

ΒΙ ΒΛΙΔΟΥΣ Μ.

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ

ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΑΠΛΟΕΙΔΗ ΦΥΤΑ

ΕΠΙΤΕΥΓΜΑΤΑ & ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

Πτυχιακή εργασία

του σπουδαστή **Τσελεπή Παναγιώτη**

Καλαμάτα, Μάρτιος 2000

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ

ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΑΠΛΟΕΙΔΗ ΦΥΤΑ

ΕΠΙΤΕΥΓΜΑΤΑ & ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

Πτυχιακή εργασία

του σπουδαστή **Τσελεπή Παναγιώτη**

Καλαμάτα, Μάρτιος 2000

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ

ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΑΠΛΟΕΙΔΗ ΦΥΤΑ

ΕΠΙΤΕΥΓΜΑΤΑ & ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ

ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΤΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

Πτυχιακή εργασία

του σπουδαστή **Τσελεπής Παναγιώτης**

Επιβλέποντες Καθηγητές: **Βασιλειάδης Στέλιος**

Μαρκόπουλος Κυριάκος

Καλαμάτα, Μάρτιος 2000

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.	ΑΠΛΟΕΙΔΗ ΦΥΤΑ	1
1.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.2	ΑΠΛΟΕΙΔΗ ΣΤΗ ΦΥΣΗ	1
1.3	ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΠΛΟΕΙΔΩΝ ΜΕ ΣΥΜΒΑΤΙΚΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ	2
1.4	ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΑΠΛΟΕΙΔΩΝ	2
2.	<i>IN VITRO</i> ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΓΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΠΛΟΕΙΔΩΝ ΦΥΤΩΝ	3
2.1	ΑΝΔΡΟΓΕΝΕΣΗ	3
2.1.1	Καλλιέργεια ανθέρων	3
2.1.1.1	Χειρισμός ανθέρων	4
2.1.1.2	Συνθήκες καλλιέργειας μητρικών φυτών	4
2.1.1.3	Ηλικία μητρικών φυτών	5
2.1.1.4	Στάδιο ανάπτυξης της γύρης	5
2.1.1.5	Μέθοδοι απολύμανσης	6
2.1.1.6	Προμεταχείριση οφθαλμών	6
2.1.1.7	Μέθοδοι απομόνωσης ιστών	11
2.1.1.8	Θρεπτικό μέσο	11
2.1.1.8.1	Στερεό ή υγρό	11
2.1.1.8.2	Οσμωτικές συνθήκες	12
2.1.1.8.3	Μεταλλικά άλατα	12
2.1.1.8.4	Βιταμίνες	12
2.1.1.8.5	Ρυθμιστές ανάπτυξης	13
2.1.1.8.6	Οργανικά και άλλα αζωτούχα πρόσθετα συμπληρώματα	14
2.1.1.8.7	Άλλα συστατικά	14
2.1.1.9	Συνθήκες επαγωγής	15
2.1.1.9.1	Θερμοκρασία	15
2.1.1.9.2	Φως	15
2.1.1.9.3	Δοχεία καλλιέργειας	15
2.1.1.9.4	Προσανατολισμός εκφύτου (ανθήρα)	15
2.1.1.9.5	Πυκνότητα ανθέρων	16
2.1.2	Καλλιέργεια γύρης	20
2.1.2.1	Συνθήκες καλλιέργειας μητρικών φυτών	20
2.1.2.2	Ηλικία μητρικών φυτών	20
2.1.2.3	Στάδιο ανάπτυξης γύρης	20
2.1.2.4	Απολύμανση	20
2.1.2.5	Προμεταχείριση	21
2.1.2.6	Μέθοδοι απελευθέρωσης μικροσπορίων	21
2.1.2.6.1	Αυθόρμητη απελευθέρωση	21
2.1.2.6.2	Τεχνική σχισίματος	22

2.1.2.7	Θρεπτικό μέσο	22
2.1.2.7.1	Στερεό ή υγρό	22
2.1.2.7.2	Οσμωτικές συνθήκες	23
2.1.2.7.3	Μεταλλικά άλατα	24
2.1.2.7.4	Βιταμίνες	24
2.1.2.7.5	Ρυθμιστές ανάπτυξης	24
2.1.2.7.6	Άλλα συστατικά	24
2.1.2.8	Συνθήκες επαγωγής	24
2.1.2.8.1	Θερμοκρασία	24
2.1.2.8.2	Φως	25
2.2	ΓΥΝΟΓΕΝΕΣΗ	26
2.2.1	Καλλιέργεια ωοθηκών	26
2.2.1.1	Στάδιο ανάπτυξης ωοθήκης	27
2.2.1.2	Απολύμανση	27
2.2.1.3	Μεταχείριση και τοποθέτηση ωοθήκης στο θρεπτικό μέσο	27
2.2.1.4	Θρεπτικό μέσο	27
2.2.1.4.1	Στερεό ή υγρό	27
2.2.1.4.2	Πηγή υδατανθράκων	28
2.2.1.4.3	Βιταμίνες	28
2.2.1.4.4	Ουσίες - Ρυθμιστές ανάπτυξης	28
2.2.1.4.5	Οργανικά άζωτούχα συμπληρώματα	29
2.2.1.5	Συνθήκες επαγωγής	29
2.2.1.6	Επίδραση επικονίασης	29
2.2.1.7	Επίδραση ανθικών ιστών	29
2.2.1.8	Τρόπος και καθορισμός ανάπτυξης	30
2.2.1.9	Σχηματισμός πόρων	30
2.2.1.10	Μέγεθος καρπού	30
2.2.2	Καλλιέργεια ωαρίων	32
2.2.2.1	Στάδιο ανάπτυξης ωαρίων	32
2.2.2.2	Απολύμανση	32
2.2.2.3	Μεταχείριση και τοποθέτηση ωαρίων στο θρεπτικό μέσο	33
2.2.2.4	Θρεπτικό μέσο	33
2.2.2.4.1	Στερεό ή υγρό	33
2.2.2.4.2	Οσμωτικές συνθήκες	33
2.2.2.4.3	Θρεπτικά συμπληρώματα	34
2.2.2.4.4	Ουσίες - Ρυθμιστές ανάπτυξης	34
2.2.2.5	Συνθήκες επαγωγής	34
2.2.2.6	Επίδραση ανθικών ιστών	34
2.2.2.7	Καθορισμός ανάπτυξης	34
2.3	ΧΡΩΜΟΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΞΑΛΕΙΨΗ	35
2.4	ΠΡΟΪΟΝΤΑ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	38
2.4.1	Πλοειδία	38
2.4.2	Γενετικές παρεκκλίσεις	39
2.4.3	Διπλοειδισμός για την παραγωγή ομοζύγωτων φυτών	39
2.4.4	Φυτά albino	40

3.	ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ <i>IN VITRO</i> ΑΝΔΡΟΓΕΝΕΣΗ ΣΕ ΜΕΡΙΚΑ ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΩΣ ΣΗΜΑΝΤΙΚΑ ΦΥΤΑ	42
3.1	ΣΙΤΑΡΙ	42
3.1.1	Γενότυπος και φυσιολογική κατάσταση του μητρικού φυτού	42
3.1.2	Στάδιο ανάπτυξης γύρης	42
3.1.3	Προμεταχείριση	43
3.1.4	Θρεπτικό μέσο	43
3.1.5	Συνθήκες επαγωγής	44
3.1.6	Διπλασιασμός των απλοειδών φυτών	44
3.2	ΡΥΖΙ	46
3.2.1	Γενότυπος μητρικού φυτού	46
3.2.2	Φυσιολογική κατάσταση του μητρικού φυτού	46
3.2.3	Στάδιο συλλογής των ανθέρων	47
3.2.4	Στάδιο ανάπτυξης της γύρης	47
3.2.5	Προμεταχειρίσεις των ανθέρων	48
3.2.6	Θρεπτικό μέσο	49
3.2.6.1	Βασικά διαλύματα	49
3.2.6.2	Στερεή ή υγρή καλλιέργεια	49
3.2.6.3	Ζαχαρόζη	49
3.2.6.4	Ρυθμιστές ανάπτυξης	50
3.2.6.5	Οργανικά συμπληρώματα	51
3.3	ΚΑΠΙΝΟΣ	53
3.3.1	Προμεταχείριση οφθαλμών	53
3.3.2	Απολύμανση οφθαλμών	53
3.3.3	Στάδιο ανθέρων	53
3.3.4	Καλλιέργεια με άγαρ	54
3.3.5	Εφαρμογές της καλλιέργειας ανθέρων	54
3.4	ΚΑΛΑΜΠΟΚΙ	55
3.4.1	Εισαγωγή	55
3.4.2	Καλλιέργεια ανθέρων και επαγωγή των εμβρύων γύρης	55
3.4.3	Στάδιο ανάπτυξης της γύρης	56
3.4.4	Ενεργός άνθρακας	59
3.4.5	Επίδραση της συγκέντρωσης ζαχαρόζης	59
3.4.6	Η επίδραση διάφορων ρυθμιστών ανάπτυξης	59
3.4.7	Επίδραση του βασικού θρεπτικού μέσου	60
3.4.8	Παρατηρήσεις στους απόγονους των γυρεοφύτων	60
3.5	ΠΑΤΑΤΑ	62
3.5.1	Εισαγωγή	62
3.5.2	Προκαλλιέργεια των ανθέρων μητρικών φυτών	62
3.5.3	Στάδιο ανάπτυξης των μικροσπορίων	63
3.5.4	<i>In vitro</i> καλλιεργητική διαδικασία	63

3.5.5	Καλλιεργητικά μέσα	64
3.5.6	Επίπεδο πλοειδίας	65
3.5.7	Μεταχείριση των απλοειδών	65
3.5.8	Διπλασιασμός των χρωμοσωμάτων	65

4.	ΠΡΟΟΠΤΙΚΕΣ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΣΗΣ ΤΩΝ ΑΠΛΟΕΙΔΩΝ ΦΥΤΩΝ ΣΤΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ	67
----	---	----

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	69
---------------------	----

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	93
------------------	----

1.	Πίνακας με τα είδη στα οποία έχει επιτευχθεί in vitro ανδρογένεση	94
2.	Πίνακας με τα είδη στα οποία έχει επιτευχθεί in vitro γυνογένεση	97
3.	Ορισμοί όρων που χρησιμοποιούνται	98

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θεωρώ χρέος μου να ευχαριστήσω για την πολύτιμη συμβολή τους στην εκπόνηση της παρούσας πτυχιακής τους καθηγητές:

Βασιλειάδη Στέλιο & Μαρκόπουλο Κυριάκο.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΑΠΛΟΕΙΔΗ ΦΥΤΑ

1.1 Εισαγωγή

Ο λόγος που μας ώθησε να ασχοληθούμε με τα απλοειδή φυτά, ήταν καταρχήν η γνώση των πλεονεκτημάτων που μας παρέχει η χρησιμοποίησή τους. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα την επιθυμία για διερεύνηση των μεθόδων παραγωγής απλοειδών φυτών.

Στο πρώτο κεφάλαιο αναφέρεται η εμφάνιση απλοειδών στη φύση και η παραγωγή τους με συμβατικές μεθόδους. Στο δεύτερο κεφάλαιο αναφέρονται οι *in vitro* τεχνικές για παραγωγή απλοειδών. Σ' αυτό το μέρος έχει δοθεί ιδιαίτερη έμφαση γιατί είναι ο μοναδικός αξιόπιστος τρόπος παραγωγής απλοειδών. Εφόσον επιλυθούν κάποια προβλήματα που εμφανίζονται θα είμαστε σε θέση για μαζική παραγωγή απλοειδών σε ένα ιδιαίτερα μεγάλο εύρος ειδών.

Στο τρίτο κεφάλαιο αναφέρονται παράγοντες που επηρεάζουν την *in vitro* ανδρογένεση σε μερικά σημαντικά είδη. Γίνεται ιδιαίτερη αναφορά για την *in vitro* ανδρογένεση διότι είναι η πιο αποτελεσματική, εφαρμόσιμη και με τις μεγαλύτερες προοπτικές τεχνική. Στο τέταρτο κεφάλαιο γίνεται αναφορά των προοπτικών χρησιμοποίησης των απλοειδών φυτών στην βελτίωση των φυτών.

1.2 Απλοειδή στη φύση

Η σημασία των απλοειδών φυτών για τους γενετιστές και τους βελτιωτές είναι πολύ μεγάλη. Η μεγάλη αξία των απλοειδών στηρίζεται στο γεγονός ότι μέσω αυτών παράγονται ομοζύγωτα φυτά με διπλασιασμό των χρωμοσωμάτων. Ένας τόσο γρήγορος δρόμος με τον οποίο πετυχαίνουμε ομοζυγωτία προσφέρει μεγάλες δυνατότητες στους βελτιωτές.

Παρόλα αυτά η εκμετάλλευσή τους παρέμεινε περιορισμένη λόγω της εξαιρετικά χαμηλής συχνότητας με την οποία εμφανίζονται – προκύπτουν στη φύση (0.001-0,01%). Φυσική παραγωγή απλοειδών συμβαίνει κατά την διαδικασία της παρθενογένεσης (ανάπτυξη εμβρύου από ένα μη γονομοποιημένο ωάριο). Σπάνια εκφράζονται οι χαρακτήρες μόνο του αρσενικού γονέα, μέσω της ανδρογένεσης που μπορεί να συμβεί στην ωοθήκη. Στη φύση ανδρογενή απλοειδή έχουν αναφερθεί στα *Nicotiana*, *Crepis tectacum*, *Antirrhinum majus*, *Oenothera Scabra*.

1.3 Παραγωγή απλοειδών με συμβατικές μεθόδους

Οι ερευνητές έχοντας κατανοήσει την σημασία της δυνατότητας παραγωγής απλοειδών φυτών έκαναν αρκετές προσπάθειες για την επίτευξη αυτού του σκοπού.

Μέχρι το 1966 απόπειρες γίνονταν για τεχνητή παραγωγή απλοειδών με τους παρακάτω τρόπους :

- α) Με μακρινές διασταυρώσεις
- β) Με καθυστερημένη επικονίαση
- γ) Με την εφαρμογή γύρης που έχει υποστεί ακτινοβολία
- δ) Με θερμοκρασιακά «σοκ».

Καμία από αυτές τις μεθόδους δεν αποδείχτηκε αξιόπιστη.

1.4 Πλεονεκτήματα απλοειδών

Τα πλεονεκτήματα της χρήσης απλοειδών στην βελτίωση φυτών και στη γενετική που έχουν καταγραφεί είναι τα παρακάτω :

- 1) Παρέχουν τον γρηγορότερο δυνατό τρόπο προς την πλήρη ομοζυγωτία.
- 2) Μπορούν να χρησιμοποιηθούν για να αποκαλυφθούν οι υποτελείς αλληλόμορφοι.
- 3) Προκύπτουν πληροφορίες για την σύνδεση των γονιδίων.
- 4) Είναι τα ιδανικά υλικά για να μελετήσουμε την συχνότητα και το εύρος των μεταλλάξεων.
- 5) Σε καλλιέργειες κυττάρων και πρωτοπλαστών προσφέρουν ένα ιδανικό σύστημα για μελέτη βασικών προβλημάτων της βιολογίας του κυττάρου.
- 6) Τα απλοειδή κύτταρα όπως και οι πρωτοπλάστες παρέχουν ένα μοναδικό υλικό για μεταφορά γονιδίων, μελέτη αντίδρασης παθογόνου-ξενιστή και ασυμβατότητα μεταξύ χρωμοσωμάτων-κυτοπλάσματος.
- 7) Τα διπλασιασμένα απλοειδή δίνουν γενετικά σταθερούς απογόνους σε διασταυρώσεις μεταξύ των φυτών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

IN VITRO ΤΕΧΝΙΚΕΣ ΓΙΑ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΑΠΛΟΕΙΔΩΝ ΦΥΤΩΝ

2.1 Ανδρογένεση

Κατά την διάρκεια της δεκαετίας του '70 και αρχές του '80 η καλλιέργεια ανθέρων/γύρης παρουσιάστηκε ως μία από τις νέες και περισσότερο υποσχόμενες τεχνικές για μαζική παραγωγή 100% καθαρών σειρών από διπλασιασμό των χρωμοσωμάτων των απλοειδών φυτών.

In vitro ανδρογένεση έχει επιτυχημένα εφαρμοστεί σε περίπου 200 είδη τα οποία ανήκουν σε περισσότερα από 50 γένη και σε 25 οικογένειες μονοκότυλων και δικότυλων (Sangwan-Norqeel et al 1986, Dunwell 1986).

Κατά την διάρκεια της δεκαετίας του '90 οι τεχνικές καλλιέργειας ανθέρων/γύρης έχουν βελτιωθεί σημαντικά και τροποποιηθεί για πολλά είδη. Ο μηχανισμός της *in vitro* ανδρογένεσης έχει γίνει κατανοητός καλύτερα από πρώτα.

Λόγω αυτών των δεδομένων ευελπιστούμε ότι στο άμεσο μέλλον θα εφαρμόσουμε την μέθοδο και στα είδη που προς το παρόν συναντάμε δυσκολίες.

2.1.1. Καλλιέργεια ανθέρων

Η ανακάλυψη των Guha και Maheshwari (1964) ότι ανθères του *Datura* εάν υποβληθούν σε καλλιέργεια διεγείρουν τη γύρη να παράγει έμβρυα. Σε συνδυασμό με την ανακάλυψη των Bourgin και Nitsch (1967) που επέτυχαν με καλλιέργεια ανθέρων του *Nicotiana* να παράγουν απλοειδή φυτά, έδωσαν μία νέα κατεύθυνση στην έρευνα.

Η καλλιέργεια ανθέρων είναι μία πολύ εξειδικευμένη διαδικασία όπου οι παράγοντες που λαμβάνουν μέρος επηρεάζουν την απόδοση. Εάν μεταβάλουμε τη διαδικασία καλλιέργειας *in vitro* επηρεάζεται ο τρόπος με τον οποίο δρουν οι παράγοντες και έχουμε μεταβολή των αποτελεσμάτων.

Αυτός ο νέος τομέας έρευνας προσέελκυσε το ενδιαφέρον των περισσότερων ερευνητών και ιδιαίτερα των γενετιστών και βελτιωτών. Για τους οποίους θα ήταν ένα εξαιρετο εργαλείο η δυνατότητα παραγωγής απλοειδών φυτών για την μελέτη του γενότυπου και την βελτίωση των φυτών.

2.1.1.1 Χειρισμός ανθέρων

Οι ανθères απομακρύνονται από το φυτό και τοποθετούνται σε θρεπτικό υπόστρωμα. Σε κάποιους από τους ανθères ή στο σύνολό τους κάποιος αριθμός μικροσπορίων θα επιβιώσει και θα αναπτυχθεί.

Για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων ενός πειράματος συνηθίζεται η χρήση της σχέσης : αριθμός ανθέρων (τα μικροσπόρια των οποίων παράγουν) προς αριθμό κάλλων/εμβρύων/φυτών που δημιουργούνται.

Στην περίπτωση ανθέρων που δεν παρήγαγαν σχηματισμούς θα πρέπει να τους εξετάσουμε μικροσκοπικά για να καθορίσουμε αν έχουν συμβεί διαιρέσεις των κυττάρων στα μικροσπόρια. Εάν έχουν συμβεί υπολογίζουμε την αναλογία των σπορίων που ανταποκρίθηκαν.

2.1.1.2 Συνθήκες καλλιέργειας μητρικών φυτών

Οι συνθήκες ανάπτυξης των μητρικών φυτών τα οποία μας παρέχουν ανθères για καλλιέργεια είναι από τους σημαντικότερους παράγοντες για την παραγωγή μικροσπορίων.

Για να μπορούμε να επιτύχουμε επανάληψη αποτελεσμάτων θα πρέπει να έχουμε ελεγχόμενο περιβάλλον. Αυτό μπορούμε να το πετύχουμε με ρύθμιση της θερμοκρασίας, της φωτοπερίόδου και της έντασης του φωτός. Σε μη ελεγχόμενο περιβάλλον είναι πολύ πιθανό να έχουμε μεγάλες διακυμάνσεις σε σχέση με την αναμενόμενη ανταπόκριση.

Οι απαιτούμενες ιδανικές συνθήκες διαφέρουν για κάθε είδος για αυτό και δεν υπάρχουν κάποιες γενικές συστάσεις που να ισχύουν καθολικά.

Οι πιο ολοκληρωμένες μελέτες έχουν διεξαχθεί στον καπνό (*Nicotiana tabacum*) στον οποίο βρέθηκε ότι είναι ωφέλιμες μικρή φωτοπερίοδος (8 ώρες) και υψηλή ένταση φωτός (16.000 Lux).

Για το κριθάρι (*Hordeum vulgare*) συνιστώνται (Foroughi-Wehr και Mix, 1979. Lyne Bennett και Hunter 1985) χαμηλές θερμοκρασίες (12° C) και υψηλές εντάσεις φωτός (20.000 lux). Στο γένος *Brassica* το οποίο έχει επίσης μελετηθεί αρκετά (Keller, Armstrong, Roche 1983; Keller 1984) συνιστώνται υψηλές εντάσεις φωτός ενώ οι ιδανικές θερμοκρασίες εξαρτώνται από το είδος του φυτού.

2.1.1.3 Ηλικία μητρικών φυτών

Η λήψη των ανθοφόρων οφθαλμών από τα φυτά θα πρέπει να γίνεται στην αρχή της περιόδου της άνθησης. Επίσης οι οφθαλμοί θα πρέπει να παίρνονται από νέα φυτά, επειδή όσο αυξάνεται η ηλικία του μητρικού φυτού η αντίδραση στην ανδρογένεση ελαττώνεται ενώ έχουμε και εμφάνιση ανωμαλιών.

Στην περίπτωση που είναι αναγκαίο να συνεχιστούν τα πειράματα για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα, διατηρούμε τους αχρησιμοποίητους ανθικούς οφθαλμούς σε χαμηλές θερμοκρασίες για να αποτρέψουμε την ωρίμανσή τους.

2.1.1.4 Στάδιο ανάπτυξης της γύρης

Το ιδανικό στάδιο ανάπτυξης της γύρης από τη στιγμή της λήψης των οφθαλμών είναι καθοριστικής σημασίας και διαφέρει μεταξύ των ειδών.

Για τα περισσότερα φυτικά είδη το κατάλληλο στάδιο γύρης για την επαγωγή ανδρογένεσης είναι ακριβώς πριν, κατά την διάρκεια και ακριβώς μετά την πρώτη μίτωση των μικροσπορίων.

Στον καπνό (Sunderland 1978, Sunderland 1984) γύρη από την πρώτη μίτωση των γυρεοκόκκων δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα. Ενώ στα σιτηρά (Dunwell 1985, Wenzel και Foroughi-Wehr 1984) και στα είδη *Brassica* το ιδανικό στάδιο είναι το στάδιο πριν την πρώτη διαίρεση των μικροσπορίων.

Για τα φυτά που αναπτύσσονται κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες είναι πιθανό να υπάρχει ένας ισχυρός συσχετισμός μεταξύ του σταδίου ανάπτυξης της γύρης και ορισμένων ορατών μορφολογικών χαρακτηριστικών των ανθοφόρων οφθαλμών, όπως το μήκος της βάσης της στεφάνης, η εμφάνιση της στεφάνης από τον κάλυκα και άλλα παρόμοια. Αυτά τα εξωτερικά γνωρίσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την διαλογή των οφθαλμών που προσεγγίζουν το απαιτούμενο στάδιο.

Παρόλα αυτά ο συσχετισμός δεν είναι ποτέ απόλυτος και για αυτό είναι πάντα αναγκαίο να ανοίξουμε έναν από τους ανθήρες από κάθε οφθαλμό για να εκτιμήσουμε το ακριβές στάδιο ανάπτυξης της γύρης.

- Μέθοδοι Χρωματισμού

Είναι μεγάλης σημασίας να μπορούμε να καθορίσουμε το ιδανικότερο στάδιο ανάπτυξης της γύρης εάν επιδιώκουμε την επίτευξη καλύτερων αποδόσεων. Υπάρχουν κάποιες μέθοδοι χρωματισμού για την ανάλυση ανάπτυξης της γύρης.

Η μέθοδος που χρησιμοποιείται περισσότερο είναι της ακετοκαρμίνης (4%β/κ.ο Καρμίνη σε 50% όγκος/όγκο οξικό οξύ) το διάλυμα αφήνεται για 8 ώρες διηθείται και αποθηκεύεται σε σκουρόχρωμη φιάλη.

Για εκτίμηση της ζωτικότητας της γύρης συνιστάται (Heslop-Harrison J. Harrison Y – Shivanna 1984) η μέθοδος fluorescein diacetate (πρωτόκολλο 2.1). Η γονιμότητα της γύρης μπορεί επίσης να υπολογιστεί μετά τον χρωματισμό από τις μεθόδους στα πρωτόκολλα 2.2, 2.3., 2.4.

2.1.1.5 Μέθοδοι απολύμανσης

Αυτό που πρέπει να γίνει πρώτα στην καλλιέργεια απομονωμένων ανθών είναι να αφαιρέσουμε τους περιβάλλοντες ανθικούς ιστούς και όπου χρειάζεται να αφαιρέσουμε τα φύλλα μετά την αποστείρωση.

Στα περισσότερα είδη έχουμε αποτελεσματική απολύμανση αρκεί να γίνει μεταχείριση των εκφύτων με διάλυμα υποχλωριώδες ασβεστίου (1% χλωρίνη) για δέκα λεπτά, το οποίο περιέχει παράγοντες ενυδάτωσης. Εναλλακτικά μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε το εμπορικό σκεύασμα “Domestos” σε 5% συγκέντρωση.

2.1.1.6 Προμεταχείριση οφθαλμών

Η καλύτερη παραγωγή μικροσπορίων σε πολλά είδη επιτυγχάνεται όταν οι ανθίρες από τους οποίους προέρχονται υποβληθούν σε μια συγκεκριμένη θερμοκρασία προμεταχείρισης πριν την καλλιέργεια.

Η προμετάχειριση μπορεί να εφαρμοστεί σε στάχεις, σταχύδια ή σε απομονωμένους ανθίρες αρκεί να μην έρθει σε επαφή το φυτικό υλικό με νερό κατά την περίοδο της προμεταχείρισης.

Η προτεινόμενη μέθοδος είναι να εγκλείσουμε έναν ολόκληρο στάχυ στο μισό ενός διαιρεμένου τριβλίου και στο άλλο μισό να βάλουμε 5 ml νερό για να διατηρήσουμε την υγρασία σε υψηλά επίπεδα. Κλείνουμε το τριβλίο με Parafilm και το αποθηκεύουμε στο ψυγείο στο σκοτάδι.

Υπάρχουν αποδείξεις ότι σε μερικά είδη καλά αποτελέσματα μπορούν να επιτευχθούν εάν εφαρμόσουμε κρύα μεταχείριση σε ανθίρες μετά την τοποθέτησή τους στο θρεπτικό διάλυμα. Η μέθοδος αυτή ενδείκνυται όπου είναι εφαρμόσιμη γιατί έχουμε οικονομία χρόνου και είναι πιο εύκολη η εφαρμογή της.

**Πρωτόκολλο 2.1 : Εκτίμηση της ζωτικότητας της γύρης με χρησιμοποίηση
Fluorescein diacetate.**

1. Ετοιμάζουμε ένα stock διάλυμα με διάλυση 2 mg fluorescein diacetate ανά ml ακετόνης.

Αποθηκεύουμε το διάλυμα στο ψυγείο σε σκοτάδι.

2. Ετοιμάζουμε ένα υδατικό διάλυμα με προσθήκη του διαλύματος stock σταγόνα - σταγόνα σε ένα διάλυμα ζάχαρης κατάλληλης τονικότητας μέχρι το διάλυμα να γίνει θολό. Αυτό το υδατικό διάλυμα πρέπει να ετοιμάζεται κάθε φορά.
3. Τοποθετούμε την γύρη στην επιφάνεια του διαλύματος και την αφήνουμε για ένα συγκεκριμένο χρονικό διάστημα για να γίνει η ανάπτυξη φθορισμού και κατόπιν παρατηρούμε την γύρη στο φθοροσκόπιο.

Πρωτόκολλο 2.2 : Τρόπος παρασκευής ζελέ ακετοκαρμίνης γλυκερίνης για μέτρηση γονιμότητας της γύρης.

1. Ετοιμάζουμε το stock ζελέ με προσθήκη 0,25 gr. σκόνης καρμίνης σε 50 ml σε ένα είδος ζελέ λιωμένης γλυσερόλης. Αναμειγνύουμε καλά για να πετύχουμε ομαλή κατανομή της σκόνης σε ολόκληρο το ζελέ όταν κρυώσει.
2. Προσθέτουμε 4 ml οξικό οξύ συγκέντρωσης 45% σε 20 ml. λιωμένου ζελέ stock.
3. Βράζουμε το διάλυμα σιγά μέχρι να γίνει διαγές και όλη η καρμίνη να έχει διαλυθεί (ελέγχουμε στο μικροσκόπιο).
4. Προσθέτουμε 40 ml. κορεσμένου οξικού σιδήρου σε 45% οξικού οξέος.
5. Αποκόπτουμε τον ανθήρα και τον βάζουμε σε μία σταγόνα θρεπτικού διαλύματος, αφαιρούμε τα υπολείμματα και ανακινούμε την σταγόνα μέχρι να διασκορπιστούν οι γυρεόκοκκοι.
6. Καλύπτουμε με μια καλυπτρίδα και εξετάζουμε στο μικροσκόπιο.

Πρωτόκολλο 2.3 : Συνταγή για διαφορετικό χρωματισμό της βιώσιμης γύρης και της γύρης που αποβάλλεται

1. Αναμειγνύουμε τα παρακάτω συστατικά :

Αιθανόλη (95%)	10 ml
Πράσινο του μαλαχίτη	10 ml (1 ml 1% βάρος κατ' όγκον διαλύματος σε 95% αιθανόλη)
Απιονισμένο νερό	50 ml
Γλυσερόλη	25 ml
Φαινόλη	5 g.
Chloral hydrate	5 g.
Οξική Φουξίνη	50 mg. (5 ml 1% βάρος κατ' όγκον διαλύματος σε νερό)
Orange G	5 mg. (0,5 ml 1% βάρος κατ' όγκον διαλύματος σε νερό)
Κρύο οξικό οξύ	1- 4 ml (το ποσό αυξάνεται με το πάχος του τοιχώματος της γύρης)

2. Αποθηκεύουμε σε σκουρόχρωμο μπουκάλι.

3. Βυθίζουμε την γύρη σε μία σταγόνα χρωστική και καλύπτουμε με καλυπτρίδα.

4. Ζεσταίνουμε πάνω σε μικρή φλόγα.

5. Η γύρη που αποβάλλεται μένει πράσινη, η βιώσιμη γύρη βάφεται κόκκινη έως βαθιά κόκκινη ανάλογα με την ποσότητα στο μίγμα.

