπορούν να ανασχηματίσουν κυτταρικό τοίχωμα και να διαιρεθούν. Προκύπτει τελικά ομάδα κυττάρων που σχηματίζει κάλλο από τον οποίο μπορεί να

αναγεννηθούν φυτά. Οι καλλιέργειες πρωτοπλαστών χρησιμοποιούνται ευρύτατα στην έρευνα των φυτικών ιών και στην τροποποίηση του γονιδιώματος ενός κυττάρου με την εισαγωγή επιλεγμένων τμημάτων DNA. Είναι δυνατή ακόμη η συνένωση δύο πρωτοπλαστών με αποτέλεσμα τη δημιουργία σωματικών υβριδίων (EvansandBravo 1983, Ελευθερίου 1994, Georgeetal. 2008).

8 ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΣ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ

Η δημιουργία οποιουδήποτε ιστοκαλλιεργητικής μονάδας απαιτεί την ύπαρξη βασικού εργαστηριακού εξοπλισμού ή ακόμα και η χρήση εξειδικευμένων οργάνων και εργαλείων. Μπορούμε να εγκαταστήσουμε μια απλή ιστοκαλλιέργεια χρησιμοποιώντας ορισμένα στοιχειώδη εξαρτήματα. Η διαθέσιμη υποδομή για ένα ιστοκαλλιεργητικό πείραμα πρέπει να εξασφαλίζει την απομάκρυνση των μικροβίων από το περιβάλλον της καλλιέργειας.(Κίντζιος 2015)

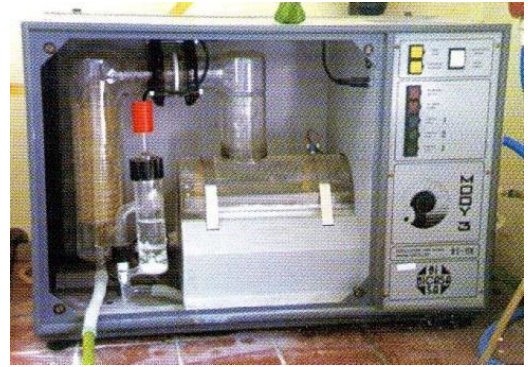
Μια μονάδα μικροπολλαπλασιασμού αποτελείται από ανεξάρτητους χώρους

Για την κατασκευή μιας μονάδας μικροπολλαπλασιασμού πρέπει να υπάρχουν ορισμένη χώροι απαραίτητων για τη πραγματοποίηση των εργασιών. Οι χώροι αυτοί πρέπει να είναι όσο το δυνατόν διαχωρισμένοι και απομονωμένοι, είναι οι εξής:

1.Γενικός χώρος καθαρισμού και έκπλυσης σκευών: είναι ο χώρος που γίνεται ο καθαρισμός των διαφόρων εργαλείων και σκευών που χρησιμοποιούνται στην ιστοκαλλιέργεια. Πρέπει να είναι όσο το δυνατόν απομονωμένος από τους υπόλοιπους και εντελώς απομονωμένος από τον χώρο ασηπτικής μεταφοράς και τον χώρο ανάπτυξης καλλιεργείων. Περιλαμβάνει λεκάνες και νεροχύτες καθαρισμού, παροχές νερού (βρύση με ζεστό και κρύο νερό), χώρους στεγνώματος των σκευών, χώρους απόρριψης και αποκομιδής απορριμμάτων και πρέπει να διαθέτει διάταξη απορροής υγρών λυμάτων.(Κίντζιος 2015) Στο χώρο αυτό τοποθετούνται και η στήλη απιονισμένου ύδατος (εικόνα 8.1), καθώς και η συσκευή απόσταξης ύδατος (εικόνα 8.2). (Μετζάκης 2005)



Εικόνα 8.1: Στήλη απιονισμού ύδατος (Μετζάκης 2005)



Εικόνα 8.2: Συσκευή απόσταξης ύδατος (Μετζάκης 2005)

2. Χώρος παρασκευής, αποστείρωσης και αποθήκευσης θρεπτικού υποστρώματος: στον χώρο αυτό γίνεται η δημιουργία του θρεπτικού υποστρώματος, στο οποίο θα καλλιεργηθούν τα έκφυτα. Περιλαμβάνει προθήκη με χημικές ουσίες και διαλύματα, προθήκη με σκεύη καλλιέργειας (σωλήνες, τρυβλία) και άλλα σκεύη και εργαλεία, αναλυτικό ζυγό, πεχάμετρο, μαγνητικό αναδευτήρα, αυτόκαυστο, ψυγείο-καταψύκτη και χώρο αποθήκευσης έτοιμου υποστρώματος (κατασκευασμένο έτσι ώστε να προφυλάσσει το υπόστρωμα από τη σκόνη και το φως) και για αυτό θα πρέπει να είναι αρκετά μεγάλος . Ο χώρος αυτός πρέπει να είναι τελείως απομονωμένος από τον χώρο καθαρισμού, για την αποφυγή μολύνσεων των θρεπτικών διαλυμάτων. Ακόμη, θα πρέπει να υπάρχουν πάγκοι για την τοποθέτηση όλων των οργάνων που χρειάζονται για τη μέτρηση, την ανάδευση και το αραίωμα των διαλυμάτων. (Κίντζιος 2015., Μετζάκης 2005., Hartmann et al. 2002)

3.Χώρος αποστείρωσης:Είναι ο χώρος στον οποίο γίνεται η αποστείρωση των θρεπτικών διαλυμάτων, των οργάνων και του φυτικού υλικού. Επομένως, θα πρέπει να διατηρείται απόλυτα καθαρός. Στο χώρο αυτό βρίσκεται και ο κλίβανος, ο οποίος μπορεί να είναι είτε υγρής , είτε ξηρής (εικόνα 8.3) αποστείρωσης. (Μετζάκης 2005)



*Εικόνα8. 3:*Κλίβανος ξηρής αποστείρωσης (Μετζάκης 2005)

4.Χώρος ασηπτικής μεταφοράς του φυτικού υλικού:Στον χώρο αυτό πραγματοποιείται η εμφύτευση των εκφύτων στο υπόστρωμα, η μεταφύτευση καλλιεργούμενων κυττάρων και ιστών από ένα υπόστρωμα σε άλλο. Πρέπει να είναι απομονωμένος. Οι μολύνσεις των ιστών ή και του υποστρώματος κατά την εκτέλεση των εργασιών στον χώρο αυτό, μπορεί να έχουν σαν αποτέλεσμα τη συνολική μόλυνση των καλλιεργειών και επομένως την καταστροφή του πειράματος. Περιλαμβάνει θάλαμο νηματικής ροής αέρα που θα πρέπει να διαθέτει σύστημα ανακύκλωσης/καθαρισμού του αέρα.(Κίντζιος 2015)

Ο χώρος θα πρέπει να διατηρείται καθαρός από μικροοργανισμούς καθ' όλη τη διάρκεια των εργασιών. Ο θάλαμος εμβολιασμού ή θάλαμος οριζόντιας ροής ρεύματος αέρα ή θάλαμος νηματικής ροής αέρα αποτελείται από ειδικά φύλλα με οπές, μέσα από τις οποίες διέρχεται ρεύμα φιλτραρισμένου και αποστειρωμένου αέρα. Η αποστείρωση του αέρα γίνεται με ειδικά φίλτρα, τα οποία βρίσκονται στην οροφή ή στο πίσω μέρος του θαλάμου. Η διάμετρος των οπών των φίλτρων είναι τέτοια που δεν επιτρέπει τη διόδο, στο χώρο εργασιών, μικροοργανισμών ή σπορίων τους, που αιωρούνται στον αέρα. Ακόμη, το ρεύμα του αέρα δεν επιτρέπει στους μικροοργανισμούς, που κυκλοφορούν στο περιβάλλον, να εισχωρήσουν στο χώρο εργασίας. Επομένως, αν ο θάλαμος αποστειρωθεί κατά την έναρξη της εργασίας, με ψεκασμό με αλκοόλη και με υπεριώδη ακτινοβολία από

ειδικές λάμπες που βρίσκονται στην οροφή του, θα διατηρηθεί αμόλυντος μέχρι το τέλος της εργασίας. (Μετζάκης 2005, Hartmann et al. 2002)

5.Χώρος ανάπτυξης καλλιέργειών με ελεγχόμενες συνθήκες περιβάλλοντος: Σε αυτόν το χώρο αναπτύσσονται οι καλλιέργειες. Θα πρέπει να είναι κατά το δυνατόν απομονωμένος και να περιέχει διατάξεις για τον έλεγχο των εσωτερικών περιβαλλοντικών συνθηκών. Είναι ο τελικός χώρος μέσα στον οποίο αναπτύσσονται οι κυτταρικές καλλιέργειες κάτω από συνθήκες ελεγχόμενης θερμοκρασίας και σχετικής υγρασίας. Επίσης στον θάλαμο ανάπτυξης υπάρχει παροχή φωτισμού κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, δηλαδή ένταση φωτός και μήκος κύματος με τη βοήθεια κατάλληλων λαμπτήρες φθορισμού, έτσι ώστε να μπορεί η ένταση του φωτισμού να φτάνει μέχρι τα 10.000 lux. Θα πρέπει να ελέγχεται και η διάρκεια της φωτοπεριόδου. Συνήθως, χρησιμοποιούνται μεγάλες ημέρες, δηλαδή 12-16 ώρες. Τοποθετούνται και επωάζονται όλα τα είδη ιστο-και κυτταροκαλλιέργειών σε στερεή καλλιέργεια, όπως κάλοι, μικροπολλαπλασιασμένα φυτά αλλά και υγρές καλλιέργειες πάνω σε τροχιακούς αναδευτήρες..

Η ρύθμιση της θερμοκρασίας και της σχετικής υγρασίας γίνεται με κατάλληλο σύστημα κλιματισμού, από 15 έως 30°C, αν και συνήθως χρησιμοποιούνται θερμοκρασίες 20-28°C. Για να μην υπάρχει συσσώρευση θερμού αέρα στα ράφια, γύρω από τους λαμπτήρες, θα πρέπει κάθε ράφι να φέρει και ένα μικρό ανεμιστήρα.Ενώ τα τοιχώματα του θαλάμου πρέπει να είναι από κατάλληλο μονωτικό υλικό για να μην επηρεάζεται από τις θερμοκρασιακές διακυμάνσεις του περιβάλλοντος χώρου, κυρίως κατά τις εποχές ακραίων καιρικών φαινομένων, όπως είναι το καλοκαίρι ή ο χειμώνας.%. (Μετζάκης 2005.,Hartmann et al. 2002., Conger 1981., Κίντζιος 2015.)

6.Όργανα του εργαστηρίου: Κάθε εργαστήριο μικροπολλαπλασιασμού, θα πρέπει να είναι εφοδιασμένο με τα παρακάτω όργανα και σκεύη:

- Γυάλινα ή ατσάλινα δοχεία για τη θέρμανση και τη διάλυση των θρεπτικών διαλυμάτων.
- Βαθμολογημένους κυλίνδρους μέτρησης διαφόρων μεγεθών.
- Πιπέτες και μικροπιπέτες.

- Κωνικές φιάλες ή δοκιμαστικούς σωλήνες ή άλλα γυάλινα ή πλαστικά δοχεία με κατάλληλα καλύμματα για την καλλιέργεια των εκφύτων.
- Μικρά εργαλεία μεταφοράς (σπάτουλες, κουτάλια, λαβίδες κ.λπ.).
- Συσκευές διάλυσης αιωρημάτων.
- Μαγνητικούς αναδευτήρες με θερμαινόμενη βάση (εικόνα 8.4).
- Πεχάμετρο (εικόνα 8.5).
- Ζυγό ακριβείας (εικόνα 8.6) και κοινό ζυγό.
- Ισχυρό μεγεθυντικό φακό ή στερεοσκόπιο
- Ψυγείο με καταψύκτη
- Θερμαινόμενες πλάκες ή μικρό ηλεκτρικό φούρνο ή φούρνο μικροκυμάτων Αποστειρωτικά (αλκοόλη, χλωρίνη κ.λπ.).
- Χημικές ουσίες για την παρασκευή των θρεπτικών διαλυμάτων ή έτοιμα θρεπτικά διαλύματα. (Μετζάκης 2005)



Εικόνα 8.4: Μαγνητικός αναδευτήρας:



Εικόνα 8.5: Πεχάμετρο



Εικόνα 8.6: Ζυγός ακριβείας

7. Χώρος ανάπτυξης τεχνικών και έρευνας (προαιρετικός): Μπορεί να είναι ξεχωριστός χώρος ή να είναι ενταγμένος στη συνολική διάταξη του εργαστηρίου.

8. Φυτοπαθολογικό εργαστήριο: Στον χώρο αυτό γίνονται αναλύσεις των καλλιεργούμενων ιστών και των παραγόμενων φυτών για την ύπαρξη διαφόρων παθογόνων όπως:

- A) Τον φυτοπαθολογικό έλεγχο μητρικών φυτών, καλλιεργειών και τελικών προϊόντων
- B) Έλεγχο, προφύλαξη και απομάκρυνση πηγών μόλυνσεων κατά την παραγωγική διαδικασία
- Γ) Εξυγίανση μητρικών φυτών και βασικού μεριστωματικού υλικού, με επιλογή ανθεκτικών κλώνων, υποκαλλιέργεια και απολύμανση

Δ) Ταυτοποίηση βακτηρίων, μυκήτων και ιών Πρέπει να είναι εντελώς απομονωμένος από το υπόλοιπο εργαστήριο.(Κίντζιος 1994)

9.Χώρος σκληραγώγησης: Στον χώρο αυτό γίνεται η σκληραγώγηση των φυτών εκτός συνθηκών ιστοκαλλιέργειας. Μπορεί να είναι ένα θερμοκήπιο ή ένας κλειστός θάλαμος. Πρέπει να έχει ελεγχόμενο φωτισμού, θερμοκρασία, σχετική υγρασία και παροχής CO₂.

10.Θερμοκήπιο: για την τελική ανάπτυξη των φυτών.(Κίντζιος 2015)

9 ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΔΙΑΛΥΜΑ

Ένας από τους κυριότερους παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των εκφύτων είναι η σύνθεση του υποστρώματος. Η μορφή του θρεπτικού υποστρώματος μπορεί να είναι υγρή, ήμιστερεή με την προσθήκη πηκτινώδους υλικού, όπως το άγαρ ή το Gelrite. Η μορφή αυτή μπορεί να επηρεάσει την αύξηση και μορφογένεση *in vitro*(Murashige, 1974).

Η προσθήκη άγαρ μπορεί να προκαλέσει προβλήματα μεσουστατικά που παρεμποδίζουν την αύξηση, όπως ένζυμα ή αυξάνοντας την περιεκτικότητα των αλάτων. Παρ' όλα αυτά, η χρήση πηκτινώδους παράγοντα θεωρείται πλεονέκτημα, καθώς το έκφυτο στηρίζεται επάνω στο θρεπτικού υπόστρωμα και αερίζεται καλά και η μορφογένεση συντελείται φυσιολογικά καθώς το έκφυτο διατηρείται σε σταθερή και κατάλληλη θέση ως προς τη βαρύτητα. Η χρήση υγρού υποστρώματος ή πολύ μικρής συγκέντρωσης πηκτινώδους παράγοντα μπορεί να προκαλέσει υπερυδάτωση και τα φυτά να εμφανίσουν ανωμαλίες στη μορφολογία. Το πλεονέκτημα της χρήσης υγρού υποστρώματος είναι η γρήγορη αύξηση των φυτών, καθώς οι φυτικοί ιστοί βρίσκονται σε άμεση επαφή με το υπόστρωμα και προσλαμβάνουν περισσότερα θρεπτικά συστατικά. Η αύξηση κυμαίνεται από 30% στην κορυφή βλαστών μέχρι και 20-30 φορές αύξηση στο ξηρό βάρος των κορυφών των βλαστών ροδακινιάς σε σχέση με το ήμιστερο υπόστρωμα. Στην περίπτωση που το έκφυτο βρίσκεται μέσα στο υπόστρωμα, παρατηρείται έλλειψη οξυγόνου (Skoog, 1944) και μη κανονική οργανογένεση (Kessell & Carr, 1972). Οι βασικές απαιτήσεις ενός εκφύτου είναι όμοιες με τις απαιτήσεις ενός κανονικού φυτού.

