



**ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ  
ΙΔΡΥΜΑ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ**  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΚΑΙ  
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ  
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΩΝ  
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

## **ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**«ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΜΕ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ»**

**ΔΕΛΗΜΑΝΗΣ ΔΗΜΗΤΡΙΟΣ Α.Μ. 240/2013**



**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΠΑΛΑΤΟΣ**  
Καθηγητής Εφαρμογών

**Θεσσαλονίκη 2019**

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμότερες ευχαριστίες στον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Γεώργιο Παλάτο για την στήριξη, βοήθεια και καθοδήγηση που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια εκπόνησης της πτυχιακής μου εργασίας.

Η συμβολή του στη δημιουργία της πτυχιακής μου εργασίας ήταν παραπάνω από καθοριστική.

Με εκτίμηση,

Δελημάνης Δημήτριος

ABSTRACT

Plant biotechnology plays an important role in solving problems related to the improvement of forest and fruit trees. In vitro techniques are increasingly being applied to support conventional methods of vegetative propagation and plant breeding. Tissue culture is the foremost branch of biotechnology associated with plant improvement, ie the production of new varieties and hybrids. The relevant techniques are many and different: for example, with the isolation and fusion of protoplasts, individual genes or even whole groups of germs can be transferred to plants from completely different species (not only plant but also microbial or animal - even human). With the cultivation of anthers we can achieve the production of dicotyledonous plants that have exactly the same alleles and therefore a perfectly symmetric genome. Also with tissue culture, we can successfully replace conventional plant propagation techniques, which for various reasons are difficult, expensive or time-consuming. Examples are vaccination, flowering, and storage of propagation material. Typically, tissue culture applications related to plant improvement require a high level of technical and scientific training and laboratory infrastructure.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η βιοτεχνολογία των φυτών διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στην επίλυση των προβλημάτων που σχετίζονται με τη βελτίωση των δασικών και οπωροφόρων δένδρων. In vitro τεχνικές εφαρμόζονται όλο και περισσότερο προς υποστήριξη των συμβατικών μεθόδων αγενούς πολλαπλασιασμού και βελτίωσης των φυτών. Η ιστοκαλλιέργεια είναι ο κατεξοχήν κλάδος της βιοτεχνολογίας ο οποίος σχετίζεται με την βελτίωση των φυτών, δηλαδή την παραγωγή νέων ποικιλιών και υβριδίων. Οι σχετικές τεχνικές είναι πολλές και διαφορετικές: για παράδειγμα, με την απομόνωση και συγχώνευση πρωτοπλαστών μπορούμε να μεταφέρουμε στα φυτά μεμονωμένα γονίδια ή ακόμα και ολόκληρες ομάδες γόνων από εντελώς διαφορετικά είδη (όχι μόνο φυτικά αλλά και μικροβιακά ή ζωικά – ακόμα και ανθρώπινα). Με την καλλιέργεια ανθήρων μπορούμε να επιτύχουμε την παραγωγή διαπλοειδών φυτών τα οποία έχουν απόλυτα ίδιους αλληλόμορφους και επομένως ένα απόλυτα συμμετρικό γονίωμα. Επίσης με την ιστοκαλλιέργεια μπορούμε να αντικαταστήσουμε με επιτυχία συμβατικές τεχνικές πολλαπλασιασμού των φυτών, οι οποίες για διάφορους λόγους είναι δύσκολες, ακριβές ή χρονοβόρες. Παραδειγματικά αναφέρονται ο εμβολιασμός, η πρόκληση ανθοφορίας και η αποθήκευση του πολλαπλασιαστικού υλικού. Συνήθως οι εφαρμογές της ιστοκαλλιέργειας που σχετίζονται με τη βελτίωση των φυτών απαιτούν ένα υψηλό επίπεδο τεχνικής και επιστημονικής κατάρτισης και εργαστηριακής υποδομής.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 <sup>ο</sup> .....	7
1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ .....	7
1.2 ΓΕΝΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ ΚΑΙ ΒΑΣΙΚΟΙ ΟΡΟΙ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.....	8
1.3 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ .....	9
1.4 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΕΠΙΤΥΧΙΑΣ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ .....	11
1.4.1 ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ.....	11
1.4.2 ΣΥΣΤΑΣΗ ΦΥΤΙΚΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ.....	11
1.4.3 ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ .....	12
1.5 ΒΑΣΙΚΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ .....	12
1.5.1 ΜΟΛΥΝΣΕΙΣ (Contamination).....	13
1.5.2 ΟΞΕΙΔΩΣΗ (Exudation /Browning) .....	14
1.5.3 ΥΑΛΟΠΟΙΗΣΗ (Vitrification) .....	14
1.5.4 ΑΤΕΛΗΣ ΕΓΚΛΙΜΑΤΙΣΜΟΣ (Acclimatization).....	14
1.5.5 ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑ IN VITRO Ή ΣΩΜΑΚΛΩΝΙΚΗ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑ (Somaclonal variation) .....	15
1.6 ΣΤΑΔΙΑ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.....	15
1.7 ΕΙΔΗ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.....	16
1.7.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΕΡΙΣΤΩΜΑΤΩΝ.....	17
1.7.2 ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ.....	17
1.7.2.1 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗΣ.....	18
1.7.3 ΤΥΧΑΙΑ ΟΡΓΑΝΟΓΕΝΕΣΗ.....	18
1.7.4 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΟΦΘΑΛΜΩΝ .....	18
1.7.5 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΕΜΒΡΥΩΝ .....	19
1.8 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.....	21
1.9 ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ .....	22
1.10 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ .....	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 <sup>ο</sup> .....	25
2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ .....	25
2.2 ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ .....	26
2.3 ΤΥΠΟΙ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ.....	27
2.4 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΡΥΘΜΙΣΤΩΝ ΑΥΞΗΣΗΣ.....	28
2.4.1 ΑΥΞΙΝΕΣ.....	28
2.4.2 ΚΥΤΟΚΙΝΕΣ.....	30
2.4.3 ΓΙΒΕΡΕΛΛΙΝΕΣ.....	31
2.4.4 ΑΜΠΙΣΙΚΟ ΟΞΥ.....	32
2.4.5 ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ.....	32
2.5 ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΥ ΜΕΣΟΥ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.....	34
2.6 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ.....	35
2.6.1 ΕΤΟΙΜΑ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ .....	36
2.7 ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΥ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΥ .....	37
2.8 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΚΦΥΤΟΥ ΚΑΙ ΕΜΦΥΤΕΥΣΗ ΥΠΟ ΑΣΗΠΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ....	38
2.8.1 ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗ ΤΟΥ ΦΥΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ.....	38
2.8.2 ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ ΧΩΡΩΝ ΕΜΦΥΤΕΥΣΗΣ .....	38
2.8.3 ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΕΓΧΥΣΗΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΜΦΥΤΕΥΣΗΣ .....	39
2.8.4 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΜΦΥΤΕΥΣΗΣ.....	39
2.8.5 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΜΕΤΑΦΥΤΕΥΣΗΣ.....	40

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 <sup>ο</sup> .....	42
3.1 ΕΛΑΧΙΣΤΕΣ ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΜΟΝΑΔΑΣ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ .....	42
3.2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΒΑΣΙΚΟΥ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΥ .....	43
3.2.1 ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΟΥ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ .....	45
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 <sup>ο</sup> .....	47
4.1 ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ .....	47
4.1.1 ΣΤΟΧΟΙ ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ.....	49
4.2 ΣΤΑΔΙΑ ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ .....	49
4.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΟΝ ΕΠΙΤΥΧΗ ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΕΝΟΣ ΦΥΤΙΚΟΥ ΕΙΔΟΥΣ.....	51
4.4 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ .....	53
4.5 ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ .....	54
4.6 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΦΥΤΩΝ ΜΕ ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΕΝΑΝΤΙ ΣΥΜΒΑΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ .....	55
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	57
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ .....	58
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	63

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1<sup>ο</sup>

### 1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Ο όρος ιστοκαλλιέργεια φυτών (plant tissue culture) ή καλλιέργεια *in vitro*, αναφέρεται στην καλλιέργεια φυτικών τμημάτων, είτε αυτά είναι μεμονωμένα κύτταρα ή ιστοί ή όργανα, σε θρεπτικό υπόστρωμα υπό ασηπτικές συνθήκες σε ευνοϊκές περιβαλλοντικές συνθήκες. Σχεδόν οποιοσδήποτε τύπος φυτικού ιστού μπορεί να καλλιεργηθεί σε στερεό ή και σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα και να διαφοροποιηθεί σε νέους τύπους ιστών ή οργάνων ή και να εξελιχθεί σε ολοκληρωμένο οργανισμό. Αυτή η ικανότητα ενός διαφοροποιημένου σωματικού φυτικού κυττάρου, να επαναδιαφοροποιηθεί και να αναγεννήσει ολόκληρο φυτό ονομάζεται ολοδυναμικότητα (totipotency) και αποτελεί τη βάση της ιστοκαλλιέργειας.

Όπως αναφέρει ο Pierik (1988) η πρώτη προσπάθεια για την καλλιέργεια φυτικών ιστών έγινε από τον Haberlandt το 1902. Η ανακάλυψη των αυξινών καθώς και η επιλογή κατάλληλου φυτικού υλικού και θρεπτικού διαλύματος οδήγησαν στα πρώτα επιτυχή αποτελέσματα από τον White, ο οποίος το 1934 καλλιεργησε *in vitro* ρίζες τομάτας και το 1939 παρατήρησε ανάπτυξη βλαστών *in vitro* από ιστούς καπνού, και από τον Nobecourt (1939), που ανέφερε το σχηματισμό ριζών από κάλλους καρότου. Από τότε και μέχρι σήμερα η καλλιέργεια φυτικών κυττάρων, ιστών και οργάνων έχει χρησιμοποιηθεί με συνεχώς αυξανόμενο ρυθμό τόσο ως μέσο έρευνας σε θέματα βιοχημείας, φυσιολογίας, μοριακής βιολογίας και γενετικής όσο και για πρακτικούς σκοπούς.

Η *in vitro* καλλιέργεια φυτικών ιστών και κυττάρων επηρεάζεται από μεγάλο αριθμό παραγόντων που σχετίζονται με:

- το φυτικό υλικό
- τη σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος
- τις περιβαλλοντικές συνθήκες καλλιέργειας.

Για την επιτυχή *in vitro* καλλιέργεια ενός φυτικού είδους πρέπει να ληφθούν υπόψη οι παραπάνω παράγοντες και να καθοριστούν πειραματικά οι άριστες συνθήκες καλλιέργειας (Pierik 1988, Ποντίκης 1998). Η δυνατότητα της καλλιέργειας φυτικών ιστών σε θρεπτικό υπόστρωμα βοηθάει στο να κατανοήσουμε τις ικανότητες και τις δυνατότητες που έχει το κύτταρο σαν μια στοιχειώδη μονάδα, μας δίνει πληροφορίες για τις μεταξύ των κυττάρων σχέσεις και αλληλεπιδράσεις μέσα στο φυτό, καθώς και πως επηρεάζει η σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος την αύξηση και ανάπτυξη των φυτών *in vitro*.

## 1.2 ΓΕΝΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ ΚΑΙ ΒΑΣΙΚΟΙ ΟΡΟΙ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Ο όρος ιστοκαλλιέργεια φυτών (plant tissue culture) αναφέρεται στην καλλιέργεια φυτικών τμημάτων και πήρε τη συγκεκριμένη ονομασία επειδή το νέο φυτό που αναπτύσσεται μπορεί να προέρχεται από φυτικό ιστό. Η Ιστοκαλλιέργεια είναι μια μέθοδος αγενούς πολλαπλασιασμού των φυτών με τεράστιες δυνατότητες, ποσοτικές-ποιοτικές, παραγωγής νέων φυτών, βασισμένη στη σύγχρονη τεχνολογία που αναπτύχθηκε τα τελευταία χρόνια. Μέχρι πρότινος η ιστοκαλλιέργεια αναφερόταν σε ποώδη φυτά, ενώ την τελευταία δεκαετία εφαρμόστηκε στα δενδρώδη φυτά π.χ την άμπελο.

Η ιστοκαλλιέργεια (tissue culture) είναι γενικότερα γνωστότερη με τους όρους «καλλιέργεια in vitro» ή «τεχνικές in vitro». Ο λατινικός όρος in vitro σημαίνει κυριολεκτικά «στο γυαλί» και προέρχεται από την εποχή που οι κυτταροκαλλιέργειες πραγματοποιούνταν μέσα σε γυάλινους σωλήνες (χρησιμοποιούνται ακόμα σε αρκετές εφαρμογές). Με τα σημερινά δεδομένα, ως τεχνική in vitro θα χαρακτηρίσουμε οποιαδήποτε μέθοδο ή διαδικασία αναφέρεται στην απομάκρυνση κυττάρων από έναν οργανισμό και στη συνέχεια, τη διατήρησή του σε ένα τεχνητό περιβάλλον καλλιέργειας, όπου προσπαθούμε να ελέγξουμε τη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων αυτών. Ο έλεγχος επιτυγχάνεται με εφαρμογή διαφόρων φυσικών μεθόδων (π.χ. τροποποίηση θερμοκρασίας, φωτισμού, σύστασης ατμόσφαιρας) και/ή με προσθήκη χημικών ουσιών (π.χ. θρεπτικών μέσων, ρυθμιστών αύξησης κ.λπ.

Η ιστοκαλλιέργεια είναι συνυφασμένη με μια σειρά από βασικές τεχνικές όπως: παρασκευή υποστρώματος, αποστείρωση και απολύμανση, οι οποίες απαιτούν ένα επαρκές επίπεδο εκπαίδευσης και εργαστηριακής υποδομής.

Κάθε διαδικασία κυτταροκαλλιέργειας είναι συνώνυμη με τη χρήση ασηπτικών τεχνικών (aseptic techniques), δηλαδή την αποστείρωση και απολύμανση του χώρου εργασίας, των χρησιμοποιούμενων σκευών και αναλώσιμων αλλά και του ίδιου του φυτικού υλικού. Αυτό γίνεται για να εμποδιστεί η ανάπτυξη των μικροοργανισμών, οι οποίοι βρίσκονται παντού, σε βάρος των καλλιεργούμενων κυττάρων. Απόλυτη αποστείρωση δεν είναι δυνατόν να επιτευχθεί, αρκεί όμως τα μικρόβια να διατηρηθούν σε πληθυσμούς τόσο αραιούς ώστε να μην μπορούν να εξαπλωθούν κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας. Η «φιλοσοφία» της ιστοκαλλιέργειας βασίζεται στη δυνατότητα ελέγχου της μορφογένεσης ενός φυτικού κυττάρου ή ιστού με τεχνητά μέσα. Πρόκειται για την περίφημη αρχή της ολοδυναμίας (totipotency) των φυτικών κυττάρων, ιδιότητα η οποία απουσιάζει από τα περισσότερα ζωικά



είδη. Για παράδειγμα, είναι δυνατόν να παράγουμε ολόκληρα έμβρυα από έναν σωματικό ιστό, όπως ένα φύλλο, χωρίς να υπάρχει προηγούμενα γονιμοποίηση. Είναι επίσης δυνατόν να μετατρέψουμε ένα είδος ιστού σε κάποιο άλλο, π.χ. έναν ανθοφόρο οφθαλμό σε φυλλοφόρο. Όμως, η ευέλικτη αυτή συμπεριφορά των φυτικών κυττάρων έχει κάποια όρια: έτσι, ενώ είναι δυνατόν να προκαλέσουμε την έκπτυξη ριζών από ιστούς βλαστού, είναι πολύ δύσκολο να συμβεί το αντίστροφο.

Έκφυτο ονομάζεται οποιοδήποτε μέρος του φυτού το οποίο υπό κατάλληλους χειρισμούς και υπό κατάλληλες συνθήκες μπορεί να αναπαραγάγει το μητρικό φυτό. Το τμήμα του φυτού που χρησιμοποιείται μπορεί να είναι οφθαλμός, φύλλο, κόμβος, επικοτύλιο, ρίζα, κύτταρο, πρωτοπλάστης, γυρεόκοκκος κτλ.

Το μητρικό φυτό (φυτό δότης - donor plant) αποτελεί την πηγή των εκφύτων τα οποία θα χρησιμοποιηθούν στην ιστοκαλλιέργεια και έτσι οι ιδιότητές του, μεταφερόμενες στα έκφυτα, επηρεάζουν πολύ σημαντικά την απόκριση αυτών στους διάφορους χειρισμούς μας.

### 1.3 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Αν και θεωρείται εξαιρετικά προηγμένος, ο επιστημονικός κλάδος της ιστοκαλλιέργειας έχει ήδη προϊστορία περίπου δύο αιώνων. Αυτό αφορά ιδιαίτερα την καλλιέργεια των ζωικών κυττάρων, με σημαντικότερο ορόσημο τα επιτυχημένα πειράματα των Harrison, Burrows και Carrel κατά το διάστημα 1907-1909, τα οποία εστιάζονταν στην *in vitro* διατήρηση εμβρύων. Αντίθετα, ο κλάδος της ιστοκαλλιέργειας των φυτικών κυττάρων δεν αναπτύχθηκε ιδιαίτερα έως τα μέσα περίπου του 20ού αιώνα. Κατά τρόπο ειρωνικό, όμως, η ιστοκαλλιέργεια των φυτών αναπτύχθηκε σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα και τελειοποιήθηκε σε μεγάλο βαθμό, ενσωματώνοντας τεχνολογίες και γνώσεις από πολλούς διαφορετικούς επιστημονικούς κλάδους και ξεπερνώντας κατά πολύ τις δυνατότητες και το εύρος των εφαρμογών της καλλιέργειας των ζωικών κυττάρων.

Παρακάτω παρουσιάζεται συνοπτικά η εξέλιξη της ιστοκαλλιέργειας στο πέρασμα των χρόνων:

1838 - Διατύπωση της θεωρίας της ολοδυναμίας από τους Schwan και Schleiden.

1902 - Πρώτη απόπειρα ιστοκαλλιέργειας από τον Haberlandt.

1909 - Πρώτη απόπειρα σύντηξης πρωτοπλαστών (Kuster).

- 1934 - Καλλιέργεια ρίζας τομάτας από τον White.
- 1939 - Εγκατάσταση συνεχώς αυξανόμενων καλλιεργειών κάλλου (Gautheret, Nobécourt και White).
- 1948 - Σχηματισμός τυχαίων ριζών και βλαστών σε κυτταροκαλλιέργειες καπνού με έλεγχο της σχετικής συγκέντρωσης αυξίνης/αδενίνης (κυτοκινίνης) (Skoog και Tsui).
- 1952 - Παραγωγή φυτών ντάλιας απηλλαγμένων ιών μέσω καλλιέργειας μεριστωμάτων (Morel και Martin).
- 1954 - Αναγέννηση φυτού από ένα και μόνο κύτταρο (Muir).
- 1955 - Ανακάλυψη της κινετίνης, βασικής κυτοκινίνης (Miller).
- 1956 - Παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών από κυτταροκαλλιέργειες (Tuleck και Nickell).
- 1958 - Αναγέννηση φυτών μέσω σωματικής εμβρυογένεσης από το ενδοσπέρμιο του είδους Citrus ovules (Maheshwari και Rangaswamy).
- 1962 - Δημιουργία του θρεπτικού υποστρώματος Murashige και Skoog, του διασημότερου και πλέον χρησιμοποιημένου βασικού θρεπτικού μέσου στην ιστοκαλλιέργεια των φυτών.
- 1967 - Παραγωγή απλοειδών φυτών από γυρεόκοκκους καπνού (Bourgin και Nitsch).
- 1970 - Πρώτη επιτυχημένη χημική σύντηξη πρωτοπλαστών (Power).
- 1974 - Βιομετατροπή (Reinhard).
- 1980 - Ακίνητοποίηση κυττάρων (Alfermann).
- 1982 - Ηλεκτροσύντηξη πρωτοπλαστών (Zimmerman).
- 1984 - Μεταμόρφωση φυτικών κυττάρων με πλασμιδιακό DNA (Paszkowski).
- 1984 - Καλλιέργεια φυτικών κυττάρων σε βιοαντιδραστήρα (Smart και Fowler).
- 1991 - Μικροπολλαπλασιασμός φυτών σε βιοαντιδραστήρα (Ziv).

## 1.4 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΕΠΙΤΥΧΙΑΣ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Ορισμένοι παράγοντες, που σχετίζονται: α) με το φυτικό υλικό β) τη σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος και γ) τις περιβαλλοντικές συνθήκες καλλιέργειας, επηρεάζουν την καλλιέργεια των φυτικών ιστών και κυττάρων. Για να έχει επιτυχία μια *in vitro* καλλιέργεια ενός φυτικού είδους πρέπει οι παραπάνω παράγοντες να ληφθούν υπόψη και να καθοριστούν οι άριστες συνθήκες καλλιέργειας πειραματικά.

### 1.4.1 ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Ιδιαίτερη προσοχή δίνεται στην επιλογή υγιούς μητρικού φυτού με χαρακτηριστικά της επιθυμητής ποικιλίας ή κλώνου. Το τμήμα του φυτικού ιστού που τοποθετείται σε *in vitro* καλλιέργεια ονομάζεται μικρομόσχευμα ή έκφυτο (*explant*). Τα έκφυτα μπορεί να προέρχονται σχεδόν από όλα τα φυτικά όργανα και ιστούς του μητρικού φυτού και ανάλογα με τον σχεδιασμό του πειράματος, να αναπτύξουν νέα όργανα και ιστούς με τελικό αποτέλεσμα την αναγέννηση ολόκληρων φυτών. Για παράδειγμα, χρησιμοποιούνται συνήθως τμήματα από κοτυληδόνες, υποκοτύλια, φύλλα, βλαστούς ή έμβρυα για το σχηματισμό κάλλου. Για γρήγορο πολλαπλασιασμό φυτών προτιμώνται έκφυτα από την κορυφή του βλαστού ή πλευρικοί οφθαλμοί ενώ απλοειδή φυτά παράγονται από καλλιέργειες ανθήρων ή γύρης. Επίσης παράγοντες που επηρεάζουν την ιστοκαλλιέργεια και σχετίζονται με το φυτικό υλικό είναι η φυσιολογική και οντογενετική ηλικία του ιστού – οργάνου, η εποχή λήψης του έκφυτου και το μέγεθος και η ποιότητα του μητρικού φυτού.

