

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

**ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΙΔΩΝ
Arbutus unedo, *Erica carnea*, *Erica* × *darleyensis***



**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΜΕΡΕΤΗ ΜΑΡΙΑ**

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΓΕΩΡΓΙΟΣ ΝΑΝΟΣ



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

Αριθ. Εισ.: 91/1

Ημερ. Εισ.: 09-09-2003

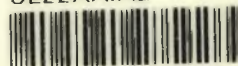
Δωρεά: _____

Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ - ΓΦΖΠ

1999

ΜΕΡ

ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000070239

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΚΑΙ ΖΩΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

**ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ ΕΙΔΩΝ
Arbutus unedo, *Erica carnea*, *Erica* × *darleyensis***

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΜΕΡΕΤΗ ΜΑΡΙΑ**

**ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ: Γ. Νάνος, Επ. Καθηγητής
Κ. Κίττας, Καθηγητής
Α. Οικονόμου, Καθηγητής**

ΒΟΛΟΣ 1999

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο και τις θερμοκηπιακές εγκαταστάσεις της εταιρίας ΒΙΤΡΟ ΕΛΛΑΣ στο Νησέλι Αλεξανδρείας, από το Μάρτιο ως το Νοέμβριο του 1998.

Ευχαριστώ τη διοίκηση της ΒΙΤΡΟ ΕΛΛΑΣ και ιδιαίτερα το διευθυντή της εταιρίας, Αθανάσιο Ταμπαρόπουλο, διότι μου παρείχε όλα τα μέσα και τις διευκολύνσεις για την εκτέλεση της εργασίας. Ιδιαίτερες ευχαριστίες εκφράζω στην υπεύθυνη παραγωγής της εταιρίας και γεωπόνο Κατερίνα Γρηγοριάδου, η οποία, σε συνεργασία με τον επίκουρο καθηγητή Δενδροκομίας Δρ. Γεώργιο Νάνο, μου πρότεινε το θέμα και παρακολούθησε τις εργασίες της μελέτης.

Ευχαριστώ τον επίκουρο καθηγητή Δενδροκομίας, του τμήματος Γεωπονίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Δρ. Γεώργιο Νάνο, διότι ανέλαβε την επίβλεψη της πτυχιακής διατριβής, παρακολούθησε την πορεία των εργασιών, παραχώρησε τον Η/Υ για την επεξεργασία του κειμένου και διόρθωσε το κείμενο της μελέτης. Ευχαριστώ επίσης τον καθηγητή του τμήματος Γεωπονίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλίας, Δρ. Κωνσταντίνο Κίττα και τον καθηγητή του τμήματος Γεωπονίας του Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης, Δρ. Αθανάσιο Οικονόμου, για τη συμμετοχή τους στην εξεταστική επιτροπή.

Τέλος ευχαριστώ την οικογένειά μου διότι μου συμπαραστάθηκε σε όλη τη διάρκεια των εργασιών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	1
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	2
2. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ	4
2.1. Βοτανικά χαρακτηριστικά	4
2.1.1. Βοτανική περιγραφή	4
2.1.2. Εξάπλωση – Οικολογικές απαιτήσεις – Χρησιμότητα	8
2.2. Πολλαπλασιασμός φυτών	8
2.2.1. Εγγενής πολλαπλασιασμός	9
2.2.2. Αγενής πολλαπλασιασμός	10
2.3. Μικροπολλαπλασιασμός – Ιστοκαλλιέργεια	15
2.3.1. Σύστημα μικροπολλαπλασιασμού και ιστοκαλλιέργειας	17
2.3.2. Προβλήματα κατά τη διάρκεια της ιστοκαλλιέργειας	21
2.3.3. Εργαστηριακός εξοπλισμός	23
2.3.4. Θερμοκηπιακές εγκαταστάσεις	27
2.3.5. Φυτώριο	30
2.3.6. Σύσταση θρεπτικών υποστρωμάτων	31
2.3.7. Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων	37
2.3.8. Επιφανειακή απολύμανση	37
2.3.9. Στάδια μικροπολλαπλασιασμού	38
2.3.10. Μικροπολλαπλασιασμός των <i>Ericaceae</i>	40
2.4. Σκοπός της εργασίας	42
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	43
3.1. <i>Arbutus unedo</i>	43
3.1.1. Ανάπτυξη μητρικών φυτών	43
3.1.2. Συλλογή και απολύμανση φυτικού υλικού	43
3.1.3. Εγκατάσταση εκφύτων	43
3.1.4. Πολλαπλασιασμός	44
3.1.5. Ριζοβολία εκφύτων (in vitro)	44
3.1.6. Ριζοβολία εκφύτων στο θερμοκήπιο (ex vitro)	46
3.2. <i>Erica carnea</i> (ποικιλία Springwood White)	47
3.2.1. Ανάπτυξη μητρικών φυτών	47
3.2.2. Συλλογή και απολύμανση φυτικού υλικού	47
3.2.3. Εγκατάσταση εκφύτων	47
3.2.4. Νέα συλλογή και απολύμανση φυτικού υλικού	48
3.2.5. Νέα εγκατάσταση εκφύτων	48
3.2.6. Πολλαπλασιασμός	48
3.2.7. Ριζοβολία εκφύτων (in vitro)	49
3.3. <i>Erica x darleyensis</i> (ποικιλία Silberschmelze)	50
3.3.1. Συλλογή και απολύμανση φυτικού υλικού	50
3.3.2. Εγκατάσταση εκφύτων	50
3.3.3. Πολλαπλασιασμός	50
3.3.4. Ριζοβολία εκφύτων (in vitro)	50
3.4. Στατιστική επεξεργασία	51

4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	58
4.1. <i>Arbutus unedo</i>	58
4.1.1. Εγκατάσταση εκφύτων	58
4.1.2. Πολλαπλασιασμός	61
4.1.3. Ριζοβολία εκφύτων (in vitro)	63
4.1.4. Ριζοβολία εκφύτων στο θερμοκήπιο (ex vitro)	65
4.2. <i>Erica carnea</i> (ποικιλία Springwood White)	67
4.2.1. Εγκατάσταση εκφύτων	67
4.2.2. Νέα εγκατάσταση εκφύτων	70
4.2.3. Πολλαπλασιασμός	71
4.2.4. Ριζοβολία εκφύτων (in vitro)	72
4.3. <i>Erica × darleyensis</i> (ποικιλία Silberschmelze)	72
4.3.1. Εγκατάσταση	72
4.3.2. Πολλαπλασιασμός	73
4.3.3. Ριζοβολία εκφύτων (in vitro)	74
5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	76
5.1. <i>Arbutus unedo</i>	76
5.2. <i>Erica carnea</i> (ποικιλία Springwood White)	79
5.3. <i>Erica × darleyensis</i> (ποικιλία Silberschmelze)	81
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	82

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η σημασία των ειδών *Arbutus unedo*, *Erica carnea* και *Erica × darleyensis* ως καλλωπιστικά φυτά οδηγεί στην ανάγκη εύρεσης ταχείας μεθόδου πολλαπλασιασμού τους. Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε ο μικροπολλαπλασιασμός των παραπάνω ειδών, και συγκεκριμένα διάφοροι τύποι υποστρωμάτων και διάφορα είδη ορμονών, για εγκατάσταση και πολλαπλασιασμό καθώς και για *in vitro* και *ex vitro* ριζοβολία. Η εγκατάσταση και ο πολλαπλασιασμός εκφύτων του *Arbutus unedo* σε υπόστρωμα Murashige & Skoog (MS), πιθανότατα λόγω παρουσίας υψηλής συγκέντρωσης αμμωνιακών και νιτρικών ιόντων, απέτυχαν λόγω εμφάνισης καφετιάσματος (Browning) και νέκρωσης ή μείωσης της ευρωστίας με την επανακαλλιέργεια. Έκφυτα που καλλιεργήθηκαν *in vitro* σε υπόστρωμα Woody Plant Medium (WPM) με προσθήκη 11.1 μM BA παράγαγαν ικανοποιητικό αριθμό παραγωγικών (μήκους > 1 cm) πλάγιων βλαστών. Η *in vitro* ριζοβολία σε υπόστρωμα MS παρουσία NAA και ελάχιστης IBA ήταν μερικά ικανοποιητική, ενώ ποικιλία άλλων συνδυασμών αυξινών, φλορογλυκίνης και ενεργού άνθρακα δεν βελτίωσαν το αποτέλεσμα. Η *ex vitro* ριζοβολία ήταν ικανοποιητική σε σύστημα υδρονέφωσης και μικρότερη σε σύστημα ομίχλης. Καλύτερη ριζοβολία είχαν τα έκφυτα που προέρχονταν από καλλιέργεια σε υπόστρωμα WPM. Έκφυτα της *Erica carnea* παρουσίασαν καθυστερημένα τεράστιες απώλειες από διασυστηματικές μολύνσεις με βακτήρια. Ψεκάσμος του μητρικού φυτού με διασυστηματικό μυκητοκτόνο και αντιβιοτικό, καθώς και απολύμανση στην εγκατάσταση με HgCl₂, εκμηδένισαν τις απώλειες από διασυστηματικά βακτήρια. Έκφυτα που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα MS, παράγαγαν λίγους βλαστούς, ενώ συχνά παρουσίασαν νέκρωση της κορυφής με αποτέλεσμα την ξήρανσή τους. Ικανοποιητικό υπόστρωμα για την εγκατάσταση και τον πολλαπλασιασμό της *Erica carnea* βρέθηκε αυτό του Anderson παρουσία 2iP και IAA, ενώ η BA δεν βοήθησε στον πολλαπλασιασμό. *In vitro* ριζοβολία σε υπόστρωμα MS παρουσία διαφόρων συνδυασμών και συγκεντρώσεων αυξινών, φλορογλυκίνης και ενεργού άνθρακα απέτυχε. Έκφυτα της *Erica × darleyensis* εγκαταστάθηκαν και πολλαπλασιάστηκαν με επιτυχία όπως και στην *Erica carnea*. Κατά τον πολλαπλασιασμό παρουσιάστηκε το φαινόμενο των ακανόνιστων κυτταροδιαίρεσεων που έχει βρεθεί επανειλημμένα σε ποικιλίες ροδόδενδρου. Η ριζοβολία των εκφύτων με ελάχιστη ή καθόλου ορμόνη έδωσε μόνο ελάχιστες, ασθενικές ρίζες μετά από μακρά παραμονή στο μέσο ριζοβολίας.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα περισσότερα οπωροφόρα δένδρα και πολλά καλλωπιστικά δένδρα και θάμνοι, δεν αναπαράγονται πιστά γενετικά, ως προς το τύπο, από σπόρο, με αποτέλεσμα τα θυγατρικά φυτά να παραλλάσσουν γενετικά και φαινοτυπικά. Επίσης, η ταχύτητα με την οποία μπορεί να αναπαραχθεί και να φτάσει στην ωριμότητα για παραγωγή ανθέων και καρπών με αγενή πολλαπλασιασμό, είναι πολύ μεγάλη σε σχέση με την αντίστοιχη ταχύτητα ενός σπορόφυτου. Οι δυο αυτές σπουδαιότερες ιδιότητες του αγενούς πολλαπλασιασμού είναι οι κυριότεροι λόγοι εφαρμογής και εξάπλωσής του.

Η σημαντικότερη από τις τεχνικές αγενούς πολλαπλασιασμού είναι ο μικροπολλαπλασιασμός - ιστοκαλλιέργεια, που εξασφαλίζει την ταχύτερη κλωνική αναπαραγωγή, την υψηλή παραγωγή φυτών σε σύντομο χρονικό διάστημα, σε περιορισμένο χώρο και ανεξάρτητα εποχής και την παραγωγή φυτικού πολλαπλασιαστικού υλικού απαλλαγμένου από ιώσεις. Πρέπει να σημειωθεί ακόμη ότι για μερικά είδη (κυρίως γλαστρικά και κηποτεχνικά εξωτερικού χώρου), ο μικροπολλαπλασιασμός είναι η μοναδική εμπορική μέθοδος πολλαπλασιασμού.

Ο μικροπολλαπλασιασμός αποτελεί σήμερα το μοναδικό τρόπο αναπαραγωγής του ροδόδενδρου (οικογ. *Ericaceae*) και η παραγωγή του κυμαίνεται στα 3.9 εκατομμύρια φυτά το χρόνο, μόνο στην Ευρώπη. Η μεγάλη αυτή εφαρμογή του μικροπολλαπλασιασμού στα ροδόδενδρα οφείλεται στο γεγονός ότι τα μοσχεύματα ριζοβολούν πολύ δύσκολα στο θερμοκήπιο (Anderson, 1975). Το ίδιο όμως ισχύει και για άλλα σημαντικά ανθοκομικά είδη της οικογένειας *Ericaceae*. Κάποια από αυτά χρησιμοποιούνται ως γλαστρικά για τη διακόσμηση εσωτερικών χώρων, ενώ κάποια άλλα στην αρχιτεκτονική τοπίου και διαμόρφωση κήπων και πάρκων. Τα περισσότερα είδη δεν ανέχονται τα αλκαλικά εδάφη, με τη βοήθεια όμως της γενετικής, έχουν δημιουργηθεί ποικιλίες που αντέχουν ικανοποιητικά στο ασβέστιο του εδάφους, γεγονός ιδιαίτερης σημασίας για τα συχνά ασβεστολιθικής προέλευσης εδάφη της Ελλάδας.

Δυο άγρια γένη της οικογένειας *Ericaceae*, το *Arbutus* και το *Erica*, απαντούν κυρίως σε δασικές εκτάσεις των παραμεσόγειων χωρών. Στην Ελλάδα, τα είδη *Arbutus unedo* και *Erica carnea* είναι αυτοφυή ενώ πρόσφατα παρουσιάζουν ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως καλλωπιστικά εξωτερικών χώρων. Πολυάριθμες ποικιλίες

των ειδών *Erica carnea* και *Erica* × *darleyensis*, ανέχονται τα αλκαλικά εδάφη και ανθίζουν το χειμώνα, δυο πλεονεκτήματα που έχουν τεράστια οικονομική σημασία.

Κατόπιν των ανωτέρω, η ανάπτυξη πρωτοκόλλων μικροπολλαπλασιασμού, με στόχο τη βέλτιστη και ταχεία αναπαραγωγή των *Arbutus unedo*, *Erica carnea* (ποικιλία Springwood White) και *Erica* × *darleyensis* (ποικιλία Silberschmelze), θα έχει οικονομικό και ερευνητικό ενδιαφέρον.

2. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

2.1. ΒΟΤΑΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

2.1.1. Βοτανική περιγραφή

Τα γένη *Erica* και *Arbutus* ανήκουν στη τάξη *Ericales* και οικογένεια *Ericaceae* ή Ερεικίδες των Αγγειόσπερμων Δικοτυλήδονων φυτών. Η τάξη *Ericales* περιλαμβάνει περίπου 80 γένη και 2500 είδη. Αυτά εξαπλώνονται κυρίως στις εύκρατες και ψυχρές περιοχές της γης, στα ψηλά βουνά των τροπικών και κατά προτίμηση στα όξινα εδάφη.

Στην οικογένεια *Ericaceae* ανήκουν μικροί ή μεγάλοι αείφυλλοι θάμνοι, με φύλλα χωρίς παράφυλλα. Τα άνθη τους είναι συνήθως ακτινόμορφα τετραμερή ή πενταμερή, μονήρη κατά μασχालιαίες δέσμες, δηλαδή πολλά μαζί στις μασχάλες των φύλλων ή κατά βοτρυώδεις ταξιανθίες. Τα πέταλα συνήθως είναι συμφυή, οι στήμονες ίσοι ή διπλάσιοι από τα πέταλα, συνήθως ελεύθεροι, μερικές φορές όμως προσφύονται στο κατώτερο τμήμα της στεφάνης. Οι ανθήρες ανοίγουν με πόρους. Η ωοθήκη είναι επιφυής και αποτελείται από 4-5 καρπόφυλλα με απλό στύλο. Ο καρπός είναι κάψα, δρύπη ή ράγα.

Οι Ερεικίδες περιλαμβάνουν είδη που είναι χαρακτηριστικά ορισμένων φυτικών διαπλάσεων, όπως τα μακκί και οι ερεικώνες, περιλαμβάνουν επίσης είδη που καλλιεργούνται ως διακοσμητικά (Εκπαιδευτική Ελληνική Εγκυκλοπαίδεια, 1983).

Τα κυριότερα γένη της οικογένειας είναι: *Rhododendron* (αζαλέα και συγγενή είδη), *Arbutus* και *Erica*, ενώ κάποια άλλα μικρότερης σημασίας είναι τα εξής: *Vaccinium* (οπωροφόρα), *Arctostaphylos*, *Cassiope*, *Bruckenthalia*, *Calluna*, *Loiseleuria*, *Ledum*, *Daboecia*, *Phyllodoce* και *Andromeda* (Polunin, 1969).

Το γένος *Rhododendron* περιλαμβάνει περισσότερα από 600 είδη, πολλά από τα οποία καθώς και πολυάριθμα υβρίδιά τους, καλλιεργούνται ως διακοσμητικά, γνωστά με τα ονόματα ροδόδενδρο και αζαλέα.

Το γένος *Arbutus* (Άρβουτος) περιλαμβάνει περίπου 20 είδη. Η κουμαριά ήταν γνωστή από την αρχαιότητα και αναφέρεται με το όνομα «κόμαρος» (Θεόφραστος, Διοσκουρίδης).

Η Άρβουτος η κοινή (*Arbutus unedo*), κν. κουμαριά, εμφανίζεται με διάφορες καλλιεργήσιμες ποικιλίες, όπως με φύλλα ακέραια, άνθη κόκκινα κ.α. Είναι μεγάλος θάμνος, ύψους 1-3 m ή σπάνια μικρό δέντρο, αείφυλλο, με κορμό σκεπασμένο σε περιοχές, με τμήματα κοκκινοκάστανου ξηρού φλοιού. Τα φύλλα της είναι απλά

δερματώδη, λεία, βραχύμισχα, επιμήκη ως λογχοειδή, συνήθως πριονωτά, τοποθετημένα σε εναλλασσόμενη τάξη. Γενικά έχουν χρώμα βαθύ πράσινο στην επάνω επιφάνεια, και ανοιχτό πράσινο στην κάτω, όπου το κεντρικό νεύρο προεξέχει εμφανώς.

Τα άνθη της κουμαριάς εμφανίζονται από το φθινόπωρο και είναι λευκά, λευκοπράσινα ή λευκορόδινα. Έχουν μικρό ποδίσκο, κάμπτονται προς τα κάτω και καθώς φύονται πολλά μαζί σχηματίζουν επάκριες ταξιανθίες (βότρυς ή φόβη).

Ο καρπός είναι σφαιρική ράγα (διαμέτρου 1.5-2 cm) με κοκκώδη επιφάνεια φλοιού και πολλά σπέρματα. Αρχικά είναι κίτρινος, όταν όμως ωριμάσει (από το τέλος Οκτωβρίου ως τον Ιανουάριο) γίνεται ζωηρά κόκκινος. Ο καρπός της κουμαριάς (κούμαρο) είναι εδώδιμος, σαν νωπός ή για παρασκευή ποτών.

Άλλο είδος είναι η Άρβουτος η ανδράχνη (*Arbutus andrachne*) κν. αγριοκουμαριά. Φέρει φύλλα ακέραια, ωοειδή, με βάση αποστρογγυλεμένη και τα άνθη της εμφανίζονται την άνοιξη.

Τα πιο αξιόλογα, από τα συγγενή ξενικά είδη που καλλιεργούνται και ως διακοσμητικά, είναι: η Άρβουτος η κανάρειος (*Arbutus canariensis*), δενδρύλλιο ύψους 3-10 m και η Άρβουτος η πυκνανθής (*Arbutus densiflora*), δενδρύλλιο ύψους περίπου 6 m, ιθαγενές του Μεξικού (Εκπαιδευτική Ελληνική Εγκυκλοπαίδεια, 1983).

Η ποικιλία – υβρίδιο που προήλθε από τη διασταύρωση των ειδών *A. unedo* και *A. andrachne*, ονομάζεται *Arbutus × andrachnoides*, ανθίζει αργά το φθινόπωρο και έχει εντυπωσιακό κόκκινο φλοιό (Αnonymous, 1993).

Στο γένος *Erica* (Ερείκη) ανήκουν μικροί θάμνοι που αποτελούν χαρακτηριστικά είδη της διάπλασης των ερεικώνων, δηλαδή ενός τύπου βλάστησης όπου κυριαρχούν τα είδη αυτά (Εκπαιδευτική Ελληνική Εγκυκλοπαίδεια, 1983).

Οι θάμνοι, που ανήκουν στο γένος αυτό, είναι αείφυλλοι, συνήθως μικρού ύψους, με μικρά, στενά, λογχοειδή φύλλα. Τα άνθη είναι μικρά, πολυάριθμα και σχηματίζονται στα άκρα των βλαστών. Ο κάλυκας φέρει 4 πράσινα σέπαλα, η στεφάνη είναι κυλινδρική με 4 λοβούς, σε διάφορα χρώματα και οι στήμονες είναι 8. Ο καρπός είναι κάψα (Polunin, 1969).

Το είδος *Erica carnea* (*E. herbacea*) περιλαμβάνει νάνους θάμνους, ύψους μέχρι 25 cm. Τα φύλλα είναι απλά, οξύληκτα, μήκους 5-8 mm και τοποθετημένα συνήθως γραμμικά ανά 4, σε κάθε γόνατο. Τα άνθη είναι μικρά με υποτυπώδη κάλυκα και ωοθήκη. Η στεφάνη είναι κυλινδρική, 5-6 mm, με λοβούς (Tutin et al, 1972).

Πίνακας 1. Είδη του γένους *Erica*, μερικές ποικιλίες αυτών και τα κυριότερα χαρακτηριστικά του (Anonymous, 1993).

Είδος	Ποικιλία	Χαρακτηριστικά ποικιλίας
arborea Φέρει άσπρα αρωματικά άνθη. Ανθίζει την άνοιξη.	Albert' s Gold	Λαμπερό κίτρινο φύλλωμα
	alpina	Λαμπερό πράσινο φύλλωμα
Australis Φέρει κόκκινα ή βιολέ άνθη. Ανθίζει Απρίλιο- Μάιο.	Mr Robert	Άσπρα άνθη
	Riverslea	Φούξια ή βιολέ άνθη
carnea Φέρει κόκκινα άνθη το χειμώνα. Υπάρχουν πολύαριθμες ποικιλίες που όλες ανέχονται το ασβέστιο.	Ann Sparkes	Λαμπερό κίτρινο φύλλωμα, βιολέ άνθη
	December Red	Βαθύ πράσινο φύλλωμα, κόκκινα άνθη, ανθίζει Ιανουάριο – Απρίλιο
	Eileen Porter	Κόκκινα άνθη, ανθίζει Οκτώβριο – Απρίλιο
	Foxhollow	Κίτρινο φύλλωμα που χρωματίζεται κόκκινο το χειμώνα, ροζ άνθη
	Loughrigg	Βαθύ πράσινο φύλλωμα, ροζ ή βιολέ άνθη, ανθίζει Ιανουάριο – Μάρτιο
	Myretoun Ruby	Βαθύ πράσινο φύλλωμα, μεγάλα βαθυκόκκινα άνθη
	Pink Spangles	Άφθονα ροζ άνθη το χειμώνα
	Praecox Rubra	Βαθυκόκκινα άνθη, ανθίζει Νοέμβριο – Μάρτιο
	Ruby Glow	Μπρούτζινο φύλλωμα, πολυάριθμα βαθυκόκκινα άνθη, ανθίζει τον Απρίλιο
	Springwood Pink	Κόκκινα άνθη, ανθίζει Ιανουάριο – Μάρτιο
ciliaris Φέρει μεγάλα κόκκινα άνθη. Ανθίζει Ιούλιο - Οκτώβριο	Mrs. C. H. Gill	Βαθυπράσινο φύλλωμα, κόκκινα άνθη, ύψος άνω των 30 cm
	Stoborough	άσπρα άνθη, ύψος 50-60 cm
cinerea Φέρει βιολέ άνθη, δυνατούς βλαστούς με ύψος 23-30 cm. Ανθίζει Ιούνιο - Σεπτέμβριο	Alba Minor	Άσπρα άνθη, ύψος 15 cm
	Atrosanguinea Smith' s Variety	Βαθυπράσινο φύλλωμα, κατακόκκινα άνθη, ύψος 15 cm
	C. D. Eason	Ροζ άνθη
	Eden Valley	Ροζ ή βιολέ άνθη ανοιχτόχρωμα στη βάση

	Golden Hue Pink Ice Velvet Night	τους, ύψος 15 cm Λαμπερό κίτρινο φύλλωμα που γίνεται κόκκινο το χειμώνα, ύψος 50 cm Συμπαγές φυτό, λαμπερό πράσινο φύλλωμα, ροζ άνθη Βιολέ άνθη
× <i>darleyensis</i> Ανθίζει το χειμώνα, ανέχεται το Ca, ύψος 50-60 cm.	Arthur Johnson George Rendall Silberschmelze	Κόκκινα άνθη Πολυάριθμα ροζ άνθη Άσπρα άνθη με ευχάριστο άρωμα
<i>erigena</i> Φέρει κόκκινα αρωματικά άνθη, ανθίζει Μάρτιο – Μάιο, ανέχεται το Ca.	Brightness Irish Dusk W. T. Rackliff	Μπρούτζινοι-κοκκινωποί οφθαλμοί που καταλήγουν σε ροζ άνθη, ύψος 0.6-1 m Συμπαγές φυτό, βαθυπράσινο φύλλωμα, ροζ άνθη, ύψος 45 cm Βαθυπράσινο φύλλωμα, ελάχιστα άσπρα άνθη με καστανούς ανθήρες
<i>lusitanica</i> Φέρει άσπρα αρωματικά άνθη και ροζ οφθαλμούς. Ανθίζει μετά το Δεκέμβριο		
<i>terminalis</i> Φέρει κόκκινα άνθη, ανθίζει αργά το καλοκαίρι και ανέχεται το Ca.		
<i>tetralix</i> Φέρει κόκκινα άνθη, ανθίζει Ιούνιο-Οκτώβριο, ύψος 20-50 cm.	Alba Mollis Con Underwood L. E. Underwood	Γκριζωπό φύλλωμα, άσπρα άνθη Γκριζοπράσινο φύλλωμα, βυσσινί άνθη Γκριζωπό φύλλωμα, ροζ άνθη
<i>vagans</i> Ανθίζει Ιούλιο – Οκτώβριο σε μεγάλους βλαστούς	Lyonesse Mrs. D. F. Maxwell St. KeverneValerie Proudley	Άσπρα άνθη με καστανούς ανθήρες, ύψος 0.5-1m Βαθυκόκκινα άνθη, ύψος 50 cm Ροζ άνθη, ύψος 50 cm Λαμπερό κίτρινο φύλλωμα, άσπρα άνθη
× <i>veitchii</i>	Exeter	Λαμπερό πράσινο φύλλωμα, άσπρα αρωματικά άνθη, ανθίζει την άνοιξη

2.1.2. Εξάπλωση – Οικολογικές απαιτήσεις – Χρησιμότητα

Τα διάφορα είδη του γένους *Arbutus*, απαντούν στις παραμεσόγειες χώρες και στη Β. και Κ. Αμερική. Στην Ελλάδα απαντούν αυτοφυή τα είδη *A. unedo* και *A. andrachne*. Τα είδη αυτά απαντούν σε όλες τις περιοχές της χώρας μας, στους θαμνότοπους της ζώνης των σκληρόφυλλων – αείφυλλων – πλατύφυλλων.

