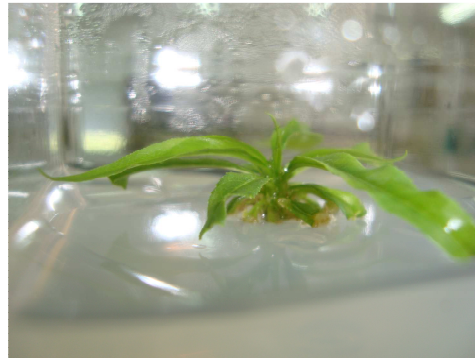


ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ
ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

**ΕΞΥΓΙΑΝΣΗ - ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ *IN VITRO* ΤΟΥ
ΑΜΥΓΔΑΛΟΡΟΔΑΚΙΝΟΥ Ρ1**



ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ: ΓΡΗΓΟΡΙΑΔΟΥ ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗ
ΦΟΙΤΗΤΡΙΑ: ΡΑΠΤΟΠΟΥΛΟΥ ΧΡΗΣΤΙΝΑ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ, 2009

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1. <i>IN VITRO</i> ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΙΣΤΩΝ, ΚΥΤΤΑΡΩΝ & ΟΡΓΑΝΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ ΦΥΤΩΝ.....	6
1.1 Ιστορική αναδρομή.....	7
1.2 Υλικά και συνθήκες Ιστοκαλλιέργειας.....	9
1.2.1 Επιλογή του κατάλληλου τμήματος φυτού.....	9
1.2.2 Θρεπτικά διαλύματα.....	12
1.2.3 Τεχνικές αποστείρωσης.....	14
1.2.4 Συνθήκες καλλιέργειας στον θάλαμο ανάπτυξης.....	15
2. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.....	17
2.1 ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ.....	17
2.1.1 Πλεονεκτήματα μικροπολλαπλασιασμού.....	18
2.1.2 Μειονεκτήματα μικροπολλαπλασιασμού.....	19
2.1.3 Στάδια μικροπολλαπλασιασμού.....	19
2.1.4 Πολλαπλασιασμός εκφύτων σε συνθήκες <i>in vitro</i>	21
2.1.5 Προβλήματα στον μικροπολλαπλασιασμό.....	21
2.2 ΕΞΥΓΙΑΝΣΗ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΟΣΟΥ ΦΥΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ.....	26
2.2.1 Ιστορική αναδρομή.....	27
2.2.2 Θερμοθεραπεία και καλλιέργεια ακραίου μεριστώματος.....	27
2.2.3 <i>In vitro</i> μικροεμβολιασμός.....	31
2.2.3.1 Συνδυασμός του μικροεμβολιασμού με τον μικροπολλαπλασιασμό.....	32
2.2.4 Χημειοθεραπεία.....	32
2.3 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΦΥΤΩΝ.....	34
2.4 ΜΕΛΕΤΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΜΕΝΩΝ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗ <i>IN VITRO</i> ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ.....	37
3. ΠΥΡΗΝΟΚΑΡΠΑ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΣΤΟ ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΟ P1.....	38
3.1 Πυρήνοκαρπα.....	38
3.2 Το υποκείμενο ροδακινιάς P1 (αμυγδαλοροδάκινο).....	39
3.3 Εφαρμογή της Ιστοκαλλιέργειας στο υποκείμενο P1.....	40
4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	41

Β. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	42
1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΟΥ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ.....	42
2. ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ.....	44
3. ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗ ΦΥΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΚΑΙ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ <i>IN VITRO</i>	44
3.1 Πρώτη εγκατάσταση της καλλιέργειας.....	44
3.2 Δεύτερη εγκατάσταση της καλλιέργειας.....	46
3.3 Τρίτη εγκατάσταση της καλλιέργειας.....	47
Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	48
1. Πρώτη εγκατάσταση.....	48
2. Δεύτερη εγκατάσταση.....	48
3. Τρίτη εγκατάσταση.....	53
Δ. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	56
Ε. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΙΚΟΝΩΝ.....	58
ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	61

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία αυτή άρχισε τον Ιούνιο του 2008, ολοκληρώθηκε τον Φεβρουάριο του 2009 και πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Ιστοκαλλιέργειας του τμήματος Φυτικής Παραγωγής του ΤΕΙ Θεσσαλονίκης.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τους ανθρώπους που συνέβαλαν στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας. Πρώτον, την κ. Γρηγοριάδου Αικατερίνη, επιβλέπων καθηγήτρια της πτυχιακής διατριβής μου, για την υπομονετική της καθοδήγηση, την παρακολούθηση των πειραμάτων, την κριτική ανάγνωση του κειμένου και τον πολύτιμο προσωπικό χρόνο που διέθεσε. Τον κ. Ρούμπο Αθανάσιο για την υπόδειξη του θέματος της πτυχιακής, την εμπιστοσύνη που μου έδειξε για την πραγματοποίηση των πειραμάτων στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Ιστοκαλλιέργειας, την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με το αντικείμενο της Ιστοκαλλιέργειας και τις σημαντικές πληροφορίες για το αμυγδαλοροδάκινο P1.

Τον κ. Μαυρομάτη Αθανάσιο, για την ηθική υποστήριξη, για την βοήθεια στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων και για την κριτική ανάγνωση του κειμένου. Τον καθηγητή Φυτοπαθολογίας, κ. Θωμίδη Θωμά για την ευγενική παραχώρηση πληροφοριών.

Τέλος και πάνω από όλους θέλω να ευχαριστήσω την οικογένειά μου για την αμέριστη συμπαράστασή τους, την υπομονή τους και την ηθική τους υποστήριξη.

Αφιερωμένη,
στον πατέρα μου

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην εργασία αυτή εξετάζεται ένα αξιόλογο υποκείμενο ροδακινιάς, το υβρίδιο αμυγδαλοροδακινιάς, P1. Το συγκεκριμένο υβρίδιο επιλέχθηκε γιατί έδωσε λύσεις σε προβλήματα εγκατάστασης νέων ροδακινιών σε ημιγόνιμες-ημιαρδευόμενες περιοχές, σε ασβεστούχα εδάφη καθώς και στο πρόβλημα της επαναφύτευσης. Για τους λόγους αυτούς η παρούσα διατριβή αποσκοπεί στην αναλυτική μελέτη των παραγόντων που επηρεάζουν την καλλιέργεια του αμυγδαλοροδάκινου *in vitro*.

Μελετήθηκε η διαδικασία αναπαραγωγής, χρησιμοποιώντας τρόπους και μεθόδους ιστοκαλλιέργειας. Επίσης, μελετήθηκαν οι μέθοδοι εξυγίανσης φυτικού υλικού. Περιγράφηκαν τα χαρακτηριστικά του αμυγδαλοροδάκινου P1 και οι παράγοντες που συντέλεσαν για την επιτυχή εγκατάσταση και πολλαπλασιασμό του. Ακόμη, μελετήθηκαν οι διάφορες μέθοδοι απολύμανσης των εκφύτων σε διαφορετικές χρονικές περιόδους και η καταλληλότητα των εκφύτων που ελήφθησαν από νεαρούς βλαστούς.

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1. IN VITRO ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΙΣΤΩΝ, ΚΥΤΤΑΡΩΝ & ΟΡΓΑΝΩΝ ΚΑΙ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ ΦΥΤΩΝ

Η ιστοκαλλιέργεια βασίζεται στις δύο σημαντικές ιδιότητες του φυτικού κυττάρου, στην ολοδυναμικότητα, δηλαδή στην μοναδική ικανότητα του φυτικού κυττάρου να μπορεί να αναγεννήσει ολόκληρο το φυτό από το οποίο προήλθε, ανεξάρτητα από τον βαθμό διαφοροποίησης στον οποίο βρίσκεται εκείνη την στιγμή και στην αποδιαφοροποίηση, που αναφέρεται στην ικανότητα πλήρως διαφοροποιημένων και ώριμων φυτικών κυττάρων να αποκτήσουν ξανά μεριστωματικές ιδιότητες (George, 1993).

Η εκμετάλλευση του μοναδικού φαινομένου της ολοδυναμίας που παρουσιάζουν τα φυτικά κύτταρα, οδήγησε στην ανάπτυξη τεχνικών καλλιέργειας των κυττάρων *in vitro*, προκαλώντας έτσι τη δημιουργία ενός νέου επιστημονικού κλάδου, αυτού της σύγχρονης εφαρμοσμένης Βιοτεχνολογίας. Η δυνατότητα να απομονώνονται κύτταρα και να καλλιεργούνται αυτόνομα, μακριά από το μητρικό σώμα, έδωσε την δυνατότητα για εκτεταμένη έρευνα στο κυτταρικό επίπεδο και επεμβάσεις που στις μέρες μας φτάνουν ακόμη και σε χειρισμούς του γενετικού υλικού των κυττάρων, με τις εφαρμογές των μεθόδων της Μοριακής Βιολογίας και της Γενετικής Μηχανικής.

Ο όρος Ιστοκαλλιέργεια ή καλλιέργεια *in vitro*, περιγράφει μια διαδικασία (τεχνική), κατά την οποία μικρά τεμάχια φυτικού ιστού, όργανα ή κύτταρα, απομονώνονται από το μητρικό φυτό κάτω από ασηπτικές συνθήκες και καλλιεργούνται σε ειδικά δοχεία που περιέχουν αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα σε χώρους με ελεγχόμενο περιβάλλον (φωτισμός και θερμοκρασία). Το μικρό όργανο ή κομμάτι ιστού που απομακρύνεται από το μητρικό φυτό και από το οποίο πρόκειται να εγκατασταθεί όλη η καλλιέργεια *in vitro*, ονομάζεται έκφυτο. Οι χειρισμοί του εκφύτου, η ρύθμιση της σύνθεσης του θρεπτικού υποστρώματος αλλά και των παραμέτρων του περιβάλλοντος καλλιέργειας, μπορούν να προσανατολίσουν την συμπεριφορά του προς ποικίλους δρόμους διαφοροποίησης, ανάλογα με τον επιδιωκόμενο σκοπό.

Η ιστοκαλλιέργεια σε γενικές γραμμές μπορεί να χωριστεί σε δύο μεγάλες κατηγορίες (Χατζόπουλος, 2001). Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει την καλλιέργεια οργάνων ή ακόμη και σπερμάτων (ή ζυγωτικών εμβρύων) για την δημιουργία ενός ολόκληρου φυτού. Η δεύτερη κατηγορία συμπεριλαμβάνει την *in vitro* καλλιέργεια κυττάρων

με απώτερο σκοπό την δημιουργία αναγεννημένου φυτού. Έτσι, ενώ στην πρώτη περίπτωση επιτρέπεται η ανάπτυξη και διαφοροποίηση των κυττάρων ή των ιστών από τα όργανα τα οποία έχουν εμβολιαστεί στο θρεπτικό μέσο, στην δεύτερη περίπτωση επιτυγχάνεται η αποδιαφοροποίηση των κυττάρων (είτε αυτά βρίσκονται μέσα στα όργανα είτε μέσα στους ιστούς) για τη δημιουργία κάλου που αργότερα θα μπορέσει μέσα από την οργανογένεση ή την σωματική εμβρυογένεση, να αναγεννήσει ένα ολόκληρο φυτό.

1.1 Ιστορική αναδρομή

Οι σύγχρονες εφαρμογές της ιστοκαλλιέργειας έχουν τις ρίζες τους βαθιά χωμένες στο παρελθόν, αφού ένα σύνολο συμπτώσεων, προσεκτικών παρατηρήσεων και επιστημονικών επεμβάσεων, οδήγησαν στην σημερινή τους εξέλιξη. Η ιστορία της *in vitro* καλλιέργειας των φυτικών κυττάρων, ξεκίνησε πριν από 100 περίπου χρόνια, όταν ο βοτανικός Haberlandt, προβλέποντας την αρχή της ολοδυναμίας, έθεσε την βιολογική βάση για την εφαρμογή της ιστοκαλλιέργειας, επιβεβαιώνοντας έτσι τα πειράματα του Roux και τις προσδοκίες του Vochting (Haberlandt, 1902). Όμως, η προϊστορία της καλλιέργειας φυτικών ιστών μάλλον ξεκινά πολύ νωρίτερα, ίσως πριν 235 χρόνια, όταν παρατηρήθηκε ο σχηματισμός κάλου μετά την απομάκρυνση μικρού δακτυλίου από τον φλοιό και εμφάνιση νεοεκπτυσσόμενων οφθαλμών (που προέρχονται από μια άγνωστη περιοχή μεταξύ του ξύλου και του καμβίου) όπως διατύπωσε ο Hérnc-Louis Duhamel.

Ο Gautheret πιστεύει ότι η χρησιμοποίηση του μικροσκοπίου από τον Melpighi και η ανάπτυξη της θεωρίας του κυττάρου, σχεδόν ταυτόχρονα για τα ζωικά και φυτικά κύτταρα, αποτέλεσαν τα σκαλοπάτια για την καλλιέργεια των κυττάρων *in vitro* (Gautheret, 1982). Ο Vochting το 1878, κατάφερε να παράγει κάλο από έκφυτα του είδους *Brassica rapa*, δίνοντας ιδιαίτερη βαρύτητα στην πολικότητα που χαρακτηρίζει την ανάπτυξη των φυτικών τμημάτων. Επίσης, προσπάθησε να εμβολιάσει διαφορετικά είδη μεταξύ τους, αποδεικνύοντας τους αυστηρούς κληρονομικούς παράγοντες που εμποδίζουν τέτοιου είδους επαφές. Ο Sachs και ο Wiesner, διατύπωσαν την άποψη ότι η πολικότητα ρυθμίζεται από ενδογενείς ουσίες που είναι υπεύθυνες για το σχηματισμό οργάνων, ενώ λίγο αργότερα ο Reehinger, καθόρισε ποιο πρέπει να είναι το μικρότερο μέγεθος εκφύτου που επιτρέπει την κυτταρική διαίρεση. Αυτό το απέδειξε, παίρνοντας οφθαλμούς από βλαστούς των *Populus nigra* και *Fraxinus ornus* και οφθαλμούς από ρίζες των *Beta vulgaris* και *Brassica rapa*, όπου τεμαχίζοντάς τα σε λεπτότατα τμήματα (από

0,5mm-0,5cm) απέδειξε τη δυνατότητα κυτταροδιαιρέσεων ακόμη και στα έκφυτα των 1,5mm.

Ο Haberlandt, προβληματιζόμενος έντονα, αναφέρει στην εργασία του "Experiments on the culture of isolated plant cells" τη δυνατότητα απομόνωσης των κυττάρων αλλά και τη δυσκολία πρόκλησης κυτταροδιαιρέσεων στις καλλιέργειες αυτών, επισημαίνοντας παράλληλα, ότι το πρόβλημα για το μέλλον της τεχνικής θα είναι η ανακάλυψη των συνθηκών, κάτω από τις οποίες τα μεμονωμένα κύτταρα θα καταφέρουν να οδηγηθούν σε κυτταροδιαιρέσεις. Χρησιμοποίησε μάλιστα ένα πιο σύνθετο θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε γλυκόζη και πεπτόνη, όμως ατύχησε στην επιλογή του φυτού. Έχοντας την πατάτα σαν υλικό, όπου η δέσμευσή της αγγειακά από το μητρικό φυτό οδηγεί στην ανάγκη χρησιμοποίησης ορμονών στο μέσο, καθυστέρησε τη λήψη των πρώτων πραγματικών προϊόντων ιστοκαλλιέργειας. Γι' αυτά, καυχόνται οι Kotte και Robbins, όπου καλλιεργώντας, ανεξάρτητα ο ένας από τον άλλο, μεριστωματικά κύτταρα ριζιδίων μπιζελιού και καλαμποκιού, κατάφεραν να οδηγήσουν σε διαφοροποίηση τους ιστούς αυτούς.

Τα απλής σύνθεσης υποστρώματα, αντικαταστάθηκαν από το διάλυμα τύπου Knop's ενισχυμένο με την παρουσία γλυκόζης, αλανίνης και ασπαργίνης. Η χρησιμοποίηση των αυξινών σε τεχνητά υποστρώματα έγινε για πρώτη φορά από τους White, Gautheret και Nobercourt. Η ανίχνευση του ρόλου των αυξινών και η συνεργιστική τους δράση με τις κυτοκινίνες στην επαγωγή των οργάνων, έγινε γνωστή αργότερα από τους Miller & Skoog, με την ανακάλυψη της χημείας και της δράσης των κυτοκινινών (Skoog and Miller, 1957). Έτσι, άρχισαν να δημιουργούνται τα σύνθετα θρεπτικά υποστρώματα, αφού ο ρόλος των μακροστοιχείων και μικροστοιχείων είχε ήδη επισημανθεί έγκαιρα. Οι Hannay & Street, Ball & Street, μελέτησαν τη δράση του χαλκού και του μαγγανίου, οι Sheat et al. των NH_4^+ , ενώ οι Street et al. το ρόλο των ηλικικών ενώσεων και ο Delarge τη σημασία των αμινοξέων στις ρίζες.

Η σημασία των μικροστοιχείων Zn και B, οδήγησε τον Heller, στο να αυξήσει τη συγκέντρωσή τους έως και 10 φορές, σε σχέση με το υπόστρωμα Knop's, ενώ ιδιαίτερα πετυχημένη εφαρμογή όλων των προηγούμενων παρατηρήσεων έγινε από τους Murasighe & Skoog και Nitsch & Nitsch. Εφαρμόζοντας σύνθετα πειράματα θρέψης *in vitro* σε έκφυτα καπνού, βελτίωσαν αισθητά τα υποστρώματα των Gautheret's, White's, Heller και Knop's. Κάνοντας βαθιές καινοτομίες, όπως για παράδειγμα αύξηση του Fe^{+2} , στο υπόστρωμα MS έως και 500 φορές, του Zn^{++} έως και 50 φορές και των NH^{+4} , NO_3^- έως και 25 φορές σε σχέση με τα αρχικά χρησιμοποιούμενα υποστρώματα, συνέθεσαν θρεπτικά υποστρώματα που στήριζαν και στηρίζουν μέχρι σήμερα την πορεία της ιστοκαλλιέργειας (Gautheret, 1982).

Μια πορεία με πολλούς σταθμούς, όπως η πρόταση του Ball, για το ποιο είναι το ακριβές τμήμα του βλαστικού μεριστώματος που είναι υπεύθυνο για την αναγέννηση ολόκληρου φυτού κατά τον μικροπολλαπλασιασμό και τα πειράματα του Steward που οδήγησαν στην σωματική εμβρυογένεση (Steward, 1958). Ο Steward καλλιέργησε με επιτυχία κύτταρα από τη σαρκώδη ρίζα του καρότου, οδηγώντας τη μάζα των κυττάρων του νεοδημιουργημένου κάλου, σε διαφοροποίηση και μάλιστα για πρώτη φορά στο σχηματισμό ευδιάκριτων σωματικών εμβρύων. Ακολουθούν οι επιτυχίες των Vasil & Hildebrandt, οι οποίοι εφαρμόζοντας κλωνική αναπαραγωγή με την καλλιέργεια *in vitro* απομονωμένων κυττάρων, πέτυχαν την αναγέννηση φυτών του υβριδίου *Nicotiana glutinosa x N.tabacum* (Vasil and Hildebrandt, 1965).

1.2 Υλικά και συνθήκες Ιστοκαλλιέργειας

Τα υλικά που απαιτούνται για την εφαρμογή της ιστοκαλλιέργειας αναλύονται ως εξής (George, 1993):

1.2.1 Επιλογή του κατάλληλου τμήματος φυτού

- **Τμήματα με οργανωμένη ανάπτυξη.** Περιλαμβάνονται οργανωμένα τμήματα φυτών ή όργανα, όπως ακραία μεριστώματα βλαστών, καταβολές φύλλων, κοτυληδόνες, μεσογονάτια διαστήματα, νεαροί οφθαλμοί και μικροί σπόροι ή καρποί. Τα τμήματα αυτά με την ιστοκαλλιέργεια αναπτύσσονται δίνοντας γένεση σε ολοκληρωμένα φυτά.

Καλλιέργεια σπόρων

Οι σπόροι αποτελούν τον ευκολότερο τρόπο να αρχίσει κανείς την καλλιέργεια ιστών. Από τους σπόρους, αναπτύσσονται πολλοί πλευρικοί και δευτερογενείς βλαστοί, οι οποίοι μπορούν να διαιρεθούν και να επανακαλλιεργηθούν στο ίδιο θρεπτικό υπόστρωμα. Επίσης από τον σπόρο, με την χρήση των κατάλληλων θρεπτικών διαλυμάτων, μπορεί να δημιουργηθεί κάλος, από τον οποίο αργότερα θα δημιουργηθούν σωματικά έμβρυα ή νέα φυτά.

Καλλιέργεια εμβρύων

Ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης του εμβρύου διακρίνουμε: την καλλιέργεια ώριμων εμβρύων, τα οποία απομακρύνονται από τους σπόρους με απλή αποκοπή και την καλλιέργεια ανώριμων εμβρύων, τα οποία χρησιμοποιούνται κυρίως σε περιπτώσεις, όπου η εξέλιξη του εμβρύου στον μητρικό ιστό δεν είναι ομαλή.

Καλλιέργεια βλαστικών κορυφών

Η καλλιέργεια ακραίων ή μασχαλαίων βλαστών μήκους 5-10mm, χρησιμοποιούνται με μεγάλη επιτυχία για τον πολλαπλασιασμό των φυτών. Είναι η κύρια και πιο αξιόπιστη μέθοδος πολλαπλασιασμού *in vitro* για τα ξυλώδη είδη. Τα τμήματα φυτών που χρησιμοποιούνται περισσότερο είναι: μοσχεύματα με ένα ή δύο γόνατα (μικρομοσχεύματα), κοιμώμενοι οφθαλμοί και βλαστικές κορυφές.

Τα μοσχεύματα με ένα ή δύο γόνατα, λαμβάνονται από νεαρούς βλαστούς, συνήθως στο τέλος της άνοιξης, όταν οι βλαστοί έχουν ταχεία ανάπτυξη, η επιδερμίδα δεν έχει ακόμη αποφελλωθεί και οι ιστοί είναι αρκετά ξυλοποιημένοι. Η χειμερινή περίοδος είναι τελείως ακατάλληλη για αυτόν τον τύπο μοσχεύματος γιατί η αποστείρωσή του είναι πολύ δύσκολη.

Οι κοιμώμενοι οφθαλμοί, λαμβάνονται από βλαστούς μεγάλης διαμέτρου, έτσι ώστε και οι οφθαλμοί να είναι μεγαλύτερης διαμέτρου.

Οι βλαστικές κορυφές λαμβάνονται μόνο κατά την διάρκεια της βλαστικής περιόδου, παίρνοντας πάντα μοσχεύματα με ενεργό αύξηση. Το είδος αυτό μοσχευμάτων, επειδή είναι περισσότερο ευαίσθητο στα χημικά αποστειρωτικά, είναι απαραίτητο να μειωθεί η συγκέντρωση του αποστειρωτικού όπως επίσης και ο χρόνος που εκτίθεται σε αυτό.