### 1.4.2 ΣΥΣΤΑΣΗ ΦΥΤΙΚΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ

Το θρεπτικό υπόστρωμα μπορεί να είναι υγρό (δεν περιέχει άγαρ) ή στερεό (περιέχει άγαρ σε συγκέντρωση συνήθως 0,6-0,8%). Τα υλικά αυτά περιέχουν όλα τα απαραίτητα μακρο και μικροστοιχεία, τα οποία προσθέτονται με τη μορφή ανόργανων αλάτων, μια πηγή άνθρακα και ενέργειας (συνήθως σακχαρόζη), βιταμίνες, αμινοξέα και ρυθμιστές της αύξησης και ανάπτυξης των φυτών (φυτοορμόνες). Για πολλά φυτικά είδη χρησιμοποιείται το θρεπτικό υπόστρωμα των Murashige και Skoog, το οποίο τροποποιείται ανάλογα με τις ανάγκες κάθε φυτού. Άλλα καθορισμένα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται συχνά είναι το B5, το White και το MV.

Οι ορμόνες που χρησιμοποιούνται κυρίως είναι οι αυξίνες και οι κυτοκινίνες, ενώ λιγότερο οι γιββεριλλίνες και το αιθυλένιο. Οι αυξίνες είναι ενώσεις που γενικά προάγουν την κυτταρική διαίρεση, την επιμήκυνση των κυττάρων και το σχηματισμό επίκτητων ριζών, ενώ αναστέλλουν το σχηματισμό μασχαλιαίων και τυχαίων βλαστών. Φυσική αυξίνη είναι το ινδολυλοξικό οξύ (IAA) και συνθετικές το ινδολυλοβουτυρικό οξύ (IBA), το ναφθαλινοξικό οξύ (NAA) και το 2,4-διχλωροφαινοξυοξικό οξύ (2,4-D). Σε συνδυασμό με τις αυξίνες και σε μικρές συγκεντρώσεις οι κυτοκινίνες προάγουν την κυτταρική διαίρεση, ενώ όταν βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο θρεπτικό υπόστρωμα προωθούν την ανάπτυξη μασχαλιαίων και τυχαίων βλαστών σε αντίθεση με τον σχηματισμό ριζών που αναστέλλουν. Οι κύριες κυτοκινίνες που χρησιμοποιούνται στην ιστοκαλλιέργεια είναι η βενζυλαδενίνη (BAP), η κινετίνη και η ζεατίνη. Περισσότερο η αναλογία αυξίνης και κυτοκινίνης παρά η συγκέντρωση τους κατευθύνει τη μορφογένεση, δηλαδή το σχηματισμό βλαστών ή ριζών ή κάλλων ή εμβρύων. Κάθε φυτό έχει και διαφορετικές απαιτήσεις σε φυτοορμόνες αλλά σε γενικές γραμμές έχει παρατηρηθεί ότι η υψηλή συγκέντρωση κυτοκινίνης σε σχέση με την αυξίνη επάγει το σχηματισμό βλαστών ενώ παρουσία χαμηλής συγκέντρωσης κυτοκινίνης και υψηλής αυξίνης επάγεται ο σχηματισμός ριζών. Σε περίπτωση παρουσίας μέτριων έως μεγάλων συγκεντρώσεων των δύο φυτοορμονών στο υπόστρωμα προωθείται η ανάπτυξη κάλλου.

### **1.4.3 ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ**

Διάφοροι παράγοντες του περιβάλλοντος της καλλιέργειας επηρεάζουν την ιστοκαλλιέργεια. Αυτοί οι παράγοντες είναι το pH του θρεπτικού υποστρώματος, η φύση του (στερεό ή υγρό), οι συνθήκες φωτισμού (ένταση ποιότητα, φωτοπερίοδος), η θερμοκρασία καλλιέργειας και η σχετική υγρασία. Κάθε φυτικό είδος έχει διαφορετικές απαιτήσεις στις παραπάνω συνθήκες αλλά συνήθως οι καλλιέργειες αναπτύσσονται σε θερμοκρασία 22 έως 28° C, ένταση φωτισμού 1000 έως 10000 Lux, φωτοπερίοδο 16h φως / 8h σκοτάδι και υψηλή σχετική υγρασία.

### **1.5 ΒΑΣΙΚΑ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ**

Κατά την εκτέλεση των εργασιών των διαφόρων σταδίων της ιστοκαλλιέργειας υπάρχει το ενδεχόμενο να σημειωθούν διάφορα προβλήματα τα οποία είναι πιθανόν να οδηγήσουν είτε σε απώλειες της παραγωγής είτε σε μείωση της ποιότητας των παραγόμενων

φυτών. Τα κυριότερα προβλήματα λόγω λανθασμένης εφαρμογής των τεχνικών είναι τα εξής:

- Μολύνσεις
- Οξείδωση (κυρίως φαινολών)
- Υαλοποίηση
- Ατελής εγκλιματισμός
- Παραλλακτικότητα in vitro

### 1.5.1 ΜΟΛΥΝΣΕΙΣ (Contamination)

Τα έκφυτα για να επιζήσουν και να αναπτυχθούν φυσιολογικά θα πρέπει να είναι ελεύθερα από την παρουσία μυκήτων και κυρίως βακτηρίων. Οι μολύνσεις είναι δυνατόν να προκαλέσουν μεγάλες απώλειες κατά τη διάρκεια του μικροπολλαπλασιασμού και έλεγχός τους είναι το πιο συνηθισμένο και δύσκολο πρόβλημα στα εργαστήρια. Μια απλή επιφανειακή απολύμανση δεν είναι πάντοτε αποτελεσματική κατά των βακτηρίων, μυκήτων, ιών, ιοειδών, μυκοπλασμάτων, και ρικέτσιων.

Μύκητες: Κατά την εγκατάσταση των εκφύτων συχνά εμφανίζονται μυκητολογικές μολύνσεις. Επίδραση των μυκήτων γενικά έχει ως αποτέλεσμα το θάνατο του εκφύτου. Αυτό το είδος μόλυνσης γίνεται ορατό πολύ γρήγορα και έτσι δεν υπάρχει κίνδυνος μεταφοράς τους σε επόμενη καλλιέργεια.

Βακτήρια: Τα βακτήρια είναι οι πιο συνηθισμένοι και προβληματικοί μικροοργανισμοί στις καλλιέργειες in vitro. Μερικές φορές μόλυνση που προκαλούν δε γίνεται εμφανής μέχρι καλλιέργεια να σταθεροποιηθεί μετά από μια θεωρητική περίοδο, αλλά μετά γίνεται τόσο έντονη ώστε καλλιέργεια να χαθεί. Το υπόστρωμα των μολυσμένων καλλιεργειών γίνεται διάφανο, τα έκφυτα εμφανίζουν καστανές κηλίδες και τελικά όλη επιφάνεια του υποστρώματος καλύπτεται από το γαλακτώδες βακτηριακό έκκριμα. Η χρήση αντιβιοτικών μπορεί μερικές φορές να αποβεί αποτελεσματική, ειδικά στις περιπτώσεις που δεν είναι δυνατόν να ελαττωθεί αριθμός των παραγόμενων φυτών, λόγω της αυξημένης ζήτησης, αλλά αυτό δεν είναι λύση, αν το μολυσμένο φυτικό υλικό επρόκειτο να χρησιμοποιηθεί ως stock για τις επόμενες καλλιέργειες.

Ιοί: Μεγάλη προσοχή πρέπει να δίνεται στη μόλυνση από ιούς. Η παραγωγή φυτικού υλικού ελευθέρου ιώσεων είναι ένα από τα πλεονεκτήματα του μικροπολλαπλασιασμού, που

μπορεί να επιτευχθεί με το συνδυασμό της θερμοθεραπείας και της μεριστωματικής καλλιέργειας ή του μικροεμβολιασμού.

### 1.5.2 ΟΞΕΙΔΩΣΗ (Exudation /Browning)

Ένα από τα πιο συνηθισμένα προβλήματα κατά την εγκατάσταση των εκφύτων, που συνήθως εμφανίζεται στα πολυετή ξυλώδη φυτά, είναι παραγωγή ουσιών από τα πληγωμένα κύτταρα της βάσης του εκφύτου. Αυτές οι ουσίες είναι συνήθως φαινολικές, που κατά τον πολυμερισμό τους οξειδώνονται και προκαλούν έτσι καστανό μεταχρωματισμό του υποστρώματος, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η ανάπτυξη του εκφύτου. Για την αντιμετώπιση του φαινομένου συνιστάται προσθήκη αντιοξειδωτικών ουσιών (κιτρικό, ασκορβικό οξύ) που έχουν την ιδιότητα να απορροφούν τα φαινολικά (ενεργός άνθρακας) και συχνή μεταφορά των εκφύτων σε νέο υπόστρωμα.

### 1.5.3 ΥΑΛΟΠΟΙΗΣΗ (Vitrification)

Υάλοποιηση είναι το φαινόμενο κατά το οποίο τα φύλλα του εκφύτου αποκτούν ημιδιαφανή, χυμώδη εμφάνιση με αποτέλεσμα να υποβαθμίζεται η ποιότητά τους και να παρεμποδίζεται ο μετέπειτα πολλαπλασιασμός τους. Οφείλεται σε περίσσεια νερού και μείωση της σύνθεσης λιγνίνης και κυτταρίνης. Οι συνθήκες αυτές είναι συνέπεια της μεγάλης ταχύτητας μετακίνησης του νερού μέσα στο υπόστρωμα σε σχέση με τη ταχύτητα ανάπτυξης των βλαστών. Η υάλωση εμφανίζεται εντονότερα όταν τα φυτά αναπτύσσονται σε υγρό υπόστρωμα όταν το υπόστρωμα περιέχει χαμηλή συγκέντρωση άγαρ, υψηλή υγρασία και υψηλή συγκέντρωση αμμωνίας. Κάποιοι παράγοντες που μπορούν να βοηθήσουν στην αντιμετώπιση του προβλήματος είναι αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ, αλλαγή της ποιότητας του άγαρ, τροποποίηση της συγκέντρωσης των ανόργανων συστατικών, μείωση της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης και προσθήκη ουσιών, που ελαχιστοποιούν την εμφάνιση του φαινομένου, στο υπόστρωμα.

### 1.5.4 ΑΤΕΛΗΣ ΕΓΚΛΙΜΑΤΙΣΜΟΣ (Acclimatization)

Ο εγκλιματισμός είναι η διαδικασία που επιτρέπει την ορθή προσαρμογή-εγκλιματισμό ενός φυτού ανεπτυγμένου *in vitro*, σε συνθήκες εκτός του δοχείου καλλιέργειας (*ex vitro*), όπως αυτές που επικρατούν στο θερμοκήπιο ή το χωράφι. Κάποια φυτά όμως δεν

καταφέρνουν να προσαρμοστούν επαρκώς in vitro, εξαιτίας διαφόρων παραγόντων, πχ: υπερβολική σχετική υγρασία > 60%, φωτισμός, εφαρμογή ορμονών κ.ά.

### **1.5.5 ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑ IN VITRO Ή ΣΩΜΑΚΛΩΝΙΚΗ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑ (Somaclonal variation)**

Τα φυτά από ιστοκαλλιέργεια δεν είναι πάντα όμοια μεταξύ τους (ακόμα και αν προέρχονται από το ίδιο φυτό). Η σωμακλωνική παραλλακτικότητα 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. Η σωμακλωνική παραλλακτικότητα αποτελεί πρόβλημα από την άποψη ότι μειώνει τον βαθμό ομοιομορφίας των αναγεννημένων φυτών καθώς και την πιστή αναπαραγωγή (true-to-type) του μητρικού φυτού. Ωστόσο μπορεί να αποτελέσει ένα χρήσιμο εργαλείο στη βελτίωση των φυτών για τη δημιουργία νέων γονοτύπων σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα.

## **1.6 ΣΤΑΔΙΑ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ**

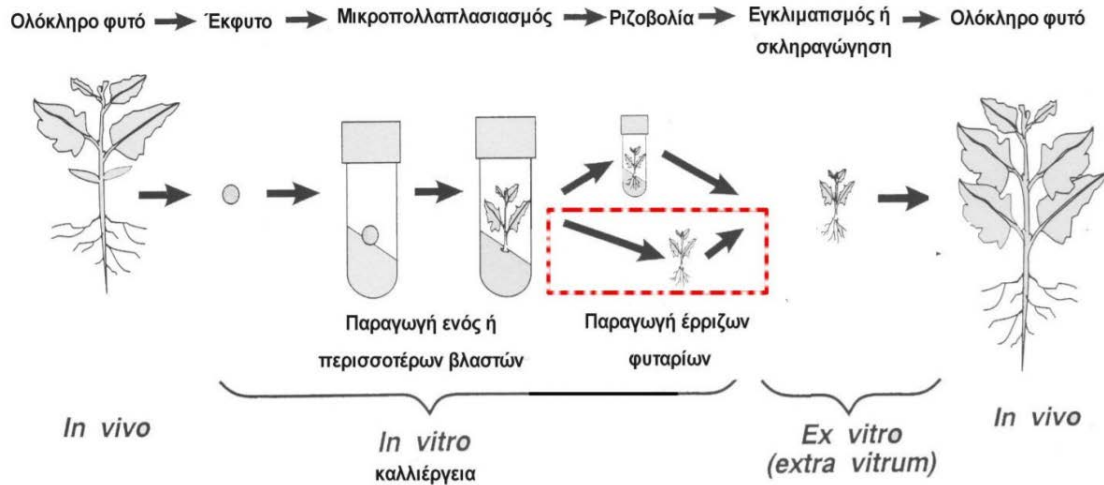
Ανεξάρτητα του σκοπού για τον οποίο εφαρμόζεται η ιστοκαλλιέργεια, η τεχνική είναι η ίδια και ακολουθεί τα παρακάτω στάδια :

1. Προ – in vitro
  - α) Επιλογή μητρικού υλικού
  - β) Επιλογή τύπου έκφυτου
  - γ) Επιλογή θρεπτικού υποστρώματος
  - δ) Επιλογή συνθηκών καλλιέργειας
  - ε) Αποστείρωση φυτικού υλικού και μέσων καλλιέργειας
2. IN VITRO
  - α) Εμφύτευση έκφυτου
  - β) Βλαστικός πολλαπλασιασμός
  - γ) Ανάπτυξη ριζογένεσης

### 3. Μετα – in vitro

- α) Εγκλιματισμός των φυτών σε φυσικές συνθήκες
- β) Σκληραγωγή στο θερμοκήπιο
- γ) Αποθήκευση στο ψυγείο

Η παρακάτω εικόνα είναι χαρακτηριστική των προαναφερθέντων σταδίων:



Εικόνα 1. Στάδια ιστοκαλλιέργειας.

## 1.7 ΕΙΔΗ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Η όλη μέθοδος της ιστοκαλλιέργειας στηρίζεται στην ικανότητα που έχουν τα σωματικά κύτταρα των φυτών να διαιρούνται υπό κατάλληλες συνθήκες και να εξελίσσονται σε πλήρη φυτά πανομοιότυπα με το αρχικό. Το καλλιεργούμενο φυτικό τμήμα *in vitro* ή αλλιώς έκφυτο (*explant*) αναγεννά βλαστούς ή ρίζες ή και τα δύο, τα οποία μπορούν να καταλήξουν σε νέα πλήρη και ανεξάρτητα φυτά. Αυτό το αρχικό φυτικό τμήμα (έκφυτο ή μόσχευμα ή μικρομόσχευμα) αποτελεί την βασική μονάδα για κάθε ιστοκαλλιέργεια. Ως έκφυτα μπορούν να χρησιμοποιηθούν τμήματα από σχεδόν όλα τα φυτικά όργανα και ιστούς. Ανάλογα με το είδος του εκφύτου από το οποίο αναγεννώνται νέα φυτά και τον τρόπο με τον οποίο γίνεται η αναγέννηση, τα συστήματα των ιστοκαλλιεργειών ταξινομούνται ως εξής (Ελευθερίου 1994):



### 1.7.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΕΡΙΣΤΩΜΑΤΩΝ

Η απομόνωση και ανάπτυξη του βλαστικού μεριστώματος είναι σημαντική για την ανάκτηση φυτών απαλλαγμένων από παθογόνα. Όταν τα βλαστικώς πολλαπλασιασμένα φυτά μολυνθούν, το παθογόνο περνά από τη μια βλαστική γενεά στην επόμενη. Ολόκληρος ο πληθυσμός μιας ορισμένης κλωνοποιημένης ποικιλίας μπορεί να μολυνθεί από το ίδιο παθογόνο. Στα πρώτα πειράματα πολλαπλασιασμού φυτών ντομάτας *in vitro*, βρέθηκε ότι οι ιώσεις δεν διατηρούνταν πάντοτε όταν υποκαλλιεργούνταν το ακρορρίζιο από μια προσβεβλημένη ρίζα. Αυτή ήταν και η πρώτη έρευνα που θεμελίωσε τη θεωρία της χρήσης καλλιέργειας μεριστωμάτων για την εξάλειψη παθογόνων ιών. Η καλλιέργεια μεριστωμάτων χρησιμοποιείται ακόμα για την παραγωγή φυτών κλωνικά πιστών προς το αρχικό φυτό-δότη, δηλαδή χωρίς παραλλαγές. Μετά από σχετικές μελέτες η μεριστωματική καλλιέργεια έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για πλήθος φυτών και αποτελεί τη βάση της βιομηχανίας μικροπολλαπλασιασμού των κηπευτικών.

### 1.7.2 ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ

Η σωματική εμβρυογένεση (somatic embryogenesis) είναι η διαδικασία εκείνη με την οποία σχηματίζονται εμβρυακές δομές πάνω στα καλλιεργούμενα έκφυτα χωρίς να έχει προηγηθεί καμία φάση γονιμοποίησης. Είναι η διαδικασία σχηματισμού εμβρύων από σωματικά κύτταρα, δηλαδή χωρίς γονιμοποίηση θηλυκών γαμετών (ωαρίων) από αρσενικούς (μικροσπόρια γύρης). Τα έμβρυα τα οποία δημιουργούνται ονομάζονται σωματικά ακριβώς επειδή προέρχονται από σωματικά κύτταρα (όπως π.χ. τα κύτταρα του φύλλου, του βλαστού ή της ρίζας) τα οποία δεν μπορούν να γονιμοποιηθούν. Το έργο αυτό διεκπεραιώνουν αποκλειστικά τα γαμετικά κύτταρα, δηλαδή τα μικροσπόρια των κόκκων της γύρης (αρσενικά) και τα ωάρια (θηλυκά). Επίσης τα σωματικά έμβρυα θεωρούνται διπολικές μορφολογικές δομές επειδή μπορούν να παράγουν τόσο βλαστούς όσο και ρίζες έτσι ώστε τελικά να εξελιχθούν σε ολόκληρα φυτά.

Τα σωματικά έμβρυα δεν διαφέρουν μορφολογικά από τα κανονικά ζυγωτικά έμβρυα (που προέρχονται από γονιμοποίηση). Όμως, τα σωματικά έμβρυα είναι κλωνικά αντίγραφα του μητρικού φυτού, δηλαδή είναι όμοια με αυτό.

Τα σωματικά έμβρυα είναι διπολικά, σε αντίθεση με τα μονοπολικά ξεχωριστά αναγεννώμενα ριζίδια και βλαστίδια (κατά την οργανογένεση). Όταν βλαστήσει, ένα σωματικό έμβρυο δίνει ένα ολόκληρο φυτό (με βλαστό και ρίζα).

### **1.7.2.1 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗΣ**

Συνοπτικά, τα πλεονεκτήματα της παραπάνω μεθόδου είναι τα εξής:

- Πολύ παραγωγική μέθοδος (έως 1 εκατομμύριο φυτά από ένα έκφυτο 1 cm<sup>2</sup>).
- Παράγει ολόκληρα φυτά (ταυτόχρονη βλαστογένεση και ριζογένεση).
- Εξασφαλίζει κλωνική πιστότητα (παραλλακτικότητα).
- Εξασφαλίζει τη μη μετάδοση ιώσεων από μητρικό φυτό.
- Επιτρέπει να δημιουργηθούν συνθετικοί σπόροι.

### **1.7.3 ΤΥΧΑΙΑ ΟΡΓΑΝΟΓΕΝΕΣΗ**

Τυχαία ή επίκτητη οργανογένεση (adventitious organogenesis) χαρακτηρίζουμε τη διαδικασία εκείνη με την οποία σχηματίζονται βλαστοί, ρίζες ή άλλα είδη οργάνων πάνω σε ένα καλλιεργούμενο έκφυτο. Η οργανογένεση διακρίνεται σε άμεση ή έμμεση, ανάλογα με το εάν λαμβάνει χώρα σε διαφοροποιημένο ή αποδιαφοροποιημένο ιστό (κάλο). Κατά την άμεση οργανογένεση ο σχηματισμός του νέου οργάνου αρχίζει από επιδερμικά ή υποδερμικά παρεγχυματικά κύτταρα από τα οποία προκύπτει το μεριστωματοειδές, δηλαδή μια ομάδα ταχέως διαιρούμενων κυττάρων που μοιάζουν με μεριστωματικά. Επίσης τα φυτά που αναγεννώνται μέσω οργανογένεσης αποτελούν μονοπολικές δομές, δηλαδή σχηματίζονται πρώτα οι βλαστοί και μετά οι ρίζες. Με τον τρόπο αυτό η τυχαία οργανογένεση διακρίνεται σαφώς από τη σωματική εμβρυογένεση, όπου η βλάστηση των εμβρύων δίνει ολοκληρωμένα φυτά διπολικής δομής με τον ταυτόχρονο σχηματισμό βλαστών και ριζών. Σε γενικές γραμμές, η οργανογένεση βρίσκεται κάτω από τον άμεσο έλεγχο των φυτικών ρυθμιστών αύξησης.

### **1.7.4 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΟΦΘΑΛΜΩΝ**

Οι οφθαλμοί περιέχουν μεριστωματικά κύτταρα και για αυτό ιστοκαλλιεργούνται για τον ίδιο πρακτικά σκοπό όπως και τα κορυφαία μεριστώματα. Η μέθοδος χρησιμοποιείται για τον μικροπολλαπλασιασμό φυτικών ειδών όπως κουνουπίδι, ζέρμπερα, ροδόδενδρο, ευκάλυπτο και διοσκορέα. Ωστόσο η χρήση των οφθαλμών απαιτεί αυξημένη προσοχή καθώς:

Τα λέπια των οφθαλμών αποτελούν σημαντικές εστίες μικροοργανισμών (κυρίως βακτηρίων) που μπορούν να μολύνουν την ιστοκαλλιέργεια. Για αυτό το λόγο πρέπει να εφαρμοστούν τα κατάλληλα πρωτόκολλα απολύμανσης.

Οι πλευρικοί οφθαλμοί (δηλαδή αυτοί που εκφύονται στα πλάγια ενός βλαστού) συνήθως δεν αντιδρούν στην ιστοκαλλιέργεια. Αυτό συμβαίνει λόγω του φαινομένου της κυριαρχίας του κορυφαίου οφθαλμού, δηλαδή αυτού που βρίσκεται στην άκρη του βλαστού. Ο τελευταίος παρεμποδίζει τη βλάστηση των πλάγιων οφθαλμών μέσω της παραγωγής αυξίνης και άλλων παρεμποδιστών. Για να καταστεί δυνατή η χρησιμοποίηση των πλάγιων οφθαλμών στην ιστοκαλλιέργεια, πρέπει πρώτα να κοπεί ο κορυφαίος οφθαλμός από τον βλαστό στο μητρικό φυτό και μετά από μερικές ημέρες, αφού θα έχει εξουδετερωθεί η δράση της αυξίνης, να παραληφθούν οι πλάγιοι οφθαλμοί για ιστοκαλλιέργεια.