Έτσι, τα κύρια συστατικά ενός υποστρώματος θα πρέπει να είναι:

- Νερό

- Μακροστοιχεία
- Ιχνοστοιχεία
- Βιταμίνες
- Αμινοξέα ή άλλες αζωτούχες ενώσεις
- Φυτορρυθμιστικές ουσίες
- Σταθεροποιητές
- Στερεοποιητικοί παράγοντες. (Μετζάκης 2005)

Νερό: Αποτελεί το 95% του υποστρώματος και σε αυτό βρίσκονται διαλυμένα όλα τα υπόλοιπα συστατικά, ανόργανα και οργανικά με τα οποία τρέφονται τα έκφυτα. Σε μικροπολλαπλασιασμούς ρουτίνας χρησιμοποιείται απιονισμένο νερό, ενώ σε ερευνητικές εργασίες χρησιμοποιείται απεσταγμένο. Το νερό της βρύσης δεν είναι κατάλληλο, γιατί περιέχει κατιόντα, ανιόντα, μικροοργανισμούς, διαλυμένα αέρια και άλλα σωματίδια, τα οποία θα επιδράσουν αρνητικά στην ανάπτυξη των εκφύτων. Το απεσταγμένο νερό δεν πρέπει να διατηρείτε για πολύ γιατί υπάρχει κίνδυνος ανάπτυξης μολυσματικών μικροοργανισμών. (Μετζάκης 2005)

Ανόργανα άλατα: Τα στοιχεία αυτά χωρίζονται σε:

A) Μακροστοιχεία. Τα κύρια μακροστοιχεία είναι το άζωτο (N), ο φώσφορος (P), το κάλιο (K), το ασβέστιο (Ca), το μαγνήσιο (Mg), και το θείο (S) και προστίθενται στο υπόστρωμα με τη μορφή αλάτων. Τα μακροστοιχεία είναι απαραίτητα για το φυτικό κύτταρο και την ανάπτυξη του ιστού.

Το **άζωτο** είναι το βασικό συστατικό όλων των θεμελιωδών συστατικών του πρωτοπλάσματος, των πρωτεϊνών, των νουκλεοξέων, των φωσφορολιπιδίων και άλλων. Αυτό είναι το συστατικό που προστίθεται στη μεγαλύτερη ποσότητα. Προστίθεται υπό την μορφή νιτρικού ή αμμωνιακού αζώτου ή και σαν συνδυασμός και των δύο μορφών.

Το **κάλιο** απαιτείται για την κυτταρική αύξηση των περισσότερων κυτταρικών ιστών. Επιδρά σαν παράγοντας της ειδικής δομής του πρωτοπλάστη και των οργανιδίων του, του χυμοτοπίου και των κυτταρικών τοιχωμάτων και δρα σαν καταλυτικός παράγοντας απαραίτητος για την δραστηριότητα ενζύμων και οργανιδίων (μιτοχόνδρια, χλωροπλάστες, ριβοσώματα) στις ειδικές φυσικοχημικές διεργασίες. Παρόμοια επίδραση στις λειτουργίες ασκούν και το μαγνήσιο και το ασβέστιο. Το κάλιο προστίθεται υπό την

μορφή νιτρικού καλίου ή χλωριούχου νατρίου και προστίθεται υπό τη μορφή KH_2PO_4 που καλύπτει τις ανάγκες και σε φώσφορο. Ο φώσφορος μπορεί να προστίθεται και με την μορφή $\text{NaHPO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$.

Το **ασβέστιο** προστίθεται υπό την μορφή $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ή σαν άλατα άνυδρης μορφής, ενώ το μαγνήσιο ως ένυδρο θειικό μαγνήσιο ($\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$). Υπό την μορφή του ένυδρου θειικού μαγνησίου καλύπτονται και οι ανάγκες σε **θείο**. Το θείο ως συστατικό των ζωντανών οργανισμών απαντάται της πρωτεΐνες και τα συνένζυμα υπό την μορφή ανοιγμένου θείου, σουλφιδρυλικών ομάδων (SH^-) ή των δισουλφιδικών αυτών (S:S^-).

Ο **φώσφορος** περιέχεται σε θεμελιώδη συστατικά της ζωντανής ύλης, τα νουκλεοξέα και τα φωσφορολιπίδια, που είναι φωσφορούχες ενώσεις. Ο μεταβολισμός των κυττάρων, η βιοσύνθεση και η αποδόμηση των περισσοτέρων συστατικών και δομικών υλικών της ζωντανής ύλης, καθώς και ο μεταβολισμός της ενέργειας συντελείται μέσω φωσφορυλιωμένων παραγώγων. Ο φώσφορος προστίθεται με την μορφή του KH_2PO_4 ή του $\text{NaHPO}_4\cdot\text{H}_2\text{O}$. Οι συγκεντρώσεις που προστίθενται είναι ανάλογες με της ανάγκες κάθε φορά. Σε περίπτωση που παρουσιάζεται έλλειψη σε κάποιο στοιχείο, τότε αυτό προστίθεται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις.

B) Ιχνοστοιχεία. Εκτός από τα μακροστοιχεία υπάρχουν και τα θρεπτικά στοιχεία τα οποία είναι απαραίτητα σε πολύ μικρές ποσότητες. Αυτά ονομάζονται μικροστοιχεία ή ιχνοστοιχεία (micronutrient elements) και είναι ο σίδηρος (Fe), το νάτριο (Na), το χλώριο (Cl), το μαγγάνιο (Mn), ο ψευδάργυρος (Zn), το βόριο (B), ο χαλκός (Cu), το μολυβδαίνιο (Mo) και το νικέλιο (Ni) και προστίθενται στο υπόστρωμα με τη μορφή αλάτων.

Το σημαντικότερο από τα ιχνοστοιχεία είναι ο **σίδηρος**, ο οποίος προστίθεται σε χηλική μορφή στο μέσο καλλιέργειας, της και ο **ψευδάργυρος**. Επειδή οι χηλικές μορφές του τύπου EDTA (αίθυλοδιαμινοτετραοξικό οξύ), δεν είναι σταθερές, παρατηρείται το φαινόμενο της κατακρήμνισης των δύο παραπάνω στοιχείων στα υγρά υποστρώματα.

Το **νάτριο** δεν απαιτείται από τα ανώτερα φυτά για την καλλιέργεια σε τεχνητά υποστρώματα, είναι της χρήσιμο για την καλλιέργεια ιστών αλλοφύτων (φυτών που διαθέτουν C_4 φωτοσυνθετικό μηχανισμό), και των φυτών που μεταβολίζουν το πυροσταφυλικό οξύ. Ο ρόλος άλλων στοιχείων της το **νικέλιο**, το **τιτάνιο**, το **βηρίλιο**, και

το **αλουμίνιο**, δεν έχει ακόμη ερευνηθεί πλήρως και γι' αυτό χρησιμοποιούνται μόνο σε λίγα μέσα καλλιέργειας.

Τα ιχνοστοιχεία δρουν ως απαραίτητοι καταλύτες για την ενεργοποίηση ενζύμων ή σαν συστατικά συνενζύμων και προσθετικών ομάδων. Η παρουσία τους στο θρεπτικό διάλυμα είναι απαραίτητη για την ομαλή ανάπτυξη των εκφύτων. Έχει παρατηρηθεί ότι έλλειψή τους οδηγεί σε αναστολή της ανάπτυξης των εκφύτων ή δεν επιτρέπει την ολοκλήρωση της καλλιέργειας λόγω πρόωρου θανάτου των εκφύτων.

Βιταμίνες: Αν και οι φυτικοί ιστοί μπορούν να συνθέσουν βιταμίνες, είναι καλύτερο να τις προσθέτουμε στο θρεπτικό υπόστρωμα, αφού έχει αποδειχτεί ότι ασκούν ευεργετική επίδραση στην καλλιέργεια. Οι βιταμίνες δρουν ως βιοκαταλύτες σε πολλές και διαφορετικές μεταβολικές διεργασίες. Η έλλειψή τους θεωρείται περιοριστικός παράγοντας για την οργανογένεση και οι συγκεντρώσεις στις οποίες χρειάζονται είναι ελάχιστες. Οι βιταμίνες που προστίθενται, συνήθως, στο υπόστρωμα είναι:

- η θειαμίνη (βιταμίνη B1),
- η ριβοφλαβίνη (βιταμίνη B2),
- η πιριδοξίνη (βιταμίνη B6),
- η κυανοκοβαλαμίνη (βιταμίνη B12),
- το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C),
- η τοκοφερόλη (βιταμίνη E),
- η βιοτίνη (βιταμίνη H),
- το νικοτινικό οξύ (βιταμίνη PP),
- η μυοϊνοσιτόλη,
- το παντοθενικό οξύ ή παντοθενικό διασβέστιο,
- το φολικό οξύ,
- η κολίνη και το p-αμινοβενζοϊκό οξύ. (Μετζάκης 2005)

Μερικοί ερευνητές υποστηρίζουν ότι η θειαμίνη είναι ίσως η μόνη βιταμίνη που χρειάζεται για την καλλιέργεια όλων σχεδόν των έκφυτων. Η ανάγκη θειαμίνης είναι μεγαλύτερη σε χαμηλά επίπεδα κυτοκινινών στο διάλυμα. Σε μερικά διαλύματα χρησιμοποιούνται κι άλλες βιταμίνες όπως το π-αμινοβενζοϊκό οξύ (PABA), το

ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C), η βιοτίνη (βιταμίνη H), η χλωρική χολίνη, το φολικό οξύ, η κυανοκοβαλαμίνη (βιταμίνη B12), το παντοθενικό ασβέστιο και η ριβοφλαβίνη. Το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) χρησιμοποιείται σαν αντιοξειδωτικό για την αποφυγή του μεταχρωματισμού των ιστών ορισμένων ειδών που καλλιεργούνται. Τέτοιες ουσίες είναι οι ταννίνες που χημικώς είναι φαινολικά παράγωγα. Γι' αυτό τον σκοπό μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ο ενεργός άνθρακας.

Υδατάνθρακες: Οι πράσινοι ιστοί, κατά το μικροπολλαπλασιασμό, δεν έχουν την ικανότητα της φωτοσύνθεσης σε ικανοποιητικό βαθμό, λόγω της έλλειψης CO₂ μέσα στο δοχείο και επομένως, δεν είναι σε θέση να παράγουν τους υδατάνθρακες που χρειάζονται για την παραγωγή ενέργειας. Για το λόγο αυτό, οι υδατάνθρακες προστίθενται στο υπόστρωμα με τη μορφή σακχάρων. Επομένως η προσθήκη υδατανθράκων κρίνεται απαραίτητη.

Συνήθως χρησιμοποιείται σακχαρόζη, η οποία είναι ένας δισακχαρίτης, που αποτελείται από φρουκτόζη και γλυκόζη και αποτελεί έμμεσο προϊόν της φωτοσύνθεσης η σακχαρόζη και η D-γλυκόζη σε συγκεντρώσεις 20-30 gr/lit. Μπορούν, επίσης, να χρησιμοποιηθούν μαλτόζη, ραφινόζη, σορβιτόλη και μανιτόλη (κυρίως σε καλλιέργειες πρωτοπλαστών, τόσο ως θρεπτικό συστατικό, όσο και ως ελεγκτικό της ώσμωσης), ανάλογα με τις απαιτήσεις του φυτού. Η φρουκτόζη και η γαλακτόζη αποδείχτηκαν λιγότερο αποτελεσματικές, ενώ η μανόζη και η λακτόζη βρίσκονται στο τέλος της σειράς προτίμησης. (Μετζάκης 2005, Kyte and Kleyn 1996) Έκτος από τη χρήση τους ως πηγή άνθρακα και πηγή ενεργείας, επηρεάζουν τις invitro καλλιέργειες ρυθμίζοντας την οσμωτική πίεση των θρεπτικών στοιχείων στο υπόστρωμα (Gleddieetal., 1983).

Ρυθμιστές ανάπτυξης: Οι ρυθμιστές ανάπτυξης ή ορμόνες είναι οργανικές ουσίες ικανές να ρυθμίζουν τις φυσιολογικές διεργασίες των φυτών, να κατευθύνουν την ανάπτυξη των οργάνων και να ελέγχουν την ανάπτυξη ολόκληρου του φυτού. Τα φυτά σχηματίζουν ενδογενώς τις ορμόνες που είναι απαραίτητες για την ανάπτυξή τους. Οι ουσίες αυτές συντίθενται σε πολύ μικρές ποσότητες, αλλά είναι πολύ ενεργές και συνήθως δρουν σε διαφορετικό μέρος του φυτού από αυτό στο οποίο παράγονται. Συχνά, όμως, προσθέτουμε εξωγενώς φυσικές ή και συνθετικές ορμόνες, με στόχο την τροποποίηση ή την ενίσχυση της ανάπτυξης. Οι συνθετικές ορμόνες έχουν παρόμοια δομή με τις φυσικές, αλλά, συνήθως, είναι πιο δραστικές.

Οι καλλιεργούμενοι με μικροπολλαπλασιασμό ιστοί έχουν μειωμένη ικανότητα παραγωγής ορμονών και επομένως, είναι απαραίτητη η προσθήκη τους στο θρεπτικό υπόστρωμα. Η ανάγκη σε ορμόνες και το είδος των ορμονών, διαφέρει ανάλογα με το είδος του εκφύτου που καλλιεργείται, το είδος ή την ποικιλία του φυτού και τον τύπο μορφογένεσης που επιδιώκεται. Οι πιο σημαντικοί ρυθμιστές είναι οι αυξίνες και οι κυτοκινίνες, ενώ λιγότερο χρησιμοποιούνται οι γιββερελλίνες, το αφιζικό οξύ και το αιθυλένιο. (Μετζάκης 2005, Ελευθερίου 1994)

Οι αυξίνες γενικά προάγουν την κυτταρική διαίρεση, την κυτταρική επιμήκυνση (τάνυση), την κυριαρχία της κορυφής, τη διόγκωση των ιστών και το σχηματισμό επιγενών (επίκτητων ή τυχαίων) ριζών. Είναι απαραίτητες για το σχηματισμό κάλλου, τη σταθεροποίηση εναιωρημάτων κυττάρων και την επαγωγή σχηματισμού σωματικών εμβρύων. Αναστέλλουν την ανάπτυξη μασχαλαίων και επιγενών βλαστών και την εμβρυογένεση στις καλλιέργειες εναιωρημάτων κυττάρων. Η κυριότερη εμπορική τους εφαρμογή στο μικροπολλαπλασιασμό των φυτών είναι η επαγωγή ριζοβολίας. Η πιο σημαντική φυσική αυξίνη είναι το ινδολυλοξικό οξύ (IAA, indole-3-acetic acid), ενώ η περισσότερο χρησιμοποιούμενη φυσική αυξίνη είναι το ινδολοβουτυρικό οξύ (IBA, indole-3-butyric acid) γιατί είναι πιο σταθερό και δεν είναι τοξικό σε μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων. Το IBA υπάρχει και ως συνθετική αυξίνη. Ωστόσο, στα in vitro συστήματα χρησιμοποιούνται περισσότερο τα συνθετικά ανάλογα των αυξινών, όπως το ναφθαλινοξικό οξύ (NAA, α -naphthalene-acetic acid) (Taiz and Zieger 1998).

Μερικές αυξίνες που χρησιμοποιούνται στον μικροπολλαπλασιασμό φαίνονται στον Πίνακα 9.1:

Πίνακας 9.1: Κοινώς χρησιμοποιούμενες αυξίνες (Μετζάκης 2005)

ΤΥΠΟΣ	ΧΗΜΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ
IAA	3-ινδολοξικό οξύ
IBA	Ινδολο-3-βουτυρικό οξύ
NAA	Ναφθαλινοξικό οξύ
NOA	Ναφθοξοξικό οξύ
p-CPA	Παρα-χλωροφαινοξοξικό οξύ
2,4-D	Διχλωροφαινοξοξικό οξύ
2,4,5-T	Τριχλωροφαινοξοξικό οξύ

Οι κυτοκινίνες προάγουν την κυτταρική διαίρεση, μετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, προωθούν την ανάπτυξη των μασχαλαίων βλαστών αναστέλλοντας την κυριαρχία της κορυφής, προκαλούν το σχηματισμό επιγενών βλαστών και συμβάλλουν στον σχηματισμό κάλλου. Επίσης, αναστέλλουν το σχηματισμό ριζών, διακόπτουν τον λήθαργο σπερμάτων και οφθαλμών, καθυστερούν τη γήρανση. Οι κυριότερες φυσικά απαντώμενες κυτοκινίνες είναι η ζεατίνη (zeatin) και η 2iP (isorepentinyladenine), οι οποίες όμως χρησιμοποιούνται σε περιορισμένο βαθμό λόγω του μεγάλου κόστους και της σχετικής αστάθειάς τους. Περισσότερο χρησιμοποιούνται οι συνθετικές κυτοκινίνες, ιδιαίτερα η κινητίνη (kinetin) και η βενζυλαδενίνη (BA, benzyladenine) ή βενζυλαμινοπουρίνη (BAP, benzylaminopurine), λόγω χαμηλότερου κόστους και μεγαλύτερης σταθερότητας από τις άλλες. Η χρήση υψηλών συγκεντρώσεων κυτοκινίνης κατά το μικροπολλαπλασιασμό μπορεί να αποδειχθεί προβληματική, καθώς είναι δυνατό να δημιουργηθούν σωμακλωνικές μεταλλάξεις στα έκφυτα (George 1993, Ελευθερίου 2006, Georgeetal. 2008).

