



ΑΝΩΤΑΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ

**ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ**

ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΩΝ (ΠΡΩΗΝ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ)

ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΣΤΟ ΕΙΔΟΣ *Sideritis clandestina*



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ: ΚΟΝΔΥΛΗΣ ΣΥΜΕΩΝ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ

2015

ΑΝΩΤΑΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ

**ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ**

ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΩΝ (ΠΡΩΗΝ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ)

ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΣΤΟ ΕΙΔΟΣ *Sideritis clandestina*

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ: ΚΟΝΔΥΛΗΣ ΣΥΜΕΩΝ
ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΚΑΡΤΣΩΝΑΣ ΕΠΑΜΕΙΝΩΝΔΑΣ**

ΚΑΛΑΜΑΤΑ

2015

Πνευματικά δικαιώματα

Copyright ©

Υπεύθυνη Δήλωση : Εγώ, ο Κονδύλης Συμεών βεβαιώνω ότι είμαι ο συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας με τίτλο ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΣΤΟ ΕΙΔΟΣ *Sideritis clandestina*. Στο τέλος της εργασίας αναφέρονται λεπτομερώς οι πηγές οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την άντληση πληροφοριών, δεδομένων, πινάκων καθώς και εικόνων.

Υπογραφή

ΚΟΝΔΥΛΗΣ ΣΥΜΕΩΝ

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον καθηγητή και επιβλέπων στην πτυχιακή μου εργασία κ. Κάρτσωνα Επαμεινώνδα για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε δίνοντάς μου τη δυνατότητα να εκπονήσω την συγκεκριμένη πτυχιακή εργασία. Τον ευχαριστώ επίσης για την πολύτιμη βοήθεια που μου προσέφερε και για το γεγονός ότι αποτέλεσε έναν άψογο καθοδηγητή. Ιδιαίτερες ευχαριστίες θα ήθελα να απευθύνω στον κ. Καρρά Ευστράτιο για τις πολύτιμες γνώσεις και συμβουλές που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας και ιδιαίτερα για την υποστήριξη που έλαβα από εκείνον κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

Επιπλέον, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους συναδέλφους μου, οι οποίοι με αγκάλιασαν από την πρώτη στιγμή και με έκαναν να αισθανθώ ισότιμο μέλος της ομάδας.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένεια μου και ιδιαίτερα την μητέρα μου και την αδελφή μου διότι ήταν και είναι πάντα δίπλα μου και με στηρίζουν με όλη τους τη θερμότητα σε κάθε μου βήμα.

Περίληψη

Στην εργασία αυτή εξετάζεται η βλαστική ικανότητα σπόρων του είδους *Sideritis cladestina* σε θρεπτικό υπόστρωμα Murashige και Skoog (MS). Αναφέρονται οι καταλληλότερες συνθήκες που θα πρέπει να γίνει η ιστοκαλλιέργεια, πια τα βασικότερα συστατικά που απαρτίζεται ένα θρεπτικό υλικό και πως γίνεται η προετοιμασία του. Επίσης αναφέρονται πως πρέπει να είναι ο χώρος που παρασκευάζεται το θρεπτικό υπόστρωμα και πως αποστειρώνονται τα αντικείμενα. Ακόμη μελετήθηκε η απολύμανση των εκφύτων σε δυο διαφορετικές χρονικές περιόδους. Παρακάτω αναγράφονται και τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα της ιστοκαλλιέργειας. Επίσης αναφέρονται παράγοντες που επηρεάζουν την ιστοκαλλιέργεια. Τέλος στην πειραματική διαδικασία αναγράφονται λεπτομέρειες για το φυτικό ιστό καθώς και για την πορεία του πειράματος την απολύμανση και τα αποτελέσματα φαίνονται και παρακάτω στα διαγράμματα που θα ακολουθήσουν.

Περιεχόμενα

Πνευματικά δικαιώματα.....	iii
Ευχαριστίες.....	iv
Περίληψη.....	1
1. Εισαγωγή.....	4
1.2 Ιστοκαλλιέργεια.....	5
1.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την ιστοκαλλιέργεια.....	7
1.3.1 Ενδογενείς παράγοντες.....	7
1.3.2 Εξωγενείς παράγοντες.....	9
2. Θρεπτικά υλικά.....	11
2.1 Σύνθεση θρεπτικού υλικού.....	12
2.1.1. Ανόργανα άλατα.....	12
2.1.2. Πηγές άνθρακα και ενέργειας.....	13
2.1.3. Βιταμίνες.....	14
2.1.4. Αμινοξέα.....	14
2.1.5. Οργανικά συμπληρώματα.....	15
2.1.6. Ρυθμιστές ανάπτυξης – PGR (plant growth regulators).....	15
2.1.7. Στερεοποιητικοί παράγοντες.....	18
2.2 Προετοιμασία θρεπτικού υλικού.....	19
3. Εργαστήριο ιστοκαλλιέργειας.....	20
3.1 Χώροι εργαστηρίου.....	21
3.1.1 Χώρος πλυσίματος.....	21
3.1.2 Χώρος προετοιμασίας θρεπτικού υλικού.....	22
3.1.3 Χώρος ασηπτικής μεταφοράς.....	22
3.1.4 Χώρος ανάπτυξης καλλιεργειών.....	23
3.1.5 Χώρος φυτοπαθολογικού εργαστηρίου.....	24
3.1.6 Χώρος εγκλιματισμού/ σκληραγώγησης.....	24
3.1.7 Θερμοκήπιο.....	25
3.2 Εξασφάλιση ασηπτικού περιβάλλοντος – Τεχνικές αποστείρωσης.....	25
3.2.1 Αποστείρωση σκευών και εξοπλισμού.....	25
3.2.2 Αποστείρωση θρεπτικού υλικού.....	25
3.2.3 Αποστείρωση φυτικού υλικού.....	26

3.2.4 Αποστείρωση του θαλάμου ανάπτυξης και μεταφοράς.....	26
4. Μικροπολλαπλασιασμός.....	27
4.1 Στάδια μικροπολλαπλασιασμού.....	27
4.2 Πλεονεκτήματα μικροπολλαπλασιασμού.....	28
4.3 Μειονεκτήματα μικροπολλαπλασιασμού.....	29
4.4 Σκοπός εργασίας.....	29
5. Υλικά και μέθοδοι.....	30
5.1. Υλικά.....	30
5.2. Μέθοδοι.....	31
5.2.1. Παρασκευή του θρεπτικού υποστρώματος.....	31
5.2.2. Τοποθέτηση σπόρων <i>in vitro</i>	31
6. Αποτελέσματα – Συζήτηση.....	32
Βιβλιογραφία.....	36

1. Εισαγωγή

Σε έναν κόσμο όπου η αύξηση του πληθυσμού ξεπερνά την παροχή τροφίμων, νέες γεωργικές τεχνολογίες, και ειδικά αυτή της φυτικής βιοτεχνολογίας, πρέπει να εφαρμοστούν ταχέως, έτσι ώστε το κενό που έχει δημιουργηθεί μεταξύ της παραγωγής και της ανθρώπινης ζήτησης να μειωθεί. Ο παγκόσμιος πληθυσμός θα φτάσει σύντομα τα 7,5 δισεκατομμύρια, ενώ εκτιμάται ότι μέχρι το 2050 θα έχει ξεπεράσει τα 10 δισεκατομμύρια. Ταυτόχρονα, η γεωργική παραγωγή αυξάνεται με βραδύ ρυθμό που δεν ξεπερνά το 1.8 – 2.0% ετησίως. Η ανάγκη της κάλυψης τόσο των ανθρώπινων αναγκών όσο και της ενίσχυσης και βελτίωσης της γεωργικής παραγωγής, έχει οδηγήσει όλα αυτά τα χρόνια στην αναζήτηση καινοτόμων ιδεών και τεχνικών {Altman, 2002}.

Αν και η φυτική βιοτεχνολογία δεν αποτελεί ένα νέο πεδίο, παρ' όλα αυτά χρειάστηκαν σχεδόν έξι δεκαετίες (αρχές της δεκαετίας του 1990) μέχρι την καλύτερη κατανόηση των ορμονών που σχετίζονται με την ανάπτυξη των φυτών. Η ανακάλυψη του DNA το 1953 και των περιοριστικών ενζύμων κατά τη διάρκεια του 1970, είχε ως αποτέλεσμα όχι μόνο την ταχεία πρόοδο της μοριακής γενετικής αλλά και την κατανόηση της δομής, της λειτουργίας και της ρύθμισης των φυτικών γονιδίων. Η τεχνολογία της φυτικής ιστοκαλλιέργειας σε συνδυασμό με τη μοριακή βιολογία κατά τη διάρκεια της δεκαετίας του 1980, οδήγησαν στην ανάπτυξη διαγονιδιακών καλλιεργειών, και σε αυτό που σήμερα αποτελεί τη βιοτεχνολογία των φυτών {Vasil, 2003}.

Η βιοτεχνολογία των φυτών είναι ένας σύνθετος επιστημονικός κλάδος και είναι άρρηκτα συνδεδεμένος με τη μοριακή βιολογία και τη γενετική μηχανική. Το κύριο αντικείμενο ενασχόλησης της βιοτεχνολογίας των φυτών εστιάζει στη διαλεύκανση της μοριακής βάσης και του δικτύου των γονιδίων μέσω των οποίων ελέγχονται η αύξηση, η ανάπτυξη, ο μεταβολισμός, η αναπαραγωγή, καθώς και άλλες θεμελιώδεις διαδικασίες των φυτών, με τελικό σκοπό την παραγωγή ποιοτικότερων και θρεπτικότερων προϊόντων {Κανελλής, & Γερασόπουλος 2003}.

Οι βασικές τεχνολογίες της φυτικής βιοτεχνολογίας είναι η ιστοκαλλιέργεια φυτικών ιστών και κυττάρων που έχει αναβαθμίσει τις τεχνικές πολλαπλασιασμού των φυτών και η γενετική μηχανική που οδήγησε στη δημιουργία των γενετικά τροποποιημένων προϊόντων με βελτιωμένες ιδιότητες.

1.2 Ιστοκαλλιέργεια

Η ιστοκαλλιέργεια (plant tissue culture) ορίζεται ως η *in vitro* ασηπτική καλλιέργεια κυττάρων, ιστών, οργάνων, τμημάτων του φυτού ή ακόμα και ολόκληρου του φυτού, κάτω από κατάλληλες θρεπτικές και περιβαλλοντικές συνθήκες, με σκοπό την αναπαραγωγή νέων ολοκληρωμένων φυτών {George, 1993; Thorpe, 2007}.

Οι σύγχρονες εφαρμογές της ιστοκαλλιέργειας έχουν τις ρίζες τους βαθιά στο παρελθόν όταν το 1838, οι Schleiden και Schwann καθιέρωσαν την κυτταρική θεωρία και διατύπωσαν την άποψη ότι κάθε κύτταρο ενός πολυκύτταρου οργανισμού πρέπει να είναι ικανό να δρα ανεξάρτητα, και κάτω από κατάλληλες συνθήκες να αναπτύσσεται σε πλήρη οργανισμό. Το 1878, ο Vochting υποστήριξε ότι κάθε τμήμα του φυτού, ανεξαρτήτως μεγέθους, όταν βρεθεί σε κατάλληλες συνθήκες, θα πρέπει να μπορεί να αναπτυχθεί και να δώσει ένα νέο φυτό. Ο Vochting επέτυξε την παραγωγή κάλλου, δηλαδή ανοργάνωτης και αδιαφοροποίητης μάζας κυττάρων, από έκφυτα του είδους *Brassica rapa*, δίνοντας ιδιαίτερη βαρύτητα στη πολικότητα που χαρακτηρίζει την ανάπτυξη των φυτικών τμημάτων. Σχεδόν δύο δεκαετίες αργότερα, ο Rechniger (1893), περιέγραψε τη δημιουργία κάλλου, από τμήματα βλαστού και ρίζας. Ως κάλλος ορίζεται ένας συμπαγής, άμορφος ιστός που σχηματίζεται όταν τα φυτικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται με άτακτο τρόπο και στον οποίο είναι δυνατόν να εκφραστεί διαφορετικό μορφογενετικό πρόγραμμα, ανάλογα με το είδος και τη συγκέντρωση των εξωγενών αυξητικών παραγόντων {Hartmann et al.; Thorpe, 2007}.

Ο Haberlandt, στην εργασία του ‘‘Experiments on the culture of isolated plant cells’’ ανέφερε τόσο τη δυνατότητα απομόνωσης φυτικών κυττάρων όσο και τη δυσκολία πρόκλησης κυτταροδιαίρεσεων. Παράλληλα, επεσήμανε ότι το πρόβλημα για το μέλλον της τεχνικής θα ήταν η ανακάλυψη των κατάλληλων συνθηκών κάτω από τις οποίες τα μεμονωμένα κύτταρα θα μπορούσαν να οδηγηθούν σε κατταροδιαίρεσεις. Ο Haberlandt στο πείραμά του χρησιμοποίησε την πατάτα ως φυτικό υλικό, καθώς και ένα σύνθετο θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε γλυκόζη. Κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας, τα κύτταρα αυξήθηκαν σε μέγεθος, συσσωρεύσαν άμυλο, όμως απέτυχαν στο διαχωρισμό.

