

ΤΕΙ ΚΡΗΤΗΣ

**ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

***ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΦΥΤΙΚΟΥ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ
IN VITRO***

**ΣΠΟΥΔΑΣΤΡΙΑ ΦΙΛΙΠΠΙΔΟΥ ΣΩΤΗΡΙΑ
ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

**ΕΙΣΗΓΗΤΗΣ Δρ. ΛΟΥΛΑΚΑΚΗΣ Α. ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ
ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2004**

«Η εργασία αυτή είναι αφιερωμένη με πολύ αγάπη στην οικογένεια μου που με στήριξε οικονομικά και ψυχολογικά.»

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η εργασία αυτή ολοκληρώθηκε υπό την επίβλεψη του κύριου Λουλακάκη στα εργαστήρια Βιοτεχνολογίας και Φυσιολογίας Φυτών της Σχολής Τεχνολογίας Γεωπονίας του Τ.Ε.Ι. Ηρακλείου Κρήτης. Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους εκείνους που με βοήθησαν για την πολύτιμη συμπαράστασή τους, κατά την διάρκεια της προσπάθειάς μου. Τις μεγαλύτερες ευχαριστίες μου θα ήθελα να εκφράσω στον επιβλέποντα καθηγητή μου Δρ. Κωνσταντίνο Λουλακάκη για την συνεχή επίβλεψη καθ'όλη τη διάρκεια, τις ανεκτίμητες επιστημονικές συμβουλές του και το ενδιαφέρον που έδειξε για τη σωστή διεκπεραίωση της εργασίας μου. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τους συμφοιτητές μου Άννα Γριβάνη και Κατερίνα Τζανέλλου που με στήριξαν και με βοήθησαν καθ'όλη την διάρκεια της φοιτητικής μας ζωής.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ	9
2.1 ΒΑΣΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	10
2.1.1 Φυτικό υλικό	12
2.1.2 Σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος	12
2.1.3 Περιβαλλοντικές συνθήκες καλλιέργειας.....	14
2.2 ΤΕΧΝΙΚΗ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	15
2.3 ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	15
2.3.1 Καλλιέργεια τμημάτων ή ολόκληρων φυτικών οργάνων ..	15
2.3.2 Καλλιέργεια ακραίων μεριστωμάτων	16
2.3.3 Μικροεμβολιασμός.....	16
2.3.4 Καλλιέργεια αρχεφύτρων βλαστού	17
2.3.5 Τυχαία βλαστογένεση	17
2.3.6 Κυτταροκαλλιέργειες.....	18
2.3.7 Καλλιέργεια κάλλου	18
2.3.8 Καλλιέργεια αιωρημάτων κυττάρων	19
2.3.9 Καλλιέργεια πρωτοπλαστών	20
2.3.10 Καλλιέργεια ανθέρων και γυρεόκοκκων	21
2.3.11 Καλλιέργεια άλλων αναπαραγωγικών τμημάτων	21
2.4 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	25
2.4.1 Μικροπολλαπλασιασμός	26
2.4.2 Σωματική εμβρυογένεση	27
2.4.3 Απαλλαγή από ιούς και παθογόνα	27
2.4.4 Διάσωση εμβρύων	28
2.4.5 Παραγωγή απλοειδών φυτών	28
2.4.6 Συντήρηση και διάσωση γενετικού υλικού	29
2.4.7 Παραγωγή χημικών ουσιών από καλλιεργούμενους ιστούς και κύτταρα	29
2.4.8 Μελέτη του φυτικού μεταβολισμού	30
2.4.9 Τροποποίηση φυτών με σωμακλωνική παραλλακτικότητα ..	31
2.4.10 Μεταφορά γονιδίων με σύντηξη πρωτοπλαστών	32
2.4.11 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.....	33
2.4.12 ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΣΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ IN VITRO	36
3.1 ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ	39
3.1.1 ΦΥΣΗ ΤΟΥ ΦΥΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ	41
3.1.1.1 ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΜΕΡΙΣΤΩΜΑΤΩΝ	41
3.1.2 ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ	42
3.1.3 ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΕΜΒΡΥΩΝ	42
3.1.3.1 ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ	42
3.1.3.2 ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΖΥΓΩΤΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ	43
3.1.4 ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΓΥΡΗΣ.....	44
3.1.5 ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΩΝ	44
3.2 ΠΡΟ-ΨΥΚΤΙΚΕΣ ΠΕΡΙΠΟΙΗΣΕΙΣ	44
3.2.1 ΠΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ.....	44
ΑΠΟΞΗΡΑΝΣΗ	45

ΥΑΛΟΠΟΙΗΣΗ	45
3.3 ΚΡΥΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ	45
3.3.1 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΡΥΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ..	48
3.4 ΨΥΞΗ	49
3.5 ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ	50
3.6 ΞΕΠΑΓΩΜΑ	51
3.7 ΕΠΑΝΑΦΟΡΑ ΒΛΑΣΤΗΣΗΣ	51
3.8 ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑ	53
ΕΛΕΓΧΟΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ	54
3.8.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΙΣΤΩΝ	55
ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ	56
3.9 ΜΙΚΡΗΣ Ή ΜΕΤΡΙΑΣ ΧΡΟΝΙΚΗΣ ΔΙΑΡΚΕΙΑΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ	56
3.9.1 ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΧΩΡΙΣ ΨΥΞΗ	57
3.9.2 ΑΛΛΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ΡΥΘΜΟΥ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ	58
3.9.3 ΨΥΧΡΗ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ	60
3.9.4 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΑΕΡΙΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ (ΤΗΣ ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΑΣ)	61
3.9.5 ΑΠΟΞΗΡΑΝΣΗ	62
3.10 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	62
4. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΤΡΑΠΕΖΑΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΣΤΗΝ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΧΩΡΑΣ	64
4.1 ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ ΤΡΑΠΕΖΑΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ	65
5. ΕΘΝΙΚΕΣ ΥΠΟΧΡΕΩΣΕΙΣ-ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ	66

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα φυτά των καλλιεργούμενων ποικιλιών καθώς και οι αρχέγονοι πρόγονοι αυτών αποτελούν το πλήθος του γενετικού υλικού για μελλοντικά πειραματικά προγράμματα. Ωστόσο η ύπαρξη αυτών των ποικιλιών απειλείται από εξαφάνιση λόγω της εισαγωγής νέων βελτιωμένων ποικιλιών στις νέες καλλιέργειες. Ο κίνδυνος αυτός έγινε αντιληπτός το 1974 όταν το Διεθνές Συμβούλιο Γεωπονικής Έρευνας ίδρυσε την Διεθνή Επιτροπή Έρευνας Γενετικού Υλικού με στόχο να αποτελέσει ένα παγκόσμιο δίκτυο γενετικής έρευνας. Αυτό έγινε για να εξασφαλισθεί γενετικό υλικό από όλες τις καλλιεργημένες ποικιλίες το οποίο συλλέχθηκε, διατηρήθηκε υπό κατάλληλες συνθήκες, εκτιμήθηκε και έγινε διαθέσιμο για όλους τους καλλιεργητές ανά τον κόσμο. (Hawkes 1975, Heyshaw 1979).

Οι γενετικοί πόροι ώρας, περιλαμβάνουν τα καλλιεργούμενα είδη καθώς και τους κοντινούς συγγενείς αυτών, και επιπλέον ένα μεγάλο αριθμό από άγρια είδη που επηρεάζουν την ανθρώπινη ζωή με ποικίλους τρόπους. Κάποια από αυτά, τα οποία ως επί το πλείστον είναι φαρμακευτικά φυτά, είναι πολύτιμα, αλλά δεν έχουν ποτέ καλλιεργηθεί. Η υπερβολική εκμετάλλευση ορισμένων φυτών μείωσε σημαντικά τον πληθυσμό τους σε τέτοιο βαθμό ώστε να απειλούνται από αφανισμό. Τόσο η επέμβαση του ανθρώπου, όσο και οι φυσικοί παράγοντες είχαν σαν αποτέλεσμα τη μείωση των γενετικών πόρων. Η αποθήκευση συνεπώς των φυτικών ειδών και ποικιλιών έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον αφού έχει σαν στόχο την συλλογή και διατήρηση

ειδών που χρησιμοποιούνται για ποικίλες ανθρώπινες ανάγκες όπως διατροφή, ντύσιμο κ.τ.λ. (Fay 1992).

Συνήθως, το γενετικό υλικό αποτελείται κυρίως από σπόρους διότι αφενός χρειάζονται μικρό χώρο και μπορούν να διατηρηθούν σε χαμηλές θερμοκρασίες για πολλά χρόνια. Μπορούν επίσης εύκολα αποξηρανθούν, να συσκευαστούν και να μεταφερθούν συγκεντρωμένοι σε Γενετικές Τράπεζες. Η μέθοδος όμως αυτή παρουσιάζει πολλά μειονεκτήματα: (α) Ορισμένα φυτά, όπως του κακάο, της καρύδας και του μάνγκο, παράγουν μεγάλο αριθμό βιώσιμων σπόρων, οι οποίοι όμως διαθέτουν μηχανισμούς λήθαργου και δεν μπορούν να βλαστήσουν μετά από την παραμονή τους σε χαμηλές θερμοκρασίες. (β) Οι σπόροι μπορεί να καταστραφούν από παθογόνα ή τρωκτικά. (γ) Αξιόλογοι κλώνοι δε μπορούν να αποθηκευτούν στη μορφή των σπόρων, εκτός από τα απομικτικά είδη. (δ) Δεν είναι δυνατόν να εφαρμοστεί σε ορισμένα λαχανοκομικά (όπως *Dioscorea*, *Jromoea* και πατάτα). (ε) Επιπλέον, το κόστος της αποθήκευσης φυτών σε μικρούς αγρούς είναι εξαιρετικά μεγάλο και υπάρχει ο κίνδυνος να χαθεί ολόκληρη η καλλιέργεια από άσχημες περιβαλλοντικές συνθήκες.

Η δυνατότητα παραγωγής ολόκληρων φυτών από σωματικά ή γαμετικά έμβρυα και μικρά κομμάτια βλαστών ώθησε τους μελετητές να εξετάσουν την πιθανότητα της αποθήκευσης των γονότυπων σε συνθήκες *in vitro*. Τα κυριότερα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι : (α) Απαιτείται μικρός χώρος για την αποθήκευση μεγάλου αριθμού κλωνικού υλικού. (β) Το γενετικό υλικό δεν κινδυνεύει από τρωκτικά, παθογόνα, ιούς ή από τις συνθήκες του περιβάλλοντος. (γ) Κάτω από ειδικές συνθήκες αποθήκευσης τα φυτά δεν εμφανίζουν συχνά σχισίματα ή

εκδορές. (δ) Το γενετικό υλικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή νέων φυτών γρήγορα, και (ε) Μπορεί να μετακινηθεί από χώρα σε χώρα, εφόσον είναι απαλλαγμένο από ιούς και

παθογόνα μειώνοντας έτσι τα εμπόδια από τους ποιοτικούς ελέγχους που γίνονται κατά τη μεταφορά τους.

Στον αγρό τα φυτά μπορούν να μείνουν σε συνθήκες υποκαλλιέργειας για 4-8 εβδομάδες. Ωστόσο η αποθήκευση γενετικού πλάσματος σε συνεχείς υποκαλλιέργειες είναι αφενός αντισυμβατική, αφ' ετέρου δε υπάρχει ο κίνδυνος απωλειών λόγω εσφαλμένων ενεργειών ή προσβολής από παθογόνα και εχθρούς. Συχνά σε καλλιεργήσιμους κάλλους και κύτταρα μειώνεται η δυνατότητα βλάστησης και η γενετική κατασκευή των κυττάρων υποφέρει. Στην πράξη πρέπει να διατηρείται η συχνότητα υποκαλλιέργειας στο χαμηλότερο επίπεδο. Υπάρχουν 2 τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την *in vitro* αποθήκευση γενετικού υλικού.

(α) Η μακράς χρονικής διάρκειας αποθήκευση γενετικού υλικού στη θερμοκρασία του υγρού αζώτου ή *Κρυοσυντήρηση*.

(β) Η μικρή ή μέτριας χρονικής διάρκειας αποθήκευση γενετικού υλικού σε χαμηλές θερμοκρασίες και σε συνθήκες υποκαλλιέργειας. Οι Withers and Williams (1986) τις αναφέρουν ως «*Βασική Γενετική Τράπεζα in vitro*» και «*Δραστήρια Γενετική Τράπεζα in vitro*».

2. ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

ΓΕΝΙΚΑ

Η τεχνική της *ιστοκαλλιέργειας* (η ανάπτυξη της άρχισε στη δεκαετία του 40) χρησιμοποιείται σε μεγάλη έκταση σήμερα για τη μελέτη βασικών και εφαρμοσμένων προβλημάτων της βιολογίας φυτών. Ο όρος ιστοκαλλιέργεια φυτών (*plant tissue culture*) αναφέρεται στην καλλιέργεια φυτικών τμημάτων και πήρε τη συγκεκριμένη ονομασία επειδή το νέο φυτό που αναπτύσσεται μπορεί να προέρχεται από φυτικό ιστό. Επίσης συναντάται και σαν *μεριστωματικός πολλαπλασιασμός* επειδή, συχνά, ο ιστός που καλλιεργείται είναι το ακραίο μερίστωμα ή *in vitro*. Ο όρος *μικροπολλαπλασιασμός* (micropropagation) αναφέρεται στον αγενή πολλαπλασιασμό των φυτών μέσω της μεθόδου της ιστοκαλλιέργειας σε αντιδιαστολή με τη συμβατική μέθοδο που ονομάζεται *μακροπολλαπλασιασμός*.

Σχεδόν οποιοσδήποτε τύπος φυτικού ιστού μπορεί να καλλιεργηθεί σε στερεό ή υγρό θρεπτικό υπόστρωμα και να διαφοροποιηθεί σε νέους τύπους ιστών ή οργάνων ή και να εξελιχθεί σε ολοκληρωμένο οργανισμό. Το φυτικό υλικό αποχωρίζεται από το μητρικό φυτό και καλλιεργείται κάτω από πειραματικές συνθήκες μέσα σε δοκιμαστικούς σωλήνες, τριβλία, μπουκάλια με μεγάλο στόμιο ή άλλα κατάλληλα δοχεία, όπου οι συνθήκες περιβάλλοντος και διατροφής ελέγχονται αυστηρά.

Ο μικροπολλαπλασιασμός στα φυτά βασίζεται στην ολοδυναμικότητα (totipotency) των κυττάρων, δηλαδή την

ικανότητα ενός απομονωμένου κυττάρου ή μιας ομάδας κυττάρων να επαναδιαφοροποιηθούν και να αναγεννήσουν το αρχικό φυτό από το οποίο προήλθαν. Η θεωρία της ολοδυναμικότητας θεμελιώθηκε από τους Schwann και Schleiden το 1838, ενώ η ενόραση της εξέλιξης του μικροπολλαπλασιασμού αποδίδεται στο Γερμανό βοτανικό Vochting (1878), ο οποίος κατανόησε ότι “σε κάθε φυτικό τμήμα, όσο μικρό κι αν είναι, υπάρχουν όλα τα στοιχεία από τα οποία μπορεί να ανασυγκροτηθεί ολόκληρο το φυτικό σώμα”. Σημαντικό βήμα στην εξέλιξη του μικροπολλαπλασιασμού αποτέλεσε ο σχηματισμός ριζών από κάλλους καρότου που ανέφερε ο Nobecourt το 1939. Ακολούθησε η ανακάλυψη από τους Skoog και Miller (1957) του ανεξάρτητου ρόλου των αυξινών και κυτοκινινών στην βλαστογένεση και ριζογένεση που θεμελίωσε τις αρχές στις οποίες στηρίζεται ο μικροπολλαπλασιασμός.

