

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ & ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
Αριθμ. Πρωτοκ. <u>97</u>
Ημερομηνία <u>4-10-2005</u>

ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ  
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

Πτυχιακή Εργασία του  
Παυλή Γ. Σωτηρίου

Ιστοκαλλιέργεια αμπέλου: *In vitro* πολλαπλασιασμός του  
υποκειμένου 110R της αμπέλου

Επιβλέπων Καθηγητής  
Γεώργιος Νάνος

Βόλος, 2005



**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ**  
**ΥΠΗΡΕΣΙΑ ΒΙΒΛΙΟΘΗΚΗΣ & ΠΛΗΡΟΦΟΡΗΣΗΣ**  
**ΕΙΔΙΚΗ ΣΥΛΛΟΓΗ «ΓΚΡΙΖΑ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ»**

Αριθ. Εισ.: 4901/1  
Ημερ. Εισ.: 11/09/2006  
Δωρεά: Συγγραφέα  
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΦΠΑΠ  
2005  
ΣΩΤ

## Περίληψη

Μελετήθηκε η αναγέννηση βλαστών κατά την *in vitro* καλλιέργεια του υποκειμένου αμπέλου 110R. Σκοπός ήταν η εύρεση της άριστης συγκέντρωσης βενζυλαδενίνης (BA), η οποία είναι συνθετική κυτοκίνη, για την παραγωγή του μέγιστου αριθμού ικανοποιητικού μήκους βλαστών, για να χρησιμοποιηθούν στον πολλαπλασιασμό του ανωτέρου υποκειμένου.

Μικρομοσχεύματα που προήλθαν από επανειλημμένες *in vitro* καλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν ένα ανά δοκιμαστικό σωλήνα που περιείχε τροποποιημένο υπόστρωμα MS με 0, 6,8 ή 34  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA (0, 30,2 ή 151  $\mu\text{moles}\cdot\text{L}^{-1}$ ). Τα έκφυτα που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα που περιείχε 0  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA δεν έδωσαν βλαστούς, πλην ενός εκφύτου, ενώ 4 από τα 21 έδωσαν ρίζες.

Τα έκφυτα που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα που περιείχε 34  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA έδωσαν ικανό αριθμό βλαστών, αλλά με μικρό μήκος και μικρό νωπό και ξηρό βάρος βλαστών χωρίς καθόλου ανάπτυξη ριζών. Τέλος τα έκφυτα που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα που περιείχε 6,8  $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA έδωσαν υψηλό αριθμό βλαστών με ικανοποιητικό μήκος, υψηλό νωπό και ξηρό βάρος βλαστών και θεωρείται η καλύτερη συγκέντρωση για πολλαπλασιασμό *in vitro* του υποκειμένου αμπέλου 110R.

Η παρουσία των δύο συγκεντρώσεων BA δεν έδωσε διαφορές στο μήκος ανά μεσογονάτιο διάστημα και στο νωπό και ξηρό βάρος βλαστού ανά μονάδα μήκους του.

## Ευχαριστίες

Φθάνοντας τώρα στην ολοκλήρωση των προσπαθειών μου, θα ήθελα να αναφερθώ στους ανθρώπους που με βοήθησαν με τον ένα ή με τον άλλον τρόπο στην ολοκλήρωση της πτυχιακής μου εργασίας.

Πρώτα απ' όλα, θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στον καθηγητή μου και επιβλέποντα της πτυχιακής εργασίας τον κ. Γεώργιο Νάνο για την τιμή που μου έκανε στην ανάθεση αυτής της πτυχιακής διατριβής. Επίσης ευχαριστώ και τους κ. Αβραάμ Χα Επίκουρο Καθηγητή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας και τον κ. Στέφανο Κουνδουρά Λέκτορα του Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης για τη βοήθεια που μου προσέφεραν ως μέλη της τριμελούς επιτροπής.

Ακόμη θα ήθελα να ευχαριστήσω το διευθυντή του Ινστιτούτου Προστασίας Φυτών Βόλου κ. Ιωάννη Ρούμπο, ο οποίος μου έδωσε τη δυνατότητα υλοποίησης του πειραματικού μέρους. Σημαντική ήταν και η βοήθεια όλου του προσωπικού του ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε, καθώς και της μεταπτυχιακής φοιτήτριας Αγγελικής Θ. Σουρρή, στην εκπαίδευσή μου στις τεχνικές της παρασκευής των υποστρωμάτων, της εγκατάστασης και του πολλαπλασιασμού των φυταρίων.

## Πίνακας Περιεχομένων

1. Εισαγωγή.....	1
1.1 Ορισμός.....	1
1.2 Ιστορική ανασκόπηση.....	1
1.3 Μέθοδοι.....	8
1.4 Επίδραση του φυσικού περιβάλλοντος στα καλλιεργούμενα φυτά <i>in vitro</i> .....	10
1.4.1 Συνοχή του θρεπτικού υποστρώματος.....	11
1.4.2 Θερμοκρασία.....	12
1.4.2.1 Επίδραση στην αύξηση των φυτών.....	12
1.4.2.2 Επίδραση στη μορφογένεση.....	13
1.4.3 Σχετική υγρασία.....	14
1.4.4 Φωτισμός.....	15
1.4.4.1 Επίδραση στη μορφογένεση.....	16
1.5 Πλεονεκτήματα-Μειονεκτήματα.....	17
2. Υποστρώματα χρησιμοποιούμενα στην ιστοκαλλιέργεια.....	24
3. Μεθοδολογία ιστοκαλλιέργειας αμπέλου.....	29
3.1 Γενικά.....	29
3.2 Υποκείμενα της αμπέλου.....	32
3.2.1 Γενικά.....	32
3.2.2 Κυριότερα υποκείμενα.....	32
3.2.3 Το υποκείμενο 110R.....	33
4. Υλικά και μέθοδοι.....	35
4.1 Τα φυτά.....	35
4.2 Ο θάλαμος ανάπτυξης.....	35
4.3 Παρασκευή του υποστρώματος.....	36
4.4 Συστατικά του υποστρώματος.....	38
4.5 Περιγραφή πειράματος.....	41
4.5.1 Παραγωγή φυτικού υλικού.....	41
4.5.2 Εγκατάσταση.....	43
4.5.3 Συλλογή δεδομένων.....	44
5. Αποτελέσματα.....	45

6. Συζήτηση-Συμπεράσματα.....	58
Βιβλιογραφία.....	60

## Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας 1.1. Βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης και περιοριστικές θερμοκρασίες εκφύτων.....	13
Πίνακας 1.2. Σχετική υγρασία στους γυάλινους περιέκτες ανάλογα με το πώμα που χρησιμοποιείται.....	15
Πίνακας 1.3. Οι διάφοροι τύποι της ιστοκαλλιέργειας και ο λόγος για τον οποίο εφαρμόζονται.....	21
Πίνακας 2. Υποστρώματα που χρησιμοποιούνται στην ιστοκαλλιέργεια. Οι συγκεντρώσεις είναι σε $mg \cdot L^{-1}$ .....	24
Πίνακας 3.1. Υπόστρωμα για την ιστοκαλλιέργεια αμπέλου.....	31
Πίνακας 4.1. Μακροστοιχεία.....	38
Πίνακας 4.2. Ιχνοστοιχεία.....	39
Πίνακας 4.3. Βιταμίνες.....	39
Πίνακας 4.4. Υδατάνθρακες.....	40
Πίνακας 4.5. Άλλα συστατικά.....	40
Πίνακας 4.6. Ορμόνες.....	40
Πίνακας 5.1. Ποσοστό επί τοις εκατό των εκφύτων υποκειμένου 110R αμπέλου που βλάστησαν και ρίζωσαν κατά την <i>in vitro</i> ανάπτυξη τους παρουσία 0, 6,8 ή 34 $mg \cdot L^{-1}$ BA.....	45
Πίνακας 5.2. Μέσος όρος και τυπική απόκλιση του μήκους βλαστών, αριθμού κόμβων, αριθμού βλαστών και μήκους ριζών ανά έκφυτο υποκειμένου 110R αμπέλου κατά την <i>in vitro</i> ανάπτυξη του παρουσία 0, 6,8 ή 34 $mg \cdot L^{-1}$ BA....	46
Πίνακας 5.3. Μέσος όρος και τυπική απόκλιση του νωπού βάρους των βλαστών, των ριζών και του ολικού νωπού βάρους ανά έκφυτο υποκειμένου 110R αμπέλου κατά την <i>in vitro</i> ανάπτυξη του παρουσία 0, 6,8 ή 34 $mg \cdot L^{-1}$ BA.....	47
Πίνακας 5.4. Μέσος όρος και τυπική απόκλιση του ξηρού βάρους των βλαστών, των ριζών και του ολικού ξηρού βάρους ανά έκφυτο υποκειμένου 110R αμπέλου κατά την <i>in vitro</i> ανάπτυξη του παρουσία 0, 6,8 ή 34 $mg \cdot L^{-1}$ BA.....	48

Πίνακας 5.5. Μέσος όρος του ποσοστού επί τοις εκατό της ξηρής ουσίας (%ξ.ο.) των βλαστών και των ριζών ανά έκφυτο υποκειμένου 110R αμπέλου κατά την <i>in vitro</i> ανάπτυξη του παρουσία 0, 6,8 ή 34 mg*L <sup>-1</sup> BA.....	49
Πίνακας 5.6. Μέσος όρος και τυπική απόκλιση του μήκους μεσογονατίων ανά έκφυτο υποκειμένου 110R αμπέλου κατά την <i>in vitro</i> ανάπτυξη του παρουσία 0, 6,8 ή 34 mg*L <sup>-1</sup> BA.....	50
Πίνακας 5.7. Μέσος όρος και τυπική απόκλιση του νωπού βάρους (N.B.) βλαστών ανά μονάδα μήκους (mm) βλαστών, του νωπού βάρους ριζών ανά μονάδα μήκους (mm) των ριζών, του ξηρού βάρους (Ξ.Β.) βλαστών ανά μονάδα μήκους (mm) βλαστών και του ξηρού βάρους ριζών ανά μονάδα μήκους (mm) ριζών ανά έκφυτο υποκειμένου 110R αμπέλου κατά την <i>in vitro</i> ανάπτυξη του παρουσία 0, 6,8 ή 34 mg*L <sup>-1</sup> BA.....	51

### Κατάλογος εικόνων

Εικόνα 4.1. Ο θάλαμος ανάπτυξης.....	36
Εικόνα 4.2. Ο κλίβανος υγρής αποστείρωσης.....	41
Εικόνα 4.3. Η τράπεζα νηματικής ροής.....	42
Εικόνα 4.4. Έκφυτα μέσα σε σωλήνες.....	43



## **1. Εισαγωγή**

### **1.1 Ορισμός**

Ιστοκαλλιέργεια είναι μια βιολογική τεχνική η οποία περιλαμβάνει την αφαίρεση από ζώα ή φυτά μικρών τμημάτων ιστού και την τοποθέτησή τους σε ένα κατάλληλο μέσο, όπου μπορούν να επιβιώσουν έξω από τον οργανισμό (*in vitro*).

Μια ιστοκαλλιέργεια μπορεί να αποτελείται από ένα αριθμό κυττάρων (κυτταροκαλλιέργεια) ή από τμήματα φυτών, σπόρων, εμβρύων, οργάνων (οργανοκαλλιέργεια) ή και πρωτοπλαστών ανωτέρων φυτών σε θρεπτικά υποστρώματα κάτω από ασηπτικές συνθήκες. Τα κύτταρα στην ιστοκαλλιέργεια μπορούν να αυξάνονται σε μέγεθος και σε αριθμό, να διαφοροποιούνται σε εξειδικευμένα κύτταρα και να εκτελούν ορισμένες λειτουργίες, π.χ κυτταροκαλλιέργεια κυττάρων από το πάγκρεας παράγει ινσουλίνη, ενώ κύτταρα του φυτού άτροπος παράγουν ατροπίνη (εγκυκλοπαίδεια Πάπυρος).

### **1.2 Ιστορική ανασκόπηση**

Η πρώτη προσπάθεια καλλιέργειας κυττάρων σε καλλιεργητικό μέσο έγινε το 1902 από το Γερμανό βοτανολόγο Gottlieb Haberlandt. Ο Haberlandt χρησιμοποιώντας το υπόστρωμα Κηορ και προσθέτοντας σακχαρόζη, ασπαραγίνη και πεπτόνη κατάφερε να επιζήσουν τα κύτταρα για μερικές μόνο εβδομάδες. Προέβλεψε ότι καλλιεργώντας βλαστικά κύτταρα θα μπορούν να παραχθούν έμβρυα των φυτών.

Δύο χρόνια αργότερα, ένας άλλος Γερμανός βοτανολόγος, ο E. Hanning, επιδιώκοντας τη διάσωση εμβρύων, καλλιέργησε με επιτυχία ανώριμα έμβρυα σταυρανθών, αποκόπτοντάς τα από το σπόρο. Παρατήρησε όμως ότι τοποθετώντας τα έμβρυα αυτά σε καλλιεργητικό μέσο, παρήχθησαν μικρά και ασθενικά φυτά σε αντίθεση με τα κανονικά αναπτυσσόμενα έμβρυα.

Με την πάροδο των χρόνων του 20<sup>ου</sup> αιώνα, ο τομέας της ιστοκαλλιέργειας άρχισε να αναπτύσσεται με εκθετικούς ρυθμούς. Μεγάλης εμπορικής σημασίας επίτευγμα αποτέλεσε η βλάστηση σπόρων ορχιδέας σε

θρεπτικό μέσο με άγαρ, ένα ζελατινώδη πολυσακχαρίτη που παράγεται από συγκεκριμένα είδη φυκιών. Αυτό το επίτευγμα αναφέρθηκε ανεξάρτητα, αλλά σχεδόν ταυτόχρονα, από τους L. Knudson., Noel Bernarf και H. Burgeff στις αρχές της δεκαετίας του 1920. Σχεδόν την ίδια εποχή, οι W. Kotte και W. J. Bobbins παρουσίασαν, με περιορισμένη επιτυχία, την καλλιέργεια μεριστωμάτων από ρίζες.

Πειραματικά διαπιστώθηκε ότι τα φυτά που αναπτύσσονται σε ιστοκαλλιέργεια κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας τους στο υπόστρωμα είναι ετερότροφοι οργανισμοί. Σε αντίθεση δηλαδή με τα φυτά που βρίσκονται στο χώμα, τα φυτά σε καλλιεργητικό μέσο δεν μπορούν να συνθέσουν πρωτεΐνες και υδατάνθρακες από ανόργανα συστατικά και επομένως θα πρέπει να παρέχεται μια σειρά από οργανικές ουσίες μέσω του υποστρώματος.

Εμπειρικά ανακαλύφθηκε ότι η ζάχαρη και κάποια άλλα συστατικά όπως το γάλα της καρύδας, η μαγιά, οι χυμοί των φρούτων και ο πολτός της μπανάνας, επιδρούσαν σημαντικά στην ανάπτυξη των φυτών που καλλιεργούνταν σε υπόστρωμα που περιείχε κάποια από τα παραπάνω συστατικά, ενώ αντίθετα τα ανόργανα χημικά συστατικά μόνα τους δεν έδειχναν να έχουν θετικό αποτέλεσμα στην ανάπτυξη των φυτών. Σύμφωνα με αναφορές του Robbin, την καλλιέργεια ριζών ντομάτας βοηθούσε η προσθήκη μαγιάς στο καλλιεργητικό μέσο. Αναλύσεις, που πραγματοποιήθηκαν αργότερα, αποκάλυψαν ότι η μαγιά περιέχει αρκετές βιταμίνες, και κυρίως θειαμίνη (βιταμίνη B<sub>1</sub>).

Το 1924 δυο γιατροί, οι P. Blumenthal και P. Meyer ερεύνησαν την καλλιέργεια κάλλων καρότων.

- Κάλλος είναι μια άμορφη μάζα από πολλά κύτταρα τα οποία πολλαπλασιάζονται συνεχώς μέσα στο θρεπτικό υλικό του υποστρώματος, μέχρι να εξαντληθούν τα θρεπτικά συστατικά.
- Με τον ίδιο περίπου τρόπο αναπτύσσονται και τα καρκινικά κύτταρα σε ιστοκαλλιέργεια.
- Το αρχικό ενδιαφέρον τους εστιαζόταν στη συσχέτιση του δημιουργούμενου κάλλου με την ανάπτυξη όγκων. Το συμπέρασμα, όμως, που ανακοινώθηκε, ήταν ότι η

καλλιέργεια κάλλων από φέτες καρότου ήταν άσχετη με παθολογικά αίτια.

Μετά και την ανακάλυψη της αυξίνης (1911) και των ιδιοτήτων της μέσω μιας σειράς πειραμάτων (1928), το 1934 οι F. Kogl, A. J. Haagen-Smit και H. Ergleben την απομόνωσαν, την ανάλυσαν χημικά και αποφάνθηκαν ότι πρόκειται για φυτική ορμόνη, την οποία και ονόμασαν ινδολο-3-οξικό οξύ (IAA). Πέντε χρόνια αργότερα, αναφέρθηκε, ανεξάρτητα, από τους R. J. Gautheret και P. Nobecourt στη Γαλλία ότι, όταν χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό μέσο με αυξίνη σε κάμβιο καρότου, παρήχθη κάλλος. Ο Gautheret ήταν ο πρώτος που κατάφερε με επιτυχία να καλλιεργήσει φυτικούς ιστούς μέσα σε κατάλληλο υπόστρωμα, καθώς το 1934 καλλιέργησε καμβιακό ιστό από τα είδη *Acer pseudoplatanus*, *Salix caprea*, και *Sambucus*, μερικά από τα οποία κατάφεραν να παραμείνουν στο καλλιεργητικό μέσο για περισσότερο από ένα χρόνο.

Στις Η.Π.Α. πατέρας της ιστοκαλλιέργειας θεωρείται ο P. R. White. Ήταν ο πρώτος που καλλιέργησε σε θρεπτικό μέσο ριζικό μερίστωμα ντομάτας. Η προσθήκη γλυκίνης, πυριδοξίνης και νικοτινικού οξέος μέσα στο υπόστρωμα είχε θετικά αποτελέσματα. Το 1939 ανέφερε ότι καλλιέργησε με επιτυχία κάλλους από φυτό καπνού. Σε συνεργασία με τον A. Braun απέδειξε την ομοιότητα των κυττάρων που βρίσκονται σε όγκους φυτών και ζώων. Το 1943 εξέδωσε το εγχειρίδιο της Καλλιέργειας Φυτικών Ιστών, στο οποίο αναγραφόταν όλη η συσσωρευμένη γνώση εκείνης της εποχής επάνω στον τομέα της ιστοκαλλιέργειας.

Στα μέσα του 20<sup>ου</sup> αιώνα αρκετοί επιστήμονες ασχολήθηκαν με την καλλιέργεια εμβρύων που αφαιρούσαν από τους σπόρους (διάσωση εμβρύων) ή την προσπάθεια προσομοίωσης της διαδικασίας παραγωγής εμβρύων από αδιαφοροποίητα κύτταρα (εμβρυογένεση). Με την υπάρχουσα γνώση, οι μελέτες εστιάστηκαν στη χρήση του γάλακτος της καρύδας (υγρό ενδοσπέρμιο), καθώς αποτελούσε έτοιμο φυσικό θρεπτικό μέσο που τρέφει το έμβryo. Έτσι, το 1941 ανακαλύφθηκε από τους J. van Overbeek, M. E. Conklin και A. F. Blakeslee ότι το γάλα της καρύδας προκαλούσε το σχηματισμό κάλλων σε έμβρυα του ζιζανίου *Datura stramonium*, όταν αυτά καλλιεργούνταν στο μέσο αυτό. Το γάλα της καρύδας αποτέλεσε αντικείμενο μελέτης και άλλων ερευνητών, με αποτέλεσμα να αποκαλυφθεί ότι περιέχει

βιταμίνες και αμινοξέα, αλλά και ουσίες παρόμοιες με τις κυτοκινίνες, γι' αυτό και κατατάσσεται συνήθως στις αυξητικές ρυθμιστικές ουσίες και αποτελεί μέχρι και σήμερα ένα από τα καλλιεργητικά μέσα των ορχιδέων.

Η βιομηχανία παραγωγής ορχιδέων ήταν η πρώτη που αντελήφθη τις δυνατότητες του μικροπολλαπλασιασμού. Οι G. Morel και C. Martin καλλιέργησαν ντάλιες απαλλαγμένες από ιώσεις με καλλιέργεια μεριστωμάτων ακολουθώντας τα πρωτόκολλα που έφτιαξε ο E. Bali το 1946. Το 1960 οι Morel και Martin εφάρμοσαν τα ευρήματά τους και στις ορχιδέες.

Για πρώτη φορά η ιστοκαλλιέργεια εφαρμόστηκε εμπορικά στον πολλαπλασιασμό της ορχιδέας (Marston, 1967), παράγοντας φυτά με συγκεκριμένα, πανομοιότυπα ποιοτικά χαρακτηριστικά και απαλλαγμένα από ιώσεις κάτι που ήταν αδύνατο να συμβεί με τον εγγενή πολλαπλασιασμό.

Με αυτόν τον τρόπο παράγονται ορχιδέες απαλλαγμένες από ιώσεις αλλά έχουμε και έναν ταχύτατο τρόπο πολλαπλασιασμού τους. Έτσι, οι ορχιδέες έγιναν αφθονότερες και λιγότερο ακριβές σαν αποτέλεσμα αυτής της μεθόδου.

Στη συνέχεια έγινε φανερό ότι όλα τα φυτά μπορούσαν να πολλαπλασιαστούν με το συγκεκριμένο τρόπο, με την προϋπόθεση ότι θα ακολουθούσαν η απαραίτητη κάθε φορά διαδικασία για κάθε φυτό.