Η θέση του οφθαλμού στο μητρικό φυτό είναι καθοριστική για το είδος της οντογενετικής του εξέλιξης *in vitro*. Έχει παρατηρηθεί ανάπτυξη των εκφύτων σε μεγαλύτερο ποσοστό όταν προέρχονται από ακραία μπουμπούκια από ότι όταν προέρχονται από πλαϊνά. Σε ορισμένα φυτά ο ακραίος οφθαλμός διαφοροποιείται σε άνθος ενώ ο προσκείμενος μασχαλιαίος σε βλαστικό τμήμα. Η έκφραση ενός οφθαλμού ως «ανθοφόρου» ή «φυλλοφόρου» εξαρτάται σημαντικά και από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως τη θερμοκρασία και τη φωτοπερίοδο. Για τον μικροπολλαπλασιασμό χρησιμοποιούνται αποκλειστικά βλαστοφόροι οφθαλμοί.

### 1.7.5 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΕΜΒΡΥΩΝ

Η *in vitro* καλλιέργεια ζυγωτών εμβρύων (δηλαδή εμβρύων τα οποία προέρχονται από κανονική γονιμοποίηση) αποσκοπεί στη διευκόλυνση της βλάστησης του εμβρύου όταν αυτή δεν είναι εφικτή. Αυτό μπορεί να συμβεί σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως:

Ο σπόρος δεν έχει εκτεθεί για αρκετό χρονικό διάστημα σε χαμηλές θερμοκρασίες, δηλαδή δεν έχει ολοκληρωθεί η διαδικασία της εαρινοποίησης (*vernalization*). Η απαιτούμενη διάρκεια εαρινοποίησης διαφέρει ανάλογα με το φυτικό είδος και μερικές φορές με την ποικιλία, π.χ. για το κριθάρι απαιτείται γενικά αποθήκευση των σπόρων για δύο μήνες σε θερμοκρασία 4-8°C. Η ωρίμανση του σπόρου μπορεί να καθυστερεί και για άλλους φυσιολογικούς λόγους, με αποτέλεσμα να απαιτούνται έως και δεκαετίες για τη βλάστησή του (π.χ. σε πολλά κωνοφόρα). Το χαρακτηριστικό παράδειγμα της εφαρμογής της καλλιέργειας εμβρύων για την επιτάχυνση της βλάστησης είναι η δραστική συντόμευση (από

έτη σε μήνες) του αναπαραγωγικού κύκλου του γένους *Iris* καθώς και διαφόρων ποικιλιών μηλιάς.

Για διαφόρους λόγους, το ενδοσπέρμιο περιέχει παρεμποδιστικούς παράγοντες για τη βλάστηση του εμβρύου. Ένας από αυτούς είναι και η διαφορετική ταξινομική προέλευση του εμβρύου από το μητρικό φυτό (από το οποίο προέρχεται το ενδοσπέρμιο). Στις περιπτώσεις αυτές λέμε ότι το έμβρυο προήλθε από μια απαγορευμένη διασταύρωση (illegal crossing). Για παράδειγμα, τα έμβρυα τα οποία προέρχονται από τη διασταύρωση *Triticum aestivum* και *Aegilops spp.* πεθαίνουν κατά την ανάπτυξή τους λόγω της ανάπτυξης απορριπτικών παραγόντων από το μητρικό ενδοσπέρμιο. Στο σημείο αυτό μπορούμε να επέμβουμε καλλιεργώντας τα υβριδικά έμβρυα σε τεχνητό υπόστρωμα το οποίο θα αναπληρώνει τις απαραίτητες θρεπτικές και ορμονικές ουσίες του ενδοσπερμίου, χωρίς να περιέχει τοξικούς παράγοντες. Με τον τρόπο αυτόν είναι δυνατή η αναγέννηση φυτών που θα φέρουν υβριδικά χαρακτηριστικά και των δύο διαφορετικών φυτικών ειδών. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται διάσωση εμβρύου (embryo rescue). Δεν σημαίνει βέβαια ότι η διαδικασία της διάσωσης του εμβρύου μπορεί να εφαρμοστεί σε κάθε πιθανό συνδυασμό διασταύρωσης, καθώς τις περισσότερες φορές οι απαγορευμένες διασταυρώσεις μεταξύ πολύ απομακρυσμένων ειδών (από ταξινομική άποψη) αποτυγχάνουν στα πολύ αρχικά στάδια σχηματισμού εμβρύου. Πολλές φορές τα υβριδικά έμβρυα είναι στείρα ή υπογόνιμα.

Τα καλλιεργούμενα έμβρυα μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως πηγή για την επαγωγή, δευτερογενώς, σωματικών εμβρύων, δηλαδή τα σωματικά έμβρυα να προέλθουν από ζυγωτά. Αυτό συνήθως επιτυγχάνεται με την εφαρμογή αυξίνης. Παραδείγματα τέτοιων εφαρμογών συναντώνται στα σιτηρά και τα κωνοφόρα.

Μια ειδική ερευνητική εφαρμογή αποτελεί η παραγωγή ινών από σπόρους βαμβακιού *in vitro*, έτσι ώστε να μελετηθεί η ινοποιητική ικανότητα διαφορετικών ποικιλιών σε πολύ πρώιμο στάδιο. Άλλες εφαρμογές περιλαμβάνουν τη βασική έρευνα σχετικά με την ανάπτυξη και τη φυσιολογία του εμβρύου, τη δοκιμή ζωτικότητας του σπόρου κ.ά.

Από τεχνική άποψη, η καλλιέργεια των εμβρύων παρουσιάζει ορισμένες ιδιομορφίες, οι οποίες αναφέρονται περιληπτικά στη συνέχεια: Πολλές φορές απαιτείται η κατεργασία του περιβλήματος του σπόρου (ιδιαίτερα αν αυτό είναι σκληρό) πριν απομονωθεί το έμβρυο. Η απολύμανση γίνεται κυρίως σε επίπεδο σπόρου και όχι εμβρύου.

Για την καλλιέργεια του εμβρύου αρχικά απαιτούνται υψηλές συγκεντρώσεις σακχαρόζης (8-12% β/ο), μέτριες συγκεντρώσεις αυξίνης και χαμηλές συγκεντρώσεις κυτοκινίνης. Μετά την ανάπτυξή του για χρονικό διάστημα 1-2 εβδομάδων, το καλλιεργούμενο έμβρυο πρέπει να

μεταφερθεί σε άλλο υπόστρωμα το οποίο θα περιέχει σακχαρόζη σε φυσιολογική συγκέντρωση (2-3%), μειωμένη συγκέντρωση αυξίνης και μέτρια έως αυξημένη συγκέντρωση κυτοκινίνης. Ωστόσο οι συνθήκες αυτές μπορούν να διαφέρουν ανάλογα με την περίπτωση. Συνίσταται καλλιέργεια εμβρύων ανεπτυγμένων έως την αυτοτροφική φάση, δηλαδή εμβρύων που έχουν ήδη αρχίσει να παίρνουν το σχήμα τορπίλης, καθώς και η διατήρηση του ιμάντα που συνδέει το έμβρυο με το ενδοσπέρμιο.

Τέλος, έχει βρει σημαντική εφαρμογή η χρήση του τροφικού ενδοσπερμίου (nurse endosperm), η οποία συνιστάται στην τοποθέτηση του εμβρύου σε ένα φυσιολογικό, υγιές ενδοσπέρμιο και την από κοινού καλλιέργειά τους *in vitro*. Πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι η καλύτερη ανάπτυξη και γρηγορότερη διαφοροποίηση του εμβρύου χάρη στην απελευθέρωση διαφόρων συστατικών από το τροφικό ενδοσπέρμιο.

## 1.8 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Από τα παραπάνω, συμπεραίνουμε ότι η ιστοκαλλιέργεια είναι μία μέθοδος πολύ σημαντική για την καλλιέργεια και εξέλιξη των φυτικών ειδών. Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα αυτής, παρουσιάζονται παρακάτω:

- Ανεξαρτησία από περιβαλλοντικούς (κλιματολογικές συνθήκες, ασθένειες - ζιζάνια, μικρόβια, ιούς, έντομα) και γεωγραφικούς παράγοντες καθώς και από εποχιακούς περιορισμούς.
- Παραγωγή άνοσου φυτικού υλικού, κυρίως όσον αφορά τις ιώσεις, υπό προϋποθέσεις.
- Καθορισμένα συστήματα παραγωγής με μεγαλύτερο έλεγχο των διαδικασιών παραγωγής καθώς και παραγωγή δευτερευόντων προϊόντων όταν απαιτείται.
- Πιο σταθερή ποιότητα και ποσότητα του προϊόντος.
- Αυξημένη παραγωγή φυτών σε σύντομο χρονικό διάστημα. Έτσι με καλλιέργεια ενός μόνο έκφυτου μπορούν να παραχθούν, με συνεχείς υποκαλλιέργειες, πολλές εκατοντάδες χιλιάδες φυτά ετησίως.
- Δυνατότητα παραγωγής νέων προϊόντων που φυσιολογικά δεν παράγονται από το φυτό.
- Ταχύτητα παραγωγής. Επιτάχυνση σε όλες τις διαδικασίες και φθηνότερη παραγωγή φυτών και χημικών ουσιών από ποικίλους οργανισμούς.
- Πολλά φυτά, τα οποία περιέχουν πολύτιμα προϊόντα δεν είναι εύκολο να καλλιεργηθούν και πολλά από αυτά επαπειλούνται λόγω της εντατικής καλλιέργειας.

- Η χημική σύνθεση είναι οικονομικά δαπανηρή ή/ και δεν είναι εφικτή εξ αιτίας της πολυπλοκότητας των μορίων.
- Σε πολλές περιπτώσεις, η παραγωγή ενός δευτερογενούς προϊόντος με ιστοκαλλιέργειες απαιτεί πολύ μικρότερο χρόνο απ' ότι η παραγωγή του από το διαφοροποιημένο ιστό.
- Απαιτείται μικρό μέγεθος χώρου για παραγωγή πολλών φυτών πχ: εργαστηριακός χώρος 100 τετρ. μέτρων είναι αρκετός για την παραγωγή έως και 1 εκ. φυτών ετησίως, ενώ θα απαιτούνταν υπερπολλαπλάσιος χώρος για συμβατική παραγωγή στο χωράφι ή στο θερμοκήπιο
- Συνεχής παραγωγή φυτών ανεξαρτήτως κλιματικών ή βιολογικών σταδίων.
- Επιτάχυνση βελτίωσης με ταχύτατο πολλαπλασιασμό ελάχιστου γενετικού υλικού.
- Κλωνική αναπαραγωγή των μητρικών φυτών, δηλαδή παραγωγή γενετικά όμοιων φυτών - απογόνων, κυρίως όταν χρησιμοποιούνται μεριστωματικά έκφυτα.
- Ακριβής αναπαραγωγή των γενικών χαρακτηριστικών των φυτών.
- Μεγάλος βαθμός ομοιομορφίας της καλλιέργειας. Αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό λόγω της μείωσης του κόστους καλλιέργειας που προκύπτει απ' αυτή, όπως επίσης και από την εξασφάλιση υψηλής ποιότητας τελικού προϊόντος.
- Παραγωγή μεγάλου αριθμού φυταρίων (θεωρητικά μπορεί να φθάσει και το ένα εκατομμύριο) από μικρό τμήμα κορυφής βλαστού, σε εξαιρετικά σύντομο χρονικό διάστημα (μαζική παραγωγή σε ανταγωνιστικές τιμές).
- Δυνατότητα να ξεπεραστούν πολύπλοκα προβλήματα ληθάργου, χαμηλής ζωτικότητας σπόρου και δυσκολιών στις διαδικασίες σποροπαραγωγής.
- Διαιώνιση των γενοτύπων ορισμένων φυτών ανθεκτικών σε έντομα και ασθένειες μέσω βελτιωτικών προγραμμάτων.

## 1.9 ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Παρόλα αυτά, η συγκεκριμένη μέθοδος δεν παύει να παρουσιάζει και κάποια μειονεκτήματα:

- Κίνδυνος τυχαίων μεταλλάξεων
- Ακριβός εξοπλισμός - απαιτεί υψηλό επενδυτικό κόστος (τόσο σε πάγιο εξοπλισμό όσο και σε λειτουργικά έξοδα)
- Απαιτείται εξειδικευμένο προσωπικό - υψηλό επίπεδο τεχνογνωσίας καθώς και αποτελεσματική επίβλεψη και έλεγχο όλων ανεξαιρέτως των σταδίων παραγωγής.

- Συχνές μολύνσεις εφόσον δεν τηρούνται οι διαδικασίες αποστείρωσης και απολύμανσης.
- Υψηλό κόστος παραγωγής λόγω εγκατάστασης όταν πρόκειται για λίγα φυτά - Το κόστος της in vitro παραγωγής φυτών είναι, προς το παρόν τουλάχιστον, σημαντικά μεγαλύτερο από αυτό των συμβατικών μεθόδων (Κίντζιος, 1994).

## 1.10 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

Ο Ευρωπαϊκός χώρος χαρακτηρίζεται από πολλές μονάδες μικρής δυναμικότητας. Σε αντίθεση με τον υπόλοιπο κόσμο, η μαζική παραγωγή υπολείπεται. Η σημαντικότερη χώρα παραγωγής είναι η Ολλανδία (περίπου 62% της παραγωγής). Κύρια κατηγορία φυτών είναι τα γλαστρικά ανθοκομικά, ακολουθούμενα από τα δρεπτά. Στην Ελλάδα η εμπορική ιστοκαλλιέργεια απαριθμεί 15 μονάδες, εκ των οποίων μόνοι οι τέσσερις παράγουν ποσότητες μεγαλύτερες των 500,000 φυτών ετησίως. Η συνολική ετήσια παραγωγή φυτών που προέρχονται από ιστοκαλλιέργεια στην Ελλάδα αγγίζει τα 2 έως 5 εκατομμύρια φυτά το χρόνο. Ο μεγαλύτερος όγκος παραγωγής εστιάζεται σε γλαστρικά φυτά, τριανταφυλλίες και εξειδικευμένα υποκείμενα.

Η παραγωγή φαρμακευτικών και άλλων ουσιών (π.χ. εντομοκτόνων) μέσα από την ιστοκαλλιέργεια αποτελεί έναν ιδιαίτερα ενδιαφέροντα επιστημονικό κλάδο με γοργή εξέλιξη κατά το διάστημα των τελευταίων ετών. Η κατάστρωση και βελτιστοποίηση κάθε πρωτοκόλλου παραγωγής απαιτεί ιδιαίτερη επένδυση σε βασική εργαστηριακή έρευνα, ωστόσο η παραγωγική διαδικασία κάθε αυτή δεν διαφέρει πολύ από μια τυπική ιστοκαλλιέργεια. Μια από τις σύγχρονες εξελίξεις στην ιστοκαλλιέργεια είναι η ενσωμάτωση αυτοματισμών σε κάθε στάδιο της παραγωγικής διαδικασίας. Ιδιαίτερα σημαντική θέση έχουν οι βιοαντιδραστήρες, δηλαδή συστήματα ιστοκαλλιέργειας στα οποία μειώνεται σε μεγάλο βαθμό η ανθρώπινη παρέμβαση και επιτυγχάνεται μεγιστοποίηση της παραγωγής σε μεγάλη κλίμακα. Οι τεχνικές των αυτοματισμών απαιτούν σημαντικές επενδύσεις σε έρευνα και εκπαίδευση, αν και όχι πάντα. Έχουν άμεση σχέση με τον εμπορικό μικροπολλαπλασιασμό, οι απαιτήσεις του οποίου διαφέρουν σημαντικά από τον μικροπολλαπλασιασμό σε εργαστηριακή κλίμακα, καθώς στον πρώτο υπεισέρχονται και παράμετροι οικονομικού σχεδιασμού.

Η σημαντικότητα της ιστοκαλλιέργειας είναι μεγάλη καθώς ετησίως παράγονται περισσότερα από 200 εκατ. φυτά στην Ευρώπη και περίπου 1 δισεκατομμύριο στον κόσμο.



Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται η Ευρωπαϊκή παραγωγή φυτών κάθε έτος σε εκατομμύρια.

Είδος	Εκατ. φυτά	Είδος	Εκατ. φυτά
<b>Ζέρμπερα</b>	18,4	<b>Φρέζια</b>	2,8
<b>Νεφρολέπις</b>	14,5	<b>Ορχιδοειδή</b>	2,2
<b>Είδη Prunus</b>	10,7	<b>Φυλλόδεντρο</b>	2,1
<b>Σπαθίφυλλο</b>	9,8	<b>Εσπεριδοειδή</b>	2
<b>Λύλιο</b>	7,1	<b>Αγλαδιά</b>	1,8
<b>Φράουλα</b>	7	<b>Μπεγκόνια</b>	1,7
<b>Φίκος</b>	7	<b>Κορδυλίνη</b>	1,1
<b>Σενπόλια</b>	6	<b>Ακτινιδιά</b>	1,1
<b>Αγγινάρα</b>	5,7	<b>Beta vulgaris</b>	1,1
<b>Τριανταφυλλιά</b>	5,7	<b>Είδη Rubus</b>	1
<b>Συγγκόνιο</b>	4,8	<b>Κάλμια</b>	1
<b>Ανθούριο</b>	4,4	<b>Σημύδα</b>	0,8
<b>Είδη Triticum</b>	4	<b>Νικοτιδιάνια</b>	0,7
<b>Ροδόδενδρο</b>	3,9	<b>Πλατοκέριο</b>	0,7
<b>Πατάτα</b>	2,8	<b>Λιφενμπάχια</b>	0,7

*Πίνακας 1. Ευρωπαϊκή παραγωγή φυτών ανά έτος σε εκατομμύρια.*

Συνοψίζοντας το πρώτο κεφάλαιο μπορούμε να αναφέρουμε πως οι σκοποί της ιστοκαλλιέργειας είναι οι εξής:

- Απαλλαγή από ιούς και ασθένειες των βασικών μητρικών φυτών.
- Μαζική παραγωγή φθηνών φυτών.
- Μαζική παραγωγή και γρήγορη επέκταση νέων υβριδίων – ποικιλιών.
- Μαζική παραγωγή φαρμακευτικών φυτών.
- Γενετική βελτίωση φυτών (μικροεμβολιασμός, μεταλλάξεις, καλλιέργειες ανθήρων, ομοζύγωτα φυτά, καλλιέργεια σύντηξη πρωτοπλαστών).
- Διατήρηση γενετικού υλικού επί μακρόν σε τράπεζες γενετικού υλικού.



## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2<sup>ο</sup>

### 2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ

Η Ιστοκαλλιέργεια είναι η ασηπτική καλλιέργεια φυτικών τμημάτων για μαζική παραγωγή φυτών πανομοιότυπων με το μητρικό. Η μέθοδος της ιστοκαλλιέργειας βασίζεται στην ολοδυναμικότητα του κυττάρου, την ικανότητα δηλαδή να αναγεννά το φυτό από το οποίο προήλθε. Η ιστοκαλλιέργεια είναι ουσιαστικά η καλλιέργεια οποιουδήποτε μέρους του φυτού το οποίο υπό κατάλληλους χειρισμούς και υπό κατάλληλες συνθήκες μπορεί να αναπαραγάγει το μητρικό φυτό. Το τμήμα του φυτού που χρησιμοποιείται ονομάζεται έκφυτο, και μπορεί να είναι οφθαλμός, φύλλο, κόμβος, επικοτύλιο, ρίζα, κύτταρο, πρωτοπλάστης, γυρεόκοκκος κτλ. Η καλλιέργεια των εκφύτων γίνεται στο εργαστήριο σε ειδικούς θαλάμους ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία περί τους 22-25°C ή και διαφορετική ανάλογα με το είδος, φωτοπερίοδος 8 ώρες σκοτάδι 16 ώρες φως) και για αυτό τον λόγο αναφέρεται η τεχνική και ως πολλαπλασιασμός *in vitro*. Τα έκφυτα καλλιεργούνται σε θρεπτικά υποστρώματα, τα οποία περιέχουν όλα εκείνα τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία (μάκρο και ιχνοστοιχεία) για τα φυτά. Επιπλέον λόγω της αδυναμίας των εκφύτων αυτών να φωτοσυνθέσουν επαρκώς, ώστε να υποστηρίξουν την αύξηση βλαστών και ριζών, προστίθεται στο υπόστρωμα και κάποιο σάκχαρο ως πηγή ενέργειας και άνθρακα. Λόγω επίσης της μειωμένης ικανότητας σύνθεσης πολύπλοκων οργανικών ενώσεων προσθέτονται επίσης και αμινοξέα (για σύνθεση πρωτεϊνών και ως πηγές ανηγμένου αζώτου) καθώς επίσης και βιταμίνες κ.ά. Στη βιβλιογραφία παρουσιάζονται πάρα πολλά υποστρώματα, τα οποία συνήθως αναφέρονται συντομογραφικά, είτε από τα ονόματα των ερευνητών οι οποίοι τα συνέθεσαν, είτε από το φυτό για το οποίο προορίζονται είτε συνδυασμό των παραπάνω, π.χ. MS (υπόστρωμα των Murashige & Skoog), OM (olive medium), DKW (Driver and Kuniyuki medium for Walnut). Από τα πλέον όμως γνωστά και συχνά χρησιμοποιούμενα υποστρώματα είναι τα MS και WPM (Woody Plant Medium). Το πρώτο αποτελεί ουσιαστικά το υπόβαθρο πάνω στο οποίο βασίστηκε η σύγχρονη ιστοκαλλιέργεια από το 1960 και μετά, και έχει χρησιμοποιηθεί αυτούσιο ή παραλλαγές του, στην καλλιέργεια *in vitro* πάρα πολλών φυτών. Εκτός όμως από τα παραπάνω στο υπόστρωμα ανάλογα με το αν θα είναι στερεό ή υγρό, προστίθεται και άγαρ, ένας στερεοποιητικός παράγοντας ο οποίος προστίθεται όταν δουλεύουμε με στερεό ή ημιστερεό υπόστρωμα.