Η κουμαριά ευδοκμεί σε καλά στραγγιζόμενα εδάφη, ελαφρά και γόνιμα εδάφη, σε θέσεις που προστατεύονται από τους ανέμους. Είναι από τα λίγα είδη των Ερεικίδων που ανέχονται τα ασβεστολιθικά εδάφη.

Η κουμαριά είναι φυτό δασικό ενώ χρησιμοποιείται και ως διακοσμητικό σε πάρκα και άλση.

Οι καρποί, τα κούμαρα, είναι εδώδιμοι, μπορούν να αποτελέσουν εξαιρετικό και ιδιότυπο έδεσμα, έχουν μάλιστα διουρητικές και στυπτικές ιδιότητες. Στην Κ. Ευρώπη χρησιμοποιούνται για την παρασκευή κρασιού, κονιάκ και ενός ηδύποτου που λέγεται κουμαρόκρεμα και διευκολύνει την πέψη. Σε ορισμένες περιοχές παρασκευάζεται, με ζύμωση και απόσταξη, οινόπνευμα και τσίπουρο.

Το ξύλο της κουμαριάς έχει χρώμα λευκό ως ερυθρόλευκο, είναι σκληρό, βαρύ και χρησιμοποιείται για την κατασκευή μικροαντικειμένων, καλής ποιότητας κάρβουνο και ως καυσόξυλο. Ο φλοιός της περιέχει ταννίνη, που στην Ελλάδα χρησιμοποιείται στην επεξεργασία δερμάτων (Εκπαιδευτική Ελληνική Εγκυκλοπαίδεια, 1983).

Τα είδη του γένους *Erica* απαντούν κυρίως στις παραμεσόγειες χώρες και λιγότερο στη Γερμανία, Αυστρία, Αγγλία και Ελβετία (Tutin et al, 1972).

Στην Ελλάδα απαντούν τρία είδη, γνωστά με το όνομα ρείκια. Το *E. arborea* και το *E. verticilata* ή χαμορείκι, απαντώνται σε θαμνότοπους, στα χαμηλότερα μέρη των βουνών, κυρίως στα νότια διαμερίσματα της χώρας. Το *E. carnea* είναι φυτό μεγάλου υψόμετρου και συναντάται κυρίως στα βουνά της Β. Ελλάδας (Σφήκας, 1983).

Τα διάφορα είδη, γενικά, δεν αντέχουν στο ασβέστιο του εδάφους. Οι ποικιλίες όμως της *E. carnea*, που αναφέρονται στον Πίνακα 1, ανέχονται τα αλκαλικά εδάφη.

Οι ποικιλίες της φέρουν άνθη διαφόρων χρωμάτων, κάποιες ανθίζουν το χειμώνα και κάποιες άλλες νωρίς την άνοιξη. Παρουσιάζουν έτσι ιδιαίτερο ενδιαφέρον ως διακοσμητικά εξωτερικών χώρων (Anonymus, 1993).

2.2. ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΦΥΤΩΝ

Η συστηματική και εντατική καλλιέργεια των φυτών με σκοπό την παραγωγή καταναλωτικών αγαθών, ποικίλων φυτικών προϊόντων και υπηρεσιών αποτελεί μια

από τις αρχαιότερες και πλέον θεμελιώδεις ασχολίες του ανθρώπου. Η γεωργική καλλιέργεια των φυτών άρχισε από τότε που άρχισε και ο πολιτισμός, ίσως πριν 10.000 χρόνια. Στην πορεία της εξέλιξης ο άνθρωπος έμαθε να επιλέγει και να καλλιεργεί ορισμένα μόνο είδη από την τεράστια ποικιλία που υπάρχουν στη φύση. Δημιούργησε ποικιλίες, όχι μόνο για φυτά με βρώσιμα προϊόντα, αλλά και για φυτά που τα προϊόντα τους χρησιμοποιούνται για παραγωγή ίνας, φαρμάκων και ως καλλωπιστικά.

Οι ανάγκες της σύγχρονης γεωργίας για μεγαλύτερη απόδοση των φυτών και καλύτερη ποιότητα καρπού και άνθους, απαιτούν τη χρησιμοποίηση κατάλληλου και υγιούς φυτικού πολλαπλασιαστικού υλικού. Ως **πολλαπλασιαστικό υλικό** εννοείται κάθε μέσο εγγενούς ή αγενούς αναπαραγωγής, το οποίο χρησιμοποιείται από τον άνθρωπο για την αύξηση του αριθμού των καλλιεργούμενων φυτών, σε αντιδιαστολή με την αναπαραγωγή των φυτών στη φύση.

Το πρώτο κριτήριο που λαμβάνεται υπόψη για την παραγωγή πολλαπλασιαστικού υλικού είναι ο φυσικός τρόπος αναπαραγωγής των φυτών, απαιτούνται όμως και άλλες προϋποθέσεις. Τέτοιες είναι οι κατάλληλοι χειρισμοί και η τεχνική επιδεξιότητα που αποκτώνται με εξάσκηση και εμπειρία, όπως στους εμβολιασμούς, η επιστημονική γνώση της μορφολογίας, ανατομίας, φυσιολογίας, ταξινομικής και γενετικής των φυτών, καθώς και η γνώση των μεθόδων με τις οποίες τα διάφορα φυτά μπορούν να αναπαραχθούν (Ελευθερίου, 1994).

2.2.1. Εγγενής πολλαπλασιασμός

Ο **εγγενής πολλαπλασιασμός** πραγματοποιείται με την αναπαραγωγή με τη βοήθεια σπόρων.

Από οικονομικής άποψης οι σπόροι χρησιμεύουν όχι μόνο για την παραγωγή εδώδιμων προϊόντων, αλλά και για την αύξηση του αριθμού των φυτών. Στα οπωροκηπευτικά οι σπόροι αποτελούν την κύρια μέθοδο πολλαπλασιασμού των φυτών εκείνων, που αναπαράγονται πιστά ή σχεδόν πιστά ως προς τον τύπο. Ακόμα χρησιμοποιούνται για την παραγωγή των υποκειμένων ορισμένων οπωροφόρων δένδρων, τα οποία ακολούθως εμβολιάζονται με την επιθυμητή ποικιλία, καθώς επίσης και για τη δημιουργία νέων ποικιλιών με υβριδισμό.

Η προέλευση, ο σχηματισμός και η ανάπτυξη του σπόρου περιλαμβάνει τις εξής φάσεις: α) σχηματισμός μητρικού κυτταρικού μικροσπορίου, β) μικροσποριογένεση, γ) σχηματισμός μητρικού κυτταρικού μεγασπορίου, δ) μεγασποριογένεση και ε)

γονιμοποίηση (βλάστηση γύρης, συγχώνευση πυρήνων, σχηματισμός ζυγωτού κυττάρου).

Το ζυγωτό κύτταρο κληρονομεί χαρακτηριστικά αμφοτέρων των γονέων, θηλυκού και αρσενικού. Αν οι γονείς είναι όμοιοι γενετικά, το νέο φυτό θα τους μοιάζει. Αν όμως οι γονείς διαφέρουν γενετικά, το νέο φυτό θα φέρει χαρακτηριστικά και των δύο γονέων, είτε θα μοιάζει στη μητέρα σε μερικούς χαρακτήρες, και στον πατέρα σ' άλλους. Ακόμα θα φέρει και χαρακτήρες των γονέων σε συνδυασμό. Η εγγενής αναπαραγωγή μπορεί να καταλήξει σε απόγονους απόλυτα όμοιους με τους γονείς, όταν αυτοί είναι σχεδόν ομοζύγωτοι, ή απόλυτα παραλλάσσοντες, όταν αυτοί είναι ετεροζύγωτοι. Στη βελτίωση των φυτών, η παραλλακτικότητα, που παράγεται δια του εγγενούς πολλαπλασιασμού, ενέχει οικονομική σημασία στην ανάπτυξη νέων ποικιλιών ή πληθυσμών. Στη μαζική όμως παραγωγή των φυτών, η παραλλακτικότητα αυτή είναι ανεπιθύμητο γνώρισμα του εγγενούς πολλαπλασιασμού (Ποντίκης, 1994).

2.2.2. Αγενής πολλαπλασιασμός

Ο αγενής πολλαπλασιασμός γίνεται με διάφορα βλασθητικά τμήματα των φυτών τα οποία μπορούν να αναπαράγουν το αρχικό φυτό χωρίς τη μεσολάβηση της φυλετικής διαδικασίας. Η αναπαραγωγή του φυτού γίνεται με μιτωτικές διαιρέσεις σωματικών κυττάρων, γι' αυτό ο αγενής πολλαπλασιασμός χαρακτηρίζεται και ως **σωματικός**. Ο αγενής ή σωματικός πολλαπλασιασμός βασίζεται στην ύπαρξη μεριστωμάτων σε διάφορες θέσεις του φυτικού σώματος (κορυφές βλαστών και ριζών, μασχαλιαίοι οφθαλμοί, κάμβια), αλλά και στην ολοδυναμικότητα των φυτικών κυττάρων, τα οποία, αν και σε κάποιο βαθμό διαφοροποιημένα, μπορεί να επαναποκτήσουν μεριστωματικές ιδιότητες και να αναγεννήσουν το αρχικό φυτό.

Το κύριο γνώρισμα του αγενούς πολλαπλασιασμού είναι ότι γίνεται χωρίς καμιά μεταβολή της γενετικής σύστασης και τα φυτά που παράγονται είναι γενετικά πανομοιότυπα με τα μητρικά φυτά. Η ιδιότητα αυτή βρίσκει ευρεία εφαρμογή στην πράξη. Εκλεκτές ποικιλίες φυτών που δημιουργούνται με οποιοδήποτε τρόπο μπορούν να διατηρηθούν αναλλοίωτες θεωρητικά απεριόριστα εάν έχουν την ικανότητα της αγενούς αναπαραγωγής. Η ιδιότητα αυτή εφαρμόζεται κυρίως στην καλλιέργεια οπωροφόρων και ανθοκομικών. Αυτές οι ομάδες φυτών που έχουν ένα κοινό πρόγονο και αναπαράγονται αγενώς αποτελούν ένα κλώνο (Ελευθερίου, 1994).

2.2.2.1. Λόγοι εφαρμογής αγενούς πολλαπλασιασμού

Οι κυριότεροι λόγοι εφαρμογής του αγενούς πολλαπλασιασμού είναι οι εξής:

A) Η ανικανότητα παραγωγής ζωτικών σπόρων. Τα φυτά αναπαράγονται αγενώς, γιατί είτε δεν είχαν είτε έχουν χάσει την ικανότητα να αναπαραχθούν εγγενώς με σπόρο. Πολλά από τα κατώτερα φυτά ή τα φυτά που δεν ανθίζουν δεν είναι δυνατόν να παράγουν σπόρους, αν και παράγουν σπόρια, τα οποία μπορεί να θεωρηθούν οι πρόδρομοι των σπόρων. Τα φυτά αυτά αναπαράγονται αγενώς με βλαστικά όργανα. Επίσης πολλά από τα ανώτερα φυτά, που παράγουν άνθη, δεν παράγουν ζωτικούς σπόρους και γι' αυτό πρέπει να αναπαραχθούν αγενώς, αν πρόκειται να διαιωνιστούν. Κατά την εξέλιξη του φυτικού βασιλείου, που έλαβε χώρα δια μέσου εκατομμυρίων ετών, είναι φανερό ότι κατά την ανάπτυξη από το απλούστερο στο πιο περίπλοκο, μερικά από τα ονομαζόμενα ανώτερα φυτά είτε δεν έχουν αναπτύξει λειτουργικά σεξουαλικά όργανα, είτε, αν έχουν αναπτύξει, έχουν γίνει μερικώς ή πλήρως άγονα.

Πολλά μηλοειδή αποτελούν κλασικά παραδείγματα της ανικανότητας του φυτού να παράγει σπόρο ικανό για φύτευμα. Από τους πιο γνωστούς καρπούς, που δεν παράγουν ζωτικούς σπόρους, είναι ο ανανάς, το πορτοκάλι Μέρλιν, η εδώδιμη μπανάνα και μερικές ποικιλίες συκιάς. Επίσης πολλά κηπευτικά φυτά, όπως είναι η γλυκοπατάτα, εμπορικά πολλαπλασιάζονται αγενώς, γιατί σπάνια παράγουν ζωτικούς σπόρους. Το ίδιο παρατηρείται και σε πολλά καλλωπιστικά φυτά, όπως στο *Viburnum macrocephalum*.

B) Η ανικανότητα να αναπαραχθούν πιστά γενετικά, ως προς τον τύπο, από σπόρο. Πολλά φυτά παράγουν άνθη, τα οποία είναι επιδεκτικά στη σταυρογονιμοποίηση, και κατά συνέπεια παράγουν σπόρους, που παραλλάσσουν γενετικά. Τα πιο πολλά από τα οπωροφόρα δένδρα, όπως το μήλο, το αχλάδι, το ροδάκινο, το κεράσι, κ.α. δεν αναπαράγονται πιστά από σπόρο και πρέπει να αναπαραχθούν αγενώς. Αυτό παρατηρείται και σε πολλά καλλωπιστικά δένδρα και θάμνους. Τα πιο πολλά από τα διετή και πολυετή οπωροκηπευτικά δεν παράγουν σπόρους, για να αναπαραχθούν πιστά γενετικά. Πολλά όμως από τα ετήσια ανθοκομικά φυτά και τα πιο πολλά κηπευτικά δια προσεκτικής επιλογής, διαλογής και της ενδεδειγμένης τοποθέτησης των σποροπαραγωγικών τεμαχίων αναπαράγονται πιστά γενετικά με σπόρο.

Γ) Η διαιώνιση ενός ιδιαίτερου χαρακτηριστικού του φυτού. Τα φυτά μπορεί να αναπαραχθούν αγενώς για να διαιωνίσουμε ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του φυτού. Ο χαρακτήρας νεανικότητας μιας ποικιλίας ενός φυτού διαφέρει από το χαρακτήρα

ενηλικιώσης και είναι μερικές φορές επιθυμητό να διατηρήσουμε το χαρακτήρα νεανικότητας με τη μέθοδο του αγενούς πολλαπλασιασμού.

Δ) Η επιτάχυνση αύξησης του αριθμού των φυτών. Πολλά φυτά αναπαράγονται με βλαστικά όργανα λόγω της ταχύτητας και ευκολίας αύξησης του αριθμού των φυτών. Η ταχύτητα έχει ιδιαίτερη σημασία στη χουρμαδιά, η οποία μπορεί να αναπαραχθεί και να φθάσει στο παραγωγικό στάδιο γρήγορα από ένα μεγάλο μόσχευμα, ενώ θα χρειαζόνταν αρκετά χρόνια για να φθάσει στο μέγεθος αυτό από σπόρο. Σε πολλές περιπτώσεις ο αριθμός των αναπαραγόμενων οπωροφόρων δένδρων αυξάνει γρηγορότερα, αν πολλαπλασιάζονται με καταβολάδες ή μοσχεύματα, παρά όταν πολλαπλασιάζονται από σπόρο. Τέλος με τη χρήση του μικροπολλαπλασιασμού, από την καλλιέργεια ενός μόνο εκφύτου μπορούν να παραχθούν πολλές εκατοντάδες χιλιάδες φυτά ετησίως.

Ε) Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα παθογόνα. Τα φυτά πολλαπλασιάζονται με βλαστικά όργανα για να αυξήσουν την ανθεκτικότητά τους στα παθογόνα. Το ριζικό σύστημα της Ευρωπαϊκής αμπέλου προσβάλλεται σοβαρά από τη φυλλοξήρα, ενώ το Αμερικάνικο είδος έχει ριζικό σύστημα που είναι ανθεκτικό στη φυλλοξήρα. Συνεπώς οι ποικιλίες του Ευρωπαϊκού είδους εμβολιάζονται σε ανθεκτικά Αμερικάνικα υποκείμενα. Επίσης, η πορτοκαλιά, που είναι πολύ ευαίσθητη στη φυτόφθορα, δεν χρησιμοποιείται ως υποκείμενο των εσπεριδοειδών σε περιοχές όπου ενδημεί ο μύκητας αυτός.

Ο λόγος αυτός του αγενούς πολλαπλασιασμού έχει κάποια σημασία για μερικά καλλωπιστικά φυτά και λαχανικά.

Στ) Η περιβαλλοντική προσαρμογή. Σε πολλές περιπτώσεις ο μόνος λόγος πολλαπλασιασμού των φυτών με βλαστικά όργανα είναι η βελτίωση της προσαρμοστικότητας του φυτού σε μια συγκεκριμένη περιοχή δια μέσου της επιλογής διαφόρων υποκειμένων για πολλά οπωροφόρα δένδρα.

Ζ) Ο έλεγχος της ζωηρότητας της βλάστησης. Συχνά είναι επιθυμητός ο έλεγχος της βλάστησης του φυτού και αυτό επιτυγχάνεται με τον αγενή πολλαπλασιασμό. Για να δημιουργήσουμε νάνα φυτά, τα οποία θα παραμείνουν μικρά σε όγκο και κατά την πλήρη ανάπτυξή τους, χρησιμοποιούμε νάνα υποκείμενα. Νάνα υποκείμενα όπως τα M27, M9, M26, MM106, κ.α. χρησιμοποιούνται ευρύτατα ανά τον κόσμο για δημιουργία μηλεώνων χαμηλού σχήματος (Ποντίκης, 1994).

2.2.2.2. Τεχνικές αγενούς πολλαπλασιασμού

Οι κυριότεροι τρόποι αγενούς πολλαπλασιασμού των φυτών είναι με απομιξία, καταβολάδες, μοσχεύματα, με εμβολιασμό και με μικροπολλαπλασιασμό.

- Απομιξία

Σε μερικά είδη φυτών τα έμβρυα των σπερμάτων παράγονται με βλαστική διαδικασία. Τα φυτά που παράγονται απ' αυτά τα έμβρυα ονομάζονται απομικτικά. Ο τρόπος αυτός αναπαραγωγής ονομάζεται απομιξία, που είναι χαρακτηριστικό μερικών φυτών, των γενών Malus, Rubus, Citrus κ.α. Στην ευρύτερη της έννοια, ως απομιξία θεωρείται η ανάπτυξη, από ιστό που περιβάλλει τον εμβρυόσακκο, καταβολών από τις οποίες αναπτύσσονται εμβρυοκατασκευές, οι οποίες μοιάζουν με τα κανονικά έμβρυα που παράγονται από γονιμοποίηση. Ο τρόπος αυτός αναπαραγωγής είναι αντίστοιχος της κλωνικής αναπαραγωγής, αφού το φυτό που προέρχεται από το έμβρυο αυτό είναι γενετικά όμοιο με το μητρικό και όμοιο με ένα φυτό που αναπαράγεται με εμβολιασμό, με μόσχευμα, ή δι' άλλων μεθόδων πολλαπλασιασμού.

Από οπωροκομικής άποψης η απομιξία παρουσιάζει σημαντικό ενδιαφέρον, γιατί επιτρέπει την παραγωγή θυγατρικών φυτών γενετικά όμοιων προς το μητρικό και απαλλαγμένων ιώσεων.

- Καταβολάδες

Η τεχνική αυτή χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό των φυτών, όταν αυτά δεν αναπαράγονται πιστά με σπόρο ή όταν δεν εμβολιάζονται ή δεν ριζοβολούν με τα μοσχεύματά τους. Κατά τον πολλαπλασιασμό με καταβολάδες δεν απαιτείται ιδιαίτερη προσοχή στη σχετική υγρασία, θερμοκρασία και υγρασία, που απαιτείται για τα μοσχεύματα. Μια καταβολάδα τροφοδοτείται από το μητρικό φυτό επ' αόριστον ή τουλάχιστον μέχρι αυτή ν' αποκτήσει πλήρες ριζικό σύστημα. Σ' όλους τους τύπους καταβολάδας, ο έρριζος βλαστός αποκόπτεται από το μητρικό φυτό, όταν έχει σχηματιστεί επαρκές ριζικό σύστημα ικανό για την επιβίωσή του ως ανεξάρτητο φυτό.

Καλύτερη ριζοβολία των στρωματωμένων βλαστών επιτυγχάνεται, όταν το υπόστρωμα είναι πορώδες, καλά αεριζόμενο και με επαρκή υγρασία. Για τις κοινές, σύνθετες και κατά συστάδα καταβολάδες, ένα ελαφρό, αμμοπηλώδες υπόστρωμα, εμπλουτισμένο με οργανική ύλη, είναι καλύτερο από ένα αμμώδες ή αργιλλώδες.

Η κοινή (απλή), σύνθετη (οφιοειδής), κατ' αύλακα (συνεχής), κατά συστάδα και εναέρια καταβολάδα είναι οι συνήθεις καταβολάδες.

- Μοσχεύματα

Κατά τη μέθοδο αυτή χρησιμοποιούνται τμήματα φυτών, τα οποία όταν τοποθετηθούν σε συνθήκες ευνοϊκές για αναγέννηση, θα αναπτυχθούν σε πλήρη φυτά, όμοια σε όλα τα χαρακτηριστικά με το μητρικό φυτό, από το οποίο παραλήφθηκαν. Ως μόσχευμα μπορεί να χαρακτηριστεί οποιοδήποτε βλαστικό μέρος του φυτού, το οποίο, όταν αποκοπεί από το μητρικό φυτό, είναι ικανό να αναπαραγάγει το όργανο ή τα όργανα του μητρικού φυτού απ' όπου προήλθε.

Η γενική αυτή μέθοδος αναπαραγωγής φυτών διαφέρει από εκείνη της καταβολάδας στο ότι το φυτικό τμήμα αποκόπτεται πριν από τη δημιουργία ριζικού συστήματος. Ο τύπος του μοσχεύματος, που χρησιμοποιείται για την παραγωγή ενός φυτού, θα εξαρτηθεί από πολλούς παράγοντες, όπως είναι η ευκολία σχηματισμού ρίζας ή βλαστού, η διαθεσιμότητα φυτικού υλικού, τα διαθέσιμα μέσα για τον πολλαπλασιασμό, η εποχή του έτους και η διαθέσιμη τεχνική εμπειρία.

Τα μοσχεύματα ταξινομούνται σε διάφορες ομάδες σύμφωνα με το ιδιαίτερο χρησιμοποιούμενο τμήμα του φυτού. Αυτά ανήκουν σε τέσσερις γενικά κατηγορίες: ριζών, βλαστών (μαλακά, ημίσκληρα, σκληρά), φύλλων (με ή χωρίς μίσχο) και ειδικών κατασκευών (βολβοί και ριζώματα).

- Εμβολιασμοί

Ο εμβολιασμός είναι η τεχνική της τοποθέτησης τμήματος ενός φυτού σε ένα άλλο φυτό κατά τέτοιο τρόπο, ώστε να ενωθούν και να συνεχίσουν να αναπτύσσονται ως ένα ενιαίο φυτικό άτομο. Οποιαδήποτε μέθοδος, που επιτρέπει την επαφή καμβίων μεταξύ φυτικών μερών, είναι και ένας τρόπος εμβολιασμού.

Ο εμβολιασμός αποσκοπεί: (1) στο να πολλαπλασιάσουμε ποικιλίες διαφόρων ειδών, που ο πολλαπλασιασμός τους με άλλο αγενή τρόπο είναι πολύ δύσκολος ή αδύνατος, (2) στο να υποκαταστήσουμε ένα τμήμα ενός φυτού με κάποιο άλλο, (3) στο να ενώσουμε φυτά που συλλέχθηκαν για ειδικές ιδιότητες, όπως ανθεκτικότητα στις ασθένειες, προσαρμοστικότητα σε ειδικές εδαφικές - κλιματικές συνθήκες και ποιότητα καρπού, (4) στο να επανορθώσουμε ζημιές από πληγές, να αντιμετωπίσουμε ασυμφωνία υποκειμένου – εμβολίου και να ενδυναμώσουμε αδύναμα φυτά, (5) στο να ωθήσουμε κάποιο ριζικό σύστημα (υποκείμενο) να αναπτύξει περισσότερες της μιας ποικιλίες ή ένα σύστημα κλάδων να προέρχεται από περισσότερα του ενός ριζικά συστήματα και (6) στο να αντιμετωπίσουμε προβλήματα διαμόρφωσης, αύξησης και ασθeneιών διαφόρων φυτικών ειδών.

Ο όρος εμβολιασμός περιλαμβάνει εμβολιασμούς διά προσέγγισης, εγκεντρισμούς (π.χ. αγγλικός απλής τομής, σφηνωτός, σχιστός) και ενοφθαλμισμούς (π.χ. “Γ” , ημιμαγιόρκιος, πλακίτης) (Ποντίκης, 1994).

- Μικροπολλαπλασιασμός

Μικροπολλαπλασιασμός είναι η τεχνολογία της παραγωγής φυτικού πολλαπλασιαστικού υλικού από πολύ μικρά φυτικά τμήματα (ιστούς ή κύτταρα), που αποχωρίζονται από το γονικό φυτό και αναπτύσσονται κάτω από ασηπτικές συνθήκες μέσα σε δοκιμαστικούς σωλήνες ή δοχεία όπου οι συνθήκες περιβάλλοντος και διατροφής ελέγχονται αυστηρά. Οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται είναι γνωστές συλλογικά και ως ιστοκαλλιέργειες, όρος που χρησιμοποιείται συχνά συνώνυμα με τον μικροπολλαπλασιασμό (Hartmann et al, 1997).