Παρ' όλα αυτά τα επιτεύγματα, παρέμεινε βασικό θέμα η εξεύρεση νέων συστατικών και οι αναλογίες που πρέπει να χρησιμοποιούνται στα καλλιεργητικά μέσα, ώστε να είναι επιτυχής η εφαρμογή της ιστοκαλλιέργειας στην εμπορική πράξη.

Το 1955 ο C. O. Miller ανακάλυψε την κινετίνη, μία ορμόνη που προάγει τον σχηματισμό βλαστών και η οποία ανήκει σε μια ομάδα ρυθμιστών ανάπτυξης γνωστές ως κυτοκινίνες.

Οι F. Went και F. Skoog συνεργάστηκαν για την εξέταση της αρνητικής επίδρασης της αυξίνης στη δημιουργία βλαστού, καθώς και της αλληλεπίδρασης της με την κινετίνη.

Οι Went και Thimann απέδειξαν την ιδιότητα της αυξίνης να προκαλεί ανάπτυξη ριζών.

Αργότερα, το 1957, οι Skoog και Miller δημοσίευσαν το "Χημική Ρύθμιση της Ανάπτυξης και Σχηματισμού Οργάνων σε Καλλιεργούμενους Φυτικούς Ιστούς *in vitro*" ("Chemical Regulation of Growth and Organ

Formation in Plant Tissue Cultured *in vitro*”), στο οποίο και έκαναν λόγο για την επιθυμητή σχέση αυξίνης/κυτοκινίνης.

Το όνομα του Skoog είναι άμεσα αναγνωρίσιμο από τον οποιοδήποτε που ασχολείται με την ιστοκαλλιέργεια, καθώς συμμετείχε στη δημιουργία του υποστρώματος Murashige and Skoog, κοινά αναφερόμενο και ως M&S ή MS υπόστρωμα. Το υπόστρωμα αυτό αποτελεί το πιο συνηθισμένο υπόστρωμα που χρησιμοποιείται παγκοσμίως και πρωτοαναφέρθηκε το 1962 στο κλασικό άρθρο “A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassay with Tobacco Tissue Cultures”.

Το υπόστρωμα αυτό περιείχε περισσότερα άλατα από τα προηγούμενα καθώς και συμπληρωματικά στοιχεία αποτελώντας ένα μέσο κλειδί για την παραγωγή περισσότερων φυτών με τη μέθοδο της ιστοκαλλιέργειας. Αργότερα, ο E. Linsmaier, σε συνεργασία με τον Skoog, μελέτησε συστηματικά τις απαιτήσεις στις καλλιέργειες κάλλων φυτών καπνού και υπόδειξε μερικές κατάλληλες αλλαγές στο υπόστρωμα MS, ώστε να βρίσκει μεγαλύτερο πεδίο εφαρμογής (Kyte & Kleyn, 1996).

Επομένως η ιστοκαλλιέργεια είναι μια τεχνική που αναπτύχθηκε τη δεκαετία του '60 και βρίσκει πολλές εφαρμογές, όπως στον πολλαπλασιασμό καλλωπιστικών και πολυετών καλλιεργούμενων φυτών σε εμπορική κλίμακα (Toogood, 1999), την παραγωγή φυτών απαλλαγμένων από ιώσεις, αλλά και τη δημιουργία φυτών που έχουν τα επιθυμητά χαρακτηριστικά. Π.χ. μπορούμε να τοποθετήσουμε σε ένα τριβλύο Petri εκατομμύρια πρωτοπλαστών. Οι παθογόνοι μικροοργανισμοί που υπάρχουν σε προσβεβλημένα φυτά παράγουν τοξίνες, οι οποίες, αν ενσωματωθούν στο υπόστρωμα αναπαραγωγής των πρωτοπλαστών, θα προκαλέσουν το θάνατο σχεδόν όλων των πρωτοπλαστών, εκτός από μερικούς ανθεκτικούς στις τοξίνες, που θα εξελιχθούν σε κάλλους, από τους οποίους μπορούμε να δημιουργήσουμε φυτά ανθεκτικά στους παθογόνους μικροοργανισμούς (Ποντίκης, 1994).

Επίσης, κατά το παρελθόν πολλά φυτά έχουν βελτιωθεί με κατάλληλες διασταυρώσεις, αλλά, για να γίνει διασταύρωση, θα πρέπει τα φυτά να είναι σεξουαλικά συμβατά. Με την καλλιέργεια πρωτοπλαστών δύο ειδών που είναι σεξουαλικά ασύμβατα και τη συνένωση τους παράγονται φυτά που αποτελούν σωματικά υβρίδια, δηλαδή προέρχονται από αγενή διασταύρωση. Η τεχνική

αυτή μπορεί να δημιουργήσει φυτά που θα φέρουν τα επιθυμητά γονίδια διαφορετικών φυτών (Ποντίκης, 1994).

Η χρήση της ιστοκαλλιέργειας στην Ελλάδα για την παραγωγή ανθοκομικών φυτών άρχισε στις αρχές της δεκαετίας του '80 και στη δεκαετία του '90 έφτασε να παράγει 3,5 εκατομμύρια φυτά, κυρίως εσωτερικού χώρου (Κίντζιος, 1994).

Τώρα η ιστοκαλλιέργεια αποτελεί ένα από τα δυναμικότερα εργαλεία για τον πολλαπλασιασμό των φυτών. Αποκτά ακόμη μεγαλύτερη σημασία στην περίπτωση φυτών στα οποία ο εγγενής πολλαπλασιασμός δεν είναι επιθυμητός.

Σε όλα τα εργαστήρια των πανεπιστημίων και των ΤΕΙ που ασχολούνται με τη γενετική βελτίωση των φυτών ερευνώνται νέοι τρόποι και αναπτύσσονται νέα υποστρώματα κατάλληλα για τα φυτά που μας ενδιαφέρουν.

Στο εργαστήριο Γενετικής και Βελτίωσης των Φυτών, του Αριστοτέλειου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης δημιουργήθηκε ένα πρωτόκολλο μικροπολλαπλασιασμού και αναγέννησης της Βερικοκιάς *Prunus armeniaca*, ποικιλίας "Μπεμπέκου". Συγκεκριμένα, εξελίχθηκαν θρεπτικά υποστρώματα στα οποία η ποικιλία "Μπεμπέκου" αντέδρασε άριστα, καθορίστηκαν συνδυασμοί ρυθμιστών αύξησης, που έδωσαν ρυθμό πολλαπλασιασμού έως και 1:6,3 ανά 30 ημέρες και μήκος βλαστού έως και 4 εκατοστά, και τέλος επιτεύχθηκε ριζοβολία σε ποσοστό 20 έως 60%. Από τα διάφορα τμήματα των εκφύτων, που ελέγχθηκαν ως προς τις αναγεννητικές τους ικανότητες, ο κάλλος της βάσης και ο μίσχος των φύλλων έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα με μέγιστο τα 4 αναγεννημένα φυτά ανά έκφυτο. Ο συνδυασμός αυτών των μεθόδων αποτελεί έναν άριστο τρόπο πολλαπλασιασμού της βερικοκιάς "Μπεμπέκου", απόκτησης μεγάλου αριθμού φυτών ομοιόμορφης γενετικής σύστασης και απαλλαγμένων από προσβολές (Παπαδόπουλος και συνεργάτες, 2001).

Επίσης στο ίδιο εργαστήριο αναπτύχθηκε τρόπος πολλαπλασιασμού του κρητικού Λάδανου (*Cistus creticus* spp. *creticus*), από το οποίο εξάγεται η ρητίνη Λάδανο. Η ρητίνη αυτή εκκρίνεται από τις αδενώδεις τρίχες των φύλλων και παρουσιάζει ισχυρή αντιμικροβιακή δράση (Demetzos και συνεργάτες, 1997) και κυρίως αντιλευχαιμική δράση (Dimas και συνεργάτες,



1998), η οποία μπορεί να συγκριθεί με καθιερωμένα φάρμακα των κατηγοριών αυτών, όπως είναι η αμπικιλίνη και η καμπτοθεκίνη. Για την εγκατάσταση της καλλιέργειας *in vitro* χρησιμοποιήθηκαν σπόροι και βλαστικές κορυφές που προήλθαν από μητρικά φυτά που καλλιεργήθηκαν στον αγρό. Οι βλαστικές κορυφές έδωσαν περισσότερο φυτικό υλικό σε μικρότερο χρονικό διάστημα. Ο μικροπολλαπλασιασμός των βλαστικών κορυφών σε βασικό υπόστρωμα MS χωρίς την προσθήκη ρυθμιστών αύξησης έδωσε το μεγαλύτερο ρυθμό πολλαπλασιασμού (6 φυτά ανά βλαστική κορυφή). Στα πειράματα της αναγέννησης τα καλύτερα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν, όταν χρησιμοποιήθηκε ως έκφυτο το κατώτερο τμήμα των τεσσάρων φύλλων της κορυφής. Το υπόστρωμα MS με τον συνδυασμό ρυθμιστών αύξησης  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA και  $0,1 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  TDZ, μας έδωσε το μεγαλύτερο ποσοστό αναγέννησης 33,3% (Μαδέσης και συνεργάτες, 2001).

Στη Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας ΤΕΙ Κρήτης υπεγράφη σύμβαση έργου με την Ένωση Αγροτικών Συνεταιρισμών Πάρου, που αφορά την αξιολόγηση της τεχνικής “μικροπολλαπλασιασμός *in vitro*” για κλώνους από τις κυριότερες τοπικές ποικιλίες αμπέλου (Μονεμβασιά, Μανδηλαριά, Βάφτρα, Αηδάνι κ.α.). Τα αποτελέσματα θα αξιοποιηθούν σε μελλοντική σύμβαση έργου, που θα έχει ως κύριο στόχο την παραγωγή μικροπολλαπλασιασμένων αμπελόφυτων για τη δημιουργία αμπελώνων “βασικού πολλαπλασιαστικού υλικού” στην Πάρο. Ακόμη, αναπτύσσεται στο ίδιο ΤΕΙ ερευνητική δραστηριότητα για την εξυγίανση από ιώσεις ελληνικών κλώνων αμπέλου και μπανάνας με βιοτεχνολογικές μεθόδους (*in vitro* τεχνικές) (Γραμματικάκη - Αυγελή).

Επίσης, στο Εργαστήριο Υποτροπικών Φυτών και Ιστοκαλλιέργειας του Ινστιτούτου Υποτροπικών Φυτών και Ελαιάς Χανίων διεξήχθη έρευνα με αντικείμενο τα προβλήματα σε σχέση με την προσαρμογή στο περιβάλλον, την ανάπτυξη, τις τεχνικές καλλιέργειας και την παραγωγή καρπών μερικών τροπικών και υποτροπικών φυτών, που παρουσιάζουν οικονομικό ενδιαφέρον για την Ελλάδα (Αβοκάντο, Μάνγκο, Μουσμουλιά, Παπάγια, Χοχόμπα, Χαρουπιά, Τσεριμόγια, Χουρμαδιά, Πεκάν, Λίτσι, Ροδιά, Φραγκοσουκιά, Λωτός κ.ά.).

Η έρευνα περιλαμβάνει:

Πολλαπλασιασμό φυτών με την εφαρμογή κλασσικών μεθόδων (σπορόφυτα, εμβολιασμός, μοσχεύματα) και βιοτεχνολογικών μεθόδων (μικροεμβολιασμός και καλλιέργεια φυτικών ιστών *in vitro*) για την παραγωγή φυτικού υλικού απαλλαγμένου από ιώσεις. Αποτελέσματα:

- 1) Εισήχθησαν από ερευνητικά ιδρύματα εξωτερικού ποικιλίες διαφόρων ειδών υποτροπικών φυτών, μελετήθηκε η δυνατότητα επιτυχούς καλλιέργειας τους στον Ελλαδικό χώρο και έγινε αξιολόγηση και επιλογή των πλέον κατάλληλων για εμπορική καλλιέργεια ποικιλιών Αβοκάντο, Ακτινιδίου, Μπανάνας, Μάνγκο, Τσεριμόγιας, Πεκάν, Φειζόγιας, Χουρμαδιάς, Δεσπολιάς (μουσμουλιάς) και Φραγκοσουκιάς.
- 2) Παράχθηκε και διατέθηκε σε φυτώρια και γεωργούς φυτικό υλικό Αβοκάντο, Ακτινιδίου και Μπανάνας στα πλαίσια προγραμμάτων αναδιάρθρωσης καλλιεργειών του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων.
- 3) Έγινε βελτίωση της τεχνικής του πολλαπλασιασμού στα φυτά: Ακτινιδιά (με ριζοβολία μοσχευμάτων και ιστοκαλλιέργεια), Αβοκάντο (με εμβολιασμό σποροφύτων και ιστοκαλλιέργεια), Τσεριμόγια (με ριζοβολία μοσχευμάτων και ιστοκαλλιέργεια) και Μπανάνα - Φυσικιά - Ελιά - Σμέουρο (με ιστοκαλλιέργεια) (Πρωτοπαπαδάκης και Λοξού).

Επίσης υπάρχει Τράπεζα Ελληνικών Ποικιλιών Αμπέλου σε ιστοκαλλιέργεια στο Ινστιτούτο Προστασίας Φυτών Βόλου και έχει ληφθεί απόφαση από το Υπουργείο Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων, αξιοποίησης του υπάρχοντος υλικού για το γρήγορο πολλαπλασιασμό των φυτών (Πρακτικά της Βουλής Δευτέρα 10/1/2005).

### **1.3 Μέθοδοι**

Οι διαδικασίες που περιλαμβάνει η ιστοκαλλιέργεια είναι απλές. Ένα κομμάτι από το φυτό, το ονομαζόμενο έκφυτο, το οποίο μπορεί να προήλθε από το βλαστό, τη ρίζα, το φύλλο, τους οφθαλμούς ή από ένα μόνο κύτταρο ή ακόμα και από πρωτοπλάστες, τοποθετείται μέσα σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα ή κάποιο άλλο περιέκτη σε περιβάλλον απαλλαγμένο από μικροοργανισμούς. Στην απλούστερη περίπτωση, με την παροχή των απαραίτητων θρεπτικών



στοιχείων μέσω του υγρού ή πηκτού μέσου ανάπτυξης το έκφυτο παράγει φυτάρια τα οποία με τη σειρά τους μπορούν να πολλαπλασιαστούν περαιτέρω.

Αν χρησιμοποιηθούν μεμονωμένα κύτταρα ή πρωτοπλάστες, τότε αρχικά γίνεται κάλλος και στη συνέχεια με κατάλληλη επεξεργασία γίνεται διαφοροποίηση πρώτα οφθαλμών, κατόπιν βλαστών και στη συνέχεια ριζοβολία των βλαστών, για να δημιουργηθούν νέα φυτά, ή διαφοροποίηση εμβρύων και δημιουργία τεχνητών σπόρων. Επίσης από κάλλο συχνά διαφοροποιούνται έμβρυα.

Από το στάδιο του εκφύτου μέχρι τη μεταφύτευση στο θερμοκήπιο ή το χωράφι η ιστοκαλλιέργεια συμπεριλαμβάνει τα εξής βασικά στάδια:

### **I) Εγκατάσταση:**

- α) Παρασκευάζονται και αποστειρώνονται τα κατάλληλα θρεπτικά υποστρώματα για τα Στάδια I.γ ως III. Σε γενικές γραμμές, χρησιμοποιούνται οι αναλογίες που αναφέρονται στον Πίνακα 2 (Υποστρώματα). Η αποστείρωση πραγματοποιείται σε αυτόκαυστο των 85 λίτρων, ενώ οι βιταμίνες αποστειρώνονται με διήθηση μέσω φίλτρων 0.2 μm. Τα μεταλλικά και γυάλινα σκεύη αποστειρώνονται είτε στο αυτόκαυστο (121° C, 20 min) είτε σε κλίβανο ξήρανσης (160° C, 30 min). Η έγχυση των υποστρωμάτων γίνεται στους θαλάμους νηματικής ροής σε πλαστικά δοχεία ή, πριν την αποστείρωση, σε γυάλινα δοχεία (Κίντζιος, 1994).
- β) Από τα μητρικά φυτά λαμβάνονται έκφυτα, τα οποία αποστειρώνονται σε διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου ( $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ ) ή διάλυμα χλωρίνης 10%, κατόπιν πλένονται με αποστειρωμένο και αποσταγμένο νερό και στη συνέχεια λαμβάνονται μικρομοσχεύματα, τα οποία εμφυτεύονται στα δοχεία καλλιέργειας με το ανάλογο θρεπτικό υπόστρωμα. Όλες οι εργασίες πραγματοποιούνται υπό ασηπτικές συνθήκες στους θαλάμους νηματικής ροής. Σε ορισμένες περιπτώσεις, ανάλογα με το φυτικό είδος, τα μητρικά φυτά μπορεί να έχουν υποστεί προεπεξεργασία (π.χ. ανάπτυξη σε ορισμένη θερμοκρασία).
- γ) Τα μικρομοσχεύματα αναπτύσσονται και διαφοροποιούνται μέσα στα δοχεία καλλιέργειας που έχουν τοποθετηθεί στο θάλαμο ανάπτυξης

σταθερών συνθηκών (25° C, φωτισμός 16 ώρες φως/8 ώρες σκοτάδι, σχετική υγρασία 60%). Χρόνος επεξεργασίας: 3-5 εβδομάδες.

## **II) Πολλαπλασιασμός**

- α) Τα μικρομοσχεύματα μεταφυτεύονται σε υπόστρωμα ανάπτυξης πλαγίων βλαστών (υψηλή αναλογία κυτοκινινών) προς παραγωγή τούφας βλαστών με φύλλα. Χρόνος επεξεργασίας: 3-4 εβδομάδες για παραγωγή 5-10 βλαστών/μικρομόσχευμα.
- β) Μεταφύτευση των μικροβλαστών σε υπόστρωμα πλούσιο σε γιβεριλλίνες και επιμήκυνση αυτών. Χρόνος επεξεργασίας: 3-4 εβδομάδες (Το στάδιο αυτό σπάνια χρησιμοποιείται).

## **III) Ριζοβόληση**

Μεταφύτευση των μικροβλαστών σε υπόστρωμα πλούσιο σε αυξίνη προς ριζοβολία. Χρόνος επεξεργασίας: 4 εβδομάδες.

## **IV) Εγκλιματισμός**

Μικροεγκλιματισμός ή σκληραγώγηση των φυτών από τα στάδια II.β και III με ανάπτυξη αυτών υπό συνθήκες κανονικών θερμοκρασιών και υψηλής σχετικής υγρασίας και συχνά υψηλής περιεκτικότητας σε CO<sub>2</sub> και ειδικών συνθηκών λίπανσης και φωτισμού. Χρόνος επεξεργασίας: 3 εβδομάδες. Το στάδιο αυτό μπορεί να συνδυαστεί με το Στάδιο III (μικροεγκλιματισμός και ταυτόχρονη ριζοβολία σε υγρό υπόστρωμα)

Σημείωση: Κατά τα Στάδια I,II,III τα φυτά αναπτύσσονται στο Θάλαμο Ανάπτυξης σε θερμοκρασία 22-25° C (Ποντίκης, 1994, Κίντζιος, 1994, Kyte & Kleyn, 1996).

### **1.4 Επίδραση του φυσικού περιβάλλοντος στα καλλιεργούμενα φυτά *in vitro*.**

Μία σειρά παραγόντων του φυσικού περιβάλλοντος επιδρούν στο φυτικό υλικό που καλλιεργείται *in vitro*. Ένας από τους παράγοντες, η φυσική στήριξη, επιτυγχάνεται χάρη στο υπόστρωμα, ενώ οι άλλοι είναι η θερμοκρασία, ο φωτισμός και η σχετική υγρασία.

#### **1.4.1 Συνοχή του θρεπτικού υπόστρωματος**

Η μορφή του θρεπτικού υπόστρωματος μπορεί να είναι υγρή, ή ημιστερεή με την προσθήκη πηκτινώδους υλικού, όπως το άγαρ ή το Gelrite. Η μορφή αυτή μπορεί να επηρεάσει την αύξηση και μορφογένεση *in vitro* (Murashige, 1974). Η προσθήκη άγαρ μπορεί να προκαλέσει προβλήματα με συστατικά που παρεμποδίζουν την αύξηση, όπως ένζυμα ή αυξάνοντας την περιεκτικότητα των αλάτων. Παρ' όλα αυτά, η χρήση πηκτινώδους παράγοντα θεωρείται πλεονέκτημα, καθώς το έκφυτο στηρίζεται επάνω στο θρεπτικό υπόστρωμα και αερίζεται καλά και η μορφογένεση συντελείται φυσιολογικά καθώς το έκφυτο διατηρείται σε σταθερή και κατάλληλη θέση ως προς τη βαρύτητα. Η χρήση υγρού υπόστρωματος ή πολύ μικρής συγκέντρωσης πηκτινώδους παράγοντα μπορεί να προκαλέσει υπερυδάτωση και τα φυτά να εμφανίσουν ανωμαλίες στη μορφολογία. Το πλεονέκτημα της χρήσης υγρού υπόστρωματος είναι η γρήγορη αύξηση των φυτών, καθώς οι φυτικοί ιστοί βρίσκονται σε άμεση επαφή με το υπόστρωμα και προσλαμβάνουν περισσότερα θρεπτικά συστατικά. Η αύξηση κυμαίνεται από 30% στην κορυφή βλαστών *Scutellaria* μέχρι και 20-30 φορές αύξηση στο ξηρό βάρος των κορυφών των βλαστών ροδακινιάς σε σχέση με το ημιστερεό υπόστρωμα. Στην περίπτωση που το έκφυτο βρίσκεται μέσα στο υπόστρωμα, παρατηρείται έλλειψη οξυγόνου (Skoog, 1944) και μη κανονική οργανογένεση (Kessell & Carr, 1972). Ικανοποιητικός αερισμός επιτυγχάνεται με ανάδευση του μέσου. Στην περίπτωση όμως που μέρος του εκφύτου, όπως για παράδειγμα η κορυφή του βλαστού, είναι έξω από το υπόστρωμα, τότε επιτυγχάνεται ικανοποιητική ανταλλαγή αερίων. Σε κάποιες περιπτώσεις, όπως στην ανθηροκαλλιέργεια, τα έκφυτα επιπλέουν επάνω στο υπόστρωμα και δεν είναι απαραίτητη η ανάδευση.

