



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΕΤΡΙΑΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ

**ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ
ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗΣ
ΣΤΗΝ ΕΛΙΑ (*Olea europaea* L.)**



**Διδακτορική Διατριβή
Αλεξία Ε. Αλεξάκη
Αθήνα 2021**

Επιτρέπεται η χρήση του ψηφιακού αρχείου

**NATIONAL AND KAPODISTRIAN UNIVERSITY OF ATHENS
FACULTY OF BIOLOGY
DEPARTMENT OF BOTANY**

**Physiological and molecular investigation
of somatic embryogenesis
in olive tree (*Olea europaea* L.)**

PhD Thesis

Alexia Alexaki

Athens 2021

Φωτογραφίες εξωφύλλου:

Κέντρο: *Olea europaea* από τη φυτοθήκη του Λινναίου <http://linnean-online.org>.

Κάτω αριστερά: Σωματικά έμβρυα ελιάς σε μορφή «μπουκέτου».

Κάτω δεξιά: Δευτερογενής σωματική εμβρυογένεση.

“Η έγκριση της Διδακτορικής Διατριβής από τη Σχολή Θετικών Επιστημών του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών δεν υποδηλώνει αποδοχή των γνώμών του συγγραφέα.»

(Ν. 5343/1932, άρθρο 202).

Στους Γονείς μου
που χρωστώ το «εὖ ζῆν».

Κι εἶν' ἀκόμα ἐδῶ τέτοιο, που ἐγώ
πουθενά αλλοῦ παρόμοιο δέντρο
δεν ἀκούω νὰ βλάστησε ποτέ...
ἀνέγγιχτο αὐτοφύτρωτο δέντρο
τρόμος καὶ φόβος στὰ κοντάρια τοῦ ἐχθροῦ
που ἀνθίζει πιο παρ' ὅπου αλλοῦ
σ' αὐτὴ τὴ χώρα:

Ἡ σταχτόχρωμη **ελιά** ἡ παιδοτρόφα,
που ποτέ κανεὶς τοῦ ἢ νέος ἢ γηραιός
με χέρι ἐχθρικό θὰ σώσει ν' ἀφανίσει,
γιατί ἀπάνω τῆς πάντ' ἀνοιχτά
ο Μόριος Δίας καὶ ἡ γλαυκόφθαλμη Ἀθηνά
ἔχουν τὰ μάτια.

Σοφοκλῆς

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΣΥΜΒΟΥΛΕΥΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

✓ **Επιβλέπων Καθηγητής**

Γεωργίου Κυριάκος :

Ομότιμος Καθηγητής Φυσιολογίας Φυτών- Τομέας Βοτανικής - Τμήμα Βιολογίας - ΕΚΠΑ

✓ **Χατζόπουλος Πολυδεύκης :**

Καθηγητής – Τμήμα Βιοτεχνολογίας Μοριακής Βιολογίας – Γεωπονικό Πανεπιστήμιο
Αθηνών

✓ **Σπυροπούλου Καρολίνα:**

Ομότιμη Καθηγήτρια Φυσιολογίας Φυτών - Τομέας Βοτανικής - Τμήμα Βιολογίας -
ΕΚΠΑ

ΕΠΤΑΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

✓ **Γεωργίου Κυριάκος :**

Ομότιμος Καθηγητής Φυσιολογίας Φυτών - Τομέας Βοτανικής - Τμήμα Βιολογίας -
ΕΚΠΑ

✓ **Χατζόπουλος Πολυδεύκης :**

Καθηγητής – Τμήμα Βιοτεχνολογίας Μοριακής Βιολογίας – Γεωπονικό Πανεπιστήμιο
Αθηνών

✓ **Σπυροπούλου Καρολίνα:**

Ομότιμη Καθηγήτρια Φυσιολογίας Φυτών - Τομέας Βοτανικής - Τμήμα Βιολογίας -
ΕΚΠΑ

✓ **Θάνος Κωνσταντίνος:**

Ομότιμος Καθηγητής Φυσιολογίας Φυτών - Τομέας Βοτανικής - Τμήμα Βιολογίας - ΕΚΠΑ

✓ **Ριζοπούλου Σοφία:**

Καθηγήτρια Οικοφυσιολογίας Φυτών- Τομέας Βοτανικής - Τμήμα Βιολογίας - ΕΚΠΑ

✓ **Χαραλαμπίδης Κοσμάς:**

Αναπληρωτής Καθηγητής Μοριακής Βιολογίας Ανάπτυξης Φυτών- Τομέας Βοτανικής -
Τμήμα Βιολογίας - ΕΚΠΑ

✓ **Μελετίου Σόνια:**

π. Επίκουρη Καθηγήτρια Φυσιολογίας Φυτών - Τομέας Βοτανικής - Τμήμα Βιολογίας -
ΕΚΠΑ

Πρόλογος

Η παρούσα Διδακτορική Διατριβή εκπονήθηκε εν μέρει στον Τομέα Βοτανικής του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών και εν μέρει στο Εργαστήριο Μοριακής Βιολογίας του Τμήματος Βιοτεχνολογίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, από τον Ιούλιο 1992 μέχρι τον Ιούνιο 1997.

Τόσο η σύλληψη όσο και η παρότρυνση για την υλοποίηση της παρούσας ερευνητικής προσπάθειας ανήκει αποκλειστικά στον εκλιπόντα Καθηγητή Κωνσταντίνο Μητράκο, ο οποίος ήταν και ο αρχικός Επιβλέπων Καθηγητής. Καθώς τη στιγμή της ολοκλήρωσής της δεν έχω πλέον τη δυνατότητα να ευχαριστήσω τον ίδιο προσωπικά, νοιώθω ηθικό χρέος, αλλά κυρίως βαθύτατη προσωπική ανάγκη, να εκφράσω την ειλικρινή μου ευγνωμοσύνη στην οικογένειά του. Αγαθή τύχη η συνεργασία μας, όχι μόνο γιατί έδειξε απεριόριστη εμπιστοσύνη στο πρόσωπό μου αναθέτοντάς μου την παρούσα μελέτη, αλλά γιατί υπήρξε στα πρώτα μου επιστημονικά βήματα άοκνος αρωγός και υπομονετικός συμπαράστατης. Η διακριτική, αλλά πάντα καταλυτική και όποτε το απαιτούσαν οι περιστάσεις, κριτική του στάση αποτελούσαν και αποτελούν μάθημα επιστημονικής ακεραιότητας και αμέριστης ανθρώπινης κατανόησης.

Ευχαριστώ από καρδιάς τον Ομότιμο Καθηγητή Φυσιολογίας Φυτών, αρχικά μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής και μετέπειτα Επιβλέπων Καθηγητή, κ. Κυριάκο Γεωργίου, καθώς ήταν ο καθοριστικός κρίκος στην αλυσίδα των ανθρώπων που βοήθησαν στην ολοκλήρωση της Διδακτορικής μου Διατριβής. Η συνδρομή του ήταν καταλυτική, αφού μετά από πολλές αντιξοότητες και σκοπέλους, βοήθησε στην συγγραφή και την παρουσίαση της διατριβής μου, τη χρονική στιγμή που κάτι τέτοιο διαφαινόταν να μην είναι πλέον εφικτό. Η υπομονή και η επιμονή του, οι εύστοχες και εποικοδομητικές του παρατηρήσεις διαμόρφωσαν το εφαλτήριο για την διεκπεραίωση της παρούσας ερευνητικής προσπάθειας.

Στον Καθηγητή Βιοτεχνολογίας Μοριακής Βιολογίας και μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής κ. Πολυδεύκη Χατζόπουλο νοιώθω την ανάγκη να εκφράσω τις ευχαριστίες μου για την ευκαιρία που μου προσέφερε να εργαστώ στο εργαστήριό του και μου έδωσε τη δυνατότητα να έρθω σε άμεση επαφή με αυτόν τον τόσο γοητευτικό και πολλά υποσχόμενο για το μέλλον επιστημονικό τομέα της Μοριακής Βιολογίας. Η συνεπής καθοδήγηση κατά τη διάρκεια της εκμάθησης και εφαρμογής των μεθόδων της και η μέχρι τέλους απρόσκοπτη αρωγή του συνιστούν τον δεύτερο καθοριστικό παράγοντα ολοκλήρωσης της Διδακτορικής μου Διατριβής.

Τον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Στέργιο Διαμαντόγλου, μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής για το χρονικό διάστημα 1992-1995 και Επιβλέποντα Καθηγητή για το χρονικό διάστημα 1995-2005, καθώς και την Ομότιμη Καθηγήτρια Φυσιολογίας Φυτών κ. Καρολίνα Σπυροπούλου, μέλος της συμβουλευτικής επιτροπής, ευχαριστώ για την επιστημονική συνδρομή και συνεργασία τους.

Την Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Βιοτεχνολογίας Μοριακής Βιολογίας κ. Δήμητρα Μηλιώνη και τον Αναπληρωτή Καθηγητή Μοριακής Βιολογίας Ανάπτυξης Φυτών κ. Κοσμά Χαραλαμπίδη για την ανιδιοτελή συμβολή τους στην πραγματοποίηση των πειραμάτων της μοριακής ανάλυσης. Η επιστημονική τους κατάρτιση, οι εύστοχες παρατηρήσεις και κυρίως η αμέριστη συμπαράσταση και κατανόηση χαρακτήρισαν την άψογη συνεργασία μας καθ' όλη τη διάρκεια της ερευνητικής μου προσπάθειας.

Θερμές ευχαριστίες στα μέλη της εξεταστικής επιτροπής για την αφιέρωση μέρους του πολύτιμου χρόνου τους για την διόρθωση του παρόντος συγγράμματος και την ενεργή και αποφασιστική σημασίας συμμετοχή τους στην τελική παρουσίαση της Διατριβής.

Προσωπικές και ξεχωριστές ευχαριστίες στον αγαπητό συνοδοιπόρο μου, στο Εργαστήριο των Ιστοκαλλιιεργειών του Τομέα Βοτανικής του Τμήματος Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών, κ. Στέλιο Βασιλειάδη για την ανθρωπιά, τη φιλία και την απρόσκοπτη συνεργασία που είχαμε. Ιδιαίτερες και ειλικρινείς ευχαριστίες χρωστώ για τον προσωπικό χρόνο που αφιέρωσε και τον κόπο που κατέβαλλε, προκειμένου να φωτογραφήσει τις πειραματικές μου προσπάθειες σε όλες τις φάσεις τους.

Για τη φιλολογική επιμέλεια ευχαριστώ θερμά τη φιλόλογο κ. Άννα Χριστοπούλου.

Τέλος ευχαριστώ ολόψυχα τους γονείς μου που μου έμαθαν να υπομένω και να επιμένω με αξιοπρέπεια και καρτερικότητα κάθε δυσκολία και τον σύζυγό μου που δεν μου επέτρεψε να εγκαταλείψω την προσπάθεια για την ολοκλήρωση της Διατριβής, παρά τους κακούς καινούς, παραμένοντας δίπλα μου με κατανόηση και πίστη σε μένα και τη δουλειά μου.

Τέλος καί τό θεῶ δόξα!!!

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	Σελ.
A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗΣ	1
A.1. ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ	1
A.2. ΚΑΤΑΓΩΓΗ & ΕΞΑΠΛΩΣΗ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ	3
A.2.1. ΚΑΤΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ	3
A.2.2. ΕΞΑΠΛΩΣΗ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ	3
A.2.3. ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ	4
A.3. <i>IN VIVO</i> ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ	5
A.3.1. ΑΓΕΝΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ	5
A.3.2. ΕΓΓΕΝΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ	6
A.4. <i>IN VITRO</i> ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ	6
A.4.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
A.4.2. ΕΙΔΗ ΦΥΤΙΚΗΣ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗΣ <i>IN VITRO</i>	7
A.4.3. ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΟΜ: ΜΙΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΗ ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΓΙΑ ΤΗΝ <i>IN VITRO</i> ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ	8
A.4.4. ΚΑΛΛΟΓΕΝΕΣΗ	8
A.4.5. ΕΠΑΓΩΓΗ ΡΙΖΩΝ	9
A.4.6. ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ ΒΛΑΣΤΩΝ <i>IN VITRO</i>	11
A.4.7. ΕΠΑΓΩΓΗ ΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ	13
A.5. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ	17
A.5.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	17
A.5.2. ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ	18
A.5.2.1. ΜΟΝΟΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ	18
A.5.2.2. ΠΟΛΥΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ	19
A.6. ΣΤΑΔΙΑ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ ΚΑΡΟΤΟΥ (<i>Daucus carota</i>)	23
A.7. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ	25
A.8. ΕΙΔΗ ΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗΣ	26
A.9. ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΗΣ ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ	29
A.10. ΔΥΣΜΟΡΦΙΕΣ ΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ	30
A.11. ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗΣ	32
A.11.1. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ & ΦΥΤΙΚΗ ΟΝΤΟΓΕΝΕΣΗ	32
A.11.2. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ & ΦΥΤΙΚΗ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ	33
A.12. ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗΣ	35
A.13. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗ ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ	36
A.13.1 ΕΙΔΟΣ ΕΚΦΥΤΟΥ	37
A.13.2. ΦΥΤΟΑΥΞΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ & ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ	39
A.13.2.1. Εισαγωγή	39
A.13.2.2. Φυτοαυξητικοί παράγοντες & <i>in vitro</i> ιστοκαλλιέργεια	40
1.1. Αυξίνες	41
A. Γενικά στοιχεία	41
B. Αυξίνες & σωματική εμβρυογένεση	42
1.2. Κυτοκινίνες	44
A. Γενικά στοιχεία	44
B. Κυτοκινίνες & σωματική εμβρυογένεση	46
1.3. ABA	48
A.13.3 ΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΕΣ	51
A.13.4. ΑΖΩΤΟ	55
A.13.5. ΠΟΛΥΑΜΙΝΕΣ	59
A.13.5.1. Γενικά	59
A.13.5.2. Σωματική εμβρυογένεση και ενδογενή επίπεδα πολυαμινών	60
A.13.5.3. Σωματική εμβρυογένεση και εξωγενώς παρεχόμενες πολυαμίνες	61

A.13.6. ΕΝΕΡΓΟΣ ΑΝΘΡΑΚΑΣ	62
A.13.7. ΑΓΑΡ	63
A.13.8. pH	64
A.13.9. ΦΩΤΟΠΕΡΙΟΔΟΣ	65
A.13.10. ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ	67
A.13.11. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ	68
A.13.12. ΩΣΜΩΤΙΚΟ ΔΥΝΑΜΙΚΟ	69
A.13.13. ΗΛΕΚΤΡΙΚΟ ΡΕΥΜΑ	70
A.13.14. ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ	71
A.13.15. ΚΟΛΧΙΚΙΝΗ	72
A.13.16. ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΑ	73
A.13.17. ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ-ΑΕΡΙΑ	74
A.13.17.1. ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ	74
A.13.17.2. ΑΕΡΙΑ	76
A.13.18. ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	76
A.14. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΖΥΓΩΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗΣ	78
A.14.1. ΟΜΟΙΟΤΗΤΕΣ ΖΥΓΩΤΙΚΗΣ & ΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗΣ	78
A.14.2. ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΖΥΓΩΤΙΚΗΣ & ΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗΣ	79
A΄. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗΣ	81
A΄1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	81
A΄ 1.1. ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ & ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ	81
A΄ 1.2. ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ & ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ ΣΤΗΝ ΕΛΙΑ	82
A΄.2. ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ DNA	83
A΄.3. ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑ ΚΑΙ ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ	84
A΄ 4. CEM ΓΟΝΙΔΙΑ	84
A΄.5. ΟΡΜΟΝΟ - ΕΠΑΓΟΜΕΝΑ ΓΟΝΙΔΙΑ	85
A΄.5.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	85
A΄.5.2. SAUR ΓΟΝΙΔΙΑ	86
A΄.6. ΚΙΝΑΣΕΣ	86
A΄.7. ΗΟΜΕΟΒΟΧ ΓΟΝΙΔΙΑ	88
A΄.8. ΕΚΚΡΙΝΟΜΕΝΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΣΩΜΑΤΙΚΑ ΕΜΒΡΥΑ	89
A΄.9. ΠΡΩΤΕΪΝΟΣΥΝΘΕΣΗ ΣΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗΣ	90
A΄.9.1. ΠΟΙΟΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΠΟΣΟΤΙΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΟΣΥΝΘΕΣΗΣ	90
A΄.9.2. AGPs	93
A΄.9.3. HPRGPs	93
A΄.9.4. LTPs	94
A΄.9.5. ΛΕΚΤΙΝΕΣ	94
A΄.9.6. GERMINs ΚΑΙ GLPs	95
A΄.10. LEA ΓΟΝΙΔΙΑ	95
A΄.10.1. Dc8 & Dc59 ΓΟΝΙΔΙΑ	97
A΄ 10.1.1. Εισαγωγή	97
A΄.10.1.2. Γενικά χαρακτηριστικά Dc8 γονιδίου	98
A΄.10.1.3. Dc8 γονίδιο και LEA γονίδια	100
A΄.10.1.4. Dc8 γονίδιο και ABA	101
A΄.10.2. Dc59 ΓΟΝΙΔΙΟ	103
A΄.10.2.1. Δομικά χαρακτηριστικά Dc59 γονιδίου	103
A΄.10.2.2. Λειτουργικός ρόλος Dc59 γονιδίου	103
A΄.10.2.3. Dc59 γονίδιο και ABA	105
A΄.10.3. EMB-1 ΓΟΝΙΔΙΟ	105

Α'.11. HSPS	106
Β. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗΣ	109
Β.1. ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	109
Β.1. 1. ΕΠΙΛΟΓΗ ΦΥΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ	109
Β.1.2. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ & ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΚΟΡΩΝΕΙΚΗΣ	109
Β.1.3. ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΦΥΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ	110
Β.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΚΦΥΤΩΝ	111
Β.2.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΚΦΥΤΩΝ ΑΠΟ ΩΡΙΜΑ ΣΠΕΡΜΑΤΑ	111
Β.2.1.1. Απολύμανση & διάβρεξη ώριμων σπερμάτων	111
Β.2.1.2. Απομόνωση εκφύτων από ώριμα σπέρματα	111
Β.2.2. ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗ ΔΙΑΒΡΕΞΗ & ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΚΦΥΤΩΝ ΑΠΟ ΑΝΩΡΙΜΑ ΣΠΕΡΜΑΤΑ	113
Β.3. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤ <i>IN VITRO</i> ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ	114
Β.3.1. ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ	114
Β.3.2. ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ ΕΚΦΥΤΩΝ & <i>IN VITRO</i> ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΛΛΩΝ	117
Β.4. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗΣ	118
Β.4.1. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ ΟΜC ΚΑΙ ΜS	118
Β.4.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΚΦΥΤΟΥ	118
Β.4.2.1. Μελέτη της επίδρασης της ηλικίας του εκφύτου	118
Β. 4.2.2. Μελέτη της επίδρασης του είδους του εκφύτου	119
Β.4.3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΦΥΤΟΑΥΞΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ	119
Β.4.3.1. Μελέτη της επίδρασης αυξινών	119
1.1. Παροχή ενός είδους αυξίνης	119
1.2. Παροχή συνδυασμού αυξινών	120
Β.4.3.2. Μελέτη της επίδρασης κυτοκινινών	121
2.1. Παροχή ενός είδους κυτοκινίνης	121
2.1.Α.Ριζίδια ώριμων ζυγωτικών εμβρύων	121
2.1.Β. Βάσεις & κορυφές ώριμων ζυγωτικών εμβρύων	122
2.2. Παροχή συνδυασμού κυτοκινινών	122
Β.4.4. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΠΗΓΗΣ ΑΝΟΡΓΑΝΟΥ ΑΖΩΤΟΥ	123
Β.4.5. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΗΣ ΣΟΥΚΡΟΖΗΣ	124
Β.4.6. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΜΑΝΝΙΤΟΛΗΣ	125
Β.4.7. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ	125
Β.4.8. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ "ΚΜ"	126
Β.5. ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ ΣΤΟ ΧΩΜΑ	126
Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗΣ	127
Γ.1. ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	127
Γ.2. ΥΛΙΚΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗΣ	128
Γ.2.1. ΧΗΜΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	128
Γ.2.2. ΕΝΖΥΜΑ & ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΕΝΖΥΜΩΝ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ	128
Γ.2.3. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ & ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΓΕΝΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA & RNA	129
Γ.2.4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ & ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ DNA & RNA ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ	129
Γ.2.5. ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ	130
Γ.2.6. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ	132
Γ.3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ	133
Γ.3.1. ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΞΟΞΥΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ (DNA)	133
Γ.3.1.1. Απομόνωση γενωματικού DNA(Μέθοδος CTAB)	133
Γ.3.1.2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA	134
2.1. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων E. coli με πλασμιδιακό	134

DNA	
2.2. Προετοιμασία βακτηρίων	135
2.3. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση	135
Γ.3.1.3. Πέψεις DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού	136
Γ.3.1.4. Ανάλυση DNA σε πηκτή αγαρόζης	137
Γ.3.1.5. Απομόνωση και καθαρισμός κλασμάτων DNA από πηκτή αγαρόζης	138
5.1. Απομόνωση ζωνών DNA από πηκτή αγαρόζης	138
5.2. Μέθοδος <i>Freeze squeeze</i>	139
5.3. Μέθοδος φαινόλης	139
Γ.3.1.6. Μεταφορά DNA από πηκτή αγαρόζης σε πλαστική μεμβράνη (Μέθοδος <i>Southern</i>)	140
Γ.3.2. ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ (RNA)	141
Γ.3.2.1. Απομόνωση ολικού RNA	141
Γ.3.2.2. Προσδιορισμός της ποσότητας του RNA	142
Γ.3.2.3. Ανάλυση RNA σε πηκτή αγαρόζης αποδιάταξης	143
Γ.3.2.4. Μεταφορά RNA από πηκτή αγαρόζης σε πλαστική μεμβράνη (Μέθοδος <i>Northern</i>)	144
Γ.3.3. ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ (DNA & RNA)	144
Γ.3.3.1. Σήμανση DNA με $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$	144
1.1. Μέθοδος Nick Translation	144
1.2. Καθαρισμός του προϊόντος αντίδρασης με τη μέθοδο της στήλης	145
Γ.3.3.2. Υβριδισμός με ανιχνευτή σημασμένο ετερόλογο DNA	145
2.1. Προϋβριδισμός	145
2.2. Υβριδισμός	146
2.3. Ξεπλύματα	146
Γ.3.3.3. Αυτοραδιογραφία - Ανίχνευση σήματος	147
Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΠΡΟΣΕΓΓΙΣΗΣ	148
Δ.1. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΕΛΙΑΣ	148
Δ.2. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ	151
Δ.3. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΗΛΙΚΙΑ ΕΚΦΥΤΟΥ	153
Δ.4. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ ΣΕ ΕΚΦΥΤΑ ΩΡΙΜΩΝ ΖΥΓΩΤΙΚΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ	156
Δ.4.1. ΕΞΑΡΤΗΣΗ ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗΣ ΑΠΟ ΤΟ ΕΙΔΟΣ ΚΑΙ ΤΗΝ ΗΛΙΚΙΑ ΤΟΥ ΚΑΛΛΟΥ	156
Δ.4.2. ΕΞΑΡΤΗΣΗ ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗΣ ΑΠΟ ΤΟ ΤΜΗΜΑ ΤΟΥ ΡΙΖΙΔΙΟΥ- ΕΚΦΥΤΟΥ	160
Δ.5. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ ΣΕ ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΟΥΜΕΝΟΥΣ ΚΑΛΛΟΥΣ	162
Δ.6. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΣΟΥΚΡΟΖΗΣ	163
Δ.7. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΜΑΝΝΙΤΟΛΗΣ	167
Δ.8. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΦΥΤΟΑΥΞΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	168
Δ.8.1. ΕΞΑΡΤΗΣΗ ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΥΞΙΝΗ	168
Δ.8.1.1. Εξάρτηση της σωματικής εμβρυογένεσης από το IBA	169
1.1. Έκφυτα ριζιδίων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων	169
1.2. Έκφυτα βάσεων και κορυφών κοτυληδόνων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων	171
Δ.8.1.2. Εξάρτηση της σωματικής εμβρυογένεσης από το NAA	174
2.1. Έκφυτα ριζιδίων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων	174
2.2. Έκφυτα βάσεων και κορυφών κοτυληδόνων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων	176
Δ.8.1.3. Εξάρτηση της σωματικής εμβρυογένεσης από το 2,4-D	177

3.1. Έκφυτα ριζιδίων, βάσεων και κορυφών κοτυληδόνων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων	177
Δ.8.1.4. Συγκριτικά αποτελέσματα μεταξύ των τριών αυξινών	181
Δ.8.2. ΕΞΑΡΤΗΣΗ ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΑΡΟΧΗ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ ΑΥΞΙΝΩΝ	182
Δ.8.3. ΕΞΑΡΤΗΣΗ ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗΣ ΑΠΟ ΤΟ ΕΙΔΟΣ ΚΑΙ ΤΗ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΤΗΣ ΚΥΤΟΚΙΝΙΝΗΣ	185
Δ.8.3.1. Εξάρτηση της σωματικής εμβρυογένεσης από το 2iP	185
1.1. Έκφυτα από ριζίδια ώριμων ζυγωτικών εμβρύων	185
1.2. Έκφυτα από βάσεις και κορυφές κοτυληδόνων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων	188
Δ.8.3.2. Εξάρτηση της σωματικής εμβρυογένεσης από το BA	190
2.1. Έκφυτα ριζιδίων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων	190
Δ.8.3.3. Εξάρτηση της σωματικής εμβρυογένεσης από το TDZ	191
3.1. Έκφυτα ριζιδίων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων	191
Δ.8.4. ΕΞΑΡΤΗΣΗ ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΑΡΟΧΗ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ ΚΥΤΟΚΙΝΙΝΩΝ	193
Δ.9. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ & ΑΝΟΡΓΑΝΟ ΑΖΩΤΟ	197
Δ.9.1. ΕΞΑΡΤΗΣΗ ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΗΓΗ ΑΝΟΡΓΑΝΟΥ ΑΖΩΤΟΥ	197
Δ.9.1.1. Εξάρτηση της σωματικής εμβρυογένεσης από το NH_4NO_3	198
Δ.9.1.2. Εξάρτηση της σωματικής εμβρυογένεσης από το KNO_3	199
Δ.9.1.3. Εξάρτηση της σωματικής εμβρυογένεσης από το NH_4Cl	200
Δ.9.2. ΕΞΑΡΤΗΣΗ ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΑΡΟΧΗ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ ΠΗΓΩΝ ΑΝΟΡΓΑΝΟΥ ΑΖΩΤΟΥ	202
Δ. 10. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ ΣΤΟ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ “ΚΜ”	205
Ε. ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ	208
Ε.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	208
Ε.2. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ DC8 ΚΑΙ DC59 ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ	208
Ε.2.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ & ΠΕΨΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA ΕΛΙΑΣ & ΚΑΡΟΤΟΥ	208
Ε.2.1.1. Δοκιμαστικές πέψεις γονιδιωματικού DNA ελιάς	208
Ε.2.2. ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΣΕ ΦΙΛΤΡΟ ΝΙΤΡΟΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA ΕΛΙΑΣ & ΚΑΡΟΤΟΥ	210
Ε.2.3. ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ ΓΕΝΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA ΕΛΙΑΣ ΜΕ ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ Dc8 & Dc59	210
Ε.3. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ DC8 ΣΕ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΕΛΙΑΣ	214
Ε.3.1. Απομόνωση ολικού RNA από εμβρυογενετικές καλλιέργειες ελιάς	214
Ε.3.2. Υβριδισμός ολικού RNA εμβρυογενετικών καλλιεργειών ελιάς με το Dc8 γονίδιο	216
ΣΤ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗΣ	220
ΣΤ.1. ΕΚΦΥΤΟ	220
ΣΤ.1.1. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΕΛΙΑΣ	220
ΣΤ.1.2 ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΗΛΙΚΙΑ ΕΚΦΥΤΟΥ	223
ΣΤ.1.3. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΤΑ ΜΗΚΟΣ ΤΟΥ ΡΙΖΙΔΙΟΥ	225
ΣΤ.2. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	227
ΣΤ.3. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ	228
ΣΤ.4. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΣΑΚΧΑΡΟΖΗΣ	229
ΣΤ. 5. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ & ΠΑΡΟΧΗ ΑΥΞΙΝΗΣ	234

ΣΤ.5.1. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ & ΠΑΡΟΧΗ ΑΥΞΙΝΗΣ	234
ΣΤ.5.1.1. Έκφυτα ριζιδίων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων	234
ΣΤ.5.1.2. Έκφυτα κοτυληδόνων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων	238
ΣΤ.5.2. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΑΥΞΙΝΩΝ	240
ΣΤ.6. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ & ΚΥΤΟΚΙΝΙΝΕΣ	240
ΣΤ.6.1. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΠΑΡΟΧΗ ΕΝΟΣ ΕΙΔΟΥΣ ΚΥΤΟΚΙΝΙΝΗΣ	240
ΣΤ.6.2. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΚΥΤΟΚΙΝΙΝΩΝ	245
ΣΤ.7. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΑΝΟΡΓΑΝΟ ΑΖΩΤΟ	247
ΣΤ.7.1. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΜΙΑ ΠΗΓΗ ΑΝΟΡΓΑΝΟΥ ΑΖΩΤΟΥ	247
ΣΤ.7.2. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΙ ΠΗΓΩΝ ΑΝΟΡΓΑΝΟΥ ΑΖΩΤΟΥ	249
ΣΤ.8. ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ “ΚΜ”	251
Ζ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗΣ	253
Ζ.1. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ DC8 ΚΑΙ DC59 ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ	253
Ζ.2 ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ DC8	253
Ζ.2.1. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ DC8 ΣΕ ΕΜΒΡΥΑ ΚΑΙ ΕΝΔΟΣΠΕΡΜΙΑ ΕΛΙΑΣ ΚΑΙ ΚΑΡΟΤΟΥ	253
Ζ.2.2. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ DC8 ΣΕ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΤΙΚΟΥΣ ΚΑΛΛΟΥΣ ΕΛΙΑΣ	254
Η. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	256
Θ. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	305
Ι. SUMMARY	313

A. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗΣ**A.1. ΣΥΣΤΗΜΑΤΙΚΗ ΚΑΤΑΤΑΞΗ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ**

Η *Olea europaea* L. αποτελεί ένα από τα 35 είδη του γένους *Olea* της οικογένειας *Oleaceae* (Πίνακας 1).

Πίνακας 1: Σύστηματική κατάταξη της ελιάς

Βασίλειο	Plantae
Ομοταξία	Magnoliopsida (Δικοτυλήδονα)
Τάξη	Lamiales
Οικογένεια	Oleaceae
Γένος	<i>Olea</i> L.
Είδος	<i>Olea europaea</i> L.

Τα είδη του γένους *Olea* έχουν ομαδοποιηθεί σε τρία υπογένη:

- *Tetrapilus*.
- *Paniculatae*.
- *Olea* (άγριες και καλλιεργούμενες ελιές).

Τα τρία υπογένη εξαπλώνονται στην Ασία, Αυστραλία και Ασία, Αφρική και Ευρώπη αντίστοιχα (Rugini et al. 2011).

Το είδος *O. europaea* L. περιλαμβάνει έξι υποείδη:

- *O. europaea* L. ssp. *europaea*.
- *O. europaea* L. ssp. *laperrinei* (εξαπλώνεται σε λόφους της Σαχάρας στην Αλγερία).
- *O. europaea* L. ssp. *cuspidata* (το οποίο μετακινήθηκε από την νότια Αφρική προς την Αίγυπτο, τις ανατολικές περιοχές της Αυστραλίας και τη Χαβάη και από την Αραβία προς την βόρεια Ινδία και τη νοτιοδυτική Κίνα).
- *O. europaea* L. ssp. *guanchica* (Κανάρια νησιά).
- *O. europaea* L. ssp. *maroccana* (νοτιοδυτικό Μαρόκο).
- *O. europaea* L. ssp. *cerasiformis* (Μαδέρα).

Η *O. europaea* L. ssp. *europaea* είναι το μοναδικό υποείδος που απαντά, αποκλειστικά, στις μεσογειακές ακτές της Ευρώπης και έχει εξακριβωθεί, μέσω της χρήσης μοριακών δεικτών, ότι περιλαμβάνει:

1. Την **ευρωπαϊκή** (*O. europaea* L. ssp. *europaea* var. *europaea*), που αποτελείται από τις καλλιεργούμενες ποικιλίες και τα υπολείμματα από εγκαταλελειμμένους ελαιώνες. Ο αριθμός των σύγχρονων καλλιεργούμενων ποικιλιών είναι μεγάλος, λόγω της διασταυρούμενης επικοινωνίας και ποικίλει το μέγεθος, το σχήμα και η απόδοσή τους σε ποσότητα και ποιότητα λαδιού.
2. Την **αγριελιά** [*O. europaea* L. ssp. *europaea* var. *sylvestris* (Mill) Lehr], που αποτελείται από αυτόχθονα φυτά τα οποία δύσκολα διακρίνονται από τα μη αυτόχθονα.
3. Την *O. europaea* L. ssp. *europaea* var. *oleaster* (Hoffmanns & Link) Negodi, η οποία περιλαμβάνει φυτά, που προήλθαν από καλλιέργεια σπερμάτων καλλιεργούμενων από τον άνθρωπο ποικιλιών, αλλά εγκαταλείφθηκαν και εξελίχθηκαν σαν άγρια δέντρα, με αποτέλεσμα τα χαρακτηριστικά τους να είναι διαφορετικά τόσο από την αγριελιά όσο και από την ευρωπαϊκή.

Οι καλλιεργούμενες και οι άγριες ελιές είναι διπλοειδή φυτά ($2n=46$) και είναι, πλήρως, διασταυρούμενα μεταξύ τους. Τριπλοειδείς και τετραπλοειδείς γονότυποι έχουν απομονωθεί από καλλιεργούμενες *O. europaea* L. ssp. *europaea*, καθώς και τετραπλοειδείς και εξαπλοειδείς γονότυποι από απειλούμενους φυσικούς πληθυσμούς της *O. europaea* L. ssp. *guanchica* και της *O. europaea* L. ssp. *maroccana* αντίστοιχα.

A.2. ΚΑΤΑΓΩΓΗ & ΕΞΑΠΛΩΣΗ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ

A.2.1. ΚΑΤΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ

Η ελιά είναι ένα από τα αρχαιότερα καλλιεργούμενα φυτικά είδη και η ιστορία της είναι συνυφασμένη με την ιστορία και την εξέλιξη του πολιτισμού των χωρών της ανατολικής μεσογείου, αποτελώντας σύμβολο ειρήνης, ευημερίας και ιερό δένδρο για πολλούς λαούς και θρησκείες.

Έχει χρησιμοποιηθεί και εξακολουθεί να χρησιμοποιείται σε θρησκευτικές τελετές (Αρχαίοι Αιγύπτιοι και Έλληνες, Εβραίοι, Χριστιανοί), αλλά και σαν θεραπευτικό μέσο, λόγω των ιαματικών ιδιοτήτων των παραγώγων της, μέσο καλλωπισμού και ατομικής υγιεινής. Εξάλλου, το ελαιόλαδο κατέχει ξεχωριστή θέση στο διαιτολόγιο των λαών της μεσογείου, λόγω της μοναδικής θρεπτικής συνεισφοράς του.

Η καλλιέργειά της ανάγεται στους προϊστορικούς χρόνους, καθώς είναι γνωστή από το 4.000 π.Χ. τουλάχιστον και εντοπίζεται στην ανατολική Μεσόγειο, σε μια κοιλάδα του Ιορδάνη ποταμού (Rhizoroulou 2007).

Στην Ελλάδα η καλλιέργειά της ανάγεται στα μυκηναϊκά και μινωικά χρόνια, σύμφωνα με τα ευρήματα των ανασκαφών. Απολιθωμένα φύλλα ελιάς, ηλικίας 50.000-60.000 χρόνων, βρέθηκαν στη Σαντορίνη και στη Νίσυρο και σε ανθρακοφόρα στρώματα στην Κύμη της Εύβοιας, γεγονός που υποδεικνύει ότι φύτευε στη συγκεκριμένη περιοχή πριν ακόμα εμφανιστεί ο άνθρωπος (Ποντίκης 2000). Η πρώτη γραπτή αναφορά στην ελιά έχει εντοπιστεί σε πήλινες πινακίδες, χαραγμένες με γραμμική Β, που χρονολογούνται από το 13^ο αιώνα π.Χ.

A.2.2. ΕΞΑΠΛΩΣΗ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ

Οι Έλληνες με τους Ρωμαίους και τους Άραβες τη διέδωσαν, αρχικά, στην Ισπανία και στη συνέχεια κατά μήκος των ευρωπαϊκών και των αφρικανικών ακτών, γεγονός που αποδεικνύεται από την προέλευση του λατινικού της ονόματος *olea* από το ελληνικό “ελαία” σύμφωνα με το Θεόφραστο (Lopes et al. 2009).

Σήμερα συνιστά ένα ευρέως καλλιεργούμενο φυτικό είδος με παγκόσμια, σχεδόν, εξάπλωση. Πρόκειται για ένα υποτροπικό, αειθαλές και πολυετές φυτό, που αναπτύσσεται πολύ αργά και εξελίσσεται σε δένδρο ή θάμνο. Τα ελαιόδεντρα καλύπτουν εκτάσεις:

- της Ανατολικής Μεσογείου (Συρία, Τουρκία, Κύπρο, Λίβανο, Ισραήλ κ.ά.).

- των βόρειων ακτών της Αφρικής (Αίγυπτο, Μαρόκο, Τυνησία κ.ά.).
- των μεσογειακών ακτών της Ευρώπης (Ιταλία, Ισπανία, Γαλλία κ.ά.).
- χωρών της Λατινικής Αμερικής (Χιλή, Περού, Αργεντινή, Βραζιλία, Μεξικό κ.ά.).
- της Καλιφόρνιας των Η.Π.Α.
- της Κίνας.
- της Ν. Αυστραλίας.
- της Ν. Αφρικής.

A.2.3. ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΗ ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ

Η ελιά κατέχει μια σημαντική θέση στην οικονομία πολλών χωρών. Οι περισσότερες ποικιλίες καλλιεργούνται ή για την παραγωγή ελαιόλαδου (93,0%) ή για την παραγωγή επιτραπέζιων ελιών (μαύρες και πράσινες), καθώς ελάχιστες από τις υπάρχουσες ποικιλίες ανταποκρίνονται ταυτόχρονα και στους δύο στόχους σε ικανοποιητικό βαθμό.

Το ελαιόλαδο αποτελεί το δεύτερο σημαντικότερο, παγκοσμίως, είδος λαδιού (πρώτο είναι το φοινικέλαιο) και παραδοσιακά η παραγωγή του είναι συγκεντρωμένη στην περιοχή της Μεσογείου. Υπολογίζεται ότι υπάρχουν περίπου 800 εκ. ελαιόδεντρα διασκορπισμένα σε μια έκταση 10 εκ. εκταρίων (98,0% εντοπίζονται στη λεκάνη της Μεσογείου) (Rugini et al. 1995). Τα 2/3 των ελαιώνων αποτελούν αμιγείς καλλιέργειες οι οποίες είναι σημαντικές καθώς:

- Αξιοποιούν ακατάλληλες για άλλες καλλιέργειες εκτάσεις και συμβάλλουν καθοριστικά στην αποφυγή της διάβρωσης του εδάφους.
- Προσφέρουν εποχική εργασία και ικανοποιητικό εισόδημα σε χιλιάδες μικροκαλλιεργητές.
- Είναι δυνατή η εκμετάλλευση, εκτός των κύριων προϊόντων τους (ελαιόλαδο και βρώσιμες ελιές) και των υποπροϊόντων τους (φύλλα, ξύλο, πυρήνας και πυρηνέλαιο) για φαρμακευτικούς και άλλους σκοπούς.

Η ελιά αποτελεί ένα μακρόβιο φυτό, το οποίο έχει αναπτύξει προσαρμοστικούς μηχανισμούς, προκειμένου να αντεπεξέλθει στην παρατεταμένη καλοκαιρινή ξηρασία. Αν και καρποφορεί σε αντίξοες συνθήκες, ακόμα και με ελλιπή καλλιεργητική φροντίδα, διαθέτει μερικά μειονεκτήματα τα οποία κάνουν ασύμφορη την καλλιέργειά της:

- Η μακροζωία της οδηγεί στη συσσώρευση υπεραιωνόβιων, μη προσοδοφόρων ελαιώνων.

- Η πρόωρη ενηλικίωση των δέντρων.
- Η ευαισθησία σε παρασιτικές εισβολές.
- Οι μη σύγχρονοι μέθοδοι συλλογής, επεξεργασίας, και συντήρησης των ελαιοκά-
πων.
- Η φαινοτυπική ανομοιομορφία, η μικρή προσαρμοστικότητα και η χαμηλή περιεκτι-
κότητα σε λάδι των καλλιεργούμενων ποικιλιών.

Αντίθετα με την πλειοψηφία των καρποφόρων φυτών και την τεράστια οικονομική και
θεραπευτική της αξία, η καλλιέργεια της ελιάς εξακολουθεί να απαιτεί επίπονες και όχι πάντα απο-
δοτικές διαδικασίες (Lambardi et al. 2013). Ως εκ τούτου πολυάριθμες είναι οι ερευνητικές προ-
σπάθειες για την επίτευξη γρήγορων, εύκολων και αποδοτικών μεθόδων πολλαπλασιασμού της
[*in vivo*, *in vitro* και *ex vivo* (Leva 2011)] με μειωμένο κόστος παραγωγής.

A.3. IN VIVO ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ

A.3.1. ΑΓΕΝΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ

Η πρώτη μέθοδος αναγέννησης της ελιάς *in vivo*, δηλαδή σε φυσικές μη ασηπτικές καλ-
λιεργητικές συνθήκες πραγματοποιείται με τον *αγενή*, *αφυλετικό* ή *βλαστητικό* τρόπο αναπαρα-
γωγής.

Περιλαμβάνει την απόσπαση μιας πολυκυτταρικής, φυτικής μάζας (σωματικά κύτταρα,
τμήματα φυτικών ιστών ή οργάνων) από το μητρικό φυτό και τη διαφοροποίησή της σε πλήρες
φυτό.

Οι κυριότεροι μέθοδοι αγενούς πολλαπλασιασμού είναι μέσω:

- Ενοφθαλμισμού.
- Εγκεντρισμού επιθυμητής ποικιλίας σε κλωνικά υποκείμενα ή σε υποκείμενα σπο-
ριόφυτα (γίνεται συνήθως την άνοιξη ή νωρίς το φθινόπωρο).
- Φυλλοφόρων ή άφυλλων ξυλοποιημένων μοσχευμάτων.
- Ριζοβολίας παραφυάδων.
- Παραβλαστημάτων της βάσης του μητρικού φυτού, τα οποία προκύπτουν από το
υπόγειο τμήμα του, όταν το υπέργειο έχει ξεραθεί.

A.3.2. ΕΓΓΕΝΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ

Ο εγγενής ή φυλετικός τρόπος αναπαραγωγής περιλαμβάνει τη φύτευση σπερμάτων στον αγρό.

Αποτελεί μια μη πρακτική αναγεννητική προσέγγιση, καθώς είναι πολύ αργό, σπάνιο φαινόμενο και οι απόγονοι που προκύπτουν χαρακτηρίζονται από μεγάλη “νεανική” περίοδο και γονοτυπική και επομένως φαινοτυπική ετερογένεια. Η συγκεκριμένη μέθοδος επιλέγεται, όταν επιδιώκεται η γενετική βελτίωση του φυτικού είδους.

Προτιμούνται μικροί πυρήνες αγριελιάς, λόγω της μεγαλύτερης βλαστικότητας, της ζωηρότητας και της ανθεκτικότητας στο ψύχος των σποριόφυτων που προκύπτουν. Αντίθετα οι μεγάλοι πυρήνες εκδηλώνουν χαμηλότερο ποσοστό βλαστικότητας, αλλά καλή απόκριση στον εμβολιασμό.

Έχει διαπιστωθεί η ύπαρξη εμβρυϊκού λήθαργου, λόγω αναστολέων στο ενδοσπέρμιο οι οποίοι ευθύνονται για την παρεμπόδιση της φύτευσης των σπερμάτων, μέχρι την απενεργοποίησή τους από τις χαμηλές θερμοκρασίες του χειμώνα στον αγρό (Diamantoglou et al. 1979). Σε πειραματικό επίπεδο ο εμβρυϊκός λήθαργος εξαφανίζεται σταδιακά με την αποθήκευση των σπερμάτων σε ξηρό μέρος, χαμηλή θερμοκρασία και στο φως, παρά στο σκοτάδι, όταν η θερμοκρασία είναι ακατάλληλη (Istanbouli et al. 1977).

Είναι πιθανή η ύπαρξη αναστολέων και σε άλλα μέρη του σπέρματος, εκτός του εμβρύου, καθώς τα ολόκληρα σπέρματα δε φυτρώνουν, ενώ τα απομονωμένα έμβρυα φυτρώνουν 100,0% (Cañas et al. 1987).

A.4. IN VITRO ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ

A.4.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η μη ανταγωνιστικότητα των προϊόντων της ελιάς οφείλεται κυρίως στη μικρή παραγωγικότητα, στην περιορισμένη φωτοσυνθετική ικανότητα των καλλιεργούμενων ποικιλιών και στις παραδοσιακές μεθόδους καλλιέργειας (Cañas et al. 1987). Αδήριτη είναι επομένως η ανάγκη για εφαρμογή εναλλακτικών αναγεννητικών προσεγγίσεων.

Ο αγενής, *in vitro* (με τη μέθοδο των ιστοκαλλιιεργειών), φυτικός πολλαπλασιασμός περιλαμβάνει όλες τις καλλιεργητικές μεθόδους φυτικών ιστών σε ασηπτικές συνθήκες.

A.4.2 ΕΙΔΗ ΦΥΤΙΚΗΣ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗΣ *IN VITRO*

Δύο είναι τα εναλλακτικά μονοπάτια με τα οποία έχει πραγματοποιηθεί ο αγενής πολλαπλασιασμός *in vitro* στην ελιά:

1. Δημιουργία νέων φυταρίων μέσω **οργανογένεσης** σε δύο στάδια:
 - α) Επαγωγή βλαστών από υποκοτύλια (Bao et al. 1980), από τμήματα κοτυληδόνων (Rugini 1986, Cañas et al. 1988) και από μίσχους (Mencuccini et al. 1993, Mendoza-de Gyves et al. 2008).
 - β) Ενεργοποίηση μασχαλιαίων οφθαλμών για μικροπολλαπλασιασμό (Roussos et al. 2002, Grigoriadou et al. 2002, Lambarbi et al. 2003, Binet et al. 2007).
2. Δημιουργία νέων φυταρίων μέσω **σωματικής εμβρυογένεσης**:
 - α) Σε στερεές ιστοκαλλιέργειες από ανώριμο ιστό ελιάς (Rugini 1988, Leva et al. 1995), από ώριμο ιστό (Orinos et al. 1991, Mitrakos et al. 1992), από κάλλο φυταρίων, που προέρχονται από ρίζες (Rugini 1986).
 - β) Σε υγρές καλλιέργειες από ώριμους ιστούς (τμήματα φύλλων από *in vitro* καλλιεργημένους βλαστούς) (Trabelsi et al. 2011).

Οι κυριότερες διαφορές των δύο αναγεννητικών μεθόδων είναι:

- α. Τα φυτάρια που προκύπτουν μέσω οργανογένεσης είναι πολυκυτταρικής προέλευσης, ενώ τα σωματικά έμβρυα προκύπτουν από ένα κύτταρο ή από μια ομάδα κυττάρων.
- β. Οι βλαστοί αναπτύσσονται από προκαμβιακές δεσμίδες, οι οποίες βρίσκονται σε σύνδεση με τον προϋπάρχοντα αγγειώδη ιστό του κάλλου ή του κάλλου-εκφύτου, ενώ τα σωματικά έμβρυα δε διατηρούν αγγειώδη σύνδεση με το μητρικό ιστό ή με το έκφυτο, αφού αναπτύσσουν ένα κλειστό ριζικό άκρο.
- γ. Τα σωματικά έμβρυα διαθέτουν έναν πόλο-μερίστωμα βλαστού και έναν πόλο-μερίστωμα ρίζας σε αντιδιαμετρικές θέσεις, χωρίς την παρεμβολή κάλλου. Αυτή είναι και η ειδοποιός διαφορά μεταξύ σωματικής εμβρυογένεσης και οργανογένεσης κατά την οποία παρεμβάλλεται κάλλος μεταξύ των δύο αντιδιαμετρικών μεριστωμάτων του βλαστού και της ρίζας.

A.4.3. ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ OM: ΜΙΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΗ ΑΝΑΚΑΛΥΨΗ ΓΙΑ ΤΗΝ *IN VITRO* ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ

Ένα καθοριστικό βήμα για την πραγματοποίηση ιστοκαλλιέργειών στην ελιά έγινε από τον Rugini (1984) ο οποίος δημιούργησε και χρησιμοποίησε ένα νέο θρεπτικό υπόστρωμα το OM.

Η σύνθεσή του καθορίστηκε από τον συνδυασμό πολλών πειραματικών δεδομένων τα κυριότερα των οποίων ήταν:

- α. Η σύγκριση δεδομένων που προέκυψαν από την ανάλυση των κύριων μεταλλικών στοιχείων που ανιχνεύτηκαν σε μίσχους ελιάς και αμυγδάλου, κατά τη διάρκεια της έντονης αυξητικής περιόδου και σε ζυγωτικά έμβρυα ελιάς που ήταν στο τελικό στάδιο ωρίμανσης.
- β. Η μελέτη της μοριακής βιολογίας της ελιάς και του γενετικού της μετασχηματισμού μέσω t-DNA από *Agrobacterium*.
- γ. Η σύγκριση ενός μεγάλου αριθμού συστατικών του OM θρεπτικού υποστρώματος με τα αντίστοιχα του MS θρεπτικού υποστρώματος.

Η αξιολόγηση και η σύγκριση των παραπάνω δεδομένων οδήγησαν στη δημιουργία του OM θρεπτικού υποστρώματος, το οποίο ήταν ικανό να διατηρήσει καλλιέργεια βλαστών υψηλού αυξητικού ρυθμού για μεγάλο χρονικό διάστημα, σε σύγκριση με τα μέχρι τότε δοκιμασμένα τεχνητά υποστρώματα, συμπεριλαμβανομένου και του MS (Zacchini et al. 2004).

Έκτοτε η χρήση του OM δεν περιορίστηκε σε ιστοκαλλιέργειες εκφύτων ελιάς, αλλά επεκτάθηκε και σε άλλα φυτικά είδη (Thomas 1999).

A.4.4. ΚΑΛΛΟΓΕΝΕΣΗ

Η πρώτη *in vitro* αναγεννητική προσπάθεια στην ελιά έγινε από τους Lavee και Messer (1969), οι οποίοι καλλιέργησαν *in vitro*, τμήματα βλαστών, ηλικίας ενός έτους, από ώριμες ελιές της ποικιλίας *Manzanillo*, σε τροποποιημένο White's θρεπτικό μέσο και μελέτησαν την επαγωγή κάλλων. Η μεμονωμένη παροχή 2,4-D προκάλεσε ικανοποιητική αύξηση κάλλου, ενώ η παροχή NAA και IAA πιο περιορισμένη. Παρουσία αυξίνης και κινετίνης διαμορφώθηκε υψηλότερο ποσοστό πιο ομοιόμορφων και συμπαγών κάλλων. Η καλλογένεση ήταν ανεξάρτητη από τη διάμετρο των βλαστών. Παράλληλα διαπίστωσαν ότι η διατήρηση της καλλογένεσης, για πολλές συνεχόμενες ανακαλλιέργειες, απαιτούσε θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε συνδυασμό αυξίνης και κυτοκίνινης.

Ο Lavee (1977) ανακοίνωσε ότι σε ιστοκαλλιέργειες μεσοκαρπίων ελιάς, η κινετίνη και η ζεατίνη ήταν οι πιο αποτελεσματικές κυτοκινίνες για την επαγωγή κάλλου.

Οι Wang et al. (1979a) πρότειναν ότι η ανάπτυξη του κάλλου στην ελιά υπόκεινται σε τρία, διακριτά, αναπτυξιακά στάδια :

1. Ενεργοποίηση κυττάρων.
2. Κυτταρική διαίρεση.
3. Εμφάνιση και ανάπτυξη κάλλου.

Το κάθε στάδιο χαρακτηρίζεται από αλλαγές της κυτταρικής μορφολογίας, της κυτταρικής διαίρεσης και αύξησης, καθώς και της ενεργοποίησης σχετικών μεταγραφημάτων (mRNA).

Σε μετέπειτα δημοσιεύσεις τους (1979b) ανέφεραν διαμόρφωση και διαφοροποίηση δύο τύπων μεριστωματικών κυττάρων, σε τυχαίες θέσεις, ανάμεσα σε παρεγχυματικά κύτταρα:

1. Μεριστωματικών κυτταρικών μαζών από τις οποίες διαφοροποιούνται ρίζες.
2. Μεριστωματικών όγκων από τους οποίους προκύπτουν οφθαλμοί σε τυχαίες θέσεις.

Οι Lavee et al. (1982) κατέγραψαν ότι για την επαγωγή κάλλου από τμήματα βλαστών απαιτείται αυξίνη (1,0 mg/L IAA), κυτοκινίνη (1,0 mg/L 2iP) και χλωρογενικό οξύ (10^{-3} M) ή κινναμικό οξύ (10^{-4} M) τα οποία αντικατέστησαν επιτυχώς το IAA, χωρίς να επηρεάσουν την κυτταρική αύξηση.

Ο Rugini σε αδημοσίευτα δεδομένα αναφέρει την επαγωγή εύθραυστων κάλλων, τόσο από εμβρυϊκό όσο και από ώριμο υλικό, σε BN θρεπτικό μέσο παρουσία 2,4-D (0,1-5,0 mg/L) και ζεατίνης (0,1 mg/L) στο σκοτάδι. Η προσθήκη NAA (1,0-5,0 mg/L) κατέληγε στη δημιουργία μικρότερων κυττάρων που νεκρώνονταν πιο γρήγορα. Η προσθήκη GSH προστάτευε τους κάλλους από την οξείδωση και δεν επηρέαζε την κυτταρική αύξηση. Αντίθετα σε MS με υψηλότερες συγκεντρώσεις Ca^{2+} , Mg^{2+} και μειωμένη συγκέντρωση NH_4^+ προέκυπταν πιο ανθεκτικά κύτταρα.

Έκτοτε αναρίθμητοι συνδυασμοί θρεπτικών υποστρωμάτων και φυτοαυξητικών παραγόντων χρησιμοποιήθηκαν για την επαγωγή καλλογένεσης. Η επιλογή του θρεπτικού μέσου βρίσκεται σε άμεση συνάρτηση με το είδος του φυτικού είδους και του εκφύτου και τους πειραματικούς στόχους της κάθε ερευνητικής ομάδας.

A.4.5. ΕΠΑΓΩΓΗ ΡΙΖΩΝ

Αρκετές ερευνητικές προσπάθειες έχουν ανακοινωθεί που στοχεύουν στη μελέτη της διαφοροποίησης ριζών από διαφορετικά έκφυτα ελιάς:

- Οι Avidan et al. (1978) διαπίστωσαν ότι οι καλλιεργούμενες ποικιλίες της ελιάς εμφανίζουν μεγάλες διαφορές ως προς το ριζογενετικό τους δυναμικό, *in vitro*, το οποίο καθορίζεται από:
 - ◆ Το ενδογενές επίπεδο των ριζογενετικών παραγόντων οι οποίοι συντίθενται στα φύλλα και στους οφθαλμούς και μεταφέρονται στη βάση του εκφύτου.
 - ◆ Τα ανατομικά χαρακτηριστικά της ελιάς, όπως η πυκνότητα και η συνέχεια του σκληρεγχύματος των φύλλων.
 - ◆ Την αναπτυξιακή κατάσταση του μητρικού φυτού, καθώς μικρότερα ποσοστά ριζογένεσης καταγράφονται όσο αυξάνεται η ηλικία του εκφύτου.
 - ◆ Τη θέση του εκφύτου επάνω στο μητρικό φυτό, καθώς υψηλότερη ριζογένεση παρατηρείται στην ακραία περιοχή του εκφύτου, ενώ μικρότερη προς τη βάση του μητρικού βλαστού. Μια πιθανή ερμηνεία είναι ότι η ακραία περιοχή δεν περιέχει το ακραίο μερίστωμα το οποίο αναστέλλει τη ριζογένεση, ενώ παράλληλα διαθέτει χαμηλό επίπεδο αυξητικών αναστολέων.
 - ◆ Τον αριθμό των φύλλων ανά έκφυτο, αφού είναι γνωστό ότι τα ριζογενετικά ρυθμιστικά συστατικά παράγονται από αυτά.
 - ◆ Τους φυτοαυξητικούς παράγοντες του θρεπτικού υποστρώματος.
- Ο Rugini (1981) ανακοίνωσε ότι το NAA και το IBA είναι οι πιο προωθητικές αυξίνες για την επαγωγή ριζογένεσης, *in vitro*, τόσο σε ξυλώδη όσο και σε εμβρυϊκά έκφυτα και ώριμους βλαστούς ελιάς. Αντίθετα το IAA είναι ικανό να επάγει ικανοποιητικά ποσοστά ριζών σε εμβρυϊκά έκφυτα, αλλά όχι σε ώριμα.

Σε μετέπειτα μελέτη του (1984) χρησιμοποίησε έκφυτα από μασχαλιαίους οφθαλμούς. Η ριζοβολία των βλαστών πραγματοποιήθηκε σε OMr με 1,0 mg/L IBA ή NAA και η επιμήκυνση των ριζών σε OMe, όπου αντί για αυξίνη προστέθηκε ζεατίνη ή 2iP. Όταν ο φυτοαυξητικός παράγοντας παρεχόταν στη βάση των εκφύτων και η καλλιέργεια παρέμενε στο σκοτάδι, οι πιο αποτελεσματικές αυξίνες ήταν το IBA (90,0%), το NAA (70,0%), και το IAA (20,0%) στις ισπανικές και γαλλικές ποικιλίες, ενώ στις ιταλικές το NAA (80,0%), το IBA (50,0%) και το IAA (20,0%). Οι βιταμίνες δεν ήταν απαραίτητες και πιθανώς ανέστελλαν τη ριζογένεση.
- Οι Orinos et al. (1991) εμβολίαζαν ριζίδια και κοτυληδόνες ώριμων ζυγωτικών εμβρύων άγριας ελιάς σε θρεπτικό μέσο OMc με 2,5 μM 2iP και 25,0 μM IBA για 21 ημέρες και τα ανακαλλιεργούσαν σε OMc και διάφορες συγκεντρώσεις 2iP και IBA. Την 3^η εβδομάδα της καλλιέργειας εμφανίζονταν οι πρώτες ρίζες στους κάλλους από

κοτυληδόνες (5,0-6,0%). Η ριζογενετική αντίδραση ήταν μεγάλη σε χαμηλές συγκεντρώσεις IBA (0,5-2,5 μM), περιορισμένη σε υψηλότερες (5,0 / 10,0 ή 25,0 μM), ενώ αναστελλόταν από το 2iP σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 20,0 μM .

- Οι Mitrakos et al. (1992) καλλιέργησαν, *in vitro*, έκφυτα ώριμων ζυγωτικών εμβρύων ποικιλίας Κορωνέικης σε θρεπτικό μέσο OMc που περιείχε 25,0 μM IBA και 2,5 μM 2iP. Οι πρώτες ρίζες εμφανίζονταν την 2^η εβδομάδα και τα υψηλότερα ποσοστά καταγράφονταν στα έκφυτα ριζιδίων και ακολουθούσαν τα έκφυτα των βάσεων και των κορυφών. Η παραπάνω ριζογενετική διαβάθμιση των κάλλων που είχαν διαφορετική ηλικία (0, 7, 14 και 21 ημερών) ήταν έντονη, όταν η ανακαλλιέργεια γινόταν σε OMc χωρίς ορμόνες, ενώ ήταν λιγότερο ξεκάθαρη, όταν οι κάλλοι ανακαλλιεργούνταν σε OMc και 2,5 μM IBA. Ανάλογη διαβάθμιση του ριζογενετικού δυναμικού έχει καταγραφεί και ερμηνευτεί από τους Cañas et al. (1988) και Orinos et al. (1991).
- Η μελέτη της επαγωγής ριζών, *in vitro*, σε τμήματα βλαστών ελιάς κατέδειξε ότι ο μεταβολισμός των φαινολών, των φλαβονοειδών και της λιγνίνης συνδέεται άμεσα με το υπό μελέτη φαινόμενο (Santos Macedo et al. 2012). Ταυτόχρονα απομονώθηκαν δύο γονίδια που σχετίζονται με τη ριζογένεση.

A.4.6. ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ ΒΛΑΣΤΩΝ IN VITRO

Η διαφοροποίηση βλαστών από κύτταρα ελιάς, *in vitro*, έχει ανακοινωθεί από πολλούς ερευνητές, οι οποίοι χρησιμοποίησαν διάφορα είδη εκφύτων. Ενδεικτικά αναφέρονται:

- Οι Bao et al. (1980) εμβολίασαν υποκοτύλια σε τροποποιημένο White's θρεπτικό υπόστρωμα. Ο συνδυασμός NAA (0,01 mg/L) και BAP (0,5 mg/L) ήταν ο πιο αποτελεσματικός για την επαγωγή βλαστών. Η προσθήκη χαμηλής συγκέντρωσης 2,4-D (0,1 mg/L) και ζεατίνης (0,1 mg/L) προωθούσε τη διαφοροποίηση βλαστών, περιστασιακά μόνο, όταν η καλλιέργεια γινόταν στο σκοτάδι.
- Ο Rugini (1986) εμβολίασε βλαστητικά μεριστώματα, που προέρχονταν από βλαστούς αναγεννημένους *in vitro*, προκειμένου να αποφευχθεί η γρήγορη οξείδωση των ιστών και να αποκτήσει φυτά απαλλαγμένα από ασθένειες.
Σε προγενέστερη μελέτη του (1981) είχε ανακοινώσει ότι η καταλληλότερη κυτοκίνη για την αύξηση μασχαλιαίων οφθαλμών ήταν η ζεατίνη και σε μικρότερο βαθμό το 2iP. Αντίθετα το BAP προκαλούσε την ανάπτυξη λεπτών βλαστών, περιορισμένη

αύξηση και μεγάλο κάλλο στη βάση των εκφύτων.

- O Cañas (1988) δημοσίευσε τη διαφοροποίηση βλαστών, *in vitro*, από τμήματα κοτυληδόνων που αναπτύσσονταν σε θρεπτικό υπόστρωμα OMc με 5,0 mg/ml IBA, 0,2-0,5 mg/ml 2iP και ανακαλλιεργούνταν κάθε τρεις εβδομάδες σε OMc με 1,0-2,0 mg/L IBA και ίδια συγκέντρωση 2iP ή ζεατίνης στο φως. Οι κάλλοι μεταφέρονταν σε OMc που περιείχε διάφορες συγκεντρώσεις IBA ή συνδυασμούς IBA και 2iP, οπότε και διαμορφώνονταν βλαστοί. Το υψηλότερο ποσοστό βλαστών καταγραφόταν σε 4,0 mg/ml 2iP, ενώ σε χαμηλές συγκεντρώσεις 2,4-D (0,1 mg/ml) και ζεατίνης (0,1 mg/ml) παρατηρήθηκε περιστασιακή επαγωγή βλαστών στο σκοτάδι. Το υψηλότερο ποσοστό βλαστών καταγράφηκε στους κάλλους που προέρχονταν από τμήματα κοτυληδόνων και γειτνίαζαν με τον εμβρυϊκό άξονα, σε αντίθεση με τα πιο απομακρυσμένα, γεγονός που υποδεικνύει την ύπαρξη διαβάθμισης της αναγεννητικής ικανότητας των εκφύτων κατά μήκος των κοτυληδόνων.
- Οι Mencuccini et al. (1993) μελέτησαν την επαγωγή βλαστών, *in vitro*, σε έκφυτα μίσχων που απομονώνονταν από φυτά του αγρού ή του θερμοκηπίου και καλλιεργούνταν σε θρεπτικό μέσο OM με κυτοκίνη και αυξίνη. Τα έκφυτα, στο σκοτάδι, διαμόρφωναν λευκή διόγκωση σε αντιδιαμετρικά άκρα, έντονη καλλογένεση και 2,0-5,0% επαγωγή βλαστών σε συγκέντρωση αυξίνης μεγαλύτερη από 2,5 μM. Αντίθετα, όταν το βασικό θρεπτικό μέσο περιείχε μόνο κυτοκίνη, καταγραφόταν χαμηλό ποσοστό επιβίωσης των εκφύτων (30,0-40,0%), στο όμορο άκρο σχηματισμοί μη συγκεκριμένης μορφολογίας και ένας μόνο βλαστός, ανά έκφυτο, παρουσία ή απουσία κάλλου. Η φυτική αναγέννηση λάμβανε χώρα τόσο σε θρεπτικό μέσο MS όσο και σε κατάλληλα τροποποιημένο θρεπτικό μέσο OM, ενώ το ½ MS δεν ήταν εξίσου προωθητικό.
- Σε ανάλογα πειραματικά αποτελέσματα κατέληξαν και οι Cozza et al. (1997). Η έρευνά τους κατέδειξε ότι, τόσο τα διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα όσο και το είδος της ποικιλίας, επηρεάζουν δραστικά τη βιοσύνθεση μεταλλικών στοιχείων στους επαγόμενους βλαστούς, το ποσοστό διαφοροποίησης, αλλά και τη βιωσιμότητάς τους στη φάση εγκλιματισμού στο πλαίσιο του μικροπολλαπλασιασμού.
- Η *in vitro* καλλιέργεια βλαστών εφαρμόστηκε στην τοπική ιταλική ποικιλία *Nebbian* με απώτερο στόχο τη διατήρηση του απειλούμενου γονιδιώματός της (Zacchini et al. 2004). Η πιο ικανοποιητική επαγωγή βλαστών επιτεύχθηκε σε έκφυτα δέντρων του αγρού, ηλικίας 50 ετών, σε θρεπτικό μέσο MS παρουσία 36,0 g/L μαννιτόλης και 4,56

μM ζεατίνης. Η περαιτέρω επαγωγή ριζών έγινε σε θρεπτικό μέσο OM που περιείχε μισή ποσότητα μακροστοιχείων, 20,0 g/L σακχαρόζη και 3,22 μM NAA.

A.4.7. ΕΠΑΓΩΓΗ ΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ

Ακολουθεί σύντομη καταγραφή των σημαντικότερων δημοσιεύσεων που αφορούν τις ερευνητικές προσπάθειες για επαγωγή σωματικής εμβρυογένεσης στην ελιά:

- Η πρώτη αναφορά έγινε από τον Rugini (1988) από ανώριμα ζυγωτικά έμβρυα, καταδεικνύοντας το καθοριστικό ρόλο της ηλικίας του εκφύτου, του σκοταδίου και του είδους της αυξίνης.

Ανώριμα ζυγωτικά έμβρυα (50, 90 και 105 ημέρες μετά την πλήρη άνθιση των μητρικών φυτών) καλλιεργήθηκαν *in vitro* και ανέπτυξαν κάλλους στους οποίους διαμορφώθηκαν σφαιρικές μάζες κάλλου και εμβρυοειδείς δομές.

Αντίθετα τα ανώριμα ζυγωτικά έμβρυα που συλλέχθηκαν 75 μέρες μετά την πλήρη άνθιση και διατηρήθηκαν στο σκοτάδι έδωσαν σωματικά έμβρυα από τα οποία διαφοροποιήθηκαν και δευτερογενή έμβρυα.

Τα σωματικά έμβρυα προέκυπταν από όλα τα μέρη των ζυγωτικών εμβρύων σε συνολικό ποσοστό 70,0% (20,0% με την παρεμβολή κάλλου και 50,0% άγνωστης προέλευσης), 6 εβδομάδες μετά την έναρξη του πειράματος. Από κάθε ζυγωτικό έμβρυο προέκυπταν 2-15 σωματικά έμβρυα τοποθετημένα, συνήθως, σε μορφή ροζέτας, που απομονώνονταν δύσκολα το ένα από το άλλο. Σε MS η σωματική εμβρυογένεση ήταν 70,0% υψηλότερη από ότι στο OM, πιθανώς εξαιτίας της χαμηλότερης συγκέντρωσης ανοιγμένου αζώτου και τα σωματικά έμβρυα εξελίσσονταν σε φυτάρια γρηγορότερα. Το NAA προωθούσε, ακόμα και σε μεγάλες συγκεντρώσεις, τη σωματική εμβρυογένεση, ενώ αντίθετα τόσο το 2,4-D, ανεξαρτήτως συγκέντρωσης, όσο και ο συνδυασμός 12,5 μM NAA και BAP τη μείωναν δραστικά.

Η παροχή σορβιτόλης δεν προκαλούσε αύξηση του αριθμού των σωματικών εμβρύων, αλλά αντίθετα ανέστελλε την επιμήκυνση των βλαστών και των ριζών.

- Οι Orinos et al. (1991) ανακοίνωσαν την επαγωγή, *in vitro*, σωματικών εμβρύων από ριζίδια και κοτυληδόνες ώριμων ζυγωτικών εμβρύων άγριας ελιάς.

Τα έκφυτα εμβολιάζονταν σε θρεπτικό υπόστρωμα OMc με 2,5 μM 2iP και 25,0 μM IBA για 21 ημέρες και ανακαλλιεργούνταν σε OMc με διάφορες συγκεντρώσεις 2iP

και IBA. Τα πρώτα σωματικά έμβρυα εμφανίζονταν τις πρώτες ημέρες της ανακαλλιέργειας και τα υψηλότερα ποσοστά σωματικών εμβρύων προέκυπταν από έκφυτα ριζιδίων.

Η μείωση των αλάτων και η παραμονή των κάλλων για 21 ημέρες στο σκοτάδι, στα αρχικά στάδια της ανακαλλιέργειας, κατέληγαν σε αύξηση του ποσοστού της σωματικής εμβρυογένεσης. Ανακαλλιέργεια σε OMc χωρίς φυτοαυξητικούς παράγοντες ή σε OMc και IBA (0,5 / 2,5 ή 5,0 μM), ανεξαρτήτως φωτεινών συνθηκών, τις πρώτες 21 ημέρες κατέληγε σε ποσοστό σωματικής εμβρυογένεσης 7,0%, ενώ μειωνόταν αισθητά στα 10,0 μM ή 25,0 μM IBA και 5,0-40,0 μM 2iP.

Η μεγάλη διαφορά στο ποσοστό επαγωγής σωματικών εμβρύων των δύο παραπάνω εργασιών οφείλεται, πιθανώς, στο γεγονός ότι τα σωματικά έμβρυα για τον Rugini προέρχονταν άμεσα από κάλλο μόνο σε ποσοστό 20,0%, ενώ στην εργασία των Orinos et al. όλα προέρχονταν από κάλλο.

- Οι Mitrakos et al. (1992) μελέτησαν την εξάρτηση της σωματικής εμβρυογένεσης από την ηλικία και το είδος του εκφύτου.

Εμβολίασαν έκφυτα ώριμων ζυγωτικών εμβρύων ποικιλίας Κορωνέικης σε θρεπτικό μέσο OMc με 25,0 μM IBA και 2,5 μM 2iP. Τα πρώτα σωματικά έμβρυα εμφανίζονταν 30-35 ημέρες μετά τον εμβολιασμό και το μέγιστο ποσοστό καταγραφόταν 75 ημέρες αργότερα.

Τα έκφυτα που εμβολιάζονταν απευθείας σε θρεπτικό μέσο OMc χωρίς φυτοαυξητικούς παράγοντες ή OMc με 2,5 μM IBA, χωρίς να μεσολαβήσει καλλογένεση, δεν έδιναν σωματικά έμβρυα. Οι κάλλοι 7 ημερών εκδήλωναν χαμηλό ποσοστό σωματικής εμβρυογένεσης σε σύγκριση με κάλλους ηλικίας 14 ή 21 ημερών. Η προσθήκη στο θρεπτικό μέσο 2,5 μM IBA μείωνε ελαφρώς την σωματική εμβρυογένεση σε κάλλους κοτυληδόνων 14 και 21 ημερών, αλλά δεν την επηρέαζε σημαντικά σε κάλλους κοτυληδόνων ηλικίας 7, 14 και 21 ημερών. Υψηλά ποσοστά σωματικής εμβρυογένεσης καταγράφηκαν σε κάλλους από ριζίδια (40,0%) και πολύ χαμηλότερα σε κάλλους κοτυληδόνων.

- Ο Rugini (1995) δημοσίευσε για πρώτη φορά επαγωγή σωματικών εμβρύων, *in vitro*, από ώριμους ιστούς, δηλαδή μίσχους των ποικιλιών *Canino* και *Morailo* που εμβολιάζονταν σε δύο θρεπτικά μέσα:

1. ½ MS που περιείχε 30,0 μM TDZ, 0,54 μM NAA και 4,0% σακχαρόζη.
2. OMs που περιείχε 1 g/L υδρολυμένη καζεΐνη, 3,0% σακχαρόζη, 10,0 μM 2iP και

2,2 μ M BAP.

Στους καλλιεργηθέντες μίσχους διαφοροποιήθηκαν βλαστοί που διατηρήθηκαν για 3-5 χρόνια *in vitro*, με συνεχείς ανακαλλιέργειες ανά 40 ημέρες σε OM. Από τους βλαστούς απομονώνονταν έκφυτα τα οποία εμβολιάζονταν σε θρεπτικό υπόστρωμα OMc με 2iP και BAP, οπότε προέκυπταν μικροί και συμπαγείς κάλλοι (65,0%) και σπάνια βλαστοί που νεκρώνονταν σύντομα.

Αντίθετα, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS με TDZ όλοι οι μίσχοι παρήγαγαν πλούσιο κάλλο και 2-3 βλαστούς μετά από τρεις εβδομάδες. Όταν τα έκφυτα μεταφέρονταν σε θρεπτικό υπόστρωμα OMe με 1,0 g/L υδρολυμένη καζεΐνη, 3,0% σακχαρόζη, 0,5 μ M 2iP, 0,44 μ M BAP, 0,25 μ M IBA, και 0,42 mM σεφοταξίμη προέκυπταν μαλακές, προεμβρυϊκές μάζες (10,0%) από τα κατώτερα άκρα των μίσχων σε διάστημα 20-30 ημερών. Οι προεμβρυϊκές μάζες διαφοροποιούνταν σε φυσιολογικά και μη σωματικά έμβρυα μετά την τοποθέτησή τους σε διηθητικό χαρτί διαβρεγμένο με υγρό θρεπτικό μέσο OMe και σεφοταξίμη.

Τα νεοσχηματισθέντα σωματικά έμβρυα μεταφέρονταν σε άγαρ και εκδήλωναν γρήγορους αυξητικούς ρυθμούς, ενώ αντίθετα, όταν μεταφέρονταν σε υγρό θρεπτικό μέσο έδιναν εύθρυπτο, μη μορφογενετικό κάλλο και λίγα φυσιολογικά σωματικά έμβρυα.

Τα σωματικά έμβρυα προέρχονταν από τα επιδερμικά κύτταρα των υποκοτυλίων και των ριζικών ζωνών, αλλά ποτέ από τις κοτυληδόνες.

Η παραγωγή συνεχιζόταν για δύο χρόνια, χωρίς απώλεια του εμβρυογενετικού δυναμικού των κάλλων.

- Οι Leva et al. (1995) απομόνωσαν κοτυληδόνες από σπέρματα 30, 60, 90 και 140 ημέρες μετά την άνθιση, από δέντρα του αγρού ηλικίας 10 χρόνων και τις καλλιεργήσαν σε SH θρεπτικό μέσο με 0,1 M σακχαρόζη. Στο 1^ο στάδιο της ιστοκαλλιέργειας τα σπέρματα παρέμεναν στο σκοτάδι με 1,25 μ M NAA και 2,5 μ M 2iP μέχρι να διογκωθούν. Στο 2^ο στάδιο μεταφέρονταν σε θρεπτικό μέσο που δεν περιείχε φυτοαυξητικούς παράγοντες και παρέμεναν στο φως, οπότε προέκυπτε κάλλος μόνο από τα έκφυτα ηλικίας 60 και 90 ημερών.

Οι ποικιλίες *Picholine* και *Frangivento* εκδήλωναν εμβρυογενετική διαφοροποίηση μόνο στα έκφυτα των 60 και 90 ημερών, ενώ η ποικιλία *Frantoio* μόνο στα έκφυτα ηλικίας 90 ημερών. Στην ποικιλία *Picholine* καταγράφηκε σωματική εμβρυογένεση παρουσία υψηλής συγκέντρωσης NAA, ενώ στην ποικιλία *Frantoio* παρουσία 2iP.

- Οι Shibli et al. (2001) καλλιέργησαν, *in vitro*, τομές φύλλων, μίσχους φύλλων, υποκοτύλια και ρίζες φυτρωμένων σπερμάτων ελιάς.
Τα έκφυτα από ρίζες έδιναν την υψηλότερη καλλογένεση (46,0%) και μεταφέρονταν σε θρεπτικό υπόστρωμα επαγωγής σωματικών εμβρύων (5,0 mM 2,4-D - 0,5 mM κινετίνη και 5,0 mM NAA), παρέμεναν στο σκοτάδι και στη συνέχεια μεταφέρονταν στο θρεπτικό μέσο έκφρασης που περιείχε διάφορες συγκεντρώσεις 2iP, BA, TDZ, ζεατίνης ή κινετίνης. Υψηλότερα ποσοστά σωματικής εμβρυογένεσης καταγράφονταν σε 10,0 mM 2iP και 5,0 mM 2,4-D. Τα 0,2 M σακχαρόζης είχαν την πιο διεγερτική δράση, έναντι της φρουκτόζης και της γλυκόζης, ενώ τόσο η σορβιτόλη όσο και η μανιτόλη (0,1- 0,2 ή 0,3 M) μείωναν σημαντικά τη σωματική εμβρυογένεση μέχρι την πλήρη αναστολή της στα 0,4 M.
Η περαιτέρω ανάπτυξη των σωματικών εμβρύων λάμβανε χώρα σε θρεπτικό μέσο, χωρίς φυτοαυξητικούς παράγοντες. 85,0% των σωματικών εμβρύων ανέπτυσαν τις ρίζες τους και μετατρέπονταν σε φυτάρια, 5,0% έδιναν δευτερογενή έμβρυα και 10,0% νεκρώνονταν. 95,0% των φυτρωμένων σωματικών εμβρύων επιβίωναν με *ex novo* εγκλιματισμό και μετατρέπονταν σε πλήρη φυτά στο θερμοκήπιο, χωρίς εμφανείς φαινοτυπικές διαφορές από το μητρικό φυτό.
- Οι Trabelsi et al. (2003) ανακοίνωσαν την επαγωγή σωματικών εμβρύων, *in vitro*, από τμήματα κοτυληδόνων τριών ποικιλιών ελιάς. Τη μεγαλύτερη εμβρυογενετική αντίδραση κατέγραψαν σε θρεπτικό μέσο OMc με μηδενική ή χαμηλή συγκέντρωση φυτοαυξητικών παραγόντων, καθώς υψηλά επίπεδα (>0,5 mg/L IBA και 2iP) ανέστελλαν τη σωματική εμβρυογένεση. Η ιδανική επωαστική περίοδος για επαγωγή σωματικών εμβρύων στο θρεπτικό μέσο με αυξίνη ήταν 4 εβδομάδες.
Προσθήκη 30,0-40,0 g/L σακχαρόζης είχαν πιο προωθητική δράση στην επαγωγή, αύξηση και ωρίμανση των σωματικών εμβρύων συγκριτικά με τη γλυκόζη.
Τα επαχθέντα φυτάρια από σωματικά έμβρυα ήταν ίδιας μορφολογίας με εκείνα που προέκυπταν από μασχαλιαίους οφθαλμούς.
- Για πρώτη φορά οι Capelo et al. (2010) ανακοίνωσαν την επίτευξη ενός δύσκολου στόχου: την επαγωγή σωματικής εμβρυογένεσης από ώριμους ιστούς αγριελιάς (φύλλα και μίσχους).
Τα έκφυτα εμβολιάζονταν σε MS ή OM μέσο και ποικίλους συνδυασμούς ορμονών (NAA, ζεατίνη, IBA, 2iP, TDZ και BAP). Η διαφοροποίηση λάμβανε χώρα τρεις μήνες μετά τη μεταφορά των κάλλων σε θρεπτικό μέσο χωρίς φυτοαυξητικές ουσίες.

Η υψηλότερη επαγωγή κάλλου παρατηρήθηκε σε έκφυτα από μίσχους και η μέγιστη επαγωγή σωματικών εμβρύων από έκφυτα μίσχων και ακραίων τομών φύλλων σε MS με 12,25 μ M IBA και 4,56 μ M ζεατίνη.

- Οι Cerezo et al. (2011) ανακοίνωσαν 25,0% επαγωγή σωματικής εμβρυογένεσης σε ιστοκαλλιέργειες απομονωμένων ριζιδίων από ώριμα σπέρματα της ισπανικής ποικιλίας *Picual*.

Τα έκφυτα εμβολιάστηκαν σε OMc που περιείχε 25,0 μ M IBA και 2,5 μ M 2iP για τρεις εβδομάδες και μεταφέρθηκαν στο ίδιο θρεπτικό μέσο χωρίς 2iP και χαμηλότερες συγκεντρώσεις IBA.

- Μια σημαντική και καθοριστική για το μέλλον των ιστοκαλλιεργειών της ελιάς δημοσίευση έκαναν οι Trabelsi et al. (2011). Ανακοίνωσαν την επαγωγή σωματικών εμβρύων σε υγρές καλλιέργειες από ώριμους κάλλους φύλλων.

Οι κάλλοι προέρχονταν από MS με 10,0 μ M NAA και 2,25 μ M 2iP στο σκοτάδι. Οι εμβρυογενετικές υγρές καλλιέργειες επιτεύχθηκαν σε OMe με 2,5 μ M 2,4-D και 2,5 μ M ζεατίνη.

A.5. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ

A.5.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η εμβρυογένεση είναι το αποτέλεσμα μιας μακροχρόνιας εξελικτικής διαδικασίας *in vivo* των ανώτερων φυτών. Πρώτος ο γερμανός βοτανολόγος Haberlandt διατύπωσε τις προβλέψεις του για τη φυτική κυτταρική ολοδυναμία στις αρχές της δεκαετίας του 1900.

Η πρώτη καταγραφή σωματικής εμβρυογένεσης δημοσιεύτηκε το 1958 από τους Steward et al. σε υγρές καλλιέργειες καρότου (*Daucus carota*) και το 1959 σε καλλιέργειες κάλλων καρότου σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα από τους Reinert et al. Τα φυτάρια αναγεννώνται άμεσα από σωματικά κύτταρα των εκφύτων που συμπεριφέρονται σαν ζυγωτά, όταν καλλιεργηθούν σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα το οποίο επάγει τη δημιουργία ανεξάρτητων διπολικών δομών που δεν συνδέονται μηχανικά με το μητρικό ιστό.

Οι προκύπτοντες διπολικοί σχηματισμοί έχουν όλα τα δομικά και λειτουργικά μέρη ενός ζυγωτικού εμβρύου και ονομάζονται **σωματικά έμβρυα**. Όταν οι καλλιεργητικές συνθήκες το επιτρέπουν, τα σωματικά έμβρυα εξελίσσονται σε ολοκληρωμένα νεαρά φυτάρια, μέσω μορφο-

λογικών και λειτουργικών σταδίων αντίστοιχων της ζυγωτικής εμβρυογένεσης, γι' αυτό και ο συγκεκριμένος τρόπος πολλαπλασιασμού χαρακτηρίστηκε **σωματική εμβρυογένεση**.

Πολλές επιτυχείς μελέτες ακολούθησαν που έδιναν έμφαση στην κληρονομική ομοιογένεια των φυτικών κυττάρων και την ικανότητά τους να παράγουν μορφολογικά και λειτουργικά φυσιολογικά έμβρυα και κατ' επέκταση ολόκληρα φυτά.

Η διαφοροποίηση σωματικών κυττάρων σε έμβρυα απαντά αποκλειστικά στο φυτικό βασίλειο τόσο στα Αγγειόσπερμα όσο και στα Γυμνόσπερμα. Η βιβλιογραφική έκρηξη των τελευταίων χρόνων με εργασίες που αναφέρονται στην επαγωγή σωματικών εμβρύων σε περισσότερες από 30 οικογένειες ανώτερων φυτών και εκατοντάδες φυτικά είδη, ερμηνεύεται με τη δυνατότητα παραγωγής εκατοντάδων εμβρύων από λίγα μόλις γραμμάρια φυτικού ιστού. Πιο διεξοδικά μελετημένα είναι η επαγωγή σωματικής εμβρυογένεσης *in vitro*, ενώ ελάχιστα είναι γνωστά για την *in vivo* σωματική εμβρυογένεση.

A.5.2. ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ

Τα μέχρι σήμερα διαθέσιμα πειραματικά δεδομένα είναι ανεπαρκή και μερικές φορές αντικρουόμενα, προκειμένου να διασαφηνίσουν πλήρως την μονοκυτταρική ή πολυκυτταρική προέλευση των σωματικών εμβρύων.

Ακολουθεί μια σύντομη αναφορά των κυριότερων ερευνητικών προσπαθειών που υποστηρίζουν τις δύο παραπάνω απόψεις.

A.5.2.1. Μονοκυτταρική προέλευση σωματικών εμβρύων

Οι αρχικές και παρωχημένες, πλέον, ερευνητικές προσπάθειες υποδεικνύουν την μονοκυτταρική προέλευση των σωματικών εμβρύων. Η συγκεκριμένη παραδοχή στηρίχτηκε στην αντιμετώπιση του γονιμοποιημένου ωαρίου στην ωοθήκη του υπέρου, ως ελεύθερου κυττάρου (Steward et al. 1970). Περιορισμένα είναι τα πειραματικά δεδομένα από μελέτες εμβρυοειδών που ξεκινούν από ελεύθερα-επιπλέοντα μεμονωμένα κύτταρα και υποστηρίζουν αυτήν την άποψη:

1. Οι Steward et al. (1967) κατέγραψαν την ύπαρξη ελεύθερων τόσο σφαιρικών και πιο εξελιγμένων μορφογενετικά σωματικών εμβρύων όσο και διπλών κυττάρων ή συσσωματωμάτων λίγων κυττάρων, που πιθανώς ήταν πρόδρομα των σφαιρικών εμ-

βρύων σε ιστοκαλλιέργειες καρότου (*Daucus carota*).

Τα πολύ νεαρά ζυγωτικά έμβρυα του καρότου αποτελούνται από μικρά κύτταρα, με πυκνό κυτταρόπλασμα και πλούσια αποθέματα αμύλου, ενώ αντίθετα τα κύτταρα των συσσωματωμάτων ήταν ώριμα και έντονα χυμοτοπιασμένα.

2. Οι Bäck-Hüsemann et al. (1970) ανακοίνωσαν τη δημιουργία σωματικών εμβρύων από μεμονωμένα κύτταρα καρότου μέσα σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα τα οποία δεν διαφοροποιούνταν άμεσα σε σωματικά έμβρυα, αλλά πρώτα διαιρούνταν για να δημιουργήσουν συσσωμάτωμα κυττάρων. Από αυτό το μητρικό συσσωμάτωμα διαμορφώνονταν ένα ή περισσότερα εμβρυοειδή. Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης στο εμβρυογενετικό συσσωμάτωμα, τα κύτταρα συρρικνώνονταν και αποκτούσαν πλούσιο κυτταρόπλασμα.

A.5.2.2. Πολυκυτταρική προέλευση σωματικών εμβρύων

Η πλειοψηφία των δημοσιεύσεων, παλαιότερων και νεότερων, συγκλίνουν στην άποψη ότι τα εμβρυοειδή των υγρών ιστοκαλλιεργειών προέρχονται από χαρακτηριστικά κυτταρικά συσσωματώματα (**εμβρυογενετικά συσσωματώματα**) και όχι άμεσα από ελεύθερα μεμονωμένα επιπλέοντα κύτταρα.

Τα εμβρυοειδή προέρχονται από μεμονωμένα κύτταρα, που βρίσκονται μέσα στο συσσωμάτωμα, ακολουθώντας μια διαδικασία ανάλογη της ζυγωτικής εμβρυογένεσης. Η εμφάνιση σωματικών εμβρύων με μια ή περισσότερες κοτυληδόνες ή άλλες δυσμορφίες δεν επηρεάζει την άποψη της πολυκυτταρικής προέλευσης των σωματικών εμβρύων.

Οι σημαντικότερες εργασίες που υποστηρίζουν την παραπάνω άποψη είναι:

1. Ο Halperin (1966 και 1967) πρότεινε ότι τα εμβρυοειδή προέρχονται από:
 - α) Επιφανειακά κύτταρα κυτταρικών συσσωματωμάτων τα οποία τα χαρακτήρισαν «προεμβρυογενετικές μάζες» ή «εμβρυϊκά συσσωματώματα».
 - β) Κύτταρα βυθισμένα μέσα στους ιστούς. Είναι κύτταρα μικρά, πλούσια σε κυτταρόπλασμα, με έντονο κυτταρικό πολλαπλασιασμό και κατάτμηση λόγω της αύξησης του κυτταρικού μεγέθους και της απομόνωσής τους στο εσωτερικό των συσσωματωμάτων.

Τα σωματικά κύτταρα που τελικά θα αποτελέσουν τα μητρικά των νέων φυτών, παίζουν το ρόλο ενός “αφυλετικού σποριόφυτου” ή των κονιδίων των μυκήτων ή των

απλανοσπορίων των φυκών. Η πιο πρόσφατη υπόθεση υποστηρίζει ότι ισχύει κάτι ανάλογο με τη διαδικασία απόκτησης ολοδυναμίας *in vivo*, η οποία συνδέεται με τη μειωτική διαίρεση, καθώς ένα είδος ψευδομείωσης έχει καταγραφεί και *in vitro*.

Αρχικά τα μητρικά κύτταρα των προεμβρυοειδών διαιρούνται εγκάρσια, ακολουθεί κάθετη διαίρεση του ακραίου κυττάρου ή και εγκάρσια διαίρεση του κυττάρου της βάσης, οπότε προκύπτει ένα άθροισμα τριών κυττάρων. Τα θυγατρικά κύτταρα του ακραίου κυττάρου δημιουργούν το πρώιμο σφαιρικό εμβρυοειδές, ενώ από το κύτταρο της βάσης προκύπτει ο αναρτήρας που αποτελείται από οκτώ περίπου κύτταρα. Τα προκύπτοντα εμβρυοειδή απελευθερώνονται και ανεξαρτητοποιούνται, όχι πριν το σφαιρικό στάδιο, αλλά συνήθως στο καρδιόσχημο ή στο στάδιο της τορπίλης.

Το παραπάνω μοντέλο σωματικής εμβρυογένεσης έχει διαφορές από τη ζυγωτική εμβρυογένεση του καρότου (*Daucus carota*), καθώς τα δύο αρχικά κύτταρα (ακραίο και βασικό) υφίστανται εγκάρσιες διαιρέσεις, προκύπτουν τέσσερα κύτταρα και αυτά στη συνέχεια μετασχηματίζονται σε οκτώ κύτταρα.

2. Σε ανάλογα αποτελέσματα κατέληξαν και οι Smith et al. (1974) σε υγρές καλλιέργειες καρότου (*Daucus carota*) τόσο σε θρεπτικό μέσο με 2,4-D όσο και χωρίς 2,4-D:

A) Στο θρεπτικό μέσο με 2,4-D πραγματοποίησαν χρώση και τομές στα εμβρυογενετικά συσσωματώματα και διαπίστωσαν ότι συνίστανται από τέσσερις κυτταρικούς τύπους:

- ♦ Μεγάλα κύτταρα χωρίς αμυλοκόκκους και μη ξεκάθαρης προέλευσης τα οποία, πιθανώς, εμπλέκονται στη διαμερισματοποίηση.
- ♦ Κεντρικά κύτταρα ενδιάμεσου μεγέθους με μικρούς αμυλόκοκκους, μεγάλο κεντρικό χυμοτόπιο, μικρό και συμπαγή πυρήνα, αχνό πυρηνίσκο και ένα σχετικά παχύ κυτταρικό τοίχωμα.
- ♦ Επιφανειακή κυτταρική στρώση 3-6 σειρών. Τα κύτταρα διαθέτουν πυκνό κυτταρόπλασμα, κεντρικό μεγάλο και αχνό πυρήνα, με έναν έντονα χρωματισμένο πυρηνίσκο που περιβάλλεται από ένα συσσωμάτωμα μικρών χυμοτοπίων. Περιέχουν περισσότερο RNA από τα υπόλοιπα κύτταρα και εκδηλώνουν υψηλή αφυδρογονωτική δράση.
- ♦ Μικρότερα κύτταρα με μεγάλους αμυλόκοκκους.

B) Στο θρεπτικό υπόστρωμα που δεν περιέχει 2,4-D, η σωματική εμβρυογένεση εκδηλώνεται στα επιφανειακά κύτταρα. Με την εμφάνιση των πρώτων εμβρυοειδών αυξάνονται τα μεγάλα χυμοτοπιασμένα κύτταρα των εξωτερικών

στρώσεων τα οποία, πιθανώς, όταν σπάζουν προκαλούν την απελευθέρωση των εμβρυοειδών, αν και τα εμβρυοειδή είναι δυνατό να παραμείνουν πάνω στο συσσωμάτωμα. Η τύχη των κεντρικών κυττάρων στο μέσο χωρίς αυξίνη ήταν ασαφής, αλλά πιθανολογείται ότι μεγεθύνονται και απελευθερώνονται στο θρεπτικό υπόστρωμα.

Οι παραπάνω μελέτες επιβεβαίωσαν από ποιες κυτταρικές στρώσεις, αλλά όχι από ποια συγκεκριμένα μεμονωμένα κύτταρα ξεκινάει η διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων, ενδεχομένως, λόγω αδυναμίας των χρησιμοποιηθέντων τεχνικών χρώσεων. Αν και όλα τα επιφανειακά κύτταρα είναι ισοδύναμα, όταν είναι μεμονωμένα μετασχηματίζονται σε σωματικά έμβρυα και αναστέλλουν τη σωματική εμβρυογένεση στα όμορα κύτταρά τους (π.χ. λόγω απώλειας αμύλου, απορρόφησης νερού, κυτταρικής επέκτασης κ.ά.), με αποτέλεσμα να προκύπτουν τα άδεια χυμοτοπιασμένα κύτταρα που παρατηρούνται ανάμεσα στα αναπτυσσόμενα εμβρυοειδή.

3. Οι Nomura et al. (1985a) από υγρές ιστοκαλλιέργειες υποκοτυλίων καρότου (*Daucus carota*), τα οποία προέρχονταν από φυτάρια, απομόνωσαν τρεις διακριτούς κυτταρικούς τύπους:
- Σφαιρικά κύτταρα διαμέτρου 12 μm που διαφοροποιούνται σε σωματικά έμβρυα σε ποσοστό 90,0%.
 - Οβάλ κύτταρα που μετασχηματίζονται σε σωματικά έμβρυα σε ποσοστό 10,0%.
 - Επιμηκυσμένα κύτταρα που δεν διαφοροποιούνται σε σωματικά έμβρυα σε καμία καλλιεργητική συνθήκη.

Στη συγκεκριμένη μελέτη η διαφοροποίηση των σωματικών εμβρύων από μεμονωμένα κύτταρα πραγματοποιείται σε δύο φάσεις:

- α. Στην πρώτη φάση μεμονωμένα κύτταρα εξελίσσονται σε εμβρυογενετικά κυτταρικά συσσωματώματα που αποτελούνται από μικρά, συμπαγή, ευδιάκριτα και εύκολα αποσπώμενα κύτταρα από τους γειτονικούς τους ιστούς, μετά από παροχή αυξίνης. Τα μητρικά κύτταρα των σωματικών εμβρύων αναγνωρίζονται εύκολα, καθώς χαρακτηρίζονται από πυκνό κυτταρόπλασμα, φτωχή χυμοτοπίωση και είναι ισοδύναμα με τον νεαρό ζυγώτη.
- β. Στη δεύτερη φάση τα εμβρυογενετικά κυτταρικά συσσωματώματα μετατρέπονται σε σωματικά έμβρυα σε θρεπτικό υπόστρωμα που δεν περιέχει φυτοαυξητικούς παράγοντες.

4. Η προέλευση των σωματικών κυττάρων μελετήθηκε και από τους Michaux-Ferrière et al. (1992) σε λεπτές τομές ανώριμων σπερμάτων από ιστοκαλλιέργειες καουτσουκόδεντρου (*Hevea brasiliensis*). Τα κύτταρα του κάλλου που προέκυπτε ήταν παρεγχυματικά, πλούσια σε πολυφαινόλες και διακρίνονταν σε δύο τύπους με υψηλό εμβρυογενετικό δυναμικό:

- Κύτταρα υψηλής πυρηνοπλάσματικής αναλογίας και με έντονα τα χαρακτηριστικά εμβρυογενετικών κυττάρων (μεμονωμένα, έντονα βασεόφιλο πυρηνίσκο και πλούσια αποθέματα αμύλου).

Συνήθως εντοπίζονταν στην επιφάνεια του κάλλου, απομονώνονταν σταδιακά το ένα από το άλλο και προσέδιδαν, τελικά, στον κάλλο χαλαρή εμφάνιση. Μερικά διαιρούνταν και διαφοροποιούνταν σε μικρά εκφυλισμένα προέμβρυα, είτε λόγω πρώιμης διαφοροποίησης, είτε λόγω ενεργοποίησης φαινολικών συστατικών. Στους κάλλους μεγάλης ηλικίας τα προέμβρυα πολυκυτταρικής προέλευσης δεν ήταν ορατά πλέον.

- Κύτταρα υψηλής μεριστωματικότητας στην περιφέρεια του κάλλου που διαιρούνταν έντονα και διέθεταν κυτταρόπλασμα με πλούσιο, πρωτεϊνικό περιεχόμενο. Από τα συγκεκριμένα κύτταρα προέκυπταν συμπαγείς μάζες από δύο ή τρεις σειρές διαφοροποιημένων κυττάρων και πλούσιων σε άμυλο και στη συνέχεια, στους λοβούς των κάλλων, περιφερειακές κυτταρικές στρώσεις με παρεγχυματική δομή. Εξαιτίας της διαφοροποίησης των περιφερειακών στρώσεων οι συμπαγείς δομές εμφανίζονταν απομονωμένες.

Με τη δεύτερη ανακαλλιέργεια η έντονη μεταβολική και μιτωτική δραστηριότητα των συμπαγών μεριστωματικών λοβών κατέληγε στη διόγκωση και στο διαχωρισμό των κυττάρων στο εσωτερικό του κάλλου. Τα επιδερμικά κυτταρικά στρώματα αποκόπτονταν και οι μεριστωματικοί λοβοί δημιουργούσαν μια επιδερμίδα που ήταν το πρώτο σημάδι διαφοροποίησης προεμβρύων, οπότε και εμφανίζονταν προαγγειώδεις δεσμίδες και κοτυληδόνες, δηλαδή σφαιρικά προέμβρυα πολυκυτταρικής προέλευσης, χωρίς αποθέματα αμύλου ή πρωτεϊνών.

Μετά την τρίτη ανακαλλιέργεια εμφανίζονταν καλά επιδερμοποιημένες εμβρυογενετικές μάζες που περιείχαν προκαμβιακές δεσμίδες και αποθέματα αμύλου και ξεκινούσε η διαμόρφωση των κοτυληδόνων. Στο τέλος της τρίτης ανακαλλιέργειας διαμορφωνόταν το μερίστωμα της ρίζας, αλλά έλειπε το α-

κραίο βλασθητικό μερίστωμα, γι' αυτό και οι μονοπολικές δομές δε βλάσταναν, αλλά μετατρέπονταν σε ανώριμα έμβρυα.

Οι ανακαλλιέργειες πραγματοποιούνταν κάθε 25 μέρες σε θρεπτικά μέσα που διέφεραν στη συγκέντρωση AgNO_3 , σακχαρόζης και φυτοαυξητικών ουσιών. Είναι πιθανό οι συγκεκριμένες συνθήκες καλλιέργειας να ευνοούσαν την πολυκυτταρική προέλευση των σωματικών εμβρύων. Ανάλογα ήταν τα πειραματικά αποτελέσματα σε κάλλους από φοίνικα (*Phoenix dactylifera*) και στις πρώτες εργασίες με καρότο (*Daucus carota*) (Bäcks-Hüsemann et al. 1970).

A.6. ΣΤΑΔΙΑ ΔΙΑΦΟΡΟΠΟΙΗΣΗΣ ΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ ΚΑΡΟΤΟΥ (*Daucus carota*)

Αν και έχουν δημοσιευτεί πληθώρα εργασιών που αναφέρονται σε εμβρυογενετικές καλλιέργειες διαφόρων φυτικών ειδών, οι αρχικές περιγραφές της σωματικής εμβρυογένεσης σε στερεές και υγρές ιστοκαλλιέργειες καρότου (*Daucus carota*), εξακολουθούν να παραμένουν μέχρι σήμερα το καλύτερο πειραματικό σύστημα για τη μελέτη και περιγραφή της σωματικής εμβρυογένεσης.

Τα κυριότερα στάδια εκδήλωσης του εμβρυογενετικού φυτικού προγράμματος είναι τα ακόλουθα:

- Επαγωγή και επιλογή εμβρυογενετικών κυττάρων.
- Μετατροπή των επιλεγμένων κυττάρων σε προεμβρυϊκές μάζες.
- Διπολική διαφοροποίηση, δηλαδή παραγωγή κοτυληδόνων και μεριστωμάτων βλαστού και ρίζας.
- Ωρίμανση σωματικών εμβρύων.
- Φύτρωση σωματικών εμβρύων.
- Μετατροπή σωματικών εμβρύων σε φυτάρια.
- Μεταφορά των φυταρίων στο χώμα.

Σε κάθε μορφογενετικό στάδιο υπάρχουν περιορισμοί και απώλειες που μειώνουν το δυνατό τελικό αριθμό των *in vitro* αναγεννώμενων φυτών.

Η διαδικασία της σωματικής εμβρυογένεσης αποτελείται από δύο διαδοχικές φάσεις:

- i) Την επαγωγική φάση.
- ii) Την αναπτυξιακή φάση ή φάση έκφρασης του εμβρυογενετικού δυναμικού.

Η επαγωγική φάση απαιτεί αυξίνη και στη διάρκειά της τα κύτταρα αποδιαφοροποιούνται,

πολλαπλασιάζονται σαν ανοργάνωτα συσσωματώματα και εγκαθίσταται η εμβρυογενετική τους μοίρα.

Το πρώτο αναγνωρίσιμο μορφογενετικό βήμα είναι το **σφαιρικό στάδιο**. Το στάδιο αυτό αντανακλά μια ισοδιαμετρική αύξηση μέσω μη προσανατολισμένων διαιρέσεων. Τα σφαιρικά έμβρυα προκύπτουν από τα μικρά κυτταρικά συσσωματώματα που επιλέγονται με διήθηση της υγρής καλλιέργειας στο τέλος της 1^{ης} εβδομάδας της καλλιέργειας και μεταφέρονται σε θρεπτικό μέσο χωρίς αυξίνη. Τα σφαιρικά έμβρυα των υγρών καλλιεργειών είναι αντίστοιχα με τα σφαιρικά προέμβρυα που προέρχονται από κάλλους, αλλά το πρωτόδερμά τους δεν είναι τόσο διακριτό, αφού στις υγρές ιστοκαλλιέργειες υπάρχει τάση απόρριψης της εξωτερικής στρώσης και τα κύτταρα στην εξωτερική περιοχή εμφανίζουν πρόωμη χυμοτοπίαση (ενδείξεις πρόωμης φύτρωσης του σπέρματος). Η δημιουργία προεμβρύου επηρεάζεται ελάχιστα από το φως, το σκοτάδι ή το ωσμωτικό δυναμικό του θρεπτικού υποστρώματος. Σε μερικές περιπτώσεις μια διαφοροποίηση που μοιάζει με αναρτήρα εμφανίζεται, αν και είναι πιο συχνή σε στερεό θρεπτικό μέσο, καθώς σε υγρό αναστέλλεται από την έντονη ανακίνηση.

Μετά από 2 ή 3 ημέρες πραγματοποιείται ισοδιαμετρική αύξηση και το σφαιρικό στάδιο μεταπίπτει στο επίμηκες στάδιο το οποίο σηματοδοτεί τη μετάβαση από την ισοδιαμετρική στη δίπολη συμμετρία και τη διαφοροποίηση των **καρδιόσχημων εμβρύων**. Πιθανώς η συγκεκριμένη μετάβαση οφείλεται στην παρουσία δίπλευρης διαβάθμισης στον εμβρυϊκό σάκο που μπορεί να είναι συνέπεια της δράσης ενδογενών παραγόντων. Η δημιουργία καρδιόσχημων εμβρύων χαρακτηρίζεται από τη δημιουργία των δύο κοτυληδόνων (η δημιουργία τους προκαλεί την αλλαγή στη συμμετρία από ακτινωτή σε δίπλευρη), την επιμήκυνση του υποκοτυλίου και την επαγωγή του ριζικού πόλου.

Στο τελικό εμβρυϊκό στάδιο, δηλαδή της **τορπίλης**, το έμβρυο διαθέτει κυλινδρικό σχήμα σαν αποτέλεσμα της πλευρικής επέκτασης και της επιμήκυνσης των κοτυληδόνων. Αν και η ανάπτυξη των κοτυληδόνων είναι αργή, οι δυσμορφίες των σωματικών εμβρύων είναι συχνές, καθώς η συμμετρία μεταπίπτει από ακτινωτή σε δίπλευρη.

Η ολοκλήρωση του μορφογενετικού μηχανισμού περιλαμβάνει την εξέλιξη της τορπίλης (σε συνθήκες έντονου φωτισμού και χαμηλού ωσμωτικού δυναμικού) σε **ώριμο φυτάριο**, πλούσιο σε αποταμιευτικά υλικά, 2,5-3 εβδομάδες μετά την αρχική επαγωγή. Στο στάδιο αυτό δεν απαιτείται η εξωγενής παροχή φυτοαυξητικών παραγόντων. Τα φυτάρια συνίστανται από πράσινες κοτυληδόνες, επιμηκυμένα υποκοτύλια και αναπτυγμένα ριζίδια που φέρουν καθαρά διαφοροποιημένα ριζικά τριχίδια. Τα φυτάρια έχουν τη δυνατότητα να συνεχίσουν να αυξάνονται στο υγρό μέσο ή μπορούν να μεταφυτευτούν σε στερεό μέσο με τελικό αποτέλεσμα την αναγέννηση

νέων φυτών.

A.7. ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ

Όταν ξεπεραστούν τα προβλήματα της επαγωγής σωματικών εμβρύων, *in vitro*, το δεύτερο και καθοριστικό βήμα είναι η μετατροπή των διαφοροποιημένων πλέον σωματικών εμβρύων σε ώριμα φυτάρια, η επιτυχής εγκατάστασή τους στο θερμοκήπιο και η περαιτέρω καλλιέργεια και ανάπτυξή τους στον αγρό. Οι δυσκολίες εφαρμογής του δεύτερου αυτού βήματος το καθιστούν έναν περιοριστικό παράγοντα για την εφαρμογή της σωματικής εμβρυογένεσης, ως γενικευμένης μεθόδου φυτικής αναγέννησης *in vitro*.

Η κύρια και πρωταρχική προϋπόθεση για να φυτρώσουν τα σωματικά έμβρυα είναι να έχουν λειτουργικά μεριστώματα βλαστού και ρίζας. Τόσο σε ζυγωτικά όσο και σε σωματικά έμβρυα έχει καταγραφεί περιορισμένη μεριστωματική ενεργότητα στο ακραίο μερίστωμα του βλαστού, με αποτέλεσμα να παραμένει ληθαργικό.

Ποικίλοι πειραματικοί χειρισμοί έχουν χρησιμοποιηθεί για την προώθηση της φύτευσης και της φυσιολογικής εξέλιξης των σωματικών εμβρύων σε πλήρη φυτά. Οι κυριότεροι είναι οι ακόλουθοι:

1. Η συνδυασμένη εφαρμογή BA και ψύχους συνεισφέρει στην εν μέρει υπερπήδηση του μεριστωματικού λήθαργου και προωθεί την αύξηση του βλαστού, χωρίς να επηρεάζει τη διαφοροποίηση των ριζών. Ειδικότερα το BA είναι γνωστό ότι αυξάνει την ενεργότητα των φωτοσυνθετικών ενζύμων και ενεργοποιεί τη χλωροφυλλική σύνθεση, με άμεσο αποτέλεσμα την αύξηση της φυλλικής επιφάνειας του φυτού και έμμεσα την προώθηση της φύτευσης των σωματικών εμβρύων.
2. Η επαγωγή σωματικών εμβρύων από σωματικά κύτταρα απαιτεί στα αρχικά στάδια της ιστοκαλλιέργειας υψηλή συγκέντρωση αυξίνης. Όταν τα σωματικά έμβρυα μεταφέρονται στο θρεπτικό μέσο που δεν περιέχει αυξίνη, πιθανώς απελευθερώνουν την αυξίνη που απορρόφησαν και αποθήκευσαν στα κύτταρά τους κατά την παραμονή τους στο αρχικό θρεπτικό μέσο και η οποία αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα για την περαιτέρω ωρίμανση και φύτευσή τους. Ο ενεργός άνθρακας έχει χρησιμοποιηθεί για τον περιορισμό της ανασταλτικής δράσης της εκλυόμενης αυξίνης, δεδομένου ότι απορροφά αρωματικά συστατικά που αποβάλλονται στο καλλιεργητικό μέσο και δρουν σαν αναστολείς της ανάπτυξης.

3. Ο έλεγχος της αφυδάτωσης των ανώριμων σωματικών εμβρύων συνιστά καθοριστική προϋπόθεση για τη βελτίωση της φυτρωτικότητας και της μετατροπής τους σε νεαρά φυτάρια σε ιστοκαλλιέργειες σόγιας (*Glycine max*) (Buchheim et al. 1989). Έχει προταθεί ότι μεταξύ πρώιμης και ώριμης εμβρυϊκής περιόδου είναι απαραίτητη η παρεμβολή μιας φάσης αφυδάτωσης, είτε σταδιακής είτε γρήγορης, αν και η πρώτη είναι πιο αποτελεσματική για την ανάπτυξη ώριμων φυτών. Η σταδιακή αφυδάτωση, σε αντίθεση με τη γρήγορη ή και την πλήρη απουσία αφυδάτωσης, πιθανώς, επιτρέπει την ενεργοποίηση αμύλου και πρωτεϊνικών αποταμιευτικών υλικών που απαιτούνται για την ωρίμανση και εξέλιξη των ανώριμων σωματικών εμβρύων.

Η μεταφορά των νεαρών φυταρίων στο χώμα γίνεται συνήθως σε μίγμα βερμικουλίτη-περλίτη, όπου παραμένουν καλυμμένα με μεμβράνη πολυαιθυλενίου, προκειμένου:

- α. Να μην παρεμποδίζεται η ελεύθερη ανταλλαγή των αερίων.
- β. Να επικρατούν συνθήκες υψηλής υγρασίας. Είναι γνωστό ότι τα φυτάρια, που μεγαλώνουν *in vitro* (100,0% υγρασία), δείχνουν μειωμένη ανάπτυξη κυτταρικών τοιχωμάτων και μη φυσιολογική στοματική λειτουργία, με αποτέλεσμα, όταν μεταφέρονται στο χώμα να έχουν μεγάλες υδατικές απώλειες. Αν στο στάδιο αυτό δεν προστατευτούν από τις απώλειες του διαπνεόμενου νερού, καθώς οι ρίζες και τα φύλλα αναπτύσσονται με έντονους αυξητικούς ρυθμούς, τα φυτάρια νεκρώνονται.
- γ. Να δέχονται την απαραίτητη ένταση φωτεινής ενέργειας. Η παροχή της φωτεινής ενέργειας γίνεται σταδιακά (ξεκινά από 20,0% και καταλήγει στον πλήρη φωτισμό), ώστε τα φυτά να γίνουν σκληρότερα και με έντονο πράσινο χρώμα.

A.8. ΕΙΔΗ ΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗΣ

Η σωματική εμβρυογένεση διακρίνεται σε **άμεση** και **έμμεση**. Οι έννοιες άμεση και έμμεση σωματική εμβρυογένεση αφορούν την επιγενετική κατάσταση και τη φυσιολογία των κυττάρων των εκφύτων τα οποία θα διαφοροποιηθούν σε σωματικά έμβρυα τη στιγμή του εμβολιασμού.

Η “αμεσότητα” ή μη της σωματικής εμβρυογένεσης προσδιορίζεται από τη φυσιολογική ή / και τη γονιδιακή «απόσταση» των κυττάρων των εκφύτων από την εμβρυϊκή κατάσταση. Είναι γενικά αποδεκτό ότι από την στιγμή που επάγεται η σωματική εμβρυογένεση, δεν υπάρχουν ουσιαστικές διαφορές μεταξύ άμεσης και έμμεσης σωματικής εμβρυογένεσης.

Οι Sharp et al. (1980) και Evans et al. (1981) μελέτησαν το μηχανισμό, αλλά και τα κύτταρα

που μπορούν να εκδηλώσουν το φαινόμενο της σωματικής εμβρυογένεσης και τα ταξινομήσαν σε δύο κατηγορίες:

1. Τα προεμβρυϊκά προκαθορισμένα κύτταρα ('pre-embryogenic' determined cells).

Τα κύτταρα αυτά είναι επιγενετικά εμβρυϊκά (π.χ. κύτταρα ζυγωτικού εμβρύου), δηλαδή ήδη τη στιγμή της απομόνωσής τους από το μητρικό ιστό και του εμβολιασμού τους, στο κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα, περιέχουν το μήνυμα για την εκδήλωση των μορφογενετικών σταδίων της εμβρυογένεσης. Το μήνυμα αυτό το διατηρούν σε όλη τη διάρκεια της ιστοκαλλιέργειας και δημιουργούν καλλιέργειες που περιέχουν σφαιρικά προέμβρυα ή προεμβρυϊκές μάζες.

Τα κύτταρα της συγκεκριμένης κατηγορίας είναι προγραμματισμένα για εμβρυϊκή διαφοροποίηση, χωρίς την παρεμβολή καλλογένεσης και γι' αυτό το φαινόμενο χαρακτηρίζεται **άμεση σωματική εμβρυογένεση**. Η άμεση σωματική εμβρυογένεση είναι σπάνιο φαινόμενο και έχει περιγραφεί σε λίγα φυτικά είδη, όπως στο σέλινο (*Ranunculus sceleratus*), στο καρότο (*Daucus carota*) κ.ά..

Οι Maheswaran et al. (1985 & 1987) πρότειναν ότι το πρώτο σήμα για την επαγωγή άμεσης σωματικής εμβρυογένεσης είναι η μετάβαση από την κανονική αντικλινή διαίρεση στην ακανόνιστη περικλινή και πλάγια διαίρεση των επιδερμικών κυττάρων, αν και ανάλογες διαιρέσεις έχουν καταγραφεί και κατά την έμμεση. Οι καλλιεργητικές και φυσιολογικές συνθήκες που απαιτούνται για την εκδήλωση του συγκεκριμένου φαινομένου είναι:

- i) Ειδικά προκαθορισμένη εμβρυϊκή γενετική κατάσταση των κυττάρων την οποία ήδη διαθέτουν, ενώ βρίσκονται μέσα στα όρια του μητρικού ιστού.
- ii) Απώλεια ελέγχου της φυσιολογικής διακυτταρικής επικοινωνίας των ιστών και εμφάνιση πολικότητας για τη διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων.
- iii) Κατάλληλα θρεπτικά συστατικά του τεχνητού υποστρώματος (π.χ. σακχαρόζη, φυτοαυξητικές ουσίες κ.λ.π.) τα οποία εξασκούν κυρίως μια ποσοτική, μη αποτρεπτική επίδραση, παρά ένα εναρκτήριο μήνυμα διαφοροποίησης.

Οι παραπάνω παράγοντες είναι πιθανό να μεσολαβούν στη φυσιολογική διακυτταρική επικοινωνία των ιστών και / ή να συμμετέχουν στην επαγωγή της μιτωτικής δραστηριότητας στις περιπτώσεις που η προηγούμενη επικοινωνία έχει εξασθενήσει. Η παρουσία ενός συνεχούς ερεθίσματος για μιτωτική διαίρεση σε κύτταρα που είναι σχετικά αποδιαφοροποιημένα και προκαθορισμένα για εμβρυογένεση, μπορεί να τα αποδεσμεύει από το μορφογενετικό έλεγχο των παρακείμενων κυττάρων και ειδικό-

τερα του μητρικού ζυγωτικού εμβρυϊκού άξονα. Η απεμπλοκή των κυττάρων από τη μητρική μορφογενετική εξάρτηση είναι απαραίτητη προϋπόθεση για την επακόλουθη κυτταροδιαίρεση, την αποφυγή παραγωγής ανοργάνωτου κάλλου, την έναρξη ενός ανεξάρτητου εμβρυογενετικού μονοπατιού και την τελική παραγωγή αυτοτελών σωματικών εμβρυοειδών.

Η άμεση σωματική εμβρυογένεση, όταν εκδηλώνεται απουσία εξωγενούς αυξίνης, χαρακτηρίζεται από μια μικρής διάρκειας αναπτυξιακή περίοδο, από τη στιγμή της επαγωγής των κοτυληδόνων και μέχρι την έναρξη της ωρίμανσης του σπέρματος. Αποτελεί, δυνητικά, ένα μέσο μαζικής παραγωγής φυταρίων, χωρίς να προαπαιτείται εκτεταμένη κυτταρική αποδιαφοροποίηση, ακόμα και μετά από μακροχρόνια παραμονή και διαδοχικές ανακαλλιέργειες των φυτικών ιστών *in vitro*.

2. Τα επαχθέντα εμβρυογενετικά προκαθορισμένα κύτταρα (*induced embryogenic determined cells*). Τα συγκεκριμένα κύτταρα είναι “εν δυνάμει” εμβρυϊκά, δηλαδή απαιτείται μια ριζική επιγενετική ενεργοποίηση (epigenetic switch), κυρίως σε γονιδιακό επίπεδο, της δυνατότητάς τους να εκδηλώσουν το φαινόμενο της σωματικής εμβρυογένεσης.

Αρχικά επάγεται η δημιουργία κάλλου και στη συνέχεια μερικά κύτταρά του λαμβάνουν το μήνυμα για διαφοροποίηση σε σωματικά έμβρυα, οπότε γίνονται λειτουργικά ισοδύναμα με τα κύτταρα της πρώτης κατηγορίας. Πραγματοποιούν αναπτυξιακά στάδια, ανάλογα των προεμβρυϊκών προκαθορισμένων κυττάρων, καθώς απαιτείται η παρεμβολή καλλογένεσης, προκειμένου να ενεργοποιηθεί το εμβρυϊκό δυναμικό τους. Το φαινόμενο αυτό χαρακτηρίζεται **έμμεση σωματική εμβρυογένεση**.

Τμήματα ώριμων φυτών ή ζυγωτικών εμβρύων χρησιμοποιούνται σαν έκφυτα για την επαγωγή έμμεσης σωματικής εμβρυογένεσης, όταν είναι επιθυμητή η σωμακλωνική παραλλακτικότητα. Τα επιλεχθέντα έκφυτα εμβολιάζονται σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα (συνήθως με υψηλή συγκέντρωση αυξίνης) και τα σωματικά τους κύτταρα πραγματοποιούν ανοργάνωτους, ασύγχρονους και μη εμβρυϊκούς μιτωτικούς κύκλους οι οποίοι καταλήγουν στη δημιουργία κάλλου. Αρκετοί ερευνητές υποστηρίζουν ότι ένα μικρό μόνο ποσοστό των κυττάρων του εκφύτου, είτε των επιφανειακών στρωμάτων είτε αυτών που βρίσκονται σε φυσική επαφή με το θρεπτικό υπόστρωμα, συνεισφέρουν στη δημιουργία του κάλλου. Ο κάλλος είναι ετερογενής και αποτελείται από ποικίλους κυτταρικούς τύπους, μεταξύ των οποίων και τα κύτταρα που θα εξελιχθούν σε εμβρυϊκά και τα οποία μπορεί να είναι μεμονωμένα ή να

αποτελούν πολυκυτταρικές ομάδες. Ο μη εμβρυογενετικός κάλλος (χαλαρός, εύθροπος με συσσωματώματα μικρών και πλούσιων σε κυτταρόπλασμα κυττάρων) παρεμβάλλεται μεταξύ του εμβρυογενετικού συμπαγούς ιστού των εκφύτων μέχρι την εμφάνιση των πρώτων αναγνωρίσιμων εμβρυϊκών δομών (Roberts 1991).

Όταν ο κάλλος μεταφερθεί σε θρεπτικό μέσο που περιέχει χαμηλή συγκέντρωση ή και καθόλου αυξίνη, τα επαχθέντα προέμβρυα εξελίσσονται σε δίπολα έμβρυα μέσω μιας μη συγχρονισμένης πορείας και αν οι καλλιεργητικές συνθήκες το επιτρέπουν φυτρώνουν και εξελίσσονται σε πλήρη νέα φυτάρια.

Τόσο η άμεση όσο και η έμμεση σωματική εμβρυογένεση έχουν πλεονεκτήματα, αλλά και περιορισμούς ανάλογα με τις εκάστοτε εφαρμογές τους. Είναι γνωστό ότι η φυτική αναγέννηση μέσω καλλογένεσης, όπως συμβαίνει στην έμμεση σωματική εμβρυογένεση, συνδέεται συχνά με γενετικές και κυτταροπλασματικές παραλλαγές οι οποίες δεν είναι πάντα επιθυμητές γι' αυτό και η άμεση σωματική εμβρυογένεση βρίσκει καλύτερες εφαρμογές στη βελτίωση των φυτικών ειδών (π.χ. δημητριακών).

