

**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ (ΤΕΙ)
ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΟΓ-ΠΣΕ**

**«ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΕΛΙΑΣ - ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΚΑΙ
ΜΟΡΦΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΑΝΤΙΔΡΑΣΕΙΣ ΚΑΛΟΥ.»**

**Τ Ε Ι Κ Α Λ Α Μ Α Τ Α Σ
Τ Μ Η Μ Α
Ε Κ Δ Ο Σ Ε Ω Ν & Β Ι Β Λ Ι Ο Θ Η Κ Η Σ**



Πτυχιακή εργασία

Της σπουδάστριας Ξαρχάκου Χριστίνας-Δέσποινας

Επιβλέπων καθηγητής: Ζακυνθινός Γεώργιος

Καλαμάτα Μάρτιος 2005

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ		Σελίδες
Πρόλογος.....		3
ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ		
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1		
1.1 Βιοτεχνολογία και Γεωργία-Εισαγωγικές έννοιες.....		4
1.2 Καλλιέργεια κάλου.....		6
1.2.1 Ανάπτυξη κάλου.....		7
1.2.2 Φάσεις ανάπτυξης του κάλου.....		9
1.2.3 Δομή κάλου.....		9
1.2.4 Κάλος και περιβάλλον θρέψης		11
α) Ανόργανα άλατα.....		11
β) Πηγή άνθρακα και ενέργειας.....		12
γ) Βιταμίνες.....		13
δ) Οργανικό Άζωτο.....		13
ε) Οργανικά Οξέα.....		14
ζ) Ρυθμιστές Ανάπτυξης.....		14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2		
2 Εφαρμογές καλλιέργειας ιστών στην ελιά		16
2.1 Βιβλιογραφική Ανασκόπηση		16
2.2 Καλλιέργεια και βιοτεχνολογικές εφαρμογές στην ελιά.....		19
2.3 Μικροπολλαπλασιασμός της ελιάς.....		19
2.3.1 Σωματική εμβρυογένεση.....		19
2.3.2 Εμβρυογένεση.....		19
2.4 Γενετική βελτίωση στην ελιά.....		20
2.4.1 Γενετική μετάλλαξη.....		20
2.4.2 Γενετική παραλλακτικότητα		21
2.4.2.1 Σωματοκλωνική ποικιλομορφία.....		22
2.4.3 Παραγωγή απλοειδών.....		22
2.4.4 Χαρτογράφηση γονιδιώματος και κλωνικού γονιδίου.....		23
2.4.5 Συντήρηση γενετικού υλικού.....		24
2.4.6 Μικρομόσχευμα.....		25
2.5 Ιστοκαλλιέργεια της ελιάς.....		26
2.5.1 Καλλιέργεια κυττάρων.....		26
2.5.2 Καλλιέργεια πρωτοπλαστών.....		26
2.5.3 Καλλιέργεια κάλου.....		27
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3		29
3. Περιγραφή ποικιλιών.....		29
3.1 Ποικιλία Κορωνέικη.....		29
3.2 Ποικιλία Καλαμών.....		30
ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ		
Περίληψη.....		31
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1		
Υλικά - Μέθοδοι		32
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2		
Αποτελέσματα		39
Συζήτηση.....		46
Βιβλιογραφία.....		51
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ		

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η πτυχιακή μου εργασία «Ιστοκαλλιέργεια ελιάς- Δημιουργία και Μορφογενετικές Αντιδράσεις Κάλου» ολοκληρώνει ένα κύκλο σπουδών που μου έδωσαν την δυνατότητα να διευρύνω τις γνώσεις μου σε Τεχνολογίες ολοκληρωμένης Γεωργίας μέσα στα πλαίσια των Προγραμμάτων Σπουδών Επιλογής.

Θα ήθελα να εκφράσω τις ειλικρινείς ευχαριστίες μου στον Πρόεδρο των Προγραμμάτων Σπουδών Επιλογής κ. Α. Κανάκη για την υποστήριξη της υλοποίησης αυτού του Προγράμματος στο ΤΕΙ Καλαμάτας και για τη συνεργασία του.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον πρόεδρο του ΤΕΙ Καλαμάτας κ. Δ. Νικόπουλο που μου επέτρεψε να διεκπεραιώσω το πρακτικό μέρος της μελέτης μου στο εργαστήριο Ιστοκαλλιέργειας του ΤΕΙ Καλαμάτας καθώς και τους υπεύθυνους του εργαστηρίου για τη βοήθεια και τη συνεργασία τους.

Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον καθηγητή κ. Γ. Ζακυνθινό για την καθοδήγηση, την εμπιστοσύνη, την συμπαράσταση του κατά τη διεξαγωγή της μελέτης και για την ευκαιρία που μου έδωσε να ασχοληθώ με μια τόσο ενδιαφέρον μελέτη.

ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1 Βιοτεχνολογία και Γεωργία- Εισαγωγικές έννοιες

Η βιοτεχνολογία καθορίζεται ως: "οποιαδήποτε τεχνολογική εφαρμογή που χρησιμοποιεί τα βιολογικά συστήματα, τους οργανισμούς διαβίωσης ή τα παράγωγα τους με συγκεκριμένες διαδικασίες, έτσι ώστε να δημιουργήσει ή να τροποποιήσει προϊόντα για συγκεκριμένη χρήση". Ερμηνευμένος υπό αυτήν την ευρεία έννοια, ο ορισμός της βιοτεχνολογίας καλύπτει πολλά από τα εργαλεία και τις τεχνικές που είναι κοινά στη γεωργία και την παραγωγή τροφίμων. Επεξεργάζεται τις νέες τεχνικές DNA (την αποκωδικοποίηση του DNA, το χειρισμό και τη μεταφορά γονιδίων), τη μοριακή βιολογία και τις αναπαραγωγικές τεχνολογικές εφαρμογές. Η βιοτεχνολογία παρέχει ισχυρά εργαλεία για τη βιώσιμη ανάπτυξη της γεωργίας, της αλιείας και της δασονομίας, καθώς επίσης και της βιομηχανίας τροφίμων. Μακροπρόθεσμα η άμεση εφαρμογή στις καλλιέργειες της γεωργικής βιοτεχνολογίας είναι σημαντικότερη από αυτή της ιατρικής βιοτεχνολογίας, δεδομένου ότι περισσότεροι άνθρωποι πεθαίνουν παγκοσμίως από την πείνα και τις ασθένειες που σχετίζονται με τον υποσιτισμό παρά από τις "σύγχρονες", δυτικές ασθένειες.

Η βιοτεχνολογία αλλάζει σήμερα τη γεωργική σκηνή σε δύο σημαντικούς τομείς λόγω των αυξημένων απαιτήσεων του διεθνούς εμπορίου (παραγωγή αρκετών ποσοτήτων τροφίμων καλής ποιότητας), των κλιματολογικών αλλαγών, της αλόγιστης χρήσης του εδάφους και του ύδατος σε συνδυασμό με την αστικοποίηση και εκβιομηχάνιση που μειώνουν την διαθεσιμότητά τους και την ποιότητά τους:

–ελέγχει λοιπόν την ανάπτυξη, την εξέλιξη, την παραγωγή και το πολλαπλασιασμό των φυτών. Η δυνατότητα βελτίωσης των καλλιεργειών των φυτών και της ζωικής παραγωγής στηρίζεται κατά ένα μεγάλο μέρος στην πρόσφατα αναπτυσσόμενη βιοτεχνολογία με κατάλληλη χρήση στη γεωργία του DNA και των μοριακών δεικτών. Αυτές οι τεχνικές επιτρέπουν την επιλογή κατάλληλων γενοτύπων, την καλύτερη απομόνωση και κλωνοποίηση των

κατάλληλων γνωρισμάτων και τη δημιουργία διαγενετικών οργανισμών απαραίτητων για την επιλογή "κλασικών" κύκλων αναπαραγωγής.

– Προστατεύει τις καλλιέργειες από τις συνεχώς αυξανόμενες απειλές της αβιοτικής και βιοτικής καταπόνησης. Η ανοχή των καλλιεργειών στην καταπόνηση της ξηρασίας και της αλατότητας και οι στρατηγικές για το χειρισμό της ανοχής της οσμωτικής πίεσης στις καλλιέργειες αντιμετωπίζεται: με την έκφραση των συμβατών διαλυτών ουσιών, τη μεταφορά ιόντων ύδατος μέσω καναλιών, με την έκφραση και άλλων πρωτεϊνών, παραγόντων μεταγραφής και ανασυνδυασμού του DNA, κ.λ.π. Η ανακάλυψη νέων σχετικών με τη καταπόνηση γονιδίων και το σχέδιο των συγκεκριμένων υποκινητών-γονιδίων καταπόνησης είναι εξίσου σημαντικές όπως η χρήση ενός ευρέους φάσματος εναλλακτικών γονιδίων για την αντιμετώπιση του προβλήματος της ανθεκτικότητας των παρασίτων.

1.2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΛΟΥ

Κάθε φυτικός οργανισμός χαρακτηρίζεται από ιεραρχημένη κλιμάκωση οικοδόμησης, σε διαδοχικές βαθμίδες, που η κάθε μια τους αποτελεί, σε σχέση με την προηγούμενη, ένα ανώτερο επίπεδο ολοκλήρωσης σύμφωνα με την ακολουθία: άτομα → μόρια → μακρομόρια → μοριακά σύμπλοκα → υποκυτταρικές ομάδες → κύτταρα → ιστοί → συστήματα ιστών → όργανα → οργανισμός. (Καραμπέτσος, 1999)

Το 1902 ο Haberlandt προφήτευσε ότι τα μεμονωμένα κύτταρα μπορεί να δώσουν τέλεια φυτά μέσω της διαδικασίας της ανάπτυξης « τεχνητών εμβρύων», που επιβεβαιώθηκε αργότερα από πολλούς ερευνητές σε πολλούς τύπους κυττάρων από πολλά φυτικά είδη. Οι σημαντικότερες ιδιότητες των οργάνων που συμβάλουν στη παραγωγή τέλειων φυτών είναι οι εξής:

- Ολοδυναμία ή ικανότητα αναπαραγωγής (totipotency) : η ιδιότητα των μεμονωμένων κυττάρων (σωματικών) να παράγουν τέλεια φυτά.

- Εξελικτική ικανότητα (competence) :είναι παροδική, μη κληρονομήσιμη ιδιότητα του κυττάρου και συνοπτικά είναι η αντίδραση του κυττάρου σε κάποιο ερέθισμα που προκαλεί εξέλιξη προς συγκεκριμένη κατεύθυνση.

- Προσδιορισμός(determination):είναι κληρονομήσιμη ιδιότητα του κυττάρου. Το κύτταρο ανταποκρίνεται σε ένα συγκεκριμένο ερέθισμα και μετατρέπεται σε προσδιορισμένο πλέον κύτταρο, που ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης του ιστού στο οποίο συμπεριλαμβάνεται, είτε συνεχίζει να ανταποκρίνεται σε επιπρόσθετα ερεθίσματα, είτε παραμένει στάσιμο σε αυτή τη φάση μέχρι να ενεργοποιηθεί (κατάλληλες συνθήκες) και να δώσει μορφογενετικές αλλαγές.

- Διαφοροποίηση(differentiation):είναι οι χημικές και δομικές αλλαγές σε ατομικά και μεμονωμένα κύτταρα καθώς αυτά απομακρύνονται από τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα που ορίζονται ως ευμεριστωματικά και παίρνουν άλλες εξειδικεύσεις.

- Μορφογένεση: είναι όλες οι μορφογενετικές αλλαγές σε κυτταρικό ή υπερκυτταρικό επίπεδο.

- Αποδιαφοροποίηση(dedifferentiation):το κύτταρο ή ο ιστός χάνει τη συγκεκριμένη κατάσταση διαφοροποίησης και οδηγείται σε αλλαγή της μορφογενετικής έκφρασης παράγοντας πλέον νέες μορφογενετικές δομές.

- Ικανότητα αναπαραγωγής τέλειου φυτού από το κύτταρο.

Η δυνατότητα της επαγωγής σε καλλιέργεια ιστών έχει αναγνωριστεί ως ένα δυναμικό εργαλείο για τη μελέτη της διαφοροποίησης και της οργανογένεσης.

Το πιο συνηθισμένο πρότυπο είναι η καλλιέργεια κάλου ο οποίος προέρχεται από την καλλιέργεια *in vitro* συγκεκριμένου εκφύτου. Ένας κάλος αποτελείται από μια άμορφη μάζα χαλαρά διατεταγμένων και με λεπτά τοιχώματα παρεγχυματικών κυττάρων αλλά και κυττάρων που βρίσκονται σε κατάσταση μερισμού. Μέρος των κυττάρων αυτών και ιδιαίτερα τα αρχικώς σχηματισθέντα προέρχονται από κύτταρα του μητρικού ιστού. Ο κάλος δεν έχει κάποια προβλέψιμη μέθοδο οργάνωσης παρ' όλο που παρουσιάζει τοπικά κέντρα μεριστωματικής δραστηριότητας, είναι παρόντα συχνά και κάποια στοιχεία αγγειακής διαφοροποίησης (Dodds και Roberts, 1985). Συχνά ο κάλος μπορεί να σχηματίζεται σαν αποτέλεσμα πληγώματος, και μπορεί να σχηματίζεται στο άκρο κομμένης ρίζας, κομμένου μίσχου ή μοσχεύματος (Dodds και Roberts, 1985). Ο Sinnott (1960) ανέφερε μερικές από τις πρώτες παρατηρήσεις σχετικά με σχηματισμό κάλου πάνω σε πληγή. Επιπλέον πρόσθεσε ότι η δημιουργία κάλου πάνω στην πληγή είναι αποτέλεσμα της δράσης των ενδογενών ορμονών της αυξίνης και της κυτοκινίνης. Με τις τεχνικές καλλιέργειας ιστών ο σχηματισμός του κάλου μπορεί να προκληθεί σε αναρίθμητους φυτικούς ιστούς και όργανα τα οποία συνήθως παράγουν κάλο σαν αντίδραση σε ένα τραυματισμό (Street, 1969, 1987). Παρ' όλο ότι έχει δοθεί μεγάλη έμφαση στους ιστούς των αγγειόσπερμων, ο σχηματισμός του κάλου έχει παρατηρηθεί επίσης στα γυμνόσπερμα, στις φτέρες, στα βρύα και στα βρυόφυτα (Yeoman, 1970. Yeoman & Macleod, 1977).

Οργανογένεση κυττάρων από διαφοροποιημένους κάλους ή αποδιαφοροποιημένες δομές με τις τεχνικές και τα πρωτόκολλα της καλλιέργειας *in vitro* μπορούν να παράγουν ρίζες ή βλαστούς. Η παραγωγή κάλου από οφθαλμούς ελιάς (Wang K. J. *et al*., 1979, Wang K. J *et al* ., 1979, Wang K.J. *et al.*, 1981) ή από κοτυληδόνες (Canas L. & Benbadis A., 1988). μπορεί να δώσει άμεση οργανογένεση (Bao Z.H. *et al.*, 1980).

1.2.1 Ανάπτυξη κάλου

Το φυτικό υλικό το οποίο τυπικά καλλιεργείται *in vitro* περιλαμβάνει αγγειακά κάμβια- περιοχές παρεγχυματικών κυττάρων, περικύκλια ριζών, κοτυληδόνες, τμήματα μεσόφυλλου, προαγγειακούς ιστούς τμημάτων ριζιδίων και υποκοτυλίων. Στην πραγματικότητα όλα τα πολυκύτταρα φυτά είναι δυναμικές πηγές εκφύτων που προσφέρονται και για την ανάπτυξη κάλου (Yeoman και Macleod, 1977). Οι πρώτες επιτυχείς καλλιέργειες πειραματικά προκαλούμενων

κάλων πραγματοποιήθηκαν το 1939 ταυτόχρονα στο Παρίσι (Gautheret), στην Γρενόμπλ (Nobecourt) και στο Πρίνστον (White). Οι καλλιέργειες αυτές προήλθαν από τα έκφυτα καμβιακού ιστού καρότου και καπνού.

Η δημιουργία του κάλου από τα έκφυτα μπορεί να χωριστεί σε τρία διακριτά στάδια: την επαγωγή σχηματισμού κάλου, την καλλιέργεια και την μορφογένεση των κάλων.

▪ Η επαγωγή σχηματισμού του κάλου αποτελεί τον ερεθισμό των κυττάρων του μοσχεύματος να αρχίσουν τις κυτταροδιαιρέσεις και να δημιουργήσουν τα κύτταρα του κάλου. Ο τρόπος και η χρονική διάρκεια της επαγωγής εξαρτάται από τη φυσιολογική κατάσταση των κυττάρων του εκφύτου και από τις συνθήκες καλλιέργειας. Επηρεάζεται από εξωγενείς (είδος ρυθμιστών, συγκέντρωση, αναλογία αυξίνης/κυτοκινίνης) και ενδογενείς παράγοντες (γενότυπος, ενδογενείς ορμόνες, βαθμός διαφοροποίησης κυττάρων του μοσχεύματος). Αρχικά παρατηρείται κυτταροδιαίρεση με αργό ρυθμό ή μια κατάσταση προετοιμασίας των κυττάρων για κυτταροδιαίρεση.

▪ Οι κυτταροδιαιρέσεις αρχίζουν αμέσως, εάν το μικρομόσχευμα περιέχει κύτταρα που δεν έχουν χάσει τη μεριστωματική τους ικανότητα (κάμβια, έμβρυα, κοτυληδόνες). Εάν όμως αποτελούνται από διαφοροποιημένα κύτταρα (τμήματα φύλλων, βλαστών, ριζών) πρέπει να προηγηθεί μια **αποδιαφοροποίηση** ώστε τα κύτταρα να επανακτήσουν μεριστωματικές ιδιότητες. Από όλα τα μόνιμα κύτταρα, πιο εύκολα αποδιαφοροποιούνται τα παρεγχυματικά κύτταρα. Η ορμονική σύνθεση του θρεπτικού μέσου εξαρτάται από το είδος του μοσχεύματος και τη περιεκτικότητά του σε δικές του ορμόνες. Υπάρχουν είδη τα οποία χρειάζονται μόνο αυξίνη, άλλα που χρειάζονται κυτοκινίνη, ενώ περισσότερα είδη χρειάζονται και τις δύο και μάλιστα σε υψηλές συγκεντρώσεις. Η κυτταροδιαίρεση συνεχίζεται μέχρις ότου ένα ή περισσότερα θρεπτικά συστατικά του μειωθούν (Dodds & Roberts, 1985). Η αύξηση του αριθμού των κυττάρων συνήθως προηγείται της αύξησης του νωπού βάρους και αυτό οφείλεται στο χρόνο καθυστέρησης της κυτταρικής διόγκωσης (Yeoman et al., 1972). Ο Yeoman και οι συνεργάτες του έδειξαν επίσης στην καλλιέργεια εκφύτων από το φυτό *Helianthus tuberosus* ότι ο αριθμός των κυττάρων μπορεί να αυξηθεί δεκαπλάσια στις πρώτες επτά ημέρες όταν καλλιεργηθεί στους 25°C. Μια τέτοια έκρηξη δραστηριότητας συσχετίζεται με την αύξηση της αναπνευστικής (μέτρηση O₂ που καταναλώνονταν) δραστηριότητας. Η κυτταροδιαίρεση μπορεί να λαμβάνει χώρα σ' ένα μεριστωματικό στρώμα στην εξωτερική περιφέρεια των κυττάρων και όχι σε ολόκληρη τη καλλιεργούμενη μάζα (Lyndsey & Jones, 1989), το εσωτερικό τμήμα του κάλου μπορεί να παραμένει σαν μια αδιαίρετη μάζα παλαιότερης ηλικίας

ιστού μέσα στο χρόνο και ίσως διαφέρει φυσιολογικώς και γενετικώς από κύτταρα του εξωτερικού στρώματος(Dodds& Roberts,1985). Η διαίρεση στο εξωτερικό στρώμα μειώνεται και η εμφάνιση των κάλων παίρνει γρομπαλοειδή μορφή όσο η κυτταροδιαίρεση περιορίζεται σε συγκεκριμένες νησίδες κυττάρων (Thorpe,1982). Έτσι έχουμε διαφορές στην ηλικία και τον τύπο των κυττάρων στην καλλιεργούμενη κυτταρική μάζα. Τη φάση αυτή της ταχείας κυτταροδιαίρεσης όπου συνεπάγεται ενεργή σύνθεση DNA, RNA, και πρωτεΐνης (Lyndsey & Jones, 1989) διαδέχεται η φάση της διαφοροποίησης.

• Η διαφοροποίηση του κάλου είναι μια φάση βαθμιαία κατάπαυσης της κυτταροδιαίρεσης με εμφάνιση της κυτταρικής διαφοροποίησης και την έκφραση συγκεκριμένων μεταβολικών διαδικασιών που οδηγούν στο σχηματισμό κυττάρων ηθμού και ξύλου αλλά και δευτερογενών μεταβολιτών (Lindsey & Yeoman, 1983). Τα παρεγχυματικά κύτταρα, ανάλογα με τη σύνθεση του θρεπτικού υποστρώματος, και κυρίως τη παρουσία ορμόνης προσδιορίζονται εκ νέου προς τα έξω με διαφοροποιημένες μορφογενετικές εκφράσεις (π.χ. μορφογενετικά κύτταρα, κύτταρα ξύλου, αναπαραγωγικά κύτταρα κ.λ.π.)

