

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

<<Ιστοκαλλιέργεια αμπέλου: επίδραση μικροπεριβάλλοντος κατά
την *ex vitro* σκληραγώγηση των φυταρίων>>

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Αγγελική Θ. Σουρρή

Νέα Ιωνία Μαγνησίας, 2003



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

Αριθ. Εισ.: 1366/1
Ημερ. Εισ.: 01-07-2003
Δωρεά:
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ
634.8
ΣΟΥ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ
ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ



<<Ιστοκαλλιέργεια αμπέλου: επίδραση μικροπεριβάλλοντος κατά την *ex vitro* σκληραγώγηση των φυταρίων>>

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Αγγελική Θ. Σουρρή

Νέα Ιωνία Μαγνησίας, 2003

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Γ. Νάνος (Επιβλέπων)

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κ. Κίττας (Μέλος)

Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ι. Ρούμπος (Μέλος)

ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε

Επίκουρος Καθηγητής

Καθηγητής

Ερευνητής Α

Στην Αγγελική

Αγγελική Θ. Σουρρή, 2003, <<Ιστοκαλλιέργεια αμπέλου: επίδραση μικροπεριβάλλοντος κατά την *ex vitro* σκληραγώγηση των φυταρίων>>, Μεταπτυχιακή Διατριβή, Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, Νέα Ιωνία Μαγνησίας.

12 Προκαταρκτικές σελίδες, 105 Σελίδες, 22 Πίνακες, 14 Σχήματα, 82 Βιβλιογραφικές παραπομπές.

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία έγινε μελέτη των κλιματικών συνθηκών ανάπτυξης και *ex vitro* σκληραγώγησης φυτών αμπέλου 110R που αναπτύχθηκαν *in vitro* σε δύο υποστρώματα, το τροποποιημένο υπόστρωμα MS (M₄) και το υπόστρωμα M₄ με προσθήκη μίγματος τύρφης-περλίτη. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις των παραγόντων του μικροπεριβάλλοντος των φυτών κατά την ανάπτυξη και σκληραγώγησή τους και έγινε προσπάθεια συσχέτισης του υποστρώματος *in vitro* καλλιέργειας, της βλαστικής ανάπτυξης των φυταρίων και των κλιματικών συνθηκών κατά την αρχική σκληραγώγηση. Έγινε φανερό ότι η μείωση του διαθέσιμου νερού στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης που επιτεύχθηκε μέσω της προσθήκης τύρφης-περλίτη έδωσε φυτά με μικρότερο βλαστό και ρίζα (μήκος, βάρος νωπό και ξηρό) αλλά με μεγαλύτερο ποσοστό ξηρής ουσίας στη ρίζα από φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄. Τέλος, το υπόστρωμα M₄ παρουσία τύρφης-περλίτη δεν δημιούργησε πιο ταχέως αναπτυσσόμενα φυτά κατά το στάδιο της σκληραγώγησης. Καταγράφηκε πλήρως η πορεία των κλιματικών παραγόντων με το χρόνο κατά την *ex vitro* σκληραγώγηση των φυταρίων. Παρά το χαμηλό φωτισμό τα φυτά συσώρευσαν σημαντικές ποσότητες νωπής και ξηρής ουσίας και την κατένειμαν επιλεκτικά προς τους βλαστούς μετά την πρώτη περίοδο σκληραγώγησης οπότε και ολοκληρώθηκε η ανάπτυξή του το ριζικού συστήματος. Ενώ η θερμοκρασία και σχετική υγρασία κατά τη διάρκεια της σκληραγώγησης ήταν σε ικανοποιητικά-αποτελεσματικά επίπεδα, ο φωτισμός ήταν ιδιαίτερα χαμηλός και πιθανότατα σημαντική αύξησή του θα είχε σαν αποτέλεσμα τη μείωση του χρόνου σκληραγώγησης και ταχύτερη έξοδο των φυτών στο εξωτερικό περιβάλλον του φυτωρίου.

Ευχαριστίες

Φτάνοντας τώρα στην ολοκλήρωση των προσπαθειών μου, θα ήταν βασική παράληψη εάν δεν αναφερόμουν στους ανθρώπους που με τον ένα ή τον άλλο τρόπο πορεύτηκαν μαζί μου το δρόμο αυτό και έκαναν τις προσπάθειές μου να καρποφορήσουν.

Πρώτον από όλους, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου και επιβλέποντα της διατριβής αυτής, κ. Γεώργιο Νάνο, ο οποίος και αποδέχτηκε να αναλάβει τη στήριξή μου για την πραγματοποίηση αυτής της εργασίας, αν και το θέμα της δεν ήταν απολύτως σύμφωνο με τα στενά ερευνητικά του ενδιαφέροντα και σίγουρα αντιμετώπισε αρκετά προβλήματα για πρώτη φορά μαζί με εμένα. Αρχικά, η διδασκαλία του στο προπτυχιακό μάθημα του Αγενούς Πολλαπλασιασμού αποτέλεσε το έναυσμα για τη γέννηση του πρώτου ενδιαφέροντος από πλευράς μου επάνω στον τομέα της ιστοκαλλιέργειας. Στην πορεία των μεταπτυχιακών σπουδών, η δυνατότητα που μου έδωσε να υλοποιήσω έρευνα στον τομέα της ιστοκαλλιέργειας του αμπελιού ήταν σημαντικότερη, καθώς χωρίς την συνδρομή του πιθανότατα δεν θα είχα ανακαλύψει στην πράξη το ιδιαίτερο ενδιαφέρον που παρουσιάζει για μένα αυτό το γνωστικό πεδίο. Η συνεχής και αμέριστη συμπαράστασή του καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας αυτής συνέβαλε καθοριστικά στη διαμόρφωση και ολοκλήρωση του παρόντος αποτελέσματος. Τον ευχαριστώ θερμά για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε και την ουσιαστική στήριξη της προσπάθειάς αυτής.

Σημαντικότερη ήταν η προσφορά του διευθυντή του Ινστιτούτου Προστασίας Φυτών Βόλου κ. Ιωάννη Ρούμπου στην πραγματοποίηση της διατριβής αυτής, ο οποίος και μου έδωσε τη δυνατότητα υλοποίησης του πειραματικού μέρους. Η άψογη συνεργασία του, η αμέριστη συμπαράστασή του καθώς και η δημιουργία ιδανικού κλίματος εργασίας στους χώρους του ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε. συνετέλεσε στο να τελεσφορήσει η προσπάθειά μου αυτή με τον καλύτερο δυνατό τρόπο. Η ευκαιρία που μου έδωσε ήταν πολύ σημαντική για μένα και για το λόγο αυτό τον ευχαριστώ πολύ.

Εν συνεχεία θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Κωνσταντίνο Κίττα για την επίβλεψη, την παροχή πολύτιμων πληροφοριών σε θέματα που άπτονται του γνωστικού του αντικειμένου καθ' όλη τη διάρκεια της εργασίας

αυτής, την καθοδήγησή του στην οργάνωση και παρουσίαση των αποτελεσμάτων των μετρήσεων του περιβάλλοντος, καθώς και τις διορθώσεις-επισημάνσεις που έχει επιφορτιστεί για να πραγματοποιήσει στην παρούσα διατριβή.

Σημαντική ήταν επίσης η βοήθεια όλου του προσωπικού του ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε με αντικείμενο την ιστοκαλλιέργεια στην εκπαίδευσή μου στις τεχνικές της εγκατάστασης, του πολλαπλασιασμού και του εγκλιματισμού των φυταρίων. Ιδιαίτερως θα ήθελα να ευχαριστήσω τις κυρίες Κ. Αδαμοπούλου και Ε. Ζαχαροπούλου για την ουσιαστική προσφορά τους στην εκπαίδευσή μου και την εξοικείωσή μου με τις τεχνικές.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον καθηγητή του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας κ. Πέτρο Λόλα που με καλή διάθεση προσέφερε εργαστηριακό εξοπλισμό αλλά και βιβλία όποτε αυτό κρίθηκε αναγκαίο. Ευχαριστώ επίσης τον κ. Άγγελο Πατάκα, Επίκουρο Καθηγητή και τον κ. Αθανάσιο Μαυρομάτη, Λέκτορα για την πολύτιμη βιβλιογραφία που μου έδωσαν επάνω στο αντικείμενο της ιστοκαλλιέργειας.

Σημαντική ήταν για μένα η ηθική συμπαράσταση του Βαΐου καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου. Τον ευχαριστώ για την υπομονή, την υποστήριξη και την κατανόηση που έδειξε και δείχνει να κάνω τα όνειρά μου πραγματικότητα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου, τους γονείς μου και την αδερφή μου, οι οποίοι υπήρξαν πάντα συμπαραστάτες μου και συνέβαλλαν τόσο ηθικά όσο και οικονομικά να πραγματοποιηθούν οι σπουδές μου. Ευχαριστώ πολύ.

Πίνακας Περιεχομένων

1

Βιβλιογραφική ανασκόπηση.....	1
1.1. Ιστοκαλλιέργεια.....	1
1.1.1 Γενικά για την ιστοκαλλιέργεια	1
1.1.2 Ιστορική αναδρομή.....	8
1.1.3 Υποστρώματα χρησιμοποιούμενα στην ιστοκαλλιέργεια	12
1.2 Επίδραση του φυσικού περιβάλλοντος στα καλλιεργούμενα φυτά <i>in vitro</i>.....	16
1.2.1 Συνοχή του θρεπτικού υποστρώματος	16
1.2.2 Θερμοκρασία	17
1.2.2.1 Επίδραση στην αύξηση των φυτών	17
1.2.2.2 Επίδραση στη μορφογένεση.....	18
1.2.3 Σχετική υγρασία	19
1.2.4 Φωτισμός.....	20
1.2.4.1 Επίδραση στη μορφογένεση.....	22
1.3 Σκληραγώγηση (εγκλιματισμός) φυταρίων παραγόμενων <i>in vitro</i>.....	23
1.4 Αμπέλι.....	29
1.4.1 Η αμπελουργία ανά τον κόσμο	29
1.4.2 Η αμπελουργία στην Ελλάδα	31
1.4.3 Το γένος <i>Vitis</i>	32
1.4.4 Το υποκείμενο 110R.....	33
1.5 Μεθοδολογία ιστοκαλλιέργειας αμπέλου	35
1.6 Σκοπός της εργασίας	38

2

Υλικά και μέθοδοι	39
2.1 Τα φυτά.....	39
2.2 Οι γυάλες ανάπτυξης	39
2.3 Ο θάλαμος ανάπτυξης	40
2.4 Ο θάλαμος σκληραγώγησης και οι κλωβοί εγκλιματισμού	41
2.5 Παρασκευή του υποστρώματος.....	42
2.6 Εγκατάσταση	47
2.7 Πολλαπλασιασμός.....	48
2.8 Πειραματική διαδικασία και συλλογή δεδομένων	48
2.9 Στατιστική ανάλυση των δεδομένων	55

3

Αποτελέσματα..... 56

3.1 Μετρήσεις αύξησης 56

3.2 Μετρήσεις περιβάλλοντος κατά την ανάπτυξη 84

3.2.1 Μετρήσεις των παραμέτρων του εξωτερικού περιβάλλοντος της γυάλας (περιβάλλον του θαλάμου ανάπτυξης)..... 84

3.2.2 Το μικροκλίμα της γυάλας..... 86

3.3 Μετρήσεις περιβάλλοντος κατά την σκληραγώγηση..... 89

3.3.1 Μετρήσεις των παραμέτρων του εξωτερικού περιβάλλοντος του κλωβού (περιβάλλον του θαλάμου σκληραγώγησης)..... 89

3.3.2 Το μικροκλίμα του κλωβού..... 89

4

Συζήτηση..... 97

4.1 Μελέτη αύξησης των φυτών 97

4.2 Μελέτη περιβάλλοντος στο θάλαμο ανάπτυξης..... 101

4.3 Μελέτη περιβάλλοντος στο θάλαμο εγκλιματισμού 102

5

Συμπεράσματα..... 104

5.1 Γενικά συμπεράσματα..... 104

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ..... 106

Κατάλογος Πινάκων

- ✂ Πίνακας 1.1. Οι διάφοροι τύποι της ιστοκαλλιέργειας και ο λόγος για τον οποίο εφαρμόζονται..... 6
- ✂ Πίνακας 1.2. Υποστρώματα που χρησιμοποιούνται στην ιστοκαλλιέργεια. Οι συγκεντρώσεις που αναφέρονται στον πίνακα είναι σε mg/L. 13
- ✂ Πίνακας 1.3. Βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης και περιοριστικές θερμοκρασίες διαφόρων εκφύτων..... 18
- ✂ Πίνακας 1.4. Σχετική υγρασία στους γυάλινους περιέκτες ανάλογα με το πώμα που χρησιμοποιείται..... 20
- ✂ Πίνακας 1.5. Τεχνητά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται κατά την σκληραγώγηση φυταρίων προερχόμενων από ιστοκαλλιέργεια..... 28
- ✂ Πίνακας 1.6. Η καλλιεργούμενη έκταση με αμπέλι σε διάφορες χώρες. 30
- ✂ Πίνακας 1.7. Η καλλιεργούμενη έκταση με σταφύλια στις περιφέρειες της Ελλάδας..... 32
- ✂ Πίνακας 1.8. Υπόστρωμα για την ιστοκαλλιέργεια αμπέλου..... 37
- ✂ Πίνακας 2.1. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του υποστρώματος M₄..... 45
- ✂ Πίνακας 2.2. Στάδια ανοίγματος του καπακιού του κλωβού εγκλιματισμού κατά την σκληραγώγηση-ποσοστό επί τοις εκατό του ανοίγματος ως προς την συνολική επιφάνεια του ανοίγματος του κλωβού. 52
- ✂ Πίνακας 3.1. Μέσος όρος του ποσοστού επί τοις εκατό της ξηρής ουσίας (ξ.ο.) στο βλαστό και τη ρίζα των φυτών του πρώτου πειράματος, στα δύο χρησιμοποιούμενα υποστρώματα (M₄ και M₄ με τύρφη και περλίτη) και τις δύο χρονικές στιγμές λήψης μετρήσεων (πριν και μετά την σκληραγώγηση των τεσσάρων εβδομάδων), σημαντικότητα και Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά (Ε.Σ.Δ.) των μεταβλητών αυτών..... 58
- ✂ Πίνακας 3.2. Μέσος όρος του ποσοστού επί τοις εκατό της ξηρής ουσίας (ξ.ο.) στο βλαστό και τη ρίζα των φυτών του δεύτερου πειράματος, στα δύο χρησιμοποιούμενα υποστρώματα (M₄ και M₄ με τύρφη και περλίτη) και τις δύο χρονικές στιγμές λήψης μετρήσεων (πριν και μετά την σκληραγώγηση των δύο εβδομάδων), σημαντικότητα και Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά (Ε.Σ.Δ.) των μεταβλητών αυτών..... 59
- ✂ Πίνακας 3.3. Μέσος όρος του νωπού βάρους του βλαστού, της ρίζας και ολόκληρου του φυτού (σε mg) του πρώτου πειράματος, στα δύο χρησιμοποιούμενα υποστρώματα (M₄ και M₄ με τύρφη και περλίτη) και τις δύο χρονικές στιγμές λήψης μετρήσεων (πριν και μετά την σκληραγώγηση των τεσσάρων εβδομάδων), σημαντικότητα και Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά (Ε.Σ.Δ.) των μεταβλητών αυτών..... 63
- ✂ Πίνακας 3.4. Μέσος όρος του νωπού βάρους του βλαστού, της ρίζας και ολόκληρου του φυτού (σε mg) του δεύτερου πειράματος, στα δύο χρησιμοποιούμενα υποστρώματα (M₄ και M₄ με τύρφη και περλίτη) και τις δύο χρονικές στιγμές λήψης μετρήσεων (πριν και μετά την σκληραγώγηση

των δύο εβδομάδων), σημαντικότητα και Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά (Ε.Σ.Δ.) των μεταβλητών αυτών. 64

✂ Πίνακας 3.6. Μέσος όρος του ξηρού βάρους του βλαστού, της ρίζας και ολόκληρου του φυτού του δεύτερου πειράματος, στα δύο χρησιμοποιούμενα υποστρώματα (M_4 και M_4 με τύρφη και περλίτη) και τις δύο χρονικές στιγμές λήψης μετρήσεων (πριν και μετά την σκληραγώγηση των δύο εβδομάδων), σημαντικότητα και Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά (Ε.Σ.Δ.) των μεταβλητών αυτών. 68

✂ Πίνακας 3.7. Μέσος όρος του αριθμού κόμβων στο βλαστό, του μήκους του βλαστού (σε cm), του αριθμού των κυρίων ριζών και του συνολικού μήκους των κυρίων ριζών (σε cm) των φυτών του πρώτου πειράματος, στα δύο χρησιμοποιούμενα υποστρώματα (M_4 και M_4 με τύρφη και περλίτη) και τις δύο χρονικές στιγμές λήψης μετρήσεων (πριν και μετά την σκληραγώγηση των τεσσάρων εβδομάδων), σημαντικότητα και Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά (Ε.Σ.Δ.) των μεταβλητών αυτών. 72

✂ Πίνακας 3.8. Μέσος όρος του αριθμού κόμβων στο βλαστό, του μήκους του βλαστού (σε cm), του αριθμού των κυρίων ριζών και του συνολικού μήκους των κυρίων ριζών (σε cm) των φυτών του δεύτερου πειράματος, στα δύο χρησιμοποιούμενα υποστρώματα (M_4 και M_4 με τύρφη και περλίτη) και τις δύο χρονικές στιγμές λήψης μετρήσεων (πριν και μετά την σκληραγώγηση των δύο εβδομάδων), σημαντικότητα και Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά (Ε.Σ.Δ.) των μεταβλητών αυτών. 73

✂ Πίνακας 3.9. Μέσος όρος του νωπού βάρους (N.B.) βλαστού (σε mg) ανά μονάδα μήκους (cm) βλαστού, του νωπού βάρους ρίζας (σε mg) ανά μονάδα μήκους (cm) ρίζας, του ξηρού βάρους βλαστού (σε mg) ανά μονάδα μήκους (cm) βλαστού και του ξηρού βάρους ρίζας (σε mg) ανά μονάδα μήκους (cm) ρίζας, των φυτών του 1^{ου} πειράματος, στα δύο χρησιμοποιούμενα υποστρώματα (M_4 και M_4 με τύρφη και περλίτη) και τις δύο χρονικές στιγμές λήψης μετρήσεων (πριν και μετά την σκληραγώγηση των τεσσάρων εβδομάδων), σημαντικότητα και Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά (Ε.Σ.Δ.) των μεταβλητών αυτών. 78

✂ Πίνακας 3.10. Μέσος όρος του νωπού βάρους (N.B.) βλαστού ανά μονάδα μήκους (cm) βλαστού, του νωπού βάρους ρίζας ανά μονάδα μήκους (cm) ρίζας, του ξηρού βάρους βλαστού ανά μονάδα μήκους (cm) βλαστού και του ξηρού βάρους ρίζας ανά μονάδα μήκους (cm) ρίζας, των φυτών του 2^{ου} πειράματος, στα δύο χρησιμοποιούμενα υποστρώματα (M_4 και M_4 με τύρφη και περλίτη) και τις δύο χρονικές στιγμές λήψης μετρήσεων (πριν και μετά την σκληραγώγηση των δύο εβδομάδων), σημαντικότητα και Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά (Ε.Σ.Δ.) των μεταβλητών αυτών. 79

✂ Πίνακας 3.11. Μέσος όρος του νωπού βάρους (N.B.) βλαστού και νωπού βάρους ρίζας προς το νωπό βάρος όλου του φυτού επί 100%, του ξηρού βάρους (Ξ.Β.) βλαστού και ρίζας προς το ξηρό βάρος όλο του φυτού επί 100%, των φυτών του 1^{ου} πειράματος, στα δύο χρησιμοποιούμενα υποστρώματα (M_4 και M_4 με τύρφη και περλίτη) και τις δύο χρονικές στιγμές λήψης μετρήσεων (πριν και μετά την σκληραγώγηση των τεσσάρων εβδομάδων), σημαντικότητα και Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά (Ε.Σ.Δ.) των μεταβλητών αυτών. 82

✂ Πίνακας 3.12. Μέσος όρος του νωπού βάρους (N.B.) βλαστού και νωπού βάρους ρίζας προς το νωπό βάρος όλου του φυτού επί 100%, του ξηρού βάρους (Ξ.Β.) βλαστού και ρίζας προς το ξηρό βάρος όλο του φυτού

επί 100%, των φυτών του 2^{ου} πειράματος, στα δύο χρησιμοποιούμενα υποστρώματα (M₄ και M₄ με τύρφη και περλίτη) και τις δύο χρονικές στιγμές λήψης μετρήσεων (πριν και μετά την σκληραγώγηση των δύο εβδομάδων), σημαντικότητα και Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά (Ε.Σ.Δ.) των μεταβλητών αυτών. 83

Κατάλογος Σχημάτων

✧ Σχήμα 3.2.1. Ημερήσια πορεία της θερμοκρασίας στο θάλαμο ανάπτυξης.	85
✧ Σχήμα 3.2.2. Μετρούμενο φως στο ράφι (LUX), στην έξω πλευρά του-προς το διάδρομο, στο κέντρο του και στη μέσα πλευρά-προς τον τοίχο.	85
✧ Σχήμα 3.2.3. Ημερήσια πορεία της θερμοκρασίας των δύο υποστρωμάτων, M ₄ και M ₄ με προσθήκη τύρφης κα περλίτη, μέσα στη γυάλα ανάπτυξης.....	87
✧ Σχήμα 3.2.4. Ημερήσια πορεία της θερμοκρασίας των φύλλων των φυτών που αναπτύσσονται στα δύο υποστρώματα, M ₄ και M ₄ με προσθήκη τύρφης κα περλίτη, μέσα στη γυάλα ανάπτυξης.....	87
✧ Σχήμα 3.2.5. Διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ υποστρωμάτων M ₄ και M ₄ με τύρφη και περλίτη $\Delta T_{u_{M_4-M_4+T+\Pi}}$ ($=T_{u_{M_4}}-T_{u_{M_4+T+\Pi}}$) (°C) και διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ φύλλων φυτών αναπτυσσόμενων στα υποστρώματα M ₄ και M ₄ με τύρφη και περλίτη $\Delta T_{\phi_{M_4-M_4+T+\Pi}}$ ($=T_{\phi_{M_4}}-T_{\phi_{M_4+T+\Pi}}$) (°C), στη γυάλα ανάπτυξης, κατά τη διάρκεια του 24ώρου.....	88
✧ Σχήμα 3.2.6. Διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ φύλλου και υποστρώματος $\Delta T_{\phi_{\gamma}-u_{\gamma}}$ ($=T_{\phi_{\gamma}}-T_{u_{\gamma}}$) (°C) στη γυάλα ανάπτυξης, κατά τη διάρκεια του 24ώρου.	88
✧ Σχήμα 3.3.1. Ημερήσια πορεία της θερμοκρασίας στο θάλαμο σκληραγώγησης.	92
✧ Σχήμα 3.3.2. Μέση μετρούμενη θερμοκρασία στο θάλαμο σκληραγώγησης κατά τη διάρκεια του 24ώρου, τις 19ημέρες εγκλιματισμού.	93
✧ Σχήμα 3.3.3. Μέση μετρούμενη σχετική υγρασία κατά τη διάρκεια του 24ώρου στον κλωβό, τις 19ημέρες εγκλιματισμού.	93
✧ Σχήμα 3.3.4. Έλλειμμα κορεσμού του αέρα του κλωβού τις 19 ημέρες σκληραγώγησης.	94
✧ Σχήμα 3.3.5. Διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ του αέρα του κλωβού στο ύψος των φυτών και του εξωτερικού αέρα $\Delta T_{i_k-o_k}$ ($=T_{i_k}-T_{o_k}$) (°C) κατά τη διάρκεια της σκληραγώγησης των 19 ημερών.....	94
✧ Σχήμα 3.3.6. Διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ του αέρα του κλωβού στο ύψος των φυτών και του εξωτερικού αέρα $\Delta T_{i_k-o_k}$ ($=T_{i_k}-T_{o_k}$) (°C) κατά τη διάρκεια του 24ώρου, τη δεύτερη, δέκατη τρίτη και δέκατη έκτη ημέρα της σκληραγώγησης.	95

✧ Σχήμα 3.3.7. Διαφορά μεταξύ πίεσης ατμών μεταξύ του αέρα του κλωβού και του αέρα του θαλάμου σκληραγώγησης $\Delta e_{i_k} - e_{o_k}$ ($=e_{i_k} - e_{o_k}$) (kPa) τις 19 ημέρες εγκλιματισμού..... 95

✧ Σχήμα 3.3.8. Διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ του υποστρώματος και του φύλλου των φυτών $\Delta T_{u_k} - \phi_k$ ($=T_{u_k} - T_{\phi_k}$) ($^{\circ}\text{C}$) 96

Κατάλογος Εικόνων

✧ Εικόνα 2.1. Οι γυάλες ανάπτυξης με υπόστρωμα.....	40
✧ Εικόνα 2.2. Ο θάλαμος ανάπτυξης.	41
✧ Εικόνα 2.3. α) Ο θάλαμος εγκλιματισμού και β) ο κλωβός εγκλιματισμού.	42
✧ Εικόνα 2.4. Ο κλίβανος υγρής αποστείρωσης.	46
✧ Εικόνα 2.5. Η τράπεζα νηματικής ροής.....	48
✧ Εικόνα 2.6. Το φωτόμετρο.	54

1

Βιβλιογραφική ανασκόπηση

1.1. Ιστοκαλλιέργεια

Θεοφραύτος

1.1.1 Γενικά για την ιστοκαλλιέργεια

Η ιστοκαλλιέργεια είναι μία τεχνική που αναπτύχθηκε τη δεκαετία του '60 και βρίσκει πολλές εφαρμογές, από τον πολλαπλασιασμό καλλωπιστικών και πολυετών καλλιεργούμενων φυτών σε εμπορική κλίμακα μέχρι την επίπονη επιστημονική έρευνα στο εργαστήριο (Toogood, 1999). Με τον όρο ιστοκαλλιέργεια νοείται η καλλιέργεια τμημάτων φυτών, σπόρων, εμβρύων, οργάνων, κυττάρων και πρωτοπλαστών ανώτερων φυτών σε θρεπτικά υποστρώματα κάτω από ασηπτικές συνθήκες. Η τεχνική της ιστοκαλλιέργειας είναι ένα σημαντικό εργαλείο για τους γενετιστές που βελτιώνουν το γενετικό υλικό φυτών με αγενή ή εγγενή τρόπο. Αποτελεί γρήγορο και καθαρό τρόπο για τους γενετιστές ώστε να μεγαλώσει το υλικό τους και στη συνέχεια να μπορέσουν να αναγνωρίσουν σ' αυτό γονίδια τα οποία επιθυμούν να χειριστούν ή να μεταφέρουν χαρακτηριστικά από ένα φυτό σε ένα άλλο. Ο ρόλος της είναι σημαντικός σε μια σειρά από επιστημονικά πεδία όπως η Βοτανική, η Χημεία, η Φυσική, η Γενετική Μηχανική, η Μοριακή Βιολογία, η δημιουργία υβριδίων, η δοκιμή των φυτοπροστατευτικών ουσιών και η τεχνολογία τροφίμων.

Γενικά, οι τεχνικές της ιστοκαλλιέργειας χαρακτηρίζονται από τα παρακάτω:

- Λαμβάνουν χώρα σε μικρής έκτασης χώρο

- Οι συνθήκες του περιβάλλοντος και της ανάπτυξης αριστοποιούνται (φυσικοί παράγοντες, θρέψη, ορμόνες)
- Όλοι οι μικροοργανισμοί καθώς και άλλοι εχθροί των ανώτερων φυτών αποκλείονται
- Ο συνήθης τρόπος ανάπτυξης των φυτών συχνά καταρρίπτεται ώστε ένα φυτό να αναπτύσσεται συνεχώς ή ένας ιστός μπορεί να δημιουργήσει κάλο και από αυτόν να προκληθεί οργανογένεση, σωματική εμβρυογένεση κ.λ.π.
- Η ικανότητα παραγωγής πρωτοπλαστών και μεμονωμένων κυττάρων δίνει την δυνατότητα πραγματοποίησης χειρισμών στα φυτά που δεν ήταν δυνατοί να γίνουν νωρίτερα με άλλο τρόπο.

Για πρώτη φορά η ιστοκαλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε στον πολλαπλασιασμό της ορχιδέας (Marston, 1967) παράγοντας φυτά με συγκεκριμένα πανομοιότυπα ποιοτικά χαρακτηριστικά και απαλλαγμένα από ιώσεις, πράγμα που πριν με τον εγγενή πολλαπλασιασμό ήταν αδύνατο. Στη συνέχεια έγινε φανερό ότι όλα τα φυτά μπορούσαν να πολλαπλασιαστούν με τον συγκεκριμένο τρόπο, με την προϋπόθεση ότι θα ακολουθούσαν η απαραίτητη κάθε φορά διαδικασία για κάθε φυτό.

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 ακόμα και ένα μόνο κύτταρο, 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.

Από το στάδιο του έκφυτου μέχρι την μεταφύτευση στο θερμοκήπιο ή το χωράφι, η ιστοκαλλιέργεια συμπεριλαμβάνει τέσσερα βασικά στάδια. Τα στάδια αυτά είναι: I) εγκατάσταση των εκφύτων, II)

πολλαπλασιασμός, III) ριζοβόληση και IV) εγκλιματισμός ή σκληραγώγηση (Kyte & Kleyn, 1996, Ποντίκης, 1994).

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

Το ενδιαφέρον σ' αυτή την τεχνική είναι ότι ασθένειες από το μητρικό φυτό δεν μεταφέρονται στους απογόνους. Εξωτερικά παθογόνα όπως μύκητες, βακτήρια, σπόρια αλλά και 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 βλαστού. Το ακραίο μερίστωμα είναι συνήθως απαλλαγμένο ιών σε ιομένα φυτά λόγω του ότι αυτά τα μεριστωματικά κύτταρα δεν έχουν ακόμα συνδεθεί με το αγγειακό σύστημα του φυτού ή προκαλούνται να αναπτυχθούν γρηγορότερα από τον ιό (θερμοθεραπεία) (Ελευθερίου, 1994). (Dec 17

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- πχ 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 κυτάρων ή κάλων είναι συνήθως πιο γενετικά ασταθείς σε σχέση με έκφυτα που προέρχονται από τμήμα βλαστού ή άλλων φυτικών οργάνων. Στις περιπτώσεις των σχετικά εύκολα μεταλλάξιμων ειδών, η εμπειρία επιβάλλει την χρησιμοποίηση πολλών εκφύτων, τον περιορισμό των υπό-καλλιεργειών αυτών και τη χρησιμοποίηση νέου υλικού κάθε χρονιά.

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:

- Η ανομοιομορφία των φυτών που παράγονται από σπόρο
- Η παραγωγή από σπόρο φυτών μη χαρακτηριστικών της ποικιλίας
- Το μεγάλο χρονικό διάστημα που μεσολαβεί μέχρι ο σπόρος να μεγαλώσει και να δώσει ώριμο φυτό
- Η δυσκολία χειρισμού σπόρων
- Η μη διαθεσιμότητα των σπόρων
- Η αργή ανάπτυξη των μοσχευμάτων
- Το μικρό ποσοστό επιβίωσης των μοσχευμάτων
- Η μεγάλη φροντίδα που απαιτούν τα μοσχεύματα
- Η μεγάλη ευαισθησία των μοσχευμάτων στις ασθένειες
- 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.
- Η απαίτηση ύπαρξης μεγάλου χώρου για αρκετά μητρικά φυτά λήψης μοσχευμάτων
- 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 και της ιδιαίτερα εντατικής διαδικασίας παραγωγής, ιδιαίτερα στις περιπτώσεις που απαιτούνται να δημιουργηθούν λίγα νέα φυτά.

