

Εφαρμογές της ιστοκαλλιέργειας

# Στρατηγικές της Βελτίωσης των Φυτών

- Εντοπισμός ή δημιουργία γενετικής παραλλακτικότητας
- Επιλογή των καλύτερων γονοτύπων
- Αξιολόγηση των επιλεγέντων γονοτύπων
- Πολλαπλασιασμός των επιθυμητών γονοτύπων

# Η Ιστοκαλλιέργεια στην Βελτίωση

- Πολλαπλασιασμός Βελτιωμένου Γενετικού Υλικού
- Διατήρηση Βελτιωμένου Γενετικού Υλικού
- Αύξηση Γενετικής Παραλλακτικότητας και
- Επιλογή *in vitro*

# ***In vitro* καλλιέργεια**

- Η *in vitro* καλλιέργεια (*in vitro* culture) ή ιστοκαλλιέργεια (tissue culture) κυττάρων, ιστών, οργάνων και πρωτοπλαστών χρησιμοποιείται ως τεχνική πολλαπλασιασμού από τους βελτιωτές και τους καλλιεργητές φυτών.

# Γενετικό και Βελτιωτικό Υλικό

- Το υλικό πολλαπλασιάζεται αγενώς
  - οι παραδοσιακοί τρόποι είναι βραδείς
- Σταυρογονιμοποιούμενο υλικό (π.χ. ζαχαρότευτλα)
  - μαζικό πολλαπλασιασμό ή διατήρησή του χωρίς να αλλάξει η γενετική σύσταση

# Γενετικό και Βελτιωτικό Υλικό

- Παραγωγή σπόρου δύσκολη ή αδύνατη
  - αρρενόστειρες σειρές (κρεμμύδια)
  - αυτοασυμβίβαστες (λάχανο, μαρούλι)
- Διάδοση ενός εξαιρετικού γονότυπου
- Λίγα φυτά -Υβρίδια

# Κατηγορίες κλωνικά πολλαπλασιαζόμενων ειδών

- Κατηγορίες κλωνικά πολλαπλασιαζόμενων ειδών βάσει οικονομικής χρήσης
- Κατηγορίες κλωνικά πολλαπλασιαζόμενων ειδών για βελτιωτικούς σκοπούς

# Κλώνοι βάσει οικονομικής χρήσης

- Αυτά που καλλιεργούνται για κάποιο βλαστητικό μέρος (προϊόν)  
(Πατάτα)
- Είδη που καλλιεργούνται για τον καρπό τους (Μπανάνα)
- Είδη που καλλιεργούνται για τα ανθικά τους προϊόντα (Τουλίπες)



# Κλωνικά για βελτιωτικούς σκοπούς

- Φυτά που εμφανίζουν φυσιολογική άνθηση και σπορόδεση (διατήρηση ετεροζυγωτίας)
- Φυτά που εμφανίζουν φυσιολογικά άνθη αλλά μειωμένη σπορόδεση
- Φυτά που παράγουν σπόρους με απόμειξη
- Μη ανθοφόρα είδη

# Τύποι κλωνικού πολλαπλασιασμού

- Φυσικός κλωνικός πολλαπλασιασμός
- Τεχνητός κλωνικός πολλαπλασιασμός

# Η σημασία του κλωνικού πολλαπλασιασμού στη ΒΦ

- Ταχεία παραγωγή ποιοτικού υλικού αποθέματος προς χρήση στη βελτίωση
- Επαγωγή πρώιμης άνθησης
- Διατήρηση γενετικού υλικού
- Διατήρηση της γενετικής ομοιομορφίας
- Παραγωγή φυτών απαλλαγμένων από ασθένειες

# Μικροπολλαπλασιασμός

- Ο μικροπολλαπλασιασμός (micropropagation) είναι ο *in vitro* πολλαπλασιασμός ή αναπαραγωγή των φυτών
- Χρησιμοποιείται συχνότερα για τον εμπορικό πολλαπλασιασμό καλλωπιστικών και άλλων κηπευτικών ειδών υψηλής αξίας

# Χρησιμοποιεί

- Προϋπάρχοντα μεριστώματα (περιοχές όπου τα κύτταρα είναι αδιαφοροποίητα ή δεν έχουν συγκεκριμένους ρόλους ή λειτουργία)
- Μη μεριστωματικό ιστό

# Μέθοδοι μικροπολλαπλασιασμού

- Μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες:
- (i) παραγωγή μασχαλαίου βλαστού
- (ii) παραγωγή τυχαίων βλαστών και
- (iii) σωματική εμβρυογένεση

# Πέντε γενικά βήματα

- Επιλογή εκφύτου
- Εγκατάσταση ασηπτικής καλλιέργειας
- Πολλαπλασιασμός των μασχαλιαίων βλαστών
- Ριζοβολία
- Μεταφορά στο φυσικό περιβάλλον

# Η σημασία του κλωνικού πολλαπλασιασμού στη ΒΦ

- Πολλαπλασιασμός ειδών που δεν αναπαράγονται εύκολα μέσω σπερμάτων
- Πολλαπλασιασμός εγγενώς παραγόμενων στείρων υβριδίων
- Διατήρηση του γενετικού οφέλους



# Δύσκολη αναπαραγωγή με σπέρματα

- Ορισμένα είδη
  - δεν παράγουν καθόλου σπόρους ή
  - παράγουν λίγους βιώσιμους σπόρους ή
  - μπορεί να αντιμετωπίζουν θέματα λήθαργου
  - ενώ άλλα διαθέτουν σπόρους με μειωμένη φυτρωτική ικανότητα

# Συνθετικός σπόρος (synthetic seed)

- Εκτός από τον μικροπολλαπλασιασμό υπάρχουν και άλλες εφαρμογές της ιστοκαλλιέργειας που παρουσιάζουν ενδιαφέρον για τους βελτιωτές φυτών.
- Συνθετικός σπόρος
- Η σωματική εμβρυογένεση έχει δυνητικές εμπορικές εφαρμογές, μία εκ των οποίων είναι η τεχνολογία συνθετικού σπόρου (synthetic seed) (παραγωγή τεχνητών σπόρων).