1.2.2 ΦΑΣΕΙΣ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΤΟΥ ΚΑΛΟΥ

Η ανάπτυξη του κάλου ακολουθεί τις εξής φάσεις:

□ Φάση υστέρησης, κατά την οποία τα κύτταρα προετοιμάζονται να επιζήσουν στο νέο περιβάλλον.

□ Εκθετική φάση, όπου ο ρυθμός των κυτταροδιαιρέσεων είναι μέγιστος. Τα κύτταρα στην εκθετική φάση φαίνονται αδιαφοροποίητα με μικρά αγγεία και τυπική συσσώρευση δευτερογενών μεταβολιτών(Lindsey & Yeoman, 1983). Στη συνέχεια το μέσο μέγεθος των κυττάρων μεταβάλλεται λίγο και οι τιμές της πρωτεΐνοσύνθεσης και της σύνθεσης νουκλεϊκών οξέων παραμένουν σχετικά υψηλές (Lyndsey & Jones, 1989. Dixon, 1989).

□ Γραμμική φάση, όπου ο ρυθμός των κυτταροδιαιρέσεων παραμένει σταθερός και παρατηρείται διόγκωση των κυττάρων.

□ Φάση επιβράδυνσης, ο ρυθμός των κυτταροδιαιρέσεων και της διόγκωσης των κυττάρων παραμένει σταθερός.

□ Φάση στασιμότητας, ο αριθμός και το μέγεθος των κυττάρων παραμένει σταθερός χαρακτηρίζεται από μείωση του ρυθμού της.

□ Φάση παρακμής, παρατηρείται λύση των κυττάρων. Η φάση αυτή εκδηλώνεται σε γηρασμένες επιφάνειες. Για τη διατήρηση του κάλου σε ενεργό

δραστηριότητα πρέπει σε τακτά χρονικά διαστήματα 3-6 εβδομάδων να μεταφέρονται σε φρέσκο θρεπτικό υπόστρωμα. Οι καλλιέργειες που ακολουθούν την αρχική καλλιέργεια καλούνται επανακαλλιέργειες ή υποκαλλιέργειες. Η επιτυχία μιας υποκαλλιέργειας εξαρτάται και από το μέγεθος του κάλου το οποίο δεν πρέπει να είναι ούτε πολύ μικρό(στασιμότητα της ανάπτυξης του κάλου) ούτε πολύ μεγάλο (μείωση του χρόνου επανακαλλιέργειας, συχνότερες επανακαλλιέργειες). Κατάλληλη διάμετρος 5-10mm και κατάλληλη θερμοκρασία 25°C.

1.2.3 Δομή του κάλου

Μια λεπτομερής περιγραφή των τρόπων ανάπτυξης των κάλο-καλλιεργειών έχει δοθεί από τον Aitchison και τους συνεργάτες του (1977) με ιδιαίτερη αναφορά στις υφές των κάλων. Οι ερευνητές αυτοί παρατήρησαν κάλους με έντονη ξυλοποίηση και πολύ σκληρή υφή καθώς και άλλους κάλους που σπάγανε σε πολύ μικρά κομμάτια και χαρακτηρίστηκαν ως εύθρυπτοι. Ο κάλος μπορεί να φαίνεται κίτρινος, πράσινος, άσπρος ή χρωσμένος με ανθοκυανίνες. Ο χρωματισμός μπορεί να 'ναι ομοιόμορφος σ' όλη την μάζα του κάλου ή κατά περιοχές (Alfermann & Reinhard, 1971. Yamamoto, Mizuguchi & Yamada, 1982. Yamakawa *et al.*, 1982).

Σχετικά με την ανατομία υπάρχει κάποια σημαντική παραλλακτικότητα στην έκταση και στον τύπο της κυτταρικής διαφοροποίησης. Ένας ομοιογενής κάλος ο οποίος αποτελείται ολοκληρωτικά από παρεγχυματικά κύτταρα σπάνια απαντάται παρ' όλο που έχουν αναφερθεί, κάποιες εξαιρέσεις στις καλλιέργειες των κυττάρων των φυτών *Agave* και *Rosa* (Narayanswamy, 1977). Η κυτταρική διαφοροποίηση εκδηλώνεται με την παρουσία των στοιχείων του ηθμού, των εκκριτικών κυττάρων και της αλλαγής της υφής των κυτταρικών τοιχωμάτων (Roberts, 1976). Μικρές περιοχές διαιρεμένων κυττάρων σχηματίζουν μεριστωματοειδή ή αγγειακά οζίδια τα οποία μπορεί να γίνουν κέντρα για τον σχηματισμό των άκρων των ριζών, των καταβολών των οφθαλμών και άλλων διαφόρων οργάνων (Thorpe, 1982). Τα αγγειακά οζίδια τυπικά αποτελούνται από ξεχωριστές ζώνες ξυλώδους και ηθμώδους στοιχείου οι οποίες χωρίζονται από κάμβιο. Η δημιουργία του ξυλώδους και του φλοιώδους στοιχείου από την καμβιακή ζώνη επηρεάζεται από την φύση του αρχικού ιστού (Gautheret, 1955). Η θέση των οζιδίων μέσα στον κάλο μπορεί να τροποποιηθεί με την αλλαγή της σύνθεσης του θρεπτικού μέσου (Gautheret, 1966). Η αγγειακή διαφοροποίηση

μπορεί επίσης να πάρει την μορφή κάπως τυχαίας διατεταγμένης σειράς δεσμίδων ή λωρίδων των τραχειακών στοιχείων αγγείων (Roberts, 1976).

1.2.4 Κάλος και περιβάλλον θρέψης

Πέρα από τον παράγοντα "προέλευση φυτικού τμήματος" για την επιτυχή έναρξη της κάλο-καλλιέργειας αποφασιστικός παράγοντας είναι το περιβάλλον θρέψης, δηλαδή το θρεπτικό υπόστρωμα. Το θρεπτικό υπόστρωμα αποτελείται από κύρια και προαιρετικά συστατικά. Τα κύρια συστατικά αποτελούνται από ανόργανα άλατα μία πηγή άνθρακα και ενέργειας, βιταμίνες και ρυθμιστές αύξησης (Ball, 1955). Άλλα συστατικά όπως οργανικά άλατα-οργανικά οξέα - σύνθετες ουσίες μπορεί να είναι σημαντικές αλλά δεν παίζουν κυρίαρχο ρόλο.

α) Ανόργανα άλατα

Τα ανόργανα θρεπτικά στοιχεία μιας καλοκαλλιέργειας είναι αυτά που απαιτούνται και από τα κανονικά φυτά. Τα N, K, P, Ca, S & Mg σε συγκεντρώσεις mM. Η άριστη συγκέντρωση, για να επιτευχθούν οι μεγαλύτεροι ρυθμοί αύξησης, ποικίλει αρκετά και πρέπει να υπολογίζεται σε σχέση με την προέλευση του ιστού που πρόκειται να καλλιεργηθεί. Για τις περισσότερες όμως περιπτώσεις το θρεπτικό μέσο θα πρέπει να περιέχει 25-60 mM ανόργανο άζωτο (Murashige και Skoog, 1962).

Το νιτρικό N χρησιμοποιείται ευρέως σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονται μεταξύ 25 και 40 mM. Η ποσότητα του αμμωνιακού κυμαίνεται μεταξύ 2 και 20 mM (Walker & Sato, 1981. Grimes & Hodges, 1990). Κατά τον Eriksson (1965) η άριστη συγκέντρωση μπορεί να είναι 2-8 mM, ενώ ποσότητες πάνω από 8 mM μπορεί να έχουν σαν αποτέλεσμα μικρότερη αύξηση. Ακόμη οι καλοκαλλιέργειες μπορούν να αναπτυχθούν πάνω και σε άλλες πηγές αζώτου όπως είναι η ουρία, η γλουταμίνη, ή υδρολυμένη καζεΐνη (Kirby, 1982. King, 1977. Skokut & Filner, 1980. Anstis & Northcote, 1973).

Το Κάλιο είναι απαραίτητο σε συγκεντρώσεις από 1.4mM έως 3.5 mM όπως αναφέρεται από τους Lavee & Hoffman (1971), δίδει πολύ καλούς ρυθμούς ανάπτυξης κάλου σε καλοκαλλιέργειες ιστών μήλου, όμως σύμφωνα με τους Brown et al.,(1976) η εμβρυογένεση του καρότου απαιτεί συγκεντρώσεις 10-50 mM K⁺. Το δε διάλυμα Murashige και Skoog (1962) περιέχει 20.04 mM K⁺. Το

Νάτριο προστίθεται ως νιτρικό ή ως χλωρίδιο και έχει ρόλο σταθεροποιητή της οσμωτικής πίεσης μέσα στο θρεπτικό υπόστρωμα χωρίς να είναι απαραίτητο για την ανάπτυξη, αν και έχει αναφερθεί ότι 230 mg/l Na⁺ μπορεί να προωθεί την ανάπτυξη φυτών των οικογενειών *Chenopodiaceae* και *Compositae* (Brownell, 1979).

Για τις άριστες συγκεντρώσεις των P, Ca, Mg & S αναφέρεται ότι η διαδικασία της κυτταρικής αύξησης ικανοποιείται από 1-6mM (Walker και Sato, 1981. Klapheck et al., 1982. Hepler & Wayne, 1985. Murashige et al., 1972. Thorpe & Murashige, 1970. George, 1993b).

Τα στοιχεία Fe, Mn, Zn, B, Cu & Mo απαιτούνται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις (Eeuwens, 1976). Το Co ίσως είναι σημαντικό για ορισμένους ιστούς (Miller, 1954. Chee, 1986).

Επιπροσθέτως αναφέρεται ότι τα φυτικά κύτταρα μπορεί να αντέξουν ψηλές συγκεντρώσεις χλωρίου και Νατρίου χωρίς να εμφανίζουν αρνητική επίδραση στη ταχύτητα αύξησης τους (Gonzales & Widholm, 1985).

β) Πηγή άνθρακα και ενέργειας

Η συνηθέστερη πηγή άνθρακα είναι η σακχαρόζη και η γλυκόζη. Κάλοι που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα γλυκόζης έχουν διατηρηθεί το ίδιο χρονικό διάστημα με κάλους που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα φρουκτόζης (Stefen et al., 1988. Georges; 1993 b). Η σακχαρόζη έχει χρησιμοποιηθεί για ανάπτυξη κάλου σε συγκεντρώσεις των 20-60 g/l (George, 1993b. Yerma & Dougal, 1977).

Πολλοί ερευνητές χρησιμοποιούν γλυκόζη στην πρώτη εγκατάσταση του εκφύτου και στην συνέχεια στη φάση της μεταφύτευσης χρησιμοποιούν σακχαρόζη με πολύ καλούς ρυθμούς ανάπτυξης (George, 1993). Άλλοι υδατάνθρακες όπως λακτόζη, μαλτόζη, γαλακτόζη και άμυλο έχουν επίσης δοκιμασθεί αλλά είναι πολύ κατώτεροι από την σακχαρόζη και την γλυκόζη. Η σακχαρόζη χρησιμοποιείται συνήθως σε συγκεντρώσεις 2-4% (George, 1993). Επίσης στα περισσότερα μέσα χρησιμοποιείται η myo-inositol παρά το ότι συνήθως, δεν υπάρχει απόλυτη ανάγκη γι' αυτήν. Μία συγκέντρωση 100 mg/l της ουσίας αυτής βελτιώνει την κυτταρική διαίρεση σύμφωνα με τον Letham (1966).

γ) Βιταμίνες

Μερικές βιταμίνες όπως για παράδειγμα η θειαμίνη, η πυριδοξίνη, το νικοτινικό οξύ, το φυλικό οξύ, και το ασκορβικό οξύ είναι απαραίτητες για τη ζωηρότητα του μεταβολισμού και την κυτταρική διαίρεση στις καλλιέργειες κάλων (Digby & Skoog, 1996. Murashige & Skoog, 1962). Το νικοτινικό οξύ επηρεάζει τον μεταβολισμό των υδατανθράκων, την μεριστωματική δραστηριότητα και την διάμετρο των κυττάρων σε *in vitro* καλλιέργειες αλλά δεν είναι ξεκάθαρη η απαίτησή του στην ανάπτυξη κάλου (George, 1993a). Η πυριδοξίνη (B6) αν και είναι απαραίτητη κατά το μεταβολισμό των αμινοξέων εν τούτοις δεν έχει διαπιστωθεί καμία ιδιαίτερη απαίτηση στην ανάπτυξη κάλου σε πειράματα καπνού (Murashige & Skoog, 1962).

Το ασκορβικό οξύ, χρησιμοποιείται κυρίως σαν αντιοξειδωτικό. Σε καλλιέργειες κάλου, αύξησε το βάρος και βελτίωσε το χρώμα του κάλου (Murashige & Skoog, 1962). Γενικά η απουσία της πυριδοξίνης και του ασκορβικού οξέος δεν θεωρείται περιοριστικός παράγοντας αύξησης (George, 1993).

Το φυλλικό οξύ ενδιάμεσος φορέας ομάδων άνθρακα σε καλλιέργειες κάλου του καπνού αυξάνει την απόδοση σε κάλο των καλλιεργειών και βελτιώνει το χρώμα του κάλου στο φως ενώ στο σκοτάδι παρεμποδίζεται η δράση του (George, 1993).

δ) Οργανικό άζωτο

Ως πηγές οργανικού αζώτου συνηθίζεται να χρησιμοποιούνται τα αμινοξέα γλουταμίνη, ασπαραγίνη και αδενίνη. Το οργανικό άζωτο δεν είναι απαραίτητο.

Αν ένα μίγμα οργανικού αζώτου θεωρηθεί απαραίτητο τότε το μέσο μπορεί να εμπλουτιστεί με υδρολυμένη καζεΐνη (Radojevic *et al.*, 1987. Nagmani & Bonga, 1985. Bannerjee & Gupta, 1976) η οποία αποτελείται από αλυσίδα 18 αμινοξέων. Η χρήση ενώσεων με οργανικό άζωτο μπορεί να είναι απαραίτητη όταν ο κάλος εγκαθίσταται για πρώτη φορά αν και μπορεί να υπάρχουν μερικά οφέλη από την ενίσχυση του θρεπτικού μέσου με οργανικό N, σε εγκατεστημένο κάλο για την παραγωγή κέντρων εμβρυογένεσης (Finer & Nagasawa, 1988). Δεν είναι επίσης ασυνήθιστο φαινόμενο η παρεμπόδιση ανάπτυξης κάλου λόγω αλληλεπίδρασης των αμινοξέων (Basu *et al.*, 1989).

ε) Οργανικά Οξέα

Υπάρχει μια αδυναμία των φυτικών κυττάρων να χρησιμοποιούν οργανικά οξέα σαν μοναδική πηγή άνθρακα. Δεν έχει αναφερθεί αν τα οργανικά οξέα είναι περιοριστικοί παράγοντες αύξησης. Παρ' όλα αυτά έχουν χρησιμοποιηθεί από ερευνητές οργανικά οξέα όπως το κιτρικό και το φουμαρικό τόσο σαν καθαρές ουσίες όσο και σαν άλατα, με ευεργετική επίδραση (Kao & Michayluk, 1975. Ojima & Ohira, 1980).

ζ) Ρυθμιστές Ανάπτυξης

Στις καλλιέργειες ιστού, δύο κατηγορίες φυτικών ορμονών είναι σημαντικής σπουδαιότητας: οι κυτοκινίνες και οι αυξίνες. Πολλές ορμόνες, ειδικότερα γιββερελλίνες, το αιθυλένιο, το αμπισικό οξύ, οι πολυαμίνες, έχουν χρησιμοποιηθεί μόνο περιστασιακά. Οι ανάγκες σε ρυθμιστές αύξησης για την δημιουργία -ανάπτυξη κάλου είναι σημαντικές και αφορούν κυρίως τις αυξίνες και τις κυτοκινίνες. Κάθε μια ομάδα από αυτές τις ουσίες συνιστούν παράγοντες ανάπτυξης που σε μεταξύ τους συνδυασμό μπορούν να ρυθμίζουν την κυτταρική διαίρεση, την αύξηση του κυττάρου, την κυτταρική διαφοροποίηση και την δημιουργία οργάνων. Από τις αυξίνες για την καλλιέργεια κάλου κατά κύριο λόγο χρησιμοποιούνται το ινδολυλοξικό οξύ (IAA) φυσικός ρυθμιστής αύξησης, το 2,4D (Διχλωροφαινολυοξικό οξύ), το NAA (Ναφθαλενοξικό οξύ) το Ινδολυλοβουτυρικό (IBA) και το 2,4-5(Τριχλωροφαινολυοξικό οξύ). Το IAA χρησιμοποιείται σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (1-3 mg/l) σε σχέση με τις υπόλοιπες αυξίνες λόγω της παρουσίας της IAA-οξειδάσης η οποία είναι πάντα παρούσα στους καλλιεργημένους ιστούς και προκαλεί ενζυματική οξείδωση του IAA (Stonier & Yoneda, 1967). Το NAA προστίθεται σε συγκεντρώσεις (0,1 - 2,0 mg/l). Όμως η πιο αποτελεσματική αυξίνη είναι το 2,4 D σε συγκεντρώσεις 1- 5 mg/l συχνά που δίνει ικανοποιητικό κάλο χωρίς την παρουσία κυτοκινίνης (Gamborg *et al.*, 1976). Εκτός από μερικές εξαιρέσεις, είναι διπλή η απαίτηση τόσο σε αυξίνη όσο και σε κυτοκινίνη. Μερικές καλλιέργειες δεν απαιτούν καθόλου εξωγενή προσθήκη αυξίνης (Street, 1969).

Άλλοι ρυθμιστές όπως το γιββερελλικό οξύ χρησιμοποιούνται κυρίως για μορφογένεση και λιγότερο για ανάπτυξη κάλου. Επίσης το αιθυλένιο έχει χρησιμοποιηθεί για την δημιουργία οφθαλμών *in vitro* (Thorpe, 1982) και στην διαφοροποίηση τραχειακών στοιχείων (Miller & Roberts 1984).

Μελέτες με το αμπισικό οξύ έχουν γίνει πάνω στην ανάπτυξη του κάλου

χωρίς ιδιαίτερα αποδεκτά αποτελέσματα.

Από τις κυτοκινίνες οι οποίες είναι παράγωγα της αδεΐνης, συνήθως χρησιμοποιούνται η κινεΐνη, η βενζυλαδεΐδη και η ζεαΐνη η οποία είναι φυσική. Άλλες κυτοκινίνες που χρησιμοποιούνται συνήθως αντί της ζεαΐνης είναι η N⁶-Δ²ισοπεντυλαδεΐνη και η 6-γ-γ διμέθυλοπουρίνη. Η κινεΐνη(KIN) χρησιμοποιείται συνήθως σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 0,1mg/l. Η διφαινυλουρία αναφέρεται επίσης σαν παράγοντας ανάπτυξης (Butenko *et al*, 1972).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2 ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΙΣΤΩΝ ΣΤΗΝ ΕΛΙΑ

2.1 Βιβλιογραφική Ανασκόπηση

Η ελιά μπορεί να πολλαπλασιαστεί εγγενώς ή αγενώς. Η πρώτη μέθοδος συνεπάγεται το πολλαπλασιασμό με σπόρο αλλά δε χρησιμοποιείται ευρέως διότι τα φυτά που παράγονται δεν είναι αληθή ως προς τη ποικιλία.

Η ελιά πολλαπλασιάζεται αγενώς, χρησιμοποιώντας είδη μοσχευμάτων που εξασφαλίζουν φυτά αληθή ως προς τη μητρική φυτεία. Παρόλο που η σημασία και η ανάλογη ευκολία των κλασικών τεχνικών του πολλαπλασιασμού με μοσχεύματα (σκληρά και ημι-σκληρά ξυλώδη) παράγουν προϊόντα που δεν είναι πιστοποιημένα ως υγιές και μπορούν να διαβιβάσουν ασθένειες.

Έχουν ξεκινήσει έρευνες από το 1970 για το πολλαπλασιασμό *in vitro* της ελιάς με καλλιέργειες ιστού και για την παραγωγή υγιούς φυτικού υλικού αληθές ως προς τη ποικιλία. Η ειδικευμένη εφαρμογή τέτοιων προσεγγίσεων συμβάλλει στην επιτυχία προγραμμάτων αναπαραγωγής με τη δημιουργία γενετικών συνδυασμών που δεν είναι δυνατοί με τις κλασικές τεχνικές διασταυρώσεων.