Είναι σύνηθες να σπαταλάται χρόνος, κόπος και χώρος για μη παραγωγικούς σπόρους και μοσχεύματα που δεν θα δώσουν φυτά. Παράλληλα ένας μεγάλος αριθμός νεαρών φυταρίων χάνονται από προσβολές εχθρών, ασθενειών αλλά και από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Τα έκφυτα της ιστοκαλλιέργειας είναι λιγότερο ευπαθή σε τέτοιες προβολές εξ' αιτίας του αποστειρωμένου περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκονται αλλά και υποφέρουν λιγότερο από ακραίες συνθήκες περιβάλλοντος λόγω των ελεγχόμενων συνθηκών στο εργαστήριο και τους χώρους παραγωγής τους. Σ' αυτό συντείνει και το γεγονός ότι 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 και ένα μόσχευμα ένα φυτό επίσης. Αντίθετα, ένα έκφυτο (κομμάτι βλαστού, φύλλου, ρίζας, οφθαλμού, σπόρου, μερίστωμα ή ακόμα και θεωρητικά ένα κύτταρο) 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.

Στο 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 2 έως 6 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 βιγκόνια (*Begonia*). Στην πολυπλοκότητα ακολουθούν τα γαρύφαλλα (*Dianthus*), η φράουλα (*Fragaria*) και το *Syngonium*.

Στον Πίνακα 1.1 που ακολουθεί παρουσιάζονται οι διάφοροι τύποι της ιστοκαλλιέργειας καθώς και ο λόγος για τον οποίο κάθε μία από αυτές εφαρμόζεται.

Πίνακας 1.1. Οι διάφοροι τύποι της ιστοκαλλιέργειας και ο λόγος για τον οποίο εφαρμόζονται.

Τύπος ιστοκαλλιέργειας	Σκοπός εφαρμογής
Καλλιέργεια εμβρύων	<ul style="list-style-type: none"> • Συντόμευση του κύκλου βελτίωσης • Παρεμπόδιση της αποβολής του εμβρύου • Παράκαμψη της ασυμβατότητας • Παραγωγή απλοειδών • Σαν πηγή για την δημιουργία κάλου
Καλλιέργεια σπόρου ορχιδέας	<ul style="list-style-type: none"> • Μαζική παραγωγή φυτών για γλάστρα ή δρεπτό άνθος
Καλλιέργεια μεριστώματος	<ul style="list-style-type: none"> • Εξάλειψη παθογόνων (ιοί, μύκητες, βακτήρια) • Βλαστική αναπαραγωγή των ορχιδέων μέσω βολβιδίων • Κλωνοποίηση φυτών εκτός των ορχιδέων • Πιστοποίηση φυτοϋγείας • Συλλογή και διατήρηση γενετικού

	υλικού (κρυοδιατήρηση)
Καλλιέργεια κορυφής βλαστού και ενός κόμβου	<ul style="list-style-type: none"> • Πολλαπλασιασμός των περισσότερων φυτών
Καλλιέργεια εκφύτων χωρίς προϋπάρχοντες οφθαλμούς	<ul style="list-style-type: none"> • Οργανογένεση • Απόκτηση φυτών απαλλαγμένων από ασθένειες • Δημιουργία μεταλλάξεων (βελτίωση μέσω μεταλλάξεων) • Απομόνωση των μεταλλάξεων • Παραγωγή πολυπλοειδών
Καλλιέργεια κάλων, αιωρημάτων και ενός κυττάρου	<ul style="list-style-type: none"> • Κλωνοποίηση φυτών μέσω του σχηματισμού οργάνων και εμβρύων • Δημιουργία γενετικού υλικού με τροποποιημένο DNA • Απόκτηση φυτών απαλλαγμένων από ασθένειες • Ως πηγή παραγωγής πρωτοπλαστών • Υλικό εκκίνησης για κρυοδιατήρηση • Παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών
Καλλιέργεια ανθήρων και μικροσπορίων	<ul style="list-style-type: none"> • Παραγωγή απλοειδών για τη δημιουργία ομοζύγωτων • Ως υλικό εκκίνησης για τη δημιουργία μεταλλάξεων • Δημιουργία άρρενων φυτών • Ως εργαλείο σε γενετικούς χειρισμούς • Για βελτίωση σε χαμηλότερα επίπεδα πλοειδίας
Καλλιέργεια ωαρίων και αποκομμένων ανθέων	<ul style="list-style-type: none"> • Παράκαμψη της ασυμβατότητας • Παρεμπόδιση πρόωρης αποβολής των ανθέων • Επίτευξη γονιμοποίησης μέσα σε

- δοκιμαστικούς σωλήνες
- Καλλιέργεια πρωτοπλαστών
- Σωματικός υβριδισμός
 - Δημιουργία κυττοπλασμικών υβριδίων (cybrids)
 - Μεταφορά πυρήνων, τμημάτων ή ολόκληρων χρωμοσώμων και οργανιδίων
 - Μελέτες γενετικών τροποποιήσεων
- Καλλιέργεια πρωτοπλαστών, 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)

1.1.2 Ιστορική αναδρομή

Γενικά, μπορεί να υποστηριχθεί σε κάποιο βαθμό η άποψη ότι η ιστορία της ιστοκαλλιέργειας συμπεριλαμβάνει ολόκληρη την ιστορία της ύπαρξης των φυτών, των οποίων η προέλευση χάνεται στα βάθη της ιστορίας. Παρ' όλα αυτά, συγκεκριμένα γεγονότα της ιστορίας, τα οποία και αναφέρονται στη συνέχεια, σχετίζονται άμεσα με την πορεία της ιστοκαλλιέργειας ως τεχνική και ως γνώση.

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. Ωστόσο, προέβλεψε ότι έμβρυα των φυτών μπορούν να παραχθούν καλλιεργώντας βλαστικά κύτταρα. Δύο χρόνια αργότερα, ένας άλλος γερμανός βοτανολόγος, ο E. Hanning, προβλέποντας την διαδικασία διάσωσης 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^{ου} 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 Bernard και H. Burgess στις αρχές της δεκαετίας του 1920. Σχεδόν την ίδια εποχή, οι W. Kotte και W. J. Robbins παρουσίασαν με περιορισμένη επιτυχία την καλλιέργεια μεριστωμάτων από ρίζες.

Πειράματα επιβεβαίωσαν νωρίς ότι τα φυτά που παράγονται από ιστοκαλλιέργεια κατά την καλλιέργειά τους στο υπόστρωμα είναι ετερότροφοι οργανισμοί. Σε αντίθεση με τα φυτά που βρίσκονται στο χώμα, τα φυτά σε καλλιεργητικό μέσο δεν μπορούν να συνθέσουν πρωτεΐνες και υδατάνθρακες από ανόργανα συστατικά. Εμπειρικά ίσως ανακαλύφθηκε ότι η ζάχαρη και κάποια άλλα συστατικά όπως το γάλα της καρύδας, η μαγιά και οι χυμοί των φρούτων δρούσαν θετικά στην ανάπτυξη των φυτών που καλλιεργούνταν σε μέσα που τα περιείχαν εν αντιθέσει με τα ανόργανα χημικά συστατικά που 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 Β₁).

Το 1924 δύο γιατροί, οι P. Blumenthal και P. Meyer ερεύνησαν την καλλιέργεια κάλων καρότων. Το αρχικό ενδιαφέρον τους εστιαζόταν στη λήψη συμπερασμάτων που θα αφορούσαν την παθολογία και θα συσχέτιζαν τον δημιουργούμενο κάλο με την ανάπτυξη όγκων. Το συμπέρασμα όμως που ανακοινώθηκε ήταν ότι η καλλιέργεια κάλων 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. Erxleben την απομόνωσαν, την ανέλυσαν 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 κάλος. Ο Gautheret ήταν ο πρώτος που κατάφερε με επιτυχία να καλλιεργήσει φυτικούς ιστούς μέσα σε κατάλληλο υπόστρωμα καθώς το 1934 καλλιεργήσε καμβιακό ιστό από τα είδη *Acer pseudoplatanus*, *Salix caprea* και *Sambucus*, μερικά από τα οποία κατάφεραν να παραμείνουν στο καλλιεργητικό μέσο για περισσότερο του ενός έτους.

Στις Η.Π.Α. πατέρας της ιστοκαλλιέργειας θεωρείται ο P. R. White. Ήταν ο πρώτος που καλλιεργήσε σε θρεπτικό μέσο ριζικό μερίστωμα ντομάτας. Η προσθήκη γλυσίνης, πυριδοξίνης και νικοτινικού οξέος μέσα στο υπόστρωμα είχε θετικά αποτελέσματα. Το 1939 ανέφερε ότι καλλιεργήσε με επιτυχία κάλους από φυτό καπνού. Σε συνεργασία με τον A. Braun απέδειξε την ομοιότητα των κυττάρων που βρίσκονται σε όγκους φυτών και ζώων. Μάλιστα 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^{ου} 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, μελέτες εστιάστηκαν στη χρήση του γάλακτος της καρύδας (υγρό ενδοσπέρμιο) καθώς αποτελούσε έτοιμο φυσικό θρεπτικό μέσο που τρέφει το έμβρυο. Έτσι, το 1941 ανακαλύφθηκε από τους J. van Overbeek, M. E. Conklin και A. F. Blakeslee ότι το γάλα της καρύδας προκαλούσε τον σχηματισμό κάλων σε έμβρυα του ζιζανίου *Datura stramonium*, όταν αυτά καλλιεργούνταν στο μέσο αυτό. Αποτέλεσμα μελέτης και άλλων ερευνητών υπήρξε το γάλα της καρύδας με αποτέλεσμα να αποκαλυφθούν τα συστατικά του και να αποτελεί μέχρι και σήμερα ένα από τα καλλιεργητικά μέσα των ορχιδέων.

Η βιομηχανία παραγωγής ορχιδέων ήταν η πρώτη που εφάρμοσε σε εμπορική κλίμακα τον μικροπολλαπλασιασμό. Οι G. Morel και C. Martin καλλιέργησαν ντάλιες απαλλαγμένες από ιώσεις καθώς και πατάτες με καλλιέργεια μεριστωμάτων ακολουθώντας τα πρωτόκολλα που έφτιαξε ο E. Ball το 1946. Το 1960 οι Morel και Martin εφάρμοσαν τα ευρήματά τους στις ορχιδέες. Με αυτόν τον τρόπο όχι μόνο κατόρθωσαν να παράγουν ορχιδέες απαλλαγμένες από ιώσεις αλλά ανακάλυψαν έναν ταχύτατο τρόπο πολλαπλασιασμού. Έτσι, οι ορχιδέες για παράδειγμα, έγιναν αφθονότερες και λιγότερο ακριβές ως αποτέλεσμα αυτής της ανακάλυψης.

Παρ' όλα αυτά τα επιτεύγματα, παρέμεινε βασικό θέμα η εξεύρεση νέων συστατικών και οι αναλογίες που πρέπει να έχουν στα καλλιεργητικά μέσα ώστε να είναι επιτυχής η εφαρμογή της ιστοκαλλιέργειας στην εμπορική πράξη. Οδεύοντας προς αυτή την κατεύθυνση, 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 κυτοκίνινες. Οι F. Went και F. Skoog συνεργάστηκαν για την εξέταση της αρνητικής επίδρασης της αυξίνης στη δημιουργία βλαστού καθώς και της αλληλεπίδρασής της με την κινετίνη.

Οι Went και Thimann απέδειξαν την ιδιότητα της αυξίνης να προκαλεί έκπτυξη 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 ενεπλάκη στη δημιουργία του υποστρώματος Murashige and Skoog, κοινά αναφερόμενο και ως M&S ή MS υπόστρωμα. Το υπόστρωμα αυτό αποτελεί το πιο κοινά χρησιμοποιούμενο 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 από αυτό καθώς και συμπληρωματικά στοιχεία αποτελώντας ένα μαγικό κλειδί για την παραγωγή περισσότερων φυτών με τη μέθοδο της ιστοκαλλιέργειας σε σχέση με προηγούμενα υποστρώματα. Αργότερα, ο E. Linsmaier σε συνεργασία με τον Skoog, μελέτησε συστηματικά τις απαιτήσεις καλλιέργειας κάλων φυτών καπνού και υπόδειξε μερικές κατάλληλες αλλαγές στο υπόστρωμα MS ώστε να βρίσκει μεγαλύτερο πεδίο εφαρμογής (Kyte & Kleyn, 1996).

1.1.3 Υποστρώματα χρησιμοποιούμενα στην ιστοκαλλιέργεια

Τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται στην ιστοκαλλιέργεια παρουσιάζονται στον Πίνακα 1.2.

$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,05	0,03	-	-	-	0,025	0,025	-	0,025	0,025	0,2	-	-
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	250	125	250	720	250	125-200	250	370	125	370	185	400	250	720
$\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	-	-	-	-	-	1,81	-	-	-	-	-	-	-	-	7,0
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16,9	10	3,0	-	-	-	-	-	22,3	-	16,9	-	10	-	-
$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	-	-	-	0,1	4,5	-	7,5	22,3	-	-	-	25	-	7,5	-
KCl	-	-	-	750	130	-	-	-	-	1.000	-	-	-	-	65
KI	-	0,75	0,5	0,1	0,375	-	-	0,33	-	-	0,83	-	1,0	-	0,75
KNO_3	480	2.500	125	-	160	607	125-200	-	1.900	-	1.900	950	2.500	525	80
KH_2PO_4	-	-	125	-	-	-	125-200	250	170	125	170	68	-	250	-
K_2SO_4	-	-	-	-	-	-	-	-	990	-	-	-	-	-	-
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,25	0,25	-	-	-	-	-	-	0,25	0,025	0,25	0,25	0,1	-	-
NaNO_3	-	-	600	600	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	380	150	125	125	132	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16,5
Na_2SO_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	-	-

Na ₂ EDTA	74,5	37,3	-	-	-	37,3	37,3	37,3	20	-
Θειική αδενίνη	80	-	-	-	-	-	-	-	-	-
θ-Βιοτίνη	-	-	-	-	-	-	0,05	-	-	-
Ινσοτόλη	100	100	-	-	100	100	100	1000	-	-
Νικοτινικό οξύ	-	1,0	-	-	-	0,5	0,5	5,0	5,0	0,5
Πυριδοξίνη	-	1,0	-	-	-	0,5	0,5	0,5	0,5	0,1
Θειαμίνη	0,4	10	-	-	-	1,0	0,4	0,5	5,0	0,1
ζιΠ	5,0	-	-	-	-	1,0	-	-	-	-
ΥΑΑ	1,0	-	-	-	-	1,3	1,3	0,1	-	-
Κινετίνη	-	-	-	-	-	0,001-1C	0,04-1C	-	-	-
Γλυσίνη	-	-	-	-	-	2,0	-	2,0	-	3,0
Σακχαρόζη	30.000	30.000	-	-	-	30.000	20.000	20.000	-	20.00
Αγαρ	6.000	-	-	-	-	10.000	6.000	8.000	8.000	-

(Πηγή: Kyte & Kleyn, 1996)

1.2 Επίδραση του φυσικού περιβάλλοντος στα καλλιεργούμενα φυτά *in vitro*.

Μία σειρά παραγόντων του φυσικού περιβάλλοντος επιδρούν σημαντικά 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.

1.2.1 Συνοχή του θρεπτικού υποστρώματος

Η μορφή του θρεπτικού υποστρώματος 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 υποστρώματος ή πολύ μικρής συγκέντρωσης γελλώδους παράγοντα, μπορεί να προκαλέσει υπερευδάτωση και τα φυτά να εμφανίσουν ανωμαλίες στη μορφολογία. Το πλεονέκτημα της χρήσης υγρού υποστρώματος είναι η γρηγορότερη αύξηση των φυτών καθώς οι φυτικοί ιστοί βρίσκονται σε άμεση επαφή με το υπόστρωμα και προσλαμβάνουν περισσότερα θρεπτικά. 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 επιπλέον 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 φυλλώδη φυτά πολλαπλασιάζονται καλύτερα σε υγρό υπόστρωμα, ενώ για τη ριζοβόληση είναι απαραίτητο το ημιστερεό υπόστρωμα.

1.2.2 Θερμοκρασία

1.2.2.1 Επίδραση στην αύξηση των φυτών

Στην πράξη, πέρα από τις ενδείξεις ότι η εναλλαγή θερμοκρασίας είναι αποτελεσματικότερη στην 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, τα φυτά *in vitro*, ανταποκρίνονται θετικά σε ένα εύρος θερμοκρασιών, παρ' όλα αυτά σε κάποιες περιπτώσεις απαιτούνται κατάλληλες θερμοκρασίες για την ιδανική ανάπτυξη και μορφογένεση.

Η μέση θερμοκρασία στην οποία τα περισσότερα φυτά αναπτύσσονται *in vitro* είναι οι 25⁰C. Το θερμοκρασιακό εύρος μπορεί να κυμαίνεται από 17 έως 32⁰C. Ένας γενικός κανόνας είναι ότι τα φυλλώδη φυτά αρέσκονται σε ελαφρώς μεγαλύτερες θερμοκρασίες (27,7⁰C) από τα μεσόφιλα είδη. Κάποια άλλα φυτά αρέσκονται σε χαμηλότερες θερμοκρασίες όπως για παράδειγμα το *Dicentra spectabilis* που απαιτεί 22⁰C και η *Anemone coronaria* που απαιτεί 10⁰C. Τα περισσότερα φυτά περιορίζουν την ανάπτυξή τους σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 32-35⁰C. Για τον καθορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας απαιτούνται εμπειρικά πειράματα. Μερικά παραδείγματα δίνονται στον Πίνακα 1.3.

Πίνακας 1.3. Βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης και περιοριστικές θερμοκρασίες διαφόρων εκφύτων.

Είδος καλλιέργειας	Βέλτιστη θερμοκρασία ($^{\circ}\text{C}$)	Δοκιμασμένες περιοριστικές θερμοκρασίες ($^{\circ}\text{C}$)
Κορυφές βλαστών ροδακινιάς	21-24	28
Έμβρυα ελιάς	25	15,20,30
Βλαστοί τριανταφυλλιάς	18	12,24
Ρίζες	20-25	27-28

(Πηγή: Anonymus, 2003b)

1.2.2.2 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 cheimantha* αν και η συνεχής ανάπτυξη των βλαστών απαιτεί 24°C . Έκφυτα από το βλαστό της *Anemone coronaria* απαιτούν θερμοκρασίες $15-19^{\circ}\text{C}$ προκειμένου να σχηματιστούν βλαστοφόροι οφθαλμοί. Άλλα φυτικά είδη απαιτούν υψηλότερες θερμοκρασίες της τάξης των $28-30^{\circ}\text{C}$. Σε αυτή την κατηγορία ανήκει η ευρωπαϊκή άμπελος (*Vitis vinifera*) και το είδος *Pinus radiata*. Η πλειοψηφία των φυτικών ειδών έχουν κατά μέσο όρο βέλτιστη θερμοκρασία για μορφογένεση στο εύρος $22-26^{\circ}\text{C}$.

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°C είχε ως αποτέλεσμα την αποφυγή του ληθάργου σε σχέση με βολβούς που σχηματίστηκαν σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Τα ξυλώδη φυτά που προέρχονται από ιστοκαλλιέργεια είναι γνωστόν 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 ημέρες) μιμούμενοι με τον τρόπο αυτό τις συνθήκες που απαιτούνται για το σπάσιμο του ληθάργου και την έκπτυξη των οφθαλμών την άνοιξη.

1.2.3 Σχετική υγρασία

Η σχετική υγρασία είναι ένας από τους λιγότερο εύκολα ελεγχόμενους παράγοντες του περιβάλλοντος κατά την ιστοκαλλιέργεια. Είναι δύσκολο 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 μεγάλης σημασίας όταν τα πώματα από τα δοχεία ανάπτυξης των φυτών δεν κλείνουν αεροστεγώς. Ενδεικτικά στον Πίνακα 1.4 δίνεται η σχετική υγρασία στους γυάλινους περιέκτες των φυτών ανάλογα με το κλείσιμό τους.

Πίνακας 1.4. 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, 2003b)

Σε συνθήκες πολύ ξηρού αέρα το θρεπτικό υπόστρωμα ξηραίνεται γρηγορότερα. Εάν χρησιμοποιούνται συσκευές διατήρησης της υγρασίας, είναι σημαντικό να λαμβάνεται φροντίδα για την αποφυγή μouxλιάσματος 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 από το θάλαμο ανάπτυξης. Μειώνοντας την 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.

1.2.4 Φωτισμός

Στα φυτά που αναπτύσσονται *in vitro*, τόσο η ένταση όσο και η ποιότητα του φωτός επηρεάζουν την ανάπτυξή τους. Αν και τα φυτά του

εξωτερικού περιβάλλοντος απαιτούν φως να φωτοσυνθέσουν, τα φυτά *in vitro* μπορούν να παρακάμψουν την φωτοσύνθεση καθώς έχουν στο θρεπτικό υπόστρωμα την απαραίτητη πηγή άνθρακα (σακχαρόζη). Ο φωτισμός απαιτείται σ' αυτή την περίπτωση για τη δημιουργία της χλωροφύλλης και τη φωτομορφογένεση. 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. Οι λάμπες αυτές παρέχουν αρκετό φωτισμό στην ερυθρή περιοχή του φάσματος (600-700nm). Κάποιες έρευνες χρησιμοποίησαν συμπληρωματικό φωτισμό με λάμπες πυρακτώσεως αλλά δεν φάνηκε η πρακτική αυτή να είναι απαραίτητη στην πλειοψηφία των περιπτώσεων. 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 των $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ παρουσιάζονται προβλήματα λόγω της υπερβολικής έκθεσης και λεύκανση των βλαστών.

Σε μερικές περιπτώσεις είναι σημαντική η φωτοπερίοδος. Οι περισσότερες καλλιέργειες *in vitro* αναπτύσσονται σε φωτοπερίοδο 16 ωρών φωτός καθώς φαίνεται ότι είναι βολική στην πράξη αλλά και ερευνητικά στοιχεία επιβεβαίωσης της ανάγκης 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.

1.2.4.1 Επίδραση στη μορφογένεση

Περισσότερο το μήκος κύματος και λιγότερο η ένταση του φωτισμού έχει βρεθεί ότι έχει σημαντική επίδραση στο σχηματισμό κάλου, βλαστών και ριζών. Γενικά, το μπλε φως και οι κοντινές περιοχές στο UV (420-467nm) φαίνεται να προάγουν τη δημιουργία κάλου και το σχηματισμό ριζών. Αρκετά φυτά ακολουθούν αυτό, 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 ($0,24 \text{ W m}^{-2}$) (Weis & Jaffe, 1969, Seibert, 1973). Σε μεγαλύτερες εντάσεις φωτός η ανάπτυξη παρεμποδίζεται.

Παράλληλα, φαίνεται να υπάρχει σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του φωτός και των κυτοκινινών στον πολλαπλασιασμό 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 την 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.

1.3 Σκληραγώγηση (εγκλιματισμός) φυταρίων παραγόμενων *in vitro*

Γενικά φαίνεται ότι είναι ευκολότερη η εγκατάσταση σπορόφυτων από την εγκατάσταση φυτών προερχόμενων από ιστοκαλλιέργεια στις συνθήκες θερμοκηπίου. Αν δεν ληφθεί ιδιαίτερη φροντίδα κατά αυτό το ιδιαίτερα σημαντικό στάδιο (σκληραγώγηση των φυτών παραγόμενων *in vitro*), τότε οι απώλειες σε φυτικό υλικό αναμένεται να είναι εξαιρετικά μεγάλες. Η απότομη αλλαγή των συνθηκών από αυτές που επικρατούσαν *in vitro* σε αυτές του θερμοκηπίου, ή γενικότερα χώρου *ex vitro* σκληραγώγησης (χαμηλότερη υγρασία και υψηλότερος φωτισμός) μπορεί να είναι θανατηφόρα για τα νεαρά φυτάρια σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα. Για να συνεχίσουν να υφίστανται τα θετικά αποτελέσματα της ιστοκαλλιέργειας (παραγωγή μεγάλης ποσότητας φυτικού υλικού σε σύντομο χρονικό διάστημα), τότε είναι απαραίτητο να εφαρμόζονται αποτελεσματικές τεχνικές σκληραγώγησης (Anonymous, 2003a).

Η επιτυχία των φυτών στο στάδιο IV (σκληραγώγηση) εξαρτάται από την ποιότητα των φυταρίων που εξήλθαν από το θάλαμο ανάπτυξης. Αρκετές φορές το στάδιο III (ριζοβόληση) παραλείπεται και τα φυτά ριζοβολούν στο υπόστρωμα *ex vitro* απ' ευθείας μετά το στάδιο II (πολλαπλασιασμός). Η επιτυχία αυτής της πρακτικής εξαρτάται από το συγκεκριμένο φυτό, την ευκολία με την οποία ριζοβολεί και τον ανθρώπινο παράγοντα. Πολλές φορές οι ρίζες που αναπτύσσονται στο στάδιο III δεν φαίνεται να είναι λειτουργικές στο έδαφος και συνεπώς, σε αυτές τις περιπτώσεις, τα φυτά μπορούν να μεταφερθούν κατευθείαν από το στάδιο II για ριζοβόληση *ex vitro*. Τα πλεονεκτήματα της παράληψης του σταδίου III είναι το λιγότερο κόστος και η εξοικονόμηση περισσότερου χώρου στο θάλαμο ανάπτυξης. Γενικά, το ριζικό σύστημα που δημιουργείται φαίνεται να είναι ισχυρότερο αν παρακαμφθεί το στάδιο III. Αναφέρεται από τους Mikkelsen και Sink (1978) ότι το κόστος παραγωγής της *Begonia rex* μειώθηκε κατά 50% όταν η ριζοβόληση γινόταν απ' ευθείας μετά το στάδιο II. Παρ' όλα αυτά, τα έκφυτα ορισμένων ειδών απαιτούν το στάδιο III για να ριζοβολήσουν ταχύτερα, να αποκτήσουν καλύτερο ύψος και καλύτερη στήριξη.

Ο εγκλιματισμός μπορεί να ξεκινήσει όταν ακόμα τα φυτά είναι ακόμα *in vitro* ή να γίνει στο στάδιο IV όπου τα φυτάρια μεταφέρονται *ex vitro*. Εάν απαιτείται να γίνει πολλαπλασιασμός και να παρθούν μικρομοσχεύματα κατά το στάδιο II, τότε η σκληραγώγηση γίνεται στο στάδιο IV.

Ένα πολύ βασικό πρόβλημα που παρουσιάζεται κατά τον εγκλιματισμό είναι η απώλεια νερού μέσω των στομάτων. Αν και φυσιολογικά τα στόματα ανοιγοκλείνουν ανάλογα με την σπαργή τους, όταν ένα φυτάριο που παρήχθη από ιστοκαλλιέργεια μεταφυτευθεί *ex vitro*, τα στόματά του είναι μονίμως ανοιχτά και η απώλεια υγρασίας από το φυτό είναι ανεξέλεγκτη μέχρις ότου προσαρμοστούν στην χαμηλότερη υγρασία σε σχέση με την υψηλή σχετική υγρασία που είχε το φυτό κατά την ανάπτυξή του *in vitro*. Η περίοδος που μεσολαβεί μέχρι το φυτό να μπορέσει να προσαρμοστεί στις νέες συνθήκες και να ρυθμίσει την απώλεια νερού ποικίλει ανάλογα με το συγκεκριμένο φυτό, τις συνθήκες κατά την ιστοκαλλιέργεια και τις συνθήκες στο νέο περιβάλλον που βρέθηκε μετά τη μεταφύτευση.

Με το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο βρέθηκαν μη τυπικά χαρακτηριστικά επάνω στα φύλλα φυτών που παρήχθησαν με τη μέθοδο της ιστοκαλλιέργειας. Συχνά παρατηρείται ιδιαίτερα υψηλός αριθμός στομάτων ανά μονάδα επιφάνειας φύλλου. Επίσης, έχει παρατηρηθεί ασυνήθιστη φύση των κηρών της εφυμενίδας στα φυτά προερχόμενα από ιστοκαλλιέργεια τόσο στην χημική της σύσταση όσο και στην υφή της (Preece και Sutter, 1991) με αποτέλεσμα τη μείωση της ικανότητας ελέγχου της διαπνοής από το φυτό. Επιπρόσθετα, παρατηρείται απώλεια νερού από τα φυτά προερχόμενα από ιστοκαλλιέργεια λόγω του φαινομένου της δακρύρροιας.

Εξ' αιτίας όλων αυτών των αλλαγών στη μορφολογία και τη διαπνοή, όλη η διαδικασία της φωτοσύνθεσης διαταράσσεται στα έκφυτα *in vitro*. Τα έκφυτα που βρίσκονται μέσα σε θρεπτικά υποστρώματα κάνουν λίγη χρήση CO₂ γιατί παίρνουν από το μέσο σακχαρόζη την οποία και χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας αντί να είναι εξαρτώμενα

από την φωτοσύνθεση. Στην προσπάθεια αύξησης της φωτοσύνθεσης στα φυτάρια, μπορεί να εισαχθεί CO₂ μέσα στις γυάλες που αναπτύσσονται ή αργότερα στο θερμοκήπιο. Αυτό μπορεί να γίνει πρακτικά ευκολότερα στο θάλαμο σκληραγώγησης παρά στα δοχεία ανάπτυξης των φυτών. Εάν εισαχθεί επιπλέον CO₂, είναι παράλληλα απαραίτητο να αυξηθεί το φως για να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα χρήσης του CO₂. Σύμφωνα με τους Mudge et al (1992), αρκετά ξυλώδη φυτά, όπως το αμπέλι (*Vitis*), η μηλιά (*Malus*), τα βατόμουρα (*Rubus*), ευνοούνται σημαντικά όταν εισαχθεί CO₂ στον θάλαμο εγκλιματισμού.

Άλλα χαρακτηριστικά που εμφανίζουν τα φυτά που προέρχονται από ιστοκαλλιέργεια και τα κάνουν να διαφέρουν από τα κανονικά παραγόμενα φυτά είναι οι λεπτότερες ρίζες και βλαστοί, τα λεπτότερα φύλλα, το υποτυπώδες δρυφακτοειδές παρέγχυμα, οι λιγότερες επιδερμικές τρίχες, το λιγότερο κολλέγχυμα, ο λιγότερος αγγειακός ιστός και η λιγότερη χλωροφύλλη.

Εάν πρόκειται τα φυτά να ριζοβολήσουν στο στάδιο III, υπάρχουν αρκετοί τρόποι ώστε να προετοιμαστούν για την σκληραγώγηση. Μπορούν να τοποθετηθούν στους γυάλινους περιέκτες με τα φυτά μικρές σακουλίτσες με silica gel έτσι ώστε να μειωθεί η σχετική υγρασία, προσέχοντας όμως να μην αφυδατωθεί ιδιαίτερα γρήγορα το φυτό. Μία εναλλακτική λύση είναι η χαλαρή τοποθέτηση των καλυμμάτων ώστε να επιτρέπουν μεγαλύτερη απώλεια νερού. Αναφέρεται στη βιβλιογραφία ότι τα γαρύφαλλα (*Dianthus*), είχαν ποσοστό επιτυχίας 90% όταν οι περιέκτες έμεναν χωρίς κάλυμμα για 9 ημέρες μέσα σε δωμάτιο με σχετική υγρασία 50-70% πριν μεταφυτευθούν στο έδαφος (Ziv, 1986). Άλλοι ερευνητές έκαναν χρήση αυτής της τεχνικής τόσο μέσα σε δωμάτιο όσο και σε συνθήκες θερμοκηπίου. Το βασικό συμπέρασμα ήταν ότι, ανάλογα και με τις συνθήκες του χώρου, είναι προτιμότερο η αφαίρεση του καπακιού να γίνεται σταδιακά. Άλλη τεχνική σκληραγώγησης είναι αυτή της χρήσης καπακιών με ειδικά φίλτρα που επιτρέπουν μερική ανταλλαγή αερίων μεταξύ του περιέκτη και του περιβάλλοντος, με αποτέλεσμα τη γρηγορότερη σκληραγώγηση των φυτών σε σχέση με την

σταδιακή αφαίρεση του καπακιού. Τέλος, μια άλλη τεχνική που αναφέρεται στη βιβλιογραφία είναι αυτή της ψύξης του πυθμένα των περιεκτών έτσι ώστε να μειωθεί η σχετική υγρασία στα υψηλότερα μέρη του περιέκτη. Η μεθοδολογία αυτή βρέθηκε ιδιαίτερα αποτελεσματική σε είδη όπως η *Cynara*, *Iris*, *Rosa* και *Marantha* (Maene και Debergh, 1983).