A.9. ΔΕΥΤΕΡΟΓΕΝΗΣ ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ

Έχουν καταγραφεί περιπτώσεις σωματικών εμβρύων που προέρχονται είτε από άμεση είτε από έμμεση σωματική εμβρυογένεση, τα οποία αντί να ωριμάσουν φυσιολογικά και να εξελιχθούν σε ολοκληρωμένα φυτάρια, δίνουν διαδοχικούς κύκλους νέων σωματικών εμβρύων. Τα νέα σωματικά έμβρυα προέρχονται, συνήθως, από διαφοροποίηση επιδερμικών κυττάρων κοτυληδόνων ή υποκοτυλίων ονομάζονται **δευτερογενή έμβρυα** και το φαινόμενο χαρακτηρίζεται **δευτερογενής σωματική εμβρυογένεση**.

Για τη διαφοροποίηση δευτερογενών σωματικών εμβρύων τα έκφυτα εμβολιάζονται σε θρεπτικό μέσο με υψηλή συγκέντρωση αυξίνης και ανακαλλιεργούνται σε θρεπτικό μέσο που περιέχει την ίδια ή χαμηλότερη συγκέντρωση αυξίνης.

Για την προέλευση των δευτερογενών σωματικών εμβρύων έχουν διατυπωθεί διάφορες απόψεις. Οι διαδοχικοί κύκλοι παραγωγής σωματικών εμβρύων είναι πιθανό, να εκδηλώνονται αυθόρμητα και να διατηρούνται λόγω της παρεμπόδισης της ολοκλήρωσης του αναπτυξιακού σταδίου της πρωτογενούς σωματικής εμβρυογένεσης, με αποτέλεσμα να μην μπορούν να εξελιχθούν σε φυτάρια και να επαναλαμβάνουν τον αέναο κύκλο παραγωγής νέων σωματικών εμβρύων.

Η ελεγχόμενη επαγωγή και αναστολή των διαδοχικών κύκλων της δευτερογενούς σωματικής εμβρυογένεσης προσφέρουν τη μοναδική δυνατότητα μαζικής παραγωγής σωματικών εμβρύων και τελικά ώριμων φυταρίων για μεγάλο χρονικό διάστημα. Η αξία και οι πρακτικές εφαρμογές της ελεγχόμενης, δευτερογενούς σωματικής εμβρυογένεσης μπορούν να συνοψιστούν στα παρακάτω:

1. Τα δευτερογενή σωματικά έμβρυα απομονώνονται εύκολα, χωρίς να καταστρέφεται ο μητρικός ιστός και αναπτύσσονται ραγδαία σε φυσιολογικά φυτάρια, όταν μεταφέρονται σε θρεπτικό μέσο που δεν περιέχει φυτοαυξητικές ουσίες.
2. Προσφέρει τη δυνατότητα γρήγορης φυτικής αναγέννησης από τις προεμβρυϊκές μάζες με παρεμβολή ελάχιστης κυτταρικής αποσταθεροποίησης και αποδιαφοροποίησης, αφού η πολυκυτταρική προέλευση των σωματικών εμβρύων εξασφαλίζει τη σωμακλωνική σταθερότητα.
3. Αποτελεί πρόσφορο γενετικό εργαλείο, βραχυπρόθεσμα για την παραγωγή τροποποιημένων γενετικά κυττάρων και μακροπρόθεσμα για την παραγωγή διαγονιδιακών φυτών.
4. Τέλος, προσφέρει τη δυνατότητα για παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών (*in vitro*) που απαντούν σε εμβρυϊκούς ιστούς, όπως λιπίδια και αποταμιευτικές πρωτεΐνες σπερμάτων. Η συγκεκριμένη εφαρμογή, όμως, δεν ενδείκνυται για εμπορική χρήση, δεδομένου ότι αποτελεί μια ιδιαίτερα δαπανηρή διαδικασία και εμπορικά μη βιώσιμη.

A.10. ΔΥΣΜΟΡΦΙΕΣ ΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ

Σε αρκετές ιστοκαλλιέργειες αναπτύσσονται πληθυσμοί σωματικών εμβρύων που ωριμάζουν ασύγχρονα, με αποτέλεσμα όλα τα μορφογενετικά στάδια να είναι ταυτόχρονα παρόντα σε όλη τη διάρκεια της ιστοκαλλιέργειας. Η μη συγχρονισμένη εμφάνιση των μορφογενετικών σταδίων της εμβρυογένεσης οδηγεί, εκτός των άλλων και στην εμφάνιση ανώμαλων σωματικών εμβρύων με έντονες μορφολογικές δυσμορφίες. Τα δύσμορφα σωματικά έμβρυα που προκύπτουν ονομάζονται **“neomorphs”** ή **“embryonic budding”** και εμφανίζονται συνήθως σε θρεπτικό μέσο με υψηλές συγκεντρώσεις αυξίνης.

Ο όρος “neomorphs” προτάθηκε για πρώτη φορά από τον Waris (1959 και 1962) για την περιγραφή ειδικών τύπων αυτοαναπαραγόμενων φυτών σε καλλιέργειες μάραθου (*Oenanth*

aquatica) και μαϊντανού (*Oenanthe lachenalii*) που περιείχαν περίσσεια γλυκίνης και τα οποία συνέχιζαν να αναπαράγονται και όταν απομακρυνόταν το συγκεκριμένο αμινοξύ.

Τα “neomorphs” παρομοιάζουν με φυτάρια, ανάλογα των καρδιόσχημων φυταρίων έχουν θαλλοειδή μορφή και διαθέτουν έναν νέο τύπο φύλλων ανάλογο, αλλά όχι ταυτόσημο, με των κοτυληδόνων. Οι κοτυληδόνες των “neomorphs” διαφέρουν από τις φυσιολογικές, καθώς η ικανότητά τους για επιμήκυνση είναι μεγαλύτερη με αποτέλεσμα να αποκτούν ταινιοειδή μορφή.

Η δυσλειτουργία των ανώμαλων σωματικών εμβρύων δεν επηρεάζει μόνο την φυσιολογική τους ωρίμανση και την ελλιπή ομοιομορφία των παραγόμενων κλώνων, αλλά ευθύνεται και για το μικρό ποσοστό φύτρωσής τους που αποτελεί καθοριστική προϋπόθεση για την επιτυχή φυτική αναγέννηση.

Στα “neomorphs” καταγράφηκε αυξημένος αριθμός χρωμοσωμάτων, αν και είναι δύσκολο να διερευνηθεί, αν πρόκειται για πολυπλοειδία ή πολυσωμία. Η αστάθεια της ιστοκαλλιέργειας μπορεί να συνδέεται με τη μεταβλητότητα του χρωμοσωμικού αριθμού (Reinert et al. 1977). Η αυξημένη παρουσία χρωμοσωμάτων καταδεικνύει ότι ο πυρήνας άμεσα ή έμμεσα επηρεάζεται από την προσθήκη των αμινοξέων.

Είναι πιθανό, οι δυσμορφίες των σωματικών εμβρύων να οφείλονται σε πυρηνικούς παράγοντες, καθώς τα αμινοξέα και άλλοι παράγοντες του θρεπτικού μέσου (φως, θερμοκρασία, pH κ.ά.) έχουν μορφογενετικά αποτελέσματα σε διάφορα κυτταρικά οργανίδια. Η μορφογενετική τους δράση σχετίζεται, κυρίως με την επίδρασή τους στη σύνθεση ενζύμων μη φυσιολογικής σύστασης και πρωτεϊνών. Ενδεικτικά αναφέρουμε ότι η σύνθεση χλωροφύλλης μειώνεται ή αναστέλλεται πλήρως, ανάλογα με τη συγκέντρωση των αμινοξέων, του pH κ.ά.

Τέλος, σε ιστοκαλλιέργειες εκφύτων από καουτσουκόδεντρο (*Hevea brasiliensis*) (Michaux-Ferriere et al. 1992) καταγράφηκε η εμφάνιση μίας ή τριών, ασύντακτων ή ενωμένων και ασύγχρονα αναπτυσσόμενων κοτυληδόνων.

Οι παραπάνω δυσμορφίες, πιθανώς να σχετίζονται με την εμφάνιση προκαμβιακών δεσμίδων κάθετα στον επιμήκη άξονα του εκφύτου και ασύμμετρα κατανεμημένων μέσα στους ιστούς στα πολύ αρχικά αναπτυξιακά στάδια. Η πρώιμη ανάπτυξη προκαμβιακών δεσμίδων, ο προσανατολισμός των δομών πολυκυτταρικής προέλευσης και η έλλειψη πολικότητας περιορίζουν την ομοιόμορφη διανομή των θρεπτικών συστατικών στα κύτταρα του εκφύτου. Η εμφάνιση του προαγγειώδους συστήματος στα σωματικά έμβρυα πολύ γρηγορότερα απ’ ότι στα ζυγωτικά έμβρυα, πιθανώς είναι μια προσπάθεια υποκατάστασης του ενδοσπερμίου το οποίο είναι επιφορτισμένο με τη θρεπτική υποστήριξη του ζυγωτικού εμβρύου μέσα στο σπέρμα, αλλά δεν υπάρχει στα σωματικά έμβρυα.

Η ασύγχρονη ανάπτυξη των κοτυληδόνων κάνει πιο σπάνια την εμφάνιση καρδιόσχημων εμβρύων. Αντίθετα η ανάπτυξη του προαγγειώδους συστήματος σε μετέπειτα αναπτυξιακά στάδια προωθεί την πιο ομοιόμορφη κατανομή των αυξητικών παραγόντων και επιτρέπει την ανάπτυξη και της δεύτερης κοτυληδόνας.

A.11. ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗΣ

A.11.1. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ & ΦΥΤΙΚΗ ΟΝΤΟΓΕΝΕΣΗ

Η αρχική περιγραφή της σωματικής εμβρυογένεσης σε κύτταρα καρότου (*Daucus carota*), 50 περίπου χρόνια πριν, ήταν μόνο η αρχή της αναγνώρισής της σαν ένα σημαντικό μονοπάτι για φυτική αναπαραγωγή, αλλά και σαν ένα δυναμικό μοντέλο για τη βασική έρευνα και μελέτη της φυτικής εμβρυογένεσης.

Αποτελεί ένα πολλά υποσχόμενο πειραματικό σύστημα-εργαλείο για τη μελέτη της κυτταρικής διαφοροποίησης και ανάπτυξης, του γονιδιακού μετασχηματισμού φυτικών ειδών, της κλωνοποίησης γονιδίων, της έκφρασης και της πρόκλησης καταπόνησης και της μελέτης της φυσιολογίας φυταρίων. Τυπικές γενετικές προσεγγίσεις που περιλαμβάνουν μεταλλαξιογένεση, χαρακτηρισμό των μεταλλάξεων και ταυτοποίηση των ελαττωματικών φαινοτύπων σε σωματικά έμβρυα, ανοίγουν νέες προοπτικές στη μελέτη της εμβρυογένεσης των φυτικών ευκαρυωτικών οργανισμών.

Τα ζυγωτικά φυτικά έμβρυα, τοποθετημένα μέσα σε αλλεπάλληλες στρώσεις προστατευτικών σπερματικών περιβλημάτων, δεν είναι προσιτά για μικροχειρουργικές επεμβάσεις, αντίθετα με τα σωματικά φυτικά έμβρυα που είναι δεκτικά σε τέτοιου είδους πειραματικούς χειρισμούς. Τα σωματικά έμβρυα συνιστούν ένα ιδιαίτερα εύχρηστο υλικό για την πρόκληση μεταλλαξιογένεσης, καθώς παρέχουν τη δυνατότητα παραγωγής μεγάλων ποσοτήτων μεταγραφημάτων που αποτελούν απαραίτητη προϋπόθεση για τη μελέτη της μεταγραφικής και της μετα-μεταγραφικής ρύθμισης.

Πολλές βασικές αρχές της κυτταρικής διαφοροποίησης, οντογένεσης και ανάπτυξης των φυτών αποκαλύπτονται από την πρόκληση και τη μελέτη μεμονωμένων γονιδιακών μεταλλάξεων που παρεμποδίζουν την έκφραση ρυθμιστικών γονιδίων, τα προϊόντα των οποίων αποτελούν απαραίτητη προϋπόθεση για την εκδήλωση και ολοκλήρωση του εμβρυογενετικού προγράμματος. Οι παραπάνω γονιδιακές μεταλλάξεις οδηγούν στη δημιουργία μεταλλαγμένων κυτταρικών

σειρών που έχουν τη δυνατότητα να εκδηλώσουν το φαινόμενο της σωματικής εμβρυογένεσης παρουσία κάποιου προωθητικού παράγοντα, ενώ παρεμποδίζονται, όταν προστίθεται κάποιος ανασταλτικός παράγοντας (συνήθως αύξηση της θερμοκρασίας).

Η βιοχημική και μοριακή προσέγγιση της σωματικής εμβρυογένεσης, η κατανόηση και διαλεύκανση των αναπτυξιακών επιπτώσεων κάθε μετάλλαξης στην εμβρυογένεση (π.χ. αναστολή επιδερμικής ανάπτυξης, ελαττωματική τοποθέτηση ή πρόωμη προαγγειώδη διαφοροποίηση, απουσία ακραίων μεριστωμάτων κ.ά.) μπορούν να διευκολυνθούν από τη διαθεσιμότητα ειδικών μοριακών δεικτών για τα συγκεκριμένα αναπτυξιακά γεγονότα. Το σωματικό εμβρυϊκό σύστημα έχει μόλις ξεκινήσει να αποκαλύπτει τη δυναμική του παρέμβαση και στην αναγνώριση τέτοιων δεικτών.

Η διεξοδική μελέτη της σωματικής εμβρυογένεσης σε καμία περίπτωση δεν πρέπει να οδηγήσει σε περιθωριοποίηση τη μελέτη για την κατανόηση της ζυγωτικής εμβρυογένεσης (Etienne et al. 1993). Οι παραπάνω πειραματικοί χειρισμοί είναι δυνατό να πραγματοποιηθούν και σε ζυγωτικά έμβρυα [π.χ. μέσω της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) κ.ά.] και τα αποτελέσματά τους να χρησιμοποιηθούν για επιβεβαίωση και διασταύρωση των δεδομένων που προκύπτουν από ανάλογες μελέτες σε σωματικά έμβρυα. Ίσως το κλειδί για την πληρέστερη κατανόηση της φυτικής εμβρυογένεσης να βρίσκεται κάπου στο συγκεκριμένο της μελέτης της ζυγωτικής και της σωματικής εμβρυογένεσης.

A.11.2. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ & ΦΥΤΙΚΗ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗ

Η δυνατότητα επαγωγής και απόλυτου ελέγχου της φυτικής αναγέννησης μέσω της σωματικής εμβρυογένεσης αποτελεί ένα ισχυρό βιοτεχνολογικό εργαλείο, δεδομένου ότι συγκεντρώνει πολλά πλεονεκτήματα έναντι των παραδοσιακών μεθόδων:

1. Τα αναγεννηθέντα φυτά, έχοντας αναπτυχθεί σε ασηπτικές συνθήκες, είναι αποστειρωμένα και απολύτως υγιή.
2. Τα φυτά που προκύπτουν από διαφοροποίηση σωματικών κυττάρων είναι πιο ανθεκτικά σε τοξίνες, άλατα, μεταλλαξιογόνους παράγοντες, ασθένειες (μυκητιώσεις, ιώσεις κ. ά.) και δεν προσβάλλονται εύκολα από έντομα ή άλλα παράσιτα, με αποτέλεσμα να μην απαιτούνται εκτεταμένοι ψεκασμοί με εντομοκτόνα και ζιζανιοκτόνα.
3. Η παραγωγή φυτών δεν εξαρτάται από την εποχή ή τις περιβαλλοντικές συνθήκες

(θερμοκρασία, υγρασία, φωτοπερίοδο κ. ά.), γεγονός που επιτρέπει την αδιάκοπη φυτική παραγωγή.

4. Υπάρχει δυνατότητα απόκτησης ομοιογενών φυτών ανθεκτικών σε συνθήκες καταπόνησης (ξηρασία, υψηλή αλατότητα κ.ά.) και με ικανοποιητική χρωμοσωμική σταθερότητα. Τα φυτά που προέρχονται από διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων εμφανίζουν συνήθως μικρή σωμακλωνική παραλλακτικότητα, σε αντίθεση με τα φυτά που προέρχονται από οργανογένεση.
5. Η μορφολογική και λειτουργική αυτάρκεια των σωματικών εμβρύων σε συνδυασμό με την εύκολη απομόνωσή τους από τους μητρικούς ιστούς των εκφύτων προσφέρει τη δυνατότητα για άμεση παραλαβή των σωματικών εμβρύων και μεταφορά τους στο θερμοκήπιο ή στον αγρό, ελαχιστοποιώντας ή εξαλείφοντας την ανάγκη διαδοχικών μεταφυτεύσεων και μειώνοντας παράλληλα το κόστος παραγωγής ανά φυτάριο.
6. Πολλά δασικά είδη απαιτούν μέχρι και 50 χρόνια για να αναπαραχθούν. Η χρονοβόρα αναγέννηση μπορεί εύκολα να ξεπεραστεί με την επαγωγή σωματικών εμβρύων. Η προσφορά της σωματικής εμβρυογένεσης είναι ιδιαίτερα σημαντική στον μαζικό πολλαπλασιασμό επιθυμητών γονότυπων, στην αναδάσωση και στην μακροπρόθεσμη αύξηση της δασικής παραγωγικότητας (ξύλου κ.ά.), υπερπηδώντας πολλά προβλήματα που συνδέονται με την ωρίμανση και τη φυτρωτική συμπεριφορά των φυταρίων στον αγρό.
7. Η δημιουργία γενετικά τροποποιημένων φυτικών ποικιλιών, η κλωνοποίηση και η κρυοσυντήρηση επιλεγμένων φυτικών ειδών με υψηλούς φωτοσυνθετικούς ρυθμούς, για γρήγορο και μαζικό πολλαπλασιασμό επιθυμητών ή δύσκολα πολλαπλασιαζόμενων φυτικών ποικιλιών με απώτερο στόχο την εμπορική τους εκμετάλλευση είναι επίσης εφικτά (Torreblanca et al. 2010).
8. Μεγάλος αριθμός φυταρίων μπορεί να διατηρηθεί *in vitro* σε μικρό χώρο (π.χ. σε θάλαμο ιστοκαλλιέργειών με θερμοκρασία που κυμαίνεται από 15-30 °C ή σε ψυχρό θάλαμο 0-5 °C) μέσω διαδοχικών ανακαλλιέργειών, προκειμένου να αποφεύγεται ο γηρασμός και ο σταδιακός τους εκφυλισμός.
9. Οι εμβρυογενετικοί κάλλοι, οι υγρές εμβρυϊκές καλλιέργειες, καθώς και τα σωματικά έμβρυα προσφέρουν τη δυνατότητα δημιουργίας πρωτοπλαστών από τους οποίους αναγεννούνται ολόκληρα φυτά.
10. Οι καλλιέργειες ανθρώπων και μικροσπόρων μπορούν να διαφοροποιηθούν σε απλο-

ειδή σωματικά έμβρυα.

11. Η δημιουργία τράπεζας γονιδιώματος και τεχνητών σπερμάτων τα οποία εγκλείονται σε προστατευτικά περιβλήματα (εγκλεισμός σε κάψουλες και αποξήρανση) αποτελεί μια ακόμα σημαντική εφαρμογή της σωματικής εμβρυογένεσης (Fujii et al. 1987). Τα τεχνητά σπέρματα μπορούν, όπως ακριβώς τα φυσικά, να αποθηκευτούν, να μεταφερθούν και να εγκατασταθούν στο θερμοκήπιο ή στον αγρό. Η διαδικασία παραγωγής τεχνητών σπερμάτων συναγωνίζεται τη διαδικασία παραγωγής βελτιωμένων σπερμάτων και είναι πιο εύχρηστο σύστημα από τον μικροπολλαπλασιασμό.
12. Τέλος, είναι δυνατή η μελέτη του φυτικού αναπτυξιακού προγράμματος, καθώς η μηχανοποίηση και αυτοματοποίηση των καλλιεργητικών εμβρυϊκών συστημάτων (π.χ. εφαρμογή βιοαντιδραστήρων) μπορούν να αποδώσουν έναν τεράστιο αριθμό φυτών και παράλληλα να μειώσουν, δραστικά, χρονοβόρους και επίπονους χειρισμούς (Maheswaran et al. 1985).

A.12. ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗΣ

Μερικοί από τους κυριότερους περιορισμούς της εφαρμογής της σωματικής εμβρυογένεσης ως γενικευμένου συστήματος διερεύνησης των φυτικών αναπτυξιακών σταδίων και της φυτικής αναγέννησης είναι οι εξής:

1. Μερικά από τα πλέον σημαντικά από οικονομικής άποψης καλλιεργούμενα είδη (π.χ. δημητριακά) αναγεννούνται με μεγάλη δυσκολία μέσω σωματικής εμβρυογένεσης. Τα συγκεκριμένα είδη έχουν τη δυνατότητα να δώσουν σωματικά έμβρυα μόνο, όταν καλλιεργούνται σε τροποποιημένο θρεπτικό μέσο στο οποίο έχουν προστεθεί κατάλληλοι προωθητικοί παράγοντες (π.χ. γλυκοπρωτεΐνες κ.ά.) οι οποίοι εκκρίνονται και απομονώνονται από εμβρυϊκές καλλιέργειες.
2. Η επιμήκυνση του χρόνου παραμονής των εκφύτων *in vitro* συσσωρεύει μεταλλάξεις και σωμακλωνική παραλλακτικότητα που παρακωλύουν την ανάλυση των εμβρυϊκών μεταλλάξεων και κάθε άλλο γενετικό χειρισμό.

Η αναγέννηση φυταρίων μέσω κάλλου δε θεωρείται αξιόπιστη μέθοδος φυτικής αναγέννησης, αφού η γενετική σταθερότητα των νέων φυταρίων είναι αμφισβητήσιμη και η παραλλακτικότητα τους δε βρίσκεται πολλές φορές μέσα στα γενικώς αποδεκτά όρια. Η καλλογένεση συνοδεύεται από αυξημένη ανευπλοειδία και σταδιακό γη-

ρασμό των κυττάρων, φαινόμενα τα οποία οδηγούν στην απώλεια της μορφογενετικής ικανότητας των καλλιεργούμενων κάλλων.

3. Το εμβρυογενετικό δυναμικό των περισσότερων κυτταρικών σειρών έχει περιορισμένο χρόνο ζωής (1-2 χρόνια). Πιθανές αιτίες μείωσης του εμβρυογενετικού δυναμικού μιας κυτταρικής καλλιέργειας είναι:
 - α. Η αρχική επιλογή και ο εμβολιασμός μη εμβρυογενετικών κυττάρων ή κυττάρων με χαμηλή εμβρυογενετική αντίδραση.
 - β. Η υψηλή κυτταρική πυκνότητα της καλλιέργειας η οποία ευνοεί την αύξηση των μη εμβρυογενετικών κυττάρων, σε αντίθεση με τη χαμηλή κυτταρική πυκνότητα η οποία ευνοεί την αύξηση και διαφοροποίηση των εμβρυϊκών κυττάρων.
 - γ. Οι μεταλλάξεις και οι ρυθμιστικές-επιγενετικές τροποποιήσεις που υφίστανται τα εμβρυϊκά κύτταρα, με αποτέλεσμα να χάνουν σταδιακά την αναγεννητική τους ικανότητα.

Αν και η παραγωγή και η διατήρηση κυτταρικών σειρών με υψηλό εμβρυογενετικό δυναμικό δεν αποτελούν ένα ανυπέρβλητο εμπόδιο για την αναγέννηση φυτών *in vitro*, απαιτούν επιδέξιους, επίπονους και χρονοβόρους χειρισμούς.

4. Εμφάνιση ασυνήθιστων και ανώμαλων φαινοτύπων στις ιστοκαλλιέργειες (π.χ. πολλαπλές κοτυληδόνες κ.ά.).
5. Τέλος, τα νεαρά φυτάρια που προκύπτουν από σωματικά έμβρυα ή από υγρές εμβρυϊκές κυτταρικές σειρές εμφανίζουν, συχνά, μειωμένη γονιμότητα ή είναι εντελώς στérια.

A.13. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗ ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ

Τα φυτικά κύτταρα, προκειμένου να διαφοροποιηθούν σε σωματικά έμβρυα *in vitro*, είναι απαραίτητη η αλληλεπίδρασή τους με πληθώρα εξωγενών μορφογενετικών ερεθισμάτων του τεχνητού θρεπτικού υποστρώματος. Η βιολογική ενεργότητα των παραγόντων που χρησιμοποιούνται στην *in vitro* ιστοκαλλιέργεια, εξαρτάται τόσο από τη συγκέντρωσή τους όσο και από το ακριβές αναπτυξιακό στάδιο κατά το οποίο παρέχονται στο θρεπτικό υπόστρωμα.

Ακολουθεί μια σύντομη καταγραφή των παραγόντων που καθορίζουν την επαγωγή και την ολοκλήρωση του φυτικού, σωματικού εμβρυογενετικού μηχανισμού.

A.13.1 ΕΙΔΟΣ ΕΚΦΥΤΟΥ

Ο όρος έκφυτο αναφέρεται σε κάθε αρχικό αποστειρωμένο τμήμα, που αποκόπτεται από το μητρικό φυτό και καλλιεργείται *in vitro*, με σκοπό τον φυτικό πολλαπλασιασμό, την κυτταρική διαφοροποίηση και τελικά τη φυτική αναγέννηση. Η επιλογή του εκφύτου παίζει καθοριστικό ρόλο τόσο για την επιτυχή δημιουργία της ιστοκαλλιέργειας όσο και για την επακόλουθη φυτική αναγέννηση.

Ο Kohlenbach et al. (1975) αναφέρει ότι τρεις είναι οι κύριες πηγές διπλοειδών κυττάρων που έχουν τη δυνατότητα να διαφοροποιηθούν σε σωματικά έμβρυα:

- i) Βλαστητικά κύτταρα ώριμων φυτών.
- ii) Κύτταρα αναπαραγωγικών ιστών εκτός του ζυγωτού.
- iii) Κύτταρα υποκοτυλίων, κοτυληδόνων και νεαρών φυταρίων.

Η αδυναμία κάποιων κυττάρων να διαφοροποιηθούν σε σωματικά έμβρυα *in vitro* μπορεί να είναι αποτέλεσμα μετάλλαξης ή της εξοικείωσης τους (habituation) με τις *in vitro* συνθήκες.

Τα κυριότερα κριτήρια επιλογής των εκφύτων είναι:

1. Το αναπτυξιακό τους στάδιο. Ακόμα και κύτταρα φυτικών ειδών που αναγεννούνται δύσκολα *in vitro*, διαφοροποιούνται εύκολα, αρκεί τα έκφυτα να προέρχονται από ιστούς συγκεκριμένων αναπτυξιακών σταδίων (Maheswaran et al. 1986a & b). Η φυσιολογία των κυττάρων του εκφύτου πριν τον εμβολιασμό τους (ποσότητα και είδος χημικών λιπασμάτων που χρησιμοποιούνται στην καλλιέργεια των μητρικών φυτών, οι καλλιεργητικές συνθήκες κ.ά.) και οι μεταβολές του ορμονικού τους ισοζυγίου, πιθανώς να διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην επαγωγή κυττάρων, ικανών για *in vitro* διαφοροποίηση.
2. Η ηλικία του εκφύτου. Έκφυτα κοτυληδόνων ήλιου (*Helianthus annuus*), από ώριμα φυτάρια, παρήγαγαν στατιστικά το μικρότερο ποσοστό κάλλου, ενώ η μορφογενετική ικανότητα εκφύτων από νεαρότερα φυτάρια (4 ημερών) ήταν πολύ υψηλότερη (Dagustu 2002).

Σε φυτάρια καρότου (*Daucus carota*), οι Nishiwaki et al. (2002) κατέγραψαν ότι η ηλικία του εκφύτου ήταν καθοριστική για την αντίδραση των εκφύτων έναντι του εξωγενώς παρεχόμενου ABA. Φυτάρια με υποκοτύλια μεγαλύτερα από 3,0 εκ. δεν ήταν ικανά να διαφοροποιηθούν σε σωματικά έμβρυα. Σε καλλιέργειες ανώριμων εμβρύων, ανθέρων, στημόνων και τμημάτων φύλλων από φυτάρια σίκαλης (*Secale cereale*) περισσότεροι εμβρυογενετικοί κάλλοι δημιουργούνταν από τα ανώριμα έμ-

βρυα συγκριτικά με όλα τα υπόλοιπα έκφυτα (Ma et al. 2004). Παράλληλα το αναπτυξιακό στάδιο του εμβρύου έπαιζε καθοριστικό ρόλο στην επιτυχή επαγωγή διαφοροποίησης. Το στάδιο του ώριμου σφαιρικού κολεόπτου (μήκος εμβρύου 0,5-1,0 mm) ήταν το ιδανικότερο.

Οι Martin et al. (2005), σε καλλιέργειες κυττάρων μεσόφυλλου γαλατσίδας (*Euphorbia nivulia*) σε MP και BA, απέδειξαν ότι τα έκφυτα που συλλέγονταν Μάρτιο-Απρίλιο αποτελούσαν το καταλληλότερο φυτικό υλικό, για τη διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων, συγκριτικά με εκείνα που συλλέγονταν Ιούλιο-Αύγουστο.

Όλα τα πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν ότι οι ανώριμοι ιστοί και τα ανώριμα όργανα χαρακτηρίζονται από μορφογενετική πλαστικότητα *in vitro*, σε αντίθεση με τα αντίστοιχα ώριμα έκφυτα. Οι ανώριμοι φυτικοί ιστοί διακρίνονται από υψηλό ποσοστό επιβίωσης, γρήγορους αυξητικούς ρυθμούς και *in vitro* ολοδυναμία. Οι καταλληλότεροι ανώριμοι φυτικοί ιστοί για την επαγωγή σωματικών εμβρύων είναι τα βλαστητικά μεριστώματα, οι μασχαλιαίοι οφθαλμοί, τα γεννητικά κύτταρα και τα ζυγωτικά έμβρυα.

Παράλληλα τα έκφυτα από ανώριμους ιστούς, αν και διακρίνονται από υψηλό εμβρυογενετικό δυναμικό, διαθέτουν και κάποια μειονεκτήματα πρακτικής φύσης:

- α. Απαιτείται διατήρηση και συνεχή φροντίδα στον αγρό ή στο θερμοκήπιο των μητρικών φυτών.
- β. Δεν είναι διαθέσιμα σε όλη τη διάρκεια του χρόνου.
- γ. Απαιτούν χρονοβόρες και επίπονες διαδικασίες απομόνωσης και ιστοκαλλιέργειας.

3. *Η δομική ακεραιότητα των φυταρίων.* Ενδεικτικά αναφέρουμε ότι σε καλλιέργειες γαιοκαρύου (*Arachis hypogaea*) η απομάκρυνση των κοτυληδόνων από τα φυτάρια μείωνε αισθητά τα ποσοστά της σωματικής εμβρυογένεσης, ενώ η παρουσία και της μιας μόνο κοτυληδόνας προωθούσε την επαγωγή σωματικών εμβρύων σε υψηλή συχνότητα (Murthy et al. 1995).

Μια πιθανή ερμηνεία αποτελεί η εμπλοκή των κοτυληδόνων στη θρεπτική υποστήριξη των φυταρίων και ο ρυθμιστικός ρόλος που εξασκούν στην ανάπτυξη των παρακείμενων περιοχών με υψηλό αναγεννητικό δυναμικό.

A.13.2. ΦΥΤΟΑΥΞΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ & ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ

A.13.2.1. Εισαγωγή

Πρώτος ο γερμανός Julius von Sachs (1832-1897) πρότεινε την ύπαρξη χημικών αγγελιοφόρων, στα ανώτερα φυτά, που είναι υπεύθυνοι για τη ρύθμιση και το συντονισμό του μεταβολισμού, της αύξησης και της μορφογένεσης μετά από την αλληλεπίδρασή τους και με εξωτερικούς παράγοντες (π.χ. βαρύτητα κ.ά.).

Διεξοδικές και μακροχρόνιες ερευνητικές προσπάθειες απέδειξαν την ύπαρξη των χημικών αυτών σημάτων, που ονομάστηκαν **φυτικές ορμόνες** ή **φυτοαυξητικοί ρυθμιστές** ή **φυτοαυξητικοί παράγοντες**. Έξι είναι οι κύριες κατηγορίες των φυτοαυξητικών παραγόντων:

- Οι αυξίνες.
- Οι κυτοκινίνες.
- Οι γιββερελλίνες.
- Το αιθυλένιο.
- Το αποκοπτικό οξύ.
- Τα βρασσινοστεροειδή.

Οι φυτοαυξητικοί παράγοντες συντίθενται σε συγκεκριμένα φυτικά κύτταρα και δρουν σε θέσεις-στόχους, που είναι όμορες των θέσεων παραγωγής ή πολύ απομακρυσμένες από αυτές. Η δράση τους γίνεται μέσω κατάλληλων βιοχημικών μονοπατιών και τη μεσολάβηση ειδικών πρωτεϊνών-υποδοχέων.

Μια φυτική ορμόνη δεν είναι, σύμφωνα με την κλασική άποψη που ισχύει στα ζώα, μια χημική ουσία που παράγεται σε ένα όργανο και μεταφέρεται σε ένα άλλο, προκειμένου να διεκπεραιώσει μια χημική αντίδραση ή να ελέγξει μια φυσιολογική διαδικασία. Κάθε φυτοαυξητικός παράγοντας μπορεί να συντεθεί οπουδήποτε και να επηρεάσει ποικίλες αυξητικές και αναπτυξιακές διαδικασίες σε διαφορετικά φυτικά μέρη.

Όλες οι φυτικές αναπτυξιακές διαδικασίες, από τη φύτευση μέχρι τη νέκρωση, υπόκεινται σε ορμονικό έλεγχο. Η φυτική φυσιολογία σχετίζεται με μεταβολές των συγκεντρώσεων των φυτοαυξητικών ρυθμιστών στο σημείο δράσης τους, με περιοδικές διαφορές και αλλαγές της ευαισθησίας των ιστών έναντι αυτών, με τη μεταφορά τους, και τον μεταβολισμό τους, με ισορροπίες και αλληλεπιδράσεις με άλλες φυτοαυξητικούς ρυθμιστές ή της μεταβολική τους σχέση, ενώ εμπλέκονται και δευτερογενείς αγγελιοφόροι.

Αναπτυξιακά φαινόμενα, όπως ο σχηματισμός ριζών, βλαστών και ανθέων είναι αποτέλε-

σμα αλυσιδωτών, εξειδικευμένων γεγονότων σε συγκεκριμένα φυτικά τμήματα, μέσω ενός εναρμονισμένου ελέγχου από ηλεκτρικά σήματα, από τους φυτοαυξητικούς ρυθμιστές, από μη εξειδικευμένα μόρια του πρωτογενούς και του δευτερογενούς μεταβολισμού και κάποια κυτοπλασμικά και αποπλαστικά συστατικά (Gaspar et al. 2003).

A.13.2.2. Φυτοαυξητικοί παράγοντες & *in vitro* ιστοκαλλιέργεια

Καθοριστικός είναι ο ρόλος των φυτοαυξητικών παραγόντων και στις *in vitro* ιστοκαλλιέργειες. Η επαγωγή της φυτικής αύξεσης, αλλά και η διαφοροποίηση των φυτικών ιστών *in vitro*, απαιτεί την παροχή των κατάλληλων φυτοαυξητικών παραγόντων (αυξινών, κυτοκινινών κ.ά.). Οι φυτικοί φυτοαυξητικοί παράγοντες (υψηλές συγκεντρώσεις 2,4-D, ABA και αιθυλενίου) είναι γνωστά συστατικά καταπόνησης που επάγουν την απόκτηση της ολοδυναμίας από τα φυτικά κύτταρα (Karami et al. 2010).

Οι παράγοντες που καθορίζουν το είδος και το βαθμό εξάρτησης της ιστοκαλλιέργειας από τις φυτοαυξητικές ουσίες είναι κυρίως:

1. Ο γονότυπος, το είδος και το αναπτυξιακό στάδιο των ιστών του εκφύτου.
2. Το ενδογενές επίπεδο των δραστικών φυτοαυξητικών παραγόντων.
3. Το είδος και η συγκέντρωση της παρεχόμενης αυξίνης ή /και κυτοκινίνης.
4. Ο ρυθμός απορρόφησης των φυτοαυξητικών παραγόντων από το θρεπτικό μέσο.
5. Ο τρόπος δράσης τους.
6. Ο βαθμός γλυκοζυλίωσης και υδρόλυσης των φυτοαυξητικών ουσιών μέσα στα κύτταρα.
7. Η ενζυμική δραστικότητα των οξειδασών των αυξινών ή /και των κυτοκινινών.

Η αρχική και κλασική, πλέον, υπόθεση των Skoog et al. (1957) για την εξάρτηση της μορφογένεσης από την αναλογία των συγκεντρώσεων αυξίνης προς κυτοκινίνης έχει επιβεβαιωθεί σε ένα μεγάλο αριθμό φυτικών ειδών που “αναγεννούνται εύκολα” *in vitro*. Συνοπτικά πρότειναν ότι:

- α. Όταν η συγκέντρωση της αυξίνης είναι μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση της κυτοκινίνης επάγεται η δημιουργία ριζών.
- β. Όταν η συγκέντρωση της κυτοκινίνης είναι μεγαλύτερη από τη συγκέντρωση της αυξίνης επάγεται η δημιουργία βλαστών.
- γ. Όταν η αυξίνη και η κυτοκινίνη παρέχονται στις ίδιες αναλογίες επάγεται μόνο καλ-

λογένεση.

1.1. Αυξίνες

A. Γενικά στοιχεία

Στα τέλη του 19^{ου} αιώνα ο Κάρολος Δαρβίνος ενώ μελετούσε το φαινόμενο του φωτοτροπισμού, σε κολεόπτια και νεαρά αρτίβλαστα, πρότεινε ότι στην κορυφή τους παράγεται κάποιο σήμα που μεταφέρεται στη ζώνη επιμήκυνσης και προκαλεί τη διαφορική αύξηση της σκιασμένης πλευράς έναντι της φωτιζόμενης.

Μετά από πληθώρα ερευνητικών προσπαθειών, το 1926, ο Frits Went κατόρθωσε να απομονώσει τη χημική ουσία που προκαλεί τη διαφορική αύξηση στην κορυφή των κολεοπτύλων. Η νέα χημική ουσία ονομάστηκε **αυξίνη** από το ελληνικό ρήμα αυξείν (αυξάνω) και αποτελεί την πρώτη φυτική ορμόνη η οποία μελετήθηκε και απομονώθηκε από τους φυτικούς ιστούς. Έτσι, ταυτοποιήθηκε το IAA (ινδολο-3-οξικό οξύ ή 3-ινδολυλοξικό οξύ), που είναι η κύρια φυσική αυξίνη και ακολούθησαν οι υπόλοιπες αυξίνες.

Αυξίνες ορίζονται οι χημικές ενώσεις που η βιολογική τους δράση είναι ανάλογη της δράσης του IAA, όπως είναι η προώθηση της κυτταρικής επιμήκυνσης σε κολεόπτια και σε τμήματα στελεχών, της κυτταρικής διαίρεσης σε ιστοκαλλιέργειες κάλλων σε συνδυασμό με κυτοκινίνες κ.ά.

Η βιοσύνθεση του IAA εντοπίζεται, κυρίως, στις μεριστωματικές περιοχές (βλαστών και ριζών) και στους ταχέως διαιρούμενους ιστούς. Παράλληλα, είναι η μοναδική φυτοορμόνη που έχει ξεκάθαρη πολική μεταφορά, από την κορυφή προς τη βάση, η οποία διατηρείται σε όλη τη διάρκεια της αναπτυξιακής διαδικασίας.

Έχει αποδειχθεί ότι οι αυξίνες εμπλέκονται σε όλες, σχεδόν, τις μορφογενετικές διαδικασίες της φυτικής αύξησης και ανάπτυξης, ενώ αντίθετα οι υπόλοιπες φυτικές ορμόνες διαδραματίζουν ρυθμιστικό ρόλο σε διακριτές αναπτυξιακές διαδικασίες. Οι αυξίνες, αλλά και οι κυτοκινίνες, αποτελούν απαραίτητα χημικά συστατικά για την επιτυχή διεκπεραίωση από τη φύτευση μέχρι το γηρασμό σε συνεργασία με άλλες ορμόνες, Ca^{2+} και δραστικές μορφές οξυγόνου.

Πιο συγκεκριμένα, οι αυξίνες εμπλέκονται στην ανάπτυξη των πλευρικών οφθαλμών και των πλάγιων κλάδων, στη διατήρηση της επάκριας κυριαρχίας, στη φυσιολογική ανάπτυξη του ανθικού μεριστώματος και των καταβολών των φύλλων, στη διαφοροποίηση και αναγέννηση του αγωγού ιστού, στη φυλλοταξία και στην ανάπτυξη των καρπών.

Παράλληλα, εκτεταμένη είναι η χρήση των αυξινών και στη γεωργία και στη φυτοκομία. Μερικές εμπορικές εφαρμογές τους είναι οι εξής:

- Η καθυστέρηση της αποκοπής καρπών και φύλλων.
- Η προώθηση της ανθοφορίας.
- Η επαγωγή της παρθενοκαρπίας.
- Η ριζοβολία μοσχευμάτων.
- Ο πολλαπλασιασμός φυτών.
- Χρησιμοποιούνται σαν ζιζανιοκτόνα, όπως το 2,4-D και το dicamba.

B. Αυξίνες & σωματική εμβρυογένεση

Τόσο οι φυσικά απαντώμενες (π.χ. IAA, IBA κ.ά.) όσο και οι συνθετικές αυξίνες (π.χ. 2,4-D, dicamba κ.ά.) έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως για την επαγωγή σωματικών εμβρύων σε μεγάλο αριθμό φυτικών ειδών, σε ποικίλες συγκεντρώσεις και πειραματικές προσεγγίσεις.

Πιο ευρεία είναι η χρήση των αυξινών 2,4-D, NAA και IBA, καθώς εμφανίζουν μεγαλύτερη σταθερότητα συγκριτικά με το IAA. Στα φυτικά είδη που αντιστέκονται στην *in vitro* αναγέννηση, είναι απαραίτητη η προσθήκη δύο αυξινών ταυτόχρονα στο θρεπτικό μέσο. Σε αυτή την περίπτωση είναι πιθανό να υπάρχουν διαφορετικές θέσεις δράσης ή διαφορετικά μόρια-στόχοι των αυξινών.

Στη συνέχεια αναφέρονται ενδεικτικά πειραματικά αποτελέσματα που αφορούν τον συσχετισμό αυξινών και σωματικής εμβρυογένεσης:

- ❖ Ανώριμα ζυγωτικά έμβρυα, *Commiphora wightii*, ενός ξυλώδους φαρμακευτικού φυτού, καλλιεργήθηκαν σε B5 μέσο και χαμηλή συγκέντρωση (<2,5 mM 2,4-D, IBA, IAA ή NAA) (Singh et al. 1997). Καταλληλότερες αυξίνες ήταν το IBA και το 2,4-D. Παρουσία 2,4-D διαμορφώνονταν άσπρα σωματικά έμβρυα ποικίλων σχημάτων, ενώ παρουσία IBA πράσινα και καλά διαμορφωμένα σωματικά έμβρυα.
- ❖ Οι Mary et al. (1997), σε κάλλους από υποκοτύλια σουσαμιού (*Sesamum indicum*), μελέτησαν την επίδραση τεσσάρων αυξινών (NAA, IAA, IBA και 2,4-D). Το 2,4-D προκάλούσε την υψηλότερη εμβρυογενετική συχνότητα και τον υψηλότερο αριθμό σωματικών εμβρύων ανά κάλλο. Το NAA ήταν επίσης αποτελεσματικό στην επαγωγή σωματικών εμβρύων, αλλά δεν έφτανε τα επίπεδα επαγωγής του 2,4-D.
- ❖ Πλήρη αναγέννηση φυτών, μέσω σωματικών εμβρύων, κατέγραψαν οι Jayanthi et al. (2001) σε ιστοκαλλιέργειες κάλλων από φύλλα *Tylophora indica*. Τα έκφυτα καλλιε-

γούνταν σε MS και διάφορες συγκεντρώσεις 2,4-D. Η καλύτερη εμβρυογενετική αντίδραση καταγράφηκε σε 2,0 mg/L 2,4-D και 0,01 mg/L κινετίνης. Ακολουθούσαν δύο ανακαλλιέργειες στο αρχικό θρεπτικό υπόστρωμα και μεταφορά των κάλλων σε διάφορες συγκεντρώσεις BA, 2iP και IBA, προκειμένου τα σωματικά έμβρυα να αναπτυχθούν και να ωριμάσουν. Επιτυχεστέρα ωρίμανση σε πλήρη φυτάρια καταγράφηκε σε 2,0 mg/L 2iP.

- ❖ Οι Hernandez et al. (2003) σε φύλλα βελανιδιάς (*Quercus suber*) κατέδειξαν ότι ο συνδυασμός NAA και BAP ήταν αναγκαίος για την επαγωγή σωματικών εμβρύων. Αν και η επίδρασή τους ήταν καθοριστική στη φάση επαγωγής, τα πειραματικά αποτελέσματα δεν υπέδειξαν αλληλεπίδραση των δύο φυτοαυξητικών παραγόντων, υποδεικνύοντας ότι διαδραματίζουν ανεξάρτητους ρόλους.
- ❖ Το TDZ, με ιδανικότερη συγκέντρωση τα 13,62 mM, προώθησε την άμεση σωματική εμβρυογένεση σε καλλιέργειες μιας ποικιλίας ορχιδέας (*Phalaenopsis amabilis*), ενώ το NAA την ανέστειλε (Chen et al. 2004).
- ❖ Οι Urbanek et al. (2004) ανακοίνωσαν την επαγωγή σωματικών εμβρύων σε έκφυτα κοτυληδόνων μιας ποικιλίας κολοκυθιάς (*Cucurbita pepo*) σε MS με χαμηλή συγκέντρωση NAA (16,11 mM) και BA (4,44 mM). Η φύτρωση ήταν επιτυχής σε 11,42 mM IAA.
- ❖ Σε καλλιέργειες με ανώριμες κοτυληδόνες σόγιας (*Glycine max*) χρησιμοποιήθηκαν τόσο NAA όσο και 2,4-D. Καλύτερη επαγωγή σωματικών εμβρύων (97,1%) καταγράφηκε σε 135,7 mM 2,4-D (Hofmann et al. 2004).
- ❖ Σωματική εμβρυογένεση από ζυγωτικά έμβρυα σχιζάνδρας (*Schisandra chinensis*) πραγματοποιήθηκε, όταν το θρεπτικό μέσο επαγωγής περιείχε 2,4-D (9,04 mM) και ζεατίνη (0,09 mM) και το θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης δεν περιείχε φυτοαυξητικούς παράγοντες. Η ωρίμανση και η φύτρωση των σωματικών εμβρύων μέχρι το στάδιο της κοτυληδόνας πραγματοποιήθηκε σε MS με 0,45 mM 2,4-D και 1,11 mM BA (Kim et al. 2005).
- ❖ Ο προσανατολισμός της διαφοροποίησης των κυττάρων μεσοφύλλου γαλατσίδας (*Euphorbia nivulia*) προς βλαστογένεση ή προς σωματική εμβρυογένεση ήταν άμεσα συνδεδεμένη με τον τύπο της αυξίνης. NAA ή IAA σε συνδυασμό με BA προωθούσαν τη διαφοροποίηση βλαστών, ενώ 2,4-D σε συνδυασμό με BA τη σωματική εμβρυογένεση (Martin et al. 2005).
- ❖ Ο συνδυασμός 18,1 μM 2,4-D με 4,5 μM BA, σε *in vitro* καλλιέργεια ζυγωτικών εμ-

βρύων φρούτου του πάθους (*Passiflora cincinnata*), προωθούσε τη σωματική εμβρυογένεση. Οι εμβρυογενετικοί κάλλοι ήταν κιτρινωποί, εύθρυπτοι και έφεραν λευκές προεμβρυϊκές μάζες στην επιφάνειά τους (Da Silva et al. 2009). Τα εμβρυογενετικά κύτταρα ήταν μικρά, με μεγάλο πυρηνίσκο και πυκνό κυτταρόπλασμα, σε αντίθεση με τα μη εμβρυογενετικά τα οποία ήταν επιμήκη, με μικρό πυρηνίσκο και λιγότερο πυκνό κυτταρόπλασμα.

Δεν λείπουν όμως και τα βιβλιογραφικά δεδομένα που αναφέρουν αναστολή της διαφοροποίησης σωματικών εμβρύων, λόγω της προσθήκης αυξινών στο θρεπτικό μέσο ιστοκαλλιέργειας. Ενδεικτικά αναφέρουμε:

- ❖ Η προσθήκη NAA και 2,4-D σε έκφυτα φύλλων από διάφορες ποικιλίες γαρύφαλλου (*Dianthus*) κατέληξε σε πλήρη αναστολή της σωματικής εμβρυογένεσης (Nakano et al. 1993).
- ❖ Οι Chen et al. (2001) ανακοίνωσαν ότι και οι τέσσερις αυξίνες που χρησιμοποιήθηκαν (IAA, IBA, NAA και 2,4-D) σε έκφυτα φύλλων *Oncidium* είχαν ανασταλτική δράση στην επαγωγή άμεσης σωματικής εμβρυογένεσης.

1.2. Κυτοκινίνες

A. Γενικά στοιχεία

Οι κυτοκινίνες οφείλουν το όνομά τους στην έννοια της κυτοκίνησης, δηλαδή της κυτταρικής διαίρεσης. Ανακαλύφθηκαν στο πλαίσιο της μελέτης των παραγόντων που συμμετέχουν στη διαδικασία της διαίρεσης των φυτικών κυττάρων.

Ο αυστριακός φυτοφυσιολόγος Haberlandt, το 1913, πρότεινε την ύπαρξη ενός ή περισσότερων υδατοδιαλυτών παραγόντων που επάγουν την κυτταρική διαίρεση, στον αγωγό ιστό τραυματισμένου ιστού κονδύλου πατάτας. Οι πειραματικές προσπάθειες προσδιορισμού και απομόνωσης των παραπάνω παραγόντων κατέληξε στην ανακάλυψη των κυτοκινινών τη δεκαετία του 1950.

Τη δεκαετία του 1930 ο White πέτυχε να καλλιεργήσει, *in vitro*, ρίζες τομάτας σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε μόνο σακχαρόζη, ανόργανα άλατα και βιταμίνες, χωρίς προσθήκη φυτοαυξητικών παραγόντων. Αντίθετα η *in vitro* ανάπτυξη απομονωμένων βλαστών ήταν περιορισμένη, ακόμη και μετά από παροχή αυξίνης, η οποία οφειλόταν, όμως, κυρίως στην κυτταρική

διόγκωση και όχι στην κυτταρική διαίρεση.

Προκειμένου να διεγερθεί και να διατηρηθεί η *in vitro* ανάπτυξη φυτικών ιστών δοκιμάστηκαν πολλές διαφορετικές ουσίες. Τα εντυπωσιακότερα αποτελέσματα προέκυψαν, όταν προστέθηκε στο θρεπτικό υπόστρωμα της ιστοκαλλιέργειας γάλα καρύδας, δηλαδή υγρό ενδοσπέρμιο καρύδας. Ο συνδυασμός αυξίνης και 10-20% γάλακτος καρύδας μπορούσε να επάγει και να διατηρήσει, στις *in vitro* συνθήκες, την κυτταρική διαίρεση ώριμων και διαφοροποιημένων φυτικών ιστών και οργάνων διαφόρων φυτικών ειδών, μέσω της δημιουργίας κάλλου.

Ο διεγερτικός παράγοντας της κυτταρικής διαίρεσης εντοπίστηκε και ταυτοποιήθηκε το 1973, πολλά χρόνια μετά την ανακάλυψη των κυτοκινών. Η προωθητική ουσία της κυτταροδιαίρεσης ήταν η ζεατίνη, που έχει παρόμοια μοριακή δομή με την κινετίνη.

Οι κυτοκινίνες διακρίνονται σε φυσικές και συνθετικές. Οι φυσικές είναι:

- α)** Η κινετίνη η οποία αποτελεί το πρωτότυπο μόριο για τη δημιουργία των συνθετικών αδενυλικών-κυτοκινινών.
- β)** Η ζεατίνη η οποία είναι δέκα φορές ισχυρότερη μορφογενετικά από την κινετίνη και θεωρείται, επίσης πρωτότυπο μόριο για τις φυσικές κυτοκινίνες. Κυριότερες περιοχές βιοσύνθεσής της είναι οι ρίζες και ειδικότερα η κορυφή της ρίζας.

Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες συνθετικές κυτοκινίνες οι οποίες αποτελούν και δραστικά συστατικά απαραίτητα για την επαγωγή της κυτταρικής διαίρεσης είναι:

- α)** BA(6-Βενζυλαδεκίνη) η οποία είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη συνθετική κυτοκινίνη.
- β)** 2iP [N^6 (Δ^2 -ισοπεντενυλοφωσφορική) αδενοσίνη].
- γ)** TDZ[Φαίνυλο-N-(1,2,3-θειοδιαζ-5-υλ)-ουρία] η οποία είναι μια ετεροκυκλική συνθετική ουρία παρόμοιας δράσης με τις πουρινικές κυτοκινίνες.

Εκτός του διεγερτικού ρόλου των κυτοκινινών στην κυτταρική διαίρεση, πολλαπλές ερευνητικές μελέτες κατέδειξαν την καθοριστική τους συμμετοχή και σε πολλές, ακόμα, φυτικές φυσιολογικές και αναπτυξιακές διαδικασίες. Ενδεικτικά αναφέρονται οι εξής:

- Διατήρηση της επάκριας κυριαρχίας.
- Διαφοροποίηση των ακραίων μεριστωμάτων.
- Διαφοροποίηση και ανάπτυξη του αγωγού ιστού.
- Διαφοροποίηση των χλωροπλαστών.
- Άρση λήθαργου των οφθαλμών.

Η μορφογενετική επίδραση των κυτοκινινών (συνθετικών και μη) εξαρτάται από:

- Τη φύση της κυτοκινίνης.

- Το βαθμό πρόσληψής της από το θρεπτικό μέσο.
- Την ταχύτητα και την αποτελεσματική διανομή της στους ιστούς.
- Το ρυθμό καταβολισμού της.
- Την ικανότητα του εκάστοτε εκφύτου να μεταβολίσει την παρεχόμενη κυτοκίνη.

B. Κυτοκίνες & σωματική εμβρυογένεση

Ακολουθεί σύντομη καταγραφή μερικών χαρακτηριστικών εργασιών που διερευνούν τη σχέση κυτοκινών και σωματικής εμβρυογένεσης:

- ❖ Η προσθήκη TDZ (0,5-10,0 μ M) σε ολόκληρα φυτάρια γαιοκάρου (*Arachis hypogaea*) έδωσε ποσοστά εμβρυογένεσης 85,0-100,0% (Murthy et al. 1995). Αυξημένη συχνότητα σωματικής εμβρυογένεσης επιτεύχθηκε με την αύξηση της παραμονής των εκφύτων στο θρεπτικό μέσο επαγωγής ή της συγκέντρωσης TDZ.
- ❖ Οι Beruto et al. (1996), κατά τη διάρκεια τριών ανακαλλιεργειών κάλλων νεραγκούλας (*Ranunculus asiaticus*), κατέδειξαν ότι οι κυτοκίνες δεν ήταν απαραίτητες για την έναρξη της καλλογένεσης, αλλά ήταν για την αύξηση των επαχθέντων κάλλων και τη φυτική αναγέννηση. Σωματική εμβρυογένεση δεν παρατηρήθηκε σε κάλλους που καλλιεργούνταν σε θρεπτικό μέσο χωρίς κυτοκίνες ή που περιείχε μόνο κινετίνη. Οι κάλλοι που εμφάνιζαν σωματικά έμβρυα είχαν αναπτυχθεί σε υπόστρωμα που περιείχε BA και κινετίνη ή μόνο BA. Οι μη διαφοροποιημένοι κάλλοι σε αντίθεση με τους διαφοροποιημένους κάλλους χαρακτηρίζονταν από υψηλό περιεχόμενο φαινολικών πολυμερών, ενεργότητα υπεροξειδάσης και πολυφαινολικής οξειδάσης.
- ❖ Οι Hutchinson et al. (1996) σε καλλιέργειες υποκοτυλίων γερανιού (*Pelargonium hortorum*), ανέφεραν την επαγωγή σωματικής εμβρυογένεσης παρουσία TDZ (10,00 mM/L ή 20,0 mM/L) κατά τη διάρκεια της επαγωγικής φάσης. Τόσο η επαγωγή όσο και η ανάπτυξη των σωματικών εμβρύων βρίσκονταν σε άμεση εξάρτηση με τα επίπεδα εξωγενών και ενδογενών αυξινών. Προσθήκη PCIB (αναστολέας της δράσης και της μεταφοράς αυξινών) σε θρεπτικό μέσο με TDZ μείωνε την εμβρυογενετική αντίδραση και τα ενδογενή επίπεδα αυξίνης, κυτοκίνης και ABA. Υψηλά επίπεδα εξωγενούς IAA κατέστειλαν την ανάπτυξη των σωματικών εμβρύων. Τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι το TDZ ενεργοποιεί τον ενδογενή μεταβολισμό αυξίνης κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των σωματικών εμβρύων.

- ❖ Οι Mary et al. (1997) κατέγραψαν μικρή αύξηση στην επαγωγή σωματικών εμβρύων μόνο σε θρεπτικό μέσο με 2,2 mM BA και 13,6 mM 2,4-D σε ιστοκαλλιέργειες σουσαμιού. Αντίθετα, η κινετίνη και η ζεατίνη ανέστελλαν τόσο το ποσοστό της διαφοροποίησης των σωματικών εμβρύων όσο και τον αριθμό των εμβρύων ανά καλλιέργεια.
- ❖ Η επώαση σπόρων γαιοκάρυου (*Arachis hypogaea*) με TDZ ή BAP κατέληξε σε επαγωγή σωματικών εμβρύων και βλαστών αντίστοιχα. Τα δεδομένα αυτά υποδεικνύουν ότι αν και το TDZ συγκαταλέγεται στις συνθετικές κυτοκινίνες προκαλεί μια διαφορετική μορφογενετική πορεία ανάπτυξης από αυτή που επάγουν οι κυτοκινίνες πουρίνης (Victor et al. 1999).
- ❖ Η προσθήκη BA σε ιστοκαλλιέργειες έλατου (*Abies alba*) προώθησε τη σωματική εμβρυογένεση και την ωρίμανση των σωματικών εμβρύων. Η δημιουργία σωματικών εμβρύων πρώιμου σταδίου και προχωρημένου σταδίου με κοτυληδόνες αυξήθηκε σημαντικά από την επιπλέον προσθήκη BA στο μέσο ωρίμανσης. Αντίθετα ούτε το 2iP ούτε η ζεατίνη προώθησαν την ωρίμανση των σωματικών εμβρύων (Schuller et al. 2000).
- ❖ Οι Hutchinson et al. (2000) ανέφεραν ότι η αλληλεπίδραση TDZ και ποικίλων συνθηκών φωτισμού ενεργοποιεί τα ενδογενή φυτικά αυξητικά συστατικά τα οποία επηρεάζουν άμεσα την εμβρυογενετική διαδικασία σε έκφυτα υποκοτυλίων γερανιού (*Pelargonium hortorum*).
- ❖ Σε φυτάρια μελιτζάνας (*Solanum melongena*) η επαγωγή σωματικών εμβρύων απαιτούσε χαμηλή συγκέντρωση BAP, ενώ σε φυτάρια ντομάτας (*Solanum lycopersicum*) υψηλά επίπεδα BAP και σε πιπεριάς (*Capsicum annuum*) ακόμα υψηλότερα. Η προσθήκη TDZ στις ιστοκαλλιέργειες ντομάτας και μελιτζάνας ελάττωσε τη σωματική εμβρυογένεση και στις ιστοκαλλιέργειες πιπεριάς την ανέστειλε πλήρως (Karakakis et al. 2002). Καλλιέργεια σπόρων και των τριών φυτών με BAP (0,0-20,0 mg/L) ανέστειλε τη σωματική εμβρυογένεση στη ντομάτα και στη μελιτζάνα, αλλά την προώθησε στην πιπεριά.
- ❖ Πλήρη αναγέννηση δύο ποικιλιών σιταριού (*Triticum aestivum*) μέσω σωματικής εμβρυογένεσης ανακοινώθηκε από τους Malik et al. (2004) σε θρεπτικό υπόστρωμα MS. Η μεγαλύτερη συχνότητα φυτικής αναγέννησης καταγράφηκε σε 0,5 mg/L BAP και 0,1 mg/L IAA. Υψηλότερη συγκέντρωση BAP αποδείχθηκε τοξική και τελικά θνησιγόνος για τους κάλλους σε μερικές περιπτώσεις.

- ❖ Σε έκφυτα ριζών κερασιάς (*Prunus insica*) οι Cheong et al. (2004) κατέγραψαν αναστολή της σωματικής εμβρυογένεσης από την προσθήκη BA, TDZ και GA₃.
- ❖ Οι Gutierrez et al. (2004) ανακοίνωσαν το υψηλότερο ποσοστό δευτερογενούς εμβρυογένεσης από εμβρυογενετικές μάζες κερασιάς (*Prunus avium* x *P. pseudocerasus*), σε θρεπτικό υπόστρωμα με 1,0 mg/L BA και 0,1 mg/L TDZ. Περαιτέρω εφαρμογή 1,0 mg/L TDZ μετέτρεπε τους εμβρυογενετικούς κάλλους σε μη εμβρυογενετικούς, όταν το θρεπτικό υπόστρωμα περιείχε 2,0% σακχαρόζη.
- ❖ Τέλος, σε ιστοκαλλιέργειες πιπεριάς (*Capsicum annuum*), άμεση σωματική εμβρυογένεση προκλήθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα MS με TDZ. Το υψηλότερο ποσοστό καταγράφηκε σε συγκέντρωση 0,5 μM TDZ (Khan et al. 2006).

1.3. ABA

Η αναπτυξιακή επίδραση του ABA επηρεάζεται από ποικίλους παράγοντες, όπως την αρχική επεξεργασία των φυτών, το είδος του θρεπτικού μέσου, τη θερμοκρασία κατά την έναρξη της ιστοκαλλιέργειας, την ανακίνηση του υποστρώματος, τον αριθμό των κυττάρων, το ωσμωτικό δυναμικό κ.ά.

Στα αρχικά μορφογενετικά στάδια της ζυγωτικής εμβρυογένεσης και μέχρι το στάδιο των κοτυληδόνων, τα επίπεδα του ABA παραμένουν πολύ χαμηλά. Αντίθετα αξιοσημείωτη αύξηση των επιπέδων του καταγράφεται κατά το στάδιο ωρίμανσης των ζυγωτικών εμβρύων και αισθητή μείωσή του με την έναρξη του σπερματικού λήθαργου τόσο στα μονοκοτυλήδονα όσο και στα δικοτυλήδονα φυτά. Από την πλειοψηφία των πειραματικών δεδομένων διαφαίνεται ότι το ABA διαδραματίζει ρυθμιστικό ρόλο στη φυσιολογική ανάπτυξη τόσο των ζυγωτικών όσο και των σωματικών εμβρύων *in vitro* μέσω δύο κυρίως μορφογενετικών προσεγγίσεων:

1. Αναστολή της πρόωρης φύτευσής τους.
2. Ενεργοποίηση της ωρίμανσής τους.

Έχει προταθεί ότι πιθανώς το ABA:

- i) Μιμείται τις συνθήκες υψηλού ωσμωτικού δυναμικού που προωθούν τη σωματική εμβρυογένεση (Brown et al. 1989).
- ii) Ενεργεί σαν ρυθμιστής σε μεταφραστικό επίπεδο, επηρεάζοντας τη διαθεσιμότητα του αδρού ΕΝΠΔ που απαιτείται για τη μετάφραση των μεταγραφημάτων υδρόφιλων πρωτεϊνών που ενεργούν σαν προστατευτικά συστατικά έναντι της

ξήρανσης.

- iii) Σχετίζεται άμεσα με τα επίπεδα των λιπαρών οξέων (ποιοτικά και ποσοτικά) και συνεισφέρει στην καταστολή της ανάπτυξης των προγλυοξωσωμάτων (proglyoxysomes). Η υψηλή συγκέντρωση ABA σε ώριμα έμβρυα, πιθανώς, διατηρεί την ενεργοποίηση αποταμιευτικών λιπιδίων μέσω της αναστολής της σύνθεσης της λιπάσης και της παρεμπόδισης της μετατροπής των προγλυοξωσωμάτων σε ώριμα γλυοξωσώματα.

Πολυάριθμες βιοχημικές και φυσιολογικές μελέτες πιστοποιούν τον πρωταγωνιστικό ρόλο του ABA στην προώθηση της παραγωγής σωματικών εμβρύων φυσιολογικής μορφολογίας:

- ❖ Σε υγρές καλλιέργειες αγριοκύνινου (*Carum carvi*) η προσθήκη 1,0-0,1 μM ABA προώθησε επιλεκτικά την ωρίμανση μόνο των φυσιολογικών σωματικών εμβρύων, αναστέλλοντας την ανάπτυξη δύσμορφων σωματικών εμβρύων και την πρόωμη ανάπτυξη των φυταρίων (Ammirato 1983).
- ❖ Ανάλογες παρατηρήσεις έγιναν και σε εμβρυογενετικούς κάλλους από ανώριμα και ώριμα ζυγωτικά έμβρυα ερυθρελάτης (*Picea abies*) (von Arnold et al. 1988). Ανάλογη εμφάνιση και παρόμοιες καλλιεργητικές απαιτήσεις *in vitro* είχαν τα σωματικά και τα ζυγωτικά έμβρυα, αν και τα σωματικά εμφάνιζαν πιο συμπαγή, λεία και ομοιόμορφη επιφάνεια. Παράλληλα καταγράφηκε καταστολή της πρόωρης φύτευσης, πολλαπλή δημιουργία σωματικών εμβρύων κατά μήκος του εμβρυογενετικού άξονα, αύξηση της συχνότητας σωματικών εμβρύων με φυσιολογικές κοτυληδόνες και ενεργοποίηση λιπιδίων, όπως και στα ώριμα σωματικά έμβρυα.
- ❖ Ο Thomas (1999) προσθέτοντας 1,0 mg/L ABA σε καλλιέργειες μάνγκο (*Mangifera indica*) πέτυχε την φυσιολογική ωρίμανση και φύτευση των σωματικών εμβρύων.
- ❖ Σε ιστοκαλλιέργειες κωνοφόρων το ABA ανέστειλε την πολυσχιδή σωματική εμβρυογένεση (cleavage polyembryony), προώθησε την επαγωγή μεμονωμένων εμβρύων στην επιφάνεια των εκφύτων, καθώς και την περαιτέρω ανάπτυξη και ωρίμανσή τους. Σε καλλιέργειες έλατου (*Abies alba*) η υψηλή συγκέντρωση ABA (20,0-40,0 mM) προώθησε τη σωματική εμβρυογένεση μόνο μέχρι το στάδιο της ανώριμης τορπίλης (Schuller et al. 2000). Αντίθετα η χαμηλή συγκέντρωση ABA (0,0-5,0 mM) αύξησε σημαντικά τον αριθμό των επαχθέντων ώριμων σωματικών εμβρύων σταδίου τορπίλης.
- ❖ Οι Nakagawa et al. (2001) σε καλλιέργειες κοτυληδόνων πεπονιού (*Cucumis melo*) παρουσία 200,0 mM σακχαρώδους διαπίστωσαν ότι τα ενδογενή επίπεδα ABA των κάλλων αυξάνονταν μετά από δύο εβδομάδες καλλιέργειας. Το περιεχόμενο των εμ-

βρυογενετικών κάλλων σε ABA ήταν εντυπωσιακά υψηλότερο από εκείνο των μη εμβρυογενετικών. Τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι η σύνθεση του ABA ελέγχεται από το ωσμωτικό δυναμικό του θρεπτικού μέσου το οποίο ρυθμίζεται από τη συγκέντρωση των σακχάρων και πιθανώς σχετίζεται με την επαγωγή της σωματικής εμβρυογένεσης.

❖ Η προσθήκη ABA σε υγρές καλλιέργειες καρότου (*Daucus carota*):

1. Ανέστειλε την αύξηση των σωματικών εμβρύων όσο αυξανόταν η συγκέντρωση του.
2. Μείωσε την ταχύτητα επαγωγής σωματικών εμβρύων σφαιρικού σταδίου, ενώ αντίθετα διέγειρε την επαγωγή καρδιόσχημων εμβρύων και σταδίου τορπίλης.
3. Μπλόκαρε τη σωματική εμβρυογένεση στο στάδιο της τορπίλης και ανέστειλε την εξέλιξη των σωματικών εμβρύων σε φυτά. Τα μπλοκαρισμένα έμβρυα σταδίου τορπίλης συνέχιζαν να αναγεννούν νέα σωματικά έμβρυα, οπότε και καταγράφηκε αύξηση του νωπού βάρους.
4. Απέτρεψε πολλές μορφολογικές δυσμορφίες, όπως πολλαπλές ή / και εύθρυπτες κοτυληδόνες, πολλαπλά ή δακτυλιοειδή σωματικά έμβρυα, καθώς και σωματικά έμβρυα με επιπρόσθετες δομές.
5. Ανέστειλε το λιπιδικό καταβολισμό και διέγειρε τη σύνθεση αποταμιευτικών πρωτεϊνών, όταν αυτές συσσωρεύονταν στις κοτυληδόνες. Δεν έχει ξεκαθαριστεί αν το ίδιο ισχύει σε φυτά, στα οποία οι αποταμιευτικές πρωτεΐνες συσσωρεύονται στο ενδοσπέρμιο και όχι στο έμβρυο.

❖ Η δράση του ABA σε στερεές καλλιέργειες καρότου κατέληξε συνοπτικά στα εξής:

1. Διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων από φυτάρια καρότου (*Daucus carota*) σε θρεπτικό μέσο με ABA, γεγονός που υποδεικνύει ότι η δράση του απαιτεί συστατικό/ά που μεταφέρονται από τα βλαστητικά μεριστώματα διαμέσου των υποκοτυλίων (Nishiwaki et al. 2002).
2. Σε καλλιέργειες περικαρπίου καρότου (*Daucus carota*), από φυτάρια 14 ημερών, το ABA ήταν ένας καθοριστικός ενδογενής παράγοντας για την επαγωγή δευτερογενούς εμβρυογένεσης. Η απαίτηση υψηλών επιπέδων IAA από τα πρωτογενή σωματικά έμβρυα υποδηλώνει την αλληλεπίδραση ABA και IAA στην επαγωγή της δευτερογενούς σωματικής εμβρυογένεσης από τα πρωτογενή έμβρυα (Ogata et al. 2005).

A.13.3 ΠΟΛΥΣΑΚΧΑΡΙΤΕΣ

Οι *in vitro* καλλιέργειες φυτικών κυττάρων, ιστών και οργάνων δεν είναι πλήρως αυτότροφες, γι' αυτό απαιτούν την παροχή υδατανθράκων τόσο για τη διατήρηση του ωσμωτικού δυναμικού όσο και για την προσφορά ενέργειας και πηγής άνθρακα για την ολοκλήρωση των φυτικών αναπτυξιακών διαδικασιών (διαφοροποίηση βλαστών, ριζογένεση, οργανογένεση και εμβρυογένεση), καθώς αποτελούν άκρως ενεργοβόρες διαδικασίες της φυτικής φυσιολογίας (Yaseen et al. 2012).

Κάθε φυτικό έκφυτο δε μπορεί να μεταβολίσει όλα τα είδη των πηγών άνθρακα το ίδιο αποτελεσματικά. Το είδος του άνθρακα που απαιτείται εξαρτάται από το φυτό και το είδος του εκφύτου και επιδρά καθοριστικά στην *in vitro* αύξηση των φυτικών εκφύτων.

Πολλαπλές είναι οι εργασίες που αποδεικνύουν τον άμεσο συσχετισμό υδατανθράκων και σωματικής εμβρυογένεσης, καθώς έχει προταθεί ότι εμπλέκονται άμεσα στη διαφοροποίηση των σωματικών εμβρύων μέσω της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης (Yaseen et al. 2012). Αποτελούν βιολογικά δραστικά συστατικά του κυτταρικού τοιχώματος και εμπλέκονται στους αμυντικούς φυτικούς μηχανισμούς έναντι των παθογόνων μικροοργανισμών.

Η μορφογενετική τους αποτελεσματικότητα, πιθανώς, σχετίζεται με το στάδιο της ιστοκαλλιέργειας εκφύτων ελιάς, καθώς και με την αλληλεπίδρασή τους με τις αυξίνες στα αρχικά στάδια της (Leva et al. 2013). Ενδεχομένως μοιράζονται κοινό υποδοχέα με την αυξίνη και συμμετέχουν στην ενεργοποίηση ενζύμων του κυτταρικού τοιχώματος.

Οι Garcia et al. (2002) ανακοίνωσαν ότι η φύτευση ζυγωτικών εμβρύων ελιάς (*Olea europaea*) *in vitro* ήταν το ίδιο επιτυχής παρουσία σακχαρόζης και μαννιτόλης. Αντίθετα τα έκφυτα που προέκυπταν από τα ζυγωτικά έμβρυα, είχαν καλύτερη ανάπτυξη (αυξημένη επιμήκυνση βλαστού, δημιουργία ζευγών φύλλων και σπάσιμο της ακραίας κυριαρχίας) παρουσία μαννιτόλης αντί σακχαρόζης.

Οι μηχανισμοί δράσης των ολιγοσακχαριτών στην φυτική αύξηση και ανάπτυξη δεν είναι ακόμα πλήρως γνωστοί, καθώς τα πειραματικά αποτελέσματα είναι πολλές φορές αντικρουόμενα.

Ειδικότερα η σακχαρόζη διαδραματίζει διττό ρόλο:

- Αποτελεί πηγή άνθρακα και είναι απαραίτητη σε συγκεντρώσεις κάτω από ένα κρίσιμο επίπεδο το οποίο επιτρέπει την αναγέννηση.
- Συνιστά ωσμωτικό δραστικό συστατικό που μπορεί να υποκατασταθεί από άλλον υδατάνθρακα ή sugar alcohol που προωθούν επίσης την αναγέννηση.

Αντικρουόμενες είναι οι ερευνητικές προσπάθειες που αναφέρονται στη δράση της σακχαρόζης στα πλαίσια της έκφρασης του φυτικού εμβρυογενετικού δυναμικού. Μια ομάδα ερευνητών υποστηρίζει ότι οι χαμηλές συγκεντρώσεις σακχαρόζης είναι αναγκαίες για την επαγωγή της σωματικής εμβρυογενετικής διαδικασίας:

- ❖ Οι Smith et al. (1988) καλλιέργησαν ζυγωτικά έμβρυα καρότου (*Daucus carota*) σε θρεπτικό μέσο BM και ανακοίνωσαν ότι το επίπεδο επαγωγής προεμβρύων ήταν 54,0% σε 1,0% σακχαρόζη, 42,0% σε 2,0% σακχαρόζη, 54,0% σε 3,0% σακχαρόζη, 37,0% σε 5,0% σακχαρόζη και 36,0% σε 10,0% σακχαρόζη. Η παραμονή των εκφύτων στο παραπάνω θρεπτικό μέσο για μεγάλο χρονικό διάστημα κατέληγε στην εμφάνιση ιστών με μικρότερη ανάπτυξη και στην προαγωγή της φυσιολογικής σωματικής εμβρυογένεσης. Τα παραπάνω, πιθανώς, οφείλονται στην επίδραση του ωσμωτικού δυναμικού, αφού είναι γνωστό ότι το υψηλό ωσμωτικό δυναμικό τείνει να ευνοεί το ξεκίνημα των σωματικών εμβρύων και το χαμηλό ωσμωτικό δυναμικό ευνοεί την πιο φυσιολογική εξέλιξη των σωματικών εμβρύων σε φυτάρια. Ίσως οι συγκεκριμένες αλλαγές να αποτελούν και την αιτία της ανάσχεσης της δευτερογενούς σωματικής εμβρυογένεσης.
- ❖ Οι Hofmann et al. (2004), σε καλλιέργειες σόγιας (*Glycine max*), δοκίμασαν 1,0%, 2,0%, 3,0%, 4,0%, 5,0% και 6,0% σακχαρόζη. Η μεγαλύτερη προώθηση της σωματικής εμβρυογένεσης διαπιστώθηκε σε 2,0% σακχαρόζη.
Περισσότερες είναι οι ερευνητικές δημοσιεύσεις που υποστηρίζουν ότι η υψηλή συγκέντρωση σακχαρόζης ενδυναμώνει τη σωματική εμβρυογένεση:
- ❖ Οι Brown et al. (1989), σε καλλιέργεια ανώριμων εμβρύων σιταριού (*Triticum aestivum*), υπέδειξαν ότι η προσθήκη σακχαρόζης σε χαμηλή συγκέντρωση (20,0 g/L) ενεργοποιούσε τη βλαστογένεση, ενώ η αυξημένη παροχή σακχαρόζης προωθούσε τη σωματική εμβρυογένεση, αυξάνοντας τόσο τον αριθμό των εμβρυογενετικών κάλλων όσο και το μέγεθος των εμβρυογενετικών περιοχών. Πιθανώς οι διαφορετικές μορφογενετικές αντιδράσεις να οφείλονται στην μεταβολή του εσωτερικού ορμονικού ισοζυγίου, εξαιτίας της διαφορετικής σύστασης του θρεπτικού υποστρώματος.
- ❖ Ο Liu (1993), σε ιστοκαλλιέργειες ανώριμων εκφύτων ζαχαροκάλαμου (*Saccharum officinarum*), που εμβολιάζονταν σε θρεπτικό μέσο MSC12, υπέδειξε ότι η υψηλή συγκέντρωση σακχαρόζης (60,0 g/L) προωθούσε υψηλό ποσοστό καλλογένεσης και σωματικής εμβρυογένεσης. Ανάλογα αποτελέσματα στην επαγωγή των σωματικών εμβρύων είχε και η προσθήκη μαννιτόλης σε ιστοκαλλιέργειες ζυγωτικών εμβρύων,

τμημάτων βλαστών και πρωτοπλάστων.

- ❖ Οι Charriere et al. (1998), σε ιστοκαλλιέργειες ανώριμων ζυγωτικών εμβρύων ηλίανθου (*Helianthus annuus*), κατέγραψαν επαγωγή βλαστών σε μέσο με 3,0% σακχαρόζη και διαμόρφωση σωματικών εμβρύων σε θρεπτικό μέσο με 12,0% σακχαρόζη.
- ❖ Οι Nakagawa et al. (2001), σε ιστοκαλλιέργειες κοτυληδόνων πεπονιού (*Cucumis melo*), παρατήρησαν ότι η σακχαρόζη (ιδανική συγκέντρωση τα 200,0 mM) αύξανε τη διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων, όχι όμως και η μαννιτόλη. Υψηλότερες ή χαμηλότερες συγκεντρώσεις σακχαρόζης δεν προωθούσαν τη σωματική εμβρυογένεση. Αντίθετα η μαννιτόλη αν και δεν αύξανε τη σωματική εμβρυογένεση μπορούσε να αυξήσει το ποσοστό επαγωγής, όταν συνδυαζόταν με χαμηλή συγκέντρωση σακχαρόζης. Αξιοσημείωτο είναι ότι στα 200,0 mM σακχαρόζης τα ενδογενή επίπεδα ABA αυξανόταν σημαντικά μετά από δύο εβδομάδες καλλιέργειας. Το περιεχόμενο των εμβρυογενετικών κάλλων σε ABA ήταν εντυπωσιακά υψηλότερο από των μη εμβρυογενετικών κάλλων, γεγονός που υποδεικνύει ότι η σύνθεση ABA επηρεάζει την επαγωγή σωματικών εμβρύων και ελέγχεται από τις ωσμωτικές συνθήκες, όπως προαναφέρθηκε.
- ❖ Σε ιστοκαλλιέργειες γλαδιόλας (*Gladiolus italicus*) η υψηλή συγκέντρωση σακχαρόζης προωθούσε τη σωματική εμβρυογένεση, αλλά περαιτέρω αύξησή της δεν κατέληγε σε ανάλογη αύξηση της διαφοροποίησης (Kumar et al. 2002). Όταν η σακχαρόζη αντικαταστάθηκε από μαννιτόλη, παρατηρήθηκε μόνο βλαστητική διαφοροποίηση. Η αλληλεπίδραση πουτρεσκίνης και υψηλής συγκέντρωσης σακχαρόζης προωθούσε τη σωματική εμβρυογένεση και ανέστελλε τη βλαστητική διαφοροποίηση. Ο συνδυασμός πουτρεσκίνης και χαμηλής συγκέντρωσης σακχαρόζης προωθούσε μόνο τη διαφοροποίηση βλαστών. Τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι η σακχαρόζη δε διαδραματίζει μόνο το ρόλο ωσμωτικά δραστικού συστατικού, αλλά εμπλέκεται και σε άλλους φυτικούς μηχανισμούς.
- ❖ Σε ιστοκαλλιέργειες χρυσάνθεμου (*Chrysanthemum indicum*) παρατηρήθηκε επαγωγή σωματικών εμβρύων (4,0%), παρουσία γλυκόζης, φρουκτόζης ή σακχαρόζης 60,0 g/L (Silva 2004).

Αξιομνημόνευτο είναι και το συμπέρασμα αρκετών εργασιών οι οποίες υποδηλώνουν ότι η επαγωγή της σωματικής εμβρυογένεσης, η τελική ωρίμανση και φύτευση των σωματικών εμβρύων απαιτούν διαφορετικές συγκεντρώσεις σακχάρου ανάλογα με το φυτικό είδος:

- ❖ Ο Thomas (1999) ανακοίνωσε ότι σε ιστοκαλλιέργειες μάνγκο (*Mangifera indica*) η επαγωγή σωματικών εμβρύων και η προώθησή τους μέχρι το σφαιρικό στάδιο του προεμβρύου απαιτούσε μεγάλη συγκέντρωση σακχαρόζης (6,0%), ενώ η περαιτέρω εξέλιξη στο καρδιόσχημο στάδιο και στην κοτυληδόνας μικρότερη (4,0% σακχαρόζη).
- ❖ Αντίθετα οι Mandal et al. (2001) κατέδειξαν σαν ιδανικότερη πηγή άνθρακα τα 87,6 mM σακχαρόζης, τόσο για την επαγωγή όσο και για την ωρίμανση και φύτευση των σωματικών εμβρύων από έκφυτα κνίκου (*Carthamus tinctorius*).

Εκτός από τη μεμονωμένη παροχή σακχάρων ή σακχαρόζης και η συνδυασμένη παροχή τους με σακχαρόζη επάγει δραστικά τη σωματική εμβρυογένεση. Οι Hisajima et al. (1985) ανακοίνωσαν ότι η γλυκόζη, η φρουκτόζη και η γαλακτόζη είναι μονοσακχαρίτες και μπορούν να αποδομηθούν πιο εύκολα από τη σακχαρόζη (δισακχαρίτης αποτελούμενος από γλυκόζη και φρουκτόζη). Η γλυκόζη που παράγεται από την υδρόλυση της σακχαρόζης, απορροφάται περισσότερο από τα κύτταρα συγκριτικά με τη φρουκτόζη. Ενδεικτικά αναφέρονται μερικές ερευνητικές εργασίες που υποδεικνύουν την καταλληλότητα και άλλων υδατανθράκων:

- ❖ Οι Loiseau et al. (1995), σε ιστοκαλλιέργειες μίσχων μπιζελιού (*Pisum sativum*), κατέγραψαν μέγιστη εμβρυογενετική δυναμικότητα σε υψηλή συγκέντρωση υδατανθράκων με ιδανική τη φρουκτόζη (252,0-504,0 mM) συγκριτικά με το πείραμα μάρτυρα (84,0 mM σακχαρόζη).
- ❖ Σε ιστοκαλλιέργειες υποκοτυλίων λιναριού (*Linum usitatissimum*), σε MS, οι μονοσακχαρίτες γλυκόζη και φρουκτόζη σε υψηλές συγκεντρώσεις (4,0%) ήταν καταλληλότεροι για την επαγωγή σωματικών εμβρύων συγκριτικά με θρεπτικό μέσο που περιείχε σακχαρόζη και μαλτόζη. Αντίθετα θρεπτικό μέσο με μαλτόζη (1,0-4,0%) προώθούσε την περαιτέρω ανάπτυξη των σωματικών εμβρύων. Η προσθήκη σακχαρόζης (4,0%) ανέστελλε την ωρίμανση των σωματικών εμβρύων (Cunha 1999).
- ❖ Σε ιστοκαλλιέργειες καουτσουκόδεντρου (*Hevea brasiliensis*) η σακχαρόζη αντικαταστάθηκε από μαλτόζη, φρουκτόζη ή γλυκόζη και το υψηλότερο ποσοστό σωματικής εμβρυογένεσης παρατηρήθηκε παρουσία μαλτόζης (Blanc et al. 1999). Η χρήση μαλτόζης μετέτρεπε τους κίτρινους κάλλους σε πορτοκαλί και μείωνε κατά το ήμισυ την παραγωγή ξηρού βάρους σε αντίθεση με τη σακχαρόζη. Παράλληλα η μαλτόζη μείωνε την ποσότητα διαλυμένου σακχάρου, ενώ η παρουσία σακχαρόζης την αύξανε. Η αργή υδρόλυση της μαλτόζης ήταν το βιοχημικό σήμα για την επαγωγή σωματικών εμβρύων. Αντίθετα η γρήγορη υδρόλυση της σακχαρόζης πιθανώς αύξανε τα επίπεδα των εξοζών και των αποταμιευτικών συστατικών, γεγονός, που οδηγούσε τα κύτ-

ταρα σε γρήγορους αναπτυξιακούς ρυθμούς (Blanc et al. 2002).

- ❖ Η συνδυασμένη προσθήκη λακτόζης, ΒΑ, γλουταμίνης και υδρολυμένης καζεΐνης σε ιστοκαλλιέργειες έλατου (*Abies alba*) ενδυνάμωνε το ποσοστό των επαχθέντων σωματικών εμβρύων και προωθούσε την πλήρη διαφοροποίησή τους (Schuller et al. 2000). Το υψηλότερο ποσοστό σωματικών εμβρύων σταδίου τορπίλης καταγραφόταν στα 200,0 mM λακτόζης και 29,0 mM σακχαρόζης. Ο συνδυασμός λακτόζης και σορβιτόλης προωθούσε την ωρίμανση των σωματικών εμβρύων μέχρι το στάδιο της κοτυληδόνας.
- ❖ Οι Mendoza et al. (2002) ανακοίνωσαν την εξάρτηση της επίδρασης του σακχάρου από το είδος της αυξίνης. Η αντικατάσταση της σακχαρόζης από μαλτόζη ενδυνάμωνε την αναγεννητική ικανότητα των κάλλων, από ανώριμα έμβρυα σιταριού (*Triticum aestivum*), παρουσία 2,4-D και picloram, αλλά προκαλούσε τα αντίθετα αποτελέσματα, όταν συνδυαζόταν με dicamba.
- ❖ Η προσθήκη 10,0% σακχαρόζης ήταν απαραίτητη για την επαγωγή σωματικής εμβρυογένεσης σε ιστοκαλλιέργειες ανώριμων ζυγωτικών εκφύτων πιπεριάς (*Capsicum annuum*) (Bodhipadma et al. 2002). Αντίθετα η προσθήκη 10,0% γλυκόζης ή φρουκτόζης στο θρεπτικό μέσο επαγωγής είχε ανασταλτικό αποτέλεσμα. Μόνο η μαλτόζη μπορούσε να αντικαταστήσει επαρκώς τη σακχαρόζη, τόσο στην επαγωγή όσο και στη μετατροπή των σωματικών εκφύτων σε φυτάρια.

A.13.4. Αζωτο

Πολλαπλές είναι οι ερευνητικές ανακοινώσεις που καταδεικνύουν ότι η αναλογία NO_3^- : NH_4^+ , αλλά και η προσθήκη οργανικού αζώτου στο υπόστρωμα (κυρίως με την μορφή αμινοξέων) επιδρούν τόσο στη φυτική αναγέννηση όσο και στη σωματική εμβρυογένεση (Abu-Qaoud et al. 1991). Μετά τις πρώτες περιγραφές του φαινομένου της σωματικής εμβρυογένεσης ακολούθησαν ποικίλες μελέτες σε υγρές και στερεές ιστοκαλλιέργειες καρότου (*Daucus carota*) με σκοπό τη μελέτη της επίδρασης του αζώτου στη σωματική εμβρυογένεση με αντικρουόμενα, μερικές φορές, αποτελέσματα:

- 1) Σε στερεές ιστοκαλλιέργειες καμβίου καρότου ο συνδυασμός KNO_3 και $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ δεν ήταν επαρκής, αλλά ήταν απαραίτητη η προσθήκη KNO_3 (13,8-20,6 ή 41,2 mM/L) ή NH_4NO_3 (20,6 mM), δηλαδή συγκέντρωση συνολικού αζώτου 44,4 mM για την κατα-

γραφή 50,0% σωματικής εμβρυογένεσης (Reinert et al. 1967). Αντίθετα παρατηρήθηκε μόνο 10,0% σωματική εμβρυογένεση, όταν το θρεπτικό μέσο περιείχε συνολικό άζωτο 17,0 mM ή 23,8 mM. Η μείωση της συγκέντρωσης του αζώτου από 60,0 mM/L σε 1,5 mM/L οδήγησε σε απώλεια της εμβρυογενετικής ικανότητας η οποία επανακτήθηκε μόνο με παροχή γλουταμινικού οξέος ή μίγματος αμινοξέων (συγκέντρωση συνολικού αζώτου 60,0 mM) αντί για KNO_3 ή NH_4NO_3 . Η χαμηλή συγκέντρωση αζώτου (6,0 mM) και K^+ (3,1 mM) δεν επέτρεπε τη διαμόρφωση σωματικών εμβρύων.

Αντίθετα, όταν η συγκέντρωση του αζώτου ήταν η ίδια (6,0 mM) και η συγκέντρωση του K^+ 20,0 mM, καταγράφηκε 50,0% σωματική εμβρυογένεση.

Η ιδανική συγκέντρωση αζώτου ήταν τα 60,0 mM και του K^+ 20,0 mM. Απουσία NH_4NO_3 αναπτύσσονταν λίγα ή καθόλου σωματικά έμβρυα, ενώ η μικρή προσθήκη NH_4Cl (2,1 mM) προωθούσε αισθητά τη σωματική εμβρυογένεση.

- 2) Σε καλλιέργειες ριζών καρότου καταγράφηκε θετική επίδραση των ιόντων K^+ και NH_4^+ στην επαγωγή σωματικής εμβρυογένεσης (Tazawa et al. 1969).

Σημαντική ανάσχεση υπήρχε, όταν απομακρυνόταν το KNO_3 και παρεχόταν μέτρια συγκέντρωση NH_4NO_3 . Η παροχή NH_4NO_3 μείωνε το ενδοκυτταρικό επίπεδο K^+ , καθώς αναστελλόταν ισχυρά η πρόσληψη του [με τη μορφή KH_2PO_4 (1,25 mM K^+)]. Η προσθήκη KH_2PO_4 σε συγκέντρωση αντίστοιχη του KNO_3 (18,8 mM) επανέφερε το ενδοκυτταρικό επίπεδο K^+ στην αρχική του συγκέντρωση και επέτρεπε τη διαφοροποίηση μικρών ποσοστών σωματικής εμβρυογένεσης, καθώς τα ιόντα PO_4^{3-} την ανέστελλαν. Το Na^+ μόνο του δεν ανέστελλε την εμβρυογένεση, όπως αποδεικνύεται από την παρόμοια δραστηριότητα του NaNO_3 και του KNO_3 . Η προσθήκη 41,2 mM NaCl προκαλούσε μικρή αναστολή της σωματικής εμβρυογένεσης.

- 3) Σε υγρές καλλιέργειες μίσχων άγριου στελέχους καρότου παρουσία 5,0-95,0 mM KNO_3 καταγραφόταν μικρή αύξηση της σωματικής εμβρυογένεσης. Η παροχή 0,1 mM NH_4Cl την προωθούσε, ενώ η παροχή 10,0 mM NH_4Cl ήταν κατάλληλη μόνο, όταν η συγκέντρωση του KNO_3 κυμαινόταν από 12,0-40,0 mM. Η μεμονωμένη προσθήκη στο τεχνητό υπόστρωμα γλουταμίνης, γλουταμινικού οξέος, ουρίας ή αλανίνης μπορούσε να υποκαταστήσει το NH_4Cl παρουσία KNO_3 (Wetherell et al. 1976).

- 4) Η παροχή υψηλής συγκέντρωσης KNO_3 σε υποκοτύλια καρότου ενεργοποιούσε ελάχιστα τη σωματική εμβρυογένεση, ενώ η συνδυασμένη παροχή KNO_3 και NH_4NO_3 την προωθούσε σημαντικά (Kamada et al. 1979b). Η σωματική εμβρυογένεση αυξανόταν, όταν το θρεπτικό μέσο περιείχε αποκλειστικά NH_4NO_3 . Ο συνδυασμός $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ και

KNO_3 ανέστειλε τόσο τη ριζογένεση όσο και τη σωματική εμβρυογένεση. Αν και η μεμονωμένη παρουσία NH_4Cl δεν ήταν αποτελεσματική για την επαγωγή σωματικής εμβρυογένεσης, ο συνδυασμός του με KNO_3 ήταν πολύ προωθητικός. Η πλήρης απομάκρυνση των αζωτούχων συστατικών ανέστειλε τη σωματική εμβρυογένεση.

Έκτοτε ακολούθησε πλήθος εργασιών με στόχο τη διαλεύκανση της εξάρτησης της σωματικής εμβρυογένεσης από το είδος και τη συγκέντρωση του παρεχόμενου αζώτου. Ενδεικτικά αναφέρονται οι παρακάτω:

- ❖ Σε κάλλους από σημύδα (*Betula pendula*, Roth.) καταγράφηκε μέγιστη σωματική εμβρυογένεση σε συνολικό ανόργανο άζωτο 35,0 mM και συγκέντρωση σακχαρόζης 20,8 g/L (Nuutila et al. 1991). Το ανοιγμένο άζωτο με την μορφή NO_3^- ήταν πολύ αποτελεσματικό, αλλά όχι και το $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Υψηλή συγκέντρωση KNO_3 στο θρεπτικό μέσο απουσία NH_4NO_3 ή NH_4Cl προώθησε ελάχιστα την επαγωγή σωματικών εμβρύων. Αντίθετα η παροχή KNO_3 (20,0 mM) και α-αλανίνης (5,0-10,0 mM) την προωθούσε σημαντικά.

Τα αμινοξέα γλουταμίνη, ασπαράγινη, ασπαρτικό οξύ, γλουταμινικό οξύ, αργινίνη και προλίνη προωθούσαν τη σωματική εμβρυογένεση σε αντίθεση με τα αμινοξέα λυσίνη, βαλίνη, ιστιδίνη, λευκίνη, β-αλανίνη και μεθειονίνη. Το πουριβικό οξύ παρεμπόδιζε την προωθητική επίδραση του γλουταμινικού οξέος. Από τα αμινοξέα που προστέθηκαν μεμονωμένα, χωρίς ταυτόχρονη προσθήκη άλλων αζωτούχων συστατικών, η γλουταμίνη ήταν το καταλληλότερο.

- ❖ Οι Mordhorst et al. (1993) ανακοίνωσαν ότι σε ιστοκαλλιέργειες μικροσπόρων κριθαριού (*Hordeum vulgare*) τα κυτταρικά συσσωματώματα παρουσία 20,0 mM αζώτου αναπτύσσονταν πολύ αργά, εξελίσσονταν σπάνια σε ολοκληρωμένα σωματικά έμβρυα και τελικά σε πλήρη φυτά. Όταν η συγκέντρωση του εξωγενώς παρεχόμενου αζώτου ήταν μεγαλύτερη από 35,0 mM, τα κυτταρικά συσσωματώματα εμφάνιζαν ακανόνιστο σχήμα και δημιουργία κάλλου. Τα υψηλότερα ποσοστά σωματικής εμβρυογένεσης καταγραφόταν σε αναλογία $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+$ 90:10 και 70:30. Όταν η αναλογία ήταν 50:50 η φυτική αύξηση ήταν ίδια με την αύξηση του πειράματος-μάρτυρα, τα κυτταρικά συσσωματώματα εμφάνιζαν μικρή αναγεννητική ικανότητα και σε διάστημα 6-8 εβδομάδων γίνονταν καφέ και τελικά νεκρώνονταν.

Σε υψηλή αναλογία ανόργανου-οργανικού άνθρακα και ταυτόχρονη προσθήκη γλουταμίνης παρατηρήθηκε ανάσχεση της φυτικής αναγέννησης, ενώ η ανάπτυξη ήταν συγκρίσιμη με του πειράματος-μάρτυρα. Η μεμονωμένη παροχή NO_3^- ή NH_4^+ οδη-

γούσε σε μικρή φυτική αναγέννηση. Η περιορισμένη ανάπτυξη των μικροσπόρων σε θρεπτικό μέσο που περιείχε μόνο NH_4^+ ή αναλογία $\text{NO}_3^- : \text{NH}_4^+ 30:70$ οφειλόταν στην τοξικότητα του NH_4^+ .

- ❖ Σε ιστοκαλλιέργειες υποκοτυλίων λιναριού (*Linum usitatissimum*) βρέθηκε ότι το NO_3^- διαδραμάτιζε καθοριστικό ρόλο στην επαγωγή, διαφοροποίηση και αύξηση του κάλλου, ενώ η μεγάλη συγκέντρωση NH_4^+ αύξανε δραστικά τη συχνότητα της σωματικής εμβρυογένεσης (Cunha et al. 1999).
- ❖ Οι Leljak-Levanik et al. (2004) καλλιέργησαν ανώριμα ζυγωτικά έμβρυα κολοκυθιού (*Cucurbita pepo*) σε MS με μοναδική πηγή αζώτου το NH_4Cl και δημιούργησαν τρεις ομοιόμορφες εμβρυογενετικές σειρές. Οι ιστοκαλλιέργειες περιείχαν προεμβρυικά συσσωματώματα ή σωματικά έμβρυα σφαιρικού σχήματος, τα οποία δεν εξελίσσονταν σε πλήρη φυτάρια. Τα σφαιρικά έμβρυα ωρίμαζαν, όταν μεταφέρονταν σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε συνδυασμό NH_4^+ και NO_3^- . Οι διαφορετικές πηγές αζώτου προκαλούσαν αλλαγές στο pH του θρεπτικού μέσου από 4,0-6,5, γι' αυτό και ήταν απαραίτητη η σταθεροποίηση του pH σε τιμές 4,0 ή 3,2.
- ❖ Οι Trabelsi et al. (2011) ανακοίνωσαν για πρώτη φορά την επαγωγή σωματικής εμβρυογένεσης από έκφυτα ώριμων ιστών της ποικιλίας "Chetoui" ελιάς (*Olea europaea*) σε υγρές καλλιέργειες. Τμήματα ώριμων φύλλων που προέρχονταν από *in vitro* επαχθέντες βλαστούς (ηλικίας τεσσάρων εβδομάδων), εμβολιάστηκαν σε MS με 10,0 μM NAA και 2,25 μM 2iP στο σκοτάδι. Οι πιο εύθρυπτοι και υγιείς κάλλοι μεταφέρονταν σε υγρό θρεπτικό μέσο OMe με 2,25 μM ζεατίνη αποκλειστικά ή συνδυασμένη με 2,5 μM 2,4-D ή 2,5 μM NAA ή αποκλειστικά 2,5 μM 2,4-D. Το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα επαγωγής περιείχε 700,0 mg/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ή 950,0 mg/L KNO_3 ή οργανική μορφή αζώτου (500,0 mg/L υδρολυμένης καζεΐνης) ή συνδυασμό και των τριών πηγών αζώτου. Ο πιο αποδοτικός ρυθμός επαγωγής σωματικών εμβρύων καταγράφηκε στο θρεπτικό μέσο με το συνδυασμό των πηγών αζώτου.

A.13.5. ΠΟΛΥΑΜΙΝΕΣ

A.13.5.1. Γενικά

Οι πολυαμίνες **πουτρεσκίνη**, **σπερμιδίνη** και **σπερμίνη** αποτελούν τμήμα του συνολικού μεταβολισμού των αζωτούχων κυτταρικών συστατικών. Πρόκειται για αλειφατικές αμίνες μικρού μοριακού βάρους, πολυκαντιοντικής φύσης και απαντούν σε όλους τους ζωντανούς οργανισμούς.

Εξαιτίας των πολυκαντιοντικών τους ιδιοτήτων σχετίζονται με πλήθος μεταβολικών και αναπτυξιακών διαδικασιών στα φυτά. Έχει διατυπωθεί η άποψη ότι οι πολυαμίνες δεν συμπεριφέρονται σαν ορμόνες, καθώς υπάρχουν αρκετές ενδείξεις ότι ενεργούν σαν δευτερογενείς αγγelioφόροι των ορμονών.

Οι κυριότερες κυτταρικές λειτουργίες στις οποίες εμπλέκονται οι πολυαμίνες είναι:

1. Συνεισφέρουν στην κυτταρική ομοιόσταση, ενεργώντας σαν ένα μεταβολικό ρυθμιστικό διάλυμα της διατήρησης του κυτταρικού pH, όταν η ενεργοποίηση ιόντων NH_4^+ παρέχει περίσσεια πρωτονίων.
2. Συμμετέχουν στην αντιμετώπιση καταστάσεων περιβαλλοντικής καταπόνησης (αφυδάτωση, οσμωτική καταπόνηση κ.ά.), πιθανώς μέσω της σύνδεσής τους με αρνητικά φορτισμένα μακρομόρια.
3. Εμπλέκονται στον *in vitro* tuberization.
4. Διαδραματίζουν μορφογενετικό ρόλο. Σε κύτταρο/ιστοκαλλιέργειες φυτικών εκκύτων έχουν καταγραφεί υψηλές συγκεντρώσεις πολυαμινών σε ιστούς με ενεργό μεταβολισμό, έντονους αυξητικούς ρυθμούς, αύξηση ακραίων βλαστητικών μεριστωμάτων, ανάπτυξη ριζών και σωματικών εμβρύων. Έχει προταθεί ότι ο μορφογενετικός ρόλος των πολυαμινών οφείλεται στο ηλεκτροστατικό τους δέσιμο με αρνητικά φορτισμένα συστατικά, όπως νουκλεϊκά οξέα και φωσφολιπίδια της κυτταρικής μεμβράνης. Οι πολυαμίνες δρουν σαν αντιξηραντικά συστατικά, λόγω της άμεσης σύνδεσής τους με την κυτταρική μεμβράνη. Η εμπλοκή των πολυαμινών με τη βιοσύνθεση του αιθυλενίου σε μεμβρανικό επίπεδο υποδηλώνει τη συνδρομή τους στη σταθεροποίηση, τόσο της δομής και της λειτουργίας των νουκλεϊκών οξέων και των μεμβρανών όσο και της επιβράδυνσης του γηρασμού.

Συνοπτικά μια ενδιαφέρουσα και ελκυστική, ταυτόχρονα, πρόταση για το ρόλο τους κατά τη φυτική διαφοροποίηση είναι ότι οι πολυκατιοντικές πολυαμίνες ρυθμίζουν άμεσα το κυτταρι-

κό pH κι έτσι έμμεσα συνεισφέρουν:

- Στη δημιουργία πολικότητας στο κύτταρο, αφού η άνιση κατανομή προκαλεί την ανισοκατανομή και άλλων αρνητικά φορτισμένων μακρομορίων.
- Στη διατήρηση της ασύμμετρης κατανομής ενός αρνητικά φορτισμένου μακρομορίου εξουδετερώνοντας το φορτίο του.

Και στις δύο περιπτώσεις απαραίτητη προϋπόθεση είναι η ασύμμετρη κατανομή των ενδοκυτταρικών πολυαμινών.

A.13.5.2. Σωματική εμβρυογένεση & ενδογενή επίπεδα πολυαμινών

Λεπτομερείς μελέτες έχουν πραγματοποιηθεί με στόχο τη διασαφήνιση του συσχετισμού ενδογενών πολυαμινών και σωματικής εμβρυογένεσης. Οι περισσότερες βιβλιογραφικές αναφορές δεν υποδεικνύουν έναν κοινό τρόπο δράσης σε όλα τα φυτικά είδη, αλλά φανερώνουν ότι ο μεταβολισμός τους αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση για τη διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων.

Είναι γνωστό ότι τα φυτικά κύτταρα συνθέτουν πουτρεσκίνη μέσω δύο παράλληλων μεταβολικών μονοπατιών (Mader 1995):

- Του ενζύμου 3-truncated mouse ornithine decarboxylase (ODC).
- Του ενζύμου Arginine decarboxylase (ADC).

Αντίθετα τα ζωικά κύτταρα διαθέτουν μόνο το ODC μονοπάτι.

Η πρώτη αναφορά για τον καθοριστικό ρόλο των ενδογενών πολυαμινών στη διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων έγινε από τους Montague et al. (1978). Οι Montague et al. κατέγραψαν αυξημένα ενδογενή επίπεδα πουτρεσκίνης σε κυτταρικές καλλιέργειες ανεξάρτητα από την παροχή ή μη 2,4-D στο τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα. Υψηλότερα επίπεδα πουτρεσκίνης διατηρούσαν οι εμβρυϊκοί κάλλοι συγκριτικά με τους μη εμβρυϊκούς κάλλους, ενώ τα επίπεδα της σπερμίνης ήταν χαμηλά στους εμβρυϊκούς κάλλους. Η αλληλεπίδραση σπερμιδίνης και αυξίνης δεν ήταν ιδιαίτερα καθοριστική για το τελικό ποσοστό της σωματικής εμβρυογένεσης.

Οι Fienberg et al. (1984) επιβεβαίωσαν τον καθοριστικό ρόλο της βιοσύνθεσης των πολυαμινών κατά τη διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων σε ιστοκαλλιέργειες καρότου (*Daucus carota*). Όταν εμβρυϊκοί κάλλοι καρότου κατεργάστηκαν με ειδικό αναστολέα της βιοσύνθεσης πολυαμινών, καταγράφηκε δραματική μείωση της σωματικής εμβρυογένεσης (50,0%), σε αντίθεση με καλλιέργειες μη κατεργασμένων κάλλων. Η αναστολή ήταν αναστρέψιμη, καθώς η εξω-

γενής παροχή πουτρεσκίνης, σπερμιδίνης ή σπερμίνης αποκαθιστούσε το αρχικό ποσοστό σωματικής εμβρυογένεσης.

Οι Huang et al. (2001), σε καλλιέργειες τριφυλλίου (*Medicago sativa*), ανακοίνωσαν ότι οι εμβρυογενετικοί κάλλοι στο στάδιο της επαγωγής περιείχαν πουτρεσκίνη, σπερμιδίνη και σπερμίνη σε πολύ μικρή συγκέντρωση, ιδιαίτερα αναλογίες πουτρεσκίνης/σπερμιδίνης. Η εμφάνιση των σωματικών εμβρύων αύξανε τα επίπεδα πολυαμινών στο μέγιστο επίπεδο τα οποία στη συνέχεια μειωνόντουσαν όσο η εμβρυογενετική διαδικασία εξελισσόταν.

Σε μια προσπάθεια διασαφήνισης του αυξητικού ρόλου των πολυαμινών και του επαγωγικού τους ρόλου στη διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων χρησιμοποιήθηκε μια μεταλλαγμένη κυτταρική σειρά καρότου που είχε χάσει την εμβρυογενετική ικανότητα, αλλά διατηρούσε τη δυνατότητα αύξησης και πολλαπλασιασμού σε θρεπτικό μέσο κατάλληλο για επαγωγή σωματικών εμβρύων. Στη μεταλλαγμένη κυτταρική σειρά δεν καταγράφηκε σημαντική αύξηση της συγκέντρωσης σπερμιδίνης και σπερμίνης, ενώ η εξωγενής παροχή τους προωθούσε, μερικές φορές, τα ποσοστά της σωματικής εμβρυογένεσης.

Τα παραπάνω αποτελέσματα ενισχύουν την άποψη ότι οι πολυαμίνες και ειδικότερα η σπερμιδίνη και η σπερμίνη αποτελούν απαραίτητη προϋπόθεση για την εκδήλωση σωματικής εμβρυογένεσης, αλλά και δευτερογενούς σωματικής εμβρυογένεσης (Rajesh et al. 2003).

A.13.5.3. Σωματική εμβρυογένεση & εξωγενώς παρεχόμενες πολυαμίνες

Οι πολυαμίνες, όπως η πουτρεσκίνη, η σπερμιδίνη και η σπερμίνη, εμπλέκονται σε πολυάριθμες διαδικασίες που σχετίζονται με τη φυτική αύξηση, επιδρώντας στην κυτταρική διαίρεση (Rugini et al. 1997).

Σε πειράματα που χρησιμοποιήθηκαν τόσο κάλλοι καλαμποκιού (*Zea mays*) (Koch et al. 1996) όσο και κάλλοι από τομές ριζών *Panax ginseng* (Kervers et al. 2000) η παρουσία εξωγενούς αυξίνης, πολυαμινών ή πρόδρομων συστατικών της σύνθεσής τους (ιδιαίτερα αργινίνης και ορνιθίνης) κατέληγε, ακόμα και στον τετραπλασιασμό του ρυθμού παραγωγής σωματικών εμβρύων. Παράλληλα η χρήση αναστολέων τόσο της βιοσύνθεσης όσο και της βιοδιάσπασης των πολυαμινών μείωνε τον αριθμό των επαγόμενων εμβρύων.

Οι παραπάνω αναφορές υποδεικνύουν την εμπλοκή τόσο του μεταβολικού μονοπατιού ODC όσο και του ADC στο μηχανισμό της σωματικής εμβρυογένεσης. Σε υγρές καλλιέργειες εμβρυογενετικών κάλλων *Panax ginseng* η προσθήκη στο αρχικό θρεπτικό μέσο σπερμιδίνης αύξα-

νε τη διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων (Monteiro et al. 2002). Διαπιστώθηκε ότι η παρεχόμενη σπερμιδίνη οξειδωνόταν από οξειδάσες των πολυαμινών και εν μέρει μεταβολιζόταν σε πουτρεσκίνη.

Ο συνδυασμός πουτρεσκίνης, θερμοκρασιακής καταπόνησης (50 °C για μία ώρα) και υψηλής συγκέντρωσης σακχαρόζης, σε ιστοκαλλιέργειες γλαδιόλας (*Gladiolus italicus*), προωθούσε τη σωματική εμβρυογένεση και παρεμπόδιζε τη βλαστική διαφοροποίηση (Kumar et al. 2002). Η προσθήκη πουτρεσκίνης και χαμηλής συγκέντρωσης σακχαρόζης προωθούσε τη διαφοροποίηση βλαστών.

Οι Sakhanokho et al. (2005) αύξησαν 2-8 φορές την παραγωγή σωματικών εμβρύων σε διάφορες σειρές βαμβακιού (*Gossypium hirsutum*) με την προσθήκη 0,5 mg/L πουτρεσκίνης.

Σε αντίθετα αποτελέσματα κατέληξαν οι Bonneau et al. (1995). Σε ιστοκαλλιέργειες κοτυληδόνων ευωνύμου (*Euonymus europaea*) η προσθήκη DFMO (ειδικός μη αντιστρεπτός αναστολέας της ODC) σε μη εμβρυογενετικούς κάλλους παρεμπόδιζε την καλλογένεση και τη βιοσύνθεση της πουτρεσκίνης, αλλά προωθούσε σημαντικά την επαγωγή ριζών. Αντίθετα σε εμβρυογενετικούς κάλλους ανέστελλε μερικώς τη βιοσύνθεση πουτρεσκίνης, αλλά καταγράφονταν υψηλή συχνότητα σωματικών εμβρύων.

Οι Mauri et al. (2011) μελέτησαν το συνολικό ενδογενές περιεχόμενο πολυαμινών, σε ιστοκαλλιέργειες βελανιδιάς (*Quercus ilex*). Οι εμβρυογενετικοί κάλλοι ανώριμων ζυγωτικών και σωματικών εμβρύων βελανιδιάς περιείχαν υψηλό ποσοστό πολυαμινών το οποίο μειωνόταν στις φάσεις ωρίμανσης και φύτρωσής τους. Πιο συγκεκριμένα περιείχαν υψηλά επίπεδα σπερμιδίνης που μειωνόταν στη φάση ωρίμανσης και φύτρωσης. Τα επίπεδα σπερμίνης ήταν μικρότερα από της σπερμιδίνης. Τα μεγαλύτερα ποσοστά σπερμίνης καταγράφονταν στους εμβρυογενετικούς κάλλους και στα ανώριμα ζυγωτικά έμβρυα συγκριτικά με τα ώριμα.

A.13.6. ΕΝΕΡΓΟΣ ΑΝΘΡΑΚΑΣ

Η προσθήκη ενεργού άνθρακα στο τεχνητό υπόστρωμα επάγει θετικά τη σωματική εμβρυογένεση, καθώς αρκετά πειραματικά αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι έχει τη δυνατότητα να απορροφά ανασταλτικά συστατικά και αυξητικούς παράγοντες που επιβραδύνουν ή αναστέλλουν τη σωματική εμβρυογένεση (Ammirato 1983).

Οι Pullman et al. (2005) ανακοίνωσαν ότι ο συνδυασμός ABA και ενεργού άνθρακα αύξανε την παραγωγή σωματικών εμβρύων σε καλλιέργειες ερυθρελάτης (*Picea abies*). Τα σωματικά

έμβρυα διέθεταν αυξημένο μέγεθος, μεγαλύτερα ακραία μεριστώματα και έμοιαζαν περισσότερο με ζυγωτικά έμβρυα, καθώς είχαν μεγαλύτερο ποσοστό ανάπτυξης επικοτυλίου κατά τη φύτρωση. Παράλληλα κατέγραψαν ταχύτατη μείωση του ελεύθερου ABA, μέσα σε λίγες ώρες, σταδιακή πτώση τις επόμενες ημέρες και μικρή αλλαγή τις 2-6 επόμενες εβδομάδες.

Οι Lopez-Perez et al. (2005) σε ιστοκαλλιέργειες ανώριμων ανθέρων και ωοθηκών αμπελιού (*Vitis vinifera*) και οι Loganathan et al. (2010) σε ιστοκαλλιέργειες ανώριμων εμβρυϊκών μεριστωμάτων βλαστού σόγιας (*Glycine max*) έδειξαν ότι ο ενεργός άνθρακας ήταν απαραίτητος για την απόκτηση σωματικών εμβρύων σε κάποιες ποικιλίες και για την αύξηση του ποσοστού επαγωγής σωματικών εμβρύων σε κάποιες άλλες.

Η προσθήκη 1,0 g/L ενεργού άνθρακα προώθησε τη φύτρωση δευτερογενών σωματικών εμβρύων σε *in vitro* ιστοκαλλιέργεια σούρβου (*Sorbus robuasbanensis*) (Yang et al. 2012). Η φύτρωση των εμβρύων έγινε στο φως και σε MS που περιείχε, εκτός του ενεργού άνθρακα, 0,06 μM NAA ή 0,15 μM IBA. Το ποσοστό φύτρωσης ξεπέρασε το 60,0% (πείραμα-μάρτυρας 50,0%) παρουσία ενεργού άνθρακα.

A.13.7. ΑΓΑΡ

Το άγαρ είναι, σε γενικές γραμμές, ένας ανενεργός μεταβολικά πολυσακχαρίτης. Σχετικές μελέτες, όμως, υποδεικνύουν ότι το είδος του στερεωτικού μέσου των θρεπτικών υποστρώματων επηρεάζει τη διαθεσιμότητα νερού και αλάτων στους φυτικούς ιστούς και κατ' επέκταση την παραγωγή ξηρού και νωπού βάρους (Beruto et al. 1999).

Οι Ponsamuel et al. (1996) σε ιστοκαλλιέργειες ανώριμων κοτυληδόνων καλλιεργήσιμου τσαγιού (*Camellia sinensis*) χρησιμοποίησαν υποστρώματα με 0,8% και 1,5% άγαρ, προκειμένου να παράγουν μη εμβρυογενετικούς κάλλους και υποστρώματα με 3,0% και 6,0% άγαρ για την επαγωγή σωματικών εμβρύων. Οι υψηλές συγκεντρώσεις (3,0% και 6,0% άγαρ) μείωναν τη συχνότητα μετατροπής των σωματικών εμβρύων σε πλήρη φυτάρια και προωθούσαν τη δημιουργία ανώμαλων φυταρίων. Η συγκέντρωση 0,8% άγαρ προωθούσε, κατά 50,0%, την ωρίμανση των σωματικών εμβρύων σε πλήρη φυτάρια.

Σε καλλιέργειες ερυθρελάτης (*Picea abies*) τα διαφορετικά στερεωτικά μέσα (phytagel κ.ά.) επιδρούσαν αισθητά στην απορρόφηση του ABA. Το άγαρ τη μείωνε αισθητά, συγκριτικά με τα υπόλοιπα, προκαλώντας έτσι στην περαιτέρω μείωση της σωματικής εμβρυογένεσης (Pullman et al. 2005). Αντίθετα οι Kumar et al. (2002) σε καλλιέργεια γλαδιόλας (*Gladiolus italicus*) είχαν ανα-

κοινώσει την υπεροχή του άγαρ έναντι του phytagel στη δημιουργία σωματικών εμβρύων.

Ο Gaj (2002) σε ιστοκαλλιέργειες ανώριμων ζυγωτικών εμβρύων (*Arabidopsis thaliana*) διαπίστωσε ότι η φάση του θρεπτικού μέσου (στερεή ή υγρή) δεν επηρέαζε την εμβρυογενετική ικανότητα των καλλιεργούμενων εκφύτων.

Αντίθετα οι Beena et al. (2003) κατέγραψαν την υπεροχή του υγρού θρεπτικού υποστρώματος έναντι του στερεού σε ιστοκαλλιέργειες κηροπηγής (*Ceropegia candelabrum*). Το ποσοστό των σωματικών εμβρύων ήταν υψηλότερο, όταν οι εύθρυπτοι κάλλοι από στερεό θρεπτικό μέσο MS που περιείχε 4,52 μM 2,4-D, μεταφέρονταν σε υγρό θρεπτικό μέσο $\frac{1}{2}$ ή $\frac{1}{4}$ MS με χαμηλότερες συγκεντρώσεις 2,4-D.

Ανάλογα ήταν και τα πειραματικά αποτελέσματα των Mauri et al. (2003) που κατέδειξαν την υπεροχή του υγρού έναντι του στερεού θρεπτικού μέσου στην επαγωγή σωματικών εμβρύων και δευτερογενούς εμβρυογένεσης, καθώς το τελευταίο ήταν καταλληλότερο για την ωρίμανση των σωματικών εμβρύων.

Η αναγκαιότητα της παρουσίας άγαρ για την επιτυχή ωρίμανση των σωματικών εμβρύων υποδεικνύεται και από τις δημοσιεύσεις των Sauer et al. (2005) σε ιστοκαλλιέργειες ωοθηκών και ανώριμων ζυγωτικών εμβρύων καστανιάς (*Castanea sativa*), των Duoue et al. (2006) σε καλλιέργειες *Medicago truncatula* και των Màrquez-Martín et al. (2012) σε ιστοκαλλιέργειες αβοκάντο (*Persea americana*).

A.13.8. PH

Το αρχικό pH του τεχνητού μέσου και οι μεταβολές του κατά τη διάρκεια της ιστοκαλλιέργειας επιδρούν στην εκδήλωση του φυτικού οργανογενετικού προγράμματος *in vitro* (Cousson et al. 1989).

Σε κυτταροκαλλιέργειες καρότου (*Daucus carota*), σε βιοαντιδραστήρα, η παραγωγή σωματικών εμβρύων ήταν υψηλότερη σε μέσο χωρίς φυτοαυξητικούς παράγοντες και pH 4,3, αλλά δεν ευνοούσε τα περισσότερα επαχθέντα έμβρυα αδυνατούσαν να εξελιχτούν στο στάδιο της τορπίλης και του φυταρίου. Αντίθετα, αν και το pH 5,8 μείωνε κατά τρεις φορές την παραγωγή σωματικών εμβρύων, τα επαχθέντα σωματικά έμβρυα διαφοροποιούνταν σε πλήρη φυτάρια. Οι διαφορές στην εμβρυϊκή ανάπτυξη πρέπει να σχετίζονται με τις αλλαγές στην απώλεια NH_4^+ από το θρεπτικό μέσο και το διαφορετικό ρυθμό απορρόφησης σακχαρώζης (Jay et al. 1994).

Σε ιστοκαλλιέργειες ανώριμων κοτυληδόνων σόγιας (*Glycine max*) με pH 5,7 ή 7,0 υψηλό-

τερη εμβρυογενετική αντίδραση καταγράφεται στο τελευταίο (Santnarem et al.1997 και Bonacin et al. 2000), αν και οι Hofmann et al. (2004) δεν διαπίστωσαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ίδιων τιμών pH σε αντίστοιχες καλλιέργειες.

Σε καλλιέργειες εκφύτων από φύλλα *Ostericum koreanum* (Cho et al. 2003) η παραγωγή και αναγέννηση σωματικών εμβρύων ενδυναμωνόταν από την προσωρινή έκθεση των εκφύτων σε υπόστρωμα με χαμηλό pH, αν και η σωματική εμβρυογένεση ουσιαστικά λάμβανε χώρα σε υπόστρωμα με συνήθη τιμή pH.

A.13.9. ΦΩΤΟΠΕΡΙΟΔΟΣ

Ποικίλα, αλλά αντικρουόμενα είναι τα πειραματικά δεδομένα που αναφέρονται στην αναγκαιότητα ή μη του φωτός για την επαγωγή σωματικών εμβρύων. Υπάρχουν ερευνητικές παρατηρήσεις που υποδεικνύουν ότι η σωματική εμβρυογένεση είναι ανεξάρτητη από τη φωτοπερίοδο (Sujatha et al. 2001), αλλά πολλαπλές είναι και οι βιβλιογραφικές αναφορές που αναδεικνύουν την επαγωγική της δύναμη.