Πρωτόκολλο 2.4 : Καθορισμός της ζωτικότητας της γύρης

1. Προσθέτουμε 2 ml. κρύο οξικό οξύ και 0,2 g. ισατίνη (isatin) σε 20 ml. ακετόνης.
2. Αναμιγνύουμε την γύρη με τρεις σταγόνες αντιδραστηρίου πάνω στην αντικειμενοφόρο.
3. Μετά από 5 λεπτά χρωματισμού (ζεσταίνουμε) βράζουμε στους 90°C για 10 λεπτά.
4. Αφαιρούμε την χρωστική που περισσεύει με ένα βρεγμένο βαμβακερό ύφασμα.
5. Πάνω σε μια αντικειμενοφόρο διασπείρουμε τους ανθήρες προσεκτικά μέσα σε μια σταγόνα γλυκερίνης και τους ανακινούμε με μια γυάλινη ράβδο.
6. Καλύπτουμε με μια καλυπτρίδα και εξετάζουμε κάτω από το μικροσκόπιο. Γόνιμη γύρη αντιδρά με την ισατίνη για να παράγει έντονο μπλε - μαύρο χρώμα.

Δυστυχώς δεν υπάρχει καθορισμένη προμεταχείριση που μπορεί να εφαρμοστεί. Για κάθε είδος η ακριβής θερμοκρασία και διάρκεια ποικίλλει. Αυτό άλλωστε οφείλεται στο γεγονός ότι αυτές οι μεταβλητές αλληλεπιδρούν με το στάδιο ανάπτυξης της γύρης και τον χρόνο συγκομιδής.

2.1.1.7 Μέθοδοι απομόνωσης ιστών

Οι ανθήρες των περισσότερων ειδών είναι αρκετά μεγάλου μεγέθους και μπορούν να απομακρυνθούν από τα λουλούδια με σχετική ευκολία. Εντούτοις σε μερικά είδη όπως τα τροπικά σιτηρά των γενών *Panicum*, *Pennisetum* και *Setaria* η απομόνωση των συμπαγών ανθιδίων είναι πολύ δύσκολη και χρονοβόρα εργασία, γι' αυτό συνιστάται η καλλιέργεια ολόκληρων των ανθιδίων και όχι των ανθέρων.

Τα καλύτερα αποτελέσματα προκύπτουν αν τα τοποθετήσουμε σε υγρό θρεπτικό μέσο που υπόκειται σε ελαφρά ανακίνηση.

2.1.1.8 Θρεπτικό μέσο

Ενώ συχνά θεωρείται πρωταρχικής σημασίας το θρεπτικό μέσο είναι μικρότερης σημασίας από τις μεταβλητές των συνθηκών ανάπτυξης και το στάδιο της γύρης. Στους πίνακες 2.5, 2.6 και 2.7 δίνονται τα συστατικά τριών βασικών διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται στην καλλιέργεια ανθέρων / γύρης.

2.1.1.8.1 Στερεό ή υγρό

Γνωρίζουμε ότι οι περισσότεροι τύποι άγαρ που χρησιμοποιούνται για στερεοποίηση του θρεπτικού διαλύματος περιέχουν συστατικά βλαβερά για την επιβίωση της γύρης. Για ελαχιστοποίηση των δυσμενών επιπτώσεων και μεγιστοποίηση των αποτελεσμάτων το άγαρ θα πρέπει να αποφεύγεται ή να πλένεται πολύ καλά με αποστειρωμένο νερό.

Οι εναλλακτικές λύσεις είναι είτε χρησιμοποίηση της αγαρόζης είτε να χρησιμοποιήσουμε υγρό διάλυμα. Το μειονέκτημα των υγρών διαλυμάτων είναι ότι αν και έχουμε μεγάλο αριθμό κάλλων από μικροσπόρια, το ποσοστό των φυτών που αναπαράγονται είναι πολύ μικρό. Υποθέτουμε ότι αυτό οφείλεται στις αναερόβιες συνθήκες οι οποίες εμποδίζουν την ανάπτυξη του κάλλου ο οποίος είναι βυθισμένος στο υγρό. Για να αυξήσουμε την ζωνρότητα αυτών των κάλλων συστήνεται (Καο

1981) για το κριθάρι η προσθήκη Ficoll (200g/l) αυτό όμως πρέπει να μελετηθεί περαιτέρω.

Ένα σύστημα δύο φάσεων χρησιμοποιήθηκε (Johansson Anderson Eriksson 1982) για συγκεκριμένα είδη : *Nicotiana*, *Anemone*, *Clematis* και *Paraver*.

Σ' αυτή τη μέθοδο σε ένα τριβλίο (50 χιλιοστών διαμέτρου) οι ανθήρες επιπλέουν σε 4 ml υγρού το οποίο βρίσκεται πάνω από ένα στερεοποιημένο από άγαρ υπόστρωμα 5ml το οποίο περιέχει ενεργό άνθρακα 5%.

2.1.1.8.2 Οσμωτικές συνθήκες

Αν και είναι μία από τις περισσότερο σημαντικές μεταβλητές του διαλύματος, λίγες αναλυτικές πληροφορίες είναι διαθέσιμες. Από εμπειρία έχει προκύψει ένας διαχωρισμός των ειδών σε αυτά που απαιτούν χαμηλές συγκεντρώσεις ζαχαρόζης (2-4%) και στα είδη όπου οι ανθήρες παράγουν καλύτερα αποτελέσματα σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις (8-12%).

Αυτός ο διαχωρισμός των ειδών φαίνεται να σχετίζεται με τον διαχωρισμό εάν η ώριμη γύρη είναι δικύτταρη (*Solanaceae*, *Liliaceae*) ή τρικύτταρη (*Gramineae*, *Cruciferae*). Η πρώτη ομάδα απαιτεί χαμηλές οσμωτικές συνθήκες ενώ η δεύτερη υψηλές.

2.1.1.8.3 Μεταλλικά άλατα

Υπάρχουν λίγες αναφορές γι' αυτό το συστατικό του θρεπτικού μέσου. Τα περισσότερα θρεπτικά μέσα βασίζονται σε παραλλαγές των συγκεντρώσεων του διαλύματος Murashige και Skoog (M.S.)

Για την καλλιέργεια ανθέρων σιτηρών έχουν επινοηθεί δύο διαλύματα : Το N6 (ChuC-C1978) και το εκχύλισμα πατάτας (Chuang etal 1978).

2.1.1.8.4 Βιταμίνες

Τα μίγματα που χρησιμοποιούμε βασίζονται σε παραλλαγές του διαλύματος M.S. Δεν υπάρχουν αποδείξεις ότι αυτά τα συστατικά είναι πραγματικά αναγκαία για την επαγωγή και ανάπτυξη μικροσπορίων σε κάλλους/ έμβρυα.

2.1.1.8.5 Ρυθμιστές ανάπτυξης

Τα είδη έχουν χωριστεί σε αυτά (*Gramineae*, *Guciferae*) που απαιτούν την προσθήκη ρυθμιστών ανάπτυξης και για τα οποία η καλλιέργεια των ανθέρων είναι σχεδόν ανεξάρτητη των ρυθμιστών ανάπτυξης (*Solanaceae*).

Λόγω του ότι η καλλιέργεια ανθέρων των φυτών *Solanaceae* δεν απαιτεί καμία αυξίνη είναι λογικό να υποθέσουμε ότι οι γυρεόκοκκοι αυτών των ειδών όπως και πολλά είδη των αγγειοσπέρμων περιέχουν ενδογενώς αυξίνες και πιθανότατα είναι αυξινό / αυτοτροφικά (Barendse et al 1970).

Το πιθανότερο είναι ότι τα κύτταρα του τάπητα παρέχουν τις απαιτούμενες ουσίες για την ανάπτυξη εμβρύων γύρης. Εφόσον ο τάπητας είναι πηγή θρεπτικών ουσιών για την ανάπτυξη των γυρεοκόκκων (Heslop-Harrison 1972) ένας αριθμός σημαντικών ουσιών, που προέρχονται από τον τάπητα, συντελούν στην επαγωγή εμβρυογενών διαιρέσεων στη γύρη ανδρογενών ειδών.

Υπάρχουν αποδείξεις για τους ανθήρες της πρώτης κατηγορίας (*Gramineae*, *Cruciferae*), ότι εάν αναπτυχθούν σε διάλυμα χωρίς ορμόνες κάτω από ιδανικές συνθήκες, είναι πιθανή κάποια ανταπόκριση, τουλάχιστον για το πρώτο στάδιο της καλλιέργειας.

Ο Raghavan (1978) και οι Raghavan, Nagmani (1983, 1989) μελέτησαν τον ρόλο των ρυθμιστών ανάπτυξης στην καλλιέργεια ανθέρων του *Hyoscyamus niger*. Παρατήρησαν ότι προσθήκη αυξινών όπως 2,4D (2mg/l) αυξάνει την ικανότητα καλλοποίησης των ανθέρων αλλά δεν επηρεάζει τον αριθμό των εμβρυογενών γυρεοκόκκων. Υψηλότερη συγκέντρωση του 2,4D (50mg/l) μειώνει σημαντικά την δημιουργία κάλλου. Κυτοκινίνες όπως κινετίνη, BAP, Ζεατίνη (0,01 – 10 mg/l) μειώνουν την ικανότητα της γύρης περίπου 40-60% ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις. Με αυξανόμενες συγκεντρώσεις κυτοκινίνης υπήρξε μία προοδευτική καθυστέρηση στον σχηματισμό φυταρίων.

Σε μερικά είδη που απαιτούν ρυθμιστές ανάπτυξης δεν φαίνεται να είναι μεγάλης σημασίας οι συγκεντρώσεις και οι συνδυασμοί των παρεχόμενων ρυθμιστών ανάπτυξης.

Στο κριθάρι ικανοποιητικά αποτελέσματα έχουν επιτευχθεί με συνδυασμό της κινετίνης (0,5 mg/l) με 2,4D (1,5mg/l) από τους Huang και Sunderland (1982). Επίσης ικανοποιητικά αποτελέσματα είχαμε από τους Wenzel και Wehr (1984) στο κριθάρι με συνδυασμό BAP (1 mg/l) με IAA (1mg/l).

Για να υποκινήσουμε τις εμβρυογενείς διαιρέσεις των γυρεοκόκκων θα πρέπει το θρεπτικό μέσο να καλύπτει τις απαιτήσεις τους σε ρυθμιστικές ουσίες.

Σε ελάχιστα είδη έχει μελετηθεί η επίδραση των ρυθμιστών ανάπτυξης, με αποτέλεσμα να μην είμαστε σε θέση να συστήσουμε το είδος και την ποσότητα συγκεκριμένων ρυθμιστικών ουσιών που να καλύπτουν πλήρως τις απαιτήσεις του συγκεκριμένου είδους, στην καλλιέργεια ανθέρων.

2.1.1.8.6 Οργανικά και άλλα αζωτούχα πρόσθετα συμπληρώματα

Από έρευνες που αφορούν τις επιδράσεις προσθήκης διάφορων συμπληρωμάτων στα θρεπτικά διαλύματα που χρησιμοποιούνται για καλλιέργεια ανθέρων (π.χ. η χρησιμοποίηση εκχύλισματος πατάτας ή διάφορων αμινοξέων και ειδικότερα γλουταμίνης), έχουν προκύψει ενδείξεις ευνοϊκής επίδρασης τουλάχιστον για κάποια είδη.

Συγκεκριμένα το εκχύλισμα πατάτας έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως στην καλλιέργεια ανθέρων διάφορων σιτηρών. Πειράματα με τους ανθήρες κρίθης αποδεικνύουν ότι θρεπτικό διάλυμα με εκχύλισμα πατάτας επάγει την αρχική καλλογένεση μεγάλου αριθμού μικροσπορίων. Παρ' όλα αυτά η περαιτέρω ανάπτυξη της καλλιέργειας ευνοείται περισσότερο σε μείγματα αλάτων μεγαλύτερων συγκεντρώσεων. Γενικά εάν θέλουμε να έχουμε επαναληψιμότητα των αποτελεσμάτων μας θα πρέπει να αποφεύγουμε τη χρήση θρεπτικών διαλυμάτων απροσδιόριστης σύστασης.

2.1.1.8.7 Άλλα συστατικά

Ένα βασικό συστατικό, το οποίο συστήνεται ευρέως για καλλιέργεια ανθέρων είναι ο ενεργός άνθρακας. Ο ενεργός άνθρακας επιδρά στο θρεπτικό υπόστρωμα με ποικίλους τρόπους, κυρίως απορροφώντας ρυθμιστές ανάπτυξης, βιταμίνες και σίδηρο, καθώς και τα φαινολικά συστατικά που συχνά απελευθερώνονται από τους γηραιότερους ιστούς στην καλλιέργεια. Ο ακριβής τρόπος λειτουργίας του δεν έχει εξακριβωθεί.

Μελέτη με *Nicotiana tabacum* (Bajaj et al 1976) έδειξε ότι διεγείρει την επαγωγή ανδρογένεσης στους ανθήρες. Το ποσοστό ανταποκρινόμενων ανθέρων μπορεί να αυξηθεί από 41% σε 91% με προσθήκη 2% ενεργού άνθρακα στο διάλυμα.

Μεταξύ των ειδών στα οποία συστήνεται η χρήση του είναι η πατάτα (προσθήκη 0,5% στο διάλυμα MS, 6% ζαχαρόζη, BAP 1mg/l) και το *Lolium* (0,2%). Έχει επίσης χρησιμοποιηθεί σε θρεπτικά υποστρώματα των δύο φάσεων.

2.1.1.9 Συνθήκες επαγωγής

2.1.1.9.1 Θερμοκρασία

Η θερμοκρασία είναι η πιο σημαντική μεταβλητή για την επαγωγή. Οι ανθήρες των περισσότερων ειδών, περιλαμβάνοντας και τα Solanaceae ανταποκρίνονται επαρκώς εάν καλλιεργηθούν στους 25° C.

Κάποια είδη κυρίως του γένους *Brassica* έχουν ιδιαίτερες θερμοκρασιακές απαιτήσεις, με καλύτερη ανταπόκριση για σύντομες περιόδους σε 35° C ή σε ακόμα μεγαλύτερες θερμοκρασίες.

Οι ανθήρες της πιπεριάς (*Capsicum anum*) επίσης αντιδρούν με παρόμοιες υψηλές θερμοκρασιακές μεταχειρίσεις.

2.1.1.9.2 Φως

Υπάρχουν λίγες αξιόπιστες αποδείξεις για την επίδραση του φωτός στην καλλιέργεια ανθέρων. Αυτό που συστήνεται συνήθως για την επαγωγή είναι σκοτάδι μέχρι να σχηματιστούν έμβρυα ή κάλλοι.

2.1.1.9.3 Δοχεία καλλιέργειας

Η μοναδική συστηματική έρευνα που έχει διεξαχθεί για τα δοχεία καλλιέργειας είναι στους ανθήρες καπνού. Η καλύτερη ανταπόκριση έχει επιτευχθεί με δοχεία που εξασφάλιζαν 5 ml αέρα για κάθε ανθήρα. Με μεγαλύτερα ή κυρίως με μικρότερα δοχεία η ανταπόκριση μειώθηκε σε μεγάλο βαθμό.

2.1.1.9.4 Προσανατολισμός εκφύτου (ανθήρα)

Ο προσανατολισμός του ανθήρα σε σχέση με την επιφάνεια του υποστρώματος συνήθως ούτε ρυθμίζεται, ούτε περιγράφεται στις δημοσιεύσεις. Είναι ένα στοιχείο στο οποίο δεν έχει δοθεί η δέουσα προσοχή αν και υπάρχουν αποδείξεις από τον καπνό και το *Datura* ότι τα καλύτερα αποτελέσματα επιτυγχάνονται με ανθήρες τοποθετημένους επίπεδα στο υπόστρωμα. Συνεπώς έχουμε διαβαθμίσεις στα αποτελέσματα ανάλογα με τον προσανατολισμό του εκφύτου.

2.1.1.9.5 Πυκνότητα ανθήρων

Μόνο στο κριθάρι υπάρχει απόδειξη ότι είναι μια σημαντική μεταβλητή στον καθορισμό της ανταπόκρισης στην καλλιέργεια. Εάν χρησιμοποιείται υγρό διάλυμα συνιστάται να τοποθετούνται τουλάχιστον 60 ανθήρες ml.

Εναλλακτικά μπορεί να χρησιμοποιηθεί θρεπτικό μέσο στο οποίο προηγήθηκε καλλιέργεια ωθηκών. Σε αυτή την περίπτωση ο αριθμός ανθήρων ανά ml διαλύματος μπορεί να μειωθεί σημαντικά.

Πίνακας 2.5 : ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΡΙΩΝ ΒΑΣΙΚΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ
ΕΥΡΕΩΣ ΣΤΗΝ ΚΑΛΙΕΡΓΕΙΑ ΑΝΘΗΡΩΝ / ΓΥΡΗΣ

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	mg/l		
	WHITE (1943)	MURASHIGE & SKOOG (1962)	NITSCH & NITSCH (1969)
<i>Macronutrients</i>			
		mg/l	
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	288	-	-
KNO ₃	80	1900	950
NH ₄ NO ₃	-	1650	720
KCl	65	-	-
KH ₂ PO ₄	-	170	68
NaH ₂ PO ₄ ·4H ₂ O	19	-	-
CaCl ₂ ·2H ₂ O	-	440	166
MgSO ₄ ·7H ₂ O	737	370	185
Na ₂ SO ₄	200	-	-
<i>Micronutrients</i>			
Fe ₂ (SO ₄) ₃	2.5	-	-
FeSO ₄ ·7H ₂ O	-	27.8	27.8
Na ₂ -EDTA	-	37.3	37.3
MnSO ₄ ·4H ₂ O	6.7	22.3	25
H ₃ BO ₃	1.5	6.2	10
ZnSO ₄ ·4H ₂ O	2.2	8.6	10
KI	0.75	0.83	-
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	-	0.25	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	-	0.025	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	-	0.025	-
<i>Organic</i>			
Biotin	-	-	0.05
Glycine	3.0	2.0	2
Inositol	-	100	100
Nicotinic acid	0.5	0.5	5
Pyridoxine-HCl	0.1	0.5	0.5
Thiamine-HCl	0.1	0.1	0.5
Folic acid	-	-	5
Sucrose	20000	30000	20000

Πίνακας 2.6 ΒΑΣΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ
ΑΝΘΗΡΩΝ / ΓΥΡΗΣ

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	mg/l				
	H Bourgin & Nitsch 1967	1/2 ms Marashige & Skoog 1962	M Miller 1963	MM Modified Miller Chu <i>et al.</i> 1975	K Keller <i>et al.</i> 1975
KNO ₃	950	950	1000	2830	2500
NH ₄ NO ₃	720	825	1000	-	-
(NH ₄) ₂ SO ₄	-	-	-	463	134
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	-	-	347	-	-
CaCl ₂ ·2H ₂ O	166	220	-	166	750
KCl	-	-	65	-	-
MgSO ₄ ·7H ₂ O	185	185	35	185	250
KH ₂ PO ₄	68	85	300	400	-
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	-	-	-	-	150
MnSO ₄ ·4H ₂ O	25	11.2	4.4	4.4	10
H ₃ BO ₃	10	3.1	1.6	1.6	3
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	10	4.3	1.5	1.5	2
KI	-	0.4	0.8	0.8	0.75
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.13	-	-	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.013	-	-	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	-	0.013	-	-	0.025
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	14	-	27.8	-
	αντιμετρώνονται πριν την προσθήκη τους στο διάλυμα				
Na ₂ EDTA	37.5	19	-	37.5	-
NaFeEDTA	-	-	32	-	-
Sequenstrene 330 Fe	-	-	-	-	40
Thiamin HCl	0.5	0.05	0.1	1.0	10.0
Pyrodoxin HCl	0.5	0.25	0.1	0.5	1.0
Nicotinic acid	5.0	0.25	0.5	0.5	1.0
Folic acid	0.5	-	-	-	-
Biotin	0.05	-	-	-	-
Glycine	2.0	1.0	2.0	2.0	-
Glumatine	-	-	-	-	800
m-inositol	100	50	-	-	100
Sucrose	20,000	30,000	30,000	50,000	100,000
pH (πριν την αποστείρωση)	5.5	5.5	6.0	5.8	5.8

Πίνακας 2.7 ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΤΡΙΩΝ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΑΝΑΠΤΥΧΘΗΚΑΝ ΣΤΗΝ ΚΙΝΑ
ΓΙΑ ΤΗΝ ΚΑΛΙΕΡΓΕΙΑ ΑΝΘΗΡΩΝ / ΓΥΡΗΣ ΤΩΝ ΣΙΤΗΡΩΝ

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	mg/l		
	N6 ^a	Potato-1 ^b	Potato-2 ^b
KNO ₃	2830	-	1000
(NH ₄) ₂ SO ₄	463	-	100
KH ₂ PO ₄	100	-	200
KCl	-	-	35
MgSO ₄ ·7H ₂ O	185	-	125
CaCl ₂ ·2H ₂ O	166	-	-
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	-	-	100
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.2	-	-
Na·EDTA	37.2	-	-
Fe·EDTA	-	10 ⁻⁴ mol l ⁻¹	10 ⁻⁴ mol l ⁻¹
H ₃ BO ₃	1.6	-	-
MnSO ₄ ·4H ₂ O	4.4	-	-
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.5	-	-
KI	0.8	-	-
Thiamine HCl	1.0	1.0	1.0
Pyrodoxine HCl	0.5	-	-
Niacin	0.5	-	-
Glycine	2.0	-	-
2,4 - D	2.0	1.0	1.5
Kinetin	-	0.5	0.5
Potato extract	-	20%	10%
Sucrose	50 g.	90 g.	90 g.
Agar	10 g.	6 g.	6 g.

^a : Μετά τον Chu 1978

^b : Μετά τον Chuang et al. 1978

2.1.2 Καλλιέργεια γύρης

Το 1953 ο Tulecke πέτυχε ανάπτυξη κάλλων από την γύρη του *Ginkgo biloba* σε καλλιέργεια *in vitro*. Ο κάλλος είχε απλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων αλλά δεν ήταν δυνατή η αναγέννηση φυτών. Ο Nitsch (1974) απομόνωσε και καλλιέργησε γύρη του *N. tabacum* και επέτυχε παραγωγή απλοειδών φυτών.

Την επιτυχή έκβαση της καλλιέργειας γύρης βοήθησε σε σημαντικό βαθμό η επιτυχής έκβαση καλλιέργειας ανθέρων που είχε προηγηθεί. Η καλλιέργεια ανθέρων παρείχε στους ερευνητές κάποιες κατευθυντήριες γραμμές στην καλλιέργεια γύρης.

Θα διαπιστώσουμε ότι συμπίπτουν σε πολλά σημεία η καλλιέργεια γύρης και η καλλιέργεια ανθέρων. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι και στις δύο περιπτώσεις τα απλοειδή φυτά προέρχονται από τη γύρη. Με την διαφορά ότι στην καλλιέργεια ανθέρων η γύρη αναπτύσσεται εντός των ανθέρων.

Αυτός είναι ο λόγος που η καλλιέργεια απομονωμένης γύρης είναι πολύ πιο λεπτή, δύσκολη και εξειδικευμένη εργασία από την καλλιέργεια ανθέρων. Η απομονωμένη γύρη, δεν υφίσταται τον προστατευτικό ρόλο που έχουν στην καλλιέργεια ανθέρων οι ανθικοί ιστοί και ίσως κάποια ευνοϊκή επίδραση που πιθανόν διαδραματίζουν (ακόμα δεν έχει διευκρινιστεί) στην επαγωγή των γυρεοκόκκων.

2.1.2.1 Συνθήκες καλλιέργειας μητρικών φυτών

Ισχύει ότι αναφέραμε στην καλλιέργεια ανθέρων (2.1.1.2).

2.1.2.2 Ηλικία μητρικών φυτών

Ισχύει ότι αναφέραμε στην καλλιέργεια ανθέρων (2.1.1.3).

2.1.2.3 Στάδιο ανάπτυξης της γύρης

Ισχύει ότι αναφέραμε στην καλλιέργεια ανθέρων (2.1.1.4).

2.1.2.4 Απολύμανση

Αφού συλλέξουμε τους ανθικούς οφθαλμούς τους απολυμαίνουμε επιφανειακά με υποχλωριώδες ασβέστιο 5% για 7 λεπτά. Κατόπιν τους ξεπλένουμε 3 φορές με αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό. Μετέπειτα απομονώνουμε τους ανθήρες εκτός εάν θέλουμε να εφαρμόσουμε προμεταχείριση στους ανθικούς οφθαλμούς.

2.1.2.5 Προμεταχείριση

Έχει συχνά παρατηρηθεί (Sangwan-Norreeel et al 1986) ο ωφέλιμος ρόλος των προμεταχειρίσεων όπως κρύα «σοκ», υψηλές θερμοκρασίες, φυγοκέντρωση, για να αφαιρέσουμε τους ανθικούς οφθαλμούς στην άνθιση ή τους ανθήρες πριν την καλλιέργεια.

Κάποιοι ερευνητές έχουν αναφέρει επιτυχία με αυτές τις προμεταχειρίσεις αν και συχνά προκύπτουν αντικρουόμενα αποτελέσματα (Sunderland 1974, 1983).

Η πιο αποτελεσματική και ευρέως χρησιμοποιούμενη προμεταχείριση είναι η χαμηλή θερμοκρασία (Nitsch και Norreeel 1973, Sangwan-Norreeel et al 1986). Η κρύα μεταχείριση έχει εφαρμοστεί σε μεγάλη κλίμακα βαθμών 0-10°C και διάρκειας.

Αρκετά άλλα «σοκ» όπως προμεταχείριση με υψηλές θερμοκρασίες (30-35°C) στο *Brassica* (Keller et al 1975) και *Triticum aestivum* (Ouyang et al 1983), φυγοκέντρωση (Norreeel 1975), ακτινοβολία με ακτίνες x ή γ (Sangwan και Sangwan-Norreeel 1985) και η μειωμένη ατμοσφαιρική πίεση (Imanura και Harada 1980) φαίνεται επίσης να προάγουν την *in vitro* ανδρογένεση.

2.1.2.6 Μέθοδοι απελευθέρωσης μικροσπορίων

Παρά την θεωρητική προσέγγιση της δυνατότητας απομάκρυνσης των σωματικών ιστών των ανθών και την καλλιέργεια απομονωμένων μικροσπορίων αυτή η τεχνική μπορεί να εφαρμοσθεί σε λίγα είδη.

Ακόμα και σ' αυτά τα είδη η παραγωγή φυταρίων ανά ανθήρα είναι συχνά μικρότερη από αυτή που θα είχε επιτευχθεί εάν επιτρέπαμε στα μικροσπόρια να αναπτυχθούν εντός του ανθήρα.

Στα υπόλοιπα είδη και κυρίως στα σιτηρά, τα μικροσπόρια δεν μπορούν να χωριστούν από τους υπόλοιπους ανθικούς ιστούς, χωρίς να μειωθεί δραστικά η ζωτικότητα τους και συνεπώς η επιβίωση και ανάπτυξή τους στην καλλιέργεια.

Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για διαχωρισμό της γύρης από τους σωματικούς ιστούς είναι :

2.1.2.6.1 Αυθόρμητη απελευθέρωση

Σε πολλά είδη με σωστό συνδυασμό του σταδίου ανάπτυξης της γύρης, προμεταχείρισης και συνθηκών επαγωγής οι ανθήρες θα ανοίξουν και θα απελευθερώσουν τα μικροσπόρια. Εάν χρησιμοποιούμε υγρό μέσο για ανάπτυξη

κάλλων/εμβρύων τότε τα μικροσπόρια θα επιπλεύσουν ελεύθερα από σωματικούς ιστούς. Αυτός ο τρόπος απελευθέρωσης μικροσπορίων εφαρμόζεται σε πολλά είδη *Solanaceae*, *Brassicae* και σε αρκετά σιτηρά.

2.1.2.6.2 Τεχνική σχισίματος

Με αυτή την τεχνική κόβουμε το τοίχωμα του ανθήρα και απελευθερώνουμε τα μικροσπόρια. Στην αρχή εφαρμόστηκε στον καπνό και τώρα εφαρμόζεται επιτυχημένα στο *Pennisetum typhoides*. Προφανώς είναι χρονοβόρα διαδικασία και θα ήταν προτιμότερο να παρακινήσουμε την αυθόρμητη απελευθέρωση.

2.1.2.7 Θρεπτικό μέσο

Το θρεπτικό μέσο είναι μικρότερης σημασία από τις μεταβλητές συνθηκών ανάπτυξης και το στάδιο ανάπτυξης της γύρης.

Δυστυχώς δεν έχει γίνει εμπεριστατωμένη μελέτη της επίδρασης των θρεπτικών μέσων στην καλλιέργεια με αποτέλεσμα να μην είμαστε σε θέση να συστήσουμε ένα συγκεκριμένο διάλυμα για καλλιέργεια γύρης.

Ένας άλλος λόγος ο οποίος συντελεί στο γεγονός αυτό, είναι ότι η αντίδραση της καλλιέργειας στα διάφορα θρεπτικά μέσα έχει άμεση σχέση με το γενότυπο του φυτού. Γι' αυτό δεν είναι εύκολη η ομαδοποίηση των επιδράσεων μιας ουσίας σε διάφορα φυτά.

Τα περισσότερα κοινά χρησιμοποιούμενα βασικά διαλύματα είναι του Mourashige και Skoog (1962), το N6 (Chu 1978) ή οι παραλλαγές τους Linsmaier και Skoog (1965) Bourgin και Nitsch (1967) αντιστοίχως.

Μέσα με διαλύματα ευδιάλυτων αλάτων του White (1943) και του Heller (1953) συμπληρώνονται με γάλα καρύδας, υδρολυμένη καζεΐνη και εκχυλίσματα ζύμης. Ένα διάλυμα εκχυλίσματος πατάτας αναπτύχθηκε στην Κίνα (Chuang et al 1978) στο οποίο τα μονοκοτυλήδονα και ιδιαίτερα το σιτάρι είχε υψηλή ανταπόκριση στην ανδρογένεση.

2.1.2.7.1 Στερεό ή υγρό

Γνωρίζουμε ότι οι περισσότεροι τύποι άγαρ που χρησιμοποιούνται για στερεοποίηση του θρεπτικού διαλύματος περιέχουν συστατικά βλαβερά για την επιβίωση της γύρης. Συνεπώς για άρση των δυσμενών επιπτώσεων και μεγιστοποίηση

του τελικού αποτελέσματος το άγαρ θα πρέπει να αποφεύγεται ή να πλένεται πολύ καλά με αποστειρωμένο νερό.

Για να αυξήσουν την συχνότητα των γυρεοκόκκων που οδηγούνται σε εμβρυογένεση οι Sunderland και Roberts (1977) ανέπτυξαν την τεχνική υγρής καλλιέργειας για το *Nicotiana*. Η τεχνική εφαρμόζεται σε αρκετά είδη, οι ανθήρες επιπλέουν σε ένα λεπτό στρώμα υγρού μέσου εντός του τριβλίου. Διαρρηγνύονται αμέσως μετά τον εμβολιασμό και απελευθερώνουν τη γύρη στο διάλυμα. Οι γυρεοκόκκοι που έχουν απελευθερωθεί συνεχίζουν να αναπτύσσονται ακόμα και αν οι ανθήρες απομακρυνθούν από το τριβλίο.