Χρησιμοποιώντας πυκνότερο άγαρ μπορεί να μειωθεί η διαθέσιμη υγρασία αλλά γίνεται δυσκολότερος ο διαχωρισμός των ριζών από το υπόστρωμα κατά την εξαγωγή του φυταρίου με αποτέλεσμα να σπάνε. Παράλληλα, το πυκνότερο σε άγαρ υπόστρωμα μειώνει τη διαθεσιμότητα ορισμένων θρεπτικών. Εάν στο στάδιο III χρησιμοποιηθεί υγρό υπόστρωμα, τότε αναπτύσσονται πολύ περισσότερα ριζικά τριχίδια αλλά οι ρίζες γίνονται λιγότερο ισχυρές από αυτές που δημιουργούνται στο άγαρ και μπορεί να μην μπορούν να προσαρμοστούν ικανοποιητικά στο υπόστρωμα μεταφύτευσης.

Μειώνοντας τα επίπεδα των αλάτων, κυρίως των νιτρικών, συχνά ευνοείται ο σχηματισμός ριζών. Παράλληλα η ποσότητα και ο τύπος της κυτοκίνης που χρησιμοποιείται στο στάδιο II μπορεί να επηρεάσει τη ριζοβολία. Φυτά όπως η *Lilione*, η *Schefflera* και το *Philodendron* φάνηκε να έχουν μεγαλύτερο ποσοστό επιβίωσης από 80% κατά τη μεταφύτευση όταν χρησιμοποιήθηκε στο στάδιο II 2iP ή κινετίνη αντί για BA. Συνήθως, στο στάδιο III, η κυτοκίνη μειώνεται δραστικά ενώ τα επίπεδα αυξίνης αυξάνουν. Τα επίπεδα αυξίνης είναι πολύ σημαντικά καθώς μεγάλες συγκεντρώσεις μπορεί να έχουν δυσμενέστερα αποτελέσματα από την παντελή απουσία της. Αρκετές φορές, δύο αυξίνες φαίνεται να λειτουργούν καλύτερα σε σχέση με την χρήση κάθε μίας χωριστά. Χαμηλότερη συγκέντρωση σακχαρόζης στο στάδιο III μπορεί να αυξήσει τη φωτοσύνθεση αλλά μεγαλύτερη συγκέντρωση μπορεί να δρα θετικά στο υδατικό δυναμικό. Στη ριζοβόληση ορισμένων σπυροφόρων ειδών φαίνεται ότι η φλορογλυκινόλη δρα θετικά.

Αν και οι απαιτήσεις σε φωτισμό ποικίλουν μεταξύ των διαφόρων φυτών, πολλά φυτά ριζοβολούν καλύτερα σε συνθήκες υψηλού φωτισμού

(350 έως 600 κηρίων). Αντίθετα, κάποια είδη βολβωδών και *Rosaceae* φυτών σχηματίζουν ρίζες ευκολότερα στο σκοτάδι από ότι στο φως.

Η συνήθης πρακτική που ακολουθείται κατά την μεταφορά των φυταρίων από τον περιέκτη *in vitro* στο θερμοκήπιο είναι ξέπλυμα των ριζών από το άγαρ, φύτευση των φυταρίων μέσα σε περιέκτες με τεχνητά υποστρώματα (συνήθως μίγματα τύρφης-περλίτη) και τοποθέτησή τους σε συνθήκες υψηλής σχετικής υγρασίας και σκίασης στο θερμοκήπιο. Σε χρονικό διάστημα 2-4 εβδομάδων η κουρτίνα σκίασης ανοίγει σταδιακά καθώς μειώνεται σταδιακά και η λειτουργία της υδρονέφωσης, έτσι ώστε να επιτευχθούν χαμηλότερα επίπεδα σχετικής υγρασίας. Με αυτό τον τρόπο τα ήδη υπάρχοντα φύλλα των φυταρίων προσαρμόζονται στις νέες συνθήκες.

Ιδανικός τρόπος για τη διατήρηση της υψηλής σχετικής υγρασίας κατά την σκληραγώγηση είναι το σύστημα παραγωγής τεχνητής ομίχλης (fog) το οποίο αν και έχει υψηλό κόστος, είναι ιδανικό έτσι ώστε να μην προκαλεί κορεσμό σε νερό στα φυτά που εγκλιματίζονται. Εναλλακτικά χρησιμοποιούνται συσκευές διατήρησης υψηλής υγρασίας (humidifiers) οι οποίες είναι οικονομικότερες και είναι εξ' ίσου αποτελεσματικές σε μικρούς χώρους. Το πιο κοινά χρησιμοποιούμενο σύστημα είναι αυτό της υδρονέφωσης. Όσο μικρότερες οι ψεκάδες που παράγονται τόσο καλύτερα για τα φυτά. Η σκίαση του θερμοκηπίου μπορεί να διατηρηθεί στο 50%, ενώ αν απαιτείται, το μήκος ημέρας κατά τη φωτοπερίοδο μπορεί να μεγαλώσει με τεχνητό φωτισμό περίπου 200 κηρίων.

Ένας θάλαμος ανάπτυξης εφοδιασμένος με φθορίζον φωτισμό στα ράφια, όπως ακριβώς και ο θάλαμος ανάπτυξης που βρίσκονται οι γυάλες με τα φυτάρια, παρέχει καλές προοπτικές για την ικανοποιητική εγκατάσταση των φυταρίων που προέρχονται από ιστοκαλλιέργεια *ex vitro*. Με αυτόν τον τρόπο είναι εύκολος ο έλεγχος της θερμοκρασίας και του φωτός. Η σχετική υγρασία είναι δυνατόν να ελέγχεται φυτεύοντας τα φυτάρια της ιστοκαλλιέργειας σε πλαστικούς κλωβούς οι οποίοι καλύπτονται με πλαστικό κάλυμμα. Με αυτό τον τρόπο δημιουργούνται

μίνι- θερμοκήπια και οι συνθήκες του περιβάλλοντος ελέγχονται καλύτερα.

Η χρήση αντιδιαπνευστικών ουσιών για τον αποτελεσματικότερο εγκλιματισμό δεν είναι διαδεδομένη καθώς δεν υπάρχουν ικανοποιητικά ερευνητικά αποτελέσματα.

Τα τεχνητά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται κατά την *ex vitro* σκληραγώγηση φυταρίων προερχόμενων από ιστοκαλλιέργεια είναι πάρα πολλά (Πίνακας 1.5).

Πίνακας 1.5. Τεχνητά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται κατά την σκληραγώγηση φυταρίων προερχόμενων από ιστοκαλλιέργεια

ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	ΑΝΑΛΟΓΙΑ	ΦΥΤΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΕΙΤΑΙ
Ψιλόκοκκο κάρβουνο/ λεπτοτεμαχισμένος φλοιός από σεκόγια ή έλατο/ περλίτης	1/1/1	ορχιδέες
Πελλέτες τύρφης που διογκώνονται στο νερό (Jiffy 7)		<i>Dianthus, Rubus</i>
Αλεσμένα βρύα σφάγνου		Tsuga
Τύρφη		Rhododendron
Τύρφη		Kalmia
Τύρφη/ φλοιοί/ άμμος/ πριονίδι/	1/1/1/1	Ξυλώδη φυτά
Τύρφη/ περλίτης	1/1	Betula, Malus, Rhododendron, Rubus
Τύρφη/ περλίτης	1/2	Rhododendron
Τύρφη/ περλίτης/ πριονίδι		Rhododendron
Τύρφη/ περλίτης/ πριονίδι/ ηφαιστειακή στάχτη/		Ξυλώδη φυτά

βερμικουλίτης	3/2/1/1/1	
Τύρφη/ περλίτης/		<i>Acacia, Larix, Pinus</i>
βερμικουλίτης	1/2/1	
Τύρφη/ ηφαιστειακή στάχτη	1/1	<i>Pinus radiata</i>
Τύρφη/ άμμος	1/1	<i>Vitis</i>
Τύρφη/ άμμος	1/1,5	<i>Pinus taeda</i>
Τύρφη/ άμμος/ περλίτης	3/1/4	Υποκείμενα οπωροφόρων
Τύρφη/ βερμικουλίτης	1/1	<i>Alnus, Salix, Typha</i>
Βερμικουλίτης/ άμμος	1,5/1	<i>Pinus taeda</i>

(Πηγή: Kyte & Kleyn, 1996)

1.4 Αμπέλι

1.4.1 Η αμπελουργία ανά τον κόσμο

Η καλλιέργεια του αμπελιού ξεκίνησε πριν 5000 χρόνια στη νότια περιοχή του Καυκάσου, εκεί όπου σήμερα βρίσκονται τα σύνορα Γεωργίας-Αρμενίας. Στη συνέχεια διαδόθηκε στη Μεσοποταμία όπου και αναπτύχθηκε ο πρώτος ανθρώπινος πολιτισμός. Στη Μεσόγειο και στην Ελλάδα το αμπέλι ήρθε αργότερα περνώντας από τη Φοινίκη, το σημερινό Λίβανο. Η λέξη οίνος φαίνεται να είναι φοινικικής προελεύσεως. Σήμερα το αμπέλι καλλιεργείται σε όλο σχεδόν τον κόσμο σε εύκρατα κλίματα όπου προσαρμόζεται καλύτερα.

Το 90% της παγκόσμιας καλλιεργούμενης έκτασης και παραγωγής βρίσκεται κοντά και γύρω από τη λεκάνη της Μεσογείου, ανατολικά, δυτικά, βόρεια και νότια. Οι χώρες της Λατινικής Αμερικής όπου πρόσφατα καλλιεργείται το αμπέλι (Αργεντινή, Χιλή) είναι σοβαρές ανταγωνίστριες χώρες (Βλάχος, 1991).

Η συνολική καλλιεργούμενη έκταση με αμπέλι παγκοσμίως υπολογίζεται σε 73.053.550 στρέμματα (FAO, 2001). Η κατανομή ανά χώρα σε αμπελουργική έκταση φαίνεται στον Πίνακα 1.6.

Πίνακας 1.6. Η καλλιεργούμενη έκταση με αμπέλι σε διάφορες χώρες.

Χώρα	Καλλιεργούμενη έκταση (χιλιάδες στρέμματα)
Ισπανία	11.000
Γαλλία	8.700
Ιταλία	7.970
Πορτογαλία	2.473
Ελλάδα	1.240
Γερμανία	1.015
Αυστρία	480
Ρωσία	630
Ουκρανία	1.000
Ουζμπεκιστάν	1.120
Ρουμανία	2.450
Μολδαβία	1.106
FYROM	278
Κροατία	590
Τουρκία	5.350
Ουγγαρία	900
Βουλγαρία	1.150
Χώρες Β.Αφρικής (Μαρόκο, Αλγερία, Τυνησία)	1.260
Αίγυπτος	617
Νότια Αφρική	1.167
Ιράν	2.500
Συρία	688
Η.Π.Α. (Καλιφόρνια)	3.957
Αργεντινή	2.070

Χιλή	1.550
Αυστραλία	1.150

1.4.2 Η αμπελουργία στην Ελλάδα

Η Ελλάδα θεωρείται η κοιτίδα της αμπελουργίας καθώς το αμπέλι μαζί με την ελιά αποτέλεσαν τη βάση της οικονομικής ανάπτυξης του αρχαίου ελληνικού πολιτισμού. Από τους Έλληνες το αμπέλι πέρασε στη Ρώμη, τη Γαλλία, την Ισπανία και σε όλες της παραμεσόγειες χώρες και τις χώρες γύρω από τη Μαύρη Θάλασσα.

Ο οίνος στην αρχαία Ελλάδα θεωρούνταν πρωταρχικό αγαθό καθώς εκτός από τις διασκεδάσεις χρησιμοποιούνταν και σε πνευματικές και φιλοσοφικές ενασχολήσεις, στα "συμπόσια". Η Ελλάδα ήταν η πρώτη χώρα που καθόρισε την έννοια των εκλεκτών τοπικών οίνων. Περίφημοι ήταν οι αρχαίοι οίνοι της Χίου, της Θάσου, της Θήρας, της Σικυώνος κλπ.

Στην Ελλάδα, η καλλιεργούμενη έκταση με οινοποιήσιμα, επιτραπέζια σταφύλια και σταφίδα το 1993 ανερχόταν σε 1.317.748 στρέμματα. Η καλλιεργούμενη έκταση κατά κατηγορία χρήσης και περιφέρεια παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.7 (στοιχεία Υπουργείου Γεωργίας).

Πίνακας 1.7. Η καλλιεργούμενη έκταση με σταφύλια στις περιφέρειες της Ελλάδας.

Περιφέρεια	Καλλιεργούμενη έκταση (στρέμματα)		
	Οινάμπελοι	Επιτραπέζια σταφύλια	Σταφιδάμπελοι
Αττικής	141.170	930	25
Στερεά Ελλάδα	93.875	2.610	-
Πελοπόννησος	68.475	9.880	150.321
Δυτ. Ελλάδας	116.775	7.457	84.980
Ιόνιων νήσων	43.708	861	21.060
Ηπείρου	8.032	183	-
Θεσσαλίας	20.313	46.099	-
Κεντρ. Μακεδονίας	30.711	27.288	-
Δυτικ. Μακεδονίας	22.746	2.685	
Αν. Μακεδονίας-Θράκης	4.832	48.290	700
Βορ. Αιγαίου	25.830	4.467	10
Νοτ. Αιγαίου	63.750	4.705	300
Κρήτης	88.470	16.385	159.825

(Πηγή: Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, 1998)

1.4.3 Το γένος *Vitis*

Το γένος *Vitis* συνεστήθη από τον Tournefort το 1700 και είναι ένα από τα πρώτα που μελετήθηκαν από το Λινναίο (1753).

Η βοτανική κατάταξη της αμπέλου έχει ως εξής:

- Άθροισμα: Σπερματοφύτα
- Συνομοταξία: Αγγειόσπερμα
- Κλάση: Δικότυλα
- Υπόκλαση: Διαλυπέταλα
- Τάξη: Rhamnales

Οικογένεια: Vitaceae

Γένος: Vitis

Το γένος αυτό περιλαμβάνει φυτά αναρριχητικά, με πλούσια διακλαδιζόμενες, ξυλώδεις ρίζες, κληματίδες καστανέρυθρες έως καστανοκίτρινες, ραβδωτές, φύλλα εναλλασσόμενα, παλαμόνευρα, ακέραια ή 3-7λοβα, έλικες απλές ή διακλαδιζόμενες, ταξιανθίες σε σύνθετο βότρυ ή θυρσό σε θέση αντίθετη από τα φύλλα όπως και οι έλικες. Φυτά πολυγαμοδίοικα, άνθη ερμαφρόδιτα ή μονογενή άρρενα ή θήλεα, πενταμερή, καμία φορά εξαμερή και σπανιότερα εφταμερή, στεφάνη γαμοπέταλος σχήματος πηλιδίου, ωθήκη επιφυής, δίχωρη και σπανιότερα τρίχωρη, καρπός ράγα, γίγαρτα απιοειδή ή πλατυσμένα σκαφοειδή.

Πρόκειται για φυτά αυτόχθονα των εύκρατων περιοχών του βορείου ημισφαιρίου (Ασία, Βόρειος Αμερική) από τα οποία ορισμένοι ενδιαφέροντες τύπου για καλλιέργεια διαδόθηκαν από τον άνθρωπο σε διάφορες περιοχές του κόσμου που καλλιεργείται σήμερα η άμπελος (Βόρεια και Νότια Αφρική, Αμερική, Ευρώπη, Ασία, Αυστραλία και Νέα Ζηλανδία) (Βλάχος, 1991).

1.4.4 Το υποκείμενο 110R

Ανήκει στην ομάδα *Berlandieri* × *Rupestris*. Αποκτήθηκε στη Γαλλία το 1889 από το Richter με υβριδισμό των ποικιλιών *Berlandieri* *Resseguier* No2 × *Rupestris* *Martin*. Η κορυφή του νεαρού βλαστού είναι ανοιχτή, αραχνοϋφής, πρασινέρυθρη με κόκκινη παρυφή. Τα νεαρά φύλλα είναι γυαλιστερά, ορειχαλκόχρωα με αραιό μεταξώδες χνούδι στις νευρώσεις της κάτω επιφάνειας. Ο βλαστός είναι ποώδης και λείος, σκοτεινός ερυθροιώδης από τη μία πλευρά. Η τομή του είναι πεπλατυσμένη.

Το αναπτυσσόμενο φύλλο είναι μικρού έως 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 επάνω επιφάνειας. Τα δόντια του φύλλου είναι κανονικά, με πλευρές σχεδόν ευθείες και ο μισχικός κόλπος σε σχήμα U ανοιχτό.

Το άνθος είναι αρσενικό. Οι έλικες δισχιδείς και ερυθροϊώδεις. 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 ζωηρό με διάρκεια βλαστικού κύκλου μεγάλη. Αντέχει ικανοποιητικά στη ριζόβια μορφή της φυλλοξήρας και στις κρυπτογαμικές ασθένειες. Παρουσιάζει μέτρια αντοχή στους νηματώδεις. Είναι ευαίσθητο στα άλατα του εδάφους ενώ αντέχει ικανοποιητικά στη ξηρασία. Είναι κατάλληλο για εδάφη αργιλλασβεστώδη, ξηρά, φτωχά, συμπαγή και πιεσμένα μεσημβρινών περιφερειών. Στη χλώρωση αντέχει μέχρι ποσοστού 50% ολικού ανθρακικού ασβεστίου (17% ενεργού).

Συμβιώνει καλά με τις ποικιλίες ευρωπαϊκής αμπέλου και είναι κατάλληλο για ποικιλίες παραγωγής επιτραπέζιων σταφυλιών όψιμης ωρίμανσης.

Στον επιτραπέζιο εμβολιασμό παρουσιάζει χαμηλά ποσοστά επιτυχίας, ενώ στον επιτόπιο πετυχαίνει καλά. Η ριζοβολία των μοσχευμάτων του είναι αρκετά καλή (μ.ο 55%). Στις μητρικές φυτείες παράγει κατά μέσο όρο 12.000 μοσχεύματα ανά στρέμμα (εμβολιάσιμα και ριζοβόλησης).

Χρησιμοποιείται στις αναμπελώσεις διαφόρων περιοχών (Αττικής, 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).

1.5 Μεθοδολογία ιστοκαλλιέργειας αμπέλου

Η ιστοκαλλιέργεια ως μέθοδος πολλαπλασιασμού έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε πολλά είδη αμπέλου, υβρίδια και καλλιεργούμενες ποικιλίες (Gray & Fisher, 1985, Gray & Klein, 1987, 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, 1982, Chee et al., 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 & Σταυρακάκης, 1998-9), βλαστικές κορυφές (Barlass & Skene, 1978, 1980a,b, Rui & Eaton, 1984, Martinez & Tizio, 1989, Σταυρακάκης & Κανάκης, 1997), μικρομοσχεύματα ενός κόμβου (Norton & Skirvin, 2001, Lee & Wetzstein, 1990, Novak & Junova, 1982/83, Roubelakis-Angelakis και Katsirdakis, 1990, Alleweldt & Radler, 1962, Ρούμπος, 1987, Roubelakis-Agelakis & Zinanovits, 1991), τμήματα ή ολόκληρα φύλλα (Katsirdakis & Roubelakis-Angelakis, 1991, Συμινής κ.α., 1998/9, Das et al., 2002), σωματικά κύτταρα (Mullins & Srinivasan, 1976, Krul & Worley, 1977, Krul & Myerson, 1980, Srinivasan & Mullins, 1980), 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 είναι 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 υγίες, 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 ευοίωνες για την ιστοκαλλιέργεια της αμπέλου, το γένος *Vitis* παραμένει δύσκολο στον χειρισμό του εξ' αιτίας 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 2 εβδομάδων, η προσοχή στη λεπτομέρεια και η προσεκτική παρατήρηση του φυταρίου κατά την ανάπτυξή 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 5cm 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

νεοδημιουργούμενα φυτά 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 φυτάρια ποτίζονται με το υπόστρωμα του σταδίου III χωρίς σακχαρόζη. Τοποθετούνται σε συνθήκες υψηλής υγρασίας για 3 εβδομάδες και στη συνέχεια η υδρονέφωση διακόπτεται σταδιακά για κάποια χρονικά διαστήματα με στόχο την σταδιακή μείωση της υγρασίας και τον εγκλιματισμό.

Το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται είναι $\frac{3}{4}$ -συγκέντρωση MS μαζί με άλλα πρόσθετα (Πίνακας 1,8). Ο απαραίτητος φωτισμός είναι 300 κηρία από φθορίζοντες λαμπτήρες με φωτοπερίοδο 16 ώρες φως/ 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 1.8. Υπόστρωμα για την ιστοκαλλιέργεια αμπέλου

	Στάδιο I	Στάδιο II	Στάδιο III
Συστατικά	mg/L		
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			

1.6 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη διαφόρων χαρακτηριστικών της αύξησης φυτών αμπέλου καλλιεργούμενων *in vitro* σε δύο θρεπτικά υποστρώματα κατά τα χρονικά διαστήματα που βρίσκονταν στο θάλαμο ανάπτυξης και το θάλαμο σκληραγώγησης. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε μελέτη των συνθηκών του μικροπεριβάλλοντος των φυτών στις γυάλες ανάπτυξης και τους κλωβούς σκληραγώγησης σε σχέση με τις κλιματικές συνθήκες στο θάλαμο ανάπτυξης και σκληραγώγησης αντίστοιχα.

2

Υλικά και μέθοδοι

2.1 Τα φυτά

Τα φυτά αμπέλου που χρησιμοποιήθηκαν ως υλικό εκκίνησης για την διεξαγωγή της παρούσας εργασίας ήταν υποκείμενα 110R. Από εύρωστες κληματίδες των φυτών αυτών αφαιρέθηκαν νεαροί βλαστοί οι οποίοι και χρησιμοποιήθηκαν για την εγκατάσταση, με την 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.

2.2 Οι γυάλες ανάπτυξης

Οι γυάλες που χρησιμοποιήθηκαν στο θάλαμο ανάπτυξης ήταν τετράγωνης βάσης με πλευρά 9,5 cm. Το ύψος κάθε γυάλας ήταν 12cm και η χωρητικότητά της 750mL. Κάθε γυάλα διέθετε καπάκι επίσης από γυαλί. Μετά την αποστείρωση, οι γυάλες σφράγιζαν αεροστεγώς χάρη σε ένα ελαστικό δακτύλιο που βρισκόταν στο στόμιό τους (Εικόνα 2.1).



Εικόνα 2.1. Οι γυάλες ανάπτυξης με υπόστρωμα.

2.3 Ο θάλαμος ανάπτυξης

Στο θάλαμο ανάπτυξης τα γυάλινα βάζα τοποθετήθηκαν σε μεταλλικά ράφια πλάτους 40 cm. Κάθε ράφι φωτιζόταν με 3 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 2.2).

Η εφαρμοζόμενη φωτοπερίοδος ήταν 16 ώρες φως και 8 ώρες σκοτάδι. Το φως άναβε στις 7:04 και έκλεινε στις 23:04. Η θερμοκρασία διατηρούνταν σταθερή στους 25-26⁰C με τη βοήθεια κλιματιστικού που διέθετε θερμοστάτη.

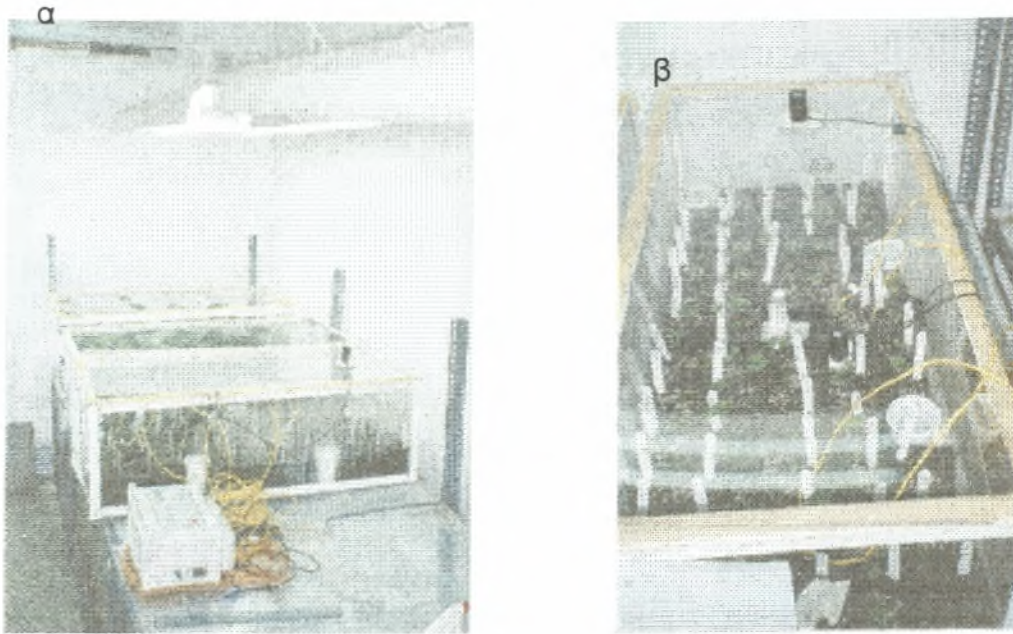


Εικόνα 2.2. Ο θάλαμος ανάπτυξης.

2.4 Ο θάλαμος σκληραγώγησης και οι κλωβοί εγκλιματισμού

Στο θάλαμο σκληραγώγησης που χρησιμοποιήθηκε για την παρούσα εργασία υπήρχαν μεγάλα χαμηλά μεταλλικά τραπέζια ύψους 60cm επάνω στα οποία ήταν τοποθετημένοι οι κλωβοί εγκλιματισμού. Επάνω από τους κλωβούς, και σε ύψος 96cm από τη βάση τους, υπήρχαν 4 λαμπτήρες φθορισμού Philips τύπου TLD 58W/54, ώστε να εξασφαλίζεται ο απαραίτητος φωτισμός (Εικόνα 2.3α). Η θερμοκρασία στον θάλαμο σκληραγώγησης διατηρούνταν σταθερή στους 25°C με τη βοήθεια κλιματιστικού που διέθετε θερμοστάτη. Η εφαρμοζόμενη φωτοπερίοδος ήταν 16 ώρες φως και 8 ώρες σκοτάδι. Το φως άναβε στις 6:06 και έκλεινε στις 22:05.

Οι κλωβοί εγκλιματισμού ήταν κατασκευασμένοι από plexy glass και στεγανοποιημένοι με σιλικόνη στα σημεία ένωσης των πλευρών τους. Οι διαστάσεις τους ήταν: 100cm μήκος, 45cm πλάτος και 30cm ύψος. Το καπάκι τους ήταν επίσης κατασκευασμένο από plexy glass (Εικόνα 2.3β).



Εικόνα 2.3. α) Ο θάλαμος εγκλιματισμού και β) ο κλωβός εγκλιματισμού.

2.5 Παρασκευή του υποστρώματος

Τα δύο θρεπτικά υποστρώματα που δοκιμάστηκαν στην παρούσα εργασία ήταν το M_4 (τροποποιημένο MS) (Πίνακας 2.1) και το M_4 με προσθήκη τύρφης και περλίτη (Merety et al, 2002). Πριν την παρασκευή του υποστρώματος M_4 , προηγούνταν η παρασκευή των ακόλουθων 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.

1. 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 $C_1=25mg \cdot L^{-1}$
- Διάλυμα $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ συγκέντρωσης $C_2=25mg \cdot L^{-1}$
- Διάλυμα KJ συγκέντρωσης $C_3=830mg \cdot L^{-1}$
- Διάλυμα $MnSO_4 \cdot 4H_2O$ συγκέντρωσης $C_4=8450mg \cdot L^{-1}$
- Διάλυμα $BeSO_4 \cdot 4H_2O$ συγκέντρωσης $C_5=100mg \cdot L^{-1}$

- Διάλυμα $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ συγκέντρωσης $C_6=183,9\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
- Διάλυμα $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ συγκέντρωσης $C_7=8600\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
- Διάλυμα H_3BO_3 συγκέντρωσης $C_8=6200\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
- Διάλυμα $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ συγκέντρωσης $C_9=50\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

2. Παρασκευή stock διαλύματος σιδήρου (Fe) Σεκεστρέν

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

3. Παρασκευή stock διαλυμάτων βιταμινών

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

- Διάλυμα Θειαμίνης συγκέντρωσης $C_{11}=400\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
- Διάλυμα Πυριδοξίνης συγκέντρωσης $C_{12}=500\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
- Διάλυμα Νικοτινικού οξέος συγκέντρωσης $C_{13}=500\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
- Διάλυμα Παντοθεικού Ασβεστίου συγκέντρωσης $C_{14}=1000\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
- Διάλυμα Ινοζιτόλης συγκέντρωσης $C_{15}=25000\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
- Διάλυμα Γλυσίνης συγκέντρωσης $C_{16}=2000\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
- Διάλυμα Βιοτίνης συγκέντρωσης $C_{17}=10\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$

Η αποθήκευση των stock διαλυμάτων βιταμινών γινόταν στους 5°C .

4. Παρασκευή stock διαλύματος αυξίνης

Σε μία ογκομετρική φιάλη των 100 mL παρασκευάστηκε το stock διάλυμα IAA τελικής συγκέντρωσης $C_{18}=100\text{mg/L}$, χρησιμοποιώντας απεσταγμένο νερό ως διαλύτη. Σημειώνεται ότι η διάλυση της IAA αρχικά έγινε με μία σταγόνα HCl.

Η αποθήκευση του stock διαλύματος αυξίνης γινόταν στους 5°C .

Η παρασκευή του υποστρώματος M_4 γινόταν κάθε φορά ως εξής:

Τα μακροστοιχεία ζυγίζονταν ένα-ένα και προστίθονταν σε ογκομετρική φιάλη του ενός λίτρου που περιείχε απεσταγμένο νερό. Οι ζυγίσεις των μακροστοιχείων γίνονταν με ζυγό KERN ακριβείας δύο δεκαδικών ψηφίων (KERN, Germany) σε ποσότητες που φαίνονται στον Πίνακα 2.1. Η ογκομετρική φιάλη βρισκόταν συνεχώς επάνω σε μαγνητικό αναδευτήρα. Στη συνέχεια, ακολουθούσε η πρόσθεση των διαλυμάτων των ιχνοστοιχείων. Την πρόσθεση των διαλυμάτων ιχνοστοιχείων ακολουθούσε ρHμέτρηση με τη βοήθεια ρHμέτρου τύπου 3310 JENWAY (JENWAY LTD, UK) με ρύθμιση του ρH στο $6,1 \pm 0,1$ με τη βοήθεια διαλύματος KOH συγκέντρωσης 70g/100mL. Στη συνέχεια ακολουθούσε η προσθήκη της ζάχαρης και του άγαρ. Μετά από τη διαδικασία αυτή, το υλικό θερμαίνονταν επάνω στο μαγνητικό αναδευτήρα με αντίστοιχη θέρμανση 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. Ακολουθούσε λίγη ώρα ανάδευσης και το υλικό τοποθετούνταν στις γυάλες.