Καλλιέργεια ακραίων μεριστωμάτων

Στην καλλιέργεια ακραίων μεριστωμάτων, παίρνουμε πολύ μικρά τμήματα βλαστών (μήκους 0,1-0,5mm και πλάτους 0,08-0,3mm), που αποτελούνται από το ακραίο μερίστωμα και 1-2 καταβολές φύλλων.

Καλλιέργεια ανθικών μεριστωμάτων

Χρησιμοποιούμε μεριστώματα που σε κανονικές συνθήκες θα έδιναν άνθη ή ανθικά τμήματα. Επιτυχία έχουν οι νέες ανθοταξίες, όπου η διαφοροποίηση του μεριστώματος δεν έχει ολοκληρωθεί.

Καλλιέργεια ριζών

Κατάλληλα έκφυτα είναι τα μικρά τμήματα αμόλυντων ριζών, τα οποία φέρουν μεριστώματα κύριας ή δευτερεύουσας ρίζας. Η καλλιέργεια των ριζών χρησιμοποιείται για την μελέτη των μορφολογικών και φυσιολογικών ιδιοτήτων των φυτών, όπως τον τρόπο συμβίωσης των φυτών με τα αζωτοβακτήρια, τον τρόπο προσβολής των ριζών από νηματώδεις και την επιλογή ανθεκτικών φυτών στους νηματώδεις.

- Τμήματα με μη οργανωμένη ανάπτυξη. Εδώ, τα εξειδικευμένα κύτταρα είναι περιορισμένα, δεν διαθέτουν κάποια εμφανή δομή, είναι παντός τύπου μεμονωμένα φυτικά κύτταρα όπως, κύτταρα μεσόφυλλου, εντεριώνη, παρεγχυματικά κύτταρα, πρωτοπλάστες, γυρεόκκοκοι ή ωάρια, ανθήρες, καλλιέργεια ανθήρων, στύλου, κάλου.

Καλλιέργεια κυττάρων

Η καλλιέργεια απλών κυττάρων ή συσσωματωμάτων κυττάρων, συνήθως αρχίζει με την μεταφορά εύθραυστου κάλου σε ένα υγρό θρεπτικό υπόστρωμα. Από τέτοιες καλλιέργειες είναι δυνατόν να πάρουμε: κάλους, σωματικά έμβρυα, βλαστούς.

Καλλιέργεια πρωτοπλαστών

Με την καλλιέργεια πρωτοπλαστών, σχηματίζεται το κυτταρικό τοίχωμα και έπειτα, με την διαίρεση των κυττάρων, θα δημιουργηθεί ο κάλος, ο οποίος θα δώσει ένα ολοκληρωμένο φυτό.

Καλλιέργεια ανθήρων

Κάτω από ορισμένες συνθήκες καλλιέργειας, η μεταγραφή των γονιδίων που κατευθύνουν την γαμετοφυτική εξέλιξη, απενεργοποιείται και δραστηριοποιούνται τα γονίδια που κατευθύνουν την σποροφυτική εξέλιξη, με αποτέλεσμα, αντί να σχηματιστεί γύρη, να σχηματίζονται οργανωμένα προέμβρυα ή κάλος, από όπου αναπαράγονται ολοκληρωμένα φυτά.

Καλλιέργεια στύλου

Ο στύλος των ανθήρων αποτελεί μητρικό ιστό, είναι διπλοειδής και γενετικά όμοιος με το μητρικό φυτό. Με την καλλιέργειά του, αναπτύσσεται κάλος από τον οποίο μπορούν να προκύψουν σωματικά έμβρυα.

Καλλιέργεια κάλου

Με τον όρο «κάλος» εννοούμε μία άμορφη μάζα κυττάρων, τα οποία δεν εμφανίζουν καμία οργανωμένη δομή ιστού ή οργάνου. Σε συνθήκες *in vitro*, αποτελεί σύνθετο φαινόμενο και εξαρτάται από την σύνθεση του θρεπτικού διαλύματος και τον τύπο του εκφύτου. Από την καλλιέργεια κάλου μπορούμε να πάρουμε βλαστούς άμεσα ή έμμεσα, μέσω σχηματισμού σωματικών εμβρύων και αιωρήματα κυττάρων που θα μας δώσουν κάλο ή σωματικά έμβρυα. Με την μορφή κάλου είναι δυνατόν να διατηρηθούν φυτά για πολλά χρόνια.

1.2.2 Θρεπτικά διαλύματα

Ο σημαντικότερος παράγοντας ο οποίος ελέγχει την ανάπτυξη και τη μορφογένεση του εκφύτου, είναι η σύνθεση του θρεπτικού διαλύματος. Η επιτυχία της ιστοκαλλιέργειας ως τεχνική για τον μαζικό πολλαπλασιασμό των φυτών, εξαρτάται κατά πολύ από το υπόστρωμα που θα χρησιμοποιηθεί. Το κατάλληλο υπόστρωμα για κάθε καλλιέργεια μπορεί να διαφέρει μεταξύ ειδών, μεταξύ ποικιλιών του ίδιου είδους και ανάλογα του σταδίου ανάπτυξης στο οποίο βρίσκεται (Γρηγοριάδου, 2007). Αξίζει να σημειωθεί, ότι η χρήση θρεπτικών διαλυμάτων που δεν βρίσκονται στην άριστη σύνθεση, είναι δυνατόν να δημιουργήσουν φυσιολογικές ανωμαλίες στα έκφυτα ή να προκαλέσουν τον θάνατο των ιστών (Nas and Read, 2004).

Τα θρεπτικά υποστρώματα, προμηθεύουν τους φυτικούς ιστούς με τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία για την ανάπτυξή τους και αποτελούνται από έναν συγκεκριμένο συνδυασμό ανόργανων αλάτων και οργανικών ουσιών. Ένα θρεπτικό υπόστρωμα αποτελείται από (Auge et al., 1995):

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

Μικροστοιχεία, που χρησιμοποιούνται σε μικρότερες ποσότητες και είναι ο σίδηρος (Fe), το νάτριο (Na), το χλώριο (Cl), το μαγγάνιο (Mn), ο ψευδάργυρος (Zn), το βόριο (B), ο χαλκός (Cu), το μολυβδαίνιο (Mo) και το νικέλιο (Ni) και προστίθενται στο υπόστρωμα με τη μορφή αλάτων. Τα μικροστοιχεία παρεμβαίνουν στις μεταβολικές διεργασίες των φυτών και είναι υπεύθυνα για βασικές λειτουργίες των φυτικών οργανισμών.

Βιταμίνες, 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. Οι κυριότερες που προσθέτουμε στο θρεπτικό διάλυμα είναι η *μυοϊνοσιτόλη* (myo-isotinol), η *θειαμίνη* (thiamine), το *νικοτινικό οξύ* (nicotinic acid), η *πυριδοσίνη* (pyridoxine-HCL) και το *ασκορβικό οξύ* (ascorbic acid).

Ρυθμιστές ανάπτυξης, είναι οργανικές ενώσεις που ρυθμίζουν τις φυσιολογικές διεργασίες των φυτών, κατευθύνουν την ανάπτυξη των οργάνων και ελέγχουν την ανάπτυξη ολόκληρου του φυτού. Οι

σπουδαιότερες ενώσεις είναι οι *αυζίνες* (IBA, NAA, IAA, 2,4-D), που χρησιμοποιούνται για τη διαφοροποίηση επίκτητων ριζών, για τον σχηματισμό και την ανάπτυξη κάλου και για τη σωματική εμβρυογένεση. Οι *κυτοκινίνες* (BAP, 2-*ip*, Kinetin, ζεατίνη), που χρησιμοποιούνται για το σχηματισμό πλάγιων οφθαλμών, τη διαίρεση των κυττάρων και τη διαφοροποίηση επίκτητων βλαστών από κάλους και βλαστούς και οι *γιββεριλλίνες* (GA₃), που διεγείρουν την κανονική εξέλιξη των φυταρίων που προέρχονται από σωματικά έμβρυα παραγόμενα *in vitro*, προκαλούν την επιμήκυνση των μεσογονατίων διαστημάτων και την αύξηση των ακραίων οφθαλμών μετά την αποκοπή τους και τέλος ευνοούν τη χαλάρωση των κυττάρων.

Σάκχαρα, είναι πηγή άνθρακα, ενέργειας και έμμεσα ρυθμίζουν την οσμωτική πίεση (έως 3bar) των θρεπτικών στοιχείων στο υπόστρωμα. Οι πράσινοι ιστοί δεν φωτοσυνθέτουν σε ικανοποιητικό βαθμό εξαιτίας της έλλειψης CO₂ που δημιουργείται στο εσωτερικό των γυάλινων δοχείων και επομένως δεν είναι σε θέση να παράγουν τους υδατάνθρακες που είναι απαραίτητοι για την παραγωγή ενέργειας. Για τον λόγο αυτό οι υδατάνθρακες, προστίθενται στο υπόστρωμα καλλιέργειας υπό μορφή σακχάρων. Η πιο διαδεδομένη είναι η *σουκρόζη* (στα εμπορικά εργαστήρια μπορεί να χρησιμοποιηθεί και η κοινή ζάχαρη), η *γλυκόζη*, η *μαλτόζη* και η *ραφινόζη*.

Στερεοποιητικοί παράγοντες, με πιο διαδεδομένη ουσία στερεοποίησης το *άγαρ*, που είναι πολυσακχαρίτης υψηλού μοριακού βάρους που εξάγεται από φύκη της θάλασσας (seaweed του γένους *Gelidium*). Το άγαρ με το νερό σχηματίζει ζελατίνη, η οποία λιώνει στους 90-100°C και στερεοποιείται στους 45°C. Επίσης, δεν αντιδρά με τα συστατικά του θρεπτικού διαλύματος, δεν μεταβάλλει σε τίποτα την σύνθεσή του και η ζελατίνη δεν διασπάται από τα φυτικά ένζυμα. Το θρεπτικό διάλυμα μπορεί να είναι υγρό (για καλλιέργειες αιωρημάτων κυττάρων και για πειράματα θρέψης, ανάπτυξης και διαφοροποίησης κάλων) ή στερεό (για εγκατάσταση εκφύτων, για καλλιέργεια κάλων ή φυτικών οργάνων και για την μακροπρόθεσμη διατήρηση των καλλιεργειών).

1.2.3 Τεχνικές αποστείρωσης

Το πιο σημαντικό μέρος της *in vitro* καλλιέργειας, είναι η απολύμανση του φυτικού υλικού, η αποστείρωση των θρεπτικών διαλυμάτων και η διατήρηση των ασηπτικών συνθηκών μετά την εφαρμογή τους.

Δύο από τις πιο κοινές αιτίες μόλυνσης των καλλιεργειών είναι οι μυκήτες και τα βακτήρια. Τα σπόρια των μυκήτων είναι πολύ ελαφρά και βρίσκονται πάντα στο περιβάλλον. Όταν αυτά έρθουν σε επαφή με το θρεπτικό διάλυμα, δημιουργούνται άριστες συνθήκες ανάπτυξης και μολύνουν την καλλιέργεια. Για να έχουμε αμόλυντες καλλιέργειες πρέπει να προσέχουμε 5 βασικά σημεία:

1. Την αποστείρωση του θρεπτικού διαλύματος
2. Την απολύμανση του φυτικού υλικού
3. Την αποστείρωση των εργαλείων και σκευών που θα χρησιμοποιηθούν
4. Την αποστείρωση και τη διατήρηση αμόλυντων συνθηκών στον θάλαμο εμβολιασμού
5. Την τοποθέτηση του φυτικού υλικού στο θρεπτικό διάλυμα

Για την αποστείρωση του θρεπτικού διαλύματος, χρησιμοποιούνται κυρίως δύο μέθοδοι: ο κλιβανισμός (σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης) και το φιλτράρισμα μέσω μεμβρανών υπό πίεση. Γενικά, τα θρεπτικά διαλύματα αποστειρώνονται στον κλίβανο στους 120°C και πίεση 1,1atm για 20 λεπτά. Στο φιλτράρισμα, χρησιμοποιούνται φίλτρα αποτελούμενα από δύο μεμβράνες με πόρους μεγέθους 0,25μm, τα οποία δεν επιτρέπουν την είσοδο βακτηρίων ή άλλων μικροοργανισμών.

Για την απολύμανση του φυτικού υλικού, τα τμήματα πρέπει να είναι απαλλαγμένα από μικροοργανισμούς. Αρχικά, προετοιμάζουμε το μητρικό φυτό και το έκφυτο. Για τα οπωροφόρα φυτά, ιδανική περίπτωση είναι να έχουμε στην διάθεσή μας μητρικά φυτά, απαλλαγμένα από ιώσεις (ένα φυτό από κάθε ποικιλία είναι αρκετό), που διατηρούνται σε δικτυοκήπιο, το οποίο δεν επιτρέπει την είσοδο εντόμων. Συχνά, πρέπει να γίνεται φυτοϋγειονομικός έλεγχος. Σε ορισμένες περιπτώσεις είναι ανάγκη να κατεργαστούμε αυτά τα φυτά ή μέρος αυτών με ειδικές μεθόδους, ώστε να έχουμε αναβλάστηση. Έτσι, στην διάθεσή μας θα έχουμε ιστούς που αντιδρούν καλύτερα στην καλλιέργεια *in vitro*. Επίσης, με τις απολυμαντικές ουσίες, απολυμαίνεται μόνο η επιφάνεια του φυτού από μικροοργανισμούς και όχι από ιούς και διασυστηματικούς παθογόνους μικροοργανισμούς.

Έπειτα, ακολουθεί η απολύμανση του φυτικού υλικού, η οποία περιλαμβάνει τον ψεκασμό του μητρικού φυτού με μυκητοκτόνο ή εντομοκτόνο, προκαταρκτική επεξεργασία του φυτικού υλικού,

καθαρισμός της επιφάνειας από νεκρούς ιστούς και εξωτερικούς μικροοργανισμούς. Μετά, ακολουθεί η κυρίως απολύμανση συνήθως με το υποχλωριώδες νάτριο (NaOCl) ή το υποχλωριώδες ασβέστιο (Ca(ClO)₂), απομάκρυνση του απολυμαντικού ξεπλένοντας τα φυτά με αποστειρωμένο νερό και τέλος διαίρεση του φυτικού υλικού και μεταφορά στο θρεπτικό διάλυμα.

Για την αποστείρωση των εργαλείων και σκευών, τα πλένουμε πρώτα με ένα κοινό απορρυπαντικό, τα ξεπλένουμε με απεσταγμένο νερό, τα καλύπτουμε με φύλλα αλουμινίου και τα τοποθετούμε στον κλίβανο υγρής αποστείρωσης.

Για την αποστείρωση του θαλάμου εμβολιασμού, στους μεγάλους θαλάμους χρησιμοποιούνται οι υπεριώδης ακτίνες και στους θαλάμους με ρεύμα αέρα οριζόντιας ροής ανοίγεται ο αέρας 15-30 λεπτά πριν την έναρξη των εργασιών και καθαρίζονται οι επιφάνειές του με 95% αλκοόλη.

Τέλος, όσον αφορά την τοποθέτηση του φυτικού υλικού στο θρεπτικό διάλυμα, προσέχουμε όλα τα εργαλεία και σκεύη που θα χρησιμοποιηθούν να είναι αποστειρωμένα πριν και κατά την διάρκεια των εργασιών. Τα νυστέρια, οι σπάτουλες και οι λαβίδες να εμβαπτίζονται σε αλκοόλη και να αποστειρώνονται με κάψιμο σε φλόγα (Δημάση-Θεριού, 1995) και τα άτομα που θα ασχοληθούν με τον εμβολιασμό να διατηρούν τις απαραίτητες προϋποθέσεις καθαριότητας και πάντα να καίγονται τα άκρα του δοχείου πάνω από την φλόγα και να σφραγίζεται αμέσως.

1.2.4 Συνθήκες καλλιέργειας στον θάλαμο ανάπτυξης

Όσον αφορά τις συνθήκες καλλιέργειας στον θάλαμο ανάπτυξης, το φως και η θερμοκρασία πρέπει να ρυθμίζονται κατάλληλα, έτσι ώστε να επιτρέπουν την άριστη ανάπτυξη των βλαστών σε όλη την διάρκεια του έτους, χωρίς να επηρεάζονται από τις κλιματικές αλλαγές των εποχών.

Σε τεχνητές συνθήκες καλλιέργειας *in vitro*, η φωτοσύνθεση μειώνεται στο ελάχιστο δυνατόν και τα φυτά χρησιμοποιούν το ζάχαρο του υποστρώματος ως πηγή άνθρακα. Για αυτό, το φως από τους λαμπτήρες φθορίου ψυχρού φωτισμού (2000-4000 Lux) που παρέχεται, χρησιμοποιείται μόνο για την μορφογενετική πορεία των φυτών.

Η πιο κατάλληλη φωτοπερίοδος είναι ίση με 16 ώρες ημέρας και 8 σκότους. Όσον αφορά την επίδραση της θερμοκρασίας του θαλάμου στην ανάπτυξη των φυτών, κυμαίνεται από 21° - 25°C την ημέρα και 18°

- 21°C την νύχτα (Γρηγοριάδου, 2007). Θερμοκρασίες μεταξύ 25° - 30°C ευνοούν την βλαστογένεση και σωματική εμβρυογένεση και μεταξύ 18° - 25°C ευνοούν την ριζογένεση. Η άριστη σχετική υγρασία σε έναν θάλαμο ανάπτυξης κυμαίνεται μεταξύ 50 - 70% (Γρηγοριάδου, 2007).

Γενικά όμως, θα πρέπει να γνωρίζουμε ότι η θερμοκρασία πρέπει να διατηρείται σταθερή κατά την διάρκεια της καλλιέργειας και να αποφεύγονται όσο είναι δυνατόν οι διακυμάνσεις.

Τέλος, οι απαιτήσεις σε φως και θερμοκρασία εξαρτώνται από το είδος που φυτού και τον τύπο της καλλιέργειας.

2. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΤΗΣ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Η καλλιέργεια *in vitro* εφαρμόζεται στις παρακάτω περιπτώσεις:

- Μικροπολλαπλασιασμός
- Εξυγίανση και παραγωγή άνοσου φυτικού υλικού
- Γενετική βελτίωση των φυτών
- Μελέτη φυσιολογικών φαινομένων και παραγωγή *in vitro* δευτερογενών μεταβολιτών.

2.1 ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ

Μικροπολλαπλασιασμός ονομάζεται η διαδικασία της μαζικής κλωνικής παραγωγής νέων φυτών χρησιμοποιώντας τεχνικές ιστοκαλλιέργειας (Γρηγοριάδου, 2007). Για τον σκοπό αυτόν χρησιμοποιούνται συνήθως:

- Καλλιέργειες μεριστωμάτων ή βλαστικών κορυφών
- Καλλιέργειες κάλων
- Η τεχνική της σωματικής εμβρυογένεσης
- Ο μικροεμβολιασμός

Η αξία του μικροπολλαπλασιασμού, αφορά την παραγωγή μεγάλου αριθμού φυτών, υγιών και απόλυτα όμοιων με το μητρικό. Δίνει τη δυνατότητα για τη διάθεση ανώτερης ποιότητας φυτών όταν υπάρχει ανάγκη για μεγάλες ποσότητες, σε περιορισμένη χρονική περίοδο. Ωστόσο, η παραγωγή των φυτών αυτών, δεν μπορεί να θεωρηθεί πετυχημένη, αν δεν υπάρχει ένα αποτελεσματικό πρωτόκολλο για κάθε είδος, που να εξασφαλίζει τον μεγαλύτερο δυνατό αριθμό φυτών ανώτερης ποιότητας, στον μικρότερο χρόνο με το μικρότερο δυνατό κόστος, γιατί ήδη το κόστος παραγωγής αυτής της μεθόδου είναι αρκετά υψηλό (Γρηγοριάδου, 2007).

Έτσι, τελευταία η έρευνα στον τομέα του μικροπολλαπλασιασμού στρέφεται κυρίως στην ανάπτυξη αποτελεσματικών πρωτοκόλλων παραγωγής και εγκλιματισμού, αλλά και στην αυτοματοποίηση των εργασιών με διάφορους τρόπους (Kitto, 1997).

Η καλλιέργεια ακραίων μεριστωμάτων ή βλαστικών κορυφών, κάλων και ο μικροεμβολιασμός, αναλύονται μέσα στην εργασία. Όσον αφορά την τεχνική της σωματικής εμβρυογένεσης αναλύεται παρακάτω.

Η μορφογένεση είναι ένα φαινόμενο κατά το οποίο παρατηρείται σχηματισμός αναγνωρίσιμων ιστών ως αποτέλεσμα της διαφοροποίησης των κυττάρων, μέσω των μεταβολικών και αναπτυξιακών διεργασιών που αυτά υφίστανται. Ειδικότερα, κατά τον *in vitro* αγενή

πολλαπλασιασμό, δύο κύριοι μηχανισμοί δρουν για τον σχηματισμό μεριστωμάτων και τη σταδιακή τους εξέλιξη σε ολόκληρα φυτά. Είναι εκείνοι που οδηγούν στην ανάπτυξη προϋπάρχοντων μασχαλιαίων μεριστωμάτων (οφθαλμών) και ενεργοποιούνται για τη δημιουργία πλάγιων βλαστών ή και διακλαδώσεων βλαστών και εκείνοι που δίνουν τη δυνατότητα για ανάπτυξη επίκτητων μη προϋπάρχοντων μεριστωμάτων με την μορφή εκβλαστημάτων, εμβρυόμορφων κατασκευών και σωματικών εμβρύων. Οι τελευταίοι, είναι και οι υπεύθυνοι για την αναγέννηση φυτών, είτε απ' ευθείας από το έκφυτο είτε μέσω της φάσης του κάλου.

Κατά την σωματική εμβρυογένεση, έχουμε την εμφάνιση διπολικών κατασκευών που φέρουν βλαστικά και ριζικά μεριστώματα πάνω στην μάζα των κυττάρων του κάλου. Οι κατασκευές αυτές ονομάζονται εμβρυοειδή και ακολουθούν στάδια ανάπτυξης ανάλογα με αυτά των ζυγωτικών εμβρύων (Μαυρομάτης, 1996).

2.1.1 Πλεονεκτήματα μικροπολλαπλασιασμού

Τα πλεονεκτήματα του μικροπολλαπλασιασμού μπορούν να συνοψιστούν στα παρακάτω (George, 1993; Ελευθερίου, 1994):

1. Η διαδικασία πραγματοποιείται κάτω από ασηπτικές συνθήκες που εξασφαλίζουν την παραγωγή υγιών φυταρίων.
2. Η μέθοδος μπορεί να δώσει, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, μεγάλο αριθμό φυτών ελεύθερων από ιώσεις.
3. Ο ρυθμός παραγωγής φυτών είναι μεγαλύτερος από κάθε άλλη μέθοδο αγενούς πολλαπλασιασμού. Με τις νέες τεχνικές καλλιέργειας που αναπτύσσονται και βελτιώνονται συνεχώς, είναι δυνατόν από έναν μεμονωμένο οφθαλμό, να παραχθούν 2,3-8,7 εκατομμύρια φυτάρια τον χρόνο.
4. Δίνεται η δυνατότητα εύκολης αναπαραγωγής φυτών σε κάποια είδη, που με άλλους τρόπους ήταν δύσκολη, ακόμα και αδύνατη.
5. Απαιτείται πολύ μικρός αριθμός φυτικού υλικού για τις αρχικές εγκαταστάσεις, γεγονός που διευκολύνει πολύ την διατήρηση των μητρικών φυτών, αφού απαιτείται πολύ λίγος χώρος για την συντήρησή τους.
6. Υπάρχει η δυνατότητα διατήρησης του αναπαραγόμενου φυτικού υλικού στο ψυγείο για αρκετό χρονικό διάστημα.
7. Δίνει τη δυνατότητα γρήγορης αναπαραγωγής νέων ή βελτιωμένων ποικιλιών ή υβριδίων που προέρχονται από βελτιωτικά προγράμματα και τη γρήγορη εισαγωγή τους στην παραγωγική διαδικασία.