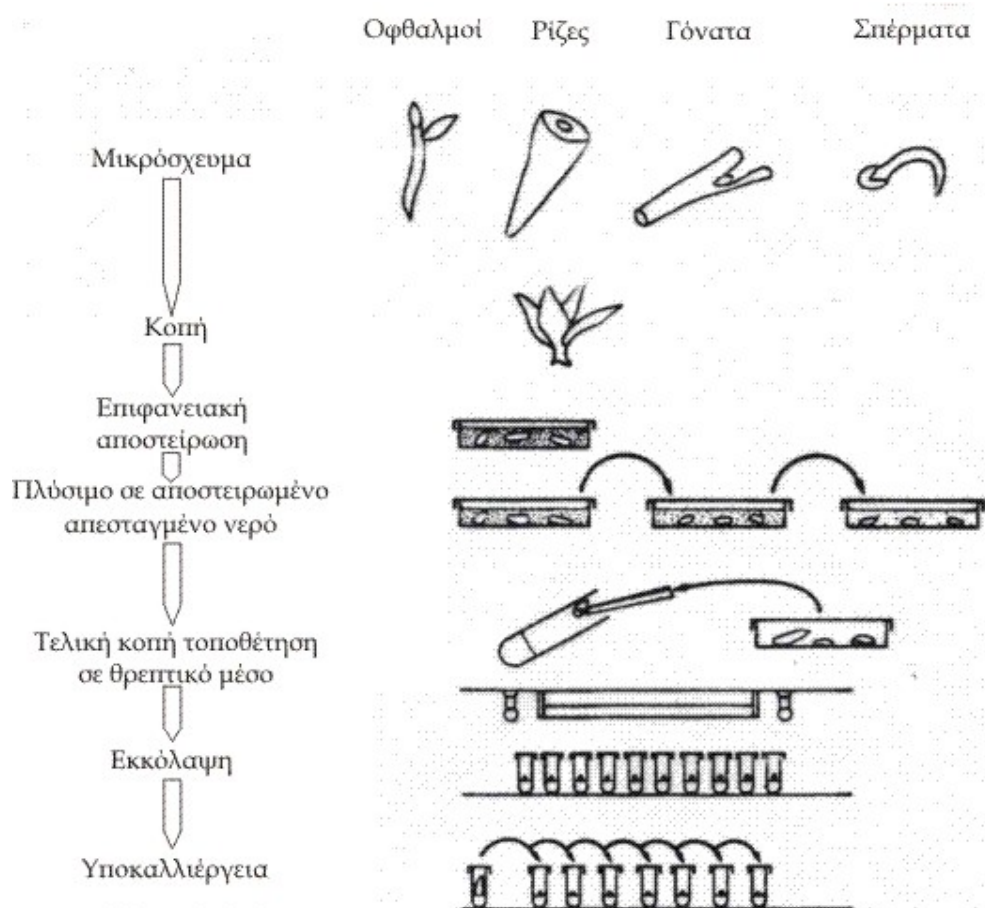
Η νέα αυτή μέθοδος πολλαπλασιασμού των φυτών έτυχε ευρύτερης εφαρμογής σε ορισμένα φυτά από ότι σε άλλα. Μεγάλος αριθμός εργαστηρίων σε όλο τον κόσμο πολλαπλασιάζουν ανθοκομικά φυτά διαφόρων κατηγοριών με ιστοκαλλιέργεια. Γενικά τα ποώδη φυτά πολλαπλασιάζονται σχετικά εύκολα με τη μέθοδο αυτή ενώ τα πολυετή ξυλώδη παρουσιάζουν ορισμένες δυσκολίες. Στην επιχειρηματική ανθοκομία ο μεριστωματικός πολλαπλασιασμός εφαρμόζεται στις παρακάτω περιπτώσεις :

- Για την εξυγίανση κλώνων ανθοκομικών φυτών τα οποία στη συνέχεια πολλαπλασιάζονται με μοσχεύματα,
- Για την παραγωγή, σε μικρό χρονικό διάστημα, μεγάλου αριθμού νεαρών φυτών για επιχειρηματική χρήση και
- Για την παραγωγή φυτών σε βάζα που πωλούνται για καλλωπιστικούς σκοπούς.

2.1 ΒΑΣΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Η διαδικασία της **ιστοκαλλιέργειας** περιλαμβάνει τα βασικά στάδια που λίγο πολύ έχουν υιοθετηθεί τόσο από τα ερευνητικά όσο και από τα εμπορικά εργαστήρια ιστοκαλλιέργειας. Διαφορετικές συνθήκες καλλιέργειας επικρατούν στα στάδια αυτά που πολλές φορές αλλάζουν από είδος σε είδος προκειμένου να ικανοποιηθούν οι ειδικές απαιτήσεις των φυτικών ειδών. Ορισμένοι παράγοντες, που σχετίζονται: **α) με το φυτικό υλικό β) τη σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος και γ) τις περιβαλλοντικές συνθήκες καλλιέργειας**, επηρεάζουν την καλλιέργεια των φυτικών ιστών και κυττάρων.

Για να έχει επιτυχία μια **in vitro καλλιέργεια** ενός φυτικού είδους πρέπει οι παραπάνω παράγοντες να ληφθούν υπόψη και να καθοριστούν οι άριστες συνθήκες καλλιέργειας πειραματικά.



Εικ. 1

2.1.1 Φυτικό υλικό

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

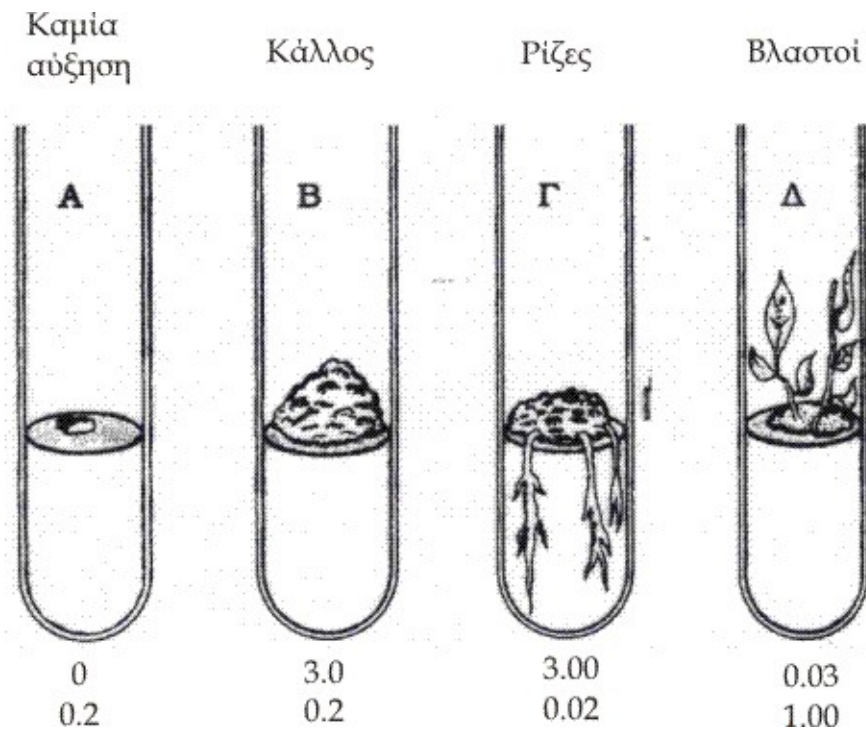
2.1.2 Σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος

Το θρεπτικό υπόστρωμα μπορεί να είναι υγρό (δεν περιέχει άγαρ) ή στερεό (περιέχει άγαρ σε συγκέντρωση συνήθως 0,6-0,8%). Τα υλικά αυτά περιέχουν όλα τα απαραίτητα μακρο και μικροστοιχεία,

τα οποία προσθέτονται με τη μορφή ανόργανων αλάτων, μια πηγή άνθρακα και ενέργειας (συνήθως σακχαρόζη), βιταμίνες, αμινοξέα και ρυθμιστές της αύξησης και ανάπτυξης των φυτών (φυτοορμόνες). Για πολλά φυτικά είδη χρησιμοποιείται το θρεπτικό υπόστρωμα των Murashige και Skoog, το οποίο τροποποιείται ανάλογα με τις ανάγκες κάθε φυτού. Άλλα καθορισμένα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται συχνά είναι το B5, το White και το MV.

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

συγκεντρώσεων των δύο φυτοορμονών στο υπόστρωμα προωθείται η ανάπτυξη κάλλου.



Εικ. 2 Επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων αυξίνης (ΙΑΑ) και κιτοκινίνης (κινετίνη) στην αύξηση και μορφογένεση εκφύτων καπνού.

2.1.3 Περιβαλλοντικές συνθήκες καλλιέργειας

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

2.2 ΤΕΧΝΙΚΗ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

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

1. Προ - *in vitro*

- α) Επιλογή μητρικού υλικού
- β) Επιλογή τύπου έκφυτου
- γ) Επιλογή θρεπτικού υποστρώματος
- δ) Επιλογή συνθηκών καλλιέργειας
- ε) Αποστείρωση φυτικού υλικού και μέσων καλλιέργειας

2. *IN VITRO*

- α) Εμφύτευση έκφυτου
- β) Βλαστικός πολλαπλασιασμός
- γ) Ανάπτυξη ριζογένεσης

3. Μετα - *in vitro*

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

2.3 ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

2.3.1 Καλλιέργεια τμημάτων ή ολόκληρων φυτικών οργάνων

Όλα τα όργανα ή τμήματα των οργάνων ενός φυτού (κορυφές ή άλλα τμήματα βλαστών, τμήματα φύλλου ή ρίζας, ανθήρες, έμβρυα, ωοθήκες κ.ά.) μπορούν να καλλιεργηθούν *in vitro* και να αναγεννήσουν νέους ιστούς ή και ολόκληρα φυτάρια.

2.3.2 Καλλιέργεια ακραίων μεριστωμάτων

Μεγαλύτερη πρακτική σημασία για τις ιστοκαλλιέργειες έχουν τα επάκρια μεριστώματα του βλαστού γιατί μπορούν να καλλιεργηθούν εύκολα σε *in vitro* συνθήκες και να αναπαράγουν αυτοτελή φυτάρια, ευκολότερα και σε μεγαλύτερη συχνότητα παρά τα άλλα μεριστώματα. Το ακραίο μερίστωμα κάτω από ασηπτικές συνθήκες αποκαλύπτεται από το ακραίο τμήμα ενός βλαστού. Η κορυφή αποκόπτεται και μεταφέρεται σε αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα. Όταν οι συνθήκες ανάπτυξης είναι ευνοϊκές το μερίστωμα σχηματίζει βλαστούς και ρίζες και τελικά αναγεννάται ένα φυτάριο.

Κατά κύριο λόγο η καλλιέργεια επάκριων μεριστωμάτων εφαρμόζεται στην παραγωγή υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού και συνδυάζεται με θερμοθεραπεία για σίγουρη απαλλαγή από παθογόνα. Χρησιμοποιείται σε καλλωπιστικά φυτά (χρυσάνθεμα, γαρύφαλλα, ορχεοειδή), κηπευτικά (πατάτες, φράουλες, σκόρδα), βιομηχανικά (καπνός), οπωροφόρα δέντρα (εσπεριδοειδή, μηλιά, πυρηνόκαρπα) κ.τ.λ.

2.3.3 Μικροεμβολιασμός

Ο μικροεμβολιασμός εφαρμόζεται στα ξυλώδη - δεντρώδη φυτά επειδή τα είδη αυτά ριζοβολούν δύσκολα με αποτέλεσμα η καλλιέργεια επάκριων μεριστωμάτων να μην δίνει ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Όπως και στο παραπάνω σύστημα ιστοκαλλιέργειας ο βασικός σκοπός του μικροεμβολιασμού είναι η δημιουργία φυτών ελεύθερων ιώσεων και άλλων παθογόνων.

2.3.4 Καλλιέργεια αρχεφύτρων βλαστού

Αυτό το σύστημα ιστοκαλλιέργειας είναι γνωστό και ως καλλιέργεια κορυφών βλαστού και γονάτων επειδή περιλαμβάνει την αναπαραγωγή των φυτών και το μαζικό πολλαπλασιασμό από τα κορυφαία τμήματα τρυφερών βλαστών και των γονάτων της κορυφής που φέρουν μασχαλιαίους οφθαλμούς. Οι διαφορές που παρουσιάζει από την καλλιέργεια ακραίων μεριστωμάτων είναι ότι τα φυτικά τμήματα έχουν μεγαλύτερο μήκος και εκτός από το κορυφαίο μεριστώμα περιλαμβάνουν και τα πρώτα 3-4 γόνατα με τα φύλλα και τους μασχαλιαίους οφθαλμούς τους. Επίσης έχει υψηλότερα ποσοστά επιτυχίας αλλά δεν απαλλάσσει τα φυτά από τυχόν ιώσεις. Ο βασικός σκοπός αυτού του συστήματος είναι ο μαζικός πολλαπλασιασμός και γι' αυτό το λόγο θα πρέπει τα αρχικά φυτά που θα χρησιμοποιηθούν να είναι απόλυτα ελεύθερα ιώσεων και άλλων παθογόνων.

2.3.5 Τυχαία βλαστογένεση

Ορισμένοι βλαστοί ονομάζονται τυχαίοι ή επίκτητοι επειδή προκύπτουν από μη προκαθορισμένες θέσεις αποκομμένων βλαστών, ριζών, φύλλων, βολβών και άλλων φυτικών τμημάτων. Το φαινόμενο της τυχαίας βλαστογένεσης είναι σπάνιο στα άθικτα φυτά αλλά σε συνθήκες μικροκαλλιέργειας συχνά σχηματίζονται τυχαίοι βλαστοί και συμβάλλουν σημαντικά στο μικροπολλαπλασιασμό των φυτών. Ο σχηματισμός των τυχαίων βλαστών μπορεί να είναι άμεσος ή έμμεσος. Στον άμεσο ο σχηματισμός αρχίζει από επιδερμικά ή υποεπιδερμικά παρεγχυματικά κύτταρα που επανακτούν μεριστωματικές ιδιότητες και με τις διαιρέσεις τους δημιουργούν μια ομάδα μικρών κυττάρων πλούσιων σε πρωτόπλασμα που ονομάζεται

μεριστωματοειδές, το οποίο αναπτύσσεται σε ένα αρχέφυτρο βλαστού. Στον έμμεσο τρόπο μεσολαβεί σχηματισμός κάλλου από το κομμένο άκρο του μοσχεύματος. Γύρω από τον κάλλο αναπτύσσονται και πάλι μεριστωματοειδή που εξελίσσονται σε αρχέφυτρα βλαστού. Οι πιο σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την έναρξη σχηματισμού τυχαίων βλαστών και στις δυο περιπτώσεις είναι: 1) η επιλογή του μοσχεύματος και 2) το είδος και η συγκέντρωση των ορμονών στο θρεπτικό υπόστρωμα. Η καλλιέργεια αρχεφύτρων βλαστού βρίσκει εφαρμογή στο μαζικό πολλαπλασιασμό των φυτών.

2.3.6 Κυτταροκαλλιέργειες

Μεμονωμένα φυτικά κύτταρα μπορούν να καλλιεργηθούν σε *in vitro* συνθήκες, παρόμοια με την καλλιέργεια μικροβιακών κυττάρων. Η τεχνολογία των κυτταροκαλλιεργειών περιλαμβάνει

την ανάπτυξη κυττάρων σε ένα τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα υπό ασηπτικές συνθήκες. Τα κύτταρα χρησιμοποιούνται είτε σε ελεύθερη κατάσταση αιωρούμενα μέσα σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα (αιωρούμενες καλλιέργειες κυττάρων) είτε σε ακινητοποιημένη μορφή. Οι κυτταροκαλλιέργειες έχουν σήμερα αποφασιστικό ρόλο τόσο στη βασική βιολογική έρευνα, για τη μελέτη διάφορων πτυχών του μεταβολισμού των κυττάρων, όσο και σε εφαρμογές, όπως η σωματική εμβρυογένεση ή μαζική παραγωγή χρήσιμων φυτικών ενώσεων.

2.3.7 Καλλιέργεια κάλλου

Ο τραυματισμός ενός φυτικού ιστού συνήθως έχει ως αποτέλεσμα την έναρξη κυτταρικών διαιρέσεων στην περιοχή ή σε γειτονικές

περιοχές του τραύματος. Έτσι όταν ένα φυτικό τμήμα καλλιεργηθεί σε θρεπτικό υπόστρωμα, υπό την επίδραση φυτοορμονών, λαμβάνουν χώρα κυτταροδιαιρέσεις που οδηγούν στο σχηματισμό κάλλου, μίας άμορφης μάζας φαινομενικά ανοργάνωτων κυττάρων. Θεωρητικά, όλοι οι φυτικοί ιστοί παρουσιάζουν την ικανότητα σχηματισμού κάλλου, όμως σε γενικές γραμμές καταλληλότερο υλικό, για την έναρξη καλλιεργειών κάλλου, αποτελούν οι νεαροί ή οι αναπτυξιακά ανώριμοι ιστοί όπως υποκοτύλια, νεαρά φύλλα ή ανώριμα έμβρυα.

Οι φυτοορμόνες καθορίζουν το σχηματισμό κάλλου σε συνθήκες ιστοκαλλιέργειας. Υπάρχουν είδη που χρειάζονται μόνο κυτοκινίνη και άλλα που χρειάζονται μόνο αυξίνη (π.χ πολλά μονοκότυλα) αλλά τα περισσότερα απαιτούν σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις αυξινών και κυτοκινινών. Μετά την εδραίωση της καλλιέργειας οι κάλλοι μεταφέρονται σε νέο θρεπτικό υπόστρωμα που συνήθως περιέχει μικρότερες συγκεντρώσεις φυτοορμονών.