2.3. ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ – ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Για πολλά χρόνια, τα ξυλώδη είδη θεωρούνταν δύσκολο υλικό για μελέτες *in vitro*. Κατά τα τελευταία όμως χρόνια σημαντική πρόοδος επιτεύχθηκε στον τομέα αυτό. Μια ταχεία μέθοδος πολλαπλασιασμού των φυτών είναι άκρως αναγκαία, όταν οι παραδοσιακές μέθοδοι πολλαπλασιασμού είναι πολύ βραδείες ή μη κερδοσκοπικές, και ο διαθέσιμος αριθμός των μητρικών φυτών περιορισμένος.

Ο **μικροπολλαπλασιασμός** είναι μια μέθοδος αγενούς πολλαπλασιασμού κάτω από ασηπτικές συνθήκες, μέσα σε δοκιμαστικούς σωλήνες ή δοχεία (*in vitro*), που εξασφαλίζει την ταχεία αναπαραγωγή του φυτικού πολλαπλασιαστικού υλικού.

Σχετικές εργασίες μικροπολλαπλασιασμού με υποκείμενα και ποικιλίες φυλλοβόλων οπωροφόρων δένδρων άρχισαν να διενεργούνται από τις αρχές της δεκαετίας του 1970. Κατά τα τελευταία χρόνια υπάρχει αυξημένο ενδιαφέρον για την εγκατάσταση συστημάτων πυκνής φύτευσης οπωρώνων και αυτόριζων ποικιλιών. Με τη μέθοδο του μικροπολλαπλασιασμού είναι πλέον δυνατός ο πολλαπλασιασμός των ποικιλιών των οπωροφόρων δένδρων, οι οποίες αποτυγχάνουν να ριζοβολήσουν με τις παραδοσιακές τεχνικές. Ανεξάρτητα μ’ αυτό, η χρησιμοποίηση κλωνικών υποκειμένων παραμένει ακόμα πολύ σημαντική. Η ταχεία αναπαραγωγή των κλωνικών υποκειμένων με τις *in vitro* τεχνικές υπερνίκησε τις δυσκολίες που σχετίζονται με τις εποχικές αλλαγές στη σύσταση των φυτικών ιστών, την ηλικία και τη γενετική προδιάθεση των μητρικών φυτών. Για τον επιτυχή, σε μεγάλη κλίμακα, πολλαπλασιασμό των οπωροφόρων δένδρων, με την τεχνική του μικροπολλαπλασιασμού, πρέπει να υπερνικηθούν κυρίως οι δυσκολίες που

σχετίζονται με την εγκατάσταση καλλιεργειών αρχεφύτρων, τη σύνθεση των κατάλληλων υποστρωμάτων ανάπτυξης και ριζοβολίας και τον καθορισμό των κατάλληλων περιβαλλοντικών συνθηκών, για την επίτευξη του υψηλότερου δυνατού ρυθμού βλαστογένεσης, του επιθυμητού ποσοστού ριζοβολίας των αναπαραγομένων βλαστών, ως και του επιθυμητού ποσοστού επιβίωσης των έρριζων βλαστών, μετά τη μεταφύτευσή τους σε ενδεδειγμένο υπόστρωμα (χώμα, διάφορα εδαφικά μίγματα) (Ποντίκης, 1994).

Πλεονεκτήματα

Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα της ιστοκαλλιέργειας έναντι των συμβατικών μεθόδων πολλαπλασιασμού των φυτών είναι:

1. **Η κλωνική αναπαραγωγή των μητρικών φυτών**, δηλαδή η παραγωγή γενετικά όμοιων φυτών – απογόνων, κυρίως όταν χρησιμοποιούνται μεριστωματικά έκφυτα.

2. **Η αυξημένη παραγωγή φυτών σε σύντομο χρονικό διάστημα**. Έτσι με καλλιέργεια ενός μόνο έκφυτου μπορούν να παραχθούν, με συνεχείς υποκαλλιέργειες, πολλές εκατοντάδες χιλιάδες φυτά ετησίως.

3. **Η εξοικονόμηση χώρου**: εργαστηριακός χώρος 100 τετρ. μέτρων είναι αρκετός για την παραγωγή έως και 1 εκ. φυτών ετησίως, ενώ θα απαιτούνταν υπερπολλαπλάσιος χώρος για συμβατική παραγωγή στο χωράφι ή στο θερμοκήπιο.

4. **Η αποδέσμευση της παραγωγής από εξωτερικές περιβαλλοντικές συνθήκες και περιορισμούς**, επειδή όλη η διαδικασία της ιστοκαλλιέργειας πραγματοποιείται σε κλειστό εργαστηριακό χώρο.

5. **Η παραγωγή άνοσου φυτικού υλικού**, κυρίως όσον αφορά τις ιώσεις. Αυτό προϋποθέτει: (1) την καλλιέργεια μεριστωμάτων ή την παραγωγή σωματικών εμβρύων, κυρίως επειδή τα δύο αυτά είδη οργάνων έχουν μειωμένη ή και μηδενική αγγειακή σύνδεση με τους μητρικούς ιστούς και επομένως είναι θεωρητικά απαλλαγμένα από τις ιώσεις που έχουν προσβάλλει τους τελευταίους και (2) την εφαρμογή θερμοθεραπείας και/ή χημειοθεραπείας για την εξάλειψη παθογόνων (κυρίως ιών και βακτηρίων) που κατ' εξαίρεση υφίσταται στα μεριστώματα και τα σωματικά έμβρυα, ή συνήθως απαντώνται στα υπόλοιπα έκφυτα.

6. Για ορισμένα φυτικά είδη (κυρίως γλαστρικά και κηποτεχνικά εξωτερικού χώρου) ο μικροπολλαπλασιασμός εξακολουθεί να είναι η **μοναδική εμπορική μέθοδος πολλαπλασιασμού**.

Μειονεκτήματα

Η ιστοκαλλιέργεια παρουσιάζει και μειονεκτήματα σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους, τα σπουδαιότερα από τα οποία είναι τα εξής:

1. Απαιτεί **υψηλό επενδυτικό κόστος** (τόσο σε πάγιο εξοπλισμό όσο και σε λειτουργικά έξοδα).

2. Προϋποθέτει **υψηλό επίπεδο τεχνογνωσίας** καθώς και αποτελεσματική επίβλεψη και έλεγχο όλων ανεξαιρέτως των σταδίων παραγωγής.

3. Το **κόστος** της in vitro παραγωγής φυτών είναι, προς το παρόν τουλάχιστον, σημαντικά **μεγαλύτερο** από αυτό των συμβατικών μεθόδων (Κίντζιος, 1994).

2.3.1. Συστήματα μικροπολλαπλασιασμού και ιστοκαλλιέργειας

Όλες οι μέθοδοι μικροπολλαπλασιασμού περιλαμβάνουν την αποκοπή ενός μικρού τμήματος από το γονικό φυτό (έκφυτο), την απαλλαγή του από μικροοργανισμούς (αποστείρωση) και την τοποθέτησή του σε θρεπτικό υλικό για ασηπτική καλλιέργεια. Αυτό το αρχικό φυτικό τμήμα ονομάζεται μόσχευμα ή μικρομόσχευμα ή έκφυτο και αποτελεί τη βασική μονάδα για κάθε ιστοκαλλιέργεια και μικροπολλαπλασιασμό. Οι νέοι βλαστοί που παράγονται από το μικρομόσχευμα διαχωρίζονται σε πολλαπλασιαστικά σώματα (propagules), που επανακαλλιεργούνται για επέκταση της καλλιέργειας. Τελικά, από αυτά σχηματίζονται ρίζες έτσι ώστε να παραχθούν πλήρη νέα φυτάρια.

Ως μικρομοσχεύματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν οποιαδήποτε φυτικά τμήματα που έχουν τη δυνατότητα να αναπαράγουν το αρχικό φυτό. Τέτοια είναι τα επάκρια μεριστώματα, πλευρικά μεριστώματα (βλαστών και ριζών), οι μασχαλιαίοι οφθαλμοί, οι κορυφές των βλαστών, τα γόνατα των βλαστών, τα έμβρυα των σπερμάτων, καθώς και τμήματα νεαρών φύλλων, κοτυληδόνων, υποκοτυλίου και ριζών.

Ανάλογα με το είδος του μικρομοσχεύματος από το οποίο αναγεννώνται νέα φυτά και τον τρόπο με τον οποίο γίνεται η αναγέννηση, τα συστήματα του μικροπολλαπλασιασμού και των ιστοκαλλιεργειών ταξινομούνται σε δύο κλάσεις με υποκατηγορίες:

Κλάση I. Αναγέννηση βλαστών από βλαστικά μοσχεύματα

1. Καλλιέργεια μεριστωμάτων

Από όλα τα είδη μεριστωμάτων μεγαλύτερη πρακτική σημασία για τις ιστοκαλλιέργειες έχουν τα επάκρια μεριστώματα του βλαστού, γιατί αυτά μπορούν να αναπαράγουν ολόκληρο το φυτό ευκολότερα και σε μεγαλύτερη συχνότητα σε σχέση με άλλα μεριστώματα.

Η καλλιέργεια επάκριων μεριστωμάτων εφαρμόζεται κατά κύριο λόγο για την απαλλαγή εκλεκτών ποικιλιών από διασυστηματικές ασθένειες που προκαλούνται από διάφορα παθογόνα (μύκητες, νηματώδεις, βακτήρια, μυκοπλάσματα, ιοί, ιοειδή), τα οποία συσσωρεύονται σε καλλιεργούμενες ποικιλίες και αναπαράγονται βλαστικά για μακρύ χρονικό διάστημα, κληρονομούνται από γενεά σε γενεά και μειώνουν σημαντικά την απόδοση των φυτών. Ιδιαίτερη σημασία έχει η μέθοδος για απαλλαγή από ιώσεις, επειδή οι ιοί μολύνουν ολόκληρο το φυτό εκτός από τα κύτταρα των επάκριων μεριστωμάτων.

2. Μικροεμβολιασμός

Η καλλιέργεια επάκριων μεριστωμάτων έχει αποδειχθεί επιτυχής ιδιαίτερα για μη ξυλώδη φυτά. Στα ξυλώδη – δενδρώδη είδη η μέθοδος έχει πολύ χαμηλά ποσοστά επιτυχίας επειδή τα είδη αυτά ριζοβολούν δύσκολα. Στην περίπτωση αυτή εφαρμόζεται ο μικροεμβολιασμός. Ο μικροεμβολιασμός εφαρμόζεται κυρίως στα οπωροφόρα, όπως είναι τα εσπεριδοειδή, οι μηλιές και τα πυρηνόκαρπα. Όπως και η καλλιέργεια μεριστωμάτων, βασικός σκοπός του μικροεμβολιασμού είναι η δημιουργία φυτών ελεύθερων ιώσεων και άλλων παθογόνων. Στα εσπεριδοειδή η μέθοδος χρησιμοποιείται επίσης και για να παραχθούν νεαρά φυτά με φυσιολογικά χαρακτηριστικά ώριμων φυτών και να παρακαμφθεί έτσι η μακρόχρονη περίοδος της νεανικότητας που υπάρχει στα σπορόφυτα.

3. Καλλιέργεια αρχεφύτρων βλαστού

Η καλλιέργεια αρχεφύτρων βλαστού βρίσκει σήμερα την πιο ευρεία πρακτική εφαρμογή από όλες τις άλλες μεθόδους μικροπολλαπλασιασμού και χρησιμοποιείται ευρύτατα για την παραγωγή άνοσων υποκειμένων εμβολιασμού, μητρικών κηπευτικών φυτών και καλλωπιστικών φυτών. Περιλαμβάνει την αναπαραγωγή των φυτών και το μαζικό τους πολλαπλασιασμό από τα κορυφαία τμήματα τρυφερών βλαστών που φέρουν μασχαλιαίους οφθαλμούς, γι' αυτό είναι γνωστή και ως καλλιέργεια κορυφών βλαστού και γονάτων. Διαφέρει από την καλλιέργεια μεριστωμάτων γιατί εδώ έχουμε μεγαλύτερα φυτικά τμήματα μήκους 1-2 εκ. ή και περισσότερο, τα οποία εκτός από το κορυφαίο μερίστωμα περιλαμβάνουν και τα πρώτα 3-4 γόνατα με τα φύλλα και τους μασχαλιαίους οφθαλμούς τους. Λόγω του μεγαλύτερου μεγέθους, η μέθοδος έχει πολύ υψηλότερα ποσοστά επιτυχίας από την καλλιέργεια μεριστωμάτων, όμως δεν απαλλάσσει τα φυτά από τυχόν ιώσεις. Αποσκοπεί αποκλειστικά και μόνο στο μαζικό πολλαπλασιασμό, γι' αυτό θα πρέπει τα αρχικά φυτά να είναι απόλυτα ελεύθερα ιώσεων και άλλων παθογόνων. Εάν υπάρχει

ακόμα και η παραμικρή υπόνοια για μόλυνση, πρέπει να προηγείται καλλιέργεια μεριστωμάτων σε συνδυασμό με θερμοθεραπεία του μητρικού φυτού και να γίνονται επιπλέον σχολαστικοί έλεγχοι.

4. Τυχαία βλαστογένεση

Εκτός από τους βλαστούς που αναπτύσσονται από προκαθορισμένες θέσεις (κορυφαία και μασχαλιαία μεριστώματα), υπάρχουν και βλαστοί που προκύπτουν από μη προκαθορισμένες θέσεις αποκομμένων βλαστών, ριζών, φύλλων, βολβών και άλλων φυτικών τμημάτων. Οι βλαστοί αυτοί ονομάζονται τυχαίοι ή επίκτητοι βλαστοί. Η τυχαία βλαστογένεση σε κανονικές συνθήκες στα άθικτα φυτά είναι σπάνια, σε συνθήκες μικροκαλλιέργειας όμως τυχαίοι βλαστοί σχηματίζονται με μεγάλη συχνότητα και συμβάλλουν σημαντικά στο μικροπολλαπλασιασμό πολλών φυτών.

5. Ιστοκαλλιέργειες και κυτταροκαλλιέργειες

Οι ιστοκαλλιέργειες και κυτταροκαλλιέργειες είναι συστήματα στα οποία υπάρχει η δυνατότητα της γενετικής παραλλακτικότητας, γι' αυτό οι καλλιέργειες αυτές έχουν μεγάλη σημασία για τη γενετική, τη βελτίωση και τη γενετική μηχανική των φυτών. Οι τεχνικές των μεθόδων αυτών αναπτύχθηκαν αρχικά στον κόσμο των μικροβίων, από όπου έχουν παραληφθεί και προσαρμοστεί για τα ανώτερα φυτά γιατί προσφέρουν θεαματικές προοπτικές στο μικροπολλαπλασιασμό των φυτών. Οι τεχνικές αυτές είναι οι **καλλιέργειες κάλλων, αιωρημάτων κυττάρων και πρωτοπλαστών**, οι οποίες αποτελούν τη βάση της σύγχρονης φυτικής βιοτεχνολογίας.

Η πιο θεαματική ανακάλυψη στις καλλιέργειες κάλλων και αιωρημάτων κυττάρων είναι η **σωματική εμβρυογένεση**. Στον κανονικό κύκλο ζωής των σπερματοφύτων η εμβρυογένεση περιλαμβάνει την ανάπτυξη ενός εμβρύου από ένα γονιμοποιημένο κύτταρο, το ζυγωτό. Τα έμβρυα αυτά είναι φυλετικά ή εγγενή. Στη σωματική εμβρυογένεση το έμβρυο προκύπτει από ένα σωματικό κύτταρο ή από ένα μικρό άθροισμα τέτοιων κυττάρων, παρακάμπτοντας τη φυλετική διαδικασία. Τα έμβρυα αυτά, σε αντιδιαστολή με τα φυλετικά, χαρακτηρίζονται ως εμβρυοειδή ή σωματικά έμβρυα. Η ανάπτυξη σωματικών κυττάρων σε έμβρυα είναι αποτέλεσμα, αλλά και πειστική απόδειξη της ολοδυναμικότητας των κυττάρων.

Η σωματική εμβρυογένεση διακρίνεται σε άμεση και έμμεση. **Άμεση εμβρυογένεση** είναι ο σχηματισμός εμβρύων κατ' ευθείαν από το μικρομόσχευμα χωρίς τη μεσολάβηση σχηματισμού κάλλου ή αιωρήματος κυττάρων. **Έμμεση**

εμβρυογένεση είναι ο σχηματισμός εμβρύων από τους κάλλους και τα αιωρήματα κυττάρων, που προκύπτουν από την καλλιέργεια του μικρομοσχεύματος. Η έμμεση εμβρυογένεση παρέχει τη δυνατότητα παραγωγής τεράστιου αριθμού εμβρυοειδών.

Οι δυνατότητες και οι προοπτικές της σωματικής εμβρυογένεσης για το μαζικό πολλαπλασιασμό των φυτών είναι τεράστιες. Από μια υγρή καλλιέργεια 100 mL μπορούν να παραχθούν μέχρι 1.000.000 εμβρυοειδή σε μια μόνο καλλιεργητική περίοδο.

Κλάση II. Αναγέννηση φυτών από αναπαραγωγικά μικρομοσχεύματα

1. Καλλιέργεια ανθέρων και γυρεοκόκκων

Η μεγαλύτερη σημασία της καλλιέργειας ανθέρων και γυρεοκόκκων βρίσκεται στο γεγονός ότι παρέχει τη δυνατότητα ανάπτυξης απλοειδών φυτών, τα οποία έχουν ένα και μοναδικό γενετικό υλικό με ανεκτίμητη αξία στην έρευνα των μεταλλάξεων και τη βελτίωση των φυτών. Διπλασιασμός στη συνέχεια των χρωμοσωμάτων δημιουργεί διπλοειδείς ισογενετικές ομοζυγωτικές σειρές. Επειδή η φυσιολογική βλάστηση των γυρεοκόκκων και κατά συνέπεια η γονιμοποίηση επηρεάζονται δραματικά από ποικιλία ρυπαντών, η καλλιέργεια της γύρης εφαρμόζεται και για μελέτη προβλημάτων ρύπανσης του φυσικού περιβάλλοντος.

2. Καλλιέργεια άλλων αναπαραγωγικών οργάνων (ωοθήκης, εμβρύων, σπερμάτων, σπορίων)

Παραγωγή απλοειδών φυτών μπορεί να γίνει και με καλλιέργεια του θηλυκού γαμετοφύτου. Τα φυτάρια προκύπτουν είτε από το ωοκύτταρο είτε από τους αντίποδες. Το ωοκύτταρο κάτω από ορισμένες συνθήκες μπορεί να αναπτυχθεί και να δώσει απλοειδές φυτό. Η ανάπτυξη αυτή ονομάζεται γυνογένεση. Επίσης, αγονιμοποίητα ωοκύτταρα μπορούν να αποχωριστούν και να καλλιεργηθούν *in vitro* και στη συνέχεια να γονιμοποιηθούν με γύρη. Η τεχνική αυτή παρέχει την προοπτική παραγωγής σπερμάτων υβριδίων μεταξύ φυτών, που δεν είναι δυνατή με συμβατικά μέσα, καθώς και την αυτογονιμοποίηση ειδών που δεν αυτογονιμοποιούνται.

Η καλλιέργεια εμβρύων παράγει διπλοειδή φυτά. Τα έμβρυα μπορεί να αποχωριστούν από το γονικό φυτό σε διάφορα στάδια ανάπτυξης, από το γονιμοποιημένο ωοκύτταρο μέχρι το ώριμο έμβρυο.

Η ασηπτική καλλιέργεια ολόκληρων σπερμάτων συνιστάται για πολύ μικρά σε μέγεθος σπέρματα. Η μέθοδος εφαρμόζεται στον εμπορικό πολλαπλασιασμό των ορχοειδών, τα οποία παράγουν μικροσκοπικά σπέρματα, σαν σκόνη, και στα οποία τα έμβρυα δεν είναι εντελώς αναπτυγμένα.

Τέλος, η καλλιέργεια σπορίων εφαρμόζεται για τον εμπορικό πολλαπλασιασμό καλλωπιστικών πτεριδοφύτων (Ελευθερίου, 1994).

2.3.2. Προβλήματα κατά τη διάρκεια της ιστοκαλλιέργειας

1. Μολύνσεις (Contamination)

Τα έκφυτα για να επιζήσουν και να αναπτυχθούν φυσιολογικά θα πρέπει να είναι ελεύθερα από την παρουσία μυκήτων και κυρίως βακτηρίων. Οι μολύνσεις είναι δυνατόν να προκαλέσουν μεγάλες απώλειες κατά τη διάρκεια του μικροπολλαπλασιασμού και ο έλεγχός τους είναι το πιο συνηθισμένο και δύσκολο πρόβλημα στα εργαστήρια. Μια απλή επιφανειακή απολύμανση δεν είναι πάντοτε αποτελεσματική κατά των βακτηρίων, μυκήτων, ιών, ιοειδών, μυκοπλασμάτων, και ρικέτσιων.

- μύκητες

Κατά την εγκατάσταση των εκφύτων συχνά εμφανίζονται μυκητολογικές μολύνσεις. Η επίδραση των μυκήτων γενικά έχει ως αποτέλεσμα το θάνατο του εκφύτου. Αυτό το είδος μόλυνσης γίνεται ορατό πολύ γρήγορα και έτσι δεν υπάρχει κίνδυνος μεταφοράς τους σε επόμενη καλλιέργεια.

- βακτήρια

Τα βακτήρια είναι οι πιο συνηθισμένοι και προβληματικοί μικροοργανισμοί στις καλλιέργειες *in vitro*. Μερικές φορές η μόλυνση που προκαλούν δε γίνεται εμφανής μέχρι η καλλιέργεια να σταθεροποιηθεί μετά από μια θεωρητική περίοδο, αλλά μετά γίνεται τόσο έντονη ώστε η καλλιέργεια να χαθεί. Το υπόστρωμα των μολυσμένων καλλιεργειών γίνεται διάφανο, τα έκφυτα εμφανίζουν καστανές κηλίδες και τελικά όλη η επιφάνεια του υποστρώματος καλύπτεται από το γαλακτώδες βακτηριακό έκκριμα. Η χρήση αντιβιοτικών μπορεί μερικές φορές να αποβεί αποτελεσματική, ειδικά στις περιπτώσεις που δεν είναι δυνατόν να ελαττωθεί ο αριθμός των παραγόμενων φυτών, λόγω της αυξημένης ζήτησης, αλλά αυτό δεν είναι λύση, αν το μολυσμένο φυτικό υλικό επρόκειτο να χρησιμοποιηθεί ως stock για τις επόμενες καλλιέργειες.

- ιοί

Μεγάλη προσοχή πρέπει να δίνεται στη μόλυνση από ιούς. Η παραγωγή φυτικού υλικού ελευθέρου ιώσεων είναι ένα από τα πλεονεκτήματα του μικροπολλαπλασιασμού, που μπορεί να επιτευχθεί με το συνδυασμό της θερμοθεραπείας και της μεριστωματικής καλλιέργειας ή του μικροεμβολιασμού.

Για όλες τις παραπάνω περιπτώσεις, ο πιο σημαντικός παράγοντας μείωσης του πληθυσμού των μικροοργανισμών είναι η αποστείρωση των χώρων του εργαστηρίου, των υλικών και σκευών και η τήρηση των κανόνων εργασίας.

2. Υάλωση (Vitrification)

Υάλωση είναι το φαινόμενο κατά το οποίο τα φύλλα του εκφύτου αποκτούν ημιδιαφανή, χυμώδη εμφάνιση με αποτέλεσμα να υποβαθμίζεται η ποιότητά τους και να παρεμποδίζεται ο μετέπειτα πολλαπλασιασμός τους. Οφείλεται σε περίσσεια νερού και μείωση της σύνθεσης λιγνίνης και κυτταρίνης. Οι συνθήκες αυτές είναι συνέπεια της μεγάλης ταχύτητας μετακίνησης του νερού μέσα στο υπόστρωμα σε σχέση με τη ταχύτητα ανάπτυξης των βλαστών.

Η υάλωση εμφανίζεται εντονότερα όταν τα φυτά αναπτύσσονται σε υγρό υπόστρωμα ή όταν το υπόστρωμα περιέχει χαμηλή συγκέντρωση άγαρ, υψηλή υγρασία και υψηλή συγκέντρωση αμμωνίας.

Κάποιοι παράγοντες που μπορούν να βοηθήσουν στην αντιμετώπιση του προβλήματος είναι η αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ, η αλλαγή της ποιότητας του άγαρ, η τροποποίηση της συγκέντρωσης των ανόργανων συστατικών, η μείωση της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης και η προσθήκη ουσιών, που ελαχιστοποιούν την εμφάνιση του φαινομένου, στο υπόστρωμα.

3. Οξειδωση φαινολικών ουσιών (Exudation /Browning)

Ένα από τα πιο συνηθισμένα προβλήματα κατά την εγκατάσταση των εκφύτων, που συνήθως εμφανίζεται στα πολυετή ξυλώδη φυτά, είναι η παραγωγή ουσιών από τα πληγωμένα κύτταρα της βάσης του εκφύτου. Αυτές οι ουσίες είναι συνήθως φαινολικές, που κατά τον πολυμερισμό τους οξειδώνονται και προκαλούν έτσι καστανό μεταχρωματισμό του υποστρώματος, με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η ανάπτυξη του εκφύτου. Για την αντιμετώπιση του φαινομένου συνιστάται προσθήκη αντιοξειδωτικών ουσιών (κιτρικό ή ασκορβικό οξύ) ή ουσιών που έχουν την ιδιότητα να απορροφούν τα φαινολικά (ενεργός άνθρακας) και συχνή μεταφορά των εκφύτων σε νέο υπόστρωμα.

4. Νέκρωση κορυφής και εσωτερικό καφέτιασμα (Shoot Tip Burning)

Η κορυφή των εκφύτων σταματά να αναπτύσσεται, μετατρέπεται σε καστανή και τελικά νεκρώνεται. Το φαινόμενο συνήθως ξεκινά από το στάδιο του πολλαπλασιασμού, αλλά είναι πολύ συνηθισμένο και κατά το στάδιο της ριζοβολίας, οπότε οδηγεί σε μεγάλο αριθμό απωλειών.

5. Ακανόνιστες κυτταροδιαιρέσεις (Tissue Proliferation)

Το φαινόμενο αναφέρεται στο σχηματισμό άμορφης μάζας κυττάρων και εμφανίζεται κατά τη διάρκεια του πολλαπλασιασμού των φυτών *in vitro* ή μετά τη μεταφορά τους στο θερμοκήπιο ή το φυτώριο. Είναι πολύ συνηθισμένο φαινόμενο σε είδη της οικογένειας *Ericaceae*, όπως το ροδόδενδρο. Η αιτία σχηματισμού της άμορφης μάζας δεν είναι γνωστή μέχρι σήμερα, αλλά προφανώς δεν οφείλεται σε παθογόνο αίτιο.