Οι κυτοκινίνες που χρησιμοποιούνται στον μικροπολλαπλασιασμό φαίνονται στον Πίνακα 9.2:

Πίνακας 9.2: Κοινώς χρησιμοποιούμενες κυτοκινίνες (Μετζάκης 2005)

ΤΥΠΟΣ	ΧΗΜΙΚΗ ΟΝΟΜΑΣΙΑ
BAP ή BA	N-6-βενζυλαμινοπουρίνη ή N-βενζυλαδενίνη
BPA ή PBA ή BPT	6-βενζυλαμινο-9-2-τετραϋδροπυραυλ-9H-αδενίνη
2-ip	Ισοπεντενυλ-αδενίνη
Kinetin	Φουρφουρυλαμινοπουρίνη
Ζεατίνη	4-υδροξυ-3-μεθυλ-trans-2-βουτενυλαμινοπουρίνη

Οι αυξίνες και οι κυτοκινίνες έχουν περίπου αντίθετη δράση και για το λόγο αυτό στα in vitro συστήματα, συνήθως χρησιμοποιούνται μαζί, σε διάφορους συνδυασμούς διότι αλληλεπιδρούν μεταξύ τους για τη ρύθμιση σημαντικών λειτουργιών των φυτών. Μεγαλύτερη σημασία έχει η σχετική αναλογία αυξίνης κυτοκινίνης παρά η απόλυτη

συγκέντρωσή τους. Γενικά, αυξημένη αναλογία αυξίνης προς κυτοκινίνη ευνοεί τη ριζογένεση, υψηλή σχέση κυτοκινίνης προς αυξίνη προάγει τη βλαστογένεση και ενδιάμεση αναλογία την καλλογένεση (Μετζάκης 2005, Grigoriadou et al. 2002, Hartmann et al. 2002, Πασπάτης 1998, Pierik 1997, Kyte an Kleyn 1996, Ελευθερίου 1994, Kenneth 1989, Conger 1981)

Γιββερελίνες: Σε σύγκριση με τις προηγούμενες ομάδες ορμονών, οι γιββερελίνες χρησιμοποιούνται σπάνια. Οι ουσίες αυτές διεγείρουν την εξέλιξη των φυταρίων που προέρχονται από σωματικά έμβρυα, παραγόμενα με μικροπολλαπλασιασμό, προκαλούν την επιμήκυνση των μεσογονατίων και την αύξηση των επάκριων οφθαλμών μετά την αποκοπή τους και ευνοούν τη χαλάρωση των κυττάρων. Συνήθως, παρεμποδίζουν τον σχηματισμό τυχαίων βλαστών και τυχαίων ριζών.

Αν και υπάρχουν περισσότερες από 60 γνωστές γιββερελίνες, μόνο η GA_3 (γιββερελικό οξύ) χρησιμοποιείται. Η GA_3 , σε συνδυασμό με κυτοκινίνες, επηρεάζει το ρυθμό αύξησης των κυττάρων των εκφύτων. (Μετζάκης 2005, Hartmann et al. 2002, Πασπάτης 1998, Pierik 1997, Kyte an Kleyn 1996, Ελευθερίου 1994, Kenneth 1989, Conger 1981)

Αιθυλένιο: Είναι μία αέρια ορμόνη, που ρυθμίζει την κανονικότητα της αύξησης και εμπλέκεται στην άνθηση, την ωρίμανση και αποκοπή των φρούτων, καθώς και στην πτώση των φύλλων. Επίσης, διεγείρει τον σχηματισμό ριζικών τριχιδίων. Η υψηλή συγκέντρωσή του, όμως, είναι επιζήμια. (Μετζάκης 2005, Grigoriadou et al. 2002, Hartmann et al. 2002, Πασπάτης 1998, Pierik 1997, Kyte an Kleyn 1996, Ελευθερίου 1994, Kenneth 1989, Conger 1981)

Σταθεροποιητές: Οι περισσότερες μορφές του μικροπολλαπλασιασμού έχουν ανάγκη μία ορισμένη τιμή pH, η οποία θα επιτρέπει την κανονική ανάπτυξη των φυτικών ιστών. Ακόμη, η τιμή του pH επηρεάζει τη διάλυση των αλάτων, την πρόσληψη των θρεπτικών στοιχείων και των ορμονών και τη διάλυση του άγαρος. Έτσι, η άριστη τιμή του pH κυμαίνεται μεταξύ 5,5 και 5,8. Η τιμή αυτή θα πρέπει να διατηρείται σταθερή σε όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας. Ορισμένες ενώσεις που συμμετέχουν στη σύνθεση του υποστρώματος, προκαλούν αλλαγή του pH και, για αυτό είναι απαραίτητη η προσθήκη άλλων ουσιών, οι οποίες θα αποτελούν σταθεροποιητές του pH. Υπάρχουν πολλές ενώσεις, οργανικές ή ανόργανες, που μπορούν να

χρησιμοποιηθούν σαν σταθεροποιητές, όμως η χρήση τους θα πρέπει να ελέγχεται, γιατί είναι δυνατόν να επηρεάσουν την πρόσληψη στοιχείων και άρα την κανονική ανάπτυξη των ιστών. (Μετζάκης 2005)

Σε μικροπολλαπλασιασμούς ρουτίνας, συνήθως, το pH του υποστρώματος ρυθμίζεται με χρήση NaOH ή HCl, όταν όλα τα υπόλοιπα στοιχεία του διαλύματος έχουν αναμειχθεί. (Pierik 1997, Kyte and Kleyn 1996)

Στερεοποιητικοί παράγοντες: Το θρεπτικό διάλυμα του μικροπολλαπλασιασμού, μπορεί να είναι υγρό ή στερεό και αυτό εξαρτάται από τον τύπο και τον σκοπό της καλλιέργειας.

Τα υγρά υποστρώματα είναι ουσιώδη για καλλιέργειες αιωρημάτων κυττάρων, αν και χρησιμοποιούνται και σε κριτικά πειράματα θρέψης, καθώς και ανάπτυξης και διαφοροποίησης κάλων.

Τα στερεά υποστρώματα χρησιμοποιούνται ευρέως για την εγκατάσταση εκφύτων, για καλλιέργειες κάλων και φυτικών οργάνων και για τη μακροπρόθεσμη διατήρηση των καλλιιεργειών.

Η ουσία που χρησιμοποιείται σαν στερεοποιητικός παράγοντας για την παρασκευή στερεών ή ημιστερεών υποστρωμάτων είναι το άγαρ, ένας πολυσακχαρίτης φυτικής προέλευσης (απομονώνεται από φύκη), ο οποίος καθαρίζεται και απελευθερώνεται από τοξικές προσμίξεις. Στο εμπόριο υπάρχουν διάφοροι τύποι άγαρος, οι οποίοι διαφέρουν ως προς την καθαρότητα και τα τεχνικά χαρακτηριστικά τους. Το άγαρ αποτελεί το πιο ακριβό συστατικό των υποστρωμάτων και για αυτό, καθαρό άγαρ χρησιμοποιείται μόνο σε πειράματα ακριβείας, ενώ στους μικροπολλαπλασιασμούς ρουτίνας χρησιμοποιείται, συνήθως, άγαρ κατώτερης ποιότητας. (Μετζάκης 2005)

9.1 Επιλογή του κατάλληλου μέσου καλλιέργειας

Σημαντικό ρόλο, παίζει η επιλογή του κατάλληλου μέσου καλλιέργειας για την επιτυχή έκβαση της καλλιέργειας.

Δεν εφαρμόζεται σε όλες τις καλλιέργειες το ίδιο θρεπτικό μέσο. Η επιλογή του γίνεται με βάση τις ανάγκες του φυτού και εξαρτάται από το είδος του φυτού, τον ιστό ή το όργανο που καλλιεργείται (οφθαλμός, κάλος, έμβρυο κ.λπ.), καθώς και την κατεύθυνση της καλλιέργειας. Μελέτες οδήγησε στη διαμόρφωση ορισμένων διαλυμάτων που έγιναν γνωστά και επώνυμα: το θρεπτικό διάλυμα των Murashige και Skoog (MS) χρησιμοποιείται συχνά για την δημιουργία

κάλου και έχει καλύτερα αποτελέσματα στα δικότυλα φυτά. Παρουσιάζει σχετικώς υψηλή συγκέντρωση σε νιτρικά, αμμωνιακά και ιόντα καλίου. Οι Gamborg, Miller και Ojima διαμόρφωσαν το θρεπτικό διάλυμα B5, το οποίο εφαρμόζεται επίσης για την δημιουργία κάλου. Η σύστασή του σε βιταμίνες είναι όμοια με εκείνη του διαλύματος MS και περιέχει επίσης ινοσιτόλη (100mg/l) και σακχαρόζη 2-3%, ενώ είναι πλούσιο σε θειαμίνη (10mg/l) απ' ότι το MS (0,1mg/l).(Κίντζιος 2015)

9.2 Παρασκευή του κατάλληλου θρεπτικού υποστρώματος

Η παρασκευή του υποστρώματος περιλαμβάνει τα εξής στάδια:

1. Ανάμειξη των συστατικών
2. Προσδιορισμός και διόρθωση του pH
3. Διανομή του διαλύματος στα δοχεία καλλιέργειας
4. Αποστείρωση
5. Μεταφορά στο χώρο αποθήκευσης. (Μετζάκης 2005, Hartmann et al. 2002)

Η σύνθεση του υποστρώματος ποικίλει ανάλογα με το είδος και την ποικιλία του φυτού που καλλιεργείται, από τον τύπο του εκφύτου (οφθαλμός, κάλος, έμβρυο κ.λπ.) και από το στάδιο ανάπτυξης. Το να αναμειγνύει ο ερευνητής τα απαιτούμενα συστατικά του υποστρώματος έχει δύο πλεονεκτήματα. Πρώτον είναι οικονομικότερο και δεύτερων επιτρέπει τις αλλαγές ανάλογα με την απόκριση της καλλιέργειας. Όμως, είναι πιο εύκολο και γρήγορο, να χρησιμοποιούνται προαναμεμιγμένα υποστρώματα.

10 ΑΣΗΨΙΑ ΚΑΙ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ

Το πιο σημαντικό μέρος της ιστοκαλλιέργειας είναι η αποστείρωση του φυτικού υλικού και των μέσων που χρησιμοποιούνται, όπως σημαντική είναι και η διατήρηση των ασηπτικών συνθηκών κατά την καλλιέργεια. Η πιο κοινή αιτία μολύνσεων είναι τα σπόρια μυκήτων και βακτηρίων, τα οποία είναι πολύ ελαφρά και βρίσκονται πάντα στον αέρα. Αν τα σπόρια αυτά, έρθουν σε επαφή με το θρεπτικό διάλυμα, βρίσκουν άριστες

συνθήκες βλάστησης και ανάπτυξης και μολύνουν την καλλιέργεια (Μετζάκης 2005) (εικόνα 10.1).



Εικόνα 10.1: Μολύνσεις σε δοχεία καλλιέργειας

10.1 Τεχνικές Αποστείρωσης

Τα πιο βασικά σημεία που πρέπει να προσέχουμε ώστε να επιτύχουμε αμόλυντες καλλιέργειες είναι:

Αποστείρωση θρεπτικού διαλύματος: Χρησιμοποιούνται δύο κυρίως μέθοδοι

- A) Ο κλιβανισμός (σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης)
- B) Το φιλτράρισμα μέσω μεμβρανών υπό πίεση

Μπορούν να κλιβανιστούν στον κλίβανο υγρής αποστείρωσης τα θρεπτικά διαλύματα και το απεσταγμένο νερό, μέσα σε γυάλινα ή κατάλληλα πλαστικά δοχεία, κλεισμένα με υδρόφοβο βαμβάκι, φύλλα αλουμινίου ή ειδικά πλαστικά καλύμματα. Τα θρεπτικά διαλύματα κλιβανίζονται στους 121 °C και πίεση 1.1 atm για 20 λεπτά. Η αποστείρωση με θερμοκρασία μπορεί να επηρεάσει την ποιότητα κάποιων συστατικών του θρεπτικού υποστρώματος.

Τα φίλτρα που χρησιμοποιούνται για την αποστείρωση αποτελούνται από μεμβράνες με πόρους μεγέθους 0.25μm, τα οποία δεν επιτρέπουν την είσοδο βακτηρίων ή άλλων μικροοργανισμών (Μετζάκης 2005)

Αποστείρωση του φυτικού υλικού: Τα τμήματα του φυτού που θα χρησιμοποιηθούν για καλλιέργεια πρέπει να είναι απαλλαγμένα από μικροοργανισμούς. Για την αποστείρωση του φυτικού υλικού ακολουθούμε τρία βήματα:

A) Προετοιμασία του μητρικού φυτού και του εκφύτου. Για την επιτυχία της καλλιέργειας είναι σημαντική η σωστή επιλογή του είδους και της υγείας του μητρικού φυτού και του εκφύτου. Οι μητρικές φυτείες διατηρούνται σε ειδικούς χώρους και κάτω από ελεγχόμενες υγιεινές συνθήκες. Αν όμως, δεν είναι δυνατή η διατήρηση μίας τέτοιας μητρικής φυτείας, θα πρέπει τα μητρικά φυτά, από τα οποία θα ληφθούν τα έκφυτα, να εξετάζονται προσεκτικά για την απουσία ιώσεων, βακτηρίων και μυκήτων. Ακόμη, πριν τη λήψη των εκφύτων, μπορεί να γίνει μία επέμβαση με μυκητοκτόνο ή/και βακτηριοκτόνο ή/και εντομοκτόνο, για τον περιορισμό των προσβολών, αν υπάρχουν.

B) Αποστείρωση του φυτικού υλικού. Πριν από τη μεταφορά του φυτικού υλικού στα θρεπτικά υποστρώματα, πρέπει να ακολουθήσουμε ορισμένα στάδια επεξεργασίας, για την απολύμανση του.

- Πρώτο στάδιο: Προκαταρκτικός ψεκασμός του μητρικού φυτού με μυκητοκτόνα ή και εντομοκτόνα.
- Δεύτερο στάδιο: Επεξεργασία του φυτικού υλικού. Κόβεται ένα τεμάχιο που περιλαμβάνει μερικούς οφθαλμούς, αφαιρούνται τα φύλλα και αποστειρώνεται με ένα βαμβάκι ποτισμένο με αλκοόλη. Στην συνέχεια το τοποθετούμε σε αποστειρωμένη νάιλον σακούλα μέχρι τη στιγμή που θα μεταφερθεί στο εργαστήριο.
- Τρίτο στάδιο: Καθαρισμός της επιφάνειας από περιττά υλικά(νεκρούς ή περιττούς ιστούς και εξωτερικούς μικροοργανισμούς).
- Τέταρτο στάδιο : Η αποστείρωση του φυτικού υλικού. Μπορεί να γίνει με πολλά μέσα. Το υποχλωριώδες νάτριο (NaClO) (διάλυμα 0.5-2% w/v) και το υποχλωριώδες ασβέστιο [$\text{Ca}(\text{ClO})_2$] (φιλτραρισμένη διάλυση 5-10% w/v) χρησιμοποιούνται πιο συχνά σήμερα. Το υποχλωριώδες νάτριο (NaClO), το οποίο βρίσκεται σε κοινά οικιακά λευκαντικά (χλωρίνες), σε συγκέντρωση 10-20% χρησιμοποιείται σε πολλά εργαστήρια. Για να βοηθήσουμε την αποστείρωση, μπορούμε πρώτα να βυθίσουμε τα τεμάχια σε αιθανόλη 70-90% για λίγα δευτερόλεπτα και μετά να τα βυθίσουμε στο απολυμαντικό διάλυμα, στο οποίο θα έχουμε προσθέσει λίγες σταγόνες ενός μη φυτοτοξικού διαβρεκτικού παράγοντα, όπως το 0,01% Tween-20. Ακόμη, θα πρέπει να ανακατεύουμε συνεχώς τα αποστειρωτικά διαλύματα, με χρήση του μαγνητικού αναδευτήρα με χαμηλές στροφές. Η διάρκεια της αποστείρωσης είναι ένας πολύ σημαντικός παράγοντας, ο οποίος θα πρέπει να καθορίζεται πειραματικά για το είδος του φυτού και του εκφύτου που θα καλλιεργηθεί. Παρατεταμένη αποστείρωση ζημιώνει τους ιστούς, ενώ πολύ σύντομη αποστείρωση δεν επιφέρει τα επιθυμητά αποτελέσματα.

