

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΠΟΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΔΙΑΤΜΗΜΑΤΙΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ ΤΟΥ ΤΜΗΜΑΤΟΣ
ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΚΑΙ ΤΟΥ
ΤΜΗΜΑΤΟΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΚΑΙ ΥΔΑΤΙΝΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΣΚΛΗΡΑΓΩΓΗΣ ΦΥΤΑΡΙΩΝ ΚΑΤΑ ΤΟ
ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΩΝ ΑΜΠΕΛΟΥ.

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

ΚΟΝΤΟΥ ΣΤΕΛΛΑ

ΒΟΛΟΣ, 2004



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

Αριθ. Εισ.: 4219/1
Ημερ. Εισ.: 16-12-2004
Δωρεά: Συγγραφέα
Ταξιθετικός Κωδικός: Δ
634.8
ΚΟΝ

ΑΡΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΕΛΛΗΝΙΚΩΝ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ ΑΜΠΕΛΟΥ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

Γ. Νάνος (Επιβλέπων)
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Π.Λόλας (Μέλος)
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Ι. Ρούμπος (Μέλος)
ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε

Επίκουρος Καθηγητής

Καθηγητής

Ερευνητής Α

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πρωτίστως θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον Δρ. Γεώργιο Νάνο, Επίκουρο Καθηγητή της Σχολής Γεωπονικών Επιστημών του Π.Θ. για την πολύτιμη καθοδήγηση στην διεξαγωγή του πειράματος καθώς και τις σημαντικότερες συμβουλές στην ολοκλήρωση της ερευνητικής εργασίας.

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Δρ. Πέτρο Λόλα για τις πολύτιμες συμβουλές του στην ολοκλήρωση της ερευνητικής εργασίας.

Ευχαριστώ τον Ι. Ρούμπο, Ερευνητή Α΄ (ΕΘ.Ι.ΑΓ.Ε.) για την πολύτιμη συνεργασία του και την καθοδήγηση στη διεξαγωγή της παρούσας εργασίας.

ΚΟΝΤΟΥ ΣΤΕΛΛΑ, 2004, «ΒΕΛΤΙΣΤΟΠΟΙΗΣΗ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΣΚΛΗΡΑΓΩΓΗΣΗΣ ΦΥΤΑΡΙΩΝ ΚΑΤΑ ΤΟ ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΩΝ ΑΜΠΕΛΩΝ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ, ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ, ΒΟΛΟΣ.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα εργασία έγινε μελέτη των χαρακτηριστικών αύξησης φυτών αμπέλου (BACCO και 140 Ru) που αναπτύχθηκαν *in vitro* σε δυο υποστρώματα, το τροποποιημένο υπόστρωμα MS (M₄) και το υπόστρωμα M₄ με προθήκη μίγματος τύρφης – περλίτη, προκειμένου να αξιολογηθεί η πορεία ανάπτυξης αυτών των φυταρίων κατά τη σκληραγώγηση.

Έγινε φανερό ότι η μείωση του διαθέσιμου νερού στο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης που επιτεύχθηκε μέσω της προσθήκης τύρφης – 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 αλλά με μεγαλύτερο ποσοστό ξηρής ουσίας στη ρίζα από φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄.

Επιπλέον, το υπόστρωμα M₄ παρουσία τύρφης – περλίτη δεν δημιούργησε πιο ταχέως αναπτυσσόμενα φυτά κατά το στάδιο της σκληραγώγησης αλλά αντίθετα τα φυτάρια του συγκεκριμένου υποστρώματος καθυστέρησαν σε σχέση με φυτάρια που προήλθαν από το υπόστρωμα M₄. Η συσσώρευση νωπής και ξηρής ουσίας στο βλαστό ήταν κατά πολύ μεγαλύτερη στη διάρκεια των τεσσάρων εβδομάδων της σκληραγώγησης. Αντίθετα, το νωπό βάρος της ρίζας δεν άλλαξε πολύ μετά την έξοδο από τους γυάλινους περιέκτες. Τέλος, η συσσώρευση ξηρής ουσίας στη ρίζα έγινε με σχεδόν παρόμοιους ρυθμούς τόσο *in vitro* όσο και *ex vitro* κατά τη σκληραγώγηση.

Πίνακας Περιεχομένων

1	<u>Βιβλιογραφική ανασκόπηση</u>	1
1.1. Ιστοκαλλιέργεια		1
1.1.1 Γενικά για την ιστοκαλλιέργεια		1
1.1.2 Ιστορική αναδρομή		6
1.1.3 Υποστρώματα χρησιμοποιούμενα στην ιστοκαλλιέργεια		10
1.2. Επίδραση του περιβάλλοντος στα καλλιεργούμενα φυτά in vitro		14
1.2.1 Συνοχή του θρεπτικού υποστρώματος		14
1.2.2 Θερμοκρασία		15
1.2.2.1 Επίδραση στην αύξηση των φυτών		15
1.2.2.2 Επίδραση στη μορφογένεση		16
1.2.3 Σχετική υγρασία		17
1.2.4 Φωτισμός		18
1.2.4.1 Επίδραση στη μορφογένεση		20
1.3 Σκληραγώγηση (εγκλιματισμός) φυταρίων παραγόμενων in vitro		21
1.4 Αμπέλι		27
1.4.1 Η αμπελουργία ανά τον κόσμο		27
1.4.2 Η αμπελουργία στην Ελλάδα		29
1.4.3 Το γένος Vitis		31
1.5 Μεθοδολογία ιστοκαλλιέργειας αμπέλου		32
1.6 Σκοπός της εργασίας		35
2	<u>Υλικά και μέθοδοι</u>	37
2.1 Τα φυτά		37
2.2 Οι γυάλες ανάπτυξης		37
2.3 Ο θάλαμος ανάπτυξης		38
2.4 Ο θάλαμος σκληραγώγησης και οι κλωβοί εγκλιματισμού		39
2.5 Παρασκευή του υποστρώματος		41
2.6 Εγκατάσταση		46
2.7 Πολλαπλασιασμός		47
2.8 Πειραματική διαδικασία και συλλογή δεδομένων		47
2.9 Στατιστική ανάλυση των δεδομένων		49

<u>3</u>	<u>Αποτελέσματα</u>	50
-----------------	---------------------------	----

<u>4</u>	<u>Συζήτηση</u>	67
-----------------	-----------------------	----

<u>5</u>	<u>Συμπεράσματα</u>	71
-----------------	---------------------------	----

	<u>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</u>	72
--	---------------------------	----

1

Βιβλιογραφική ανασκόπηση

1.1. Ιστοκαλλιέργεια

1.1.1 Γενικά για την ιστοκαλλιέργεια

Με τον όρο ιστοκαλλιέργεια νοείται η καλλιέργεια τμημάτων φυτών, σπόρων, εμβρύων, οργάνων, κυττάρων και πρωτοπλαστών ανώτερων φυτών σε θρεπτικά υποστρώματα κάτω από ασηπτικές συνθήκες.

Οι πρακτικές εφαρμογές αυτής της μεθόδου είναι πολλές, κυριότερες των οποίων είναι ο αγενής πολλαπλασιασμός των φυτών, η παραγωγή φυτικών φαρμακευτικών ουσιών, καθώς και η αντιμετώπιση ασθενειών των φυτών (παραγωγή υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού απαλλαγμένου από ιώσεις). Πιο συγκεκριμένα ο γρήγορος και μαζικός αγενής πολλαπλασιασμός των φυτών μέσω της τεχνικής της καλλιέργειας ιστών *in vitro* έχει ήδη εφαρμογή τόσο διεθνώς όσο και στη χώρα μας σε εμπορική κλίμακα κυρίως σε ανθοκομικά φυτά όπως ορχιδέες, γαρδένιες κ.ά. (Πλαστήρα και Μπουρμπρούλη, 1993) αλλά και σε άλλα φυτά γεωργικής σημασίας (φράουλα κ.ά.). Η τεχνική αυτή συνδυάζει την ταχύτητα με την οικονομία στο χώρο και γενικά στις εγκαταστάσεις.

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.

