

ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Με τον όρο ιστοκαλλιέργεια εννοούμε τη διαδικασία εκείνη κατά την οποία μικρά κομμάτια ζωντανού ιστού, τα λεγόμενα **έκφυτα**, απομονώνονται από τον οργανισμό και καλλιεργούνται υπό ασηπτικές συνθήκες σε θρεπτικά υποστρώματα (καθορισμένα ή μη), για χρονική περίοδο που εξαρτάται από ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες.

Ο όρος ιστοκαλλιέργεια έχει επικρατήσει και αναφέρεται για κάθε καλλιέργεια *in vitro*, η οποία όμως περιλαμβάνει εκτός από καλλιέργεια ιστών, καλλιέργεια οργάνων (όπου το έκφυτο είναι οφθαλμός, ρίζα, σπόρος κλπ.), καλλιέργεια κυττάρων και καλλιέργεια πρωτοπλαστών.

Βασικές αρχές εργαστηριακής μεθόδου της ιστοκαλλιέργειας

Η ιστοκαλλιέργεια γίνεται πάντοτε υπό ασηπτικές συνθήκες γιατί τα τεχνητά θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιούμε είναι κατάλληλα για την ανάπτυξη και μικροοργανισμών.

Ο κανόνας είναι, ότι κατά την ιστοκαλλιέργεια όλες οι εργασίες πρέπει να γίνονται σε καθαρό περιβάλλον, ενώ στην κυρίως φάση της ιστοκαλλιέργειας σε αποστειρωμένο περιβάλλον.

α) Φυτά-δότες

Τα φυτά που θα δώσουν το υλικό που θα χρησιμοποιηθεί στην ιστοκαλλιέργεια ονομάζονται **μητρικά ή φυτά δότες ή δωρητές**.

Η επιτυχία της ιστοκαλλιέργειας ξεκινά από το μητρικό φυτό, το οποίο πρέπει να είναι υγιές και ζωηρό. Τα μητρικά φυτά συνήθως μεγαλώνουν ή στο θερμοκήπιο ή σε θάλαμο με ελεγχόμενες συνθήκες. Αυτό βοηθάει στον καλύτερο χειρισμό των φυτών από άποψη ασθενειών. Τα μητρικά φυτά ποτίζονται στη ρίζα και αποφεύγεται το πότισμα του υπέργειου τμήματος του φυτού. Οι ελεγχόμενες συνθήκες χρειάζονται στη περίπτωση που γίνεται συγκριτική μελέτη των μητρικών φυτών ως προς την αντίδραση τους στην ιστοκαλλιέργεια. Αυτό είναι απαραίτητο γιατί εκτός από τον γονότυπο και το περιβάλλον ανάπτυξης του δωρητού ή μητρικού φυτού πριν από τη λήψη του έκφυτου παίζουν σημαντικό ρόλο στην αντίδραση του έκφυτου στην ιστοκαλλιέργεια.

β) Έκφυτο

Συνηθισμένα έκφυτα είναι οι οφθαλμοί, τα ακκρορίζια, τα μεσογονάτια, τα έμβρυα κ.λ.π. Για μία επιτυχή ιστοκαλλιέργεια είναι καλύτερα να χρησιμοποιούνται έκφυτα πλούσια σε αδιαφοροποίητα κύτταρα γιατί αυτά τα κύτταρα έχουν την ικανότητα γρήγορου πολλαπλασιασμού.

Το έκφυτο απολυμαίνεται επιφανειακά. Απλούστερο απολυμαντικό είναι η εμπορική χλωρίνη. Άλλα απολυμαντικά το υποχλωριώδες νάτριο και ασβέστιο, το υπεροξειδίο του υδρογόνου ή ο χλωριούχος υδράργυρος (πολύ τοξικός). Πολλοί χρησιμοποιούν και αιθανόλη. Ο χρόνος παραμονής στο απολυμαντικό πρέπει να είναι αρκετός για να γίνει σωστή απολύμανση αλλά όχι τόσοσ που να προξενήσει βλάβες στους υπό καλλιέργεια ιστούς. Το είδος του απολυμαντικού που χρησιμοποιείται εξαρτάται από το είδος του έκφυτου

(ξυλοποιημένο ή μη κλπ). Μετά την εφαρμογή του απολυμαντικού τα έκφυτα ξεπλένονται πολύ καλά με απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό για να απομακρυνθεί το υπόλειμμα του απολυμαντικού. Η εργασία αυτή καθώς και αυτές που ακολουθούν την απολύμανση γίνονται μέσα σε θάλαμο αποστείρωσης.

Ακολουθεί η τελική εξαγωγή του έκφυτου και η τοποθέτηση του στο δοχείο με το θρεπτικό υπόστρωμα. Στην περίπτωση της καλλιέργειας του ακραίου μεριστώματος ή της ανθηροκαλλιέργειας επειδή τα έκφυτα καλύπτονται από φύλλα και κατά κάποιο τρόπο προστατεύονται από περιβαλλοντικές μολύνσεις, η απολύμανση μπορεί να γίνει χησιμοποιώντας 70% αιθανόλη. Έτσι απολυμαίνονται οι επιφανειακές προστατευτικές επιφάνειες και μετά ακολουθεί η εξαγωγή του έκφυτου υπό ασηπτικές συνθήκες.

γ) Θρεπτικά υποστρώματα

Τα θρεπτικά υποστρώματα μπορεί να είναι υγρά ή στερεά. Στην δεύτερη περίπτωση ο παράγοντας ζελατινοποίησης μπορεί να είναι άγαρ ή αγαρόζη ή άλλες συνθετικές ουσίες. Τα περισσότερα θρεπτικά υποστρώματα αποτελούνται από ανόργανα άλατα, ιχνοστοιχεία, βιταμίνες, κάποια πηγή άνθρακα, συνήθως σουκρόζη και ρυθμιστές ανάπτυξης. Επίσης, πηγές οργανικού αζώτου (γλυσίνη) και ινοσιτόλη.

Για την εξέλιξη των φυτικών κυττάρων σε κάλλο είναι αναγκαία τις περισσότερες φορές η παρουσία φυτομόνης, δηλαδή αυξίνη κυτοκίνη, γιβερελλίνη ή τα συνθετικά αντίστοιχα τους. Οι ακριβείς ποσότητες που χρησιμοποιούνται ποικίλουν για διαφορετικά έκφυτα από διαφορετικά μέρη του ίδιου φυτού αλλά και για το ίδιο είδος εκφύτου (π.χ. ανθήρες) από διαφορετικά είδη φυτών.

Οι τρεις βασικές ομάδες που χρησιμοποιούνται είναι οι αυξίνες, οι κυτοκίνες και οι γιβερελλίνες. Απο τις αυξίνες το IAA, μια φυσική αυξίνη διασπάται εύκολα από τους φυτικούς ιστούς και συνήθως δεν χρησιμοποιείται μόνη της. Περισσότερο αποτελεσματικά είναι τα σταθερά ανάλογα του IAA, το IBA και το NAA. Οι πιο ενεργές απο τις αυξίνες είναι το 2,4-D το CPA και το 2,4,5-T που προκαλούν γρήγορη ανάπτυξη του κάλλου. Από τις κυτοκίνες χρησιμοποιούνται το BAP, το 2iP, η κινετίνη, η ζεατίνη.

Όταν χρησιμοποιηθούν τα κατάλληλα θρεπτικά υποστρώματα, τότε κομμάτια ιστού από τα περισσότερα δικοτυλήδονα φυτά και ιδιαίτερα έκφυτα σε μεριστωματική φάση από τα μονοκοτυλήδονα φυτά (σιτηρά) θα αντιδράσουν και θα αρχίσουν να διαιρούνται και να πολλαπλασιάζονται γρήγορα.

Το περισσότερο διαδεδομένο θρεπτικό υπόστρωμα είναι αυτό των Murashige and Skoog, τροποποιήσεις του οποίου βρίσκουν εφαρμογή σε πολλά μονοκοτυλήδονα και δικοτυλήδονα φυτά.

Η σύνθεση του θρεπτικού υποστρώματος εξαρτάται από το είδος του έκφυτου και τον σκοπό της ιστοκαλλιέργειας. Πριν ολοκληρωθεί η παρασκευή του θρεπτικού μέσου γίνεται ρύθμιση του pH. Η αποστείρωση των θρεπτικών μέσων και των δοχείων ή τρυβλίων ιστοκαλλιέργειας είναι απαραίτητη.

δ) Επώαση

Τα δοχεία ή τρυβλία ιστοκαλλιέργειας κλείνονται καλά και τοποθετούνται σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών θερμοκρασίας, φωτισμού, φωτοπερίόδου και ατμόσφαιρας που

ρυθμίζονται ανάλογα με τις απαιτήσεις της ιστοκαλλιέργειας. Συνήθως η θερμοκρασία κυμαίνεται γύρω στους 25°C και η ένταση του φωτός στα 1000-5000 lux. Οι επιδράσεις της θερμοκρασίας και του φωτισμού είναι πολύ σημαντικές για ορισμένα είδη.

ε) Υποκαλλιέργεια

Η υποκαλλιέργεια γίνεται διαιρώντας την αρχική καλλιέργεια σε αρκετές θυγατρικές. Η συχνότητα των υποκαλλιεργειών εξαρτάται από πολλούς παράγοντες (π.χ. το είδος του θρεπτικού μέσου που χρησιμοποιείται).

Καλλιέργεια φυτικών κυττάρων

Όταν ο κάλλος μεταφέρεται σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα που βρίσκεται υπό συνεχή ανακίνηση, τότε η μάζα των κυττάρων «σπάει» για να δώσει ένα αιώρημα μεμονωμένων κυττάρων και συσσωματωμάτων τους. Τέτοια εναιωρήματα κυττάρων μπορούν να διατηρηθούν στην υγρή καλλιέργεια και να πολλαπλασιασθούν απεριόριστα με συνεχείς υποκαλλιέργειες. Όταν απομονωθούν μεμονωμένα κύτταρα από αυτές τις καλλιέργειες και τοποθετηθούν στο κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα μπορούν να διαιρεθούν.

Για τη διαίρεση και τον πολλαπλασιασμό μπορεί να είναι απαραίτητη η χρησιμοποίηση ειδικού μέσου (conditioned medium), η προετοιμασία του οποίου γίνεται ως εξής: Καλλιεργούνται υψηλές συγκεντρώσεις κυττάρων σε φρέσκο θρεπτικό υπόστρωμα για μερικές μέρες και μετά απομακρύνονται τα κύτταρα με ασηπτικό φιλτράρισμα (filter sterilization). Το θρεπτικό υπόστρωμα περιέχει απαραίτητα αμινοξέα όπως γλουταμίνη και ρυθμιστές ανάπτυξης όπως κυτοκίνη. Εάν χρησιμοποιηθεί αυτό το ειδικό μέσο, τότε τα φυτικά κύτταρα μπορούν να καλλιεργηθούν σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα με παρόμοιο τρόπο όπως οι μικροοργανισμοί. Αντί να σχηματισθεί μία αποικία στη περίπτωση των φυτικών κυττάρων σχηματίζεται κάλλος.

Καλλιέργεια πρωτοπλαστών

Στην καλλιέργεια των φυτικών κυττάρων μπορεί να συμπεριληφθεί και η καλλιέργεια πρωτοπλαστών οι οποίοι είναι κύτταρα χωρίς το κυτταρικό τους τοίχωμα. Οι πρωτοπλάστες προέρχονται από εναιωρούμενες καλλιέργειες, κάλλο που αναπτύσσεται σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα ή κάποιο άλλο κατάλληλο ιστό από τον φυτικό οργανισμό όπως π.χ. το μεσόφυλλο των φύλλων. Η απομόνωση των πρωτοπλαστών επιτυγχάνεται μετά από ενζυματική ή μηχανική απομάκρυνση του κυτταρικού τοιχώματος ή και συνδυασμό των δύο. Τα ένζυμα που συνήθως χρησιμοποιούμε στην απομόνωση των πρωτοπλαστών είναι η πηκτινάση και η κυτταρινάση. Η πηκτινάση είναι απαραίτητη για να σπάσει τα συσσωματώματα των κυττάρων σε μεμονωμένα κύτταρα και η κυτταρινάση για να απομακρύνει το κυτταρικό τοίχωμα.