Διάφοροι ερευνητές έχουν επιτύχει το πολλαπλασιασμό *in vitro* της ελιάς χρησιμοποιώντας προ διαμορφωμένους οφθαλμούς από νεανικό ή ενήλικο υλικό (Ruggini, 1984; Ramas & Pontikis, 1990; Dimassi-Theriou, 1994; Briccoli-Batti & Lombardo, 1995) ή σωματική εμβρυογένεση από κάλους που προκλήθηκαν από κοτυληδόνες, έμβρυα, ή μίσχους (Rugini 1988; Canas & Ben Badis, 1988; Orinos & Mitrakos, 1991, Roussos & Pontikis, 2002). Προσπάθειες αναπαραγωγής έχουν γίνει με την απομόνωση πρωτοπλαστών (Canas *et al*, 1987), την καλλιέργεια ανθήρων και ωάριων (Fodale *et al*, 1995) για την παρατήρηση της σωμακλωνικής ποικιλομορφίας σε διάφορες ποικιλίες.

Η ελιά είναι ένα είδος που παρουσιάζει μια μακρά νεανική περίοδο (περίπου 10-15 έτη) και υψηλή ετεροζυγωτία (Rugini, E., 1995).

Το μήκος αυτής της περιόδου πολυάριθμων καλλιεργούμενων ποικιλιών, μπορεί να μειωθεί μερικά έτη με τεχνικές ανάπτυξης σε θερμοκήπιο. (Morettini A., 1972). Η εμφάνιση της βιοτεχνολογίας στη γεωργία έχει ανοίξει προοπτικές για το είδος της ελιάς όσον αφορά τη γενετική βελτίωση.

Οι καλλιέργειες *"in vitro"* της ελιάς πρόσφεραν εναλλακτικές λύσεις (οργανογένεση, σωματική εμβρυογένεση, σύντηξη πρωτοπλαστών, κ.λ.π.), με την τεχνική ανασυνδυασμένου DNA (εξωγενής εισαγωγή του DNA με την παραγωγή των διαγονιδιακών φυτών). Αυτές οι τεχνικές μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην ολοκλήρωση της γενετικής βελτίωσης, της καλλιέργειας και της αναπαραγωγή *"in vitro"* και είναι απαραίτητος ο κυτταρικός ιστός των φυτών.

Αρκετά θρεπτικά υποστρώματα έχουν δοκιμαστεί στον πολλαπλασιασμό *"in vitro"* της ελιάς. Για τη δημιουργία κάλου από βλαστούς ελιάς χρησιμοποιήθηκε ως θρεπτικό υπόστρωμα το White με διπλασιασμό της συγκέντρωσης των μακροστοιχείων (Lavee & Messer, 1969). Το ίδιο θρεπτικό υπόστρωμα χρησιμοποιήθηκε από το Bao το 1980 για την επίτευξη οργανογένεσης από υποκοτύλες ελιάς. Έχει χρησιμοποιηθεί από αρκετούς ερευνητές (Rugini & Verma 1983, Rugini 1984, Rama & Pontikis 1990) υπόστρωμα πλούσιο σε Ca, Mg, S, P, Cu, Zn, γνωστό ως OM. (Olive Medium) Οι Fiorino και Lera (1986) χρησιμοποίησαν φυτικό ιστό ημιώριμου βλαστού σε καλλιέργεια ελιάς *in vitro* και θεώρησαν το OM ισοδύναμο με το B5 (Gamborg *et al.*, 1968) και το MS, με μια τροποποίηση στα μεταλλικά άλατα. Ως θρεπτικό υπόστρωμα έχει επίσης χρησιμοποιηθεί το WPM (Wood Plant Medium) σε έκφυτα από κορυφές βλαστών ποικιλίας «Καλαμών» (Δημάση-θεριού 1994). Οι Ρούσσος και Ποντίκης το 2002 χρησιμοποίησαν σε έκφυτα «Κορωνέικης» το DKW (Driver- Kuniyuki Walnut Medium). Οι ποσότητες και οι αναλογίες των μικροστοιχείων και μακροστοιχείων των σημαντικότερων υποστρωμάτων σε σύγκριση με το MS παρατίθενται στο πίνακα 1. Η καλλιέργεια των ιστών μπορεί να έχει άμεση (τα φύλλα, οι ρίζες, οι κοτυληδόνες, κ.λ.π.) ή έμμεση αρχή ένα όγκο κυττάρων και την ικανότητα της διαφοροποίησης και απεριόριστης αναπαραγωγής τους, τον κάλο. Η παραγωγή κάλου στην ελιά αναφέρεται σε πολυάριθμες εργασίες και αποκτιέται με ευκολία, από οποιοδήποτε ιστό ή όργανο του φυτού, (Lavee S & Messer G.; 1969; Lavee. S και Adiri N., 1974 Grossoni P., 1979 Lavee S. & Avidan N., 1982).

ΠΙΝΑΚΑΣ 1: Θρεπτικά Υποστρώματα

ΟΝΟΜΑΣΙΕΣ/ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ	MURASHIGE & SKOOG MEDIUM	RUGINI OLIVE MEDIUM	WHITE MEDIUM	DKW/ WALNUT MEDIUM	Mc COWN WOODY PLANTS MEDIUM	GAMBORG'S B5 MEDIUM
MICROELEMENTS	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l	mg/l
CoCl ₂ .6H ₂ O	0.025	0.025	-	-	-	0.025
CuSO ₄ .5H ₂ O	0.025	0.25	0.001	0.25	0.25	36.70
FeNaEDTA	36.70	36.70	-	44.63	36.70	36.70
H ₃ BO ₃	6.20	12.40	1.50	4.80	6.20	3.00
KI	0.83	0.83	0.75	-	-	0.75
MnSO ₄ . H ₂ O	16.90	16.90	5.31	33.80	22.30	10.00
Na ₂ MoO ₄ 2 H ₂ O	0.25	0.25	-	0.39	0.25	0.25
ZnSO ₄ . 7 H ₂ O	8.60	14.30	2.67	17.00	8.60	2.00
FeSO ₄ . 7 H ₂ O	-	-	3.47	-	-	-
Na ₂ SO ₄	-	-	200.00	-	-	-
MACRO ELEMENTS						
CaCl ₂	332.02	332.16	-	112.50	72,50	113,23
KNO ₃	1900.00	11.00	80.00	-	-	2,500.00
Mg SO ₄	180.54	732.60	351.60	361.49	400.00	121.56
NaH ₂ PO ₄	-	-	-	-	-	130.44
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	-	-	-	134.00
Ca (NO ₃) ₂ 2 H ₂ O	-	-	-	1,664.00	471.26	-
KH ₂ PO ₄	170.00	340.00	-	265.00	170.00	-
K ₂ SO ₄	-	-	-	1,416.00	980.00	-
NH ₄ NO ₃	1,650.00	412.00	-	-	400.00	-
Ca(NO ₃) ₂ anhydrous	-	416.92	208.47	-	-	-
KCl	-	500,00	65.00	-	-	-
NaH ₂ PO ₄ anhydrous	-	-	16.80	-	-	-
VITAMINS						
Glycine	2.00	2.00	-	2.00	2.00	-
Myo-inositol	100.00	100.00	-	100.00	100.00	100.00
Nicotinic acid	0.50	5.00	-	1.00	0.50	1.00
Thiamine HCl	0.10	0.50	-	2.00	1.00	10.00
Pyridoxine HCl	0.50	0.50	-	-	0.50	1.00
Biotin	-	0.05	-	-	0.50	1.00
Folic acid	-	0.50	-	-	-	-
ΣΥΝΟΛΟ	4,405.19	4,023.69	963,39	5,584,5	2,462,60	3,163.98

ΠΗΓΗ : Duchefa catalogue 2003-2004

2.2 Καλλιέργεια και βιοτεχνολογικές εφαρμογές στην ελιά.

Η απασχόληση με την βιοτεχνολογική τεχνική *in vitro* βασίζεται κυρίως στην πραγματοποίηση προγραμμάτων γενετικής βελτίωσης που είναι μια ενδιαφέρουσα εναλλακτική λύση στη μέθοδο του υβριδισμού, ειδικά για ένα είδος όπως η ελιά που χαρακτηρίζεται με μήκος περιόδου νεανικότητας μετά από περίπου 10 με 15 έτη βλάστησης, τα δέντρα εισάγονται στην ώριμη φάση και στο τέλος της ασυμβατότητας μεταξύ πολλών ποικιλιών παρουσιάζοντας μια υψηλή ετεροζυγωτία ανά είδος.

2.3. Μικροπολλαπλασιασμός της ελιάς

Ο μικροπολλαπλασιασμός της ελιάς αποτελεί τη μεταφορά ζωντανού τμήματος από διάφορα μέρη του φυτού ως έκφυτα και τη τοποθέτηση τους υπό ελεγχόμενες ασηπτικές συνθήκες σε θρεπτικό μέσο. Διαχωρίζεται σε 4 κύριες φάσεις:

- Εγκατάσταση της καλλιέργειας. Αυτή η φάση μελετά τη λήψη αποστειρωμένου πολλαπλασιαστικού υλικού.

- Πολλαπλασιασμός. Σε αυτή τη φάση επιλέγεται το θρεπτικό υπόστρωμα για την ανάπτυξη του αποστειρωμένου φυτικού ιστού. Για την ανάπτυξη απαιτείται θάλαμος επώασης με θερμοστάτη σε συνθήκες δωματίου περίπου στους 23-25 °C

- Ριζογένεση. Η επαγωγή ριζικού συστήματος στο ζωντανό φυτικό ιστό και βλαστού που θα δώσει ολοκληρωμένο φυτό.

- Προσαρμογή ή εγκλιματισμός. Η μεταφορά του υλικού από τις συνθήκες "in vitro" σε φυσικές συνθήκες

2.3.1 Σωματική εμβρυογένεση

Από εργασίες που έγιναν στην ελιά έχει αναφερθεί καλογένεση ριζών σπορόφυτου το 1986 (Rugini E. and Tarini P.1986) και αναγέννηση ζυγωτικού

εμβρύου από νεαρά ζυγωτικά έμβρυα (75 ημέρες από τη γονιμοποίηση) (Rugini E.,1988).

Στην περίπτωση των ξυλωδών ειδών είναι υποχρεωτική, προκειμένου να πραγματοποιηθεί μια επιτυχή γενετική βελτίωση, η αναπαραγωγή ιστού από ένα σωματικό (κλωνικό) υποκείμενο της ποικιλίας. Για το λόγο αυτό οι γενότυποι επιλέγονται για την αγρονομική τους αξία. Έχουν αποκτηθεί σωματικά έμβρυα από ώριμο ιστό της ποικιλίας "Moraiolo" και "Canoni" η χρήση μιας τεχνικής παραγωγής κάλου από φυλλάρια οφθαλμών που αναπαράγονται από μίσχο και διαφοροποιούνται σε φυλλάρια (Rugini & Caritato G.,1995).

2.3.2 Εμβρυογένεση

Η τεχνική της εμβρυογένεσης περιλαμβάνει την απομόνωση και την ανάπτυξη *in vitro*, σε συνθήκες αποστείρωσης, ώριμων ή ανώριμων εμβρύων από τη λήψη τους από το δέντρο μέχρι την τοποθέτηση τους σε δοχείο. Τα πλεονεκτήματα και οι παρεκκλίσεις της εφαρμογής αυτής της τεχνικής μπορούν να συνοψιστούν στα εξής:

- 1) Πλήρης μείωση των φαινομένων που παρουσιάζονται ως παρεμποδιστές της βλάστησης "*in vivo*".
- 2) Βλάστηση του φυτού με την απουσία των παράσιτων.
- 3) Μείωση της ληθαργικής περιόδου των σπόρων και επακόλουθης εξοικονόμησης χρόνου στην αύξηση των υβριδίων.
- 4) Δυνατότητα καλλιέργειας εμβρύων που "*in vivo*" είναι δυνατόν να αποτύχει λόγω της ασύγχρονη αύξηση με το ενδοσπέρμιο.
- 5) Δυνατότητα να αποτραπεί αποβολή των εμβρύων από τους καρπούς διασταυρώσεων μεταξύ των ίδιων ειδών ή διαφορετικών.
- 6) Πηγή υλικού για τη δραστηριότητα της αναγέννησης (οργανογένεσης και σωματικής εμβρυογένεσης).

Η βλάστηση των σπόρων της ελιάς "*in vivo*" είναι μια διαδικασία που απαιτεί αρκετό χρόνο. Η παρουσία ανασταλτικών παραγόντων στο ενδοσπέρμιο του σπόρου αποτρέπει τη βλάστηση στις χαμηλές θερμοκρασίες (Diamadoglou S. & Mitrakos K., 1979). Η τεχνική της εμβρυοκαλλιέργειας καθιστά την ελιά, μεγάλου ενδιαφέροντος και για το λόγο αυτό έχουν μελετηθεί οι πιο κατάλληλες συνθήκες για τη βλάστηση των εμβρύων "*in vitro*", που

πραγματοποιείται η ανάπτυξη και η ριζοβολία των υποκειμένων σε υποστρώματα που βοηθούν τα μικρά φυτάρια να βγάλουν ρίζες σε περίπου 1-2 μήνες στο δεύτερο στάδιο της ωρίμανσης του εμβρύου (Rugini E. *et al.*, 1979; Canas *et al.*, 1987).

2.4 ΓΕΝΕΤΙΚΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΣΤΗΝ ΕΛΙΑ

2.4.1 Γενετική μετάλλαξη

Μεταξύ των βιοτεχνολογικών τεχνικών, ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει προκαλέσει τα τελευταία χρόνια η μεταφορά τμημάτων πλασμιδίων του ακροβακτηριδίου *A. rhizogenes* για το σχηματισμό ριζών αλλά και τη μεταφορά γονιδίων (Cardarelli M. *et al.*, 1987). Συνεχείς μελέτες γίνονται για να μεταφέρουν γονίδια με συγκεκριμένες λειτουργίες όπως το ORF10 (rol A) που καθορίζει τη συστροφή των φυλλαρίων (Mariotti *et al.*, 1989), το ORF 11 (rol B) που είναι αρμόδιο της ριζικής επαγωγής (Spano L. *et al.*, 1988), και το ORF 12 (rol Γ) που έχει μια μορφογενετική δράση στην ανάπτυξη των μασχαλαίων οφθαλμών (Schmulling T. *et al.*, 1988).

Μια σειρά εργασιών μελετά τη πιθανότητα τις διεξαγωγής των μεταλλάξεων, στο κορυφαίο οφθαλμό και στην αναπαραγωγή των ιστών της ελιάς. Γι αυτό χρησιμοποιείται το γονίδιο rol A, B, C, (ORFs 10 11, 12) σε διαφορετική αλληλουχία και η περιλαμβανόμενη μεταφορά του ακροβακτηριδίου *A. tumefaciens* σε στέλεχος LBA 4404 (Mencuccini *et al.*, 1991).

2.4.2 Γενετική παραλλακτικότητα στην καλλιέργεια "in vitro" των κυτταρικών ιστών.

Ο Meins (1983) επεξεργάστηκε την διαδοχική παραλλακτικότητα σε καλλιέργεια φυτικών κυττάρων, όπως ορίζεται υπό τη στενή έννοια η αναφορά της παραλλαγής, που παρατηρήθηκε ως αντικείμενο έρευνας εάν η φαινοτυπική αλλαγή εμμένει σταθερή στην απουσία του γεγονότος που την έχει προκαλέσει και εάν είναι κληρονομήσιμη τότε γίνεται λόγος για γενετική

παραλλακτικότητα, όταν παρουσιάζουν οι καλλιέργειες που αναπαράγονται από την καλλιέργεια κυτάρων κληρονομήσιμες παραλλάξεις που σεξουαλικά διαβιβάζονται στους απογόνους. Μεταξύ των αποκτηθέντων καλλιεργειών που διαδίδονται *"in vivo"* μπορεί να αναγεννηθούν *"in vitro"* και να βρεθεί ότι δίνουν ποικιλομορφία και μετάλλαξη, αν και παρατηρήθηκαν στη φύση κληρονομικές μεταλλάξεις παρόλο που ήταν άδηλες. Στη κατάσταση της μετάλλαξης αυτό το χαρακτηριστικό συμφωνεί και μεταφέρεται μειωτικά σύμφωνα με τον κανόνα της κληρονομικότητας, αποδεικνύεται γενετικά ή μοριακά σαν μετάλλαξη. (Maliga P., 1984). Οι Larkin P. I. και Scowcroft W. R. (1981) πρότειναν το γενετικό όρο του "σωματοκλώνου" για τις καλλιέργειες που αναπαράγονται από κάθε τύπο κυτταρικών καλλιεργειών και "σωματοκλωνική ποικιλομορφία" η παρατηρηθείς γενετική παραλλαγή μεταξύ των αποκτηθέντων καλλιεργειών ίδιας προέλευσης *"in vitro"*.

2.4.2.1 Σωματοκλωνική ποικιλομορφία.

Η αναγέννηση από τον ίδιο ιστό *"in vitro"* (ακραίου μεριστώματος, κάλου, κυτάρων, πρωτοπλάστη κ.λ.π.) από τον ίδιο γενότυπο, μπορεί να εισαγάγει την γενετική ποικιλομορφία από τη παραλλαγή της κυτταρολογίας (Amato F., 1977) και της μορφο-φυσιολογίας (Skirvin R.M., 1978). Αυτή η ποικιλομορφία βρίσκεται σχεδόν σε όλα τα είδη που μελετώνται *"in vitro"*, καλείται σωμακλωνική ποικιλομορφία, αυτό αποδεικνύεται πολύ καλύτερα *"in vivo"* και αντιπροσωπεύει μια σημαντικότερη πηγή γενετικής ποικιλομορφίας που αναπαράγεται περισσότερο με τη φυτική διάδοση και τους χαρακτήρες που διαβιβάζονται στους απογόνους στις γενετικές βάσεις. Η παραγωγικότητα τους ποικίλλει στην καλλιέργεια *"in vitro"*, και ταξινομούνται ως εξής (Skirvin R. M., 1978):

- Μορφολογικές και φυσιολογικές αλλαγές της μη υφιστάμενης διάκρισης του κάλου.
- Ποικιλομορφία στην οργανογένεση.
- Αλλαγές που φανερώνονται στα έκφυτα της καλλιέργεια (μεταλλαγές γονιδίων, ενεργοποίηση της μεταφοράς στοιχείων, ποικιλομορφία των ποσοτικών χαρακτηριστικών).

- Χρωμοσωμικές αλλαγές (ποικιλομορφία των χρωμοσωμάτων : αριθμός χρωμοσωμάτων, απλές μεταλλαγές γονιδίων, ανασυνδυασμένα μειωτικά, μεταλλαγές στους χλωροπλάστες και στα μιτοχόνδρια)

2.4.3 Παραγωγή απλοειδών

Στην ελιά έχουν γίνει μερικές δοκιμαστικές καλλιέργειες ανθέρων και σπερματικών βλαστών αλλά ήταν ανεπαρκή τα αποτελέσματα εξαιτίας της δυσκολίας του προσδιορισμού των συνθηκών και των ιδανικών υποστρωμάτων. (Mule R.*et al.*, 1992). Εντούτοις το ενδιαφέρον για την παραγωγή απλοειδών φυτών είναι αξιοπρόσεκτο, καθώς παρουσιάζει για τη γενετική βελτίωση τη δυνατότητα για:

- 1) Τη λήψη ομοζυγωτών φυτών (διπλασιασμό των χρωμοσωμάτων με τη βοήθεια χημικών και φυσικών μέσων) με επιλογή των αγρονομικών χαρακτηριστικών.
- 2) Γνώση των μεταλλάξεων και των χαρακτηριστικών ιδιοτήτων σε κάθε είδος.
- 3) Τη χρήση ομοζυγωτών σειρών στα προγράμματα των διασταυρώσεων.

2.4.4 Χαρτογράφηση του γονιδιώματος και του κλωνικού γονιδίου

Η γενετική βελτίωση των φυτικών ειδών είχε πρόσφατα μια αξιοπρόσεκτη ώθηση με την εγκατάσταση των βιοτεχνολογικών τεχνικών που συμβάλουν στην καταγραφή των γενετικών χαρτών, στον εντοπισμό "του γεωμετρικού τύπου" στα χρωμοσώματα των επιλεγμένων ειδών.

