

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ (Τ.Ε.Ι.)
ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ.

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ.
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΠΙΛΟΓΗΣ: ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ
ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗΣ ΓΕΩΡΓΙΑΣ.
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΦΥΤΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΟΥ
ΥΛΙΚΟΥ.

ΘΕΜΑ: *«ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΣΕ ΤΟΠΙΚΕΣ
ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΑΜΠΕΛΟΥ».*

Πτυχιακή Εργασία,
του σπουδαστή **ΣΥΡΡΑΚΟΥ ΓΙΩΡΓΟΥ.**



Καλαμάτα, Μάιος 2003.

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ (Τ.Ε.Ι.)
ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ.

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ.
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΠΙΛΟΓΗΣ: ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ
ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗΣ ΓΕΩΡΓΙΑΣ.
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ: ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΦΥΤΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΟΥ
ΥΛΙΚΟΥ.

ΘΕΜΑ: «ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΙΣΤΟΚΑΛΜΙΕΡΓΕΙΑΣ ΣΕ ΤΟΠΙΚΕΣ
ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΑΜΠΕΛΟΥ».

Πτυχιακή Εργασία,
του σπουδαστή ΣΥΡΡΑΚΟΥ ΓΙΩΡΓΟΥ.

Επιβλέπων καθηγητής: Δρ. Κανάκης Ανδρέας.

Καλαμάτα, Μάιος 2003.

Εξώφυλλο: Ρωμαϊκή τειχογραφία του 1^{ου} μ.Χ.αίωνα.(Διόνυσος).

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ:

	<i>Σελίδα.</i>
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.	1.
 I. ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ.	
 - ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.	
ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ/ΒΑΣΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.	
1.1.ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΤΗΣ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.	2.
1.2.ΒΑΣΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.	3.
1.2.1. ΤΥΠΟΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ- ΣΤΑΔΙΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.	5.
1.3. ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ-ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΩΝ <i>IN VITRO</i> ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ.	7.
 -ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2.	
ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.	
2.1.ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ-ΣΥΣΚΕΥΕΣ.	9.
2.2.ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ.	9.
2.3.ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ.	11.
2.4.ΦΥΤΟΡΥΘΜΙΣΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ.	13.
2.5.ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ.	17.
 -ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.	
3.1.ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΚΟΛΙΝΙΑΤΙΚΟ-ΑΥΓΟΥΣΤΟΛΙΔΙ.	19.
3.2.ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΑΜΠΕΛΟΥ.	20.
 -ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4.	
ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΑΜΠΕΛΟΥ.	
4.1. ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΑΜΠΕΛΟΥ.	23.
4.2. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΑΜΠΕΛΟΥ.	24.
4.3. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΤΗΣ ΑΜΠΕΛΟΥ.	25.
4.3.1 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΒΛΑΣΤΩΝ	26.
4.3.2. ΡΙΖΟΒΟΛΙΑ.	27.
4.3.2.1. ΡΙΖΟΒΟΛΙΑ <i>IN VITRO</i> .	27.
4.3.2.2. ΡΙΖΟΒΟΛΙΑ <i>EXTRA VIRUM</i> .	28.
4.4. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΟΣΟΥ ΦΥΤΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΣΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΑΜΠΕΛΟΥ - ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΕΡΙΣΤΩΜΑΤΩΝ.	30.

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ :ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ.

➤ ΠΕΡΙΛΗΨΗ.	33.
➤ ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ.	34.
➤ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.	41.
➤ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ.	50.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.	57.
----------------------	------------

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.

ΕΙΣΑΓΩΓΗ.

Η τεχνική της *in vitro* καλλιέργειας φυτικών ιστών και κυττάρων άνοιξε τα τελευταία 30 χρόνια νέους δρόμους στην επίλυση προβλημάτων της γεωργικής πράξης (αντιμετώπιση ασθενειών, παραγωγή άνοσου πολλαπλασιαστικού υλικού κ.τ.λ.).

Έχουν αναπτυχθεί έτσι μέθοδοι πολλαπλασιασμού με ιστοκαλλιέργεια και για το αμπέλι, που επιτρέπουν την γρήγορη απόκτηση μεγάλου αριθμού κλωνικών φυτών, κάθε επιθυμητής ποικιλίας και απαλλαγμένων από διάφορα φυτοπαθογόνα (κυρίως ιώσεων).

Οι μέθοδοι αυτές είναι επίσης χρήσιμες για τη διατήρηση του πολυπληθούς υπάρχοντος γενετικού υλικού, ενώ συμβάλλουν αποφασιστικά στη δημιουργία νέου γενετικού υλικού.

Έτσι καθώς το πρόβλημα παραγωγής εξυγιασμένου πολλαπλασιαστικού υλικού είναι ιδιαίτερα οξύμενο στην χώρα μας, οι νέες μέθοδοι *in vitro* καλλιεργειών μπορούν να συμβάλλουν αποφασιστικά για την επίλυσή του.

Ευτυχώς, τα τελευταία χρόνια, έχουν λειτουργήσει στην χώρα μας (πέρα από τις ερευνητικές προσπάθειες στα εκπαιδευτικά και ερευνητικά ιδρύματα) μονάδες εμπορικής παραγωγής πολλαπλασιαστικού υλικού της αμπέλου (ΒΙΤΡΟ ΕΛΛΑΣ, ΙΣΤΟ κ.α.), με ενθαρρυντικά αποτελέσματα.

Ενόψει των ραγδαίων εξελίξεων, κατά την τελευταία εικοσαετία, στον τομέα της ιστοκαλλιέργειας (και για το αμπέλι) επιχειρείται παρακάτω μια προσπάθεια για την εφαρμογή των τεχνικών και μεθόδων αυτών σε δυο ακόμα τοπικές και χρησιμοποιούμενες στην πράξη από πολύ παλιά ποικιλίες του νομού Μεσσηνίας.

Αξίζει να αναφερθεί ότι στην Ελλάδα έχουν εφαρμοσθεί *in vitro* τεχνικές, στο μεγαλύτερο μέρος των ποικιλιών και υποκειμένων αμπέλου, που χρησιμοποιούνται στην γεωργική πράξη.

Στο πρώτο μέρος γίνεται μια προσπάθεια για την συνοπτική περιγραφή των βασικών εννοιών της ιστοκαλλιέργειας και ειδικά για το αμπέλι, ενώ στο δεύτερο θα σταθούμε καθαρά στο πειραματικό μέρος και οι αναφορές μας στο θεωρητικό υπόβαθρο θα είναι μόνο οι αναγκαίες.

I. ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ: ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1.

ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΤΗΣ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ/ ΒΑΣΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.

1.1. ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΤΗΣ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.

Όπως είναι γνωστό το κύτταρο είναι η βασική δομική μονάδα κάθε οργανισμού. Η λεγόμενη θεωρία της ολοδυναμικότητας του κυττάρου (totipotency) από τον 19^ο αιώνα, υποστήριξε την δυνατότητα μεμονωμένων κυττάρων ενός οργανισμού για αυτόνομη φυσιολογική εξέλιξη, που θα δώσει έναν νέο όμοιο οργανισμό.

Η παραπάνω θεωρία, που διατυπώθηκε από τους Schwann και Schleiden το 1838, προσδιόριζε το κύτταρο αφ' ενός μεν σαν βασική δομική μονάδα των ζώντων οργανισμών και αφετέρου σαν μια αυτόνομη φυσιολογική μονάδα (Πλαστήρα, 1994).

Στην αρχή μόνο το πρώτο μέρος της θεωρίας αυτής έγινε αποδεκτό. Η δυνατότητα αυτόνομης φυσιολογικής εξέλιξης των κυττάρων των πολυκύτταρων οργανισμών, που αποτελεί την βάση της καλλιέργειας ιστών και κυττάρων, αμφισβητήθηκε και τα πρώτα πειράματα για την απόδειξή τους απέτυχαν.

Ο πρώτος που απομόνωσε φυτικά κύτταρα ήταν ο Haberlandt το 1902. Η προσπάθειά του απέτυχε αφού τα κύτταρα διατηρήθηκαν στην ζωή για ένα διάστημα, αλλά δεν μπόρεσαν να πολλαπλασιαστούν. Τα αίτια της αποτυχίας πρέπει να αποδοθούν στη χρήση πολύ απλών θρεπτικών διαλυμάτων, χωρίς τις απαραίτητες φυτορρυθμιστικές ουσίες για την διέγερση της κυτταρικής διαίρεσης.

Η αξία της εργασίας του Haberlandt ήταν μεγάλη, αν την εξετάσει κανείς υπό το φως των σημερινών επιστημονικών δεδομένων. Προέβλεψε έτσι την παραγωγή εμβρύων από καλλιέργεια σωματικών κυττάρων, καθώς και την ανάγκη προσθήκης στο θρεπτικό διάλυμα των ουσιών, που είναι απαραίτητες για την κυτταρική διαίρεση. Για το τελευταίο αυτό, πρότεινε την συγκαλλιέργεια των φυτικών κυττάρων με σωλήνες γύρης, που υποτίθεται ότι εκκρίνουν κάποιες τέτοιες «ουσίες». Σήμερα γνωρίζουμε ότι οι «ουσίες» αυτές δεν είναι άλλες από τις φυτορρυθμιστικές ουσίες και συγκεκριμένα τις αυξίνες και τις κυτταροκινίνες ή

κυτοκινίνες, που είναι απαραίτητες για την καλλιέργεια φυτικών ιστών και κυττάρων (η ανακάλυψη της IAA έγινε το 1937, ενώ της κινετίνης το 1955). Επίσης πρότεινε την καλλιέργεια μεριστωματικών ιστών και την χρησιμοποίηση υλικών όπως το γάλα της καρύδας, τεχνικές που χρησιμοποιούνται και σήμερα σε καλλιέργειες φυτικών ιστών.

Οι πρώτες επιτυχημένες προσπάθειες καλλιέργειας φυτικών ιστών και κυττάρων *in vitro* με την έννοια του πολλαπλασιασμού και της διατήρησης των κυττάρων, με συνεχείς μεταφύτευσεις, επ' άπειρον, έγιναν γύρω στα 1939, από τρεις διαφορετικούς επιστήμονες, τους White, Gautheret και Nobecourt που εργαζόταν ο καθένας χωριστά. Ο Reinert το 1959 παρατήρησε την δημιουργία των λεγόμενων σωματικών εμβρύων που προέρχονται από διαίρεση και ανάπτυξη σωματικών κυττάρων. Αυτό αποδείχτηκε οριστικά το 1965 από τους Vasil και Hildebrandt, οπότε από καλλιέργεια μεμονωμένων φυτικών κυττάρων παρήχθησαν τέτοια έμβρυα που αναπτύχθηκαν και έδωσαν φυτά, που έφθασαν μέχρι την ανθοφορία.

Ο Morel στα 1960, πέτυχε με την καλλιέργεια μεριστωμάτων, την εξυγίανση φυτών από ιώσεις (ντάλια αρχικά και ορχεοειδή στη συνέχεια). Στα 1966 οι Guha & Maheshwari κατόρθωσαν να αποκτήσουν τέλεια απλοειδή φυτά. Το 1971 οι Takebe, Labib and Melchers, πέτυχαν την παραγωγή τέλειων φυτών από *in vitro* καλλιέργεια πρωτοπλαστών.

Από τότε, μέχρι σήμερα έχουν γίνει ακόμα πολλά βήματα στο επίπεδο της έρευνας, με κύριους σκοπούς την εφαρμογή των παραπάνω μεθόδων σε κάθε φυτικό είδος και ποικιλία, την γενετική βελτίωση των φυτών, την μαζική παραγωγή προϊόντων μεταβολισμού των φυτών (δευτερογενείς μεταβολίτες) για φαρμακευτικούς ή άλλους σκοπούς, κ.α.

1.2.ΒΑΣΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.

Στις μέρες μας είναι πολλές οι συζητήσεις, γύρω από την Βιοτεχνολογία. Εύλογα, λοιπόν τίθεται το ερώτημα τι είναι Βιοτεχνολογία.

Σαν ένα ορισμό θα μπορούσαμε να πούμε, ότι πρόκειται για ένα σύνολο από τεχνικές που έχουν σαν σκοπό, είτε να διαφοροποιήσουν και βελτιώσουν έναν οργανισμό (φυτό ή μικροοργανισμό) ως προς ένα ή περισσότερα χαρακτηριστικά, είτε να βελτιώσουν ένα τελικό προϊόν (Τσαπικούνης, 1999).

Κατά άλλους, βιοτεχνολογία είναι η ανάπτυξη μεθόδων με τις οποίες τα προϊόντα των ζώντων οργανισμών μπορεί να χρησιμοποιηθούν από τη βιομηχανία, τη γεωργία, τη δασοπονία καθώς και από την κηποτεχνία και την επιστήμη της αναπαραγωγής (φυτών και

ζώων). Το μέρος της βιοτεχνολογίας που σχετίζεται με τα φυτά είναι γνωστό ως βιοτεχνολογία φυτών, ή γεωργική βιοτεχνολογία.

Οι επιστήμες που συνθέτουν την γεωργική βιοτεχνολογία είναι κυρίως, η Γενετική Μηχανική, η Μοριακή Βιολογία, η Βιοχημεία, η Μικροβιολογία και η Ιστοκαλλιέργεια. Από όλες αυτές τις επιστήμες η ιστοκαλλιέργεια κατέχει εξέχουσα θέση, γιατί όλες οι άλλες επιστήμες, για την ολοκλήρωσή τους θα περάσουν απαραίτητα από το στάδιο της *in vitro* καλλιέργειας.

Αποτελεί επομένως, η ιστοκαλλιέργεια, την «αιχμή του δόρατος» των βιοτεχνολογικών εφαρμογών γενικότερα, σε παγκόσμιο επίπεδο (Κίντζιος, 1994).

Η *in vitro* κυτταροκαλλιέργεια και ιστοκαλλιέργεια ορίζεται σαν η δυνατότητα της αναγέννησης και του πολλαπλασιασμού των φυτών από μοναδικά κύτταρα, ιστούς και όργανα, υπό ασηπτικές συνθήκες και ελεγχόμενες περιβαλλοντολογικές συνθήκες (Murashige and Skoog, 1974).

Κατά άλλους η *in vitro* καλλιέργεια φυτικών ιστών, κυττάρων ή οργάνων είναι η απομόνωση, καλλιέργεια και ανάπτυξή τους σε θρεπτικό μέσο, κάτω από ασηπτικές και ελεγχόμενες συνθήκες φωτισμού, θερμοκρασίας, διατροφής κ.τ.λ.

Άρα η ιστοκαλλιέργεια είναι ένας όρος που χρησιμοποιείται για να υποδηλώσει την ασηπτική καλλιέργεια *in vitro* σε ένα ευρύ φάσμα αποκοπτομένων φυτικών τμημάτων. Ο όρος μικροπολλαπλασιασμός χρησιμοποιείται ειδικά και αναφέρεται στην εφαρμογή των τεχνικών ιστοκαλλιέργειας για τον πολλαπλασιασμό φυτών, ξεκινώντας από πολύ μικρά φυτικά τμήματα, που αναπτύσσονται υπό ασηπτικές συνθήκες και καθορισμένο περιβάλλον, σ' ένα δοκιμαστικό σωλήνα ή άλλο περιέκτη.

Στην πράξη, πολλοί ερευνητές χρησιμοποιούν τους όρους μικροπολλαπλασιασμό και ιστοκαλλιέργεια εναλλακτικά, με την έννοια κάθε φυτικής πολλαπλασιαστικής διαδικασίας υπό ασηπτικές συνθήκες. Ένας συνώνυμος όρος είναι η *in vitro* καλλιέργεια.

In vitro κυριολεκτικά σημαίνει «στο γυαλί», και αναφέρεται, μ'έναν γενικό τρόπο, στα εργαστηριακά γυάλινα δοχεία (περιέκτες), όπου έχουν συχνά εγκατασταθεί οι καλλιέργειες. Αυτά τα υάλινα δοχεία έχουν σήμερα αντικατασταθεί από νέα υλικά, όπως δοχεία πολυαιθυλενίου, πλαστικά τρυβλία Petri κ.α.

Ο μικροπολλαπλασιασμός και η ιστοκαλλιέργεια ξεκινούν με την αποκοπή ενός μικρού φυτικού τμήματος, την εξυγίανσή του από μικροοργανισμούς και την τοποθέτησή του υπό ασηπτικές συνθήκες. Ο χρησιμοποιούμενος όρος για τα φυτικά τμήματα εκκίνησης της *in vitro* διαδικασίας είναι **έκφυτα** και ανταποκρίνεται σε άλλα πολλαπλασιαστικά σώματα, όπως μοσχεύματα, καταβολάδες, εμβόλια ή σπόροι.

Οι *in vitro* καλλιέργειες ποικίλουν ανάλογα α) με τη δομή και οργάνωση των παρόντων κυττάρων και ιστών στο έκφυτο από το οποίο έγινε η αρχική εγκατάσταση της καλλιέργειας β) με τη σύνθεση του θρεπτικού υποστρώματος και γ) με τις συνθήκες ανάπτυξης.

1.2.1. ΤΥΠΟΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ-ΣΤΑΔΙΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.

Κατά τον Pierik (1987), υπάρχουν οι εξής τύποι καλλιιεργειών φυτικών ιστών και κυττάρων *in vitro*:

1. Καλλιέργεια ολόκληρων φυτών. Ένας σπόρος μπορεί να σπαρεί *in vitro*, από τον οποίο θα αναπτυχθεί ένα σπορόφυτο και τελικά ένα ολόκληρο φυτό όπως π.χ. συμβαίνει με τα ορχιδοειδή.

2. Καλλιέργεια εμβρύων. Ένα έμβρυο απομονώνεται από ένα σπόρο, και αναπτύσσεται σε ένα θρεπτικό υπόστρωμα.

3. Καλλιέργεια οργάνων. Ένα φυτικό όργανο, όπως μερίστωμα, κορυφή βλαστού, κορυφή ρίζας ή ανθήρας, απομονώνεται και καλλιεργείται *in vitro*. Ένα τμήμα από ένα φυτό (κομμάτι ιστού, όργανο) το οποίο έχει απομονωθεί από ένα φυτό, αναφέρεται σαν έκφυτο (explant).

4. Καλλιέργεια κάλου. Αν ένας διαφοροποιημένος ιστός απομονωθεί και καλλιεργηθεί *in vitro* παράγεται μια μάζα αδιαφοροποίητων κυττάρων που ονομάζεται κάλος. Στη συνέχεια, με κατάλληλες μεθόδους καλλιέργειας, παράγονται φυτά.

5. Καλλιέργεια κυττάρων. Είναι η καλλιέργεια μεμονωμένων κυττάρων (που λαμβάνονται από έναν ιστό ή κάλο) σε πηκτή αγαρόζης ή σε υγρά διαλύματα με μορφή αιωρημάτων.

6. Καλλιέργεια πρωτοπλαστών. Οι πρωτοπλάστες αυτοί λαμβάνονται από κύτταρα, μετά από μηχανική ή ενζυμική καταστροφή του κυτταρικού τοιχώματος και καλλιεργούνται για την δημιουργία υβριδίων, την εισαγωγή στον πρωτοπλάστη «ξένου» γενετικού υλικού κ.α.

7. Σωματική εμβρυογένεση. Έμβρυα παράγονται *in vitro*, από σωματικά κύτταρα και στην συνέχεια με κατάλληλους μεθόδους παράγονται φυτά.

Επίσης σύμφωνα με άλλους ερευνητές, οι *in vitro* καλλιέργειες φυτικών ιστών και κυττάρων ανωτέρων φυτών διακρίνονται σε:

-Οργανωμένες.

-Μη οργανωμένες.

-Μη οργανωμένες/οργανωμένες.

1. Οργανωμένες. Η καλλιέργεια ολόκληρων φυτών (έμβρυα, σπόροι) και η καλλιέργεια οργάνων ανήκουν σ' αυτόν τον τύπο καλλιεργειών *in vitro*. Η χαρακτηριστική οργανωτική δομή του φυτού ή του μεμονωμένου οργάνου διατηρείται και η καλλιέργεια μοιάζει με *in vivo* αγενή πολλαπλασιασμό μοσχευμάτων, υπόγειων βλαστών κ.τ.λ.
2. Μη οργανωμένες. Αν τα κύτταρα και ή οι ιστοί που απομονώνονται από ένα οργανωμένο μέρος του φυτού, αποδιαφοροποιούνται καλλιεργούμενα *in vitro* και προκύπτει μια μη οργανωμένη μάζα κυττάρων (κάλος). Αν ο κάλος διασπασθεί προκύπτουν ομάδες κυττάρων (aggregates) και ή μεμονωμένα κύτταρα. Αυτά επωάζονται είτε σαν καλλιέργεια εν αιωρήσει (suspension culture) ή σε ημιστερεά διαλύματα και παράγονται τέλεια φυτά.

Η μη οργανωμένη αναπαραγωγή φυτικών ιστών και κυττάρων υποκινείται κυρίως με την χρήση πολύ υψηλών συγκεντρώσεων αυξίνης και/ή κυτοκινίνης στο θρεπτικό υπόστρωμα.

Η γενετική σταθερότητα των μη οργανωμένων καλλιεργειών είναι συχνά χαμηλή.

3. Μη οργανωμένες/οργανωμένες. Αυτός ο τύπος των καλλιεργειών είναι ενδιάμεσος μεταξύ των δυο προηγούμενων τύπων. Κύτταρα από ένα απομονωμένο όργανο ή ιστό, πρώτα αποδιαφοροποιούνται και μετά σχηματίζουν με διαίρεση, ιστούς ή ένα στρώμα κάλου από τα οποία αναπτύσσονται διάφορα όργανα (ρίζες ή βλαστοί) ή ακόμα και ολόκληρα φυτά (έμβρυα ή προέμβρυα). Πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι οργανωμένοι ιστοί μπορεί να αναπτυχθούν από μη οργανωμένες καλλιεργείες με τη χρήση ειδικών τεχνικών ή εντελώς τυχαία. Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις οι απόγονοι δεν είναι συχνά ακριβώς όμοιοι με το αρχικό φυτικό υλικό.

Η *in vitro* παραγωγή φυτών, τέλος μπορεί να διακριθεί σε πέντε στάδια:

Στάδιο 0 : Προετοιμασία/επεξεργασία μητρικού φυτού.

Στάδιο I : Απομόνωση εκφύτου –επαγωγή καλλιέργειας.

Στάδιο II : Πολλαπλασιασμός κάλου/ιστού.

Στάδιο III : Αναγέννηση ολόκληρων φυτών (διακρίνονται ενδιάμεσα πιθανά στάδια βλαστογέννησης/ριζογέννησης).

Στάδιο IV : Εγκλιματισμός των φυτών πριν την υπαίθρια φύτευση τους.

1.3. ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ-ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΩΝ IN VITRO

ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ.

Οι πρακτικές εφαρμογές της τεχνικής της καλλιέργειας φυτικών ιστών σήμερα είναι πολλές, κυριότερες των οποίων είναι ο αγενής πολλαπλασιασμός των φυτών, η παραγωγή απλοειδών φυτών για τις ανάγκες της βελτίωσης των φυτών, η παραγωγή φυτικών φαρμακευτικών ουσιών, καθώς και η αντιμετώπιση ασθενειών των φυτών (παραγωγή υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού απαλλαγμένου από ιώσεις).

Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της ιστοκαλλιέργειας έναντι των συμβατικών μεθόδων πολλαπλασιασμού των φυτών ακολουθούν αναλυτικά παρακάτω και είναι:

1.Η κλωνική αναπαραγωγή των μητρικών φυτών, δηλαδή η παραγωγή γενετικά όμοιων φυτών απογόνων, κυρίως όταν χρησιμοποιούνται μεριστωματικά έκφυτα.

2.Η αυξημένη παραγωγή φυτών σε σύντομο χρονικό διάστημα. Έτσι με καλλιέργεια ενός και μόνο εκφύτου μπορούν να παραχθούν, με συνεχείς υποκαλλιέργειες, πολλές εκατοντάδες χιλιάδες φυτά ετησίως.

3.Η εξοικονόμηση χώρου. Έτσι εργαστηριακός χώρος 100 τετραγωνικών μέτρων είναι αρκετός για την παραγωγή ενός εκατομμυρίου φυτών ετησίως, ενώ θα απαιτείτο υπερπολλαπλάσιος χώρος (πολλά στρέμματα), για συμβατική παραγωγή στο χωράφι ή το θερμοκήπιο.

4.Η αποδέσμευση της παραγωγής από εξωτερικές περιβαλλοντολογικές συνθήκες και περιορισμούς και παραγωγή φυτικού υλικού όλο τον χρόνο, επειδή όλη η διαδικασία της ιστοκαλλιέργειας πραγματοποιείται σε κλειστό εργαστηριακό χώρο.

5.Η παραγωγή άνοσου φυτικού υλικού, κυρίως όσον αφορά τις ιώσεις. Αυτό προϋποθέτει: (1) την καλλιέργεια μεριστωμάτων ή τη παραγωγή σωματικών εμβρύων, κυρίως επειδή τα δυο αυτά είδη οργάνων έχουν μειωμένη ή και μηδενική αγγειακή σύνδεση με τους μητρικούς ιστούς και επομένως είναι θεωρητικά απαλλαγμένα από τις ιώσεις, που έχουν προσβάλλει τους τελευταίους και (2) την εφαρμογή θερμοθεραπείας ή και χημειοθεραπείας, για την εξάλειψη παθογόνων (κυρίως ιών και βακτηρίων), που κατ' εξαίρεση υφίστανται στα μεριστώματα και τα σωματικά έμβρυα και συνήθως απαντώνται στα υπόλοιπα έκφυτα.

6.Για πολλά φυτικά είδη (κυρίως γλαστρικά και κηποτεχνικά), ο μικροπολλαπλασιασμός εξακολουθεί να είναι μοναδική μέθοδος πολλαπλασιασμού.

7. Η διατήρηση φυτικών ειδών σε **τράπεζα γενετικού υλικού**. Έτσι μπορούμε να διατηρήσουμε σε περιορισμένο χώρο, το γενετικό υλικό, πολλών ποικιλιών και κλώνων, χωρίς να υπάρχει η ανάγκη να περάσουμε από τον αγρό.

8. Διάφορες *in vitro* τεχνικές χρησιμοποιούνται για **γενοτυπικό μετασχηματισμό** (βελτίωση φυτών), **παραγωγή βιοχημικών προϊόντων** και άλλες εφαρμογές (π.χ με καλλιέργεια ανθήρων για παραγωγή απλοειδών φυτών, συγχώνευση πρωτοπλαστών για δημιουργία πολυπλοειδικών φυτών κ.τ.λ.).