- Πέμπτο στάδιο: Απομάκρυνση του αποστειρωτικού διαλύματος. Το έκφυτο ξεπλένεται με άφθονο απεσταγμένο-αποστειρωμένο νερό, το οποίο αλλάζουμε 3-5 φορές, έτσι ώστε να απομακρυνθεί κάθε ίχνος της αποστειρωτικής ουσίας.
- Έκτο στάδιο: Διαίρεση του φυτικού υλικού και μεταφορά στο θρεπτικό υπόστρωμα. Γίνεται πάντα με αποστερημένα εργαλεία και γίνονται κάτω από αυστηρά αμόλυντες συνθήκες.

Καθαρισμός και αποστείρωση των δοχείων καλλιέργειας. Για απλή χρήση ο καθαρισμός των δοχείων γίνεται με ένα κοινό απορρυπαντικό, με ζεστό νερό βρύσης και καλό ξέπλυμα, πρώτα με νερό βρύσης και μετά με απεσταγμένο. Στην συνέχεια, τα καθαρισμένα δοχεία θα πρέπει να στεγνώνουν σε φούρνο ξηρής αποστείρωσης στους 150°C και μετά να καλύπτονται με φύλλα αλουμινίου και να φυλάσσονται σε καθαρό χώρο. Δοχεία τα οποία περιέχουν θρεπτικά διαλύματα με καλλιέργειες, αρχικά κλιβανίζονται με τα θρεπτικά διαλύματα και τις καλλιέργειες, για να θανατωθούν οι μικροοργανισμοί που μπορεί να υπάρχουν. Στη συνέχεια, αφού κρυώσουν τα διαλύματα, αλλά πριν στερεοποιηθούν, αδειάζουμε το περιεχόμενο των δοχείων και τέλος, πλένουμε τα δοχεία όπως περιγράφηκε παραπάνω. Τα όργανα που θα χρησιμοποιηθούν αποστειρώνονται, είτε με κλιβανισμό, είτε με αιθανόλη. Για να διατηρηθούν αποστειρωμένα καθ' όλη τη διάρκεια των εργασιών, τοποθετούνται μέσα σε δοχείο με αιθανόλη 95% και κάθε φορά που θα χρησιμοποιηθούν για ένα νέο έκφυτο, καίγονται πάνω από φλόγα λύχνου bunsen, ο οποίος είναι αναμμένος για όσο διαρκούν οι εργασίες. (Μετζάκης 2005)

Αποστείρωση του θαλάμου εμβολιασμού και επώασης. Γίνεται με την χρήση υπεριώδων ακτινών. Από το μέγεθος του θαλάμου εξαρτάται και ο χρόνος που χρειάζεται. Οι υπεριώδεις ακτίνες μπορεί να προκαλέσουν ζημιές στα μάτια και στο δέρμα. Οι θάλαμοι που διαθέτουν οριζόντιας ροής ρεύματος αέρα μπορεί να αποστειρωθεί κατά την έναρξη της εργασίας, ανοίγοντας τον αέρα 15 λεπτά πριν, με ψεκασμό με αλκοόλη 95% και με υπεριώδη ακτινοβολία, από ειδικές λάμπες που βρίσκονται στην οροφή του, θα διατηρηθεί αμόλυντος μέχρι το τέλος των εργασιών.

11 ΣΩΜΑΚΛΩΝΙΚΗ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑ

Οι γενετικές αλλαγές που παρουσιάζονται στην διάρκεια της ιστοκαλλιέργειας, συνήθως στην καλλιέργεια του κάλλου, ονομάζονται σωμακλωνική παραλλακτικότητα. (Παπαχατζής και Καλορίζου., 2008) Είναι μια ενδογενής διαδικασία της *in vitro* καλλιέργειας φυτών, η οποία προκαλεί προσωρινές ή μόνιμες μεταβολές στο γονιδίωμα των μικροπολλαπλασιασμένων φυτών και μάλιστα με συχνότητα πολύ υψηλότερη από αυτήν της τυχαίας μετάλλαξης. (Κίντζιος 2015)

Τα τελευταία είκοσι χρόνια, καλλιέργεια φυτικών ιστών είναι μια πιθανή πηγή γενετικής παραλλακτικότητας και ένα πιθανό μέσο για την επιλογή νέων αξιόλογων γενοτύπων από αναγέννηση εκφύτων που έχουν περάσει από το στάδιο του κάλλου και εμφανίζουν σταθερή τροποποίηση ενός χαρακτηριστικού. Στην ιστοκαλλιέργεια, στην περίπτωση της αναγέννησης φυτών, μπορεί τα φυτά που θα παραχθούν να έχουν διαφορετικό φαινότυπο από τα φυτά από τα οποία έχουν προέλθει τα κύτταρα που χρησιμοποιήθηκαν στην αναγέννηση. (Karp και Bright, 1986).

Η καλλιέργεια φυτικών ιστών έχει γίνει ένα από τα βασικά εργαλεία στην έρευνας της επιστήμης των φυτών. Σε μεγάλο βαθμό απασχολείται στην παραγωγή, τη διατήρηση και βελτίωση των φυτικών ειδών. Η παρουσία της σωμακλωνικής παραλλακτικότητας σε πληθυσμούς που προέρχονται από καλλιέργεια ιστού είναι που επηρεάζουν τη χρήση της ιστοκαλλιέργειας αρνητικά και έχει παραμείνει ένα σημαντικό πρόβλημα έως και σήμερα. Αντίθετα είναι μια πηγή νέας επιθυμητής παραλλακτικότητας. Ο όρος σωμακλωνική παραλλακτικότητα είναι πλέον αποδεκτός και αντιπροσωπεύει κληρονομικές παραλλαγές που προκύπτουν από την καλλιέργεια ιστού που έχει περάσει από το στάδιο του κάλλου. Υπάρχει, ωστόσο κάποια ανησυχία στην παγκόσμια χρήση της σωμακλωνικής παραλλακτικότητας ειδικά στα πολυσωματικά και χιμαιρικά φυτά. Προϋπάρχουσες παραλλαγές σε χιμαιρικό ιστό θα μπορούσε θεωρητικά να καλλιεργηθούν χωριστά και να εκδηλώσουν αργότερα φαινοτυπικά τις παραλλαγές αυτές σε κλώνους. Αυτά μπορεί να μην αντιπροσωπεύουν απαραίτητα παραλλαγές που προκύπτουν κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας ιστού. Ο όρος θα πρέπει συνεπώς, να περιορίζεται σε παραλλαγές που δεν ήταν ορατές με γυμνό μάτι κατά το στάδιο έναρξης της ιστοκαλλιέργειας. Στην εξέταση της σωμακλωνικής παραλλαγής, τόσο τα αρνητικά όσο και θετικά αποτελέσματα θα πρέπει να εξετάζονται παράλληλα. Σωμακλωνική παραλλαγή μπορεί να ανιχνευθεί χρησιμοποιώντας ένα ευρύ φάσμα των τεχνικών που έχουν τα πλεονεκτήματα και τα

μειονεκτημάτά τους. . Γενικά, οι μοριακές τεχνικές καθίστανται δυνατές να ανιχνεύουν τις παραλλαγές σε νεανικά στάδια χρησιμοποιώντας νουκλεϊκά οξέα. Η βάση της σωμακλωνικής παραλλακτικότητας δεν είναι πλήρως κατανοητή, αν και παράγοντες που μπορεί να συνεισφέρουν σε αυτή είναι χρωμοσωμικές αναδιατάξεις, ενεργοποίηση ενδογενών μεταθετών στοιχείων, αλλαγές στο επίπεδο της μεθυλίωσης του DNA και μεταλλάξεις (Tsaftaris και Polidoros, 2000). Μέσω της σωματοκλωνικής ποικιλομορφίας έχουν παραχθεί φυτά τα οποία είναι ανθεκτικά σε υψηλή αλατότητα, που είναι ανθεκτικά σε ζιζανιοκτόνα και φυτά στα οποία έχει βελτιωθεί η θρεπτική τους αξία.(Χατζόπουλος 2001)

Πίνακας 11.1 : Σωματοκλωνική ποικιλομορφία σε φυτά με εμπορική σημασία. (Χατζόπουλος 2001)

Φυτικό είδος	Τροποποιημένα χαρακτηρισικά
<i>Apium graveolens</i>	Ποικιλομορφία στα ισοένζυμα, χρωμοσωμική δομή
<i>Chrysanthemum X morifolium</i>	Σχήμα και χρώμα άνθους, σχήμα πετάλων
<i>Dendrobium</i>	Σχήμα και χρώμα άνθους
<i>Lactuca sativa</i>	Ύψος και ζωτικότητα φυτού, γονιμότητα χρώμα φύλλου
<i>Lycopersicon esculentum</i>	Χρώμα καρπού και άνθους, γονιμότητα, περιεκτικότητα σε χλωροφύλλη
<i>Medicago sativa</i>	Παραγωγικότητα, γονιμότητα
<i>Nicotiana glauca</i>	Μορφολογία άνθους και φύλλου, χρόνος άνθισης, ύψος φυτού
<i>Solanum tuberosum</i>	Χρωμοσωμική δομή, παραγωγή, ανθεκτικότητα σε ασθένειες
<i>Zea mays</i>	Ζωτικότητα

Η σωμακλωνική παραλλακτικότητα μπορεί να μειωθεί αν χρησιμοποιηθούν ημιοργανωμένοι ιστοί για τη μεταμόρφωση, ειδικά αν τα κύτταρα στόχοι μπορούν να μπουν στη φάση της οργανογένεσης είτε άμεσα, είτε μετά από μια σύντομη φάση

επαγωγής κάλλου. Άλλος ένας τρόπος για να αποφευχθεί η σωμακλωνική παραλλακτικότητα είναι η εισαγωγή DNA απευθείας στα γαμετικά κύτταρα (π.χ. μεριστωματικός ιστός ή κάλλος που προέρχεται από ανθήρες) (Michael W. Bairu, Adeyemi O. Aremu, Johannes Van Staden), (Valeria B. Kuksova, NikolaiM. Piven&YuriYu. Gleba).

B ΑΜΠΕΛΙ

1 Ιστορική ανασκόπηση

Μία από τις αρχαιότερες καλλιέργειες στον κόσμο, είναι το αμπέλι.. Απ' ότι φαίνεται , το αμπέλι ευδοκίμωσε στην πολική ζώνη, στην Ισλανδία, στη βόρεια Ευρώπη και στη βορειοδυτική Ασία, πριν από την εποχή των παγετώνων. Όμως οι παγετώνες περιόρισαν την εξάπλωσή του, δημιουργώντας διάφορα είδη άγριων αμπέλων προς θερμότερες ζώνες, όπως στην κεντρική και ανατολική Ασία, στην κεντρική και νότια Ευρώπη αλλά και στην ευρύτερη περιοχή του νότιου Καυκάσου. Στην Ελλάδα εμφανίστηκε την 4η χιλιετία π.χ.

Η καλλιέργεια της αμπέλου ξεκίνησε με την αγροτική επανάσταση γύρω στο 5.000 π.χ. Από τους πρώτους γνωστούς καλλιεργητές θεωρούνται οι Άριοι (πρόγονοι των Περσών και των Ινδών), οι Σημιτικοί λαοί και οι Ασσύριοι. Το κρασί την εποχή εκείνη ήταν γνωστό ακόμη και στην αρχαία Κίνα. Κατόπιν οι τέχνες της αμπελουργίας και της οινοποιίας πέρασαν στους Αιγυπτίους, στους λαούς της Παλαιστίνης, της Φοινίκης και στους Έλληνες. Στην Ελλάδα αναπτύχθηκε η τεχνική την οινοποιία. Σύμφωνα με μια από τις επικρατέστερες θεωρίες, η Έλληνες έμαθαν την τεχνική της οινοποιίας από τους ανατολικούς λαούς (Φοίνικες ή Αιγυπτίους) με τους οποίους είχαν αναπτυγμένες εμπορικές σχέσεις. Το κρασί έπαιξε πολύ σπουδαίο ρόλο στη ζωή των αρχαίων Ελλήνων. Υπάρχουν πολλά παλαιοντολογικά και αρχαιολογικά ευρήματα που μας δείχνουν ότι το αμπέλι μαζί με το σιτάρι, το λινάρι και την ελιά είναι ένα από τα πρώτα φυτικά είδη που γνώρισε, βελτίωσε και καλλιεργήσε ο άνθρωπος από τότε που άρχισε να χρησιμοποιεί τη σκέψη του.

Η λέξη κρασί προέρχεται από τη λέξη κράσις= ανάμειξη. Η λέξη κράσις προέρχεται από το ρήμα κεράννυμι= αναμειγνύω και η λέξη κρατήρ σημαίνει το σκεύος στο οποίο γινόταν η ανάμειξη του κρασιού με το νερό. (Πετροπούλου Καραγιαννοπούλου., 2016)

1.1 Η άμπελος στην αρχαιότητα και στη μυθολογία.

Είναι γνωστό ότι μια σειρά από τελετές και γιορτές που ξεκινούσαν από την αρχαία Ελλάδα όπως οι γιορτές αφιερωμένες στον Διόνυσο συνοδευόταν από την κατανάλωση

κρασιού Οι αρχαίοι Έλληνες θεωρούσαν ότι το κρασί είναι αναπόσπαστο μέρος της ζωής τους. Αυτό επιβεβαιώνεται από θεότητες που επινόησαν τον Διόνυσο. Ο Διόνυσος ήταν ο θεός της γονιμότητας, του κρασιού και του θεάτρου. Γιος Δία και της Σεμέλης, βασιλιά της Θήβας. Ο Δίας ερωτεύτηκε τη Σεμέλη και υποσχέθηκε να πραγματοποιήσει κάθε της επιθυμία. Αυτή την υπόσχεση εκμεταλλεύθηκε η ζηλόφθονη Ήρα, η οποία έπεισε τη Σεμέλη να ζητήσει από τον Δία να φανερωθεί μπροστά της σε όλο του το μεγαλείο. Ο Δίας ήταν διστακτικός, η Σεμέλη όμως του θύμισε την υπόσχεσή του και τελικά ο Δίας πείστηκε. Η εμφάνισή του ήταν συγκλονιστική, καθώς ήταν στο άρμα του και συνοδευόταν από τρομερές βροντές, αστραπές και δυνατό φως. Η Σεμέλη, θνητή καθώς ήταν, δεν μπόρεσε να αντέξει το θέαμα και κάηκε. Ο Δίας, όμως, πρόλαβε να πάρει από τα σπλάχνα της τον καρπό του παράνομου δεσμού τους, που ήταν ήδη έμβρυο έξι μηνών. Πολύ γρήγορα και χωρίς να μάθει τίποτα η Ήρα, έβαλε το έμβρυο μέσα στο μηρό του. Όταν ήρθε η ώρα, ο Δίας έκοψε τα ράμματα και έτσι γεννήθηκε ο Διόνυσος (Κακριδής 1986). (Νικολάου, 2008)

Το μίσος της Ήρας δεν έσβησε με το θάνατο της Σεμέλης αλλά στράφηκε προς το παιδί. Ο Διόνυσος για να γλιτώσει αναγκάστηκε να φεύγει και να κρύβεται στα βουνά και στα δάση. Μόνιμοι σύντροφοί του σε αυτή την ατελείωτη φυγή οι Σειληνοί, οι Μαινάδες και οι Πάνες. Κάποια μέρα ο Διόνυσος επισκέφτηκε την Αιτωλία, όπου τον υποδέχθηκε ο βασιλιάς Οινέας. Εκτιμώντας τη φιλική υποδοχή που του έγινε, ο Διόνυσος έκανε δώρο στον Οινέα ένα κλήμα και του έδωσε τις πρώτες οδηγίες για τον τρόπο καλλιέργειάς του. Αργότερα ο Διόνυσος παντρεύτηκε την Αριάδνη και απέκτησε μαζί της δύο παιδιά, τον Στάφυλο και τον Οينوπίωνα. Σύμφωνα με άλλη εκδοχή ο Στάφυλος ήταν ένας από τους βοσκούς του Οινέα. Καθώς έβοσκε τα κοπάδια του παρατήρησε ότι μια κατσίκα τρώγοντας τους καρπούς κάποιου φυτού γινόταν πιο ζωντανή. Ο Στάφυλος πήρε τον καρπό και τον έδειξε στο βασιλιά ο οποίος δοκίμασε το χυμό του. Έτσι στον καρπό έδωσε το όνομα του βοσκού (Στάφυλος-σταφύλι) και στο χυμό το δικό του (Οινέας-οίνος) (Κακριδής 1986).