Η ανακάλυψη και η εμπορευματοποίηση των περιοριστικών ενζύμων και η χρήση των μοριακών τεχνικών και του υβριδισμού με συγκεκριμένους ελέγχους, επιτρέπουν την εγκατάσταση συστημάτων για να αναλύσουν το πολυμορφισμό μήκους περιορισμένων τεμαχίων DNA (Soller M. & Beckmann I.S., 1983). Με τις μεθοδολογικές εξελίξεις τα τελευταία χρόνια των τεχνικών όπως τα RAPDs (Williams I. G.K.*et al.*, 1990) μια τεχνική που βασίζεται στην ενίσχυση των ακολουθιών DNA που χρησιμοποιούν ολιγονουκλεοτίδια (10-15 βάσεις) σε ακολουθία και ενεργοποιούνται αφού εισαχθούν συμπληρώνοντας έτσι την

αλυσίδα των κενών αλληλουχιών του DNA. Η μέθοδος RFLP ("Restriction Fragment Length Polymorphism") είναι ένα έγκυρο σύστημα που διαχωρίζει γονιδιακά, και παρουσιάζει, πολλές και σύνθετες τεχνικές, βασισμένες στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR- "αλυσιδωτή αντίδραση πολυμεράσεων") Αποβλέπουν οι δύο τεχνικές στο προσδιορισμό της ποικιλομορφίας των φαινολογικών και αγρονομικών χαρακτηριστικών (Bogani P. *et al.*, 1994. Fabbri A. *et al.*, 1994), Χρησιμοποιώντας το RFLP και τα RAPDs χωριστά ή σε συνδυασμό, μπορεί να επιτευχθούν ταξινομικοί και γενετικοί αντικειμενικοί στόχοι, όπως: ταξινόμηση της ποικιλομορφίας, γονιδιακός προσδιορισμός και θέση των συγκεκριμένων γονιδίων που είναι υπεύθυνα για την έκφραση των χαρακτήρων με αγρονομικό ενδιαφέρον, στην ελιά.

2.4.5 Συντήρηση γενετικού υλικού "in vitro"

Σε διατήρηση του γενετικού υλικού της ελιάς, υπάρχουν αυξημένες απαιτήσεις με διαφορετικούς γενότυπος, ανθεκτικούς σε ασθένειες και παράσιτα, με προσαρμοστικότητα σε ποικιλία εδαφών, σε δύσκολες κλιματικές συνθήκες όπως οι χαμηλές θερμοκρασίες (για την ελιά) έτσι ώστε να μπορούν να χρησιμοποιηθούν στη γενετική βελτίωση του υλικού και στη διατήρηση της καλλιέργειας της ελιάς σε αρνητικές συνθήκες.

Οι νέες τεχνολογίες συμβάλουν στη διατήρηση του υλικού σε μικρό χρονικό διάστημα, κάτω από ελεγχόμενες περιβαλλοντικές και φυτοϋγειονομικές συνθήκες. Η χρήση του πολλαπλασιασμού "in vitro" για τη διατήρηση του γενετικού υλικού σε επαναλαμβανόμενο υπόστρωμα, που επιβραδύνει την αύξηση του εκφύτου με χημική (υπερτονικό διάλυμα, παρεμποδιστής των ορμονών) ή φυσική (χαμηλή θερμοκρασία -80⁰ C ή σε -196⁰C) παρέμβαση. Είναι αναγκαίες τεχνικές για την γενετική σταθερότητα και τη διατήρηση της αναγεννητικής ικανότητας αλλά και για τη δυνατότητα περισσότερης βιωσιμότητας του υλικού.

Βασικά υπάρχουν δύο συστήματα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν στην ελιά:

1) Διατήρηση σε συνθήκες ψύξης. Συνίσταται η διατήρηση "in vitro" σε χαμηλή θερμοκρασία (1-9⁰ C). Όσον αφορά την ελιά, έγιναν δοκιμασίες στη

μεταχείριση διατήρησης εκφύτων σε 5 °C για 12 μήνες, καθώς μεταφέρθηκαν σε κανονικές συνθήκες η ανάπτυξη και η ριζοβολία τους απέτυχαν.

2) Κρυοδιατήρηση. Προβλέπει την αποθήκευση του υλικού σε χαμηλότερες θερμοκρασίες και ειδικότερα σε υγρό άζωτο σε θερμοκρασία (-196 °C). Σε τέτοιες συνθήκες τα κύτταρα των ιστών είναι σε πλήρη απραξία. Ένα τέτοιο σύστημα καθιστά ικανή τη συντήρηση για μακρύ χρονικό διάστημα και θεωρητικά απεριόριστο. Για την ελιά πρόσφατα έγιναν πειραματικές έρευνες για τη ψύξη σε υπερκαταψύκτη στους -80 °C με τη χρήση υγρού αζώτου με κρυογόνο εξοπλισμό και πρόγραμμα παγώματος (Mencuccini M., 1995).

2.4.6 Μικρομόσχευμα

3) Η τεχνική του μικροεμβολιασμού είναι ιδιαίτερα σημαντική για την ελιά. Η καλλιέργεια των μεριστωμάτων είναι πολύ δύσκολη καθώς απαιτούν την εισαγωγή κατάλληλων εμβολίων σχετικά με τον εντοπισμό των προβλημάτων και την εξυγίανση των ιώσεων (Mencuccini M., 1995).

2.5 ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ

2.5.1 Καλλιέργεια κυττάρων

Η καλλιέργεια των κυττάρων προσδιορίζει το πολλαπλασιασμό ενός μόνο κύτταρου ή μιας ομάδας κυττάρων που διαχέονται σε ένα εναιώρημα διατηρημένο σε ένα υγρό θρεπτικό υπόστρωμα υπό ανάδευση. Η καλλιέργεια του κυττάρου από τους βιοχημικούς χρησιμοποιείται για φυσιολογικές και βιοχημικές μελέτες. Για την ελιά έγιναν προσπάθειες να αναπαραχθούν καλλιέργειες κάλου. Οι κυτταροκαλλιέργειες της ελιάς, έδωσαν τη δυνατότητα ξεκινώντας από ένα εύθραυστο κάλο να αναπαραχθούν φυτά με σειρές κυττάρων που επιλέγονται για την ανθεκτικότητά τους στην αλατότητα, στα ζιζάνια, στους παθογόνους, κ.λ.π. (Rugini E., 1986)

2.5.2 Καλλιέργεια πρωτοπλαστών

Πρωτοπλάστης ονομάζεται ένα ιδιαίτερο κυτταρικό τοίχωμα. Η λύση του κυτταρικού τοιχώματος που γίνεται με τη βοήθεια ενζύμων, βοηθά στη σύντηξη των πρωτοπλαστών. Η ασυμβατότητα λόγω της διαφορετικής προέλευσης κυττάρων μπορεί να ξεπεραστεί μεταξύ των ειδών υπερβαίνοντας τα φυσικά, γενετικά, μηχανικά, και άλλα εμπόδια. Μπορεί να οδηγήσει σε νέους συνδυασμούς DNA και να προκύψουν αφού ανακτηθούν τα κυτταρικά τοιχώματα, κάλοι οι οποίοι μπορούν να δώσουν στο τελικό τους στάδιο νέα άτομα με διαφοροποιημένο γονιδιακό υπόβαθρο. Τέτοιου είδους εργασίες έχουν γίνει στην ελιά με πρωτοπλάστες από αποκομμένα φύλλα, από το υποκοτύλιο και από την κοτυληδόνα χρησιμοποιώντας το ένζυμο Drilase (15%) από τον Rugini E. (1986) και τον Can L.A. (1987).

2.5.3 Καλλιέργεια κάλου

Ο κάλος μπορεί να προέλθει από διαφορετικά έκφυτα ελιών (πίνακας 2). Οι καλλιέργειες της ελιάς ξεκίνησαν αρχικά από τους Lavee & Messer (1969) από ενός έτους μίσχο της ποικιλίας 'Manzanillo' σε ένα τροποποιημένο διάλυμα White (Miller & Skoog, 1953) με μια διπλή συγκέντρωση ανόργανων συστατικών (Lavee, 1963) συν 2 mg/l ινδολο-3-ακετικό οξύ (IAA) και 0.2 mg/l κινετίνη. Επιπλέον, ανακάλυψαν ότι το IAA και το 2,4-Διχλωροφαινοξυοξέικό οξύ (2,4-D) ήταν οι αποτελεσματικότερες αυξίνες.

Πίνακας 2: Περίληψη των μελετών *in vitro* για τη μορφογένεση στην ελιά.

Ποικιλία	Αρχική πηγή εκφύτου (ηλικία σε έτη)	Αποτέλεσμα	Αναφορά
'Manzanillo'	Βλαστοί (1)	Κάλος	Lavee & Messer, 1969, Lavee & Adiri, 1974, Lavee & Avidan, 1982
'Ogliarola di Monopoli'	κόμβοι	Ρίζα και κάλος	Scaramuzzi & de Gaetano, 1974
'Manzanillo'	μεσοκάρπιο	Κάλος	Lavee, 1977
'Frantoio'	κόμβοι (1)	Ρίζες και κάλος	Grossoni, 1979
'Leccino' και 'Cipressino'	Μίσχος και ακραίοι βλαστοί	Κάλος, ρίζες και βλαστοί	Wang et al., 1979a,b
Σπορόφυτα	Υποκοτύλες	Βλαστοί	Bao et al., 1980
Αρκετές ποικιλίες	<i>in vitro</i> βλαστοί	Ριζοβολία	Rugini et al., 1987; Rugini & Fedeli, 1990
Αρκετές Ιταλικές ποικιλίες	Ανώριμα ζυγωτικά έμβρυα (75 ημερών)	Σωματική εμβρυογένεση	Rugini, 1988
Ισπανικές και Ιταλικές ποικιλίες	Ωριμες κοτυληδόνες	Μικροί κάλοι από πρωτοπλάστες	Rugini, 1986; Canas et al., 1987b
Ισπανικές ποικιλίες	κοτυληδόνες	Οργανογένεση βλαστών	Canas & Benbadis, 1988
Σπορόφυτα 'Manzanillo'	κοτυληδόνες, επικοτύλια και υποκοτύλια	Κάλος, βλαστοί, ρίζες και φυτά	Gilad & Lavee, 1974
'Barnea'	Ακραίοι βλαστοί	Κάλος και βλαστοί	Lavee & Avidan, 1982
'Moraiolo'	Μίσχοι φύλλων <i>in vitro</i>	Βλαστοί	Mencuccini & Corona, 1990
Κορωνέικη	βλαστοί	Ριζοβολία	Roussos & Pontikis, 2001
Καλαμών	Κορυφές βλαστών, οφθαλμοί, μίσχοι, ακραίοι βλαστοί	Ρίζες και κάλος	Rama & Pontikis, 1990, Dimassi-Theriou, 1994.

Τα κύτταρα του μεσοκαρπίου επίσης μπορούν να προκαλέσουν τη

διαμόρφωση κάλου εξαρτώμενο βέβαια από την ηλικία του καρπού (Lavee, 1977). Αφότου στους καρπούς η συγκέντρωση ελαίου είναι 10-12%, η δυνατότητα να διαμορφωθεί ο κάλος είναι χαμένη.

Ο εύθρυπτος κάλος συνήθως αναπτύσσεται σε BN θρεπτικό μέσο υπό συνθήκες σκότους (Bourgin & Nitsch, 1967), συμπληρωμένο με αυξίνες, π.χ. 0.1-5 mg/l 2,4-D, α-Ναφθαλινοξικό οξύ (NAA) ή Ινδολοβουτυρικό οξύ (IBA) και κυτοκινίνες, συνήθως 0.1 mg /l ζεατίνη. Οι κάλοι αναπτύσσονται σε υπόστρωμα με 2,4-D είναι περισσότερο επιρρεπής στο μαύρισμα από εκείνων που αναπτύσσονται με άλλες αυξίνες. Αυτό μπορεί να ελεγχθεί με την προσθήκη GSH (οξειδωμένη γλουθατιόνη) στον κάλο κατά τη διάρκεια της υποκαλλιέργειας (Rugini, 1986). Το αντιοξειδωτικό GSH εμφανίζεται στο καρότο ως ανασταλτικός παράγοντας σε μια υψηλή συγκέντρωση 2,4-D κατά τη διάρκεια της διαδικασίας (Earnshaw & Johnson, 1985), το οποίο δεν φαίνεται να συμβαίνει με τον κάλο της ελιάς. Μετά από την έναρξη, ο κάλος της ελιάς μπορεί να διατηρηθεί υπό όρους για αρκετές ημέρες σε MS (Murashige & Skoog, 1962) με μακροστοιχεία συν 2-3 mg/l IBA ή NAA και 0.1-0.2 mg/l 6-βενζυλαμινοπουρίνη (BA) ή ζεατίνη (Rugini, 1986; Canas & Benbandis, 1988). Οι Canas & Benbandis (1988) προκάλεσαν κάλο από τμήματα ώριμης κοτυληδόνας σε τροποποιημένο θρεπτικό μέσο (OM), στο οποίο OM τα μακροστοιχεία είχαν αντικατασταθεί με μακροστοιχεία του θρεπτικού διαλύματος BN, παραλείφθηκαν οι γλουταμίνες, και προστέθηκαν 1 g/l καζεΐνη 5 mg/l IBA και 0.2-0.5 mg/l ζεατίνη ή 2-ισοπενθυλαδεσίνη (2iP). Οι Lavee & Adiri (1974) παρατήρησαν ότι το αμπισισικό οξύ (ABA) έχει μικρή επίδραση στην δημιουργία κάλου από τον μίσχο, ενώ προκαλεί πρόωρη γήρανση σε υψηλές συγκεντρώσεις. Σε χαμηλές συγκεντρώσεις ABA, ο κάλος μεγαλώνει καλύτερα.

Το γιββερελλικό οξύ (GA_3) εμποδίζει την ανάπτυξη του κάλου από μίσχους ελιάς *in vitro*. Δεν έχει βρεθεί σαφής αλληλεπίδραση μεταξύ ABA and GA_3 αν και σε μερικές περιπτώσεις ήταν εμφανές μια μικρή συνεργιστική επίδραση στην ανάπτυξη του (Lavee & Adiri, 1974).

Οι Ρούσσος και Ποντίκης το 2001 χρησιμοποίησαν βλαστούς ποικιλίας Κορωνέικης σε θρεπτικό υπόστρωμα DKW για χρονικό διάστημα ενός μήνα με την παρουσία Ζεατίνης και BA και στη συνέχεια WPM για δύο μήνες με τη παρουσία 1mg/l IBA και 1mg/l NAA παράγοντας ολοκληρωμένα φυτά

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3 ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ

Οι σπουδαιότερες για το Νομό Μεσσηνίας ποικιλίες ελιάς είναι δύο η Κορωνέϊκη και η Καλαμών.

Όλες οι ποικιλίες που καλλιεργούνται ανήκουν στο υποείδος *O. e sativa*, εκτός από τις άγριες ελιές, από τις οποίες πολλές χρησιμοποιούνται σαν υποκείμενα, που ανήκουν στο υποείδος *O.e. oleaster* ή *silvestris*. Οι ποικιλίες ανάλογα με το μέγεθος του καρπού τους, ταξινομούνται σε μικρόκαρπες, μεσόκαρπες και χονδρόκαρπες ή αδρόκαρπες.

3.1 Ποικιλία Κορωνέϊκη (*O.e.v. Microcarpa alba*) ή Λιανολιά ή Ψιλολιά ή Λαδολιά

Είναι η σπουδαιότερη ελαιοποιήσιμη ποικιλία ,πολύ παραγωγική με λάδι άριστης ποιότητας. Είναι προσαρμοσμένη σε ξηρές και θερμές περιοχές και έχει απόδοση 30-100 kg/δέντρο, ανάλογα με τις καλλιεργητικές τεχνικές και τις κλιματολογικές συνθήκες. Σε αντίξοες συνθήκες παρενιαυτοφορεί ενώ εάν γίνεται σωστή άρδευση και κλάδεμα η παρενιαυτοφορία είναι μικρότερη. Είναι πρώιμη ποικιλία(η ωρίμανση αρχίζει από νωρίς τον Οκτώβριο). Έχει μικρές απαιτήσεις σε χειμερινό ψύχος για ανθοφορία. Είναι ανθεκτική στους δυνατούς ανέμους. Ανθίζει το 2ο και 3ο δεκαήμερο του Απρίλη. Έχει άφθονη και σταθερή ανθοφορία. Δεν παρουσιάζει συνήθως ανθόρροια. Καρποδένει καλά και γρήγορα. Αντέχει στον πυρηνοτρήτη. Είναι ή καλύτερη ποικιλία για την παραγωγή λαδιού. Πολύ παραγωγική και ανθεκτική στις ξηροθερμικές περιοχές. Προσβάλλεται εύκολα από τον καρκίνο (*Bacterium Savastanoi*), τον δάκο, τη καπνιά και τον Ρυγχίτη. Το ύψος του δέντρου φθάνει τα 5-7 μέτρα. Χαρακτηρίζεται από μικρά φύλλα και μικρούς καρπούς. Ο καρπός της είναι πολύ μικρός έχει σχήμα κυλινδροκωνικό μέσο βάρος 1,3 gr με τη μια πλευρά κυρτωμένη και έχει βάρος 1 gr και διαστάσεις 7-9 mm .Η ελαιοπεριεκτικότητα κυμαίνεται μεταξύ 15-27 % και θεωρείται πολύ καλή . Ο πυρήνας έχει το ίδιο σχήμα με το καρπό. (Αλεξάκης Α. ,1998)

3.2 Ποικιλία Καλαμών (O. eur. v. ceraticarpa) ή Καλαματιανή, Χονδρολιά, Κορακολιά, Αετονυχολιά, Τσιγκέλι, ή Τσιγκελολιά.

Ανήκει στις αδρόκαρπες ή χονδρολιές (μέγεθος καρπού μεγάλο). Καλλιεργείται κυρίως στην Μεσσηνία, Λακωνία, Αιτωλοακαρνανία και Φθιώτιδα. Το ύψος του δέντρου φτάνει 7-10 μέτρα. Τα φύλλα είναι μεγάλα, πλατιά, σκληρά με κυματοειδή και αναδιπλούμενα άκρα. Η άνω επιφάνεια είναι βαθυπράσινη ενώ η κάτω πρασινόσταχτη. Ο καρπός της είναι μεγάλος ή μέτριος, έχει σχήμα μονόπλευρο, κυρτό και μέσο βάρος 5,6 γραμμάρια. Το χρώμα στην ωρίμανση γίνεται σκοτεινό μαύρο, χωρίς ν' αλλάξει στην κονσερβοποίηση. Ωριμάζει Νοέμβρη - Δεκέμβρη. Ο πυρήνας Έχει σχήμα παρόμοιο με τον καρπό, μέσο βάρος 0,60 γραμμάρια και φέρει εννιά έως δέκα αβαθή χωρίσματα. Η σχέση σάρκας προς πυρήνα του καρπού είναι 8,3:1. Η περιεκτικότητα του καρπού σε λάδι κυμαίνεται γύρω στο 17% (περίπου 1:6). Καλλιεργείται κυρίως για την παρασκευή κονσερβών. Η ποικιλία αυτή γίνεται παραγωγικότερη σε περιοχές με μεγάλες βροχοπτώσεις και με υψηλή ατμοσφαιρική υγρασία. Είναι ανθεκτική στις προσβολές του δάκου. (Ποντίκης, 1992)

ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μελετήθηκε η ποιοτική και ποσοτική σημασία των ορμονών στη δημιουργία αδιαφοροποίητου κάλου *in vitro* σε δύο τοπικές ποικιλίες ελιάς «Καλαμών» και «Κορωνέικη». Η δημιουργία αδιαφοροποίητου κάλου μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως πρωτογενές υλικό για φυσιολογικές, βιοχημικές και βιοτεχνολογικές εφαρμογές. Ως έκφυτα χρησιμοποιήθηκαν και από τις δύο ποικιλίες τμήματα φύλλου, βλαστού, οφθαλμού και ρίζας. Τα έκφυτα λήφθηκαν το χρονικό διάστημα από τον Ιανουάριο έως τον Σεπτέμβριο του 2004, ενώ της ρίζας από τον Ιούλιο έως τον Οκτώβριο του 2004.

Δοκιμάστηκαν 5 διαφορετικοί ρυθμιστές ανάπτυξης σε $\frac{1}{2}$ MS : (κινετίνη) KIN(0.5mg/l,0.8mg/l,1.0mg/l,1.5mg/l,2.0mg/l,5.0mg/l,10mg/l), 2,4D, GA₃, BAP (συγκεντρώσεις 0.5 mg/l και 1.0 mg/l) και NAA(0.5 mg/ l,1.0 mg/ l και 2.0 mg/ l) καθώς και συνδυασμός ρυθμιστικών ουσιών ,KIN και NAA (σε αναλογία 1:1, 1.5:1 και 1:4.) NAA και 2,4D (σε αναλογία1:1).

Καλύτερα αποτελέσματα για την ποικιλία «Κορωνέικη» έδωσε το θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε 1.5 mg/l KIN και 1mg/l NAA δίνοντας ποσοστό παραγόμενου κάλου 56 % ενώ για την «Καλαμών» ο συνδυασμός1mg/l NAA και 1mg/l 2,4D σε συνθήκες σκότους δίνοντας ποσοστό 60%. Η δομή και η υφή του κάλου ήταν διαφορετική ανάλογα με το είδος της ορμόνης και στις δύο ποικιλίες. Η παρουσία μόνο κυτοκινίνης(KIN) έδωσε συμπαγή και σκληρό κάλο πράσινου χρώματος σε χρονικό διάστημα 6 ημερών από την ημέρα εγκατάστασης σε αντίθεση με το συνδυασμό αυξινών (1mg/l 2,4D και 1mg/l NAA) που έδωσε μετά από 12 ημέρες στο θάλαμο επώασης εμποπλαστικό και εύθρυπτο κάλο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

ΥΛΙΚΑ - ΜΕΘΟΔΟΙ:

Φυτικό υλικό

Τα πειράματα πραγματοποιήθηκαν στο εργαστήριο της Ιστοκαλλιέργειας του ΤΕΙ Καλαμάτας. Τα έκφυτα προήλθαν από νεαρά δένδρα ηλικίας τριών ετών που καλλιεργήθηκαν σε φυτοδοχεία των 20 l. Στα τέσσερα φυτοδοχεία καλλιεργήθηκαν δενδρύλλια ποικιλίας «Καλαμών» και άλλα 4 της ποικιλίας «Κορωνέικη».