Οι καλλιέργειες κάλλου αποτελούν χρήσιμο εργαλείο τόσο για ερευνητικούς σκοπούς (μελέτη του φυτικού μεταβολισμού, της οργανογένεσης και της σωματικής εμβρυογένεσης) όσο και για πρακτικές εφαρμογές (π.χ μικροπολλαπλασιασμός φυτών).

2.3.8 Καλλιέργεια αιωρημάτων κυττάρων

Πρόκειται για υγρές καλλιέργειες απομονωμένων κυττάρων ή πολύ μικρών συναθροίσεών τους που αιωρούνται συνέχεια καθώς αυξάνονται σε υγρό θρεπτικό μέσο, αιώρηση που εξασφαλίζεται με συνεχή ανατάραξη, συνήθως περιστροφής.

Η χρήση των αιωρούμενων καλλιεργειών για ερευνητικούς σκοπούς παρουσιάζει αρκετά πλεονεκτήματα σε σχέση με άλλα φυτικά συστήματα. Πρώτον, σε τέτοιες καλλιέργειες ελέγχεται απόλυτα το θρεπτικό και φυσικό περιβάλλον. Δεύτερον, τα κύτταρα

βρίσκονται σε ομοιόμορφη αναπτυξιακή φάση και αποτελούν πολύ πιο ομοιογενή πληθυσμό απ' ό,τι ολόκληροι οργανισμοί με την ποικιλομορφία ιστών που τους χαρακτηρίζει. Τρίτον, σε αιωρούμενες καλλιέργειες μπορεί να γίνουν ακριβείς μετρήσεις βιολογικών φαινομένων.

2.3.9 Καλλιέργεια πρωτοπλαστών

Οι πρωτοπλάστες μπορούν να απομονωθούν τόσο από σωματικά κύτταρα (σωματικοί πρωτοπλάστες) όσο και από αναπαραγωγικά κύτταρα (φυλετικοί πρωτοπλάστες). Μετά την απομόνωσή τους καλλιεργούνται σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα, οπότε σε μερικές ημέρες συνθέτουν νέο τοίχωμα, αρχίζουν να διαιρούνται και μετά από συνεχείς κυτταρικές διαιρέσεις παράγουν κάλλο. Από τον κάλλο, όπως έχει αναφερθεί, μπορεί να αναγεννηθεί ολόκληρο φυτό.

Η δυνατότητα απομόνωσης και καλλιέργειας πρωτοπλαστών και η αναγέννηση του μητρικού φυτού από αυτούς έχει μεγάλη σημασία για τη βιοτεχνολογία, αφού στο επίπεδο του πρωτοπλάστη μπορούν να εφαρμοστούν ευκολότερα οι νέες τεχνολογίες και ιδιαίτερα οι τεχνικές της γενετικής μηχανικής. Έτσι οι πρωτοπλάστες χρησιμοποιούνται για τη βελτίωση των φυτών επειδή, λόγω της απουσίας κυτταρικού τοιχώματος, αποτελούν πολύ καλό σύστημα για την απευθείας μεταφορά γονιδίων. Επίσης, η τεχνολογία των πρωτοπλαστών δίνει την δυνατότητα για σωματικό υβριδισμό, με σύντηξη πρωτοπλαστών, επιτρέποντας έτσι τη μεταφορά γονιδίων μεταξύ διαφορετικών ειδών. Αποτελούν σύστημα μοντέλο για την έρευνα διαφόρων βιοχημικών και φυσιολογικών προβλημάτων, όπως για μελέτες φωτοσύνθεσης και εντοπισμού ενζύμων στα C3 και C4 φυτά, σύνθεσης κυτταρικών τοιχωμάτων, πρόσληψης στοιχείων και χαρακτήρων της κυτταρικής μεμβράνης. Οι πρωτοπλάστες

χρησιμοποιούνται και ως σύστημα για απομόνωση κυτταρικών οργανιδίων.

2.3.10 Καλλιέργεια ανθέρων και γυρεόκοκκων

Η μεγαλύτερη σημασία της καλλιέργειας ανθέρων και γυρεόκοκκων βρίσκεται στο γεγονός ότι παρέχει τη δυνατότητα ανάπτυξης απλοειδών φυτών, τα οποία έχουν ένα και μοναδικό γενετικό υλικό με ανεκτίμητη αξία στην έρευνα των μεταλλάξεων και τη βελτίωση των φυτών. Επειδή η φυσιολογική βλάστηση των γυρεόκοκκων και κατά συνέπεια η γονιμοποίηση επηρεάζονται δραματικά από ποικιλία ρυπαντών, η καλλιέργεια της γύρης εφαρμόζεται και για μελέτη προβλημάτων ρύπανσης του φυσικού περιβάλλοντος.

Οι απαιτήσεις για την καλλιέργεια ανθέρων και γύρης ανάμεσα στα διάφορα φυτά, ακόμα και στις ποικιλίες, είναι διαφορετικές. Αυτό σημαίνει ότι οι διάφοροι γονότυποι έχουν και διαφορετική ανταπόκριση. Επιτυχία στην παραγωγή ολόκληρων φυτών έγινε στα *Nicotiana*, *Brassica*, *Pelargonium*, *Datura*, *Hyoscyamus* και σε μερικά μέλη της οικογένειας *Poaceae*. Σε άλλα φυτά δημιουργήθηκαν μόνο κάλλοι ή προέμβρυα.

2.3.11 Καλλιέργεια άλλων αναπαραγωγικών τμημάτων

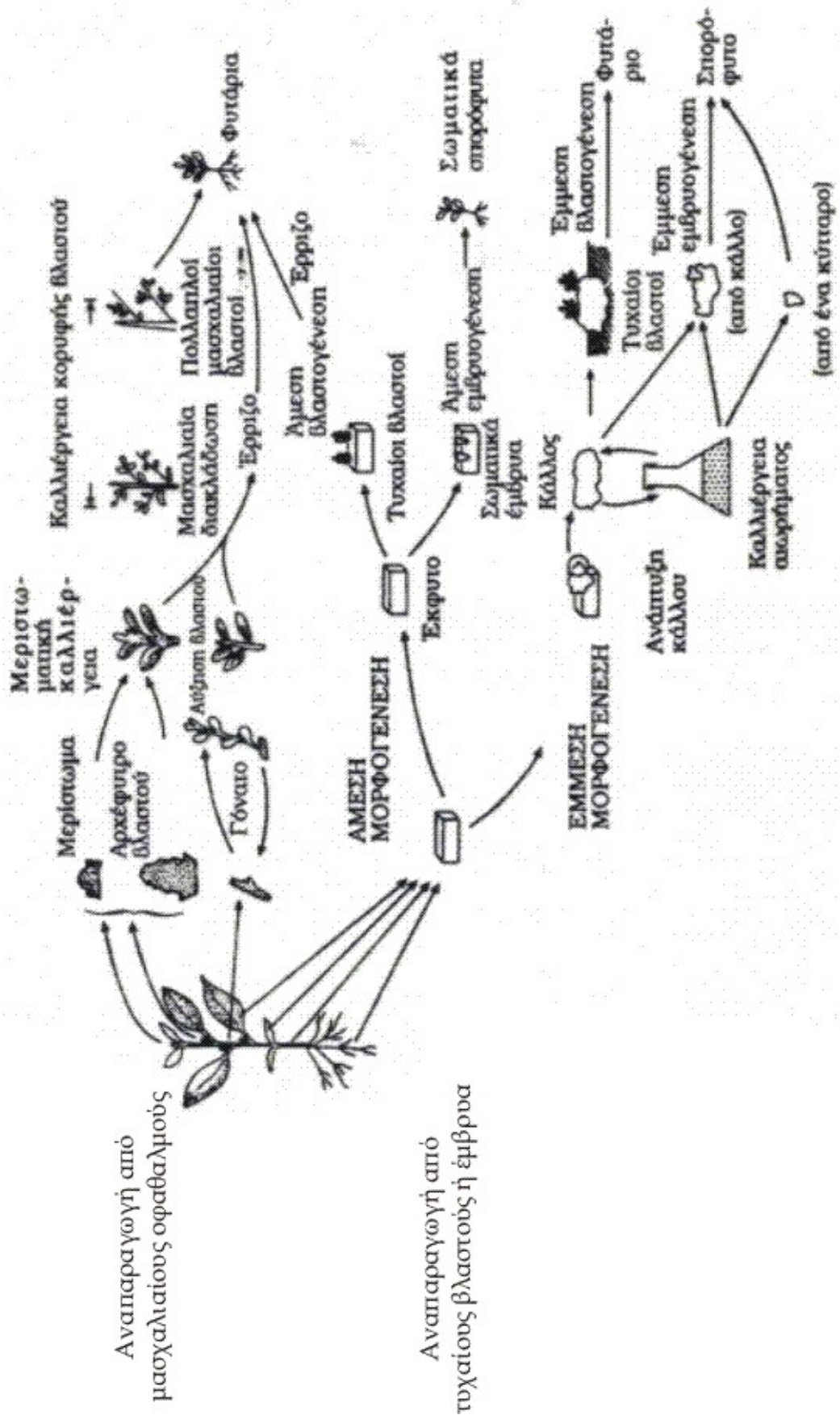
Η καλλιέργεια του θηλυκού γαμετόφυτου μπορεί να παράγει απλοειδή φυτά. Τα φυτάρια προκύπτουν είτε από το ωκότυταρο είτε από τους αντίποδες. Το ωκότυταρο κάτω από ορισμένες συνθήκες μπορεί να αναπτυχθεί και να δώσει απλοειδές φυτό. Αγονιμοποίητα

ωοκύτταρα μπορούν να αποχωριστούν και να καλλιεργηθούν *in vitro* και στη συνέχεια να γίνει γονιμοποίησή τους με γύρη. Με αυτή τη τεχνική παράγονται σπέρματα υβριδίων που δεν είναι δυνατόν να παραχθούν με άλλα μέσα, καθώς και αυτογονιμοποιούνται είδη που σε άλλες περιπτώσεις δεν θα είχαν τη δυνατότητα να το κάνουν.

Καλλιέργεια εμβρύων παράγει διπλοειδή φυτά. Τα έμβρυα μπορεί να αποχωριστούν από το γονικό φυτό σε διάφορα στάδια ανάπτυξης, από το γονιμοποιημένο ωοκύτταρο μέχρι το ώριμο έμβρυο. Η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί για τη διάσωση εμβρύων που σε φυσιολογικές συνθήκες αποβάλλονται από το φυτό. Επίσης εφαρμόζεται για την άμεση βλάστηση σπερμάτων που βρίσκονται σε λήθαργο και έτσι επιταχύνεται ο χρόνος καλλιέργειας.

Η ασηπτική καλλιέργεια ολόκληρων σπερμάτων συνιστάται για πολύ μικρά σε μέγεθος σπέρματα και εφαρμόζεται στον εμπορικό πολλαπλασιασμό των ορχεοειδών που παράγουν πολύ μικρά σπέρματα τα οποία δεν έχουν εντελώς ανεπτυγμένα έμβρυα.

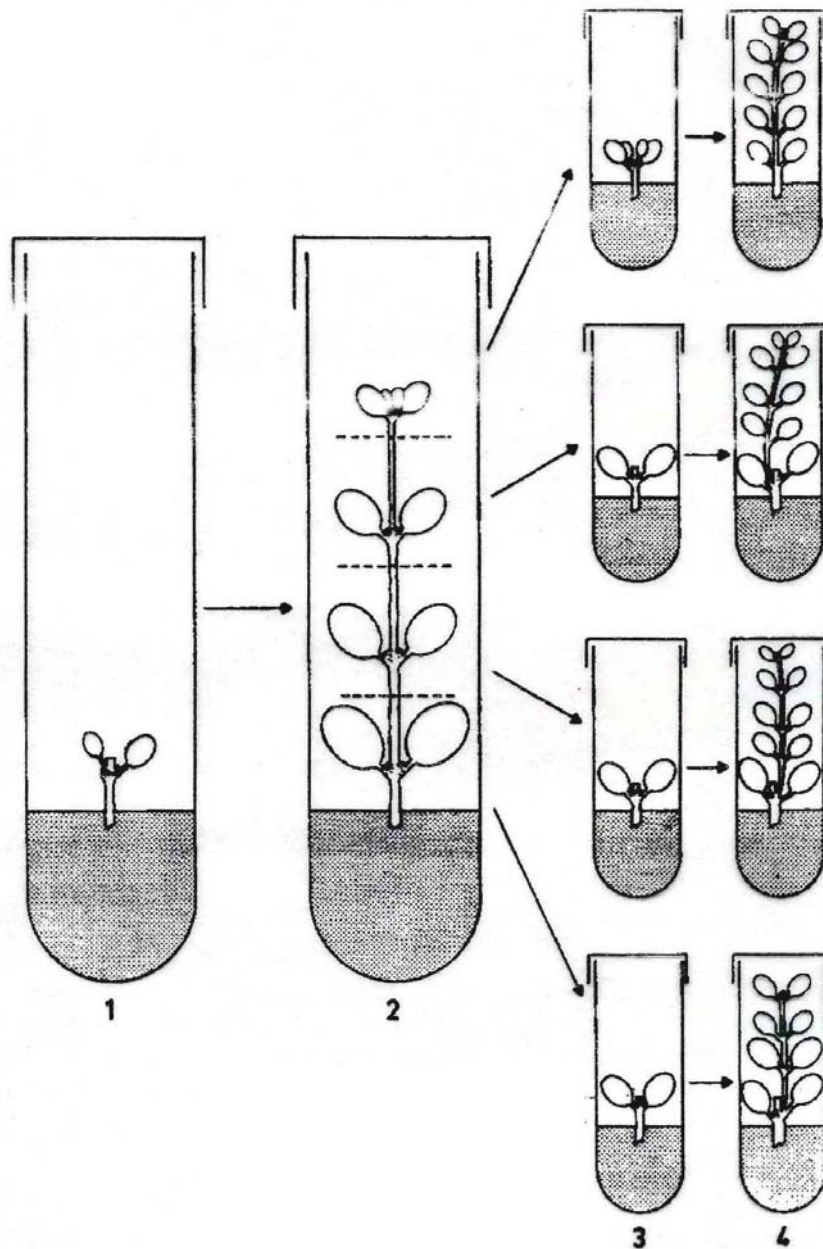
Τέλος για τον εμπορικό πολλαπλασιασμό καλλωπιστικών φυτών εφαρμόζεται η καλλιέργεια σπορείων.



Εικ. 3 Τεχνική Ιστοκαλ/ας

2.4 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Η ιστοκαλλιέργεια χρησιμοποιείται ευρύτατα σήμερα για ερευνητικούς και για εμπορικούς σκοπούς. Μερικές από της εφαρμογές και αναπτυσσόμενες τεχνολογίες που στηρίζονται στην ιστοκαλλιέργεια παρουσιάζονται παρακάτω.



Εικ. 4 Μικροπολλαπλασιασμός φυτών με καλλιέργεια κόμβων βλαστού.

2.4.1 Μικροπολλαπλασιασμός

Όπως αναφέρθηκε ήδη ο μικροπολλαπλασιασμός είναι ο αγενής πολλαπλασιασμός των φυτών μέσω της μεθόδου της ιστοκαλλιέργειας. Χρησιμοποιείται σήμερα ευρύτατα από πολλές εταιρίες και εργαστήρια για την παραγωγή εκατομμυρίων φυταρίων διαφόρων φυτικών ειδών. Τέτοιες εταιρίες *in vitro* πολλαπλασιασμού φυτών δραστηριοποιούνται στην Ολλανδία., Μεγάλη Βρετανία, Γαλλία, Γερμανία, Ισραήλ, Η.Π.Α. κ.τ.λ. Ένα οργανωμένο κέντρο εμπορικής εκμετάλλευσης μπορεί να παράγει 1 έως 3 ή και περισσότερα εκατομμύρια φυτά το χρόνο. Μεγάλη επιτυχία παρουσιάζει σε καλλωπιστικά φυτά μεγάλης καλλιέργειας καθώς και σε ιατρικά και αρωματικά φυτά και δένδρα (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Μερικά από τα φυτικά είδη που πολλαπλασιάζονται *in vitro*.

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

2.4.2 Σωματική εμβρυογένεση

Η εμβρυογένεση περιλαμβάνει την ανάπτυξη φυλετικών εμβρύων από ένα γονιμοποιημένο κύτταρο, το ζυγωτό. Σε κατάλληλες συνθήκες τα σωματικά κύτταρα σε ιστοκαλλιέργεια μπορούν να αναπτύξουν δομές που ομοιάζουν με έμβρυα. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται σωματική εμβρυογένεση και τα έμβρυα που σχηματίζονται χαρακτηρίζονται ως εμβρυοειδή ή σωματικά έμβρυα. Τα σωματικά έμβρυα έχουν καταβολές βλαστού (βλαστίδιο) και ρίζας (ριζίδιο) και μπορούν να διαχωριστούν από την υπόλοιπη καλλιέργεια, να αναπτυχθούν και να σχηματίσουν φυτά, με τρόπο ανάλογο της βλάστησης των φυλετικών εμβρύων.