Έχει ανακοινωθεί ότι το φως επιδρά άμεσα στην αναλογία αυξίνης:κυτοκίνινης εξαιτίας της αποσταθεροποίησης της αυξίνης και σε συνδυασμό με το pH επιδρά στην απορρόφηση σακχαρώζης και αμινοξέων από το θρεπτικό υπόστρωμα (Reinhold et al. 1984).

Οι Pelkonen et al. (1999) υποστήριξαν ότι η καλλογένεση λαμβάνει χώρα επιτυχώς στο σκοτάδι, ενώ το φως τείνει να προωθεί το πρασίνισμα του κάλλου, τη σωματική εμβρυογένεση και τη βλαστογένεση. Τα έκφυτα αναπτύσσονταν συνήθως σε συχνότητα φωτισμού 500-1.000 lux και 16 ώρες φωτοπερίοδο. Οι υψηλότερες συχνότητες (5.000-10.000 lux) προωθούσαν την αύξηση των φωτοσυνθετικών ιστών και των φυταρίων, καθώς και τον επιτυχή εγκλιματισμό τους στο χώμα.

Ο Ammirato (1983), σε καλλιέργειες αγριοκύμινου (*Carum carvi*), κατέγραψε την επαγωγή απλών σωματικών εμβρύων και ανώμαλων δομών οι οποίες εξελίσσονταν σε μακριές φυλλοειδείς κοτυληδόνες. Όταν η αύξηση των σωματικών εμβρύων γινόταν στο φως καταγραφόταν διαφοροποίηση των ώριμων φύλλων και τόσο οι κοτυληδόνες όσο και τα φύλλα πρασίνιζαν. Ο αριθμός των σωματικών εμβρύων στο φως ήταν διπλάσιος και το νωπό τους βάρος τριπλάσιο συγκριτικά με τα έμβρυα που αναπτύσσονταν στο σκοτάδι. Η πλειοψηφία των εμβρυϊκών πληθυσμών ήταν πολλαπλές δομές και μόνο 35,0% των σωματικών εμβρύων που αναπτύσσονταν στο φως και 24,0% των σωματικών εμβρύων που αναπτύσσονταν στο σκοτάδι είχαν το φυσιολογικό

αριθμό κοτυληδόνων. Στην επιφάνεια όλων σχεδόν των σωματικών εμβρύων, που αναπτύσσονταν είτε στο φως είτε στο σκοτάδι, διαφοροποιούνταν μάζες πολλαπλών εμβρύων και εμβρύων με κάλλο. Συμπερασματικά το φως δεν επηρέαζε τόσο τα ποσοστά επαγωγής σωματικής εμβρυογένεσης όσο αύξανε δραστικά τη φύτευση των εμβρυοειδών.

Πολλαπλές είναι και οι ερευνητικές προσπάθειες που υποδεικνύουν το συσχετισμό της φωτοπεριόδου, της ποιότητας του φωτός, της φωτομετατροπής του φυτοχρώματος και των πολυαμινών με τη σωματική εμβρυογένεση (Torne et al. 2001).

Σε ιστοκαλλιέργειες φύλλων κυδωνιάς (*Cydonia oblonga*), η υψηλότερη εμβρυογενετική αντίδραση καταγραφόταν στο κόκκινο φως και μειωνόταν σταδιακά με τη μετάβαση των εκφύτων σε κόκκινο/μπλε και τελικά σε λευκό φως (D'Onofrio et al. 1998). Η εμβρυογενετική ικανότητα φάνηκε να σχετίζεται με το φωτοϊσοζύγιο, καθώς το φυτόχρωμα είχε επαγωγική δράση, αν και επηρεαζόταν αρνητικά από τον φωτοϋποδοχέα απορρόφησης του μπλε ειδικά σε χαμηλό φωτοϊσοζύγιο.

Οι Latkowska et al. (2000) ανέφεραν ότι η επίδραση της ποιότητας του φωτός στην ανάπτυξη εμβρυϊκών ιστών, σχετιζόταν άμεσα με το γονότυπο του εκφύτου σε ιστοκαλλιέργειες ερυθρελάτης (*Picea abies*).

Δεν λείπουν, όμως και οι βιβλιογραφικές αναφορές που καταδεικνύουν την επαγωγική δράση του σκοταδίου στην εμβρυογενετική διαδικασία.

Οι Hutchinson et al. (2000) κατέγραψαν την αλληλεπίδραση TDZ και φωτός η οποία επηρέαζε τα ενδογενή φυτικά αναπτυξιακά συστατικά που καθόριζαν την εμβρυογενετική διαφοροποίηση σε ιστοκαλλιέργειες εκφύτων από υποκοτύλια γερανιού (*Pelargonium grandiflorum*). Τα συγκεκριμένα έκφυτα σε θρεπτικό μέσο με TDZ ανέπτυσαν πλήρως διαμορφωμένα σωματικά έμβρυα σε συνεχές φως, πλήρες σκοτάδι ή 16 ώρες φωτοπερίοδο.

Ο Gaj (2002) ανακοίνωσε την αναγκαιότητα του σκοταδίου στη διάρκεια των πρώιμων αναπτυξιακών σταδίων της σωματικής εμβρυογένεσης σε ιστοκαλλιέργειες ανώριμων ζυγωτικών εμβρύων (*Arabidopsis thaliana*). Το ποσοστό επαγωγής σωματικών εμβρύων στο σκοτάδι έφτανε το 69,8%, ενώ το αντίστοιχο του πειράματος-μάρτυρα στο φως ήταν 25,8-37,3%.

Η αλληλεπίδραση φωτός και αυξινών κατά τη διάρκεια της επαγωγικής φάσης υποδεικνύεται και από τη δημοσίευση των Suliman Elmeer et al. (2008) που αναφέρεται σε καλλιέργειες αγγουριού (*Cucumis sativus*). Ο συνδυασμός 2,4-D και φωτός είχε μικρή επαγωγική δύναμη, ενώ ο συνδυασμός του φωτός και NAA κατέληγε σε επαγωγή 1,25 σωματικών εμβρύων ανά κάλλο. Η παροχή 2,4-D και η παραμονή των εκφύτων στο σκοτάδι προκαλούσε πενταπλάσια επαγωγή σωματικών εμβρύων ανά κάλλο.

Η επίδραση της ποιότητας του φωτός, τόσο κατά τη διάρκεια της επαγωγής όσο και της διαφοροποίησης σωματικών εμβρύων, μελετήθηκε σε ιστοκαλλιέργειες ενός είδους αγαύης (*Agave tequilana*) (Rodríguez-Sahagún et al. 2011). Η έκθεση εμβρυογενετικών κάλλων σε λευκό ή κόκκινο φως κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης, έδινε κατά μέσο όρο 2 σωματικά έμβρυα ανά έκφυτο, ανεξαρτήτως των συνθηκών φωτισμού που επικρατούσαν κατά τη διάρκεια της καλλογένεσης. Μεγαλύτερος αριθμός σωματικών εμβρύων (κατά μέσο όρο 18 ανά έκφυτο) προέκυπτε, όταν εφαρμόζοταν λευκό ή κόκκινο φως στη διάρκεια της καλλογένεσης και ευρύ φάσμα συνθηκών φωτισμού στη διάρκεια της διαφοροποίησης.

A.13.10. ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ

Η συνηθέστερη θερμοκρασία πραγματοποίησης των ιστοκαλλιεργειών είναι οι 25 °C. Εξαίρεση αποτελούν ορισμένα φυτικά είδη που απαιτούν ιδιαίτερους θερμοκρασιακούς χειρισμούς, προκειμένου να εκδηλώσουν τη μέγιστη κυτταρική αύξηση. Ενδεικτικά αναφέρουμε τα υποτροπικά φυτά (π.χ. φοίνικες) που αναπτύσσονται καλύτερα σε θερμοκρασία 29 °C.

Η εξάρτηση της σωματικής εμβρυογένεσης από τους θερμοκρασιακούς χειρισμούς έχει μελετηθεί σε πολλά φυτικά είδη.

Για παράδειγμα η επαγωγή σωματικών εμβρύων από μικροσπόρους απαιτεί ειδικούς χειρισμούς θερμοκρασιακής καταπόνησης, καθώς οι μικροσπόροι αναγεννούν σωματικά έμβρυα στους 32 °C, αλλά όχι στους 25 °C.

Σημαντική εξάρτηση της άμεσης σωματικής εμβρυογένεσης από τη θερμοκρασία καταγράφηκε και σε καλλιέργειες τομών φύλλων ραδικιού (*Cichorium intybus*) (Decout et al. 1994). Η ανάπτυξη κάλλων και βλαστών καταγραφόταν στους 20 °C και 25 °C, η άμεση σωματική εμβρυογένεση στους 35 °C και όλοι οι τύποι μορφογένεσης στους 30 °C. Στους 25 °C η διαμόρφωση κάλλου περιοριζόταν στα τραυματισμένα κύτταρα, ενώ στους 35 °C εμφάνιζαν μεγαλύτερη ανάπτυξη κάλλου τα κύτταρα του μεσόφυλλου που γειτνιάζαν με τα τραυματισμένα. Την 7^η ημέρα επαγωγής σωματικών εμβρύων στους 35 °C, τα προέμβρυα εμφάνιζαν έναν επιφανειακό κυτταρικό ιστό που απουσίαζε στους 25 °C, καθώς τα βλαστητικά μεριστώματα καλύπτονταν από ένα λείο πρωτόδερμα.

Σε ιστοκαλλιέργειες σπαραγγιού (*Asparagus officinalis*) δοκιμάστηκαν τρεις θερμοκρασίες (24 °C, 27 °C και 30 °C) και η υψηλότερη παραγωγή κάλλου και διπολικών σφαιρικών εμβρύων καταγράφηκε στους 27 °C (Li et al. 1996). Η μετατροπή των σωματικών εμβρύων σε φυτάρια ή-

ταν, επίσης, σε άμεση εξάρτηση με τη θερμοκρασία. Τα σωματικά έμβρυα που προέρχονταν από 27 °C και μεταφέρονταν στους 27 °C μετατρέπονταν σε φυτάρια σε ποσοστό 42,0-63,0%. Αντίθετα τα έμβρυα που προκύπταν και μεταφέρονταν για περαιτέρω ανάπτυξη στους 24 °C είχαν πολύ μικρότερα ποσοστά επιβίωσης.

Σε υψηλά θερμοκρασιακά επίπεδα (28-32°C) καταγράφηκε η μεγαλύτερη συχνότητα σωματικών εμβρύων και σε ιστοκαλλιέργειες ανώριμων ζυγωτικών εμβρύων ηλίανθου (*Helianthus annuus*) (Sujatha et al. 2001).

Υπάρχει, όμως, και βιβλιογραφικά δεδομένα που υποδεικνύουν την αναγκαιότητα χαμηλών θερμοκρασιών σε μερικά φυτικά είδη, προκειμένου να διαφοροποιηθούν σωματικά έμβρυα.

Ενδεικτικά αναφέρουμε τη διέγερση σωματικών εμβρύων από χαμηλές θερμοκρασίες σε ιστοκαλλιέργειες φύλλων χλόης κήπου (*Dactylis glomerata*) (Tomaszewski et al.1994). Τα έκφυτα παρέμεναν για 1-7 ημέρες στους 4 °C, πριν μεταφερθούν στους 21 °C. Η εμβρυογενετική αντίδραση ήταν ισοδύναμη ή υψηλότερη με του πειράματος-μάρτυρα. Παράλληλα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, έδειξαν ότι η διέγερση στη χαμηλή θερμοκρασία της σωματικής εμβρυογένεσης δε σχετιζόταν με την καταστολή της βιοσύνθεσης του αιθυλενίου.

Η εφαρμογή χαμηλής θερμοκρασίας, σε καλλιέργειες βλαστητικών μεριστωμάτων από εμβρυϊκές μάζες διαγονιδιακής κερασιάς (*Prunus avium* x *P. pseudocerasus*), διέγειρε τη δευτερογενή σωματική εμβρυογένεση. Τα δευτερογενή έμβρυα αναπτύσσονταν μέχρι το στάδιο της κοτυληδόνας, αλλά αναστελλόταν η φύτευσή τους (Gutierrez et al. 2004).

A.13.11. ΚΥΤΤΑΡΙΚΗ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ

Η εξάρτηση της σωματικής εμβρυογένεσης από την κυτταρική πυκνότητα είναι ιδιαίτερα καθοριστική στις υγρές καλλιέργειες και στις καλλιέργειες πρωτοπλαστών (Kao et al. 1975). Πρόσφατες έρευνες έδειξαν ότι τόσο τα κυτταρικά συσσωματώματα όσο και τα μεμονωμένα κύτταρα έχουν τις ίδιες μεταβολικές δραστηριότητες, αλλά τα μεμονωμένα κύτταρα απαιτούν υψηλότερη κυτταρική πυκνότητα, προκειμένου να εκδηλώσουν το εμβρυογενετικό τους πρόγραμμα.

Η ανικανότητα των κυττάρων ή των πρωτοπλαστών να μεγαλώσουν σε χαμηλή πληθυσμιακή πυκνότητα, πιθανώς, να οφείλεται:

- 1.Στη διάχυση απαραίτητων μεταβολιτών από τα κύτταρα στο θρεπτικό μέσο της ιστοκαλλιέργειας σε τέτοιο βαθμό που να είναι αδύνατη η επιβίωση και η διαίρεσή τους.
- 2.Στην υπερβολική συσσώρευση τοξικών συστατικών στο θρεπτικό υπόστρωμα.

Η παρουσία ποικίλων κυτταρικών τύπων των φυτικών υγρών ιστοκαλλιέργειών, οι οποίοι βρίσκονται σε διαφορετικές μεταβολικές καταστάσεις, δυσχεραίνει και περιπλέκει τη διαλεύκανση των αλληλεπιδράσεων συστατικών του θρεπτικού υποστρώματος και των κυττάρων των εκφύτων.

Η πιο πιθανή ερμηνεία είναι η πρώτη, καθώς σε υψηλές κυτταρικές πυκνότητες επέρχεται γρήγορη εξισορρόπηση των συγκεντρώσεων των συστατικών των κυττάρων και του θρεπτικού μέσου. Τα περισσότερα μεμονωμένα κύτταρα νεκρώνονται και απελευθερώνουν τα συστατικά τους στο τεχνητό θρεπτικό μέσο τα οποία, πιθανώς, προσλαμβάνονται από τα κυτταρικά συσσωματώματα, προκειμένου να μετασχηματιστούν σε σωματικά έμβρυα. Σε μερικές περιπτώσεις τα κυτταρικά συσσωματώματα μετατρέπονται σε σωματικά έμβρυα, ακόμα και απουσία μεμονωμένων κυττάρων.

A.13.12. ΩΣΜΩΤΙΚΟ ΔΥΝΑΜΙΚΟ

Οι Brown et al. (1989), σε ιστοκαλλιέργειες ανώριμων σιταριού (*Triticum aestivum*), ανακοίνωσαν ότι η παροχή 3,0% μαννιτόλης προκαλούσε αργή φυτική ανάπτυξη, αλλά ενεργοποιούσε το εμβρυογενετικό δυναμικό των κυττάρων το οποίο διατηρούσαν για μεγάλο χρονικό διάστημα. Η προσθήκη PEG 55 ανέστελλε τη βλαστογένεση, αλλά ενεργοποιούσε τη σωματική εμβρυογένεση. Πιθανώς η ωσμωτική καταπόνηση τροποποιούσε την ενδογενή συγκέντρωση του ABA η οποία επάγει αλλαγές στο ποσοστό διαφοροποίησης εμβρυογενετικών κάλλων.

Ο Roberts (1991), σε εμβρυογενετικές ιστοκαλλιέργειες είδους έλατου (γένος *Picea*), ανακοίνωσε ότι η παροχή 2,0-6,0% μαννιτόλης προωθούσε τη δημιουργία σφαιρικών σωματικών εμβρύων, αλλά ανέστελλε τα τελευταία στάδια ωρίμανσής τους. Η παραμονή των εκφύτων για μια εβδομάδα σε θρεπτικό υπόστρωμα με μαννιτόλη και ABA διπλασίαζε την παραγωγή σωματικών εμβρύων (σταδίου κοτυληδόνας), ενώ σε υψηλότερα επίπεδα μαννιτόλης (13,0% και 20,0%) καταγραφόταν αναστολή της πρόωρης φύτευσης. Οι τελευταίες συγκεντρώσεις μαννιτόλης προωθούσαν την ενεργοποίηση αποταμιευτικών πρωτεϊνών και την ωρίμανση των κοτυληδόνων, αλλά δεν προωθούσαν τη διαμόρφωση σωματικών εμβρύων, τουλάχιστον, μέχρι το στάδιο των κοτυληδόνων.

Οι Klimaszewska et al. (1992), σε ιστοκαλλιέργειες ανώριμων ζυγωτικών εμβρύων λάρικα (*Larix eurolepis*), ανέφεραν ότι η διέγερση της ωρίμανσης, αλλά και της συχνότητας φύτευσης

των σωματικών εμβρύων προωθούνταν σημαντικά τόσο από τη σακχαρόζη (0,4 M) όσο και από το ABA (40,0 mM).

Οι Lou et al. (1995) πρότειναν ότι η γλυκόζη, πιθανώς, διαδραματίζει έναν διττό ρόλο στην επαγωγή σωματικών εμβρύων σε ιστοκαλλιέργειες κοτυληδόνων αγγουριού (*Cucumis sativus*). Υπέδειξαν ότι η γλυκόζη αποτελεί μια ιδιαίτερα ξεχωριστή πηγή άνθρακα για τα φυτικά κύτταρα, αλλά ταυτόχρονα διαδραματίζει και έναν ξεχωριστό ωσμωτικό ρόλο. Η προσθήκη σακχαρόζης (0,25 ή 0,50 M) και γλυκόζης (0,50 M) κατέληγε σε υψηλά ποσοστά σωματικής εμβρυογένεσης. Αντίθετα το ποσοστό επαγωγής σωματικών εμβρύων μηδενιζόταν, όταν η μοναδική πηγή άνθρακα ήταν η μαννιτόλη. Η αύξηση του ωσμωτικού δυναμικού με προσθήκη μαννιτόλης ή γλυκόζης (0,15 M) προωθούσε την άμεση διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων, όταν το αρχικό θρεπτικό μέσο περιείχε 0,25 M σακχαρόζη.

Σε ανάλογα αποτελέσματα κατέληξε και ο Sujatha (2001), σε ιστοκαλλιέργειες ζυγωτικών εμβρύων ηλίανθου (*Helianthus annuus*), με 120,0–210,0 g/L σακχαρόζη και οι Hofmann et al. (2004) σε ιστοκαλλιέργειες ανώριμων κοτυληδόνων σόγιας (*Glycine max*) με 2,0% σακχαρόζη.

Τέλος, καθοριστική κρίνεται η χρήση των πολυσακχαριτών, λόγω της ωσμωτικής τους δράσης και στο πλαίσιο της κρυοσυντήρησης φυτικών ιστών. Η ικανότητα επανάκτησης της αύξησης και της περαιτέρω ωρίμανσης, μετά από κρυοσυντήρηση, μελετήθηκε σε σωματικά έμβρυα ελιάς (*Olea europaea*). Τα σωματικά έμβρυα παρέμειναν σε θρεπτικό υπόστρωμα με 0,25 M ή 0,5 M ή 0,75 M σακχαρόζης σε συνθήκες κρυοπροστασίας και ελεγχόμενου ρυθμού ψύξης. Η υψηλότερη επανάκτηση της φυτικής αύξησης και της εμβρυϊκής ανάπτυξης, μετά την κρυοσυντήρηση, καταγραφόταν σε 0,75 M σακχαρόζης. Η αντικατάσταση της σακχαρόζης με μαννιτόλη ή σορβιτόλη δεν είχε ανάλογα μορφογενετικά αποτελέσματα (Lynch et al. 2011).

A.13.13. ΗΛΕΚΤΡΙΚΟ ΡΕΥΜΑ

Η εξωγενής επιβολή πολικότητας μπορεί να ενεργήσει σαν επαγωγικός παράγοντας και στη διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων σε μη διαφοροποιημένες κυτταρικές καλλιέργειες. Αρκετές ερευνητικές προσπάθειες καταλήγουν ότι η παροχή εξωγενών ρυθμιστικών παραγόντων που ενδυναμώνουν την πολικότητα, βρέθηκε ότι προωθούν τη διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων. Σε υγρές ιστοκαλλιέργειες, στο σκοτάδι, τα κυτταρικά συσσωματώματα, εξαιρουμένων των μεμονωμένων κυττάρων, έχουν μια έμφυτη-ενδογενή πολικότητα, εξαιτίας της γειτνίασής τους με άλλα κύτταρα, τον προσανατολισμό τους στο ημίρρευστο μέσο και πιθανώς της κατεύθυνσης

του φωτισμού.

Η εφαρμογή ηλεκτρικής πολικότητας σε ιστοκαλλιέργειες καρότου (*Daucus carota*) συν-δεδούνταν από ασυμμετρία στην κατανομή της ενεργοποιημένης καλμοδουλίνης η οποία ήταν παρούσα στις σφαιρικές προεμβρυϊκές μάζες, πριν ακόμα οποιαδήποτε ορατή μορφολογική πολικότητα. Η συγκέντρωση της ενεργοποιημένης καλμοδουλίνης ήταν υψηλότερη στην περιοχή του ριζικού πόλου, ενώ στα τελικά στάδια της δίπολης ανάπτυξης ήταν ισχυρή στην περιοχή του βλαστητικού μεριστώματος. Πολικότητα ανιχνεύτηκε και στην ασύμμετρη σύνθεση DNA από τους Nomura et al. (1985a & b). Η καταστολή της φυσιολογικής ενδογενούς πολικότητας σε ανώριμα ζυγωτικά έμβρυα επηρέαζε την επαγωγή άμεσης σωματικής εμβρυογένεσης.

Από ζυγωτικά έμβρυα, στα οποία η αύξηση του κύριου εμβρυϊκού άξονα ήταν περιορισμένη ή βρισκόταν υπό καταστολή, ήταν πιο πιθανό να προκύψουν σωματικά έμβρυα από τα επιφανειακά τους κύτταρα. Η αναστολή των παραγόντων που συντηρούσαν την πολικότητα (ανάλογα με τον προσανατολισμό τους επάνω στο θρεπτικό μέσο) παρεμπόδιζε την αύξηση του κύριου άξονα με αποτέλεσμα τα μεμονωμένα επιφανειακά κύτταρα να ξεφεύγουν από τον ενδογενή έλεγχο και να μετασχηματίζονται, μερικές φορές, σε εμβρυϊκά. Η πλήρης αναστολή του μορφογενετικού ενδογενούς ελέγχου του εμβρυϊκού άξονα οδηγούσε στη διάλυση και στον μαρασμό του ζυγωτικού εμβρυϊκού ιστού (Smith et al. 1989).

A.13.14. ΒΑΡΕΑ ΜΕΤΑΛΛΑ

Οι Murashige et al. (1962) μελέτησαν τα αποτελέσματα της εξάλειψης του κοβαλτίου από το τεχνητό υπόστρωμα σε ιστοκαλλιέργειες ποικίλων φυτών. Σε ιστοκαλλιέργειες άγριας βιολέτας (*Viola*) καταγράφηκε αυξημένος ρυθμός αναγέννησης φυταρίων. Αντίθετα σε ιστοκαλλιέργειες λάχανου (*Brassica oleracea*) και φρούτου του πάθους (*Passiflora edulis*) παρήχθησαν λιγότερα φυτάρια με μειωμένη βιωσιμότητα και με αυξημένες μορφολογικές δυσμορφίες, πιθανώς εξαιτίας της εμπλοκής του κοβαλτίου στον μεταβολισμό του αιθυλενίου.

Σε καλλιέργειες τμημάτων ακραίων μεριστωμάτων καρότου (*Daucus carota*) σε θρεπτικό μέσο MS για 1-3 εβδομάδες, η επίδραση CoCl_2 , NiCl_2 , CuCl_2 , CdCl_2 ή ZnCl_2 προωθούσε τη δημιουργία φύλλων και / ή σωματικών εμβρύων, μερικά από τα οποία νεκρώνονταν, λόγω της απώλειας χλωροφύλλης (Kiyosue et al. 1990). Τα σωματικά έμβρυα ήταν ταυτόσημα με εκείνα που επάγονταν παρουσία 2,4-D και εξελίσσονταν σε νεαρά φυτάρια. Τα ποσοστά επαγωγής των σωματικών εμβρύων ήταν σε άμεση εξάρτηση με το είδος, τη συγκέντρωση και τη διάρκεια του

χειρισμού των εκφύτων με τα ιόντα των βαρέων μετάλλων. Η υψηλότερη επαγωγή σωματικών εμβρύων (38,0%) καταγραφόταν σε 0,50 mM CdCl₂, όταν παρεχόταν για 2 εβδομάδες και η επιβίωση των φυταρίων ανερχόταν στο 62,0%. Η παροχή NiCl₂ ή CuCl₂ ή ZnCl₂ έδινε μικρότερα ποσοστά επαγωγής σωματικών εμβρύων 10,0%, 14,0% και 7,5% αντίστοιχα. Ειδικότερα το ZnCl₂ επέτρεπε μεγάλο ποσοστό επιβίωσης, αλλά περιορισμένη επαγωγή σωματικών εμβρύων.

Στο πλαίσιο της επαγωγής σωματικών εμβρύων σε ιστοκαλλιέργειες Γκότζι Μπέρι (*Lycium barbarum*) μελετήθηκε η απορρόφηση βαρέων μετάλλων. Αν και ο βαθμός απορρόφησης διέφερε ανάλογα με το είδος του μετάλλου, για όλα τα βαρέα μέταλλα καταγράφηκε επιλεκτική απορρόφηση από τα εμβρυϊκά κύτταρα στα στάδια της διαφοροποίησης και της κυτταρικής διαίρεσης (Shah et al. 2001).

A.13.15. ΚΟΛΧΙΚΙΝΗ

Η κολχικίνη χρησιμοποιήθηκε για την επαγωγή υψηλού ρυθμού φυτικής αναγέννησης. Η προσθήκη 25,0 mg/L κολχικίνης σε γυρεοκόκκους, για 12-14 ώρες, κατέληγε σε τριπλάσια - τετραπλάσια αύξηση της σωματικής εμβρυογενετικής αντίδρασης συγκριτικά με το πείραμα-μάρτυρα, πιθανώς εξαιτίας της διαμεσολάβησής της στη μείωση του πολυμερισμού των μικροσωληνίσκων που συμμετέχουν στην ασύμμετρη τοποθέτηση του πυρήνα μέσα στον μικροσπόρο. Έτσι ο πυρήνας διατηρεί μια κεντρική θέση στο κύτταρο, προκαλώντας συμμετρική διαίρεση η οποία είναι απαραίτητη πριν την έναρξη της διαφοροποίησης σωματικών εμβρύων. Συμπερασματικά, η κολχικίνη προωθεί τη σωματική εμβρυογένεση, πιθανώς, λόγω της αποδιοργάνωσης των κυτταροπλασματικών συστατικών, πριν ή κατά τη διάρκεια της πρώτης κυτταροδιαίρεσης του γυρεόκοκκου.

Παράλληλα η κολχικίνη χρησιμοποιείται για τη δημιουργία πολυπλοειδικών φυτών από σωματικά έμβρυα πολλών φυτικών ειδών, όπως σε ιστοκαλλιέργειες λεμονιάς (*Citrus limon*) (Wu et al. 2002) και σε ιστοκαλλιέργειες σπαθίφυλλου (*Spathiphyllum wallisi*) (Eeckhaut et al. 2004).

Οι Rey et al. (2002) εμβολίαζαν καρδιόσχημα ανώριμα σωματικά **έμβρυα πρίνου (*Quercus coccifera*)** σε ¼ MS με 3,0% σακχαρόζη, 0,46 mM ζεατίνη και κολχικίνη σε διάφορες συγκεντρώσεις. Οι καλλιέργειες παρέμεναν στο σκοτάδι, αλλά ο αριθμός των επαχθέντων σωματικών εμβρύων ήταν περιορισμένος. Μόνο 2 από τα 152 φυτά που προέκυψαν από την ωρίμανση των σωματικών εμβρύων και την μετατροπή τους σε ολόκληρα φυτά στο θερμοκήπιο, περιείχαν τετραπλοειδικό αριθμό χρωμοσωμάτων (2n = 4x = 80). Τα υπόλοιπα φυτά είχαν τον φυσιολογι-

κό διπλοειδή αριθμό χρωμοσωμάτων.

Ανάλογα αποτελέσματα ανακοινώθηκαν και σε ιστοκαλλιέργειες εκφύτων αμπελιού (*Vitis vinifera*) (Yang et al. 2006). Τα έκφυτα εμβολιάζονταν σε θρεπτικό μέσο NN (Nitsch & Nitsch) με 1,0 mg/L 2,4-D και οι επαχθέντες κάλλοι μεταφέρονταν σε θρεπτικό μέσο NN με 1,0 mg/L NAA και 0,5 mg/L BA, όπου και προέκυπταν σφαιρικά σωματικά έμβρυα. Τα πιο εύρωστα σωματικά έμβρυα μεταφέρονταν σε θρεπτικό μέσο NN με 0,03 mg/L NAA και 0,5 mg/L BA που περιείχε 10,0 ή 20,0 mg/L ή καθόλου κολχικίνη για 1, 2, ή 3 ημέρες. Ο αριθμός των σωματικών εμβρύων που επιβίωναν και των φυταρίων που προκύπταν, μειωνόταν με την αύξηση της συγκέντρωσης και του χρόνου δράσης της κολχικίνης. Μεταξύ των 29 τυχαία επιλεγθέντων φυταρίων μόνο τα 5 ήταν τετραπλοειδή και όλα τα υπόλοιπα διπλοειδή.

A.13.16. ANTIBIOTIKA

Αν και ο μορφογενετικός μηχανισμός των αντιβιοτικών δεν έχει διαπιστωθεί, πλήρως, δύο είναι οι πιο πιθανές ερμηνείες:

- i) Δρουν σαν παράγοντες καταπόνησης.
- ii) Μιμούνται την επίδραση των φυτοαυξητικών παραγόντων, καθώς επάγουν τη φυτική αύξηση και την ανάπτυξη *in vitro*.

Αν και τα περισσότερα αντιβιοτικά είναι συνήθως αβλαβή για τα φυτικά κύτταρα, η τοξικότητα μερικών έχει εξεταστεί σε ορισμένες φυτικές ιστοκαλλιέργειες. Η χλωραμφενικόλη και τα αμινογλυκοσιδικά ανάλογα είναι τοξικά για τα φυτικά κύτταρα και δεν επάγουν τη σωματική εμβρυογένεση, σε αντίθεση με τη στρεπτομυκίνη που σε χαμηλή συγκέντρωση την προωθεί.

Σε έκφυτα από φύλλα ποικιλιών γαρύφαλλου (*Dianthus*) η σεφοταξίμη ενεργοποιούσε τη σωματική εμβρυογένεση, απουσία φυτοαυξητικών ουσιών, ενώ η πενικιλίνη και η καρμπενικιλίνη μείωνε τη συχνότητα επαγωγής σωματικών εμβρύων (Nakano et al. 1993). Στις ποικιλίες *Eolo* και *Telstar scarlet* μικρό ποσοστό σωματικών εμβρύων καταγραφόταν απουσία τόσο φυτοαυξητικών παραγόντων όσο και αντιβιοτικών.

Η σεφοταξίμη προωθούσε την ανάπτυξη κάλλου και τη σωματική εμβρυογένεση στο σιτάρι (*Triticum aestivum*).

Σε καλλιέργειες φύλλων καπνού (*Nicotiana tabacum*) η καναμυκίνη και η στρεπτομυκίνη δεν ήταν αποτελεσματικές στη διέγερση σωματικών εμβρύων, αλλά προωθούσαν τη βλαστογένεση.

Οι Zhang et al. (2001) κατέδειξαν ότι οι εμβρυογενετικοί κάλλοι βαμβακιού (*Gossypium hirsutum*) εμφάνιζαν διαφορετική ευαισθησία έναντι της καναμυκίνης, ανάλογα με το αναπτυξιακό τους στάδιο. Η καναμυκίνη αναχαίτιζε τόσο την ανάπτυξη εμβρυογενετικών κάλλων όσο και την επαγωγή και την ανάπτυξη των σωματικών εμβρύων.

Η προσθήκη καρμπενικιλίνης (500,0 mg/L) σε ιστοκαλλιέργειες σέρβικου έλατου (*Picea omorika*) μείωνε την ανάπτυξη των εμβρυογενετικών ιστών σε ποσοστό 50,0% (Mihaljevic et al. 2001), ενώ η σεφοταξίμη ήταν λιγότερο τοξική (93,0%). Η καναμυκίνη (10,0 mg/L) και η hygromycin (2,0 mg/L) ανέστελλαν πλήρως τη δευτερογενή εμβρυογένεση. Οι εμβρυογενετικοί ιστοί εκδήλωναν υψηλότερη ανθεκτικότητα στη νεομυκίνη και τα αμινογλυκοσιδικά ανάλογα της καναμυκίνης.

A.13.17. ΑΙΘΥΛΕΝΙΟ-ΑΕΡΙΑ

A.13.17.1. Αιθυλένιο

Το αιθυλένιο εμπλέκεται στην αύξηση και στη διαφοροποίηση εκφύτων σε ιστοκαλλιέργειες *in vitro*, αν και δεν είναι ξεκάθαρος ο μορφογενετικός του ρόλος σε σχέση με τη σωματική εμβρυογένεση.

Πειραματικά δεδομένα υποστηρίζουν ότι το αιθυλένιο σχετίζεται με το μεταβολισμό των πολυαμινών, η αυξημένη σύνθεση των οποίων είναι απαραίτητη για την επαγωγή σωματικών εμβρύων στο καρότο (*Daucus carota*) (Roustan et al. 1994). Έχει προταθεί ότι το αιθυλένιο αναστέλλει τη σωματική εμβρυογένεση, μπλοκάροντας τη σύνθεση των πολυαμινών, καθώς εξωγενής προσθήκη σπερμιδίνης (σε κύτταρα που έχει προστεθεί αρχικά αιθυλένιο) επαναφέρει την εμβρυογενετική τους ικανότητα. Αντίθετα το etharphan το οποίο απελευθερώνει αιθυλένιο, προάγει τη σωματική εμβρυογένεση σε ιστοκαλλιέργειες λεμονιάς (*Citrus limon*) και σε άλλες πειραματικές προσπάθειες.

Σε *in vitro* ιστοκαλλιέργειες καφέ (*Coffea canephora*) δοκιμάστηκαν τρεις διαφορετικοί αναστολείς του αιθυλενίου (CoCl_2 , σαλικυλικό οξύ και AgNO_3). Τα πειραματικά αποτελέσματα, ξεκάθαρα, κατέδειξαν την επαγωγική υπεροχή του AgNO_3 στον επαναπρογραμματισμό της κυτταρικής μηχανής προς τη σωματική εμβρυογένεση (Kumar et al. 2007).

Υπάρχουν όμως και πειραματικές διατάξεις που υποδεικνύουν έναν θετικό συσχετισμό αιθυλενίου και σωματικής εμβρυογένεσης.

Οι Hatanaka et al. (1995) σε ιστοκαλλιέργειες δίσκων φύλλων καφέ (*Coffea canephora*) ανέφεραν ότι τα έκφυτα παρήγαγαν πάντα ένα μικρό ποσό αιθυλενίου, η απομάκρυνση του οποίου μείωνε τον αριθμό των σωματικών εμβρύων. Η εφαρμογή αναστολέων του αιθυλενίου ανέστελλε δραστικά τη σωματική εμβρυογένεση και η προσθήκη εξωγενούς αιθυλενίου αποκαθιστούσε τα υψηλά επίπεδα επαγωγής σωματικών εμβρύων.

Τα αντικρουόμενα αποτελέσματα πιθανώς να οφείλονται στη διαφορετική ποικιλία, στο διαφορετικό έκφυτο ή / και στις διαφορετικές καλλιεργητικές συνθήκες.

Σε καλλιέργειες ριζών καρότου (*Daucus carota*), οι Ishizaki et al. (2000) κατέγραψαν ότι η προσθήκη αιθυλενίου διπλασίαζε τη συχνότητα δημιουργίας εμβρυογενετικών κάλλων, αλλά η προσθήκη αιθυλενίου κατά τη διάρκεια της σωματικής εμβρυογένεσης ανέστελλε πλήρως την ανάπτυξη των σωματικών εμβρύων. Οι συγκεκριμένοι μελετητές πρότειναν ότι πιθανώς το αιθυλένιο παίζει το ρόλο φυτοαυξητικής ουσίας για τη δημιουργία εμβρυογενετικών κάλλων, αλλά ανέστελλε τη σωματική εμβρυογένεση μόλις αυτή επαγόταν.

Ανάλογες ήταν και οι παρατηρήσεις των Mandal et al. (2001) σε ιστοκαλλιέργειες εκφύτων από κοτυληδόνες **κενταύριου** (*Carthamus tinctorius*), ενώ οι Saly et al. (2002) σε ιστοκαλλιέργειες λάρικα (*Larix x leptoeuropaea*) παρατήρησαν ότι ενώ το αιθυλένιο προήγαγε τη δημιουργία εμβρυογενετικών μαζών μείωνε αισθητά τη δευτερογενή εμβρυογένεση.

Στο πλαίσιο της μελέτης της σωματικής εμβρυογένεσης σε ιστοκαλλιέργειες τριφυλλιού (*Medicago sativa*) μελετήθηκε η παραγωγή αιθυλενίου από τους φυτικούς ιστούς (Kerczyńska et al. 2009 & 2011). Σημαντική επαγωγή αιθυλενίου ανιχνεύτηκε κατά την καλλογένεση και πολύ μικρότερη κατά τη διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων. Τα ανώριμα σωματικά έμβρυα παρήγαγαν περισσότερο αιθυλένιο συγκριτικά με τα ώριμα. Η απομάκρυνση του αιθυλενίου από την ατμόσφαιρα της ιστοκαλλιέργειας δεν επηρέαζε αισθητά την καλλογένεση, την επαγωγή και την ανάπτυξη των σωματικών εμβρύων. Η μείωση της βιοσύνθεσης του αιθυλενίου μείωνε δραστικά την παραγωγή σωματικών εμβρύων, υποδεικνύοντας την απαίτηση αιθυλενίου στη φάση διαφοροποίησης και ανάπτυξης, αλλά όχι και στη φάση επαγωγής.

Υψηλή παραγωγή αιθυλενίου ανιχνεύθηκε σε εμβρυογενετικούς κάλλους, ανώριμα σωματικά έμβρυα και έκφυτα βελανιδιάς (*Quercus ilex*) που εκδήλωναν δευτερογενή εμβρυογένεση (Mauri et al. 2011). Χαμηλότερα ποσοστά διαπιστώθηκαν σε ώριμα και φυτρωμένα σωματικά έμβρυα.

A.13.17.2. Αέρια

Η επίδραση των διαφορετικών βαθμών αερισμού αναφέρεται ότι ασκούν καθοριστική επίδραση στη μορφογένεση *in vitro* (Ammirato 1983). Ελάχιστες, όμως, έρευνες έχουν πραγματοποιηθεί για την επίδραση των αερίων που παρέχονται στο δοχείο ιστοκαλλιέργειας ή βρίσκονται διαλελυμένα στο θρεπτικό μέσο.

Γενικά είναι αποδεκτό ότι όταν τα επίπεδα του οξυγόνου ξεπεράσουν ένα κρίσιμο σημείο προωθείται ο ανοργάνωτος πολλαπλασιασμός και επάγεται η δημιουργία ριζών κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Ανάλογη επίδραση παρατηρείται και παρουσία μειωμένων επιπέδων υψηλών συγκεντρώσεων οξυγόνου.

A.13.18. ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΣ

Η μορφογενετική επίδραση της ηλικίας του κάλλου στη σωματική εμβρυογένεση καταγράφηκε για πρώτη φορά από τους Kochba et al. (1974). Η πλειοψηφία των επιστημονικών μελετών καταδεικνύει ότι η σωματική εμβρυογένεση λαμβάνει χώρα, κυρίως, σε μικρής ηλικίας ιστοκαλλιέργειες και ότι η εμβρυογενετική ικανότητα μειώνεται με την πάροδο του χρόνου. Σε ελάχιστες περιπτώσεις το εμβρυογενετικό δυναμικό διατηρείται για αρκετά χρόνια.

Πιθανοί παράγοντες που οδηγούν στην απώλεια της εμβρυογενετικής δυναμικότητας είναι:

1. Οι αλλαγές της ενζυμικής ενεργότητας και των ισοενζυμικών προτύπων.
2. Τα επίπεδα των ενδογενών φυτοαυξητικών ουσιών.
3. Οι καλλιεργητικές συνθήκες που συνδέονται με τον γηρασμό των ιστών.
4. Η μείωση των υδρογοναναθρακικών αποθεμάτων (Kochba et al. 1974).
5. Οι μεταβολές της πλοειδίας των καλλιεργούμενων κυττάρων (Smith et al. 1974).

Οι Reinert et al. (1977) ανακοίνωσαν ότι η εμφάνιση σωματικών εμβρύων σε ιστοκαλλιέργειες καρότου (*Daucus carota*) ξεκινά 4-6 εβδομάδες μετά την απομόνωση και τον εμβολιασμό των ιστών στο τεχνητό θρεπτικό υπόστρωμα και το μέγιστο εμβρυογενετικό δυναμικό καταγράφεται περίπου 15 εβδομάδες αργότερα. Η απώλεια της εμβρυογενετικής δυναμικότητας *in vitro* παρατηρείται 36 εβδομάδες μετά τον εμβολιασμό. Οι ιστοκαλλιέργειες καρότου μπορούν να επανακάμψουν και να ξεκινήσει πάλι η παραγωγή εμβρυοειδών, αν ανακαλλιεργηθούν σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα. Η προσωρινή απώλεια της εμβρυογενετικής δυνατότητας, πιθανώς

να οφείλεται στη μη βιοσύνθεση συγκεκριμένων “εμβρυογενετικών συστατικών” από τα καλλιεργούμενα κύτταρα.

Οι Beruto et al. (1996) ανακοίνωσαν το μηδενισμό της επαγωγής σωματικών εμβρύων μετά την τρίτη ανακαλλιέργεια κάλλων από έκφυτα νεραγκούλας (*Ranunculus asiaticus*). Το θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε στις συγκεκριμένες ανακαλλιέργειες περιείχε BA, κινετίνη και 2,4-D σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Οι Lambe et al. (1998) κατέδειξαν τη σημασία της προσθήκης ενεργού άνθρακα και GA₃ στο θρεπτικό μέσο για τη διατήρηση της εμβρυογενετικής ικανότητας σε μεγάλης διάρκειας ιστοκαλλιέργειες κέχρου (*Pennisetum glaucum*). Όταν η ωρίμανση των εμβρυογενετικών κάλλων γινόταν σε θρεπτικό μέσο με ενεργό άνθρακα και η φύτευση των σωματικών εμβρύων σε θρεπτικό μέσο με GA₃ καταγραφόταν αποκατάσταση της αναγέννησης για μεγάλο χρονικό διάστημα. Όταν οι εμβρυογενετικοί κάλλοι μεταφέρονταν για περαιτέρω ανάπτυξη και ωρίμανση των σωματικών εμβρύων σε θρεπτικό μέσο χωρίς αυξίνη διατηρούσαν την εμβρυογενετική τους πλαστικότητα για τρεις μήνες. Η αναγεννητική δυνατότητα χανόταν σταδιακά όσο αυξανόταν η διάρκεια των ανακαλλιεργειών.

Οι Ma et al. (2004) ανέφεραν τη μείωση και τον τελικό μηδενισμό της μορφογενετικής δυνατότητας των εμβρυογενετικών κάλλων σε ιστοκαλλιέργειες σίκαλης (*Secale cereale*), λόγω των συνεχών ανακαλλιεργειών. Η εμβρυογενετική αναγέννηση των κάλλων από ανώριμα έμβρυα, τμήματα φύλλων φυταρίων και ανθήρων μπορούσε να διατηρηθεί *in vitro*, μέσω συνεχών ανακαλλιεργειών για οκτώ μήνες το μέγιστο.

Αντίθετα, διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων, από ανώριμα ζυγωτικά έμβρυα μαονιού (*Cedrela fissilis*), έγινε εφικτή μετά από μια καλλιεργητική περίοδο 12 μηνών και περιοδικές ανακαλλιέργειες κάθε 6-8 εβδομάδες (Vila et al. 2009). Η καλλογένεση ξεκινούσε σε θρεπτικό μέσο MS με 2,4-D ή PIC (picloram) και οι κάλλοι μεταφέρονταν στο θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης, όπου και εμφάνιζαν σωματικά έμβρυα μετά από 6 μήνες. Η ανακαλλιέργεια των εμβρυογενετικών ιστών σε MS με 4,5 μM 2,4-D κατέληγε σε διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων μετά από 4 μήνες. Επαναλαμβανόμενη δευτερογενής εμβρυογένεση καταγραφόταν μετά από περιοδικές ανακαλλιέργειες στο ίδιο θρεπτικό μέσο. Ιστολογικές παρατηρήσεις έδειξαν ότι τα σωματικά έμβρυα δεν είχαν σύνδεση με το μητρικό έκφυτο, ήταν διπολικά (με μερίστωμα βλαστού και ρίζας), διέθεταν αγγειώδες σύστημα και τυπικά χαρακτηριστικά σωματικού, δικοτυλήδονου εμβρύου.

A.14. ΣΥΓΚΡΙΣΗ ΖΥΓΩΤΙΚΗΣ & ΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗΣ

A.14.1. ΟΜΟΙΟΤΗΤΕΣ ΖΥΓΩΤΙΚΗΣ & ΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗΣ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η δυνατότητα αναγέννησης ώριμων φυτών *in vitro* από σωματικά κύτταρα που εξελίσσονται σε διπολικές εμβρυϊκές δομές υποδηλώνει τη διαφοροποίησή τους μέσω ενός μορφογενετικού μονοπατιού ανάλογου της διαφοροποίησης του φυτικού ζυγωτού *in vivo* (Steward et al. 1958 και Reinert 1959).

Τα κυριότερα κοινά σημεία των δύο αναγεννητικών προσεγγίσεων είναι:

- α.** Τα αντίστοιχα αναπτυξιακά στάδια των σωματικών και των ζυγωτικών εμβρύων (σφαιρικό, καρδιόσχημο, τορπίλης).
Η ταυτόσημη εμβρυϊκή οντογένεση είναι ακόμα εντονότερη, αν συγκριθεί η φυτική αναγέννηση *in vitro* από απομονωμένα εμβρυϊκά κύτταρα και η φυτική αναγέννηση *in vivo* από γονιμοποιημένα ωάρια (Nomura et al. 1985). Αντίθετα ο παραλληλισμός των οντογενετικών σταδίων δεν είναι απόλυτα ταυτόσημος, όταν συγκρίνουμε την αναγέννηση μέσω σωματικών εμβρύων πολυκυτταρικής προέλευσης και μέσω γονιμοποιημένου ωαρίου.
- β.** Τα σωματικά έμβρυα, όπως και τα ζυγωτικά αποτελούν διπολικές δομές, δηλαδή διαθέτουν βλασθητικό και ριζικό μερίστωμα και κοτυληδόνες.
- γ.** Τα σωματικά κύτταρα αναπτύσσουν πλήρως τις φυτικές αναγεννητικές διαδικασίες, ενώ είναι απομονωμένα από το γενετικό έλεγχο των μητρικών ιστών.
- δ.** Η δυνατότητα ανάπτυξης ολοκληρωμένων δομικά και λειτουργικά φυσιολογικών σωματικών εμβρύων από σωματικά κύτταρα υποδεικνύει ότι το γενετικό πρόγραμμα και η επεξεργασία της εμβρυογενετικής διαδικασίας περιλαμβάνεται μέσα σε κάθε κύτταρο και μπορεί να εκφραστεί απουσία γονιδιακών προϊόντων του μητρικού περιβάλλοντος, περιβαλλοντικών πληροφοριών ή χωροταξικών περιορισμών.
- ε.** Η ενεργοποίηση αποταμιευτικών θρεπτικών συστατικών (π.χ. λιποπρωτεΐνες) τόσο στα αναπτυσσόμενα ζυγωτικά όσο και στα σωματικά έμβρυα υπογραμμίζει την παράλληλη εξέλιξή τους.
- στ.** Τέλος, τα μοριακά γεγονότα που υπαγορεύουν τη διαφοροποίηση και τον πολλαπλασιασμό όλων των κύριων φυτικών ιστών και συστημάτων και στα δύο είδη εμβρύων είναι σε μεγάλο βαθμό συγκρίσιμα αν όχι ισοδύναμα.

A.14.2. ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΖΥΓΩΤΙΚΗΣ & ΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗΣ

Τα σωματικά έμβρυα, εκτός από τα πολλά κοινά χαρακτηριστικά που έχουν με τα ζυγωτικά έμβρυα εμφανίζουν και μερικές διαφορές:

1. Στα αρχικά στάδια της σωματικής εμβρυογένεσης, ο αναρτήρας εμφανίζει περιορισμένη ανάπτυξη, πιθανώς, λόγω της μη αναγκαιότητάς του στις *in vitro* συνθήκες.
2. Από πολλές ερευνητικές μελέτες γίνεται φανερό ότι, ενώ η *in vivo* εμβρυϊκή ανάπτυξη είναι ανάλογη της σωματικής εμβρυογένεσης μέχρι το στάδιο της τορπίλης, πέρα από το στάδιο αυτό η διαδικασία της ζυγωτικής και της σωματικής εμβρυογένεσης διίσταται.

Στο πλαίσιο της ζυγωτικής εμβρυογένεσης το στάδιο της τορπίλης ακολουθείται από το στάδιο των κοτυληδόνων. Οι κοτυληδόνες διαθέτουν έντονη πρωτεϊνοσυνθετική δραστηριότητα και αποταμίευση θρεπτικών συστατικών, προκειμένου να ξεκινήσει το τελικό εμβρυϊκό στάδιο, δηλαδή της αποξήρανσης και του επακόλουθου λήθαργου, στο οποίο ρυθμιστικό ρόλο διαδραματίζει η φυτοαυξητική ουσία ABA. Τα ώριμα αποξηραμένα ζυγωτικά έμβρυα μετά από μια παρατεταμένη ή μη χρονική περίοδο ηρεμίας η οποία εξαρτάται από περιβαλλοντικούς και άλλους παράγοντες, ξεκινούν ένα ολοκληρωτικό καινούργιο πρόγραμμα φύτρωσης και ανάπτυξης νέων φυταρίων.

Αντίθετα τα σωματικά έμβρυα αναπτύσσονται και διαφοροποιούνται διαδοχικά, ενεργοποιώντας απευθείας τα βλαστητικά τους μεριστώματα, χωρίς να μεσολαβεί φάση ξήρανσης και λήθαργου. Αν και τα σωματικά έμβρυα δεν αποξηραίνονται και δε γίνονται ληθαργικά καταγράφεται σύνθεση και ενεργοποίηση ABA, καθώς και μετάφραση μιας ομάδας γονιδίων που πιθανώς επάγονται από το ABA και σχετίζονταν με την αντοχή στη ξήρανση. Το πρόγραμμα του εμβρυϊκού λήθαργου δεν ενεργοποιείται άμεσα στα σωματικά έμβρυα, αλλά πιθανώς να ενεργοποιείται έμμεσα από κάποιο μήνυμα, όπως είναι η υψηλότερη συγκέντρωση ABA.

Οι ουσιαστικές διαφοροποιήσεις των τελευταίων σταδίων της σωματικής και της ζυγωτικής εμβρυογένεσης επιβάλλουν σαν πιο κατάλληλο και δόκιμο τον όρο “φυτάριο-έμβρυο” για την πιο ακριβή περιγραφή του πλήρως διαφοροποιημένου σωματικού εμβρύου και του όρου “κοτυληδόνες εμβρύου” για την περιγραφή του τελευταίου σταδίου των ζυγωτικών εμβρύων.

3. Αξιόλογα είναι και τα συμπεράσματα που προκύπτουν από τη μελέτη των σωματι-

κών εμβρύων καουτσουκόδεντρου (*Hevea brasiliensis*) που είναι μπλοκαρισμένα στο τελευταίο μορφογενετικό στάδιο και εμφανίζουν σημαντικές διαφορές από τα αντίστοιχα ζυγωτικά έμβρυα (Etienne et al. 1993):

- α. Αν και το υδατικό περιεχόμενο των ανώριμων σωματικών εμβρύων είναι πολύ μικρότερο από εκείνο των ανώριμων ζυγωτικών εμβρύων, τα πρώτα είναι πιο διογκωμένα. Το υδατικό περιεχόμενο και τα ιστολογικά χαρακτηριστικά των σωματικών εμβρύων είναι ταυτόσημα με εκείνα των ζυγωτικών εμβρύων 14 εβδομάδες μετά την άνθιση.
- β. Τα σωματικά έμβρυα είναι 60 φορές μικρότερα από τα αντίστοιχα ζυγωτικά έμβρυα, λόγω των ατροφικών κοτυληδόνων.
- γ. Τα ριζικά και βλαστητικά μεριστώματα των σωματικών εμβρύων δεν είναι διαφοροποιημένα.
- δ. Τα σωματικά έμβρυα δεν περιέχουν αποταμιευτικά υλικά και αποτελούνται, κυρίως από πλήρως διαφοροποιημένα και χυμοτοπιασμένα κύτταρα.
- ε. Τα σωματικά έμβρυα είναι πολύ ανώριμα και γι' αυτό δεν έχουν τη δυνατότητα άμεσης φύτευσης.

Ποια είναι η βάση, όμως, των διαφορών της σωματικής και της ζυγωτικής εμβρυογένεσης; Εικάζεται ότι η φυτική μορφογενετική διαδικασία που επάγει την ανάπτυξη εμβρύων ρυθμίζεται από δύο αλληλεπικαλυπτόμενους μηχανισμούς:

- ❖ Ο πρώτος ξεκινά είτε σαν μια επίδραση των μητρικών ιστών στο αναπτυσσόμενο έμβρυο είτε σαν συνέπεια της πολωμένης θέσης του εμβρύου μέσα στον εμβρυϊκό άξονα. Είναι πιθανό να δρα στα ζυγωτικά έμβρυα και να προωθεί μερικά μορφογενετικά τους στάδια, ακόμα και απουσία της πολικής μεταφοράς αυξίνης.
- ❖ Ο δεύτερος βρίσκεται ουσιαστικά μέσα στο ίδιο το έμβρυο. Είναι πιθανό να εξαρτάται από την πολική μεταφορά αυξίνης και να αποτελεί τον μοναδικό ενεργό μηχανισμό στα σωματικά έμβρυα.

Α΄. ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗΣ

Α΄.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Α΄.1.1. ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ & ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ

Η σωματική εμβρυογένεση αποτελεί ένα πολύ ελκυστικό σύστημα για τη μελέτη των βασικών αρχών της φυτικής ανάπτυξης, καθώς πρόκειται για μια πολύπλοκη μορφογενετική διαδικασία που απαιτεί φυσιολογικές, βιοχημικές και μοριακές αλλαγές στα συστατικά των φυτικών ιστών και κυττάρων (Pedroso et al. 1995). Σήμερα είναι πλέον αποδεκτό ότι όλα τα φυτικά είδη που αναπαράγονται με σπέρματα, διαθέτουν μικρό αριθμό γονιδίων συντηρημένων δια μέσου της φυσικής επιλογής τα οποία, όταν ενεργοποιηθούν την κατάλληλη στιγμή και με την κατάλληλη αλληλουχία, επάγουν τη δημιουργία σωματικών εμβρύων.

Αν και πολλές εργασίες έχουν δημοσιευτεί που καταγράφουν μορφολογικά και κυτταρικά κριτήρια που χαρακτηρίζουν την απόκτηση της ολοδυναμίας και της εμβρυογενετικής ικανότητας σε αρκετά φυτά, δεν υπάρχει ένας ή περισσότεροι γενικευμένοι φυσιολογικοί, δομικοί ή / και μοριακοί δείκτες που να υποδεικνύουν ξεκάθαρα το κύτταρο ή τα κύτταρα που αργότερα θα εξελιχθούν σε σωματικό έμβρυο (Namasivayam 2007).

Οι φυτικοί, φυτοαυξητικοί παράγοντες (υψηλές συγκεντρώσεις 2,4-D, ABA, αιθυλένιο κ.ά.) θεωρούνται συστατικά καταπόνησης και επάγουν την απόκτηση ολοδυναμίας από τα φυτικά κύτταρα. Οι Karami et al. (2010) και οι Lu et al. (2011) ταυτοποίησαν και χαρακτήρισαν μερικά γονίδια και πρωτεΐνες που επάγονται σε συνθήκες καταπόνησης σε εμβρυογενετικές καλλιέργειες.

Η σωματική εμβρυογένεση, απαιτώντας τη μετάβαση από ανοργάνωτες κυτταρικές μάζες σε σωματικά έμβρυα, σηματοδοτείται από μια ριζική αναδιοργάνωση του κυτταρικού μεταβολισμού και της RNA σύνθεσης, γεγονός που υποδεικνύει ότι ο ουσιαστικός επαναπρογραμματισμός της γονιδιακής έκφρασης, πιθανώς, συμβαίνει σε μεταγραφικό επίπεδο.

Δύο είναι τα επικρατέστερα μοντέλα γενετικού ελέγχου της σωματικής εμβρυογένεσης, καθώς οι πρώτες βιοχημικές αλλαγές καταγράφονται στα πρώιμα στάδια της εμβρυογένεσης και οι υπόλοιπες, όταν τα κύτταρα μεταφέρονται στο θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης και ανάπτυξης των σωματικών εμβρύων:

- **Α Μοντέλο:** Λόγω της πιστής και σταθερής επαναληψιμότητας της φυτικής μορφογενετικής αλληλουχίας, προτάθηκε η ύπαρξη ενός βιοχημικού, αναπτυξιακού μονο-

πατιού κατά το οποίο τα προϊόντα της κάθε αντίδρασης είναι υπεύθυνα (σαν αντιδρώντα) για την έναρξη της επόμενης αντίδρασης.

- **B Μοντέλο:** Η δεύτερη εκδοχή που είναι και η πιθανότερη, υποστηρίζει ότι υφίσταται “μία έκρηξη γονιδιακής έκφρασης” με το ξεκίνημα της εμβρυογένεσης η οποία ακολουθείται από σταδιακή αύξηση των συγκεντρώσεων των κατάλληλων γονιδιακών προϊόντων. Όταν η συγκέντρωση των συγκεκριμένων γονιδιακών προϊόντων φτάσει σε μια κρίσιμη τιμή, η διακυτταρική επικοινωνία, μέσα στον ιστό, αποκαθίσταται και η περαιτέρω διαφοροποίηση, ίσως να περιλαμβάνει ή και να μην περιλαμβάνει έκφραση νέων γονιδίων.

Το καρότο (*Daucus carota*), η σόγια (*Glycine max*) και το έλατο (*Abies alba*) είναι τα πιο συχνά χρησιμοποιούμενα, φυτικά πρότυπα μοντέλα-συστήματα για τη μελέτη της σωματικής εμβρυογένεσης σε ιστολογικό, υποκυτταρικό, φυσιολογικό, βιοχημικό και μοριακό επίπεδο.

Οι αλλαγές της γονιδιακής έκφρασης στα πλαίσια της έκφρασης της σωματικής εμβρυογένεσης, σε υγρές καλλιέργειες καρότου, μελετώνται συνήθως μέσω των εξής προσεγγίσεων :

- α)** Σύγκριση γονιδίων και πρωτεϊνών που εκφράζονται στα σωματικά έμβρυα, αλλά όχι στα κύτταρα κάλλων.
- β)** Ταυτοποίηση κλώνων που επάγονται σε σφαιρικά έμβρυα και η σύγκρισή τους με κλώνους φυταρίων ηλικίας 7 ημερών.

Στη συνέχεια θα γίνει μια σύντομη παρουσίαση των κυριότερων αλλαγών σε υποκυτταρικό επίπεδο, καθώς και των σημαντικότερων δομικών και λειτουργικών γονιδίων που σχετίζονται με τη σωματική εμβρυογένεση.

Α΄.1.2. ΜΟΡΙΑΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ & ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ ΣΤΗΝ ΕΛΙΑ

Η επαγωγή σωματικής εμβρυογένεσης σε ιστοκαλλιέργειες ελιάς (έχει κάνει εφικτή την ανάπτυξη βιοχημικών και μοριακών δεικτών, οι οποίοι εφαρμόζονται σε μελέτες γενετικής ποικιλότητας και διάκρισης των διαφορετικών καλλιεργούμενων ποικιλιών και / ή των άγριων τύπων (Bracci et al. 2011 και Leva et al. 2012). Πολλαπλές είναι και οι πειραματικές προσπάθειες που αποσκοπούν στον υπολογισμό του μεγέθους του γονιδιώματος τόσο της αγριελιάς όσο και των καλλιεργούμενων ποικιλιών (Loureiro et al. 2007). Έχει προταθεί ότι τόσο η αμφιγονική όσο και η μονογονική αναπαραγωγή έχουν παίξει καθοριστικό ρόλο στην εξέλιξη των ποικιλιών της ελιάς (Albertini et al. 2011).

Τα παραπάνω πειραματικά δεδομένα είναι πολύτιμα, καθώς η γρήγορη και σαφής ταυτοποίηση των ποικιλιών αποτελεί βασική προϋπόθεση για την επίτευξη μιας ικανής και αποτελεσματικής εκμετάλλευσης των γενετικών της αποθεμάτων.

Παράλληλα η εφαρμογή της σωματικής εμβρυογένεσης έχει βοηθήσει στη γενετική τροποποίηση της ελιάς (Pérez-Barranco et al. 2009 και Torreblanca et al. 2010) και στον εντοπισμό γονιδίων που κωδικοποιούν ένζυμα που εμπλέκονται στη βιοσύνθεση και στην τροποποίηση των λιπαρών οξέων.

Α΄.2. ΜΕΘΥΛΙΩΣΗ DNA

Ανάλογα με το αναπτυξιακό στάδιο των κάλλων έχουν καταγραφεί αλλαγές στο ποσοστό της μεθυλιωμένης κυτοσίνης του DNA. Οι LoSchiavo et al. (1989) κατέγραψαν μεταβολή στη μεθυλίωση του DNA εμβρυϊκών κυττάρων καρότου, όταν παρείχαν αυξίνη. Οι ιστοκαλλιέργειες απαιτούσαν ένα ιδανικό επίπεδο μεθυλίωσης για τη φυσιολογική ανάπτυξη των σωματικών εμβρύων, καθώς τόσο η υπερμεθυλίωση όσο και η υπομεθυλίωση προκαλούσαν άμεση και μη αναστρέψιμη αναστολή της σωματικής εμβρυογένεσης. Η υψηλή συγκέντρωση αυξίνης οδηγούσε σε αύξηση της μεθυλιωμένης κυτοσίνης, ενώ η απομάκρυνση των φυτοαυξητικών παραγόντων σε απότομη απομεθυλίωση του DNA (περίπου 30,0%). Υπάρχουν ενδείξεις ότι η μεθυλίωση είναι εν μέρει τουλάχιστον site – specific και είναι πολύ πιθανό να σχετίζεται με τη μεταγραφή του DNA.

Οι Hao et al. (2002), σε καλλιέργειες κάλλων 15 γονότυπων πορτοκαλιού, κατέγραψαν τη θετική επίδραση διαφόρων ειδών καταπονήσεων στην επαγωγή της σωματικής εμβρυογένεσης και πιο συγκεκριμένα στην ενδυνάμωση της ανάκτησης της εμβρυϊκής δυναμικότητας από μερικούς γονότυπους. Παράλληλα διαπίστωσαν ότι το επίπεδο DNA μεθυλίωσης στους εμβρυογενετικούς κάλλους ήταν χαμηλότερο συγκριτικά με των μη εμβρυογενετικών κάλλων του ίδιου γονότυπου.

A'.3. ΚΥΤΤΑΡΟΠΛΑΣΜΑ & ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ

Πειραματικά αποτελέσματα που προέκυψαν από ιστοκαλλιέργειες καλαμποκιού (*Zea mays*), ρυζιού (*Oryza sativa*) και σιταριού (*Triticum aestivum*) υποδεικνύουν ότι το κυτταρόπλασμα συνεισφέρει σημαντικά στη γονιδιακή έκφραση και στη φυτική αναγεννητική διαδικασία.

Οι μη εμβρυογενετικοί κάλλοι διαχωρίζονται εύκολα από τους εμβρυογενετικούς κάλλους ανώριμων ζυγωτικών εμβρύων βάσει κυτταροπλασματικών παρατηρήσεων. Συγκεκριμένα το μιτοχονδριακό DNA των μη εμβρυογενετικών κάλλων υφίσταται επαναπρογραμματισμό, καθώς συγκεκριμένοι μιτοχονδριακοί γονότυποι απαιτούνται για την ολοκλήρωση της φυτικής αναγέννησης (Tyagi et al. 2003).

A'.4. CEM ΓΟΝΙΔΙΑ

Πολυάριθμα γονίδια που εμπλέκονται στην κυτταρική διαίρεση και στη δημιουργία κυτταρικού τοιχώματος στο πλαίσιο της εμβρυϊκής διαφοροποίησης έχουν ταυτοποιηθεί (Aleith et al. 1990). Οι πρωτεΐνες που κωδικοποιούνται από αυτά τα γονίδια (CEM γονίδια) χαρακτηρίζονται, συνήθως, από επαναλαμβανόμενα μοτίβα προλίνης, είναι πλούσιες σε γλυκίνη και μοιάζουν είτε με τις πρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος είτε με εκείνες που εμπλέκονται στις αναπτυξιακές διαδικασίες που ρυθμίζονται από τις αυξίνες.

Ένα cDNA έμβryo-ειδικό του σφαιρικού σταδίου το οποίο κωδικοποιεί τον παράγοντα επιμήκυνσης 1α CEM1 εντοπίστηκε σε διαιρούμενα κύτταρα.

Ένα άλλο γονίδιο το CEM6 εκφράζεται στο προσφαιρικό και σφαιρικό στάδιο σωματικών εμβρύων καρότου. Η πολυπεπτιδική αλυσίδα που κωδικοποιείται από το CEM6 είναι πλούσια σε γλυκίνη και συνεισφέρει στη βιογένεση του κυτταρικού τοιχώματος κατά τη σωματική εμβρυογένεση (Sato et al. 1995).

Αν και τα γονίδια που κωδικοποιούν την ακτίνη και την τουμπουλίνη εκφράζονται σε μη εμβρυογενετικά κύτταρα, η αυξημένη σύνθεση κυτταρικού τοιχώματος και πλασματικής μεμβράνης κατά τη σωματική εμβρυογένεση, οδηγεί σε αύξηση της έκφρασης των συγκεκριμένων γονιδίων και στη διάρκεια της συγκεκριμένης μορφογενετικής αντίδρασης (Raghavan 1997).

Α΄.5. ΟΡΜΟΝΟ - ΕΠΑΓΟΜΕΝΑ ΓΟΝΙΔΙΑ

Α΄.5.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι αυξίνες έχουν αναδειχθεί σε ισχυρούς επαγωγικούς παράγοντες της σωματικής εμβρυογένεσης. Σε μοριακό επίπεδο η παροχή αυξίνης σε απομονωμένα όργανα, κυτταρικές καλλιέργειες και ολόκληρα φυτά μπορεί να οδηγήσει σε ραγδαία συσσώρευση μεταγραφημάτων (Li et al. 1994 και Khurana et al. 2007).

Οι Sung et al. (1983) ανακοίνωσαν ότι υπήρχαν πολλές βιοχημικές διαφορές ανάμεσα στους κάλλους και στα σωματικά έμβρυα τα οποία απομόνωσαν από ιστοκαλλιέργειες καρότου. Οι μορφολογικές αλλαγές υποδηλώνουν μεταβολές των βιοχημικών δραστηριοτήτων των κυττάρων που ρυθμίζονται από ομάδα γονιδίων τα οποία ανάλογα με την κατεύθυνση της μορφογένεσης ενεργοποιούνται ή απενεργοποιούνται. Ο/οι μηχανισμός/οί που κατευθύνουν τα κύτταρα του καρότου είτε προς την ανοργάνωτη ανάπτυξη κάλλου είτε προς την οργανωμένη ανάπτυξη και διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων, έχει προταθεί ότι περιλαμβάνει/ουν την επαγωγή μιας ομάδας λειτουργιών και ταυτόχρονα την αναστολή μιας άλλης.

Πιο συγκεκριμένα ανακοίνωσαν ότι η μορφογενετική μοίρα των σωματικών κυττάρων του καρότου ελέγχεται από τη συγκέντρωση του 2,4-D. Ο συνδυασμός υψηλής συγκέντρωσης 2,4-D και υψηλής κυτταρικής πυκνότητας καταστέλλει την ανάπτυξη σωματικών εμβρύων και προωθεί την ανάπτυξη κάλλων, αν και η κυτταρική πυκνότητα φαίνεται να παίζει έναν πιο άμεσο ρόλο στην καταστολή. Αντίθετα η χαμηλή κυτταρική πυκνότητα, παρουσία 2,4-D, οδηγεί στην εμφάνιση τόσο των ειδικών εμβρυϊκών πρωτεϊνών όσο και των πρώτων σωματικών εμβρύων, έξι ημέρες μετά τον εμβολιασμό.

Ενδιαφέρον παρουσιάζει η παρατήρηση ότι οι ειδικές πρωτεΐνες κάλλου συντίθενται και σε χαμηλή πυκνότητα κυττάρων, όταν τα κύτταρα επωάζονται, για 12 ημέρες, σε θρεπτικό μέσο που αποτελείται από 40,0% φρέσκο και 60,0% παλιό θρεπτικό μέσο, που προέρχεται από ιστοκαλλιέργεια υψηλής κυτταρικής πυκνότητας. Προφανώς το παλιό θρεπτικό υπόστρωμα τροποποιεί το φρέσκο θρεπτικό μέσο και το καθιστά κατάλληλο για επαγωγή ειδικών πρωτεϊνών κάλλου. Τα μέχρι τώρα δεδομένα υποδεικνύουν ότι ο παράγοντας που προωθεί την καλλογένεση πρέπει να είναι διαφορετικός από αυτόν που επάγει την πρωτεϊνοσύνθεση.

Η απομόνωση δύο αυξινο-επαγόμενων γονιδίων από σωματικά έμβρυα καρότου υπέδειξε ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις ορμονών, πιθανώς να δρουν σαν παράγοντες καταπόνησης. Οι Dudits et al. (1991) ανακοίνωσαν ότι η έκθεση εμβρυϊκών σειρών τριφυλλίου (*Trifolium repens*)

στην καταπόνηση με αυξίνη, πυροδότησε την επαγωγή της κυτταρικής διαίρεσης σε επιδερμικά κύτταρα και προώθησε την περαιτέρω διαφοροποίηση των σωματικών εμβρύων.

A'.5.2. SAUR ΓΟΝΙΔΙΑ

Μια κατηγορία γονιδίων που επάγονται από την παρουσία αυξίνης ονομάζονται **SAUR** (Small Auxin Up-Regulated).

Τα πρώτα SAUR γονίδια που απομονώθηκαν από τη σόγια (*Glycine max*) ονομάστηκαν pJCW1 και pJCW2 (Walker et al, 1982). Η εξωγενής αυξίνη επάγει αύξηση των επιπέδων των SAUR, κυρίως στα κύτταρα της επιδερμίδας, του φλοιού και στις ζώνες επιμήκυνσης των υποκοτυλίων σόγιας και διαγονιδιακών φυταρίων **καπνού** (*Nicotiana tabacum*).

Μέχρι σήμερα έχουν ανιχνευθεί πέντε SAUR γονίδια (7Kb περίπου το καθένα) στο γονιδιωματικό DNA της σόγιας (Li et al, 1994). Οι νουκλεοτιδικές αλληλουχίες των πέντε γονιδίων και τα πολυπεπτίδια που προκύπτουν από αυτά είναι παρόμοια.

Τα συγκεκριμένα γονίδια μπορούν να χρησιμοποιηθούν για το διαχωρισμό εμβρυογενετικών και μη εμβρυογενετικών σειρών. Τα επίπεδα μεταγραφής τους μειώνονται, όταν χρησιμοποιούνται σαν ραδιενεργοί ανιχνευτές σε εμβρυογενετικές ιστοκαλλιέργειες τριφυλλιού (*Trifolium repens*) μεγάλης ηλικίας, υποδεικνύοντας την αλλαγή του εμβρυογενετικού δυναμικού σε συνάρτηση με την ηλικία.

A'.6. ΚΙΝΑΣΕΣ

Ο καθοριστικός ρόλος των κινασών στην μετάδοση μηνυμάτων από την κυτταρική μεμβράνη στη θέση δράσης και του ασβεστίου σαν δευτερογενή αγγελιοφόρου σε πολλές ορμονορυθμιζόμενες διαδικασίες έχει ταυτοποιηθεί σε ποικίλες κυτταρικές και φυσιολογικές διαδικασίες των ανώτερων φυτών (Harper 2001). Η ανάλυση ενός ορμονικού ερεθίσματος και / ή των δευτερογενών αγγελιοφόρων, όπως του ασβεστίου, πιθανώς να πυροδοτεί ποικίλα μορφογενετικά μονοπάτια και στα σωματικά έμβρυα.

Σε ιστοκαλλιέργειες καρότου (*Daucus carota*) το ασβέστιο (στη κρίσιμη συγκέντρωση 200,0 μM) ήταν αναγκαίο για τη μετατροπή μη διαφοροποιημένων κυττάρων σε σωματικά έμβρυα (Overvoorde et al. 1994). Σε υψηλότερη συγκέντρωση δεν επηρέαζε ούτε τη βιωσιμότητα ούτε το

εμβρυογενετικό δυναμικό της ιστοκαλλιέργειας, ενώ σε χαμηλότερη ανέστελλε τη σωματική εμβρυογένεση.

Όταν το ασβέστιο αποτελεί δευτερογενή αγγελιοφόρο καταγράφονται δομικές αλλαγές στις πρωτεΐνες που συνδέονται με αυτό [π.χ. καλμοδουλίνη (*CaM*)], προκειμένου να αποκτήσουν τη λειτουργική τους μορφή και να αλληλοεπιδράσουν με άλλες ρυθμιστικές πρωτεΐνες (Perera et al. 1992). Κατά τη διάρκεια της σωματικής εμβρυογένεσης παρατηρήθηκαν αλλαγές στη διανομή του ασβεστίου, όχι όμως και στη συγκέντρωση του ασβεστίου που σχετίζεται με την πλασματική μεμβράνη. Δραστικά συμπλέγματα ασβεστίου/καλμοδουλίνης ανιχνεύτηκαν σε μεριστώματα καρδιόσχημων και σχήματος τορπίλης σωματικών εμβρύων. Η έκφραση του μεταγραφήματος της καλμοδουλίνης αυξανόταν με την επαγωγή των σωματικών εμβρύων και στη συνέχεια παρέμενε σταθερή.

Γονίδια που κωδικοποιούν την ασβεστοδεσμευόμενη πρωτεΐνη *MsCa1*, επίσης είχαν αυξημένα μεταγραφικά επίπεδα μετά από επίδραση 2,4-D και συσσωρεύονταν επιλεκτικά σε πρώιμα σφαιρικά στάδια της σωματικής εμβρυογένεσης (Dudits et al. 1991).

Μια οικογένεια ασβεστοεξαρτόμενων, αλλά ανεξάρτητων από την καλμοδουλίνη πρωτεϊνικών κινασών οι *CDPKs* ταυτοποιήθηκαν για πρώτη φορά στη σόγια (*Glycine max*). Αντίθετα με την ασβεστοεξαρτώμενη και από την καλμοδουλίνη εξαρτώμενη πρωτεϊνική κινάση, οι *CDPKs* ενεργοποιούνται μετά από άμεσο δέσιμο με το **ασβέστιο** (Harper et al. 1991).

Ένα cDNA που κωδικοποιεί μια τυπική πρωτεϊνική κινάση την *CRK* (ομόλογη με κινάσες άλλων φυτών) έχει απομονωθεί από cDNA βιβλιοθήκη σωματικών εμβρύων καρότου (*Daucus carota*) (Lindzen et al. 1995). Το *CRK* μεταγράφημα και η αντίστοιχη πρωτεΐνη εκφραζόταν στα σωματικά έμβρυα καρότου σε πολύ υψηλότερα επίπεδα από ότι στους ώριμους φυτικούς ιστούς. Η *CRK* γονιδιακή αλληλουχία έχει συντηρηθεί μεταξύ των αγγειοσπέρμων, υποδηλώνοντας με την παρουσία της τόσο σε μονοκοτυλήδονα όσο και σε δικοτυλήδονα είδη, το καθοριστικό ρόλο που παίζει στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου.

Δύο *CDPKs* (55KDa και 60KDa) ταυτοποιήθηκαν από εμβρυογενετικές καλλιέργειες **σανδόξυλου**. Οι δύο κινάσες είχαν προσωρινή έκφραση στο σφαιρικό σωματικό και ζυγωτικό έμβρυο κατά την ωρίμανση του σπέρματος (ανάπτυξη ενδοσπερμίου) και κατά τη φύτευση. Τα επίπεδα ασβεστίου τετραπλασιάζονταν κατά τη σωματική εμβρυογένεση, όταν οι προεμβρυϊκές μάζες διαφοροποιούνταν σε σωματικά έμβρυα (Anil et al. 2000).

Η *MsCPK3* μια άλλη πρωτεϊνική κινάση, απομονώθηκε από καλλιέργεια τριφυλλίου (*Trifolium repens*) και η γονιδιακή της έκφραση αυξανόταν κατά τη σωματική εμβρυογένεση (Davletova et al. 2001).

Μεταξύ των cDNA κλώνων που απομονώθηκαν από υγρές καλλιέργειες καρότου (*Daucus carota*) (2 μηνών-4 χρόνων) σε διάφορες φάσεις ανάπτυξης ένας μόνο είχε ομολογία με ζωικό και φυτικό υποδοχέα πρωτεϊνικής κινάσης. Ο κλώνος εκφραζόταν σε ιστοκαλλιέργειες σωματικών εμβρύων και ονομάστηκε *SERK* γονίδιο (*Somatic Embryogenesis Receptor kinase*). Πειραματικά δεδομένα υποδηλώνουν ότι αποτελεί πιθανό μοριακό δείκτη για το διαχωρισμό εμβρυογενετικών και μη εμβρυογενετικών κυττάρων. Η έκφρασή του ξεκινούσε σε εμβρυογενετικά κύτταρα και καταγραφόταν μέχρι το σφαιρικό στάδιο των σωματικών εμβρύων, αλλά δεν ανιχνευόταν σε μη εμβρυογενετικά στάδια εμβρυογενετικών καλλιεργειών. Σε άλλα φυτά το *SERK* ανιχνευόταν σε ζυγωτικά έμβρυα σφαιρικού σταδίου, αλλά έλειπε από μη επικονιασμένα λουλούδια ή άλλους φυτικούς ιστούς (Schmidt et al. 1997).

Τα εμβρυογενετικά κύτταρα της *Dactylis glomerata* εκφράζουν ένα *SERK* γονίδιο μέχρι το σφαιρικό στάδιο, ενώ τα κύτταρα καρότου στα ακραία μεριστώματα, στο πρωτόδερμα και στο κολεόπτυλο (Somleva et al. 2000).

Στο κάρδαμο (*Arabidopsis thaliana*) έχουν ταυτοποιηθεί πέντε μέλη της *SERK* οικογένειας (*AtSERK1*, *AtSERK2*, *AtSERK3*, *AtSERK4* και *AtSERK5*). Το *AtSERK1* εκφραζόταν σε σωματικά έμβρυα και μεσολαβούσε στην απόκτηση εμβρυϊκής ικανότητας από το ωάριο κατά τη ζυγωτική εμβρυογένεση (Shah et al. 2001).

Δύο γονίδια το *ZmSERK1* και το *ZmSERK2* απομονώθηκαν από το καλαμπόκι (*Zea mays*) και έχουν όλα τα χαρακτηριστικά της *SERK* οικογένειας. Το *ZmSERK1* είχε επιλεκτική έκφραση σε θηλυκούς και αρσενικούς αναπαραγωγικούς ιστούς με μεγαλύτερη έκφραση στους μικροσπόρους, ενώ το *ZmSERK2* σε όλους τους ιστούς. Και τα δύο γονίδια εκφράζονταν τόσο σε εμβρυϊκά όσο και σε μη εμβρυϊκά κύτταρα (Baudino et al. 2001).

Α΄.7. HOMEODOM BOX ΓΟΝΙΔΙΑ

Τα *homeobox* γονίδια ταυτοποιήθηκαν για πρώτη φορά στη δροσόφιλα (*Drosophila melanogaster*) και είναι γονίδια κλειδιά για τη ρύθμιση της διαφοροποίησης σε πολυκύτταρους οργανισμούς. Περιέχουν μια χαρακτηριστική συντηρημένη νουκλεοτιδική αλληλουχία που λέγεται *homeobox*.

Το *homeobox* γονίδιο *Sbhl* ταυτοποιήθηκε και χαρακτηρίστηκε από cDNA βιβλιοθήκη σωματικών εμβρύων σόγιας (*Glycine max*). Καταγράφηκε αύξηση των μεταγραφικών του επιπέδων κατά τη μετάβαση από το καρδιάσχημα στάδιο στο στάδιο της τορπίλης, όταν διαφοροποιούνταν

οι κοτυληδόνες και ο προαγγειώδης ιστός. Το μεταγράφημά του δεν ανιχνεύτηκε σε μη εμβρυϊκούς ή άλλους ιστούς, αν και ο βλαστός και το υποκοτύλιο εκδήλωναν περιορισμένη έκφρασή του. Το γονιδιακό πρότυπο της έκφρασής του υποδηλώνει το ρυθμιστικό του ρόλο στη βιογένεση αγγείων και στη δημιουργία σωματικών εμβρύων (Lindzen et al. 1995).

Έξι homeobox γονίδια (*GHB1-CHB6*) ταυτοποιήθηκαν από cDNA βιβλιοθήκη σωματικών εμβρύων και υποκοτυλίων καρότου (*Daucus carota*) (Meijer et al. 1997). Το *CHB1* εκφραζόταν συνεχώς σε μη διαφοροποιημένα κυτταρικά συσσωματώματα και το *CHB2* μετά το σφαιρικό στάδιο με μέγιστη έκφραση κατά το καρδιόσχημο στάδιο και το στάδιο τορπίλης, ενώ μειωνόταν δραστικά σε μη διαφοροποιημένες καλλιέργειες. Τα *CHB3*, *CHB4* και *CHB5* εμφάνιζαν εξειδικευμένη συσσώρευση στα κύτταρα του φλοιού του εμβρυϊκού άξονα σε έμβρυα τορπίλης. Το *CHB6* περιοριζόταν σε προκαμβιακά κύτταρα, καρδιόσχημα και σχήματος τορπίλης σωματικά έμβρυα. Στις εμβρυϊκές κοτυληδόνες και στα υποκοτύλια φυταρίων τα μεταγραφήματα των τεσσάρων τελευταίων γονιδίων σχετίζονταν με αγγειώδεις ιστούς.

Ανάλογα homeobox γονίδια στην (*Arabidopsis thaliana*) (*Athb-8*) και στη ντομάτα (*Solanum lycopersicum*) (*VAHOX1*) εκφράζονταν, επίσης, κατά την αγγειώδη διαφοροποίηση (Tornerio et al. 1996).

Α΄.8. ΕΚΚΡΙΝΟΜΕΝΕΣ ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ ΠΟΥ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΣΩΜΑΤΙΚΑ ΕΜΒΡΥΑ

Πολλά χρόνια πριν, είχε διαπιστωθεί η τροποποίηση του θρεπτικού υποστρώματος που προερχόταν από καλλιέργειες σωματικών εμβρύων, λόγω των ουσιών, κυρίως πρωτεϊνών, που εκκρίνονταν από τα καλλιεργούμενα, *in vitro*, φυτικά κύτταρα. Το τροποποιημένο θρεπτικό υπόστρωμα ήταν κατάλληλο για την προώθηση της σωματικής εμβρυογένεσης.

Πιο συγκεκριμένα αποδείχτηκε ότι εκκρίνονταν **EPs** (*Extracellular Proteins*) οι οποίες σχετίζονταν με την επαγωγή και την έναρξη της σωματικής εμβρυογένεσης. Οι πρωτεΐνες αυτές εκκρίνονταν τόσο από εμβρυογενετικά όσο και από μη εμβρυογενετικά κύτταρα και απομονώθηκαν κλώνοι που κωδικοποιούσαν μερικές από αυτές.

Ένας από αυτούς τους κλώνους, ο *EP2*, ταυτοποιήθηκε και βρέθηκε ότι κωδικοποιούσε μια εξωκυτταρική λιπιδική μεταφορική πρωτεΐνη η οποία, πιθανώς, συμμετείχε στη μεταφορά λιπιδίων ή άλλων μη πολικών μορίων έξω από το κύτταρο. Η έκφραση του *EP2* στο καρότο ήταν περιοδικά ρυθμιζόμενη και περιοριζόταν σε εμβρυογενετικές κυτταροκαλλιέργειες, σε κύτταρα πρωτοδέρματος ζυγωτικών και σωματικών εμβρύων, επιδερμικά κύτταρα βλαστητικού μεριστώ-

ματος, σε αναπτυσσόμενα άνθη και σε ωριμάζοντα σπέρματα. Αν και η έκφρασή του δεν ήταν ειδική σε σωματικά έμβρυα αποτελεί χρήσιμο δείκτη για τη δημιουργία επιδερμικών κυτταρικών σειρών, καθώς ενισχύεται η έκφρασή του στο πλαίσιο της σωματικής εμβρυογένεσης (Sterk et al. 1991).

Οι κλώνοι *EP1* και *EP3* απομονώθηκαν από θρεπτικό υπόστρωμα εμβρυογενετικών καλλιέργειών (van Engelen et al. 1991). Η *EP3* πρωτεΐνη λειτουργικά είναι μια χιτινάση και δεν εκκρινόταν ούτε από σωματικά ούτε από ζυγωτικά έμβρυα, αλλά εκφραζόταν σε επιδερμικά κύτταρα φρούτων και ενδοσπερμίων. Πιθανώς διαδραματίζει διατροφικό ρόλο κατά τη διάρκεια της ζυγωτικής εμβρυογένεσης (van Hengel et al. 1998). Έχει προταθεί ότι οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες συμμετέχουν στη ρύθμιση της κυτταρικής επέκτασης, στη διατήρηση της ακεραιότητας της επιδερμικής κυτταρικής σειράς σε εμβρυϊκούς και μη ιστούς και στην εγκαθίδρυση φυσιολογικού σχήματος και μορφής.

Παράλληλα μια 38 KDa εξωκυτταρικά εκκρινόμενη πρωτεΐνη έχει ταυτοποιηθεί και χαρακτηριστεί στα πλαίσια της σωματικής εμβρυογένεσης στο ραδίκι (*Taraxacum officinale*) και το πολυπεπίδιο της *β1,3-glucanase* εκκρίνεται σε υψηλότερα επίπεδα στο θρεπτικό μέσο εμβρυϊκών σειρών συγκριτικά με το θρεπτικό μέσο μη εμβρυϊκών σειρών.

Τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι οι περισσότερες εξωκυτταρικά εκκρινόμενες πρωτεΐνες που μελετήθηκαν κατά τη διάρκεια της σωματικής εμβρυογένεσης, αφορούν μια ομάδα χιτινών και glucanases οι οποίες δε σχετίζονται μόνο με τα πρώιμα στάδια της σωματικής εμβρυογενετικής ανάπτυξης, αλλά πιθανώς αποτελούν απαραίτητα θρεπτικά συστατικά για την επαγωγή σωματικών εμβρύων και την αποικοδόμηση του κυτταρικού τοιχώματος.

Α΄.9. ΠΡΩΤΕΙΝΟΣΥΝΘΕΣΗ ΣΤΗ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗΣ

Α΄.9.1. ΠΟΙΟΤΙΚΕΣ & ΠΟΣΟΤΙΚΕΣ ΑΛΛΑΓΕΣ ΤΗΣ ΠΡΩΤΕΪΝΟΣΥΝΘΕΣΗΣ

Πλούσια είναι η βιβλιογραφία από εργασίες που αναφέρονται στις μεταβολές της πρωτεϊνοσύνθεσης κατά τη διάρκεια της διαφοροποίησης σωματικών εμβρύων σε διάφορα φυτικά είδη:

- Σε σωματικά έμβρυα σόγιας (*Glycine max*) ανιχνεύτηκαν μερικές ειδικές αποταμιευτικές πρωτεΐνες σπερμάτων (Muhitch et al. 1994). Λεπτομερής μελέτη της παραγωγής τους έδειξε:

1. Υψηλή σχετικά συσσώρευσή τους σε σωματικά έμβρυα που αναπτύσσονταν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε NAA. Τα επίπεδά τους ήταν ίδια σε όλα τα μορφογενετικά στάδια των σωματικών εμβρύων.
 2. Δεν καταγράφηκαν σημαντικές διαφορές στα επίπεδά τους σε σωματικά έμβρυα που αναπτύσσονταν παρουσία 2,4-D. Ανιχνεύτηκαν, μόνο, μερικές σπερματικές αποταμιευτικές πρωτεΐνες στα σωματικά έμβρυα που επάγονταν από 10,0 μΜ 2,4-D, κυρίως στα αρχικά στάδια της σωματικής εμβρυογένεσης. Ανάλογα ποσοστά δεν καταγράφηκαν σε σωματικά έμβρυα από καλλιέργειες μεγάλης ηλικίας.
- Σε υγρές καλλιέργειες έλατου (*Abies alba*) καταγράφηκε θετικός συσχετισμός μεταξύ αριθμού σωματικών εμβρύων και ενδοκυτταρικής συσσώρευσης πρωτεϊνών (Dong et al. 1994). Έντονη μεταγραφική δραστηριότητα καταγράφηκε πριν την αύξηση του αριθμού των κυττάρων και της αύξησης του νωπού βάρους. Η αντιγραφή του DNA και η κυτταρική διαίρεση παρατηρήθηκαν μετά την ανακαλλιέργεια και κατέληγε στην κυτταρική επέκταση (διόγκωση) και στην αύξηση της βιομάζας.
- Ο θετικός συσχετισμός μεταγραφής και αριθμού σωματικών εμβρύων, ίσως οφείλεται στη φύση των ανώριμων σωματικών εμβρύων και στον τρόπο πολλαπλασιασμού τους. Εξάλλου η ενδοκυτταρική συσσώρευση πρωτεϊνών αντανακλά τα φυσιολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά πολλαπλασιασμού των σωματικών εμβρύων σε υγρές καλλιέργειες.
- Η εφαρμογή δισδιάστατης ανάλυσης, σε ιστοκαλλιέργεια φύλλων καμέλιας (*Camellia japonica*) και ελεγχόμενης επαγωγής άμεσης σωματικής εμβρυογένεσης, έδειξε σημαντικές διαφορές στις πρωτεΐνες των εμβρυϊκών και των μη εμβρυϊκών ιστοκαλλιεργειών (Pedroso et al. 1995). 9,0% των νέων πρωτεϊνών κατανέμονταν σε όλα τα μοριακά βάρη και τα ισοηλεκτρικά σημεία. Η πλειοψηφία τους ήταν χαμηλού μοριακού βάρους και σχετιζονταν με την επαγωγή προεμβρύων και την εξέλιξή τους σε σφαιρικά έμβρυα. Ειδικότερα δύο πολυπεπτίδια, τα E₁ και E₂, ανιχνεύονταν σε δείγματα πρώιμων σωματικών εμβρύων σφαιρικού σταδίου.
- Ανάλυση της *in vivo* πρωτεϊνοσύνθεσης κατά τη σωματική εμβρυογένεση και τη φυτική ανάπτυξη σε ιστοκαλλιέργειες έλατου (*Abies alba*) έδειξε μεγαλύτερη ποικιλία στη σύνθεση πρωτεϊνών συγκριτικά με την *in vitro* μετάφραση και την πρωτεϊνική συσσώρευση (Dong et al. 1997). Οι μεταβολές στη γονιδιακή έκφραση και πρωτεϊνο-

σύνθεση κατά τη διάρκεια της συγκεκριμένης αναπτυξιακής διαδικασίας μπορούν να ταξινομηθούν σε 5 μεγάλες ομάδες:

Ομάδα 1: Έκφραση πολυπεπτιδίων που δεν επηρεάζονταν αισθητά από την έκθεση των σωματικών εμβρύων σε θρεπτικό μέσο ωρίμανσης που περιείχε ABA. Η σύνθεση και η συσσώρευσή τους παρέμενε σταθερή σε όλα τα αναπτυξιακά στάδια.

Ομάδα 2: Πολυπεπτίδια των οποίων η συγκέντρωση μεταβαλλόταν (αύξηση, μείωση, ή παροδική εξαφάνιση) κατά τη διάρκεια της επαγωγής σωματικών εμβρύων.

Ομάδα 3: Πολυπεπτίδια που ήταν παρόντα σε ανώριμα σωματικά έμβρυα και σε ώριμα έμβρυα, αλλά εξαφανίζονταν μετά τη φύτευση.

Ομάδα 4: Πολυπεπτίδια που ανιχνεύονταν σε σωματικά έμβρυα μετά την έκθεσή τους σε θρεπτικό μέσο ωρίμανσης που περιείχε ABA, σπάνια σε φυτάρια, αλλά δεν ανιχνεύονταν σε ανώριμα σωματικά έμβρυα.

Ομάδα 5: Πολυπεπτίδια που σχετίζονταν με συγκεκριμένα και διακριτά στάδια ανάπτυξης των σωματικών εμβρύων και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν εργαλεία διαχωρισμού γονοτύπων που δεν μπορούν να πραγματοποιήσουν ή να ολοκληρώσουν την ωρίμανση.

- Οι Sung et al. (1983), σε καλλιέργειες άγριου καρότου (*Daucus carota*) WOO1C, ανίχνευσαν δύο πρωτεΐνες. Οι συγκεκριμένες πρωτεΐνες, δεν παραγόntonτο στο πλαίσιο της καλλογένεσης, αλλά στα αρχικά στάδια της ζυγωτικής και σωματικής εμβρυογένεσης, γι' αυτό και ονομάστηκαν εμβρυϊκές πρωτεΐνες (Sung 1984). Μια μετάλλαξη που δεν επιτρέπει την εκδήλωση της σωματικής εμβρυογένεσης ανέστελλε τη σύνθεση των εν λόγω πρωτεϊνών, ακόμα και σε εμβρυογενετικό θρεπτικό μέσο, αν και ήταν πιθανό να ανιχνεύονταν σε κάλλο.

Η έκφραση των παραπάνω εμβρυογενετικών πρωτεϊνών μελετήθηκε και σε άλλες ποικιλίες καρότου (π.χ. 11A, WCH105). Η έκφρασή τους διαπιστώθηκε σε κάλλους, σωματικά έμβρυα, αλλά όχι σε βλαστούς και ρίζες. Το ότι εκφράζονταν και σε άλλους ιστούς, πλην των εμβρυϊκών, δεν αποκλείει την πιθανότητα να κατέχουν σημαντικό ρόλο και στην εκδήλωση της σωματικής εμβρυογένεσης. Η αναπτυξιακή τους εξειδίκευση μπορεί να καθορίζεται μέσω της κατανομής τους σε έναν συγκεκριμένο ιστό ή της αλληλεπίδρασής τους με άλλες πρωτεΐνες του ιστού.

A΄.9.2. AGP

Οι **AGPs** (**A**rabinogalactans **P**roteins) είναι πρωτεογλυκάνες (10,0% πρωτεΐνη και περισσότερο από 90,0% υδρογονάνθρακας) των ανώτερων φυτών. Εντοπίζονται στην κυτταρική μεμβράνη και είναι πλούσιες σε αλανίνη, γλυκίνη και σερίνη.

Το *Pc1* είναι το πρώτο cDNA AGP που απομονώθηκε από υγρές καλλιέργειες **αχλαδιού** (*Pyrus*). Έξι επιπλέον AGPs ταυτοποιήθηκαν και χαρακτηρίστηκαν σε διάφορα φυτικά συστήματα (π.χ. καπνού κ.ά.) και η παρουσία τους, πιθανώς, σχετίζεται με την μορφολογία των σωματικών εμβρύων (Egertsdotter et al. 1993).

Σε ιστοκαλλιέργειες ριζών καρότου (*Daucus carota*) εντοπίστηκαν AGPs στο πρωτόδερμα, σε πρώιμα στάδια σωματικών εμβρύων και στον προαγγειώδη ιστό του ακραίου μεριστώματος της ρίζας και των κοτυληδόνων (Stacey et al. 1990). Η εμβρυογενετική ικανότητα γερασμένων καλλιεργειών καρότου μπορούσε να αποκατασταθεί με προσθήκη εκχυλίσματος από σπέρματα καρότου που περιείχε AGPs. Είναι πιθανό ότι οι AGPs εμπλέκονται στη διακυτταρική επικοινωνία, εξαιτίας των δομικών και φυσικών τους ιδιοτήτων.

Σε εμβρυογενετικές καλλιέργειες ραδικιού (*Taraxacum officinale*) οι AGPs εντοπίζονται στα εξωτερικά κυτταρικά τοιχώματα των περιφερειακών κυττάρων των σφαιρικών εμβρύων. Αυτές και άλλες παρόμοιες καταγραφές υποστηρίζουν τον προτεινόμενο ρόλο των AGPs στην κυτταρική αύξηση και διαίρεση, καθώς μπορούν να επανακινήσουν την κυτταρική διαίρεση σε μη διαιρούμενους υποπληθυσμούς πρωτοπλαστών (van Hengel et al. 2001).

A΄.9.3. HPRGPs

Μια σημαντική κατηγορία πρωτεϊνών οι οποίες μπορούν να επάγονται κατά τη σωματική εμβρυογένεση είναι οι **HPRGPs** (**C**ell wall **h**ydroxy**p**roline-rich **g**lyco**p**roteins). Οι HPRGPs είναι συστατικά των φυτικών κυτταρικών τοιχωμάτων.

Οι αρχικές μελέτες έδειξαν ότι μια πρώτη λειτουργία τους είναι να διατηρούν τη δομή και τη μορφή των φυτικών κυττάρων. Πρόσφατες μελέτες υποδηλώνουν ένα δεύτερο σημαντικό ρόλο, καθώς φαίνεται ότι αποτελούν ασπίδα έναντι παθογόνων μικροοργανισμών και άλλων καταπονήσεων.

Οι HPRGPs πρωτεΐνες επάγονται κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης από διάφορα ερεθίσματα και πιθανώς ρυθμίζονται από περισσότερες από μια ανεξάρτητες DNA αλληλουχίες, γεγονός που

τις καθιστά άκρως σημαντικές από πλευράς γονιδιακής ρύθμισης.

Σε φρεσκοκομμένους δίσκους από ρίζες καρότου (*Daucus carota*) παρατηρήθηκε αύξηση των μεταγραφημάτων των HPRGPs (5,0-10,0% των συνολικών μεταγραφημάτων) υποδηλώνοντας την εμπλοκή τους στην επαναδημιουργία του κυτταρικού τοιχώματος. Ενδιαφέρουσα είναι και η παρατήρηση ότι τα φυτάρια που κανονικά ήταν ευάλωτα στο μύκητα *C. cucumerinum*, όταν εκτέθηκαν σε μια πολύ σύντομη θερμική καταπόνηση (για 40' στους 50 °C) εκδήλωσαν διπλασιασμό της συγκέντρωσης του αιθυλενίου και 100% αύξηση των HPRGPs στα κυτταρικά τους τοιχώματα. Αποτέλεσμα των παραπάνω ήταν η δραστική αύξηση της αντίστασής τους στη μόλυνση από τον παθογόνο μικροοργανισμό (Wilde et al. 1995).

A'.9.4. LTPs

Οι **LTPs** (Lipid transfer proteins) εκκρίνονται εξωκυτταρικά και πιθανώς σχετίζονται με τη μεταφορά φωσφολιπιδίων από τις θέσεις σύνθεσής τους σε άλλες κυτταρικές θέσεις.

Σε καλλιέργειες φύλλων καμέλιας (*Camellia japonica*) τα LTP γονίδια εμπλέκονται στην επαγωγή άμεσης σωματικής εμβρυογένεσης (Pedroso et al. 1995).

Η έκφραση των LTP γονιδίων είναι στενά συνδεδεμένη με τον πρώτο ιστό που διαφοροποιείται στα σωματικά έμβρυα (π.χ. το πρωτόδερμα), ασκώντας ρυθμιστικό ρόλο στον έλεγχο της κυτταρικής επέκτασης κατά το εμβρυϊκό αναπτυξιακό πρόγραμμα (Dodeman et al. 1997). Η έκφραση των LTP γονιδιακών προϊόντων περιορίζεται στις περιφερειακές κυτταρικές σειρές νεαρών ιστών και αναπτυσσόμενων σωματικών εμβρύων.

A'.9.5. ΛΕΚΤΙΝΕΣ

Οι **λεκτίνες** είναι γλυκοπρωτεΐνες φυτικών και ζωικών κυττάρων. Οι λειτουργίες των φυτικών λεκτινών παραμένουν αδιευκρίνιστες, αν και τους έχουν αποδοθεί ρόλοι που σχετίζονται με την αποθήκευση των σπερμάτων, την άμυνα έναντι παθογόνων παραγόντων, τη ρύθμιση της αύξησης και την αναγνώριση γύρης και ύπερου.

Σε σπέρματα κίτρου (*Citrus medica*) η λεκτίνη εκφράζεται στα πρώιμα σφαιρικά στάδια του ζυγωτικού εμβρύου, ενώ στα σωματικά έμβρυα σε μεταγενέστερα στάδια.

Διαφοροποιημένη έκφραση λεκτινών έχει καταγραφεί σε διάφορα στάδια της σωματικής

και ζυγωτικής εμβρυϊκής ανάπτυξης στο τριφύλλι. (*Trifolium repens*). Στα τελικά στάδια της διαφοροποίησης των εμβρύων συσσωρεύονταν τα *MsLEC1* και *MsLEC2* μεταγραφήματα. Είναι πολύ πιθανό να είναι καθοριστικά για την εμβρυϊκή ανάπτυξη στο τριφύλλι και η λειτουργία τους να περιλαμβάνει τη ρύθμιση της αύξησης στη διάρκεια της εμβρυϊκής διαμόρφωσης (Brill et al. 2001).

A'.9.6. GERMINS & GLPS

Οι *germins* είναι ρυθμιστικές πρωτεΐνες της ανάπτυξης και ανακαλύφθηκαν για πρώτη φορά κατά τη φύτευση σιταριού (*Triticum aestivum*). Οι **germins** και οι **GLPs** (**Germins like proteins**) έχει προταθεί ότι παίζουν καθοριστικό ρόλο κατά τη ζυγωτική και σωματική εμβρυογένεση. Το επίπεδο των γονιδίων που τις κωδικοποιούν ενδυναμώνεται με την εφαρμογή αυξίνης (π.χ. 2,4-D). Γονίδια που κωδικοποιούν *germins* και GLPs έχουν απομονωθεί από διάφορα γυμνόσπερμα, μονοκότυλα και δικότυλα.

Το γονίδιο *PcGER1* εκφράζεται σε ενεργά και μη ζυγωτικά έμβρυα πεύκου (*Pinus caribaea*) και απουσιάζει σε όλες τις μη εμβρυογενετικές σειρές, όπως και στο θηλυκό γαμετόφυτο. Οι GLPs ανιχνεύονται σε προσφαιρικά σωματικά έμβρυα και όχι σε μη εμβρυογενετικούς κάλλους. Οι GLPs μπορεί να εμπλέκονται στην έναρξη και τον τερματισμό της επέκτασης του κυτταρικού τοιχώματος στη διάρκεια της σωματικής εμβρυογένεσης και μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν μοριακοί δείκτες της σωματικής εμβρυογένεσης.

A'.10. LEA ΓΟΝΙΔΙΑ

Τόσο στη διάρκεια των τελευταίων σταδίων της ζυγωτικής εμβρυογένεσης όσο και στη διάρκεια της ωρίμανσης των σωματικών εμβρύων λαμβάνει χώρα μια δραματική αφυδάτωση του εμβρύου και του σπέρματος η οποία χαρακτηρίζεται από αυξημένη συσσώρευση ABA.

Στο πλαίσιο της ωρίμανσης των διαφοροποιημένων σωματικών εμβρύων παρατηρείται μια ραγδαία μεταβολή στη γονιδιακή έκφραση. Τα γονίδια που εκφράζονται σε αυτή την περίοδο είναι ειδικά γονίδια ωρίμανσης και μοιάζουν με τα γονίδια ωρίμανσης των ζυγωτικών εμβρύων. Μερικά από αυτά είναι αποταμιευτικά, ενώ άλλα εμπλέκονται στη σύνθεση και συσσώρευση λιπιδίων και υδρογονανθράκων (Goupil et al. 1992). Τα υπόλοιπα γονιδιακά προϊόντα πιστεύεται

ότι παίζουν ρόλο στην προστασία του εμβρύου κατά την αποξήρανση των σπερμάτων και συχνά αναφέρονται σαν **LEA** (**L**ate **e**mbryogenesis **a**bundant) γονίδια ή πρωτεΐνες, καθώς εκφράζονται στα τελευταία στάδια της εμβρυϊκής ωρίμανσης.

Η πρώτη LEA πρωτεΐνη που ταυτοποιήθηκε ήταν *Em* πρωτεΐνη. Πρόκειται για μια cytosolic πρωτεΐνη που παράγεται σε μεγάλες ποσότητες στα τελευταία στάδια ωρίμανσης του ζυγωτικού εμβρύου σιταριού. Αργότερα το *Em* γονίδιο κλωνοποιήθηκε και τα ομόλογά του ταυτοποιήθηκαν και σε άλλα φυτά (καρότο κ.ά.).

Ποικίλα πειράματα υποδεικνύουν ότι τα *Em* γονίδια είναι δείκτες για τη διάκριση άμεσης και έμμεσης εμβρυογένεσης στα αρχικά στάδια της καλλιέργειας (Corre et al. 1996).

Τα LEA γονίδια διαθέτουν κοινές αλληλουχίες στις δομικές και ρυθμιστικές τους περιοχές, ρυθμίζονται από το ABA και διαδραματίζουν έναν παρόμοιο ρόλο-κλειδί στην ανοχή έναντι της αφυδάτωσης. Καθώς τα LEA γονίδια επάγονται και εκφράζονται μετά από προσθήκη εξωγενούς ABA η ανάλυσή τους κατευθύνεται στην κατανόηση του μοριακού μηχανισμού της ορμονικής ρύθμισης.

Παράλληλα οι LEA πρωτεΐνες εκφράζονται επιλεκτικά σε σωματικά έμβρυα, είναι πολύ υ-δρόφιλες και παράγονται σε μεγάλα ποσά και στα τελευταία στάδια της ζυγωτικής εμβρυογένεσης σε αρκετά φυτικά είδη (π.χ. βαμβάκι, βρώμη, ρύζι, σιτάρι κ.ά.).

Ειδικότερα τα LEA γονίδια που απομονώθηκαν από σωματικά έμβρυα καρότου (*Daucus carota*) περιλαμβάνουν αντιπροσώπους και των τεσσάρων ομάδων LEA πρωτεϊνών οι οποίες χαρακτηρίζονται από σημαντική αναλογία τόσο στην αμινοξική σύνθεση όσο και στη γενική πρωτεϊνική τους δομή (DC3, DC8, DCECP31, DCECP40 και DCEMB1) (Zimmerman, 1993). Τα γονίδια του καρότου προσδιορίστηκαν είτε σαν πρώιμοι είτε σαν όψιμοι μοριακοί δείκτες της σωματικής εμβρυογένεσης ανάλογα με το χρόνο έκφρασής τους στα διαφορετικά στάδια της φυτικής εμβρυϊκής διαφοροποίησης.

Όλα τα LEA γονίδια καρότου που έχουν αναλυθεί, μέχρι σήμερα, δείχνουν ανιχνεύσιμη έκφραση σε κύτταρα κάλλου και τα περισσότερα από τα μεταγραφήματά τους αυξάνονται σημαντικά σε σωματικά έμβρυα καρδιόσχημου σταδίου. Αποτελούν τα πολυπληθέστερα εκλεκτικά εκφραζόμενα μεταγραφήματα των σωματικών εμβρύων, όχι όμως και των κυττάρων κάλλων, γεγονός που ερμηνεύει, γιατί τόσα πολλά LEA γονίδια έχουν απομονωθεί από σωματικά έμβρυα καρότου.

Παράλληλα τα LEA γονίδια του καρότου επάγονται από το ABA τόσο σε κύτταρα κάλλων όσο και σωματικών εμβρύων. Ενδεικτικά αναφέρουμε ότι το DC3 μπορεί να επαχθεί και σε μη εμβρυϊκούς ιστούς είτε με προσθήκη ABA είτε με καταπόνηση αποξήρανσης, ενώ τα άλλα LEA

γονίδια (DC8, DC59, ECP31 και ECP40) δεν επάγονται σε μη εμβρυϊκά κύτταρα.

Οι Puurponen-Pimiä et al (1993) απομόνωσαν από το γονιδίωμα της σημύδας (*Betula pendula* Roth) το γονίδιο BP8. Το BP8 γονίδιο είναι ομόλογο με το DC8 γονίδιο του καρότου και κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη 53KDa. Η πρωτεΐνη εμφανίζει 52,0% ομοιότητα στην αλληλουχία της με το DC8 γονίδιο σε αμινοξικό επίπεδο και περιέχει 20 επαναλήψεις των 11 αμινοξέων, γεγονός που την κατατάσσει στην ομάδα των LEA πρωτεϊνών. Ο Northern υβριδισμός των mRNA που απομονώθηκαν από κύτταρα που αντιπροσώπευαν διαφορετικά στάδια σωματικής εμβρυογένεσης και μη εμβρυογενετικού υλικού με έναν BP8 ανιχνευτή, έδειξε χαμηλά επίπεδα έκφρασης του γονιδίου.

A'.10.1. DC8 & DC59 ΓΟΝΙΔΙΑ

A'.10.1.1. Εισαγωγή

Το DC8 και το DC59 εκφράζονται κατά την εμβρυϊκή ανάπτυξη. Αν και το μοτίβο έκφρασης των δύο γονιδίων είναι παρόμοιο, τα δύο γονίδια είναι εντελώς διαφορετικά, καθώς τα μεταγραφήματά τους δεν εμφανίζουν υβριδοποίηση μεταξύ τους και οι πρωτεΐνες τους έχουν διαφορετικά μεγέθη. Το DC59 κωδικοποιεί μια μεμβρανική ελικοειδή πρωτεΐνη, ενώ το DC8 μια πολύ υδρόφιλη πρωτεΐνη και ανήκει στην κατηγορία των LEA γονιδίων.

Τα γονίδια DC8 και DC59 δεν εκφράζονται σε ώριμους ιστούς, φύλλα, μίσχους, ρίζες, νεαρά φυτάρια ή φυτικούς ιστούς που αποκτώνται από ώριμα σπέρματα καρότου, όπως διαπιστώθηκε σε πρωτεϊνικό επίπεδο. Αντίθετα σε σωματικά έμβρυα καρότου καταγράφηκαν υψηλά επίπεδα των μεταγραφημάτων τους και εκλεκτική έκφραση των αντίστοιχων πρωτεϊνών τους, ενώ δεν ανιχνεύτηκαν σε ανοργάνωτα κυτταρικά συσσωματώματα.

Παράλληλα εκφράζονται σε φυτάρια που προκύπτουν από σωματικά έμβρυα τα οποία φυτρώνουν άμεσα, χωρίς να μεσολαβήσει λήθαργος, καθώς η έκφρασή τους καταστέλλεται από το λήθαργο, αλλά επανέρχεται μετά την υπερπήδηση του λήθαργου.

Τέλος, εκφράζονται έντονα σε ζυγωτικά έμβρυα και λιγότερο σε ενδοσπέρμια. Η έκφρασή τους σχετίζεται με το καρδιόσχημο στάδιο των ζυγωτικών εμβρύων, ελέγχεται από το αναπτυξιακό πρόγραμμα της σωματικής εμβρυογένεσης και δε ρυθμίζεται άμεσα από το 2,4-D.

A'.10.1.2. Γενικά χαρακτηριστικά DC8 γονιδίου

Οι Young et al. (1983) κατασκεύασαν μια cDNA βιβλιοθήκη από poly(A)⁺ RNA σωματικών εμβρύων χρησιμοποιώντας εμβρυϊκά αντισώματα. Έτσι δημιουργήθηκε μια ομάδα cDNA κλώνων που είναι ομόλογη με τα μεταγραφήματα που εκφράζονται εκλεκτικά σε σωματικά έμβρυα καρότου (*Daucus carota*) (Choi et al. 1987). Ένας από αυτούς τους κλώνους, ο cDNA 8 (DC8), μελετήθηκε περαιτέρω, επειδή το μεταγράφημά του εκφραζόταν μόνο σε εμβρυϊκούς ιστούς τόσο σωματικούς όσο και ζυγωτικούς και όχι σε φύλλα, βλαστούς, άνθη ή ρίζες ώριμων φυτών.

Το DC8 γονίδιο αποτελεί ένα μοναδικό αντίγραφο γονιδίου με όλα τα χαρακτηριστικά μιας ευκαρυωτικής μεταγραφικής μονάδας, δηλαδή περιέχει TATA, CAP, poly(A) αλληλουχίες και τα δύο εσώνια τα οποία ακολουθούν τον GTAG κανόνα. Τα δεδομένα από τον προσδιορισμό της αλληλουχίας των βάσεων του γονιδίου συμφωνούν με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από άλλες μεθόδους και αναφέρονται στα MB του μεταγραφήματος, της πρωτεΐνης, καθώς και του ισοηλεκτρικού της σημείου. Το μέγεθος του mRNA του κλώνου cDNA 8 είναι 1,9Kb και αντιστοιχεί σε μια 66KDa πρωτεΐνη. Όπως και σε άλλα γονίδια, έτσι και στο DC8 οι όμορες περιοχές είναι πολυμορφικές. Δύο από αυτούς τους αλληλομόρφους τύπους έχουν αναλυθεί σε επίπεδο αλληλουχίας.

Ο μοριακός μηχανισμός της έκφρασης του DC8 γονιδίου μελετήθηκε σε σωματικά έμβρυα καρότου. Η εκλεκτική έκφρασή του σε σωματικά έμβρυα και σε σπέρματα εξαρτάται από την παρουσία ABA. Η ανάλυση υπέδειξε δύο περιοχές στις DC8 upstream αλληλουχίες που απαιτούνται ταυτόχρονα για υψηλά επίπεδα γονιδιακής έκφρασης για επαγωγή της γονιδιακής έκφρασης από το ABA. Μια από αυτές βρίσκεται μεταξύ των θέσεων -170 και -51 και περιέχει τρία αντίγραφα ενός ACGTG μοτίβου. Μια άλλη περιοχή του υποκινητή απαραίτητη για υψηλά επίπεδα έκφρασης βρίσκεται μεταξύ των θέσεων -505 και -170. Η λειτουργία αυτής της περιοχής μπορεί να υποκατασταθεί από αλληλουχίες upstream της θέσης -505.

Στο DC59 υπάρχουν δύο πυρηνικοί παράγοντες, ο C3 και ο C4, οι οποίοι συνδέονται στον υποκινητή. Η σύνδεσή τους μπορεί να εμποδιστεί με την προσθήκη της DC8 upstream αλληλουχίας που δρα σαν συναγωνιστής. Οι C3 και C4 παράγοντες παράγονται και τα συμπλέγματα που δημιουργούν με το ισοδύναμο τμήμα του DC8, καταγράφονται μόνο σε πυρηνικά εκχυλίσματα που απομονώνονται από σωματικά έμβρυα. Ένα σύνολο τεσσάρων συμπλεγμάτων DNA-πρωτεϊνών ανιχνεύτηκαν upstream του -505. Τα συγκεκριμένα πειραματικά δεδομένα υποδεικνύουν το ρυθμιστικό τους ρόλο στη γονιδιακή έκφραση κατά τη σωματική εμβρυογένεση.

Περαιτέρω ανάλυση απαιτείται για να αποδειχθεί αν αυτά τα συμπλέγματα είναι υπεύθυ-

να για τον παρατηρούμενο λειτουργικό πλεονασμό. Δεν μπορεί να ανιχνευθεί δέσιμο πυρηνικών παραγόντων, όταν χρησιμοποιούνται τα τμήματα που επάγονται από το ABA.

Άλλα δεδομένα έδειξαν ότι αυτή η περιοχή είναι απαραίτητη για την ενεργότητα του DC8 υποκινητή. Έτσι πιστεύεται ότι το δέσιμο των παραγόντων στις -505 και -301 είναι το πρωταρχικό γεγονός και ότι αυτό το δέσιμο είναι ένα προαπαιτούμενο για την αλληλεπίδραση των πρωτεϊνών με τα ACGTG μοτίβα. Μια εναλλακτική ερμηνεία μπορεί να είναι ότι τα πυρηνικά εκχυλίσματα δεν περιέχουν ή περιέχουν ανεπαρκή ποσά των αντίστοιχων πρωτεϊνών που συνδέονται με το μοτίβο έκφρασης από το ABA, αλλά αυτό φαίνεται απίθανο, αφού τα εκχυλίσματα προέρχονται από έμβρυα ηλικίας 10-15 ημερών τα οποία είναι γνωστό ότι δείχνουν υψηλή έκφραση του DC8.

Παρόμοια αποτελέσματα έχουν προκύψει και για το Em γονίδιο του σιταριού και έχει προταθεί ότι αυτή η αλληλεπίδραση DNA και πρωτεΐνης σχετίζεται με μετα-μεταφραστική ωρίμανση. Η γονιδιακή ρύθμιση των εμβρυϊκών γονιδίων είναι υψηλά συντηρημένη.

Το DC8 εκφράζεται στο έμβρυο και στο ενδοσπέρμιο ζυγωτικών εμβρύων. Το μοτίβο έκφρασης του μεταγραφήματός του είναι παρόμοιο στα ζυγωτικά και στα σωματικά έμβρυα (Franz et al. 1989).

Η λειτουργία της DC8 πρωτεΐνης ήταν αρχικά άγνωστη (Hatzopoulos et al. 1990), αλλά αργότερα διαπιστώθηκε ότι σχετίζεται μεν, αλλά δεν εξαρτάται από τη σωματική εμβρυογένεση (Cheng et al. 1996).

Το DC8 μεταγράφημα και η αντίστοιχη πρωτεΐνη του ενεργοποιούνται στα αρχικά στάδια της σωματικής εμβρυογένεσης. Η παραγωγή τους αρχίζει να αυξάνεται 5 ημέρες μετά την απομάκρυνση της αυξίνης και μεγιστοποιείται την 15^η μέρα (τελευταία μέρα συλλογής δειγμάτων).

Αυτά τα δεδομένα αποδεικνύουν ότι το γονίδιο επάγεται στην πρώιμη εμβρυογένεση, καθώς η διαμόρφωση του σφαιρικού σταδίου απαιτεί 7 ημέρες περίπου και την 15^η μέρα το 77,0%, το 20,0% και το 3,0% των σωματικών εμβρύων βρίσκονται στο σφαιρικό, στο καρδιόσχημο και στο στάδιο τορπίλης αντίστοιχα.

Η έκφραση του γονιδίου DC8 μελετήθηκε και σε δύο εμβρυογενετικές κυτταρικές σειρές καρότου, οι οποίες ήταν θερμικά καταπονημένες. Και στις δύο κυτταρικές σειρές καταγράφηκε μείωση της γονιδιακής έκφρασης (Milionis et al. 2001).

Ο κυτταρικός εντοπισμός έδειξε ότι το DC8 κωδικοποιεί μια εμβρυϊκή, υδρόφιλη πρωτεΐνη καρότου που εκφράζεται σε σωματικά και ζυγωτικά έμβρυα, αλλά όχι σε ώριμα όργανα. Εκφράζεται σε σφαιρικά (σε χαμηλά επίπεδα), καρδιόσχημα και έμβρυα τορπίλης, καθώς και στο ενδοσπέρμιο ώριμων σπερμάτων, παρά το γεγονός ότι τα επίπεδα του μεταγραφήματος του DC8

στο ενδοσπέρμιο είναι περίπου 2 φορές χαμηλότερο από ότι στα ζυγωτικά έμβρυα. Σε νεαρούς αναπτυσσόμενους ιστούς καρότου το μεταγράφημα του DC8 ανιχνεύεται κυρίως στα χυμοτόπια, σε κυστίδια και συστατικά του ενδομεμβρανικού συστήματος. Σε ώριμους ιστούς ανιχνεύεται στα πρωτεϊνικά σώματα και στο κυτταρικό τοίχωμα, αλλά δεν ανιχνεύεται στον πυρήνα, στα λιπώδη σώματα, στα πλαστίδια και στα μιτοχόνδρια.

Ο υποκυτταρικός εντοπισμός υποδεικνύει ότι το DC8 μετακινείται μέσω του μεταφορικού μονοπατιού ενδοπλασματικό δίκτυο-σύστημα Golgi και στη συνέχεια εναποτίθεται στο χυμοτόπιο ή στο κυτταρικό τοίχωμα. Τα συγκεκριμένα δεδομένα έρχονται σε σύγκρουση με την αμινοξική του αλληλουχία, καθώς δε διαθέτει μια διακριτή υδρόφοβη περιοχή στο αμινικό άκρο η οποία θα μπορούσε να παίζει το ρόλο εναρκτήριας αλληλουχίας για το συγκεκριμένο μεταφορικό μονοπάτι.