# Συνθετικός σπόρος (synthetic seed)

- Ένας συνθετικός σπόρος αποτελείται από σωματικά έμβρυα που περικλείονται από προστατευτικό περίβλημα
- Μη εμβρυογενείς συνθετικοί σπόροι με χρήση γονάτων με πλευρικούς οφθαλμούς

# Η θεωρία των τεχνητών σπόρων

- Εισαγωγή 1970
- Ιδιαίτερα χρήσιμοι σε φυτά που δεν παράγουν ζωτικούς σπόρους
- Οι τεχνητοί σπόροι είναι μικροί σε μέγεθος και έχουν πλεονεκτήματα στην αποθήκευση τους, στην διαχείριση, μεταφορά και φύτευση

# Τεχνητοί Σπόροι

- Οι τεχνητοί σπόροι μπορούν να παραχθούν ενθυλακώνοντας μια πολλαπλασιαστική μονάδα σε ένα υλικό που θα του επιτρέψει να αναπτυχθεί σε ένα φυτό.
- Οι πολλαπλασιαστικές μονάδες μπορεί να αποτελούνται από οφθαλμούς βλαστών ή σωματικά έμβρυα που έχουν αναπτυχθεί ασηπτικά με ιστοκαλλιέργεια.
- Στην καλλιέργεια, αυτές οι πολλαπλασιαστικές μονάδες μπορούν εύκολα να αναπτυχθούν σε μεμονωμένα φυτά καθώς έχουμε την ικανότητα να ελέγξουμε την ανάπτυξή του χρησιμοποιώντας χημικές ουσίες που παρέχονται στα μέσα καλλιέργειας.
- Στην παραγωγή τεχνητών σπόρων, ένα τεχνητό ενδοσπέρμιο μπορεί να δημιουργηθεί μέσα στη μήτρα ενθυλάκωσης.

# Τεχνητοί Σπόροι

- Η μήτρα ενθυλάκωσης είναι μια υδρογέλη φτιαγμένη από φυσικά εκχυλίσματα από φύκια (άγαρ, αλγινικό), φυτά, ή μικροοργανισμοί.
- Χρήσιμες βοηθητικές ουσίες όπως θρεπτικά συστατικά, ρυθμιστές ανάπτυξης φυτών, φυτοφάρμακα και μυκητοκτόνα μπορούν να παρέχονται στη μονάδα πολλαπλασιασμού εντός της μήτρας ενθυλάκωσης.

## Δύο τύποι

- Ο ενυδατωμένος συνθετικός σπόρος - ο σπόρος εσωκλείεται σε ένυδρη γέλη (π.χ. αλγινικό ασβέστιο).
- Ο αποξηραμένος συνθετικός σπόρος - ο σπόρος επικαλύπτεται με υδατοδιαλυτή ρητίνη (π.χ. πολυοξυαιθυλένιο).

# Φάση ηρεμίας

- Για την ανάπτυξη συνθετικών σπόρων είναι κρίσιμο να επιτευχθεί **μια φάση ηρεμίας**, η οποία συνήθως απουσιάζει στη σωματική εμβρυογένεση (δηλαδή υπάρχει συνεχής αύξηση, φύτευση και τελικά θάνατος χωρίς ηρεμία, αλλά όχι στατική φάση όπως στα έμβρυα των ώριμων σπόρων).



# Εφαρμογή

- Είδη που είναι εμφανίζουν υψηλό βαθμό ετεροζυγωτίας και στα οποία η συμβατική βελτίωση είναι χρονοβόρα
- Τροπικά είδη που πολλαπλασιάζονται με σπόρους αλλά οι σπόροι διαθέτουν σύντομη περίοδο βιωσιμότητας (π.χ. κακάο, καρύδα, φοινικέλαιο, καφές)

# Εφαρμογή

- Στη μηδική (*Medicago sativa*) και δακτυλίδα (*Dactylis glomerata*) προσπάθεια για ανάπτυξη τεχνητών σπόρων
- Υβριδικός συνθετικός σπόρος σε είδη στα οποία η εμπορική παραγωγή υβριδίων είναι προβληματική (π.χ. βαμβάκι, σόγια)

# Εμπορευματοποίηση της τεχνολογίας συνθετικών σπόρων

- Ενώ οι προοπτικές των εμπορικών συνθετικών σπόρων είναι ελκυστικές, αρκετοί παράγοντες την καθιστούν μη εφαρμόσιμη σήμερα.

# Περιορισμοί

- Προβλήματα ενδέχεται να παρουσιαστούν
- κατά την ωρίμαση
- τη φύτρωση
- τη ριζοβολία
- τον σχηματισμό της κορυφής του βλαστού
- ή τον εγκλιματισμό

# Περιορισμοί

- Πρόκληση -Η παραγωγή υψηλής ποιότητας βιώσιμων πολλαπλασιαστικών μονάδων
- Ανεπαρκής μετατροπή των φαινομενικά φυσιολογικών πολλαπλασιαστικών μονάδων σε φυσιολογικά φυτάρια.

# Περιορισμοί

- Μη ικανοποιητική δυνατότητα αποθήκευσης των συνθετικών σπόρων λόγω **έλλειψης ληθάργου** και **ανθεκτικότητας στην καταπόνηση** των σωματικών εμβρύων
- Μηχανική φθορά, έλλειψη παροχής οξυγόνου, προσβολή από μικρόβια και έλλειψη θρεπτικών συστατικών

# Λύσεις

- Για την αντιμετώπιση ορισμένων από αυτές τις προκλήσεις προτείνονται διάφορες στρατηγικές.
- Αυτές ποικίλλουν μεταξύ των ειδών και περιλαμβάνουν την αφυδάτωση, μια διαδικασία που μπορεί να οδηγήσει σε βλάβη του εμβρύου.