8. Μείωση του χώρου που απαιτείται για το πολλαπλασιαστικό υλικό (Θερίος και Δημάση-Θερίου, 2006). Έχει υπολογιστεί ότι σε 1m², μπορούν να παραχθούν έως και 25.000 φυτά.

2.1.2 Μειονεκτήματα του μικροπολλαπλασιασμού

Τα μειονεκτήματα του μικροπολλαπλασιασμού μπορούν να συνοψιστούν στα ακόλουθα (George, 1993; Ελευθερίου, 1994):

1. Απαιτούνται εξειδικευμένες εγκαταστάσεις και προσωπικό για την επιτυχία της μεθόδου, άρα αυξάνεται και το κόστος παραγωγής.
2. Τα εργατικά αποτελούν το κύριο ποσοστό του κόστους παραγωγής. Σε χώρες με υψηλό κόστος εργατικών, αυτό αποτελεί το σημαντικότερο μειονέκτημα, που μερικές φορές μπορεί να καταστήσει τη μέθοδο οικονομικά ασύμφορη.
3. Υπάρχουν περιπτώσεις που στη διάρκεια της ιστοκαλλιέργειας τα φυτά μπορούν να αναπτύξουν ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά.
4. Τα φυτά που αναπτύσσονται σε συνθήκες ιστοκαλλιέργειας δεν είναι αυτότροφα, με αποτέλεσμα πολλά να αντιμετωπίζουν προβλήματα κατά τη διάρκεια του εγκλιματισμού τους (Γρηγοριάδου, 2007).
5. Η πιθανότητα παραγωγής γενετικά ανώμαλων φυτών μπορεί να αυξηθεί κάτω από ορισμένες συνθήκες (σωματοκλωνική παραλλακτικότητα).

2.1.3 Στάδια μικροπολλαπλασιασμού

Τα στάδια του μικροπολλαπλασιασμού, όπως έχουν περιγραφεί από τον Murashige (1974) είναι πέντε:

Στάδιο 0: Επιλογή μητρικών φυτών και προετοιμασία.

Το μητρικό φυτό από το οποίο θα ληφθούν τα έκφυτα πρέπει να επιλεγεί πολύ προσεκτικά, να διατηρείται σε περιβάλλον ιδανικό για την ανάπτυξή του και να βρίσκεται σε πολύ καλή υγιεινή κατάσταση. Επίσης, πρέπει να δοθεί σημασία στο είδος του εκφύτου που θέλουμε να καλλιεργήσουμε, ποιο μέρος του φυτού θα χρησιμοποιήσουμε και στην εποχή λήψης του. Σε περίπτωση που είναι επιθυμητό να αναπαραχθούν φυτά ελεύθερα ιώσεων, είναι απαραίτητο να πραγματοποιούνται διάφορα τεστ για την πιστοποίηση. Τα μητρικά φυτά θα πρέπει τότε να διατηρούνται σε εντομοστεγείς κλωβούς, για την αποφυγή προσβολών τους από έντομα ή ακάρεα που πιθανόν να μεταδίδουν ιώσεις.

Στάδιο I: Εγκατάσταση της ασηπτικής καλλιέργειας.

Αφού απολυμανθούν τα έκφυτα, τοποθετούνται σε κατάλληλο δοχείο, με το κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα. Ακολουθεί η τοποθέτηση των δοχείων στον θάλαμο ανάπτυξης, με ρυθμιζόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και φωτισμού. Στόχος, είναι η επιτυχής εγκατάσταση του φυτικού υλικού, κάτω από ασηπτικές συνθήκες και η έναρξη της διαδικασίας ανάπτυξής του. Το στάδιο αυτό διαρκεί περίπου 3-6 εβδομάδες, όπου στο διάστημα αυτό το μικρομόσχευμα, αυξάνεται σε μέγεθος, αποκτά φυλλώδη μορφή και αναπτύσσει συνήθως πλάγιους βλαστούς.

Στάδιο II: Βλαστικός πολλαπλασιασμός.

Το φυτικό υλικό που εγκαταστάθηκε με επιτυχία, μεταφέρεται σε νέο θρεπτικό υπόστρωμα, με κατάλληλες ποσότητες ρυθμιστών ανάπτυξης, που ελέγχουν τον ρυθμό παραγωγής νέων μικροβλαστών. Οι νέοι μικροβλαστοί που σχηματίζονται, διαχωρίζονται σε μικρομοσχεύματα και επανακαλλιεργούνται. Έτσι αυξάνεται ο αριθμός του φυτικού υλικού.

Στάδιο III: Ριζοβολία μικροβλαστών.

Οι μικροβλαστοί που σχηματίστηκαν, τοποθετούνται σε νέο θρεπτικό υπόστρωμα πλούσιο σε αυξίνες (IBA, NAA, IAA), για τον σχηματισμό ριζιδίων. Στην περίπτωση που η ριζοβολία δεν είναι ικανοποιητική, μπορεί να γίνει μεταφορά των βλαστών σε εδαφικό υπόστρωμα στο θερμοκήπιο, με σκοπό την ριζοβολία *in vivo*. Έτσι, επιλέγονται βλαστοί που έχουν αρκετά ανεπτυγμένο στέλεχος και φύλλα και κατεργάζονται με αυξίνες (είτε με εμβάπτιση σε διάλυμα ή σε σκόνη ορμόνης, είτε με προσθήκη της ορμόνης στο έδαφος). Το στάδιο αυτό διαρκεί 10-20 ημέρες και μπορεί να επηρεαστεί από την θερμοκρασία και από την ένταση φωτός στους θαλάμους ανάπτυξης. Τα ξυλώδη φυτά απαιτούν μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αυξινών από τα ποώδη.

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

Είναι η σταδιακή μετάβαση των φυταρίων από συνθήκες *in vitro* σε πραγματικές συνθήκες και αυτό το στάδιο διαρκεί 30-40 ημέρες. Στην αρχή, μεταφυτεύονται το καθένα ξεχωριστά σε γλαστράκια στο θερμοκήπιο με σχετική υγρασία μεγαλύτερη από 90% (υδρονέφωση), με χαμηλό φωτισμό (κουρτίνες σκίασης) και προοδευτικά η υγρασία μειώνεται και περνούν σε κανονικές συνθήκες. Πολύ σημαντικό σε αυτό το στάδιο, είναι να μην αφυδατωθούν τα φυτά. Τα φυτά παραμένουν σε ειδικές συνθήκες για 20 ημέρες περίπου, μετά είναι ικανά να επιβιώσουν σε συνθήκες θερμοκηπίου και τελικά μεταφέρονται σε εξωτερικό χώρο.

Ο εγκλιματισμός των φυτών είναι ίσως το δυσκολότερο στάδιο, γιατί τα φυτάρια από ετερότροφα και από ιδανικές θρεπτικές συνθήκες, θα πρέπει σταδιακά να επιβιώσουν σε κανονικές συνθήκες.

2.1.4 Πολλαπλασιασμός εκφύτων σε συνθήκες *in vitro*

Ένα πλεονέκτημα του μικροπολλαπλασιασμού είναι η ταχύτητα με την οποία πολλαπλασιάζονται τα έκφυτα σε συνθήκες *in vitro*. Μόλις εγκατασταθεί το έκφυτο στο νέο του περιβάλλον, διεγείρεται ο σχηματισμός νέων βλαστών. Ο πολλαπλασιασμός, μέσω του σχηματισμού μασχαλιαίων ή και επίκτητων βλαστών, έχει ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη μεγάλου αριθμού φυταρίων, σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα. Η ικανότητα των εκφύτων να πολλαπλασιάζονται, καθορίζεται από τον γενότυπο του φυτού, τον τύπο του εκφύτου και την ηλικία του μητρικού φυτού ή του μοσχεύματος από το οποίο θα πάρουμε το έκφυτο. Μόλις εμφανίσουν τα έκφυτα έντονη κυτταροδιαίρεση και ταχεία ανάπτυξη, πρέπει να μεταφερθούν σε νέο υπόστρωμα. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται *επανακαλλιέργεια*. Η διαδικασία της «μεταφύτευσης» ενός εκφύτου γίνεται στην τράπεζα νηματικής ροής, χρησιμοποιώντας αποστειρωμένα εργαλεία, κάθε 18-20 ημέρες. Οι βλαστοί διαχωρίζονται, διαιρούνται και μεταφέρονται σε νέο θρεπτικό υπόστρωμα. Η διαδικασία μεταφοράς από ένα δοχείο καλλιέργειας σε νέο υπόστρωμα, χρειάζεται πολύ προσοχή, γιατί πολύ εύκολα μπορεί να μολυνθεί κάποιο έκφυτο. Για να μειωθεί ο κίνδυνος μόλυνσης, είναι απαραίτητο να αποστειρώνονται τα εργαλεία σε κάθε μεταφορά και να καίγεται ο λαιμός του δοχείου πριν από την εξαγωγή του φυτού. Επίσης δεν επιτρέπεται η μεταφορά στο ίδιο δοχείο, εκφύτων από διαφορετικά δοχεία.

2.1.5 Προβλήματα στον μικροπολλαπλασιασμό

Κατά την διάρκεια της φάσης του μικροπολλαπλασιασμού, συχνά συναντώνται ορισμένα προβλήματα, τα οποία πρέπει να επιλυθούν, αν θέλουμε να έχουμε επιτυχία στην καλλιέργεια. Τα πιο συνήθη είναι τα παρακάτω (Μερτζάκης, 2005):

I. Μολύνσεις

Το βασικό πλεονέκτημα της ιστοκαλλιέργειας, όπως έχει ήδη αναφερθεί, είναι η δημιουργία αμόλυντων φυτών. Όμως, είναι πολύ συχνό φαινόμενο, η εμφάνιση μολύνσεων σε διάφορα στάδια κατά την διάρκεια μιας καλλιέργειας, όπως:

1. Κατά την απολύμανση του έκφυτου. Με την απολύμανση καταστρέφονται μόνο έντομα και μικροοργανισμοί που βρίσκονται στην επιφάνειά του, άρα είναι δυνατόν να επιζήσουν κάποιοι μικροοργανισμοί που βρίσκονται και κινούνται μέσα στο φυτό. Ορισμένοι τύποι μικροβίων, είναι δυνατόν να παραμείνουν στην επιφάνεια του εκφύτου και μετά την απολύμανση, διατηρημένοι σε λανθάνουσα κατάσταση, για πολλές γενεές. Για τον έλεγχο τέτοιων καταστάσεων, μπορούν να προστεθούν αντιβιοτικά ή μυκητοκτόνα στο υπόστρωμα. Γενικά, η καλύτερη λύση είναι η διατήρηση αμόλυντων μητρικών φυτών στο εργαστήριο.

2. Κατά την επανακαλλιέργεια ήδη μολυσμένων φυτών. Υπάρχει πιθανότητα τα έκφυτα να διατηρούν κάποιο μολυσματικό οργανισμό σε λανθάνουσα κατάσταση και τα οποία δεν έχουν εκδηλώσει κάποια ασθένεια. Κατά την επανακαλλιέργεια, πρέπει να μεταφέρουμε καλλιέργειες που να είμαστε απόλυτα σίγουροι ότι είναι αμόλυντες.

3. Κατά την διάρκεια των εργασιών στην τράπεζα νηματικής ροής. Είναι ο συνηθέστερος τρόπος μεταφοράς μολυσματικών οργανισμών στα έκφυτα, γι' αυτό θα πρέπει να τηρούνται αυστηρά τα μέτρα που υπάρχουν για την χρήση της τράπεζας νηματικής ροής. Οι μολύνσεις από τους μύκητες όταν αναπτυχθούν, είναι ορατές με γυμνό μάτι. Οι μολύνσεις από βακτήρια όμως είναι δυσκολότερο να διαπιστωθούν γιατί σε ορισμένα φυτικά είδη, παραμένουν στον φυτικό ιστό σε λανθάνουσα κατάσταση για καιρό, μέχρι κάποιος περιβαλλοντολογικός παράγοντας (αλλαγή στην σύνθεση υποστρώματος, θερμοκρασίας) να προκαλέσει την ανάπτυξή τους. Οι αιτίες των μολύνσεων, τα συμπτώματα και η αντιμετώπισή τους, αναλύονται στο πειραματικό μέρος της εργασίας.

Για να έχουμε λοιπόν επιτυχία στις καλλιέργειες θα πρέπει να δώσουμε προσοχή στα παρακάτω:

- Τα μητρικά φυτά πρέπει να είναι απαλλαγμένα από διασυστηματικούς μικροοργανισμούς.
- Το υπόστρωμα της καλλιέργειας θα πρέπει να είναι αποστειρωμένο και απαλλαγμένο από μικροοργανισμούς.
- Το έκφυτο, είτε πρόκειται περί ακραίου μεριστώματος είτε περί βλαστού, πρέπει να απολυμανθεί προτού τοποθετηθεί στο υπόστρωμα.
- Η μεταφορά των εκφύτων από το ένα δοχείο στο άλλο, να γίνεται μέσα στην τράπεζα νηματικής ροής, χρησιμοποιώντας πάντα αποστειρωμένα εργαλεία.
- Οι μολυσμένες καλλιέργειες πρέπει να απομακρύνονται το γρηγορότερο δυνατόν και να καταστρέφονται.

II. Αδυναμία Αναγέννησης

Ένα χαρακτηριστικό των φυτών είναι ότι ένα τμήμα του ιστού τους, μπορεί να δημιουργήσει *in vitro* νέους βλαστούς ή έμβρυα. Για να έχει επιτυχία όμως ο μικροπολλαπλασιασμός, το έκφυτο που θα τοποθετηθεί σε συνθήκες *in vitro*, πρέπει να προσαρμοστεί στις νέες τεχνητές συνθήκες και να αρχίσει να πολλαπλασιάζεται σε σύντομο χρονικό διάστημα. Το φαινόμενο αυτό της δημιουργίας νέων βλαστών επιτυγχάνεται, μόνο όταν το έκφυτο ενεργοποιήσει τον μηχανισμό αναγέννησης, ο οποίος περιλαμβάνει την διακοπή της κυριαρχίας της κορυφής και μια ολόκληρη σειρά φυσιολογικών, μορφολογικών και βιοχημικών τροποποιήσεων.

Η αναγέννηση των φυτών εξαρτάται από ενδογενείς παράγοντες (γενετική σύνθεση φυτού και είδος εκφύτου) και εξωγενείς παράγοντες (φύση και σύνθεση θρεπτικού υποστρώματος, θερμοκρασία και φωτισμός του θαλάμου ανάπτυξης και το μικροκλίμα μέσα στα δοχεία καλλιέργειας).

Αν το έκφυτο παραμένει κοιμώμενο για αρκετές επανακαλλιέργειες, μπορούμε να επιταχύνουμε τον χρόνο αντίδρασης, εφαρμόζοντας τα παρακάτω:

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

Στα μητρικά φυτά, μπορούμε να βοηθήσουμε το πρόβλημα της αναγέννησης με επαναλαμβανόμενο ψεκασμό με BAP (50 mg/l), 5-6 φορές την εβδομάδα και αφαίρεση των πιο ηλικιωμένων οργάνων, για τη δημιουργία νέας βλάστησης.

Επίσης πειράματα έδειξαν, ότι η χρήση του θειαζουρόν (TDZ), αυξάνει την ικανότητα αναγέννησης ορισμένων φυτών (Shan et al., 2000).

III. Υπερυδάτωση (Υάλωση)

Πρόκειται για μια φυσιολογική ανωμαλία. Παρατηρείται συχνότερα σε καλλιέργειες του φυτικού υλικού σε υδαρές υπόστρωμα (Δημάση-Θεριού, 1995). Το φαινόμενο αυτό, το οποίο συχνά ακολουθείται από νέκρωση της κορυφής, έχει ως αποτέλεσμα την νέκρωση του φυτικού υλικού και μπορεί να προκαλέσει μια απώλεια της τάξεως του 20-50%. Οι βλαστοί που έχουν υποστεί υάλωση, αναγνωρίζονται από τα φύλλα, τα οποία έχουν διάφανη όψη, είναι παχύτερα, υδαρή, κατσαρωμένα και σπάζουν με μεγάλη ευκολία και οι βλαστοί γίνονται υπερτροφικοί.

Οι παράγοντες οι οποίοι συμβάλλουν στην εκδήλωση αυτού του φαινομένου είναι ο γενότυπος, η σύνθεση του υποστρώματος, ο τύπος και η συγκέντρωση του άγαρ, η μεταχείριση των νεαρών βλαστών και οι

συνθήκες του περιβάλλοντος, συμπεριλαμβανομένης της συγκέντρωσης μεθυλενίου στο δοχείο καλλιέργειας.

Περιορισμός της υάλωσης μπορεί να επιτευχθεί με την συνεχή μεταφορά σε νέο υπόστρωμα (επανακαλλιέργεια) το οποίο στερείται κυτοκίνινης και έχει προστεθεί πηκτίνη. Επίσης, επειδή το περιεχόμενο του διαλύματος σε ανόργανα άλατα παίζει σημαντικό ρόλο, μπορούμε να μειώσουμε την αναλογία των μακροστοιχείων. Ο τύπος του δοχείου και πιο συγκεκριμένα του πόματός του, φαίνεται να παίζει ρόλο στην εκδήλωση του φαινομένου (η συγκέντρωση αιθυλενίου στο εσωτερικό του δοχείου επιτείνει την υάλωση). Άρα το δοχείο δεν πρέπει να κλείνει αεροστεγώς, ώστε να επιτρέπεται η ανταλλαγή αερίων μεταξύ του εσωτερικού και του εξωτερικού χώρου (Paoli et al., 1994).

Σε μερικές περιπτώσεις η προσθήκη ενεργού άνθρακα σε δόση 100-500 mg/l μειώνει το ποσοστό της υάλωσης, ίσως επειδή ο ενεργός άνθρακας απορροφά ορισμένες τοξικές ουσίες, οι οποίες συγκεντρώνονται μέσα στο δοχείο καλλιέργειας. Ακόμη, η υποβολή των καλλιεργειών σε χαμηλή θερμοκρασία μπορεί να βελτιώσει την κατάσταση για τα έκφυτα οπωροφόρων.

Όλα τα παραπάνω θα πρέπει να αξιολογηθούν και να δοκιμασθούν πειραματικά, ακόμα και σε συνδυασμό μεταξύ τους, ώστε να βρεθεί κάποια λύση για κάθε είδος, σε αυτό το πολύπλοκο πρόβλημα το οποίο δυστυχώς, είναι ένα αρκετά συχνό φαινόμενο κατά τον μικροπολλαπλασιασμό.

IV. Έκκριση φαινολών

Ορισμένες καλλιέργειες *in vitro* εκκρίνουν φαινολικές ουσίες (τανίνες ή υδροξυφαινόλες), οι οποίες κατά την εγκατάσταση του εκφύτου διαχέονται στο υπόστρωμα. Στην περίπτωση αυτή, η αύξηση του φυτικού ιστού παρεμποδίζεται και αρχίζει μια διαδικασία αποδιοργάνωσης.

Η παραγωγή φαινολών, είναι πιο εμφανής στα είδη εκείνα τα οποία περιέχουν τέτοιες ουσίες σε μεγάλο ποσοστό στην φύση (δενδρώδη και ποώδη φυτά). Επίσης, η χρονική περίοδος που λαμβάνονται τα έκφυτα φαίνεται να παίζει ρόλο.

Η μέθοδος που εφαρμόζεται περισσότερο είναι η επανακαλλιέργεια σε νέο υπόστρωμα, αμέσως μόλις γίνει αντιληπτή η έκκριση φαινολών 2-3 φορές κάθε μέρα, όμως μπορούμε να εφαρμόσουμε και προληπτικά μέτρα.

Αρχικά, θα πρέπει να φροντίσουμε να περιορίσουμε την συγκέντρωση των φαινολών, πλένοντας τους βλαστούς με αποστειρωμένο νερό επί μερικές ώρες, πριν από την καλλιέργειά τους *in vitro*. Η έναρξη της καλλιέργειας σε υγρό θρεπτικό διάλυμα, μπορεί να συμβάλλει σημαντικά στην επιτυχία της καλλιέργειας, γιατί έχει

μεγαλύτερη ικανότητα διάχυσης των φαινολικών ουσιών. Η προσθήκη στο υπόστρωμα ορισμένων ουσιών PVP (polyvinylpyrrolidone) που απορροφούν ή αδρανοποιούν τις πολυφαινόλες, βρίσκει ευρεία εφαρμογή. Επίσης, η προσθήκη ενεργού άνθρακα μπορεί να βελτιώσει την κατάσταση, μειώνοντας όμως τον ρυθμό πολλαπλασιασμού. Ακόμα ορισμένες αντιοξειδωτικές ουσίες (ασκορβικό οξύ, κιτρικό οξύ, μερκαπτοαιθανόλη), μπορούν να χρησιμοποιηθούν με καλά αποτελέσματα (Hartman and Kester, 1997; Πλαστήρα, 1990).

V. Νέκρωση της κορυφής

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

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

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

2.2 ΕΞΥΓΙΑΝΣΗ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΟΣΟΥ ΦΥΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

Η Ιστοκαλλιέργεια χρησιμοποιείται σε μεγάλη έκταση για την μελέτη βασικών και εφαρμοσμένων προβλημάτων στην βιολογία των φυτών. Είναι πολύ σπουδαία τεχνική, γιατί είναι δυνατόν να λύσει το πρόβλημα πολλαπλασιασμού ειδών που πολλαπλασιάζονται δύσκολα με συμβατικές μεθόδους και γιατί σε συνδυασμό με τη μέθοδο της θερμοθεραπείας, παράγει φυτά απαλλαγμένα από σοβαρές ιώσεις.

Το γενετικό υλικό των ιών αποτελείται κυρίως από DNA ή RNA, ουσία δηλαδή όμοια με εκείνη του γενετικού υλικού των φυτών. Οποιαδήποτε προσπάθεια λοιπόν καταπολέμησης των ιώσεων, δεν είναι δυνατόν να μην έχει επιπτώσεις στην ακεραιότητα των φυτικών κυττάρων. Η μόλυνση επιρρεπών φυτών από έναν ιό, έχει σαν αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό του ιού πρώτα στα κύτταρα στα οποία έχει εισέλθει. Ακολούθως, γίνεται η εξάπλωση του ιού με την μεταφορά του από κύτταρο σε κύτταρο, με αποτέλεσμα ο ιός να πολλαπλασιάζεται σε ιστούς που δεν είχαν αρχικά μολυνθεί.