## 2.2 ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ

Το θρεπτικό υπόστρωμα αποτελεί το μέσο πάνω ή μέσα στο οποίο πραγματοποιείται η καλλιέργεια και η περαιτέρω ανάπτυξη ή διαφοροποίηση των εκφύτων (ιστών ή κυττάρων). Η σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος πρέπει να είναι τέτοια ώστε: (α) να επιτρέπει την τροφοδοσία των εκφύτων με απαραίτητους για την επιβίωσή τους χημικούς παράγοντες μετά τη διακοπή της παροχής αυτών από το μητρικό φυτό (β) να κατευθύνει την κυτταρική διαφοροποίηση ανάλογα με τον επιδιωκόμενο σκοπό του εκάστοτε πειράματος.

Το θρεπτικό μέσο μιας καλλιέργειας αποτελείται κυρίως από:

1. Ανόργανα άλατα, δηλαδή μακροστοιχεία (N, P, K, Ca, Mg, S) τα οποία είναι απαραίτητα για το φυτικό κύτταρο και την ανάπτυξη του ιστού, καθώς και ιχνοστοιχεία (Mn, Fe, Zn, Cu, Co, Mo, B κ.ά.) τα οποία παρεμβαίνουν στις μεταβολικές διεργασίες των φυτών και είναι υπεύθυνα για βασικές λειτουργίες των φυτικών οργανισμών.
2. Σύνθετα οργανικά συστατικά, κυρίως βιταμίνες (θιαμίνη, φολικό οξύ, βιοτίνη, πυριδοξίνη κ.ά), οι οποίες ασκούν ευεργετική επίδραση στην καλλιέργεια, βελτιώνοντας την ανάπτυξη και την επιβίωση των φυτικών ιστών και χρησιμοποιούνται από τα φυτικά κύτταρα ως βασικοί μεταβολικοί καταλύτες, σάκχαρα (σακχαρόχη, γλυκόζη).
3. Ρυθμιστικές ουσίες ανάπτυξης (όπως οι φυτοορμόνες) οι οποίες είναι οργανικές ενώσεις που ρυθμίζουν τις φυσιολογικές διεργασίες των φυτών, κατευθύνουν την ανάπτυξη των οργάνων και ελέγχουν την ανάπτυξη ολόκληρου του φυτού.
4. Πηγές άνθρακα και ενέργειας, συνήθως υδατάνθρακες οι οποίες ρυθμίζουν την οσμωτική πίεση στο υπόστρωμα.
5. Στερεοποιητικό παράγοντα, όπως το άγαρ (αδρανές υλικό, προϊόν κυτταρικών τοιχωμάτων φυκιών, που στερεοποιείται στους 45°C. Προσοχή χρειάζεται στη χρήση του άγαρ, γιατί μπορεί να τροποποιήσει τη σύνθεση του θρεπτικού διαλύματος (Barbas et al., 1993).
6. Νερό

Τέλος, η οξύτητα του μέσου ρυθμίζεται σε μια ορισμένη τιμή. Για συνήθεις εφαρμογές το pH του υποστρώματος πρέπει να είναι 5,6-5,8. Απαραίτητη είναι η χρήση υδροχλωρικού οξέος (HCl) για μείωση τιμών pH και καυστικού νατρίου (NaOH) για αύξηση τιμών pH.

### 2.3 ΤΥΠΟΙ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ

Οι απαιτήσεις σε θρεπτικά συστατικά μεταβάλλονται ανάλογα με το είδος, την προέλευση του ιστού, τις διαστάσεις του έκφυτου, τη μεταβολική δραστηριότητά του, καθώς επίσης και με τον τρόπο καλλιέργειας, τον τύπο οργανογένεσης που επιδιώκουμε και τη συχνότητα των μεταφυτεύσεων. Οι περισσότεροι φυτικοί ιστοί αναπτύσσονται καλύτερα σε πλούσια θρεπτικά διαλύματα όπως είναι αυτό των Murashige και Skoog (MS). Έχει διαπιστωθεί ότι τα πλούσια υποστρώματα σε ανόργανα στοιχεία ευνοούν την οργανογένεση, και μόνο σε μερικές περιπτώσεις, σε τέτοια διαλύματα, παρουσιάστηκε νέκρωση των ιστών κατά τη διάρκεια των μεταφυτεύσεων. Ωστόσο, υπάρχουν φυτικά είδη με κύτταρα ευαίσθητα στην παρουσία αλάτων σε υψηλές συγκεντρώσεις. Στις περιπτώσεις αυτές προτείνεται η χρήση υποστρωμάτων πολύ χαμηλής συγκέντρωσης σε ανόργανα θρεπτικά στοιχεία, όπως αυτά του Heller ή του Knop. Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί το κλασικό, πλούσιο υπόστρωμα MS με τη συγκέντρωση των ανόργανων στοιχείων μειωμένη στο 50% (1/2 MS) ή στο 25% (1/4 MS). Επίσης έχουν αναπτυχθεί θρεπτικά μέσα κατάλληλα για την ιστοκαλλιέργεια ειδικών κατηγοριών φυτών, όπως ορισμένων δασικών ειδών με ευαισθησία στα άλατα (Υπόστρωμα Ξυλωδών Φυτών – Woody Plant Medium/WPM) ή για ειδικές κατηγορίες ιστοκαλλιέργειας, όπως η καλλιέργεια πρωτοπλαστών (Υπόστρωμα του Gamborg – B5) ή ριζών (Υπόστρωμα του White). Η σύσταση αντιπροσωπευτικών θρεπτικών υποστρωμάτων παρουσιάζεται στο Παράρτημα. Από τον πίνακα που παρατίθεται σε αυτό μπορεί κανείς εύκολα να συμπεράνει ότι τα διαφορετικά υποστρώματα έχουν αρκετά κοινά σημεία μεταξύ τους ότι έχουν συνταχθεί πάνω σε μια μάλλον εμπειρική αρχή. Για παράδειγμα, το υπόστρωμα MS περιέχει άλατα Cu και Co στην ίδια συγκέντρωση (0.025 mg/ml), ενώ οι βιολογικές επιδράσεις των δύο ιχνοστοιχείων είναι εντελώς διαφορετικές. Όλοι οι παραπάνω παράγοντες πρέπει να λαμβάνονται σοβαρά υπόψη για την επιλογή του κατάλληλου ανόργανου διαλύματος. Η σημαντικότερη δυσκολία προκύπτει από το γεγονός ότι τα στοιχεία σχηματίζουν σύμπλοκα και δεν μπορούν να εξεταστούν ξεχωριστά. Για τον ακριβή προσδιορισμό της συγκέντρωσης κάθε στοιχείου θα πρέπει να γίνονται αλληπάλληλα πειράματα στη μελέτη ενός φυτικού υλικού ή ενός προβλήματος οργανογένεσης. Επειδή είναι δύσκολο να ακολουθήσουμε τέτοια διαδικασία, ακολουθούμε συνήθως ένα από τα

κλασικά θρεπτικά υποστρώματα, όπως των MS (Murasige & Skoog), των SH (Schenk & Hilderbandt), ή του Gamborg (B5) και κάνουμε τις κατάλληλες αλλαγές στη συγκέντρωση των στοιχείων, όπου αυτές είναι απαραίτητες.

## 2.4 ΚΑΤΗΓΟΡΙΕΣ ΡΥΘΜΙΣΤΩΝ ΑΥΞΗΣΗΣ

Έναν από τους σπουδαιότερους ρόλους όμως στην ιστοκαλλιέργεια ενός φυτικού είδους τον παίζουν οι φυτορρυθμιστικές ουσίες. Από αυτές στην ιστοκαλλιέργεια χρησιμοποιούνται κυρίως οι κυτοκινίνες, οι αυξίνες, οι γιββερελλίνες και δευτερευόντως το αμπισικό οξύ. Κάθε μία από τις ομάδες αυτές παίζει σημαντικό και καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη των εκφύτων και ουσιαστικά καθορίζουν και την πορεία ανάπτυξης αυτού.

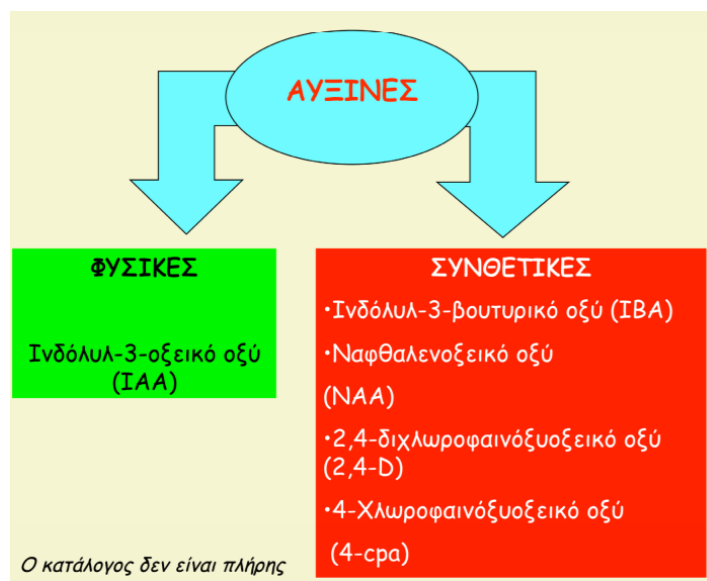
Οι ρυθμιστές αύξησης διακρίνονται στους παρακάτω :

- Αυξίνες (auxins)
- Κυτοκινίνες (cytokinins)
- Γιββερελλίνες (gibberellins)
- Αμπισικό οξύ (abscisic acid)
- Αιθυλένιο (ethylene)
- Ουσίες (εκχυλίσματα) απροσδιόριστης σύστασης

### 2.4.1 ΑΥΞΙΝΕΣ

Η δράση των αυξινών στις φυσιολογικές λειτουργίες του φυτού είναι πολύπλευρη και αυτό δυσκολεύει τη βιοχημική μελέτη του τρόπου δράσης τους. Οι αυξίνες συμβάλλουν στον γενικότερο μεταβολισμό των κυττάρων. Κύρια δραστηριότητά τους είναι η επιμήκυνση των κυττάρων στους βλαστούς και στις ρίζες, που είναι αποτέλεσμα της ικανότητας των ορμονών για σύνθεση πρωτεϊνών και RNA. Επίσης, προωθούν την αύξηση του όγκου των κυττάρων, διεγείρουν τη δραστηριότητα του καμβίου, αποτελούν παράγοντες νεανικότητας των φυτών και είναι θεμελιώδεις παράγοντες της διατήρησης της ενεργητικότητας των οργάνων του φυτού. Γενικά, θεωρείται ότι έχουν παρόμοιες δραστηριότητες με τον φυσικό ρυθμιστή ανάπτυξης 3-ινδολυλοξικό οξύ (3-indoleacetic acid) (IAA), η δράση του οποίου περιλαμβάνει τις εξής επιπλέον δραστηριότητες: αποτελεί έναν από τους κύριους παράγοντες

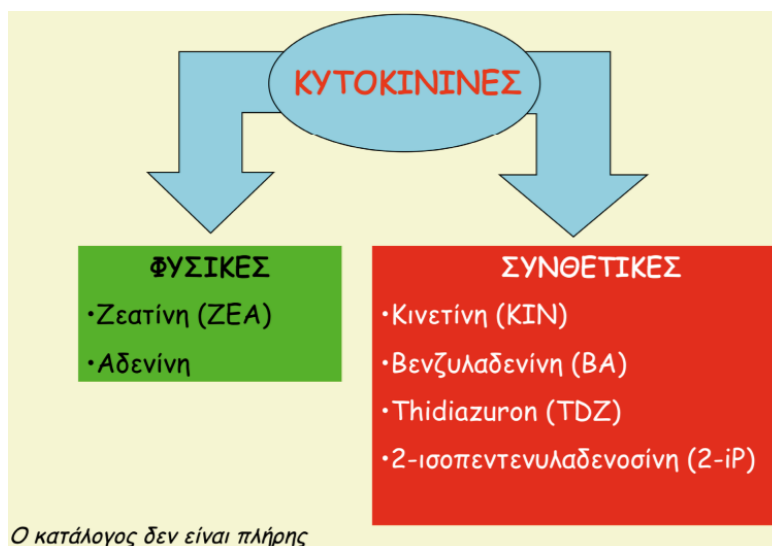
της κυριαρχίας του κορυφαίου οφθαλμού· είναι θεμελιώδης παράγοντας, όταν συνδυαστεί με κυτοκινίνες, της διαφοροποίησης των διαιρούμενων και αδιαφοροποιήτων κυττάρων σε ιστοκαλλιέργειες. Ακόμη είναι βασικός παράγοντας στις διεργασίες της διαφοροποίησης των στοιχείων μεταφοράς ηθμού και ξύλου σε συνδυασμό με τις κατάλληλες συγκεντρώσεις σακχαρόζης, διεγείρει τον σχηματισμό ριζικών καταβολών και την περαιτέρω ανάπτυξη ριζών στα μοσχεύματα. Το IAA είναι η ιδανική αυξίνη για χρήση στις ιστοκαλλιέργειες, λόγω του ευρέως φάσματος δράσης που παρουσιάζει, όμως μειονεκτεί γιατί με την επίδραση του φωτός υποβιβάζεται η δραστηριότητά του, υφίσταται ενζυμική οξείδωση και καταστρέφεται. Η συγκέντρωση που προστίθεται συνήθως στο διάλυμα είναι 1-30 mg/l. Άλλες αυξίνες που συνήθως χρησιμοποιούνται στην ιστοκαλλιέργεια είναι το ινδολλυλοβουτυρικό οξύ (IBA) που είναι συνθετική αυξίνη και διεγείρει ιδιαίτερα τη ριζογένεση, το α-ναφθαλινοξικό οξύ (NAA), επίσης συνθετική αυξίνη, που χρησιμοποιείται για την επαγωγή και την ανάπτυξη κάλου, όπως επίσης και το 2,4-διχλωροφαινοξικό οξύ (2,4-D). Το IBA προστίθεται σε ποσότητες 1-10 mg/l, ενώ το NAA και το 2,4-D σε μικρές ποσότητες 0,01-1 mg/l. Στα σιτηρά το 2,4-D περιέχεται σε μεγαλύτερη ποσότητα 1-5 mg/l. Για την καλύτερη επαγωγή κάλου χρησιμοποιείται το 2,4 σε συνδυασμό με κάποια εξωγενή κυτοκινίνη. Άλλες αυξίνες που χρησιμοποιούνται αλλά σε πολύ μικρές ποσότητες είναι το 4-χλωροφαινοξικό οξύ (4-CPA, PCPA), το 2,4,5-τριχλωροφαινοξικό οξύ (2,4,5-T), το δίχλωρο-2μεθοξυβενζοϊκό οξύ (dicamba) και το 4-αμινο-3,5,6τριχλωρο-πικολινικό οξύ (picloram). Το 2,4,5-T έχει δώσει επαρκή ανάπτυξη κάλου. Από πειράματα που έγιναν σε φυτά σιταριού, προέκυψε ότι το 2,5-D είναι 8 έως 10 φορές πιο δραστικό από το IAA, το 2,4,5-T τέσσερις φορές, το PCPA 2 έως 4 φορές, ενώ το NAA δύο φορές πιο δραστικό από το IAA. Τα 2,4-D, 2,4,5-T, 4CPA και Picloram χρησιμοποιούνται συχνά για τον ταχύτατο πολλαπλασιασμό των κυττάρων σε υψηλά επίπεδα συγκέντρωσης ή παρατείνοντας την έκθεση των ιστών σε αυτές, αν και μπορούν να οδηγήσουν τη μορφογενετική ικανότητα σε παύση. Στο παρακάτω σχήμα συνοψίζονται τα κυριότερα είδη αυξινών.



Εικόνα 2. Κύρια είδη αυξινών.

## 2.4.2 ΚΥΤΟΚΙΝΙΝΕΣ

Οι κυτοκινίνες είναι μια ομάδα ρυθμιστών ανάπτυξης καθολικής διάδοσης στα φυτά. Συντίθεται στις ρίζες και στα έμβρυα και συνδέονται με σάκχαρα. Ενισχύουν τις κυτταροδιαιρέσεις και τη βλαστογένεση, ενώ ανταγωνίζονται τη ριζογένεση. Σε συνδυασμό με το IAA αποτελούν θεμελιώδεις παράγοντες της οργανογένεσης σε καλλιέργειες φυτικών ιστών και επηρεάζουν τις διεργασίες της διαφοροποίησης οργάνων και ιστών. Ακόμη, αποτελούν παράγοντες διαφοροποίησης πρωτογενών και δευτερογενών αγγειωδών ιστών (ενεργοποίηση καμβίου) και οντογένεσης, διατήρησης της νεανικότητας ή παρεμπόδισης του γήρατος όταν βρίσκονται σε συνδυασμό με άλλους ρυθμιστές ανάπτυξης. Βοηθούν επίσης στην άρση του λήθαργου των οφθαλμών και στη βλάστηση των σπερμάτων, διεγείρουν το άνοιγμα των στοματίων και κατά συνέπεια τη διαπνοή των φυτών (Cheng et al. 2013). Στα σιτηρά διαπιστώθηκε ότι ενισχύουν την κυτταροδιαίρεση, ειδικά μετά την επαγωγή της καλογένεσης από αυξίνη. Γενικά η επίδραση των κυτοκινινών στις κυτταροκαλλιέργειες σιτηρών είναι αμφιλεγόμενη και θεωρείται ευνοϊκή μόνο σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Οι κυτοκινίνες που χρησιμοποιούνται συνήθως είναι η 6-φουρφυουρυλάμινο πουρίνη ή κινετίνη (AP ή KIN), η 6-βενζυλαμινοπουρίνη ή βενζυλαδενίνη (BAP ή BA), η 2-ισοπεντενυλαδενίνη (2iP) και η ζεατίνη (ZEA). Η ζεατίνη και η 2iP είναι φυσικές κυτοκινίνες, ενώ η BAP και η KIN είναι συνθετικές. Στο σχήμα συνοψίζονται τα κυριότερα είδη κυτοκινινών. Για την επαγωγή κάλου συνήθως χρησιμοποιείται κινετίνη σε συγκέντρωση 0,1 mg/l, ενώ γενικά οι συγκεντρώσεις των κυτοκινινών στα διαλύματα κυμαίνονται από 0,02 έως 5mg/l.



Εικόνα 3. Κύρια είδη κυτοκινών.

### 2.4.3 ΓΙΒΒΕΡΕΛΛΙΝΕΣ

Οι γιββερελλίνες είναι ρυθμιστές ανάπτυξης καθολικής διάδοσης, οι οποίες όμως χρησιμοποιούνται λιγότερο συχνά από τις άλλες, διότι παρεμποδίζουν την οργανογένεση και ιδίως τη ριζογένεση. Η δράση τους δεν είναι καθορισμένη και μεταβάλλεται ανάλογα με τη συγκέντρωσή τους και το έκφυτο. Έχει διαπιστωθεί ότι οι γιββερελλίνες προκαλούν αύξηση των μεσογονατίων, συμβάλλουν στην άρση του λήθαργου των οφθαλμών και των σπόρων, διεγείρουν τις κυτταροδιαιρέσεις στις περιοχές των κορυφαίων μεριστωμάτων και στο κάμβιο, συμβάλλουν στον σχηματισμό ανθικών καταβολών σε πολλά φυτά, αν και σε μερικά έχει διαπιστωθεί παρεμποδιστική δράση, συμβάλλουν στον καθορισμό του γένους στα δίοικα και μόνοικα φυτά και επηρεάζουν το δέσιμο, την ανάπτυξη και την ωρίμανση πολλών καρπών. Ακόμη, επιταχύνουν τη βλάστηση των σπερμάτων (στα σπέρματα των δημητριακών διεγείρουν τη σύνθεση του ενζύμου α-αμυλάση), προκαλούν αύξηση του μεγέθους των καρπών, υπεισέρχονται στην κυριαρχία του κορυφαίου οφθαλμού (θετικά ή αρνητικά) και επιβραδύνουν τις διεργασίες του γήρατος στα φύλλα ορισμένων φυτών. Συνήθως, οι γιββερελλίνες προστίθενται στο μέσο καλλιέργειας για να αυξήσουν την πυκνότητα των κυτταροκαλλιέργειών και να επιμηκύνουν καχεκτικά φυτάρια. Οι ποσότητες στις οποίες χρησιμοποιούνται είναι από 0,05 έως 2 mg/l. Η συχνότερα χρησιμοποιούμενη γιββερελλίνη είναι το γιββεριλλικό οξύ ή GA3 (φυσική), το οποίο έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε καλλιέργειες κορυφαίων μεριστωμάτων. Επίσης χρησιμοποιείται και το μείγμα των GA3 και GA7. Η σύνθεση των φυσικών γιββερελινών γίνεται στα νεαρά φύλλα και στα ακρορίζια.

#### 2.4.4 ΑΜΠΙΣΙΚΟ ΟΞΥ

Το αμπισικό οξύ (ABA) προστίθεται για να παρεμποδίσει ή να διεγείρει την αύξηση του κάλου, για να επαυξήσει την παραγωγή βλαστών και οφθαλμών και να προωθήσει την ωρίμανση των σωματικών εμβρύων. Δεν χρησιμοποιείται ιδιαίτερα συχνά, παρά μόνο σε λίγες περιπτώσεις.

#### 2.4.5 ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ

Το αιθυλένιο είναι ένας απλός υδρογονάνθρακας ( $\text{CH}_2=\text{CH}_2$ ) σε αέρια μορφή, με φυτορρυθμιστικές ιδιότητες. Παράγεται σε όλα τα μέρη του φυτού και προκαλεί την έναρξη της ωρίμανσης των καρπών. Θεωρείται ο υποκινητής της αποκόλλησης των φύλλων από τους βλαστούς και του σχηματισμού τυχαίων ριζών. Επιδρά στην πολική μετακίνηση των αυξινών στα φυτά και στο φαινόμενο του γεωτροπισμού των φυτών, βοηθά στην αύξηση της περατότητας των μεμβρανών, ενώ παρεμποδίζει την αύξηση των ριζών και την έκπτυξη των φύλλων και του επάκριου οφθαλμού σε φυτάρια μεγαλωμένα στο σκοτάδι. Ιδιαίτερη προσοχή χρειάζεται στις συγκεντρώσεις στις οποίες χρησιμοποιείται το αιθυλένιο, διότι έχει παρατηρηθεί ότι ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις δρα ανασταλτικά στην ανάπτυξη των κυτταροκαλλιιεργειών, σε χαμηλές δρα ευνοϊκά στην επαγωγή εμβρυογένεσης, στην αναγέννηση φυτών από καλλιέργεια κυττάρων σιτηρών, στον σχηματισμό τυχαίων οφθαλμών και στη διαφοροποίηση στοιχείων ηθμού και ξύλου. Εξωγενής προσθήκη αιθυλενίου γίνεται μέσω της προσθήκης στο διάλυμα L-μεθειονίνης, η οποία είναι φυσικός πρόδρομος βιοσύνθεσης του αιθυλενίου.

Αναλόγως του σταδίου της ιστοκαλλιέργειας χρησιμοποιούνται και οι αντίστοιχοι ρυθμιστές αύξησης.