Τα δενδρύλλια τους χειμερινούς μήνες διατηρήθηκαν σε θερμοκηπιακό χώρο. Τον Απρίλιο και για τους επόμενους μήνες μεταφέρθηκαν σε περιφραγμένο χώρο κοντά στο εργαστήριο για λόγους διευκόλυνσης της κοπής των φυτικών τμημάτων και της περιποίησης των δενδρυλλίων.

Τους πρώτους μήνες έγινε ψεκασμός της φυλλικής επιφάνειας των δενδρυλλίων με χαλκούχο σκεύασμα (6g/100ml νερό). Η άρδευση των δενδρυλλίων γινόταν μια φορά την εβδομάδα. Τον Ιούλιο έγινε ριζοπότισμα των δενδρυλλίων με μυκητοκτόνο (Rindomil 25g/l) για μείωση του μικροβιακού φορτίου και για τη λήψη υγιών τμημάτων ρίζας.

Η πρώτη εγκατάσταση *in vitro* έγινε με φύλλα και κορυφές βλαστών και από τις δύο ποικιλίες και είχε χαρακτήρα πειραματισμού σχετικά με την απολύμανση.

Απολύμανση

Η επιτυχία μιας *in vitro* καλλιέργειας εξαρτάται πρωταρχικά από τον αποκλεισμό εισόδου των μικροοργανισμών (μυκήτων, βακτηρίων, ιών) στα θρεπτικά υποστρώματα. Οι μικροοργανισμοί λόγω των άριστων συνθηκών ανάπτυξης που παρέχονται *in vitro* αναπτύσσονται ταχέως και σε σύντομο χρονικό διάστημα καλύπτουν τους φυτικούς ιστούς και τα θρεπτικά υποστρώματα κρίνοντας τα ακατάλληλα για περαιτέρω χρήση.

Ως απολυμαντικά επιφάνειας χρησιμοποιούνται τα διαλύματα του υποχλωριώδους Νατρίου ή υποχλωριώδους Ασβεστίου, το υπεροξειδίο του υδρογόνου, το βρωμιούχο νερό, ο νιτρικός Άργυρος, ο χλωριούχος υδράργυρος κ.α. Στο πείραμα επιλέχθηκε η κοινή χλωρίνη (ένα εμπορικό απορρυπαντικό που υποχλωριώδους Νατρίου).

Οι συγκεντρώσεις χλωρίνης και ο συνδυασμός του χρόνου που ακολουθήθηκε σε όλα τα έκφυτα που χρησιμοποιήθηκαν αναφέρεται στο πίνακα 1. Ως πιο κατάλληλη κρίθηκε η συγκέντρωση 10% χλωρίνης για χρονικό διάστημα 10 min υπό ανάδευση όσον αφορά τα φύλλα και τους βλαστούς, ενώ για τους οφθαλμούς και την κορυφή βλαστού χρησιμοποιήθηκε 6% χλωρίνη για 10 min. Για την απολύμανση της ρίζας απαιτήθηκε η συγκέντρωση 15% χλωρίνη για 20 min.

Πίνακας 1: Μεταχειρίσεις απολύμανσης των φυτικών ιστών.

Τύπος εκφύτου	Ποσοστό μυκητοκτόνου (Rindomil)	Ποσοστό αιθανόλης	Ποσοστό χλωρίνης	Χρονική περίοδος	Αριθμός εκπλύσεων
Φύλλα		45%	10%	10 min	4
Βλαστοί		45%	10%	10 min	4
Κόμβοι		45%	6%	10 min	4
Κορυφές βλαστών		45%	6%	10 min	4
Ρίζα	0.25%	45%	15%	20 min	4

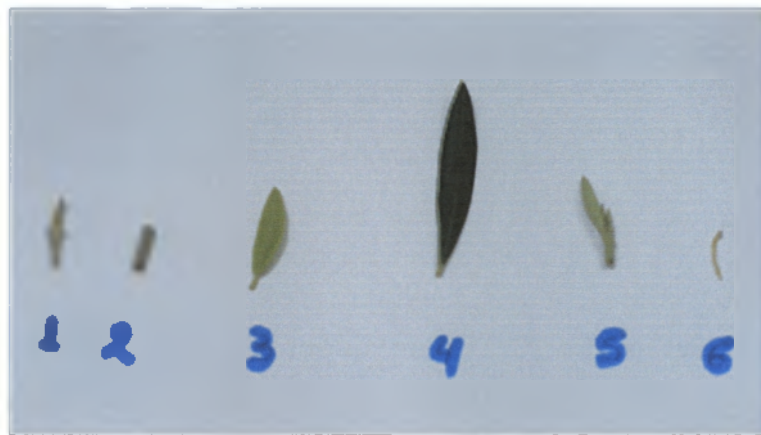
Τύπος Εκφύτου

Η επιλογή των φύλλων και των βλαστών έγινε από το ίδιο πάντα δενδρύλλιο, με κύριο χαρακτηριστικό τη ζωηρότητα και το έντονο πρασινωπό χρώμα τους. Ομοίως επιλέχθηκαν φύλλα πρασινωπά και ζωηρά με φυλλική επιφάνεια χωρίς καμία ένδειξη συμπτώματος από εχθρούς ή ασθένειες. Οι βλαστοί αποκόπτονταν από τα δενδρύλλια με τη βοήθεια ενός ψαλιδιού και στη συνέχεια μεταφέρονταν στο εργαστήριο όπου γίνονταν η αποφύλλωση τους καθώς και η προσεκτική αφαίρεση των πλάγιων οφθαλμών πάντα με τμήμα βλαστού, διότι ήταν αρκετά μικροί και δύσκολοι στους μετέπειτα χειρισμούς.

Χρησιμοποιήθηκαν ως έκφυτα και από τις δύο ποικιλίες φύλλα (Εικόνες 1.3, 1.4, 2.3, 2.4), βλαστοί (Εικόνες 1.1, 2.2), κόμβοι (Εικόνες 1.2, 2.1), κορυφές βλαστών (Εικόνες 1.5, 2.5), ρίζα (Εικόνες 1.6, 2.6).



Εικόνα 1: Πηγές εκφύτων και έκφυτα ποικιλίας «Καλαμών»



Εικόνα 2: Πηγές εκφύτων και έκφυτα ποικιλίας «Κορωνέικης»

Πραγματοποιήθηκαν προκαταρκτικά πειράματα για την εύρεση του άριστου συνδυασμού των αυξητικών ουσιών για την επαγωγή της καλογένεσης και στη συνέχεια σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές δοκιμάστηκαν 23 διαλύματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις ρυθμιστών αύξησης.

Κάθε διάλυμα που δοκιμάστηκε περιλάμβανε συνολικά 18 επαναλήψεις (τριβλία petri) για κάθε ποικιλία. Στα τριβλία τοποθετήθηκε ο ίδιος τύπος εκφύτου με ίσο αριθμό εκφύτων και για τις δύο ποικιλίες.

Διαδικασία εγκατάστασης in vitro

Για το πείραμα χρησιμοποιήθηκαν κωνικές φιάλες (περιείχαν 3/4 ποσότητα απιονισμένου νερού), γυάλινα τριβλία petri (η εσωτερική βάση καλυπτόταν από διηθητικό χαρτί), εργαλεία χειρός (λαβίδες, νυστέρια). Πριν την τοποθέτησή τους στο αυτόκαυστο η επιφάνειά τους καλύφθηκε με αδιαφανές φύλλο. Για οικονομικούς και πρακτικούς λόγους η αποστείρωση των εργαλείων γινόταν παράλληλα με την αποστείρωση των θρεπτικών υποστρωμάτων. (1/2

MS στερεοποιημένο με 6g agar/l. Το pH του θρεπτικού υποστρώματος ρυθμίστηκε στο 5.7 προ της αποστείρωσής του θρεπτικού υποστρώματος).

Η αποστείρωση των σκευών, εργαλείων και θρεπτικών μέσων γίνεται σε κλίβανους υγρής αποστείρωσης με την επίδραση υδρατμών θερμοκρασίας 120 °C και πίεσης 1,5 Atm για 20 min.

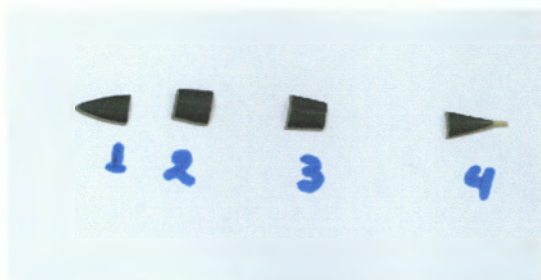
Αφού γινόταν η πλύση τόσο των φύλλων, όσο και των βλαστών με τρεχούμενο νερό, τοποθετήθηκαν σε κωνική φιάλη με απιονισμένο νερό πάνω σε θερμαινόμενη πλάκα για 10 min υπό ανάδευση για καλύτερη πλύση.

Κατόπιν μεταφέρθηκαν στο θάλαμο νηματικής ροής που είχε τεθεί σε λειτουργία 20 min πριν την έναρξη της εργασίας. Ο καθαρισμός με αιθανόλη σε όλη την εσωτερική και εξωτερική επιφάνεια του θαλάμου ήταν απαραίτητος καθώς και η χρησιμοποίηση γαντιών για αποφυγή μικροοργανισμών που θα προκαλέσουν αρνητικά αποτελέσματα στην εγκατάσταση των εκφύτων. Ανάλογα με το τμήμα του εκφύτου ακολουθήθηκε η ανάλογη απολύμανση σύμφωνα με το πίνακα 1.

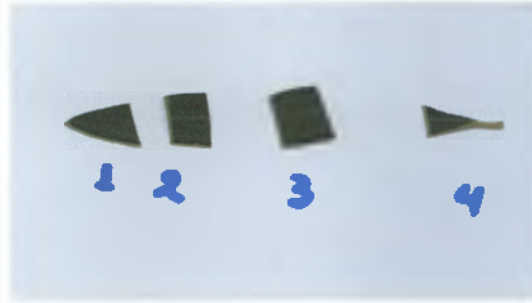
Η ανανέωση της αποστείρωσης των εργαλείων γινόταν σε τακτά χρονικά διαστήματα με την εμβάπτισή τους σε αιθανόλη 90% και με την καύση τους σε φλόγα προερχόμενη από λυχνίες Bunsen (με βαλβίδα διέλευσης υγραερίου) στο εσωτερικό του θαλάμου επώασης.

Προετοιμασία εκφύτων

Τα φύλλα τεμαχίζονταν σε τέσσερα επιμέρους μέρη (Εικόνα 3,4), σε ειδικό αποστειρωμένο γυάλινο τριβλίο (που το εσωτερικό του καλύφθηκε με αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί) με τη βοήθεια αποστειρωμένης λαβίδας και νυστεριού.



Εικόνα 3: Τομή φύλλου σε τέσσερα διαδοχικά τμήματα ποικιλίας «Κορωνέικης»



Εικόνα 4: Τομή φύλλου σε τέσσερα διαδοχικά τμήματα ποικιλίας «Καλαμών»

Τα τμήματα των εκφύτων των φύλλων τοποθετήθηκαν σε τέσσερα τριβλία, προκειμένου να εξυπηρετούνται οι εμφυτεύσεις

Το μήκος των τμημάτων των βλαστών που χρησιμοποιήθηκαν ήταν περίπου 3 cm. Από τους βλαστούς αποκόπτονταν τμήματα με οφθαλμούς οι οποίοι απαιτούσαν λεπτούς χειρισμούς λόγω του μικρού μεγέθους τους και του κινδύνου να καούν από τη λαβίδα κατά τους χειρισμούς τους.

Τα τμήματα της ρίζας αφαιρέθηκαν με πολύ προσοχή από τα δοχεία που βρίσκονταν τα δενδρύλλια με την βοήθεια ενός αιχμηρού εργαλείου και μιας σπάτουλας. Αφού έγινε προσεκτική αφαίρεση του χώματος που κάλυπτε τη ρίζα με μεγάλη προσοχή αποσπάστηκαν τμήματα ρίζας διαμέτρου από 2-5 mm και μήκους 2-8 cm.

Μετά την κοπή των τα έκφυτα της ρίζας τοποθετούνταν σε κωνική φιάλη με νερό και μεταφέρθηκαν στον εργαστηριακό χώρο όπου και έγινε καλή πλύση με τρεχούμενο νερό, (αφαίρεση ξένων στοιχείων από τα τεμάχια της ρίζας και του εξωτερικού φλοιού). Στη συνέχεια απολυμάνθηκαν σε κωνική φιάλη με διάλυμα μυκητοκτόνου Rindomil (0,25 g /100 ml νερού) υπό ανάδευση και έπειτα σε κωνική φιάλη με διάλυμα χλωρίνης (πίνακας 1). Ακολούθησαν 6 εκπλύσεις με αποστειρωμένο και απιονισμένο νερό και η τοποθέτηση τους σε γυάλινο τριβλίο με διηθητικό χαρτί αφενός για την μείωση της ποσότητας του νερού που υπήρχε στη επιφάνειά τους και αφετέρου για τη διατήρηση της υγρασίας τους

Η τράπεζα νηματικής ροής καθαρίστηκε με τμήμα καθαρού χαρτιού καθ' όλη την επιφάνεια της, απομακρύνθηκαν τα ποτήρια ζέσεως που χρησιμοποιήθηκαν κατά την έκπλυση, καθώς και τα εργαλεία(λαβίδες και νυστέρια) που ήδη είχαν χρησιμοποιηθεί .

Άλλοι Χειρισμοί εκφύτων –Συνθήκες

Έπειτα ξεκινούσε η μεταφορά των τμημάτων των εκφύτων από τα γυάλινα τριβλία με την βοήθεια νέας αποστειρωμένης λαβίδας, σε πλαστικά τριβλία petri που περιείχαν το θρεπτικό υπόστρωμα. Σε κάθε τριβλίο τοποθετήθηκαν από 4-8 τμήματα ανάλογα με το μήκος των τμημάτων ή 2-3 τμήματα ριζών. Τα έκφυτα τοποθετήθηκαν σε οριζόντια ή κατακόρυφη θέση μέσα στο περιέκτη έτσι ώστε πάντα η τομή του εκφύτου να καλύπτεται ολοκληρωτικά από το θρεπτικό υπόστρωμα. Τα τριβλία petri καλύπτονταν περιμετρικά με para film, και στο επάνω μέρος του τριβλίου αναγράφονταν η ημερομηνία, η ποικιλία και το θρεπτικό υπόστρωμα. Τα τριβλία στη συνέχεια μεταφέρονταν σε θάλαμο επώασης με θερμοκρασία 25°C για 16 ώρες και 18°C για 8 ώρες, ένταση φωτισμού 3000-4500 lux και σχετική υγρασία 60%.

Στη συνέχεια υπήρχε σχολαστικός έλεγχος των εκφύτων μετά τη τοποθέτησή τους στο θάλαμο επώασης. Οι πρώτες 4 ημέρες ήταν καθοριστικές για το εάν το φυτικό υλικό θα παρέμενε καθαρό

Στις περισσότερες τις επαναλήψεις υπήρχε ένα ποσοστό περίπου 2-8% μολυσμένων εκφύτων.

Επανακαλλιέργειες

Η μεταφορά των εκφύτων σε περιέκτες σε νέο θρεπτικό υπόστρωμα έγινε ανά 2 -6 εβδομάδες. Όταν το μέγεθος του κάλου έφτασε 2-3 mm αποκόπτονταν από το αρχικό έκφυτο και μεταφέρονταν σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε KIN (1,5mg/l). Έπειτα από δύο εβδομάδες η διάμετρος του κάλου έφτανε περί τα 10 mm.

Ακολουθούσε διαχωρισμός του κάλου σε 3 επιμέρους μέρη. Η κοπή τους έγινε σε αποστειρωμένο γυάλινο τριβλίο και μεταφέρθηκαν με την βοήθεια αποστειρωμένης λαβίδας σε νέο θρεπτικό υπόστρωμα ίδιας συγκεντρώσεως κινετίνης. Όταν τα επιμέρους τμήματα του κάλου έφταναν στο ίδιο μέγεθος με τα αρχικά γινόταν επανακαλλιέργεια του κάλου. Ένας κάλος έδινε κάθε φορά 4-6 επιμέρους κάλους που διατηρήθηκαν συνολικά 6 μήνες.

Τόσο για τη δομή όσο και για την ανάπτυξη του κάλου έγιναν μετρήσεις της διαμέτρου και του νωπού βάρους σε χρονικό διάστημα 45 ημερών ανά 5 ημέρες.

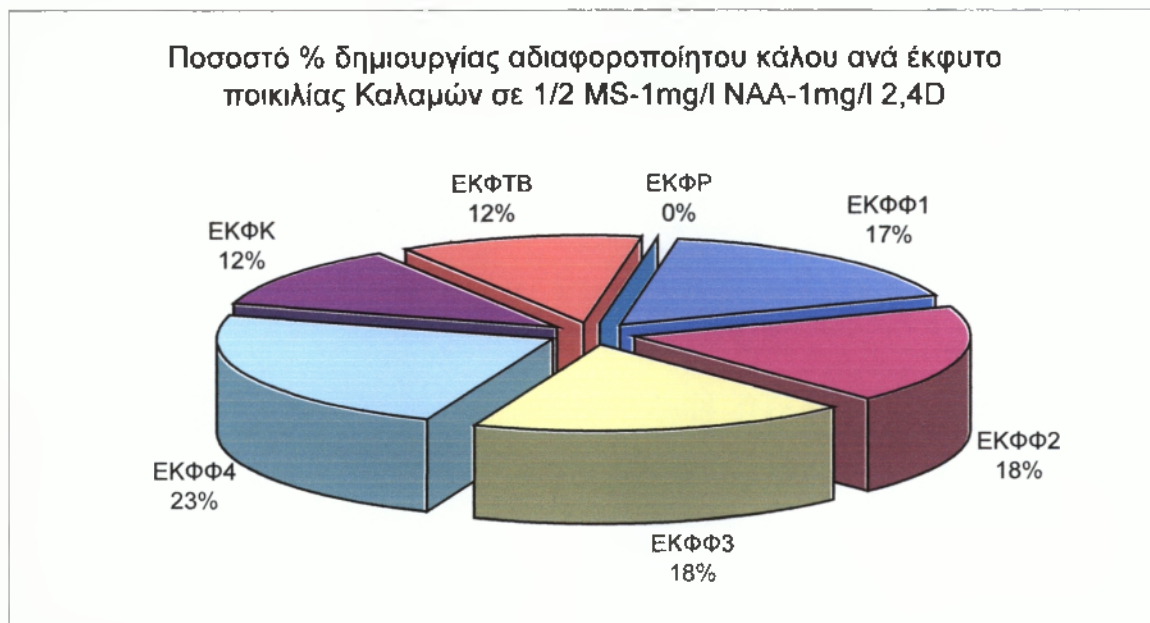
Μετρήσεις

Η μέτρηση της διαμέτρου έγινε ως εξής: το τριβλίο του κάλου τοποθετήθηκε σε μιλιμετρέ χαρτί μέσα στη τράπεζα νηματικής ροής και υπολογίζονταν σε εκατοστόμετρα(cm) η διάμετρος που καταλάμβανε ο κάλος μέσα στο τριβλίο. Όσον αφορά το νωπό βάρος του κάλου, η μέτρηση γίνονταν με ζυγαριά ακριβείας 4 δεκαδικών ψηφίων που τοποθετήθηκε στη τράπεζα νηματικής ροής. Κάθε φορά ζυγίζονταν τρεις κάλοι που αφαιρούνταν ο καθένας από ένα τριβλίο και το βάρος που καταγράφονταν ήταν το μέσο βάρος.