Παρόμοιοι σχηματισμοί έχουν παρατηρηθεί στα ροδόδενδρα στη φύση, γεγονός που δείχνει ότι το τεχνητό περιβάλλον της ιστοκαλλιέργειας, μάλλον ευνοεί την έκφραση του φαινομένου στα είδη που έχουν αυτή την τάση. Πρέπει να σημειωθεί, ότι μερικές ποικιλίες παρουσιάζουν μεγάλη τάση εμφάνισης του φαινομένου, στις οποίες πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή κατά το μικροπολλαπλασιασμό.

6. Μεταλλάξεις (Mutation)

Κύριο χαρακτηριστικό του μικροπολλαπλασιασμού είναι η παραγωγή φυτών, όμοια με το μητρικό και απαλλαγμένα από σοβαρά παθογόνα. Ωστόσο μερικές φορές συμβαίνουν μεταλλάξεις, φαινόμενο πολύ συνηθισμένο στις καλλιέργειες κάλλων, οι οποίες οδηγούν σε φαινοτυπική παραλλακτικότητα, γεγονός που καθιστά τα παραγόμενα φυτά ακατάλληλα για εμπορία. Το πρόβλημα παρουσιάζεται με μεγαλύτερη συχνότητα κατά το μικροπολλαπλασιασμό, λόγω του μεγάλου ρυθμού αναπαραγωγής, που μπορεί να οδηγήσει σε σημαντικές οικονομικές απώλειες (Hartmann et al, 1997).

2.3.3. Εργαστηριακός εξοπλισμός

2.3.3.1. Κτιριακές εγκαταστάσεις και επιστημονικά όργανα

Για την πραγματοποίηση των μεθόδων του μικροπολλαπλασιασμού απαιτούνται κατάλληλες εγκαταστάσεις με τον απαραίτητο εργαστηριακό εξοπλισμό. Η μονάδα πρέπει να είναι ξεχωριστή και με ανεξάρτητη είσοδο από τα φυτώρια και τα θερμοκήπια, που είναι απαραίτητα για την αύξηση των φυτών σε εδαφικές συνθήκες, ώστε να αποφεύγεται η μόλυνση των θαλάμων καλλιέργειας. Η όλη μονάδα μπορεί να διακριθεί σε τρεις περιοχές: προετοιμασίας, μεταφοράς και αύξησης.

Η **περιοχή προετοιμασίας** αποτελείται από χώρους καθαρισμού και αποστείρωσης των υαλικών, προετοιμασίας και αποστείρωσης των θρεπτικών μέσων και χώρους αποθήκευσης των υαλικών, χημικών ουσιών και διαφόρων προμηθειών.

Ο βασικός εξοπλισμός της περιοχής προετοιμασίας είναι:

- Συσκευή υγρής αποστείρωσης των θρεπτικών μέσων.

- Κλίβανος ή φούρνος για την αποστείρωση των υαλικών και άλλων αντικειμένων που χρησιμοποιούνται στην περιοχή μεταφοράς.
- Ψυγείο για τη διατήρηση των χημικών ουσιών και των stock διαλυμάτων.
- Ζυγοί και ζυγοί ακριβείας.
- pHμετρα.
- Αναδευτήρες.
- Φίλτρα αποστείρωσης για ουσίες ευαίσθητες σε υψηλές θερμοκρασίες.
- Συσκευή απιονισμού του νερού ή απόσταξης.
- Στερεοσκόπιο.
- Μίξερ για την ανάμιξη των συστατικών των υποστρωμάτων.
- Πιπέτες, ογκομετρικοί κύλινδροι, κωνικές φιάλες, ποτήρια ζέσεως, χωνιά και άλλα εφόδια.
- Αποθήκη για τα διάφορα εφόδια.

Ο βαθμός καθαρότητας στην περιοχή προετοιμασίας είναι εφάμιλλος με καλά οργανωμένο νοσοκομείο.

Η **περιοχή μεταφοράς** (Εικόνα 2) είναι ένας σχολαστικά αποστειρωμένος χώρος όπου γίνεται η μεταφορά των φυτών στο θρεπτικό τους υπόστρωμα ή η επιλογή των πολλαπλασιαστικών φυταρίων και η επανατοποθέτηση τους σε υποκαλλιέργεια. Η εργασία της μεταφοράς πραγματοποιείται σε **απαγωγό νηματικής ροής** και δίπλα από φλόγα οιοπνεύματος ή λύχνου bunsen, από την οποία διέρχεται τακτικά η λαβίδα και τα στόμια των σωλήνων καλλιέργειας. Ο απαγωγός νηματικής ροής είναι πάγκος εργασίας κλειστός σε όλες του τις πλευρές εκτός από τη μπροστινή. Από τη πίσω πλευρά ο αέρας φιλτράρεται με ειδικά φίλτρα, πριν φτάσει στο πάγκο εργασίας. Στη συνέχεια ο αποστειρωμένος αέρας παρασύρει προς τα έξω τα σπόρια μυκήτων και άλλων οργανισμών που ενδεχόμενα αιωρούνται στον αέρα ώστε να μην πέφτουν στα φυτάρια και στα δοχεία καλλιέργειας που εδώ ανοίγονται.

Συνιστάται να επισκευάζονται οι απαγωγείς αυτοί μια φορά το χρόνο από το εργοστάσιο κατασκευής τους. Τα φίλτρα πρέπει να αντικαθίστανται ετησίως. Το πάτωμα του δωματίου πρέπει να απολυμαίνεται καθημερινώς. Ότι υπάρχει και ότι χρησιμοποιείται στην περιοχή μεταφοράς (επιφάνειες των πάγκων, λαβίδες, νυστέρια, δοχεία, εργαστηριακές μπλούζες κτλ.) είναι αποστειρωμένο ή απολυμασμένο, όπως ένα χειρουργείο. Το προσωπικό που εργάζεται φοράει γάντια, μάσκα προσώπου, δίχτυα μαλλιών, μπλούζες κτλ. Δεν επιτρέπεται η είσοδος ατόμων που δεν εργάζονται

εκεί. Οι τράπεζες και οι λαβίδες που χρησιμοποιούνται καθώς και τα χέρια των εργαζομένων πρέπει να απολυμαίνονται συχνά με οινόπνευμα 96%. Πρέπει ακόμη να θέτουμε σε λειτουργία τον απαγωγό τουλάχιστον 15 min πριν τη χρησιμοποίησή του.

Σε μερικά εργαστήρια χρησιμοποιούνται λάμπες υπεριώδους ακτινοβολίας, οι οποίες ανάβουν για 2 ώρες πριν τη χρήση της τράπεζας, ενώ κατά τη διάρκεια της εργασίας σβήνουν διότι προκαλούν βλάβες στα μάτια.

Η **περιοχή αύξησης** (Εικόνα 7) είναι θάλαμοι καλλιέργειας με ελεγχόμενες συνθήκες φωτισμού, θερμοκρασίας και υγρασίας, όπου τοποθετούνται οι δοχεία που περιέχουν τα αναπτυσσόμενα έκφυτα. Αν και για κάθε φυτό απαιτούνται ειδικές συνθήκες, γενικά ο φωτισμός παρέχεται από λάμπες φθορισμού, έχει ένταση που κυμαίνεται από 1000 ως 10000 Lux και φωτοπερίοδο 16 h φως και 8 h νύχτα. Οι συνηθισμένες τιμές θερμοκρασίας είναι 21⁰ ως 30⁰ C και της σχετικής υγρασίας 30 ως 50 %. Συχνά, οι σωλήνες καλλιέργειας τοποθετούνται πλάγια για να δημιουργούν μεγαλύτερη επιφάνεια του θρεπτικού μέσου, αλλά και για να δέχονται περισσότερο και πιο ομοιόμορφο φως (Ελευθερίου, 1994).

2.3.3.2. Δοχεία όπου καλλιεργούνται τα έκφυτα

Τα δοχεία που χρησιμοποιούνται για την καλλιέργεια των φυτών είναι δοκιμαστικοί σωλήνες, φιάλες Erlenmeyer, δίσκοι Petri και άλλα σκεύη σε διάφορα μεγέθη, τα οποία για να αντέχουν στην υψηλή θερμοκρασία αποστείρωσης, είναι συνήθως γυάλινα (Pyrex). Σε ορισμένα εργαστήρια χρησιμοποιούνται πλαστικά δοχεία, λιγότερο ακριβά αλλά περισσότερο εύθραυστα κατά την αποστείρωση.

Για το κλείσιμο των δοχείων είναι απαραίτητα καπάκια γυάλινα, πλαστικά ή μεταλλικά. Επιπλέον, κάλυψη των δοχείων με πλαστική μεμβράνη (σελοφάν) ή Parafilm είναι χρήσιμη για τη συγκράτηση της υγρασίας και την ελαχιστοποίηση των μολύνσεων.

2.3.3.3. Αποστείρωση

Η αποστείρωση των θρεπτικών μέσων γίνεται συνήθως σε κλίβανους, λιγότερο συχνά με φίλτράρισμα και σπανιότερα με ακτινοβολία. Κάθε μέθοδος έχει τα δικά της πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα.

A. Κλίβανος υγρής αποστείρωσης.

Οι κλίβανοι υγρής αποστείρωσης είναι συσκευές που χρησιμοποιούν συμπιεσμένο ατμό ο οποίος καταστρέφει όλους τους μικροοργανισμούς. Υπάρχουν διάφοροι τύποι και μεγέθη, άλλα με μεγάλο κόστος αγοράς. Υπάρχει ο οριζόντιος τύπος, που είναι πιο

εύκολος στη χρήση άλλα πιο ακριβός, και ο κατακόρυφος. Τα τελευταία χρόνια κατασκευάζονται κλιβανοί χωρητικότητας από 0.5 ως 16 L.

Η θερμοκρασία που μπορεί να αναπτύξει ένας τέτοιος κλιβανός είναι 115 ως 135 °C. Η επιτυχία αποστείρωσης εξαρτάται από το χρόνο, την πίεση, τη θερμοκρασία και τον όγκο του θρεπτικού υποστρώματος. Για καλύτερα αποτελέσματα συνιστώνται: α) δοκιμαστικοί σωλήνες και φιάλες με 20-50 mL υποστρώματος, αποστείρωση για 20 min στους 121 °C, β) φιάλες με 50-500 mL υποστρώματος, αποστείρωση για 25 min στους 121 °C, γ) φιάλες με 500-5000 mL υποστρώματος, αποστείρωση για 35 min στους 121 °C και δ) άδειοι δοκιμαστικοί σωλήνες και φιάλες, , αποστείρωση για 30 min στους 130 °C.

Από τα παραπάνω γίνεται φανερό ότι όσο ο όγκος του υποστρώματος μεγαλώνει, η διάρκεια αποστείρωσης πρέπει να αυξάνει.

Ωστόσο τα υλικά όπως δοκιμαστικοί σωλήνες, φιάλες, δίσκοι Petri, χαρτιά κ.α. συνιστάται να αποστειρώνονται σε ξηρούς κλιβάνους στους 160 °C για 2-3 h.

Τόσο κατά τη διάρκεια της αποστείρωσης, όσο και μετά το πέρας αυτής πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα εξής:

- το pH του υποστρώματος ελαττώνεται κατά 0.3-0.5,
- η πολύ υψηλή θερμοκρασία μπορεί να προκαλέσει καραμελοποίηση των σακχάρων, γεγονός που μπορεί να καταστεί τοξικό για τα φυτά,
- αποστείρωση για πολύ χρόνο μπορεί να προκαλέσει τον πολυμερισμό του άγαρ και την καθίζηση των αλάτων,
- κάποιες πτητικές ουσίες καταστρέφονται κατά την αποστείρωση (ethrel, αιθυλένιο),
- συνιστάται η χρήση απιονισμένου νερού, αφού το νερό βρύσης περιέχει πολύ ασβέστιο, το οποίο συσσωρεύεται στη βάση του κλιβάνου προκαλώντας λειτουργικά προβλήματα,
- κάποιες ουσίες χάνουν τη δραστηριότητα τους, όπως η GA₃, βιταμίνη B₁, B₁₂, C, αντιβιοτικά, ένζυμα.

B. Αποστείρωση με ακτινοβολία

Η αποστείρωση των υποστρωμάτων με ακτινοβολία εφαρμόζεται ελάχιστα λόγω του μεγάλου κόστους σε σχέση με τους κλιβάνους. Είναι εξίσου αποτελεσματική με τους κλιβάνους και εφαρμόζεται όταν τα δοχεία που χρησιμοποιούνται είναι πλαστικά και δεν αντέχουν στις υψηλές θερμοκρασίες.

Γ. Αποστείρωση με φιλτράρισμα

Κατά τη μέθοδο αυτή το διάλυμα περνά μέσα από ειδικό μεμβρανώδες φίλτρο το οποίο συγκρατεί όλους τους μικροοργανισμούς που είναι μεγαλύτεροι από τη διάμετρο των πόρων του φίλτρου. Τα μειονεκτήματα που έχει είναι ότι κάποιες ουσίες συγκρατούνται από το φίλτρο, κάποιοι ιοί διαπερνούν τους πόρους και ο χρόνος που απαιτείται για το φιλτράρισμα όλου του όγκου του υποστρώματος είναι πολύ μεγάλος.

Γι' αυτούς τους λόγους, εφαρμόζεται για την αποστείρωση ορισμένων μόνο ουσιών που καταστρέφονται από τις υψηλές θερμοκρασίες. Το υπόστρωμα με όλα τα συστατικά του, εκτός από τη συγκεκριμένη ουσία, αποστειρώνεται σε κλίβανο. Παραμένει σε συνθήκες δωματίου, μέχρι η θερμοκρασία του φτάσει τους 45-50 °C και πριν στερεοποιηθεί, μεταφέρεται στον απαγωγό νηματικής ροής όπου εισάγεται με το ειδικό φίλτρο το διάλυμα της ουσίας (Pierik, 1998).

2.3.4. Θερμοκηπιακές εγκαταστάσεις

Οι κατασκευές, που είναι απαραίτητες για τον πολλαπλασιασμό πολλών φυτικών ειδών με σπόρο, μοσχεύματα ή με εμβολιασμό, περιλαμβάνουν κατασκευές τύπου θερμοκηπίου, με ρυθμιζόμενες συνθήκες θερμοκρασίας, υγρασίας και φωτισμού. Οι κατασκευές αυτές χρησιμεύουν για τη βλάστηση των σπόρων, τη ριζοβολία των μοσχευμάτων και γενικά την ανάπτυξη του παραγόμενου πολλαπλασιαστικού υλικού, συμπεριλαμβανομένων και των φυτών που προέρχονται από ιστοκαλλιέργεια.

Υδρονέφωση

Το σημαντικότερο πρόβλημα στον πολλαπλασιασμό των φυτών με φυλλοφόρα μοσχεύματα είναι η απώλεια υγρασίας μέσω της διαπνοής έως και ξήρανσή του, πολύ πριν να βγάλουν ρίζες. Εξίσου σημαντικό πρόβλημα είναι η σκληραγώγηση των φυτών που προέρχονται από μικροπολλαπλασιασμό.

Τα φύλλα των μοσχευμάτων στο χώρο της ριζοβολίας, εξακολουθούν να επιτελούν τις βασικές τους λειτουργίες, όπως διαπνοή, αναπνοή και φωτοσύνθεση. Ο ρυθμός της διαπνοής καθορίζει αν θα συγκρατηθεί το φύλλο επάνω στο μόσχευμα ή θα πέσει και θα ξεραθεί όλο το μόσχευμα. Επειδή τα μοσχεύματα δεν έχουν ρίζες, όταν τα φύλλα έχουν έντονο ρυθμό διαπνοής, δεν μπορούν να απορροφήσουν από το υπόστρωμα τις απαιτούμενες μεγάλες ποσότητες νερού και αφυδατώνονται. Γι' αυτό τα φυλλοφόρα μοσχεύματα τοποθετούνται σε κατάλληλα διαμορφωμένο περιβάλλον υψηλής σχετικής υγρασίας, ώστε να ελαχιστοποιείται η διαπνοή των φύλλων. Το περιβάλλον αυτό δημιουργείται σε χώρο υδρονέφωσης με επαναλαμβανόμενο ψεκασμό πολύ μικρών σταγόνων νερού από ειδικούς ψεκαστές, για να αυξηθεί η σχετική υγρασία

του περιβάλλοντος, χωρίς όμως να αυξηθεί πολύ η υγρασία του υποστρώματος ριζοβολίας.

Η θερμοκρασία στο χώρο της υδρονέφωσης θα πρέπει να διατηρείται στους 18 °C στην περιοχή του φύλλου και λίγο υψηλότερα, στους 21 °C στην περιοχή της βάσης του μοσχεύματος.

Ο ψεκάσμος που γίνεται εντελώς αυτόματα βάσει του ρυθμού εξάτμισης, αυξάνει την υγρασία στο γύρω χώρο του μοσχεύματος, και δημιουργεί μια πολύ λεπτή μεμβράνη νερού πάνω στο μόσχευμα, ενώ συγχρόνως μειώνεται και η θερμοκρασία των φύλλων, με αποτέλεσμα να μειώνεται ο ρυθμός διαπνοής και ταυτόχρονα ο ρυθμός αναπνοής τους. Τούτο σημαίνει ότι το μόσχευμα σ' αυτό το περιβάλλον έχει πολύ μικρότερες ανάγκες σε νερό και αποθηκευμένους ή παραγόμενους υδατάνθρακες για να επιζήσει. Παράλληλα, στη βάση του μοσχεύματος η θερμοκρασία διατηρείται λίγο υψηλότερη με τη χρησιμοποίηση θέρμανσης, ιδανική για τη δημιουργία κάλου και τη ριζοβολία.

Τη βάση της υδρονέφωσης, δηλαδή το μέρος όπου τοποθετούνται τα κιβώτια με τα μοσχεύματα, αποτελεί συνήθως ένα τραπέζι θερμοκηπίου, κατασκευασμένο από τσιμέντο ή πλάκες αμιαντοτσιμέντου πλάτους μέχρι 1.8 m και ύψους από το έδαφος 0.8 m. Οι αποστάσεις μεταξύ των τραπεζιών εξαρτώνται από τα εργαλεία ή τα μηχανήματα μεταφοράς που χρησιμοποιούνται. Κατά μήκος του θερμοκηπίου αφήνεται συνήθως ένας κεντρικός διάδρομος πλάτους 1-1.3 m, ενώ οι δευτερεύοντες διάδρομοι έχουν πλάτος 45 cm. Αυτή η διεύθετηση κάνει εκμεταλλεύσιμο το 67-80% της επιφάνειας του θερμοκηπίου.

Στις σύγχρονες εγκαταστάσεις η εκμετάλλευση του χώρου του θερμοκηπίου φθάνει μέχρι 90% της επιφάνειάς του, με τη χρησιμοποίηση κινητών τραπεζιών. Σ' αυτή τη περίπτωση απαιτείται μόνο ένας κεντρικός διάδρομος, διότι με τη μετακίνηση των τραπεζιών ο διάδρομος αυτός μετατοπίζεται σε όλες τις θέσεις.

Η διαμόρφωση του τραπεζιού υδρονέφωσης γίνεται ως εξής: Προσαρμόζονται πλευρικά τοιχώματα από ξύλο ή αμιαντοτσιμέντο, ύψους 20 cm. Μέσα τοποθετείται μικρής διαμέτρου χαλίκι μέχρι ύψους 5 cm, για αποτελεσματική στράγγιση και θερμική μόνωση. Πάνω από το χαλίκι τοποθετείται ένα στρώμα χοντρής άμμου 5 cm. Πάνω στην ισοπεδωμένη άμμο απλώνεται επενδυμένο σύρμα ηλεκτρικής αντίστασης, σε σχήμα μαιάνδρου, σε απόσταση 10-15 cm η μια σειρά από την άλλη. Η απαιτούμενη ισχύς της αντίστασης είναι 150-200 Watt ανά m². Επάνω από το καλώδιο τοποθετείται στρώμα 1 cm λεπτόκοκκης άμμου και επάνω τοποθετείται συρμάτινο

πλέγμα. Το συρμάτινο πλέγμα τοποθετείται έτσι ώστε η θερμοκρασία να κατανέμεται πιο ομοιόμορφα σ' όλη την επιφάνεια και για να μην υπάρχει κίνδυνος τραυματισμού της ηλεκτρικής αντίστασης από τα κιβώτια ή τα εργαλεία. Επάνω από το πλέγμα μπαίνει άλλο ένα στρώμα 1 cm λεπτόκοκκης άμμου και από πάνω του τοποθετούνται τα κιβώτια ριζοβολίας, ή το υπόστρωμα ριζοβολίας όταν δεν χρησιμοποιούνται κιβώτια.

Στα θερμοκήπια που διαθέτουν θέρμανση με ζεστό νερό ή ατμό, αντί της ηλεκτρικής αντίστασης χρησιμοποιούνται σωλήνες ½ ίντσας ζεστού νερού.

Η ρύθμιση της θερμοκρασίας του τραπεζιού γίνεται με ένα θερμοστάτη, το αισθητήριο του οποίου τοποθετείται στο υπόστρωμα ριζοβολίας, στη μέση του τραπεζιού.

Στην κάτω επιφάνεια του τραπεζιού καλό είναι να τοποθετείται θερμομονωτική επιφάνεια, ώστε να περιορίζονται αποτελεσματικότερα οι θερμικές απώλειες.

Για τον ψεκασμό του νερού σε πολύ μικρές σταγόνες χρησιμοποιούνται διάφορα συστήματα. Στα **συστήματα υδρονέφωσης (mist)** η διάμετρος των σταγόνων νερού κυμαίνεται από 50 ως 100 μm, ενώ στα **συστήματα ομίχλης (fog)** από 2 ως 40 μm. Οι σταγόνες με διάμετρο μικρότερη των 40 μm έχουν την ιδιότητα να δημιουργούν ομίχλη πάνω από τις φυλλικές επιφάνειες και να παραμένουν στον αέρα για μεγάλο χρονικό διάστημα χωρίς να πέφτουν. Σταγόνες όμως διαμέτρου άνω των 40 μm συμπυκνώνονται, πέφτουν πάνω στις επιφάνειες των φύλλων και ελαττώνουν τη θερμοκρασία τους, ενώ ταυτόχρονα αυξάνουν σημαντικά την υγρασία του υποστρώματος. Τα συστήματα ομίχλης πλεονεκτούν σε σχέση με εκείνα της υδρονέφωσης αλλά έχουν υψηλότερο κόστος εγκατάστασης (Hartmann et al, 1997).

Το ψέκασμα του νερού καθορίζεται από μια μαγνητική βαλβίδα νερού, η οποία παραμένει ανοιχτή, ώστε να ψεκάζεται νερό, όταν το ηλεκτρικό κύκλωμα είναι ανοιχτό (δεν υπάρχει ηλεκτρικό ρεύμα) και κλείνει όταν το ηλεκτρικό κύκλωμα είναι κλειστό (υπάρχει ηλεκτρικό ρεύμα). Έτσι, και αν για κάποιο λόγο διακοπεί η ηλεκτρική ενέργεια, δεν θα καταστραφούν τα μοσχεύματα από αφυδάτωση.

Πρέπει να σημειωθεί ότι όταν το νερό έχει μεγάλη σκληρότητα δημιουργούνται προβλήματα στη λειτουργία του συστήματος, διότι συμπυκνώνονται τα άλατα στους ψεκαστές και σταματούν τη λειτουργία του. Η διάλυση νιτρικού οξέος σ' αυτά τα νερά περιορίζει τις δυσμενείς συνέπειες.

Το άνοιγμα και κλείσιμο του ηλεκτρικού κυκλώματος μπορεί να γίνει με:

A) Χρονοδιακόπτη, που ρυθμίζεται κατάλληλα από τον καλλιεργητή. Η ρύθμιση περιλαμβάνει το χρόνο ψεκασμού, το χρόνο που μεσολαβεί μεταξύ δύο ψεκασμών και τη διάρκεια της νύχτας (τη νύχτα δεν γίνονται ψεκασμοί). Οι χρόνοι αυτοί ρυθμίζονται διαφορετικά κατά τις διάφορες εποχές του έτους.

B) Ηλεκτρονικό φύλλο, που τοποθετείται μεταξύ των μοσχευμάτων. Όταν το ηλεκτρονικό φύλλο στεγνώσει, ανοίγει το ηλεκτρικό κύκλωμα και η μαγνητική βαλβίδα, ώστε να ψεκάζεται νερό μέχρις ότου το ηλεκτρονικό φύλλο διαβραχεί, οπότε κλείνει το ηλεκτρικό κύκλωμα και σταματάει ο ψεκασμός. Αυτό επαναλαμβάνεται συνεχώς.

Θα πρέπει να σημειωθεί ότι όταν το νερό έχει μεγάλη αλατότητα δυσκολεύεται ο έλεγχος της υδρονέφωσης με το ηλεκτρονικό φύλλο, διότι συσσωρεύονται άλατα που μεταβάλλουν τις συνθήκες καλής λειτουργίας του φύλλου. Το καθημερινό καθάρισμα του ηλεκτρονικού φύλλου με απεσταγμένο νερό είναι πολύ χρήσιμο.

Γ) Ειδικό ζυγό. Ο ζυγός τοποθετείται με την επιφάνεια ζυγίσεως οριζόντια στο ύψος των μοσχευμάτων. Όταν ψεκάζεται νερό, αυξάνει το βάρος στην επιφάνεια ζυγίσεως. Ο ζυγός τότε κλείνει το ηλεκτρικό κύκλωμα, κλείνει η μαγνητική βαλβίδα και σταματά ο ψεκασμός. Όταν εξατμιστεί το νερό από την επιφάνεια ζυγίσεως, ελαφραίνει και ανοίγει το ηλεκτρικό κύκλωμα, με αποτέλεσμα να ψεκάζεται νερό. Αυτό επαναλαμβάνεται συνεχώς. Και σ' αυτή την περίπτωση απαιτείται καθαρισμός της επιφάνειας ζυγίσεως από τα άλατα, με αραιό υδροχλωρικό οξύ.

Δ) Φωτοκύτταρο, που ανοιγοκλείνει το ηλεκτρικό κύκλωμα συναρτήσει της φωτεινής έντασης, έτσι ώστε να ψεκάζεται συχνότερα νερό όταν επικρατεί μεγάλη ηλιοφάνεια και λίγο νερό ή καθόλου όταν το φως λιγοστεύει.

Ε) Συνδυασμό θερμοστάτη – χρονοδιακόπτη. Το άνοιγμα και κλείσιμο του ηλεκτρικού κυκλώματος και κατά συνέπεια ο ψεκασμός, καθορίζονται από τη θερμοκρασία του φύλλου των μοσχευμάτων. Όταν υψώνεται η θερμοκρασία, αυξάνει η συχνότητα των ψεκασμών και όταν μειώνεται, ελαττώνεται (Μαυρογιαννόπουλος, 1990).