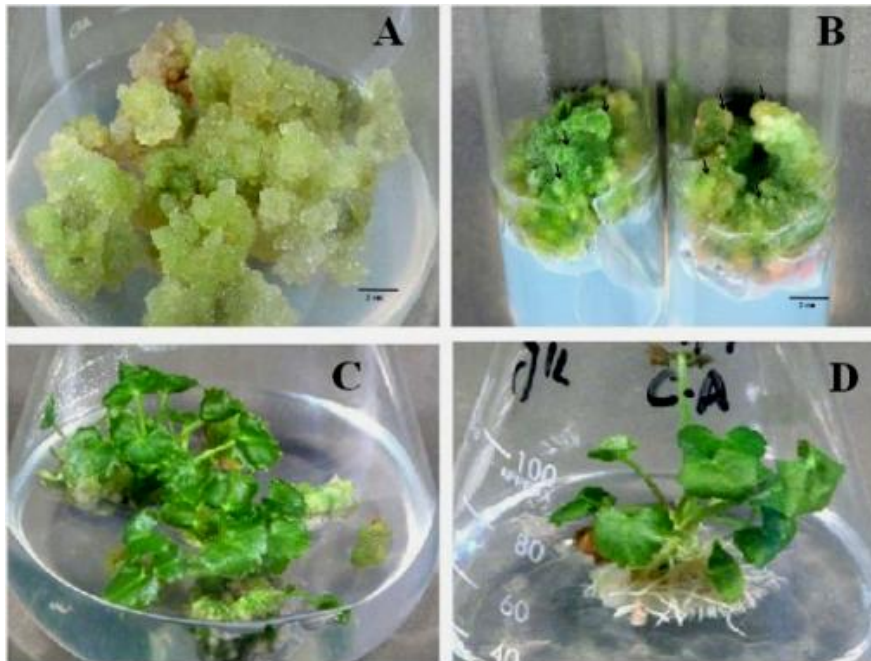
Οι πρώτες επιτυχείς καλλιέργειες φυτικών ιστών έγιναν τη δεκαετία του 1930 από τους White, Gautheret, Nobecourt κ.α {Trigiano, 2000; Chawla, 2002}. Το 1957, οι Skoog και Miller απέδειξαν ότι η σχέση μεταξύ αυξινών και κυτοκινινών παίζει καθοριστικό ρόλο στη διαφοροποίηση των βλαστών και των ριζών σε μια καλλιέργεια.

Έτσι, ο μικροπολλαπλασιασμός παρουσιάστηκε σαν μέθοδος το 1960 {Morel, 1960, 1965}. Οι τεχνικές που αναπτύχθηκαν μέχρι τότε σε συνδυασμό με την ανακάλυψη ενός

Κεφάλαιο 1

θρεπτικού υποστρώματος κατάλληλου να χρησιμοποιηθεί σε πολλές περιπτώσεις {Murashige & Skoog 1962} οδήγησαν στην επιτυχή *in vitro* αναπαραγωγή πολλών ειδών.

Η ιστοκαλλιέργεια βασίζεται στις δύο σημαντικές ιδιότητες του φυτικού κυττάρου, στην ολοδυναμικότητα (totipotency) {Haberlandt., 1902} και στην ικανότητα διαφοροποίησης (de-differentiation). Η ολοδυναμικότητα αναφέρεται στη μοναδική ικανότητα του φυτικού κυττάρου να μπορεί να αναγεννήσει ολόκληρο το φυτό από το οποίο προήλθε ανεξάρτητα από το βαθμό διαφοροποίησης στον οποίο βρίσκεται εκείνη τη στιγμή, ενώ η αποδιαφοροποίηση αναφέρεται στην ικανότητα πλήρως διαφοροποιημένων και ώριμων φυτικών κυττάρων να αποκτήσουν ξανά μεριστωματικές ιδιότητες {George, 1993}.



Εικόνα 1. Καλλογέννεση και οργανογέννεση του είδους *Centella asiatica* L. από έκφυτο φύλλου σε MS θρεπτικό υλικό. Α) Σχηματισμός κάλλου σε 5,37μM βενζυλαδενίνης (BA); Β) Σχηματισμός σε 5,37μM ναφθενικού ακετικού οξέως (NAA); Γ) Έκφυση σε 4.42μM BA+5.37 μM NAA; Δ) Σχηματισμός ριζών σε 10.74 μM NAA.

<http://www.jbioleng.org/content/5/1/13/figure/F1?highres=y>

1.3 Παράγοντες που επηρεάζουν την ιστοκαλλιέργεια

Για την επιτυχία μιας *in vitro* καλλιέργειας, μια σειρά από παράγοντες πρέπει να ληφθούν υπόψη. Γενικότερα, μπορεί να διαχωριστούν σε ενδογενείς και εξωγενείς. Οι παράγοντες αυτοί αναφέρονται συνοπτικά στον παρακάτω πίνακα.

Πίνακας 1. Παράγοντες που επηρεάζουν την επιτυχία της ιστοκαλλιέργειας.

Ενδογενείς Παράγοντες	Εξωγενείς Παράγοντες
Φυτικό είδος	Μέγεθος εκφύτου
Γονότυπος	Ασηπτικό περιβάλλον
Είδος εκφύτου	Θρεπτικό υπόστρωμα
Ηλικία	Συνθήκες καλλιέργειας

1.3.1 Ενδογενείς παράγοντες

> Φυτικό είδος

Το φυτικό είδος είναι εξαιρετικά σημαντικό για την επιτυχία της ιστοκαλλιέργειας. Υπάρχουν ορισμένα είδη τα οποία παρουσιάζουν από μικρή μέχρι μεγάλη αδυναμία αναγέννησης. Αυτά ονομάζονται δύστροπα (*recalcitrant*) και τόσο τα κύτταρα όσο και οι ιστοί τους παρεμποδίζουν την έκφραση ολοδυναμισμού {Tiesserat, 1985}.

> Γονότυπος

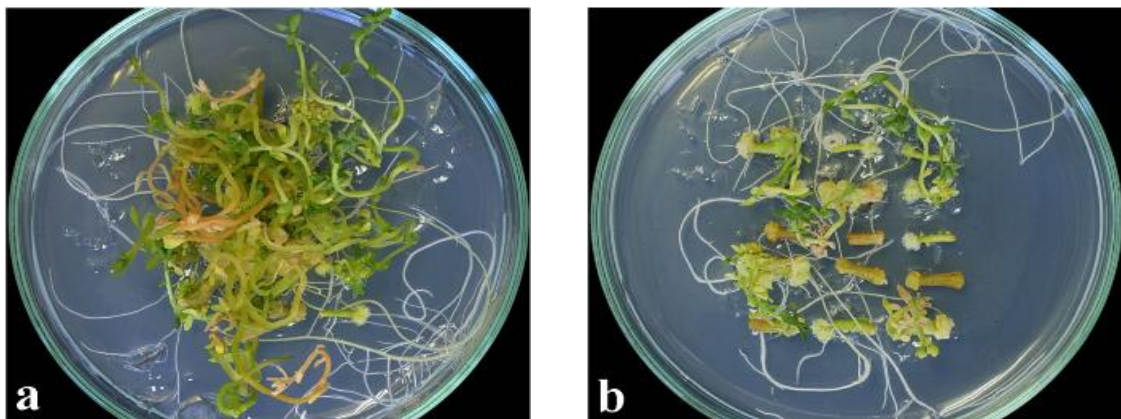
Σύμφωνα με έρευνες, ο γονότυπος παίζει επίσης σπουδαίο ρόλο στην επιτυχία της ιστοκαλλιέργειας. Έχει αποδειχτεί ότι τα δικοτυλήδωνα αναγεννώνται πιο εύκολα σε αντίθεση με τα μονοκοτυλήδωνα. Φυτά που ανήκουν στην κατηγορία των δικοτυλήδωνων όπως *Solanacea*, *Cruciferae*, *Gesneriaceae*, *Begoniaceae* και *Crassulaceae*, έχουν μεγαλύτερες ικανότητες αναγέννησης. Γενικότερα, εκτιμάται ότι τα ποώδη φυτά αναπαράγονται πιο εύκολα απ' ό,τι τα ξυλώδη (π.χ θάμνοι) {Pierik, 1997}.

> Είδος εκφύτου

Θεωρητικά, κάθε τμήμα του φυτού μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως έκφυτο (explant) στην *in vitro* καλλιέργεια. Ως έκφυτα μπορεί να χρησιμοποιηθούν: τμήματα ρίζας, τμήματα φύλλου, μίσχου ή ελάσματος, τμήματα βλαστού, μεριστωματικά κύτταρα, τμήματα ανθικών οργάνων ή και ολόκληρα ανθικά μέρη (γυρεόκοκκοι, ύπεροι, πέταλα και άλλα) {Arditti., 2008}.

> Ηλικία

Η ικανότητα αναπαραγωγής μεγαλύτερων ηλικιακά φυτών, είναι συχνά χαμηλή. Όσο η ηλικία του εκφύτου που χρησιμοποιείται στην ιστοκαλλιέργεια αυξάνεται, τόσο η αναπαραγωγική ικανότητά του μειώνεται. Ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα της αναπαραγωγικής ικανότητας μεταξύ νέων και παλαιών φυταρίων αποτελεί το δικότυλο φυτό λινάρι (*Linum usitatissimum L.*) Κατά τη διάρκεια αυτής της μελέτης, ερευνήθηκε η αναπαραγωγική ικανότητα των βλαστών σε τρεις διαφορετικές φάσεις (έπειτα από 7, 12 και 17 ημέρες). Τα 7 ημερών έκφυτα όπως ακεινονίζεται και στην Εικ. 2. έδωσαν υψηλότερα ποσοστά αναπαραγωγικότητας σε αντίθεση με των 12 ημερών έκφυτα {Yildiz M. et al., 2003}.



Εικόνα 2. Αναπαραγωγή βλαστών από το είδος *Linum usitatissimum L.* a) 7 ημερών σπορόφυτο και b) 12 ημερών σπορόφυτο έπειτα από 4 εβδομάδες από την έναρξη της καλλιέργειας. <http://www.intechopen.com/source/html/40187/media/image3.jpeg>

1.3.2 Εξωγενείς παράγοντες

> Μέγεθος εκφύτου

Εξαιτίας των περιορισμένων θρεπτικών και ορμονικών αποθεμάτων είναι γενικά πιο δύσκολο να ληφθεί μια επιτυχημένη ιστοκαλλιέργεια από μικρά τμήματα του φυτού (π.χ κύτταρα ή μεριστώματα). Μεγαλύτερου μεγέθους έκφυτα (π.χ φύλλα, υποκοτύλια) διαθέτουν επαρκές ποσοστό διατροφικών αποθεμάτων και μπορούν να αναγεννηθούν *in vitro* χωρίς να εξαρτώνται άμεσα από τις θρεπτικές ουσίες και τις ορμόνες ως μέσο ανάπτυξης {Pierik, 1997}.

> Ασηπτικό περιβάλλον

Η εξασφάλιση ασηπτικών συνθηκών τόσο κατά την έναρξη της καλλιέργειας, όσο και κατά τη διάρκειά της είναι απολύτως απαραίτητη. Οι *in vitro* συνθήκες παρέχουν ένα περιβάλλον ευνοϊκό για την ανάπτυξη βακτηρίων και μυκήτων, με αποτέλεσμα την αναστολή της ανάπτυξης της καλλιέργειας. Ο πιο σημαντικός χειρισμός πριν την έναρξη της καλλιέργειας είναι η επιφανειακή αποστείρωση του εκφύτου.