2.1.2.7.2 Οσμωτικές συνθήκες

Η ζαχαρόζη βρέθηκε ότι είναι το σημαντικότερο συστατικό στο μέσο για την επαγωγή του εμβρύου. Αν και ρυθμιστές ανάπτυξης χρησιμοποιούνται ευρέως στην *in vitro* ανδρογένεση, ο ρόλος τους κατά την διάρκεια επαγωγής δεν είναι αποσαφηνισμένος. Υπάρχουν ορισμένες αναφορές για τον ρόλο τους σε κάποια είδη αλλά δεν είμαστε σε θέση να προτείνουμε με ποιους ρυθμιστές ανάπτυξης και σε ποιες συγκεντρώσεις επιτυγχάνεται η μέγιστη ανταπόκριση για μεγάλο αριθμό ειδών. Περισσότερες ενδείξεις για τον ρόλο των ρυθμιστών ανάπτυξης έχουμε κατά την διάρκεια ανάπτυξης του εμβρύου. Στο *Datura* (Noopel 1975) έμβρυα προέκυψαν αν και σε χαμηλή συχνότητα σε μέσο με 2% ζαχαρόζη και άγαρ. Αυτή η εξέλιξη κάνει ξεκάθαρο το γεγονός ότι όλα τα συστατικά εκτός της ζαχαρόζης εμπλέκονται στην ανάπτυξη του εμβρύου μετά την επαγωγή. Το γεγονός αυτό είχε επισημανθεί νωρίτερα από άλλους ερευνητές : Nitsch και Nitsch (1969), Sunderland (1974). Γενικώς τα καλύτερα αποτελέσματα επιτυγχάνονται σε μέσο με 2-3% ζαχαρόζη.

Ο Ouyang et al (1983) αναφέρει ότι στο *L.aestivum* 6% ζαχαρόζη προάγει τον σχηματισμό κάλλου από γύρη και συγχρόνως αναχαιτίζει την παραγωγή κάλλου από σωματικούς ιστούς. Το υψηλό επίπεδο ζαχαρόζης κατά την διάρκεια της περιόδου επαγωγής πιο πιθανό είναι να έχει έναν ρόλο ρυθμιστικό της όσμωσης παρά να λειτουργεί ως πηγή υδατανθράκων. Εφόσον η ανάπτυξη έχει αρχίσει υψηλά επίπεδα ζαχαρόζης δεν έχουν περαιτέρω ωφέλιμη επίδραση αντιθέτως είναι βλαβερά.

2.1.2.7.3 Μεταλλικά άλατα

Επειδή λίγες αναφορές υπάρχουν γι' αυτό το συστατικό του θρεπτικού μέσου, βασιζόμαστε στις συγκεντρώσεις των βασικών διαλυμάτων που έχουμε αναφέρει (2.1.2.5) και στις παραλλαγές τους.

2.1.2.7.4 Βιταμίνες

Τα μίγματα που χρησιμοποιούμε βασίζονται σε παραλλαγές του βασικού διαλύματος MS (Mourashige και Skoog). Δεν υπάρχουν αποδείξεις ότι αυτά τα συστατικά είναι πραγματικά αναγκαία για την επαγωγή και ανάπτυξη μικροσπορίων σε κάλλους/έμβρυα.

2.1.2.7.5 Ρυθμιστές ανάπτυξης

Το γεγονός ότι σε φυτά πρότυπα όπως *Datura* και *Nicotiana*, η εμβρυογένεση από γύρη μπορεί να συμβεί χωρίς την παροχή ρυθμιστών ανάπτυξης, δηλώνει ότι δεν είναι απολύτως αναγκαίες στην ανδρογένεση.

Στο *Datura* τα έμβρυα γύρης σχηματίζονται με αυξίνη, κυτοκινίνη ή GA3, αλλά τα καλύτερα αποτελέσματα τα επιτύχαμε με 0,1mg/l IAA. Σε είδη τα οποία περιλαμβάνουν και φάση κάλλου, ιδιαίτερα τα μέλη των *Gramineae*, οι αυξίνες και κυτοκινίνες συχνά χρησιμοποιούνται μαζί ή σε σειρά (Clapham 1977, Sunderland 1974, 1983, Sangwan και Sangwan-Norjeel 1987) και προάγουν την ανάπτυξη του κάλλου.

2.1.2.7.6 Άλλα συστατικά

Διάφορα φυσικά άλλα απροσδιόριστα συστατικά των ρυθμιστών ανάπτυξης όπως γάλα καρύδας και εκχυλίσματα πατάτας επηρεάζουν την καλλιέργεια γύρης. Αν και αυτές οι ουσίες είναι ωφέλιμες για την διαίρεση των κυττάρων στους γυρεοκόκκους, ο τρόπος δράσης τους δεν είναι ξεκάθαρος.

2.1.2.8 Συνθήκες επαγωγής

2.1.2.8.1 Θερμοκρασία

Όπως σε κάθε καλλιέργεια η θερμοκρασία στην οποία τα κύτταρα αναπτύσσονται διαφέρει για κάθε είδος. Μπορούμε να αναφέρουμε ως κανόνα ότι η ιδανική

θερμοκρασία για ανάπτυξη της γύρης, σε κάθε είδος, είναι λίγους βαθμούς υψηλότερη από την θερμοκρασία στην οποία ο αδιαφοροποίητος καλλικός ιστός αναπτύσσεται καλύτερα.

2.1.2.8.2 Φως

Μια σειρά πειραμάτων διεξήχθησαν για την επίδραση του φωτός στην ανάπτυξη φυταρίων που προέρχονται από την καλλιέργεια απομονωμένων μικροσπορίων.

Τα μικροσπόρια λόγω της έλλειψης προστασίας από τους ιστούς του ανθήρα είναι περισσότερο ευαίσθητα στο φως. Κόκκινο φθοριώδες φως ή χαμηλής έντασης λευκό φως (500Lux) έδωσαν τα καλύτερα αποτελέσματα. Από τα πειράματα διαπιστώσαμε ότι η ευαισθησία των μικροσπορίων στο φως είναι μεγαλύτερη κατά την διάρκεια των πρώτων δέκα ημερών της καλλιέργειας. Επιπλέον τα μικροσπόρια που αναπτύσσονται κάτω από κόκκινο φθοριώδες φως αναπτύσσονται ταχύτερα από αυτά στο άσπρο φως. Στις καλλιέργειες με κόκκινο φως τα μικρά έμβρυα είναι ορατά μακροσκοπικά μετά από 10 ημέρες, ενώ 15 ημέρες είναι αναγκαίες για καλλιέργειες με χαμηλής έντασης λευκό φως.

2.2 ΓΥΝΟΓΕΝΕΣΗ

Γυνογενή απλοειδή φυτά μέσω καλλιέργειας ωοθηκών και ωαρίων έχουν επιτευχθεί σε 16 είδη τα οποία ανήκουν σε 7 οικογένειες. Ο αριθμός αυτός είναι πολύ μικρός για να εδραιώσει την ιδέα ότι η *in vitro* γυνογένεση έχει γίνει μια ευρέως αποδεκτή τεχνική. Αυτό θεωρούμε ότι είναι επακόλουθο των ανεπαρκών προσπαθειών που έχουν γίνει από λίγους ερευνητές. Ακόμα και στα είδη όπου η γυνογένεση έχει αναφερθεί δεν πρέπει σε κάθε περίπτωση να θεωρούμε ότι είναι ένα πλήρως ανεπτυγμένο σύστημα, γιατί σε αρκετές περιπτώσεις τα ποσοστά επαγωγής είναι χαμηλά.

Λαμβάνοντας υπόψη τους περιορισμούς της *in vitro* γυνογένεσης και αφού ξέρουμε ότι η επαγωγή των απλοειδών φυτών έχει γίνει εύκολη μέσω της ανδρογένεσης. Η γυνογένεση εφαρμόζεται μόνο σε είδη όπως το ζαχαρότευτλο ή ανδρόστερες σειρές, εκεί όπου η καλλιέργεια ανθρών/γύρης συναντά δυσκολίες. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα να μην αναπτύσσεται η *in vitro* γυνογένεση αλλά να λειτουργεί συμπληρωματικά, θα μπορούσαμε να πούμε, στην *in vitro* ανδρογένεση και ειδικότερα για τα είδη που είναι αναποτελεσματική ή *in vitro* ανδρογένεση.

2.2.1 Καλλιέργεια ωοθηκών

Η πρώτη προσπάθεια καλλιέργειας ωοθηκών έγινε από τον LaRue (1942) όπου προέκυψε περιορισμένη ανάπτυξη των ωοθηκών συνοδευόμενη με δημιουργία ριζών από τα πέταλα του άνθους σε αρκετά είδη. Ο Nitsch (1951) χρησιμοποίησε την καλλιέργεια ωοθηκών για την μελέτη της φυσιολογίας των καρπών.

Η καλλιέργεια ωοθηκών προσφέρει μια καλύτερη προσέγγιση για διασαφήνιση αρκετών τομέων της φυσιολογίας των καρπών όπως μορφογένεση του καρπού και φυσιολογικές και βιοχημικές μεταβολές. Οι τομείς της φυσιολογίας του καρπού μπορούν να μελετηθούν μόνο κάτω από απόλυτα ελεγχόμενες περιβαλλοντικές και θρεπτικές συνθήκες.

Ωοθήκες από έναν αριθμό ειδών έχουν αναπτυχθεί *in vitro* με διακυμάνσεις ως προς τα αποτελέσματα. Οι μελέτες έχουν κυρίως επικεντρωθεί στις μορφογενετικές και φυσιολογικές εκφράσεις των καρπών και στην ανάπτυξη του σπόρου (Johri και Guha 1963, Nitsch 1963 α).

2.2.1.1 Στάδιο ανάπτυξης της ωοθήκης

Για να έχουμε ανεπικονίαστες ωοθήκες οι ανθικοί οφθαλμοί μεταφέρονται 24-48 ώρες πριν την άνθιση και μετά αφαιρούμε τις ωοθήκες.

Σε περίπτωση που επιθυμούμε επικονιασμένες ωοθήκες ολόκληροι οι ανθικοί οφθαλμοί αφαιρούνται 2-15 ημέρες μετά την επικονίαση (ανάλογα με το είδος) και κατόπιν αφαιρούμε τον κάλυκα, τη στεφάνη και τους στήμονες.

2.2.1.2 Απολύμανση

Οι ωοθήκες απολυμαίνονται επιφανειακά σε διάλυμα υποχλωριώδες ασβεστίου 5-10% και ξεπλένουμε 3-4 φορές με αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό.

2.2.1.3 Μεταχείριση και τοποθέτηση ωοθήκης στο θρεπτικό μέσο

Πριν την καλλιέργεια η κορυφή του ακραίου μέρους των πετάλων κόβεται (για να αφαιρέσουμε τους ιστούς που έχουν επηρεαστεί από το υποχλωριώδες ασβέστιο) και η ωοθήκη τοποθετείται στο θρεπτικό μέσο με το κομμένο άκρο βυθισμένο.

2.2.1.4 Θρεπτικό μέσο

Στις περισσότερες περιπτώσεις καλλιέργειας ωοθηκών το θρεπτικό μέσο είναι μάλλον απλό. Περιέχει μίγματα ανόργανων αλάτων, είτε του Nitsch (1951) είτε του White (1954).

Σε ορισμένες περιπτώσεις χρειάζεται η προσθήκη και άλλων συστατικών. Την επίδραση όλων των συστατικών που μπορεί να χρησιμοποιηθούν στην καλλιέργεια ωοθηκών θα μελετήσουμε παρακάτω.

2.2.1.4.1 Στερεό ή υγρό

Μπορούμε να χρησιμοποιήσουμε στερεό ή υγρό θρεπτικό μέσο αφού δεν υπάρχουν ενδείξεις ότι κάποιο υπερτερεί έναντι του άλλου. Εάν θέλουμε υπόστρωμα στερεοποιούμε το διάλυμα με άγαρ. Όταν πρόκειται να χρησιμοποιήσουμε υγρό θρεπτικό μέσο η ωοθήκη μπορεί να τοποθετηθεί πάνω σε διηθητικό χαρτί ή να επιπλέει στην επιφάνεια του υγρού.

2.2.1.4.2 Πηγή υδατανθράκων

Έχει αποδειχτεί ότι είναι απαραίτητη η παροχή υδατανθράκων στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας ωοθηκών. Συνήθως χρησιμοποιείται η ζαχαρόζη αλλά εξίσου αποτελεσματικές έχουν αποδειχτεί η λακτόζη και η μαλτόζη (Leopold και Scott 1952, Ito 1966).

2.2.1.4.3 Βιταμίνες

Βιταμίνες όπως B1 και B6 ή ακόμα και ένα μίγμα βιταμινών (Maheshwari και Lal 1961) διεγείρουν την ανάπτυξη της ωοθήκης. Η βιταμίνη E αυξάνει την γονιμότητα των σπερμάτων στο *D.nobile* (Ito 1966).

2.2.1.4.4 Ουσίες – Ρυθμιστές ανάπτυξης

Ανάλογα με τις απαιτήσεις του κάθε είδους διάφορες ουσίες ανάπτυξης (αυξίνες, κυτοκινίνες κ.α) και σύνθετα συμπληρώματα ανάπτυξης (εκχυλίσματα ζύμης, υδρολυμένη καζεΐνη και γάλα καρύδας) προστίθενται στο θρεπτικό μέσο.

Στην *in vitro* καλλιέργεια ωοθηκών πολύ λίγα είναι τα κοινά στοιχεία που απαιτούν για ανάπτυξη τα διάφορα είδη. Ωοθήκες των *Cucumis anguria* (Nitsch 1951) *Lycopersicon esculentum* (Nitsch 1951, Kano 1962). *I. amare* (Maheshwari και Lal 1961) και *Zephyranthes sp.* (Sachar και Karoor, 1959) απαιτούν μόνο ένα βασικό διάλυμα με ανόργανα άλατα και ζαχαρόζη για ανάπτυξη αν και προσθήκη αυξίνης σε κάθε περίπτωση επιφέρει μεγαλύτερη διέγερση ανάπτυξης.

Αντιθέτως ωοθήκες των *A. Rosea* (Chopra 1962) *Linaria maroccana* (Sachar και Baddeu 1958) και *R. sceleratus* (Sachar και Guha 1962) δεν αναπτύχθηκαν ικανοποιητικά ακόμα και με την προσθήκη σύνθετων ουσιών ανάπτυξης όπως υδρολυμένης καζεΐνης και εκχυλίσματος ζύμης.

Σε πολλά είδη τα αναπτυσσόμενα σπέρματα είναι πλούσιες πηγές αυξίνης (Nitsch 1952). Σε συνδυασμό με την γύρη η οποία προκαλεί τον αρχικό ερεθισμό τα αναπτυσσόμενα σπέρματα παρέχουν την αναγκαία αυξίνη για κανονική ανάπτυξη των καρπών.

Προσθήκη αυξίνης αν και προκαλεί διέγερση συχνά οδηγεί σε παρθενοκαρπία. Συνθετικές αυξίνες όπως NOA και 2,4D μπορούν να αντικαταστήσουν την διέγερση που προέρχεται από την επικονίαση. Επομένως μπορούμε να συμπεράνουμε ότι οι αυξίνες έχουν ένα κύριο ρόλο στην ανάπτυξη των καρπών.

Ο Peterson (1974) μελέτησε την επίδραση ρυθμιστών ανάπτυξης στο *N. sativa* και παρατήρησε ότι το γιβεργιλικό οξύ διέγειρε την ανάπτυξη ύπερου· αλλά όχι τον σχηματισμό ωαρίου. Ενώ το IAA και η κινετίνη δεν είχαν καμία επίδραση.

2.2.1.4.5 Οργανικά αζωτούχα συμπληρώματα

Ο Peterson (1973) για το *Nigella sativa* απέδειξε ότι θρεπτικά μέσα με υψηλή συγκέντρωση σε αζωτούχα είχαν τα καλύτερα αποτελέσματα στην ανάπτυξη της ωοθήκης. Ο Nitsch (1963b) θεωρεί ότι τα αζωτούχα συστατικά είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη της ωοθήκης.

2.2.1.5 Συνθήκες επαγωγής

Οι συνθήκες επαγωγής έχουν έναν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της ωοθήκης. Ανάλογα με το είδος οι καλλιεργούμενες ωοθήκες υφίστανται επαγωγή στους 25°C= 2°C, σχετική υγρασία 50-60% και κάτω από συνεχόμενες ή μεταβαλλόμενες περιόδους διάχυτου φωτός (16:8 ώρες φως: σκοτάδι).

2.2.1.6 Επίδραση επικονίασης

Η ανάπτυξη της ωοθήκης συνδέεται με την επικονίαση και γονιμοποίηση. Σε αρκετά απομεικτικά είδη όπως *Aerva tomentosa* αν και δεν γίνεται γονιμοποίηση, η επικονίαση και μόνο διεγείρει την ανάπτυξη της ωοθήκης και του ωαρίου.

Σε καλλιέργεια επικονιασμένες και ανεπικονιαστές ωοθήκες των ίδιων ειδών αντιδρούν πολύ διαφορετικά. Οι επικονιασμένες ωοθήκες αυξανόμενες σχηματίζουν μικρογραφίες καρπών. Οι ανεπικονιαστές ωοθήκες αποτυγχάνουν να αυξηθούν σε μέγεθος αν και επιβιώνουν για μήνες (Nitsch 1951). Αναφορές αποδεικνύουν ότι μέσω καλλιέργειας ανεπικονιαστων ωοθηκών έχει επιτευχθεί σε μερικά είδη η παρθενογενετική ανάπτυξη τους (Yang και Zhou 1982).

2.2.1.7 Επίδραση ανθικών ιστών

Αρκετοί ερευνητές που μελετούν την ανάπτυξη της ωοθήκης έχουν διαπιστώσει ότι κάποια ανθικά όργανα, ιδιαίτερα ο κάλυκας ευνοούν την ανάπτυξη και σε μερικές περιπτώσεις είναι αναγκαία (Redei και Redei 1955, La Groix et al 1962, Bajaj 1966, Guha και Johri 1966).

Οι μελέτες του Nitsch (1963 b) δηλώνουν ότι πιθανότατα ο κάλυκας είναι η πηγή αζωτούχων συστατικών τα οποία είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη.

2.2.1.8 Τρόπος και καθορισμός ανάπτυξης

Όταν καλλιεργηθεί σε ένα κατάλληλο μέσο η απομονωμένη ωοθήκη, μεγεθύνεται και ο τρόπος ανάπτυξης ταυτίζεται με την σιγμοειδή καμπύλη.

Η ανάπτυξη της ωοθήκης *in vitro* γενικώς καθορίζεται με μέτρηση του μήκους της (από την βάση της ωοθήκης μέχρι την κορυφή του στίγματος) και του πάχους της (σύμφωνα με τη μεγαλύτερη διάμετρο που είναι περίπου στο μέσο του καρπού).

Σε είδη όπου ο σχηματισμός των σπόρων είναι ικανοποιητικός, ο αριθμός των σπόρων που σχηματίζονται μπορεί επίσης να χρησιμοποιηθεί ως παράμετρος καθορισμού ανάπτυξης. Ορισμένοι ερευνητές χρησιμοποιούν την αλλαγή του χρώματος της ωοθήκης ως κριτήριο ωρίμανσης.

2.2.1.9 Σχηματισμός σπόρων

Στις ωοθήκες που αναπτύσσονται *in vitro* ο σχηματισμός σπόρων είναι χαμηλός και σε αρκετά είδη οι σπόροι δεν αναπτύσσονται καθόλου.

Η υψηλή στειρότητα που συναντάμε στις καλλιεργούμενες ωοθήκες συνήθως οφείλεται στον εκφυλισμό του ενδοσπερμίου, εμβρύου ή ολόκληρων ωαρίων.

Γόνιμοι σπόροι αναπτύσσονται και βλασταίνουν σε αρκετά είδη σιταριού (Nitsch 1951, Leopold και Scott 1952, Maheshwari και Lal 1961, Sachar και Guha 1962, Ito 1966).

2.2.1.10 Μέγεθος καρπού

Το μέγεθος των ώριμων καρπών *in vitro* είναι συνήθως μικρότερο. Συχνά ο περιορισμένος χώρος των δοχείων καλλιέργειας εμποδίζει την ωοθήκη να φθάσει στο τελικό της μέγεθος.

Για να ξεπεράσει αυτό το πρόβλημα ο Ito (1966) ακολούθησε μια μέθοδο καλλιέργειας μερικά αποστειρωμένης για ωοθήκες του *Dendrobium nobile*. Σε αυτή τη μέθοδο αποστειρώνεται ο ποδίσκος, στη συνέχεια τοποθετείται μέσα στο διάλυμα, ενώ η ωοθήκη παραμένει έξω από το δοχείο καλλιέργειας.

Στα *Iberis amara* (Maheshwari και Lal 1961), *Althaea rosea* (Chopra 1962) και *Ranunculus sceleratus* (Sachar και Guha 1962) είναι δυνατό να προκύψουν καρποί

κανονικού ή ακόμα μεγαλύτερου μεγέθους με προσθήκη κατάλληλων συμπληρωμάτων ανάπτυξης στο θρεπτικό μέσο και με μεταβολή του σταδίου της ωοθήκης στην καλλιέργεια.

2.2.2 Καλλιέργεια ωαρίων

ο White (1932) καλλιέργησε ωάρια για πρώτη φορά του *Antirrhinum*. Στη συνέχεια ωάρια αρκετών ειδών καλλιεργήθηκαν κυρίως με σκοπό να κατανοήσουμε τους παράγοντες που ρυθμίζουν την ανάπτυξη του ζυγώτη μέσω οργανωμένων σταδίων σε ένα ώριμο έμβρυο. (Maheshwari και Rangaswamy 1965, Rangan 1982).

Αν και οι αρχικές προσπάθειες καλλιέργειας αγονιμοποίητων ωαρίων αποδείχτηκαν μάταιες, αρκετές έρευνες μετέπειτα υποδηλώνουν ότι η καλλιέργεια αγονιμοποίητων ωαρίων ίσως αποδειχτεί, μια ελπιδοφόρα προσέγγιση, για να προκύψουν γυνογενή απλοειδή (Yang και Zhou 1982).

Η αυξανόμενη επιτυχία της καλλιέργειας αγονιμοποίητων ωαρίων αποδεικνύει τον ελπιδοφόρο ρόλο της στην βελτίωση απλοειδών φυτών (Yang και Zhou 1982).

2.2.2.1 Στάδιο ανάπτυξης ωαρίων

Η πετυχημένη ανάπτυξη των ωαρίων *in vitro* συσχετίζεται με την ηλικία των ωαρίων (αριθμός ημερών μετά την επικονίαση στην καλλιέργεια). Για να πετύχουμε ωάρια όμοιας ηλικίας οι ανθικοί οφθαλμοί παρακολουθούνται για να εντοπίσουμε την ημέρα άνθισης. Ακολουθεί επικονίαση και η ωοθήκη συλλέγεται 1-12 ημέρες μετά την επικονίαση. Για να πετύχουμε αγονιμοποίητα ωάρια η ωοθήκη συλλέγεται 24-48 ώρες πριν την άνθιση. Η ηλικία στην οποία αντιδρά το ωάριο καλύτερα στην καλλιέργεια διαφέρει από είδος σε είδος.

2.2.2.2 Απολύμανση

Η ωοθήκη απολυμαίνεται επιφανειακά με υποχλωριώδες ασβέστιο 5-10% και ξεπλένεται 3-4 φορές με αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό.

Σε είδη όπως *Abelmoscus* όπου το τοίχωμα της ωοθήκης είναι σχετικά παχύ, οι ωοθήκες μπορούν να απολυμανθούν με μια γρήγορη βύθιση σε αιθανόλη ακολουθούμενη από ελαφρύ κάψιμο.

Ο Rangaswamy (1963) για να απολυμάνει τα σπέρματα του *Orobanchae aegyptiaca* ακολούθησε την παρακάτω τεχνική η οποία είναι ιδανική για απολύμανση μικροσκοπικών και λεπτών σπόρων. Χρησιμοποιούμε ένα γυάλινο κύλινδρο (7,5X1,5εκ.) ανοιχτό και στα δύο άκρα. Καλύπτουμε το ένα άκρο με ένα κομμάτι τούλι. Ο κύλινδρος τοποθετείται κάθετα σ' ένα δοχείο με χλωριωμένο νερό. Οι σπόροι διασκορπίζονται πάνω στο τούλι και το χλωριωμένο νερό χύνεται πάνω στους

σπόρους. Σε δοχείο που έχουμε τοποθετήσει στο άκρο του σωλήνα που καλύπτεται με το τούλι μαζεύουμε το χλωριωμένο νερό. Αυτή η τεχνική αποδείχτηκε πολύ καλή γιατί δεν έχουμε σπατάλη υλικού, έχουμε εγγυημένη απολύμανση και είναι εύκολος ο χειρισμός των σπόρων.

2.2.2.3 Μεταχείριση και τοποθέτηση ωαρίων στο θρεπτικό μέσο

Η ωοθήκη κόβεται και ανοίγεται με αποστειρωμένο νυστέρι και τα ωάρια μεταφέρονται και τοποθετούνται ομοιόμορφα στην επιφάνεια του θρεπτικού μέσου. Εάν ακολουθήσουμε την τεχνική απολύμανσης του Rangaswamy (1963). Τα σπέρματα μετά την απολύμανση μεταφέρονται και απλώνονται ομοιόμορφα με μια λεπτή αποστειρωμένη βούρτσα στο θρεπτικό μέσο.

2.2.2.4 Θρεπτικό μέσο

Το θρεπτικό μέσο περιέχει μίγματα ανόργανων αλάτων του Nitsch (1951) ή του White (1954). Περαιτέρω προσθήκη στο θρεπτικό μέσο άλλων συστατικών θα μελετηθεί παρακάτω.

2.2.2.4.1 Στερεό ή υγρό

Στην καλλιέργεια ωαρίων χρησιμοποιούμε στερεό θρεπτικό μέσο. Το διάλυμα στερεοποιείται με προσθήκη άγαρ. 0,6-0,8%.

2.2.2.4.2 Οσμωτικές συνθήκες

Είναι γνωστό ότι η οσμωτική συγκέντρωση του θρεπτικού μέσου έχει σημαντική επίδραση στην ανάπτυξη (Mauney 1961, Maheshwari και Rangaswamy 1965). Οι Wakizuka και Nakajima (1974) βρήκαν ότι ωάρια του *Petunia hybrida* καλλιεργούμενα 4 ημέρες μετά την επικονίαση αναπτύσσονται σε μέσα με 6% ζαχαρόζη. Ωάρια καλλιεργούμενα 3 ημέρες μετά την επικονίαση απαιτούν 8% ζαχαρόζη.

Η οσμωτική συγκέντρωση μπορεί να αυξηθεί με προσθήκη ζαχαρόζης,μανιτόλης, γλυσερόλης και χλωριούχου νατρίου στο καλλιεργητικό μέσο.

Κατά την διάρκεια των αρχικών σταδίων ανάπτυξης του εμβρύου το περιεχόμενο του χυμοτοπίου του ωαρίου έχει υψηλή οσμωτική τιμή η οποία βαθμιαία μειώνεται με την περαιτέρω ανάπτυξη του εμβρύου (Ryczkowski 1962 a,b).

Μελέτη της οσμωτικής τιμής του ωαρίου κατά την διάρκεια διαφορετικών σταδίων της ανάπτυξης του ίσως αποδειχθεί ωφέλιμη για να κατανοήσουμε τις απαιτήσεις των απομονωμένων ωαρίων.

2.2.2.4.3 Θρεπτικά συμπληρώματα

Αρκετοί ερευνητές έχουν αποδείξει ότι πολλά θρεπτικά συμπληρώματα όπως αργινίνη και ασπαρτικό οξύ (Sproerl 1948), χυμός τομάτας και υδρολυμένη πρωτεΐνη (Vacin και Went 1949) και πεπτόνη (Ito 1961) προωθούν σημαντικά την ανάπτυξη ωαρίων των ορχιδέων.

2.2.2.4.4 Ουσίες-ρυθμιστές ανάπτυξης

Ουσίες ανάπτυξης όπως κινετίνη (Maheshwari και Lal 1961), γάλα καρύδας και αμινοξέα (Karoog 1959) και υδρολυμένη καζεΐνη (Bajaj 1964) ευνοούν την ανάπτυξη των ωαρίων.

2.2.2.5 Συνθήκες επαγωγής

Οι συνθήκες επαγωγής είναι ένας σημαντικός παράγοντας στην ανάπτυξη των ωαρίων. Ανάλογα με το είδος τα καλλιεργούμενα ωάρια υφίστανται επαγωγή στους 25°C ± 2°C, σχετική υγρασία 50-60% και κάτω από συνεχόμενες ή μεταβαλλόμενες περιόδους διάχυτου φωτός (16:8 ώρες, φως: σκοτάδι).

2.2.2.6 Επίδραση ανθικών ιστών

Όταν τα ωάρια καλλιεργούνται μαζί με τον πλακούντα έχει βρεθεί ότι ο ιστός του πλακούντα έχει ωφέλιμη επίδραση στην καλλιέργεια ωαρίου (Chopra και Sabharwal 1963, Pontovich και Sveshnikova 1966).

Δεν είναι ξεκάθαρο εάν αυτό οφείλεται στο ότι αυξάνεται η επιφάνεια απορρόφησης ή στην πιθανή παρουσία ουσιών ανάπτυξης στον ιστό.

2.2.2.7 Καθορισμός ανάπτυξης

Η ανάπτυξη του ωαρίου *in vitro* καθορίζεται με σύγκριση της ανάπτυξης του ωαρίου *in vivo* καθώς και από το μέγεθος και το στάδιο ανάπτυξης του εμβρύου και του ενδοσπερμίου.

2.3 Χρωμοσωματική εξάλειψη

Επιλεκτική εξάλειψη χρωμοσωμάτων μετά από διειδικές διασταυρώσεις εξερευνήθηκε για παραγωγή απλοειδών φυτών. Η μέθοδος αυτή βασίζεται στην παρατήρηση από τους Kasha και Kao (1970), ότι από την διασταύρωση του καλλιεργούμενου κριθαριού *Hordeum vulgare* (2x). Με το άγριο διπλοειδές *H. bulbosum*, παράγονται αρκετά απλοειδή, με συχνότητα που διαφέρει ανάλογα με τις σειρές που διασταυρώνονται για να δώσουν το διειδικό υβρίδιο. Η συχνότητα αυτή κυμαίνεται από 11-70% των εμβρύων που καλλιεργούνται σε τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα.

Αυτή η τεχνική της χρωμοσωματικής εξάλειψης συχνά αναφέρεται ως μέθοδος *Bulbosum*. Ο θηλυκός γαμέτης του κριθαριού γονιμοποιείται από τον γαμέτη του *H. bulbosum*. Υπενθυμίζουμε ότι το *H. bulbosum* είναι πολυετές, σταυρογονιμοποιούμενο και χρειάζεται χαμηλές θερμοκρασίες (κάτω από 10°C) και μικρή φωτοπερίοδο (8-10 ώρες φωτός) για να ανθίσει.

Λεπτομερείς κυτολογικές μελέτες αποκάλυψαν ότι σε αυτές τις διασταυρώσεις η διπλή γονιμοποίηση συμβαίνει κανονικά. Επιλεκτική εξάλειψη των χρωμοσωμάτων του *bulbosum* κατά την διάρκεια των αρχικών σταδίων της ανάπτυξης του εμβρύου υβριδίου οδηγεί στον σχηματισμό εμβρύων με χρωμοσώματα μόνο του *vulgare*. Συνεπώς μορφολογικά και κυτολογικά οι απόγονοι αναπαριστούν το *H. vulgare* (Subrahmanyam και Kasha 1973).