# Εξυγίανση Γενετικού και Βελτιωτικού Υλικού

- Καλλιέργεια Ακραίου Μεριστώματος
- Τα μεριστώματα είναι συχνά απαλλαγμένα από ιούς ακόμη και όταν το φυτό είναι μολυσμένο.
- Ανάπτυξη του αποκομμένου μεριστωματικού ιστού σε πλήρη φυτά απαλλαγμένα από ιούς



# Μέγεθος ακραίου μεριστώματος

- Όσο πιο μικρό είναι το ακραίο μερίστωμα τόσο μεγαλύτερη είναι η ανάκτηση φυτών απαλλαγμένων από ιούς
- Μειώνεται η επιβίωση και η αναγέννηση σε σύγκριση με μεγαλύτερο έκφυτο - ακραίο μερίστωμα

# Παραγωγή φυτών απαλλαγμένων από ιούς

- Οι ιογενείς μολύνσεις είναι συστημικές, όντας διάχυτες σε ολόκληρο το προσβεβλημένο φυτό
- Η θερμοθεραπεία είναι μια διαδικασία που χρησιμοποιείται για την απαλλαγή των μολυσμένων φυτών από τις ιογενείς μολύνσεις

# Η διαδικασία

- Ανίχνευση (π.χ. με ELISA) της παρουσίας μιας ιογενούς μόλυνσης στο φυτό
- Τα μεριστώματα των βλαστών αφαιρούνται ασηπτικά και αποστειρώνονται
- Εμβαπτίζονται σε 75-99% αιθανόλη ή 0,1-0,5% υποχλωριώδες νάτριο ή οικιακή χλωρίνη για μερικά δευτερόλεπτα ή λεπτά

# Φυτά Χωρίς Παθογόνα

- Χωρίς ιούς
  - Κορυφαίο μερίστωμα <0.5 mm
    - 30-37 °C, 10-14 ημέρες
    - 50-60 °C, 5-10 min
    - πράσινο μαλαχίτη
    - Θειουρακίλη
    - Ribavirin, Virazole

# Φυτά Χωρίς Παθογόνα

- Τα απαλλαγμένα από ιούς φυτά μικροπολλαπλασιάζονται για τη φύτευση μιας καλλιέργειας απαλλαγμένης από ιούς.
- Η εξάλειψη του ιού από τα φυτά δεν τα καθιστά ανθεκτικά στον ιό.

# Παράδειγμα

- Πατάτα
- Παραγωγή μικροκονδύλων

# Μικροκόνδυλοι

- 2 έως 12 mm σε διάμετρο
- Σχηματίζονται στους βλαστούς ή παράγονται στο στερεό θρεπτικό υπόστρωμα
- 150 ml δοχείο και 30 ml θρεπτικό μέσο και 4 έως 5 κομμάτια βλαστού μετά από 6 μήνες παράγει μέχρι 20 μικροκονδύλους
- Επιπροσθέτως παρέχει αρκετά στελέχη για να δώσουν γένεση σε 100-150 μικρομοσχεύματα.
- Οι μικροκόνδυλοι, περίπου 5 έως 10 mm σε διάμετρο είναι ακριβώς όπως οι μεγάλοι σποροκόνδυλοι περίπου 35 έως 55mm, εκτός από το μέγεθος μινιατούρα και συνήθως έχουν παρόμοιο σχήμα με τον κόνδυλο, χρώμα με τον κόνδυλο αριθμό και κατανομή και σχετικό βάθος ματιών.
-

# Διατήρηση Γενετικού Υλικού

- Ορθόδοξοι σπόροι
- Δύστροποι σπόροι
- Αγενώς πολλαπλασιαζόμενο υλικό



# Τεχνολογίες αποθήκευσης γενετικού υλικού

- Μόλις συλλεχθεί το γενετικό υλικό διατηρείται στην πιο κατάλληλη μορφή του από την τράπεζα γονιδίων (τράπεζα γενετικού υλικού).
- Το φυτικό γενετικό υλικό μπορεί να αποθηκευτεί με τη μορφή **γύρης, κυρίως σπόρων, ή φυτικών ιστών**.
- Τα ξυλώδη καλλωπιστικά είδη μπορούν να διατηρηθούν **ως ζωντανά φυτά** όπως συμβαίνει στα δενδροκομεία.
- Η διατήρηση σε εσωτερικούς χώρους πραγματοποιείται κάτω από συνθήκες **ψυχρής αποθήκευσης**, με τις θερμοκρασίες να κυμαίνονται από -18 έως -196 ° C.

# Αποθήκευση σπόρων

- Οι σπόροι ξηραίνονται έως ότου επιτευχθεί η κατάλληλη υδατοπεριεκτικότητα πριν τοποθετηθούν σε φακέλους σπόρων.
- Ο χώρος αποθήκευσης διατηρείται στους  $-18^{\circ}\text{C}$ , μία θερμοκρασία η οποία θα διατηρήσει τους περισσότερους σπόρους βιώσιμους τουλάχιστον για 20 ή και περισσότερα έτη.
- Πραγματοποίηση περιοδικών δειγματοληψιών σπόρων από κάθε καταχωρημένο δείγμα γενετικού υλικού για τη διεξαγωγή ενός ελέγχου φυτρωτικότητας.
- Όταν η φυτρωτικότητα πέσει κάτω από ένα συγκεκριμένο προκαθορισμένο επίπεδο, το δείγμα επανακαλλιεργείται για την απόκτηση φρέσκων σπόρων.

# Αποθήκευση αγενώς πολλαπλασιαζόμενου υλικού

- Συνήθως αποθηκεύεται σε βλαστητικές μορφές όπως οι κόνδυλοι, οι βολβοί, τα ριζώματα και τα μοσχεύματα.
- Η διατήρηση φυτών σε αυτές τις μορφές επίπονη και δαπανηρή.
- *In vitro* αποθήκευση γενετικού υλικού
- Υπάρχουν διάφοροι τύποι συστημάτων ιστοκαλλιέργειας (ιστοκαλλιέργειες κυττάρων εν αιωρήσει, κάλλων, μεριστωματικών ιστών)
- Για τη χρήση των υλικών των κυττάρων εν αιωρήσει και των κάλλων θα πρέπει να υπάρχει ένα καθιερωμένο σύστημα αναγέννησης πλήρων φυτών από τα συστήματα αυτά, κάτι το οποίο ακόμη δεν είναι εφικτό για όλα τα είδη φυτών.
- Συνεπώς, στην *in vitro* αποθήκευση προτιμώνται οι καλλιέργειες μεριστωμάτων διότι είναι περισσότερο σταθερές.