Οι αρχαίοι Έλληνες τιμούσαν τον Διόνυσο και το κρασί με γιορτές σε κάθε ευκαιρία. Κάθε αγροτική δουλειά που γινόταν ομαδικά, συνοδευόταν από μεγάλα γλέντια. Κλασικό παράδειγμα ο τρύγος. Τον Οκτώβριο, προς τιμήν του Διόνυσου γιόρταζαν τα Οσχοφόρια. Η γιορτή περιλάμβανε αγώνες δρόμου και χορούς από νέους χορευτές που έφεραν

σταφύλια και κλαδιά αμπέλου. Το Δεκέμβριο γιόρταζαν τα Διονύσια, γιορτή αφιερωμένη στη γονιμότητα και στη βλάστηση. Κατά τα Διονύσια, τελούνταν και διάφοροι αγώνες. Σε έναν από αυτούς, οι διαγωνιζόμενοι προσπαθούσαν να ισορροπήσουν πάνω σε ένα λαδωμένο ασκί που περιείχε κρασί. Το έπαθλο του νικητή ήταν το ίδιο το ασκί.

Μια άλλη λαμπρή γιορτή ήταν τα Ανθεστήρια που άρχιζαν μέσα Φεβρουαρίου. Την πρώτη μέρα της γιορτής, κάθε χωρικός έφερνε το πιθάρι του στο Λίμναιον, το αρχαίο ιερό της Αθήνας. Στη συνέχεια με τη σειρά άνοιγαν τα πιθάρια και δοκίμαζαν το καινούριο κρασί. Αυτή η μέρα που ήταν αφιερωμένη στο άνοιγμα των πιθαριών ονομαζόταν Πυθοίγια. Την ημέρα αυτή ακολουθούσε και μεγάλο γλέντι με μουσική και χορό. Η δεύτερη μέρα λεγόταν Χόες (Χους = μικρό αγγείο). Χαρακτηριστική εκδήλωση της ημέρας αυτής ήταν ένας διαγωνισμός οινοποσίας. Νικητής ήταν όποιος έπινε πιο γρήγορα το περιεχόμενο της χόας. Η ημέρα αυτή ήταν αφιερωμένη στην οινοποσία, το γλέντι και το χορό. Επίσης, γινόταν και η «πομπή του Διονύσου», που περιέφερε το θεό ανεβασμένο το άρμα του. Όσοι συμμετείχαν στην πομπή φορούσαν μάσκες. Η Τρίτη ημέρα λεγόταν Χύτροι γιατί προσέφεραν χύτρους, δηλαδή στολισμένα αγγεία, στον Δίονυσο. Η μέρα ήταν αφιερωμένη στους νεκρούς και στους ετοιμοθάνατους (Τσακίρης 2003).



Εικόνα1.1 Εικόνα12

Η άμπελος και το κρασί στις παραστάσεις των αρχαίων ελληνικών αγγείων. Εικ1.1) Τιμητική προσφορά κρασιού σε πολεμιστή πριν την αναχώρηση για τη μάχη. Εικ. 1.2) Η κύλικα του Εξηκία (530 π.Χ.) όπου απεικονίζεται το πλοίο με το οποίο ταξιδεύει ο Δίονυσος και στο κατάρτι του οποίου έχει αναπτυχθεί μια κληματαριά.

1.2 Η σύγχρονη ελληνική αμπελουργία

Πριν τον Β' Παγκόσμιο Πόλεμο, η καλλιεργούμενη έκταση με αμπέλια στην Ελλάδα, έφτανε περίπου τα 3.000.000 στρέμ. Λίγο μετά, η έκταση αυτή μειώθηκε σημαντικά Έτσι χάθηκαν ονομαστοί αμπελώνες όπως της Σιάτιστας στην Κεντρική Μακεδονία, της Μαρώνειας στη Θράκη, της Αράχοβας πλάι στους Δελφούς κ.α. Σε πολλές περιοχές τα αμερικάνικα υποκείμενα που χρησιμοποιήθηκαν για την αναμπέλωση μετά την εισβολή της φυλλοξήρας στις αρχές του αιώνα δεν ήταν επαρκώς κατάλληλα και οι μικρές αποδόσεις απογοήτεψαν τους αμπελουργούς εγκαταλείποντας σαν ασύμφορη την καλλιέργεια του αμπελιού. Σήμερα η καλλιεργούμενη με αμπέλια έκταση έχει κατέβει στα 1.650.000 περίπου στρέμ., ενώ η τάση εγκατάλειψης, ιδιαίτερα κάτω από την πίεση της Ευρωπαϊκής Ένωσης και τα κίνητρα που παρέχει για ξερίζωμα, συνεχίζεται.

Από τα 1.650.000 στρέμ., τα 250.000 στρέμ. είναι επιτραπέζια σταφύλια, τα 600.000 περίπου στρέμ. είναι σταφίδες και τα 800.000 στρέμ. οινοποιήσιμες ποικιλίες. Το 90% της παγκόσμιας καλλιεργούμενης έκτασης και παραγωγής βρίσκεται κοντά και γύρω από τη λεκάνη της Μεσογείου, ανατολικά, δυτικά, βόρεια και νότια. Οι χώρες της Λατινικής Αμερικής όπου πρόσφατα καλλιεργείται το αμπέλι (Αργεντινή, Χιλή) είναι σοβαρές ανταγωνίστριες χώρες (Βλάχος, 1991).

2 ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ

Το αμπέλι ανήκει στο γένος *Vitis*, οικογένεια *Vitaceae* (*Ampelidaceae*), τάξη *Rhamnales*, κλάση δικοτυλήδονα. Η οικογένεια αυτή περιλαμβάνει 14 γένη, το γένος *Vitis* ενδιαφέρει την αμπελουργία. Το αρχαιότερο είδος του γένους *Vitis* είναι το *Vitis Sezzanesis*, το οποίο χρονολογείται πάνω από ένα εκατομμύριο χρόνια. Ένα άλλο επίσης προϊστορικό είδος είναι το *Vitis Silvestris*, το οποίο είναι ανθεκτικό στον παγετό και κατάλληλο για οινοποιία. Όμως, το είδος που ενδιαφέρει περισσότερο (από αγρονομικής και οικονομικής άποψης) και καλλιεργείται σε ολόκληρη την Ευρώπη είναι το *Vitis Vinifera*. Το *V. Vinifera* διακρίνεται σε δύο υποείδη: το *V. Vinifera silvestris*(άγριο

αμπέλι) και το *V. Vinifera sativa*. Το *V. Vinifera sativa* περιλαμβάνει όλες τις καλλιεργούμενες ποικιλίες (Ασημακοπούλου και Αλεξόπουλος 2013).

Η συστηματική κατάταξη της αμπέλου είναι η εξής:

Κλάση: *Dicolyledones*

Τάξη: *Raminales*

Οικογένεια: *Vitaceae*

Γένος: *Envilus*

Είδος: *Vitisvinifera* (Νικολάου, 2005).

3 ΚΟΡΙΝΘΙΑΚΗ ΣΤΑΦΙΔΑ



Εικόνα 3: Κορινθιακή σταφίδα

Η Κορινθιακή σταφίδα είναι εκείνο το προϊόν το οποίο στήριξε τη χώρα μας σε περιόδους μεγάλων οικονομικών κρίσεων. Επηρέασε τόσο όσο κανένα άλλο αγροτικό προϊόν την πολιτική, πολιτιστική και οικονομική εξέλιξη της σύγχρονης Ελλάδας.

Η καλλιέργεια της σταφίδας στην Ευρωπαϊκή Ένωση εστιάζεται κυρίως στην Ελλάδα (Κορινθιακή, Σουλτανίνα) και δευτερευόντως στην Ισπανία (όπου καλλιεργείται η ποικιλία Moscatel). . (Πετροπούλου Καραγιαννοπούλου., 2016)

Είναι ένα προϊόν πασίγνωστο, αλλά στην Ελλάδα έχει ελάχιστη καταλαλήσω γιατί εξάγεται το 95% στο εξωτερικό. Καλλιεργείται στην Αχαΐα, Μεσσηνία, Ηλεία, Κορίνθια, Ζάκυνθο και Κεφαλληνία. Υπάρχουν δυο τύποι Κορινθιακής σταφίδας που έχουν αναγνωριστεί ως προϊόντα Π.Ο.Π (Προστατευμένη Ονομασία Προέλευσης) και ένα ως Π.Γ.Ε (Προστατευμένης Γεωγραφικής Ένδειξης)

1. Η Κορινθιακή σταφίδα που καλλιεργείτε στο Νομό Αχαΐας (ΚΟΡΙΝΘΙΑΚΗ ΣΤΑΦΙΔΑ ΒΟΣΤΙΤΣΑ) και είναι προϊόν Π.Ο.Π.
2. Η Κορινθιακή σταφίδα που καλλιεργείτε στο Νομό Ζακύνθου (ΣΤΑΦΙΔΑ ΖΑΚΥΝΘΟΥ) και είναι προϊόν Π.Ο.Π.
3. Η Κορινθιακή σταφίδα που καλλιεργείτε στο Νομό Ηλείας (ΣΤΑΦΙΔΑ ΗΛΕΙΑΣ) και είναι προϊόν Π.Γ.Ε.(Agrocapital)

Η σταφίδα που παράγεται από την Κορινθιακή σταφίδα είναι γνωστή ως μαύρη σταφίδα. Η μεγάλη εξάπλωση της καλλιέργειας έγινε την περίοδο του 16ου και 19ου αιώνα. Έχει ένα σημαντικό πλεονέκτημα ότι είναι προσαρμοσμένη σε ξηρές συνθήκες, χωρίς άρδευση, όπου μπορεί να παράγει επαρκώς για πάρα πολλά χρόνια., είναι πολύ παραγωγική ποικιλία, δεδομένου ότι είναι γόνιμη και η τσίμπλα. Χαρακτηριστικό της γνώρισμα είναι η απουσία κουκουτσιών από τις ρώγες της.

Η Κορινθιακή σταφίδα έχει τρεις υποποικιλίες: τη μαύρη, τη λευκή και την ερυθρά.

Η Κορινθιακή σταφίδα είναι ζωηρότατη και παραγωγικότητα ποικιλία και καρποφορεί ακόμα και σε ξερό ξύλο. Η ταξιανθία είναι μετρίου μεγέθους, συνήθως διπλή. Η ρώγα είναι μικρή, σφαιρική, με φλοιό λεπτό, μαλακό, χρώματος ομοιόμορφου κυανομελανού. Μετά την ωριμότητα η σάρκα είναι μαλακή, άχρωμη, με γλυκιά και ευχάριστη γεύση και ελαφρά αρωματική. Ένα ποσοστό περίπου 98% των ρωγών δεν έχουν κουκούτσια.

Οι εγίγαρτες ρώγες είναι μεγάλες και θεωρούνται κακής ποιότητας προϊόν. Ο κορμός του πρέμνου είναι πολύ ισχυρός. Η ωρίμανση αρχίζει από τις αρχές Αυγούστου στα πεδινά και φτάνει μέχρι τα τέλη Σεπτεμβρη στα ορεινά. Ευδοκιμεί σε εδάφη ελαφριά, καλώς στραγγιζόμενα, έστω και χαλικώδη, όπου έχει τις μεγαλύτερες αποδόσεις. Είναι καλλιέργεια ευαίσθητη στα παθογόνα (περονόσπορο, οίδιο, ίσκα, ευδεμίδα) και γι' αυτό απαιτεί ιδιαίτερο κόπο. (Πετροπούλου Καραγιαννοπούλου., 2016)

Η καλλιέργεια της Κορινθιακής σταφίδας είναι πολύ απαιτητική. Χρειάζεται μεγάλη φροντίδα και αφοσίωση για να παραχθεί ένα ποιοτικό προϊόν. Ο τρύγος της σταφίδας ξεκινά τον Αύγουστο- Σεπτέμβριο. Ύστερα το νωπό σταφυλή οδηγείται στα αλώνια (ειδικούς χώρους) για την αποξήρανση του κάτω από τον ήλιο. Μετά την αποξήρανση συλλέγεται και στην συνέχεια μεταποιείτε και τυποποιείτε. (Agrocapital)

Η έκταση που αναλογεί στην καλλιέργεια σταφίδας φθάνει τα 149.000 στρέμματα στη κορινθιακή και τα 120.000 στρέμματα στη σουλτανίνα, ήτοι η συνολική έκταση αγγίζει τα 269.000 στρέμματα(Υπουργείπ Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων)

Πινάκας3:Στοιχεια έκτασης και παράγωγης για την Κορινθιακή σταφίδα και την Σουλτανίνας (Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων)

ΚΟΡΙΝΘΙΑΚΗ ΣΤΑΦΙΔΑ			ΣΟΥΛΤΑΝΙΝΑ		
Εμπορική περίοδος	Έκταση (στρέμματα)	Παραγωγή (τόνοι)	Εμπορική περίοδος	Έκταση (στρέμματα)	Παραγωγή (τόνοι)
2002-2003	163.764	23.935	2002-2003	138.581	10.123
2003-2004	158.049	36.770	2003-2004	147.540	20.097
2004-2005	155.507	39.977	2004-2005	159.357	36.425
2005-2006	154.620	27.112	2005-2006	173.087	29.000
2006-2007	151.154	25.000	2006-2007	172.998	26.751
2010-2011	146.500	22.000	2010-2011	150.000	3.000
2011-2012	149.000	20.000	2011-2012	120.000	1.500

4 ΣΟΥΛΤΑΝΙΝΑ



Εικόνα 4: Σουλτανίνα

Η Σουλτανίνα έχει πάρει το όνομα της από την περιφέρεια Σουλτάνε του Ιράκ από την οποία κατάγεται. Αρχικά μεταφέρθηκε στην Μ. Ασία και ύστερα στις άλλες χώρες.(Gaia επιχειρειν)

Το 1922 η καλλιέργεια της Σουλτανίνας είχε μεγάλη άνοδο, με την εγκατάσταση των προσφύγων της Μικράς Ασίας στην Κρήτη Στη συνέχεια αναβαθμίστηκε σταδιακά η καλλιεργητική της μέθοδος. Ήταν μια σημαντική πηγή εισοδήματος μέχρι τα μέσα περίπου της δεκαετίας του '80. Το κυριότερο εμπορικό της χαρακτηριστικό είναι η απουσία κουκουτσιών.

Η Σουλτανίνα καρποφορεί από άνθη ερμαφρόδιτα και αυτογόνιμα, οπότε δε χρειάζεται επικονίαση. Είναι συγκεκριμένα στενοσπεμοκαρπική, δηλαδή στη συγκεκριμένη ποικιλία δεν έχουμε επικονίαση, γονιμοποίηση και πρόωρο εκφυλισμό του εμβρύου. Τα σταφύλια της είναι μεγάλα και σχετικά πυκνά, ενώ το χρώμα της ράγας κυμαίνεται από λευκό ως χρυσίζον. Η σάρκα της ράγας είναι πολύ γευστική. Είναι παραγωγική και ζωνρή ποικιλία, παράγοντας 1-2 σταφύλια ανά καρποφόρο βλαστό.