Έχει διαπιστωθεί ότι:

Οι αυξίνες:

- σε μικρή συγκέντρωση προωθούν τη διαφοροποίηση των ιστών προς τον σχηματισμό ριζών και/ή σωματικών εμβρύων, σπανιότερα όμως βλαστογένεσης (σε συνδυασμό με κυτοκινίνες).
- σε μεγάλη συγκέντρωση προωθούν την αποδιαφοροποίηση των ιστών προς τον σχηματισμό κάλου.





Εικόνα 4.

Οι κυτοκινίνες, αντίθετα:

- σε μικρή συγκέντρωση προωθούν τόσο την αποδιαφοροποίηση των ιστών προς τον σχηματισμό κάλου όσο και τη διαφοροποίηση των ιστών προς τον σχηματισμό βλαστών και/ή σωματικών εμβρύων, σπανιότερα όμως ριζογένεσης και αυτό σε πολύ μικρή συγκέντρωση (σε συνδυασμό με αυξίνες).
- σε μεγάλη συγκέντρωση προωθούν μόνο τη διαφοροποίηση των ιστών προς τον σχηματισμό βλαστών και/ή σωματικών εμβρύων

ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ	ΑΥΞΙΝΕΣ	ΚΥΤΟΚΙΝΙΝΕΣ
ΜΙΚΡΗ ( $<10 \mu\text{M}$ )	Ριζογένεση Σωματική εμβρυογένεση (Βλαστογένεση)	Καλογένεση Σωματική εμβρυογένεση Βλαστογένεση
ΜΕΓΑΛΗ ( $>10 \mu\text{M}$ )	Καλογένεση	Σωματική εμβρυογένεση Βλαστογένεση

Πίνακας 2

## 2.5 ΕΠΙΛΟΓΗ ΚΑΤΑΛΛΗΛΟΥ ΜΕΣΟΥ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Σημαντικό ρόλο, όπως προαναφέρθηκε, παίζει η επιλογή του κατάλληλου μέσου καλλιέργειας για την επιτυχή έκβαση της καλλιέργειας. Όπως είναι φυσικό, 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, καθώς και την κατεύθυνση της καλλιέργειας. Η μελέτη πολλών ερευνητών οδήγησε στη διαμόρφωση ορισμένων διαλυμάτων που έγιναν ευρύτερα γνωστά και επώνυμα: το θρεπτικό διάλυμα των Murashige και Skoog (MS) χρησιμοποιείται ιδιαίτερα για την επαγωγή 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 χρησιμοποιείται επίσης για την επαγωγή 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' ό,τι το MS (0,1mg/l).

ΔΙΑΛΥΜΑ	ΣΥΣΤΑΣΗ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ (g)	ΔΙΑΛΥΣΗ ΣΕ ΟΓΚΟ ΝΕΡΟΥ (ml)	ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΟΓΚΟΥ ΓΙΑ ΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟ 1 LT ΤΕΛΙΚΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ (ml)
Α Μακρο-στοιχεία	KNO <sub>3</sub> NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub> CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	9,5 8,25 2,2 1,85 0,85	1000	200
Β Μικρο-στοιχεία	H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub> MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O Na <sub>2</sub> EDTA	0,062 0,156 0,086 0,278 0,373	10	1
Γ Ιχνοστοιχεία	KJ Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,083 0,025 0,0025 0,0025	100	1
Δ Βιταμίνες	Thiamine-HCl Pyridoxine-HCl Nicotinic acid	0,050 0,050 0,005	100	1

Πίνακας 3.. Σύσταση μητρικού και τελικού θρεπτικού διαλύματος Murashige & Skoog (MS) επιμερισμένου στις διαφορετικές ομάδες συστατικών.

Στο τελικό διάλυμα (1 L) προστίθενται 797 ml νερού και:

- 10 ml διαλύματος ορμονών (ορισμένη ποσότητα ορμονών σε 20% υδατικό διάλυμα αλκοόλης ή αλκάλεως)
- 100 mg μυο-ινοσιτόλης (επιπρόσθετη βιταμίνη)
- 10 g άγαρ (στερεοποιητικός παράγοντας)
- 30 g σακχαρόζης (πηγή άνθρακα και ενέργειας)

Το pH του υποστρώματος ρυθμίζεται στο 5,6-5,8, μετά την προσθήκη όλων των άλλων συστατικών

## 2.6 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ

Το υπόστρωμα της ιστοκαλλιέργειας αποτελείται από διάφορα υλικά, τα οποία περιέχουν απαραίτητα στοιχεία για την ανάπτυξη των εκφύτων. Ουσιαστικά λοιπόν το υπόστρωμα δεν είναι τίποτε άλλο παρά μια συνταγή.

ΙΧΝΟΣΤΟΙΧΕΙΑ	ΟΡΜΟΝΕΣ	ΜΑΚΡΟΣΤΟΙΧΕΙΑ
•Fe	Αυξίνες	•Mg
•Cu	Κυτοκινίνες	•Ca
•Mn	Γιββερελλίνες	•P
•Co	Αμπισισικό οξύ	•S
•Mo	Αιθυλένιο	•N
•B	Πολυαμίνες	•K
•I	Γιασμονικό οξύ	
•Ni		
•Cl		
•Al		

Εικόνα 5.

Για την παρασκευή του υποστρώματος χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι.

Υπάρχει λοιπόν η δυνατότητα να:

- Παρασκευαστεί το υπόστρωμα προσθέτοντας ένα ένα τα υλικά που απαιτούνται.

- Να παρασκευαστούν πυκνά διαλύματα από μίγματα διαφόρων ενώσεων και να αναμιγνύονται κάθε φορά με συγκεκριμένη αναλογία ώστε να επιτευχθεί το τελικό υπόστρωμα.
- Να χρησιμοποιηθεί έτοιμο υπόστρωμα σε σκόνη και να διαλύεται κάθε φορά σε συγκεκριμένο όγκο νερού ώστε να παρασκευάζεται το τελικό υπόστρωμα. Η συγκεκριμένη τεχνική είναι αυτή που χρησιμοποιείται ευρέως για την παρασκευή υποστρωμάτων σε εργαστήρια παραγωγής πολλαπλασιαστικού υλικού.

### 2.6.1 ΕΤΟΙΜΑ ΣΚΕΥΑΣΜΑΤΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Οι περισσότεροι φυτικοί ιστοί αναπτύσσονται καλύτερα σε πλούσια θρεπτικά διαλύματα όπως είναι αυτό των Murashige και Skoog (MS). Μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί το κλασικό, πλούσιο υπόστρωμα MS με τη συγκέντρωση των ανόργανων στοιχείων μειωμένη στο 50% (1/2 MS) ή στο 25% (1/4 MS). Επίσης έχουν αναπτυχθεί θρεπτικά μέσα κατάλληλα για την ιστοκαλλιέργεια ειδικών κατηγοριών φυτών, όπως ορισμένων ξυλωδών φυτών με ευαισθησία σε κάποια συστατικά υποστρωμάτων (Υπόστρωμα Ξυλωδών Φυτών – Woody Plant Medium/WPM) (βλ. παράρτημα).

Τα στάδια παρασκευής του 1000 ml υποστρώματος MS

1. Προσθέτουμε 900 ml νερό σε ένα ποτήρι ζέσεως
2. Καθ' όλη αυτή τη διάρκεια το υπόστρωμα θερμαίνεται και αναδεύεται ταυτόχρονα προς διάλυση των ενώσεων και ομογενοποίηση του διαλύματος.
3. Προσθέτουμε τις απαραίτητες ενώσεις, όπως αυτές υπαγορεύονται από το υπόστρωμά μας ή 4.400 gr MS /lt
4. Προσθέτουμε την πηγή άνθρακα (ζάχαρη) 40 gr
5. Προσθέτουμε βιταμίνη (myo inositol) 0,1000gr
6. Προσθέτονται οι απαραίτητες φυτορρυθμιστικές ουσίες (αυτό μόνον εφόσον οι φυτορρυθμιστικές αυτές ουσίες μπορούν να αποστειρωθούν χωρίς να καταστραφούν, πληροφoρία που τη βρίσκουμε στη βιβλιογραφία).
7. Ογκομετρούμε το υπόστρωμα έως τα 1000ml
8. Ρυθμίζουμε το pH του υποστρώματος στην επιθυμητή τιμή 5.75

9. Χωρίζουμε το υπόστρωμα σε δύο φιάλες του 1lit (500+500)
10. Προσθέτουμε το άγαρ 3gr, (1,5 gr/φιάλη)
11. Ακολούθως το υπόστρωμα τοποθετείται στο αυτόκαυστο για αποστείρωση.

## **2.7 ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΟΥ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΥ**

Πάνω στο υπόστρωμα στο οποίο θα πραγματοποιηθεί η ιστοκαλλιέργεια μπορούν να αναπτυχθούν, εκτός από τους επιθυμητούς ιστούς ή κύτταρα, διάφοροι ανεπιθύμητοι μικροοργανισμοί. Οι μικροοργανισμοί αυτοί μπορεί να βρίσκονται πάνω στην επιφάνεια των εκφύτων ή μέσα σε αυτά (διασυστηματικά), να αιωρούνται στην ατμόσφαιρα του χώρου εργασίας ή να μεταφέρονται σε αυτόν με διάφορα σκεύη, ρούχα ή την αναπνοή των εργαζομένων. Ακόμα μπορούν να περιέχονται σε διάφορα υλικά ή στο νερό. Για τους λόγους αυτούς είναι απαραίτητη η αποστείρωση των χρησιμοποιούμενων υποστρωμάτων, υλικών και σκευών, καθώς και η επιφανειακή απολύμανση των εκφύτων πριν αυτά εμφυτευτούν

- Η αποστείρωση του θρεπτικού υποστρώματος γίνεται συνήθως με τη συνδυασμένη εφαρμογή υψηλής θερμοκρασίας και πίεσης 121°C και 1,2-1,5 Atm.
- Οι συνθήκες αυτές αναπαράγονται μέσα στο αυτόκαυστο (το αυτόκαυστο δεν είναι τίποτα περισσότερο από έναν κύλινδρο από ανοξείδωτο χάλυβα ο οποίος πληρούται στη βάση του με νερό).
- Όταν κλειστεί ερμητικά και αναπτυχθεί στο εσωτερικό του θερμοκρασία ανώτερη των 100°C (με τη βοήθεια μιας αντίστασης), το νερό βράζει και ο παραγόμενος ατμός συμπιέζεται στον ερμητικά κλεισμένο κλίβανο μέχρις ότου επιτευχθεί η κατάλληλη πίεση.
- Η αποστείρωση δεν ξεπερνά τα 20 με 30 λεπτά της ώρας (min).
- Η αποστείρωση όλων των γυάλινων και μεταλλικών σκευών γίνεται στο αυτόκαυστο σε θερμοκρασία 121°C και πίεση 1,2Atm για 20 λεπτά (υγρή αποστείρωση).
- Όσον αφορά τα πλαστικά τρυβλία, αυτά συνήθως είναι θερμοευαίσθητα και επομένως δεν είναι αποστειρώσιμα στο αυτόκαυστο.

## 2.8 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΕΚΦΥΤΟΥ ΚΑΙ ΕΜΦΥΤΕΥΣΗ ΥΠΟ ΑΣΗΠΤΙΚΕΣ ΣΥΝΘΗΚΕΣ

### 2.8.1 ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗ ΤΟΥ ΦΥΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

Η δυσκολία της απολύμανσης του φυτικού υλικού οφείλεται κυρίως στην καταστροφή των ιστών του και έχει σχέση με το είδος και την προέλευσή του. Περισσότερη δυσκολία παρουσιάζουν μέρη του φυτού τα οποία βρίσκονται στο έδαφος όπου οι παθογόνοι μικροοργανισμοί είναι άφθονοι (ρίζες, ριζώματα, βολβοί, κόνδυλοι, υπόγειοι βλαστοί). Μέρη τα οποία είναι λιγότερο ευάλωτα σε μικροβιακές προσβολές, όπως τα υπέργεια μεριστώματα και οι βλαστικές κορυφές, δεν παρουσιάζουν ιδιαίτερα προβλήματα στην απολύμανσή τους.

- Ο συνήθης τρόπος απολύμανσης είναι η εμβάπτιση των εκφύτων σε χαμηλής συγκέντρωσης διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 10-15%, για μερικά λεπτά (10 έως 20).
- Στη συνέχεια ξεπλένονται με αποστειρωμένο νερό (τουλάχιστον 3-4 φορές) και εμφυτεύονται. Πρέπει να σημειωθεί ότι το πρωτόκολλο απολύμανσης εξειδικεύεται για κάθε περίπτωση (είδος εκφύτου, φυτικό είδος, κ.λπ.). Αυτό είναι εφικτό μόνο μετά από σχετικό πειραματισμό.
- Ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δίνεται στην αποφυγή τοξικότητας λόγω απολύμανσης, τόσο με χρήση του κατάλληλου χρόνου επίδρασης του απολυμαντικού (ο οποίος δεν θα πρέπει να υπερβαίνει τα μέγιστα επιτρεπτά όρια) όσο και με την απομάκρυνση του απολυμαντικού διαλύματος μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας απολύμανσης με επαναλαμβανόμενο ξέπλυμα του εκφύτου σε αποστειρωμένο νερό (αυτόκαυστο).

### 2.8.2 ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ ΧΩΡΩΝ ΕΜΦΥΤΕΥΣΗΣ

Για την εμφύτευση των ιστών χρειάζεται όσο το δυνατόν περισσότερο ασηπτικό περιβάλλον. Απαραίτητος είναι ο θάλαμος νηματικής ροής αέρα.

- Ο θάλαμος αποτελείται από συστοιχία δύο φίλτρων μέσα από τα οποία εισάγεται υπό πίεση ο αέρας του περιβάλλοντος χώρου. Λόγω της μικρής διατομής των φίλτρων και της νηματικής ροής που επιτυγχάνεται (χάρη στην οποία αποφεύγονται οι στροβιλισμοί και η ανάδευση των στρωμάτων του αέρα), η ατμόσφαιρα του θαλάμου παραμένει καθαρή από σωματίδια και μικροοργανισμούς σε ποσοστό 99,9999%.

- Πριν από οποιαδήποτε εργασία, γίνεται απολύμανση του γύρω από τον θάλαμο χώρου με υποχλωριώδες ασβέστιο (χλωρίνη) και στη συνέχεια απολύμανση όλων των επιφανειών του θαλάμου, εξωτερικών και εσωτερικών με αλκοόλη 95%..
- Στην συνέχεια, τοποθετούνται μέσα στον θάλαμο όλα τα απαραίτητα υλικά και σκεύη όπως οι λαβίδες, τα νυστέρια, ένα ποτήρι με αλκοόλη για την απολύμανση των εργαλείων κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης, ποτήρια ζέσης με αποστειρωμένο νερό, δοχεία καλλιέργειας με το θρεπτικό υπόστρωμα αποστειρωμένο και συσκευή υψηλής θερμότητας για αποστείρωση των εργαλείων κατά τη διάρκεια της εμφύτευσης
- Στη συνέχεια γίνεται αποστείρωση του θαλάμου και των σκευών και υλικών με υπεριώδη ακτινοβολία (UV light) για 30 λεπτά.
- Η εργασία στον θάλαμο αρχίζει εφόσον περάσουν άλλα 30 λεπτά από τη στιγμή που θα σταματήσει η υπεριώδης ακτινοβολία. Αυτό συμβαίνει επειδή η υπεριώδης ακτινοβολία αντιδρά με το ατμοσφαιρικό οξυγόνο παράγοντας όζον, το οποίο, αν και απολύτως αναγκαίο στα ανώτερα επίπεδα της ατμόσφαιρας, είναι τοξικό όταν το αναπνεύσουμε (δρα ως ελεύθερο ριζικό).

### **2.8.3 ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ ΚΑΤΑ ΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΕΓΧΥΣΗΣ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΜΦΥΤΕΥΣΗΣ**

Κατά τη διάρκεια της έγχυσης θρεπτικού υποστρώματος σε τρυβλία τα στόμια των γυάλινων φιαλών αποστειρώνονται τακτικά στη φλόγα του λύχνου. Τα μεταλλικά εργαλεία (λαβίδες, νυστέρια) αποστειρώνονται με τον ίδιο τρόπο αφού πρώτα εμβαπτιστούν σε διάλυμα αλκοόλης. Οι χώροι μέσα στο θάλαμο νηματικής ροής πρέπει να καθαρίζονται τακτικά με διάλυμα αλκοόλης. Τέλος τα χέρια των εργαζόμενων πρέπει να απολυμαίνονται τακτικά με επάλειψη με αλκοόλη ή άλλο κατάλληλο απολυμαντικό διάλυμα. Δεν συνιστάται η χρήση γαντιών μιας χρήσης, καθώς σε περίπτωση φωτιάς (από την πηγή φλόγας) υπάρχει ο κίνδυνος να λιώσει το υλικό κατασκευής τους πάνω στο δέρμα, προκαλώντας σοβαρό έγκαυμα.

### **2.8.4 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΕΜΦΥΤΕΥΣΗΣ**

Κατά την εμφύτευση τα έκφυτα τα οποία έχουν ήδη απολυμανθεί και μεταφερθεί ασηπτικά στον θάλαμο νηματικής ροής τεμαχίζονται (με τη βοήθεια ενός νυστεριού) σε μικρότερα

τμήματα και τοποθετούνται πάνω ή μέσα στο υπόστρωμα καλλιέργειας. Το έκφυτο πρέπει να στερεωθεί μεν στο υπόστρωμα, ωστόσο να μη «βυθιστεί» μέσα σε αυτό σε βαθμό που να μην μπορεί να αναπνεύσει. Οι διαστάσεις των εκφύτων ποικίλλουν ανάλογα με το είδος αυτών και τον σκοπό του πειράματος. Συνήθως λαμβάνονται τμήματα μήκους 0,5-1 εκ. Ο τεμαχισμός των εκφύτων πραγματοποιείται πάνω σε γυάλινη ή κεραμική επιφάνεια, η οποία πρέπει να απολυμαίνεται πριν χρησιμοποιηθεί. Έκφυτα όπως έμβρυα, οφθαλμοί ή ανθήρες τοποθετούνται ακέραια μέσα στο υπόστρωμα. Για την παραλαβή ορισμένων εκφύτων απαιτούνται ειδικές τεχνικές και εξοπλισμός, π.χ. στερεοσκόπιο για την παραλαβή μεριστωμάτων (Reinert et al. 2012, Smith 2013). Πριν την εμφύτευση αφαιρούνται με το νυστέρι τμήματα μήκους 1-2 χιλιοστών από τις άκρες ή την περιφέρεια του εκφύτου, καθώς αυτά έχουν συνήθως νεκρωθεί από την απολύμανση και δεν θα αντιδράσουν στην ιστοκαλλιέργεια. Σε γενικές γραμμές ο τεμαχισμός των εκφύτων αποσκοπεί στη δημιουργία τομών στο φυτικό ιστό μέσα από τις οποίες θα εισέλθει το θρεπτικό υπόστρωμα. Ωστόσο οι τομές αυτές δεν πρέπει να είναι τόσο πολλές ώστε να προκαλέσουν καταπόνηση στον φυτικό ιστό. Το ίδιο ισχύει και για το μέγεθος των εκφύτων: πολύ μικρά έκφυτα θα καταπονηθούν υπερβολικά από τη μεταχείρισή τους κατά την εμφύτευση ενώ ο συγκριτικά μικρότερος αριθμός κυττάρων που περιέχονται (κυρίως μεριστωματικών), δεν θα επιτρέψει την ικανοποιητική απόκριση στην ιστοκαλλιέργεια. Από την άλλη πλευρά, η χρήση εκφύτων υπερβολικά μεγάλου μεγέθους δεν συνιστάται λόγω της αδυναμίας απορρόφησης του θρεπτικού υποστρώματος από όλο το σώμα του εκφύτου και ιδιαίτερα την κεντρική περιοχή αυτού. Κατά την εμφύτευση αποσφραγίζονται τα δοχεία καλλιέργειας, τοποθετούνται τα έκφυτα στο υπόστρωμα (με τη βοήθεια λαβίδας) και τα δοχεία καλλιέργειας (τρυβλία, δοχεία) σφραγίζονται ξανά (με Parafilm™ ή πώμα, αντίστοιχα). Τέλος, τα εμφυτευμένα δοχεία καλλιέργειας μεταφέρονται στον θάλαμο ανάπτυξης για την περαιτέρω επώαση των καλλιεργειών κάτω από προκαθορισμένες συνθήκες φωτισμού και θερμοκρασίας.

### **2.8.5 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΜΕΤΑΦΥΤΕΥΣΗΣ**

Κατά τη μεταφύτευση ιστών από ένα υπόστρωμα σε κάποιο άλλο (με σκοπό, για παράδειγμα, τον πολλαπλασιασμό ή την επαγωγή ριζογένεσης) ακολουθείται η ίδια ακριβώς διαδικασία, χωρίς όμως να απαιτείται η απολύμανση των καλλιεργούμενων ιστών.

Κατά τη διαδικασία της προετοιμασίας για την εμφύτευση, όσο και κατά τη διάρκεια της ίδιας της διαδικασίας της εμφύτευσης, πρέπει να δίνει ιδιαίτερη προσοχή στα εξής σημεία:



- Να μην εκτίθενται σε υπεριώδη ακτινοβολία οργανικές ουσίες (υποστρώματα), χλωρίνη (δημιουργεί τοξικά παράγωγα με το όζον του χώρου) και (το σπουδαιότερο) το δέρμα και τα μάτια.
- Να μην έρχονται σε επαφή θερμά αντικείμενα με οινόπνευμα.
- Να μην υπάρχουν πιθανές πηγές μόλυνσης (π.χ. τρόφιμα, σκουπίδια, παρατεταμένη συνομιλία, συνωστισμός) στον χώρο εμφύτευσης.
- Να υπολογίζεται ο κατάλληλος τρόπος και χρόνος απολύμανσης για κάθε είδος εκφύτου.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3<sup>ο</sup>

### 3.1 ΕΛΑΧΙΣΤΕΣ ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΜΟΝΑΔΑΣ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Η διεξαγωγή οποιουδήποτε ιστοκαλλιεργητικού πειράματος προϋποθέτει την ύπαρξη βασικού εργαστηριακού εξοπλισμού καθώς και συγκεκριμένων οργάνων και εργαλείων. Σε κάθε περίπτωση η διαθέσιμη υποδομή για ένα ιστοκαλλιεργητικό πείραμα πρέπει να είναι τέτοια ώστε να εξασφαλίζει ασηπτικές συνθήκες, δηλαδή την απομάκρυνση των μικροβίων από το περιβάλλον της καλλιέργειας.