Η επιλογή υγρού ή ημιστερεού μέσου εξαρτάται από πολλούς παράγοντες συμπεριλαμβανομένων του σκοπού του πειράματος ή της φάσης της καλλιέργειας, το γενότυπο του φυτού και το στάδιο του μικροπολλαπλασιασμού. Γενικά, αρκετά φυτά πολλαπλασιάζονται καλύτερα σε υγρό υπόστρωμα, ενώ για τη ριζοβόληση είναι απαραίτητο το ημιστερεό υπόστρωμα.

## 1.4.2 Θερμοκρασία

### 1.4.2.1 Επίδραση στην αύξηση των φυτών

Στην πράξη, πέρα από τις ενδείξεις ότι οι μικρές μεταβολές στη θερμοκρασία είναι αποτελεσματικότερες για την ανάπτυξη και την οργανογένεση, ακολουθείται ένα θερμοκρασιακό πρωτόκολλο. Η έρευνα έχει δείξει ότι ο μικρός χώρος των θαλάμων ανάπτυξης είναι προτιμότερος καθώς σε αυτόν επιτυγχάνεται ομοιομορφία και σταθερότητα στη θερμοκρασία που επικρατεί. Γενικά, αν και τα φυτά *in vitro* ανταποκρίνονται θετικά σε ένα εύρος θερμοκρασιών, παρ' όλα αυτά, όμως, σε κάποιες περιπτώσεις απαιτούνται κατάλληλες θερμοκρασίες για την ιδανική ανάπτυξη και μορφογένεση.

Η θερμοκρασία στην οποία τα περισσότερα φυτά αναπτύσσονται *in vitro* κυμαίνεται από 22-28<sup>0</sup>C, που εξαρτάται από το είδος του φυτού. Τα είδη *Malus spp* και μερικά του *Prunus spp* καλλιεργούνται στους 25±2<sup>0</sup>C, ενώ τα είδη *Pyrus communis*, *Morus nigra* και *Punica granatum* στους 28<sup>0</sup>C (Ποντίκης, 1994). Κάποια άλλα φυτά αναπτύσσονται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες όπως για παράδειγμα το *Dicentra spectabilis*, που απαιτεί 22<sup>0</sup>C και η *Anemone coronaria*, που απαιτεί 10<sup>0</sup>C.

Τα περισσότερα φυτά περιορίζουν την ανάπτυξη τους σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 32-35<sup>0</sup>C. Για τον καθορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας απαιτούνται εμπειρικά πειράματα. Μερικά παραδείγματα δίνονται στον Πίνακα 1.1.

**Πίνακας 1.1. Βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης και περιοριστικές θερμοκρασίες διαφόρων εκφύτων.**

Είδος καλλιέργειας	Βέλτιστη θερμοκρασία (°C)	Δοκιμασμένες περιοριστικές θερμοκρασίες (°C)
Κορυφές βλαστών ροδακινιάς	21-24	28
Έμβρυα ελιάς	25	15,20,30
Βλαστοί τριανταφυλλιάς	18	12,24
Ρίζες	20-25	27-28

(Πηγή: Anonymus, 2003)

**1.4.2.2 Επίδραση στη μορφογένεση**

Αντίθετα, με την αύξηση ένα στενό εύρος θερμοκρασιών είναι συνήθως άριστο για τη μορφογένεση, την ανάπτυξη των εμβρύων, των βλαστών και των ριζών. Μερικά είδη απαιτούν σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες (15°C) για το σχηματισμό βλαστών από έκφυτα φύλλου, όπως η *Begonia x cheimanthia* αν και η συνεχής ανάπτυξη των βλαστών απαιτεί 24°C. Έκφυτα από το βλαστό της *Anemone coronaria* απαιτούν θερμοκρασίες 15-19°C προκειμένου να σχηματιστούν βλαστοφόροι οφθαλμοί. Άλλα φυτικά είδη απαιτούν υψηλότερες θερμοκρασίες της τάξης των 28-30°C. Σε αυτή την κατηγορία ανήκει η ευρωπαϊκή άμπελος (*Vitis vinifera*) και το είδος *Pinus radiate*. Η πλειοψηφία των φυτικών ειδών έχουν κατά μέσο όρο βέλτιστη θερμοκρασία για μορφογένεση στο εύρος 22-26°C.

Ο σχηματισμός ριζών φαίνεται να εξαρτάται από τη θερμοκρασία σε αρκετά φυτικά είδη. Παρ' όλα αυτά κανόνας που να συμπεριλαμβάνει όλα τα φυτά δεν υπάρχει. Στα κωνοφόρα, για παράδειγμα, ο σχηματισμός ριζών ευνοείται στους 20°C, ενώ σε μικρομοσχεύματα μηλιάς απαιτείται θερμοκρασία 22-25°C προκειμένου να ριζοβολήσουν.

Η θερμοκρασία φαίνεται να είναι καθοριστικός παράγοντας στο σχηματισμό κονδύλων στις πατάτες. Μελέτες έδειξαν ότι θερμοκρασία 20°C

έδωσε 10 φορές μεγαλύτερη παραγωγή κονδύλων από υψηλότερες θερμοκρασίες. Από αρκετά είδη απαιτούνται χαμηλές θερμοκρασίες, για να σπάσουν το λήθαργο. Σε μερικά βολβώδη φυτά ο σχηματισμός βολβιδίων στους 30<sup>0</sup> C είχε σαν αποτέλεσμα την αποφυγή του ληθάργου σε σχέση με βολβούς που σχηματίστηκαν σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Τα ξυλώδη φυτά που προέρχονται από ιστοκαλλιέργεια είναι γνωστό ότι πρέπει να διακόψουν το λήθαργό τους, κυρίως όταν μεταφυτεύονται στο θερμοκήπιο. Για το σκοπό αυτό εφαρμόζονται χαμηλές θερμοκρασίες, ενώ βρίσκονται ακόμα *in vitro*. Ξυλώδη είδη που έχουν πρόβλημα ληθάργου κατά την καλλιέργεια *in vitro* είναι η αχλαδιά, το είδος *Prunus insititia*, καθώς και ορισμένα είδη των *Malus* και *Prunus*. Στα είδη αυτά εφαρμόζονται χαμηλές θερμοκρασίες στους ριζωμένους βλαστούς σε σκοτάδι (2-4°C για τουλάχιστον 42 μέρες) μιμούμενοι με τον τρόπο αυτό τις συνθήκες που απαιτούνται για το σπάσιμο του ληθάργου και την έκπτυξη των οφθαλμών την άνοιξη.

#### **1.4.3 Σχετική υγρασία**

Η σχετική υγρασία είναι ένας από τους παράγοντες του περιβάλλοντος που ελέγχονται δύσκολα κατά την ιστοκαλλιέργεια. Δεν μπορεί να μετρηθεί με ακρίβεια μέσα στους σωλήνες λόγω του μικρού τους μεγέθους και συνήθως είναι δύσκολο να ελεγχθεί στους θαλάμους ανάπτυξης. Η σχετική υγρασία του θαλάμου ανάπτυξης είναι μεγαλύτερης σημασίας, όταν τα πώματα από τα δοχεία ανάπτυξης δεν κλείνουν αεροστεγώς. Ενδεικτικά, στον Πίνακα 1.2 δίνεται η σχετική υγρασία στους γυάλινους περιέκτες των φυτών ανάλογα με το κλείσιμό τους.



**Πίνακας 1.2. Σχετική υγρασία στους γυάλινους περιέκτες ανάλογα με το πώμα που χρησιμοποιείται.**

Κάλυμμα περιέκτη	Σχετική υγρασία μέσα στον περιέκτη
Κλειστό περιστρεφόμενο καπάκι	100%
Μερικώς κλειστό περιστρεφόμενο καπάκι	80%
Πώμα από ακατέργαστο βαμβάκι	70%
Πλαστική μεμβράνη	60%
Διηθητικό χαρτί	50%

(Πηγή: Anonymous, 2003)

Σε συνθήκες πολύ ξηρού αέρα το θρεπτικό υπόστρωμα ξηραίνεται γρηγορότερα. Εάν χρησιμοποιούνται συσκευές διατήρησης της υγρασίας, είναι σημαντικό να λαμβάνεται φροντίδα για την αποφυγή μουχλιάσματος των συσκευών.

Έχει βρεθεί ότι η σχετική υγρασία έχει σημαντική επίδραση στο σχηματισμό των κηρών της εφυμενίδας σε αρκετά φυτικά είδη, όπως, για παράδειγμα, το λάχανο, το κουνουπίδι και τα γαρύφαλλα, τα οποία και κάτω από φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης στο θερμοκήπιο ή στο χωράφι παράγουν μεγάλες ποσότητες κηρών. Η έλλειψη των κηρών της εφυμενίδας σχετίζεται με τον ελλιπή εγκλιματισμό, όταν τα φυτά βγαίνουν *ex vitro*. Μειώνοντας τη σχετική υγρασία μέσα στο γυάλινο περιέκτη με τη χρήση ξηραντικών μέσων, υψηλότερων συγκεντρώσεων άγαρ ή ψύξη της βάσης του περιέκτη, βρέθηκε ότι παράγονται μεγαλύτερες ποσότητες κηρών σε αυτά τα είδη.

#### **1.4.4 Φωτισμός**

Στα φυτά που αναπτύσσονται *in vitro* τόσο η ένταση όσο και η ποιότητα του φωτός, επηρεάζουν την ανάπτυξη τους. Αν και τα φυτά του εξωτερικού περιβάλλοντος απαιτούν φως, για να φωτοσυνθέσουν, τα φυτά *in vitro* πρακτικά δεν φωτοσυνθέτουν, γιατί, όπως αναφέρθηκε, είναι

ετερότροφοι οργανισμοί και προσλαμβάνουν από το θρεπτικό υπόστρωμα την απαραίτητη ποσότητα υδατανθράκων (σακχαρόζη) και πρωτεϊνών. Ο φωτισμός απαιτείται σε αυτή την περίπτωση για τη δημιουργία της χλωροφύλλης και τη μορφογένεση. Αναφέρεται ότι το φως είναι απαραίτητο για το σχηματισμό βλαστού (Nebel & Naylor, 1968), για τη δημιουργία ριζών (Leroux, 1968, Letouze & Beauchesne, 1969, Ueda & Torikata, 1972), τη διαφοροποίηση των κλαδόφυλλων (Hasegawa et al., 1973) και τη σωματική εμβρυογένεση (Haccious, & Lakshmanan, 1965).

Ο φωτισμός στους θαλάμους ανάπτυξης παρέχεται συνήθως από λαμπτήρες φθορισμού τύπου cool white ολικής έντασης 6000 Lux. Οι λάμπες αυτές παρέχουν αρκετό φωτισμό στην ερυθρή περιοχή του φάσματος (600-700nm). Κάποιες έρευνες χρησιμοποίησαν συμπληρωματικό φωτισμό με λάμπες πυρακτώσεως, αλλά η πρακτική αυτή δε βελτίωσε την ανάπτυξη των φυτών στις περισσότερες περιπτώσεις. Παράλληλα, οι λάμπες πυρακτώσεως παρουσιάζουν το μειονέκτημα της αύξησης της θερμοκρασίας στο θάλαμο ανάπτυξης. Η ένταση του φωτισμού έχει βρεθεί ότι επιδρά στην ανάπτυξη των φυτών *in vitro* (Nebel & Naylor, 1968). Όταν η ένταση είναι μεγαλύτερη από 6000 Lux, παρουσιάζονται προβλήματα λόγω της υπερβολικής έκθεσης από λεύκανση των βλαστών.

Σε μερικές περιπτώσεις είναι σημαντική η φωτοπερίοδος. Οι περισσότερες καλλιέργειες *in vitro* αναπτύσσονται σε φωτοπερίοδο 16 ωρών φωτός, γιατί είναι βολική στην πράξη, αλλά και ερευνητικά στοιχεία που να επιβεβαιώνουν την ανάγκη εφαρμογής διαφορετικής φωτοπερίοδου δεν υπάρχουν για τα περισσότερα είδη. Όπως με την ένταση του φωτός και το μήκος κύματος, η επίδραση της φωτοπερίοδου είναι συγκεκριμένη για κάθε είδος και πρέπει να ελέγχεται εμπειρικά.

#### **1.4.4.1 Επίδραση στη μορφογένεση**

Περισσότερο το μήκος κύματος και λιγότερο η ένταση του φωτισμού έχει βρεθεί ότι έχει σημαντική επίδραση στο σχηματισμό κάλλου, βλαστών και ριζών. Γενικά, το μπλε φως και οι κοντινές περιοχές στο UV (420-467nm) φαίνεται να προάγουν τη δημιουργία κάλλου και το σχηματισμό ριζών. Αρκετά



φυτά συμπεριφέρονται με αυτό τον τρόπο, όπως για παράδειγμα ο καπνός και το γεράνι (*Pelargonium*). Αρκετές έρευνες απέδειξαν ότι η ένταση του φωτός αλληλεπιδρά με το μήκος κύματος. Έτσι, ο μπλε φωτισμός είναι αποτελεσματικότερος στη μορφογένεση των βλαστών, όταν η ένταση είναι χαμηλή ( $0,24 \text{ W}\cdot\text{m}^{-2}$ ) (Weis & Jaffe, 1969). Σε μεγαλύτερες εντάσεις φωτός η ανάπτυξη παρεμποδίζεται.

Παράλληλα φαίνεται να υπάρχει σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του φωτός και των κυτοκινινών στη δημιουργία ή ανάπτυξη πλευρικών οφθαλμών. Σε αρκετά φυτά η έλλειψη του μπλε φωτός μπορεί να υποκατασταθεί από την εφαρμογή κυτοκινίνης *in vitro*. Η δημιουργία και ανάπτυξη πλευρικών οφθαλμών σε μπλε φως απαιτεί σημαντικά λιγότερη κυτοκινίνη με αποτελέσματα παρόμοια με αυτά των υψηλότερων επιπέδων κυτοκινίνης. Στην περίπτωση, όμως, που τα υψηλά επίπεδα κυτοκινίνης χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με μπλε φωτισμό, η ανωτέρω διαδικασία παρεμποδίζεται.

Ο σχηματισμός ριζών (*in vitro* και *ex vitro*) ελέγχεται από το φυτόχρωμα. Η εφαρμογή κόκκινου φωτισμού στους βλαστούς βελτιώνει τη ριζοβόληση (Letouze & Beauchesne, 1969), όπως για παράδειγμα σε φυτά αζαλέας και ροδόδεντρου. Μικρομοσχεύματα βλαστού του *Prunus* GF655/2' που δέχονται υπέρυθρο φως απαιτούν αυξίνη για το σχηματισμό ριζών. Εάν αυτά τα μικρομοσχεύματα δεχτούν κόκκινο φως, δεν απαιτείται αυξίνη.

### **1.5 Πλεονεκτήματα-Μειονεκτήματα**

Ο πολλαπλασιασμός με τη μέθοδο της ιστοκαλλιέργειας όπως και ο πολλαπλασιασμός με μοσχεύματα, παράγει νέα φυτά που ανήκουν στο ίδιο κλώνο τόσο μεταξύ τους όσο και με το μητρικό φυτό, εφ' όσον έχουν πανομοιότυπη γενετική σύσταση.

Το ενδιαφέρον με αυτή την τεχνική είναι ότι η μεταφορά ασθενειών από το μητρικό φυτό στους απογόνους μπορεί να αποφευχθεί. Εξωτερικά παθογόνα, όπως μύκητες, βακτήρια, σπόρια, αλλά και άλλα έντομα, απομακρύνονται με την απολύμανση του εκφύτου, ενώ εσωτερικά παθογόνα όπως οι ιοί, μπορούν να απομονωθούν, χρησιμοποιώντας ως έκφυτο στην ιστοκαλλιέργεια το ακραίο μερίστωμα, δηλαδή τον αδιαφοροποίητο ιστό στον

οφθαλμό κορυφής του βλαστού. Το ακραίο μερίστωμα είναι συνήθως απαλλαγμένο ιών σε φυτά που έχουν προσβληθεί από ιούς λόγω του ότι αυτά τα μεριστωματικά κύτταρα δεν έχουν ακόμα συνδεθεί με το αγγειακό σύστημα του φυτού ή προκαλούνται να αναπτυχθούν γρηγορότερα από το ιό (θερμοθεραπεία) (Ελευθερίου, 1994).

Ερωτηματικά προκύπτουν σχετικά με τη γενετική σταθερότητα των φυτών που παράγονται με τη μέθοδο της ιστοκαλλιέργειας. Ενώ χιλιάδες φυτά μπορεί να παραχθούν συγχρόνως, πιθανά ελαττωματικά χαρακτηριστικά -π.χ. λόγω χημικής ανισορροπίας ή μετάλλαξης- εμφανίζονται μόνο μετά τη φύτευση στον αγρό ή το θερμοκήπιο. Αν και στην πράξη οι περισσότερες καλλιέργειες παραμένουν σταθερές και υγιείς, υπάρχουν μερικά είδη που είναι πιο επιρρεπή στις μεταλλάξεις σε σχέση με τα υπόλοιπα. Καλλιέργειες κυττάρων ή κάλλων είναι συνήθως γενετικά περισσότερο ασταθείς σε σχέση με έκφυτα που προέρχονται από τμήμα βλαστού ή άλλων φυτικών οργάνων. Στις περιπτώσεις των ειδών που παθαίνουν σχετικά εύκολα μεταλλάξεις, η εμπειρία επιβάλλει τη χρησιμοποίηση πολλών εκφύτων, τον περιορισμό των υπο-καλλιεργειών αυτών και τη χρησιμοποίηση νέου υλικού κάθε χρονιά.

Πιθανόν, ένα από τα δύσκολα προβλήματα, που επηρεάζουν την αρχική εγκατάσταση των καλλιεργειών των ξυλωδών φυτών, είναι το φαινόμενο του μαυρίσματος των εκφύτων, που οδηγεί στο θάνατο τους. Αυτό, συνήθως, οφείλεται σε φαινορικά συστατικά, που παράγονται από τους ιστούς, λόγω πρόκλησης ζημιάς, από την επιφανειακή απολύμανση τους ή κατά τη διάρκεια της διαδικασίας προετοιμασίας τους, λόγω των διενεργούμενων τομών. Αρκετές αντιοξειδωτικές ουσίες, όπως είναι η κυστεΐνη, το κιτρικό οξύ, το ασκορβικό οξύ, η τυροσίνη, το DTT (dithiothreitol), το PVP (polyvinylpyrrolidone) και ο ενεργός άνθρακας, χρησιμοποιούνται για να περιορίσουν το φαινόμενο του μαυρίσματος των εκφύτων. Συνήθως χρησιμοποιείται αντιοξειδωτικό μίγμα, που περιέχει  $150 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  κιτρικό οξύ και  $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  ασκορβικό οξύ. Το διάλυμα αποστειρώνεται με ειδικό φίλτρο, και στη συνέχεια τα μικρομοσχεύματα εμβαπτίζονται στο διάλυμα για 5-30 λεπτά της ώρας. Το διάλυμα πρέπει να παρασκευάζεται αμέσως πριν την εμβάπτιση των εκφύτων. Επίσης, συνιστάται η χρησιμοποίηση μιας σύντομης προκαλλιεργητικής περιόδου σε κινούμενο υγρό υπόστρωμα, αλλά μέχρι στιγμής δεν έχει βρεθεί κάποια ικανοποιητική λύση στην αντιμετώπιση του

προβλήματος αυτού, αν και ο περιορισμός της περιόδου εμβαπτίσεως στα επιφανειακά απολυμαντικά, σε συνδυασμό με ένα γρήγορο ξέπλυμα των τομών, μπορεί να βοηθήσει στη μείωση του προβλήματος.

Η ιστοκαλλιέργεια χρησιμοποιείται για αρκετούς λόγους, λύνοντας μια σειρά από προβλήματα που συνοδεύουν τον πολλαπλασιασμό με σπόρο ή μοσχεύματα. Μερικά από τα προβλήματα που λύνει η ιστοκαλλιέργεια είναι:

1. Η ανομοιομορφία των φυτών που παράγονται με σπόρο.
2. Η παραγωγή από σπόρο φυτών μη χαρακτηριστικών της ποικιλίας.
3. Το μεγάλο χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μέχρι ο σπόρος να μεγαλώσει και να δώσει ώριμο φυτό.
4. Η δυσκολία χειρισμού σπόρων.
5. Η μη διαθεσιμότητα των σπόρων.
6. Η αργή ανάπτυξη των μοσχευμάτων.
7. Το μικρό ποσοστό επιβίωσης των μοσχευμάτων.
8. Η μεγάλη φροντίδα που απαιτούν τα μοσχεύματα.
9. Η μεγάλη ευαισθησία των μοσχευμάτων στις ασθένειες.
10. Ο περιορισμένος αριθμός μοσχευμάτων που μπορούν να ληφθούν από ένα μητρικό φυτό, γιατί μπορεί να υπάρχει μόνο ένα υβρίδιο, μόνο ένα φυτό απαλλαγμένο ιώσεων ή μόνο μία επιθυμητή μετάλλαξη.
11. Η απαίτηση ύπαρξης μεγάλου χώρου για αρκετά μητρικά φυτά, από τα οποία θα πάρουμε τα μοσχεύματα.
12. Το μεγάλο κόστος για τη διατήρηση των μητρικών φυτών.