Μετά τη χρήση του ενζύμου, τα εναιωρήματα των πρωτοπλαστών συλλέγονται με φυγοκέντρηση, ξεπλένονται σε μέσο χωρίς ένζυμο και διαχωρίζονται από τα φυτικά κύτταρα, καθώς και τα υπολείμματα των κυτταρικών τοιχωμάτων. Όταν οι πρωτοπλάστες τοποθετούνται στο κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα μέσα σε 5-10 μέρες θα συνθέσουν νέα κυτταρικά τοιχώματα και θα αρχίσουν οι κυτταρικές διαιρέσεις.

Καλλιέργεια φυτικών οργάνων

Εάν το κορυφαίο μερίστωμα απολυμανθεί επιφανειακά και τοποθετηθεί σε θρεπτικό υπόστρωμα χωρίς ορμόνη θα αναπτυχθεί και θα δώσει ένα φυτάριο. Αντίθετα εάν έχει προστεθεί κυτοκινίνη στο θρεπτικό υπόστρωμα θα ενεργοποιηθούν οι μαχαλιαίοι οφθαλμοί και θα παραγουν μια συστάδα βλαστών-φύλλων. Εάν αυτή η συστάδα διαχωριστεί σε ατομικούς βλαστούς τότε κάθε ένας από αυτούς μπορεί να δώσει εκ νέου μία συστάδα βλαστών-φύλλων. Αυτή η διαδικασία ονομάζεται **μικροπολλαπλασιασμός** και συνεχίζεται χωρίς τέλος αν υπάρχουν οι κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες.

Η ικανότητα του μαχαλιαίου μεριστώματος να δώσει βλαστό βρίσκεται υπό ορμονικό έλεγχο. Στην περίπτωση αυτή δεν γίνεται αναγέννηση. Οι παραδοσιακές μέθοδοι της αγενούς αναπαραγωγής έχουν βοηθήσει στο παρελθόν στον πολλαπλασιασμό ετεροζυγωτικών φυτών που χρησιμοποιούνται σε βελτιωτικά προγράμματα ή στον πολλαπλασιασμό εκλεκτών ποικιλιών. Η *in vitro* αναπαραγωγή που αναφέρεται ως **μικροπολλαπλασιασμός** επιτρέπει την γρήγορη αναπαραγωγή όλων των ειδών των ανώτερων φυτών.

Παραγωγή νέων φυταρίων

Κατά την *in vitro* καλλιέργεια τα νέα φυτάρια μπορούν να παραχθούν αφού μεσολαβήσει η φάση του **κάλλου**. Δηλαδή η μάζα των αδιαφοροποίητων κυττάρων πάνω στην οποία μπορούν να επαχθούν μεριστωμοειδή όταν έχουμε αναγέννηση.

Αυτός ο τρόπος είναι αναπόφευκτος κατά την αναγέννηση φυταρίων από πρωτοπλάστες και κυτταροκαλλιέργειες και επίσης κατά τον *in vitro* πολλαπλασιασμό συγκεκριμένων φυτών οικονομικού ενδιαφέροντος όπως στα σιτηρά.

Τα νέα πρώτα φυτάρια μπορούν να παραχθούν από προϋπάρχοντα μεριστώματα (πλάγιους οφθαλμούς και κορυφαίο μερίστωμα), καθώς και περιστασιακά βλαστίδια (σχηματισμοί βλαστών ή φύλλων που αναπτύσσονται από θέσεις που δεν θα είχαν προέλθει υπό κανονικές συνθήκες. Παράδειγμα βολβοί, ριζώματα, νευρώσεις φύλλων κλπ.). Αυτός ο τρόπος παραγωγής νέων φυταρίων από προϋπάρχοντα μεριστώματα είναι τυπικός για τον μικροπολλαπλασιασμό.

Τρόπος παραγωγής νέων φυταρίων

Υπάρχουν δύο βασικοί τρόποι ανάλογα αν μεσολαβήσει κάλλος ή όχι. Ο διαχωρισμός του τρόπου παραγωγής των φυταρίων με την μεσολάβηση του κάλλου ή όχι είναι απαραίτητος.

Όταν δεν μεσολαβεί το στάδιο του κάλλου τα φυτάρια που παράγονται είναι ως επί το πλείστον γενετικά ομοιόμορφα, το οποίο επιδιώκει άλλωστε και ο μικροπολλαπλασιασμός. Όταν μεσολαβεί το στάδιο του κάλλου μπορεί να δράσει το φαινόμενο της σωμακλωνικής παραλλακτικότητας.

Αναγέννηση(ή Αναγένεση)

Η **αναγέννηση (regeneration)** στηρίζεται στην θεωρία της **παντοδυναμίας (totipotency)**. Τα κύτταρα που μπορούν να διαφοροποιηθούν και να δώσουν ολόκληρο τον οργανισμό από τον οποίο προέρχονται, λέγονται ότι είναι **παντοδύναμα**.

Ο αριθμός των φυτικών ειδών που μπορεί να μας δώσει κάλλο ή μία κυτταροκαλλιέργεια είναι πολύ μεγάλος. Στο στάδιο των κυττάρων ή των πρωτοπλαστών μπορεί να προκληθεί η δημιουργία παραλλακτικότητας εξαιτίας των συνθηκών ιστοκαλλιέργειας (σωμακλωνική παραλλακτικότητα), λόγω επέμβασης (σύντηξη πρωτοπλαστών) ή λόγω γενετικής μεταχείρισης με ανασυνδυασμένο DNA. Η αναγέννηση είναι το πιο κρίσιμο στάδιο. Δηλαδή αν είναι δυνατό να αναγεννήσουμε τα νέα φυτάρια από τα κύτταρα μιας καλλιέργειας ή από κάλλο. Αυτό που ενδιαφέρει πρακτικά τον βελτιωτή είναι να πάρει φυτάρια μετά από την εφαρμογή των νέων μεθόδων της γενετικής μηχανικής.

Παντοδυναμία κυττάρων

Παρόλο που αναγνωρίζουμε τους χημικούς παράγοντες που οδηγούν στην μορφογένεση, δεν γνωρίζουμε ποιος είναι ο μηχανισμός που οδηγεί στην απαρχή σχηματισμού ενός βλαστού ή την δημιουργία μιας ρίζας. Πολύ λίγα καλλιεργούμενα κύτταρα αντιδρούν στους εξωτερικούς ορμονικούς και άλλους περιβαλλοντικούς ερεθισμούς και προχωρούν στην αναγέννηση.

Το θέμα της παντοδυναμίας των κυττάρων, δηλ. της ικανότητας μεμονωμένων κυττάρων να δώσουν ολόκληρα τα φυτά από τα οποία προέρχονται, έχει συζητηθεί πολύ από διάφορους ερευνητές. Όσο όμως εξακολουθούν να υπάρχουν δύστροποι ιστοί ή κύτταρα ή πρωτοπλάστες που δεν προχωρούν σε αναγέννηση, το θέμα αυτό θα παραμένει ανοιχτό. Η παντοδυναμία των κυττάρων είναι χαρακτηριστικό των μη διαφοροποιημένων κυττάρων. Τα αδιαφοροποίητα κύτταρα μπορούν να αλλάζουν μεταβολικούς δρόμους ανάπτυξης σε εξάρτηση με το περιβάλλον στο οποίο βρίσκονται.

Μορφογένεση

Η επαγωγή των περιστασιακών μεριστωμάτων και οι αναπτυξιακοί μεταβολικοί δρόμοι που οδηγούν στην διαφοροποίηση και τελικά στον σχηματισμό αναγνωρίσιμων ιστών ονομάζεται **μορφογένεση**. Η μορφογένεση γίνεται είτε με την **οργανογένεση** είτε με την **εμβρυογένεση**. Κατά την οργανογένεση σχηματίζονται ρίζες, βλαστοί ή και ανθικά όργανα. Κατά τη σωματική εμβρυογένεση σχηματίζεται μια διπολική μορφή με βλαστικές και ριζικές καταβολές. Έρευνες έδειξαν ότι οργανογένεση αρχίζει από πολλά κύτταρα ενώ η εμβρυογένεση από ένα μόνο. Ο διαχωρισμός αυτός έχει νόημα όταν η ιστοκαλλιέργεια εξυπηρετεί τις σύγχρονες μεθόδους της βελτίωσης, κατά τις οποίες φιλοδοξούμε να προκαλέσουμε γενετικές αλλαγές σε κάποια από τα κύτταρα μιας καλλιέργειας. Αν κάποιο γενετικά αλλαγμένο κύτταρο δώσει φυτάριο με την διαδικασία της εμβρυογένεσης τότε ολόκληρο το φυτάριο θα φέρει την γενετική αλλαγή. Αν όμως το φυτάριο προέλθει μέσω της οργανογένεσης από μια ομάδα κυττάρων μεταλλαγμένων και μη τότε το φυτό θα είναι χιμαιρικό.

Αναγέννηση στα σιτηρά

Έχουν δημοσιευτεί πολλά πρωτόκολλα μεθόδων που χρησιμοποιούνται για τη μορφογένεση και ακολούθως της αναγέννησης των σιτηρών. Η μορφογένεση γίνεται και στα σιτηρά είτε με την **οργανογένεση**, είτε με την **εμβρυογένεση**. Κατά την οργανογένεση

σηματίζεται ξεχωριστά κάποιο όργανο, είτε ο βλαστός (shoot) είτε η ρίζα (root). Το όργανο αυτό δεν αποτελεί ξεχωριστό σώμα αλλά έχει αγγειώδεις δεσμίδες και συνδέεται με τον κύριο κάλλο. Οι ρίζες αναπτύσσονται ανεξάρτητα από τους βλαστούς ως προς την θέση τους και τον χρόνο σχηματισμού τους. Για το σχηματισμό του κάλλου είναι απαραίτητη η χρήση ορμονών κυτοκινίνης ή αυξίνης. Η κυτοκινίνη είναι απαραίτητη για την επαγωγή μεριστωμάτων βλαστών ενώ η αυξίνη είναι απαραίτητη για την επαγωγή των μεριστωμάτων της ρίζας.

Όλες οι αρχικές δημοσιεύσεις για την αναγέννηση των φυτών μετά απο ιστοκαλλιέργεια στα Gramineae αναφέρονταν στην οργανογένεση. Στις περισσότερες από αυτές τις περιπτώσεις γινόταν ανάπτυξη προϋπάρχοντων μεριστωμάτων και όχι η δημιουργία νέων. Από το 1980 και μετά υπάρχουν πολλές αναφορές για ύπαρξη σωματικής εμβρυογένεσης. Κατά την σωματική εμβρυογένεση σχηματίζεται μια διπολική μορφή με βλαστικά και ριζικά μεριστώματα που συνδέονται απευθείας μεταξύ τους. Ανάμεσα στη ρίζα και το βλαστό δεν μεσολαβεί μάζα από διαφοροποιημένα κύτταρα του κάλλου. Οι διπολικές αυτές μορφές ονομάζονται **εμβρυοειδή** και η διαδικασία ανάπτυξής τους **σωματική εμβρυογένεση**.

Ιστολογικές μελέτες της σωματικής εμβρυογένεσης στα σιτηρά, δείχνουν ότι τα περισσότερα σωματικά εμβρυοειδή, αναπτύσσονται με παρόμοιο τρόπο ανάπτυξης, όπως και τα διαφοροποιημένα ζυγωτά, τα οποία προέρχονται από γονιμοποίηση. Κατά τη σωματική εμβρυογένεση, υπό τις κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας, σχηματίζονται εντελώς λειτουργικά φυτά. Οι εμβρυογενείς αντιδράσεις διεγείρονται ιδιαίτερα όταν χρησιμοποιείται για την παραγωγή των κάλλων η αυξίνη 2,4-D, και οι κάλλοι μεταφέρονται σε θρεπτικό υπόστρωμα χωρίς 2,4-D, που περιέχει όμως άλατα ή αμινοξέα.