Μια μονάδα ιστοκαλλιέργειας αποτελείται από επιμέρους, ανεξάρτητους χώρους. Για την κατασκευή μιας μονάδας μικροπολλαπλασιασμού πρέπει καταρχάς να υπάρξει πρόβλεψη ορισμένων χώρων απαραίτητων για τη διεξαγωγή των εργασιών σε αυτό.

Οι προϋποθέσεις έναρξης μιας μονάδας παραγωγής και εμπορίας πολλαπλασιαστικού υλικού καλλιεργούμενων φυτικών ειδών περιγράφονται στην ΚΥΑ 1153/16620/04-02-2014 (ΦΕΚ 616 ΤΕΥΧΟΣ Β ) και είναι οι κάτωθι:

Εργαστήριο Ιστοκαλλιέργειας, τουλάχιστον 25 τμ, με ικανοποιητικό βαθμό μόνωσης από τους άλλους χώρους της επιχείρησης. Επισπρόσθετα, πρέπει να υφίστανται:

1. Παρασκευαστήριο
2. Βοηθητικοί χώροι
3. Ψυκτικός θάλαμος ή ψυγείο
4. Θάλαμος ανάπτυξης καλλιεργειών και
5. Ασηπτικός χώρος κοπής ιστών και καλλιεργειών

Ο εξοπλισμός του εργαστηρίου, σύμφωνα με την παραπάνω απόφαση πρέπει υποχρεωτικά να περιλαμβάνει:

1. Ασηπτική τράπεζα ή χώρο ασηψίας
2. Συσκευή αποστείρωσης θρεπτικών υλικών, εργαλείων και δοχείων καλλιέργειας
3. Πεχάμετρο
4. Στερεοσκόπιο

5. Ζυγό και

6. Συσκευή απόσταξης ή απιονισμού νερού

Εκτός των παράπανω η μονάδα πρέπει να εγκαθίσταται, σε αρδευόμενη έκταση ιδιόκτητη ή μη, χωρίς ανεπτυγμένα δένδρα ή θάμνους, η οποία βρίσκεται υπό την επίδραση ευνοϊκών κλιματολογικών συνθηκών. Το εδαφικό υπόστρωμα καλλιέργειας των φυτών πρέπει να είναι ελαφρό μέχρι μέτριας σύστασης, εύπλαστο, βαθύ, γόνιμο, να έχει περιεκτικότητα σε ολικό ανθρακικό ασβέστιο όχι πάνω από 30% και σε άλατα όχι πάνω από 0,5%. Από φυτοϋγειονομικής άποψης, το έδαφος δεν πρέπει να βρίσκεται μέσα σε ζώνη προσβεβλημένη από μεταδοτικές ασθένειες και εχθρούς, ιδίως ιώσεις και νηματώδεις. Το νερό πρέπει να είναι άφθονο και όχι αλατούχο. Η δειγματοληψία του νερού και του εδάφους είναι επίσημη και γίνεται από το Κ.Ε.Π.Π.Υ.Ε.Λ., στη ζώνη ευθύνης του οποίου πρόκειται να δραστηριοποιηθεί η επιχείρηση. Οι αντίστοιχες αναλύσεις γίνονται σε ένα από τα κρατικά Εδαφολογικά Εργαστήρια ή σε άλλα αναγνωρισμένα εργαστήρια.

### 3.2 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΒΑΣΙΚΟΥ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΥ

Ο βασικός εξοπλισμός ενός εργαστηρίου ιστοκαλλιέργειας, όπως αναφέρθηκε παραπάνω πρέπει να περιέχει τα εξής αντικείμενα:

- Εργαστηριακός χώρος
- Χώρος προετοιμασίας υποστρωμάτων

**Ζυγοί ακριβείας:** Θα πρέπει να είναι ψηφιακοί, υψηλής πιστότητας με ανάλυση τεσσάρων δεκαδικών, καθώς οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται είναι εξαιρετικά μικρές από χιλιοστά του mg έως gr.

**Πεχάμετρο:** Πολλές φορές μπορεί να προκύψει η ανάγκη διόρθωσης του PH του θρεπτικού υλικού, γι αυτό είναι απαραίτητο να υπάρχει με ακρίβεια μέτρησης 0,01.

**Συσκευή απιονισμού νερού:** Είναι απαραίτητη συσκευή του εργαστηρίου, καθώς κάθε εργαστηριακή διαδικασία απαιτεί απιονισμένο νερό.

**Βραστήρας με ταυτόχρονη ανάδευση**

**Ψυγείο-καταψύκτης:** Χρησιμοποιείται για τα διάφορα διαλύματα που χρειάζονται χαμηλές θερμοκρασίες.

Κλίβανος υγρής αποστείρωσης: Είναι απαραίτητος για την αποστείρωση του θρεπτικού υποστρώματος που χρησιμοποιείται, αλλά και για την αποστείρωση των δοχείων καλλιέργειας και άλλων εργαλείων που χρησιμοποιούνται.

Κλίβανος ξηρής αποστείρωσης: Χρησιμοποιείται για την αποστείρωση εργαλείων (λαβίδες, μαχαίρια, κτλ), γυαλικών (τριβλίων, δοκιμαστικών σωλήνων, κτλ) και για τον απαραίτητο εξοπλισμό του εργαστηρίου.

Χώρος πλυσίματος εξοπλισμού ή εργαστηριακό πλυντήριο: Χρησιμοποιείται για το άριστο πλύσιμο όλων των σκευών (γυαλικών, πλαστικών) που χρησιμοποιούνται στην καλλιέργεια ιστού.

- Χώρος φυτεύσεως (θάλαμος νηματικής ροής): Οριζόντιος θάλαμος νηματικής ροής: Εξασφαλίζει τις ασηπτικές συνθήκες κάτω από τις οποίες εξελίσσονται όλες οι διαδικασίες της ιστοκαλλιέργειας. Με τη λειτουργία του εξασφαλίζεται συνεχής ροή αέρα, ο οποίος φιλτράρεται με ένα φίλτρο HEPA, το οποίο συγκρατεί όλους τους μικροοργανισμούς που θα μπορούσαν να είναι αιτία μόλυνσης.
- Χώρος ανάπτυξης καλλιεργειών (θάλαμοι ή ολόκληρα δωμάτια με ελεγχόμενες συνθήκες): Είναι θάλαμοι οι οποίοι έχουν τη δυνατότητα να ελέγχουν τις συνθήκες φωτισμού, θερμοκρασίας και σχετικής υγρασίας, σύμφωνα με τις ανάγκες και τον τύπο της καλλιέργειας. Είναι συνήθως σε μέγεθος δωματίου, χωρίς παράθυρα και εφοδιασμένοι με ράφια. Ο φωτισμός γίνεται με λάμπες φθορισμού και υπάρχει σύστημα προγραμματισμού μέρας-νύχτας. Η θέρμανση και η ψύξη του θαλάμου πραγματοποιείται από ειδικά κλιματιστικά. Επίσης, είναι καλό να υπάρχει ανεμιστήρας για τη διασπορά του αέρα και μηχανισμός ελέγχου και σταθεροποίησης της υγρασίας. Υπάρχουν επίσης και κινητοί θάλαμοι ανάπτυξης οι οποίοι έχουν τις ίδιες δυνατότητες που προαναφέρθηκαν, αλλά για μικρότερο όγκο καλλιέργειας. Το πλεονέκτημα τους είναι ότι μπορούν να ελέγξουν με μεγαλύτερη ικανότητα τις παραμέτρους που είναι απαραίτητοι για την ανάπτυξη των φυτών.
- Κατάλληλος φωτισμός (ένταση, μήκος κύματος και φωτοπερίοδος), κατάλληλη θερμοκρασία και κατάλληλη σχετική υγρασία
- Αποθηκευτικοί χώροι
- Στερεοσκόπιο: απαραίτητο για τη λήψη ακραίων μεριστωμάτων.
- Ψυχρός θάλαμος: χρειάζεται για την αποθήκευση καλλιεργειών που χρειάζονται σταθερή θερμοκρασία



*Εικόνα 6. Χώρος εργαστηρίου ιστοκαλλιέργειας*

### **3.2.1 ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΟΥ ΚΑΙ ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ**

Εκτός από εργαλεία μηχανήματα και συγκεκριμένους χώρους, θα πρέπει να φροντίσουμε να υπάρχει και το κατάλληλο περιβάλλον.

1. Αερισμός: α) φυσικός: προκαλείται από διαφορές πίεσης μεταξύ του εξωτερικού και εσωτερικού χώρου που προκαλούνται λόγω του ανέμου και της διαφοράς θερμοκρασίας. β) δυναμικός: Η διαφορά πίεσης δημιουργείται με μηχανικά μέσα (π.χ. ανεμιστήρες).
2. Θέρμανση: ανάλογα με το μέγεθος της μονάδας εγκαθίστανται συστήματα θέρμανσης προσαρμοσμένα στις ιδιαιτερότητες της περιοχής και της μονάδας. Σε μεγάλες μονάδες διοχετεύεται ζεστό νερό μέσω σωληνώσεων κυρίως. Σε μικρές η χρήση αερόθερμων είναι αρκετή.
3. Ψύξη - δροσισμός: Μια καλή μέθοδος δροσισμού είναι τα πάνελ που χρησιμοποιούν ανεμιστήρες χαμηλής περιστροφής και έλικα μεγάλης διαμέτρου. Η άλλη λύση είναι το σύστημα FOG.

4. Σκίαση: αποτελεί σημαντική παράμετρο κλίματος για την προστασία από την ένταση της ηλιακής ακτινοβολίας και για την εξοικονόμηση ενέργειας από την απώλεια θερμότητας. Βοηθάει επίσης στην συσκότιση για καλλιέργειες που απαιτούν μεγαλύτερη διάρκεια νύχτας και αυτό δεν είναι εφικτό φυσιολογικά. Επιτυγχάνεται με τη χρησιμοποίηση ειδικών κουρτινών που ονομάζονται θερμοκουρτίνες και χωρίζονται σε: κουρτίνες εξοικονόμησης ενέργειας, κουρτίνες εξοικονόμησης ενέργειας και σκίασης, κουρτίνες σκίασης, κουρτίνες συσκότισης, κουρτίνες γενικής χρήσης, κουρτίνες εξωτερικής χρήσης.

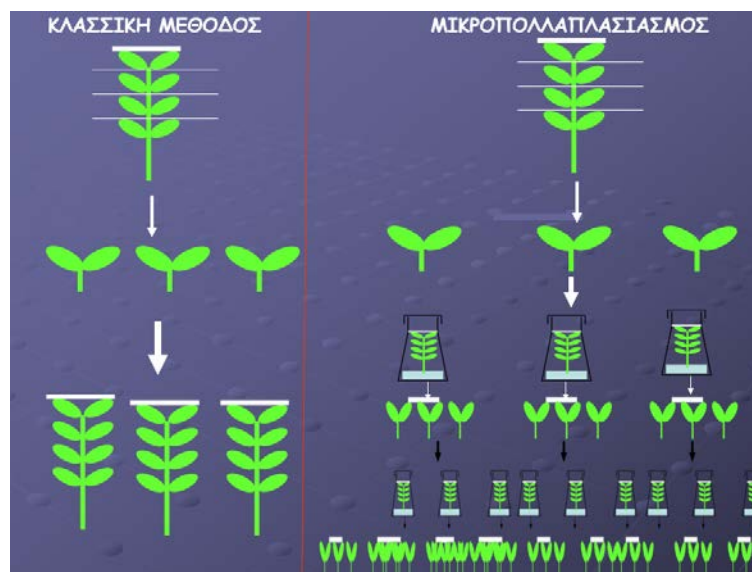
5. Άρδευση: Το είδος της καλλιέργειας, το υπόστρωμα, το κλιματολογικό και το υδρολογικό περιβάλλον είναι οι παράγοντες που προσδιορίζουν το σύστημα για την αντιμετώπιση των αρδευτικών αναγκών της καλλιέργειας. Τα τελευταία χρόνια έχει γενικευτεί η χρήση της στάγδην άρδευσης εξαιτίας της εξοικονόμησης νερού, του χαμηλού κόστους, τη μείωση της σχετικής υγρασίας και την ομοιόμορφη άρδευση που προσφέρει. Απαραίτητος εξοπλισμός είναι οι δεξαμενές νερού. Υπάρχει μεγάλη ποικιλία διαστάσεων, είναι εύκολες στην τοποθέτηση και την αποσυναρμολόγησή τους και δεν απαιτείται ειδική άδεια εγκατάστασης. Είναι κατασκευασμένες συνήθως από υλικό που δεν επιτρέπει την είσοδο του φωτός και της σκόνης για να παρέχεται προστασία στο νερό ύδρευσης.

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4<sup>ο</sup>

### 4.1 ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ

Ο μικροπολλαπλασιασμός είναι μόνο μία από τις πολλές εφαρμογές της ιστοκαλλιέργειας. Ο μικροπολλαπλασιασμός των φυτών αποτελεί την κυριότερη πρακτική και εμπορική εφαρμογή της ιστοκαλλιέργειας φυτών. Όπου μπορεί να εφαρμοστεί (τυπικό παράδειγμα είναι τα ανθοκομικά φυτά), ο μικροπολλαπλασιασμός υπερέχει στην απόδοση έως και χιλιάδες φορές σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους. Σε μικρή κλίμακα παραγωγής και εφόσον υπάρχουν διαθέσιμα τα κατάλληλα πρωτόκολλα, χαρακτηρίζεται από μέτριο επίπεδο δυσκολίας. Αυτή αυξάνεται προκειμένου για είδη με χαμηλή απόκριση στην ιστοκαλλιέργεια και όταν επιθυμούμε παραγωγή σε μεγάλη κλίμακα (εκατοντάδες χιλιάδες ή και εκατομμύρια φυτά κάθε χρόνο).

Όσον αφορά τον μικροπολλαπλασιασμό, η βασική αρχή είναι ότι η ιστοκαλλιέργεια παραμένει μια εξελιγμένη μέθοδος αγενούς πολλαπλασιασμού. Αυτό σημαίνει ότι είδη τα οποία πολλαπλασιάζονται εύκολα αγενώς (δηλαδή με μοσχεύματα, καταβολάδες κ.λ.π.) ανταποκρίνονται καλά και στον μικροπολλαπλασιασμό. Τυπικά παραδείγματα είναι η γαρδένια, η φράουλα, το σπαθίφυλλο και ο βασιλικός. Αντίθετα, όσα είδη δεν πολλαπλασιάζονται αγενώς (δηλαδή πολλαπλασιάζονται μόνο με σπόρο) ανταποκρίνονται με κάποια δυσκολία. Τέτοια φυτικά είδη είναι τα περισσότερα σιτηρά, πολλά δασικά φυτά και διάφορα αρωματικά φυτά.



Εικόνα 7

Ο μικροπολλαπλασιασμός (micropropagation) αποτελεί τη σπουδαιότερη εφαρμογή της ολοδυναμίας (ένα φυτικό κύτταρο πολλαπλασιαζόμενο μπορεί να δώσει ένα ολόκληρο φυτό ανεξάρτητα αν το κύτταρο αυτό έχει προέλθει από το φύλλο, τον βλαστό, τη ρίζα, τον οφθαλμό, κ.λπ. Totipotency Schwann και Schleiden - 1838) 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. Βέβαια, στην πράξη αυτό δεν είναι ακριβώς εφικτό: συνήθως ολόκληρα φυτά αναγεννώνται από ομάδες μερικών χιλιάδων κυττάρων που όμως έχουν συνολικά πολύ μικρή επιφάνεια, όχι μεγαλύτερη από μερικά τετραγωνικά χιλιοστά έως εκατοστά. Η επιφάνεια αυτή είναι ένας ιστός, δηλαδή μια ομάδα κυττάρων με εξειδικευμένη λειτουργία, όπως φύλλο, ρίζα κ.λπ. Όταν εισάγεται στην ιστοκαλλιέργεια, ο ιστός αυτός ονομάζεται έκφυτο (explant). Ένα φυτό μπορεί να μας δώσει πολύ μεγάλο αριθμό εκφύτων. Για παράδειγμα, ένα φύλλο μεσαίων διαστάσεων μπορεί να δώσει περίπου δέκα φυλλικά έκφυτα διαστάσεων 0,5 x 0,5 cm<sup>2</sup>. Αυτό που έχει ιδιαίτερη σημασία είναι ο συντελεστής πολλαπλασιασμού (proliferation rate), δηλαδή το πόσα φυτά μπορούμε να αναγεννήσουμε από ένα και μόνο έκφυτο. Συνήθως ο λόγος αυτός κυμαίνεται από 5-10, ωστόσο μπορεί να είναι και χαμηλότερος (π.χ. περίπου 3 στην ελιά) ή και πολύ υψηλότερος (π.χ. 100 στον βασιλικό και στη μέντα έως και 10.000 στο σέλινο, μέσω σωματικής εμβρυογένεσης). Επομένως ακόμα και με έναν σχετικά χαμηλό συντελεστή, γύρω στο πέντε, μπορούμε να αναγεννήσουμε 50 φυτά από ένα και μόνο φύλλο, δηλαδή τρεις με τέσσερις φορές περισσότερα φυτά από όσα θα παίρναμε από ολόκληρο το μητρικό φυτό με τον κλασικό αγενή πολλαπλασιασμό. Η αξία του μικροπολλαπλασιασμού γίνεται ακόμα πιο κατανοητή όταν σκεφτούμε ότι ένα φυτό μπορεί να έχει δεκάδες, εκατοντάδες ή (στην περίπτωση των δένδρων) χιλιάδες φύλλα. Ακόμη σπουδαιότερα, κάθε ιστός που αναγεννιέται μέσα στο δοχείο καλλιέργειας μπορεί να χρησιμοποιηθεί με τη σειρά του ως έκφυτο. Με τον τρόπο αυτόν, ξεκινώντας αρχικά με μικρό αριθμό εκφύτων και πολλαπλασιάζοντας συνέχεια τους αναγεννημένους βλαστούς, μπορούμε να πετύχουμε την παραγωγή χιλιάδων φυτών σε σχετικά μικρό χρονικό διάστημα (Khayat 2012). Δεν είναι επομένως τυχαίο που σε εμπορικό επίπεδο παράγονται ετησίως περίπου ένα δισεκατομμύριο φυτά με μικροπολλαπλασιασμό μέσα από τη διεθνή δραστηριότητα περισσότερων των 600 εταιριών ιστοκαλλιέργειας. Για ορισμένα είδη, μάλιστα, όπως είναι τα περισσότερα γλαστρικά ανθοκομικά, ο μικροπολλαπλασιασμός αποτελεί την κυριότερη, αν όχι αποκλειστική, μέθοδο αναπαραγωγής (Κίντζιος 1994).



#### 4.1.1 ΣΤΟΧΟΙ ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ

Οι στόχοι αυτής της μεθόδου ιστοκαλλιέργειας παρουσιάζονται συνοπτικά παρακάτω:

- Κλινική αναπαραγωγή φυτών μέσω ιστοκαλλιέργειας
- Αυξημένο ρυθμό πολλαπλασιασμού του φυτικού υλικού.
- Πλήρη ανοσία των παραγόμενων φυτών.
- Μειωμένο κόστος φυτού σε συγκεκριμένα φυτικά είδη.

#### 4.2 ΣΤΑΔΙΑ ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ

Η διαδικασία παραγωγής νέων φυτών με τη μέθοδο του μικροπολλαπλασιασμού περιλαμβάνει διάφορα στάδια ανάλογα με τις επιμέρους διεργασίες. Οι απαιτούμενες συνθήκες θερμοκρασίας, φωτός αλλά και σύστασης θρεπτικού διαλύματος και υποστρώματος διαφοροποιούνται ανάλογα με το στάδιο. Η διαδικασία του μικροπολλαπλασιασμού περιλαμβάνει λοιπόν μια σειρά από πέντε διακριτά στάδια τα οποία συνοψίζονται στη συνέχεια:

##### 1. Προετοιμασία φυτικού υλικού

Επιλογή του μητρικού φυτικού υλικού που θα χρησιμοποιηθεί για πολλαπλασιασμό. Τα μητρικά φυτά πρέπει να είναι υγιή, εύρωστα και σε νεαρή ηλικία. Έτσι αυξάνονται οι πιθανότητες θετικής απόκρισης και περιορίζεται σε κάποιο βαθμό η ενδεχόμενη διάδοση παθογόνων. Ως επί το πλείστον η καλλιέργεια του φυτικού υλικού γίνεται σε θερμοκήπια κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες. Με τη μέθοδο αυτή γίνεται εφικτός ο διαρκής και άμεσος έλεγχος της υγιεινής και φαινοτυπικής κατάστασης των φυτών.

##### 2. Εγκατάσταση κυτταρο-/ιστοκαλλιέργειας

Στο στάδιο αυτό γίνεται η επιλογή, η παραλαβή και η απολύμανση των εκφύτων. Έπειτα πραγματοποιείται η εγκατάσταση της ιστοκαλλιέργειας με εμφύτευση του φυτικού υλικού σε κατάλληλα δοχεία και τοποθέτησή τους στον θάλαμο καλλιέργειας.

##### 3. Πολλαπλασιασμός

Στο στάδιο του πολλαπλασιασμού, εισάγονται στο θρεπτικό υπόστρωμα οι ρυθμιστές αύξησης (κυτοκίνηνη - αυξίνη), οι συγκεντρώσεις των οποίων καθορίζουν το ρυθμό

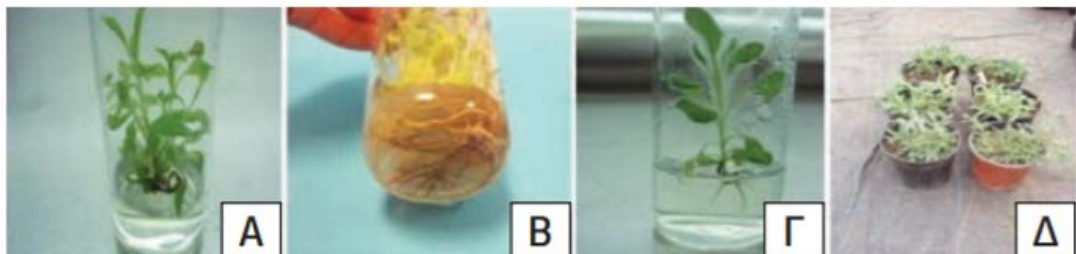
παραγωγής νέων βλαστών. Στόχος του σταδίου αυτού είναι ο πολλαπλασιασμός του αρχικού φυτικού υλικού έτσι ώστε να αποκτηθεί ικανός αριθμός φυτών. Το στάδιο αυτό περιλαμβάνει αρκετές ανακαλλιέργειες για ανανέωση των θρεπτικών πόρων, καθώς τα θρεπτικά στοιχεία του υποστρώματος καταναλώνονται. Συνήθως ο πολλαπλασιασμός αφορά μόνο τους αναγεννημένους τυχαίους βλαστούς χωρίς επαγωγή ριζογένεσης.