# Μέθοδοι Διατήρησης Γενετικού Υλικού

- Αργή ανάπτυξη
- Κρυοδιατήρηση

# Αργή ανάπτυξη

- Επιβράδυνση του μεταβολισμού με φυσικά και χημικά μέσα
  - Μείωση θερμοκρασίας
  - Μείωση φωτισμού
  - Ειδικά θρεπτικά υποστρώματα
- Περίοδος αποθήκευσης (1 έως 4 χρόνια)
- Αμπέλι, πατάτα κλπ

# Κρυοσυντήρηση

- Η **κρυοσυντήρηση** (cryopreservation) ή **διατήρηση σε ψύξη** είναι η αποθήκευση των υλικών σε εξαιρετικά χαμηλές θερμοκρασίες μεταξύ **-150 και -196 ° C σε υγρό άζωτο**.
- Τα **φυτικά κύτταρα, οι ιστοί ή τα μοσχεύματα** μπορούν να αποθηκευτούν με αυτόν τον τρόπο για μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς να χάσουν την ικανότητα αναγέννησης.
- Μολονότι και οι σπόροι μπορούν να αποθηκευτούν με αυτή τη μέθοδο, η **κρυοσυντήρηση προορίζεται κυρίως για αγενώς πολλαπλασιαζόμενα είδη** που πρέπει να διατηρηθούν ως ζωντανά φυτά.
- Οι καλλιέργειες των κορυφών του βλαστού προέρχονται από το υλικό που πρόκειται να αποθηκευθεί και προστατεύονται με **εμβάπτιση σε κρυοπροστατευτικό μέσο** (π.χ. **ένα μείγμα ζάχαρης και πολυαιθυλενογλυκόλης μαζί με διμεθυλοσουλφοξείδιο**).

# Κρυοδιατήρηση

- Θερμοκρασίες υγρού αζώτου (-196°C)
- Σταματά τελείως η ανάπτυξη
- Διατηρούνται
  - κυτταροκαλλιέργειες
  - σωματικά έμβρυα
  - πρωτοπλάστες

# IPK Cryobank

- Μεριστωματικοί ιστοί, γύρη και έμβρυα αποθηκεύονται σε υγρό άζωτο
- Αυτή η θερμοκρασία αναστέλλει όλες τις μεταβολικές διαδικασίες και επιμηκύνει την ζωτικότητα του κυττάρου
- Έχουν αναπτυχθεί πολλές μέθοδοι και διαφοροποιούνται σε μεθόδους αργού και γρήγορου παγώματος
- Τον Οκτώβριο του 2018 η τράπεζα είχε 2,029 καταχωρήσεις σε κρυοδιατήρηση
- Αν και η κρυοδιατήρηση εφαρμόζεται επιτυχώς παγκοσμίως οι οι κυτταρικές διαδικασίες και οι μηχανισμοί δεν είναι επαρκώς κατανοητοί και απαιτείται έρευνα πολλών επιστημών



# Στόχος κρυοδιατήρησης

- Στόχος να φέρει τις καλλιέργειες φυτικών κυττάρων και ιστών σε μηδενικό μεταβολισμό ή φάση μη διαίρεσης με μείωση της θερμοκρασίας παρουσία κρυοπροστατευτικών

# Μέθοδοι κρυοδιατήρησης

- Η κρυοδιατήρηση γενικά σημαίνει την αποθήκευση γενετικού υλικού σε πολύ χαμηλές θερμοκρασίες:
  - Πάνω από το στερεό διοξείδιο του άνθρακα (στους  $-79^{\circ}\text{C}$ )
  - Ψυκτικοί θάλαμοι χαμηλής θερμοκρασίας (στους  $-80^{\circ}\text{C}$ )
  - Σε ατμόσφαιρα αζώτου (στους  $-150^{\circ}\text{C}$ )
  - Σε υγρό άζωτο (στους  $-196^{\circ}\text{C}$ )

# Κρυοδιατήρηση σε υγρό άζωτο

- Η συνηθέστερα χρησιμοποιούμενη κρυοδιατήρηση είναι με χρήση υγρού αζώτου
- Στη θερμοκρασία του υγρού αζώτου ( $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ ), τα κύτταρα παραμένουν σε εντελώς ανενεργή κατάσταση και επομένως μπορούν να διατηρηθούν για μεγάλες χρονικές περιόδους

# Εφαρμογές

- Ρύζι, σιτάρι, φυστίκι, μανιόκα, ζαχαροκάλαμο, φράουλα, καρύδα
- Αρκετά φυτά μπορούν να αναγεννηθούν από κύτταρα, μεριστώματα και έμβρυα αποθηκευμένα σε κρυοδιατήρηση

# Μηχανισμός της κρυοδιατήρησης

- Η τεχνική της διατήρησης σε κατάψυξη βασίζεται στη μετατροπή του νερού που υπάρχει στα κύτταρα από υγρή σε στερεή κατάσταση.
- Λόγω της παρουσίας αλάτων και οργανικών μορίων στα κύτταρα, το νερό των κυττάρων απαιτεί πολύ χαμηλότερη θερμοκρασία για να παγώσει (ακόμη και στους  $-68\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) σε σύγκριση με το σημείο πήξης καθαρού νερού (περίπου  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ).