Η απαρχή για τη δημιουργία εμβρυοειδούς είναι ένα μόνο κύτταρο ενώ για τη δημιουργία οργάνου μια ομάδα κυττάρων.

Η εμβρυογένεση είναι ιδιαίτερα σημαντική για τα συστήματα γενετικού χειρισμού. Γι' αυτό καταβάλλονται ιδιαίτερες προσπάθειες για την αναγνώριση γονοτύπων που αντιδρούν εμβρυογενετικά στην ιστοκαλλιέργεια. Τα σωματικά έμβρυα που παράγονται με τη διαδικασία αυτή υπερέχουν κατά το ότι παράγουν αναγεννημένα φυτά που προέρχονται από ένα κύτταρο και είναι αντιπροσωπευτικά του γονότυπου από τον οποίο προήλθαν.

Μορφογενετική ικανότητα στα σιτηρά

Τα Gramineae (σιτάρι, κριθάρι, βρώμη, σίκαλη, τριτικάλε) είναι λιγότερο ικανά από τα δικοτυληδόνα να δώσουν αναγεννημένα φυτά μετά από καλλιέργεια *in vitro* και φαίνεται ότι χάνουν την παντοδυναμία τους σε πολύ νεαρό στάδιο κατά την διαφοροποίηση. Έτσι μόνο μεριστωματικές περιοχές έχουν την ικανότητα να παράγουν κάλλο κατά την ιστοκαλλιέργεια. Ιδιαίτερα για την παραγωγή κάλλου, που θα μπορεί να δώσει βλαστούς, θα πρέπει να καλλιεργηθεί μόνο πολύ ανώριμος ιστός. Το πιο συνηθισμένο σύστημα *in vitro* καλλιέργειας σιτηρών είναι η καλλιέργεια ανώριμων εμβρύων. Πετυχημένα επίσης συστήματα είναι η καλλιέργεια της βάσης νεαρού φύλλου.

Παράγοντες που επηρεάζουν την αναγέννηση στα σιτηρά

1. Οι συνθήκες ανάπτυξης του δωρητού. Η εξήγηση για την επίδραση του παράγοντα αυτού βρίσκεται στο επίπεδο των ενδογενών θρεπτικών συστατικών και των ρυθμιστών ανάπτυξης.

2. Το στάδιο ανάπτυξης και η φυσιολογική κατάσταση του εκφύτου. Τα έκφυτα που χρησιμοποιούνται στα σιτηρά για επιτυχημένη αναγέννηση προέρχονται μόνο από μεριστωματικούς ιστούς.

3. Το θρεπτικό υπόστρωμα συμπεριλαμβανομένου και της περιεκτικότητας σουκρόζης. Το πιο συνηθισμένο θρεπτικό μέσο, που δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα στα περισσότερα είδη σιτηρών, είναι αυτό των Murashige and Skoog. Ωστόσο σε ορισμένες περιπτώσεις έχουν χρησιμοποιηθεί με επιτυχία άλλα υποστρώματα, όπως το B5, το N6 (ιδιαίτερα στην ανθηροκαλλιέργεια) και άλλα. Από τα σάκχαρα το πιο αποτελεσματικό είναι η σουκρόζη.

4. Το είδος και η συγκέντρωση των ορμονών. Από τους διάφορους ρυθμιστές ανάπτυξης που έχουν δοκιμαστεί, το 2,4-D είναι το πιο αποτελεσματικό στο να παράγει καλλιέργειες ικανές να αναγεννήσουν φυτά. Η συγκέντρωση που χρησιμοποιείται εξαρτάται από το είδος του σιτηρού και κυμαίνεται από 1 έως 5 mg/lit θρεπτικού υποστρώματος.

5. Η συχνότητα των υποκαλλιεργιών. Υποκαλλιέργεια ανά δυο βδομάδες αυξάνει το δυναμικό της αναγέννησης.

6. Ο γονότυπος. Αν και υπάρχουν διαφορούμενες απόψεις γίνεται γενικά δεκτό ότι ο γονότυπος έχει καθοριστική σημασία στην αντίδραση στην ιστοκαλλιέργεια. Στο καλαμπόκι μετά από μελέτη της ικανότητας για ιστοκαλλιέργεια από καθαρά γενετική σκοπιά βρέθηκαν ένα ή δύο γονίδια που καθορίζουν αν ένας γονότυπος είναι κατάλληλος ή όχι για ιστοκαλλιέργεια.

Η αντίθετη άποψη αρνείται την επίδραση του γονότυπου στην ιστοκαλλιέργεια. Το επιχείρημα εδώ είναι ότι οι γονότυποι που θεωρούνταν στο παρελθόν δύστροποι μετά από αριστοποίηση των φυσιολογικών παραγόντων έδειξαν πολύ καλή μορφογενετική ικανότητα.

Αναγέννηση από πολυκυτταρικά σωματικά έκφυτα

1. Εμβρυοκαλλιέργεια
2. Καλλιέργεια ανώριμων ταξιανθιών
3. Καλλιέργεια της βάσης ανώριμου φύλλου.

Αναγέννηση από εναιωρούμενες κυτταροκαλλιέργειες (suspension culture)

Οι εναιωρούμενες καλλιέργειες παρέχουν ένα μέσο για να πολλαπλασιάζονται τα φυτικά κύτταρα ταχύτατα και σε μεγάλους αριθμούς. Δηλαδή οι εναιωρούμενες καλλιέργειες επιτρέπουν τον χειρισμό των φυτικών κυττάρων σε μικροβιολογική κλίμακα.

Πρακτικά για τη δημιουργία εναιωρούμενων καλλιεργιών χρησιμοποιούνται κομματάκια εμβρυογενούς κάλλου που μεταφέρεται υπό ασηπτικές συνθήκες σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα. Με τις κατάλληλες συνθήκες υποκαλλιέργειας επιδιώκεται η απόκτηση μιας εναιωρούμενης καλλιέργειας που χαρακτηρίζεται από ισοδιαμετρικά κύτταρα, πλούσια σε κυτταρόπλασμα. Η απόκτηση μιας τέτοιας καλλιέργειας απαιτεί την κατάλληλη μεθοδολογία. Οι εμβρυογενείς υγρές καλλιέργειες είναι υλικό που προσφέρεται για πειράματα *in vitro* επιλογής και ως πηγή κυττάρων σε πειράματα απομόνωσης

πρωτοπλαστών. Περιοριστικό παράγοντα στη χρήση των εναιωρουμένων καλλιεργειών αποτελεί η πιθανή απώλεια της μορφογενετικής ικανότητας με την πάροδο του χρόνου καλλιέργειας.

Ανθηροκαλλιέργεια ή καλλιέργεια γύρης

Οι γυρεόκοκκοι είναι διαφοροποιημένα κύτταρα που η κανονική αναπτυξή τους είναι η βλάστηση και ο σχηματισμός του γυρεοσωλήνα και των αρρένων γαμετών. Όταν τοποθετούνται στο κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα, τότε κάποιοι από τους γυρεόκοκκους θα σχηματίσουν κάλλο. Τις περισσότερες φορές είναι προτιμότερο να καλλιεργηθούν ολόκληροι οι ανθήρες. Σε αυτή την περίπτωση σχηματίζονται εμβρυοειδή πάνω στον καλλιεργούμενο ανθήρα προερχόμενα από γυρεόκοκκους. Από τα εμβρυοειδή αυτά είναι δυνατόν να αναγεννηθούν ολόκληρα φυτά τα οποία είναι απλοειδή.

Ο πρωταρχικός στόχος της ανθηροκαλλιέργειας είναι η παραγωγή απλοειδών από το άρρεν γαμετόφυτο ή το μικροσπόριο. Οι παράμετροι που επηρεάζουν την επιτυχία της ανθηροκαλλιέργειας είναι: α) η κατάσταση ανάπτυξης του φυτού-δωρητή, β) ο γονότυπος του φυτού-δωρητή, γ) η προμεταχείριση των ανθέρων, δ) τα θρεπτικά υποστρώματα, ε) το στάδιο ανάπτυξης του μικροσπορίου, ζ) οι συνθήκες καλλιέργειας και η) η διαδικασία αναγέννησης. Εάν οι συνθήκες αυτές είναι οι άριστες, τότε ο κάθε ανθήρας μπορεί να δώσει μερικές εκατοντάδες απλοειδών φυτών.

Η ανθηροκαλλιέργεια αποτελεί μια γρήγορη μέθοδο για την απόκτηση ομοζυγωτικών διπλοειδών στην παραγωγή καθαρών σειρών. Μέχρι σήμερα η ανθηροκαλλιέργεια δεν μπορεί να θεωρηθεί ως απλή στην εφαρμογή της στα σιτηρά. Για το λόγο αυτό, είναι αναγκαίο να διερευνηθούν οι παράγοντες που επηρεάζουν θετικά την ανθηροκαλλιέργεια και να μελετηθεί ο μηχανισμός ανάπτυξης της γύρης σε κάλλο (Κεφ. 23 Βελτίωση Φυτών. Αρχές και Μέθοδοι. Π.Ι. Καλτσίκη).

Το φράγμα της αναγέννησης

Παρόλα τα μέσα και τους ποικίλους συνδυασμούς περιβαλλοντικών συνθηκών που έχουν χρησιμοποιηθεί για πολύ χρόνο από πολλούς ερευνητές, ορισμένα είδη εξακολουθούν να μην αντιδρούν όσον αφορά στην αναγέννηση. Η έλλειψη αντίδρασης οδηγεί στην υπόθεση ότι το κώλυμα της αναγέννησης έχει ένα σύμπλοκο αιτιών: γενετικών, επιγενετικών και φυσιολογικών.

Τα δύο σπουδαιότερα προβλήματα στην απεριόριστη εφαρμογή της ιστοκαλλιέργειας στην βιοτεχνολογία είναι:

1. η αδυναμία αναγέννησης πολλών σημαντικών ειδών και
2. η γενετική και φαινοτυπική παραλακτικότητα που εμφανίζεται στην ιστοκαλλιέργεια και που είναι γνωστή ως **σωμακλωνική παραλλακτικότητα** (somaclonal variation).

ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΣΕΙΣ

Η παραδοσιακή βελτίωση για τη δημιουργία και εισαγωγή γενετικής παραλλακτικότητας στηρίζεται στην εγγενή αναπαραγωγή χρησιμοποιώντας για τον σκοπό αυτό τις διασταυρώσεις. Μετά τη διασταύρωση ακολουθεί ο γενετικός ανασυνδυασμός και η επιλογή των επιθυμητών φυτών. Η τεχνική της διασταύρωσης διαφέρει από είδος σε είδος και μέσα σε κάθε είδος (Κεφ. 7. Βελτίωση Φυτών. Αρχές και μέθοδοι. Π.Ι. Καλτσίκη). Οι ιδιαιτερότητες που παρουσιάζονται στη δομή των διαφόρων ανθέων και ο τρόπος ανάπτυξής τους έχουν οδηγήσει σε μια μεγάλη ποικιλία τεχνικών διασταύρωσης. Οι βασικές αρχές όμως είναι κοινές σε όλες τις μεθόδους και πρέπει να ακολουθούνται πιστά για να εξασφαλίζεται η επιτυχία της διασταύρωσης.

Συνθήκες για επιτυχή διασταύρωση

Το βασικό βήμα για την επιτυχία μιας διασταύρωσης είναι η επιτυχής επιλογή των γονέων, η οποία φυσικά εξαρτάται από τους αντικειμενικούς σκοπούς του βελτιωτικού προγράμματος. Αν οι γονείς που διαλέξαμε δεν έχουν το γνώρισμα που θέλουμε είναι απίθανο ότι θα μπορέσουμε να το βρούμε στους απογόνους της διασταύρωσης. Μετά την επιλογή των γονοτύπων-γονέων πρέπει να γίνει ο καθορισμός του γονότυπου που θα χρησιμοποιηθεί σαν μητέρα και του γονότυπου που θα χρησιμοποιηθεί σαν πατέρας.