2.3.5. Φυτώριο

Το φυτώριο αποτελεί το οργανικό εκείνο τμήμα του εδάφους, όπου τα σπορόφυτα και το αγενές πολλαπλασιαστικό υλικό (έρριζα μοσχεύματα, έρριζα φυτά από καταβολάδες, έρριζες παραφυάδες και σκληραγωγημένα φυτά από μικροπολλαπλασιασμό) μεταφυτεύονται και κατόπιν (πολύ συχνά) εμβολιάζονται, για την παραγωγή δενδρυλλίων.

Η έκθεση του φυτωρίου, κατά προτίμηση, πρέπει να είναι μεσημβρινή, γιατί έτσι εξασφαλίζονται ευνοϊκότερες συνθήκες θερμοκρασίας και φωτισμού. Όσον αφορά το έδαφος από μηχανικής συστάσεως, γενικά τα μέσης συστάσεως εδάφη θεωρούνται τα πλέον κατάλληλα.

Το φυτώριο πρέπει να είναι απαλλαγμένο από ζιζάνια και κυρίως από πολυετή ζιζάνια, όπως είναι η αγριάδα, ο βέλιουρας και η κύπερη.

Το προοριζόμενο για φυτώριο έδαφος δέχεται κατά το θέρος – φθινόπωρο βαθειά άροση (40-50 cm). Ακολουθεί ο καθαρισμός (απομάκρυνση ζιζανίων, ριζών, λίθων κλπ.), η ισοπέδωση, το αυλάκωμα (σχηματισμός αρδευτικών αυλακιών και διαρρύθμιση του εδάφους σε αλίες διαστάσεων μήκους 5-10 m και πλάτους 1.2-1.5 m), η λίπανση (με χωνευμένη κοπριά σε ποσότητα 5 τόνους κατά στρέμμα), η σκαφή αλιών, σε βάθος 0.25 m για την ενσωμάτωση της κοπριάς και επανασκαφή των αλιών κατά τα τέλη του χειμώνα με αρχές της ανοιξέως, σε βάθος 0.25 m, που αποσκοπεί στην ισοπέδωση των αλιών και στην καταστροφή τυχόν ζιζανίων.

Η φύτευση στο φυτώριο διενεργείται την κατάλληλη εποχή, η οποία δεν καθορίζεται ημερολογιακά. Ως κατάλληλη εποχή θεωρείται η άνοιξη κυρίως και δευτερευόντως το φθινόπωρο, γιατί τότε οι συνθήκες είναι ευνοϊκές. Στην πράξη, η φύτευση στο φυτώριο γίνεται συνήθως τέλη του χειμώνα με αρχές της άνοιξης, ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες.

Η φύτευση γίνεται βασικά κατά γραμμές, σε αποστάσεις 30X40 cm για τα φυλλοβόλα και 40X50 cm για τα αειθαλή. Η φύτευση μπορεί να γίνει και με μηχανικά μέσα. Στην περίπτωση αυτή απαιτείται πλήρης προετοιμασία των φυτών (κόμης και ριζικού συστήματος) και ύψος που να μην υπερβαίνει τα 50 cm. Η εκμηχάνιση της φυτεύσεως επιφέρει οικονομία δαπάνης μέχρι και 50%, συγκριτικά προς τη δαπάνη φύτευσης με χειρωνακτική εργασία. Το βάθος φυτεύσεως κυμαίνεται από 8 ως 12 cm (Ποντίκης, 1994).

2.3.6. Σύσταση θρεπτικών υποστρωμάτων

Όπως τα φυτά που μεγαλώνουν σε εδαφικές συνθήκες, έτσι και τα ασηπτικά καλλιεργούμενα *in vitro*, για να αναπτυχθούν χρειάζονται μακρο- και μικροστοιχεία, τα οποία προστίθενται στο θρεπτικό μέσο με τη μορφή ανόργανων αλάτων. Χρειάζονται επίσης υδρογόνο και οξυγόνο με τη μορφή του νερού, καθώς και αέριο οξυγόνο. Σε αντίθεση όμως με τα φυτά που αναπτύσσονται στο φως, επιπρόσθετα χρειάζονται άνθρακα σε οργανική μορφή (που προσφέρεται συνήθως ως σάκχαρο),

αμινοξέα, βιταμίνες και αυξητικές ορμόνες. Με άλλα λόγια, ενώ τα φυτά στην πλειοψηφία τους είναι αυτότροφα, τα φυτά των ασηπτικών καλλιεργειών είναι ετερότροφα.

Τα συστατικά των θρεπτικών υποστρωμάτων ποικίλουν με το είδος του φυτού και το στάδιο της ιστοκαλλιέργειας. Υπάρχουν πολλά πρότυπα θρεπτικά μέσα, όπως των **Murashige & Skoog** (γνωστό ως MS), κατάλληλο για ένα μεγάλο εύρος φυτών, του **Anderson**, ειδικό για την καλλιέργεια των ροδόδενδρων, το **Woody Plant Medium** (Lloyd & McCown, 1980), κατάλληλο για πολλά ξυλώδη φυτά και το **Gamborg B5** ειδικό για κυτταροκαλλιέργεια. Ωστόσο όταν πρόκειται να καλλιεργηθεί κάποιο είδος στο οποίο δεν έχει εφαρμοστεί στο παρελθόν ο μικροπολλαπλασιασμός, πρέπει να μελετώνται διάφορα υποστρώματα και να γίνονται διάφορες τροποποιήσεις αυτών για την εύρεση του ιδανικότερου.

2.3.6.1. Ανόργανα άλατα

Είναι τα συστατικά τα οποία παρέχουν τα κύρια ιόντα, που χρειάζονται τα φυτά. Η σημασία αυτών στα υποστρώματα καλλιέργειας είναι παρόμοια με εκείνη των λιπασμάτων, που χρησιμεύουν ως θρεπτικά στοιχεία για τα φυτά που αναπτύσσονται υπό φυσικές συνθήκες. Τα θρεπτικά αυτά στοιχεία διακρίνονται σε **μακροστοιχεία** (N, P, K, Ca, S, Mg) και **μικροστοιχεία** (B, Co, Mn, I, Fe, Zn, Mo, Cu, Cl, Na).

Ανά τακτά διαστήματα, παρασκευάζονται stock διαλύματα των παραπάνω δυο ομάδων, η συγκέντρωση των οποίων είναι συνήθως 100 φορές μεγαλύτερη από αυτή του τελικού υποστρώματος. Πρέπει να σημειωθεί ότι τα άλατα του σιδήρου αναμιγνύονται χωριστά από τα υπόλοιπα και διατηρούνται σε σκοτεινή φιάλη.

Η παρασκευή των stock διαλυμάτων αποβλέπει στην εξοικονόμηση χρόνου, διότι έτσι τα στερεά άλατα ζυγίζονται μόνο μια φορά. Ο λόγος που παρασκευάζονται διαφορετικά stock διαλύματα είναι ότι μερικά συστατικά σχηματίζουν ιζήματα όταν αναμιγνύονται με κάποια άλλα και δεν διαλύονται στο τελικό θρεπτικό υπόστρωμα. Τα διαλύματα αυτά μπορούν να διατηρηθούν στο ψυγείο για μερικούς μήνες, όταν όμως χάσουν τη διαυγή τους, είναι ακατάλληλα πλέον για χρήση.

Πίνακας 2: Σύσταση stock διαλυμάτων ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) τεσσάρων γνωστών υποστρώματων που χρησιμοποιούνται στο μικροπολλαπλασιασμό. Οι συγκεντρώσεις που αναγράφονται είναι 100 φορές μεγαλύτερες από τη τελική συγκέντρωση του υποστρώματος, που σημαίνει ότι χρησιμοποιούνται 10 mL από το κάθε stock διάλυμα για την παρασκευή 1 L υποστρώματος. (*Μερικές φορές προστίθενται $85\text{-}255\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ του συστατικού, απευθείας στο υπόστρωμα καλλιέργειας) (Hartmann et al, 1997).

Συστατικό ($\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$)	Murashige and Skoog (MS)	Woody Plant Medium (WPM)	Anderson (And)	Gamborg B5
NH_4NO_3	165.00	40.00	40.00	-
KNO_3	190.00	-	48.00	250.0
$\text{Ca}(\text{NO}_3\cdot 4\text{H}_2\text{O})$	-	55.6	-	-
K_2SO_4	-	99.00	-	-
$\text{MgSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	37.00	37.00	37.00	25.00
$\text{MnSO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$	1.69	2.23	1.69	1.00
$\text{ZnSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	0.86	0.86	0.86	0.2
$\text{CuSO}_4\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.0025	0.0025	-	0.0025
NH_4SO_4	-	-	-	13.4
$\text{CaCl}_2\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	44.00	9.6	44.00	15.00
KI	0.083	-	0.083	0.075
$\text{CoCl}_2\cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.0025	-	0.083	0.0025
KH_2PO_4	17.00	17.00	-	-
H_3BO_3	0.62	0.62	0.62	0.30
$\text{Na}_2\text{MoO}_4\cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.025	0.025	0.025
$\text{NaH}_2\text{PO}_4\cdot \text{H}_2\text{O}$	*	-	38.00	15.00
$\text{FeSO}_4\cdot 7\text{H}_2\text{O}$	2.784	2.78	5.57	2.78
$\text{Na}_2\text{ EDTA}$	3.724	3.73	7.45	3.725
Thiamin HCl	0.10	0.10	0.04	1.00
Nicotinic acid	0.05	0.05	-	0.10
Pyridoxine HCl	0.05	0.05	-	0.10
Glycine	0.20	0.20	-	-
Myo-inositol	10.00	10.00	10.00	10.00
Adenine sulfate	-	-	8.00	-

2.3.6.2. Οργανικά συστατικά

A) Σάκχαρα

Η **σακχαρόζη** είναι το πιο κοινό σάκχαρο που χρησιμοποιείται στις περισσότερες καλλιέργειες. Η συγκέντρωσή της είναι συνήθως 2-4 %, αλλά μερικές φορές, όπως στην καλλιέργεια εμβρύων, μπορεί να φτάσει το 12 %. Η γλυκόζη, η φρουκτόζη και η μαλτόζη χρησιμοποιούνται ελάχιστα. Τα σάκχαρα προστίθενται στο θρεπτικό υπόστρωμα τη στιγμή που παρασκευάζεται.

B) Βιταμίνες

Οι βιταμίνες που είναι απαραίτητες για την ομαλή αύξηση και ανάπτυξη των φυτών είναι η θειαμίνη, το νικοτινικό οξύ, η πυριδοξίνη και η μυο-ινοσιτόλη. Κάποιες άλλες λιγότερο απαραίτητες είναι η βιοτίνη, η ριβοφλαβίνη και η βιταμίνη Ε. Αυτές χρησιμοποιούνται σε συγκέντρωση $0.1-0.5 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$.

Όπως και στην περίπτωση των ανόργανων αλάτων, οι βιταμίνες διαλύονται στο νερό και διατηρούνται στο ψυγείο με τη μορφή stock διαλυμάτων, σε συγκέντρωση 100 φορές μεγαλύτερη από αυτή του τελικού υποστρώματος (Hartmann et al, 1997).

Γ) Ορμόνες – ρυθμιστές ανάπτυξης

Ρυθμιστές της αύξησης και ανάπτυξης των φυτών στα *in vitro* συστήματα είναι οργανικές ενώσεις που επηρεάζουν την κυτταρική διαίρεση και μορφογένεση, και ρυθμίζουν την κατανομή των οργανικών ενώσεων τις οποίες βιοσυνθέτει το φυτό. Οι φυσικοί ρυθμιστές ανάπτυξης των φυτών είναι οι ορμόνες. Οι ορμόνες συντίθενται στα φυτά σε πολύ μικρές ποσότητες αλλά είναι πολύ ενεργές και συνήθως δρουν σε διαφορετικές θέσεις του φυτού από εκεί όπου παράγονται. Εκτός από τις ορμόνες, υπάρχουν και συνθετικές ορμόνες, που έχουν παρόμοια δομή με τις φυσικές και συνήθως είναι πιο δραστικές.

Οι πιο σημαντικοί ρυθμιστές είναι οι **αυξίνες**, οι **κυτοκινίνες** και οι **γιββεριλλίνες**.

Οι κυριότερες αυξίνες, σε σειρά αυξανόμενης δραστικότητας, είναι το **ινδολυλοξικό οξύ** (IAA, indole-3-acetic acid), το **ινδολυλοβουτυρικό οξύ** (IBA, indole-3-butyric acid), το **ναφθαλινοξικό οξύ** (NAA, *n*-naphthaleneacetic acid) και το **2,4-διχλωροφαινοξικό οξύ** (2,4-D, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid). Από αυτά, φυσική αυξίνη είναι το IAA, το οποίο, όπως φαίνεται και από την παραπάνω σειρά, είναι η λιγότερο δραστική αυξίνη και προστίθεται στα θρεπτικά διαλύματα συνήθως σε συγκεντρώσεις $0.01-10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$. Οι συνθετικές αυξίνες (IBA, NAA, και 2,4-D) είναι πιο δραστικές και χρησιμοποιούνται σε συγκεντρώσεις $0.001-10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, η χρησιμοποίησή όμως της 2,4-D πρέπει κατά το δυνατό να αποφεύγεται γιατί μπορεί να προκαλέσει μεταλλαξογένεση ή αναστολή της φωτοσύνθεσης.

Οι αυξίνες γενικά προάγουν την κυτταρική διαίρεση (σχηματισμός κάλλου), κυτταρική επιμήκυνση, διόγκωση των ιστών και το σχηματισμό επίκτητων (τυχαίων) ριζών, ενώ αναστέλλουν το σχηματισμό μασχαλαίων και τυχαίων βλαστών και την εμβρυογένεση στις καλλιέργειες αιωρημάτων.

Οι κυριότερες κυτοκινίνες είναι η **κινητίνη**, η **βενζυλαδενίνη** (BA, benzyladenine ή benzylaminopurine), η **ζεατίνη** και η **PBA** [6-(benzylamino)-9-(2-tetrahydropyran-9H-purine)]. Υπάρχουν τόσο φυσικές όσο και συνθετικές. Οι κυτοκινίνες προάγουν την κυτταρική διαίρεση, ιδιαίτερα σε μικρές συγκεντρώσεις και σε συνδυασμό με τις αυξίνες, ενώ σε λίγο μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ($1-10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) προκαλούν το σχηματισμό τυχαίων βλαστών και αναστέλλουν το σχηματισμό ριζών. Επίσης, προάγουν την ανάπτυξη των μασχαλιαίων βλαστών αναστέλλοντας την κυριαρχία της κορυφής και καθυστερούν τη γήρανση (Ελευθερίου, 1994). Η **2iP** (N^6 -isopentenyl-adenine) και η **adenine-sulfate** συχνά χρησιμοποιούνται στα θρεπτικά μέσα σε συγκεντρώσεις $0.01-10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ και $40-120 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$, αντίστοιχα (Hartmann et al, 1997). Η **αδενίνη** η οποία είναι μια πουρίνη, αποτέλεσε το κλειδί για την ανακάλυψη των κυτοκινινών, αφού όλες είναι παράγωγα αυτής. Επομένως η ικανότητα των κυτοκινινών για κυτταροδιαίρεση περιορίζεται μόνο στα παράγωγα αυτά της αδενίνης. Αυτή καθαυτή η αδενίνη δείχνει δραστηριότητα κυτοκινίνης, όταν προστίθεται σε φυτικούς ιστούς. Μέχρι σήμερα ελάχιστες ουσίες είναι γνωστές, που να μην είναι παράγωγα της αδενίνης και να έχουν δραστηριότητα κυτοκινίνης, όπως για παράδειγμα η χλωροφαινυλ-φαινυλουρία (Καράταγλης, 1995).

Η πιο σημαντική γιββεριλλίνη που χρησιμοποιείται στην ιστοκαλλιέργεια είναι το **γυββεριλλικό οξύ** (GA_3). Ένα από τα πιο χαρακτηριστικά βιολογικά αποτελέσματα της δράσης των γιββεριλλινών είναι η αύξηση του μήκους των βλαστών που προκαλείται με κυτταρική επιμήκυνση. Πέρα όμως από την επιμήκυνση των κυττάρων, είναι σήμερα βέβαιο ότι επηρεάζουν και τη διαδικασία της κυτταρικής διαίρεσης στα ανώτερα φυτά. Έχει διαπιστωθεί ότι λίγες ώρες μετά τη χρήση της γιββεριλλίνης παρατηρείται αύξηση του μεγέθους της μεριστωματικής περιοχής (συνεπώς και του ποσοστού των κυττάρων που διαιρούνται), καθώς και επιτάχυνση των κυτταρικών διαιρέσεων (Καράταγλης, 1995).

Οι ορμόνες που αναφέρθηκαν παραπάνω, παρασκευάζονται και διατηρούνται σε stock διαλύματα στο ψυγείο, όμως χάνουν τη δράση τους με το πέρασμα του χρόνου (Hartmann et al, 1997).

Η περίπου αντίθετη δράση των αυξινών και των κυτοκινινών έχει τεράστια σημασία για τα συστήματα μικροπολλαπλασιασμού γιατί παρέχουν ένα αποτελεσματικό μέσο στη διάθεση των ερευνητών και των παραγωγών πολλαπλασιαστικού υλικού να ρυθμίζουν κατά βούληση την επαγωγή της

μορφογένεσης, δηλαδή να κατευθύνουν το σχηματισμό βλαστών ή ριζών ή κάλλων ή εμβρύων. Γι' αυτό, οι *in vitro* καλλιέργειες είναι σχεδόν αδύνατες χωρίς τους ρυθμιστές.

Οι απαιτήσεις των διάφορων φυτών σε ρυθμιστές είναι πολύ διαφορετικές διότι υπάρχουν είδη που παράγουν από μόνα τους επαρκείς ποσότητες αυξίνης ή κυτοκινίνης και δεν χρειάζονται επιπλέον ποσά. Έτσι, ανάλογα με τις απαιτήσεις τους σε ρυθμιστές, οι *in vitro* καλλιέργειες διακρίνονται σε αυτές που δεν χρειάζονται ούτε αυξίνες ούτε κυτοκινίνες, σε άλλες που χρειάζονται μόνο αυξίνη ή μόνο κυτοκινίνη και σε αυτές που χρειάζονται και τα δύο είδη ορμονών. Έχει αποδειχθεί ότι εκείνο το οποίο έχει μεγαλύτερη σημασία, είναι η σχετική αναλογία των ορμονών, παρά η ακριβής ποσότητά τους (Ελευθερίου, 1994).

Δ) Άλλες ουσίες

Το **κιτρικό** και το **ασκορβικό οξύ** χρησιμοποιούνται συχνά ως αντιοξειδωτικά μέσα. Ο **ενεργός άνθρακας** επίσης, προστίθεται σε ορισμένες περιπτώσεις στα θρεπτικά υποστρώματα, διότι απορροφά κάποιες ανεπιθύμητες ουσίες. Σε μερικές καλλιέργειες χρησιμοποιείται **γάλα καρύδας** και **εκχυλίσματα ζυμομυκήτων**, ενώ σε κάποιες καλλιέργειες εμβρύων απαραίτητο είναι το **μηλικό οξύ** (Hartmann et al, 1997).

2.3.6.3. Άγαρ

Τα θρεπτικά υποστρώματα χρησιμοποιούνται είτε ως υγρά είτε ως στερεά (πήκτες). Τα στερεά δημιουργούνται με τη προσθήκη άγαρ ή αγαρόζης, μια ουσία που στο εμπόριο κυκλοφορεί σαν σκόνη. Η καλύτερη συγκέντρωση του άγαρ στα θρεπτικά μέσα είναι 0.5-0.6 %, η οποία εξασφαλίζει στο έκφυτο στήριξη και πρόσληψη θρεπτικών από το υπόστρωμα. Σε χαμηλότερες συγκεντρώσεις το έκφυτο δε στηρίζεται, βυθίζεται μέσα στο υπόστρωμα και συνήθως χάνει τη ζωηρότητά του. Αντίθετα, σε συγκεντρώσεις πάνω από 1%, τα θρεπτικά άλατα δύσκολα προσλαμβάνονται λόγω της πολύ αρνητικής οσμωτικής πίεσεως.

Ένας πολυσακχαρίτης (Gelrite) που παράγεται από το βακτήριο *Pseudomonas*, χρησιμοποιείται σε ορισμένες καλλιέργειες, ως υποκατάστατο του άγαρ. Η συγκέντρωσή του στα θρεπτικά υποστρώματα είναι μικρότερη από αυτή του άγαρ, αλλά συχνά χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με το άγαρ σε αναλογία 3:1 (Gelrite:άγαρ).

Τα υγρά υποστρώματα, που παρασκευάζονται χωρίς την προσθήκη άγαρ, βρίσκουν εφαρμογή σε κάποια είδη φυτών που εκκρίνουν τοξικές ουσίες από τις κομμένες

επιφάνειες τους. Τα έκφυτα, σ' αυτή τη περίπτωση, δεν τοποθετούνται πάνω στο υπόστρωμα, αλλά σε κάποιο υλικό στήριξης, όπως διηθητικό χαρτί ή περιστρεφόμενο δίσκο, μέσα σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer (Hartmann et al, 1997).

2.3.7. Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων

Το νερό, που χρησιμοποιείται ως διαλύτης των θρεπτικών μέσων, πρέπει να είναι υψηλής ποιότητας, δις-απιονισμένο, χωρίς οργανικές και χημικές προσμίξεις και με χαμηλή συγκέντρωση αλάτων.

Για την προετοιμασία μεγάλης ποσότητας υποστρώματος χρειάζεται ένας μεταλλικός αναμίκτης (mixer), στον οποίο προστίθεται αρχικά ένα μέρος του τελικού όγκου του νερού. Κατόπιν, προστίθενται με πιπέτες ή ογκομετρικούς κυλίνδρους τα stock διαλύματα. Ζυγίζονται τα στερεά συστατικά (σακχαρόζη, άγαρ) και αναμιγνύονται στο διάλυμα με ταυτόχρονη ανάδευση. Αφού συμπληρωθεί με νερό μέχρι τελικού όγκου και τα συστατικά αναμιχθούν εντελώς, ρυθμίζεται το pH του διαλύματος. Αυτό έχει καθοριστεί ανάλογα με τις απαιτήσεις του φυτού που πρόκειται να καλλιεργηθεί.

Το στερεό θρεπτικό μέσο τοποθετείται σε σωλήνες, τριβλία ή γυάλινα δοχεία και βράζεται μέχρι πλήρους διαλύσεως των συστατικών και καλής διαυγάσεώς του. Κατόπιν, αποστειρώνεται σε ειδικό κλίβανο υγρής αποστείρωσης (autoclave) στους 121 °C για 20 min. Ο χρόνος αποστείρωσης είναι ανάλογος με τον όγκο του θρεπτικού μέσου.

Οι ουσίες που είναι ευαίσθητες στις υψηλές θερμοκρασίες, προστίθενται στο διάλυμα μετά την αποστείρωσή του και όταν η θερμοκρασία του φτάσει τους 45-50 °C, με τη βοήθεια των ειδικών φίλτρων.

Το υπόστρωμα μπορεί να χρησιμοποιηθεί για καλλιέργεια μετά τη στερεοποίησή του έως και για 2-4 εβδομάδες. Για να διατηρηθεί περισσότερο πρέπει να τοποθετείται στο ψυγείο (Hartmann et al, 1997).

2.3.8. Επιφανειακή απολύμανση

Τα τμήματα των βλαστών του φυτού, που πρόκειται να πολλαπλασιαστεί, απολυμαίνονται επιφανειακά. Αρχικά γίνεται μια προεμβάπτιση σε διάλυμα αλκοόλης (αιθυλικής, μεθυλικής ή ισοπροπυλικής) συνήθως 80 % και κατόπιν γίνεται εμβάπτιση σε διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου ή ασβεστίου 10-20 %. Μερικές σταγόνες κάποιου προσκολλητικού (συνήθως Tween 20), προστίθενται στο διάλυμα απολύμανσης για να βοηθήσουν στη πλήρη διαβροχή των εκφύτων.

Η αποτελεσματικότητα της απολύμανσης, αυξάνει με την αύξηση του χρόνου απολύμανσης και της συγκέντρωσης του απολυμαντικού, αλλά ταυτόχρονα αυξάνει και ο κίνδυνος καταστροφής των ζωντανών ιστών των εκφύτων. Οι τιμές που παίρνουν αυτοί οι δύο παράγοντες, εξαρτώνται κάθε φορά από το είδος του φυτού και καθορίζονται με δοκιμές.

Άλλα απολυμαντικά που χρησιμοποιούνται είναι το **υπεροξειδίο του υδρογόνου**, ο **νιτρικός άργυρος** και ο **χλωριούχος υδράργυρος**. Το τελευταίο είναι δηλητηριώδες, ισχυρά τοξική ουσία, γι' αυτό η χρήση του πρέπει να γίνεται με μεγάλη προσοχή.

Μια τυπική διαδικασία απολύμανσης, περιλαμβάνει τη συλλογή των βλαστών από τα μητρικά φυτά, την απομάκρυνση ή όχι των φύλλων και τον τεμαχισμό τους σε τμήματα (έκφυτα) μήκους μερικών εκατοστών. Ακολουθεί πλύσιμο με νερό βρύσης, προεμβάπτιση σε διάλυμα αλκοόλης, εμβάπτιση σε διάλυμα ισχυρότερου απολυμαντικού για 5-15 min και ξέπλυμα με αποστειρωμένο νερό τουλάχιστον 2-3 φορές. Η απολύμανση και το ξέπλυμα γίνεται κάτω από ασηπτικές συνθήκες, στον απαγωγό νηματικής ροής.

Οι μικροοργανισμοί που δεν νεκρώθηκαν κατά την απολύμανση, συνήθως εμφανίζονται μετά από μερικές ημέρες, από την είσοδο των εκφύτων στους σωλήνες καλλιέργειας. Τότε οι καλλιέργειες αυτές απορρίπτονται και αποστειρώνονται σε ειδικό κλίβανο. Μερικές φορές κάποια βακτήρια, όπως ο *Bacillus subtilis*, *Erwinia* ή *Pseudomonas*, βρίσκονται στους εσωτερικούς ιστούς του φυτού και όχι επιφανειακά. Τότε η μόλυνση δεν είναι ορατή στα πρώτα στάδια, αλλά εμφανίζεται μετά τη σταθεροποίηση της καλλιέργειας, μέχρι και μετά από μερικούς μήνες. Σ' αυτή την περίπτωση, οι απώλειες είναι τεράστιες και η αντιμετώπιση του φαινομένου πολύ δύσκολη. Η προσθήκη αντιβιοτικών στο υπόστρωμα καλλιέργειας είναι η μόνη πιθανή λύση του προβλήματος (Hartmann et al, 1997).