Η ιστοκαλλιέργεια είναι συχνά ο μόνος πρακτικός τρόπος για την παραγωγή μεγάλου αριθμού φυτών. Αναφέρεται, χαρακτηριστικά, ότι για τα ξυλώδη φυτά αρκούν 8-12 εβδομάδες για να παραχθούν εκατοντάδες βλαστοί από μία και μόνο αρχική κορυφή (Lineberger, 2003).

Στην περίπτωση που είναι διαθέσιμη μεγάλη ποσότητα σπόρων ή είναι εύκολος ο πολλαπλασιασμός των φυτών με μοσχεύματα, τότε η ιστοκαλλιέργεια ίσως να μην είναι ο πλέον ενδεδειγμένος τρόπος πολλαπλασιασμού, λόγω του αυξημένου κόστους παραγωγής, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις που απαιτούνται να δημιουργηθούν λίγα νέα φυτά.

Πολλή συχνά σπαταλάται χρόνος και χώρος για μη παραγωγικούς σπόρους ή για μοσχεύματα που δε θα δώσουν φυτά. Παράλληλα ένας μεγάλος αριθμός νεαρών φυτών χάνονται από προσβολές εχθρών, ασθενειών

αλλά και από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Τα έκφυτα της ιστοκαλλιέργειας δε θα υποστούν τέτοιες προσβολές εξ' αιτίας του αποστειρωμένου περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκονται αλλά και γιατί δεν θα εκτεθούν στις ακραίες συνθήκες του περιβάλλοντος (υπερβολική ζέστη, κρύο, υπερβολική υγρασία, ξηρασία κ.λ.π.) λόγω των ελεγχόμενων συνθηκών στο εργαστήριο και τους χώρους παραγωγής τους. Επίσης, το φυτικό υλικό που χρησιμοποιείται για την παραγωγή εκφύτων στην ιστοκαλλιέργεια είναι στην καλύτερη δυνατή υγιεινή κατάσταση, παράγοντας που διασφαλίζει στη συνέχεια την καλή υγεία των φυτών που θα προκύψουν.

Οι περισσότεροι σπόροι και τα μοσχεύματα που αναπτύσσονται σε φυτώρια, για να αναπτυχθούν πρέπει να βρίσκονται στην κατάλληλη εποχή. Αντίθετα η παραγωγή φυτικού υλικού με ιστοκαλλιέργεια μπορεί να γίνει οποιαδήποτε περίοδο του χρόνου ανεξάρτητα από τις καιρικές συνθήκες.

Κάνοντας χρήση των συμβατικών μεθόδων πολλαπλασιασμού των φυτών, ένας σπόρος δίνει πάντα ένα φυτό. Αντίθετα, ένα έκφυτο (κομμάτι βλαστού, φύλλου, ρίζας, οφθαλμού, σπόρου, μερίστωμα ή ακόμα ένα κύτταρο ή ένας πρωτοπλάστης) μπορεί να παράγει έναν τεράστιο αριθμό νέων φυτών. Σαν συνέπεια, απαιτούνται λίγα μητρικά φυτά που θα δώσουν τα έκφυτα τα οποία με τη σειρά τους θα παράγουν χιλιάδες νέα φυτά.

Στα θερμοκήπια μοσχεύματα μπορεί να χρειάζονται μήνες για να ριζοβολήσουν. Με την ιστοκαλλιέργεια τα φυτά ριζοβολούν συντομότερα και σε πολύ μικρότερο χρονικό διάστημα παράγονται τα νέα φυτά που είναι έτοιμα να βγουν στο εμπόριο.

Με την παραγωγή φυτών με ιστοκαλλιέργεια αποφεύγεται η καθημερινή φροντίδα που απαιτείται για τους σπόρους και τα μοσχεύματα. Συνήθως απαιτείται ο διαχωρισμός των φυτών και η μεταφορά τους σε νέο καλλιεργητικό μέσο (θρεπτικό υπόστρωμα) κάθε δύο έως έξι εβδομάδες και ενδιάμεσα από αυτό το χρονικό διάστημα δεν απαιτείται άρδευση ή κάποια άλλη φροντίδα.

Η διαδικασία της ιστοκαλλιέργειας είναι ιδιαίτερα απλή σε φυτά όπως η καλαγχόη (*Kalanchoe*), η *Nephtrolepis*, οι αφρικανικές βιολέτες (*Saintpaulia*) και η μπιγκόνια (*Begonia*). Στην πολυπλοκότητα ακολουθούν τα γαρύφαλλα (*Dianthus*), η φράουλα (*Fragaria*) και το *Syngonium*.

Στον Πίνακα 1.3, που ακολουθεί, παρουσιάζονται οι διάφοροι τύποι της ιστοκαλλιέργειας καθώς και ο λόγος για τον οποίο κάθε μια από αυτές εφαρμόζεται.

**Πίνακας 1.3. Οι διάφοροι τύποι της ιστοκαλλιέργειας και ο λόγος για τον οποίο εφαρμόζονται.**

---

<b><u>Τύπος ιστοκαλλιέργειας</u></b>	<b><u>Σκοπός εφαρμογής</u></b>
Καλλιέργεια εμβρύων	<ul style="list-style-type: none"><li>-Συντόμευση του κύκλου βελτίωσης</li><li>-Παρεμπόδιση της αποβολής του εμβρύου</li><li>-Παράκαμψη της ασυμβατότητας</li><li>-Παραγωγή απλοειδών</li><li>-Σαν πηγή για την δημιουργία κάλλου</li></ul>
Καλλιέργεια σπόρου ορχιδέας	<ul style="list-style-type: none"><li>-Μαζική παραγωγή φυτών για γλάστρα ή δρεπτό άνθος</li></ul>
Καλλιέργεια μεριστώματος	<ul style="list-style-type: none"><li>-Εξάλειψη παθογόνων (ιοί, μύκητες βακτήρια)</li><li>-Βλαστική αναπαραγωγή των ορχιδέων μέσω βολβιδίων</li><li>-Κλωνοποίηση φυτών εκτός των ορχιδέων</li><li>-Πιστοποίηση φυτοϋγείας</li><li>-Συλλογή και διατήρηση γενετικού υλικού (κρυοδιατήρηση)</li></ul>
Καλλιέργεια κορυφής βλαστού και μικρο- μοσχευμάτων ενός κόμβου	<ul style="list-style-type: none"><li>-Πολλαπλασιασμός των περισσότερων φυτών</li></ul>
Καλλιέργεια εκφύτων χωρίς προϋπάρχοντες οφθαλμούς	<ul style="list-style-type: none"><li>-Οργανογένεση</li><li>-Απόκτηση φυτών απαλλαγμένων από ασθένειες</li></ul>

	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Δημιουργία μεταλλάξεων (βελτίωση μέσω μεταλλάξεων)</li> <li>-Απομόνωση των μεταλλάξεων</li> <li>-Παραγωγή πολυπλοειδών</li> </ul>
Καλλιέργεια κάλλων, αιωρη- μάτων και ενός κυττάρου	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Κλωνοποίηση φυτών μέσω σχηματισμού οργάνων και εμβρύων</li> <li>-Δημιουργία γενετικού υλικού με τροποποιημένο DNA</li> <li>-Απόκτηση φυτών απαλλαγμένων από ασθένειες</li> <li>-Ως πηγή παραγωγής πρωτοπλαστών</li> <li>-Υλικό εκκίνησης για κρυοδιατήρηση</li> <li>-Παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών</li> </ul>
Καλλιέργεια ανθήρων και μικροσπορίων	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Παραγωγή απλοειδών για τη δημιουργία ομοζύγων</li> <li>-Ως υλικό εκκίνησης για τη δημιουργία μεταλλάξεων</li> <li>-Δημιουργία άρρενων φυτών</li> <li>-Ως εργαλείο σε γενετικούς χειρισμούς</li> <li>-Για βελτίωση σε χαμηλότερα επίπεδα πλοειδίας</li> </ul>
Καλλιέργεια ωαρίων και αποκομμένων ανθέων	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Παράκαμψη της ασυμβατότητας</li> <li>-Παρεμπόδιση πρόωρης αποβολής των ανθέων</li> <li>-Επίτευξη γονιμοποίησης μέσα σε δοκιμαστικούς σωλήνες</li> </ul>
Καλλιέργεια πρωτοπλαστών	<ul style="list-style-type: none"> <li>-Σωματικός υβριδισμός</li> <li>-Δημιουργία κυττοπλασμικών υβριδίων (cybrids)</li> <li>-Μεταφορά πυρήνων, τμημάτων ή</li> </ul>

ολόκληρων χρωμοσώμων και οργανιδίων  
-Μελέτες γενετικών τροποποιήσεων

Καλλιέργεια πρωτοπλάστων,  
κυττάρων, ιστών και  
οργάνων

**Ως εργαλείο στην φυτοπαθολογία**

- Είσοδος ιών και πολλαπλασιασμός τους
- Καλλιέργεια υποχρεωτικών παρασίτων
- Αλληλεπιδράσεις ξενιστή-παθογόνου
- Καλλιέργεια νηματωδών σε καλλιέργειες ριζών
- Έλεγχος φυτοτοξινών
- Μελέτες σχηματισμού ογκιδίων

**Ως εργαλείο στη φυσιολογία**

- Μελέτες των κύκλων στα κύτταρα
- Μεταβολισμός
- Μελέτες θρέψης
- Μελέτες μορφογενετικές και ανάπτυξης

---

(Πηγή Pierik, 1997)



## 2. ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΜΕΝΑ ΣΤΗΝ ΙΣΤΟΚΑΛΙΕΡΓΕΙΑ

Τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται στην ιστοκαλλιέργεια παρουσιάζονται στον Πίνακα 2.

**ΠΙΝΑΚΑΣ 2. ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΟΥΝΤΑΙ ΣΤΗΝ ΙΣΤΟΚΑΛΙΕΡΓΕΙΑ. ΟΙ ΣΥΚΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΕΙΝΑΙ ΣΕ mg·L<sup>-1</sup>.**

	1	Anterson(1978)	400	
	2	Gamborg et al (1976)	-	134
	3	Gautheret (1942)	-	-
	4	Heller (1942)	-	125
	5	Hildebrandt,Riker&Duggar (1946)	-	-
	6	Hoagland (1950)	-	115
	7	Knop (1865)	-	-
	8	Knudson (1946)	-	500
	9	Linsmaier&Skoog (1965)	1650	-
	10	Lloyd&McCown(1980)	400	-
	11	Morel & Muller(1946)	-	1000
	12	Murashige&Skoog (1942) (MS)	1650	-
	13	Nitch&Nitch (1969)	720	-
	14	Schenk&Hildebrandt(1972)	-	300
	15	Vacin&Went(1949)	-	500
	16	White(1963)	-	-
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>				
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>				
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>				



	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	6,2	3,0	0,05	1,0	3,0	2,86	-	-	6,2	6,2	-	6,2	10	5,0	-	1,5
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	440	150	-	75	-	-	-	-	400	96	-	440	166	200	-	-
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	-	-	500	-	800	950	500	1000	-	556	500	-	-	-	-	300
							800									
Ca <sub>10</sub> (PO <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> (OH) <sub>2</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	200	-
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,050	-	-	-	-	-	0,025	-	-	0,025	-	0,1	-	-
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0,025	0,025	0,05	0,03	-	-	-	-	0,025	0,025	-	0,025	0,025	0,2	-	-
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	370	250	125	250	720	250	125	250	370	370	125	370	185	400	250	720
							-									
MnCl <sub>2</sub> ·4H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	-	1,81	-	-	-	-	-	-	-	-	-	7,0

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	16,9	10	3,0	-	-	-	-	-	-	22,3	-	16,9	-	10	-	-
MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	-	-	-	0,1	4,5	-	-	7,5	22,3	-	-	-	25	-	7,5	-
KCl	-	-	-	750	130	-	-	-	-	-	1000	-	-	-	-	65
KI	-	0,75	0,5	0,1	0,375	-	-	-	0,33	-	-	0,83	-	1,0	-	0,75
KNO <sub>3</sub>	480	2500	125	-	160	607	125	-	1900	-	-	1900	950	2500	525	80
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	125	-	-	-	125	250	170	170	125	170	68	-	250	-
K <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	990	-	-	-	-	-	-
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2 H <sub>2</sub> O	0,25	0,25	-	-	-	-	-	-	0,25	0,025	-	0,25	0,25	0,1	-	-
NaNO <sub>3</sub>	-	-	600	600	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	380	150	125	125	132	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16,5
$\text{Na}_2\text{SO}_4$	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	200
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8,6	2,0	0,18	1,0	3,0	-	-	-	8,6	8,6	-	8,6	10	1,0	-	3,0
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$	-	-	-	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,5
$\text{Fe}_2(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6)_3$	-	-	-	-	5,0	-	-	-	-	-	-	-	-	-	28	-
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	55,7	27,8	-	-	-	5,0	-	25	2,8	27,8	-	27,8	27,8	15	-	-
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	74,5	37,3	-	-	-	-	-	-	37,3	37,3	-	37,3	37,3	20	-	-
Θειική αδενίνη	80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d-Biotίνη	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0,05	-	-	-
Ινουλινόλη	100	100	-	-	-	-	-	-	100	100	-	100	100	1000	-	-
Νικοτινικό οξύ	-	1,0	-	-	-	-	-	-	-	0,5	-	0,5	5,0	5,0	-	0,5

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
Ποριδοξίνη	-	1,0	-	-	-	-	-	-	-	0,5	-	0,5	0,5	0,5	-	0,1
Θεαμίνη	0,4	10	-	-	-	-	-	-	-	1,0	-	0,4	0,5	5,0	-	0,1
ZiP	5,0	-	-	-	-	-	-	-	-	1,0	-	-	-	-	-	-
IAA	1,0	-	-	-	-	-	-	-	1,3	-	-	1,3	0,1	-	-	-
Kiverίνη	-	-	-	-	-	-	-	-	0,001	-	-	0,04	-	-	-	-
Γλυσίνη	-	-	-	-	-	-	-	-	-10	2,0	-	-10	2,0	-	-	3,0
Σακχαρόζη	$3 \cdot 10^4$	$3 \cdot 10^4$	-	-	-	-	-	-	$3 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^4$	-	$3 \cdot 10^4$	$2 \cdot 10^4$	-	-	$2 \cdot 10^4$
Άγαρ	6000	-	-	-	-	-	-	-	$10^4$	6000	-	8000	8000	-	-	-

(Πηγή: Kyte & Doolittle, 1996).

### **3. Μεθοδολογία ιστοκαλλιέργειας αμπέλου**

#### **3.1 Γενικά**

Η ιστοκαλλιέργεια ως μέθοδος πολλαπλασιασμού έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε πολλά είδη αμπέλου, υβρίδια και καλλιεργούμενες ποικιλίες (Gray & Fisher, 1985, Gray & Klein, 1989), με ή χωρίς την προσθήκη φυτορρυθμιστικών ουσιών στο θρεπτικό μέσο (Galzy, 1969, 1977, Galzy et al., 1990, Goussard, 1982, Chee & Pool, 1983, Roubelakis-Agelakis & Zinanovits, 1991, Jona & Webb, 1978, Grenan, 1977). Ο πολλαπλασιασμός της αμπέλου με ιστοκαλλιέργεια είναι απαραίτητη τεχνική όταν απαιτείται παραγωγή μεγάλου αριθμού φυτών (Barlass & Skene, 1978, Chee & Pool, 1983., 1984, Gray & Klein, 1987) ή είναι άμεση προτεραιότητα η παραγωγή φυτών απαλλαγμένων από ιώσεις (Barlass et al., 1982, Gifford & Hewitt, 1961, Hoefler & Gifford, 1964, Bini, 1976, Robacker & Chang, 1992). Γενότυποι υποκειμένων ή ποικιλιών που εξυγιάνθηκαν με τη μέθοδο αυτή χορηγήθηκαν μετά από έγκριση στα φυτώρια για περαιτέρω πολλαπλασιασμό (Galzy, 1964, Deloire et al., 1995). Για την παραγωγή φυτών αμπέλου με τη μέθοδο της ιστοκαλλιέργειας έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα είδη εκφύτων όπως μεριστώματα (Chee & Pool, 1983, Gray & Benton, 1991, Huang et al., 1990, Cholvadova, 1989, Minas, 2002, Κανάκης και Σταυρακάκης, 1998-9), βλαστικές κορυφές (Barlass & Skene, 1978, 1980a,b, Rui & Eaton, 1984, Martinez & Tizio, 1989, Σταυρακάκης και Κανάκης, 1997) μικροσχεύματα ενός κόμβου (Norton & Skirvin, 2001, Lee & Wetzstein, 1990, Novak & Junova, 1982/83, Roubelakis-Angelakis & Zinanovits, 1991), τμήματα ή ολόκληρα φύλλα (Roubelakis-Angelakis, K. A. and Katsirdakis, K.C. 1990, Συμινής κ.α., 1998/9, Das et al., 2002), σωματικά κύτταρα (Mullins and Srinivasan, 1976), ωοθήκες (Nakagawa et al., 1983) κλπ.

Μία μεθοδολογία περιλαμβάνει τη χρήση του ακραίου μεριστώματος. Έκφυτα μήκους 2mm λαμβάνονται από φυτά που βρίσκονται σε αμπελώνες ή από stock υλικό που ήδη πολλαπλασιάζεται με ιστοκαλλιέργεια και πρακτικά απαλλαγμένο από ιώσεις. Από τα φυτά που είναι ήδη απαλλαγμένα από ιώσεις συνιστάται να λαμβάνονται μεγαλύτερα σε μέγεθος έκφυτα έτσι ώστε να είναι γρηγορότερη η παραγωγή νέων φυταρίων. Αξίζει να σημειωθεί ότι με

τις συμβατικές μεθοδολογίες η εξάλειψη των ιώσεων από φυτά αμπέλου είναι εξαιρετικά χρονοβόρα και κοστοβόρα διαδικασία. Απαιτούνται αρκετά χρόνια για περαιτέρω πολλαπλασιασμό και παραγωγή λίγων εκατοντάδων φυτών από ένα υγιές ή δύο χρόνια για την παραγωγή έτοιμων φυτών στο χωράφι με εμβολιασμό. Σε αντίθεση, εκατοντάδες φυτά προερχόμενα από ιστοκαλλιέργεια μπορούν να φυτευτούν στο χωράφι μέσα σε ένα χρόνο είτε αυτόριζα είτε εμβολιασμένα σε άλλο υποκείμενο.

Αν και οι προοπτικές είναι ευσύνετες για την ιστοκαλλιέργεια της αμπέλου, το γένος *Vitis* παραμένει δύσκολο στον χειρισμό του εξαιτίας των συχνών αλλαγών που πρέπει να πραγματοποιούνται κατά τη διαδικασία του πολλαπλασιασμού. Οι συχνές μεταφορές του φυτικού υλικού από δοχείο σε δοχείο, με σύνηθες ενδιάμεσο χρονικό διάστημα αυτό των δύο εβδομάδων, η προσοχή στη λεπτομέρεια και η προσεκτική παρατήρηση του φυταρίου κατά την ανάπτυξη του είναι μεγάλης σπουδαιότητας γι' αυτό το φυτό.

Στην περίπτωση που το φυτικό υλικό είναι απαλλαγμένο από ιώσεις τα έκφυτα που χρησιμοποιούνται είναι κορυφές βλαστών με τρεις κόμβους. Οι διαδικασίες που πρέπει να ακολουθηθούν είναι οι εξής: κόβονται τα κορυφαία τμήματα μήκους 5 cm από κάθε βλαστό. Τα φύλλα που είναι εκπτυγμένα αφαιρούνται. Ακολουθεί ανάδευση των κομματιών σε διάλυμα αλκοόλης 70% για ένα λεπτό ή σε 7% χλωρίνη συν 0,1% Tween για 20 λεπτά. Ξεπλένονται τα κομμάτια αυτά του βλαστού 4 φορές σε αποστειρωμένο και απεσταγμένο νερό. Στη συνέχεια κόβονται οι κορυφές κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να είναι τρεις κόμβοι σε κάθε κορυφή. Τα έκφυτα που δημιουργούνται τοποθετούνται σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα με άγαρ.

Τα ψηλά γυάλινα δοχεία είναι προτιμότερα από τα κοντύτερα προκειμένου τα έκφυτα να έχουν αρκετό χώρο στη διάθεσή τους. Τα νέα φυτά που δημιουργούνται μπορεί από το στάδιο II (πολλαπλασιασμός) να περάσουν κατευθείαν *ex vitro* για ριζοβόληση, αλλά η διαδικασία είναι συντομότερη, αν διανύσουν στις γυάλες και το στάδιο III (ριζοβόληση). Για το στάδιο IV (εγκλιματισμός) χρησιμοποιείται τύρφη/ βερμικουλίτης σε ανάμιξη (1/4) ή περλίτης. Σε κάθε περίπτωση τα φυτάρινα ποτίζονται με το υπόστρωμα του σταδίου III χωρίς σακχαρόζη (Πίνακας 3.1). Τοποθετούνται σε συνθήκες υψηλής υγρασίας για 3 εβδομάδες και στη συνέχεια η υδρονέφωση

διακόπτεται σταδιακά για κάποια χρονικά διαστήματα με στόχο τη σταδιακή μείωση της υγρασίας και τον εγκλιματισμό.