# Αποτέλεσμα

- Όταν αποθηκεύονται σε χαμηλή θερμοκρασία, οι μεταβολικές διαδικασίες και οι βιολογικές αλλοιώσεις στα κύτταρα / τους ιστούς σχεδόν σταματούν

# Προφυλάξεις - Περιορισμοί

- Οι περιορισμοί που πρέπει να ξεπεραστούν για την επιτυχή κρυοδιατήρηση:
  - Οι σχηματισμοί παγοκρυστάλλων μέσα στα κύτταρα θα πρέπει να αποτρέπονται καθώς προκαλούν τραυματισμό στα οργανίδια και στο κύτταρο.
  - Η υψηλή ενδοκυτταρική συγκέντρωση διαλυμένων ουσιών μπορεί επίσης να βλάψει τα κύτταρα

# Προφυλάξεις - Περιορισμοί

- Μερικές φορές, ορισμένες διαλυμένες ουσίες από το κύτταρο ενδέχεται να διαρρεύσουν κατά τη διάρκεια της κατάψυξης
- Τα κρυοπροστατευτικά επηρεάζουν επίσης τη βιωσιμότητα των κυττάρων
- Η φυσιολογική κατάσταση του φυτικού υλικού είναι επίσης σημαντική



# Απαιτήσεις κρυοδιατήρησης

- Προκαλλιέργεια
- Κρυοπροστασία
- Κατάψυξη
- Αποθήκευση
- Ξεπάγωμα
- Ανάκτηση

# Κρυοπροστατευτικά

- Διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO)
- Η τοξικότητα του DMSO είναι πρακτικά μηδενική, ωστόσο η χρήση του στο εργαστήριο απαιτεί ιδιαίτερη προσοχή, γιατί απορροφάται ευκολότατα από το δέρμα και μεταφέρεται ταχύτατα στην κυκλοφορία του αίμα

# Βήματα

- Ανάπτυξη αποστειρωμένων καλλιεργειών ιστών
- Προσθήκη κρυοπροστατευτικών και προεπεξεργασία
- Ψύξη
- Αποθήκευση
- Απόψυξη
- Επανακαλλιέργεια
- Μέτρηση επιβίωσης / βιωσιμότητας
- Αναγέννηση των φυτών

# Ανάπτυξη καλλιέργειας αποστειρωμένου ιστού:

- Η επιλογή των φυτικών ειδών και των ιστών με ιδιαίτερη αναφορά στους μορφολογικούς και φυσιολογικούς χαρακτήρες επηρεάζει σε μεγάλο βαθμό την ικανότητα του εκφύτου να επιβιώσει στην κρυοδιατήρηση

# Οποιοδήποτε ιστό;

- Οποιοσδήποτε ιστός από ένα φυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί για κρυοδιατήρηση, π.χ. μεριστώματα, έμβρυα, ενδοσπέρμια, ωάρια, σπόροι, καλλιεργημένα φυτικά κύτταρα, πρωτοπλάστες, κάλους.

# Κρυοπροστατευτικά

- Προσθήκη κρυοπροστατευτικών και προεπεξεργασία:
- Τα κρυοπροστατευτικά είναι οι ενώσεις που μπορούν να αποτρέψουν τη ζημιά που προκαλείται στα κύτταρα από κατάψυξη ή απόψυξη.

# Τι κάνουν τα κρυοπροστατευτικά;

- Το σημείο πήξης του νερού μειώνεται λόγω της παρουσίας κρυοπροστατευτικών
- Ως αποτέλεσμα, ο σχηματισμός κρυστάλλων πάγου καθυστερεί κατά τη διάρκεια της διαδικασίας κρυοδιατήρησης

# Κρυοπροστατευτικά

- Υπάρχουν πολλά κρυοπροστατευτικά που περιλαμβάνουν διμεθυλοσουλφοξείδιο (DMSO), γλυκερόλη, αιθυλένιο, προπυλένιο, σακχαρόζη, μαννόζη, γλυκόζη, προλίνη και ακεταμίδη. Μεταξύ αυτών, χρησιμοποιούνται ευρύτερα DMSO, σακχαρόζη και γλυκερόλη.



# Χρησιμοποιούνται τέσσερις διαφορετικοί τύποι μεθόδων ψύξης:

- 1. Μέθοδος βραδείας κατάψυξης
- 2. Μέθοδος ταχείας κατάψυξης
- 3. Μέθοδος κατά στάδια κατάψυξης
- 4. Μέθοδος ξηρής κατάψυξης

# Κρυοδιατήρηση

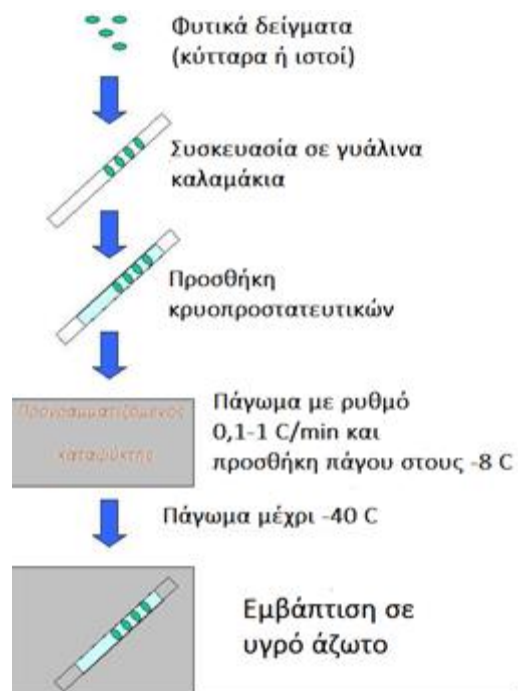


- Φυτικοί ιστοί διατηρούνται σε δεξαμενές με υγρό άζωτο

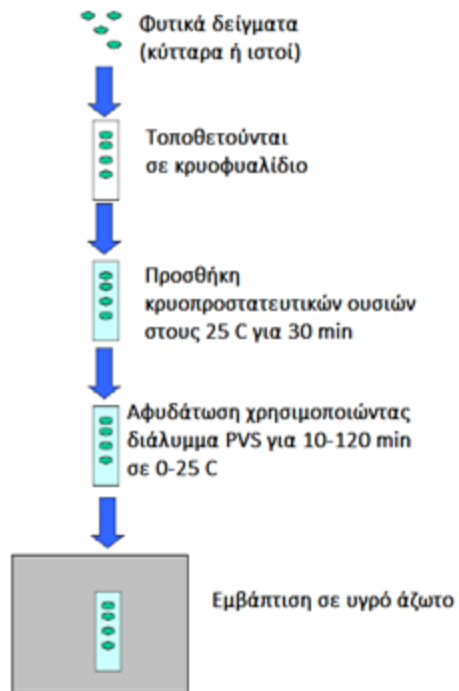
# Υαλοποίηση (Vitrification)