Ωστόσο η ιστοκαλλιέργεια παρουσιάζει και μειονεκτήματα σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους και τα σπουδαιότερα τεχνικά προβλήματα είναι τα εξής:

1. **Η εκτεταμένη μόλυνση** των καλλιεργειών, σε διάφορα στάδια της παραγωγής, από διάφορα παθογόνα, ειδικά όταν δεν τηρούνται οι απαιτούμενες συνθήκες υγιεινής.

2. **Η υαλοποίηση** των *in vitro* αναγεννώμενων φυτών, δηλαδή η υπερυδρωτική παραμόρφωση αυτών λόγω των ειδικών συνθηκών της *in vitro* ανάπτυξης.

3. **Η χαμηλή βιωσιμότητα** των *in vitro* παραχθέντων φυτών, η οποία μπορεί και να μην υπερβαίνει το 50% και οφείλεται κυρίως στην δυσκολία προσαρμογής ορισμένων φυτικών ειδών κατά τη μετάβαση από την ετεροτροφική ανάπτυξη (*in vitro*), στην αυτοτροφική (φυσική). Η προσαρμογή αυτή απαιτεί μια διαδικασία εγκλιματισμού των φυτών *ex vitro*, δηλαδή σε μη ασηπτικές συνθήκες με έλεγχο της υγρασίας και της θερμοκρασίας. Ο εγκλιματισμός των φυτών μπορεί να συνδυαστεί και με τη ριζοβολία αυτών, εάν αυτή δεν έχει ήδη επιτευχθεί *in vitro*.

4. **Η μη κλωνική αναπαραγωγή** του μητρικού υλικού, κυρίως όταν δεν χρησιμοποιούνται μεριστωματικά έκφυτα (σωμακλωνική παραλλακτικότητα).

5. **Η μη επιτυχής αναγέννηση** πλήρων φυτών από έκφυτα ορισμένων φυτικών ειδών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.

2.1.ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ-ΣΥΣΚΕΥΕΣ.

Για την εφαρμογή των τεχνικών της ιστοκαλλιέργειας είναι απολύτως απαραίτητες οι παρακάτω συσκευές: pHμετρα, θερμαντικές πλάκες, λύχνοι (διαφόρων τύπων), ζυγοί ακριβείας, συσκευές απιονισμού και απόσταξης του νερού, ανατομικές λεπίδες και βελόνες, διάφορα χημικά στοιχεία (ιόντα και ανιόντα στοιχείων, οινόπνευμα, φυτορμόνες κ.τ.λ.), καρτσάκια μεταφοράς, διάφορα όργανα εργαστηρίου (σιφόνια, ογκομετρικά δοχεία, προχοίδες, φιάλες κ.τ.λ.), διαφόρων ειδών (πλαστικά, υάλινα) και χωρητικοτήτων. Επίσης χρειάζεται ένας κλίβανος υγρής αποστείρωσης, στερεοσκόπια και μικροσκόπιο, φωτογραφικές μηχανές, φυγόκεντρος χαμηλής ταχύτητας, ασηπτική τράπεζα ή θάλαμος νηματικής ροής αέρα (laminar air flow cabinet), ψυγεία και καταψύκτες, φούρνος ξηρής αποστείρωσης, και τέλος θάλαμοι επώασης.

2.2.ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΕΙΣ.

Για την πραγματοποίηση των μεθόδων του μικροπολλαπλασιασμού απαιτούνται κατάλληλες εγκαταστάσεις με τον απαραίτητο εξοπλισμό κάθε φορά . Η μονάδα πρέπει να είναι ξεχωριστή και με ανεξάρτητη είσοδο από τα φυτώρια και τα θερμοκήπια, που είναι απαραίτητα για την αύξηση των φυτών σε εδαφικές συνθήκες, ώστε να αποφεύγεται η μόλυνση των θαλάμων καλλιέργειας. Η όλη μονάδα μπορεί να διακριθεί σε τρεις περιοχές: προετοιμασίας, μεταφοράς και αύξησης.

Η **περιοχή προετοιμασίας** αποτελείται από χώρους καθαρισμού και αποστείρωσης των υαλικών, προετοιμασίας και αποστείρωσης των θρεπτικών μέσων και χώρους αποθήκευσης των υαλικών, χημικών ουσιών και διαφόρων προμηθειών. Η αποστείρωση των υαλικών γίνεται στους κλιβάνους ή φούρνους (θερμοκρασία άνω των 200 °C) και των θρεπτικών μέσων στις συσκευές υγρής αποστείρωσης, σε θερμοκρασία 121 °C ή σε συνηθισμένες χύτρες ταχύτητας.

Συχνά, τα θρεπτικά μέσα διανέμονται πριν από την αποστείρωσή τους στα δοχεία ή σωλήνες καλλιέργειας και κλείνονται αεροστεγώς με διαφανές ανθεκτικό περιτύλιγμα, αποστειρώνονται όλα μαζί και δεν ανοίγονται πλέον πριν μεταφερθούν στην τράπεζα νηματικής ροής (στην επόμενη περιοχή). Άλλος βασικός εξοπλισμός της περιοχής προετοιμασίας είναι τα ψυγεία για την διατήρηση των χημικών μέσων, ζυγοί, pHμετρα,

φίλτρα αποστείρωσης, συσκευή απιονισμού του νερού κ.τ.λ. Ο βαθμός καθαρότητας στην περιοχή προετοιμασίας είναι εφάμιλλος με καλά οργανωμένο νοσοκομείο.

Η **περιοχή μεταφοράς** είναι ένας σχολαστικά αποστειρωμένος χώρος όπου γίνεται η μεταφορά των εκφύτων στο θρεπτικό τους υπόστρωμα ή η επιλογή των πολλαπλασιαστικών φυταρίων και η επανατοποθέτησή τους σε υποκαλλιέργειες. Η εργασία της μεταφοράς πραγματοποιείται σε τράπεζα νηματικής ροής και δίπλα από φλόγα οξυπνεύματος ή λύχνου bunsen, από την οποία διέρχονται τακτικά η λαβίδα και τα στόμια των σωλήνων καλλιέργειας.

Η τράπεζα νηματικής ροής είναι πάγκος εργασίας κλειστός σε όλες του τις πλευρές εκτός της μπροστινής. Από την πίσω πλευρά του διοχετεύεται φιλτραρισμένος και αποστειρωμένος αέρας, ο οποίος παρασύρει προς τα έξω τα σπόρια μυκήτων και άλλων οργανισμών που ενδεχόμενα αιωρούνται στον αέρα, ώστε να μην πέφτουν στα έκφυτα και στα δοχεία καλλιέργειας, τα οποία ανοίγονται σ' αυτόν τον χώρο (Εικ.1).

Ό,τι υπάρχει και ό,τι χρησιμοποιείται εδώ μέσα (οριζόντια και πλευρικές επιφάνειες της τράπεζας, λαβίδες, νυστέρια, δοχεία, εργαστηριακές μπλούζες κ.τ.λ.) είναι αποστειρωμένο ή απολυμασμένο, όπως σε χειρουργείο. Το προσωπικό που εργάζεται πρέπει να φοράει γάντια, μάσκα προσώπου, δίκτυα μαλλιών, μπλούζες κ.τ.λ.

Εικ.1. Τράπεζα νηματικής ροής, περιοχή μεταφοράς.



Εικ.2. Κατακόρυφος θάλαμος αύξεσης (επώασης), των φυτών μονόθυρος, περιοχή αύξεσης.



Η **περιοχή αύξησης** (Εικ.2.) είναι θάλαμοι καλλιέργειας με ελεγχόμενες συνθήκες φωτισμού, θερμοκρασίας και υγρασίας, όπου τοποθετούνται οι περιέκτες με τα έκφυτα για να μεγαλώσουν. Αν και για κάθε φυτικό είδος απαιτούνται ειδικές συνθήκες, γενικά ο φωτισμός κυμαίνεται από 1000 έως 10000 Lux και φωτοπερίοδο 16h φώς και 8h νύχτα. Οι συνηθισμένες τιμές θερμοκρασίας είναι 21 °C έως 30 °C και της σχετικής υγρασίας 30 έως 50%. Συχνά, τα δοχεία καλλιέργειας τοποθετούνται πλάγια για να δημιουργούν μεγαλύτερη επιφάνεια του θρεπτικού μέσου, αλλά και να δέχονται περισσότερο και πιο ομοιόμορφα το φως.

2.3.ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΜΕΣΑ.

Όπως και τα φυτά που μεγαλώνουν σε εδαφικές συνθήκες, έτσι και τα ασηπτικά καλλιεργούμενα για να αναπτυχθούν χρειάζονται κύρια στοιχεία (N,P,K,Fe,Mg) και ιχνοστοιχεία (Mn,Cu,Zn,B,Mo,Ca,Na,S), τα οποία προστίθενται στο θρεπτικό υπόστρωμα με την μορφή ανόργανων αλάτων. Χρειάζονται επίσης υδρογόνο και οξυγόνο με τη μορφή του νερού, καθώς και αέριο οξυγόνο. Σε αντίθεση όμως με τα φυτά που αναπτύσσονται στο φως, επιπρόσθετα χρειάζονται άνθρακα σε οργανική μορφή (που προσφέρεται συνήθως ως σάκχαρο), αμινοξέα, βιταμίνες και αυξητικές ορμόνες. Με άλλα λόγια, ενώ τα φυτά στην φύση είναι στην πλειοψηφία τους **αυτότροφα**, τα φυτά των ασηπτικών καλλιεργειών είναι **ετερότροφα**. Σήμερα χρησιμοποιούνται έτοιμα παρασκευασμένα γνωστά θρεπτικά υποστρώματα (π.χ. MS κ.α.). Στον πίνακα 1, φαίνεται η σύνθεση των πέντε πιο γνωστών θρεπτικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιούνται στην ιστοκαλλιέργεια.

Πιν.1. Σύνθεση των πέντε πιο γνωστών θρεπτικών υποστρωμάτων, που χρησιμοποιούνται στην ιστοκαλλιέργεια.

Χημική Ένωση	Murashige & Skoog,(MS), 1962.	Woody Plant Medium(WPM)	Camborg et al. B5 (1968)	Lismajer & Skoog(LS) 1965	White S-3 (1934)
	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΣΕ mg/l				
AlCl ₃	-	-	-	-	-
CaCl ₂ 2H ₂ O	440	96	150	440	-
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	-	550,6	-	-	300
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,025	-	0.025	0,025	-
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025	0.025	0.025	0.025	-
FeCl ₃ 6H ₂ O	-	-	-	-	-
Fe ₂ (SO ₄) ₃	-	-	-	-	2.5
Fe ₂ SO ₄ 7H ₂ O	27.8	20.78	-	27.8	-
H ₃ BO ₃	6.2	6.2	3	6.2	1.5
KCl	-	-	-	-	65
KH ₂ PO ₄	170	170	-	170	68
KI	0.83	-	0.75	0.83	0.75
K ₂ SO ₄	-	990	-	-	-
KNO ₃	1900	-	2500	1900	80
MgSO ₄ 7H ₂ O	370	370	246	370	720
MnSO ₄ H ₂ O	-	20.23	10	16.897	-
MnSO ₄ 4H ₂ O	22.3	-	-	-	7
NaH ₂ PO ₄ anhydr	-	-	-	-	16.5
NaH ₂ PO ₄ H ₂ O	-	-	150	-	-
NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O	-	-	-	-	-
NaNO ₃	-	-	-	-	-
Na ₂ EDTA	37.3	37.3	-	-	-
Na ₂ EDTA 2H ₂ O	-	-	-	37.25	-
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.25	0.25	0.25	0.25	-
Na ₂ SO ₄	-	-	-	-	200
NH ₄ NO ₃	1650	400	-	1650	-
(NH ₄) ₂ SO ₂	-	-	134	-	-
NiCl ₂ 6H ₂ O	-	-	-	-	-
Zn SO ₄ 7H ₂ O	8.6	8.6	2	10.58	3
Μυο-ινοσιτόλη	100	100	100	100	-
Νικοτινικό οξύ	0.50	0.5	1	0.50	0.5
Παντοθενικό οξύ	-	-	0.4	-	1
Υδροχλωρική πυριδοξίνη	0.50	0.5	1	0.50	0.1
Ριβοφλαβίνη	-	-	0.015	-	-
Υδροχλωρική θειαμίνη.	0.1	0.1	10	0.1	0.1
Γλυκίνη	0.2	0.2	-	0.2	3
ΦΥΤΟΡΜΟΝΕ Σ	Κατά περίπτωση.	Κατά Περίπτωση	Κατά Περίπτωση	Κατά περίπτωση.	Κατά περίπτωση.

2.4. ΦΥΤΟΡΡΥΘΜΙΣΤΙΚΕΣ ΟΥΣΙΕΣ.

Κάποιες χημικές ουσίες που υπάρχουν φυσικά σε φυτικούς ιστούς (ενδογενώς) έχουν ένα ρυθμιστικό, παρά ένα θρεπτικό ρόλο, στην αύξηση και στην ανάπτυξη.

Αυτές οι ενώσεις, οι οποίες είναι γενικά ενεργές σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, είναι γνωστές σαν φυτικές ουσίες της ανάπτυξης (ή φυτορμόνες). Οι συνθετικές χημικές ενώσεις με παρόμοιες φυσιολογικές δράσεις στην φυτική ανάπτυξη, ή κάποιες ενώσεις που έχουν την ικανότητα να τροποποιούν την φυτική ανάπτυξη με κάθε έννοια, συνήθως αναφέρονται ως φυτικοί ρυθμιστές της αύξησης. Μερικοί ρυθμιστές της αύξησης παρασκευάζονται συνθετικά ή μέσω διαδικασιών ζυμώσεως. Όταν αυτά τα χημικά προστίθενται σε υποστρώματα ιστοκαλλιέργειας, ορίζονται ως ρυθμιστές της αύξησης, οι οποίοι προστίθενται εξωγενώς (εκτός των φυτικών ιστών).

Υπάρχουν αρκετές αναγνωρισμένες κατηγορίες φυτικών ουσιών της αύξησης, όπως:

- Αυξίνες,
- Κυτοκινίνες,
- Γιββεριλλίνες,
- Αιθυλένιο,
- Αμπσισικό οξύ.

Οι αυξίνες και οι κυτοκινίνες, είναι επί μακρόν, οι πιο σημαντικές απ' αυτές για τον καθορισμό της αύξησης και μορφογένεσης στην ιστοκαλλιέργεια και καλλιέργεια οργάνων. Σε δεύτερη μοίρα έρχονται οι γιββεριλλίνες, οι οποίες χρησιμοποιούνται σε κάποιες περιπτώσεις. Παρακάτω θα γίνει περιγραφή μόνο των αυξινών και των κυτοκινινών, γιατί αυτές είναι οι κύριες κατηγορίες που μας ενδιαφέρουν.

Κάποιες ενώσεις ονομάζονται αυξίνες εφόσον είναι ικανές να επηρεάζουν μερικές διακριτές διαδικασίες, όπως η αύξηση των και η επιμήκυνση των κυττάρων των βλαστικών κορυφών και η δράση τους είναι παρόμοια με εκείνης του φυσικού IAA. Τέτοιες ενώσεις είναι το 2,4-D, το IBA, το NAA, κ.α. (περισσότερες λεπτομέρειες δίδονται στον πιν.2.)

In vivo οι αυξίνες συμβάλλουν στην έναρξη της κυτταρικής διαίρεσης και εμπλέκονται στην προέλευση των μεριστωμάτων, δίνοντας αύξηση είτε σε ανοργάνωτους ιστούς ή σε ορισμένα όργανα. *In vitro* (ως πρόσθετα στο θρεπτικό υπόστρωμα) διεγείρουν τον σχηματισμό τυχαίων ριζών και παρεμποδίζουν το σχηματισμό οφθαλμών-βλαστών.

Σε οργανωμένους ιστούς οι αυξίνες είναι υπεύθυνες για την συντήρηση της κυριαρχίας του επάκριου οφθαλμού.

Τα επίπεδα των φυσικά υπαρχόντων αυξινών στα έκφυτα βρέθηκε να εξαρτώνται από το μητρικό φυτό από το οποίο τα έκφυτα πάρθηκαν. Η ηλικία του μητρικού φυτού, οι συνθήκες υπό τις οποίες αναπτυσσόταν και η εποχή του χρόνου την οποία πάρθηκαν τα έκφυτα, μπορεί να επηρεάζουν αυτά τα επίπεδα.

Οι αυξίνες πιστεύεται ότι προωθούν την ανάπτυξη των φυτικών ιστών με δύο τρόπους:

1. Παρακινώντας την έκκριση ιόντων υδρογόνου εντός και διαμέσου του κυτταρικού τοιχώματος. Η δέσμευση των αυξινών οδηγεί στην διάλυση των λιπιδίων, διάταση του τοιχώματος και αύξηση της περατότητας του. Ιόντα καλίου περνούν έτσι το κυτταρικό τοίχωμα, για να εξουδετερώσουν την ηλεκτρική αγωγιμότητα των ιόντων υδρογόνου H^+ (πρωτονίων) και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση του υδατικού δυναμικού του κυττάρου και έτσι νερό εισέρχεται (λόγω διαφοράς οσμωτικού δυναμικού) και το κύτταρο επεκτείνεται. Αυτή η εξήγηση είναι κυρίως αποδεκτή από την γρήγορη διέγερση της αύξησης που επιτελούν οι αυξίνες.
2. Από μια επίδραση στον μεταβολισμό του RNA (και την περαιτέρω πρωτεϊνική σύνθεση), πιθανώς επηρεάζοντας την μεταγραφή ειδικών μορίων αγγελιοφόρων RNA (mRNA). Τα mRNA πιστεύεται ότι κωδικοποιούν πρωτεΐνες που απαιτούνται για να υποστηρίξουν την ανάπτυξη.

Οι κυτταροκινίνες (κυτοκινίνες) είναι ως επί το πλείστον παράγωγα της αδενίνης και έχουν μεγάλη σχέση με την *in vitro* κυτταροδιαίρεση, καθώς και τον αναπολλαπλασιασμό (proliferation) των μεριστωμάτων. Αυτές είναι η Ζεατίνη, η 2iP, και η συνθετική BAP (βλέπε πίνακα 2).

Στην ιστοκαλλιέργεια οι κυτοκινίνες φαίνεται να είναι αναγκαίες για την κυτταρική διαίρεση. Στην απουσία τους η μετάφαση, αλλά όχι η πρόφαση της μίτωσης, μακραίνει χρονικά σημαντικά, και έχει υποτεθεί ότι οι κυτοκινίνες απαιτούνται για να ρυθμίσουν την σύνθεση μιας πρωτεΐνης, που εμπλέκεται στον σχηματισμό και την λειτουργία του μιτωτικού ατρακτοειδούς μηχανισμού.

Οι κυτοκινίνες είναι επίσης πολύ δραστικές στην προώθηση του άμεσου ή έμμεσου σχηματισμού βλαστών. Χρησιμοποιούνται για αυτόν τον σκοπό σε συνδυασμό με αυξίνες. Μία ισορροπία μεταξύ αυξινών και κυτοκινινών κανονικά δίνει την πιο ικανοποιητική οργανογένεση.

Έτσι οι κυτοκινίνες, ιδιαίτερα σε μικρές συγκεντρώσεις και σε συνδυασμό με τις αυξίνες, προάγουν την κυτταρική διαίρεση, ενώ σε λίγο μεγαλύτερες δόσεις (1-10mg/l) προκαλούν τον σχηματισμό τυχαίων βλαστών και αναστέλλουν τον σχηματισμό ριζών. Επίσης προάγουν την ανάπτυξη των μασχαλιαίων βλαστών αναστέλλοντας την κυριαρχία της κορυφής και καθυστερούν την γήρανση.

Παρά την *in vivo* ύπαρξη ενδογενών ρυθμιστών της αύξησης σε όλο το φυτό, πολλοί ιστοί ή μικρά φυτικά όργανα απομονωμένα *in vitro* είναι ανίκανα να συνθέσουν ικανά ποσά από αυτές τις ουσίες, για να προκαλέσουν την αύξηση. Αυτό συμβαίνει ιδιαίτερα στα δικοτυλήδονα φυτά και ως εκ τούτου είναι συχνά απαραίτητη η προσθήκη στο θρεπτικό υπόστρωμα μιας κυτοκινίνης, σε μικρές συγκεντρώσεις.

Η περίπου αντίθετη δράση των αυξινών και των κυτοκινίνων έχει τεράστια σημασία για τα συστήματα μικροπολλαπλασιασμού γιατί παρέχουν ένα αποτελεσματικό μέσο στη διάθεση των ερευνητών να ρυθμίζουν κατά βούληση την επαγωγή της μορφογένεσης, δηλαδή να κατευθύνουν το σχηματισμό βλαστών ή ριζών (ή κάλων και εμβρύων ακόμα). Γι αυτό οι *in vitro* καλλιέργειες είναι σχεδόν αδύνατες χωρίς τους ρυθμιστές της αύξησης.

Οι απαιτήσεις όμως των διαφόρων φυτών σε ρυθμιστές είναι κατά πολύ διαφορετικές διότι υπάρχουν είδη που παράγουν από μόνα τους επαρκείς ποσότητες αυξίνης ή κυτοκινίνης και δεν χρειάζονται επιπλέον ποσά.

Έχει δειχθεί ότι εκείνο το οποίο έχει μεγαλύτερη σημασία είναι η σχετική αναλογία των φυτορμονών, παρά η ακριβής ποσότητα τους.

Πιν.2. Κύρια χαρακτηριστικά των φυτορμονών (φυσικά-χημικά), που χρησιμοποιούνται στην *in vitro* καλλιέργεια.

ΟΝΟΜΑ	ΣΥΝ/ΣΗ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ.	ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑ.	ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ.	ΦΥΛΑΞΙΣ	ΧΗΜΙΚΟΣ ΤΥΠΟΣ.	ΜΟΡΙΑΚΟ ΒΑΡΟΣ.
ΑΥΞΙΝΕΣ							
3-Ινδολυλοξικό οξύ	IAA	Φυσική	Λίγο διαλυτή σε νερό, διαλυτή σε αιθανόλη 96%.	Αποσυντίθεται παρουσία φωτός.	Σε ψύξη και σε σκοτάδι.	C ₁₀ H ₉ NO ₂	175,18
Ινδολυλοβουτυρικό οξύ	IBA	Συνθετική	Διαλυτή σε αιθανόλη 96%.	Σταθερή και στους 120 °C	Σκοτάδι 4-5 °C ή κατάψυξη	C ₁₂ H ₁₃ NO ₂	203,23
α-Ναφθαλινοξικό οξύ	NAA	Συνθετική	Διαλυτή σε αιθανόλη, σε νερό στους 20 °C, 250mg/l.	Σταθερή και στους 120 °C.	Σκοτάδι 4-5 °C ή κατάψυξη	C ₁₂ H ₁₀ O ₂	186,21
2,4 Διχλωροφαινοξικό οξύ	2,4-D	Συνθετική	Λίγο διαλυτή σε νερό, διαλυτή σε αιθανόλη 96%.	Σταθερή και στους 120 °C.	Σκοτάδι 4-5 °C ή κατάψυξη	C ₈ H ₆ Cl ₂ O ₃	221,04
ΚΥΤΟΚΙΝΙΝΕΣ							
6-Φουρφουραμινι πουρίνη ή Κινετίνη	KIN ή FAP	Συνθετική	Διαλυτή σε NaOH 1N ή HCl 1N.	Σταθερή και στους 120 °C.	Σκοτάδι 4-5 °C ή κατάψυξη	C ₁₃ H ₁₇ N ₅	215,2
6-Βενζυλαμινοπουρίνη ή Βενζυλαδενίνη	BAP ή BA	Συνθετική	Διαλυτή σε NaOH 1N ή HCl 1N.	Σταθερή και στους 120 °C.	Σκοτάδι 4-5 °C ή κατάψυξη	C ₁₂ H ₁₁ N ₅	225,3
Ζεατίνη	Z	Φυσική	Διαλυτή σε NaOH 1N ή HCl 1N.	Σταθερή και στους 120 °C.	Σκοτάδι 4-5 °C ή κατάψυξη	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O	219,2
ΓΙΒΒΕΡΙΛΛΙΝΕΣ							
A-3 Γιββερελικό οξύ	GA3	Φυσική	Διαλυτή σε αιθανόλη, μέτρια διαλυτή σε νερό.	Λίγο σταθερή, αποσυντίθεται σε υψηλές θερμοκρασίες.	Σκοτάδι 4-5 °C ή κατάψυξη	C ₁₉ H ₇ O ₆	346,4

2.5.ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ-ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗ.

Η επιτυχία μιας *in vitro* καλλιέργειας εξαρτάται πρωταρχικά από τον αποκλεισμό εισόδου στα θρεπτικά υποστρώματα των μικροοργανισμών (μυκήτων, βακτηρίων, ιών κ.α.). Οι μικροοργανισμοί, λόγω των άριστων συνθηκών ανάπτυξης που τους προσφέρουν οι *in vitro* καλλιέργειες και της μεγάλης τους ταχύτητας ανάπτυξης, σε σύντομο χρονικό διάστημα καλύπτουν τους φυτικούς ιστούς και τα θρεπτικά υποστρώματα και τα καταστρέφουν.

Οι παραπάνω λόγοι οδηγούν στο συμπέρασμα ότι στα εργαστήρια των ιστοκαλλιιεργειών, καθώς και σε όλα τα μέσα που χρησιμοποιούνται για την εφαρμογή των εργασιών, πρέπει να πληρείται απόλυτη καθαριότητα.

Η αποστείρωση γίνεται με διαφορετικά μέσα. Για παράδειγμα άλλες μέθοδοι ακολουθούνται για την αποστείρωση του εκφύτου, άλλες για τα σκεύη και ούτω καθεξής.

Έτσι η αποστείρωση των σκευών, των εργαλείων και των λοιπών μεταλλικών εργαλείων καθώς και των θρεπτικών υποστρωμάτων γίνεται σε κλιβάνους υγρής αποστείρωσης, με επίδραση υδρατμών θερμοκρασίας 121 °C για 15-20 λεπτά.

Η αποστείρωση του αέρα και του χώρου της τράπεζας εργασίας επιτυγχάνεται με την διέλευση του αέρα μέσω φίλτρων. Αυτά είναι ειδικά φίλτρα (με πολύ μικρούς πόρους) όπου παρακρατούνται οι μικροοργανισμοί και τα σπόριά τους.