Προετοιμασία του θηλυκού γονέα

Η προετοιμασία του θηλυκού γονέα θα πρέπει να συμπίπτει με την παραγωγή και διαθεσιμότητα της γύρης από τον αρσενικό γονέα. Για να γίνει μια διασταύρωση θα πρέπει να υπάρχει συγχρονισμός του θηλυκού και του αρσενικού γονέα. Αυτό επιτυγχάνεται με ειδικές τεχνικές κατά τη φύτευση ή κατά την ανάπτυξη του φυτού ιδιαίτερα αν ο ένας γονέας είναι πρώιμος και ο άλλος όψιμος.

Η ώρα της ημέρας που θα γίνει η προετοιμασία του άνθους του θηλυκού γονέα, της "μητέρας", εξαρτάται από την ώρα που η γύρη του αρσενικού γονέα, του "πατέρα", είναι διαθέσιμη και το αν είναι απαραίτητη η άμεση επικονίαση του θηλυκού γονέα.

Στο καλαμπόκι ο θηλυκός γονέας μπορεί να προετοιμαστεί οποιαδήποτε ώρα της ημέρας χωρίς να επηρεάζεται η επιτυχία της διασταύρωσης. Στις διασταυρώσεις στην πατάτα, η προετοιμασία του θηλυκού (ευνουχισμός) γίνεται το απόγευμα και η επικονίαση το πρωί, μόλις τα πέταλα ξαναοίξουν και τα άνθη είναι εντελώς ανοιχτά. Στο φασόλι ο ευνουχισμός και η διασταύρωση μπορεί να γίνει κατά τη διάρκεια της ημέρας και η επιτυχία εξαρτάται από την τεχνική και τις καιρικές συνθήκες. Στο σιτάρι, τη βρώμη και το κριθάρι τα άνθη του θηλυκού γονέα ευνουχίζονται πριν να ωριμάσουν οι ανθήρες και επικονιάζονται δύο με τρεις μέρες αργότερα όταν το στίγμα είναι επιδεκτικό. Ο χρόνος που μεσολαβεί ανάμεσα στον ευνουχισμό και την επικονίαση εξαρτώνται από την δεκτικότητα του στίγματος.

Τα θηλυκά που θα προετοιμαστούν πρέπει να βρίσκονται στο άριστο στάδιο, δηλαδή ούτε να είναι πολύ ανώριμα, ούτε εντελώς ανεπτυγμένα. Το άριστο στάδιο του άνθους-μητέρα συνήθως αναγνωρίζεται από την εξωτερική εμφάνιση του άνθους ή της ταξιανθίας. Η γνώση της σχέσης ανάμεσα στην εξωτερική εμφάνιση του άνθους και την ανάπτυξη των ανθικών οργάνων είναι απαραίτητη.

Ο ευνουχισμός δεν είναι απαραίτητη προϋπόθεση στην τεχνητή διασταύρωση. Αν η μητέρα είναι αρρενόστειρη ή αν υπάρχει αυτοασυμβίβαστο δεν χρειάζεται να γίνει ευνουχισμός. Τα πρωτόγυνα - μόνοικα και δίοικα είδη δεν απαιτούν ευνουχισμό. Στις προαναφερθείσες περιπτώσεις που δεν γίνεται ευνουχισμός η προετοιμασία του θηλυκού άνθους συνιστάται στην κάλυψη των ανθέων και ταξιανθιών με προστατευτικές σακούλες για την αποφυγή μη ελεγχόμενης επικονίασης.

Ευνουχισμός ή αποστημόνωση

1) Η αφαίρεση ανθέρων είναι η ευρέως χρησιμοποιημένη τεχνική για ευνουχισμό.

Το πρώτο βήμα είναι η αφαίρεση των πολύ μικρών ή πολύ μεγάλων σε ηλικία ανθέων από την ταξιανθία. Κατ' αυτό τον τρόπο μειώνεται ο ανταγωνισμός σε θρεπτικά στοιχεία και περιορίζονται οι κίνδυνοι αυτογονιμοποίησης από τα μη ευνουχισμένα παραμένοντα άνθη.

Στο βαμβάκι, οι ανθήρες και τα πέταλα μπορούν να αφαιρεθούν με τα δάκτυλα. Οι ανθήρες συνήθως αφαιρούνται με λαβίδες κατάλληλες για το μέγεθος και την κατασκευή του άνθους με το οποίο δουλεύουμε. Ανάλογα με το είδος μπορεί να χρησιμοποιούνται βελόνες (π.χ. φακή), μαχαιρίδια(π.χ. πατάτα). Μπορεί να γίνει αφαίρεση ανθέρων και με αναρρόφηση (π.χ. ρύζι).

2) Ευνουχισμός με ψαλίδι.

Ο ευνουχισμός στη σίκαλη, το κριθάρι και άλλα αγροστόδια, μπορεί να επιτευχθεί κόβοντας τους νεαρούς ανθήρες, χωρίς μετακίνηση υπολλειμμάτων των ανθέρων.

3) Ευνουχισμός με χρήση ζεστού νερού για το σόργο και χρήση αλκοόλης για τη μηδική.

Κατά την διάρκεια του ευνουχισμού θα πρέπει να είμαστε πολύ προσεκτικοί για την αποφυγή ανεπιθύμητων επικονιάσεων. Θα πρέπει να γίνεται πολύ προσεκτική αφαίρεση των ανθέρων. Ανεπιθύμητη γύρη μπορεί να βρίσκεται στα εργαλεία που χρησιμοποιούνται στις διασταυρώσεις καθώς επίσης και στα χέρια του βελτιωτή. Ιδιαίτερη προσοχή χρειάζεται όταν κατά την διάρκεια της εργασίας μας αλλάζουμε γονείς. Για τον καθαρισμό των εργαλείων από τη γύρη του προηγούμενου γονέα χρησιμοποιείται αλκοόλη ή νερό. Το ευνουχισμένο άνθος θα πρέπει να προφυλαχθεί από τυχόν ανεξέλεγκτες επικονιάσεις. Για το λόγο αυτό καλύπτουμε αναλόγως είτε τα άνθη, είτε ολόκληρες τις ταξιανθίες τα άνθη των οποίων έχουν ευνουχισθεί με προστατευτικές σακούλες. Οι σακούλες μπορεί να είναι από πανί ή χαρτί. Στο βαμβάκι χρησιμοποιούμε καλαμάκι σόδας για την προστασία του ευνουχισμένου άνθους.

Επικονίαση

Η συλλογή ανθέων ή ταξιανθιών, που βρίσκονται στο κατάλληλο στάδιο, από τα φυτά που θα χρησιμοποιηθούν σαν αρσενικοί γονείς είναι περισσότερο αποτελεσματική όταν η ανάπτυξη των ανθέρων μπορεί να συσχετισθεί με την εξωτερική εμφάνιση του άνθους ή της ταξιανθίας. Για παράδειγμα στη τομάτα η γύρη είναι κατάλληλη μόλις το άνθος ανοίγει τελείως. Η σχέση ανάμεσα στην ανάπτυξη του ανθήρα και την εμφάνιση του άνθους εξαρτάται από τον γονότυπο, το περιβάλλον, την ώρα της ημέρας.

Συλλογή της γύρης

Η διαδικασία αυτή είναι πολύ απλή όταν πρόκειται για άμεση επικονίαση. Η άμεση επικονίαση εξασφαλίζει την μεγαλύτερη ζωτικότητα της γύρης.

Για την συλλογή της γύρης είτε γίνεται συλλογή μόνο ανθέρων σε τρυβλίο ή στο χέρι μας και μεταφορά στο άνθος του “φυτού-μητέρα”, ή κόβουμε ολόκληρα άνθη ή ταξιανθίες και τα μεταφέρουμε στο “φυτό-μητέρα”.

Η γύρη μπορεί να μεταφερθεί είτε με άνεμο ή έντομα και να “μολύνει” την γύρη στα αρσενικά άνθη πριν αυτά χρησιμοποιηθούν για επικονίαση. Γι’ αυτό το λόγο και τα άνθη που θα χρησιμοποιηθούν ως πατέρες προστατεύονται με σακούλες αυτογονιμοποίησης.

Οι “ταξιανθίες-πατέρες” στο καλαμπόκι και το σόργο σκεπάζονται με προστατευτικές σακούλες 12- 24 ώρες πριν την επικονίαση. Κατά την διάρκεια αυτής της περιόδου εάν υπήρχαν ξένοι γυρεόκοκκοι στην “ταξιανθία-πατέρα” χάνουν τη ζωτικότητα τους. Συγχρόνως, η επιθυμητή γύρη συλλέγεται στη σακούλα για να χρησιμοποιηθεί την επόμενη μέρα για την επικονίαση του θηλυκού. Πριν μετακινηθεί η σακούλα η αρσενική ταξιανθία κάμπτεται για να έρθει σε οριζόντια θέση. Με δυνατό χτύπημα στην σακούλα επιτυγχάνεται άνοιγμα περισσότερων ανθέρων.

Για τη συλλογή γύρης στην τομάτα και ιδιαίτερα την πατάτα είναι συνηθισμένη η χρήση δονητή.

Εναπόθεση της γύρης στο στίγμα

1) Άμεση

Η πιο συνηθισμένη μέθοδος είναι η απ'ευθείας εναπόθεση γύρης στο στίγμα χρησιμοποιώντας διάφορες τεχνικές και εργαλεία. Στον καπνό, τρίβουμε ελαφρά τους ανθήρες του “άνθους-πατέρα” στο στίγμα του θηλυκού άνθους. Στον ηλίανθο, ταξιανθίες των δυο γονέων τρίβονται η μια πάνω στην άλλη. Στο καλαμπόκι, η γύρη από τη φούντα συλλέγεται σε μια σακούλα και σκορπίζεται πάνω στο μετάξι της ρόκας.

2) Εμμεση

Προϋποθέτει παραγωγή και διαθεσιμότητα άφθονης γύρης (βλ. Επικονίαση σιταριού).

Ευνουχισμός στο σιτάρι

Ο ευνουχισμός πρέπει να γίνεται 1 έως 3 μέρες πριν την κανονική άνθηση. Αυτό μπορεί να γίνει παρακολουθώντας τους στάχεις και σημειώνοντας το μέγεθός τους και κατά πόσο έχουν βγει οι στάχεις έξω από το φύλλο-σημαία. Αυτό το στάδιο ποικίλει ανάλογα με το περιβάλλον και τον γονότυπο.

Οι ανθήρες πρέπει να είναι καλά αναπτυγμένοι και ανοικτοπράσινοι αλλά όχι κίτρινοι ή κρεμ.

Αναφέρονται τρεις τρόποι ευνουχισμού στο σιτάρι:

α) 1-3 από τα σταχύδια της βάσης και τα σταχύδια της κορυφής αφαιρούνται γιατί μπορεί να έχουν μη λειτουργικά ανθίδια. Η αφαίρεση γίνεται με λαβίδα ή με ψαλίδι. Σε κάθε σταχύδιο αφήνουμε μόνο τα πρωτεύοντα και δευτερεύοντα ανθίδια και αφαιρούμε τα υπόλοιπα. Οι ανθήρες αφαιρούνται από κάθε ανθίδιο ανοίγοντας τον χιτώνα και την λεπίδα. Οι τρεις ανθήρες αφαιρούνται με λαβίδα αλλά πρέπει να είμαστε προσεκτικοί ώστε να μην τους

συνθλίψουμε και να μην τραυματίσουμε το στίγμα. Με την εμπειρία, ο βελτιωτής μπορεί συνήθως να πιάσει και να αφαιρέσει όλους τους ανθήρες με μια κίνηση. Οι ευνουχισμένοι στάχεις πρέπει να καλύπτονται αμέσως με προστατευτικές σακούλες αυτογονιμοποίησης.