Στις γυάλες που περιλάμβαναν τη μεταχείριση με το υπόστρωμα M₄, προστίθονταν 50mL υποστρώματος. Στις γυάλες που περιλάμβαναν την μεταχείριση με υπόστρωμα M₄ με την προσθήκη τύρφης και περλίτη προστίθονταν 30mL υποστρώματος M₄ και 30mL μείγματος λεπτής τύρφης-περλίτη σε αναλογία 1:4, χωρίς το μείγμα αυτό να συμπιεστεί κατά τη μέτρηση του όγκου του. Μετά από ελαφριά ανατάραξη των γυαλών, το μείγμα ομογενοποιούνταν και οι γυάλες κλείνονταν ερμητικά και τοποθετούνταν σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης 16KW (Εικόνα 2.4). Η αποστείρωση γινόταν στους 121°C και για 20 λεπτά.

Πίνακας 2.1. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του υποστρώματος M₄.

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	M (gr [*] mol ⁻¹)	Συγκέ- ντρωση (mg [*] L ⁻¹)		ΠΑΡΑΣΚΕΥ- ΑΣΤΡΙΑ ΕΤΑΙΡΙΑ
ΜΑΚΡΟΣΤΟΙΧΕΙΑ			mmoles	
NH ₄ NO ₃	80,04	1000	12,5	Riedel-de-Haen
KNO ₃	101,10	1000	9,89	Riedel-de-Haen
MgSO ₄ · 7H ₂ O	246,47	850	3,4	Riedel-de-Haen
KH ₂ PO ₄	136,09	260	1,9	Riedel-de-Haen
CaCl · 2H ₂ O	147,02	400	2,7	Riedel-de-Haen
Fe (Σκεκστρέν)	138	100	0,724	Novartis
ΙΧΝΟΣΤΟΙΧΕΙΑ			μmoles	
CoCl ₂ · 6H ₂ O	237,93	0,025	0,105	Riedel-de-Haen
CuSO ₄ · 5H ₂ O	249,69	0,025	0,1	Riedel-de-Haen
KJ	166,00	0,830	5	Riedel-de-Haen
MnSO ₄ · 4H ₂ O	169,02	16,9	99,9	Riedel-de-Haen
BeSO ₄ · 4H ₂ O	177,14	0,1	0,56	Fluka
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄	1235,86	0,184	0,149	Merck
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	287,55	8,6	29,90	Riedel-de-Haen
H ₃ BO ₃	61,83	6,2	100,27	Riedel-de-Haen
NiCl ₂ · 6H ₂ O	237,70	0,05	0,21	Merck
ΒΙΤΑΜΙΝΕΣ			μmoles	
Θειαμίνη	337,3	0,4	1,186	Sigma
Πυριδοξίνη	205,6	0,5	2,432	Sigma
Νικοτινικό οξύ	123,1	0,5	4,062	Sigma
Παντοθεικό Ασβέστιο	238,3	1	4,196	Sigma
Ινοζιτόλη	180,2	100	554,939	Sigma

Γλυσίνη	75,07	2	26,642	Merck
Βιοτίνη	244,3	0,01	40,93	Sigma
ΟΡΜΟΝΕΣ	(gr*mol⁻¹)	(mg*L⁻¹)	μmoles	
ΙΑΑ	175,19	0,1	0,571	Fluka
ΥΔΡΟΓΟ- ΝΑΝΘΡΑΚΕΣ	(gr*mol⁻¹)	(mg*L⁻¹)	mmoles	
Σακχαρόζη	342	15000	43,86	
ΛΟΙΠΑ	(gr*mol⁻¹)	(mg*L⁻¹)	mmoles	
Agar	3000- 9000	6000		Fluka



Εικόνα 2.4. Ο κλίβανος υγρής αποστείρωσης.

2.6 Εγκατάσταση

1215

Από υγιείς κληματίδες του επιθυμητού υποκειμένου (110R) (οι οποίες είχαν 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 ένα οφθαλμό. Τα τμήματα αυτά τοποθετήθηκαν σε ποτήρια ζέσεως και πλύθηκαν καλά με τρεχούμενο νερό βρύσης για περισσότερο από 15 λεπτά. Ακολούθησε εμβάπτισή τους σε καθαρό οινόπνευμα για 3 λεπτά και έκπλυση με απεσταγμένο 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% (10mL χλωρίνη-90mL απεσταγμένο νερό). Παρέμειναν για 20 λεπτά περίπου και με συνεχή ανάδευση στο μαγνητικό αναδευτήρα. Μετά την πάροδο αυτού του χρονικού διαστήματος, τα τμήματα του βλαστού ξεπλύθηκαν 3 φορές με αποστειρωμένο νερό μέσα στην τράπεζα νηματικής ροής MSC 12 (JOUANSA, France) εξοπλισμένη με φίλτρο με σπές διαμέτρου 0,3μm ώστε να μην μεταφερθούν μικροοργανισμοί από το περιβάλλον κατά την εγκατάσταση της νέας καλλιέργειας (Εικόνα 2.5). Κάθε τμήμα βλαστού με έναν οφθαλμό τοποθετήθηκε χωριστά σε γυάλινο σωλήνα μήκους 20cm και διαμέτρου 2,5cm που έκλεινε με φελλό και που περιείχε 16mL υποστρώματος M₄ και είχε ήδη απολυμανθεί σε κλίβανο όπως έχει αναφερθεί στην παράγραφο 2.5. Οι σωλήνες τοποθετήθηκαν στο θάλαμο ανάπτυξης για περίπου 20 μέρες και ακολούθησαν διαδοχικοί πολλαπλασιασμοί.



Εικόνα 2.5. Η τράπεζα νηματικής ροής.

2.7 Πολλαπλασιασμός

Μετά την πάροδο περίπου 20 ημερών στις οποίες τα φυτά μέσα στους σωλήνες αναπτύσσονταν αποκτώντας ύψος περί τα 10cm, ακολουθούσε ο πολλαπλασιασμός. Τα φυτά που είχαν ήδη αναπτυχθεί αρκετά τεμαχίζονταν μέσα στην τράπεζα νηματικής ροής με αποστειρωμένα εργαλεία τα οποία επαναποστειρώνονταν σε φλόγα κάθε φορά που γινόταν αλλαγή φυτού κατά τον χειρισμό. Κατά τον ίδιο τρόπο, κάθε 20 μέρες περίπου ακολουθούσε πολλαπλασιασμός ώστε να παραχθεί ικανοποιητικός αριθμός φυτών για την διεξαγωγή του πειράματος. Σε κάθε νέο σωλήνα που περιείχε 16mL υποστρώματος M₄ τοποθετούνταν ένα τμήμα βλαστού με έναν οφθαλμό.

2.8 Πειραματική διαδικασία και συλλογή δεδομένων

Αφού εξασφαλίστηκε ικανοποιητικός αριθμός φυτών πραγματοποιήθηκαν δύο πειράματα, τα οποία διέφεραν χρονικά μεταξύ τους 2 μήνες. Συνολικά σε κάθε πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 28 γυάλες με

φυτά στο θάλαμο ανάπτυξης. Για το καθένα πείραμα ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία. Παρασκευάστηκε το υπόστρωμα M_4 με τον τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω και στις μισές γυάλες (14) με τη βοήθεια ογκομετρικού κυλίνδρου προστέθηκαν 50mL υποστρώματος M_4 . Οι γυάλες αυτές αποτέλεσαν τη μεταχείριση “υπόστρωμα M_4 ”. Στις υπόλοιπες γυάλες με τη βοήθεια ογκομετρικού κυλίνδρου των 50mL προστέθηκαν 30mL υποστρώματος M_4 και 30mL μίγματος τύρφης-περλίτη. Οι γυάλες αυτές αποτέλεσαν τη μεταχείριση “υπόστρωμα M_4 +τύρφη+περλίτη”. Όλες οι γυάλες τοποθετήθηκαν στο κλίβανο υγρής αποστείρωσης στους 121°C για 20 λεπτά. Την επόμενη ημέρα πάρθηκαν φυτά από τους σωλήνες που βρίσκονταν στο θάλαμο ανάπτυξης για να χρησιμοποιηθούν στο πείραμα. Στην τράπεζα νηματικής ροής αφού έγινε τεμαχισμός των φυτών αυτών σε κομμάτια που αποτελούνταν από ένα κομμάτι βλαστό και έναν οφθαλμό, τα έκφυτα τοποθετήθηκαν στις γυάλες. Σημειώνεται ότι τα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη διαδικασία αυτή ήταν αποστειρωμένα σε κλίβανο ξηράς αποστείρωσης Memmert 1400W στους 180°C για 60 λεπτά. Σε κάθε γυάλα τοποθετήθηκαν 8 έκφυτα με τον εξής τρόπο: τέσσερα έκφυτα τοποθετήθηκαν στις τέσσερις γωνίες της τετράγωνης βάσης της γυάλας και τα υπόλοιπα τέσσερα, τοποθετήθηκαν ένα στο μέσο κάθε πλευράς. Μετά την τοποθέτηση των φυτών σε κάθε γυάλα, κλείστηκε το καπάκι και τυλίχτηκε γύρω-γύρω η ένωση καπακιού-γυάλας με διάφανη μεμβράνη. Οι γυάλες τοποθετήθηκαν στον θάλαμο ανάπτυξης για τέσσερις εβδομάδες.

Μετά την πάροδο τεσσάρων εβδομάδων στο θάλαμο ανάπτυξης, έγινε η πρώτη έξοδος των φυτών και λήφθηκαν μετρήσεις των φυτών, μέσα σε δωμάτιο που προετοιμάστηκε για να έχει χαμηλή θερμοκρασία και υψηλή σχετική υγρασία. Οι μετρήσεις ήταν οι εξής: νωπό βάρος βλαστού, νωπό βάρος ρίζας, μήκος βλαστού, αριθμός κόμβων, αριθμός κυρίων ριζών και μήκος κυρίων ριζών. Οι ζυγίσεις 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 μετρήσεις αυτές της πρώτης εξόδου πάρθηκαν από φυτά που περιέχονταν στις 7 από το σύνολο των 14 γυαλών κάθε μεταχείρισης, δηλαδή από τις 14 γυάλες κάθε μεταχείρισης. Οι βλαστοί και οι ρίζες τοποθετήθηκαν για τρία εικοσιτετράωρα σε ξηραντήριο στους 80°C και στη συνέχεια επαναζυγίστηκαν για τη λήψη του ξηρού βάρους.

Τα φυτά από τις υπόλοιπες 7 γυάλες κάθε μεταχείρισης μεταφυτεύτηκαν σε γλαστράκια όγκου 500mL, ένα φυτό σε κάθε γλαστράκι. Το υπόστρωμα των γλαστρών ήταν τύρφη-περλίτης σε αναλογία 3:1. Τα γλαστράκια αυτά τοποθετήθηκαν πολύ γρήγορα στον θάλαμο εγκλιματισμού μέσα σε κλωβούς διαστάσεων 100×45×30cm, που περιγράφηκαν στην παράγραφο 2.4. Οι κλωβοί ήταν ήδη απολυμασμένοι με χλωρίνη και περιείχαν στις γωνίες τους δοχεία με νερό ώστε να προκαλείται η σχετική υγρασία να διατηρείται σχετικά υψηλή μέσα στον κλωβό. Μετά την τοποθέτηση των γλαστρών μέσα στους κλωβούς, ψεκάστηκαν τα φυτά και τα εσωτερικά τοιχώματα του κλωβού με νερό ώστε να δημιουργηθούν συνθήκες υψηλής σχετικής υγρασίας. Τέλος, κλείστηκε το καπάκι του κλωβού.

Δοκιμάστηκαν δύο χρόνοι παραμονής των φυτών σε συνθήκες εγκλιματισμού. Τα φυτά παρέμειναν μέσα στους κλωβούς για δύο ή τέσσερις εβδομάδες ανάλογα με το πείραμα. Τα φυτά του πρώτου πειράματος σκληραγωγήθηκαν για τέσσερις εβδομάδες ενώ τα φυτά του δεύτερου πειράματος σκληραγωγήθηκαν δύο μόνο εβδομάδες.

Η διαδικασία της σκληραγωγής είχε ως εξής. Για το πρώτο πείραμα που δοκιμάστηκε η σκληραγωγή τεσσάρων εβδομάδων, την πρώτη εβδομάδα το καπάκι του κλωβού μετακινούνταν σταδιακά κατά ελάχιστο αφήνοντας ελάχιστη επιφάνεια του καπακιού ανοιχτό και έκλεινε μετά από καθορισμένη ώρα κατά τον εξής τρόπο (βλέπε Πίνακα 2.2): την επόμενη ημέρα της μεταφύτευσης στον κλωβό, το καπάκι μετακινούνταν κατά λίγο για μια ώρα και μετά ξανάκλεινε. Τη δεύτερη μέρα για δύο ώρες, την τρίτη για τρεις ώρες και ούτω καθ' εξής. Στο τέλος της πρώτης εβδομάδας, το καπάκι αφήνονταν ελάχιστα ανοιχτό (Πίνακας 2.2). Τη

δεύτερη εβδομάδα της σκληραγώγησης, αυξανόταν σταδιακά το άνοιγμα του καπακιού μέρα με τη μέρα, χωρίς να κλείνει, αφήνοντας περισσότερη επιφάνεια του κλωβού ακάλυπτη αυξανόμενη κατά 5% περίπου καθημερινά. Την τρίτη εβδομάδα το καπάκι ανοίγονταν τμηματικά καθημερινά στο τέλος της τρίτης εβδομάδας. Ακολουθούσε τέταρτη εβδομάδα στους κλωβούς στον θάλαμο σκληραγώγησης με τελείως ανοιχτό καπάκι. Για το δεύτερο πείραμα που δοκιμάστηκε η σκληραγώγηση δύο εβδομάδων, την πρώτη εβδομάδα το καπάκι του κλωβού μετακινούνταν κατά ανάλογο τρόπο της πρώτης εβδομάδας του πρώτου πειράματος (Πίνακας 2.2). Από την αρχή της δεύτερης εβδομάδας ξεκινούσε το σταδιακό άνοιγμα του καπακιού του κλωβού, αφήνοντας μεγαλύτερη επιφάνεια ακάλυπτη σε σχέση με το πρώτο πείραμα, μέχρι την πλήρη απομάκρυνσή του στα τέλη της δεύτερης εβδομάδας (Πίνακας 2.2). Οι περιποιήσεις κατά το χρονικό διάστημα αυτό του εγκλιματισμού περιλάμβαναν το πότισμα με ταυτόχρονη λίπανση με διάλυμα όμοιο με αυτό του υποστρώματος M₄ χωρίς όμως την προσθήκη άγαρ, όποτε ήταν αυτό απαραίτητο.

Μετά την πάροδο αυτού του χρονικού διαστήματος πραγματοποιήθηκε η δεύτερη έξοδος φυτών από το πείραμα και πάρθηκαν μετρήσεις. Οι μετρήσεις, ήταν οι ίδιες με αυτές της πρώτης εξόδου, δηλαδή: νωπό βάρος βλαστού, νωπό βάρος ρίζας, μήκος βλαστού, αριθμός κόμβων, αριθμός κυρίων ριζών και μήκος κυρίων ριζών. Όπως και στην πρώτη έξοδο, οι βλαστοί και οι ρίζες τοποθετήθηκαν για τρία εικοσιτετράωρα σε ξηραντήριο στους 80°C και στη συνέχεια επαναζυγίστηκαν για τη λήψη του ξηρού βάρους.

Πίνακας 2.2. Στάδια ανοίγματος του καπακιού του κλωβού εγκλιματισμού κατά την σκληραγώγηση-ποσοστό επί τοις εκατό του ανοίγματος ως προς την συνολική επιφάνεια του ανοίγματος του κλωβού.

Ημέρα	Σκληραγώγηση 2 εβδομάδων	Σκληραγώγηση 4 εβδομάδων	Ώρες που το καπάκι παρέμεινε ανοιχτό
	Ποσοστό ανοίγματος του καπακιού ως % του συνολικού ανοίγματός του		
1 ^η μέρα	Μεταφύτευση στον κλωβό		-
2 ^η μέρα	0,33	0,05	1
3 ^η μέρα	0,33	0,05	2
4 ^η μέρα	0,33	0,06	3
5 ^η μέρα	0,33	0,06	Ανοιχτό για όλο το
6 ^η μέρα			σαββατοκύριακο
7 ^η μέρα			
8 ^η μέρα	0,82	0,16	Σταδιακή
9 ^η μέρα	1,1	0,82	αύξηση του
10 ^η μέρα	2,8	1,14	ανοίγματος του
11 ^η μέρα	6,14	2,02	κλωβού
12 ^η μέρα	9,45	3,04	
13 ^η μέρα			
14 ^η μέρα			
15 ^η μέρα	50,1	10,6	Σταδιακή
16 ^η μέρα	(έξοδος των φυτών)	12	αύξηση του
17 ^η μέρα		24,1	ανοίγματος του
18 ^η μέρα		46,2	κλωβού
19 ^η μέρα		50,1	
20 ^η μέρα			
21 ^η μέρα			
22 ^η μέρα		52	

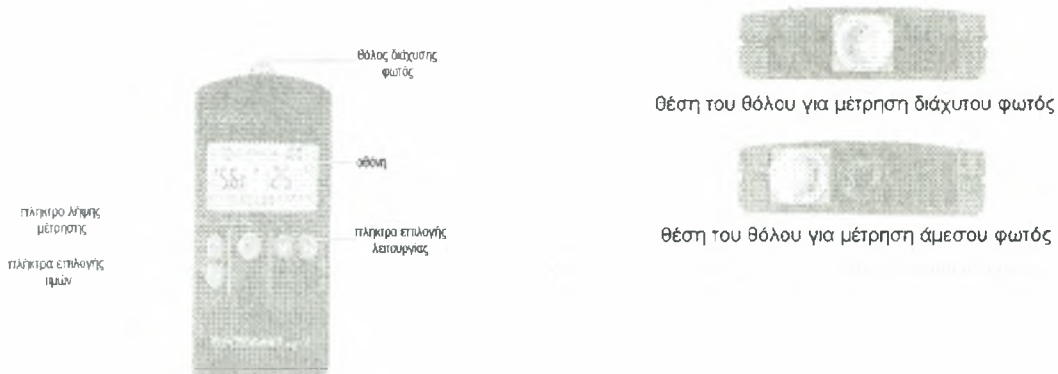
23^η –29^η μέρα100 (Αφαίρεση του
καπακιού)

Κατά το δεύτερο πείραμα και την τελευταία εβδομάδα παραμονής των φυτών στο θάλαμο ανάπτυξης (τέταρτη εβδομάδα) πάρθηκαν μετρήσεις κλιματικών παραμέτρων με τη βοήθεια καταγραφικού Delta-T (DL-2e, Delta-T Devices, UK) που αφορούσαν τις συνθήκες ανάπτυξης μέσα στη γυάλα και στο θάλαμο ανάπτυξης. Οι μετρήσεις αυτές ήταν οι εξής: θερμοκρασία υποστρώματος (M_4 και M_4 +τύρφη+περλίτη), θερμοκρασία φύλλου (φυτών σε γυάλα με υπόστρωμα M_4 και φυτών σε γυάλα με υπόστρωμα M_4 +τύρφη+περλίτη), θερμοκρασία θαλάμου ανάπτυξης, PAR που έφτανε στο ράφι και σε ύψος φυτού (ύψος φυτού θεωρήθηκε αυτό των 5 cm), PAR που έφτανε μέσα στη γυάλα με κλειστό το καπάκι και σε ύψος φυτού όμοιο με πριν. Ο αισθητήρας σχετικής υγρασίας ήταν τύπου SKH 2001 (SKYE Instruments LTD, UK) ακρίβειας $\pm 2\%$ σε σχετική υγρασία 1-75% στους 27°C. Τα θερμόμετρα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν thermistor's τύπου MT2 (Delta-T Devices LTD, UK) ακρίβειας $\pm 0,1^\circ\text{C}$ σε θερμοκρασία 0-70°C. Οι αισθητήρες PAR ήταν τύπου QS2 (Delta-T Devices LTD, UK) ακρίβειας $\pm 5\%$ στους 20°C. Οι παραπάνω μετρήσεις παίρνονταν ανά 1min και καταγράφονταν ο μέσος όρος ανά 10 min.

Μετά το τέλος του δεύτερου πειράματος και αφού ελευθερώθηκαν τα ράφια στο θάλαμο ανάπτυξης, έγινε λήψη μετρήσεων που αφορούσαν το διάχυτο φως που έφτανε στο ράφι σε ύψος 5cm από την επιφάνειά του και σε τρεις θέσεις: στη μέσα πλευρά του ραφιού-προς τον τοίχο, στο μέσο του ραφιού και στην έξω πλευρά του ραφιού-προς το διάδρομο, με τη βοήθεια του φωτόμετρου GOSSEN SIXTOMAT digital (GOSSEN, Germany) (Εικόνα 2.6). Ακόμα πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις του φωτός που ανακλούνταν από το λευκό ράφι προς τους λαμπτήρες: στη μέσα πλευρά της συστοιχίας των λαμπτήρων-προς τον τοίχο, στο μέσο της συστοιχίας των λαμπτήρων και στην έξω πλευρά της συστοιχίας των

λαμπτήρων-προς το διάδρομο, επίσης με τη βοήθεια του φωτόμετρου. Επιπρόσθετα, με τη βοήθεια του παραπάνω φωτόμετρου έγιναν μετρήσεις του διάχυτου φωτός που διαπερνούσε το κλειστό γυάλινο καπάκι της γυάλας και έφτανε στα φυτά σε ύψος 5cm από τον πυθμένα της. Παράλληλα, έγιναν μετρήσεις του φωτός που διαπερνούσε κάθε ένα από τα δύο υποστρώματα σε 3 γυάλες με υπόστρωμα M₄ και 3 γυάλες με υπόστρωμα M₄+τύρφη+περλίτης) ώστε να υπολογιστεί το φως που απορροφούσε το καθένα από αυτά. Το φωτόμετρο GOSSEN επιτρέπει τη μέτρηση τόσο του άμεσου φωτός όσο και του διάχυτου, με τη βοήθεια ενός προσαρμοζόμενου θόλου που προκαλεί την προαιρετική διάχυση του φωτός που φτάνει στην συσκευή και τελικά μετράται. Οι τιμές που εμφανίζει στην οθόνη του είναι σε μονάδες EV (Exposure Values). Η μετατροπή τους σε μονάδες LUX έγινε με τη χρήση τυπολογίου. Αναφέρεται συγκεκριμένα ότι η εξίσωση αντιστοίχισης EV (x) σε LUX (y) είναι:

$$y=5,6802e^{0,6913x}$$



Εικόνα 2.6. Το φωτόμετρο.

Για τις μετρήσεις του περιβάλλοντος που έγιναν κατά τις πρώτες 19 ημέρες της σκληραγώγησης των νεαρών φυταρίων του πρώτου πειράματος, χρησιμοποιήθηκε καταγραφικό. Οι μετρήσεις που πάρθηκαν αφορούσαν τη θερμοκρασία του υποστρώματος των γλαστρών σε βάθος 2cm από την επιφάνειά τους, τη θερμοκρασία του φύλλου, τη σχετική υγρασία που επικρατούσε στον κλωβό αυτές τις πρώτες 19 ημέρες, η PAR που περνούσε μέσα από το καπάκι του κλωβού και έφτανε στα φυτά σε ύψος 10cm από τη βάση του κλωβού, η PAR που έφτανε επάνω στο καπάκι του κλωβού και τη θερμοκρασία του θαλάμου εγκλιματισμού. Οι παραπάνω μετρήσεις παίρνονταν ανά 1min και καταγράφονταν κάθε 10min.

2.9 Στατιστική ανάλυση των δεδομένων

Για την σύγκριση μεταξύ των μέσων όρων για την εύρεση πιθανών σημαντικών διαφορών έγινε χρήση του στατιστικού πακέτου SPSS 10.0. Ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας θεωρήθηκε το 95% ($p < 0.05$). Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με ανάλυση της παραλλακτικότητας (ANOVA) και υπολογίστηκε η ελάχιστη σημαντική διαφορά (LSD).

3

Αποτελέσματα

3.1 Μετρήσεις αύξησης

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 1 (1^ο Πείραμα) προκύπτει ότι τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄, είχαν παρόμοιο ποσοστό ξηρής ουσίας στο βλαστό (πριν και μετά την σκληραγώγηση) με τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄ με την προσθήκη τύρφης και περλίτη. Μετά την έξοδο των φυτών από το θάλαμο ανάπτυξης και κατά την σκληραγώγησή τους για 4 εβδομάδες, το ποσοστό της ξηρής ουσίας στο βλαστό αυξήθηκε κατά 50% για τα φυτά που προήλθαν και από τα δύο υποστρώματα ανάπτυξης *in vitro*.

Στον Πίνακα 2 (2^ο Πείραμα) επίσης φαίνεται ότι η επί τοις εκατό ξηρή ουσία στο βλαστό μεταξύ φυτών που αναπτύχθηκαν *in vitro* και στα δύο χρησιμοποιούμενα υποστρώματα ήταν παρόμοια πριν και μετά την σκληραγώγηση. Στο πείραμα αυτό η αύξηση του ποσοστού επί τοις εκατό της ξηρής ουσίας στο βλαστό που συντελέστηκε κατά τη σκληραγώγηση των φυτών (προερχόμενων και από τα δύο υποστρώματα) διάρκειας δύο εβδομάδων ήταν της τάξης του 28,6%.

Στο πρώτο Πείραμα που διεξήχθη (Πίνακας 1), το ποσοστό επί τοις εκατό της ξηρής ουσίας στη ρίζα βρέθηκε να είναι μεγαλύτερο κατά 24,4% στα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄ που περιείχε μίγμα τύρφης-περλίτη σε σχέση με τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄. Στις τέσσερις εβδομάδες σκληραγώγησης που ακολούθησαν την έξοδο των φυτών από το θάλαμο ανάπτυξης, το ποσοστό επί τοις εκατό ξηρής ουσίας στη ρίζα αυξήθηκε κατά 62,9% κατά μέσο όρο. Έτσι, μικρότερο ποσοστό επί τοις εκατό ξηρής ουσίας στη ρίζα εμφάνισαν τα φυτά του υποστρώματος M₄ κατά την έξοδό τους από το θάλαμο ανάπτυξης και ακολούθησαν τα φυτά του

υποστρώματος M₄ με τύρφη και περλίτη που μετρήθηκαν την ίδια χρονική στιγμή. Τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα επί τοις εκατό σε ξηρή ουσία στη ρίζα εμφάνισαν τα φυτά μετά το πέρας των τεσσάρων εβδομάδων σκληραγώγησης, ανεξαρτήτως του υποστρώματος που είχε χρησιμοποιηθεί για την ανάπτυξη *in vitro*.

Στο 2^ο Πείραμα (Πίνακας 2), όπως και στο 1^ο Πείραμα, βρέθηκε το ποσοστό επί τοις εκατό της ξηρής ουσίας στη ρίζα να είναι μεγαλύτερο κατά 17% στα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄ που περιείχε μίγμα τύρφης- περλίτη σε σχέση με τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄. Η αύξηση της επί τοις εκατό ξηρής ουσίας στη ρίζα στις δύο εβδομάδες σκληραγώγησης ήταν 58,3%. Έτσι, μικρότερο ποσοστό επί τοις εκατό ξηρής ουσίας στη ρίζα εμφάνισαν τα φυτά του υποστρώματος M₄ κατά την έξοδό τους από το θάλαμο ανάπτυξης, ακολούθησαν τα φυτά του υποστρώματος M₄ με τύρφη και περλίτη που μετρήθηκαν την ίδια χρονική στιγμή, ενώ τη μεγαλύτερη περιεκτικότητα επί τοις εκατό σε ξηρή ουσία εμφάνισαν τα φυτά μετά το πέρας της σκληραγώγησης των δύο εβδομάδων, προερχόμενα κα από τα δύο υποστρώματα ανάπτυξης *in vitro*.

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 3 (1^ο Πείραμα), φαίνεται ότι το νωπό βάρος του βλαστού των φυτών που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα M₄ με την προσθήκη μίγματος τύρφης και περλίτη ήταν κατά 49,6% μικρότερο σε σχέση με τα φυτά που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα M₄. Η αύξηση του νωπού βάρους του βλαστού που συντελέστηκε κατά τις τέσσερις εβδομάδες της σκληραγώγησης ήταν της τάξης του 417,1%. Το μικρότερο νωπό βάρος βλαστού είχαν τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄ με προσθήκη τύρφης και περλίτη αμέσως μετά την έξοδό τους από το θάλαμο ανάπτυξης, ακολούθησαν τα φυτά του υποστρώματος M₄ του ίδιου χρονικού διαστήματος λήψης μετρήσεων, στη συνέχεια τα φυτά του υποστρώματος M₄ με προσθήκη τύρφης και περλίτη μετά από τις τέσσερις εβδομάδες σκληραγώγησης, και τέλος, το μεγαλύτερο νωπό βάρος βλαστού είχαν τα φυτά που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα M₄ και μετά υποβλήθηκαν σε τέσσερις εβδομάδες εγκλιματισμού.

Πίνακας 3.1. Μέσος όρος του ποσοστού επί τοις εκατό της ξηρής ουσίας (%ξ.ο.) στο βλαστό και τη ρίζα των φυτών του πρώτου πειράματος, στα δύο χρησιμοποιούμενα υποστρώματα (M₄ και M₄ με τύρφη και περλίτη) και τις δύο χρονικές στιγμές λήψης μετρήσεων (πριν και μετά την σκληραγώγηση των τεσσάρων εβδομάδων), σημαντικότητα και Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά (Ε.Σ.Δ.) των μεταβλητών αυτών.

Υπόστρωμα	% ξ.ο. στο βλαστό	% ξ.ο. στη ρίζα
M₄		
0 εβδ. σκληραγ.	9,21	4,92
4 εβδ. σκληραγ.	14,4	9,72
M₄+τύρφη+περλίτης		
0 εβδ. σκληραγ.	9,83	7,57
4 εβδ. σκληραγ.	14,2	10,6
<u>Σημαντικότητα:</u>		
Υπόστρωμα	NS	**
Χρόνος σκληραγώγησης	***	***
Υπόστρωμα*χρόνος	NS	NS
Ε.Σ.Δ.	0,78	1,29

Σημείωση: Μεταβλητές που συνοδεύονται από ** διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά για πιθανότητα $p < 1\%$, από *** για πιθανότητα $p < 1\%$ και από NS δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους για $p < 5\%$.

Πίνακας 3.2. Μέσος όρος του ποσοστού επί τοις εκατό της ξηρής ουσίας (%ξ.ο.) στο βλαστό και τη ρίζα των φυτών του δεύτερου πειράματος, στα δύο χρησιμοποιούμενα υποστρώματα (M_4 και M_4 με τύρφη και περλίτη) και τις δύο χρονικές στιγμές λήψης μετρήσεων (πριν και μετά την σκληραγώγηση των δύο εβδομάδων), σημαντικότητα και Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά (Ε.Σ.Δ.) των μεταβλητών αυτών.