Το ποσοστό μόλυνσης των καλλιεργειών κατά το αρχικό στάδιο ενδυνάμωσης των εκφύτων, περιορίζεται σημαντικά, αν τα μητρικά φυτά δεν είναι εκτεθειμένα σε υπαίθριες συνθήκες, αλλά καλλιεργούνται εντός θερμοκηπίων (Ποντίκης, 1994).

2.3.9. Στάδια μικροπολλαπλασιασμού

2.3.9.1. Εγκατάσταση και σταθεροποίηση καλλιέργειας

Το στάδιο αυτό περιλαμβάνει την επιλογή των εκφύτων, την απολύμανσή τους (όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 2.3.7.) και τη σταθεροποίηση της καλλιέργειας στο κατάλληλο θρεπτικό μέσο.

Ο τύπος του εκφύτου ποικίλει ανάλογα με το είδος και την ποικιλία του φυτού και το σκοπό της καλλιέργειας. Είναι συνήθως τμήματα νεοσχηματιζόμενων βλαστών, που φέρουν κορυφή (επάκριο μερίστωμα) ή τουλάχιστον ένα γόνατο με ένα μασχαλαίο οφθαλμό. Το μήκος τους ποικίλει από 1-5 mm, όταν πρόκειται για μεριστωματική καλλιέργεια, μέχρι μερικά εκατοστά.

Στο βασικό θρεπτικό υπόστρωμα πολλές φορές, προστίθενται αντιοξειδωτικές ουσίες όπως ασκορβικό οξύ, κιτρικό οξύ και ενεργός άνθρακας, για την αντιμετώπιση της οξείδωσης των φαινολικών ουσιών, που εκκρίνονται από τις κομμένες επιφάνειες των εκφύτων. Ο όγκος του υποστρώματος είναι συνήθως μικρός (περίπου 10 mL), όταν ο όγκος του δοκιμαστικού σωλήνα που χρησιμοποιείται είναι 50 mL.

Κατά το στάδιο αυτό οι καλλιέργειες ενδυναμώνονται, επί 4-6 εβδομάδες, και μεταφυτεύονται (χωρίς διαίρεση) σε γυάλινα βάζα όπου αρχίζει το στάδιο του πολλαπλασιασμού.

2.3.9.2. Πολλαπλασιασμός

Κατά το στάδιο αυτό παράγονται αρκετοί βλαστοί από το αρχικό έκφυτο και όταν αυτοί αποκτήσουν ικανοποιητικό μήκος, αποχωρίζονται και μεταφυτεύονται σε νέο υπόστρωμα. Η διεργασία αυτή επαναλαμβάνεται κάθε 4-8 εβδομάδες.

Το θρεπτικό μέσο που χρησιμοποιείται εξαρτάται από το είδος και την ποικιλία του φυτού. Συνήθως είναι όμοιο με εκείνο που χρησιμοποιείται στο προηγούμενο στάδιο, αλλά συχνά με μεγαλύτερη συγκέντρωση κυτοκίνης. Ο όγκος του υποστρώματος είναι 100-150 mL, ανάλογα με το δοχείο καλλιέργειας.

Οι νέοι βλαστοί τοποθετούνται κατακόρυφα ή οριζόντια στην επιφάνεια του υποστρώματος, χωρίς να βυθίζονται βαθιά μέσα σ' αυτό. Με την οριζόντια τοποθέτηση επιτυγχάνεται η εκβλάστηση περισσότερων πλάγιων οφθαλμών.

Ο αριθμός των παραγόμενων βλαστών ανά έκφυτο, ποικίλει από 5-25, ή και περισσότερο, και εξαρτάται από το είδος και τις συνθήκες καλλιέργειας.

2.3.9.3. Ριζοβολία

Οι βλαστοί που αναπτύσσονται στα υποστρώματα πολλαπλασιασμού, πολύ σπάνια εκπτύσσουν ρίζες, όπως συμβαίνει στην αφρικανική βιολέτα. Τα περισσότερα είδη φυτών για να σχηματίσουν ρίζες, πρέπει να μεταφερθούν σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα (in vitro) ή να μεταφυτευθούν κατ' ευθείαν σε συνθήκες υδρονέφωσης στο θερμοκήπιο (ex vitro).

Το υπόστρωμα, για την in vitro ριζοβολία, πρέπει να περιέχει αυξίνη και όχι κυτοκίνη (ή μικρή συγκέντρωση αυτής). Πολλές φορές, η μείωση της συγκέντρωσης

των ανόργανων αλάτων είναι ευνοϊκή. Για μερικά φυτικά είδη, το ποσοστό ριζοβολίας αυξάνει, αν οι βλαστοί καλλιεργηθούν μόνο για 1-2 ημέρες σε υπόστρωμα με αυξίνη και κατόπιν μεταφερθούν σε υπόστρωμα χωρίς αυξίνη. Η ριζοβολία κάποιων άλλων ειδών ευνοείται με τη τοποθέτησή τους στο σκοτάδι.

Οι βλαστοί που χρησιμοποιούνται γι' αυτό το σκοπό, πρέπει να είναι μεμονωμένοι, ακέραιοι, χωρίς πλάγιους βλαστούς.

Σε μερικά είδη, μεταξύ του σταδίου του πολλαπλασιασμού και της ριζοβολίας, παρεμβάλλεται ένα επιπλέον στάδιο, το στάδιο ανάπτυξης ή επιμήκυνσης (elongation). Τα έκφυτα κατά το στάδιο αυτό, καλλιεργούνται για 2-4 εβδομάδες, σε υπόστρωμα χωρίς κυτοκινίνη και σε μερικές περιπτώσεις με ορισμένη συγκέντρωση γιββεριλλικού οξέος. Έτσι, όταν αυτά μεταφερθούν στο υπόστρωμα ριζοβολίας, δεν επηρεάζονται από την ανασταλτική, για το σχηματισμό ριζών, δράση της κυτοκινίνης.

Η διαδικασία της ριζοβολίας των εκφύτων στο θερμοκήπιο (ex vitro) είναι όμοια με εκείνη που ακολουθείται κατά το πολλαπλασιασμό των φυτών με μοσχεύματα. Τα έκφυτα εμβαπτίζονται σε διάλυμα αυξίνης, ή καλλιεργούνται για 5-10 ημέρες σε θρεπτικό μέσο με αυξίνη, και έπειτα φυτεύονται σε κατάλληλο υπόστρωμα (μίγμα τύρφης - βερμικουλίτη ή τύρφης - περλίτη στο θερμοκήπιο), όπου η σχετική υγρασία είναι υψηλή.

2.3.9.4. Εγκλιματισμός στις εξωτερικές συνθήκες

Όταν τα έκφυτα σχηματίσουν ικανοποιητικό ριζικό σύστημα (in vitro), εξέρχονται από τα δοχεία καλλιέργειας και ξεπλένονται με νερό βρύσης, για την απομάκρυνση του υποστρώματος. Κατόπιν, μεταφυτεύονται σε αποστειρωμένο υπόστρωμα εντός δίσκων και τοποθετούνται σε θερμοκήπιο, ή σε θάλαμο ρυθμιζόμενων συνθηκών, με χαμηλή ένταση φωτός και υψηλή σχετική υγρασία.

Μετά από μερικές ημέρες, τα φυτά σχηματίζουν νέες ρίζες και σταδιακά εκτίθενται σε χαμηλότερη σχετική υγρασία και υψηλότερη ένταση φωτός. Παραμένουν εντός των θερμοκηπιακών εγκαταστάσεων για κάποιο ακόμα χρονικό διάστημα, κατόπιν μεταφυτεύονται σε ατομικά δοχεία (γλάστρες) και αφού σκληραγωγηθούν επαρκώς, μεταφέρονται σε συνθήκες αγρού - φυτώριο (Hartmann et al, 1997).

2.3.10. **Μικροπολλαπλασιασμός των *Ericaceae***

Αρκετή έρευνα έγινε τα τελευταία χρόνια για τον πολλαπλασιασμό των ροδόδενδρων, ανθοκομικών με τεράστιο οικονομικό ενδιαφέρον. Η προσπάθεια παραγωγής φυτών με τη μέθοδο των μοσχευμάτων, απέτυχε λόγω της δυσκολίας ριζοβολίας αυτών (Anderson, 1975). Η αποτελεσματικότερη μέθοδος

πολλαπλασιασμού του γένους αυτού είναι ο μικροπολλαπλασιασμός, που χρησιμοποιείται σήμερα ευρύτατα σε εμπορική κλίμακα. Τα υποστρώματα που χρησιμοποιούνται είναι του Anderson και το Woody Plant Medium (Lloyd & McCown, 1980). Το είδος και η συγκέντρωση των ορμονών που προστίθενται, εξαρτώνται από το είδος και την ποικιλία του φυτού και από το στάδιο καλλιέργειας. Στο υπόστρωμα MS, που είναι κατάλληλο για το μικροπολλαπλασιασμό πολλών φυτών, τα έκφυτα του ροδόδενδρου παρουσίασαν καφέτιασμα, χλωρώσεις φύλλων και τελική νέκρωση, εξαιτίας της αυξημένης συγκέντρωσης αλάτων (Anderson, 1984).

Οι Hartmann et al (1997) αναφέρουν ότι το ροδόδενδρο πολλαπλασιάζεται σε υπόστρωμα του Anderson με 5.71 μM IAA και 24.59 μM 2iP, και ριζοβολεί σε υπόστρωμα του Anderson με 26.85 μM NAA και ενεργό άνθρακα ή σε υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS με 9.84-34.45 μM IBA και ενεργό άνθρακα.

Για τον μικροπολλαπλασιασμό του υβριδίου *Rhododendron laetum* \times *aurigeranum*, βρέθηκε ότι το κατάλληλο υπόστρωμα για το στάδιο του πολλαπλασιασμού, είναι του Anderson με 23 μM IAA και 74 μM 2iP, ενώ για το στάδιο της ριζοβολίας είναι το $\frac{1}{4}$ του Anderson με 28 μM IAA (Iapichino et al, 1991).

Για τον μικροπολλαπλασιασμό του είδους *Oxydendrum arboreum*, δοκιμάστηκε το υπόστρωμα WPM, το οποίο με 2 ή 4 μM ζεατίνη και 2.5-10 μM IBA, για τον πολλαπλασιασμό και τη ριζοβολία, αντίστοιχα, έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα (Banko & Stefani, 1989).

Για τον μικροπολλαπλασιασμό του είδους *Arbutus xalapensis* (Texas madrone), βρέθηκε ότι το κατάλληλο υπόστρωμα για το στάδιο του πολλαπλασιασμού, περιέχει ανόργανα άλατα του WPM, βιταμίνες του MS και 11.1 ή 22.2 μM BA, ενώ το κατάλληλο υπόστρωμα για το στάδιο της ριζοβολίας, περιέχει ανόργανα άλατα του WPM, βιταμίνες του MS και 6.1 μM IBA (Mackay, 1996).

Καμιά σχετική μελέτη και κανένα δημοσίευμα δεν έχει γίνει μέχρι σήμερα, για τον μικροπολλαπλασιασμό των ειδών *Arbutus unedo*, *Erica carnea* και *Erica* \times *darleyensis*.

2.4. ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσας εργασίας είναι η εύρεση τρόπου μικροπολλαπλασιασμού των ειδών *Arbutus unedo*, *Erica carnea* και *Erica × darleyensis* που παρουσιάζουν οικονομικό ενδιαφέρον σαν ανθοκομικά. Περιλαμβάνει την εύρεση του καλύτερου υποστρώματος και της κατάλληλης ορμόνης και συγκέντρωσης αυτής, για το κάθε στάδιο του *in vitro* πολλαπλασιασμού (εγκατάσταση, πολλαπλασιασμός και ριζοβολία), καθώς και την *ex vitro* ριζοβολία (όπου ήταν δυνατό) σε συνθήκες υδρονέφωσης και ομίχλης.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. *Arbutus unedo*

3.1.1. Ανάπτυξη μητρικών φυτών (24/3/98)

Τα μητρικά φυτά του *A. unedo* (Εικόνα 1) μεταφέρθηκαν σε πλαστικό θερμοκήπιο, λιπάνθηκαν και αρδεύονταν ανά τακτά διαστήματα. Η λίπανση περιλάμβανε διαφυλλικό ψεκασμό με υδατοδιαλυτό σύνθετο λίπασμα 20-20-20 (N-P-K) με ιχνοστοιχεία ($2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$) σε συνδυασμό με υγρό σύνθετο λίπασμα 15-5-5 (N-P-K) ($25\text{mL}\cdot\text{L}^{-1}$) και προσθήκη κοκκώδους 12-10-20 (N-P-K) στο έδαφος ($20\text{g}/\text{φυτό}$).

Οι παραπάνω εργασίες έγιναν με σκοπό την ταχεία έκπτυξη των οφθαλμών και τη δημιουργία νέας βλάστησης.

3.1.2. Συλλογή και απολύμανση φυτικού υλικού (24/4/98)

Νεαροί βλαστοί, μήκους 5-10 cm ο καθένας, συλλέχθηκαν από τα μητρικά φυτά και αφαιρέθηκαν τα φύλλα τους, ενώ οι μασχαλιαίοι οφθαλμοί παρέμειναν ανέπαφοι. Ακολούθησε πλύσιμο με νερό βρύσης και τεμαχισμός των βλαστών σε έκφυτα μήκους 1-2 cm, με 1-2 γόνατα, το καθένα. Τα έκφυτα εμβαπτίστηκαν σε αιθανόλη 95% για 10 sec και πλύθηκαν με απεσταγμένο νερό 3 φορές. Κατόπιν μεταφέρθηκαν στο απαγωγό νηματικής ροής και εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου (NaOCl) 1.5%, στο οποίο είχαν προστεθεί 2-3 σταγόνες Tween ως διαβρεκτικό. Στο διάλυμα, ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν αποστειρωμένο νερό. Παρέμειναν σ' αυτό, σε κωνική φιάλη των 250 mL, για 10 min με συνεχή ανάδευση και ακολούθησε πλύσιμο των εκφύτων 3 φορές με αποστειρωμένο νερό.

3.1.3. Εγκατάσταση εκφύτων (24/4/98)

Για την εγκατάσταση των εκφύτων χρησιμοποιήθηκαν δοκιμαστικοί σωλήνες που περιείχαν 10-15 mL υπόστρωμα. Τα έκφυτα τοποθετήθηκαν κάθετα προς την επιφάνεια του υποστρώματος, με βυθισμένο το 1/3 του μήκους τους μέσα σ' αυτό και κατόπιν κλείστηκαν με πλαστικό καπάκι. Μελετήθηκαν δύο διαφορετικά υποστρώματα (με 42 σωλήνες-επαναλήψεις για κάθε υπόστρωμα): το ένα περιείχε ανόργανα άλατα του Woody Plant Medium (WPM), το άλλο ανόργανα άλατα του Murashige and Skoog (MS), ενώ και τα δύο περιείχαν τις βιταμίνες του MS, $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ σακχαρόζη, $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ άγαρ και $11.1 \text{ }\mu\text{M}$ βενζυλαδερίνης (BA). Το pH του διαλύματος

ρυθμίστηκε στο 5.7 πριν την αποστείρωση. Τα αντίστοιχα υποστρώματα, WPM₁ και MS₁, φαίνονται στους Πίνακες 3 και 4.

Ακολούθησαν τρεις ανανεώσεις (μετά από 18, 41 και 66 ημέρες από την εγκατάσταση) και επανακαλλιέργειες των εκφύτων σε άλλους σωλήνες με ίδιας συστάσεως υπόστρωμα και κάθε φορά γινόταν καταμέτρηση των σωλήνων που είχαν μολυνθεί από μύκητα ή βακτήριο και των σωλήνων όπου τα έκφυτά τους παρουσίασαν Browning. Κατά την πρώτη και δεύτερη ανανέωση μετρήθηκε επίσης ο αριθμός των βλαστών ανά έκφυτο που σχηματίστηκαν. Κατά την πρώτη ανανέωση αφαιρέθηκαν 1-3 mm από τη βάση του εκφύτου, ενώ στις άλλες τα υγιή έκφυτα τεμαχίστηκαν με σκοπό την αύξηση του αριθμού των σωλήνων.

3.1.4. Πολλαπλασιασμός (21/7/98)

Για τη μελέτη του ρυθμού πολλαπλασιασμού του *A. unedo*, χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα όσο το δυνατόν ομοιόμορφα, μήκους 2-2.5 cm με 2 γόνατα το καθένα και χωρίς πλάγιους βλαστούς. Αυτά τοποθετήθηκαν κατακόρυφα σε σωλήνες που περιείχαν 10-15 mL υπόστρωμα και οι οποίοι στο τέλος κλείστηκαν με καπάκι. Δοκιμάστηκαν τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις της κυτοκίνινης BA, σε δύο διαφορετικής συστάσεως υποστρώματα. Τα υποστρώματα ήταν εκείνα που αναφέρθηκαν στην παράγραφο 3.1.3. και οι συγκεντρώσεις της BA που μελετήθηκαν ήταν: 5.5, 11.1 και 22.2 μM (Πίν. 3 & 4). Μελετήθηκαν επίσης έκφυτα με και χωρίς κορυφή. Το πείραμα ήταν με τρεις παράγοντες (ανόργανα άλατα * συγκέντρωση BA * είδος εκφύτου) με 12 μεταχειρίσεις (2*3*2), αντίστοιχα, ενώ ο αριθμός των επαναλήψεων κάθε πειράματος ήταν μεταξύ 5 και 29 σωλήνων.

Μετά από 30 ημέρες (21/8/98), μετρήθηκε ο αριθμός των εκπτυσσόμενων βλαστών ανά έκφυτο που χωρίστηκαν σε βλαστούς μήκους 0-1 cm και > 1cm. Πρέπει να σημειωθεί ότι μόνο βλαστοί μήκους > 1cm μπορούν να αποχωριστούν από το έκφυτο και να δώσουν νέο έκφυτο, με αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό του φυτού. Επομένως, σημασία στα πειράματα πολλαπλασιασμού έχουν αυτοί οι βλαστοί, και όχι οι μικρότεροι.

3.1.5. Ριζοβολία εκφύτων (in vitro)

Τα έκφυτα που χρησιμοποιήθηκαν στα παρακάτω πειράματα ριζοβολίας του *A. unedo* ήταν όλα με κορυφή, μήκους 2-4 cm και χωρίς πλάγιους βλαστούς. Αυτά τοποθετούνταν σε γυάλινα βάζα (5-7 έκφυτα / βάζο), με περίπου 50 mL υποστρώματος και κλείνονταν με πλαστικό καπάκι και μεμβράνη (Εικόνα 3).

3.1.5.1. Πείραμα 1^ο (30/7/98)

Μελετήθηκε η επίδραση του ινδολυλοβουτυρικού οξέος (IBA) στη ριζοβολία των εκφύτων του *A.unedo*. Το βασικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε περιείχε ανόργανα άλατα και βιταμίνες του MS, 20 g·L⁻¹ σακχαρόζη, 4.5 g·L⁻¹ άγαρ και το pH ρυθμίστηκε στο 5.7 (Πίν. 6). Οι διάφορες συγκεντρώσεις του IBA ήταν: 0, 3, 6 και 9 μM (4 μεταχειρίσεις) με 2 βάζα – επαναλήψεις και 6 έκφυτα / βάζο.

Παρατηρήσεις σχετικά με τον αριθμό των εκφύτων που ριζοβόλησαν πάρθηκαν μετά από διάστημα 20 ημερών (20/8/98).

3.1.5.2. Πείραμα 2^ο (21/8/98)

Μελετήθηκε η δράση δύο ορμονών ταυτόχρονα, του IBA και του ναφθαλινοξικού οξέος (NAA), σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς κάποιων συγκεντρώσεών τους, στη ριζοβολία των εκφύτων. Το βασικό υπόστρωμα ήταν εκείνο που περιγράφηκε στην παράγραφο 3.1.5.1., εκτός του pH που ήταν 5.2, και οι συγκεντρώσεις των ορμονών ήταν: 0, 0.49, 2.46 και 4.92 μM IBA και 0, 0.54, 2.69 και 5.37 μM NAA, οι οποίες αντιστοιχούν σε 0, 0.1, 0.5 και 1 mg·L⁻¹, για το καθένα (Πίν. 9). Οι μεταχειρίσεις ήταν συνολικά 16 με 6 έκφυτα – επαναλήψεις ανά μεταχείριση.

Ο αριθμός των εκφύτων που ριζοβόλησαν, μετρήθηκε μετά από 39 ημέρες από την είσοδό τους στο βάζο (29/9/98).

3.1.5.3. Πείραμα 3^ο (28/9/98)

Στο πείραμα αυτό, εξετάστηκε η δράση του IBA και του γιββερλικού οξέος (GA₃) ταυτόχρονα, καθώς και η επίδραση της μείωσης στο ήμισυ της ποσότητας των ανόργανων αλάτων των μακροστοιχείων, παρουσία ή απουσία ινδολυλοξικού οξέος (IAA), στη ριζοβολία των εκφύτων. Η σύσταση των πέντε υποστρωμάτων – μεταχειρίσεων, φαίνεται αναλυτικά στον Πίνακα 8. Το πείραμα έγινε με 6 έκφυτα – επαναλήψεις ανά μεταχείριση.

Οι παρατηρήσεις του πειράματος πάρθηκαν μετά από 50 ημέρες από την είσοδό τους στο βάζο (17/11/98).

3.1.5.4. Πείραμα 4^ο (30/9/98)

Σε κάποια φυτικά είδη βρέθηκε πως η φλορογλυκίνη επιδρά θετικά στην έκπτυξη ριζών (είτε όταν αυτή βρίσκεται στο υπόστρωμα πολλαπλασιασμού, είτε όταν βρίσκεται στο υπόστρωμα ριζοβολίας), ενώ σε κάποια άλλα είδη βρέθηκε πως ο ενεργός άνθρακας, όταν βρίσκεται στο υπόστρωμα ριζοβολίας, ευνοεί την έκπτυξη ριζών.

Στο πείραμα αυτό, έκφυτα καλλιεργήθηκαν για ένα μήνα σε δύο υποστρώματα πολλαπλασιασμού, WPM_1 και WPM_{1F} (Πίν. 3). Τα υποστρώματα αυτά ήταν όμοια αλλά το δεύτερο περιείχε επιπλέον $0.16 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ φλορογλυκίνη.

Μετά από διάστημα 30 ημερών, έκφυτα από το κάθε υπόστρωμα πολλαπλασιασμού, μεταφέρθηκαν σε 3 υποστρώματα ριζοβολίας. Το πρώτο περιείχε $0.49 \mu\text{M}$ IBA και $5.37 \mu\text{M}$ NAA, δηλαδή το συνδυασμό των αυξινών που αποδείχτηκε καλύτερος στο δεύτερο πείραμα. Το δεύτερο ήταν όμοιο με το πρώτο, όμως περιείχε επιπλέον 0.16 g/L φλορογλυκίνη, ενώ το τρίτο περιείχε αντί της φλορογλυκίνης, $0.2 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ ενεργό άνθρακα (Πίν. 9). Οι μεταχειρίσεις του πειράματος ήταν 6 με 2 βάζα – επαναλήψεις ανά μεταχείριση και 7 έκφυτα ανά βάζο.

Οι παρατηρήσεις σχετικά με τη ριζοβολία των εκφύτων, πάρθηκαν μετά από 30 ημέρες από την τοποθέτησή τους στο βάζο (30/11/98).

3.1.6. Ριζοβολία εκφύτων στο θερμοκήπιο (ex vitro)

3.1.6.1. Πείραμα 1° (24/6/98)

Έκφυτα από δύο υποστρώματα πολλαπλασιασμού WPM_1 και MS_1 , εμβλαπτίστηκαν σε διάλυμα IBA 2000 ppm, για 10-15 sec, φυτεύτηκαν σε δίσκους με μίγμα τύρφης : περλίτη (3:1) και τοποθετήθηκαν στο θερμοκήπιο σε σύστημα ομίχλης. Ο αριθμός των εκφύτων που επιβίωσαν μετρήθηκε μετά από 15 ημέρες.

3.1.6.2. Πείραμα 2° (20/8/98)

Έκφυτα από δύο υποστρώματα πολλαπλασιασμού WPM_1 και MS_1 , και επιπλέον από υποστρώματα ριζοβολίας που φαίνονται στον Πίνακα 6, εμβλαπτίστηκαν σε διάλυμα IBA 2000 ppm, για 10-15 sec, φυτεύτηκαν σε δίσκους με μίγμα τύρφης : περλίτη (3:1) και τοποθετήθηκαν στο θερμοκήπιο, μερικά σε σύστημα ομίχλης και μερικά σε σύστημα υδρονέφωσης (Εικόνα 4).

Ο αριθμός των εκφύτων που επέζησαν και σχημάτισαν ρίζες, μήκους 1-4 cm, μετρήθηκε μετά από 39 ημέρες (28/9/98).

3.1.6.3. Πείραμα 3° (30/9/98)

Έκφυτα από τα υποστρώματα πολλαπλασιασμού WPM_1 και MS_1 , και επιπλέον από υποστρώματα ριζοβολίας που φαίνονται στον Πίνακα 9, εμβλαπτίστηκαν σε διάλυμα IBA 2000 ppm, για 10-15 sec, φυτεύτηκαν σε δίσκους με μίγμα τύρφης : περλίτη (3:1) και τοποθετήθηκαν στο θερμοκήπιο σε σύστημα υδρονέφωσης.

Παρατηρήσεις πάρθηκαν μετά από 27 και 60 ημέρες από τη φύτευσή τους (27/10/98 και 30/11/98, αντίστοιχα).

3.2. *Erica carnea* (ποικιλία Springwood White)

3.2.1. Ανάπτυξη μητρικών φυτών (24/3/98)

Οι εργασίες ήταν όμοιες με εκείνες που έγιναν στην ανάπτυξη των μητρικών φυτών του *Arbutus unedo* και που αναφέρθηκαν στην παράγραφο 3.1.1 (Εικόνα 5).