β) Το πάνω μέρος κάθε ανθιδίου κόβεται με το ψαλίδι για να φανούν τα γεννητικά όργανα. Οι ανθήρες τότε αφαιρούνται με την λαβίδα από την κορυφή του ανθιδίου. Η μέθοδος αυτή είναι χρήσιμη σε περιοχές όπου χαμηλές θερμοκρασίες ή υψηλές υγρασίες ελάττωσαν τη ρήξη των ανθέρων.

γ) Ευνουχισμός με το ψαλίδι. Ο ευνουχισμός αυτός συνίσταται στο κόψιμο των κυρίων και δευτερευόντων ανθιδίων σε ένα νωρίτερο στάδιο (5 έως 7 μέρες πριν την άνθηση). Τα υπολείμματα των ανθέρων εκφυλίζονται και τα περισσότερα δεν παράγουν ζωντανή γύρη. Η μέθοδος αυτή είναι γρήγορη αλλά απαιτεί επιδεξιότητα και πείρα. Η αυτογονιμοποίηση μπορεί να είναι πρόβλημα έτσι πρέπει να μπορούμε να αναγνωρίσουμε τα υβρίδια-σπόρους ή τα υβρίδια-φυτά.

Επικονίαση στο σιτάρι

Ο χρόνος επικονίασης ποικίλει ανάλογα με τις κλιματικές συνθήκες και το στάδιο ανάπτυξης του στίγματος όταν ο στάχυς ευνουχίστηκε.

Τα ανθίδια πρέπει να έχουν πολύ καλά ανεπτυγμένα στίγματα όταν επικονιάζονται.

Οι “στάχεις-πατέρες” που είναι έτοιμοι για επικονίαση αναγνωρίζονται εύκολα γιατί ανθήρες με ζοηρό κίτρινο χρώμα έχουν εκπτυχθεί από 2-3 ανθίδια. Οι ανθήρες μετακινούνται με τη λαβίδα μόλις πριν την άνθηση και μεταφέρονται γρήγορα στο θηλυκό. Η εναπόθεση της γύρης μπορεί να γίνει με πολλούς τρόπους.

α) Η συνηθισμένη μέθοδος είναι να βγάλουμε τη προστατευτική σακούλα από τον στάχυ-μητέρα και με προσοχή να πάρουμε έναν ανθήρα από το στάχυ-πατέρα και να τον τρίψουμε πάνω στο στίγμα του θηλυκού.

β) Μια άλλη μέθοδος της "συστροφής" χρησιμοποιείται όταν έχουμε άφθονους και διαθέσιμους “στάχεις-πατέρες”. Αυτή η μέθοδος είναι γρήγορη και δεν απαιτεί μεγάλη επιδεξιότητα.

Σκίζουμε το επάνω μέρος της προστατευτικής σακούλας του θηλυκού στάχου, βάζουμε τον αρσενικό στάχυ με ανάποδη φορά μέσα στη σακούλα και παράλληλα προς τον θηλυκό. Περιστρέφουμε και πιέζουμε ζοηρά τον αρσενικό στάχυ χρησιμοποιώντας τον αντίχειρα με τον δείκτη προκαλώντας άνοιγμα περισσότερων ανθέρων. Έτσι τινάζεται άφθονη γύρη και πέφτει πάνω στον ευνουχισμένο στάχυ-μητέρα. Στη συνέχεια ή απομακρύνουμε τον στάχυ-πατέρα ή τον αφήνουμε μέσα στο σακουλάκι αυτογονιμοποίησης μαζί με το θηλυκό. Ξανακλείνουμε το σακουλάκι αυτογονιμοποίησης.

γ) Μια τρίτη μέθοδος είναι η μέθοδος "προσέγγισης".

Ο θηλυκός στάχυς τοποθετείται λίγο πιο κάτω από τον αρσενικό στάχυ και οι δύο στάχεις σκεπάζονται με μια σακούλα. Αυτή η μέθοδος είναι πρακτική όταν τα φυτά είναι σε γλάστρες.

Εφαρμογές της ιστοκαλλιέργειας στην βελτίωση των Φυτών

Ο βελτιωτής για να πετύχει τη δημιουργία καλύτερων ποικιλιών χρειάζεται γενετική παραλλακτικότητα για να μπορέσει να κάνει επιλογή των καλύτερων γονοτύπων, τους οποίους θα αξιολογήσει. Μετά την αξιολόγηση οι επιθυμητοί γονότυποι θα πολλαπλασιαστούν και θα διαδοθούν.

Η ιστοκαλλιέργεια μπορεί να βοηθήσει σ'όλα τα στάδια της δημιουργίας μιας νέας μορφής φυτού εκτός από την τελική αξιολόγηση που θα πρέπει να γίνει στο χωράφι.

Αναλυτικά μπορεί να βοηθήσει στα ακόλουθα:

- Πολλαπλασιασμό Βελτιωτικού και Γενετικού υλικού
- Διατήρηση Βελτιωτικού και Γενετικού Υλικού και κατ'αυτό τον τρόπο τη Διατήρηση (της φυσικής ή δημιουργηθείσας Γενετικής Παραλλακτικότητας).
- Αύξηση της Γενετικής Παραλλακτικότητας και Μερική Επιλογή με:
 1. Βοηθητικές μεθόδους στην Παραδοσιακή Βελτίωση.
 2. Σύγχρονες μεθόδους (σωμακλωνική παραλλακτικότητα, σωματικό υβριδισμό, μεταμόρφωση).

A) Μικροπολλαπλασιασμός

Ο μικροπολλαπλασιασμός βοηθάει έμμεσα τον βελτιωτή στον πολλαπλασιασμό γενετικού και βελτιωτικού υλικού:

1. Όταν το υλικό πολλαπλασιάζεται αγενώς αλλά οι παραδοσιακοί τρόποι κλωνικής αναπαραγωγής είναι βραδείς.
2. Όταν το υλικό πολλαπλασιάζεται με σπόρο αλλά είναι σταυρογονιμοποιούμενο (π.χ. ζαχαρότευτλα, Cruciferae) και εμείς επιδιώκουμε τον μαζικό πολλαπλασιασμό ή διατήρηση του χωρίς να αλλάξει το γενετικό του δυναμικό.
3. Όταν η παραγωγή σπόρων είναι δύσκολη ή αδύνατη όπως συμβαίνει σε αρρενόστειρες σειρές (κρεμμύδια) και αυτοασυμβίβαστες σειρές (λάχανο, μαρούλι, μπρόκολα). Αυτές οι σειρές χρησιμοποιούνται σαν γονείς στην παραγωγή υβριδίων.
4. Όταν πρέπει να διαδωθεί ταχύτατα ένας εξαιρετικός γονότυπος.
5. Όταν δημιουργήσουμε με δυσκολία ένα ή λίγα φυτά-υβρίδια και θέλουμε να τα πολλαπλασιάσουμε.

B) Εξυγίανση του βελτιωτικού και γενετικού υλικού

Το βελτιωτικό υλικό που πολλαπλασιάζεται και διαδίδεται θα πρέπει να είναι υγιές. Τα φυτά που αναπαράγονται με τις παραδοσιακές μεθόδους αγενούς πολλαπλασιασμού χρησιμοποιώντας βολβούς, κονδύλους κλπ. μολύνονται από ιούς που πολλές φορές είναι δύσκολο να αναγνωριστούν αμέσως.

Με την καλλιέργεια του ακραίου μεριστώματος σε συνδυασμό με θερμοθεραπεία μπορούμε να παράγουμε γενετικό υλικό απαλλαγμένο από ιώσεις. Φυσικά θα χρειαστούμε τη βοήθεια των ειδικών φυτοπαθολόγων και εντομολόγων μια και πολλοί από τους ιούς αυτούς μεταδίδονται με αφίδες.

Σαν παράδειγμα εφαρμογής αναφέρουμε την περίπτωση της πατάτας όπου η καλλιέργεια ακραίου μεριστώματος και ο μικροπολλαπλασιασμός με την ειδική τεχνική των

μικροκονδύλων μπορούν να οδηγήσουν στην ταχεία παραγωγή υγιούς πατατόσπορου από βελτιωμένες ποικιλίες πατάτας.

Γ) Διατήρηση γενετικού υλικού

Ο βελτιωτής έχει εκμεταλλευτεί τη φυσική παραλλακτικότητα, δηλαδή άγρια είδη, ντόπιες ποικιλίες κλπ. Πολλά άγρια είδη έχουν χαθεί. Γι'αυτό έχει γίνει κατανοητό ότι είναι υπέρτατη ανάγκη η διατήρηση του αυτοφυούς γενετικού υλικού. Επίσης, ποικιλίες που αποσύρονται μπορούν να διατηρηθούν σε τράπεζες γενετικού υλικού.

Ο πιο εύκολος τρόπος διατήρησης γενετικού υλικού είναι υπό μορφή σπόρου όταν μειωθεί η θερμοκρασία αποθήκευσης και η περιεκτικότητά τους σε υγρασία. Υπάρχει όμως μια κατηγορία σπόρων, οι δύστροποι, που νεκρώνονται όταν η περιεκτικότητά τους σε υγρασία πέσει κάτω από μια σχετικά μεγάλη τιμή (20-30%) ή όταν αποθηκευτούν σε χαμηλές θερμοκρασίες. Ακόμα κι αν αποθηκευτούν με μεγάλη περιεκτικότητα σε υγρασία διατηρούν την ζωτικότητα τους μόνο για δύο-τρεις μήνες. Στην κατηγορία αυτή ανήκουν πολλά είδη με μεγάλη οικονομική σημασία όπως το καουτσουκόδενδρο και ο ελαιοφώικας.

Η διατήρηση υλικού υπό μορφή σπόρων δεν είναι εφικτή σε φυτά που πολλαπλασιάζονται αγενώς. Μονάδες αγενούς αναπαραγωγής όπως βολβοί και κόνδυλοι μπορούν να αποθηκευτούν αλλά όχι για μεγάλα χρονικά διαστήματα.

Η καλλιέργεια *in vitro* μπορεί να θεωρηθεί σαν μέσο διατήρησης του γενετικού υλικού. Αυτό το επιτυγχάνει:

1) με την αργή ανάπτυξη κατά την οποία έχουμε επιβράδυνση του μεταβολισμού με φυσικά και χημικά μέσα (χρησιμοποιούμε χαμηλές θερμοκρασίες, ειδικά θρεπτικά υποστρώματα, ειδικές συνθήκες ατμόσφαιρας). Εδώ ακραία μεριστώματα μπορούν να διατηρηθούν για ένα χρόνο οπότε γίνεται υποκαλλιέργεια π.χ. αμπέλι, πατάτα.

2) Κρυοδιατήρηση σε θερμοκρασίες υγρού αζώτου (-196°C) σταματά τελείως η ανάπτυξη και έτσι μπορούν να διατηρηθούν εκτός από ακραία μεριστώματα, κυτταροκαλλιέργειες, σωματικά έμβρυα, πρωτοπλάστες. π.χ. φράουλα, μπιζέλι. Η αργή ανάπτυξη έχει εφαρμοστεί με επιτυχία. Για την κρυοδιατήρηση υπάρχουν μερικές τεχνικές δυσκολίες.

ΑΜΕΣΑ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΔΟΣΙΑΚΗ ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΒΟΗΘΗΤΙΚΕΣ ΤΕΧΝΙΚΕΣ

1. Διάσωση εμβρύων
2. Γονιμοποίηση στο σωλήνα
3. Παραγωγή απλοειδών με καλλιέργεια ανθέρων, ωοθηκών
4. Επιλογή μεταλλαγμένων φυτών

1. Διάσωση εμβρύων

Ο βελτιωτής στη προσπάθειά του να αυξήσει την ωφέλιμη γενετική παραλλακτικότητα καταφεύγει στις διασταυρώσεις. Οι διασταυρώσεις ανάμεσα σε δύο είδη και ακόμη περισσότερο σε δύο γένη είναι δύσκολες ή αδύνατες. Όταν δεν είναι αδύνατες τα προβλήματα που παρουσιάζονται μπορούν να εμφανιστούν πριν ή μετά την γονιμοποίηση. Τα εμπόδια αυτά μπορούν να ξεπεραστούν με την τεχνική του σωλήνα.