Εικόνα 3. Α) Δείγμα εκφύτου από υγιές δείγμα, Β) Δείγμα εκφύτου από μολυσμένο δείγμα

Η επιφανειακή αποστείρωση έχει ως στόχο την εξάλειψη όλων των μικροοργανισμών που μπορούν εύκολα να αναπτυχθούν κάτω από *in vitro* συνθήκες. Επιπλέον, η αποστείρωση θα πρέπει να εγγυάται όχι μόνο τη βιωσιμότητα του εκφύτου αλλά και την ικανότητα αναγέννησης, τα οποία είναι γνωστό ότι επηρεάζονται από την συγκέντρωση, την περίοδο εφαρμογής {Allan, 1991} και την θερμοκρασία του απολυμαντικού μέσου {Yildiz, 2002}. Καθώς η άμεση επαφή των εκφύτων με το απολυμαντικό κατά τη διαδικασία της αποστείρωσης ίσως έχει σοβαρές επιπτώσεις στην ικανότητα αναγέννησης {Yildiz, 2002}, η χρησιμοποίηση ασηπτικών ιστών ως πηγή εκφύτου συνιστάται ιδιαίτερα {Dixon &

Gonzales., 1994; Yildiz M. et al., 1997}. Ένα ευρύ φάσμα απολυμαντικών επιφανείας όπως η αιθανόλη, το υπεροξείδιο του υδρογόνου, το βρωμιούχο ύδωρ, ο χλωριούχος υδράργυρος, ο νιτρικός άργυρος, και τα αντιβιοτικά χρησιμοποιούνται στην επιφανειακή αποστείρωση. Από τα παραπάνω, το υποχλωριώδες νάτριο (NaOCl) είναι αυτό που χρησιμοποιείται συχνότερα καθώς είναι ιδιαίτερα αποτελεσματικό έναντι όλων των ειδών των βακτηρίων, των μυκήτων και των ιών {Dunn, 1968; Mercer & Somers, 1957; Smith, 1968; Spaulding, 1968}. Επιπλέον, οι ισχυρές οξειδωτικές του ιδιότητες το καθιστούν ιδιαίτερα δραστικό με τα αμινοξέα {Bietz & Sandford, 1971; Kantouch & Ardel-Fattah, 1971}, τα νουκλεϊκά οξέα {Hayatsu et al., 1971}, τις αμίνες και τα αμίδια {Sandford et al., 1971}.

> **Θρεπτικό υπόστρωμα**

Η σύνθεση του θρεπτικού υποστρώματος αποτελεί έναν σημαντικό παράγοντα που επηρεάζει την ανάπτυξη και την μορφογέννηση της ιστοκαλλιέργειας. Αν και υπάρχουν διάφορα θρεπτικά υποστρώματα, το πλέον γνωστό και χρησιμοποιούμενο είναι αυτό που προτάθηκε από τους Murashige και Skoog το 1962 {Murashige & Skoog., 1962}. Εκτενής αναφορά σχετικά με τη σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος θα γίνει στο επόμενο κεφάλαιο.

> **Συνθήκες καλλιέργειας**

Αρχικά τα έκφυτα τοποθετούνται στο υπόστρωμα ανάπτυξης, και έπειτα μεταφέρονται σε ειδικά διαμορφωμένα δωμάτια καλλιέργειας όπου περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η θερμοκρασία και ο φωτισμός ελέγχονται. Οι περιβαλλοντικές συνθήκες προσαρμόζονται κάθε φορά ανάλογα με το φυτικό είδος. Ο φωτισμός στο δωμάτιο καλλιέργειας πραγματοποιείται με λαμπτήρες φθορισμού. Συνήθως, φωτοπερίοδος 16/8 ωρών εφαρμόζεται, αν και μερικές φορές ίσως υπάρξουν κάποιες διαφοροποιήσεις ανάλογα με το φυτικό είδος.

Η θερμοκρασία στο δωμάτιο καλλιέργειας επηρεάζει την επιτυχία της ιστοκαλλιέργειας. Συνιστάται γενικότερα θερμοκρασία μεταξύ 26-28°C στο δωμάτιο καλλιέργειας {Trigiano, 2000}. Διακυμάνσεις της θερμοκρασίας θα πρέπει γενικώς να αποφεύγονται. Σε περίπτωση που η θερμοκρασία δεν παραμείνει σταθερή, έντονο στρες (stress) προκαλείται στις καλλιέργειες και αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αποτυχία της καλλιέργειας.

2. Θρεπτικά υλικά

Το είδος και η σύνθεση του θρεπτικού υλικού επιδρά τόσο στην ανάπτυξη όσο και στη μορφογένεση της ιστοκαλλιέργειας. Η επιλογή του θρεπτικού υλικού εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το είδος της επιλεγόμενης καλλιέργειας. Ορισμένοι ιστοί ανταποκρίνονται καλύτερα σε στερεό υπόστρωμα, ενώ άλλοι προτιμούν υγρό υπόστρωμα. Το θρεπτικό υλικό του White είναι ένα από τα πρώτα που χρησιμοποιήθηκαν στη φυτική ιστοκαλλιέργεια ριζών. Παρ' όλ' αυτά, το θρεπτικό υλικό των Murashige και Skoog (MS) θεωρείται το πλέον κατάλληλο και συνηθέστερα χρησιμοποιούμενο θρεπτικό υλικό στην αναγέννηση φυτών από ιστούς και κάλλους {Murashige & Skoog., 1962}. Το θρεπτικό υλικό του Gamborg (B5) χρησιμοποιείται συνήθως για την καλλιέργεια χλωροπλαστών {Gamborg et al., 1968}. Το B5 περιέχει μικρότερες ποσότητες νιτρικών αλάτων σε σύγκριση με το MS θρεπτικό υλικό. Τέλος, το θρεπτικό υλικό των Nitsch και Nitsch (NN) χρησιμοποιείται για τις καλλιέργειες ανθήρων και περιέχει ενδιάμεση συγκέντρωση αλάτων σε σύγκριση με αυτών του MS και του White {Nitsch & Nitsch, 1969}. Ο πίνακας 2 απεικονίζει τη σύσταση του θρεπτικού διαλύματος Murashige και Skoog (MS).

Πίνακας 2. Θρεπτικό διάλυμα MS {Murashige & Skoog, 1962}

Στοιχεία	Mg/l
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ · 2H ₂ O	440
MgSO ₃ · 7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
NA ₂ -EDTA	37.3
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27.8
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ · 4H ₂ O	22.3
ZnSO ₄ · 4H ₂ O	8.6
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025
Nicotinic Acid	0.5

Pyridoxine –HCl	0.5
Thiamine HCl	0.1
Glycine	2
Myoinositol	100

2.1 Σύνθεση θρεπτικού υλικού

Το θρεπτικό υλικό στο οποίο θα καλλιεργηθεί και θα αναπτυχθεί το έκφυτο που έχει επιλεγεί για την πραγματοποίηση μιας ιστοκαλλιέργειας παίζει καθοριστικό ρόλο για την επιτυχία αυτής. Το θρεπτικό υλικό μπορεί να είναι υγρό (δεν περιέχει άγαρ) ή στέρεο (περιέχει άγαρ σε συγκέντρωση συνήθως 0.6-0.8%). Το θρεπτικό υλικό περιλαμβάνει διάφορα συστατικά τα οποία συνοψίζονται συνοπτικά στον πίνακα 3.

Πίνακας 3. Συστατικά ενός θρεπτικού υλικού

Συστατικά	
Ανόργανα άλατα	Οργανικά συμπληρώματα
Πηγές άνθρακα και ενέργειας	Ρυθμιστές ανάπτυξης
Βιταμίνες	Στερεοποιητικοί παράγοντες
Αμινοξέα	

2.1.1. Ανόργανα άλατα

> Μακροστοιχεία

Οι καλλιεργούμενοι ιστοί έχουν ανάγκη από συνεχή εφοδιασμό με ορισμένα ανόργανα συστατικά. Τα συστατικά αυτά απαιτούνται σε μεγάλες ποσότητες (>0.5 mM/l) και ονομάζονται μακροστοιχεία. Αυτά περιλαμβάνουν: άνθρακα (C), υδρογόνο (H), οξυγόνο (O), άζωτο (N), φώσφορο (P), κάλιο (K), ασβέστιο (Ca), μαγνήσιο (Mg), και θείο (S).

Το άζωτο προστίθεται συνήθως υπό τη μορφή νιτρικού ή αμμωνιακού αζώτου ή ως συνδυασμός και των δύο μορφών. Το κάλιο προστίθεται υπό τη μορφή νιτρικού καλίου ή χλωριούχου νατρίου, όπως επίσης και υπό τη μορφή KH_2PO_4 που καλύπτει τις ανάγκες και σε φώσφορο. Ο φώσφορος μπορεί να προστεθεί και με τη μορφή $\text{NaHPO}_4\text{H}_2\text{O}$. Το ασβέστιο προστίθεται υπό τη μορφή $\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2\cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ή σαν άλατα άνυδρης μορφής, ενώ το μαγνήσιο ως ένυδρο θειικό μαγνήσιο ($\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$) {Κίντζιος, 1994}.

Το θρεπτικό υλικό θα πρέπει να περιέχει τουλάχιστον 25mM/l άζωτο και κάλιο. Τα υπόλοιπα μακροστοιχεία είναι επαρκή σε συγκεντρώσεις μεταξύ 1-3 mM/l {Torres, 1989}.

> Μικροστοιχεία

Τα μικροστοιχεία απαιτούν συγκέντρωση μικρότερη από 0.05 mM/l. Τα απαραίτητα μικροστοιχεία για την ανάπτυξη των ιστών και κυττάρων περιλαμβάνουν: σίδηρο (Fe), μαγγάνιο (Mn), ψευδάργυρο (Zn), βόριο (B), χαλκό (Cu) και μολυβδαίνιο (Mo). Αυτά τα ανόργανα στοιχεία αν και απαιτούνται σε πολύ μικρή ποσότητα, είναι απολύτως απαραίτητα και σημαντικά για την ανάπτυξη των φυτών. Το πιο σημαντικό στοιχείο είναι ο σίδηρος ο οποίος δεν είναι διαθέσιμος σε χαμηλό pH. Για την επίλυση αυτού του προβλήματος χρησιμοποιείται αιθυλενοδιαμινοτετραοξικό οξύ (EDTA- Ethylene Diaminetetraacetic Acid) – χηλικός σίδηρος (FeEDTA) {Steiner & Winden., 1970}. Το κοβάλτιο (Co) και το ιώδιο (I) μπορούν να προστεθούν σε ορισμένα θρεπτικά υλικά, αλλά δεν έχει καθοριστεί με ακρίβεια η επιρροή τους στην ανάπτυξη των κυττάρων. Ο χαλκός και το κοβάλτιο προστίθενται στα θρεπτικά υλικά σε συγκεντρώσεις 0.1μM, ο σίδηρος και το μολυβδαίνιο σε 1μM, η ιοδίνη σε 5μM, ο ψευδάργυρος μεταξύ 5-30μM, το μαγγάνιο σε 20-90μM και τέλος το βόριο σε 25-100μM {Torres., 1989}.

2.1.2. Πηγές άνθρακα και ενέργειας

Τα σάκχαρα αποτελούν ένα πολύ σημαντικό μέρος του θρεπτικού υλικού ως πηγή ενέργειας. Οι περισσότερες ιστοκαλλιέργειες αδυνατούν να φωτοσυνθέσουν αποτελεσματικά εξαιτίας της ανεπαρκούς ανάπτυξης των κυττάρων και των ιστών, της έλλειψης χλωροφύλλης, της περιορισμένης ανταλλαγής αερίων καθώς και του διοξειδίου του άνθρακα στα δοχεία καλλιέργειας. Εξαιτίας των παραπάνω, στερούνται αυξητικής ικανότητας και χρειάζονται εξωτερική πηγή άνθρακα για την απόκτηση ενέργειας. Πηγές άνθρακα όπως η λακτόζη, η γαλακτόζη, η μαλτόζη και το άμυλο χρησιμοποιούνται σε συγκεντρώσεις μεταξύ 2-5%. Παρ' όλα αυτά η σακχαρόζη και η γλυκόζη έχουν αποδειχτεί ως οι πιο αποτελεσματικές πηγές ενέργειας. Έρευνες έχουν δείξει ότι κατά τη διάρκεια της αυτόκαυσης του θρεπτικού υλικού, η σακχαρόζη υδρολύεται σε πιο αποτελεσματικά χρησιμοποιούμενα σάκχαρα όπως τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη, τα οποία χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη του φυτού. Τέλος, έχει διαπιστωθεί ότι τα συμπληρώματα μελάσας από ζαχαροκάλαμο, το εκχύλισμα μπανάνας καθώς και το νερό καρύδας μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως

εναλλακτικές πηγές ενέργειας με στόχο τη μείωση του κόστους {Dhamankar., 1992; Zahed., 2000}.

2.1.3. Βιταμίνες

Ορισμένες βιταμίνες απαιτούνται για τη φυσιολογική αύξηση και ανάπτυξη των φυτών, και χρησιμοποιούνται από τα φυτά ως καταλύτες σε διάφορες μεταβολικές διεργασίες, ενώ άλλες βιταμίνες ίσως ενεργούν ως περιοριστικοί παράγοντες στην κυτταρική ανάπτυξη και διαφοροποίηση όταν τα φυτικά κύτταρα και ιστοί αναπτύσσονται *in vitro* {Torres, 1989}. Οι βιταμίνες που συνήθως χρησιμοποιούνται στο θρεπτικό υλικό στην κυτταρο- και ιστοκαλλιέργεια περιλαμβάνουν τη θειαμίνη (B1), το νικοτινικό οξύ (B3) και την πυριδοξίνη (B6). Η θειαμίνη απαιτείται από όλα τα κύτταρα. {Ohira et al., 1976}. Η θειαμίνη χρησιμοποιείται συνήθως σε συγκεντρώσεις $0.1-10\text{mg.l}^{-1}$, ενώ το νικοτινικό οξύ και η πυριδοξίνη χρησιμοποιούνται σε συγκεντρώσεις $0.1-5\text{mg.l}^{-1}$ και $0.1-10\text{mg.l}^{-1}$ αντίστοιχα. Άλλες βιταμίνες όπως η βιοτίνη, το φολικό οξύ, το ασκορβικό οξύ, η βιταμίνη E, η ριβοφλαβίνη, το π-αμινο-βενζοϊκό οξύ χρησιμοποιούνται σε ορισμένα θρεπτικά υλικά. Γενικότερα συνιστάται οι βιταμίνες να προστίθονται στα θρεπτικά υλικά μόνο και εφόσον η συγκέντρωση της θειαμίνης είναι κάτω από το επιθυμητό επίπεδο ή όταν απαιτείται ανάπτυξη των κυττάρων σε χαμηλές πυκνότητες πληθυσμού {Murashige, 1974}.