Επίσης βασικός παράγοντας επιτυχίας είναι και η απολύμανση των φυτικών ιστών. Έτσι, επειδή τα ληφθέντα από την φύση φυτά έχουν μεγάλο μικροβιακό φορτίο, είναι απαραίτητη η καλύτερη απολύμανσή τους, πριν το πέρασμά τους στην ιστοκαλλιέργεια. Η απολύμανση των εκφύτων δεν μπορεί να γίνει σε υψηλές θερμοκρασίες, όπως προηγουμένως, γιατί θα καταστραφούν και οι φυτικοί ιστοί.

Αντί αυτού χρησιμοποιούνται στην πράξη απολυμαντικά επιφανείας, που δρουν σε χαμηλές θερμοκρασίες.

Τέτοια είναι τα διαλύματα του υποχλωριώδους νατρίου ή υποχλωριώδους ασβεστίου, το υπεροξείδιο του υδρογόνου, το βρωμιούχο νερό, ο νιτρικός άργυρος, ο χλωριούχος υδράργυρος, καθώς και διάφορα εμπορικά απορρυπαντικά που περιέχουν υποχλωρίτη όπως π.χ. η κοινή χλωρίνη κ.α.

Επειδή η δημιουργία και συνεχής τήρηση των ασηπτικών συνθηκών στις *in vitro* καλλιέργειες είναι βασικότατος παράγοντας επιτυχίας και συνιστά κύριο πρόβλημα σε πολλές μονάδες εφαρμογής της, είναι απαραίτητη η εξειδίκευση του προσωπικού που ασχολείται με αυτήν, καθώς και η σχολαστικότητα των εργασιών που απαιτούνται για την απολύμανση, σε

κάθε τομέα αυτής. Το ότι πρέπει να τηρείται καθαριότητα, εφάμιλλη και καλύτερη ενός χειρουργείου δεν είναι υπερβολή και συνιστά βασική παράμετρο της επιτυχίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3.

3.1. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ.

Η περιγραφή του φυτού της αμπέλου θεωρείται περιττή και μπορεί να ανατρέξει κανείς, σε οποιοδήποτε ανάλογο εγχειρίδιο αμπελοκομίας.

Στο πείραμα μας χρησιμοποιήθηκαν δύο αξιόλογες τοπικές ποικιλίες που καλλιεργούνται από πολύ παλιά στους αμπελώνες του νομού Μεσσηνίας και παρακάτω θα σταθούμε μόνο στην σύντομη περιγραφή τους.

-ΑΥΓΟΥΣΤΟΛΙΔΙ (Γουστολίδι, Βοστυλίδι, Βουστολίδι).

Χώρος καλλιέργειας: Πρώιμη λευκή ποικιλία καλλιεργούμενη στα Ιόνια νησιά, τη Μεσσηνία, την Αχαΐα, την Αιτωλοακαρνανία και την Πρέβεζα.

Φυτό : Είναι ζωηρό, γόνιμο, παραγωγικό, ευπαθές στον περονόσπορο και ανθεκτικό στην ξηρασία. Διαμορφώνεται σε κύπελλο και γραμμικό αμφίπλευρο κορδόνι (Roya) και δέχεται κλάδεμα κοντό στα 3 μάτια. Διαθέτει μεγάλη ικανότητα προσαρμογής σε διαφορετικούς τύπους εδαφών. Ξεκινά τη βλάστηση στα μέσα του Μάρτη και ωριμάζει τους καρπούς στα τέλη Αυγούστου με αρχές Σεπτεμβρη. Κάθε καρποφόρα κληματίδα φέρνει 1-3 σταφύλια, μέτρια προς μεγάλα, περίπου 300-350 gr περίπου, συνήθως διπλά, κυλινδρικά, κανονικής πυκνότητας. Οι ράγες είναι μικρές έως μέτριες, σφαιρικές, με φλοιό παχύ, κιτρινόχρυσου χρωματισμού, και σάρκα μαλακή, εύχυμη, στυφή, με δύο μέτρια γίγαρτα.

Προϊόν : Το γλέκος είναι πλούσιο σε σάκχαρα, μέτριας οξύτητας, και σχετικά χαμηλού αλκοολικού βαθμού. Το Αυγουστολίδι συμμετέχει στην παραγωγή ορισμένων Τοπικών οίνων (Πλαγές Αίνου, Ματζαβινάτων).

-ΚΟΛΛΙΝΙΑΤΙΚΟ (Ευγενικό).

Χώρος καλλιέργειας: Ερυθρή ποικιλία, ιδανική για την παραγωγή ποιοτικών κρασιών, καλλιεργούμενη στη Μεσσηνία και την Αρκαδία.

Φυτό : Είναι μέτρια ζωηρό, πολύ παραγωγικό, ανθεκτικό στον περονόσπορο και ευαίσθητο στο ωίδιο. Διαμορφώνεται σε κύπελλο και γραμμικό αμφίπλευρο κορδόνι(Roya) και δέχεται κλάδεμα κοντό στα δύο μάτια. Ωριμάζει τους καρπούς τέλος Σεπτεμβρη. Κάθε καρποφόρα κληματίδα φέρει δύο σταφύλια μεγάλα, που φτάνουν τα 400-600 gr, κωνικοκυλινδρικά, πυκνόραγα. Οι ράγες είναι μεσαίου μεγέθους, σφαιρικές, με φλοιό παχύ, ερυθρομέλανου χρωματισμού, και σάρκα άχρωμη, εύχυμη, γλυκιά με 3-4 μέτρια γίγαρτα.

Προϊόν: Το κρασί του Κολινιάτικου είναι υψηλού αλκοολικού τίτλου, καλής οξύτητας, πλούσιο σε χρώμα.

Εικ.3. Ποικιλία Αυγουστολίδι (λευκή).



Εικ.4. Ποικιλία Κολινιάτικο (ερυθρή).



3.2. ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΑΜΠΕΛΟΥ.

Το αμπέλι πολλαπλασιάζεται με σπόρους, μοσχεύματα, καταβολάδες και εμβολιασμό (ενοφθαλμισμό και εκκεντρισμό). Νέα φυτά έχουν επίσης παραχθεί από αρκετές *in vitro* τεχνικές, μέσω βλαστογένεσης ή σωματικής εμβρυογένεσης.

Οι μέθοδοι του πολλαπλασιασμού της αμπέλου, έχουν εκμοντερνιστεί με την χρήση α) της δεικτοδότησης γιαλώσεις (indexing) για παραγωγή αμόλυντου φυτικού υλικού, β) της τεχνικής της υδρονέφωσης και γ) γρήγορων διαδικασιών εμβολιασμού με μηχανές. Η ευρύτερη εμπορική αναπαραγωγική διαδικασία συντελείται με μοσχεύματα σκληρού ξύλου. Για τύπους σταφυλιών που ριζοβολούν δύσκολα, όπως τα Muscadine (*Vitis rotifolia*) οι καταβολάδες ή η χρήση φυλλωδών μοσχευμάτων υπό υδρονέφωση είναι απαραίτητες.

Οι ενοφθαλμισμοί ή οι εκκεντρισμοί χρησιμοποιούνται ενίοτε για την αύξηση της ζωής της αμπέλου, την ανάκτηση της ευρωστίας των φυτών και για την αύξηση των αποδόσεων.

Όπου υπάρχουν επιβλαβείς οργανισμοί εδάφους, όπως η φυλλοξήρα (*Phylloxera vastatrix*) ή οι ριζόβιοι νηματώδεις (*Meloidogyne spp.*) και πρόκειται να καλλιεργηθούν είδη ευαίσθητα, όπως η ευρωπαϊκή άμπελος (*Vitis vinifera*), είναι απαραίτητος ο εμβολιασμός σε ανθεκτικά υποκείμενα. Η πρακτική αυτή άρχισε τον 19^ο αιώνα όταν οι Ευρωπαϊκές ποικιλίες

προσβλήθηκαν από φυλλοξήρα, στην οποία τα υποκείμενα *Vitis labrusca* και διάφορα άλλα, ήταν ανθεκτικά. Οι ριζόβιοι νηματώδεις μπορούν να εξολοθρευτούν από τις ρίζες των φυταρίων με εμβαπτισή τους σε ζεστό νερό (51,5 έως 54,5 °C για 3-5 λεπτά).

Σπόροι. Οι σπόροι χρησιμοποιούνται μόνο σε προγράμματα βελτίωσης για παραγωγή νέων ποικιλιών. Οι σπόροι της αμπέλου δεν είναι δύσκολο να εκβλαστήσουν. Καλύτερα αποτελέσματα εξασφαλίζονται εάν προηγηθεί μια υγρή στρωμάτωση των σπόρων (0.5-4 °C), για 12 εβδομάδες πριν την σπορά.

Μοσχεύματα σκληρού ξύλου. Οι πιο πολλές ποικιλίες αμπέλου πολλαπλασιάζονται παραδοσιακά με μοσχεύματα σκληρού ξύλου, τα οποία ριζοβολούν εύκολα. Το μόσχευμα πρέπει να συλλέγεται κατά την διάρκεια του χειμώνα από υγιή, εύρωστα, ώριμα αμπέλια. Πρέπει να χρησιμοποιούνται καλά αναπτυγμένες κληματίδες του τρέχοντος έτους. Αυτές πρέπει να είναι μεσαίου μεγέθους και να έχουν κοντά μεσογονάτια διαστήματα. Γενικά χρησιμοποιούνται μοσχεύματα διαμέτρου 8 με 13 mm και 36 με 46cm μήκος και φυτεύονται την άνοιξη αρκετά βαθειά, ώστε να καλυφθεί ένας τουλάχιστον οφθαλμός. Η παραμονή τους στο φυτώριο για μια βλαστική περίοδο μπορεί να παράγει φυτά αρκετά μακριά, ώστε να μεταφυτευτούν στον αμπελώνα. Η προώθηση της ριζοβολίας με αυξίνες δεν είναι απαραίτητη σε σκληρά μοσχεύματα της Ευρωπαϊκής αμπέλου.

Φυλλώδη μοσχεύματα. Τα πράσινα μοσχεύματα τα φέροντα φύλλα, σε συνθήκες υδρονέφωσης ριζοβολούν πλουσιοπάροχα, σε 10 περίπου μέρες, εφόσον τους δοθεί σχετικά υψηλή θερμοκρασία εδάφους (bottom heat), γύρω στους 26 – 30 °C και εφόσον προηγηθεί χειρισμός με ινδολυλοβουτυρικό οξύ (IBA). Σπάνιο φυτικό υλικό (όπως π.χ. απηλλαγμένο από ιώσεις) μπορεί να πολλαπλασιαστεί πολύ γρήγορα, χρησιμοποιώντας μοσχεύματα βλαστού με έναν οφθαλμό ο οποίος εκπτύσσεται σε νέο βλαστό. Παίρνοντας διαδοχικά επιπρόσθετα μοσχεύματα από τους νέους βλαστούς μπορούμε να συνεχίσουμε τη διαδικασία και να παράγουμε μεγάλο αριθμό φυτών.

Καταβολάδες. Οι ποικιλίες που ριζοβολούν δύσκολα μπορούν να πολλαπλασιαστούν με απλές ή οφιοειδής καταβολάδες.

Εμβολιασμός. Όπως προαναφέρθηκε ο εμβολιασμός της αμπέλου είναι απαραίτητος για τις ευαίσθητες στην φυλλοξήρα ποικιλίες. Χρησιμοποιούνται διάφορες μέθοδοι εμβολιασμού στο αμπέλι με πιο κοινές τον εγκεντρισμό με σχισμή, με πλευρική σχισμή, με κοιμώμενο μάτι ή μαγιόρκειο. Από τους ενοφθαλμισμούς πιο κοινοί είναι ο μεξικάνικος εμβολιασμός και ο εμβολιασμός αγγλικής σχισμής. Οι διάφορες μέθοδοι εμβολιασμού, περιγράφονται αναλυτικά σε πολλά βιβλία денδροκομίας και αμπελουργίας.

Αξίζει να σημειωθεί ότι ο εμβολιασμός στο αμπέλι (και ειδικά ο αγγλικός εμβολιασμός) μπορεί να γίνει με χρήση εμβολιαστικών μηχανών, γεγονός που κάνει την μέθοδο αυτή ιδιαίτερα ανταγωνιστική για μαζική παραγωγή φυταρίων.

Τέλος μία σύγχρονη και πολλά υποσχόμενη αξιολογη μέθοδος, για τον εμβολιασμό ποικιλίας σε επιθυμητό υποκείμενο είναι ο μικροεμβολιασμός *in vitro*.

Η ανάγκη για εναλλακτικές τεχνικές εξυγίανσης της αμπέλου, λιγότερο χρονοβόρες (μειονέκτημα της θερμοθεραπείας+μεριστωματικής καλλιέργειας), οδήγησε στην αξιολόγηση του μικροεμβολιασμού *in vitro*. Ο εμβολιασμός στο επικοτύλιο υγιούς σπορόφυτου, που αναπτύχθηκε σε *in vitro* καλλιέργεια ενός μεριστωματικού εκφύτου διαστάσεων 0,3-0,5mm, μονολότι είναι μια διαδικασία αρκετά δύσκολη, εξασφαλίζει πολλές φορές πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4. ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΑΜΠΕΛΟΥ.

4.1. ΙΣΤΟΡΙΚΟ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΑΜΠΕΛΟΥ.

Η ιστοκαλλιέργεια των *Vitis spp.* έχει μια ιστορία 50 περίπου ετών και ήταν μεταξύ των πρώτων φυτών που καλλιεργήθηκαν *in vitro*. Η ιστοκαλλιέργεια αμπέλου ξεκινά από Gautheret το 1948 κάνοντας χρήση του υποστρώματος Knorr (1865) και παράλληλα των ετεροαυξινών, αλλά σε καμιά περίπτωση δεν σημειώθηκε αναγέννηση φυτών. Οι πρώτες καλλιέργειες κάλου, επίσης, αναφέρθηκαν στα 1940.

Οι ασηπτικές καλλιέργειες μεριστωμάτων, για απαλλαγή από ιώσεις παρουσιάστηκαν στα 1960 και μέθοδοι για μικροπολλαπλασιασμό της αμπέλου, περιλαμβάνοντας καλλιέργειες τμημάτων του ακραίου οφθαλμού, αναπτύχθηκαν στα 1970. Αναπολλαπλασιασμός κάλου και σχηματισμός επίκτητων (τυχαίων) ριζών, ήταν τα αντικείμενα πολλών αναφορών στα 1950 και 1960, αλλά η άμπελος αποδείχθηκε δύσκολη στην αναγέννηση *in vitro*.

Στα 1964 η Gazly, χρησιμοποιώντας απλά γόνατα από φυτά που είχαν υποστεί θερμοθεραπεία, πήρε ριζοβολημένα φυτάρια, απαλλαγμένα από ιώσεις.

Στα 1972 η ίδια ερευνήτρια (Gazly) κατάφερε την επιτυχή αποθήκευση βλαστών για 300 μέρες, στους 9 °C.

Το 1977 η Gazly πάλι, χρησιμοποίησε κορυφές βλαστών και σε συνδυασμό με θερμοθεραπεία πήρε άνοσο φυτικό υλικό.

Το 1973, βλέπουμε καλλιέργεια πρώτα κάλου και στη συνέχεια κυττάρων από τον Hawker *et al.* σε καλλιέργεια *in vitro* μικρής ανώριμης ράγας.

Η σωματική εμβρυογένεση και οργανογένεση στο αμπέλι επιτεύχθηκε την δεκαετία του 1970, όπως επίσης και η απομόνωση πρωτοπλαστών αμπέλου. Οι Mullins & Srinivasan (1976) πέτυχαν εμβρυογένεση και παραγωγή φυταρίων από εκβλάστηση των εμβρυοειδών, σε κάλο που προήλθε από αγωνιμοποίητα θάμνα. Το ίδιο πέτυχαν και οι Krul & Myerson (1977), από κάλο που προήλθε από καλλιέργειες φύλλων βλαστών και ανθέων.

Υπάρχει μια αναφορά από τους Zou and Li (1981) για παραγωγή απλοειδών φυτών αμπέλου, αλλά προσπάθειες σε άλλα εργαστήρια, για εξασφάλιση απλοειδών φυτών από καλλιέργειες ανθέρων και κόκκων γύρης ήταν ανεπιτυχής.

Υπήρξαν αρκετές δημοσιεύσεις σε μεθοδολογικούς παράγοντες που επηρεάζουν την απομόνωση, επιβίωση και διαχωρισμό των πρωτοπλαστών της αμπέλου (Skene 1975, Brezeanu *et al.* 1982, Hasler *et al.* 1982,1983) αλλά αναγέννηση φυτών, από καλλιέργεια

πρωτοπλαστών, δεν έχει ακόμα πραγματοποιηθεί. Οι καλλιέργειες ανθήρων ή κόκκων γύρης, για την παραγωγή ομοζύγωτων διπλοειδών φυτών από απλοειδή φυτά, έχουν παρουσιάσει μικρή πρόοδο.

Υπάρχουν περίπου πενήντα δημοσιεύσεις για τον μικροπολλαπλασιασμό της αμπέλου από την αρχική αναφορά των Jona και Webb (1978), όπου υπάρχουν περιγραφές διαδικασιών που περιλαμβάνουν αναπολλαπλασιασμό των πλευρικών οφθαλμών *in vitro* και επόμενο σχηματισμό τυχαίων ριζών, από μικρομοσχεύματα.

Το 1984 οι Chee *et al.* παρουσίασαν μεθόδους, όχι πειραματισμού, αλλά μαζικής πλέον παραγωγής πολλαπλασιαστικού υλικού, διαφόρων ποικιλιών αμπελιού, με *in vitro* καλλιέργειες, που μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε μονάδες επιχειρηματικής μορφής.

Τέλος ο Krul στα 1986, και οι Stamp *et al.* το 1990 απέκτησαν φυτά *in vitro*, από καλλιέργειες φύλλων διαφόρων ποικιλιών αμπέλου.

Στην Ελλάδα, στις αρχές της δεκαετίας των '80, ξεκινά η ιστοκαλλιέργεια της αμπέλου, και πρώτη η Ρουμπελάκη (1986), χρησιμοποίησε *in vitro* τεχνικές και παράγαγε άνοσο πολλαπλασιαστικό υλικό αμπέλου. Από τότε έχουν γίνει πολλές εφαρμογές *in vitro* των παραπάνω μεθόδων (Αυγελής και Γραμματικάκη, 1994 , Κανάκης 1992, 1995 , Πλαστήρα 1994 , κ.α.) σε αξιόλογες Ελληνικές ποικιλίες και έχει καλυφθεί το μεγαλύτερο μέρος από αυτές.

4.2. ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΑΜΠΕΛΟΥ.

Οι σύγχρονες τεχνικές εμβολιασμού, οι οποίες μπορούν να μηχανοποιηθούν (με την χρήση εμβολιαστικών μηχανών), είναι πολύ αποτελεσματικές και επιπρόσθετα τα μοσχεύματα μαλακού ξύλου της αμπέλου ριζοβολούν εύκολα και παρέχουν μια κατάλληλη μέθοδο πολλαπλασιασμού. Είναι άρα προβληματικό εάν τα φυτά που παράγονται από ιστοκαλλιέργεια θα είναι οικονομικά, για μεγάλης έκτασης παραγωγής φυταρίων.

Λίγα πρέμνα έχουν παραχθεί με τη μέθοδο του μικροπολλαπλασιασμού. Υπολογίστηκε ότι ο αριθμός των παραγόμενων με ιστοκαλλιέργεια φυτών αμπέλου στην Αμερική, για το έτος 1984, να ανέρχεται σε 30.000 και δεν υπάρχουν πληροφορίες που να υποδηλώνουν ότι έγιναν από τότε σημαντικές αλλαγές στο επίπεδο των αριθμών. Κάποια εμπορική παραγωγή στην Αμερική στο παρελθόν έχει γίνει στην ποικιλία «Seyval» χρησιμοποιώντας σωματικά έμβρυα. Η παραγωγή στην Νότια Ιταλία το 1989 ήταν 5000 φυτά.

Επίσης έχουν παραχθεί με μικροεμβολιασμό, σε *in vitro* καλλιέργειες, φυτά τόσο υποκειμένων όσο και εμβολίων.

Αρκετές χιλιάδες τέτοιων φυτών παράχθηκαν στην Γαλλία το 1996, για να χρησιμοποιηθούν για εκτενέστερη αξιολόγηση από παραγωγούς. Και τούτο επειδή αριθμός φυτών που παράχθηκαν *in vitro*, της ποικιλίας «Corvina Veronese», του γένους *Vitis vinifera* διέφεραν σε φαινοτυπικά χαρακτηριστικά, όπως το σχήμα των φύλλων, το χρώμα των φύλλων και των βλαστών, το μέγεθος και τη μορφολογία της νεαρής βλάστησης (κορυφής) και τη γονιμότητα.

Παρόμοια αποτελέσματα βρέθηκαν σε φυτά της ποικιλίας «Seyval», τα οποία αναπτύχθηκαν από σωματικά έμβρυα (Krul and Mowbray, 1984).

Τέτοια αποτελέσματα και άλλες ανησυχίες έχουν προκαλέσει κάποια απροθυμία στην χρήση του μικροπολλαπλασιασμού στην άμπελο και ως εκ τούτου επιβάλλονται ορισμένοι περιορισμοί που προλαμβάνουν αστοχίες πριν την υιοθέτηση της μεθόδου για γενική χρήση.

Αυτή η συμπεριφορά είναι κατανοητή στην περίπτωση των οινοποιήσιμων σταφυλιών όπου οι παραγωγοί είναι ιδιαίτερα ανήσυχοι στο ότι πιθανές αλλαγές που τυχόν συμβούν μπορεί να επηρεάσουν τόσο τα οινολογικά χαρακτηριστικά όσο και τα χαρακτηριστικά της οινάμπελου.

Παρόλα αυτά περιορισμένος μικροπολλαπλασιασμός μπορεί να χρησιμοποιηθεί για παραγωγή υλικού απηλλαγμένου από ιώσεις, για πολλαπλασιασμό ποικιλιών που ριζοβολούν δύσκολα με συμβατικές μεθόδους ή για γρήγορο πολλαπλασιασμό υποσχόμενων νέων ποικιλιών. Η ιστοκαλλιέργεια μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί για την μακρόχρονη διατήρηση του γενετικού υλικού της αμπέλου, καθώς και για την γενετική βελτίωση διαφόρων ποικιλιών.

4.3. ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΤΗΣ ΑΜΠΕΛΟΥ.

Η αύξηση και η ανάπτυξη ενός φυτού ή φυτικού μέρους που καλλιεργείται *in vitro* καθορίζεται από έναν αριθμό παραγόντων και κυρίως από:

1. Το γενετικό δυναμικό του φυτού.
2. Τα θρεπτικά συστατικά: νερό, μακροστοιχεία, ιχνοστοιχεία και σάκχαρα.
3. Τις συνθήκες της καλλιέργειας: φως, θερμοκρασία, pH, περιεκτικότητα σε O₂ και CO₂ του

θρεπτικού μέσου.

4. Την παρουσία ή όχι καθώς και την μεταξύ τους σχέση, διάφορων οργανικών ουσιών και συγκεκριμένα των απαραίτητων φυτορρυθμιστικών ουσιών, βιταμινών κ.τ.λ.

Ιστοί και όργανα από πολλούς γενότυπους των *Vitis spp.* μπορούν επιτυχώς να καλλιεργηθούν *in vitro*, παρόλο που μπορεί να σημειωθούν διαφορές στην αναγεννητική ικανότητα. Αυτές είναι εξαρτώμενες κυρίως από τον γενότυπο και την παρουσία και τη σχέση μεταξύ των φυτορμονών.

Η καλλιέργεια βλαστών και η ριζοβολία αυτών είναι σχετικά εύκολη, και υπάρχουν πολλές εργασίες πάνω στα αντικείμενα αυτά.

4.3.1. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΙ ΑΝΑΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΒΛΑΣΤΩΝ.

Καλλιέργεια γονάτων:

Οι καλλιέργειες βλαστών μπορούν να εγκαθιδρυθούν, όταν ως έκφυτα χρησιμοποιηθούν κορυφές βλαστών ή τμήματα που περιέχουν γόνατα. Απλοί βλαστοί εξασφαλίζονται εάν στο θρεπτικό υπόστρωμα λείπουν παντελώς οι αυξητικοί παράγοντες ή προστεθεί μια ελάχιστη ποσότητα αυξίνης, όπως για παράδειγμα 0,2 mg/l IAA.

Οι βλαστοί που εξασφαλίζονται μπορούν να κοπούν σε απλά τεμάχια με γόνατο και να ξανακαλλιεργηθούν.

Γι' αυτό το σκοπό έχουν χρησιμοποιηθεί κατά καιρούς θρεπτικά υποστρώματα με χαμηλότερες του κανονικού συγκεντρώσεις ανοργάνων στοιχείων. Έτσι η μεν Gazly (1964) χρησιμοποίησε το διάλυμα του Knop στη μισή (1/2) συγκέντρωση, οι δε Blazina *et al.*, χρησιμοποίησαν το διάλυμα MS, επίσης στην μισή (1/2) συγκέντρωση. Τέλος οι Stamp *et al.* (1990), για τον ίδιο σκοπό, χρησιμοποίησαν και αυτοί διάλυμα MS στη μισή (1/2) συγκέντρωση στο οποίο όμως προσέθεσαν 20g/l σακχαρόζη και 1mg/l IAA. Για τον ίδιο στόχο μπορεί να χρησιμοποιηθεί πλήρες θρεπτικό υπόστρωμα MS.

Αύξηση και αναπολλαπλασιασμός πλάγιων επίκτητων βλαστών (Shoot proliferation):

Για την παραγωγή πλευρικών επίκτητων βλαστών, τα έκφυτα συνήθως εγκαθίστανται σε υποστρώματα μεγαλύτερης συγκέντρωσης. Συχνά χρησιμοποιείται ένα υπόστρωμα που περιέχει άλατα του MS, παρόλο που μερικοί ερευνητές προτιμούν την χρήση των υποστρωμάτων 2,3 και 4 στον πίνακα 3.

Μερικοί, χρησιμοποίησαν το WPM (πιν.1) το οποίο δεν αποδείχθηκε ικανοποιητικό (Morini *et al.*,1985, Gray and Benton,1991). Οι Mharte *et al.* (2000) το ξαναχρησιμοποίησαν με προσθήκη σ' αυτό των βιταμινών του υποστρώματος B5 (πιν.1) και τον εμπλουτισμό του με επιπρόσθετο χηλικό σίδηρο και φωσφορικά άλατα, 0,5mg/l IBA και 2.2mg/l BAP και πέτυχαν άριστα αποτελέσματα.