Ο απαραίτητος φωτισμός είναι 300 κηρία από φθορίζοντες λαμπτήρες με φωτοπερίοδο 16 ώρες φως ανά 8 ώρες σκοτάδι. Προτιμώμενη θερμοκρασία είναι αυτή των 23-30° C.

Οι σχετικές παραπομπές είναι οι εξής: Barlass & Skene, 1978, Chee et al., 1984, Harris & Stevenson, 1982, Krul & Myerson, 1980, Monette, 1983, Murashige, 1974, Murashige & Skoog, 1962, Smith et al., 1992, Li & Eaton, 1984).

**Πίνακας 3.1. Υπόστρωμα για την ιστοκαλλιέργεια αμπέλου.**

	Στάδιο I	Στάδιο II	Στάδιο III
Συστατικά	mg*L <sup>-1</sup>		
Άλατα του MS	3.471	3.471	3.471
Sodium phosphate	-	170	150
Adenine sulfate	-	80	-
Inositol	100	100	25
Thiamine HCL	0,4	0,4	0,4
IAA	-	-	0,1
BA	0,1	2,0	-
Sucrose	30.000	30.000	10.000
Agar	500	500	500
Gelrite	1.000	2.000	1.000
pH	-	-	-

## **3.2 .Υποκείμενα της αμπέλου**

### **3.2.1. Γενικά**

Η χρησιμοποίηση των υποκειμένων προέκυψε σαν ανάγκη για την αντιμετώπιση της ριζόβιας μορφής της φυλλοξήρας της αμπέλου. Γι' αυτόν το σκοπό χρησιμοποιήθηκαν διάφορα αμερικάνικα είδη του γένους *Vitis* εκ των οποίων τα τρία βασικά είναι τα *V. rupestris*, *V. riparia* και *V. berlandieri*. Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν τα *V. riparia* και *V. rupestris* τα οποία όμως παρουσίασαν πρόβλημα προσαρμογής στα ασβεστούχα εδάφη. Για τη λύση αυτού του προβλήματος εισήχθηκε το *V. berlandieri* και δημιουργήθηκαν υβρίδια με αυτό, τα οποία αντέχουν σε διάφορες περιεκτικότητες σε ανθρακικό ασβέστιο του εδάφους. Επιπλέον από την ανθεκτικότητα στο ανθρακικό ασβέστιο, τα υποκείμενα που χρησιμοποιούμε στον εμβολιασμό της αμπέλου πρέπει να πληρούν και τις ακόλουθες συνθήκες:

- 1) Να έχουν καλή συγγένεια με το μόσχευμα-εμβόλιο.
- 2) Να δίνουν ικανοποιητική ευρωστία έτσι ώστε να εξασφαλίζεται καλή καρποφορία του μοσχεύματος-εμβολίου.
- 3) Να έχουν αντοχή στην ξηρασία.
- 4) Να έχουν αντοχή στους νηματώδεις, άλατα κ.τ.λ.

### **3.2.2. Κυριότερα υποκείμενα**

Τα υποκείμενα τα οποία ικανοποιούν τις παραπάνω συνθήκες και χρησιμοποιούνται περισσότερο στην ελληνική παραγωγή (όλα υβρίδια του *V. berlandieri*) είναι τα εξής:

- 1) Το 110R (*V. berlandieri* x *V. rupestris*), το οποίο προσαρμόζεται καλά σε όλα σχεδόν τα εδάφη εκτός από τα πολύ αμμουδερά, τα υγρά και σε όσα το ενεργό ανθρακικό ασβέστιο είναι πάνω από 17% (περισσότερες λεπτομέρειες γι' αυτό το υποκείμενο θα δοθούν παρακάτω).
- 2) Το υποκείμενο 41B (*V. vinifera* x *V. berlandieri*), το οποίο αντέχει μέχρι και σε 40% ενεργό ανθρακικό ασβέστιο. Έτσι, μπορεί να χρησιμοποιηθεί με μεγάλη επιτυχία στα εδάφη στα οποία δε μπορεί να προσαρμοστεί το 110R, δηλαδή σε αυτά που έχουν μεγάλη περιεκτικότητα σε ανθρακικό ασβέστιο. Απαιτεί αυξημένη υγρασία στο έδαφος και θα πρέπει να ποτίζεται τουλάχιστον στην αρχή.



- 3) Το 140 Ruggeri (*V. berlandieri* x *V. rupestris*). Αντέχει θαυμάσια σε εδάφη με αρκετό ασβέστιο (μέχρι 32% ενεργό ασβέστιο) και πολύ ξηρά, τέτοια που έχουμε άφθονα στη χώρα μας.
- 4) Το 1103 Paulsen (*V. berlandieri* x *V. rupestris*). Αντέχει σε ενεργό ανθρακικό ασβέστιο μέχρι 18-20%. Παρουσιάζει παρόμοιες ιδιότητες με το 110R.
- 5) Το 420A (*V. berlandieri* x *V. riparia*). Αντέχει περισσότερο στο ανθρακικό ασβέστιο από το 110R (μέχρι 20% ενεργό ασβέστιο), αλλά δεν είναι τόσο ανθεκτικό στην ξηρασία (δεν χρησιμοποιείται στην Ελλάδα).
- 6) Το υποκείμενο SO4 (*V. berlandieri* x *V. riparia*) το οποίο αντέχει σε 18% περίπου ανθρακικό ασβέστιο. Χρησιμοποιείται ευρύτατα στη Γαλλία και τη Γερμανία, γιατί αντέχει σε όλους τους τύπους εδάφους εφόσον έχουν αρκετή υγρασία. Στην χώρα μας φαίνεται ότι ταιριάζει πολύ καλά σε ελαφρά αμμουδερά παραθαλάσσια εδάφη με αρκετή υγρασία (Σταύρακας, 1997, Κούσουλας, 2002, Βαγιανού, 1983).

### **3.2.3. Το υποκείμενο 110R**

Ανήκει στην ομάδα *berlandieri* x *rupestris*. Δημιουργήθηκε στη Γαλλία το 1889 από τον Richter με υβριδισμό των ποικιλιών *Berlandieri Resseguier No2* \* *Rupestris Martin*. Η κορυφή του νεαρού βλαστού είναι ανοιχτή, αραχνουφή, πρασινέρυθρη με κόκκινη παρυφή. Τα νεαρά φύλλα είναι γυαλιστερά, ορειχαλκόχροα, με αραιό μεταξώδες χνούδι στις νευρώσεις της κάτω επιφάνειας. Ο βλαστός είναι πωώδης και λείος, σκοτεινός ερυθροιώδης από τη μία πλευρά. Η τομή του είναι πεπλατυσμένη.

Το αναπτυσσόμενο φύλλο είναι μικρού ως μεσαίου μεγέθους, έχει μεγαλύτερο πλάτος από μήκος (νευρόσχημο), έλασμα αναδιπλωμένο, λείο, με την ανώτερη επιφάνεια βαθυπράσινου χρωματισμού και γυαλιστερή. Η κατώτερη επιφάνεια είναι ανοιχτού πράσινου χρώματος. Οι κύριες νευρώσεις είναι ερυθρωπές στη βάση της πάνω επιφάνειας. Τα δόντια του φύλλου είναι κανονικά, με πλευρές σχεδόν ευθείες και ο μισχικός κόλπος σε σχήμα U πολύ ανοιχτό.

Το άνθος είναι αρσενικό. Οι έλικες δισχιδείς και ερυθριώδεις. Η κληματίδα είναι μέτριου μήκους και πάχους, διακλαδιζόμενη, κόκκινου τεφρού χρωματισμού. Τα μεσογονάτια είναι κοντά. Η τομή της κληματίδας είναι ελλειπτική. Φέρει κόμπους και οφθαλμούς μικρού μεγέθους.

Είναι υποκείμενο πολύ ζυγηρό (λιγότερο από 1103P και 140Ru) με διάρκεια βλαστικού κύκλου μεγάλη. Αντέχει ικανοποιητικά στη ριζόβια μορφή της φυλλοξήρας και στις κρυπτογαμμικές ασθένειες. Παρουσιάζει μέτρια αντοχή στους νηματώδεις. Είναι ευαίσθητο στα άλατα του εδάφους, ενώ αντέχει ικανοποιητικά στην ξηρασία. Είναι κατάλληλο για εδάφη αργιλλασβεστώδη, ξηρά, φτωχά σε περιοχές με νότιο προσανατολισμό. Στη χλώρωση αντέχει μέχρι ποσοστού 50% ολικού ανθρακικού ασβεστίου (17% ενεργού).

Συμβιώνει καλά με τις ποικιλίες ευρωπαϊκής αμπέλου (έχει παρατηρηθεί ασυμφωνία μόνο με το Syrah) και είναι κατάλληλο για ποικιλίες κυρίως οινοποιήσιμες πρώιμες-μεσοπρώιμες.

Στον επιτραπέζιο εμβολιασμό παρουσιάζει χαμηλά ποσοστά επιτυχίας, ενώ στον επιτόπιο πετυχαίνει καλά (κύρια χρήση). Η ριζοβολία των μοσχευμάτων του είναι αρκετά καλή (μ.ο 55%). Στις μητρικές φυτείες παράγει κατά μέσο όρο 12000 μοσχεύματα ανά στρέμμα (εμβολιάσιμα και ριζοβόλησης).

Χρησιμοποιήθηκε, μετά τη φυλλοξήρα, στις αναμπελώσεις διαφόρων περιοχών (Αττικής, Πελοποννήσου, Εύβοιας, νησιών). Στις μητρικές φυτείες των κρατικών και ιδιωτικών φυτωρίων κατέχει την πρώτη θέση καθώς είναι μέχρι σήμερα το υποκείμενο με τη μεγαλύτερη διάδοση (Βλάχος, 1991). Τα τελευταία χρόνια όμως υποχωρεί η χρησιμοποίησή του υπέρ του 1103P, γιατί το 1103P είναι καλύτερο στον επιτραπέζιο εμβολιασμό.

## **4. Υλικά και μέθοδοι**

### **4.1 Τα φυτά**

Τα φυτά αμπέλου που χρησιμοποιήθηκαν ως υλικό εκκίνησης για τη διεξαγωγή της παρούσας εργασίας ήταν υποκείμενα 110R. Από εύρωστες κληματίδες των φυτών αυτών αφαιρέθηκαν νεαροί βλαστοί, οι οποίοι και χρησιμοποιήθηκαν για την εγκατάσταση, με τη διαδικασία που περιγράφεται στη σχετική παράγραφο. Τα φυτά αυτά προήλθαν από τη ριζοβόληση κληματίδων οι οποίες είχαν πρωτίτερα ελεγχθεί μακροσκοπικά και εργαστηριακά για μυκητολογικές ασθένειες, αλλά και ιούς με τη μέθοδο ELISA. Τα φυτά διατηρούνταν σε ειδικό θάλαμο απομονωμένο, χωρίς παράθυρα και με τεχνητό φωτισμό ώστε να μην έρχονται σε επαφή με το περιβάλλον και έντομα και να εξασφαλίζεται η φυτοϋγεία τους.

### **4.2 Ο θάλαμος ανάπτυξης**

Στο θάλαμο ανάπτυξης τα στατό με τους δοκιμαστικούς σωλήνες τοποθετήθηκαν σε μεταλλικά ράφια πλάτους 40cm. Κάθε ράφι φωτιζόταν με 4 λάμπες φθορισμού Philips τύπου TLD 36W/33, οι οποίες βρίσκονταν σε απόσταση 50cm από την επιφάνεια του ραφιού, τοποθετημένες κατά τέτοιο τρόπο ώστε να βρίσκονται στοιχισμένες ως προς το κέντρο του πλάτους του ραφιού (Εικόνα 4.1).

Η εφαρμοζόμενη φωτοπερίοδος ήταν 16 ώρες φως και 8 ώρες σκοτάδι. Η θερμοκρασία διατηρούνταν σταθερή στους 25°C με τη βοήθεια κλιματιστικού που διέθετε θερμοστάτη.



Εικόνα 4.1. Ο θάλαμος ανάπτυξης.

#### **4.3 Παρασκευή του υποστρώματος**

Το θρεπτικό υπόστρωμα που δοκιμάστηκε στην παρούσα εργασία ήταν το  $M_4$  (τροποποιημένο MS) χωρίς την προσθήκη αυξίνης (Πίνακες 4.1 ως 4.5) αλλά με την προσθήκη BA (Πίνακας 4.6). Πριν την παρασκευή του υποστρώματος  $M_4$  προηγούνταν η παρασκευή των ακολούθων stock διαλυμάτων. Σημειώνεται ότι οι ζυγίσεις για τα ιχνοστοιχεία, τις βιταμίνες και την ορμόνη γίνονταν με ζυγό KERN 770 (KERN, Germany) ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων.

##### **I. Παρασκευή stock διαλυμάτων ιχνοστοιχείων**

Σε 9 ογκομετρικές φιάλες των 100 mL παρασκευάστηκαν τα ακόλουθα διαλύματα, χρησιμοποιώντας απεσταγμένο νερό:

Διάλυμα  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$  συγκέντρωσης  $C1=25mg \cdot L^{-1}$

Διάλυμα  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$  συγκέντρωσης  $C2=25 mg \cdot L^{-1}$

Διάλυμα KJ συγκέντρωσης  $C3= 830mg \cdot L^{-1}$

Διάλυμα  $MnSO_4 \cdot 4H_2O$  συγκέντρωσης  $C4=8450mg \cdot L^{-1}$

Διάλυμα  $BeSO_4 \cdot 4H_2O$  συγκέντρωσης  $C5=100mg \cdot L^{-1}$

Διάλυμα  $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$  συγκέντρωσης  $C6=183,9mg \cdot L^{-1}$

Διάλυμα  $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$  συγκέντρωσης  $C7=8600mg \cdot L^{-1}$

Διάλυμα  $\text{H}_3\text{BO}_3$  συγκέντρωσης  $\text{C}_8=6200\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

Διάλυμα  $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  συγκέντρωσης  $\text{C}_9=50\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

### **II. Παρασκευή stock διαλύματος σιδήρου (Fe) Σεκεστρέν**

Σε μία διάφανη ογκομετρική φιάλη των 500 ml παρασκευάστηκε το stock διαλύματος σιδήρου τελικής συγκέντρωσης  $\text{C}_{10}=20000\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ . Η αποθήκευση του διαλύματος αυτού γινόταν στο σκοτάδι.

### **III. Παρασκευή stock διαλυμάτων βιταμινών**

Σε 7 ογκομετρικές φιάλες των 100 ml παρασκευάστηκαν τα ακόλουθα διαλύματα, χρησιμοποιώντας νερό ως διαλύτη:

Διάλυμα Θειαμίνης συγκέντρωσης  $\text{C}_{11}=400\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

Διάλυμα Πυριδοξίνης συγκέντρωσης  $\text{C}_{12}=500\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

Διάλυμα Νικοτινικού οξέος συγκέντρωσης  $\text{C}_{13}=500\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

Διάλυμα Παντοθενικού Ασβεστίου συγκέντρωσης  $\text{C}_{14}=1000\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

Διάλυμα Ινοζιτόλης συγκέντρωσης  $\text{C}_{15}=25000\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

Διάλυμα Γλυσίνης συγκέντρωσης  $\text{C}_{16}=2000\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

Διάλυμα Βιοτίνης συγκέντρωσης  $\text{C}_{17}=10\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

Η αποθήκευση των stock διαλυμάτων γινόταν στους  $5^\circ\text{C}$ .

### **IV. Η παρασκευή του υποστρώματος $\text{M}_4$ γινόταν κάθε φορά ως εξής:**

Τα μακροστοιχεία ζυγίζονταν ένα-ένα και προστίθονταν σε ογκομετρική φιάλη των δύο λίτρων που περιείχε 1,5 λίτρο απεσταγμένο νερό. Οι ζυγίσεις των μακροστοιχείων γίνονταν με ζυγό KERN ακριβείας δύο δεκαδικών ψηφίων (KERN, Germany) σε ποσότητες που φαίνονται στους πίνακες 4.1 έως 4.6. Η ογκομετρική φιάλη βρισκόταν συνεχώς επάνω σε μαγνητικό αναδευτήρα. Στη συνέχεια, ακολουθούσε η προσθήκη των διαλυμάτων των ιχνοστοιχείων. Την προσθήκη των διαλυμάτων ιχνοστοιχείων ακολουθούσε η μέτρηση του pH με τη βοήθεια pHμέτρου (τύπου 3310 JENWAY LTD, UK) και ρύθμιση του στο  $6,1\pm 0,1$  με τη βοήθεια διαλύματος  $\text{KOH}$  συγκέντρωσης  $70\text{mg}\cdot 100\text{mL}^{-1}$ . Στη συνέχεια, ακολουθούσε η προσθήκη της ζάχαρης και του άγαρ. Μετά από τη διαδικασία αυτή το υλικό θερμαίνονταν πάνω στο

μαγνητικό αναδευτήρα, ώστε να διαλυθεί το άγαρ, που προστίθονταν σε μορφή σκόνης και να ομογενοποιηθεί το μίγμα. Όταν το διάλυμα γινόταν διαυγές, παρέμενε σε ανάδευση χωρίς θέρμανση, μέχρι να ψυχθεί ελαφρά και να προστεθούν οι θερμοευαίσθητες βιταμίνες. Κατόπιν χωρίζονταν σε τρία μέρη των 500 mL, και προστίθονταν σε ογκομετρικές φιάλες του ενός λίτρου η καθεμία. Οι ογκομετρικές φιάλες ήταν επάνω σε αναδευτήρες. Μετά ακολουθούσε η προσθήκη της κατάλληλης, αντίστοιχης, ποσότητας ΒΑ, η οποία είναι συνθετική κυτοκίνη, σε κάθε μια ογκομετρική φιάλη, δηλαδή, 0mg ΒΑ στην μία, 3,4mg στην δεύτερη και 17mg στην τρίτη, ενώ δεν προστέθηκε καθόλου αυξίνη. Ακολουθούσε λίγη ώρα ανάδευσης και το υλικό από κάθε φιάλη τοποθετούνταν σε 21 σωλήνες.

Σε κάθε σωλήνα τοποθετούνταν περίπου 20 mL διαλύματος. Μετά αφού οι σωλήνες κλείνονταν ερμητικά με φελλό, ο οποίος ήταν καλυμμένος με ένα αλουμινόχαρτο, τοποθετούνταν σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης ισχύος 16KW (Εικόνα 4.2). Η αποστείρωση γινόταν στους 121<sup>0</sup>C για 20 λεπτά.

#### **4.4 Συστατικά του υποστρώματος**

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του υποστρώματος M<sub>4</sub> όγκου 1,5 L χωρίς την προσθήκη αυξίνης (Πίνακες 4.1 ως 4.5) αλλά με την προσθήκη ΒΑ (Πίνακας 4.6) είναι τα εξής:

**Πίνακας 4.1 Μακροστοιχεία**

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΜΒ (g*mol <sup>-1</sup> )	Ποσότητα (mg)	Συγκέντρωση (mmoles*L <sup>-1</sup> )	ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΡΙΑ ΕΤΑΙΡΙΑ
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	80,04	1500	12,5	Riedel-de-Haen
KNO <sub>3</sub>	101,10	1500	9,89	Riedel-de-Haen
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	246,47	1275	3,4	Riedel-de-Haen
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	136,09	390	1,9	Riedel-de-Haen
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	147,02	600	2,7	Riedel-de-Haen
Fe ( Σεκεστρέν )	138	150	0,724	Novartis

### Πίνακας 4.2 Ιχνοστοιχεία

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΜΒ (g*mol <sup>-1</sup> )	Ποσότητα (mg)	Συγκέντρωση (μmoles*L <sup>-1</sup> )	ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΡΙΑ ΕΤΑΙΡΙΑ
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	237,93	0,0375	0,105	Riedel-de-Haen
CuSO <sub>4</sub> · 5H <sub>2</sub> O	249,69	0,0375	0,1	Riedel-de-Haen
KJ	166	1,245	5	Riedel-de-Haen
MnSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	169,02	25,35	99,9	Riedel-de-Haen
BeSO <sub>4</sub> · 4H <sub>2</sub> O	177,14	0,15	0,56	Fluka
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> ·4H <sub>2</sub> O	1235,86	0,276	0,149	Merck
ZnSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	287,55	12,9	29,9	Riedel-de-Haen
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	61,83	9,3	100,27	Riedel-de-Haen
NiCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	237,7	0,075	0,21	Merck

### Πίνακας 4.3 Βιταμίνες

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΜΒ (g*mol <sup>-1</sup> )	Ποσότητα (mg)	Συγκέντρωση (μmoles*L <sup>-1</sup> )	ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΡΙΑ ΕΤΑΙΡΙΑ
Θειαμίνη	337,3	0,6	1,186	Sigma
Πυριδοξίνη	205,6	0,75	2,432	Sigma
Νικοτινικό οξύ	123,1	0,75	4,062	Sigma
Παντοθενικό ασβέστιο	238,3	1,5	4,196	Sigma
Ινοζιτόλη	180,2	150	554,939	Sigma
Γλυσίνη	75,07	3	26,642	Merck
Βιοτίνη	244,3	0,015	0,041	Sigma



**Πίνακας 4.4 Υδατάνθρακες**

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΜΒ (g*mol <sup>-1</sup> )	Ποσότητα (mg)	Συγκέντρωση (mmoles*L <sup>-1</sup> )	ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΡΙΑ ΕΤΑΙΡΙΑ
Σακχαρόζη	342	22500	43,86	

**Πίνακας 4.5 Άλλα συστατικά**

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΜΒ (g*mol <sup>-1</sup> )	Ποσότητα (mg)		ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΡΙΑ ΕΤΑΙΡΙΑ
Agar	3000- 9000	6000		Fluka

**Πίνακας 4.6 Ορμόνες**

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	ΜΒ (g*mol <sup>-1</sup> )	Ποσότητα (mg)	Συγκέντρωση (μmoles*L <sup>-1</sup> )	ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΡΙΑ ΕΤΑΙΡΙΑ
ΒΑ (1 <sup>η</sup> μεταχείριση)	225	0	0	
ΒΑ (2 <sup>η</sup> μεταχείριση)	225	3,4	30,2	
ΒΑ (3 <sup>η</sup> μεταχείριση)	225	17	151	



Εικόνα 4.2. Ο κλίβανος υγρής αποστείρωσης.