Πρέπει να επισημάνουμε το γεγονός ότι δεν είναι γνωστό με ποιον τρόπο λειτουργεί ο μηχανισμός εξάλειψης.

Σε αυτές τις διασταυρώσεις το έμβρυο κανονικά αποβάλλεται 10 ημέρες μετά την γονιμοποίηση. Για να επιτύχουμε τον στόχο μας που είναι η παραγωγή απλοειδών φυτών εξάγουμε τα ανώριμα έμβρυα και τα καλλιεργούμε *in vitro*. Τα φυτάρια που θα προκύψουν τα υποβάλλουμε στην επίδραση της κολχικίνης για να διπλασιάσουμε τον χρωμοσωματικό τους αριθμό με αποτέλεσμα να παράγουμε γόνιμα απλοειδή φυτά (Η μέθοδος δίνεται πολύ συνοπτικά στον πίνακα 2.8).

Δεν πρέπει να δημιουργηθεί η εντύπωση ότι η μέθοδος του διειδικού υβριδισμού με το *H. bulbosum* για την παραγωγή απλοειδών αποδίδει μόνο στο κριθάρι. Ορισμένοι γονότυποι του μαλακού σιταριού όταν διασταυρωθούν με το *H. bulbosum* δίνουν μια ικανοποιητική αναλογία απλοειδών.

Πράγματι ο Barclay (1975) και οι Zenktele, Strand (1979), διασταυρώνοντας το *H. bulbosum* με το *Triticum aestivum* και εφαρμόζοντας στη συνέχεια καλλιέργεια *in vitro* του ανώριμου εμβρύου, πέτυχαν υψηλή συχνότητα απλοειδών του Κινέζικου ανοιξιάτικου σιτηρού.

Πίνακας 2.8 : Η μέθοδος που χρησιμοποιείται για την παραγωγή απλοειδών στο κριθάρι με βάση τη διασταύρωση *H. vulgare* x *H. bulbosum* (Τροποποίηση από Kasha)

Αριθμός ημερών μετά τον ευνουχισμό	Επέμβαση	
0	<i>H. vulgare</i> (F1 διαφόρων 2n = 2x = 14 γονέων) ευνουχισμός ⇓	<i>H. bulbosum</i> 2n = 2x = 14
2	Επικονίαση ⇓	Συλλογή γύρης
3 - 5	Επέμβαση με GA3 (75 ppm, μια σταγόνα / ανθίδιο επί 2-3 μέρες) ⇓	
14 - 16	Αποκοπή και καλλιέργεια του έμβρυου. Οι φιάλες διατηρούνται στο σκότος σε 22° C. ⇓	
22 - 28	Τα έμβρυα, που έχουν διαφοροποιηθεί, τοποθετούνται στο φως (12 ώρες / 24 ωρο) σε 22° C.	
40 - 50	Τα φυτάρια, στο στάδιο των 2-3 φύλλων, υποβάλλονται στην επίδραση της κολχικίνης (0,1%) επί 5 ώρες, ξεπλύνονται και φυτεύονται σε γλάστρες.	

2.4 Προϊόντα της καλλιέργειας

2.4.1 Πλοειδία

Η εμφάνιση μη απλοειδών κατά την καλλιέργεια ανθήρων/γύρης είναι ένα θέμα ιδιαίτερης σημασίας. Σε πολλά είδη τα απλοειδή παράγωγα είναι η εξαίρεση ενώ παρατηρούνται ευρύτατα «προϊόντα» με ποικίλο επίπεδο πλοειδίας, η πλειοψηφία των «προϊόντων» αυτών έχουν προέλθει από μεμονωμένα απλοειδή μικροσπόρια τα οποία έχουν υποστεί μια σειρά χρωμοσωματικών διπλασιασμών συχνά κατά την διάρκεια της αρχικής περιόδου της καλλιέργειας. Σε αυτές τις περιπτώσεις τα πολυπλοειδή είναι ομοζύγωτα στην φύση και αν είναι γόνιμα και αυτοσυμβιβαστά θα αναπαραχθούν πιστά.

Σε είδη με τον εμβρυογενή τρόπο ανδρογένεσης μη απλοειδή μπορούν να προκύψουν από τα κύτταρα του τοιχώματος του ανθήρα ή λόγω της σύντηξης των πυρήνων, ή λόγω ενδοπολυπλοειδίας της γύρης (η οποία σε μερικά είδη, εμφανίζεται σε χαμηλά ποσοστά, σε όλους τους ανθήρες υπό κανονικές συνθήκες) Sunderland και Dunwell (1977) Narayanaswamy και George (1982), Sangwan-Norveel (1983). Εάν ενδοπολυπλοειδής γύρη υποκινηθεί να διαιρεθεί στην καλλιέργεια και τελικά παράγει φυτά, αυτά τα φυτά μπορεί να είναι ετεροζύγωτα. Αυτά τα φυτά δεν θα έχουν ενδιαφέρον για τους βελτιωτές που η ομοζυγωτία είναι απολύτως απαραίτητη.

Τα ώριμα απλοειδή φυτά μπορούν εύκολα να αναγνωριστούν με βάση εξωτερικά γνωρίσματα ενώ πρόσθετα μπορεί να επιβεβαιωθεί η χρωμοσωματική τους σύνθεση με κυτολογικές τεχνικές.

Κυτολογικές τεχνικές

Υπάρχει ένας αριθμός τεχνικών με τις οποίες η πλοειδία των αναγεννώμενων φυτών μπορεί να εκτιμηθεί.

Για πρακτικούς βελτιωτικούς σκοπούς όσο πιο σύντομα μπορούμε να διακρίνουμε τις διάφορες πλοειδίες τόσο επισπεύδεται η επιλογή των απλοειδών στα οποία θα γίνει διπλασιασμός των χρωμοσωμάτων τους.

Για τα γρήγορα αναπτυσσόμενα φυτά, μπορούν να εφαρμοσθούν οι συνηθισμένες μέθοδοι για την μέτρηση των χρωμοσωμάτων στη ρίζα ή στις κορυφές των φύλλων. Εναλλακτικά επιδερμικές λωρίδες μπορούν να παρθούν από το πρώτο πλήρως εκπτυσσόμενο φύλλο και να εξεταστούν τα στομάτια τους. Ο αριθμός των χλωροπλαστών ανά καταφακτικό κύτταρο μπορεί να υπολογιστεί μετά από χρωματισμό με διαλύματα ιωδίου/καλλίου.

Ο αριθμός των χλωροπλαστών ανά καταφρακτικό κύτταρο είναι ευθέως ανάλογος με την πλοειδία (π.χ. στην πατάτα, μονοπλοειδή, έχουν 5-8, διπλασιασμένα απλοειδή 10-15 και τετραπλοειδή 18-24, χλωροπλάστες / καταφρακτικό κύτταρο).

Είναι αναγκαίο να έχουμε υπόψη μας ότι μερικά φυτά μπορεί να είναι χμαιρικά και να έχουν τομείς διαφορετικής πλοειδίας.

2.4.2 Γενετικές παρεκκλίσεις

Έχουμε αναφέρει ότι τα διπλασιασμένα απλοειδή φυτά που προέρχονται από μεμονωμένα απλοειδή μικροσπόρια πρέπει να θεωρούνται ομοζύγωτα. Υπάρχουν ενδείξεις ότι αυτό δεν είναι αναγκαίο. Και ότι τέτοια διπλοειδή μπορούν να εμφανίσουν διάσπαση στους απογόνους τους. Υπάρχουν επίσης αποδείξεις ότι τα μικροσπόρια που αναγεννώνται από καθαρές σειρές ή από ομοζυγωτικούς δότες δεν είναι εντελώς ομοιόμορφα. Αυτές οι δυο διαπιστώσεις είναι μεγάλης σημασίας και υπονοούν ότι τυχαίες μεταλλάξεις συμβαίνουν είτε κατά την διάρκεια της ανάπτυξης αυτού του μέρους του ανώριμου γαμετοφύτου (σωματικό κύτταρο) το οποίο παράγει το έμβρυο και/ή κατά την διάρκεια της καλλιεργητικής φάσης.

2.4.3 Διπλοειδισμός για την παραγωγή ομοζύγων φυτών

Τα απλοειδή φυτά μπορούν να αναπτυχθούν κανονικά μέχρι το στάδιο της άνθησης. Λόγω της απουσίας ομόλογων χρωμοσωμάτων η μείωση είναι ανώμαλη και κατά συνέπεια δεν σχηματίζονται βιώσιμοι γαμέτες. Για να επιτύχουμε γόνιμα ομοζύγωτα διπλοειδή φυτά (η σωστή έκφραση είναι διπλασιασμένα απλοειδή) πρέπει να διπλασιάσουμε τα χρωμοσώματα των απλοειδών.

Η παραγωγή διπλοειδών μπορεί να γίνει ή με τη χρήση κάλλου, που προέρχεται από τους ιστούς του στελέχους ή του φύλλου των απλοειδών ή με τη χρήση κολχικίνης.

Στην πρώτη περίπτωση καλλιεργούμε τα τμήματα του απλοειδούς φυτού που αναφέραμε. Χρησιμοποιούμε βασικά το θρεπτικό μέσο των Murashige και Skoog.

Προσθέτουμε στο θρεπτικό μέσο ορμόνες και κυτοκινίνες (καλά αποτελέσματα έχουμε με κινετίνη και 2,4D).

Κατά την διάρκεια σχηματισμού του κάλλου γίνεται η ενδομίτωση (στάδιο διπλασιασμού που κρατάει 1-6 εβδομάδες) η οποία διπλασιάζει τον αριθμό των χρωμοσωμάτων.

Κατόπιν μεταφέρουμε τα κύτταρα του κάλλου σε θρεπτικό υπόστρωμα που υποβοηθά στον σχηματισμό ματιών και ρίζας (στάδιο αναγέννησης). Για να συμβεί η οργανογένεση τα περισσότερα φυτά απαιτούν την προσθήκη αυξίνης και κυτοκινίνης. Αν και υπάρχουν φυτά στα οποία δεν συμβαίνει οργανογένεση εάν δεν απομακρυνθούν από το διάλυμα η αυξίνη και η κυτοκινίνη. Με τη μέθοδο αυτή το ποσοστό επιτυχίας είναι γύρω στο 60-70% Nitsch και Hamon (1969).

Όταν χρησιμοποιείται η κολχικίνη τα φυτάρια εμβαπτίζονται σε υδατικό διάλυμα της (0,4%) επί τέσσερις ώρες. Το ποσοστό επιτυχίας με αυτή την μέθοδο είναι γύρω στο 30-40% (Tanaka και Nakata 1969).

Εάν ώριμα απλοειδή φυτά είναι διαθέσιμα τότε μπορεί να εφαρμοστεί κολχικίνη με μορφή πάστας λαυολίνης (0,4%) στο κεντρικό νεύρο των φύλλων. (Tanaka και Nakata 1969).

2.4.4 Φυτά *albino*

Ένα σοβαρό πρόβλημα που σχετίζεται με την παραγωγή *in vitro* ανδρογενών απλοειδών στα σιτηρά είναι η εμφάνιση μεγάλου αριθμού φυτών που έχουν έλλειψη χλωροφύλλης (*albinos*) (Clapham 1977). Για να εκτιμηθεί η σημαντικότητα του προβλήματος αναφέρουμε ότι στο ρύζι το ποσοστό φυτών *albino* που έχουν παρατηρηθεί κυμαίνεται από 10% (C.C.Wang et al 1978, Genovesi και Magill 1979) έως 100%. (Tsay et al 1981).

Ένας παράγοντας που συμβάλλει σε αυτήν τη παρέκκλιση είναι ο γενότυπος των μητρικών φυτών. Ορισμένες ποικιλίες έχουν την τάση να παράγουν συγκεκριμένα ποσοστά φυτών *albino* (C.C. Wang et al 1978, C.C. Chen και C.M. Lin 1981). Όταν χρησιμοποιούνται ποικιλίες που παράγουν *albino* η F1 έχει υψηλό ποσοστό *albino* (Bullock et al 1982). Επιπλέον κατά μέσο όρο, οι ποικιλίες παράγουν λιγότερα φυτά *albino* από ότι τα υβρίδια. Συνεπώς αυτή η παρέκκλιση αποτελεί ένα κύριο εμπόδιο στην ανάκτηση ωφέλιμων ανασυνδυασμών από διάφορα υβρίδια μέσω της καλλιέργειας ανθήρων.

Η παραγωγή φυτών *albino* μπορεί επίσης να οφείλεται, στην αποτυχία έκφρασης των γονιδίων που είναι υπεύθυνα, για την ανάπτυξη των χλωροπλαστών και για τον σχηματισμό της χλωροφύλλης, λόγω των συνθηκών της καλλιέργειας.

Είναι ενδιαφέρον να επισημάνουμε ότι το ποσοστό των *albino* επηρεάζεται από παράγοντες όπως : οι συνθήκες επαγωγής (C.C.Wang et al 1974, Bernand 1980), το

είδος και την συγκέντρωση των ρυθμιστών ανάπτυξης, από τη ζαχαρόζη και τα μεταλλικά άλατα του θρεπτικού μέσου (Lee και CC Chen 1982, C.C. Chen 1978, Y.Chen et al 1978a) καθώς και από το στάδιο ανάπτυξης της γύρης κατά την διάρκεια της αφαίρεσης των ανθών και της καλλιέργειας (C.C.Chen 1977, Genovesi και Magill 1979). Ο κατάλληλος χειρισμός αυτών των παραγόντων μπορεί να μειώσει το ποσοστό των albino στο ελάχιστο δυνατό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

Παράγοντες που επηρεάζουν την in vitro ανδρογένεση σε μερικά οικονομικώς σημαντικά φυτά.

3.1 Σιτάρι

3.1.1 Γενότυπος και φυσιολογική κατάσταση του μητρικού φυτού

Ο γενότυπος των μητρικών φυτών έχει μεγάλη επίδραση στην ανταπόκριση των ανθέρων στην καλλιέργεια. Σημαντικές διαφορές ως προς τον σχηματισμό κάλλου παρατηρήθηκαν με την χρησιμοποίηση διάφορων ποικιλιών.

Επιπροσθέτως με τον γενότυπο των μητρικών φυτών, η φύση των ποικιλιών του σιταριού (ανοιξιάτικο ή χειμερινό) επηρεάζει επίσης το ποσοστό επαγωγής των φυταρίων. Γενικώς το ποσοστό επαγωγής του κάλλου και των πράσινων φυταρίων είναι πολύ υψηλότερο στις ανοιξιάτικες ποικιλίες από ότι στις χειμερινές. Η μελέτη που έγινε από τον J.Ouyang et al(1983) έδειξε ότι οι συνθήκες, κάτω από τις οποίες αναπτύσσονται τα μητρικά φυτά, μπορούν να επηρεάσουν σε μεγάλο βαθμό την παραγωγή φυταρίων.

Ενώ οι Κινέζοι ερευνητές δούλεψαν κυρίως με φυτικό υλικό από τον αγρό (Wang P. και Chen Y.R.1980) οι περισσότεροι άλλων εθνικοτήτων ερευνητές χρησιμοποίησαν φυτά του θερμοκηπίου (Picard και De Buyser 1973, De Buyser και Henry 1979, Bullock et al 1982).

Δεν φαίνεται να υπάρχουν σημαντικές διαφορές μεταξύ των φυτικών υλικών που αναπτύσσονται στο θερμοκήπιο και στον αγρό (Schaeffer et al 1979).

3.1.2 Στάδιο ανάπτυξης γύρης

Το στάδιο ανάπτυξης της γύρης είναι ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τα αποτελέσματα της καλλιέργειας ανθέρων.

Το ποσοστό επαγωγής των κάλλων ήταν υψηλότερο από το μέσο του σταδίου των αδιαιρέτων πυρήνων γύρης (J. Ouyang et al 1973, Chu 1978, Chuang et al 1978) έως το τέλος του σταδίου των αδιαιρέτων πυρήνων γύρων (C.C.Wang et al 1973, Bajaj 1977a, Pan και Gao 1978).

3.1.3 Προμεταχείριση

Κρύα προμεταχείριση πριν από τον εμβολιασμό μπορεί να αυξήσει το ποσοστό επαγωγής των κάλλων. Σ' ένα πείραμα με δύο διασταυρώσεις του σιταριού (Orofen X. Χίαογαν 759) F1 και (Xian-Yang No 4x74971) όπου χρησιμοποιήθηκαν F1 απόγονοι και οι στάχεις του σιταριού προμεταχειρίστηκαν στους 1°-4°C για 48 ώρες, τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το ποσοστό παραγωγής κάλλου από γύρη του μάρτυρα και της επέμβασης στη διασταύρωση (Orofen x Χίαογαν 759) ήταν 11,7% και 20,6% αντιστοίχως και στο (Xian-Yang No 4 x 7497) ήταν 4.2% και 8.9% αντιστοίχως. Συνεπώς η συχνότητα αυξήθηκε τουλάχιστον δύο φορές όταν οι στάχεις του σιταριού προμεταχειρίστηκαν σε χαμηλές θερμοκρασίες.

3.1.4 Θρεπτικό μέσο

Οι καλλιεργούμενοι ανθήρες αναπτύσσονται και σε υγρό και σε στερεοποιημένο (άγαρ) θρεπτικό μέσο (Henry και De Buyser 1981).

Διάφορα βασικά διαλύματα χρησιμοποιούνται όπως MS (Murashige και Skoog 1962), N6 (C.C.Chu et al 1975) potato-2 (Chuang et al 1978) Miller (Miller 1963). Η συμβολή των $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$ και KNO_3 δηλώνουν ότι είναι σημαντικοί παράγοντες.

Τα κύρια συστατικά του διαλύματος είναι :

1) Υψηλή συγκέντρωση ζαχαρόζης (90g/l εμφανίζεται ως ιδανική). Η διπλή δράση της ζαχαρόζης ως πηγή υδατανθράκων και ρυθμιστής της όσμωσης δεν έχει ξεκαθαριστεί.

2) Η παρουσία αυξίνης : γενικώς 1-3mg/l 2,4D ευνοεί την ανάπτυξη εμβρύου (Zhu Z.Q. et al 1978) είναι αναγκαία μόνο κατά την διάρκεια των 12 πρώτων ημερών της καλλιέργειας (Henry και De Buyser 1981).

3) 10⁻⁴ M σίδηρος EDTA.

Πολυάριθμα συμπληρώματα έχουν δοκιμασθεί αλλά μόνο η μεσοινοσιτόλη (Wei Z.M. 1982), η κινετίνη (Pan και Gao 1978) και η σερίνη (Wei Z.M. 1982) είναι σημαντικές.

Τα εκχυλίσματα πατάτας έχουν βρεθεί πολύ αποτελεσματικά (Chuang et al 1978). Η ποιότητα αυτών των εκχυλισμάτων διαφέρει ανάλογα με την ποικιλία πατάτας που χρησιμοποιείται (Chuang et al 1978) και η ποιότητα ελαττώνεται στους κονδύλους που αποθηκεύονται για καιρό (De Buyser και Henry 1980b). Η δράση του

εκχυλίσματος πατάτας μπορεί να αντικατασταθεί μερικώς από την δράση της γλουταμίνης.

3.1.5 Συνθήκες επαγωγής

Τα πειραματικά αποτελέσματα για τις συνθήκες επαγωγής μας οδηγούν στα παρακάτω συμπεράσματα :

1. Η επίδραση του φωτός και της φωτοπερίοδου δεν είναι πολύ σημαντικές εφόσον έχουν εφαρμοστεί από πλήρες σκοτάδι μέχρι συνεχιζόμενο φωτισμό (Ouyang J. et al 1973, Chu et al 1973, C.C. Wang et al 1973, Z. M Wei 1982) με φωτοπερίοδους 9-16 ώρες (Chuang et al 1978, C.C. Wang et al 1975, Henry και De Buyser 1981).

2. Η θερμοκρασία μεταβάλλει ουσιαστικά την παραγωγή εμβρύων (Picard και De Buyser 1975b). Σχετικά υψηλές θερμοκρασίες αυξάνουν το ποσοστό των εμβρύων (Pan et al 1975) το οποίο μειώνεται στους 26°C (J. Ouyang et al 1980). Για τις πρώτες 8 ημέρες θερμοκρασίες επαγωγής γύρω στους 29°C-30°C και μετέπειτα στους 26°C φαίνεται ότι είναι οι ιδανικές θερμοκρασίες.

3.1.6 Διπλασιασμός των απλοειδών φυτών

Έχουν περιγραφεί τρεις τεχνικές για τον διπλασιασμό των χρωμοσωμάτων των φυτών σιταριού:

1. Εμβαπτίζουμε τους κάλλους για 72h σε διάλυμα κολχικίνης (0,01-0,04%), πριν τη μεταφορά τους στο διάλυμα αναγέννησης και έτσι αυξάνεται το ποσοστό των διπλοειδών φυτών (Zhuang και Jia 1980).

2. Εμβαπτίζουμε τα αδέρφια κάτω από ασηπτικές συνθήκες σε διάλυμα κολχικίνης 0,25% για 3h το οποίο επιτρέπει στο 44% των φυτών να διπλασιάσουν τα χρωμοσώματά τους (Henry και De Buyser 1980 a)

3. Συνιστάται τα φυτά που έχουν μεγάλο αριθμό αδελφών να μεταχειρίζονται πριν την επιμήκυνσή τους. Τα φυτά πρώτα καθαρίζονται και οι ρίζες και τα φύλλα τους κόβονται. Τα διαφορετικά αδέρφια του ίδιου φυτού χωρίζονται και μεταχειρίζονται με εμβάπτιση του λαιμού για 4-5 ώρες σε διάλυμα κολχικίνης 0,25% στους 25-30°C. Αυτό επιτρέπει στο 75-90% των φυτών που μεταχειρίστηκαν να διπλασιάσουν τον χρωμοσωματικό τους αριθμό. Αυτή η μεταχείριση μπορεί να διεξαχθεί αρκετά αποδοτικά στο στάδιο φυταρίων με 3 αδέρφια.

Τα απλοειδή που δεν τα μεταχειριζόμαστε με κολχικίνη είναι πάντα στείρα. Τα αυθόρμητα διπλοειδή είναι γόνιμα εκτός από αυτά που έχουν χρωμοσωματικές ανωμαλίες. Τα απλοειδή που μεταχειριζόμαστε με κολχικίνη είναι μιξοπλοειδή.

Κάποια αδέρφια παραμένουν απλοειδή και στείρα. Άλλα είναι περισσότερο ή λιγότερο τέλεια διπλασιασμένα και έχουν κυμαινόμενη γονιμότητα. Τα πολύ λίγα τετραπλοειδή φυτά που προκύπτουν από αναγέννηση είναι στείρα ή μερικώς γόνιμα.

3.2 Ρύζι

3.2.1 Γενότυπος μητρικού φυτού

Ο γενότυπος των μητρικών φυτών επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό τον σχηματισμό φυτών από γύρη. Όχι μόνο στα είδη ενός γένους αλλά επίσης και στις ποικιλίες ίδιων ειδών έχουν εμφανισθεί διαφορετικές ανταποκρίσεις (Guha-Mukherjee 1973, Lin C.I. et al 1974, Oono 1975, Chen C.C. και Lin C.M. 1984).

Γενικώς οι ανθήρες των ποικιλιών του υποείδους *japonica*, είναι πολύ περισσότερο παραγωγικοί από αυτούς των ποικιλιών του υποείδους *indica*. Αξιοσημείωτα υψηλότερες παραγωγές φυτών που προέρχονται από γύρη, μπορούν να προκύψουν από πολλές ποικιλίες και υβρίδια του υποείδους *japonica* ακόμα και χωρίς προμεταχειρίσεις (Chen C.C. και Lin M.H. 1976, Hsu S.C. και Chen C.C. 1977, Chen C.M. et al 1982, Lee και Chen C.C. 1982, Chen C.C. et al 1983).

Ο σχηματισμός κάλλων και η αναγέννηση φυτών αποτελούν δύσκολα προβλήματα για τις περισσότερες ποικιλίες του *indica* (Guha-Mukherjee 1973, Chen C.C. και Lin M.H. 1976, Huang H.S. et al 1977). Οι μελέτες των Chen C.C. και Lin C.M. (1981) έδειξαν ότι το ποσοστό των ανθέρων που παράγουν κάλλους, η ικανότητα των κάλλων για διαφοροποίηση προς σχηματισμό φυτών, η αναλογία των πράσινων φυτών προς τα φυτά *albino* και ο χρωμοσωματικός αριθμός των αναγεννούμενων φυτών έχουν όλα σχέση με τον γενότυπο των φυτών που παρέχουν τους ανθήρες. Επομένως ένας τρόπος για να βελτιώσουμε την ανταπόκριση στην καλλιέργεια ανθέρων είναι η γενετική τροποποίηση του γενότυπου των μητρικών φυτών (Foroughi-Wehr et al 1982).

3.2.2 Φυσιολογική κατάσταση του μητρικού φυτού

Η ηλικία και οι συνθήκες ανάπτυξης των μητρικών φυτών και τα θρεπτικά στοιχεία που του παρέχουμε είναι σημαντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την ανδρογένεση (Dunwell 1976, Sunderland 1978, Foroughi-Wehr και Mix 1979, Tsay 1981).

Αξιοσημείωτες διαφορές στην ανταπόκριση ανθέρων έχουν παρατηρηθεί μεταξύ φυτών που αναπτύσσονται κατά την διάρκεια διαφορετικών μηνών του χρόνου (Tsai και Lin M.H. 1977, Hu C. et al 1978 c, Chaleff και Stolarz 1981). Αυτές οι εποχιακές διαφοροποιήσεις στην ανταπόκριση των ανθέρων μπορούν να αποδοθούν στη φυσιολογική κατάσταση του μητρικού φυτού. Η οποία επηρεάζεται από περιβαλλοντικούς παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η φωτοπερίοδος και η ένταση του

φωτός. Είναι γενικώς αποδεκτό ότι τα φυτά που χρησιμοποιούνται για καλλιέργεια ανθέρων θα πρέπει να έχουν αναπτυχθεί κάτω από ιδανικές συνθήκες (Collins 1977, Nitsch et al 1982). Αν και κάποιες περιβαλλοντικές αντιξοότητες (stress) έχουν βρεθεί ωφέλιμες για την παραγωγή φυτών από γύρη (Sunderland 1978).

Οι ιδανικές συνθήκες για την ανάπτυξη διαφορετικών ποικιλιών ενός είδους πιθανώς διαφέρουν. Συμπερασματικά οι ανθίρες θα πρέπει να συλλέγονται από φυτά που τους παρέχεται η κατάλληλη θρέψη και διατηρούνται σε εύρωστα και υγιή.

3.2.3 Στάδιο συλλογής των ανθέρων

Οι Chen C.C. και Lin M.H. (1976) παρατήρησαν ότι οι ανθίρες που συλλέγονται και καλλιεργούνται στην αρχή της περιόδου άνθισης είναι περισσότερο παραγωγικοί από αυτούς που συγκομίζονται στο τέλος της περιόδου.

3.2.4 Στάδιο ανάπτυξης της γύρης

Το στάδιο ανάπτυξης της γύρης κατά την στιγμή της αφαίρεσης των ανθέρων και της καλλιέργειας είναι ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει την ανδρογένεση. Έχει αποδειχθεί ότι η παραγωγή εμβρύων ή κάλλου ως ανταπόκριση στην καλλιέργεια των ανθέρων συμβαίνει μόνο κατά την διάρκεια μιας σύντομης περιόδου της μικροσποριογένεσης και το ιδανικό στάδιο ανταπόκρισης διαφέρει για κάθε είδος (Sunderland και Dnwell 1977, Sunderland 1980).

Η σχέση μεταξύ του σταδίου της γύρης και της παραγωγής φυτών από γύρη στο ρύζι έχει μελετηθεί από τον C.C.Chen (1976, 1977).

Αυτή η έρευνα έδειξε ξεκάθαρα ότι η μέγιστη ανταπόκριση συμβαίνει στο μέσο του σταδίου των αδιαίρετων πυρήνων των μικροσπορίων. Πριν ή μετά από αυτό το στάδιο η ανταπόκριση μειώνεται σε μεγάλο βαθμό. Επιπλέον η ικανότητα των κάλλων για αναγέννηση φυτών και η αναλογία των πράσινων προς τα φυτά albino που αναγεννούνται σχετίζεται με το στάδιο της γύρης. Οι κάλλοι που προέρχονται από μικροσπόρια που είναι μεγαλύτερα από το ιδανικό στάδιο έχουν την τάση να εμφανίζουν χαμηλότερη ικανότητα για αναγέννηση φυτών και παράγουν περισσότερα albino φυτά από τους κάλλους που προέρχονται από μικροσπόρια στο ιδανικό στάδιο ανταπόκρισης (C.C.Chen 1977, Genovesi και Magill 1979).

Αρκετοί παράγοντες μπορούν να προκαλέσουν αλλαγή στο ιδανικό στάδιο ανταπόκρισης. Στο ρύζι η μέγιστη ανταπόκριση μεταβάλλεται στο αρχικό στάδιο των

αδιαίρετων πυρήνων όταν η συγκέντρωση της ζαχαρόζης του καλλιεργητικού μέσου αυξάνεται από 6% σε 9% (C.C.Chen 1978).

Η κυτολογική εξέταση των μικροσπορίων την οποία μεταχειρίστηκε ο C.C.Chen (1976, 1977) είναι η περισσότερο αξιόπιστη μέθοδος για να αναγνωρίσουμε το στάδιο των ανθέρων αλλά αυτή η διαδικασία είναι πολύ κουραστική και χρονοβόρα για να την εφαρμόσουμε σε καλλιέργειες με μεγάλο αριθμό φυτών που χρησιμοποιούνται σε βελτιωτικούς σκοπούς. Άλλα κριτήρια που μπορούν να χρησιμοποιηθούν είναι : 1) Η απόσταση μεταξύ των ωτίων του πρώτου φύλλου και του αμέσως από κάτω του (Oono 1975, Chen C.C. και Chen C.M. 1979, Chaleff και Stolarz 1981). 2) Το χρώμα και το μέγεθος των σταχυδίων και των ανθέρων (C.C.Chen και C.M.Chen 1979). 3) Η υφή των σταχυδίων.

Αυτές οι μέθοδοι όταν συνδυαστούν και μετά από κάποια εξάσκηση μπορούν να είναι αρκετά ακριβείς.

3.2.5 Προμεταχειρίσεις των ανθέρων

Η επίδραση της προμεταχείρισης χαμηλών θερμοκρασιών στο σχηματισμό κάλλων και στην αναγέννηση φυτών στην καλλιέργεια ανθέρων ρυζιού έχει μελετηθεί από αρκετούς ερευνητές. Ο τρόπος με τον οποίο οι ανθήρες μεταχειρίζονται καθώς και η θερμοκρασία και η διάρκεια της προμεταχείρισης ποικίλλουν αλλά τα αποτελέσματα σε όλες τις περιπτώσεις ήταν θετικά.