Υπόστρωμα	% ξ.ο.	% ξ.ο.
	στο βλαστό	στη ρίζα
M_4		
0 εβδ. σκληραγ.	11,5	6,03
2 εβδ. σκληραγ.	16,3	10,6
M_4+τύρφη+περλίτης		
0 εβδ. σκληραγ.	13,6	7,93
2 εβδ. σκληραγ.	16,0	11,5
<u>Σημαντικότητα:</u>		
Υπόστρωμα	NS	*
Χρόνος σκληραγώγησης	**	***
Υπόστρωμα*χρόνος	NS	NS
Ε.Σ.Δ.	2,09	1,37

Σημείωση: Μεταβλητές που συνοδεύονται από * διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά για πιθανότητα $p < 5\%$, από ** για πιθανότητα $p < 1\%$, από *** για πιθανότητα $p < 1\%$ και από NS δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους για $p < 5\%$.

Στο δεύτερο Πείραμα (Πίνακας 4), καθ' όμοιο τρόπο, το νωπό βάρος του βλαστού των φυτών που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄ με την προσθήκη μίγματος τύρφης- περλίτη βρέθηκε μικρότερο, σε ποσοστό 37,9% σε σχέση με αυτό των φυτών που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄. Στο χρονικό διάστημα των δύο εβδομάδων εγκλιματισμού που ακολούθησε την έξοδο των φυτών από το θάλαμο ανάπτυξης, δεν αυξήθηκε σημαντικά το νωπό βάρος του βλαστού. Έτσι, τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄ με τύρφη και περλίτη ανεξάρτητα από το χρονικό διάστημα λήψης μετρήσεων (πριν ή μετά τον εγκλιματισμό των δύο εβδομάδων), είχαν μικρότερο νωπό βάρος στο βλαστό τους από ότι τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄, ανεξάρτητα από το χρονικό διάστημα λήψης των μετρήσεων.

Το νωπό βάρος της ρίζας των φυτών του 1^{ου} Πειράματος (Πίνακας 3), βρέθηκε να είναι κατά 46,6% μικρότερο στα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄ με προσθήκη τύρφης και περλίτη. Μετά την σκληραγώγηση των τεσσάρων εβδομάδων δεν φάνηκε να αυξήθηκε το νωπό βάρος των ριζών όλων των φυτών, σε σχέση με την πρώτη μέτρηση. Κατά κανόνα, τα φυτά που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα M₄ με τύρφη και περλίτη είχαν μικρότερο νωπό βάρος ρίζας σε σχέση με αυτά που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα M₄, ανεξαρτήτως του χρονικού διαστήματος λήψης μετρήσεων (πριν ή μετά τον εγκλιματισμό).

Μεταξύ των φυτών του 2^{ου} Πειράματος (Πίνακας 4) που αναπτύχθηκαν είτε στο ένα είτε στο άλλο υπόστρωμα, δεν βρέθηκαν διαφορές στο νωπό βάρος των ριζών τους. Όταν οι ρίζες ζυγίστηκαν μετά από τις δύο εβδομάδες της σκληραγώγησης, είχαν μικρότερο νωπό βάρος κατά 34,5% σε σχέση με αυτό που μετρήθηκε μετά την έξοδό τους από τις γυάλες ανάπτυξης. Το μεγαλύτερο νωπό βάρος ρίζας εμφάνισαν τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄ αμέσως μετά την έξοδό τους από το θάλαμο ανάπτυξης, σε σχέση με τα υπόλοιπα φυτά.

Στο 1^ο Πείραμα (Πίνακας 3), το νωπό βάρος ολόκληρου του φυτού ήταν κατά 48,7% μικρότερο στα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄ με την προσθήκη του μίγματος τύρφης-περλίτη σε σχέση με τα φυτά που

αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα M₄. Το νωπό βάρος του φυτού αυξήθηκε κατά 180,6% στις τέσσερις εβδομάδες εγκλιματισμού σε σχέση με αυτό που μετρήθηκε αμέσως μετά την έξοδο των φυτών από το θάλαμο ανάπτυξης. Τα φυτά με το μικρότερο νωπό βάρος ήταν αυτά που ζυγίστηκαν αμέσως μετά την έξοδό τους από τις γυάλες και τα οποία είχαν αναπτυχθεί σε υπόστρωμα M₄ με τύρφη και περλίτη, ακολούθησαν τα φυτά που ζυγίστηκαν την ίδια χρονική στιγμή και είχαν αναπτυχθεί σε υπόστρωμα M₄, στη συνέχεια τα φυτά που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα M₄ με τύρφη και περλίτη μετά από τις τέσσερις εβδομάδες σκληραγώγησης, και τέλος, το μεγαλύτερο νωπό βάρος είχαν τα φυτά του υποστρώματος M₄ μετά την παραμονή τους για τέσσερις εβδομάδες σε συνθήκες εγκλιματισμού.

Όσον αφορά το νωπό βάρος των φυτών του 2^{ου} Πειράματος (Πίνακας 4), όπως και στο 1^ο Πείραμα, το νωπό βάρος ολόκληρου του φυτού ήταν μικρότερο στα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄ με την προσθήκη του μίγματος τύρφης-περλίτη σε σχέση με τα φυτά που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα M₄, κατά 28,5%. Το νωπό βάρος του φυτού δεν αυξήθηκε στις δύο εβδομάδες εγκλιματισμού σε σχέση με αυτό που μετρήθηκε αμέσως μετά την έξοδο των φυτών από το θάλαμο ανάπτυξης. Το μεγαλύτερο νωπό βάρος είχαν τα φυτά του υποστρώματος M₄ αμέσως μετά την έξοδό τους από τις συνθήκες ανάπτυξης, σε σχέση με τα φυτά του υποστρώματος M₄ με τύρφη και περλίτη που ζυγίστηκαν την ίδια χρονική στιγμή καθώς και τα φυτά και των δύο υποστρωμάτων μετά την σκληραγώγηση των δύο εβδομάδων.

Μεταξύ των φυτών του 1^{ου} Πειράματος (Πίνακας 5) που αναπτύχθηκαν στα δύο υποστρώματα, βρέθηκαν τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄ με την προσθήκη μίγματος τύρφης και περλίτη να έχουν κατά 46,9% μικρότερο ξηρό βάρος βλαστού σε σχέση με τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄. Όταν υπολογίστηκε το ξηρό βάρος των βλαστών των φυτών μετά από τις τέσσερις εβδομάδες της σκληραγώγησης, βρέθηκε να έχει αυξηθεί κατά 695,4%. Το μικρότερο ξηρό βάρος βλαστού είχαν τα φυτά του υποστρώματος M₄ με τύρφη και περλίτη αμέσως μετά την έξοδό τους από το θάλαμο ανάπτυξης, ακολούθησαν τα φυτά του υποστρώματος M₄ του ίδιου χρόνου λήψης μετρήσεων, στη συνέχεια τα

σκληραγωγημένα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄ με το μίγμα τύρφης-περλίτη, και τέλος, το μεγαλύτερο ξηρό βάρος βλαστού είχαν τα φυτά του υποστρώματος ανάπτυξης M₄, μετά από τις τέσσερις εβδομάδες εγκλιματισμού.

Στο 2^ο Πείραμα (Πίνακας 6), όμοια με πριν, τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄ με την προσθήκη μίγματος τύρφης και περλίτη βρέθηκαν να έχουν μικρότερο ξηρό βάρος βλαστού σε σχέση με αυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄. Το βάρος τους ήταν κατά 32,3% μικρότερο. Μετά από σκληραγωγή 2 εβδομάδων, το ξηρό βάρος του βλαστού αυξήθηκε κατά 60%. Έτσι, το μεγαλύτερο ξηρό βάρος βλαστού είχαν τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄ μετά την σκληραγωγή τους, και το μικρότερο, τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄ με τύρφη και περλίτη αμέσως μετά την έξοδό τους από τις γυάλες. Ενδιάμεσες τιμές εμφάνισαν τα φυτά του υποστρώματος M₄ αμέσως μετά την έξοδό τους από το θάλαμο ανάπτυξης καθώς και τα φυτά του υποστρώματος M₄ με τύρφη και περλίτη μετά από δύο εβδομάδες εγκλιματισμού.

Όσον αφορά το ξηρό βάρος της ρίζας των φυτών του 1^{ου} Πειράματος (Πίνακας 5), βρέθηκε μικρότερο κατά 30,2% στα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄ με μίγμα τύρφης και περλίτη σε σχέση με τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄ μόνο. Μετά από τέσσερις εβδομάδες εγκλιματισμού, συντελέστηκε αύξηση της τάξης του 74% στο ξηρό βάρος της ρίζας. Το μικρότερο ξηρό βάρος είχαν οι ρίζες των φυτών αμέσως μόλις βγήκαν από το θάλαμο ανάπτυξης, προερχόμενων και από τα δύο υποστρώματα ανάπτυξης *in vitro*, ακολούθησαν οι ρίζες των φυτών του υποστρώματος ανάπτυξης M₄ με τύρφη και περλίτη μετά την σκληραγωγή, και τέλος, το μεγαλύτερο ξηρό βάρος είχαν οι ρίζες των φυτών που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα M₄ *in vitro* και σκληραγωγήθηκαν για τέσσερις εβδομάδες.

Το ξηρό βάρος των ριζών των φυτών του δεύτερου Πειράματος (Πίνακας 6) δεν διέφερε μεταξύ των φυτών που αναπτύχθηκαν *in vitro* σε διαφορετικά υποστρώματα. Μετά από την σκληραγωγή των δύο εβδομάδων επίσης δεν άλλαξε το ξηρό βάρος των ριζών των φυτών.

Πίνακας 3.3. Μέσος όρος του νωπού βάρους του βλαστού, της ρίζας και ολόκληρου του φυτού (σε mg) του πρώτου πειράματος, στα δύο χρησιμοποιούμενα υποστρώματα (M₄ και M₄ με τύρφη και περλίτη) και τις δύο χρονικές στιγμές λήψης μετρήσεων (πριν και μετά την σκληραγώγηση των τεσσάρων εβδομάδων), σημαντικότητα και Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά (Ε.Σ.Δ.) των μεταβλητών αυτών.

Υπόστρωμα	Νωπό βάρος βλαστού (mg)	Νωπό βάρος ρίζας (mg)	Νωπό βάρος φυτού (mg)
M₄			
0 εβδ. σκληραγ.	180	219	399
4 εβδ. σκληραγ.	781	224	1005
M₄+τύρφη+περλίτης			
0 εβδ. σκληραγ.	54	106	160
4 εβδ. σκληραγ.	429	131	560
<u>Σημαντικότητα:</u>			
Υπόστρωμα	***	***	***
Χρόνος σκληραγώγησης	***	NS	***
Υπόστρωμα*χρόνος	***	NS	*
Ε.Σ.Δ.	63,9	28,4	79,9

Σημείωση: Μεταβλητές που συνοδεύονται από * διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά για πιθανότητα $p < 5\%$, από *** για πιθανότητα $p < 1\%$ και από NS δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους για $p < 5\%$.

Πίνακας 3.4. Μέσος όρος του νωπού βάρους του βλαστού, της ρίζας και ολόκληρου του φυτού (σε mg) του δεύτερου πειράματος, στα δύο χρησιμοποιούμενα υποστρώματα (M₄ και M₄ με τύρφη και περλίτη) και τις δύο χρονικές στιγμές λήψης μετρήσεων (πριν και μετά την σκληραγώγηση των δύο εβδομάδων), σημαντικότητα και Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά (Ε.Σ.Δ.) των μεταβλητών αυτών.

Υπόστρωμα	Νωπό βάρος βλαστού (mg)	Νωπό βάρος ρίζας (mg)	Νωπό βάρος φυτού (mg)
M₄			
0 εβδ. σκληραγ.	276	327	603
2 εβδ. σκληραγ.	284	173	458
M₄+τύρφη+περλίτης			
0 εβδ. σκληραγ.	146	223	369
2 εβδ. σκληραγ.	202	186	388
<u>Σημαντικότητα:</u>			
Υπόστρωμα	**	NS	*
Χρόνος σκληραγώγησης	NS	*	NS
Υπόστρωμα*χρόνος	NS	NS	NS
Ε.Σ.Δ.	72,2	83,1	125

Σημείωση: Μεταβλητές που συνοδεύονται από * διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά για πιθανότητα $p < 5\%$, από ** για πιθανότητα $p < 1\%$ και από NS δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους για $p < 5\%$.

Στο πρώτο Πείραμα (Πίνακας 5), φαίνεται ότι το ξηρό βάρος ολόκληρου του φυτού ήταν κατά 44,4% μικρότερο στα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄ με προσθήκη μίγματος τύρφης- περλίτη, σε σχέση με τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄. Μετά από την περίοδο εγκλιματισμού των τεσσάρων εβδομάδων, το ξηρό βάρος των φυτών αυξήθηκε κατά 395,2% σε σχέση με αυτό που είχαν αμέσως μετά την έξοδό τους από τι θάλαμο ανάπτυξης. Πιο συγκεκριμένα, το μικρότερο ξηρό βάρος είχαν τα φυτά του υποστρώματος M₄ με προσθήκη τύρφης-περλίτη πριν να σκληραγωγηθούν, αμέσως μεγαλύτερο τα φυτά του υποστρώματος M₄ πριν την σκληραγώγηση, ακολούθησαν τα φυτά που προέρχονταν από το υπόστρωμα ανάπτυξης M₄ με τύρφη και περλίτη μετά την σκληραγώγησή τους για τέσσερις εβδομάδες, και τέλος, το μεγαλύτερο ξηρό βάρος είχαν τα φυτά που προέρχονταν από υπόστρωμα M₄ και σκληραγωγήθηκαν για τέσσερις εβδομάδες.

Στο δεύτερο Πείραμα, (Πίνακας 6), επίσης φαίνεται ότι το ξηρό βάρος ολόκληρου του φυτού ήταν μικρότερο στα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄ με προσθήκη μίγματος τύρφης- περλίτη, σε σχέση με τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄, το ποσοστό όμως σε αυτή την περίπτωση ήταν 20,7%. Το ξηρό βάρος των φυτών αυξήθηκε κατά 37,9% μετά από την περίοδο εγκλιματισμού των δύο εβδομάδων, σε σχέση με αυτό που είχαν αμέσως μετά την έξοδό τους από τις γυάλες. Φυτά με το μικρότερο ξηρό βάρος ήταν αυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄ με τύρφη και περλίτη και πριν εγκλιματιστούν, αμέσως μεγαλύτερο ξηρό βάρος είχαν τα φυτά του υποστρώματος M₄ πριν εγκλιματιστούν επίσης, ακολούθησαν τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄ με τύρφη και περλίτη και εγκλιματίστηκαν για δύο εβδομάδες, και το μεγαλύτερο ξηρό βάρος είχαν τα φυτά που προήλθαν από το υπόστρωμα M₄ μετά την σκληραγώγησή τους.

Ο αριθμός των κόμβων που μετρήθηκαν στα φυτά του 1^{ου} Πειράματος (Πίνακας 7), ήταν μικρότερος κατά 27,1% στα φυτά που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα M₄ με προσθήκη τύρφης και περλίτη, απ' ότι σε αυτά που αναπτύχθηκαν σε σκέτο υπόστρωμα M₄. Ο αριθμός των κόμβων που είχαν τα φυτά μετά το χρονικό διάστημα της ανάπτυξής τους στο θάλαμο αυξήθηκε κατά 132% μετά και από τις τέσσερις εβδομάδες σκληραγώγησης. Τους

λιγότερους κόμβους είχαν τα φυτά του υποστρώματος M₄ με τύρφη και περλίτη αμέσως μετά την έξοδό τους από τις γυάλες, ακολούθησαν τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄ κατά το ίδιο χρονικό διάστημα λήψης μέτρησης με τα προηγούμενα, στη συνέχεια τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄ με την προσθήκη του μίγματος τύρφης και περλίτη και μετά τις τέσσερις εβδομάδες εγκλιματισμού, και τέλος, τους περισσότερους κόμβους είχαν τα φυτά που προήλθαν από το υπόστρωμα M₄ μετά από την σκληραγώγησή τους.

Μεταξύ των φυτών του 2^{ου} Πειράματος (Πίνακας 8) που αναπτύχθηκαν στα δύο υποστρώματα, βρέθηκαν τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄ με την προσθήκη μίγματος τύρφης και περλίτη να έχουν κατά 12,9% λιγότερους κόμβους σε σχέση με αυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄. Όταν μετρήθηκαν πάλι οι κόμβοι των φυτών μετά από δύο εβδομάδες σκληραγώγησης, βρέθηκε να έχουν αυξηθεί κατά 26,5%. Τους λιγότερους κόμβους είχαν τα φυτά του υποστρώματος M₄ με τύρφη και περλίτη αμέσως μετά την έξοδό τους από το θάλαμο ανάπτυξης, ακολούθησαν τα φυτά του υποστρώματος M₄ του ίδιου χρόνου λήψης μετρήσεων, και τέλος, τους περισσότερους κόμβους είχαν τα φυτά που προήλθαν από το υπόστρωμα M₄, μετά από τις δύο εβδομάδες εγκλιματισμού. Ταυτόχρονα, τα φυτά του υποστρώματος M₄ με τύρφη και περλίτη αμέσως μετά την έξοδό τους από το θάλαμο ανάπτυξης είχαν λιγότερους κόμβους από τα φυτά που προήλθαν από το ίδιο υπόστρωμα και σκληραγωγήθηκαν για δύο εβδομάδες.

Πίνακας 3.5. Μέσος όρος του ξηρού βάρους του βλαστού, της ρίζας και ολόκληρου του φυτού του πρώτου πειράματος, στα δύο χρησιμοποιούμενα υποστρώματα (M₄ και M₄ με τύρφη και περλίτη) και τις δύο χρονικές στιγμές λήψης μετρήσεων (πριν και μετά την σκληραγώγηση των τεσσάρων εβδομάδων), σημαντικότητα και Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά (Ε.Σ.Δ.) των μεταβλητών αυτών.

Υπόστρωμα	Ξηρό βάρος βλαστού (mg)	Ξηρό βάρος ρίζας (mg)	Ξηρό βάρος φυτού (mg)
M₄			
0 εβδ. σκληραγ.	16,7	10,8	27,4
4 εβδ. σκληραγ.	112	21,5	133
M₄+τύρφη+περλίτης			
0 εβδ. σκληραγ.	52,4	9,30	15,5
4 εβδ. σκληραγ.	61,6	13,3	74,9
<u>Σημαντικότητα:</u>			
Υπόστρωμα	***	***	***
Χρόνος σκληραγώγησης	***	***	***
Υπόστρωμα*χρόνος	***	**	***
Ε.Σ.Δ.	10,1	2,3	10,6

Σημείωση: Μεταβλητές που συνοδεύονται από ** διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά για πιθανότητα $p < 1\%$ και από *** για πιθανότητα $p < 1\%$.

Πίνακας 3.6. Μέσος όρος του ξηρού βάρους του βλαστού, της ρίζας και ολόκληρου του φυτού του δεύτερου πειράματος, στα δύο χρησιμοποιούμενα υποστρώματα (M_4 και M_4 με τύρφη και περλίτη) και τις δύο χρονικές στιγμές λήψης μετρήσεων (πριν και μετά την σκληραγώγηση των δύο εβδομάδων), σημαντικότητα και Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά (Ε.Σ.Δ.) των μεταβλητών αυτών.

Υπόστρωμα	Ξηρό βάρος βλαστού (mg)	Ξηρό βάρος ρίζας (mg)	Ξηρό βάρος φυτού (mg)
M_4			
0 εβδ. σκληραγ.	29,5	18,5	48,0
2 εβδ. σκληραγ.	45,8	18,2	64,0
M_4+τύρφη+περλίτης			
0 εβδ. σκληραγ.	19,1	17,3	36,4
2 εβδ. σκληραγ.	31,9	20,5	52,4
<u>Σημαντικότητα:</u>			
Υπόστρωμα	**	NS	*
Χρόνος σκληραγώγησης	***	NS	**
Υπόστρωμα*χρόνος	NS	NS	NS
Ε.Σ.Δ.	7,9	5,0	11,5

Σημείωση: Μεταβλητές που συνοδεύονται από * διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά για πιθανότητα $p < 5\%$, από ** για πιθανότητα $p < 1\%$, από *** για πιθανότητα $p < 1\%$ και από NS δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους για $p < 5\%$.

Στο 1^ο Πείραμα (Πίνακας 7), τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄ με την προσθήκη μίγματος τύρφης και περλίτη ήταν κατά 30,2% πιο κοντά από αυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄. Μετά την έξοδο των φυτών από το θάλαμο ανάπτυξης και κατά την σκληραγώγησή τους για τέσσερις εβδομάδες, το μήκος του βλαστού αυξήθηκε κατά 218,5%. Τα ψηλότερα φυτά ήταν αυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄ και μετά υπέστησαν την σκληραγώγηση των τεσσάρων εβδομάδων, αμέσως κοντύτερα ήταν τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄ με προσθήκη μίγματος τύρφης και περλίτη και επίσης υπέστησαν το ίδιο χρονικό διάστημα σκληραγώγησης, στη συνέχεια ήταν τα φυτά του υποστρώματος M₄ αμέσως μετά την έξοδό τους από το θάλαμο ανάπτυξης, και τέλος, τα κοντύτερα φυτά ήταν αυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄ με τύρφη και περλίτη αμέσως μετά την έξοδό τους από τις γυάλες.

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 8 (2^ο Πείραμα), προκύπτει ότι τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄ με την προσθήκη τύρφης και περλίτη είχαν μικρότερο μήκος βλαστού κατά 24,4% σε σχέση με τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄. Μετά την έξοδο των φυτών από το θάλαμο ανάπτυξης και κατά την σκληραγώγησή τους για 2 εβδομάδες, το μήκος του βλαστού αυξήθηκε κατά 47,8%. Τα κοντύτερα φυτά ήταν αυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄ με την προσθήκη τύρφης και περλίτη και μετρήθηκαν αμέσως μετά την έξοδό τους από το θάλαμο ανάπτυξης, ακολούθησαν σε ύψος τα φυτά του υποστρώματος M₄ μετά την έξοδό τους από τις γυάλες και τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄ με προσθήκη μίγματος τύρφης και περλίτη μετά την σκληραγώγηση των δύο εβδομάδων, και τέλος, τα ψηλότερα φυτά ήταν αυτά που προήλθαν από το υπόστρωμα M₄ και υποβλήθηκαν σε σκληραγώγηση δύο εβδομάδων.

Στον Πίνακα 7 (1^ο Πείραμα), φαίνεται ότι ο αριθμός των κυρίων ριζών μεταξύ των φυτών που αναπτύχθηκαν στα δύο χρησιμοποιούμενα υποστρώματα διέφερε σημαντικά. Τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄ με προσθήκη μίγματος τύρφης και περλίτη είχαν κατά μέσο όρο 22% λιγότερες κύριες ρίζες από αυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄. Στο πείραμα αυτό, ο αριθμός των κυρίων ριζών που μετρήθηκε μετά την

σκληραγώγηση (4 εβδομάδες μετά την έξοδο από το θάλαμο ανάπτυξης) βρέθηκε 35% μικρότερος. Τις λιγότερες ρίζες είχαν τα φυτά που προήλθαν από το υπόστρωμα M₄ με τύρφη και περλίτη και εγκλιματίστηκαν για τέσσερις εβδομάδες, ακολούθησαν τα φυτά του υποστρώματος M₄ επίσης μετά το πέρας του εγκλιματισμού, στη συνέχεια τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄ με τύρφη και περλίτη αμέσως μετά την έξοδο από το θάλαμο ανάπτυξης, και τέλος, τις περισσότερες ρίζες είχαν τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄, μετά την έξοδό τους από τις γυάλες.

Στο 2^ο Πείραμα που διεξήχθη (Πίνακας 8), όπως και στο 1^ο Πείραμα, τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄ με προσθήκη μίγματος τύρφης και περλίτη είχαν λιγότερες κύριες ρίζες κατά 36,8% από αυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄. Στις δύο εβδομάδες σκληραγώγησης που ακολούθησαν την έξοδο των φυτών από το θάλαμο ανάπτυξης, ο αριθμός των κυρίων ριζών των φυτών δεν μεταβλήθηκε. Έτσι, τα φυτά που προήλθαν από το υπόστρωμα M₄ με τύρφη και περλίτη, ανεξαρτήτως του χρονικού διαστήματος που πάρθηκε η μέτρηση (πριν ή μετά τον εγκλιματισμό) είχαν λιγότερες κύριες ρίζες από τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄, ανεξάρτητα από το χρονικό διάστημα λήψης μετρήσεων.

Μεταξύ των φυτών του 1^{ου} Πειράματος (Πίνακας 7), βρέθηκε ότι τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄ με την προσθήκη μίγματος τύρφης και περλίτη είχαν κατά 49,4% μικρότερο μήκος ριζών σε σχέση με τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄. Όταν μετρήθηκαν πάλι τα μήκη των κυρίων ριζών μετά από τις τέσσερις εβδομάδες σκληραγώγησης, βρέθηκαν αμετάβλητα. Τα φυτά του υποστρώματος M₄ με τύρφη και περλίτη, ανεξαρτήτως από το χρόνο λήψης μετρήσεων των μηκών (κατά την έξοδο από το θάλαμο ανάπτυξης ή κατά την έξοδο από τον εγκλιματισμό), είχαν κοντύτερες ρίζες από τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄, ανεξαρτήτως από το χρόνο λήψης μετρήσεων.

Στο 2^ο Πείραμα (Πίνακας 8), δεν βρέθηκε το μήκος των κυρίων ριζών να διαφέρει μεταξύ των φυτών που αναπτύχθηκαν *in vitro* στα δύο διαφορετικά υποστρώματα. Επίσης, δεν βρέθηκαν να διαφέρουν τα μήκη των

ριζών όταν αυτά μετρήθηκαν μετά από δύο εβδομάδες σκληραγώγησης, σε σχέση με τα αρχικά μετρούμενα κατά την έξοδο των φυτών από τις γυάλες. Τις μακρύτερες ρίζες εμφάνισαν τα φυτά του υποστρώματος M₄ κατά την έξοδό τους από το θάλαμο ανάπτυξης σε σχέση με τα υπόλοιπα φυτά.

Στο 1^ο Πείραμα (Πίνακας 9), τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄ με την προσθήκη μίγματος τύρφης και περλίτη είχαν κατά 34,9% μικρότερο νωπό βάρος στο βλαστό τους ανά εκατοστό μήκους από τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄. Μετά την έξοδο των φυτών από το θάλαμο ανάπτυξης και κατά την σκληραγώγησή τους για τέσσερις εβδομάδες, το νωπό βάρος του βλαστού ανά cm αυξήθηκε κατά 70,6%. Τα φυτά με το μικρότερο βάρος ανά εκατοστό βλαστού ήταν αυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄ με προσθήκη μίγματος τύρφης και περλίτη αμέσως μετά την έξοδό τους από τις γυάλες, αμέσως μεγαλύτερο είχαν τα φυτά του υποστρώματος M₄ αμέσως μετά την έξοδό τους από το θάλαμο ανάπτυξης και του υποστρώματος M₄ με τύρφη και περλίτη μετά την σκληραγώγηση των τεσσάρων εβδομάδων, και τέλος, το μεγαλύτερο νωπό βάρος ανά εκατοστό βλαστού είχαν τα φυτά που προήλθαν από το υπόστρωμα M₄ και υπέστησαν σκληραγώγηση τεσσάρων εβδομάδων.

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 10 (2^ο Πείραμα), προκύπτει ότι τα φυτά που αναπτύχθηκαν και στα δύο υποστρώματα δεν είχαν διαφορετικό νωπό βάρος ανά εκατοστό βλαστού. Μετά την έξοδο των φυτών από το θάλαμο ανάπτυξης και κατά την σκληραγώγησή τους για 2 εβδομάδες, το νωπό βάρος βλαστού ανά μονάδα μήκους δεν μεταβλήθηκε. Το μεγαλύτερο νωπό βάρος ανά εκατοστό βλαστού είχαν τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄, αμέσως μετά την έξοδό τους από το θάλαμο ανάπτυξης. Τις μικρότερες τιμές της μεταβλητής αυτής είχαν τα φυτά του υποστρώματος M₄ με τύρφη και περλίτη μετά την έξοδό τους από το θάλαμο ανάπτυξης, τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄ και σκληραγωγήθηκαν για δύο εβδομάδες και τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄ με προσθήκη μίγματος τύρφης και περλίτη και σκληραγωγήθηκαν για το ίδιο χρονικό διάστημα.

Πίνακας 3.7. Μέσος όρος του αριθμού κόμβων στο βλαστό, του μήκους του βλαστού (σε cm), του αριθμού των κυρίων ριζών και του συνολικού μήκους των κυρίων ριζών (σε cm) των φυτών του πρώτου πειράματος, στα δύο χρησιμοποιούμενα υποστρώματα (M₄ και M₄ με τύρφη και περλίτη) και τις δύο χρονικές στιγμές λήψης μετρήσεων (πριν και μετά την σκληραγώγηση των τεσσάρων εβδομάδων), σημαντικότητα και Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά (Ε.Σ.Δ.) των μεταβλητών αυτών.

Υπόστρωμα	# κόμβων	Μήκος βλαστού (cm)	# κυρίων ριζών	Μήκος κυρίων ριζών (cm)
M₄				
0 εβδ. σκληραγ.	3,1	8,15	3,09	30,8
4 εβδ. σκληραγ.	6,4	23,3	2,00	32,9
M₄+τύρφη+περλίτης				
0 εβδ. σκληραγ.	1,9	4,63	2,40	17,2
4 εβδ. σκληραγ.	5,2	17,3	1,55	16,3
Σημαντικότητα:				
Υπόστρωμα	***	***	**	***
Χρόνος σκληραγώγησης	***	***	***	NS
Υπόστρωμα*χρόνος	NS	NS	NS	NS
Ε.Σ.Δ.	0,9	1,42	0,38	4,02

Σημείωση: Μεταβλητές που συνοδεύονται από ** διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά για πιθανότητα $p < 1\%$, από *** για πιθανότητα $p < 1\%$ και από NS δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους για $p < 5\%$.

Πίνακας 3.8. Μέσος όρος του αριθμού κόμβων στο βλαστό, του μήκους του βλαστού (σε cm), του αριθμού των κυρίων ριζών και του συνολικού μήκους των κυρίων ριζών (σε cm) των φυτών του δεύτερου πειράματος, στα δύο χρησιμοποιούμενα υποστρώματα (M₄ και M₄ με τύρφη και περλίτη) και τις δύο χρονικές στιγμές λήψης μετρήσεων (πριν και μετά την σκληραγώγηση των δύο εβδομάδων), σημαντικότητα και Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά (Ε.Σ.Δ.) των μεταβλητών αυτών.

Υπόστρωμα	# κόμβων	Μήκος βλαστού (cm)	# κυρίων ριζών	Μήκος κυρίων ριζών (cm)
M₄				
0 εβδ. σκληραγ.	5,0	7,52	2,81	26,5
2 εβδ. σκληραγ.	6,1	11,2	2,37	15,0
M₄+τύρφη+περλίτης				
0 εβδ. σκληραγ.	4,2	5,72	1,52	17,3
2 εβδ. σκληραγ.	5,5	8,40	1,75	19,4
<u>Σημαντικότητα:</u>				
Υπόστρωμα	**	*	NS	NS
Χρόνος σκληραγώγησης	NS	**	*	NS
Υπόστρωμα*χρόνος	NS	NS	NS	NS
Ε.Σ.Δ.	0,78	1,67	1,54	6,99

Σημείωση: Μεταβλητές που συνοδεύονται από * διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά για πιθανότητα $p < 5\%$, από ** για πιθανότητα $p < 1\%$ και από NS δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους για $p < 5\%$.