2.1.4. Αμινοξέα

Τα αμινοξέα που απαιτούνται για τη βέλτιστη ανάπτυξη της ιστοκαλλιέργειας συντίθενται συνήθως από τα περισσότερα φυτά, ωστόσο η προσθήκη ορισμένων αμινοξέων ή μιγμάτων αμινοξέων είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη δημιουργία καλλιεργειών κυττάρων και πρωτοπλαστών. Τα αμινοξέα αποτελούν πηγή αζώτου για τα φυτικά κύτταρα και τους ιστούς. Μίγματα αμινοξέων όπως υδρόλυμα καζεΐνης, L-γλουταμίνη, L-ασπαραγίνη και αδερίνη χρησιμοποιούνται συχνά ως πηγές οργανικού αζώτου σε ένα θρεπτικό υλικό. Το υδρόλυμα καζεΐνης χρησιμοποιείται συνήθως σε συγκεντρώσεις $0.25-1\text{g.l}^{-1}$. Αμινοξέα που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη των κυττάρων σε θρεπτικό υλικό περιλαμβάνουν γλυκίνη σε 2mg.l^{-1} , γλουταμίνη έως 8mM , ασπαραγίνη σε συγκέντρωση 100mg.l^{-1} , L-αργινίνη και κυστεΐνη σε 10mg.l^{-1} και τέλος τυροσίνη σε συγκέντρωση 100mg.l^{-1} {Torres., 1989}.

2.1.5. Οργανικά συμπληρώματα

Υπάρχει μια ομάδα συμπληρωμάτων τα οποία ορισμένες φορές προστίθονται στο θρεπτικό υλικό με σκοπό να εξεταστεί η επίδραση αυτών στην ανάπτυξη της ιστοκαλλιέργειας. Ορισμένα θρεπτικά υλικά ενισχύονται με φυσικές ουσίες ή εκχυλίσματα όπως γάλα καρύδας, εκχύλισμα βύνης, χυμό πορτοκαλιού και χυμό ντομάτας. Αυτές οι ουσίες χρησιμοποιούνται συχνά όταν κανένας άλλος από τους γνωστούς συνδυασμούς δεν είναι σε θέση να προάγει την επιθυμητή ανάπτυξη.

Επιπλέον, η προσθήκη ενεργού άνθρακα σε ένα θρεπτικό υλικό μπορεί τόσο να βελτιώσει όσο και να αναστείλει την ανάπτυξη της καλλιέργειας, ανάλογα πάντα με το είδος του φυτού που καλλιεργείται. Έχει αναφερθεί ότι ο ενεργός άνθρακας διεγείρει την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση σε φυτικά είδη όπως οι ορχιδέες {Wang et al., 1976}, τα κρεμμύδια, τα καρότα {Fridborg, 1975; Fridborg et al., 1978} και τη τομάτα {Anagnostakis, 1974}, ενώ μπορεί για παράδειγμα να είναι ανασταλτικός παράγοντας στην καλλιέργεια καπνού και φασολιών {Fridborg et al., 1978}. Ο τρόπος με τον οποίο δρά ο ενεργός άνθρακας έχει βασιστεί στην προσρόφηση ανασταλτικών ουσιών από το θρεπτικό υλικό, στην προσρόφηση των ρυθμιστών ανάπτυξης από το υλικό ή στην απόκτηση σκούρου χρώματος του θρεπτικού υλικού {Pan.;van Staden.,1998}. Η παρουσία 1% ενεργού άνθρακα στο θρεπτικό υλικό έχει αποδειχτεί ότι αυξάνει σε μεγάλο βαθμό την υδρόλυση της σακχαρόζης κατά τη διάρκεια της αυτόκαυσης, η οποία προκαλεί οξίνιση του θρεπτικού υλικού {Druart.; Wulf., 1993}.

2.1.6. Ρυθμιστές ανάπτυξης – PGR (plant growth regulators)

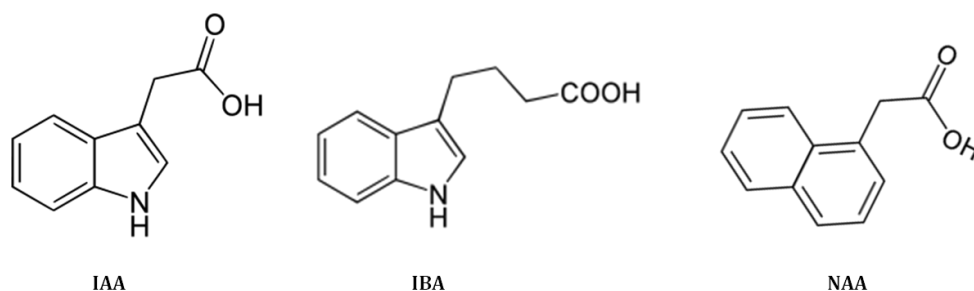
Οι ρυθμιστές ανάπτυξης είναι οργανικές ενώσεις οι οποίες είναι απαραίτητες στην ιστοκαλλιέργεια καθώς ρυθμίζουν τις φυσιολογικές διεργασίες των φυτών, κατευθύνουν την ανάπτυξη των οργάνων και ελέγχουν την ανάπτυξη ολόκληρου του φυτού. Επιπλέον, παίζουν σημαντικό ρόλο στην επιμήκυνση του μίσχου, και στον τροπισμό.

Σε αυτή την κατηγορία περιλαμβάνονται οι αυξίνες, οι κυτοκινίνες, οι γιββερελλίνες καθώς και το αψισικό οξύ. Έχει αποδειχτεί ότι η αναλογία αυξινών και κυτοκινινών, καθορίζει το είδος και την έκταση της οργανογένεσης στις ιστοκαλλιέργειες {Skoog, Miller, 1957}.

> Αυξίνες

Οι αυξίνες θεωρούνται ως οι σπουδαιότερες ενώσεις που χρησιμοποιούνται ως ρυθμιστικοί παράγοντες στο θρεπτικό υλικό μιας ιστοκαλλιέργειας και περιλαμβάνουν το ινδολ-3-οξικό οξύ (IAA), το ινδολ-3-βουτανικό οξύ (IBA), το ναφθαλινοξικό οξύ (NAA) και το 2,4-διχλωροφαινοξυοξικό οξύ (2,4-D). Η αυξίνη IAA είναι η μοναδική φυσική αυξίνη που υπάρχει στους φυτικούς ιστούς ενώ οι υπόλοιπες είναι συνθετικές. Οι συνθετικές αυξίνες που χρησιμοποιούνται στο θρεπτικό υλικό της ιστοκαλλιέργειας περιλαμβάνουν: 4-χλωροφαινοξυοξικό οξύ ή p-χλωρο-φαινοξυοξικό οξύ (4-CPA, pCPA), 2,4,5-τριχλωροφαινοξυοξικό οξύ (2,4,5 T), 3,6- διχλωρο-2-μεθοξυ-βενζοϊκό οξύ (dicamba) και 4-αμινο-3,5,6- τριχλωρο-πικολινικό οξύ (picloram) {Torres, 1989}.

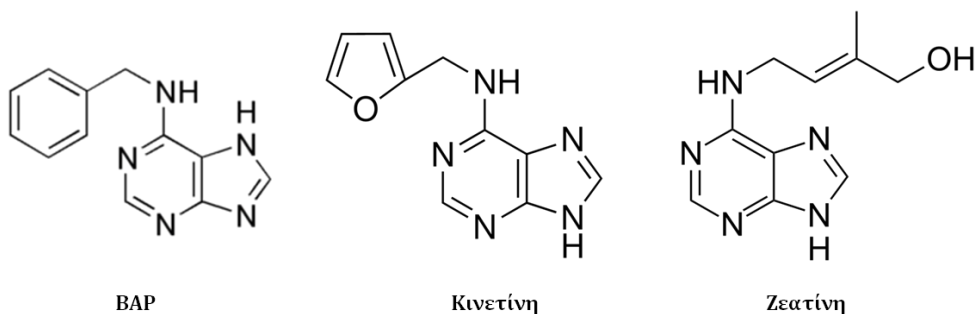
Οι αυξίνες διαφέρουν τόσο ως προς τη φυσιολογική τους δράση όσο και στο βαθμό στον οποίο μετατοπίζονται μέσω του ιστού και μεταβολίζονται. Βάση αναλύσεων, έχει βρεθεί ότι η χρήση 2,4-D έχει 8-12 φορές υψηλότερη δράση σε σχέση με την IAA αυξίνη {Lam T.H., 1977}. Στις ιστοκαλλιέργειες οι αυξίνες προάγουν την κυτταρική διαίρεση, την επιμήκυνση των κυττάρων και το σχηματισμό επίκτητων ριζών, ενώ αναστέλλουν το σχηματισμό μασχαλαίων και τυχαίων βλαστών. Οι αυξίνες NAA και 2,4-D θεωρούνται σταθερές και μπορούν να αποθηκευτούν στους 4°C για αρκετούς μήνες, ενώ οι αυξίνες IAA μπορούν να αποθηκευτούν σε φιάλη στους 4 °C όχι πάνω από μια εβδομάδα. Κατά τη διάρκεια προετοιμασίας θρεπτικού υλικού, θεωρείται ότι είναι καλύτερη η προετοιμασία φρέσκων διαλυμάτων που περιέχουν IAA αυξίνη. Η χημική δομή μερικών από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες αυξίνες απεικονίζεται στην Εικ. 4.



Εικόνα 4. Χημική δομή των αυξινών: ινδολ-3-οξικό οξύ (IAA), ινδολ-3-βουτανικό οξύ (IBA) και ναφθαλινοξικό οξύ (NAA).

> Κυτοκινίνες

Οι κύριες κυτοκινίνες που χρησιμοποιούνται στην ιστοκαλλιέργεια είναι η βενζυλαδενίνη (BAP), η διμεθυλαδενίνη (2iP 6-dimethylaminopurine), η κινετίνη, η ζεατίνη και η TDZ (thiazuron-N-phenyl-N-1,2,3 thiadiazol-5ylurea). Η ζεατίνη και η 2iP είναι φυσικές κυτοκινίνες, με τη ζεατίνη θα θεωρείται ως η πιο αποτελεσματική. Σε συνδυασμό με τις αυξίνες και σε μικρές συγκεντρώσεις οι κυτοκινίνες προάγουν την κυτταρική διαίρεση, ενώ όταν βρίσκονται σε μεγάλες συγκεντρώσεις στο θρεπτικό υπόστρωμα προωθούν την ανάπτυξη μασχαλιαίων και τυχαίων βλαστών. Οι κυτοκινίνες είναι σχετικά σταθερές ενώσεις και μπορούν να αποθηκευτούν στους -20°C . Συχνά αναφέρεται, ότι οι κυτοκινίνες είναι δύσκολο να διαλυθούν και γι' αυτό το λόγο, απαιτείται η προσθήκη μερικών σταγόνων HCl ή NaOH {Schmitz et al., 1972}. Η χημική δομή μερικών από τις πιο συχνά χρησιμοποιούμενες κυτοκινίνες σε ένα θρεπτικό υλικό απεικονίζεται στην Εικ. 5.



Εικόνα 5. Χημική δομή κυτοκινινών : βενζυλαδενίνη (BAP), κινετίνη και ζεατίνη.

> Γιββερελλίνες και αφισικό οξύ

Είναι οι λιγότερο χρησιμοποιούμενοι ρυθμιστές ανάπτυξης. Οι γιββερελλίνες περιλαμβάνουν πάνω από είκοσι ενώσεις, απ' τις οποίες το γιββερελλινικό οξύ (GA3) είναι το πιο συχνά χρησιμοποιούμενο. Αυτές οι ενώσεις όχι μόνο ενισχύουν την ανάπτυξη κάλλων και μεριστωμάτων αλλά βοηθούν και στην επιμήκυνση καχεκτικών φυταρίων {Vasil, 2003}. Άλλοι ρυθμιστές ανάπτυξης προστίθενται μερικές φορές στο θρεπτικό υλικό μιας ιστοκαλλιέργειας όπως για παράδειγμα το αφισικό οξύ (ABA) το οποίο συνήθως προστίθεται συμπληρωματικά με σκοπό την αναστολή ή τη διέγερση της ανάπτυξης του κάλλου, ανάλογα με το καλλιεργούμενο είδος. Επιπλέον, το αφισικό οξύ ενισχύει τον πολλαπλασιασμό των βλαστών και αναστέλλει μεταγενέστερα στάδια της ανάπτυξης του εμβρύου {Anagnostakis,

1974}. Αν και οι ρυθμιστές ανάπτυξης αποτελούν τα πιο δαπανηρά συστατικά του θρεπτικού υλικού, ωστόσο έχουν μικρή επίδραση στο κόστος του θρεπτικού υλικού καθώς απαιτούνται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις {Prakash et al., 2002}.