Οι υψηλές συγκεντρώσεις αυξίνης (συνήθως 2,4-D) προωθούν τη σωματική εμβρυογένεση. Επίσης θετική επίδραση έχει το άζωτο και το κάλλιο. Η παραγωγή σωματικών εμβρύων παρατηρείται είτε άμεσα από το έκφυτο είτε έμμεσα από κάλλο ή καλλιεργούμενα κύτταρα.

Η σωματική εμβρυογένεση παρουσιάζει τεράστιες δυνατότητες και προοπτικές ως μέθοδος μαζικού πολλαπλασιασμού των φυτών. Τα τελευταία χρόνια γίνονται ερευνητικές προσπάθειες με σκοπό να χρησιμοποιηθούν τα σωματικά έμβρυα ως μονάδες πολλαπλασιασμού (propagules) των φυτών με τη μορφή τεχνητών σπερμάτων.

2.4.3 Απαλλαγή από ιούς και παθογόνα

Για να βελτιωθεί η απόδοση και για να γίνει πιο εύκολη η μεταφορά του φυτοπολλαπλασιαστικού υλικού σε διεθνή κλίμακα είναι επιθυμητή η εξάλειψη των ιών και των άλλων παθογόνων. Οι τεχνικές ιστοκαλλιέργειας χρησιμοποιούνται ευρύτατα σήμερα για την απαλλαγή των φυτών από ιώσεις και άλλα παθογόνα όπως ιοειδή, μυκοπλάσματα, βακτήρια, μύκητες και νηματώδεις. Μεγάλη οικονομική σημασία έχει η εφαρμογή τεχνικών ιστοκαλλιέργειας γιατί, ως γνωστόν, οι ιοί δεν αντιμετωπίζονται με χημική μεταχείριση ή άλλα μέσα.

Από παρατηρήσεις που έχουν γίνει έχει διαπιστωθεί ότι τα ακραία μεριστώματα δεν περιέχουν σωματίδια ιών ή εάν υπάρχουν είναι ελάχιστα. Η καλλιέργεια ακραίων μεριστωμάτων για τον παραπάνω λόγο αποτελεί τη σημαντικότερη μέθοδο παραγωγής υγιών φυτών απαλλαγμένων από ιώσεις. Για αποτελεσματικότερη αντιμετώπιση των ιώσεων η μέθοδος συνδυάζεται με τη θερμοθεραπεία.

2.4.4 Διάσωση εμβρύων

Οι προσπάθειες που έχουν γίνει για παραγωγή υβριδίων από διασταυρώσεις μεταξύ ταξινομικά απομακρυσμένων γονέων δεν είναι πάντα επιτυχείς ενώ με τις τεχνικές της ιστοκαλλιέργειας τα εμπόδια που αποτρέπουν αυτήν την επιτυχία έχουν ξεπεραστεί. Ειδικότερα, σε περιπτώσεις όπου παρατηρείται επιτυχής γονιμοποίηση, αλλά τα έμβρυα αποτυγχάνουν να αναπτυχθούν, τα ανώριμα ζυγωτικά έμβρυα καλλιεργούνται σε κατάλληλα θρεπτικά υποστρώματα αναγεννώντας νέα υβριδικά φυτά.

2.4.5 Παραγωγή απλοειδών φυτών

Οι τεχνικές της ιστοκαλλιέργειας επιτρέπουν την εύκολη παραγωγή απλοειδών φυτών αν και σε πολλές περιπτώσεις

παράγονται τέτοια φυτά στη φύση. Όπως έχει ήδη αναφερθεί σε προηγούμενο κεφάλαιο, η σπουδαιότητα της συγκεκριμένης τεχνικής ιστοκαλλιέργειας οφείλεται στη δυνατότητα ανάπτυξης διπλοειδών ομοζύγωτων φυτών (καθαρές σειρές) και επίσης μπορεί να γίνει μελέτη στα προβλήματα ρύπανσης του φυσικού περιβάλλοντος.

2.4.6 Συντήρηση και διάσωση γενετικού υλικού

Οι καλλιέργειες είναι εκτεθειμένες σε ξαφνική εμφάνιση μιας σημαντικής ασθένειας ή επιδημίας εντόμων και επομένως είναι απαραίτητη η συντήρηση όσο γίνεται περισσότερου γενετικού υλικού για μελλοντική χρήση. Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί μέθοδοι αποθήκευσης γενετικού υλικού *in vitro* και κατατάσσονται σε δύο κύριες κατηγορίες :

1. Τεχνικές της αργής αύξησης : Η συντήρηση των μητρικών αποθεμάτων γίνονται με επεμβάσεις που αποσκοπούν στην επιβράδυνση του ρυθμού αύξησης των καλλιεργειών.

2. Κρυοσυντήρηση (cryopreservation) : Αναφέρεται στη διατήρηση του βιολογικού υλικού σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες και αποτελεί την καλύτερη μέθοδο για τη μακρά διατήρηση του γενετικού υλικού. Στις πολύ χαμηλές θερμοκρασίες σταματούν όλες οι μεταβολικές λειτουργίες των κυττάρων και το φυτικό υλικό μπορεί να διατηρηθεί απεριόριστα. Μετά την απόψυξη το φυτικό υλικό καλλιεργείται και αναγεννά νέα φυτάρια.

2.4.7 Παραγωγή χημικών ουσιών από καλλιεργούμενους ιστούς και κύτταρα

Τα φυτά εκτός από τις κύριες ενώσεις που εμπλέκονται στον πρωτογενή μεταβολισμό, παράγουν και ένα μεγάλο αριθμό άλλων ενώσεων. Τα μόρια αυτά είναι γνωστά ως δευτερογενείς μεταβολίτες

και πολλοί από αυτούς έχουν αξιοποιηθεί στο παρελθόν από τον άνθρωπο για διάφορες χρήσεις. Σήμερα ένας μεγάλος αριθμός φυτικών ουσιών χρησιμοποιούνται σε διάφορους κλάδους της βιομηχανίας ως φαρμακευτικές ουσίες, χρωστικές και αρωματικές ουσίες στη βιομηχανία τροφίμων και καλλυντικών ή ως αγροχημικά.

Η τεχνολογία ανάπτυξης φυτικών κυττάρων θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την απομόνωση διαφόρων μεταβολιτών που παράγονται από τα κύτταρα. Όμως η προσπάθεια παραγωγής ουσιών σε ευρεία κλίμακα μέσω της κυτταροκαλλιέργειας συναντά μερικά τεχνικά και βιολογικά προβλήματα, με σημαντικότερο το γεγονός ότι στις περισσότερες των περιπτώσεων τα κύτταρα παράγουν και συσσωρεύουν πολύ μικρές ποσότητες της επιθυμητής ένωσης.

2.4.8 Μελέτη του φυτικού μεταβολισμού

Η ιστοκαλλιέργεια χρησιμοποιείται ευρύτατα τα τελευταία χρόνια για τη μελέτη διαφόρων θεμάτων βιοχημείας, φυσιολογίας μοριακής βιολογίας και βιοτεχνολογίας φυτών. Μεταξύ αυτών περιλαμβάνονται θέματα γενικότερου βιολογικού ενδιαφέροντος όπως ο προσδιορισμός της δραστηριότητας των ενζύμων, η σύνθεση αμινοξέων, πρωτεϊνών και νουκλεϊκών οξέων καθώς και ειδικότερα θέματα που σχετίζονται με τα φυτά, όπως η φωτοσύνθεση και η σύνθεση κυτταρικών τοιχωμάτων. Η χρησιμοποίηση ιστοκαλλιεργειών αντί ολόκληρων φυτών για τη μελέτη θεμάτων του μεταβολισμού παρουσιάζει αρκετές ιδιαιτερότητες. Ορισμένες από αυτές είναι :

- 1. Ο γρήγορος ρυθμός αύξησης των κυττάρων.**
- 2. Οι ελεγχόμενες συνθήκες καλλιέργειας (περιβαλλοντικές και σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος).**
- 3. Η απουσία μικροοργανισμών και επομένως η έλλειψη αλληλεπίδρασής τους με τα φυτικά κύτταρα.**

4. Η δυνατότητα καλλιέργειας περιορισμένου αριθμού κυτταρικών φαινοτύπων.

5. Η δυσχέρεια προέκτασης των αποτελεσμάτων σε ολόκληρα φυτά.

6. Η έλλειψη αλληλεπίδρασης μεταξύ των διαφόρων οργάνων και ιστών.

2.4.9 Τροποποίηση φυτών με σωμακλωνική παραλλακτικότητα

Σωμακλωνική παραλλακτικότητα (somaclonal variation) ονομάζεται το φαινόμενο της ποικιλομορφίας που παράγεται όταν φυτά που αναγγενώνται από ιστοκαλλιέργεια, με την παρεμβολή ενδιάμεσου σχηματισμού κάλλου, εμφανίζουν φαινοτυπικούς ή βιοχημικούς χαρακτήρες, διαφορετικούς από το αρχικό μητρικό υλικό. Η κύρια πηγή της σωμακλωνικής παραλλακτικότητας φαίνεται να είναι οι αναδιατάξεις του γενετικού υλικού και οι μεταλλάξεις που συμβαίνουν κατά τη διάρκεια της διαίρεσης των καλλιεργούμενων κυττάρων.

Η σωμακλωνική παραλλακτικότητα έχει ως αποτέλεσμα την αναγέννηση φυτών με υποβαθμισμένα χαρακτηριστικά. Όμως τέτοιες γενετικές αλλαγές αποτελούν νέα πηγή γενετικής ποικιλότητας και παρουσιάζουν ενδιαφέρον για πρόγραμμα βελτίωσης φυτών που αποσκοπούν στην επιλογή φυτικών γενοτύπων με χρήσιμους αγρονομικούς χαρακτήρες. Το κύριο πλεονέκτημα της επιλογής νέων γενοτύπων *in vitro* είναι η δυνατότητα ταυτόχρονης μεταχείρισης και επιλογής εκατομμυρίων κυττάρων, υπό ελεγχόμενες συνθήκες καλλιέργειας, σε ένα σχετικά μικρό χώρο. Η σωμακλωνική παραλλακτικότητα αξιοποιείται σήμερα σε προγράμματα βελτίωσης των ιδιοτήτων πολλών καλλιεργούμενων φυτικών ειδών.

2.4.10 Μεταφορά γονιδίων με σύντηξη πρωτοπλαστών

Όπως προαναφέρθηκε, η τεχνολογία των πρωτοπλαστών επιτρέπει τη μεταφορά γονιδίων μεταξύ ειδών, με σύντηξη διαφορετικών σωματικών πρωτοπλαστών (σωματικός υβριδισμός). Η σύντηξη πρωτοπλαστών επιτυγχάνεται με δύο κυρίως τρόπους : α) χημικά επαγόμενη σύντηξη και β) ηλεκτοσύντηξη.

Η τεχνολογία σύντηξης των πρωτοπλαστών προσφέρει σημαντικές δυνατότητες για πρακτικές εφαρμογές στο πεδίο της βελτίωσης φυτών. Χρήσιμοι αγρονομικοί χαρακτήρες μπορούν να μεταφερθούν μεταξύ αναπαραγωγικά ασύμβατων φυτικών γενότυπων.

Η βελτίωση των τεχνικών σύντηξης και των μεθόδων αναγέννησης φυτών από πρωτοπλάστες και η περαιτέρω κατανόηση του ελέγχου της γενετικής σταθερότητας των φυτικών κυττάρων σε καλλιέργεια αναμένεται να οδηγήσουν σε πολύ περισσότερες πρακτικές εφαρμογές.

2.5 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

2.5.1 Πλεονεκτήματα

- i. Ένα βασικό πλεονέκτημα της ιστοκαλλιέργειας είναι η δυνατότητα μαζικής παραγωγής κλωνικών φυτών λόγω των άριστων συνθηκών καλλιέργειας (σύσταση θρεπτικού υποστρώματος, επίπεδα φυτοορμονών, φωτισμός, θερμοκρασία, κ. α.). Ο θεωρητικός ρυθμός πολλαπλασιασμού είναι εξαιρετικά μεγάλος. Ένα οργανωμένο κέντρο εμπορικής εκμετάλλευσης μπορεί να παράγει 1 έως 3 εκατομμύρια φυτά το χρόνο.
- ii. Η ιστοκαλλιέργεια βρίσκει ευρεία εφαρμογή στην ταχεία αναπαραγωγή νέων ή βελτιωμένων ποικιλιών που δημιουργούνται στα βελτιωτικά προγράμματα και την εισαγωγή τους στην παραγωγική διαδικασία. Γενετικά καθαρές σειρές που χρησιμοποιούνται στην παραγωγή υβριδιοσπόρου διατηρούνται μακρόχρονα, μεταφέρονται εύκολα σε μεγάλες αποστάσεις και αναπαράγονται ταχύτατα με μικροπολλαπλασιασμό.
- iii. Επίσης εφαρμόζεται σε φυτικά είδη που με τις κλασικές μεθόδους θα ήταν δύσκολο να πολλαπλασιαστούν.
- iv. Σπουδαίο πλεονέκτημα αποτελεί η ιστοκαλλιέργεια για παραγωγή άνοσου πολλαπλασιαστικού υλικού. Λόγω των ασηπτικών συνθηκών δεν υπάρχουν απώλειες από ασθένειες, ενώ τα φυτάρια που παράγονται είναι ελεύθερα από βακτήρια, μύκητες και νηματώδεις. Εάν χρησιμοποιηθούν υγιή μητρικά φυτά, μπορούν να παραχθούν φυτά σε μεγάλη κλίμακα που εγγυημένα είναι ελεύθερα ιώσεων.

ν. Άλλα πλεονεκτήματα είναι ότι απαιτείται πολύ μικρός χώρος σε σχέση με τις πολυδάπανες θερμοκηπιακές εγκαταστάσεις που χρησιμοποιούν οι κλασσικές μέθοδοι. Οι ελεγχόμενες συνθήκες εξασφαλίζουν συνεχείς και υψηλούς ρυθμούς παραγωγής ανεξάρτητα της εποχής του έτους.

2.5.2 Μειονεκτήματα

- i. Βασικό μειονέκτημα είναι το υψηλό κόστος που απαιτείται για τη δημιουργία εξειδικευμένων εγκαταστάσεων, την προμήθεια του εξοπλισμού και τη λειτουργία τους. Το οικονομικό πρόβλημα συχνά είναι απαγορευτικό για τον εμπορικό πολλαπλασιασμό πολλών φυτικών ειδών αλλά μπορεί να αντιμετωπιστεί με τη μαζικοποίηση της παραγωγής και την ανάπτυξη αυτοματοποιημένων μεθόδων, τουλάχιστον για μερικά φυτικά είδη.
- ii. Απαιτείται επίσης εξειδικευμένο προσωπικό που θα επιλαμβάνεται των εργασιών οι οποίες πρέπει να γίνονται σε ασηπτικές συνθήκες. Εμφάνιση μολύνσεων στα αρχικά στάδια μπορεί να οδηγήσει σε απώλεια σημαντικού αριθμού φυταρίων.
- iii. Για κάθε φυτικό είδος πρέπει να αναπτυχθούν κατάλληλες μέθοδοι πολλαπλασιασμού *in vitro* π.χ. συνθήκες για ριζοβολία και εδραίωση φυταρίων.
- iv. Μειονέκτημα επίσης αποτελεί η παραγωγή σε μερικές περιπτώσεις υποβαθμισμένων φυτών λόγω της σωμακλωνικής παραλλακτικότητας που οφείλεται σε γενετικές αλλαγές και μεταλλάξεις. Η αναπαραγωγή πρέπει να γίνεται σε συνθήκες που εξασφαλίζουν τη γενετική σταθερότητα των αναπαραγόμενων φυτών και γι' αυτό απαιτείται να λειτουργεί ένα αδιάκοπο σύστημα ελέγχου και αξιολόγησης των ποικιλιών που αναπαράγονται.

3. ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΚΑΙ ΔΙΑΣΩΣΗ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ IN VITRO

Η παγκόσμια ανάγκη για αυξημένη παραγωγή τροφίμων οδήγησε στην ανάπτυξη και καλλιέργεια ποικιλιών υψηλής απόδοσης με αποτέλεσμα τον περιορισμό της γενετικής βάσης των καλλιεργειών. Έτσι, είναι απαραίτητη η συντήρηση όσο γίνεται περισσότερου γενετικού υλικού για μελλοντική χρήση. Επιπλέον κρίνεται απαραίτητη η συντήρηση, υπό κατάλληλες συνθήκες, επιλεγμένων γονοτύπων ή φυτών απαλλαγμένων από παθογόνα που παρήχθησαν in vitro. Ο οικονομικότερος τρόπος φύλαξης του γενετικού υλικού είναι με τη μορφή σπόρων, για φυτά βέβαια που πολλαπλασιάζονται εγγενώς, αλλά και σε αυτή την περίπτωση παρουσιάζονται πολλά προβλήματα (μη βιώσιμοι σπόροι, σπόροι με περιορισμένο χρόνο ζωής κατά την αποθήκευση κ.ά.). Τα τελευταία χρόνια έχουν αναπτυχθεί in vitro μέθοδοι αποθήκευσης γενετικού υλικού, που παρουσιάζουν σημαντικό πρακτικό ενδιαφέρον. Οι τεχνικές αυτές κατατάσσονται σε δύο κατηγορίες:

α) Τεχνικές της αργής αύξησης: Ο συνήθης τρόπος συντήρησης των μητρικών αποθεμάτων περιλαμβάνει τη συνεχή καλλιέργεια τμημάτων βλαστού, μέθοδος που απαιτεί υποκαλλιέργεια κάθε 6-4 εβδομάδες και εμπεριέχει τον κίνδυνο της απώλειας του υλικού, λόγω ανθρώπινου σφάλματος. Τα παραπάνω προβλήματα μπορούν εν μέρει να αντιμετωπισθούν με επεμβάσεις που αποσκοπούν στην επιβράδυνση του ρυθμού αύξησης των καλλιεργειών. Μια επέμβαση περιλαμβάνει την αποθήκευση των καλλιεργειών σε χαμηλή θερμοκρασία (4-8 °C), συνήθως παρουσία μειωμένου φωτισμού. Η μέθοδος έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε πολλά είδη (φράουλα, πατάτα, αμπέλι κ.α.). Η επιβράδυνση της αύξησης επιτυγχάνεται και με άλλους τρόπους όπως με παραγωγή ωσμωτικού stress ή με την προσθήκη επιβραδυντών αύξησης. Με τις παραπάνω μεθόδους επιμηκύνεται η περίοδος υποκαλλιέργειας σε δώδεκα μήνες ή και περισσότερους.

β) Κρυοσυντήρηση (cryopreservation). Είναι μια μέθοδος διατήρησης του βιολογικού υλικού σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες (στους -196 °C, θερμοκρασία του υγρού αζώτου) χωρίς να καταστραφεί και διατηρώντας την ικανότητα για αναγέννηση. Στη θερμοκρασία αυτή, σταματούν όλες οι μεταβολικές λειτουργίες των κυττάρων και μπορούν να διατηρηθούν σχεδόν απεριόριστα. Η διαδικασία απαιτεί λεπτούς χειρισμούς και την ανάπτυξη ειδικών συνθηκών για κάθε φυτικό

είδος, όσον αφορά την προετοιμασία του ιστού, τη μέθοδο κατάψυξης, τη μέθοδο απόψυξης, καθώς και τη μέθοδο επανακαλλιέργειας του ιστού. Η κρυοσυντήρηση έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε διάφορους τύπους ιστών, όπως σε μεριστώματα, έμβρυα, κάλλους, ακόμα και πρωτοπλάστες.

Οι περισσότερες διεργασίες κρυοσυντήρησης περιλαμβάνουν τις ακόλουθες φάσεις:

1. Την προμεταχείριση των μητρικών φυτών και τον καθορισμό του εκφύτου.
2. Τη βραδεία ή ταχεία κατάψυξη του φυτικού υλικού.
3. Την έκθεση του δείγματος σε θερμοκρασίες κατάψυξης.
4. Την απόψυξη του φυτικού υλικού.
5. Την καλλιέργειά του.



Εικ. 5 Συντήρηση χρυσανθέμων σε συνθήκες χαμηλών θερμοκρασιών.

3.1 ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ

ΓΕΝΙΚΑ

Η κρυοσυντήρηση επιτυγχάνεται με πάγωμα των καλλιεργειών στη θερμοκρασία του υγρού αζώτου (στους $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$). Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την παύση όλων των μεταβολικών λειτουργιών των κυττάρων. Για το σκοπό αυτό, χρησιμοποιούνται διάφορα κρυοπροστατευτικά διαλύματα, όπως αιθυλική γλυκερόλη, DMSO κ.α. και ακολουθεί τοποθέτηση των καλλιεργειών στους $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Η κρυοσυντήρηση περιλαμβάνει: πρόψυξη (μια αργή και ρυθμιστική διαδικασία ψύξης), και απότομη τοποθέτηση στην θερμοκρασία των $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$. Μετά την κρυοσυντήρηση οι καλλιέργειες αποψύχονται κατάλληλα, τοποθετούνται στους $35-40\text{ }^{\circ}\text{C}$, και αναγεννιούνται.

Μεγάλος αριθμός φυτικών ειδών έχουν αναγεννηθεί μετά από κρυοσυντήρηση, όπως σιτηρά, όσπρια, αρωματικά φυτά, φαρμακευτικά φυτά κ.α. Τα αποτελέσματα έχουν δείξει ότι η ηλικία και το φυσιολογικό στάδιο ανάπτυξης των φυτών παίζουν σημαντικό ρόλο. Επίσης, η χρήση κρυοπροστατευτικών, έδωσαν καλύτερα αποτελέσματα.

Από το 1975 διάφορες μελέτες αναφέρουν την τεχνική της Κρυοσυντήρησης φυτικών κυττάρων και οργάνων σαν την κυριότερη μέθοδο συντήρησης γενετικού πλάσματος για μεγάλο χρονικό διάστημα (Kartha, 1987, Bajaj 1990, Grout, 1995, Engleuman, 1991, Withers, 1991, Benson, 1994). Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή, το φυτικό υλικό ψύχεται και παραμένει στη θερμοκρασία του υγρού αζώτου, η οποία είναι γύρω στους -196°C . Στη θερμοκρασία αυτή τα κύτταρα παραμένουν σε αδράνεια και θεωρητικά μπορούν να αποθηκευτούν επί αόριστον. Αυτή η τεχνική χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία για

αποθήκευση μικροβίων και ζωικών κυττάρων (Withers 1990). Περισσότερη προσοχή δόθηκε ώστε να αναπτυχθούν μέθοδοι Κρυοσυντήρησης εμβρύων, ιστών οργάνων που κατόπιν μεταφυτεύονται.

Γενικά η Κρυοσυντήρηση φυτικών κυττάρων θεωρείται η σημαντικότερη μέθοδος για αποθήκευση γενετικού πλάσματος. (Bjoci and Reiyert 1977). Κατά την αποθήκευση φυτικών κυττάρων θα πρέπει να δίδεται προσοχή στην επαναδραστηριοποίηση και το δευτερεύοντα μεταβολισμό αυτών. Για αυτό το λόγο προτιμούνται κομμάτια βλαστών, έμβρυα, ή μικρά φυτά για αποθήκευση γενετικού πλάσματος.

Κάποιοι από τους λόγους που οδήγησαν σε αυτό αναφέρονται παρακάτω :

(α) Γενετική αστάθεια των κυττάρων σε κάλλους ή σε σταμάτημα καλλιέργειας είναι πολύ συχνό φαινόμενο. Συχνά δημιουργούνται κάλλοι από μη μεριστωματικά κύτταρα των φυτών, τα οποία σε πολλά αγκείοσπερμα είναι πολυσωματικά. Έτσι τα νέα φυτά παρουσιάζουν γενετικές διαφορές από τα αρχικά. Σε αντίθεση με αυτά, τα φυτά που προέρχονται από σωματικά κύτταρα των φυτών δίνουν φυτά πανομοιότυπα με τα αρχικά.

(β) Καλλιεργούμενα κύτταρα από ορισμένα φυτά χάνουν την δυναμικότητά τους, ή ακόμα και όταν κάποια από αυτά σχηματίσουν όργανα /έμβρυα ή ολόκληρα φυτά χάνουν την ικανότητα επαναβλάστησης. Από την άλλη μεριά, κομμάτια βλαστών παρουσιάζουν μεγάλη αντοχή και επιτυγχάνουν στην καλλιέργεια, χρησιμοποιούνται επίσης για παραγωγή γενετικού υλικού απαλλαγμένο από ιούς και για κλωνικό πολλαπλασιασμό.

(γ) Κύτταρα από τα άκρα βλαστών και από νεαρά έμβρυα είναι μικρά και μεριστωματικά και προτιμούνται από μεγαλύτερα γιατί επιβιώνουν καλύτερα στους -196C Εκτός από σωματικά

έμβρυα, χρησιμοποιούνται ακόμα κύτταρα γύρης και μικρά φυτά με επιτυχία.

Η κρυοσυντήρηση περιλαμβάνει γενικά 4 βήματα:

Ψύξη > Αποθήκευση > Ξεπάγωμα > Επαναφορά Βλάστησης

Κατά τη διάρκεια της κρυοσυντήρησης πρέπει να δίδεται ιδιαίτερη προσοχή γιατί είναι δυνατόν να μειωθεί η αξία του γενετικού υλικού. Οι κυριότεροι παράγοντες που προκαλούν ζημιές στα αποθηκευμένα κύτταρα είναι η δημιουργία κρυστάλλων εσωτερικά των κυττάρων και η αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού διαλύματος σε τοξικά επίπεδα. Η βιωσιμότητα συνεπώς του γενετικού υλικού επηρεάζεται τόσο από τη φύση του υλικού, τις προφυκτικές μεταχείρισης και το κρυοπροστατευτικό που χρησιμοποιείται.

3.1.1 ΦΥΣΗ ΤΟΥ ΦΥΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

Τα μορφολογικά και φυσιολογικά χαρακτηριστικά των φυτών επηρεάζονται κατά τη διάρκεια της ψύξης από τη δυνατότητα να επιβιώσουν στους -196° C. Γενικά, προτιμούνται τα μικρά, με πλούσιο κυττόπλασμα, μεριστωματικά κύτταρα των φυτών. Επίσης τα νεαρά και σφαιρικά έμβρυα παρουσιάζουν καλύτερα αποτελέσματα.

3.1.1.1 ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΜΕΡΙΣΤΩΜΑΤΩΝ

Οι κορυφές των βλαστών αποτελούν ιδεώδες γενετικό υλικό για κρυοσυντήρηση, διότι παρουσιάζουν τις ακόλουθες ιδιότητες: α) Έχουν την ικανότητα να αναπαράγουν ολόκληρα φυτά με μεγάλο βαθμό αναπαραγωγής β) Οι μεριστωματικές καλλιέργειες καταλαμβάνουν μικρό αποθηκευτικό χώρο γ) Η ασηπτική

διατήρηση των καλλιεργειών μειώνει ή εξαλείφει την πιθανότητα μόλυνσης από έντομα ή παθογόνα και δ) Τα κατεψυγμένα μεριστωματικά κύτταρα επιβιώνουν καλύτερα από τα διαφοροποιημένα.

Αν και οι καλλιέργειες βλαστοκορυφών πολλών φυτών διατηρούνται άριστα σε θερμοκρασίες πάνω από 0 °C η κρυοδιατήρηση θεωρείται γενικά η καλύτερη μέθοδος για μακρά διατήρηση του γενετικού υλικού. Για μακροχρόνια φύλαξη, η κρυοσυντήρηση είναι η πιο πρακτική μέθοδος. Σε αντίθεση με τις ψυχόμενες καλλιέργειες, οι καταψυχόμενες δε χρειάζονται υποκαλλιέργεια. Η σκληραγώγηση, με έκθεση των μητρικών φυτών σε θερμοκρασίες υπό του μηδενός ή κοντά στους 0 °C αυξάνει σημαντικά τη διάρκεια ζωής του εκφύτου κατά την κρυοσυντήρηση.

3.1.1.2 ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΚΥΤΤΑΡΩΝ

Κάλλοι και φυτικά κύτταρα που καλλιεργούνται *in vitro*, υφίστανται γενετική διάβρωση. Αντίθετα, κύτταρα που αποθηκεύονται στη θερμοκρασία του υγρού αζώτου, διατηρούν τα μορφογενετικά τους χαρακτηριστικά και είναι ικανά να αναπαράγουν ολόκληρα φυτά που αναπτύσσονται φυσιολογικά. Η μέθοδος έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε πολλά είδη φυτών όπως λαχανοκομικά, κηπευτικά, σιτηρά, φαρμακευτικά, εσπεριδοειδή κ.ά.

3.1.1.3 ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΕΜΒΡΥΩΝ

3.1.1.3.1 ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ

Τα σωματικά έμβρυα, που παράγονται σε μεγάλες ποσότητες σε διάφορα συστήματα ιστοκαλλιέργειας, παρουσιάζουν ιδιαίτερο βιοτεχνολογικό ενδιαφέρον. Σήμερα με τη μέθοδο της κρυοσυντήρησης μπορούν να αποθηκευτούν στο κατάλληλο στάδιο μέχρι να χρειαστούν. Σωματικά έμβρυα όπως καρότου, πορτοκαλιού, και σπαραγγιού αποθηκεύονται αποτελεσματικά με τον παραπάνω τρόπο.

3.1.1.3.2 ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΖΥΓΩΤΙΚΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ

Τα πλήρως αναπτυγμένα έμβρυα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στις χαμηλές θερμοκρασίες. Το κύριο πρόβλημα είναι η δημιουργία παγοκρυστάλλων και επιπλέον το ενδοκυτταρικό πάγωμα που μπορούν να οδηγήσουν στη διάρρηξη και το θάνατο του κυττάρου. Έτσι, το περιεχόμενο νερό στα πλήρως αναπτυγμένα έμβρυα πρέπει να ελέγχεται με αποξήρανση ρυθμίζοντάς το στο ελάχιστο επίπεδο. Οι ζημιές από χαμηλές θερμοκρασίες μπορούν να παρεμποδιστούν, επίσης, με κάποια μέθοδο που επιβραδύνει την ανάπτυξη των κρυστάλλων. Η μέθοδος αυτή βρίσκεται εφαρμογή κυρίως στα δύσκολα αναγεννώμενα φυτά. Επιπλέον, ένας μεγάλος αριθμός δέντρων παράγει έμβρυα που δεν μπορούν να συντηρηθούν σε κανονικές συνθήκες. Στην περίπτωση αυτή, η κρυοσυντήρηση είναι μία λογική επιλογή. Η κρυοσυντήρηση εφαρμόζεται επίσης σε προγράμματα υβριδισμού, ειδικά σε αυτά που ασχολούνται με διασταύρωση γενετικά ασυμβίβαστων φυτών.

Στη βιβλιογραφία, υπάρχουν αρκετές αναφορές για κρυοσυντήρηση ζυγωτών εμβρύων, όπως για το ρύζι (Bajai 1981), το σιτάρι (Bajai 1984), το κριθάρι (Withers 1982) και την καρύδα (Bajai 1984).

3.1.1.4 ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΓΥΡΗΣ

Η κρυοσυντήρηση γύρης παρουσιάζει μεγάλο ενδιαφέρον, ενώ έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε πολλά είδη κτηνοτροφικών, ανθοκομικών φυτών και οπωροφόρων δένδρων.

3.1.1.5 ΚΡΥΟΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΠΡΩΤΟΠΛΑΣΤΩΝ

Πρόσφατα απομονώθηκαν πρωτοπλάστες από μεγάλο αριθμό φυτικών ειδών και τοποθετήθηκαν σε θερμοκρασία του υγρού αζώτου, όπου επιβίωσαν και διατήρησαν τα μορφογενετικά τους χαρακτηριστικά. Η μέθοδος αυτή, αν και μοιάζει γενικά με την κρυοσυντήρηση κυττάρων, διαφέρει αφού οι πρωτοπλάστες στερούνται κυτταρικό τοίχωμα. Για αυτό το λόγο κρίνεται απαραίτητη η χρήση κατάλληλου μίγματος κρυοπροστατευτικού και οσμωτικού για την προστασία των πρωτοπλαστών κατά τη διάρκεια της ψύξης.

3.2 ΠΡΟ-ΨΥΚΤΙΚΕΣ ΠΕΡΙΠΟΙΗΣΕΙΣ

3.2.1 ΠΡΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Μια σύντομη καλλιέργεια των κορυφών των βλαστών πριν την ψύξη αποδείχθηκε ευεργετική σε πολλές περιπτώσεις. Για να εξασφαλισθεί ένα υψηλό ποσοστό βιωσιμότητας των φυτικών ιστών μετά την ψύξη αποδείχθηκε αποτελεσματική η

προηγούμενη καλλιέργεια τους παρουσία κρυοπροστατευτικού διαλύματος, συνήθως χρησιμοποιείται διάλυμα 5% DMSO.