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 νέο φυτό, 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 *in vitro* καλλιέργεια της γύρης των φυτών δίνει απλοειδή φυτά, ένα πολύτιμο υλικό στην έρευνα πάνω στη γενετική και τη βελτίωση των φυτών ενώ η καλλιέργεια πρωτοπλάστων (φυτικών κυττάρων χωρίς κυτταρικό τοίχωμα) είναι απαραίτητο εργαλείο της γενετικής μηχανικής στην προσπάθεια των επιστημόνων για ενσωμάτωση επιθυμητών χαρακτηριστικών σε καλλιεργούμενα φυτά. Επίσης η καλλιέργεια φυτικών ιστών *in vitro* χρησιμοποιείται σήμερα από την φαρμακευτική και χημική βιομηχανία για την βιοτεχνολογική παραγωγή ορισμένων φαρμακευτικών ή άλλων χημικών ουσιών. Τέλος η καλλιέργεια φυτικών ιστών *in vitro* χρησιμοποιείται σαν εργαλείο για την μελέτη φυτοπαθογόνων υποχρεωτικών παρασίτων και νηματωδών, καθώς και για την ανεύρεση κλώνων και ποικιλιών καλλιεργούμενων φυτών ανθεκτικών στις ασθένειες και στους διάφορους εχθρούς.

Μεγάλη όμως είναι η συμβολή της καλλιέργειας φυτικών ιστών *in vitro* στην μελέτη των ιώσεων των φυτών και στην παραγωγή απαλλαγμένου από ιώσεις, υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού διάφορων καλλιεργούμενων φυτών. Η παραγωγή φυτών απαλλαγμένων από ιώσεις γίνεται με καλλιέργεια μεριστωματικών κορυφών (μεριστωματικός πολλαπλασιασμός) και στηρίζεται στο γεγονός ότι σε ιωμένα φυτά, η συγκέντρωση του ιού στους φυτικούς ιστούς μειώνεται πλησιάζοντας προς τα κορυφαία μεριστώματα τα οποία φαίνεται πως είναι απαλλαγμένα από τον ιό. Η πρώτη παραγωγή υγιών φυτών με τη μέθοδο της καλλιέργειας μεριστωματικών κορυφών έγινε το 1952 από φυτά ντάλιας μολυσμένα με τον ιό του μωσαϊκού της ντάλιας και από

φυτά πατάτας μολυσμένα με τους ιούς Α, Υ και Χ από τους Morel και Martin (Πλαστήρα, 1990).

Ιδιαίτερη σημασία έχει σήμερα η μέθοδος της καλλιέργειας μεριστωματικών κορυφών για την παραγωγή απαλλαγμένου από ιώσεις πολλαπλασιαστικού υλικού για τα εσπεριδοειδή και διάφορα άλλα καρποφόρα δένδρα.

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 τη δυνατότητα πραγματοποίησης χειρισμών στα φυτά που δεν ήταν δυνατόν να γίνουν νωρίτερα με άλλο τρόπο.

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 περαιτέρω.

Από το στάδιο του εκφύτου μέχρι τη μεταφύτευση στο θερμοκήπιο ή το χωράφι, η ιστοκαλλιέργεια περιλαμβάνει 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).

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 Knor 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 καλλίεργησε 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 Bernarf και H. Burgeff 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 ινδολυλο-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 καλλιέργησε 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 καλλιέργησε σε θρεπτικό μέσο ριζικό μερίστωμα ντομάτας. Η προσθήκη γλυκίνης, πυριδοξίνης και νικοτινικού οξέος μέσα στο υπόστρωμα είχε θετικά αποτελέσματα. Το 1939 ανέφερε ότι καλλιέργησε με επιτυχία 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 orchidées.

Η βιομηχανία παραγωγής orchidées 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 orchidées. 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 κυτοκινίνες. 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 1.1.

Πίνακας 1.1. Υποστρώματα που χρησιμοποιούνται στην ιστοκαλλιέργεια. Οι συγκεντρώσεις που αναφέρονται στον πίνακα είναι σε mg/L.

NH_4NO_3	400	Anderson (1978)	Gamborg et al. (1976)	Gautheret (1942)	Heller (1942)	Hildebrandt, Riker & Duggar (1946)	Hoagland (1950)	Knop (1865)	Knudson (1946)	Linsmaier & Skoog (1965)	Lloyd & McCown (1980)	Morel & Muller (1964)	Murashige & Skoog (1962)	Nitch & Nitch (1969)	Schenk & Hildebrandt (1972)	Vacin & Went (1949)	White (1963)
$\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	-	-	-	-	-	-	115	-	-	-	-	-	-	-	300	-	-
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	-	134	-	-	125	-	-	-	500	-	-	1.000	-	-	-	500	-
H_3BO_3	6,2	3,0	0,05	1,0	3,0	2,86	-	-	-	6,2	6,2	-	6,2	10	5,0	-	1,5
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	150	-	75	-	-	-	-	-	400	96	-	440	166	200	-	-
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	-	-	500	-	-	800	945	500-800	1.000	-	556	500	-	-	-	-	300
$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	200	-
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,025	0,025	0,05	-	-	-	-	-	-	0,025	-	-	0,025	-	0,1	-	-

CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	0,025	0,05	0,03	-	-	-	0,025	0,025	0,025	0,025	0,2	-	-	
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	250	125	250	720	250	125-200	250	370	125	370	185	400	250	720
MnCl ₂ ·4H ₂ O	-	-	-	-	-	1,81	-	-	-	-	-	-	-	-	7,0
MnSO ₄ ·H ₂ O	16,9	10	3,0	-	-	-	-	-	22,3	-	16,9	-	10	-	-
MnSO ₄ ·4H ₂ 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 ₂ PO ₄	-	-	125	-	-	-	125-200	250	170	125	170	68	-	250	-
K ₂ SO ₄	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	990	-	-	-	-
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	0,25	-	-	-	-	-	0,25	0,025	-	0,25	0,25	0,1	-	-
NaNO ₃	-	-	600	600	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	380	150	125	125	132	-	-	-	-	-	-	-	-	-	16,5
Na ₂ SO ₄	-	-	-	-	100	-	-	-	-	-	-	-	-	-	200
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,6	2,0	0,18	1,0	3,0	-	-	8,6	8,6	-	8,6	10	1,0	-	3,0
Fe ₂ (SO ₄) ₃	-	-	-	50	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	2,5
Fe ₂ (C ₄ H ₄ O ₆) ₃	-	-	-	-	5,0	-	-	-	-	-	-	-	-	28	-
FeSO ₄ ·7H ₂ O	55,7	27,8	-	-	-	5,0	-	2,8	27,8	-	27,8	27,8	15	-	-

Na ₂ EDTA	74,5	37,3	-	-	-	-	37,3	37,3	37,3	20	-	-
Θειική αδερίνη	80	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
d-Βιοτίνη	-	-	-	-	-	-	-	0,05	-	-	-	-
Ινσοπόλη	100	100	-	-	-	100	100	100	1000	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
ZiP	5,0	-	-	-	-	-	1,0	-	-	-	-	-
CAA	1,0	-	-	-	-	1,3	-	1,3	0,1	-	-	-
Κινετίνη	-	-	-	-	-	0,001-10	-	0,04-10	-	-	-	-
Γλυσίνη	-	-	-	-	-	-	2,0	-	2,0	-	-	3,0
Σακχαρόζη	30.000	30.000	-	-	-	30.000	20.000	30.000	20.000	-	-	20.000
Άγαρ	6.000	-	-	-	-	10.000	6.000	8.000	8.000	-	-	-

(Πηγή: Kyte & Kieyn, 1996)

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

Μία σειρά παραγόντων του 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 υπερυδάτωση 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 επιπλέουν επάνω στο υπόστρωμα και δεν είναι απαραίτητη η ανάδευση.

Η επιλογή υγρού ή ημιστερεού μέσου εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, συμπεριλαμβανομένων του σκοπού του πειράματος ή της φάσης της καλλιέργειας, το γενότυπο του φυτού και το στάδιο του μικροπολλαπλασιασμού. Γενικά, αρκετά 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 (°C)	Δοκιμασμένες περιοριστικές θερμοκρασίες (°C)
Κορυφές βλαστών ροδακινιάς	21-24	28
Έμβρυα ελιάς	25	15,20,30
Βλαστοί τριανταφυλλιάς	18	12,24
Ρίζες	20-25	27-28

(Πηγή: Anonymus, 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°C προκειμένου να σχηματιστούν βλαστοφόροι οφθαλμοί. Άλλα φυτικά είδη απαιτούν υψηλότερες θερμοκρασίες της τάξης των 28-30°C. Σε αυτή την κατηγορία ανήκει η ευρωπαϊκή άμπελος (*Vitis vinifera*) και το είδος *Pinus radiata*. Η πλειοψηφία των φυτικών ειδών έχουν κατά μέσο όρο βέλτιστη θερμοκρασία για μορφογένεση στο εύρος 22-26°C.