Οι ιοί είναι ένα σημαντικό πρόβλημα στα φυτώρια και στους οπωρώνες. Μειώνουν δραματικά τις αποδόσεις των καλλιεργειών (μείωση ομοιογένειας και ανάπτυξης των φυτών), επιτείνουν τα προβλήματα ασυμφωνίας μεταξύ εμβολίου και υποκειμένου και για τους λόγους αυτούς, επιθυμία όλων είναι η παραγωγή άνοσου φυτικού υλικού.

Η ανθεκτικότητα του φυτού στην μόλυνση ορίζεται, ως η ικανότητα του φυτού να ελαττώσει δραστικά τον πολλαπλασιασμό του ιού και την εξάπλωσή του, αντίθετα με τα επιρρεπή φυτά και εξαρτάται από τα γονίδια του φυτού ξενιστή, το στέλεχος του ιού καθώς και τους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Ο προσδιορισμός και η ανίχνευση της προσβολής, μπορεί να γίνει με την ανοσοενζυμική μέθοδο «ELISA» ή με προσδιορισμό του ξένου DNA με την μέθοδο της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης «PCR».

Υπάρχουν τρεις κύριοι τρόποι ελέγχου προσβολής των φυτών από ιούς (Χατζόπουλος, 2001). Ο πρώτος τρόπος είναι η παραγωγή υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού ελεύθερου ιών, ο δεύτερος στοχεύει στην παρεμπόδιση της διασποράς των ιών από φυτό σε φυτό, συνήθως με την θανάτωση των φορέων που μεταδίδουν τους ιούς και ο τρίτος είναι η γενετική βελτίωση και ο πολλαπλασιασμός καλλιεργούμενων φυτών ανθεκτικών στους ιούς.

Παρακάτω θα ασχοληθούμε με τους τρόπους εξυγίανσης του φυτικού υλικού, με διάφορες μεθόδους, για την παραγωγή πολλαπλασιαστικού υλικού απαλλαγμένου από ιούς .

2.2.1 Ιστορική αναδρομή

Το 1968, ο Morel και ο Martin είπαν σχετικά με την αναγέννηση φυτών πατάτας ότι «Η πιο σημαντική συνεισφορά της ιστοκαλλιέργειας στην λύση αγρονομικών προβλημάτων, είναι σίγουρα η εφαρμογή διαδικασιών για την θεραπεία φυτών προσβεβλημένων από ιούς».

Οι μελέτες του Limasset και του Cornuet το 1949, για την διάδοση του ιού του μωσαϊκού του καπνού στα βλαστικά όργανα του φυτού, έδειξαν ότι ο βαθμός εξάπλωσης του ιού, μειώθηκε σταδιακά στα μεριστώματα, που από ότι φαινόταν ήταν ελεύθερα από τον ιό. Το 1968, ο Morel και ο Martin, κατάφεραν να θεραπεύσουν φυτά πατάτας που είχαν προσβληθεί από τους ιούς A και Y με μεριστωματική καλλιέργεια και ποσοστό επιτυχίας 85 - 95% (Morel and Martin, 1968). Από την άλλη μεριά οι ιοί X και S, ήταν πολύ δύσκολο να θεραπευτούν. Η θερμοθεραπεία από μόνη της δεν ήταν αποτελεσματική, όμως ο συνδυασμός της με την καλλιέργεια ακραίου μεριστώματος, θεράπευσε τα φυτά πατάτας από τους ιούς X και S σε ποσοστό 80%.

Αμέσως κάποια είδη αναγεννήθηκαν με αυτόν τον τρόπο όπως, φαγώσιμα φυτά (λυκίσκος, φράουλα), τροπικά είδη (μπανάνα, μανιόκο) και ανθοκομικά φυτά (φορσύθια, βιβούρνο). Στα ξυλώδη είδη η τεχνική αυτή ήταν πιο δύσκολη στην εφαρμογή της, όμως πλέον παράγονται κλώνοι ελεύθεροι ιών σε πολλά είδη (αμπέλι, αμύγδαλο, κέρασι, prunus).

2.2.2 Θερμοθεραπεία και καλλιέργεια ακραίου μεριστώματος

Η ωφελιμότητα της θερμοθεραπείας είναι γνωστή από το 1936 όταν ο Kunkel κατάφερε να εξυγιάνει δένδρα ροδακινιάς από τον ιό «Yellow peach virus». Αργότερα οι Posnette και Cropley το 1952, εφάρμοσαν με επιτυχία την θερμοθεραπεία σε φυτά φράουλας. Έως τότε αυτή η μέθοδος μας επέτρεπε την ίαση των φυτών, αλλά παρέμενε περιορισμένη και αυτό διότι μόνο το κομμάτι του φυτού που αναπτύχθηκε κατά την διάρκεια αυτής (και όχι ολόκληρο το φυτό) απαλλάχθηκε από τον ιό (Auge et al., 1995).

Τα ακραία μεριστώματα των φυτών, στο μεγαλύτερο μέρος των περιπτώσεων, παραμένουν άνοσα από διασυστηματικούς παρασιτικούς μικροοργανισμούς. Η ιδιόμορφη αυτή ιδιότητα των ακραίων μεριστωμάτων σε συνδυασμό με τις τεχνικές καλλιέργειας *in vitro*, επιτρέπει την εξυγίανση φυτικών ειδών (δενδρώδη και ποώδη). Σε ορισμένες πιο σπάνιες περιπτώσεις και μόνο η προσπάθεια να διεγείρουμε την ανάπτυξη επίκτητων βλαστών είναι μια εξυγίανση, αφού οι αναγεννημένοι ιστοί εμφανίζονται ελεύθεροι από ιολογικές προσβολές. Γι' αυτό το λόγο, καταφεύγουμε στην μέθοδο της

θερμοθεραπείας σε συνδυασμό με την καλλιέργεια ακραίου μεριστώματος.

Η θερμοθεραπεία έχει εφαρμοσθεί με επιτυχία σε όλες σχεδόν τις δενδροκομικές, λαχανοκομικές, και ανθοκομικές καλλιέργειες, με διαφορές που αναφέρονται στο ύψος της θερμοκρασίας του θερμοθαλάμου, στην διάρκεια της θερμοθεραπείας καθώς και στο μέγεθος της βλαστικής κορυφής που καλλιεργείται.

Η διάρκειά της μπορεί να ποικίλει από 10 ημέρες μέχρι και πάνω από 200 ημέρες (συνήθως 6-8 εβδομάδες), ανάλογα με το είδος, την αντοχή του φυτού και το είδος του ιού που πρόκειται να εξαλειφθεί. Το ύψος της εφαρμοζόμενης θερμοκρασίας, κυμαίνεται από 32-42°C (συνήθως 37°C). Βασική προϋπόθεση αντοχής στις υψηλές και παρατεταμένης διάρκειας θερμοκρασίες, εκτός από το είδος και την ποικιλία, έχει ο βαθμός σκληραγώγησης των φυτών, η καλή θρεπτική τους κατάσταση και το άριστο ριζικό τους σύστημα. Η αντοχή των φυτών σε υψηλές θερμοκρασίες έχει ορισμένα όρια, πέρα από τα οποία η θνησιμότητα αυξάνεται κατακόρυφα. Τα ξυλώδη φυτά, διαθέτουν μεγαλύτερη αντοχή στις υψηλές θερμοκρασίες και στην διάρκεια εφαρμογής τους, από ότι τα ποώδη.

Στη συνέχεια, κορυφές των βλαστών από τα φυτά αυτά παίρνονται υπό ασηπτικές συνθήκες, με την βοήθεια ειδικού στερεοσκοπίου (μέγεθος κορυφής περίπου 0,5-2,5mm). Έπειτα, το πολύ μικρό κορυφαίο μερίστωμα αυξάνει υπό ασηπτικές συνθήκες, πολλαπλασιάζεται, ριζοβολεί και μεταφυτεύεται στο θερμοκήπιο που προστατεύεται με ειδική σήτα, έτσι ώστε να μην μπορούν να μπουνε μέσα έντομα, ιδιαίτερα αφίδες. Έτσι, δημιουργούνται τα πρώτα μητρικά φυτά απαλλαγμένα από ιώσεις. Μετά, τα φυτά πολλαπλασιάζονται αγενώς με τις κλασικές μεθόδους πολλαπλασιασμού.

Η εξήγηση της επίδρασης της θερμότητας στην εξυγίανση των φυτών είναι, ότι υπό την επίδραση των υψηλών θερμοκρασιών του θερμοθαλάμου, η ταχύτητα πολλαπλασιασμού του ιού ελαττώνεται ή σταματά και αδυνατεί να παρακολουθήσει την αύξηση του βλαστού, που συμβαίνει κατά την διάρκεια υποβολής στις υψηλές θερμοκρασίες. Επομένως, απαραίτητη προϋπόθεση για να έχουν επίδραση ή καλύτερη αποτελεσματικότητα οι υψηλές θερμοκρασίες στην εξυγίανση, είναι το φυτό να δημιουργεί νέα βλάστηση. Εφόσον το φυτό, για διάφορους λόγους, αδυνατεί να παράγει νέα βλάστηση στην διάρκεια της θερμοθεραπείας, αυτή είναι λιγότερο ή καθόλου αποτελεσματική.

Ο συνδυασμός της θερμοθεραπείας με την καλλιέργεια κορυφαίου μεριστώματος, βελτιώνει κατά πολύ τα ποσοστά των υγιών φυτών που παράγονται. Στην πράξη, στα διάφορα προγράμματα παραγωγής υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού σε διάφορα φυτά, συνδυάζεται η θερμοθεραπεία με την καλλιέργεια του κορυφαίου μεριστώματος *in vitro*.

Ειδικότερα, τα φυτά που είναι μολυσμένα από ιούς και μυκοπλάσματα, εμφανίζονται υγιή μόνο στο τμήμα του ιστού στο ακρότατο σημείο της βλαστικής κορυφής. Η απουσία των ιών σε αυτούς τους μεριστωματικούς ιστούς οφείλεται (Maule, 1991; Leisner and Howell, 1993; Lucas and Gilbertson, 1994):

- Στο ότι δεν υπάρχουν αγγειακά συστήματα στην μεριστωματική ζώνη και το πέρασμα των ιών μέσω των πλασμοδεσμών είναι δύσκολο άρα αργό, ενώ η ταχύτητα αύξησης των μεριστωματικών ιστών είναι ταχύτερη από την κίνηση των ιών.
- Η ισχυρή μεταβολική δραστηριότητα των μεριστωματικών κυττάρων, δεν επιτρέπει την αναπαραγωγή των ιών.
- Η αυξημένη συγκέντρωση της ενδογενούς αυξίνης που βρίσκεται στην βλαστική κορυφή, μπορεί να εμποδίζει την κανονική ανάπτυξη των ιών.

Η επιτυχία της τεχνικής της καλλιέργειας των μεριστωμάτων εξαρτάται από τον γενότυπο, το υπόστρωμα της καλλιέργειας, τις συνθήκες του περιβάλλοντος στον θάλαμο ανάπτυξης και το μέγεθος του μεριστώματος.

Να σημειωθεί ότι καλλιέργεια *in vitro* με την χρήση βλαστικής κορυφής πολύ μικρού μεγέθους, η οποία έχει υποβληθεί σε θερμοθεραπεία, είναι δυνατόν να δώσει έκφυτα απαλλαγμένα από ιώσεις. Αυτό το ανέφεραν στις μελέτες τους ο Pennazio και ο Redolfi, όταν από φυτά πατάτας, παρέλαβαν την μικρότερη βλαστική κορυφή (0,12mm), πήραν τα λιγότερα ποσοστά μόλυνσης (52%) (Pennazio & Redolfi, 1974). Συνεπώς, όσο μικρότερη είναι η βλαστική κορυφή που παίρνουμε, τόσο αποτελεσματικότερη είναι η θεραπεία, αλλά ταυτόχρονα μειώνονται τα ποσοστά επιβίωσης των φυτών.

Για τον πολλαπλασιασμό των οπωροφόρων δένδρων, ως έκφυτα χρησιμοποιούνται κυρίως κορυφές από νεαρούς βλαστούς που αυξάνουν γρήγορα. Επίσης, χρησιμοποιούνται βλαστοί του παρελθόντος έτους, οι οποίοι τοποθετούνται σε ψυγείο επί έναν μήνα περίπου, για να διακοπεί ο λήθαργος των οφθαλμών τους. Οι βλαστοί στην συνέχεια, τοποθετούνται σε γυάλινο βάζο με νερό, οι πλάγιοι οφθαλμοί βλαστάνουν και οι κορυφές τους χρησιμοποιούνται ως έκφυτα.

Επειδή η αρχική εγκατάσταση είναι πολύ σπουδαία εργασία και ο κίνδυνος μόλυνσεων πολύ μεγάλος, καλό είναι τα φυτά ή οι βλαστοί να βρίσκονται σε κλειστό χώρο (θερμοκήπιο ή εργαστήριο). Επίσης, η εποχή λήψης των εκφύτων έχει μεγάλη σημασία για την πιθανή μόλυνσή τους. Η καλύτερη εποχή λήψης είναι ο χειμώνας, περίοδος κατά την οποία η ατμόσφαιρα φέρει το μικρότερο φορτίο μολύσματος (σπόρια μυκήτων, βακτήρια κ.α.), ενώ κατάλληλο υλικό έναρξης του πολλαπλασιασμού αποτελούν φύλλα ολόκληρα ή κομμένα σε λωρίδες, ιστοί από ωοθήκες ή σπερμοβλάστες, κ.α.

Μια άλλη τεχνική θερμοθεραπείας που χρησιμοποιείται σε ευρεία κλίμακα για βολβούς, ριζώματα και σπόρους, με σκοπό την απελευθέρωση των φυτών από ιούς, βακτήρια, νηματώδεις, μύκητες και έντομα είναι η κατεργασία με ζεστό νερό (Grondeau and Samson, 1994).

Το πλεονέκτημα της κατεργασίας με ζεστό νερό, είναι ότι μειώνει και τους ενδογενείς παθογόνους μικροοργανισμούς. Η αντίσταση που εμφανίζουν τα φυτά στην κατεργασία με το ζεστό νερό, εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την φυσιολογική τους κατάσταση (μέγεθος φυτού, το περιεχόμενο σε υγρασία, την ζωτικότητα του, την κατάσταση των εξωτερικών στρωμάτων, τις συνθήκες θερμοκρασίας κατά την διάρκεια της ανάπτυξής του, το επίπεδο λήθαργου, την ηλικία και την γενετική του σύσταση).

Μετά την κατεργασία με ζεστό νερό, ίσως είναι απαραίτητο τα έκφυτα να μην κλείνονται με παραφίλμ για την διευκόλυνση της ανταλλαγής αερίων με το εξωτερικό περιβάλλον. Οι πιθανές εξηγήσεις για την αντίδραση αυτή των φυτών είναι:

1. Κατά την διάρκεια και μετά την κατεργασία με ζεστό νερό ο μεταβολισμός των φυτών αυξάνεται, άρα έχουν μεγαλύτερες ανάγκες σε οξυγόνο.
2. Κατά την διάρκεια που τα φυτά είναι βυθισμένα στο νερό, βρίσκονται σε συνθήκες μερικής αναεροβίωσης. Η έλλειψη οξυγόνου πιθανόν να οδηγεί για παράδειγμα, στην παραγωγή ακεταλδεύδης και αιθανόλης. Αυτά τα αέρια προκαλούν εκφυλισμό των ιστών. Έτσι, ο θάνατος των εκφύτων στα ερμητικά κλειστά δοχεία πιθανόν να οφείλεται στην ασφυξία των ιστών εξαιτίας της συγκέντρωσης ακεταλδεύδης και αιθανόλης.
3. Οι ιστοί οι οποίοι υφίστανται την επίδραση μεγαλύτερων θερμοκρασιών, ίσως να έχουν δραστικότερη αντίδραση στις πληγές που δημιουργούνται με το κόψιμο των εκφύτων. Έτσι η παραγωγή πτητικών αερίων (π.χ. αιθυλένιο και αιθάνιο) που παράγονται με τις πληγές, πιθανόν να αυξάνεται και η υψηλή συγκέντρωση αυτών των αερίων μέσα στα δοχεία καλλιέργειας πιθανόν να είναι τοξική (George, 1993).

Η θερμοθεραπεία σε συνδυασμό με την κατεργασία με ζεστό νερό, μπορεί να εφαρμοστεί και σε φυτά που καλλιεργούνται ήδη *in vitro*. Έτσι, επιλέγονται φυτά σε *in vitro* καλλιέργεια, καλώς ριζοβολημένα, ζωνρά και με επαρκή βλάστηση και τοποθετούνται σε υδατόλουτρα, με θερμοκρασία νερού 35°C για 3 μήνες τουλάχιστον. Στο τέλος του χρόνου της θερμοθεραπείας, ακολουθεί η καλλιέργεια μικροκορυφής αρχικά ή μεριστώματος αργότερα, *in vitro*.

Σε πρόσφατα πειράματα, εφαρμόζονται τροποποιήσεις στις παραπάνω μεθοδολογίες, που προβλέπουν την επίδραση της θερμότητας σε *in vitro* καλλιέργεια, με μορφή ρεύματος αέρος. Πρέπει να αναφερθεί ότι η

επίδραση της θερμότητας για να είναι αποτελεσματική, πρέπει να είναι συνεχής, χωρίς διακοπές καθ' όλη τη διάρκεια της θερμοθεραπείας.

2.2.3 *In vitro* μικροεμβολιασμός

Ο μικροεμβολιασμός ξεκίνησε από τον Morel και τον Martin σε φυτά ντάλιας, όπου καλλιέργησαν *in vitro* μεριστώματα εμβολιασμένα σε ελεύθερα από ιώσεις υποκείμενα (Morel and Martin, 1952). Ο πρώτος επιτυχής μικροεμβολιασμός πραγματοποιήθηκε από τους Murashige et al. (1972).

Σκοπός αυτής της τεχνικής είναι η εξυγίανση των φυτών από ιούς, αξιοποιώντας το χαρακτηριστικό των ακραίων μεριστωμάτων. Είναι διαφορετικό από την καλλιέργεια ακραίου μεριστώματος γιατί ο μεριστωματικός ιστός, αφού αποκοπεί από το μόσχευμα, αντί να τοποθετηθεί απ' ευθείας στο υπόστρωμα, εμβολιάζεται σε ένα υποκείμενο απαλλαγμένο από ιούς το οποίο έχει καλλιεργηθεί *in vitro*.

Επίσης ο μικροεμβολιασμός χρησιμοποιείται, για την μελέτη της ασυμφωνίας μεταξύ υποκειμένου και εμβολίου ή ιστολογικών και φυσιολογικών προβλημάτων που σχετίζονται με τον εμβολιασμό (Vasilakakis, 1991) και για την διακίνηση φυτικού υλικού, από μια περιοχή που δεν υπάρχει κάποια ασθένεια σε κάποια άλλη με τον μικρότερο δυνατό κίνδυνο διάδοσης (Smith, 2002).

Τα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι τα παρακάτω:

- Επιτρέπει την καλλιέργεια ακραίων μεριστωμάτων, ακόμα και για τα φυτά εκείνα τα οποία υπό κανονικές συνθήκες δεν αναπτύσσονται όταν τοποθετηθούν απ' ευθείας στο υπόστρωμα.
- Αποκλείει την εμφάνιση γενετικών αποκλίσεων, οι οποίες οφείλονται στην άμεση επαφή μεριστωματικών ιστών με το θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας.
- Αυξάνει την ταχύτητα ανάπτυξης υγιών φυτών.

Οι παράγοντες που ευνοούν την επιτυχία του μικροεμβολιασμού είναι κυρίως η μέγιστη δυνατή συγγένεια μεταξύ του υποκειμένου και του εμβολίου και έπειτα, το υποκείμενο να έχει καλή βλαστικότητα και ταχεία ανάπτυξη στο υπόστρωμα καλλιέργειας, διογκωμένο ιστό και έντονη αύξηση, καθαρή επιφάνεια κοπής με ευδιάκριτο κάμβιο, ιστό ο οποίος δεν υφίσταται ταχεία οξειδωση και ιδανική ανάπτυξη του ριζικού συστήματος.

Η διαδικασία του εμβολιασμού γίνεται στην τράπεζα νηματικής ροής. Ως υποκείμενα, χρησιμοποιούνται σπορόφυτα που αναπτύσσονται σε *in vitro* συνθήκες και ως εμβόλια, χρησιμοποιούνται νεαροί βλαστοί δένδρων με επιθυμητό γενότυπο, που είτε λαμβάνονται από τον αγρό (και αποστειρώνονται) είτε από έκφυτα που αναπτύσσονται *in vitro*. Έπειτα,

κόπτεται από το φυτό-εμβόλιο το ακραίο μερίστωμα (0,2-0,4mm), με 2-3 καταβολές φύλλων και τοποθετείται αμέσως πάνω στο κομμένο υποκείμενο, με τέτοιο τρόπο ώστε να ενωθούν τα δυο κάμβια. Επίσης ως εμβόλιο, μπορεί να χρησιμοποιηθεί βλαστική κορυφή μεγαλύτερου μήκους και με περισσότερες καταβολές φύλλων και να τοποθετηθεί στο υποκείμενο, στο οποίο έχει χαραχθεί τομή ανεστραμμένου T. Εφόσον κολλήσει το εμβόλιο, χρειάζονται μόνο 60-70 ημέρες για την λήψη ενός πλήρους φυταρίου.

Ο μικροεμβολιασμός είναι γενικά μια τεχνική που απαιτεί πολύ χρόνο, εμπειρία και τα ποσοστά επιτυχίας συνήθως είναι πολύ μικρά για να εφαρμοστεί σε ευρεία κλίμακα.

2.2.3.1 Συνδυασμός του μικροεμβολιασμού με τον μικροπολλαπλασιασμό

Ο συνδυασμός του μικροεμβολιασμού με τον μικροπολλαπλασιασμό, μπορεί να μειώσει το κόστος και να προσφέρει τη δυνατότητα συνδυασμού της τεχνολογίας αυτής με τη γενετική μεταμόρφωση. Ενδιαφέρον παρουσιάζει η ανεύρεση νέων συνδυασμών εμβολίου-υποκειμένου για πρακτική εφαρμογή και η αξιοποίηση των πλούσιων φυτογενετικών πόρων της χώρας μας.

Με αυτό το συνδυασμό δίνεται η δυνατότητα μαζικής παραγωγής υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού προερχόμενο από βιοτεχνολογικές μεθόδους (*in vitro* παραγωγή πολλαπλασιαστικού υλικού). Τα πλεονεκτήματα της τεχνικής αυτής είναι (Νιάνιου, 2004):

- Παραγωγή φτηνών φυταρίων
- Φυτά ανθεκτικά στις ασθένειες και τις αντιξοότητες του εδάφους λόγω του εμβολιασμού τους σε ανθεκτικά υποκείμενα
- Υγιές φυτικό υλικό (απαλλαγή από ιώσεις μέσω θερμοθεραπείας, όταν αυτό απαιτείται)
- Δυνατότητα συνδυασμού της τεχνικής αυτής με την γενετική μεταμόρφωση, με αποτέλεσμα την παραγωγή φυτών με νέα επιθυμητά αγρονομικά χαρακτηριστικά.