#### **4.5 Περιγραφή πειράματος**

##### **4.5.1 Παραγωγή φυτικού υλικού**

Το φυτικό υλικό που απαιτείται για το πείραμα παρασκευάστηκε στο ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε ως εξής: Από υγιείς κληματίδες του επιθυμητού υποκειμένου, (110R) οι οποίες έχουν ελεγχθεί για μυκητολογικές και ιολογικές ασθένειες, αφαιρέθηκαν νεαροί βλαστοί. Από τους βλαστούς αυτούς αφαιρέθηκαν τα φύλλα και οι έλικες και χωρίστηκαν σε μεσογονάτια τμήματα κατά τέτοιο τρόπο, ώστε κάθε τμήμα βλαστού να περιέχει και έναν οφθαλμό. Τα τμήματα αυτά τοποθετήθηκαν σε ποτήρια ζέσεως και πλύθηκαν καλά με τρεχούμενο νερό βρύσης για περισσότερο από 15 λεπτά. Ακολούθησε η εμβάπτισή τους σε καθαρό οινόπνευμα για 3 λεπτά και έκπλυση με αποσταγμένο νερό. Στη συνέχεια έγινε απολύμανση των τμημάτων του βλαστού μέσα σε κωνική φιάλη καλυμμένη με αλουμινόχαρτο, ώστε να εμποδιστεί η οποιαδήποτε είσοδος ανεπιθύμητων σωματιδίων, η οποία φιάλη περιείχε διάλυμα χλωρίνης συγκέντρωσης 10% (10 ml χλωρίνη-90 ml αποσταγμένο νερό), όπου παρέμειναν για 20 λεπτά περίπου με συνεχή ανάδευση στο μαγνητικό

αναδευτήρα. Μετά την πάροδο αυτού του χρονικού διαστήματος τα τμήματα του βλαστού ξεπλύθηκαν 3 φορές με αποστειρωμένο νερό μέσα σε τράπεζα νηματικής ροής MSC 12 (JOUANSA, France) εξοπλισμένη με φίλτρο με οπές διαμέτρου 0,3μm, ώστε να μην μεταφερθούν μικροοργανισμοί από το περιβάλλον κατά την εγκατάσταση της νέας καλλιέργειας (Εικόνα 4.3). Κάθε τμήμα βλαστού με έναν οφθαλμό τοποθετήθηκε χωριστά σε γυάλινο σωλήνα μήκους 20cm και διαμέτρου 2,5cm, που έκλεινε με φελλό, περιείχε 16ml υποστρώματος M<sub>4</sub> και είχε απολυμανθεί σε κλίβανο, όπως έχει αναφερθεί στην παράγραφο 4.3.IV. Οι σωλήνες τοποθετήθηκαν στο θάλαμο ανάπτυξης για περίπου 20 μέρες. Μετά την πάροδο των 20 ημερών, στις οποίες τα φυτά μέσα στους σωλήνες αναπτύσσονταν αποκτώντας ύψος περίπου 10cm, ακολουθούσε ο πολλαπλασιασμός: Τα φυτά τεμαχίζονταν μέσα στην τράπεζα νηματικής ροής με αποστειρωμένα εργαλεία, τα οποία επαναποστειρώνονταν σε φλόγα κάθε φορά που γινόταν αλλαγή φυτού κατά τον χειρισμό. Σε κάθε νέο σωλήνα που περιείχε 16ml υποστρώματος M<sub>4</sub> τοποθετούνταν ένα τμήμα βλαστού με έναν οφθαλμό.

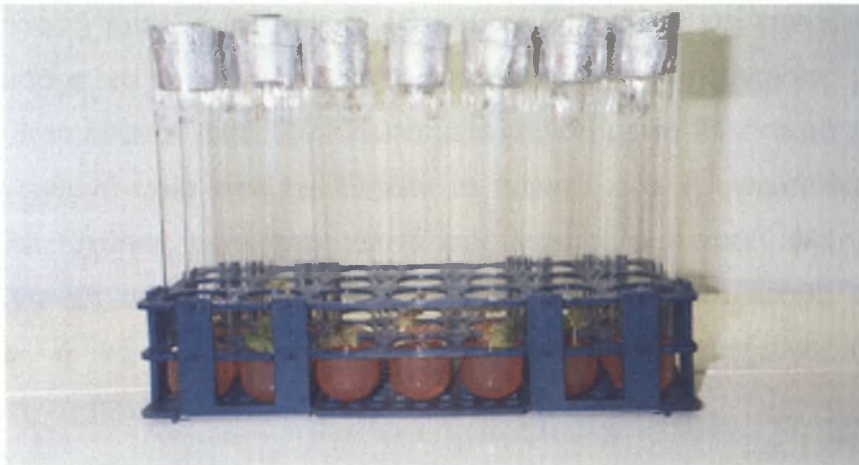
Κατά τον ίδιο τρόπο κάθε 20 μέρες περίπου ακολουθούσε πολλαπλασιασμός, ώστε να παραχθεί ικανοποιητικός αριθμός φυτών για τη διεξαγωγή του πειράματος.



Εικόνα 4.3. Η τράπεζα νηματικής ροής.

#### **4.5.2 Εγκατάσταση**

Συνολικά στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 63 σωλήνες με φυτά στο θάλαμο ανάπτυξης. Για το πείραμα ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία: Παρασκευάστηκε το υπόστρωμα M<sub>4</sub> με τον τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω και από κάθε μία ογκομετρική φιάλη προστέθηκαν περίπου 20 ml μείγματος σε 21 σωλήνες. Έτσι στο πείραμα υπήρχαν τρεις μεταχειρίσεις με 21 σωλήνες σε κάθε μία. Στην πρώτη μεταχείριση δεν υπήρχε καθόλου BA (μάρτυρας), στην δεύτερη μεταχείριση υπήρχαν 6,8mg\*L<sup>-1</sup> BA και στην τρίτη υπήρχαν 34mg\*L<sup>-1</sup> BA. Όλοι οι δοκιμαστικοί σωλήνες τοποθετήθηκαν στο κλίβανο υγρής αποστείρωσης στους 121<sup>0</sup>C για 20 λεπτά. Την επόμενη μέρα πάρθηκαν φυτά από τους σωλήνες που βρίσκονταν στο θάλαμο ανάπτυξης (τα οποία παράχθηκαν με τη διαδικασία που περιγράφεται στην παράγραφο 4.5.1.), για να χρησιμοποιηθούν στο πείραμα. Στη τράπεζα νηματικής ροής, αφού έγινε τεμαχισμός των φυτών αυτών σε κομμάτια που αποτελούνταν από ένα κομμάτι βλαστό και ένα οφθαλμό, τα έκφυτα τοποθετήθηκαν στους σωλήνες. Σημειώνεται ότι τα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία αυτή ήταν αποστειρωμένα σε κλίβανο ξηράς αποστείρωσης Memmert ισχύος 1400W στους 180<sup>0</sup>C για 60 λεπτά. Σε κάθε σωλήνα τοποθετήθηκε από ένα έκφυτο. Οι σωλήνες σφραγίστηκαν με φελλό, ο οποίος ήταν καλυμμένος με αλουμινοχαρτο (Εικόνα 4.4). Οι γυάλινοι σωλήνες τοποθετήθηκαν στο θάλαμο ανάπτυξης για 42 μέρες.



Εικόνα 4.4. Έκφυτα μέσα σε σωλήνες.

### **4.5.3. Συλλογή δεδομένων**

Μετά την πάροδο των 42 ημερών στο θάλαμο ανάπτυξης βγήκαν τα φυτά μέσα σε δωμάτιο που προετοιμάστηκε, ώστε να έχει χαμηλή θερμοκρασία (περίπου 20°C) και υψηλή σχετική υγρασία. Οι μετρήσεις που διενεργήθηκαν στα έκφυτα ήταν οι εξής:

- ύπαρξη νέων βλαστών
- ύπαρξη ριζών
- νωπό βάρος βλαστού
- νωπό βάρος ρίζας
- μήκος βλαστού
- αριθμός κόμβων
- αριθμός κυρίων ριζών
- μήκος κυρίων ριζών

Οι ζυγίσσεις νωπού και ξηρού βάρους βλαστών και ριζών έγιναν με ζυγό OHAUS GA 200D ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (OHAUS, GERMANY). Οι μετρήσεις του μήκους των βλαστών και ριζών έγιναν με τη βοήθεια υποδεκάμετρου. Οι βλαστοί και οι ρίζες τοποθετήθηκαν για τρία εικοσιτετράωρα σε ξηραντήριο στους 80°C και στη συνέχεια επαναζυγίστηκαν για τη λήψη του ξηρού βάρους.

**ΣΗΜΕΙΩΣΗ:** Η μεταχείριση χωρίς BA έγινε δύο φορές γιατί τα έκφυτα μετά την τοποθέτησή τους, την πρώτη φορά, στους δοκιμαστικούς σωλήνες άρχισαν να ξεραίνονται οπότε μετά πάροδο περίπου 10 ημερών από την εγκατάστασή τους ξεράθηκαν τα 15 από τα 21 έκφυτα και επομένως δεν θα μπορούσαμε να έχουμε αξιόπιστα αποτελέσματα συγκρίνοντας μόνο τα 6 έκφυτα που έμειναν από την πρώτη μεταχείριση με τα 21 έκφυτα των άλλων δύο. Η πιθανή αιτία που ξεράθηκαν τα έκφυτα είναι η υψηλή θερμοκρασία που αναπτύχθηκε, γιατί ήταν κοντά στις λάμπες φωτισμού. Μπορεί, όμως, ακόμη να μη σφραγίστηκαν καλά οι σωλήνες, με αποτέλεσμα να χάνουν υγρασία, ή να μολύνθηκαν τα έκφυτα κατά την επεξεργασία και την τοποθέτησή τους στους σωλήνες.

## 5. Αποτελέσματα

### Μετρήσεις αύξησης.

#### Πίνακας 5.1

Ποσοστό επί τοις εκατό των εκφύτων υποκειμένου 110R αμπέλου που βλάστησαν και ρίζωσαν κατά την *in vitro* ανάπτυξη τους παρουσία 0, 6,8 ή 34 mg\*L<sup>-1</sup> BA.

Μεταχείριση	Ποσοστό εκφύτων που βλάστησαν	Ποσοστό εκφύτων που ρίζωσαν
1 <sup>η</sup> (0 mg BA)	4,8%	19,0%
2 <sup>η</sup> (3,4 mg BA)	90,5%	-
3 <sup>η</sup> (17 mg BA)	71,4%	-

Στον Πίνακα 5.1 φαίνεται το ποσοστό των εκφύτων που βλάστησαν ή που ρίζωσαν παρουσία 0 mg\*L<sup>-1</sup> ή 6,8 mg\*L<sup>-1</sup> ή 34 mg\*L<sup>-1</sup> BA. Συγκεκριμένα 1 από τα 21 έκφυτα βλάστησε παρουσία μηδενικής ποσότητας BA, τα 19 από τα 21 έκφυτα βλάστησαν παρουσία 6,8 mg\*L<sup>-1</sup> BA, και 15 από τα 21 παρουσία 34 mg\*L<sup>-1</sup> BA.

Ακόμη, 4 από τα 21 έκφυτα ρίζωσαν παρουσία μηδενικής ποσότητας BA, αλλά κανένα φυτό δεν ρίζωσε παρουσία 6,8 mg\*L<sup>-1</sup> BA ή παρουσία 34 mg\*L<sup>-1</sup> BA.

## Πίνακας 5.2

Μέσος όρος και τυπική απόκλιση του μήκους βλαστών, αριθμού κόμβων, αριθμού βλαστών και μήκους ριζών ανά έκφυτο υποκειμένου 110R αμπέλου κατά την *in vitro* ανάπτυξη του παρουσία 0, 6,8 ή 34 mg\*L<sup>-1</sup> BA.

Μεταχείριση	Μήκος βλαστών (mm)	Αριθμός κόμβων	Αριθμός βλαστών	Μήκος ριζών (mm)
1 <sup>η</sup> (0 mg BA)	47,0	3,0	1	35,8±32,8
2 <sup>η</sup> (3,4 mg BA)	32,0±7,5	6,4±1,8	2,6±0,7	-
3 <sup>η</sup> (17 mg BA)	14,3±8,9	2,9±2,0	1,8±0,8	-

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 5.2 προκύπτει ότι:

Το μήκος βλαστών ανά έκφυτο στην 1<sup>η</sup> μεταχείριση (χωρίς BA) σε σχέση με την 2<sup>η</sup> (6,8 mg\*L<sup>-1</sup> BA) ήταν μεγαλύτερο κατά 46,9%. Επίσης της 1<sup>ης</sup> σε σχέση με την 3<sup>η</sup> (34 mg\*L<sup>-1</sup> BA) ήταν μεγαλύτερο κατά 228,7%. Τέλος της 2<sup>ης</sup> σε σχέση με την 3<sup>η</sup> ήταν μεγαλύτερο κατά 123,8%.

Επομένως, το μήκος βλαστών ανά έκφυτο παρουσία 6,8 mg\*L<sup>-1</sup> BA ήταν σημαντικά μεγαλύτερο από αυτό των εκφύτων παρουσία 34 mg\*L<sup>-1</sup> BA και μικρότερο από αυτό των εκφύτων παρουσία 0 mg\*L<sup>-1</sup> BA. Αλλά, επειδή παρουσία 0 mg\*L<sup>-1</sup> BA αναπτύχθηκε βλαστός μόνο σε ένα από τα 21 έκφυτα, η παρουσία βλαστού τόσο μεγάλου μήκους στην πρώτη μεταχείριση μπορεί να θεωρηθεί ένα τυχαίο γεγονός ή μπορεί να οφείλεται στην μη παρεμπόδιση από τη BA της κυριαρχίας της κορυφής. Επίσης είναι πιθανό κατά τη διαδικασία του τεμαχισμού των εκφύτων, στην αρχή του πειράματος, μέρος του υποστρώματος που περιείχε αυξίνη να μεταφέρθηκε με το νέο έκφυτο στο υπόστρωμα που δεν περιείχε αυξίνη. Η ύπαρξη αυτής της αυξίνης μπορεί να βοήθησε στην ανάπτυξη ενός επιμήκους βλαστού και στη ριζοβολία του.



Ο αριθμός κόμβων στους βλαστούς ανά έκφυτο χωρίς BA ήταν σχεδόν ίσος με τον αριθμό των κόμβων παρουσία 34 mg\*L<sup>-1</sup> BA και μικρότερος κατά 53,1% σε σχέση με τους κόμβους παρουσία 6,8 mg\*L<sup>-1</sup> BA.

Ο αριθμός των βλαστών ανά έκφυτο που αναπτύχθηκαν χωρίς BA ήταν κατά 61,5% μικρότερος σε σχέση με τον αριθμό των βλαστών που αναπτύχθηκαν παρουσία 6,8 mg\*L<sup>-1</sup> BA και κατά 44,4% μικρότερος σε σχέση με τον αριθμό των βλαστών που αναπτύχθηκαν παρουσία 34 mg\*L<sup>-1</sup> BA. Τέλος, ο αριθμός των βλαστών που αναπτύχθηκαν παρουσία 6,8 mg\*L<sup>-1</sup> BA, ήταν κατά 44,4% μεγαλύτερος σε σχέση με τον αριθμό των βλαστών που αναπτύχθηκαν παρουσία 34 mg\*L<sup>-1</sup> BA.

Από τον Πίνακα 5.2 φαίνεται ότι παρουσία 0 mg\*L<sup>-1</sup> BA αναπτύχθηκαν και ρίζες στα έκφυτα. Συγκεκριμένα αναπτύχθηκε ρίζα μήκους 92 mm στο ίδιο έκφυτο που είχε και το βλαστό. Βλαστός δεν αναπτύχθηκε σε άλλο έκφυτο της ανωτέρω μεταχείρισης, αλλά αναπτύχθηκαν μεμονωμένες ρίζες σε τρία έκφυτα με μέσο μήκος 17 mm και τυπική απόκλιση ±5,66.

### Πίνακας 5.3

Μέσος όρος και τυπική απόκλιση του νωπού βάρους των βλαστών, των ριζών και του ολικού νωπού βάρους ανά έκφυτο υποκειμένου 110R αμπέλου κατά την *in vitro* ανάπτυξη του παρουσία 0, 6,8 ή 34 mg\*L<sup>-1</sup> BA.

Μεταχείριση	Νωπό βάρος βλαστών (mg)	Νωπό βάρος ριζών (mg)	Ολικό νωπό βάρος (mg)
1 <sup>η</sup> (0 mg BA)	72,0	19,0±22,7	130,0
2 <sup>η</sup> (3,4 mg BA)	60,8±19,2	-	-
3 <sup>η</sup> (17 mg BA)	24,7±22,0	-	-

Από τον Πίνακα 5.3 φαίνεται ότι το νωπό βάρος του βλαστού της πρώτης μεταχείρισης (0 mg\*L<sup>-1</sup> BA) ήταν μεγαλύτερο κατά 18,4% σε σχέση με

το νωπό βάρος του βλαστού της δεύτερης μεταχείρισης ( $6,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA) και ήταν μεγαλύτερο κατά 191% σε σχέση με το νωπό βάρος της τρίτης μεταχείρισης ( $34 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA). Τέλος, το νωπό βάρος βλαστών παρουσία  $34 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA ήταν κατά 59,4% μικρότερο σε σχέση με αυτό των εκφύτων παρουσία  $6,8 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA.

Παρουσία  $0 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA σε ένα έκφυτο αναπτύχθηκε βλαστός νωπού βάρους 72 mg και μια ρίζα νωπού βάρους 58 mg και επομένως το ολικό νωπό βάρος ήταν 130 mg. Αλλά και σε τρία ακόμη έκφυτα αναπτύχθηκε μόνο ρίζα οπότε ο μέσος όρος του νωπού βάρους των ριζών είναι  $19,0\pm 22,7$  (Πίνακας 5.3).

Η σύγκριση αυτή φυσικά δεν οδηγεί στο συμπέρασμα ότι δεν θα πρέπει να χρησιμοποιούμε BA, γιατί χωρίς BA αναπτύχθηκε σε ένα μόνο έκφυτο βλαστός και ρίζα.

Το κλάσμα του νωπού βάρους βλαστού προς το νωπό βάρος φυτού στην πρώτη μεταχείριση, όπου αναπτύχθηκε και βλαστός και ρίζα σε ένα έκφυτο, ήταν 0,554 ή το 55,4% του ολικού νωπού βάρους ήταν ο βλαστός και 44,6% η ρίζα.

#### **Πίνακας 5.4**

Μέσος όρος και τυπική απόκλιση του ξηρού βάρους των βλαστών, των ριζών και του ολικού ξηρού βάρους ανά έκφυτο υποκειμένου 110R αμπέλου κατά την *in vitro* ανάπτυξη του παρουσία  $0, 6,8$  ή  $34 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BA.

Μεταχείριση	Ξηρό βάρος βλαστών (mg)	Ξηρό βάρος ριζών (mg)	Ολικό ξηρό βάρος (mg)
1 <sup>η</sup> ( $0 \text{ mg}$ BA)	10,0	$2,3\pm 1,64$	15,0
2 <sup>η</sup> ( $3,4 \text{ mg}$ BA)	$7,5\pm 2,5$	-	-
3 <sup>η</sup> ( $17 \text{ mg}$ BA)	$3,5\pm 1,8$	-	-

Από τον Πίνακα 5.4 προκύπτει ότι το ξηρό βάρος του βλαστού της πρώτης μεταχείρισης ( $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BA) σε σχέση με το ξηρό βάρος των βλαστών της δεύτερης μεταχείρισης ( $6,8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BA) ήταν μεγαλύτερο κατά 33,3%, ενώ το ξηρό βάρος του βλαστού της πρώτης μεταχείρισης ( $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BA) σε σχέση με το ξηρό βάρος των βλαστών της τρίτης μεταχείρισης ( $34 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BA) ήταν μεγαλύτερο κατά 185,7%. Η σύγκριση αυτή, όμως, έχει μικρή αξία γιατί αναπτύχθηκε ένας μόνο βλαστός στην πρώτη μεταχείριση. Το ξηρό βάρος βλαστών ανά έκφυτο παρουσία  $6,8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BA ήταν κατά 114,3% μεγαλύτερο σε σχέση με αυτό των εκφύτων παρουσία  $34 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BA.

Παρουσία  $0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BA σε ένα έκφυτο αναπτύχθηκε βλαστός ξηρού βάρους 10 mg και μια ρίζα ξηρού βάρους 5 mg και επομένως ολικού ξηρού βάρους 15 mg. Αλλά και σε τρία ακόμη έκφυτα αναπτύχθηκε μόνο ρίζα, οπότε ο μέσος όρος του ξηρού βάρους των ριζών είναι  $2,3 \pm 1,64$  (Πίνακας 5.4).