Ο αναπολλαπλασιασμός των βλαστών στο στις επανακαλλιέργειες μπορεί να επιτευχθεί σε MS, αλλά καλύτερα αποτελέσματα εξασφαλίζονται εάν οι καλλιέργειες εφοδιασθούν με επιπλέον φωσφορικά άλατα.

Τα θρεπτικά υποστρώματα 5 και 6 του πίνακα 3, έχουν προτιμηθεί σε κάποια εργαστήρια (Harris and Stevenson 1979,1982).

Οι καλλιέργειες συνήθως εγκαθίστανται στο φώς, σε στερεοποιημένο με άγαρ θρεπτικό υπόστρωμα εφοδιασμένο με 1-4mg/l BAP. Μερικές φορές συμπεριλαμβάνεται μια χαμηλή συγκέντρωση αυξίνης (0,02 mg/l IBA).

Ο αναπολλαπλασιασμός των βλαστών, στο επόμενο στάδιο (στις επανακαλλιέργειες), συμβαίνει σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιέχει τους ίδιους ρυθμιστές αύξησης.

Έχει αναφερθεί ότι συγκεντρώσεις της BAP από 1,25 έως 2,25 mg/l είχαν ως αποτέλεσμα τον άριστο αναπολλαπλασιασμό και ανάπτυξη των βλαστών (Harris and Stevenson,1982 , Chee and Pool, 1985).

4.3.2. ΡΙΖΟΒΟΛΙΑ.

4.3.2.1. ΡΙΖΟΒΟΛΙΑ *IN VITRO*.

Το αμπέλι ριζοβολεί εύκολα *extra virum* και δεν είναι δύσκολο να ριζοβολήσει και *in vitro*. Χαμηλές συγκεντρώσεις αυξινών υποβοηθούν την ριζοβολία.

Τα αμπέλια μπορούν να ριζοβολήσουν *in vitro* με μια ποικιλία θρεπτικών υποστρωμάτων με χαμηλές συγκεντρώσεις ιόντων, όπως για παράδειγμα:

White(1954)

Barlass and Scene (1982), Barlass *et al.* (1981).

1/2MS+3gr/l AC

Galzy and Hamoyi (1984).

1/4MS

Harris and Stevenson (1979).

Ρίζες δεν εξασφαλίζονται σε θρεπτικό υπόστρωμα White εκτός εάν αυτό εφοδιασθεί με βιταμίνες.

Έκφυτα βλαστών μερικών γενοτύπων σχηματίζουν ρίζες σε θρεπτικά υποστρώματα που στερούνται αυξίνης (Skene and Barlass,1981). Έκφυτα γονάτων που αναπτύσσονται σε ένα

θρεπτικό υπόστρωμα χωρίς ρυθμιστές αύξησης συνήθως ριζοβολούν αυθόρμητα (Galzy 1964).

Οι βλαστοί που παράγονται από άλλα είδη καλλιεργειών, τα οποία έχουν αναπτυχθεί με την παρουσία κυτοκινίνης, ριζοβολούν όταν μια αυξίνη (π.χ. NAA 0,1-0,2mg/l) προστίθεται στο υπόστρωμα. Οι Barlass and Scene (1978) χρησιμοποίησαν την NAA, σε έκφυτα της ποικιλίας Chardonnay σε συγκέντρωση 0,1mg/l, προκειμένου να ενθαρρύνουν τη ριζογένεση.

Οι Helior *et al.* (1997) ανέφεραν ότι η IBA είναι η κατάλληλη αυξίνη για την ριζοβολία *in vitro* της ποικιλίας “Pinot noir”, σε αντίθεση με την NAA, που δεν δίδει αύξηση σε επιπλέον ρίζες, αλλά οδηγεί σε σχηματισμό κάλου.

Οι Mharte *et al.* (2000) χρησιμοποίησαν 0,1 mg/l IAA, στην ποικιλία “Sonaka” και πέτυχαν επαγωγή ριζών και μη εμφάνιση κάλου.

Οι διαφορές εφαρμογής και ο βαθμός της επιτυχίας σε κάθε στάδιο της καλλιέργειας, εξαρτάται από τον γενότυπο της κάθε ποικιλίας ή κλώνου και ποικίλει υπό τις δεδομένες συνθήκες καλλιέργειας.

4.3.2.2. ΡΙΖΟΒΟΛΙΑ EXTRA VIRUM.

Οι βλαστοί που αναπτύσσονται *in vitro* μπορούν να ριζοβολήσουν άμεσα σε μείγμα κομπόστ, ειδικά αν προηγηθεί χειρισμός με αυξίνη (αφού βυθιστούν σε εμπορική σκόνη ριζοβολίας).

Μερικοί βρήκαν ότι η τεχνική αυτή δίνει μεγαλύτερο ποσοστό ριζοβολημένων βλαστών παρά η *in vitro* ριζοβολία, άλλοι ότι λιγότεροι βλαστοί ριζοβολούν, αλλά τα εγκλιματιζόμενα φυτά παράγονται πιο γρήγορα και επίσης ένα βήμα της *in vitro* καλλιέργειας απαλείφεται.

Πίνακας 3. Θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται για *in vitro* καλλιέργεια βλαστών και γονάτων, των *Vitis spp.* (Από GEORGE E.F., 1993).

ΧΗΜΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ(Κάθετα) / ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ (Οριζόντια).	MS	Webb & Street,C I, (1977)	Harris & Stevenson, A,(1982).	Stevenson & Monnette, I,(1982).	Murashi ge, 1984	Miller & Murashig e(1974)	Troncoso et al. (1988).
	1	2	3	4	5	6	7
Μακροστοιχεία (meq/l)							
NO ₃ ⁻	39.4	21.65	29.55	29.55	39.4	39.4	15.8
PO ₄ ³⁻	3.74	3.74	6.51	5.95	7.44	7.44	8.26
SO ₄ ²⁻	3	3	2.25	2.25	3	3	7.54
Cl ⁻	5.98	0.87	4.49	4.48	5.98	5.98	5.99
K ⁺	20.04	5.48	15.03	15.03	20.04	20.04	4.75
Ca ⁺	5.98	8.29	4.49	4.48	5.98	5.98	12.08
Na	-	-	1.23	0.92	1.23	1.23	2.75
Mg ⁺	3	3	2.25	2.25	3	3	3
NH ₄	20.61	10	15.64	15.64	20.61	20.61	9.54
Μικροστοιχεία(mg/l).							
MnSO ₄ 4H ₂ O	22.3	22.3	16.7	16.7	22.3	22.3	22.3
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8.6	8.6	6.5	6.5	8.6	8.6	8.6
H ₃ BO ₃	6.2	6.2	4.7	4.7	6.2	6.2	6.2
KI	0.83	0.83	0.62	0.62	0.83	0.83	0.3
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025	0.025	0.02	0.2	0.025	0.025	0.025
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.25	0.25	0.2	0.2	0.25	0.25	0.25
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.025	0.025	0.02	0.02	0.025	0.025	0.025
NaFeEDTA-mM	0.1	0.1	0.075	0.075	0.1	0.1	0.2
Βιταμίνες(mg/l)							
Myo-Inositol	100	500	75	75	100	100	10
Thiamine HCL	0.1	5	0.3	0.075	0.1	0.4	1
Nicotinic acid	0.5	-	-	0.4	0.5	-	1
Pyridoxine HCL	0.5	-	-	0.4	0.5	-	1
Ca pantothenate	-	-	-	-	-	-	1
Biotin	-	-	-	-	-	-	0.01
Αμινοξέα(mg/l)							
Glycine	2	-	-	1.5	2	-	2

Σημ.1. Το υποστρώματα 3 είναι ¼ MS με επιπρόσθετα 170 mg/l NaH₂PO₄ H₂O.

Σημ.2. Το υποστρώματα 4 είναι ¼ MS με επιπρόσθετα 128 mg/l NaH₂PO₄ H₂O.

4.4. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΝΟΣΟΥ ΦΥΤΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ ΑΜΠΕΛΟΥ - ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΕΡΙΣΤΩΜΑΤΩΝ.

Η δυνατότητα παραγωγής *in vitro* άνοσου φυτικού πολλαπλασιαστικού υλικού, είναι ένα πολύ σημαντικό πλεονέκτημα.

Η εξυγίανση των καλλιεργειών από βακτηριακά παθογόνα γίνεται με ενσωμάτωση στα υποστρώματα καλλιέργειας αντιβιοτικών ευρέως φάσματος και χαμηλής φυτοτοξικότητας (χημειοθεραπεία) όπως η ριφαμπικίνη, η ερυθρομυκίνη, το μυκοναζόλ, η τετρακυκλίνη κ.α.

Εναλλακτικά, γίνεται επιλογή υγιών/ανθεκτικών κλώνων και υποκαλλιέργεια αυτών.

Η εξυγίανση των φυτών προσβληθέντων από ιώσεις επιτυγχάνεται με καλλιέργειες κυρίως ακραίων μεριστωμάτων και δευτερευόντως βλαστών σε ειδικό κλίβανο θερμοκρασίας 35-40 °C, για 1-4 εβδομάδες (θερμοθεραπεία), καθώς και με επιλογή υγιών κλώνων και υποκαλλιέργεια αυτών.

Οι ιοί μπορούν να απενεργοποιηθούν σε υψηλές θερμοκρασίες (άνω των 35 °C), ενώ συχνά απουσιάζουν από τα μεριστωματικά κύτταρα, παρόλο που είναι παρόντες στα άλλα φυτικά μέρη.

Στην καλλιέργεια κορυφαίων μεριστωμάτων (πρωτοχρησιμοποιήθηκε από τον Morel στα 1960), χρησιμοποιείται για πολλαπλασιασμό το αποκοπτόμενο, πολύ μικρό μέρος ενός κορυφαίου οφθαλμού, που περιλαμβάνει ένα μοναδικό κορυφαίο μερίστωμα μήκους 0,1-0,2mm και τις υποτεινόμενες σ' αυτό καταβολές φύλλων.

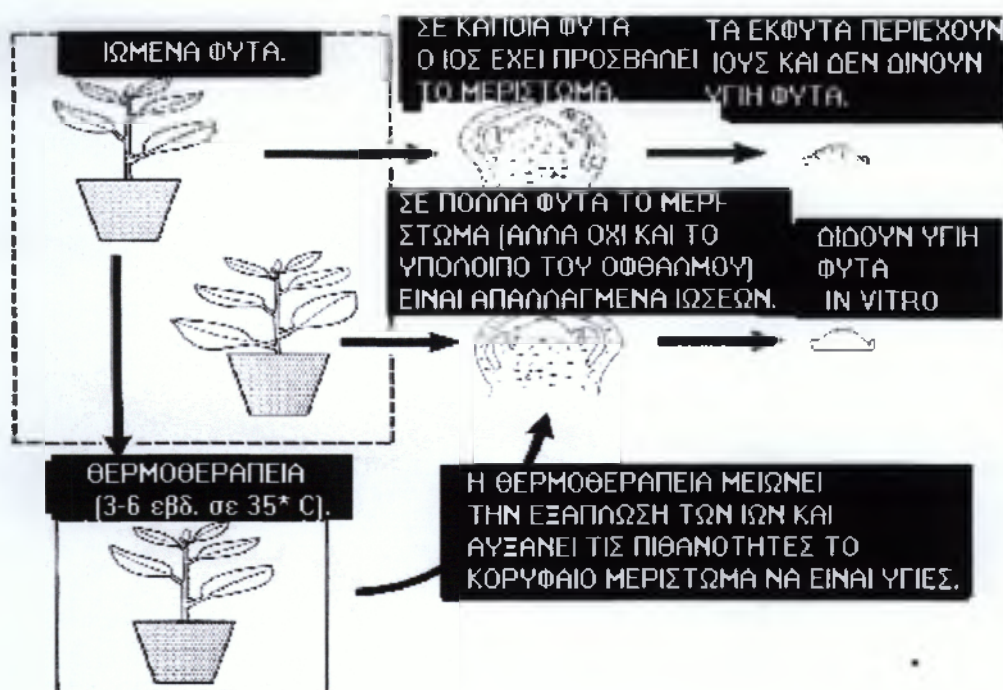
Σύμφωνα με τους Wang και Hu (1980), η μικρή συγκέντρωση ή η πλήρης απουσία ιών στο ακραίο μερίστωμα οφείλεται σε τέσσερις πιθανούς λόγους:

1. Την έλλειψη αγγειακού συστήματος που θα διευκόλυνε τη μεταφορά του ιού, σε αντίθεση με την μετακίνηση αυτού από κύτταρο σε κύτταρο, η οποία είναι βραδεία.
2. Την υψηλή μεταβολική δραστηριότητα στα μεριστωματικά κύτταρα επειδή στα κύτταρα αυτά που βρίσκονται στο στάδιο της ενεργού μιτωτικής διαίρεσης η σύνθεση του RNA, που απαιτείται για τον πολλαπλασιασμό του ιού, μειώνεται δραστικά.
3. Την πιθανή ύπαρξη ενός συστήματος απενεργοποίησης του ιού, του οποίου (συστήματος) η δραστηριότητα είναι αυξημένη στην ακραία περιοχή του μεριστώματος και αυξάνεται επίσης με την αποκοπή του μεριστώματος από το φυτό.
4. Την υψηλή συγκέντρωση ενδογενών αυξινών στο ακραίο μερίστωμα, που ίσως παρεμποδίζουν τον πολλαπλασιασμό των ιών.

Για το αμπέλι συγκεκριμένα, συνδυασμός καλλιέργειας μεριστωμάτων με χημειοθεραπεία, δεν έχει δώσει ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Οι κλασικές, επίσης, μέθοδοι της καλλιέργειας του ακραίου μεριστώματος και θερμοθεραπείας δεν έχουν ευρέως χρησιμοποιηθεί για την απαλλαγή της αμπέλου από ιώσεις, και αυτό επειδή το αμπέλι είναι πολύ ευαίσθητο σε παρατεταμένες υψηλές θερμοκρασίες. Σαν αποτέλεσμα έχουμε χαμηλό ποσοστό επιβίωσης των υποβαλλομένων σε θερμοθεραπεία φυτών. Η Galzy (1964) κράτησε τις καλλιέργειες γονάτων, σε δοκιμαστικούς σωλήνες που εισέρχονταν σε υδατόλουτρο, στους 35 °C. Οι συνθήκες αυτές περιορίζουν την εξάπλωση του ιού, αλλά είναι κάτω από το θερμικό σημείο θανάτωσης των φυτικών ιστών.

Σχήμα 1. Αποτελέσματα συνδυασμού θερμοθεραπείας και καλλιέργειας μεριστωμάτων.



Από τότε όμως εφαρμόστηκαν άλλες τεχνικές, που είναι πιο εύκολες και αποτελεσματικές και είναι:

- Τα μητρικά φυτά υποβάλλονται σε θερμοθεραπεία και τότε καλλιεργούνται είτε οι μεγαλύτεροι ακραίοι οφθαλμοί ή πιο συχνά οι μασχαλιαίοι οφθαλμοί που συνοδεύονται από μεσογονάτια τμήματα του βλαστού.
- Υποβάλλονται σε θερμοθεραπεία οι καλλιεργούμενοι βλαστοί (Blazina *et al.*, 1991).

- Γίνεται χρήση της τεχνικής των Barlass *et al.* (1981) ή Barlass and Scene (1982), στην οποία μικροί κορυφαίοι οφθαλμοί (1mm μήκος) τεμαχίζονται με τυχαίες κινήσεις του νυστεριού οπότε οι συντεθλιμένοι ιστοί καλλιεργούνται *in vitro* για να δώσουν αύξηση σε επίκτητους οφθαλμούς.

Και οι τρεις μέθοδοι έχουν σαν αποτέλεσμα την απαλλαγή των φυτών από ιώσεις.

Για καλλιέργεια τεμαχίων του επάκριου μεριστώματος, ο Barlass και οι συνεργάτες του χρησιμοποίησαν υγρό MS θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε 2,25mg/l BAP για εγκατάσταση βλαστών και διατηρώντας τις καλλιέργειες στους 27 °C κατά τη διάρκειά της φωτεινής περιόδου (15h) και στους 20 °C κατά τη σκοτεινή περίοδο (9h). Στο ίδιο σύστημα επαναλαμβανόμενος αναπολλαπλασιασμός βλαστών συνέβη όταν τα έκφυτα μεταφέρθηκαν σε ημιστερέο θρεπτικό υπόστρωμα της ίδιας σύστασης (Skene and Barlass, 1981).

Κατά την τυχαία αναγέννηση, τα φυτά που αναγεννιούνται από ακραία μεριστώματα έχει βρεθεί να είναι πανομοιότυπα και η τεχνική των τεμαχίων των ακραίων οφθαλμών έχει υιοθετηθεί στην Αυστραλία, σε εμπορική βάση, για την απαλλαγή μολυσμένων κλώνων από τις κύριες ιώσεις του αμπελιού (Barlass, 1991).

Οι Bass *et al.* (1988) πέτυχαν μεγάλη αύξηση στον αριθμό των βλαστών που προήλθαν από τεμάχια ακραίων οφθαλμών, όταν στο εφοδιασμένο με 2 mg/l BAP, MS υπόστρωμα, πρόσθεσαν ορό αίματος ζώων (1% ορός αίματος κουνελιού ήταν το καλύτερο).

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ: ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ:

Μεριστώματα αμπέλου μήκους 0,2-0,3mm με τις υποτεινόμενες σ' αυτά μια-δυο καταβολές φύλλων, καλλιεργήθηκαν *in vitro* (ασηπτικώς), σε βασικό θρεπτικό υπόστρωμα MS₃₋₄ και με διάφορους τύπους και συγκεντρώσεις ρυθμιστών της αύξησης (αυξινών και κυτοκινινών). Τα έκφυτα προέρχονταν από δύο ντόπιες Μεσσηνιακές ποικιλίες, το Κολινιάτικο και το Αυγουστολίδι.

Στην αρχή το βασικό υπόστρωμα εμπλουτίστηκε με BAP σε συγκέντρωση 1, 2 ή 4mg/l και αργότερα, το ίδιο υπόστρωμα εφοδιάστηκε πάλι με 2mg/l BAP ή με 2mg/l BAP+0,2 mg/l IAA ή με 2mg/l BAP+0,02mg/l NAA. Σκοπός ήταν ο αναπολλαπλασιασμός και η απόκτηση επίκτητων βλαστών αρχικά και η απόκτηση τέλειων φυτών αργότερα. Μετά την απόκτηση ικανοποιητικού μήκους βλαστών και προκειμένου αυτοί να ριζοβολήσουν χρησιμοποιήθηκαν στο υπόστρωμα 0,1mg/l NAA ή 0,2mg/l NAA ή 0,2mg/l IAA.

Για τον αναπολλαπλασιασμό των μεριστωμάτων η συγκέντρωση των 2mg/l της BAP, αποδείχθηκε καταλληλότερη και για τις δυο ποικιλίες, και όσον αφορά τον συνεργισμό αυξινών-κυτοκινινών καλύτερα αποτελέσματα παρουσίασε η συγκέντρωση των 2mg/l BAP σε συνδυασμό με 0,2mg/l IAA.

Επίσης η χρήση της ίδιας συγκέντρωσης (2mg/l BAP+0,2mg/l IAA), παρουσίασε τα καλύτερα αποτελέσματα για την εξέλιξη των μεριστωμάτων σε βλαστούς. Η χρήση της NAA, στην συγκέντρωση των 0,02mg/l, μονολόπι παρουσίασε καλά αποτελέσματα στον αναπολλαπλασιασμό μεριστωμάτων πρέπει να αποφεύγεται στην ποικιλία Κολινιάτικο, διότι συμβάλει στην δημιουργία κάλου (εξ' ολοκλήρου ή σε περιοχές των εκφύτων), ένα αποτέλεσμα μη επιθυμητό.

Για την ριζοβολία καλύτερα αποτελέσματα παρουσίασαν οι συγκεντρώσεις των 0,1mg/l NAA και 0,2mg/l IAA, ενώ αυτή των 0,2mg/l NAA προάγει την δημιουργία κάλου αντί ριζών.

Τα ριζοβολημένα *in vitro* φυτά, με κατάλληλες τεχνικές, μεταφέρθηκαν στο φυσικό περιβάλλον.

ΥΛΙΚΑ-ΜΕΘΟΔΟΙ:

A. ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ.

Ως δότες εκφύτων χρησιμοποιήθηκαν εύρωστες, οπτικά υγιείς και καλοσχηματισμένες κληματίδες των δύο συγκεκριμένων ποικιλιών, τρέχοντος ή προηγούμενου έτους. Η αποκοπή τους, από τα μητρικά φυτά έγινε σταδιακά την περίοδο από τα τέλη Ιουνίου έως αρχές Σεπτεμβρίου. Έπειτα κόβονταν τα φύλλα των κληματίδων αυτών προσεκτικά, ώστε να μην πληγωθούν ή καταστραφούν οι μασχालιαίοι ή οι επάκριοι οφθαλμοί (κύριοι οφθαλμοί), που μας ενδιέφεραν περισσότερο για την περαιτέρω διαδικασία. Στη συνέχεια εμβαπτίστηκαν σε πυκνό διάλυμα μυκητοκτόνου (10-20 γραμ. Baylleton ή Rindomil ανά λίτρο νερού) για 10-12 ώρες. Αυτός ο χειρισμός έγινε για να μειωθεί το μικροβιακό φορτίο που φέρουν τα φυτά στην φύση.

Έπειτα μετεφέρθησαν στο εργαστήριο, όπου και έγινε η κοπή των κληματίδων σε μεσογονάτια διαστήματα για την εργαστηριακή πλέον απολύμανση. Τα τεμάχια αυτά, απολυμάνθηκαν για 20 λεπτά της ώρας με διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου 0,5-1% (διάλυμα κοινής χλωρίνης 10%). Η διαδικασία αυτή λάμβανε χώρα στην περιοχή της τράπεζας νηματικής ροής του αέρα και μετά την έξοδο των εκφύτων από το διάλυμα απολύμανσης, αυτά ξεπλένονταν εις διπλούν σε αποστειρωμένο νερό. Αυτό γιατί τα υπολείμματα χλωρίου προκαλούν νεκρώσεις στους φυτικούς ιστούς. Στη συνέχεια κάθε τεμάχιο ξεχωριστά μεταφερόταν στο στερεοσκόπιο, όπου γινόταν προσπάθεια για την εξαγωγή του μεριστώματος.

Σε κατά μήκος τομή ενός κύριου οφθαλμού διακρίνουμε, στο κέντρο, ένα τμήμα κωνικού σχήματος, τον βλαστικό κώνο (στο κέντρο αυτού υπάρχει το μερίστωμα). Σ' αυτόν τον κώνο παρεμβάλλονται τα πέταλα (λέπια του οφθαλμού), ένα είδος από στοιχειώδη φυλλίδια, χωρισμένα μεταξύ τους από ένα βαμβακώδες χνούδι στο εξωτερικό. Τέλος βλέπουμε δυο φυλλώδη ελάσματα ή αραιά λέπια με ένα γέμισμα που περικλείουν όλα τα στοιχειώδη φυλλίδια.

Η αφαίρεση των μεριστωμάτων γινόταν, επίσης σε ασηπτικές συνθήκες, στην περιοχή της τράπεζας νηματικής ροής, από κορυφαίους ή πλάγιους οφθαλμούς.

Η εργασία αυτή γινόταν σε στερεοσκόπιο, σε μεγέθυνση 10-50X. Καθώς αφαιρούνται σιγά-σιγά με την μύτη του νυστεριού τα εξωτερικά περιβλήματα, διακρίνουμε ένα σχήμα μυτερό, πολύ μικρού μεγέθους (σε σχήμα κεφαλής βελόνας). Έπειτα προχωρούμε βαθύτερα ώσπου να

διακρίνουμε τα εμβρυακά φυλλάρια, αφαιρούμε με την μύτη της βελόνας το μικρότατο αυτό έκφυτο και το εμφυτεύουμε στο θρεπτικό υπόστρωμα.

Επειδή το μεριστώμα περιβαλλόταν από όλα αυτά τα στοιχεία, ήταν αρκετά δύσκολη η εξαγωγή του στην αρχή και στην συνέχεια ήταν μεγάλο το ποσοστό μολύνσεων, λόγω του βαμβακώδους χνουδιού που περιβάλλει τα φυλλίδια και τον βλαστικό κώνο. Αυτό το βαμβακώδες χνούδι, παρακρατούσε μεγάλο μικροβιακό φορτίο και δεν ήταν εύκολο να απολυμανθεί, προφανώς λόγω της υφής του. Έτσι το ποσοστό των μολυσμάτων στην αρχή, ήταν πάρα πολύ υψηλό, άνω του 50%. Βέβαια συνάρτηση όλων αυτών ήταν και η απειρία του πειραματιζόμενου και έτσι στην συνέχεια το ποσοστό αυτό μειωνόταν σταδιακά.

Στην συνέχεια τα μεμονωμένα μεριστώματα ή τα μεριστώματα με μια-δύο καταβολές φύλλων (μεγέθους από 0,1-0,5 mm) μεταφέρονταν στα δοχεία καλλιέργειας, δηλαδή σε τρυβλία Petri διαμέτρου 100mm και ύψους 10mm, τα οποία περιείχαν 20 ± 2 ml θρεπτικού υποστρώματος. Η όλη διαδικασία απαιτούσε μεγάλη προσοχή και συνεχείς απολυμάνσεις των λαβίδων και νυστεριών (με κάψιμο), για την αποφυγή μολύνσεων.

Σε κάθε τρυβλίο στην αρχή τοποθετούνταν, έως τρία μεριστώματα, ενώ αργότερα όταν λόγω εμπειρίας τα ποσοστά μολύνσεων ήταν πολύ χαμηλότερα, τοποθετούνταν έως και δέκα έκφυτα σε κάθε τρυβλίο. Και σε όλες αυτές τις διαδικασίες λαμβάνονταν μέτρα για την πλήρη απολύμανση των εργαλείων (καύση με καμινέτο) και των χεριών (με αιθυλική αλκοόλη).