Ο σχηματισμός ριζών φαίνεται να εξαρτάται από τη θερμοκρασία σε αρκετά φυτικά είδη. Παρ' όλα αυτά κανόνας που να συμπεριλαμβάνει όλα τα φυτά δεν υπάρχει. Στα κωνοφόρα για παράδειγμα ο σχηματισμός

ριζών ευνοείται στους 20⁰C, ενώ σε μικρομοσχεύματα μηλιάς απαιτείται θερμοκρασία 22-25⁰C προκειμένου να ριζοβολήσουν.

Η θερμοκρασία φαίνεται να είναι καθοριστικός παράγοντας στο σχηματισμό κονδύλων στις πατάτες. Μελέτες έδειξαν ότι θερμοκρασία 20⁰C 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 30⁰C 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 (2-4⁰C 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 σπυροφύτων 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 κυτοκινίνης 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 κυτοκινίνη 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 οπωροφόρων 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: Kytte & 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 οἶνος 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 την υπόλοιπη Ευρώπη.

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. Ελλάδα	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:

Αθροισμα: 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 πολυγαμοδιόικα, άνθη ερμαφρόδιτα ή μονογενή άρρενα ή θήλεα, πενταμερή, καμία φορά εξαμερή και σπανιότερα εφταμερή, στεφάνη γαμοπέταλος σχήματος πηλιδίου, ωοθήκη 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).

1.5 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 & Juvova, 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 υγιές, ή δύο χρόνια για την παραγωγή έτοιμων φυτών στο χωράφι με εμβολιασμό. Σε αντίθεση, εκατοντάδες φυτά προερχόμενα από ιστοκαλλιέργεια μπορούν να φυτευτούν στο χωράφι μέσα σε ένα χρόνο είτε αυτόριζα είτε εμβολιασμένα σε άλλο υποκείμενο.

Αν και οι προοπτικές είναι 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 23-30⁰C. 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 sulfated	-	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

Η ιστοκαλλιέργεια είναι σημαντική τεχνική παραγωγής αγενούς πολλαπλασιαστικού υλικού. Βρίσκει πολλές εφαρμογές στον πολλαπλασιασμό καλλωπιστικών και πολυετών καλλιεργούμενων φυτών. Το ενδιαφέρον σ' αυτή την τεχνική είναι ότι ασθένειες από το μητρικό φυτό δεν μεταφέρονται στους απογόνους. Τα εξωτερικά παθογόνα απομακρύνονται με την απολύμανση του εκφύτου, ενώ τα εσωτερικά παθογόνα μπορούν να απομονωθούν, πράγμα που πριν με τον εγγενή πολλαπλασιασμό ήταν αδύνατο. Στο αμπέλι η ιστοκαλλιέργεια ως μέθοδος πολλαπλασιασμού έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε πολλά είδη, υποκείμενα και καλλιεργούμενες ποικιλίες. Είναι απαραίτητη τεχνική όταν απαιτείται παραγωγή μεγάλου αριθμού φυτών ή είναι άμεση προτεραιότητα η παραγωγή φυτών απαλλαγμένων από ιώσεις.

Λίγη δουλειά έχει γίνει στη μελέτη του περιβάλλοντος κατά την ιστοκαλλιέργεια και ιδιαίτερα τον εγκλιματισμό των φυταρίων. Η σκληραγώγηση παίζει σημαντικότατο ρόλο στην αποτελεσματικότητα της ιστοκαλλιέργειας καθώς αποτελεί το κρίσιμότερο στάδιό της, στο οποίο χάνεται και ο μεγαλύτερος αριθμός φυτών. Μελέτες βελτίωσης των συνθηκών σκληραγώγησης παρουσιάζουν ενδιαφέρον.

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 *ex vitro* στο θάλαμο σκληραγώγησης.

2

Υλικά και μέθοδοι

2.1 Τα φυτά

Τα φυτά αμπέλου που χρησιμοποιήθηκαν ως υλικό εκκίνησης για τη διεξαγωγή της παρούσας εργασίας ήταν υποκείμενα BACCO και 140Ru. Από εύρωστες κληματίδες των φυτών αυτών αφαιρέθηκαν νεαροί βλαστοί οι οποίοι και χρησιμοποιήθηκαν για την εγκατάσταση, με τη διαδικασία που περιγράφεται στη σχετική παράγραφο. Τα φυτά αυτά προήλθαν από τη ριζοβόληση κληματιδών οι οποίες είχαν πρωτύτερα 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).

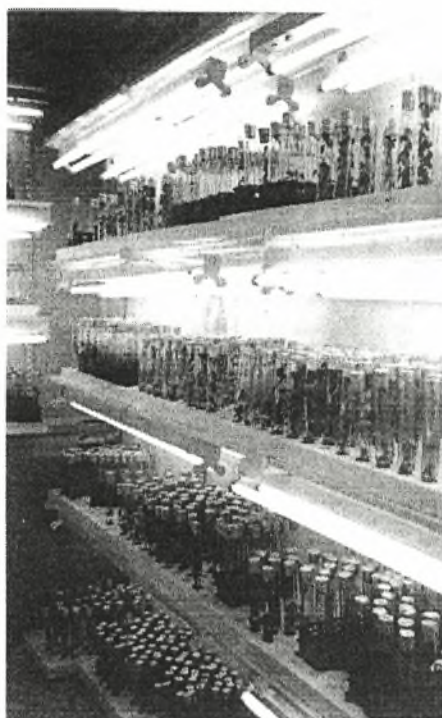


Εικόνα 2.1. Οι γυάλες ανάπτυξης με υπόστρωμα.

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 25-26°C με τη βοήθεια κλιματιστικού που διέθετε θερμοστάτη.

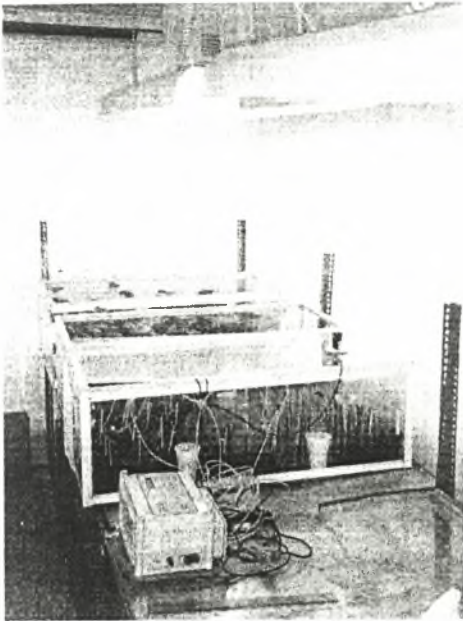


Εικόνα 2.2. Ο θάλαμος ανάπτυξης.

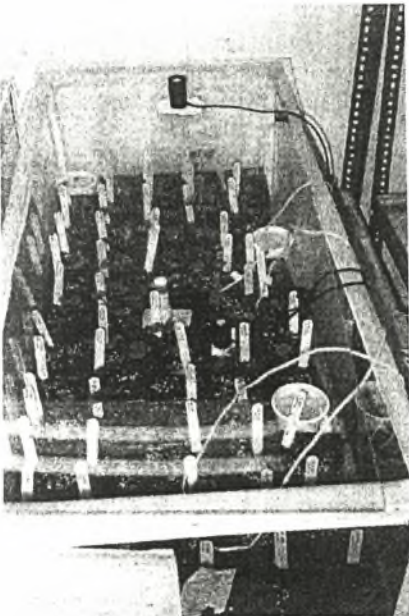
2.4 Ο θάλαμος σκληραγώγησης και οι κλωβοί εγκλιματισμού

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 25⁰C 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).



α.



β.