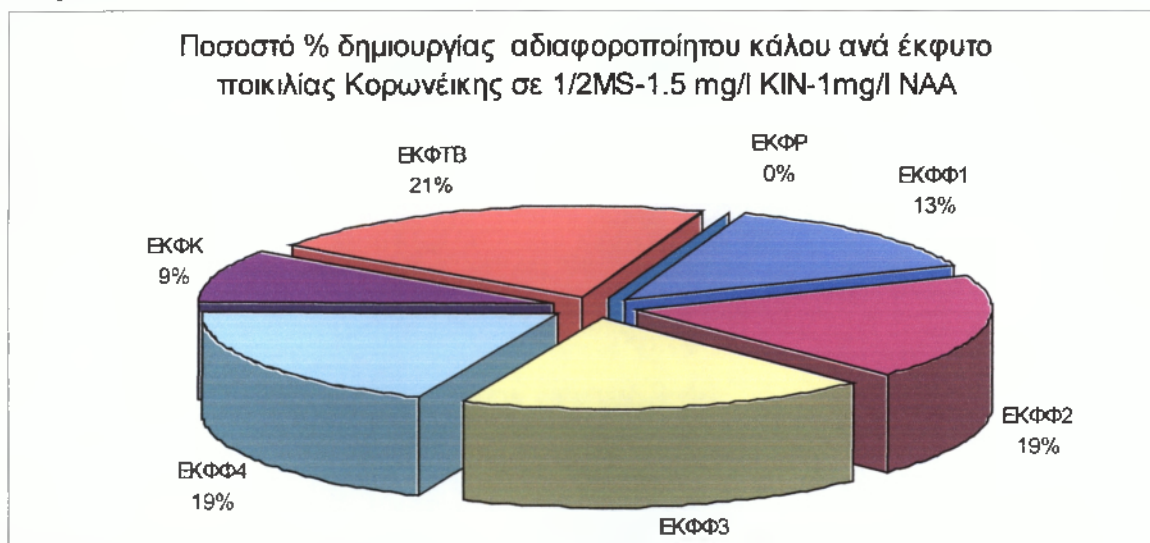
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Από τους 23 συνδυασμούς ρυθμιστών ανάπτυξης που δοκιμάστηκαν βρέθηκε ότι μέγιστος αριθμός κάλων για τη ποικιλία **Κορωνέικη** επιτεύχθηκε με τη συγκέντρωση 1.5 mg/l KIN και 1 mg/l NAA, με ποσοστό δημιουργίας κάλου 56%. Για την ποικιλία **Καλαμών** δε ο συνδυασμός των αυξίνων 1 mg/l NAA και 1 mg/l 2,4D έδωσε ποσοστό δημιουργίας κάλου 60%.



Γράφημα 1: Καλύτερη απόδοση στη δημιουργία επιθυμητού κάλου σε σχέση με το έκφυτο για τη ποικιλία Καλαμών σε θρεπτικό υπόστρωμα 1 mg/l NAA και 1 mg/l 2,4D

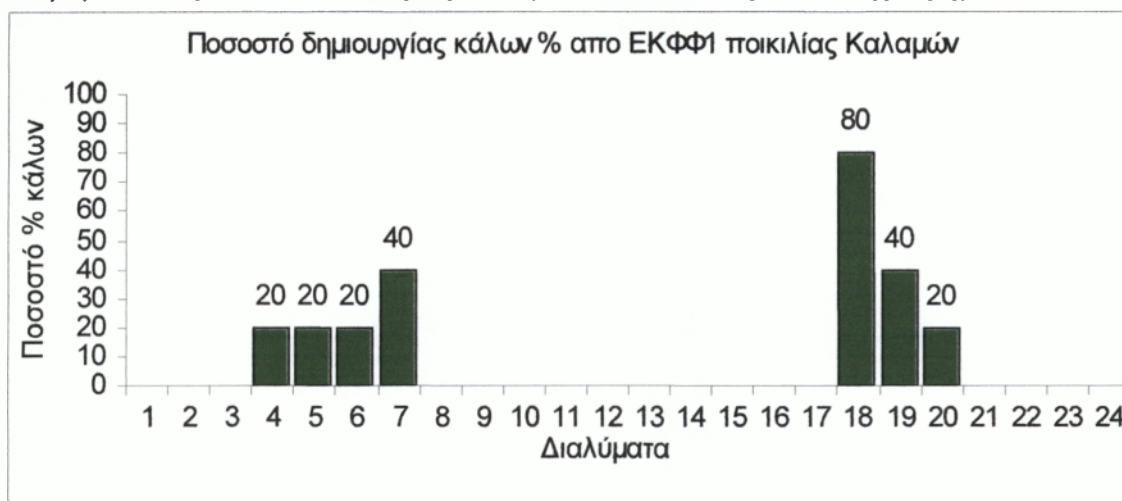


Γράφημα 2: Καλύτερη απόδοση στη δημιουργία επιθυμητού κάλου σε σχέση με το έκφυτο για τη ποικιλία Κορωνέικη σε θρεπτικό υπόστρωμα 1/2MS-1.5 mg/l KIN-1 mg/l NAA.

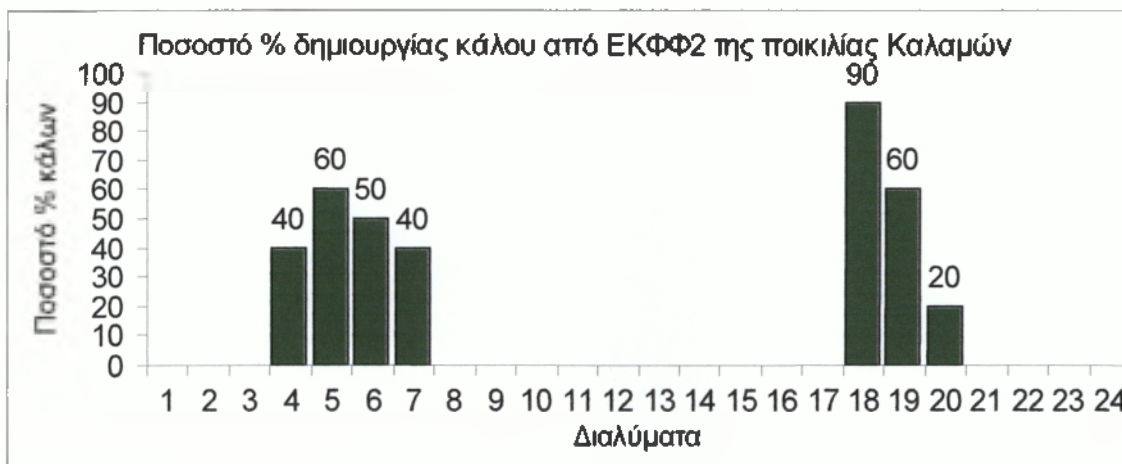
Όπως φαίνεται στα παραπάνω γραφήματα(1,2) τα έκφυτα των δύο ποικιλιών έδωσαν διαφορετικό ποσοστό επιθυμητής καλογένεσης σε διαφορετικούς ρυθμιστές ανάπτυξης. Αναλυτικά στην ποικιλία Καλαμών το τμήμα του φύλλου με μίσχο έδωσε ποσοστό 23%, τα μεσαία τμήματα του φύλλου 18% και το ακραίο τμήμα φύλλου 17%. Το τμήμα του βλαστού και της κορυφής έδωσε 12%.

Στην ποικιλία Κορωνέικη το τμήμα του βλαστού έδωσε αδιαφοροποίητο κάλο σε ποσοστό 21%, τα έκφυτα από μεσαίο και τμήμα φύλλου με μίσχο έδωσαν 19%, ενώ το έκφυτο ακραίου φύλλου έδωσε 13% ποσοστό και το έκφυτο της κορυφής 9%.

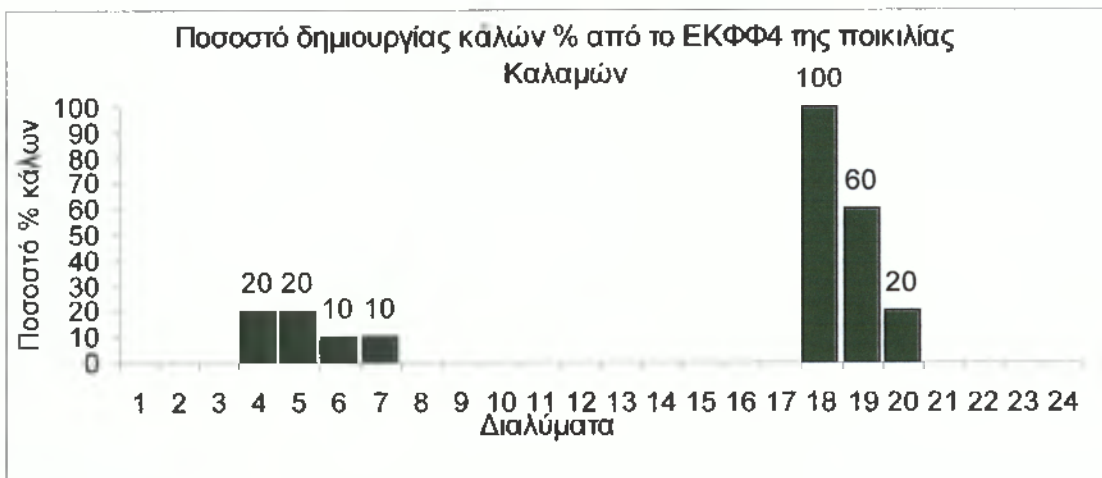
Αναλυτικά η αντίδραση της κάθε ποικιλίας και του κάθε έκφυτου σε διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα φαίνεται στα παρακάτω γραφήματα.



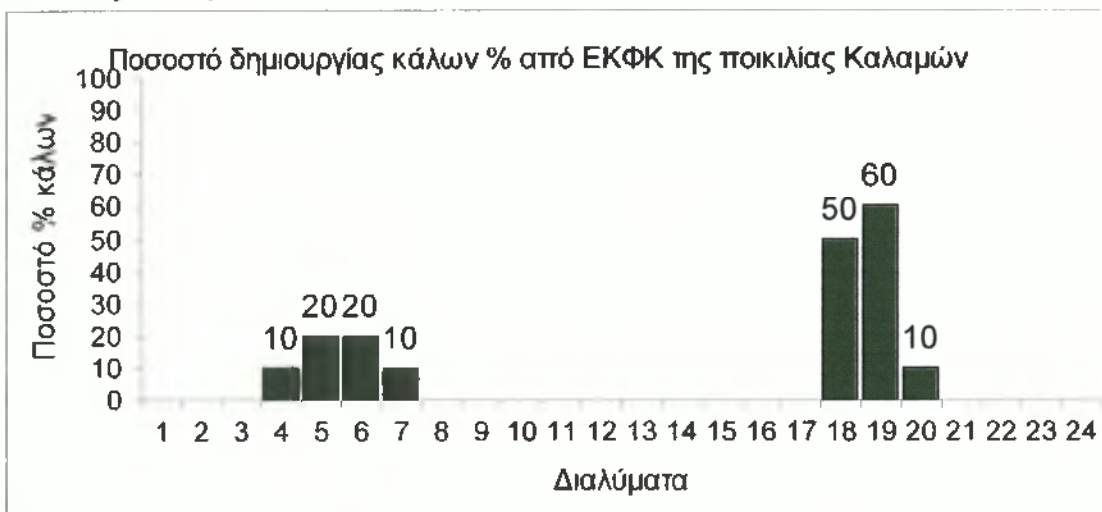
Γράφημα 3: Δημιουργία αδιαφοροποίητων κάλων από ακραίο φύλλο ποικιλίας Καλαμών



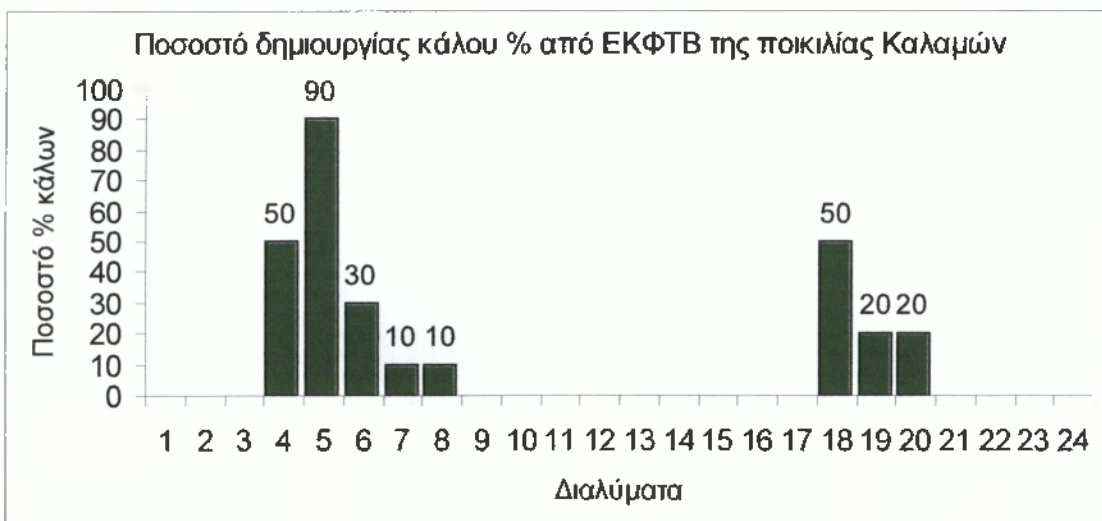
Γράφημα 4: Δημιουργία αδιαφοροποίητων κάλων από μεσαίο φύλλο ποικιλίας Καλαμών



Γράφημα 5 : Δημιουργία αδιαφοροποίητων κάλων από μίσχο φύλλου ποικιλίας Καλαμών



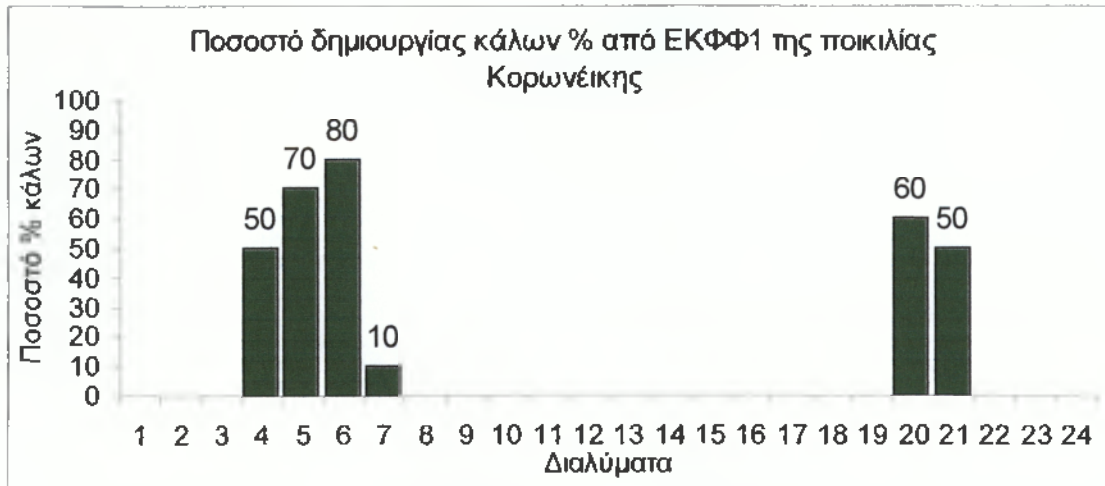
Γράφημα 6: Δημιουργία αδιαφοροποίητων κάλων από κορυφή βλαστού ποικιλίας Καλαμών



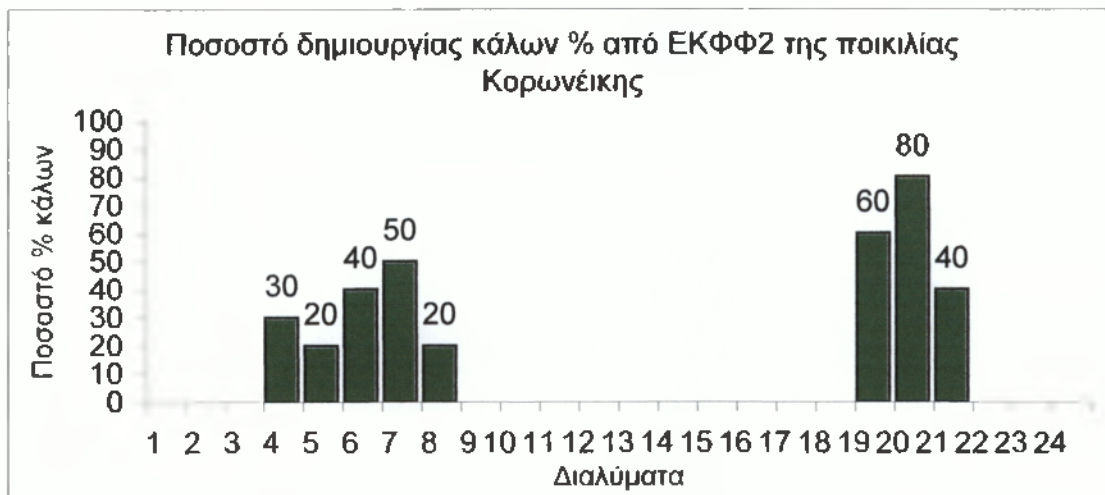
Γράφημα 7: Δημιουργία αδιαφοροποίητων κάλων από τμήμα βλαστού ποικιλίας Καλαμών.

Στα παραπάνω γραφήματα (3,4,5,6,7) παρουσιάζεται ο αριθμός κάλων που προκλήθηκαν από τα έκφυτα της **ποικιλίας Καλαμών** που καλλιεργήθηκαν σε διαφορετικής συγκέντρωσης αυξινών. Όπως φαίνεται από τα γραφήματα από τα 23 διαλύματα εκείνα που συνέβαλαν στην επαγωγή αδιαφοροποιήτου κάλου σε όλα τα έκφυτα ήταν τα: Δ3(1/2MS-1.5mg/l KIN), Δ4(1/2MS-1.5mg/l KIN), Δ5(1/2MS-2 mg/l KIN), Δ6(1/2MS-5 mg/l KIN), Δ17(1/2MS – 1mg/l NAA -1mg/l 2,4D), Δ18(1/2MS-1mg/l KIN-1mg/l NAA) και Δ19(1/2MS-1.5mg/l KIN-1mg/l NAA). Για τα έκφυτα από τμήμα (ακραίου, μεσαίου και με μίσχο) φύλλου αδιαφοροποιήτος κάλος δημιουργήθηκε σε μεγαλύτερο ποσοστό στο διαλύματα Δ17 με 80%,90%, και 100% αντίστοιχα. Για τα έκφυτα της κορυφής δημιουργία κάλου παρουσιάστηκε στο διάλυμα Δ18 με ποσοστό 60% ενώ στα έκφυτα τμήματος βλαστού στο Δ5 με ποσοστό 90%. Καλύτερη απόδοση σε όλα τα διαλύματα όσον αφορά την επαγωγή κάλου είχαν τα έκφυτα από τμήμα μεσαίου φύλλου.

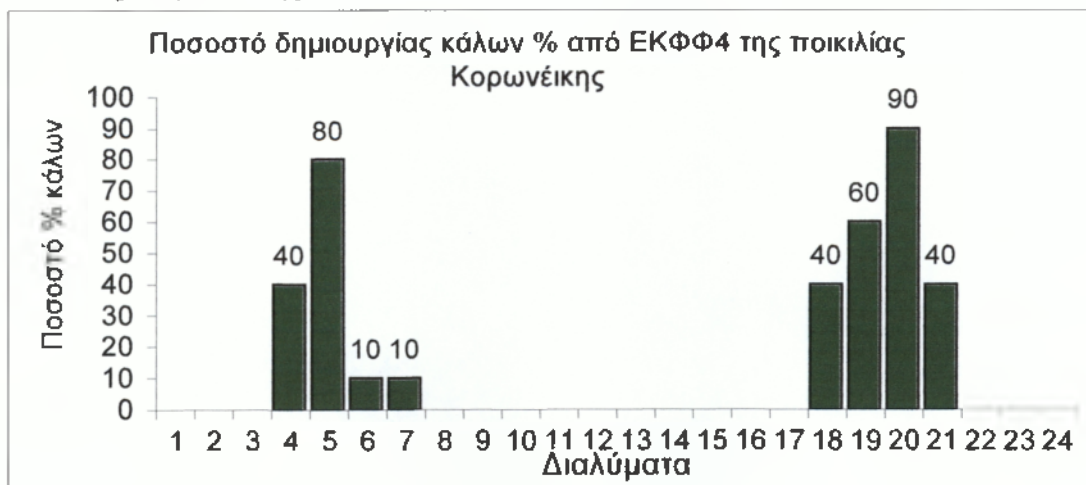
Για την **ποικιλία Κορωνέικη** τα θρεπτικά υποστρώματα που στα έκφυτα δημιουργήθηκε κάλος ήταν τα: Δ3(1/2MS-1.5mg/l KIN), Δ4(1/2MS-1.5mg/l KIN), Δ5(1/2MS-2 mg/l KIN), Δ6(1/2MS-5 mg/l KIN), Δ7(1/2MS-10 mg/l KIN), Δ17(1/2MS-1mg/l NAA -1mg/l 2,4D), Δ18(1/2MS-1mg/l KIN-1mg/l NAA), Δ19 (1/2MS-1.5mg/l KIN-1mg/l NAA) και Δ20(1/2MS-2 mg/l KIN-1mg/l NAA). Τα έκφυτα που προήλθαν από τμήμα ακραίου φύλλου αντέδρασαν καλύτερα στο Δ5 με ποσοστό 80%, για τα μεσαία τμήματα των φύλλων στο Δ19 έδωσαν κάλο σε ποσοστό 80% όπως και τα έκφυτα των τμημάτων των φύλλων με μίσχο σε ποσοστό 90%. Τα έκφυτα της κορυφής απέδωσαν τόσο στο Δ17 όσο και στο Δ19 με ποσοστό 60% ενώ τα τμήματα του βλαστού ως έκφυτα αντέδρασαν στα Δ4 και Δ19 με ποσοστό 90%. Για την ποικιλία Κορωνέικη αντέδρασαν καλύτερα στα θρεπτικά υποστρώματα τα έκφυτα που προήλθαν από τους βλαστούς και από τμήμα φύλλου με μίσχο.