Έπειτα τα τρυβλία κλείνονταν με ημιπερατή ταινία parafilm M (American Can Co.), αναγράφονταν σ' αυτά διάφορα χρήσιμα στοιχεία (ποικιλία, ημερομηνία εμφύτευσης, είδος θρεπτικού υποστρώματος, αριθμηση) και μεταφέρονταν σε θάλαμο ρυθμιζόμενων συνθηκών για την περαιτέρω ανάπτυξή τους.

Εκεί τα φυτά επωάζονταν, σε σταθερές συνθήκες καλλιέργειας, με θερμοκρασία ημέρας 25 °C και νύχτας 18 °C, ένταση φωτισμού 3000-4500 lux, και σχετική υγρασία θαλάμου 55-60%. Το ποσοστό της υγρασίας φυσικά στα δοχεία καλλιέργειας, είναι πολύ μεγαλύτερο (λόγω συγκράτησης αυτής), άνω του 90%.

Επί τετραήμερης βάσης γινόταν έλεγχος του φυτικού υλικού και καταγραφή των διαφόρων στοιχείων καθώς και απόρριψη του μολυσμένου υλικού. Οι μολύνσεις επισυμβαίνουν επειδή το περιβάλλον της καλλιέργειας, καθώς και το θρεπτικό υπόστρωμα προσφέρουν άριστο περιβάλλον για την ανάπτυξη και πολλαπλασιασμό των διαφόρων μικροοργανισμών. Έτσι σε σύντομο χρονικό διάστημα αυτοί γίνονται ορατοί ακόμη και με γυμνό μάτι (Εικ. 5).

Με την συστηματική παρακολούθηση των καλλιεργειών με γυμνό μάτι ή στερεοσκόπιο μπορούν ν' ανιχνευθούν α) μυκητολογικές μολύνσεις, οι οποίες έχουν σύντομο χρόνο παρουσίασης (2-15 μέρες) και β) βακτηριολογικές προσβολές με μεγαλύτερο χρόνο παρουσίασης (έως και δύο μήνες μετά την εμφύτευση των εκφύτων), αλλά ουδέποτε μπορεί να γίνει διάγνωση ιώσεων για τις οποίες χρειάζονται εξειδικευμένες εργαστηριακές μέθοδοι (π.χ. ELISA TEST). Η μέθοδος ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay) χρησιμοποιείται ευρύτατα στο αμπέλι. Ο μόνος περιορισμός έγκειται στο γεγονός πως η ELISA δεν μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε ασθένειες των οποίων το παθογόνο αίτιο δεν έχει προηγουμένως απομονωθεί και ταυτοποιηθεί.

Στις τελευταίες αυτές περιπτώσεις χρησιμοποιείται αναγκαστικά η μέθοδος του εμβολιασμού σε ευαίσθητα φυτά δείκτες (Indexing).

Η εναλλαγή των καλλιεργειών σε περιέκτες με νέο θρεπτικό υπόστρωμα (υποκαλλιέργεια), γινόταν κάθε 3-4 εβδομάδες, ανάλογα με την πορεία του εκφύτου και την οπτική παρακολούθηση. Συνήθως, κατά μεσαία προσέγγιση, οι καλλιέργειες παρουσιάζουν οριστικοποίηση της νέας τους μορφογεννητικής έκφρασης (ριζοβολία, πολλαπλασιασμό και ανάπτυξη βλαστών κ.τ.λ.) μετά από περίοδο 5-10 εβδομάδων και αυτό επαληθεύτηκε και εδώ με κύριο χρόνο έκφρασης της κάθε μορφογεννητικής διαδικασίας αυτόν των 5-6 εβδομάδων. Έτσι μετά από κάθε τέτοιο χρονικό διάστημα γινόταν αξιολόγηση της εκάστοτε κατάστασης και προσδιορισμός των περαιτέρω διαδικασιών.

Στο πείραμά μας, ακολουθήθηκαν όλα εκείνα τα απαραίτητα στάδια για την παραγωγή τέλειων φυτών από μεμονωμένα μεριστώματα (μερίστωμα→αναπολλαπλασιασμός αυτού→ανάπτυξη βλαστών→ επιμήκυνση βλαστών→ ριζοβολία βλαστών). Έως το στάδιο της επιμήκυνσης των βλαστών οι καλλιέργειες γίνονταν κυρίως σε τρυβλία Petri, και δευτερευόντως σε φιάλες Erlenmayer. Στο στάδιο της ριζοβολίας, οι αποκοπέντες (κάτω από γόνατο) ικανοποιητικού μήκους βλαστοί, μεταφέρονταν σε δοκιμαστικούς σωλήνες εφοδιασμένους με το ανάλογο κάθε φορά υπόστρωμα.

Τα ριζοβολημένα εντέλει φυτάρια μεταφέρθηκαν από τα δοχεία καλλιέργειας τους σε εδαφικά μείγματα, για το περαιτέρω πέρασμα τους στο φυσικό περιβάλλον.

Αφού ξεπλένονταν πολύ προσεκτικά (αυτή είναι μια άκρως απαραίτητη διαδικασία, γιατί η πηγή άνθρακα και το ζελατοποιημένο άγαρ του υποστρώματος, αποτελούν άριστη τροφή για τους σαπροφυτικούς μικροοργανισμούς), τα φυτάρια πλέον μεταφέρθηκαν σε πλαστικά δοχεία με υπόστρωμα που συνίστατο από τύρφη, κομπόστ και περλίτη (1:1:3),

τοποθετήθηκαν στον Walk-in θάλαμο, στις ίδιες συνθήκες καλλιέργειας και σκεπάστηκαν τις πρώτες μέρες με υάλινο σκεύος (Εικ.6).

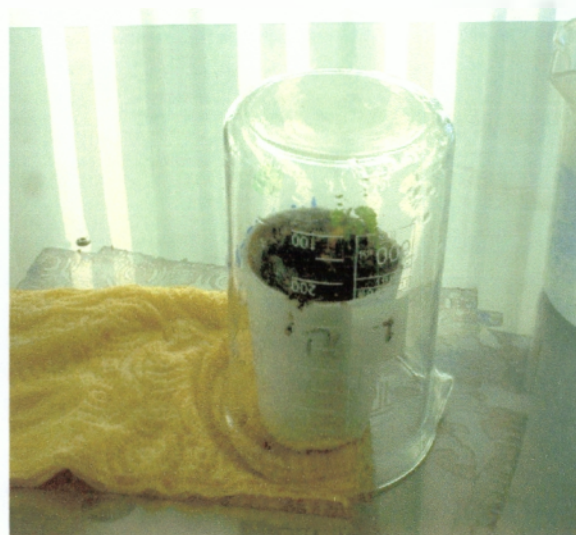
Αυτό έγινε α) για να περιοριστούν οι απώλειες νερού από την αυξημένη διαπνοή των φυτών, στα οποία η λειτουργικότητα της εφυμενίδας είναι περιορισμένη και β) να προστατευθούν τα νεαρά φυτά από την αλλαγή του καθεστώτος των μεγάλων ποσοστών υγρασίας που επικρατούσαν στην *in vitro* καλλιέργεια και των χαμηλότερων επιπέδων σχετικής υγρασίας του φυσικού περιβάλλοντος (Κανάκης, 2001).

Έπειτα σταδιακά κατεβάζαμε την υγρασία και την θερμοκρασία του θαλάμου αυτού, ώστε να σκληραγωγηθούν τα φυτά, για να αντιμετωπίσουν τις συνθήκες του φυσικού περιβάλλοντος. Κάθε αλλαγή θερμοκρασίας απαιτούσε τουλάχιστο 5-7 ημέρες προσαρμογής για το φυτό. Έτσι συνολικά σε χρόνο 3-4 εβδομάδων τα φυτά ήταν έτοιμα να ζήσουν στο φυσικό πλέον περιβάλλον. Σε μερικές περιπτώσεις ήταν προτιμότερο, μετά από τους χώρους της ιστοκαλλιέργειας, τα φυτά να παραμείνουν στο θερμοκήπιο για κάποιες ακόμα εβδομάδες (εξαρτόνταν από τις συνθήκες περιβάλλοντος) και ακολουθούσε, την κατάλληλη χρονική περίοδο, η μεταφύτευσή τους στους φυσικούς χώρους καλλιέργειας των, για την περαιτέρω ανάπτυξή τους.

Εικ.5. Ταυτοποίηση μολύσματος (και απόρριψη του) σε τρυβλίο Petri.



Εικ.6. Στάδιο σκληραγωγώσης εκφύτου.



Β.ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΚΑΙ ΡΥΘΜΙΣΤΕΣ ΤΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ.

Για την Παρασκευή των θρεπτικών υλικών χρειαζόμαστε:

- Ηλεκτρονικό ζυγό, γιατί οι απαιτούμενες ποσότητες των θρεπτικών στοιχείων και των ρυθμιστών της αύξησης, που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή των θρεπτικών διαλυμάτων, είναι της τάξεως των χιλιοστογραμμαρίων (mgs).
- Σιφώνια, ογκομετρικούς κυλίνδρους, ποτήρια ζέσεως, κωνικές φιάλες και διάφορα άλλα εργαστηριακά όργανα διαφόρων μεγεθών και χωρητικότητων.
- Πεχάμετρο για να μετρήσουμε το pH του θρεπτικού διαλύματος. Για την ρύθμιση του pH στο επιθυμητό επίπεδο, χρησιμοποιήσαμε αντιδραστήρια όπως το NaOH, για την άνοδο της τιμής του pH και HCl, για την πτώση του.
- Πηγή θερμότητας.
- Κλίβανο υγρής αποστείρωσης (autoclave), για την αποστείρωση τόσο των δοκιμαστικών σωλήνων, των κωνικών φιαλών, όσο και όλων των εργαλείων που χρησιμοποιούνται στην καλλιέργεια (π.χ. νυστέρια, λαβίδες κ.τ.λ.)

Ως βασικό υπόστρωμα στο πείραμά μας χρησιμοποιήθηκε το MS (Murashige and Skoog, 1962) και η σύσταση του φαίνεται στους πίνακες 1 και 3, αλλά με διαφορετικές ποσότητες και συνδυασμούς ρυθμιστών της αύξησης, κυρίως αυξινών (NAA και IAA) και κυτοκινινών (BAP). Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις των 1mg/l, 2mg/l και 4mg/l της BAP. Έπειτα χρησιμοποιήθηκαν υποστρώματα με συνδυασμό ορμονών, όπως 2mg/l BAP, 2mg/l BAP+0,02mg/l NAA, 2mg/l BAP+0,2mg/l IAA και τέλος για την προαγωγή της ριζοβολίας χρησιμοποιήθηκαν υποστρώματα μόνο με αυξίνες, όπως 0,2 και 0,5mg/l IAA, καθώς και 0,1mg/l NAA.

Αρχικά το υπόστρωμα εφοδιάστηκε με 3% (w/v) σακχαρόζη, ως πηγή άνθρακα, καθώς και με 0,6% (w/v) παράγοντα ζελατινοποίησης, δηλαδή άγαρ (Merck Co). Έπειτα το άγαρ μειώθηκε σε 0,4% (w/v), και φαίνεται ότι είχε καλύτερα αποτελέσματα, αλλά δεν έγιναν μετρήσεις που να το επιβεβαιώνουν. Όπου αναγράφεται MS_{A-B-Γ...}, ο πρώτος δείκτης δεικνύει το ποσοστό σακχαρόζης (w/v), ο δεύτερος το ποσοστό του παράγοντα ζελατινοποίησης, και οι λοιποί τις ποσότητες των φυτορμονών, που προστέθηκαν στο θρεπτικό υπόστρωμα.

Το άγαρ είναι πολυσακχαρίτης που προέρχεται από φύκη. Η αξία του συνίσταται στο ότι τα έκφυτα που τοποθετούνται στην επιφάνεια του ημιστερεού υποστρώματός του, έχουν περισσότερη επιφάνεια εκτεθειμένη στον ελεύθερο αέρα, ενώ ταυτόχρονα επιτρέπεται η

δίοδος του αέρα και η ελεύθερη μετακίνηση των θρεπτικών στοιχείων μέσα στο ημιστερεοποιημένο υπόστρωμα.

Το pH των θρεπτικών διαλυμάτων, πριν προστεθεί σ' αυτό το άγαρ και πριν την αποστείρωσή του, ρυθμίστηκε στο $5,7 \pm 0,2$ με την βοήθεια σταγόνων διαλυμάτων NaOH (0,1N ή 1N) για την άνοδο της τιμής του pH και HCl (0,1N ή 1N) για την καθοδό της.

Η αποστείρωση επιτεύχθηκε σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης, σε θερμοκρασία 121°C και χρόνο 21 min.

Παρακάτω αναφέρονται συνοπτικά οι διαδικασίες που ακολουθούνται για την παρασκευή ενός λίτρου θρεπτικού υποστρώματος MS₃₋₄+ORMONEΣ.

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ 1L ΔΙΑΛΥΜΑΤΟΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ (MS₃₋₄+ORMONEΣ)

- 800 cc απιονισμένο νερό.
- +4,708 g σκόνης εμπορικού σκευάσματος MS σε συνεχή ανάδευση.
- + 30 g sucrose (ζάχαρη).
- συνεχής ανάδευση.
- + 100mg myo-inositol ($\text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6$, M.B=180,2).
- + προσθήκη φυτομονών (κατά περίπτωση).
- Συμπλήρωση στα 1000cc με απιονισμένο νερό.
- Διόρθωση pH στα $5,7 \pm 0,2$ (↑ NaOH)
(↓ HCL).
- Διανομή σε φιάλες χωρητικότητας του 1 λίτρου, ως εξής:
 - 500cc διαλύματος+2 g άγαρ (πρώτη φιάλη)
 - 500cc διαλύματος+2 g άγαρ (δεύτερη φιάλη).
- Πολύ καλή ανακίνηση των φιαλών.
- Τοποθέτηση φιαλών στο autoclave στους 121°C .
- Τίθεται αυτό σε λειτουργία σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης του.
- Τοποθέτηση στο υδατόλουτρο στους 55°C για 15min, για ομοιόμορφη κάθοδο της θερμοκρασίας,
- Διανομή του διαλύματος σε τρυβλία ή άλλους περιέκτες, κάτω από συνθήκες ασηψίας.

-ΡΥΘΜΙΣΤΕΣ ΤΗΣ ΑΥΞΗΣΗΣ.

Οι ρυθμιστές της αύξησης, επειδή δρουν σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις, χρησιμοποιούνται σε πολύ μικρές ποσότητες και το ζύγισμα τους είναι δύσκολο και πολλές φορές αδύνατο. Το ίδιο συμβαίνει και με τα ιχνοστοιχεία και διάφορες βιταμίνες που περιέχει το θρεπτικό υπόστρωμα.

Σ' αυτές τις περιπτώσεις φτιάχνουμε stock διαλύματα σε προκαθορισμένες αναλογίες, και στη συνέχεια χρησιμοποιούμε ανάλογα ποσά.

Επειδή για θρεπτικό υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε έτοιμο MS της εταιρίας SIGMA , η παραπάνω εφαρμογή, χρησιμοποιήθηκε μόνο για την διάλυση των ορμονών.

Έτσι αν θέλουμε να χρησιμοποιήσουμε 2mg/l μιας φυτορμόνης για παράδειγμα, επειδή είναι δύσκολο να ζυγίσουμε σε τέτοιες ποσότητες, τοποθετούμε μια μικρή ποσότητα τυχαία, της συγκεκριμένης φυτορμόνης, στον ζυγό ακριβείας.

Έπειτα αφού την διαλύσουμε καλά με μερικές σταγόνες του κατάλληλου κάθε φορά διαλύτη (βλέπε πιν. 2), προσθέτουμε απιονισμένο νερό μέχρι μιας αναλογίας 1/10, 1/100, 1/1000 συνήθως. Έτσι λέμε π.χ. 0,1mg (διαλυμένου σώματος) / 1ml (διαλύτη) ή 0,01mg/1ml κ.τ.λ. Με βάση αυτές τις αναλογίες προσθέτουμε την κατάλληλη ποσότητα διαλύματος στο θρεπτικό υπόστρωμα και πετυχαίνουμε έτσι τις ακριβείς ποσότητες ρυθμιστών αύξησης.

Αν για παράδειγμα θέλουμε να προσθέσουμε 2mg/l μιας φυτορμόνης στο θρεπτικό υπόστρωμα διαλυτότητας 0,1mg/1ml, τότε δεν έχουμε παρά να προσθέσουμε 2mg/0,1mg=20ml διαλύματος.

Στο πείραμά μας χρησιμοποιήθηκαν οι ρυθμιστές αύξησης NAA, BAP, καθώς και η φυσική φυτορμόνη IAA σε συγκεντρώσεις που θα αναφερθούν παρακάτω και η διάλυση τους έγινε με τον παραπάνω τρόπο σε διαλυτότητα 0,1mg/1ml. Μόνο η NAA χρησιμοποιήθηκε σε διάλυση 0,01mg/1ml (σε μια περίπτωση) και αυτό γιατί είναι αρκετά ισχυρότερη από την φυσική ορμόνη IAA (10 φορές περίπου πιο ισχυρή).

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ:

Μετά από κάποιο πρόδρομο χρονικό διάστημα κατά το οποίο είχε γίνει α) η επιτυχής *in vitro* αναγέννηση επίκτητων μεριστωμάτων, β) επανακαλλιέργεια αυτών και γ) αναπολλαπλασιασμός τους και υπήρχε έτσι αρκετό φυτικό υλικό *in vitro*, άρχισε πλέον ο κανονικός πειραματισμός με διάφορες συγκεντρώσεις ρυθμιστών της αύξησης και ακολούθησε η συγκριτική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων.

Έτσι, σε πρώτο στάδιο ελήφθησαν, από το ήδη παραχθέν *in vitro* φυτικό υλικό, απλά μεριστώματα και των δυο ποικιλιών αμπέλου μεγέθους 0,2-0,3mm και τοποθετήθηκαν ανά πέντε σε ξεχωριστά τρυβλία, που περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα MS₃₋₄ και συμπληρώθηκαν με διαφόρων ποσοτήτων ρυθμιστές της αύξησης.

Αρχικά χρησιμοποιήθηκε η BAP, σε συγκεντρώσεις των 1mg/l, 2mg/l ή 4mg/l. Μετά από τέσσερις εβδομάδες καλλιέργειας έγιναν μετρήσεις στον αριθμό των παραχθέντων νέων οφθαλμών. Παρακάτω, στο διάγραμμα 1, φαίνονται οι μέσοι αριθμητικοί όροι των παραχθέντων οφθαλμών και στις δύο ποικιλίες, στις προαναφερθείσες συγκεντρώσεις.

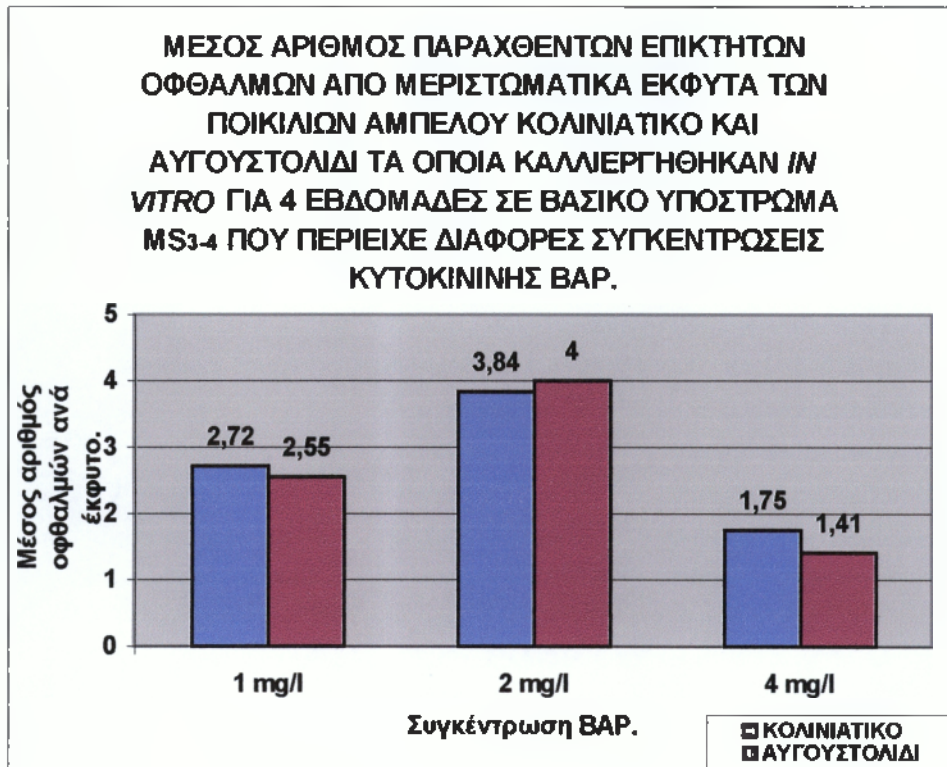
Καλύτερα αποτελέσματα παρουσίασε, η συγκέντρωση των 2mg/l της κυτοκινίνης BAP και για τις δύο ποικιλίες, με μέσο όρο οφθαλμών ανά έκφυτο 3,84 για την ποικιλία Κολινιάτικο και 4 για την ποικιλία Αυγουστολίδι και έτσι στην συνέχεια χρησιμοποιήθηκε αυτή η συγκέντρωση είτε μόνη είτε σε συνδυασμό με κάποια αυξίνη σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Έτσι χρησιμοποιήθηκε είτε η NAA σε συγκέντρωση 0,02mg/l είτε η IAA σε συγκέντρωση 0,2mg/l. Η NAA είναι περίπου 10 φορές πιο ισχυρή από την IAA, γι' αυτό χρησιμοποιήθηκε σε αναλογικά μικρότερη δόση. Υψηλές συγκεντρώσεις NAA είχαν ως αποτέλεσμα την δημιουργία κάλου, ένα αποτέλεσμα μη επιθυμητό. Επίσης ξαναχρησιμοποιήθηκε η συγκέντρωση των 2mg/l της BAP.

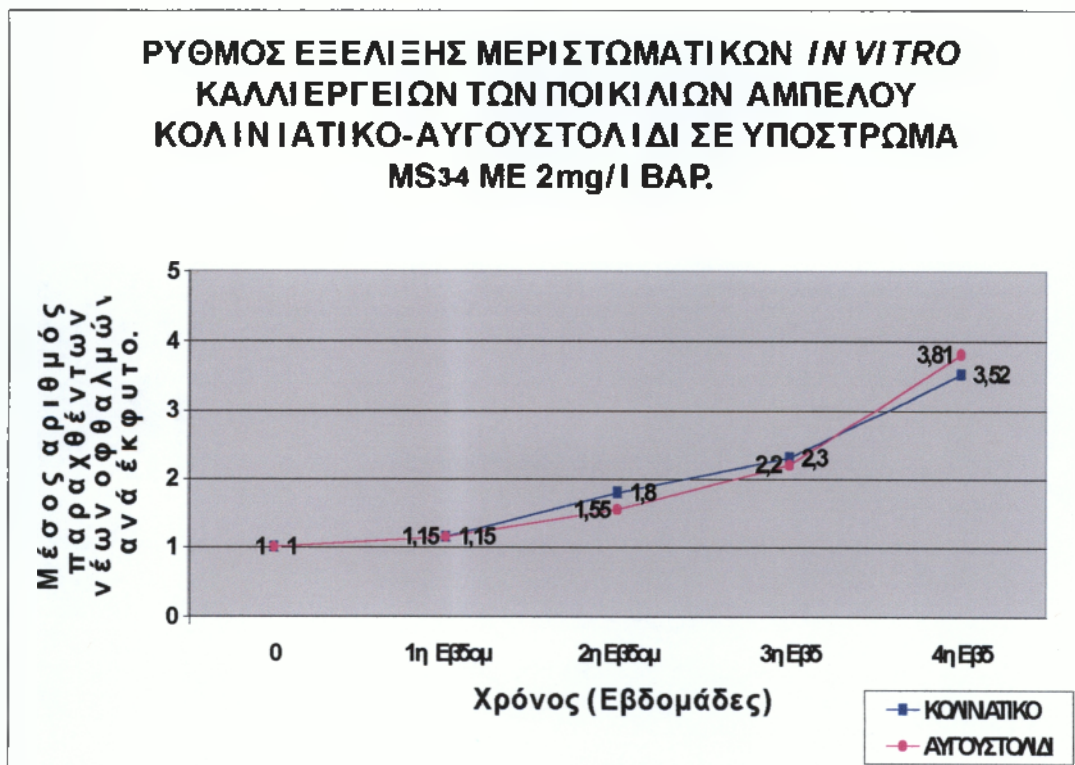
Σ' αυτόν τον δεύτερο γύρο μετρήσεων, αυτές γίνονταν κάθε εβδομάδα πλέον, ώστε να φανεί η εξελικτική πορεία του ρυθμού αναγέννησης νέων οφθαλμών, και στο πέρας των τεσσάρων εβδομάδων, ξαναμετρήθηκαν συνολικά οι παραγόμενοι οφθαλμοί.

Στα διαγράμματα 2, 3 και 4 φαίνεται, αυτή η πορεία αναπολλαπλασιασμού των μεριστωμάτων, ενώ στο διάγραμμα 5, φαίνεται ο συνολικός αριθμός παραχθέντων οφθαλμών, μετά από 4 εβδομάδες καλλιέργειας, για τους προηγούμενους συνδυασμούς ρυθμιστών της αύξησης.