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. 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 $(NH_4)_6Mo_7O_{24}$ συγκέντρωσης $C_6=183,9mg \cdot L^{-1}$
- Διάλυμα $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$ συγκέντρωσης $C_7=8600mg \cdot L^{-1}$
- Διάλυμα H_3BO_3 συγκέντρωσης $C_8=6200mg \cdot L^{-1}$
- Διάλυμα $NiCl_2 \cdot 6H_2O$ συγκέντρωσης $C_9=50mg \cdot L^{-1}$

2. Παρασκευή stock διαλύματος σιδήρου (Fe) Σεκεστρέν

Σε μία αδιαφανή ογκομετρική φιάλη των 500 mL παρασκευάστηκε το stock διαλύματος σιδήρου τελικής συγκέντρωσης $C_{10}=20000mg \cdot L^{-1}$. 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 $C_{11}=400mg \cdot L^{-1}$
- Διάλυμα Πυριδοξίνης συγκέντρωσης $C_{12}=500mg \cdot L^{-1}$

- 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 Ινοσιτόλης συγκέντρωσης $C_{15}=25000\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$
- Διάλυμα Γλυκίνης 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 pHμέτρηση με τη βοήθεια pHμέτρου τύπου 3310 JENWAY (JENWAY LTD, UK) με ρύθμιση του pH στο $6,1\pm 0,1$ με τη βοήθεια διαλύματος KOH συγκέντρωσης $70\text{g}/100\text{mL}$. 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.

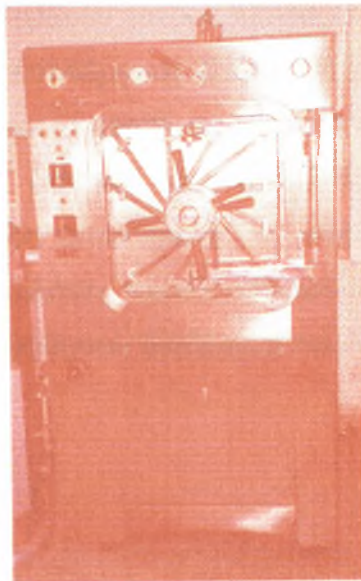
Στις γυάλες που περιλάμβαναν τη μεταχείριση με το υπόστρωμα M_4 , προστίθονταν 50mL υποστρώματος. Στις γυάλες που περιλάμβαναν την

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 121⁰C και για 20 λεπτά.

Πίνακας 2.1. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του υποστρώματος M₆.

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	M(g* <i>mol</i> ⁻¹)	Συγκέντρωση (mg*L ⁻¹)		ΠΑΡΑΣΚΕΥΑΣΤΡΙΑ 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 (ΣΕΚΕΣΤΡΕΝ)	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

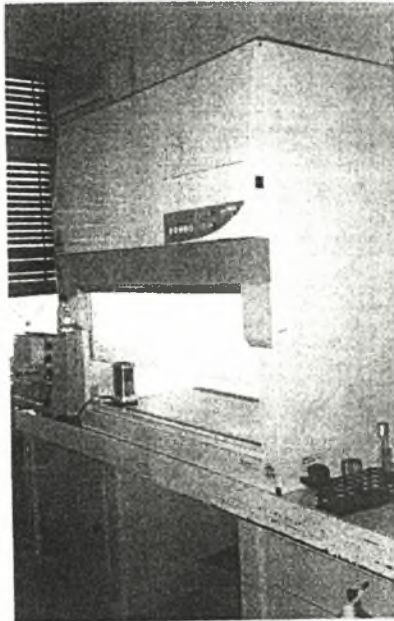
Βιοτίνη	244,3	0,01	40,93	Sigma
ΟΡΜΟΝΕΣ	(g·mol⁻¹)	(mg·L⁻¹)	μmoles	
ΙΑΑ	175,19	0,1	0,571	Fluka
ΥΔΡΟΓΟ- ΝΑΝΘΡΑΚΕΣ	(g·mol⁻¹)	(mg·L⁻¹)	mmoles	
Σακχαρόζη	342	15000	43,86	
ΛΟΙΠΑ	(g·mol⁻¹)	(mg·L⁻¹)	mmoles	
Agar	3000- 9000	6000		Fluka



Εικόνα 2.4. Ο κλίβανος υγρής αποστείρωσης.

2.6 Εγκατάσταση

Από υγιείς κληματίδες των επιθυμητών υποκειμένων (BACCO και 140Ru) (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 μεσογονάκια 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 αλουμινοχαρτό ώστε να εμποδιστεί η οποιαδήποτε είσοδος ανεπιθύμητων σωματιδίων. Η 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. Κάθε γυάλινος σωλήνας υποστρώματος M₄ 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 M_4 τοποθετούνταν ένα τμήμα βλαστού με έναν οφθαλμό.

2.8 Πειραματική διαδικασία και συλλογή δεδομένων

Αφού εξασφαλίστηκε ικανοποιητικός αριθμός φυτών, παρασκευάστηκε το υπόστρωμα M_4 , με τον τρόπο που περιγράφηκε παραπάνω και στις μισές γυάλες, συγκεκριμένα στις 12 από τις 24 γυάλες, με τη βοήθεια ογκομετρικού κυλίνδρου προστέθηκαν 50 mL υποστρώματος M_4 . Οι γυάλες αυτές αποτέλεσαν την μεταχείριση «υπόστρωμα M_4 ». Από τις παραπάνω γυάλες οι μισές χρησιμοποιήθηκαν για το υποκείμενο BACCO και οι υπόλοιπες για το

υποκείμενο 140Ru. Στις υπόλοιπες γυάλες με τη βοήθεια ογκομετρικού κυλίνδρου των 50mL προστέθηκαν 30mL υποστρώματος M₄ και 30mL μίγματος τύρφης-περλίτη. Οι γυάλες αυτές αποτέλεσαν τη μεταχείριση "υπόστρωμα M₄+τύρφη+περλίτη". Όπως και προηγουμένως, οι μισές απ' αυτές χρησιμοποιήθηκαν για το υποκείμενο BACCO και οι υπόλοιπες για φυτά του υποκειμένου 140Ru. 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 περιείχονταν στις 6 από το σύνολο των 12 γυαλών κάθε μεταχείρισης, δηλαδή από τις 12 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 6 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 η σχετική υγρασία να διατηρείται το δυνατόν 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.

Ο χρόνος παραμονής των φυτών σε συνθήκες εγκλιματισμού ήταν 4 εβδομάδες. 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, όπως νωπό βάρος βλαστού και ρίζας, μήκος βλαστού, αριθμός κόμβων, αριθμός και μήκος κυρίων ριζών. Όπως και στην πρώτη έξοδο, οι βλαστοί και οι ρίζες τοποθετήθηκαν για τρία εικοσιτετράωρα σε ξηραντήριο και στη συνέχεια επαναζυγίστηκαν για τη λήψη του ξηρού βάρους.

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 ως επίπεδο στατιστικής σημαντικότητας θεωρήθηκε το 95% ($p < 0.05$). Η επεξεργασία των δεδομένων έγινε με ανάλυση της παραλλακτικότητας (ANOVA). Η ανάλυση της παραλλακτικότητας καθενός από τα μετρημένα και υπολογισμένα μεγέθη έγινε χρησιμοποιώντας την διαδικασία GLM του λογισμικού SPSS, με πλήρες παραγοντικό μοντέλο.

3

Αποτελέσματα

Από τα αποτελέσματα του Πίνακα 3.1 προκύπτει ότι τα φυτά και των δύο υποκειμένων που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M_4 είχαν παρόμοιο ποσοστό ξηρής ουσίας στο βλαστό (πριν τη σκληραγώγηση) με τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M_4 με την προσθήκη τύρφης και περλίτη. Μετά τη σκληραγώγηση τα φυτά του υποκειμένου 140Ru είχαν ακόμα παρόμοιο ποσοστό ξηρής ουσίας στο βλαστό, ενώ για τα φυτά του υποκειμένου BACCO το υπόστρωμα M_4 με την προσθήκη τύρφης και περλίτη είχε υψηλότερο ποσοστό ξηρής ουσίας στο βλαστό.

Από τον ίδιο πίνακα φαίνεται ότι το ποσοστό της ξηρής ουσίας στη ρίζα των φυτών και των δύο υποκειμένων ήταν αυξημένο στο υπόστρωμα M_4 με την προσθήκη μίγματος τύρφης και περλίτη. Η αύξηση αυτή ήταν της τάξης του 13% για το υποκείμενο BACCO και 38% για το υποκείμενο 140Ru. Στις 4 εβδομάδες σκληραγώγησης που ακολούθησαν την έξοδο των φυτών από το θάλαμο ανάπτυξης, το ποσοστό της ξηρής ουσίας στη ρίζα αυξήθηκε κατά 81% για τα φυτά του υποκειμένου BACCO και κατά 60% για τα φυτά του υποκειμένου 140Ru.