Όταν το πρόβλημα παρουσιάζεται μετά τη γονιμοποίηση το υβρίδιο-έμβρυο αναπτύσσεται κανονικά στα πρώτα στάδια της ανάπτυξης, μετά όμως το ενδοσπέρμιο δεν

αναπτύσσεται, διακόπτεται η διατροφή του εμβρύου και αποβάλλεται ο αναπτυσσόμενος καρπός. Σε αυτές τις περιπτώσεις το έμβρυο μπορεί να καλλιεργηθεί σε θρεπτικό υπόστρωμα που επιτρέπει την επιτυχή ανάπτυξη του εμβρύου σε φυτό. Παράδειγμα το *Triticale* που προήλθε από διασταύρωση σιταριού και σίκαλης.

2. Γονιμοποίηση *in vitro*

Όταν το πρόβλημα παρουσιάζεται πριν από την γονιμοποίηση. Ο γυρεοσωλήνας δεν μπορεί να διανύσει την απόσταση από το στίγμα στην ωοθήκη.

Οι ύπεροι καλλιεργούνται σε θρεπτικά υποστρώματα και μετά από μετακίνηση μέρους του τοιχώματος της ωοθήκης, η γονιμοποίηση πραγματοποιείται τοποθετώντας γύρη απευθείας στην εκτεθειμένη σπερμοβλάστη.

3. Παραγωγή απλοειδών με καλλιέργεια ανθέρων, ωοθηκών

Ο βελτιωτής σε πολλά βελτιωτικά προγράμματα χρειάζεται ομοζυγωτικά φυτά που έχουν ορισμένα χαρακτηριστικά. Με την παραδοσιακή βελτίωση χρειάζονται αρκετά χρόνια αυτογονιμοποίησης για την πραγματοποίηση του σκοπού αυτού. Εδώ η καλλιέργεια *in vitro* ανθέρων και ωοθηκών έχει συμβάλει στη γρήγορη σχετικά παραγωγή απλοειδών φυτών που στη συνέχεια με διπλασιασμό του αριθμού των χρωμοσωμάτων τους δίνουν ομοζυγωτικά φυτά. (Κεφ.23 Βελτίωση Φυτών Π.Ι. Καλτσίκη).

Μεγαλύτερη εφαρμογή βρήκε η καλλιέργεια ανθέρων παρά η καλλιέργεια ωοθηκών. Την ανθηροκαλλιέργεια την έχουν εκμεταλλευτεί οι Κινέζοι και έχουν παράγει υπέρτερες ποικιλίες ρυζιού και σιταριού.

Η πιο διαδεδομένη μέθοδος για την παραγωγή απλοειδών βασίζεται στα φυτά της F1 των διασταυρώσεων. Όλα αυτά τα απλοειδή θα διαφέρουν γενετικά το ένα από το άλλο, γιατί αντιπροσωπεύουν τα προϊόντα διαχωρισμού και ανασυνδυασμού ενός πολλαπλού ετεροζυγωτού.

Τα απλοειδή είναι χρήσιμα στην βελτίωση για τη διαπίστωση και επιλογή υπολειπόμενων μεταλλάξεων.

4. Επιλογή μεταλλάξεων

Μεταλλάξεις που μπορεί να συμβούν σε σωματικά κύτταρα δεν περνάνε στους απογόνους. Εν τούτοις μπορούν να διαιρεθούν και πολλαπλασιαστούν όταν καλλιεργηθούν *in vitro*.

Επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα μπορούν να δράσουν σαν κόσκινα για αυτές τις μεταλλάξεις και στη συνέχεια τα μεταλλαγμένα κύτταρα να δώσουν φυτά.

Η διαδικασία αυτή είναι χρήσιμη μόνο για μονογονικά χαρακτηριστικά όπως ανθεκτικότητα σε συγκεκριμένες παθοτοξίνες ζιζανιοκτόνα. Δυστυχώς δεν μπορούμε να επιλέξουμε για αγροκομικά χαρακτηριστικά σε *in vitro* επίπεδο. Οι λόγοι είναι ότι:

1. Δεν υπάρχει επιλεκτικό κόσκινο
2. Τα αγροκομικά χαρακτηριστικά εκφράζονται σε διαφοροποιημένα κύτταρα και τέλειους ιστούς.

ΑΥΞΗΣΗ ΤΗΣ ΓΕΝΕΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΜΕ ΣΥΓΧΡΟΝΕΣ ΜΕΘΟΔΟΥΣ

Σωμακλωνική παραλλακτικότητα

1. Ορισμός, Ιστορία, Εξέλιξη

Μίτωση είναι η κυτταρική διαίρεση κατά την οποία παράγονται από ένα κύτταρο δύο θυγατρικά κύτταρα που είναι όμοια μεταξύ τους και ως προς το μητρικό κύτταρο από το οποίο προέρχονται. Με βάση τον κλασικό αυτό ορισμό η μίτωση οδηγεί σε γενετική σταθερότητα, σε αντίθεση με την μείωση κατά την οποία γίνεται γενετικός ανασυνδυασμός που οδηγεί σε παραλλακτικότητα.

Σ' αυτή την ιδέα στηρίζεται και ο αγενής πολλαπλασιασμός κατά τον οποίο από ένα κομμάτι ενός φυτού (παραφυάδες, καταβολάδες, μοσχεύματα κ.λ.π.) προέρχονται φυτά που είναι γενετικά ομοιόμορφα. Εάν έκφυτα ενός φυτού, ή ακόμη και σωματικά ή αναπαραγωγικά κύτταρα, καλλιεργηθούν σε θρεπτικά υποστρώματα και πολλαπλασιαστούν με μιτωτικές διαιρέσεις, τότε θα πρέπει τα αναγεννημένα φυτά που θα προκύψουν να είναι όμοια μεταξύ τους και με το μητρικό φυτό. Πραγματικά όταν γίνεται καλλιέργεια ακραίου μεριστώματος ή κλωνικός πολλαπλασιασμός μετά από καλλιέργεια μασχαλιαίων οφθαλμών, τα φυτά που προκύπτουν είναι συνήθως γενετικά ομοιόμορφα.

Τα φυτά όμως που αναγεννώνται μέσω καλλιέργειας *in vitro* διαφόρων φυτικών εκφύτων (πρωτοπλαστών, κυττάρων, ιστών και οργάνων) μετά από σχηματισμό κάλλου (μάζα αδιαφοροποίητων κυττάρων) μπορεί να διαφέρουν μεταξύ τους και από το μητρικό φυτό από το οποίο προέρχονται. Οι διαφορές αυτές μπορεί να είναι φαινοτυπικές και γονοτυπικές. Οι Larkin and Scowcroft ήταν οι πρώτοι που πρότειναν, το 1981, τον όρο **σωμακλωνική παραλλακτικότητα** για το φαινόμενο αυτό.

Όμως η ιστορία της παραλλακτικότητας που εκλύεται μετά από αγενή πολλαπλασιασμό δεν άρχισε το 1981 αλλά σχεδόν μια δεκαετία πιο πριν. Σήμερα δεν προκαλεί έκπληξη η παραλλακτικότητα που παρουσιάζεται μετά από μία μη σεξουαλική διαδικασία. Το 1967 όμως όταν αναφέρθηκε για πρώτη φορά από τους Heinz και Mee στο ζαχαροκάλαμο η εμφάνιση της παραλλακτικότητας αυτής ήταν πρωτάκουστη.

Ωστόσο πολύ φυτωριόχοι θα έπρεπε να είχαν παρατηρήσει παραλλαγμένα φυτά έπειτα από κλωνικό πολλαπλασιασμό. Υπήρχαν λόγοι, ίσως οικονομικοί, για τους οποίους δεν ήλθαν νωρίτερα ως τέτοιες μαρτυρίες. Τα φυτώρια "πουλούσαν" γενετική ομοιομορφία. Δεν είχαν συμφέρον να παραδεχτούν ότι αυτό δε συνέβαινε πάντα. Επίσης, ένας άλλος ισχυρός λόγος ήταν ότι "η πίστη σκοτώνει την καλοπιστία". Η πίστη στο δόγμα της αγενούς αναπαραγωγής δεν επέτρεπε την παραδοχή του νέου, αντίθετου, φαινομένου που σιγά-σιγά πήρε καθολικές διαστάσεις. Στο διάστημα που μεσολάβησε ανάμεσα στις πρώτες επίσημες αναφορές του Heinz και των συνεργατών του και την υιοθέτηση του όρου σωμακλωνική παραλλακτικότητα το 1981, πολλοί επιστήμονες ασχολήθηκαν με το φαινόμενο αυτό. Τα παραλλαγμένα φυτά στο μαρούλι ονομάστηκαν φαινοτυποπαραλλάσσοντα ενώ τα παραλλαγμένα φυτά του *Pelargonium* "καλλικλώνοι". Η ομάδα του Shepard παρατήρησε παραλλακτικότητα μετά από καλλιέργεια πρωτοπλαστών και γι' αυτό ονόμασαν τα παραλλαγμένα φυτά "πρωτοκλώνους". Ίσως μετά από μια δεκαετία επιστημονικών

αναζητήσεων και αμφιβολιών για το δόγμα της γενετικής σταθερότητας της μίτωσης είχε ωριμάσει πια η ιδέα ότι οι παρατηρήσεις παραλλακτικότητας σε διάφορα επιστημονικά εργαστήρια, σε διαφορετικά είδη αλλά και διαφορετικές διαδικασίες καλλιέργειας αντιπροσώπευαν όχι μεμονωμένες περιπτώσεις αλλά ένα καθολικό φαινόμενο.

Έτσι ο όρος σωμακλωνική παραλλακτικότητα έγινε δεκτός. Άλλωστε είναι όρος γενικός, ανεξάρτητος από την πηγή προέλευσης των κυτταρικών ή υποκυτταρικών τμημάτων που καλλιεργούνται.

Αργότερα προτάθηκε και ο όρος **γαμετοκλωνική παραλλακτικότητα** που αναφέρεται σε φυτά που αναγεννώνται από γαμετικούς ιστούς. Ο επικρατέστερος όρος για την παραλλακτικότητα που μπορεί να παρουσιαστεί μετά από την καλλιέργεια *in vitro* (και σχηματισμό κάλλου) και έχει περιγραφεί είτε στο στάδιο του κάλλου, είτε στα αναγεννημένα φυτά εξακολουθεί να είναι αυτός που προτάθηκε από τους Larkin and Scowcroft δηλαδή **σωμακλωνική παραλλακτικότητα**. Ωστόσο για λόγους ευκολίας μερικές φορές παρουσιάζεται στη βιβλιογραφία ο αυθαίρετος τεχνητός διαχωρισμός ανάμεσα στην παραλλακτικότητα που παρουσιάζεται στο στάδιο του κάλλου ή τις υγρές καλλιέργειες και την παραλλακτικότητα που παρουσιάζεται στα αναγεννημένα φυτά. Η πρώτη ονομάζεται **αστάθεια της ιστοκαλλιέργειας** (tissue culture instability) και η δεύτερη **σωμακλωνική παραλλακτικότητα** (somaclonal variation). Ακολουθώντας αυτή την αυθαίρεση η σωμακλωνική παραλλακτικότητα που μετράμε σε επίπεδο φυτού είναι πολύ μικρότερη από όση πραγματικά υπάρχει.