2.1.7. Στερεοποιητικοί παράγοντες

Η σκληρότητα του θρεπτικού υλικού επηρεάζει άμεσα την ανάπτυξη της ιστοκαλλιέργειας. Υπάρχουν διάφορες σταθεροποιητικές ουσίες όπως το άγαρ, η αγαρόζη και το κόμμι τζελάν (gellan gum). Το άγαρ, είναι πολυσακχαρίτης υψηλού μοριακού βάρους που λαμβάνεται από τα φύκη (seaweed του γένους *Gelidium*), και αποτελεί το πλέον χρησιμοποιούμενο υλικό για την προετοιμασία ημι-στερεών και στερεών θρεπτικών υλικών στην ιστοκαλλιέργεια. Το άγαρ έχει διάφορα πλεονεκτήματα έναντι των άλλων σταθεροποιητικών ουσιών. Για παράδειγμα, όταν αναμιχθεί με το νερό, σχηματίζει ένα κολλοειδές που τήκεται στους 60-100°C και στερεοποιείται στους 45°C. Στις συνήθεις θερμοκρασίες επώασης ιστοκαλλιεργειών το άγαρ είναι στερεοποιημένο. Το πήκτωμα του άγαρ (agar gel) δεν αντιδρά με τα συστατικά του θρεπτικού υλικού και δεν αφομοιώνεται από τα φυτικά ένζυμα. Χρησιμοποιείται συνήθως στα θρεπτικά υλικά σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται μεταξύ 0.8-1.0%. Η προετοιμασία ενός άγαρ υψηλής καθαρότητας παίζει σημαντικό ρόλο, ιδιαίτερα στα πειράματα που σχετίζονται με το μεταβολισμό του ιστού. Ανάλογα με την εμπορική μάρκα, το άγαρ μπορεί να περιέχει ασβέστιο (Ca), μαγνήσιο (Mg) και ιχνοστοιχεία. Έχει αναφερθεί ότι το άγαρ Bacto περιέχει 0.13, 0.01, 0.19, 0.43, 2.54, 0.17% ασβέστιο (Ca), βάριο (Ba), πυρίτιο (Si), χλώριο (Cl), θειϊκό άλας και άζωτο (N), αντίστοιχα. Γι' αυτό το λόγο, θα πρέπει να χρησιμοποιείται άγαρ πιστοποιημένης ποιότητας {Pierik, 1997}.



Εικόνα 6. Διαφορετικά είδη άγαρ ως σταθεροποιητικοί παράγοντες στην ανάπτυξη φυτικής καλλιέργειας. <http://pavillon35.polycinease.com/gotterspeise-plants-in-jelly-1-0/>

2.2 Προετοιμασία θρεπτικού υλικού

Η προετοιμασία του θρεπτικού υλικού συνίσταται να γίνεται σε ειδικά διαμορφωμένους χώρους του εργαστηρίου. Οι χώροι αυτοί θα πρέπει να είναι κατασκευασμένοι με τέτοιο τρόπο ώστε να είναι εφικτό να διατηρούνται καθαροί. Με αυτό τον τρόπο, η πιθανότητα τυχόν μολύνσεων μειώνεται αισθητά. Επιπλέον, εξίσου σημαντικό ρόλο παίζουν τα συστήματα για την αποστείρωση ή τον απιονισμό του νερού.

Κατά την προετοιμασία του θρεπτικού υλικού, συνίσταται η παρασκευή πυκνών διαλυμάτων, τα οποία μπορούν άμεσα να διαλυθούν-αραιωθούν σε προτεινόμενες συγκεντρώσεις πριν από κάθε χρήση. Η χρήση πυκνών διαλυμάτων προλαμβάνει συχνά τυχόν σφάλματα που μπορούν να παρουσιαστούν κατά τη ζύγιση πολύ μικρών ποσοτήτων κατά τη διάρκεια παρασκευής ενός θρεπτικού υλικού. Επιπλέον, επιταχύνει τη διαδικασία εξασφαλίζοντας λιγότερο χρόνο και χώρο. Τα διαλύματα μακροστοιχείων είναι προτιμότερο να παρασκευάζονται σε συγκεντρώσεις δεκαπλάσιες από αυτές του τελικού διαλύματος. Τα διαλύματα που περιέχουν μακροστοιχεία, μπορούν να αποθηκευτούν για μερικές εβδομάδες στο ψυγείο στους 2-4°C {Κίντζιος., 1994}.

Τα πυκνά διαλύματα μικροστοιχείων παρασκευάζονται σε συγκεντρώσεις εκατονταπλάσιες από αυτές που θα χρησιμοποιηθούν. Η αποθήκευση αυτών γίνεται στην κατάψυξη στους -20°C, και η διατήρησή τους δεν ξεπερνά τον ένα χρόνο {Κίντζιος., 1994}.

Οι βιταμίνες παρασκευάζονται σε συγκεντρώσεις εκατονταπλάσιες ή χιλιαπλάσιες από αυτές που θα χρησιμοποιηθούν. Το διάλυμα αυτό αποθηκεύεται στην κατάψυξη στους 20°C για μακρά περίοδο, διαφορετικά μπορεί να αποθηκευτεί στο ψυγείο για 2-3 μήνες.

Οι ρυθμιστικοί παράγοντες παρασκευάζονται επίσης σε συγκεντρώσεις εκατονταπλάσιες ή χιλιαπλάσιες απ' αυτές του τελικού διαλύματος. Η αποθήκευσή τους γίνεται στην κατάψυξη στους -20°C για μερικούς μήνες. Ιδιαίτερη προσοχή απαιτείται για την αυξίνη IAA η οποία παρουσιάζει προβλήματα οξείδωσης κατά την αποθήκευση. Η συγκεκριμένη μπορεί να αποθηκευτεί στους 4°C μόνο για μία εβδομάδα και μέσα σε σκουρόχρωμη φιάλη {Κίντζιος., 1994}.

3. Εργαστήριο ιστοκαλλιέργειας

Ένα εργαστήριο ιστοκαλλιέργειας θα πρέπει να διαθέτει επαρκείς χώρους για την εκτέλεση όλων των εργασιών που σχετίζονται με αυτή. Ενδεικτικά, κάθε εργαστήριο θα πρέπει να διαθέτει χώρους για 1) τον καθαρισμό και την αποθήκευση των γυαλικών, των πλαστικών και των άλλων αντικειμένων που χρησιμοποιούνται στο εργαστήριο, 2) την προετοιμασία του θρεπτικού υλικού, την αποστείρωση, τον καθαρισμό, και την αποθήκευση των διαλυμάτων, 3) τον ασηπτικό χειρισμό του φυτικού υλικού, 4) την ανάπτυξη των φυτικών τμημάτων κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες, 5) την αξιολόγηση και εκτίμηση των καλλιεργειών, και τέλος 5) την παρατήρηση και καταγραφή των αποτελεσμάτων. Ορισμένες φορές, οι χώροι αυτοί διαφοροποιούνται από εργαστήριο σε εργαστήριο. {White, 1943}. Οι χώροι που απαιτούνται σε ένα εργαστήριο ιστοκαλλιέργειας συνοψίζονται στον πίνακα 4.

Κατά τη σύσταση μιας μονάδας ιστοκαλλιέργειας, παράγοντες όπως: η τοποθεσία του εργαστηρίου, το κλίμα, η παροχή νερού και ηλεκτρισμού, καθώς και τα διαθέσιμα μέσα μεταφοράς για το προσωπικό λαμβάνονται σοβαρά υπόψη. Γενικότερα, οι εγκαταστάσεις ενός εργαστηρίου ιστοκαλλιέργειας θα πρέπει να βρίσκονται μακριά τόσο από από εστίες μόλυνσης όσο και από περιοχές όπου ο πληθυσμός εντόμων και ζιζανίων είναι υψηλός.

Πίνακας 4. Απαραίτητοι χώροι εργαστηρίου ιστοκαλλιέργειας

Χώροι εργαστηρίου
Πλυσίματος
Προετοιμασίας θρεπτικού υλικού
Ασηπτικής μεταφοράς
Ανάπτυξης καλλιεργειών
Φυτοπαθολογικό εργαστήριο
Εγκλιματισμού/Σκληραγώγησης
Θερμοκήπιο

3.1 Χώροι εργαστηρίου

3.1.1 Χώρος πλυσίματος

Σε αυτόν τον χώρο γίνεται ο καθαρισμός των διαφόρων σκευών και εργαλείων που χρησιμοποιούνται κατά τη διάρκεια της ιστοκαλλιέργειας καθώς και η αποθήκευση αυτού του εξοπλισμού σε ειδικά ερμάρια. Ο χώρος αυτός περιλαμβάνει: νεροχύτη καθαρισμού ο οποίος θα πρέπει να είναι ανθεκτικός στα οξέα και στα αλκάλια, επαρκής παροχή νερού (βρύσης, απιονισμένου και/ή απεσταγμένου), χώρος στεγνώματος των σκευών, χώρος απόρριψης και αποκομιδής απορριμμάτων καθώς και ειδικά διαμορφωμένος χώρος για την απορροή των υγρών λυμάτων.

Αρχικά, η πλύση των σκευών που περιέχουν το θρεπτικό υλικό πραγματοποιείται με την αποστείρωση αυτών για μικρό χρονικό διάστημα μέχρις ότου το άγαρ υγροποιηθεί. Με αυτό τον τρόπο, εξασφαλίζεται η γρήγορη και εύκολη αφαίρεση του θρεπτικού υλικού από τα δοχεία καθώς και ο αποτελεσματικός καθαρισμός αυτών. Βούρτσες διαφόρων μεγεθών χρησιμοποιούνται για τον καθαρισμό του εσωτερικού μέρους των δοχείων. Στη συνέχεια, τα σκεύη ξεπλένονται αρκετές φορές με νερό βρύσης ενώ ακολουθεί η τελική έκπλυση αυτών (2-3 φορές) με απεσταγμένο ή απιονισμένο νερό .

Σήμερα, τα περισσότερα εργαστήρια χρησιμοποιούν πλυντήριο πιάτων. Στην περίπτωση αυτή, τα σκεύη θα πρέπει να ξεπλένονται με απεσταγμένο νερό, έτσι ώστε να απομακρυνθούν τυχόν υπολείμματα απορρυπαντικού. Μετά την πλύση, τα σκεύη τοποθετούνται σε φούρνο ξήρανσης (hot air cabinet) και έπειτα αποθηκεύονται σε ειδικά διαμορφωμένο χώρο (ερμάρια) όπου και κρατούνται καθαρά { Biondi & Thorpe, 1981 }.



Εικόνα 7. Χώρος πλυσίματος και αποθήκευσης σκευών

3.1.2 Χώρος προετοιμασίας θρεπτικού υλικού

Στο χώρο αυτό γίνεται η παρασκευή, η αποστείρωση καθώς και η αποθήκευση του θρεπτικού υλικού. Ο χώρος αυτός περιλαμβάνει τους πάγκους εργασίας όπου πραγματοποιείται η παρασκευή του θρεπτικού υλικού, καθώς και μια σειρά από εργαστηριακό εξοπλισμό που είναι απολύτως απαραίτητος.

Στο χώρο αυτό βρίσκονται: i) μια αναλυτική ζυγαριά για τη ζύγιση των χημικών ουσιών και συστατικών που χρειάζονται κατά την προετοιμασία του θρεπτικού υλικού, ii) ένας ψυγείο-καταψύκτης για την αποθήκευση των διαλυμάτων και των χημικών ουσιών, iii) ένα pH-μέτρο για τη μέτρηση της οξύτητας του θρεπτικού υλικού, iv) θερμική εστία και μαγνητικός αναδευτήρας για την παρασκευή του θρεπτικού υλικού, v) αυτόκαυστο για την αποστείρωση του θρεπτικού υλικού καθώς και των μικροεργαλείων, γυάλινων σκευών και άλλων αντικειμένων που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διάρκεια της ιστοκαλλιέργειας {Kumar, 2009; Giri, 2007}.