Α'.10.1.3. DC8 γονίδιο και LEA γονίδια

Η ποσότητα της DC8 πρωτεΐνης είναι πολύ χαμηλότερη από εκείνη των αποταμιευτικών πρωτεϊνών των σπερμάτων. Δε θεωρείται πιθανό να αποτελεί αποταμιευτική πρωτεΐνη των σπερμάτων και επομένως θρεπτικό συστατικό κατά τη φύτρωση. Αντίθετα εμφανίζει μια συγκεκριμένη ομοιότητα με την ομάδα των LEA γονιδίων που πιστεύεται ότι παίζουν ρόλο στην εμβρυϊκή αποξήρανση.

Το DC8 (το οποίο περιέχει μια αλληλουχία 11 αμινοξέων που επαναλαμβάνεται πολλές φορές) είναι ένα LEA γονίδιο των δικοτυλήδων φυτών το οποίο πρωταρχικά εκφράζεται εκλεκτικά στα σπέρματα και ειδικότερα στα κύτταρα του ενδοσπερμίου, του αναπτυσσόμενου εμβρύου και του εμβρύου που βλαστάνει. Αντίθετα δεν εκφράζεται στα κύτταρα των μεριστωμάτων των φυταρίων και των ώριμων φυτών ακόμα και παρουσία ABA.

Τα LEA γονίδια των μονοκοτυλήδων φυτών επάγονται από το ABA τόσο σε έμβρυα όσο και σε νέα φυτά. Μερικά LEA γονίδια των μονοκοτυλήδων φυτών είναι:

- i. Το Rab γονίδιο του ρυζιού (*Oryza sativa*).
- ii. Το Em γονίδιο του σιταριού. (*Triticum aestivum*).
- iii. Ένα LEA γονίδιο του καλαμποκιού (*Zea mays*) το οποίο κωδικοποιεί μια πρωτεΐνη πλούσια σε γλυκίνη.

Τα DC8, Em και Rab γονίδια περιέχουν παρόμοιες ρυθμιστικές αλληλουχίες, αλλά δεν είναι γνωστό αν ρυθμίζονται με τον ίδιο τρόπο. Τα γονίδια Rab, Em και LEA των μονοκοτυλήδων φυ-

τών εντοπίζονται σε νεαρά φύλλα, γι' αυτό και δεν θεωρούνται έμβρυο-ειδικά. Αντίθετα το DC8 γονίδιο εντοπίζεται σε φύλλα καρότου (*Daucus carota*).

Αυτή η διαφορά στη γονιδιακή έκφραση μπορεί να αντικατοπτρίζει τις διαφορές της αναπτυξιακής διαδικασίας μεταξύ μονοκοτυλήδων και δικοτυλήδων φυτών. Είναι γνωστό ότι τα πρώτα πέντε ή έξι φύλλα των μονοκοτυλήδων δημιουργούνται στο σπέρμα πριν τη φύτευση, ενώ τα πρώτα φύλλα των δικοτυλήδων δημιουργούνται μόνο μετά τη φύτευση. Η εξειδίκευση στα σπέρματα μπορεί να εκφράζεται με την παρουσία μεταγραφικών παραγόντων σε όλους τους ιστούς και τα κύτταρα που δημιουργούνται στο σπέρμα, οι οποίοι πιθανώς παραμένουν στα κύτταρα για αρκετό χρόνο και μετά τη φύτευση. Αυτό μπορεί να ερμηνεύσει γιατί οι κοτυληδόνες των δικότυλων και τα νέα φύλλα των μονοκότυλων είναι ικανά να ανταποκριθούν στο εξωγενές ABA μετά τη φύτευση μέσω ενεργοποίησης υποκινητών μερικών LEA γονιδίων.

A'.10.1.4. DC8 γονίδιο και ABA

Το DC8 ανήκει σε μια ομάδα γονιδίων που ρυθμίζονται από το ABA, όπως και τα πρωτεϊνικά τους προϊόντα και πιθανώς να παίζουν ρόλο στη φάση της αποξήρανσης και ωρίμανσης των εμβρύων.

Σε έρευνες με στόχο τη μελέτη της ρύθμισης της γονιδιακής έκφρασης του DC8 από το ABA, προστέθηκε εξωγενές ABA στο θρεπτικό μέσο, χωρίς να ελέγχονται τα ενδογενή επίπεδα (Hatzopoulos et al. 1990). Παράλληλα χρησιμοποιήθηκε φλουριδόνη που μειώνει δραματικά τη συσσώρευση ABA, χωρίς να επηρεάζει την κυτταρική ζωτικότητα και γι' αυτό είναι χρήσιμη για το χειρισμό των επιπέδων ABA στην καλλιέργεια του καρότου.

Όταν το ABA παρεχόταν στο θρεπτικό υπόστρωμα στην έναρξη της εμβρυϊκής ανάπτυξης παρατηρήθηκε αύξηση της συσσώρευσης της DC8 πρωτεΐνης συγκριτικά με τα σωματικά έμβρυα καρότου που καλλιεργούνταν απουσία ABA. Η προσθήκη φλουριδόνης στο θρεπτικό μέσο με σκοπό την αναστολή της παραγωγής και της συσσώρευσης του ενδογενούς ABA, μείωνε τα επίπεδα της DC8 πρωτεΐνης σε επίπεδα χαμηλότερα της ευαισθησίας της Western μεθόδου. Η προσθήκη 10^{-6} M ABA σε κύτταρα που είχαν κατεργασθεί με φλουριδόνη αποκαθιστούσε τη συσσώρευση της DC8 πρωτεΐνης. Πιο συγκεκριμένα η προσθήκη ABA σε καλλιέργειες σωματικών εμβρύων αυξανόταν το επίπεδο του μεταγραφήματος του DC8 τουλάχιστον 50 φορές μέσα σε 15 λεπτά. Η προσθήκη φλουριδόνης κατέληγε στη δραματική μείωση του μεταγραφήματος του DC8. Αντίθετα ούτε το εξωγενώς παρεχόμενο ABA, ούτε και η ενδοκυτταρική αύξηση ABA

μπορούσε να ρυθμίσει την έκφραση του DC8 γονιδίου σε ώριμους ιστούς σε επίπεδα ισοδύναμα με εκείνα που καταγράφονταν σε σωματικά έμβρυα κατεργασμένα με ABA.

Προκειμένου να προσδιοριστεί η ιδανική συγκέντρωση ABA που απαιτείται για τη συσσώρευση της DC8 πρωτεΐνης, τα σωματικά έμβρυα καλλιεργούνταν σε όλο και πιο αυξανόμενες συγκεντρώσεις ABA. Παράλληλα η προσθήκη φλουριδόνης ήταν χρήσιμη για τη μείωση των ενδογενών επιπέδων ABA στις καλλιέργειες καρότου για να είναι δυνατός ο προσδιορισμός των ιδανικών συγκεντρώσεων εξωγενούς ABA που απαιτούνται, καθώς και του χρονοδιαγράμματος της κυτταρικής αντίδρασης σε συνάρτηση με το ABA.

Πρωτεϊνικά εκχυλίσματα από κύτταρα που καλλιεργούνταν με φλουριδόνη έδειξαν την απουσία ανιχνεύσιμων επιπέδων DC8 πρωτεΐνης τα οποία μπορούσαν να αποκατασταθούν (στα φυσιολογικά και πάνω από τα φυσιολογικά επίπεδα) μόνο μετά την προσθήκη ABA. Το κατώφλι του επιπέδου 10^{-7} M ABA ήταν απαραίτητο για την αποκατάσταση των ανιχνεύσιμων επιπέδων του DC8 σε καλλιέργειες που αναπτύσσονταν παρουσία φλουριδόνης και 10^{-8} M ABA για την αποκατάσταση των τυπικών επιπέδων της DC8 πρωτεΐνης. Η φυσιολογική δραστική κλίμακα κυμαινόταν από 10^{-7} M μέχρι 10^{-5} M ABA. Αντίθετα με ότι παρατηρήθηκε στα έμβρυα ούτε η επώαση με ABA για 24 ώρες ούτε η αποξήρανση οδηγούσαν στη συσσώρευση DC8 πρωτεΐνης ή του μεταγραφήματός της σε ρίζες ή φύλλα.

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι η γονιδιακή έκφραση του DC8 σχετίζεται με τη σωματική εμβρυογένεση, καθώς και με cis- και trans ενεργούς παράγοντες που πιθανώς εμπλέκονται με την κατάλληλη περιοδική και προσωρινή επαγωγή του από το ABA. Η επίδραση ABA στη συσσώρευση του μεταγραφήματος του DC8 υποδηλώνει μεταγραφική ρύθμιση. Μια άλλη πιθανή ερμηνεία είναι ότι το ABA (που αποτελεί ειδικό trans ενεργό παράγοντα) είναι απών σε ώριμους ιστούς ή ότι το γονίδιο καταστέλλεται σε μη εμβρυϊκούς ιστούς.

A'.10.2. DC59 ΓΟΝΙΔΙΟ

A'.10.2.1. Δομικά χαρακτηριστικά DC59 γονιδίου

Ο κλώνος cDNA 59 αρχικά περιεγράφηκε από τους Choi et al. (1987) οι οποίοι υποστήριξαν ότι κωδικοποιεί μια μεμβρανική πρωτεΐνη (λέγεται και oleosin) η οποία αν και διακριτή από τις LEA πρωτεΐνες, επίσης επάγεται από το ABA.

Η ανάλυση της αλληλουχίας έδειξε ότι το γονίδιο έχει τα χαρακτηριστικά της φυτικής μεταγραφικής μονάδας με TATA box που ακολουθείται μετά από 24bp από μια αλληλουχία που δείχνει ομοιότητες στη μεταγραφική εναρκτήρια περιοχή και περιέχει δύο πολυαδενυλικές αλληλουχίες downstream του κωδικονίου. Το DC59 αποτελείται από ένα μοναδικό εξώνιο και δημιουργεί ένα μεταγράφημα 0,84Kb.

Το μεταφραστικό προϊόν του DC59 είναι ένα βασικό πολυπεπτίδιο μεγέθους 20KDa και η ανάλυση της hydrophobicity δείχνει ότι η πρωτεΐνη μπορεί να διαιρεθεί σε τρεις διακριτές περιοχές. Η μεταγραφή του DC59 βρίσκεται υπό αυστηρό αναπτυξιακό έλεγχο και τόσο το μεταγράφημα όσο και η πρωτεΐνη που προκύπτουν ανιχνεύονται μόνο σε εμβρυϊκούς ιστούς (Hatzopoulos et al. 1990).

Η μοριακή ανάλυση αυτού του γονιδίου έχει ταυτοποιήσει περιοχές μέσα στο 5' άκρο που αλληλοεπιδρούν με πυρηνικούς παράγοντες παρόντες μόνο σε εμβρυϊκά εκχυλίσματα. Αυτές οι περιοχές δείχνουν ομοιότητες στην αλληλουχία με τις 5' περιοχές του DC8 γονιδίου και, πιθανώς, να συνιστούν τις θέσεις που ρυθμίζονται από το ABA. Υπάρχουν δεδομένα που δείχνουν ότι πρέπει να υπάρχουν τουλάχιστον τρεις διαφορετικοί παράγοντες σε πυρηνικά εκχυλίσματα εμβρύων οι οποίοι αλληλοεπιδρούν με τη DC59 upstream αλληλουχία. Είναι άγνωστο αν και οι τρεις παράγοντες ρυθμίζουν την έκφραση του DC59 γονιδίου με ένα πολυπλοκότερο τρόπο.

A'.10.2.2. Λειτουργικός ρόλος DC59 γονιδίου

Σε καλλιέργεια χαμηλής πυκνότητας κυττάρων που περιέχει 2,4-D η έκφραση του mRNA και της πρωτεΐνης του κλώνου cDNA 59 είναι σχεδόν μη ανιχνεύσιμες σε όλη τη διάρκεια των 15 ημερών της καλλιεργητικής περιόδου. Αυτή η παρατήρηση υποδεικνύει ότι η έκφρασή του δεν απαιτείται για τη δημιουργία του σφαιρικού εμβρύου η οποία πιθανώς καταστέλλεται από το 2,4-D ή σχετίζεται και με τη δημιουργία του καρδιάσχημου εμβρύου.

Η έκφραση του γονιδίου DC59 μελετήθηκε και σε δύο εμβρυογενετικές, θερμικά καταπονημένες, κυτταρικές σειρές καρότου. Η έκφραση του γονιδίου μειώθηκε και στις δύο κυτταρικές σειρές. Επιπλέον, καταγράφηκε μια προοδευτική μείωση των συσσωρευμένων μηνυμάτων με το πέρασμα του χρόνου (Milionis et al. 2001).

Το DC59 είναι σε μεγάλο βαθμό ομόλογο με την L3 πρωτεΐνη της μεμβράνης των λιποσωμάτων του καλαμποκιού. Αυτή η ομολογία περιορίζεται στις υδρόφοβες περιοχές που βρίσκονται και στις δύο πρωτεΐνες. Η αμινοξική αλληλουχία των L3 και DC59 πολυπεπτιδίων έδειξε ότι το 49% των αμινοξέων σε αυτή την περιοχή είναι ταυτόσημη κι ένα πρόσθετο 46% σχετίζεται με-σω της εξέλιξης. Και τα δύο πολυπεπτίδια έχουν τα ακόλουθα κοινά χαρακτηριστικά:

1. Είναι μικρά περίπου 19KD με ένα πολύ παρόμοιο hydropathicity profile.
2. Αποτελούνται από 2 υδρόφιλες περιοχές ($-NH_2$ και $-COOH$) και μια κεντρική υδρόφοβη.
3. Η υδρόφοβη περιοχή έχει σχεδόν το ίδιο μήκος, 76 αμινοξέα στο DC59 και 72 αμινοξέα στο L3. Οι άλλες δύο περιοχές, $-NH_2$ και $-COOH$, είναι επίσης παρόμοιου μεγέθους.
4. Οι $-NH_2$ και $-COOH$ περιοχές του DC59 και της L3 πρωτεΐνης έχουν ισοηλεκτρικά σημεία περίπου 10,5.
5. Το $-COOH$ άκρο του DC59 έχει δύο δυνητικά ελικοειδείς περιοχές, μια 18 και μια 10 αμινοξέων. Οι δύο έλικες έχουν αμφολυτικές ιδιότητες και μπορούν εν μέρει να βυθιστούν στο φωσφολιπιδικό στρώμα. Στην L3 πρωτεΐνη το $-COOH$ άκρο περιέχει επίσης μια δυνητικά αμφολυτική ελικοειδή περιοχή 18 αμινοξέων.

Όλες αυτές οι κοινές ιδιότητες σε συνδυασμό με το γεγονός ότι και τα δύο γονίδια δείχνουν την ίδια προσωρινή και περιοδική έκφραση οδήγησε στο συμπέρασμα ότι το πολυπεπτίδιο που κωδικοποιείται από το DC59 είναι μια από τις μεμβρανικές πρωτεΐνες των λιποσωμάτων.

Είναι γνωστό από το καλαμπόκι (*Zea mays*) ότι η μεμβράνη των λιποσωμάτων περιέχει τέσσερα κύρια πολυπεπτίδια: ένα μεγέθους 45 KD που ονομάζεται H και τα L1, L2 και L3 που έχουν μεγέθη μέχρι 20 KD. Η ακριβής λειτουργία της πρωτεΐνης είναι άγνωστη, αλλά πιθανώς να συμβάλλει στην σταθεροποίηση της δομής του λιποσώματος.

Υπάρχουν αλληλουχίες στην κωδική περιοχή που σχετίζονται με άλλα γονιδιωματικά τμήματα. Το τμήμα του DC59 που κωδικοποιεί το υδρόφοβο τμήμα (δηλαδή το 5' τμήμα της μεταγραφικής περιοχής) υβριδίζει με δύο πρόσθετα mRNAs παρόντα μόνο σε εμβρυϊκούς ιστούς. Τα μεγέθη τους είναι 880 και 1300 νουκλεοτίδια αντίστοιχα και τα προκύπτοντα πολυπεπτίδια είναι

περίπου 20 KD και 40 KD αντίστοιχα. Μια πιθανή ερμηνεία είναι ότι αυτή η περιοχή μοιράζεται ομολογίες με άλλες μεμβρανικές πρωτεΐνες των λιποσωμάτων δικαιολογώντας τον παρατηρούμενο υβριδισμό.

A'.10.2.3. DC59 γονίδιο & ABA

Η φυτική ορμόνη ABA παίζει σημαντικό ρόλο στη ρύθμιση της γονιδιακής έκφρασης του DC59. Όταν παρέχεται εξωγενές ABA το επίπεδο του μεταγραφήματος του DC59 μειώνεται. Αυτό είναι ιδιαίτερα αισθητό, όταν χρησιμοποιούνται νεαρά έμβρυα. Είναι πιθανό το ABA να ελέγχει τουλάχιστον εν μέρει τη σταθερότητα του μεταγραφήματος του DC59. Όμως το γεγονός ότι η επίδραση του ABA είναι πιο δραστική και πιο γρήγορη (περίπου 15 λεπτά σε νεαρά έμβρυα) δείχνει ότι το ABA ρυθμίζει και τη γονιδιακή έκφραση του DC59.

A'.10.3. EMB-1 ΓΟΝΙΔΙΟ

Ένα άλλο γονίδιο το οποίο εκφράζεται νωρίς κατά τη σωματική εμβρυογένεση του καρότου (*Daucus carota*) είναι το **EMB-1**, απομονώθηκε από αναπτυσσόμενα σωματικά έμβρυα καρότου και δείχνει ισχυρή ομολογία με τα Em γονίδια που απομονώνονται από τα έμβρυα σιταριού (*Triticum aestivum*) (Wurtele et al. 1993). Η εντατική μελέτη της ενεργοποίησης του γονιδίου επιβεβαίωσε ότι ανιχνεύεται μόνο σε εμβρυϊκούς ιστούς κατά την μετάβασή τους από το σφαιρικό στάδιο, στο στάδιο της τορπίλης και συσσωρεύεται εξειδικευμένα στις μεριστωματικές του περιοχές.

Ο *in situ* υβριδισμός έδειξε ότι τα μεταγραφήματα του **EMB-1** αρχίζουν να συσσωρεύονται ομοιόμορφα τόσο σε σωματικά έμβρυα όσο και σε ζυγωτικά σφαιρικά έμβρυα. Καθώς η ανάπτυξη προχωρά στο καρδιόσχημο στάδιο συσσωρεύονται σε υψηλότερες συγκεντρώσεις και δείχνουν μια πολικότητα στην κατανομή τους με υβριδισμό κυρίως στην περιφερειακή περιοχή τόσο των ζυγωτικών όσο και των σωματικών εμβρύων. Στα ώριμα ζυγωτικά έμβρυα πολύ υψηλά επίπεδα ανιχνεύονται στο προκάμβιο και στα μεριστώματα βλαστού και ρίζας. Στο στάδιο του φυταρίου των σωματικών εμβρύων συσσωρεύονται κυρίως σε μεριστωματικά κύτταρα, αλλά σε μικρότερες συγκεντρώσεις. Δεν ανιχνεύονται στο ενδοσπέρμιο, στα αναπτυσσόμενα σπερματικά περιβλήματα, στα αναπτυσσόμενα καρπόφυλλα, καθώς και σε κανένα κυτταρικό τύπο νεα-

ρών φυτών. Συσσωρεύονταν σε υψηλότερα επίπεδα στα ζυγωτικά έμβρυα από ότι στα σωματικά έμβρυα και περισσότερο στις κοτυληδόνες.

Η προφανής διαφορά στα επίπεδα συσσώρευσης του συγκεκριμένου μεταγραφήματος σε σωματικά και ζυγωτικά έμβρυα μπορεί να ερμηνευτεί με την υπόθεση ότι στη ζυγωτική εμβρυογένεση υπάρχει ένα δευτερογενές μήνυμα (πιθανώς το ABA) του μητρικού περιβάλλοντος το οποίο μπορεί όχι μόνο να ενδυναμώνει την έκφραση των LEA γονιδίων, αλλά μπορεί επίσης να αποτελεί μήνυμα για την έναρξη του προγράμματος του λήθαργου.

Προς το παρόν η λειτουργία του *EMB-1* γονιδίου και της πρωτεΐνης του είναι άγνωστη. Το πρωτεϊνικό προϊόν του *EMB-1* γονιδίου ανήκει στην ομάδα των LEA πρωτεϊνών και μοιράζεται υψηλή ομοιότητα στην αμινοξική της αλληλουχία με αυτές. Ο υψηλός βαθμός συντήρησης κατά την εξέλιξη έχει σκοπό τη διατήρηση τη δευτεροταγούς, τριτοταγούς και τεταρτοταγούς τους δομής οι οποίες απαιτούνται για την επιτυχή διεκπεραίωση του ρόλου του.

Έχει προταθεί ότι η *EMB-1* πρωτεΐνη ενεργεί σαν παράγοντας αφυδάτωσης και προστασίας των κυτταρικών συστατικών του εμβρύου κατά την αποξήρανση, όταν τα σπέρματα γίνονται ληθαργικά. Η αργή της συσσώρευση κατά την ανάπτυξη του σπέρματος και ο υγροσκοπικός της χαρακτήρας συμβάλλουν σε αυτήν την υπόθεση. Είναι δύσκολο, όμως, να συμβιβαστούν με το γενικευμένο μοτίβο έκφρασης του *EMB-1* γονιδίου στα έμβρυα καρότου και την υψηλή συντήρηση της αμινοξικής αλληλουχίας στα αγγειόσπερμα. Αν πράγματι το *EMB-1* λειτουργεί σαν προστατευτικό συστατικό έναντι της αποξήρανσης, ίσως να απαιτείται και η πιο εξειδικευμένη αλληλεπίδρασή του με κάποιο άλλο μόριο για την επίτευξη αυτού του στόχου.

A'.11. HSPS

Η heat shock αντίδραση είναι ένας γενικός μηχανισμός αντίδρασης-προσαρμογής σε συγκεκριμένες περιβαλλοντικές καταπονήσεις (π.χ. ζέστης, ανοξίας κ.ά.).

Τα **heat shock** γονίδια είναι μια μικρή ομάδα γονιδίων που ρυθμίζονται ταυτόχρονα, είναι εξελικτικά συντηρημένα και αντιδρούν σε θερμοκρασιακά και άλλα περιβαλλοντικά είδη καταπόνησης με άμεσο και χαρακτηριστικό τρόπο. Έχουν απομονωθεί από πλήθος οργανισμών, από τα βακτήρια μέχρι και τον άνθρωπο (Zimmerman et al. 1993).

Στη δροσόφιλα (μύγα των φρούτων) (*Drosophila melanogaster*), το πιο εντατικά μελετημένο heat shock σύστημα, έχουν καταγραφεί οι πρωτεΐνες *hsp 83, 70, 68, 28, 26, 23* και *22*. Πειραματικά αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι συγκεκριμένα μέλη της οικογένειας των heat shock γο-

νιδίων διαθέτουν πολλαπλές ρυθμιστικές αλληλουχίες μια από τις οποίες (συνηθισμένη σε όλα τα heat shock γονίδια) ανταποκρίνεται σε γενικά είδη καταπόνησης (ζέστη, ανοξία κ.ά.) και τουλάχιστον άλλη μια σε κάποιο αναπτυξιακό μήνυμα, πιθανώς ορμονικό.

Μια πλειάδα **hsps** (**heat shock proteins**) έχουν απομονωθεί και έχει μελετηθεί το μοτίβο έκφρασής τους στο πλαίσιο της ζυγωτικής εμβρυογένεσης.

Στη σόγια (*Glycine max*) έχει καταγραφεί μια ομάδα περίπου 15 πολυπεπτιδίων με MB 15-18 KD. Αρκετά από αυτά τα γονίδια, ιδίως αυτά με τα μικρότερα μοριακά βάρη, έχουν κλωνοποιηθεί και έχει προσδιοριστεί η νουκλεοτιδική τους αλληλουχία.

Στο καρότο οι σημαντικότερες heat shock πρωτεΐνες είναι 95, 88, 74, 23, 21, 20 και 18 KD πρωτεϊνών και παρατηρούνται σε διαφορετικά στάδια σωματικών εμβρύων. Η μελέτη σε δισδιάστατο πήκτωμα πολυακρυλαμίδης υποδηλώνει ότι οι ζώνες των μικρών MB περιέχουν πολυπεπτίδια με διαφορετικά ισοηλεκτρικά σημεία, όπως και στη σόγια. Η πολυπληθέστερη πρωτεΐνη είναι η *hsp 74* για την οποία δεν είναι τίποτα γνωστό σε μοριακό επίπεδο.

Σε σωματικά έμβρυα καρότου πολλά από τα γονίδια που κωδικοποιούν hsps πρωτεΐνες εκφράζονται επιλεκτικά (Milionis et al. 2001). Έχει παρατηρηθεί ότι η θερμική καταπόνηση μεταχείριση (heat shock) αναστέλλει την αύξηση των σφαιρικών εμβρύων, ενώ τα υπόλοιπα αναπτυξιακά στάδια των σωματικών εμβρύων δεν επηρεάζονται και τα έμβρυα συνεχίζουν να αναπτύσσονται κανονικά.

Τα σφαιρικά έμβρυα εμφανίζουν μικρότερη σύνθεση και συσσώρευση μικρού μοριακού βάρους μεταγραφήματος hsps πρωτεϊνών συγκριτικά με τα υπόλοιπα αναπτυξιακά στάδια των σωματικών εμβρύων και των αδιαφοροποίητων κυττάρων των κάλλων. Τα συγκεκριμένα πειραματικά δεδομένα μπορεί να αποδοθούν στην αποτυχία επαγωγής της μεταγραφής των hsps γονιδίων, αλλά τη διατήρηση της ικανότητας ρύθμισης της απομάκρυνσης του μεταγραφήματος.

Από υγρές καλλιέργειες τριφυλλιού (*Trifolium repens*) απομονώθηκαν δύο cDNAs το *Mshsp18-1* και το *Mshsp18-2* που κωδικοποιούν μικρές hsps της hsps17 οικογένειας. Τα δύο cDNAs είναι 92,0% ταυτόσημα σε πρωτεϊνικό επίπεδο και μοιράζονται μια ομόλογη περιοχή αμινοξέων στην C-ακραία περιοχή με τις hsps22, hsps23 και hsps26 της *Drosophila*. Τα μεταγραφήματα των Mshps18 δεν ανιχνεύονταν σε ρίζες και ιστούς φύλλων, αντίθετα καταγράφονταν χαμηλά επίπεδα σε καλλιέργειες μικροκάλλων και υψηλά επίπεδα σε σωματικά έμβρυα από καλλιέργειες μικροκάλλων. Το μεταγραφικό επίπεδο του Mshps18 ενδυναμώνεται με την αύξηση της θερμοκρασίας, την προσθήκη CdCl₂ και την ωσμωτική καταπόνηση των καλλιεργούμενων κυττάρων. Τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι οι hsps πρωτεΐνες έχουν έναν εξειδικευμένο ρόλο κατά τη διάρκεια των αναπτυξιακών μεταβολών στα φυτικά κύτταρα (Gyögyey et al.1991).

Είναι γνωστό εξάλλου ότι οι **heat shock proteins (hsps)** εκφράζονται στα πλαίσια της σωματικής εμβρυογένεσης σαν αντίδραση των σωματικών κυττάρων σε ορμόνες (π.χ. 2,4-D) σε καλλιέργειες υποκοτυλίων καρότου (*Daucus carota*) (Kitamiya et al. 2000). Το Dchsp-1 αποτελεί ένα από τα αυξινο-επαγόμενα γονίδια που είναι ομόλογο με hsps χαμηλού μοριακού βάρους και καταγράφεται συνεχής έκφρασής του σε όλη τη διάρκεια της σωματικής ανάπτυξης. Παράλληλα επάγεται από ορμόνες και από συνθήκες καταπόνησης που επάγουν τη σωματική εμβρυογένεση.

Ένα άλλο γονίδιο το Dcarg-1 (ομόλογο αυξινο-επαγόμενων γονιδίων) και το μεταγράφημά του ανιχνεύονται στα πρώιμα στάδια της εμβρυϊκής διαφοροποίησης και όχι κατά τη διάρκεια των τελευταίων σταδίων της.

Έχει αποδειχθεί ότι η μετάβαση από το σφαιρικό εμβρυϊκό στάδιο στο καρδιόσχημο και η περαιτέρω εμβρυϊκή ανάπτυξη απαιτούν είτε μικρή συγκέντρωση αυξίνης ή την απουσία της. Τρεις cDNA κλώνοι οι Nos43, No87, και No93 έχουν απομονωθεί από κυτταρικά συσσωματώματα καρότου που βρίσκονται στα πρώιμα στάδια της σωματικής εμβρυογένεσης. Τα συγκεκριμένα μεταγραφήματα συσσωρεύονται επιλεκτικά σε εμβρυϊκά κυτταρικά συσσωματώματα που διαμορφώνονται μετά την παροχή 2,4-D στο θρεπτικό μέσο (Yasuda et al. 2001).

B. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗΣ

B.1. ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

B.1.1. ΕΠΙΛΟΓΗ ΦΥΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

Στις ιστοκαλλιέργειες, που πραγματοποιήθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής, χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα από ζυγωτικά έμβρυα, που απομονώνονταν από καρπούς ελιάς της καλλιεργούμενης ελληνικής ποικιλίας *Κορωνέικη* (*Olea europaea* L. ssp. *europaea* var. *microcarpa alba* ή κατ' άλλους var. *mastoides*).

Η επιλογή της συγκεκριμένης ποικιλίας έγινε σύμφωνα με τα αποτελέσματα:

1. Της διδακτορικής διατριβής του Θεόδωρου - Δημητρίου Χ. Ορεινού (1992).
2. Προκαταρκτικών πειραμάτων που πραγματοποιήθηκαν με έκφυτα από ζυγωτικά έμβρυα τεσσάρων ελληνικών καλλιεργούμενων ποικιλιών:
 - *Αγγουρομάνα*.
 - *Άμφισσα*.
 - *Καλαμάτα*.
 - *Κορωνέικη* (Mitrakos et al. 1992).

Όλες οι προηγούμενες ερευνητικές μελέτες υπέδειξαν ότι τα έκφυτα της ποικιλίας *Κορωνέικη* εμφανίζουν το υψηλότερο εμβρυογενετικό δυναμικό σε *in vitro* συνθήκες. Έτσι, η συγκεκριμένη ποικιλία επιλέχτηκε, σαν το καταλληλότερο φυτικό υλικό, για τη διεκπεραίωση των στόχων της διατριβής, δηλαδή τη φυσιολογική και μοριακή διερεύνηση της σωματικής εμβρυογένεσης στην ελιά.

B.1.2. ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ & ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΤΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΗΣ ΚΟΡΩΝΕΙΚΗΣ

Η *Κορωνέικη* που λέγεται και *Βάτσικα* ή *Κρητικιά* ή *Κορωνιά* ή *Κορώνι* ή *Λαδολιά* ή *Λιανολιά* ή *Ψιλολιά*, ανήκει στις μικρόκαρπες ποικιλίες και καλλιεργείται στη Μεσσηνία, στην Αχαΐα, στη Λακωνία, στην Αιτωλοακαρνανία, στην Κρήτη, στην Κεφαλονιά, στη Ζάκυνθο, στη Σάμο και στις Κυκλάδες.

Το ύψος του δέντρου φτάνει τα 5-7 μέτρα. Τα φύλλα του είναι βαθυπράσινα με μήκος $5,47 \pm 0,25$ εκατοστά και πλάτος $1,03 \pm 0,12$ εκατοστά.

Η άνθιση συντελείται από τέλη Απριλίου μέχρι τέλη Μαΐου, με εξαίρεση τη Λιανολιά Κέρκυρας, η οποία χαρακτηρίζεται από όψιμη άνθιση.

Ο καρπός της είναι πολύ μικρή, σφαιρική ή ελλειψοειδής δρύπη που σχηματίζεται, όπως σε όλα τα πυρηνόκαρπα, από ιστούς των καρπόφυλλων και η οποία χαρακτηρίζεται από μικρή αναλογία σάρκας/πυρήνα (5:1) και μεγάλη ελαιοπεριεκτικότητα (15,0-27,0%). Η δρύπη αποτελείται από εξωκάρπιο (φλοιός αποτελούμενος από εφυμενίδα με επιδερμίδα), σαρκώδες μεσοκάρπιο (όπου γίνεται η ελαιοποίηση) και σκληρό αποξυλωμένο ενδοκάρπιο (πυρήνας) στο οποίο περιέχεται το σπέρμα (Ποντίκης 2000). Το σπέρμα αποτελείται από επιδερμίδα, ενδοσπέρμιο, δύο κοτυληδόνες και το ζυγωτικό έμβρυο. Οι δρύπες χρησιμοποιούνται, αποκλειστικά, για παραγωγή λαδιού εκλεκτής ποιότητας, με εξαιρετικό άρωμα καρπού και ευχάριστη φρουτώδη γεύση. Η πορεία ελαιογένεσης είναι, πιθανώς, ενζυμικής φύσης.

Η *Κορωνέικη* θεωρείται πολύ παραγωγική ποικιλία, ανθεκτική στην ξηρασία και στους ισχυρούς ανέμους, με υψηλή και σταθερή καρποφορία (30-150 κιλά καρπού ανά δέντρο), αλλά ευαίσθητη στη φυματίωση, στον δάκο και στον ρυγχίτη.

B.1. 3. ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ ΦΥΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

Για την πραγματοποίηση των *in vitro* καλλιεργειών, των οποίων τα έκφυτα προέρχονταν από ώριμα ζυγωτικά έμβρυα, χρησιμοποιήθηκαν δρύπες *Κορωνέικης*, που ήταν ευγενική προσφορά του Ινστιτούτου Ελαίας Κέρκυρας του ΕΛΓΟ “ΔΗΜΗΤΡΑ” (ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε.). Οι δρύπες προέρχονταν από δέντρα του Ινστιτούτου. Η συλλογή τους ξεκινούσε αρχές Ιανουαρίου και ολοκληρωνόταν τέλος Φεβρουαρίου (1991-1996). Οι δρύπες, αμέσως μετά την παραλαβή τους, αποθηκεύονταν, προκειμένου να αποξηρανθούν, στο χώρο του εργαστηρίου μας σε θερμοκρασία δωματίου, για 2-3 μήνες.

Για τη διεξαγωγή των ιστοκαλλιεργειών, των οποίων τα έκφυτα προέρχονταν από ανώριμα ζυγωτικά έμβρυα, χρησιμοποιήθηκαν δρύπες *Κορωνέικης* που συλλέγονταν, σε εβδομαδιαία βάση, από συγκεκριμένο δέντρο του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, από τα μέσα Ιουλίου μέχρι τα μέσα Σεπτεμβρίου του 1994. Οι ανώριμες δρύπες δεν αποξηραίνονταν, αλλά γινόταν άμεση εξαγωγή των ανώριμων ζυγωτικών εμβρύων και εμβολιασμός των εκφύτων.

B.2. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΚΦΥΤΩΝ

B.2.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΚΦΥΤΩΝ ΑΠΟ ΩΡΙΜΑ ΣΠΕΡΜΑΤΑ

B.2.1.1. Απολύμανση & διάβρεξη ώριμων σπερμάτων

Οι αποξηραμένες δρύπες θραύονταν μηχανικά, με τη χρήση μέγγενης, απομακρύνονταν το εξωκάρπιο, το μεσοκάρπιο, το ξυλώδες ενδοκάρπιο και εξάγονταν τα ώριμα σπέρματα.

Τα λευκά και ακέραια σπέρματα απολυμαίνονταν μέσω των εξής βημάτων:

1. Τα σπέρματα εμβαπτίζονταν και παρέμεναν σε διάλυμα αιθανόλης (80,0%) για ένα λεπτό.
2. Τα σπέρματα εμβαπτίζονταν και παρέμεναν σε διάλυμα χλωρίνης εμπορίου (5,25% NaOCl), στο οποίο είχαν προστεθεί 50 σταγόνες/L διαβρεκτικού παράγοντα TWEEN 20 της εταιρείας SERVA, για μια ώρα υπό συνεχή ανάδευση.

Σε ειδικό θάλαμο, συνεχούς παροχής αποστειρωμένου αέρα (Laminar Flow Hood, Galaire), τα απολυμαθέντα σπέρματα ξεπλένονταν τρεις φορές, με διαδοχικές εμβαπτίσεις τους σε ποτήρια ζέσης, που περιείχαν αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό.

Στη συνέχεια τα σπέρματα τοποθετούνταν σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri διαμέτρου 10 εκατοστών που περιείχαν δύο δίσκους αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί και 5,0 ml αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό. Τα τρυβλία Petri τυλίγονταν με διαφανή μεμβράνη, αλουμινόχαρτο και παρέμεναν 24 ώρες σε θάλαμο σταθερής θερμοκρασίας 25 ± 1 °C, προκειμένου τα σπέρματα να διαβρεχτούν.

B.2.1.2. Απομόνωση εκφύτων από ώριμα σπέρματα

Μετά την ολοκλήρωση της διάβρεξης, τα διογκωμένα σπέρματα μεταφέρονταν στο θάλαμο ασηπτικών συνθηκών, όπου χαράζονταν στο πλάι, με τη χρήση αποστειρωμένης λαβίδας και νυστεριού και διαχωρίζονταν, με άσκηση ελαφριάς πλευρικής πίεσης, τα ζυγωτικά έμβρυα από τα ενδοσπέρμια.

Τα έγχρωμα (κίτρινα, υποκίτρινα, καφέ κ.ά.) και τα μη φυσιολογικής διαμόρφωσης ζυγωτικά έμβρυα απορρίπτονταν και δεν εμβολιάζονταν.

Τα λευκά και ακέραια ζυγωτικά έμβρυα τεμαχίζονταν σε τρία τμήματα και έτσι προέκυπταν τα εξής έκφυτα:

1. Ριζίδια.

Τα ριζίδια εμβολιάζονταν ολόκληρα (Εικόνα 1) ή αφού τεμαχίζονταν σε δύο τμήματα:

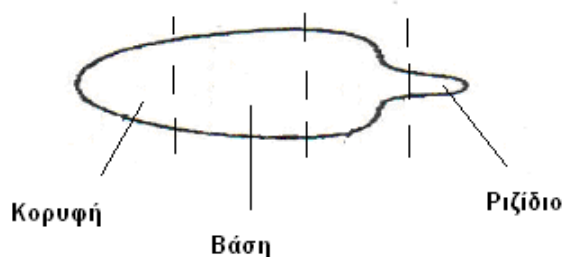
- Στο **ακραίο ριζίδιο**, δηλαδή το τμήμα του ριζιδίου προς το ριζικό άκρο του ζυγωτικού εμβρύου.
- Στο **υποακραίο ριζίδιο**, δηλαδή το τμήμα του ριζιδίου που γειτνιάζει με τις κοτυληδόνες του ζυγωτικού εμβρύου (Εικόνα 2).

2. Τμήματα κοτυληδόνων.

Οι δύο κοτυληδόνες τεμαχίζονταν, εγκάρσια, οπότε προέκυπταν δύο επιπλέον είδη εκφύτων:

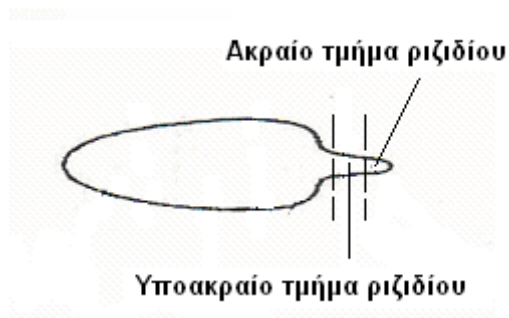
- Οι **βάσεις των κοτυληδόνων**, δηλαδή το τμήμα τους που είναι όμορο με το ριζίδιο.
- Οι **κορυφές των κοτυληδόνων**, δηλαδή το τμήμα τους που βρίσκεται στο αντιδιαμετρικό άκρο του ριζιδίου (Εικόνα 1).

Το τμήμα του ζυγωτικού εμβρύου, μεταξύ ριζιδίου και κοτυληδόνων που έφερε το βλαστητικό μερίστωμα, δεν εμβολιαζόταν.



Εικόνα 1: Έκφυτα ζυγωτικού εμβρύου ελιάς.

Τεμαχισμός ζυγωτικού εμβρύου ελιάς και δημιουργία τριών ειδών εκφύτων: ριζίδιο, βάση κοτυληδόνας και κορυφή κοτυληδόνας.



Εικόνα 2: Έκφυτα ριζιδίου ζυγωτικού εμβρύου ελιάς.

Τεμαχισμός ριζιδίου ζυγωτικού εμβρύου ελιάς και δημιουργία δύο ειδών εκφύτων: ακραίο και υποακραίο τμήμα ριζιδίου.

B.2.2. ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗ ΔΙΑΒΡΕΞΗ & ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΕΚΦΥΤΩΝ ΑΠΟ ΑΝΩΡΙΜΑ ΣΠΕΡΜΑΤΑ

Καθώς το ενδοκάρπιο των ανώριμων δρυπών δεν είχε σκληρυνθεί αρκετά, κάθε προσπάθεια μηχανικής εξαγωγής, με τη βοήθεια της μέγγενης, και επιφανειακής απολύμανσης των ανώριμων σπερμάτων κατέληγε στη νέκρωση και στην πλήρη καταστροφή των ανώριμων ζυγωτικών εμβρύων, που περιείχαν.

Προκειμένου να ξεπεραστεί η παραπάνω δυσκολία, εφαρμόστηκε επιφανειακή απολύμανση σε ολόκληρες τις δρύπες με εμβαπτισμό τους σε διάλυμα (30,0%) χλωρίνης εμπορίου (5,25% NaOCl), στο οποίο είχαν προστεθεί 50 σταγόνες/L διαβρεκτικού παράγοντα TWEEN 20 της εταιρείας SERVA. Η απολύμανση των δρυπών διαρκούσε δύο ώρες και πραγματοποιείτο υπό συνεχή ανάδευση.

Στο θάλαμο ασηπτικών συνθηκών, οι δρύπες ξεπλένονταν τρεις φορές, με διαδοχικές εμβαπτίσεις σε ποτήρια ζέσης που περιείχαν αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό. Οι απολυμασμένες δρύπες θραύονταν μηχανικά και απομονώνονταν τα ανώριμα σπέρματα, όπως ακριβώς και τα ώριμα.

Τα απομονωθέντα ανώριμα σπέρματα δε διαβρέχονταν, αλλά χαράζονταν και εξάγονταν άμεσα τα ανώριμα ζυγωτικά τους έμβρυα τα οποία τεμαχίζονταν, όπως έχει ήδη περιγραφεί στην προηγούμενη ενότητα.

B.3. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ *IN VITRO* ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

B.3.1. ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων, της παρούσας διατριβής, χρησιμοποιήθηκαν δύο βασικά, τεχνητά, θρεπτικά υποστρώματα:

1. Το MS.

Το MS παρασκευάστηκε και προτάθηκε από τους Murashige and Skoog (1962) και, έκτοτε, χρησιμοποιείται ευρέως στις ιστοκαλλιέργειες εκφύτων, ποικίλων φυτικών ειδών, με μεγάλη επιτυχία.

2. Το OMc.

Το OMc παρασκευάστηκε και προτάθηκε από τους Cañas and Benbadis (1988) και αποτελεί τροποποίηση του θρεπτικού μέσου OM (Olive Medium) (Rugini 1984). Το θρεπτικό υπόστρωμα OMc έχει την ίδια βασική χημική σύσταση με το OM, αλλά με τις παρακάτω τροποποιήσεις:

- ✓ Τα μακροστοιχεία του OM έχουν αντικατασταθεί από τα μακροστοιχεία του θρεπτικού μέσου BN (Bourgin and Nitsch 1967).
- ✓ Η γλουταμίνη (2,194 g/L) έχει αντικατασταθεί από υδρολυμένη καζεΐνη (1,0 g/L).
- ✓ Η συγκέντρωση της σακχαρόζης ελαττώθηκε από 30,0 g/L σε 20,0 g/L.

Τα μακροστοιχεία, τα μικροστοιχεία και οι οργανικές ενώσεις, που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του MS και του OMc, καταγράφονται, αναλυτικά, στους πίνακες 2, 3 και 4 αντίστοιχα, που ακολουθούν.

Σκόπιμο είναι να διευκρινιστεί ότι, εκτός του KNO_3 και του NH_4NO_3 , που περιέχονται τόσο στο θρεπτικό υπόστρωμα MS όσο και στο OMc σαν πηγές ανόργανου αζώτου, σε μια σειρά πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε και το NH_4Cl σε συγκεντρώσεις που αναφέρονται στη συνέχεια.

Τα χημικά αντιδραστήρια (ανόργανα άλατα και οργανικές ενώσεις), που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή όλων των θρεπτικών υποστρωμάτων, ήταν υψηλού βαθμού καθαρότητας της εταιρείας Merck.

Οι φυτοαυξητικοί παράγοντες, που προστέθηκαν στα θρεπτικά υποστρώματα, σε ποικίλες συγκεντρώσεις ανάλογα με τις ανάγκες του εκάστοτε πειράματος, ήταν:

1. Οι αυξίνες:
 - IBA (Ινδολο-3-βουτυρικό οξύ).
 - NAA (Ναφθυλοξικό οξύ).

- **2,4-D** (2,4-Διχλωροφαινο-οξυοξικό οξύ).
2. Οι κυτοκινίνες:
- **2iP** (N^6 - Δ^2 -Ισοπεντενυλο-αδενοσίνη).
 - **BA** (6-Βενζυλαδερίνη).
 - **TDZ** (Φαίνυλο-N-(1,2,3-θειοδιαζ-5-υλ)-ουρία).

Τα διαλύματα των φυτοαυξητικών παραγόντων παρασκευάζονταν με διάλυση των μεν αυξινών σε 1,0 N NaOH των δε κυτοκινινών σε 1,0 N HCl. Οι φυτοαυξητικοί παράγοντες ήταν χημικά αντιδραστήρια υψηλού βαθμού καθαρότητας της εταιρείας Sigma.

Για τις ζυγίσεις και την παρασκευή όλων των χημικών αντιδραστηρίων χρησιμοποιήθηκε αναλυτικός ζυγός Mettler H80 ευαισθησίας $d=0,1$ mg. Όλα τα διαλύματα, μετά την παρασκευή τους, αποθηκεύονταν σε θερμοκρασία 5,0 °C.

Το pH των θρεπτικών μέσων κυμαινόταν από 5,6 έως 5,8. Το pH ρυθμιζόταν με προσθήκη διαλύματος 0,1 N NaOH και τη χρήση pH-μέτρου Hanna, HI 8014.

Τα θρεπτικά υποστρώματα, μετά την παρασκευή τους, αποστειρώνονταν σε αυτόκαυστο (Αφοι Ανδριανόπουλοι) σε θερμοκρασία 121,0 °C και πίεση 1,0 Kp/cm² για χρονικό διάστημα 20 λεπτών. Τα αποστειρωμένα θρεπτικά μέσα διαμοιράζονταν ανά 20,0 ml σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri των 9 εκατοστών και ανά 50,0 ml σε αποστειρωμένα τρυβλία Petri των 15 εκατοστών στο θάλαμο ασηπτικών συνθηκών. Τα τρυβλία Petri τυλίγονταν με διαφανή μεμβράνη, αλουμινόχαρτο και αποθηκεύονταν στους 5,0 °C.

Πίνακας 2: Συγκέντρωση μακροστοιχείων MS και OMc.

ΜΑΚΡΟΣΤΟΙΧΕΙΑ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ MS	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ OMc
KNO ₃	18,97 mM	9,34 mM
NH ₄ NO ₃	20,61 mM	8,99 mM
CaCl ₂ · 2H ₂ O	2,99 mM	1,13 mM
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1,50 mM	0,75 mM
KH ₂ PO ₄	1,25 mM	0,50 mM
FeSO ₄ · 7H ₂ O	0,10 mM	0,10 mM
Na ₂ EDTA	0,10 mM	0,10 mM
FeNaEDTA	0,10 mM	0,10 mM

Πίνακας 3: Συγκέντρωση μικροστοιχείων MS και OMc.

ΜΙΚΡΟΣΤΟΙΧΕΙΑ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ MS	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ OMc
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1,03 mM	1,03 mM
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,10 μM	1,00 μM
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,11 μM	0,11 μM
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	0,10 mM	0,10 mM
H_3BO_3	0,10 mM	0,20 mM
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	29,91 mM	49,7 μM
KJ	5,00 μM	5,00 μM

Πίνακας 4: Συγκέντρωση οργανικών ενώσεων MS και OMc.

ΟΡΓΑΝΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ MS	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ OMc
Μυο-ινοσιτόλη	0,56 mM	0,56 mM
Γλυκίνη	26,64 μM	26,64 μM
Θειαμίνη-HCl	0,30 μM	1,50 μM
Πυριδοξίνη-HCl	2,43 μM	2,43 μM
Νικοτινικό οξύ	4,06 μM	40,60 μM
Βιοτίνη	-	0,20 μM
Φολικό οξύ	-	1,10 μM
Καζεΐνη	-	1,00 g/l
Σακχαρόζη	87,64 mM	58,43 mM
Άγαρ	8,00 g/L	6,00 g/L

B.3.2. ΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ ΕΚΦΥΤΩΝ & *IN VITRO* ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΚΑΛΛΩΝ

Τα έκφυτα, που προέκυπταν από τον τεμαχισμό των ζυγωτικών εμβρύων, εμβολιάζονταν ανά 30-40 σε τρυβλία Petri των 9 εκατοστών, που περιείχαν **θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης ή οργανοκαλλιέργειας**. Το θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης ή οργανοκαλλιέργειας ήταν OMc ή MS και περιείχε κατάλληλο συνδυασμό φυτοαυξητικών παραγόντων, ανάλογα με τις πειραματικές απαιτήσεις του εκάστοτε ερευνητικού στόχου. Τα έκφυτα παρέμεναν στο συγκεκριμένο θρεπτικό υπόστρωμα για 7, 14 ή 21 ημέρες και έτσι προέκυπταν κάλλοι 7, 14 ή 21 ημερών αντίστοιχα.

Μερικοί πειραματικοί χειρισμοί, λόγω των ιδιαίτερων *in vitro* καλλιεργητικών συνθηκών που εφαρμόστηκαν, δεν επέτρεπαν την καλλογένεση αλλά, αντίθετα, την οργανοκαλλιέργεια, δηλαδή τα έκφυτα διογκώνονταν και επιμηκύνονταν, χωρίς να διαμορφώνουν κάλλο.

Μετά την ολοκλήρωση της καλλογένεσης, ή της οργανοκαλλιέργειας, τα έκφυτα-κάλλοι μεταφέρονταν ανά 25 σε τρυβλία Petri των 9 εκατοστών, που περιείχαν **θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης**. Το θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης ήταν ίδιο με το θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης ή οργανοκαλλιέργειας, αλλά δεν περιείχε φυτοαυξητικούς παράγοντες και προωθούσε τη διαφοροποίηση ριζών, βλαστών ή / και σωματικών εμβρύων. Οι κάλλοι παρέμεναν στο συγκεκριμένο θρεπτικό υπόστρωμα, τουλάχιστον, για 60 ημέρες. Η παρακολούθηση των πειραμάτων και η καταγραφή των αποτελεσμάτων γινόταν σε εβδομαδιαία βάση.

Τα σωματικά έμβρυα, μετά την παρέλευση των 60 ημερών, απομακρύνονταν από τους κάλλους ή παρέμεναν επάνω σε αυτούς, όταν δεν ήταν δυνατός ο διαχωρισμός τους και μεταφέρονταν σε τρυβλία Petri των 15 εκατοστών που περιείχαν **θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης σωματικών εμβρύων**. Το συγκεκριμένο θρεπτικό υπόστρωμα ήταν ½MS, που δεν περιείχε φυτοαυξητικές ουσίες, και επέτρεπε την περαιτέρω ανάπτυξη των σωματικών εμβρύων, πριν την τελική τους μεταφορά στο χώμα.

Τα τρυβλία Petri, όλων των πειραματικών χειρισμών, τοποθετούνταν σε θάλαμο θερμοκρασίας 25 ± 1 °C και φωτοπεριόδου 16:8, που ήταν εφικτή μέσω της χρήσης λαμπτήρων φθορισμού Philips TLM 40W 33RS συνολικής φωτεινής έντασης 1.500-1.800 Lux, ή 4,1-4,3 W/m² (z =6,3-6,7).

Ακολουθεί περιγραφή των επιμέρους πειραμάτων που διεξήχθησαν, καθώς και των τροποποιήσεων των βασικών θρεπτικών υποστρωμάτων καλλογένεσης, οργανοκαλλιέργειας και διαφοροποίησης, OMc και MS, που παρασκευάστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν, ανάλογα με τις απαιτήσεις της εκάστοτε πειραματικής διερεύνησης.

B.4. ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΕΠΑΓΩΓΗΣ ΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗΣ

B.4.1. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ ΟΜc ΚΑΙ MS

Ριζίδια ώριμων ζυγωτικών εμβρύων καλλιεργήθηκαν, *in vitro*, σε τέσσερα διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα, προκειμένου να επιλεγεί το καταλληλότερο για την πραγματοποίηση των υπόλοιπων πειραμάτων της παρούσας διδακτορικής εργασίας. Τα θρεπτικά υποστρώματα καλλογένεσης, που δοκιμάστηκαν, ήταν τα ακόλουθα:

1. **MS**, το οποίο αποτελεί το πιο ευρέως χρησιμοποιούμενο θρεπτικό υπόστρωμα ιστοκαλλιιεργειών.
2. **MS**, που περιείχε 1,0 g/L υδρολυμένη καζεΐνη.
3. **ΟΜc**, όπως προτάθηκε από τους Cañas et al. (1988) ειδικά για τις ιστοκαλλιιεργειες εκφύτων ελιάς.
4. **ΟΜc**, από το οποίο είχε αφαιρεθεί η υδρολυμένη καζεΐνη.

Οι φυτοαυξητικοί παράγοντες που προστέθηκαν, σε όλα τα παραπάνω θρεπτικά υποστρώματα καλλογένεσης, ήταν 25,0 μΜ IBA και 2,5 μΜ 2iP. Στα τεχνητά θρεπτικά υποστρώματα καλλογένεσης τα εκφύτα παρέμεναν 21 ημέρες.

Μετά την ολοκλήρωση της καλλογένεσης, οι κάλλοι μεταφέρονταν σε θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης, προκειμένου να διαφοροποιηθούν και να καταγραφεί το ποσοστό επαγωγής σωματικής εμβρυογένεσης.

B.4.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΕΚΦΥΤΟΥ

B.4.2.1. Μελέτη της επίδρασης της ηλικίας του εκφύτου

Για τη μελέτη της εξάρτησης της σωματικής εμβρυογένεσης από την ηλικία του εκφύτου, συλλέχθηκαν ανώριμες δρύπες από τον Ιούλιο μέχρι τον Αύγουστο (1994) και πιο συγκεκριμένα τις παρακάτω ημερομηνίες:

- 13/7/1994.
- 15/7/1994.
- 22/7/1994.
- 7/8/1994.
- 18/7/1994.

Τα ριζίδια, οι βάσεις και οι κορυφές των ανώριμων ζυγωτικών εμβρύων, που απομονώθηκαν από τις ανώριμες δρύπες, καλλιεργήθηκαν, *in vitro*, σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης ΟΜς που περιείχε 25,0 μM IBA και 2,5 μM 2iP για 21 ημέρες.

Μετά την ολοκλήρωση της καλλογένεσης, οι κάλλοι μεταφέρονταν σε θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης, προκειμένου να διαφοροποιηθούν και να καταγραφεί το ποσοστό επαγωγής σωματικών εμβρύων.

B.4.2.2. Μελέτη της επίδρασης του είδους του εκφύτου

Από ώριμα ζυγωτικά έμβρυα απομονώθηκαν και χρησιμοποιήθηκαν σαν έκφυτα αποκλειστικά τα ριζιδιά τους. Τα ριζίδια, πριν την τοποθέτησή τους στο θρεπτικό μέσο καλλογένεσης, τεμαχίζονταν στη μέση, οπότε προέκυπταν δύο είδη εκφύτων:

- Ακραίο τμήμα ριζιδίου.
- Υποακραίο τμήμα ριζιδίου (Εικόνα 2).

Τα τμήματα των ριζιδίων καλλιεργήθηκαν, *in vitro*, σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης ΟΜς, που περιείχε 25,0 μM IBA και 2,5 μM 2iP, για 21 ημέρες.

Μετά την ολοκλήρωση της καλλογένεσης, οι κάλλοι μεταφέρονταν σε θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης, προκειμένου να διαφοροποιηθούν και να καταγραφεί το ποσοστό επαγωγής σωματικών εμβρύων.

B.4.3. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΦΥΤΟΑΥΞΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ

B.4.3.1. Μελέτη της επίδρασης αυξινών

1.1. Παροχή ενός είδους αυξίνης

Ριζίδια, βάσεις και κορυφές ώριμων ζυγωτικών εμβρύων καλλιεργήθηκαν, *in vitro*, σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης ΟΜς, που περιείχε σταθερή συγκέντρωση και είδος κυτοκινίνης (2,5 μM 2iP) και μια συνθετική αυξίνη (IBA, NAA ή 2,4-D) στις συγκεντρώσεις που αναγράφονται στον πίνακα 5. Η καλλογένεση διαρκούσε 21 ημέρες.

Μετά την ολοκλήρωση της καλλογένεσης, οι κάλλοι μεταφέρονταν σε θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης, προκειμένου να διαφοροποιηθούν και να καταγραφεί το ποσοστό επαγωγής σωματικών εμβρύων.

Πίνακας 5: Συγκεντρώσεις αυξινών θρεπτικού υποστρώματος καλλογένεσης ΟΜc.

ΕΙΔΟΣ ΑΥΞΙΝΗΣ	IBA	NAA	2,4-D
ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (μM)	• 0,39 • 1,56 • 6,25 • 12,5 • 25,0 • 50,0 • 100,0 • 200,0	• 0,1 • 0,39 • 1,56 • 6,25 • 12,5 • 25,0 • 50,0	• 0,01 • 0,05 • 0,10 • 0,39 • 1,56

1.2. Παροχή συνδυασμού αυξινών

Παράλληλα με τη μελέτη της επίδρασης της παροχής μιας αυξίνης, αποκλειστικά, στην επαγωγή σωματικών εμβρύων, κρίθηκε σκόπιμη και η μελέτη της επίδρασης της παροχής δύο διαφορετικών, ταυτόχρονα, συνθετικών αυξινών.

Οι συνδυασμοί αυξινών, που χρησιμοποιήθηκαν, επιλέχτηκαν μετά από τη μελέτη και την ανάλυση της επίδρασης της μεμονωμένης παροχής IBA και NAA. Δεν εφαρμόστηκαν συνδυασμοί με τον φυτοαυξητικό παράγοντα 2,4-D, καθώς η μεμονωμένη προσθήκη του στο θρεπτικό μέσο της ιστοκαλλιέργειας ανέστελλε τόσο την καλλογένεση όσο και τη σωματική εμβρυογένεση (15,0%).

Αναλυτικότερα, ριζίδια ώριμων ζυγωτικών εμβρύων εμβολιάστηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης ΟΜc, που περιείχε σταθερή συγκέντρωση και είδος κυτοκινίνης (2,5 μM 2iP) και έναν από τους συνδυασμούς συνθετικών αυξινών, που αναγράφονται στον πίνακα 6. Τα έκφυτα παρέμεναν, στο θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης, για 21 ημέρες.

Μετά την ολοκλήρωση της καλλογένεσης, οι κάλλοι μεταφέρονταν σε θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης, προκειμένου να διαφοροποιηθούν και να καταγραφεί το ποσοστό επαγωγής σωματικών εμβρύων, σε εβδομαδιαία βάση.

Πίνακας 6: Συγκεντρώσεις συνδυασμού αυξινών του θρεπτικού υποστρώματος καλλογένεσης.

ΦΥΤΟΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	1 ^{ος} ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ	2 ^{ος} ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ	3 ^{ος} ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ	4 ^{ος} ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ
IBA	0,78 μM	1,56 μM	12,5 μM	25,0 μM
NAA	0,195 μM	0,39 μM	6,25 μM	12,5 μM

B.4.3.2. Μελέτη της επίδρασης κυτοκινινών**2.1. Παροχή ενός είδους κυτοκινίνης****2.1.A. Ριζίδια ώριμων ζυγωτικών εμβρύων**

Ριζίδια ώριμων ζυγωτικών εμβρύων εμβολιάστηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης ΟΜc, που περιείχε σταθερή συγκέντρωση και είδος αυξίνης (25,0 μM IBA) και μία συνθετική κυτοκινίνη (2iP, BA ή TDZ) στις συγκεντρώσεις που αναγράφονται στον πίνακα 7. Τα έκφυτα παρέμειναν, στο θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης, για 21 ημέρες.

Μετά την ολοκλήρωση της καλλογένεσης, οι κάλλοι μεταφέρονταν σε θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης, προκειμένου να διαφοροποιηθούν, οπότε και το ποσοστό επαγωγής σωματικών εμβρύων καταγραφόταν σε εβδομαδιαία βάση.

Πίνακας 7: Συγκεντρώσεις κυτοκινινών θρεπτικού υποστρώματος καλλογένεσης.

ΕΙΔΟΣ ΚΥΤΟΚΙΝΙΝΗΣ	2iP	BA	TDZ
ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ (μM)	0,625 5,0 10,0 40,0	0,625 5,0 10,0 40,0	0,625 5,0 10,0 40,0

2.1.B. Βάσεις & κορυφές ώριμων ζυγωτικών εμβρύων

Βάσεις και κορυφές ώριμων ζυγωτικών εμβρύων εμβολιάστηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης OMc, που περιείχε 100,0 μ M IBA, καθώς η υψηλή συγκέντρωση αυξίνης ήταν απαραίτητη για την επιτυχή καλλογένεση στα συγκεκριμένα έκφυτα, και μια από τις πιο κάτω συγκεντρώσεις 2iP:

- 2,5 μ M.
- 10,0 μ M.
- 20,0 μ M.
- 40,0 μ M.

Η καλλογένεση διαρκούσε 21 ημέρες. Μετά την ολοκλήρωση της καλλογένεσης, οι κάλλοι μεταφέρονταν σε θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης, προκειμένου να διαφοροποιηθούν, οπότε και καταγραφόταν, εβδομαδιαίως, το ποσοστό επαγωγής σωματικής εμβρυογένεσης.

2.2. Παροχή συνδυασμού κυτοκινινών

Παράλληλα με τη μελέτη της επίδρασης της παροχής ενός είδους, κάθε φορά, κυτοκινίνης, στο θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης, κρίθηκε σκόπιμη και η μελέτη της επίδρασης της προσθήκης δύο διαφορετικών, ταυτόχρονα, συνθετικών κυτοκινινών. Οι συνδυασμοί, που χρησιμοποιήθηκαν, επιλέχτηκαν μετά από τη μελέτη και την ανάλυση της επίδρασης της παροχής 2iP, BA ή TDZ στο θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης.

Πιο συγκεκριμένα, ριζίδια ώριμων ζυγωτικών εμβρύων εμβολιάστηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης OMc, που περιείχε σταθερή συγκέντρωση και είδος αυξίνης (25,0 μ M IBA) και έναν από τους συνδυασμούς συνθετικών κυτοκινινών στις συγκεντρώσεις που αναγράφονται στον πίνακα 8. Τα έκφυτα παρέμεναν, στο θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης, 21 ημέρες.

Μετά την ολοκλήρωση της καλλογένεσης, οι κάλλοι μεταφέρονταν σε θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης, προκειμένου να διαφοροποιηθούν. Το ποσοστό επαγωγής σωματικών εμβρύων καταγραφόταν σε εβδομαδιαία βάση.

Πίνακας 8: Συγκεντρώσεις συνδυασμού κυτοκινινών θρεπτικού υποστρώματος καλλογένεσης.

ΦΥΤΟΑΥΞΗΤΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ	1 ^{ος} ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ	2 ^{ος} ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ	3 ^{ος} ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ	4 ^{ος} ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ
2iP	2,5 μ M	1,25 μ M	2,5 μ M	1,25 μ M
BA	10,0 μ M	5,0 μ M	-	-
TDZ	-	-	10,0 μ M	5,0 μ M

B.4.4. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΑΝΟΡΓΑΝΟΥ ΑΖΩΤΟΥ

Πληθώρα βιβλιογραφικών δεδομένων καταδεικνύουν την άμεση εξάρτηση της σωματικής εμβρυογένεσης από την πηγή ανόργανου αζώτου του θρεπτικού υποστρώματος της ιστοκαλλιέργειας.

Για τη διερεύνηση της παραπάνω άποψης, ριζίδια ώριμων ζυγωτικών εμβρύων καλλιεργήθηκαν, *in vitro*, σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης OMc, που περιείχε τροποποιημένα μακροστοιχεία ως προς την πηγή του ανόργανου αζώτου, δηλαδή δεν προστέθηκε KNO_3 και NH_4NO_3 στις συγκεντρώσεις που αναφέρονται στον πίνακα 2, αλλά στις συγκεντρώσεις που αναγράφονται στους πίνακες 9(A) και 9(B). Στα θρεπτικά υποστρώματα, που δεν περιείχαν KNO_3 , γινόταν προσθήκη κατάλληλης ποσότητας KCl, προκειμένου να παραμένει σταθερή η συγκέντρωσή του K^+ , δηλαδή ίδια με του βασικού θρεπτικού μέσου καλλογένεσης OMc (35,0 mM). Οι φυτοαυξητικές ουσίες του θρεπτικού υποστρώματος καλλογένεσης ήταν 25,0 μ M IBA και 2,5 μ M 2iP.

Η καλλογένεση διαρκούσε 21 ημέρες και, στη συνέχεια, οι κάλλοι μεταφέρονταν σε θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης, προκειμένου να διαφοροποιηθούν και το ποσοστό επαγωγής σωματικών εμβρύων, καταγραφόταν εβδομαδιαίως.

Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε και ένα πείραμα-μάρτυρας, στο πλαίσιο του οποίου τα έκφυτα εμβολιάζονταν σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης OMc, του οποίου τα μακροστοιχεία δεν περιείχαν καμία πηγή ανόργανου αζώτου.

Πίνακας 9(A): Συγκεντρώσεις διαφορετικών πηγών ανόργανου αζώτου θρεπτικού υποστρώματος καλλογένεσης.

ΠΗΓΗ ΑΝΟΡΓΑΝΟΥ ΑΖΩΤΟΥ	NH ₄ NO ₃	KNO ₃	NH ₄ Cl
ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΣΕ mM	▪ 5,0 ▪ 20,0 ▪ 80,0 ▪ 160,0	▪ 5,0 ▪ 20,0 ▪ 80,0 ▪ 160,0	▪ 5,0 ▪ 20,0 ▪ 80,0 ▪ 160,0

Πίνακας 9(B): Συγκεντρώσεις συνδυασμών πηγών ανόργανου αζώτου θρεπτικού υποστρώματος.

ΠΗΓΗ ΑΝΟΡΓΑΝΟΥ ΑΖΩΤΟΥ	KNO ₃ : NH ₄ NO ₃	KNO ₃ : NH ₄ Cl
ΑΝΑΛΟΓΙΑ	10 : 90 30 : 70 50 : 50 70 : 30 90 : 10	10 : 90 30 : 70 50 : 50 70 : 30 90 : 10

B.4.5. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΗΣ ΣΑΚΧΑΡΟΖΗΣ

Ριζίδια ώριμων ζυγωτικών εμβρύων καλλιεργήθηκαν, *in vitro*, σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης OMC που περιείχε 25,0 μM IBA, 2,5 μM 2iP και μια από τις ακόλουθες συγκεντρώσεις σακχαρόζης, προκειμένου να ελεγχθεί η επίδρασή τους στην επαγωγή σωματικών εμβρύων:

- 5,0 g/L σακχαρόζης.
- 20,0 g/L σακχαρόζης (πείραμα – μάρτυρας).
- 40,0 g/L σακχαρόζης.
- 80,0 g/L σακχαρόζης.
- 160,0 g/L σακχαρόζης.

Στο θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης, τα έκφυτα παρέμεναν για 21 ημέρες.

Μετά την ολοκλήρωση της καλλογένεσης, οι κάλλοι μεταφέρονταν σε θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης, οπότε και γινόταν εβδομαδιαία καταγραφή του ποσοστού επαγωγής σωματικών εμβρύων.

B.4.6. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΜΑΝΝΙΤΟΛΗΣ

Στα πλαίσια της προσπάθειας διερεύνησης της εμπλοκής του ωσμωτικού δυναμικού στην επαγωγή και εκδήλωση της σωματικής εμβρυογένεσης προστέθηκε μαννιτόλη, στο θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης και διαφοροποίησης ΟΜc, αντί σακχαρόζης.

Για τον σκοπό αυτό ριζίδια ώριμων ζυγωτικών εμβρύων καλλιεργήθηκαν, *in vitro*, σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης ΟΜc, που περιείχε 2,5 μ M 2iP, 25,0 μ M IBA και αντί σακχαρόζης, μαννιτόλη σε μια από τις παρακάτω συγκεντρώσεις:

- 0,05 M μαννιτόλη (20,0 g/L).
- 0,23 M μαννιτόλη (80,0 g/L).
- 0,46 M μαννιτόλη (160,0 g/L).

Στο θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης τα έκφυτα παρέμεναν για 21 ημέρες.

Μετά την ολοκλήρωση της καλλογένεσης, οι κάλλοι μεταφέρονταν σε θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης, οπότε και γινόταν εβδομαδιαία καταγραφή του ποσοστού επαγωγής σωματικών εμβρύων.

B.4.7. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

Ριζίδια ώριμων ζυγωτικών εμβρύων εμβολιάστηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης ΟΜc, που περιείχε 25,0 μ M IBA και 2,5 μ M 2iP, όπου και παρέμεναν για 21 ημέρες.

Στη συνέχεια οι μισοί κάλλοι μεταφέρονταν σε θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης, προκειμένου να διαφοροποιηθούν. Οι υπόλοιποι κάλλοι τεμαχίζονταν σε δύο ή περισσότερα κομμάτια, ανάλογα με το μέγεθός τους και εμβολιάζονταν σε θρεπτικό μέσο καλλογένεσης, προκειμένου να συνεχιστεί η καλλογένεση για 21, ακόμα, ημέρες.

Η παραπάνω διαδικασία επαναλαμβανόταν, με απώτερο στόχο τη μελέτη του εμβρυογενετικού δυναμικού τεσσάρων γενιών ανακαλλιεργηθέντων κάλλων.

B.4.8. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ “ΚΜ”

Παρασκευάστηκε και χρησιμοποιήθηκε ένα “ιδανικό” θρεπτικό μέσο το οποίο ονομάστηκε “ΚΜ” προς τιμήν του εκλιπόντα καθηγητή Κωνσταντίνου Μητράκου. Το “ΚΜ” θρεπτικό υπόστρωμα περιείχε τη βασική σύσταση του θρεπτικού μέσου ΟΜς, τους φυτοαυξητικούς παράγοντες 25,0 μΜ IBA και 2,5 μΜ 2iP και τις εξής τροποποιήσεις:

α) Μοναδική πηγή ανόργανου αζώτου 20,0 mM NH₄Cl.

Η συγκεκριμένη συγκέντρωση NH₄Cl προτιμήθηκε από τις υψηλότερες, αν και είχε μικρότερη επαγωγική δράση, καθώς οι υψηλότερες συγκεντρώσεις είχαν έντονα ανασταλτικά αποτελέσματα στην επαγωγή κάλλων.

β) 160,0 g/L σακχαρόζη.

Πιο συγκεκριμένα, ριζίδια ώριμων ζυγωτικών εμβρύων εμβολιάζονταν, *in vitro*, στο “ΚΜ” θρεπτικό υπόστρωμα και παρέμεναν για 21 ημέρες.

Μετά την ολοκλήρωση της καλλογένεσης, οι κάλλοι μεταφέρονταν για δύο μήνες στο θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης που είχε την ίδια σύσταση με το αρχικό χωρίς φυτοαυξητικούς παράγοντες. Η διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων καταγραφόταν σε εβδομαδιαία βάση.

B.5. ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΣΩΜΑΤΙΚΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ ΣΤΟ ΧΩΜΑ

Σωματικά έμβρυα που διαφοροποιήθηκαν σε “ΚΜ” θρεπτικό υπόστρωμα, απομακρύνονταν σε ασηπτικές συνθήκες από τους κάλλους τους και μεταφέρονταν σε τρυβλία Petri, διαμέτρου 15 εκατοστών, που περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα ½MS χωρίς φυτοαυξητικές ουσίες. Στο συγκεκριμένο θρεπτικό υπόστρωμα παρέμεναν για χρονικό διάστημα 20-30 ημερών στο θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών.

Στη συνέχεια, τα νεαρά φυτάρια μεταφέρονταν σε μικρά γλαστράκια τα οποία περιείχαν αποστειρωμένο μίγμα περλίτη-χώματος σε αναλογία 1:2. Τα γλαστράκια καλύπτονταν με διαφανή μεμβράνη, προκειμένου να προστατευτούν από την αφυδάτωση και να επιτευχθεί σταδιακή σκλήρυνση και εγκλιματισμός των νεαρών φυταρίων. Τα νεαρά φυτάρια μεταφέρονταν εκτός του θαλάμου ελεγχόμενων συνθηκών και παρέμεναν σε φυσικές συνθήκες θερμοκρασίας και φωτισμού.

Ακολουθούσαν σταδιακές μεταφυτεύσεις, ανά 21 ημέρες, χωρίς τη χρήση διαφανούς μεμβράνης. Ο αριθμός των διαδοχικών μεταφυτεύσεων ήταν ανάλογος της ανάπτυξης του κάθε φυταρίου.

Γ. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗΣ

Γ.1. ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Για την υλοποίηση των πειραμάτων της μοριακής ανάλυσης, χρησιμοποιήθηκαν κάλλοι από ριζίδια, βάσεις και κορυφές κοτυληδόνων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων ελιάς ποικιλίας Κορωνέικης.

Αρχικά εξάγονταν μηχανικά τα σπέρματα από τις ώριμες δρύπες. Τα σπέρματα απολυμάνονταν, διαβρέχονταν και απομονώνονταν τα ζυγωτικά τους έμβρυα. Τα ζυγωτικά έμβρυα εμβολιάζονταν σε ΟΜς που περιείχε 25,0 μM IBA και 2,5 μM 2iP. Όλες οι παραπάνω διαδικασίες περιγράφονται αναλυτικά στο προηγούμενο κεφάλαιο.

Στο πλαίσιο των πειραμάτων απομόνωσης γονιδιωματικού DNA ομογενοποιήθηκαν κάλλοι από ριζίδια, βάσεις και κορυφές κοτυληδόνων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων. Οι κάλλοι ήταν ηλικίας 21 ημερών, δηλαδή οι κάλλοι παρέμεναν τρεις εβδομάδες στο αρχικό θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης (ΟΜς που περιείχε 25,0 μM IBA και 2,5 μM 2iP).

Στο πλαίσιο των πειραμάτων μελέτης της έκφρασης του γονιδίου Dc8 ομογενοποιήθηκαν κάλλοι ριζιδίων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων, οκτώ διαφορετικών ηλικιών, προκειμένου να μελετηθεί η έκφρασή του κατά τη διάρκεια εκδήλωσης του εμβρυογενετικού δυναμικού των συγκεκριμένων κάλλων.

Πιο συγκεκριμένα απομονώθηκε ολικό RNA:

1. Από τρία είδη κάλλων οι οποίοι είχαν παραμείνει σε θρεπτικό μέσο καλλογένεσης, δηλαδή σε ΟΜς που περιείχε 25,0 μM IBA και 2,5 μM 2iP, για 7, 14 και 21 ημέρες αντίστοιχα.
2. Από πέντε είδη κάλλων οι οποίοι παρέμεναν στο αρχικό θρεπτικό μέσο καλλογένεσης 21 ημέρες και στη συνέχεια μεταφέρονταν σε θρεπτικό μέσο επαγωγής σωματικών εμβρύων, δηλαδή σε ΟΜς που δεν περιείχε παράγοντες αύξησης, για 3, 6, 10, 15 και 21 ημέρες αντίστοιχα.

Γ.2. ΥΛΙΚΑ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗΣ

Γ.2.1. ΧΗΜΙΚΕΣ ΕΝΩΣΕΙΣ

- Φαινόλη pH 7,0 (κορεσμένη με T.E.).
- 3,0 M CH₃COONa pH 4,8.
- 0,5 M EDTA (Αιθυλοδιαμινοτετραοξικό οξύ) pH 8,0.
- 1,0 N HCl.
- 1,0 M MgCl₂.
- 5,0 M NaCl.
- 10,0 N NaOH.
- 20,0% SDS (Sodium Dodecyl Sulfate).
- 2,0 M σπερμιδίνη.
- 1,0 M Tris-HCl pH 7,4
- 1,0 M Tris-HCl pH 8,0.

Γ.2.2. .ENZYMΑ & ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ENZYMΩΝ ΠΕΡΙΟΡΙΣΜΟΥ

- **10x EcoRI (1,0 ml):**
 - 100,0 mM NaCl.
 - /100,0 mM Tris-HCl pH 7,5.
 - 10,0 mM MgCl₂.
 - 5,0 mM β-μερκαπτοαιθανόλη.
- **10x HindIII (1,0 ml):**
 - 50,0 mM NaCl.
 - 10,0 mM Tris-HCl pH 7,5.
 - 10,0 mM MgCl₂.
 - 5,0 mM β-μερκαπτοαιθανόλη.
- **10x Sal I (1,0 ml):**
 - 150,0 mM NaCl.
 - 10,0 mM Tris-HCl pH 7,9.
 - 10,0 mM MgCl₂.
 - 5,0 mM β-μερκαπτοαιθανόλη.
- **RNάση I:**
 - 1,0 mg/ml σε: 10,0 mM Tris-HCl pH 7,5 και 15,0 mM NaCl.

Γ.2.3. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ & ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA & RNA

- **2x CTAB:**
 - 2,0% (w/v) CTAB.
 - 100,0 mM Tris pH 8,5.
 - 20,0 mM EDTA pH 8,0.
 - 1,4 M NaCl.
 - 1,0%(w/v) DTT.
 - 1%(w/v) PVP (πολυβινυλ-πυρρολιδόνη) M.B. 40.000.
- **5,0% (w/v) CTAB / 0,35 M NaCl.**
- **Ρυθμιστικό διάλυμα επαναδιάλυσης DNA:**
 - 10,0 mM Tris-Cl pH 7,5.
 - 1,0 mM EDTA pH 8,0.
 - 1,0 M NaCl.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα κατακρήμνισης DNA**
 - 1,0% (w/v) CTAB (Cetyl-trimethyl/-ammonium bromide).
 - 50,0 mM Tris-Cl pH 8,0.
 - 10,0 mM EDTA pH 8,0.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα εκχύλισης RNA:**
 - 100,0 mM Tris-HCl pH 9,0.
 - 0,5% (w/v) SDS
- **T.E. ρυθμιστικό διάλυμα pH 7,5:**
 - 10,0 mM Tris-HCl pH 7,4.
 - 1,0 mM EDTA pH 8,0.
- **SEVAG:**
 - 24,0 ml χλωροφόρμιο.
 - 1,0 ml ισοαμλική αλκοόλη.

Γ.2.4. ΑΝΤΙΔΡΑΣΤΗΡΙΑ & ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ DNA & RNA ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗΣ

- **5,0 mg/ml EtBr** (βρωμιούχο αιθίδιο) σε απιονισμένο νερό. Αποθηκεύταν σε σκοτεινή φιάλη.
- **10 x ρυθμιστικό διάλυμα RNA ηλεκτροφόρησης (αποστειρωμένο):**
 - 0,2 M MOPS pH 7,0.

- 50,0 mM CH₃COONa.
- 1,0 mM EDTA pH 8,0.

Στην ηλεκτροφόρηση του RNA χρησιμοποιήθηκε 1x ρυθμιστικό διάλυμα RNA ηλεκτροφόρησης στο οποίο είχαν προστεθεί 1,2 M φορμαλδεΰδης.

- **10x RNA-φορμαλδεΰδης loading buffer:**
 - 50,0% γλυκερόλη.
 - 1,0 mM EDTA pH 8,0.
 - 0,4% BPBxC.
- **50x TAE ρυθμιστικό διάλυμα:**
 - 0,05 M EDTA pH 8,0 (100,0 ml / 10,5 M EDTA pH 8,0).
 - 1,0 M οξικό οξύ (57,1 ml/L CH₃COOH).
 - 2,0 M Trizma base [24,2 γραμμάρια (w/v) Tris-base].
- **X-GAL:**
 - 20,0 mg/ml 1ml DMFO (διμέθυλο-φορμαμίδη). Αποθηκευόταν σε σκοτεινό φιαλίδιο στους -20,0°C.
- **10x χρωστική για DNA πήκτωμα αγαρόζης:**
 - 2,5% μπλε της βρωμοφαινόλης.
 - 2,5% κυανό του ξυλένιου.
 - 40,0% σακχαρόζη.
- **RNA χρωστική:**
 - 50,0% γλυκερόλη.
 - 1,0 mM EDTA pH 8,0.
 - 0,25% μπλε της βρωμοφαινόλης.
 - 0,25% κυανό του ξυλένιου.

Γ.2.5. ΡΥΘΜΙΣΤΙΚΑ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑ ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΥ

- **10,0% BSA.**
- **Ξέπλυμα I:**
 - 5,0% SDS.
 - 40,0 mM Na[P].
 - 1,0 mM EDTA.

- **Ξέπλυμα II:**
 - 2,0% SDS.
 - 40,0 mM Na[P].
 - 1,0 mM EDTA.
- **10x Nick translation (1,0 ml) ρυθμιστικό διάλυμα:**
 - 500,0 mM Tris-Cl pH 7,5.
 - 50,0 mM MgCl₂.
- **dNTP's για nick translation:**
 - 2,5 mM dATP.
 - 2,5 mM dGTP.
 - 2,5 mM TTP

Διαλύονταν σε 10,0-100,0 mM μη τιτλοδοτημένου διαλύματος Tris και φυλάσσονταν στους -20,0 °C.

- **20x SSC διάλυμα:**
 - 0,3 M κιτρικό νάτριο pH 7,0.
 - 3,0 M NaCl.
- **1,0 M NaP:**
 - 0,5 M Na₂HPO₄.
 - 50,0 mM H₃PO₄.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα αποδιάταξης:**
 - 0,5 M NaOH.
 - 1,5 M NaCl.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα ουδετεροποίησης:**
 - 1,0 M Tris-HCl.
 - 1,5 M NaCl pH 7,5.
- **Ρυθμιστικό διάλυμα υβριδισμού:**
 - 7,0% SDS.
 - 0,5 M Na[P].
 - 1,0 mM EDTA.
 - 1% w/v BSA.
- **G 50 σε T.E. pH 7,4.**

Γ.2.6. ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

- **SM:**
 - 100,0 mM NaCl.
 - 10,0 mM MgSO₄.
 - 50,0 mM Tris-HCl pH 7,5.
- **LB:**
 - 1,0% Bacto-tryptone.
 - 0,5% Yeast extracts.
 - 1,0% NaCl.
- **LMP:**
 - 1,0% χαμηλού σημείου τήξης αραρόζη.
 - 2x TAE.
 - 0,25 µg/ml EtBr.
- **Αμπικιλίνη:**
 - 100,0 mg/ml νερού. Αποθηκευόταν στους -20°C.

Όλα τα παραπάνω αντιδραστήρια που χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση των πειραμάτων μοριακής ανάλυσης ήταν των εταιρειών MERCK και SERVA.

Γ.3. ΜΕΘΟΔΟΙ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΑΝΑΛΥΣΗΣ**Γ.3.1. ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΔΕΞΟΞΥΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΪΚΟΥ ΟΞΕΟΣ (DNA)****Γ.3.1.1. Απομόνωση γονιδιωματικού DNA (Μέθοδος CTAB)**

1. Αρχικά ομογενοποιούσαμε 1,0 γραμμάριο φυτικού υλικού, με υγρό άζωτο, σε γουδί λειοτρίβησης. Προκειμένου να αποφευχθεί το “στέγνωμα” του ιστού, η προσθήκη υγρού αζώτου ήταν συνεχής, μέχρι την πλήρη ομογενοποίηση του δείγματος.
2. Ο ομογενοποιημένος ιστός διαμοιραζόταν σε τέσσερα φιαλίδια errendorf, που περιείχαν 500,0 µl διαλύματος 2x CTAB προθερμασμένα στους 60,0 °C.
3. Τα φιαλίδια errendorf επωάζονταν στους 60,0 °C για 15 λεπτά. Κατά τη διάρκεια της επώασης τα δείγματα υπόκειντο σε δυνατή ανάμειξη, ανά τακτά χρονικά διαστήματα, οπότε το εκχύλισμα μετατρεπόταν σε μια παχύρρευστη μάζα, εξαιτίας της λύσης των κυττάρων και της απελευθέρωσης των ενδοκυτταρικών συστατικών. Ο συγκεκριμένος χειρισμός αποσκοπούσε στη δημιουργία συμπλόκων CTAB-νουκλεϊκών οξέων.
4. Τα φιαλίδια errendorf παρέμεναν σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά, προκειμένου να ψυχθούν. Στη συνέχεια σε κάθε φιαλίδιο errendorf προσθέταμε ίσο όγκο SEVAG, αναμειγνύαμε πολύ δυνατά και φυγοκεντρούσαμε στις 3.000 στροφές για 10 λεπτά, οπότε και καθίζαναν τα κυτταρικά υπολείμματα.
5. Το υπερκείμενο μεταφερόταν σε καινούργιο φιαλίδιο errendorf και αναμειγνυόταν με 1/5 του όγκου του με διάλυμα CTAB 5,0% προθερμασμένο στους 60,0 °C και 1,2 του όγκου του SEVAG. Το δείγμα αναδεύονταν δυνατά και ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 3.000 στροφές για 10 λεπτά.
6. Ογκομετρούσαμε την υδάτινη φάση (υπερκείμενο) και τη μεταφέραμε σε νέο φιαλίδιο errendorf στο οποίο προσθέταμε 1,3 του όγκου του ρυθμιστικό διάλυμα κατακρήμνισης (CTAB 1,0% w/v) και ανακινούσαμε πολύ δυνατά. Τα δείγματα επωάζονταν σε θερμοκρασία δωματίου για 20 λεπτά, οπότε και κατακρημνίζονταν τα νουκλεϊκά οξέα.
7. Φυγοκεντρούσαμε τα δείγματα στις 6.000 στροφές για 5 λεπτά.
8. Η υγρή φάση απορριπτόταν, ακολουθούσε δεύτερη φυγοκέντρηση στις 14.000 στροφές για 1 λεπτό και απομακρύνονταν, προσεκτικά, τα υπολείμματα της υγρής φάσης.
9. Το ίζημα διαλύονταν σε ρυθμιστικό διάλυμα επαναδιάλυσης (0,5 mg ανά γραμμάριο φυτικού ιστού) το οποίο είχε προθερμανθεί στους 60,0 °C.
10. Τα νουκλεϊκά οξέα κατακρημνίζονταν με την προσθήκη δύο όγκων παγωμένης αιθανόλης, αναμειγνύονταν πολύ δυνατά και παρέμεναν σε θερμοκρασία δωματίου για 5 λεπτά.

11. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 14.000 στροφές για 5 λεπτά.
12. Απομακρύνουμε την υγρή φάση, ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 14.000 στροφές για 1 λεπτό, προσεκτική απομάκρυνση της υπόλοιπης αιθανόλης και παραμονή του ιζήματος σε θερμοκρασία δωματίου, μέχρι την πλήρη εξάτμιση των υπολειμμάτων αιθανόλης.
13. Το ίζημα επαναδιαλυόταν σε T.E. (200,0 μl/2,0 γραμμάρια ιστού) και ακολουθούσε, όπως περιγράφουμε παρακάτω, ο καθαρισμός των νουκλεϊκών οξέων.
14. Το επαναδιαλυμένο ίζημα διαμοιραζόταν σε errendorf, οπότε το καθένα περιείχε 500,0 μl. Σε κάθε errendorf προσθέταμε ίσο όγκο φαινόλη, αναμειγνύαμε δυνατά, προκειμένου να αναμειχθούν πλήρως οι δύο φάσεις και φυγοκεντρούσαμε στις 11.000 στροφές για 5 λεπτά.
15. Τα υπερκείμενα μεταφέρονταν σε νέα errendorf και προσθέταμε μισό όγκο φαινόλης και μισό όγκο χλωροφορμίου. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές για 4 λεπτά.
16. Τα υπερκείμενα μεταφέρονταν σε νέα errendorf, προσθέταμε ίσο όγκο χλωροφορμίου, αναμειγνύαμε δυνατά και ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 14.000 στροφές για 3 λεπτά.
17. Τα υπερκείμενα μεταφέρονταν σε νέα errendorf και προσθέταμε 1/10 του όγκου 3,0 M CH_3COONa pH 4,8 και δύο όγκους παγωμένης αιθανόλης.
18. Τα νουκλεϊκά οξέα κατακρημνίζονταν και γίνονταν ορατά με τη μορφή αρχικά φυσαλίδων και μετά από δυνατή και συνεχή ανάμειξη με τη μορφή λεπτών νηματίων μέσα στο διάλυμα της παγωμένης αιθανόλης.
19. Τα νουκλεϊκά οξέα συλλέγονταν και επαναδιαλύονταν σε 200,0 μl T.E. και 1,0 μl RNάση, προκειμένου να καταστραφεί το RNA των δειγμάτων.
20. Τα δείγματα φυλάσσονταν στους 4,0 °C.

Γ.3.1.2. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA

2.1. Μετασχηματισμός δεκτικών κυττάρων *E. coli* με πλασμιδιακό DNA

1. Σε φιαλίδια errendorf, που ήταν τοποθετημένα στον πάγο, προσθέταμε 100,0 λ δεκτικών κυττάρων και 50,0 ng πλασμιδιακού DNA.
2. Τα φιαλίδια errendorf αναμειγνύονταν και παρέμεναν στον πάγο για 30 λεπτά.
3. Ακολουθούσε θερμική καταπόνηση των δειγμάτων στους 42 °C για 2-3 λεπτά.
4. Σε κάθε φιαλίδιο errendorf προσθέταμε 1,0 ml LB και όλα μεταφέρονταν άμεσα στους 37,0 °C για 1 ώρα, προκειμένου να ξαναδημιουργηθούν τα κυτταρικά τοιχώματα που είχαν καταστραφεί με την επώαση των δειγμάτων στους 42,0 °C.

5. Τα κύτταρα συμπυκνώνονταν με φυγοκέντρηση των φιαλιδίων errendorf στις 11.000 στροφές για 2 λεπτά.
6. 20,0 μl συμπυκνωμένων κυττάρων στρώνονταν σε πλαστικά τρυβλία Petri που περιείχαν θρεπτικό μέσο LB και αμπικιλίνη. Η αμπικιλίνη είναι κατάλληλο αντιβιοτικό για την επιλογή των μετασχηματισμένων δεκτικών κυττάρων, δεδομένου ότι το πλασμίδιο που μεταφερόταν έφερε γονίδιο που προσδίδει ανθεκτικότητα στην αμπικιλίνη, οπότε αναπτύσσονταν μόνο τα βακτήρια που ενσωμάτωναν το πλασμίδιο, ενώ τα υπόλοιπα νεκρώνονταν από το αντιβιοτικό.
7. Τα τρυβλία Petri επωάζονταν στους 37,0 °C για 12 ώρες.

2.2. Προετοιμασία βακτηρίων

1. Κωνικές φιάλες με 10,0 ml LB και 10,0 l αμπικιλίνης μολύνονταν με μια μονή και διακριτή βακτηριακή αποικία που έφερε ανασυνδυασμένα πλασμίδια και είχε απομονωθεί από τα τρυβλία Petri του προηγούμενου πειραματικού χειρισμού.
2. Οι κωνικές φιάλες επωάζονταν στους 37,0 °C σε περιστρεφόμενο θάλαμο επώασης για 12 ώρες.

2.3. Απομόνωση πλασμιδιακού DNA με αλκαλική λύση

1. 1,5 ml κυττάρων από τις παραπάνω καλλιέργειες τοποθετούνταν σε φιαλίδιο errendorf το οποίο και φυγοκεντρούσαμε στις 11.000 στροφές για 30 δευτερόλεπτα.
2. Το υπερκείμενο απορριπτόταν και τα συμπυκνωμένα κύτταρα επαναδιαλύονταν με την προσθήκη των τριών ακόλουθων διαλυμάτων:
 - 100,0 μl διαλύματος A (περιείχε ωσμορυθμιστικές ουσίες και EDTA το οποίο δεσμεύει το Mg^{2+} που ενεργοποιεί τις DNάσες) :
Διάλυμα A:
 - 50,0 mM γλυκόζη.
 - 10,0 mM EDTA pH 8,0.
 - 25,0 mM Tris-HCl.
 - 4,0 mg/ml λυσοζύμη την οποία προσθέταμε λίγο πριν αναμειχθεί το διάλυμα A με τα συμπυκνωμένα κύτταρα.
 - 200,0 μl ευδιάλυτου διαλύματος λύσης (αποδιατάσσει τις πρωτεΐνες):

Διάλυμα λύσης:

- 0,2 N NaOH.
 - 1,0% SDS.
 - 150,0 μl δυσδιάλυτου διαλύματος 3,0 M CH₃COOH και 5,0 M CH₃COOK για την κατακρήμνιση των αποδιαταγμένων πρωτεϊνών.
3. Το δείγμα επωαζόταν στον πάγο για 15 λεπτά.
 4. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 12.000 στροφές στους 4,0 °C για 15 λεπτά.
 5. Το υπερκείμενο μεταφερόταν σε καινούργιο errendorf, προσθέταμε ίσο όγκο φαινόλης, αναμειγνύαμε δυνατά και φυγοκεντρούσαμε στις 11.000 στροφές για 5 λεπτά.
 6. Το υπερκείμενο μεταφερόταν σε νέο errendorf, προσθέταμε μισό όγκο φαινόλης, μισό όγκο χλωροφορμίου και ακολουθούσε φυγοκέντρηση στις 13.000 στροφές για 4 λεπτά.
 7. Το υπερκείμενο μεταφερόταν σε νέο errendorf, προσθέταμε ίσο όγκο χλωροφορμίου, αναμειγνύαμε δυνατά και φυγοκεντρούσαμε στις 14.000 στροφές για 3 λεπτά.
 8. Το υπερκείμενο μεταφερόταν σε νέο errendorf και τα νουκλεϊκά οξέα κατακρημνίζονταν με διπλάσιο όγκο παγωμένης αιθανόλης.
 9. Το δείγμα ανακινείτο και επωαζόταν σε θερμοκρασία δωματίου για 10 λεπτά.
 10. Ακολουθούσε φυγοκέντρηση του δείγματος στις 11.000 στροφές για 5 λεπτά. Η αιθανόλη απομακρυνόταν προσεκτικά και το ίζημα παρέμενε σε θερμοκρασία δωματίου, προκειμένου να εξατμιστούν τα υπολείμματα αιθανόλης.
 11. Το ίζημα διαλυόταν σε 50,0 μl T.E. και 1,0 λ RNάσης.
 12. Το απομονωμένο πλασμιδιακό DNA φυλασσόταν στους 4,0 °C.

Γ.3.1.3. Πέψεις DNA με ενδονουκλεάσες περιορισμού

Σε φιαλίδιο errendorf, που βρισκόταν συνέχεια στον πάγο, προσθέταμε τα ακόλουθα αντιδραστήρια:

- i) Ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης, ιοντικής ισχύος και pH ανάλογα με την περιοριστική ενδονουκλεάση που χρησιμοποιούσαμε στην κάθε αντίδραση.
- ii) 3,0-4,0 μg γονιδιωματικού ή πλασμιδιακού DNA.
- iii) 1-4 μονάδες περιοριστικής ενδονουκλεάσης (ο τελικός όγκος περιείχε 40 μονάδες). Απεσταγμένο νερό μέχρι τελικού όγκου 50,0 μl.

Τα φιαλίδια errendorf επωάζονταν στους 37,0 °C για 6 ώρες και τα δείγματα αναλύονταν σε πήκτωμα αгарόζης 0,8%. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιήθηκαν καταγράφονται στον πίνακα 10.

Πίνακας 10: Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες, που χρησιμοποιήθηκαν και οι αλληλουχίες που αναγνωρίζουν. Με τον αστερίσκο(*) υποδεικνύονται τα σημεία τομής.

ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΕΣ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΕΣ	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΠΟΥ ΑΝΑΓΝΩΡΙΖΕΤΑΙ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΕΡΙΟΡΙΣΤΙΚΗ ΕΝΔΟΝΟΥΚΛΕΑΣΗ
BamHI	5' ...G*GATCC...3' 3' ...CCTAG*G...5'
EcoRI	5' ...G*AATTC...3' 3' ...CTTAA*G...5'
HindIII	5' ...A*AGCTT...3' 3' ...TTCGA*A...5'
PstI	5' ...CTGCA*G...3' 3' ...G*ACGTC...5'
Sau3AI	5' ...*GATC...3' 3' ... CTAG*...5'
XhoI	5' ...C*TCGAG...3' 3' ...GAGCT*C...5'

Γ.3.1.4 Ανάλυση DNA σε πήκτωμα αγαρόζης

Η ανάλυση κλασμάτων DNA πραγματοποιήθηκε με την ηλεκτροφόρησή τους σε πήκτωμα αγαρόζης. Ο διαχωρισμός γραμμικών μορίων DNA ήταν ανάλογος του μεγέθους τους και γίνονταν ορατά με τη βοήθεια της χρωστικής βρωμιούχο αιθίδιο (EtBr) η οποία παρεμβάλλεται μεταξύ των αζωτούχων βάσεων του DNA και φθορίζει κάτω από υπεριώδες φως. Τα βήματα που ακολουθήσαμε είναι τα εξής:

1. 0,7-0,8% σκόνης αγαρόζης τοποθετούνταν σε κωνική φιάλη που περιείχε 1/10 του τελικού όγκου ρυθμιστικό διάλυμα TAE και αναμειγνύονταν, πλήρως, σε φούρνο μικροκυμάτων.
2. Προσθέταμε 0,5 µg/ml EtBr.
3. Το διάλυμα αγαρόζης τοποθείτο σε κατάλληλο υποδοχέα πηκτώματος αγαρόζης που έφερε ειδική κτένα για τη δημιουργία οπών.

4. Μετά τη στερεοποίηση της αγαρόζης η κτένα απομακρυνόταν και τοποθετούσαμε τον υποδοχέα στη συσκευή ηλεκτροφόρησης. Η συσκευή ηλεκτροφόρησης περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα 1x TAE και 0,5 µg/ml EtBr το οποίο κάλυπτε, πλήρως, το πήκτωμα αγαρόζης.
5. Τα δείγματα, που επρόκειτο να αναλυθούν στο πήκτωμα αγαρόζης, διαλύονταν σε χρωστική φόρτωσης DNA τοποθετούνταν στις οπές του πηκτώματος και ηλεκτροφοούνταν υπό σταθερή τάση. Παράλληλα σε μια οπή της πηκτής τοποθετούσαμε 1,0 λ διαλύματος που περιείχε μοριακά βάρη γνωστής συγκέντρωσης, προκειμένου να προσδιοριστεί το μέγεθος των άγνωστων δειγμάτων που ηλεκτροφορούσαμε.
6. Τόσο κατά τη διάρκεια όσο και μετά το τέλος της ηλεκτροφόρησης για την παρακολούθηση της ανάλυσης των δειγμάτων χρησιμοποιήθηκε λάμπα υπεριώδους φωτισμού και για τη φωτογράφησή τους Mitsubishi Video Copy Processor P68B.

Γ.3.1.5. Απομόνωση & καθαρισμός κλασμάτων DNA από πήκτωμα αγαρόζης

5.1. Απομόνωση ζωνών DNA από πήκτωμα αγαρόζης

1. Κατάλληλη ποσότητα DNA, που περιείχε τα κλάσματα που θέλαμε να απομονώσουμε, αναλύονταν ηλεκτροφορητικά σε πήκτωμα αγαρόζης με χαμηλή τάση, μέχρι που οι ζώνες του χρωμοσωμικού και του πλασμιδιακού DNA διαχωρίζονταν με ευκρίνεια. Στη συνέχεια χαράζαμε μπροστά από τις ζώνες που θέλαμε να απομονώσουμε οπές με τη βοήθεια κοπιδιού.
2. Οι χαραγμένες περιοχές του πηκτώματος αγαρόζης, στα όρια των προς απομόνωση ζωνών, απομακρύνονταν και τα κενά που προέκυπταν συμπληρώνονταν με διάλυμα LMP αγαρόζης, δηλαδή αγαρόζης χαμηλού σημείου πήξης.
3. Μετά τη στερεοποίηση της αγαρόζης η ηλεκτροφόρηση εξακολουθούσε, αλλά σε ηλεκτρικό πεδίο μεγαλύτερης ισχύος με στόχο την είσοδο των επιθυμητών ζωνών στην LMP αγαρόζη. Οι ζώνες αφαιρούνταν με τη βοήθεια κοπιδιού, τοποθετούνταν σε φιαλίδια eppendorf και φυλάσσονταν στους -20,0 °C, καθώς η χαμηλή θερμοκρασία βοηθά την αποδιάταξη της αγαρόζης και την απελευθέρωση των παγιδευμένων ζωνών του πλασμιδιακού DNA.

5.2. Μέθοδος Freeze squeeze

1. Τοποθετούσαμε το απομονωμένο κομμάτι της πηκτής αγαρόζης σε φιαλίδιο errendorf χωρητικότητας 0,5 ml, που έφερε άνοιγμα στον πυθμένα του καλυμμένο με υαλοβάμβακα.
2. Το φιαλίδιο errendorf παρέμενε σε υγρό άζωτο για 20 δευτερόλεπτα.
3. Τοποθετούσαμε το μικρό φιαλίδιο errendorf μέσα σε μεγαλύτερο φιαλίδιο errendorf χωρητικότητας 1,5 ml και ακολουθούσε φυγοκέντρωση στις 13.000 στροφές για 5 λεπτά.
4. Το διήθημα, που συλλεγόταν στο μεγάλο φιαλίδιο errendorf, μεταφερόταν σε καινούργιο errendorf.
5. Στο μικρό φιαλίδιο errendorf προσθέταμε 100,0 ml T.E. και επαναλαμβάναμε τα βήματα 3-4 φροντίζοντας ο τελικός όγκος του συλλεγόμενου υγρού να μην ξεπερνάει τα 500,0 ml.
6. Το υγρό, που συλλεγόταν, καθαριζόταν διαδοχικά με:
 - α. Φαινόλη.
 - β. Φαινόλη-χλωροφόρμιο.
 - γ. Χλωροφόρμιο.
7. Το DNA κατακρημνιζόταν με προσθήκη δύο όγκων παγωμένης αιθανόλης και 1/10 του όγκου 3,0 M CH_3COONa .
8. Το δείγμα παρέμενε στους $-20,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 12 ώρες.
9. Ακολουθούσε φυγοκέντρωση στις 13.000 στροφές στους $4,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 20 λεπτά.
10. Μετά την πλήρη εξάτμιση της αιθανόλης το ίζημα επαναδιαλυόταν σε 20,0 λ T.E. και η συγκέντρωσή του προσδιοριζόταν με ανάλυση σε πήκτωμα αγαρόζης.

5.3. Μέθοδος φαινόλης

1. Τοποθετούσαμε το απομονωμένο κομμάτι του πηκτώματος αγαρόζης σε φιαλίδιο errendorf και το επωάζαμε στους $64,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 30 λεπτά.
2. Προσθέταμε ίσο όγκο φαινόλης, μέχρι την πλήρη ανάμειξη των δύο φάσεων και το δείγμα επωαζόταν για 30 λεπτά στον πάγο.
3. Ακολουθούσε φυγοκέντρωση στις 13.000 στροφές στους $4,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 30 λεπτά.
4. Το υπερκείμενο μεταφερόταν σε καινούργιο errendorf με ίσο όγκο φαινόλης και επωαζόταν για 30 λεπτά στον πάγο.
5. Ακολουθούσε φυγοκέντρωση στις 13.000 στροφές στους $4,0\text{ }^{\circ}\text{C}$ για 30 λεπτά.
6. Το υπερκείμενο μεταφερόταν σε καινούργιο errendorf και απομακρύνονταν τα υπολείμματα της LMP αγαρόζης με ίσο όγκο:

- α. Φαινόλη-χλωροφόρμιο.
- β. Χλωροφόρμιο.
- 7. Το DNA της ζώνης κατακρημνίζονταν με δύο όγκους παγωμένης αιθανόλης και 1/10 του όγκου CH_3COONa .
- 8. Το δείγμα επωαζόταν για 12 ώρες στους -20°C .
- 9. Το DNA συλλεγόταν με φυγοκέντρηση στις 14.000 στροφές για 30 λεπτά και μετά την πλήρη εξάτμιση της αιθανόλης επαναδιαλυόταν σε 20,0 λ Τ.Ε.

Γ.3.1.6. Μεταφορά DNA από πήκτωμα αγαρόζης σε πλαστική μεμβράνη (Μέθοδος Southern)

- 1. Το πήκτωμα αγαρόζης το οποίο έφερε τα κλάσματα DNA φωτογραφιζόταν κάτω από λάμπα υπεριώδους φωτός. Στη συνέχεια εμβαπτιζόταν σε γυάλινο δοχείο που περιείχε διάλυμα 0,25 M HCl και παρέμενε υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 12 λεπτά. Το διάλυμα HCl απομακρυνόταν, το πήκτωμα αγαρόζης ξεπλενόταν με απιονισμένο νερό και επαναλαμβανόταν η ίδια διαδικασία αποπουρινοποίησης.
- 2. Το πήκτωμα αγαρόζης ξεπλενόταν με απιονισμένο νερό και παρέμενε σε ρυθμιστικό διάλυμα αποδιάταξης νουκλεϊκών οξέων υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά. Το διάλυμα αποδιάταξης απομακρυνόταν, το πήκτωμα αγαρόζης ξεπλενόταν με απιονισμένο νερό και επαναλαμβανόταν η ίδια διαδικασία.
- 3. Το πήκτωμα αγαρόζης ξεπλενόταν με απιονισμένο νερό και στη συνέχεια προσθέταμε ρυθμιστικό διάλυμα ουδετεροποίησης υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 30 λεπτά.
- 4. Σε γυάλινο δοχείο που περιείχε ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς 20xSSC, κατασκευάζαμε γέφυρα με δύο λωρίδες διηθητικού χαρτιού Whatmann 3 MM ίδιου πλάτους με το πλάτος του πηκτώματος αγαρόζης, διαβρεγμένες με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς και των οποίων οι άκρες βρίσκονταν βυθισμένες στο ρυθμιστικό διάλυμα του γυάλινου δοχείου.
- 5. Τοποθετούσαμε το πήκτωμα αγαρόζης πάνω στη γέφυρα και το καλύπταμε με φύλλο μεμβράνης νιτροκυτταρίνης ίδιων διαστάσεων και διαβρεγμένη με ρυθμιστικό διάλυμα μεταφοράς 2x SSC. Ο εγκλωβισμένος αέρας τόσο στην κάτω επιφάνεια του πηκτώματος αγαρόζης όσο και ανάμεσα σε αυτό και στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης απομακρυνόταν επισταμένως. Οι ακάλυπτες επιφάνειες του πηκτώματος αγαρόζης και του γυάλινου δοχείου τυλίγονταν με διαφανή μεμβράνη, προκειμένου να αποφευχθεί η απορρόφηση ρυθμιστικού διαλύματος μεταφοράς από τα απορροφητικά χαρτιά που τοποθετούνταν στη συνέχεια πάνω στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.

6. Καλύπταμε τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με τρία διηθητικά χαρτιά Whatmann 3 MM ίδιων διαστάσεων και διαβρεγμένα σε απιονισμένο νερό.
7. Πάνω από τα διηθητικά χαρτιά Whatmann 3 MM τοποθετούσαμε απορροφητικά χαρτιά ύψους περίπου 5 εκατοστών και ένα βάρος, περίπου, ενός κιλού.
8. Η παραπάνω διάταξη μεταφοράς DNA κατά *SOUTHERN* παρέμενε σε θερμοκρασία δωματίου για 12-16 ώρες.
9. Μετά την ολοκλήρωση της μεταφοράς του DNA, η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης απομακρύνονταν και σημαδευόταν, ώστε να είναι δυνατός ο προσδιορισμός των θέσεων των επιμέρους δειγμάτων στην επιφάνειά της.
10. Τυλίγαμε τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης με διαφανή μεμβράνη, την ακτινοβολούσαμε με UV για 20 δευτερόλεπτα και την τοποθετούσαμε στους 80,0 °C για 2 ώρες, προκειμένου τα νουκλεϊκά οξέα να ακινητοποιηθούν πάνω της.
11. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης φυλασσόταν στους 4,0 °C.

Γ.3.2. ΧΕΙΡΙΣΜΟΣ ΡΙΒΟΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ (RNA)

Γ.3.2.1. Απομόνωση ολικού RNA

Το RNA είναι πολύ ευάλωτο στις ριβονουκλεάσες οι οποίες βρίσκονται σχεδόν παντού. Προκειμένου να αποφευχθεί η καταστροφή του RNA από τις ριβονουκλεάσες τόσο τα διαλύματα όσο και τα εργαστηριακά σκεύη που χρησιμοποιούσαμε κατά την απομόνωσή του φροντίζαμε να έχουν πρόσφατα παρασκευαστεί και επιμελώς αποστειρωθεί. Η διαδικασία απομόνωσης που ακολουθήσαμε ήταν η εξής:

1. Αρχικά τοποθετούσαμε 0,5 γραμμάρια φυτικού ιστού σε φιαλίδιο errendorf με 250,0 μl ρυθμιστικού διαλύματος εκχύλισης RNA και τα ομογενοποιούσαμε με έμβολο και πολύ γρήγορες κινήσεις για 1 λεπτό.
2. Στη συνέχεια προσθέταμε 250,0 μl φαινόλης για να ολοκληρώσουμε την ομογενοποίηση του ιστού.
3. Το εκχύλισμα αναδευόταν έντονα και ακολουθούσε φυγοκέντρωση στις 13.000 στροφές για 5 λεπτά.
4. Το υπερκείμενο μεταφερόταν σε καινούργιο errendorf, προσθέταμε ίσο όγκο φαινόλης και το φυγοκεντρούσαμε, όπως πριν.
5. Το υπερκείμενο μεταφερόταν σε καινούργιο errendorf, προσθέταμε ίσο όγκο φαινόλης-χλωροφορμίου και φυγοκεντρούσαμε, όπως πριν.

6. Το υπερκείμενο μεταφερόταν σε καινούργιο errendorf, προσθέταμε ίσο όγκο χλωροφορμίου και φυγοκεντρούσαμε, όπως πριν.
7. Το υπερκείμενο μεταφερόταν σε καινούργιο errendorf και ακολουθούσε κατακρήμνιση των νουκλεϊκών οξέων με προσθήκη 2,5 όγκων παγωμένης αιθανόλης και 1/10 του όγκου 3,0 M CH₃COONa.
8. Το δείγμα παρέμενε για 12 ώρες στους -20,0 °C και ακολουθούσε φυγοκέντρωση στις 13.000 στροφές στους 4,0 °C για 30 λεπτά.
9. Μετά την πλήρη εξάτμιση της αιθανόλης το ίζημα επαναδιαλυόταν σε 20,0 μl απεσταγμένο νερό.
10. Το απομονωμένο RNA φυλασσόταν στους -80,0 °C.

Γ.3.2.2. Προσδιορισμός της ποσότητας του RNA

Ο προσδιορισμός της ποσότητας του απομονωθέντος RNA γινόταν με την μέτρηση της οπτικής πυκνότητας των εκάστοτε δειγμάτων. Τα βήματα φωτομέτρησης των δειγμάτων RNA ήταν τα εξής:

- α) Τα δείγματα RNA αραιώνονταν (1:10) με απεσταγμένο νερό και επωάζονταν στους 65,0 °C για 2 λεπτά.
- β) Τα δείγματα αραιώνονταν περαιτέρω (1:200) με απεσταγμένο νερό και τα φωτομετρούσαμε στα 260 nm (όπου απορροφά το RNA) και 280 nm (όπου απορροφούν οι πρωτεΐνες) με U -1100 φασματοφωτόμετρο της Hitachi. Ο υπολογισμός των συγκεντρώσεων των δειγμάτων γινόταν με τη χρήση του τύπου:

$$1,0 \text{ O.D.}_{260} = 40,0 \text{ } \mu\text{g/ml}$$

- γ) Με βάση τις παραπάνω μετρήσεις υπολογιζόταν:
 - i. Ο λόγος της απορρόφησης στα 260 nm και της απορρόφησης στα 280 nm, προκειμένου να προσδιοριστεί η περιεκτικότητα των δειγμάτων σε πρωτεΐνες. Σε καθαρά δείγματα νουκλεϊκών οξέων, δηλαδή δείγματα απαλλαγμένα από πολυσακχαρίτες, πρωτεΐνες και πολυφαινολικά παράγωγα ισχύουν οι τύποι:

$$a. \text{ O.D.}_{260} / \text{ O.D.}_{280} = 2$$

$$b. \text{ O.D.}_{240} / \text{ O.D.}_{260} \sim 0,5$$

Οι λόγοι των δειγμάτων της παρούσας εργασίας κυμαίνονταν μεταξύ 1,7 και 2,1. Οι συγκεκριμένες τιμές θεωρούνται αρκετά ικανοποιητικές και επομένως η καθαρότητα των δειγμάτων αποδεκτή.

- ii. Η συγκέντρωση του RNA σε mg/ml υπολογίστηκε από τον τύπο των *Beer-Lambert*:

$$2 \times (O.D._{260} \times d.f. \times 40)$$

O.D.₂₆₀: οπτική απορρόφηση στα 260nm

d.f.: παράγοντας αραίωσης

Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων της παρούσης εργασίας μεταξύ 8,0-11,0 μg/ml.

- δ) 1,0 λ, 2,0 λ και 4,0 λ από τις τελικές αραιώσεις των δειγμάτων αναλύονταν σε πήκτωμα αγαρόζης με χρώση EtBr, προκειμένου να προσδιοριστεί και ηλεκτροφορητικά η ποσότητα και η ποιότητα του RNA. Οι αραιώσεις φυλάσσονταν στους -80,0 °C.

Γ.3.2.3. Ανάλυση RNA σε πήκτωμα αγαρόζης αποδιάταξης

Η ηλεκτροφόρηση του RNA γινόταν σε σύστημα αποδιάταξης φορμαλδεΐδης-αγαρόζης:

1. Αρχικά προετοιμάσαμε 100,0 ml διαλύματος πηκτώματος αγαρόζης:
 - i) Σε κωνική φιάλη αναμειγνύονταν:
 - 1,4 gr αγαρόζης.
 - 10,0 ml 10x ρυθμιστικού διαλύματος RNA ηλεκτροφόρησης.
 - 75,0 ml απεσταγμένου νερού.
 - ii) Το διάλυμα αγαρόζης διαλυόταν, επιμελώς, σε φούρνο μικροκυμάτων και παρέμενε σε θερμοκρασία δωματίου μέχρι η θερμοκρασία του να φτάσει περίπου τους 50,0 °C.
 - iii) Στο διάλυμα αγαρόζης προσθέταμε 18,0 ml φορμαλδεΐδης (37,0%) αναμειγνύαμε δυνατά και το τοποθετούσαμε σε συσκευή ηλεκτροφόρησης η οποία περιείχε 1x ρυθμιστικό διάλυμα RNA ηλεκτροφόρησης.
2. Τα δείγματα, πριν τοποθετηθούν στο πήκτωμα αγαρόζης, προετοιμάζονταν ως εξής:
 - 5,0 λ RNA.
 - 2,0 λ 10x ρυθμιστικού διαλύματος RNA ηλεκτροφόρησης.
 - 3,5 λ φορμαλδεΐδης (37,0%).
 - 10,0 λ φορμαμίδιου.
 - 2,0 λ διαλύματος χρωστικής για RNA.
3. Ακολουθούσε ανάμειξη και επώαση των δειγμάτων στους 65,0 °C για 15 λεπτά.

4. Ηλεκτροφορούσαμε τα δείγματα στα 130 V, ενώ κάθε 30 λεπτά το ρυθμιστικό διάλυμα RNA ηλεκτροφόρησης της συσκευής αναδευόταν.

Γ.3.2.4. Μεταφορά RNA από πήκτωμα αγαρόζης σε πλαστική μεμβράνη **(Μέθοδος Northern)**

Η μεταφορά RNA από το πήκτωμα αγαρόζης στο φίλτρο πλαστικής μεμβράνης περιελάμβανε τα ίδια στάδια με εκείνα της μεταφοράς DNA. Η μόνη εξαίρεση είναι ότι τα στάδια της αποπουρινοποίησης, της αποδιάταξης και της ουδετεροποίησης δεν ελάμβαναν χώρα, καθώς το RNA ήταν ήδη αποδιαταγμένο στο πήκτωμα αγαρόζης-αποδιάταξης.

Γ.3.3. ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ ΝΟΥΚΛΕΪΚΩΝ ΟΞΕΩΝ (DNA & RNA)

Γ.3.3.1. Σήμανση DNA με [α - ^{32}P]-dCTP

1.1. Μέθοδος Nick Translation

1. Παρασκευαζόταν διάλυμα αραιωμένης DNάσης I η οποία είναι ένα ένζυμο που προκαλεί τομές σε δίκλωνο μόριο DNA. Η προετοιμασία της περιελάμβανε τα εξής στάδια:
 - α. 1,0 mg/ml DNάσης I αραιωνόταν 1: 5000 με διάλυμα SM.
 - β. Δυνατή ανακίνηση.
 - γ. Τοποθέτηση του δείγματος στον πάγο.
2. Σε φιαλίδιο errendorf προσθέταμε τα ακόλουθα αντιδραστήρια με τη σειρά που καταγράφονται, ώστε ο τελικός όγκος της αντίδρασης ήταν 20,0 λ:
 - 7,0 μl απεσταγμένου νερού.
 - 2,0 μl 10x ρυθμιστικού διαλύματος για nick translation.
 - 4,0 μl DNA ανιχνευτή (Dc8) με μέγιστη συγκέντρωση 100,0 ng.
 - 1,0 μl dNTP's για nick translation (διάλυμα νουκλεοτιδίων dATP, dTTP, dGTP).
 - 1,0 μl DNA πολυμεράσης I (5 μονάδες ανά μl).
 - 1,0 μl αραιωμένης DNάσης I.
 - 4,0 μl [α - ^{32}P] – dCTP (ειδικής δραστηριότητας 3.200 Ci/mmol).
3. Το φιαλίδιο αναδευόταν και επωαζόταν για 1 ώρα στους 15,0 °C.

4. Η αντίδραση τερματιζόταν με προσθήκη 5,0 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 και παραμονή του δείγματος στον πάγο.

1.2. Καθαρισμός του προϊόντος αντίδρασης με τη μέθοδο της στήλης

1. Προετοιμασία στήλης Sephadex G-50 (Pharmacia):
 - α) Σε φιαλίδιο errendorf χωρητικότητας 0,5 ml, που έφερε άνοιγμα στον πυθμένα καλυμμένο με υαλοβάμβακα, προσθέταμε 500,0 ml αιωρήματος Sephadex G-50 με πιπέτα Pasteur και συνεχείς κυκλικές κινήσεις.
 - β) Τοποθετούσαμε το παραπάνω φιαλίδιο errendorf μέσα σε φιαλίδιο errendorf χωρητικότητας 1,5ml, το φυγοκεντρούσαμε διαδοχικά δύο φορές, στις 6.000 στροφές για 1 λεπτό και απορρίπταμε το υγρό που συγκεντρωνόταν στο μεγαλύτερο φιαλίδιο.
2. Τοποθετούσαμε τη στήλη σε καινούργιο φιαλίδιο errendorf χωρητικότητας 1,5 ml και προσθέταμε στη στήλη το διάλυμα ραδιενεργά σημασμένου ανιχνευτή, το οποίο είχε παρασκευαστεί, όπως έχει ήδη περιγραφεί.
3. Προκειμένου να απομακρυνθούν τα $[\alpha - ^{32}\text{P}]\text{-dCTP}$ τα οποία δεν είχαν ενσωματωθεί στο DNA ακολουθούσε φυγοκέντρωση στις 6.000 στροφές για 3 λεπτά.
4. Το ραδιενεργά σημασμένο DNA που διαπερνούσε τη στήλη συγκεντρωνόταν στο μεγάλο errendorf και φυλασσόταν στους $-20,0\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Γ.3.3.2. Υβριδισμός με ανιχνευτή σημασμένο ετερόλογο DNA

2.1. Προϋβριδισμός

Ο προϋβριδισμός είναι μια διαδικασία που αποσκοπεί στην κάλυψη των ελεύθερων θέσεων στη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης, προκειμένου να αποφευχθεί η μη ειδική δέσμευση του ανιχνευτή:

1. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης που είχε προετοιμαστεί με τη μέθοδο *Southern* ή *Northern* και έφερε ακινητοποιημένα δείγματα DNA ή RNA αντίστοιχα, διαβρεχόταν με διάλυμα 2x SSC.
2. Στη συνέχεια τοποθετούσαμε τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης σε σωλήνα υβριδισμού με την πλευρά που έφερε τα νουκλεϊκά οξέα προς το εσωτερικό του.

3. Ακολουθούσε ετερόλογος προϋβριδισμός με προσθήκη 20,0 ml διαλύματος προϋβριδισμού.
4. Ο σωλήνας επωαζόταν σε φούρνο υβριδισμού υπό συνεχή περιστροφή στους 60,0 °C για 1 ώρα.