2.2.4 Χημειοθεραπεία

Μια ακόμη μέθοδος, για να απαλλαγούν τα φυτά από τους ιούς ή έστω να αυξηθούν τα ποσοστά ανάρρωσης μολυσμένων φυτών, είναι η χημειοθεραπεία. Είναι δηλαδή, η εφαρμογή χημικών ουσιών (αντιικά φάρμακα) που καταστρέφουν ή εμποδίζουν την εξάπλωση των ιών. Είναι η χορήγηση διασυστηματικών ενδοθεραπευτικών μυκητοκτόνων ή

αντιβιοτικών από την ρίζα, τα φύλλα ή και με ενέσεις στον κορμό ή προσθήκη στο θρεπτικό υπόστρωμα (Τζαβέλλα-Κλωνάρη, 2003).

Τέτοιες ουσίες είναι η ribavirin (Virazole) ή acyclovir (Hartman and Kester, 1997), 2-thiouracil, acycloguanosine, cycloheximide, actinomycin D (www.molecular-plant-biotechnology.info).

Πειράματα έδειξαν ότι η χρησιμοποίηση της ribavirin σε συγκέντρωση 20mg l^{-1} , μείωσε τον ιό Grapevine Fanleaf Virus σε ποσοστό 94%, χωρίς να επηρεαστεί η ανάπτυξη του φυτού, η ριζοβολία και ο αριθμός των ριζών και δεν προκάλεσε χλώρωση, υπερυδάτωση ή νέκρωση της κορυφής (Weiland et al., 2004).

Η ribavirin σε συγκέντρωση $25\text{-}100\text{mg l}^{-1}$ ήταν αποτελεσματική στην εξάλειψη της Νεκρωτικής δακτυλιωτής κηλίδωσης (*Prunus necrotic ring spot virus*) της ποικιλίας «Empress» (*Prunus domestica L.*) (Miroslawa, 2007). Ο συνδυασμός της θερμοθεραπείας με την χημική ουσία ribavirin σε συγκεντρώσεις $50\text{-}100\text{mg l}^{-1}$ εξάλειψε τον Νανισμό της δαμασκηνιάς (*Prune dwarf virus*) από την ποικιλία «Early Rivers» (sweet cherry) (Miroslawa, 2007). Η ribavirin σε συγκέντρωση 40mg l^{-1} και 60mg l^{-1} , ήταν αποτελεσματική στην εξάλειψη της ίωσης Ευλογιά ή Σάρκα των πυρηνοκάρπων (*Plum Pox Virus*) από φυτά *Prunus domestica L.* cv «Cacansa Lepotica», σε ποσοστά 15,38% και 16,60% αντίστοιχα (Paunovic et al., 2007).

Επίσης, η χημειοθεραπεία μπορεί να εφαρμοστεί σε συνδυασμό με τον μικροεμβολιασμό. Όπως στην εργασία των Sanjeev et al., οι οποίοι χρησιμοποίησαν διάφορες χημικές ουσίες, για να εξαλείψουν τον ιό Indian Citrus Ringspot Virus (ICRSV) από φυτά «Kinnow» - ποικιλία μανταρινιάς (*Citrus nobilis Lour x C. deliciosa Tenora*), αφού πρώτα πήραν ακραία μεριστώματα μεγέθους 0,7mm τα οποία εμβολίασαν σε ανθεκτικό υποκείμενο λεμονιάς (*Citrus jambhiri*). Χρησιμοποίησαν 25mg l^{-1} ribavirin με 37% επιτυχία (εξάλειψη του ιού), 25mg l^{-1} 2-thiouracil με 21,4% επιτυχία και 25mg l^{-1} από την χημική ουσία acycloguanosine με 20,8% επιτυχία (Sanjeev et al., 2006).

2.3 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΦΥΤΩΝ

Ως εφαρμοσμένη μέθοδος της Βιοτεχνολογίας η ιστοκαλλιέργεια, αποτελεί χρήσιμο εργαλείο που από μόνο του ή και επικουρικά, βοηθά στη λύση συγκεκριμένων προβλημάτων της βελτίωσης των φυτών που είναι δύσκολο ή και αδύνατο να λυθούν με τη συμβατική μεθοδολογία. Πιο συγκεκριμένα η προσφορά της εντοπίζεται :

1. Στη βασική έρευνα, με τη μελέτη φυσιολογικών, βιοχημικών και μεταβολικών διεργασιών κατά την πορεία διαφοροποίησης (Μπεμπέλη, 1989), με παρατήρηση και την ιστολογική μελέτη της πορείας των κυτταρικών διαιρέσεων και του σχηματισμού των οργάνων. Έτσι γεννήθηκε η θεωρία των Miller & Skoog για τον έλεγχο της οργανογένεσης από τους φυτικούς ρυθμιστές της αύξησης (Gautheret, 1982).

2. Στην παραγωγή άνοσου πολλαπλασιαστικού υλικού με το μικροπολλαπλασιασμό, που χαρακτηρίζεται από την ταχύτητα και τη μεγάλου αριθμού παραγωγή ομοιόμορφων φυτών. Με τον τρόπο αυτό, εξασφαλίζεται ο πολλαπλασιασμός σπάνιων γενοτύπων που πολλαπλασιάζονται δύσκολα σε πολλά μάλιστα αντίγραφα με το μεγαλύτερο γενετικό κέρδος, διατηρώντας αναλλοίωτη τη δράση των αθροιστικών γονιδίων και την αλληλεπίδραση των μη αθροιστικών (Σκαλτσογιάννης, 1988). Βοηθά επίσης στην αναπαραγωγή βελτιωμένων γενοτύπων από σταυρογονιμοποιούμενα είδη χωρίς κινδύνους αλλαγής του γενετικού τους δυναμικού (Μπεμπέλη, 1989).

3. Στη διατήρηση και αποθήκευση γενετικού υλικού κάτω από *in vitro* συνθήκες για απεριόριστο θεωρητικά χρόνο. Σε συνδυασμό με συνθήκες και τεχνικές που επιβραδύνουν ή σταματούν τους ρυθμούς ανάπτυξης (cryopreservation technique), μπορεί να διατηρηθεί υλικό που περιλαμβάνει σπάνια είδη ή εξαιρετικούς γενότυπους, δημιουργώντας μια τράπεζα γενετικού υλικού άμεσα αξιοποιήσιμη (Μαυρομάτης, 1996).

4. Στο σωματικό υβριδισμό με τη συγχώνευση πρωτοπλαστών από διαφορετικά φυτικά είδη ή και γένη, με στόχο την απόκτηση σπάνιων αλλά επιθυμητών συνδυασμών. Το σύστημα βέβαια, προϋποθέτει την ύπαρξη ενός ικανού συστήματος απομόνωσης πρωτοπλαστών και τη δυνατότητα αναγέννησης ολόκληρων φυτών μετά από κυτταροκαλλιέργεια. Με τον τρόπο αυτό δίνονται απεριόριστες δυνατότητες, όπως :

- ο συνδυασμός ολόκληρων γενωμάτων από γονείς που είναι φυλετικά ασυμβίβαστοι (*Daucus carota x Aegopodium podagraria*, *Nicotiana tabacum x Petunia hybrida*, *S.tuberosum x L.esculentum*),

- η μεταφορά σε έναν πυρήνα μέρους μόνο του γενώματος από δύο είδη,
- ανταλλαγή οργανιδίων (μιτοχόνδρια, χλωροπλάστες), που οδηγεί σε νέα φαινόμενα όπως η κυτοπλασματική αρρενοστεριότητα και η αντοχή σε ζιζανιοκτόνα.

5. Στην παραγωγή απλοειδών φυτών. Η καλλιέργεια γαμετικών κυττάρων (μικροσπόρια, ωοκύτταρα) που φέρουν απλοειδή αριθμό χρωμοσώμων και εφ' όσον υπάρχει η δυνατότητα αναγέννησης, οδηγεί στην παραγωγή απλοειδών φυτών με άμεσες θετικές συνέπειες. Η χρησιμότητα των απλοειδών στη βελτίωση των φυτών είναι άμεση, τόσο για τη μελέτη και δημιουργία μεταλλάξεων και συνεπώς την παροχή χρήσιμης γενετικής παραλλακτικότητας, όσο και για την ταχεία παραγωγή πλήρως ομοζύγωτων καθαρών σειρών μετά από διπλασιασμό του αριθμού χρωμοσώμων των απλοειδών φυτών.

6. Στην *in vitro* αξιολόγηση γενοτύπων. Η αξιολόγηση γενοτύπων κάτω από κανονικές συνθήκες ή μετά την εφαρμογή συνθηκών καταπόνησης από βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες, είναι μια ακόμη εφαρμογή της ιστοκαλλιέργειας. Έτσι, σε μικρή επιφάνεια χώρου μπορούν να αξιολογηθούν μεγάλοι αριθμοί γενοτύπων, αφού βρέθηκε ότι υπάρχει θετική και υψηλή συσχέτιση μεταξύ των ρυθμών ανάπτυξης ενός φυτού *in vivo* και *in vitro*. Έτσι, μπορούμε να επιλέξουμε γενότυπους που αναπτύσσονται κάτω από συνθήκες υψηλής αλατότητας, αλκαλικότητας, χαμηλών και υψηλών θερμοκρασιών, παρουσία βαρέων μετάλλων και τοξικών ουσιών.

7. Στη μεταμόρφωση φυτικών κυττάρων με τη μεταφορά ξένου DNA. Η ύπαρξη ενός ικανού συστήματος αναγέννησης *in vitro*, μπορεί να υποστηρίξει επεμβάσεις στο γενετικό υλικό με τη μεταφορά "ξένων" γονιδίων, από ένα είδος σε κάποιο άλλο, μέσω της μεθόδου του *Agrobacterium tumefaciens*. Έχοντας έτσι, επιτυχή συστήματα απομόνωσης και ενσωμάτωσης του ξένου DNA στο Ti-πλασμίδιο του *Agrobacterium*, με δυνατότητα έκφρασης και αναπαραγωγής του ξένου DNA στο σώμα του ξενιστή, αυτό που απομένει είναι η υποστήριξη με ένα σύστημα ιστοκαλλιέργειας που θα δίνει τη δυνατότητα για μορφογένεση και αναγέννηση στο νεοδημιουργημένο γενότυπο.

9. Στη δημιουργία σπάνιων διειδικών συνδυασμών που προέρχονται από (α) *in vitro* καλλιέργεια σπερμοβλαστών ή ενδοωαριακή καλλιέργεια εμβρύων, (β) εμβρυοδιάσωση και (γ) *in vitro* γονιμοποίηση.

Με τις παραπάνω μεθόδους της ιστοκαλλιέργειας, μπορούν να δημιουργηθούν διειδικοί και διαγενικοί συνδυασμοί και να ξεπεραστούν έτσι εμπόδια ασυμβιβάστου υβριδιακού εκφυλισμού και ανεπάρκειας ενδοσπερμίου. Η πρώτη μέθοδος εφαρμόζεται, όταν το υβριδιακό έμβρυο αποβάλλεται σε πολύ πρώιμα στάδια μετά τη γονιμοποίηση και συνεπώς δύσκολα εντοπίζεται για να απομονωθεί, η δεύτερη κυρίως λόγω ανεπάρκειας ή εκφυλισμού του ενδοσπερμίου και η τρίτη για την

πρόκληση μιας πορείας γονιμοποίησης διαφορετικής από την *in situ* γνωστή πορεία, με την παροχή ιδανικών συνθηκών *in vitro* (Μαυρομάτης, 1996).

10. Στη δημιουργία χρήσιμης σωμακλωνικής παραλλακτικότητας. Είναι γνωστό ότι οι *in vitro* συνθήκες δημιουργούν καταστάσεις που οδηγούν στην εμφάνιση μεταλλαγμένων μορφών και ιδιαίτερα όταν στο σύστημα αναγέννησης μεσολαβεί η φάση του κάλου. Οι νεοδημιουργούμενες αυτές μορφές, μπορούν να αξιολογηθούν και να χρησιμοποιηθούν κατάλληλα στα διάφορα βελτιωτικά προγράμματα, αφού εμπλουτίζουν με ωφέλιμη σε πολλές περιπτώσεις παραλλακτικότητα, καλλιεργούμενα είδη με στενή γενετική βάση. Επίσης, παράγουν μεταλλαγμένες μορφές που ελέγχουν χρήσιμους αγρονομικά χαρακτήρες και που είναι αδύνατο να εμφανιστούν με τις συνήθεις κλασικές μεθόδους διασταυρώσεων και επιλογής.

2.4 ΜΕΛΕΤΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΦΑΙΝΟΜΕΝΩΝ ΚΑΙ ΠΑΡΑΓΩΓΗ *IN VITRO* ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΩΝ ΜΕΤΑΒΟΛΙΤΩΝ

Η καλλιέργεια κυττάρων και οργάνων, διευκολύνει την ανάλυση ορισμένων φυσιολογικών φαινομένων που παρατηρούνται στα φυτά και την μελέτη της παραγωγής και της λειτουργίας μεταβολιτών στα κύτταρα. Τα φυτά επιδεικνύουν ένα τεράστιο και πολύπλοκο φάσμα βιοχημικών και βιοσυνθετικών διεργασιών που οδηγεί σε μια ποικιλία μεταβολιτών (Χατζόπουλος, 2001). Τα όργανα των φυτών είναι μια εναλλακτική λύση στις κυτταροκαλλιέργειες, για την παραγωγή δευτερευόντων μεταβολιτών. Δύο τύποι οργάνων εξετάζονται γενικά για αυτόν τον σκοπό, οι καλλιέργειες ριζών και οι καλλιέργειες βλαστών. Για παράδειγμα, μπορούμε να μελετήσουμε τον μηχανισμό σύμφυσης των αζωτοβακτηρίων με τις ρίζες των ψυχανθών, καλλιεργώντας τα στο ίδιο δοχείο και να παρατηρήσουμε τον τρόπο με τον οποίο συνεργάζονται, όπως επίσης και να μελετήσουμε τις μεταβολές που υφίσταται το φυτό στο σημείο σύμφυσης.

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες, είναι μια μεγάλη ομάδα διαφόρων ανόμοιων χημικών ουσιών (χρωστικές, αρωματικές ουσίες, στεροειδή, αλκαλοειδή, φαινόλες, τανίνες και βιοενεργά χημικά παράγωγα). Η τεχνική συλλογής τέτοιων προϊόντων, βασίζεται στην εκχύλισή τους από τα ίδια τα φυτά. Η παραγωγή τους, βασίζεται στο γεγονός ότι τα ίδια αυτά προϊόντα που παράγονται σε κάποιο όργανο του φυτού, είναι δυνατόν να παραχθούν κάτω από κατάλληλες συνθήκες στα αδιαφοροποίητα φυτικά κύτταρα της κυτταροκαλλιέργειας. Έτσι μια καλλιέργεια *in vitro*, μπορεί να αποδώσει δευτερογενείς μεταβολίτες ελεγχόμενης χημικής σύστασης, ποιότητας και αξίας.

Τελευταία, γίνεται μεγάλη προσπάθεια για την βιοσύνθεση και απομόνωση φαρμάκων φυσικής προέλευσης από κυτταροκαλλιέργειες, όπως διάφορες αντικαρκινικές ενώσεις (ταξόλη από το φυτό *Taxus*).

Έτσι, η επιλογή και ο πολλαπλασιασμός αποτελεσματικών κυττάρων κάτω από *in vitro* συνθήκες, μπορεί να οδηγήσει στην δημιουργία «γυάλινων» μικρογραφιών εργοστασίων υψηλής παραγωγικότητας, με συγκεκριμένη κατεύθυνση που θα μπορούν να παράγουν φυσικά προϊόντα διαφόρων κλάσεων (Χατζόπουλος, 2001).

3. ΠΥΡΗΝΟΚΑΡΠΑ ΚΑΙ ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΙΑΣ ΣΤΟ ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΟ ΡΙ

3.1 Πυρηνόκαρπα

Τα πυρηνόκαρπα ανήκουν στη μεγάλη οικογένεια *Rosaceae* και υποοικογένεια *Prunoideae*. Όλα τα πυρηνόκαρπα τοποθετούνται σε διάφορα υπογένη του γένους *Prunus*. Η ροδακινιά και η αμυγδαλιά ανήκουν στο υπογένος *amygdalus*. Τα δύο αυτά είδη έχουν πολλά κοινά χαρακτηριστικά, συνδυάζονται τόσο στον εμβολιασμό όσο και στις διασταυρώσεις και δίνουν αξιόλογα υβρίδια (Σφακιωτάκης, 1987).

Καρποφορούν σε οφθαλμούς που δίνουν ένα ή και περισσότερα άνθη χωρίς φύλλα ή βλαστούς. Οι ανθοφόροι οφθαλμοί βρίσκονται στα πλάγια των βλαστών (πλαγιοκαρπία), ενώ ο ακραίος οφθαλμός είναι πάντα βλαστοφόρος. Ο καρπός των ειδών του γένους *Prunus*, είναι δρύπη. Ο όρος Πυρηνόκαρπα εκφράζει το γεγονός ότι το σπέρμα περιβάλλεται από σκληρό ενδοκάρπιο, τον πυρήνα, ο οποίος αναπτύσσεται από το εσωτερικό τμήμα του τοιχώματος της ωοθήκης (Μαγγανάρης, 2008).

Τα είδη των πυρηνοκάρπων έχουν ορισμένους κοινούς φυσιολογικούς χαρακτήρες. Τα άνθη, οι καρποί και μερικές φορές οι νεαροί βλαστοί προσβάλλονται από τον μύκητα Μονίλια ή Φαία Σήψη. Μεγάλος αριθμός ιών προσβάλλει ορισμένα είδη, με κυριότερη ίωση την Ευλογιά ή Σάρκα των Πυρηνοκάρπων (Plum Pox ή Sarka) και άλλες, όπως την Νεκρωτική Δακτυλιωτή Κηλίδωση των Πυρηνοκάρπων (*Prunus Necrotic Ringspot*), το Μωσαϊκό της Ροδακινιάς (*Peach Mosaic*) και τον Νανισμό της Δαμασκηνιάς (*Prune Dwarf*) (Παναγόπουλος, 1993).

Μεταξύ τους, υπάρχει δυνατότητα αμοιβαίου εμβολιασμού καθώς και δυνατότητα διασταύρωσης, αν και υπάρχουν σημαντικοί περιορισμοί, με αποτέλεσμα ακόμα και είδη που υπάγονται στο ίδιο υπογένος να μην μπορούν να εμβολιαστούν ούτε να επικονιαστούν μεταξύ τους (Μαγγανάρης, 2008).

Γενικά τα φυλλοβόλα οπωροφόρα από την πτώση των φύλλων τους (Οκτώβριος-Νοέμβριος) μέχρι την έκπτυξη των οφθαλμών (Μάρτιος), δέχονται μια περίοδο λήθαργου. Τα είδη αυτά για να διακόψουν τον λήθαργό τους και να είναι σε θέση να ανθίσουν και να βλαστήσουν την άνοιξη, πρέπει να υποστούν την επίδραση χαμηλών θερμοκρασιών του χειμώνα (Σφακιωτάκης, 1993).

3.2 Το υποκείμενο ροδακινιάς P1 (αμυγδαλοροδάκινο)

Οι ανάγκες για τη δημιουργία σύγχρονων οπωρώνων πυρηνοκάρπων επιβάλλουν τη χρησιμοποίηση υποκειμένων που να συνδυάζουν τους εξής κυρίως χαρακτήρες: αντοχή σε αντίξοες συνθήκες εδάφους (περίσσεια Ca, περίσσεια υγρασίας), αντοχή σε εχθρούς και ασθένειες (νηματώδεις, ξυλοφάγα, έντομα, μύκητες εδάφους, βακτήρια, ιώσεις), ευκολία στον πολλαπλασιασμό και καταλληλότητα για επαναφυτεύσεις οπωρώνων (Σφακιωτάκης, 1987).

Το νέο αξιόλογο υποκείμενο ροδακινιάς P1 (Ρούμπος1), αποτελεί φυσικό υβρίδιο μεταξύ αμυγδαλιάς και ροδακινιάς (*Prunus persica* x *Prunus amygdalus*), το οποίο εντοπίστηκε σε ιδιωτικό οπωρόνα. Πιο συγκεκριμένα, είναι διασταύρωση πικραμυγδαλιάς με την ποικιλία ροδακινιάς «Λεμονάτο Βόλου». Δίνει δένδρα πιο ζωηρά από τα σπορόφυτα ροδακινιάς και συνίσταται:

1. Σε εδάφη που η ροδακινιά παρουσιάζει χλώρωση σιδήρου λόγω αυξημένης παρουσίας CaCO_3 ,
2. Σε εδάφη μικρής γονιμότητας,
3. Εκεί όπου το νερό άρδευσης δεν επαρκεί,
4. Σε επαναφυτεύσεις εκριζωθέντων ροδακινιών (αντοχή στις ασθένειες επαναφύτευσης).

Παρουσιάζει ικανοποιητική ζωηρότητα και θεωρείται ως το πιο κατάλληλο υποκείμενο για ξηρά και ασβεστούχα εδάφη. Έχει πλούσιο ριζικό σύστημα, σχετικά υψηλή αντοχή στην ξηρασία του εδάφους, ικανοποιητικό επίπεδο ανθεκτικότητας στις χαμηλές θερμοκρασίες του εδάφους, ανθεκτικό και στα υγρά εδάφη.

Η εξαιρετική αντοχή του στο CaCO_3 , αποτέλεσε χαρακτηριστικό ιδιαίτερου ενδιαφέροντος και για αυτό το λόγο ελήφθησαν μοσχεύματα που ανέπτυξαν ριζικό σύστημα και εμβολιάστηκαν στους χώρους του ΑΤΕΙ Θεσσαλονίκης, με διάφορες ποικιλίες ροδακινιάς. Κατά την διάρκεια των δοκιμών αυτών δεν παρατηρήθηκαν προβλήματα ασυμφωνίας μεταξύ εμβολίου-υποκειμένου (Ρούμπος, 2009, προσωπική επικοινωνία).

Γενικά παρουσιάζεται μια τάση απόρριψης του εμβολίου με κάποιες από τις ποικιλίες ροδακινιάς και νεκταρινιάς σε ποσοστό 30-40%. Αυτό οφείλεται στους πλούσιους χυμούς του υποκειμένου κατά την διάρκεια εποχής εμβολιασμού (Αύγουστο-Σεπτέμβριο), με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η συγκόλληση του εμβολίου.