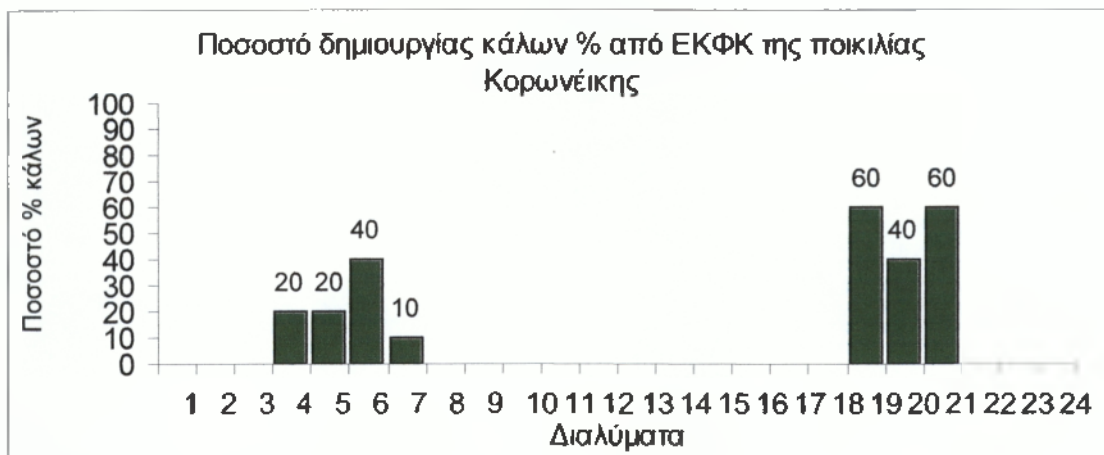
Γράφημα 8: Δημιουργία αδιαφοροποίητων κάλων από ακραίο φύλλο ποικιλίας Κορωνέικης



Γράφημα 9: Δημιουργία αδιαφοροποίητων κάλων από μεσαίο φύλλο ποικιλίας Κορωνέικης



Γράφημα 10: Δημιουργία αδιαφοροποίητων κάλου από μίσχο φύλλου ποικιλίας Κορωνέικης.



Γράφημα 11: Δημιουργία αδιαφοροποίητων κάλων από κορυφή βλαστού ποικιλίας Κορωνέικης



Γράφημα 12: Δημιουργία αδιαφοροποίητου κάλου από τμήμα βλαστού ποικιλίας Κορωνέικης.

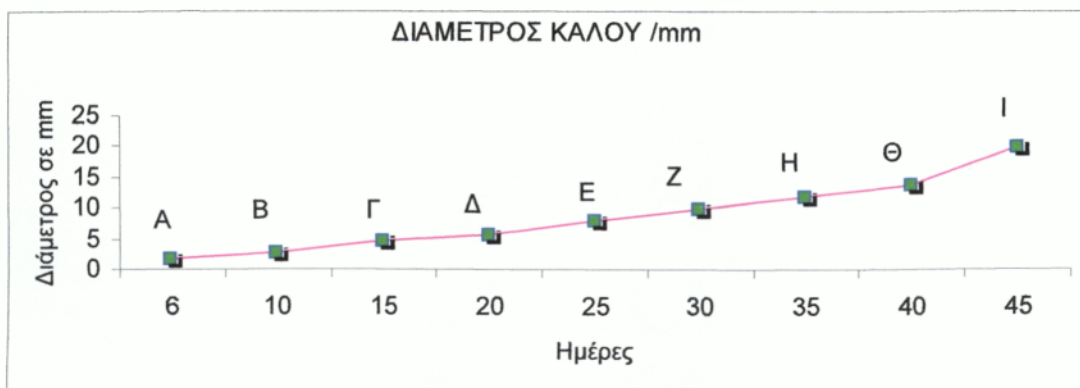
Για τις δύο ποικιλίες τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν κοινά αποτελέσματα και δημιουργήθηκε αδιαφοροποίητος κάλος. Τα Δ3(1/2MS -1 mg/l KIN), Δ4 (1/2MS -1.5mg/l KIN), Δ5(1/2MS -2mg/l KIN), Δ6(1/2MS - 5mg/l KIN), Δ17(1/2MS-1mg/l NAA- 1mg/l 2,4D), Δ18(1/2MS-1mg/l KIN-1mg/l NAA) και Δ19 (1/2MS-1.5mg/l KIN-1mg/l NAA). Το ποσοστό δημιουργίας του κάλου στα διάφορα έκφυτα που χρησιμοποιήθηκαν και από τις δύο ποικιλίες δεν ήταν το ίδιο. Η ποικιλία Κορωνέικη είχε καλύτερα αποτελέσματα στην παρουσία κάλου στα έκφυτα από την ποικιλία Καλαμών.

Στο γράφημα 15 που ακολουθεί παρουσιάζεται η σταδιακή ανάπτυξη της διαμέτρου του κάλου σε 45 ημέρες. Ο κάλος προήλθε από έκφυτο μεσαίου τμήματος ποικιλίας Καλαμών που αναπτύχθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα με την παρουσία δύο αυξινών 1mg/l NAA και 1mg/l 2,4D και διατηρήθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα με την παρουσία 1.5 mg/l KIN. Το μήκος του κάλου τις πρώτες εβδομάδες μεγάλωνε κατά 1-2 mm ενώ μετά την 40^η ημέρα η διαφορά έφτασε

τα 6 mm και η συνολική διάμετρος του κάλου τα 20 mm. Έπειτα από την 45^η ημέρα μετρήσεις που έγιναν έδειξαν ότι η διάμετρος έμεινε σταθερή και ο κάλος δεν είχε περαιτέρω ανάπτυξη.



Γράφημα 13: Διάμετρος κάλου σε συνδυασμό με τις ημέρες εγκατάστασης.



Γράφημα 14 : Σταδιακή ανάπτυξη του κάλου (A: φάση υστέρησης, I: Εκθετική φάση)

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η επαγωγή κάλου στην ελιά όπως έχει αναφερθεί από πολλούς ερευνητές απαιτεί την παρουσία ρυθμιστών αύξησης εκτός από τα θρεπτικά στοιχεία που λαμβάνονται από ποικίλα θρεπτικά υποστρώματα. Η συγκεκριμένη μελέτη έχει ως στόχο την επιλογή του συνδυασμού εκείνου που θα έχει ως αποτέλεσμα τη δημιουργία καλογένεσης. Για το σκοπό αυτό δοκιμάστηκαν σύμφωνα με βιβλιογραφικές αναφορές 23 θρεπτικά υποστρώματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις ρυθμιστών αύξησης για να επιβεβαιωθεί πρακτικά αφενός στο συγκεκριμένο είδος η καλογένεση και αφετέρου να μελετηθεί η διαφορετική αντίδραση δύο ποικιλιών του ίδιου είδους. Η παρουσία κινετίνης(1,1.5,2,5,10 mg/l),καθώς και ο συνδυασμός αυξινών 2,4 D(1 mg/l) και NAA (1 mg/l) ήταν και για τις δύο ποικιλίες απαραίτητος για την επαγωγή κάλου. Τα υπόλοιπα διαλύματα διατηρούσαν το φυτικό υλικό καθαρό χωρίς να διευκολύνουν το σχηματισμό κάλου.

Η παρουσία μόνο κυτοκινίνης (KIN) και στις δύο ποικιλίες είχε ως αποτέλεσμα την επαγωγή κάλου, κυρίως στην ποικιλία Κορωνέικη αλλά και στη διατήρηση και ανάπτυξη του κάλου. Το δεδομένο αυτό συμφωνεί με την άποψη πολλών ερευνητών σύμφωνα με τους οποίους η αυξίνη δεν είναι απαραίτητη για το σχηματισμό κάλου σε *in vitro* καλλιέργειες βλαστών ελιάς (Lavee & Messer, 1969).

Ο ρόλος της παρουσίας των ορμονών επιβεβαιώθηκε και για το 2,4 D σε συγκέντρωση 1mg/l που ήταν αποτελεσματικό (Lavee 1963) σε συνδυασμό με το NAA 1mg/l για τη ποικιλία Καλαμών καθώς παρατηρήθηκε στα έκφυτα εύθρυπτος κάλος σε $\frac{1}{2}$ MS υπό συνθήκες σκότους(Bourgin & Nitsch, 1967)

Αναφορικά με τις ρίζες δεν απέδωσαν κανένα αποτέλεσμα σε κανένα συνδυασμό και συγκέντρωση. Παρέμειναν απλά ως καθαρό φυτικό υλικό χωρίς καμία μεταβολή.

Αναφορικά με τη δομή και τη σύσταση του κάλου, παρατηρήθηκε διαφορά σύμφωνα με τα θρεπτικά διαλύματα όπως προαναφέρθηκε ο συνδυασμός δύο αυξινών 1mg/l 2,4 D και 1mg/l NAA υπό συνθήκες σκότους (οι περιέκτες καλύφθηκαν με αδιαφανές φύλλο) παρουσίαζαν ένα ετιοπλαστικό, ημιδιαφανές, εύθρυπτο κάλο που ο ρυθμός ανάπτυξής του ήταν αργός ενώ η παρουσία KIN σε συγκεντρώσεις 1.5 mg/l, 2.0 mg/l, 5 mg/l και 10 mg/l στο θρεπτικό υπόστρωμα έδωσε πράσινου χρώματος κάλο με σκληρή υφή.

Αναφορικά με την ανάπτυξη του κάλου ήταν απαραίτητη η μεταφορά σε νέο θρεπτικό υπόστρωμα ανά τακτά χρονικά διαστήματα 2-4 εβδομάδων. Για να παρατηρηθεί το όριο της ανάπτυξης του κάλου, κρίθηκε σκόπιμο οι κάλοι να μην επανακαλλιεργηθούν αλλά να τοποθετηθούν εξ 'ολοκλήρου σε νέο θρεπτικό υπόστρωμα και να μετρηθεί η διάμετρος και το βάρος τους σε 45 ημέρες. Έπειτα από 45 ημέρες παρατηρήθηκε ότι το βάρος και η διάμετρος του κάλου παρέμεινε σταθερή, ενώ σε μερικά επιφανειακά κύτταρα σταδιακά φάνηκε λύση και αποχρωματισμός των κυττάρων.

Ο τεμαχισμός του κάλου και η επανακαλλιέργεια σε νέο θρεπτικό υπόστρωμα με 1.5 mg/l KIN συνέβαλε στην ανάπτυξη των επιμέρους τμημάτων του αρχικού κάλου. Ως προς τη δομή των κυττάρων παρατηρήθηκε με το μικροσκοπίου σε τομές του κάλου ότι δεν υπήρχαν κύτταρα ξύλου αλλά κύτταρα με μεγάλα χυμοτόπια και μικρούς πυρήνες γεγονός που υποδηλώνει ότι γινόταν λόγος για παρεγχυματικά κύτταρα **αδιαφοροποίητα** που υπό αυτές τις συνθήκες δεν έδωσαν περαιτέρω μορφογενετικές αλλαγές.

Συμπερασματικά στην παρούσα εργασία και σύμφωνα με πολλούς ερευνητές αρκετοί ίσως παράγοντες παίζουν σημαντικό ρόλο στη παρουσία μορφογενετικών αλλαγών στα έκφυτα και στην επαγωγή του κάλου. Πιθανά κάποια ενδογενή αίτια και μηχανισμοί που το ίδιο το φυτό αναπτύσσει αλλά και που η παρουσία των συγκεκριμένων ρυθμιστών ανάπτυξης στις χρησιμοποιημένες συγκεντρώσεις συμβάλλει στην ενεργοποίηση για να δοθούν αποτελέσματα. Συγκεκριμένα:

□ Το είδος του εκφύτου.

Και στις δύο ποικιλίες το φύλλο ως έκφυτο ήταν αυτό που δημιουργήθηκε κάλος. Στα έκφυτα της ποικιλίας «Κορωνέικης παρατηρήθηκε» μορφογενετική αλλαγή κυρίως σε έκφυτα προερχόμενα από τμήμα βλαστού ενώ στη ποικιλία Καλαμών από έκφυτα μεσαίου τμήματος φύλλου.

□ Η απόσταση από τη μορφολογική βάση του εκφύτου.

Στη περίπτωση των φύλλων με τμήμα μίσχου και τα τμήματα βλαστών που χρησιμοποιήθηκαν ως έκφυτα τα σημεία εκκίνησης της δημιουργίας κάλου

ήταν το ακραίο τμήμα του μίσχου και όχι η εσωτερική τομή του φύλλου και στη περίπτωση του βλαστού τα ακραία τμήματα που υπήρχαν οι τομές.

□ Η ιστολογική σύνθεση του εκφύτου.

Η δημιουργία του κάλου ξεκίνησε από τα επιδερμικά κύτταρα του φύλλου και κυρίως από το σημείο τομής του βλαστού φυσιολογικά από κύτταρα των ηθμαγγειώδων δεσμίδων.

Η κυτταροδιαίρεση μπορεί να λαμβάνει χώρα σ' ένα μεριστωματικό στρώμα στην εξωτερική περιφέρεια των κυττάρων και όχι σε ολόκληρη τη καλλιεργούμενη μάζα (Lyndsey & Jones, 1989), το εσωτερικό τμήμα του κάλου μπορεί να παραμένει σαν μια αδιαίρετη μάζα παλαιότερης ηλικίας ιστού μέσα στο χρόνο και ίσως διαφέρει φυσιολογικώς και γενετικώς από κύτταρα του εξωτερικού στρώματος (Dodds & Roberts, 1985). Η διαίρεση στο εξωτερικό στρώμα μειώνεται και η εμφάνιση των κάλων παίρνει γρομπαλοειδή μορφή όσο η κυτταροδιαίρεση περιορίζεται σε συγκεκριμένες νησίδες κυττάρων (Thorpe, 1982).

Στην περίπτωση των εκφύτων της παρούσας εργασίας εκδηλώθηκε το φαινόμενο της δημιουργίας κάλου στην πάνω επιδερμίδα του φύλλου και στις δύο ποικιλίες σε σύγκριση με την κάτω επιδερμίδα, ενώ παρατηρήθηκε σε αρκετά έκφυτα σε περισσότερο από δύο σημεία η παρουσία δημιουργίας κάλου

□ Η επαφή με το υπόστρωμα.

Η ένταση και η συχνότητα της μορφογένεσης είναι εντονότερη στις περιοχές του εκφύτου που βρίσκονται σε επαφή με το θρεπτικό υπόστρωμα. Σε όλα τα έκφυτα η τομή τους καλυπτόταν εξ ολοκλήρου από το θρεπτικό διάλυμα.

□ Η ηλικία του εκφύτου.

Η ικανότητα προς μορφογένεση είναι εντονότερη και συχνότερη σε έκφυτα που προέρχονται από φυτά που διανύουν τα αρχικά βλαστικά στάδια (νεαρά σπορόφυτα). Παρατηρήθηκε ότι νεαρά φύλλα ελιάς απέδωσαν κάλο σε σύγκριση με μεγαλύτερης ηλικίας φύλλα που δεν

απέδωσαν κάλο και σταδιακά έδειχναν σημάδια ωρίμανσης χωρίς καμία κυτταρική δραστηριότητα στο σημείο τομής. Διαφοροποίηση της έντασης του φαινομένου παρατηρήθηκε και όσο αφορά τη **εποχή λήψης** των εκφύτων από τα δενδρύλια. Το χρονικό διάστημα Ιανουάριο -Σεπτέμβριο του 2004 έγιναν αρκετές λήψεις εκφύτων, καλύτερα αποτελέσματα έδωσαν τα έκφυτα που όχι μόνο ήταν νεαρά σε ηλικία αλλά αποκόπηκαν και από το φυτό την περίοδο της ανθοφορίας (Απρίλιο) και την εποχή που συμπίπτει με την έναρξη της ελαιοποίησης του καρπού (Αύγουστο- Σεπτέμβριο) ή μάλλον με την εποχή όπου υπάρχει έντονη δραστηριότητα του καμβίου .

□Ο γενότυπος.

Η διαδικασία της τυχαίας μορφογένεσης φαίνεται να επηρεάζεται από τη καλλιεργούμενη ποικιλία του είδους.(Λοχου & Lionakis, 2000) Στην παρούσα εργασία δύο διαφορετικές ποικιλίες του ίδιου είδους αποκρίθηκαν διαφορετικά στο φαινόμενο της επαγωγής κάλου και απαιτήθηκε διαφορετική συγκέντρωση και συνδυασμός ρυθμιστών ανάπτυξης για την απόδοση αδιαφοροποίητου κάλου. Για την Κορωνέικη χρειάστηκε η παρουσία κινετίνης και NAA ενώ για την Καλαμών 2,4 D και NAA.

Συμπερασματικά και για τις δύο ποικιλίες ήταν απαραίτητη η παρουσία ρυθμιστών ανάπτυξης για τη δημιουργία αδιαφοροποίητου κάλου. Φάνηκε επίσης αφενός ότι ο τεμαχισμός των φύλλων είναι απαραίτητος, αφετέρου όσο πιο μικρή είναι η επιφάνεια της τομής τόσο πιο μεγάλη ήταν η δραστηριότητα των κυτταρικών διαιρέσεων άρα πιο γρήγορη η δημιουργία του κάλου. Η θερμοκρασίας ήταν 25°C, η ένταση φωτισμού 4500 lux και η σχετική υγρασία 60 %. Για τη ποικιλία Κορωνέικη η εναλλαγή 16 ωρών φως και 8 ωρών σκότους (συνθήκες ευνοϊκού περιβάλλοντος) έδωσαν κάλο σε 6 ημέρες με την παρουσία κινετίνης (1.5 mg/l) και αυξίνης(1 mg/l NAA) σε αντίθεση με τη ποικιλία Καλαμών που έδωσε καλύτερα αποτελέσματα σε συνθήκες σκότους (δημιουργία κάλου σε 6 ημέρες)υπό την επίδραση δύο αυξινών (1 mg/l2,4 D και 1 mg/l NAA)και (1, 1.5, 2, 5 mg/l) KIN. Ως θρεπτικό υπόστρωμα το MS (μισής δυναμικότητας) πρόσφερε τα απαραίτητα στοιχεία στα έκφυτα.

Βιβλιογραφία

- Aitchison P.A., Macleod A. J., Yeoman M.M. 1977. Growth patterns in tissue (callus) cultures: *Plant tissue and cell culture*, pp 276-306 2^a ed., H. E. Street. Blackwell Scientific Publications. Oxford.
- Alferman A. W. & Reinhard E. 1971. Isolation of anthocyanin- producing and non-producing cell lines of tissue cultures of *Daucus carota*. *Experientia* 27, 353-4.
- Anstis P. J. P., Northcote D. H. 1973. The initiation, growth and characteristics of a tissue culture from potato tubers. *J. Exp. Bot.* 24, 425-41.
- Basu A. Seth U. & Gua-Murkherjee S. 1989. Regulation of cell proliferation and morphogenesis by amino acids in Brassica tissue cultures and its correlation with threonine deaminase. *Plant Cell Rep.* 8, 333-335.
- Bao Z-H, Ma Y-E, Liu J-F, Wang K-J, Zhang, P-F, Ni D-X, Yang W-Q., 1980. Induction of plantlets from the hypocotyls of *Olea europaea* L. in vitro. *Acta Bot. Sin.* 2:96-97.
- Ball E. 1955. Studies of the nutritive value of the callus culture of *Sequoia sempervirens*. *Ann. Biol.* 31:80.
- Brown M. S., Witherell D. F., & Dougal D. K. 1976. The potassium requirement for growth and embryogenesis in wild carrot suspension cultures. *Physiol. Plant.* 37: 73-79.
- Briccoli Batti B., Godino G., Nuzzo V., 2002. Results of the first five years after planting of an agronomical evaluation of two olive cultivars obtained by different propagation methods.
- Briccoli Batti c., Lombardo n., 1995. Propagazione in vitro della cv Nocellara Etnea. Proceeding of Congress on Mediterranean olive growing: cultivation and research now and in the future. (*Rende Consenza-Italy*, 26-28/1/1995), 249-257.
- Butenko R. G., Atanassov A. & Urmantseva W. 1972. Some features of the sugar beet tissue culture. *Phytomorph* 22: 140-143
- Canas L.A. & Benbandis A. 1988. Plant regeneration from cotyledon fragments of the olive tree (*Olea europaea* L.) *Plant Science* 54, 65-74.
- Canas L.A., Carramolino C., and Vicente M., 1987. Vegetative propagation of the olive tree from in vitro cultured embryos. *Plant Sci.* 50:85-90.
- Conceição V. Santos, Gina Brito, Gloria Pinto and Henrique M. A. C. Fonseca y 2003 In vitro plantlet regeneration of *Olea europaea* ssp. *maderensis*, *Sci. Horti.*, Vol. 97, 1, 3 p. 83-87.