2.2. Υβριδισμός

1. Σε 50,0 ml ραδιενεργά σημασμένου DNA ανιχνευτή προσθέταμε 500,0 λ T.E. και ακολουθούσε η αποδιάταξή του με βρασμό για 10 λεπτά. Η αποδιάταξη τερματιζόταν με παραμονή του δείγματος στον πάγο.
2. Από το σωλήνα υβριδισμού απορριπτόταν το διάλυμα προϋβριδισμού και προσθέταμε:
 - 10,0 ml διαλύματος υβριδισμού προθερμασμένο στους 60,0 °C και ίδιας σύστασης με του διαλύματος προϋβριδισμού.
 - Το αποδιαταγμένο DNA σημασμένου ανιχνευτή.
3. Τοποθετούσαμε το σωλήνα υβριδισμού στο φούρνο υβριδισμού υπό συνεχή περιστροφή για 16 ώρες στους 60,0 °C.

2.3. Ξεπλύματα

1. Το διάλυμα υβριδισμού απορριπτόταν και προσθέταμε 50,0 ml διάλυμα ξεπλύματος I προθερμασμένο στους 55,0 °C. Ανακινούσαμε το σωλήνα υβριδισμού και απορρίπταμε το διάλυμα.
2. Η μεμβράνη απομακρυνόταν από το σωλήνα υβριδισμού και την τοποθετούσαμε σε γυάλινο δοχείο που περιείχε διάλυμα ξεπλύματος I προθερμασμένο στους 50,0 °C το οποίο κάλυπτε πλήρως τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης.
3. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης παρέμενε υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Το διάλυμα απορριπτόταν και επαναλαμβάναμε τη διαδικασία με διάλυμα ξεπλύματος I προθερμασμένο στους 45,0 °C.
4. Το διάλυμα απορριπτόταν και ακολουθούσε τρίτο ξέπλυμα με διάλυμα ξεπλύματος II προθερμασμένο στους 40,0 °C.
5. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης παρέμενε υπό συνεχή ανάδευση σε θερμοκρασία δωματίου για 15 λεπτά. Απομακρύναμε το διάλυμα και επαναλαμβάναμε τη διαδικασία με διάλυμα ξεπλύματος II προθερμασμένο στους 35,0 °C.

6. Η μεμβράνη νιτροκυτταρίνης τυλιγόταν σε διαφανή μεμβράνη.

Γ.3.3.3 Αυτοραδιογραφία -Ανίχνευση σήματος

Το ραδιενεργό ισότοπο ^{32}P που χρησιμοποιήθηκε για τη σήμανση εκπέμπει β-σωματίδια υψηλής ενέργειας (1,71 MeV). Η εκπεμπόμενη β-ακτινοβολία μετατρέπεται σε φωτεινή ενέργεια, όταν παρεμβάλλονται παραπετάσματα μεγιστοποίησης, οπότε οι περιοχές της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης που εκπέμπουν ακτινοβολία μπορούν να αποτυπωθούν πάνω σε φιλμ. Με βάση αυτά τα δεδομένα η ανίχνευση του σήματος έγινε ως εξής:

1. Τοποθετούσαμε τη μεμβράνη σε ειδική μεταλλική κασέτα έκθεσης, προκειμένου να γίνουν ορατά τα δείγματα DNA ή RNA που είχαν ακινητοποιηθεί σε αυτή με τη μέθοδο *Southern* ή *Northern* αντίστοιχα.
2. Σε σκοτεινό θάλαμο τοποθετούσαμε πάνω από τη μεμβράνη νιτροκυτταρίνης φωτογραφικό φιλμ Kodak X-OMAT- AR Pont Crenex Lightening Plus πίσω από τα παραπετάσματα μεγιστοποίησης, με σκοπό να ενισχυθεί το σήμα.
3. Η έκθεση της μεμβράνης νιτροκυτταρίνης διαρκούσε τουλάχιστον 24 ώρες.
4. Η εμφάνιση του φιλμ γινόταν μέσω διαδοχικών εμβαπτίσεών του σε:
 - Διάλυμα εμφάνισης D-19 της Kodak.
 - Μονιμοποιητικό υγρό Fix-100.

Δ. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗΣ

Δ.1. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΕΣ ΠΟΙΚΙΛΙΕΣ ΕΛΙΑΣ

Με απώτερο στόχο τον εντοπισμό μιας ποικιλίας με ισχυρή μορφογενετική αντίδραση πραγματοποιήθηκαν προκαταρκτικά πειράματα στα οποία χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα από πέντε ελληνικές καλλιεργούμενες ποικιλίες ελιάς:

- Κορωνέικη.
- Άμφισσα.
- Τζονάτη.
- Αγγουρομάννα.
- Καλαμάτα.

Διερευνήθηκε η επαγωγή σωματικών εμβρύων σε ριζίδια, βάσεις και κορυφές κοτυληδόνων που προέρχονταν από ώριμα ζυγωτικά έμβρυα της εκάστοτε ποικιλίας.

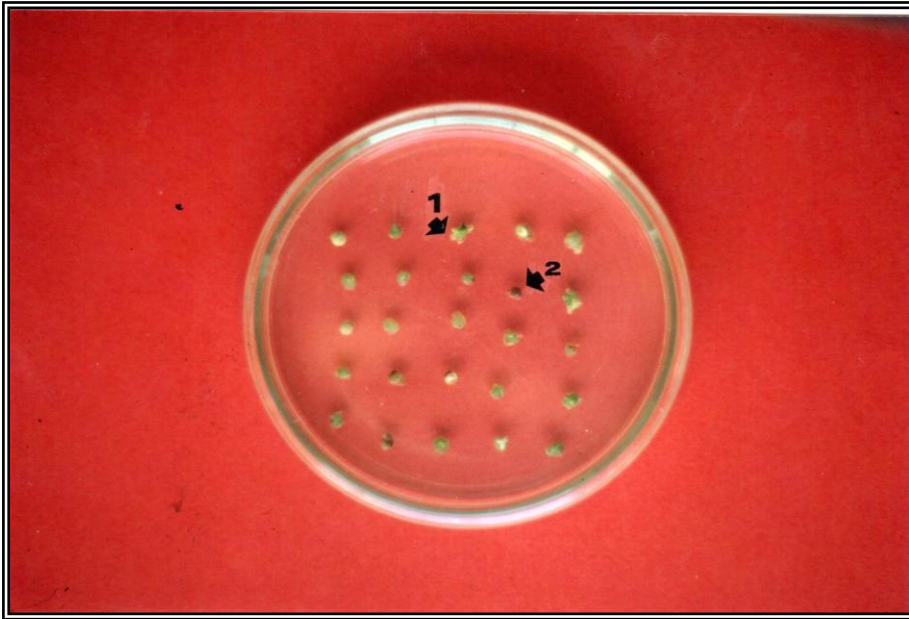
Τα έκφυτα εμβολιάζονταν για 21 ημέρες σε θρεπτικό υπόστρωμα OMc με 25,0 μ M IBA και 2,5 μ M 2iP. Οι κάλλοι που προκύπταν μεταφέρονταν σε θρεπτικό υπόστρωμα OMc χωρίς φυτοαυξητικές ουσίες για δύο μήνες (Φωτογραφίες 1,2 και 3).

Στον πίνακα 11 καταγράφονται τα τελικά ποσοστά επαγωγής σωματικών εμβρύων που παρατηρήθηκαν.

Από τη μελέτη του συγκριτικού πίνακα 11 γίνεται φανερό η περιορισμένη αναγεννητική ικανότητα των ποικιλιών *Τζονάτη*, *Καλαμάτα* και *Αγγουρομάννα*. Αντίθετα οι ποικιλίες *Κορωνέικη* και *Άμφισσα* εκδήλωναν αξιοσημείωτη διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων.

Στα έκφυτα ριζιδίων μικρή υπεροχή εμφάνιζε η ποικιλία *Άμφισσα*, έναντι της *Κορωνέικης*, ενώ στα έκφυτα βάσεων και κορυφών κοτυληδόνων υψηλότερη διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων παρατηρήθηκε στην ποικιλία *Κορωνέικη*.

Με βάση τα παραπάνω αποτελέσματα και με το δεδομένο ότι και τα τρία είδη εκφύτων θα αποτελούσαν αντικείμενα μελέτης, η *Κορωνέικη* επιλέχθηκε σαν καταλληλότερη ποικιλία ως φυτικό υλικό των πειραμάτων της υπόλοιπης ερευνητικής μας προσπάθειας.



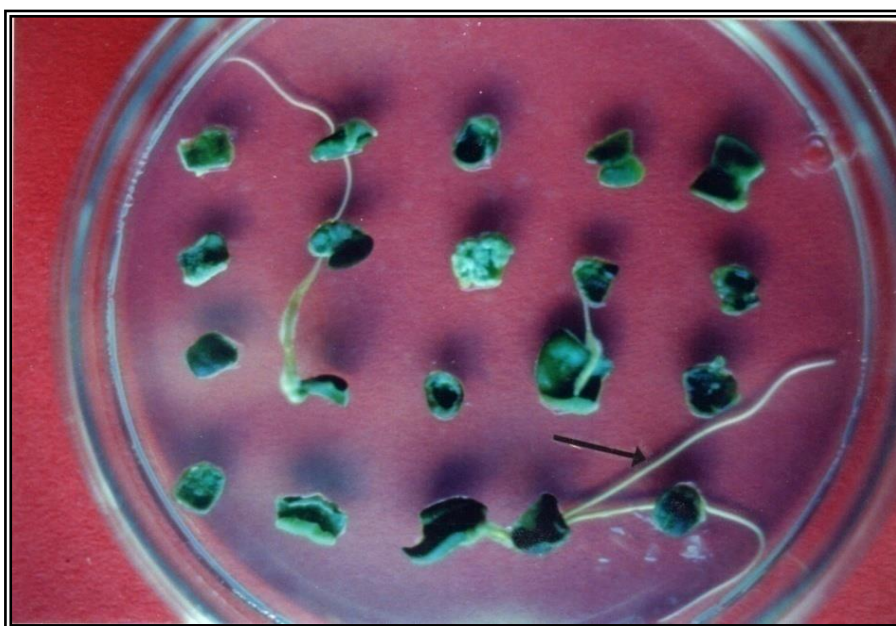
Φωτογραφία 1: Κάλλοι ριζιδίων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων Κορωνέικης.

Τα ριζίδια εμβολιάζονταν σε ΟΜc καλλογένεσης, που περιείχε 2,5 μM 2iP και 25,0 μM IBA και μεταφέρονταν, μετά από 21 ημέρες, σε ΟΜc διαφοροποίησης, όπου παρέμειναν για 50 ημέρες. Διακρίνεται: **1)** Η έναρξη διαφοροποίησης σωματικών εμβρύων. **2)** Νέκρωση κάλλου.



Φωτογραφία 2: Κάλλοι βάσεων κοτυληδόνων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων Κορωνέικης.

Οι βάσεις εμβολιάζονταν σε ΟΜc καλλογένεσης, που περιείχε 2,5 μM 2iP και 25,0 μM IBA και μεταφέρονταν, μετά από πάροδο 21 ημερών, σε ΟΜc διαφοροποίησης, όπου παρέμειναν για 50 ημέρες. Με το βέλος υποδεικνύεται διαφοροποίηση ριζών.



Φωτογραφία 3: Κάλλοι κορυφών κοτυληδόνων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων Κορωνέικης.

Οι κορυφές εμβολιάζονταν σε ΟΜς καλλογένεσης, που περιείχε 2,5 μM 2iP και 25,0 μM IBA και μεταφέρονταν, μετά από πάροδο 21 ημερών, σε ΟΜς διαφοροποίησης, όπου παρέμειναν για 50 ημέρες. Με το βέλος υποδεικνύεται διαφοροποίηση ριζών.

Πίνακας 11: Σωματική εμβρυογένεση (%) σε πέντε ελληνικές καλλιεργούμενες ποικιλίες ελιάς: Κορωνέικη, Άμφισσα, Τζονάτη, Αγγουρομάνα και Καλαμάτα.

Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τριών πειραμάτων.

ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΕΛΙΑΣ	ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ (%)		
	ΡΙΖΙΔΙΑ	ΒΑΣΕΙΣ ΚΟΤΥΛΗΔΟΝΩΝ	ΚΟΡΥΦΕΣ ΚΟΤΥΛΗΔΟΝΩΝ
ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ	23,8 $\pm$ 4,3	23,3 $\pm$ 3,3	24,7 $\pm$ 3,1
ΑΜΦΙΣΣΑ	29,1 $\pm$ 3,3	5,5 $\pm$ 2,5	4,2 $\pm$ 2,1
ΤΖΟΝΑΤΗ	16,6 $\pm$ 4,2	0,0	0,0
ΑΓΓΟΥΡΟΜΑΝΑ	5,5 $\pm$ 2,7	0,0	0,0
ΚΑΛΑΜΑΤΑ	0,0	0,0	0,0

Δ.2. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΤΙΚΑ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

Ποικίλα είναι τα τεχνητά θρεπτικά υποστρώματα που έχουν προταθεί και χρησιμοποιηθεί στις *in vitro* ιστοκαλλιέργειες. Ειδικότερα για την πραγματοποίηση ιστοκαλλιεργειών στην ελιά καθοριστική ήταν η δημιουργία του εξειδικευμένου θρεπτικού υποστρώματος OM (Olive medium) από τον Rugini (1984). Το OM δημιουργήθηκε από την ανάλυση και τον συνδυασμό των συστατικών:

1. Των ακραίων μεριστωμάτων της ελιάς
2. Των ζυγωτικών εμβρύων της ελιάς
3. Του κλασικού θρεπτικού υποστρώματος MS (Murashige & Skoog 1962) για *in vitro* ιστοκαλλιέργειες.

Στην παρούσα ερευνητική προσπάθεια συγκρίναμε τη μορφογενετική ικανότητα τεσσάρων διακριτών θρεπτικών υποστρωμάτων. Πιο συγκεκριμένα ριζίδια ώριμων ζυγωτικών εμβρύων εμβολιάστηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης:

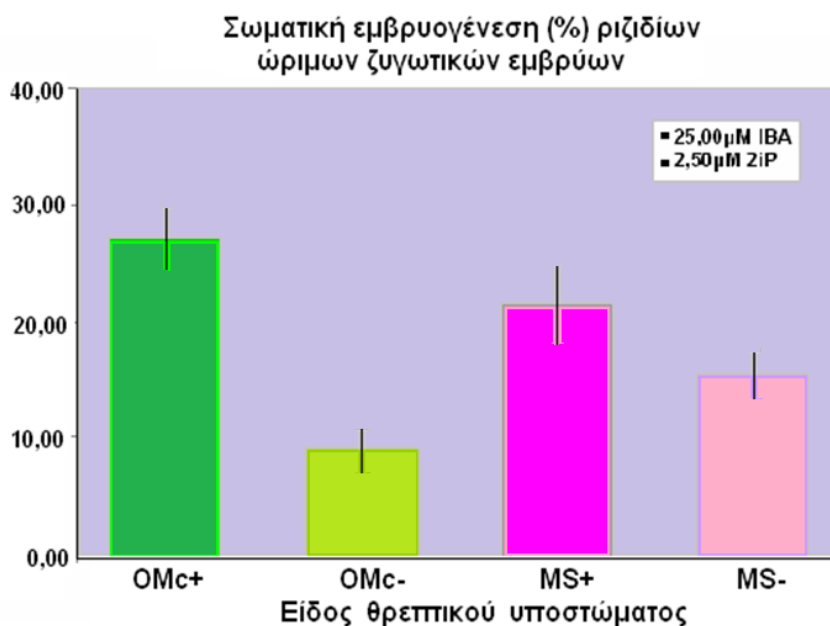
- α) OMc το οποίο αποτελεί τροποποίηση του θρεπτικού υποστρώματος OM και προτάθηκε από τους Cañas & Benbadis (1988). Η κύρια διαφορά του OMc από το MS έγκειται στη συγκέντρωση ανόργανου και οργανικού αζώτου, όπως έχει ήδη αναλυθεί.
- β) OMc, χωρίς υδρολυμένη καζεΐνη.
- γ) MS, χωρίς υδρολυμένη καζεΐνη.
- δ) MS, που περιείχε 1,0 g/L υδρολυμένη καζεΐνη (13,1% άζωτο).

Σε όλα τα παραπάνω θρεπτικά μέσα οι φυτοαυξητικές ουσίες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν 25,0 μM IBA και 2,5 μM 2iP. Τα έκφυτα παρέμεναν για 21 ημέρες στο εκάστοτε θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης, όπου μετατρέπονταν σε κάλλους. Οι κάλλοι μεταφέρονταν στο θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης, δηλαδή σε θρεπτικό υπόστρωμα ίδιο με το θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης, αλλά χωρίς φυτοαυξητικές ουσίες και παρέμεναν σε αυτό για δύο μήνες.

Στα γραφήματα της εικόνας 3 απεικονίζονται τα τελικά ποσοστά επαγωγής σωματικών εμβρύων που καταμετρήθηκαν στα τέσσερα διακριτά θρεπτικά υποστρώματα. Από τη μελέτη των γραφημάτων είναι φανερή η υπεροχή της μορφογενετικής δυναμικότητας του OMc συγκριτικά με το MS.

Η αφαίρεση της υδρολυμένης καζεΐνης από το OMc μείωνε δραστικά το ποσοστό διαφοροποίησης σωματικών εμβρύων. Η αναγκαιότητα της παροχής υδρολυμένης καζεΐνης για την επαγωγή σωματικής εμβρυογένεσης διαφαίνεται και από τη χρήση του MS. Στο MS το

οποίο δεν περιείχε υδρολυμένη καζεΐνη, δεν παρατηρήθηκε υψηλή εμβρυογενετική διαφοροποίηση. Αντίθετα όταν προστέθηκε 1,0 g/L υδρολυμένη καζεΐνη το ποσοστό αυξήθηκε, αλλά και πάλι δεν έφτασε το ποσοστό που καταγράφηκε στο OMc.



Εικόνα 3: Σωματική εμβρυογένεση (%) σε τέσσερα διακριτά θρεπτικά υποστρώματα.

Ριζίδια ώριμων ζυγωτικών εμβρύων εμβολιάζονταν, για 21 ημέρες, σε OMc (OMc+), OMc χωρίς υδρολυμένη καζεΐνη (OMc-), MS με 1,0 g/L υδρολυμένης καζεΐνης (MS+) και MS χωρίς υδρολυμένη καζεΐνη (MS-). Τα θρεπτικά υποστρώματα καλλογένεσης περιείχαν 25,0 μM IBA και 2,5 μM ZnP. Τα ποσοστά, που αναγράφονται, καταγράφηκαν μετά από μεταφορά και παραμονή των κάλλων σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης για δύο μήνες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τριών-τεσσάρων πειραμάτων.

Συμπερασματικά το καταλληλότερο θρεπτικό υπόστρωμα για την επαγωγή σωματικών εμβρύων σε ιστοκαλλιέργειες ελιάς είναι το OMc συγκριτικά με το MS. Από το πειραματικό αυτό αποτέλεσμα διαφαίνεται ότι ο συνδυασμός μακροστοιχείων, κυρίως των πηγών ανόργανου αζώτου, οργανικών ενώσεων και υδρολυμένης καζεΐνης του OMc είναι καθοριστικός για την επαγωγή και την έκφραση της εμβρυογενετικής δυναμικότητας των συγκεκριμένων εκφύτων (Φωτογραφία 4).



Φωτογραφία 4: Κάλλοι ριζιδίων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων.

Τα ριζίδια εμβολιάζονταν σε OMc καλλογένεσης (OMc+), που περιείχε 2,5 μM 2iP και 25,0 μM IBA και μεταφέρονταν, μετά από πάροδο 21 ημερών, σε OMc (OMc+) διαφοροποίησης, όπου παρέμεναν για 50 ημέρες. Διακρίνεται η διαφοροποίηση:

- a) Μεμονωμένου και ανεπτυγμένου σωματικού εμβρύου.
- b) Απαρχές πολλαπλών σωματικών εμβρύων με μορφή «μπουκέτου».

Δ.3. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΙ ΗΛΙΚΙΑ ΕΚΦΥΤΟΥ

Ένας από τους καθοριστικότερους παράγοντες για την επαγωγή σωματικών εμβρύων, όπως υποδεικνύεται από πλήθος ερευνητικών προσπαθειών, είναι η ηλικία του εκφύτου.

Είναι γενική η διαπίστωση ότι το φυτικό τμήμα που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί για *in vitro* ιστοκαλλιέργεια, πρέπει να αποκοπεί από το μητρικό φυτό το κατάλληλο αναπτυξιακό στάδιο. Οι ανώριμοι φυτικοί ιστοί, συγκρινόμενοι με τους ώριμους, χαρακτηρίζονται από μεγαλύτερη μορφογενετική πλαστικότητα *in vitro*, αλλά ταυτόχρονα και από πολλά μειονε-

κτήματα πρακτικής φύσης (χρονοβόρες και επίπονες διαδικασίες απομόνωσης, είναι διαθέσιμοι μόνο συγκεκριμένες περιόδους του έτους κ.ά.).

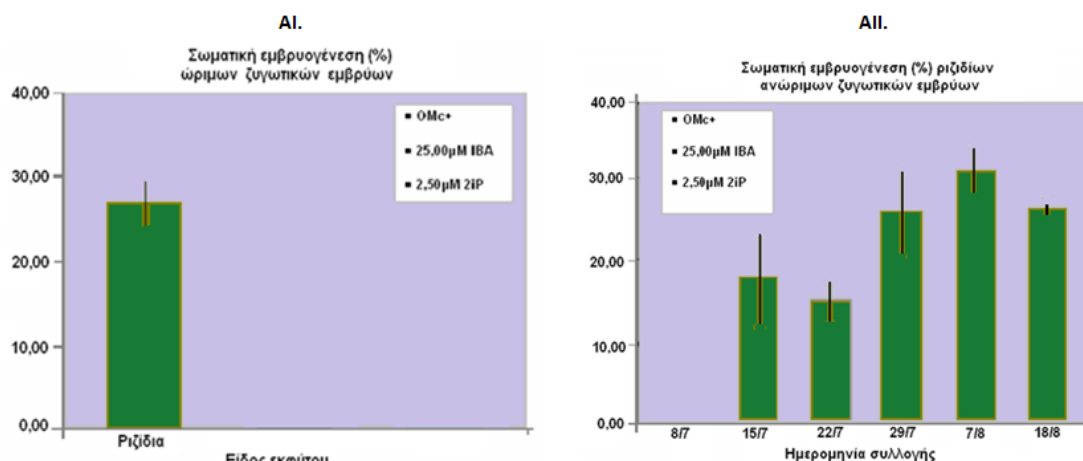
Για τη μελέτη της εξάρτησης της εμβρυογενετικής αναγεννητικής ικανότητας από την ηλικία των ζυγωτικών εμβρύων χρησιμοποιήθηκαν ανώριμα ζυγωτικά έμβρυα ελιάς που συλλέγονταν από τις αρχές Ιουλίου μέχρι τα μέσα Αυγούστου. Τα ριζίδια, οι βάσεις και οι κορυφές των κοτυληδόνων των ανώριμων ζυγωτικών εμβρύων εμβολιάζονταν για 21 ημέρες σε θρεπτικό υπόστρωμα OMC που περιείχε 25,0 μM IBA και 2,5 μM 2iP. Οι κάλλοι, που προκύπταν, μεταφέρονταν για περαιτέρω διαφοροποίηση σε θρεπτικό υπόστρωμα OMC χωρίς φυτοαυξητικούς παράγοντες.

Στις γραφικές παραστάσεις των εικόνων 4(A), 4(B) και 4(Γ) απεικονίζονται τα τελικά ποσοστά της σωματικής εμβρυογένεσης που καταγράφηκαν στις παραπάνω ιστοκαλλιερητικές συνθήκες.

Από τη γραφική παράσταση της εικόνας 4(A) γίνεται φανερό ότι τα ποσοστά επαγωγής σωματικών εμβρύων αυξάνονταν ανάλογα με την αύξηση της ηλικίας των εκφύτων-ριζιδίων και μεγιστοποιούνταν στα έκφυτα που είχαν συλλεχθεί τις πρώτες ημέρες του Αυγούστου (2-2,5 μήνες μετά την άνθιση). Στη συνέχεια καταγράφονταν μικρές πτωτικές τάσεις και τελικά σταθεροποίηση των ποσοστών σε τιμές ανάλογες των εκφύτων-ριζιδίων από ώριμα ζυγωτικά έμβρυα (πείραμα-μάρτυρας).

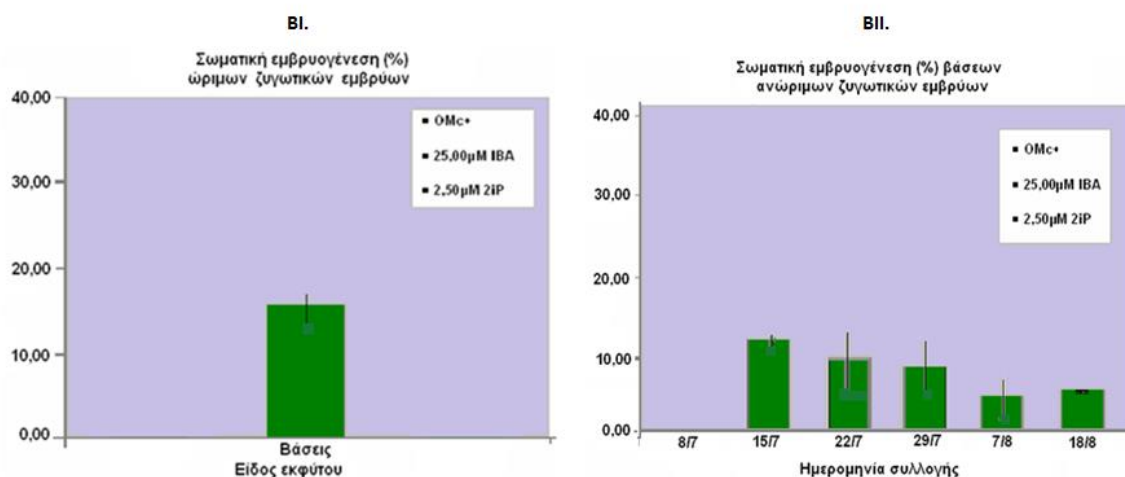
Τα τελικά ποσοστά σωματικών εμβρύων από έκφυτα βάσεων και κορυφών κοτυληδόνων, όπως διαγράφονται στις γραφικές παραστάσεις των εικόνων 4(B) και 4(Γ), αναδεικνύουν την πολύ μικρή εμβρυογενετική δυναμικότητά τους, ακόμα και αν τα έκφυτα είναι ανώριμα. Οι βάσεις εκδήλωναν μια περιορισμένη αυξητική τάση διαφοροποίησης σωματικών εμβρύων μέχρι τα τέλη Ιουλίου, αλλά στη συνέχεια η διαφοροποίηση περιοριζόταν σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Οι κορυφές εμφάνιζαν πολύ χαμηλά ποσοστά επαγωγής σωματικών εμβρύων και μια μικρή, αλλά μη αξιοσημείωτη αύξηση στα μέσα Αυγούστου.

Συμπερασματικά τα ποσοστά διαφοροποίησης σωματικών εμβρύων από έκφυτα βάσεων και κορυφών κοτυληδόνων ανώριμων ζυγωτικών εμβρύων ήταν πολύ χαμηλότερα από εκείνα που καταγράψαμε στις ιστοκαλλιέργειες των αντίστοιχων εκφύτων από ώριμα ζυγωτικά έμβρυα (πείραμα-μάρτυρας). Παράλληλα τα υψηλότερα ποσοστά σωματικής εμβρυογένεσης που καταμετρήθηκαν στα έκφυτα ριζιδίων ανώριμων ζυγωτικών εμβρύων δεν ξεπέρασαν σημαντικά τα ποσοστά που καταγράφονταν σε ιστοκαλλιέργειες ριζιδίων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων (πείραμα-μάρτυρας).



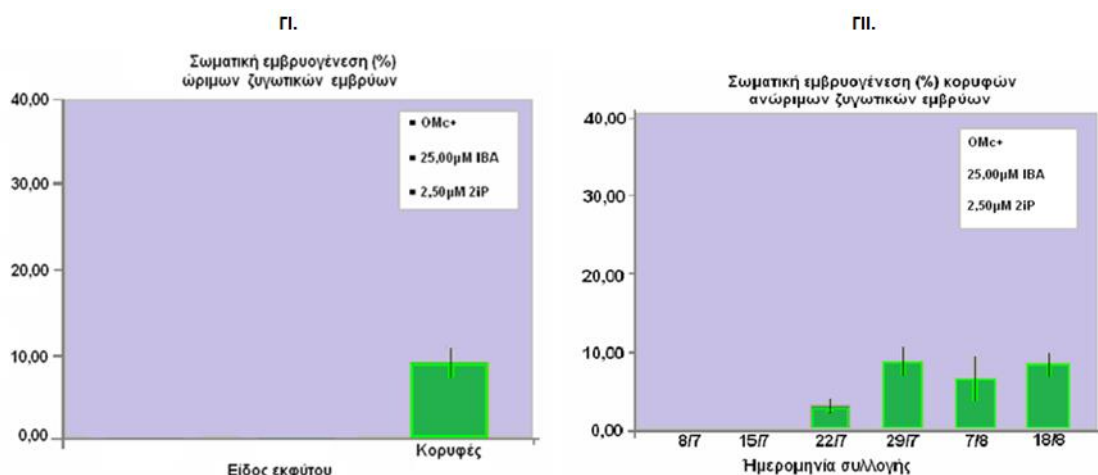
Εικόνα 4(A): Σωματική εμβρυογένεση (%) ριζιδίων ώριμων(AI.) και ανώριμων ζυγωτικών εμβρύων(AII.).

Τα έκφυτα εμβολιάζονταν, για 21 ημέρες, σε ΟΜc καλλογένεσης, που περιείχε 25,0 μM IBA και 2,5 μM 2iP. Τα ποσοστά, που αναγράφονται, καταγράφηκαν μετά από μεταφορά και παραμονή των κάλλων σε θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης για δύο μήνες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τριών-τεσσάρων πειραμάτων.



Εικόνα 4(B): Σωματική εμβρυογένεση (%) βάσεων ώριμων(BI.) και ανώριμων ζυγωτικών εμβρύων (BII.).

Τα έκφυτα εμβολιάζονταν, για 21 ημέρες, σε ΟΜc καλλογένεσης, που περιείχε 25,0 μM IBA και 2,5 μM 2iP. Τα ποσοστά, που αναγράφονται, καταγράφηκαν μετά από μεταφορά και παραμονή των κάλλων σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης για δύο μήνες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τριών-τεσσάρων πειραμάτων.



Εικόνα 4(Γ): Σωματική εμβρυογένεση (%) κορυφών ώριμων(ΓΙ.) και ανώριμων ζυγωτικών εμβρύων(ΓΙΙ.).

Τα έκφυτα εμβολιάζονταν, για 21 ημέρες, σε OMc καλλογένεσης, που περιείχε 25,0 μM IBA και 2,5 μM 2iP. Τα ποσοστά, που αναγράφονται, καταγράφηκαν μετά από μεταφορά και παραμονή των κάλλων σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης για δύο μήνες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τριών-τεσσάρων πειραμάτων.

Δ.4.ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ ΣΕ ΕΚΦΥΤΑ ΩΡΙΜΩΝ ΖΥΓΩΤΙΚΩΝ ΕΜΒΡΥΩΝ

Δ.4.1 ΕΞΑΡΤΗΣΗ ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗΣ ΑΠΟ ΤΟ ΕΙΔΟΣ & ΤΗΝ ΗΛΙΚΙΑ ΤΟΥ ΚΑΛΛΟΥ

Τα αποτελέσματα της προηγούμενης πειραματικής ενότητας υποδεικνύουν το εφάμιλλο (για τα ριζίδια) ή το μικρότερο (για τις βάσεις και τις κορυφές) εμβρυογενετικό δυναμικό των ώριμων έναντι των ανώριμων ζυγωτικών εμβρύων. Αυτό το δεδομένο σε συνδυασμό με τις εγγενείς δυσκολίες των πειραματικών χειρισμών που απαιτούν οι ανώριμοι ιστοί, μας οδήγησαν να επικεντρώσουμε την έρευνά μας στη μελέτη της σωματικής εμβρυογένεσης χρησιμοποιώντας έκφυτα μόνο από ώριμα ζυγωτικά έμβρυα.

Ο επόμενος πειραματικός μας στόχος ήταν να μελετήσουμε την εξάρτηση της σωματικής εμβρυογένεσης από:

α. *Το είδος του εκφύτου.*

Χρησιμοποιήθηκαν ριζίδια, βάσεις και κορυφές κοτυληδόνων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων.

β. *Την ηλικία του κάλλου.*

Χρησιμοποιήθηκαν κάλλοι ηλικίας 0, 7, 14 και 21 ημερών.

Όλα τα έκφυτα εμβολιάζονταν σε ΟΜς που περιείχε 25,0 μM IBA και 2,5 μM 2iP για 7, 14 ή 21 ημέρες, προκειμένου να προκύψουν κάλλοι διαφορετικής ηλικίας. Ως “κάλλοι” 0 ημερών χαρακτηρίζονται τα έκφυτα που εμβολιάζονταν απευθείας στο θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης, χωρίς να μεσολαβήσει στάδιο καλλογένεσης. Η συγκεκριμένη πειραματική διάταξη αποτελούσε το πείραμα-μάρτυρα.

Οι κάλλοι ριζιδίων, βάσεων και κορυφών διαφορετικής ηλικίας που προκύπταν, μεταφέρονταν για επαγωγή μορφογένεσης σε δύο διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα στα οποία παρέμεναν για χρονικό διάστημα δύο μηνών. Τα θρεπτικά υποστρώματα μορφογένεσης ήταν:

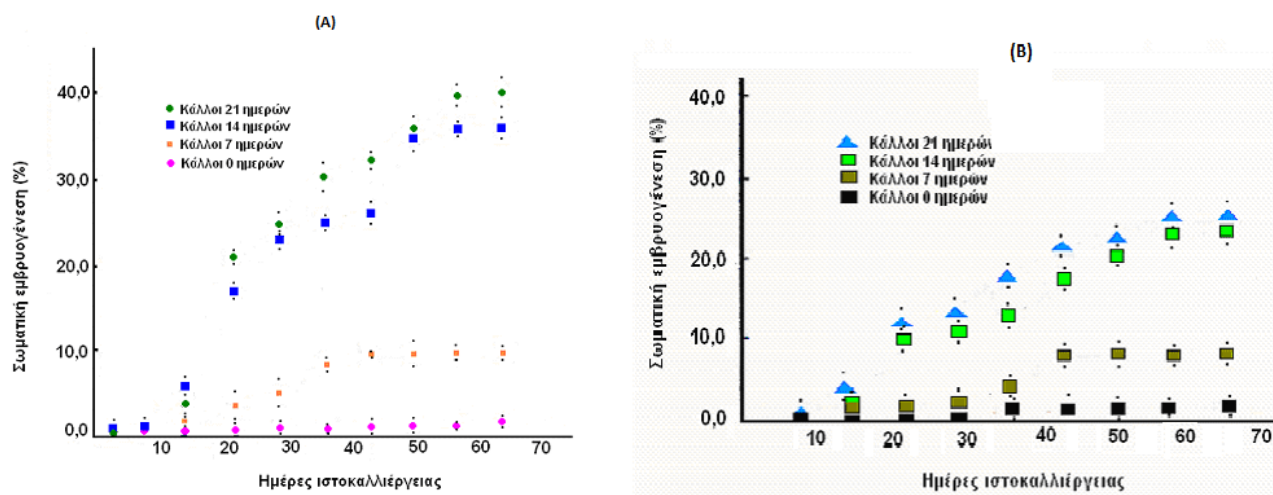
1. ΟΜς χωρίς φυτοαυξητικές ουσίες.
2. ΟΜς που περιείχε 2,5 μM IBA.

Από τη μελέτη των επιμέρους γραφημάτων της εικόνας 5 γίνεται φανερό η εμβρυογενετική ανωτερότητα των ριζιδίων [Εικόνες 5(A & B)], έναντι των βάσεων [Εικόνες 5(Γ & Δ)] και των κορυφών [Εικόνες 5(E & ΣΤ)] των κοτυληδόνων. Παράλληλα είναι σαφές το εμβρυογενετικό προβάδισμα των κάλλων 14 και 21 ημερών, έναντι των κάλλων 0 και 7 ημερών ανεξαρτήτως του θρεπτικού υποστρώματος διαφοροποίησης.

Ειδικότερα στους κάλλους ριζιδίων, 14 και 21 ημερών, αξιοσημείωτη είναι η μείωση του ποσοστού επαγωγής σωματικών εμβρύων μετά την προσθήκη 2,5 μM IBA στο θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης (Εικόνα 5B), έναντι των αντίστοιχων ποσοστών που καταμετρήθηκαν στο θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης που δεν περιείχε φυτοαυξητικούς παράγοντες (Εικόνα 5A).

Αντίθετα η προσθήκη 2,5 μM IBA στο θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης δεν επηρέαζε ή προωθούσε ελαφρώς τη διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων σε κάλλους βάσεων και κορυφών κοτυληδόνων 7, 14 και 21 ημερών [Εικόνες 5(Δ & ΣΤ)], έναντι των αντίστοιχων ποσοστών που καταμετρήθηκαν στο θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης που δεν περιείχε φυτοαυξητικούς παράγοντες [Εικόνες 5(Γ & Ε)].

Τέλος, η διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων στους “κάλλους” 0 ημερών (πείραμα-μάρτυρας) ήταν μηδενική, ανεξαρτήτως είδους εκφύτου και ιστοκαλλιεργητικών συνθηκών, γεγονός που υποδεικνύει ότι η καλλογένεση αποτελεί απαραίτητη προϋπόθεση, προκειμένου να επαχθεί η μορφογένεση στα συγκεκριμένα έκφυτα.



Εικόνα 5(A): Σωματική εμβρυογένεση (%) ριζιδίων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων.

Τα έκφυτα εμβολιάζονταν, για 0 (●), 7 (■), 14 (■) ή 21 (●) ημέρες, σε ΟΜσκαλλογένεσης, που περιείχε 25,0 μM IBA και 2,5 μM 2iP. Τα ποσοστά, που αναγράφονται, καταγράφηκαν μετά από μεταφορά και παραμονή των κάλλων, για δύο μήνες, σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης ΟΜσ χωρίς φυτοαυξητικούς παράγοντες.

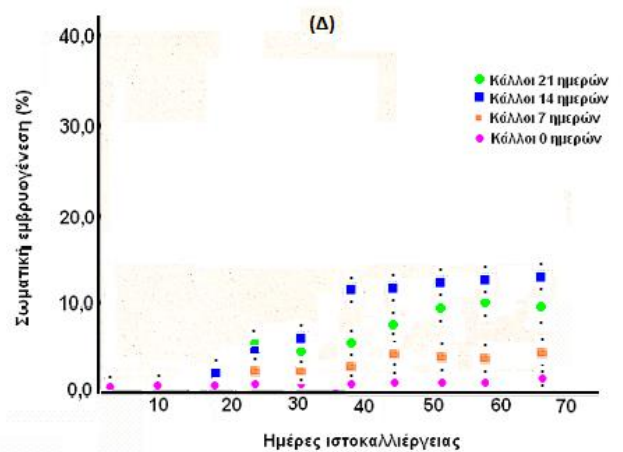
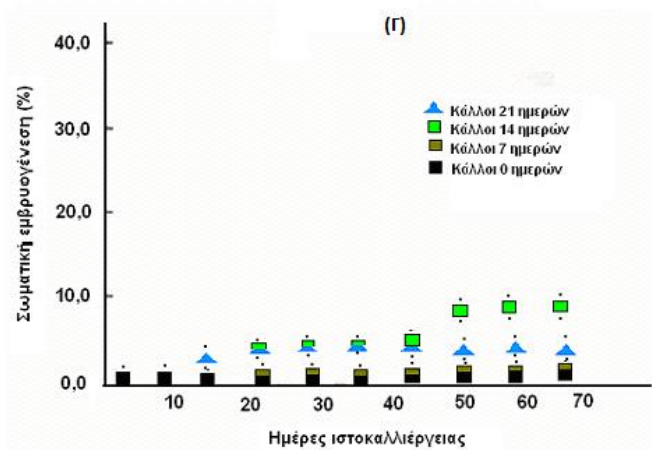
Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τριών πειραμάτων.

Εικόνα 5(B): Σωματική εμβρυογένεση (%) ριζιδίων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων.

Τα έκφυτα εμβολιάζονταν, για 0 (■), 7 (■), 14 (■) ή 21 (▲) ημέρες, σε ΟΜσκαλλογένεσης, που περιείχε 25,0 μM IBA και 2,5 μM 2iP. Τα ποσοστά, που αναγράφονται, καταγράφηκαν μετά από μεταφορά και παραμονή των κάλλων, για δύο μήνες, σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης ΟΜσ που περιείχε 2,5 μM IBA.

Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τριών πειραμάτων.

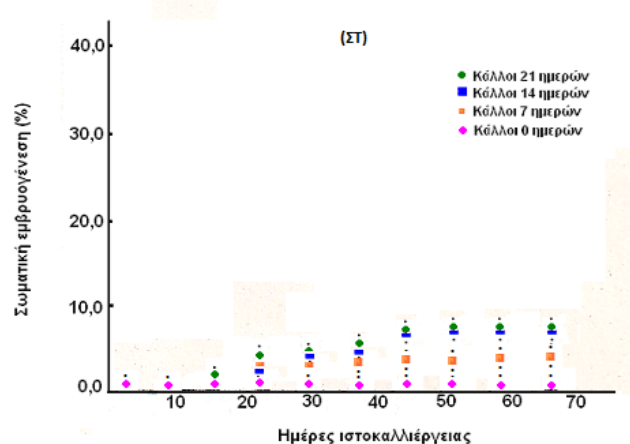
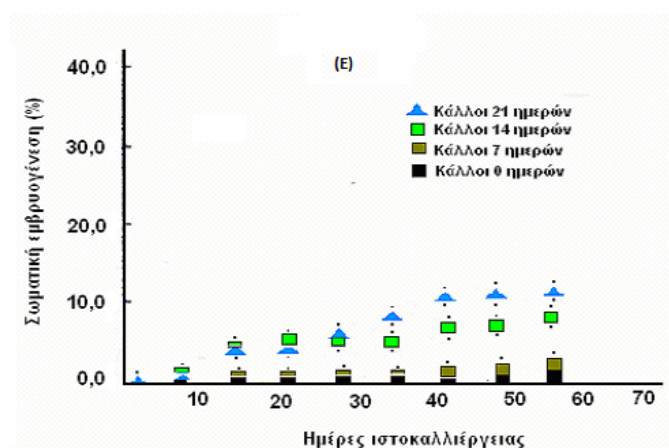
Αποτελέσματα



Εικόνα 5 (Γ): Σωματική εμβρυογένεση (%) βάσεων κοτυληδόνων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων. Τα έκφυτα εμβολιάζονταν, για 0 (■), 7 (■), 14 (■) ή 21 (▲) ημέρες, σε ΟΜς καλλιέργειας, που περιείχε 25,0 μΜ IBA και 2,5 μΜ 2iP. Τα ποσοστά, που αναγράφονται, καταγράφηκαν μετά από μεταφορά και παραμονή των κάλλων σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης, χωρίς φυτοαυξητικούς παράγοντες, για δύο μήνες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τριών πειραμάτων.

Εικόνα 5(Δ): Σωματική εμβρυογένεση (%) βάσεων κοτυληδόνων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων. Τα έκφυτα εμβολιάζονταν, για 0 (●), 7 (■), 14 (■) ή 21 (●) ημέρες, σε ΟΜς καλλιέργειας, που περιείχε 25,0 μΜ IBA και 2,5 μΜ 2iP. Τα ποσοστά, που αναγράφονται, καταγράφηκαν μετά από μεταφορά και παραμονή των κάλλων, για δύο μήνες, σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης ΟΜς που περιείχε 2,5 μΜ IBA. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τριών πειραμάτων.

Αποτελέσματα



Εικόνα 5(Ε): Σωματική εμβρυογένεση (%) κορυφών κοτυληδόνων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων. Τα έκφυτα εμβολιάζονταν, για 0 (■), 7 (■), 14 (■) ή 21 (▲) ημέρες, σε ΟΜς καλλογένεσης, που περιείχε 25,0 μΜ IBA και 2,5 μΜ 2iP. Τα ποσοστά, που αναγράφονται, καταγράφηκαν μετά από μεταφορά και παραμονή των κάλλων σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης, χωρίς φυτοαυξητικούς παράγοντες, για δύο μήνες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τριών πειραμάτων.

Εικόνα 5(ΣΤ): Σωματική εμβρυογένεση (%) κορυφών κοτυληδόνων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων. Τα έκφυτα εμβολιάζονταν, για 0 (●), 7 (■), 14 (■) ή 21 (●) ημέρες, σε ΟΜς καλλογένεσης, που περιείχε 25,0 μΜ IBA και 2,5 μΜ 2iP. Τα ποσοστά, που αναγράφονται, καταγράφηκαν μετά από μεταφορά και παραμονή των κάλλων, για δύο μήνες, σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης ΟΜς που περιείχε 2,5 μΜ IBA. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τριών πειραμάτων.

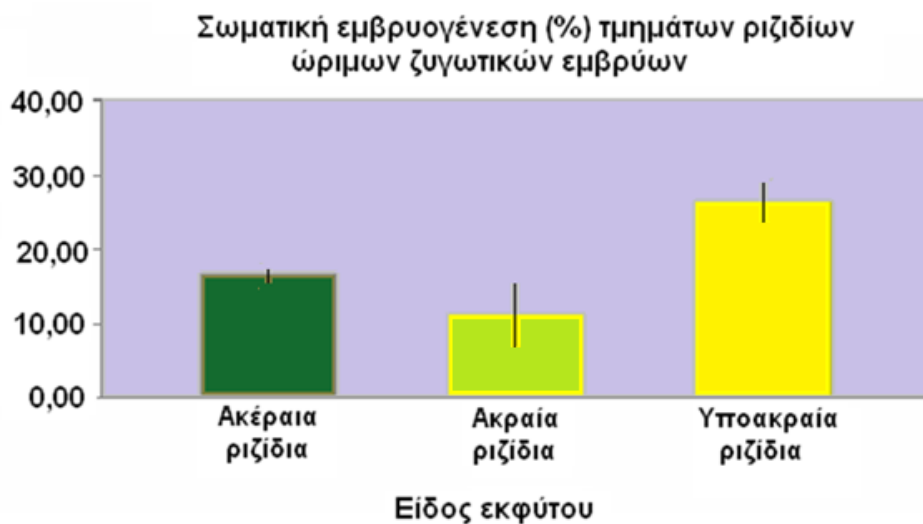
Δ.4.2. ΕΞΑΡΤΗΣΗ ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗΣ ΑΠΟ ΤΟ ΤΜΗΜΑ ΤΟΥ ΡΙΖΙΔΙΟΥ-ΕΚΦΥΤΟΥ

Από όλα τα προηγούμενα πειραματικά αποτελέσματα ήταν σαφές ότι το έκφυτο με το υψηλότερο εμβρυογενετικό δυναμικό ήταν το ριζίδιο συγκριτικά με τις βάσεις και τις κορυφές των κοτυληδόνων των ώριμων ζυγωτικών εμβρύων. Έχοντας σαν δεδομένο αυτή την παρατήρηση διερευνήθηκε η πιθανή μεταβολή της εμβρυογενετικής δυναμικότητας κατά μήκος του ριζιδίου.

Για την επίτευξη του συγκεκριμένου στόχου τα ριζίδια, μετά την απομόνωσή τους από τα ώριμα ζυγωτικά έμβρυα, τεμαχίζονταν σε δύο τμήματα:

- α)** Στο *ακραίο τμήμα του ριζιδίου*, δηλαδή στο τμήμα του ριζιδίου προς το ριζικό άκρο του ζυγωτικού εμβρύου.
- β)** Στο *υποακραίο τμήμα του ριζιδίου*, δηλαδή στο τμήμα του ριζιδίου προς τις κοτυληδόνες το οποίο γειτνιάζει με το μερίστωμα του βλαστού και το οποίο δεν εμβολιαζόταν.

Τα δύο είδη εκφύτων εμβολιάζονταν σε θρεπτικό μέσο OMc, που περιείχε 25,0 μ M IBA και 2,5 μ M 2iP, για 21 ημέρες. Στην εικόνα 6 απεικονίζονται τα τελικά ποσοστά σωματικής εμβρυογένεσης που καταγράφονταν μετά από τη μεταφορά και την παραμονή των κάλλων στο θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης (OMc χωρίς φυτοαυξητικές ουσίες) για δύο μήνες.



Εικόνα 6: Σωματική εμβρυογένεση (%) σε έκφυτα ριζιδίων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων.

Τα ακέραια ή τεμαχισμένα ριζίδια εμβολιάζονταν, για 21 ημέρες, σε OMc καλλογένεσης, που περιείχε 25,0 μ M IBA και 2,5 μ M 2iP. Τα ποσοστά, που αναγράφονται, καταγράφηκαν μετά από μεταφορά και παραμονή των κάλλων σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης για δύο μήνες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τριών πειραμάτων.

Η εμβρυογενετική δυναμικότητα του υποακραίου τμήματος του ριζιδίου υπερέιχε έναντι της εμβρυογενετικής ικανότητας του ολόκληρου ριζιδίου (πείραμα – μάρτυρας).

Αντίθετα, στις ιστοκαλλιέργειες του ακραίου τμήματος ριζιδίου παρατηρήθηκε μερική αναστολή της σωματικής εμβρυογένεσης συγκριτικά με το πείραμα-μάρτυρα.

Τα αποτελέσματα υποδηλώνουν μια διαβάθμιση της εμβρυογενετικής δυναμικότητας κατά μήκος του ριζιδίου, καθώς το εμβρυογενετικό δυναμικό αυξάνεται όσο η απόσταση του εκφύτου αυξάνεται από την καλύπτρα και μειώνεται από το μερίστωμα του βλαστού.

Δ. 5. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ ΣΕ ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΟΥΜΕΝΟΥΣ ΚΑΛΛΟΥΣ

Η πλειοψηφία των επιστημονικών μελετών καταδεικνύει ότι υψηλότερα ποσοστά σωματικής εμβρυογένεσης καταγράφονται σε ιστοκαλλιέργειες μικρής ηλικίας, καθώς η εμβρυογενετική ικανότητα μειώνεται με τις συνεχείς ανακαλλιέργειες.

Με στόχο τη διερεύνηση της ισχύος των παραπάνω και στις ιστοκαλλιέργειες της ηλικίας, καλλιεργήθηκαν ριζίδια, βάσεις και κορυφές κοτυληδόνων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων σε θρεπτικό μέσο ΟΜc με 25,0 μM IBA και 2,5 μM 2iP. Οι επαχθέντες κάλλοι, μετά από την παρέλευση 21 ημερών, χωρίζονταν σε δύο πληθυσμούς:

1. Οι μισοί κάλλοι μεταφέρονταν σε θρεπτικό υπόστρωμα ΟΜc χωρίς φυτοαυξητικούς παράγοντες, προκειμένου να ελεγχθεί το εμβρυογενετικό τους δυναμικό.
2. Οι υπόλοιποι κάλλοι τεμαχίζονταν και ανακαλλιεργούνταν σε φρέσκο θρεπτικό μέσο καλλογένεσης.

Η παραπάνω διαδικασία επαναλήφθηκε για τέσσερις γενιές.

Στον πίνακα 12 αναγράφονται τα ποσοστά της διαφοροποίησης των σωματικών εμβρύων και των τεσσάρων γενιών ανακαλλιεργούμενων κάλλων.

Πίνακας 12: Σωματική εμβρυογένεση (%) ανακαλλιεργούμενων κάλλων εκφύτων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων.

Τα έκφυτα εμβολιάζονταν, για 21 ημέρες, σε ΟΜc καλλογένεσης, που περιείχε 25,0 μM IBA και 2,5 μM 2iP. Τα ποσοστά, που αναγράφονται, καταγράφηκαν μετά από μεταφορά και παραμονή των κάλλων σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης για δύο μήνες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο δύο πειραμάτων.

ΓΕΝΙΑ ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΟΥΜΕΝΩΝ ΚΑΛΛΩΝ	ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ (%)		
	ΡΙΖΙΔΙΑ	ΒΑΣΕΙΣ ΚΟΤΥΛΗΔΟΝΩΝ	ΚΟΡΥΦΕΣ ΚΟΤΥΛΗΔΟΝΩΝ
1 ^η	28,2 $\pm$ 2,1	7,1 $\pm$ 3,1	7,7 $\pm$ 2,5
2 ^η	22,1 $\pm$ 3,5	0,0	0,0
3 ^η	5,2 $\pm$ 2,6	0,0	0,0
4 ^η	0,0	0,0	0,0

Η μελέτη των πειραματικών αποτελεσμάτων του πίνακα 12 καταδεικνύει σαφώς ότι:

- α) Τα ριζίδια υπερείχαν εμβρυογενετικά έναντι των βάσεων και των κορυφών των κοτυληδόνων.
- β) Η εμβρυογενετική δυναμικότητα των ριζιδίων μειωνόταν σταδιακά από γενιά σε γενιά, κυρίως από την 3^η γενιά και τελικά μηδενιζόταν την 4^η γενιά.
- γ) Η εμβρυογενετική διαφοροποίηση τόσο των βάσεων όσο και των κορυφών των κοτυληδόνων μηδενιζόταν από τη 2^η γενιά.

Δ. 6. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ & ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΣΑΚΧΑΡΟΖΗΣ

Πολλαπλές είναι οι βιβλιογραφικές αναφορές οι οποίες αφορούν τη μορφογενετική επίδραση των υδατανθράκων και ειδικότερα της σακχαρόζης στις ιστοκαλλιέργειες. Δεν έχει αποσαφηνιστεί, όμως, το είδος της εξάρτησης της αναγεννητικής δυναμικότητας των φυτικών εκφύτων από την παροχή διαφορετικών συγκεντρώσεων σακχαρόζης στο θρεπτικό υπόστρωμα.

Στην παρούσα έρευνα μελετήθηκε η εξάρτηση της επαγωγής σωματικών εμβρύων, σε έκφυτα ριζιδίων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων, από πέντε συγκεντρώσεις σακχαρόζης:

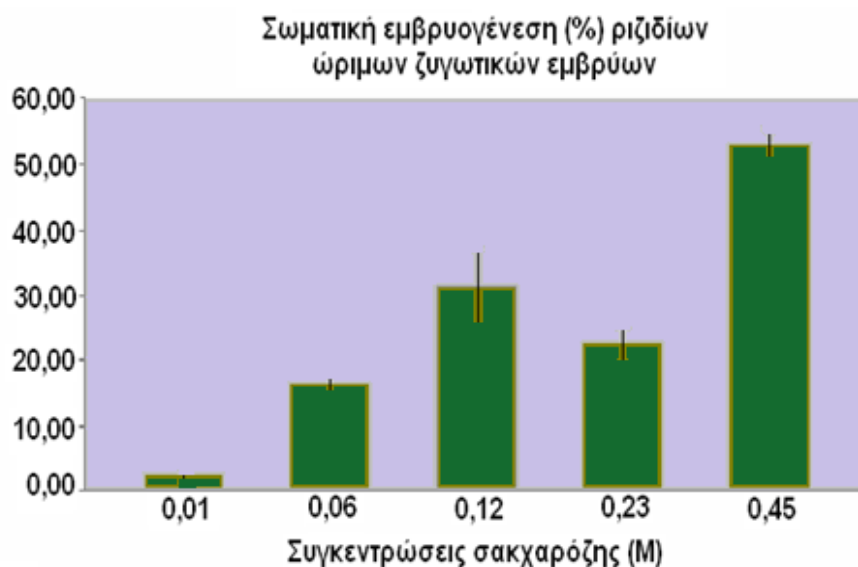
- α) 5,0 g/L σακχαρόζης (0,015 M).
- β) 20,0 g/L σακχαρόζης [0,058 M (πείραμα-μάρτυρας)].
- γ) 40,0 g/L σακχαρόζης (0,12 M).
- δ) 80,0 g/L σακχαρόζης (0,23 M).
- ε) 160,0 g/L σακχαρόζης (0,45 M).

Το βασικό θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης ήταν το OMc με 25,0 μM IBA, 2,5 μM 2iP και την εκάστοτε συγκέντρωση σακχαρόζης. Το θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης ήταν το OMc χωρίς φυτοαυξητικές ουσίες και την ίδια συγκέντρωση σακχαρόζης με το θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης.

Στα γραφήματα της εικόνας 7(A) απεικονίζονται τα τελικά ποσοστά σωματικής εμβρυογένεσης που προέκυψαν στις πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις σακχαρόζης. Στα γραφήματα της εικόνας 7(B) παρουσιάζεται το χρονοδιάγραμμα της εμφάνισης των σωματικών εμβρύων στα 40,0 g/L και στα 160,0 g/L σακχαρόζης, από την ημέρα του εμβολιασμού μέχρι και 40 ημέρες μετά τη μεταφορά των κάλλων στο θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης.

Από τα γραφήματα της εικόνας 7(A) γίνεται σαφές ότι η σωματική εμβρυογένεση αναστελλόταν δραστικά στα 5,0 g/L σακχαρόζης, παρέμενε σε επίπεδα ανάλογα με του πειράμα-

τος-μάρτυρα στα 40,0 g/L και 80,0 g/L σακχαρόζης, ενώ στα 160,0 g/L σακχαρόζης καταγραφόταν μια εντυπωσιακή εκτόξευση του ποσοστού της.



Εικόνα 7(A): Σωματική εμβρυογένεση (%) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις σακχαρόζης.

Ριζίδια ώριμων ζυγωτικών εμβρύων εμβολιάζονταν, για 21 ημέρες, σε ΟΜς καλλογένεσης, που περιείχε 25,0 μ M IBA, 2,5 μ M 2iP και 0,01 / 0,06 / 0,12 / 0,23 ή 0,45 M σακχαρόζη. Οι κάλλοι μεταφέρονταν σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης και με συγκέντρωση σακχαρόζης ίδια με του θρεπτικού μέσου καλλογένεσης. Τα ποσοστά, που αναγράφονται, καταγράφονταν μετά από παραμονή των κάλλων σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης για δύο μήνες. Οι τιμές, που προέκυψαν σε όλες τις συγκεντρώσεις αποτελούν το μέσο όρο τριών πειραμάτων, ενώ για τη συγκέντρωση 0,45 M σακχαρόζη έξι πειραμάτων.

Από τα γραφήματα της εικόνας 7(B) γίνεται φανερό ότι στο θρεπτικό υπόστρωμα με 160,0 g/L σακχαρόζης τα πρώτα σωματικά έμβρυα εμφανίζονταν, ενώ οι κάλλοι βρίσκονταν ακόμα στο θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης (14 μόλις ημέρες μετά τον εμβολιασμό) κάτι που δεν έχει καταγραφεί σε κανέναν άλλο πειραματικό χειρισμό. Πιο συγκεκριμένα την ημέρα μεταφοράς των κάλλων από το θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης στο θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης καταγράψαμε ήδη ένα υψηλό ποσοστό (20,0%) σωματικών εμβρύων.

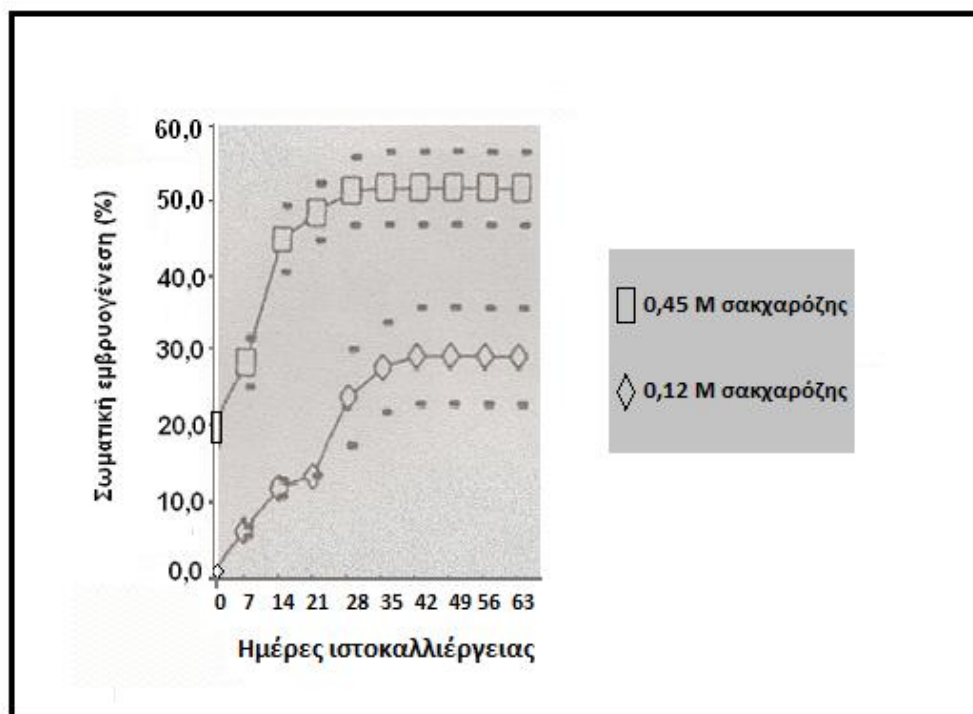
Αντίθετα στα 40,0 g/L σακχαρόζης τα πρώτα σωματικά έμβρυα εμφανίζονταν στο θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης και το τελικό ποσοστό ήταν χαμηλότερο συγκριτικά με το πείραμα των 160,0 g/L σακχαρόζης [Εικόνα 7(A)].

Αξιομνημόνευτη είναι η μορφολογία τόσο των κάλλων όσο και των σωματικών εμβρύων που προκύπταν στα παραπάνω θρεπτικά υποστρώματα.

Οι κάλλοι που επάγονταν σε 5,0 g/L σακχαρόζης ήταν πολύ μικροί και στρογγυλοί. Οι περισσότεροι νεκρώνονταν, ενώ βρίσκονταν ακόμα στο θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης και οι υπόλοιποι μετά από παραμονή τριών εβδομάδων στο θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης.

Οι κάλλοι του πειράματος-μάρτυρα (20,0 g/L σακχαρόζης), ήταν ευμεγέθεις, συμπαγείς και έντονα πράσινοι. Οι κάλλοι που επάγονταν σε 40,0 g/L και 80,0 g/L σακχαρόζης είχαν ανάλογη εμφάνιση και ανάλογα ποσοστά επαγωγής ριζών με τους κάλλους-μάρτυρες αν και η επιμήκυνση των επαγόμενων ριζών ήταν πολύ μεγαλύτερη.

Οι κάλλοι που επάγονταν σε 160,0 g/L σακχαρόζης είχαν το μικρότερο μέγεθος από όλους τους υπόλοιπους.

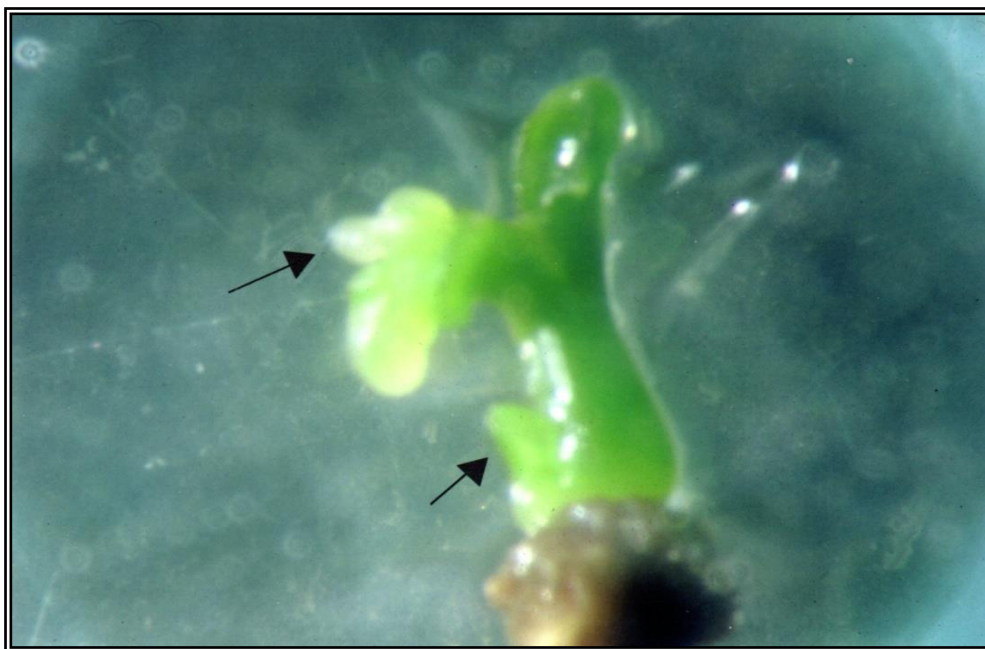


Εικόνα 7(B): Σωματική εμβρυογένεση (%) σε 0,12 M και 0,45 M σακχαρόζη.

Ριζίδια ώριμων ζυγωτικών εμβρύων εμβολιάζονταν, για 21 ημέρες, σε OMc καλλογένεσης, που περιείχε 0,12 M ή 0,45 M σακχαρόζη. Οι φυτοαυξητικοί παράγοντες και των δύο θρεπτικών υποστρωμάτων καλλογένεσης ήταν 25,0 μM IBA και 2,5 μM 2iP. Οι κάλλοι μεταφέρονταν σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης, δηλαδή OMc χωρίς φυτοαυξητικούς παράγοντες και με συγκέντρωση σακχαρόζης ίδια με του θρεπτικού μέσου καλλογένεσης. Τα ποσοστά, που αναγράφονται, καταγράφηκαν 40 ημέρες μετά τη μεταφορά των κάλλων στο θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τριών πειραμάτων για τα 0,12 M σακχαρόζη και έξι πειραμάτων για τα 0,45 M σακχαρόζη.

Τα σωματικά έμβρυα, που διαφοροποιούνταν από όλα τα είδη κάλλων, ήταν υπόλευκα και εμφανίζονταν σε ομάδες («μπουκέτα») στην επιφάνεια των κάλλων. Εξαίρεση αποτελούσαν τα σωματικά έμβρυα που διαμορφώνονταν στην επιφάνεια των κάλλων του πειράματος-μάρτυρα, τα οποία ήταν πράσινα και μεμονωμένα. Σποραδικά και σε πολύ μικρά ποσοστά καταγράφηκε και η ανάπτυξη δευτερογενών σωματικών εμβρύων (Φωτογραφία 5).

Ανακεφαλαιώνοντας ήταν ξεκάθαρη η επαγωγική μορφογενετική δράση των 160,0 g/L σακχαρόζης, καθώς σε αυτή τη συγκέντρωση προέκυψαν τα υψηλότερα ποσοστά σωματικής εμβρυογένεσης και πολύ γρηγορότερα συγκριτικά με τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις σακχαρόζης.



Φωτογραφία 5: Επαγωγή δευτερογενών σωματικών εμβρύων.

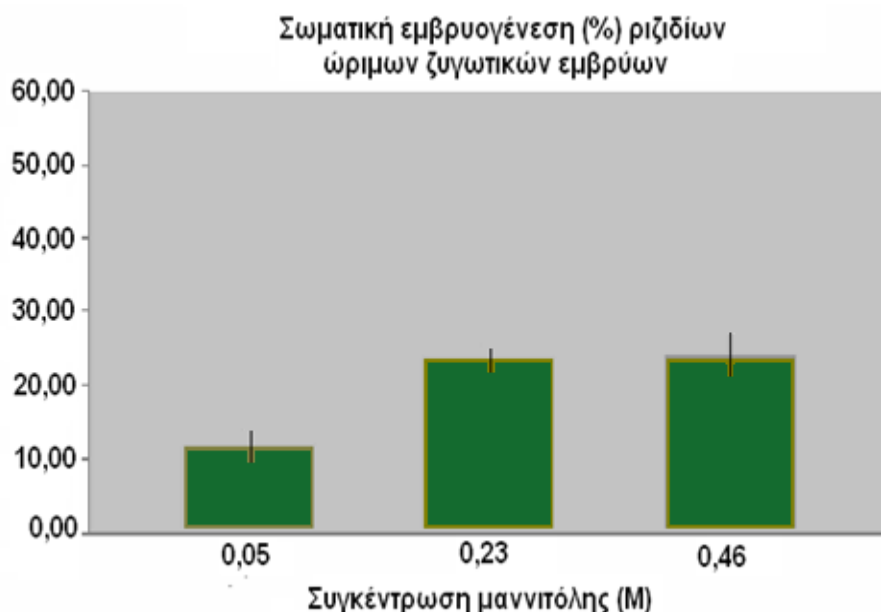
Στη βάση του πρωτογενούς σωματικού εμβρύου διακρίνεται ο νεκρός, πλέον, κάλλος από τον οποίο προήλθε, καθώς και απαρχή δευτερογενούς σωματικού εμβρύου (κάτω βέλος). Διακρίνεται απαρχή δευτερογενούς σωματικού εμβρύου και από την κοτυληδόνα-φύλλο του πρωτογενούς σωματικού εμβρύου (πάνω βέλος).

Δ. 7. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ & ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΜΑΝΝΙΤΟΛΗΣ

Μια πιθανή ερμηνεία της έντονης επαγωγικής δράσης της υψηλής συγκέντρωσης σακχαρόζης θα ήταν το υψηλό ωσμωτικό δυναμικό του θρεπτικού μέσου της ιστοκαλλιέργειας. Με σκοπό να εξακριβώσουμε την ισχύ αυτής της υπόθεσης, πραγματοποιήσαμε μια σειρά πειραμάτων, όπου ριζίδια ώριμων ζυγωτικών εμβρύων εμβολιάζονταν και παρέμεναν για 21 ημέρες σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης, δηλαδή ΟΜc με φυτοαυξητικές ουσίες 25,0 μ M IBA και 2,5 μ M 2iP, το οποίο δεν περιείχε σακχαρόζη αλλά μαννιτόλη στις εξής συγκεντρώσεις:

- α)** 10,0 g/L μαννιτόλη (0,05 M).
- β)** 42,0 g/L μαννιτόλη (0,23 M).
- γ)** 85,0 g/L μαννιτόλη (0,46 M).

Οι κάλλοι που προκύπταν, μεταφέρονταν και παρέμεναν για δύο μήνες σε θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης, δηλαδή ΟΜc που περιείχε συγκέντρωση μαννιτόλης ίση με του θρεπτικού μέσου καλλογένεσης, αλλά χωρίς φυτοαυξητικούς παράγοντες.



Εικόνα 8: Σωματική εμβρυογένεση (%) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις μαννιτόλης.

Ριζίδια ώριμων ζυγωτικών εμβρύων εμβολιάζονταν, για 21 ημέρες, σε ΟΜc καλλογένεσης, που περιείχε 25,0 μ M IBA, 2,5 μ M 2iP και 0,05 M / 0,23 M ή 0,46 M μαννιτόλη αντί σακχαρόζης. Τα ποσοστά, που αναγράφονται, καταγράφηκαν μετά από μεταφορά και παραμονή των κάλλων σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης για δύο μήνες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τριών-τεσσάρων πειραμάτων.

Από τις γραφικές παραστάσεις της εικόνας 8 διαπιστώνουμε ότι τα ποσοστά επαγωγής σωματικών εμβρύων ήταν ανάλογα με εκείνα που καταγράφονταν στο πείραμα-μάρτυρα. Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι η επαγωγή υψηλού ποσοστού σωματικής εμβρυογένεσης σε θρεπτικό υπόστρωμα με υψηλή συγκέντρωση σακχαρώδους δεν πρέπει να σχετίζεται με το αυξημένο ωσμωτικό δυναμικό του θρεπτικού υποστρώματος.

Δ.8. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ & ΦΥΤΟΑΥΞΗΤΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ

Δ.8.1. ΕΞΑΡΤΗΣΗ ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΑΥΞΙΝΗ

Οι αυξίνες είναι φυτοαυξητικοί παράγοντες που προωθούν την κυτταρική διαίρεση, τη μεγέθυνση και την επιμήκυνση των φυτικών ιστών. Η μορφογενετική δράση των αυξινών καθιστά αναγκαία την προσθήκη τους στο αρχικό θρεπτικό υπόστρωμα των ιστοκαλλιιεργειών, προκειμένου να επαχθεί και να προωθηθεί επιτυχώς η καλλογένεση *in vitro*. Η προσθήκη υψηλών συγκεντρώσεων αυξίνης στο θρεπτικό μέσο καλλογένεσης είναι απαραίτητη για την πρόκληση της αποδιαφοροποίησης και την απόκτηση της ολοδυναμίας από τους φυτικούς ιστούς της ιστοκαλλιέργειας. Η απομάκρυνση των αυξινών από το θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης, όπως εφαρμόστηκε στην παρούσα διδακτορική εργασία, ή η προσθήκη μειωμένης συγκέντρωσης αυξίνης είναι απαραίτητη για την επαγωγή σωματικών εμβρύων.

Στο πλαίσιο της διερεύνησης της επίδρασης των αυξινών στις ιστοκαλλιέργειες εκφύτων, από ώριμα ζυγωτικά έμβρυα ελιάς, χρησιμοποιήθηκαν τρία είδη αυξινών σε διάφορες συγκεντρώσεις. Συγκεκριμένα ριζίδια ώριμων ζυγωτικών εμβρύων εμβολιάζονταν σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης, δηλαδή OMc με σταθερή συγκέντρωση κυτοκίνης 2,5 μM 2iP. Τα είδη των αυξινών και οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν, με βάση βιβλιογραφικά δεδομένα για τη μορφογενετική επίδραση της κάθε αυξίνης, αναφέρονται στον πίνακα 5 του κεφαλαίου “Υλικά & Μέθοδοι”.

Παράλληλα πραγματοποιήθηκε ένα πείραμα-μάρτυρας στο οποίο τα ριζίδια εμβολιάζονταν σε OMc που περιείχε μόνο κυτοκίνη (2,5 μM 2iP) και καθόλου αυξίνη. Για τη διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων οι κάλλοι, όλων των πειραματικών χειρισμών, μεταφέρονταν και παρέμεναν για δύο μήνες στο θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης, δηλαδή OMc χωρίς φυτοαυξητικούς παράγοντες.

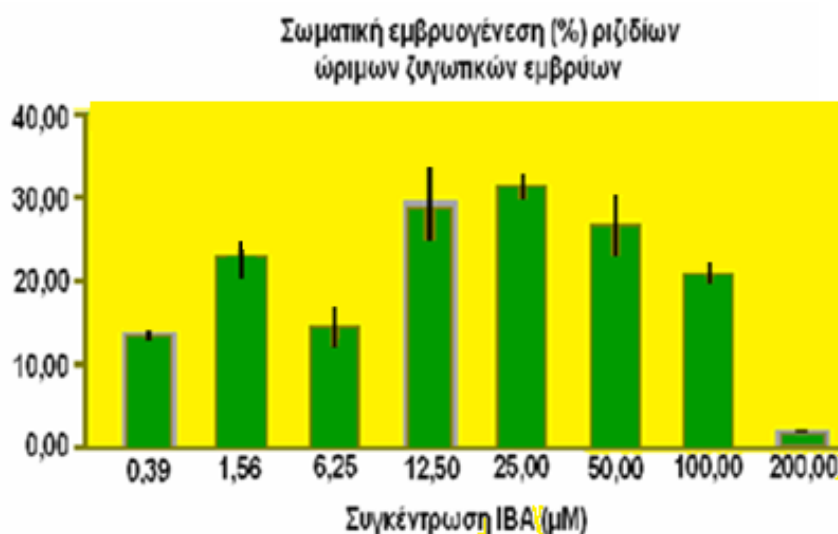
Δ.8.1.1. Εξάρτηση της σωματικής εμβρυογένεσης από το IBA**1.1. Έκφυτα ριζιδίων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων**

Ριζίδια ώριμων ζυγωτικών εμβρύων εμβολιάζονταν σε θρεπτικό υπόστρωμα ΟΜc καλλογένεσης που περιείχε 2,5 μM 2iP και μια από τις συγκεντρώσεις IBA, που αναγράφονται στον πίνακα 13.

Πίνακας 13: Συγκεντρώσεις IBA (μM) θρεπτικού μέσου καλλογένεσης.

Συγκέντρωση IBA (μM)							
0,39	1,56	6,25	12,5	25,0	50,0	100,0	200,0

Στις γραφικές παραστάσεις της εικόνας 9 απεικονίζονται τα τελικά ποσοστά σωματικής εμβρυογένεσης, που καταγράφονταν μετά από τη μεταφορά και την παραμονή των κάλλων στο θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης, δηλαδή ΟΜc χωρίς φυτοαυξητικές ουσίες, για δύο μήνες.



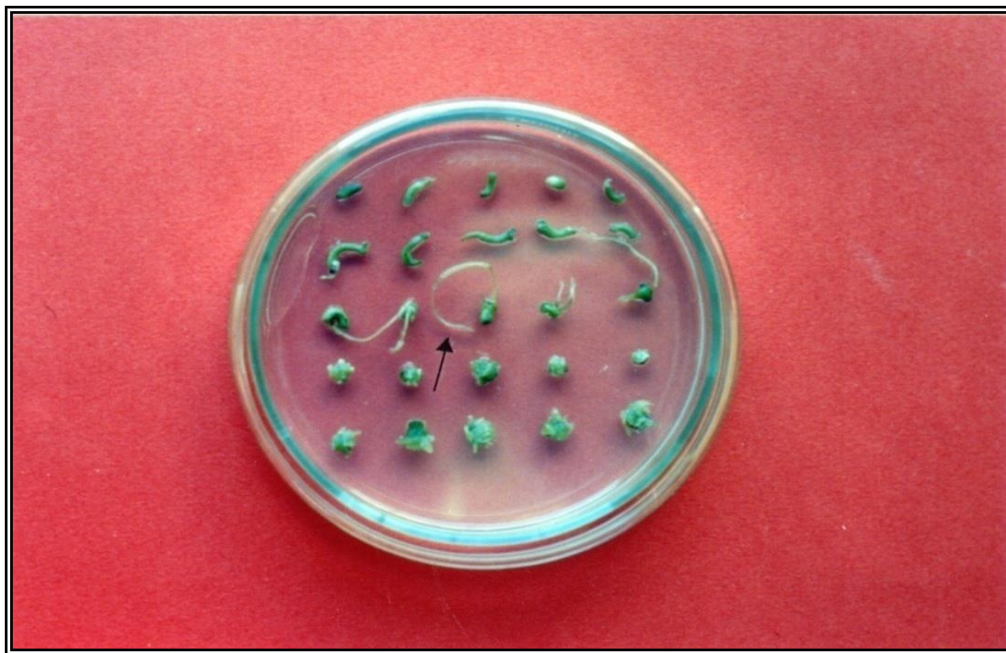
Εικόνα 9: Σωματική εμβρυογένεση (%) ριζιδίων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις IBA.

Τα έκφυτα εμβολιάζονταν, για 21 ημέρες, σε ΟΜc καλλογένεσης, που περιείχε 2,5 μM 2iP και 0,39 / 1,56 / 6,25 / 12,5 / 25,0 / 50,0 / 100,0 ή 200,0 μM IBA. Τα ποσοστά, που αναγράφονται, καταγράφηκαν μετά από μεταφορά και παραμονή των κάλλων σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης για δύο μήνες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τεσσάρων-πέντε πειραμάτων.

Στις συγκεντρώσεις 0,39 / 1,56 και 6,25 μM IBA τα έκφυτα ριζιδίων επιμηκύνονταν και διογκώνονταν, δηλαδή παρατηρήθηκε οργανοκαλλιέργεια (Φωτογραφία 6). Ως εκ τούτου η

σωματική εμβρυογένεση που καταγράφηκε ήταν *άμεση* και το υψηλότερο ποσοστό (23,0%) καταγράφηκε στη συγκέντρωση 1,56 μM IBA.

Στις συγκεντρώσεις 12,5 / 25,0 / 50,0 / 100,0 και 200,0 μM IBA τα έκφυτα ριζιδίων μετατρέπονταν σε συμπαγείς κάλλους των οποίων το χρώμα ήταν βαθύ πράσινο, αλλά γινόταν όλο και πιο ανοιχτό πράσινο όσο αυξανόταν η συγκέντρωση του IBA (Φωτογραφία 6). Τα ποσοστά καλλογένεσης μέχρι και τα 100,0 μM IBA κυμαίνονταν σε υψηλά επίπεδα (90,0% - 95,0%), ενώ στα 200,0 μM IBA η καλλογένεση περιοριζόταν αισθητά (55,0%) και τα σημεία νέκρωσης στην επιφάνεια των κάλλων ήταν πολύ εμφανή.



Φωτογραφία 6: Κάλλοι, 21 ημερών, ριζιδίων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων.

Τα ριζίδια εμβολιάζονταν, για 21 ημέρες, σε ΟΜς καλλογένεσης, που περιείχε 2,5 μM 2iP και IBA στις εξής συγκεντρώσεις:

1. 0,39 μM (1^η σειρά από πάνω).
2. 1,56 μM (2^η σειρά από πάνω).
3. 6,25 μM (3^η σειρά από πάνω).
4. 25,0 μM (4^η σειρά από πάνω).
5. 50,0 μM (5^η σειρά από πάνω).

Διακρίνεται οργανοκαλλιέργεια και έντονη ριζογένεση (1-3) και καλλογένεση (4-5).

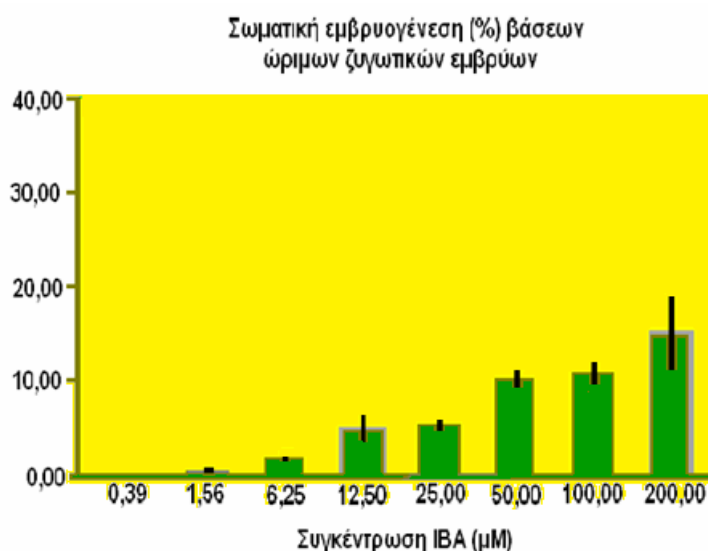
Τα σωματικά έμβρυα στις συγκεντρώσεις 12,5 / 25,0 / 50,0 / 100,0 και 200,0 μM IBA προκύπταν από διαφοροποίηση κυττάρων των κάλλων, δηλαδή επρόκειτο για *έμμεση σωματική εμβρυογένεση*. Το υψηλότερο ποσοστό καταγράφηκε στη συγκέντρωση 25,0 μM IBA (31,0%), χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά από τα ποσοστά των συγκεντρώσεων 12,5

μM και 50,0 μM IBA. Στα 100,0 μM IBA τα ποσοστά σωματικής εμβρυογένεσης μειώνονταν σημαντικά, ενώ στα 200,0 μM IBA σχεδόν μηδενίζονταν (2,5%).

1.2. Έκφυτα βάσεων & κορυφών κοτυληδόνων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων

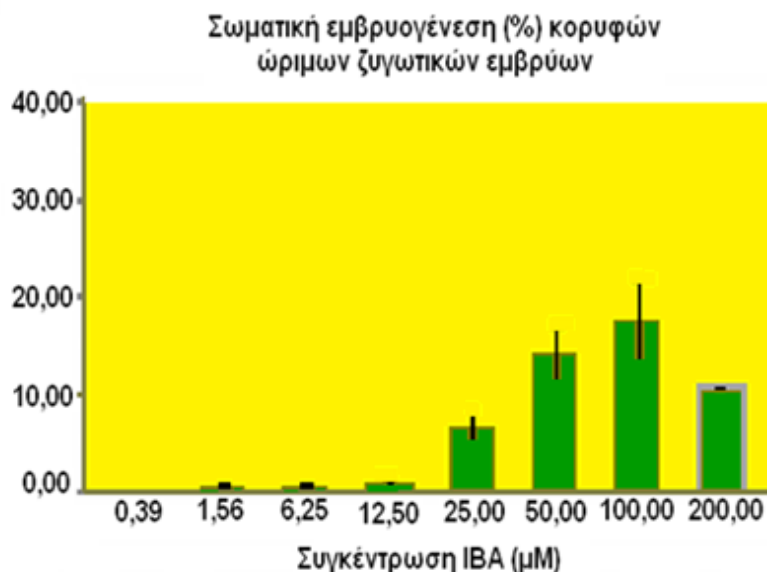
Βάσεις και κορυφές κοτυληδόνων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων εμβολιάζονταν σε θρεπτικό υπόστρωμα OMc καλλογένεσης που περιείχε σταθερή συγκέντρωση κυτοκινίνης (2,5 μM 2iP) και μια από τις συγκεντρώσεις IBA, που αναγράφονται στον πίνακα 13.

Στις γραφικές παραστάσεις των εικόνων 10 και 11 απεικονίζονται τα τελικά ποσοστά σωματικής εμβρυογένεσης που καταγράφονταν μετά από τη μεταφορά και την παραμονή των κάλλων στο θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης, δηλαδή θρεπτικό υπόστρωμα OMc χωρίς φυτοαυξητικές ουσίες, για δύο μήνες.



Εικόνα 10: Σωματική εμβρυογένεση (%) βάσεων κοτυληδόνων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις IBA.

Τα έκφυτα εμβολιάζονταν, για 21 ημέρες, σε OMc καλλογένεσης, που περιείχε 2,5 μM 2iP και 0,39 / 1,56 / 6,25 / 12,5 / 25,0 / 50,0 / 100,0 ή 200,0 μM IBA. Τα ποσοστά, που αναγράφονται, καταγράφηκαν μετά από μεταφορά και παραμονή των κάλλων σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης για δύο μήνες. Τα ποσοστά αποτελούν το μέσο όρο τριών-τεσσάρων πειραμάτων.



Εικόνα 11: Σωματική εμβρυογένεση (%) κορυφών κοτυληδόνων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις IBA.

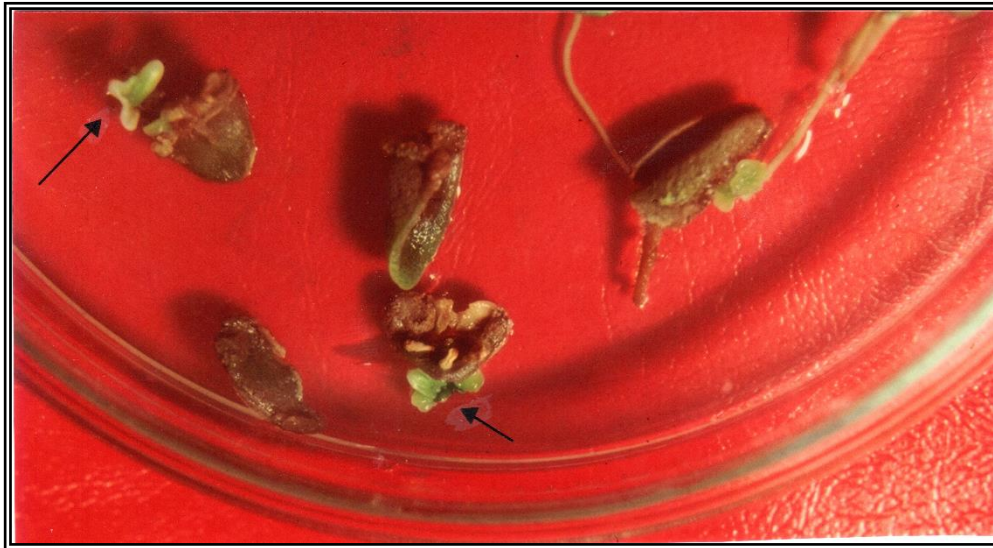
Τα έκφυτα εμβολιάζονταν, για 21 ημέρες, σε ΟΜς καλλογένεσης, που περιείχε 2,5 μM 2iP και 0,39 / 1,56 / 6,25 / 12,5 / 25,0 / 50,0 / 100,0 ή 200,0 μM IBA. Τα ποσοστά, που αναγράφονται, καταγράφηκαν μετά από μεταφορά και παραμονή των κάλλων σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης για δύο μήνες. Τα ποσοστά αποτελούν το μέσο όρο τριών-τεσσάρων πειραμάτων.

Στα έκφυτα βάσεων και κορυφών κοτυληδόνων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων και στις συγκεντρώσεις 0,39 / 1,56 και 6,25 μM IBA καταγράφηκε οργανοκαλλιέργεια, όπως και στα ριζίδια ώριμων ζυγωτικών εμβρύων. Αντίθετα στις συγκεντρώσεις 12,5 / 25,0 / 50,0 και 100,0 μM IBA πραγματοποιήθηκε καλλογένεση σε υψηλό ποσοστό (95,0%), ενώ στα 200,0 μM IBA περιορίστηκε αισθητά (λιγότερο από 50,0%) (Φωτογραφίες 7 & 8).

Στα έκφυτα βάσεων κοτυληδόνων παρατηρήθηκε μια αυξητική τάση διαφοροποίησης σωματικών εμβρύων από τα 12,5 μM (5,0%) μέχρι τα 200,0 μM IBA (15,0%) που ήταν και η δραστικότερη συγκέντρωση. Στα έκφυτα κορυφών κοτυληδόνων καταγράφηκε αυξητική τάση διαφοροποίησης σωματικών εμβρύων από τα 12,5 μM IBA (2,0%) μέχρι τα 100,0 μM IBA (17,0%) και πτώση στα 200,0 μM IBA (11,0%). Τα συγκεντρωτικά συμπεράσματα από τα παραπάνω πειραματικά αποτελέσματα είναι:

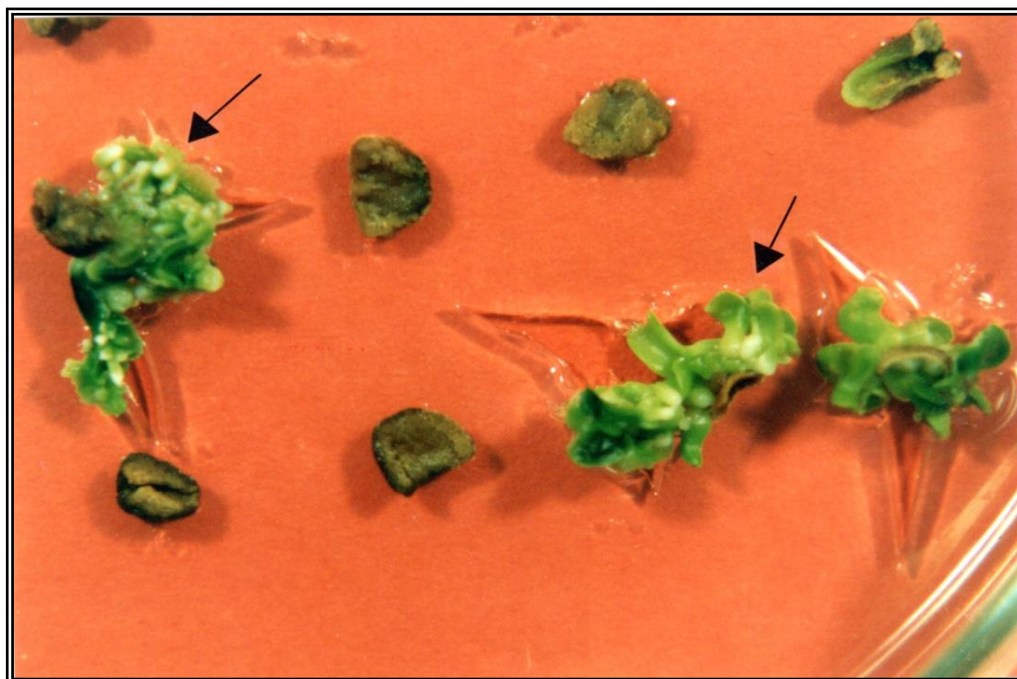
1. Η άμεση σωματική εμβρυογένεση από έκφυτα κοτυληδόνων δεν ήταν εφικτή. Η εμβρυογενετική αντίδραση στις χαμηλές συγκεντρώσεις (0,39 / 1,56 και 6,25 μM IBA), στις οποίες δεν διαμορφώνονταν κάλλοι, δεν ξεπερνούσε τα 2,5% και αυτό στην υψηλότερη συγκέντρωση (6,25 μM IBA).

2. Η έμμεση σωματική εμβρυογένεση από έκφυτα κοτυληδόνων ήταν δυνατή σε υψηλότερα ποσοστά συγκρινόμενα με τα ποσοστά της άμεσης σωματικής εμβρυογένεσης. Η εμβρυογενετική αντίδραση στις υψηλές συγκεντρώσεις (12,5 / 25,0 / 50,0 / 100,0 και 200,0 μM IBA), στις οποίες διαμορφώνονταν κάλλοι, έφτανε το 17,0% στη συγκέντρωση 100,0 μM IBA.



Φωτογραφία 7: Κάλλοι βάσεων κοτυληδόνων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων.

Οι βάσεις εμβολιάζονταν, για 21 ημέρες, σε OMc καλλογένεσης, που περιείχε 2,5 μM 2iP και 100,0 μM IBA και μεταφέρονταν σε OMc διαφοροποίησης. Στην εικόνα είναι εμφανής η νέκρωση των κάλλων και η επαγωγή τόσο μεμονωμένων σωματικών εμβρύων (πάνω βέλος), όσο και πολλαπλών σωματικών εμβρύων με μορφή «μπουκέτων» (κάτω βέλος).



Φωτογραφία 8: Κάλλοι κορυφών ώριμων ζυγωτικών εμβρύων.

Οι κορυφές εμβολιάζονταν, για 21 ημέρες, σε ΟΜς καλλογένεσης, που περιείχε 2,5 μM 2iP και 100,0 μM IBA και μεταφέρονταν σε ΟΜς διαφοροποίησης. Διακρίνεται η επαγωγή πολλαπλών σωματικών εμβρύων με μορφή «μπουκέτων».

Δ.8.1.2. Εξάρτηση της σωματικής εμβρυογένεσης από το NAA

2.1. Έκφυτα ριζιδίων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων

Ριζίδια ώριμων ζυγωτικών εμβρύων εμβολιάζονταν σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης, δηλαδή ΟΜς που περιείχε 2,5 μM 2iP και μια από τις συγκεντρώσεις NAA, που αναγράφονται στον πίνακα 14.

Πίνακας 14: Συγκεντρώσεις NAA θρεπτικού μέσου καλλογένεσης (μM).

Συγκέντρωση NAA (μM)						
0,10	0,39	1,56	6,25	12,5	25,0	50,0

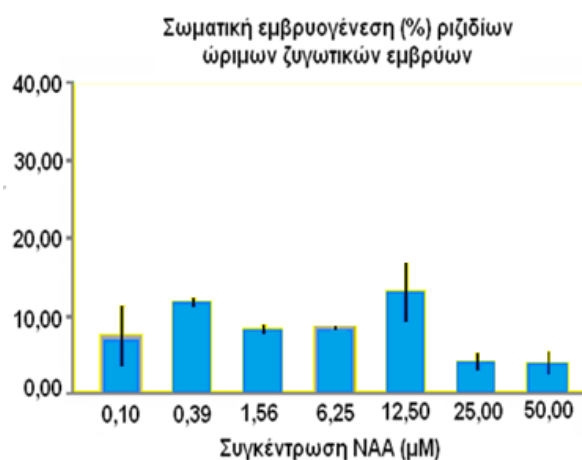
Στο γράφημα της εικόνας 12 απεικονίζονται τα τελικά ποσοστά σωματικής εμβρυογένεσης που καταγράφονταν μετά από τη μεταφορά και την παραμονή των κάλλων στο θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης, δηλαδή ΟΜς χωρίς φυτοαυξητικές ουσίες, για δύο μήνες.

Στις συγκεντρώσεις 0,1 / 0,39 / 1,56 και 6,25 μM NAA δεν καταγράφηκε δημιουργία κάλλου, καθώς τα ριζίδια διογκώνονταν και επιμηκυνόταν. Από το ακραίο τους τμήμα, το όμορο με το ριζικό μερίστωμα, διαμορφώνονταν ρίζες και από το υποακραίο τους τμήμα, που γειτνιάζε με τις κοτυληδόνες, διαμορφώνονταν βλαστοί.

Τα ποσοστά επαγωγής άμεσης, λόγω μη επαγωγής κάλλου, σωματικής εμβρυογένεσης στις συγκεντρώσεις (0,1 / 0,39 / 1,56 και 6,25 μM NAA) ήταν χαμηλότερα (7,0% - 12,0%) συγκριτικά με εκείνα των αντίστοιχων συγκεντρώσεων IBA.

Στις συγκεντρώσεις 12,5 / 25,0 και 50,0 μM NAA καταγράφηκε δημιουργία κάλλου. Οι κάλλοι που διαμορφώνονταν παρουσία NAA ήταν λιγότερο πράσινοι από τους κάλλους που διαμορφώνονταν παρουσία IBA και περισσότερο πράσινοι από τους κάλλους που διαμορφώνονταν παρουσία 2,4-D.

Τα ποσοστά έμμεσης, λόγω επαγωγής κάλλου, σωματικής εμβρυογένεσης στις υψηλότερες συγκεντρώσεις (12,5 / 25,0 και 50,0 μM NAA) διατηρήθηκαν στα ίδια επίπεδα με εκείνα των μικρότερων συγκεντρώσεων NAA (13,0%) μόνο στα 12,5 μM NAA, ενώ στα 25,0 μM και 50,0 μM NAA μειώθηκαν δραστικά (4,0%).



Εικόνα 12: Σωματική εμβρυογένεση (%) σε ριζίδια ώριμων ζυγωτικών εμβρύων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις NAA.

Τα έκφυτα εμβολιάζονταν, για 21 ημέρες, σε ΟΜc καλλογένεσης, που περιείχε 2,5 μM 2iP και 0,1 / 0,39 / 1,56 / 6,25 / 12,5 / 25,0 ή 50,0 μM NAA. Τα ποσοστά σωματικής εμβρυογένεσης καταγράφηκαν μετά από μεταφορά και παραμονή των κάλλων σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης για δύο μήνες.

Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τεσσάρων-πέντε πειραμάτων.

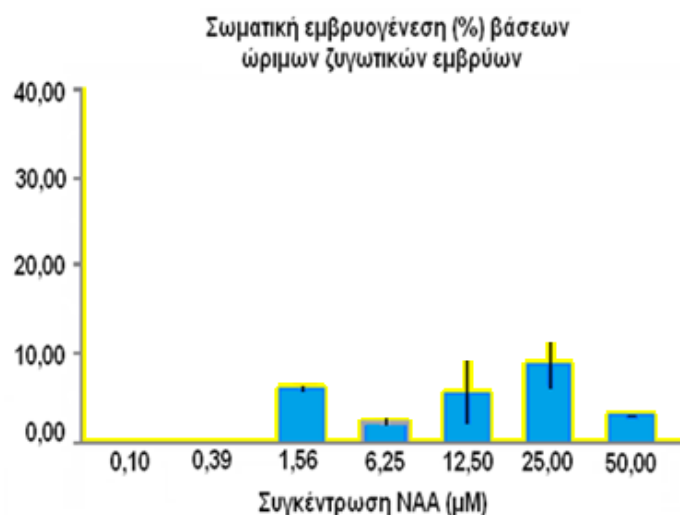
2.2. Έκφυτα βάσεων & κορυφών κοτυληδόνων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων

Βάσεις και κορυφές κοτυληδόνων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων εμβολιάζονταν σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης, δηλαδή OMc που περιείχε 2,5 μM 2iP και μια από τις συγκεντρώσεις NAA, που αναγράφονται στον πίνακα 14.

Στις γραφικές παραστάσεις των εικόνων 13 και 14 απεικονίζονται τα τελικά ποσοστά σωματικής εμβρυογένεσης που καταγράφονταν μετά από τη μεταφορά και την παραμονή των κάλλων στο θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης, δηλαδή OMc χωρίς φυτοαυξητικές ουσίες, για δύο μήνες.

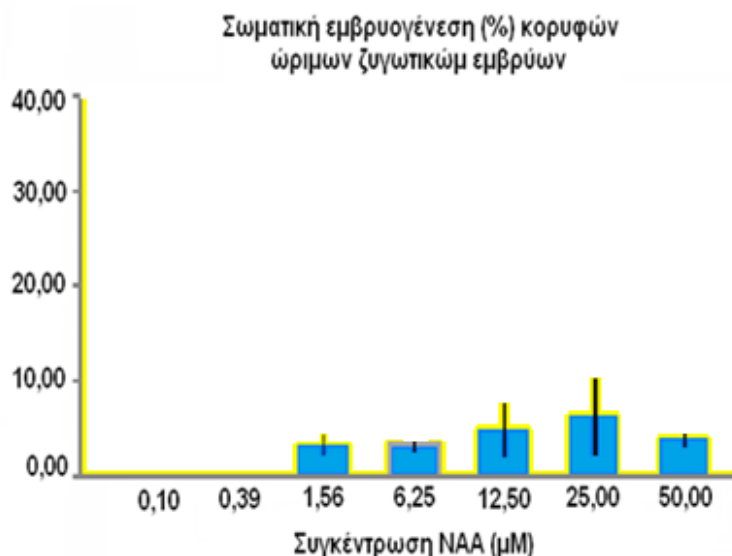
Στα έκφυτα βάσεων και κοτυληδόνων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων στις συγκεντρώσεις 0,1 και 0,39 μM NAA δε διαφοροποιήθηκαν σωματικά έμβρυα, ενώ στις συγκεντρώσεις 1,56 και 6,25 μM NAA καταγράφηκε περιορισμένη επαγωγή (2,5% - 5,0%) άμεσης, λόγω μη επαγωγής κάλλου, σωματικής εμβρυογένεσης.

Στις συγκεντρώσεις 12,5 / 25,0 και 50,0 μM NAA καταγράφηκε δημιουργία κάλλου, αλλά η επαγωγή σωματικών εμβρύων ήταν πολύ περιορισμένη. Το υψηλότερο ποσοστό έμμεσης σωματικής εμβρυογένεσης προέκυψε στα 25,0 μM NAA (8,5%), ενώ στα 50,0 μM NAA ανεστάλη δραστικά (2,5%).



Εικόνα 13: Σωματική εμβρυογένεση (%) βάσεων κοτυληδόνων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις NAA.

Τα έκφυτα εμβολιάζονταν, για 21 ημέρες, σε OMc καλλογένεσης, που περιείχε 2,5 μM 2iP και 0,1 / 0,39 / 1,56 / 6,25 / 12,5 / 25,0 ή 50,0 μM NAA. Τα ποσοστά, που αναγράφονται, καταγράφονταν μετά από μεταφορά και παραμονή των κάλλων σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης για δύο μήνες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τριών-τεσσάρων πειραμάτων.



Εικόνα 14: Σωματική εμβρυογένεση (%) κορυφών κοτυληδόνων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις NAA.

Τα έκφυτα εμβολιάζονταν, για 21 ημέρες, σε ΟΜc καλλογένεσης, που περιείχε 2,5 μM 2iP και 0,1 / 0,39 / 1,56 / 6,25 / 12,5 / 25,0 ή 50,0 μM NAA. Τα ποσοστά, που αναγράφονται, καταγράφονταν μετά από μεταφορά και παραμονή των κάλλων σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης για δύο μήνες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τριών-τεσσάρων πειραμάτων.

Δ.8.1.3. Εξάρτηση της σωματικής εμβρυογένεσης από το 2,4-D

3.1. Έκφυτα ριζιδίων, βάσεων & κορυφών κοτυληδόνων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων

Ριζίδια, βάσεις και κορυφές κοτυληδόνων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων εμβολιάζονταν σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης, δηλαδή ΟΜc που περιείχε 2,5 μM 2iP και μια από τις συγκεντρώσεις 2,4-D, που αναγράφονται στον πίνακα 15.

Πίνακας 15: Συγκεντρώσεις 2,4-D (μM) θρεπτικού μέσου καλλογένεσης.

Συγκέντρωση 2,4-D (μM)				
0,01	0,05	0,10	0,39	1,56

Στα γραφήματα των εικόνων 15, 16 και 17 απεικονίζονται τα τελικά ποσοστά σωματικής εμβρυογένεσης που καταγράφονταν μετά από τη μεταφορά και την παραμονή

των κάλλων στο θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης, δηλαδή ΟΜς χωρίς φυτοαυξητικές ουσίες, για δύο μήνες.

Στις συγκεντρώσεις 0,01 / 0,05 και 0,10 μM 2,4-D, ανεξαρτήτως εκφύτου, δεν παρατηρήθηκε καλλογένεση, αλλά οργανοκαλλιέργεια. Αντίθετα στις συγκεντρώσεις 0,39 και 1,56 μM 2,4-D από τα έκφυτα ριζιδίων αναπτύσσονταν κιτρινόχρωμοι και πολύ ανεπτυγμένοι κάλλοι και από τα έκφυτα βάσεων και κορυφών πράσινοι και ανοιχτοπράσινοι κάλλοι (Φωτογραφία 9) .



Φωτογραφία 9: Κάλλοι ριζιδίων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων.

Τα ριζίδια εμβολιάζονταν, για 21 ημέρες, σε ΟΜς που περιείχε 2,5 μM 2iP και 2,4-D στις εξής συγκεντρώσεις:

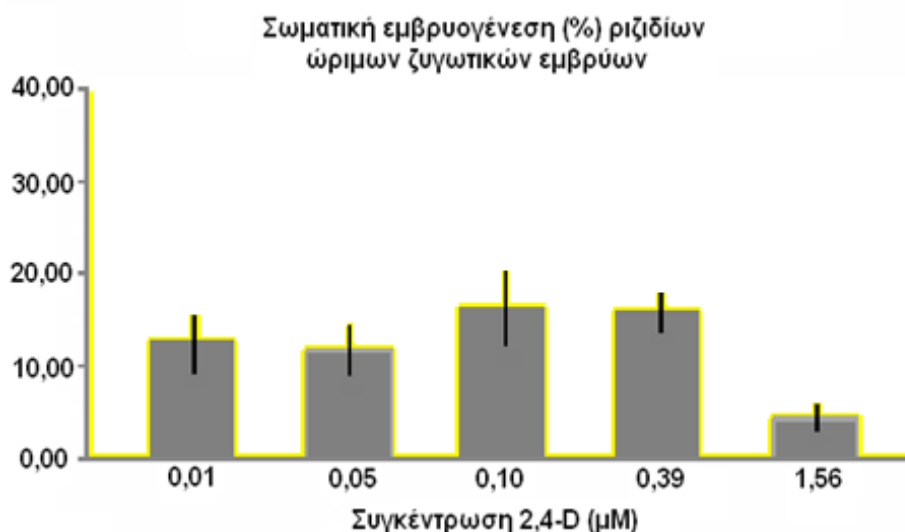
1. 0,01 μM (1^η σειρά από πάνω).
2. 0,05 μM (2^η σειρά από πάνω).
3. 0,10 μM (3^η σειρά από πάνω).
4. 0,39 μM (4^η σειρά από πάνω).
5. 1,56 μM (5^η σειρά από πάνω).

Διακρίνεται οργανοκαλλιέργεια και ριζογένεση (1-3) και καλλογένεση (4-5).

Στα έκφυτα ριζιδίων (Εικόνα 15) τα ποσοστά επαγωγής σωματικής εμβρυογένεσης ανεξαρτήτως συγκέντρωσης κυμαίνονταν σε χαμηλά επίπεδα (12,5% - 15,0%), ενώ ανεστάλη δραστικά στα 1,56 μM 2,4-D (4,0%).

Στα έκφυτα βάσεων και κορυφών κοτυληδόνων (Εικόνα 16 και 17) η σωματική εμβρυογένεση ανεστάλη πλήρως. Ελάχιστη διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων καταγράφηκε στα έκφυτα βάσεων στα 0,39 μM 2,4-D (2,0%).

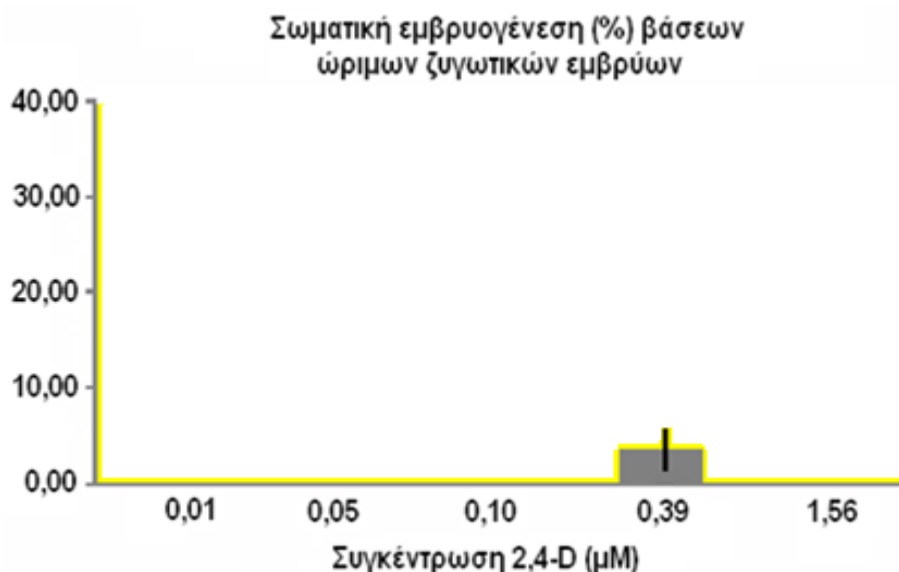
Είναι σκόπιμο στο σημείο αυτό να αναφερθεί ότι δοκιμάστηκε και η συγκέντρωση 6,25 μM 2,4-D η οποία δεν παρουσιάζεται στα γραφήματα των εικόνων 15 - 17. Στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες προκύπταν κάλλοι χρώματος ανοιχτού πράσινου έως ανοιχτού κίτρινου οι οποίοι νεκρώνονταν, πολύ γρήγορα, σε ποσοστό μέχρι και 85,0%. Η νέκρωση των περισσότερων κάλλων, ήδη στο θρεπτικό μέσο καλλογένεσης και των υπόλοιπων στο θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης, δεν επέτρεπε την περαιτέρω διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων.



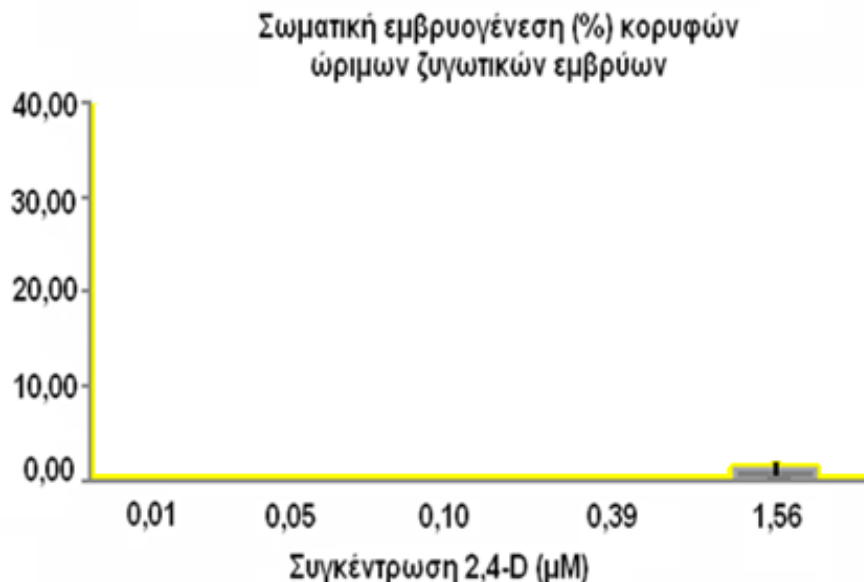
Εικόνα 15: Σωματική εμβρυογένεση (%) ριζιδίων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις 2,4-D.

Τα έκφυτα εμβολιάζονταν, για 21 ημέρες, σε ΟΜς καλλογένεσης, που περιείχε 2,5 μM 2iP και 0,01 / 0,05 / 0,1 / 0,39 ή 1,56 μM 2,4-D.

Τα ποσοστά, που αναγράφονται, καταγράφονταν μετά από μεταφορά και παραμονή των κάλλων σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης για δύο μήνες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τεσσάρων πειραμάτων.



Εικόνα 16: Σωματική εμβρυογένεση (%) βάσεων κοτυληδόνων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις 2,4-D. Τα έκφυτα εμβολιάζονταν, για 21 ημέρες, σε ΟΜς καλλογένεσης, που περιείχε 2,5 μM 2iP και 0,01 / 0,05 / 0,1 / 0,39 ή 1,56 μM 2,4-D. Τα ποσοστά, που αναγράφονται, καταγράφονταν μετά από μεταφορά και παραμονή των κάλλων σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης για δύο μήνες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τεσσάρων πειραμάτων.



Εικόνα 17: Σωματική εμβρυογένεση (%) κορυφών κοτυληδόνων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις 2,4-D. Τα έκφυτα εμβολιάζονταν, για 21 ημέρες, σε ΟΜς καλλογένεσης, που περιείχε 2,5 μM 2iP και 0,01 / 0,05 / 0,1 / 0,39 ή 1,56 μM 2,4-D. Τα ποσοστά, που αναγράφονται, καταγράφονταν μετά από μεταφορά και παραμονή των κάλλων σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης για δύο μήνες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τεσσάρων πειραμάτων.

Δ.8.1.4. Συγκριτικά αποτελέσματα μεταξύ των τριών αυξινών

Η πλειοψηφία των βιβλιογραφικών αναφορών καταδεικνύουν το 2,4-D σαν την αυξίνη με την πιο έντονη μορφογενετική δράση *in vitro*. Το 2,4-D χρησιμοποιείται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις από τις υπόλοιπες αυξίνες, καθώς οι υψηλές του συγκεντρώσεις προκαλούν νέκρωση των εκφύτων, γεγονός που πιστοποιήθηκε και από την πειραματική διάταξη που περιγράφεται σε προηγούμενη ενότητα.

Παράλληλα το NAA συνιστά, μετά το 2,4-D, την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη συνθετική αυξίνη με έντονη μορφογενετική δράση στις ιστοκαλλιέργειες.

Αντίθετα η χρήση του IBA δεν είναι γενικευμένη, καθώς δε θεωρείται αυξίνη με ισχυρή μορφογενετική δράση.

Τα αποτελέσματα της παρούσας πειραματικής ενότητας, όμως, έρχονται σε αντιδιαστολή με τις παραπάνω βιβλιογραφικές αναφορές.

Στο πείραμα-μάρτυρα, όπου τα θρεπτικά υποστρώματα δεν περιείχαν αυξίνη, το ποσοστό διαφοροποίησης σωματικών εμβρύων (14,0%) που καταγράψαμε στα έκφυτα ριζιδίων ήταν εντυπωσιακό και μη αναμενόμενο. Αντίθετα, στα έκφυτα βάσεων και κορυφών κοτυληδόνων η εμβρυογενετική αντίδραση ήταν μηδενική.

Οι αυξίνες 2,4-D και NAA, ανεξαρτήτως συγκέντρωσης, είχαν ανάλογη μορφογενετική δράση σε ιστοκαλλιέργειες εκφύτων ριζιδίων. Το ποσοστό διαφοροποίησης σωματικών εμβρύων δεν ξεπερνούσε το 15,0% (ποσοστό ανάλογο με το πείραμα-μάρτυρα) και μηδενιζόταν στις υψηλότερες συγκεντρώσεις. Στα έκφυτα βάσεων και κορυφών κοτυληδόνων μόνο μετά από παροχή NAA παρατηρήθηκε περιορισμένη επαγωγή σωματικών εμβρύων, ενώ παρουσία 2,4-D ανεστάλη, πλήρως, όπως και στο πείραμα-μάρτυρα.

Αντίθετα το IBA προωθούσε τη σωματική εμβρυογένεση σε υψηλότερα ποσοστά συγκριτικά με το NAA, το 2,4-D, αλλά και το πείραμα-μάρτυρα, σε ιστοκαλλιέργειες εκφύτων ριζιδίων. Η συγκέντρωση του IBA, εξάλλου, διαδραμάτιζε καθοριστικό ρόλο. Στις χαμηλές συγκεντρώσεις (0,39 / 1,56 και 6,25 μM IBA) η υψηλότερη επαγωγή σωματικών εμβρύων σε έκφυτα ριζιδίων διαμορφώθηκε στα 1,56 μM IBA (23,0% άμεση σωματική εμβρυογένεση), ενώ στις υψηλές συγκεντρώσεις (12,5 / 25,0 / 50,0 / 100,0 και 200,0 μM IBA) η μεγαλύτερη επαγωγή σωματικών εμβρύων διαμορφώθηκε στα 25,0 μM IBA (31,0% έμμεση σωματική εμβρυογένεση).

Αντίθετα τα ποσοστά σωματικών εμβρύων που καταγράφηκαν στα έκφυτα βάσεων και κορυφών κοτυληδόνων ήταν πολύ χαμηλά. Η μόνη αξιοσημείωτη επαγωγική δράση (15,0% έμμεση σωματική εμβρυογένεση) έλαβε χώρα στις υψηλές συγκεντρώσεις 50,0-100,0

και 200,0 μM IBA. Το ποσοστό αυτό είναι σημαντικό αν συγκριθεί με το μηδενικό ποσοστό του πειράματος-μάρτυρα.

Συμπερασματικά τόσο το NAA όσο και το 2,4-D, ανεξαρτήτως συγκέντρωσης και είδους εκφύτου, δεν επάγουν υψηλότερα ποσοστά σωματικής εμβρυογένεσης από εκείνα του πειράματος-μάρτυρα. Αντίθετα παρουσία IBA καταγράφηκαν πολύ υψηλότερα ποσοστά διαφοροποίησης σωματικών εμβρύων, σε όλα τα είδη των εκφύτων, ιδιαίτερα στις υψηλότερες συγκεντρώσεις.

Δ.8.2. ΕΞΑΡΤΗΣΗ ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΑΡΟΧΗ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ ΑΥΞΙΝΩΝ

Πολλαπλές είναι οι βιβλιογραφικές καταγραφές που αφορούν την αναγκαιότητα προσθήκης δύο αυξινών, ταυτόχρονα, στο θρεπτικό μέσο ιστοκαλλιέργειας, προκειμένου να επαχθεί η *in vitro* αναγέννηση, ιδιαίτερα των φυτικών ειδών που αντιστέκονται σε αυτή. Έχει προταθεί ότι η συγκεκριμένη αναγκαιότητα υποδεικνύει την ύπαρξη διαφορετικών θέσεων-στόχων των αυξινών.

Στην προσπάθειά μας για περαιτέρω αύξηση της εμβρυογενετικής αναγέννησης στην ελιά διερευνήθηκε και η εξάρτησή της από τη συνδυασμένη παροχή IBA και NAA στο θρεπτικό μέσο καλλογένεσης.

Επιλέχθηκε η φυτοαυξητική ουσία IBA, καθώς τα αποτελέσματα των προηγούμενων πειραματικών χειρισμών, κατέδειξαν ότι αποτελεί τη δραστικότερη αυξίνη για *in vitro* μορφογένεση της ελιάς. Το NAA προτιμήθηκε έναντι του 2,4-D, καθώς το NAA και το 2,4-D είχαν ανάλογη μορφογενετική δράση, αλλά το δεύτερο προκαλούσε νέκρωση των εκφύτων σε υψηλά ποσοστά.

Οι συνδυασμοί αυξινών που χρησιμοποιήθηκαν αναγράφονται στον πίνακα 16.

Τα κριτήρια επιλογής των συγκεκριμένων συγκεντρώσεων των δύο αυξινών ήταν τα εξής:

- Η αναγκαιότητα χρήσης χαμηλών συγκεντρώσεων IBA (0,78 μM και 1,56 μM IBA) και NAA (0,195 μM και 6,25 μM NAA), προκειμένου να προκληθεί οργανοκαλλιέργεια και όχι καλλογένεση και τελικά να επαχθεί άμεση σωματική εμβρυογένεση.
- Η αναγκαιότητα δοκιμής υψηλών συγκεντρώσεων IBA (12,5 μM και 25,0 μM IBA) και NAA (12,5 μM NAA), προκειμένου να επαχθεί καλλογένεση και στη συνέχεια έμμεση σωματική εμβρυογένεση.
- Ο πειραματισμός με υψηλότερες συγκεντρώσεις IBA και NAA δεν κρίθηκε σκόπιμο, καθώς η μεμονωμένη παροχή τους ανέστελλε δραστικά τη σωματική εμβρυογένεση.

Στις γραφικές παραστάσεις της εικόνας 18 απεικονίζονται τα τελικά ποσοστά σωματικής εμβρυογένεσης που καταγράφηκαν, μετά από τη μεταφορά και την παραμονή των κάλλων στο θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης, δηλαδή ΟΜc χωρίς φυτοαυξητικές ουσίες, για δύο μήνες.

Ο 1^{ος} και ο 2^{ος} συνδυασμός αυξινών προωθούσαν την οργανοκαλλιέργεια, καθώς τα ριζίδια επιμηκύνονταν και διογκώνονταν αισθητά. Στις συγκεκριμένες καλλιεργητικές συνθήκες τα ριζίδια, προς την πλευρά που γειτνιάζαν με τις κοτυληδόνες, διαμόρφωναν βλαστούς και χαμηλά ποσοστά άμεσης σωματικής εμβρυογένεσης (10,0% - 15,0%), δηλαδή ανάλογα του πειράματος-μάρτυρα.

Πίνακας 16: Συγκεντρώσεις συνδυασμών αυξινών (NAA και IBA) θρεπτικού μέσου καλλογένεσης.