#### 4. Αναγέννηση φυτού

Αφού έχει αποκτηθεί ικανή ποσότητα φυτικού υλικού ακολουθεί η επιμήκυνση και παραγωγή ρίζας στα φυτά. Έτσι, τα φυτά που κρίνονται κατάλληλα μεταφυτεύονται στο υπόστρωμα ριζοβολίας. Το στάδιο της ριζοβολίας περιλαμβάνει την πρόκληση της ανάπτυξης ριζών στη βάση των βλαστών και προετοιμάζει τα μικρομοσχεύματα για τη μεταφορά τους από το μιζότροφο περιβάλλον της *in vitro* καλλιέργειας στο εξωτερικό περιβάλλον. Η ορθή αναγέννηση του φυτού διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον μετέπειτα επιτυχή εγκλιματισμό του.

#### 5. Εγκλιματισμός φυτού

Συνήθως πραγματοποιείται σε συνθήκες θερμοκηπίου ή σε ειδικούς θαλάμους εγκλιματισμού. Τα φυτά, ανάλογα με τη φυσιολογική τους κατάσταση απαιτούν λιγότερο ή περισσότερο χρόνο για να αποκτήσουν τις φυσιολογικές τους λειτουργίες και την ικανότητα της φωτοσύνθεσης. Η χρήση θαλάμων εγκλιματισμού με αυστηρά καθορισμένες συνθήκες επιβάλλεται ώστε να έχουμε ομοιόμορφο εγκλιματισμό και ανάπτυξη των φυτών. Τα φυτά που παράγονται είναι πλήρως αναγεννημένα και, με κατάλληλους χειρισμούς, η επιτυχία μπορεί να φτάσει το 100%. Στην παρακάτω εικόνα βλέπουμε τα στάδια της *in vitro* αναπαραγωγής του κρητικού τσαγιού, μαλοτήρα.



Εικόνα 8. Α: στάδιο πολλαπλασιασμού, Β, Γ: στάδιο ριζοβολίας, Δ: στάδιο *ex vitro* σκληραγώγησης/ εγκλιματισμού



Εικόνα 9. Α: στάδιο πολλαπλασιασμού, Β: στάδιο ριζοβολίας, Γ: στάδιο *ex vitro* σκληραγώγησης/εγκλιματισμού του βλάχικου τσαγιού

ΚΩΔΙΚΟΣ ΜΟΝΑΔΑΣ	ΣΤΑΔΙΟ ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ/ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΦΥΤΩΝ	ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΥΠΟΛΟΜΗΣ
0	Προετοιμασία μητρικού φυτού	Ενδεχομένως θερμοκήπιο ή ειδικός θάλαμος ανάπτυξης φυτών (φυτοτρόνιο)
1	Εγκατάσταση καλλιέργειας Εμφυτευμένα έκφυτα σε αρχική φάση διαφοροποίησης/αποδιαφοροποίησης	Γενικός χώρος Χώρος παρασκευής υποστρώματος Χώρος ασηπτικής μεταφοράς Χώρος ανάπτυξης καλλιεργείων
2	Πολλαπλασιασμός (κυρίως τυχαίων βλαστών)	Γενικός χώρος Χώρος παρασκευής υποστρώματος Χώρος ασηπτικής μεταφοράς Χώρος ανάπτυξης καλλιεργείων
3	Επιμήκυνση βλαστών Ριζοβολία Αναγέννηση φυτών	Γενικός χώρος Χώρος παρασκευής υποστρώματος Χώρος ασηπτικής μεταφοράς Χώρος ανάπτυξης καλλιεργείων
4	Εγκλιματισμός φυτών	Χώρος εγκλιματισμού/σκληραγώγησης

Πίνακας 4. Ταξινόμηση μονάδων μικροπολλαπλασιασμού ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης του φυτικού υλικού και τη διαθέσιμη υποδομή.

#### 4.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΟΝ ΕΠΙΤΥΧΗ ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΕΝΟΣ ΦΥΤΙΚΟΥ ΕΙΔΟΥΣ

Οι βασικοί παράγοντες που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά τη συλλογή των εκφύτων είναι το είδος του οργάνου και το μέρος του φυτού από όπου θα αποκοπεί, η ηλικία, η φυσιολογική κατάσταση και η ποιότητα του φυτού-δότη των εκφύτων και η κατάλληλη εποχή συλλογής τους. Η ηλικία του φυτού-δότη είναι κι αυτή σημαντική, διότι από τα νεότερα φυτά προκύπτουν τα πιο ρωμαλέα έκφυτα. Επίσης, σημαντικό ρόλο παίζει το θρεπτικό υπόστρωμα καθώς και μια σειρά από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως παρουσιάζονται παρακάτω:

### 1. Θρεπτικό υπόστρωμα

Τα θρεπτικά υποστρώματα, προμηθεύουν τους φυτικούς ιστούς με τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία για την ανάπτυξή τους. Η επιλογή του κατάλληλου θρεπτικού υποστρώματος και η προσθήκη της ιδανικότερης αναλογίας ρυθμιστών αύξησης έχουν ως αποτέλεσμα την βελτιστοποίηση της καλλιέργειας.

Σύνθεση υποστρώματος (ΟΜ, DKW, κ.ά.)

Φυτορυθμιστικές ουσίες – pH (5.0-6.2)

Σάκχαρα (μαννιτόλη σε ελιά, σορβιτόλη σε μηλιά και ροδακινιά), κ.τ.λ.

### 2. Έκφυτο

Οι κορυφές των βλαστών σχηματίζουν επιπλέον μεριστώματα στις μασχάλες των φύλλων και οι πρωτογενείς ρίζες σχηματίζουν δευτερογενείς ρίζες κατά μήκος των πιο ώριμων ζωνών. Οι βλαστοφόροι οφθαλμοί και τα επάκρια μεριστώματα μπορεί να αναπτύσσονται και να ριζοβολούν in vitro και αποτελούν μέσο αγενούς πολλαπλασιασμού. Επίσης σε ορισμένες περιπτώσεις, οι ρίζες σε in vitro συνθήκες μπορούν να σχηματίσουν βλαστούς.

Επιπλέον, με την οργανογένεση είτε άμεσα από βλαστούς και ρίζες ή έμμεσα μετά δημιουργία κάλλου, η μορφογένεση σε in vitro καλλιέργεια μπορεί να οδηγήσει στο σχηματισμό εμβρύων. Ο σχηματισμός επίκτητων εμβρύων είναι ένας άλλος γνωστός τρόπος αλλά περιορίζεται σε κύτταρα μέσα στο ωάριο. Επίσης, έμβρυα μπορεί να προκύψουν από ανθήρες. Αυτό που είναι ασυνήθιστο σε in vitro καλλιέργειες είναι η εμφάνιση εμβρύων είτε άμεσα από βλαστικό ιστό (επιδερμίδα βλαστών, αποθησαυριστικό παρέγχυμα ριζών) ή μετά από διαίρεση αυτών των σωματικών κυττάρων. Τα έμβρυα προκύπτουν επίσης από γαμετικούς ιστούς σε in vitro καλλιέργεια, ιδιαίτερα από τη γύρη.

Είδος εκφύτου (βλαστοκορυφές, κομβικά, μερίστωμα, κ.τ.λ.)

Πηγή εκφύτου

Μέγεθος εκφύτου (μεγαλύτερο μέγεθος για σμέουρο)

Φυσιολογική ηλικία εκφύτου (νεανικά έναντι μεγαλύτερης ηλικίας)

### 3. Συνθήκες ανάπτυξης

Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η θερμοκρασία, το διοξείδιο του άνθρακα, η ποιότητα, η διάρκεια και η ένταση του φωτός επηρεάζουν τη μορφογένεση των φυτών. Τα φυτά, ανάλογα με το είδος και με το γενότυπο τους, αντιδρούν διαφορετικά στους παράγοντες. Ακόμα, η ανταλλαγή αερίων με το περιβάλλον, η οποία επιτυγχάνεται με τη

χρήση ειδικών φίλτρων στα καπάκια των δοχείων, μπορεί να αυξήσει τη φωτοσυνθετική ικανότητα των εκφύτων

Φωτισμός (φωτοπερίοδος, μήκος κύματος, ένταση φωτισμού)

Θερμοκρασία

Αέριο περιβάλλον

Σχετική υγρασία

#### 4. Γενότυπος

Αν και όλα τα κύτταρα μέσα σ' ένα φυτό μπορεί να θεωρηθούν ότι έχουν τον ίδιο γενότυπο, υπάρχουν βασικές διαφορές από κύτταρο σε κύτταρο και από όργανο σε όργανο μέσα στο φυτό, όσο αφορά την ικανότητα να αναπαράγονται σε *in vitro* καλλιέργειες. Γενικά, εμβρυακοί ή μεριστωματικοί ιστοί φαίνεται ότι έχουν μεγαλύτερη ικανότητα για αύξηση και μορφογένεση *in vitro*.

#### 5. Εποχή

Ανάλογα με την εποχή διακρίνεται στα φυτά ένα στάδιο έντονης δραστηριότητας και ένα στάδιο καμψής. Την άνοιξη στα φυτά παρατηρούνται ρυθμιστές αύξησης όπως η αυξίνη, οι κυτοκινίνες και οι γιββερελλίνες, το καλοκαίρι το ποσοστό των ουσιών αυτών μειώνεται και το φθινόπωρο εμφανίζονται αναστολές αύξησης.

### 4.4 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ

Ο μικροπολλαπλασιασμός, σύμφωνα με τον Σκαλτσογιάννη (1990), παρουσιάζει πληθώρα πλεονεκτημάτων σε σχέση με τις κλασσικές μεθόδους πολλαπλασιασμού φυταρίων. Τα σημαντικότερα αναφέρονται παρακάτω:

- Παρέχει τη δυνατότητα ελέγχου των χημικών και φυσικών παραγόντων του περιβάλλοντος. Δίνεται η δυνατότητα πολλαπλασιασμού σε είδη, που με άλλους τρόπους ήταν δύσκολος, ακόμα και αδύνατος.
- Παρέχει τη δυνατότητα παραγωγής όλο το έτος.
- Προσφέρει μαζική παραγωγή φυτών απαλλαγμένα από παθογόνους μικροοργανισμούς και δυσμενείς επιγενετικές επιδράσεις (κυκλόφυση, τοπόφυση).
- Δημιουργία προϋποθέσεων ανανέωσης ώριμων ιστών.
- Δυνατότητα διατήρησης του αναπαραγόμενου φυτικού υλικού στο ψυγείο για αρκετό χρονικό διάστημα.

- Απλοποίηση μετακίνησης και ανταλλαγής φυτικού υλικού μεταξύ ερευνητικών ιδρυμάτων διαφορετικών χωρών.
- Δυνατότητα άμεσης και οικονομικής ίδρυσης φυτειών με βελτιωμένο υλικό σε φυτικά είδη που μπορούν να αναπαραχθούν κλωνικά σε μαζική ή σε περιορισμένη κλίμακα.
- Παραγωγή μεγάλου αριθμού φυτών σε ελάχιστο χώρο.
- Αποτελεί τεχνική υπερπήδησης του ασυμβίβαστου στις διασταυρώσεις μεταξύ των ειδών, με το σωματικό υβριδισμό.
- Δυνατότητα συγκέντρωσης γενετικού υλικού σ' ένα ορισμένο τόπο, για την εφαρμογή προγραμμάτων βελτίωσης για την ίδρυση σποροπαραγωγών κήπων, για τη δημιουργία τράπεζας γονιδίων ή κέντρων προστασίας των γενετικών πόρων ενός είδους
- Δυνατότητα αξιολόγησης γενοτύπων και της αλληλεπίδρασης τους με το περιβάλλον.
- Δημιουργεί προϋποθέσεις υπολογισμού γενετικών παραμέτρων.
- Εξασφάλιση της αναπαραγωγής φαινοτύπων προσαρμοσμένων σε ιδιαίτερα περιβάλλοντα, όπως αρκετά εξειδικευμένων κλώνων και κλώνων με ευρεία προσαρμοστικότητα.
- Εξασφάλιση ομοιομορφίας υλικού στον τομέα της βελτίωσης καλλωπιστικών δέντρων και θάμνων.
- Δυνατότητα βασικής έρευνας στη γενετική βιοχημεία, ανατομία, φυσιολογία και παθολογία με τον προσδιορισμό της σχέσης ανθεκτικότητα και περιβάλλον, ανθεκτικότητα και ταχύτητα αύξησης.
- Για ορισμένα φυτικά είδη (κυρίως γλαστρικά και κηποτεχνικά εξωτερικού χώρου) ο μικροπολλαπλασιασμός εξακολουθεί να είναι η μοναδική εμπορική μέθοδος πολλαπλασιασμού.

#### **4.5 ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ**

Ο μικροπολλαπλασιασμός δεν είναι πάντα το τέλειο μέσο για την παραγωγή φυτών, υπάρχουν προϋποθέσεις που περιορίζουν τη χρήση του.

- Απαιτούνται εξειδικευμένες εγκαταστάσεις και προσωπικό για την επιτυχία της μεθόδου.
- Το κόστος παραγωγής είναι αρκετά υψηλό εξαιτίας του εξειδικευμένου εξοπλισμού.

- Τα φυτά που αναπτύσσονται σε συνθήκες ιστοκαλλιέργειας δεν είναι αυτότροφα, με αποτέλεσμα να απαιτείται εγκλιματισμός.
- Σε περίπτωση μόλυνσης μπορεί να προκληθούν τεράστιες απώλειες φυτικού υλικού.
- Μερικά φυτά είναι πολύ δύσκολο να απολυμανθούν πλήρως από τους μικροοργανισμούς χωρίς να προκληθεί η νέκρωση του φυτού.

#### 4.6 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΦΥΤΩΝ ΜΕ ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΕΝΑΝΤΙ ΣΥΜΒΑΤΙΚΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ

Ένα βασικό πλεονέκτημα του μικροπολλαπλασιασμού είναι η δυνατότητα μαζικής παραγωγής κλωνικών φυτών. Ο θεωρητικός ρυθμός μικροπολλαπλασιασμού είναι εξαιρετικά μεγάλος. Αρχίζοντας από 1 φυτό και πολλαπλασιάζοντάς το κάθε μήνα παίρνοντας 10 φυτά από κάθε αρχικό φυτό, μέσα σε 6 μήνες μπορεί κανείς να πάρει 1.000.000 φυτά. Αν και τέτοιοι αριθμοί δεν επιτυγχάνονται στη πράξη, οι ρυθμοί πολλαπλασιασμού που κατορθώνονται είναι πραγματικά εντυπωσιακοί. Ένα οργανωμένο κέντρο εμπορικής εκμετάλλευσης μπορεί να παράγει 1 έως 3 εκατομμύρια φυτά το χρόνο. Ο μικροπολλαπλασιασμός βρίσκει επίσης εφαρμογή στην ταχεία αναπαραγωγή νέων ή βελτιωμένων ποικιλιών που δημιουργούνται στα βελτιωτικά προγράμματα και την εισαγωγή τους στην παραγωγική διαδικασία. Γενετικά καθαρές σειρές που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή υβριδιοσπόρου διατηρούνται μακρόχρονα, μεταφέρονται εύκολα σε μεγάλες αποστάσεις και αναπαράγονται ταχύτατα με μικροπολλαπλασιασμό, αρκεί μόνο να έχουν τη δυνατότητα αγενούς αναπαραγωγής. Ο έλεγχος των παθογόνων, όπως είναι οι ιοί και τα βακτήρια, σε φυτά που αποτελούν τράπεζες φυτικού πολλαπλασιαστικού υλικού διευκολύνεται σε *in vitro* συστήματα. Εάν χρησιμοποιηθούν υγιή αρχικά φυτά μπορούν να παραχθούν φυτά σε μεγάλη κλίμακα που εγγυημένα είναι ελεύθερα ιώσεων. Άλλα πλεονεκτήματα είναι ότι το πολλαπλασιαστικό υλικό παράγεται σε μικρό χώρο, σε ασηπτικές συνθήκες οι οποίες αποκλείουν απώλειες από διάφορα παθογόνα. Οι ελεγχόμενες συνθήκες (φωτός, θερμοκρασίας, σύνθεσης θρεπτικού μέσου, ορμονών κτλ) εξασφαλίζουν συνεχείς και υψηλούς ρυθμούς παραγωγής ανεξάρτητα της εποχής του έτους. Με τις μεθόδους μικροπολλαπλασιασμού μπορούν να αναπαραχθούν φυτά *in vitro* που είναι δύσκολο ή και αδύνατο να αναπαραχθούν *in vivo*.

Εντοπίζονται όμως και σημαντικά οφέλη καθώς και οικονομική σημασία από την εφαρμογή του μικροπολλαπλασιασμού.

Με τον μικροπολλαπλασιασμό απαιτείται μικρότερο μέγεθος χώρου για μαζική παραγωγή φυτών σε συντομότερο χρονικό διάστημα, περιορίζεται η έκταση των μητρικών φυτειών καθώς απαιτείται μικρή ποσότητα αρχικού φυτικού εκκίνησης, εξασφαλίζοντας χαμηλότερο κόστος για τη διατήρηση των μητρικών φυτειών και παραγωγής πολλαπλασιαστικού υλικού.

Παράγονται υγιή φυτά, καθώς αναπτύσσονται σε απόλυτα αποστειρωμένο περιβάλλον απαλλαγμένο από παθογόνους μικροοργανισμούς, γεγονός που αυξάνει την ποιότητα και εμπορική αξία του τελικά παραγόμενου προϊόντος.

Διατηρούνται, αξιολογούνται και αξιοποιούνται φυτογενετικοί πόροι, των σπάνιων, ενδημικών, απειλούμενων ποικιλιών καλλιεργούμενων ειδών και άγριων συγγενών τους που απειλούνται από γενετική διάβρωση ή εξαφάνιση.

Αξιοποιούνται μειονεκτικές, ορεινές ή ημιορεινές εκτάσεις με άγονα, φτωχά, μέτριας σύστασης επικλινή, βραχώδη, πετρώδη, ασβεστολιθικά εδάφη, συμβάλλοντας στην αναδιάρθρωση της καλλιέργειας διαφόρων σπάνιων ειδών, στην αύξηση του εισοδήματος των παραγωγών που ασχολούνται με την καλλιέργειά του και στην ανάπτυξη επιχειρηματικών δραστηριοτήτων στις περιοχές αυτές με αποτέλεσμα την συγκράτηση του πληθυσμού στην ύπαιθρο.

Συνοπτικά, η τεχνική *in vitro* του μικροπολλαπλασιασμού έχει τα ακόλουθα διακριτά πλεονεκτήματα έναντι των συμβατικών μεθόδους αγενούς πολλαπλασιασμού: απαιτούνται μικροί χωροί εγκατάστασης, υψηλοί ρυθμοί πολλαπλασιασμού, απαλλαγή από εποχικούς περιορισμούς, ελεγχόμενες διαδικασίες παραγωγής και απαλλαγή από ιούς.



## ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Συμπερασματικά, μπορούμε να επισημάνουμε ότι η σημασία της ιστοκαλλιέργειας είναι κάτι παραπάνω από σημαντική, αφού οι εφαρμογές της βρίσκουν πρόσφορο έδαφος στη μαζική παραγωγή πανομοιότυπων φυτών, στην παραγωγή φαρμακευτικών και άλλων χημικών ουσιών, στην παραγωγή φυτών απαλλαγμένα από ιώσεις, στην έρευνα διαφόρων αναπτυξιακών, φυσιολογικών και άλλων λειτουργιών όσο και στην γενετική βελτίωση φυτών.

## ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. «Ανοικτά Ακαδημαϊκά Μαθήματα Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών»
2. Ainaa, O.O., Quesenberry, K.H., & Galloa, M. (2015). Culture vessel and auxin treatments affect in vitro rooting and ex vitro survival of six *Arachis paraguariensis* genotypes. *Scientia Horticulturae* 183:167-171.
3. Ananthakrishnan, G., Xia, X., Elman, C., Singer, S., Paris, H.S., Gal-on, A., & Gaba, V. (2003). Shoot production in squash (*Cucurbita pepo*) by in vitro organogenesis. *Plant Cell Reports* 21:739–746.
4. Azizi, P., Rafii, M.Y., Maziah, M., Abdullah, S.N.A., Hanafi, M.M., Latif, M.A., Rashid, A.A., & Sahebi, M. (2015). Understanding the shoot apical meristem regulation: A study of the phytohormones, auxin and cytokinin, in rice. *Mechanisms of Development* 135: 1-15.
5. Barberaki, M., & Kintzios, S. (2002). Accumulation of selected macronutrients in mistletoe tissue cultures: effect of medium composition and explant source. *Scientia Horticulturae* 95:133-150.
6. Bhattacharya, P., Dey, S., & Bhattacharyya, B.C. (1994). Use of low cost gelling agents and support matrices for industrial scale plant tissue culture. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 37: 15–23.
7. Bromke, B.J., & Furiga, M. (1991). Carrageenan is a desirable substitute for agar in media for growing *Trichomonas vaginalis*. *Journal of Microbiology Methods* 13: 61–65.
8. Brown, D.C.W. (1984). Organization of a plant tissue culture laboratory. In: Vasil, I.K. (ed.), *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol. 1: Laboratory Procedures and Their Applications. Academic Press, Waltham, MA, pp. 1-12.
9. Brown, D.C.W. και T.A. Thorpe, 1984, Οργάνωση ενός εργαστηρίου ιστοκαλλιέργειας, Αγγλία
10. Carrel, Alexis and Montrose T. Burrows (1911). "[Cultivation of Tissues in Vitro and its Technique](#)"
11. Cheng, Y., Maa, R.-L., Jiaoa, Y., Qiaoa, N., & Lib, T.T. (2013). Impact of genotype, plant growth regulators and activated charcoal on embryogenesis induction in microspore culture of pepper (*Capsicum annuum* L.). *South African Journal of Botany* 88: 306-309.
12. Cseke, L.J., Kirakosyan, A., Kaufman, P.B., & Westfall, M.V. (2011). *Handbook of Molecular and Cellular Methods in Biology and Medicine*, 3rd Edition. CRC Press, Boca Raton, 735 p., ISBN 978- 1420069389.
13. Cushie John, 2009, Ο τέλειος πολλαπλασιασμός, Αθήνα
14. Davey, M.R., & Anthony, P. (2010). *Plant Cell Culture: Essential Methods*. Wiley Publishers, Hoboken, NJ, 358 p., ISBN 978-0470686485, DOI: 10.1002/9780470686522
15. Davies, P.J. (2013). *Plant Hormones*, 3rd Edition. Springer, Berlin, 802 p., ASIN: B00E41OVDS.
16. De la Cruz, E.M., García-Ramírez, E., Vázquez-Ramos, J.M., de la Cruz, H.R., & López-Bucio, J. (2015). Auxins differentially regulate root system architecture and cell cycle protein levels in maize seedlings. *Journal of Plant Physiology* 176: 147-156.