Στον Πίνακα 9 (1^ο Πείραμα), φαίνεται ότι το νωπό βάρος ανά εκατοστό μήκους ρίζας δεν διέφερε μεταξύ των φυτών που αναπτύχθηκαν στα δύο χρησιμοποιούμενα υποστρώματα. Στο πείραμα αυτό, το νωπό βάρος ανά cm ρίζας μετά την σκληραγώγηση (4 εβδομάδες μετά την έξοδο από το θάλαμο ανάπτυξης) δεν μεταβλήθηκε. Το μικρότερο νωπό βάρος ανά εκατοστό ρίζας είχαν τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄ με τύρφη και περλίτη μετά την έξοδό τους από τις γυάλες και τα φυτά του υποστρώματος M₄ μετά το πέρας του εγκλιματισμού. Το μεγαλύτερο νωπό βάρος ρίζας ανά cm είχαν τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄ με τύρφη και περλίτη μετά το πέρας των τεσσάρων εβδομάδων εγκλιματισμού.

Στο 2^ο Πείραμα που διεξήχθη (Πίνακας 10), όπως και στο 1^ο Πείραμα, το νωπό βάρος ανά εκατοστό ρίζας δεν διέφερε μεταξύ των φυτών που αναπτύχθηκαν στα δύο χρησιμοποιούμενα υποστρώματα. Επίσης, το νωπό βάρος ανά cm ρίζας μετά την σκληραγώγηση των δύο εβδομάδων δεν μεταβλήθηκε. Δεν βρέθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των φυτών όσον αφορά αυτή τη μεταβλητή.

Μεταξύ των φυτών του πρώτου Πειράματος (Πίνακας 9), βρέθηκαν τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄ με την προσθήκη μίγματος τύρφης και περλίτη να έχουν κατά 32,2% πιο μικρό ξηρό βάρος ανά εκατοστό βλαστού σε σχέση με αυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄. Όταν επαναλήφθηκαν οι μετρήσεις μετά από τις τέσσερις εβδομάδες σκληραγώγησης, βρέθηκε το ξηρό βάρος του βλαστού ανά cm να έχει αυξηθεί κατά 163,5%. Το μικρότερο ξηρό βάρος ανά εκατοστό βλαστού είχαν τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄ με προσθήκη μίγματος τύρφης και περλίτη αμέσως μετά την έξοδό τους από το θάλαμο ανάπτυξης, ακολούθησαν αυτά του υποστρώματος M₄ επίσης μετά την έξοδό τους από τις γυάλες, αμέσως μεγαλύτερη τιμή παρουσίασαν τα φυτά που προήλθαν από το υπόστρωμα M₄ με τύρφη και περλίτη και σκληραγωγήθηκαν για τέσσερις εβδομάδες, και τέλος, το μεγαλύτερο ξηρό βάρος ανά εκατοστό βλαστού είχαν

τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄, μετά την σκληραγώγησή τους.

Στο 2^ο Πείραμα (Πίνακας 10), δεν βρέθηκε το ξηρό βάρος ανά μονάδα μήκους βλαστού να διαφέρει μεταξύ των φυτών που αναπτύχθηκαν *in vitro* στα δύο διαφορετικά υποστρώματα. Επίσης, δεν βρέθηκε να διαφέρει η μεταβλητή αυτή όταν επαναλήφθηκε η μέτρηση μετά από τις δύο εβδομάδες σκληραγώγησης, σε σχέση με την αρχικά μετρούμενη κατά την έξοδο των φυτών από τις γυάλες. Το ξηρό βάρος ανά εκατοστό βλαστού των φυτών που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄ με προσθήκη τύρφης και περλίτη κατά την έξοδό τους από το θάλαμο ανάπτυξης ήταν στατιστικώς σημαντικά μικρότερο από αυτό των φυτών που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄ και υπέστησαν σκληραγώγηση δύο εβδομάδων.

Όσον αφορά το ξηρό βάρος της ρίζας ανά εκατοστό μήκους των φυτών του 1^{ου} Πειράματος (Πίνακας 9), βρέθηκε μεγαλύτερο κατά 39,6% στα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄ με μίγμα τύρφης και περλίτη σε σχέση με αυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄. Μετά από τέσσερις εβδομάδες εγκλιματισμού, συντελέστηκε αύξηση της τάξης του 64,7% στο ξηρό βάρος ανά cm ρίζας. Το μικρότερο ξηρό βάρος ανά εκατοστό ρίζας είχαν τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄, αμέσως μόλις βγήκαν από το θάλαμο ανάπτυξης. Ακολούθησαν τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄ με προσθήκη μίγματος τύρφης-περλίτη μετά την έξοδό τους από το θάλαμο ανάπτυξης. Μεγαλύτερες τιμές εμφάνισαν τα φυτά που προήλθαν από το υπόστρωμα M₄ και σκληραγωγήθηκαν για τέσσερις εβδομάδες, και τέλος, το μεγαλύτερο ξηρό βάρος ανά εκατοστό ρίζας είχαν τα φυτά που προήλθαν από το υπόστρωμα ανάπτυξης M₄ με τύρφη και περλίτη και υποβλήθηκαν σε εγκλιματισμό τεσσάρων εβδομάδων.

Το ξηρό βάρος ανά εκατοστό ρίζας των φυτών του δεύτερου Πειράματος (Πίνακας 10), δεν διέφερε μεταξύ των φυτών που αναπτύχθηκαν *in vitro* σε διαφορετικά υποστρώματα. Μετά από την σκληραγώγηση των δύο εβδομάδων, η τιμή του αυξήθηκε κατά 49,8%. Τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄ μετά την έξοδό τους από το θάλαμο ανάπτυξης είχαν μικρότερο ξηρό βάρος ανά cm ρίζας σε σχέση με τα φυτά που προήλθαν και

από τα δύο υποστρώματα ανάπτυξης και σκληραγωγήθηκαν για δύο εβδομάδες.

Στο 1^ο Πείραμα (Πίνακας 11), τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄ με την προσθήκη μίγματος τύρφης και περλίτη είχαν κατά 9,9% μικρότερη αναλογία νωπού βάρους βλαστού προς νωπό βάρος φυτού σε σχέση με τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄. Μετά την έξοδο των φυτών από το θάλαμο ανάπτυξης και κατά την σκληραγωγή τους για τέσσερις εβδομάδες, το νωπό βάρος βλαστού προς νωπό βάρος ολόκληρου του φυτού αυξήθηκε κατά 94,7%. Τα φυτά με τη μικρότερη τιμή της αναλογίας αυτής ήταν αυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄ με προσθήκη μίγματος τύρφης και περλίτη μετά την έξοδό τους από τις γυάλες, αμέσως μεγαλύτερη είχαν τα φυτά του υποστρώματος M₄ της ίδιας χρονικής στιγμής λήψης μετρήσεων και τέλος, τη μεγαλύτερη τιμή είχαν τα φυτά και των δύο υποστρωμάτων ανάπτυξης *in vitro* μετά την σκληραγωγή των τεσσάρων εβδομάδων.

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 12 (2^ο Πείραμα), προκύπτει ότι τα φυτά που αναπτύχθηκαν στα δύο υποστρώματα δεν είχαν διαφορετικό νωπό βάρος βλαστού προς το συνολικό νωπό βάρος του φυτού. Μετά την έξοδο των φυτών από το θάλαμο ανάπτυξης και κατά την σκληραγωγή τους για 2 εβδομάδες, το νωπό βάρος βλαστού προς το νωπό βάρος του φυτού αυξήθηκε κατά 36,9%. Τις μικρότερες τιμές της αναλογίας αυτής είχαν τα φυτά προερχόμενα και από τα δύο υποστρώματα μετά την έξοδό τους από το θάλαμο ανάπτυξης, ακολούθησαν τα φυτά του υποστρώματος ανάπτυξης M₄ με τύρφη και περλίτη μετά από την σκληραγωγή των δύο εβδομάδων, και τέλος, το μεγαλύτερο νωπό βάρος βλαστού προς νωπό βάρος φυτού είχαν τα φυτά που προήλθαν από το υπόστρωμα M₄ μετά την σκληραγωγή των δύο εβδομάδων.

Στον Πίνακα 11 (1^ο Πείραμα), φαίνεται ότι η αναλογία του νωπού βάρους ρίζας προς νωπό βάρος φυτού ήταν κατά 15,8% μεγαλύτερη στα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄ με προσθήκη μίγματος τύρφης-περλίτη σε σχέση με τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄. Στο πείραμα αυτό, η αναλογία νωπού βάρους ρίζας προς νωπό βάρος φυτού

μετά την σκληραγώγηση (4 εβδομάδες μετά την έξοδο από το θάλαμο ανάπτυξης) μειώθηκε κατά 62,1%. Τη μικρότερη τιμή του κλάσματος αυτού είχαν τα φυτά που προήλθαν και από τα δύο υποστρώματα ανάπτυξης και σκληραγωγήθηκαν για τέσσερις εβδομάδες. Την αμέσως μεγαλύτερη τιμή στην αναλογία αυτή είχαν τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄ και μετρήθηκαν κατά την έξοδό τους από το θάλαμο ανάπτυξης, ενώ τη μεγαλύτερη τιμή παρουσίασαν τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄ με τύρφη και περλίτη και μετρήθηκαν επίσης πριν τον εγκλιματισμό.

Στο 2^ο Πείραμα που διεξήχθη (Πίνακας 12), το κλάσμα του νωπού βάρους ρίζας προς το συνολικό νωπό βάρος του φυτού δεν διέφερε μεταξύ των φυτών που αναπτύχθηκαν στα δύο χρησιμοποιούμενα υποστρώματα. Το κλάσμα αυτό, μετά την σκληραγώγηση των δύο εβδομάδων μειώθηκε κατά 27% σε σχέση με την μετρούμενη τιμή κατά την έξοδο των φυτών από το θάλαμο ανάπτυξης. Την μικρότερη τιμή του λόγου αυτού παρουσίασαν τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄ και στη συνέχεια υπεβλήθησαν σε εγκλιματισμό δύο εβδομάδων. Αμέσως μεγαλύτερη τιμή εμφάνισαν τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄ με προσθήκη τύρφης και περλίτη μετά την έξοδό τους από τους κλωβούς σκληραγώγησης. Την μεγαλύτερη τιμή νωπού βάρους ρίζας προς νωπό βάρος φυτού είχαν τα φυτά και των δύο υποστρωμάτων ανάπτυξης *in vitro*, κατά τη μέτρηση που πραγματοποιήθηκε αμέσως μετά την έξοδο των φυτών από το θάλαμο ανάπτυξης.

Μεταξύ των φυτών του πρώτου Πειράματος (Πίνακας 11), βρέθηκαν τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄ με την προσθήκη μίγματος τύρφης και περλίτη να έχουν κατά 18% πιο μικρή αναλογία ξηρού βάρους βλαστού προς ξηρό βάρος ολόκληρου του φυτού σε σχέση με τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄. Όταν επαναλήφθηκαν οι μετρήσεις μετά από τις τέσσερις εβδομάδες σκληραγώγησης, βρέθηκε ο λόγος αυτός να έχει αυξηθεί κατά 69,3%. Το μικρότερο ξηρό βάρος βλαστού προς ξηρό βάρος φυτού είχαν τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄ με προσθήκη μίγματος τύρφης και περλίτη αμέσως μετά την έξοδό τους από το

θάλαμο ανάπτυξης, και ακολούθησαν αυτά του υποστρώματος M₄, επίσης μετά την έξοδό τους από τις γυάλες. Τη μεγαλύτερη τιμή παρουσίασαν τα φυτά και των δύο υποστρωμάτων ανάπτυξης μετά από τον εγκλιματισμό των τεσσάρων εβδομάδων.

Στο 2^ο Πείραμα (Πίνακας 12), το κλάσμα το ξηρού βάρους του βλαστού ανά μονάδα ξηρού βάρους φυτού βρέθηκε να διαφέρει μεταξύ των φυτών που αναπτύχθηκαν *in vitro* στα δύο διαφορετικά υποστρώματα. Τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄ με προσθήκη μίγματος τύρφης και περλίτη είχαν κατά 12,8% μικρότερη τιμή στο κλάσμα αυτό από τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄. Όταν επαναλήφθηκε η μέτρηση μετά από τις δύο εβδομάδες σκληραγώγησης, βρέθηκε να έχει αυξηθεί η μεταβλητή αυτή κατά 18,7% σε σχέση με την αρχικά μετρούμενη κατά την έξοδο των φυτών από τις γυάλες. Το κλάσμα του ξηρού βάρους του βλαστού προς το ξηρό βάρος όλου του φυτού ήταν μικρότερο στα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄ με προσθήκη τύρφης και περλίτη κατά την έξοδό τους από το θάλαμο ανάπτυξης, αμέσως μεγαλύτερο ήταν στα φυτά που αναπτύχθηκαν στο ίδιο υπόστρωμα και στη συνέχεια υπέστησαν σκληραγώγηση δύο εβδομάδων, και μεγαλύτερο, ήταν στα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄ και σκληραγωγήθηκαν για δύο εβδομάδες. Παράλληλα, και τα φυτά του υποστρώματος M₄ αμέσως μετά την έξοδό τους από το θάλαμο ανάπτυξης είχαν μικρότερη αναλογία ξηρού βάρους στο βλαστό τους σε σχέση με τα φυτά του ίδιου υποστρώματος μετά την σκληραγώγηση των δύο εβδομάδων.

Πίνακας 3.9. Μέσος όρος του νωπού βάρους (N.B.) βλαστού (σε mg) ανά μονάδα μήκους (cm) βλαστού, του νωπού βάρους ρίζας (σε mg) ανά μονάδα μήκους (cm) ρίζας, του ξηρού βάρους βλαστού (σε mg) ανά μονάδα μήκους (cm) βλαστού και του ξηρού βάρους ρίζας (σε mg) ανά μονάδα μήκους (cm) ρίζας, των φυτών του 1^{ου} πειράματος, στα δύο χρησιμοποιούμενα υποστρώματα (M₄ και M₄ με τύρφη και περλίτη) και τις δύο χρονικές στιγμές λήψης μετρήσεων (πριν και μετά την σκληραγώγηση των τεσσάρων εβδομάδων), σημαντικότητα και Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά (Ε.Σ.Δ.) των μεταβλητών αυτών.

Υπόστρωμα	N.B.βλ./cm (mg/cm)	N.B.ρίζ./cm (mg/cm)	Ξ.Β.βλ./cm (mg/cm)	Ξ.Β.ρίζ./cm (mg/cm)
M₄				
0 εβδ. σκληραγ.	22,2	7,15	2,05	0,352
4 εβδ. σκληραγ.	33,3	6,84	4,79	0,657
M₄+τύρφη+περλίτης				
0 εβδ. σκληραγ.	11,8	6,31	1,14	0,576
4 εβδ. σκληραγ.	24,5	8,21	3,49	0,870

Σημαντικότητα:

Υπόστρωμα	***	NS	***	*
Χρόνος σκληραγώγησης	***	NS	***	**
Υπόστρωμα*χρόνος	NS	NS	NS	NS
Ε.Σ.Δ.	2,25	1,13	0,36	0,171

Σημείωση: Μεταβλητές που συνοδεύονται από * διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά για πιθανότητα $p < 5\%$, από ** για πιθανότητα $p < 1\%$, από *** για πιθανότητα $p < 1\%$ και από NS δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους για $p < 5\%$.

Πίνακας 3.10. Μέσος όρος του νωπού βάρους (N.B.) βλαστού ανά μονάδα μήκους (cm) βλαστού, του νωπού βάρους ρίζας ανά μονάδα μήκους (cm) ρίζας, του ξηρού βάρους βλαστού ανά μονάδα μήκους (cm) βλαστού και του ξηρού βάρους ρίζας ανά μονάδα μήκους (cm) ρίζας, των φυτών του 2^{ου} πειράματος, στα δύο χρησιμοποιούμενα υποστρώματα (M₄ και M₄ με τύρφη και περλίτη) και τις δύο χρονικές στιγμές λήψης μετρήσεων (πριν και μετά την σκληραγώγηση των δύο εβδομάδων), σημαντικότητα και Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά (Ε.Σ.Δ.) των μεταβλητών αυτών.

Υπόστρωμα	N.B.βλ./cm (mg/cm)	N.B.ρίζ./cm (mg/cm)	Ξ.Β.βλ./cm (mg/cm)	Ξ.Β.ρίζ./cm (mg/cm)
M₄				
0 εβδ. σκληραγ.	36,4	12,1	3,76	0,71
2 εβδ. σκληραγ.	25,2	13,8	4,12	1,43
M₄+τύρφη+περλίτης				
0 εβδ. σκληραγ.	25,2	13,5	3,36	1,03
2 εβδ. σκληραγ.	23,9	10,8	3,79	1,23
<u>Σημαντικότητα:</u>				
Υπόστρωμα	NS	NS	NS	NS
Χρόνος σκληραγώγησης	NS	NS	NS	NS
Υπόστρωμα*χρόνος	NS	NS	NS	NS
Ε.Σ.Δ.	9,1	4,6	0,74	0,43

Σημείωση: Μεταβλητές που συνοδεύονται από NS δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους για $p < 5\%$.

Όσον αφορά το ποσοστό του ξηρού βάρους του φυτού που αντιστοιχεί στη ρίζα των φυτών του 1^{ου} Πειράματος (Πίνακας 11), βρέθηκε μεγαλύτερο κατά 46,8% στα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄ με μίγμα τύρφης και περλίτη σε σχέση με τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄. Μετά από τέσσερις εβδομάδες εγκλιματισμού, μειώθηκε το ποσοστό αυτό κατά 66%. Το μικρότερο κλάσμα ξηρού βάρους ρίζας ανά μονάδα ξηρού βάρους ολόκληρου του φυτού είχαν τα φυτά και των δύο υποστρωμάτων ανάπτυξης, μετά την σκληραγώγηση των τεσσάρων εβδομάδων. Πιο υψηλές τιμές είχαν τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄, μετά την έξοδό τους από το θάλαμο ανάπτυξης, και τέλος, τη μεγαλύτερη τιμή στο κλάσμα ξηρό βάρος ρίζας προς ξηρό βάρος φυτού εμφάνισαν τα φυτά του υποστρώματος ανάπτυξης M₄ με τύρφη και περλίτη, αμέσως μετά την έξοδό τους από το θάλαμο ανάπτυξης.

Το ξηρό βάρος ρίζας ανά μονάδα ξηρού βάρους φυτού στο δεύτερο Πείραμα (Πίνακας 10), διέφερε μεταξύ των φυτών που αναπτύχθηκαν *in vitro* σε διαφορετικά υποστρώματα. Τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄ με προσθήκη μίγματος τύρφης και περλίτη είχαν τιμή μεγαλύτερη κατά 24,3% σε σχέση με τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄. Μετά από την σκληραγώγηση των δύο εβδομάδων, όπως παρατηρήθηκε και στο 1^ο Πείραμα, η τιμή του λόγου μειώθηκε κατά 23,9%. Τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄ και σκληραγωγήθηκαν για δύο εβδομάδες, είχαν τη μικρότερη τιμή στο λόγο ξηρό βάρος ρίζας προς ξηρό βάρος φυτού. Πιο υψηλές τιμές είχαν τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄ με προσθήκη τύρφης και περλίτη μετά τη σκληραγώγησή τους, και τέλος, τη μεγαλύτερη τιμή στο λόγο της μεταβλητής αυτής είχαν τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄ με τύρφη και περλίτη, αμέσως μετά την έξοδό τους από το θάλαμο ανάπτυξης. Παράλληλα, τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄ με προσθήκη μίγματος τύρφης περλίτη, μετά την σκληραγώγησή τους για δύο εβδομάδες είχαν μικρότερο ξηρό βάρος ρίζας ανά μονάδα ξηρού βάρους φυτού σε σχέση με τα φυτά του ίδιου υποστρώματος ανάπτυξης που μετρήθηκαν αμέσως μετά την έξοδό τους από τις γυάλες.

Πίνακας 3.11. Μέσος όρος του νωπού βάρους (N.B.) βλαστού και νωπού βάρους ρίζας προς το νωπό βάρος όλου του φυτού επί 100%, του ξηρού βάρους (Ξ.Β.) βλαστού και ρίζας προς το ξηρό βάρος όλο του φυτού επί 100%, των φυτών του 1^{ου} πειράματος, στα δύο χρησιμοποιούμενα υποστρώματα (M₄ και M₄ με τύρφη και περλίτη) και τις δύο χρονικές στιγμές λήψης μετρήσεων (πριν και μετά την σκληραγώγηση των τεσσάρων εβδομάδων), σημαντικότητα και Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά (Ε.Σ.Δ.) των μεταβλητών αυτών.

Υπόστρωμα	N.B.βλ./	N.B.ρίζ./	Ξ.Β.βλ./	Ξ.Β.ρίζ/
	φυτ.	φυτ.	φυτ.	φυτ.
M₄				
0 εβδ. σκληραγ.	45,3	54,7	60,7	39,3
4 εβδ. σκληραγ.	77,5	22,5	83,7	16,3
M₄+τύρφη+περλίτης				
0 εβδ. σκληραγ.	33,9	66,1	36,9	63,1
4 εβδ. σκληραγ	76,7	23,3	81,5	18,5
<u>Σημαντικότητα:</u>				
Υπόστρωμα	**	**	***	***
Χρόνος σκληραγώγησης	***	***	***	***
Υπόστρωμα*χρόνος	*	*	***	***
Ε.Σ.Δ.	4,3	4,3	5,4	5,4

Σημείωση: Μεταβλητές που συνοδεύονται από * διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά για πιθανότητα $p < 5\%$, από ** για πιθανότητα $p < 1\%$ και από *** για πιθανότητα $p < 1\%$.

Πίνακας 3.12. Μέσος όρος του νωπού βάρους (N.B.) βλαστού και νωπού βάρους ρίζας προς το νωπό βάρος όλου του φυτού επί 100%, του ξηρού βάρους (Ξ.Β.) βλαστού και ρίζας προς το ξηρό βάρος όλο του φυτού επί 100%, των φυτών του 2^{ου} πειράματος, στα δύο χρησιμοποιούμενα υποστρώματα (M₄ και M₄ με τύρφη και περλίτη) και τις δύο χρονικές στιγμές λήψης μετρήσεων (πριν και μετά την σκληραγώγηση των δύο εβδομάδων), σημαντικότητα και Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά (Ε.Σ.Δ.) των μεταβλητών αυτών.

Υπόστρωμα	N.B.βλ./	N.B.ρίζ/	Ξ.Β.βλ./	Ξ.Β.ρίζ/
	φυτ.	φυτ.	Φυτ.	φυτ.
M₄				
0 εβδ. σκληραγ.	44,3	55,7	59,2	40,8
2 εβδ. σκληραγ.	62,5	37,5	71,8	28,2
M₄+τύρφη+περλίτης				
0 εβδ. σκληραγ.	40,3	59,7	52,9	47,1
2 εβδ. σκληραγ	53,3	46,7	61,4	38,6
<u>Σημαντικότητα:</u>				
Υπόστρωμα	NS	NS	*	*
Χρόνος σκληραγώγησης	***	***	**	**
Υπόστρωμα*χρόνος	NS	NS	NS	NS
Ε.Σ.Δ.	8,6	8,6	6,7	6,7

Σημείωση: Μεταβλητές που συνοδεύονται από * διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά για πιθανότητα $p < 5\%$, από ** για πιθανότητα $p < 1\%$, από *** για πιθανότητα $p < 1\%$ και από NS δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους για $p < 5\%$.

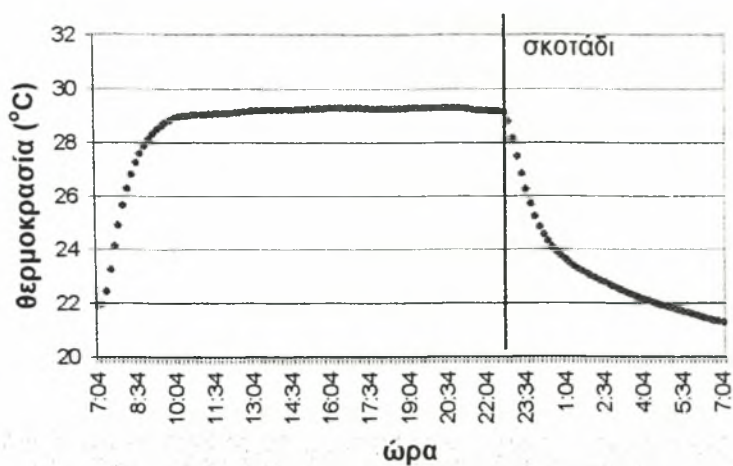
3.2 Μετρήσεις περιβάλλοντος κατά την ανάπτυξη

3.2.1 Μετρήσεις των παραμέτρων του εξωτερικού περιβάλλοντος της γυάλας (περιβάλλον του θαλάμου ανάπτυξης).

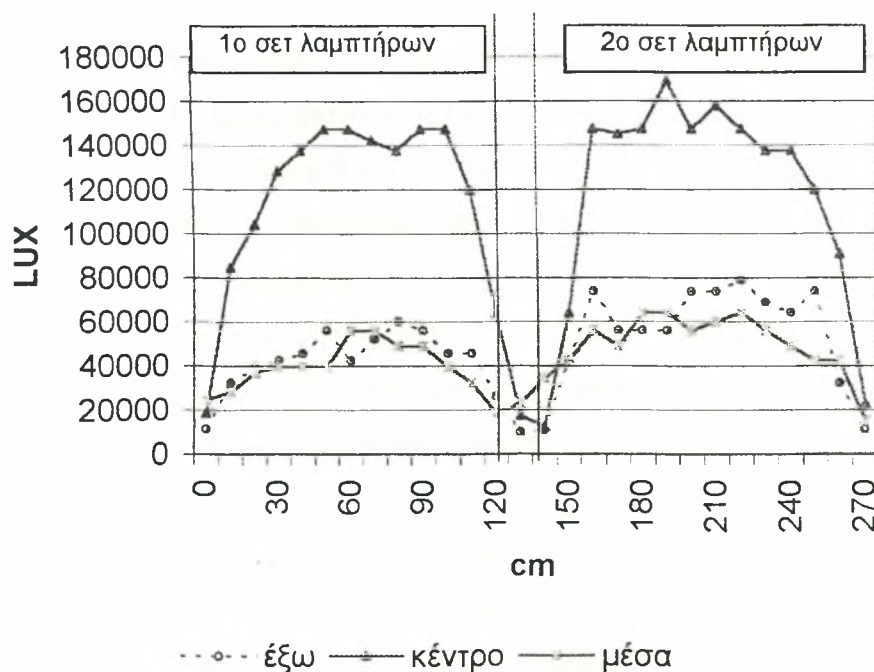
Η θερμοκρασία ενός τυπικού 24ώρου που μετρήθηκε στο θάλαμο ανάπτυξης παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.2.1. Η διακύμανση της ήταν αρκετά μεγάλη καθώς η μέγιστη τιμή της έφτασε τους 29,9°C και η ελάχιστη έπεσε στους 22°C. Η ελάχιστη θερμοκρασία σημειώθηκε στις 7:00πμ, λίγο πριν ανάψουν τα φώτα, ενώ οι μέγιστες τιμές σημειώθηκαν τις περισσότερες ώρες που φωτίζονταν ο θάλαμος (11:00πμ-11:00μμ).

Το φως που έφτανε επάνω στο ράφι, στην έξω πλευρά-προς το διάδρομο, στο κέντρο του ραφιού και στη μέσα πλευρά- προς τον τοίχο, παρουσιάζεται σχηματικά στο Σχήμα. 3.2.2. Οι μετρήσεις πάρθηκαν ανά 10cm κατά μήκος του ραφιού. Διαπιστώνεται ότι το κέντρο του ραφιού δέχεται πολύ περισσότερο φως σε σχέση με τα δύο άκρα του, τα οποία δεν φάνηκε να διαφέρουν μεταξύ τους ως προς την ένταση του φωτός που δέχτηκαν. Το φως στο μέσο του ραφιού ήταν κατά μέσο όρο 175% υψηλότερο στα σημεία που βρίσκονταν κοντά στο μέσο των λαμπτήρων (30-90cm και 170-240cm) σε σχέση με τα σημεία του ραφιού που βρίσκονταν κάτω από τα άκρα των λαμπτήρων.

Η τιμή της φωτοσυνθετικά ενεργού ακτινοβολίας (PAR) που έφτανε επάνω στο ράφι του θαλάμου ανάπτυξης το χρονικό διάστημα που τα φώτα ήταν ανοιχτά, ήταν της τάξης των $72\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Η PAR που μετρήθηκε μέσα στη γυάλα με κλειστό καπάκι, στο ύψος των φυτών, ήταν $53,9\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Έτσι, ο συντελεστής διαπερατότητας του καπακιού της γυάλας (τ_{γ}) υπολογίστηκε 0,75.



Σχήμα 3.2.1. Ημερήσια πορεία της θερμοκρασίας στο θάλαμο ανάπτυξης.



Σχήμα 3.2.2. Μετρούμενο φως στο ράφι (LUX), στην έξω πλευρά του-προς το διάδρομο, στο κέντρο του και στη μέσα πλευρά-προς τον τοίχο.

3.2.2 Το μικροκλίμα της γυάλας

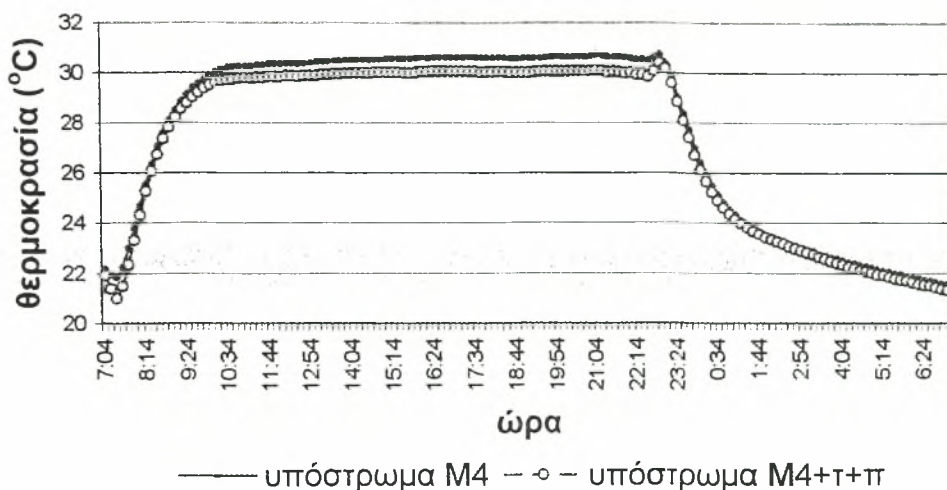
Τα αποτελέσματα των μετρήσεων των παραμέτρων του περιβάλλοντος κατά τη διάρκεια των 15 ημερών από τις 30 που τα φυτά βρίσκονταν στις γυάλες ανάπτυξης, επέτρεψαν τη μελέτη του μικροκλίματος της γυάλας. Η θερμοκρασία που είχαν τα δύο υποστρώματα κατά τη διάρκεια του 24ώρου παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.2.3. Κατά κανόνα, το υπόστρωμα M₄ με προσθήκη τύρφης και περλίτη εμφάνισε χαμηλότερες τιμές θερμοκρασίας από το υπόστρωμα M₄. Η διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ των δύο υποστρωμάτων έγινε μέγιστη στις 7:30 το πρωί και η τιμή της ήταν 0,85°C (Σχήμα 3.2.5). Από την ώρα αυτή και μέχρι τις 8:30-9:00πμ η διαφορά μειώθηκε φτάνοντας τους 0,3°C. Στη συνέχεια η διαφορά αυξήθηκε και από τις 15:30 έως τις 22:30 περίπου παρέμεινε σχεδόν σταθερή στους 0,6°C.