Η φύση δεν επιτρέπει απότομες μεταβολές στην εξέλιξη. Οι κυτταροκαλλιέργειες βρίσκονται σε μια δίνη γενετικών και επιγενετικών αλλαγών. Συχνά οι αλλαγές αυτές οδηγούν στην απώλεια της ικανότητας για αναγέννηση. Υπάρχει φυσικά και η συντηρητική άποψη, σύμφωνα με την οποία πραγματικές αλλαγές του γονιώματος συμβαίνουν σε περιορισμένο αριθμό κυττάρων και σε διασκορπισμένους γενετικούς τόπους. Τέτοιες αλλαγές δεν δικαιολογούν το φράγμα της αναγέννησης. Δεν έχουν μελετηθεί αρκετά οι αλλαγές που αφορούν στη διαφορική σύνθεση του DNA ή ακόμη και στην απώλειά του. Τέτοιου είδους αλλαγές γίνονται σε όλα τα κύτταρα και μπορεί να σχετίζονται με την απώλεια της μορφογενετικής ικανότητας.

Οι μέχρι τώρα προσπάθειες για την έρευνα του φαινομένου της σωμακλωνικής παραλλακτικότητας περιορίζονται, κατά το μεγαλύτερο ποσοστό, σε μελέτες σε αναγεννημένα φυτά. Ίσως οι προσπάθειες για τη μελέτη του φαινομένου και την αξιολόγηση του σε μεγαλύτερο φάσμα περιπτώσεων, θα έπρεπε να στραφούν και στην αστάθεια των καλλιεργειών που έχασαν την παντοδυναμία τους.

Ποιές είναι εκείνες οι κρίσιμες αλλαγές που έγιναν στο κυτταρογενετικό και γενετικό επίπεδο που εμπόδισαν την αναγέννηση; Πόσο κοινές είναι οι αλλαγές για τα διαφορετικά είδη φυτών στα διαφορετικά συστήματα, πώς εκδηλώνονται αυτές και πολλά άλλα σχετικά ερωτήματα ή παραμένουν αναπάντητα ή έχουν εκφραστεί μέχρι τώρα μόνο υποθέσεις για την εξήγησή τους;

Σχεδόν δέκα χρόνια έχουν περάσει από την καθιέρωση του όρου που περιγράφει το φαινόμενο της σωμακλωνικής παραλλακτικότητας και οι μηχανισμοί του είναι άγνωστοι.

2. Γιατί μελετάται η σωμακλωνική παραλλακτικότητα

Η μελέτη της σωμακλωνικής παραλλακτικότητας είναι απαραίτητη και για τα θετικά και τα αρνητικά της αποτελέσματα. Υπάρχουν περιπτώσεις όπου η παραλλακτικότητα είναι ανεπιθύμητη και άλλες όπου μπορεί να αποδειχθεί χρήσιμη και εκμεταλλεύσιμη, εάν τεθεί κάτω από έλεγχο.

Η σωμακλωνική παραλλακτικότητα είναι ανεπιθύμητη όταν επιθυμούμε:

1. Να παράγουμε, γρήγορα, ομοιόμορφα φυτά με κλωνική αναπαραγωγή.
2. Να διατηρήσουμε με ιστοκαλλιέργεια στις τράπεζες γονιδίων δύστροπο γενετικό υλικό που δεν μπορεί να διατηρηθεί αλλιώς.
3. Να παράγουμε, με ιστοκαλλιέργεια ή κυτταροκαλλιέργεια, δευτερογενή προϊόντα.

Σ' αυτές τις περιπτώσεις πρέπει να περιορίσουμε ή να μηδενίσουμε τη δράση των μηχανισμών που οδηγούν στην παραλλακτικότητα. Η σωμακλωνική παραλλακτικότητα αποτελεί μεγάλο πρόβλημα στην Γενετική Μηχανική όσον αφορά στην παραγωγή σωματικών υβριδίων και στην παραγωγή μεταμορφωμένων κυττάρων ή φυτών.

Η σωμακλωνική παραλλακτικότητα όμως έχει και θετικά αποτελέσματα. Μπορεί να γίνει χρήσιμη στο βελτιωτή όταν τεθεί υπό έλεγχο ως πηγή εκμεταλλεύσιμης γενετικής παραλλακτικότητας στα διάφορα βελτιωτικά προγράμματα.

Πέρα από τον προαναφερθέντα ρόλο της σωμακλωνικής παραλλακτικότητας, που έχει άμεση πρακτική εφαρμογή, ίσως το πιο σημαντικό στοιχείο αυτής της παραλλακτικότητας είναι ότι καθιστά δυνατή την βαθύτερη μελέτη των μηχανισμών αλλαγής του γονιώματος. Υποστηρίζεται ότι το γονίωμα υπό συνθήκες *in vitro* καλλιέργειας βρίσκεται σε μια συνεχή αλλαγή και μια ρευστή κατάσταση και ότι η σωμακλωνική παραλλακτικότητα, επιταχύνει και αποκαλύπτει τις αλλαγές με πιο δυναμικό τρόπο. Μήπως λοιπόν η σωμακλωνική παραλλακτικότητα κρατάει το κλειδί για τις απαντήσεις των αναπάντητων ερωτημάτων που συνδέονται με την οντογένεση, τη διαφοροποίηση και την εξέλιξη;

3. Η Σωμακλωνική Παραλλακτικότητα στη Βελτίωση των Φυτών

Για να είναι χρήσιμη η σωμακλωνική παραλλακτικότητα πρέπει:

1. Τα αναγεννημένα φυτά να είναι γενετικά διαφορετικά από το αρχικό φυτό από το οποίο προήλθαν. Το είδος του φυτού που βελτιώνεται πρέπει να μπορεί να καλλιεργηθεί εύκολα *in vitro* και να αναγεννήσει φυτά. Γι' αυτό παράλληλα με τη σωμακλωνική παραλλακτικότητα μελετάται και η μορφογενετική ικανότητα του είδους, ή, καλύτερα, των συγκεκριμένων γονοτύπων.

2. Τα καινούργια γενετικά χαρακτηριστικά πρέπει να μεταδίδονται και να εκφράζονται σταθερά στους απογόνους.

3. Το γενετικό κέρδος να είναι διαφορετικό και μεγαλύτερο από αυτό που παρέχουν οι παραδοσιακές πηγές παραλλακτικότητας (διασταυρώσεις, άγρια είδη, μεταλλάξεις).

Η σωμακλωνική παραλλακτικότητα αξιοποιείται κατά τον καλύτερο τρόπο όταν είναι δυνατή η επιλογή των παραλλαγμένων μορφών σε κυτταρικό επίπεδο, πριν αναγεννηθούν τα φυτά, γιατί έτσι υπάρχει μείωση του κόστους. Επιλογή αυτού του είδους είναι δυνατή και έχει γίνει για ανθεκτικότητα σε ανάλογα αμινοξέων (αντιμεταβολίτες), αντιβιοτικά, παθοτοξικά, ζιζανιοκτόνα και φυσιολογική καταπόνηση. Παραδείγματα επιλογής σε παθοτοξίνες ειδών υπάρχουν αρκετά. Στο ζαχαροκάλαμο π.χ. έχει γίνει επιλογή για ανθεκτικότητα στην τοξίνη του *Helminthosporium sacchari*.

Στη μηδική έγινε επιλογή για ανθεκτικότητα σε τοξίνες του *Fusarium* και στην τομάτα έγινε επιλογή για τα *Pseudomonas* και *Alternaria* καθώς και στον καπνό. Έχει γίνει επίσης, επιλογή για ανθεκτικότητα στα ζιζανιοκτόνα στον καπνό και στην τομάτα. Επίσης, επιλογή μπορεί να γίνει για ανεκτικότητα σε αλατούχα εδάφη, όξινα εδάφη, τοξικότητα βαρέων μετάλλων, ανεκτικότητα σε ακραίες θερμοκρασίες και πλημμύρες.

Σχετικά με την ανθεκτικότητα σε έντομα ή σε παθογόνα θα πρέπει να είμαστε επιφυλακτικοί αναφορικά με το είδος της ανθεκτικότητας που επιτυγχάνεται, όταν συγκρίνουμε τη σωμακλωνική παραλλακτικότητα με τις παραδοσιακές μεθόδους βελτίωσης. Η περισσότερη φυσική ανθεκτικότητα είναι οριζόντια, πολυγονιδιακή και περισσότερο επιθυμητή. Εάν η ανθεκτικότητα που επιτυγχάνεται με την σωμακλωνική παραλλακτικότητα ελέγχεται από ένα γονίδιο, είναι κατακόρυφη και σχετικά μικρής αξίας μια και τα παθογόνα, όπως και τα έντομα, έχουν την ικανότητα να αναπτύσσουν άτομα που μπορούν να προσβάλλουν ανθεκτικές ποικιλίες.

Η επιλογή για αγροκομικά χαρακτηριστικά σε *in vitro* επίπεδο είναι δύσκολη γιατί:

1. Δεν υπάρχει πάντοτε κατάλληλο κριτήριο επιλογής.
2. Τα καλλιεργούμενα κύτταρα δεν έχουν την ικανότητα να εκφράσουν το αγροκομικό χαρακτηριστικό σε *in vitro* καλλιέργεια.
3. Υπάρχει το ενδεχόμενο τα αναγεννημένα φυτά να μην εκφράσουν το αγροκομικό χαρακτηριστικό σε διαφοροποιημένα κύτταρα και τέλειους ιστούς.

Ωστόσο, παρά τους περιορισμούς που αναφέρθηκαν, η σωμακλωνική παραλλακτικότητα έχει πετύχει στην βελτίωση αγροκομικών χαρακτηριστικών και τη διάδοση νέων ποικιλιών με βελτιωμένα αγροκομικά χαρακτηριστικά σε λιγότερο χρόνο, σε σύγκριση με τις παραδοσιακές μεθόδους. Σε σύγκριση με τον παραδοσιακό τρόπο εισαγωγής παραλλακτικότητας, η σωμακλωνική παραλλακτικότητα δεν αλλάζει το γενετικό υπόβαθρο μιας καλά προσαρμοσμένης ποικιλίας. Η σωμακλωνική παραλλακτικότητα επίσης οδηγεί και σε νέους τύπους παραλλακτικότητας. Τα πειράματα όμως δοκιμασίας και αξιολόγησης του υλικού που προκύπτει από τη χρήση της σωμακλωνικής παραλλακτικότητας, και τα οποία είναι χρονοβόρα, πρέπει να γίνουν με τον παραδοσιακό τρόπο.

4. Χαρακτηριστικά της σωμακλωνικής παραλλακτικότητας

Η σωμακλωνική παραλλακτικότητα, που είναι ευρέως διαδεδομένη σ'όλα τα είδη φυτών, εκφράζεται ως φαινοτυπική ή ως γονοτυπική παραλλακτικότητα.

Η φαινοτυπική παραλλακτικότητα αναφέρεται σε ένα ολόκληρο φάσμα αλλαγών σε ποιοτικούς και ποσοτικούς χαρακτήρες, παρουσιάζει μεγάλη συχνότητα ομοζυγωτικών μεταλλάξεων και μπορεί να εκφραστεί ως αλλαγή ολόκληρου πληθυσμού. Μερικές από τις αλλαγές παρατηρούνται αποκλειστικά στη σωμακλωνική παραλλακτικότητα. Δυστυχώς η παραλλακτικότητα που εκλύεται δεν είναι όλη σταθερή και δεν μπορεί να προβλεφτεί.

Η γονοτυπική παραλλακτικότητα εκφράζεται όσον αφορά στον πυρήνα ως:

- α) μετάλλαξη γονιδίων,
- β) ενίσχυση του DNA ,
- γ) μείωση DNA,
- δ) παραλλακτικότητα που αφορά στον χρωμοσωματικό αριθμό,

ε) παραλλακτικότητα που αφορά στην δομή των χρωμοσωμάτων και
στ) μεταφερόμενα/ μεταθετά στοιχεία (transposable elements).

Όσον αφορά στο κυτταρόπλασμα, έχουν αναφερθεί αλλαγές στο μιτοχονδριακό και στο χλωροπλαστικό DNA.