Εικόνα 8. Αυτόκαυστο

3.1.3 Χώρος ασηπτικής μεταφοράς

Ο χώρος αυτός θα πρέπει να είναι ο καλύτερα απομονωμένος και η είσοδος σε αυτόν το χώρο θα πρέπει να είναι αυστηρά περιορισμένη. Στο χώρο ασηπτικής μεταφοράς βρίσκεται ο θάλαμος νηματικής ροής. Ο αέρας ωθείται μέσα στο θάλαμο μέσω ενός φίλτρου κατακράτησης της σκόνης και στη συνέχεια περνά μέσω ενός HEPA (high efficiency

particulate air) φίλτρου. Ο αέρας έπειτα κατευθύνεται είτε προς τα κάτω (κάθετη νηματική ροή) είτε προς τα έξω (οριζόντια νηματική ροή). Η συνεχής ροή φιλτραρισμένου αέρα απαλλαγμένου από βακτήρια αποτρέπει τυχόν μολύνσεις της καλλιέργειας .



Εικόνα 9. Θάλαμος νηματικής ροής

3.1.4 Χώρος ανάπτυξης καλλιιεργειών

Στο χώρο αυτό αναπτύσσονται οι καλλιέργειες κάτω από αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες. Γενικότερα είναι επιθυμητό να υπάρχουν περισσότερα από ένα δωμάτια ανάπτυξης στα οποία θα εφαρμόζονται διαφορετικές τιμές θερμοκρασίας και φωτισμού. Ο χώρος αυτός θα πρέπει να είναι απομονωμένος και η πρόσβαση σε αυτόν περιορισμένη για την αποφυγή μολύνσεων. Επιπλέον, η ύπαρξη παραθύρων στο χώρο αυτό θα πρέπει να αποφεύγεται καθώς το εξωτερικό φώς θα μπορούσε να επηρεάσει τη διατήρηση σταθερής θερμοκρασίας στο εσωτερικό του χώρου. Στο δωμάτιο ανάπτυξης η θερμοκρασία διατηρείται μεταξύ $25\pm 27^{\circ}\text{C}$. Για τη διατήρηση σταθερής θερμοκρασίας σύστημα κλιματισμού χρησιμοποιείται συχνά.

Η παροχή φωτισμού γίνεται κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες με τη βοήθεια κατάλληλων λαμπτήρων. Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δοθεί στην ποιότητα και ένταση του φωτός, στο μήκος κύματος αυτού καθώς και στη φωτοπερίοδο. Οι λαμπτήρες φθορισμού προτιμούνται έναντι των άλλων διότι παρέχουν καλύτερη ποιότητα φάσματος, έχουν βολικό σχήμα και έχουν χαμηλότερη παραγωγή θερμότητας σε σύγκριση με τους κοινούς λαμπτήρες πυρακτώσεως. Ωστόσο, ορισμένες καλλιέργειες φαίνεται να αναπτύσσονται καλύτερα με την παρουσία και των δύο τύπων φωτισμού. Έχει αποδειχθεί βάση πειραμάτων ότι ιδανικά η

Κεφάλαιο 3

ένταση 1000 lux είναι η πιο κατάλληλη για την ιστοκαλλιέργεια και των πολλαπλασιασμού των βλαστών. Ένα υψηλότερο βέλτιστο των 3000-10000 lux ήταν απαραίτητη για τη δημιουργία των φυταρίων. Τέλος, η σχετική υγρασία πρέπει να παραμένει σε επίπεδα μεταξύ 20-98%.



Εικόνα 10. Θάλαμος ανάπτυξης ιστοκαλλιέργειας

http://www.jkuat.ac.ke/institutes/ibr/wp-content/uploads/2011/06/20140228_115605.jpg

3.1.5 Χώρος φυτοπαθολογικού εργαστηρίου

Σε αυτόν τον χώρο τόσο οι ιστοκαλλιέργειες όσο και τα παραγόμενα φυτά ελέγχονται για την ύπαρξη τυχόν παθογόνων. Ο χώρος αυτός πρέπει να είναι τελείως απομονωμένος από τους υπόλοιπους.

3.1.6 Χώρος εγκλιματισμού/ σκληραγώγησης

Στο χώρο αυτό γίνεται η σκληραγώγηση των φυτών εκτός συνθηκών καλλιέργειας. Το δωμάτιο σκληραγώγησης των φυτών απαιτεί υψηλό φωτισμό (4000-10000 lux) και υψηλά επίπεδα υγρασίας (90-100%). Η διαδικασία αυτή μπορεί να γίνει είτε σε ειδικό θερμοκήπιο είτε σε κλειστούς θαλάμους.

3.1.7 Θερμοκήπιο

Τα φυτάρια μεταφέρονται σε περιβάλλον θερμοκηπίου, όπου και γίνεται η τελική ανάπτυξη των φυτών.

3.2 Εξασφάλιση ασηπτικού περιβάλλοντος – Τεχνικές αποστείρωσης

Το θρεπτικό υλικό της ιστοκαλλιέργειας, το οποίο περιέχει υψηλή συγκέντρωση σακχάρων, ευνοεί την ανάπτυξη πολλών μικροοργανισμών όπως βακτηρίων και μυκήτων. Τα αρχικά έκφυτα είναι η κύρια πηγή μόλυνσης, αλλά μια εκ νέου μόλυνση είναι πιθανή σε κάθε στάδιο της ιστοκαλλιέργειας. Όταν οι μικροοργανισμοί έρθουν σε επαφή με το θρεπτικό υλικό, αναπτύσσονται πολύ πιο γρήγορα σε σύγκριση με τον ιστό της ιστοκαλλιέργειας με αποτέλεσμα την παραγωγή φυτοτοξικών προϊόντων ζύμωσης όπως η αιθανόλη και το οξικό οξύ. Το γεγονός αυτό, προκαλεί τόσο τη μη διαθεσιμότητα ορισμένων θρεπτικών ουσιών όσο και την πρόκληση τοξικών ουσιών στις ιστοκαλλιέργειες. Η διατήρηση ασηπτικών ή αποστειρωμένων συνθηκών είναι ως εκ τούτου απολύτως απαραίτητη για την επιτυχία της ιστοκαλλιέργειας. Γενικότερα, διακρίνονται τέσσερις κατηγορίες αποστείρωσης:

1. Αποστείρωση σκευών και εξοπλισμού
2. Αποστείρωση θρεπτικού υλικού
3. Αποστείρωση φυτικού υλικού
4. Αποστείρωση θαλάμου ανάπτυξης και μεταφοράς

3.2.1 Αποστείρωση σκευών και εξοπλισμού

Τα γυάλινα σκεύη, τα δοχεία καλλιέργειας, και τα μεταλλικά εργαλεία μπορούν να αποστειρωθούν σε κλίβανο θερμού αέρα στους 160-180°C για 2-4 ώρες ή σε αυτόκαυστο στους 120°C, 15psi για 15-20 λεπτά.

3.2.2 Αποστείρωση θρεπτικού υλικού

Η αποφυγή της μόλυνσης του θρεπτικού υλικού είναι σημαντική σε όλη τη διαδικασία του μικροπολλαπλασιασμού και έχει ως στόχο την εξάλειψη της εξάπλωσης φυτικών

παρασίτων. Το θρεπτικό υλικό μεταφέρεται σε γυάλινη φιάλη, κλεισμένη με βαμβάκι ή πλαστικό πώμα και αποστειρώνεται σε αυτόκαυστο σε 15psi. Ο χρόνος αποστείρωσης είναι συνάρτηση του όγκου του διαλύματος.

Οι βιταμίνες, τα αμινοξέα, τα φυτικά εκχυλίσματα, οι ορμόνες και οι υδατάνθρακες μπορούν να αποσυντεθούν κατά τη διάρκεια της αυτόκαυσης. Για το λόγο αυτό, η αποστείρωσή τους γίνεται μέσω μικροπορώδων (0.22-.045μm) φίλτρων {Levin R., 2002}.

3.2.3 Αποστείρωση φυτικού υλικού

Η επιφανειακή απολύμανση του φυτικού υλικού γίνεται με τη χρήση απολυμαντικών, όπως το υποχλωριώδες νάτριο, το υπεροξείδιο του υδρογόνου, ο χλωριούχος υδράργυρος, ή η αιθανόλη. Η μεταφορά του απολυμασμένου φυτικού υλικού στο αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό γίνεται σε εστία νηματικής ροής.

3.2.4 Αποστείρωση του θαλάμου ανάπτυξης και μεταφοράς

Το δάπεδο και οι τοίχοι του θαλάμου ανάπτυξης πλένονται με απορρυπαντικό και ακολουθώς με 2% υποχλωριώδες νάτριο ή 95% αιθανόλη. Η αποστείρωση μπορεί να γίνει και με έκθεση στο υπεριώδες φως. Η εστία νηματικής ροής αποστειρώνεται με την έκθεση σε υπεριώδες φως για 30 min και 95% αιθανόλη για 15 λεπτά πριν την έναρξη των εργασιών.

4. Μικροπολλαπλασιασμός

Μικροπολλαπλασιασμός ονομάζεται η διαδικασία της μαζικής κλωνικής παραγωγής νέων φυτών χρησιμοποιώντας τεχνικές ιστοκαλλιέργειας. Ο μικροπολλαπλασιασμός αρχίζει με την επιλογή φυτικών ιστών (έκφυτο) από ένα υγιές μητρικό φυτό και ολοκληρώνεται με τον εγκλιματισμό των νέων φυτών στο φυσικό περιβάλλον.

4.1 Στάδια μικροπολλαπλασιασμού

Η διαδικασία του μικροπολλαπλασιασμού σύμφωνα με τον Murashige (1974) περιλαμβάνει μια σειρά από **5 στάδια** τα οποία συνοψίζονται:

Στάδιο 0: Επιλογή μητρικού φυτού και προετοιμασία

Πριν την έναρξη του μικροπολλαπλασιασμού, ιδιαίτερη προσοχή πρέπει να δοθεί στην επιλογή του μητρικού φυτού. Το μητρικό φυτό είναι εκείνο που θα χρησιμοποιηθεί για την αναπαραγωγή εκατοντάδων χιλιάδων νέων φυτών και οποιοδήποτε λάθος σε αυτό το στάδιο παίζει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη του φυτού. Το περιβάλλον που διατηρούνται τα μητρικά φυτά πρέπει να είναι ιδανικό για την ανάπτυξή τους. Τα μητρικά φυτά πρέπει να είναι υγιή, νεαρά ηλικιακά και απαλλαγμένα από ασθένειες και έντομα.

Στάδιο I: Εγκατάσταση της ασηπτικής καλλιέργειας (Initiation of culture)

Το συνηθέστερο δεύτερο στάδιο στη διαδικασία του μικροπολλαπλασιασμού είναι η απόκτηση μιας ασηπτικής καλλιέργειας από το επιλεγόμενο φυτικό υλικό. Τα έκφυτα, αφού απολυμανθούν για συγκεκριμένο χρονικό διάστημα, τοποθετούνται σε δοκιμαστικούς σωλήνες με κατάλληλο θρεπτικό υλικό. Ο στόχος του σταδίου αυτού είναι η εγκατάσταση του φυτικού υλικού κάτω από ασηπτικές συνθήκες και η έναρξη της διαδικασίας ανάπτυξης του {Murashige., 1974}.

Στάδιο II: Βλαστικός πολλαπλασιασμός (Shoot proliferation)

Στο στάδιο αυτό, τα έκφυτα καλλιεργούνται σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα για τον πολλαπλασιασμό των βλαστών. 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 {Murashige., 1974}.

Στάδιο III: Ριζοβολία μικροβλαστών (Rooting)

Η ριζοβολία των βλαστών μπορεί να επιτευχθεί είτε *in vitro* είτε *ex vitro*. Οι βλαστοί ή τα φυτάρια που προέκυψαν από το στάδιο II είναι μικρά σε μέγεθος και δεν είναι ακόμα ικανά να υποστηρίξουν την ανάπτυξή τους στο έδαφος. Έτσι, το στάδιο αυτό περιλαμβάνει την τοποθέτηση των μικροβλαστών σε νέο θρεπτικό υπόστρωμα κάτω από ασηπτικές συνθήκες ή τη μεταφύτευση αυτών σε θερμοκήπιο κάτω από συνθήκες υψηλής σχετικής υγρασίας για το σχηματισμό ριζών {Murashige., 1974}.

Στάδιο IV: Εγκλιματισμός (ή σκληραγώγηση) (Acclimatization or hardening)

Το στάδιο αυτό ίσως είναι και το δυσκολότερο σε όλη τη διαδικασία της ιστοκαλλιέργειας, καθώς σε αυτή τη φάση τα φυτάρια μεταφέρονται από συνθήκες *in vitro* σε πραγματικές. Εάν δεν πραγματοποιηθούν προσεκτικοί χειρισμοί τότε θα υπάρξει σημαντική απώλεια του πολλαπλασιαστικού υλικού. Αφού τα φυτάρια μεταφυτευτούν στο θερμοκήπιο, στην αρχή τοποθετούνται κάτω από συνθήκες πολύ υψηλής σχετικής υγρασίας και χαμηλής έντασης φωτός, σταδιακά όμως περνούν σε κανονικές συνθήκες περιβάλλοντος όπου και συνεχίζουν την ανάπτυξή τους μέχρι να είναι έτοιμα για τη μεταφύτευση στην τελική θέση ανάπτυξής τους {Murashige., 1974}.