- Η υαλοποίηση κατά τη διάρκεια της κρυοσυντήρησης περιλαμβάνει τη φάση μετάβασης του νερού σε ένα άμορφο “γυαλί” χωρίς σχηματισμό κρυστάλλων.
- Αρκετά μίγματα υαλοποίησης έχουν χρησιμοποιηθεί ως κρυοπροστατευτικά για την αύξηση της ανάκτησης των φυτών μετά την κρυοσυντήρηση

# A. Αργό πάγωμα



## Β. Υάλωση.



# Δημιουργία παραλλακτικότητας

- Βοηθητικές μέθοδοι
- Σύγχρονες μέθοδοι

# Βοηθητικές μέθοδοι

- Διάσωση των εμβρύων
- Γονιμοποίηση στον σωλήνα
- Καλλιέργεια ανθέρων και ωοθηκών
- Επιλογή μεταλλαγμένων φυτών

# Δύσκολες ή αδύνατες διασταυρώσεις

- Γονιμοποίηση στο σωλήνα
- Διάσωση εμβρύου



# Γονιμοποίηση στο σωλήνα

- Το πρόβλημα παρουσιάζεται πριν την γονιμοποίηση
- Ο γυρεοσωλήνας δεν μπορεί να φτάσει στην ωθήκη
- Οι ύπεροι καλλιεργούνται σε θρεπτικά υποστρώματα – μετακίνηση τοιχώματος ωθήκης – τοποθέτηση γύρης στην εκτεθειμένη σπερμοβλαστη

# Διάσωση εμβρύου

- Πρόβλημα μετά την γονιμοποίηση
- Το υβρίδιο -έμβρυο αναπτύσσεται κανονικά
- Το ενδοσπέρμιο δεν αναπτύσσεται
- Το έμβρυο καλλιεργείται σε θρεπτικό υπόστρωμα

# Η διαδικασία

- Η γονιμοποιημένη ωοθήκη αφαιρείται εντός μερικών ημερών από τη γονιμοποίηση προκειμένου να αποφευχθεί η αποβολή (εξαιτίας π.χ. της ανώμαλης ανάπτυξης του ενδοσπερμίου).

# Ανάπτυξη του εμβρύου

## Στάδια

- Το σφαιρικό στάδιο είναι μη διαφοροποιημένο
- Στάδιο της καρδιάς είναι διαφοροποιημένο και ικανό για αυτόνομη ανάπτυξη.
- Το στάδιο της τορπίλης
- Στάδιο των κοτυληδόνων της ανάπτυξης του εμβρύου

# Παράγοντες που επηρεάζουν την αναγέννηση στα σιτηρά

- Συνθήκες ανάπτυξης του φυτού-δωρητή
- Στάδιο ανάπτυξης και φυσιολογική κατάσταση του εκφύτου
- Το θρεπτικό υπόστρωμα
- Το είδος και η συγκέντρωση των ορμονών
- Συχνότητα των υποκαλλιεργειών
- Γονότυπος

# Παραγωγή απλοειδών

- Καλλιέργεια **ανθέρων** για την επαγωγή ανδρογένεσης.
- Καλλιέργεια **ωοθηκών** για την επαγωγή γυνογένεσης.
- Διάσωση εμβρύου από μακρινές διασταυρώσεις

# Ανθηροκαλλιέργεια

- Είναι η *in-vitro* καλλιέργεια ανθήρων, που περιέχουν **μικροσπόρια ή ανώριμους γυρεοκόκκους**, σε θρεπτικό υπόστρωμα με σκοπό την παραγωγή απλοειδών φυτών

# Ανθηροκαλλιέργεια

- Ταχεία μέθοδος παραγωγής ομοζυγωτικών φυτών
- F1 των διασταυρώσεων
  - Προϊόντα διαχωρισμού και ανασυνδυασμού



# Ανθηροκαλλιέργεια στην F1 ή F2

- Για την επίτευξη της μέγιστης γενετικής παραλλακτικότητας στα φυτάρια οι βελτιωτές χρησιμοποιούν συνήθως ανθères από φυτά της F1 ή της F2.

# Διπλασιασμένα απλοειδή (Double haploids)

- Τα φυτάρια μετατρέπονται σε διπλοειδή (για την παραγωγή διπλοειδών φυτών) χρησιμοποιώντας **κολχικίνη** για τον διπλασιασμό των χρωμοσωμάτων.
- Παραγωγή μιας εξαιρετικά ομόμεικτης σειράς που είναι **ομόζυγη** σε όλους τους γενετικούς τόπους, μετά από **μία μόλις γενεά**.

# Διαδικασία

- **Ανθικοί οφθαλμοί** συλλέγονται από υγιή φυτά.
- Επιφανειακή αποστείρωση και οι ανθήρες αποκόπτονται από τους οφθαλμούς
- Καλλιεργούνται σε κατάλληλο θρεπτικό μέσο ιστοκαλλιέργειας

# Στάδιο ανάπτυξης ανθήρα

- Μονοπυρηνικό στάδιο του μικροσπορίου
- Στο ρύζι προτιμάται το όψιμο μονοπυρηνικό στάδιο

# Σχηματισμός κάλου

- Σχηματίζεται εντός 2-6 εβδομάδων, ανάλογα με το **είδος**, τον **γονότυπο** και τη **φυσιολογική κατάσταση** του δότη
- Μια υψηλή περιεκτικότητα σε άζωτο του φυτού δότη και μία έκθεση σε χαμηλή θερμοκρασία κατά τη μείωση, **ελαττώνει τα αλφικά άτομα** και βελτιώνει την πιθανότητα αναγέννησης πράσινων φυτών.