3.2.2 ΑΠΟΞΗΡΑΝΣΗ

Ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες για επιτυχημένη κρυοσυντήρηση είναι η αποβολή του νερού των κυττάρων πριν από την ψύξη. Η αποξήρανση των κυττάρων περιορίζει την χρήση των κρυοπροστατευτικών, αλλά παράλληλα απλοποιεί την όλη διαδικασία.

3.2.3 ΥΑΛΟΠΟΙΗΣΗ

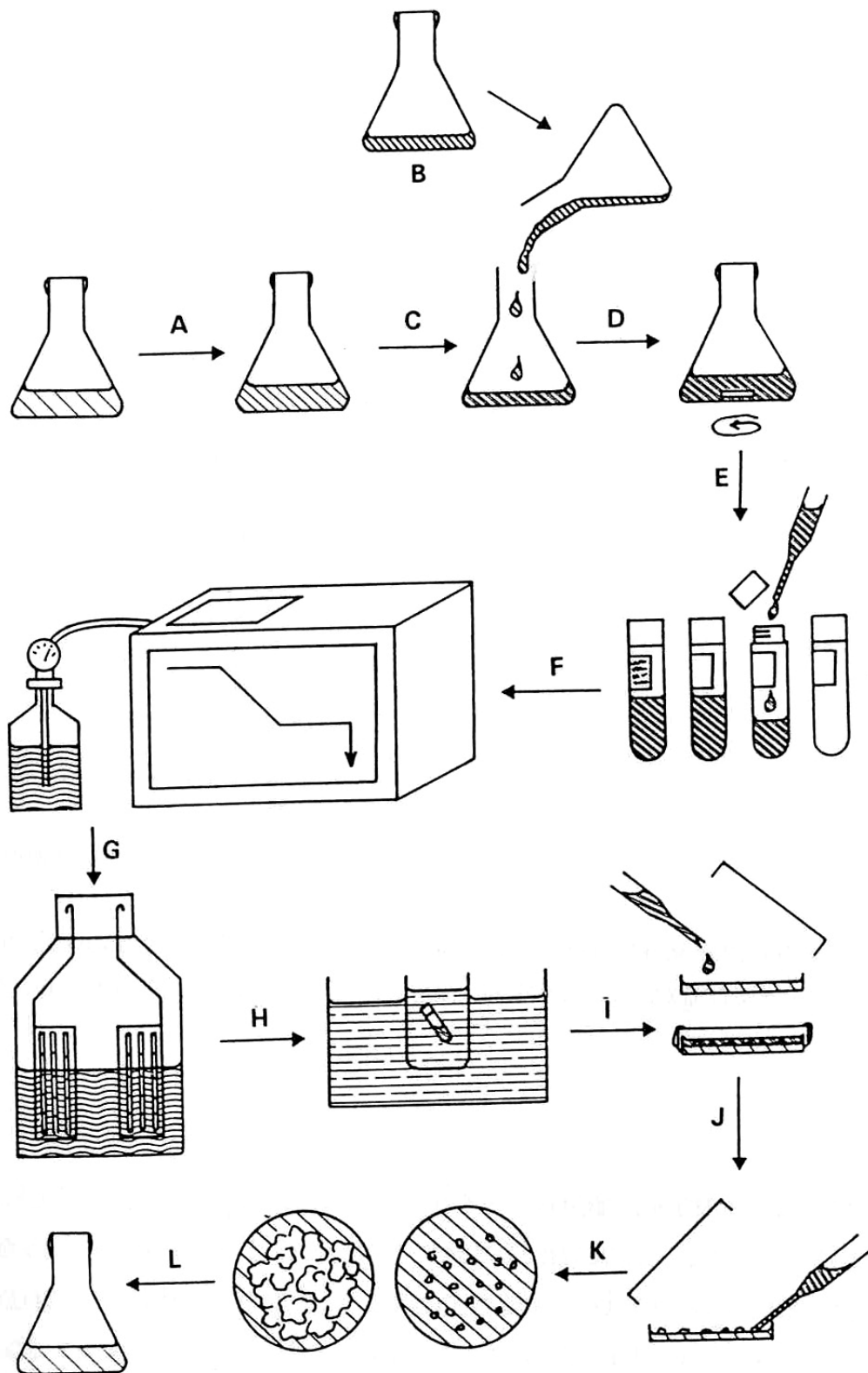
Η υαλοποίηση είναι μια φυσική διαδικασία κατά την οποία το υδατικό διάλυμα των κυττάρων ψύχεται σε χαμηλές θερμοκρασίες έτσι ώστε δημιουργείται μια υαλώδης μάζα και αποφεύγεται έτσι η ανάπτυξη ενδοκυτταρικών κρυστάλλων.

3.3 ΚΡΥΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΑ

Σαν αποτέλεσμα της αφυδάτωσης των κυττάρων πριν ή κατά τη διάρκεια της ψύξης είναι η αύξηση της συγκέντρωσης του ενδοκυτταρικού διαλύματος, η αύξηση δηλαδή της οσμωτικής πίεσης και η ρήξη του πρωτοπλάσματος. Τα κρυοπροστατευτικά είναι διαλύματα που χρησιμοποιούνται αφ' ενός για να αποφευχθεί η τοξική επίδραση της αύξησης της οσμωτικής πίεσης των διαλυμάτων και αφ' ετέρου για να εμποδίσουν το σχηματισμό κρυστάλλων στο εσωτερικό των κυττάρων.

Όσον αφορά τα φυτά το DMSO αποδεδειγμένα δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα. Άλλες χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται μόνες ή σε συνδυασμένο με το DMSO, είναι η γλυκερόλη και η προλίνη (proline). Η μέση συγκέντρωση του DMSO για καλλιεργήσιμα κύτταρα κυμαίνεται μεταξύ 5-8%. Ωστόσο, κομμάτια βλαστών ή μικρά φυτά αντέχουν και σε υψηλότερες συγκεντρώσεις 5-20% (Sakai et al, 1977, Withers, 1978, Grout and Henshaw, 1980). Η μέση συγκέντρωση προλίνης είναι 10%. Για να προστατευθούν τα κύτταρα από οσμωτικό σοκ, τα κρυοπροστατευτικά πρέπει να προστίθενται βαθμιαία για μια χρονική περίοδο από 30-60 λεπτά. Στη περίπτωση που χρησιμοποιούμε γλυκερόλη είναι απαραίτητο να προηγηθεί αυτό το στάδιο λόγω της μικρής της διαπερατότητας. Κατά τη διάρκεια της μεταχείρισης με DMSO το υλικό διατηρείται σε θερμοκρασία 0° C για να αποφύγουμε τοξικά φαινόμενα. Το DMSO πρέπει να διατηρείται σε θερμοκρασία δωματίου (>19° C), ενώ έχει δυσάρεστη και διαπεραστική οσμή. Για καλύτερα αποτελέσματα συνίσταται η χρήση φρέσκων κρυοπροστατευτικών διαλυμάτων.

Προσθήκη κρυοσπόρων (cryoseeds, 0,15-5 mm O₂ με επικάλυψη ακρυλικού πολυμερούς) στο κρυοπροστατευτικό διάλυμα αυξάνει τη βιωσιμότητα των κυττάρων. Οι κρυόσποροι αυξάνουν τον εμπύρηνο πάγο σε θερμοκρασίες από -13,8 έως 5,9 °C.



Εικ. 6 Βασικά στάδια κρυοσυντήρησης καλ/ων φυτικών κυττάρων. (Α)Καλ/α κύτταρα αναφέρονται σε θρεπτικό

μέσο. (B) Κρυοπροστατευτικά διαλύματα παρασκευάζονται. (Γ) Κρυοπροστατευτικά διαλύματα προστίθενται στα κύτταρα που καταψύχονται. (Δ) Τα κρυοπροστατευτικά κολλάνε στα κύτταρα με συνεχή ανάνευση του μίγματος. (Ε) Μεταφέρονται σε αμπούλες. (ΣΤ) Οι αμπούλες καταψύχονται με αργό ρυθμό στη θερμοκρασία του υγρού αζώτου και αποθηκεύονται σε καταψύκτη υγρού αζώτου. (Ζ) (Η) Τα κύτταρα ξεπαγώνουν με εμβάπτιση σε νερό θερμοκρασίας 35-40°C. (Θ) Τα κύτταρα μεταφέρονται σε τρίβμα πέτρι μέσα σε θρεπτικό μέσο. (Ι) Το περίσιο κρυοπροστατευτικό διάλυμα αφαιρείται. (Κ) Τα κύτταρα παραμένουν στο θρεπτικό μέσο. (Λ) Τα κύτταρα μεταφέρονται σε νέο θρεπτικό μέσο και βλαστούν (Witners 1990)

3.3.1 ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ ΚΡΥΟΠΡΟΣΤΑΤΕΥΤΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ

Ένα δραστικό κρυοπροστατευτικό πρέπει να έχει τις ακόλουθες ιδιότητες:

1. Να μην είναι τοξικό
2. Να έχει μικρό μοριακό βάρος
3. Να παρουσιάζει μικρή διαλυτότητα στο νερό
4. Να έχει την ικανότητα να διαπερνά το κυτταρικό τοίχωμα
5. Να απομακρύνεται εύκολα με το πλύσιμο

Κοινά κρυοπροστατευτικά είναι το διμεθυλοσουλφοξείδιο, η γλυκερίνη, και η αιθυλική γλυκόλη. Περισσότερο αποτελεσματικά φαίνεται ότι είναι τα μίγματα κρυοπροστατευτικών.

3.4 ΨΥΞΗ

Η ευαισθησία των φυτικών κυττάρων στις χαμηλές θερμοκρασίες διαφέρει ανάλογα με το είδος και την ποικιλία των φυτών. Έτσι, δεν υπάρχει μια μέθοδος ψύξης που να εφαρμόζεται γενικά σε όλα τα είδη. Πρακτικά, το υλικό παραμένει σε καλλιέργεια και το μεταχειριζόμαστε με το κατάλληλο κρυοπροστατευτικό μεταφέρεται σε άγονες πολυμερισμένες αμπούλες με βιδωτό καπάκι και ψύχεται με μια από τις παρακάτω μεθόδους :

(i) Μέθοδος της αργής ψύξης.

Το υλικό ψύχεται με ταχύτητα $0,5-4^{\circ}\text{C}/\text{min}$, από τη θερμοκρασία των 0°C μέχρι τους -100°C και κατόπιν μεταφέρεται στην θερμοκρασία του υγρού αζώτου. Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε με επιτυχία σε σταματημένες καλλιέργειες.

(ii) Μέθοδος της γρήγορης ψύξης.

Σε αυτή τη μεταχείριση η θερμοκρασία μειώνεται με ταχύτητα $>1000^{\circ}\text{C}/\text{min}$, μέχρι τους -196°C . Η μέθοδος αυτή εφαρμόζεται με επιτυχία στα περισσότερα φυτά. Ένας μεγάλος αριθμός φυτικών ειδών μπορεί να ψυχθεί και να συντηρηθεί με επιτυχία με απευθείας τοποθέτηση του στους -196°C , ενώ η βιωσιμότητα αυτών είναι εξαιρετικά υψηλή ακόμα και αν δεν έχει προηγηθεί μεταχείριση με κρυοπροστατευτικό, απλά έχουν προηγουμένως αποξηρανθεί.

(iii) Προ-ψυκτική μέθοδος: Στην μέθοδο αυτή το υλικό ψύχεται με ταχύτητα $1^{\circ}\text{C}/\text{min}$ ή $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$, αρχικά στη θερμοκρασία των -30°C ως -50°C και παραμένει σε αυτήν για περίπου 30'. Στη συνέχεια η θερμοκρασία πέφτει στους -196°C . Η μέθοδος αυτή εφαρμόστηκε με επιτυχία σε κομμάτια βλαστών και μπουμπούκια, καθώς και για αποβαλλόμενα κύτταρα.

Στην περίπτωση της αργής ψύξης μειώνεται το ποσό του ενδοκυτταρικού πάγου λόγω αφυδάτωσης των κυττάρων. Αρχικά σχηματίζεται πάγος εξωτερικά των κυττάρων, και έτσι το πρωτόπλασμα χάνει το νερό υπό τη μορφή υδρατμών που μετακινείται για να καλύψει την διαφορά πίεσης που δημιουργείται μεταξύ του πρωτοπλάσματος και του εξωτερικού των κυττάρων.

Διάφοροι μέθοδοι ψύξης έχουν χρησιμοποιηθεί για τη συντήρηση και αποθήκευση του φυτικού υλικού. Για να ελέγχουμε το ρυθμό ψύξης και της προψυκτικής μεθόδου, και για να εφαρμοστεί με επιτυχία σε πολλά είδη φυτών, συνίσταται η χρήση μιας προγραμματισμένης ψυκτικής μονάδας. Με την αναζήτηση νέων τεχνικών αφυδάτωσης και υαλοποίησης, ίσως να μην είναι απαραίτητη η χρήση μιας ακριβής ψυκτικής μηχανής.

3.5 ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ

Η αποθήκευση του φυτικού υλικού στην σωστή θερμοκρασία είναι τόσο σημαντική όσο και η διαδικασία της ψύξης. Θερμοκρασίες γύρω στους -130°C , προκαλούν σχηματισμό κρυστάλλων στο εσωτερικό των κυττάρων και κατά συνέπεια μειώνουν την βιωσιμότητα τους. Η μακρά αποθήκευση του γενετικού υλικού στους -196°C , απαιτεί έναν καταψύκτη υγρού αζώτου. Ένας καταψύκτης τέτοιου τύπου για 4000 περίπου αμπούλες των 2ml υπολογίζεται ότι καταναλώνει 20 έως 25 lt. υγρού αζώτου την εβδομάδα. Θεωρητικά, όσο η προμήθεια της συσκευής με υγρό άζωτο γίνεται κανονικά, το φυτικό υλικό που καταψύχεται παραμένει αναλλοίωτο, εφ' όσον τηρούνται όλες οι απαραίτητες προφυλάξεις. Στην πραγματικότητα όμως η βιωσιμότητα αυτού μειώνεται με την πάροδο του χρόνου.

Όταν αποθηκεύεται μεγάλος αριθμός γενετικού πλάσματος είναι ζωτικής σημασίας να ακολουθούμε ένα πρόγραμμα καταγραφής των περιεχόμενων δειγμάτων. Αυτό μας δίνει τη δυνατότητα να γνωρίζουμε το τι υπάρχει αποθηκευμένο αλλά και μέχρι πότε μπορεί να παραμείνει σε αυτές τις συνθήκες. Επιπλέον διευκολύνει και όλες τις διαδικασίες μεταχείρισης των δειγμάτων.