4.2 Πλεονεκτήματα μικροπολλαπλασιασμού

Τα πλεονεκτήματα του μικροπολλαπλασιασμού μπορούν να συνοψιστούν στα ακόλουθα {George, 1993; Ελευθερίου, 1994}:

- Ο ρυθμός παραγωγής φυτών είναι πολύ μεγαλύτερος σε σύγκριση με κάθε άλλη μέθοδο αγενούς πολλαπλασιασμού. Πολύ μεγάλες ποσότητες μπορούν να παραχθούν σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα. Ένα οργανωμένο κέντρο εμπορικής εκμετάλλευσης μπορεί να παράγει έως και 3 εκατομμύρια φυτά το χρόνο
- Η παραγωγή των φυτών πραγματοποιείται όλο το χρόνο και είναι ανεξάρτητη από τις καιρικές συνθήκες.
- Λόγω των ασηπτικών συνθηκών που επικρατούν καθ' όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας δεν υπάρχουν απώλειες από ασθένειες, ενώ τα φυτάρια που παράγονται είναι ελεύθερα από βακτήρια, μύκητες και άλλους μικροοργανισμούς.
- Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται σε ορισμένα φυτικά είδη που με τις κλασσικές μεθόδους θα ήταν δύσκολο ή ακόμα και αδύνατο να πολλαπλασιαστούν.

- Απαιτείται πολύ μικρός αριθμός φυτικού υλικού για τις αρχικές εγκαταστάσεις, γεγονός που διευκολύνει πολύ τη διατήρηση των μητρικών φυτών αφού απαιτείται πολύ λίγος χώρος για τη συντήρησή τους.

4.3 Μειονεκτήματα μικροπολλαπλασιασμού

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

- Το βασικό μειονέκτημα της ιστοκαλλιέργειας είναι το υψηλό κόστος που απαιτείται για τη δημιουργία εξειδικευμένων εγκαταστάσεων, καθώς και για την αγορά του εξοπλισμού.
- Η απαίτηση ενός εξειδικευμένου προσωπικού αυξάνει επιπλέον το κόστος.
- Η πιθανότητα παραγωγής γενετικά ανώμαλων φυτών μπορεί να αυξηθεί κάτω από ορισμένες συνθήκες (σωμακλωνική παραλλακτικότητα).
- Σε ορισμένες περιπτώσεις κατά τη διάρκεια της ιστοκαλλιέργειας τα φυτά μπορούν να αναπτύξουν ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά.
- Τα φυτά αναπτύσσονται σε -ελεγχόμενες συνθήκες ιστοκαλλιέργειας; αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία προβλημάτων κατά τον εγκλιματισμό αυτών στο φυσικό περιβάλλον.

4.4 Σκοπός εργασίας

Στην εργασία αυτή πραγματοποιήθηκαν προκαταρκτικές μελέτες βλάστησης *in vitro* σπόρων του είδους *Sideritis cladestina*, εξετάστηκαν α) η επίδραση δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων του θρεπτικού υποστρώματος Murashige και Skoog (MS) καθώς και β) η χρονική διάρκεια της απολύμανσης των σπόρων του είδους πριν εμφυτευθούν στο θρεπτικό υπόστρωμα.

5. Υλικά και μέθοδοι

5.1. Υλικά

Το θρεπτικό υπόστρωμα όπου τοποθετήθηκαν οι σπόροι περιείχε τα εξής:

Πίνακας 5. Συστατικά (μακροστοιχεία - ιχνοστοιχεία - βιταμίνες) των υποστρωμάτων MS (Murashige & Skoog, 1962) και WPM (McCown and Lloyd, 1981).

Συστατικά	MS (mg/l)
NH ₄ NO ₃	1650
CaCl ₂ · 2H ₂ O	332.2
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370
KNO ₃	1900
KH ₂ PO ₄	170
H ₃ BO ₃	6.2
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0.025
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0.025
Na ₂ EDTA	37.3
FeSO ₄ · 7H ₂	27.8
MnSO ₄ · H ₂ O	16.9
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.25
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8.6
Myo-inositol	100
Glycine	2.0
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine HCl	0.5
Thiamin HCl	0.1

α) Υπόστρωμα MS (MS basal mixture της εταιρείας SIGMA) σε μορφή σκόνης (Murashige and Skoog, 1962), αναλυτικά τα συστατικά του MS αναφέρονται στον Πίν. 5.

β) Σακχαρόζη (του εμπορίου).

γ) Βιταμίνες

Μυοινοζιτόλη (myo-inositol) MB = 180.16, της εταιρείας Merck.

δ) Άγαρ (Προμηθευτής Ρουμπουλάκης Α.Ε. Χημικά).

Φυτικό υλικό

Σπόροι του είδους *Sideritis cladestina* συλλέχτηκαν από αυτοφυή φυτά στο όρος Ταΰγετος τον μήνα Αύγουστο ώστε κατά τη συλλογή τους να βρίσκονται σε πλήρη ωριμότητα. Οι σπόροι που χρησιμοποιήθηκαν επιλέχτηκαν σε οπτικό στερεοσκόπιο ώστε να μην έχουν προσβολές από έντομα ή μύκητες. Στη συνέχεια οι επιλεγμένοι σπόροι αποθηκεύτηκαν σε ψυγείο (4 °C) μέχρι την χρησιμοποίησή τους.

5.2. Μέθοδοι

5.2.1. Παρασκευή του θρεπτικού υποστρώματος

Σε δοχείο ζέσεως με απεσταγμένο νερό (όγκου λιγότερο του τελικού) προσθέτονταν οι ακριβείς ποσότητες μισής δύναμης ή πλήρους Murashige and Skoog (MS) 4.4 g l⁻¹, σακχαρόζης 3%, ή 1.5%, και των επιθυμητών κάθε φορά φυτορρυθμιστικών ουσιών, από τα stock διαλύματα αυτών και αναδεύονταν σε μαγνητικό αναδευτήρα μέχρι να διαλυθούν πλήρως. Στη συνέχεια γινόταν ογκομέτρηση και προσθήκη απεσταγμένου νερού, μέχρι τον επιθυμητό όγκο και ακολουθούσε ρύθμιση του pH στην τιμή 5.7 της κλίμακας με τη βοήθεια διαλυμάτων 1N NaOH και 1N HCl. Ακολούθως προστίθετο άγαρ στην απαιτούμενη ποσότητα (4 g l⁻¹) και ακολουθούσε θέρμανση του διαλύματος, υπό συνεχή ανάδευση μέχρι να λιώσει το άγαρ.

5.2.2. Τοποθέτηση σπόρων *in vitro*

Πραγματοποιήθηκαν δύο εγκαταστάσεις σπόρων του είδους σε θρεπτικά υποστρώματα., όπου και στις δύο σπόροι του είδους *Sideritis cladestina* τοποθετήθηκαν *in vitro* σε θρεπτικό υπόστρωμα MS, πλήρους ή μισής δύναμης .ώστε να ελεγχθεί η ιδανική συγκέντρωση του MS στη βλάστηση των σπόρων του είδους. Στην πρώτη εγκατάσταση οι σπόροι απολυμάνθηκαν με υδατικό διάλυμα χλωρίνης εμπορίου σε συγκέντρωση 10% για 12 min, ενώ στη δεύτερη εγκατάσταση των σπόρων οι σπόροι απολυμάνθηκαν με υδατικό διάλυμα χλωρίνης εμπορίου σε συγκέντρωση 10 % για 10 min. Την απολύμανση των σπόρων ακολούθησαν τρία τρίλεπτα ξεπλύματα με αποσταγμένο νερό ώστε να απομακρυνθεί το διάλυμα χλωρίνης. Στη συνέχεια οι σπόροι φυτεύτηκαν στα τρυβλία με τα υποστρώματα.

6. Αποτελέσματα - Συζήτηση

Οι σπόροι παρέμεινα στα υποστρώματα για 40 ημέρες και μετρήθηκε ο αριθμός των σπόρων που βλάστησαν. Η εκτίμηση της βλαστικότητας των σπόρων πραγματοποιούνταν εβδομαδιαία.

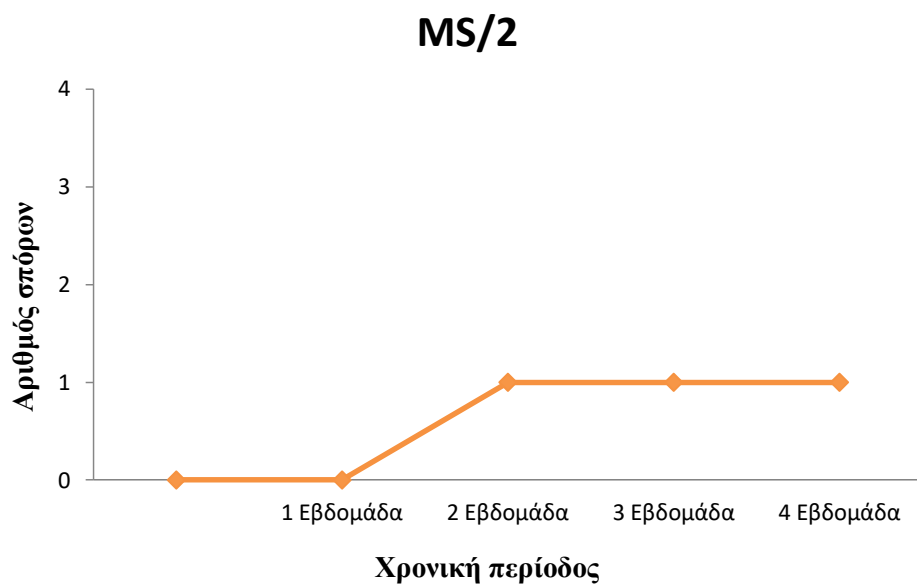
Στα διάγραμμα 1 και 3 φαίνεται ότι οι σπόροι που τοποθετήθηκαν για βλάστηση στα υποστρώματα πλήρους δύναμης MS και 3% σουκρόζη δεν βλάστησαν ανεξάρτητα το χρόνου διάρκειας της απολύμανσης τους.

Στα διάγραμμα 2 και 4 φαίνεται ότι οι σπόροι που τοποθετήθηκαν για βλάστηση στα υποστρώματα μισής δύναμης MS και 1.5% σουκρόζη βλάστησαν σε πολύ χαμηλό ποσοστό ανεξάρτητα το χρόνου διάρκειας της απολύμανσης τους.

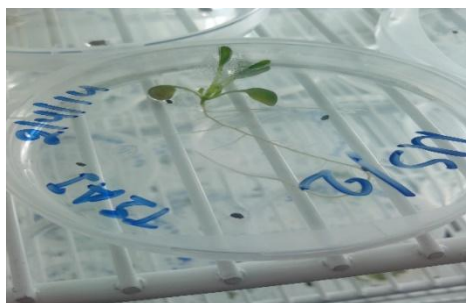
Το διάγραμμα 1. Απεικονίζει τα αποτελέσματα που προέκυψαν κατά την καλλιέργεια των σπόρων σε MS 4-3 σε χρονική περίοδο 4 εβδομάδων.