Η θερμοκρασία του φύλλου των φυτών που αναπτύσσονταν στο υπόστρωμα M₄ εμφανίστηκε μικρότερη από τη θερμοκρασία του φύλλου των φυτών που αναπτύσσονταν στο υπόστρωμα M₄ με τύρφη και περλίτη (Σχήμα 3.2.4). Κατά τις ώρες του φωτισμού αυτή η διαφορά ήταν μεταξύ 0,5-0,6°C (Σχήμα 3.2.5). Κατά τις ώρες σκότους η θερμοκρασία φύλλου των φυτών που αναπτύσσονταν στο υπόστρωμα M₄ με προσθήκη μίγματος τύρφης-περλίτη ήταν παρόμοια ή κατά τι μικρότερη από αυτή των φύλλων φυτών που αναπτύσσονταν σε υπόστρωμα M₄.

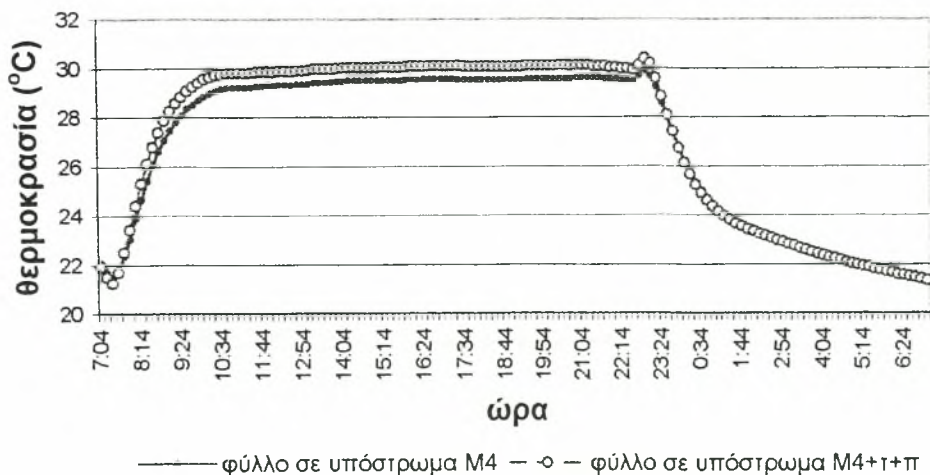
Στο Σχήμα 3.2.6 παρουσιάζεται η διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ φύλλου και υποστρώματος, τόσο στη γυάλα με υπόστρωμα M₄ όσο και στη γυάλα με υπόστρωμα M₄ με προσθήκη τύρφης και περλίτη. Στη γυάλα που περιείχε το υπόστρωμα M₄ με προσθήκη τύρφης και περλίτη ουσιαστικά δεν υπήρξε διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ φύλλου και υποστρώματος. Στη γυάλα με το υπόστρωμα M₄, δύο ώρες μετά το άναμμα των λαμπτήρων μέχρι και το σβήσιμό τους, η διαφορά θερμοκρασίας φύλλου-υποστρώματος βρέθηκε περίπου στον -1°C. Στο σκότος η διαφορά θερμοκρασίας φύλλου-υποστρώματος των φυτών που αναπτύσσονταν στο υπόστρωμα M₄ ήταν σχεδόν μηδαμινή.

Ο συντελεστή διαπερατότητας του φωτός του υποστρώματος M₄ (τ_{M4}) υπολογίστηκε 0,69 και του υποστρώματος M₄ με προσθήκη μίγματος τύρφης-

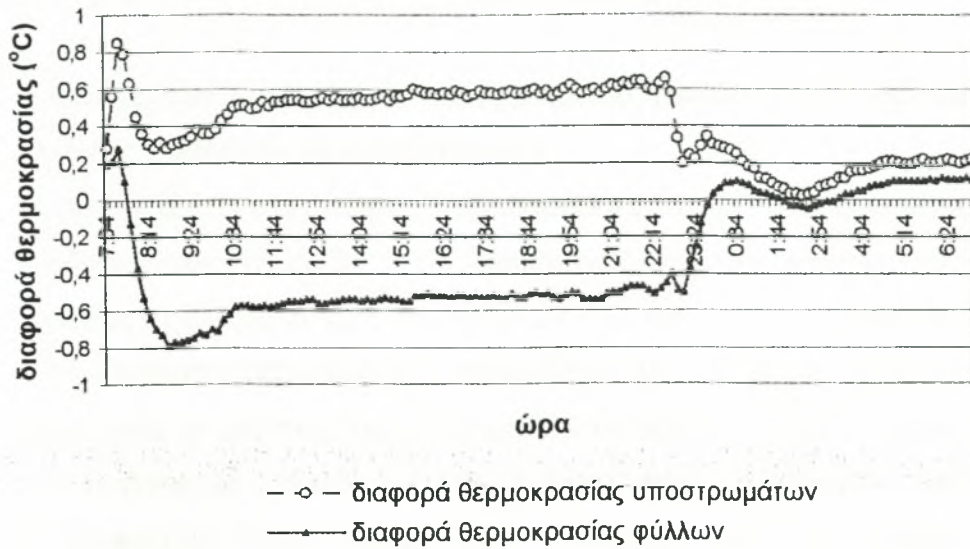
περλίτη ($T_{M4+t+\pi}$) 0,16. Η τιμή του T_{M4} ήταν μεγαλύτερη κατά 76% σε σχέση με την τιμή του $T_{M4+t+\pi}$.



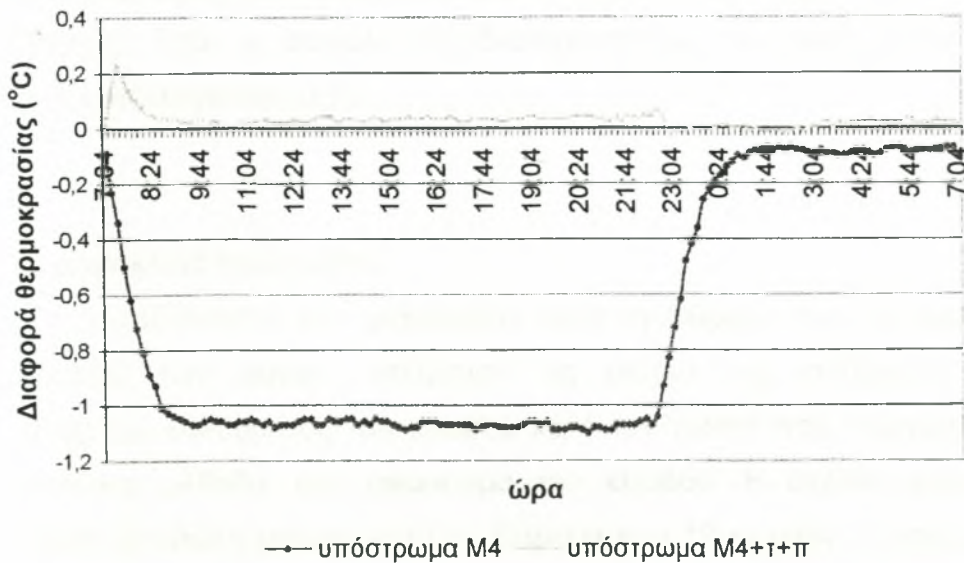
Σχήμα 3.2.3. Ημερήσια πορεία της θερμοκρασίας των δύο υποστρωμάτων, M_4 και M_4 με προσθήκη τύρφης κα περλίτη, μέσα στη γυάλα ανάπτυξης



Σχήμα 3.2.4. Ημερήσια πορεία της θερμοκρασίας των φύλλων των φυτών που αναπτύσσονται στα δύο υποστρώματα, M_4 και M_4 με προσθήκη τύρφης κα περλίτη, μέσα στη γυάλα ανάπτυξης



Σχήμα 3.2.5. Διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ υποστρωμάτων M_4 και M_4 με τύρφη και περλίτη $\Delta T_{U_{M_4-M_4+t+\pi}}$ ($=T_{U_{M_4}}-T_{U_{M_4+t+\pi}}$) ($^{\circ}C$) και διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ φύλλων φυτών αναπτυσσόμενων στα υποστρώματα M_4 και M_4 με τύρφη και περλίτη $\Delta T_{\Phi_{M_4-M_4+t+\pi}}$ ($=T_{\Phi_{M_4}}-T_{\Phi_{M_4+t+\pi}}$) ($^{\circ}C$), στη γυάλα ανάπτυξης, κατά τη διάρκεια του 24ώρου.



Σχήμα 3.2.6. Διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ φύλλου και υποστρώματος $\Delta T_{\Phi_{\gamma}-\gamma}$ ($=T_{\Phi_{\gamma}}-T_{\gamma}$) ($^{\circ}C$) στη γυάλα ανάπτυξης, κατά τη διάρκεια του 24ώρου.

3.3 Μετρήσεις περιβάλλοντος κατά την σκληραγώγηση

3.3.1 Μετρήσεις των παραμέτρων του εξωτερικού περιβάλλοντος του κλωβού (περιβάλλον του θαλάμου σκληραγώγησης).

Η θερμοκρασία του 24ώρου που μετρήθηκε στο θάλαμο εγκλιματισμού παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.3.1. Η διακύμανσή της δεν φαίνεται να είναι μεγάλη καθώς η ελάχιστη τιμή της ήταν $24,2^{\circ}\text{C}$ και η μέγιστη έφτασε τους $26,2^{\circ}\text{C}$. Η ελάχιστη θερμοκρασία σημειώθηκε λίγο πριν το άναμμα των λαμπτήρων ενώ οι μέγιστες τιμές σημειώθηκαν τις περισσότερες ώρες που φωτιζόταν ο θάλαμος (11:00πμ-11:00μμ) Στο Σχήμα 3.3.2 παρουσιάζεται η μέση θερμοκρασία του 24ώρου που μετρήθηκε τις 19 ημέρες του εγκλιματισμού των φυτών στον θάλαμο σκληραγώγησης. Η διακύμανση της ήταν μικρή καθώς η μέγιστη τιμή της δεν ξεπέρασε τους $25,7^{\circ}\text{C}$ και η ελάχιστη δεν έπεσε κάτω από $25,1^{\circ}\text{C}$.

Η τιμή της φωτοσυνθετικά ενεργού ακτινοβολίας (PAR) που μετρήθηκε ακριβώς επάνω από το κάλυμμα του κλωβού το χρονικό διάστημα που τα φώτα ήταν ανοιχτά, ήταν της τάξης των $29,7\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Η PAR που μετρήθηκε στο ύψος των φυτών και διαπερνούσε το κάλυμμα του κλωβού ήταν $22,6\text{mol}$. Έτσι, ο συντελεστής διαπερατότητας του καλύμματος του κλωβού (τ_k) υπολογίστηκε 0,76.

3.3.2 Το μικροκλίμα του κλωβού

Τα αποτελέσματα των μετρήσεων κατά τη διάρκεια των 19 ημερών εγκλιματισμού των φυτών, επέτρεψαν τη μελέτη της επίδρασης του ανοίγματος του καλύμματος του κλωβού κατά τον τρόπο που περιγράφηκε στα υλικά και μέθοδοι στο μικροκλίμα του κλωβού. Η σχετική υγρασία παρουσίασε σταδιακή μείωση κατά τη διάρκεια των 19 ημερών, η οποία και απεικονίζεται στο Σχήμα 3.3.3. Σε σχέση με την πρώτη ημέρα, η σχετική υγρασία τη δεύτερη ημέρα μειώθηκε κατά 0,82%, την τρίτη κατά 1,13%, την τέταρτη παρέμεινε το ίδιο ποσοστό με την προηγούμενη καθώς δεν φάνηκε να αλλάζει η τιμή της από τη μία μέρα στην άλλη, την πέμπτη ημέρα μειώθηκε

κατά 1,44% σε σχέση με την πρώτη, την έκτη κατά 2,05%, την έβδομη κατά 2,77%, την όγδοη κατά 3,08%, την ένατη κατά 3,49%, την δέκατη δεν μεταβλήθηκε, την ενδέκατη κατά 6,9%, τη δωδέκατη κατά 9,34%, τη δέκατη τρίτη κατά 9,75%, τη δέκατη τέταρτη, δέκατη πέμπτη και δέκατη έκτη κατά 10,47%, τη δέκατη έβδομη κατά 26,49%, τη δέκατη όγδοη 29,16% και την τελευταία, τη δέκατη ένατη ημέρα η σχετική υγρασία μειώθηκε κατά 32,26% σε σχέση με την μετρούμενη τιμή της πρώτης ημέρας.

Το έλλειμμα κορεσμού του αέρα του κλωβού τις 19 ημέρες σκληραγώγησης παρουσίασε εκθετική άνοδο (Σχήμα 3.3.4). Η σχέση μεταξύ της ημέρας σκληραγώγησης (d) και του ελλείμματος κορεσμού (VPD_a) του αέρα του κλωβού βρέθηκε να ακολουθεί τη σχέση:

$$VPD_a = 0,0681 \times e^{0,1349d} \quad (1)$$

με τιμή για τον συντελεστή προσδιορισμού R^2 0,94, για $N=19$.

Η πορεία της διαφοράς θερμοκρασίας μεταξύ του αέρα του κλωβού και του εξωτερικού περιβάλλοντος τις 19 ημέρες της σκληραγώγησης παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.3.5. Φαίνεται ότι με την πάροδο των ημερών, η διαφορά της μέσης ημερήσιας θερμοκρασίας μειώθηκε γραμμικά. Βρέθηκε ότι η μείωση της διαφοράς θερμοκρασίας αέρα κλωβού και αέρα θαλάμου σκληραγώγησης ($\Delta T_{i_k - o_k}$) συνδέεται με την ημέρα που τα φυτά βρίσκονται στον κλωβό (d) με την σχέση:

$$\Delta T_{i_k - o_k} = -0,0197 \times d + 0,3978 \quad (2)$$

με τιμή για τον συντελεστή προσδιορισμού R^2 0,89.

Η μετρούμενη θερμοκρασία μέσα στον κλωβό στο ύψος των φυτών διέφερε από τη μετρούμενη θερμοκρασία έξω από τον κλωβό. Σχηματικά, η ημερήσια πορεία της διαφοράς θερμοκρασίας μεταξύ του αέρα του κλωβού και του εξωτερικού αέρα για τρεις ημέρες, τη δεύτερη, τη δέκατη τρίτη και τη

δέκατη έκτη ημέρα του εγκλιματισμού, παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.3.6. Τη δεύτερη ημέρα, λίγο μετά το άναμμα των λαμπτήρων στο θάλαμο (6:05 πμ), η διαφορά άρχισε να μειώνεται και μία ώρα μετά έφτασε το ελάχιστό της. Την χρονική στιγμή αυτή ο αέρας του κλωβού ήταν περίπου κατά 0,5°C ψυχρότερος από τον αέρα του θαλάμου σκληραγώγησης. Στην επόμενη μία ώρα συντελέστηκε αύξηση της διαφοράς θερμοκρασίας κλωβού-θαλάμου σκληραγώγησης, ο αέρας του κλωβού θερμάνθηκε και διέφερε ελάχιστα (0,1°C) από τον εξωτερικό αέρα του θαλάμου. Τη δέκατη τρίτη ημέρα της σκληραγώγησης, την ίδια ώρα με τη δεύτερη ημέρα παρουσιάστηκε το ελάχιστο της διαφοράς με τον αέρα του κλωβού να έχει μικρότερη θερμοκρασία από τον αέρα του θαλάμου κατά 0,7°C. Την επόμενη ώρα η διαφορά μειώθηκε ταχύτατα και ο κλωβός θερμάνθηκε περισσότερο από τον εξωτερικό αέρα του θαλάμου. Τη δέκατη έκτη μέρα, επίσης λίγο μετά το άναμμα των λαμπτήρων στο θάλαμο, η διαφορά άρχισε να μειώνεται και μία ώρα μετά έφτασε την ελάχιστη τιμή της, όμοια με αυτή της δέκατης τρίτης ημέρας (-0,7°C). Κατά παρόμοιο τρόπο με τις δύο προηγούμενες ημέρες που περιγράφηκαν, στην επόμενη μία ώρα συντελέστηκε αύξηση της διαφοράς θερμοκρασίας κλωβού-θαλάμου σκληραγώγησης, με τον αέρα του κλωβού να είναι θερμότερος κατά 0,6°C.

Η διαφορά της μέσης τιμής της πίεσης ατμών μεταξύ του αέρα του κλωβού και του εξωτερικού του αέρα ($\Delta e_{ik}-e_{ok}$) για τις 19 ημέρες της σκληραγώγησης παρουσιάζεται στο Σχήμα 3.3.7. Με την πάροδο του χρόνου η διαφορά της πίεσης ατμών φάνηκε να μειώνεται. Αν όπου d η ημέρα της σκληραγώγησης, η μείωση ακολούθησε τη σχέση:

$$\Delta e_{ik}-e_{ok}= - 4,4054 \times d^2 + 40,63 \times d + 944,16 \quad (3)$$

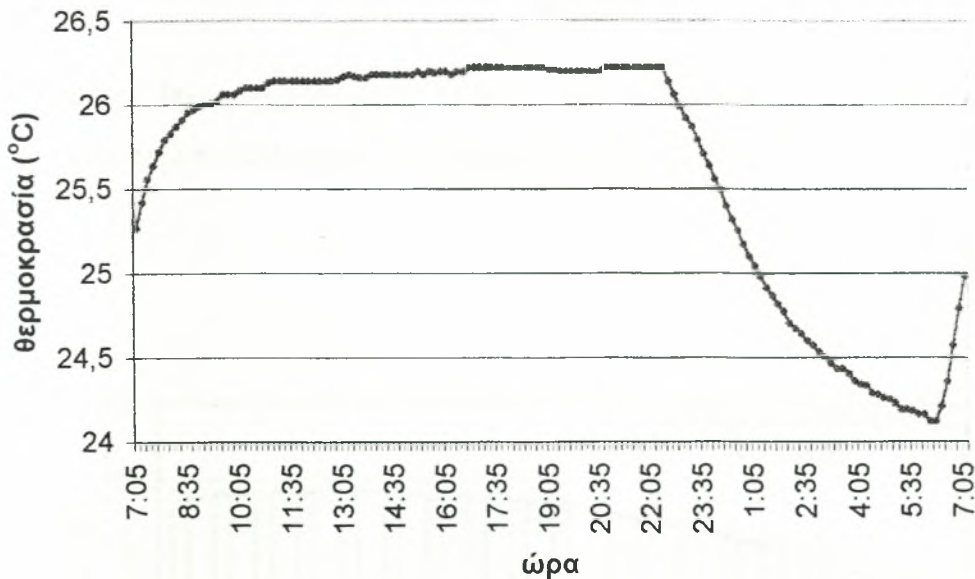
με τιμή για τον συντελεστή προσδιορισμού R^2 0,91, για $N=19$.

Η διαφορά μεταξύ της μέσης τιμής θερμοκρασίας του υποστρώματος και του φύλλου των φυτών που βρίσκονταν στον κλωβό εγκλιματισμού για τις 19 ημέρες της σκληραγώγησης φαίνεται στο Σχήμα 3.3.8. Η διαφορά αυτή

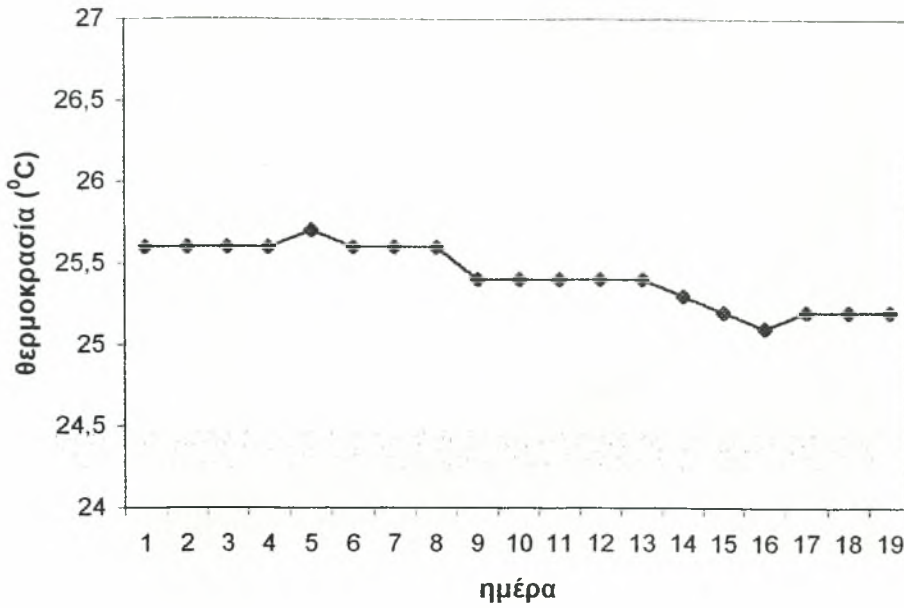
μειώθηκε σταδιακά με την πάροδο του χρόνου. Η σχέση που φαίνεται να συνδέει τη διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ υποστρώματος και φύλλου ($\Delta T_{u_k - \phi_k}$) με την ημέρα που το φυτό βρίσκεται υπό συνθήκες σκληραγώγησης (d) δίνεται από τον τύπο:

$$\Delta T_{u_k - \phi_k} = -0,0105 \times d + 0,3096 \quad (4)$$

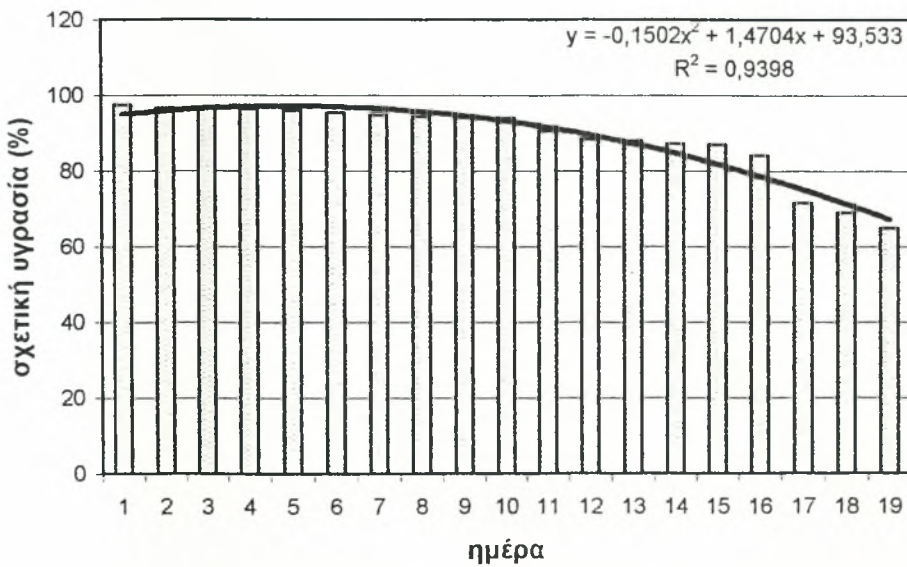
με τιμή για τον συντελεστή προσδιορισμού R^2 0,71, για $N=19$.



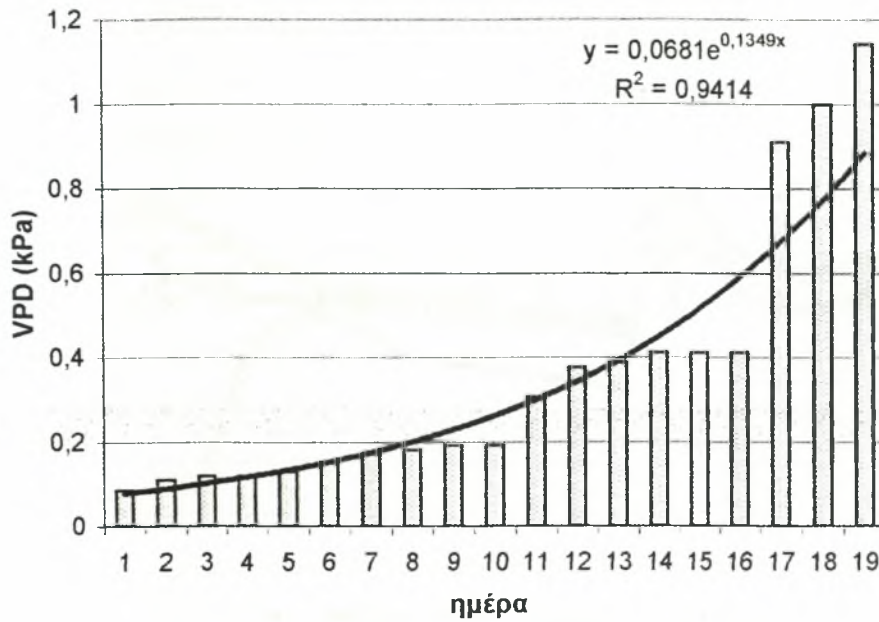
Σχήμα 3.3.1. Ημερήσια πορεία της θερμοκρασίας στο θάλαμο σκληραγώγησης.



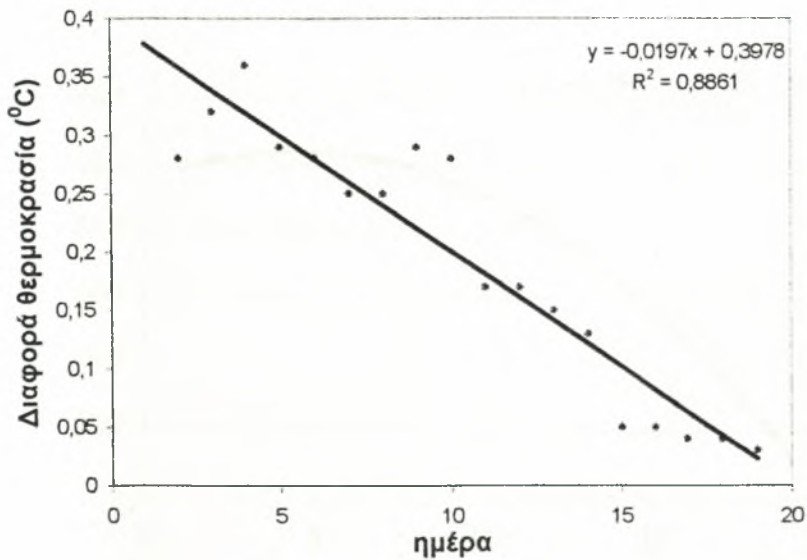
Σχήμα 3.3.2. Μέση μετρούμενη θερμοκρασία στο θάλαμο σκληραγωγησης κατά τη διάρκεια του 24ώρου, τις 19ημέρες εγκλιματισμού.



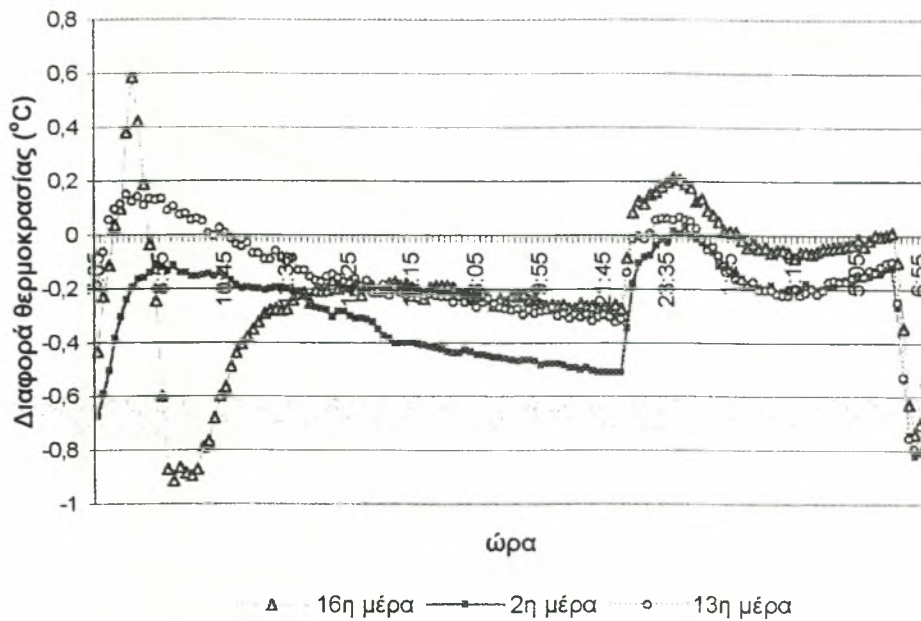
Σχήμα 3.3.3. Μέση μετρούμενη σχετική υγρασία κατά τη διάρκεια του 24ώρου στον κλωβό, τις 19ημέρες εγκλιματισμού.



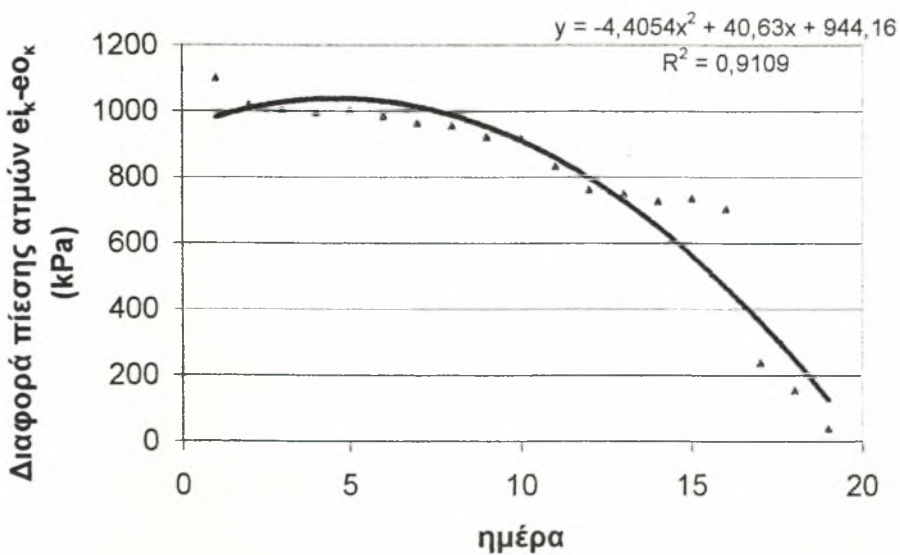
Σχήμα 3.3.4. Έλλειμμα κορεσμού του αέρα του κλωβού τις 19 ημέρες σκληραγώγησης.



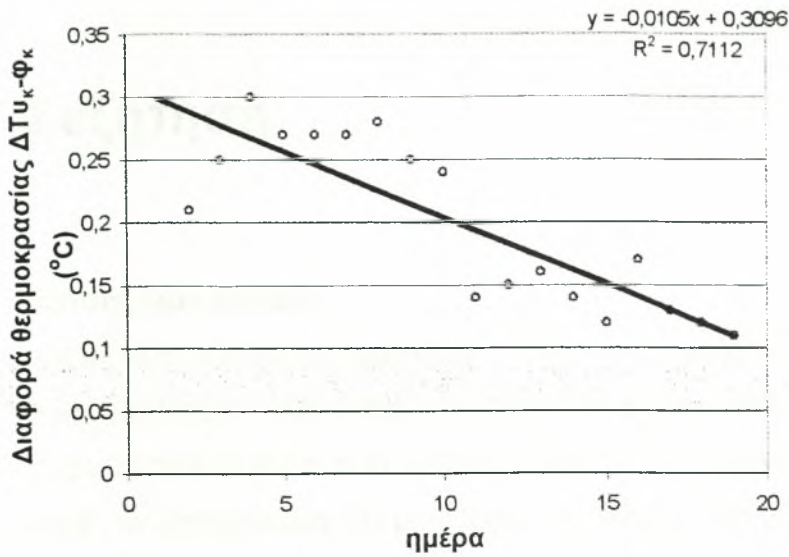
Σχήμα 3.3.5. Διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ του αέρα του κλωβού στο ύψος των φυτών και του εξωτερικού αέρα ΔT_{ik-o_k} ($=T_{ik}-T_{o_k}$) (°C) κατά τη διάρκεια της σκληραγώγησης των 19 ημερών.