3.6 ΞΕΠΑΓΩΜΑ

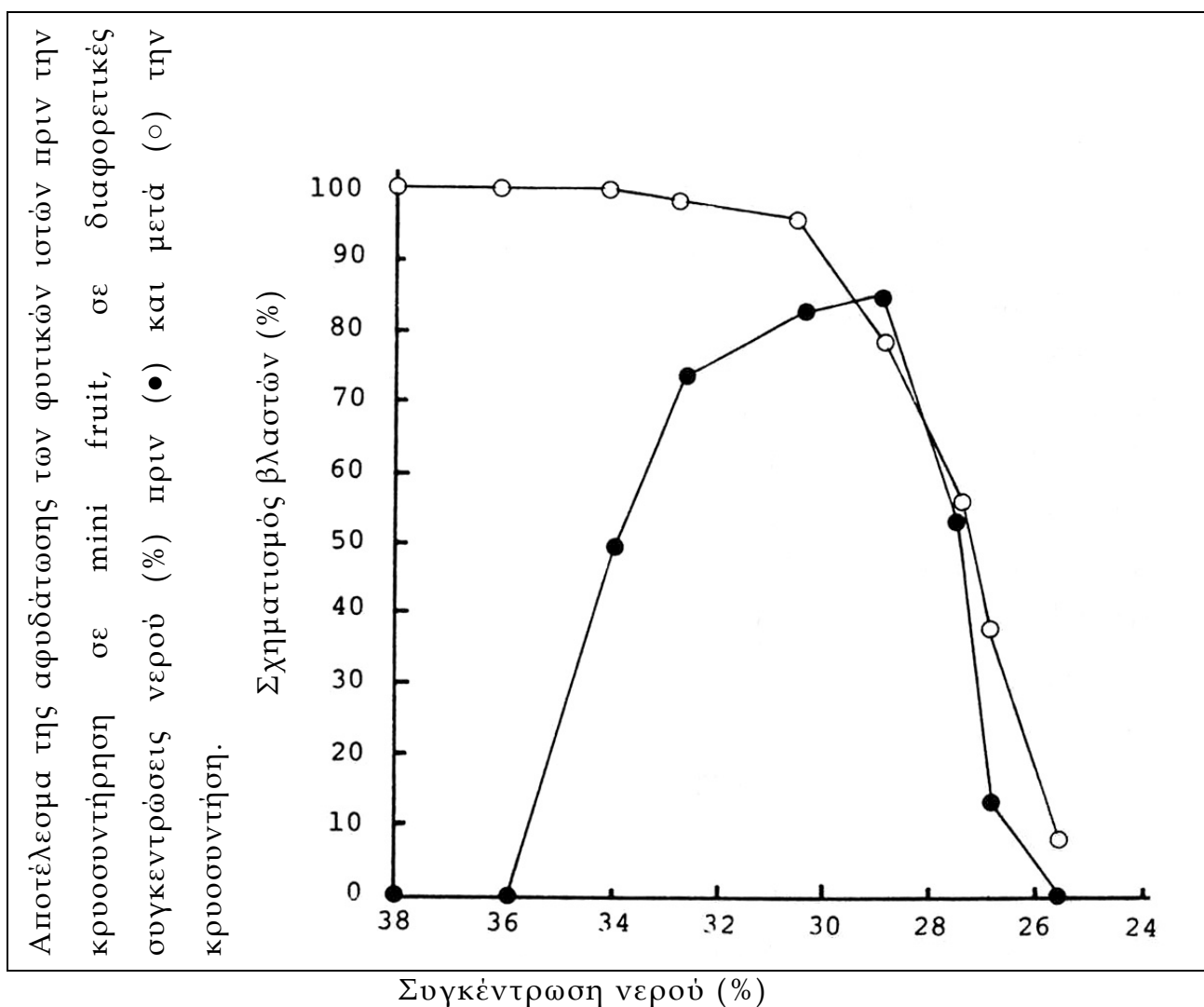
Το γενετικό υλικό που βρίσκεται αποθηκευμένο στους -196°C , ξεπαγώνει εύκολα με εμβάπτιση σε ζεστό νερό θερμοκρασίας $37-40^{\circ}\text{C}$ (με το οποίο επιτυγχάνεται ρυθμός ξεπαγώματος $500-700^{\circ}\text{C/ανά λεπτό}$). Μετά από περίπου $90''$ το υλικό μεταφέρεται σε παγωμένο νερό έως ότου χρησιμοποιηθεί. Αργό ξεπάγωμα σε θερμοκρασία δωματίου έχει δυσμενείς συνέπειες. Το γρήγορο ξεπάγωμα φαίνεται ότι προστατεύει τα κύτταρα από τις καταστροφικές συνέπειες των ενδοκυτταρικών κρυστάλλων (που προκαλούνται στο αργό ξεπάγωμα). Η βιωσιμότητα του υλικού εξαρτάται από τις διαδικασίες ψύξης που προηγήθηκαν. Αν κατά τη διάρκεια της ψύξης αυξηθεί το νερό στο εσωτερικό νερό των κυττάρων πάνω από το επιτρεπόμενο όριο, τότε μπορεί να προκληθούν ζημιές σε αυτά στο στάδιο του ξεπαγώματος.

3.7 ΕΠΑΝΑΦΟΡΑ ΒΛΑΣΤΗΣΗΣ

Συνήθως πριν την καλλιέργεια, το φυτικό υλικό πλένεται συνήθως πολλές φορές για να απομακρυνθεί το κρυοπροστατευτικό το οποίο διαφορετικά μπορεί να προκαλέσει

τοξικές αντιδράσεις στα κύτταρα. Βαθμιαία διάλυση του κροοπροστατευτικού είναι επιθυμητή κανονικά για να αποφευχθεί η πλασμόλυση στο εσωτερικό των κυττάρων. Ο Withers (1980) ωστόσο υποστηρίζει ότι δεν είναι αναγκαία η πλύση του γενετικού υλικού μετά την απόψυξη. Με την παρατεταμένη πλύση του γενετικού υλικού απομακρύνονται υδατοδιαλυτά στοιχεία ζωτικής σημασίας από τα κύτταρα είτε με απόπλυση είτε με την πλασμόλυση αυτών.

Το καταψυγμένο φυτικό υλικό έχει ορισμένες ειδικές απαιτήσεις για μεγαλύτερη βιωσιμότητα και επαναβλάστηση. Η χρήση αυξητικών ουσιών και κυρίως της GA₃ σε ποσότητα 10mg/lit. έχει παρουσιάσει πολύ καλά αποτελέσματα.



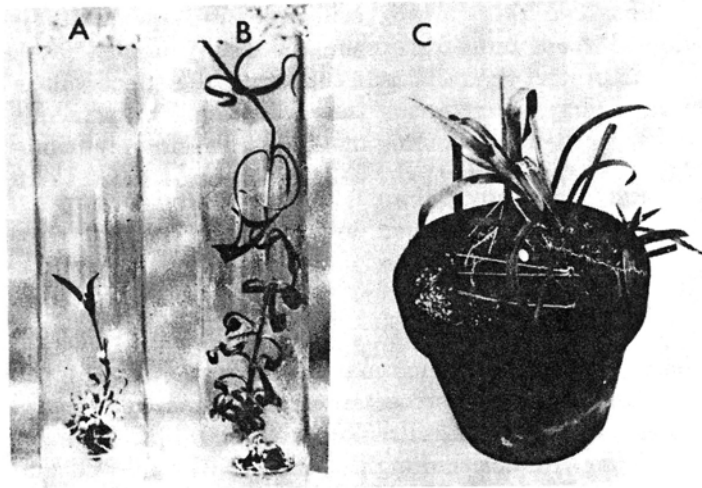
3.8 ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑ

Η βιωσιμότητα των φυτικών κυττάρων που συντηρήθηκαν στη θερμοκρασία του υγρού H₂ μπορεί να εξετασθεί με την βοήθεια διαφόρων τεχνικών όπως με την χρήση φθοριούχου διαλύματος ή του Evan's blue και άλλων διαλυμάτων.

Παρόλα αυτά οι παραπάνω μέθοδοι δε δίνουν αξιόπιστα αποτελέσματα, διότι η πλειοψηφία των κυττάρων που φαίνονται αρχικά βιώσιμα αποτυγχάνουν στην βλάστηση. Έτσι ο πιο αξιόπιστος τρόπος είναι να τοποθετηθούν τα δείγματα σε συνθήκες καλλιέργειας και να υπολογιστεί ο βαθμός βιωσιμότητας αυτών δίδεται από τον τύπο:

$$\frac{\text{κύτταρα ή όργανα που βλάστησαν}}{\text{κύτταρα ή όργανα που τοποθετήθηκαν σε συνθήκες βλάστησης}} \times 100\%$$

Ωστόσο μελέτες φυτικών οργάνων που αναπτύσσονται σε συνθήκες in vitro μετά από κρυοσυντήρηση αποδεικνύουν ότι ακόμα και αν αναπτυχθούν σε ολόκληρα φυτά υπάρχει πάντα ο κίνδυνος να εμφανιστούν ποικίλες δυσμορφίες από ζημιές που υπέστησαν τα κύτταρα αυτών κατά τη φάση της ψύξης ή της απόψυξης.



Εικ. 8 Νεαρά φυτά γαρυφαλιάς που προέκυψαν από καμμάτια βλαστών που αποθηκεύθηκαν στους -196°C , για 50ημέρες (B) 80 ημέρες και (Γ) 5 μήνες μετά από καλλιέργεια (Nemura and Sakai 1980)

3.8.1 ΕΛΕΓΧΟΣ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑΣ

Αν και έχουν αναπτυχθεί διάφορες τεχνικές για την προστασία των εκφύτων κατά την κρυοσυντήρηση, κρίνεται απαραίτητος ο έλεγχος βιωσιμότητας των κυττάρων, για πιθανές βλάβες κατά την αποθήκευσή τους. Ο ποιοτικός έλεγχος της δομής μπορεί να γίνει άμεσα με τη χρήση απλού ή ηλεκτρονικού μικροσκοπίου. Η απώλεια οσμωτικής πίεσης διαπιστώνεται με τη χρήση υπερτονικών ή υποτονικών διαλυμάτων. Ιστολογικές δοκιμές βιωσιμότητας παρέχουν πληροφορίες για τις συνθήκες ψύξης και απόψυξης των κυττάρων. Ο έλεγχος είναι προτιμότερο να γίνεται σε μεγάλο αριθμό φυτών και τα αποτελέσματα θα πρέπει να συνδυάζονται μεταξύ τους.

3.8.2 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗ ΒΙΩΣΙΜΟΤΗΤΑ ΤΩΝ ΚΥΤΤΑΡΩΝ ΚΑΙ ΤΩΝ ΙΣΤΩΝ

α) Συνθήκες χαμηλών θερμοκρασιών: Τα διάφορα φυτά εμφανίζουν διαφορετική ικανότητα αντίστασης στο πάγωμα και αντοχή στην επίδραση χαμηλών θερμοκρασιών. Σε πολλά είδη φυτών η αποθήκευση των μητρικών φυτών σε χαμηλές θερμοκρασίες για αρκετές ημέρες φαίνεται ότι αυξάνει την πιθανότητα επιτυχίας.

β) Ζημιές κατά την ψύξη: Σχεδόν όλες οι ζημιές των φυτικών ιστών από πάγωμα οφείλονται στο νερό που περιέχουν. Μια άλλη εκδοχή είναι η παρεμβολή βιοχημικών ή βιοφυσικών παραγόντων κατά τη μείωση της θερμοκρασίας. Οι ζημιές από ψύξη μπορούν γενικά να αποφευχθούν με τη γρήγορη ψύξη του φυτικού υλικού.

γ) Ζημιές κατά το ξεπάγωμα: Ενδεικνύεται γρήγορη απόψυξη των δειγμάτων, συχνά όμως συναντώνται προβλήματα κατά το στάδιο αυτό.

δ) Αποθήκευση σε μη κατάλληλες θερμοκρασίες: Οι συμβατικοί καταψύκτες δεν ενδεικνύονται για συντήρηση του γενετικού υλικού. Το κατεψυγμένο φυτικό υλικό πρέπει να συντηρείται στους $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$.

ε) Χρήση κρυοπροστατευτικών:

Κοινά κρυοπροστατευτικά είναι το διμεθυλοσουλφοξείδιο, η γλυκερίνη, και η αιθυλική γλυκόλη. Περισσότερο αποτελεσματικά φαίνεται ότι είναι τα μίγματα κρυοπροστατευτικών.

3.8.3 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ

Έχουν παρατηρηθεί αλλαγές στα χρωμοσώματα πολλών ειδών φυτών σε καλλιέργειες κάλλου ή σε καλλιέργειες κυττάρων, ιδιαίτερα σε εκείνα που περιέχουν υψηλά επίπεδα οξέων. Τέτοιου είδους μέθοδοι δεν ενδείκνυται για αποθήκευση γενετικού υλικού, αλλά χρησιμοποιούνται κυρίως για εκπαιδευτικούς σκοπούς.

Μεταλλαγές στο γενετικό υλικό μπορούν να συμβούν πριν ή μετά την κρυοσυντήρηση ή ακόμα και κατά τη διάρκεια της αναγέννησης. Κατά τη φάση της αποθήκευσης κάποιου είδους, μπορεί να παρατηρηθεί γενετική μεταλλαγή είτε από τη συσσώρευση τοξικών ουσιών ή από την αλλοίωση του γονότυπού του από την εισερχόμενη ακτινοβολία. Η χρήση του DMSO ως κρυοπροστατευτικού μειώνει την πιθανότητα εμφάνισης μεταλλαγών, όπως και η χρήση γυάλινων σκευών.

3.9 ΜΙΚΡΗΣ Ή ΜΕΤΡΙΑΣ ΧΡΟΝΙΚΗΣ ΔΙΑΡΚΕΙΑΣ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ

Μερικά από τα μειονεκτήματα της Κρυοσυντήρησης είναι:

- (α) Απαιτεί ειδικά όργανα για την ψύξη και συντήρηση
- (β) Χρησιμοποιούνται κρυοπροστατευτικά διαλύματα και
- (γ) Υπάρχει πάντα ο κίνδυνος να προκληθούν ζημιές λόγω σχηματισμού κρυστάλλων.

Αυτοί είναι οι κυριότεροι λόγοι που η Κρυοσυντήρηση βρίσκεται ακόμα σε πειραματικό στάδιο και δεν χρησιμοποιείται γενικά σαν πρακτική. Σε αντίθεση με αυτήν, η αποθήκευση για μικρό ή μέτριο χρονικό διάστημα είναι απλούστερη, έχει μικρότερο ποσοστό απωλειών και παρέχει τη δυνατότητα να

γίνονται περιοδικοί έλεγχοι της βιωσιμότητας του γενετικού πλάσματος. Σύμφωνα με τη μέθοδο αυτή το φυτικό υλικό μεταφέρεται σε οριακές συνθήκες καλλιέργειας και έτσι αυξάνεται η διάρκεια ζωής αυτών. Η δημοφιλέστερη μέθοδος είναι αυτή της ψυχρής αποθήκευσης, όπου τα μοσχεύματα μεταφέρονται σε χαμηλές θερμοκρασίες και είναι αποτελεσματική για πλήθος φυτικών ειδών.

3.9.1 ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΧΩΡΙΣ ΨΥΞΗ

Διάφορες μέθοδοι έχουν αναπτυχθεί, οι οποίες μειώνοντας τον ρυθμό ανάπτυξης των καλλιεργειών καθυστερούν την συχνότητα υποκαλλιέργειας. Μερικές από αυτές είναι:

α) Ελάχιστη και μέση επιβράδυνση ανάπτυξης: η χρήση επιβραδυντών ανάπτυξης, όπως το αμπισικό οξύ ή καλλιέργεια σε μέσο, απουσία σακχάρου, βοήθησε στο να μειωθεί η περίοδος υποκαλλιέργειας.

β) Επικάλυψη με ειδικό λάδι: ο Carlin το 1959 ανέφερε ότι επικάλυψη ιστών κάλλου καρότου με ειδικό λάδι μείωσε αξιοσημείωτα το ρυθμό ανάπτυξης και επιπλέον καθυστέρησε τη συχνότητα μεταφοράς. Επίσης, οι Augereau et al. το 1986 αποθήκευσαν ιστοκαλλιέργειες ποικίλων φαρμακευτικών φυτών για 4-6 μήνες .

γ) Αποξήρανση: Ο Nitzse το 1980 ανέφερε την ανάπτυξη αποξηραμένου κάλλου καρότου μετά από ένα χρόνο αποθήκευσης. Επίσης, ο Gray το 1987 παρατήρησε ότι σωματικά έμβρυα καρότου, σταφυλιού και δενδροκομικών φυτών αναπτύχθηκαν φυσιολογικά μετά από αποξήρανση.

δ) **Χαμηλή πίεση οξυγόνου:** Ο Brigen & Staby το 1981 αποθήκευσαν ιστοκαλλιέργειες σε χαμηλή ατμοσφαιρική πίεση και χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου.

ε) **Χαμηλή θερμοκρασία:** η αποθήκευση καλλιεργειών σε χαμηλές θερμοκρασίες, χωρίς κατάψυξη (στους 2-8 °C) έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε μεγάλο αριθμό φυτικών ειδών.

Από όλες αυτές τις μεθόδους, η μέθοδος των χαμηλών θερμοκρασιών έχει χρησιμοποιηθεί περισσότερο. Η αποθήκευση καλλιεργειών φαρμακευτικών φυτών σε χαμηλές θερμοκρασίες και τα αποτελέσματά τους πάνω σε δευτερεύοντες μεταβολίτες έχουν εκτενώς μελετηθεί. Τα νεαρά φυτάρια πετούνιας και χρυσανθέμων, που παρήχθησαν *in vitro*, πολλαπλασιάζονται μαζικά και αποθηκεύονται στους 4-5 °C, για περισσότερο από 6 χρόνια. Τα φυτά αυτά ανθίζουν μετά από μεταφορά σε δοχεία χωρίς να εμφανίζουν καμία ανωμαλία ανάπτυξης.

3.9.2 ΑΛΛΕΣ ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΕΙΩΣΗΣ ΤΟΥ ΡΥΘΜΟΥ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Σε συγκέντρωση πάνω από 4-5% η σακχαρόζη αρχίζει να έχει αρνητική, αλλά όχι τοξική, επίδραση στην ανάπτυξη του φυτού, που οφείλεται σε οσμωτικά φαινόμενα. Υψηλά επίπεδα σακχαρόζης μπορούν έτσι να χρησιμοποιηθούν για την διατήρηση καλλών σε κατάσταση ληθάργου για μεγάλο χρονικό διάστημα. Προσθήκη μαννιτόλης μπορεί να εμποδίσει την γρήγορη νέκρωση των κυττάρων. Επίσης προτείνει ότι η προσθήκη μαννιτόλης είναι ικανή να διατηρήσει την ακεραιότητα της κυτταρικής μεμβράνης και να εμποδίσει τη διαρροή του κυτταρικού διαλύματος. Υψηλά επίπεδα σακχαρόζης φαίνεται ότι μειώνουν τις ζημιές από τις χαμηλές θερμοκρασίες

με τον ίδιο τρόπο όπως η προλίνη στην κρυσταλλοποίηση, προστατεύοντας τον ιστό από πιθανή πλασμόλυση.