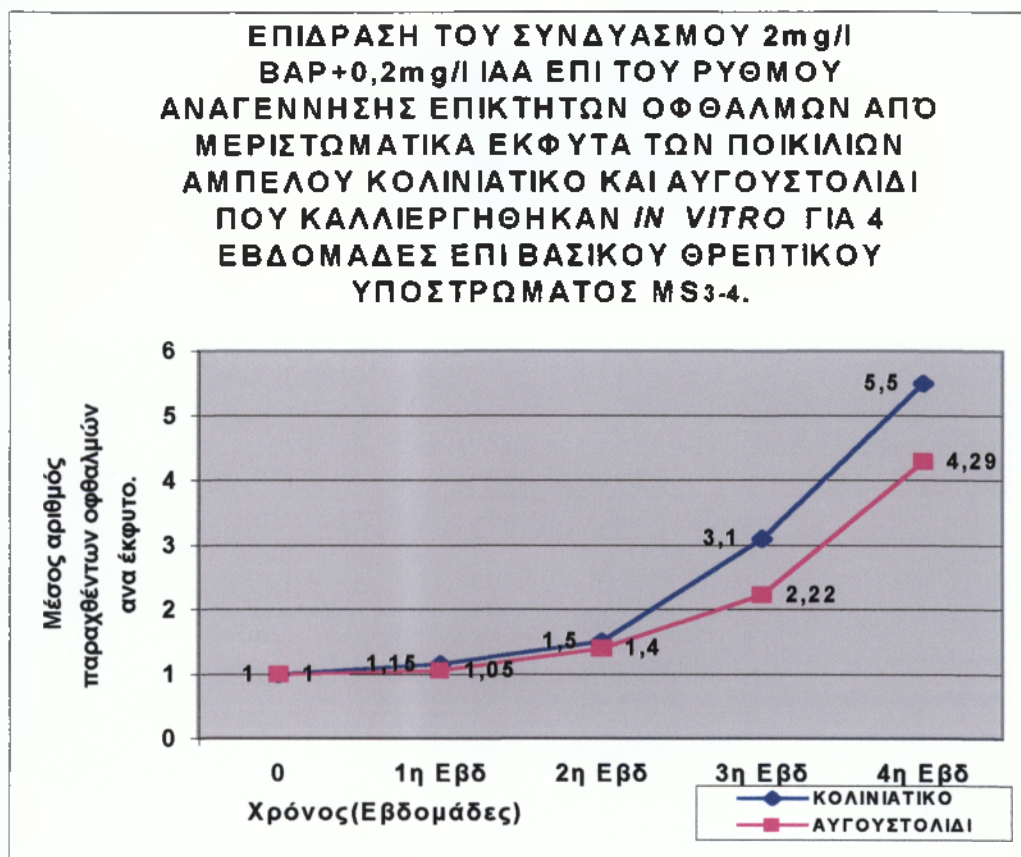
Διάγραμμα 1.



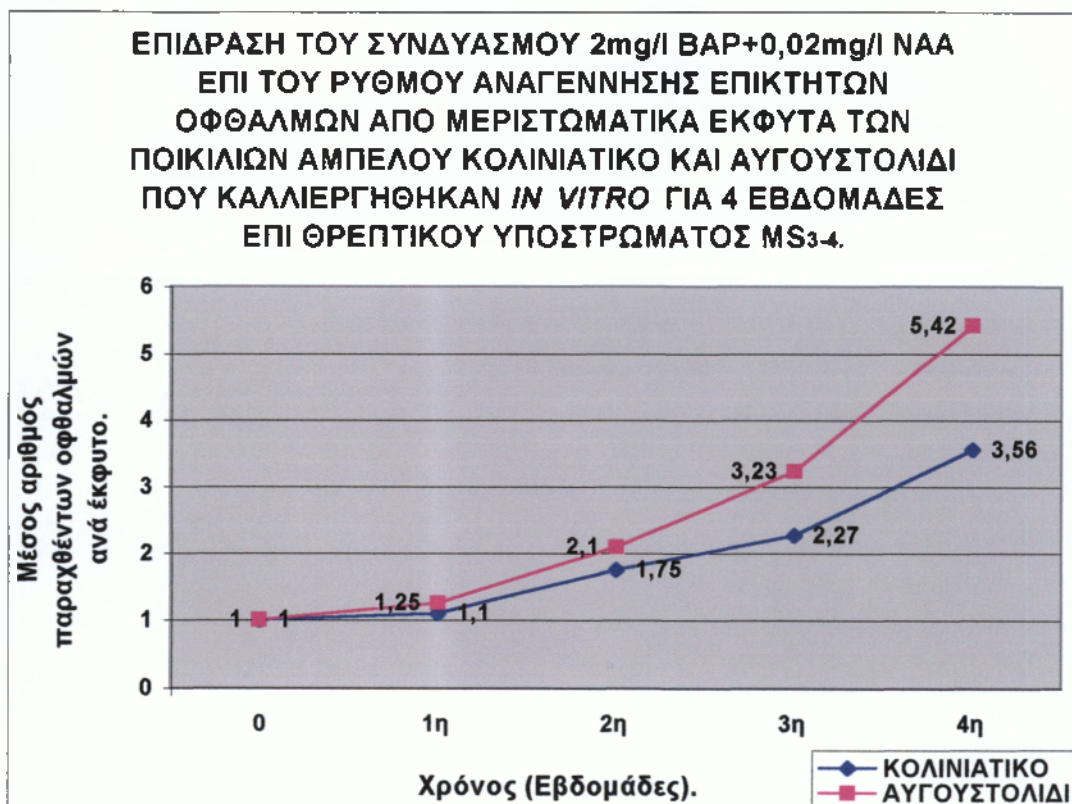
Διάγραμμα 2.



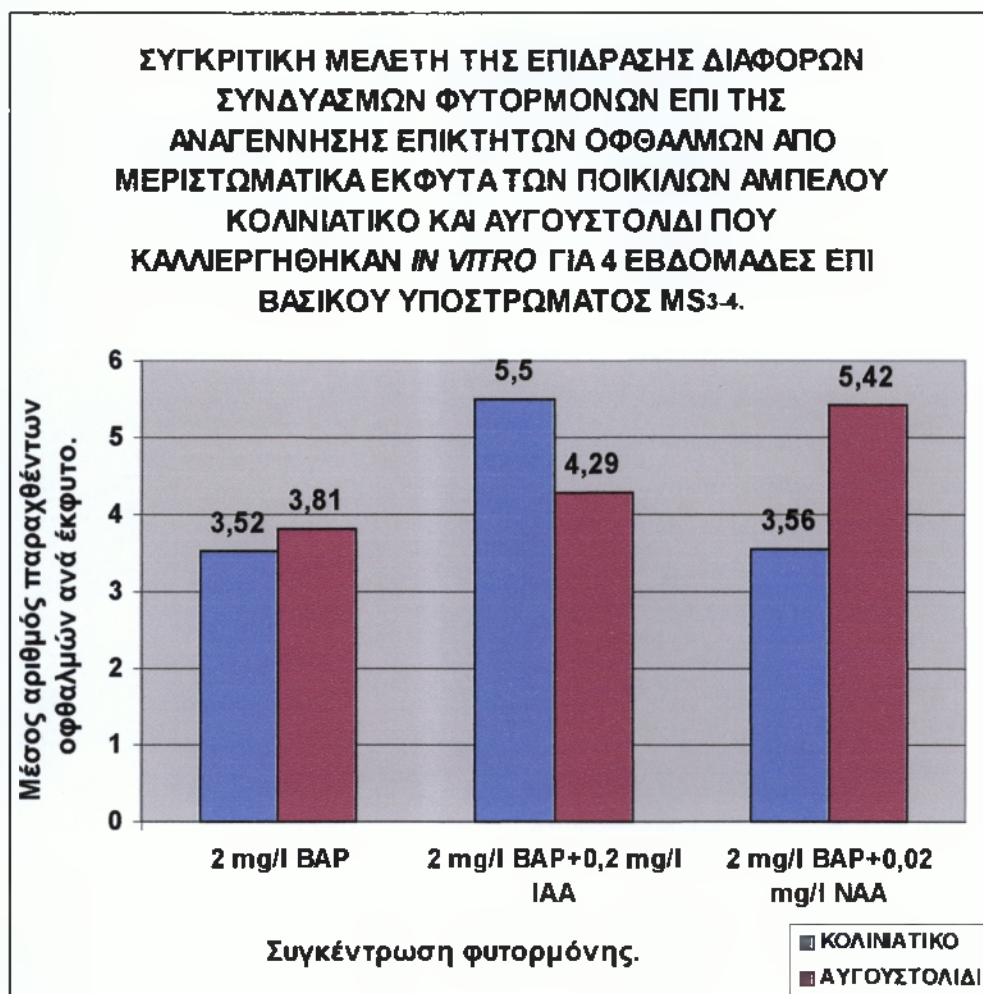
Διάγραμμα 3.



Διάγραμμα 4.



Διάγραμμα 5.



Έτσι στην συγκέντρωση των 2mg/l της BAP, τα αποτελέσματα είναι παρόμοια (και συμφωνούν) των αρχικών μετρήσεων, με ίδιο περίπου αριθμό παραχθέντων επίκτητων οφθαλμών, ενώ στις περιπτώσεις συνεργισμού κυτοκίνινης και αυξίνης, τα αποτελέσματα είναι αύξηση του αριθμού των παραγομένων οφθαλμών. Διαπιστώθηκε όμως μια κάποια διαφοροποίηση που οφειλόταν στην ποικιλία. Έτσι η μεν ποικιλία Κολινιάτικο παρουσίασε το μέγιστο μέσο αριθμό επίκτητων οφθαλμών ανά έκφυτο στην συγκέντρωση των 2mg/l BAP+0,2mg/l IAA, η δε ποικιλία Αυγουστολίδι σ' αυτήν των 2mg/l BAP+0,02mg/l NAA.

Έπειτα, τα έκφυτα τοποθετήθηκαν ακέραια (χωρίς τεμαχισμό) σε νέα δοχεία καλλιέργειας για να παρακολουθηθεί πλέον η εξέλιξη ανάπτυξης των οφθαλμών σε βλαστούς, οι οποίοι αρχίζουν και εμφανίζονται μετά την τρίτη-τέταρτη βδομάδα καλλιέργειας.

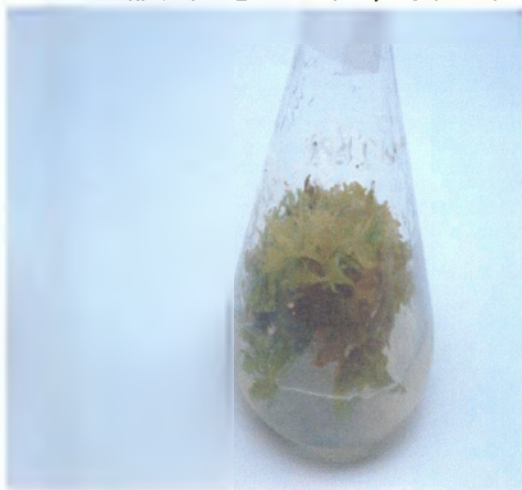
Όσα έκφυτα δεν χρειάζονταν για τις μετρήσεις τοποθετούνταν σε χαμηλότερες δόσεις της BAP (0,2-0,5mg/l), με ή χωρίς την παρουσία αυξινών και επιτυγχάνετο επιμήκυνση των βλαστών (Εικ.8).

Οι βλαστοί, τέλος, όταν επιμηκύνονταν ικανοποιητικά, αποκόπτονταν και ακολουθούσε η διαδικασία της ριζοβολίας, που θα αναφερθεί παρακάτω.

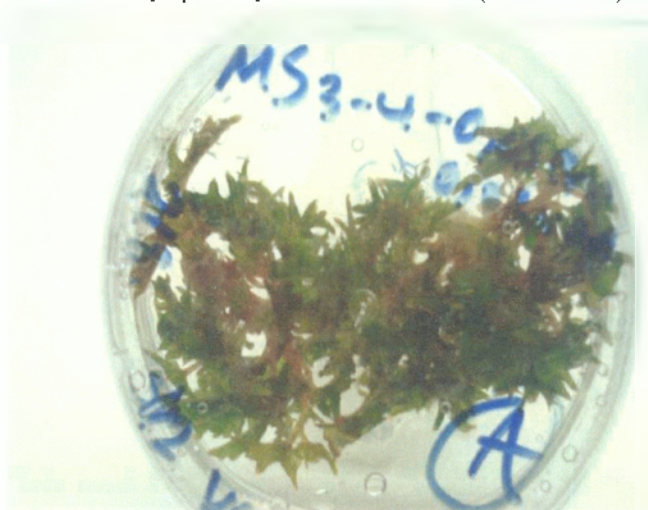
Τα έκφυτα που χρησιμοποιήθηκαν για την μέτρηση του αριθμού των παραχθέντων βλαστών μήκους >0,5 cm, τοποθετήθηκαν μετά τις 4 πρώτες εβδομάδες, σε περιέκτες με το ίδιο βασικό θρεπτικό υπόστρωμα MS34 και στο πέρας δύο ακόμα εβδομάδων (6 συνολικά), γινόταν μέτρηση των παραχθέντων βλαστών, αποκοπή τους και τοποθέτησή τους σε θρεπτικό υπόστρωμα για την προαγωγή της ριζοβολίας των.

Στον παρακάτω πίνακα (Πιν.4) φαίνεται ο αριθμός των παραχθέντων βλαστών, μετά από 6 εβδομάδες καλλιέργειας, καθώς και άλλα στατιστικά στοιχεία, επί αυτού.

Εικ.7. Στάδιο ανάπτυξης βλαστών με χρήση 2mg/l BAP (6 Εβδομ.)- Αυγουστολίδι.



Εικ.8. Στάδιο επιμήκυνσης των βλαστών με μείωση των επιπέδων BAP (Κολινιάτικο).

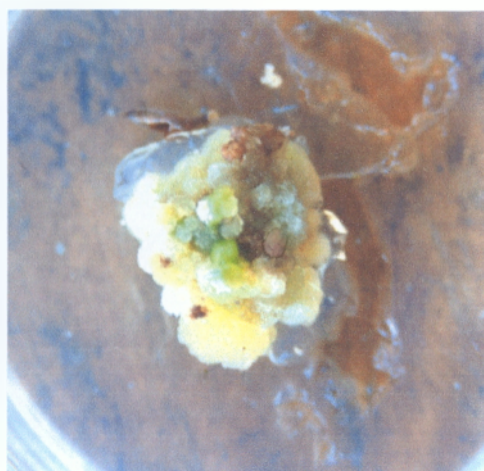


Πίν.4. Αριθμός παραχθέντων βλαστών ανά εκφύτο, μετά από 6 εβδομάδες καλλιέργειας σε διάφορες συγκεντρώσεις ρυθμιστών αύξησης.

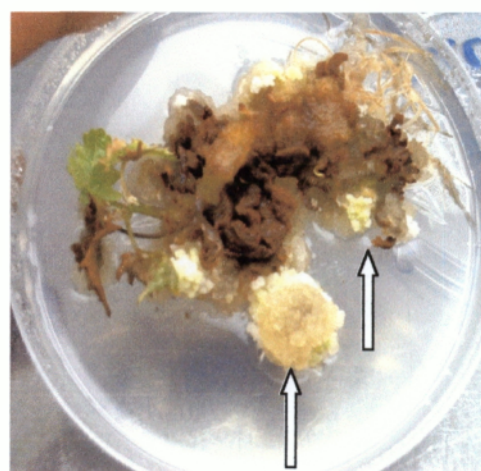
ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΕΙΔΟΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΗΤΑ ΡΥΘΜΙΣΤΩΝ ΑΥΞΗΣΗΣ	Αριθμός χρησιμο- ποιηθέ- νων εκφύτων.	Έκφυτα που αντέδρασαν.		Μ.Ο. βλα- στών ανά έκ- φυτο.	Έκφυτα που παρήγαγαν:					
					Εώς 2 βλαστ.		3-5 βλαστ.		>6βλαστ.	
		Αριθ.	%		Αριθ.	%	Αριθ.	%	Αριθ.	%
ΑΥΓΟΥΣΤΟΛΙΑΙ:										
2 BAP	50	48	96%	3,52	18	36%	22	44%	8	16%
2 BAP +0,02 NAA	60	51	85%*	3,01	24	40%	23	38%	4	6%
2 BAP + 0,2 IAA	50	48	96%	4,2	15	30%	23	46%	10	20%
ΚΟΛΙΝΙΑΤΙΚΟ :										
2 BAP	50	47	94%	3,57	16	32%	25	50%	6	12%
2 BAP +0,02 NAA	60	50	83%*	3	16	26%	22	36%	4	6%
2 BAP + 0,2 IAA	70	67	95%	3,92	19	27%	34	48%	14	20%

*Στην περίπτωση χρήσης της NAA το χαμηλό ποσοστό εκφύτων που αντέδρασαν, οφείλεται στην εξ'ολοκλήρου δημιουργία κάλου σε αριθμό αυτών (και απορρήφθηκαν) που το ποσοστό τους υπολογίζεται σε 12-15%. Το χαμηλό ποσοστό παραγωγής βλαστών οφείλεται στην δημιουργία κάλου σε περιοχές των εκφύτων (Εικ.10).

Εικ.9. Δημιουργία κάλου με την χρήση της NAA, στην ποικιλία Κολινιάτικο.

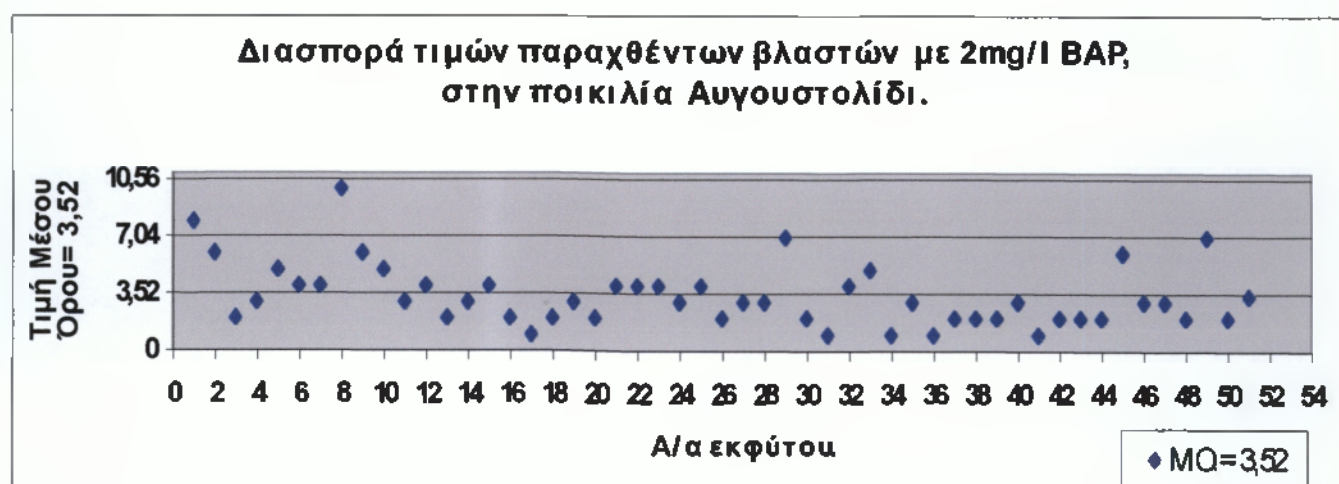


Εικ.10. Δημιουργία κάλου σε περιοχή του εκφύτου, με την χρήση της NAA, στην ποικιλία Κολινιάτικο.

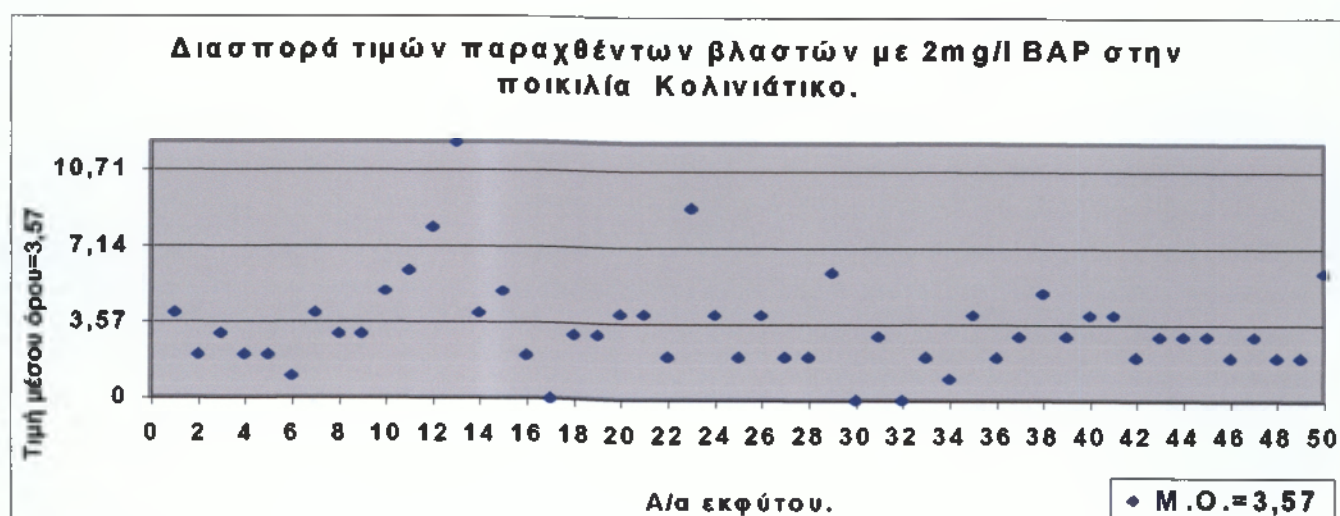


Στα επόμενα δυο διαγράμματα (6,7) φαίνεται η διασπορά των τιμών των παραχθέντων βλαστών ανά έκφυτο, με χρήση της 2 BAP, μετά από 6 εβδομάδες καλλιέργειας και για τις δύο ποικιλίες και δείχνει, όπως και για τους άλλους συνδυασμούς ρυθμιστών αύξησης, ότι το μεγαλύτερο ποσοστό εκφύτων, παρήγαγε από 3-5 βλαστούς.

Διάγραμμα 6.

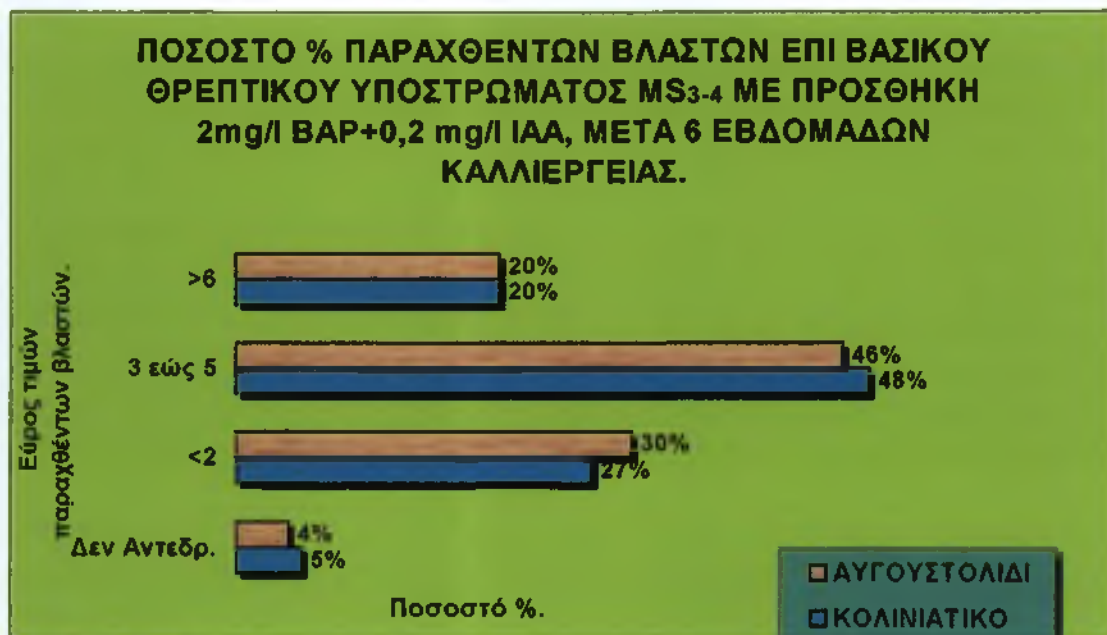


Διάγραμμα 7.



Στο επόμενο διάγραμμα (8) φαίνονται τα ποσοστά %, των παραχθέντων βλαστών με 2mg/l BAP+0,2mg/l IAA, για τις δύο ποικιλίες και μετά από 6 εβδομάδες καλλιέργειας.

Διάγραμμα 8.



Στο επόμενο στάδιο, οι παραχθέντες *in vitro* βλαστοί >0,5 cm, αποκόπτονταν κάτω από το τελευταίο γόνατο και τοποθετούνταν είτε σε τριβλεία Petri, είτε σε δοκιμαστικούς σωλήνες, για την πρόκληση ριζοβολίας. Εφοδιάστηκαν με 0,1mg/l NAA ή 0,2mg/l NAA ή 0,2mg/l ΙΑΑ.

Καλύτερα αποτελέσματα παρουσίασαν οι συγκεντρώσεις των 0,1mg/l NAA και 0,2mg/l ΙΑΑ. Αυτό δεν προέκυψε από μετρήσεις, αλλά ήταν σαφή η διαφορά, η οποία προέκυψε μόνο με οπτική παρατήρηση.

Εικ.11. Ριζοβολία της ποικιλίας Αυγουστολίδι, με 0,1mg/l NAA.



Εικ.12. Ριζοβολία της ποικιλίας Κολινιάτικο με 0,1mg/l NAA.



Τέλος, αφού οι βλαστοί ριζοβόλησαν *in vitro*, ακολουθήθηκαν οι διαδικασίες που περιγράφηκαν, για την σκληραγώγηση των φυτών και την μεταφορά τους στο φυσικό περιβάλλον.

Σ' αυτήν την διαδικασία πρέπει να λαμβάνονται υπόψη, καταρχάς το επιμελές ξέπλυμα των παραχθέντων *in vitro* φυταρίων, πριν την τοποθέτησή τους σε φυσικό υπόστρωμα. Αυτό γιατί το άγαρ του υποστρώματος, καθώς και οι οργανικές ενώσεις (σάκχαρα) αποτελούν άριστη τροφή για τους μύκητες και προσβάλλουν τα φυτά. Έπειτα τα φυτά τοποθετούνται στον θάλαμο σκληραγώγησης (Walk in) και σκεπάζονται για κάποιο διάστημα, ώστε να περιοριστούν οι απώλειες λόγω διαπνοής.

Αρχικά τοποθετούνται στις ίδιες συνθήκες καλλιέργειας, με αυτές *in vitro* και σταδιακά τα επίπεδα θερμοκρασίας, υγρασίας και φωτισμού μειώνονται, και τα φυτά παραμένουν σε αυτές για κάποιες εβδομάδες (4-5 ημέρες παραμονής σε κάθε επίπεδο).

Μετά και από αυτό το στάδιο, τα φυτά είναι έτοιμα να ζήσουν στο φυσικό περιβάλλον και μεταφέρονται ή στον αγρό ή σε θερμοκήπιο (Εικ.13,14).

Εικ.13. Παραχθέντα *in vitro* φυτά, μετά την σκληραγώγηση και πριν την μεταφορά τους στο θερμοκήπιο. (Λευκά=Κολινιάτικο, Μαύρα=Αυγουστολίδι).