Το κλάσμα του ξηρού βάρους βλαστού προς το ξηρό βάρος του φυτού στην πρώτη μεταχείριση, όπου αναπτύχθηκε σε ένα έκφυτο και βλαστός και ρίζα, ήταν 0,666 ή 66,6% του ολικού ξηρού βάρους ήταν ο βλαστός και 33,3% η ρίζα.

### **Πίνακας 5.5**

Μέσος όρος του ποσοστού επί τοις εκατό της ξηρής ουσίας (%ξ.ο.) των βλαστών και των ριζών ανά έκφυτο υποκειμένου 110R αμπέλου κατά την *in vitro* ανάπτυξη του παρουσία 0, 6,8 ή  $34 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BA.

Μεταχείριση	% ξ.ο των βλαστών	% ξ.ο των ριζών
1 <sup>η</sup> (0 mg BA)	13,89%	11,84%
2 <sup>η</sup> (3,4 mg BA)	12,34%	-
3 <sup>η</sup> (17 mg BA)	14,17%	-

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 5.5 προκύπτει ότι οι βλαστοί που αναπτύχθηκαν *in vitro* παρουσία 6,8 mg\*L<sup>-1</sup> BA είχαν μικρότερο ποσοστό ξηρής ουσίας (12,9%) σε σχέση με τους βλαστούς που αναπτύχθηκαν παρουσία 34 mg\*L<sup>-1</sup> BA.

Ενώ παρουσία μηδενικής ποσότητας BA το ποσοστό ξηρής ουσίας στον έναν και μοναδικό βλαστό που αναπτύχθηκε είναι μεταξύ των δύο. Δηλαδή το ποσοστό ξηρής ουσίας της πρώτης μεταχείρισης είναι κατά 12,6% μεγαλύτερο από το ποσοστό ξηρής ουσίας της δεύτερης μεταχείρισης, αλλά είναι ελάχιστα μικρότερο (περίπου 2%) από το ποσοστό ξηρής ουσίας της τρίτης μεταχείρισης.

### **Πίνακας 5.6**

Μέσος όρος και τυπική απόκλιση του μήκους μεσογονατίων ανά έκφυτο υποκειμένου 110R αμπέλου κατά την *in vitro* ανάπτυξη του παρουσία 0, 6,8 ή 34 mg\*L<sup>-1</sup> BA.

Μεταχείριση	Μήκος μεσογονατίων (mm)
1 <sup>η</sup> (0 mg BA)	15,67
2 <sup>η</sup> (3,4 mg BA)	5,35±0,89
3 <sup>η</sup> (17 mg BA)	5,25±1,12

Από τον Πίνακα 5.6 φαίνεται ότι το μήκος μεσογονατίων παρουσία 6,8 ή 34 mg\*L<sup>-1</sup> BA ήταν παρόμοιο. Αντίθετα, το μήκος των μεσογονατίων παρουσία 0 mg\*L<sup>-1</sup> BA ήταν σημαντικά μεγαλύτερο (περίπου τριπλάσιο) από το μήκος των μεσογονατίων παρουσία 6,8 ή 34 mg\*L<sup>-1</sup> BA. Συγκεκριμένα, στην πρώτη μεταχείριση (χωρίς BA) ήταν κατά 192,9% μεγαλύτερο σε σχέση με τη δεύτερη (6,8 mg\*L<sup>-1</sup> BA) και κατά 198,5% σε σχέση με την τρίτη μεταχείριση (34 mg\*L<sup>-1</sup> BA).

### Πίνακας 5.7

Μέσος όρος και τυπική απόκλιση του νωπού βάρους (N.B.) βλαστών ανά μονάδα μήκους (mm) βλαστών, του νωπού βάρους ριζών ανά μονάδα μήκους (mm) των ριζών, του ξηρού βάρους (Ξ.Β.) βλαστών ανά μονάδα μήκους (mm) βλαστών και του ξηρού βάρους ριζών ανά μονάδα μήκους (mm) ριζών ανά έκφυτο υποκειμένου 110R αμπέλου κατά την *in vitro* ανάπτυξη του παρουσία 0, 6,8 ή 34 mg\*L<sup>-1</sup> BA.

Μεταχείριση	N.B.βλ./mm (mg/mm)	N.B.ριζ./mm (mg/mm)	Ξ.Β.βλ./mm (mg/mm)	Ξ.Β.ριζ./mm (mg/mm)
1 <sup>η</sup> (0 mg BA)	1,53	0,412±0,14	0,213	0,072±0,011
2 <sup>η</sup> (3,4 mg BA)	1,92±0,38	-	0,230±0,06	-
3 <sup>η</sup> (17 mg BA)	1,90±0,20	-	0,270±0,10	-

Στον Πίνακα 5.7 φαίνεται ότι το νωπό βάρος βλαστών ανά mm μήκους βλαστών ανά έκφυτο δεν διέφερε σημαντικά παρουσία 6,8 mg\*L<sup>-1</sup> BA ή 34 mg\*L<sup>-1</sup> BA. Το νωπό βάρος βλαστών ανά mm μήκους βλαστών ανά έκφυτο παρουσία 6,8 mg\*L<sup>-1</sup> BA ή παρουσία 34 mg\*L<sup>-1</sup> BA ήταν μεγαλύτερο κατά 25,5% σε σχέση με το νωπό βάρος βλαστών ανά mm μήκους βλαστών ανά έκφυτο παρουσία 0 mg\*L<sup>-1</sup> BA.

Το ξηρό βάρος βλαστών ανά μονάδα μήκους (mm) βλαστών ανά έκφυτο παρουσία μηδενικής ποσότητας BA ήταν μικρότερο κατά 7,4% σε σχέση με το ξηρό βάρος βλαστών ανά μονάδα μήκους (mm) βλαστών ανά έκφυτο παρουσία 6,8 mg\*L<sup>-1</sup> BA και ήταν μικρότερο κατά 21% σε σχέση με το ξηρό βάρος βλαστών ανά μονάδα μήκους (mm) βλαστών ανά έκφυτο παρουσία 34 mg\*L<sup>-1</sup> BA. Τέλος, το ξηρό βάρος βλαστών ανά μονάδα μήκους (mm) βλαστών ανά έκφυτο παρουσία 6,8 mg\*L<sup>-1</sup> BA ήταν μικρότερο κατά 14,8% σε σχέση με το ξηρό βάρος βλαστών ανά μονάδα μήκους (mm) βλαστών ανά έκφυτο παρουσία 34 mg\*L<sup>-1</sup> BA (Πίνακας 5.7).

Από τους πίνακες 5.2, 5.6 και 5.7 είναι προφανές ότι η υψηλή συγκέντρωση BA παρεμπόδισε την επιμήκυνση των βλαστών, χωρίς να επηρεάζει το μήκος μεσογονατίων αλλά τον αριθμό τους.

### **Σύγκριση των αποτελεσμάτων με τα αντίστοιχα της Α. Σουρρή.**

Σε μια παρόμοια εργασία, στην οποία χρησιμοποιήθηκε ως φυτικό υλικό πάλι το υποκείμενο αμπέλου 110R (Σουρρή, 2003), χρησιμοποιήθηκαν δύο υποστρώματα: το M<sub>4</sub> και το M<sub>4</sub> παρουσία τύρφης και περλίτη, με ταυτόχρονη προσθήκη και στα δυο ορμόνης IAA συγκεντρώσεως 0,1mg\*L<sup>-1</sup>, χωρίς την προσθήκη ορμόνης BA. Στην συγκεκριμένη εργασία πραγματοποιήθηκαν δύο επαναλήψεις του ίδιου πειράματος και τα έκφυτα αναπτύχθηκαν για 4 εβδομάδες μέσα στο θάλαμο ανάπτυξης, σε αντίθεση με την παρούσα εργασία, στην οποία τα έκφυτα αναπτύχθηκαν για 6 εβδομάδες. Επίσης, στην εργασία της Α. Σουρρή τα έκφυτα δεν αναπτύχθηκαν μέσα σε σωλήνες, αλλά σε ειδικές γυάλες τετράγωνης βάσης με πλευρά 9,5cm και ύψος 12cm. Σε κάθε γυάλα τοποθετήθηκαν οκτώ έκφυτα με τον εξής τρόπο: Τέσσερα έκφυτα τοποθετήθηκαν στις τέσσερις γωνίες της τετράγωνης βάσης της γυάλας και τα υπόλοιπα τέσσερα τοποθετήθηκαν στο μέσο της κάθε πλευράς. Μετά την τοποθέτηση των έκφυτων στις γυάλες, κάθε γυάλα κλείστηκε με καπάκι και η ένωση καπακιού - γυάλας τυλίχτηκε γύρω-γύρω με διαφανή μεμβράνη. Οι γυάλες τοποθετήθηκαν στο θάλαμο ανάπτυξης για τέσσερις εβδομάδες.

### **Σύγκριση του πίνακα 5.5 με τα αποτελέσματα του 1<sup>ου</sup> πειράματος της Α. Σουρρή**

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα του Πίνακα 5.5. με τα αποτελέσματα της Α. Σουρρή βρέθηκε ότι το ποσοστό επί τοις εκατό της ξηρής ουσίας στο βλαστό ήταν μικρότερο στα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> ή M<sub>4</sub> με προσθήκη τύρφης και περλίτη σε σχέση με τους βλαστούς που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> χωρίς αυξίνη, αλλά παρουσία 0, 6,8 ή 34 mg\*L<sup>-1</sup> BA.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα του Πίνακα 5.5 με τα αποτελέσματα της Α. Σουρρή φαίνεται ότι το επί τοις εκατό ποσοστό της ξηρής ουσίας στην ρίζα των φυτών που αναπτύχθηκαν *in vitro* στα υποστρώματα M<sub>4</sub> και M<sub>4</sub> με

προσθήκη τύρφης και περλίτη ήταν μικρότερο σε σχέση με τις ρίζες που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> χωρίς αυξίνη, αλλά παρουσία 0 mg\*L<sup>-1</sup> BA.

Δηλαδή, η παραμονή για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στην *in vitro* ανάπτυξη ή η παρουσία ενός μόνο φυτού στον περιέκτη αυξάνει το επί της % ποσοστό ξηρής ουσίας στα έκφυτα.

### **Σύγκριση του πίνακα 5.5 με τα αποτελέσματα του 2<sup>ου</sup> πειράματος της Α. Σουρρή**

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 5.5 και τα αποτελέσματα του 2<sup>ου</sup> πειράματος της Α. Σουρρή προκύπτει ότι το ποσοστό επί τοις εκατό της ξηρής ουσίας στο βλαστό ήταν μικρότερο στα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> σε σχέση με τους βλαστούς που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> χωρίς αυξίνη, αλλά παρουσία 0, 6,8 ή 34 mg\*L<sup>-1</sup> BA.

Επίσης, το ποσοστό επί τοις εκατό της ξηρής ουσίας στο βλαστό ήταν μικρότερο στα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> με προσθήκη τύρφης και περλίτη σε σχέση με τους βλαστούς που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> χωρίς αυξίνη, αλλά παρουσία 0 ή 34 mg\*L<sup>-1</sup> BA και μεγαλύτερο σε σχέση με τους βλαστούς που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> χωρίς αυξίνη, αλλά παρουσία 6,8 mg\*L<sup>-1</sup> BA.

Επίσης, από την σύγκριση των αποτελεσμάτων του Πίνακα 5.5 με τα αποτελέσματα της Α. Σουρρή φαίνεται ότι το επί τοις εκατό ποσοστό της ξηρής ουσίας στην ρίζα των φυτών που αναπτύχθηκαν *in vitro* στα υποστρώματα M<sub>4</sub> και M<sub>4</sub> με προσθήκη τύρφης και περλίτη ήταν μικρότερο σε σχέση με τις ρίζες που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> χωρίς αυξίνη, αλλά παρουσία 0 mg\*L<sup>-1</sup> BA.



### **Σύγκριση του ενός έκφυτου της 1<sup>ης</sup> μεταχείρισης που βλάστησε και ρίζωσε με το 1<sup>ο</sup> πείραμα της Α. Σουρρή**

Στην παρούσα εργασία, κατά την *in vitro* ανάπτυξη του υποκειμένου 110R αμπέλου στην πρώτη μεταχείριση (0 mg\*L<sup>-1</sup> BA) το νωπό βάρος βλαστού και το νωπό βάρος ρίζας προς το ολικό νωπό βάρος ήταν ίσο με 55,4% και 44,6% αντίστοιχα. Ενώ το ξηρό βάρος βλαστού και το ξηρό βάρος ρίζας προς το ολικό ξηρό βάρος ήταν ίσο με 66,7% και 33,3% αντίστοιχα.

Συγκρίνοντας αυτά τα αποτελέσματα με τα αντίστοιχα της άλλης εργασίας (1<sup>ο</sup> και 2<sup>ο</sup> πείραμα της Α. Σουρρή), φαίνεται ότι τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> είχαν μικρότερη αναλογία νωπού βάρους βλαστού προς νωπό βάρος φυτού και μεγαλύτερη αναλογία νωπού βάρους ρίζας προς το νωπό βάρος φυτού, μικρότερο ξηρό βάρος βλαστού προς ξηρό βάρος ολόκληρου του φυτού και μεγαλύτερο ξηρό βάρος ρίζας προς ξηρό βάρος του φυτού σε σχέση με το βλαστό και τη ρίζα, που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> χωρίς αυξίνη, αλλά παρουσία 0 mg\*L<sup>-1</sup> BA.

Ενώ τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> με προσθήκη μίγματος τύρφης και περλίτη είχαν σημαντικά μικρότερη αναλογία νωπού βάρους βλαστού προς νωπό βάρος φυτού και σημαντικά μεγαλύτερη αναλογία νωπού βάρους ρίζας προς το νωπό βάρος φυτού, επίσης σημαντικά μικρότερο ξηρό βάρος βλαστού προς ξηρό βάρος ολόκληρου του φυτού και αντίστοιχα σημαντικά μεγαλύτερο ξηρό βάρος ρίζας προς ξηρό βάρος του φυτού σε σχέση με το βλαστό και τη ρίζα, που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> χωρίς αυξίνη, αλλά παρουσία 0 mg\*L<sup>-1</sup> BA.

### **Σύγκριση του πίνακα 5.7 με τα αποτελέσματα του 1<sup>ου</sup> πειράματος της Α. Σουρρή.**

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα του Πίνακα 5.7. της παρούσας εργασίας με τα αντίστοιχα των πειραμάτων της Α. Σουρρή, φαίνεται ότι οι βλαστοί που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> χωρίς αυξίνη, αλλά παρουσία 0, 6,8 ή 34 mg\*L<sup>-1</sup> BA, είχαν διαφορετικό νωπό βάρος ανά mm βλαστού από τα φυτά που αναπτύχθηκαν στα θρεπτικά υποστρώματα M<sub>4</sub> και M<sub>4</sub> με προσθήκη τύρφης και περλίτη.

Τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> είχαν μεγαλύτερο νωπό βάρος βλαστού ανά mm μήκους βλαστού από τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> χωρίς αυξίνη, αλλά παρουσία 0, 6,8 ή 34 mg\*L<sup>-1</sup> BA. Ενώ, τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> με προσθήκη τύρφης και περλίτη είχαν μικρότερο νωπό βάρος βλαστού ανά mm μήκους βλαστού από τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> χωρίς αυξίνη, αλλά παρουσία 0, 6,8 ή 34 mg\*L<sup>-1</sup> BA.

Επίσης από τη σύγκριση των αποτελεσμάτων του Πίνακα 5.7 με την εργασία της Α. Σουρρή προκύπτει ότι τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> είχαν μικρότερο ξηρό βάρος ανά mm μήκους βλαστού από τους βλαστούς που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> χωρίς αυξίνη, αλλά παρουσία 0, 6,8 ή 34 mg\*L<sup>-1</sup> BA. Τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> με προσθήκη τύρφης και περλίτη είχαν σημαντικά μικρότερο ξηρό βάρος ανά mm μήκους βλαστού (περίπου το μισό) από τους βλαστούς που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> χωρίς αυξίνη, αλλά παρουσία 0, 6,8 ή 34 mg\*L<sup>-1</sup> BA.

Το νωπό βάρος ανά mm ρίζας των φυτών που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> ήταν σημαντικά μεγαλύτερο από αυτό των ριζών που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> χωρίς αυξίνη, αλλά παρουσία 0 mg\*L<sup>-1</sup> BA, ενώ τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> με προσθήκη τύρφης και περλίτη, είχαν μεγαλύτερο νωπό βάρος ανά mm ρίζας από τις ρίζες που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> χωρίς αυξίνη, αλλά παρουσία 0 mg\*L<sup>-1</sup> BA.

Το ξηρό βάρος ανά mm ρίζας των φυτών που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> ήταν σημαντικά μικρότερο (περίπου το μισό) από αυτό των ριζών που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> χωρίς αυξίνη, αλλά παρουσία 0 mg\*L<sup>-1</sup> BA. Ενώ, τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> με προσθήκη τύρφης και περλίτη είχαν μικρότερο ξηρό βάρος ανά mm ρίζας σε σύγκριση με τις ρίζες που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> χωρίς αυξίνη, αλλά παρουσία 0 mg\*L<sup>-1</sup> BA.

## Σύνγκριση του πίνακα 5.7 με τα αποτελέσματα του 2<sup>ου</sup> πειράματος

### της Α. Σουρρή.

Συγκρίνοντας τα αποτελέσματα του Πίνακα 5.7 και τα αντίστοιχα αποτελέσματα του 2<sup>ου</sup> πειράματος της Α. Σουρρή, φαίνεται ότι οι βλαστοί που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> χωρίς αυξίνη, αλλά παρουσία 0, 6,8 ή 34 mg\*L<sup>-1</sup> BA, είχαν διαφορετικό νωπό βάρος ανά mm βλαστού από τα φυτά που αναπτύχθηκαν στα θρεπτικά υποστρώματα M<sub>4</sub> και M<sub>4</sub> με προσθήκη τύρφης και περλίτη.

Τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> είχαν σημαντικά μεγαλύτερο νωπό βάρος ανά mm βλαστού (διπλάσιο) από τους βλαστούς που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> χωρίς αυξίνη, αλλά παρουσία 0, 6,8 ή 34 mg\*L<sup>-1</sup> BA. Ενώ, τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> με προσθήκη τύρφης και περλίτη είχαν τιμή σημαντικά μεγαλύτερη (σχεδόν 50%) από τους βλαστούς που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> χωρίς αυξίνη, αλλά παρουσία 0, 6,8 ή 34 mg\*L<sup>-1</sup> BA.

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 5.7. και τα αντίστοιχα της Α. Σουρρή προκύπτει ότι τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> είχαν σημαντικά μεγαλύτερο (περίπου 50%) ξηρό βάρος ανά mm μήκους βλαστού από τους βλαστούς που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> χωρίς αυξίνη, αλλά παρουσία 0, 6,8 ή 34 mg\*L<sup>-1</sup> BA. Επίσης, τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> με προσθήκη τύρφης και περλίτη είχαν και αυτά σημαντικά μεγαλύτερο ξηρό βάρος ανά mm μήκους βλαστού από τους βλαστούς που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> χωρίς αυξίνη, αλλά παρουσία 0, 6,8 ή 34 mg\*L<sup>-1</sup> BA.

Το νωπό βάρος ανά mm ρίζας των φυτών που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> ήταν σημαντικά μεγαλύτερο (σχεδόν τριπλάσιο) από αυτό των ριζών που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> χωρίς αυξίνη, αλλά παρουσία 0 mg\*L<sup>-1</sup> BA. Επίσης, τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> με προσθήκη τύρφης και περλίτη, είχαν και αυτά σημαντικά μεγαλύτερο (σχεδόν τρεισήμισι φορές μεγαλύτερο) νωπό βάρος ανά mm ρίζας από τις ρίζες που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> χωρίς αυξίνη, αλλά παρουσία 0 mg\*L<sup>-1</sup> BA.

Το ξηρό βάρος ανά mm ρίζας δεν διέφερε μεταξύ των φυτών που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> και των ριζών που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> χωρίς αυξίνη, αλλά παρουσία 0 mg\*L<sup>-1</sup> BA.

Αντίθετα τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> με προσθήκη τύρφης και περλίτη είχαν μεγαλύτερο ξηρό βάρος ανά mm ρίζας σε σύγκριση με τις ρίζες που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M<sub>4</sub> χωρίς αυξίνη, αλλά παρουσία 0 mg\*L<sup>-1</sup> BA.