17. Debergh, P.C., & Read, P.E. (1991). Micropropagation. In: Debergh, P.C., Zimmermann, R.H. (eds.), Micropropagation. Kluwer, Dordrecht, pp. 1-14.
18. Dodds E.F. και L.W. Roberts, 1982, Πειράματα στην καλλιέργεια Ιστού, Cambridge, Αγγλία
19. Fadel, D.G., Kintzios, S., Economou, A., Moschopoulou, G., & Constantinidou, H.-I. (2010). Effect of different strength of medium on organogenesis, phenolic accumulation and antioxidant activity of spearmint (*Mentha spicata* L.). *The Open Horticulture Journal* 3: 31-35.
20. Gambrog, O.L., & Phillips G. (2013). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture: Fundamental Methods*. Springer, Berlin, 359 p., ISBN 978-3642489747.
21. *General Techniques of Plant Tissue Culture*. Available from: [https://www.researchgate.net/publication/291056431\\_General\\_Techniques\\_of\\_Plant\\_Tissue\\_Culture](https://www.researchgate.net/publication/291056431_General_Techniques_of_Plant_Tissue_Culture).
22. George E.F. και P.D. Sherrington, 1984, Πολλαπλασιασμός φυτών με ιστοκαλλιέργεια, Hants, Αγγλία
23. George, E.F. (1993) *Plant Propagation by Tissue Culture: Part 1 – The Technology*. Basingstoke: Exegetics.
24. George, E.F., Hall M.E., & de Klerk G.-J. (2007). *Plant Propagation by Tissue Culture: Volume 1. The Background*. Springer, Berlin, 502 p., ISBN 978-1402050046.
25. Hartmann H.T. και D.F. Kester, 1983, Πολλαπλασιασμός φυτών- Αρχές και πρακτικές, 4η έκδοση, NJ
26. Henderson, W.E., & Kinnersley, A.M. (1988). Corn starch as an alternative gelling agent for plant tissue culture. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 15: 17–22.
27. <http://www.gaiapedia.gr/gaiapedia/index.php/>
28. [http://www.minagric.gr/images/stories/docs/agrotis/Pollaplasiastiko\\_Yliko/nomothesi\\_a\\_pollaplasiastiko\\_yliko/fek616\\_2014.pdf](http://www.minagric.gr/images/stories/docs/agrotis/Pollaplasiastiko_Yliko/nomothesi_a_pollaplasiastiko_yliko/fek616_2014.pdf)
29. Iliev, I., Gajdosova. A., Libiakova, G., & Mohan Jain S. (2010). Plant micropropagation. In: Davey MR, Anthony P, Eds. *Plant Cell Culture: Essential Methods*. Wiley Publishers, Hoboken, NJ, pp. 1-24, ISBN 978-0470686485, DOI: 10.1002/9780470686522.
30. *Introduction to Plant Cell, Tissue and Organ Culture* by SUNIL D. PUROHIT, PHI Learning Pvt, 2013.
31. *Introduction to Plant Tissue Culture* by M. K. Razdan, Science Publishers, 2003.
32. Karabi, D. and Swapan, K. D. (2007) Transformation Methods and Impact. In *Encyclopedia of Plant and Crop Science*. Taylor and Francis: New York, Published online: 12 Dec 2007; 1233-1237.
33. Khayat, E. (2012). An engineering view to micropropagation and generation of true to type and pathogenfree plants. In: Altman, A., ed. *Plant Biotechnology and Agriculture*, Elsevier, pp. 229-241.
34. Kintzios, S., Barberaki, M., Aivalakis, G., Drossopoulos, J., & Holevas, C.D. (1996a). In vitro morphogenetical responses of mature wheat embryos to different NaCl concentrations and growth regulator treatments. *Plant Breeding* 116: 113-118.
35. Kintzios, S., Barberaki, M., Drossopoulos, J.B., Turgelis, P., Konstas, J., & Makri, O. (2003). Effect of medium composition and explant type on the distribution profiles of

- selected micronutrients in mistletoe tissue cultures. *Journal of Plant Nutrition* 26:369-397.
36. Kintzios, S., Drossopoulos, J., & Lymperopoulos, C. (2001a). Effect of vitamins and inorganic micronutrients on callus growth and somatic embryogenesis from young mature leaves of rose (*Rosa hybrida*). *Journal of Plant Nutrition* 23: 1407-1419.
  37. Kintzios, S., Drossopoulos, J., & Lymperopoulos, C. (2001b). Effect of vitamins and inorganic micronutrients on callus growth and somatic embryogenesis from young mature leaves of pepper (*Capsicum annum L.*). *Plant, Cell, Tissue & Organ Culture* 67: 55-62.
  38. Kintzios, S., Drossopoulos, J., Manousaridou, M., & Holevas, C.D. (1996b). Competence for callus induction on mature pepper leaves depends upon specific developmental stages of the donor leaves. *Scientia Horticultura* 65: 341-347.
  39. Kintzios, S., Drossopoulos, J., Shortsianitis, E., & Peppes, D. (2000). Induction of somatic embryogenesis from young mature leaves of chilli pepper (*Capsicum annum sp.*): Effect of leaf position, illumination and explant pretreatment with high cytokinin concentrations. *Scientia Horticultura* 85: 137-144.
  40. Kintzios, S., Hiureas, G., Shortsianitis, E., Sereti, E., Blouhos, P., Manos, C., Makri, O, Taravira, N., Drossopoulos, J., & Holevas, C.D. (1998). The effect of light on the induction, development and maturation of somatic embryos from various horticultural and ornamental species. *Acta Horticultura* 461: 427-432.
  41. Kintzios, S., Papagiannakis, Em., Aivalakis, G., Konstas, J., Bouranis, D., & Christodouloupoulou, L. (2002). The effects of casein and its constituents on the development of tissue culture and somatic embryogenesis from *Malva silvestris L.*: a preliminary study. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants* 9: 211-216.
  42. Kintzios, S., Stavropoulou, E., & Skamneli, S. (2004). Accumulation of selected macronutrients and carbohydrates in melon tissue cultures: association with pathways of in vitro dedifferentiation and differentiation (organogenesis, somatic embryogenesis). *Plant Science* 167: 655-664.
  43. Kintzios, S., Triantafyllou, M., & Drossopoulos, J. (1996a). Effect of genotype and different growth regulator treatments on callus induction, proliferation and plant regeneration from mature wheat embryos. *Cereal Research Communications* 24: 147-153.
  44. Kintzios, S., Triantafyllou, M., & Drossopoulos, J. (1996b). Effect of genotype and different growth regulator treatments on callus induction, proliferation and plant regeneration from mature wheat embryos. *Cereal Research Communications* 24: 147-153.
  45. Kitsaki, C.K., Zygouraki, S., Ziobora, M., & Kintzios, S. (2004). In vitro germination, protocorms formation and plantlets development of mature versus immature seeds from several *Ophrys* species (Orchidaceae). *Plant Cell Reports* 23: 284-290.
  46. Konstas, J., & Kintzios, S. (2003). Developing a scale-up system for the micropropagation of cucumber (*Cucumis sativus L.*): the effect of growth retardants, liquid culture and vessel size. *Plant Cell Reports* 21: 538-548.
  47. Kyte L., 1983, Φυτά από δοκιμαστικούς σωλήνες: Εισαγωγή στον μικροπολλαπλασιασμό, Portland, OR 61 12) Wetherell, D.F., 1982, Εισαγωγή στον in vitro πολλαπλασιασμό, NJ

48. Loyola-Vargas, V.M., & Vázquez-Flota, F. (2005). *Plant Cell Culture Protocols*. Humana Press, New York, NY, 394 p., ISBN 978-1588295477.
49. Mageau, O.C. (1991). Laboratory design. In: Debergh, P.C., Zimmermann, R.H. (eds.), *Micropropagation*. Kluwer, Dordrecht, pp. 15-30.
50. Sathyanarayana, B.N., & Mathews, D. (2007). *Plant Tissue Culture*. IK International Publishing House, New Delhi, 250 p., ISBN 978-8189866112.
51. Matakias, T., & Kintzios, S. (2005). The effect of ATP on cucumber (*Cucumis sativus* L.) regeneration from nodal explants: association with  $\alpha$ -tocopherol, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and the size of the liquid culture vessel (flask vs. airlift bioreactor). *Plant Growth Regulation* 45: 127-137.
52. Mezghani, N., Jemmali, A., Elloumi, N., Gargouri-Bouزيد, R., & Kintzios, S. (2007). Morpho-histological study on shoot bud regeneration in cotyledon cultures of pepper (*Capsicum annum*). *Biologia* 6:704-710.
53. Michael A. Dirr και Charles W. Heuser, 1987, *Από τον σπόρο στην ιστοκαλλιέργεια*, Athens, Georgia
54. Micropropagation and Largescale Culture of *C. borivilianum* in Bioreactor
55. Mujib, A., Cho, M.J., & Predieri, S. (2004). *In Vitro Application in Crop Improvement*. CRC Press, Boca Raton, FL, 338 p., ISBN 978-1578083008.
56. Naor, V., Ziv, M., & Zahavi, T. (2011). The effect of the orientation of stem segments of grapevine (*Vitis vinifera*) cv. Chardonnay on callus development in vitro. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 106: 353-359.
57. Neumann K.-H., & Kumar, A. (2009). *Plant Cell and Tissue Culture - A Tool in Biotechnology: Basics and Application (Principles and Practice)*. Springer, Berlin, 333 p., ISBN 978-3540938828.
58. Ozel ,C.A., Khawar, K.M., & Arslan, O. (2008). A comparison of the gelling of isubgol, agar and gelrite on in vitro shoot regeneration and rooting of variety Samsun of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Scientia Horticulturae* 117: 174-181.
59. Ozudogru, E.A., Kirdok, E., Kaya, E., Capuana, M., De Carlo, A., & Engelmann, F. (2011). Medium-term conservation of redwood (*Sequoia sempervirens* (D. Don.) Endl.) in vitro shoot cultures and encapsulated buds. *Scientia Horticulturae* 127: 431-435.
60. *Plant Tissue Culture: An Introductory Text* by Sant Saran Bhojwani, Prem Kumar Dantu, Springer, 2013.
61. *Plants from Test Tubes: An Introduction to Micropropagation* by Kyte Lydiane, Timber Press, 1996.
62. Ramage, C.M., & Williams, R.R. (2003). Mineral uptake in tobacco leaf discs during different developmental stages of shoot organogenesis. *Plant Cell Reports* 21:1047–1053.
63. Rastogi, R., & Sawhney, V.K. (1986). In vitro culture of young floral buds of tomato (*Lycopersicon esculentum* mill.). *Plant Science* 3: 221-227.
64. Reuveni, M., & Evenor, D. (2007). On the effect of light on shoot regeneration in petunia. *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 89: 49–54.
65. Zhang, Y., Zhou, J., Wu, T., & Cao, J. (2008). *Plant Cell Tissue & Organ Culture* 93: 323–331.
66. Sage, D.O., and Ian, J. P. (2007) *Plant Cell Tissue and Organ Culture: Concepts and Methodologies*. In *Encyclopedia of Plant and Crop Science*, Taylor and Francis: New York, Published online: 12 Dec 2007; 934-938.

65. Saiman, M.Z., Mustafa, N.R., Schulte, A.E., & Verpoorte, R. (2012). Induction, characterization, and NMR-based metabolic profiling of adventitious root cultures from leaf explants of *Gynura procumbens*. *Plant Cell, Tissue & Organ Culture* 109: 465-475.
66. Scoggins, L., & Bridgen, M. (2013). *Plants from Test Tubes: An Introduction to Micropropagation*, 4th Edition. Timber Press, Portland, OR, 274 p., ISBN 978-1604692068.
67. Smith, R. (2013). *Plant Tissue Culture: Techniques and Experiments*, 3rd Edition. Academic Press, Waltham, MA, 208 p., ISBN 978-0124159204.
68. Stanišić, M., Raspor, M., Ninković, S., Milošević, S., Čalić, D., Bohanec, B., Trifunović, M., Petrić, M., Subotić, A., & Jevremović, S. (2015). Clonal fidelity of *Iris sibirica* plants regenerated by somatic embryogenesis and organogenesis in leaf-base culture — RAPD and flow cytometer analyses. *South African Journal of Botany* 96: 42-52.
69. Vasil, K.I. (1991). Rationale for the scale-up and automation of plant propagation. In: Vasil, K.I., (ed.), *Scale-up and Automation in Plant Propagation*, Academic Press, Waltham, MA, pp. 7-35.
70. Vitaly, C., Stanislav, V. K., Benoît, L., Adi, Z., Mery, D. Y., Shachi, V., Andriy, T., and Tzvi, T. (2007) Biological systems of the host cell involved in *Agrobacterium* infection. *Cellular Microbiology*. 9(1), 9–20.
71. Wetherell, D.F., 1982, Εισαγωγή στον *in vitro* πολλαπλασιασμό, NJ
72. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών 2014, Τμήμα Βιοτεχνολογίας, Κίντζιος Σπυρίδων, «Βιοτεχνολογία Τροφίμων». Έκδοση: 1.0. Αθήνα 2014. Διαθέσιμο από τη δικτυακή διεύθυνση: <https://mediasrv.aua.gr/eclass/courses/OCDB102/>
73. Γρηγοριάδου Αικατερίνη, 2010, Πολλαπλασιασμός οπωροκηπευτικών φυτών, Θεσσαλονίκη
74. Κ. Δαμάση Θέριου και Ι. Θέριος, 2006, Γενική δενδροκομία, Μέρος Α, Αθήνα
75. Κίντζιος 1994, Trigiano and Gray 1999, Reinert et al. 2012, Smith 2013
76. Κίντζιος Σ. (1994). Επιχειρηματική Ιστοκαλλιέργεια. Κατασκευή και διαχείριση επιχειρηματικών μονάδων παραγωγής ανθοκομικού πολλαπλασιαστικού υλικού με ιστοκαλλιέργεια. Εκδόσεις Α. Σταμούλης.
77. Κίντζιος, Σ. (1994). Επιχειρηματική Ιστοκαλλιέργεια. Αθήνα: Εκδόσεις Σταμούλη, σελ. 139. ISBN 960-351- 009-2.
78. Κίντζιος, Σ., 2015. *Εισαγωγή στον μικροπολλαπλασιασμό των φυτών*. [ηλεκτρ. βιβλ.] Αθήνα:Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών. Διαθέσιμο στο: <http://hdl.handle.net/11419/241>
79. Μετζάκης, Δ. (2005). Καλλιέργειες *in vitro*. Αθήνα: Εκδόσεις Ίων, σελ. 198. ISBN 960-411-526-X.
80. Νάνος Γεώργιος, 2011, Παραγωγή αγενώς πολλαπλασιαστικού υλικού, Αθήνα
81. Ποντίκης Κωνσταντίνος, 1994, Πολλαπλασιασμός Καρποφόρων δέντρων και θάμνων, Αθήνα 6) Κ. Δαμάση Θέριου και Ι. Θέριος, 2006, Γενική δενδροκομία, Μέρος Α, Αθήνα
82. Ποντίκης Κωνσταντίνος, 1994, Πολλαπλασιασμός Καρποφόρων δέντρων και θάμνων, Αθήνα
83. Ρούσσοι Πέτρος, 2011, πολλαπλασιασμός καρποφόρων δέντρων και θάμνων, Αθήνα

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

Καλλωπιστικά	Ξυλώδη είδη	Λαχανοκομικά και άλλα καλλιεργούμενά είδη
<i>Alstromeria</i>	<i>Araucaria</i>	<i>Allium</i>
<i>Anthurium</i>	<i>Coffea</i>	<i>Asparagus</i>
<i>Chrysanthemum</i>	<i>Eucalyptus</i>	<i>Beta</i>
<i>Gerbera</i>	<i>Pinus</i>	<i>Brassica</i>
<i>Gladiolus</i>	<i>Pyrus</i>	<i>Glycine</i>
<i>Hyacinthus</i>	<i>Rosa</i>	<i>Phaseolus</i>
Ορχεοειδή	<i>Santalum</i>	<i>Solanum</i>
<i>Pelargonium</i>	<i>Vitis</i>	<i>Trifolium</i>
<i>Tulipa</i>		<i>Zea</i>

Μερικά από τα φυτικά είδη που πολλαπλασιάζονται in vitro.

### Woody Plant Medium

Θρεπτικά στοιχεία	mg/l
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	400.00
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.20
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	96.00
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	386.40
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.25
FeSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	27.80
MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	29.43
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	370.00
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170.00
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	990.00
Na <sub>2</sub> EDTA	37.30
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.25
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	8.60
Glycine	2.00
i-Inositol	100.00
Nicotinic Acid	0.50
Pyridoxine HCl	0.50
Sucrose	20000.00
Thiamine HCl	1.00
Agar	6000.00

### Murashige and Skoog Medium

Θρεπτικά στοιχεία	mg/l
CaCl <sub>2</sub> 2H <sub>2</sub> O	440.00
CoCl <sub>2</sub> 6H <sub>2</sub> O	0.025
CuSO <sub>4</sub> 5H <sub>2</sub> O	0.025
FeNa EDTA	36.70
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6.20
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170.00
KI	0.83
KNO <sub>3</sub>	1900.00
MgSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	370.00
MnSO <sub>4</sub> 4H <sub>2</sub> O	22.30
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> 2H <sub>2</sub> O	0.25
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650.00
ZnSO <sub>4</sub> 7H <sub>2</sub> O	8.60
Glycine	2.00
i-Inositol	100.00
Nicotinic Acid	0.50
Sucrose	30000.00
Pyridoxine HCl	0.50
Thiamine HCl	0.10
Agar	10000.00

Χαρακτηριστικά υποστρώματα στον πολλαπλασιασμό σποροφόρων δέντρων (πηγή διαδικτυο)



Sterilant	Concentration	Treatment time (minutes)
Antibiotics	4-50 mg/liter	30-60
Bromine water	1-2%	2-10
Calcium hypochlorite	9-10%	5-30
Ethanol/isopropanol	70%	quick dip
Hydrogen peroxide	10-12%	5-15
Mercuric chloride	0.1-1%	2-10
Sodium hypochlorite	10-20% <sup>1</sup>	5-30

<sup>1</sup> 10-20% (v/v) of a commercial bleach solution

Ουσίες αποστείρωσης επιφάνειας των εκφύτων πριν την καλλιέργεια (πηγή διαδικτυο)

Substance	Concentration
<b>Auxins</b>	
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid—2,4-D	0.01-10 mg/l
Indole-3-acetic acid—IAA	0.1-10 mg/l
Indole-3-butyric acid—IBA	0.1-10 mg/l
Naphthaleneacetic acid—NAA	0.1-10 mg/l
P-chlorophenoxyacetic acid	0.1-10 mg/l
<b>Cytokinins</b>	
6-(γ,γ-dimethylallylamino) purine (2iP)	0.1-30 mg/l
Kinetin	0.1-10 mg/l
N <sub>6</sub> -Benzyladenine-BA	0.1-10 mg/l
Thidiazuron	0.01-10 mg/l
<b>Other Organic Substances</b>	
Adenine sulfate	20-200 mg/l
Ascorbic acid	100 mg/l
Citric acid	150 mg/l
Sucrose	20-30 g/l
<b>Undefined Ingredients</b>	
Bacto malt extract	50-5000 mg/l
Bacto yeast extract	50-5000 mg/l
Casein hydrolysate	50-5000 mg/l
Coconut milk/water	100-150 ml/l
Orange juice	50-300 ml/l

Ουσίες που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη των φυτών και οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται συνήθως (πηγή Διαδίκτυο)



Θρεπτικό υπόστρωμα Murashige και Skoog (MS)																																				
Ένωση	Ποσότητα ανά λίτρο		Συνέχεια πίνακα																																	
	mg	mmol																																		
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	1650	20,6	<table border="1"> <thead> <tr> <th>Ένωση</th> <th colspan="2">Ποσότητα ανά λίτρο</th> </tr> <tr> <td></td> <th>mg</th> <th>mmol</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Σακχαρόζη</td> <td>30g</td> <td>87,6 mmol</td> </tr> <tr> <td>IAA</td> <td>1-30mg</td> <td>5,71-171 μmol</td> </tr> <tr> <td>Κινητίνη</td> <td>0,04-10mg</td> <td>0,186-46,5 μmol</td> </tr> <tr> <td>Ινοσιτόλη</td> <td>100mg</td> <td>555 μmol</td> </tr> <tr> <td>Νικοτινικό οξύ</td> <td>0,5mg</td> <td>4,06 μmol</td> </tr> <tr> <td>Πυριδοξίνη.HCl</td> <td>0,5mg</td> <td>2,43 μmol</td> </tr> <tr> <td>Θειαμίνη.HCl</td> <td>0,1mg</td> <td>0,296 μmol</td> </tr> <tr> <td>Γλυκίνη</td> <td>2mg</td> <td>26,6 μmol</td> </tr> <tr> <td>Άγαρ</td> <td>6g</td> <td>6g</td> </tr> </tbody> </table>	Ένωση	Ποσότητα ανά λίτρο			mg	mmol	Σακχαρόζη	30g	87,6 mmol	IAA	1-30mg	5,71-171 μmol	Κινητίνη	0,04-10mg	0,186-46,5 μmol	Ινοσιτόλη	100mg	555 μmol	Νικοτινικό οξύ	0,5mg	4,06 μmol	Πυριδοξίνη.HCl	0,5mg	2,43 μmol	Θειαμίνη.HCl	0,1mg	0,296 μmol	Γλυκίνη	2mg	26,6 μmol	Άγαρ	6g	6g
Ένωση	Ποσότητα ανά λίτρο																																			
	mg	mmol																																		
Σακχαρόζη	30g	87,6 mmol																																		
IAA	1-30mg	5,71-171 μmol																																		
Κινητίνη	0,04-10mg	0,186-46,5 μmol																																		
Ινοσιτόλη	100mg	555 μmol																																		
Νικοτινικό οξύ	0,5mg	4,06 μmol																																		
Πυριδοξίνη.HCl	0,5mg	2,43 μmol																																		
Θειαμίνη.HCl	0,1mg	0,296 μmol																																		
Γλυκίνη	2mg	26,6 μmol																																		
Άγαρ	6g	6g																																		
KNO <sub>3</sub>	1900	18,8																																		
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	440	2,99																																		
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	370	1,50																																		
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	170	1,25																																		
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	100 μmol																																		
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	22,3	100																																		
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	8,6	29,9																																		
KI	0,83	5,00																																		
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	0,25	1,03																																		
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,025	0,100																																		
CoCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	0,025	0,105																																		
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	27,8	100																																		
Na <sub>2</sub> EDTA.2H <sub>2</sub> O	37,3	100																																		