3.3 Εφαρμογή της Ιστοκαλλιέργειας στο υποκείμενο P1

Για τον πολλαπλασιασμό των υβριδίων ροδακινιάς-αμυγδαλιάς χρησιμοποιείται κυρίως η μέθοδος των μοσχευμάτων σκληρού ξύλου. Όμως τα αποτελέσματά της κατά καιρούς δεν υπήρξαν ενθαρρυντικά, γιατί εμφανίστηκαν προβλήματα κατά την ριζοβολία των μοσχευμάτων, συνεπώς αυτή η μέθοδος δεν ενδείκνυται για μαζική αναπαραγωγή (Ποντίκης, 1994). Με την χρήση ορμονών ριζοβολίας (IBA), το πρόβλημα αυτό έχει λυθεί σε ένα μικρό ποσοστό. Μεταξύ των διαφόρων ειδών και ποικιλιών υπάρχουν σημαντικές διαφορές σχετικά με την ικανότητα ριζοβολίας των μοσχευμάτων (Ποντίκης, 1994).

Για αυτό, ο κύριος πλέον τρόπος πολλαπλασιασμού τους είναι αυτός της ιστοκαλλιέργειας (Βασιλακάκης και Θεριός, 2001). Ένα μεγάλο ποσοστό διειδικών υβριδίων ροδακινιάς-αμυγδαλιάς προέρχεται από μικροπολλαπλασιασμό στα εργαστήρια ιστοκαλλιέργειας και διατίθεται στους φυτωριούχους συνήθως την περίοδο Απριλίου-Μαΐου σε μικρά σακουλάκια. Οι φυτωριούχοι τα μεταφυτεύουν στο φυτόριο σε σχετικά μικρές αποστάσεις γιατί το υποκείμενο αυτό είναι πολύ ζωηρό.

4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός αυτής της εργασίας, ήταν η επιτυχής *in vitro* καλλιέργεια και η επιτυχής εγκατάσταση του νέου αμυγδαλοροδάκινου P1. Επίσης να μελετηθούν οι διάφορες μέθοδοι απολύμανσης των εκφύτων σε διαφορετικές χρονικές περιόδους και να δημιουργηθεί υλικό βάσης, που στη συνέχεια θα χρησιμοποιηθεί για τη μάζική αναπαραγωγή του P1, με την μέθοδο της ιστοκαλλιέργειας.

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΤΟΥ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ

Η καλλιέργεια των εκφύτων έγινε σε θρεπτικό υπόστρωμα MS1. Για την παρασκευή του MS1 υποστρώματος, πρώτα παρασκευάστηκαν τα πυκνότερα διαλύματα (stock solutions). Ο Πίνακας 1, δείχνει τις ακριβείς αναλογίες που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή των stock διαλυμάτων, του κύριου θρεπτικού υποστρώματος Murashige and Skoog (1962).

Πίνακας 1: Σύνθεση stock διαλυμάτων του MS1 υποστρώματος.

Συστατικά	MS (mg/L)	Stock solution x 20 (100ml)
Μακροστοιχεία		
KNO ₃	1900	3,8g
NH ₄ NO ₃	1650	3,3g
KH ₂ PO ₄	170	0,34g
CaCL ₂ 2H ₂ O	440	0,88g
MgSO ₄ 7H ₂ O	370	0,74g
Μικροστοιχεία		Stock solution x 1000 (100ml)
MnSO ₄ 4H ₂ O	22,3	2,23g
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8,6	0,86g
H ₃ BO ₃	6,2	0,62g
KJ	0,83	0,083g
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,025	0,0025g
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,25	0,025g
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,025	0,0025g
Σίδηρος		Stock solution x 200 (100ml)
FeSO ₄ 7H ₂ O	27,8	0,556g
Na ₂ EDTA2H ₂ O	37,3	0,746g
Βιταμίνες		Stock solution x 200 (100ml)
Myo-isoinol	100	2g
Thiamine-HCL	0,1	0,002g
Nicotinic acid	0,5	0,01g
Pyridoxine-HCL	0,5	0,01g
Ρυθμιστές αύξησης		(100ml)
BA		0,01g
NAA		0,01g
GA ₃		0,01g

Γενικά η παρασκευή του MS1 περιλαμβάνει, την ανάμειξη των συστατικών, την ρύθμιση του pH, την διανομή του διαλύματος στα δοχεία καλλιέργειας, την αποστείρωση του υποστρώματος στον κλίβανο και τέλος την μεταφορά των εκφύτων στον θάλαμο ανάπτυξης.

Αρχικά, σε κωνική φιάλη των 1000ml, τοποθετήθηκε μαγνήτης με λίγο απεσταγμένο νερό, και ξεκίνησε η ανάδευση στον μαγνητικό αναδευτήρα. Έπειτα, προστέθηκαν τα στοιχεία που υπάρχουν στον Πίνακα 2, στις συγκεκριμένες ποσότητες, για την παρασκευή 1L υποστρώματος MS1:

Πίνακας 2: Παρασκευή υποστρώματος MS1.

ΣΤΟΙΧΕΙΑ	ΠΟΣΟΤΗΤΑ stock διαλ/τος (ml)
MS MACRO	50
MS MICRO	1
MS Fe	5
MS VIT	5
BA	7
NAA	0,1
GA ₃	1
SUCROSE	20gr
AGAR	6gr

Το διάλυμα κατά την προσθήκη των στοιχείων βρισκόταν υπό συνεχή ανάδευση. Μόλις τα στοιχεία διαλύθηκαν και πριν από την τοποθέτηση του άγαρ, ρυθμίστηκε η τιμή του pH στο 5.8, προσθέτοντας προσεκτικά σταγόνες KOH (1N). Το άγαρ προστέθηκε τελευταίο, γιατί ενώ δεν επηρεάζει την τιμή του pH, προκαλεί βλάβη στο πεχάμετρο. Έπειτα, σκεπάστηκε το υπόστρωμα με φύλλο αλουμινίου και ανοίχτηκε η θέρμανση στους 100°C για 30 περίπου λεπτά. Διακόπηκε η θέρμανση και η ανάδευση, λίγο πριν το σημείο βρασμού και μόλις το διάλυμα έγινε διαυγές. Στην συνέχεια, έγινε κατανομή του διαλύματος σε αποστειρωμένους δοκιμαστικούς σωλήνες, όπου σφραγίστηκαν με ειδικά καπάκια και το υπόστρωμα τοποθετήθηκε στον κλίβανο υγρής αποστείρωσης στους 120°C για 20 λεπτά.

Μετά την ολοκλήρωση της αποστείρωσης, οι δοκιμαστικοί σωλήνες παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου, ώστε να στερεοποιηθεί το υπόστρωμα και να είναι έτοιμο για την εγκατάσταση του φυτικού υλικού. Εξωτερικά στους δοκιμαστικούς σωλήνες, αναγράφηκε το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε και η ημερομηνία παρασκευής του.

2. ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Το φυτικό υλικό προέρχεται από ιδιωτικό οπωρώνα σε περιοχή της Θεσσαλονίκης, από δένδρο αμυγδαλοροδακινιάς. Στις 19 Ιουνίου 2008, ελήφθησαν για πρώτη φορά από το αμυγδαλοροδάκινο P1 νεαροί βλαστοί και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας και Ιστοκαλλιέργειας στο ΤΕΙ Θεσσαλονίκης, όπου τοποθετήθηκαν στο ψυγείο. Το ίδιο φυτικό υλικό χρησιμοποιήθηκε και για τις τρεις προσπάθειες εγκατάστασης *in vitro* του αμυγδαλοροδάκινου.

3. ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗ ΦΥΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΚΑΙ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ *IN VITRO*

3.1 Πρώτη εγκατάσταση της καλλιέργειας

Η πρώτη εγκατάσταση της καλλιέργειας πραγματοποιήθηκε στις 20 Ιουνίου 2008. Ελήφθησαν νεαροί βλαστοί αμυγδαλοροδάκινου, από τους οποίους αφαιρέθηκαν τα φύλλα (αφήνοντας περίπου 2cm του μίσχου τους) και κόπηκαν σε μικρομοσχεύματα (έκφυτα) με 2 γόνατα (Εικόνα 2β). Επειδή όμως γενικά στην εξωτερική επιφάνεια των φυτών υπάρχουν πολλοί μικροοργανισμοί, έπρεπε να προηγηθεί πριν την εγκατάσταση, η απολύμανσή τους.

Αρχικά, σε ένα ποτήρι ζέσεως που περιείχε 70% αλκοόλη, εμβάπτιστηκαν τα έκφυτα για 30 δευτερόλεπτα υπό συνεχή ανάδευση. Η εμβάπτιση των αποκομμένων φυτικών οργάνων στην αλκοόλη, αποσκοπούσε στην καλύτερη διαβροχή της επιφάνειας των βλαστών από το απολυμαντικό (Δημάση-Θεριού, 1995). Έπειτα, ξεπλύθηκαν με απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό για τρεις συνεχόμενες φορές.

Για την κυρίως απολύμανση χρησιμοποιήθηκε διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου (NaOCl-εμπορική χλωρίνη). Τα έκφυτα μεταφέρθηκαν στην τράπεζα νηματικής ροής όπου υπήρχαν τα αναγκαία αποστειρωμένα υλικά και σκεύη. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

1. Ογκομετρικοί κύλινδροι.
2. Κωνική φιάλη των 100ml.
3. Ποτήρια ζέσεως διαφορετικών όγκων.

Η κυρίως απολύμανση έγινε με υποχλωριώδες νάτριο 3% και ανάδευση για 20 λεπτά. Η ακριβής ποσότητα της χλωρίνης και του αποστειρωμένου νερού που ρίξαμε, υπολογίστηκε σύμφωνα με τον τύπο:

$$C_1 \times V_1 = C_2 \times V_2$$

Η περιεκτικότητα του εμπορικού σκευάσματος της χλωρίνης σε ιόντα χλωρίου (Cl⁻) ήταν 4,7%, η συγκέντρωση του NaOCl που θέλαμε

να παρασκευάσουμε για την αποστείρωση ήταν 3% και ο τελικός όγκος του διαλύματος ήταν 100ml, άρα αντικαθιστώντας τα στον αρχικό τύπο έχουμε:

$$4,7 \times V_1 = 3 \times 100 \leftrightarrow V_1 = 300 / 4,7 = 63,82\text{ml χλωρίνη και} \\ 36,18\text{ml αποστειρωμένο νερό}$$

Μετά την εκτίμηση της απαραίτητης ποσότητας, ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

1. Σε κωνική φιάλη των 100ml, τοποθετήθηκε ο μαγνήτης και ξεκίνησε η ανάδευση, αφού πρώτα αποστειρώθηκε με κάψιμο σε φλόγα.
2. Προστέθηκαν 63,82ml χλωρίνης, 36,18ml αποστειρωμένο νερό και λίγες σταγόνες απολυμαντικό-προσκολλητικό Tween[®]20, το οποίο αυξάνει την αποτελεσματικότητα της απολύμανσης.
3. Τοποθετήθηκαν τα έκφυτα στην κωνική φιάλη και ξεκίνησε η ανάδευση στον μαγνητικό αναδευτήρα, αφού πρώτα σκεπάστηκε με αποστειρωμένο φύλλο αλουμινίου.
4. Η ανάδευση διήρκεσε 20 λεπτά, χωρίς θέρμανση.

Μετά το πέρας των 20 λεπτών, τα έκφυτα ξεπλύθηκαν από το διάλυμα χλωρίνης 3 φορές με αποστειρωμένο νερό (αφήνοντάς τα την τελευταία φορά για λίγα λεπτά στο νερό). Τα έκφυτα απολυμάνθηκαν και ακολούθησε η διαδικασία της τοποθέτησής τους στους δοκιμαστικούς σωλήνες. Για την εγκατάσταση των εκφύτων (Εικόνα 1α,β) τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν:

1. Φλόγιστρο
2. Φωτιστικό οινόπνευμα
3. Λαβίδες
4. Αλουμινένια πιατάκια

Βάζοντας τα έκφυτα σε ένα αλουμινένιο πιατάκι και κρατώντας τους δοκιμαστικούς σωλήνες σε γωνία 45°, μεταφέρθηκαν με την λαβίδα ένα ένα στην επιφάνεια του θρεπτικού διαλύματος. Αποστειρώθηκε το στόμιο του κάθε σωλήνα στο φλόγιστρο και έπειτα, σφραγίστηκε με το καπάκι. Σε κάθε τοποθέτηση των εκφύτων, εμβαπτίζονταν οι λαβίδες σε οινόπνευμα και αποστειρώνονταν στο φλόγιστρο. Έπειτα, οι σωλήνες καλλιέργειας τοποθετήθηκαν στα ειδικά στηρίγματα και καταγράφηκε το είδος του εκφύτου, το υπόστρωμα με την ημερομηνία παρασκευής του και η ημερομηνία εγκατάστασης των εκφύτων. Τέλος, μεταφέρθηκαν στον θάλαμο ανάπτυξης με θερμοκρασία 21°C και φωτοπερίοδο τις 16 ώρες.

Σε αυτή τη πρώτη προσπάθεια εγκατάστασης, τοποθετήθηκαν στον θάλαμο ανάπτυξης 31 έκφυτα (Εικόνα 3).

3.2 Δεύτερη εγκατάσταση της καλλιέργειας

Η δεύτερη προσπάθεια εγκατάστασης του αμυγδαλοροδάκινου P1 πραγματοποιήθηκε στις 17 Ιουλίου 2008. Ελήφθησαν νεαροί βλαστοί όπου αφαιρέθηκαν τα φύλλα (αφήνοντας περίπου 2cm μίσχου).

Αυτή τη φορά όμως, τεμαχίστηκαν σε μικρομοσχεύματα (έκφυτα) με ένα γόνατο (Εικόνα 2α) και διαχωρίστηκαν σε χοντρά έκφυτα (τμήμα προς την βάση του νεαρού βλαστού) και λεπτά έκφυτα (τμήμα προς την κορυφή του νεαρού βλαστού). Αρχικά:

1. Ξεπλύθηκαν οι βλαστοί πολύ καλά με νερό βρύσης.
2. Σκουπίστηκαν με κομμάτι χαρτί εμποτισμένο με 70% αλκοόλη, για να απομακρυνθεί η σκόνη.
3. Τοποθετήθηκαν σε ένα ποτήρι ζέσεως κάτω από τρεχούμενο νερό βρύσης για να ξεπλυθούν.
4. Τεμαχίστηκαν σε έκφυτα με ένα γόνατο, διαχωρίστηκαν σε χοντρά και λεπτά έκφυτα και τοποθετήθηκαν σε ποτήρια ζέσεως με 70% αλκοόλη για 30 δευτερόλεπτα, υπό συνεχή ανάδευση.
5. Ξεπλύθηκαν 3 φορές με νερό βρύσης.

Η κυρίως απολύμανση έγινε με υποχλωριώδες νάτριο (NaOCl), όμως αυτή τη φορά χρησιμοποιήθηκε διαφορετική συγκέντρωση χλωρίνης στα χοντρά έκφυτα σε σχέση με τα λεπτά.

ΓΙΑ ΤΑ ΧΟΝΤΡΑ ΕΚΦΥΤΑ:

Η κυρίως απολύμανση έγινε με υποχλωριώδες νάτριο 4% και ανάδευση για 30 λεπτά.

Η περιεκτικότητα του εμπορικού σκευάσματος της χλωρίνης σε ιόντα χλωρίου ήταν 4,7%, η συγκέντρωση του NaOCl που θέλαμε να παρασκευάσουμε για την αποστείρωση ήταν 4%, ο τελικός όγκος του διαλύματος ήταν 200ml, άρα σύμφωνα με τον αρχικό τύπο έχουμε:

$$4,7 \times V_1 = 4 \times 200 \leftrightarrow V_1 = 800 / 4,7 = 170,21 \text{ ml χλωρίνη και}$$

$$29,79 \text{ ml αποστειρωμένο νερό}$$

Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία, όπως και στην πρώτη εγκατάσταση, ρίχνοντας σε κωνική φιάλη των 200ml αυτή τη φορά, 170,21ml χλωρίνη, 29,79ml αποστειρωμένο νερό, λίγες σταγόνες Tween[®]20 και παρέμειναν 30 λεπτά στον αναδευτήρα χωρίς θέρμανση. Η διαδικασία τοποθέτησης των εκφύτων στους δοκιμαστικούς σωλήνες ήταν ίδια, ακριβώς όπως και στην πρώτη εγκατάσταση της καλλιέργειας.

ΓΙΑ ΤΑ ΛΕΠΤΑ ΕΚΦΥΤΑ:

Η κυρίως απολύμανση έγινε με υποχλωριώδες νάτριο 3% και ανάδευση για 20 λεπτά.

Η περιεκτικότητα του εμπορικού σκευάσματος της χλωρίνης σε ιόντα χλωρίου ήταν 4,7%, η συγκέντρωση του NaOCl που θέλαμε να παρασκευάσουμε για την απολύμανση ήταν 3%, ο τελικός όγκος του διαλύματος ήταν 100ml, άρα σύμφωνα με τον αρχικό τύπο, έχουμε:
 $4,7 \times V_1 = 3 \times 100 \leftrightarrow V_1 = 300 / 4,7 = 63,82\text{ml}$ χλωρίνη και
36,18ml αποστειρωμένο νερό

Ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία όπως και στην πρώτη εγκατάσταση, ρίχνοντας σε κωνική φιάλη των 100ml, 63,82ml χλωρίνη, 36,18ml αποστειρωμένο νερό, λίγες σταγόνες Tween[®] 20 και παρέμειναν 20 λεπτά στον αναδευτήρα, χωρίς θέρμανση. Η διαδικασία τοποθέτησης των εκφύτων στους δοκιμαστικούς σωλήνες ήταν ίδια με την πρώτη εγκατάσταση της καλλιέργειας.

Σε αυτή τη δεύτερη προσπάθεια εγκατάστασης, τοποθετήθηκαν στον θάλαμο ανάπτυξης 124 έκφυτα, εκ των οποίων 63 χοντρά και 61 λεπτά.

3.3 Τρίτη εγκατάσταση της καλλιέργειας

Η τρίτη προσπάθεια εγκατάστασης του αμυγδαλοροδάκινου P1 πραγματοποιήθηκε στις 15 Σεπτεμβρίου 2008, όπου ελήφθησαν νεαροί βλαστοί και ακολουθήθηκε η ίδια διαδικασία τεμαχισμού, απολύμανσης και εγκατάστασης στον θάλαμο ανάπτυξης, με την δεύτερη εγκατάσταση.

Σε αυτήν την τρίτη προσπάθεια εγκατάστασης, τοποθετήθηκαν στον θάλαμο ανάπτυξης 44 έκφυτα, εκ των οποίων 19 χοντρά και 25 λεπτά.

Γ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

1. Πρώτη εγκατάσταση

Στην πρώτη εγκατάσταση, τοποθετήθηκαν 31 έκφυτα στον θάλαμο ανάπτυξης με σχεδόν καθημερινή παρακολούθηση. Όμως μέσα σε μια εβδομάδα, όλα τα έκφυτα εμφάνισαν μολύνσεις και απομακρύνθηκαν αμέσως από τον θάλαμο. Στην πρώτη αυτή προσπάθεια εγκατάστασης του αμυγδαλοροδάκινου P1, οι μολύνσεις έφτασαν στο 100%.

2. Δεύτερη εγκατάσταση

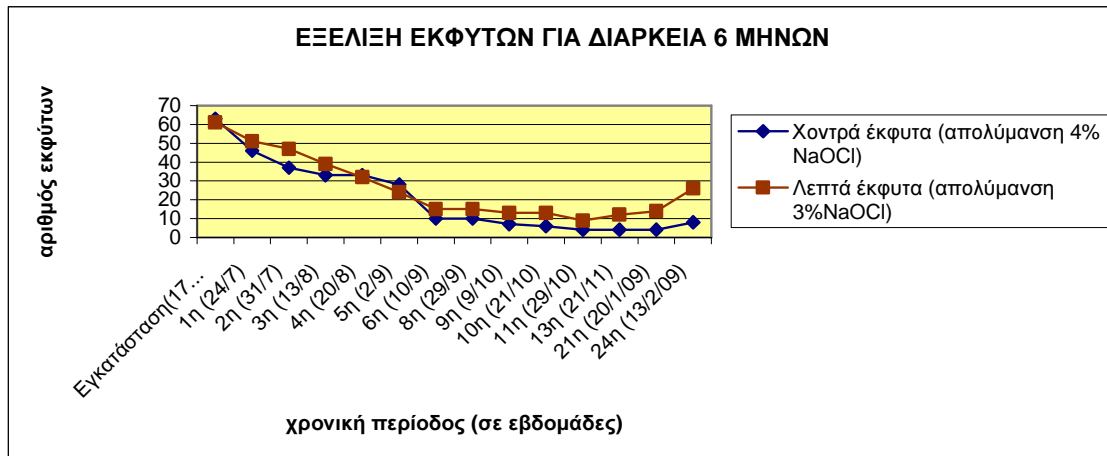
Στην δεύτερη εγκατάσταση, τοποθετήθηκαν 124 έκφυτα στον θάλαμο ανάπτυξης (63 χοντρά και 61 λεπτά) και η παρακολούθηση ήταν σχεδόν καθημερινή. Παρακάτω, αναλύονται οι μεταχειρίσεις που πραγματοποιήθηκαν στα έκφυτα και η εξέλιξή τους, μέχρι το στάδιο της έναρξης του βλαστικού πολλαπλασιασμού του αρχικού φυτικού υλικού.

Στον Πίνακα 3, βλέπουμε την συνολική εξέλιξη των εκφύτων που είχαν χωριστεί σε χοντρά και λεπτά τα οποία απολυμάνθηκαν με 4% και 3% διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου αντίστοιχα, από την αρχή της εγκατάστασης μέχρι 6 μήνες.

Πίνακας 3: Συνολική εξέλιξη εκφύτων για διάρκεια 6 μηνών.

	Χοντρά έκφυτα (4% NaOCl)	Λεπτά έκφυτα (3% NaOCl)
Εγκατάσταση (17/07/08)	63	61
1 ^η εβδομάδα (24/07)	46	51
2 ^η (31/07)	37	47
3 ^η (13/08)	33	39
4 ^η (20/08)	33	32
5 ^η (02/09)	28	24
6 ^η (10/09)	10	15
8 ^η (29/09)	10	15
9 ^η (09/10)	7	13
10 ^η (21/10)	6	13
11 ^η (29/10)	4	9
13 ^η (21/11)	4	12
21 ^η (20/01)	4	14
24 ^η (13/02)	8	26

Διάγραμμα 1: Εξέλιξη εκφύτων για διάρκεια 6 μηνών με εβδομαδιαία παρακολούθηση.



Εξαιτίας του μεγάλου αριθμού των μολύνσεων που παρατηρήθηκαν στην *in vitro* καλλιέργεια, θεωρήθηκε σκόπιμο να περιγραφεί η εικόνα τους και να αναλυθεί σύμφωνα με τα δεδομένα της βιβλιογραφίας (Auge et al., 1995). Γενικά, η μη επιτυχής απολύμανση φαίνεται σε διάρκεια 3-4 εβδομάδων παραμονής στο θεραπευτικό υπόστρωμα. Από τα συμπτώματα που παρατηρούνται, γίνεται κατανοητό αν η μόλυνση οφείλεται σε μύκητα, βακτήριο, κ.α.