3.2.2. Συλλογή και απολύμανση φυτικού υλικού (15/4/98 και 25/4/98)

Νεαροί βλαστοί, μήκους 2-5 cm ο καθένας, συλλέχθηκαν από τα μητρικά φυτά, ενώ η αφαίρεση των φύλλων πραγματοποιήθηκε μόνο σε μερικούς βλαστούς που διαχωρίστηκαν από τους υπόλοιπους. Ακολούθησε πλύσιμο με νερό βρύσης και τεμαχισμός των βλαστών σε έκφυτα μήκους 1-2 cm, με 4-5 γόνατα το καθένα. Τα έκφυτα εμβαπτίστηκαν σε αιθανόλη 95% για 10 δευτερόλεπτα και πλύθηκαν με απεσταγμένο νερό 3 φορές. Κατόπιν μεταφέρθηκαν σε ασηπτικές συνθήκες και εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου (NaOCl) 2%, στο οποίο είχαν προστεθεί 2-3 σταγόνες Tween ως διαβρεκτικό. Στο διάλυμα ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν αποστειρωμένο νερό. Παρέμειναν σ' αυτό, σε κωνική φιάλη των 250 mL, για 10 min με συνεχή ανάδευση και ακολούθησε πλύσιμο των εκφύτων 3 φορές με αποστειρωμένο νερό.

3.2.3. Εγκατάσταση εκφύτων (15/4/98 και 25/4/98)

Η εγκατάσταση των εκφύτων της *E. carnea* έγινε όπως και στην παράγραφο 3.1.3. Τα υποστρώματα που μελετήθηκαν ήταν τα εξής: το ένα αποτελούνταν από ανόργανα άλατα και βιταμίνες του MS, το άλλο από τα αντίστοιχα του Anderson (And), ενώ και τα δύο περιείχαν $30 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ σακχαρόζη, $5 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ άγαρ, $24,59 \mu\text{M}$ 2iP και $5,71 \mu\text{M}$ IAA. Το pH ρυθμίστηκε στο 5.2 πριν την αποστείρωση. Τα αντίστοιχα υποστρώματα MS₃ και A₁ φαίνονται στους Πίνακες 4 & 5 (Εικόνα 6).

Στην δεύτερη εγκατάσταση εκτός των δύο υποστρωμάτων, μελετήθηκε και η δυνατότητα εγκατάστασης εκφύτων με ή χωρίς φύλλα. Ο αριθμός των σωλήνων – επαναλήψεων για κάθε μεταχείριση ήταν 14 έως και 57.

Η πρώτη παρατήρηση, για τις ανωτέρω δυο εγκαταστάσεις, πάρθηκε ταυτόχρονα μετά από 28 και 18 ημέρες, αντίστοιχα. Μετρήθηκε ο αριθμός των σωλήνων που μολύνθηκαν από μύκητα ή βακτήριο, ο αριθμός των σωλήνων που τα έκφυτά τους παρουσίασαν νέκρωση της κορυφής και ο αριθμός των βλαστών που εκπύχθηκαν από τα υγιή. Οι βλαστοί ανάλογα με το μήκος τους κατατάχθηκαν σε βλαστούς μήκους 0-1cm και σε βλαστούς μήκους > 1cm.

Παράλληλα με την πρώτη παρατήρηση, έγινε ανανέωση της βάσης των υγιών εκφύτων (αφαίρεση τμήματος 1-3 mm) και επανακαλλιέργεια αυτών σε βάζα που περιείχαν 150-160 mL του ίδιου υποστρώματος. Δημιουργήθηκαν έτσι 14 βάζα με υπόστρωμα A₁ και 8 βάζα με MS₃. Η δεύτερη παρατήρηση σχετικά με τον αριθμό των βάζων που ήταν μολυσμένα από μύκητα ή βακτήριο, πάρθηκε μετά από 21 ημέρες (4/6/98). Οι επανακαλλιέργειες συνεχίστηκαν μέχρι τις 30/9/98.

3.2.4. Νέα συλλογή και απολύμανση φυτικού υλικού (29/6/98)

Τρεις ημέρες πριν τη συλλογή και απολύμανση των βλαστών της *E. carnea*, εφαρμόστηκε ψεκάσμος στα μητρικά φυτά, με μίγμα Benomyl και Streptomycin (0.6 g·L⁻¹ και 0.75 g·L⁻¹, αντίστοιχα), με στόχο την ελάττωση του πληθυσμού των παρόντων μικροοργανισμών.

Μετά την πάροδο τριών ημερών, συλλέχθηκαν νεαροί βλαστοί, μήκους 2-5 cm πλύθηκαν με νερό βρύσης και τεμαχίστηκαν σε έκφυτα μήκους 1-2 cm, με 4-5 γόνατα το καθένα. Τα έκφυτα εμβαιπτίστηκαν σε αιθανόλη 95%, για 10 δευτερόλεπτα, και πλύθηκαν με απεσταγμένο νερό 3 φορές. Κατόπιν μεταφέρθηκαν σε ασηπτικές συνθήκες και εμβαιπτίστηκαν σε διάλυμα χλωριούχου υδραργύρου (HgCl₂) 1‰, όπου είχαν προστεθεί 2-3 σταγόνες Tween ως διαβρεκτικό. Στο διάλυμα, ο διαλύτης που χρησιμοποιήθηκε ήταν αποστειρωμένο νερό. Παρέμειναν σ' αυτό, σε κωνική φιάλη των 250 mL, για 15 min με συνεχή ανάδευση και ακολούθησε πλύσιμο των εκφύτων 3 φορές με αποστειρωμένο νερό.

3.2.5. Νέα εγκατάσταση εκφύτων (29/6/98)

Τα έκφυτα εγκαταστάθηκαν στο καλύτερο υπόστρωμα (A₁) που αποδείχτηκε από την πρώτη εγκατάσταση (παρ. 3.2.3.), ανεξάρτητα από τις μολύνσεις που συνέβησαν, δηλαδή σ' εκείνο που περιείχε τα ανόργανα άλατα και τις βιταμίνες του Anderson.

Η εγκατάσταση έγινε σε 76 δοκιμαστικούς σωλήνες και οι παρατηρήσεις σχετικά με τον αριθμό των εκφύτων που μολύνθηκαν, από μύκητα ή βακτήριο, και εκείνων που νεκρώθηκαν λόγω τοξικότητας από το απολυμαντικό, μετρήθηκε μετά από 32 ημέρες (31/7/98).

3.2.6. Πολλαπλασιασμός

Τα διάφορα πειράματα για τη μελέτη του ρυθμού πολλαπλασιασμού της *E. carnea* πραγματοποιήθηκαν σε σωλήνες ή σε βάζα. Το βασικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε, περιείχε ανόργανα άλατα και βιταμίνες του Anderson, 30 g·L⁻¹ σακχαρόζη, 5 g·L⁻¹ άγαρ, 5.71 μM IAA και το pH ρυθμίστηκε στο 5.2, ενώ

μελετήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης και του είδους της ορμόνης (2iP και BA) στην παραγωγή βλαστών. Τα έκφυτα ήταν όσο το δυνατόν ομοιόμορφα, μήκους 2-2.5 cm και χωρίς πλάγιους βλαστούς.

3.2.6.1. Πείραμα 1° (10/8/98)

Τα έκφυτα τοποθετήθηκαν σε σωλήνες με το βασικό υπόστρωμα που αναφέρθηκε παραπάνω και με επιπλέον προσθήκη 2iP σε τρεις συγκεντρώσεις: 24.59, 49.19 και 73.77 μM (Πίν. 5). Μελετήθηκαν επίσης έκφυτα με ή χωρίς κορυφή.

Μετά από διάστημα 29 ημερών (8/9/98), τα έκφυτα μεταφέρθηκαν σε άλλους σωλήνες, με νέο αλλά ίδιας συστάσεως υπόστρωμα, με ταυτόχρονη ανανέωση της βάσης τους (αφαίρεση τμήματος 1-3 mm).

Μετά από 31 ημέρες (9/10/98) από την προηγούμενη ανανέωση, μετρήθηκε ο αριθμός των νεοσχηματιζόμενων βλαστών ανά υγιές έκφυτο (βλαστοί μήκους 0-1 cm και > 1 cm).

3.2.6.2. Πείραμα 2° (30/9/98)

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε βάζα πολλαπλασιασμού που περιείχαν 150-160 mL υποστρώματος, με 3 βάζα – επαναλήψεις ανά μεταχείριση και 8 έκφυτα ανά βάζο (Εικόνα 8). Το βασικό υπόστρωμα περιείχε επιπλέον BA σε 4 συγκεντρώσεις: 0, 5, 10 και 15 μM (Πίν. 7). Οι συγκεντρώσεις της BA ήταν 5 φορές μικρότερες από εκείνες της 2iP, λόγω της μεγαλύτερης δραστηκότητά της (Hartmann et al, 1997). Τα έκφυτα ήταν όλα με κορυφή.

Οι παρατηρήσεις του πειράματος πάρθηκαν μετά από 27 ημέρες (27/10/98).

3.2.7. Ριζοβολία εκφύτων (*in vitro*)

Τα έκφυτα που χρησιμοποιήθηκαν στα παρακάτω πειράματα ριζοβολίας της *E. carnea* ήταν όλα με κορυφή, μήκους 2-3 cm και χωρίς πλάγιους βλαστούς. Αυτά τοποθετούνταν σε γυάλινα βάζα (6 έκφυτα / βάζο), με περίπου 50 mL υποστρώματος και κλείνονταν με πλαστικό καπάκι και μεμβράνη (σελοφάν).

3.2.7.1. Πείραμα 1° (9/10/98)

Μελετήθηκαν μερικά από τα υποστρώματα ριζοβολίας που είχαν δοκιμαστεί στο *A. unedo*. Συγκεκριμένα δοκιμάστηκαν τα MRT₃, MRT₄, MRT₆, MRT₇, MSR₄, MSR₅, MSR₆, MSR₇ και MSR₈ (Πίν. 8 & 9), με 1 βάζο για κάθε υπόστρωμα και 6 έκφυτα / βάζο.

Οι παρατηρήσεις του πειράματος πάρθηκαν μετά από 39 ημέρες (17/11/98).

3.2.7.2. Πείραμα 2° (30/10/98)

Μελετήθηκαν τα υποστρώματα ριζοβολίας MRT₁₄, MRT₁₄F και MRT₁₄C (Πίν. 9), με 2 βάζα – επαναλήψεις ανά μεταχείριση και 6 έκφυτα / βάζο.

Οι παρατηρήσεις του πειράματος πάρθηκαν μετά από 30 ημέρες (30/11/98).

3.3. *Erica × darleyensis* (ποικιλία Silberschmelze).

3.3.1. Συλλογή και απολύμανση φυτικού υλικού (29/6/98)

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε ήταν όμοια με εκείνη που εφαρμόστηκε στην *E. carnea* (ποικ. Springwood White) και περιγράφηκε στην παράγραφο 3.2.4.

3.3.2. Εγκατάσταση εκφύτων (29/6/98)

Τα έκφυτα μετά την απολύμανση εγκαταστάθηκαν στο υπόστρωμα A₁, με ανόργανα άλατα και βιταμίνες του Anderson (Πίν. 5). Η εγκατάσταση έγινε σε 81 δοκιμαστικούς σωλήνες και οι παρατηρήσεις, σχετικά με τον αριθμό των σωλήνων που μολύνθηκαν από μύκητα ή βακτήριο, πάρθηκαν μετά από 32 ημέρες (31/7/98).

3.3.3. Πολλαπλασιασμός (3/8/98)

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε σε σωλήνες και τα έκφυτα που χρησιμοποιήθηκαν είχαν μήκος 2-2.5 cm, χωρίς πλάγιους βλαστούς. Το βασικό υπόστρωμα περιείχε ανόργανα άλατα και βιταμίνες του Anderson, 30 g·L⁻¹ σακχαρόζη, 5 g·L⁻¹ άγαρ, 5.71 μM IAA και 2iP σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις: 24.59, 49.19 και 73.77 μM. Τα αντίστοιχα υποστρώματα (A₁, A₂ και A₃) φαίνονται στον Πίνακα 5. Ο αριθμός των σωλήνων – επαναλήψεων ανά μεταχείριση ήταν 32.

Μετά από 23 ημέρες (26/8/98), τα έκφυτα μεταφέρθηκαν σε άλλους σωλήνες, με νέο αλλά ίδιας συστάσεως υπόστρωμα, με ταυτόχρονη ανανέωση της βάσης τους (αφαίρεση τμήματος 1-3 mm).

Μετά από 33 ημέρες (28/9/98) από την προηγούμενη ανανέωση, μετρήθηκε ο αριθμός των νεοσχηματιζόμενων βλαστών ανά έκφυτο (βλαστοί μήκους 0-1 cm και βλαστοί μήκους >1 cm).

3.3.4. Ριζοβολία εκφύτων (in vitro) (30/9/98)

Η διαδικασία ήταν όμοια με εκείνη που περιγράφηκε στην παράγραφο 3.2.7. και τα υποστρώματα που μελετήθηκαν ήταν εκείνα που φαίνονται στον Πίνακα 9, με τους 16 συνδυασμούς των αυξινών (NAA και IBA). Το πείραμα περιλάμβανε 16 μεταχειρίσεις με 5 έκφυτα – επαναλήψεις ανά μεταχείριση.

Οι παρατηρήσεις πάρθηκαν μετά από 48 ημέρες (17/11/98).

3.4. Στατιστική επεξεργασία

Οι παρατηρήσεις και μετρήσεις ανά έκφυτο – επανάληψη, που πάρθηκαν σε κάθε πείραμα, χρησιμοποιήθηκαν για τον υπολογισμό του Μέσου όρου και της Τυπικής απόκλισης ανά μεταχείριση σε κάθε πείραμα.

Πίνακας 3. Υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα πολλαπλασιασμού και στο 4^ο πείραμα ριζοβολίας του *Arbutus unedo*.

ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ	WPM ₀	WPM ₁	WPM ₂	WPM _{1F}
Μακροστοιχεία	WPM	WPM	WPM	WPM
Μικροστοιχεία	WPM	WPM	WPM	WPM
Βιταμίνες	MS	MS	MS	MS
BA (μM)	5.5	11.1	22.2	11.1
Φλορογλυκίνη (g/L)	-	-	-	0.16
Σακχαρόζη (g/L)	30	30	30	30
Άγαρ (g/L)	5	5	5	5
pH	5.7	5.7	5.7	5.7

Πίνακας 4. Υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα πολλαπλασιασμού του *Arbutus unedo* και στη πρώτη εγκατάσταση της *Erica carnea* (ποικ. Springwood White).

ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ	MS ₀	MS ₁	MS ₂	MS ₃
Μακροστοιχεία	MS	MS	MS	MS
Μικροστοιχεία	MS	MS	MS	MS
Βιταμίνες	MS	MS	MS	MS
BA (μM)	5.5	11.1	22.2	-
IAA (μM)	-	-	-	5.71
2iP (μM)	-	-	-	24.59
Σακχαρόζη (g/L)	30	30	30	30
Άγαρ (g/L)	5	5	5	5
pH	5.7	5.7	5.7	5.2

Πίνακας 5. Υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν στις εγκαταστάσεις και στα πειράματα πολλαπλασιασμού των *Erica carnea* (ποικ. Springwood White) και *Erica × darleyensis* (ποικ. Silberschmelze).

ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ	A ₁	A ₂	A ₃
Μακροστοιχεία	And	And	And
Μικροστοιχεία	And	And	And
Βιταμίνες	And	And	And
Adenine (mg/L)	45	45	45
IAA (μM)	5.71	5.71	5.71
2iP (μM)	24.59	49.19	73.77
Σακχαρόζη (g/L)	30	30	30
Άγαρ (g/L)	5	5	5
pH	5.2	5.2	5.2

Πίνακας 6. Υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν στο 1^ο πείραμα ριζοβολίας του *Arbutus unedo*.

ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ	MSR ₀	MSR ₁	MSR ₂	MSR ₃
Μακροστοιχεία	MS	MS	MS	MS
Μικροστοιχεία	MS	MS	MS	MS
Βιταμίνες	MS	MS	MS	MS
IBA (μM)	0	3	6	9
Σακχαρόζη (g/L)	20	20	20	20
Άγαρ (g/L)	4.5	4.5	4.5	4.5
pH	5.7	5.7	5.7	5.7

Πίνακας 7. Υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν στο 2^ο πείραμα πολλαπλασιασμού της *Erica carnea* (ποικ. Springwood White).

ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ	A _{B0}	A _{B1}	A _{B2}	A _{B3}
Μακροστοιχεία	And	And	And	And
Μικροστοιχεία	And	And	And	And
Βιταμίνες	And	And	And	And
Adenine (mg/L)	45	45	45	45
BA (μM)	0	5	10	15
IAA (μM)	5.71	5.71	5.71	5.71
Σακχαρόζη (g/L)	30	30	30	30
Άγαρ (g/L)	5	5	5	5
pH	5.2	5.2	5.2	5.2

Πίνακας 8. Υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν στο 3^ο πείραμα ριζοβολίας του *Arbutus unedo* και στο 1^ο πείραμα ριζοβολίας της *Erica carnea* (ποικ. Springwood White).

ΣΥΣΤΑΤΙΚΟ	MSR ₄	MSR ₅	MSR ₆	MSR ₇	MSR ₈
Μακροστοιχεία	MS	MS	MS	MS	MS
Μικροστοιχεία	MS	MS	MS	MS	MS
Βιταμίνες	MS	MS	MS	MS	MS
IBA (μM)	2.46	4.92	1.47	-	-
GA ₃ (μM)	0.29	0.29	0.29	-	-
IAA (μM)	-	-	-	11.42	11.42
Σακχαρόζη (g/L)	20	20	20	20	20
Άγαρ (g/L)	4.5	4.5	4.8	4.8	4.8
pH	6	5.9	6	5.9	5.9

Εικόνα 1. Μητρικό φυτό *Arbutus unedo*.



Εικόνα 2. Απαγωγή νηματικής ροής – περιοχή μεταφοράς εκφύτων.



Εικόνα 3. In vitro ριζοβολία του *Arbutus unedo*.



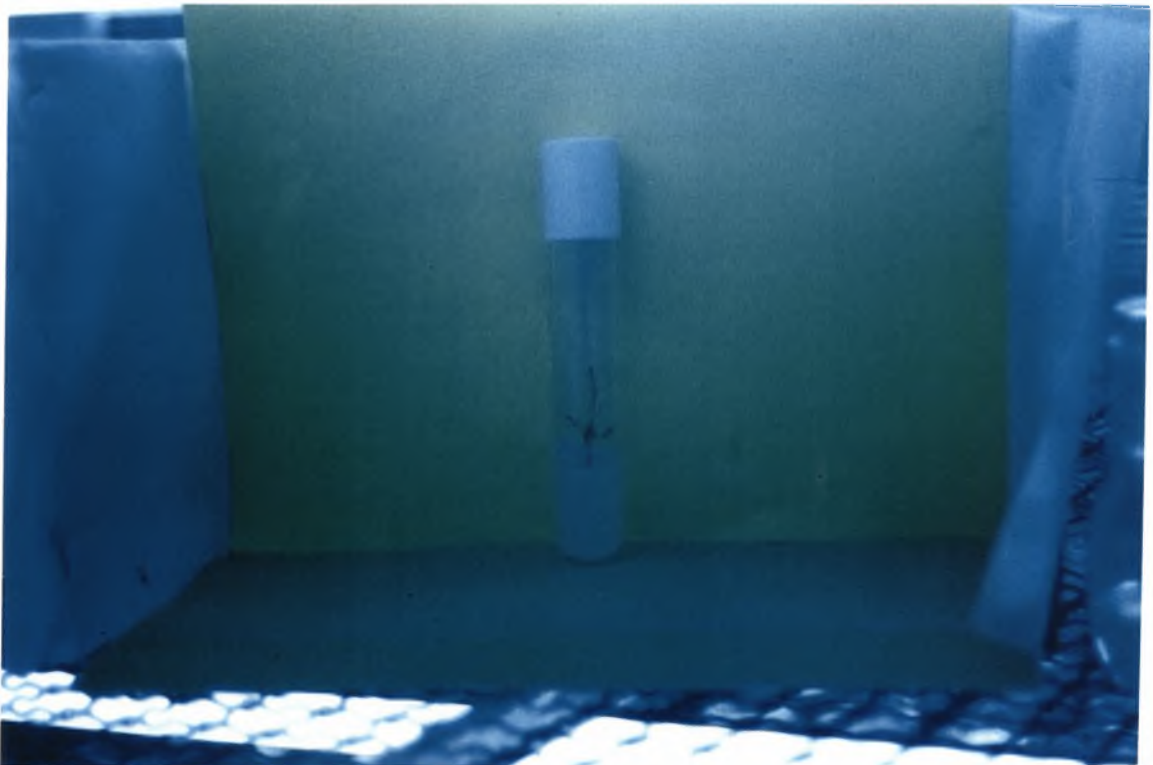
Εικόνα 4. Ριζοβολία σε υδρονέφωση του *A. unedo*.



Εικόνα 5. Μητρικό φυτό *Erica carnea*.



Εικόνα 6. Εγκατάσταση in vitro της *E. carnea*.



Εικόνα 7. Περιοχή αύξεσης – θάλαμος καλλιέργειας.



Εικόνα 8. Πολλαπλασιασμός in vitro της *Erica carnea*.



4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1. *Arbutus unedo*

4.1.1. Εγκατάσταση εκφύτων

Στο πείραμα αυτό δοκιμάστηκε η δυνατότητα εγκατάστασης του *A. unedo* στις 24/4/98 σε δυο υποστρώματα (WPM_1 και MS_1).

Στο υπόστρωμα WPM_1 , 18 ημέρες μετά την εγκατάσταση, τα ποσοστά μόλυνσης από μύκητες και βακτήρια ήταν 4.8 % και 7.1 %, αντίστοιχα, ενώ το ποσοστό εμφάνισης του Browning ήταν 7.1 %. Μετά από 41 ημέρες από την εγκατάσταση, το ποσοστό μόλυνσης από βακτήρια ανήλθε στο 61.8 %, ενώ μολύνσεις από μύκητες και Browning δεν εμφανίστηκαν. Έτσι το συνολικό ποσοστό των αποτυχημένων επαναλήψεων έφτασε το 69 %. Στο υπόλοιπο 31 % των εκφύτων, που διατηρήθηκαν υγιή, ο αριθμός των βλαστών που εκπύχθηκαν ανά έκφυτο ήταν 2.46 ± 1.5 . Όσον αφορά το χρόνο εμφάνισης των προβλημάτων, οι μολύνσεις από μύκητες και το Browning παρουσιάστηκαν στις πρώτες 18 ημέρες, ενώ το μεγαλύτερο μέρος των μολύνσεων από βακτήρια εμφανίστηκε μετά το διάστημα των 18 ημερών. Έτσι το συνολικό ποσοστό των αποτυχημένων επαναλήψεων αυξήθηκε λόγω των μολύνσεων από βακτήρια. Ο αριθμός των βλαστών ανά έκφυτο αυξήθηκε στο διάστημα μεταξύ των δυο παρατηρήσεων, αλλά όχι σημαντικά (Πίν. 10). Στις 18 ημέρες, η πλειοψηφία των υγιών εκφύτων είχαν 0-2 βλαστούς, ενώ στις 41 ημέρες είχαν περισσότερους από ένα βλαστό, με το 46 % να φέρει άνω των 3 βλαστών (Πίν. 11).

Στο υπόστρωμα MS_1 , 18 ημέρες μετά την εγκατάσταση, τα ποσοστά μόλυνσης από μύκητες και βακτήρια ήταν 2.4 %, για το κάθε ένα, ενώ το ποσοστό εμφάνισης του Browning ήταν 28.6 %. Μετά από 41 ημέρες από την εγκατάσταση, το ποσοστό μόλυνσης από βακτήρια ήταν 60.7 %, το ποσοστό του Browning ήταν 10.7 %, ενώ μολύνσεις από μύκητες δεν παρουσιάστηκαν. Έτσι το συνολικό ποσοστό της εμφάνισης του Browning, από την εγκατάσταση μέχρι τη δεύτερη παρατήρηση, ήταν 35.7 % και το συνολικό ποσοστό των αποτυχημένων επαναλήψεων ήταν 80.9 %. Στο υπόλοιπο 19.1 % των εκφύτων, ο αριθμός των βλαστών που εκπύχθηκαν ανά έκφυτο, ήταν 2.5 ± 0.93 . Αναφορικά με το χρόνο εμφάνισης των προβλημάτων, οι μολύνσεις από μύκητες παρουσιάστηκαν στις πρώτες 18 ημέρες, το μεγαλύτερο μέρος των μολύνσεων από βακτήρια παρουσιάστηκε μετά από τις 18 ημέρες, ενώ το

μεγαλύτερο μέρος του Browning εμφανίστηκε στις πρώτες 18 ημέρες. Ο αριθμός των βλαστών ανά έκφυτο αυξήθηκε σημαντικά κατά 1.29 μεταξύ των δυο παρατηρήσεων (Πίν. 10). Στις 18 ημέρες το 92 % των υγιών εκφύτων είχαν 0-2 βλαστούς, ενώ στις 41 ημέρες η πλειοψηφία αυτών είχαν περισσότερους από ένα βλαστό, με το 50 % να φέρει άνω των 3 βλαστών (Πίν. 11).

Τα ποσοστά μόλυνσεως, από μύκητες και βακτήρια, στα δυο υποστρώματα, κυμάνθηκαν περίπου στα ίδια επίπεδα, όμως το ποσοστό εμφάνισης του Browning στο υπόστρωμα MS₁, ήταν σχεδόν 5πλάσιο από εκείνο στο WPM₁. Έτσι το συνολικό ποσοστό των αποτυχημένων επαναλήψεων ήταν μεγαλύτερο στο υπόστρωμα MS₁, κυρίως λόγω του μεγάλου ποσοστού εμφάνισης του Browning. Όσον αφορά τον αριθμό των βλαστών ανά έκφυτο, δε βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δυο υποστρωμάτων. Όσον αφορά το χρόνο εμφάνισης των προβλημάτων, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές, όμως στο διάστημα μεταξύ των δυο παρατηρήσεων ο αριθμός των βλαστών ανά έκφυτο αυξήθηκε σημαντικά στο υπόστρωμα MS₁, όχι όμως σημαντικά στο WPM₁.

Ταυτόχρονα, με τις παρατηρήσεις που πάρθηκαν 41 ημέρες μετά την εγκατάσταση, που περιγράφηκε στη προηγούμενη παράγραφο, έγινε τεμαχισμός των υγιών εκφύτων και παρήχθησαν νέοι σωλήνες. Μετά από 25 ημέρες μετρήθηκε ο αριθμός των μολυσμένων και υγιών σωλήνων, ενώ παράλληλα έγινε ξανά τεμαχισμός των υγιών και παρήχθησαν έτσι νέοι σωλήνες.