Πίνακας 3.1. Μέσος όρος του ποσοστού επί τοις εκατό της ξηρής ουσίας στο βλαστό και τη ρίζα των φυτών δυο διαφορετικών υποκειμένων (BACCO και 140Ru) στα δύο χρησιμοποιούμενα υποστρώματα (M₄ και M₄ με τύρφη και περλίτη) κατά τις δύο χρονικές στιγμές λήψης μετρήσεων (πριν και μετά τη σκληραγώγηση των τεσσάρων εβδομάδων).

ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΟ	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	ΧΡΟΝΟΣ ΣΚΛΗΡΑΓΩΓΗΣΗΣ	% Ξ.Ο. ΣΤΟ ΒΛΑΣΤΟ	% Ξ.Ο. ΣΤΗ ΡΙΖΑ
BACCO	M ₄	0 εβδ. σκληραγ.	9,014	4,961
		4 εβδ. σκληραγ.	12,590	10,388
	M ₄ +τύρφη+περλίτη	0 εβδ. σκληραγ.	9,442	6,637
		4 εβδ. σκληραγ.	18,634	10,624
140Ru	M ₄	0 εβδ. σκληραγ.	10,256	4,893
		4 εβδ. σκληραγ.	14,996	9,358
	M ₄ +τύρφη+περλίτη	0 εβδ. σκληραγ.	10,571	8,111
		4. εβδ. σκληραγ.	14,594	11,481

Σημαντικότητα	%Ξ.Ο. ΣΤΟ ΒΛΑΣΤΟ	%Ξ.Ο. ΣΤΗ ΡΙΖΑ
Υποκείμενο	NS	NS
Υπόστρωμα	*	***
Χρόνος σκληραγώγησης	***	***
Ε.Σ.Δ.	2,85	1,75

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

Από τα αποτελέσματα του πίνακα 3.2 προκύπτει ότι το νωπό βάρος του βλαστού των φυτών που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄ με την προσθήκη μίγματος τύρφης και περλίτη ήταν μικρότερο σε σχέση με το αντίστοιχο νωπό βάρος που παρουσίασαν τα φυτά του υποστρώματος M₄, κατά 47% για το υποκείμενο BACCO και κατά 58% για το 140Ru. Η αύξηση του νωπού βάρους του βλαστού που συντελέστηκε κατά τις τέσσερις εβδομάδες της σκληραγώγησης ήταν της τάξης του 221% για το υποκείμενο BACCO και 296% για το υποκείμενο 140Ru.

Όσον αφορά το νωπό βάρος της ρίζας βρέθηκε να είναι μικρότερο στα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄ με τύρφη και περλίτη συγκριτικά με τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄, κατά 35% για το υποκείμενο BACCO και κατά 39% για το υποκείμενο 140Ru. Μετά τη σκληραγώγηση των τεσσάρων εβδομάδων δεν αυξήθηκε σημαντικά το νωπό βάρος των ριζών όλων των φυτών σε σχέση με την πρώτη μέτρηση.

Από τον ίδιο πίνακα φαίνεται ότι το νωπό βάρος ολόκληρου του φυτού ήταν μικρότερο στα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄ με την προσθήκη μίγματος τύρφης και περλίτη συγκριτικά με το αντίστοιχο βάρος των φυτών του υποστρώματος M₄, κατά 43% για το υποκείμενο BACCO και κατά 51% για το υποκείμενο 140Ru.

Μετά την έξοδο των φυτών από το θάλαμο ανάπτυξης και κατά τη σκληραγώγηση τους παρατηρήθηκε αύξηση του νωπού τους βάρους, της τάξης του 102% για το υποκείμενο BACCO και 120% για το 140Ru.

Πίνακας 3.2. Μέσος όρος του νωπού βάρους του βλαστού, της ρίζας και ολόκληρου του φυτού (σε mg) και για τα δυο υποκείμενα (BACCO και 140Ru), στα δυο χρησιμοποιούμενα υποστρώματα (M₄ και M₄ με τύρφη και περλίτη) κατά τις δύο χρονικές στιγμές λήψης των μετρήσεων (πριν και μετά τη σκληραγώγηση των τεσσάρων εβδομάδων).

ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΟ	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	ΧΡΟΝΟΣ ΣΚΛΗΡΑΓΩΓΗΣΗΣ	ΝΩΠΟ ΒΑΡΟΣ ΒΛΑΣΤΟΥ (mg)	ΝΩΠΟ ΒΑΡΟΣ ΡΙΖΑΣ(mg)	ΝΩΠΟ ΒΑΡΟΣ ΦΥΤΟΥ (mg)
BACCO	M ₄	0 εβδ. σκληραγ.	177	190	367
		4 εβδ. σκληραγ.	519	210	729
	M ₄ +τύρφη+περλίτη	0 εβδ. σκληραγ.	76	128	204
		4 εβδ. σκληραγ.	292	134	426
140Ru	M ₄	0 εβδ. σκληραγ.	163	212	375
		4 εβδ. σκληραγ.	565	222	787
	M ₄ +τύρφη+περλίτη	0 εβδ. σκληραγ.	46	122	168
		4. εβδ. σκληραγ.	262	144	406

Σημαντικότητα	N.B.ΒΛΑΣΤΟΥ	N.B ΡΙΖΑΣ	N.B.ΦΥΤΟΥ
Υποκείμενο	NS	NS	NS
Υπόστρωμα	***	***	***
Χρόνος σκληραγώγησης	***	NS	***
Ε.Σ.Δ.	31,5	15,5	38,5

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

Από τον πίνακα 3.3 προκύπτει ότι το ξηρό βάρος του βλαστού των φυτών που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M_4 με τύρφη και περλίτη είναι μικρότερο σε σχέση με το αντίστοιχο βάρος φυτών του υποστρώματος M_4 . Η παρατηρούμενη μείωση ήταν της τάξης του 26% για τα φυτά του υποκειμένου BACCO και 58% για τα φυτά του υποκειμένου 140Ru. Το ξηρό βάρος του βλαστού αυξήθηκε κατά τη διάρκεια των τεσσάρων εβδομάδων εγκλιματισμού σε σχέση με αυτό που μετρήθηκε αμέσως μετά την έξοδο των φυτών από το θάλαμο ανάπτυξης κατά 415% για το υποκείμενο BACCO και κατά 481% για το 140Ru.

Το ξηρό βάρος της ρίζας βρέθηκε μικρότερο στα φυτά και των δυο υποκειμένων που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M_4 με μίγμα τύρφης και περλίτη συγκριτικά με το αντίστοιχο βάρος φυτών του υποστρώματος M_4 . Μετά τις τέσσερις εβδομάδες εγκλιματισμού συντελέστηκε αύξηση στο ξηρό βάρος της ρίζας, κατά 105% για το υποκείμενο BACCO και κατά 86% για το 140Ru.

Όσον αφορά το ξηρό βάρος ολόκληρου του φυτού συμπεραίνουμε ότι είναι μικρότερο στα φυτά του υποστρώματος M_4 με προσθήκη μίγματος τύρφης και περλίτη συγκριτικά με το αντίστοιχο βάρος φυτών του υποστρώματος M_4 κατά 28% για το υποκείμενο BACCO και κατά 18% για το 140Ru. Μετά τις τέσσερις εβδομάδες εγκλιματισμού το ξηρό βάρος των φυτών αυξήθηκε σε σχέση με αυτό που είχαν αμέσως μετά την έξοδο τους από το θάλαμο ανάπτυξης, κατά 105% και κατά 86% για τα υποκείμενα BACCO και 140Ru αντίστοιχα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.3 Μέσος όρος του ξηρού βάρους βλαστού, ρίζας και ολόκληρου του φυτού και των δυο υποκειμένων (BACCO και 140Ru), στα δυο χρησιμοποιούμενα υποστρώματα (M₄ και M₄ με τύρφη και περλίτη) κατά τις δυο χρονικές στιγμές λήψης μετρήσεων (πριν και μετά τη σκληραγώγηση των τεσσάρων εβδομάδων).

ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΟ	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	ΧΡΟΝΟΣ ΣΚΛΗΡΑΓΩΓΗΣΗΣ	ΞΗΡΟ ΒΑΡΟΣ ΒΛΑΣΤΟΥ(mg)	ΞΗΡΟ ΒΑΡΟΣ ΡΙΖΑΣ(mg)	ΞΗΡΟ ΒΑΡΟΣ ΦΥΤΟΥ (mg)
BCCO	M ₄	0 εβδ. σκληραγ.	15,82	9,36	25,18
		4 εβδ. σκληραγ.	65,34	21,86	87,29
	M ₄ +τύρφη+περλίτη	0 εβδ. σκληραγ.	7,1	8,2	15,34
		4 εβδ. σκληραγ.	52,67	14,17	66,84
140Ru	M ₄	0 εβδ. σκληραγ.	16,21	10,44	26,65
		4 εβδ. σκληραγ.	84,13	20,89	10,5
	M ₄ +τύρφη+περλίτη	0 εβδ. σκληραγ.	4,72	9,49	14,21
		4. εβδ. σκληραγ.	37,46	16,26	53,72

Σημαντικότητα	ΞΒ.ΒΛΑΣΤΟΥ	Ξ.Β.ΡΙΖΑΣ	Ξ.Β.ΦΥΤΟΥ
Υποκείμενο	NS	NS	NS
Υπόστρωμα	***	***	***
Χρόνος σκληραγώγησης	***	***	***
Ε.Σ.Δ.	4,23	1,16	4,73

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

Από τον πίνακα 3.4 προκύπτει ότι ο αριθμός των κόμβων είναι μικρότερος στα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M_4 με τύρφη και περλίτη απ' ό τι σε αυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M_4 κατά 23% και κατά 22% για τα υποκείμενα BACCO και 140Ru αντίστοιχα. Μετά από την περίοδο εγκλιματισμού των τεσσάρων εβδομάδων ο αριθμός των κόμβων όλων των φυτών αυξήθηκε συγκριτικά με τον αριθμό κόμβων που είχαν τα φυτά αμέσως μετά την έξοδο τους από το θάλαμο ανάπτυξης. Η αύξηση αυτή ήταν της τάξης του 120% για το BACCO και 172% για το 140Ru.

Τα φυτά τόσο του υποκειμένου BACCO όσο και του 140Ru, παρουσίασαν μικρότερο μήκος βλαστού όταν αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M_4 με προσθήκη μίγματος τύρφης και περλίτη. Η σκληραγώγηση των φυτών για τέσσερις εβδομάδες είχε ως αποτέλεσμα αύξηση του μήκους βλαστού κατά 90% για το BACCO και κατά 241% για το υποκείμενο 140Ru.

Τα φυτά και των δυο υποκειμένων που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M_4 με τύρφη και περλίτη παρουσίασαν μικρότερο αριθμό κυρίων ριζών απ' ό τι τα φυτά του υποστρώματος M_4 . Η σκληραγώγηση των τεσσάρων εβδομάδων είχε ως αποτέλεσμα την μείωση του αριθμού των κύριων ριζών κατά 43% για το BACCO και κατά 30% για το υποκείμενο 140Ru. Τις λιγότερες ρίζες είχαν τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M_4 με τύρφη και περλίτη και εγκλιματίστηκαν για τέσσερις εβδομάδες, κατόπιν τα φυτά του υποστρώματος M_4 μετά το πέρας του εγκλιματισμού, στη συνέχεια φυτά του υποστρώματος M_4 με τύρφη και περλίτη αμέσως μετά την έξοδο τους από τον θάλαμο ανάπτυξης και τέλος τις περισσότερες ρίζες είχαν τα φυτά του υποστρώματος M_4 μετά την έξοδό τους από τις γυάλες. Τα αποτελέσματα αυτά ισχύουν και για τα δύο υποκείμενα και οφείλονται μάλλον στην απώλεια κάποιων ριζών κατά την αποκόλληση του υποστρώματος τύρφης –περλίτη και στη μη δημιουργία νέων κατά τη σκληραγώγηση.

Όσον αφορά το μήκος των ριζών βρέθηκε ότι αυτό ήταν μικρότερο στα φυτά που προήλθαν από το υπόστρωμα M_4 με τύρφη και περλίτη απ' ό τι στα φυτά του υποστρώματος M_4 . Η μείωση ήταν της τάξης του 47% και για τα δύο υποκείμενα. Οι τέσσερις εβδομάδες σκληραγώγησης δεν φάνηκε να επηρεάζουν σημαντικά τα μήκη των κυρίων

ριζών. Συνεπώς, τόσο για το υποκείμενο BACCO όσο και για το 140Ru, τα φυτά του υποστρώματος M₄ με τύρφη και περλίτη, ανεξαρτήτως από το χρόνο λήψης μετρήσεων, είχαν κοντύτερες ρίζες από τα φυτά του υποστρώματος M₄ ανεξαρτήτως από το χρόνο λήψης μετρήσεων.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.4 Μέσος όρος του αριθμού κόμβων στο βλαστό, του μήκους του βλαστού, του αριθμού των κυρίων ριζών και του συνολικού μήκους των κυρίων ριζών των φυτών και των δυο υποκειμένων (BACCO και 140Ru), στα δυο χρησιμοποιούμενα υποστρώματα (M₄ και M₄ με τύρφη και περλίτη) κατά τις δυο χρονικές στιγμές λήψης μετρήσεων (πριν και μετά τη σκληραγώγηση των τεσσάρων εβδομάδων).

ΣΚΕΙ- ΝΟ	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	ΧΡΟΝΟΣ ΣΚΛΗΡΑΓΩΓΗ ΣΗΣ	≠ ΚΟΜΒΩΝ	ΜΗΚΟΣ ΒΛΑΣΤΟΥ (cm)	≠ΚΥΡΙΩΝ ΡΙΖΩΝ	ΜΗΚΟΣ ΚΥΡΙΩΝ ΡΙΖΩΝ (cm)
BCCO	M ₄	0 εβδ. σκληρ.	3,1	7,65	3,4	20,15
		4 εβδ. σκληρ.	6,1	15,11	1,7	17,41
	M ₄ +τύρφη+περλίτη	0 εβδ. σκληρ.	2	5,19	1,9	9,05
		4 εβδ. σκληρ.	5,1	9,22	1,3	10,954
140Ru	M ₄	0 εβδ. σκληρ.	2,333	5,042	2,167	17,5
		4 εβδ. σκληρ.	5,9	17,134	1,5	19,23
	M ₄ +τύρφη+περλίτη	0 εβδ. σκληρ.	1,6	3,43	1,7	10,8
		4. εβδ. σκληρ.	4,8	11,75	1,2	8,73

Σημαντικότητα #ΚΟΜΒΩΝ ΜΗΚΟΣ ΒΛΑΣΤΟΥ #ΡΙΖΩΝ ΜΗΚΟΣ ΡΙΖΩΝ

Υποκείμενο NS NS NS NS

Υπόστρωμα *** *** ** ***

Χρόνος σκληραγ. *** *** *** NS

Ε.Σ.Δ. 0,9 2,49 0,54 4,87

Σημείωση: Μεταβλητές που συνοδεύονται από NS δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους για P<5%, από *** διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά για P<1%, από ** για P<1% και από * για P<5%

Από τον πίνακα 3.5 προκύπτει ότι τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄ με προσθήκη μίγματος τύρφης και περλίτη είχαν μειωμένο νωπό βάρος στο βλαστό τους ανά εκατοστό μήκους από τα φυτά υποστρώματος M₄. Η μείωση αυτή ήταν της τάξης του 20% για το BACCO και 46% για το 140Ru. Μετά την έξοδο των φυτών από το θάλαμο ανάπτυξης και κατά τη σκληραγώγηση τους, το νωπό βάρος του βλαστού ανά εκατοστό μήκους αυξήθηκε κατά 72% για το BACCO και κατά 16% για το 140Ru.

Όσον αφορά το νωπό βάρος ανά εκατοστό μήκους ρίζας δεν διέφερε μεταξύ των φυτών που αναπτύχθηκαν στα δυο χρησιμοποιούμενα υποστρώματα. Η σκληραγώγηση δεν επηρέασε σημαντικά το νωπό βάρος ανά εκατοστό μήκους ρίζας. Οι παραπάνω παρατηρήσεις ισχύουν και για τα δυο υποκείμενα.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.5 Μέσος όρος του νωπού βάρους βλαστού ανά μονάδα μήκους βλαστού, του νωπού βάρους ρίζας ανά μονάδα μήκους ρίζας φυτών δυο διαφορετικών υποκειμένων (BACCO και 140Ru) στα δυο χρησιμοποιούμενα υποστρώματα (M₄ και M₄ με τύρφη και περλίτη) και κατά τις δυο χρονικές στιγμές λήψης μετρήσεων (πριν και μετά τη σκληραγώγηση των τεσσάρων εβδομάδων).

ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΟ	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	ΧΡΟΝΟΣ ΣΚΛΗΡΑΓΩΓΗΣΗΣ	N.B. ΒΛ/cm (mg/cm)	N.B. ΡΙΖ/cm (mg/cm)
BACCO	M ₄	0 εβδ. σκληρ.	23,35	10,25
		4 εβδ. σκληρ.	34,29	12,1
	M ₄ +τύρφη+περλίτη	0 εβδ. σκληρ.	14,87	16,42
		4 εβδ. σκληρ.	31,45	12,19
140Ru	M ₄	0 εβδ. σκληρ.	33,45	13,09
		4 εβδ. σκληρ.	32,59	11,81
	M ₄ +τύρφη+περλίτη	0 εβδ. σκληρ.	13,74	16,08
		4. εβδ. σκληρ.	22,03	13,24

Σημαντικότητα	N.B ΒΛΑΣΤΟΥ/cm	N.B.ΡΙΖΑΣ/cm
Υποκείμενο	NS	NS
Υπόστρωμα	***	NS
Χρόνος σκληραγώγησης	***	NS
Ε.Σ.Δ.	2,34	2,87

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

Από τα αποτελέσματα του πίνακα 3.6 συμπεραίνουμε ότι τα φυτά του υποκειμένου BACCO που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα με την προσθήκη μίγματος τύρφης και περλίτη έχουν κατά 19% μικρότερο ξηρό βάρος ανά εκατοστό βλαστού σε σχέση με τα φυτά του ίδιου υποκειμένου που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄. Τα φυτά του υποκειμένου 140Ru που προήλθαν από το υπόστρωμα M₄ με τύρφη και περλίτη έχουν κατά 44% μικρότερο ξηρό βάρος ανά εκατοστό βλαστού συγκριτικά με τα φυτά του υποστρώματος M₄. Όταν επαναλήφθηκαν οι μετρήσεις μετά από τις τέσσερις εβδομάδες σκληραγώγησης, βρέθηκε το ξηρό βάρος του βλαστού ανά cm να έχει αυξηθεί κατά 132% για το BACCO και κατά 67% για το υποκείμενο 140Ru.

Συνεπώς, το μικρότερο ξηρό βάρος ανά εκατοστό βλαστού έχουν τα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄ με τύρφη και περλίτη αμέσως μετά την έξοδο τους από το θάλαμο ανάπτυξης και το μεγαλύτερο ξηρό βάρος ανά εκατοστό βλαστού έχουν τα φυτά του υποστρώματος M₄ μετά τη σκληραγώγηση τους.

Όσον αφορά το ξηρό βάρος της ρίζας ανά εκατοστό μήκους ρίζας βρέθηκε αυξημένο στα φυτά που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα με την προσθήκη μίγματος τύρφης και περλίτη απ' ότι στα φυτά του υποστρώματος M₄. Η παρατηρούμενη αύξηση ήταν της τάξης του 33% για το BACCO και 77% για το 140Ru. Οι τέσσερις εβδομάδες σκληραγώγησης οδήγησαν στην αύξηση του ξηρού βάρους της ρίζας ανά εκατοστό μήκους ρίζας κατά 82% στο υποκείμενο BACCO και 66% για το 140Ru.

Άρα, μεγαλύτερες τιμές έχουν τα φυτά του υποστρώματος M₄ με τύρφη και περλίτη, που υποβλήθηκαν σε εγκλιματισμό τεσσάρων εβδομάδων και μικρότερες τιμές παρουσιάζουν τα φυτά του υποστρώματος M₄ αμέσως μετά την έξοδο τους από το θάλαμο ανάπτυξης.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.6 Μέσος όρος του ξηρού βάρους βλαστού ανά μονάδα μήκους βλαστού και του ξηρού βάρους ρίζας ανά μονάδα μήκους ρίζας φυτών δυο διαφορετικών υποκειμένων (BACCO και 140Ru) στα δυο χρησιμοποιούμενα υποστρώματα (M₄ και M₄ με τύρφη και περλίτη) και κατά τις δυο χρονικές στιγμές λήψης μετρήσεων (πριν και μετά τη σκληραγώγηση των τεσσάρων εβδομάδων).

ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΟ	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	ΧΡΟΝΟΣ ΣΚΛΗΡΑΓΩΓΗΣΗΣ	Ξ.Β. ΒΛ/cm (mg/cm)	Ξ.Β. ΡΙΖ/cm (mg/cm)
BACCO	M ₄	0 εβδ. σκληρ.	2,09	0,49
		4 εβδ. σκληρ.	4,32	1,26
	M ₄ +τύρφη+περλίτη	0 εβδ. σκληρ.	1,40	0,95
		4 εβδ. σκληρ.	3,78	1,37
140Ru	M ₄	0 εβδ. σκληρ.	3,42	0,65
		4 εβδ. σκληρ.	4,87	1,11
	M ₄ +τύρφη+περλίτη	0 εβδ. σκληρ.	1,44	1,19
		4. εβδ. σκληρ.	3,21	1,90

Σημαντικότητα	Ξ.Β.ΒΛΑΣΤΟΥ/cm	Ξ.Β ΡΙΖΑΣ/cm
Υποκείμενο	NS	NS
Υπόστρωμα	**	***
Χρόνος σκληραγώγησης	***	***
Ε.Σ.Δ	0,42	0,50

Σημείωση: Μεταβλητές που συνοδεύονται από NS δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά για P<5%, από *** διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους για P<1‰, από ** για P<1% και από * για P<5%.

Από τον πίνακα 3.7 συμπεραίνουμε ότι τα φυτά του υποκειμένου BACCO που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο υπόστρωμα M₄ με προσθήκη τύρφης και περλίτη είχαν κατά 11% μικρότερη αναλογία νωπού βάρους βλαστού προς νωπό βάρος φυτού συγκριτικά με τα φυτά του ίδιου υποκειμένου που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄. Όσον αφορά την ίδια αναλογία στα φυτά του υποκειμένου 140Ru, βρέθηκε κατά 20% μικρότερη στο υπόστρωμα M₄ με τύρφη και περλίτη απ' ότι στο υπόστρωμα M₄. Μετά την έξοδο των φυτών από το θάλαμο ανάπτυξης και κατά τη σκληραγώγηση τους σημειώθηκε αύξηση της αναλογίας νωπού βάρους βλαστού προς νωπό βάρος φυτού κατά 61% για το BACCO και κατά 89% για το υποκείμενο 140Ru.

Άρα, μικρότερες τιμές παρουσίασαν τα φυτά που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄ με τύρφη και περλίτη αμέσως μετά την έξοδο τους από τις γυάλες, ενώ μεγαλύτερες τιμές σημειώθηκαν όταν τα φυτά αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄, μετά τη σκληραγώγηση των τεσσάρων εβδομάδων.

Η αναλογία του νωπού βάρους ρίζας προς νωπό βάρος φυτού βρέθηκε μεγαλύτερη κατά 16% στα φυτά του υποκειμένου BACCO που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄ με προσθήκη μίγματος τύρφης και περλίτη συγκριτικά με τα φυτά του ίδιου υποκειμένου του υποστρώματος M₄. Η ίδια αναλογία ήταν αυξημένη κατά 27% στα φυτά του υποκειμένου 140Ru, όταν αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄ με τύρφη και περλίτη σε σχέση με τα φυτά του υποστρώματος M₄. Η σκληραγώγηση είχε ως αποτέλεσμα μείωση της αναλογίας του νωπού βάρους ρίζας προς νωπό βάρος φυτού κατά 46% για το BACCO και κατά 49% για το υποκείμενο 140Ru.

Συνεπώς μικρότερη τιμή του κλάσματος σημειώθηκε όταν τα φυτά αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄, μετά τη σκληραγώγηση, ενώ μεγαλύτερη τιμή παρατηρήθηκε στα φυτά του υποστρώματος M₄ με τύρφη και περλίτη, πριν τη σκληραγώγηση τους.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.7 Μέσος όρος του ποσοστού νωπού βάρους βλαστού και νωπού βάρους ρίζας προς το νωπό βάρος όλου του φυτού για δυο διαφορετικά υποκείμενα (BACCO και 140Ru) στα δυο χρησιμοποιούμενα υποστρώματα (M₄ και M₄ με τύρφη και περλίτη) κατά τις δυο χρονικές στιγμές λήψης μετρήσεων (πριν και μετά τη σκληραγώγηση των τεσσάρων εβδομάδων).

ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΟ	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	ΧΡΟΝΟΣ ΣΚΛΗΡΑΓΩΓΗΣΗΣ	N.B. ΒΛ/ΦΥΤ (%)	N.B. ΡΙΖ/ΦΥΤ.(%)
BACCO	M ₄	0 εβδ. σκληρ.	48,2	51,8
		4 εβδ. σκληρ.	71,1	28,9
	M ₄ +τύρφη+περλίτη	0 εβδ. σκληρ.	38,2	61,6
		4 εβδ. σκληρ.	68,3	31,7
140Ru	M ₄	0 εβδ. σκληρ.	43,2	56,8
		4 εβδ. σκληρ.	70,9	29,1
	M ₄ +τύρφη+περλίτη	0 εβδ. σκληρ.	27,7	72,3
		4. εβδ. σκληρ.	63,4	36,6

Σημαντικότητα

N.B.ΒΛ/ΦΥΤΟΥ

N.B.ΡΙΖ/ΦΥΤΟΥ

Υποκείμενο

*

*

Υπόστρωμα

Χρόνος σκληραγώγησης

Ε.Σ.Δ.

2,94

2,9

Σημείωση: Μεταβλητές που συνοδεύονται από NS δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους για P<5%, και από *** διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά για P<1‰ και από * για P<5%.

Από τα αποτελέσματα του πίνακα 3.8 προκύπτει ότι το ξηρό βάρος βλαστού προς ξηρό βάρος φυτού είναι μικρότερο στο υπόστρωμα M₄ με την προσθήκη μίγματος τύρφης και περλίτη, συγκριτικά με το υπόστρωμα M₄ κατά 9% για τα φυτά του υποκειμένου BACCO και 28% για τα φυτά του υποκειμένου 140Ru. Όταν επαναλήφθηκαν οι μετρήσεις μετά από τις τέσσερις εβδομάδες σκληραγώγησης, η συγκεκριμένη αναλογία αυξήθηκε κατά 40% για το BACCO και 59% για το υποκείμενο 140Ru.

Άρα, μικρότερη τιμή της αναλογίας του ξηρού βάρους βλαστού προς το ξηρό βάρος φυτού σημειώθηκε όταν τα φυτά αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄ με τύρφη και περλίτη, αμέσως μετά την έξοδο τους από τον θάλαμο ανάπτυξης. Μεγαλύτερη τιμή της ίδιας αναλογίας παρουσίασαν τα φυτά και των δυο υποστρωμάτων μετά τη σκληραγώγησή τους.

Τέλος, όσον αφορά το ποσοστό του ξηρού βάρους του φυτού που αντιστοιχεί στη ρίζα του βρέθηκε μεγαλύτερο κατά 20% στα φυτά του υποκειμένου BACCO που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄ με τύρφη και περλίτη, συγκριτικά με τα φυτά του υποστρώματος M₄. Η ίδια αναλογία βρέθηκε μεγαλύτερη κατά 65% στα φυτά του υποκειμένου 140Ru, που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄ με προσθήκη μίγματος τύρφης και περλίτη, απ' ότι στα φυτά του υποστρώματος M₄. Μετά τις τέσσερις εβδομάδες εγκλιματισμού μειώθηκε το ποσοστό αυτό για τα φυτά και των δυο υποκειμένων. Η μείωση αυτή ήταν της τάξης του 48% για το υποκείμενο BACCO και 52% για το υποκείμενο 140Ru.

Άρα, μικρότερες τιμές της αναλογία του ξηρού βάρους ρίζας προς το ξηρό βάρος φυτού σημειώθηκαν όταν τα φυτά αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα M₄, μετά τη σκληραγώγηση των τεσσάρων εβδομάδων. Αντίθετα, μεγαλύτερες τιμές παρατηρήθηκαν στα φυτά του υποστρώματος M₄ με τύρφη και περλίτη, αμέσως μετά την έξοδο τους από το θάλαμο ανάπτυξης.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3.8 Μέσος όρος του ποσοστού ξηρού βάρους βλαστού και ρίζας προς το ξηρό βάρος όλου του φυτού για δυο διαφορετικά υποκείμενα (BACCO και 140Ru) στα δυο χρησιμοποιούμενα υποστρώματα (M₄ και M₄ με τύρφη και περλίτη) κατά τις δυο χρονικές στιγμές λήψης μετρήσεων (πριν και μετά τη σκληραγώγηση των τεσσάρων εβδομάδων).

ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΟ	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	ΧΡΟΝΟΣ ΣΚΛΗΡΑΓΩΓΗΣΗΣ	Ξ.Β. ΒΛ/ΦΥΤ(%)	Ξ.Β. ΡΙΖ/ΦΥΤ(%)
BACCO	M ₄	0 εβδ. σκληρ.	62,9	37,2
		4 εβδ. σκληρ.	74,7	25,2
	M ₄ +τύρφη+περλίτη	0 εβδ. σκληρ.	46,9	53,1
		4 εβδ. σκληρ.	78,5	21,5
140Ru	M ₄	0 εβδ. σκληρ.	60,7	39,3
		4 εβδ. σκληρ.	79,7	20,3
	M ₄ +τύρφη+περλίτη	0 εβδ. σκληρ.	32,9	67,1
		4. εβδ. σκληρ.	68,8	31,3

Σημαντικότητα	Ξ.Β.ΒΛ/ΦΥΤΟΥ	Ξ.Β.ΡΙΖ/ΦΥΤΟΥ
Υποκείμενο	*	*
Υπόστρωμα	***	***
Χρόνος σκληραγώγησης	***	***
Ε.Σ.Δ.	2,61	2,61

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

4 Συζήτηση

Η αύξηση *in vitro* των φυτών αμπέλου (BACCO και 140Ru) 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 τροφοπενικών 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, συσσωρεύσαν 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.

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.

Από το πείραμα αυτό 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 έκφυτο 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 τη 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 σκληραγωγή 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.

5

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 *in vitro*.
- ♦ 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 προσπάθεια του φυτού να ανταπεξέλθει στις ανάγκες πρόσληψης νερού. Η ανάπτυξη του βλαστού και ολόκληρου του φυτού αναστέλλεται σημαντικά.

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, (2003a). Acclimatization of tissue cultured plants. *In: www.oglesbytc.com*
- ✓ Anonymous (2003b). Effects of the physical environment on plant cultures. *In: www.ucdavis.edu*
- ✓ Barlass, M., and Skene, K. G. M. (1978). *In vitro* propagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) from fragmented shoot apices. *Vitis* 17: 335-340.
- ✓ Barlass, M., and Skene, K. G. M. (1980a). Studies on the fragmented shoot apex of grapevine. I. The regenerative capacity of leaf promordia fragments *in vitro*. *J. Exp. Bot.* 31 :483-488.
- ✓ Barlass, M., and Skene, K. G. M. (1980b). Studies on the fragmented shoot apex of grapevine. II. Factors affecting growth and differentiation *in vitro*. *J. Exp. Bot.* 31:489-495.
- ✓ Barlass, M., Skene, K. G. M., Woodham, R. C., and Krake, L.R. (1982). Regeneration of virus-free grapevines using *in vitro* apical culture. *J. appl. Biol.* 101: 291-295.
- ✓ Bini, G. (1976). Prove di cultura *in vitro* di meristemi apicali di *Vitis vinifera* L. *Riv. Ortoflorofruttic. Ital.* 60: 289-296.
- ✓ Chee, R., and Pool, R. M. (1983). *In vitro* vegetative propagation of *Vitis*: Application of previously defined culture conditions to a selection of genotypes. *Vitis* 22: 363-374.
- ✓ Chee, R., Pool, R. M. and Bucher, D. (1984). A method for large scale *in vitro* propagation of *Vitis*. *New York's Food and Life Sciences Bulletin*, No. 109. Geneva, NY: New York State Agricultural Experiment Station.
- ✓ Cholvadova, B. (1989). Cultivating of meristem cultures of the grapevine (*Vitis vinifera* L.). *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 Gimonet, G. (1995). Micropropagation of the grapevine: Results of 10 years of experiments in the champagne vineyard and results of the first vinification. *Am. J. Eno. Vitic.* 43: 571-578.
- ✓ Galzy, R. (1964). Technique de thermotherapie des viroses de la vigne. *Ann. Epiphytol.* 15: 245-256.
- ✓ Galzy, R. (1969). Recherchers sur la criossance de *Vitis rupestris* Scheele sain et court none cultive *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.
- ✓ Hoefler, L. L., and Gifford, E. M. (1964). Growth *in vitro* of excised stem tips of *Vitis vinifera*. Am. J. Bot. 51: 677 (abstract).
- ✓ Huang, 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 Feasibility, 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



004000074303