Όταν η μόλυνση οφείλεται σε κάποιο βακτήριο, παρατηρούνται αποικίες μέσα στο υπόστρωμα και κυρίως στην επιφάνειά του, με αποχρώσεις λευκού, ροζ ή κίτρινου χρώματος. Στην περίπτωση των πειραμάτων μας παρατηρήθηκαν στο υπόστρωμα αποικίες λευκού χρώματος, που εμφανίζονταν έως την 11^η εβδομάδα.

Στις περιπτώσεις που η προσβολή οφείλεται σε μύκητα, γεγονός που μπορεί να αντιμετωπιστεί με κατάλληλους χειρισμούς κατά την απολύμανση, παρατηρούνται συνήθως μυκήλια άσπρου ή γκρι χρώματος με συμπαγή ή αέναη μορφή. Σε μερικές περιπτώσεις μπορεί να παρατηρηθούν μικρά μαύρα στίγματα στο υπόστρωμα (καρποφορίες), που οφείλονται στο μύκητα *Rhizopus nigricans*, ο οποίος πολλαπλασιάζεται ραγδαία και πρέπει να καταστραφεί με αποστείρωση, χωρίς καθυστέρηση.

Εάν η μόλυνση εμφανίζεται μεταξύ του εκφύτου και του υποστρώματος, τότε πηγή μόλυνσης είναι το ίδιο το έκφυτο. Όταν ξεκινάει από ένα σημείο μέσα στο υπόστρωμα, η πηγή της μπορεί να οφείλεται στον αέρα του θαλάμου, στην μειωμένη αποστείρωση του υποστρώματος ή στον αέρα μέσα στα δοχεία καλλιέργειας. Σε μερικές περιπτώσεις, ευτυχώς σπάνια, τα σπόρια από κάποια βακτήρια μπορεί να αντέξουν την αποστείρωση στον κλίβανο και για αυτό είναι απαραίτητο να πλένονται τα σκεύη με διάλυμα χλωρίνης.

Εάν η μόλυνση είναι πράσινου χρώματος, είναι αναμφίβολα *Penicillium* και οφείλεται στον αέρα και σε λάθος χειρισμούς όπως, συνομιλία κατά την εγκατάσταση ή επανακαλλιέργεια των εκφύτων, αποτυχημένη αποστείρωση εργαλείων που μεταδίδουν μικροοργανισμούς από μολυσμένα σε υγιή έκφυτα.

Κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας, υπάρχει η περίπτωση να μην εμφανιστεί κανένα ίχνος σκιάς από βακτήρια, ακόμη και αν υπάρχει στα έκφυτα. Αυτό συμβαίνει διότι παραμένουν σε λανθάνουσα κατάσταση για μεγάλη χρονική περίοδο μέχρις ότου κάποιος περιβαλλοντολογικός παράγοντας προκαλέσει την ανάπτυξή τους. Ωστόσο, αν προστεθεί στο υπόστρωμα πεπτόνη (265mg/L) και εκχύλισμα ζύμης (88mg/L) που δεν επηρεάζουν τους φυτικούς ιστούς, θα αναπτυχθούν τα βακτήρια και έτσι θα απομακρύνουμε τα μολυσμένα έκφυτα. (Boxus and Terzi, 1988).

Έτσι, στον Πίνακα 4, βλέπουμε τον αριθμό των μολυσμένων εκφύτων και το ποσοστό μόλυνσης, από την αρχή της εγκατάστασης και για 11 εβδομάδες (όπου σταθεροποιήθηκε ο αριθμός τους).

Πίνακας 4: Αριθμός μολυσμένων εκφύτων και ποσοστό μόλυνσης στις 11 εβδομάδες καλλιέργειας.

	Αρχικός αριθμός εκφύτων	Μολυσμένα	Ποσοστό μόλυνσης
Χοντρά έκφυτα (4% NaOCl)	63	42	67%
Λεπτά έκφυτα (3% NaOCl)	61	37	61%

Επίσης, εκτός των μολύνσεων, υπήρξαν και τα έκφυτα που απορρίφθηκαν, διότι υπέστησαν ζημιά από την είσοδο του αποστειρωτικού στους ιστούς τους. Η ποσότητα του αποστειρωτικού λεύκανε εσωτερικά τους ιστούς (Πλαστήρας, 1990) και εξωτερικά ξυλοποιήθηκαν αποκτώντας σκούρο καφέ χρώμα. Τα κατεστραμμένα έκφυτα εμφανίστηκαν σε διάστημα 2 εβδομάδων παραμονής στο θρεπτικό υπόστρωμα. Στον Πίνακα 5, βλέπουμε τον αριθμό των κατεστραμμένων από το απολύμαντικό εκφύτων και το ποσοστό κατεστραμμένων, από την αρχή της εγκατάστασης και για 2 εβδομάδες.

Πίνακας 5: Αριθμός κατεστραμμένων από απολύμανση εκφύτων και ποσοστό κατεστραμμένων.

	Αρχικός αριθμός εκφύτων	Κατεστραμμένα από απολύμανση	Ποσοστό κατεστραμμένων
Χοντρά έκφυτα (4% NaOCl)	63	17	27%
Λεπτά έκφυτα (3% NaOCl)	61	15	25%

Στον Πίνακα 6, βλέπουμε συνολικά το ποσοστό απώλειας εκφύτων (μολυσμένων και κατεστραμμένων), που απομακρύνθηκαν από τον θάλαμο ανάπτυξης.

Πίνακας 6: Ποσοστό απώλειας φυτικού υλικού.

	Αρχικός αριθμός εκφύτων	Έκφυτα που αφαιρέθηκαν	Ποσοστό απώλειας φυτικού υλικού
Χοντρά έκφυτα (4% NaOCl)	63	59	94%
Λεπτά έκφυτα (3% NaOCl)	61	52	85%

Παρακάτω, αναφέρονται οι μεταχειρίσεις που υπέστησαν τα έκφυτα και αναλύεται η πορεία τους, για διάρκεια 6 μηνών.

Την 1^η Αυγούστου 2008, έγινε μεταφορά των εκφύτων σε κοινό ψυγείο στο σπίτι, λόγω τεχνικών προβλημάτων στον χώρο του εργαστηρίου. Τοποθετήθηκαν στον θάλαμο ξανά, μετά από 11 ημέρες (στις 12 Αυγούστου). Αυτή η εξέλιξη είχε αρνητική επίδραση στα έκφυτα και στο υπόστρωμα, γιατί κατά την μεταφορά επικρατούσαν πολύ υψηλές θερμοκρασίες.

Κατά τη διάρκεια της 9^{ης} εβδομάδας καλλιέργειας, παρατηρήθηκε στα έκφυτα πρόβλημα στην ανάπτυξή τους. Ενώ μέχρι τότε αναπτύσσονταν αργά αλλά σταθερά, παρατηρήθηκε κιτρίνισμα των νεοεκπυσσόμενων φύλλων της κορυφής, τα κομμένα φύλλα (μετά την επανακαλλιέργεια) δεν αναπτύχθηκαν και τα φύλλα που κατάφεραν να αναπτυχθούν, ήταν μικρά και κίτρινα. Για αυτό, παρασκευάστηκε αμέσως καινούργιο θρεπτικό υπόστρωμα στο οποίο μεταφέρθηκαν τα έκφυτα. Πιθανή εξήγηση αυτής της εξέλιξης, είναι κάποιο λάθος στις ποσότητες παρασκευής του υποστρώματος.

Μελετώντας τον Πίνακα 3, από την αρχή της εγκατάστασης, ο αριθμός των εκφύτων συνεχώς μειωνόταν λόγω μολύνσεων, οι οποίες διήρκησαν 11 εβδομάδες. Έπειτα, σταθεροποιήθηκε ο αριθμός τους και μετά την 11^η εβδομάδα παρατηρήθηκε έκπτυξη πλάγιων μικροβλαστών (στα έκφυτα που παρέμειναν στον θάλαμο). Διαχωρίστηκαν, τεμαχίστηκαν και τοποθετήθηκαν από τους δοκιμαστικούς σωλήνες σε πλαστικά δοχεία (Εικόνες α-στ). Στο εσωτερικό του δοχείου τα έκφυτα τοποθετήθηκαν όσο το δυνατόν πιο κοντά, ώστε να αναπτυχθεί ένα είδος συνεργισμού μεταξύ τους. Γενικά, όταν υπάρχουν λίγοι βλαστοί, τοποθετούνται στη μέση του δοχείου ομαδοποιημένα. Εάν υπάρχει μεγάλος αριθμός εκφύτων, είναι προτιμότερο να κατανεμηθούν ομοιόμορφα σε όλη την επιφάνεια του υποστρώματος, ξεκινώντας από την περιφέρεια προς το κέντρο του δοχείου. Για να εξασφαλιστεί από τα έκφυτα η απορρόφηση των θρεπτικών στοιχείων στο νέο περιβάλλον και η διέγερσή τους στον μεγαλύτερο βαθμό για πολλαπλασιασμό, τα έκφυτα

πρέπει να έρχονται σε επαφή με όσο το δυνατόν μεγαλύτερη επιφάνεια υποστρώματος. Γι' αυτό βυθίζονται μέχρι την μέση μέσα στο θρεπτικό υπόστρωμα.

Όσον αφορά τον διαχωρισμό που έγινε σε χοντρά και λεπτά έκφυτα, τα οποία ελήφθησαν από το μητρικό φυτό, πρέπει να αναφερθούν τα παρακάτω.

Σύμφωνα με τον Πίνακα 6, τα χοντρά έκφυτα που απολυμάνθηκαν με 4% NaOCl δεν έδωσαν ενθαρρυντικά αποτελέσματα, διότι αφαιρέθηκαν από τον θάλαμο περισσότερα από τα λεπτά. Επίσης, με βάση τον Πίνακα 3, ο αριθμός των εκφύτων κατά την 11^η εβδομάδα όπου σταθεροποιήθηκε η ανάπτυξή τους και σταμάτησαν οι μολύνσεις, ήταν για τα χοντρά 4 και για τα λεπτά 9 έκφυτα. Έτσι, με βάση τα ποσοστά μόλυνσης, τον αριθμό των εκφύτων που παρέμειναν τελικώς στο θάλαμο και τον ρυθμό πολλαπλασιασμού τους, καλύτερα αποτελέσματα έδωσαν αυτά που ελήφθησαν από την κορυφή των νεαρών βλαστών (λεπτά έκφυτα) (Εικόνα 2γ).

Γενικότερα, εγκαταστάθηκε μεγάλος αριθμός φυτικού υλικού. Αρχικά, η εξέλιξη των εκφύτων ήταν αποθαρρυντική, διότι αφαιρέθηκαν πολλά μολυσμένα και κατεστραμμένα από το απολυμαντικό. Παρ' όλα αυτά όμως, πολλαπλασιάστηκε το φυτικό υλικό που είχε απομείνει και υπάρχει στο εργαστήριο ένας ικανοποιητικός αριθμός για μελλοντικές πειραματικές χρήσεις. Έτσι, στον Πίνακα 7 βλέπουμε τον αριθμό των εκφύτων (χοντρά και λεπτά) που εγκαταστάθηκαν επιτυχώς στις 11 εβδομάδες και στους 6 μήνες (τέλος του πειράματος).

Πίνακας 7: Έκφυτα επιτυχώς εγκατεστημένα στις 11 εβδομάδες και στους 6 μήνες.

	Συνολικός αριθμός εκφύτων που εγκαταστάθηκαν	Συνολικός αριθμός εκφύτων που αφαιρέθηκαν	Έκφυτα επιτυχώς εγκατεστημένα στις 11 εβδομάδες	Έκφυτα επιτυχώς εγκατεστημένα στους 6 μήνες
2 ^η εγκατάσταση (17/07/2008)	124	111	13	34

Σύμφωνα με τον Πίνακα 7, στις 11 εβδομάδες, από τα 13 συνολικά έκφυτα που εγκαταστάθηκαν επιτυχώς, τα 4 ήταν χοντρά και τα 9 λεπτά. Στο τέλος των 6 μηνών, μετά από επανακαλλιέργειες και ταχύ ρυθμό ανάπτυξης και βλαστικό πολλαπλασιασμό, τα έκφυτα στον θάλαμο έφτασαν τα 34, από τα οποία τα 8 ήταν χοντρά και τα 26 λεπτά.

3. Τρίτη εγκατάσταση

Στην τρίτη εγκατάσταση, τοποθετήθηκαν 44 έκφυτα στον θάλαμο ανάπτυξης (19 χοντρά και 25 λεπτά) και η παρακολούθηση ήταν σχεδόν καθημερινή. Παρακάτω θα αναφέρουμε τις μεταχειρίσεις που υπέστησαν τα έκφυτα και την εξέλιξή τους για περίπου 5 μήνες, όπου καταφέραμε να πολλαπλασιάσουμε βλαστικά το αρχικό φυτικό υλικό.

Στον Πίνακα 8, βλέπουμε την συνολική εξέλιξη των εκφύτων που είχαν χωριστεί σε χοντρά και λεπτά και απολυμάνθηκαν με 4% και 3% διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου αντίστοιχα, από την αρχή της εγκατάστασης μέχρι περίπου 5 μήνες.

Πίνακας 8: Συνολική εξέλιξη εκφύτων για διάρκεια 5 μηνών.

	Χοντρά έκφυτα (4% NaOCl)	Λεπτά έκφυτα (3% NaOCl)
Εγκατάσταση (15/09/08)	19	25
1 ^η εβδομάδα (29/09)	19	17
2 ^η (09/10)	18	15
3 ^η (21/10)	10	12
4 ^η (29/10)	6	9
7 ^η (21/11)	4	3
10 ^η (11/12)	1	1
15 ^η (20/01/2009)	1	0
18 ^η (13/02)	3	

Κατά την διάρκεια του πειράματος, οι μολύνσεις διήρκησαν 10 εβδομάδες και πιο συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν στο υπόστρωμα αποικίες λευκού χρώματος (βακτήρια), που εμφανίζονταν έως την 10^η εβδομάδα.

Έτσι, στον Πίνακα 9, βλέπουμε τον αριθμό των μολυσμένων εκφύτων και το ποσοστό μόλυνσης, από την αρχή της εγκατάστασης και για 10 εβδομάδες (όπου σταθεροποιήθηκε ο αριθμός τους).

Πίνακας 9: Αριθμός μολυσμένων εκφύτων και ποσοστό μόλυνσης στις 10 εβδομάδες καλλιέργειας.

	Αρχικός αριθμός εκφύτων	Μολυσμένα	Ποσοστό μόλυνσης
Χοντρά έκφυτα (4% NaOCl)	19	9	47%
Λεπτά έκφυτα (3% NaOCl)	25	17	68%

Επίσης, εκτός των μολύνσεων, υπήρξαν και τα έκφυτα που απορρίφθηκαν, διότι υπέστησαν ζημιά από την είσοδο του αποστειρωτικού στους ιστούς τους. Η ποσότητα του αποστειρωτικού λεύκανε τους ιστούς (Πλαστήρας, 1990) και εξωτερικά ξυλοποιήθηκαν αποκτώντας σκούρο καφέ χρώμα. Τα κατεστραμμένα έκφυτα

εμφανίζονται σε διάστημα 2 εβδομάδων παραμονής στο θεραπευτικό υπόστρωμα. Στον Πίνακα 10, βλέπουμε τον αριθμό των κατεστραμμένων από το απολυμαντικό εκφύτων και το ποσοστό κατεστραμμένων, από την αρχή της εγκατάστασης και για 2 εβδομάδες.

Πίνακας 10: Αριθμός κατεστραμμένων από απολύμανση εκφύτων και ποσοστό κατεστραμμένων.

	Αρχικός αριθμός εκφύτων	Κατεστραμμένα από απολύμανση	Ποσοστό κατεστραμμένων
Χοντρά έκφυτα (4% NaOCl)	19	9	27%
Λεπτά έκφυτα (3% NaOCl)	25	8	32%

Στον Πίνακα 11, βλέπουμε συνολικά το ποσοστό απώλειας εκφύτων (μολυσμένων και κατεστραμμένων), που απομακρύνθηκαν από τον θάλαμο ανάπτυξης.

Πίνακας 11: Ποσοστό απώλειας φυτικού υλικού.

	Αρχικός αριθμός εκφύτων	Έκφυτα που αφαιρέθηκαν	Ποσοστό απώλειας φυτικού υλικού
Χοντρά έκφυτα (4% NaOCl)	19	18	95%
Λεπτά έκφυτα (3% NaOCl)	25	25	100%

Παρακάτω, αναφέρονται οι μεταχειρίσεις που υπέστησαν τα έκφυτα και αναλύεται η ανάπτυξη τους για διάρκεια περίπου 5 μηνών.

Αρχικά, μετά από περίπου 20 ημέρες από την τοποθέτηση των εκφύτων στον θάλαμο ανάπτυξης, παρατηρήθηκε έκκριση φαινολών. Αμέσως παρασκευάστηκε καινούργιο υπόστρωμα και τοποθετήθηκαν τα έκφυτα. Αν δεν πραγματοποιούνταν αυτή η μεταφορά σε νέο υπόστρωμα, θα παρεμποδιζόταν η αύξηση του φυτικού ιστού και θα άρχιζε μια διαδικασία αποδιοργάνωσης των εκφύτων.

Μελετώντας τον Πίνακα 8, από την αρχή της εγκατάστασης, ο αριθμός των εκφύτων συνεχώς μειωνόταν λόγω μολύνσεων, οι οποίες διήρκησαν 10 εβδομάδες. Ήδη, μετά την δεύτερη εβδομάδα είχαν αφαιρεθεί και τα κατεστραμμένα από το απολυμαντικό έκφυτα. Έπειτα, από τα λεπτά δεν ήταν δυνατό να αναπτυχθεί κανένα και αφαιρέθηκαν όλα από τον θάλαμο, ενώ από τα χοντρά έκφυτα εγκαταστάθηκε επιτυχώς ένα, με σταθερό ρυθμό ανάπτυξης.

Στον Πίνακα 12, βλέπουμε τον αριθμό των εκφύτων (χοντρά) που εγκαταστάθηκαν επιτυχώς στις 10 εβδομάδες και στους 5 μήνες (τέλος του πειράματος).

Πίνακας 12: Έκφυτα επιτυχώς εγκατεστημένα στις 10 εβδομάδες και στους 5 μήνες.

	Συνολικός αριθμός εκφύτων που εγκαταστάθηκαν	Συνολικός αριθμός εκφύτων που αφαιρέθηκαν	Έκφυτα επιτυχώς εγκατεστημένα στις 10 εβδομάδες	Έκφυτα επιτυχώς εγκατεστημένα στους 5 μήνες
3 ^η εγκατάσταση (15/09/2008)	44	43	1	3

Σύμφωνα με τον Πίνακα 12, στις 10 εβδομάδες, 1 χοντρό έκφυτο εγκαταστάθηκε επιτυχώς και στο τέλος των 5 μηνών, μετά από επανακαλλιέργειες, κανονικό ρυθμό ανάπτυξης και βλαστικό πολλαπλασιασμό, παράχθηκαν από αυτό το ένα έκφυτο άλλοι δύο μικροβλαστοί.

Στην συνέχεια, στο τέλος της τρίτης εγκατάστασης, τα έκφυτα από όλες τις μεταχειρίσεις, ενώθηκαν και αποτέλεσαν το μητρικό υλικό, στο οποίο γινόταν επανακαλλιέργεια κάθε 15 ημέρες. Το φυτικό υλικό που τελικώς δημιουργήθηκε και διατηρείται στον θάλαμο ανάπτυξης, αποτελεί το stock υλικό για μελλοντικές πειραματικές χρήσεις, επάνω στην μελέτη των επόμενων σταδίων του μικροπολλαπλασιασμού (ριζογένεση, εγκλιματισμός) και των λεπτομερειών της μεθόδου του πολλαπλασιασμού με ιστοκαλλιέργεια, όπως επίσης για περαιτέρω μελέτη όσον αφορά την εξυγίανση των φυτών και τον ιολογικό τους έλεγχο.

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Αρχικά, στην πρώτη εγκατάσταση που πραγματοποιήθηκε τον μήνα Ιούνιο, τοποθετήθηκαν στον θάλαμο ανάπτυξης 31 μικρομοσχεύματα με 2 γόνατα και απολυμάνθηκαν με 3% διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου. Όμως μέσα σε μια εβδομάδα από την εγκατάσταση, όλα τα έκφυτα εμφάνισαν μολύνσεις και απομακρύνθηκαν αμέσως από τον θάλαμο. Το ποσοστό των μολύνσεων έφτασε το 100% και πιθανή εξήγηση αυτής της εξέλιξης είναι οι λάθος χειρισμοί κατά την απολύμανσή τους (ίσως η συγκέντρωση του NaOCl να έπρεπε να ήταν μικρότερη) ή οι λάθος χειρισμοί κατά την εγκατάσταση των εκφύτων ή η περίοδος λήψης τους.

Στην δεύτερη εγκατάσταση, που πραγματοποιήθηκε τον μήνα Ιούλιο και διήρκησε 6 μήνες, τοποθετήθηκαν στον θάλαμο ανάπτυξης 124 μικρομοσχεύματα με ένα γόνατο, τα οποία διαχωρίστηκαν σε 63 χοντρά έκφυτα (προς την βάση του νεαρού βλαστού) και 61 λεπτά (προς την κορυφή) και απολυμάνθηκαν με 4% και 3% διάλυμα NaOCl αντίστοιχα, για 30' και 20' λεπτά αντίστοιχα.

Τα χοντρά έκφυτα εμφάνισαν το μεγαλύτερο ποσοστό μολύνσεων (67%) και το μεγαλύτερο ποσοστό απόρριψης των ιστών (27%). Επίσης η απώλεια του φυτικού υλικού για τα χοντρά έκφυτα, ήταν μεγαλύτερη από τα λεπτά (94%).

Μετά την 11^η εβδομάδα παραμονής στο θάλαμο, σταθεροποιήθηκε ο αριθμός των εκφύτων και υπήρχε ένας ικανοποιητικός αριθμός φυτικού υλικού που συνεχώς πολλαπλασιαζόταν σε κάθε επανακαλλιέργεια. Ξεκίνησε δηλαδή ο βλαστικός πολλαπλασιασμός τους και ο διαχωρισμός των μικροβλαστών που εκπτύχθηκαν.

Καλύτερα αποτελέσματα, όσον αφορά τον ρυθμό πολλαπλασιασμού, τον τελικό αριθμό των εκφύτων που παρέμειναν και τον ρυθμό έκπτυξης πλάγιων μικροβλαστών, έδωσαν τα λεπτά έκφυτα. Στους 6 μήνες που διήρκησε η δεύτερη εγκατάσταση, στον θάλαμο ανάπτυξης ήταν επιτυχώς εγκατεστημένα 34 έκφυτα (μετά από επανακαλλιέργειες), εκ των οποίων τα 26 ήταν λεπτά και τα 8 χοντρά.