Διάγραμμα 1. Βλάστηση σπόρων σε θρεπτικό υλικό MS 4-3 κατά τη διάρκεια 4 εβδομάδων



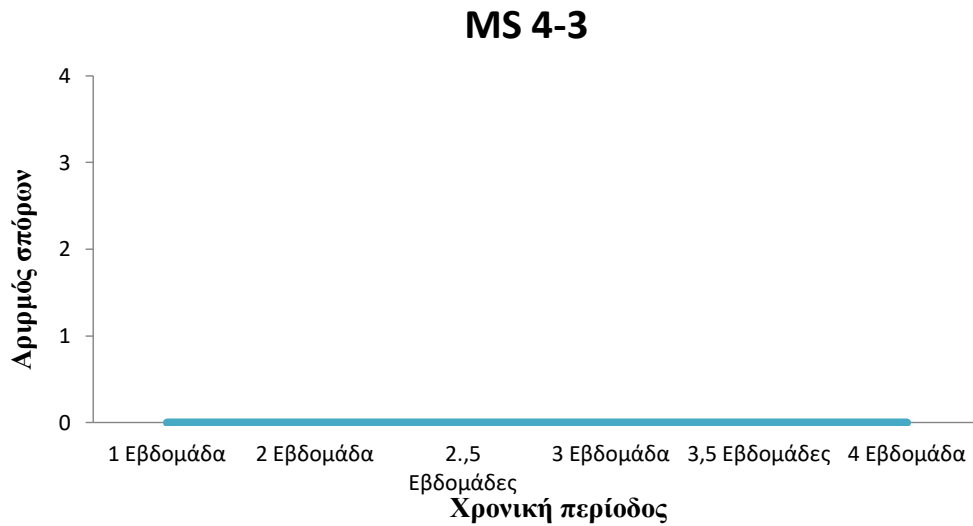
Διάγραμμα 2. Βλάστηση σπόρων σε θρεπτικό υλικό MS/2 κατά τη διάρκεια 4 εβδομάδων



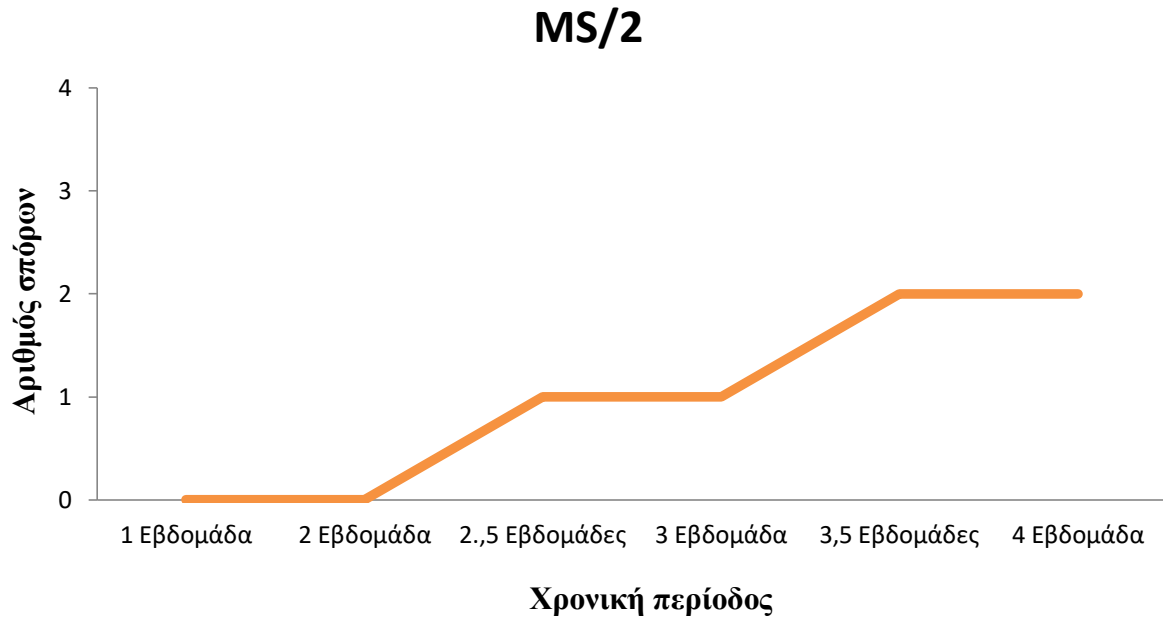
Εικόνα 11. Σπόρος που βλάστησε στο θρεπτικό υλικό MS/2

Κεφάλαιο 6

Σε αυτό το κομμάτι παρουσιάζονται τα αποτελέσματα από τη δεύτερη εφαρμογή που πραγματοποιήθηκε στις 02/05/2014. Το θρεπτικό υλικό είναι το ίδιο, όμως σε αυτή την περίπτωση ο χρόνος παραμονής των σπόρων στο υπογλωριώδες νάτριο ήταν 10 λεπτά.



Διάγραμμα 3. Βλάστηση σπόρων σε θρεπτικό υλικό MS 4-3 κατά τη διάρκεια 4 εβδομάδων



Διάγραμμα 4. Βλάστηση σπόρων σε θρεπτικό υλικό MS/2 κατά τη διάρκεια 4 εβδομάδων

Από τα διαγράμματα 1, 2, 3 και 4 προκύπτει ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις MS και σουκρόζης στα υποστρώματα όπου τοποθετήθηκαν σπόροι του είδους *Sideritis cladestina* για βλάστηση παρεμπόδισε την βλάστηση τους. Αντίθετα χαμηλές συγκεντρώσεις φαίνεται να προωθούν χαμηλή βλάστηση των σπόρων. Η απολύμανση των σπόρων επιτεύχθηκε, μιας και παρόλο την χαμηλή συγκέντρωση χλωρίνης στο διάλυμα απολύμανσης και του μικρού χρόνου απολύμανσης, δεν παρουσιάστηκαν προβλήματα μόλυνσεων. Απαιτείται περαιτέρω έρευνα για την εξεύρεση συνθηκών που να προωθούν υψηλή βλαστικότητα των σπόρων του είδους.

Βιβλιογραφία

1. Altman A., Hasegawa. P. M. (2002). Plant Biotechnology and Agriculture, Prospects for the 21st Century, Elsevier Inc.
2. Vasil, I. K. (2003). The Science and Politics of Plant Biotechnology 2002 and Beyond. 10th IAPTC&B Congress, Plant Biotechnology 2002 and Beyond. USA, Kluwer Academic Publishers: 1-9.
3. Α.Κ Κανελλής, Δ. Γ. (2003). Εφαρμογές της Βιοτεχνολογίας στη βελτίωση της ποιότητας των οπωροκηπευτικών. Πρακτικά Ελληνικής Εταιρείας της Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών. 20ο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο. Κύπρος.
4. George E.F., H. M. A., De Klerk G.J (1993). Plant Propagation by Tissue Culture: The Technology. Edington, UK, Exegetics Ltd.
5. Thorpe, T. (2007). "History of plant tissue culture." Mol. Microbial Biotechnology 37: 169-180.
6. Hartmann H.T., K. D. E., Davies F.D., Geneve R.L (1997). Plant Propagation: Principles and Practices. New Jersey, USA, Simon & Schuster.
7. Trigiano R.N., G. D. J. (2000). Culture Concepts and Laboratory Exercises, 2nd Edition, CRC Press.
8. Chawla H.S.,(2002). Introduction to Plant Biotechnology. U.S.A, Science Publishers.
9. Morel G.M., (1960). "Clonal propagation of orchids by meristem culture." Cymb. Soc. News 20: 3-11.
10. Murashige T., Skoog F. (1962). "A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures." Physiol. Plant 15: 473-497.
11. Haberlandt G., (1902). "Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen." Math.-Naturwiss. Kl. Abt. J. 111: 69-92.
12. Tisserat B., (1985). Embryogenesis, Organogenesis and Plant Regeneration. Oxford, Washington, IRL Press.
13. Pierik R.L.M, (1997). In Vitro Culture of Higher Plants. Dordrecht, The Netherlands, Kluwer Academic Publishers.
14. Arditti J., (2008). Micropropagation of Orchids, Second Edition. UK, Blackwell Publishing.
15. Yildiz M., Ulukan. H., Özbay A. (2003). The effect of different growth medium, gelling agents and explant age on shoot regeneration from hypocotyl explants (*Linum usitatissimum* L.). XIIIrd Biotechnology Congress. Canakkale, Turkey.
16. Alan A. (1991). Plant Cell Culture. Milton Keynes, Open University Press.

17. Yildiz M., E. C. (2002). "The effect of sodium hypochlorite solutions on in vitro seedling growth and shoot regeneration of flax (*Linum usitatissimum*)."
Naturwissenschaften 89: 259-261.
18. Dixon R.A., Gonzales. R. A. (1994). *Plant Cell and Tissue Culture: A Practical Approach*, 2nd ed. Oxford, Oxford University Press.
19. Yildiz M., Avci M., Ozgen M. (1997). Studies on sterilization and medium preparation techniques in sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) regeneration. Antalya, Turkey, Turkish-German Agricultural Research Symposium V.
20. Dunn C.G., (1968). *Food Preservatives*, Lea and Febiger.
21. Mercer W.A., Somers I. I. (1957). "Chlorine in food plant sanitation." *Advances in Food Research* 7: 129-169.
22. Smith C.R., (1968). *Mycobactericidal Agents*, Lea and Febiger.
23. Spaulding E.H., (1968). *Chemical Disinfection of Medical and Surgical Materials*, Lea and Febiger.
24. Bietz J.A., Sandford. P. A. (1971). "Reaction of sodium hypochlorite with amines and amides: Automation of the method." *Analytical Biochemistry* 44: 122-133.
25. Kantouch A., Ardel-Fattah. S. H. (1971). "Action of sodium hypochlorite on a-amino acids." *Chemicke Zvesti* 25: 222-230.
26. Hayatsu H., Pan S., Ukita T. (1971). "Reaction of sodium hypochlorite with nucleic acids and their constituents." *Chemical and Pharmaceutical Bulletin* 19: 2189-2192.
27. Sandford P.A., Nafyiger A. J., Jeanes A. (1971). "Reactions of sodium hypochlorite with amines and amides: A new method for quantitating polysaccharides containing hexosamines." *Analytical Biochemistry* 44: 111-121.
28. Gamborg O.L., Miller R. A., Ojima K. (1968). "Nutrient requirements of suspension culture of soybean root cells." *Ex. Cell. Res.* 50: 15-158.
29. Nitsch J.P., Nitsch C. (1969). "Haploid plants from pollen grains." *Science* 163: 85-57.
30. Κίντζιος Σ. Ε., (1994). "Επιχειρηματική ιστοκαλλιέργεια". Σταμούλη Α.Ε.
31. Steiner A.A., Winden H. (1970). "Recipe for ferric salts of ethelendiaminetetracetic acid." *Plant Physiol.* 46: 862-863.
32. Torres K.C., (1989). *Tissue culture techniques for horticultural crops*. London, Chapman and Hall.
33. Dhamankar V.S., (1992). "Molasses, a source of nutrients for in vitro sugar cane culture." *Sugar Cane* 4: 14-15.

34. Zahed M.A., (2000). Studies on morphogenesis of three elite species of orchids. Bangladesh, Univ. Dhaka. M.Sc.
35. Ohira K., Makoto I., Ojima K. (1976). "Thiamine requirements of various plant cells in suspension culture." *Plant Cell Physiol.* 17: 583-590.
36. Murashige T., (1974). "Plant propagation through tissue cultures." *Annu. Rev. Plant Physiol.* 25: 135-166.
37. Wang W.C., Yung Y.L., Lacin T.M., Hansen J.E (1976). "Greenhouse effects due to man-made perturbation of trace gases." *Science* 194: 685-690.
38. Fridborg G., Eriksson T. (1975). "Effects of activated charcoal on growth and morphogenesis in cell cultures." *Physiol. Plant* 34: 306-308.
39. Fridborg G., Pederson M., Landstrom L., Eriksson T. (1978). "The effect of activated charcoal on tissue cultures: adsorption of metabolites inhibiting morphogenesis." *Physiol. Plant* 43: 104-106.
40. Anagnostakis S.L., (1974). "Haploid plants from anthers of tobacco enhancement with charcoal." *Planta* 115: 281-283.
41. Pan M.J., van Staden J. (1998). "The use of charcoal in in vitro culture-A review." *Plant Growth Regulation* 26: 155-163.
42. Druart Ph., Wulf O. (1993). "Activated charcoal catalyses sucrose hydrolysis during autoclaving." *Plant cell, tissue and organ culture* 32: 97-99.
43. Skoog F., Miller R. A. (1957). "Chemical regulations of growth and organ formation in plant tissue culture in vitro." *Sym. Soc. Exp. Biol.* 11: 118-131.
44. Lam T.H., Street H. E. (1977). "The effect of selected aryloxycane carboxylic acids on the growth and levels of soluble phenols in cultured cells of *Rosa damascens*." *Pflanzenphysiol.* 84: 121.
45. Schmitz R.Y., Skoog F., Playtis A.J., Leonard N.J. (1972). "Cytokinins: synthesis and biological activity of geometric and position isomers of zeatin." *Plant Physiol.* 50: 702-705.
46. Prakash S., Hoque M. I., Brinks T. (2002). Culture media and containers. In: International Atomic Agency (ed.): Low cost options for tissue culture technology in developing countries. Proceedings of a technical meeting, 26-30 August. Vienna, Austria.
47. White P.R., (1943). "Nutrient deficiency studies and improved inorganic nutrients for cultivation of excised tomato roots." *Growth* 7: 53-65.

48. *Biondi, S. and Thorpe, T.A. (1981) Requirements for a Tissue Culture Facility. In: Thorpe, T.A., Ed., Plant Tissue Culture. Methods and Applications in Agriculture, Academic Press, Inc., New York, 1-20.*
49. Kumar S., Singh M. P. (2009). Plant Tissue Culture.
50. Giri C.C., Giri A. (2007). Plant Biotechnology: Practical Manual.
51. Levin R., Tanny G. (2002). "Bioreactors as a low cost option for tissue culture. In: International Atomic Energy Agency (ed.): Low cost options for tissue culture technology in developing countries. Proceedings of a technical meeting. Vienna, Austria."
52. Ελευθερίου Ε.Π., (1994). Τεχνολογία Φυτικού Πολλαπλασιαστικού Υλικού. Θεσσαλονίκη.
53. <http://www.plantcellculture.com/science.html>