# Προ-μεταχείριση

- Αποθήκευση οφθαλμών στους 4-10 οC για 2-10 ημέρες)
- Αυτές και άλλες μεταχειρίσεις σοκ προωθούν την εμβρυογενετική ανάπτυξη
- Το θρεπτικό υπόστρωμα της καλλιέργειας μερικές φορές συμπληρώνεται με φυτικά εκχυλίσματα (π.χ. νερό καρύδας, εκχύλισμα πατάτας)

# Διαδικασία

- Επιλογή και επιφανειακή απολύμανση των ανώριμων ταξιανθιών ή ανθέων
- Δημιουργία κάλου ή εμβρυοειδών
- Φυτάρια 4 με 6 βδομάδες
- Σκληραγώγηση
- Διπλασιασμός χρωμοσωμάτων με κολχικίνη

# Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή των απλοειδών

- Κατάσταση ανάπτυξης του φυτού-δωρητή
- Γονότυπος του φυτού-δωρητή
- Προμεταχείριση των ανθών
- Το στάδιο ανάπτυξης του μικροσπορίου
- Θρεπτικά υποστρώματα
- Συνθήκες καλλιέργειας
- Συνθήκες αναγέννησης



# Καλλιέργεια σπερματικών βλαστών / ωοθηκών

- Η γυνογένεση με τη χρήση σπερματοβλαστών ή ωοθηκών έχει επιτευχθεί σε είδη όπως το κριθάρι, το σιτάρι, το ρύζι, ο αραβόσιτος, ο καπνός, το σακχαρότευτλο και το κρεμμύδι

# Αποτελεσματικότητα

- Η μέθοδος είναι λιγότερο αποτελεσματική από την ανδρογένεση διότι υπάρχει μόνο ένας εμβρυόσακκος ανά ωοθήκη σε σύγκριση με τα χιλιάδες μικροσπόρια σε κάθε ανθήρα.
- Χρησιμοποιούνται ωοθήκες σε διάφορα αναπτυξιακά στάδια, από το στάδιο του ενός πυρήνα έως το στάδιο του ώριμου εμβρυόσακκου.

# Ανθήρες ή ωοθήκες;

- Γενικά, η γυνογένεση επιλέγεται όταν η ανδρογένεση είναι προβληματική (όπως στην περίπτωση του σακχαρώδους διαβήτη και του κρεμμυδιού).

# Απλοειδή από ευρείες διασταυρώσεις

- Ορισμένες ειδικές διασταυρώσεις μεταξύ καλλιεργούμενων και άγριων ειδών παράγουν απλοειδή.

# Διειδικές διασταυρώσεις

- *Hordeum vulgare* ( $2n = 2x = 14$ , VV) x *Hordeum bulbosum* ( $2n = 2x = 14$ , BB), γνωστή ως μέθοδος bulbosum
- Διασταυρώσεις σιτάρι x καλαμπόκι

*In vitro* επιλογή

# Επιλογή μεταλλάξεων *in vitro*

- Επιλογή των επιθυμητών γονοτύπων υπό ελεγχόμενες συνθήκες
- Επιλογή σε μικρό χώρο και λίγο χρόνο
- Επιλεκτικά θρεπτικά υποστρώματα – κόσκινα
- Οι αναφορές σχετικά με τη χρήση της τεχνολογίας αυτής έχουν μειωθεί τα τελευταία

# Παραδείγματα από *in-vitro* επιλογή

- Καπνός - ανθεκτικότητα στο αλάτι
- Καπνός - ανθεκτικότητα σε ζιζανιοκτόνα
- Καπνός - ανθεκτικότητα στο *Pseudomonas tabaci*
- Καλαμπόκι - ανθεκτικότητα στο *Deschlera maydis*



# Επιλογή για ανθεκτικότητα έναντι των ασθενειών

- Διάφοροι **τοξικοί μεταβολίτες** υπό την προϋπόθεση ότι διαδραματίζουν κάποιο ρόλο στην παθογένεση.
- Διηθήματα καλλιέργειας από διάφορους μύκητες (*Fusarium*, *Helminthosporium maydis*) έχουν χρησιμοποιηθεί για την άσκηση επιλεκτικής πίεσης για κύτταρα τα οποία είναι ανθεκτικά στο παθογόνο.

# Επιλογή για ανθεκτικότητα στα ζιζανιοκτόνα

- Έχουν απομονωθεί, χαρακτηριστεί και ενσωματωθεί επιτυχώς στην ανάπτυξη εμπορικών ποικιλιών μεταλλάγματα με 10-100 φορές μεγαλύτερα επίπεδα ανθεκτικότητας στα ζιζανιοκτόνα.
- Πολλές από τις καταγεγραμμένες επιτυχίες της *in vitro* επιλογής αφορούσαν την ανοχή στα ζιζανιοκτόνα.

# Επιλογή για ανθεκτικότητα στις αβιοτικές καταπονήσεις

- Προσπάθειες επιλογής για ανθεκτικότητα στην αλατότητα, στο αργίλιο και τη θερμοκρασία (ανθεκτικότητα στο ψύχος) με διάφορους βαθμούς επιτυχίας.

# Σύστημα επιλογής ενός κυττάρου

- Καλλιέργεια εν αιωρήσει, καλλιέργεια πρωτοπλαστών για *in vitro* επιλογή

# Πλεονεκτήματα

- Έλλειψη χιμαιρισμού
- Μεγαλύτερες πιθανότητες για απομόνωση των πραγματικών μεταλλαγμάτων
- Ικανότητα για αποτελεσματικότερη εφαρμογή των μικροβιακών διαδικασιών του μεγάλου αριθμού των μεμονωμένων κυττάρων που μπορούν να ελεγχθούν σε μικρό χώρο

# Πετυχημένες εφαρμογές

- Η επιλογή για ανθεκτικότητα στις βιοτικές καταπονήσεις
- Ανοχή στα ζιζανιοκτόνα (ουσία chlorsulfuron)
- Ανοχή στο αργίλιο

# Αγροκομικά χαρακτηριστικά

- Δεν υπάρχει επιλεκτικό κόσκνο
- Τα αγροκομικά χαρακτηριστικά εκφράζονται σε διαφοροποιημένα κύτταρα και τέλειους ιστούς

# Αύξηση γενετικής παραλλακτικότητας

- Σωμακλωνική παραλλακτικότητα
- Σωματικά υβρίδια
- Μεταμορφωμένα φυτά (διαγονιδιακά, γενετικά τροποποιημένα)



# Σωμακλωνική παραλλακτικότητα

- 1981 Larkin και Scowcroft
- Φυτά που αναγεννώνται μέσω καλλιέργειας *in vitro* διαφόρων φυτικών εκφύτων, μετά από σχηματισμό κάλλου, μπορεί να διαφέρουν μεταξύ τους και από το μητρικό φυτό από το οποίο προέρχονται