Στην τρίτη εγκατάσταση που πραγματοποιήθηκε τον μήνα Σεπτέμβριο και διήρκησε περίπου 5 μήνες, όσον αφορά τις μεταχειρίσεις δεν υπήρχε καμία διαφορά με την δεύτερη εγκατάσταση (χοντρά-4% απολύμανση με NaOCl για 30' και λεπτά-3% NaOCl για 20'). Τοποθετήθηκαν στον θάλαμο ανάπτυξης 44 μικρομοσχεύματα με ένα γόνατο, εκ των οποίων τα 19 ήταν χοντρά και τα 25 λεπτά.

Τα λεπτά έκφυτα, εμφάνισαν το μεγαλύτερο ποσοστό μολύνσεων (68%) και το μεγαλύτερο ποσοστό απόρριψης των ιστών από το απολυμαντικό (32%). Τελικά, μετά από 10 εβδομάδες παραμονής τους

στον θάλαμο απομακρύνθηκαν όλα τα λεπτά έκφυτα και είχαμε απώλεια φυτικού υλικού σε ποσοστό 100%.

Όσον αφορά τα χοντρά, εγκαταστάθηκε με επιτυχία 1 έκφυτο, με αργή ανάπτυξη. Έτσι τελικά, στους 5 μήνες, μετά από παραγωγή πλάγιων μικροβλαστών ήταν επιτυχώς εγκατεστημένα 3 χοντρά έκφυτα, με σταθερό ρυθμό ανάπτυξης.

Μελετώντας όλα τα δεδομένα, τις παρατηρήσεις και τα αποτελέσματα του πειράματος, που συνολικά διήρκησε 8 μήνες, καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι ο πιο καθοριστικός παράγοντας αποδείχθηκε ότι είναι η εποχή κατά την οποία παραλαμβάνεται το φυτικό υλικό. Η συλλογή του από νέα βλάστηση σε σύντομο χρονικό διάστημα από την εποχή δημιουργίας της, προσφέρει τις μεγαλύτερες πιθανότητες επιτυχίας της απολύμανσης του φυτικού υλικού. Τα καλύτερα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν, όταν το φυτικό υλικό λήφθηκε κατά τον μήνα Ιούλιο (δεύτερη εγκατάσταση), τα μικρομοσχεύματα που πήραμε για καλλιέργεια ήταν από την κορυφή των νεαρών βλαστών και η συγκέντρωση του διαλύματος για την αποστείρωσή τους ήταν μικρή (3%NaOCl). Τα λεπτά έκφυτα, ήταν αυτά που κατάφεραν να επιζήσουν, να απολυμανθούν επιτυχώς και να έχουν αυξημένη και ταχεία παραγωγή πλάγιων μικροβλαστών. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε και καταλήξαμε στο συμπέρασμα ότι είναι το καταλληλότερο για την *in vitro* καλλιέργεια του αμυγδαλοροδάκινου P1, ήταν το MS+ BA 0,7mg/L, GA3 0,1mg/L, NAA 0,01mg/L, ζάχαρη 20gr, άγαρ 6gr και pH 5.8. Συμπεραίνουμε επίσης, ότι τα λεπτά έκφυτα ευνοούνται σε συνθήκες ιστοκαλλιέργειας. Περισσότερους μικροβλαστούς έδωσαν τα λεπτά έκφυτα, αλλά και τα χοντρά έκφυτα στο τέλος του πειράματος είχαν ικανοποιητική ανάπτυξη με μικρότερο ποσοστό έκπτυξης πλάγιων μικροβλαστών από τα λεπτά. Τέλος, η επιτυχής *in vitro* εγκατάσταση του αμυγδαλοροδάκινου P1, πραγματοποιήθηκε σε διάστημα περίπου 6 μηνών.

Συνοψίζοντας, παρ' όλο που όταν σταμάτησαν οι μολύνσεις, ο αριθμός των εκφύτων που εγκαταστάθηκαν επιτυχώς ήταν σχετικά μικρός, το φυτικό υλικό πολλαπλασιάστηκε και δημιουργήθηκε ένα stock υλικό για μελλοντικές πειραματικές χρήσεις.

Ε. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΙΚΟΝΩΝ



Εικόνα 1α: Τράπεζα νηματικής ροής



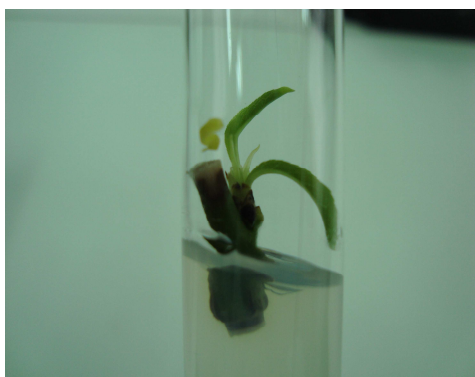
Εικόνα 1β: Προετοιμασία εργαλείων και σκευών για την εγκατάσταση των εκφύτων



Εικόνα 2α.: Έκφυτο με ένα γόνατο



Εικόνα 2β.: Έκφυτο με 2 γόνατα

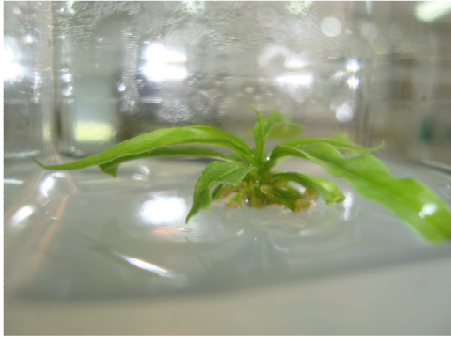


Εικόνα 2γ.: Στάδιο έκπτυξης οφθαλμού

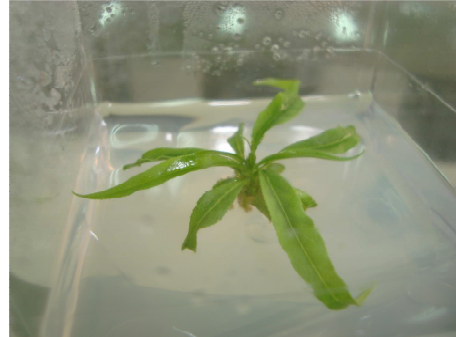


Εικόνα 3: Έκφυτα σε δοκιμαστικούς σωλήνες, μέσα στον θάλαμο ανάπτυξης

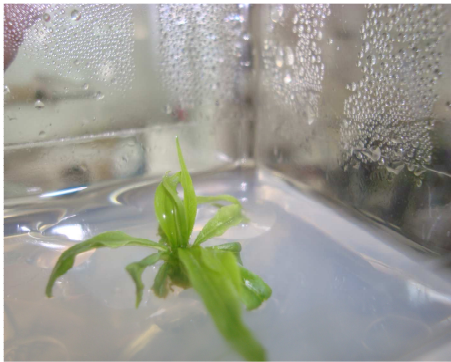
Εικόνες 4α-στ: Στάδια ανάπτυξης εκφύτων και έκπτυξη πλάγιων μικροβλαστών, σε πλαστικά δοχεία καλλιέργειας.



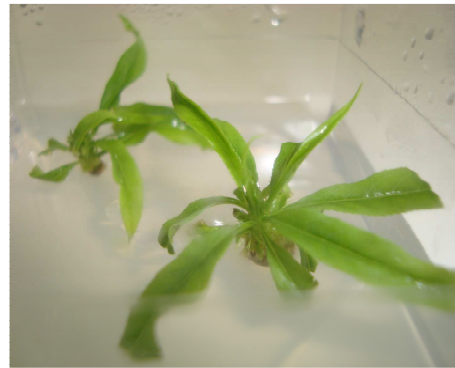
Εικόνα 4α.



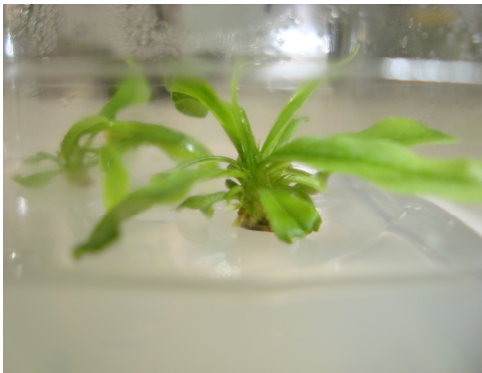
Εικόνα 4β.



Εικόνα 4γ.



Εικόνα 4δ.



Εικόνα 4ε.



Εικόνα 4στ.

ΣΤ. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Auge R., Beauchesne G., Boccon-Gibod J., Decourtye L., Digat B., Jalouzot R., Minier R., Morand J.-Cl., Reynoird J.P., Strullu D.G., Vidalie H., 1995. *In Vitro* Culture and its applications in Horticulture. Science Publishers, Inc. 3rd edition.
- Bonga J.M. and Von aderkas P., 1992. *In Vitro* Culture of Trees. Forestry sciences. Kluwer academic publishers.
- Boxus Ph. and Terzi J.M., 1988. Control of accidental contaminations during mass propagation. *Acta. Hort.* 225, pp. 189-192.
- Fotopoulos Stavros, 1999. Studies on *in vitro* propagation of PR 204/84 peach rootstock (*P. Persica* x *P. amygdalus*). Department of Horticulture, Writtle College, University of Essex. National Argicultural Research Foundation, Pomology Institute, Naoussa, Greece.
- Gautheret R.J., 1982. Plant tissue culture. In: "The history in Plant Tissue Culture" (Ed. A Fujiwara). Japan Assn. Plant Tiss. Cult., Tokyo, pp.7-11.
- George F. E., 1993. Plant propagation by tissue culture. Part 1: The Technology, 2nd edition. Exegetics Ltd., England.
- Grondeau and Samson, 1994. in Langens-Gerrits M., M. Albers and G. De Klerg, 1998. Hot-water treatment before tissue culture reduces initial contamination in *Lilium* and *Acer*. *Plant Cell Tissue org. Cult.* 52, pp. 75-77.
- Haberlandt G., 1902. Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. *Sitzungser. Math-Naturwiss. Kl. Kaiser Akad. Wiss. Wien* 111: 69-92.
- Hartman T. Hudson, Kester E. Dale, Davies T. Fred, Jr, Geneve L. Robert, 1997. *Plant Propagation: Principles and Practices*. 6th edition. Prentice Hall International, Inc.
- Kitto S.L., 1997. Commercial micropropagation. *HortScience* 32:1012-1014.
- Kyte Lydiane, 1987. *Plants From Test Tubes. An Introduction to Micropropagation*. 2nd edition. Timber Press (Portland, Oregon).
- Lawson R.A., R.H. Zimmerman, R.J. Griesbach, F.A. Hammerschlag, 1986. Pathogen detection and elimination: In tissue culture as a plant production system for horticultural crops. Dordrecht: Martinus Nijhoff Publishers, pp. 97-118.
- Leisner S.M. and S.H. Howell, 1993. Long-distance movement of viruses in plants. *Trends Microbiol.* 1, pp. 314-423.
- Lucas W.J. and R.L. Gilbertson, 1994. Plasmodesmata in relation to viral movement within tissues. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32, pp. 387-411.

- Maule A.J., 1991. Virus movement infected plants. *Crit. Rev. Plant Sci.* 9, pp. 457-473.
- Mirolawa Cieslinska, 2007. Application of thermo- and chemotherapy *in vitro* for eliminating some viruses infecting *Prunus sp.* fruit trees. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*.
- Morel G. and Martin C., 1952. Guérison de dahlias atteintes d' une maladie a virus. *C.R. Acad. Agr. France*, 41. pp. 472-475.
- Morel G., Martin C. and Muller, 1968. La guérison des pommes de terre atteintes de maladies a virus. [Recovery of potato, attacked by viral diseases.] *Ann. Physiol. Veg.*, 10(2), 113-139.
- Murashige T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15, pp. 473-497.
- Murashige T., Bitters W.P., Rangan T.S., Naver E.M., Roistacher C.N., Holliday P.B., 1972. A technique of shoot apex grafting and its utilization towards recovering virus-free citrus clones. *Hort. Science*, 7, pp. 118-119.
- Murashige T., 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Annu. Rev. Plant Physiol.*
- Myrta A., Di Terlizzi B., Savino V., 2003. Virus and virus-like diseases of stone fruits, with particular reference to the Mediterranean region. *Option Mediterranees, Ser. B/No45*. Bari, CIHEAM.
- Nas M.N. and P.E. Read, 2004. A hypothesis for the development of a defined tissue culture medium of higher plants and micropropagation of hazelnuts. *Scientia Hort.*, 101, pp.189-200.
- Paoli G., Rossi V., Scozzoli A., 1994. *Micropropagazione delle piante ortoflorofrutticole*. Edagricole-Edizioni agricole, Bologna.
- Paunovic S., Ruzic D., Vujovic T., Milenkovic S., Jevremovic D., 2007. *In vitro* production of Plum Pox Virus-Free Plums by chemotherapy with ribavirin. Fruit Research Institute, Cacak, Republic of Serbia.
- Pennazio and Redolfi, 1974. Potato virus X eradication in cultured pots to meristem tips. *Potato Res.*, 17, pp. 333-385.
- Sanjeev S., Balwinder S., Gita R., Aijaz Asghar Z., Vipin H., Aninash N., Gurdeep Singh V., 2006. Production of Indian Ringspot Virus Free plants from Kinnow employing chemotherapy coupled with shoot tip grafting. Department of Botanical&Environmental Sciences, Guru Nanak Dev University, Amritsar, India. *Journal of Central European Agriculture*, Vol. 8, No1.
- Shan X.Y., Li D.S., Qu R.D., 2000. Thidiazuron promotes *in vitro* regeneration of wheat and barley. *In vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 36, pp. 207-210.

- Skoog F., Miller CO., 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symp. Soc. Exp. Biol. 11: 118-130.
- Smith IM., 2002. The future of plant quarantine in Europe. 11^o Πανελλήνιο Φυτοπαθολογικό Συνέδριο. Πρέβεζα 1-4 Οκτωβρίου.
- Steward F.C., Mapes M.O., Mears K., 1958. Growth and organized development of cultured cells. II. Organization in cultures from freely suspended cells. Am. J. Bot. 45: 705-708.
- Vasil V. and Hildebrandt A.C., 1965. Differentiation of tobacco plants from single, isolated cells in microcultures. Science 150: 889-892.
- Vasilakakis MD., 1991. An *in vitro* study of graft-incompatibility between pear and quince: its expression in relation to rootstock, scion cultivar and temperature. Adv. Hort. Sci. 2: 51-54.
- Weiland C.M., Cantos M., Troncoso A., Perez-Camacho F., 2004. Regeneration of virus-free plants by *in vitro* chemotherapy of GFLV (Grapevine Fanleaf Virus) infected explants of *Vitis vinifera* L.CV "Zalema". ISHS, ActaHorticulturae 652: Internat. Symposium on Grapevine growing, Commerce and Research.

- Βασιλακάκης Μ., Θεριός Ι., 2001. Μαθήματα Ειδικής Δενδροκομίας: Φυλλοβόλα Οπωροφόρα Δένδρα. Εκδ. Υπηρεσία Δημοσιευμάτων ΑΠΘ.
- Βασιλακάκης Μ., 2004. Γενική και Ειδική Δενδροκομία. Εκδόσεις Γαρταγάνη.
- Βασιλακάκης Μ., 2004. Ενίσχυση Προγράμματος Μαθημάτων Επιλογής Τμήματος Γεωπονίας. Νέες Τεχνολογίες στις Γεωπονικές Επιστήμες. «Νέες Τεχνολογίες Παραγωγής Πολλαπλασιαστικού Υλικού : «Εισαγωγή - συμβατικές μέθοδοι πολλαπλασιασμού. Ιστοκαλλιέργεια, Θερμοθεραπεία». 3^{ος} κύκλος. Επιχειρησιακό Πρόγραμμα Εκπαίδευσης & Αρχικής Επαγγελματικής Κατάρτισης II.
- Γαβριηλίδης Σ., Σταματάτος Ε., 1993. Το υποκείμενο ροδακινιάς GF-677 και ο πολλαπλασιασμός του με την μέθοδο της ιστοκαλλιέργειας. Πτυχιακή διατριβή. Θεσσαλονίκη.
- Γρηγοριάδου Αικ., 2003. Μελέτη της *in vitro* αναπαραγωγής ελληνικών ποικιλιών ελιάς (*Olea europaea* L.). Διδακτορική διατριβή. Θεσσαλονίκη.
- Γρηγοριάδου Αικ., 2007. Σημειώσεις μαθήματος: Πολλαπλασιασμός Οπωροκηπευτικών φυτών. Εκδ. Υπηρεσία Δημοσιευμάτων ΤΕΙΘ.
- Γρηγοριάδου Κ. και Βασιλακάκης Μ., 2004. Ενίσχυση Προγράμματος Μαθημάτων Επιλογής Τμήματος Γεωπονίας. Νέες Τεχνολογίες

- στις Γεωπονικές Επιστήμες. «Νέες Τεχνολογίες Παραγωγής Πολλαπλασιαστικού Υλικού : Εμπορική Ιστοκαλλιέργεια-Βιοαντιδραστήρες». 3^{ος} κύκλος. Επιχειρησιακό Πρόγραμμα Εκπαίδευσης & Αρχικής Επαγγελματικής Κατάρτισης II.
- Δημάση-Θεριού Κ., 1995. Σημειώσεις γενικής δένδροκομίας: Πολλαπλασιασμός Οπωροφόρων. Εκδ. Υπηρεσία Δημοσιευμάτων ΑΠΘ.
- Ελευθερίου Ε.Π., 1994. Τεχνολογία Φυτικού Πολλαπλασιαστικού Υλικού. Εκδ. Art of Text. Θεσσαλονίκη.
- Θεριός Ι. και Δημάση-Θεριού Κ., 2006. Γενική Δένδροκομία: Πολλαπλασιασμός και υποκείμενα οπωροφόρων. Θεσσαλονίκη.
- Κάνουρα Μαρίνα, 2008. Αναπαραγωγή του νέου υποκειμένου ροδακινιάς (αμυγδαλοροδάκινο) P1. Πτυχιακή Διατριβή. Θεσσαλονίκη.
- Κίντζιος ΔΡ.Σ.Ε., 1994. Επιχειρηματική ιστοκαλλιέργεια: Κατασκευή και διαχείριση επιχειρηματικών μονάδων παραγωγής ανθοκομικού πολλαπλασιαστικού υλικού με ιστοκαλλιέργεια. Εκδ. Α. Σταμούλης. Αθήνα-Πειραιάς.
- Μαγγανάρης Α., 2008. Σημειώσεις μαθήματος: Φυλλοβόλα Οπωροφόρα Δένδρα. Εκδ. Υπηρεσία Δημοσιευμάτων ΤΕΙΘ.
- Μαγγανάρης Γ., 2001. Εξυγίανση από ιούς της ροδακινιάς (*Prunus persica* var. *Nectarina max*) με θερμοθεραπεία και καλλιέργεια *in vitro*. Μεταπτυχιακή διατριβή. Θεσσαλονίκη.
- Μαυρομάτης Α.Γ., 1994. Καλλιέργεια *in vitro* ανθέρων βαμβακιού (*Gossypium* spp.). Μεταπτυχιακή διατριβή. Θεσσαλονίκη.
- Μαυρομάτης Α.Γ., 1996. Αναγέννηση *in vitro* και σωμακλωνική παραλλακτικότητα στο βαμβάκι (*Gossypium* spp.). Διδακτορική Διατριβή. Θεσσαλονίκη.
- Μερτζάκης Δ., 2005. Καλλιέργειες *in vitro*. Εκδόσεις Ίων.
- Μπεμπέλη Π., 1989. Μορφογενετική αντίδραση και σωμακλωνική παραλλακτικότητα σε σειρές σίκαλης και *Triticale* που διαφέρουν σε συστατική τελομερική ετεροχρωματίνη. Διδακτορική διατριβή. Επετηρίδα: Ανώτατη Γεωπονική Σχολή Αθηνών (Εργαστήριο βελτίωσης φυτών και γεωργικού πειραματισμού).
- Νιάνιου Ε. και Βασιλακάκης Μ., 2004. Ενίσχυση Προγράμματος Μαθημάτων Επιλογής Τμήματος Γεωπονίας. Νέες Τεχνολογίες στις Γεωπονικές Επιστήμες. «Νέες Τεχνολογίες Παραγωγής Πολλαπλασιαστικού Υλικού: Βιοτεχνολογία - Εφαρμογές στα φυτά». 3^{ος} κύκλος. Επιχειρησιακό Πρόγραμμα Εκπαίδευσης & Αρχικής Επαγγελματικής Κατάρτισης II.
- Παναγόπουλος Χ. Γ., 1993. Ασθένειες Καρποφόρων Δένδρων και Αμπέλου. Εκδ. Α. Σταμούλης, Αθήνα.

- Πλαστήρα Β., 1990. *In vitro* καλλιέργεια φυτικών ιστών εσπεριδοειδών για παραγωγή υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού. Γεωργία και Ανάπτυξη, Νοέμ.-Δεκ., σελ. 17-31.
- Ποντίκης Κ., 1994. Πολλαπλασιασμός καρποφόρων δένδρων και θάμνων. Εκδ. Σταμούλη. Αθήνα-Πειραιάς.
- Ρούμπος Α.Κ., Καρπουζίδης Λ., Μαργαρίτα Μ., 1995. Η ιστοκαλλιέργεια της μηλιάς. Γεωργία και Ανάπτυξη, Ιαν., σελ. 12-24.
- Σκαλτσογιάννης Α., 1988. Η συμβολή του πολλαπλασιασμού *in vitro* στη Γενετική Βελτίωση του υβριδίου πεύκης *Pinus brutia x Pinus halepensis*. Διδακτορική διατριβή. Επιστημονική Επετηρίδα του τμήματος Δασολογίας και Φυσικού Περιβάλλοντος της Σχολής Γεωτεχνικών Επιστημών.
- Σφακιωτάκης Ε., 1993. Στοιχεία Γενικής Δενδροκομίας. Θεσσαλονίκη.
- Σφακιωτάκης Ε., 1987. Μαθήματα Γενικής Δενδροκομίας. Εκδ. Υπηρεσία Δημοσιευμάτων ΑΠΘ. Θεσσαλονίκη.
- Τζαβέλλα-Κλωνάρη Κ., Παπακώστα Δ., 2003. Ενίσχυση Προγράμματος Μαθημάτων Επιλογής Τμήματος Γεωπονίας. Περιβαλλοντική Εκπαίδευση-Ευαισθητοποίηση. «Ολοκληρωμένη Διαχείριση Αγροτικών Συστημάτων: Ολοκληρωμένη Αντιμετώπιση Ασθενειών». 2^{ος} κύκλος. Επιχειρησιακό Πρόγραμμα Εκπαίδευσης & Αρχικής Επαγγελματικής Κατάρτισης II.
- Χατζόπουλος Π., 2001. Βιοτεχνολογία Φυτών. Εκδόσεις Έμβρυο. Αθήνα.

www.actahort.org

www.greek.ari.gov.cy

www.insad.pl

www.microbiologyprocedure.com

www.molecular-plant-biotechnology.info