Η υψηλότερη αύξηση στην ανταπόκριση ανθέρων επιτεύχθηκε από τους Genovesi και Magill (1979), οι οποίοι μεταχειρίστηκαν τους ανθήρες με ήπιο θερμοκρασιακό σοκ (10 - 13° C) για 10 έως 14 ημέρες. Αν και κάποια αύξηση έχει βρεθεί σε ανθήρες που αποθηκεύονται στους 4°C ή σε χαμηλότερες θερμοκρασίες (Cornejo-Martin και Primo Millo 1981), αυτές οι συνθήκες θεωρούνται πολύ ακραίες για την επίτευξη της ιδανικής ανταπόκρισης στο ρύζι (Genovesi και Magill 1979). Σχετικά μεγαλύτερης διάρκειας μεταχείριση (8 έως 15 ημέρες) φαίνεται να είναι καλύτερη από τις σύντομες μεταχειρίσεις (2 έως 4 ημέρες). Παρατεταμένη κρύα μεταχείριση (μεγαλύτερη των 15 ημερών) έχει ως αποτέλεσμα να είναι πιο δύσκολη η διαφοροποίηση του κάλλου (Y.Chen et al 1982) και να σχηματίζει περισσότερα φυτά albino (Genovesi και Magill 1979, Zapata et al 1982). Η φυσιολογική κατάσταση του μητρικού φυτού (Chaleff και Stolarz 1981) και το στάδιο ανάπτυξης της γύρης (Sunderland 1978) επίσης επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα της μεταχείρισης.

Επιπροσθέτως με την κρύα μεταχείριση άλλες προμεταχειρίσεις όπως : οι υψηλές θερμοκρασίες (Keller και Armstrong 1978, 1979), η τοποθέτηση των ανθέρων σε υψηλής υγρασίας περιβάλλον (Dunwell 1981a), βρέθηκαν επίσης ωφέλιμες για το έμβρυο και την παραγωγή φυταρίων. Αυτές οι ανακαλύψεις μας οδήγησαν στην ιδέα ότι η φάση επαγωγής είναι μεγάλης σημασίας στην ανδρογένεση (Sunderland 1980) και αυτή η φάση είναι πιθανόν ανεξάρτητη της θρέψης (Dunwel 1981b).

3.2.6 Θρεπτικό μέσο

3.2.6.1 Βασικά διαλύματα

Αν και η φάση επαγωγής της ανδρογένεσης μπορεί να είναι ανεξάρτητη της θρέψης. Οι συνεχιζόμενες διαιρέσεις των επαγόμενων μικροσπορίων για τον σχηματισμό των εμβρύων ή κάλλων απαιτεί την παρουσία κατάλληλων θρεπτικών στοιχείων στο καλλιεργητικό μέσο (J.P.Nitsch 1969, C.C.Wang et al 1974). Ο Chu et al (1976) ανέπτυξε το μέσο N6 το οποίο αποδείχτηκε πολύ καλό για την καλλιέργεια ανθέρων ρυζιού (Chu 1978, Genovesi και Magill 1979, Chen L.J. et al 1982, Tsay et al 1982).

3.2.6.2 Στερεή ή υγρή καλλιέργεια

Έχει γίνει φανερό από πολλές μελέτες ότι οι ανθίρες σε υγρό μέσο συμπεριφέρονται καλύτερα από ότι σε στερεοποιημένο με άγαρ μέσο (Wernicke και Kohlenbach 1976, Sunderland 1978).

3.2.6.3 Ζαχαρόζη

Οι γνώμες για το ποια είναι η ιδανική συγκέντρωση ζαχαρόζης για την καλλιέργεια ανθέρων ρυζιού ποικίλουν. Ο Chen C.C. (1978) αναφέρει ότι ο συνδυασμός 6% ζαχαρόζης στο διάλυμα σχηματισμού κάλλου και 3% ζαχαρόζη στο διάλυμα αναγέννησης φυτών έδωσε το μεγαλύτερο ποσοστό σχηματισμού κάλλου και πράσινων φυτών. Κάποιοι ερευνητές πιστεύουν ότι 6% είναι πολύ υψηλό για ανάπτυξη και διαφοροποίηση του κάλλου. Επομένως συστήνουν συγκεντρώσεις 4% έως 5% (Huang H.S. et al 1977, Chu 1978, Chaleff και Stolarz 1981).

Ο λόγος που απαιτούνται υψηλές συγκεντρώσεις ζαχαρόζης δεν είναι γνωστός. Δύο μελέτες στην καλλιέργεια ανθέρων ρυζιού δείχνουν ότι η οσμωτική πίεση του

θρεπτικού μέσου είναι τουλάχιστον μερικώς υπεύθυνη. (Wang C.C. et al 1974, Chaleff και Stolarz 1981).

Εάν αυτό αληθεύει τότε η ιδανική συγκέντρωση ζαχαρόζης είναι πιθανόν να επηρεάζεται από τα συστατικά του θρεπτικού μέσου όπως τα μεταλλικά άλατα.

Έχει αναφερθεί ότι υψηλή συγκέντρωση ζαχαρόζης εμφανίζει διαφορετική προωθητική επίδραση στους ανθήρες που βρίσκονται σε διαφορετικό στάδιο ανάπτυξης (C.C.Chen 1978). Επομένως η ιδανική συγκέντρωση ζαχαρόζης μπορεί να μεταβάλλεται ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης των μικροσπορίων.

3.2.6.4 Ρυθμιστές ανάπτυξης

Τα πιο βασικά συστατικά στο θρεπτικό μέσο της καλλιέργειας ανθήρων ρυζιού είναι οι αυξίνες και οι κυτοκινίνες. Το 2,4-D θεωρείται ο μόνος ρυθμιστής ανάπτυξης που είναι αναγκαίος για την ανάπτυξη *in vitro* των μικροσπορίων του ρυζιού. Πάντοτε περιλαμβάνεται στο θρεπτικό μέσο είτε μόνο του ή σε συνδυασμό με κυτοκινίνη (συχνά κινετίνη) και κάποια άλλη αυξίνη ή σε συνδυασμό με κάποια άλλη αυξίνη (Niizeki και Oono 1968, Ham 1969, Nishi και Mitsuoka 1969, Guha et al 1970, Iyer και Raina 1972, Woo και Tung 1972, Guha-Mukherjee 1973, Wang C.C. et al 1974). Οι κυτοκινίνες δεν θεωρούνται αναγκαίες για την αναγέννηση φυτών (Wang C.C. et al 1974, Oono 1975, Chu 1982b).

Το γεγονός ότι το 2,4D έχει αναχαιτιστική δράση στην διαφοροποίηση του κάλλου και ότι μπορεί να αντικατασταθεί από το NAA οι Niizeki και Oono (1971) ήταν οι πρώτοι που το απέδειξαν. Μελέτες που διεξήχθησαν αργότερα απέδειξαν ότι η κυτοκινίνη απαιτείται για την επίτευξη κάλλου με υψηλή μορφογενετική δυνατότητα (Chen C.C. 1977, Chaleff και Stolarz 1981, Lee και Chen C.C. 1982).

Η επίδραση των 2,4D, NAA και κινετίνη στο σχηματισμό κάλλου και στην αναγέννηση φυτών στην καλλιέργεια ανθήρων ρυζιού έχει εξετασθεί σε σημαντικό βαθμό από τον C.R. Huang et al (1985).

Το φυτικό υλικό που χρησιμοποίησε στην μελέτη του ήταν μια διπλασιασμένη απλοειδή σειρά της ποικιλίας Tainan 5 (Lin M.H. 1979) έτσι ώστε να εξαλείψει την γενοτυπική επίδραση. Ανθήρες στο μέσο του σταδίου των αδιαιρέτων μικροσπορίων καλλιεργήθηκαν στο διάλυμα N6 το οποίο συμπληρώθηκε με διάφορους συνδυασμούς των τριών ρυθμιστών ανάπτυξης. Ο κάλλος που σχηματίστηκε μεταφέρθηκε σε ένα

τύπο διαλύματος που ήταν MS το οποίο συμπληρώθηκε με 2mg/l Κινετίνη και 0,5mg/l NAA. Τα συμπεράσματα που εξάγονται από τα πειραματικά δεδομένα είναι :

1. Για ικανοποιητική παραγωγή κάλλου υψηλής μορφογενετικής δυνατότητας και οι αυξίνες και οι κυτοκινίνες είναι αναγκαίες στο διάλυμα σχηματισμού κάλλου.

2. Οι αυξίνες 2,4D και NAA είναι ίσης ικανότητας στην προώθηση μικροσπορίων προς σχηματισμό κάλλου. Ο κάλλος που σχηματίζεται με παρουσία του 2,4D είναι λιγότερο ικανός για αναγέννηση φυτών εάν συγκριθεί με αυτόν που σχηματίζεται σε μέσο με NAA.

3. Η ιδανική συγκέντρωση του NAA στο διάλυμα σχηματισμού κάλλου φαίνεται ότι είναι 2mg/l. Με αυτή την συγκέντρωση ο σχηματισμός κάλλου και η αναγέννηση φυτών αυξάνει με την αύξηση συγκέντρωσης της κινετίνης. Πολύ υψηλή συγκέντρωση κινετίνης (2mg/l) μπορεί να έχει ως αποτέλεσμα την παραγωγή περισσότερων φυτών albino. Ο καλύτερος συνδυασμός ρυθμιστών ανάπτυξης σύμφωνα με αυτή την μελέτη είναι 2mg/l NAA και 1mg/l κινετίνη.

3.2.6.5 Οργανικά συμπληρώματα

Οργανικές ουσίες συνήθως προστίθενται στο θρεπτικό μέσο καλλιέργειας ανθέρων για να παρέχουν οργανική πηγή νιτρικών ή για να το χορηγήσουν αναγκαία αλλά αδιευκρίνιστα συστατικά. Ο Nitsch C. (1974) τονίζει την σπουδαιότητα της ινοσιτόλης, σερίνης και γλουταμίνης στο θρεπτικό μέσο για καλλιέργεια απομονωμένων μικροσπορίων. Είναι αμφισβητήσιμο ότι αυτά τα συστατικά είναι αναγκαία στην καλλιέργεια ανθέρων. Είναι γεγονός ότι μερικά από αυτά αναχαιτίζουν ελαφρώς τον σχηματισμό κάλλου (Chaleff και Stolarz 1981, Xu Z.H και Sunderland 1981).

Ορισμένοι ερευνητές (Guha et al 1970, Guha-Makerjee 1973, Wang C.C. et al 1974, Oono 1975, Liang H.M.1978) ισχυρίζονται (αλλά χωρίς επαρκή δεδομένα) ότι διάφορα φυσικά εκχυλίσματα όπως το γάλα καρύδα, εκχύλισμα ζύμης, εκχυλίσματα πατάτας είναι ωφέλιμα για τον σχηματισμό κάλλου ή για την αναγέννηση φυτών (πολλές φορές και για τα δύο) στην καλλιέργεια ανθέρων ρυζιού.

Μελέτες που έγιναν αργότερα απέδειξαν ότι υψηλά ποσοστά σχηματισμού κάλλου και αναγέννησης φυτών, μπορούν να επιτευχθούν σε μέσα που δεν περιλαμβάνουν κανένα από αυτά τα συμπληρώματα (Chen C.C. 1977, Chaleff και Stolarz 1981, Lee και Chen C.C.1982, Chen C.M. et al 1982, Tsay et al 1982, Zapata et al 1982). Στις

περιπτώσεις που επιδιώκουμε να υπάρχει η δυνατότητα επαναληψιμότητας των πειραμάτων για έλεγχο των αποτελεσμάτων μας, καλό είναι να αποφεύγεται η προσθήκη μη «στανταρισμένων» συμπληρωμάτων.

3.3 Καπνός

3.3.1 Προμεταχείριση οφθαλμών

Οι ανθικοί οφθαλμοί πρέπει να συλλέγονται μόλις η στεφάνη εμφανιστεί από τον κάλυκα (Nitsch και Nitsch 1969).

Βάζουμε τους οφθαλμούς που έχουμε αφαιρέσει σε μια σακούλα πολυαιθυλενίου και την βάζουμε μέσα σε τριβλίο. Νερό δεν είναι ανάγκη να υπάρχει μέσα στο τριβλίο αλλά αν υπάρχει πρέπει να προσέξουμε να μην έρθει σε επαφή με τους οφθαλμούς. Αποθηκεύουμε τα τριβλία τα οποία τα έχουμε κλείσει με Parafilm στο σκοτάδι στους 7-9°C (Sunderland και Roberts, 1979).

Αποθήκευση των οφθαλμών που έχουμε αφαιρέσει στους 7°C για 14-21 ημέρες αυξάνει την παραγωγή εμβρύων 10-15% (Sunderland 1978). Υψηλότερες θερμοκρασίες είναι επίσης αποτελεσματικές εφόσον συντομεύσουμε την διάρκεια προμεταχείρισης. Προμεταχειρίσεις για 7 ημέρες στους 14°C, 4 ημέρες στους 20°C ή 2 ημέρες στους 25°C (Sunderland 1982) αποδείχτηκαν αποτελεσματικές. Πρέπει να επισημάνουμε ότι όσο αυξάνονται οι θερμοκρασίες βαθμιαία ο χρόνος γίνεται περισσότερο σημαντικός.

3.3.2 Απολύμανση οφθαλμών

Βυθίζουμε τους οφθαλμούς για 10-15 λεπτά σε διάλυμα υποχλωριώδες ασβεστίου (1% χλωρίνη) το οποίο περιέχει μια σταγόνα Tween-20. Ξεβγάζουμε τους οφθαλμούς με αποστειρωμένο νερό και απομονώνουμε τους ανθήρες.

3.3.3 Στάδιο ανθήρων

Γενικώς οι ανθήρες του καπνού ανταποκρίνονται σε μήκος στεφάνης που κυμαίνεται από 15-25mm. Το στάδιο ανάπτυξης που σχετίζεται με το μήκος ποικίλλει ανάλογα με τον γενότυπο και ιδιαίτερω ανάλογα με τις συνθήκες ανάπτυξης των φυτών.

Για επαναλήψιμα αποτελέσματα οι ανθήρες του καπνού ανταποκρίνονται καλύτερα όταν τα μικροσπόρια έχουν υποστεί την πρώτη μιτωτική διαίρεση η οποία οδηγεί στον σχηματισμό γυρεοκόκκων (Sunderland και Wicks 1969).

3.3.4 Καλλιέργεια με άγαρ

Τοποθετούμε τους ανθήρες που είναι στο κατάλληλο στάδιο, στο θρεπτικό υπόστρωμα. Κλείνουμε τα τριβλία με Parafilm. Οι συνθήκες επαγωγής είναι σκοτάδι στους 25-28°C.

Χρησιμοποιούμε το N6 (Chu et al 1978) ή το MS (Murashige και Skoog 1962). Ζαχαρόζη 20.000 ή 30.000mg/l και άγαρ 8.000 mg/l. Ρυθμίζουμε το PH στο 5,8 πριν αποστειρώσουμε το θρεπτικό μέσο. Ο ενεργός άνθρακας είναι ωφέλιμος στην απορρόφηση αναχαιτιστών που προκύπτουν από το άγαρ (Kohlenbach και Wernicke 1978).

Μόλις τα εμβρυοειδή είναι ορατά μεταφέρουμε την καλλιέργεια στο φως. Συνιστάται θερμοκρασία 20-25°C και φωτοπερίοδος 16 ωρών. Με αυτές τις συνθήκες σύντομα τα εμβρυοειδή θα αναπτύξουν φυλλάρια και ρίζες.

3.3.5 Εφαρμογές της καλλιέργειας ανθέρων του καπνού

Αρκετές σειρές διπλασιασμένων απλοειδών έχουν επιλεγθεί λόγω : βελτιωμένης παραγωγής, πρώιμης άνθισης, μεγαλύτερης αντοχής σε ασθένειες και σε κάποιες περιπτώσεις καλύτερης ποιότητας στο κάπνισμα. Αυτές οι σειρές έχουν αναπτυχθεί και διοχετευθεί στην βιομηχανία (Nakamura et al 1974. Atanassov et al 1978. Institute of Tobacco, Shantung and institute of Botany, Peking 1974. Institute of Tobacco Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences 1974, 1978).

Σε πολλές περιπτώσεις τα διπλασιασμένα απλοειδή έδωσαν ομοιόμορφους απογόνους μετά από αυτογονομοιοποίηση οι οποίοι παρέμειναν γενετικά σταθεροί για αρκετές γενεές και είχαν την ίδια προσαρμοστικότητα στο περιβάλλον αν και παρατηρήθηκε μείωση ως προς την ευρωστία και το μέγεθος (Burk και Matzinger 1976, Arcia et al 1978).

Ο Nakamura et al (1974) δημιούργησε τρεις υποσχόμενες σειρές καπνού διαμέσου καλλιέργειας ανθέρων υβριδίων μεταξύ των σειρών MC-1610 και Coker-139. Οι νέες σειρές είχαν μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στις βακτηριώσεις χωρίς να έχουν χάσει τα αγρονομικά και χημικά χαρακτηριστικά της MC-1610.

Με την χρησιμοποίηση της καλλιέργειας ανθέρων οι Κινέζοι επιστήμονες ανέπτυξαν και έδωσαν στο εμπόριο νέες βελτιωμένες ποικιλίες καπνού (Hu et al 1978).

3.4 Καλαμπόκι

3.4.1 Εισαγωγή

Το καλαμπόκι είναι ένα από τα κύρια σιτηρά. Καλλιεργείται ευρέως και έχει πολλές χρήσεις και δίνει μεγάλες αποδόσεις. Τα υβρίδια που προκύπτουν με διασταύρωση ήταν μια αποτελεσματική προσέγγιση για την βελτίωση της παραγωγής, αλλά συνήθως απαιτούνται 4-6 χρόνια για την παραγωγή μιας καθαρής σειράς. Μέσω της καλλιέργειας ανθήρων/γύρης αυτή η χρονική διάρκεια μπορεί να μειωθεί αξιοσημείωτα. Χρησιμοποιώντας αυτή την μέθοδο απλοειδή έχουν παραχθεί σε ένα μεγάλο αριθμό καρποφόρων ειδών (Bajaj 1983c).

Η παραγωγή απλοειδών φυτών από καλλιεργούμενους ανθήρες *in vitro* θεωρείται μια αποτελεσματική μέθοδος για την επίτευξη καθαρών σειρών του καλαμποκιού. Συνεπώς προσέλκυσε την προσοχή των βελτιωτών που εργάζονταν με το καλαμπόκι. Ο Murakami et al (1972) για πρώτη φορά επέτυχε την δημιουργία κάλλων από τους ανθήρες αλλά δεν πέτυχε την αναγέννηση φυτών. Στην Κίνα φυτά καλαμποκιού προερχόμενα από γύρη είχαν επιτευχθεί από το 1975 (Research Group 401, 1975, Institute of Maize Research 1977, Kuo et al 1978). Αυτά τα φυτά είχαν και τα δύο αναπαραγωγικά όργανα (ανδρείο και γυναικείο) και παρήγαγαν στάχεις με καλούς σπόρους μέσω αυτογονιμοποίησης (Institute of Maize Research 1977). Από τότε σημαντική πρόοδος έγινε στην κυτολογική μελέτη της ανδρογένεσης, στον χρωμοσωματικό διπλασιασμό και στην επιλογή των απογόνων της καλλιέργειας (J.Wu et al 1980).

Περισσότερες από 100 καθαρές σειρές έχουν προκύψει από 30 διαφορετικούς συνδυασμούς (J.Wu et al 1983). Επιπλέον εκατοντάδες διασταυρώσεις συνδυασμών έχουν γίνει από αυτές τις καθαρές σειρές. Οι περισσότερες διασταυρώσεις εκδηλώνουν το φαινόμενο της ετέρωσης και αυτό είναι ένα πολύ ενθαρρυντικό γεγονός.

3.4.2 Καλλιέργεια ανθήρων και επαγωγή των εμβρύων γύρης

Οι λαμβανόμενοι ανθήρες στο στάδιο που αναφέρεται στο μέσο των αδιαίρετων πυρήνων γύρης, καλλιεργούνται στο θρεπτικό μέσο N6, το οποίο συμπληρώνεται με 2,4D (2mg/l), Κινετίνη (1mg/l), CH (υδρολυμένη καζεΐνη) 500mg/l, ενεργό άνθρακα 5% και ζαχαρόζη 15%. Μετά από αρκετές ημέρες μεγεθύνονται και αρχίζουν να παίρνουν χρώμα προς το καφέ. Οι κάλλοι και τα εμβρυοειδή αρχίζουν να

εμφανίζονται περίπου 30 ημέρες μετά τον εμβολιασμό. Φτάνουν στον μέγιστο αριθμό σε 35-45 ημέρες και συνεχίζουν να παράγουν έμβρυα για 80-90 ημέρες. Αυτά αναπτύσσονται έξω από τους ανθήρες κυρίως από την πλευρά διάρρηξης των ανθέρων. Τα εμβρυοειδή που αναπτύσσονται ανά ανθήρα είναι από 1 έως 7. Η πλειονότητα των ανθέρων παράγουν μόνο εμβρυοειδή ενώ κάποιοι παράγουν κάλλους ή και τα δύο. Η αναλογία των εμβρυοειδών και των κάλλων ποικίλλει και εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το υλικό και το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιούμε.

Το ποσοστό των εμβρυοειδών ήταν παρόλα αυτά 80%. Τα εμβρυοειδή γύρης έχουν διαφορές στην μορφολογία, κάποια εμβρυοειδή υφίστανται όλα τα στάδια της ανάπτυξης ομοιάζοντας με αυτά στην φύση ενώ τα βασικά μορφολογικά όργανα (φύλλα, κοτυληδόνες, ριζίδια) διαφοροποιούνται αργότερα. Τα περισσότερα από αυτά εντούτοις αναπτύσσονται ανώμαλα με δύο ή περισσότερους κοτυληδόνες. Κάποιοι κοτυληδόνες αναπτύσσονται σε σωληνοειδείς σχηματισμούς. Όταν τα εμβρυοειδή μεταφερθούν στο διάλυμα διαφοροποίησης N6 στο οποίο έχει προστεθεί κινετίνη (1mg/l) CH (υδρολυμένη καζεΐνη) 500mg/l, ενεργός άνθρακας 5% και ζαχαρόζη 5-6% αναπτύσσονται κατ' ευθείαν σε φυτάρια. Περιστασιακά εμφανίζονται και φυτά albino.

Δυο τύποι κάλλων σχηματίστηκαν : ο ένας ήταν συμπαγής και δύσκολος στην ανακαλλιέργεια ενώ ο άλλος ήταν χαλαρός και εύθραστος. Όταν καλλιεργήθηκε ο δεύτερος σε διάλυμα διαφοροποίησης σχηματίστηκαν οφθαλμός, ρίζα ή εμβρυοειδή. Τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των εμβρυοειδών που προέρχονται από κάλλους ήταν παρόμοια με αυτών που παράγονταν κατευθείαν από την γύρη. Μέσω συνεχόμενων (επαναλαμβανόμενων) ανακαλλιεργειών ο κάλλος τείνει να χάνει βαθμιαία την ικανότητα σχηματισμού εμβρυοειδών. Κυτολογική εξέταση των άκρων της ρίζας των φυτών γύρης έδειξε ότι ήταν απλοειδή (n=10).

3.4.3 Στάδιο ανάπτυξης της γύρης

Το στάδιο ανάπτυξης των γυρεοκόκκων εντός των ανθέρων κατά τον εμβολιασμό επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την επαγωγή εμβρυοειδών ή κάλλων.

Η συχνότητα επαγωγή είναι ιδανική όταν η γύρη είναι στο στάδιο στο μέσο των αδιαιρέτων πυρήνων. Δηλαδή όταν η γύρη είναι σφαιροειδής με πυρήνες στο κέντρο και έντονο κυτόπλασμα χωρίς μικρά χυμοτόπια.

Πίνακας 3.1 Επίδραση τηςμανιτόλης, NaCl και KCl (αντικαθιστούν μερικώς τη ζάχαρη) στην επαγωγή κάλλων ή εμβρυοειδών

Sucrose (%)	12	9	6	3	9	6	3	9	6	3
NaCl		0.25	0.5	0.75						
KCl					0.33	0.66	0.99			
Mannitol								1.60	3.20	4
Αριθμός ανθέρων που εμβολιάζονται	850	850	950	950	900	900	900	1050	1000	1000
Αριθμός κάλλων που παράγονται	10	5	0	0	1	0	0	6	1	
Ποσοστό επαγωγής (%)	1.18	0.59			0.11			0.57	0.10	

Πίνακας 3.2: Επίδραση διαφόρων ρυθμιστών ανάπτυξης και άλλων συμπληρωμάτων

Αριθμός Πειράματος	Συμπληρώματα	Αριθμός ανθέρων που εμβολιάζονται	Αριθμός κάλλων & εμβρυοειδών που παράγονται	Ποσοστό Επαγωγής
I	N6 + 2,4-D (2) + kin (1)	724	2	0.28
II	N6 + 2,4-D (2) + kin (1) + CH (500)	1276	19	1.49
III	N6 + 2,4-D (2) + kin (1) + CH (500) + BA (2)	638	12	1.88
IV	N6 + 2,4-D (2) + kin (1) + CH (500) + BA (2) + VA (2)	277	4	1.80

Πίνακας 3.3: Η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων της κινετίνης και του 2,4 D στο ποσοστό επαγωγής των κάλλων ή εμβρυοειδών

Ρυθμιστές Ανάπτυξης	Συγκέντρωση mg/l.	Αριθμός ανθών που εμβολιάζονται	Αριθμός κάλλων & εμβρυοειδών που σχηματίζονται	Ποσοστό Επαγωγής
2,4-D	(0)	248	2	0.80
2,4-D	(0.4)	249	3	0.69
2,4-D	(2)	561	3	0.53
2,4-D	(8)	586	3	0.51
2,4-D	(16)	562	4	0.71
kin	(0.4)	451	3	0.66
kin	(1)	399	6	1.76
kin	(4)	564	3	0.54
kin	(8)	320	2	0.62
kin	(1.0) + 2,4 - D (0.4)	456	7	1.54
kin	(1.0) + 2,4 - D (2)	493	12	2.43
kin	(1.0) + 2,4 - D (8)	526	11	2.09
kin	(1.0) + 2,4 - D (16)	536	18	1.49

3.4.4 Ενεργός άνθρακας

Όταν το μέσο είχε εμπλουτιστεί με 0,5% ενεργού άνθρακα η αύξηση στην συχνότητα επαγωγής των εμβρυοειδών ή κάλλων ήταν φανερή.

Κυτολογικές παρατηρήσεις στους ανθήρες 15 ημέρες μετά τον εμβολιασμό έδειξαν ότι σε μέσο χωρίς ενεργό άνθρακα πολλές κυτταρώδεις μάζες σταμάτησαν να αναπτύσσονται και το κυτόπλασμα άρχισε να εκφυλίζεται. Σε μέσα που περιείχαν ενεργό άνθρακα πολλές περισσότερες κυτταρώδεις μάζες αναπτύχθηκαν και η ανάπτυξη των φυταρίων ήταν σθεναρή. Είναι πιθανόν οι τοξικές ουσίες που δεν ευνοούν την ανάπτυξη των κυτταρώδων μαζών στην καλλιέργεια ανθέρων να απορροφούνται από τον ενεργό άνθρακα (Anagnostakis 1974).

3.4.5 Επίδραση της συγκέντρωσης ζαχαρόζης

Συγκριτικά πειράματα (πιν. 3.1) διεξήχθησαν στα οποία 12% ζαχαρόζη συγκρίθηκε με την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων μανιτόλης, NaCl και KCl τα οποία αντικατέστησαν μερικώς την ζαχαρόζη για να μελετήσουμε περαιτέρω την σχέση μεταξύ της συγκέντρωσης ζαχαρόζης και την επαγωγή κάλλων γύρης.

Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι η συγκέντρωση 12% ζαχαρόζης ήταν η πιο αποτελεσματική ενώ σε όλες τις άλλες σειρές των πειραμάτων η συχνότητα επαγωγής ήταν πολύ χαμηλότερη. Επισημαίνουμε ότι η οσμωτική πίεση στα διαλύματα με τους αντικαταστάτες ήταν ίση με την οσμωτική πίεση σε διάλυμα με 12% ζαχαρόζη. Συμπεραίνουμε ότι η ζαχαρόζη εκτός του ότι ρυθμίζει την οσμωτική πίεση παίζει επίσης ρόλο στην διαφοροποίηση της γύρης, εξάλλου είναι η κύρια πηγή υδατανθράκων στο μέσο. Επομένως η γύρη του καλαμποκιού απαιτεί υψηλές συγκεντρώσεις ζαχαρόζης παρά ένα υψηλό οσμωτικό μέσο.

3.4.6 Η επίδραση διάφορων ρυθμιστών ανάπτυξης

Τα καλύτερα αποτελέσματα επιτεύχθηκαν όταν N6+2,4D (2mg/l + Κινετίνη (1mg/l) + BA (2mg/l + VA (2mg/l) + CH (500mg/l) + ζαχαρόζη 12-15% χρησιμοποιήθηκαν ως θρεπτικό μέσο.

Όπως βλέπουμε στον πίνακα 3.2 το διάλυμα χωρίς BA και VA (βιταμίνη Α) είχε λίγη επίδραση στην συχνότητα επαγωγής. Η επίδραση της υδρολυμένης καζεΐνης στην αύξηση του ποσοστού επαγωγής των κάλλων ή εμβρυοειδών είναι φανερή.

Στο διάλυμα επαγωγής το οποίο συμπληρώνεται με διάφορες συγκεντρώσεις 2,4D και κινετίνης τα εμβρυοειδή και οι κάλλοι παρακινήθηκαν σχεδόν σε όλες τις συγκεντρώσεις.

Σε μέσο χωρίς ορμόνες το ποσοστό επαγωγής ήταν 0,8%. Αυτό δείχνει ότι οι ενδογενείς ορμόνες του ανθήρα του καλαμποκιού, μπορούν να ικανοποιήσουν τις απαιτήσεις των γυρεοκόκκων. Επομένως οι εξωγενείς ορμόνες δεν είναι απολύτως απαραίτητες. Αλλά κάτω από συνθήκες με κατάλληλους συνδυασμούς ορμονών ευνοούν το ποσοστό επαγωγής και διαφοροποίησης για τους εξαγόμενους ανθήρες καλαμποκιού. Όταν χρησιμοποιήσαμε 2,4D ως την μοναδική ορμόνη και δοκιμάσαμε διάφορες συγκεντρώσεις (0,4, 2, 8, 16mg/l) δεν είχαμε μεγάλες διακυμάνσεις ως προς την επίδραση. Όταν χρησιμοποιήσαμε κινετίνη(1mg/l) ως η μοναδική εξωγενής ορμόνη το ποσοστό επαγωγής ήταν πολύ υψηλότερο από ότι στις άλλες περιπτώσεις και κανονικά φυτάρια μπορούσαν να παραχθούν. Ενώ στις άλλες συγκεντρώσεις που δοκιμάστηκαν (0,4, 4, 8mg/l) το ποσοστό επαγωγής των εμβρυοειδών ή κάλλων ήταν πολύ χαμηλό. Σε μερικά από αυτά μπόρεσαν να παραχθούν οφθαλμοί αλλά δεν είχαμε διαφοροποίηση ριζών.