Εικ.14. Φυτάριο της ποικιλίας Αυγουστολίδι μετά την σκληραγώγηση του.



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ:

Η *in vitro* καλλιέργεια της αμπέλου μας δίνει την δυνατότητα για την παραγωγή άνοσου φυτικού πολλαπλασιαστικού υλικού, καθώς και την παραγωγή μεγάλου αριθμού φυτών σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα.

Είναι μία από τις λίγες μεθόδους, και ίσως η μοναδική, που μπορεί να μας εγγυηθεί την παραγωγή άνοσου πολλαπλασιαστικού υλικού και μάλιστα με τέτοιους γεωμετρικούς ρυθμούς ανάπτυξης.

Ο μικροπολλαπλασιασμός επιτρέπει την γρήγορη παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων, φυτικού υλικού, σε συνθήκες άριστης υγιεινής. Επιπλέον, το υλικό αυτό αναπτύσσεται στην φύση εξαιρετικά καλά, προφανώς λόγω της εξάλειψης των κρυμμένων ιών (Kgul and Mowbray, 1984).

Οι ρυθμοί ανάπτυξης του φυτικού υλικού *in vitro*, διέπονται από μια μαθηματική ακολουθία. Έτσι π.χ. αν υπολογίσουμε κατά μέσο όρο ρυθμού αναπολλαπλασιασμού μεριστωμάτων κατά μήνα τον αριθμό 4, και παραγωγή 4 βλαστών ανά έκφυτο, μετά από 6 εβδομάδες καλλιέργειας, τότε σύμφωνα με πρόχειρους υπολογισμούς, μπορούμε να παράγουμε 1000 έτοιμα φυτά, από ένα και μοναδικό έκφυτο, μετά από 6 μήνες από την αρχική λήψη του εκφύτου. Για τους επόμενους μήνες, με την ίδια μέθοδο καλλιέργειας, ακολουθούνται οι ίδιοι ρυθμοί ανάπτυξης και έτσι σε 12 μήνες μπορούμε να φτάσουμε θεωρητικά (αν υπάρχουν οι κατάλληλοι χώροι και εγκαταστάσεις) την παραγωγή των 1.000.000. φυτών από ένα και μοναδικό έκφυτο.

Στην πράξη οι αριθμοί αυτοί είναι ανέφικτοι σε χώρους με ανειδίκευτο προσωπικό, επιτυγχάνονται όμως από μεγάλες επιχειρηματικές εταιρίες ιστοκαλλιέργειας.

Ο ταχύς ρυθμός πολλαπλασιασμού στηρίζεται στον σχηματισμό περισσότερων επίκτητων βλαστών από τον φερόμενο επί των εκφύτων αριθμό οφθαλμών. Οι επιπλέον αυτοί βλαστοί μπορεί να προέρχονται: α)είτε από την ανάπτυξη των ήδη προϋπαρχόντων οφθαλμών ή των καταβολών οφθαλμών, οι οποίοι είναι τόσο μικρού μεγέθους που δεν εντοπίζονται ακόμα και με ισχυρό στερεοσκόπιο (πλάγιοι μασχαλιαίοι οφθαλμοί) ή και β) από την δημιουργία νέων-επίκτητων (adventitious) μεριστωμάτων, ως αποτέλεσμα της δράσης των θρεπτικών υποστρωμάτων και κυρίως των ρυθμιστών της αύξησης. Αυτοί δημιουργούνται στο σημείο της βάσης του εκφύτου και ο αριθμός τους βρίσκεται σε αρνητική εξάρτηση με τον νεοδημιουργημένο κάλο (Κανάκης, 1997).

Η BAP θεωρείται, όπως προελέχθη, ως ένα άριστο ερέθισμα για την πρόκληση αναπολλαπλασιασμού και ανάπτυξης βλαστών σε συγκεντρώσεις 1,125-2,25 mg/l (Harris and Stevenson, 1982, Chee and Pool, 1985). Αυτό είναι γεγονός και για τις ποικιλίες Κολινιατικό και Αυγουστολίδι.

Στην αρχική φάση, όπου χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις των 1mg/l, 2mg/l και 4 mg/l της BAP, καλύτερα αποτελέσματα είχαμε στην συγκέντρωση των 2mg/l, αλλά και η δόση των 1mg/l, είναι ικανοποιητική, σε αντίθεση με αυτή των 4mg/l, όπου παρατηρήθηκε μεν χαμηλός ρυθμός εξέλιξης αναπολλαπλασιασμού των μεριστωμάτων, αλλά και περαιτέρω αναστολή της επιμήκυνσης των βλαστών. Αυτό συμφωνεί με τους Singh *et al.* (1992), όπου έδειξαν ότι υψηλότερες δόσεις των 2,2mg/l της BAP, παρεμποδίζουν ισχυρά την επιμήκυνση των βλαστών, με εξασφάλιση λίγων ή καθόλου βλαστών.

Στην περίπτωση του συνδυασμού κυτοκινινών και αυξινών και συγκεκριμένα της BAP (2mg/l) με την IAA (0,2mg/l) παρατηρούνται τα καλύτερα δυνατά αποτελέσματα αναπολλαπλασιασμού των μεριστωμάτων, με ρυθμό αναπολλαπλασιασμού αυτόν των 5,5 για την ποικιλία Κολινιατικό και 4,29 για την ποικιλία Αυγουστολίδι.

Αυτό συμφωνεί με τους Blazina *et al.* (1991), οι οποίοι στην ποικιλία "Zelen", πέτυχαν, τα καλύτερα αποτελέσματα αναπολλαπλασιασμού στις παραπάνω συγκεντρώσεις, ύστερα από αξιολόγηση διαφόρων δόσεων, συνεργισμού της BAP και IAA, αλλά και της BAP μόνη της.

Μερικοί ερευνητές χρησιμοποίησαν την NAA, αλλά αυτή φαίνεται ότι πρέπει να αποφεύγεται, τουλάχιστον στο στάδιο του αναπολλαπλασιασμού των μεριστωμάτων, γιατί στην συγκέντρωση των 0,02mg/l σε πολλές περιπτώσεις προκάλεσε απευθείας δημιουργία κάλου επί του εκφύτου, ενώ σε άλλες περιπτώσεις μεγάλα τμήματα των περιοχών του εκφύτου μετατρέπονταν σε διογκωμένο κάλο (Εικ.9). Αυτό δικαιολογεί και τον χαμηλό μέσο αριθμό αναπολλαπλασιασμού των μεριστωμάτων στην ποικιλία Κολινιατικό.

Έτσι και για τις δυο ποικιλίες, απορρίφθηκαν από τις μετρήσεις τα έκφυτα που παρήγαγαν κάλο σ' όλη τους την επιφάνεια. Υπήρξαν όμως και περιπτώσεις που τα έκφυτα παρήγαγαν κάλο κατά περιοχές, ενώ στην υπόλοιπη επιφάνεια τους παρήγαγαν σε μικρό αριθμό επίκτητους οφθαλμούς. Τα έκφυτα αυτά ελήφθησαν υπόψη κατά τη λήψη των μετρήσεων και είχαν ως αποτέλεσμα τη μείωση του μέσου αριθμητικού όρου των παραχθέντων επίκτητων οφθαλμών ανά έκφυτο. Αυτό συνέβη ως επί το πλείστον στα έκφυτα της ποικιλίας Κολινιατικό.

Τον σχηματισμό κάλου στις δόσεις, των 0,6mg/l BAP σε συνδυασμό με 0,01mg/l NAA, παρατήρησε και ο Preto (1999) και κατά τους Gray and Benton (1991) η χρήση των αυξινών

μπορεί και να αποφευχθεί στο στάδιο II (αναπολλαπλασιασμού των μεριστωμάτων) κυρίως αυτή της NAA η οποία θεωρείται ακατάλληλη γι' αυτό το στάδιο. Ίσως μελλοντικοί πειραματισμοί, με ακόμα χαμηλότερες συγκεντρώσεις NAA (της τάξεως των 0,001mg/l) μας διαφωτίσουν ακριβώς για την δράση της.

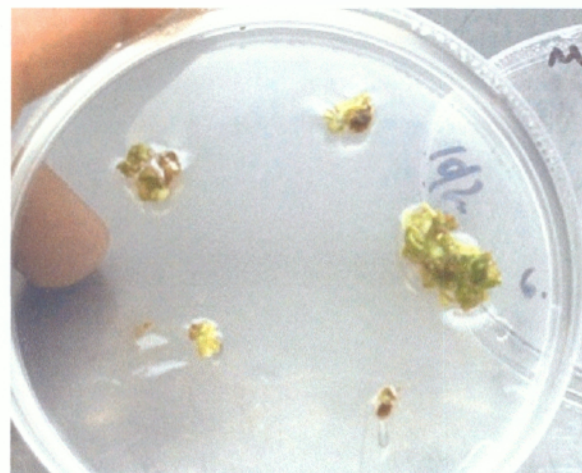
Ο κάλος είναι γενικά ανεπιθύμητος στις *in vitro* καλλιέργειες που προορίζονται για τον πολλαπλασιασμό των φυτών, επειδή παρουσιάζει ένα φαινόμενο που ονομάζεται σωμακλωνική παραλλακτικότητα, δηλαδή τα φυτά που προκύπτουν, δεν είναι πανομοιότυπα του μητρικού και παρουσιάζουν τόσο γενοτυπικές όσο και φαινοτυπικές διαφορές.

Πολλές φορές όταν ελήφθησαν μεριστωματικά έκφυτα από *in vitro* καλλιέργειες σε υπόστρωμα που περιείχε την φυτομόνη NAA και ακολούθως μεταφέρθηκαν σε νέα υποστρώματα τα οποία περιείχαν μόνο BAP (απουσία δηλαδή NAA) παρατηρήθηκε το φαινόμενο της δημιουργίας κάλου (κάτι που δεν εξηγεί η δράση της BAP)-(Εικ.15). Το φαινόμενο αυτό που ονομάζεται εθισμός μπορεί να έλαβε χώρα και στα δικά μας πειράματα. Δεν έγινε όμως από εμάς προσπάθεια απόδειξης αυτής της υπόθεσης μας.

Εθισμός είναι η ιδιότητα ορισμένων εκφύτων να παράγουν, από μόνα τους, μια συγκεκριμένη φυτορρυθμιστική ουσία, στην οποία έχουν προηγουμένως εκτεθεί για κάποιο διάστημα 3 και άνω επανακαλλιεργειών.

Εικ.15. Δημιουργία κάλου σε συγκέντρωση 2mg/l της BAP, σε έκφυτο που πάρθηκε μετά από συνεχήs χρήσεις της NAA.

Εικ.16. Καλλιέργεια μεριστωμάτων σε αρχικό της στάδιο, δύο εβδομάδων. (Αυγουστολίδι).



Παρατηρούμε επίσης (Πιν.4) ότι τα καλύτερα αποτελέσματα δημιουργίας βλαστών, μήκους >0,5cm. επιτυγχάνονται και για τις δυο ποικιλίες με την χρήση 2mg/l BAP σε συνδυασμό με 0,2mg/l IAA, με μέσο αριθμό παραχθέντων βλαστών 4,2 για την ποικιλία Αυγουστολίδι και 3,92 για την ποικιλία Κολινιάτικο. Η χρήση των 2mg/l BAP ήταν πολύ ικανοποιητική, αλλά και σ' αυτό το στάδιο, η χρήση της NAA, αποδείχθηκε να υστερεί έναντι των άλλων συνδυασμών, αφού παράγαγε χαμηλότερο μέσο αριθμό βλαστών.

Σε όλους τους εφαρμοσθέντες συνδυασμούς φυτορμονών το μεγαλύτερο ποσοστό των εκφύτων παράγαγε από 3-5 βλαστούς (από 36-50%, Πιν.4). Αξίζει όμως να αναφερθεί ότι ο συνδυασμός των 2mg/l BAP με 0,2mg/l IAA ήταν ο αποτελεσματικότερος αφού με αυτόν παράχθηκαν πάνω από 6 βλαστοί ανά έκφυτο, σε ποσοστό 20% και για τις δυο ποικιλίες, ένα αποτέλεσμα αρκετά ικανοποιητικό (Διαγρ.8).

Σ' αυτό το στάδιο (της έκπτυξης των βλαστών), αξίζει να αναφερθεί ότι ο αριθμός των παραχθέντων οφθαλμών στα έκφυτα, είναι πολύ μεγαλύτερος, από αυτόν του πρώτου σταδίου (του αναπολλαπλασιασμού των μεριστωμάτων) και σε πολλές περιπτώσεις είναι μεγαλύτερος των 100 ανά έκφυτο. Αυτό δεικνύει πιθανόν ότι τις 4 πρώτες βδομάδες καλλιέργειας γίνεται αναπολλαπλασιασμός από ένα μοναδικό μερίστωμα ενώ στο επόμενο στάδιο έχουμε, με την συνέχιση της χρήσης των ίδιων συγκεντρώσεων φυτορρυθμιστικών ουσιών, αναπολλαπλασιασμό από μεγαλύτερο αριθμό μεριστωμάτων, που παράχθηκαν στο πρώτο στάδιο. Λόγω του υπερβολικά μεγάλου αριθμού μεριστωμάτων, στο σημείο αυτό η μέτρηση τους είναι αδύνατη. Η χρήση της NAA (και η δημιουργία κάλου σε περιοχές των εκφύτων) συντέλεσε στο να παραχθεί σαφώς σημαντικά μικρότερος αριθμός νέων μεριστωμάτων, όπως εξηγήθηκε και προηγουμένως.

Μια μετέπειτα μείωση των επιπέδων της BAP (από 2mg/l σε 0,2mg/l), με την παρουσία ή όχι αυξινών, έχει ως αποτέλεσμα την επιμήκυνση των βλαστών και τη μη συνέχιση του ίδιου ρυθμού αναπολλαπλασιασμού αυτών.

Όσον αφορά την ριζοβολία της αμπέλου *in vitro* αυτή είναι σχετικά εύκολη, αν και χαμηλές συγκεντρώσεις αυξινών υποβοηθούν την ριζοβολία. Οι δύο όμως χρησιμοποιούμενες ποικιλίες, δεν ριζοβόλησαν σε βασικό MS₂₋₃ ή ½ MS₂₋₃ στο οποίο απουσίαζαν οι αυξητικοί παράγοντες.

Χρησιμοποιήθηκαν έτσι η NAA σε συγκεντρώσεις των 0,1mg/l ή 0,2mg/l και η IAA στην συγκέντρωση των 0,2mg/l και στις δύο ποικιλίες.

Η NAA στην συγκέντρωση των 0,1mg/l, φαίνεται να παρουσίασε τα καλύτερα αποτελέσματα (μεγαλύτερο ποσοστό ριζοβολίας), αν και δεν έγιναν ακριβείς μετρήσεις που να επιβεβαιώνουν το γεγονός.

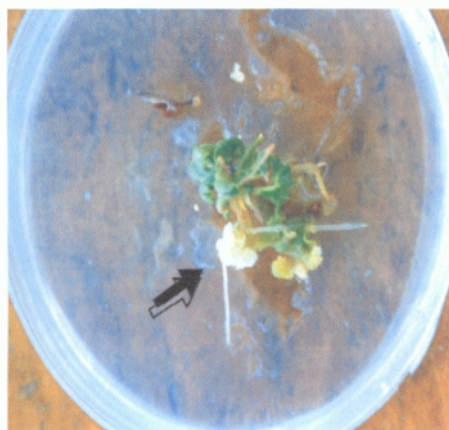
Ωστόσο στη συγκέντρωση των 0,1mg/l NAA ριζοβόλησαν όλα τα έκφυτα, που τοποθετήθηκαν σε τρυβλία Petri, και το μεγαλύτερο ποσοστό, από τα έκφυτα που τοποθετήθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες, σε αντίθεση με την NAA στην συγκέντρωση των 0,2mg/l όπου δεν δίδει αύξηση σε επιπλέον ρίζες, αλλά οδηγεί σε σχηματισμό κάλου (Εικ.18). Το ίδιο παρατήρησαν και οι Helior *et al.* (1997), για την ριζοβολία *in vitro* της ποικιλίας “Pinot noir” (στη συγκέντρωση των 2mg/l NAA) και ανέφεραν, ότι η IBA είναι καταλληλότερη, γι’ αυτόν το σκοπό.

Και η IAA, παρουσίασε καλά αποτελέσματα στο πείραμα μας.

Την NAA σε συγκεντρώσεις 0,1mg/l, χρησιμοποίησαν πρώτοι οι Barlass and Scene (1978) και πέτυχαν άριστα αποτελέσματα.

Την IAA, σε συγκεντρώσεις 0,2mg/l χρησιμοποίησαν οι Blazina *et al.* (1992) και οι Mharte *et al.* (1999) και πέτυχαν πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα, ενώ άλλοι ερευνητές προτιμούν την χρήση της IBA, με την οποία δεν έγινε πειραματισμός στην παρούσα εργασία.

Εικ.17. Δημιουργία κάλου και ριζοβολία με 0,1mg/l NAA, στην ποικιλία Κολινιάτικο.



Εικ.18. Δημιουργία κάλου με 0,2mg/l NAA (μετά 8 εβδ. καλλιέργειας)-Αυγουστολίδι.

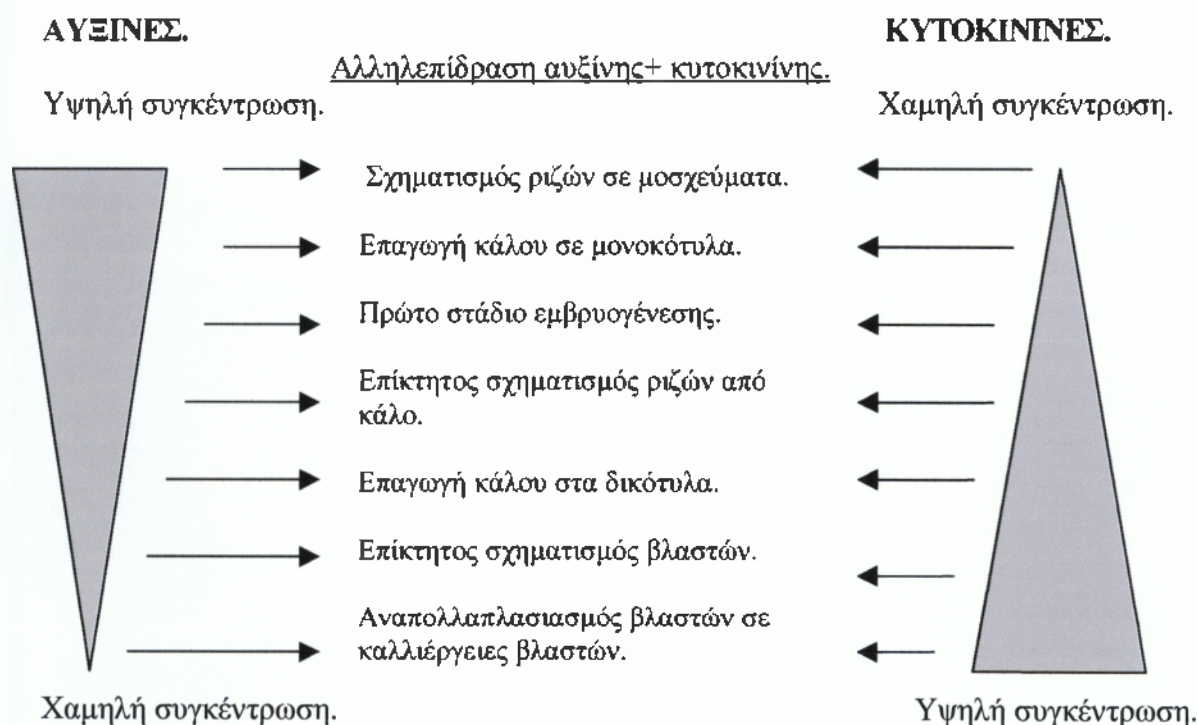


Από αυτό το στάδιο (παραγωγή *in vitro* ριζοβολημένων φυταρίων), οι περαιτέρω διαδικασίες σκληραγώγησης και εγκλιματισμού τους είναι δεδομένες, εύκολες, και ανεξάρτητες της ποικιλίας (δεν αποτελούν αντικείμενο της έρευνας μας), μπορούν δε να θεωρηθούν εργασίες ρουτίνας, και μας οδηγούν στην λήψη έτοιμων φυτών (η περιγραφή των διαδικασιών αυτών έγινε παραπάνω).

Γενικά για τα συστήματα μικροπολλαπλασιασμού, η περίπου αντίθετη δράση των αυξινών και των κυτοκινινών έχει τεράστια σημασία, γιατί παρέχουν ένα αποτελεσματικό μέσο στη διάθεση των ερευνητών, να ρυθμίζουν κατά βούληση την επαγωγή της μορφογένεσης, δηλαδή να κατευθύνουν το σχηματισμό βλαστών ή ριζών. Γι αυτό οι *in vitro* καλλιέργειες είναι σχεδόν αδύνατες χωρίς τους ρυθμιστές της αύξησης. Το ίδιο ισχύει και για το αμπέλι, αλλά απαιτείται πειραματισμός για κάθε είδος και ποικιλία αυτού, ώστε να βρεθούν οι καταλληλότερες σχέσεις των ρυθμιστών της αύξησης.

Στο παρακάτω σχήμα μπορούμε να δούμε, τι πετυχαίνουμε γενικά με τον συνεργισμό αυξινών και κυτοκινινών.

Σχήμα 2. Αποτελέσματα με αλληλεπίδραση αυξινών-κυτοκινινών (Από GEORGE E.F., 1993).



Η προσθήκη των παραπάνω ρυθμιστών της αύξησης σε ανάλογες συγκεντρώσεις κρίνεται απαραίτητη για την μεριστωματική καλλιέργεια και τον ταχύτερο μικροπολλαπλασιασμό της αμπέλου και για τις δύο χρησιμοποιούμενες στο πείραμά μας, ποικιλίες.

Σαφώς καλύτερα αποτελέσματα παρουσίασαν οι συγκεντρώσεις των 2mg/l BAP με 0,2mg/l IAA στα στάδια αναπολλαπλασιασμού και δημιουργίας βλαστών, αλλά και αυτή των 2mg/l BAP, ως μόνη φυτομόνη, είναι πολύ ικανοποιητική, σε αντίθεση με την χρήση της NAA, που πρέπει να αποφεύγεται.

Περαιτέρω έρευνα χρήζει η προσθήκη του παραπάνω ρυθμιστή της αύξησης (NAA), στο στάδιο της ριζοβολίας, με μεγαλύτερο εύρος δόσεων, ώστε να διερευνηθεί εάν όντως η επαγωγή κάλου, είναι αποτέλεσμα του επιπέδου της συγκέντρωσης ή κάποιων άλλων παραγόντων (γενότυπου, συνθηκών καλλιέργειας κ.τ.λ.).

Έτσι συμπερασματικά, μπορεί να ειπωθεί ότι οι παραπάνω μέθοδοι συνιστούν ένα αποτελεσματικό τρόπο για τον ταχύ πολλαπλασιασμό των δύο αυτών ποικιλιών και την πιθανή εξυγίανση τους από ιώσεις, που όμως αυτή για να επαληθευθεί, απαιτούνται ειδικές εργαστηριακές εξετάσεις (ELISA TEST). Όμως ένας ταχύς ρυθμός παραγωγής κλώνων αμπέλου των δύο παραπάνω ποικιλιών μπορεί σαφέστατα να επιτευχθεί και μάλιστα με ρυθμούς μαθηματικής ακολουθίας. Αν μετά από ιολογικές εξετάσεις διαπιστωθεί ότι έστω και ένας κλώνος, που παράχθηκε με τις παραπάνω μεθόδους είναι υγιής, μπορούμε να επιτύχουμε ταχύτατα τη δημιουργία μεγάλου αριθμού υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού, κάτι που είναι αδύνατο με άλλους μεθόδους (π.χ. με την θερμοθεραπεία από μόνη της, το πολύ-πολύ να παράγουμε μόνο λίγα υγιή φυτά, χωρίς μεγάλες δυνατότητες πολλαπλασιασμού των).

ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.

I. ΑΡΘΡΑ-ΒΙΒΛΙΑ.

- ΑΥΓΕΛΗΣ Α.Δ.,ΓΡΑΜΜΑΤΙΚΑΚΗ Γ.(1994)*Αντιμετώπιση των Ιώσεων. I. Εξυγίανση του Πολλαπλασιαστικού Υλικού.* Γεωργία-Κτηνοτροφία 3:50-56.
- ADERKAS P.,BONGA J.M.(1999).*Influencing Micropropagation and Somatic Embryogenesis in Mature Trees by Manipulation of Phase Change, Stress and Culture Environment.* Tree Physiology 20:921-28.
- BARLASS M.,DUE G.,HARDY G.(1991). *Micropropagated Vines Establish Substantially Better in Polypropylene Shelters.*
ANZ Wine Industry Journal, May 1991. Vol.6/No2:139-141.
- BARLASS, M. AND K.G.M. SKENE (1978). *In vitro propagation of grapevine (Vitis vinifera L.) from fragmented shoot apices.* Vitis, 17, 335-40.
- BASS P. ,CLOG E., WALTER B.(1988).*Improvements In Apex Culture in Vitis Species.*
Acta Horticulturae 227:485-88.
- BLAZINA I., KOROSK-KORUZA Z., RAVNIKAR M., GOGALA N.(1991).
Regeneration and Micropropagation of the Grapevine (Vitis Vinifera L. 'Zelen') from Shoot Tip Meristems. Acta Horticulturae 300:123-126.
- CAMBORG O., PHILLIPS G.(1996). *Plant Cell, Tissue and Organ culture. Fundamental Methods.* Springer tab manual, pp: 117-140.
- CHEE R., POOL R.M.(1982). *The effects of growth substances and photoperiod on the development of shoot apices of Vitis cultured in vitro.* Sc.Horticulturae,16:17-27.
- DEBORAH P.C.,ZIMMERMAN R.H.(1993). *Micropropagation. Technology and Application.* pp 239-41. Kluwer Acad.Publishers, London.
- DIMITROVA V.(2000). *Clonal Micropropagation of Cultivar Bolgar(Vitis vinifera) and Nutrient Medium Composition:A Mathematical Approach.*
Acta Horticulturae 526:pp.287-291.
- DODDS J.,ROBERTS L.(1995). *Experiments in Plant Tissue Culture.* Cambridge Press.pp:82-103.
- ΕΛΕΥΘΕΡΙΟΥ Ελευθέριος(1994). *Τεχνολογία Φυτικού Πολλαπλασιαστικού Υλικού.* Σελ.93-144 Art of Text . Θεσσαλονίκη.
- ZAKYNΘΙΝΟΣ Γ.(1988). *Απλές Εφαρμογές Βιοτεχνολογίας στη Γεωργία.* Α.Γ.Σ.Α.
- FOURNIOUX J.C.(1997) *Adult leaves of grapevine cuttings stimulate rhizogenesis.* Vitis 36(1):49-50(1997).
- GEORGE E.F.(1993). *Plant Propagation by Tissue Culture.Part1 :The Technology ,Part 2:In Practice pp:1055-60,1083-86.*
Exegetics Ltd.,Edington
- GRAY, D.J. AND C.M. BENTON. (1991). *In vitro micropropagation and plant establishment of muscadine grape cultivars (Vitis rotundifolia).*
Plant Cell Tissue Organ cult. 27:7-14.
- HARTMANN H.,KESTER D.,DAVIES F(1983).*Plant Propagation.Principles and Practices.*pp459-544 Prentice-Hall International Editions New Jersey.
- HELOIR M.C.,FOURNIOUX J.C.,BARBIER M.,BESSIS R.(1998). *Endogenous Poluamine Concentrations in Juvenile,adult and Micropropagated Grapevine.* Vitis 37:pp.61-62.
- ΘΕΟΔΟΣΙΑΔΟΥ Εύη(1998). *Εμβολιασμοί στο Αμπέλι.* Γεωργική Τεχνολογία Ιούλιος 1998: 96-99.
- JAYASANKAR S.,MARILYN VAN, AMAN-ZHIJIAN LI &DENNIS G.(2001).
Direct Seeding of Grapevine Somatic Embryos and Regeneration of Plants.