Πραγματοποιείται αυστηρό κορυφολόγημα που συντελεί στο να δίνει δεύτερη παραγωγή, από τους ταχυφυείς βλαστούς. Το κλάδεμα καρποφορίας είναι μακρό (4-6 μάτια) ή μικτό διότι οι οφθαλμοί της βάσης της κληματίδας είναι συνήθως μη παραγωγικοί. Καρποφορεί συνήθως από το τρίτο μάτι και πέρα.

Το κατάλληλο έδαφος για τη Σουλτανίνα είναι το μέσης σύστασης, ενώ βαριά και υγρά ή ρηγά και ξηρά εδάφη είναι ακατάλληλα. Η οργανική ουσία στο έδαφος πρέπει να

κυμαίνεται μεταξύ 2-3%. (Πετροπούλου Καραγιαννοπούλου., 2016) Σημαντικό ρολό παίζει η περιεκτικότητα του εδάφους σε ενεργό ασβέστιο, για την επιλογή του κατάλληλου υποκαμένου (Αγροτική στέγη)

Η είναι ποικιλία που χρειάζεται ήλιο και αυξημένες θερμοκρασίες κατά την άνθηση, ενώ το καλοκαίρι που ωριμάζουν τα σταφύλια πρέπει να επικρατεί χαμηλή σχετική υγρασία. Δεν ενδείκνυται να καλλιεργείται σε μεγάλα υψόμετρα που επικρατούν χαμηλές θερμοκρασίες.

Η περίοδος ωρίμασης αρχίζει από τέλος Ιουλίου μέχρι και αρχές Σεπτεμβρίου, ανάλογα την χρήση των σταφυλιών, την περιοχή καλλιέργειας, τις καλλιεργητικές φροντίδες, την παραγωγικότητα του αμπελώνα κτλ. Μερικοί παραγωγοί καλύπτουν τα πρέμνα με πλαστικό, ώστε τα σταφύλια να διατηρηθούν περισσότερο στο πρέμνο.

Με την κατάλληλη εφαρμογή φυτορρυθμιστικών ουσιών, στη Σουλτανίνα, επιτυγχάνεται επιμήκυνση της ταξιανθίας, μείωση της καρπόδεσης και αύξηση του μεγέθους της ρώγας. Και έτσι τα σταφύλια είναι κατάλληλα για επιτραπέζια κατανάλωση. (Πετροπούλου Καραγιαννοπούλου., 2016)

5 Ιστοκαλλιέργεια στην Σουλτανίνα και στην Κορινθιακή Σταφίδα

Τα τελευταία χρόνια εφαρμόζονται στην άμπελο ασηπτικές μέθοδοι καλλιεργειών με στόχο είτε τη μαζική παραγωγή πολλαπλασιαστικού υλικού είτε την απόκτηση απογόνων απαλλαγμένων από ιώσεις που μπορεί να έχουν προσβάλει τα μητρικά φυτά. Για την παραγωγή φυτών μέσω των ασηπτικών καλλιεργειών χρησιμοποιούνται διάφορα είδη εκφύτων όπως π.χ μεριστώματα , μικρομοσχεύματα ενός κόμβου, φύλλα , ακόμα και έκφυτα βλαστικών κορυφών αποτελούμενα από το βλαστικό άκρο και ένα ή δύο μεσογονάτια. (Σταυρακάκης, Κανάκης 1997).

Η αρχή της "in vitro" καλλιέργειας συνίσταται στη λήψη, από έναφυτό, ενός οργάνου ή τμήματος οργάνου που ονομάζεται έκφυτο (οφθαλμός, τεμάχιο φύλλου, τεμάχιο ρίζας κλπ.) και την καλλιέργεια του σε ασηπτικό θρεπτικό υπόστρωμα. Ύστερα το έκφυτο τεμαχίζεται και επανακαλλιεργείται σε νέο θρεπτικό υπόστρωμα. Ο ρόλος του

είναι να προκαλεί, είτε την έκπτυξη οφθαλμών που προϋπάρχουν, είτε τον σχηματισμό νέων οφθαλμών ή σωματικών εμβρύων που μεταφερόμενα σε νέο θρεπτικό υπόστρωμα και στην συνέχεια θα μπορέσουν να δώσουν νέο φυτό (Auge και Boccon-Gibod, 1982).

Όπως και σε άλλα είδη φυτών έτσι και στην άμπελο η εφαρμογή της "in vitro" καλλιέργειας προσφέρει μεγάλες προοπτικές και δυνατότητες. Γι'αυτό σ'όλες τις προηγμένες αμπελουργικά χώρες βρίσκονται σε εξέλιξη προγράμματα αξιοποίησης της "in vitro" καλλιέργειας με διάφορους αντικειμενικούς σκοπούς όπως είναι η εξυγίανση ποικιλιών προσβεβλημένων από ιώσεις, η γενετική βελτίωση και η δημιουργία νέων γονοτύπων, η διατήρηση γενετικού υλικού και ο ταχύς αγενής πολλαπλασιασμός.

Σε πειράματα (Σταυρακάκης, Κανάκης 1997) που έχουν πραγματοποιηθεί στην ποικιλία σουλτανίνα με θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν τα Nitsch and Nitsch και το Murashige and Skoog με έκφυτα βλαστικές κορυφές της ποικιλίας Σουλτανίνα και η ιστοκαλλιέργεια ήταν ιδιαίτερα επιτυχής. Ειδικότερα τα θρεπτικά διαλύματα εμπλουτίστηκαν με 0.5 έως 2 mg/l BAP (6-βενζυλ-αμινοπυρίνη), 3% (w/v) ζάχαρη και 0.7 (w/v) άγαρ. Το pH των θρεπτικών διαλυμάτων πριν προστεθεί σε αυτά άγαρ και πριν την αποστείρωσή τους, ρυθμίστηκε στο 5.6 με τη βοήθεια σταγόνων NaOH (0.1N) ή HCL (0.1 N). Η αποστείρωση επιτεύχθηκε σε κλίβανο υδρατμών θερμοκρασίας 121° C υπό πίεση 1.05 kg/cm² και χρόνο 18- 20 min. Οι συνθήκες στους θαλάμους των καλλιεργειών ήταν φωτισμός ψυχρός- λευκός έντασης 1800-2000 lux προερχόμενος από λαμπτήρες φθορίου TL 65 W, φωτοπερίοδος 16 ώρες, θερμοκρασία ημέρας 22 ± 1° C και θερμοκρασία νύχτας 20 ± 1° C.

Από την συγκεκριμένη έρευνα φαίνεται ότι για την ποικιλία Σουλτανίνα η μέθοδος ασηπτικής καλλιέργειας βλαστικών κορυφών αποτελεί πράγματι έναν τρόπο ταχύτατου πολλαπλασιασμού αφού από ένα έκφυτο μπορούν να παραχθούν από 1000 έως 16.000.000 φυτά σε διάρκεια ενός έτους. Ο ρυθμός αυτός πολλαπλασιασμού είναι πολύ μεγαλύτερος εκείνου που αναφέρεται για διάφορες αμερικάνικες ποικιλίες αμπέλου (Cheetall, 1984) και άλλες ελληνικές (Ζιώγου και Βλάχος 1989). Η διαφορά αυτή πιθανότητα οφείλεται στη διαφορετικότητα τόσο του γονοτύπου όσο και του θρεπτικού υποστρώματος, εξάλλου και τα στοιχεία της συγκεκριμένης εργασίας επιβεβαιώνουν ότι ο βαθμός επιτυχίας συναρτάται του γονοτύπου αλλά και του θρεπτικού υποστρώματος. Η ριζοβόληση βλαστών έγινε με μεγάλη επιτυχία στο θρεπτικό υπόστρωμα Nitsch and

Nitsch απουσία φυτορυθμιστικών ουσιών. Το γεγονός ότι υπήρξε ριζοβόληση αλλά και η ύπαρξη τέλειων φυτών σε θρεπτικό υπόστρωμα από απουσία αυξίνης οδηγεί στην υπόθεση ότι η ισορροπία τόσο των στοιχείων θρέψης όσο και των ενδογενών ορμονών βρίσκεται στα επιθυμητά για ριζοβόληση επίπεδα.

Επίσης η Ζιώζου το 1995 σε έκφυτα που ήταν α) βλαστικές κορυφές, β) μεμονωμένοι οφθαλμοί που λαμβάνονταν από το 2ο ή 3ο γόνατο από την κορυφή και έφεραν εκατέρωθεν μικρό τμήμα μεσογονάτιου και τέλος γ) κορυφαία μεριστώματα η επιλογή των *οποίων* γινόταν με τη βοήθεια στερεοσκοπίου Reichert. Τα έκφυτα λαμβάνονταν είτε απευθείας από τον αμπελώνα, κατά την περίοδο Απριλίου-Ιουλίου, είτε από βλαστούς μοσχευμάτων του ενός οφθαλμού σε θάλαμο ανάπτυξης. Κατά την περίοδο του λήθαργου γινόταν από ληψη κληματίδων οι οποίες διατηρούνταν σε ψυχοθάλαμο σε θερμοκρασία 1 °-2°C. Εν συνεχεία λαμβάνονταν μοσχεύματα του ενός οφθαλμού τα οποία απολυμαίνονταν επί 30' σε διάλυμα θειρατόξ (3.5g/l) και Benlate (4.0g/l). Ακολούθως τοποθετούνταν σε γυάλινα ή πλαστικά δοχεία των 100cc με νερό, στο *θάλαμο* ανάπτυξης φυτών για να εκβλαστήσουν.

Η απολύμανση του υλικού γινόταν σε διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου (18g/l) στο οποίο προσθέτονταν και μερικές σταγόνες προσκολλητικού υγρού (Tween 20). Ακολουθούσε διπλή έκπλυση με αποστειρωμένο νερό.

Για την καλλιέργεια των εκφύτων (βλαστικές κορυφές, μεμονωμένοι οφθαλμοί, κορυφαία μεριστώματα) δοκιμάστηκαν στερεά και υγρά θρεπτικά υποστρώματα όπως τα Murashige-Skoog (MS), Woody Plant Medium (WPM), C2D, Nitsch, Heller's salts, White's salts αλλά περισσότερο χρησιμοποιήθηκαν τα στερεά θρεπτικά υποστρώματα MS, WPM και C2D. Στο θρεπτικό υπόστρωμα προσθέτονταν βενζυλαδενίνη (BAP) 2,5 ως 15μM και 0.5μM α-ναφθαλινοξικό οξύ (NAA), 30g/l σακχαρόζη και 6.5g/l agar. Το pH ρυθμιζόταν σε επίπεδο 5.8 πριν την αποστείρωση.

Μετά την αποστείρωση οι δοκιμαστικοί σωλήνες με το αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα αφήνονταν επί 24-48 ώρες σε καθαρό και δροσερό περιβάλλον και ήταν πλέον έτοιμοι για την εγκατάσταση των εκφύτων η οποία γίνονταν σε θάλαμο ασηπτικών συνθηκών.

Σε κάθε σωλήνα εμφυτεύονταν ένα έκφυτο και μετά οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετούνταν σε κατάλληλες βάσεις και μεταφέρονταν στο θάλαμο καλλιέργειας όπου η

διάρκεια της φωτοπεριόδου ήταν 16 ώρες, ο φωτισμός 5,86 W.m², η θερμοκρασία 23-27°C και η σχετική υγρασία 70%. Ανάλογα με τον γενότυπο, μετά 3-4 εβδομάδες από την εγκατάσταση βλαστικών κορυφών και μεμονωμένων οφθαλμών στο θρεπτικό μέσο, αναπτύσσονταν βλαστοί και όταν το μήκος των έφθασε 1,5 cm (3-4 γόνατα) χρησιμοποιούνταν για επανακαλλιέργεια ή ριζοβόληση. Στις καλλιέργειες μεριστωμάτων, ένα μήνα μετά την εγκατάσταση τους, τα έκφυτα μεταφέρονταν σε νέο θρεπτικό υπόστρωμα που δεν περιείχε ναφθαλινοξικό οξύ (NAA).

Κατά την επανακαλλιέργεια οι βλαστοί τοποθετούνταν οριζόντια ενός θρεπτικού υποστρώματος το οποίο δεν περιείχε NAA. Για τις καλλιέργειες ριζοβολήσεως επιλέγονταν καλοσχηματισμένοι βλαστοί 1.5cm περίπου οι οποίοι εμφυτεύονταν κατακόρυφα στο θρεπτικό υπόστρωμα (MS) στο οποίο είχε προστεθεί ορμόνη ριζοβολίας, α-ναφθαλινοξικό οξύ (NAA) 0.4 μM, ή β-ινδολοβουτυρικό οξύ (IBA) 0.5 μM. Η διάρκεια της καλλιέργειας ήταν περίπου 30 ημέρες σε συνθήκες ανάλογες με την καλλιέργεια κορυφαίων μεριστωμάτων.

Ακολούθως τα ριζοβολημένα φυτά μεταφυτεύονταν σε δοχεία ή γλάστρες με αποστειρωμένο μείγμα τύρφης και περλίτη 3:1 στο οποίο προσθέτονταν θρεπτικό διάλυμα Hoagland (CHEE, POOL και BUCHER 1984). Χρησιμοποιήθηκε επίσης χαλαρό και πορώδες αποστειρωμένο εδαφικό μείγμα.

Τα έκφυτα, βλαστικές κορυφές, που λαμβάνονται απευθείας από τον αμπελώνα, λόγω μολύνσεων, παρουσίαζαν πολύ χαμηλό, σχεδόν μηδαμινό, ποσοστό επιβίωσης. Γι' αυτό ο τρόπος αυτός εγκαταλείφθηκε και χρησιμοποιούνταν μόνο έκφυτα από βλαστούς που αναπτύσσονταν, σε θάλαμο ανάπτυξης φυτών.

Τα κορυφαία μεριστώματα τα οποία έχουν συνήθως μέσομήκος 0.5-1.0 mm, σε σύγκριση με τους μεμονωμένους οφθαλμούς και τις κορυφές βλαστών 1-1.5 cm, παρουσίαζαν υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης.

Στις καλλιέργειες κορυφαίων μεριστωμάτων, ένα μήνα μετά την εγκατάσταση της καλλιέργειας τα έκφυτα διογκώνονταν και σχημάτιζαν συνήθως φυλλώδεις μάζες, είτε φύλλα παραμορφωμένα. Μετά η παραμονή των εκφύτων στο ίδιο θρεπτικό υπόστρωμα δε συμβάλλει στην ανάπτυξη των. Η μεταφορά των καλλιεργειών σε θρεπτικό υπόστρωμα που δεν περιείχε NAA είχε σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό βλαστών κατάλληλων για ριζοβολία ή επανακαλλιέργεια μετά από 4-5 εβδομάδες. Σε αυτές τις καλλιέργειες

κορυφαίων μεριστωμάτων τα θρεπτικά υποστρώματα Woody Plant Medium και C2D με την προσθήκη 10 μM BA διαπιστώθηκε υπεροχή του θρεπτικού υποστρώματος C2D (Ζιώζου 1995).

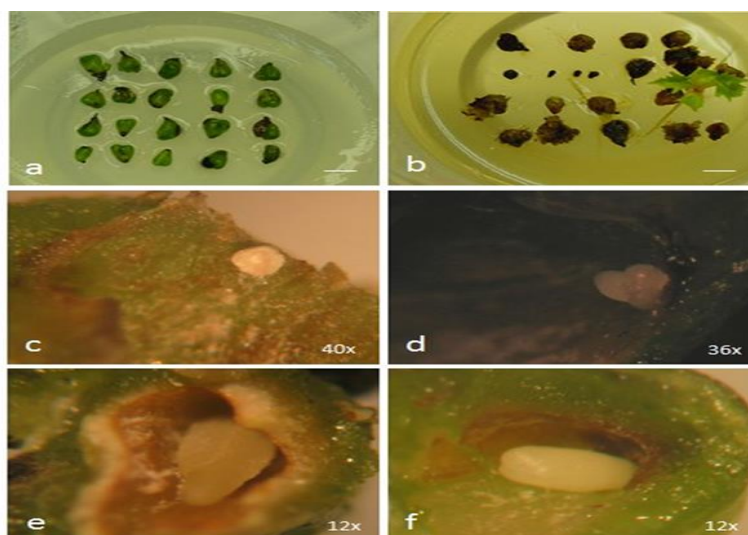
Οι Σταυρακάκης και Κανάκης το 1998 εξέτασαν διάφορες ποικιλίες αμπέλου μεταξύ αυτών και της Σουλτανίνας. Αυτή τη φορά ως έκφυτα χρησιμοποιήθηκαν κορυφαία μεριστώματα που προέρχονταν από καλλιέργειες μικρομοσχευμάτων ενός κόμβου ή από βλαστικές κορυφές. Σε προκαταρκτική εργασία που πραγματοποιήθηκε δοκιμάστηκαν τρία διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα, το CD (Cheek, *α* 1984) το MS (Murashige and Skoog, 1962) και το NN (Nitsch and Nitsch 1969), στα οποία προστέθηκαν είτε μεμονωμένα είτε σε συνδυασμό μεταξύ τους φυτορρυθμιστικές ουσίες BAP (6-βενζυλ-αμινοπουρίνη), γιββερελλίνη GA_3 , IAA (ινδολυλο-3-οξικό οξύ) και IBA (ινδολυλοβουτυρικό οξύ).