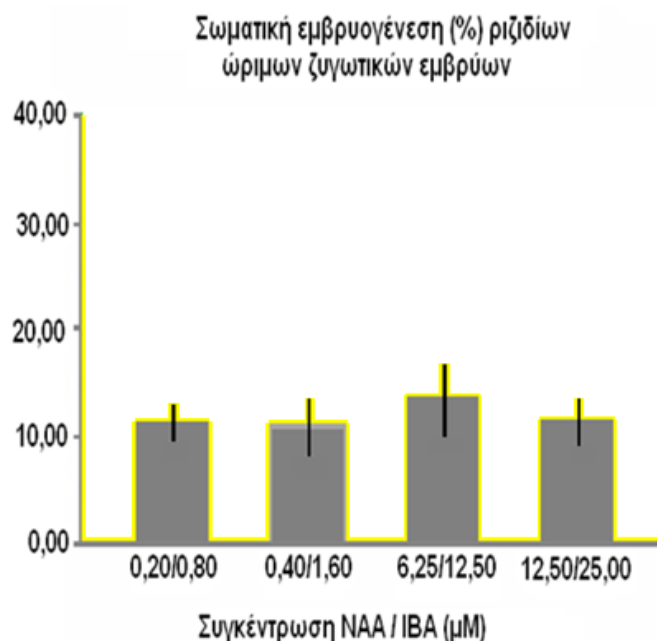
ΕΙΔΟΣ ΑΥΞΙΝΗΣ	1 ^{ος} ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ	2 ^{ος} ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ	3 ^{ος} ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ	4 ^{ος} ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ
NAA (μM)	0,195	0,39	6,25	12,5
IBA (μM)	0,78	1,56	12,5	25,0

Όπως έχει περιγραφεί, στις ενότητες Δ.8.1.1. και Δ.8.1.2., η αποκλειστική παροχή IBA και NAA, σε συγκεντρώσεις ανάλογες του 1^{ου} και 2^{ου} συνδυασμού αυξινών, είχε σαν αποτέλεσμα μέγιστο ποσοστό επαγωγής *άμεσης σωματικής εμβρυογένεσης* 23,0% και 12,0% αντίστοιχα. Γίνεται φανερό ότι η συνδυασμένη παροχή των δύο αυξινών, στις συγκεκριμένες συγκεντρώσεις, δεν κατέληξε σε αύξηση του ποσοστού άμεσης σωματικής εμβρυογένεσης

Ο 3^{ος} και ο 4^{ος} συνδυασμός αυξινών προωθούσαν τη δημιουργία κάλλου. Στον 3^ο συνδυασμό οι κάλλοι που προκύπταν ήταν συμπαγής και με έντονο πράσινο χρώμα, ενώ στον 4^ο συνδυασμό ήταν χαλαροί και υποκίτρινοι. Τα ποσοστά επαγωγής *έμμεσης σωματικής εμβρυογένεσης* που καταγράφηκαν, στους συγκεκριμένους συνδυασμούς, ήταν χαμηλά (10,0% - 15,0%) και ανάλογα του πειράματος-μάρτυρα.

Τα πειραματικά αποτελέσματα των προηγούμενων ενοτήτων, Δ.8.1.1. και Δ.8.1.2., κατέδειξαν ότι η αποκλειστική παροχή IBA ή NAA, σε συγκεντρώσεις αντίστοιχες του 3^{ου} και 4^{ου} συνδυασμού αυξινών, είχε σαν αποτέλεσμα μέγιστο ποσοστό έμμεσης σωματικής

εμβρυογένεσης 31,0% και 13,0% αντίστοιχα. Γίνεται φανερό ότι ούτε αυτοί οι συνδυασμοί των δύο αυξινών δεν κατέληξε σε αύξηση του ποσοστού έμμεσης σωματικής εμβρυογένεσης.



Εικόνα 18: Σωματική εμβρυογένεση (%) ριζιδίων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων σε διαφορετικούς συνδυασμούς αυξινών.

Τα έκφυτα εμβολιάζονταν, για 21 ημέρες, σε ΟΜc καλλογένεσης, που περιείχε 2,5 μM 2iP και έναν από τους παρακάτω συνδυασμούς NAA (μM) / IBA (μM):

- 0,195 / 0,78
- 0,39 / 1,56
- 6,25 / 12,5
- 12,5 / 25,0

Τα ποσοστά, που αναγράφονται, καταγράφονταν μετά από μεταφορά και παραμονή των κάλλων σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης για δύο μήνες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο δύο πειραμάτων (σύνολο 200 κάλλων).

Συμπερασματικά η ταυτόχρονη προσθήκη IBA και NAA στο θρεπτικό μέσο καλλογένεσης καθυλώνει την επαγωγή, τόσο της άμεσης όσο και της έμμεσης σωματικής εμβρυογένεσης, σε χαμηλά επίπεδα, ανάλογα της αποκλειστικής προσθήκης NAA και του πειράματος-μάρτυρα. Αξιοσημείωτο είναι ότι ο συνδυασμός IBA και NAA ανέστειλε τη δράση της μεμονωμένης παροχής IBA, καθώς τα μέγιστα ποσοστά που προκύπταν στον συνδυασμό των αυξινών ήταν 15,0% (άμεση και έμμεση σωματική εμβρυογένεση), ενώ μετά από την μεμονωμένη παροχή IBA 23,0% (άμεση σωματική εμβρυογένεση) και 31,0% (έμμεση σωματική εμβρυογένεση).

Από όλα τα παραπάνω δε διαφαίνεται αθροιστική δράση των δύο αυξινών. Αντίθετα αναδεικνύεται η ανασταλτική δράση του NAA στην επαγωγική δυναμική του IBA,

υποδηλώνοντας, πιθανώς, τη μη ύπαρξη διαφορετικών θέσεων-στόχων των δύο αυξινών στα κύτταρα της ελιάς.

Δ.8.3. ΕΞΑΡΤΗΣΗ ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΚΥΤΟΚΙΝΙΝΗ

Τα βιβλιογραφικά δεδομένα σχετικά με τα μορφογενετικά αποτελέσματα των κυτοκινινών είναι πολλές φορές αντικρουόμενα. Είναι γενικά αποδεκτό ότι η προσθήκη των κυτοκινινών είναι διεγερτική για τη δημιουργία κάλλου, καθώς επάγουν την κυτταρική διαίρεση, αλλά και για τη διαφοροποίηση βλαστών και μασχαλιαίων οφθαλμών. Αντίθετα η επίδρασή τους στην επαγωγή σωματικών εμβρύων είναι ακόμα ασαφής. Η συνεκτίμηση της πλειοψηφίας των πειραματικών δεδομένων οδηγεί στο συμπέρασμα ότι οι κυτοκινίνες είναι απαραίτητες στο θρεπτικό μέσο επαγωγής κάλλου, ενώ στο μέσο διαφοροποίησης, το πιθανότερο είναι, ότι παρεμποδίζουν τη διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων.

Ως εκ τούτου στην παρούσα πειραματική διερεύνηση δοκιμάστηκαν τρεις διαφορετικές συνθετικές κυτοκινίνες (TDZ, 2iP και BA) σε ποικίλες συγκεντρώσεις (0,625 / 2,5 / 10,0 και 40,0 μM).

Παράλληλα πραγματοποιήθηκε ένα πείραμα-μάρτυρας, στο πλαίσιο του οποίου ριζίδια ώριμων ζυγωτικών εμβρύων εμβολιάζονταν σε θρεπτικό υπόστρωμα OMc που περιείχε μόνο αυξίνη (25,0 μM IBA) και καθόλου κυτοκινίνη. Για τη διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων οι κάλλοι μεταφέρονταν, μετά από χρονικό διάστημα 21 ημερών, σε θρεπτικό υπόστρωμα OMc χωρίς φυτοαυξητικούς παράγοντες, στο οποίο παρέμεναν για δύο μήνες.

Δ.8.3.1. Εξάρτηση της σωματικής εμβρυογένεσης από το 2iP

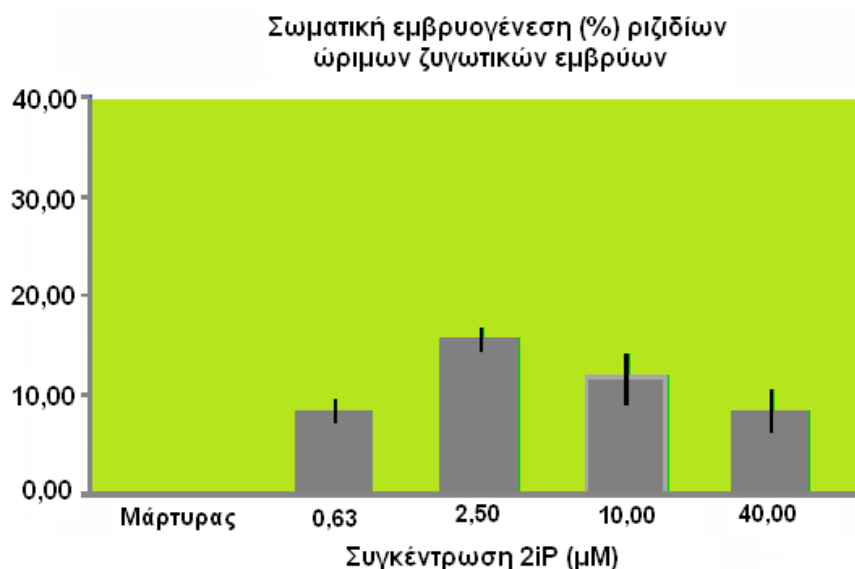
1.1. Έκφυτα ριζιδίων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων

Ριζίδια ώριμων ζυγωτικών εμβρύων εμβολιάζονταν σε OMc καλλογένεσης που περιείχε 25,0 μM IBA και τις συγκεντρώσεις 2iP, που αναγράφονται στον πίνακα 17.

Πίνακας 17: Συγκεντρώσεις 2iP (μM) θρεπτικού μέσου καλλογένεσης.

Συγκέντρωση 2iP (μM)			
0,625	2,5	10,0	40,0

Στα γραφήματα της εικόνας 19 απεικονίζονται τα τελικά ποσοστά σωματικής εμβρυογένεσης που καταγράφονταν μετά από τη μεταφορά και την παραμονή των κάλλων στο θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης (ΟΜς χωρίς φυτοαυξητικές ουσίες) για δύο μήνες.



Εικόνα 19: Σωματική εμβρυογένεση (%) ριζιδίων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις 2iP.

Τα έκφυτα εμβολιάζονταν, για 21 ημέρες σε ΟΜς καλλογένεσης, που περιείχε 25,0 μM IBA και 2iP στις εξής συγκεντρώσεις: 0,625 / 2,5 / 10,0 ή 40,0 μM. Τα ποσοστά, που αναγράφονται, καταγράφονταν μετά από μεταφορά και παραμονή των κάλλων σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης για δύο μήνες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο δύο πειραμάτων (σύνολο 200 κάλλων).

Στη χαμηλότερη συγκέντρωση 2iP (0,625 μM 2iP) δεν παρατηρήθηκε καλλογένεση, αλλά οργανοκαλλιέργεια και καταγράφηκε η χαμηλότερη εμβρυογενετική αντίδραση (περίπου 9,0% άμεση σωματική εμβρυογένεση) συγκριτικά με τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις (Φωτογραφίες 10 & 11).

Αντίθετα παρουσία 2,5 / 10,0 και 40,0 μM 2iP αναπτύχθηκαν πράσινοι και χαλαροί στην υφή κάλλοι και διαμορφώθηκαν σωματικά έμβρυα μέσω έμμεσης σωματικής εμβρυογένεσης (Φωτογραφία 10). Όπως φαίνεται καθαρά από την εικόνα 19, μικρή υπεροχή στην προώθηση της διαφοροποίησης σωματικών εμβρύων είχε η συγκέντρωση 2,5 μM 2iP (15,0%) η οποία αποτελεί και την προτεινόμενη συγκέντρωση από τους Cañas et al. (1988).



Φωτογραφία 10: Κάλλοι ριζιδίων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων.

Τα ριζίδια εμβολιάζονταν, για 21 ημέρες, σε ΟΜς που περιείχε 25,0 μM IBA και 2iP στις εξής συγκεντρώσεις:

1. 2,5 μM 2iP.
2. 0,625 μM 2iP.
3. 0,625 μM 2iP.
4. 40,0 μM 2iP.

Διακρίνεται οργανοκαλλιέργεια και ριζογένεση (2 & 3) και καλλογένεση (1 & 4).



Φωτογραφία 11: Οργανοκαλλιέργεια ριζιδίων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων.

Τα ριζίδια εμβολιάζονταν, για 21 ημέρες, σε ΟΜς καλλογένεσης, που περιείχε 25,0 μM IBA και 0,625 μM 2iP και στη συνέχεια μεταφέρονταν σε ΟΜς διαφοροποίησης. Διακρίνεται η διαφοροποίηση:

- a. απαρχών σωματικών εμβρύων και
- b. βλαστού στο άκρο του ριζιδίου που γειτνιάζε με τις κοτυληδόνες και ρίζας με πλάγιες ρίζες στο άλλο άκρο του.

1.2. Έκφυτα κοτυληδόνων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων

Βάσεις και κορυφές κοτυληδόνων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων εμβολιάζονταν σε θρεπτικό μέσο ΟΜς καλλογένεσης που περιείχε 100,0 μM IBA και μια από τις συγκεντρώσεις 2iP, που αναγράφονται στον πίνακα 18.

Πίνακας 18: Συγκεντρώσεις 2iP (μM) θρεπτικού μέσου καλλογένεσης.

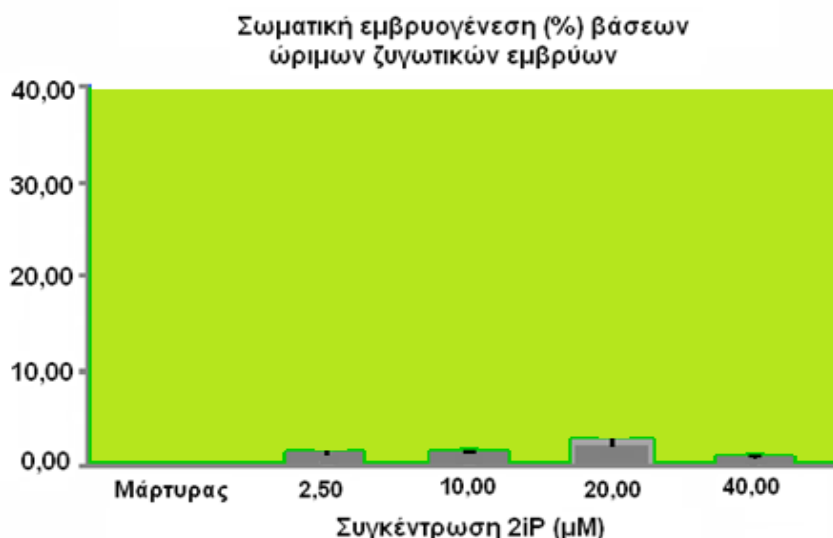
Συγκέντρωση 2iP (μM)			
2,5	10,0	20,0	40,0

Τα 100,0 μM IBA επιλέχθηκαν, καθώς, όπως αποδείχθηκε από την προηγούμενη πειραματική ενότητα, αποτελεί την καταλληλότερη συγκέντρωση αυξίνης για την επαγωγή σωματικών εμβρύων στα συγκεκριμένα έκφυτα.

Παράλληλα, επιλέχθηκε το 2iP στα συγκεκριμένα έκφυτα, καθώς τα αποτελέσματα των προηγούμενων πειραματικών χειρισμών υπέδειξαν ότι η συγκεκριμένη κυτοκινίνη προωθούσε τη διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων, ενώ το BA τη μείωνε αισθητά και το TDZ την ανέστελλε πλήρως.

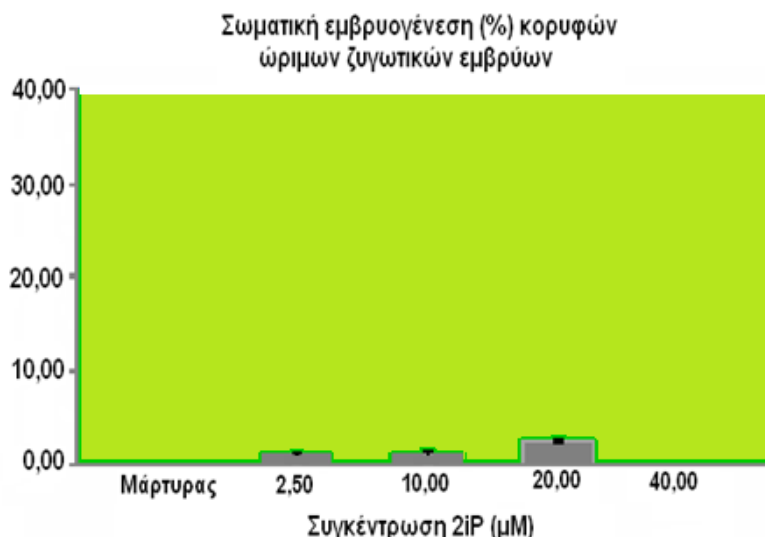
Στις γραφικές παραστάσεις των εικόνων 20 και 21 απεικονίζονται τα τελικά ποσοστά σωματικής εμβρυογένεσης που καταγράφονταν μετά από τη μεταφορά και την παραμονή των κάλλων στο θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης, δηλαδή OMc χωρίς φυτοαυξητικές ουσίες, για δύο μήνες.

Τα ποσοστά κυμαίνονταν από 0,0% - 5,0%. Μικρό προβάδισμα καταγράψαμε στη συγκέντρωση 20,0 μM 2iP (10,0%). Αξίζει να σημειωθεί ότι στην υψηλή συγκέντρωση (40,0 μM 2iP) η σωματική εμβρυογένεση ανεστάλη πλήρως στα έκφυτα κορυφών, ενώ στα έκφυτα των βάσεων διατηρήθηκε στο 5,0%.



Εικόνα 20: Σωματική εμβρυογένεση (%) βάσεων κοτυληδόνων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις 2iP.

Τα έκφυτα εμβολιάζονταν, για 21 ημέρες, σε OMc καλλογένεσης, που περιείχε 100,0 μM IBA και 2iP στις εξής συγκεντρώσεις: 2,5 / 10,0 / 20,0 ή 40,0 μM . Τα ποσοστά, που αναγράφονται, καταγράφονταν μετά από μεταφορά και παραμονή των κάλλων σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης για δύο μήνες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο δύο πειραμάτων (σύνολο 200 κάλλων).



Εικόνα 21: Σωματική εμβρυογένεση (%) κορυφών κοτυληδόνων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις 2iP.

Τα έκφυτα εμβολιάζονταν, για 21ημέρες, σε ΟΜς καλλογένεσης, που περιείχε 100,0 μM IBA και 2iP στις εξής συγκεντρώσεις: 2,5 / 10,0 / 20,0 ή 40,0 μM. Τα ποσοστά, που αναγράφονται, καταγράφονταν μετά από μεταφορά και παραμονή των κάλλων σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης για δύο μήνες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο δύο πειραμάτων (σύνολο 200 κάλλων).

Δ.8.3.2. Εξάρτηση της σωματικής εμβρυογένεσης από το BA

2.1. Έκφυτα ριζιδίων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων

Ριζίδια ώριμων ζυγωτικών εμβρύων εμβολιάζονταν σε ΟΜς καλλογένεσης που περιείχε 25,0 μM IBA και μια από τις συγκεντρώσεις BA, που αναγράφονται στον πίνακα 19.

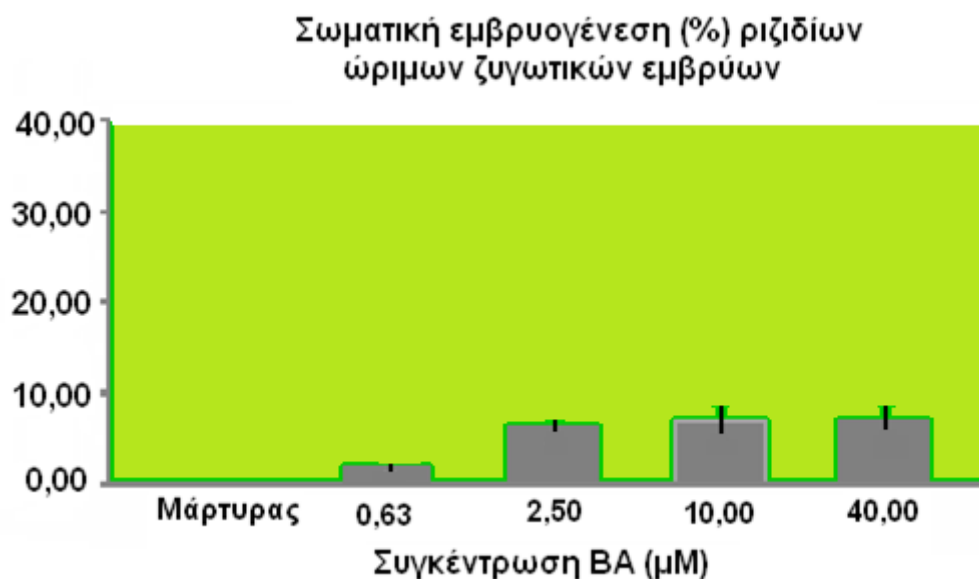
Πίνακας 19: Συγκεντρώσεις BA (μM) θρεπτικού υποστρώματος καλλογένεσης.

Συγκέντρωση BA (μM)			
0,625	2,5	10,0	40,0

Στα γραφήματα της εικόνας 22 απεικονίζονται τα τελικά ποσοστά σωματικής εμβρυογένεσης που καταγράφονταν μετά από τη μεταφορά και την παραμονή των κάλλων στο θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης, δηλαδή ΟΜς χωρίς φυτοαυξητικές ουσίες, για δύο μήνες.

Η παροχή BA, ανεξαρτήτως συγκέντρωσης, στο θρεπτικό μέσο καλλογένεσης, οδήγησε στη δημιουργία πράσινων κάλλων.

Η διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων δεν προωθήθηκε σημαντικά (2,0% - 5,0%). Τα σωματικά έμβρυα ήταν πράσινα, καλά ανεπτυγμένα, ευδιάκριτα και μεμονωμένα.



Εικόνα 22: Σωματική εμβρυογένεση (%) ριζιδίων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις BA.

Τα έκφυτα εμβολιάζονταν, για 21 ημέρες, σε ΟΜς καλλογένεσης, που περιείχε 25,0 μM IBA και BA στις εξής συγκεντρώσεις: 0,625 / 2,5 / 10,0 ή 40,0 μM. Τα ποσοστά, που αναγράφονται, καταγράφονταν μετά από μεταφορά και παραμονή των κάλλων σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης για δύο μήνες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο δύο πειραμάτων (σύνολο 200 κάλλων).

Δ.8.3.3. Εξάρτηση της σωματικής εμβρυογένεσης από το TDZ

3.1. Έκφυτα ριζιδίων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων

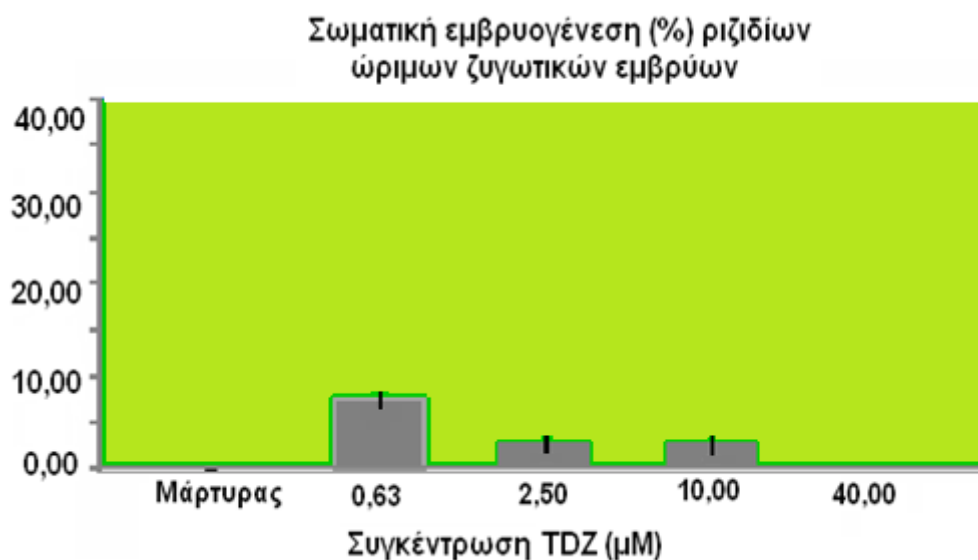
Ριζίδια ώριμων ζυγωτικών εμβρύων εμβολιάζονταν σε θρεπτικό υπόστρωμα ΟΜς καλλογένεσης που περιείχε 25,0 μM IBA και μια από τις συγκεντρώσεις TDZ, που αναγράφονται στον πίνακα 20.

Στα γραφήματα της εικόνας 23 απεικονίζονται τα τελικά ποσοστά σωματικής εμβρυογένεσης που καταγράφονταν μετά από τη μεταφορά και την παραμονή των κάλλων στο θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης, δηλαδή ΟΜς χωρίς φυτοαυξητικές ουσίες, για δύο μήνες.

Το TDZ προωθούσε τη δημιουργία συμπαγών κάλλων και ανέστελλε σχεδόν πλήρως τη σωματική εμβρυογένεση (Φωτογραφία 12).

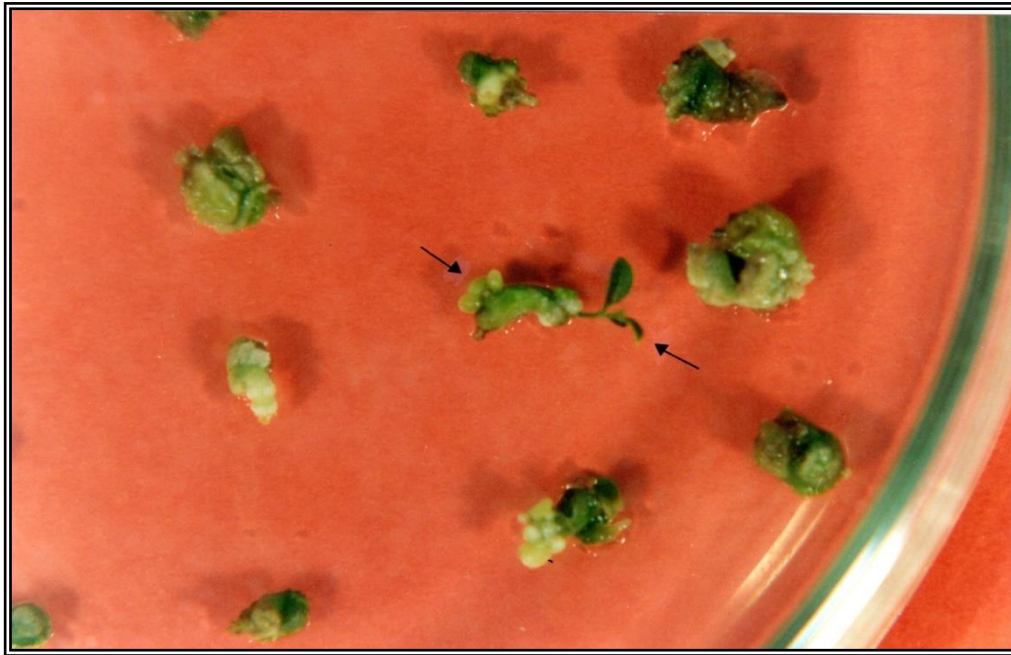
Πίνακας 20: Συγκεντρώσεις TDZ (μM) θρεπτικού μέσου καλλογένεσης.

Συγκέντρωση TDZ (μM)			
0,63	2,5	10,0	40,0



Εικόνα 23: Σωματική εμβρυογένεση (%) ριζιδίων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις TDZ.

Τα έκφυτα εμβολιάζονταν, για 21 ημέρες, σε ΟΜς καλλογένεσης, που περιείχε 25,0 μM IBA και TDZ στις εξής συγκεντρώσεις: 0,63 / 2,5 / 10,0 ή 40,0 μM . Τα ποσοστά, που αναγράφονται, καταγράφονταν μετά από μεταφορά και παραμονή των κάλλων σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης για δύο μήνες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο δύο πειραμάτων (σύνολο 200 κάλλων).



Φωτογραφία 12: Κάλλοι ριζιδίων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων.

Τα ριζίδια εμβολιάζονταν, για 21 ημέρες, σε ΟΜc καλλογένεσης, που περιείχε 25,0 μM IBA και 0,63 μM TDZ και στη συνέχεια μεταφέρονταν σε ΟΜc διαφοροποίησης. Διακρίνεται η διαφοροποίηση βλαστών στο άκρο του ριζιδίου που γειτνιάζε με τις κοτυληδόνες (δεξί βέλος) και σωματικών εμβρύων στο αντίθετο άκρο του (αριστερό βέλος).

Δ.8.4. ΕΞΑΡΤΗΣΗ ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΑΡΟΧΗ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ ΚΥΤΟΚΙΝΙΝΩΝ

Κρίθηκε σκόπιμη η διερεύνηση της εξάρτησης της επαγωγής σωματικών εμβρύων από την συνδυασμένη παροχή δύο διαφορετικών κυτοκινινών.

Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες κυτοκινίνες σε *in vitro* μελέτες είναι η κινετίνη και η ζεατίνη. Αντίθετα οι πειραματικές δοκιμασίες της παρούσας ερευνητικής προσπάθειας κατέδειξαν ότι τα εντονότερα μορφογενετικά αποτελέσματα στην *in vitro* διαφοροποίησης της ελιάς είχε το 2iP ανεξαρτήτως συγκέντρωσης.

Για το λόγο αυτό επιλέχθηκε το 2iP, να αποτελεί τη μια κυτοκινίνη του θρεπτικού υποστρώματος, σε συγκεντρώσεις 1,25 μM και 2,50 μM . Το 2iP συνδυάστηκε με το BA και το TDZ σε δύο συγκεντρώσεις (5,00 μM και 10,00 μM) (Πίνακας 21).

Πίνακας 21: Συνδυασμοί 2iP και BA (μM) θρεπτικού μέσου καλλογένεσης.

ΕΙΔΟΣ ΚΥΤΟΚΙΝΙΝΗΣ	1 ^{ος} ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ	2 ^{ος} ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ	3 ^{ος} ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ	4 ^{ος} ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ
2iP (μM)	2,50	1,25	2,50	1,25
BA (μM)	10,00	5,00	-	-
TDZ (μM)	-	-	10,00	5,00

Πιο συγκεκριμένα ριζίδια ώριμων ζυγωτικών εμβρύων εμβολιάζονταν σε θρεπτικό υπόστρωμα OMc που περιείχε σταθερά 25,0 μM IBA και έναν από τους συνδυασμούς κυτοκινινών που αναγράφονται στον πίνακα 21. Μετά από παρέλευση 21 ημερών οι κάλλοι μεταφέρονταν και παρέμεναν σε θρεπτικό θρεπτικό OMc, χωρίς φυτοαυξητικούς παράγοντες, για δύο μήνες.

Τα γραφήματα της εικόνας 24 απεικονίζουν τα τελικά ποσοστά διαφοροποίησης σωματικών εμβρύων που καταγράφηκαν στις παραπάνω ιστοκαλλιεργητικές συνθήκες. Σε όλες τις πειραματικές δοκιμασίες η σωματική εμβρυογένεση ήταν έμμεση, καθώς σε όλους τους συνδυασμούς παρατηρήθηκε επαγωγή κάλλου.

Προκειμένου να γίνει ευκολότερος ο σχολιασμός των πειραματικών αποτελεσμάτων, στους πίνακες 22(A) και 22(B) αναγράφονται τα τελικά ποσοστά διαφοροποίησης σωματικών εμβρύων που προέκυψαν σε όλους τους συνδυασμούς των κυτοκινινών, ταυτόχρονα με τα τελικά ποσοστά που προέκυψαν, όταν το 2iP, το BA και το TDZ παρέχονταν μεμονωμένα σε αντίστοιχες συγκεντρώσεις.

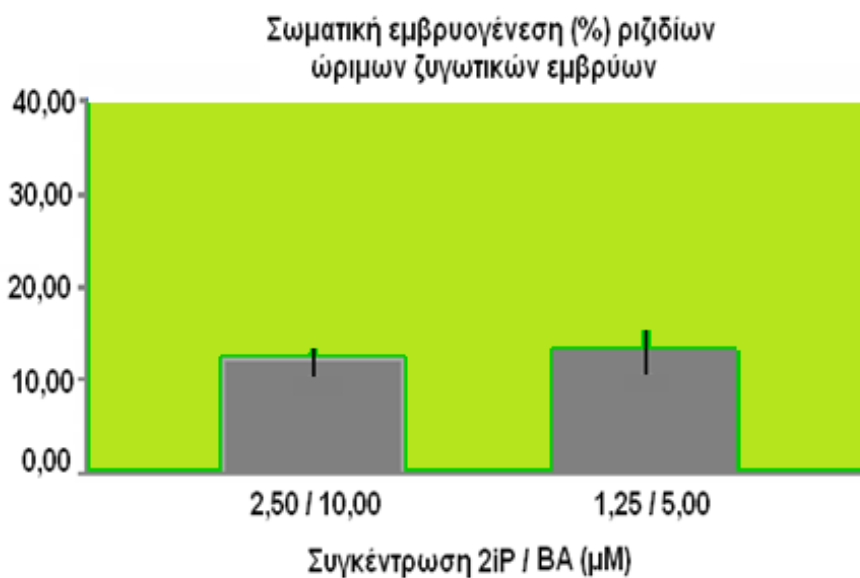
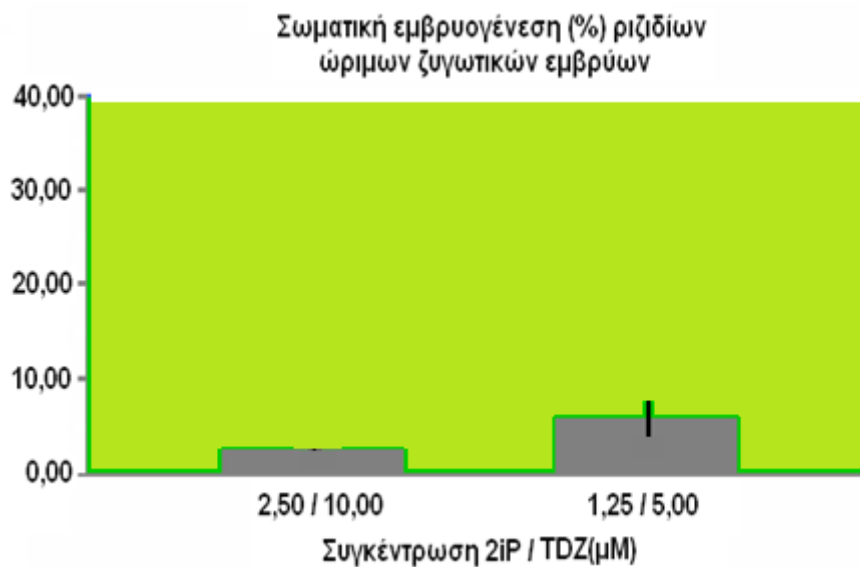
Από τη σύγκριση των ποσοστών του πίνακα 22(A) γίνεται φανερό ότι η συνδυασμένη παροχή 2iP και BA υστερούσε σε εμβρυογενετική επαγωγική δράση έναντι της μεμονωμένης παροχής του 2iP, ενώ κυμαινόταν σε αντίστοιχα επίπεδα με εκείνα της μεμονωμένης παροχής του BA. Ο πίνακας 22(B) καταδεικνύει ότι και η συνδυασμένη παροχή 2iP και TDZ μείωνε την επαγωγική δράση της μεμονωμένης παροχής του 2iP. Αξίζει να αναφερθεί η υψηλή βλαστητική διαφοροποίηση των πειραματικών διατάξεων συνδυασμένης παροχής TDZ με BA και TDZ με 2iP.

Πίνακας 22(Α): Σωματική εμβρυογένεση (%) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις 2iP, BA και συνδυασμών 2iP/BA θρεπτικού μέσου καλλογέनेσης.

ΕΙΔΟΣ ΚΥΤΟΚΙΝΙΝΗΣ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΥΤΟΚΙΝΙΝΗΣ					
2iP (μM)	2,5	1,25	2,5	1,25	-	-
BA (μM)	10,0	5,0	-	-	10,0	5,0
ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ (%)	9,0 ± 4,0	12,0 ± 5,4	15,0 ± 3,5	8,0 ± 15,0	8,0 ± 4,5	8,0 ± 4,5

Πίνακας 22(Β): Σωματική εμβρυογένεση (%) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις 2iP, TDZ και συνδυασμών 2iP/TDZ θρεπτικού μέσου καλλογέनेσης.

ΕΙΔΟΣ ΚΥΤΟΚΙΝΙΝΗΣ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΥΤΟΚΙΝΙΝΗΣ					
2iP (μM)	2,5	1,25	2,5	1,25	-	-
TDZ (μM)	10,0	5,0	-	-	10,0	5,0
ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ (%)	2,0 ± 1,55	4,0 ± 4,93	15,0 ± 3,5	8,0 ±-15,0	0,9 ± 0,0	2,5 ± 0,0



Εικόνα 24(A & B): Σωματική εμβρυογένεση (%) ριζιδίων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων σε συνδυασμούς κυτοκινινών.

Ριζίδια ώριμων ζυγωτικών εμβρύων εμβολιάζονταν, για 21 ημέρες, σε OMc καλλογένεσης, που περιείχε 25,0 μM IBA και έναν από τους παρακάτω συνδυασμούς 2iP/TDZ (24A) και 2iP/BA (24B) (μM):

- 2,5 / 10,0
- 1,25 / 5,0

Τα ποσοστά, που αναγράφονται, καταγράφονταν μετά από μεταφορά και παραμονή των κάλλων σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης για δύο μήνες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο δύο πειραμάτων (σύνολο 200 κάλλων).

Δ.9. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ & ΑΝΟΡΓΑΝΟ ΑΖΩΤΟ

Δ.9.1. ΕΞΑΡΤΗΣΗ ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΗΓΗ ΑΝΟΡΓΑΝΟΥ ΑΖΩΤΟΥ

Ο καθοριστικός ρόλος της συγκέντρωσης, αλλά και της πηγής αζώτου (ανόργανου ή οργανικού) στην *in vitro* φυτική αναγέννηση και ειδικότερα στην επαγωγή σωματικών εμβρύων, έχει αποδειχθεί μέσω πολλών δημοσιεύσεων.

Το βασικό θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήσαμε στην παρούσα διατριβή ήταν το ΟΜc το οποίο περιείχε σαν πηγές ανόργανου αζώτου 9,34 mM KNO₃ και 8,99 mM NH₄NO₃.

Προσπαθώντας να διασαφηνίσουμε τη συσχέτιση ανόργανου αζώτου και σωματικής εμβρυογένεσης στις ιστοκαλλιέργειες της ελιάς, αντί των παραπάνω πηγών ανόργανου αζώτου δοκιμάσαμε τρεις διαφορετικές πηγές ανόργανου αζώτου: KNO₃, NH₄NO₃ και NH₄Cl. Οι τρεις πηγές αζώτου προστίθονταν ξεχωριστά κάθε φορά στο θρεπτικό μέσο και σε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις, οι οποίες αναγράφονται στον πίνακα 23.

Πίνακας 23: Συγκεντρώσεις KNO₃ ή NH₄NO₃ ή NH₄Cl (mM) θρεπτικού μέσου καλλογένεσης.

Συγκέντρωση KNO ₃ ή NH ₄ NO ₃ ή NH ₄ Cl (mM)			
5,0	20,0	80,0	160,0

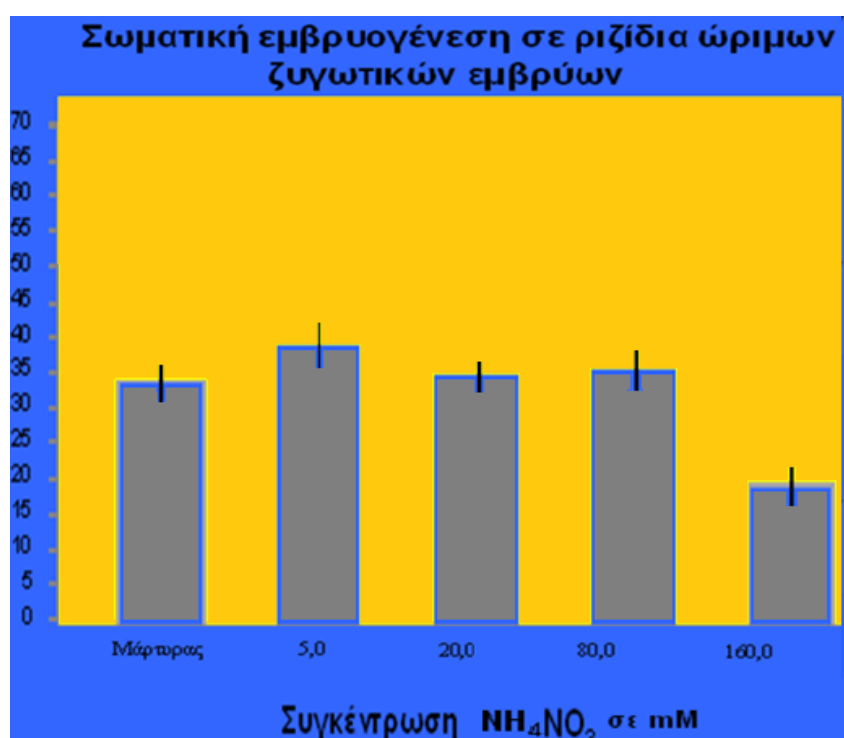
Τα υπόλοιπα συστατικά του θρεπτικού μέσου καλλογένεσης παρέμεναν σταθερά και οι φυτοαυξητικές ουσίες ήταν 25,0 μM IBA και 2,5 μM 2iP. Τα έκφυτα παρέμεναν στο θρεπτικό μέσο καλλογένεσης για 21 ημέρες και μεταφέρονταν στο θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης. Το θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης περιείχε τις τροποποιημένες πηγές ανόργανου αζώτου, δηλαδή ίδιες με εκείνες του θρεπτικού μέσου καλλογένεσης και δεν περιείχε φυτοαυξητικούς παράγοντες.

Παράλληλα πραγματοποιήθηκε και ένα πείραμα-μάρτυρας. Ριζίδια ώριμων ζυγωτικών εμβρύων εμβολιάζονταν, για 21 ημέρες, σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης, δηλαδή ΟΜc που περιείχε 25,0 μM IBA και 2,5 μM 2iP, αλλά από το οποίο είχαν αφαιρεθεί οι πηγές ανόργανου αζώτου. Οι κάλλοι μεταφέρονταν σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης, δηλαδή ΟΜc χωρίς φυτοαυξητικούς παράγοντες και πηγές ανόργανου αζώτου, όπου παρέμεναν για δύο μήνες.

Δ.9.1.1. Εξάρτηση της σωματικής εμβρυογένεσης από το NH_4NO_3

Ριζίδια ώριμων ζυγωτικών εμβρύων εμβολιάζονταν σε θρεπτικό μέσο καλλογένεσης, δηλαδή ΟΜς που περιείχε 25,0 μM IBA, 2,5 μM 2iP και NH_4NO_3 στις συγκεντρώσεις, που αναγράφονται στον πίνακα 23.

Στα γραφήματα της εικόνας 25 απεικονίζονται τα τελικά ποσοστά σωματικής εμβρυογένεσης που καταγράφονταν μετά από τη μεταφορά και την παραμονή των κάλλων στο θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης, δηλαδή ΟΜς χωρίς φυτοαυξητικές ουσίες και ίδιας περιεκτικότητας σε NH_4NO_3 με το θρεπτικό μέσο καλλογένεσης, για δύο μήνες.



Εικόνα 25: Σωματική εμβρυογένεση (%) ριζιδίων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις NH_4NO_3 .

Ριζίδια ώριμων ζυγωτικών εμβρύων εμβολιάζονταν, για 21 ημέρες, σε ΟΜς καλλογένεσης, που περιείχε 25,0 μM IBA, 2,5 μM 2iP και NH_4NO_3 στις εξής συγκεντρώσεις: 5,0 / 20,0 / 80,0 ή 160,0 mM. Τα ποσοστά, που αναγράφονται, καταγράφονταν μετά από μεταφορά και παραμονή των κάλλων σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης για δύο μήνες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο δύο πειραμάτων (σύνολο 300 κάλλων).

Μελετώντας την εικόνα 25 αξιοσημείωτο είναι το τελικό ποσοστό (37,0%) διαφοροποίησης σωματικών εμβρύων του πειράματος-μάρτυρα, που δεν περιείχε καμία

πηγή αζώτου. Το συγκεκριμένο ποσοστό ήταν κατά πολύ υψηλότερο, ακόμα και από το ποσοστό (περίπου 24,0%) που προέκυπτε σε OMc με την κανονική συγκέντρωση και πηγή ανόργανου αζώτου, όπως προτάθηκαν από τους Cañas et al. (1988).

Η προσθήκη NH_4NO_3 , ανεξαρτήτως συγκέντρωσης, δεν επηρέαζε το ποσοστό διαφοροποίησης σωματικών εμβρύων (32,0% - 36,0%) συγκρινόμενη με το πείραμα-μάρτυρα. Μοναδική εξαίρεση αποτελούσε η υψηλότερη συγκέντρωση (160,0 mM NH_4NO_3), όπου αναστελλόταν σημαντικά η σωματική εμβρυογένεση (21,0%). Σκόπιμο είναι να αναφερθεί ότι στη συγκεκριμένη συγκέντρωση NH_4NO_3 μειωνόταν δραστικά και η καλλογένεση (19,0%), δεδομένο που αν είχε συνυπολογιστεί, το ποσοστό των επαχθέντων σωματικών εμβρύων θα ήταν πολύ χαμηλότερο από 21,0% (Φωτογραφία 13).



Φωτογραφία 13: Κάλλοι ριζιδίων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων.

Τα ριζίδια εμβολιάζονταν, για 21 ημέρες, σε OMc καλλογένεσης, που περιείχε 25,0 μM IBA, 2,5 μM 2iP και 160,0 mM NH_4NO_3 και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε OMc διαφοροποίησης.

Με το βέλος υποδεικνύεται σωματικό έμβρυο που έχει αποσπαστεί από τον κάλλο από τον οποίο προήλθε. Παράλληλα είναι εμφανής η νέκρωση των κάλλων.

Δ.9.1.2. Εξάρτηση της σωματικής εμβρυογένεσης από το KNO_3

Ριζίδια ώριμων ζυγωτικών εμβρύων εμβολιάζονταν σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης, δηλαδή OMc που περιείχε 25,0 μM IBA, 2,5 μM 2iP και KNO_3 στις συγκεντρώσεις, που αναγράφονται στον πίνακα 23.

Στα γραφήματα της εικόνας 26 απεικονίζονται τα τελικά ποσοστά σωματικής εμβρυογένεσης που καταγράφονταν μετά από τη μεταφορά και την παραμονή των κάλλων στο θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης, δηλαδή ΟΜc χωρίς φυτοαυξητικές ουσίες και ίδιας περιεκτικότητας σε KNO_3 με το θρεπτικό μέσο καλλογένεσης, για δύο μήνες.

Η παροχή KNO_3 , σαν αποκλειστική πηγή ανόργανου αζώτου, μείωνε την παραγωγή σωματικών εμβρύων δραστικά τόσο στις χαμηλές συγκεντρώσεις (18,0%), αλλά ακόμα εντονότερα στις υψηλές συγκεντρώσεις (4,0%), ενώ δεν παρατηρήθηκε ταυτόχρονη αναστολή της καλλογένεσης.



Εικόνα 26: Σωματική εμβρυογένεση (%) ριζιδίων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις KNO_3 .

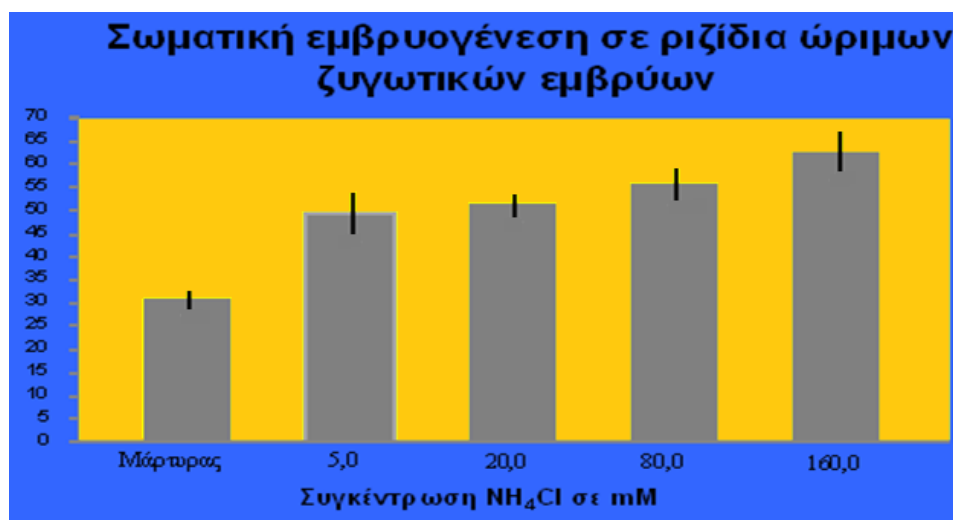
Ριζίδια ώριμων ζυγωτικών εμβρύων εμβολιάζονταν, για 21 ημέρες, σε ΟΜc καλλογένεσης, που περιείχε 25,0 μM IBA, 2,5 μM 2iP και KNO_3 στις εξής συγκεντρώσεις: 5,0 / 20,0 / 80,0 ή 160,0 mM. Τα ποσοστά, που αναγράφονται, καταγράφονταν μετά από μεταφορά και παραμονή των κάλλων σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης για δύο μήνες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο δύο πειραμάτων (σύνολο 300 κάλλων).

Δ.9.1.3. Εξάρτηση της σωματικής εμβρυογένεσης από το NH_4Cl

Ριζίδια ώριμων ζυγωτικών εμβρύων εμβολιάζονταν σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης, δηλαδή OMc που περιείχε 25,0 μM IBA, 2,5 μM 2iP και NH_4Cl στις συγκεντρώσεις, που αναγράφονται στον πίνακα 23.

Στα γραφήματα της εικόνας 27 απεικονίζονται τα τελικά ποσοστά σωματικής εμβρυογένεσης που καταγράφονταν μετά από τη μεταφορά και την παραμονή των κάλλων στο θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης, δηλαδή OMc χωρίς φυτοαυξητικές ουσίες και ίδιας περιεκτικότητας σε NH_4Cl με το θρεπτικό μέσο καλλογένεσης, για δύο μήνες.

Όπως γίνεται φανερό από τη μελέτη του γραφήματος το NH_4Cl προωθούσε σημαντικά τη διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων. Πιο συγκεκριμένα στις συγκεντρώσεις 5,0 mM και 80,0 mM τα ποσοστά κυμαίνονταν από 52,0% - 58,0%, δηλαδή πολύ υψηλότερα από το πείραμα-μάρτυρα (37,0%). Εντυπωσιακότερο ήταν το ποσοστό (62,0%) που προέκυπτε στην συγκέντρωση 160,0 mM NH_4Cl . Παράλληλα, πρέπει να σημειωθεί η περιορισμένη καλλογένεση (60,0%) στα 80,0 mM NH_4Cl (Φωτογραφία 14) και η ακόμα μικρότερη (40,0%) στα 160,0 mM NH_4Cl .



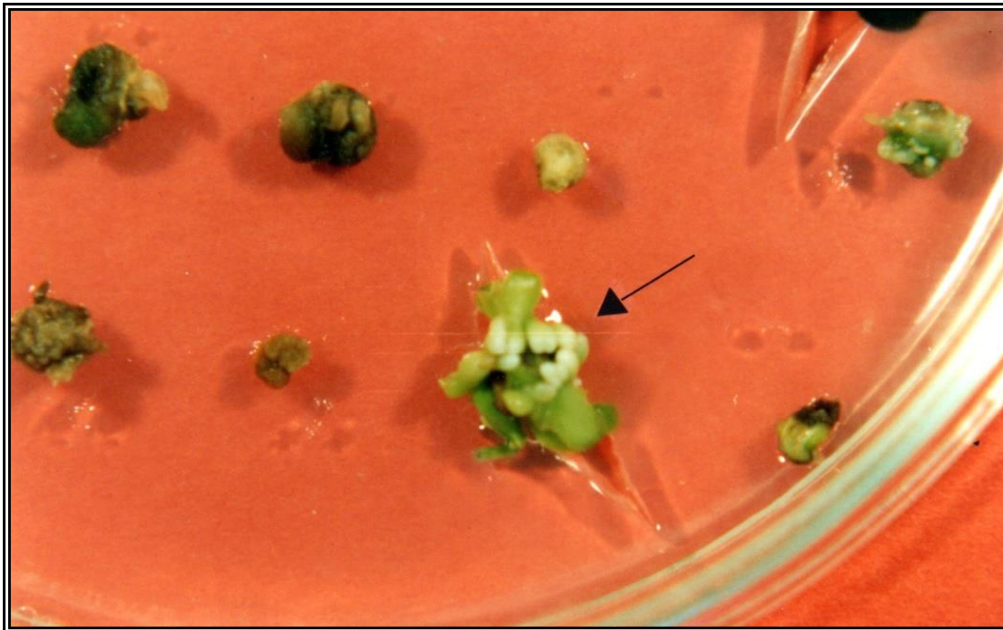
Εικόνα 27: Σωματική εμβρυογένεση (%) ριζιδίων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων σε διαφορετικές συγκεντρώσεις NH_4Cl .

Ριζίδια ώριμων ζυγωτικών εμβρύων εμβολιάζονταν, για 21 ημέρες, σε OMc καλλογένεσης, που περιείχε 25,0 μM IBA, 2,5 μM 2iP και NH_4Cl στις εξής συγκεντρώσεις: 5,0 / 20,0 / 80,0 ή 160,0 mM. Τα ποσοστά, που αναγράφονται, καταγράφονταν μετά από μεταφορά και παραμονή των κάλλων σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης για δύο μήνες.

Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο δύο πειραμάτων (σύνολο 300 κάλλων).

Ανακεφαλαιώνοντας, η παροχή KNO_3 σαν μοναδική πηγή ανόργανου αζώτου ανέστελλε δραστικά την επαγωγή σωματικών εμβρύων, η παροχή NH_4NO_3 διατηρούσε τα ποσοστά στα επίπεδα του πειράματος-μάρτυρα, ενώ η παροχή NH_4Cl είχε ιδιαιτέρως επαγωγική δράση στη διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων, αλλά ταυτόχρονα ανασταλτική στην καλλογένεση σε υψηλές συγκεντρώσεις.

Στο σημείο αυτό πρέπει να τονίσουμε ότι τα ποσοστά επαγωγής σωματικών εμβρύων τόσο μετά από προσθήκη NH_4NO_3 (με εξαίρεση τα 160,0 mM) όσο και NH_4Cl , ήταν υψηλότερα από το ποσοστό σωματικής εμβρυογένεσης (24,0%) που πρόκυπτε, όταν το ΟΜc περιείχε τις πηγές ανόργανου αζώτου που προτάθηκαν από τους Cañas et al. (1988). Αντίθετα το KNO_3 δεν προωθούσε τη σωματική εμβρυογένεση συγκρινόμενο με τα ποσοστά του πειράματος των Cañas et al. (1988).



Φωτογραφία 14: Κάλλοι ριζιδίων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων.

Τα ριζίδια εμβολιάζονταν, για 21 ημέρες, σε θρεπτικό υπόστρωμα ΟΜc καλλογένεσης, που περιείχε 25,0 μM IBA / 2,5 μM 2Ip / 80,0 mM NH_4Cl και στη συνέχεια μεταφέρονταν σε ΟΜc διαφοροποίησης. Με το βέλος υποδεικνύεται η διαφοροποίηση πολλαπλών σωματικών εμβρύων σε μορφή «μπουκέτων».

Δ.9.2. ΕΞΑΡΤΗΣΗ ΤΗΣ ΣΩΜΑΤΙΚΗΣ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗΣ ΑΠΟ ΤΗΝ ΠΑΡΟΧΗ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΥ ΠΗΓΩΝ ΑΝΟΡΓΑΝΟΥΑΖΩΤΟΥ

Τα αποτελέσματα της προηγούμενης πειραματικής ενότητας ανέδειξαν την ανάγκη για τη μελέτη της εξάρτησης της διαφοροποίησης σωματικών εμβρύων από την παροχή συνδυασμού δύο διακριτών πηγών ανόργανου αζώτου που αποτελεί και την πιο συνηθισμένη τακτική προετοιμασίας θρεπτικού υποστρώματος για ιστοκαλλιέργειες.

Οι συνδυασμοί πηγών ανόργανου αζώτου που χρησιμοποιήθηκαν ήταν $\text{KNO}_3 : \text{NH}_4\text{NO}_3$ και $\text{KNO}_3 : \text{NH}_4\text{Cl}$ στις εξής αναλογίες: 1:9, 3:7, 5:5, 7:3 και 9:1. Το θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης ήταν το ΟΜc με τον εκάστοτε συνδυασμό πηγών ανόργανου αζώτου, 25,0 μM IBA και 2,5 μM 2iP. Το θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης ήταν το ΟΜc χωρίς φυτοαυξητικές ουσίες και τις ίδιες πηγές ανόργανου αζώτου με του θρεπτικού μέσου καλλογένεσης. Τα ποσοστά σωματικών εμβρύων που προκύπτan απεικονίζονται στα γραφήματα των εικόνων 28 και 29.

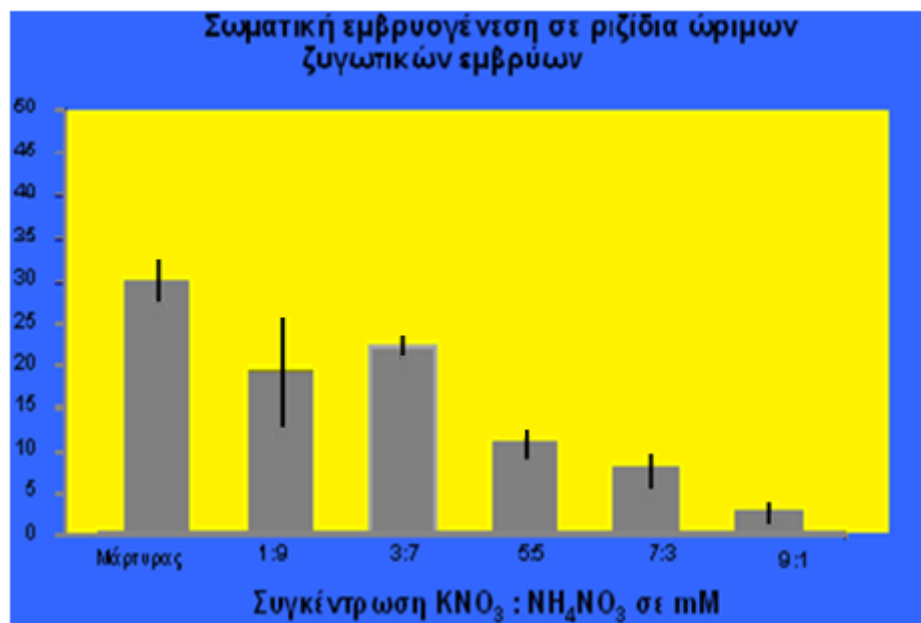
Όπως προαναφέρθηκε στο πείραμα-μάρτυρα το ποσοστό επαγωγής σωματικών εμβρύων ήταν 37,0%. Αντίθετα στους συνδυασμούς $\text{KNO}_3 : \text{NH}_4\text{NO}_3$ (Εικόνα 28) καταγράφονταν ποσοστά σωματικής εμβρυογένεσης που κυμαίνονταν από 16,0% - 3,0%. Είναι προφανές ότι η αναστολή της σωματικής εμβρυογένεσης γινόταν τόσο πιο έντονη όσο αυξανόταν η συγκέντρωση του KNO_3 και μειωνόταν η συγκέντρωση του NH_4NO_3 .

Ανάλογα αποτελέσματα προκύπτan και στις αναλογίες $\text{KNO}_3 : \text{NH}_4\text{Cl}$ (Εικόνα 29). Πιο συγκεκριμένα στην αναλογία 1:9, όπου η συγκέντρωση του KNO_3 ήταν χαμηλή και του NH_4Cl υψηλή, καταγραφόταν υψηλό ποσοστό (38,0%), δηλαδή ανάλογο με εκείνο του πειράματος-μάρτυρα. Στις υπόλοιπες αναλογίες, όπου η περιεκτικότητα του υποστρώματος σε KNO_3 αυξανόταν και σε NH_4Cl μειωνόταν, τα ποσοστά έβαιναν μειούμενα μέχρι που σχεδόν μηδενίζονταν (27,0% - 1,0%).

Αξιομνημόνευτη είναι η επίδραση των συγκεκριμένων αναλογιών και στην επαγωγή κάλλου. Στην αναλογία 1:9 $\text{KNO}_3:\text{NH}_4\text{Cl}$ καταγραφόταν χαμηλό ποσοστό καλλογένεσης (58,0%) το οποίο βαθμιαία αυξανόταν για να φτάσει στα συνήθη ποσοστά (94,0%) στην αναλογία 9:1.

Τα παραπάνω πειραματικά αποτελέσματα καταδεικνύουν την ανασταλτική δράση στην επαγωγή σωματικών εμβρύων του KNO_3 και τη διεγερτική του NH_4NO_3 και του NH_4Cl . Παράλληλα επαληθεύουν την ανασταλτική δράση στην επαγωγή κάλλου του NH_4Cl σε υψηλές συγκεντρώσεις.

Οι προηγούμενες παρατηρήσεις βρίσκονται σε πλήρη συμφωνία με τα αποτελέσματα της προηγούμενης πειραματικής ενότητας, δηλαδή την παροχή μεμονωμένων πηγών ανόργανου αζώτου.

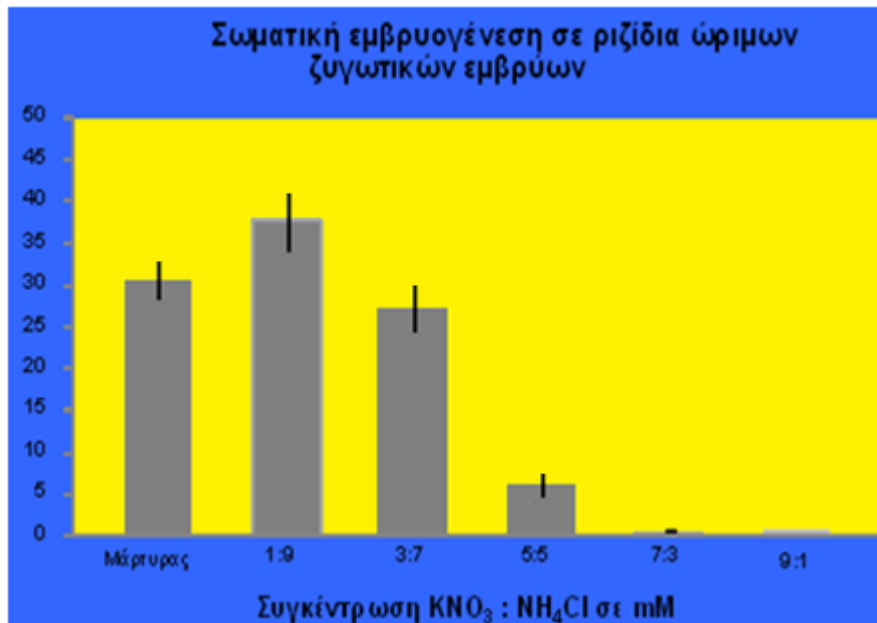


Εικόνα 28: Σωματική εμβρυογένεση (%) ριζιδίων σε συνδυασμούς KNO_3 : NH_4NO_3 .

Ριζίδια ώριμων ζυγωτικών εμβρύων εμβολιάζονταν, για 21 ημέρες, σε ΟΜc καλλογένεσης, που περιείχε 25,0 μM IBA, 2,5 μM 2iP και KNO_3 : NH_4NO_3 στις εξής αναλογίες: 1:9, 3:7, 5:5, 7:3 και 9:1.

Τα ποσοστά, που αναγράφονται, καταγράφονταν μετά από μεταφορά και παραμονή των κάλλων σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης για δύο μήνες.

Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο δύο πειραμάτων (σύνολο 300 κάλλων).



Εικόνα 29: Σωματική εμβρυογένεση (%) ριζιδίων σε συνδυασμούς $\text{KNO}_3 : \text{NH}_4\text{Cl}$.

Ριζίδια ώριμων ζυγωτικών εμβρύων εμβολιάζονταν, για 21 ημέρες, σε ΟΜc καλλογένεσης, που περιείχε 25,0 μM IBA, 2,5 μM 2iP και $\text{KNO}_3 : \text{NH}_4\text{Cl}$ στις αναλογίες : 1:9, 3:7, 5:5, 7:3 και 9:1.

Τα ποσοστά, που αναγράφονται, καταγράφονταν μετά από μεταφορά και παραμονή των κάλλων σε θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης για δύο μήνες.

Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο δύο πειραμάτων (σύνολο 300 κάλλων).

Δ. 10. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ ΣΤΟ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ “ΚΜ”

Σαν επιστέγασμα, αλλά και επαλήθευση όλων των προηγούμενων πειραματικών δοκιμασιών, θεωρήθηκε σκόπιμη η δημιουργία ενός “ιδανικού” θρεπτικού υποστρώματος το οποίο ονομάστηκε “ΚΜ”. Το “ΚΜ” θρεπτικό υπόστρωμα συνδύαζε τα θρεπτικά στοιχεία και τους φυτοαυξητικούς παράγοντες που από τα αποτελέσματα της παρούσας διατριβής αποδείχτηκαν σαν καταλληλότερα για την επαγωγή υψηλών ποσοστών σωματικής εμβρυογένεσης, *in vitro*, από έκφυτα ελιάς.

Το θρεπτικό υπόστρωμα “ΚΜ” περιείχε τη βασική σύσταση του θρεπτικού μέσου ΟΜc και τις εξής τροποποιήσεις:

α) Μοναδική πηγή ανόργανου αζώτου 20,0 mM NH_4Cl .

Η συγκεκριμένη συγκέντρωση NH_4Cl προτιμήθηκε από τις υψηλότερες αν και είχε μικρότερη επαγωγική δράση, καθώς οι υψηλότερες συγκεντρώσεις είχαν έντονη ανασταλτική δράση στην επαγωγή κάλλων.

- β) Σακχαρόζη 160,0 g/L.
- γ) Φυτοαυξητικούς παράγοντες:
 - i. 25,0 μ M IBA.
 - ii. 2,5 μ M 2iP.

Αναλυτικότερα ριζίδια ώριμων ζυγωτικών εμβρύων παρέμεναν για 21 ημέρες στο παραπάνω θρεπτικό μέσο καλλογένεσης και στη συνέχεια μεταφέρονταν και παρέμεναν για δύο μήνες στο θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης, που είχε την ίδια σύσταση με το αρχικό, χωρίς φυτοαυξητικούς παράγοντες.

Στη γραφική παράσταση της εικόνας 30 απεικονίζεται το χρονοδιάγραμμα της εμφάνισης των σωματικών εμβρύων σε όλη τη διάρκεια του πειράματος, δηλαδή από την 7^η ημέρα εμβολιασμού μέχρι και 40 ημέρες μετά τη μεταφορά των κάλλων στο θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης.

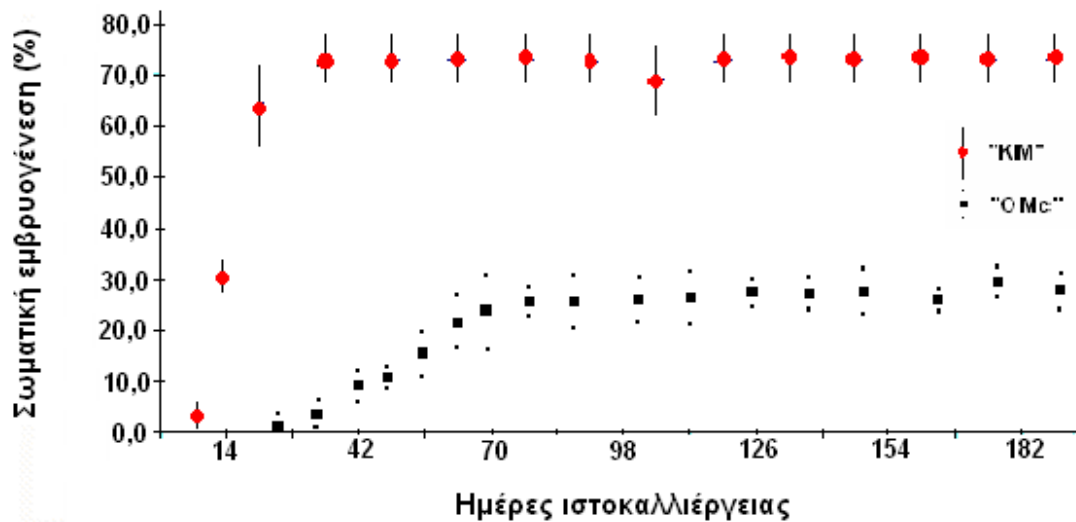
Όπως ήταν αναμενόμενο το “ΚΜ” θρεπτικό μέσο έδωσε εντυπωσιακά ποσοστά σωματικής εμβρυογένεσης (62,0%) συγκριτικά με το ΟΜc (24,0%) που προτάθηκε από τους Cañas et al. (1988) σαν καταλληλότερο θρεπτικό μέσο για τις ιστοκαλλιέργειες στην ελιά.

Χαρακτηριστικό της έντονης επαγωγικής δράσης του “ΚΜ” θρεπτικού μέσου αποτελεί η διαφοροποίηση των πρώτων σωματικών εμβρύων στο θρεπτικό μέσο καλλογένεσης, δηλαδή πριν τη μεταφορά των κάλλων στο θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης (Φωτογραφία 15).

Αξιοσημείωτο είναι ότι το ποσοστό διαφοροποίησης σωματικών εμβρύων στο “ΚΜ” θρεπτικό μέσο (62,0%) ξεπερνούσε τόσο το ποσοστό 55,0%, που καταγραφόταν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε μόνο τροποποιημένη συγκέντρωση σακχαρόζης (160,0 g/L), όσο και το ποσοστό 52,0% που καταγραφόταν σε θρεπτικό μέσο που περιείχε μόνο τροποποιημένη συγκέντρωση ανόργανου αζώτου (20,0 mM NH_4Cl).

Όλα τα παραπάνω καταδεικνύουν μια αθροιστική δράση των επιμέρους θρεπτικών συστατικών, δηλαδή του NH_4Cl και της σακχαρόζης, όταν παρέχονταν ταυτόχρονα στο θρεπτικό μέσο καλλογένεσης.

Τέλος, μερικά από τα σωματικά έμβρυα που διαφοροποιήθηκαν στις παραπάνω πειραματικές συνθήκες, εγκλιματίζονταν σταδιακά σε μη ασηπτικές συνθήκες, όπως έχει περιγραφεί αναλυτικά σε προηγούμενο κεφάλαιο και μεταφέρονταν στο χώμα (Φωτογραφία 16).

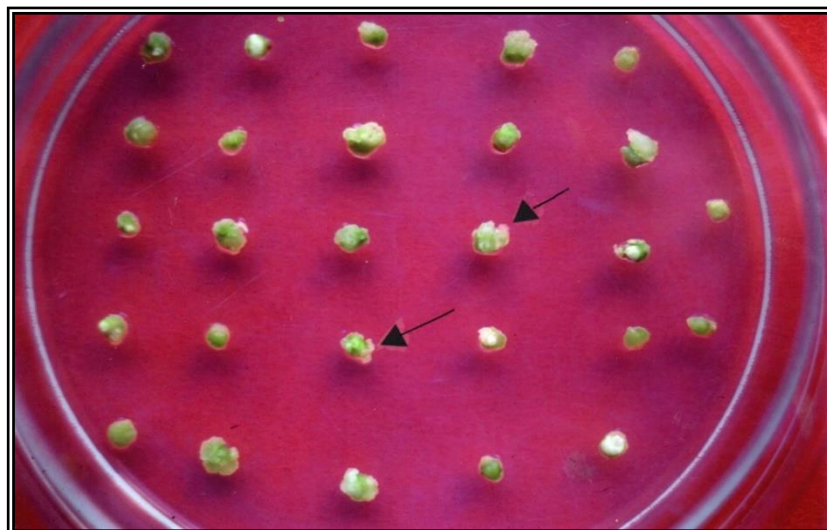


Εικόνα 30: Σωματική εμβρυογένεση (%) ριζιδίων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων σε "KM" και OMc θρεπτικά υποστρώματα.

Ριζίδια ώριμων ζυγωτικών εμβρύων εμβολιάζονταν, για 21 ημέρες, σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης:

1. OMc όπως προτάθηκε από τους Cañas et al. (1988)
2. "KM".

Τα ποσοστά, που αναγράφονται, καταγράφονταν μετά από μεταφορά και παραμονή των κάλλων στο θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης, που ήταν ίδιο με το θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης χωρίς φυτοαυξητικές ουσίες, για δύο μήνες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο δύο πειραμάτων (σύνολο 200 κάλλων).



Φωτογραφία 15: Κάλλοι ριζιδίων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων.

Τα ριζίδια εμβολιάζονταν, για 21 ημέρες, σε "KM" θρεπτικό μέσο καλλογένεσης και στη συνέχεια μεταφέρονταν σε "KM" θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης. Με το βέλος υποδεικνύονται απαρχές σωματικών εμβρύων με μορφή «μπουκέτων» .



Φωτογραφία 16: Φυτάρια ελιάς, που προήλθαν από σωματικά έμβρυα και σταδιακά μεταφέρθηκαν σε μη ασηπτικές συνθήκες στο χώμα.

Η επαγωγή των σωματικών εμβρύων έγινε σε “ΚΜ” θρεπτικό μέσο καλλογένεσης και “ΚΜ” θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης και στη συνέχεια μεταφέρονταν σε ½MS για 21 ημέρες. Τα νεαρά φυτάρια μεταφυτεύονταν στο χώμα.

Ε. ΜΟΡΙΑΚΗ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ

Ε.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Όπως έχει αναλυθεί διεξοδικά σε προηγούμενο κεφάλαιο, η έκφραση των γονιδίων **Dc8** και **Dc59** σχετίζεται άμεσα με το φαινόμενο της σωματικής εμβρυογένεσης στα φυτά. Συγκεκριμένα το Dc8 (LEA γονίδιο) εκφράζεται μόνο σε σωματικούς και ζυγωτικούς εμβρυϊκούς ιστούς και όχι σε φύλλα, βλαστούς, άνθη ή ρίζες ώριμων φυτών. Αντίθετα το Dc59 γονίδιο δεν ανήκει στα LEA γονίδια αν και επάγεται από το ABA και κωδικοποιεί μια μεμβρανική πρωτεΐνη, πιθανώς των λιποσωμάτων, η οποία, επίσης, ανιχνεύεται μόνο σε εμβρυϊκούς ιστούς.

Έχοντας σαν δεδομένα τα παραπάνω, θέσαμε δύο στόχους:

- ❖ Τη διαπίστωση της ύπαρξης ή μη αντιγράφων των συγκεκριμένων γονιδίων στο γονιδίωμα της ελιάς.
- ❖ Τη διερεύνηση του προτύπου έκφρασης ενός εκ των δύο γονιδίων μετά τον εντοπισμό του στο γονιδίωμα της ελιάς.

E.2. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ DC8 & DC59 ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ

E. 2.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ & ΠΕΨΗ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA ΕΛΙΑΣ & ΚΑΡΟΤΟΥ

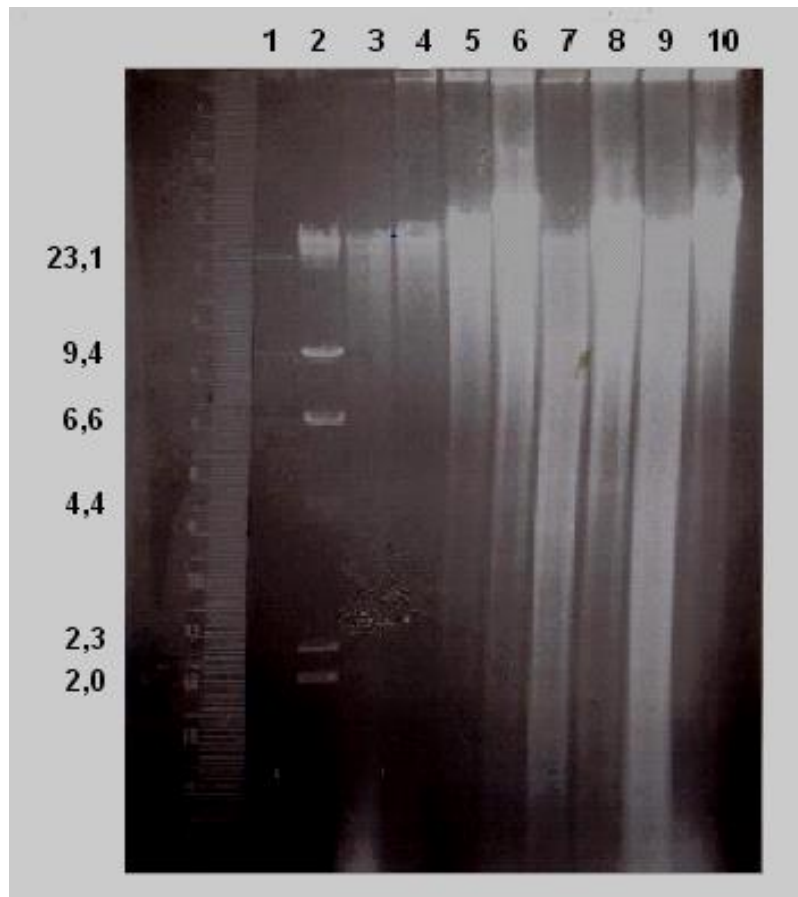
E.2.1.1 Δοκιμαστικές πέψεις γονιδιωματικού DNA ελιάς

Για τον εντοπισμό των γονιδίων Dc8 και Dc59 ήταν απαραίτητος ο υβριδισμός γονιδιωματικού DNA ελιάς με ραδιενεργά σημασμένους ανιχνευτές των δύο γονιδίων.

Το γονιδιωματικό DNA, που απομονώθηκε, προερχόταν από κάλλους ριζιδίων, βάσεων και κορυφών κοτυληδόνων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων Κορωνέικης. Οι κάλλοι προκύπταν από εμβολιασμό των εκφύτων σε θρεπτικό μέσο OMC, που περιείχε 25,0 μM IBA και 2,5 μM 2iP στο οποίο παρέμεναν για χρονικό διάστημα 21 ημερών.

Ακολουθούσε ομογενοποίηση των κάλλων και απομόνωση γονιδιωματικού DNA (συγκέντρωσης 50,0 ng/λ) με τη μέθοδο CTAB, όπως περιγράφεται στο κεφάλαιο Υλικά και Μέθοδοι. Το γονιδιωματικό μεγαλομοριακό DNA, που συλλεγόταν, υπόκειντο σε προκαταρκτικές πέψεις (2,0-3,0 μg DNA ανά πέψη) στους 37°C για έξι ώρες. Οι περιοριστικές ενδονουκλεάσες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν οι εξής: EcoRI, BamHI, XhoI, PstI, Sau3AI και HindIII.

Οι πέψεις αναλύονταν σε πήκτωμα αραρόζης 0,8% και τα αποτελέσματα απεικονίζονται στην εικόνα 31. Με βάση τα αποτελέσματα των δοκιμαστικών πέψεων επιλέχθηκαν σαν καταλληλότερες περιοριστικές ενδονουκλεάσες, για τους υπόλοιπους πειραματικούς χειρισμούς, η EcoRI και η Hind III.



Εικόνα 31: Πέψεις, με έξι περιοριστικές ενδονουκλεάσες, γονιδιωματικού DNA κάλλων ριζιδίων, βάσεων και κορυφών κοτυληδόνων ζυγωτικών εμβρύων ελιάς.

Οι στήλες αντιστοιχούν σε:

- 1^η: 2λ M.B.
- 2^η: 5λ M.B.
- 3^η: DNA με EcoRI χωρίς επώαση
- 4^η: DNA χωρίς ένζυμο μετά από επώαση
- 5^η: πέψη DNA με Bam HI
- 6^η: πέψη DNA με Xho I
- 7^η: πέψη DNA με EcoRI
- 8^η: πέψη DNA με Pst I
- 9^η: πέψη DNA με Sau 3AI
- 10^η: πέψη DNA με Hind III.

Οι αριθμοί αριστερά αντιπροσωπεύουν τα σχετικά μοριακά βάρη των αντίστοιχων ζωνών σε Kb.

E.2.2. ΜΕΤΑΦΟΡΑ ΣΕ ΦΙΛΤΡΟ ΝΙΤΡΟΚΥΤΤΑΡΙΝΗΣ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA ΕΛΙΑΣ & ΚΑΡΟΤΟΥ

Γονιδιωματικό DNA απομονωνόταν με τη μέθοδο CTAB από:

- i. Κάλλους ριζιδίων, βάσεων και κορυφών κοτυληδόνων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων Κορωνέικης.

Οι κάλλοι προκύπταν από εμβολιασμό των εκφύτων σε θρεπτικό μέσο ΟΜς, που περιείχε 25,0 μM IBA και 2,5 μM 2iP στο οποίο παρέμεναν για χρονικό διάστημα 21 ημερών.

- ii. Ζυγωτικά έμβρυα καρότου.

Τα παραπάνω δείγματα DNA υπόκειντο σε πέψεις (2,0-3,0 μg ανά πέψη) με Hind III και EcoRI. Οι πέψεις επαναλήφθηκαν δύο φορές και αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης 0,8%.

Τα αποτελέσματα της ανάλυσης των πέψεων απεικονίζονται στις εικόνες 32 (Α) και 33 (Α).

E.2.3 ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑΤΙΚΟΥ DNA ΕΛΙΑΣ ΜΕ ΤΑ ΓΟΝΙΔΙΑ DC8 & DC59

Δεκτικά κύτταρα του βακτηριακού στελέχους *Escherichia coli* μετασχηματίζονταν, ώστε τα πλασμίδιά τους να φέρουν κλωνοποιημένα cDNA των γονιδίων Dc8 και Dc59. Από τις μετασχηματισμένες καλλιέργειες των βακτηρίων *Escherichia coli* απομονώνονταν τα ανασυνδυασμένα πλασμιδιακά DNA με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης.

Τα κλωνοποιημένα γονίδια DC8 και DC59 απομονώνονταν από τα πλασμίδια μετά από πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI. Τα δείγματα DNA ηλεκτροφορούνταν σε πήκτωμα αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξης και απομονώνονταν οι ζώνες που έφεραν τα επιθυμητά κομμάτια DNA. Οι ζώνες καθαρίζονταν αρχικά με τη μέθοδο Freeze squeeze και περαιτέρω με τη μέθοδο της φαινόλης. Η συγκέντρωση των απομονωθέντων DNA ήταν περίπου 20,0 ng/λ.

Η σήμανση των γονιδίων-ανιχνευτών Dc8 και Dc59 γινόταν με τη μέθοδο Nick translation με $[\alpha\text{-P}^{32}]\text{dCTP}$. Ο προϋβριδισμός και ο υβριδισμός των φίλτρων νιτροκυτταρίνης, που προέκυψαν από τους χειρισμούς της προηγούμενης ενότητας, ήταν ετερόλογοι και χρησιμοποιήθηκαν 0,5M Na[P], 7% SDS, 1,0 mM EDTA και 1,0% BSA στους 60°C για 16 ώρες.

Τα φίλτρα ξεπλένονταν τρεις φορές σε ήπιες συνθήκες, με 40,0 mM Na[P], 5,0% SDS και 1,0 mM EDTA στους 60°C, 55°C και 50°C διαδοχικά ανά 15 λεπτά. Ακολουθούσαν άλλα δύο ξεπλύματα με 40,0 mM Na[P], 2,0% SDS και 1,0 mM EDTA στους 45°C και 37°C ανά 15 λεπτά.

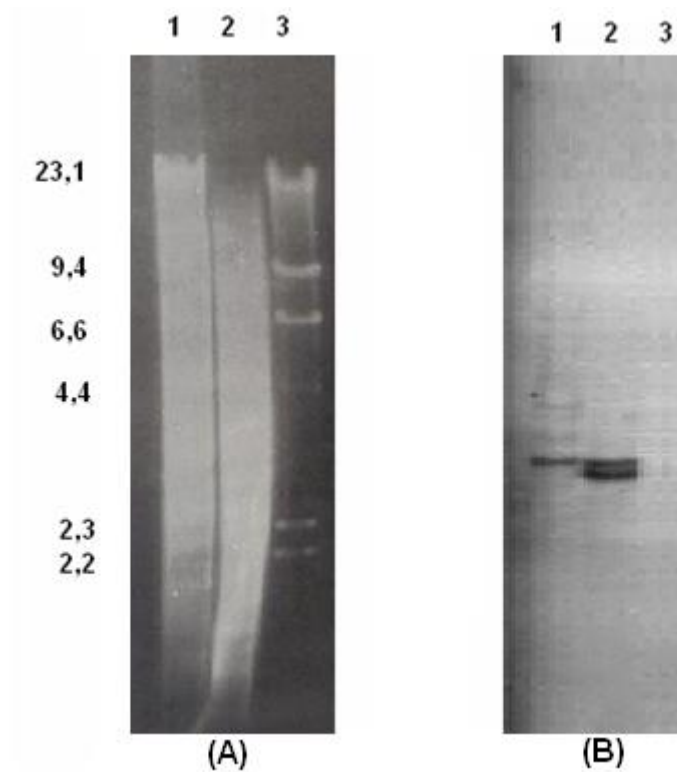
Μετά την ολοκλήρωση των ξεπλυμάτων τα φίλτρα νιτροκυτταρίνης τοποθετούνταν σε θήκη έκθεσης, κάτω από φιλμ αυτοραδιογραφίας, για 24 ώρες τουλάχιστον. Τα αποτελέσματα της εμφάνισης των φιλμ αυτοραδιογραφίας απεικονίζονται στις εικόνες 32 (B) και 33 (B).

Από τη μελέτη του φιλμ αυτοραδιογραφίας γίνεται φανερό ότι το γονίδιο Dc8 υβριδίζει σε:

- i. Μια πολύ καθαρή ζώνη περίπου στις 3 Kb με το γονιδιωματικό DNA της ελιάς, που είχε κοπεί με EcoRI.
- ii. Μερικές πιο αχνές ζώνες με το γονιδιωματικό DNA της ελιάς, που είχε κοπεί με Hind III.
- iii. Το γονίδιο Dc59 υβριδίζει σε πλήθος ζωνών, τόσο με το γονιδιωματικό DNA της ελιάς που είχε κοπεί με EcoRI όσο και με το γονιδιωματικό DNA της ελιάς που είχε κοπεί με Hind III.

Αξιοσημείωτο είναι ότι αν και οι συνθήκες υβριδισμού που χρησιμοποιήθηκαν ήταν χαμηλές, στα μοριακά βάρη τα οποία αποτελούν το πείραμα-μάρτυρα δεν προέκυψε υβριδισμός.

Παράλληλα, πρέπει να αναφερθεί ότι προέκυψαν τα ίδια αποτελέσματα και από τις δύο διαφορετικές απομονώσεις και πέψεις.



Εικόνα 32(A): Πέψεις, με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI, γενωματικού DNA ελιάς και καρότου. Οι στήλες αντιστοιχούν σε:

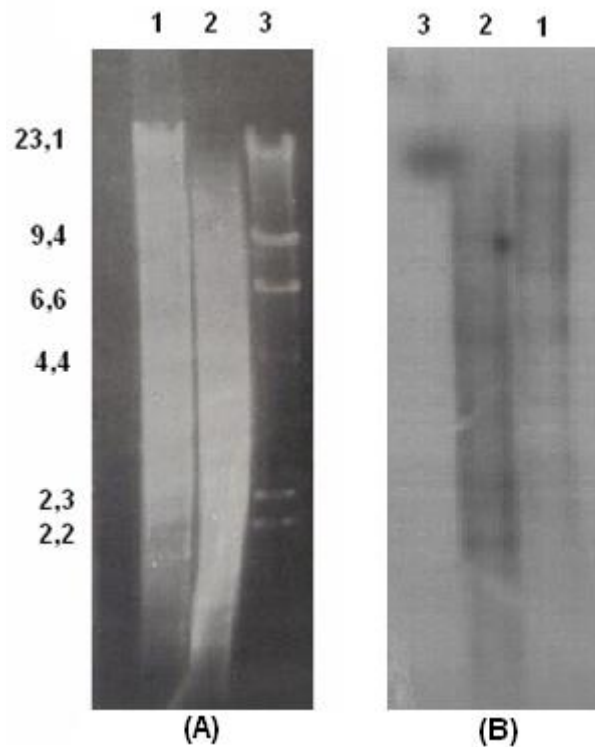
- 1: Πέψη γενωματικού DNA κάλλων εκφύτων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων ελιάς.
- 2: Πέψη γενωματικού DNA ζυγωτικών εμβρύων καρότου.
- 3: M.B.

Εικόνα 32(B): Φιλμ αυτοραδιογραφίας από την έκθεση του φίλτρου νιτροκυτταρίνης που προέκυψε από την μεταφορά της πηκτής αгарόζης της εικόνας 32(A) με τη μέθοδο Southern και ο υβριδισμός των ζωνών με το ραδιενεργά σημασμένο - ανιχνευτή Dc8.

Οι στήλες αντιστοιχούν σε:

- 1: Πέψη γενωματικού DNA κάλλων εκφύτων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων ελιάς.
- 2: Πέψη γενωματικού DNA ζυγωτικών εμβρύων καρότου.
- 3: M.B.

Οι αριθμοί αριστερά αντιπροσωπεύουν τα σχετικά μοριακά βάρη των αντίστοιχων ζωνών σε Kb.



Εικόνα 33(A): Πέψεις, με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI, γενωματικού DNA ελιάς και καρότου. Οι στήλες αντιστοιχούν σε:

- 1: Πέψη γενωματικού DNA κάλλων εκφύτων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων ελιάς.
- 2: Πέψη γενωματικού DNA ζυγωτικών εμβρύων καρότου.
- 3: M.B.

Εικόνα 33(B): Φιλμ αυτοραδιογραφίας από την έκθεση του φίλτρου νιτροκυτταρίνης που προέκυψε από την μεταφορά της πηκτής αгарόζης της εικόνας 33(A) με τη μέθοδο Southern και ο υβριδισμός των ζωνών με το ραδιενεργά σημασμένο- ανιχνευτή Dc59.

Οι στήλες αντιστοιχούν σε:

- 1: Πέψη γενωματικού DNA κάλλων εκφύτων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων ελιάς.
- 2: Πέψη γενωματικού DNA ζυγωτικών εμβρύων καρότου.
- 3: M.B.

Οι αριθμοί αριστερά αντιπροσωπεύουν τα σχετικά μοριακά βάρη των αντίστοιχων ζωνών σε Kb.

Ε.3. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ Dc8 ΣΕ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΕΛΙΑΣ

Ε.3.1. ΑΠΟΜΟΝΩΣΗ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΑΠΟ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΤΙΚΕΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΕΣ ΕΛΙΑΣ

Μετά την ανίχνευση των γονιδίων Dc8 και Dc59 στο γονιδίωμα της ελιάς, διερευνήθηκε το πρότυπο έκφρασης του Dc8. Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το Dc8 ανιχνεύεται στα τελευταία στάδια της σωματικής εμβρυογένεσης (LEA γονίδιο), επάγεται από το ABA και πιθανολογείται ότι προστατεύει το έμβρυο κατά την αφυδάτωση του σπέρματος. Το Dc8 γονίδιο κωδικοποιεί μια υδρόφιλη πρωτεΐνη με διαμόρφωση α-έλικας και μεγέθους 60,2 KD.

Στην παρούσα πειραματική προσπάθεια η έκφραση του γονιδίου Dc8 μελετήθηκε κατά τη διάρκεια των δύο διακριτών φάσεων της ιστοκαλλιέργειας:

- Στην **1^η φάση** ή **φάση επαγωγής** της σωματικής εμβρυογένεσης, δηλαδή τον εμβολιασμό και την καλλιέργεια των εκφύτων στο θρεπτικό μέσο καλλογένεσης για 7, 14 και 21 ημέρες.
- Στη **2^η φάση** ή **φάση έκφρασης** της σωματικής εμβρυογένεσης, δηλαδή τη μεταφορά και καλλιέργεια των κάλλων στο θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης σωματικών εμβρύων.

Για το σκοπό αυτό, ριζίδια από ώριμα ζυγωτικά έμβρυα ελιάς εμβολιάζονταν σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης που περιείχε:

- Τη χημική σύσταση του θρεπτικού μέσου OMc.
- Τροποποιημένη συγκέντρωση ανόργανου αζώτου 20,0 μM NH₄Cl.
- 160,0 g/L σακχαρόζης.
- Φυτοαυξητικούς παράγοντες: 25,0 μM IBA και 2,5 μM 2iP.

Επιλέχθηκε το συγκεκριμένο θρεπτικό υπόστρωμα και τα συγκεκριμένα έκφυτα, καθώς από προηγούμενα πειραματικά αποτελέσματα διαφάνηκε ότι αποτελούσαν το καταλληλότερο θρεπτικό υπόστρωμα και το ιδανικότερο φυτικό υλικό, αντίστοιχα, για την επαγωγή σωματικών εμβρύων σε υψηλό ποσοστό.

Από το θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης απομακρύνονταν και καταψύχονταν κάλλοι ηλικίας 7, 14 και 21 ημερών.

Οι υπόλοιποι κάλλοι, 21 ημερών, μεταφέρονταν στο θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης το οποίο ήταν ίδιο με το αρχικό, αλλά χωρίς φυτοαυξητικούς παράγοντες. Από το θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης απομακρύνονταν και καταψύχονταν κάλλοι μετά από παραμονή τους σε αυτό για 3, 6, 10, 15 και 21 ημέρες.

Από τα οκτώ είδη κάλλων διαφορετικής ηλικίας που καταψύχονταν, απομονωνόταν ολικό RNA. Τα δείγματα RNA φωτομετρούνταν στα 260nm και 280nm και από την αναλογία

των δύο μετρήσεων υπολογίστηκε ότι η καθαρότητά τους κυμαινόταν από 1,7-2,1 και η συγκέντρωσή τους από 8.000-14.000 µg/ml.

Στη συνέχεια τα δείγματα αραιώνονταν 1:10 και ηλεκτροφορούνταν (20,0 µg από κάθε δείγμα) σε πήκτωμα αγαρόζης αποδιάταξης 1,1% [Εικόνα 34(A)]. Όλα τα δείγματα RNA μεταφέρονταν από το πήκτωμα αγαρόζης σε φίλτρο πλαστικής μεμβράνης (μέθοδος Northern).

Παράλληλα, απομονωνόταν ολικό RNA από:

- ◆ 20 ακέραια και ώριμα ζυγωτικά έμβρυα ελιάς.
- ◆ 20 ενδοσπέρμια ελιάς.
- ◆ 200 ζυγωτικά έμβρυα καρότου.
- ◆ 200 ενδοσπέρμια καρότου.

Τα απομονωθέντα RNA από τους παραπάνω ιστούς φωτομετρούνταν στα 260nm και 280nm και από την αναλογία των δύο μετρήσεων υπολογίστηκε ότι η καθαρότητά τους κυμαινόταν από 1,4-1,8 και η συγκέντρωσή τους από 3.000-9.000 µg/ml.

Από κάθε δείγμα αναλύονταν 2,0 λ σε πήκτωμα αγαρόζης αποδιάταξης 1,1% [Εικόνα 35(A)]. Όλα τα παραπάνω δείγματα RNA μεταφέρθηκαν από το πήκτωμα αγαρόζης σε φίλτρο πλαστικής μεμβράνης (μέθοδος Northern).

E.3.2. ΥΒΡΙΔΙΣΜΟΣ ΟΛΙΚΟΥ RNA ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΤΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΕΛΙΑΣ ΜΕ ΤΟ DC8 ΓΟΝΙΔΙΟ

Δεκτικά κύτταρα του βακτηριακού στελέχους *Escherichia coli* μετασχηματίζονταν, ώστε τα πλασμίδια τους να φέρουν κλωνοποιημένα cDNA του γονιδίου Dc8. Από τις μετασχηματισμένες καλλιέργειες των βακτηρίων *Escherichia coli* απομονώνονταν τα ανασυνδυασμένα πλασμιδιακά DNA με τη μέθοδο της αλκαλικής λύσης.

Το κλωνοποιημένο γονίδιο DC8 απομονωνόταν από τα πλασμίδια μετά από πέψη με την περιοριστική ενδονουκλεάση EcoRI. Τα δείγματα DNA ηλεκτροφορούνταν σε πήκτωμα αγαρόζης χαμηλού σημείου τήξης και απομονώνονταν οι ζώνες που έφεραν τα επιθυμητά κομμάτια DNA. Οι ζώνες καθαρίζονταν αρχικά με τη μέθοδο Freeze squeeze και περαιτέρω με τη μέθοδο της φαινόλης. Η συγκέντρωση των απομονωθέντων DNA ήταν περίπου 20,0 ng/λ.

Η σήμανση του γονιδίου-ανιχνευτή Dc8 γινόταν με τη μέθοδο Nick translation με [α -P³²]dCTP. Ο προϋβριδισμός και ο υβριδισμός των φίλτρων νιτροκυτταρίνης, που προέκυψαν

από τους χειρισμούς της προηγούμενης ενότητας, ήταν ετερόλογοι και χρησιμοποιήθηκαν 0,5M Na[P], 7% SDS, 1,0 mM EDTA και 1,0% BSA στους 60°C για 16 ώρες.

Τα φίλτρα ξεπλένονταν τρεις φορές σε ήπιες συνθήκες, με 40,0 mM Na[P], 5,0% SDS και 1,0 mM EDTA στους 60°C, 55°C και 50°C διαδοχικά ανά 15 λεπτά. Ακολουθούσαν άλλα δύο ξεπλύματα με 40,0 mM Na[P], 2,0% SDS και 1,0 mM EDTA στους 45°C και 37°C ανά 15 λεπτά.

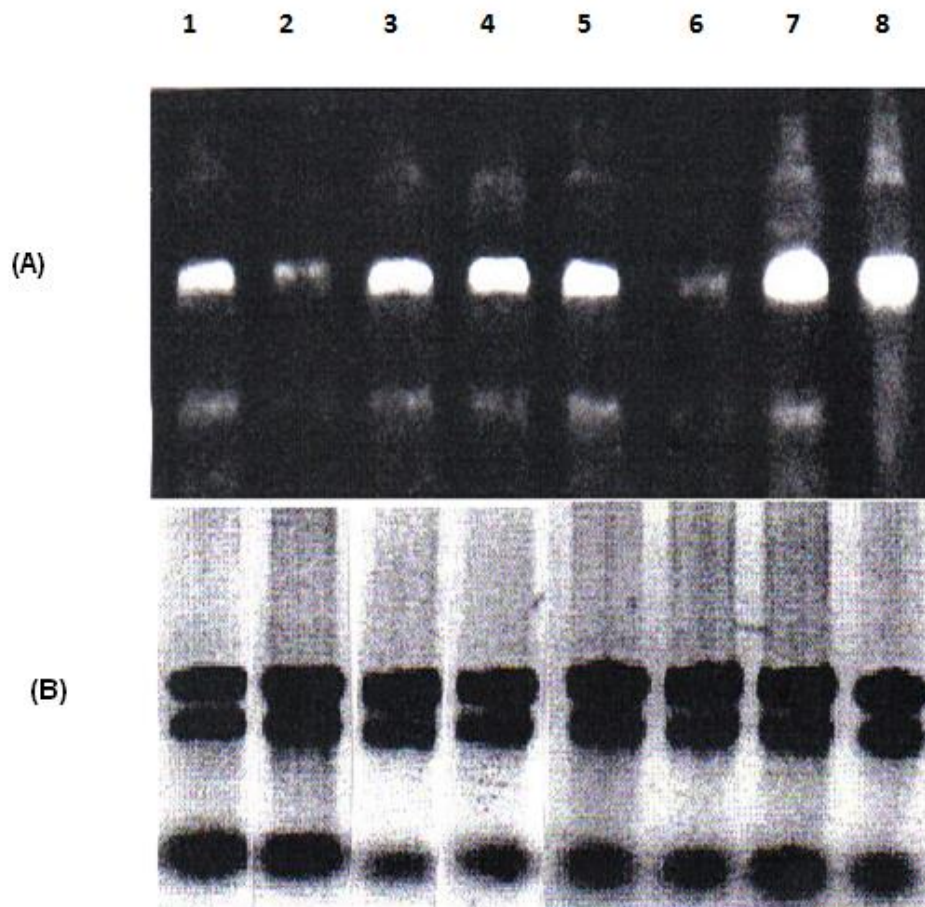
Μετά την ολοκλήρωση των ξεπλυμάτων τα φίλτρα νιτροκυτταρίνης τοποθετούνταν σε θήκη έκθεσης, κάτω από φιλμ αυτοραδιογραφίας, για 24 ώρες τουλάχιστον. Τα αποτελέσματα της εμφάνισης των φιλμ αυτοραδιογραφίας απεικονίζονται στις εικόνες 34(B) και 35(B).

Από τη μελέτη των αυτοραδιογραφημάτων διαπιστώνεται ότι η έκφραση του γονιδίου Dc8 καταγράφεται σε όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας των ριζιδίων ζυγωτικών εμβρύων ελιάς Κορωνέικης. Το φιλμ αυτοραδιογραφίας υποδεικνύει ότι η ποσότητα των μεταγραφημάτων παραμένει σχετικά σταθερή στους κάλλους ηλικίας 7-31 ημερών. Η αύξηση της ποσότητας τους μεταγραφήματος του γονιδίου Dc8 γίνεται εμφανής στα δύο τελευταία δείγματα (στήλες 7 και 8) που αντιστοιχούν σε κάλλους ηλικίας 36 και 42 ημερών αντίστοιχα.

Τέλος, από τα αποτελέσματα που απεικονίζονται στην εικόνα 35(B) διαπιστώνεται ότι η έκφραση του γονιδίου Dc8 εντοπίζεται:

- Στα ακέραια ζυγωτικά έμβρυα.
- Στα ενδοσπέρμια της ελιάς.
- Στα ακέραια ζυγωτικά έμβρυα του καρότου.

Αντίθετα, δεν διαπιστώθηκε η έκφραση του γονιδίου Dc8 στα ενδοσπέρμια του καρότου.



Εικόνα 34(A): Ολικό RNA από κάλλους, ριζιδίων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων, εμβρυογενετικών καλλιιεργειών.

Οι κάλλοι παρέμεναν στο θρεπτικό μέσο καλλογένεσης για χρονικό διάστημα:

- 7 ημερών (στήλη 1).
- 14 ημερών (στήλη 2).
- 21 ημερών (στήλη 3).

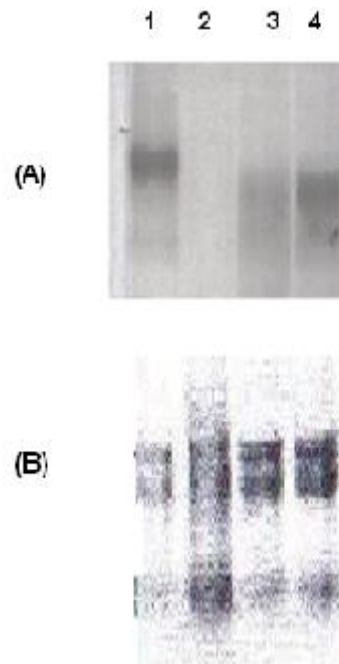
Οι κάλλοι 21 ημερών μεταφέρονταν στο θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης, όπου και παρέμεναν για χρονικό διάστημα:

- 3 ημερών (στήλη 4).
- 6 ημερών (στήλη 5).
- 10 ημερών (στήλη 6).
- 15 ημερών (στήλη 7).
- 21 ημερών (στήλη 8).

Τα δείγματα αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης αποδιάταξης 1,1%.

Εικόνα 34(B): Έκφραση του γονιδίου Dc8 σε κάλλους, ριζιδίων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων, εμβρυογενετικών καλλιιεργειών, διαφορετικής ηλικίας.

Ο υβριδισμός έγινε με ραδιενεργά σημασμένο-ανιχνευτή Dc8.



Εικόνα 35(A): Ολικό RNA από ζυγωτικά έμβρυα και ενδοσπέρμια καρότου και ελιάς.

- ♦ Στήλη 1: ζυγωτικά έμβρυα καρότου.
- ♦ Στήλη 2: ενδοσπέρμια καρότου.
- ♦ Στήλη 3: ζυγωτικά έμβρυα ελιάς.
- ♦ Στήλη 4: ενδοσπέρμια ελιάς.

Τα δείγματα αναλύθηκαν σε πήκτωμα αγαρόζης αποδιάταξης 1,1%.

Εικόνα 35(B): Έκφραση του γονιδίου Dc8 σε ζυγωτικά έμβρυα και ενδοσπέρμια καρότου και ελιάς (ανάλυση αποτυπώματος κατά Northern).

Ο υβριδισμός έγινε με ραδιενεργά σημασμένο- ανιχνευτή Dc8.

ΣΤ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΚΗΣ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗΣ**ΣΤ.1. ΕΚΦΥΤΟ**

Η προέλευση και το είδος του εκφύτου αποτελούν δύο από τις καθοριστικότερες επιλογές που πρέπει να γίνουν στην έναρξη κάθε ιστοκαλλιεργητικής, πειραματικής διαδικασίας. Το τμήμα του μητρικού ιστού που θα χρησιμοποιηθεί, η χρονική στιγμή που θα αποκοπεί από το μητρικό-φυτικό οργανισμό και ο γονότυπός του συνιστούν μερικούς από τους πρωταρχικούς παράγοντες που θα καθορίσουν την περαιτέρω πορεία της αναγεννητικής μεθόδου *in vitro*.

Οι παράγοντες που εξετάστηκαν στο πλαίσιο της παρούσας διδακτορικής διατριβής και σχετίζονται με το έκφυτο είναι:

1. Ποικιλία ελιάς.
2. Ηλικία εκφύτου.
3. Τύπος εκφύτου.

ΣΤ.1.1. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ & ΠΟΙΚΙΛΙΑ ΕΛΙΑΣ

Μελετήθηκε το εμβρυογενετικό δυναμικό πέντε ποικιλιών ελιάς οι οποίες καλλιεργούνται ευρύτατα στην ελληνική ύπαιθρο. Οι διαφορές της αναγεννητικής τους ικανότητας και στα τρία είδη εκφύτων που χρησιμοποιήθηκαν (ριζίδια, βάσεις και κορυφές κοτυληδόνων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων) ήταν σαφείς.

Η ποικιλία *Καλαμάτα*, υπό τις συγκεκριμένες καλλιεργητικές συνθήκες, αποδείχθηκε ανίκανη για διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων. Οι ποικιλίες *Τζονάτη* και *Αγγουρομάννα* διαμόρφωσαν περιορισμένο ποσοστό σωματικών εμβρύων από κάλλους ριζιδίων (17,0% και 6,0% αντίστοιχα), ενώ η μορφογενετική αντίδραση των άλλων δύο εκφύτων ήταν μηδενική. Αντίθετα σε κάλλους ριζιδίων των ποικιλιών *Κορωνέικη* και *Άμφισσα* καταγράφηκε επαγωγή σωματικών εμβρύων σε ποσοστό 24,0% και 29,0% αντίστοιχα. Ικανοποιητική ήταν η μορφογενετική αντίδραση των κάλλων από έκφυτα κοτυληδόνων *Κορωνέικης* (24,0%), ενώ αντίθετα στα έκφυτα κοτυληδόνων *Άμφισσας* περιορίστηκε στο 4,0%. Από την παραπάνω πειραματική προσέγγιση διαφαίνεται μια κλιμάκωση της εμβρυογενετικής ικανότητας στην ελιά κατά μήκος του ζυγωτικού εμβρυϊκού άξονα.

Πολλές είναι οι ερευνητικές ανακοινώσεις που έχουν καταγράψει μια θετική διαβάθμιση της αναγεννητικής ικανότητας από τις κορυφές και τις βάσεις των κοτυληδόνων προς το ριζίδιο των ζυγωτικών εμβρύων.

Η ύπαρξη “διαβάθμισης του εμβρυογενετικού δυναμικού” από τη βασική προς την ακραία περιοχή των κοτυληδόνων ελιάς προτάθηκε, για πρώτη φορά, από τους Cañas et al. (1988).

Ο Rugini (1988) αναφέρει ότι δεν κατέγραψε διαφορές στην εμβρυογενετική ικανότητα των ανώριμων ζυγωτικών εμβρύων των τεσσάρων ποικιλιών ελιάς που μελέτησε (*Dolce Agogia*, *Leccino*, *Frantoio* και *Moraiolo*). Η εμβρυογενετική αναγέννηση έδειχνε εξάρτηση μόνο από τη σύσταση του θρεπτικού μέσου ανακαλλιέργειας και κυμαινόταν μεταξύ 10,0% και 40,0%. Η ομοιόμορφη εμβρυογενετική αντίδραση των τεσσάρων ποικιλιών, πιθανώς έγκειται στο γεγονός ότι χρησιμοποιήθηκαν ανώριμα ζυγωτικά έμβρυα. Είναι γνωστό ότι οι ανώριμοι ιστοί εκδηλώνουν υψηλότερη μορφογενετική πλαστικότητα συγκριτικά με τους ώριμους.

Σε κάλλους ριζιδίων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων αγριελιάς καταγράφηκε εμβρυογενετική αντίδραση 7,0% και σε κάλλους κοτυληδόνων 4,0% (Orinos et al. 1991).

Σε κάλλους ριζιδίων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων, των καλλιεργούμενων ποικιλιών ελιάς *Μεγαρείτικης* και *Λιανολιάς Κέρκυρας*, παρατηρήθηκε 10,0% και 17,0% σωματική εμβρυογένεση αντίστοιχα, ενώ στους κάλλους κοτυληδόνων ήταν μηδενική (Ορεινός, 1992). Σκόπιμο είναι να διευκρινιστεί ότι η *Λιανολιά Κέρκυρας* που χρησιμοποιήθηκε αποτελεί τοπωνύμιο της *Κορωνέικης* που φύτευται στην Κέρκυρα και χαρακτηρίζεται από όψιμη άνθιση.

Οι Mitrakos et al. (1992) σε κάλλους ριζιδίων, ηλικίας 0-21 ημερών, ώριμων ζυγωτικών εμβρύων *Κορωνέικης* κατέγραψαν 40,0% εμβρυογενετική αντίδραση και σε κάλλους κοτυληδόνων 0,0%-10,0%.

Από τις προηγούμενες ανακοινώσεις αναδεικνύεται ξεκάθαρα η εμβρυογενετική υπεροχή των ριζιδίων έναντι των υπόλοιπων εκφύτων που προέρχονται από ώριμα ζυγωτικά έμβρυα. Οι διαφορές που παρατηρούνται στα ποσοστά σωματικής εμβρυογένεσης που καταγράφηκαν από τις παραπάνω ερευνητικές ομάδες και την ερευνητική διαδικασία, της παρούσας διατριβής, πιθανώς οφείλονται:

- i. Στο διαφορετικό θρεπτικό υπόστρωμα ανακαλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκε από τον Ορεινό (1992) και στην παρούσα διδακτορική προσπάθεια.
- ii. Ο διαφορετικός τύπος συγκομιδής της *Κορωνέικης* που χρησιμοποιήθηκε από τους Mitrakos et al. (1992). Οι δρύπες προέρχονταν από ελαιώνες της Καλαμάτας, ενώ οι δρύπες που χρησιμοποιήθηκαν σαν πειραματικό υλικό της παρούσας διατριβής, προέρχονταν από ελαιώνες της Κέρκυρας.

Η εμβρυογενετική αντίδραση τριών διαφορετικών ποικιλιών ελιάς μελετήθηκε και από τους Leva et al. (1995). Οι ποικιλίες *Picholine* και *Frangivento* έδιναν σωματικά έμβρυα μόνο από έκφυτα κοτυληδόνων ηλικίας 60 και 90 ημερών, ενώ η ποικιλία *Frantoio* μόνο από κοτυληδόνες ηλικίας 90 ημερών. Παράλληλα η επαγωγή σωματικών εμβρύων από την ποικιλία *Picholine* απαιτούσε την προσθήκη μεγάλης συγκέντρωσης NAA και από την ποικιλία *Frantoio* 2iP.

Οι Mazri et al. (2010) κατέδειξαν την άμεση εξάρτηση της εμβρυογενετικής ικανότητας από το γονότυπο και το είδος του εκφύτου. Χρησιμοποίησαν τέσσερις διαφορετικές ποικιλίες ελιάς (ισπανικές και μαροκινές), οπότε και καταγράφηκαν διαφορετικά ποσοστά σωματικής εμβρυογένεσης. Η ποικιλία *Arbequina* έδωσε τα υψηλότερα ποσοστά, τόσο από ριζίδια (13,0%) όσο και από κοτυληδόνες (17,0%), ακολουθούμενη από την *Dahbia* (ριζίδια 9,0% και κοτυληδόνες 7,0%) και την *Picual* (μόνο από ριζίδια 7,0%). Αντίθετα δεν καταγράφηκε καμία εμβρυογενετική αντίδραση από την ποικιλία *Moroccan Picholine*.

Οι Mazri et al. (2011) μελέτησαν την εμβρυογενετική ικανότητα διαφορετικών εκφύτων από την ίδια μαροκινή ποικιλία ελιάς (*Dahbia*). Συγκεκριμένα χρησιμοποίησαν σαν έκφυτα:

- Ωοθήκες και ανθήρες μη επικονιασμένων ανθέων.
- Ριζίδια και κοτυληδόνες ζυγωτικών εμβρύων.
- Φύλλα και μίσχους φυταρίων ηλικίας 4 ετών, που προέρχονταν από μικροπολλαπλασιασμό.

Αν και όλοι οι κάλλοι ήταν μορφολογικά όμοιοι και η ιστολογική ανάλυση έδειξε την ύπαρξη κυττάρων με εμβρυογενετικά χαρακτηριστικά σε όλους τους κάλλους, η μετατροπή των εμβρυογενετικών κυττάρων σε σωματικά έμβρυα παρατηρήθηκε μόνο στα ριζίδια και στις κοτυληδόνες των ζυγωτικών εμβρύων. Η συγκεκριμένη πειραματική καταγραφή καταδεικνύει την καταλυτική σημασία του είδους του εκφύτου, ακόμα και όταν χρησιμοποιείται η ίδια ποικιλία και οι ίδιες καλλιεργητικές συνθήκες.

Συνοψίζοντας τα πειραματικά αποτελέσματα, όλων των παραπάνω ερευνητικών προσεγγίσεων, γίνεται φανερό ότι συγκλίνουν στα εξής συμπεράσματα:

- Η κάθε ποικιλία ελιάς χαρακτηρίζεται από τη δική της μορφογενετική δυναμική. Τα διαφορετικά ενδογενή επίπεδα φυτοαυξητικών παραγόντων, οι διαφορετικοί γονότυποι και οι διαφορετικές θρεπτικές απαιτήσεις αποτελούν μερικούς μόνο από τους λόγους που θα μπορούσαν να ερμηνεύσουν τις ξεχωριστές αναγεννητικές ικανότητες των καλλιεργούμενων ποικιλιών ελιάς *in vitro*.

- Η ποικιλία *Κορωνέικη*, έναντι των υπόλοιπων ελληνικών καλλιεργούμενων ποικιλιών που μελετήθηκαν από τις εκάστοτε ερευνητικές ομάδες, αναδεικνύεται καταλλήλοτερη και πιο δεκτική σε *in vitro* πειραματικούς χειρισμούς.
Η υψηλή εμβρυογενετική δυναμικότητα της *Κορωνέικης* έχει και σημαντική πρακτική σημασία, καθώς αποτελεί μια ελληνική ποικιλία μεγάλης οικονομικής αξίας. Τα ελαιόδεντρα της ποικιλίας *Κορωνέικη* καλύπτουν ένα σημαντικό τμήμα των ελληνικών ελαιώνων, καθώς θεωρείται ανθεκτική και πολύ παραγωγική και προσφέρει λάδι εξαιρετικής ποιότητας.
- Τέλος, το ριζίδιο σαν έκφυτο συγκριτικά με τα έκφυτα από βάσεις και κορυφές κοτυληδόνων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων, ανεξαρτήτου ποικιλίας, χαρακτηρίζεται από αναγεννητική εμβρυογενετική ανωτερότητα *in vitro*.

ΣΤ.1.2. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ & ΗΛΙΚΙΑ ΕΚΦΥΤΟΥ

Η πλειοψηφία των βιβλιογραφικών αναφορών υποστηρίζει την υπεροχή των ανώριμων έναντι των ώριμων εκφύτων ελιάς, αλλά και των άλλων φυτικών ειδών (Ma et al. 2004, Martin et al. 2005, Trabelsi et al. 2003 & 2011). Οι νεαροί ιστοί και όργανα είναι πιο δεκτικά στη διαφοροποίηση *in vitro*, καθώς διακρίνονται από υψηλούς αυξητικούς ρυθμούς και *in vitro* ολοδυναμία, ενδεχομένως, λόγω της νεανικότητάς τους και των ενδογενών ποσοστών ορμονών που διαθέτουν.

Αντίθετα, οι ώριμοι ιστοί βρίσκονται σε ένα μεταβατικό μορφογενετικό στάδιο και απαιτείται ένα εξωτερικό ερέθισμα, προκειμένου να επανακτήσουν την ολοδυναμία τους και να εκδηλώσουν το εμβρυογενετικό τους δυναμικό (Namasivayam 2007). Μόνο οι Capelo et al. (2010) έχουν δημοσιεύσει την επαγωγή σωματικών εμβρύων από ώριμους ιστούς ελιάς (φύλλα και μίσχους), καθώς και οι Benelli et al. (2001) οι οποίοι πραγματοποίησαν ιστολογικές μελέτες σε σωματικά έμβρυα από ώριμους ιστούς.

Στο πλαίσιο της παρούσας ερευνητικής προσπάθειας μελετήθηκε η εμβρυογενετική δυναμικότητα ανώριμων ζυγωτικών εμβρύων διαφορετικής ηλικίας. Τα ανώριμα ζυγωτικά έμβρυα προέρχονταν από καρπούς που συλλέγονταν από τα μέσα Ιουλίου μέχρι τα μέσα Αυγούστου.

Τα δείγματα των δύο πρώτων εβδομάδων συλλογής εκδήλωναν χαμηλή εμβρυογενετική δυναμικότητα, ενώ τα έκφυτα των δύο τελευταίων εβδομάδων μεγαλύτερη και ανάλογη των ώ-

ριμων ζυγωτικών εμβρύων. Παράλληλα η σωματική εμβρυογενετική διαφοροποίηση εμφάνιζε φθίνουσα κλιμάκωση στα τρία είδη εκφύτων, δηλαδή στα ριζίδια, στις βάσεις και στις κορυφές κοτυληδόνων, ανεξαρτήτως της ηλικίας τους.

Αξιοσημείωτο είναι ότι τα έκφυτα του Ιουλίου (ιδιαίτερα της πρώτης εβδομάδας συλλογής) είχαν πολύ μικρό μέγεθος συγκριτικά με τα αντίστοιχα ώριμα. Το μέγεθος των ζυγωτικών εμβρύων αυξάνονταν σταδιακά και στα μέσα Αυγούστου γίνονταν ισοδύναμο με των ώριμων. Η ελλιπής διαμόρφωση των εκφύτων Ιουλίου και η πληρέστερη των εκφύτων Αυγούστου, πιθανώς να αποτελεί μια ερμηνεία της περιορισμένης μορφογενετικής αντίδρασης των πρώτων και της πιο ικανοποιητικής των δεύτερων.

Την εμβρυογενετική αντίδραση ανώριμων ζυγωτικών εμβρύων ελιάς διαφορετικής ηλικίας μελέτησε και ο Rugini (1988). Μελετώντας ιστοκαλλιέργειες ανώριμων ζυγωτικών εμβρύων ελιάς 50, 75, 90 και 105 ημερών μετά την πλήρη άνθιση ανακοίνωσε ότι μόνο τα ζυγωτικά έμβρυα 75 ημερών έδωσαν σωματικά έμβρυα σε ποσοστό 70,0% (20,0% με παρεμβολή κάλλου και 50,0% άγνωστης προέλευσης).

Η αλληλεξάρτηση ηλικίας εκφύτου και αναγεννητικής ικανότητας καταγράφηκε και από τους Leva et al. (1995). Σωματικά έμβρυα διαμορφώνονταν μόνο από έκφυτα κοτυληδόνων ηλικίας 60 και 90 ημερών στις ποικιλίες *Picholine* και *Frangivento*, ενώ αντίθετα στην ποικιλία *Frantoio* μόνο από κοτυληδόνες ηλικίας 90 ημερών.

Τα πειραματικά αποτελέσματα, της παρούσας διατριβής, αναδεικνύουν την ανάλογη εμβρυογενετική ικανότητα των ανώριμων και των ώριμων εκφύτων. Δύο ερμηνείες της ανάλογης εμβρυογενετικής αντίδρασης των δύο εκφύτων διαφορετικής ηλικίας αποτελούν:

1. Η γονοτυπική ιδιαιτερότητα της *Κορωνέικης*.
2. Η υπερπήδηση του εμβρυϊκού λήθαργου που υφίσταται στα σπέρματα των δρυπών κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής τους.

Οι Istambouli et al. (1977) διαπίστωσαν ότι ο εμβρυϊκός λήθαργος που υφίσταται στα σπέρματα της ελιάς, λόγω αναστολέων και παρεμποδίζει τη φύτευση (Diamantoglou et al. 1979), μπορεί να υπερπηδηθεί, σταδιακά, με την αποθήκευσή τους σε ξηρό μέρος, χαμηλή θερμοκρασία και φως.