- In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant 37:476-479, July-August 2001.
- KANAKHS Ανδρέας(1992)*Σύγχρονες Μέθοδοι Πολλαπλασιασμού του Αμπελιού, με in vitro Καλλιέργειες*. Γεωργία-Κτηνοτροφία 5:52-59.
- KANAKHS Ανδρέας(2001).*Μαθήματα Ιστοκαλλιέργειας .Παραγωγή Φυτικού Πολλαπλασιαστικού Υλικού. Σημειώσεις Μαθήματος. Καλαμάτα 2001.*
- KINTZIOS Σ.Ε.(1994). *Επιχειρηματική Ιστοκαλλιέργεια*. Σελ.28-29,75-76. Εκδ.Σταμούλης Αθήνα.
- KRUL, W.R., MOWBRAY (1984). *Cell, tissue and organ culture of grape*. In: Handbook of Plant Cell Culture. Vol. 2. (Eds: Sharp, WR; Evans, DA; Amirito, PV; Yamada, Y) MacMillan Publishing Co., New York, 396-434.
- MHARTE MINAL ,SALUNKHE C.K., RAO P.S.(2000). *Micropropagation of Vitis vinifera L.towards an improved protocol*. Scientia Horticulturae 84:357-363.
- MULLINS M. G (1990). *Tissue Culture and the Genetic Improvement of Grapevines: a review*. ISHS Acta Horticulturae 280:pp.11-22.
- MURASHIGE T., HUANG L.-C.(1987). *Cloning Plants by Tissue Culture: Early Years, Current Status and Future Prospects*. ISHS Acta Horticulturae 212:pp.35-42.
- ΠΑΣΠΑΤΗΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ(1998).*Φυτορρυθμιστικές Ουσίες(Φυτορμόνες)*.σελ 307-16. Εκδ.Αγρότοπος, Αθήνα.
- ΠΛΑΣΤΗΡΑ ΒΑΣΙΛΕΙΑ(1994). *Ιώσεις και Παρόμοιες Ασθένειες του αμπελιού*. Γεωργία και Ανάπτυξη 6 : 137-153.
- ΠΟΝΤΙΚΗΣ Κ.(1994). *Πολλαπλασιασμός Καρποφόρων Δένδρων και Θάμνων*. σελ. 197-222. Εκδ. Σταμούλης, Αθήνα.
- PIERIC R.L.M.(1987).*In Vitro Culture of Higher Plants*.Martinus Nijhoff Publ. Dordrecht. p.334.
- PIOUS THOMAS(1997). *Effect of pruning or removal of in vitro formed roots on ex vitro root regeneration and growth in micropropagated grapes*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 51 (3): 177-180, 1997.
- PRETO JOAO (1999). *Abnormal callus formation on Vitis*. Plant-tc Monthly Archive
- ΣΠΙΝΘΗΡΟΠΟΥΛΟΥ Χ.(2000). *Οινοποιήσιμες ποικιλίες του Ελληνικού Αμπελώνα*. OLIVE PRESS Publicatons. Κέρκυρα.σελ.64-70.
- ΣΤΑΥΡΑΚΑΚΗΣ Μ., ΜΙΧΟΣ Β.(1996). *Η Αμπελουργική Έρευνα στην Ελλάδα*. Γεωργική Τεχνολογία, Ιούλιος 1996: 20-23.
- ΣΤΑΥΡΑΚΑΚΗΣ Μ., ΚΑΝΑΚΗΣ Α.(1997). *Σύγχρονες Μέθοδοι Ταχέως Αγενούς Πολλαπλασιασμού μερικών ποικιλιών και Υποκειμένων Αμπέλου που Καλλιεργούνται στην Ελλάδα*. In vitro καλλιέργεια βλαστικών κορυφών. Γεωργική Έρευνα,21:68-74,1997.
- ΣΦΑΚΙΩΤΑΚΗΣ Ε.(1979). *Δενδρώδης καλλιέργειες*. σελ.174-86. Ίδρυμα Ευγενίδου. Αθήνα.
- STAFFORD A.,WARREN G.(1991). *Plant Cell and Tissue Culture*. J.Wiley Publishers. New York, Toronto.
- SINGH A.K., SHARMA B.B.,PANDEY R.M.(1992). *Rapid in Vitro Multiplication of Vitis Vinifera L. Through Shoot Tips and Nodal segments*. Acta Horticultutae 321:pp.601-605.
- ΤΣΑΠΙΚΟΥΝΗΣ Φάνης.(1999). *Βιοτεχνολογία*. σελ.17 Εκδ.Σταμούλης Αθήνα.
- WALKER A.,GOLINO D.A.(1998).*Rapid Propagation of Grape Planting Stock*. Tenth Australian Wine Industry Technical Conference,Australia,1998.
- WANG P.-J., HU C.Y.(1982). *In vitro mass tuberization and virus-free seed potato production in Taiwan*. Am.pot.Jurn. 59:33-37.

II. ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ.

ΑΓΝΩΣΤΟΣ(1999). *Release of transgenic grapevines in Germany*. Institute for Grapevine Breeding Geilweilerhof . - irz@geilweilerhof.suew.shuttle.de

ΑΓΝΩΣΤΟΣ(1996). *Organization of a Tissue Culture Laboratory*.

<http://www.phytotechlab.com/technical.pdf>

FRISON E.A., IKIN R.(1999). *Technical Guidelines for the Safe Movement of Grapevine Germplasm*.

<http://www.ecoport.org/REFS/IPGRI/grapevin.pdf>

TRONCOSO A. , CANTOS M. LIÑAN J., PRIETO J. *The Use of "in vitro" Culture and Tubular Container System to Propagate Selected Grapevine Plants for Sherry Wine Production*. ISHS Acta Horticulturae 227. <http://www.actahort.org/>.

ΣΥΜΠΛΗΡΩΜΑΤΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ (ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΗ).

- BARLASS M., SKENE K.G.M., WOODHAM R.C. & KRAKE L.R. (1982). *Regeneration of virus-free grapevines using in vitro apical culture*. Ann. appl. Biol. 101:291-295.
- CHEE R., POOL R.M. (1985). *In vitro propagation of Vitis. The effects of organic substances on shoot multiplication*. Vitis 24:106-118.
- GAZLY R.(1964). *Technique de la thermotherapie des viroses de la vigne*. Ann.Epiphyt 15:pp.245-256.
- GAZLY R.,COMPAN D. (1988). *Growth and nutrition of grapevine during in vitro long term storage*.Plant Organ and Tissue Culture13:229-237.
- HIRABAYASHI T., AKIHAMA T. (1982): *In vitro embryogenesis and plant regeneration from the anther-derived callus of {IVitis}*. Proc. 5th Intl. Cong. Plant Tissue & Organ Culture 1982, 547-548.
- JONA R.,WEBB K.(1978). *Callus and Axillary Bud Culture of Vitis vinifera "Sylvaner Reisling"*. Sci. Hort. 9:55-60.
- KRUL W.R. (1982): *{In vitro} propagation of grape*. Application: 3 Dec 1982. USA Patent 4,532,733, issued 6 Aug 1985.
- KRUL W.R. (1986): *{In Vitro} propagation of grape via leaf disk culture*. Application: 31 July 1987. USA Patent 4,931,394, issued 5 June 1990.
- MONETTE P. L. (1988). *"Grapevine (Vitis vinifera L.)"* pp 3-37 In: Biotechnology in agriculture and Forestry, Vol. 6, crops II. Ed. Y.P.S.Bajaj. Springer-Verlag.
- RAJASEKAREN K., MULLINS M.G. (1979): *Embryos and plantlets from cultured anthers of hybrid grapevines*. J. Exp. Bot. 30, 399-407.
- SRINIVASAN,C; MULLINS,MG (1980): *High-frequency somatic embryo production from unfertilized ovules of grape*. Scientia Hortic. 13, 245-252.
- STAMPJ.A., MEREDITH,CP (1988): *Proliferative somatic embryogenesis from zygotic embryos of grapevine*. J. Amer. Soc. Hort. Sci. 113(6), 941-945.
- VILAPLANA M., MULLINS M.G. (1989): *Regeneration of grapevines ({IVitis}spp.){In vitro}: Formation of adventitious buds on hypocotyls and cotyledons of somatic embryos*. J. Plant Physiol. 134(4), 413-419.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.

1.ΣΥΝΤΗΜΗΣΕΙΣ.

-AC	Activated Charcoal.	Ενεργός Άνθρακας.
-BA	Benzyladenine.	Βενζυλαδενίνη(Κυτοκίνη).
-BAP.	6-Benzylaminopurpurine	6-Βενζυλοαμινοπουρπουρίνη(Κυτοκ.)
-GA ₃	Gibberilic Acid.	Γιββεριλικό Οξύ (Γιββερύλλινη)
-IAA	Indoleacetic Acid.	Ινδολυλοξικό Οξύ(Αυξίνη).
-IBA	Indolebutyric Acid.	Ινδολυλοβουτυρικό Οξύ(Αυξίνη).
-NAA	Naphtaleneacetic Acid.	Ναφθαλινοξικό Οξύ (Αυξίνη).
-2,4-D.	(2,4-dichlorophenoxy)acetic Acid.	2,4-διγλωροφαινοξοξικό Οξύ(Αυξίνη).

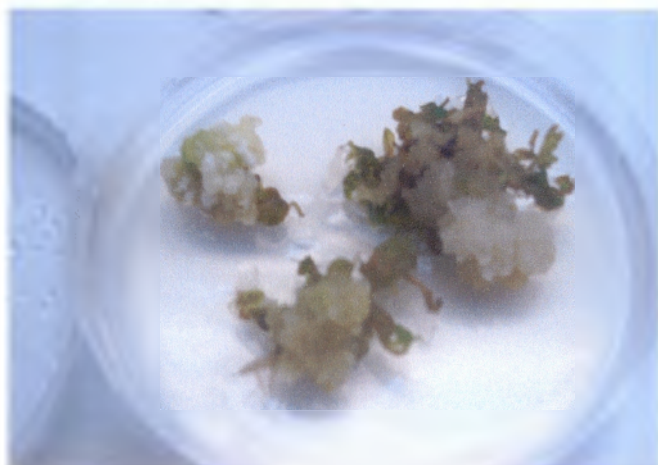
2.ΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΕΙΚΟΝΕΣ.



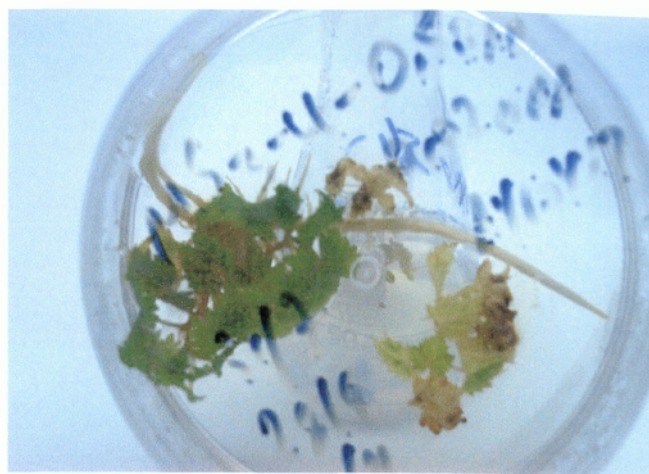
Εικ. 19. Θάλαμος σκληραγώγησης φυτών (Walk in).



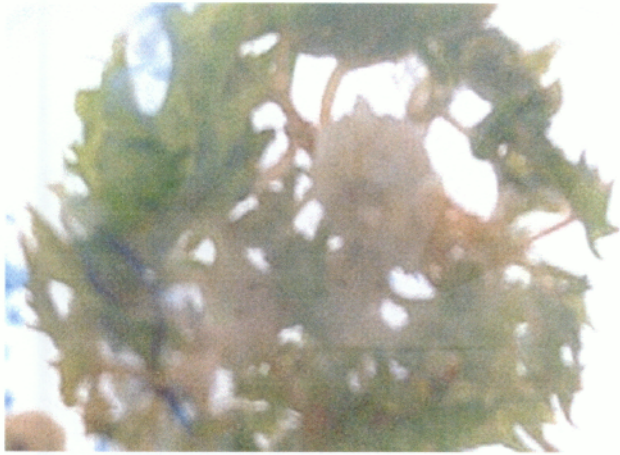
Εικ.20. Εργασία σε απαγωγό νηματικής ροής.
(Φωτ. από Διαδύκτιο).



Εικ.21. Δημιουργία καλού (σε περιοχές των εκφύτων), στην ποικιλία Αυγουστολίδι με την χρήση της NAA.



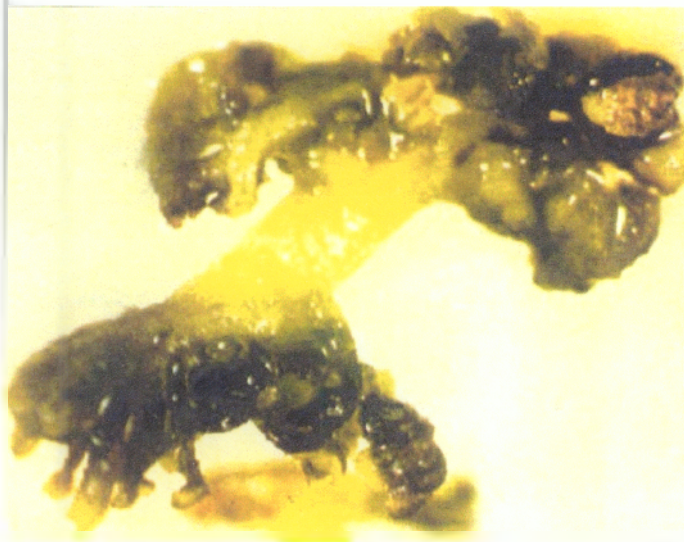
Εικ.22. Ριζοβολία στην ποικ. Αυγουστολίδι, σε τρυβλίο Petri.



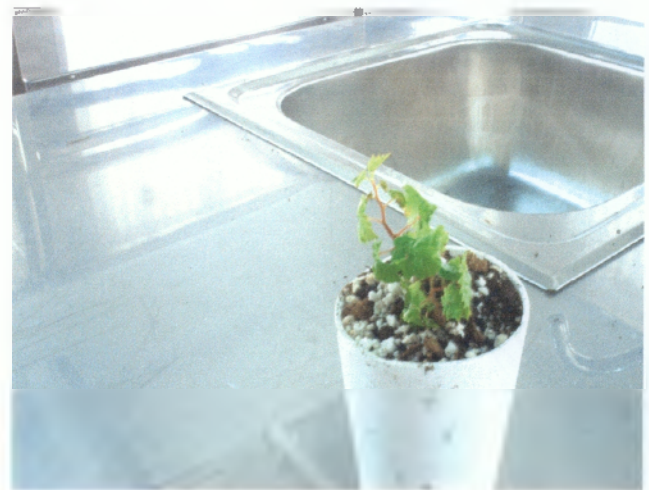
Εικ.23. Δημιουργία πολλαπλών βλαστών στην ποικιλία Κολινιάτικο (6 εβδ.καλλιέργειας)..



Εικ.24. Στάδιο δημιουργίας βλαστών, στην ποικιλία Κολινιάτικο (4 εβδ. καλλιέργ.).



Εικ.25 Αρχικό στάδιο καλλιέργειας μεριστωμάτων (Από Πλαστήρα ,1984)



Εικ.26. Φυτόριο μετά την τοποθέτηση σε φυσικό υπόστρωμα και πριν την σκληραγώγηση του (Κολινιάτικο).

3. ΠΙΝΑΚΑΣ ΕΡΕΥΝΩΝ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΔΙΕΞΑΧΘΕΙ ΣΤΗΝ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΗΣ ΑΜΠΕΛΟΥ.

<i>Vitis vinifera</i> var 'Koshu-sanjaki'	Callus	Embryogenic callus (minimum growth storage)	Plant regeneration after 1 year	—	Moriguchi <i>et al.</i> (1988)
<i>Vitis vinifera</i>	Callus	Unfertilised ovules	Embryogenesis. Plantlets from germinated embryos	—	Mullins & Santasanta (1976)
<i>Vitis vinifera</i> cv. 'Catawba'	Callus/direct?	Tendrils from field-grown plants	Adventitious shoots	—	Reisch & Mariens (1988)
<i>Vitis vinifera</i> cv. 'Vanessa'	Callus/direct?	Petiole from shoot cultures	Adventitious shoots	—	Reisch & Mariens (1988)
<i>Vitis vinifera</i> cv. 'Vignoles'	Callus/direct?	Leaves from shoot cultures	Shoots from cut leaves near veins	—	Reisch & Mariens (1988)
<i>Vitis vinifera</i> [several cultivars]	Direct	Fragmented shoot apices	Adventitious leaves and buds. Shoots and plants	Y	Barlass & Skene (1978; 1980 a, b, 1982a)
<i>Vitis vinifera</i> [several cvs.]	Direct	Fragmented incision tips	Shoot regeneration. Improved with animal serum	—	Bass <i>et al.</i> (1988)
<i>Vitis vinifera</i> 'French Colombard', 'Thompson seedless'	Direct	Infected leaves plus petiole stub	Adventitious shoots. Untransformed plantlets regen.	Y	Colby <i>et al.</i> (1991)
<i>Vitis vinifera</i> [several cvs.]	Direct	Zygotic embryos ex mature berries	Proliferating somatic embryos. Germinated seedlings	Y	Stamp & Meredith (1988)
<i>Vitis vinifera</i> [2 cvs.]	Direct/Callus	Leaves ex <i>in vitro</i> cultures	Multiple adventitious shoots. Shoots rooted	Y	Stamp <i>et al.</i> (1990)
<i>Vitis vinifera</i> hybrids	Embryo	Immature embryos	Germination. Plants	—	Ramting <i>et al.</i> (1990)
<i>Vitis vinifera</i> cv. 'Chardonnay' clone 76	Embryogenic callus	Young terminal leaves	High conversion (70%) to plantlets	—	Goebel-Tourand <i>et al.</i> (1993)
<i>Vitis vinifera</i> cv. 'Cabernet Sauvignon'	Embryogenic callus	Leaves	Somatic embryos. Normal plants	—	Stamp & Meredith (1988)
<i>Vitis vinifera</i> [several cvs.]	Embryogenic callus	Translucent to pale green anthers	Somatic embryos. Normal plants	—	Stamp & Meredith (1988)
<i>Vitis vinifera</i> [several cvs.]	Grafted	Meristems from heat-treated plants	Seedling rootstocks. Virus-free plants	—	Bass <i>et al.</i> (1988)
<i>Vitis vinifera</i>	Meristem	Fragmented shoot apices	Virus-free shoot growth. Shoots rooted	Y	Barlass <i>et al.</i> (1982)
<i>Vitis vinifera</i>	Node	Nodal segments	Axillary shoot proliferation & elongation. Rooted	YY	Aldwinckle & Buturac (1981)
<i>Vitis vinifera</i> 'Barbera'	Node	Single nodes	Shoot (and some root) formation	Y	Grubado & Fronda (1991)
<i>Vitis vinifera</i> [? cvs.]	Node	5th node from shoot apex (2.5 cm)	Nodes divided & subcultured. Plants	YY	Martinez & Tizio (1989)
<i>Vitis vinifera</i> cv. 'Perlette Seedless'	Ovule/Embryo	Fertilised ovules 10–40 days after anthesis	Ovule growth but no embryo inside	—	Singh <i>et al.</i> (1991)
<i>Vitis vinifera</i> [& hybrids]	Shoot	Nodal segments	Shoot prolif. Shoots elongated & rooted. Plants	YY	Aldwinckle & Buturac (1981)
<i>Vitis vinifera</i> cv. 'Zelen'	Shoot	Nodal sections of stem	Virus-free plants after heat treating cultures	Y	Blazna <i>et al.</i> (1991)
<i>Vitis vinifera</i> 'Corvinia Veronese' [3 clones]	Shoot	Single node cuttings	Multiple shoots. Phenotypically 'juvenile' plants	YY	Cancellier & Costo (1987)
<i>Vitis vinifera</i>	Shoot	Shoot tips	Juvenile or mature shoots depending on medium	—	Favre & Grenat (1979)
<i>Vitis vinifera</i> cv. 'Pinot Noir'	Shoot	Nodes ex <i>in vitro</i> cultures	Single shoots, rooted. High CO ₂ gave adult characters	Y	Fournoux & Bessis (1993)
<i>Vitis vinifera</i> var. 'Chardonnay'	Node	Node (leaf plus axillary bud)	Shoot growth. Shoots stored & revitalised later	Y	Galzy & Compas (1988)
<i>Vitis vinifera</i>	Shoot	Shoot tips	Shoot proliferation. Shoots rooted	YY	Harris & Stevenson (1979)
<i>Vitis vinifera</i>	Shoot	Shoot tips	Shoot multiplication. Rooted <i>in vitro</i> or extra vitrum	YY	Harris & Stevenson (1982)
<i>Vitis vinifera</i>	Shoot	Axillary bud	Axillary shoot proliferation. Shoots rooted	YY	Jana & Webb (1978)
<i>Vitis vinifera</i>	Shoot	Shoot tips	Shoot proliferation	Y	Monette (1986b)
<i>Vitis vinifera</i> cv. 'Rizamat'	Shoot	Shoot apices (ca. 1.5 mm)	Shoot proliferation	Y	Moriguchi & Yanaki (1989)
<i>Vitis vinifera</i> cv. 'Cabernet Sauvignon'	Shoot	Single nodes	Single shoots (serially subcultured)	Y	Mullins <i>et al.</i> (1979)
<i>Vitis vinifera</i> cv. 'Cabernet Sauvignon'	Shoot	Shoot tips & axillary buds	Multiple shoots	Y	Mullins <i>et al.</i> (1979)
<i>Vitis vinifera</i>	Shoot	Shoot tips (0.5 mm)	Axillary shoot proliferation. Shoots rooted	YY	Novák & Jujová (1983)
<i>Vitis vinifera</i> cv. 'Nebbiolo'	Shoot	Shoots ex <i>in vitro</i> plants	Rooting occurred. Conductance investigated	—	Novello <i>et al.</i> (1992)
<i>Vitis vinifera</i> cv. 'Perlette'	Shoot	Shoot tips ex mature plants	Shoot proliferation. Shoots rooted	YY	Singh <i>et al.</i> (1992a)

Species name	Type of Culture	Source of explant	Results		References
<i>Vitis vinifera</i> cv. 'Cabernet Sauvignon'	Shoot	Nodal sections of stem	Multiple shoots with adventitious roots	YY	Stamp & Meredith (1988)
<i>Vitis vinifera</i>	Shoot	Shoot tips	Shoot proliferation, Shoots rooted	YY	Stevenson & Monette (1983) &
<i>Vitis vinifera</i> cv. 'Cabernet Sauvignon'	Suspension	Infected pericarp callus	Transformed, kanamycin-resistant calli	—	Banbault <i>et al.</i> (1989)
<i>Vitis vinifera</i> × <i>V. berlandieri</i> (Housack 4/B1)	Suspension	Cell suspensions	Somatic embryogenesis, Plantlets	—	Coutos-Thievenot <i>et al.</i> (1992)
<i>Vitis vinifera</i> × <i>V. berlandieri</i> Clone 41B	Suspension	Anther-derived callus	Somatic embryogen Low conversion to plantlets	—	Goebel-Tourand <i>et al.</i> (1991)
<i>Vitis vinifera</i> Teinturier var. 'Gamy treaux'	Suspension	Berry pulp	Cell suspension used to study biosynthesis of phenolics	—	Lofty <i>et al.</i> (1989)
<i>Vitis vinifera</i> cvs. 'Cabernet Sauvignon', 'Grenache'	Suspension	Nucellar callus ex unfertilized ovules	Embryogenesis Embryo germination, plants	—	Rajasekaran & Mullins (1982)
<i>Vitis vinifera</i> × <i>V. rupestris</i>	Callus	Seedling internodes	Adventitious shoots	—	Rajasekaran & Mullins (1982)
<i>Vitis vinifera</i> × <i>V. rupestris</i> cv. Galia No.1	Embryogenic callus	Translucent to pale green anthers	Somatic embryos Normal plants	—	Stamp & Meredith (1988)
<i>Vitis vinifera</i> and <i>V. rupestris</i> (Gloryvine)	Node	Rooted microcuttings ex <i>in vitro</i> cults.	Photoauto- & mixo-trophic growth compared	—	Galzy & Compan (1992)
<i>Vitis vinifera</i> × <i>V. rupestris</i>	Suspension	Nucellar callus ex unfertil. ovules	Embryogenesis Embryo germination, plants	—	Rajasekaran & Mullins (1982)
The following plant species are also being micropropagated in European laboratories: <i>Ficus bengalensis</i> , <i>F. cvathistipula</i> , <i>Ziziphus jujuba</i> .					