Τελικά τα καταλληλότερα για την αξιολόγηση της αποτελεσματικότητάς τους στο συγκεκριμένο γονότυπο επιλέχθηκαν τα α) MS εφοδιασμένο με 0.1, 1.0, και 2.0 mg l^{-1} BAP και β) NN εφοδιασμένο με 0.1, και 2.0 mg l^{-1} BAP. Σε όλα τα χρησιμοποιημένα βασικά θρεπτικά υποστρώματα προστέθηκαν 3% (w/v) καλαμοζάχαρο και 0.7 (w/v) άγαρ. Το pH των θρεπτικών διαλυμάτων πριν προστεθεί σε αυτά άγαρ και πριν την αποστείρωσή τους ρυθμίστηκε στο 5.6 με τη βοήθεια σταγόνων NaOH (0.1N) ή HCL (0.1 N). Η αποστείρωση επιτεύχθηκε σε κλίβανο υδρατμών θερμοκρασίας 121° C υπό πίεση 1.05 kg/cm^2 και χρόνο 18- 20 min. Οι συνθήκες στους θαλάμους των καλλιεργειών ήταν φωτισμός ψυχρός- λευκός έντασης 1800-2000 lux προερχόμενος από λαμπτήρες φθορίου TL 65 W, φωτοπερίοδος 16 ώρες, θερμοκρασία ημέρας και νύχτας 20°-22° C.

Γενικά εντός του ίδιου βασικού θρεπτικού υποστρώματος δεν παρουσιάζονται σημαντικές διαφορές στη συχνότητα των αντιδρώντων έκφυτων που οφίονται στο γονότυπο. Αναφορικά με την ένταση του φαινομένου της οργανογένεσης, όπως αυτή προσδιορίστηκε με τον αριθμό των αναγεννηθέντων επίκτητων βλαστών ανά έκφυτο, φαίνεται ότι εντός του ίδιου βασικού θρεπτικού υποστρώματος η ένταση της βλαστογένεσης εξαρτάται από το γονότυπο, ενώ όταν αυτή εξετάζεται εντός του γονότυπου επηρεάζεται κυρίως από τη συγκέντρωση της κυτοκινίνης BAP, στην συγκεκριμένη περίπτωση δηλαδή όσον αφορά τη Σουλτανίνα ο αριθμός των επίκτητων βλαστών αυξανόταν παράλληλα με την αύξηση της συγκέντρωσης BAP και το άριστο της

ανταπόκρισης στη βλαστογέννηση σημειώθηκε σε συγκεντώσεις BAP 1.0 και 2.0 mg^l⁻¹, μάλιστα ο μέσος όρος επίκτητων βλαστών ανά έκφυτο ήταν 12.

Είναι φανερό ότι η παρουσία της κυτοκινίνης BAP ακόμα και σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση της τάξης του 0.1 mg^l⁻¹ είναι επαρκής για να προκαλέσει την αναγέννηση των επίκτητων βλαστών σε πολύ υψηλή συχνότητα από μεριστωματικά έκφυτα. Είναι ιδιαίτερα σημαντικό το γεγονός ότι η διαδικασία της αναγέννησης βλαστών έλαβε χώρα κατευθείαν από τα μητρικά κύτταρα των εκφύτων, χωρίς την μεσολάβηση σχηματισμού κάλου. Αυτό είναι πολύ σπουδαίο γιατί οδηγεί στην παραγωγή φυτών υψηλής ποικιλιακής (γενετικής) καθαρότητας και σταθερότητας και συνεπώς αυτή η τεχνική αυτή μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μέθοδος ανα πολλαπλασιασμού.

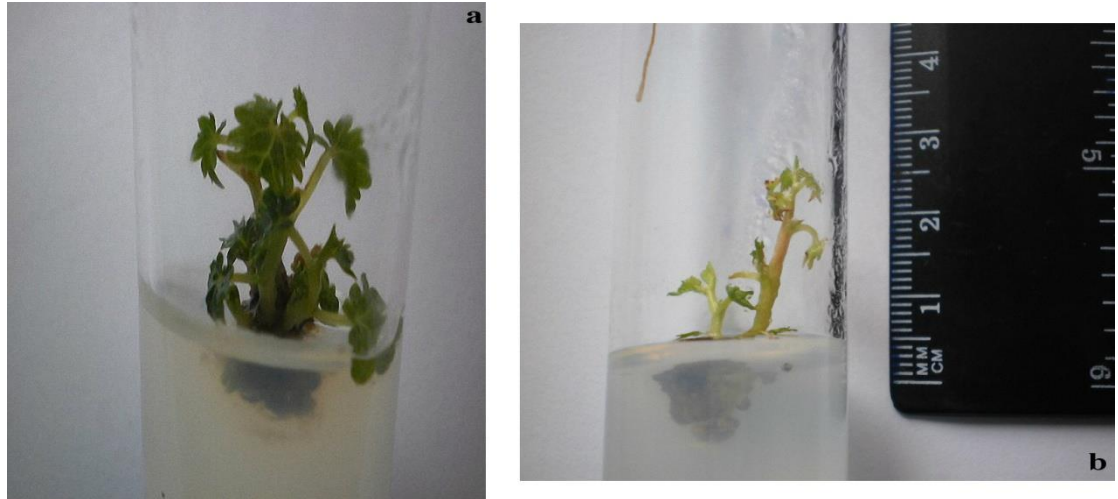


Εικόνα 5 *In vitro* καλλιέργεια οφθαλμών ποικιλίας αμπέλου Σουλτανίνα a) Οφθαλμοί μετά από 30 μέρες *in vitro* καλλιέργειας b) *In vitro* εκβλάστηση των οφθαλμών μετά από 120 ημέρες από τον εμβολιασμό c) Οφθαλμός που περιέχει εμβρύο στο σφαιρικό στάδιο d) Έμβρυο στο στάδιο καρδιά e) Λεπτομέρεια του εμβρύου σε απροσδιόριστο αναπτυξιακό στάδιο f) Οφθαλμός που περιέχει έμβρυο στο στάδιο της ανάπτυξης 'τορπίλη'

Πηγή : http://file.scirp.org/Html/16-2601403_47000.htm

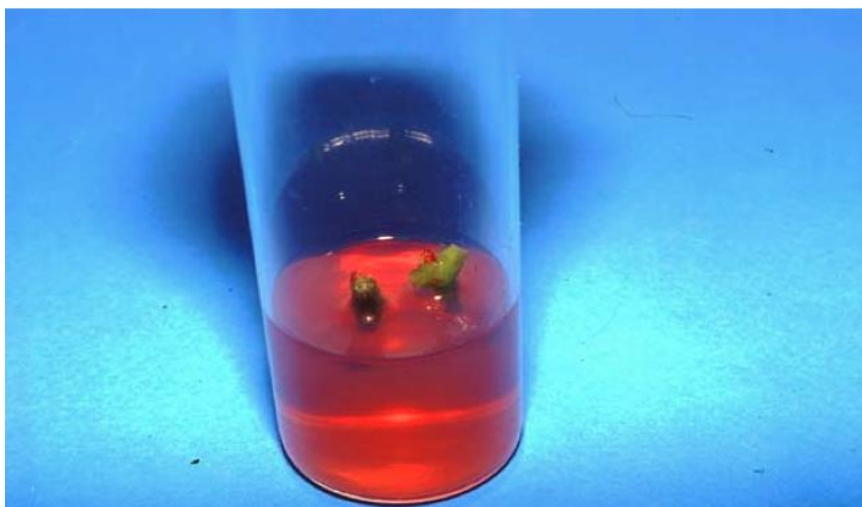
Σε δοκιμαστικές καλλιέργειες βλαστικών κορυφών της Σουλτανίνας, στο θρεπτικό υπόστρωμα WPM με την προσθήκη 5.0, 1.0 και 1.5 μM BA, παρατηρήθηκε καλύτερη ανάπτυξη στη μικρότερη συγκέντρωση BA. Αύξηση της ποσότητας BA είχε σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό ογκώδους κάλου στη βάση του εκφύτου και διόγκωση του

βλαστού ο οποίος φέρει μεγάλα σγουρά φύλλα. Οι παραγόμενοι βλαστοί χρησιμοποιούνταν για επανακαλλιέργεια και ένα μήνα αργότερα, είχαμε τη δυνατότητα να πάρουμε 1.3-7.0 βλαστούς καταλλήλους για ριζοβολία ή επανακαλλιέργεια από κάθε βλαστική κορυφή που καλλιεργήθηκε.



Εικόνα 5. 1(Α) Αριθμός βλαστών και (β) βλαστός μήκους που λαμβάνεται από το μέσο καλλιέργειας συμπληρωμένο με 1.0 mg l^{-1} IBA.

Όσον αφορά τη διαδικασία της ριζοβολίας μικρομοσχευμάτων, Οι πρώτες ρίζες εμφανίζονταν την τρίτη εβδομάδα από την εμφύτευση των μικρομοσχευμάτων στο θρεπτικό υπόστρωμα. Η προσθήκη NAA είτε IBA στο θρεπτικό υπόστρωμα δεν είχε επίδραση στατιστικώς σημαντική στο ποσοστό ριζοβολίας, στον αριθμό και το μήκος των ριζών και στην ανάπτυξη του βλαστού τα ίδια ήταν τα αποτελέσματα τόσο στο θρεπτικό υπόστρωμα MS + $0.4 \mu\text{M}$ NAA όσο και στο MS + $0.5 \mu\text{M}$ IBA (Ζιώζου 1995).



Εικόνα 5.2 Καλλιέργεια μικρομοσχευμάτων σε τροποποιημένο θρεπτικό υπόστρωμα, προτεινόμενο από τους Zlenkoetal., 1995.

Ανάμεσα στις διάφορες προσεγγίσεις για την αναγέννηση, η άμεση οργανογένεση (βλαστογένεση) από φύλλο μπορεί να θεωρηθεί η πλέον πρόσφορη εξαιτίας της απλότητάς της αλλά και της μειωμένης πιθανότητας για σωμακλωνική παραλλακτικότητα. Υποστηρίζεται ότι τα νεαρά φύλλα αποτελούμενα από νεανικούς ιστούς αποτελούν πολύ καλό υλικό για την επαγωγή της μορφογένεσης σε δύσκολα αναγενόμενα φυτικά είδη.

Επαγωγή της μορφογένεσης από φύλλο έχει αναφερθεί σε μικρό αριθμό γονοτύπων στην άμπελο. Άμεση οργανογένεση από έκφυτα φύλλου σε διάφορες ποικιλίες *V. vinifera*. Σωματική εμβυογένεση από φύλλο έχει επιτευχθεί επίσης σε διάφορες ποικιλίες της αμπέλου.

Οι Συμινής και άλλοι το 1998 χρησιμοποίησαν έκφυτα ενός κόμβου από βλαστό διάφορων ποικιλιών αναμεσα τους και Σουλτανίνας. Η καλλιέργεια έγινε σε θρεπτικό υπόστρωμα B5 (Gamborg 1968) στους 27°C και 16 h διάρκεια φωτισμού ($70 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$) με λάμπες φθορισμού (coolwhite).

Οι μεσαίοι κόμβοι των *in vitro* φυτών χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη του ρυθμού βλαστογένεσης από πλάγιους οφθαλμούς. Η καλλιέργεια αυτών έγινε σε υπόστρωμα B5, εφοδιασμένο με 1 ή 2 mg/IBA (N^6 -benzyladenine). Τριάντα ημέρες από την έναρξη της καλλιέργειας, τα έκφυτα μεταφέρθηκαν εώς είχαν σε νέο υπόστρωμα με την ίδια σύσταση. Σε όλη τη διάρκεια της επαγωγής στην βλαστογένεσης χρησιμοποιήθηκαν οι συνθήκες καλλιέργειας που αναφέρονται παραπάνω.

Φύλλα διαφορετικής ηλικίας και μεγάλους από τα *in vitro* φυτά , χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη του δυναμικού μορφογένεσης των ποικιλιών. Χρησιμοποιήθηκαν τα θρεπτικά υποστρώματα B5 και Nitsch και Nitsch. Η επαγωγή σωματικής εμβρυογένεσης μελετήθηκε παρουσία των αυξινών 2,4 D , NOA (β -naphthoxyaceticacid) και IAA σε διάφορες συγκεντρώσεις με ταυτόχρονη παρουσία των κυτοκινινών BA και TDZ(thidiazuron) . Η οργανογένεση μελετήθηκε παρουσία 2.25 mg/LBAκαι 0.03 mg/LNAAσε υπόστρωμα NN.

Τα θρεπτικά υποστρώματα ήταν εφοδιασμένα με 3 % σακχαρόζη και στερεοποιήθηκαν με 0.7 % άγαρ. Το pH ρυθμίστηκε στην τιμή 5.8 με NaOH. Τα *in vitro* φυτά και οι καλλιέργειες των πλαγίων βλαστών αναπτύχθηκαν σε γυάλινους σωλήνες.

Τα αποτελέσματα της εργασίας έδωσαν ότι σε όλα τα έκφυτα πλάγιου οφθαλμού παρατηρήθηκε βλαστογένεση ανεξαρτήτως συγκεντρώσεως BA συγκεκριμένα στη ποικιλία Σουλτανίνα δημιουργήθηκαν 15-30 οφθαλμοί / έκφυτο.

Σωματική εμβρυογένεση επιτεύχθηκε στη Σουλτανίνα σε ποσοστό που κυμαίνεται γύρω στο 30 % σε νεαρά φύλλα του ίδιου σταδίου από τους αναπτυσσόμενους βλαστούς.

Στη Σουλτανίνα παρατηρήθηκε επίσης άμεση βλαστογένεση μόνο από φύλλα αναπτυσσόμενων βλαστών , σε θρεπτικό μέσο NN παρουσία BA και NAA σε ποσότητα 2.25 mg/L και 0.03 mg/L αντίστοιχα.

Φύλλα από *in vitro* φυτά δεν έδειξαν δυναμικό για μορφογένεση , η οργανογένεση δε , δεν συνοδευόταν από καλογένεση.

Οι Κανάκης και Σταυρακάκης το 1995 εξέτασαν τη πρόκληση οργανογένεσης σε έκφυτα βλαστικών κορυφών και μεριστωμάτων με τη χρήση του TDZ σε σύγκριση με την ευρέως χρήση του BAP.

Και στις δύο περιπτώσεις των εκφύτων (βλαστικές κορυφές αλλά και μεριστώματα) χρησιμοποιήθηκαν ίδια θρεπτικά υποστρώματα Nitsch and Nitschκαι το Murashige and Skoog , τα οποία εφοδιάστηκαν με 3% (w/v) ζάχαρη και 0.7% (w/v) άγαρ. Πλέον τούτου στην καλλιέργεια των βλαστικών κορυφών προστέθηκαν α) στον μεν θρεπτικό υπόστρωμα MS0.5 ή 2.0 mg/ LBAP και 1.0 και 3.0 mg/L TDZ στο δε θρεπτικό υπόστρωμα NN 1.0 mg/LBAP. Στην καλλιέργεια μεριστωματικών εκφύτων προστέθηκαν επιπλέον στο υπόστρωμα MS 1 mg/L BAP και 1.0 ή 3.0 mg/LTDZ. Το pH των θρεπτικών διαλυμάτων πριν προστεθεί σε αυτά άγαρ και πριν την αποστείρωσή τους ρυθμίστηκε

στο 5.6 με τη βοήθεια σταγόνων NaOH (0.1N) ή HCL (0.1 N). Η αποστείρωση επιτεύχθηκε σε κλίβανο υδρατμών θερμοκρασίας 121° C υπό πίεση 1.05 kg/cm² και χρόνο 18- 20 min. Οι συνθήκες στους θαλάμους των καλλιεργειών ήταν φωτισμός ψυχρός-λευκός έντασης 1800-2000 lux προερχόμενος από λαμπτήρες φθορίου TL 65 W, φωτοπερίοδος 16 ώρες , θερμοκρασία ημέρας 22 ± 1° C και θερμοκρασία νύχτας 20 ± 1° C.