Παράλληλα οι Cãnas et al. (1987) ανακοίνωσαν, ότι ενώ τα ολόκληρα σπέρματα δεν φυτρώνουν, λόγω της ύπαρξης των προαναφερθέντων αναστολέων, τα απομονωμένα έμβρυα φυτρώνουν 100,0%.

Όπως έχει περιγραφεί, τα σπέρματα που χρησιμοποιήθηκαν στην έρευνά μας, προέρχονταν από δρύπες που είχαν αποθηκευτεί και αποξηρανθεί για 2-3 μήνες σε θερμοκρασία δωμα-

τίου και φυσικό φωτισμό. Είναι λοιπόν πιθανό οι παραπάνω αποθηκευτικές και αποξηραντικές συνθήκες να βοήθησαν στην αναστολή του εμβρυϊκού λήθαργου. Η υπερπήδηση του εμβρυϊκού λήθαργου σε συνδυασμό με την απομόνωση από τις δρύπες και τον εμβολιασμό των εκφύτων των ώριμων ζυγωτικών εμβρύων, πιθανώς να προσδίδουν στα τελευταία ανάλογη μορφογενετική συμπεριφορά με τα αντίστοιχα ανώριμα.

Παρά τη διαπίστωση ότι τα ανώριμα έκφυτα έχουν ανάλογη εμβρυογενετική αντίδραση με τα αντίστοιχα ώριμα έκφυτα, τα τελευταία προτιμούνται για τη διεξαγωγή των ιστοκαλλιεργητικών διαδικασιών. Τα ώριμα έκφυτα αναδεικνύονται καταλληλότερα για τις *in vitro* ιστοκαλλιέργειες της ελιάς για τους εξής λόγους:

- i. Έχουν ανάλογη ή και καλύτερη σε μερικές περιπτώσεις, *in vitro* συμπεριφορά και μορφογενετική αντίδραση.
- ii. Είναι διαθέσιμα σε όλη τη διάρκεια του χρόνου.
- iii. Ο εμβολιασμός τους δεν απαιτεί τους χρονοβόρους και επίπονους χειρισμούς που απαιτούν τα ανώριμα έκφυτα.

ΣΤ.1.3. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ ΚΑΤΑ ΜΗΚΟΣ ΤΟΥ ΡΙΖΙΔΙΟΥ

Η διαβάθμιση της εμβρυογενετικής δυναμικότητας κατά μήκος του ώριμου ζυγωτικού εμβρύου έγινε ξεκάθαρη, από τα συμπεράσματα των προηγούμενων ενοτήτων, καθώς τα ποσοστά επαγωγής σωματικών εμβρύων έβαιναν μειούμενα από τα ριζίδια προς τις κοτυληδόνες. Θέλοντας να διαπιστώσουμε την ύπαρξη ή όχι κάποιας ανάλογης κλιμάκωσης του ποσοστού σωματικής εμβρυογένεσης κατά μήκος του ριζιδίου το συγκεκριμένο έκφυτο τεμαχίστηκε σε δύο μέρη:

- Στο ακραίο τμήμα του ριζιδίου, προς την καλύπτρα.
- Στο υποακραίο τμήμα του ριζιδίου, προς τις κοτυληδόνες.

Τα πειραματικά αποτελέσματα κατέδειξαν ότι το υψηλότερο εμβρυογενετικό δυναμικό διαμορφωνόταν από το υποακραίο τμήμα του ριζιδίου, συγκρινόμενο ακόμα και με το ακέραιο ριζίδιο (πείραμα-μάρτυρας). Αντίθετα, όταν το έκφυτο ήταν το ακραίο τμήμα του ριζιδίου η σωματική εμβρυογένεση αναστελλόταν σημαντικά.

Η υψηλότερη μορφογενετική ικανότητα των βασικών έναντι των μεσαίων και των ακραίων τμημάτων έχει διαπιστωθεί και σε άλλες, *in vitro*, έρευνες (Martin et al. 2005). Πιθανές ερμηνείες για την αυξημένη εμβρυογενετική ικανότητα του υποακραίου τμήματος του ριζιδίου αποτελούν:

- α) Το ενδογενές ισοζύγιο φυτοαυξητικών ουσιών.

Η επιτυχής έκβαση του μορφογενετικού μονοπατιού της σωματικής εμβρυογένεσης εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την ενδογενή διαβάθμιση των φυτοαυξητικών παραγόντων. Είναι πλέον αποδεκτό ότι η έναρξη, αλλά και η ολοκλήρωση της μορφογένεσης των εκφύτων μιας ιστοκαλλιέργειας, απαιτούν την παροχή εξωγενούς αυξίνης. Ιδιαίτερα η διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων απαιτεί, αρχικά, υψηλή συγκέντρωση αυξίνης και σε δεύτερη φάση μειωμένη ή και μηδενική. Είναι πιθανό, η ενδογενής παραγωγή και μεταφορά των φυτοαυξητικών παραγόντων από τις μεριστωματικές περιοχές ή και άλλα τμήματα του φυτικού εμβρύου να δημιουργεί μια συγκεκριμένη ορμονική διαβάθμιση.

Η κλιμάκωση της εμβρυογενετικής διαφοροποίησης τόσο κατά μήκος του ριζιδίου, αλλά και ολόκληρου του ζυγωτικού φυτικού εμβρύου αποτελεί αποτέλεσμα του συγκερασμού και της αλληλεπίδρασης του ενδογενούς ορμονικού ισοζυγίου και των εξωγενώς παρεχόμενων φυτοαυξητικών ουσιών.

Η γειτνίαση του υποακράιου τμήματος του ριζιδίου με το ακραίο βλαστητικό μερίστωμα, πιθανά να επιδρά καθοριστικά στο ενδογενές ορμονικό του ισοζύγιο. Η IAA, η κύρια μορφή ενδογενούς αυξίνης των ανώτερων φυτών, συντίθεται σε νεαρούς ακραίους ιστούς και στη συνέχεια μεταφέρεται στο βασικό ιστό-στόχο. Έχει υποστηριχθεί η ύπαρξη ενός εξειδικευμένου συστήματος πολικής μεταφοράς αυξίνης που περιλαμβάνει ένα στάδιο εισροής και ένα στάδιο εκροής αυξίνης.

Παράλληλα το μερίστωμα του ριζικού άκρου του ζυγωτικού εμβρύου που εμπεριέχεται στο ακραίο τμήμα του ριζιδίου είναι μια πιθανή περιοχή παραγωγής ή / και δράσης της IAA.

- β)** Ο πιο εκτεταμένος τραυματισμός του συγκεκριμένου εκφύτου, καθώς φέρει τραυματικές επιφάνειες και από τις δύο πλευρές του.

Ο τραυματισμός των εκφύτων επάγει την κυτταρική διαίρεση και όταν οι καλλιεργητικές συνθήκες το επιτρέπουν, την προσανατολίζουν προς την αυξημένη επαγωγή σωματικών εμβρύων (Santarem et al. 1997).

Έχει αναφερθεί ότι ο τραυματισμός των ζυγωτικών εμβρύων, πριν τον εμβολιασμό τους, καταλήγει στην επαγωγή εμβρυογενετικών κάλλων και στη διαμόρφωση σωματικών εμβρύων, γεγονός που δεν παρατηρείται, όταν εμβολιάζονται ανέπαφα έμβρυα ή αρτίβλαστα (Smith et al. 1989 & Merkle et al.1990).

ΣΤ.2. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ & ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ

Η εξάρτηση της σωματικής εμβρυογένεσης μελετήθηκε σε τέσσερα διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα:

- i. OMc, που περιείχε 1 g/L υδρολυμένη καζεΐνη.
- ii. OMc, που δεν περιείχε υδρολυμένη καζεΐνη.
- iii. MS, που δεν περιείχε υδρολυμένη καζεΐνη.
- iv. MS, που περιείχε 1 g/L υδρολυμένη καζεΐνη.

Το MS με καζεΐνη προωθούσε μερικώς υψηλότερα ποσοστά σωματικών εμβρύων (17,0%) από το MS χωρίς καζεΐνη (12,0%). Αντίθετα η απομάκρυνση της καζεΐνης από το OMc ήταν πιο καθοριστική, καθώς μείωνε τη σωματική εμβρυογένεση από 24,0% σε 7,0%. Εξάλλου και οι δύο παραλλαγές του MS ήταν υποδεέστερες του OMc με καζεΐνη, αλλά καταλληλότερες του OMc χωρίς καζεΐνη. Τα πειραματικά αποτελέσματα καταδεικνύουν τόσο την ανωτερότητα του OMc όσο και την αναγκαιότητα παροχής υδρολυμένης καζεΐνης για την επαγωγή σωματικών εμβρύων.

Οι κυριότερες διαφορές των δύο θρεπτικών μέσων έγκεινται στις συγκεντρώσεις των μακροστοιχείων και των οργανικών ενώσεων που περιέχουν.

Τα μακροστοιχεία του MS έχουν μεγαλύτερη περιεκτικότητα θρεπτικών συστατικών, ιδιαιτέρως σε ανηγμένο άζωτο με τη μορφή KNO_3 και NH_4NO_3 . Σε αυτή τη διαφορά οφείλεται πιθανώς και η ανωτερότητα του MS έναντι του OMc χωρίς καζεΐνη. Ο Rugini (1988) σε ανώριμα ζυγωτικά έμβρυα διαφόρων ποικιλιών ελιάς κατέγραψε μικρότερη επαγωγή σωματικών εμβρύων σε τροποποιημένο OM, εξαιτίας της μικρότερης συγκέντρωσης του σε ανηγμένο άζωτο (Sharp et al. 1980).

Αντίθετα το OMc είναι πλουσιότερο σε οργανικές ενώσεις, περιέχει υδρολυμένη καζεΐνη (αποτελείται από 13,1% άζωτο), αλλά υστερεί σε ανηγμένο άζωτο. Καθώς οι οργανικές ενώσεις δε διαφαίνεται να διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στην επαγωγή σωματικών εμβρύων (Rugini 1988), η εμβρυογενετική υπεροχή του OMc έναντι του MS, οφείλεται στην παρουσία της υδρολυμένης καζεΐνης η οποία ισοσταθμίζει και τη μειωμένη περιεκτικότητά του σε ανηγμένο άζωτο.

Ο Ορεινός (1992) αναφέρει ότι η διαφορετική σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος της ιστοκαλλιέργειας σε ανόργανα άλατα δεν επηρέαζαν σημαντικά την επαγωγή σωματικών εμβρύων σε δύο ποικιλίες ελιάς που μελέτησε. Ταυτόχρονα σημειώνει ότι το OMc προωθούσε περισσότερο τη σωματική εμβρυογένεση συγκριτικά με το MS, ενώ σε ανώριμα ζυγωτικά έμβρυα το MS ήταν καταλληλότερο από το OMc (Rugini 1988).

Εξάλλου και ο Thomas (1999) ανακοίνωσε την υπεροχή του θρεπτικού υποστρώματος OM έναντι των θρεπτικών υποστρωμάτων B5 και MS τόσο για την έναρξη της ιστοκαλλιέργειας όσο και για την επαγωγή σωματικών εμβρύων σε ιστοκαλλιέργειες ωοθηκών μάνγκο (*Mangifera indica*).

ΣΤ.3. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ & ΑΝΑΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΣ

Η ανακαλλιέργεια κάλλων ριζιδίων *Korwnéikhs* για τέσσερις γενιές προκαλούσε σταδιακή μείωση και τελικά τον πλήρη μηδενισμό της σωματικής εμβρυογένεσης. Στους κάλλους κοτυληδόνων η σωματική εμβρυογένεση μηδενιζόταν από τη δεύτερη ανακαλλιέργεια.

Η αδυναμία διατήρησης της εμβρυογενετικής διαφοροποίησης μπορεί να ερμηνευτεί, λόγω της αποκλειστικής χρήσης του θρεπτικού υποστρώματος OMc και του συγκεκριμένου συνδυασμού φυτοαυξητικών παραγόντων, δηλαδή 25,0 μM IBA και 2,5 μM 2iP. Ο Ορεινός (1992) αναφέρει ότι, όταν η ανακαλλιέργεια εμβρυογενετικών κάλλων πραγματοποιείται σε OMγ θρεπτικό υπόστρωμα και 5,0 μM IBA, προκύπτουν διαδοχικοί κύκλοι δευτερογενούς σωματικής εμβρυογένεσης, αν και το OMγ είναι φτωχότερο σε θρεπτικά συστατικά έναντι του OMc.

Ο τεμαχισμός των εμβρυογενετικών κάλλων ελιάς, ποικιλίας *Nabali*, σε 2-3 κομμάτια και η ανακαλλιέργειά τους σε MS χωρίς φυτοαυξητικούς παράγοντες, ενεργοποιούσε την επαγωγή ριζών και τη φύτευση των σωματικών εμβρύων (Shilbi et al. 2001). 85,0% των σωματικών εμβρύων μετατρέπονταν σε φυτάρια, 5,0% έδιναν δευτερογενή σωματική εμβρυογένεση και 10,0% είτε νεκρώνονταν είτε δεν αναπτύσσονταν. Η παραμονή των κάλλων για 4-5 εβδομάδες σε MS που περιείχε 5,0 μM 2,4-D, 0,5 μM κινετίνη και 5,0 μM NAA ήταν απαραίτητη για την επαγωγή σωματικών εμβρύων. Η καλλιέργεια κάλλων για 1-2 εβδομάδες σε MS που περιείχε 5,0 μM 2iP, 0,5 μM 2,4-D και 0,5 μM IBA δεν κατέληγε σε επαγωγή σωματικής εμβρυογένεσης. Η παράταση της καλλιεργητικής περιόδου για περισσότερο από 5 εβδομάδες είχε αρνητικό αντίκτυπο στην επαγωγή σωματικών εμβρύων. Οι κάλλοι διατηρούσαν το εμβρυογενετικό τους δυναμικό για ένα χρόνο τουλάχιστον.

Η εμβρυογενετική δυναμικότητα των ιστοκαλλιεργειών συνήθως μειώνεται, όταν υφίστανται ανακαλλιέργειες και η ηλικία των κάλλων αυξάνεται (Beruto et al. 1996 & Ma et al. 2004). Από τη βιβλιογραφική διερεύνηση γίνεται φανερή η αναγκαιότητα ειδικών καλλιεργητικών συνθηκών, προκειμένου να διατηρηθεί η εμβρυογενετική διαφοροποίηση (Lambe et al. 1998), καθώς με την πάροδο του χρόνου μεταβάλλονται δραστικά τα ενδογενή επίπεδα ορμονών και η

πλοειδία των κυττάρων, οι ιστοί γηράσκουν, τα θρεπτικά αποθέματα μειώνονται (π.χ. οι υδρογονάνθρακες) κ.ά.

Κάλλοι που διατηρούνται για πολλές ανακαλλιέργειες σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα, που περιέχει 2,4-D, υφίσταται καίριες μεταβολές, όπως αύξηση μεγέθους, απώλεια χλωροφύλλης και ανικανότητα διαφοροποίησης σωματικών εμβρύων. Οι ιστολογικές παρατηρήσεις δείχνουν ότι αποτελούνται αποκλειστικά από ανευπλοειδικά κύτταρα. Η αστάθεια του χρωμοσωμικού αριθμού μπορεί εν μέρει να οφείλεται στο γεγονός ότι τα μεμονωμένα κύτταρα, ανεξάρτητα από τον αριθμό χρωμοσωμάτων, μπορούν να επιβιώνουν και να διαιρούνται ταυτόχρονα με όλη τη μάζα των κυττάρων.

Παράλληλα προκύπτει και ένα πρακτικής φύσης πρόβλημα, σχετικό με το μέγεθος του φυτικού ιστού που ανακαλλιεργείται. Οι ανακαλλιεργούμενοι κάλλοι δεν αποκτούν πάντα ικανοποιητικό μέγεθος, όπως και στην παρούσα πειραματική μελέτη, με αποτέλεσμα σε κάθε ανακαλλιέργεια να μειώνεται το μέγεθος του ανακαλλιεργούμενου ιστού και στο τέλος το φυτικό υλικό να μην επαρκεί για την έναρξη νέας καλλογένεσης και διαφοροποίησης.

ΣΤ.4. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ & ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΣΑΚΧΑΡΟΖΗΣ

Η σακχαρόζη αποτελεί την κυριότερη και συνηθέστερη πηγή ανηγμένου άνθρακα που χρησιμοποιείται για την επαγωγή σωματικών εμβρύων *in vitro*. Μπορεί, όμως, να προκαλέσει ανοξία και συσώρευση αιθανόλης, εξαιτίας του γρήγορου μεταβολισμού της. Η λακτόζη, η γαλακτόζη, η φρουκτόζη και η μαλτόζη χρησιμοποιούνται σε λιγότερα ερευνητικά συστήματα ως πηγές άνθρακα (Neto et al. 2003).

Το ΟΜς θρεπτικό υπόστρωμα, το οποίο αποτελούσε το βασικό μας καλλιεργητικό υπόστρωμα, περιείχε 20,0 g/L (0,058 M) σακχαρόζη. Η συγκέντρωση του σακχάρου τροποποιήθηκε με προσθήκη χαμηλότερης συγκέντρωσης σακχαρόζης (5,0 g/L ή 0,015 M) και τριών μεγαλύτερων συγκεντρώσεων σακχαρόζης (40,0 g/L ή 0,12 M / 80,0 g/L ή 0,23 M και 160,0 g/L ή 0,46 M).

Η μορφογενετική υπεροχή των 160,0 g/L σακχαρόζης ήταν ξεκάθαρη. Στις συγκεντρώσεις 5,0 g/L ή 20,0 g/L ή 40,0 g/L ή 80,0 g/L σακχαρόζης τα ποσοστά σωματικής εμβρυογένεσης κυμαίνονταν από 3,0-30,0% και κάθε κάλλος έφερε μέχρι πέντε σωματικά έμβρυα. Στα 160,0 g/L σακχαρόζης το ποσοστό σωματικής εμβρυογένεσης ανερχόταν στο 55,0% και τα σωματικά έμβρυα αναπτύσσονταν κατά ομάδες, των είκοσι τουλάχιστον, σχηματίζοντας “μπουκέτα” πάνω στους κάλλους.

Εντυπωσιακή και μη αναμενόμενη παρατήρηση ήταν η εμφάνιση των πρώτων σωματικών εμβρύων, στο θρεπτικό υπόστρωμα με 160,0 g/L σακχαρόζη, 14 ημέρες μετά τον εμβολιασμό, δηλαδή πριν ακόμα μεταφερθούν οι κάλλοι στο θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης σωματικών εμβρύων. Σε όλες τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις ήταν απαραίτητη η μεταφορά των κάλλων από το θρεπτικό μέσο καλλογένεσης στο θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης και η παραμονή τους σε αυτό τουλάχιστον 1-2 εβδομάδες, προκειμένου να εμφανιστούν τα πρώτα σωματικά έμβρυα.

Έχει προταθεί ότι η σακχαρόζη δεν αποτελεί μόνο πηγή άνθρακα, αλλά αυξάνει και το ωσμωτικό δυναμικό του θρεπτικού μέσου. Το ωσμωτικό δυναμικό ευνοεί την επαγωγή των σωματικών εμβρύων, ενώ η χαμηλή προωθεί τη φυσιολογική εξέλιξη των σωματικών εμβρύων σε νεαρά φυτάρια (Smith et al. 1988).

Η μαννιτόλη και η σορβιτόλη αποτελούν τους πιο συχνούς αντικαταστάτες της πηγής άνθρακα στις ιστοκαλλιέργειες, σε πειράματα προσδιορισμού του ρόλου των υδατανθράκων ως ωσμωτικών ρυθμιστών. Αποτελούν ευδιάλυτες ενώσεις και συνήθως δε μεταβολίζονται από τα φυτικά κύτταρα.

Προκειμένου να διερευνήσουμε την εξάρτηση της σωματικής εμβρυογένεσης από το ωσμωτικό δυναμικό του θρεπτικού μέσου αντικαταστήσαμε τη σακχαρόζη από μαννιτόλη. Η αντικατάσταση της σακχαρόζης από μαννιτόλη (σε συγκεντρώσεις 0,05 M ή 0,23 M ή 0,46 M) διατηρούσε τα ποσοστά σωματικής εμβρυογένεσης στα επίπεδα του πειράματος-μάρτυρα, υποδεικνύοντας ότι η αύξηση της επαγωγής σωματικών εμβρύων, στα 160,0 g/L σακχαρόζης, δε σχετιζόταν με την αύξηση του ωσμωτικού δυναμικού του θρεπτικού υποστρώματος.

Στο σημείο αυτό σκόπιμο είναι να αναφερθούν τα πειραματικά αποτελέσματα των Maalej et al. (2006). Η πειραματική τους αναζήτηση αποσκοπούσε στον προσδιορισμό των ενδογενών συγκεντρώσεων των μακροστοιχείων, μικροστοιχείων και μερικών οργανικών συστατικών (σακχαρόζης και πρωτεϊνών) σε σπέρματα ελιάς κατά τη διάρκεια των τριών σταδίων της ανάπτυξής τους. Αναφορικά με το περιεχόμενο σε σακχαρόζη, οι μετρήσεις έδωσαν τις μέγιστες τιμές κατά τη έναρξη της ανάπτυξης των ζυγωτικών εμβρύων (Απρίλιος) και τις χαμηλότερες στη φάση ωρίμανσής τους (Οκτώβριος) και στις δύο ποικιλίες ελιάς που χρησιμοποιήθηκαν.

Οι Istambouli et al. (1977) κατέγραψαν την ανασταλτική δράση των εξοζών (γλυκόζης, γαλακτόζης κ.ά.) και της μανιτόλλης σε συγκέντρωση 2,0-5,0% στη φύτευση ζυγωτικών εμβρύων ελιάς. Αντίθετα η χρήση δισακχαριτών (σακχαρόζης και λακτόζης), στην ίδια συγκέντρωση με τις εξόζες, δεν είχε ανάλογο αποτέλεσμα, ενώ η παροχή υψηλότερης συγκέντρωσης κατέληγε σε περιορισμένη αναστολή της φύτευσής τους. Σύμφωνα με τους συγγραφείς η ανασταλτική δράση της γλυκόζης οφειλόταν στην αναστολή της σύνθεσης χλωροφύλλης στο φως, πιθανώς, γιατί η

γλυκόζη δεν αποτελεί ένα από τα φυσικά αποταμιευτικά υλικά των σπερμάτων (π.χ. λίπη μεγάλου μοριακού βάρους).

Ο Rugini (1988) παρατήρησε ότι η προσθήκη σορβιτόλης σε ανώριμα ζυγωτικά έμβρυα ελιάς δεν προωθούσε τη διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων.

Ο Ορεινός (1992) διαπίστωσε ότι η πραγματοποίηση διαδοχικών κύκλων δευτερογενούς σωματικής εμβρυογένεσης σε ανακαλλιεργούμενους, εμβρυογενετικούς κάλλους ελιάς δεν επηρεαζόταν από την αύξηση της συγκέντρωσης καλαμοσάκχαρου ή την προσθήκη μαννιτόλης.

Σε ιστοκαλλιέργειες καουτσουκόδεντρου (*Hevea brasiliensis*) η σακχαρόζη αντικαταστάθηκε από μαλτόζη, φρουκτόζη και γλυκόζη (Blanc et al. 1999). Η επαγωγή σωματικών εμβρύων ήταν σημαντικά μεγαλύτερη παρουσία μαλτόζης. Παρουσία μαλτόζης, οι αρχικά κίτρινοι κάλλοι αποκτούσαν πορτοκαλί χρώμα, υποδιπλασιαζόταν η παραγωγή ξηρού βάρους και μειωνόταν η συγκέντρωση διαλυμένου σακχάρου (60,0%). Η συνήθης ενδογενής συγκέντρωση μαλτόζης ήταν μικρότερη από της σακχαρόζης. Μια απότομη αύξηση της συγκέντρωσης της μαλτόζης ενδεχομένως να επιδρά στην κυτταρική φυσιολογία και τα αναπτυξιακά μορφογενετικά προγράμματα των φυτικών κυττάρων.

Οι Shilbi et al. (2001) σε ιστοκαλλιέργειες ελιάς, ποικιλία *Nabali*, ανακοίνωσαν την επαγωγική υπεροχή της σακχαρόζης έναντι της φρουκτόζης και της γλυκόζης. Η αύξηση της συγκέντρωσης της σακχαρόζης από 0,1 M σε 0,2 M αύξανε τη σωματική εμβρυογένεση, ενώ η περαιτέρω αύξησή της την μείωνε. Παράλληλα υπέδειξαν ότι τόσο η σορβιτόλη όσο και η μαννιτόλη (σε συγκεντρώσεις 0,1 M ή 0,2 M ή 0,3 M) μείωναν σημαντικά τη σωματική εμβρυογένεση μέχρι την πλήρη αναστολή της στα 0,4 M.

Οι Trabelsi et al. (2003) σε καλλιέργειες τμημάτων κοτυληδόνων ελιάς υπέδειξαν ότι η σακχαρόζη (30,0 ή 40,0 g/L) είχε μεγαλύτερη προωθητική δράση τόσο στην επαγωγή όσο και στην τελική ωρίμανση των σωματικών εμβρύων συγκριτικά με τη γλυκόζη.

Η απαίτηση υψηλής συγκέντρωσης σακχαρόζης με στόχο την επίτευξη υψηλού ποσοστού σωματικών εμβρύων έχει αναφερθεί και σε άλλα φυτικά είδη εκτός της ελιάς.

Οι Smith et al. (1989) διαπίστωσαν μείωση της δευτερογενούς σωματικής εμβρυογένεσης στο καρότο (*Daucus carota*) με την μείωση της περιεκτικότητας του θρεπτικού μέσου σε καλαμοσάκχαρο.

Σε καλλιέργειες ακραίων μεριστωμάτων μπιζελιού (*Pisum sativum*), η προσθήκη υψηλών συγκεντρώσεων υδρογονανθράκων βελτίωνε σημαντικά τα ποσοστά σωματικής εμβρυογένεσης, ενώ μείωνε το υδατικό περιεχόμενο των κάλλων και των σωματικών εμβρύων (Loiseau et al. 1995). Η μαλτόζη (168,0 mM) και η γλυκόζη (168,0 ή 252,0 mM) έδιναν ανάλογα αποτελέσματα

με το πείραμα-μάρτυρα (84,0 mM σακχαρόζη). Η σωματική εμβρυογένεση αυξανόταν μετά από παροχή 168,0 mM σακχαρόζης ή φρουκτόζης, 252,0 mM μαλτόζης ή 336,0 mM γλυκόζης. Η υψηλότερη επαγωγή σωματικής εμβρυογένεσης, 3-4 φορές μεγαλύτερη από το πείραμα-μάρτυρα, παρατηρήθηκε στα 252,0 mM και 504,0 mM φρουκτόζης, πιθανώς λόγω του αυξημένου ωσμωτικού δυναμικού του θρεπτικού μέσου. Η υψηλή συγκέντρωση δεν προώθησε μόνο τη σωματική εμβρυογένεση, αλλά και την περαιτέρω ανάπτυξη των σωματικών εμβρύων.

Σε ιστοκαλλιέργειες ανώριμων ζυγωτικών εκφύτων πιπεριάς (*Capsicum annuum*) ήταν αναγκαία η προσθήκη 10,0% σακχαρόζης για την επαγωγή σωματικής εμβρυογένεσης (Bodhipadma et al. 2002). Η προσθήκη 10,0% γλυκόζης ή φρουκτόζης στο θρεπτικό μέσο επαγωγής είχε ανασταλτικό αποτέλεσμα, ενώ η μαλτόζη είχε ανάλογη επαγωγική δράση με τη σακχαρόζη.

Η εμβρυογενετική αντίδραση ήταν αντιστρόφως ανάλογη της συγκέντρωσης της γλυκόζης σε καλλιέργειες *spindle tree* (Neto et al. 2003). Αντίθετα η σωματική εμβρυογένεση αυξανόταν σημαντικά με την αύξηση της συγκέντρωσης της σακχαρόζης, η οποία είχε μέγιστη απόδοση στα 350,0 mM. Ο συνδυασμός μαννιτόλης και γλυκόζης ή μαννιτόλης και σακχαρόζης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις προωθούσε τη σωματική εμβρυογενετική αντίδραση. Τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι η σακχαρόζη δεν αποτελεί μόνο υδατανθρακική πηγή, αλλά διαδραματίζει και ωσμωτικό ρόλο, ενεργοποιώντας τη σωματική εμβρυογένεση. Η ανασταλτική δράση της γλυκόζης, πιθανώς να οφείλεται στην τοξικότητα της συγκεκριμένης πηγής άνθρακα και όχι στη μεταβολή του ωσμωτικού δυναμικού.

Σε κοτυληδόνες πεπονιού (*Cucumis melo*) η αντικατάσταση της σακχαρόζης από μαννιτόλη αύξανε τα ενδογενή επίπεδα ABA χωρίς ταυτόχρονη επαγωγή σωματικών εμβρύων (Nakagawa et al. 2001).

Αρκετές ερευνητικές ομάδες συγκλίνουν στην άποψη ότι ενώ η υψηλή συγκέντρωση σακχαρόζης επάγει τη διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων, η χαμηλή απαιτείται είτε για την επιτυχή ωρίμανση των σωματικών εμβρύων (Thomas et al. 1999 & Mandal et al. 2001) είτε για την προώθηση της βλαστογένεσης (Brown et al. 1989 & Charriere et al. 1998).

Σε καλλιέργειες γλαδιόλας (*Gladiolus italicus*) η αύξηση της συγκέντρωσης της σακχαρόζης ενίσχυε τη σωματική εμβρυογένεση, ενώ η αντικατάστασή της από μαννιτόλη προωθούσε τη διαφοροποίηση βλαστών (Kumar et al. 2002).

Όλα τα παραπάνω, όπως και τα αποτελέσματα της παρούσας ερευνητικής προσπάθειας συνηγορούν στην άποψη ότι η σακχαρόζη δε διαδραματίζει μόνο το ρόλο ενός παράγοντα που επιδρά στο ωσμωτικό δυναμικό του καλλιεργητικού μέσου, αλλά εμπλέκεται και σε άλλες φυτικές διαδικασίες.

Έχει υπολογιστεί ότι τα θρεπτικά υποστρώματα που περιέχουν σακχαρόζη, σαν αποκλειστική πηγή άνθρακα, υφίστανται 10,0-15,0% υδρογονανθρακική υδρόλυση, κατά την αποστείρωση, ανάλογα με το pH του θρεπτικού υποστρώματος (Neto et al. 2003). Στη διάρκεια της αποστείρωσης τα σάκχαρα, συχνά, οδηγούνται στην καραμελοποίηση ή και στην παραγωγή σακχαρούχων οξέων και μονοσακχαριτών. Οι συγκεκριμένες μετατροπές επιταχύνονται, όταν τα σάκχαρα αποστειρώνονται μαζί με άλλα θρεπτικά συστατικά (άλατα, βιταμίνες κ.ά.). Πολλά φυτικά είδη αναπτύσσονται καλύτερα σε θρεπτικά μέσα που αποστειρώνονται, καθώς επωφελούνται από την διαθεσιμότητα γλυκόζης και φρουκτόζης που προκύπτουν, λόγω της αποστείρωσης.

Όταν η σακχαρόζη αποτελεί την αποκλειστική πηγή άνθρακα, πρέπει να λαμβάνεται υπόψη η διάσπασή της, επειδή προκαλεί μείωση και του ωσμωτικού δυναμικού και καταγράφεται, συνήθως, μικρή πτώση του pH. Μελέτες έχουν δείξει ότι στην πραγματικότητα η υδρόλυση της σακχαρόζης οφείλεται στη μείωση του pH του θρεπτικού μέσου το οποίο προκαλείται κυρίως από τον ιονισμό των αλάτων. Μεγαλύτερη πτώση pH παρατηρείται σε μέσα με μαλτόζη, γλυκόζη ή φρουκτόζη.

Μια διαφορετική ερμηνεία του μορφογενετικού ρόλου των σακχάρων δόθηκε από τους Koch et al. (1996). Στη συγκεκριμένη δημοσίευση διατυπώθηκε η άποψη ότι τα σάκχαρα παρέχουν ένα από τα πιο πρωταρχικά και στοιχειώδη μηνύματα για τη μεταγραφική ρύθμιση εξειδικευμένων γονιδίων. Προκαρυωτικοί και πολυκύτταροι ευκαρυωτικοί οργανισμοί χρησιμοποιούν αυτά τα μηνύματα για την πιο επιτυχή προσαρμογή τους στα διαθέσιμα θρεπτικά μέσα. Παράλληλες έρευνες υποδεικνύουν ότι η μορφογενετική αντίδραση, λόγω της ενεργοποίησης ρυθμιστικών γονιδίων από τα σάκχαρα, μπορεί δυνητικά να επηρεάζει τη διανομή των θρεπτικών συστατικών μεταξύ φυτικών ιστών και οργάνων.

Ο συσχετισμός υδρογονανθράκων και γονιδιακής έκφρασης άλλοτε είναι θετικός και άλλοτε αρνητικός. Πιο συγκεκριμένα τα φωτοσυνθετικά γονίδια καταστέλλονται, όπως και εκείνα που είναι υπεύθυνα για την επανακινητοποίηση των αποταμιευτικών ουσιών. Αντίθετα τα γονίδια που επηρεάζονται θετικά από την παροχή σακχαρόζης στα φυτά, σχετίζονται με την ενεργοποίηση σακχαρόζης μέσω των αποταμιευτικών ουσιών, την κυτταρική αναπνοή ή τη διέγερση κατάλληλων βιοσυνθετικών μονοπατιών. Έτσι η υπόθεση ότι οι υδρογονάνθρακες ελέγχουν τα γονίδια του μεταβολισμού της σακχαρόζης, μπορεί να προσφέρει ένα μηχανισμό, όχι μόνο για τη μεταγραφική ρύθμιση του πρώτου βήματος κατά τη χρήση του εξωγενώς παρεχόμενου άνθρακα, αλλά επίσης και για τη μεταβολή μηνυμάτων στο φυτικό σύστημα.

Η μορφολογία των επαγόμενων κάλλων και των σωματικών εμβρύων της παρούσας διατριβής ενισχύουν την παραπάνω άποψη, που αναφέρεται σε καταστολή φωτοσυνθετικών γονι-

δίων. Οι κάλλοι που επάγονταν παρουσία 5,0 g/L σακχαρόζης ήταν μικρού μεγέθους, στρογγυλοί και με πολύ μικρή διάρκεια ζωής, ενώ όταν παρέχονταν 20,0 g/L ή 40,0 g/L ή 80,0 g/L σακχαρόζης ήταν ευμεγέθεις, συμπαγείς και με μεγάλη διάρκεια ζωής. Τέλος, τα 160,0 g/L σακχαρόζης προωθούσαν τη δημιουργία κάλλων που είχαν μικρότερο μέγεθος, από όλες τις άλλες συγκεντρώσεις, ήταν συμπαγείς και με μεγάλη διάρκεια ζωής. Παράλληλα, τα σωματικά έμβρυα που διαμορφώνονταν παρουσία 5,0 g/L ή 20,0 g/L ή 40,0 g/L ή 80,0 g/L σακχαρόζης είχαν έντονο πράσινο χρώμα, ενώ στα 160,0 g/L ήταν υπόλευκα, λόγω σύνθεσης ή μη σύνθεσης χλωροφύλλης αντίστοιχα.

ΣΤ.5. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ & ΑΥΞΙΝΕΣ

ΣΤ.5.1. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ & ΠΑΡΟΧΗ ΑΥΞΙΝΗΣ

Έχει γίνει γενικά αποδεκτό ότι οι εξωγενώς παρεχόμενοι φυτοαυξητικοί παράγοντες (αυξίνες και κυτοκινίνες) αλληλεπιδρούν με τους αντίστοιχους ενδογενείς παράγοντες, αλλάζοντας ή / και κατευθύνοντας τη φυτική ανάπτυξη και διαφοροποίηση των φυτικών ιστών (Gaspar et al. 1996 & 2003).

Αυτό αποδεικνύεται και από την καθοριστική σημασία της παροχής φυτοαυξητικών παραγόντων στα θρεπτικά υποστρώματα επαγωγής και διαφοροποίησης σωματικών εμβρύων (Leva et al. 1995 & Orinos et al. 1991). Η μορφογενετική αντίδραση των τριών συνθετικών αυξινών, που χρησιμοποιήθηκαν στο πλαίσιο της παρούσας διατριβής, διέφερε σημαντικά. Η συγκέντρωση και το είδος της αυξίνης επιδρούσαν καθοριστικά τόσο στο είδος της σωματικής εμβρυογένεσης (άμηση ή έμμεση) όσο και στο ποσοστό επαγωγής σωματικών εμβρύων.

ΣΤ.5.1.1. Έκφυτα ριζιδίων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων

Όπως έχει ήδη περιγραφεί χρησιμοποιήθηκαν τρία είδη αυξινών (IBA, NAA και 2,4-D) σε ποικίλες συγκεντρώσεις.

Στις μικρές συγκεντρώσεις (0,01-6,25 μM), ανεξαρτήτως είδους αυξίνης, καταγράφηκε οργανοκαλλιέργεια, καθώς τα έκφυτα ριζιδίων επιμηκύνονταν, διογκώνονταν και δεν αναπτύσσονταν κάλλοι. Λόγω της απουσίας κάλλου η εμβρυογενετική αντίδραση που καταγράφηκε ήταν

άμεση. Το υψηλότερο ποσοστό παρατηρήθηκε στα 1,56 μM IBA (23,0%), ενώ παρουσία 2,4-D και NAA τα ποσοστά ήταν μικρότερα (7,0-15,0%), χωρίς σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων.

Στις υψηλότερες συγκεντρώσεις αυξινών (12,5-200,0 μM) διαμορφώνονταν κάλλοι των οποίων, τόσο ο χρωματισμός όσο και το ποσοστό επαγωγής τους, επηρεαζόταν καθοριστικά από το είδος και τη συγκέντρωση της αυξίνης. Λόγω της ανάπτυξης κάλλου καταγράφηκε έμμεση εμβρυογενετική αντίδραση. Η υψηλότερη μορφογενετική αντίδραση (31,0%) διαμορφώθηκε στα 25,0 μM IBA, ενώ παρουσία 2,4-D ή NAA κυμαινόταν από 4,0-15,0%.

Το ποσοστό διαφοροποίησης σωματικών εμβρύων (14,0%) του πειράματος-μάρτυρας (του οποίου τόσο το θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης όσο και το θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης δεν περιείχαν αυξίνη) ήταν εντυπωσιακό και μη αναμενόμενο.

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα των παραπάνω πειραματικών χειρισμών καταλήγουμε στα εξής:

- Τα αποτελέσματα του πειράματος-μάρτυρα υποδεικνύουν την ύπαρξη μιας ενδογενούς μορφογενετικής δυναμικής των κυττάρων της ελιάς για εμβρυογενετική διαφοροποίηση (μέχρι ενός ποσοστού), χωρίς να απαιτείται η προσθήκη εξωγενούς αυξίνης. Σε αυτό συνηγορεί και η θετική ανταπόκριση των ιστοκαλλιέργειών της ελιάς σε μη ισχυρούς μορφογενετικούς παράγοντες, όπως το IBA και η ανασταλτική δράση του NAA και του 2,4-D, όπως αναφέρουμε στη συνέχεια.

Στις ιστοκαλλιέργειες ριζιδίων τόσο το NAA όσο και το 2,4-D, ανεξαρτήτως συγκέντρωσης, δεν επάγουν υψηλότερα ποσοστά σωματικής εμβρυογένεσης από εκείνα του πειράματος-μάρτυρα, σε αντίθεση με την πλειοψηφία των βιβλιογραφικών αναφορών.

Σαν πιο δραστική αυξίνη θεωρείται το 2,4-D και γι' αυτό χρησιμοποιείται σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις από τις υπόλοιπες αυξίνες, καθώς οι υψηλές του συγκεντρώσεις προκαλούν νέκρωση των εκφύτων, όπως σε καλλιέργειες υποκοτυλίων σουσαμιού (*Sesamum indicum*) (Mary et al. 1997), φύλλων *Tylophora indica* (Jayanthi et al. 2001), ανώριμων κοτυληδόνων σόγιας (*Glycine max*) (Hofmann et al. 2004) και ζυγωτικών εμβρύων σχιζάνδρας (*Schisandra chinensis*) (Kim et al. 2005). Ανάλογα ποσοστά νέκρωσης καταγράψαμε και στις ιστοκαλλιέργειες των ριζιδίων ζυγωτικών εμβρύων ελιάς στη συγκέντρωση 6,25 μM 2,4-D.

Παροχή 5,0 και 10,0 μM 2,4-D, σε κάλλους ελιάς ποικιλίας *Nabali*, προκαλούσε αυξημένα ποσοστά σωματικής εμβρυογένεσης, ενώ συγκεντρώσεις πάνω από 10,0 μM κα-

τέληγαν στην επαγωγή σκληρών, καφέ και καταπονημένων κάλλων και χαμηλά ποσοστά σωματικών εμβρύων (Shilbi et al. 2001).

Το NAA συνιστά, μετά το 2,4-D, την πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη συνθετική αυξίνη με έντονη μορφογενετική δράση στις ιστοκαλλιέργειες.

Οι Wu et al. (2004) σε κάλλους από ρίζες *Oncidium* κατέγραψαν την υψηλότερη εμβρυογενετική επαγωγή σε χαμηλές συγκεντρώσεις (2,5 / 2,0 και 0,5 mg/L) IAA, IBA, NAA και picloram, καθώς οι μεγαλύτερες συγκεντρώσεις προκαλούσαν μορφογενετική ανάσχεση. Η πιο δραστική ήταν η συγκέντρωση 2,0 mg/L IAA.

Δε λείπουν, όμως και οι δημοσιεύσεις που αναφέρουν πλήρη ανάσχεση της σωματικής εμβρυογένεσης από το 2,4-D και το NAA. Σε καλλιέργειες ζυγωτικών εμβρύων ελιάς (Rugini 1988), εκφύτων φύλλων διαφόρων ποικιλιών γαρύφαλλου (*Dianthus*) (Nakano et al. 1993), βλαστητικών μεριστωμάτων μπιζελιού (*Pisum sativum*) (Loiseau et al. 1995) και εκφύτων φύλλων *Oncidium* (Chen et al. 2001), όλες οι χρησιμοποιηθείσες αυξίνες (NAA, IAA, IBA και 2,4-D) είχαν ανασταλτική δράση.

- Η μορφογενετική ανωτερότητα του IBA, όταν παρέχεται σαν μεμονωμένη πηγή αυξίνης σε συνδυασμό με 2,5 μM 2iP, είναι φανερή τόσο στην επαγωγή άμεσης όσο και έμμεσης σωματικής εμβρυογένεσης στους πειραματικούς χειρισμούς της παρούσας εργασίας.

Αν και το IBA δεν συγκαταλέγεται στις αυξίνες με έντονη μορφογενετική δράση παρατηρούμε ότι στις ιστοκαλλιέργειες της ελιάς αναστέλλει τόσο την καλλογένεση (σε υψηλή συγκέντρωση), αλλά και η συγκέντρωσή του επηρεάζει καθοριστικά την επαγωγή σωματικών εμβρύων.

Αρκετές είναι οι ερευνητικές ανακοινώσεις που υποστηρίζουν ότι οι ιστοκαλλιέργειες στην ελιά, όπως και άλλα φυτικά είδη δεν απαιτούν αυξίνες με έντονη μορφογενετική δράση, προκειμένου να διαφοροποιηθούν τα έκφυτα *in vitro*.

Οι Halperin et al. (1966) και Nomura et al. (1985a) σε υγρές καλλιέργειες καρότου (*Daucus carota*) ανακοίνωσαν ότι η συνεχής παρουσία 2,4-D εμποδίζει την εξέλιξη των σωματικών εμβρύων και οδηγούσε σε ανοργάνωτη αύξηση, ενώ η απομάκρυνσή του επέτρεπε την εκδήλωση της σωματικής εμβρυογένεσης. Τα παραπάνω υποδεικνύουν την ύπαρξη μιας φυσικής ενδογενούς τάσης διαφοροποίησης σωματικών εμβρύων, με άμεση συνέπεια η συνεχής παρουσία 2,4-D να δρα σαν αναστολέας και κυρίως της μετάβασης από το σφαιρικό στο καρδιόσχημο στάδιο.

Σε καλλιέργειες ανώριμων ζυγωτικών εμβρύων *Commiphora wightii* το IBA αναδείχθηκε εφάφυλλο του 2,4-D. Το 2,4-D προωθούσε τη δημιουργία άσπρων και ποικιλόμορφων σωματικών εμβρύων, ενώ το IBA πράσινων και καλά διαμορφωμένων εμβρύων (Singh et al. 1997).

Στην πρώτη αναφορά επαγωγής σωματικών εμβρύων στην ελιά (Rugini 1988) διαπιστώθηκε η υπεροχή του NAA έναντι του 2,4-D το οποίο ανέστελλε τη σωματική εμβρυογένεση ανεξαρτήτως συγκέντρωσης. Αντίθετα το NAA, ακόμα και σε μεγάλες συγκεντρώσεις, προωθούσε τη σωματική εμβρυογένεση. Η σωματική εμβρυογένεση ήταν κυρίως άμεση (10,0%) σε MS με μισή συγκέντρωση αλάτων και σε συνδυασμούς NAA και BA. Στη συγκεκριμένη πειραματική διαδικασία δε χρησιμοποιήθηκε IBA και τα έκφυτα προέρχονταν από ανώριμα ζυγωτικά έμβρυα.

Οι Orinos et al. (1991) σε ιστοκαλλιέργειες αγριελιάς και οι Mitrakos et al. (1992) σε ανακαλλιέργειες κάλλων ποικιλιών ελιάς κατέγραψαν ότι συγκεντρώσεις IBA μεγαλύτερες από 5,0 μM και οποιαδήποτε συγκέντρωση 2iP ανέστελλαν τη σωματική εμβρυογένεση. Μεγαλύτερη επαγωγή καταγραφόταν, όταν η ανακαλλιέργεια γινόταν σε OMc χωρίς φυτοαυξητικούς παράγοντες ή σε συγκέντρωση IBA μικρότερη από 5,0 μM, καθώς η εμβρυογενετική υπεροχή του IBA έναντι του NAA ήταν ξεκάθαρη. Παράλληλα βασική προϋπόθεση αποτελούσε η παροχή σχετικά υψηλής συγκέντρωσης αυξίνης (25,0 μM) στο θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης και παροχή μειωμένης αυξίνης ή απομάκρυνσής της στο θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης.

Οι Cerezo et al. (2011), ακολουθώντας τη μεθοδολογία των προηγούμενων δημοσιεύσεων, πέτυχαν ανάλογα ποσοστά σωματικής εμβρυογένεσης σε καλλιέργειες απομονωμένων ριζιδίων από ώριμα σπέρματα της ισπανικής ποικιλίας *Picual*. Τα έκφυτα εμβολιάζονταν σε OMc, που περιείχε 25,0 μM IBA και 2,5 μM 2iP, για τρεις εβδομάδες και μεταφέρθηκαν στο ίδιο θρεπτικό μέσο χωρίς 2iP και χαμηλότερες συγκεντρώσεις IBA.

Έχει εξακριβωθεί ότι η συνθετική αυξίνη IBA μετατρέπεται στη φυσικά απαντώμενη IAA η οποία οξειδώνεται πολύ γρήγορα από τις υπεροξειδάσες των φυτών. Αντίθετα το IBA δεν οξειδώνεται, αλλά παραμένει στη βάση του εκφύτου, όπου και μετατρέπεται σε IAA η οποία είναι απαραίτητη για τη διαφοροποίηση ριζών.

Οι Epstein et al. (1975) πρότειναν ότι η σταθερότητα της συνθετικής αυξίνης IBA, η αργή μεταφορά της από τη θέση εφαρμογής της και η μετατροπή της σε IAA στα έκ-

φυτα είναι οι πιο πιθανοί παράγοντες που κάνουν αυτό το συστατικό έναν πολύ καλό επαγωγέα ριζών.

Πιθανώς αυτές οι μετατροπές-ιδιότητες της IBA να διαδραματίζουν έναν ξεχωριστό ρόλο και στη διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων και να ερμηνεύουν τον προωθητικό της ρόλο.

ΣΤ.5.1.2. Έκφυτα κοτυληδόνων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων

Ανάλογα με τα αποτελέσματα της προηγούμενης ενότητας ήταν και αυτά που προέκυψαν από τις ιστοκαλλιέργειες εκφύτων κοτυληδόνων, δηλαδή βάσεων και κορυφών κοτυληδόνων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων.

Σε θρεπτικό μέσο με χαμηλές συγκεντρώσεις NAA και 2,4-D (0,01 μ M - 6,25 μ M) καταγράφηκε οργανοκαλλιέργεια. Αντίθετα σε θρεπτικό υπόστρωμα με μεγαλύτερες συγκεντρώσεις NAA και 2,4-D (0,39 μ M - 50,0 μ M) καταγράφηκε καλλογένεση. Η σωματική εμβρυογένεση (άμεση και έμμεση) αναστελλόταν δραστικά από το NAA (0,0-8,5%) και πλήρως από το 2,4-D.

Το IBA σε μεγάλες συγκεντρώσεις, όπως και στα έκφυτα ριζιδίων, προωθούσε σε ικανοποιητικό ποσοστό τη διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων. Συγκεκριμένα το IBA σε χαμηλές συγκεντρώσεις (0,39 μ M - 6,25 μ M) προωθούσε την οργανοκαλλιέργεια και ανέστελλε της σωματική εμβρυογένεση (2,5%). Αντίθετα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις (12,5 μ M - 100,0 μ M) η ανάπτυξη των κάλλων (95%) ήταν ικανοποιητική και μόνο στα 200,0 μ M IBA περιοριζόταν δραστικά (λιγότερο από 50,0%). Η επαγωγή σωματικών εμβρύων είχε αυξητική τάση και μέγιστο ποσοστό στα 100,0 μ M (17,0%) και 200,0 μ M (15,0%) από κορυφές και βάσεις κοτυληδόνων αντίστοιχα. Τα παραπάνω πειραματικά αποτελέσματα υποδηλώνουν την απαίτηση παροχής υψηλότερης συγκέντρωσης IBA σε έκφυτα κοτυληδόνων συγκριτικά με των ριζιδίων, προκειμένου να επιτευχθεί η επαγωγή σωματικών εμβρύων.

Στο πείραμα-μάρτυρα, όπου τα θρεπτικά υποστρώματα δεν περιείχαν αυξίνη, η εμβρυογενετική αντίδραση των εκφύτων από κοτυληδόνες ήταν μηδενική. Η συγκεκριμένη πειραματική διαπίστωση υποδεικνύει ότι τα έκφυτα κοτυληδόνων σε αντίθεση με τα έκφυτα ριζιδίων δε χαρακτηρίζονται από ενδογενή δυνατότητα διαφοροποίησης σωματικών εμβρύων. Αυτός μπορεί να είναι και ένας λόγος της απαίτησης για παροχή υψηλής συγκέντρωσης αυξίνης που εμφάνιζαν τα συγκεκριμένα έκφυτα, προκειμένου να διαφοροποιηθούν.

Τα ποσοστά επαγωγής σωματικών εμβρύων από έκφυτα κοτυληδόνων ελιάς που έχουν αναφερθεί στην πλειοψηφία των σχετικών δημοσιεύσεων, μέχρι τώρα, κυμαίνονταν πάντα σε χαμηλά ποσοστά.

Οι Orinos et al. (1991) κατέγραψαν χαμηλά επίπεδα επαγωγής έμμεσης σωματικής εμβρυογένεσης (7,0%) σε κοτυληδόνες ζυγωτικών εμβρύων αγριελιάς, Η καλλογένεση λάμβανε χώρα σε θρεπτικό υπόστρωμα OMc με 2,5 μ M IBA ή θρεπτικό υπόστρωμα OMc χωρίς φυτοαυξητικούς παράγοντες και η σωματική εμβρυογένεση καταγραφόταν 125-150 ημέρες μετά τον εμβολιασμό.

Οι Mitrakos et al. (1992) κατέγραψαν έμμεση σωματική εμβρυογένεση (5,0-10,0%) σε κοτυληδόνες ζυγωτικών εμβρύων *Κορωνέικης* 60 ημέρες μετά την μεταφορά των κάλλων στο θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης. Οι κάλλοι ήταν ηλικίας 21 και 14 ημερών και το θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης ήταν OMc χωρίς φυτοαυξητικούς παράγοντες.

Ο Ορεινός (1992) διαπίστωσε ότι το IBA είναι λίγο δραστικότερο του NAA στην επαγωγή σωματικών εμβρύων σε κάλλους κοτυληδόνων.

Οι Trabelsi et al. (2003) ανακοίνωσαν επαγωγή σωματικών εμβρύων από έκφυτα κοτυληδόνων ελιάς σε χαμηλή ή μηδενική συγκέντρωση φυτοαυξητικών ουσιών και θρεπτικό υπόστρωμα OMc. Συγκεντρώσεις μεγαλύτερες από 0,5 mg/L IBA και 2iP είχαν ανασταλτικά αποτελέσματα.

Οι Capelo et al. (2010) διαπίστωσαν την υπεροχή του IBA έναντι των άλλων αυξινών σε καλλιέργειες εκφύτων αγριελιάς. Τα υψηλότερα ποσοστά σωματικής εμβρυογένεσης καταγράφηκαν σε MS με 12,25 μ M IBA και 4,56 μ M Zea.

Μια πιθανή ερμηνεία των χαμηλών ποσοστών διαμόρφωσης σωματικών εμβρύων, από τα συγκεκριμένα είδη εκφύτων, αποτελεί η χαμηλή συγκέντρωση της αυξίνης του θρεπτικού υποστρώματος καλλογένεσης που αποδείχθηκε ακατάλληλη για επαγωγή περαιτέρω μορφογένεσης. Πιθανολογούμε ότι το ενδογενές επίπεδο ορμονών, όπως διαφαίνεται κι από το πείραμα-μάρτυρα, είναι τέτοιο που δεν επιτρέπει την επαγωγή σωματικών εμβρύων, καθώς οι κοτυληδόνες και ιδιαίτερα οι κορυφές έναντι των βάσεων, απέχουν περισσότερο από τις μεριστωματικές περιοχές που αποτελούν τους συνήθεις χώρους σύνθεσης των φυτοαυξητικών παραγόντων. Κατ'επέκταση η εξωγενής παροχή υψηλής συγκέντρωσης αυξίνης είναι αναγκαία προϋπόθεση για την αποκατάσταση ενός ορμονικού ισοζυγίου κατάλληλου για την επαγωγή σωματικής εμβρυογένεσης.

ΣΤ.5.2. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΑΥΞΙΝΩΝ

Εκτός από την μεμονωμένη παροχή αυξινών μελετήθηκε και η επίδραση της συνδυασμένης παροχής IBA και NAA στο θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης.

Ο συνδυασμός μικρών συγκεντρώσεων των δύο αυξινών οδηγούσε σε άμεση σωματική εμβρυογένεση (10,0%). Τα ποσοστά αυτά είναι ανάλογα του πειράματος-μάρτυρα (ΟΜc χωρίς αυξίνη), αλλά και της μεμονωμένης παροχής NAA και IBA.

Ο συνδυασμός υψηλότερων συγκεντρώσεων των δύο αυξινών κατέληγε σε έμμεση σωματική εμβρυογένεση (10,0-12,0%), δηλαδή ποσοστά ανάλογα του πειράματος-μάρτυρα, αλλά χαμηλότερα της μεμονωμένης παροχής IBA και NAA στις ανάλογες συγκεντρώσεις.

Τα παραπάνω αποτελέσματα δεν υποδεικνύουν αθροιστική δράση του IBA και του NAA. Αντίθετα το NAA δρα ανασταλτικά και μπλοκάρει την επαγωγική δυναμική του IBA, πιθανώς υποδηλώνοντας τη μη ύπαρξη διαφορετικών θέσεων-στόχων των δύο αυξινών στα κύτταρα της ελιάς.

ΣΤ.6. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ & ΚΥΤΟΚΙΝΙΝΕΣ

ΣΤ.6.1. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ & ΠΑΡΟΧΗ ΕΝΟΣ ΕΙΔΟΥΣ ΚΥΤΟΚΙΝΙΝΗΣ

Για τη διερεύνηση της επίδρασης των κυτοκινινών στην επαγωγή σωματικής εμβρυογένεσης, *in vitro*, από έκφυτα ριζιδίων και κοτυληδόνων ελιάς, χρησιμοποιήθηκαν τρεις κυτοκινίνες (TDZ, 2iP και BA) σε τέσσερις συγκεντρώσεις (0,625 / 2,5 / 10,0 ή 40,0μM):

➤ 2iP

Σε ιστοκαλλιέργειες εκφύτων ριζιδίων, σε θρεπτικό υπόστρωμα ΟΜc που περιείχε 0,625 μM 2iP, καταγράφηκε οργανοκαλλιέργεια και επαγωγή άμεσης σωματικής εμβρυογένεσης σε χαμηλό ποσοστό (9,0%). Αντίθετα σε όλες τις υπόλοιπες συγκεντρώσεις 2iP διαμορφώθηκαν πράσινοι και χαλαροί στην υφή κάλλοι και μέγιστη επαγωγή έμμεσης σωματικής εμβρυογένεσης (15,0%) στα 2,5 μM 2iP.

Σε ιστοκαλλιέργειες εκφύτων κοτυληδόνων, που εμβολιάστηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα ΟΜc που περιείχε 2iP, η σωματική εμβρυογένεση κυμαινόταν σε πολύ χαμηλά επίπεδα (0,0-5,0%) ανεξαρτήτως της συγκέντρωσης του παρεχόμενου 2iP.

➤ **BA**

Η παροχή BA, ανεξαρτήτως συγκέντρωσης, προωθούσε τη διαμόρφωση πράσινων κάλλων και καλά διαμορφωμένων σωματικών εμβρύων από την αρχή της διαφοροποίησής τους, αλλά ανέστελλε σημαντικά το ποσοστό επαγωγής τους (2,0-5,0%).

➤ **TDZ**

Η προσθήκη TDZ, ανεξαρτήτως συγκέντρωσης, προωθούσε τη διαμόρφωση συμπαγών κάλλων, αλλά ανέστελλε πλήρως τη σωματική εμβρυογένεση.

Προκειμένου να είναι εφικτή η σύγκριση της εμβρυογενετικής δυναμικότητας των τριών κυτοκινινών είναι απαραίτητο να υπενθυμίσουμε ότι στο πείραμα-μάρτυρα (ΟΜc χωρίς κυτοκινίνη), το ποσοστό επαγωγής σωματικών εμβρύων ήταν μηδενικό και στα τρία είδη εκφύτων. Το συγκεκριμένο δεδομένο σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μεμονωμένη παροχή των τριών κυτοκινινών υποδεικνύουν τη σημαντική επαγωγική δράση του 2iP, την πιο περιορισμένη του BA και την ανασταλτική του TDZ στη διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων.

Παράλληλα με την καταγραφή της διαφοροποίησης σωματικών εμβρύων γινόταν και καταγραφή της διαφοροποίησης ριζών και βλαστών. Αν και η αναφορά των δύο τελευταίων μορφογενετικών αντιδράσεων ξεφεύγει από το πλαίσιο μελέτης της παρούσας εργασίας, παραθέτουμε τις παρατηρήσεις που έγιναν, προκειμένου να γίνει σαφέστερη η μορφογενετική δράση των τριών κυτοκινινών στις ιστοκαλλιέργειες της ελιάς.

Το 2iP και το BA ανέστελλαν την επαγωγή βλαστών, ενώ την προωθούσε σημαντικά το TDZ (15,0-20,0%), ανεξαρτήτως συγκέντρωσης, με εξαίρεση την υψηλότερη συγκέντρωσή του (40,0 μM) στην οποία μειωνόταν αισθητά (10,0%).

Παράλληλα το 2iP και το BA προωθούσαν τη δημιουργία ριζών (55,0-60,0%) στη χαμηλή συγκέντρωσή τους (0,625 μM) και την ανέστελλαν όσο αυξανόταν η συγκέντρωσή τους. Αντίθετα το TDZ ανέστελλε δραστικά την επαγωγή ριζών σε όλες τις συγκεντρώσεις.

Ανακεφαλαιώνοντας οι κυτοκινίνες 2iP και BA αποτελούσαν κατάλληλους προωθητικούς παράγοντες για τη διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων και ριζών (σε μικρές τουλάχιστον συγκεντρώσεις) και το TDZ για τη διαφοροποίηση βλαστών.

Το γεγονός ότι το 2iP υποδεικνύεται σαν καταλληλότερη κυτοκινίνη, ακόμα και από το BA, για την επαγωγή σωματικών εμβρύων, έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα της προηγούμενης πειραματικής ενότητας, όπου το IBA (αυξίνη χωρίς έντονη μορφογενετική δράση και όχι συχνά χρησιμοποιούμενη) αποτελεί την καταλληλότερη αυξίνη για την *in vitro* επαγωγή σωματικών εμβρύων στην ελιά. Γίνεται φανερό ότι η επαγωγή σωματικής εμβρυογένεσης ελιάς *in vitro* δεν απαιτεί πολύ δραστικά εξωγενώς παρεχόμενα μορφογενετικά ερεθίσματα.

Η βιβλιογραφική αναζήτηση με στόχο τη διερεύνηση του ρόλου των κυτοκινινών στην επαγωγή της σωματικής εμβρυογένεσης αποδεικνύεται ασαφής, καθώς τα πειραματικά αποτελέσματα είναι, συχνά, αντικρουόμενα. Η πλειοψηφία των ερευνητικών ομάδων χρησιμοποιούν τη ζεατίνη ή / και το BA και σπανιότερα το 2iP.

Έχει ανακοινωθεί ότι η ζεατίνη προωθούσε τη σωματική εμβρυογένεση, ενώ τόσο η μεμονωμένη παροχή κινετίνης ή BAP όσο και ο συνδυασμός τους οδηγούσε σε αναστολή της, πιθανώς γιατί η ζεατίνη είναι φυσική κυτοκινίνη, ενώ οι άλλες δύο συνθετικές ((Fujimura et al. 1975). Η επαγωγή σωματικών εμβρύων από τη ζεατίνη υποδηλώνει την ανάγκη παρουσίας κατάλληλης συγκέντρωσης ενδογενούς αυξίνης. Η ανασταλτική επίδραση της εξωγενώς παρεχόμενης κυτοκινίνης, ενδεχομένως, να είναι αποτέλεσμα της αύξησης των επιπέδων της ενδογενούς κυτοκινίνης στα αναπτυσσόμενα εμβρυοειδή.

Οι Epstein et al. (1975) ανακοίνωσαν ότι η ταυτόχρονη παροχή αυξίνης και κυτοκινίνης ανέστελλε την προωθητική δράση των αυξινών στην επαγωγή της ριζογένεσης και της σωματικής εμβρυογένεσης, ενώ διέγειρε τη δημιουργία μαλακού και εύθρυπτου κάλλου (όπως καταγράψαμε και εμείς σε θρεπτικό υπόστρωμα με 2iP). Όταν παρέχόταν συνδυασμός κυτοκινίνης και αυξίνης στο θρεπτικό μέσο ο ρόλος της κυτοκινίνης παρέμενε ασαφής και αδιευκρίνιστος, αν και είναι πολύ πιθανό να μην αποτελούσε καθοριστικό παράγοντα στην επαγωγή της σωματικής εμβρυογένεσης.

Ο Rugini (1988) κατέγραψε 30,0-40,0% επαγωγή σωματικών εμβρύων, από ανώριμα ζυγωτικά έμβρυα τεσσάρων καλλιεργούμενων ποικιλιών ελιάς, σε θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε μόνο BA (0,5μM ή 2,5μM) και 10,0% σε συνδυασμούς NAA και BA. Η χρήση ανώριμων ιστών, πιθανώς ερμηνεύει το υψηλό ποσοστό σωματικής εμβρυογένεσης.

Οι Orinos et al. (1991) ανακοίνωσαν την αναστολή της σωματικής εμβρυογένεσης από την παροχή 2iP στο θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης, ανεξαρτήτως συγκέντρωσης, αντιθέτως ήταν απαραίτητο στο θρεπτικό μέσο καλλογένεσης. Τα έκφυτα προέρχονταν από ώριμα ζυγωτικά έμβρυα αγριελιάς και δύο καλλιεργούμενων ποικιλιών ελιάς.

Οι Loiseau et al. (1995) σε καλλιέργειες ακραίων μεριστωμάτων μπιζελιού (*Pisum sativum*), ανακοίνωσαν ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης (0,05-2,27μM) των κυτοκινινών BA, ζεατίνης ή κινετίνης, οι κάλλοι γινόντουσαν πιο πράσινοι και συμπαγείς. Όλες οι κυτοκινίνες, σε χαμηλές συγκεντρώσεις, με εξαίρεση την κινετίνη, ανέστελλαν δραστικά τη σωματική εμβρυογένεση. Παράλληλα, η παροχή κυτοκινίνης, στο θρεπτικό μέσο ανάπτυξης, προωθούσε την ποιότητα των σωματικών εμβρύων.

Οι Beruto et al. (1996) σε κάλλους νεραγκούλας (*Ranunculus asiaticus*) δεν κατέγραψαν σωματική εμβρυογένεση σε θρεπτικό υπόστρωμα χωρίς κυτοκίνινες ή που περιείχε μόνο μια κυτοκίνη.

Σε δύο ποικιλίες σιταριού (*Triticum aestivum*) καταγράφηκε σωματική εμβρυογένεση σε MS με 0,5 mg/L BAP και 0,1 mg/L IAA. Η μεγαλύτερη συγκέντρωση BAP ήταν τοξική και κατέληγε μερικές φορές σε νέκρωση των κάλλων (Malik et al. 2004).

Αντιθέτως το TDZ έχει χρησιμοποιηθεί, κυρίως, για την αναγέννηση βλαστών σε φυτά που αντιστέκονται στην *in vitro* αναγέννηση. Μια σειρά δημοσιεύσεων σε διαφορετικά φυτικά είδη, αποτελούν σαφείς ενδείξεις για την ενεργητική ανάμειξη του TDZ στην επαγωγή μεταβολικών αλλαγών.

Πιο συγκεκριμένα σε κοτυληδόνες καρπουζιού (*Citrullus lanatus*) το TDZ μιμείται την επίδραση των κυτοκινινών στην οργανογένεση και στις αλλαγές των επιπέδων των πολυπεπτιδίων P20-25 profiles (Leshem et al. 1994). Το TDZ διέγειρε τη βλαστητική αναγέννηση και ανέστελλε τη ριζογένεση, αλλά σε υψηλή συγκέντρωση (2×10^{-5} M) ανέστελλε πλήρως την οργανογένεση και μόνο η παροχή IAA την αποκαθιστούσε στα αρχικά της ποσοστά.

Οι Gill et al. (1994) πρότειναν ότι το TDZ επιδρά με τον παραπάνω τρόπο, γιατί περιλαμβάνει την *dulation* των ενδογενών κυτοκινινών και της αυξίνης, χωρίς όμως να δίνεται κάποια απόδειξη άμεσης δράσης της κυτοκινίνης στην επαγωγή βλαστών. Οι Wang et al. (1981, 1979a & 1979b) ανέφεραν αλλαγές στα λιπίδια της πλασματικής μεμβράνης και σε κάποια ένζυμα κλειδιά μετά την προσθήκη TDZ στο θρεπτικό μέσο.

Η χρήση TDZ για την επαγωγή σωματικών εμβρύων είχε πολλαπλά αποτελέσματα.

Παρουσία TDZ διαμορφώνονταν σωματικά έμβρυα σε ιστοκαλλιέργειες γαιοκάρυου (*Arachis hypogaea*) (Murthy et al. 1995), υποκοτυλίων γερανιού (*Pelargonium hortorum*) (Hutchinson et al. 1996 & 2000) και διαγονιδιακής κερασιάς (*Prunus insica* x *P. pseudocerasus*) (Gutierrez et al. 2004) κ.ά.

Το TDZ συνιστά πολύ δραστικό, φυτοαυξητικό, ρυθμιστικό παράγοντα για την επαγωγή της σωματικής εμβρυογένεσης στο γαιοκάρυο, καθώς καταγράφεται αύξηση της ενεργότητας των ενδογενών επιπέδων των αυξινών και των κυτοκινινών. Τα ενδογενή επίπεδα των παραγόντων της αύξησης δείχνουν ότι υπάρχει διαφορά στην ευαισθησία των ιστών έναντι του TDZ. Οι περιοχές συσσώρευσης των παραγόντων της αύξησης στα υποκοτύλια τα οποία αποτελούν και τις περιοχές δημιουργίας των σωματικών εμβρύων, επηρεάζονταν λιγότερο από το TDZ σε αντίθεση με τις κοτυληδόνες. Η συγκεκριμένη διαπίστωση, πιθανώς, υποδεικνύει ότι η πρωταρχική θέση δράσης του TDZ είναι οι κοτυληδόνες και ότι τα ρυθμιστικά συστατικά της αύξησης, ενώ παρά-

γονται από αυτές μεταφέρονται σε άλλους ιστούς. Ίσως, λοιπόν, στις κοτυληδόνες να δημιουργείται ένα επαγωγικό μήνυμα ή μια σειρά μηνυμάτων για την επαγωγή της σωματικής εμβρυογένεσης, αλλά η φυτική διαφοροποίηση να πραγματοποιείται σε μια απομακρυσμένη θέση, όταν πρόκειται για ακέραιο φυτάριο.

Σε καλλιέργειες κάλλων από ρίζες *Oncidium* οι δραστικές κυτοκινίνες, όπως το TDZ, σε συγκεντρώσεις που κυμαίνονταν από 0,3-5,0 mg/L, αναδεικνύονταν ανεπαρκείς για την επαγωγή σωματικών εμβρύων. Αντίθετα άλλες κυτοκινίνες, όπως η κινετίνη και ιδιαίτερα η ζεατίνη σε χαμηλές συγκεντρώσεις (0,5 mg/L), έδιναν υψηλά ποσοστά σωματικής εμβρυογένεσης.

Η επαγωγή άμεσης σωματικής εμβρυογένεσης, σε ιστοκαλλιέργειες πιπεριάς (*Capsicum annuum*), καταγράφηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα MS με TDZ. Η πιο αποδοτική συγκέντρωση TDZ ήταν τα 0,5 μ M (Khan et al. 2006).

Σε φυτάρια μελιτζάνας (*Solanum melongena*) η επαγωγή σωματικών εμβρύων απαιτούσε χαμηλές συγκεντρώσεις BAP. Η προσθήκη TDZ, στην *in vitro* ιστοκαλλιέργεια ντομάτας (*Solanum lycopersicum*) και μελιτζάνας ελάττωνε τη σωματική εμβρυογένεση και σε ιστοκαλλιέργειες πιπεριάς (*Capsicum annuum*) την ανέστελλε πλήρως (Kararakis et al. 2002).

Έχει προταθεί ότι οι εξωγενώς παρεχόμενες κυτοκινίνες, ενδεχομένως, αλληλεπιδρούν με τις ενδογενείς φυτοαυξητικές ουσίες (π.χ. IAA, ABA κ.ά.) κατά τη διάρκεια των διαφορετικών φυσιολογικών φυτικών διαδικασιών (έλεγχος της στοματικής λειτουργίας, μεταφορά σακχαρώδους, σύνθεση χλωροφύλλης κ.ά.) με τελικό αποτέλεσμα τον προσανατολισμό της *in vitro* διαφοροποίησης. Υπάρχουν αρκετές ενδείξεις για την εμπλοκή των κυτοκινινών, καθώς και των υπόλοιπων φυτοαυξητικών ουσιών, στον μεταβολισμό της ενδογενώς φυσικά απαντώμενης αυξίνης IAA. Παράλληλα έχει αποδειχθεί ότι το ABA μπορεί να τροποποιεί το μεταβολισμό των κυτοκινινών και αντίστροφα.

Τέλος, η διαφορά στη μορφογενετική διαφοροποίηση που προκαλείται από το BA και το 2iP είναι πιθανό να οφείλεται στο διαφορετικό ρυθμό καταβολισμού τους. Ο ρυθμός απορρόφησης από το θρεπτικό μέσο είναι ίδιος και για τις δύο φυτοαυξητικές ουσίες, αλλά το 2iP είναι πιο ευάλωτο στην οξειδάση της κυτοκινίνης εμφανίζοντας μεγαλύτερο βαθμό καταβολισμού συγκριτικά με το BA.

ΣΤ.6.2. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ & ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΣ ΚΥΤΟΚΙΝΙΝΩΝ

Εκτός από τη μεμονωμένη παροχή κυτοκινινών μελετήθηκε και η εξάρτηση της σωματικής εμβρυογένεσης από την ταυτόχρονη παροχή δύο κυτοκινινών στο θρεπτικό υπόστρωμα της ι-στοκαλλιέργειας.

Προκειμένου να γίνει ευκολότερος ο σχολιασμός των αποτελεσμάτων μας, στους πίνακες 24(A) και 24(B) φαίνονται τόσο τα τελικά ποσοστά διαφοροποίησης σωματικών εμβρύων που καταγράφηκαν, όταν παρεχόταν συνδυασμός κυτοκινινών (2iP/BA και 2iP/TDZ) όσο και τα τελικά ποσοστά διαφοροποίησης σωματικών εμβρύων που προέκυψαν, όταν το 2iP, το BA και το TDZ παρέχονταν μεμονωμένα σε αντίστοιχες συγκεντρώσεις.

Πίνακας 24(A): Σωματική εμβρυογένεση (%) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις 2iP, BA και συνδυασμούς 2iP και BA.

ΕΙΔΟΣ ΚΥΤΟΚΙΝΙΝΗΣ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΥΤΟΚΙΝΙΝΗΣ						
2iP (μM)	-	2,5	1,25	2,5	1,25	-	-
BA (μM)	-	10,0	5,0	-	-	10,0	5,0
ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟ- ΓΕΝΕΣΗ (%)	0,0	9,0	12,0	15,0	8,0 - 15,0	8,0	8,0

Πίνακας 24(Β): Σωματική εμβρυογένεσης (%) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις 2iP, TDZ και συνδυασμούς 2iP και TDZ.

ΕΙΔΟΣ ΚΥΤΟΚΙΝΙΝΗΣ	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΚΥΤΟΚΙΝΙΝΗΣ						
2iP (μM)	-	2,5	1,25	2,5	1,25	-	-
TDZ (μM)	-	10,0	5,0	-	-	10,0	5,0
ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟ- ΓΕΝΕΣΗ (%)	0,0	2,0	4,0	15,0	8,0- 15,0	0,0	2,5

Από τη σύγκριση των ποσοστών του πίνακα 14(A) γίνεται φανερό ότι η συνδυασμένη παροχή 2iP και BA υστερεί σε εμβρυογενετική επαγωγική δράση, έναντι της μεμονωμένης παροχής του 2iP, κυμαίνεται σε αντίστοιχα επίπεδα με εκείνα της μεμονωμένης παροχής του BA, αλλά σαφώς υπερτερεί του πειράματος-μάρτυρα (απουσία κυτοκινίνης).

Ο πίνακας 14(B) καταδεικνύει ότι η συνδυασμένη παροχή 2iP και TDZ μειώνει την επαγωγική δράση της μεμονωμένης παροχής του 2iP, λόγω της ανασταλτικής δράσης του TDZ. Αξίζει να σημειωθεί ότι η βλαστητική διαφοροποίηση στον συγκεκριμένο συνδυασμό κυτοκινινών ήταν έντονη, λόγω του TDZ.

Η σωματική εμβρυογένεση ήταν *έμμεση* σε όλες τις πειραματικές δοκιμασίες, καθώς σε όλες τις συγκεντρώσεις διαμορφώνονταν πλήρεις και πλούσιοι κάλλοι.

Τα παραπάνω αποτελέσματα έρχονται να επαληθεύσουν και να επιβεβαιώσουν τα αποτελέσματα της προηγούμενης πειραματικής ενότητας, όπου μελετήθηκε η εξάρτηση της σωματικής εμβρυογένεσης από την παροχή μιας μόνο κυτοκινίνης κάθε φορά. Παράλληλα δεν υποδηλώνουν αθροιστική-συνεργατική δράση των κυτοκινινών στην επαγωγή και στη διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων. Αντίθετα τόσο το BA όσο και το TDZ παρεμποδίζουν τη διεγερτική δράση του 2iP. Πιθανολογούμε, όπως και για τις αυξίνες τη μη ύπαρξη διαφορετικών θέσεων-στόχων των τριών κυτοκινινών στα κύτταρα της ελιάς.

ΣΤ.7. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ & ΑΝΟΡΓΑΝΟ ΑΖΩΤΟ

ΣΤ.7.1. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ & ΜΙΑ ΠΗΓΗ ΑΝΟΡΓΑΝΟΥ ΑΖΩΤΟΥ

Η πλειοψηφία των βιβλιογραφικών αναφορών συγκλίνουν στην άποψη ότι η παρουσία ανηγμένου αζώτου είναι απαραίτητη για την επαγωγή σωματικών εμβρύων, καθώς οι αζωτούχες ενώσεις εμπλέκονται στις διαδικασίες που λαμβάνουν χώρα στην ανάπτυξη και ωρίμανση των σωματικών εμβρύων, δηλαδή μετά την επαγωγή της σωματικής εμβρυογένεσης (Kamada et al. 1979a & 1979b).

Ο Rugini (1988) σε ανώριμα ζυγωτικά έμβρυα, διαφόρων ποικιλιών ελιάς, κατέγραψε μικρό ποσοστό σωματικής εμβρυογένεσης σε τροποποιημένο θρεπτικό μέσο OM, εξαιτίας της μικρότερης περιεκτικότητάς του σε ανηγμένο άζωτο (Sharp et al. 1980).

Το θρεπτικό μέσο OMc, που αποτελούσε το βασικό καλλιεργητικό μέσο της παρούσας ερευνητικής προσπάθειας, αποτελεί ένα υπόστρωμα φτωχό σε ανηγμένο άζωτο. Γι' αυτό κρίθηκε σκόπιμη η μελέτη της εξάρτησης της σωματικής εμβρυογένεσης από τρεις πηγές ανηγμένου αζώτου (KNO_3 , NH_4NO_3 και NH_4Cl) σε τέσσερις συγκεντρώσεις (5,0 / 20,0 / 80,0 ή 160,0 mM).

Παράλληλα υλοποιήθηκε ένα πείραμα-μάρτυρας, στο πλαίσιο του οποίου τα έκφυτα εμβολιάζονταν σε OMc χωρίς πηγές αζώτου, οπότε και στο θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης καταγράφηκε το εντυπωσιακό και μη αναμενόμενο ποσοστό επαγωγής σωματικών εμβρύων 37,0%, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό στο πλήρες OMc ήταν 24,0%. Το υψηλό ποσοστό, πιθανώς, να οφείλεται είτε σε κάποιο κατάλληλο ενδογενές ισοζύγιο αζώτου είτε αποτελεί αντίδραση του φυτικού ιστού στην καταπόνηση που υφίσταται, λόγω της έλλειψης αζώτου. Οι Tazawa et al. (1969) ανακοίνωσαν ότι το αμμωνιακό ιόν μπορεί να αντικατασταθεί από το νιτρικό. Διαπίστωσαν την ύπαρξη κάποιας ενδογενούς συγκέντρωσης αμμωνιακού ιόντος απαραίτητης για την διεκπεραίωση της εμβρυογενετικής διαδικασίας στις ιστοκαλλιέργειές τους.

Το NH_4NO_3 , σε όλες τις συγκεντρώσεις, διατηρούσε τη σωματική εμβρυογένεση στα επίπεδα του πειράματος-μάρτυρα, εκτός από τα 160,0 mM που τη μείωναν δραστικά, όπως και την καλλογένεση (19,0%).

Το KNO_3 ανέστελλε τη διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων στις μικρές συγκεντρώσεις (18,0%), αλλά ακόμα δραστικότερα στις μεγαλύτερες (4,0%) χωρίς να επηρεάζει την καλλογένεση.

Το NH_4Cl προωθούσε το εμβρυογενετικό δυναμικό των ιστοκαλλιιεργειών. Στις συγκεντρώσεις 5,0-80,0 mM τα ποσοστά κυμαίνονταν από 52,0-58,0%, ενώ στα 160,0 mM το ποσοστό έ-

φτανε το 62,0%. Σκόπιμο είναι να σημειωθεί ότι η αναστολή της καλλογένεσης στα 80,0 mM (60,0%) και στα 160,0 mM (40,0%).

Ενώ λοιπόν, το NO_3^- , με τη μορφή KNO_3 , ανέστελλε την επαγωγή σωματικών εμβρύων, η προσθήκη NH_4^+ , με τη μορφή NH_4Cl , διπλασίαζε το ποσοστό σωματικής εμβρυογένεσης. Η προσθήκη NH_4NO_3 , ανεξαρτήτως συγκέντρωσης και το οποίο συνδυάζει το NH_4^+ με το NO_3^- , διατηρούσε την επαγωγή σωματικής εμβρυογένεσης στα επίπεδα του πειράματος-μάρτυρα τα οποία ταυτόχρονα αποτελούσαν και το μέσο όρο των ποσοστών που επιτυγχάνονταν με την μεμονωμένη παροχή NH_4^+ και NO_3^- υποδηλώνοντας την αντικρουόμενη μορφογενετική επίδραση των δύο ιόντων.

Συμπερασματικά το NO_3^- δεν είναι μορφογενετικά δραστικό, σε αντίθεση με το NH_4^+ (κυρίως με τη μορφή NH_4Cl) το οποίο επάγει πολύ υψηλά ποσοστά σωματικής εμβρυογένεσης χωρίς στατιστικά σημαντική εξάρτηση από τη συγκέντρωσή του.

Η σημαντική αναστολή της καλλογένεσης στα 160,0 mM NH_4NO_3 (19,0%), στα 80,0 mM (60,0%) και στα 160,0 mM NH_4Cl (40,0%) υποδεικνύουν μια τοξικότητα των υψηλών συγκεντρώσεων του NH_4^+ . Η τοξικότητα του NH_4^+ έχει ανακοινωθεί και από τους Mordhorst et al. (1993) σε καλλιέργειες μικροσπόρων κριθαριού (*Hordeum vulgare*), όπου ήταν υπεύθυνη για την περιορισμένη ανάπτυξη των μικροσπόρων, σε θρεπτικό μέσο που περιείχε μόνο NH_4^+ , ή αναλογία NO_3^- : NH_4^+ 30:70.

Από πολύ παλιές ερευνητικές δημοσιεύσεις είχε διαπιστωθεί ότι τα αμμωνιακά άλατα (π.χ. NH_4Cl) διαδραματίζουν καθοριστικό ρόλο στην προώθηση της σωματικής εμβρυογένεσης (Halperin et al. 1966, Wetherell et al. 1976 & Ammirato et al. 1977).

Σε στερεές ιστοκαλλιέργειες καμβίου καρότου (*Daucus carota*) (Reinert et al. 1967) ο συνδυασμός KNO_3 και $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ δεν ήταν τόσο προωθητικός όσο η υψηλότερη συγκέντρωση NH_4NO_3 (συνολικό άζωτο 44,4 mM) για την καταγραφή 50,0% σωματικής εμβρυογένεσης. Η μείωση της συγκέντρωσης του αζώτου από 60,0 mM σε 1,5 mM οδηγούσε σε απώλεια της εμβρυογενετικής ικανότητας η οποία μπορούσε να επανακτηθεί μόνο με παροχή γλουταμινικού οξέος ή μίγμα αμινοξέων (συγκέντρωση συνολικού αζώτου 60,0 mM) αντί για KNO_3 ή NH_4NO_3 .

Ο Reinert et al. (1967) παρατήρησε ότι η χαμηλή συγκέντρωση αζώτου (6,0 mM) και K^+ (3,1 mM) δεν επάγουν σωματικά έμβρυα. Η ιδανική συγκέντρωση αζώτου ήταν τα 60,0 mM και του K^+ 20,0 mM. Απουσία NH_4NO_3 αναπτύσσονταν λίγα ή καθόλου σωματικά έμβρυα, ενώ η προσθήκη 2,1 mM NH_4Cl προωθούσε αισθητά τη σωματική εμβρυογένεση.

Σε καλλιέργειες ριζών καρότου (*Daucus carota*) καταγράφηκε θετική επίδραση των ιόντων K^+ και NH_4^+ στη σωματική εμβρυογένεση (Tazawa et al. 1969). Σημαντική ανάσχεση παρατηρήθη-

κε, όταν απομακρύνθηκε το KNO_3 και προστέθηκε μέτρια συγκέντρωση NH_4NO_3 . Επίσης καταγράφηκε αναστολή της σωματικής εμβρυογένεσης από τα ιόντα PO_4^{3-} . Το Na^+ δεν ανέστελλε τη σωματική εμβρυογένεση, όπως αποδεικνύεται από την παρόμοια δραστικότητα του NaNO_3 και του KNO_3 . Η προσθήκη 41,2 mM NaCl προκαλούσε μικρή αναστολή της σωματικής εμβρυογένεσης.

Έχει προταθεί ότι το NH_4^+ προσλαμβάνεται πολύ γρήγορα από το θρεπτικό υπόστρωμα (Schmidt et al. 1997) και αποτελεί απαραίτητο συστατικό για τη σύνθεση αμινοξέων από τους φυτικούς ιστούς.

Το NH_4^+ (1,0-5,0mM) χρησιμοποιήθηκε σαν αποκλειστική πηγή αζώτου από τους Smith et al. (1989, 1990a & 1990b) και βοήθησε στη διατήρηση ιστοκαλλιιεργειών προεμβρύων καρότου μέσω διαδοχικών ανακαλλιιεργειών για τουλάχιστον 10 μήνες.

Σε καλλιέργειες με έκφυτα υποκοτυλίων λιναριού (*Linum usitatissimum*) βρέθηκε ότι το NO_3^- διαδραμάτιζε καθοριστικό ρόλο στην επαγωγή, διαφοροποίηση και αύξηση του κάλλου, ενώ η μεγάλη συγκέντρωση NH_4^+ προωθούσε σημαντικά τη σωματική εμβρυογένεση (Cunha et al. 1999).

Οι Leljak et al. (2004) σε εμβρυογενετικές καλλιέργειες κολοκυθιάς (*Cucurbita pepo*) ανακοίνωσαν ότι όταν τα έκφυτα εμβολιάζονταν σε MS και NH_4Cl , προέκυπταν σωματικά έμβρυα που δεν εξελίσσονταν σε πλήρη φυτάρια. Τα σφαιρικά έμβρυα ωρίμαζαν, όταν μεταφέρονταν σε συνδυασμό NH_4^+ και NO_3^- . Οι διαφορετικές πηγές αζώτου προκαλούσαν αλλαγές στο pH του θρεπτικού μέσου από 4,0-6,5 γι' αυτό και ήταν απαραίτητη η σταθεροποίηση του pH σε τιμές 4,0 ή 3,2.

Τέλος, σε υγρές καλλιέργειες κάλλων που προέρχονταν από τμήματα ώριμων φύλλων ελιάς ποικιλίας *Chetoui*, τα υψηλότερα ποσοστά επαγωγής καταγράφηκαν, όταν το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα περιείχε συνδυασμό οργανικού και ανόργανου αζώτου [700,0 mg/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 950,0 mg/L KNO_3 και 500,0 mg/L υδρολυμένη καζεΐνη] (Trabelsi et al. 2011).

ΣΤ.7.2. ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ & ΣΥΝΔΥΑΣΜΟΙ ΠΗΓΩΝ ΑΝΟΡΓΑΝΟΥ ΑΖΩΤΟΥ

Παράλληλα με τη μεμονωμένη παροχή μιας πηγής ανηγμένου αζώτου μελετήθηκε και η εξάρτηση της σωματικής εμβρυογένεσης από την παροχή συνδυασμού δύο πηγών ανόργανου αζώτου ταυτόχρονα. Χρησιμοποιήθηκαν οι συνδυασμοί $\text{KNO}_3:\text{NH}_4\text{NO}_3$ και $\text{KNO}_3:\text{NH}_4\text{Cl}$ σε αναλογίες 1:9 / 3:7 / 5:5 / 7:3 ή 9:1.

Στους συνδυασμούς $\text{KNO}_3:\text{NH}_4\text{NO}_3$ η σωματική εμβρυογένεση κυμαινόταν από 16,0-3,0%. Τα ποσοστά ήταν ανάλογα των ποσοστών που καταγράφονταν, όταν παρεχόταν αποκλειστικά KNO_3 , αλλά πολύ μικρότερα από εκείνα που καταγράφονταν, όταν η πηγή αζώτου ήταν το NH_4NO_3 ή το NH_4Cl , καθώς και από το πείραμα-μάρτυρα. Η αναστολή οφείλεται στην σταδιακή μείωση της ποσότητας του NH_4^+ και την σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης του NO_3^- .

Στους συνδυασμούς $\text{KNO}_3:\text{NH}_4\text{Cl}$ το ποσοστό διαφοροποίησης σωματικών εμβρύων είχε φθίνουσα τάση (38,0-1,0%). Το ποσοστό 38,0% στην αναλογία 1:9 ήταν ανάλογο του πειράματος-μάρτυρα, λόγω της μικρής συγκέντρωσης του KNO_3 και της μεγάλης του NH_4Cl . Η αύξηση της συγκέντρωσης του KNO_3 και η παράλληλη μείωση του NH_4Cl κατέληγε σε δραστική αναστολή της σωματικής εμβρυογένεσης, όπως και στους άλλους συνδυασμούς.

Παράλληλα καταγραφόταν νέκρωση των κάλλων σε όλες τις αναλογίες που αντιστοιχούσαν σε υψηλές συγκεντρώσεις NH_4^+ .

Η συγκεκριμένη πειραματική ενότητα υποδεικνύει την:

1. Επαγωγική ανωτερότητα των ιόντων NH_4^+ και την ανασταλτική των ιόντων NO_3^- .
2. Ανασταλτική δράση της προσθήκης συνδυασμού πηγών ανηγμένου αζώτου έναντι της μεμονωμένης παροχής NH_4^+ στη διαμόρφωση σωματικών εμβρύων.

Η επαγωγική ανωτερότητα του NH_4Cl και του NH_4NO_3 έναντι του KNO_3 αναδεικνύεται ήδη από αρκετές δημοσιεύσεις σε ιστοκαλλιέργειες καρότου (*Daucus carota*). Σε υγρές καλλιέργειες εκφύτων από μίσχους άγριου στελέχους καρότου παρουσία KNO_3 (5,0-95,0 mM) δεν αυξήθηκε η σωματική εμβρυογένεση, αντίθετα η παροχή 0,1 mM NH_4Cl και 10,0 mM NH_4Cl σε συνδυασμό με 12,0-40,0 mM KNO_3 την προώθησαν (Wetherell et al. 1976).

Η παροχή υψηλής συγκέντρωσης KNO_3 σε υποκοτύλια καρότου ενεργοποιούσε ελάχιστα τη σωματική εμβρυογένεση, ενώ η συνδυασμένη παροχή KNO_3 και NH_4NO_3 την προωθούσε σημαντικά (Kamada et al. 1979b). Η σωματική εμβρυογένεση αυξανόταν, όταν το θρεπτικό μέσο περιείχε αποκλειστικά NH_4NO_3 , αντί $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Αν και η μεμονωμένη παρουσία NH_4Cl δεν ήταν αποτελεσματική για τη σωματική εμβρυογένεση, ο συνδυασμός του με KNO_3 ήταν πολύ προωθητικός. Η πλήρης απομάκρυνση των αζωτούχων συστατικών ανέστειλε τη σωματική εμβρυογένεση.

Σε ανάλογα συμπεράσματα κατέληξαν και οι Nuutila et al. (1991) σε κάλλους από σημύδα (*Betula pendula*). Διαπίστωσαν ότι το NO_3^- ήταν πιο αποτελεσματικό συγκριτικά με το $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$. Παράλληλα κατέγραψαν την επαγωγική ανωτερότητα στη δημιουργία σωματικών εμβρύων του συνδυασμού NH_4NO_3 με KNO_3 ή του NH_4Cl με KNO_3 έναντι της μεμονωμένης παροχής σε υψηλή συγκέντρωση KNO_3 .

Αντίθετα οι Mordhorst et al. (1993) ανακοίνωσαν ότι σε καλλιέργειες μικροσπόρων κριθαριού (*Hordeum vulgare*) τα υψηλότερα ποσοστά σωματικής εμβρυογένεσης καταγράφονταν σε αναλογία $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ (90:10 και 70:30). Όταν η αναλογία ήταν 50:50 η φυτική αύξηση παρέμενε στα επίπεδα του πειράματος-μάρτυρα, τα συσσωματώματα εμφάνιζαν μικρή αναγεννητική ικανότητα και σε διάστημα 6-8 εβδομάδων γίνονταν καφέ και τελικά νεκρώνονταν. Η περιορισμένη ανάπτυξη των μικροσπόρων, όταν το θρεπτικό μέσο περιέχει αναλογία $\text{NO}_3^-:\text{NH}_4^+$ (30:70), αποδόθηκε στην τοξικότητα του NH_4^+ .

ΣΤ.8. ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ “ΚΜ”

Σαν κατακλείδα της παρούσας ερευνητικής προσπάθειας προτείνουμε το “ΚΜ” θρεπτικό υπόστρωμα για επαγωγή σωματικών εμβρύων σε ιστοκαλλιέργειες ελιάς. Το “ΚΜ” αποτελεί μια τροποποίηση του θρεπτικού υποστρώματος ΟΜc, καθώς συνδυάζει τη βασική σύσταση του ΟΜc με εκείνους τους θρεπτικούς και φυτοαυξητικούς παράγοντες που αναδείχθηκαν από τις προηγούμενες πειραματικές ενότητες καταλληλότεροι για την επαγωγή και τη διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων από ριζίδια ώριμων ζυγωτικών εμβρύων ελιάς.

Το προτεινόμενο θρεπτικό υπόστρωμα περιείχε:

- i. Σαν πηγή αζώτου 20,0 mM NH_4Cl (αντί 9,34 mM KNO_3 και 8,99 mM NH_4NO_3).
- ii. Σακχαρόζη 160,0 g/L (αντί 20,0 g/L).
- iii. Φυτοαυξητικούς παράγοντες 25,0 μM IBA και 2,5 μM 2iP.

Στον πίνακα 15 απεικονίζονται τα ποσοστά σωματικών εμβρύων που προέκυψαν, όταν ο εμβολιασμός των εκφύτων γινόταν σε “ΚΜ” και στο μη τροποποιημένο ΟΜc (Cañas et al. 1988), προκειμένου να γίνουν πιο απτές οι μορφογενετικές τους διαφορές.

Από τη μελέτη του πίνακα 25 γίνεται φανερή η αθροιστική δράση των επιμέρους συστατικών, όταν παρέχονταν ταυτόχρονα στο “ΚΜ” θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης και στο “ΚΜ” θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης σωματικών εμβρύων (ίδιο με το “ΚΜ” καλλογένεσης χωρίς, όμως, φυτοαυξητικούς παράγοντες).

Τα παραπάνω υποδηλώνουν ότι η σακχαρόζη και το ανηγμένο άζωτο συνεισφέρουν καθοριστικά στη μορφογενετική διαδικασία της σωματικής εμβρυογένεσης, αλλά το πιο πιθανό μέσω διαφορετικών μονοπατιών.

Πίνακας 25: Ριζίδια ώριμων ζυγωτικών εμβρύων εμβολιάζονταν σε τέσσερα τροποποιημένα ΟΜc, 25,0μM IBA και 2,5μM 2iP για 21 ημέρες. Τα ποσοστά % σωματικής εμβρυογένεσης, που αναγράφονται στον πίνακα, καταγράφηκαν μετά από τη μεταφορά και την παραμονή των κάλλων στο θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης για δύο μήνες. Οι τιμές αποτελούν το μέσο όρο τριών πειραμάτων.

ΕΙΔΟΣ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ	ΣΩΜΑΤΙΚΗ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΣΗ (%)
ΟΜc μη τροποποιημένο	24,0
ΟΜc με 160,0 g/L σακχαρόζη	55,0
ΟΜc με 20,0 mM NH ₄ Cl	52,0
ΟΜc με 160,0 g/L σακχαρόζη και 20,0 mM NH ₄ Cl (“ΚΜ” θρεπτικό μέσο)	62,0

Ζ. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΤΗΣ ΜΟΡΙΑΚΗΣ ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗΣ

Ζ.1. ΑΝΙΧΝΕΥΣΗ ΤΩΝ ΓΟΝΙΔΙΩΝ Dc8 & Dc59 ΣΤΟ ΓΟΝΙΔΙΩΜΑ ΤΗΣ ΕΛΙΑΣ

Η πέψη του γονιδιωματικού DNA της ελιάς με EcoRI και ο υβριδισμός του με ετερόλογο ανιχνευτή για το γονίδιο Dc8 κατέδειξε ότι το γονίδιο Dc8 υβριδίζει σε μια πολύ καθαρή ζώνη γύρω στις 3 Kb. Η εμφάνιση μιας και μόνο ζώνης υποδηλώνει ότι πιθανώς δεν υφίσταται πολυμορφισμός για το συγκεκριμένο γονίδιο στο γονιδίωμα της ελιάς, όπως έχει βρεθεί και στο καρότο.

Η πέψη του γονιδιωματικού DNA της ελιάς με Hind III και υβριδισμό με ετερόλογο ανιχνευτή για το γονίδιο Dc8 κατέληξε στην εμφάνιση μερικών ζωνών που υβριδίζουν με μικρότερη ένταση. Τα μοριακά βάρη αυτών των ζωνών κυμαίνονταν από 2,5 μέχρι 3,3Kb. Οι ζώνες αυτές είναι πιθανό να αντιπροσωπεύουν γονίδια που παρουσιάζουν κάποιο βαθμό ομολογίας με το Dc8.

Όσο αφορά το γονίδιο Dc59, μετά από πέψη του γονιδιωματικού DNA της ελιάς με EcoRI και υβριδισμό με ετερόλογο ανιχνευτή για το γονίδιο Dc59 εντοπίστηκε πλήθος ζωνών που υβριδίζουν. Τα μοριακά βάρη αυτών των ζωνών κυμαίνονταν από 4,4 μέχρι 6,6Kb. Η ποικιλία ζωνών υποδηλώνει την ύπαρξη πολυμορφισμού για το συγκεκριμένο γονίδιο και στην ελιά, όπως ισχύει στο καρότο αλλά και σε πολλά άλλα φυτικά είδη.

Ζ.2. ΜΕΛΕΤΗ ΤΗΣ ΕΚΦΡΑΣΗΣ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ Dc8

Ζ.2.1. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ Dc8 ΣΕ ΕΜΒΡΥΑ & ΕΝΔΟΣΠΕΡΜΙΑ ΕΛΙΑΣ & ΚΑΡΟΤΟΥ

Η ανίχνευση της έκφρασης του γονιδίου Dc8 πραγματοποιήθηκε σε ακέραια ώριμα, ζυγωτικά έμβρυα και ενδοσπέρμια ελιάς και καρότου.

Από τους συγκεκριμένους φυτικούς ιστούς απομονώθηκε ολικό RNA και ακολούθησε υβριδισμός του με κατάλληλο ετερόλογο ανιχνευτή για το γονίδιο Dc8. Από τη μελέτη της παραπάνω ανάλυσης γίνεται φανερό ότι η έκφραση του Dc8 ήταν αισθητή στο ακέραιο ζυγωτικό έμβρυο και στο ενδοσπέρμιο της ελιάς, στο ακέραιο ζυγωτικό έμβρυο του καρότου, όχι όμως, και στο ενδοσπέρμιό του.

Είναι γνωστό ότι το μεταγράφημα του Dc8 ανιχνεύεται μόνο σε εμβρυϊκούς ιστούς τόσο σωματικούς όσο και ζυγωτικούς και όχι σε φύλλα, βλαστούς, άνθη ή ρίζες ώριμων φυτών (Franz

et al. 1989). Εκφράζεται σε υψηλά επίπεδα σε σωματικά έμβρυα και σε φυτάρια που προκύπτουν από αυτά, σε ζυγωτικά έμβρυα, αλλά λιγότερο σε ενδοσπέρμια. Η έκφρασή του είναι πιο περιορισμένη στα σφαιρικά και περισσότερο στα καρδιόσχημα και στα έμβρυα τορπίλης, καθώς και στο ενδοσπέρμιο ώριμων σπερμάτων. Στα ενδοσπέρμια των ώριμων σπερμάτων τα επίπεδα του μεταγραφήματος του Dc8 είναι περίπου 2 φορές χαμηλότερο από ότι στα ζυγωτικά έμβρυα.

Πιθανώς αυτό σε συνδυασμό με τη χαμηλή συγκέντρωση (8-10 μg/L) του απομονωθέντος ολικού RNA που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του μεταγραφήματος του Dc8, στην παρούσα διατριβή, να εξηγούν και τη μη ανίχνευση του συγκεκριμένου μεταγραφήματος στο ενδοσπέρμιο του καρότου, γεγονός που δεν συμφωνεί με τα παραπάνω βιβλιογραφικά δεδομένα.

2.2.2. ΕΚΦΡΑΣΗ ΤΟΥ ΓΟΝΙΔΙΟΥ DC8 ΣΕ ΕΜΒΡΥΟΓΕΝΕΤΙΚΟΥΣ ΚΑΛΛΟΥΣ ΕΛΙΑΣ

Για τη μελέτη του χρονοδιαγράμματος της έκφρασης του γονιδίου Dc8 απομονώθηκε ολικό RNA από οκτώ είδη κάλλων, ώριμων ζυγωτικών εμβρύων ελιάς, διαφορετικής ηλικίας οι οποίοι βρίσκονταν σε διαφορετικά μορφογενετικά-εμβρυογενετικά στάδια. Ακολούθησε υβριδισμός του RNA με κατάλληλο ετερόλογο ανιχνευτή για το γονίδιο Dc8.

Τα αποτελέσματα αυτής της ανάλυσης κατέδειξαν ότι η έκφραση του Dc8 ήταν αισθητή από τις πρώτες ημέρες του εμβολιασμού και σε όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας των ριζιδίων στο θρεπτικό μέσο καλλογένεσης που διαρκούσε 21 ημέρες. Ο υβριδισμός με τον ετερόλογο ανιχνευτή του Dc8 καταγραφόταν και μετά την μεταφορά των κάλλων (ηλικίας 21 ημερών) στο θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης σωματικών εμβρύων στο οποίο παρέμεναν για 60 ημέρες τουλάχιστον.

Από την μελέτη του φιλμ αυτοραδιογραφίας γίνεται επίσης φανερό ότι η ποσότητα των μεταγραφημάτων παρέμενε σχετικά σταθερή στους κάλλους ηλικίας 7-31 ημερών. Η αύξηση της ποσότητάς τους γινόταν εμφανής στα δύο τελευταία δείγματα RNA που αντιστοιχούσαν σε κάλλους ηλικίας 36 και 42 ημερών αντίστοιχα.

Στο σημείο αυτό είναι σκόπιμο να αναφερθεί ότι στις συγκεκριμένες συνθήκες ιστοκαλλιέργειας διαφοροποίηση σωματικών εμβρύων καταγραφόταν ήδη σε κάλλους ηλικίας 14 ημερών. Το υψηλότερο ποσοστό σωματικής εμβρυογένεσης παρατηρήθηκε σε κάλλους ηλικίας 42-49 ημερών (Εικόνα 30).

Τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι η αύξηση στη συσσώρευση των μεταγραφημάτων του Dc8 συμπίπτει με το χρονικό διάστημα κατά το οποίο το ποσοστό επαγωγής σωματικών εμβρύων

στην ιστοκαλλιέργεια είχε πλέον σταθεροποιηθεί στο μέγιστο επίπεδο και τα περισσότερα σωματικά έμβρυα βρίσκονταν είτε στο καρδιόσχημο και στο στάδιο της τορπίλης είτε άρχιζε η ωρίμανσή τους και η περαιτέρω εξέλιξή τους σε φυτάρια.

Ανάλογα είναι και τα αποτελέσματα, τηρουμένων των αναλογιών, που καταγράφηκαν σε αντίστοιχες μελέτες σε καλλιέργειες καρότου, όπου διαπιστώθηκε η αύξηση των επιπέδων των μεταγραφημάτων του Dc8 από την 5^η ημέρα μετά την απομάκρυνση της αυξίνης από το θρεπτικό υπόστρωμα. Η μέγιστη συγκέντρωση καταγράφηκε την 15^η ημέρα που ήταν και το τελευταίο δείγμα που συλλέχθηκε.

Τα παραπάνω υποδεικνύουν ότι το γονίδιο Dc8 επάγεται στην πρώιμη εμβρυογένεση, καθώς το σφαιρικό στάδιο ολοκληρώνεται την 7^η ημέρα, περίπου, της ιστοκαλλιέργειας και την 15^η ημέρα το 77,0%, το 20,0% και το 3,0% των σωματικών εμβρύων είναι σφαιρικά, καρδιόσχημα και τορπίλης αντίστοιχα.

H. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abu-Qaoud, H., Skirvin, R.M., and Below, F.E., 1991. Influence of nitrogen form and $\text{NH}_4^+\text{-N}/\text{NO}_3^-\text{-N}$ rations on adventitious shoot formation from pear (*Pyrus communis*) leaf explants *in vitro*. Plant Cell Tiss Organ Cult, 27(3): 315-319.
- Adiri, N., and Lavee, S., 1975. Isolation of protoplasts from olive leaves. Abstracts of the Meeting of the Botanical Society of Israel, pp: 56.
- Albertini, E., Torricelli, R., Bitocchi, E., Raggi, L., Marconi, G., Pollastri, L., Di Minco, G., Battistini, A., Papa, R., and Veronesi, F., 2011. Structure of genetic diversity in *Olea europaea* L. cultivars from central Italy. Molecular Breeding, 27(4): 533-547.
- Aleith, F., and Richter, G., 1990. Gene expression during induction of somatic embryogenesis in carrot cell suspensions. Planta, 183: 17-24.
- Altabella, T., Angel, E., Biondi, S., Palaron, J., Bagni, N., and Pinol, M.T., 1995. Effect of the *rol* genes from *Agrobacterium rhizogenes* on polyamine metabolism in tobacco roots. Physiol. Plant., 95: 479-485.
- Altman, A., and Levin, N., 1993. Interactions of polyamines and nitrogen nutrition in plants. Physiol. Plant., 89: 653-658.
- Ammirato, P.V., 1974. The effects of abscisic acid on the development of somatic embryos from cells of caraway '*Carun carvi* L.'. Bot. Gaz., 135: 328-337.
- Ammirato, P.V., 1977. Hormonal Control of Somatic Embryo Development from Cultured Cells of Caraway. Interactions of Absciscic Acid, Zeatin, and Gibberellic Acid. Plant Physiol., 59: 579-586.
- Ammirato, P.V., 1983. Embryogenesis. In: Handbook of Plant Cell Culture, Vol. 1, Evans, D.A., Sharp, W.R., Ammirato, P.V., and Yamada, Y., (Eds) Macmillan Publishing Company, New York, pp: 82-123.

- Ammirato, P.V., 1983. The regulation of somatic embryo development in plant cell cultures: Suspension culture techniques and hormone requirements. *Bio/Technology*, 1(1).
- Ammirato, P.V., 1986. Role of ABA in the regulation of somatic embryogenesis. *Hort Sci.*, 21: 843.
- Anil, V.S., Harmon, A.C., and Rao, K.S., 2000. Spatio-Temporal Accumulation and Activity of Calcium-Dependent Protein Kinases during Embryogenesis, Seed Development, and Germination in Sandalwood. *Plant Physiol.*, 122:1035-1043.
- Avidan, B., and Lavee, S., 1978. Physiological aspects of the rooting ability of olive cultivars. *Acta Hortic.*, 79: 93-101.
- Bäckes-Hüsemann, D., and Reinert, J., 1970. Embryobildung durch isolierte Einzelzellen aus Gewebekulturen von *Daucus carota*. *Protoplasma*, 70: 49-60.
- Bajaj, Y.P.S., 1991b. Storage and cryopreservation of *in vitro* embryogenesis in plants cultures. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry 17: High-Tech and Micropropagation I*, Bajaj, Y.P.S., (Ed), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp: 361-381.
- Bajaj, Y.P.S., 1995. Somatic embryogenesis and its applications for crop improvement. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry 30: Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I*, Bajaj, Y.P.S., (Ed), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp: 105-125.
- Balsevich, J.J., Cutler, A.J., Lamb, N., Friesen, L.J., Kurz, E.U., Perras, M.R., and Abrams, S.R., 1994. Response of Cultured Maize Cells to (+)-Absciscic Acid, (-)- Absciscic Acid, and Their Metabolites. *Plant Physiol.*, 106: 135-142.
- Bao, Z.H., Ma, Y.F., Liu, J.F., Wang, K.J., Zhang, P.F., Ni, D.X., and Yang, W.Q., 1980. Induction of plantlets from the hypocotyl of *Olea europaea* L. *in vitro*. *Acta Bot. Sin.*, 22(1): 96-97.
- Bastola, D.R., and Minocha, S.C., 1995. Increased Putrescine Biosynthesis through Transfer of Mouse Ornithine Decarboxylase cDNA in Carrot Promotes Somatic Embryogenesis. *Plant Physiol.*, 109: 63-71.

- Baudino, S., Hansen, S., Brettschneider, R., Hecht, V.F.G., Dresselhaus, T., Lörz, H., Dumas, C., and Rogowsky, P.M., 2001. Molecular characterisation of two novel maize LRR receptor-like kinases, which belong to the *SERK* gene family. *Planta*, 213(1):1-10.
- Beena, M.R., and Martin, K.P., 2003. *In vitro* propagation of the rare medicinal plant *Ceropegia candelabrum* L. through somatic embryogenesis. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 39(5): 510-513.
- Bell, L.M., Trigiano, R.N., and Conger, B.V., 1993. Relationship of abscisic acid to somatic embryogenesis in *Dactylis glomerata*. *Envir. Exp. Bot.*, 33(4): 495-499.
- Bellarosa, R., Hakan Mo, L., and Von Arnold, S., 1992. The influence of auxin and cytokinin on proliferation and morphology of somatic embryos of *Picea abies* (L.) Karst. *Ann. Bot.*, 70: 199-206.
- Bellincampi, D., and Morpurgo, G., 1989. Evidence for the presence of a second conditioning factor in plant cell cultures. *Plant Sci.*, 65: 125-130.
- Benelli, C., Fabbri, A., Grassi, S., Lambardi, M., and Rugini, E., 2001. Histology of somatic embryogenesis in mature tissues of olive (*Olea europaea* L.). *J. Horti. Sci. & Biotech.*, 76(1): 112-119.
- Beruto, M., Curir, P., and Debergh, P., 1996. Callus growth and somatic embryogenesis in thalamus tissue of *Ranunculus asiaticus* L. cultivated *in vitro*: Cytokinin effect and phenol metabolism. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 32(3): 154-160.
- Beruto, M., Curir, P., and Debergh, P., 1999. Influence of agar on *in vitro* cultures: II. Biological performances of *Ranunculus* on media solidified with three different agar brands. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 35(1): 94-101.
- Binet, M.N., Lemoine, M.C., Martin, C., Chambon, C., and Gianinazzi, S., 2007. Micropropagation of olive (*Olea europaea* L.) and application of mycorrhiza to improve plantlet establishment. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 43: 473-478.

- Blanc, G., Lardet, L., Martin, A., Jacob, J.L., and Carron, M.P., 2002. Differential carbohydrate metabolism conducts morphogenesis in embryogenic callus of *Hevea brasiliensis* (Müll. Arg.). J Exp Bot, 53(373): 1453-1462.
- Blanc, G., Michaux-Ferriere, N., Teisson, C., Lardet, L., and Carron, M.P., 1999. Effects of carbohydrate addition on the induction of somatic embryogenesis in *Hevea brasiliensis*. Plant Cell Tiss Organ Cult, 59(2): 103-112.
- Bodhipadma, K., and Leung, D.W.M., 2002. Factors important for somatic embryogenesis in zygotic embryo explants of *Capsicum annuum* L. Journal of Plant Biology, 45(1): 49-55.
- Bollmark, M., and Eliasson, L., 1990. Ethylene accelerates the breakdown of cytokinins and thereby stimulates rooting in *Norway spruce* hypocotyl cuttings. Physiol. Plant., 80: 534-540.
- Bonacin, GA., Di Mauro, A.O., de Oliveira, R.C., and Perecin, D., 2000. Induction of somatic embryogenesis in soybean: physicochemical factors influencing the development of somatic embryos. Gen. & Mol. Bio., 23(4): 865-868.
- Bonneau, L., Berangernovat, N., Monin, J., and Martinintanguy, J., 1995. Stimulation of root and somatic embryo production in *Euonymus europaeus* L. by an inhibitor of polyamine biosynthesis. Plant Growth Regulation, 16(1): 5-10.
- Borkird, C., Choi, J.H., Jin, Z., Franz, G., Hatzopoulos, P., Chorneau, R., Bonas, U., Pelegri, F., and Sung, R.Z., 1988. Developmental regulation of embryonic genes in plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85: 6399-6403.
- Botti, C., and Vasil, I.K., 1984. Ontogeny of somatic embryos of *Pennisetum americanum*. II. In cultured immature inflorescences. Can. J. Bot., 62: 1629-1635.
- Bourgin, J.P., and Nitsch, J.P., 1967. Obtention de nicotiana haploides a partir d'etamines cultivees *in vitro*. Ann Physiol., 9: 377-382.
- Bozhkov, P.V., Mikhлина, S.B., Shizyaeva, G.A., and Lebedenko, L.A., 1993. Influence of Nitrogen Balance of Culture Medium on Norway Spruce [*Picea abies* (L.) Karst]

Somatic Polyembryogenesis: High Frequency Establishment of Embryonal-Suspensor Mass Lines from Mature Zygotic Embryos. J. Plant Physiol., 142: 735-741.

- Boulay, M., 1987. *In vitro* propagation of tree species. Plant Tissue and Cell Culture, pp: 367-382.
- Bouza, L., Jacques, M., Sotta, B., and Miginiac, E., 1993. The differential effect of N6-benzyl-adenine and N6-(Δ^2 -isopentenyl)-adenine on *in vitro* propagation of *Paeonia suffruticosa* Andr. is correlated with different hormone contents. Plant Cell Rep., 12: 593-596.
- Bracci, T., Busconi, M., Fogher, C., and Sebastiani, L., 2011. Molecular studies in olive (*Olea europaea* L.): overview on DNA markers applications and recent advances in genome analysis. Plant Cell Rep., 30(4): 449-462.
- Breton, A.M., and Sung, Z.R., 1982. Temperature-Sensitive Carrot Variants Impaired in Somatic Embryogenesis. Develop. Biol., 90: 58-66.
- Brill, L.M., Evans, C.J., and Hirsch, A.M., 2001. Expression of *MsLEC1*- and *MsLEC2*-antisense gene in alfalfa plant lines causes severe embryogenic, developmental and reproductive abnormalities. Plant J., 25: 543-461.
- Brown, C., Brooks, F.J., Pearson, D., and Mathias, R.J., 1989. Control of Embryogenesis and Organogenesis in Immature Wheat Embryo Callus Using Increased Medium Osmolarity and Absciscic Acid. J. Plant Physiol., 133: 727-733.
- Brown, D.C.W., Leung, D.W.M., and Thorpe, T.A., 1979. Osmotic requirement for shoot formation in tobacco callus. Physiol. Plant., 46: 36-41.
- Brown, S., Wetherell, D.F., and Dougall, D.K., 1976. The potassium requirement for growth and embryogenesis in wild carrot suspension cultures. Physiol. Plant., 37: 73-79.
- Buchheim, J.A., Colburn, S.M., and Ranch, J.P., 1989. Maturation of Soybean Somatic Embryos and the Transition to Plantlet Growth. Plant Physiol., 89: 768-775.

- Buiteveld, J., Fransz, P.F., and Creemers-Molenaar, J., 1994. Induction and characterization of embryogenic callus types for the initiation of suspension cultures of leek (*Allium ampeloprasum* L.). Plant Sci., 100: 195-202.
- Cañas, L.A., Wyssmann, A.M., and Benbadis, M.C., 1987. Isolation, culture and division of olive (*Olea europaea* L.) protoplasts. Plant Cell Rep., 6: 369-371.
- Cañas, L.A., 1988. *In vitro* culture of the olive tree (*Olea europaea* L.): Present aspects and prospects. Bull. Soc. Bot. Fr., 135: 263-277.
- Cañas, L.A., and Benbadis, A., 1988. *In vitro* plant regeneration from cotyledon fragments of the olive tree (*Olea europaea* L.). Plant Sci., 54: 65-74.
- Cañas, L.A., Carramolino, L., and Vicente, M., 1987. Vegetative propagation of the olive tree from *in vitro* cultured embryos. Plant Sci., 50: 85-90.
- Cañas, L.A., Wyssmann, A.M., and Benbadis, M.C., 1987. Isolation, culture and division of olive (*Olea europaea* L.) protoplasts. Plant Cell Rep., 6: 369-371.
- Capelo, A.M., Silva, S., Brito, G., and Santos, C., 2010. Somatic embryogenesis induction in leaves and petioles of a mature wild olive. Plant Cell Tiss Organ Cult, 103: 237-242.
- Carimi, F., Barizza, E., Gardiman, M., and Lo Schiavo, F., 2005. Somatic embryogenesis from stigmas and styles of grapevine. In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 41(3): 249-252.
- Cerezo, S., Mercado, A.J., and Pliego-Alfaro, F., 2011. An efficient regeneration system via somatic embryogenesis in olive. Plant Cell Tiss Organ Cult, 106: 337-344.
- Chang, W.C., and Lan, Th., 1995. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Roots of Bamboo (*Bambusa beecheyana* Munro var. *beecheyana*). J. Plant Physiol., 145: 535-538.
- Charriere, F., and Hahne, G., 1998. Induction of embryogenesis versus caulogenesis on *in vitro* cultured sunflower (*Helianthus annuus* L.) immature zygotic embryos: role of plant growth regulators. Plant Sci., 137(1): 63-71.

- Chee, R.P., and Cantliffe, D.J., 1989. Inhibition of Somatic Embryogenesis in Response to 2,3,5-Triodobenzoic Acid and 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid in *Ipomoea batatas* (L.) Lam. Cultured *in vitro*. J. Plant Physiol., 135: 398-403.
- Chen, J.T., and Chang, W.C., 2001. Effects of auxins and cytokinins on direct somatic embryogenesis on leaf explants of *Oncidium 'Gower Ramsey'*. Plant Growth Regulation, 34(2): 229-232.
- Chen, J.T., and Chang, W.C., 2004. Induction of repetitive embryogenesis from seed-derived protocorms of *Phalaenopsis amabilis* var. *formosa* Shimadzu. In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 40(3): 290-293.
- Cheng, J.C., Seeley, K.A., Goupil, P., and Sung, Z.R., 1996. Expression of DC8 is associated with, but not dependent on embryogenesis. Plant Mol. Biol., 31:127-141.
- Cheong, E.J., and Pooler, M.R., 2004. Factors affecting somatic embryogenesis in *Prunus incisa* cv. February Pink. Plant Cell Rep., 22(11): 810-815.
- Cho, D.Y., Lee, E.K., Lee, S., Chung, W.I., and Soh, W.Y., 2003. Enhanced somatic embryogenesis and plant regeneration in leaf explant cultures of *Ostericum koreanum* on medium of varying pH. Plant Cell Tiss Organ Cult, 75(3): 215-222.
- Choi, J.H., Liu, L.S., Borkird, C., and Sung, Z.R., 1987. Cloning of genes developmentally regulated during plant embryogenesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 84: 1906-1910.
- Chu, C.C., Wang, C.C., Sun, C.S., Hsu, C., Yin, K.C., Chu, C.U., and Bi, F.Y., 1975. Establishment of an efficient medium for anther culture of rice through comparative experiments on the nitrogen sources. Sci. Sin., 18: 659-668.
- Claparols, I., Santos, M.A., and Torne, J.M., 1993. Influence of some exogenous amino acids on the production of maize embryogenic callus and on endogenous amino acid content. Plant Cell Tiss Organ Cult, 34: 1-11.
- Claparols, I., and Torne, J.M., 1993. Effect of Exogenous Arginine, Ornithine, Methionine and γ -Amino Butyric Acid on Maize (*Zea mays* L.) Embryogenesis, and Polyamine Content. J. Plant Physiol., 142: 74-80.

- Compton, M.E., 1994. Statistical methods suitable for the analysis of plant tissue culture data. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 37: 217-242.
- Cook, T.J., Schiavone, F.M., and Racusen, R.H., 1985. An electrophysiological approach toward somatic embryogenesis in carrot cultures. In: *Somatic embryogenesis of carrots. Proceedings of a workshop held at San Miniato on May 28-31, 1985*, Terzi, M, Pitto, L., Sung, Z.R., (Eds), pp: 172-180.
- Cornejo-Martin, M.J., Mingo-Castel, A.M., and Primo-Millo, E., 1979. Organ redifferentiation in rice callus: Effects of C₂H₄, CO₂ and cytokinins. *Z. Pflanzenphysiol.*, 94: 117-123.
- Corre, F., Henry, Y., Rode, A., and Hartmann, C., 1996. *Em* gene expression during somatic embryogenesis in the monocot *Triticum aestivum* L. *Plant Sci.*, 117(1-2): 139-149.
- Cousson, A., Toubart, P., and Tran Thanh Van, K., 1989. Control of morphogenetic pathways in thin cell layers of tobacco by pH. *Can. J. Bot.*, 67: 650- 654.
- Cozza, R., Turco, D., Bati, C.B., and Bitonti, M.B., 1997. Influence of growth medium on mineral composition and leaf histology in micropropagated plantlets of *Olea europaea*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 51(3): 215-223.
- Cruz, G.S., Canhoto, J.M., and Abreu, M.A.V., 1990. Somatic embryogenesis and plant regeneration from zygotic embryos of *Feijoa sellowiana* Berg. *Plant Sci.*, 66: 263- 270.
- Cunha, A., and Fernandes-Ferreira, M., 1999. Influence of medium parameters on somatic embryogenesis from hypocotyl explants of flax (*Linum usitatissimum* L.)- Effects of carbon source, total inorganic nitrogen and balance between ionic forms and interaction between calcium and zeatin. *J. Plant Physiol.*, 155(4-5): 591-597.
- D' Amato, F., 1977. Cytogenetics of differentiation in tissue and cell cultures. In: *Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue, and Organ Culture*, Reinert, J., and Bajaj, Y.P.S., (Eds), Springer-Verlag Berlin Heidelberg, New York, pp: 343-357.