3.4.7 Επίδραση του βασικού θρεπτικού μέσου

Για την καλλιέργεια του Yu-pei και Nan-kai No1, το No 6 βρέθηκε ότι είναι το καλύτερο θρεπτικό μέσο. Τα πειράματα απέδειξαν ότι όταν στο N6 προστίθενται 500 mg/l υδρολυμένη καζεΐνη, κινετίνη 1mg/l και 2,4D 2mg/l, ενεργός άνθρακας 0,5% και 15% ζαχαρόζη το ποσοστό επαγωγής των γυρεοφύτων αυξάνεται σε μεγάλο βαθμό. Το ποσοστό επαγωγής των εμβρυοειδών και κάλλων σε υγρή καλλιέργεια μπορεί να αυξηθεί δύο φορές από ότι σε ημιστερεή καλλιέργεια (Mu et al 1980).

Το ποσοστό επαγωγής αυξήθηκε αξιοσημείωτα μετά από προμεταχείριση των ανθέρων σε διάλυμα ζάχαρης 25% για 6-8 λεπτά πριν μεταφερθούν στο θρεπτικό μέσο (Xu L. και Jia S.1979).

3.4.8 Παρατηρήσεις στους απογόνους των γυρεοφύτων

Ο διπλασιασμός των χρωμοσωμάτων των γυρεοφύτων επιτεύχθηκε με κολχικίνη. Περισσότερες από 100 καθαρές σειρές έχουν προκύψει από 30 διαφορετικούς συνδυασμούς καλλιέργειας. Η καθαρή σειρά Qun Hua επιλέχθηκε από τον Wu J. et al (1983). Χρειάστηκε 1 χρόνος από την καλλιέργεια ανθέρων μέχρι τον σχηματισμό

της καθαρής σειράς. Με την χρησιμοποίηση συμβατικών βελτιωτικών μεθόδων ο σχηματισμός καθαρής σειράς απαιτεί 5-7 χρόνια. Επομένως η επιλογή καθαρών σειρών μέσω καλλιέργειας ανθέρων μπορεί να συντομεύσει σημαντικά τον χρόνο βελτίωσης.

3.5 Πατάτα

3.5.1 Εισαγωγή

Ένα από τα μεγαλύτερα εμπόδια στην βελτίωση της πατάτας είναι η τετραπλοειδής φύση της ($2n=4x=48$). Με τον σταθερώς αυξανόμενο αριθμό των βελτιωτικών σκοπών και την ανάγκη να επικεντρώσουμε τις προσπάθειές μας περισσότερο στα ποσοτικά από τα ποιοτικά κληρονομούμενα χαρακτηριστικά. Ο πληθυσμός των σποροφύτων που απαιτείται για την επιτυχή παραγωγή μιας νέας ποικιλίας, έχει μεγαλώσει σε τέτοια έκταση που η κλασική προσέγγιση των τετραπλοειδών βελτιωτικής επιλογής δεν είναι πλέον κατορθωτή. Εφόσον τα διπλασιασμένα οπλοειδή ($2n=2x=24$) μπορούν να παραχθούν παρθενογενετικά (Hougas και Peloquin 1957) προέκυψε η ιδέα (σκέψη) ότι η βελτίωση θα μπορούσε να εφαρμοστεί από ένα τετραπλοειδές επίπεδο σε ένα διπλοειδές επίπεδο (Hougas και Peloquin 1958, Chase 1963). Με τη χρήση του *S.phujera* η συχνότητα επαγωγής διπλοειδών μπορεί να αυξηθεί σε τέτοιο μέγεθος που η διαδικασία γίνεται εφαρμόσιμη. Θα μπορούσε να αυξηθεί περαιτέρω εάν χρησιμοποιούσαμε γονίδια σημαντήρες (Heimssen και Verdenius 1973).

Επιπροσθέτως στην παρθενογενετική προσέγγιση, δοκιμές έγιναν για τη μείωση του επιπέδου πλοειδίας ανδρογενετικά (Dunwell και Sunderland 1973, Irikura 1975a).

Η παραγωγή των διπλοειδών είναι μόνο το πρώτο βήμα στην μείωση του επιπέδου πλοειδίας της πατάτας. Με τον συνδυασμό παρθενογενετικής (Van Breukelen et al 1975) και ανδρογενετικής τεχνικής, ένας δεύτερος κύκλος χρωμοσωματικής μείωσης είναι δυνατός που έχει ως αποτέλεσμα το μονοπλοειδή πατάτας ($2n=x=12$) (Foughi-Wehr et al 1977, Wenzel and Sopory 1978, Sopory et al 1978).

Αυτή η δεύτερη μείωση καθιστά ικανό τον σχηματισμό ομοζυγών διπλοειδών και τετραπλοειδών της πατάτας με μία ή δύο ενδοδιπλασιασμούς.

Τα μονοπλοειδή είναι επομένως ένα κύριο μέρος του βελτιωτικού σχεδίου με τα οποία η ικανότητα βελτίωσης της πατάτας μπορεί να αυξηθεί (Wenzel et al 1979). Μπορούν να χρησιμοποιηθούν περαιτέρω για την παραγωγή ομοζύγου υλικού και για την παραγωγή τετραπλοειδών σπόρων υβριδίων (Wenzel et al 1982).

3.5.2 Προκαλλιέργεια των ανθέρων μητρικών φυτών

Το πιο σημαντικό είναι η φυσιολογική κατάσταση των ανθέρων των μητρικών φυτών.

Πρέπει τακτικά να εμβολιάζονται επάνω σε υποκείμενα τομάτας για να είμαστε σίγουροι ότι η σθεναρή άνθιση δεν θα επιβραδυνθεί από την κονδυλοποίηση.

Το υβρίδιο τομάτας της ποικιλίας *Supravite* που είναι ανθεκτικό στο ιό του μωσαϊκού του καπνού είναι πολύ χρήσιμο.

Τα φυτά θα πρέπει να κρατιούνται σε θερμοκήπιο το οποίο θα τα προστατεύει από τις αφίδες.

Η θερμοκρασία δεν θα πρέπει να ξεπερνάει τους 18°C με 15 ώρες φωτοπερίοδο. Χρησιμοποιούμε λάμπες OSRAM HQI οι οποίες στο σημείο ανάπτυξης των φυτών πρέπει να έχουν ένταση τουλάχιστον 10.000 Lux.

Η απόσταση μεταξύ της λάμπας και των φυτών θα πρέπει να είναι το ελάχιστο 1m για τις λάμπες των 400W και 1,5m για τις λάμπες των 1000W για να εμποδίσουμε πιθανή καταστροφή των μικροσπορίων από τη ζέστη.

3.5.3 Στάδιο ανάπτυξης των μικροσπορίων

Τα καλύτερα αποτελέσματα έχουν προκύψει χρησιμοποιώντας ανθήρες με μικροσπόρια στο τέλος του σταδίου του αδιαιρέτου πυρήνα.

Το μήκος των ανθέρων πρέπει να είναι 3-4mm το οποίο αντιστοιχεί σε μέγεθος ανθοφόρου οφθαλμού 5-6mm. Το μέγεθος των ανθοφόρων οφθαλμών εξαρτάται σε κάποιο βαθμό από τη θέση τους στην άνθιση. Τα νεαρά λουλούδια έχουν μεγάλους ανθοφόρους οφθαλμούς και σχετικά μικρούς ανθήρες ενώ τα μεγαλύτερα λουλούδια κατέχουν σχετικά μεγάλους ανθήρες σε μικρούς ανθοφόρους οφθαλμούς. Επιπλέον το μέγεθος του ανθοφόρου οφθαλμού επηρεάζεται από τον γενότυπο. Επομένως περιστασιακά κάποιοι ανθήρες πρέπει να τοποθετηθούν στο διάλυμα του Carnoy και να χρωματιστούν με ακετοκαρμίνη για να βεβαιωθούμε για το στάδιο των μικροσπορίων.

3.5.4 *In vitro* καλλιεργητική διαδικασία

Αφού συλλέξουμε τους ανθοφόρους οφθαλμούς τους διατηρούμε για 48 ώρες σε ένα στεγνό δοκιμαστικό σωλήνα στο σκοτάδι και στο ψυγείο σε θερμοκρασία 6-9°C. Κατόπιν οι ανθοφόροι οφθαλμοί απολυμαίνονται επιφανειακά σε υδατικό διάλυμα αιθανόλης 70% με 0,1% Tween 20 και ξεπλένονται τρεις φορές με αποστειρωμένο νερό. Μετέπειτα λαμβάνουμε τους ανθήρες. Οι ανθήρες τριών ανθοφόρων οφθαλμών τοποθετούνται σε γυάλινο τριβλίο διαμέτρου 6cm. Η επιλογή πλαστικού ή γυάλινου

τριβλίου εξαρτάται κυρίως από τις ειδικές συνθήκες στο χώρο καλλιέργειας. Οι υδροποιημένοι υδρατμοί δρουν επιζήμια εφόσον είχαν σχηματιστεί σε πλαστικό τριβλίο. Όταν δεν σχηματίζονται υδροποιημένοι υδρατμοί το είδος του δοχείου δεν παίζει ρόλο.

3.5.5 Καλλιεργητικά μέσα

Γενικώς τα βασικά μέσα των Nitsch και Nitsch (1969) των Murashige και Skoog (1962) ή των Linsmaier και Skoog (1965) χρησιμοποιούνται για την επαγωγή ανάπτυξης των μικροσπορίων.

Τα σημαντικά συστατικά στα βασικά διαλύματα είναι η συγκέντρωση της ζαχαρόζης, χρησιμοποιούμε από 3%-9% αλλά το ιδανικό είναι 6% και οι ρυθμιστές ανάπτυξης. Η προσθήκη 3-5 g/l ενεργού άνθρακα ήταν ωφέλιμη.

Η προσθήκη αυξινών δεν είναι αναγκαία αλλά συνήθως 1mg/l IAA συνιστάται. Περισσότερο σημαντική είναι η κυτοκινίνη. Στις περισσότερες περιπτώσεις 1mg/l BAP είναι η καλύτερη συγκέντρωση για να προκαλέσουμε επαγωγή. Αν και κάποιοι γενότυποι που αντιδρούν δύστροπα απαιτούν ζεατίνη ακόμα και για την πρώτη επαγωγή (0,1-0,5 mg/l). Η ζεατίνη μπορεί να αντικατασταθεί ισάξια από το BAP εφόσον άλλες παράμετροι της καλλιέργειας συντονιστούν καλύτερα.

Οι συνθήκες επαγωγής είναι 20-25°C με φωτοπερίοδο 15 ωρών και ένταση φωτός 5.000 lux. Εντός 6-8 εβδομάδες μακροσκοπικοί σχηματισμοί γίνονται ορατοί οι οποίοι μεταφέρονται σε μέσο μορφογένεσης. Η αναλογία εμβρυοειδών προς κάλλους ελέγχεται κυρίως γενετικά αλλά επηρεάζεται επίσης φυσιολογικά, για παράδειγμα από την εποχή.

Το θρεπτικό μέσο μορφογένεσης περιλαμβάνει τα βασικά συστατικά του M.S. Ζεατίνη 0,3mg/l συστήνεται για τα περισσότερα είδη (για γενότυπους με υψηλή ικανότητα αναγέννησης μπορεί να αντικατασταθεί από 0,5mg/l BAP). Η ζαχαρόζη μειώνεται σε 30g/l και ο ενεργός άνθρακας δεν είναι αναγκαίος. Για τα εμβρυοειδή αυτό το διάλυμα είναι αρκετό ενώ για κάλλους πρέπει να προστεθεί 10% γάλα καρύδας. Η οργανογένεση από κάλλους μπορεί να αρχίσει ακόμα και μετά από 1 χρόνο ανακαλλιέργειας. Κατά την διάρκεια αυτού του χρόνου οι κάλλοι θα πρέπει να μεταφέρονται σε νέο διάλυμα κάθε 4-6 εβδομάδες. Από τα μικροσπόρια μη μορφογενετικοί κάλλοι δεν έχουν ακόμα προκύψει. Τα νεαρά φυτάρια πολλαπλασιάζονται κανονικά με την καλλιέργεια της κορυφής του βλαστού σε B5

μέσο (Gamborg et al 1968) το οποίο περιέχει μόνο 0,5 mg/l BAP και συμπληρώνεται με 5g/l ενεργού άνθρακα εάν επιθυμούμε την ανάπτυξη ρίζας. Για την μεταφορά στο θερμοκήπιο οι *in vitro* σχηματισμένες ρίζες συνήθως δεν χρησιμοποιούνται άλλα μοσχεύματα μεταφέρονται και ριζοβολούν στο έδαφος.

3.5.6 Επίπεδο πλοειδίας

Μόλις αναπτυχθούν τα πρώτα φύλλα, το επίπεδο πλοειδίας μπορεί να καθοριστεί με την χρησιμοποίηση της γρήγορης διαδικασίας μέτρησης των χλωροπλάστων ανά καταφρακτικό κύτταρο (Frandsen 1968).

Τα μονοπλοειδή έχουν 5-8 διπλοειδή 10-15 και τετραπλοειδή 18-24 χλωροπλάστες ανά καταφρακτικό κύτταρο.

Μόνο σε αμφίβολες περιπτώσεις μετράμε τα χρωμοσώματα στα άκρα της ρίζας. Συνήθως περισσότερα από τα 2/3 όλων των αναγεννούμενων φυτών έχουν διπλασιάσει την πλοειδία τους κατά την διάρκεια της *in vitro* καλλιέργειας.

3.5.7 Μεταχείριση των απλοειδών

Τα περισσότερα μονοπλοειδή είναι πολύ ευαίσθητα και πρέπει να τα φροντίζουμε προσεκτικά. Συνιστάται ο συστηματικός εμβολιασμός τους σε φυτά τομάτας, ειδικά τις περιόδους όπου η διάρκεια της ημέρας είναι μικρή. Για κονδυλοποίηση διπλοειδή πρέπει να εμβολιάζονται πάνω σε μονοπλοειδή.

3.5.8 Διπλασιασμός χρωμοσωμάτων

Ο διπλασιασμός των χρωμοσωμάτων των απλοειδών δεν είναι μια εύκολη διαδικασία. Σε όλα τα πειράματα που έγιναν ο διπλοειδισμός πέτυχε με όλες τις γνωστές διαδικασίες ιδιαίτερα όταν η κολχικίνη εφαρμόστηκε διαμέσου των ριζών ή διαμέσου βαμβακιού πάνω στους πλάγιους οφθαλμούς.

Έχει επιτυγχανθεί ο διπλασιασμός κάποιων γονοτύπων με επανειλημμένες επεμβάσεις κολχικίνης με εμποτισμένο βαμβάκι σε πλάγιους οφθαλμούς μέσα σε 14 ημέρες.

Διπλασιασμός των διπλοειδών σε τετροπλοειδή επιτυγχάνεται εύκολα χρησιμοποιώντας 0,5% διάλυμα κολχικίνης το οποίο εφαρμόζεται σε πλάγιους οφθαλμούς αφού πρώτα έχουν εξαχθεί.

Η εφαρμογή μπορεί να γίνει και με τη χρήση σύριγγας. Αρκετά συχνά συμβαίνει ο σχηματισμός χιμαιρών. Λιγότερες χιμαιρες σχηματίζονται με τον διπλασιασμό *in vitro*. Ο Jacobsen (1981) βρήκε ένα υψηλό ποσοστό διπλασιασμένων απλοειδών χωρίς μία χίμαιρα σε 129 φυτά που εξέτασε.

Η αναγέννηση από μικροσπόρια εντός των ανθέρων σε καλλιέργεια είναι δυνατή στην πατάτα στα τετραπλοειδή και διπλοειδή. Μεγαλύτερη επιτυχία έχει προκύψει όταν ξεκινάμε από τα διπλοειδή και δίνουμε προσοχή στην ικανότητα αναγέννησης από κλώνους. Η παραγωγή ανδρογενών φυτών με τέτοιες μεθόδους ήταν αρκετά μεγάλη για να επιτρέψει να γίνουν συνδυασμοί με φυτά που προέρχονται από άλλες ασυνήθεις και κλασσικές μεθόδους βελτίωσης της πατάτας. Έτσι παρήχθησαν οι πρώτοι χρήσιμοι κλώνοι για γεωργική χρήση (Wenzel και Uhrig 1981).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

Προοπτικές χρησιμοποίησης των απλοειδών φυτών στην βελτίωση των φυτών

Από όσα αναφέρθηκαν προηγούμενα πιστεύουμε ότι έχει γίνει φανερή η αξία των απλοειδών που προκύπτουν με *in vitro* καλλιέργεια και οι δυνατότητες εφαρμογής των τεχνικών αυτών στην βελτίωση των φυτών. Συγκεκριμένα, με τη χρήση των μεθόδων διπλοειδισμού των απλοειδών φυτών μπορούμε να δημιουργήσουμε 100% καθαρές σειρές σε πολύ συντομότερο χρονικό διάστημα σε σχέση με τις κλασσικές μεθόδους βελτίωσης.

Απλοειδή φυτά *in vitro* μπορούν να προκύψουν σε μερικές εβδομάδες. Με διπλασιασμό των χρωμοσωμάτων τους διπλοειδή (για την ακρίβεια διπλασιασμένα απλοειδή) ομοζύγωτα φυτά προκύπτουν σε μια μόνο γενεά.

Για να γίνει εμφανής η ανωτερότητα των απλοειδών ως προς τον χρόνο που εξοικονομούμε, αναφέρουμε ότι στα σταυρογονιμοποιούμενα φυτά με υψηλό βαθμό ετεροζυγωτίας, η σταθεροποίηση συγκεκριμένων χαρακτηριστικών μέσω των συμβατικών μεθόδων απαιτεί 7-8 χρόνια. Με παραγωγή απλοειδών από τα φυτά της F1 το ίδιο αποτέλεσμα μπορεί να επιτευχθεί σε μία μόνο γενεά. Επίσης τα διπλοειδή ομοζύγωτα φυτά που προέρχονται από τα απλοειδή μπορούν να χρησιμοποιηθούν για την παραγωγή βελτιωμένων καθαρών σειρών και μετέπειτα για την παραγωγή υβριδίων.

Ένα άλλο πλεονέκτημα των διπλασιασμένων απλοειδών είναι η αξιοπιστία που μας παρέχουν κατά την διάρκεια της επιλογής. Όταν επιλέγουμε φυτά βάσει της παραγωγής, είμαστε σίγουροι ότι λόγω της ομοζυγωτίας επιθυμητά χαρακτηριστικά της ποιότητας ή της ανθεκτικότητας σε ασθένειες, δεν θα χαθούν στις επόμενες γενεές.

Είναι πιθανό υποτελείς αλληλόμορφοι που υπάρχουν στα ετεροζύγωτα φυτά να έχουν ωφέλιμη επίδραση για το φυτό όταν μπορούν να εκδηλωθούν. Όταν επιθυμούμε ένας αριθμός υποτελών αλληλόμορφων να εκφραστούν συγχρόνως σε ένα φυτό η πιθανότητα είναι ελάχιστη. Αντίθετα στα απλοειδή επειδή υπάρχει μια σειρά γονιδίων που δεν καλύπτονται από τα κυρίαρχα αλληλόμορφα και μπορούν να εκφραστούν.

Οι μεταλλαγές είναι δύσκολο να ανιχνευθούν σε διπλοειδή ή μεγαλύτερης πλοειδίας φυτά επειδή είναι υποτελείς αλληλόμορφοι και δεν εκφράζουν την παρουσία τους λόγω του κυρίαρχου αλληλόμορφου στα ομόλογα χρωμοσώματα.

Συνεχείς αυτογονιμοποιήσεις του φυτού που μεταφέρει τις μεταλλαγές είναι αναγκαίες για να εκφραστούν τα υποτελή αλληλόμορφα. Αυτό όμως δεν είναι πάντα δυνατό γιατί αρκετά είδη είναι αυτοασυμβίβαστα. Επιπλέον όπου η αυτεπικονίαση είναι δυνατή ένα άτομο από τα τέσσερα θα φέρει το υποτελές χαρακτηριστικό. Όπου υπάρχουν περισσότερες μεταλλαγές υποτελών αλληλόμορφων, η πιθανότητα να εκφραστούν όλες οι μεταλλαγές σε ένα άτομο είναι πάρα πολύ μικρή. Οι μεταλλαγές στα απλοειδή μπορούν εύκολα να ανιχνευθούν επειδή έχουν μία μόνο σειρά χρωμοσωμάτων και επομένως δεν υπάρχει επισκίαση από τα κυρίαρχα αλληλόμορφα.

Τα απλοειδή με τις επιθυμητές μεταλλαγές επιλέγονται και διπλασιάζονται τα χρωμοσώματά τους. Έτσι έχουμε γόνιμα διπλοειδή με όλες τις επιθυμητές μεταλλαγές σε μία μόνο γενεά.

Η καλλιέργεια απλοειδών κυττάρων *in vitro* είναι χρήσιμο υλικό για την μελέτη της γενετικής των σωματικών κυττάρων και της βιολογίας τους. Διεύρυνση των γνώσεών μας πάνω στο συγκεκριμένο θέμα θα συνεισφέρει σημαντικά στην κατανόηση του μηχανισμού επαγωγής και καλλιέργειας *in vitro* των σωματικών κυττάρων. Με αποτέλεσμα να είμαστε σε θέση να παράγουμε απλοειδή φυτά σε είδη που ακόμα εμφανίζονται δυσκολίες. Αυτό συνεπάγεται εφαρμογή όλων αυτών που προαναφέραμε σε περισσότερα είδη και παροχή μεγαλύτερων δυνατοτήτων στους βελτιωτές; για παραγωγή βελτιωμένων ποικιλιών μέσω των διειδικών διασταυρώσεων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Παρακάτω παρατίθεται η βιβλιογραφία που χρησιμοποιήθηκε καθώς και άλλες βιβλιογραφικές αναφορές σχετικές με το αντικείμενο.

Abo El-Nil, M.M. και Hildebrandt, A.C., 1973. Origin of androgenic callus and haploid peranium plants. *Can.J. Bot.*, p. 51, 2107-2109

Ahmim M. και Vieth J. 1986. Production de plantes haploides de *Gerbera jamesonii* par culture *in vitro* d' ovules. *Can. J. Bot.*, p. 64, 2355 - 2357.

Anagnostakis S.L., 1974. Haploid plants from anthers of tobacco - enhancement with charcoal. *Planta.*, p. 115, 281 - 283.

Ao G.M., Zhao S.X., Li G.H., 1982. *In vitro* induction of haploid plantlets from unpollinated ovaries of Corn (*Zea mays L.*). *Acta Gen. Sin.*, p. 9, 281 - 283.

Arcia M.A., Wernsman E.A., Burk L.G. 1978. Performance of anther - derived haploids and their conventionally indred parent as lines, in F1 hybrids, and in F2 generations, *Crop., Sci.*, p. 18, 413 - 418.

Asselieh de Beauville M., 1980. Obtention d' haploides *in vitro* a partir d' ovaires non fécondes de Riz, *Oryza Sativa L.* *C.R. Acad. Sci (Paris)*, p. 296, 489 - 492.

Atanassov A., Pamukov I., Kunev K., Nedeltcheva S., 1978. Results from the application of haploids in tobacco breeding. *Coresta Inf. Bull. Int. Tob. Sci. Symp.*, 1978, p. 82.

Bajaj, Y.P.S., 1964. Development of ovules of *Abelmoschus esculentus* var *Pusa sawani* *in vitro*. *Proc. Natl. Inst. Sci. India, Part B* p. 30, 175-185.

Bajaj, Y.P.S., 1966. Growth of *Hyoscyamus niger* ovaries in culture. *Phyton (Buenos Aires)*. p. 23, 57-62.

Bajaj YPS. 1977a. *In vitro* induction of haploides in wheat (*Triticum aestivum L.*) *Crop Improv*, p.4, 54-64.

Bajaj YPS. 1983c. *In vitro* production of haploids. In: Evans DA., Sharp wr, Ammirato PV, Yamada Y., (eds). *Handbook of plant cell culture*, vol. 1. Techniques for propagation and breeding. MacMillan Press. New York, p. 228-287.

Bajaj Y.P.S., 1986. *Biotechnology in Agriculture and Forestry 2*. Springer - Verlag Berlin Heidelberg New York., p. 39-88, 123-180,530-543.

- Bajaj, Y.P.S., Reinert, J. Heberle, E. 1976. Factors enhancing *in vitro* production of haploid plants in anthers and isolated microspores. In: GAUTHERET, R. J. (ed.): A la Memoire de Georges Morel. Paris: Masson και Cie. p. 182 – 204
- Ban, Y., Kokubu T. και Miyaji, Y., 1971 Production of haploid plants by anther Culture of *Setaria italica* Bull. Fac. Agric. Kagoshima Univ. p. 21, 77-81
- Barclay, I.R., 1975. High frequencies of haploid production in wheat (*Triticum aestivum*) by chromosome elimination. Nature. p. 256, 410-411.
- Barendse, G.W.M., Rodrigues Pereira, A.S., Berkers, F.M., Driessen A., Van Eyden - Emons, A. and Linskens, H.F., 1970. Growth hormones in pollen, styles and ovaries of *Petunia hybrida* and of *Lilium* species. Acta. Bot. Neerl. P. 19, 175-186.
- Bernard S. 1980. *In vitro* androgenesis in hexaploid triticale: Determination of physical conditions increasing embryoid and green plant production. Z. Pflanzenzuecht., p. 85, 308-321.
- Bhojwani S.S., 1990. Plant Tissue Culture: Applications and Limitations. ELSEVIER, New York., p. 220-258, 424-435.
- Bhojwani SS. και Razdan Z.M., 1983 Plant tissue culture Theory and Practice ELSEVIER, New York., p. 113-142.
- Borhman C.H., 1985. Haploidization of sugarbeet (*Beta vulgaris*) via gynogenesis. *in vitro*, p. 21, 36.
- Bourgin, J.P. και Nitsch, J.P., 1967. Obtention de *Nicotiana* haploides a partir d' etamines cultivees *in vitro*. Ann Physiol. Veg, p. 9.. 377-382.
- Bullock W.P., Baenziger P.S., Schaeffer G.W., Bottino PJ. 1982. Anther culture of wheat (*Triticum aestivum* L.) Fi's and their reciprocal crosses. Theor Appl Genet. p. 62, 155-159.
- Burk L.G., & Matzinger D.F., 1976. Variation among anther - derived doubled haploides from an inbred line of tobacco. J. Hered., p. 67, 381 - 384.
- Buyser De J., Henry Y., 1979. Androgenese sur des tendres en cours de selection I. L' obtention des plants *in vitro*. Z. Pflanzenzuecht., p. 49-56,83.
- Cai D.T. & Zhou C., 1984. *In vitro* induction of haploid embryoids and plantlets from unpollinated young florets and ovules of *Helianthus annuus* L. Kexue Tongbao., p. 29, 680 - 682.
- Cappadocia M., Chretien L., Laublin G., 1988. Production of haploids in *Gerbera jamesonii* via ovule culture: Influence of fall versus spring sampling on callus formation and shoot regeneration. Can. J. Bot., p. 66, 1107 - 1110.

Chaleff R.S., Stolarz A., 1981. Factors influencing the frequency of callus formation among cultured rice (*Oryza sativa*) anthers. *Physiol Plant*, p. 51, 201-206.

Chase S.S., 1963. Analytic breeding in *Solanum tuberosum* L. – A. scheme utilizing parthenotes and other diploid stocks. *Can. J. Genet. Cytol*, p. 5, 359 – 363.

Chen CC. 1976. Studies on the anther culture of rice. Pollen stage and low – temperature treatment. *Natl Sci Counce Mon Taipei*, p. 4, 2187-2190.

Chen C.C. 1977. *In vitro* development of plants from microspores of rice., p. 13, 484-489

Chen C.C. 1978. Effects of sucrose concentration on plant production in anther culture of rice *Crop Sci* p., 18, 905-906.

Chen CC., Lin MH, 1976. Induction of rice plantlets from anther culture. *Bot Bull Acad Sinica*, p. 17-24.

Chen CC, Lin CM. 1981. Genotypic differences in plant production in anther culture of rice. In: «Proc Symp Plant Cell Tissue Cult». Chang W.C. (e.d.) *Acad Sinica. Taipei.*, p. 199-203.

Chen C., Chen F., Chien C., Wang C., Chang S., Hsu H., Ou H., Ho Y., kai Lu T., 1978. Obtaining pollen plants of *Hevea brasiliensis* Muell-arg. In: *Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture. Science Press, Peking* p., 11-22

Chen CC, Chiu WL, Yu LJ, Ren SS, Yu Wj, Lin MH, 1983. Genetic analysis of anther – derived plants of rice: Tests for independent assortment of unlinked genes. *Can J. Genet Cytol*, p. 25, 324-328.

Chen CM, Chen CC, Lin MH, 1982. Genetic analysis of anther – derived plants of rice. *J. Hered. P.* 49-52,73.

Chen LJ, Lai PC, Liao CH, Tsay HS, 1982. Medium evaluation for rice anther culture. In: Fujiwara A (ed.) *Plant Tissue culture 1982. Maruzen, Tokyo*, p. 551-552.

Chen Y, Tso Ch, Wang JF, Chang KH, 1978a. On screening of anther culture media for hybrid *Oryza sativa* L. Subsp. *Keng* x *O. Sativa* subsp. *Shien* by orthogonal test. In: Hu H (ed.) *Proc Symp. Anther Cult, Science Press, Peking*, p. 40-49.

Chen Y, Wang Jui-feng, Tso Chiu-hsien, Hsu Shi-huan, 1978b. Studies on simplified potato medium for anther culture of *Oryza Sativa* L. Subsp. Keng In: Proc Symp Anther Cult. Science Press, Peking, p. 65-72.

Chen Y, Zuo QZ, Li SY, Qu RD, 1982. Plant regeneration from isolated rice pollen culture and some factors affecting induction frequency. In: Fujiwara A (ed) Plant Tissue culture 1982. Maruzen, Tokyo, p. 559-560.

Chen Z.H., Xu X.N., Liao X.Q., Pang R.S., Li W.B., Zhang T.H. 1985. Production of haploid plantlets from unpollinated ovule culture in *Hevea brasiliensis* Muell. - Arg. Annual Report of the Institute of Genetics, Academia Sinica, Science Press, Beijing, p. 42.

Chopra, R. N., 1962. Effect of some growth substances and calyx on fruit and seed development of *Althaea rosea* Can. In "Plant Embryology - A Symposium". Council of Scientific and Industrial Research, New Delhi, India, p. 170-181.

Chopra, R. N. and Sabharwal, P.S., 1963. *In vitro* culture of ovules of *Gunandropsis gynandra* L. Briq and *Impatiens balsamina* L. In "Plant Tissue Culture - A Symposium" P. Maheshwari and N.S. Rangaswamy (eds) Univ. of Delhi, Delhi, India. p. 257-264.

Chu CC, 1978. The N6 medium and its applications to anther culture of cereal crops. In: Proc Symp Plant Tissue Cult, Science Press, Peking, p. 45-50.

Chu CC., 1982a. Haploids in plant improvement. In: Vasil IK., Scowcroft W.R., Frey KJ (eds). Plant improvement and somatic cell genetics. Academic Press, London New York, p. 129-158.