Οι Henshaw et al (1980) έδειξαν ότι συγκέντρωση 8% σακχαρόζης βοηθά στον περιορισμό της ανάπτυξης ακραίου τμήματος βλαστού πατάτας. Ο συνδυασμός σακχαρόζης και μαννιτόλης είναι εξίσου αποτελεσματικός. Μεριστώματα *Cassava* σε μέσο που περιείχε 20-40 mM αζώτου και 4% σακχαρόζης έδωσαν καλά αποτελέσματα, ενώ συγκέντρωση 4% μαννιτόλης ήταν τοξική. Η ανάπτυξη σωματικών εμβρύων μπορεί να εμποδιστεί τόσο απουσία σακχαρόζης, όσο και με υψηλές συγκεντρώσεις της.

Ο ρυθμιστής ανάπτυξης ABA και κάποιες άλλες χημικές ενώσεις με συγκεκριμένη δομή είναι σε θέση να επιφέρουν λήθαργο σε φυτικά μεριστώματα. Στο άγριο κύμινο 0,1 mM ABA, βρέθηκε ότι μπορεί να σταματήσει εντελώς την ανάπτυξη στο στάδιο των σωματικών εμβρύων. Τα έμβρυα που αφαιρέθηκαν από τις καλλιέργειες, παρέμειναν σε κατάσταση λήθαργου όσο το ABA ήταν παρόν, αλλά συνέχισαν να αυξάνονται και να αναπτύσσονται όταν μεταφέρθηκαν σε κατάλληλες συνθήκες. Η αποθήκευση εμβρύων που βρίσκονται σε κατάσταση λήθαργου αποτελεί μια άλλη μέθοδο συντήρησης γενετικού υλικού *in vitro*.

Τοποθέτηση καλλιεργειών κάλλου σε περιβάλλον με χαμηλή συγκέντρωση οξυγόνου φαίνεται ότι μπορεί να περιορίσει την *in vitro* ανάπτυξη. Ο Carlin (1959) χρησιμοποίησε ειδικό λάδι για την συντήρηση καλλιεργειών κάλλου. Παρατήρησε ότι ο ρυθμός ανάπτυξης των καλλιεργειών μειώθηκε. Το γεγονός αυτό αποδόθηκε στην έλλειψη οξυγόνου που εμπόδιζε την αύξηση των ιστών. Η μόλυνση των φυτών και τα τοξικά αποτελέσματα του λαδιού αποτελούν μειονεκτήματα της μεθόδου. Πρόσφατα πειράματα με απευθείας χρήση χαμηλής συγκέντρωσης οξυγόνου ή χαμηλής ατμοσφαιρικής πίεσης, σε καλλιέργειες κάλλων ή

ακραιών τμημάτων βλαστού στο χρυσάνθεμο και τον καπνό είχαν σαν αποτέλεσμα τη μείωση του ρυθμού ανάπτυξης των καλλιεργειών. Μερική πίεση οξυγόνου μικρότερη από 50 mmHg είναι απαραίτητη για να μειωθεί η ταχύτητα ανάπτυξης των καλλιεργειών. Καμία βλαβερή επίδραση δεν έχει παρατηρηθεί στους φαινοτύπους των αναγεννημένων φυτών όταν μεταφερθούν σε κανονικές συνθήκες. Υπάρχει το πρόβλημα της αποξήρανσης και της αφυδάτωσης των αναγεννημένων φυτών όταν η πίεση του οξυγόνου περιορίζεται από χαμηλή ατμοσφαιρική πίεση.

Η αργή αύξηση γίνεται περισσότερο αποτελεσματική όταν συνδυαστούν οι μεταχειρίσεις. Οι Henshaw et al (1980) και ο Westcott (1981) ανακάλυψαν ότι η βιωσιμότητα καλλιεργειών ακραιών τμημάτων βλαστού πατάτας μπορεί να επεκταθεί στους 57 μήνες με τη χρήση χαμηλών θερμοκρασιών, προσθήκη ABA(5-10 mg/l), υψηλά επίπεδα σακχαρόζης(άνω του 8%) και προσθήκη μαννιτόλης (3-6 %). Ο ακριβής συνδυασμός ποικίλει ανάλογα με την ποικιλία και το συγγραφέα, ακόμα και για το ίδιο φυτό. Έτσι, οι Schilde-Rentschler et al (1982) αποθήκευσαν καλλιέργειες ακραιών τμημάτων βλαστού πατάτας σε MS μέσο, με 0,5% σακχαρόζη και 220 mM μαννιτόλης για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα.

3.9.3 ΨΥΧΡΗ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ

Η αποθήκευση γενετικού πλάσματος σε χαμηλές θερμοκρασίες αποδείχθηκε εξαιρετικά αποτελεσματική. Σε αυτές τις θερμοκρασίες επιβραδύνονται οι βιολογικές λειτουργίες των φυτικών κυττάρων αλλά δεν σταματούν, όπως στο LN, στη θερμοκρασία του υγρού αζώτου. Συνεπώς η υποκαλλιέργεια του

φυτικού υλικού είναι αναμενόμενη αν και σπάνια παρατηρείται. Η μέθοδος αυτή έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα και χρησιμοποιήθηκε με επιτυχία για βλαστούς, μικρά φυτά ή κάλλους. Αν και η αργή ανάπτυξη έχει σαν αποτέλεσμα να καθυστερεί την απώλεια της δυναμικότητας των καλλιεργούμενων κυττάρων, ωστόσο αποδεικνύεται σε καλλιεργούμενους κάλλους που αποθηκεύονται για σύντομο χρονικό διάστημα υπάρχει πάντα ένα ποσοστό απωλειών της ζωτικότητας αυτών.

Η θερμοκρασία αποθήκευσης εξαρτάται από την ευαισθησία του φυτικού υλικού. Για τα περισσότερα φυτικά είδη χρησιμοποιούνται θερμοκρασίες μεταξύ 5 και 9° C, ενώ για τα τροπικά φυτά είναι συχνά υψηλότερες.

Η μέθοδος της ψυχρής αποθήκευσης υπόσχεται πολλά για το μέλλον. Κατά την περίοδο της συντήρησης, το φυτικό υλικό τοποθετείται απλά στο ψυγείο σε χαμηλές θερμοκρασίες, χωρίς ιδιαίτερες περιποιήσεις έτσι έχουμε μείωση του κόστους.

3.9.4 ΤΡΟΠΟΠΟΙΗΣΗ ΤΟΥ ΑΕΡΙΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ (ΤΗΣ ΑΤΜΟΣΦΑΙΡΑΣ)

Μείωση της ανάπτυξης επιτυγχάνεται επίσης με τη μείωση του διαθέσιμου O₂. Διάφορες τεχνικές έχουν χρησιμοποιηθεί για το σκοπό αυτό. Η πιο απλή μέθοδος είναι η κάλυψη των φυτικών ιστών με ορυκτά έλαια. Μια άλλη μέθοδος είναι η χρήση τροποποιημένης ατμόσφαιρας. Επίσης η αύξηση της υγρασίας έχει δώσει πολύ καλά αποτελέσματα. Η τεχνική αυτή είναι επιθυμητή κυρίως για τα τροπικά φυτά που παρουσιάζουν ευαισθησία στις χαμηλές θερμοκρασίες.

3.9.5 ΑΠΟΞΗΡΑΝΣΗ

Μερική αποξήρανση κάλλων και σωματικών εμβρύων έχει χρησιμοποιηθεί για μικρής χρονικής διάρκειας αποθήκευση γενετικού πλάσματος. Τα αποξηραμένα μοσχεύματα (δειγμάτα) μεταχειρίζονται με ABA παρουσία υψηλής συγκέντρωσης σακχαρόζης, αποθηκεύονται στην συνέχεια σε χαμηλές θερμοκρασίες (στους -80°C , -20°C , ή -15°C) ανάλογα με το είδος για 1 χρόνο περίπου. Οι τεχνικές που έχουν αναπτυχθεί για την αποξήρανση των σωματικών εμβρύων αντικατοπτρίζουν την φυσιολογία και την ανάπτυξη των ζυγωματικών εμβρύων και των ορθόδοξων σπόρων. Η μεταχείριση των δειγμάτων με ABA αυξάνει την αντοχή των δειγμάτων.

3.10 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Πειραματικές μελέτες κρυοσυντήρησης ζωικού ιστού και σπέρματος ενθάρρυναν τους επιστήμονες να εφαρμόσουν την τεχνική αυτή και για μακροχρόνια αποθήκευση φυτικού γενετικού πλάσματος. Τα τελευταία χρόνια έχει παρατηρηθεί αξιόλογη πρόοδος στον τομέα αυτό αν και η κρυοσυντήρηση φυτικού υλικού δεν εφαρμόζεται μέχρι στιγμής σαν μία εργαστηριακή μέθοδος ρουτίνας. Οι προσπάθειες εντείνονται στο να δημιουργηθεί ένα πρωτόκολλο επεμβάσεων πετυχημένο και αποτελεσματικό που να επιτρέπει στο *in vitro* φυτικό υλικό να επανακτάται με υψηλή βιωσιμότητα και μη μεταβαλλόμενη

δομικά και λειτουργικά κατάσταση. Η ικανότητα των αφυδατωμένων και αποστειρωμένων φυτικών ιστών και εμβρύων να υποβάλλονται σε άμεση εμβάπτιση σε θερμοκρασία του υγρού αζώτου, χωρίς τη χρήση κρυοπροστατευτικών διαλυμάτων, μπορεί να οδηγήσει σε απλούστερες τεχνικές στο μέλλον.

Ένα μεγάλο πρόβλημα κατά τη διάρκεια της κρυοσυντήρησης είναι η παύση των μεταβολικών δραστηριοτήτων των κυττάρων σε όλα τα επίπεδα. Η κυτταρική διαίρεση και η αντιγραφή του DNA διακόπτονται πριν από την ολοκλήρωσή τους. Αυτό έχει συχνά αρνητικές συνέπειες και μπορεί να προκαλέσει ακόμα και γονοτυπικές αλλαγές στα κύτταρα. Υπάρχει επίσης κίνδυνος τραύματος του γενετικού υλικού κατά τη μακροχρόνια αποθήκευσή του που προκαλείται από την εξωτερική ιοντική ακτινοβολία. Οποιοδήποτε τέτοιο τραύμα διατηρείται στους φυτικούς ιστούς και συσσωρεύεται εξ' αιτίας του μη λειτουργούντος αδρανοποιημένου μηχανισμού κυτταρικής επανόρθωσης σε συνθήκες κρυοσυντήρησης.

Παρ' όλα αυτά βραχυπρόθεσμες και μακροπρόθεσμες *in vitro* αποθηκεύσεις φυτικού υλικού αποτελούν πλέον μια πραγματικότητα και χρησιμοποιούνται καθημερινά στα περισσότερα εργαστήρια και διεθνή ή τοπικά κέντρα έρευνας.

Γενικά η κατάλληλη θερμοκρασία και περίοδος αποθήκευσης θα πρέπει να καθορίζονται προσεκτικά για κάθε είδος φυτού, έτσι ώστε να προστατευτεί υψηλή βιωσιμότητα αλλά και η ποιότητα του φυτικού υλικού. Οι Son et al το 1991 παρατήρησαν μεγάλη ποικιλομορφία σε φυτά που αποθηκεύτηκαν στους 4°C για 5 χρόνια. Η ελεγχόμενη αποξήρανση εμβρύων και μεριστωμάτων παρουσιάζει πολύ καλά αποτελέσματα για βραχυπρόθεσμες και μεσοπρόθεσμες αποθηκεύσεις γενετικού πλάσματος, ειδικά για τα τροπικά είδη που είναι ευαίσθητα στις χαμηλές θερμοκρασίες.

4. Ο ΡΟΛΟΣ ΤΗΣ ΤΡΑΠΕΖΑΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΣΤΗΝ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΚΑΙ ΑΞΙΟΠΟΙΗΣΗ ΤΗΣ ΓΕΩΡΓΙΚΗΣ ΒΙΟΠΟΙΚΙΛΟΤΗΤΑΣ ΤΗΣ ΧΩΡΑΣ

Η τράπεζα γενετικού υλικού (Τ.Γ.Υ.) της χώρας ιδρύθηκε το 1981 ως τμήμα του κέντρου γεωργικής έρευνας Μακεδονίας-Θράκης και υπαγόταν τότε στη διεύθυνση έρευνας του Υπουργείου Γεωργίας, ενώ από το 1989 ανήκει στο Εθνικό Ίδρυμα Αγροτικής Έρευνας (ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε.).

Η έντονη ανησυχία αρκετών συνειδητοποιημένων επιστημόνων και διεθνών οργανισμών για τον ορατό κίνδυνο εξαφάνισης του τεράστιου γενετικού πλούτου που δημιουργήθηκε στη διαδρομή των αιώνων, με τη φυσική και ανθρώπινη επιλογή, οδήγησε στην απόφαση να υποστηριχθεί, από τις εθνικές κυβερνήσεις και τους αρμόδιους διεθνείς οργανισμούς, η δημιουργία τραπεζών γενετικού υλικού σε στρατηγικά σημεία της υφελίου με υψηλή γενετική ποικιλότητα. Μια από τις χώρες που επιλέχθηκαν ήταν και η Ελλάδα.

Ως γενετικό υλικό χαρακτηρίζεται όλο το φυτικό δυναμικό που συμβάλει σήμερα ή μπορεί να συμβάλλει μελλοντικά στη γενετική βελτίωση ενός είδους. Ο όρος φυτογενετικοί πόροι περιλαμβάνει τις κατηγορίες του γενετικού υλικού που δεν προστατεύονται από ειδικές νομοθεσίες και τέτοιες είναι : α) ντόπιες παραδοσιακές ποικιλίες β) παλιές ποικιλίες ή δημιουργίες βελτιωτών που αποσύρθηκαν γ) άγρια ή ημιάγρια είδη και τέλος δ) καθαρές σειρές με μεγάλη σημασία για τη γεωργία. Το γενετικό υλικό αντιπροσωπεύει τη γεωργική βιοποικιλότητα μιας χώρας.

4.1 ΔΡΑΣΤΗΡΙΟΤΗΤΕΣ ΤΗΣ ΤΡΑΠΕΖΑΣ ΓΕΝΕΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

Οι βασικές δραστηριότητες της Τ.Γ.Υ. περιλαμβάνουν την εξερεύνηση της Ελληνικής επικράτειας με σκοπό :

- Την επισήμανση και συλλογή του γενετικού υλικού
- Την εκτίμηση του βαθμού διάβρωσης και την εισήγηση μέτρων αντιμετώπισης
- Την ασφαλή διατήρηση και προστασία του γενετικού υλικού
- Την περιγραφή του υλικού
- Την αξιολόγησή του
- Την τεκμηρίωσή του
- Τη διάθεση του γενετικού υλικού σε ιδρύματα της χώρας
- Την ανταλλαγή γενετικού υλικού και πληροφοριών με άλλες τράπεζες ή αρμόδιους διεθνείς οργανισμούς.
- Την παροχή γνωμοδοτήσεων προς το Υπουργείο Γεωργίας.

5. ΕΘΝΙΚΕΣ ΥΠΟΧΡΕΩΣΕΙΣ-ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

Η χώρα πρέπει να αναπτύξει ακόμη περισσότερο τις δράσεις προστασίας και αξιοποίησης της γεωργικής βιοποικιλότητας αφενός μεν για να προστατεύσει το μεγάλο φυτογενετικό της πλούτο και αφετέρου για να ανταποκριθεί στις διεθνείς υποχρεώσεις της στον τομέα αυτό. Για το σκοπό αυτό είναι απαραίτητη η συνεργασία του ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε. του Υπουργείου Γεωργίας, των πανεπιστημιακών ιδρυμάτων, καθώς και άλλων κυβερνητικών και μη φορέων προστασίας περιβάλλοντος και οικολογικής γεωργίας έτσι ώστε να διασφαλιστούν οι απαραίτητοι εθνικοί πόροι, η διοικητική και ερευνητική υποδομή και να ενεργοποιηθεί η συμμετοχή των πολιτών.

Τα οφέλη του θα προκύψουν από αυτό είναι:

- **Η προώθηση της επιστημονικής γνώσης και αποτελεσματική προστασία και αξιοποίηση των φυτογενετικών πόρων της χώρας.**
- **Η μεγαλύτερη ενεργοποίηση και διεθνής προβολή της χώρας.**
- **Η καλύτερη αξιοποίηση του εγχώριου γενετικού υλικού.**