- Γαμετοκλωνική παραλλακτικότητα
- Αστάθεια της ιστοκαλλιέργειας

# Παραδείγματα

- Καρότο, σέλινο - Ποιοτικά καλύτερα
- Πατάτα - ανθεκτικότητα στο *Phytophthora infestans* και *Altenaria solani*
- Ζαχαροκάλαμο *Helminthosporium sachhari* Μεγαλύτερη περιεκτικότητα σε ζάχαρη
- Τομάτα Αύξηση ολικών στερεών

# Πότε είναι η σωμακλωνική παραλλακτικότητα ανεπιθύμητη

- Όταν επιδιώκεται κλωνική αναπαραγωγή
- Στις τράπεζες γενετικού υλικού
- Όταν παράγουμε δευτερογενή προϊόντα
- Στα συστήματα γενετικού χειρισμού

# Η Σωμακλωνική Παραλλακτικότητα στην Βελτίωση των Φυτών

- Γενετικά διαφορετικά φυτά
- Μετάδοση και έκφραση στους απογόνους
- Γενετικό κέρδος διαφορετικό και μεγαλύτερο
- Επηρεάζει θετικά, οικονομικού ενδιαφέροντος χαρακτηριστικά

# Φαινοτυπική παραλλακτικότητα

- Ποιοτική παραλλακτικότητα
  - χρώμα σπόρου, κονδύλου
- Ποσοτική
  - απόδοση
- Αγροκομικά χαρακτηριστικά
  - αντίδραση σε ασθένεια

# Γονοτυπική παραλλακτικότητα

- Πυρήνα
  - Μετάλλαξη γονιδίων
  - Ενίσχυση DNA
  - Μείωση DNA
  - Χρωμοσωμικός αριθμός
  - Δομή χρωμοσωμάτων
  - Μεταφερόμενα στοιχεία
- Κυτταρόπλασμα
  - Μιτοχονδριακό και χλωροπλαστικό DNA

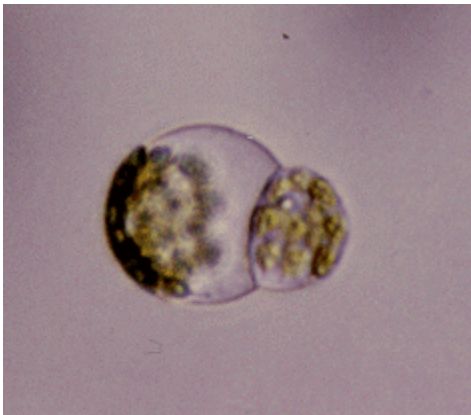
Σωματικός υβριδισμός



# Σωματικός υβριδισμός

- Υβριδισμός σωματικών κυττάρων ή
- Σύντηξη σωματικών κυττάρων ή
- Σύντηξη πρωτοπλαστών

# Σύντηξη πρωτοπλαστών



# Σωματικός υβριδισμός

- Αναφέρεται
  - στην σύντηξη των πρωτοπλαστών που προέρχονται από σωματικά κύτταρα διαφορετικών ειδών και
  - την επακόλουθη αναγέννηση των υβριδίων φυτών που θα προκύψουν από τους πρωτοπλάστες που έχουν συντηχθεί

# Διαδικασία

- Απομόνωση των πρωτοπλαστών από διαφορετικά είδη
- Σύντηξη των πρωτοπλαστών
- Αναγνώριση και πολλαπλασιασμό των πρωτοπλαστών-υβριδίων
- Αναγέννηση γόνιμων υβριδίων-φυτών

# Προϋποθέσεις για επιτυχία

- Οι πρωτοπλάστες των δύο διαφορετικών ειδών ή γενών να μπορούν να συντηχθούν
- Να γνωρίζουμε την ύπαρξη του ειδικού επιλεκτικού θρεπτικού υποστρώματος
- Να μπορούν να αναγεννηθούν τα φυτά

# Μέθοδοι σωματικού υβριδισμού

- Χημικές ουσίες
- Ηλεκτροσύντηξη

# Χημική σύντηξη

- Πολυαιθυλενική γλυκόλη
- Προκαλεί σύντηξη πολλών τύπων μικρών σωματιδίων, συμπεριλαμβανομένων των πρωτοπλαστών
- Προσθήκη ιόντων ασβεστίου σε υψηλές τιμές pH

# Ηλεκτροσύντηξη

- Προσκόλληση πρωτοπλαστών και σύντηξη όταν περάσει ένας μικρός παλμός συνεχούς ρεύματος



# Πλεονέκτημα σωματικών υβριδίων

- Υβριδισμός κυτταροπλάσμάτων
- Παρουσία μιτοχονδρίων και από τους δύο γονείς
- Γενετικός ανασυνδυασμός χαρακτηριστικών που ελέγχονται από γονίδια των μιτοχονδρίων

# Ο σωματικός υβριδισμός είναι χρήσιμος

- Παραγωγή γόνιμων σωματικών υβριδίων σε μη συμβατά είδη
- Παραγωγή ετεροζυγωτικών σειρών
- Μεταφορά τμημάτων γονιώματος
- Παραγωγή νέων μορφών

# Εφαρμογή

- Αντικατάσταση στείρου κυτταροπλάσματος από ένα γόνιμο ή και το αντίστροφο χωρίς τον κίνδυνο γενετικού ανασυνδυασμού του πυρηνικού γονοτύπου

# Παραδείγματα

- *Lycopersicon esculentum* X *Solanum tuberosum*
- *Datura innoxia* X *Atropa belladonna*
- *Petunia parodii* X *P. parviflora*

# Παρατηρήσεις

- Σε συντήξεις πρωτοπλαστών μη συγγενών ειδών
  - οι πυρήνες είτε αποτυγχάνουν να συντηχθούν
  - ή μια ομάδα χρωμοσωμάτων χάνεται μετά την σύντηξη
- Πολλοί συνδυασμοί αποτυγχάνουν να δέσουν σπόρο
- Εντατική αναδιασταύρωση