Η Σουλτανίνα αποδείχθηκε το ίδιο παραγωγική σε όλα τα χρησιμοποιηθέντα υποστρώματα ανεξαρτήτου είδους (BAP ή TDZ) ή της συγκέντρωσης του ρυθμιστή ανάπτυξης.

Το θρεπτικό υπόστρωμα για την ποικιλία Σουλτανίνα θεωρείται το MS εφοδιασμένο με 1.0 mg/LBAP.

Ο χρόνος διάρκειας των *in vitro* καλλιεργειών , ιδιαίτερα σε υποστρώματα εφοδιασμένα με TDZ είναι πολύ κρίσιμος και πρέπει να λαμβάνεται σοβαρά υπόψιν. Έκθεση των εκφύτων σε TDZ σε παραπάνω από έξι εβδομάδες προκαλεί χαλάρωση των ιστών , παραγωγή κάλου από τους ήδη αναγεννηθέντες επίκτητους οφθαλμούς και τελικά καταστροφή των καλλιεργειών. Το φαινόμενο αυτό πιθανότατα οφείλεται σε γηρασμό των ιστών από την παραγωγή αιθυλενίου εξαιτίας της παρουσίας TDZ.

Διαπιστώθηκε επίσης ότι τα έκφυτα τα οποία καλλιεργήθηκαν πρώτα σε υπόστρωμα TDZ όταν ακολούθως μεταφέρονταν σε θρεπτικό υπόστρωμα απαλλαγμένο από TDZ ή οποιουδήποτε άλλου ρυθμιστή ανάπτυξης συνέχιζαν να παράγουν βλαστούς και οφθαλμούς. Το γεγονός αυτό δηλαδή ότι τα έκφυτα εξακολουθούσαν να παράγουν βλαστούς σε επανακαλλιέργειες χωρίς την παρουσία κυτοκινίνης μας οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι καλλιέργειες μετατράπηκαν σε αυτότροφες. Αυτό μπορεί να οφείλεται σε δύο λόγους α) το TDZ αποθηκεύτηκε στους ιστούς και ακολούθως αποδιδόταν διαχρονικά καλύπτοντας έτσι τις ανάγκες της καλλιέργειας ή ότι β) το TDZ διέγειρε το μηχανισμό βιοσύνθεσης της ενδογενούς κυτοκινίνης ή αλλοίωσε τον μεταβολισμό της κυτοκινίνης πιθανώς μέσω της κοινής θέσης δράσης. (Κανάκης , Σταυρακάκης 1995).

Η Κορινθιακή Σταφίδα είναι μία ποικιλία της αμπέλου για την οποία δεν υπάρχουν αναφορές σε σχέση με την ιστοκαλλιέργειά της.

Το 1989 οι BOUQUET και DAVIS χρησιμοποίησαν νέα τεχνική "*in vitro*" καλλιέργειας γονιμοποιημένων ωαρίων προελθόντων από διασταυρώσεις μεταξύ

απύρηνων ποικιλιών, εξασφαλίζοντας έτσι την κανονική ανάπτυξη των εμβρύων. Τα αποκτηθέντα φυτάρια πολλαπλασιάστηκαν "in vitro" και μετά τον εγκλιματισμό τους μεταφυτεύθηκαν σε συνθήκες υπαίθρου για την ταχύτερη επιλογή νέων ποικιλιών με βάση τον χαρακτήρα της απυρηνίας και διαφόρων άλλων ιδιοτήτων. Η τεχνική αυτή εφαρμόστηκε σε παρθενοκαρπικές ποικιλίες όπως είναι και η Κορινθιακή και θα μπορούσε να εφαρμοστεί και σε αυτή.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

BELLINCAMPI D., BADURIN N., MORPUGO G., (1985), High plating efficiency with plant cell cultures. *Plant Cell Reports* 4, 155-157

BOUQUET A., DAVIS H.P., (1989), Culture in vitro d'ovules et d'embryons de vigne (*Vitis vinifera* L.) appliquée à la sélection de variétés de raisins de table sans pépins. *Agronomie* 9, 565-574.

CHEE R., POOL R.M., (1983) "In vitro" vegetative propagation of Vitis: Application of previously defined culture conditions to a selection of genotypes. *Vitis* 22, 363-374.

CHEE R., POOL R.M., BUCHER D., (1984), A method for large scale in vitro propagation of Vitis. *New York's food and Life Sciences*. No 109, 1-9.

CONGER B.V., 1981, Cloning agricultural plants via in vitro techniques, Crc Press, USA

DEBERGH P.C., ZIMMERMAN R.H., (1993), Micropropagation- Technology and application, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands

EVANS DA., BRAVO JE., (1983), Plant protoplast isolation and culture.

International Review of Cytology-Supplement 16,33-53.

GEORGE EF., (1993), *Plant propagation by tissue culture. Part 1, the Technology.* 2nd edition, Exegetics Ltd.

GEORGE EF., HALL MA., DE KLERK G-J., (2008), *Plant propagation by tissue culture. Volume 1. The background.* 3rd edition. Springer, the Netherlands.

GLEDDIE, S., W.KELLER AND G. SETTERFIELD.,(1983), Somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf explants and cell suspensions of *Solanum melongena* (eggplant). *Can. J. Bot.*, 61, pp. 656-666.

GRIGORIADOU K., M. VASILAKIS AND E.P. ELEFThERIOU.,(2002), In vitro propagation of the greek olive "Chondroelia Chalkidikis". *Plant cell, Tissue and organ Cult.* 71, pp.

HARTMANN HT, KESTER DE, DAVIES FD, GENEVE RL, (1997), *Plant Propagation: Principles and Practices.* Simon&Schuster, New Jersey, USA.

HARTMANN HUDSON, KESTER DALE, DAVIES FRED, GENEVE ROBERT, (2002), *Plant propagation: Principles and Practices, Seventh Edition,* Prentice Hall, USA

HARTMAN T. HUDSON, KESTER E. DALE, DAVIES T. FRED, JR, GENEVE L. ROBERT, (1997), *Plant Propagation: Principles and Practices.* 6th edition. Prentice Hall International, Inc.

KARP A. BRIGHT S.W.J. (1986), On the causes and origins of somaclonal variation. *Oxford Surveys of Plant Molecular and Cell Biology* 2: 199-234.

KENNETH C. TORRES, (1989), *Tissue culture techniques for horticultural crops,* USA

KESSELL, R.J.H. AND CARR, A.H., (1972), Effect of dissolved oxygen concentration on growth and differentiation of carrot (*Daucus carota*) tissue. *J. Exp. Bot.* 23: 996-1007.

KLEYN JOHN., LYNDIANE KYTE., (1996), *Plants from test tubes- An introduction to micropropagation,* Timber Press, Hong Kong

KNAUSS J. F. AND J. W. MILLER., (1978), A contaminant, *Erwinia carotovora*, affecting commercial plant tissue culture. *In vitro* 14, pp. 754-756

MHATRE M., SALUNKHE C.K. AND RAO P.S.,(2000),Micropropagation of *Vitis vinifera* L. towards an improved protocol. *Scientia Horticulturae* 84: 357-363.

MICHAEL W. BAIRU, ADEYEMI O. AREMU, JOHANNES VAN STADENSOMACLONAL VARIATION IN PLANTS: CAUSES AND VALERIA B. KUKSOVA, NIKOLAI M. PIVEN & YURI YU. GLEBA (1995),*Institute of Cell Biology and Genetic Engeneering, Acad Zabolotnogo Str., 148, Kiev-GSP-22, 252022, Kiev, Ukraine Instituto Venezolano de Investigaciones Cientificas, Apto. 21827, Caracas 1021-A, Venezuela American Cyanamid Company, Agricultural Research Division, P.O.Box 400, Prinseton, NJ 08543-0400, USA.*

MIGUENS FC, LOURO RP, MACHADO RD, (1993),A scanning electron microscope study of normal and vitrified leaves from *Datura insignis* plantlets cultured in vitro. *Plant Cell Tissue Organ Culture* 32, 109-113.

MURASHIGE T., (1974), Plant propagationthrough tissu cultures. *Ann Rev. Plant Physiol.*, 25, 135-166.

MURASHIGE, T. AND SKOOG, F. (1962), A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497.

PAOLI G., ROSSI V., SCOZZOLI A., (1994),Micropropagazione delle piante Ortoflorofrutticole, Edagricole-Edizioni agricole, Bologna.

PAQUES M, BOXUS P, (1987),A model to learn “vitrification”, the rootstock apple M26. Present results. *Acta Horticulturae* 212, 193-210.

ROUBELAKIS-ANGELAKIS, K. A. AND ZINANOVITC, S. B. (1991), A new culture medium for in vitro rhizogenesis of grapevine. *HortScience* 26: 1551-1553.

QUOIRIN M, LEPOIVRE P, (1977),Improved media for in vitro culture of *Prunus* spp. *ActaHorticulturae* 78, 437-442.

SHAN X.Y., LI D.S., QU R.D., (2000),Thidiazuron promotes *in vitro* Regenerationof wheat and barley. *InvitroCell. Dev. Biol.-Plant*, 36, pp. 207-210

SHEBK, N, HSIAO K.C., BARNMAN C.H., (1991), Avoidance of precipitation and carbohydrate breakdown in autoclaved plant tissue culture media. *Plant Cell Rep.* 10, pp. 115-119.

SKOOG, F. (1944), *Am. J. Bot.* 31: 19-24.

TSIFTARIS A. S., AND POLIDOROS A. N., (2000) DNA methylation and plant breeding.

ZIV M, (1991), Quality of micropropagated plants. Vitrification. *In vitro Cellular and Developmental Biology* 27, 64-69

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΑΣΗΜΑΚΟΠΟΥΛΟΥ, Α. & ΑΛΕΞΟΠΟΥΛΟΣ, Α., (2013), Αμπελουργία., Καλαμάτα (Πανεπιστημιακές σημειώσεις)

ΒΛΑΧΟΣ Μ.Β., (1991), Αμπελογραφία. Εκδόσεις ΝΕΑ ΣΤΟΙΧΕΙΟΘΕΤΙΚΗ, Θεσσαλονίκη.

ΕΛΕΥΘΕΡΙΟΥ Ε., (1994), Τεχνολογία Φυτικού Πολλαπλασιαστικού Υλικού. Εκδόσεις Art of Text. Θεσσαλονίκη, σελ. 16, 19, 101-102.

ΕΛΕΥΘΕΡΙΟΥ ΕΠ., (2006), *Τεχνολογία Φυτικού Πολλαπλασιαστικού Υλικού*. 3η έκδοση. Εκδόσεις University Studio Press, Θεσσαλονίκη.

ΖΙΩΖΟΥ, "συμβολή στη μελέτη του. in vitro πολλαπλασιασμού μερικών ποικιλιών και υποκειμένων της αμπέλου (*N. vinifera L*)",

ΚΑΚΡΙΔΗΣ ΙΘ., (1986), *Ελληνική Μυθολογία*, τόμος Β', Εκδοτική Αθηνών, Αθήνα

ΚΑΝΑΚΗΣ, Α. Γ. ΚΑΙ ΣΤΑΥΡΑΚΑΚΗΣ, Μ. Ν., (1998). Σύγχρονες μέθοδοι ταχέως αγενούς πολλαπλασιασμού μερικών ποικιλιών αμπέλου που καλλιεργούνται στην Ελλάδα. *In vitro καλλιέργεια βλαστικών κορυφών*. *Αγροτική Έρευνα* 21: 13-20.

ΚΑΝΑΚΗΣ, Α. Γ. ΚΑΙ ΣΤΑΥΡΑΚΑΚΗΣ, Μ. Ν. (1995). Αναγέννηση επίκτητων βλαστών από in vitro καλλιέργεια βλαστικών κορυφών μεριστωμάτων αμπελιού παρουσία του θειοδιαζουρόν. *Αγροτική Έρευνα* 19: 13-20.

ΚΙΝΤΖΙΟΣ ΣΠΥΡΙΔΩΝ., (2014),Εισαγωγή στον μικροπολλαπλασιασμό των φυτών
Αθήνα (Πανεπιστημιακές σημειώσεις)

ΚΙΝΤΖΙΟΣ ΣΠΥΡΙΔΩΝ., (1994),Επιχειρηματική ιστοκαλλιέργεια., Εκδόσεις, Α.
Σταμούλης Αθήνα-Πειραιά

ΜΕΤΖΑΚΗΣ ΔΗΜΗΤΡΗΣ.,(2005), Καλλιέργειες in vitro, Εκδόσεις Ίων, Αθήνα

ΝΙΚΟΛΑΟΥ, Ν. Α., (2005).Γενική Αμπελουργία, Υπηρεσία Δημοσιευμάτων
Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, Θεσσαλονίκη.

ΠΑΠΑΧΑΤΖΗΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ ΚΑΙ ΚΑΛΟΡΙΖΟΥ ΕΛΕΝΗ., (2008),Παραγωγή
Πολλαπλασιαστικού Υλικού., Εκδόσεις Γραμμικό, Λάρισα

ΠΑΣΠΑΤΗΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ., (1998), Φυτορυθμιστικές ουσίες (Φυτομόνες)- Ο
ρόλος τους στα φυτά – Οι εφαρμογές τους στις καλλιέργειες, Εκδόσεις Αγρότυπος,
Μαρούσι

ΠΕΤΡΟΠΟΥΛΟΥ ΚΑΡΑΓΙΑΝΝΟΠΟΥΛΟΥ., (2016),ΣημειώσειςΑμπελουργίας.,
Καλαμάτα,(Πανεπιστημιακές σημειώσεις)

ΠΛΑΣΤΗΡΑ Β., (1990).*In vitro* καλλιέργεια φυτικών ιστών εσπεριδοειδών για
παραγωγή υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού. Γεωργία και Ανάπτυξη, Νοέμ.-_εκ.,
σελ. 17-31

ΣΤΑΥΡΑΚΑΚΗΣ , Αμπελουργία , 2010

ΣΥΜΙΝΗΣ, Ι. Χ. ΜΠΙΝΙΑΡΗ, Κ. ΚΑΙ ΣΤΑΥΡΑΚΑΚΗΣ, Ν. Μ. (1998/9).
Μελέτη της μορφογένεσης in vitro σε ελληνικές ποικιλίες αμπελιού. Αγροτική
Έρευνα 22: 69-74.

ΤΣΑΚΙΡΗΣ Α,(2003). *Ελληνική Οινογνωσία*. Εκδόσεις Ψύχαλου., Αθήνα.

ΧΑΤΖΟΠΟΥΛΟΣ Π., (2001). Βιοτεχνολογία Φυτών. Εκδόσεις Έμβρυο.Αθήνα.

ΙΣΤΟΣΕΛΙΔΕΣ

AGROCAPITA(17/8/2014)

[www.agrocapital.gr/Category/Afieromata/Article/11703/korinthiaki-stafida--mayri-
kai-polytimi-](http://www.agrocapital.gr/Category/Afieromata/Article/11703/korinthiaki-stafida--mayri-kai-polytimi-)

ΓΑΙΑΕΠΙΧΕΙΡΕΙΝ

www.gaiapedia.gr/gaiapedia/index.php/%CE%97_%CE%BA%CE%B1%CE%BB%CE%BB%CE%B9%CE%AD%CF%81%CE%B3%CE%B5%CE%B9%CE%B1_%CF%84%CE%B7%CF%82_%CE%B5%CF%80%CE%B9%CF%84%CF%81%CE%B1%CF%80%CE%AD%CE%B6%CE%B9%CE%B1%CF%82_%CE%A3%CE%BF%CF%85%CE%BB%CF%84%CE%B1%CE%BD%CE%AF%CE%BD%CE%B1%CF%82

ΑΓΡΟΤΙΚΗ ΣΤΕΓΗ

http://agrotikistegi.gr/products-mainmenu-64?page=shop.product_details&flypage=flypage.tpl&product_id=2252&category_id=594

ΥΠΟΥΡΓΕΙΟ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΚΑΙ ΤΡΟΦΙΜΩΝ(30/9/2016)

www.minagric.gr/index.php/el/for-farmer-2/crop-production/ampeli/1062-apojiramenistafida