Chu CC. 1982b. Anther culture of rice and its significance in distant hybridization, In: Rice tissue culture planning conference. IRRI, Los Banos, p. 47-53.

Chu CC., Wang CC, Sun CS, Chien N.P., Yin KC, Hsu C., 1973. Investigation on the induction and morphogenesis of wheat (*Triticum vulgare*) pollen plants. Acta Bot Sinica., p. 1-11, 15.

Chu CC, Wang CC, Sun CS, Hsu C, Yin, KC, Chu CY, Bi Fy, 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. Sci Sinic, p. 18, 659-668.

Chuang, C.C., Ouyang, T.W., Chia, H., Chou, S.M. Ching, C.K., 1978. A set of potato media for wheat anther culture. Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture, Science Press, Peking, p. 51-56.

Chu CC, Wang, Sun CC, 1976. Development of the pollen embryo of rice and wheat on the medium devoid of hormones. Acta Bot Sinica, p. 8, 239-246.

- Clapham D., 1971. *In vitro* development of callus from the pollen of *Lolium* και *Hordeum*. Z. Pflanzenzucht, p. 65 285-292.
- Clapham D., 1973. Haploid *Hordeum* plants from anthers *in vitro*. Z. Pflanzenzucht, p. 69, 142-155
- Clapham, D., 1977, Haploid induction in cereals. J. Reinert, and Y.P.S. Bajaj (eds). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Springer - Verlag, Berlin. P. 279-298.
- Collins GB. 1977. Production and utilization of anther – derived haploids in crop plants. Crop Sci p. 17, 583-568.
- Collins, G.B. και Sunderland, N., 1974. Pollen derived haploids of *Nicotiana knightiana*, *N.raimondii* και *N. attenuata*. J. Exp. Bot. P. 25, 1030 – 1039.
- Corduan, G., 1975. Regeneration of anther-derived plants of *Hyoscyamus niger* L. Planta, p. 27-36, 127
- Corduan G., και Spix C., 1975. Haploid callus and regeneration of plants from anthers of *Digitalis purpurea* L. Planta p. 1-11, 124.
- Cornejo – Martin MJ, Primo – Millo E., 1981. Anther and pollen grain culture of rice (*Oryza sativa* L.). Euphytica, p. 30, 541-546.
- Craig. L., 1974. Haploid plants (2n=21) from *in vitro* anther culture of *Triticum aestivum*. Can. J. Genet. Cytol., p. 16, 697-700
- De verna J.W. & Collins G.B., 1984. Maternal haploids of *Petunia axillaris* L. B.S.P. via culture of placenta attached ovules. Theor. Appl. Genet. P. 69, 187 – 192.
- Devreux, M., 1970. New possibilities from the *in vitro* cultivation of plant cells. Euro Spectra-Scientific and Technical Review of the European Communities, p. 105-110.
- Doctrinal M., Sangwan R.S., Sanguan – Norreel B.S., 1989. *In vitro* gynogenesis in *Beta vulgaris*: effects of plant growth regulators, temperature, genotypes and season. Plant Cell Tissue and Organ Cult., p. 1 – 12, 17.
- Dore, C., 1974. Production de plantes homozygotes male et femelles a partir d' antheres, cultivees *in vitro* (*Asparagus officinalis* L.) C.R. Acad. Sci. Paris, Ser. D., p. 278, 2135-2138
- Dunweel JM., 1976. A comparative study of environmental and developmental factors which influence embryo induction and growth incultured anthers of *Nicotiana tabacum*. Environ Exp. Bot., p. 16, 109-118

- Dunwell JM. 1981a. Stimulation of pollen embryo induction in tobacco by pretreatment of excised anthers in a water - saturated atmosphere, *Plant Sci Lett.*, p. 9-13, 21.
- Dunwell JM. 1981b. Influence of genotype and environment on growth of barley embryos *in vitro*. *Ann Bot (London)*, p. 48, 535 - 542.
- Dunwell, J.M 1985 in *Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications*, Alderson, P.G. and Withers, L.A. (eds), Butterworths, London, in press. p. 17-22, 36
- Dunwell J.M. 1985. In *Cereal Tissue and cell culture*. Bright S.W.J. and Jones. M.J.K. (eds), Martinus Nijhoff. The Hague in press. p. 3-9, 24, 62, 77
- Dunwell J.M., 1985. *Plant cell culture a practical approach*. IRL Press, Oxford - Washington DC. P. 21-37.
- Dunwell, J.M., 1986. Pollen, ovule and embryo culture, as tools in plant breeding. L. A. Withers and P. G. Alderson (eds), *Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications*. Butterworths, London, p. 375-404.
- Dunwell J.M. και Sunderland N. 1973. Anther culture of *Solanum tuberosum* L. *Euphytica*, p. 22, 225,235, 317-323.
- Dunwell, J.M. και Sunderland, N., 1974a. Pollen ultrastructure in anther cultures of *N. tabacum* L. Early stages of culture. *J. Exp. Bot.*, p. 25, 352-361.
- Dunwell, J.M. και Sunderland, N. 1974b. Pollen ultrastructure and anther culture of *N. tabacum*. II Changes associated with embryogenesis. *J. Exp. Bot.*, p. 25, 363-373
- Durr, A. και Fleck J., 1980. Production of haploid plants of *Nicotiana langsdorffii*, *Plant Sci, Lett.*, p. 18, 75-79.
- Engvild, K.C., 1973. Triploid petunias from anther cultures. *Hereditas*, p. 74, 144-147
- Foroughi - Wehr B. Mix G., 1979. *In vitro* response of *Hordeum vulgare* L. anthers cultured from plants grown under different environments. *Environ Exp. Bot.*, p. 19, 303-309.
- Foroughi - Wehr., B., Wilson H.M., Mix G., Gaul H., 1977. Monohaploid plants from anthers of a dihaploid genotype of *Solanum tuberosum* L. *Euphytica* p. 26, 361 - 367.
- Foroughi - Wehr B, Friedt W, Wenzel G. 1982 On the genetic improvement of androgenic haploid formation in *Hordeum vulgare* L. *Theor Appl Genet.*, p. 62, 233-239.

Frandsen N.O., 1968. Die Plastidenzahl als Merkmal bei der Kartoffel. Theor. Appl. Genet., p. 38, 153 - 167.

Gamborg OL, Miller RA, Ojima K, 1968. Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res., p. 50, 151-158

Gelebart P. & San L.H., 1987. Obtention de plantes haploides par culture *in vitro* d' ovaries et d' ovules non fécondes de tournesol (*Helianthus annuus L.*) Agronomie, p. 7, 81 -86.

Genovesi AD, Magill CW, 1979. Improved rate of callus and green plant production from rice anther culture following cold shock. Crop Sci, p. 19, 662-664.

Gresshoff, P.M. και Doy C.H., 1972a. Haploid *Arabidopsis thaliana* callus and plants from anther culture. Aust. J. Biol. Sci., p. 25, 259-264.

Gresshoff, P.M. και Doy, C.H., 1972b. Development and differentiation of haploid *Lycopersicum esculentum*. Planta, p. 107, 161-170.

Gu Z.P. & Cheng K.C. 1983. *In vitro* induction of haploid plantlets from unpollinated ovaries of lily and its embryological observations. Acta Bot. Sin., p. 24 - 28.

Gu Z.P. & Zheng (Cheng) K.C. 1984. *In vitro* induction of haploid plantlets from unpollinated ovaries of highland barley. Acta Bot. Sin., p. 26, 549 – 551.

Guha – Mukherjee S., 1973. Genotypic differences in the *in vitro* formation of embryoids from rice pollen. J. Exp. Bot., p. 24, 139-144.

Guha S., Iyer RD, Gupta N., Swaminathan MS. 1970. Totipotency of gametic cells and the production of haploids in rice. Curr Sci., p. 39,174-176.

Guha, S. και Johri, B. M., 1966. *In vitro* development of ovary and ovule of *Allium cepa L.* Phytomorphology, p. 16, 353-364.

Guha. S. και Maheshwari, S.C., 1964, *In vitro* production of embryos from anthers of *Datura*. Nature, p. 204, 497-498.

Guha S. και Maheshwari, S.C., 1966. Cell division and differentiation of embryos in the pollen grains of *Datura in vitro*. Nature (London), p. 97-98, 212

Guha, S. και Maheshwari, S.C., 1967. Development of embryoids from pollen grain of *Datura in vitro*. Phytomorphology, p. 17, 454-461.

Harn, C., 1969. Studies on anther culture of rice. Korean J. Breed, p. 1-11.

Harn, C., 1972. Production of plants from anthers of *Solanum nigrum* cultured *in vitro*. *Caryologia*, p. 25, 429-437.

Harn, C., Kim, M.Z., Choi, K.T. και Lee, Y.I., 1975. Production of haploid callus and embryoid from the cultured anther of *Capsicum annum*. *SABRAO J.*, p. 7, 71-77.

Heller, R., 1953. Recherch sur la nutrition minerale des tissus vegetaux cultives *in vitro*. *Ann. Sci. Nat. Biol. Veg.*, Serie II p. 1-223.

Henry Y., Buyser De J, 1980a. Androgenese sur des Bles tendres en cours de selection 2. L' obtention des grains. *Z. Pflunzenzuecht.*, p. 9-17,84.

Henry Y, Buyser de J, 1980b. Androgenese sur des Bles tendres (*Triticum aestivum* L.) en cours de selection 3. Electrophorese degliadines de quelques haploides doubles. *Z. Pflanzenzuecht*, p. 85, 322-327.

Henry Y, Buyser de J., 1981. Float culture of wheat anthers. *Theor Appl. Genet.*, p. 60,77-79.

Hermesen J.G.T. & Verdenius J. 1973. Selection from *Solanum tuberosum* group phureja of genotypes combining high frequency haploid induction with homozygosity for embryospot. *Euphytica*, p. 22, 244 - 259.

Heslop - Harrison, J., 1972. Sexuality of angiosperms. F.C. Steward (ed), *Plant Physiology - A Treatise*, Vol. VIC, Academic Press, New York, p. 133-289.

Heslop - Harrison, J. Heslop - Harrison, Y. και Shivanna, K.R. 1984, *Theor. Appl. Genet.* p. 67, 367.

Hidaka, T., Yamada Y. και Shichijo, T. 1979. *In vitro* differentiation of haploid plants by anther culture in *Poncirus trifoliata* L. *Raf. Jpn. J. Breed*, p. 29, 248-254.

Ho, I. 1961. *in vitro* culture of ovary and seed in orchids. Ph. D. Thesis, Kyoto Prefect, Univ of Kyoto. p. 3 - 15

Hosemans D. & Bossoutrot D., 1983. Induction of haploid plants from *in vitro* culture of unpollinated beet ovules (*Beta vulgaris* L.) *Z. Pflanzenzucht.*, p. 74 - 77, 91.

Hougas R.W. & Peloquin S.J. 1957. A haploid plant of the potato variety katahdin. *Nature (London)*, p. 180, 1202 - 1210.

Hougas, R.W., Peloquin, S.J. 1958. The potential of potato haploids in breeding and genetic research. *Am. Potato J.* p. 35, 701-707.

Hsu SC, Chen, CC 1977. Studies on the anther culture of rice : Origin of the anther - derived diploid plants. Natl Sci Counc Mont., p. 5, 834 - 839.

Hu C, Ho Ching - po, Peng Li-ping, 1978a. Effect of b-ecdysone on induction of pollen plants in rice and wheat in: Proc Symp Anther Cult. Science Press, Peking, p. 270.

Hu C, Liang Han - hsing, Huang Shih- chou, Ho Ching-po, 1978b. An improved method of anther culture in paddy rice, In: Proc Symp Anther Cult. Science Press, Peking, p. 93-98.

Hu C., Huang SC, Ho CP, Liang HC, Chuang CC, Peng Lp, 1978c. On the inductive conditions of rice pollen plantlets in anther culture . In: Proc Symp Plant Tissue Cult. Science Press, Peking., p. 87-95.

Hu, H., Hsi, T., Tseng, C., Ouyang, T. kai Ching, C., 1978. Application of anther culture to crop plants. In: T. Thorpe (Editor), Frontiers in Plant Tissue Culture 1978. Univ. Calgary Press, Canada, p. 123-130.

Huang B. kai Sunderland, N., 1982 Temperature – stress pretreatment in barley anther culture. Ann. Bot. P. 49, 77-88.

Huang CR, Wu YH, Chen CC., 1985, Effects of plant growth substances on callus formation and plant regeneration in anther culture of rice. In « Proc int Rice Genet Symp». Khush G.S. (ed.) IRRI, Los Banos, p. 25-68.

Huang HS., Lin TH., Tseng PL, Hsian YL, Shi P., Ho HL, Pang CC., Wang HY, Huang PT, Tseng JF. 1977. Studies on composition of culture medium of *Oryza sativa* L. subspecies shen by methods of mathematical analysis. In «Proc. Symp. Anther Cult.» Hu.H. (ed.). Science Press Peking. P. 29 – 39.

Huang Q.F., Yang H.Y., Zhou C., 1982. Embryological observations on ovary culture of unpollinated young flowers of *Hordeum vulgare* L. Acta Bot. Sin., p. 24, 295 – 300.

Hughes, K.W., Bell, S.L. kai Caponetti, J.D., 1975. Anther derived haploids of the *African violet*. Can. J. Bot., p. 53, 1442-1444.

Imanura, J. and Harada, H., 1980. Stimulatory effects of reduced atmospheric pressure on pollen embryogenesis. Naturwissenschaften, p. 67, 357-358.

Institute of Tobacco Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences., 1974. The evaluation of the progenies of the pollen plants of tobacco. Acta Genet. Sin. P. 1, 26-29.

Institute of Tobacco, Shantung and institute of Botany, Peking. 1974. Success of breeding new tobacco cultivar "Tan - Yuh no.1" Acta Bot. Sin., p. 16, 300-303.

Institute of Maize Research Kwangsi Chuang Autonomous Region, Exp. Stn Dong Bei Wang Commune Hai-dan Peking, Inst Bot, Acad Sinica 1977. Studies on maize anther culture. Acta Bot Sinica., p. 19,89-93

Institute of Tobacco Research, Chinese Academy of Agricultural Science., 1978. A preliminary study on the heredity and vitality of the progenies of tobacco pollen plants. In "Proceedings of Symposium on Plant Tissue Culture", Science Press, Peking., p. 223-225.

Irikura, Y., 1975. Induction of haploid plants by anther culture in tuber-bearing species and interspecific hybrids of *Solanum*. Potato Res. P. 18, 133-140.

Irikura Y και Sakaguchi, S., 1972, Induction of 12-chromosome plants from anther culture in a tuberosus solanum. Patato Res., p. 15, 170-173.

Ito, I. 1966. *In vitro* culture of ovary in orchids (1). Effects of sugar, peptone and coconut milk upon the growth of ovary of *Dendrobium nobile*. Sci, Rep. Kyoto Prefect. Univ., Agric. P. 18, 38-50.

Iyer R.D., Raina S.K., 1972. The early ontogeny of embryoids and callus from pollen and subsequent organogenesis in anther cultures of *Datura metel* and rice. Planta., p. 104,146-156.

Jacobsen E. 1981. Polyploidization in leaf callus tissue and in regenerated plants of dihaploid potato (*Solanum tuberosum*). Plant Cell, Tissue Organ Cult. P. 1, 77 – 84.

Johansson, L., Andersson, B. and Eriksson, T. 1982, Physiol. Plant., 54.

Johri, B. M., και Guha, S., 1963. The technique of *in vitro* culture in the study of physiology of reproduction. J. Indian Bot. Soc. P. 42, 58-73.

Kameya, T., και Hinata, K., 1970, Induction of haploid plants from pollen grains of *Brassica*. Jpn. J. Breed., p. 20,82-87.

Kano, K. 1962. *In vitro* culture of tomato ovaries. J. Jpn. Soc. Hortic. Sci p. 31,197-206.

Kao, K.N. 1981, Plant formation from barley anther cultures with ficoll – media, Z, Pflanzenphysiol. P. 137, 437-443.

Kapoor, M. 1959. Influence of growth substances on the ovules of *Zephyranthes*. Phytomorphology. P. 9, 313-315.

- Kasha, K.J., Kao, K.N., 1970. High frequency haploid production in barley (*Hordeum vulgare* L.) Nature, p. 225, 874-875.
- Keller, W.A. 1984 in Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 1, Vasil, I.K. (ed.), Academic Press, New York., p. 302.
- Keller, W.A. και Armstrong, K.C., 1978. High frequency production of microspore - derived plants from *Brassica napus* anther cultures. Z. Pflanzenzuecht., p. 80,100-108.
- Keller, W.A. και Armstrong, K.C., 1979. Stimulation of ebyrogenesis and haploid production in *Brassica campestris* anther cultures by elevated temperature treatments. Theor. Appl. Genet., p. 55,65-67.
- Keller, W.A., Rajhathy, T. και Lacapra, J., 1975. *In vitro* production of plants from pollen in *Brassica campestris*. Can. J. Genet. Cytol. p. 17, 656 - 666.
- Keller, W.A., Armstrong, K.C. και De La Roche, A.I. 1983 In Plant Cell Culture in Crop Improvement, Sen, S. K. and Giles, K.L. (eds) Plenum Press, New York, p. 169.
- Kimata, M. και Sakamoto, S., 1972 Production of haploid albino plants of *Aegilops* by anther culture. Jpn. J. Genet., p. 47,61-63
- Kochhar, T.S., Sabharwal, P.S. και Engelberg. J., 1971b. Production of homozygous diploid plants by tissue culture technique. J. Hered., p. 59-62.
- Kohlenbach, H.W. και Geier, T., 1972. Embryonen aus *in vitro* Kultivierten Antheren von *Datura meteloides* Dun., *Datura wrightii* Reget und *Solanum tuberosum* L. Z. Pflanzenphysiol, p. 67,161-165.
- Kohlenbach HW., Wernicke W. 1978. Investigations on the inhibitory effect of agar and the function of active carbon in anther culture. Z Pflanzenphysiol, p. 86, 463 - 472.
- Kuo C.S., 1982. The preliminary studies on culture of unfertilized ovary of rice *in vitro*. Acta Bot. Sin., p. 24, 33 -38.
- Kuo CS, Sun AC., Wang YY, Gui YL, Gu SR, Maio SH, 1978. Studies on induction of pollen plants and androgenesis in maize. Acta Bot Sinica 20 (3), p. 204 - 209.
- La Croix, L. J., Naylor, J. M., και Larter, E.N. 1962. Factors controlling embryo growth and development in barley (*Hordeum vulgare* L.), Can. J. Bot. P. 40,1515-1523.
- LaRue, C.D. 1942. The rooting of flowers in sterile culture. Bull. Torrey Bot. Club. P. 69,332-341.

Lee J., Chen CC, 1982. Genetic and histological evidence for microspore origin of anther - derived plants of rice. *Taiwania*, p. 27, 86-92.

Leopold, A. C. και Scott, F. I. 1952, Physiological factors in tomato fruit set. *Am. J. Bot.* p. 39,310-317.

Li M.W. και Zhang B., 1984. *in vitro* induction of haploid plantlets from unpollinated ovaries of *Coix lacryma - jobi L.* *Hereditas* (Beijing), p. 5 - 6, 63.

Liang HM, 1978. The advance of studies on medium for anther culture of rice in China. In : *Proc Symp Plant Tissue Cult.* Science Press, Peking., p. 57 - 64.

Lin CI, Tzen MT, Tsay HS, 1974. Some influencing factors affecting callus formation from *in vitro* cultured anthers of rice plants. *Mem Coll Agric Nat I Taiwan Univ.*, p. 1- 16.

Lin MH 1979, Diploidization of haploid rice plants by colchicine treatment. *J Agric Res China.*, p. 28, 45 - 49.

Linsmaier, E.M. και Skoog, F. 1956. Organic growth factors requirements of tobacco tissue culture. *Physiol. Plant.* p. 18, 100-127.

Litz, R.E. και Conover, R.A. 1980. Recent advances in papaya tissue culture. *Proc. Fla. State Hortic. Soc.*, p. 91,180-182.

Lyne, R.L., Bennett, R.I. και Hunter, C.P. 1985. In *Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications*, Alderson, P.G. and Withers, L.A. (eds), Butterworths, London, in press. p. 6 – 18

Maheshwari, N., και Lal, M. 1961, *in vitro* culture of ovaries of *Iberis amara L.* *Phytomorphology* , p. 11, 17-23

Maheshwari, P. Rangaswamy, N.S., 1965. Embryology in relation to physiology and genetics. *Advan. Botan. P.* 2, 219-321.

Mauney, J.R. 1961. The culture *in vitro* of cotton embryos *Bot. Gaz. (Chicago)* p. 122, 205-209.

Meynet J. και Sidi M., 1984. Haploid plants from *in vitro* culture of unfertilized ovules in *Gerbera jamesonii*. *Z. Pflanzenzuch.*, p. 78 – 85, 93.

Miao, S., Kuo, C., Kwei, Y., Sun, A., Ku, S., Lu, W. και Wang, Y., 1978. Induction of pollen plants of maize and observation on their progeny. In: *Proceeding of Symposium on Plant Tissue Culture.* Science Press, Peking, p. 23-24.

Miller CO. 1963. Kinetin and Kinetin - like compounds. In : Linskens HF, Tracey MV (eds) *Moderne Methoden der Pflanzen - Analyse*. Springer, Berlin Heidelberg New York, p. 194 - 202.

Misiura, E. και Zenkteler, M., 1973. Studies on the androgenesis in cultured anthers of *Atropa belladonna* L. *Acta Soc. Bot. Pol.*, p. 42,309-322.

Mix G. 1982. Dihaploide Pflanzen aus *Solanum tuberosum* antheren. *Landbauforsch. Voelkenrode* p. 32, 34 - 36.

Mix, G., Wilson, H.M. και Foroughi - Wehr B., 1978. The cytological status of plants of *Hordeum vulgare* L. regenerated from microspore callus. *Z. Pflanzenzucht*, p. 80,89-99.

Mokhtarzadeh, A. και Constantin, J.M., 1978. Plant regeneration from hypocotyl - and anther - derived callus of barseem clover. *Crop. Sci.*, p. 18, 567-572.

Mu Q., Yang ZF, Chen Z. 1980. A study of increasing induction frequency of pollen plants in maize (*Zea mays*). *Hereditas*, p. 3, 25 -28.

Murakami M., Takahashi M., Harada K. 1972. Induction of haploid plants from anther culture. *Sci Rep Kyoto Perf. Univ. Agric.*, p. 1 -8, 24.

Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* p. 15, 473-497.

Nagata, T. και Tanaka, M., 1968. Differentiation of embryoids from developing germ cells in anther cultures of tobacco. *Jpn. J. Genet.*, p. 43,65-71.

Nakamura, A. και Itagaki, Y., 1973. Anther culture in *Nicotiana* and the characteristic of the haploid plants. *Jpn. J. Breed.*, p. 23, 71-78.

Nakamura A., Yamada T., Kadotani N., Itagaki R., Oka M., 1974. Studies on the haploid method of breeding in tobacco. *SABRO, Newsletter*, p. 6, 107-131, 224-261.

Narayanaswamy, S. και Chandy, L. P., 1971. *In vitro* induction of haploid, diploid and triploid androgenic embryoids and plantlets in *Datura metel* L. *Ann. Bot.*, p. 35, 535-542.

Narayanaswamy, S και George, L. 1982. Anther culture. B.M. Johri (ed.). *Experimental Embryology of Vascular Plants*. Springer - Verlag, Berlin, p. 79-103.

Niizeki, H. και Oono, K., 1968. Induction of haploid rice plants from anther culture. *Proc. Jpn. Acad.*, p. 44, 554-557.

- Niizeki H, Oono K. 1971. Rice plants obtained by anther culture. In : Les Cultures de Tissus des Plantes. Colloq Int. CNRS (Paris), p. 193, 251 - 257
- Nishi T., Mitsuoka S. 1969. Occurrence of various ploidy plants from anther and ovary culture of rice plant, Jpn J. Genet , p. 44, 341 - 346.
- Nitsch C., 1974. Pollen culture a new technique for mass production of haploid and homozygous plants. In : Kasha K (ed.). Haploids in higher plants - Advances and potential. Guelph Univ. Press, Guelph, p. 123 -135.
- Nitsch, C. 1974a. La culture de pollen isole sur milieu synthetique. Compt. Rend.p. 278, 1031-1034.
- Nitsch, C. 1974b. Pollen culture - A new technique for mass production of haploid and homozygous plants. In: Kasha, K.J (ed) Haploids in Higher plants - Advances and Potential. Guelph, Univ. Guelph, p. 123-135.
- Nitsch, C. και Norreel, B., 1973. Effect d'un choc thermique sur le pouvoir embryogene dupollen de *Datura innoxia* cultive dans l'anthere ou isole de l' anthere, C. R. Acad. Sci. Paris. p. 276-303-306.
- Nitsch C., Anderson S., Godard M., Neuffer MG., Sheridan WP. 1982. Production of haploid plants of *Zea mays* and *Pennisetum* through androgenesis. In : Earle ED., Demarly Y (ed.) Variability in plants regenerated from tissue culture. Praeger, New York, p. 69 -91.
- Nitsch, J.P. 1951. Growth and development *in vitro* of excised ovaries. Am. J. Bot. p. 38, 566 - 577.
- Nitsch, J.P., 1952, Plant hormones in the development of fruits. Q. Rev. Biol. p. 27, 33-59.
- Nitsch, J.P. 1963a. Fruit development. In "Recent Advances in the Embryology of Angiosperms" P. Maheshwari (ed.). Univ. of Delhi, Delhi, India p. 361-394.
- Nitsch, J.P. 1963b. The *in vitro* culture of flowers and fruits. In "Plant Tissue and organ Culture - A Symposium" P. Maheshwari and N.S. Rahgaswamy, (eds.). Univ of Delhi, Delhi, India., p. 198-214.
- Nitsch, J.P., 1969. Experimental androgenesis in *Nicotiana*. Phytomorphology, p. 19,389-404.
- Nitsch, J.P., 1972, Haploid plants from pollen Z. Pflanzenzucht., p. 3-18, 67, 245, 263.
- Nitsch JP., Nitsch C., 1969. Haploid plants from pollen grains. Science, p. 85 - 87, 163.

- Nitsch, J.P. και Nitsch, C., 1970. Obtention de plantes haploides a partir de pollen. Bull. Soc. Bot. Fr., p. 117,339-360.
- Nitsch, J.P., Nitsch, C. και Hamon, S. 1968. Realisation experimentale de l' androgenese chez divers Nicotiana. C.R. Soc. Biol. p.162, 369-372.
- Nitsch J.P., Nitsch C. και Hamon S. 1969. Production de Nicotiana diploides a partir de callus haploides Cultives *in vitro*. Cr hebd seanc. Acad. Sci. Paris. p. 262,269,1275-1278.
- Nitzsche, W., 1970. Herstellung haploider Pflanzen aus Festuca - Lolium - Bastarden. Naturwissenschaften. p. 57, 199-200.
- Noreel, B., 1975, Etude physiologique, cytochimique et ultrastructurale de l' embryogenese somatique chez le Daucus carota et de l' androgenese chez le *Nicotiana tabacum* L. et le *Datura innoxia* Mill. These de Doctorat d' Etat, Universite P. et M. curie (Paris Vi). p. 3-22, 123 – 135, 287 – 296.
- Oono K. 1975. Production of haploid plants of rice (*Oryza sativa*) by anther culture and their use for breedig. Bull Natl Inst Agric Sci. D., p. 26,139-222.
- Ouyang J, Hu H, Chuang CC, Tseng CC, 1973. Induction of pollen plants from anthers of *Triticum aestivum* L. cultured *in vitro*. Sci Sinica., p. 16, 79-95.
- Ouyang J, Zhou SM, Jia SE, 1980. Response of anther culture to culture temperature in wheat. Annu Rep Inst Genet Acad Sinica, Taipei, p. 69-70.
- Ouyang J, Zhou S, Jia S. 1983. The response of anther culture temperature in *Triticum aestivum*. Theor Appl Genet. , p. 66,101-109.
- Pan CL, Gao KH. 1978. The production of wheat pollen embryo and the influence of some factors on its frequency of induction. Proc Symp Plant Tissue Cult. Science Press, Peking, p. 133-142.
- Pan CL, Pai SH Kuan CL, Yu HH. 1975. Certain factors affecting the frequency of induction of wheat (*Triticum vulgare*) pollen plants. Acta Bot Sinica. p. 17, 161-166.
- Pelletier, G. και Durran, V., 1972, Recherche de tissus nourricieess pour la realisation de l' androgenese *in vitro* chez *Nicotiana tabacum*. C.R. Acad. Sci., Paris. p. 35-37, 275.
- Pelletier, G. και Ilami, M., 1972. Les facteurs de l' androgenese *in vitro* chez *Nicotiana tabacum*. Z. Pflanzenphysiol., p. 68, 97-114.
- Pelletier, G., Raquin, C. και Simon, G., 1972. La culture *in vitro* d' antheres d' asperge (*Asparagus officinalis*). C. R. Acad. Sci., Paris, p. 274, 848-851.

- Peterson, C. M., 1973. The nutritional requirement for ovule formation in excised pistils of *Nigella*. *Am. J. Bot.* p. 60, 381-388.
- Peterson, C. M., 1974. The effects of gibberellic acid and a growth retardant on ovule formation and growth of excised pistils of *Nigella ranunculacea* L. *Am. J. Bot.* p. 61, 693-698.
- Picard E., Buyser De J. 1973. Obtention de plantules haploides de *Triticum aestivum* L. a partir de cultures d' antheres *in vitro*. *CR Acad Sci.* p. 277, 1463-1466.
- Picard E, Buyser De J. 1975a. Nouveaux resultats concernant la culture d' antheres *in vitro* de Ble tendre (*Triticum aestivum* L.). Effects d' un choc thermique et de la position de l' anthere dans l' epi. *CR Acad Sci.* p. 127-130, 281.
- Picard E, Buyser De J. 1975b. Nouveaux resultats conernant la culture d' antheres de *Triticum aestivum* L. Conditions de regeneration des plantes haploides et production de ligness entierement homozygotes. *CR Acad Sci.*, p. 281, 989-992.
- Pontovich, V. E., και Sveshnikova, I. N., 1966. Formation of *Papaver somniferum* L. embryos during cultivation of the ovules *in vitro*. *Fiziol. Past. Moscovl.* P. 13, 105-113.
- Preil, W. Huhnke, W., Engelhardt, M. και Hoffmann, M., 1977. Haploid bei *Gerbera jamesonii* aus *in vitro* Kulturen von Blütenköpfchen. *Z. Pflanzenzucht.*, p. 79, 167-171.
- Radojevic, L., 1978. *In vitro* induction of androgenic plantlets in *Aesculus hippocastanum*. *Protoplasma*, p. 96, 369-374.
- Raghavan, V., 1975. Induction of haploid plants from anther cultures of *Henbane*. *Z. Pflanzenphysiol.*, p. 76, 89-92
- Raghavan, V., 1978. Origin and development of pollen embryoids and pollen calluses in cultured anther segments of *Hyoscyamus niger* (*Henbane*) *Am. J. Bot.*, p. 65, 984-1002.
- Raghavan, V. and Nagmani, R., 1983 Morphogenesis of pollen callus culture of *Hyoscyamus niger*. *Amer. J. Bot.* P. 40, 524-531.
- Raghavan, V. και Nagmani, R., 1989. Cytokinin effects on pollen embryogenesis in cultured anthers of *Hyoscyamus niger*. *Can. J. Bot.* P. 67, 247-257.