Σχήμα 3.3.6. Διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ του αέρα του κλωβού στο ύψος των φυτών και του εξωτερικού αέρα $\Delta T_{ik}-\Theta_k$ ($=T_{ik}-T_{\Theta k}$) (°C) κατά τη διάρκεια του 24ώρου, τη δεύτερη, δέκατη τρίτη και δέκατη έκτη ημέρα της σκληραγώγησης.



Σχήμα 3.3.7. Διαφορά μεταξύ πίεσης ατμών μεταξύ του αέρα του κλωβού και του αέρα του θαλάμου σκληραγώγησης $\Delta e_{ik}-e_{\Theta k}$ ($=e_{ik}-e_{\Theta k}$) (kPa) τις 19 ημέρες εγκλιματισμού.



Σχήμα 3.3.8. Διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ του υποστρώματος και του φύλλου των φυτών $\Delta Tu_{\kappa-\phi_{\kappa}}$ ($=Tu_{\kappa}-T_{\phi_{\kappa}}$) (°C)

4 Συζήτηση

4.1 Μελέτη αύξησης των φυτών

Η αύξηση *in vitro* των φυτών αμπέλου 110R στο θρεπτικό υπόστρωμα M₄ με προσθήκη μίγματος τύρφης-περλίτη ήταν μικρότερη από αυτή που παρατηρήθηκε σε ανάλογα φυτά που καλλιεργήθηκαν στο υπόστρωμα M₄. Πιο συγκεκριμένα, το υπόστρωμα M₄ με τύρφη και περλίτη έδωσε φυτά με μικρότερο μήκος βλαστού και λιγότερους κόμβους, μικρότερο νωπό βάρος βλαστού, μικρότερο νωπό βάρος φυτού καθώς και μικρότερο ξηρό βάρος βλαστού και ξηρό βάρος φυτού σε σχέση με αυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄. Η προσθήκη τύρφης και περλίτη στο υπόστρωμα δημιούργησε μια πιο ισορροπημένη κατανομή νωπού και ξηρού βάρους μεταξύ του βλαστού και της ρίζας. Η παρατηρούμενη μικρότερη αύξηση και ανάπτυξη των φυτών στο υπόστρωμα με τύρφη και περλίτη πιθανόν να οφείλεται σε συνθήκες καταπόνηση που ανέκοψαν τη φυσιολογική ανάπτυξη των φυτών.

Οι συνθήκες καταπόνησης που δημιουργήθηκαν από την προσθήκη τύρφης και περλίτη είτε οφείλονταν σε αύξηση του οσμωτικού του υποστρώματος ανάπτυξης (υδατική καταπόνηση), είτε σε ανεπάρκεια θρεπτικών στοιχείων λόγω της μείωσης των διαθέσιμων ποσοτήτων στο μισό σε σχέση με το υπόστρωμα M₄. Η δεύτερη υπόθεση, της ανεπάρκειας θρεπτικών, δεν φαίνεται να είναι η πιθανότερη καθώς η ποσότητα του υποστρώματος φαίνεται εμπειρικά να είναι αρκετή για να καλύψει τις ανάγκες των φυτών για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα, πέραν των δύο μηνών, αλλά και δεν παρατηρήθηκαν μακροσκοπικά συμπτώματα τροφοπενιών ή άλλων ανωμαλιών που να υποδηλώνουν οποιαδήποτε έλλειψη θρεπτικού στοιχείου. Η πρώτη υπόθεση, της υδατικής καταπόνησης, φαίνεται να είναι και η

κυρίαρχη. Το μίγμα της τύρφης και του περλίτη φαίνεται να ήρθε σε ισορροπία με το νερό από το θρεπτικό μέσο αυξάνοντας τις συγκεντρώσεις των εν διαλύσει στοιχείων στο υπόστρωμα. Έτσι, οι ρίζες με περισσότερη δυσκολία κατάφερναν να προσλάβουν τα απαραίτητα θρεπτικά από το πλέον πυκνό θρεπτικό διάλυμα που δημιουργήθηκε. Η υπόθεση της οσμωτικής καταπόνησης συμβαδίζει με την παρατηρούμενη μειωμένη αύξηση και ανάπτυξη φυτών αμπέλου καλλιεργούμενων *in vitro* όπως φαίνεται και σε άλλες ερευνητικές εργασίες (Tanne et al., 1996). Τονίζεται ότι τα φυτά που πάσχουν από έλλειψη νερού στην προσπάθειά τους να μην έχουν μεγάλη φυλλική επιφάνεια, άρα και μεγάλες απώλειες νερού, μειώνουν το ρυθμό έκπτυξης των φύλλων (Taiz & Zeiger, 1998). Στην περίπτωση των φυτών *in vitro* στο υπόστρωμα M₄ με μίγμα τύρφης-περλίτη του παρόντος πειράματος, ο αριθμός των φύλλων ήταν μειωμένος, η σχέση αυτού όμως με την υδατική καταπόνηση ή τη μειωμένη ανάπτυξη δεν μπορεί να επιβεβαιωθεί. Το γεγονός που έρχεται να επιβεβαιώσει την υπόθεση της υδατικής καταπόνησης είναι η μεταβολή του λόγου υπέργειου/υπόγειου τμήματος του φυτού. Η προσθήκη τύρφης και περλίτη φαίνεται ότι άλλαξε την αναλογία του ξηρού βάρους του φυτού που κατανέμεται στη ρίζα, αυξάνοντάς τη. Σημαντικότερη γραμμή άμυνας των φυτών στην υδατική καταπόνηση είναι η προτεραιότητα που δίνουν τα φυτά στην ανάπτυξη του οργάνου που είναι υπεύθυνο για την άντληση του νερού, και επομένως για την επιβίωσή του, τη ρίζα (Καραμπουρνιώτης, 2003). Φαίνεται ότι τα κύτταρα της ρίζας στην προσπάθειά τους να μειώσουν το υδατικό τους δυναμικό ώστε να διατηρήσουν την ικανότητα άντλησης νερού από το υπόστρωμα, συσώρευαν ξηρή ουσία αυξάνοντας το ποσοστό της επί τοις εκατό στη ρίζα. Η προτεραιότητα των φυτών να αναπτύσσουν τη ρίζα όταν καταπονούνται λόγω έλλειψης νερού, ξεπερνά την ανάπτυξη του βλαστού και την αφήνει σε δεύτερη μοίρα.

Το υπόστρωμα M₄ με προσθήκη μίγματος τύρφης-περλίτη έδωσε φυτά με υψηλότερο ποσοστό επί τοις εκατό ξηρής ουσίας στη ρίζα. Οι ρίζες αυτές, που ήταν λιγότερο υδαρείς, φαίνεται να ήταν πιο ισχυρές και ίσως περισσότερο λειτουργικές από αυτές των φυτών που αναπτύχθηκαν στο

υπόστρωμα M₄. Περαιτέρω μετρήσεις του ποσοστού επιβίωσης των φυταρίων κατά τη σκληραγώγηση ίσως μπορέσουν να τεκμηριώσουν αυτή την υπόθεση.

Κυρίως στο 1^ο πείραμα φαίνεται ότι με την προσθήκη μίγματος τύρφης-περλίτη στο υπόστρωμα τροποποιήθηκε η σχέση βλαστού:ρίζας όσον αφορά το ξηρό βάρος ανά εκατοστό μήκους τους. Οι βλαστοί των φυτών που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄ είχαν μεγαλύτερο νωπό και ξηρό βάρος ανά εκατοστό μήκους και φαίνεται ότι ήταν πιο παχείς, πιο μεστοί από βλαστούς που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα με τύρφη και περλίτη. Οι ρίζες βρέθηκε ότι είτε είχαν παρόμοιο νωπό βάρος ανά εκατοστό μήκους είτε είχαν μεγαλύτερο ξηρό βάρος ανά εκατοστό (1^ο πείραμα).

Κατά τις δύο πρώτες εβδομάδες της σκληραγώγησης το ποσοστό της ξηρής ουσίας στη ρίζα φάνηκε να αυξάνει κατά 58%, ενώ τις επόμενες δύο εβδομάδες η αύξησή του ήταν πολύ μικρή. Φαίνεται ότι το φυτό στην προσπάθειά του να εγκλιματιστεί τον πρώτο καιρό και να αντεπεξέλθει στις ανάγκες του σε νερό, εξαναγκάστηκε να αναπτύξει κάπως περισσότερο τη ρίζα του. Στη συνέχεια δεν ήταν αναγκαία η περαιτέρω κατανάλωση δομικών στοιχείων για το σκοπό αυτό.

Στις αρχικές δύο εβδομάδες σκληραγώγησης ο βλαστός δεν αύξησε ουσιαστικά το νωπό του βάρος. Το νωπό βάρος του βλαστού αυξήθηκε κατά 4 φορές περίπου μετά από τις πρώτες δύο εβδομάδες εγκλιματισμού, καθώς το φυτό φάνηκε να ξεπερνά το σοκ προσαρμογής και άρχισε να αναπτύσσεται. Κατά παρόμοιο τρόπο, το ξηρό βάρος του βλαστού αυξήθηκε ελάχιστα τις δύο πρώτες εβδομάδες της σκληραγώγησης, ενώ στη συνέχεια, και εφ' όσον επιτεύχθηκε ο στόχος 'δημιουργία επαρκούς ριζικού συστήματος' σχεδόν εφταπλασιάστηκε.

Τις δύο πρώτες εβδομάδες της σκληραγώγησης ο λόγος του ξηρού βάρους βλαστού/ξηρό βάρος φυτού αυξήθηκε κατά λιγότερο από 20%, ενώ τις επόμενες εβδομάδες για περισσότερο από το διπλάσιο. Η σημαντική δηλαδή αύξηση στην κατανομή του ξηρού βάρους στο βλαστό επιτεύχθη μετά από τις πρώτες δύο εβδομάδες σκληραγώγησης, στις οποίες το φυτό προσπαθώντας να εγκλιματιστεί 'δημιουργούσε' ρίζα. Ενώ μπορεί να λεχθεί ότι μετά την έξοδο από τις συνθήκες ανάπτυξης *in vitro* υπήρχε μια σχετική ισορροπία μεταξύ

βλαστού και ρίζας, μετά τα αρχικά στάδια της σκληραγώγησης τροποποιήθηκε σημαντικά η ισορροπία αυτή υπέρ του βλαστού.

Στο 1^ο πείραμα που το χρονικό διάστημα της ανάπτυξης *in vitro* συμπίπτει με αυτό της σκληραγώγησης (4 εβδομάδες), έγινε φανερό ότι η συσσώρευση νωπής ουσίας στο βλαστό, με αποτέλεσμα την αύξηση του νωπού βάρους, ήταν κατά πολύ μεγαλύτερη στην διάρκεια των τεσσάρων εβδομάδων της σκληραγώγησης. Είναι βέβαια γεγονός ότι η έκπτυξη του πλευρικού οφθαλμού που δίνει το νέο βλαστό πραγματοποιείται μετά από τις πρώτες 10-15 ημέρες που το έκφυτό βρίσκεται *in vitro*. Ακόμα όμως και με αυτή την παραδοχή της πραγματικής ανάπτυξης του φυτού *in vitro* για 2 εβδομάδες, η νωπή ουσία που συσσωρεύτηκε ήταν πολύ λίγη σχετικά με αυτή που κατάφερε το φυτό να συσσωρεύσει κατά την σκληραγώγηση. Ταυτόχρονα θα πρέπει να συνεκτιμάται το γεγονός που προαναφέρθηκε, ότι δηλαδή η ανάπτυξη κατά τη σκληραγώγηση επιτυγχάνεται κυρίως μετά το πέρας των πρώτων δύο εβδομάδων. Αντίθετα, το νωπό βάρος της ρίζας δεν φαίνεται να άλλαξε πολύ μετά την έξοδο από τους γυάλινους περιέκτες. Η εκκίνηση της ρίζας συμβαίνει από την πρώτη εβδομάδα των φυτών *in vitro* και η συσσώρευση νωπής ουσίας φαίνεται ότι γίνεται κυρίως κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης *in vitro* και λιγότερο κατά τη σκληραγώγηση. Η συσσώρευση ξηρού βάρους στο βλαστό είναι επίσης κατά πολύ μεγαλύτερη κατά το χρονικό διάστημα της σκληραγώγησης. Ίσως αυτό να οφείλεται σε μειωμένη φωτοσυνθετική ικανότητα των φυτών *in vitro* σε σχέση με φυτά *ex vitro*, υπόθεση που θα μπορούσε να ελεγχθεί στο μέλλον. Αυτό φαίνεται βέβαια να ανατρέπεται σε συνθήκες καταπόνησης του φυτού, όπως πχ με τη δημιουργία υδατικής καταπόνησης. Στην περίπτωση αυτή η ξηρή ουσία συσσωρεύεται νωρίς, από την ανάπτυξη *in vitro*, και κατά τη σκληραγώγηση ο ρυθμός ανάπτυξης του υπέργειου τμήματος είναι μικρός. Η ρίζα συσσωρεύει ξηρή ουσία με σχεδόν παρόμοιους ρυθμούς τόσο *in vitro* όσο και *ex vitro* κατά τον εγκλιματισμό.

4.2 Μελέτη περιβάλλοντος στο θάλαμο ανάπτυξης

Το μέγιστο τις θερμοκρασίας στο θάλαμο ανάπτυξης φάνηκε να επιτυγχάνεται 4^{1/2} ώρες περίπου μετά το άναμμα των λαμπτήρων και μέχρι μισή ώρα μετά το σβήσιμό τους. Το θερμοκρασιακό εύρος του θαλάμου ανάπτυξης που μετρήθηκε στην παρούσα εργασία φαίνεται να συμφωνεί με αυτό που αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία για το αμπέλι (22-30°C) (Kyte & Kleyn, 1996). Η πορεία της ημερήσιας θερμοκρασίας των δύο υποστρωμάτων φαίνεται να συμφωνεί με αυτή του θαλάμου ανάπτυξης. Μέσα στις γυάλες, το υπόστρωμα με τύρφη και περλίτη παρουσιάστηκε ψυχρότερο από το υπόστρωμα M₄ κατά τη διάρκεια του χρονικού διαστήματος που τα φώτα ήταν ανοιχτά. Το υπόστρωμα με τύρφη και περλίτη αργούσε περισσότερο να θερμανθεί σε σχέση με το M₄, διατηρούσε τη θερμοκρασία του όμως περισσότερο μετά το σβήσιμο των λαμπτήρων. Φαίνεται συνεπώς ότι ο περλίτης του μίγματος τύρφης-περλίτη λειτούργησε ως κακός αγωγός της θερμότητας (θερμομονωτικό υλικό). Το ότι τα φυτά του υποστρώματος με τύρφη και περλίτη είχαν μεγαλύτερη διακύμανση της θερμοκρασίας τους (πιο ζεστά φύλλα από αυτά του M₄ την ημέρα, πιο ψυχρά τη νύχτα), ίσως να οφείλεται στην επικρατούσα μικρότερη σχετική υγρασία του αέρα της γυάλας με υπόστρωμα με μίγμα τύρφης-περλίτη, λόγω του πιο αρνητικού υδατικού δυναμικού του υποστρώματος. Για την υπόθεση αυτή υπάρχουν ενδείξεις από τη μακροσκοπική παρατήρηση καθώς στα τοιχώματα από τις γυάλες με μίγμα τύρφης-περλίτη δεν παρατηρούνταν συμπυκνώσεις υδρατμών. Η μείωση της σχετικής υγρασίας του αέρα της γυάλας είναι επιθυμητή καθώς συμβάλει στον εγκλιματισμό των φυτών (Smith et al., 1992).

Το μέγιστο του φωτός φαίνεται ότι δέχονταν τα σημεία του ραφιού που βρίσκονταν στο κέντρο του, εν αντιθέσει με τα άκρα του που φαίνεται ότι έχαναν φως διαχεόμενο προς το διάδρομο ή τον τοίχο ανάλογα. Στο κέντρο του ραφιού, εκτός από το άμεσο φως που έφτανε, έφτανε και διαχεόμενο από τους λαμπτήρες που βρίσκονται στη μέσα και στην έξω πλευρά του ραφιού. Οι παρατηρούμενες αυτές μεγάλες διαφορές στο φωτισμό επάνω στο ράφι ίσως αποτελούν παράγοντα αποτυχίας ή επιτυχίας της ιστοκαλλιέργειας σε μικρότερες εντάσεις φωτός. Στο θάλαμο ανάπτυξης που πραγματοποιήθηκε

το πείραμα ο μετρούμενος φωτισμός ήταν αρκετά μεγαλύτερος από τον απαραίτητο, ακόμα και στα άκρα του ραφιού, καθώς στη βιβλιογραφία αναφέρεται ότι φωτισμός 1000-3000 Lux για κάθε ράφι στο θάλαμο ανάπτυξης είναι ικανοποιητικός (Kyte & Kleyn, 1996).

Μέσα στη γυάλα τα φυτά δέχονταν το 75% του φωτός που προσπίπτει επάνω στο καπάκι της. Φαίνεται ότι το γυαλί ήταν αρκετά παχύ και απορροφούσε ή ανακλούσε το υπόλοιπο 25% του φωτός προκαλώντας σημαντική σκίαση.

Οι ρίζες των φυτών που αναπτύσσονταν στο υπόστρωμα M₄ με προσθήκη τύρφης και περλίτη σκιάζονταν λόγω του μίγματος τύρφης-περλίτη περίπου 4 φορές περισσότερο από τις ρίζες των φυτών που αναπτύσσονταν στο υπόστρωμα M₄. Η προσθήκη του μίγματος αυτού έκανε πιο αδιαπέρατο στο φως το θρεπτικό υπόστρωμα και αναμενόταν να βοηθήσει την ανάπτυξη ριζών, αλλά αυτή η ιδιότητα δεν ήταν ικανή λόγω του αρνητικού οσμωτικού του υποστρώματος.

4.3 Μελέτη περιβάλλοντος στο θάλαμο εγκλιματισμού

Το κάλυμμα από plexy glass των κλωβών μετρήθηκε ότι επέτρεπε μόνο στο 75% του φωτός των λαμπτήρων να φτάσει στα φυτά, σκιάζοντάς τα μερικώς, ενώ και το διαθέσιμο φως κατά τη σκληραγώγηση ήταν πολύ χαμηλό. Ίσως η αύξηση του διαθέσιμου φωτός να μπορέσει να αυξήσει σημαντικά τη φωτοσύνθεση των νεαρών φυταρίων και τη συσσώρευση νωπής και ξηρής ουσίας. Στο παρόν πείραμα η ξηρή ουσία του βλαστού βρέθηκε πολύ χαμηλότερη από τη συνήθη που αναφέρεται στη διεθνή βιβλιογραφία και αφορά βλαστικούς φυτικούς ιστούς. Οι ώριμοι βλαστοί που αναπτύσσονται σε φυσικό περιβάλλον έχουν περισσότερο από 40% ξηρής ουσίας και τα ώριμα φύλλα 30-40%. Οι σημαντικές αυτές διαφορές πιθανόν να αφορούν και τη ρίζα. Έτσι, τα σκληραγωγημένα φυτά ήταν ακόμη μακριά από τα αντίστοιχα αναπτυσσόμενα σε εξωτερικό περιβάλλον και η συντόμευση του χρόνου συσσώρευσης ξηρής ουσίας κατά την σκληραγώγηση παρουσιάζει έντονο ενδιαφέρον για μελλοντική μελέτη.

Η σταδιακή πτώση της σχετικής υγρασίας σε διάρκεια 19 ημερών μέχρι να φτάσει τα επίπεδα του θαλάμου εγκλιματισμού φαίνεται ότι ακολουθούσε πολυωνυμική συνάρτηση. Επιπλέον, η θερμοκρασία στον αέρα του κλωβού μειωνόταν καθώς ανοίγονταν σταδιακά το κάλυμμα, έως ότου εξισώθηκε με αυτή του εξωτερικού περιβάλλοντος του κλωβού. Αρχικά η θερμοκρασία μέσα στον κλωβό ήταν υψηλότερη καθώς ο όγκος του αέρα ήταν μικρός και θερμαινόταν ευκολότερα από τον αέρα του θαλάμου. Με την πάροδο των ημερών και το σταδιακό άνοιγμα του καπακιού του κλωβού η ανανέωση του αέρα μέσα στον κλωβό είχε ως αποτέλεσμα να πέφτει η θερμοκρασία μέρα με τη μέρα. Αυτό επιβεβαιώνεται από τη γραμμική μείωση της διαφοράς θερμοκρασίας μεταξύ του αέρα του κλωβού και του εξωτερικού περιβάλλοντος.

Με την πάροδο των ημερών και τη μείωση της σχετικής υγρασίας στην ατμόσφαιρα του κλωβού φαίνεται ότι η διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ του αέρα του κλωβού στο ύψος των φυτών και του εξωτερικού αέρα κατά τη διάρκεια του 24ώρου παρουσίασε εντονότερες διακυμάνσεις. Η θερμοχωρητικότητα των υδρατμών του αέρα του κλωβού λειτουργούσε εξομαλυντικά στις μεταβολές τις θερμοκρασίας. Η μείωση της σχετικής υγρασίας τις τελευταίες μέρες της σκληραγώγησης είχε ως αποτέλεσμα να θερμαίνεται νωρίτερα ο μικρός όγκος του αέρα του κλωβού σε σχέση με τον αέρα του θαλάμου ανάπτυξης όταν άναβαν οι λαμπτήρες. Στη συνέχεια, η διαφορά θερμοκρασίας μεταξύ του αέρα του κλωβού στο ύψος των φυτών και του εξωτερικού αέρα μειωνόταν καθώς ο αέρας του θαλάμου ανάπτυξης θερμαινόταν.

Κατά παρόμοιο τρόπο η σχετική υγρασία ήταν παράγοντας που έκανε τη θερμοκρασία που μετρούνταν στο φύλλο να είναι μικρότερη από αυτή του υποστρώματος. Με την πάροδο των ημερών και τη μείωση της σχετικής υγρασίας η ενέργεια που προσέπιπτε επάνω στον κλωβό φάνηκε ότι θέρμαινε αποτελεσματικότερα τον αέρα και το φύλλο.

5

Συμπεράσματα

5.1 Γενικά συμπεράσματα

Συμπερασματικά μπορεί να λεχθεί ότι:

Όσον αφορά την αύξηση των φυτών

- ♦ Η αύξηση του νωπού και ξηρού βάρους των βλαστών των φυτών κατά την ανάπτυξη *in vitro* είναι πολύ μικρή σε σχέση με την περίοδο σκληραγώγησης *ex vitro*, όμοια και το % ξηρής ουσίας στο βλαστό (ίσως και τη ρίζα), πιθανόν λόγω μειωμένης φωτοσυνθετικής ικανότητας των φυταρίων.
- ♦ Η προσθήκη ενός παράγοντα καταπόνησης στο θρεπτικό υπόστρωμα τροποποιεί την αναλογία βλαστού/ρίζας των φυτών παραγόμενων *in vitro*. Οι παραγόμενοι υδατάνθρακες οδηγούνται κυρίως προς τη ρίζα καθώς αποτελεί σημαντική 'δεξαμενή' στην προσπάθειά του φυτού να αντεπεξέλθει στις ανάγκες πρόσληψης νερού. Η ανάπτυξη του βλαστού και ολόκληρου του φυτού αναστέλλεται σημαντικά.
- ♦ Στο κρίσιμο πρώτο χρονικό διάστημα της σκληραγώγησης των φυτών (2 εβδομάδες), αναπτύσσεται κυρίως η ρίζα για να μπορέσει το φυτό να αντεπεξέλθει στις ανάγκες πρόσληψης νερού και θρεπτικών. Στη συνέχεια, και εφ' όσον παρέλθει αυτό το χρονικό διάστημα της καταπόνησης, ο βλαστός αυξάνει με αλματώδεις ρυθμούς και πιθανόν να μην υπάρχει ιδιαίτερη ανάγκη για σχολαστική διαδικασία σκληραγώγησης μετά τις πρώτες δύο εβδομάδες.

Όσον αφορά το περιβάλλον ανάπτυξης *in vitro*

- ◆ Η προσθήκη θερμομονωτικού υλικού (περλίτη) στο θρεπτικό υπόστρωμα μειώνει τη θερμοκρασιακή του διακύμανση κατά τη διάρκεια του 24ώρου και παρέχει στις ρίζες σταθερότερο περιβάλλον.
- ◆ Η μείωση του υδατικού δυναμικού του θρεπτικού υποστρώματος πιθανότατα μειώνει τη σχετική υγρασία στον αέρα της γυάλας συμβάλλοντας στη σκληραγώγηση.
- ◆ Η τοποθέτηση των γυαλών στο θάλαμο ανάπτυξης πρέπει να γίνεται στο κέντρο του ραφιού καθώς ο φωτισμός είναι σημαντικά μεγαλύτερος. Σε μικρές εντάσεις φωτός ίσως η θέση των γυάλινων περιεκτών στο ράφι να αποτελεί παράγοντα αποτυχίας ή επιτυχίας της ιστοκαλλιέργειας.
- ◆ Το καπάκι από τις γυάλες σκιάζει σημαντικά τα φυτά, συνεπώς η αντικατάστασή του με ένα υλικό περισσότερο διαπερατό στην ακτινοβολία, πχ μεμβράνη τροφίμων, αξίζει να μελετηθεί εναλλακτικά.

Όσον αφορά το περιβάλλον ανάπτυξης *ex vitro*

- ◆ Ο φωτισμός είναι ελλιπής και η αύξησή του θα βοηθούσε σημαντικά στην αρχική ανάπτυξη των φυτών κατά τη σκληραγώγηση και την ταχύτερη μεταφορά τους στο φυτωριακό εξωτερικό περιβάλλον.
- ◆ Η θερμοκρασία και η σχετική υγρασία συσχετίστηκαν πολύ καλά με το άνοιγμα του καπακιού του κλωβού.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ✓ Alleweldt, G., and Radler, F. (1962). Interrelationship between photoperiodic behavior of grapes and growth of plant tissue cultures. *Plant Physiol.* 37: 376-379.
- ✓ Anonymous (2003b). Effects of the physical environment on plant cultures. *In: www.ucdavis.edu*
- ✓ Anonymous, (2003a). Acclimatization of tissue cultured plants. *In: www.oqlesbytc.com*
- ✓ 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.). *Acta facultatis renum naturalium universitatis comenianae, Physiologia plantarum.* No 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
- ✓ Deloire, A., Charpentier, M., Berlioz, G., Colin, A., and Gimonnet, G. (1995). Micropropagation of the grapevine: Results of 10 years of experiments in the champagne vineyard and results of the first vinification. *Am. J. Enol. Vitic.* 43: 571-578.
- ✓ 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. *J. 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.
- ✓ Gmelin K. C. (1805). *Flora Badensis Alsatica et confinium regionum Cis et Transrhenana plantas a lacu Botanico usque ad confluentem Mossellae et Rheni sponte nacentes exhibens*. Karlsruhe 1: 543-545.
- ✓ 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., and Klein, C. M. (1987). *In vitro* shoot micropropagation and 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 cultives *in vitro*. Connaissance Vigne Vin. 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.
- ✓ Hoefer, L. L., and Gifford, E. M. (1964). Growth *in vitro* of excised stem tips of *Vitis vinifera*. Am. J. Bot. 51: 677 (abstract).
- ✓ Huang, Z.G., Tan, S.Y., 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 auxillary bud culture of *Vitis vinifera* 'Sylvaner Riesling'. Scientia Hortic. 9: 55-60.
- ✓ Katsirdakis, K. C. and Roubelakis-Angelakis, K. A. (1991). Callogenic potentially of leaf segments and shoot proliferation response of *Vitis spp.* genotypes. J. Wine Research 2: 83-95.
- ✓ 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.

- ✓ Krul, W. R. and Worley, J. F. (1977). Formation of adventitious embryos in callus cultures of 'Seyval', a French hybrid grape. J. Am. Soc. Hort. Sc. 102: 360-363.
- ✓ Kyte, L. and Kleyn, J. (1996). Plants from test tubes. Timber Press. Portland, Oregon.
- ✓ Lattin (De), G. (1939). Ueber den Ursprung und die Verbreitung der Reben Zuchter, 11: 217-225.
- ✓ 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, Jia-Rui 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*
- ✓ Maene, L. J., and Debergh, P. C. (1983). Rooting of tissue cultured plants under *in vitro* conditions. Acta Horticulturae 212: 335-357.
- ✓ Marston, M. E. (1967). Sci. Hort. J. Hort. Educ. 19: 80-86.
- ✓ Martinez, E. and Tizio, R. (1989). Grapevine micropropagation through shoot tips and minicuttings from *in vitro* cultured one-node cuttings. HortScience 24: 513
- ✓ Mikkelsen, E. P., and Sink, K. C. (1978). *In vitro* propagation of Rieger Elatior begonias. HortScience 13: 242-244.
- ✓ 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.

- ✓ Mudge, K.W., Larden, J. P., and Eckenrode, K. L. (1992). Effects of lighting and CO₂ enrichment on acclimatization of micropropagated woody plants. *In: Proceedings of the International Plant Propagators Society.* 42: 421-426.
- ✓ 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.
- ✓ Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- ✓ Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 25: 135-166.
- ✓ Nakagawa, S., Tomoko Kazama, 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). Micropropagation of 'Norton' grape. *HortTechnology* 11: 206-208.
- ✓ 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.
- ✓ Planchon, J. E. (1887). *Ambelideae in D.C. Suites au Prodromus systematis Naturalis. Monographia Phanerogamarum.* Masson ed., Paris, 5: 305-654.
- ✓ Preece, J. E., and Sutter, E. G. (1991). Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. *In: Micropropagation, Technology and Application*, edited by P. C. Deberg and R. H. Zimmerman. Dordrecht: Kluwer Academic.
- ✓ 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 Zinanovitch, 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
 - ✓ Seibert, M. (1973). *In vitro* 8: 435.
 - ✓ 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.
 - ✓ Srinivasan, C. and Mullins, M. G. (1980). Flowering in *Vitis*. Effects of genotype on cytokinin-induced conversion of tendrils into inflorescences. *Vitis* 19: 293-300.,
 - ✓ Taiz, L. and Zeiger, E. (1998). *Plant physiology*. Sinauer. USA. pp 727.
 - ✓ Tanne, E., Spiegel-Roy, P., and Shlamovitz, N. (1996). Rapid *in vitro* indexing of grapevine viral diseases: the effect of stress inducing agents on the diagnosis of leafroll. *Plant. Dis.* 80: 972-974.
 - ✓ 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.
 - ✓ Ziv, M. (1986). *In vitro* hardening and acclimation of tissue culture plants. *In*: *Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications*, edited by L. A. Withers and P. G. Anderson. London: Butterworth.
 - ✓ Βλάχος Μ. Β. (1991). Αμπελογραφία. Θεσσαλονίκη
 - ✓ 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.
- ✓ Καραμπουρνιώτης, Γ. Α. (2003). Φυσιολογία καταπονήσεων των φυτών. Εκδόσεις Έμβρυο. Αθήνα. pp 38-39.
 - ✓ Ποντίκης, Κ. Α. (1994). Πολλαπλασιασμός καρποφόρων δέντρων και θάμνων. Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα-Πειραιάς. pp 197-222.
 - ✓ Ρουμπελάκη- Αγγελάκη, Κ. Α. (1998). Η αμπελουργία στην Κρήτη- Προβλήματα και προοπτικές. ΓΕΩΤ.Ε.Ε., Παράρτημα Κρήτης. Ηράκλειο Κρήτης.
 - ✓ Ρούμπος, Ι. Χ. (1987). Έρευνες επί του ικτέρου της αμπέλου. Καλλιέργεια προσβεβλημένων μοσχευμάτων σε θρεπτικό υπόστρωμα. Γεωτεχνικά 1: 42-48.
 - ✓ 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.
 - ✓ 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.



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000072386