- Da Silva, M. L., Pinto, D.L.P., Guerra, M.P., Floh, E.I.S., Bruckner, C.H., and Otoni, W.C., 2009. A novel regeneration system for a wild passion fruit species (*Passiflora cincinnata* Mast.) based on somatic embryogenesis from mature zygotic embryos. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 99: 47-54.
- Dagustu, N., 2002. Some factors affecting the plant regeneration in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Biotechnology & Biotechnological Equipment*, 16(1): 18-23.
- Das, N., Misra, M., and Misra, A.N., 1990. Sodium Chloride Salt Stress Induced Metabolic Changes in Callus Cultures of Pearl Millet (*Pennisetum americanum* L. Leeke): Free Solute Accumulation. *J. Plant Physiol.*, 137: 244-246.
- Das, S., Ray, S., Dey, S., and Dasgupta, S., 2001. Optimisation of sucrose, inorganic nitrogen and abscisic acid levels for *Santalum album* L. somatic embryo production in suspension culture. *Process Biochemistry*, 37(1): 51-56.
- Davletova, S., Mészáros, T., Miskolczi, P., Oberschall, A., Török, K., Magyar, Z., Dudits, D., and Deák, M., 2001. Auxin and heat shock activation of a novel member of the calmodulin like domain protein kinase gene family in cultured alfalfa cells. *J. Exp. Bot.*, 52:215-221.
- Decout, E., Dubois, T., Guedira, M., Dubois, J., Audran, J.C., and Vasseur, J., 1994. Role of temperature as a triggering signal for organogenesis or somatic embryogenesis in wounded leaves of chicory cultured *in vitro*. *J. Exp. Bot.*, 45(281): 1859-1865.
- Denchev, P.D., Kuklin, A.I., and Scragg, A.H., 1992. Somatic embryo production in bioreactors. *J. Biotech.*, 26: 99-109.
- Denney, J.O., and Martin, G.C., 1994. Ethephon Tissue Penetration and Harvest Effectiveness in Olive as a Function of Solution pH, Application Time, and BA or NAA Addition. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 119(6): 1185-1192.
- De Donato, M., Perucco, E., Chiavarra, P., and Panei, E., 1989. Activation of nuclear DNA replication and mitosis in excised cotyledons of *Capsicum annuum*. *Plant Sci.*, 63(2): 217-225.

- De Vries, S.C., Booij, H., Meyerink, P., Huisman, G., Wilde, H.D., Thomas, T.L., and Van Kammen, A., 1988. Acquisition of embryogenic potential in carrot cell-suspension cultures. *Planta*, 176: 196-204.
- Diamantoglou, S., and Mitrakos, K., 1979. Sur la culture *in vitro* de l'embryon d'olivier (*Olea europaea* L. var *oleaster*). *CR Acad. Sci. Ser. D.*, 288: 1537-1540.
- Διαμαντόγλου, Σ., και Μητράκος, Κ., 1982. Σχηματισμός κάλλων από ρίζες, κοτυληδόνες και υποκοτύλια αρτιβλάστων *Olea europaea* L. ssp. *oleaster*. *Βοτανικά Χρονικά*, 2: 183-184.
- Diamantoglou, S., Panagopoulos, I., Munoz-Ferriz, A., and Rhizopoulou, S., 1990. *In Vitro* Studies of Embryo Growth, Callus Formation and Multiple Bud Induction of *Pinus pinea* L. *J. Plant Physiol.*, 137: 58-63.
- Dodds, J.H., and Roberts, L.W., (Eds) 1984. *Experiments in plant tissue culture*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Dodds, J.H., and Roberts, L.W., 1985. Nutritional components of tissue culture media. In: *Experiments in Plant Tissue Culture 2nd Ed.*, Cambridge University Press, pp: 35-53.
- Dodeman, V.L., Ducreux, G., and Kreis, M., 1997. Review article: Zygotic embryogenesis *versus* somatic embryogenesis. *J. Exp. Bot.*, 48(8): 1493-1509.
- Dong, J-Z., and Dunstan, D.I., 1994. Growth Parameters, Protein and DNA Synthesis of an Embryogenic Suspension Culture of White Spruce (*Picea glauca*). *Plant Physiol.*, 144: 201-208.
- Dong, J-Z., Perras, M.R., Abrams, S.R., and Dunstan, D.I., 1994. ABA uptake, metabolism and induced gene expression in embryogenic suspension cultures of white spruce (*Picea glauca*). In: *Proceedings of the 21st annual meeting of the Plant Growth Regulator Society of America*, Tworowski, T. J., (Ed), pp: 96-105.
- Dong, J-Z., Perras, M.R., Abrams, S.R., and Dunstan, D.I., 1997. Gene expression patterns, and uptake and fate of fed ABA in white spruce somatic embryo tissues during maturation. *J. Exp. Bot.*, 48(307): 277-287.

- D’Onofrio, C., Morini, S., and Bellocchi, G., 1998. Effect of light quality on somatic embryogenesis of quince leaves. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 53(2): 91-98.
- Dornelas, M.C., Vieira, M.L.C., and Appazzato-da-Gloria, B., 1992. Histological analysis of organogenesis and somatic embryogenesis induced in immature tissues of *Stylosanthes scarba*. *Ann. Bot.*, 70: 477-482.
- Dudits, D., Bogre, L., and Gyorgyey, J., 1991. Molecular and cellular approaches to the analysis of plant embryo development from somatic-cells *in vitro*. *J. Cell Sci.*, 99: 475-484.
- Dudits, D., Gyorgyey, J., Bogre, L., and Bako, L., 1995. Molecular biology of somatic embryogenesis. In: *In Vitro Embryogenesis in Plants*, Thorpe, T.A. (Ed), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp: 267-308.
- Dudits, T., Guediva, M., Dubois, J., and Vasseur, J., 1991. Direct somatic embryogenesis in leaves of *Cichorium*. *Protoplasma*, 162: 120-127.
- Dunstan, D.I., Tautorius, T.E., and Thorpe, T.A., 1995. Somatic embryogenesis in woody plants. In: *In Vitro Embryogenesis in Plants*, Thorpe, T.A., (Ed), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp: 471-540.
- Duoue, A.S., Pires, A.S., Dos Santos, D.M., and Fevereiro, P., 2006. Efficient somatic embryogenesis and plant regeneration from long-term cell suspension cultures of *Medicago Truncatula* cv. Jemalong. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 42(3): 270-273.
- Durzan, D.J., and Campbell, R.A., 1974. Prospects for the mass production of improved stock of forest trees by cell and tissue culture. *Can. J. For. Res.*, 4: 151-174.
- Economou, A.S., and Read, P.E., 1986. Light quality control of shoot and root formation *in vitro* in *Petunia* cultures. *HortSci.*, 21: 761.
- Eeckhaut, T.G.R., Werbrouck, S.P.O., Leus, L.W.H., Van Bockstaele, E.J., and Debergh, P.C., 2004. Chemically Induced Polyploidization in *Spathiphyllum wallisii* Regel through Somatic Embryogenesis. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 78(3): 241-246.

- Egertsdotter, U., Lars, M.H., and von Arnold, S., 1993. Extracellular proteins in embryogenic suspension cultures of norway spruce (*Picea abies*). *Physiol. Plant*, 88(2):,315-321.
- Eliasson, L., Bertell, G., and Bolander, E., 1989. Inhibitory Action of Auxin on Root Elongation not Mediated by Ethylene. *Plant Physiol.*, 91: 310-314.
- Ellis, D., 1995. Genetic transformation of somatic embryos. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry 30: Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I*, Bajaj, Y.P.S., (Ed), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp: 207-220.
- Epstein, E., and Lavee, S., 1975. Uptake, translocation and metabolism of IAA in the olive (*Olea europaea*). *Abstracts of the Meeting of the Botanical Society of Israel*, pp: 91.
- Emons, A.M.C., and Does, H.D., 1993. Origin and development of embryo and bud primordia during maturation of embryogenic calli of *Zea mays*. *Can. J. Bot.*, 71: 1349-1356.
- Emons, A.M., 1994. Somatic embryogenesis: cell biological aspects. *Acta Bot. Neerl.*, 43(1): 1-14.
- Epstein, E., and Lavee, S., 1984. Conversion of Indole-3-butyric Acid to Indole-3-acetic Acid by Cuttings of Grapevine (*Vitis vivifera*) and Olive (*Olea europaea*). *Plant and Cell Physiol.*, 25(5): 697-703.
- Ernst, D., and Oesterhelt, D., 1984. Effect of exogenous cytokinins on growth and somatic embryogenesis in anise cells (*Pimpinella anisum* L.). *Planta*, 161: 246-248.
- Etinne, H., Montoro, P., Michaux-Ferriere, N., and Carron, M.P., 1993. Effects of desiccation, medium osmolarity and abscisic acid on the maturation of *Hevea brasiliensis* somatic embryos. *J. Exp. Bot.*, 44(267): 1613-1619.
- Evans, D.A., Sharp, W.R., and Flick, C.E., 1981. Plant regeneration from cell cultures (Review). 3: 214-314.

- Fallon, K.M., and Phillips, R., 1989. Responses to water stress in adapted and unadapted carrot-cell suspension cultures. *J. Exp. Bot.*, 40(215): 681-687.
- Fedak, G., Armstrong, K.C., and Handyside, R.J., 1987b. Chromosome instability in wheat plants regenerated from suspension culture. *Genome*, 29: 627-629.
- Fellner, M., 1995. Influence of pH and sucrose concentration on nonenzymatic and enzymatic isolation of protoplasts from mature pollen of *Tulbaghia violacea*. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 42: 157-162.
- Fernando, S.C., and Gamage, C.K.A., 2000. Absciscic acid induced somatic embryogenesis in immature embryo explants of coconut (*Cocos nucifera* L.). *Plant Sci.*, 151(2): 193-198.
- Fienberg, A.A., Choi, J.H., Lubich, W.P., and Sung, Z.R., 1984. Developmental regulation of polyamine metabolism in growth and differentiation of carrot culture. *Plant*, 162: 532-539.
- Finkelstein, R.R., and Crouch, M.L., 1986. Rapeseed Embryo Development in Culture on High Osmoticum is Similar to That in Seeds. *Plant Physiol.*, 81: 907-912.
- Flick, C.E., Evans, D.A., and Sharp, W.R., 1983. Organogenesis. In: *Handbook of Plant Cell Culture*, Vol. 1, Evans, D.A., Sharp, W.R., Ammirato, P.V., and Yamada Y., (Eds), Macmillan Publishing Company, New York, pp: 59-81.
- Franz, G., Hatzopoulos, P., Jones, T.J., Krauss, M., and Sung, Z.R., 1989. Molecular and genetic analysis of an embryonic gene, *DC8*, from *Daucus carota* L. *Mol. Gen. Genet.*, 218: 143-151.
- Fyji, J.A.A., Slade, D.T., Redenbaugh, K., and Walker, K.A., 1987. Artificial seeds for plant propagation. *Tibtech*, 12(47): 335-339.
- Fujimura, T., and Komamine, A., 1975. Effects of various growth regulators on the embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Plant Sci. Lett.*, 5: 359-364.
- Fujimura, T., and Komamine, A., 1979. Synchronization of Somatic Embryogenesis in a Carrot Cell Suspension Culture. *Plant Physiol.*, 64:162-164.

- Fujimura, T., and Komamine, A., 1979. Involvement of endogenous auxin in somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Z Pflanzenphysiol.*, 95: 13-19.
- Fujimura, T., and Komamine, A., 1980. Mode of action of 2,4-D and zeatin on somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Z Pflanzenphysiol.*, 99: 1-8.
- Fujimura, T., Komamine, A., and Matsumoto, H., 1980. Aspects of DNA, RNA and protein synthesis during somatic embryogenesis in a carrot cell suspension culture. *Physiol. Plant.*, 49: 255-260.
- Gaj, M.D., 2002. Stimulation of somatic embryo formation by mutagens and darkness in culture of immature zygotic embryos of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. *Plant Growth Regulation*, 37(1): 93-98.
- Gamborg, O.L., Constabell, F., La Rue, T.A.G., Miller, R.A., and Steck, W., 1971. The influence of hormones on secondary metabolite formation in plant cell cultures. *Colloques internationaux C.N.R.S.*, No 193 Les cultures de tissus de plantes, pp: 335-343.
- Garcia, J.L. Troncoso, J., Sarmiento, R., and Troncoso, A., 2002. Influence of carbon source and concentration on the *in vitro* development of olive zygotic embryos and explants raised from them. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 69(1): 95-100.
- Garrido, D., Chibi, F., and Matilla, A., 1995. Polyamines in the Induction of *Nicotiana tabacum* Pollen Embryogenesis by Starvation. *J. Plant Physiol.*, 145: 731-735.
- Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, DM., and Thorpe, Ta., 1996. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant.*, 32: 272-289.
- Gaspar, T., Kevers, C., Faivre-Rampant, O., Crèvecoeur, M., Penel, Cl., Greppin, H., and Dommes, J., 2003. Changing concepts in plant hormone action. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 39: 85-106.
- Gill, R., Malik, K.A., Sanago, M.H.M., and Saxena, P.K., 1995. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Seedling Cultures of Tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.). *J. Plant Physiol.*, 147: 273-276.

- Gill, R., and Saxena, P.K., 1992. Direct somatic embryogenesis and regeneration of plants from seedling explants of peanut (*Arachis hypogaea*): promotive role of thidiazuron. Can. J. Bot., 70: 1186-1192.
- Gill, R., Senaratna, T., and Saxena, P.K., 1994. Thidiazuron Induced Somatic Embryogenesis Enhances Viability of Hydrogel-Encapsulated Somatic Embryos of *Geranium*. J. Plant Physiol., 143: 726-729.
- Goupil, P., Hatzopoulos, P., Franz, G., Hempel, F.D., You, R., and Renee Sung, Z., 1992. Transcriptional regulation of a seed-specific carrot gene, *DC8*. Plant Mol. Biol., 18: 1049-1063.
- Gray, D.J., and Purohit, A., 1991. Quiescence and dormancy in somatic embryos. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry 17: High-Tech and Micropropagation I, Bajaj, Y.P.S.,(Ed), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp: 382-394.
- Griesbach, R.J., 1987. Selected topics on induced chromosome changes in tissue-cultured cells. HortSci., 22(6): 1204-1206.
- Grigoriadou, K., Vasilakakis, M., and Eleftheriou, E.P., 2002. *In vitro* propagation of the Greek olive cultivar "*Chondrolia Chalkidikis*". Plant Cell Tiss Organ Cult, 71(1): 47-54.
- Grossoni, P., 1979. Problems concerning the *in vitro* culture of *Olea europaea* L. Giorn. Bot. Ital., 113: 75-88.
- Gupta, P.K., Pullman, G., Timmis, R., Kreitinger, M., Carlson, W.C., Grob, J., and Welty, E., 1993. Forestry in the 21st Century: The biotechnology of somatic embryogenesis. Bio/Technology, 11: 454-459.
- Guru, S.K., Chandra, R., Raj, A., Khetrapal. S., and Polisetty, R., 1999. Evolution of ethylene and methane in relation to somatic embryogenesis in chickpea. Biol. Plant., 42(1): 149-154.
- Gutierrez, P., and Rugini, E., 2004. Influence of plant growth regulators, carbon sources and iron on the cyclic secondary somatic embryogenesis and plant regener-

ation of transgenic cherry rootstock “Colt” (*Prunus avium* x *P-pseudocerasus*). Plant Cell Tiss Organ Cult, 79(2): 223-232.

- Guzzo, F., Baldan, B., Mariani, P., LoSchiavo, F., and Terzi, M., 1994. Studies on the origin of totipotent cells in explants of *Daucus carota* L. J. Exp. Bot., 45(279): 1427-1432.
- Györgyey, J., Gartner, A., Nemeth, K., Magyar, Z., Hirt, H., Heberle Bors, E., and Dudits, D., 1991. Alfalfa heat shock genes are differentially expressed during somatic embryogenesis. Plant Mol. Biol., 16(6): 999-1007.
- Haissing, B.E., 1989. Influences of the new auxins 4-carbomethoxyvinylphenyl indole-3-butyric acid and 2,4-dichlorophenyl indole-3-butyric acid on adventitious root formation. Can. J. Bot., 67: 2571-2575.
- Hakman, I., Fowke, L.C., Von Arnold, S., and Eriksson, T., 1985. The development of somatic embryos in tissue cultures initiated from immature embryos of *Picea abies* (Norway spruce). Plant Sci., 38: 53-59.
- Halperin, W., 1966. Alternative morphogenetic events in cell suspensions. Am. J. Bot., 53(5): 443-453.
- Halperin, W., 1967. Population density effects on embryogenesis in carrot-cell cultures. Exp. Cell Res., 48: 170-173.
- Halperin, W., 1969. Morphogenesis in cell cultures. Ann. Rev. Plant Physiol., 20: 395-418.
- Halperin, W., 1995. In vitro embryogenesis: Some historical issues and unresolved problems. In: *In vitro* Embryogenesis in Plants, Thorpe, T.A., (Ed), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp: 1-16.
- Halperin, W., and Wetherell, D.R., 1965. Ontogeny of adventitive embryos of wild carrot. Science, 147: 756-758.
- Halperin, W., and Jensen, W.A., 1966. Ultrastructural changes during growth and embryogenesis in carrot cell cultures. J. Ultrastructure Res., 18: 428-443.

- Hammat, T.N., and Davey, M.R., 1987. Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Cultured Zygotic Embryos of Soybean (*Glycine max* L. Merr.). J. Plant Physiol., 128: 219-226.
- Hao, YJ., and Deng, X.X., 2002. Stress treatments and DNA methylation affected the somatic embryogenesis of citrus callus. Act. Bot. Sin., 44(6):673-677.
- Harini, I., and Lakshmi Sita, G., 1993. Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from immature embryos of chilli (*Capsicum annuum* L.). Plant Sci., 89: 107-112.
- Harper, J.F., 2001. Dissecting calcium oscillators in plant cells. Trends Plant Sci., 6(9): 395-397.
- Hatanaka, T., Sawabe, E., Azuma, T., Uchida, N., and Yasuda, T., 1995. The role of ethylene in somatic embryogenesis from leaf discs of *Coffea canephora*. Plant Sci., 107(2): 199-204.
- Hatzopoulos, P., Franz, G., Choy, L., and Sung, R.Z., 1990. Interaction of Nuclear Factors with Upstream Sequences of a Lipid Body Membrane Protein Gene from Carrot. The Plant Cell, 2: 457-467.
- Hatzopoulos, P., Fong, F., and Sung, R.Z., 1990. Absciscic Acid Regulation of *DC8*; A Carrot Embryonic Gene. Plant Physiol., 94: 101-106.
- Hausman, J-F., Kevers, C., and Gaspar, T., 1994. Involvement of putrescine in the inductive rooting phase of poplar shoots raised *in vitro*. Physiol. Plant., 92: 201-206.
- Hausman, J-F., Kevers, C., and Gaspar, T., 1995. Putrescine Control of Peroxidase Activity in the Inductive Phase of Rooting in Poplar Shoots *in vitro*, and the Adversary Effect of Spermidine. J. Plant Physiol., 146: 681-685.
- Hazra, S., Sathaye, S.S., and Mascarenhas, A.F., 1989. Direct somatic embryogenesis in peanut (*Arachis hypogea*). Bio/Technology, 7: 949-951.

- He, D.G., Yang, Y.M., and Scott, K.J., 1989. The effect of macroelements in the induction of embryogenic callus from immature embryos of wheat. *Plant Sci.*, 64(2): 251-258.
- Henshaw, G.G., Jha, K.K., Mehta, A.R., Shakeshaft, D.J., and Street, H.E., 1966. Studies on the growth in culture of plant cells. *J. Exp. Bot.*, 17(51): 362-377.
- Hernandez, I., Celestino, C., and Toribio, M., 2003. Vegetative propagation of *Quercus suber* L. by somatic embryogenesis I. Factors affecting the induction in leaves from mature cork oak trees. *Plant Cell Rep.*, 21(8): 759-764.
- Hisajima, S., and Thorpe, T., 1985. Carbohydrate utilization and activities of various glycosidases in cultured Japanese morning-glory callus. *Plant Tissue Cult Lett*, 2(1):14-21.
- Hofmann, N., Nelson, R.L., and Korban, S.S., 2004. Influence of media components and pH on somatic embryo induction in three genotypes of soybean. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 77(2): 157-163.
- Huang, X.L., Li, X.J., Li, Y., and Hyang, L.Z., 2001. *Medicago sativa*. *Physiol Plant.*, 113(3): 424-429.
- Hutchinson, M.J., Murch, S.J., and Saxena, P.K., 1996. Morphoregulatory role of thidiazuron: Evidence of the involvement of endogenous auxin in thidiazuron-induced somatic embryogenesis of geranium (*Pelargonium x hortorum* Bailey). *J. Plant Physiol.*, 149(5): 573-579.
- Hutchinson, M.J., Senaratna, T., Sahi, S.V., and Saxena, P.K., 2000. Light mediates endogenous plant growth substances in thidiazuron-induced somatic embryogenesis in geranium hypocotyl cultures. *J. Plant Bioc. & Biotec.*, 9(1): 1-6.
- Ishizaki, T., Komai, F., Msuda, K., and Megumi, C., 2000. Exogenous ethylene enhances formation of embryogenic callus and inhibits embryogenesis in cultures of explants of spinach roots. *J. Amer. Soc. Hort. Scie.*, 125(1): 21-24.
- Istambouli, A., and Neville, P., 1977. Influence de quelques glucides sur la germination de l'olivier (*Olea europaea* L.). *Rev Gen Bot.*, 84: 305-317.

- Jacoboni, A., 1987. In Vitro Breeding. *Olivae*, 25: 31-34.
- Jay, V., Genestier, S., and Courdouroux, J-C., 1994. Bioreactor studies of the effect of medium pH on carrot (*Daucus carota* L.) somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 36: 205-209.
- Jayanthi, M., and Mandal, P.K., 2001. Plant regeneration through somatic embryogenesis and Rapd analysis of regenerated plants in *Tylophora indica* (Burm. f. Merrill.). *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 37(5): 576-580.
- Jones, A.M., 1990. Do we have the auxin receptor yet? *Physiol. Plant.*, 80: 154-158.
- Kamada, H., and Harada, H., 1979a. Studies on the organogenesis in carrot tissue cultures. I. Effects of growth regulators on somatic embryogenesis and root formation. *Z. Pflanzenphysiol.*, 91: 255-266.
- Kamada, H., and Harada, H., 1979b. Studies on the organogenesis in carrot tissue cultures. II. Effects of amino acids and inorganic nitrogenous compounds on somatic embryogenesis. *Z. Pflanzenphysiol.*, 91: 453-463.
- Kao, K.N., and Michayluk, M.R., 1975. Nutritional Requirements for Growth of *Vicia hajastana* Cells and Protoplasts at a Very Low Population Density in Liquid Media. *Planta*, 126: 105-110.
- Καψάλη, Μ., 1992. Ιστοκαλλιέργειες στην αγριελιά (*Olea europaea* var. *sylvestris*). Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Βιολογίας, Σχολής Θετικών Επιστημών, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.
- Kaparakis, G., and Alderson, P.G., 2002. Influence of high concentration of cytokinins on the production of somatic embryos by germinating seeds of tomato, aubergine and pepper. *J. Hort. Sci. & Biot.*, 77(2): 186-190.
- Kapsali, M., Mitrakos, K., and Diamantoglou, S., 1986. *Olea europaea* callus growth and differentiation. Abstracts of the 5th Congress of the Federation of European Societies of Plant Physiology (FESPP). Hamburg, Germany, pp: 15.

- Karami, O., and Saidi, A., 2010. The molecular basis for stress-induced acquisition of somatic embryogenesis. *Molecular Biology Reports* 37, (5): 2493-2507.
- Kato, H., and Takeuchi, M., 1963. Morphogenesis *in vitro* starting from single cells of carrot root. *Plant Cell Physiol.*, 4: 243-245.
- Kawahara, R., and Komamine, A., 1995. Molecular basis of somatic embryogenesis. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry 30: Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I*, Bajaj, Y.P.S., (Ed), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp: 30-40.
- Kępczyńska, E., Ruduś, I., and Kępczyński, J., 2009. Endogenous ethylene in indirect somatic embryogenesis of *Medicago sativa* L. *Plant Growth Regulation*, 59(1): 63-73.
- Kępczyńska, E., and Zielińska, S., 2011. Disturbance of ethylene biosynthesis and perception during somatic embryogenesis in *Medicago sativa* L. reduces embryos' ability to regenerate. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(5): 1969-1980.
- Kevers, C., Le Gal, N., Monteiro, M., Dommès, J., and Gaspar, T., 2000. Somatic embryogenesis of *Panax ginseng* in liquid cultures: a role for polyamines and their metabolic pathways. *Plant Growth Regulation*, 31(3): 209-214.
- Khan, H., Siddique, I., and Anis, M., 2006. Thidiazuron induced somatic embryogenesis and plant regeneration in *Capsicum annuum*. *Biologia Plantarum*, 50(4): 789-792.
- Khoush, G.S., Virmani, S.S., and Brar, D.S., 1990. Expectations of plant breeders from tissue culture. In: *Plant Tissue Culture: Applications and Limitations*, Bhojwani, S.S., (Ed), Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp: 412-423.
- Khurana, J.P., Jain, M., and Tyagi, A.K., 2007. Auxin and Cytokinin Signaling Component Genes and Their Potential For Crop Improvement. *Genomics-Assisted Crop Improvement*, pp: 289-314.
- Kim, T.D., Anbazhagan, V.R., and Park, J.I., 2005. Somatic embryogenesis in *Schisandra chinensis* (Turcz.) Baill. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant.*, 41(3):253-257.

- Kitamiya, E., Suzuki, S., Sano, T., and Nagata, T., 2000. Isolation of two genes that were induced upon the initiation of somatic embryogenesis on carrot hypocotyls by high concentrations of 2,4-D. *Plant Cell Rep.*, 19: 551-557.
- Kiyosue, T., Takano, K., Kamada, H., and Harada, H., 1990. Induction of somatic embryogenesis in carrot by heavy metal ions. *Can. J. Bot.*, 68: 2301-2303.
- Klimaszewska, K., Ward, C., and Cheliak, W.M., 1992. Cryopreservation and plant regeneration from embryogenic cultures of larch (*Larix eurolepis*) and black spruce (*Picea mariana*). *J. Exp. Bot.*, 43(246): 73-79.
- Koch, K.E., Wu, Y., and Xu, J., 1996. Sugar and metabolic regulation of genes for sucrose metabolism: potential influence of maize sucrose synthase and soluble invertase responses on carbon partitioning and sugar sensing. *J. Exp. Bot.*, 47: 1179-1185.
- Kochba, J., and Button, J., 1974. The stimulation of embryogenesis and embryoid development in habituated ovular callus from the 'Shamouti' orange (*Citrus sinensis*) as affected by tissue age and sucrose concentration. *Z. Pflanzenphysiol.*, 73: 415-421.
- Kochba, J., and Spiegel-Roy, P., 1977. The effects of auxins, cytokinins and inhibitors on embryogenesis in habituated ovular callus of the 'Shamouti' orange (*Citrus sinensis*). *Z. Pflanzenphysiol.*, 81: 283-288.
- Koens, K.B., Nicoloso, F.T., Van Vliet, Th.B., Harteveld, M., Boot, C.J.M., Van Iren, F., Mulder, P., Libbenga, K.R., and Kijne, J.W., 1995. Kinetics of 2,4-Dichlorophenoxyacetic Acid Content in an Auxin-Dependent Suspension Culture of *Nicotiana tabacum* Cells. *J. Plant Physiol.*, 147: 383-390.
- Kohlenbach, H.W., and Schmidt, B., 1975. Cytodifferentiation in the mode of a direct transformation of isolated mesophyll cells to tracheids. *Z. Pflanzenphysiol.*, 75: 369-374.
- Krens, F.A., and Jamar, D., 1989. The Role of Explant Source and Culture Conditions on Callus Induction and Shoot Regeneration Insugarbeet (*Beta vulgaris* L.). *J. Plant Physiol.*, 134(6): 651-655.

- Kreuger, M., and Van Holst, G-J., 1993. Arabinogalactan proteins are essential in somatic embryogenesis of *Daucus carota* L. *Planta*, 189: 243-248.
- Krikorian, A.D., Kelly, K., and Smith, D.L., 1987. Hormones in tissue cultures and micropropagation. In: *Plant Hormones and Their Role in Plant Growth and Development*, Davies, P.J., (Ed) Martinus Publishers, Dordrecht-Boston-Lancaster, pp: 593-613.
- Kumar, A., Palni, L.M.S., Sood, A., Sharma, M., Palni, U.T., and Gupta, A.K., 2002. Heat-shock induced somatic embryogenesis in callus cultures of gladiolus in the presence of high sucrose. *J. Hort. Sci. & Biot.*, 77(1): 73-78.
- Kumar, V., Ramakrishna, A., and Ravishankar, G.A., 2007. Influence of different ethylene inhibitors on somatic embryogenesis and secondary embryogenesis from *Coffea canephora* P. ex Fr. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 43(6): 602-607.
- Lal, N., Singh, H.N., and Indian, J., 1991. Morphogenesis and Growth Studies on Sugarcane Callus under Different 2,4-D Levels. *Plant Physiol.*, 34(1): 84-88.
- Lambardi, M., Ozudogru, E.A. and Roncasaglia, R., 2013. In Vitro Propagation of Olive (*Olea europaea* L.) by Nodal Segmentation of Elongated Shoots. *Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants Methods in Molecular Biology*, 11013: 33-44.
- Lambardi, M., and Rugini, E., 2003. Micropropagation of olive (*Olea europaea* L.). *Micropropagation of Woody Trees and Fruits Forestry Sciences*, 75:621-646.
- Lambe, P., Mutambel, H.S.N., Deltour, R., and Dinant, M., 1998. Somatic embryogenesis in pearl millet (*Pennisetum glaucum*): Strategies to reduce genotype limitation and to maintain long-term totipotency. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 55(1): 23-29.
- Larreri, P.A., Hildebrand, D.F., Sunega, J., Williams, E.C., and Collins, C.B., 1988. Soybean somatic embryogenesis: Interactions between sucrose and auxin. *Plant Cell Rep.*, 7(7): 517-520.

- Latkowska, M.J., Kvaalen, H., and Appelgren, M., 2000. Genotype dependent blue and red light inhibition of the proliferation of the embryogenic tissue of Norway spruce. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 36(1): 57-60.
- Lavee, S., 1977. The growth potential of olive fruit mesocarp *in vitro* (*Olea europaea* L.). *Acta Hortic.*, 78: 115-122.
- Lavee, S., and Adiri, N., 1974. The effect of abscisic acid and gibberellic acid on the development of apple and olive callus. In: *Plant growth substances, PartVI. Tiss Cult Proc 8th Int. Conf. Hirokawa, Tokyo*, pp: 165-168.
- Lavee, S., and Avidan, N., 1982. Growth responses of tree callus to chlorogenic acid and related phenolic substances. Fujiwara A (ed) *Plant tissue culture*, Maruzen, Tokyo, pp: 165-168.
- Lavee, S., and Messer, G., 1969. The effect of growth-regulating substances and light on olive callus growth *in vitro*. *J. Exp. Bot.*, 20(64): 604-614.
- Leathers, R.R., and Scragg, A.H., 1989. The effect of different temperatures on the growth, lipid content and acid fatty composition of *Theobroma cacao* cell suspension cultures. *Plant Sci.*, 62(2): 217-227.
- Leljak-Levanic, D., Bauer, N., Mihaljevic, S., and Jelaska, S., 2004. Somatic embryogenesis in pumpkin (*Cucurbita pepo* L.): Control of somatic embryo development by nitrogen compounds. *J. Plant Physiol.*, 161(2): 229-236.
- Leshem, B., Ronen, R., and Lurie, S., 1994. Thidiazuron and Pactobutrazol Appear to Mimic Cytokinin and Auxin Influences on Organ Regeneration and Protein Profiles in Cultured Melon Cotyledons. *J. Plant Physiol.*, 143: 344-348.
- Leva, A., 2011. Innovative protocol for “*ex vitro* rooting” on olive micropropagation. *Central European Journal of Biology*, 6(3): 352-358.
- Leva, A., Muleo, R., and Petruccelli, R., 1995. Long-term somatic embryogenesis from immature olive cotyledons. *J. Hortic. Sci.*, 70(3): 417-421.

- Leva, A., and Petruccelli, R., 2012. Monitoring of cultivar identity in micropropagated olive plants using RAPD and ISSR markers. *Biologia Plantarum*, 56(2): 373-376.
- Leva, A., Sadeghi, H., and Petruccelli, R., 2013. Carbohydrates Modulate the In Vitro Growth of Olive Microshoots. I. The Analysis of Shoot Growth and Branching Patterns. *J. Plant Growth Reg.*, 32(1): 53-60.
- Li, B.C., and Wolyn, D.J., 1996. Temperature and genotype affect asparagus somatic embryogenesis. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 32(3): 136-139.
- Li, Y., Liu, Z-B., Shi, X., Hagen, G., and Guilfoyle, T.J., 1994. An Auxin-Inducible Element in Soybean SAUR Promoters. *Plant Physiol.*, 106: 37-43.
- Linacero, R., and Vazquez, A.M., 1986. Somaclonal variation in plants regenerated from embryo calluses in rye (*Secale cereale* L.). In: *Genetic Manipulation in Plant Breeding*. Walter de Gruyter and Co., Berlin, pp: 479-481.
- Lindsey, K., and Yeoman, M.M., 1985. Dynamics of plant cell cultures. In: *Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants*, Vol. 2, Vasil, I.K., (Ed), Academic Press, New York, pp: 61-101.
- Lindzen, E., and Choi, J. H., 1995. A carrot cDNA encoding an atypical protein kinase homologous to plant calcium-dependent protein kinases. *Plant Mol. Biol.*, 28(5):785-797.
- Litz, R.E., 1986. Effect of osmotic stress on somatic embryogenesis in carica suspension cultures. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 111(6): 969-972.
- Liu, M.C., 1993. Factors Affecting Induction, Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration of Callus from Cultured Immature Inflorescences of Sugarcane. *J. Plant Physiol.*, 141: 714-720.
- Loganathan, M., Maruthasalam, S., Shiu, L.Y., Lien, W.C., and Hsu, W.H., 2010. Regeneration of soybean (*Glycine max* L. Merrill) through direct somatic embryogenesis from the immature embryonic shoot tip. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 46(3): 265-273.

- Loiseau, J., Marche, C., and Ledebunff, Y., 1995. Effects of auxins, cytokinins, carbohydrates and amino-acids on somatic embryogenesis induction from shoot apices of pea. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 41(3): 267-275.
- Lopes, T., Capelo, A., Brito, G., Loureiro, J., and Santos, C., 2009. Genetic variability analyses of the somatic embryogenesis induction process in *Olea* spp. Using nuclear microsatellites. *Trees*. 23: 29-36.
- Lopez-Perez, AZ., Carreno, J., Martinez-Cutillas, A., and Dabauza, M., 2005. High embryogenic ability and plant regeneration of table grapevine cultivars (*Vitis vinifera* L.) induced by activated charcoal. *Vitis*, 44(2): 79-85.
- LoSchiavo, F., 1995. Early events in embryogenesis. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry 30: Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I*, Bajaj, Y.P.S., (Ed), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp: 20-29.
- LoSchiavo, F., Pitto, L., and Giuliano, G., 1989. DNA methylation of embryogenic carrot cell-cultures and its variations as caused by mutation differentiation, hormones and hypomethylating drugs. *Theor. Appl. Genet.*, 77: 325-331.
- Loveys, B.R., and Wilborrow, B.V., 1984. Metabolism of Absciscic Acid. In: *The biosynthesis and metabolism of plant hormones*. Crozier, A., and Hillman, J.R., (Eds), Cambridge Univ. Press, pp: 71-104.
- Lou, H., and Kako, S., 1995. Role of high sugar concentrations in inducing somatic embryogenesis from cucumber cotyledons. *Sci. Horti.*, 64(1-2): 11-20.
- Loureiro, J., Rodriguez, E., Costa, A., and Santos, C., 2007. Nuclear DNA content estimations in wild olive (*Olea europaea* L. ssp. *europaea* var. *sylvestris* Brot.) and Portuguese cultivars of *O. Europaea* using flow cytometry. *Gen Res Crop Evol.*, 54(1): 21-25.
- Lynch, T.P., Siddika, A., Johnston, W.J., Trigwell, M.S., Mehra, A., Benelli, C., Lambardi, M., and Benson, E.E., 2011. Effects of osmotic pretreatments on oxidative stress, antioxidant profiles and cryopreservation of olive somatic embryos. *Plant Science*, 181: 47-56.

- Lu, C-Y., and Thorpe, T.A., 1987. Somatic Embryogenesis and Plantlet Regeneration in Cultured Immature Embryos of *Picea glauca*. J. Plant Physiol., 128: 297-302.
- Lu, J., Vahala, J., and Pappinen, A., 2011. Involvement of ethylene in somatic embryogenesis in Scots pine (*Pinus sylvestris* L.). Plant Cell Tiss Organ Cult, 107(1): 25-33.
- Ma, G.H., 1998. Effects of cytokinins and auxins on cassava shoot organogenesis and somatic embryogenesis from somatic embryo explants. Plant Cell Tiss Organ Cult, 54(1): 1-7.
- Ma, R., and Pulli, S., 2004. Factors influencing somatic embryogenesis and regeneration ability in somatic tissue culture of spring and winter rye. Agri. & Food Sci., 13(4): 363-377.
- Maalej, M., Chaari-Rkhiss, A., and Drira, N., 2006. Contribution to the improvement of olive tree somatic embryogenesis by mineral and organic analysis of zygotic embryos. Euphytica, 151: 31-37.
- Mader, J.C., 1995. Polyamines in *Solanum tuberosum in vitro*: Free and Conjugated Polyamines in Hormone-Induced Tuberization. J. Plant Physiol., 146: 115-120.
- Maheswaran, G., and Williams, E.G., 1985. Origin and development of somatic embryoids formed directly on immature embryos of *Trifolium repens in vitro*. Ann. Bot., 56: 619-630.
- Maheswaran, G., and Williams, E.G., 1986a. Direct secondary somatic embryogenesis from immature sexual embryos of *Trifolium repens* cultured *in vitro*. Ann. Bot., 57: 109-117.
- Maheswaran, G., and Williams, E.G., 1986b. Primary and Secondary Direct Somatic Embryogenesis from Immature Zygotic Embryos of *Brassica campestris*. J. Plant Physiol., 124: 455-463.
- Maheswaran, G., and Williams, E.G., 1987. Uniformity of plants regenerated by direct somatic embryogenesis from zygotic embryos of *Trifolium repens*. Ann. Bot., 59: 93-97.

- Malik, S.I., Rashid, H., Yasmin, T., and Minhas, N.M., 2004. Plant regeneration by somatic embryogenesis from callus of mature seed explants of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Pak. J. Bot., 36(3): 629-634.
- Mandal, A.K.A., Gupta, S.D., and Chatterji, A.K., 2001. Factors affecting somatic embryogenesis from cotyledonary explants of safflower. Biol. Plant., 44(4): 503-507.
- Márquez-Martín, B., Barceló-Muñoz, A., Pliego-Alfaro, F., and Sánchez-Romero, C., 2012. Somatic embryogenesis and plant regeneration in avocado (*Persea americana* Mill.): influence of embryogenic culture type. Journal of Plant Biochemistry & Biotechnology, 21(2): 180-188.
- Maquoi, E., Hanke, D.E., and Deltour, R., 1993. The effects of abscisic acid on the maturation of *Brassica napus* somatic embryos. Protoplasma, 174: 147-157.
- Martin, K.P., Sunandakumari, C., Chithra, M., and Madhusoodanan, P.V., 2005. Influence of auxins in direct *in vitro* morphogenesis of *Euphorbia nivulia*, a lectinaeous medicinal plant. In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 41(3): 314-319.
- Martins, I.S., and Sondahl, M.R., 1984. Early Stages of Somatic Embryo Differentiation from Callus Cells of Bean (*Phaseolus vulgaris* L.) Grown in Liquid Medium. J. Plant Physiol., 117: 97-103.
- Mary, R.J., and Jaybalan, N., 1997. Influence of growth regulators on somatic embryogenesis in sesame. Plant Cell Tiss Organ Cult, 49(1): 67-70.
- Masuda, H., Oohashi, S-I., Tokuji, Y., and Mizue, Y., 1995. Direct Embryo Formation from Epidermal Cells of Carrot Hypocotyls. J. Plant Physiol., 145: 531-534.
- Mathews, H., and Wetzstein, H.Y., 1993. A revised protocol for efficient regeneration of somatic embryos and acclimatization of plantlets in pecan, *Carya illinoensis*. Plant Sci., 91: 103-108.
- Mauri, P.V., and Manzanera, J.A., 2003. Induction, maturation and germination of holm oak (*Quercus ilex* L.) somatic embryos. Plant Cell Tiss Organ Cult, 74(3): 229-235.

- Mauri, P.V., and Manzanera, J.A., 2011. Somatic embryogenesis of holm oak (*Quercus ilex* L.): ethylene production and polyamine content. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(3): 717-723.
- Mazri, M.A., Pliego-Alfaro, F., Belkoura, M., and Belkoura, I., 2010. Embryogenic capacity of embryo-derived explants from different olive cultivars. In Abstracts volume II of the 28th International Horticultural Congress. Lisbon, pp: 285.
- Mazri, M.A., Elbakkali, A., Belkoura, M., and Belkoura, I., 2011. Embryogenic competence of calli and embryos regeneration from various explants of Dahbia cv, a Moroccan olive tree (*Olea europaea* L.). *African Journal of Biotechnology*, 10(82): 19089-19095.
- McGee, J.D., Williams, E.G., Collins, G.B., and Hildebrand, D.F., 1989. Somatic Embryogenesis in Trifolium: Protein Profiles Associated with High- and Low-Frequency Regeneration. *J. Plant Physiol.*, 135: 306-312.
- McWilliam, A.A., Smith, S.M., and Street, H.E., 1974. The origin and development of embryoids in suspension cultures of carrot (*Daucus carota*). *Ann. Bot.*, 38: 243-250.
- Medvedev, S.S., and Markova, I.V., 1990. How can the electrical polarity of axial organs regulate plant growth and IAA transport? *Physiol. Plant.*, 78: 38-42.
- Mehta, U.J., Sahasrabudhe, N., and Hazra, S., 2005. Thidiazuron-induced morphogenesis in tamarind seedlings. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 41(3): 240-243.
- Meijer, A.H., Scarpella, E., van Dijk, E.L., Qin, L., Taal, J.C.A., Rueb, S., Harrington, S.E., McCouch, S.R., Schilperoort, R.A., and Hoge, J.H.C., 1997. Transcriptional repression by Oshox1, a novel homeodomain leucine zipper protein from rice. *Plant J.*, 11(2): 263-276.
- Meins, F.J., 1989. Habituation: Heritable variation in the requirement of cultured plant cells for hormones. *Ann. Rev. Genet.*, 23: 395-408.
- Mencuccini, M., and Rugini, E., 1993. *In vitro* shoot regeneration from olive cultivar tissues. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 32(3): 283-288.

- Mendoza, M.G., and Kaeppler, H.F., 2002. Auxin and sugar effects on callus induction and plant regeneration frequencies from mature embryos of wheat (*Triticum aestivum* L.). *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 38(1): 39-45
- Mendoza-De Gyves, E., Mira, F.R., Ruiu, F., and Rugini, E., 2008. Stimulation of node and lateral shoot formation in micropropagation of olive (*Olea europaea* L.) by using dikegulac. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 92(2): 233-238.
- Merkle, S.A., Parrott, W.A., and Flinn, B.S., 1995. Morphogenetic aspects of somatic embryogenesis. In: *In Vitro Embryogenesis in Plants*, Thorpe, T.A., (Ed), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp: 155-204.
- Merkle, S.A., Parrott, W.A., and Williams, E.G., 1990. Applications of somatic embryogenesis and embryo cloning. In: *Plant Tissue Culture: Applications and Limitations*. Bhojwani, S.S., (Ed), Elsevier, Science Publishers BV Amsterdam, pp: 67-101.
- Michaux-Ferrière, N., Grout, H., and Carron, M.P., 1992. Origin and ontogenesis of somatic embryos in *Hevea brasiliensis* (Euphorbiaceae). *Am. J. Bot.*, 79(2): 174-180.
- Michler, C.H., and Lineberger, R.D., 1987. Effects of light on somatic embryo development and abscisic levels in carrot suspension cultures. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 11: 189-207.
- Mihaljevic, S., Peric, M., and Jelaska, S., 2001. The sensitivity of embryogenic tissue of *Picea omorika* (Panc.) Purk. to antibiotics. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 67(3): 287-293.
- Milioni, D., Franz, G., Sung, R., and Hatzopoulos, P., 2001. Gene expression during heat-shock in embryogenic carrot cell lines. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 65(3): 221-228.
- Millam, S., and Davidson, D., 1993. Evidence for an Interactive Responce of Flax (*Linum usitatissimum*) Hypocotyl Tissue Cultures to Auxin and Carbohydrates. *J. Plant Physiol.*, 141: 353-356.
- Mitrakos, K., Alexaki, A., and Papadimitriou, P., 1992. Dependence of Olive Morphogenesis on Callus Origin and Age. *J. Plant Physiol.*, 139(3): 269-273.

- Mitrakos, K., and Diamantoglou, S., 1984. Endosperm dormancy breakage in olive seeds. *Physiol. Plant.*, 62: 8-10.
- Monnier, M., 1995. Culture of zygotic embryos. In: *In Vitro Embryogenesis in Plants*, Thorpe, T.A., (Ed), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp: 117-154.
- Montague, M.J., Koppenbrink, J.W., and Jaworski, E.G., 1978. Polyamine metabolism in embryogenic cells of *Daucus carota*. I. Changes in intracellular content and rates of synthesis. *Plant Physiol.*, 62: 430-433.
- Monteiro, M., Kevers, C., Dommès, J., and Gaspar, T., 2002. A specific role for spermidine in the initiation phase of somatic embryogenesis in *Panax ginseng* CA Meyer. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 68(3): 225-232.
- Mordhorst, A.P., and Lorz, H., 1993. Embryogenesis and Development of Isolated Barley (*Hordeum vulgare* L.) Microspores are Influenced by the Amount and Composition of Nitrogen Sources in Culture Media. *J. Plant Physiol.*, 142: 485-492.
- Muhitch, M.J., and Felker, F.C., 1994. Influence of Nitrogen Source on the Growth, Prolamin Content, and Glutamine Synthetase Isozyme Profiles of Endosperm-Derived Suspension Cultures of Maize. *J. Plant Physiol.*, 144: 215-221.
- Murashige, T., 1974. Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 25: 135-166.
- Murashige, T., 1978. The impact of tissue culture in agriculture. In: *Frontiers of Plant Tissue Culture*, Thorpe, T.A., (Ed), Calgary Univ. Press, Calgary, pp: 15-26.
- Murashige, T., and Nakano, R., 1967. Chromosome complement as a determinant of the morphogenic potential of tobacco cells. *Am. J. Bot.*, 54: 963-970.
- Murashige, T., and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15: 473-497.
- Murthy, B.N.S., Murch, S.J., and Saxena, P.K., 1995. Thidiazuron-induced somatic embryogenesis in intact seedlings of peanut (*Arachis hypogaea*): Endogenous growth regulator levels and significance of cotyledons. *Physiol. Plant.*, 94: 268-276.

- Nabha, S., Lamblin, F., Gillet, F., Laurain, D., Fliniaux, M., David, A., and Jacquin, A., 1999. Polyamine content and somatic embryogenesis in *Papaver somniferum* cells transformed with sam-1 gene. J. Plant Physiol., 154(5-6): 729-734.
- Nakagawa, H., Saijyo, T., Yamauchi, N., Shigyo, M., Kako, S., and Ito, A., 2001. Effects of sugars and abscisic acid on somatic embryogenesis from melon (*Cucumis melo* L.) expanded cotyledon. Scien. Horti., 90(1-2): 85-92.
- Nakamura, T., Taniguchi, T., and Maeda, E., 1992. Studies on somatic embryogenesis of coffee by scanning electron microscope. Jpn. J. Crop. Sci., 61(3): 476-486.
- Nakano, M., and Mii, M., 1993. Antibiotics Stimulate Somatic Embryogenesis without Plant Growth Regulators in Several *Dianthus* Cultivars. J. Plant Physiol., 141: 721-725.
- Namasivayam, P., 2007. Acquisition of embryogenic competence during somatic embryogenesis. Plant Cell Tiss Organ Cult, 90: 1-8.
- Narayanaswamy, S., 1977. Regeneration of plants from tissue cultures. In: Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue, and Organ Culture, Reinert, J., and Bajaj, Y.P.S., (Ed), Springer, Berlin Heidelberg New York, pp: 179-250.
- Nato, A., FRESNEAU, C., MOURSALIMOVA, N., De Buyser, J., Lavergne, D., and Henry, Y., 2000. Expression of auxin and light-regulated arrestin-like proteins, G proteins and nucleoside diphosphate kinase during induction and development of wheat somatic embryos. Plant Physiol. Bioch., 38(6):483-490.
- Neto, V.B.P., and Otoni, W.C., 2003. Carbon sources and their osmotic potential in plant tissue culture; does it matter? Scientia Horti., 97:193-202.
- Newton, R.J., Puryear, J.D., Bhaskaran, S., and Smith, R.H., 1990. Polyethylene Glycol Content of Osmotically Stressed Callus Cultures. J. Plant Physiol., 135: 646-652.
- Nishiwaki, M., Fujino, K., Koda, Y., Masuda, K., and Kikuta, Y., 2002. Somatic embryogenesis induced by the simple application of abscisic acid to carrot (*Daucus carota* L.) seedlings in culture. Planta, 211(5): 756-759.

- Nissen, S.J., and Sutter, E.G., 1990. Stability of IAA and IBA in nutrient medium to several tissue culture procedures. *HortSci.*, 25(7): 800-802.
- Nitsch, J.P., and Nitsch, C., 1969. Haploid plants from pollen grains. *Science*, 163: 85-87.
- Nomura, K., and Komamine, A., 1985a. Identification and Isolation of Single Cells that Produce Somatic Embryos at a High Frequency in a Carrot Suspension Culture. *Plant Physiol.*, 79: 988-991.
- Nomura, K., and Komamine, A., 1985b. Physiological and biochemical aspects of somatic embryogenesis. In: *Somatic embryogenesis of carrots. Proceedings of a workshop held at San Miniato on May 28-31, 1985*, Terzi, M., Pitto, L., Sung, Z.R., (Eds), pp: 1-5.
- Nomura, K., and Komamine, A., 1995. Physiological and biochemical aspects of somatic embryogenesis. In: *In Vitro Embryogenesis in Plants*, Thorpe, T.A., (Ed), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp: 249-266.
- Murthy, B.N.S., Murch, S.J., and Saxena, P.K., 1998. Thidiazuron: A potent regulator of in vitro plant morphogenesis. *In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 34(4): 267-275.
- Nuti-Ronchi, V., and Giorgetti, L., 1995. The cell's commitment to somatic embryogenesis. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry 30: Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I*, Bajaj, Y.P.S., (Ed), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp: 3-19.
- Nuti-Ronchi, V., Martini, G., Galigo, M.A., Toncelli, F., and Luccarini, G., 1985. Early events during carrot embryogenesis: A cytological approach. *Proceedings of a workshop held at San Miniato on May 28-31, 1985*, Terzi, M., Pitto, L., Sung, Z.R., (Eds), pp: 117-121.
- Nuutila, A.M., Kurten, U., and Kauppinen, V., 1991. Optimization of sucrose and inorganic nitrogen concentrations for somatic embryogenesis of birch (*Betula pendula* Roth.) callus cultures: A statistical approach. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 24: 73-77.

- Ogata, Y., Iizuka, M., Nakayama, D., Ikeda, M., Kamada, H., and Koshiba, T., 2005. Possible involvement of abscisic acid in the induction of secondary somatic embryogenesis on seed-coat-derived carrot somatic embryos. *Planta*, 221(3): 417-423.
- Οικονόμου, Α.Σ., 1984. Εισαγωγή στις βασικές αρχές της φυτικής ιστοκαλλιέργειας. *Γεωτεχνικά*, 3: 40-48.
- Ono, K., Yamamoto, Y., Hachiya, A., and Matsumoto, H., 1995. Synergistic Inhibition of Growth by Aluminum and Iron of Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Cells in Suspension Culture. *Plant Cell Physiol.*, 36(1): 115-125.
- Ορεινός, Θ.Δ., 1992. *In vitro* μορφογένεση στην ελιά (*Olea europaea* L.). Διδακτορική Διατριβή, Τμήμα Βιολογίας, Σχολής Θετικών Επιστημών, Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών.
- Orinos, Th., and Mitrakos, K., 1991. Rhizogenesis and somatic embryogenesis in calli from wild olive [*Olea europaea* var. *sylvestris* (Miller) Lehr] mature zygotic embryos. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 27: 183-187.
- Osborne, D.J., 1993. Morphogenic signals and markers *in vitro* and *in vivo*. In: Morphogenesis in Plants-Molecular approaches, Roubelakis-Angelakis, K.A., and Tran Thanh Van, K., (Eds), Plenum Press, New York, pp: 1-17.
- Otero, M.L., and Docampo, D.M., 1998. Micropropagation of olive (*Olea europaea* L.) cv. Arbequina from juvenile cuttings. *Phyton-Inter. J. Exper. Bot.*, 63(1-2):133-140.
- Overvoorde, P.J., and Grimes, H.D., 1994. The role of Calcium and Calmodulin in Carrot Somatic Embryogenesis. *Plant Cell Physiol.*, 35(2):135-144.
- Owens, L.D., and Smigochi, A.C., 1990. Regulation of genes in differentiation. In: *Plant Tissue Culture: Applications and Limitations*, Bhojwani, S.S., (Ed), Elsevier, Amsterdam, The Netherlands, pp: 136-160.
- Pedroso, M.C., and Pais, M.S., 1995. Factors controlling somatic embryogenesis. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 43:147-154.

- Pellegrischi, A., Brito, R.M., McLean, S., and Hoisington, D., 2004. Effect of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid and NaCl on the establishment of callus and plant regeneration in durum and bread wheat. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 77(3): 245-250.
- Pelkonen, V.P., and Kauppi, A., 1999. The effect of light and auxins on the regeneration of lily (*Lilium vegale* Wil.) cells by somatic embryogenesis and organogenesis. *Inter. J. Plant Sci.*, 160(3): 483-490.
- Perera, I.Y., and Zielinski, R.E., 1992. Structure and expression of the *Arabidopsis* CaM-3 calmodulin gene. *Plant Mol. Biol.*, 19(4):649-664.
- Pérez-Barranco, G., Torreblanca, R., Padilla, I.M.G., Sánchez-Romero, C., Pliego-Alfaro, F., and Mercado, J.A., 2009. Studies on genetic transformation of olive (*Olea europaea* L.) somatic embryos: I. Evaluation of different aminoglycoside antibiotics for *nptII* selection; II. Transient transformation via particle bombardment. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 97(3): 243-251.
- Peters, W., Füchtbauer, B., and Beck, E., 1995. Nitrate Reductase Activity is Endogenously Induced by Zeatin Riboside in Habituated Suspension Cultured *Chenopodium rubrum* Cells. *J. Plant Physiol.*, 147: 401-407.
- Pieric, R.L.M., (Ed). 1987. *In vitro* culture of higher plants. Martinus Nijhoff Publishers, Nordrecht-Boston-Lancaster.
- Ποντίκης, Κ., 2000. Ελαιοκομία. Εκδόσεις Α. Σταμούλης, Αθήνα.
- Ponsamuel, J., Samson, N.P., Ganeshan, P.S., Sathyaprakash, V., and Abraham, G.C., 1996. Somatic embryogenesis and plant regeneration from the immature cotyledonary tissues of cultivated tea [*Camelia sinensis* (L)O Kuntze]. *Plant Cell Rep.*, 16(3-4): 210-214.
- Pretova, A., and Williams, E.G., 1986. Direct Somatic Embryogenesis from Immature Zygotic Embryos of Flax (*Linum usitatissimum* L.). *J. Plant Physiol.*, 126: 155-161.
- Pullman, G.S., Gupta, P.K., Timmis, R., Carpenter, C., Kreitinger, M., and Welty, E., 2005. Improved Norway spruce somatic embryo development through the use of abscisic acid combined with activated carbon. *Plant Cell Rep.*, 24(5): 271-279.

- Puupponen-Pimiä, R., Saloheimo, M., Vasara, T., Ra, R., Gaugecz, J., Kurtén, U., Knowles, J.K.C., Keränen, S., and Kauppinen, V., 1993. Characterization of a birch (*Betula pendula* Roth.) embryogenic gene, *BP8*. Plant Mol. Biol., 23(2): 423-428.
- Raghavan, V., (ed), 1997. Molecular Embryology of Flowering Plants, Cambridge University Press, New York, pp. 467-499.
- Raghavan, V., (ed), 1997. Developmental Biology of Flowering Plants, Springer-Verlag, New York, pp. 309-322.
- Rajesh, M.K., Radha, E., Karun, A., and Parthasarathy, V.A., 2003. Plant regeneration from embryo-derived callus of oil palm-the effect of exogenous polyamines. Plant Cell Tiss Organ Cult, 75(1): 41-47.
- Rama, P., and Pontikis, C.A., 1990. In vitro propagation of olive (*Olea europaea sativa* L.) 'Kalamon'. J. Hortic. Sci., 65: 347-353.
- Redenbaugh, K., Fujii, J., Slade, D., Viss, P., and Kossler, M., 1991. Artificial seeds- Encapsulated somatic embryos. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry 17: High-Tech and Micropropagation I, Bajaj, Y.P.S., (Ed), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp: 395-418.
- Redenbaugh, K., Slade, D., Viss, P., and Fujii, J.A., 1987. Encapsulation of somatic embryos in synthetic seed coats. HortSci., 22(5): 803-809.
- Reinard, T., and Jacobsen, HJ., 1995. A Soluble High Affinity Auxin-Binding Protein from Pea Apex. J. Plant Physiol., 147: 132-138.
- Reinert, J., and Bajaj, Y.P.S., (Eds), 1977. Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell, Tissue and Organ Culture, Springer-Verlag, Berlin.
- Reinert, J., Bajaj, Y.P.S., and ZBELL, B., 1977. Aspects of organization organogenesis, embryogenesis, cytodifferentiation. In: Plant Tissue and Cell Culture, 2nd Ed., Street, H.E., (Ed), Blackwell Scientific Publications, Oxford, pp: 389-427.
- Reinert, J., Tazawa, M.M., and Semenov, S., 1967. Nitrogen Compounds as Factors of Embryogenesis *in vitro*. Nature, 216: 1215-1216.

- Reinert, J., 1959. Über die Kontrolle der Morphogenese und die Induktion von Adventivembryonen an Gewebekulturen aus Karotten. *Planta*, 58: 318-333.
- Reinhold, L., and Kaplan, A., 1984. Membrane transport of sugars and amino acids. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 35: 45-83.
- Rey, H.Y., Sansberro, P.A., Collavino, M.M., Davina, J.R., Gonzalez, A.M., and Mro-ginski, L.A., 2002. Colchicine, trifluralin, and oryzalin promoted development of so-matic embryos in *Ilex paraguariensis* (Aquifoliaceae). *Euphytica*, 123(1): 49-56.
- Rhizopoulou, S., 2007. *Olea europaea* L. A Botanical Contribution to Culture. *Ameri-can-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.*, 2(4): 382-387.
- Riov, J., 1994. Role of metabolism of applied auxins in rooting. In: *Proceedings of the 21st annual meeting of the Plant Growth Regulator Society of America*, Tworkoski, T.J., (Ed), pp: 206-208.
- Roberts, D.R., 1991. Absciscic acid and mannitol promote early development, matu-ration and storage protein accumulation in somatic embryos of interior spruce. *Physiol. Plant.*, 83: 247-254.
- Roberts, D.R., Lararoff, W.R., and Webster, F.B., 1991. Interaction Between Matura-tion and Light Relative Humidity Treatments and Their Effects on Germination of Sitka spruce Somatic Embryos. *J. Plant Physiol.*, 138(1): 1-6.
- Rodríguez-Sahagún, A., Acevedo-Hernández, G., Rodríguez-Domínguez, J.M., Rodríguez-Garay, B., Cervantes-Martínez, J., Castellanos- Hernández, O.A., 2011. Ef-fect of light quality and culture medium on somatic embryogenesis of *Agave tequi-lana* Weber var. Azul. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 104(2): 271-275.
- Roussos, P.A., and Pontikis C.A., 2002. In vitro propagation of olive (*Olea europaea* L.) cv. *Koroneiki*. *Plant Growth Reg.*, 37: 295-304.
- Roustan, J.P., Latche, A., and Fallot, J., 1994. Role of ethylene on induction and ex-pression of carrot somatic embryogenesis-relationship with polyamine metabolism. *Plant Sci.*, 103(2): 223-229.

- Rugini, E., 1981. Propagazione *in vitro* di una cultivar di olivo (*Olea europaea* L.): Valutazione di varie citochinine ed auxine. Atti Congr Fitoregolatori in Agricoltura, Firenze, pp: 171-180.
- Rugini, E., 1984. In vitro propagation of some olive (*Olea europaea sativa* L.) cultivars with different root-ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos. Sci. Hortic., 24(2): 123-134.
- Rugini, E., 1986. Olive (*Olea europaea* L.). In: Biotechnology in Agriculture and Forestry, Vol. I: Trees I, Bajaj, Y.P.S., (Ed), Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp: 253-267.
- Rugini, E., 1988. Somatic embryogenesis and plant regeneration in olive (*Olea europaea* L.). Plant Cell Tiss Organ Cult, 14: 207-214.
- Rugini, E., 1995. Somatic embryogenesis in olive (*Olea europaea* L.). Somatic Embryogenesis in Woody Plants Forestry Sciences, 44-46: 171-189.
- Rugini, E., De Pace, C., Gutiérrez-Pesce, P., and Muleo, R., 2011. Olea. Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources, pp: 79-117.
- Rugini, E., Di Francesco, G., Muganu, M., Astolfi, S., and Caricato, G., 1997. The Effects of Polyamines and Hydrogen Peroxide on Root Formation in Olive and the Role of Polyamines as an Early Marker for Rooting Ability. Biology Root Formation and Development Basic Life Sciences, 65: 65-73.
- Rugini, E., and Caricato, G., 1995. Somatic embryogenesis and plant recovery from mature tissues of olive cultivars (*Olea europaea* L.) 'Canino' and 'Moraiolo'. Plant Cell Rep., 14: 257-260.
- Rugini, E., and Fontanazza, G., 1981. In vitro propagation of 'Dolce agogia' olive. HortSci., 16: 492-493.
- Rugini, E., Fontanazza, G., and Bongi, G., 1979. Ricerche preliminari sulla coltura *in vitro* nella specie *Olea europaea sativa* L. Atti Convegno su 'Tecniche di colture *in vitro* per la propagazione su vasta scala delle specie ortoflorofrutticale', Pistoia, pp: 193-202.

- Rugini, E., and Tarini, P., 1986. Somatic embryogenesis in olive (*Olea europaea* L.). Conf. Fruit Tree Biotechnol, October 14-15, Paris.
- Sah, R.N., 1994. Nitrate-Nitrogen Determination - A Critical Review. Commun. Soil Sci. Plant Anal., 25(17-18): 2841-2869.
- Sakhanokho, H.F., Ozias-Akins, P., May, O., and Chee, P.W., 2005. Putrescine enhances somatic embryogenesis and plant regeneration in upland cotton. Plant Cell Tiss Organ Cult, 81(1): 91-95.
- Salmon, S., Lemoine, R., Jamaï, A., Bouche-Pillon, S., and Fromont, J.C., 1995. Study of sucrose and mannitol transport in plasma-membrane vesicles from phloem and non-phloem tissues of celery (*Apium graveolens* L.) petioles. Planta, 197: 76-83.
- Saly, S., Joseph, C., Corbineau, F., Lelu, M.A., and Come, D., 2002. Induction of secondary somatic embryogenesis in hybrid larch (*Larix x leptoeuropaea*) as related to ethylene. Plant Growth Regulation, 37(3): 287-294.
- Sane, D., Borgel, A., Verdeil, J.L., and Gassama-Dia, Y.K., 2000. Plantlets regeneration via somatic embryogenesis in immature zygotic embryos calli from a tree species adapted to arid lands: *Acacia tortilis* subsp *raddiana* (Savi.) Brenan. Acta Bot. Gal., 147(3): 257-266.
- Santarem, E.R., Pelissier, B., and Finer, J.J., 1997. Effect of explant orientation, pH, solidifying and wounding on initiation of soybean somatic embryos. In vitro Cellular & Developmental Biology-Plant, 33(1): 13-19.
- Santos Macedo, E., Sircar, D., Gardoso, H.G., PEIXE, A., and Arnholdt-Schmitt, B., 2012. Involvement of alternative oxidase (AOX) in adventitious rooting of *Olea europaea* L. microshoots is linked to adaptive phenylpropanoid and lignin metabolism. Plant Cell Reports, 31(9): 1581-1590.
- Sato, S., Toya, T., Kawahara, R., Whittier, R.F., Fukyda, H., and Komamine, A., 1995. Isolation of a carrot gene expressed specifically during early-stage somatic embryogenesis. Plant Mol. Biol., 28(1): 39-46.

- Sauer, U., and Wilhelm, E., 2005. Somatic embryogenesis from ovaries, developing ovules and immature zygotic embryos, and improved embryo development of *Castanea sativa*. *Biologia Plantarum*, 49(1): 1-6.
- Scell, J.S., 1987. Transgenic plants as tools to study the molecular organization of plant genes. *Science*, 237: 1176-1183.
- Schmidt, E.D.L., Guzzo, F., Toonen, M.A.J., and de Vries, S.C., 1997. Development, 124: 2049.
- Schuller, A., Kirchner-Ness, R., and Reuther, G., 2000. Interaction of plant growth regulators and organic C and N components in the formation and maturation of *Abies alba* somatic embryos. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 60(1): 23-31.
- Schuman, G., Ryschka, U., Schulze, J., and Klocke, E., 1995. Anatomy of somatic embryogenesis. In: *Biotechnology in Agriculture and Forestry 30: Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I*, Bajaj, Y.P.S., (Ed), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp: 71-86.
- Seelye, J.F., Borst, W.M., King, G.A., Hannan, P.J., and Maddocks, D., 1995. Glutamine Synthetase Activity, Ammonium Accumulation and Growth of Callus Cultures of *Asparagus officinalis* L. Exposed to High Ammonium or Phosphinothricin. *J. Plant Physiol.*, 146: 686-692.
- Shah, K., Gadella, T.W.J., Van Erp, H., Hecht, V., and de Vries, S.C., 2001. Subcellular Localization and Oligomerization of the *Arabidopsis thaliana* Somatic Embryogenesis Receptor Kinase 1 Protein. *J. Mol. Biol.*, 309(3): 641-655.
- Shah, L., Zhenghu, S., Zhi, Q., and Yafu, W., 2001. Uptake rate of tracer elements by *Lycium barbarum* L. in somatic embryogenesis. *Journal of Radioanalytical and Nuclear Chemistry*, 250(3): 593-597.
- Sharp, W.R., Sondahl, M.R., Caldas, L.S., and Maraffa, S.B., 1980. The physiology of *in vitro* asexual embryogenesis. *Hort. Rev.*, 2: 268-310.
- Shetty, K., and Asano, K., 1991. The Influence of Organic Nitrogen Sources on the Induction of Embryogenic Callus in *Agrosia alba*. *J. Plant Physiol.*, 139(1): 82-85.

- Shibli, R.A., Shatnawi, M., Abu-Ein, and Al-Juboory, Kh., 2001. Somatic embryogenesis and plant recovery from callus of 'Nabali'olive (*Olea europaea* L.). Scie. Hort., 88(3): 243-256.
- Silva, J.A., 2004. The effect of carbon source on *in vitro* organogenesis of chrysanthemum thin cell layers. Bragantia, 63(2): 165-177.
- Singh, A.K., Suri, S.S., Ramawat, K.G., and Sonie, K.C., 1997. Somatic embryogenesis from immature zygotic embryos of *Commiphora wightii* a woody medicinal plant. Gardenbauwissenschaft, 62(1): 44-47.
- Skoog, F., and Miller, C.O., 1957. Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured *in vitro*. Symp. Soc. Exp. Biol., 11: 118-130.
- Skoog, F., and Tsui, C., 1948. Chemical control of growth and bud formation in tobacco stem segments and callus cultured *in vitro*. Am. J. Bot., 35: 782-787.
- Smith, T.A., 1985. Polyamines. Ann. Rev. Plant Physiol., 36: 117-143.
- Smith, D.L., and Krikorian, A.D., 1988. Production of somatic embryos from carrot tissues in hormone-free medium. Plant Sci., 58: 103-110.
- Smith, D.L., and Krikorian, A.D., 1989. Release of somatic embryogenic potential from excised zygotic embryos of carrot and maintenance of proembryonic cultures in hormone-free medium. Am. J. Bot., 76: 1832-1843.
- Smith, D.L., and Krikorian, A.D., 1990a. Low external pH replaces 2,4-D in maintaining and multiplying 2,4-D initiated embryogenic cells of carrot. Physiol. Plant., 80: 329-336.
- Smith, D.L., and Krikorian, A.D., 1990b. Somatic embryogenesis of carrot in hormone-free medium: External pH control over morphogenesis. Am. J. Bot., 77: 1634-1647.
- Smith, S.M., and Street, H.E., 1974. The decline of embryogenic potential as callus and suspension cultures of carrot (*Daucus carota* L.) are serially subcultured. Ann. Bot., 38: 223-241.

- Smith, T.A., 1985. Polyamines. Ann .Rev. Plant Physiol., 36: 117-143.
- Somleva, M.N., Schmidt, E.D.L., and de Vries, S.C., 2000. Embryogenic cells in *Dactylis glomerata* L. (Poaceae) explants identified by cell tracking and by SERK expression. Plant Cell Rep., 19(7):718-726.
- Stacey, N.J., Roberts, K., and Knox, J.P., 1990. Patterns of expression of the JIM4 arabinogalactan-protein epitope in cell cultures and during somatic embryogenesis in *Daucus carota*. L. Planta, 180(2): 285-292.
- Stejskal, J., and Griga, M., 1995. Comparative Analysis of Some Isozymes and Proteins in Somatic and Zygotic Embryos of Soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. J. Plant Physiol., 146: 497-502.
- Sterk, P., Booij, H., Schellekens, G.A., van Kammen, A., and de Vries, S.C., 1991. Cell-specific expression of the carrot EP2 lipid transfer protein gene. Plant Cell, 3: 907-921.
- Steward, F.C., Mapes, M.O., and Mearns, K., 1958. Growth and organized development of cultured cells II. Organization in cultures grown from freely suspended cells. Am. J. Bot., 45: 705-708.
- Steward, F.C., Ammirato, P.V., and Mapes, M.O., 1970. Growth and development of totipotent cells. Ann. Bot., 34: 761-787.
- Steward, F.C., Kent, A.E., and Mapes, M.O., 1967. Growth and organization in cultured cells: Sequential and synergistic effects of growth regulating substances. Ann. NY Acad. Sci., 144: 326-334.
- Sticklen, M.B., 1991. Direct Somatic Embryogenesis and Fertile Plants from Rice Root Cultures. J. Plant Physiol., 138: 577-580.
- Stolarz, A., Macewicz, J., and Lörz, H., 1991. Direct Somatic Embryogenesis and Plant Regeneration from Leaf Explants of *Nicotiana tabacum* L. J. Plant Physiol., 137: 347-357.
- Sujatha, M., and Prabakaran, A.J., 2001. High frequency embryogenesis in immature zygotic embryos of sunflower. Plant Cell Tiss Organ Cult, 65(1): 23-29.

- Suliman Elmeer, K.M., and Hennerty, M.J., 2008. Observations on the combined effects of light, NAA and 2,4-D on somatic embryogenesis of cucumber (*Cucumis sativus*) hybrids. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 95(3): 381-384.
- Sung, Z.R., 1985. Developmental stages of embryogenic culture. In: Somatic embryogenesis of carrots. Proceedings of a workshop held at San Miniato on May 28-31, 1985, Terzi, M., Pitto, L., Sung, Z.R., (Eds), pp: 117-121.
- Sung, Z.R., and Okimoto, R., 1983. Coordinate gene expression during somatic embryogenesis in carrots. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 2661-2665.
- Sung, Z.R., Fienberg, A., Chornean, R., Borkird, C., Furner, I., and Smith, J., 1984. Developmental biology of embryogenesis from carrot culture. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 2(3): 3-14.
- Sweby, D.L., Hockett, B.I., and Watt, M.P., 1994. Effects of nitrogen nutrition on salt-stressed *Nicotiana tabacum* var. Samsun *in vitro* plantlets. *J. Exp. Bot.*, 45(276): 995-1008.
- Taylor, P.W.J., Ko, H-L., Adkins, S.W., Rathus, C., and Birtch, A., 1992. Establishment of embryogenic callus and high protoplast yielding suspension cultures of sugarcane. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 28(1): 69-78.
- Tazawa, M., and Reinert, J., 1969. Extracellular and intracellular chemical environments in relation to embryogenesis *in vitro*. *Protoplasma*, 68: 157-173.
- Tepper, T., Ziv, M., and Ashri, A., 1991. A simple rapid photometric estimation of the growth response of immobilised cells to fusaric acid and gamma radiation. *Plant Cell Rep.*, 10(10): 481-484.
- Terzi, M., and LoSchiavo, F., 1990. Somatic embryogenesis. In: *Plant Tissue Culture: Applications and Limitations*, Bhojwani, S.S., (Ed), Elsevier, Science, Publishers, BV Amsterdam, pp: 54-66.
- Tetu, T., Sangwan, R.S., and Sangwan-Norreel, B.S., 1987. Hormonal control of organogenesis in *Beta vulgaris* callus. *J. Exp. Bot.*, 38(188): 506-517.

- Tetu, T., Sangwan, R.S., and Sangwan-Norreel, B.S., 1990. Direct Somatic Embryogenesis in Cultured Immature Zygotic Embryos of *Pisum sativum* L. J. Plant Physiol., 137: 102-109.
- Thomas, P., 1999. Somatic embryogenesis and plantlet regeneration from nucellar tissue of monoembryonic mango. J. Hort. Sci. & Bio., 74(1): 135-139.
- Thomas, T.L., 1993. Gene Expression During Plant Embryogenesis and Germination: An Overview. The Plant Cell, 5: 1401-1410.
- Thomas, M.R., and Scott, K.J., 1985. Plant Regeneration by Somatic Embryogenesis from Callus Initiated from Immature Embryos and Immature Inflorescences of *Hordeum vulgare*. J. Plant Physiol., 121: 159-169.
- Thorpe, T.A., 1980. Organogenesis *in vitro*: Structural, physiological, and biochemical aspects. Int. Rev. Cytol. Suppl., 11A: 71-111.
- Thorpe, T.A., 1990. The current status of plant tissue culture. In: Plant Tissue Culture: Applications and Limitations. Bhojwani, S.S., (Ed), Elsevier, Science Publishers BV Amsterdam, pp: 1-33.
- Timmers, A.C.J., 1993. Imaging of polarity during zygotic and somatic embryogenesis of carrot (*Daucus carota* L.). Ph.D. Thesis.
- Tisserat, B., 1985. Embryogenesis, organogenesis and plant regeneration. In: Plant cell culture: A practical approach, Dixon, R.A., (Ed), IRL Press, Oxford Washington DC, pp: 79-106.
- Tisserat, B., Esan E.B., and Murashige, T., 1979. Somatic embryogenesis in angiosperms. Hort. Rev., 1: 1-78.
- Tomaszewski, Z., Kuklin, A.I., Sams, C.E., and Conger, B.V., 1994. Influence of low-temperature preincubation on somatic embryogenesis and ethylene emanation from orchardgrass leaves. Plant Growth Regulation, 14(3): 229-234.
- Torne, J.M., Moysset, L., Santos, M., and Simon, E., 2001. Effects of light quality on somatic embryogenesis in *Araujia sericifera*. Physiol. Plant., 111(3): 405-411.

- Tornero, P., Conejero, V., and Vera, P., 1996. Phloem-specific expression of a plant homeobox gene during secondary phases of vascular development. *Plant J.*, 9(5):639-648.
- Torreblanca, R., Cerezo, S., Palomo-Ríos, E., Mercado, A.J., and Pliego-Alfaro, F., 2010. Development of a high throughput system for genetic transformation of olive (*Olea europaea* L.) plants. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 103: 61-69.
- Trabelsi, E.B., Bouzid, S., Bouzid, M., Elloumi, N., Belfeleh, Z., Benabdallah, A., and Ghezel, R., 2003. In vitro regeneration of olive tree by somatic embryogenesis. *J. Plant Bio.*, 46(3): 173-180.
- Trabelsi, E.B., Naija, S., Elloumi, N., Belfeleh, Z., Msellem, M., Ghezel, R., and Bouzid, S., 2011. Somatic embryogenesis in cell suspension cultures of olive *Olea europaea* (L.) 'Chetoui'. *Acta Physiologiae Plantarum*, 33(2): 319-324.
- Tran Thanh Van, K., 1980a. Control of morphogenesis by inherent and exogenously applied factors in thin cell layers. *Int. Rev. Cytol. Suppl.*, 11A: 175-194.
- Tran Thanh Van, K., 1980b. Control of morphogenesis or what shapes a group of cells. In: *Advances in Biotechnical Engineering*, Vol. 18, Plant cell cultures II. Fiechter, A., (Ed), Springer-Verlag, Berlin, pp: 151-171.
- Tran Thanh Van, K., 1981. Control of morphogenesis *in vitro* cultures. *Ann. Rev. Plant Physiol.*, 32: 291-311.
- Trivedi, S., Sankhla, N., Davis, T., and Sankhla, D., 1994. Effect of abscisic acid and thidiazuron on activities of activated oxygen processing enzymes in excised roots of silktree. In: *Proceedings of the 21st annual meeting of the Plant Growth Regulator Society of America*, Tworkoski, T.J., (Ed), pp: 139-144.
- Tyagi, A.K., and Khurana, J.P., 2003. Plant Molecular Biology and Biotechnology Research in the Post-Recombinant DNA Era. *Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology*, 84: 91-121.

- Urbanek, A., Zechmann, B., and Urbanek, A., 2004. Plant regeneration via somatic embryogenesis in *Styrian pumpkin*: cytological and biochemical investigations. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 79(3): 329-340.
- Van Engelen, F.A., Sterk, P., Booij, H., Cordewener, J.H.G., Rook, W., van Kammen, A., and de Vries S.C., 1991. Heterogeneity and Cell Type-Specific Localization of a Cell Wall Glycoprotein from Carrot Suspension Cells. *Plant Physiol.*, 96(3): 705-712.
- Van Hengel, A.J., Tadesse, Z., Immerzeel, P., Schols, H., van Kammen, A., and de Vries, S.C., 2001. *N*-Acetylglucosamine and Glucosamine-Containing Arabinogalactan Proteins Control Somatic Embryogenesis. *Plant Physiol.*, 125(4): 1880-1890.
- Van Hengel, A.J., Guzzo, F., van Kammen, A., and de Vries, S.C., 1998. Expression Pattern of the Carrot *EP3* Endochitinase Genes in Suspension Cultures and in Developing Seeds. *Plant Physiol.*, 117(1): 43-53.
- Van Staden, J., and Davey, J.E., 1979. The synthesis, transport and metabolism of endogenous cytokinins. *Plant Cell Environm.*, 2: 93-106.
- Vasil, I.K., 1971. Physiology and ultrastructure of callus formation. *Coll. Int. C.N.R.S.*, 193: 103-112.
- Vasil, I.K., and Vasil, V., 1980. Clonal propagation. *Int. Rev. Cytol. Suppl.*, 11A: 145-173.
- Vasil, V., and Vasil, I.K., 1982. The ontogeny of somatic embryos of *Pennisetum americanum* (L.) Schum. In cultured immature embryos. *Bot. Gaz.*, 143: 454-465.
- Victor, J.M.R., Murch, S.J., Krishnaraj, S., and Saxena, P.K., 1999. Somatic embryogenesis and organogenesis in peanut: The role of thidiazuron and N-6-benzylaminopurine in the induction of plant morphogenesis. *Plant Growth Regulator*, 28(1): 9-15.
- Vila, S., Gonzalez, A., Rey, H., and Mroginski, L., 2009. Somatic embryogenesis and plant regeneration in *Cedrela fissilis*. *Biologia Plantarum*, 53(2): 383-386.

- Von Arnold, S., and Hakman, I., 1988. Regulation of Somatic Embryo Development in *Picea abies* by Abscissic Acid (ABA). J. Plant Physiol., 132: 164-169.
- Vucinic, Z., and Vuletic, M., 1995. The Effect of Addition of Sucrose on the Energy Status and the Trans-Root Electrical Potential Difference of Excised Maize Roots. Plant Cell Physiol., 36(1): 45-52.
- Vuorinen, A.H., Rossi, P., and Vapaavuori, E.M., 1995. Combined Effect of Inorganic Carbon and Different Nitrogen Sources in the Growth Media on Biomass Production and Nitrogen Uptake in Young Willow and Birch Plants. J. Plant Physiol., 147: 236-242.
- Vuylsteker, C., Leleu, O., and Rambour, S., 1997. Influence of BAP and NAA on the expression of nitrate reductase in excised chicory roots. J. Exp. Bot., 48(310): 1079-1085.
- Walker, J.C., and Key, J.L., 1982. Isolation of cDNAs to auxin-responsive poly(A)⁺RNAs of elongating soybean hypocotyl, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., 79(23): 7185-7189.
- Wang, K.J., Zhang, P.F., Ni, D.X., and Bao, Z.H., 1981. Callus formation and organ regeneration in tissue culture of woody plants. Acta Bot. Sin., 23(2): 97-106.
- Wang, K.J., Zhang, P.F., Ni, D.X., Zhu, X.Z., Yang, W.Q., and Bao, Z.H., 1979a. Cyto-histological studies on the tissue culture of *Olea europaea* L. Development of callus *in vitro*. Acta Bot. Sin., 21(2): 127-135.
- Wang, K.J., Zhang, P.F., Ni, D.X., Zhu, X.Z., Yang, W.Q., and Bao, Z.H., 1979b. Cyto-histological studies on the tissue culture of *Olea europaea* L. II. Histogenesis and organogenesis. Acta Bot. Sin., 21(3): 225-231.
- Wang, L., Huang, B., He, M., and Hao, S., 1990. Somatic embryogenesis and its hormonal regulation in tissue cultures of *Freesia refracta*. Ann. Bot., 65(3): 271-276.
- Waris, H., 1959. Neomorphosis in seed plants induced by amino acids. I. *Oenanthae aquatica*. Physiol. Plant., 12: 753-761.

- Waris, H., 1962. Neomorphosis in Seed Plants Induced by Amino Acids.II. *Oenanthe lachenalii* Physiol. Plant., 15: 736-753.
- Warren, G.S., and Fowler, M.W., 1977. A physical method for the separation of various stages in the embryogenesis of carrot cell cultures. Plant Sci. Lett., 9: 71-76.
- West, M.A., and Harada, J.J., 1993. Embryogenesis in Higher Plants: An Overview. The Plant Cell, 5: 1361-1369.
- Wetherell, D.F., and Dougall, D.K., 1976. Sources of nitrogen supporting growth and embryogenesis in cultured wild carrot tissue. Physiol. Plant., 37: 97-103.
- White, P.R., (Ed), 1943. A handbook of plant tissue culture. The Ronald Press Company, New York.
- Wilde, H.D., Seffens, W.S., and Thomas, T.L., 1995. Gene expression in somatic embryogenesis. In: Biotechnology in Agriculture and Forestry 30: Somatic Embryogenesis and Synthetic Seed I, Bajaj, Y.P.S., (Ed), Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, pp: 41-52.
- Williams, E.G., and Maheswaran, G., 1986. Somatic embryogenesis: Factors influencing coordinated behaviour of cells as an embryogenic group. Ann. Bot., 57: 443-462.
- Willows, R.D., and Milborrow, B.V., 1993. Configurations and Conformations of Abscissic Acid. Phytochemistry, 34(1): 233-237.
- Wiweger, M., Farbos, I., Ingouff, M., Lagercrantz, U., and von Arnold, S., 2003. Expression of Chia4-Pa chitinase genes during somatic and zygotic embryo development in norway spruce (*Picea abies*): similarities and differences between gymnosperm and angiosperm class IV chitinases. J. Exp. Bot., 54(393): 2691-2699.
- Wu, I-Fan., Chen, J.T, and Chang, W.C., 2004. Effects of auxins and cytokinins on embryo formation from root-derived callus of *Oncidium 'Gower Ramsey'*. Plant Cell Tiss Organ Cult, 77: 107-109.

- Wu, J.H., and Mooney, P., 2002. Autotetraploid tangor plant regeneration from *in vitro* *Citrus* somatic embryogenic callus treated with colchicine. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 70(1): 99-104.
- Wurtele, E.S., Wang, H., Durgerian, S., Nikolau, B.J., and Ulrich, T.J., 1993. Characterization of a Gene That is Expressed Early in Somatic Embryogenesis of *Daucus carota*. *Plant Physiol.*, 102: 303-312.
- Yang, L., Wang, J., Bian, L., Li, Y., and Shen, H., 2012. Cyclic secondary somatic embryogenesis and efficient plant regeneration in mountain ash (*Sorbus pobuashanensis*). *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 111(2): 173-182.
- Yang, X.M., Cao, Z.Y., Aa, L.Z., Wang, Y.M., and Fang, X.W., 2006. *In vitro* tetraploid induction via colchicine treatment from diploid somatic embryos in grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Euphytica*, 152(2): 217-224.
- Yaseen, M., Ahmad, T., Sablok, G., Standardi, A., and Hafiz, I.A., 2012. Review: role of carbon sources for *in vitro* plant growth and development. *Molecular Biology Reports*, December 2012.
- Yasuda, H., Nakajima, M., Ito, T., Ohwada, T., and Masuda, H., 2001. Partial characterization of genes whose transcripts accumulate preferentially in cell clusters at the earliest stage of carrot somatic embryogenesis. *Plant Mol. Biol.*, 45(6): 705-712.
- Yeoman, M.M., Naik, G.G., and Robertson, A.I., 1968. Growth and differentiation of plant tissue cultures. III The initiation and pattern of cell division in developing callus cultures. *Ann. Bot.*, 32: 301-313.
- Yeung, E.C., 1995. Structural and developmental patterns in somatic embryogenesis. In: *In Vitro Embryogenesis in Plants*, Thorpe, T.A., (Ed), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands, pp: 205-247.
- Young, R.A., and Davis, R.W., 1983. Efficient isolation of genes by using antibody probes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 80: 1194-1198.
- Zacchini, M., and De Agazio, M., 2004. Micropropagation of a local olive cultivar for germplasm preservation. *Biologia Plantarum*, 48(4): 589-592.

- Zhang, B.H., Liu, F., Liu, Z.H., Wahg, H.M., and Yao, C.B., 2001. Effects of Kanamycin on tissue culture and somatic embryogenesis in cotton. *Plant Growth Regulation*, 33(2): 137-149.
- Zimmerman, J.L., 1993. Somatic Embryogenesis: A Model for Early Development in Higher Plants. *The Plant Cell*, 5: 1411-1423.
- Zimmerman, J.L., O' Donnel, D.C., Darwish, K.E.I., and Peters, H.K., 1985. Gene expression during carrot somatic embryogenesis. *Proceedings of a workshop held at San Miniato on May 28-31, 1985*, Terzi, M., Pitto, L., Sung, Z.R., (Eds), pp: 117-121.

Θ. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η ελιά αποτελεί ένα φυτικό είδος μεγάλου οικονομικού ενδιαφέροντος για την οικονομία πολλών χωρών, οι οποίες στην πλειοψηφία τους, εξαπλώνονται γύρω από την λεκάνη της Μεσογείου. Πρόκειται για ένα μακρόβιο, αειθαλές φυτό το οποίο προσαρμόζεται και καρποφορεί σε αντίξοες συνθήκες, ακόμα και με ελλιπή καλλιεργητική φροντίδα. Οι καλλιέργειές της αξιοποιούν ακατάλληλες για άλλες καλλιέργειες εκτάσεις, συμβάλλουν καθοριστικά στην αποφυγή της διάβρωσης του εδάφους και προσφέρουν εποχική εργασία και ικανοποιητικό εισόδημα σε χιλιάδες μικροκαλλιεργητές. Παράλληλα είναι δυνατή η εκμετάλλευση, εκτός των κύριων προϊόντων της (ελαιόλαδο και βρώσιμες ελιές) και των υποπροϊόντων της (φύλλα, ξύλο, πυρήνας, πυρηνέλαιο κ.ά.) για φαρμακευτικούς και άλλους σκοπούς.

Αντίθετα με την πλειοψηφία των καρποφόρων φυτών και την τεράστια οικονομική και θρεπτική της αξία, η καλλιέργεια της ελιάς εξακολουθεί να απαιτεί επίπονες και όχι πάντα αποδοτικές διαδικασίες. Η μη ανταγωνιστικότητα των προϊόντων της οφείλεται, κυρίως, στην μικρή παραγωγικότητα, στην περιορισμένη φωτοσυνθετική ικανότητα των καλλιεργούμενων ποικιλιών και στις παραδοσιακές μεθόδους καλλιέργειας. Αδήριτη είναι λοιπόν η ανάγκη για εφαρμογή εναλλακτικών αναγεννητικών προσεγγίσεων.

Η σωματική εμβρυογένεση αποτελεί μια πολλά υποσχόμενη *in vitro* αναγεννητική μέθοδο φυτικών ειδών. Η επαγωγή και η επίτευξη υψηλών ποσοστών σωματικής εμβρυογένεσης σε έκφυτα ελιάς θα ήταν καθοριστική για την εφαρμογή γρήγορων, εύκολων και αποδοτικών μεθόδων πολλαπλασιασμού της ελιάς με μειωμένο κόστος παραγωγής.

Καθώς οι ερευνητικές προσπάθειες για την επαγωγή σωματικών εμβρύων στην ελιά ήταν περιορισμένες και τα ποσοστά επαγωγής χαμηλά, θεωρήσαμε καθοριστικής σημασίας τη διεξαγωγή έρευνας με δύο βασικούς στόχους:

1. Τον προσδιορισμό των παραγόντων (θρεπτικών συστατικών και φυτοαυξητικών παραγόντων) που απαιτούνται για την επαγωγή, ανάπτυξη και επιβίωση των σωματικών εμβρύων σε υψηλά ποσοστά.

2. Τον εντοπισμό, μέσω μοριακής ανάλυσης, δύο γονιδίων του Dc8 και του Dc59 και το πρότυπο έκφρασή τους κατά τη διάρκεια της σωματικής εμβρυογένεσης.

Στο πλαίσιο της πραγμάτωσης των παραπάνω στόχων χρησιμοποιήθηκαν σαν έκφυτα ριζίδια, βάσεις και κορυφές ώριμων ζυγωτικών εμβρύων ποικιλίας *Κορωνέικης*. Η Κορωνέικη επιλέχτηκε σαν το καταλληλότερο πειραματικό υλικό, καθώς προκαταρκτικά πειράματα με άλλες ελληνικές ποικιλίες (*Τζονάτη*, *Καλαμάτα*, *Αγγουρομάνα* και *Άμφισσα*) έδειξαν ότι εμφανίζει το υψηλότερο εμβρυογενετικό δυναμικό.

Δοκιμάστηκε η μορφογενετική ικανότητα τεσσάρων διαφορετικών θρεπτικών υποστρωμάτων καλλογένεσης, που περιείχαν σαν φυτοαυξητικούς ρυθμιστές 25,0 μM IBA και 2,5 μM 2iP:

- OMc (Cañas et al. 1988).
- OMc χωρίς υδρολυμένη καζεΐνη.
- MS (Murashige et al. 1962).
- MS με 1,0 g/L υδρολυμένη καζεΐνη.

Τα έκφυτα, μετά από παραμονή 21 ημερών στα παραπάνω θρεπτικά υποστρώματα, μεταφέρονταν σε ίδιο θρεπτικό υπόστρωμα από το οποίο απουσίαζαν οι φυτοαυξητικοί παράγοντες (θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης). Το θρεπτικό υπόστρωμα OMc αποδείχτηκε το καταλληλότερο για την επαγωγή σωματικών εμβρύων σε ιστοκαλλιέργειες ελιάς. Παράλληλα η παρουσία υδρολυμένης καζεΐνης ήταν καθοριστική για την επαγωγή και την έκφραση της εμβρυογενετικής δυναμικότητας των εκφύτων.

Σε όλα τα πειράματα που ακολουθούν το θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης ήταν το ίδιο με το αρχικό χωρίς φυτοαυξητικούς παράγοντες.

Η εξάρτηση της εμβρυογένεσης από την ηλικία του εκφύτου, μελετήθηκε με τον εμβολιασμό ανώριμων ζυγωτικών εμβρύων ελιάς τα οποία συλλέγονταν από Ιούλιο μέχρι Αύγουστο, σε θρεπτικό υπόστρωμα OMc που περιείχε 25,0 μM IBA και 2,5 μM 2iP, για 21 ημέρες και μεταφορά τους σε θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης. Μεγαλύτερη μορφογενετική δυναμικότητα εμφάνιζαν τα ριζίδια η οποία αυξανόταν αναλογικά με την ηλικία τους. Η εμβρυογενετική ικανότητα των βάσεων και των κορυφών των ανώριμων ζυγωτικών εμβρύων ήταν κατά πολύ μικρότερη από εκείνη των βάσεων και των κο-

ρυφών των ώριμων ζυγωτικών εμβρύων. Σε καμία περίπτωση δεν καταγράφηκαν υψηλότερα ποσοστά σωματικής εμβρυογένεσης από τα ποσοστά που καταγράφονταν σε ιστοκαλλιέργειες εκφύτων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων.

Διερευνήθηκε η μεταβολή της εμβρυογενετικής δυναμικότητας κατά μήκος του ριζιδίου το οποίο και τεμαχίστηκε σε δύο μέρη:

- α)** Στο ακραίο τμήμα του ριζιδίου, δηλαδή στο τμήμα του ριζιδίου προς το άκρο του ζυγωτικού εμβρύου.
- β)** Στο υποακραίο τμήμα του ριζιδίου, δηλαδή στο τμήμα του ριζιδίου προς τις κοτυληδόνες, το οποίο γειτνιάζε και με το μερίστωμα του βλαστού.

Τα έκφυτα εμβολιάζονταν σε θρεπτικό υπόστρωμα OMc που περιείχε 25,0 μM IBA και 2,5 μM 2iP. Το υποακραίο τμήμα του ριζιδίου υπερείχε εμβρυογενετικά έναντι του ακέραιου ριζιδίου (πείραμα-μάρτυρας), ενώ στο ακραίο τμήμα του ριζιδίου παρατηρήθηκε μερική αναστολή της σωματικής εμβρυογένεσης, υποδηλώνοντας την ύπαρξη διαβάθμισης της εμβρυογενετικής δυναμικότητας κατά μήκος του ριζιδίου.

Η ανακαλλιέργεια ριζιδίων, βάσεων και κορυφών κοτυληδόνων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων σε θρεπτικό υπόστρωμα OMc που περιείχε 25,0 μM IBA και 2,5 μM 2iP, κάθε 21 ημέρες, κατέληγε σε σταδιακή μείωση και τελικά μηδενισμό της εμβρυογενετικής δυναμικότητας των μεν ριζιδίων στην 4^η ανακαλλιέργεια, των δε βάσεων και κορυφών από τη 2^η ανακαλλιέργεια.

Σε επόμενη πειραματική δοκιμασία χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο OMc που περιείχε φυτοαυξητικούς παράγοντες 25,0 μM IBA και 2,5 μM 2iP και μία από τις εξής συγκεντρώσεις σακχαρόζης:

- 5,0 g/L σακχαρόζης (0,015 M).
- 20,0 g/L σακχαρόζης [0,058 M (πείραμα-μάρτυρας)].
- 40,0 g/L σακχαρόζης (0,12 M).
- 80,0 g/L σακχαρόζης (0,23 M).
- 160,0 g/L σακχαρόζης (0,46 M).

Η μορφογενετική υπεροχή (55,0% επαγωγή σωματικών εμβρύων) των 160,0 g/L σακχαρόζης καταγράφηκε από το θρεπτικό υπόστρωμα καλλογένεσης (14 μόλις ημέρες

μετά τον εμβολιασμό). Η σακχαρόζη αντικαταστάθηκε από μαννιτόλη σε τρεις συγκεντρώσεις:

- 10,0 g/L μαννιτόλης (0,05 M).
- 42,0 g/L μαννιτόλης (0,23M).
- 85,0 g/L μαννιτόλης (0,46M).

Η παραπάνω αντικατάσταση δεν υπέδειξε συσχέτιση του υψηλού ποσοστού σωματικής εμβρυογένεσης στο θρεπτικό υπόστρωμα με υψηλή συγκέντρωση σακχαρόζης, με το αυξημένο ωσμωτικό δυναμικό του θρεπτικού υποστρώματος.

Στο πλαίσιο της διερεύνησης της επίδρασης των αυξινών συνδυάστηκε σταθερή συγκέντρωση κυτοκινίνης (2,5 μ M 2iP) με μια από τις εξής αυξίνες σε θρεπτικό μέσο OMc :

- i) IBA: 0,39 / 1,56 / 6,25 / 12,5 / 25,0 / 50,0 / 100,0 ή 200,0 μ M.
- ii) NAA: 0,1 / 0,39 / 1,56 / 6,25 / 12,5 / 25,0 ή 50,0 μ M.
- iii) 2,4-D: 0,01 / 0,05 / 0,1 / 0,39 ή 1,56 μ M.

Τα αποτελέσματα κατέδειξαν ότι τόσο το NAA όσο και το 2,4-D, ανεξαρτήτως συγκέντρωσης και είδους εκφύτου, δεν προκαλούσαν υψηλότερα ποσοστά σωματικής εμβρυογένεσης από εκείνα του πειράματος-μάρτυρα (4,0-15,0%). Αντίθετα στο IBA καταγράφηκαν πολύ υψηλότερα ποσοστά διαφοροποίησης σωματικών εμβρύων από όλα τα υπόλοιπα πειράματα τόσο στα έκφυτα ριζιδίων (23,0-31,0%) όσο και κοτυληδόνων ιδιαίτερα στις υψηλότερες συγκεντρώσεις (17,0%).

Παράλληλα μελετήθηκε η επίδραση του θρεπτικού υποστρώματος OMc που περιείχε 2,5 μ M 2iP και έναν από τους εξής τέσσερις συνδυασμούς αυξινών:

- 0,195 μ M NAA / 0,78 μ M IBA.
- 0,39 μ M NAA / 1,56 μ M IBA.
- 6,25 μ M NAA / 12,5 μ M IBA.
- 12,5 μ M NAA / 25,0 μ M IBA.

Η συνδυασμένη παροχή αυξινών μείωνε την επαγωγική δράση της μεμονωμένης παροχής του IBA, πιθανώς εξαιτίας της ανασταλτικής δράσης του NAA, καθλώνοντας την επαγωγή τόσο της άμεσης όσο και της έμμεσης σωματικής εμβρυογένεσης (15,0%) έναντι της μεμονωμένης παροχής IBA (23,0% άμεση σωματική εμβρυογένεση και 31,0%

έμμεση σωματική εμβρυογένεση). Τα παραπάνω δεδομένα δεν υποδηλώνουν αθροιστική δράση των δύο αυξινών, αλλά ούτε ύπαρξη διαφορετικών θέσεων-στόχων των αυξινών στα κύτταρα της ελιάς.

Δοκιμάστηκε η μορφογενετική δράση τριών συνθετικών κυτοκινινών (TDZ, 2iP και BA) σε διάφορες συγκεντρώσεις (0,625 / 2,5 / 10,0 ή 40,0 μM), όταν παρέχονταν σε θρεπτικό υπόστρωμα OMc που περιείχε 25,0 μM IBA. Σε έκφυτα ριζιδίων τα 0,625 μM 2iP κατέληγαν σε 9,0% άμεση σωματική εμβρυογένεση, ενώ οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις σε υψηλότερα ποσοστά έμμεσης σωματικής εμβρυογένεσης, με μικρή υπεροχή των 2,5 μM 2iP (15,0%). Σε έκφυτα κοτυληδόνων τα ποσοστά επαγωγής σωματικών εμβρύων κυμαίνονταν από 0,0-10,0% (20,0 μM 2iP). Η παροχή BA σε έκφυτα ριζιδίων ανέστελλε μερικώς τη σωματική εμβρυογένεση (2,0-5,0%) και του TDZ πλήρως.

Η χρήση τεσσάρων συνδυασμών κυτοκινινών σε θρεπτικό μέσο OMc που περιείχε 25,0 μM IBA δεν προωθούσε την έμμεση σωματική εμβρυογένεση. Η συνδυασμένη παροχή 2iP και BA (2,5 μM / 10,0 μM και 1,25 μM / 5,0 μM) υστερούσε σε εμβρυογενετική επαγωγική δράση έναντι της μεμονωμένης παροχής του 2iP, ενώ κυμαινόταν σε αντίστοιχα επίπεδα με εκείνα της μεμονωμένης παροχής του BA. Η συνδυασμένη παροχή 2iP και TDZ (2,5 μM / 10,0 μM και 1,25 μM / 5,0 μM) μείωνε την επαγωγική δράση της μεμονωμένης παροχής του 2iP.

Η επίδραση της πηγής ανόργανου αζώτου στην επαγωγή σωματικών εμβρύων ήταν μια ακόμα παράμετρος που μελετήθηκε. Ριζίδια ώριμων ζυγωτικών εμβρύων εμβολιάζονταν σε θρεπτικό μέσο OMc που περιείχε 25,0 μM IBA, 2,5 μM 2iP και σαν πηγή αζώτου NH_4NO_3 ή KNO_3 ή NH_4Cl στις εξής συγκεντρώσεις: 5,0 / 20,0 / 80,0 ή 160,0 mM.

Η προσθήκη NH_4NO_3 , σαν αποκλειστική πηγή ανόργανου αζώτου ανεξαρτήτως συγκέντρωσης, δεν επηρέαζε το ποσοστό διαφοροποίησης σωματικών εμβρύων (32,0-36,0%) συγκριτικά με το πείραμα-μάρτυρα, εκτός από τα 160,0 mM που την ανέστελλαν σημαντικά, όπως και την καλλογένεση (19,0%). Η παροχή KNO_3 μείωνε την παραγωγή σωματικών εμβρύων δραστικά (18,0%) σε μικρές συγκεντρώσεις και ακόμα εντονότερα στις υψηλότερες συγκεντρώσεις (4,0%), ενώ δεν παρατηρήθηκε ταυτόχρονη μείωση της καλλογένεσης. Η παροχή NH_4Cl σε συγκεντρώσεις 5,0 / 20,0 ή 80,0 mM έδωσε υψηλά ποσοστά (52,0-58,0%) και πολύ υψηλότερο (62,0%) στα 160,0 mM. Η καλλογένεση πα-

ρουσίαζε μείωση στη συγκέντρωση 80,0 mM (60%) και στη συγκέντρωση 160,0 mM (40,0%).

Μελετήθηκε και η δράση δύο συνδυασμών πηγών ανόργανου αζώτου $\text{KNO}_3:\text{NH}_4\text{NO}_3$ και $\text{KNO}_3:\text{NH}_4\text{Cl}$ στις εξής αναλογίες: 1:9, 3:7, 5:5, 7:3 και 9:1. Ο εμβολιασμός γινόταν σε θρεπτικό υπόστρωμα OMc με τον εκάστοτε συνδυασμό πηγών ανόργανου αζώτου και φυτοαυξητικούς παράγοντες 25,0 μM IBA και 2,5 μM 2iP. Τα αποτελέσματα από όλους τους συνδυασμούς υποδείκνυαν την ανασταλτική δράση στην επαγωγή σωματικών εμβρύων του KNO_3 και τη διεγερτική του NH_4NO_3 και του NH_4Cl . Παράλληλα, επαλήθευαν την ανασταλτική δράση στην επαγωγή κάλλου του NH_4Cl στις υψηλές συγκεντρώσεις. Στους συνδυασμούς $\text{KNO}_3:\text{NH}_4\text{NO}_3$ καταγράφονταν ποσοστά που κυμαίνονταν από 3,0-16,0%. Ανάλογα αποτελέσματα προέκυπταν και στις αναλογίες $\text{KNO}_3:\text{NH}_4\text{Cl}$. Στην αναλογία 1:9 καταγραφόταν υψηλό ποσοστό σωματικής εμβρυογένεσης (38,0%) και στις υπόλοιπες αναλογίες τα ποσοστά έβαιναν μειούμενα μέχρι που σχεδόν μηδενίζονταν (27,0-1,0%).

Σαν κατακλείδα όλων των πειραματικών μας δοκιμασιών παρασκευάστηκε το θρεπτικό υπόστρωμα “KM” το οποίο συνδύαζε όλα εκείνα τα θρεπτικά στοιχεία και τους φυτοαυξητικούς παράγοντες που η παρούσα εργασία κατέδειξε σαν καταλληλότερα για την επαγωγή σωματικών εμβρύων στην ελιά *in vitro*. Πιο συγκεκριμένα συνίστατο από τη βασική χημική σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος OMc και τις εξής τροποποιήσεις:

- 25,0 μM IBA.
- 2,5 μM 2iP.
- 20,0 mM NH_4Cl .
- 160,0 g/L σακχαρόζης.

Στο “KM” θρεπτικό μέσο προέκυψαν εντυπωσιακά ποσοστά σωματικής εμβρυογένεσης (62,0%) συγκριτικά με το OMc (24,0%) που προτάθηκε από τους Cañas et al. (1988) σαν καταλληλότερο θρεπτικό μέσο για ιστοκαλλιέργειες στην ελιά. Αξιομνημόνευτη είναι η εμφάνιση των πρώτων σωματικών εμβρύων στο θρεπτικό μέσο καλλογένεσης, πριν ακόμα μεταφερθούν οι κάλλοι στο θρεπτικό μέσο διαφοροποίησης.

Στο πλαίσιο της μοριακής προσέγγισης της σωματικής εμβρυογένεσης στην ελιά χρησιμοποιήθηκαν κάλλοι από ριζίδια ζυγωτικών εμβρύων ποικιλίας *Κορωνέικης* και έγι-
νε προσπάθεια εντοπισμού στο γονιδίωμα της ελιάς των γονιδίων Dc8 και Dc59.

Από τη μελέτη των φιλμ των αυτοραδιογραφημάτων έγινε φανερή η ύπαρξη και των δύο γονιδίων. Ειδικότερα για το Dc8 δεν προέκυψε πολυμορφισμός στο γονιδίωμα της ελιάς, όπως έχει βρεθεί και στο καρότο, γεγονός που υποδεικνύεται από την εμφάνι-
ση μιας μόνο ζώνης (περίπου 3 Kb). Όσο αφορά το γονίδιο Dc59, εντοπίστηκε πλήθος ζωνών (4,4-6,6 Kb) που υβριδίζουν, υποδηλώνοντας την ύπαρξη πολυμορφισμού για το συγκεκριμένο γονίδιο και στην ελιά, όπως ισχύει στο καρότο, αλλά και σε πολλά άλλα φυτικά είδη.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η έκφραση του Dc8 σε διαφορετικούς ιστούς. Τα αποτε-
λέσματα κατέδειξαν έκφραση του συγκεκριμένου γονιδίου στο ακέραιο ζυγωτικό έμβρυο και στο ενδοσπέρμιο της ελιάς, στο ακέραιο ζυγωτικό έμβρυο του καρότου, όχι όμως και στο ενδοσπέρμιο του, γεγονός που δεν συνάδει με τα υπάρχοντα βιβλιογραφικά δεδο-
μένα. Πιθανώς αυτό οφείλεται στη χαμηλότερη έκφρασή του στα ενδοσπέρμια.(περίπου 2 φορές χαμηλότερο από ότι στα ζυγωτικά έμβρυα) και στη χαμηλή συγκέντρωση (8,0-10,0 μg/L) του απομονωθέντος ολικού RNA που χρησιμοποιήθηκε για την ανίχνευση του μεταγραφήματος του Dc8.

Τέλος, διερευνήθηκε η έκφραση του Dc8 σε οκτώ είδη κάλλων ώριμων ζυγωτικών εμβρύων ελιάς, οι οποίοι βρίσκονταν σε διαφορετικά μορφογενετικά-εμβρυογενετικά στάδια, λόγω της διαφορετικής τους ηλικίας. Η έκφραση του Dc8 ήταν αισθητή από τις πρώτες ημέρες του εμβολιασμού και σε όλη τη διάρκεια της καλλιέργειας των ριζιδίων στο θρεπτικό μέσο καλλογένεσης (21 ημέρες), αλλά και μετά την μεταφορά τους στο θρεπτικό υπόστρωμα διαφοροποίησης σωματικών εμβρύων στο οποίο παρέμεναν για 60 ημέρες τουλάχιστον. Η ποσότητα των μεταγραφημάτων ήταν σχετικά σταθερή στους κάλλους ηλικίας 7-31 ημερών και αυξανόταν στα δύο τελευταία δείγματα RNA που αντι-
στοιχούσαν σε κάλλους ηλικίας 36 και 42 ημερών. Η αύξηση της συσσώρευσης των με-
ταγραφημάτων του Dc8 συμπίπτει με το χρονικό διάστημα κατά το οποίο το ποσοστό επαγωγής σωματικών εμβρύων στην ιστοκαλλιέργεια είχε πλέον σταθεροποιηθεί στο μέγιστο επίπεδο και τα περισσότερα σωματικά έμβρυα βρίσκονταν είτε στο καρδιάσχη-

μο και στο στάδιο της τορπίλης είτε άρχιζαν να ωριμάζουν και να εξελίσσονται περαιτέρω σε φυτάρια.

I. SUMMARY

The olive tree is a plant species of great economic importance for the economy of many countries that the majority of which spread around the Mediterranean basin. It is a long-lived, evergreen plant which bears fruit and adapted to adverse conditions, even and poor crop care. The olive tree is cultivated in unsuitable soils for other plants, prevents soil erosion, and contributes to the income of thousands of farmers. At the same time olive tree varieties can be exploited, not only for their main products (olive oil and olives) but also for their by-products (leaves, wood, etc.) for pharmaceutical and other purposes.

Unlike the majority of fruiting plants with huge economic and nutritional value, cultivation of olive tree still requires laborious and not always efficient processes. The non-competitiveness of the cultivation of olive tree is mainly due to low productivity, limited photosynthetic ability of crop varieties, and traditional farming methods. Therefore alternative regenerative approaches (i.e. *in vitro* regeneration) are required.

Somatic embryogenesis is a promising *in vitro* regenerative process of plant tissues in aseptic conditions. The induction of high levels of somatic embryogenesis from immature and mature tissues of olive tree is crucial for the implementation of fast, easy, and efficient propagation methods of olive tree with reduced production costs.

As research efforts to induce somatic embryos in olive tree explants were limited and the rates of induction were low too, we considered essential to conduct research to identify the factors required for the induction of high levels of somatic embryogenesis, development, and survival of somatic embryos.

During our initial experimental approach, different explants (radicles and cotyledonary segments) of mature zygotic embryos of *Koroneiki* olive tree were tested. *Koroneiki* olive tree was chosen as the most suitable experimental material, as preliminary experiments with other Greek varieties (*Tzonati*, *Kalamata*, *Amfissa* and *Angouromana*) showed that displays the highest embryogenic potential.

The morphogenic capacity of four different culture media supplemented with 25.0 μ M IBA and 2.5 μ M 2iP were tested;

- OMc (Cañas et al. 1988).
- OMc without hydrolyzed casein.
- MS (Murashige et al. 1962).
- MS with 1.0 g/L hydrolyzed casein.

The results proved that OMc is the most suitable nutrient medium to induce somatic embryos in olive tree tissue cultures. Similarly, the presence of hydrolyzed casein is crucial for the induction and expression of embryogenic capacity of the explants.

The dependence of somatic embryogenesis on the age of explant, was studied by inoculating immature olive zygotic embryos, collected from July to August, in OMc supplemented with 25.0 μ M IBA and 2.5 μ M 2iP. Calli from radicles exhibited a greater morphogenetic capacity which increased proportionally with age. The embryogenic capacity of calli from proximal and distal segments of immature zygotic cotyledons was much lower than that of calli from proximal and distal segments of mature zygotic cotyledons. In any case however, higher rates of somatic embryogenesis were recorded in tissue explants of mature zygotic embryos than those in tissue explants of immature zygotic embryos.

We investigated the change of the embryogenic capacity of radicles which were cut into two halves;

- The upper half radicle (towards the cap).
- The bottom half radicle (towards the cotyledons).

Explants were inoculated in OMc supplemented with 25.0 μ M IBA and 2.5 μ M 2iP. The lower half of the radicle gave higher somatic embryogenesis than the intact radicle, while the upper half radicle inhibited somatic embryogenesis, suggesting that there is "*a gradient of embryogenic potential*" from the proximal to the distal region of the radicle.

Subcultures of radicles, proximal and distal cotyledonary segments of mature zygotic embryos in OMc supplemented with 25.0 μ M IBA and 2.5 μ M 2iP, every 21 days, resulted in a gradual decrease and finally zeroing of the embryogenic capacity of radicles during 4th subculture and of proximal and distal cotyledonary segments during 2nd subculture.

In another experimental test five concentrations of sucrose were used;

- 5.0 g/L sucrose (0.015 M)
- 20.0 g/L sucrose [0.058 M (control experiment)]
- 40.0 g/L sucrose (0.12 M)
- 80.0 g/L sucrose (0.23 M) and
- 160.0 g/L sucrose (0.46 M).

All explants were inoculated in OMc supplemented with 25.0 μ M IBA and 2.5 μ M 2iP. Morphogenetic primacy (55.0% induction of somatic embryos) of the medium containing 160.0 g/L sucrose was recorded only 14 days after inoculation although the explants were still in the “callogenesis” medium. The replacement of sucrose by three concentrations of mannitol [10.0 g/L (0.05 M), 42.0 g/L (0.23 M) and 85.0 g/L (0.46 M)] indicated no correlation of high percentage of somatic embryogenesis (in the medium supplemented with a high concentration of sucrose) with an increased osmotic pressure of the medium.

For the investigation of the dependence of somatic embryogenesis on auxins, OMc supplemented with 2.5 μ M 2iP and one of the following auxins was tested:

- i) IBA: 0.39 / 1.56 / 6.25 / 12.5 / 25.0 / 50.0 / 100.0 and 200.0 μ M.
- ii) NAA: 0.1 / 0.39 / 1.56 / 6.25 / 12.5 / 25.0 and 50.0 μ M.
- iii) 2,4-D: 0.01 / 0.05 / 0.1 / 0.39 and 1.56 μ M.

The results indicated that both NAA and 2,4-D, in all concentrations and the types of explant, induce lower somatic embryogenesis than those of the control experiment (4.0-15.0%). IBA induced much higher somatic embryogenesis than all other experiments in

radicles (23.0-31.0%) and in proximal and distal cotyledonary segments especially at the highest concentrations (17.0%).

In parallel we studied the effect of four combinations of auxins on somatic embryogenesis supplemented with 2.5 μM 2iP in OMc medium:

- 0.195 μM NAA / 0.78 μM IBA
- 0.39 μM NAA / 1.56 μM IBA
- 6.25 μM NAA / 12.5 μM IBA
- 12.5 μM NAA / 25.0 μM IBA

The combined supply of auxins reduced both *direct* and *indirect* somatic embryogenesis (15.0%), probably due to the inhibitory effect of NAA, compared to IBA (23,0% direct somatic embryogenesis and 31.0% indirect somatic embryogenesis). These data suggest neither “*an additive*” effect of the two auxins nor the existence of different target sites of auxin in the cells of olive tree.

The morphogenetic effect of three different synthetic cytokinins (TDZ, 2iP and BA) at various concentrations (0.625 / 2.5 / 10.0 or 40.0 μM), when were supplied to OMc medium containing 25.0 μM IBA, was tested. In radicle calli 0.625 μM 2iP induced about 9.0% *direct somatic embryogenesis*, while the other concentrations induced higher rates of *indirect somatic embryogenesis*, and 2.5 μM 2iP the highest (15.0% somatic embryogenesis). In proximal and distal cotyledonary segments the induction of somatic embryos ranged from 0.0-10.0% in medium supplemented with 20.0 μM 2iP. Supply of BA in radicles partially inhibited the somatic embryogenesis (2.0-5.0%) and TDZ fully.

The use of four combinations of cytokinins in medium OMc containing 25.0 μM IBA did not advance rates of *indirect* somatic embryogenesis. The combined supply of 2iP and BA (2.5 μM / 10,0 μM and 1.25 μM / 5.0 μM) inhibited the embryogenic induction against individual supply of 2iP and ranged in corresponding levels as individual supply of BA. The combined supply of 2iP and TDZ (2.5 μM / 10,0 μM and 1.25 μM / 5.0 μM) reduced the proliferative effects of individual supply of 2iP.

The effect of the source of inorganic nitrogen in the induction of somatic embryos was another parameter studied. Radicles of mature zygotic embryos were inoculated into OMc containing 25.0 μ M IBA, 2.5 μ M 2iP and NH_4NO_3 or KNO_3 , or NH_4Cl at the following concentrations; 5.0 / 20.0 / 80.0 or 160.0 mM. The addition of NH_4NO_3 as the only source of inorganic nitrogen in any concentration, did not affect the rate of differentiation of somatic embryos (32.0-36.0%) compared with the control experiment, except 160.0 mM that significantly inhibited both somatic embryogenesis and callogenesis (19.0%). The supply of low concentrations of KNO_3 reduced drastically the production of somatic embryos (18.0%) and yet more strongly the higher concentrations (4.0%), while no reduction of callogenesis was observed. The supply of NH_4Cl (5.0 / 20.0 or 80.0mM) increased somatic embryogenesis (52.0-58.0%) and much higher (62.0%) the concentration of 160.0 mM. Callogenesis was decreased by the concentration of 80.0 mM (60.0%) and the concentration of 160.0 mM (40.0%).

The effects of two combinations of inorganic nitrogen sources $\text{KNO}_3:\text{NH}_4\text{NO}_3$ and $\text{KNO}_3:\text{NH}_4\text{Cl}$ in different ratios (1:9, 3:7, 5:5, 7:3 and 9:1) on somatic embryogenesis were tested too. Radicles of mature zygotic embryos were inoculated in OMc supplemented with 25.0 μ M IBA and 2.5 μ M 2iP and combinations of inorganic nitrogen sources. The results of all the combinations demonstrated the inhibitory effect in the induction of somatic embryos of KNO_3 and the stimulating effect of NH_4NO_3 and NH_4Cl . Furthermore, they verified the inhibitory effect on callus induction of NH_4Cl at high concentrations. For combinations of KNO_3 and NH_4NO_3 induction of somatic embryogenesis was recorded ranging from 16.0-3.0%. Similar results have been observed in ratios $\text{KNO}_3:\text{NH}_4\text{Cl}$. In 1:9 ratios a high percentage of somatic embryogenesis (38.0%) was recorded while the rest of the ratios reduced it drastically (27.0-1.0%).

As a conclusion of all experimental tests we prepared a medium that combined all those compounds and growth regulators which were proved to be more appropriate for inducing somatic embryos from olive explants *in vitro*. Radicles of mature zygotic embryos

were inoculated in OMc supplemented with 25.0 μ M IBA, 2.5 μ M 2iP, 20.0 mM NH_4Cl and 160.0 g/L sucrose. The induction of somatic embryogenesis in this "*ideal*" medium was impressive (62.0%) compared to OMc (24.0%) which was proposed by Cañas et al. (1988) as the most appropriate medium for tissue cultures in olive tree. Noteworthy is the appearance of the first somatic embryos in callogenesis medium even before calli were transferred to differentiation medium.

During the molecular approach of somatic embryogenesis in olive tissue cultures, calli from radicles of zygotic embryos of *Koroneiki* olive tree were used in an attempt to identify in the genome of olive tree the genes Dc8 and Dc59. The study of autoradiographs made evident the existence of both genes. Specifically, for Dc8 no polymorphism in the genome of olive tree was observed, as has been found in carrot, which is indicated by the appearance of a single band (approximately 3 Kb). Regarding the gene Dc59, were identified numerous hybridized zones (4.4-6.6 Kb), suggesting the existence of polymorphism in this gene in the olive tree genome like in carrot and many other plant species.

We studied the expression of Dc8 in different tissues too. The results showed expression of this gene in intact zygotic embryo and endosperm of olives, in full zygotic embryos of carrot, but not in the endosperm, which is inconsistent with the existing literature data. Probably this is due to lower expression in the endosperm (about 2 times lower than in zygotic embryos), in combination with the low concentration of total RNA (8.0-10.0 mg/l) that was isolated and used to detect the transcript of Dc8.

Finally, we investigated the expression of Dc8 in eight different types and ages of calli of mature zygotic embryos of olive tree, which were in different morphogenetic - embryogenic stages. The Dc8 expression was significantly during the early days of inoculation, throughout the culture of radicles in callogenesis medium (21-day-old calli) and when were transferred to the differentiation medium in which were inoculated for at least 60 days. The amount of transcripts was relatively stable in 7- day-old calli and 31-

day-old calli and increased in the last two RNA samples from 36 day-old calli and 42 day-old calli. Increased accumulation of Dc8's transcripts coincides with the period during which the rate of induction of somatic embryos in tissue culture is stabilized at the maximum level and the majority of the somatic embryos are either in the heart-shaped and the torpedo stage either start to mature and evolve further into plantlets.