## **6. Συζήτηση-Συμπεράσματα**

Από την ανάλυση των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας προκύπτει ότι, για το πείραμα μας, χωρίς την προσθήκη BA τα έκφυτα δεν αναπτύσσονται. Βέβαια, ένα από τα μικρομοσχεύματα βλάστησε και ρίζωσε, και αυτό μπορεί να οφείλεται στην έλλειψη παρεμπόδισης (από την μη ύπαρξη BA) της έκπτυξης και επιμήκυνσης ριζών και της επιμήκυνσης βλαστού. Με την προσθήκη της μικρής ποσότητας BA ( $6,8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) έχουμε υψηλό ποσοστό (90,9%) εκφύτων που βλαστάνουν. Αντίθετα, με την προσθήκη μεγάλης ποσότητας ( $34 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) BA το ποσοστό των εκφύτων που βλαστάνουν περιορίζεται σημαντικά στο 71,4%. Επίσης, από τις υπόλοιπες μετρήσεις προκύπτει ότι παρουσία μικρής ποσότητας BA ( $6,8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) έχουμε καλύτερα αποτελέσματα, δηλαδή μεγαλύτερο μήκος βλαστών, περισσότερους κόμβους, μεγαλύτερο αριθμό βλαστών ανά έκφυτο, υψηλότερο νωπό βάρος βλαστών, υψηλότερο ξηρό βάρος βλαστών. Το % ποσοστό ξηράς ουσίας είναι λίγο μεγαλύτερο παρουσία της μεγάλης ( $34 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ ) ποσότητας BA. Το νωπό βάρος βλαστού ανά mm και το ξηρό βάρος βλαστού ανά mm και το μήκος των μεσογονατίων είναι περίπου ίσα και στις δύο περιπτώσεις. Επίσης, από τον πίνακα 5.7 είναι εμφανές ότι η ρίζα συσσωρεύει ανά μονάδα μήκους πολύ λιγότερη νωπή και ξηρά ουσία απ' ότι ο βλαστός. Αυτό, προφανώς, οφείλεται στις μεγαλύτερες απαιτήσεις του βλαστού, όσον αφορά την αντιμετώπιση των περιβαλλοντικών συνθηκών, αλλά και την στήριξη του βλαστού. Τέλος, το χαμηλό νωπό και ξηρό βάρος της ρίζας μπορεί να την κάνει πιο ευπαθή κατά τη μεταφύτευση.

Από την σύγκριση των αποτελεσμάτων της παρούσας εργασίας με τα αντίστοιχα της Α. Σουρρή προκύπτει ότι, η ύπαρξη αυξίνης απουσία κυτοκινίνης έχει σαν αποτέλεσμα την ανάπτυξη ενός βλαστού και την ριζοβολία του εκφύτου (Σουρρή, 2003), ενώ η απουσία αυξίνης παρουσία  $6,8 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BA (στην παρούσα εργασία), προκαλεί την ανάπτυξη ενός αριθμού βραχέων βλαστών χωρίς ρίζες.

Όπως έχει αποδειχθεί από πολλές εργασίες που έχουν γίνει πάνω στον *in vitro* πολλαπλασιασμό της αμπέλου, η χρήση κυτοκινινών είναι απαραίτητη για την *in vitro* ανάπτυξη των βλαστών της αμπέλου. (Pool and Powell, 1975 Jona and Webb, 1978 Mullins et al 1979 Novak and Junova, 1980).

Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι ερευνητές Novak, F.J. and Junonà, Z. (1983), οι οποίοι μελέτησαν την επίδραση των κυτοκινινών στην ανάπτυξη και την εξέλιξη μεμονωμένων επάκριων μεριστωμάτων αμπέλου σε συνδυασμό με το υπόστρωμα των Murashige και Skoog (MS). Έτσι, λοιπόν, αυτοί οι ερευνητές παρατήρησαν ότι με προσθήκη 10 $\mu$ M BA (στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν 6,8 mg\*L<sup>-1</sup> και 34 mg\*L<sup>-1</sup> που είναι 30,2 $\mu$ M και 151 $\mu$ M αντίστοιχα) κατέστη δυνατή η δημιουργία συνεχώς πολλαπλασιαζόμενων βλαστών και η υποκίνηση του μασχαλαίου σχηματισμού των οφθαλμών τους. Σε αυτήν την εργασία μελετήθηκαν 8 κλώνοι αμπέλου είτε υποκείμενα είτε ποικιλίες της Ανατολικής Ευρώπης, σε υπόστρωμα MS.

Επίσης, οι ερευνητές Α. Γ. Κανάκης και Γ. Α. Συρράκος (2003) διαπίστωσαν ότι η συγκέντρωση των 2mg\*L<sup>-1</sup> BA ήταν η σημαντικά καλύτερη σε σχέση με αυτές των 1 και 4mg\*L<sup>-1</sup> στην αναγέννηση οφθαλμών των ποικιλιών Γουστολίδι και Κολινιάτικο. Τα αποτελέσματά τους συμφωνούν και με εκείνα των Harris and Stevenson (1982) και Chee and Pool (1985).

Τέλος οι ερευνητές E. A. Martinez and R. Tizio (1989) εφάρμοσαν *in vitro* καλλιέργεια μέσα σε βασικό υπόστρωμα MS με ταυτόχρονη προσθήκη 0,5mg\*L<sup>-1</sup> γιββεριλλικού οξέως και 1mg\*L<sup>-1</sup> BA και παρατήρησαν ότι αυτός ο συνδυασμός ρυθμιστών ανάπτυξης ήταν ο πλέον πρόσφορος, για να διεγερθεί η ανάπτυξη των οφθαλμών σε όλες τις καλλιέργειες που μελετήθηκαν. Σε αυτήν την εργασία χρησιμοποιήθηκαν βλαστοί μήκους 2,5cm με ένα γόνατο από τις ποικιλίες 'Chardonnay', 'Pinot Noir', 'Pinot Blanc', 'Thomson Seedless', 'Cabernet Sauvignon', 'Chenin' και 'Riesling'.

Επομένως, όπως έχει διαπιστωθεί και από άλλους ερευνητές όπως τους Barlass and Skene (το 1978, 1980a, β) και τους Novak and Junona (1982), το BA σε συνδυασμό με το υπόστρωμα MS παρέχει τη βέλτιστη απόδοση για τον τυχαίο σχηματισμό οφθαλμών στα επάκρια αποκομμένα τμήματα βλαστών σε συγκεντρώσεις περίπου στα 10 $\mu$ M BA.

Στην παρούσα εργασία τα 30,2 $\mu$ M ήταν η καταλληλότερη συγκέντρωση BA, όμως δεν εξετάστηκε μικρότερη συγκέντρωση που ίσως και να έδινε καλύτερα αποτελέσματα. Αξίζει στο μέλλον να μελετηθεί και η μείωση της συγκέντρωσης BA έως τα 10 $\mu$ M.



## Βιβλιογραφία

- Anonymous (2003). Effects of the physical environment in plant cultures. *In*: [www.ucdavis.edu](http://www.ucdavis.edu)
- Barlass, M. and Skene, K. G. M. (1978). *In vitro* propagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) from fragmented shoot apices. *Vitis* 17: 335-340.
- Barlass, M. and Skene, K. G. M. (1980a). Studies on the fragmented shoot apex of grapevine. I. The regenerative capacity of leaf promordia fragments *in vitro*. *J. Exp. Bot.* 31 :483-488
- Barlass, M. and Skene, K. G. M. (1980b). Studies on the fragmented shoot apex of grapevine. II. Factors affecting growth and differentiation *in vitro*. *J. Exp. Bot.* 31:489-495.
- Barlass, M., Skene, K. G. M., Woodham, R. C. and Krake, L.R. (1982) Regeneration of virus-free grapevines using *in vitro* apical culture. *J. Appl. Biol.* 101:291-295.
- Bini, G. (1976). Prove di cultura *in vitro* di meristemi apicali di *Vitis vinifera* L. *Riv. Ortoflorofruttic. Ital.* 60: 289-296.
- Chee, R. and Pool, R. M. (1983). *In vitro* vegetative propagation of *Vitis*: Application of previously defined culture conditions to a selection of genotypes. *Vitis* 22: 363-374.
- Chee, R., Pool, R. M. and Bucher, D. (1984). A method for large scale *in vitro* propagation of *Vitis*. *New York's Food and Life Sciences Bulletin*, No. 109. Geneva, NY: New York State Agricultural Experiment Station.
- Cholvadova, B. (1989). Cultivating of meristem cultures of the grapevine (*Vitis vinifera* L.). *Physiologia Plantarum.* 24: 31-44. .
- Das, D. K., Reddy, M. K., Upadhyaya, K. C. and Sopory, S. K. (2002). An efficient leaf disk culture method for the regeneration via somatic embryogenesis and transformation of grape (*Vitis vinifera* L). *In*: [www.springer.de](http://www.springer.de)
- Deloire, A., Charpentier, M., Berlioz, G., Colin, A. and Gimonet, G. (1995). Micropropagation of the grapevine: Results of 10 years of experiments in the champagne vineyard and results of the first vinification. *Am. J. Eno. Vitic.* 43: 571-578.
- Demetzos C., Katerinopoulos H., Kouvarakis A., Stratigakis N., Loukis A.,



- Economakis C., Spiliotis V. and Tsaknis J. (1997). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cistus creticus* ssp. *eriocephalus*. *Planta Medica* 63:1-3.
- Dimas K., Demetzos C., Marsellos M., Sotiriadou R., Malamas M. and Kokkinopoulos D. (1998). Cytotoxic activity of labdane type diterpenes against human leukemic cell lines *in vitro*. *Planta Med.* 64: 208-211.
- Galzy, R. (1964). Technique de thermotherapie des viroses de la vigne. *Ann. Epiphytol.* 15:245-256.
- Galzy, R. (1969). Recherches sur la croissance de *Vitis rupestris* Scheele sain et court none cultivate *in vitro* a differentes temoeratures. *Ann. Phytopathol.*, 1: 149-166.
- Galzy, R. (1977). Recherche d' un milieu permettant la culture *in vitro* des apex de *Vitis rupestris* comportant trois ebauches foliaires. *In*: R. J. Gautheret (Editor), *Les cultures des tissus et des cellules des vegetaux*. Masson, Paris, pp. 134-146.
- Galzy R., Haffner, V. and Compan, D. (1990). Influence of three factors on the growth and nutrition of grapevine microcuttings. *Exp. Bot.* 41:295-301.
- Gifford, E. M. and Hewitt, W. M. B. (1961). The use of heat therapy and *in vitro* shoot tip culture to eliminate fanleaf virus from the grapevine. *Am. J. Enol. Vitic.* 12: 129-135.
- Goussard, P. G. (1982). Morphological responses of shoot apices of grapevine cultured *in vitro*. Effect of cytokinins in routine subculturing. *Vitis* 21: 293-298.
- Gray, D. J. and Fisher, L. C. (1985). *In vitro* shoot propagation of grape species, hybrids and cultivars. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 98: 172- 174.
- Gray, D. J. M. and Klein, C. M. (1987). *In vitro* shoot micropropagation end plant establishment of Orlando Seedless, grape and Tampa rootstock. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 100: 308-309.
- Gray, D. J. and Klein, C. M. (1989). *In vitro* micropropagation and plant establishment of "Blunc Du Bois" grape. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 102:221-223.
- Gray, D. J. and Benton, C. M. (1991). *In vitro*, micropropagation and plant establishment of muscadine grape cultivars (*Vitis rotundifolia*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 27: 7-14.

- Grenan, S. (1977). Rhizogenese de bourgeons apicaux de boutures de vigne cultivées *in vitro* Connaissance Vigne Via-13: 125-136.
- Haccious, B. and Lakshmanan, K. K. (1965). Planta 65: 102-104.
- Harris, R. E. and Stevenson, J. H. (1982). *In vitro* propagation of *Vitis*. *Vitis* 21: 22-32.
- Hasegawa, P. M. Murashige. T., Takatori, F. H. (1973). Propagation of asparagus through shoot apex culture. 2. Light and temperature requirements transability of plants and cytological-histological characteristics. J. Am. Soc. Hort. Sci. 98: 143-148.
- Hoefler, L. L. and Gifford. E. M. (1964). Growth *in vitro* of excised stem tips of *Vitis vinifera*. Am. J. Bot. 51: 677 (abstract)
- Huang, Li, S. J., Wang, Q. M., Shi, N. W. and Shen, J. C. (1990). *In vitro* rapid propagation and shoot apical meristem culture of grape. J. Fruit Sci. 7: 13-18.
- Jona, R. and Webb, K. J. (1978). Callus and auxiliary bud culture of *Vitis vinifera* "Sylvaner Riesling". Scientia Hortic. 9: 55-60.
- Kessell, R. J. H. and Carr, A. H. (1972). Effect of dissolved oxygen concentration on growth and differentiation of carrot (*Daucus carota*) tissue. J. Exp .Bot. 23: 996-1007.
- Krul, W. R. and Myerson, J. (1980). *In vitro* propagation of grape. In: Proc. Conf. Nursery Production of Fruit Plants through Tissue Culture-Application and Feasability, U.S. Dep. Agric. Beltsville, MD, pp. 35-43.
- Kyte, L. and Kleyn, J. (1996). Plants from test tubes. Timber Press. Portland, Oregon.
- Lee, N. and Wetzstein, H.Y. (1990). *In vitro* propagation and plant establishment of "Blunk du Bois" grape. J. Am. Soc. Hortic. Sci. 115: 324-329.
- Leroux, R. (1968) C. R, Acad. Sci. 226: 106-108.
- Letouze, R. and Beauchesne, G. (1969). C. R. Acad .Sci. 269: 1528-1531.
- Li J.-R. and Eaton, G.W. (1984). Growth and rooting of grape shoot apices *in vitro*. HortScience 19: 64-66.
- Lineberger, D. R. (2003). In: [www.aggie-horticulture.tamu.edu](http://www.aggie-horticulture.tamu.edu)
- Martinez, E. and Tizio, R. 1989). Grapevine micropropagation through shoot tips and minicuttings from *in vitro* cultured one-node cuttings.

HortScience 24: 513.

- Minas, G. J. (2002). *In vitro* propagation of "Veriko" grape from apical meristem. Miscellaneous reports 86. Agricultural Research Institute Ministry of Agriculture, Natural Resources and the Environment, Nicosia Cyprus.
- Monette, P. L. (1983). Influence of size of culture vessel on *in vitro* propagation of grape in a liquid medium. *Plant cell, Tissue, and Organ Culture* 6: 73-82.
- Mullins, M. G. and Srinivasan, C. (1976). Somatic embryos and plantlets from an ancient clone of the grapevine (cv "Cabernet Sauvignon") by apomixis *in vitro*. *J. Exp. Bot.* 27: 1022-1030.
- Mullins, M. G., Nair, Y. and Sampet, P. (1979). Rejuvenation *in vitro*: induction of juvenile characters in an adult clone of *Vitis vinifera* L. *Ann. Bot.* 44: 623-627.
- Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue cultures. *Rev. Plant. Physiol.* 25: 135-166.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* 15: 473-497.
- Nakagawa, S., Tomoko, K., Horiuchi S. and Yuda, E. (1983). Culture of grape ovary *in vitro*. *Acta Hortic.* 131: 259-.
- Nebel, B. J. and Naylor, A. W. (1968). *Am. J. Bot.* 55: 38-44.
- Norton, M. A. and Skirvin, R. M. (2001). Micropopagation of Norton grape. *HortTechnology* 11: 206-208.
- Novak, F. J. and Juvova, Z. (1980). Hormonal regulation of the development of isolated shoot tips of *Vitis* species *in vitro*. *Sb. UVTIZ Ochr. Rostl.* 16: 241-252.
- Novak, F. J. and Juvova, Z. (1982/83). Clonal propagation of grapevine through *in vitro* axillary bud culture. *Sc. Hortic.* 18: 231-240.
- Pierik, R. L. M. (1997). *In vitro* culture of higher plants. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
- Pool R. M. & Powell, L. E. (1975). The influence of cytokinins on *in vitro* shoot development of Concord grape. *J. Amer. Soc. Hortic. Sc.* 100 (2): 200-202.
- Robacker, C. D. and Chang, C. J. (1992). Shoot tip culture of Muscadine

- grape to eliminate Pierce's disease bacteria. HortScience 27: 449-450.
- Roubelakis-Angelakis, K. A. and Katsirdakis, K.C. (1990). *In vitro* micromultiplication of grapevine: Effect of age, genotype and culture conditions on inducing of callus in *Vitis* spp. Leaf segments, p.89-95. In: R. Rodrigues, R. Tames, and D. J. Durzan (eds.). Plant aging: basic and applied approaches. Kluwer Academic, New York.
- Roubelakis-Angelakis, K. A. and Zinanovits, S. B. (1991). A new culture medium for *in vitro* rhizogenesis of grapevine. HortScience 26: 1551-1553.
- Rui, J-R., and Eaton, G. W. (1984). Growth and rooting of grape shoot apices *in vitro*. HortScience 19: 64-66.
- Skoog, F. (1944). Am. J. Bot. 31: 19-24.
- Smith, E. F, Gribaudo, I, Roberts. A. V. and Mottley J. (1992). Paclobutrazol and reduced humidity improve resistance to wilting of micropropagated grapevine. HortScience 27: 111-113.
- Toogood, A. (editor in chief) (1999). Propagating plants pp 14-15. The royal horticultural society. London.
- Ueda, H. and Torikata, H. (1972). Am. Orchid Soc. Bull. 41: 322-327.
- Weis, J. S. and Jaffe, M. F. (1969). Physiol. Plant. 22: 171-176.
- Βαγιανού Ι. (1983). Πρακτική Αμπελουργία Οινολογία.
- Βασιλακάκης Δ. Μ. (1996). Στοιχεία γενικής και ειδικής δένδροκομίας.
- Βλάχος Μ. Β. (1991). Αμπελογραφία. Θεσσαλονίκη.
- Γραμματικάκη-Αυγελή Γ. Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας ΤΕΙ Κρήτης.  
[www.steg.teiher.gr/lab\\_geor.html](http://www.steg.teiher.gr/lab_geor.html)
- Ελευθερίου, Ε. Π. (1994). Τεχνολογία φυτικού πολλαπλασιαστικού υλικού. Art of Text. Θεσσαλονίκη.
- Κανάκης, Α. Γ. και Σταυρακάκης, Μ. Ν. (1998/9). Αναγέννηση επίκτητων βλαστών από *in vitro* καλλιέργεια μεριστωματικών εκφύτων μερικών ποικιλιών ,και υποκειμένων αμπέλου (*Vitis* sp.) καλλιεργούμενων στην Ελλάδα. Αγροτική Έρευνα 22: 13-20.
- Κανάκης, Α. Γ. και Συρράκος Γ. Λ. (2003). Μεριστωματικός πολλαπλασιασμός των ποικιλιών αμπέλου (*Vitis vinifera*) Γουστολίδι και Κολινιάτικο. Πρακτικά της 21<sup>ης</sup> Συνεδρίας της Ε.Ε.Ε.Ο., Ιωάννινα.
- Κίντζιος Σ. Ε. (1994). Επιχειρηματική ιστοκαλλιέργεια. Κατασκευή και

διαχείριση επιχειρηματικών μονάδων παραγωγής ανθοκομικού πολλαπλασιαστικού υλικού με ιστοκαλλιέργεια.

Κούσουλας Ι. Κ. (2002). Αμπελουργία.

Μαδέσης Π., Κωνσταντινίδου Ε., Νιάνιου Ε. και Τσαυτάρης Α. (2001). Αναγέννηση *in vitro* του κρητικού λαδάνου (*Cistus creticus* spp. *creticus*). [kyttariki.biol.uoa.gr/WWWROOT2/ XIOS/14η%20ΣΥΝΕΔΡΙΑ.htm](http://kyttariki.biol.uoa.gr/WWWROOT2/ XIOS/14η%20ΣΥΝΕΔΡΙΑ.htm)

Παπαδόπουλος Α., Νιάνιου Ε. και Τσαυτάρης Α. (2001). *In vitro* μικροπολλαπλασιασμός και αναγέννηση της βερικοκιάς *Prunus armeniaca* ποικιλίας «Μπεμπέκου» [kyttariki.biol.uoa.gr/WWWROOT2/ XIOS/](http://kyttariki.biol.uoa.gr/WWWROOT2/ XIOS/)

Ποντίκης, Κ. Α. (1994). Πολλαπλασιασμός καρποφόρων δέντρων και θάμνων. Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα-Πειραιάς. pp 197-222.

Πρωτοπαπαδάκης Ε. και Λοξού Β. Ινστιτούτο Ελιάς και Υποτροπικών Φυτών Χανίων. [www.nagref-cha.gr/eldocs/subtropical.html](http://www.nagref-cha.gr/eldocs/subtropical.html) - 19k.

Ρουμπελάκη- Αγγελάκη, Κ. Α. (1998). Η αμπελουργία στην Κρήτη- Προβλήματα και προοπτικές. ΓΕΩΤ.Ε.Ε., Παράρτημα Κρήτης. Ηράκλειο Κρήτης.

Σουρρή, Α. Θ. (2003). Ιστοκαλλιέργεια αμπέλου: Επίδραση μικροπεριβάλλοντος κατά την *ex vitro* σκληραγώγηση των φυταρίων. Μεταπτυχιακή διατριβή. Σχολή Γεωπονικών Επιστημών Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας.

Σταυρακάκης, Μ. Ν. και Κανάκης, Α. Γ. (1997). Σύγχρονες μέθοδοι ταχέως αγενούς πολλαπλασιασμού μερικών ποικιλιών και υποκειμένων αμπέλου που καλλιεργούνται στην Ελλάδα. *In vitro* καλλιέργεια βλαστικών κορυφών. Γεωργική Έρευνα 21: 68-74.

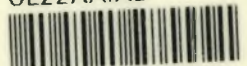
Σταύρακας Ε. Δ. (1997). Μαθήματα γενικής αμπελουργίας.

Συμινής, Ι. Χ. Μπινιάρη, Κ. και Σταυρακάκης, Ν. Μ. (1998/9). Μελέτη της μορφογένεσης *in vitro* σε ελληνικές ποικιλίες αμπελιού. Αγροτική Έρευνα 22: 69-74.

...αναλαμβάνει να εκπαιδεύσει τον υπαλλήλο...  
...παράδειγμα του προγράμματος...  
...επιχειρησιακό σχέδιο...  
...από την εισαγωγή στην εκπαίδευση...  
...επιχειρησιακό σχέδιο...  
...από την εισαγωγή στην εκπαίδευση...  
...επιχειρησιακό σχέδιο...  
...από την εισαγωγή στην εκπαίδευση...  
...επιχειρησιακό σχέδιο...  
...από την εισαγωγή στην εκπαίδευση...

35 - 36



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ  
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ  
  
00400007494 1