5. Η παραλλακτικότητα που παρατηρείται προϋπήρχε ή δημιουργήθηκε *de novo*;

Ακόμη και αν ένα μέρος της παραλλακτικότητας που παρατηρείται μετά από ιστοκαλλιέργεια, προϋπάρχει ωστόσο ένα μεγάλο μέρος της, όπως αποδεικνύεται από πειραματικά δεδομένα, δημιουργείται *de novo*. Ως επιχειρήματα για την υποστήριξη αυτής της άποψης μπορεί να χρησιμοποιηθούν τα πειραματικά δεδομένα που δείχνουν ότι η συχνότητα της παραλλακτικότητας αυξάνεται με τον χρόνο στην καλλιέργεια και ότι τα φυτά που αναγεννώνται από τον ίδιο κάλλο παραλλάσσουν μεταξύ τους χρωμοσωμικά και γενετικά.

Σωματικός υβριδισμός

Συχνά ο βελτιωτής επιθυμεί αλλά δεν είναι δυνατόν να διασταυρώσει δύο είδη ή και γένη ακόμη κι αν χρησιμοποιήσει βοηθητικές μεθόδους. Στις περιπτώσεις αυτές μπορεί να καταφύγει στο **σωματικό υβριδισμό**. Τα τοιχώματα των φυτικών κυττάρων μπορούν να απομακρυνθούν μηχανικά ή με τη δράση των ενζύμων και να σχηματιστούν πρωτοπλάστες. Η απουσία κυτταρικού τοιχώματος επιτρέπει στους πρωτοπλάστες να απορροφήσουν μεγάλα μόρια ή να συντηχθούν. Οι πρωτοπλάστες που θα προκύψουν μετά τη σύντηξη, όταν καλλιεργηθούν είναι δυνατόν να σχηματίσουν ξανά κυτταρικά τοιχώματα και να διαιρεθούν. Κάτω από ορισμένες συνθήκες είναι δυνατή η σύντηξη των πρωτοπλαστών από διαφορετικά είδη ή και γένη με αποτέλεσμα το σχηματισμό πρωτοπλαστών-υβριδίων π.χ. *Nicotiana glauca* x *Nicotiana laugsdorfii* σε θρεπτικό μέσο πάνω στο οποίο μπορούν να αναπτυχθούν οι πρωτοπλάστες υβρίδια και όχι οι πρωτοπλάστες γονείς. Στη συνέχεια αν είναι δυνατόν από τους πρωτοπλάστες-υβρίδια θα αναπτυχθούν φυτάρια.

Οι προϋποθέσεις για την επιτυχία είναι οι ακόλουθες:

1. Οι πρωτοπλάστες των δύο διαφορετικών ειδών ή γενών να μπορούν να συντηχθούν.
2. Να γνωρίζουμε την υπαρξη του ειδικού επιλεκτικού θρεπτικού υποστρώματος.
3. Να μπορούν να αναγεννηθούν τα φυτά.

Δύο βασικές μέθοδοι χρησιμοποιούνται:

α) Χημικές ουσίες όπως η πολυαιθυλενική γλυκόλη (PEG) ή η δεξτράνη ενεργούν σαν συγκολλητικά και προάγουν την σύντηξη των πρωτοπλαστών.

β) Ηλεκτροσύντηξη. Η προσκόλληση των πρωτοπλαστών συμβαίνει σε ένα ηλεκτρικό πεδίο και η σύντηξη συμβαίνει όταν περάσει ένας μικρός παλμός συνεχούς ρεύματος.

Όταν οι δύο πρωτοπλάστες συντήκονται παράγεται ένα κύτταρο που περιέχει και τους δύο πυρήνες και τα δύο κυτταροπλάσματα. Αν τα κύτταρα των γονέων δεν είναι όμοια τότε το προϊόν ονομάζεται **ετεροκάρυο**. Αν οι δύο πυρήνες στην συνέχεια συντηχθούν το μονοπύρηνιο κύτταρο που παράγεται **συγκάρυο**.

Μετά τη σύντηξη τα γονιώματα του πυρήνα και των κυτταροπλασμάτων επανασυνδυάζονται και έχουν σαν αποτέλεσμα ένα μεγάλο εύρος γενετικών συνδυασμών που δεν θα ήταν δυνατός με την παραδοσιακή βελτίωση.

Η ικανότητα της μεταφοράς πλαστιδίων είναι ιδιαίτερα υποσχόμενη γιατί χαρακτηριστικά όπως κυτταροπλασματική αρρενοστεירותητα, ανθεκτικότητα σε ασθένειες και ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα ελέγχονται από γονίδια που εδράζονται στα οργανίδια. Το μεγαλύτερο μειονέκτημα είναι ότι ο επιστήμονας δεν έχει μεγάλο έλεγχο επάνω στο ποιες γενετικές πληροφορίες παραμένουν και ποιες χάνονται. Όταν οι συντήξεις γίνονται ανάμεσα σε πρωτοπλάστες μη συγγενών ειδών π.χ. καπνός και σόγια οι πυρήνες είτε αποτυγχάνουν να συντηγηθούν ή μια ομάδα χρωμοσωμάτων χάνεται μετά τη σύντηξη. Αντίθετα συντήξεις ανάμεσα σε είδη ασυμβίβαστα της ίδιας ομάδας έχουν παράγει υβρίδια φυτά που παραμένουν μερικά χρωμοσώματα και από τους δύο τους γονείς. Το πιο γνωστό είναι το “pomato”. Σωματικά υβρίδια όπως το “pomato” δεν είναι χρήσιμα.

Πολλοί συνδιασμοί είναι άγονοι ή αποτυγχάνουν να δέσουν σπόρο και χρειάζονται εντατική αναδιασταύρωση για να περιορίσουν το ανεπιθύμητο ξένο γονίωμα. Αυτό που παραμένουν τελικά είναι ένα μέσο εισαγωγής γονιδίων. Από τη σύντηξη των πρωτοπλαστών προκύπτουν καινούριοι γενετικοί συνδιασμοί, όχι μόνο του πυρηνικού γονιώματος αλλά και των κυτταροπλασμάτων. Επειδή τα υβρίδια αυτά προκύπτουν από τη σωματικών κυττάρων, λέγονται **σωματικά υβρίδια**. Το μεγαλύτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα **κυτταροπλαστικά υβρίδια**.

Μεταμόρφωση

Η βάση της βελτίωσης των φυτών είναι η μεταφορά γενετικών πληροφοριών ανάμεσα στα φυτά με τελικό σκοπό την ανάπτυξη επιθυμητών φαινοτύπων. Η τεχνολογία του ανασυνδυασμένου DNA μας επιτρέπει τον άμεσο και εξειδικευμένο χειρισμό του γενετικού υλικού. Η εφαρμογή και η ανάπτυξη αυτής της τεχνολογίας σε έναν ικανοποιητικό βαθμό θα αποτελέσει ένα επιπλέον εργαλείο στα χέρια των βελτιωτών.

Πάνω από όλα η τεχνολογία αυτή διευρύνει τη δυνατότητα για μεταφορά των γονιδίων ανάμεσα σε μη συγγενείς οργανισμούς με εξειδικευμένη εισαγωγή των κλωνοποιημένων γονιδίων. Μεταμορφωμένα είναι τα φυτά εκείνα που φέρουν στο γονιωμα τους ενσωματωμένο DNA άλλων οργανισμών. Η μεταμόρφωση βασίζεται στη μεταφορά, σταθερή ενσωμάτωση και έκφραση χρήσιμων γονιδίων. Μερικές μέθοδοι μεταμόρφωσης είναι:

1. Με τη χρήση του Ti πλασμιδίου (αυτόνομα πολλαπλασιαζόμενου γενετικού στοιχείου) του βακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens* και ιών χωρίς παθογόνο δράση.
2. Απευθείας εισαγωγή DNA σε πρωτοπλάστες είτε με P.E.C., είτε με ηλεκτροδιείσδυση.
3. Εισαγωγή DNA με μικροενέσεις σε αναπτυσσόμενες ταξιανθίες.
4. Βομβαρδισμός πρωτοπλαστών ή κυττάρων με DNA.

Μέχρι τώρα η γενετική μηχανική έχει πετύχει την αλλαγή μονογονιδιακών χαρακτηριστικών, έτσι έχουν δημιουργηθεί γενετικά τροποποιημένα φυτά (διαγονιδιακά φυτά) που είναι ανθεκτικά σε ποικίλες ασθένειες και έντονα, ανεκτικά σε ζιζανιοκτόνα, φυτά που έχουν υψηλότερη θρεπτική αξία και φυτά με επιβραδυνόμενη ωρίμανση των φρούτων.

Πρόσφατες αναφορές έγιναν για τα φυτά με μεγαλύτερο δείκτη συγκομιδής, χειρισμό της ποιότητας και ποιότητας των πρωτεϊνών στο σιτάρι. Με τη χρήση της γενετικής μηχανικής πέτυχε η εισαγωγή ανθεκτικότητας στα λεπιδόπτερα με τη μεταφορά ενός γονιδίου από μικροοργανισμό σε ανώτερα φυτά και είναι ιδιαίτερης σημασίας. Ο *Bacillus thuringiensis* περιέχει μία γλυκοπρωτεΐνη που είναι ιδιαίτερα τοξική στα λεπιδόπτερα. Στην αρχική της κατάσταση αυτή η γλυκοπρωτεΐνη υπάρχει σαν κρυσταλλική προτοξίνη, ενώ διαλύεται και ενεργοποιείται μετά την κατάποση από το ευαίσθητο έντομο. Αυτή η πρωτεΐνη είναι σταθερή για πολλούς μήνες σε θερμοκρασία δωματίου. Το γονίδιο που κωδικοποιεί αυτό το πολυπεπτίδιο έχει κλωνοποιηθεί και εισαχθεί σε Γενετικά Τροποποιημένους Οργανισμούς (Genetically Modified Organisms). Έτσι δημιουργήθηκαν τα φυτά Bt. Η εισαγωγή σε ευαίσθητα φυτά μπορεί να μειώσει δραματικά τους πληθυσμούς της κάμπιας. Πριν την απελευθέρωση γενετικά τροποποιημένων φυτών θα πρέπει να είμαστε σίγουροι ότι η συγκεκριμένη γλυκοπρωτεΐνη δεν θα είναι τοξική στους τελικούς καταναλωτές όταν αυτή βρεθεί στο γενετικό υπόβαθρο του φυτού.

Μοριακοί Δείκτες

Ο όρος αναφέρεται σε οποιαδήποτε κληρονομούμενη οντότητα που σχετίζεται με οικονομικής σημασίας χαρακτηριστικά. Οι γενετικοί δείκτες μπορούν να βοηθήσουν και στην αναγνώριση ποικιλιών και στην επιλογή που βασίζεται σε δείκτες. Υπάρχουν οι κλασικοί γενετικοί δείκτες όπως οι μορφολογικοί και οι βιοχημικοί. Ωστόσο η χρήση αυτών των δεικτών είναι περιορισμένη εξαιτίας του μικρού αριθμού τους και του μικρού πολυμορφισμού που δείχνουν. Επίσης, επηρεάζονται από περιβαλλοντικές συνθήκες.

Οι μοριακοί δείκτες που βασίζονται στο DNA ξεπερνούν τους προαναφερθέντες περιορισμούς. Αυτοί οι δείκτες αποκαλύπτουν διαφορές που εμφανίζονται στην ακολουθία τεσσάρων βάσεων κατά μήκος των μορίων DNA των κυττάρων των οργανισμών.

Οι διάφοροι τύποι των μοριακών δεικτών μπορούν να ταξινομηθούν σε δύο κύριες κατηγορίες:

1. Αυτοί που περιλαμβάνουν χρήση περιοριστικών ενζύμων, ηλεκτροφόρηση, μεταφορά του DNA από το πήκτωμα σε πλαστική μεμβράνη (southern), σήμανση ανιχνευτών και υβριδισμό.
2. Τεχνολογία ενίσχυσης DNA που περιλαμβάνει την αντίδραση της αλυσιδωτής πολυμεράσης(PCR), όπως RAPDs, SPARs, AF-PCR, AFLPs, κ.λ.π.