Raina, S.K. και Iyer, R.D., 1973. Differentiation of haploid plants from pollen callus in anther cultures of *Solanum melongena* L. Z. Pflanzenzucht., p. 70, 275-280.

Rangan, T. S. 1982. Ovary, ovule and nucellus culture. In "Experimental Embryology of Vascular Plants" B. M. Johri, (ed.) Springer - Verlag, Berlina and New York p. 105-129.

Rangaswamy, N.S. 1963. Studies on culturing seeds of *Orobanche aegyptiaca* Pers. In "Plant Tissue and Organ Culture - A Symposium" P. Maheshwari and N.S. Rangaswamy (eds.). Univ. of Delhi, India, p. 345-354.

Raquin, C. και Pilet, V., 1972 Production de plantules a partir d' antheres de petunias cultivees *in vitro*. C. R. Acad. Sci., Paris, p. 274, 1019-1022.

Rashid, A. και Street, H.E., 1973. The development of haploid embryoids from anther cultures of *Atropa belladonna* L. Planta, p. 113, 263-270.

Redei, G. και Redei G., 1955. Rearing wheats from ovaries cultured *in vitro*. Acta Bot. Acad. Sci. Hung. p. 27, 104 -105.

Reinert. J. και Bajaj Y.P.S., 1977. Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell. Tissue and Organ culture. Springer - Verlag Berlin Heidelber New York., p. 250-340.

Research Group 401, 1975. Laboratory of Plant Cell and Tissue Culture, Institute of Genetics Academia Sinica. Primary study on induction of pollen plants of *Zea mays*. Acta Genet Sinica2. p.143-145.

Ryckwoski, M. 1962a. Changes in the osmotic value of the central vacuolar sap in developing ovules. (Dicotyledonous perennial plants). Bull. Acad. Pol. Sci. p. 10, 371-374.

Ryckwoski, M. 1962b. Changes in the osmotic value of the sap from embryos, the central vacuole and the cellular endosperm during the development of ovules. Bull. Acad. Pol. Sci. p. 10, 375-380

Sachar, R.C., και Baldev, B. 1958. *In vitro* growth of *Linaria maroccana* Hook. Curr. Sci. p. 27, 104-105

Sachar, R.C., και Kapoor, M. 1959. Gibberellin in the induction of parthenocarpy in *Zephyranthes*. Plant Physiol. p. 34, 168-170.

Sachar, R.C. και Guha, S. 1962, *In vitro* growth of auxines of *Ranunculus sceleratus* L. In "Plant Embryology - A. Symposium". Council of Scientific and industrial Research, New Delhi, India, p. 244-253.

- Saito, K., Nakayama, R., Takeda, K. και Kuwata, H., 1973. Studies on the breeding of the grass. IV. Differentiation of plants by anther culture in orchardgrass and smooth brome grass. Bull. Fac. Agric. Hirosaki Univ., p. 1-8, 21.
- Sangwan - Norreel, B.S., 1983. Male gametophyte nuclear DNA content evolution during androgenic induction in *Datura innoxia*. Z. Pflanzephysiol., p. 47-54, 111.
- Sangwan, R.S. και Norreel, B., 1975. Induction of plants from pollen grains of *Petunia* cultured *in vitro*. Nature (London), p. 222-223, 257.
- Sangwan, R.S. και Sangwan - Norreel, B.S. 1985. Effect des rayons gamma sur l' embryogenese somatique chez le *Daucus carota* L. e sur l' androgenese chez le *Nicotiana tabacum* L. et le *Datura innoxia* Mill en culture *in vitro*. Proc. Int. Symp. On Nuclear Techniques and *in vitro* Culture for plant Improvement. Vienne, Austria. p. 181 - 185.
- Sangwan, R.S. and Sangwan - Norreel, B.S., 1987a. Biochemical Cytology of pollen embryogenesis. Int. Rev. Cytol., p. 107, 221 - 272.
- Sangwan, R.S. και Sangwan - Norreel, B.S. 1987b. Ultrastructural cytology of plastids in pollen grains of certain androgenic and non androgenic plants. Protoplasma, p. 11-22, 138.
- Sangwan - Norreel, B.S., Sangwan, R.S. και Pare J., 1986. Haploidie et embryogenese provoquee *in vitro*. Bull. Soc. Bot. Fr. p. 133. Actual. Bot., p. 4, 7-39.
- San Noeum L., 1976. Haploides d' *Hordeum vulgare* L. par culture *in vitro* fecondes. Ann. Amelior, Plantes, p. 26, 751 - 754.
- Schaeffer GW, Baenziger P.S., Worley J., 1979. Haploid plant development from anthers and *in vitro* embryo culture of wheat. Crop. Sci, p. 19, 697-702.
- Sharp, W. R., Dougall, D.K. και Paddock, E.F., 1971. Haploid plantlets and callus from immature pollen grains of *Nicotiana* and *Lycopersicon*. Bull. Torrey Bot. Club., p. 98, 219-222.
- Sharp, W.R. Raskin, R.S. και Sommer, H. E., 1972. The use of nurse culture in the developing of haploid clones of tomato. Planta, p. 104, 357-361.
- Sinha, S., Roy, R.P και Jha, K.K., 1979. Callus formation and shoot bud differentiation in anther culture of *Solanum surattense*. Can. J. Bot., p. 57, 2524-2527.
- Sitbon M., 1981. Production of haploid *Gerbera jamesonii* plants by *in vitro* culture of unfertilized ovules. Agronomie, p. 1, 807 - 817.

Sopory S.K., Jacobsen E., Wenzel G., 1978. Production of monoploid embryoids and plantlets in cultured anthers of *Solanum tuberosum*. Plant Sci., Lett., p. 12, 47 - 54.

Spoerl. E. 1948. Amino acids as sources of nitrogen for orchid embryos. Am. J. Bot. p.35, 88-95.

Subrahmanyam, N.C., Kasha, K. J., 1973, Selective chromosom elimination during haploid formation in barley following interspecific hybridization, chromosom., p. 42, 111-125.

Sun, C., Wang, C. kai Ching. C., 1974. Cell division and differentiation of pollen grains in *Triticale* anthers cultured *in vitro*. Sci, Sin., p. 17, 47-54.

Sunderland, N., 1974. Anther culture as a means of haploid induction. In: K.J. Kasha (ed.), Haploids in Higher Plants - Advances and Potential. University of Guelph, Canada, p. 91-122.

Sunderland N. 1978. Strategies in the improvement of yields in anther culture. In: Proc Symp Plant Tissue Cult. Science Press, Peking, p. 65-86.

Sunderland N. 1980. Anther and pollen culture. 1974-1979. In: Davies DR, Hopwood DA (eds). The plant genome. John Innes Charity, Norwich, p. 171-183.

Sunderland N., 1982. Induction of growth in the culture of pollen. In "Differentiation *In vitro*". M.M. Yeoman dan D.E.S. Truman (eds). Cambridge Univ. Press, London and New York., p. 1-24.

Sunderland, N. 1983. The concept of morphogenic competence with reference to anther and pollen culture. S. K. Sen and K. C. Giles (eds). Plant Cell Culture in Crop Improvement. Plenum Press, New York p. 125-129.

Sunderland, N. 1984 in Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol.1, Vasil, I.K. (ed.), Academic Press, New York, p. 283.

Sunderland N., Wicks F.M. 1969. Cultivation of haploid plants from tobacco pollen. Nature, Lond. p. 224, 232, 251, 1227-1229.

Sunderland, N. kai Wicks, F.M., 1971. Embryoid formation in pollen grains of *Nicotiana tabacum*. J. Exp. Bot., p. 22, 213-226.

Sunderland N, Dunwell JM. 1977. Anther and pollen culture. In: Street HE (ed.). Plant tissue and cell culture, Blackwell, Oxford, p. 223-265.

Sunderland, N. kai Roberts, M. 1977. New approach to pollen culture. Nature p. 236-238, 270.

- Sunderland N, Roberts M., 1979. Cold - pretreatment of excised flower buds in float culture of tobacco anthers. *Ann Bot (London)*, p. 43, 405-414.
- Swamy, R.D. και Chacko, E.K., 1973. Induction of plantlets and callus from anthers of *Petunia axillaris* cultured *in vitro*. *Hortic. Res.*, p. 13, 41-44.
- Tanaka, M. Nakata, K. 1969. Tobacco plants obtained by anther culture and the experiment to get diploid seeds from haploids. *Jap.J.Genet.* p.44, 47-54.
- Tao Z.R., Liu M.S., Zhu Z.C., 1985. *In vitro* production of haploids plantlets from the unpollinated ovaries of potato *in vitro*. *Acta Genet. Sin.*, p. 15, 329 - 334.
- Thevenin, L., 1974. Haploids in *Asparagus* breeding. In: K. J. Kasha (ed.) *Haploids in Higher Plants: Advances and Potential*. University of Guelph, Canada, p. 279.
- Thomas, E., και Wenzel, W., 1975. Embryogenesis from the microspores of *Brassica napus*. *Z. Pflanzenzucht.*, p. 74, 77-81.
- Thomas, E. και Hoffmann, F. και Wenzel, G., 1975. Haploid plantlets from microspores of rye. *Z. Pflanzenzucht.*, p. 75, 106-113.
- Tian H.Q. & Yang H.Y., 1984. Morphogenetic aspects of gynogenetic embryoid and callus in ovary culture of *Oryza sativa L.* *Acta Bot. Sin.*, p. 26, 372 – 375.
- Truong – Andre I. και Demarly Y., 1984. Obtaining plants by *in vitro* culture of unfertilized maize ovaries (*Zea mays L.*) and preliminary studies on the progeny of a gynogenetic plant. *Z. Pflanzenzucht.*, p. 92, 309-320.
- Tsay H.S., 1981. The relationship between anther browning and callus formation in tobacco, rice and asparagus anther culture. In : *Plant tissue and cell culture*. Inst. Of Bot Academia Sinica (Taipei), p. 209 – 214.
- Tsay H.S., 1981. Effects of nitrogen supply to donor plants on pollen embryogenesis in cultured tobacco anthers *J. Agric Res China*, p. 5 – 13, 30.
- Tsai S.C., Lin MH., 1977. Production of rice plantlets by anther culture. *J. Agric Res China*, p. 26, 100 – 112.
- Tsay H.S., Teng YC., Lei PC., Chi NC. 1981. The culture of rice anthers of *japonica x indica* crosses *J. Agric Res China*, p. 30, 133-139.
- Tsay H.S. Chen LJ, Tseng TH, Lai PC. 1982. The culture of rice anthers of *japonica x indica* crosses. In: *Fujiwara Acad., Plant tissue culture 1982*. Maruzen, Tokyo, p. 561 – 562.
- Tulecke, W. 1953. A tissue derived from the pollen of *Ginkgo biloba*. *Science* p. 117, 599-600.

- Vacin, E.F., και Went, F. W. 1949. Use of tomato juice in the asymbiotic germination of orchid seeds. *Bot. Gaz. (Chicago)*, p. 111, 175-183.
- Van Breukelen EW., Ramanna M.S., Hermsen J.G.T. 1975. Monohaploids ($n = x = 12$) from autotetraploids *Solanum tuberosum* ($2n = 4x = 48$) through two successive cycles of female parthenogenesis. *Euphytica*, p. 24, 567 - 574.
- Van Geyt J., Speckmann Jr. G. T., D' Halluin K., Jacobs M., 1987. *In vitro* induction of haploid plants from unpollinated ovules and ovaries of the sugarbeet (*Beta vulgaris* L.) *Theor. Appl. Genet.*, p. 73, 920-925.
- Vyskot, B. και Novak, F.J., 1974. Experimental androgenesis *in vitro* in *Nicotiana clevelandii* Gray and *N. sanderae* Hort. *Theor. Appl. Genet.*, p. 44, 138-140.
- Vasil I.K., 1984. Cell culture and Somatic Cell Genetics of Plants. Academic Press, INC, New York., p. 221-230, 283-300, 311-324.
- Wagner, G. και Hess, D., 1974. Haploid, diploid and triploid plants of *Petunia hybrida* from pollen grains. *Z. Pflanzenphysiol.*, p. 73 273-276.
- Wakasa, K. και Watanabe, Y., 1979. Haploid plant of *Oryza perennis* (spontanea type) induced by anther culture. *Jpn. J. Breed.* p. 29, 146-150.
- Wakizuka, T. και Nakajima T. 1974. Effect of cultural condition on the *in vitro* development of ovules of *Petunia hybrida* *Jpn. J. Breed.* p.24, 182-187.
- Wang C.C. και Kuang B. J., 1981. Induction of haploid plants from the female gametophyte of *Hordeum vulgare* L. *Acta Bot. Sci.*, p. 23, 329-330.
- Wang, CC., Chu., C., Sun, C., Wu, S., Yin., K., και Hsu, C., 1973. The androgenesis in wheat (*Triticum aestivum* L.) anthers cultured *in vitro*. *Sci., Sin.*, p. 16, 218-222.
- Wang CC, Sun CS, Chou Z, 1974. On the conditions for the induction of rice pollen plantlets and certain factors affecting the frequency of induction. *Acta Bot Sinica.*, p. 16, 43-53.
- Wang, C., Chu., Z., Sun., C., Hsu. C., Yin., K. και Bi., F., 1975a. Induction of pollen plants from the anther culture of *Triticum vulgare* - *Agropyron glaucum* hybrid, *Acta Gen. Sin.*, p. 2, 71-77.
- Wang, CC., Chu, Z. και Sun., C., 1975b. The induction of *Populus* pollen - plants. *Acta Bot. Sin.*, p. 17, 56-59.

- Wang CC, Sun CS, Chu CC, WU SC, 1978. Studies on the albino pollen plantlets of rice. In: Proc Symp Plant Tissue Cult. Science Press, Peking, p. 149-160.
- Wang, J., Sun, J. και Zhu, Z., 1980. Induction of pollen plants from the anther culture of *Coix lacryma jobie* L. In: D. R. Davies et al (eds.) The Plant Genome. John Jnnes Ckarity, Norwich, U.K., p. 255.
- Wang P, Chen YR, 1980. Effects of growth conditions of anther -donor plants on the production of pollen plants in wheat anther culture. Acta Genet Sinica., p. 1, 64-71.
- Wang, Y., Sun., C., Wang., C., και Chien, N., 1973. Induction of pollen plantlets of *Triticale* and *Capsicum annum* from anther culture. Sci, Sin., p. 16, 147-151.
- Wei ZH, 1982. Pollen callus culture in *Triticum aestivum*. Theor Appl. Genet., p. 63, 71-73.
- Wenzel, G. & Sopory S.K. 1978. Production and utilisation of dihaploid or monohaploid potatoes. In "Production of Natural Compounds By Cell Culture Methods". A.W. Alfermann and E. Reinhard (eds.), Munich, Federal Republic of Germany, p. 303 - 305.
- Wenzel G. και Uhrig H., 1981. Breeding for nematode and virus - resistance in potato via anther culture, Theor. Appl. Genet., p. 59, 333 - 340.
- Wenzel, G., και Foroughi - Wehr, B. 1984 in Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 1. Vasil, I.K. (ed.), Academic Press, New York, p. 293, 311.
- Wenzel, G. Hoffmann, F. και Thomas E., 1977. Increased induction and chromosom doubling of androgenetic haploid rye. Theor. Appl. Genet., p. 51, 81-86.
- Wenzel, G., Bapat V.A., Uhrig H., 1982. New strategy to tackle breeding problems of potato. In "Plant Cell Culture in Crop Improvement" S.K. Sen and K.L. Giles, (eds.), Plenum, New York p. 337 - 349.
- Wernicke, W. και Kohlenbach, H. W., 1975. Antherkulturen bei *Scopolia*. Z. Pflanzephysiol., p. 77, 89-93.
- Wernicke W., Kohlenbach H.W., 1976. Investigations on liquid culture medium as a means of anther culture in *Nicotiana*. Z. Pflanzenphysiol., p. 79, 189-198.
- Wernicke, W. και Kohlenbach, H.W., 1977. Versuche zur Kultur isolierter Mikrosporen von *Nicotiana* and *Hyoscyamus*. Z. Pflanzenphysiol., p.81, 330-340.

White, P.R., 1932. Plant tissue culture: A preliminary report of results obtained in the culturing of certain plant meristems. Arch. Exp. Zellforsch. Besonders. Gewebezücht. p. 12, 602-620

White, P. R. 1954. "The Cultivation of Animal and Plant Cells". Ronald Press, New York. p. 6, 132 - 139

Woo SC, Tung IJ, 1972. Induction of rice plants from hybrid anthers of *indica* and *japonica* cross Bot Bull Acad Sinica., p. 13, 67-70.

Wu B.J. kai Cheng K.C., 1982. Cytological and embryological studies on haploid plant production from cultured unpollinated ovaries of *Nicotiana tabacum* L. Acta Bot. Sin., p. 24, 125-129.

Wu J, Zhong Q, Nong F, Zhang T., Chen M., Zheng B., 1980. Yield test of single cross in corn between inbred lines obtained from anther culture plants, Hereditas, p. 2, 23-26.

Wu J., Zhong Q., Nong F., Zhang T., Chen M., Zheng B., 1983. The pure lines from anther culture and their crossing combination of maize. Sci Sinica., p. 2, 154-160.

Wu K.X. kai Hu M.Z., 1984. Induction of maternal haploid plants from unpollinated ovaries of poplar *in vitro*. Acta Genet. Si., p. 11, 47-51.

Xu L, Jia S. 1979. Effect of sugar pretreatment on enhancing induction frequency of anther culture in maize. Heredita., p. 1, 30-31.

Xu ZH, Sunderland N. 1981. Glutamine, inositol and conditioning factor in the production of barley pollen callus *in vitro*. Plant sci Lett., p. 23, 161-168.

Yang, H.Y. kai Zhu, C. 1982. *In vitro* induction of haploid plants from unpollinated ovaries and ovules. Ther. Appl. Genet. P. 63, 97-104.

Zapata F.J., Torrizo L.B., Ramero RO, Alejar M.S., 1982, Androgenesis in *Oryza sativa*. In: Fujiwasa A (ed.) Plant Tissue culture 1982. Maruzen, Tokkyo., p. 531-532.

Zenkeler, M., 1971. *In vitro* production of haploid plants from pollen grains of *Atropa belladonna*. Experientia, p.27, 1087.

Zenkeler, M., 1972. Development of embryos and seedlings from pollen grains in *Lycium halimifolium*. Biol. Plant., p. 14, 420-422.

Zenkeler, M., 1973. *In vitro* development of embryos and seedlings from pollen grains of *Solanum dulcamara*. Z. Pflanzenphysiol., p. 69, 189-192

Zenkler, M. και Straud, J., 1979. Cytoembryological studies on the process of fertilization and the development of haploid embryos of *Triticum aestivum* L. ($2n = 42$) after crossing with *Hordeum bulbosum* ($2n = 14$). Z. Pflanzenzucht p.36-44,82.

Zhou C. και Yang H.Y., 1980. *In vitro* induction of haploid plantlets from unpollinated young ovaries of *Oryza Sativa* L. Acta Genet. Sin. p. 7, 287-288.

Zhu Z. και Wu H.S. 1979. *In vitro* induction of haploid plantlets from the unpollinated ovaries of *Triticum aestivum*. Acta Genet. Sin., p. 6, 181-183.

Zhu Z., Sun CS, Wang JJ. 1978. Cytological investigation on androgenesis of *Triticum aestivum* Acta Bot Sinica., p. 6-14, 20.

Zhu, Z., Wang., J. και Sun, J. 1980. The induction of albino plants and preliminary observation of their ploidy in *Triticum durum* Desf. In: D.R. Davies et al (eds), The Plant Genome, Jonh Innes Chority, Norwich, U.K., p. 254-255.

Zhuang J., Jia X. 1980. Studies on the differentiation of pollen calli of wheat. Annu Rep Inst. Genet Acad Sinica 1980, p. 70-71.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

1. Πίνακας με τα είδη στα οποία έχει επιτυγχανθεί

in vitro ανδρογένεση

2. Πίνακας με τα είδη στα οποία έχει επιτυγχανθεί

in vitro γυνογένεση

3. Ορισμοί όρων που χρησιμοποιούνται

νακας 1: Είδη από τα οποία έχουν παραχθεί απλοειδή με *in vitro* καλλιέργεια ανθέρων ή γύρης

Είδη	Τρόπος ανάπτυξης	Αναφορές
<i>Caricaceae</i>		
<i>Carica papaya</i>	?	Litz and Conover (1980)
<i>Chenopodiaceae</i>		
<i>Beta vulgaris</i>	?	Cited in Hu et al. (1978)
<i>Compositae</i>		
<i>Gerbera jamesonii</i>	C	Preil et al. (1977)
<i>Cruciferae</i>		
<i>Arabidopsis thaliana</i>	C	Gresshoff and Doy (1972a)
<i>Brassica campestris</i>	E	Keller and Armstrong (1979)
<i>B. chinensis</i>	?	Chung et al. (1978), cited in Hu (1978)
<i>B. oleracea</i>	C	Kameya and Hinata (1970)
<i>B. oleracea x B. alboglabra (F1)</i>	C	Kameya and Hinata (1970)
<i>B. napus</i>	E	Thomas and Wenzel (1975), Keller and Armstrong (1978)
<i>B. pekinensis</i>	?	Cited in Hu et al. (1978)
<i>Euphorbiaceae</i>		
<i>Hevea brasiliensis</i>	?	Chen et al. (1978)
<i>Geraniaceae</i>		
<i>Pelargonium hortorum</i>	C	Abo El-Nil and Hildebrandt (1973)
<i>Gramineae</i>		
<i>Aegilops caudata x Ae. umbellata</i>	C	Kimata and Sakamoto (1972)
<i>Bromus inermis</i>	C	Saito et al. (1973)
<i>Coix lacryma</i>	?	Wang et al. (1980)
<i>Hordeum vulgare</i>	C	Clapham (1971, 1973), Mix et al. (1978)
<i>Lolium multiflorum</i>	C	Clapham (1971)
<i>L. multiflorum x Festuca arundinaceae</i>	C	Nitzsche (1970)
<i>Oryza sativa</i>	C,E	Niizeki and Oono (1968), Nishi and Mitsuoka (1969), Harn (1969), Guha et al. (1970), Iyer and Raina (1972), Guha - Mykherjee (1973)
<i>O. perennis</i>	C	Wakasa and Watanabe (1979)
<i>Secale cereale</i>	C,E	Thomas et al. (1975), Wenzel et al. (1977)
<i>Setaria italica</i>	C	Ban et al. (1971)
<i>Triticale</i>	C	Sun et al. (1974)
<i>Triticum aestivum</i>	C, E	Ouyang et al. (1973), Wang, C. Et al. (1973), Craig (1974), Schaeffer et al. (1979)
<i>T. durum</i>	?	Zhu et al. (1980)
<i>T. vulgare x Agropyron glaucum</i>	C	Wang et al. (1975a)
<i>Zeas mays</i>	C, E	Miao et al. (1978)

Είδη	Τρόπος ανάπτυξης	Αναφορές
<i>Hippocastanaceae</i>		
<i>Aesculus hippocastanum</i>	E	Radojevic (1978)
<i>Leguminosae</i>		
<i>Trifolium alexandrinum</i>	E	Mokhtarzadeh and Constatin (1978)
<i>Liliaceae</i>		
<i>Asparagus officinalis</i>	C	Pelletier et al. (1972), Dore (1974), Thevenin (1974)
<i>Lilium longiflorum</i>	C	Sharp et al. (1972)
<i>Ranunculaceae</i>		
<i>Paeonia hybrida</i>	E	Sunderland (1974)
<i>Rutaceae</i>		
<i>Poncirus trifoliata</i>	E	Hidaka et al. (1979)
<i>Salicaceae</i>		
<i>Populus nigra</i>	C	Wang et al. (1975b)
<i>Scrophulariaceae</i>		
<i>Digitalis purpurea</i>	C	Corduan and Spix (1975)
<i>Solanaceae</i>		
<i>Atropa belladonna</i>	E	Zenkteler (1971), Misiura and Zenkteler (1973), Rashid and Street (1973)
<i>Capsicum annuum</i>	C, E	Wang, Y. Et al. (1973), Harn et al. (1975)
<i>Datura innoxia</i>	E	Guha and Maheshwari (1966), Nitsch (1972), Nitsch and Norreel (1973)
<i>D. metel</i>	C, E	Narayanaswamy and Chandy (1971), Iyer and Raina (1972)
<i>D. meteloides</i>	E	Nitsch (1972), Kohlenbach and Gejer (1972)
<i>D. muricata</i>	E	Nitsch (1972)
<i>D. stramonium</i>	E	Cuha and Maheshwari (1967)
<i>D. wrightii</i>	E	Kohlenbach and Geier (1972)
<i>Hyoscyamus albus</i>	E	Raghavan (1975)
<i>H. niger</i>	E, C	Corduan (1975), Wernicke and Kohlenbach (1977), Raghavan (1978)
<i>H. pusillus</i>	E	Raghavan (1975)
<i>Lycium halimifolium</i>	E	Zenkteler (1972)
<i>Lycopersicon esculentum</i>	C	Sharp et al. (1971), Gresshoff and Doy (1972b)
<i>Nicotiana alata</i>	E	Nitsch (1969), Nitsch and Nitsch (1970)
<i>N. attenuata</i>	E	Collins and Sunderland (1974)
<i>N. clevelandii</i>	E	Vyskot and Novak (1974)
<i>N. glutinosa</i>	E	Nitsch and Nitsch (1970), Nakamura and Itagaki (1973)
<i>N. knightiana</i>	E	(1973)
<i>N. langsdorffii</i>	E	Collins and Sunderland (1974) Durr and Fleck (1980)

Είδη	Τρόπος ανάπτυξης	Αναφορές
<i>N. otophora</i>	E	Nitsch (1972), Nakamura and Itagaki (1973)
<i>N. paniculata</i>	E	Nakamura et al. (1974)
<i>N. raimondii</i>	E	Collins and Sunderland (1974)
<i>N. rustica</i>	E	Nitsch and Nitsch (1970), Nakamura and Itagaki
<i>N. sanderae</i>	E	(1973)
<i>N. sylvestris</i>	E	Vyskot and Novak (1974)
<i>N. tabacum</i>	E	Bourgoin and Nitsch (1967), Nitsch and Nitsch (1970) Bourgoin and Nitsch (1967), Nagata and Tanaka (1968), Nitsch et al. (1968), Nitsch (1969), Nitsch and Nitsch (1970), Sunderland and Wicks (1971).
<i>Petunia axillaris</i>	E	Devreux (1970), Kochhar et al. (1971b)
<i>P. hybrida</i>	C	Engvild (1973), Swamy and Chacko (1973)
<i>P. axillaris</i> x <i>P. Hybrida</i>	C	Wagner and Hess (1974), Sangwan
<i>Scopolia carniolica</i>	E	Raquin and Pilet (1972)
<i>S. lurida</i>	E	Wernicke and Kohlenbach (1975)
<i>S. physaloides</i>	E	Wernicke and Kohlenbach (1975)
<i>Solanum bulbocastanum</i>	C, E	Wernicke and Kohlenbach (1975)
<i>S. demissum</i>	C, E	Irikura (1975)
<i>S. dulcanara</i>	C, E	Irikura (1975)
<i>S. fendleri</i>	C, E	Zenkteler (1973)
<i>S. hjertingii</i>	E	Irikura (1975)
<i>S. melongena</i>	C	Irikura (1975)
<i>S. nigrum</i>	C	Raina and Iyer (1973)
<i>S. phureja</i>	E	Harn (1972), Irikura (1975)
<i>S. polytrichon</i>	C, E	Irikura (1975)
<i>S. stenotomum</i>	E	Irikura (1975)
<i>S. stoloniferum</i>	E	Irikura (1975)
<i>S. surattense</i>	C	Irikura (1975)
<i>S. tuberosum</i>	C, E	Sinha et al. (1979) Dunwell and Sunderland (1973), Irikura (1975).
<i>S. verrucosum</i>	C, E	Soropy et al. (1978)
<i>S. verrucosum</i> x <i>S. Chacoense</i>	E	Irikura and Sakaguchi (1972), Irikura (1975)
<i>S. verrucosum</i> x <i>S. Tuberosum</i>	E	Irikura (1975) Irikura (1975)

κύριες πηγές πληροφοριών που παρουσιάζονται στον πίνακα προέρχονται από τις εργασίες, Niizeki (1977) και Hu (1978)

= Απλοειδή φυτά που προέρχονται από εμβρυγένεση της γύρης

= Απλοειδή φυτά που προέρχονται από καλλοποίηση της γύρης

Δεν είναι ξεκάθαρη η προέλευσή τους

Πίνακας 2: Είδη στα οποία έχουν προκύψει απλοειδή φυτά μέσω της *in vitro* γυνογένεσης

Οικογένεια	Είδος	Αναφορές / Συγγραφείς
<i>Gramineae</i>	<i>Hordeum vulgare</i>	San Noeum, 1976 Wang and Kuang, 1981 Huang et al., 1982 Gu and Zheng, 1984
	<i>Triticum aestivum</i>	Zhu and Wu, 1979
	<i>Oryza sativa</i>	Asselin de Beauville, 1980 Zhou and Yang, 1980 Kuo, 1982
	<i>Zea mays</i>	Ao et al., 1982 Truong - Andre and Demarly, 1984
	<i>Coix lacryma - jobi</i>	Li and Zhang, 1984
<i>Solanaceae</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	Zhu and Wu, 1979 Wu and Cheng, 1982
	<i>Nicotiana rustica</i>	Wu and Cheng, 1982
	<i>Petunia axillaris</i>	De Verma and Collins, 1984
	<i>Solanum tuberosum</i>	Tao et al., 1985
<i>Compositae</i>	<i>Gerbera jamesonii</i>	Sitbon, 1981 Meynet and Sibi, 1984 Ahmin and Vieth, 1986 Cappadocia et al., 1988
	<i>Helianthus annuus</i>	Cai and Zhou, 1984 Gelebart and San, 1987
	<i>Beta vulgaris</i>	Hosemans and Bossoutrot, 1983 Bornman, 1985 D' Halluin and Keimer, 1986 Van Geyt et al., 1987 Doctrinal et al., 1989
<i>Liliaceae</i>	<i>Lilium davidii</i>	Gu and Cheng, 1983
	<i>Allium tuberosum</i>	Tian and Yang, 1989
<i>Salicaceae</i>	<i>Populus x simonigra</i>	Wu and Xu, 1984
<i>Euphorbiaceae</i>	<i>Hevea brasiliensis</i>	Chen et al., 1985

ΑΠΛΟΕΙΔΗ ΦΥΤΑ:

Είναι τα φυτά που έχουν μία σειρά χρωμοσωμάτων

ΔΙΠΛΑΣΙΑΣΜΕΝΑ ΑΠΛΟΕΙΔΗ:

Είναι τα φυτά στα οποία έχουμε διπλασιάσει τον χρωμοσωματικό τους αριθμό

ΑΝΔΡΟΓΕΝΕΣΗ:

Είναι η δημιουργία αρσενικών γαμετών

ΓΥΝΟΓΕΝΕΣΗ:

Είναι η δημιουργία θηλυκών γαμετών