- Δημάση – Θεριού Κ.,1994. Πολλαπλασιασμός της ελιάς ‘Καλαμών’ in vitro. *Επιστημονική εφημερίδα του Τμήματος Γεωπονίας της Σχολής Γεωτεχνικών Επιστημών, Τόμος 30.*
- Diamadoglou S. & Mitrakos K. ,1979. Sur la culture in vitro de l’ embryon d’ olivier (*Olea europaea L. Var. Oleaster*). *C.R. Acad. Sci. Ser D 288:1537-1540.*
- Dixon R.X. 1989. Isolation and maintenance of callus and cell suspension culture .in *Plant cell culture a practical approach*, ed Dixon R. A. pp 107-126 IRL Press 1989.
- Drew R.A.,1995.Applications of Biotechnology to Fruit and Nut Species. *The Sixth Conference of the Australia Council on Tree and Nut Crops Inc. Lismone, NSW, Australia.*
- Dodds J. H. & Roberts,1985.Experiments in plant tissue culture. 2^d ed. Pp 54, *Cambridge University Press.*
- Ελευθερίου Ε.Π.1994. Τεχνολογία Φυτικού Πολλαπλασιαστικού Υλικού(Διαχείριση-Βελτίωση Φυτών, Εμβολιασμός Φυτών, Μικροπολλαπλασιασμός) *ART OF TEXT σελ.114-116.*
- Eriksson T. 1965. Studies on the growth requirements and growth measurements of cell cultures of *Haploparpus gracilis*. *Physiol. Plant.* **18**, 976-993.
- Ζακυνθινός Γ. 1998. Συμβολή στη μελέτη παραγόντων ξυλογένεσης in vitro στο φυτό *Helianthus annuus* κοινώς Ηλίανθος. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών σελ. 6-14.
- Finer J. J. & Nagasawa A. 1988. Development of an embryogenic suspension culture of soybean (*Glycine max Merrill*). *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* **15**, 125-136
- Fondale A. S., Mule R., Tucci A.,1995. Ricerca sull’ androgenesi e ginogenesi in vitro in olivo (*Olea europea L var. Sativa*). In : *Proceeding of the congress of Mediterranean olive growing: cultivation and research now and the future (Rende Consenza-Italy, 26-28/1/1995),267-276.*
- Gautheret R. J. 1955. The nutrition of plant tissue culture *Ann Rev Plant Physiol*(**6**) 433.
- Gautheret R. J.1966. Factors affecting differentiation in plant tissues growth in vitro. In: *Cell differentiation and morphogenesis. Beerman W(ed). Elsevier / North-Holand, Amsterdam, New York, pp 55-95.*
- Grimes H. D. & Hodges T. K. 1990. the inorganic NO_3^- , NH_4^+ , ratio influences plant regenerations and auxin sensitivity in primary callus derived from immature embryos of indica rice (*Oryza sativa*)*J. Cell Sci.* **17:11-26**

- Hartmann H. T. 1946 The use of root- promoting substances propagation of olives by softwood . *Pros Amer. Soc Hort. Science*, 48: 303-308.
- Kao K. N. & Michayluc M. R. 1975. Nutrition requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at very low population density in liquid media. *Planta* 126, 105- 110.
- Kirby E. G. 1982. The effects of organic nitrogen sources on growth of cell cultures of Douglas fir. *Physiol. Plant.* 56, 114-117.
- King P. J. 1977. Studies on the growth in culture of plant cells, growth limitation by nitrate and glucose in a chemostat culture of *Acer pseudoplatanus*. *J. Exp. Bot.* 28, 142- 155.
- Κανάκης Α. 2001. Μαθήματα ιστοκαλλιέργειας .Σελ.35-57.
- Lavee S. & Adiri N. 1974. The effects of abscisic acid and gibberellic acid on the development of apple and olive callus. In : *plant Growth Substances, part VI. Tissue Culture Proceedings 18th International conference, Hirokawa Publishing Co., Tokyo, pp 1141-1148.*
- Lavee S. & Avidan N. 1982. Growth responses of tree callus to chlorogenic acid and related phenolic substances. In : *Fujiwara A. (ed), V. Proceedings Plant Tissue Culture Maruzen, Tokyo, pp 165-168.*
- Lavee, S. & Messer. G. 1969. The effect of growth regulating substances and light on olive callus growth in vitro. *J. Exp. Bot.* 20:604-614.
- Lavee, S. & Hoffman M. 1971. the effects of potassium ions on peroxidase activity and its isoenzyme composition as related to apple callus growth in vitro. *Bot. Caz.* 132:232-237.
- Lavee S., 1991. Aims, methods and advances in breeding of new olive (*Olea europea L.*) cultivars. Department of Olei and Viticulture Volcani Center, Bet-Dagan and Faculty of agriculture, Hebrew University of Jerusalem.
- Loxou V. K., Lionakis S. M. & Rokba Z.A., 2000. Regeneration of olive (*Olea europea L.*) *Developmental Biology of Regeneration ,1st meeting, 12-15 Oct 2000, Geisenheim, Germany.*
- Lyndsey K. & Jones M. G. 1989. "The biology of cultured plant cells". In *Plant Biotechnology in Agriculture pp 15-34. open University Press.*
- Lyndsey K. & Yeoman M. M. 1983. The relationship between growth rate, differentiation and alkaloid accumulation in cell cultures. *Jour. Exp. Bot.* 34, pp 1055-1065.

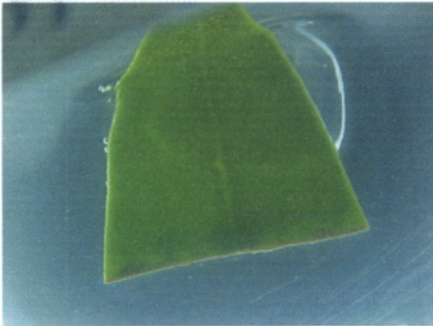
- Mc Cown B. H. & Lioud G., 1981. Woody plant medium (WPM)-A mineral nutrient formulation for micro culture of woody plant species. *Hort .Science* 16:89 (Abstract).
- Mencuccini M., 1995. Micropropagazione e miglioramento genetico in vitro dell'olivo: stato dell'arte e prospettive future. *Rivista di Frutticola* N.12
- Miller A. R. & Roberts L. W. 1984. Ethylene biosynthesis and xylogenesis in Lactuca pith explants cultured in vitro in the presence of auxin and cytokinin : the effect of ethylene precursors and inhibitors. *J. Experimental Bot.* 35. 691-8.
- Mitrakos K., Alexaki A., & Papadimitriou P.,1992. Dependence of olive morphogenesis on callus origin and age. *J. plant Physiol.* 139:269-273
- Murashige T., 1978. The impact of tissue culture. *Annu Rev. Plant Physiol.* 25:135-166.
- Orinos T., Mitrakos K., 1991. Rhizogenesis and somatic embryogenesis in calli from wild olive (*Olea europea* L. var *Sylvestris* (Miller),(Lehr) mature zygotic embryos. *Plant Cell, Tissue and OrganCulture*,27,183-187.
- Ποντικής Κ., 1992. Ελαιοκομία, *Εκδόσεις Α. Σταμούλη ,Πειραιάς* σελ.143-161.
- Rama P. , & Pontikis C.A. , 1990. In vitro propagation of olive (*Olea europaea sativa* L) Kalamon. *J Hort. Sci.* 6:347-353
- Roussos P.A.& Pontikis C.A., 2002. In vitro propagation of olive (*Olea europaea* L) Koroneiki. *Plant Growth Regulation* 37:295-304
- Rugini E. 1981. propagazione in vitro di una cultivar di olivo (*Olea europea* L.): valutazione di varie citochinine ed auxine. *Centro di studio per la Olivocoltura C. N. R. Perugia.*
- Ruggini E.& Fontanazza G.,1981.in vitro propagation of 'Dolce Agogia'. *Hort. Sci.*16(4):492-493.
- Ruggini E. 1984 . In vitro propagation of some olive (*Olea europea*), cultivars with different root -ability and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. *Sci. Hort., Vol 24,p.123-134*
- Rugini E. and Caricato G., 1995. Somatic embryogenesis and plant recovery from mature tissues of olive (*Olea europea* L.) «Canino» anf «Moraiolo». *Plant Cell Rep.*14:257-260.
- Ruggini E., Pezza A., Muganu M., & Caricato, 1995. Somatic Embryogenesis in Olive (*Olea europea* L.). *Biotechnology in agriculture and Forestry*, Vol.30, Somatic embryogenesis and synthetic seeds I ed. By Y .P .S. Bajaj.

Wang K. J., Zhang P. F., Ni D. X., Zhu X. Z., Yang W. Q., & Bao Z. H. 1981. Callus formation and organ regeneration in tissue culture of woody plants. *Acta Botanica Sinica* 23, 97-108.

Yeoman M. M., 1981. Tissue (callus) cultures techniques. In John P. CL (ed). *The cell cycle*. Cambridge University Press. Cambridge, pp 161-184.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

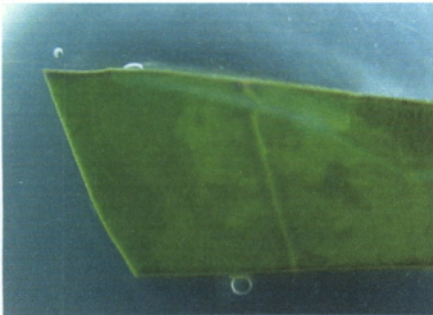
ΦΩΤΟΓΡΑΦΙΕΣ ΕΚΦΥΤΩΝ



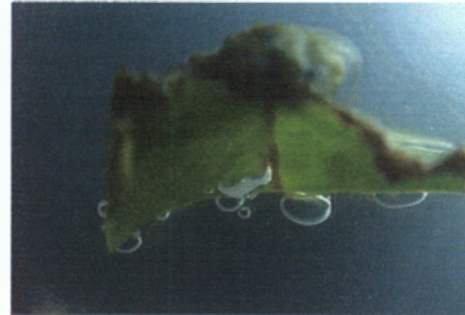
Εικόνα 1: Ακραίο τμήμα φύλλου



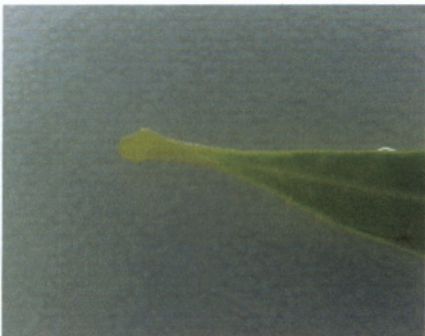
Εικόνα 2: Δημιουργία κάλου σε ακραίο τμήμα



Εικόνα 3: Μεσαίο τμήμα φύλλο



Εικόνα 4: Δημιουργία κάλου σε Μεσαίο τμήμα



Εικόνα 5: Ακραίο τμήμα με μίσχο



Εικόνα 6: Δημιουργία κάλου σε μίσχο



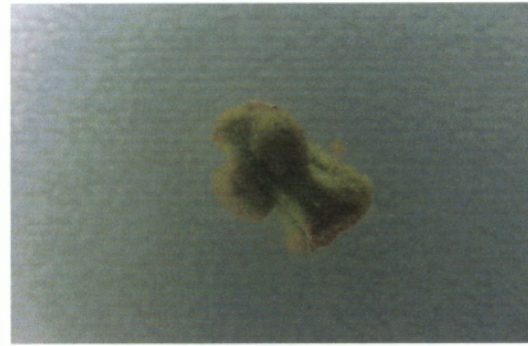
Εικόνα 7: Κορυφή βλαστού



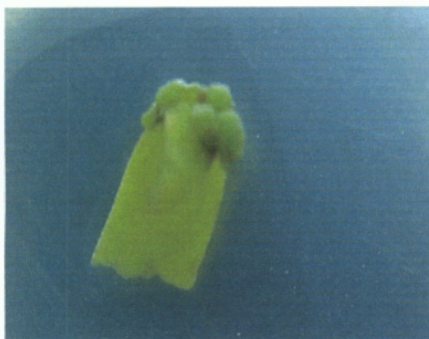
Εικόνα 8: Δημιουργία κάλου σε κορυφή



Εικόνα 9: Κόμβος και οφθαλμός



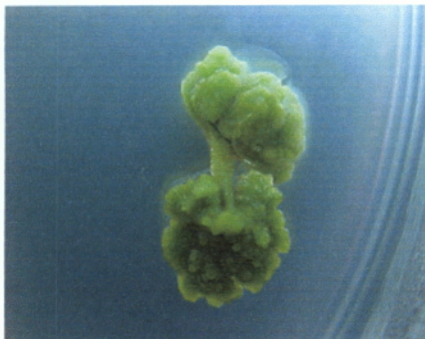
Εικόνα 10: Αρχή δημιουργίας κάλου σε οφθαλμό.



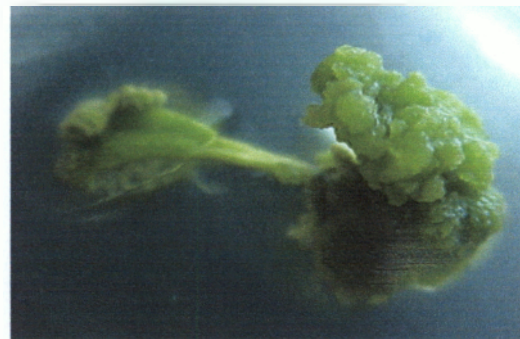
Εικόνα 11: Κάλος σε νεαρό φύλλο



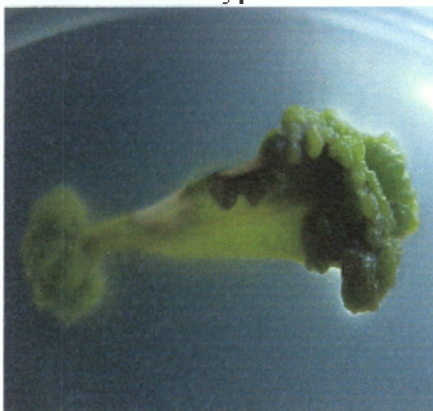
Εικόνα 12: Κάλος σε νεαρό φύλλο



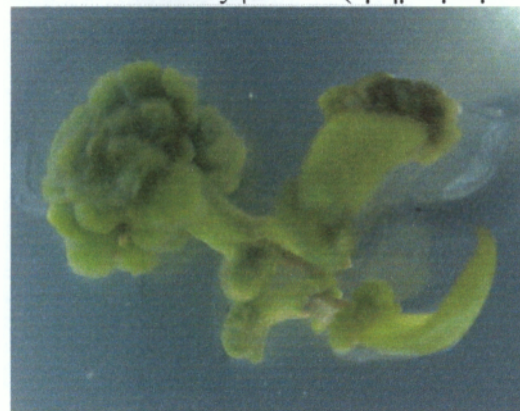
Εικόνα 16: κάλος βλαστού



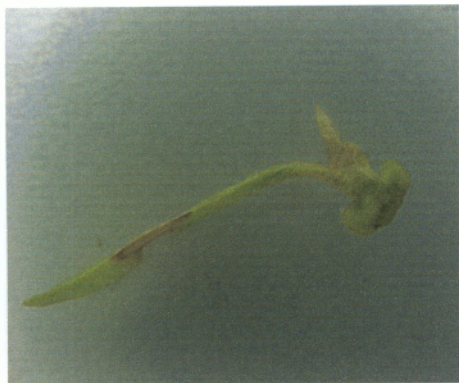
Εικόνα 17: κάλος φύλλου (τμήμα με μίσχο)



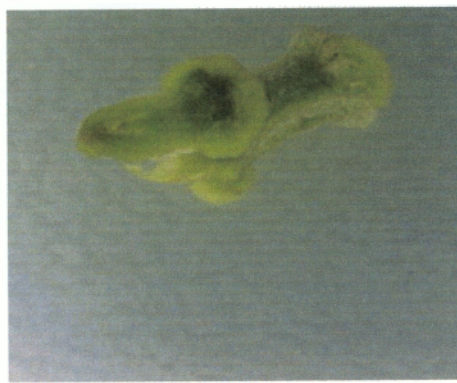
Εικόνα 18: κάλος φύλλου



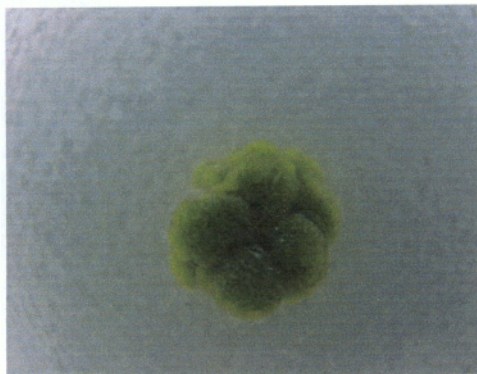
Εικόνα 19: κάλος κορυφής βλαστού



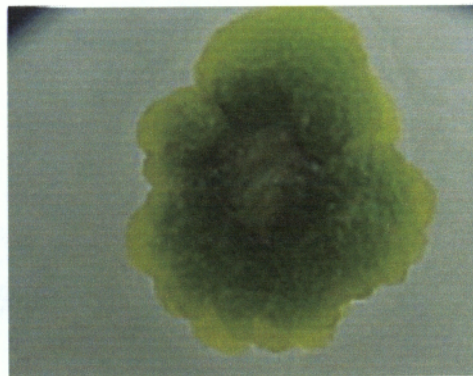
Εικόνα 20: κάλος μίσχου



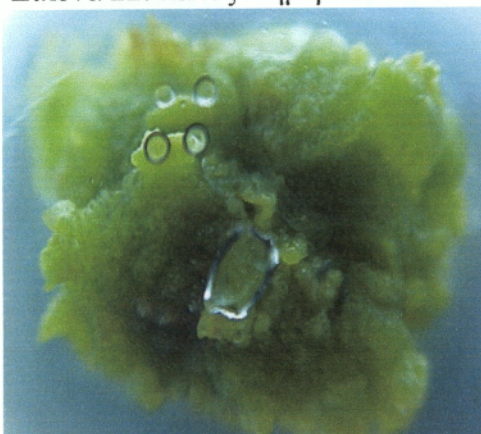
Εικόνα 21 : Κάλος βλαστού



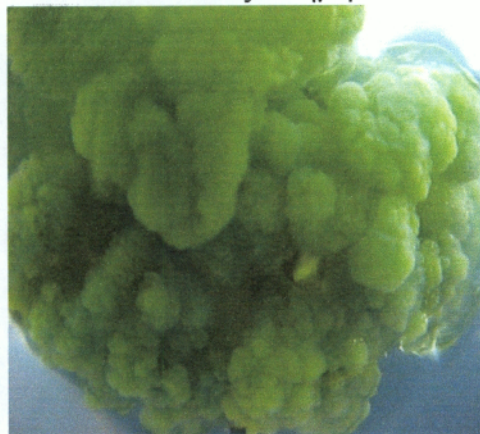
Εικόνα 22: κάλος 5 ημερών



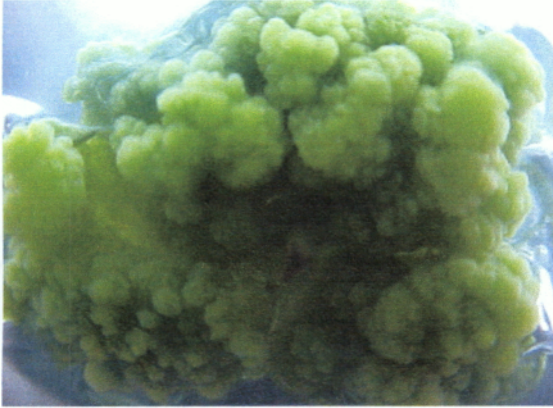
Εικόνα 23: κάλος 20 ημερών



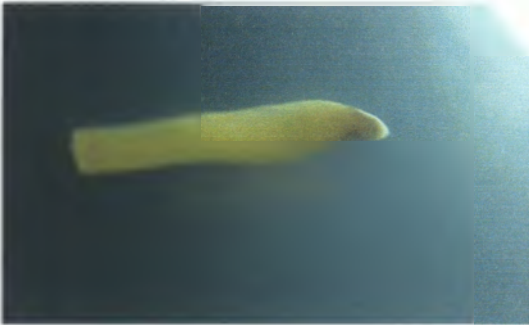
Εικόνα 24: κάλος 30 ημερών



Εικόνα 25: κάλος 35 ημερών



Εικόνα 32 : κάλος 45 ημερών



Εικόνα 34: ρίζα