Στο υπόστρωμα WPM₁, οι αρχικοί υγιείς σωλήνες ήταν 13 και μετά το τεμαχισμό δημιουργήθηκαν 35 σωλήνες, δηλαδή ένα ποσοστό 269 %. Μετά από 25 ημέρες το ποσοστό μόλυνσης των νέων αυτών σωλήνων, ήταν 14.3 %. Το ποσοστό των σωλήνων που παράχθηκαν, από τους υπόλοιπους υγιείς και μετά από τεμαχισμό, ήταν 440 %.

Στο υπόστρωμα MS₁, οι αρχικοί υγιείς σωλήνες ήταν 8 και μετά από το τεμαχισμό δημιουργήθηκαν 30 σωλήνες, δηλαδή ένα ποσοστό 375 %. Μετά από 25 ημέρες το ποσοστό μόλυνσης των νέων αυτών σωλήνων, ήταν 40 %. Το ποσοστό των σωλήνων που παράχθηκαν, από τους υπόλοιπους υγιείς και μετά από τεμαχισμό, ήταν 220 %.

Κατά τη πρώτη επανακαλλιέργεια, το ποσοστό των σωλήνων που παράχθηκαν ήταν μεγαλύτερο στο υπόστρωμα MS₁, όμως κατά τη δεύτερη επανακαλλιέργεια, το αντίστοιχο ποσοστό ήταν κατά πολύ μεγαλύτερο στο WPM₁. Όσον αφορά το ποσοστό μόλυνσης, ήταν μεγαλύτερο κατά 25.7 % στο υπόστρωμα MS₁ (Πίν. 12).

Συμπεραίνεται ότι το WPM₁ είναι ένα ικανοποιητικό υπόστρωμα για εγκατάσταση του *A. unedo*.

Πίνακας 10. Αποτελέσματα της *in vitro* εγκατάστασης του *Arbutus unedo* (24/4/98), με αξιολόγηση του αριθμού (#) των μολυσμένων (από μύκητες και βακτήρια) επαναλήψεων (σωλήνων ή/και εκφύτων), του αριθμού των εκφύτων όπου εμφανίστηκε Browning και του αριθμού των βλαστών που εκπύχθηκαν ανά υγιές έκφυτο, μετά από 18 και 41 ημέρες, στα υποστρώματα WPM₁ και MS₁. (H.M.E. = ημέρες μετά την εγκατάσταση).

H.M.E	Αρχικός # σωλήνων	# μολυσμένων από μύκητες	# μολυσμένων από βακτήρια	# με Browning	Συνολικός # αποτυχημένων	# βλαστών ανά έκφυτο
WPM₁						
18	42	2	3	3	8	1.35 ±1.04
41	34	0	21	0	21	2.46 ±1.50
MS₁						
18	42	1	1	12	14	1.21 ±0.96
41	28	0	17	3	20	2.50 ±0.93

Πίνακας 11. Ποσοστιαία αναλογία των υγιών εκφύτων του *Arbutus unedo* που σχημάτισαν 0, 1, 2, 3 και 4 και άνω βλαστούς ανά έκφυτο, 18 και 41 ημέρες μετά από την *in vitro* εγκατάστασή τους στα υποστρώματα WPM₁ και MS₁. (H.M.E. = ημέρες μετά την εγκατάσταση).

H.M.E.	% με 0 βλαστούς	% με 1 βλαστό	% με 2 βλαστούς	% με 3 βλαστούς	% με 4 και άνω βλαστούς
WPM₁					
18	20	41	24	12	3
41	8	23	23	15	31
MS₁					
18	21	46	25	4	4
41	0	12.5	37.5	37.5	12.5

Πίνακας 12. Αποτελέσματα των δυο *in vitro* επανακαλλιιεργειών του *Arbutus unedo*, με αξιολόγηση του αριθμού (#) των σωλήνων – εκφύτων που παράγονταν κάθε φορά και του αριθμού των σωλήνων που μολύνθηκαν, 41 ημέρες μετά την εγκατάσταση και 25 ημέρες μετά τη πρώτη επανακαλλιιεργεία, στα υποστρώματα WPM₁ και MS₁.

Υπόστρωμα	Αρχικός # σωλήνων	Νέος # σωλήνων	# μολυσμένων σωλήνων	# υγιών σωλήνων	Νέος # σωλήνων
WPM₁	13	35	5	30	132
MS₁	8	30	12	18	40

4.1.2. Πολλαπλασιασμός

Στο πείραμα αυτό μελετήθηκε η ικανότητα πολλαπλασιασμού του *Arbutus unedo*, στα υποστρώματα WPM₀, WPM₁, WPM₂ και MS₀, MS₁, MS₂ όπου οι συγκεντρώσεις της BA ήταν 5.5, 11.1 και 22.2 μM, αντίστοιχα. Τα έκφυτα που χρησιμοποιήθηκαν για το σκοπό αυτό ήταν με και χωρίς κορυφή.

Ο αριθμός βλαστών μήκους 0-1 cm (βλαστοί που δεν μπορούν να επανακαλλιεργηθούν) στα υποστρώματα WPM και στις διάφορες συγκεντρώσεις της BA, δεν διέφερε στατιστικά μεταξύ εκφύτων με ή χωρίς κορυφή. Όσον αφορά τον αριθμό βλαστών μήκους > 1 cm (βλαστοί κατάλληλοι για επανακαλλιέργεια) και το συνολικό αριθμό βλαστών, παρατηρήθηκε μια τάση μη σημαντικής αύξησης όταν τα έκφυτα ήταν χωρίς κορυφή. Πρέπει να σημειωθεί εδώ, ότι μόνο βλαστοί μήκους > 1 cm μπορούν να αποχωριστούν από το έκφυτο και να δώσουν νέο έκφυτο, με αποτέλεσμα τον πολλαπλασιασμό του φυτού. Επομένως, σημασία στα πειράματα πολλαπλασιασμού έχουν αυτοί οι βλαστοί, και όχι οι μικρότεροι. Μεταξύ των τριών συγκεντρώσεων της BA, δεν βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε καμία από τις δυο κατηγορίες βλαστών αλλά ούτε και στο συνολικό αριθμό βλαστών ανά έκφυτο. Ωστόσο παρατηρήθηκε μια τάση αύξησης του αριθμού βλαστών και ταυτόχρονα αύξηση του ποσοστού υάλωσης, με την αύξηση της συγκέντρωσης της BA. Το πρόβλημα έγινε εντονότερο στο υπόστρωμα WPM₂, με 22.2 μM BA, όπου τα έκφυτα παρουσίασαν υάλωση σε μεγάλο βαθμό και γενική καθήλωση (Πίν. 13).

Τα ποσοστά των βλαστών μήκους 0-1 cm και > 1 cm σε σχέση με το σύνολο, ήταν περίπου 25 % και 75 %, αντίστοιχα (Πίν. 13).

Ο αριθμός βλαστών μήκους 0-1 cm, στα υποστρώματα MS και στις διάφορες συγκεντρώσεις της BA, δεν διέφερε στατιστικά μεταξύ εκφύτων με ή χωρίς κορυφή. Τα έκφυτα όμως χωρίς κορυφή σχημάτισαν στατιστικώς περισσότερους βλαστούς μήκους > 1 cm, όταν η συγκέντρωση της BA ήταν 11.1 και 22.2 μM, όχι όμως όταν αυτή ήταν 5.5 μM. Στο συνολικό δε αριθμό βλαστών παρατηρήθηκε μια τάση αύξησης, όταν τα έκφυτα ήταν χωρίς κορυφή και στη περίπτωση που η συγκέντρωση της BA ήταν 11.1 μM, ο συνολικός αριθμός βλαστών ήταν στατιστικά μεγαλύτερος στα έκφυτα χωρίς κορυφή. Μεταξύ των τριών συγκεντρώσεων της BA, στο υπόστρωμα MS₁, με 11.1 μM BA, σχηματίστηκαν περισσότεροι βλαστοί μήκους 0-1 cm και συνολικά, απ' ότι στα υποστρώματα με 22.2 και 5.5 μM BA. Στο υπόστρωμα με 22.2 μM BA σχηματίστηκαν επίσης στατιστικά περισσότεροι βλαστοί μήκους 0-1

cm και συνολικά απ' ότι σ' εκείνο με 5.5 μM BA. Όσον αφορά τους βλαστούς μήκους > 1 cm, το υπόστρωμα με 11.1 μM BA ήταν στατιστικά καλύτερο από εκείνο με 5.5 μM BA, δε διέφερε όμως στατιστικώς σημαντικά από εκείνο με 22.2 μM BA.

Το ποσοστό των βλαστών μήκους 0-1 cm σε σχέση με το σύνολο, κυμάνθηκε από 47 ως 75% σε όλες τις περιπτώσεις, ενώ το αντίστοιχο ποσοστό των βλαστών μήκους > 1 cm κυμάνθηκε από 25 ως 52 % (Πίν. 13).

Στα υποστρώματα MS σε σχέση με τα WPM, σχηματίστηκαν στατιστικώς περισσότεροι βλαστοί μήκους 0-1 cm ανά έκφυτο, με ή χωρίς κορυφή, όταν η συγκέντρωση της BA ήταν 11.1 και 22.2 μM . Όσον αφορά τον αριθμό βλαστών μήκους > 1 cm, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δυο ειδών υποστρωμάτων, στις διάφορες συγκεντρώσεις, όμως το ποσοστό αυτών στο σύνολο ήταν μεγαλύτερο στα υποστρώματα WPM. Σχετικά με το συνολικό αριθμό των βλαστών ανά έκφυτο, το MS₁, με 11.1 μM BA, ήταν στατιστικά καλύτερο από το WPM₁, όταν τα έκφυτα ήταν χωρίς κορυφή, ενώ στις άλλες περιπτώσεις δεν παρατηρήθηκαν στατιστικές διαφορές (Πίν. 13).

Κατά τις επόμενες επανακαλλιέργειες, έκφυτα από το WPM₁ παρήγαγαν περισσότερους βλαστούς μήκους > 1 cm, από ότι στο υπόστρωμα MS₁ (αποτελέσματα δεν φαίνονται). Επιπλέον τα έκφυτα στο MS₁ παρουσίασαν σταδιακή απώλεια ευρωστίας και ξήρανση των φύλλων.

Πίνακας 13. Αποτελέσματα του πειράματος in vitro πολλαπλασιασμού του *Arbutus unedo* (21/7/98), με αξιολόγηση του αριθμού (#) των βλαστών (μήκους 0-1 cm, ≥ 1 cm και του συνολικού) που σχηματίστηκαν από έκφυτα με και χωρίς κορυφή, μετά από καλλιέργεια 30 ημερών, στα βασικά υποστρώματα WPM και MS με τρεις συγκεντρώσεις της BA (5.5, 11.1 και 22.2 μM).

Υπόστρωμα	BA (μM)	Είδος εκφύτου	# βλαστών 0-1 cm	# βλαστών ≥ 1 cm	Συνολικός # βλαστών
WPM	5.5	με κορυφή	0.45 \pm 0.74	0.72 \pm 0.88	1.17 \pm 1.03
		χωρίς κορ.	1.00 \pm 1.70	2.20 \pm 1.30	3.20 \pm 2.18
	11.1	με κορυφή	0.79 \pm 0.77	1.24 \pm 0.95	2.07 \pm 1.16
		χωρίς κορ.	0.60 \pm 0.89	2.20 \pm 1.79	2.80 \pm 2.18
	22.2	με κορυφή	1.00 \pm 1.34	1.79 \pm 1.31	2.79 \pm 1.76
		χωρίς κορ.	0.20 \pm 0.45	3.60 \pm 2.07	3.80 \pm 1.92
MS	5.5	με κορυφή	1.69 \pm 1.70	0.69 \pm 1.01	2.37 \pm 2.13
		χωρίς κορ.	0.83 \pm 0.40	1.67 \pm 1.50	2.50 \pm 1.64
	11.1	με κορυφή	2.44 \pm 1.50	0.81 \pm 0.91	3.25 \pm 2.02
		χωρίς κορ.	3.33 \pm 2.50	3.67 \pm 1.63	7.00 \pm 1.26
	22.2	με κορυφή	2.12 \pm 1.78	0.75 \pm 0.86	2.87 \pm 2.50
		χωρίς κορ.	2.33 \pm 1.75	2.33 \pm 1.21	4.67 \pm 2.07

4.1.3. Ριζοβολία εκφύτων (in vitro)

4.1.3.1. Πείραμα 1^ο

Καμιά από τις 4 συγκεντρώσεις (0, 3, 6 και 9 μM) της αυξίνης IBA που δοκιμάστηκαν, δεν προκάλεσε την έκπτυξη ριζών των εκφύτων του *Arbutus unedo*, μετά από καλλιέργεια 20 ημερών σε βάζα με τα υποστρώματα ριζοβολίας MSR₀, MSR₁, MSR₂ και MSR₃ (Πίν. 6).

4.1.3.2. Πείραμα 2^ο

Τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού, όπου μελετήθηκε η δράση δυο ορμονών ταυτόχρονα, του NAA, σε συγκεντρώσεις 0, 0.54, 2.69 και 5.37 μM , και του IBA, σε συγκεντρώσεις 0, 0.49, 2.46 και 4.92 μM , σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς μεταξύ τους (Πίν. 9), έδειξαν ότι μετά από 18 ημέρες καλλιέργειας σε κανένα υπόστρωμα δε σχηματίστηκαν ρίζες. Ωστόσο μετά από 39 ημέρες, το 16.7 %, το 33.3 % και το 50 % των εκφύτων που καλλιεργήθηκαν στα υποστρώματα με 2.69 μM NAA και 2.46 μM IBA, με 0 μM NAA και 2.46 μM IBA και με 5.37 μM NAA και 0.49 μM IBA, αντίστοιχα, σχημάτισαν ρίζες μικρού μήκους (Πίν. 14).

4.1.3.3. Πείραμα 3^ο

Τα έκφυτα του *Arbutus unedo* δε σχημάτισαν ρίζες σε κανένα από τα πέντε διαφορετικά υποστρώματα (Πίν. 8) που μελετήθηκαν στο πείραμα αυτό, ακόμη και μετά από καλλιέργεια 50 ημερών.

Συγκεκριμένα, το GA₃ (0.29 μM) μαζί με IBA (1.47, 2.46 και 4.92 μM), το IAA (11.42 μM) και η μείωση των μακροστοιχείων στο ήμισυ με IAA (11.42 μM), δεν βοήθησαν στο σχηματισμό ριζών.

4.1.3.4. Πείραμα 4^ο

Αφού τα έκφυτα του *Arbutus unedo* καλλιεργήθηκαν για 30 ημέρες σε υπόστρωμα πολλαπλασιασμού WPM₁ με ή χωρίς προσθήκη φλορογλυκίνης (0.16 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$), τοποθετήθηκαν σε τρία υποστρώματα ριζοβολίας: το ένα ήταν όμοιο με εκείνο που προκάλεσε το 50 % των εκφύτων να ριζοβολήσουν στο 2^ο πείραμα, περιείχε δηλαδή 5.37 μM NAA και 0.49 μM IBA (MRT₁₄). Το δεύτερο περιείχε επιπλέον 0.2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ενεργό άνθρακα (MRT₁₄C) και το τρίτο περιείχε επιπλέον 0.16 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ φλορογλυκίνη (MRT₁₄F).

Μετά από 18 ημέρες καλλιέργειας, σε κανένα υπόστρωμα δε σχηματίστηκαν ρίζες. Κάποιες μόνο καταβολές ριζών παρατηρήθηκαν στα υποστρώματα που περιείχαν μόνο τις αυξίνες.

Μετά από 30 ημέρες, ριζοβόλησε το 35.7 % των εκφύτων που καλλιεργήθηκαν για 30 ημέρες στο WPM₁ και κατόπιν μεταφέρθηκαν στο υπόστρωμα ριζοβολίας MRT₁₄. Επίσης ριζοβόλησε το 7.1% των εκφύτων που καλλιεργήθηκαν για 30 ημέρες στο WPM₁ με φλορογλυκίνη και κατόπιν μεταφέρθηκαν στα υποστρώματα ριζοβολίας MRT₁₄ και MRT₁₄C (Πίν. 15).

Πίνακας 14. Αριθμός (#) εκφύτων του *Arbutus unedo* που σχημάτισαν ρίζες μικρού μήκους, μετά από 39 ημέρες in vitro καλλιέργειας, σε 16 υποστρώματα ριζοβολίας MRT₁₋₁₆, που περιείχαν NAA και IBA. Ο αριθμός των επαναλήψεων – εκφύτων ήταν 6 για κάθε μεταχείριση.

NAA (μM)	IBA (μM)	# εκφύτων με ρίζες
0	0	0
	0.49	0
	2.46	2
	4.92	0
0.54	0	0
	0.49	0
	2.46	0
	4.92	0
2.69	0	0
	0.49	0
	2.46	1
	4.92	0
5.37	0	0
	0.49	3
	2.46	0
	4.92	0

Πίνακας 15. Αριθμός (#) εκφύτων του *Arbutus unedo* που σχημάτισαν ρίζες, μετά από in vitro καλλιέργεια 30 ημερών σε υποστρώματα πολλαπλασιασμού WPM₁ με ή χωρίς προσθήκη φλορογλυκίνης (0.16 g·L⁻¹) και κατόπιν τοποθετήθηκαν για 30 ημέρες σε υποστρώματα ριζοβολίας παρουσία μόνο αυξινών (MRT₁₄), αυξινών και ενεργού άνθρακα (0.2 g·L⁻¹) (MRT₁₄C), αυξινών και φλορογλυκίνης (0.16 g·L⁻¹) (MRT₁₄F). Ο αριθμός των επαναλήψεων – εκφύτων ήταν 14 για κάθε μεταχείριση.

Υπόστρωμα πολλαπλασιασμού	Υπόστρωμα ριζοβολίας MRT ₁₄	# εκφύτων με ρίζες
WPM ₁	-	5
	με άνθρακα	0
	με φλορογλυκίνη	0
WPM ₁ F (με φλορογλυκίνη)	-	1
	με άνθρακα	1
	με φλορογλυκίνη	0

4.1.4. Ριζοβολία εκφύτων στο θερμοκήπιο (ex vitro)

4.1.4.1. Πείραμα 1^ο

Κανένα από τα έκφυτα που προήλθαν από τα υποστρώματα καλλιέργειας MS₁ και WPM₁, δεν επιβίωσε, όταν αυτά φυτεύτηκαν σε μίγμα τύρφης – περλίτη και τοποθετήθηκαν για ριζοβόληση σε συνθήκες ομίχλης (fog) για 15 ημέρες. Πρέπει να σημειωθεί ότι στο διάστημα αυτό επικράτησαν πολύ υψηλές θερμοκρασίες – καύσωνας.

4.1.4.2. Πείραμα 2^ο

Στο πείραμα αυτό μελετήθηκαν δυο συστήματα δροσισμού: το σύστημα ομίχλης (fog) και το σύστημα υδρονέφωσης (mist).

Τα έκφυτα που φυτεύτηκαν σε συνθήκες ομίχλης προέρχονταν από τρία υποστρώματα καλλιέργειας in vitro. Μετά από 39 ημέρες από τη φύτευση, τα ποσοστά ριζοβολίας των εκφύτων που προήλθαν από τα υποστρώματα ριζοβολίας MSR και από τα υποστρώματα πολλαπλασιασμού MS₁ και WPM₁, ήταν αντίστοιχα 4.2 %, 11.7 % και 14 %.

Τα έκφυτα που φυτεύτηκαν σε συνθήκες υδρονέφωσης, προέρχονταν μόνο από τα υποστρώματα MSR. Μετά από 39 ημέρες από τη φύτευσή τους, το 50 % αυτών σχημάτισε ρίζες και επιβίωσε (Πίν. 16).

Από τα παραπάνω γίνεται φανερό ότι το σύστημα της υδρονέφωσης ευνοεί τη ριζοβολία και επομένως την επιβίωση των εκφύτων του *Arbutus unedo*, περισσότερο απ' ότι το σύστημα ομίχλης.

4.1.4.3. Πείραμα 3^ο

Στο πείραμα αυτό, έκφυτα από τα υποστρώματα ριζοβολίας MRT και από τα υποστρώματα πολλαπλασιασμού MS₁ και WPM₁, φυτεύτηκαν μόνο σε συνθήκες υδρονέφωσης, που από το προηγούμενο πείραμα φάνηκε πως ήταν ευνοϊκότερες.

Τα ποσοστά ριζοβολίας μετά από 27 ημέρες ήταν 0 %, 0 % και 61.1 %, ενώ μετά από 60 ημέρες ήταν 9.4 %, 0 % και 61.1 %, αντίστοιχα.

Το υψηλότερο ποσοστό (61.1 %) ex vitro ριζοβολίας, σημειώθηκε στα έκφυτα που καλλιεργήθηκαν in vitro στο WPM₁ (υπόστρωμα πολλαπλασιασμού), μετά από σχετικά μικρό χρονικό διάστημα, στο σύστημα υδρονέφωσης (Πίν. 17).

Πίνακας 16. Ποσοστό ex vitro ριζοβολίας του *Arbutus unedo*, μετά από 39 ημέρες, σε συνθήκες ομίχλης και υδρονέφωσης στο θερμοκήπιο, εκφύτων που προήλθαν από τρία υποστρώματα καλλιέργειας in vitro (MSR₀₋₃: υποστρώματα ριζοβολίας, MS₁ και WPM₁: υποστρώματα πολλαπλασιασμού).

Σύστημα δροσισμού	Υπόστρωμα	# φυτών που φυτεύτηκαν	# φυτών που ριζοβόλησαν	Ποσοστό (%) ριζοβολίας
Ομίχλη	MSR ₀₋₃	24	1	4.2
	MS ₁	60	7	11.7
	WPM ₁	93	13	14
Υδρονέφωση	MSR ₀₋₃	24	12	50

Πίνακας 17. Ποσοστό ex vitro ριζοβολίας του *Arbutus unedo*, μετά από 27 και 60 ημέρες σε συνθήκες υδρονέφωσης στο θερμοκήπιο, εκφύτων που προήλθαν από τρία υποστρώματα in vitro καλλιέργειας (MRT₀₋₁₆: υποστρώματα ριζοβολίας, MS₁ και WPM₁: υποστρώματα πολλαπλασιασμού).

Υπόστρωμα	# φυτών που φυτεύτηκαν	# φυτών που ριζοβόλησαν 27 ημέρες μετά	Ποσοστό (%) ριζοβολίας	# φυτών που ριζοβόλησαν 60 ημέρες μετά	Ποσοστό (%) ριζοβολίας
MRT ₀₋₁₆	85	0	0	8	9.4
MS ₁	39	0	0	0	0
WPM ₁	18	11	61.1	11	61.1

4.2. *Erica carnea* (ποικιλία Springwood White)

4.2.1. Εγκατάσταση εκφύτων

Στο πείραμα αυτό έγινε προσπάθεια εγκατάστασης της *Erica carnea* σε δύο υποστρώματα (MS₃ και A₁). Πραγματοποιήθηκαν δυο εγκαταστάσεις με χρονική διαφορά 10 ημερών, που τα έκφυτά τους υπέστησαν την ίδια απολύμανση. Στη δεύτερη όμως εγκατάσταση μελετήθηκε και η δυνατότητα εγκατάστασης εκφύτων χωρίς φύλλα.

Στο υπόστρωμα MS₃, 28 ημέρες μετά την πρώτη εγκατάσταση, τα ποσοστά μόλυνσης από μύκητες και βακτήρια ήταν 3.1 % και 2.1 %, αντίστοιχα, ενώ το ποσοστό εμφάνισης της νέκρωσης της κορυφής ήταν 43.2 %. Έτσι το συνολικό ποσοστό των αποτυχημένων επαναλήψεων έφτασε το 48.4 %. Στα υπόλοιπα έκφυτα που παρέμειναν υγιή, μετρήθηκε ο αριθμός βλαστών που εκπτύχθηκαν ανά έκφυτο και βρέθηκε ότι 55 % αυτών ήταν μήκους 0-1 cm και το 45 % ήταν μήκους > 1 cm. Δεκαοχτώ ημέρες μετά τη δεύτερη εγκατάσταση των εκφύτων με φύλλα, το ποσοστό μόλυνσης από βακτήρια ήταν 7.1 %, το ποσοστό νέκρωσης της κορυφής ήταν 12.5 %, ενώ μολύνσεις από μύκητες δεν εμφανίστηκαν. Έτσι το συνολικό ποσοστό των αποτυχημένων επαναλήψεων ήταν 19.6 %. Στα υπόλοιπα έκφυτα που παρέμειναν υγιή, μετρήθηκε ο αριθμός βλαστών που εκπτύχθηκαν ανά έκφυτο και βρέθηκε ότι 62 % αυτών ήταν μήκους 0-1 cm και το 38 % ήταν μήκους > 1 cm. Όσον αφορά την εγκατάσταση των εκφύτων χωρίς φύλλα, 18 ημέρες μετά από αυτή, τα ποσοστά μόλυνσης από μύκητες και βακτήρια ήταν 0 %, ενώ το ποσοστό νέκρωσης της κορυφής και επομένως το συνολικό ποσοστό των αποτυχημένων επαναλήψεων ήταν 14.3 %. Στα υπόλοιπα έκφυτα που παρέμειναν υγιή, μετρήθηκε ο αριθμός βλαστών που εκπτύχθηκαν ανά έκφυτο και βρέθηκε ότι 84 % αυτών ήταν μήκους 0-1 cm και το 16 % ήταν μήκους > 1 cm.

Στο ίδιο υπόστρωμα, νέκρωση της κορυφής των εκφύτων εμφανίστηκε σε πολύ υψηλό ποσοστό (43.2 %) μετά από καλλιέργεια 28 ημερών, σε αντίθεση με την καλλιέργεια 18 ημερών (12-15%). Τα ποσοστά μολύνσεων δεν αυξήθηκαν με το χρόνο και οι αριθμοί βλαστών, των δυο κατηγοριών και του συνολικού, αυξήθηκαν με το χρόνο αλλά όχι στατιστικά σημαντικά. Μεταξύ των εκφύτων με φύλλα και χωρίς, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στατιστικά σημαντικές (Πίν. 18 & 19)

Στο υπόστρωμα A₁, μετά από 28 ημέρες από τη πρώτη εγκατάσταση, τα ποσοστά μόλυνσης από μύκητες και βακτήρια ήταν 2.1 % και 5.4 %, αντίστοιχα, ενώ νέκρωση

της κορυφής δεν παρουσιάστηκε σε κανένα έκφυτο. Έτσι το συνολικό ποσοστό των αποτυχημένων επαναλήψεων ήταν 7.5 %. Στα υπόλοιπα έκφυτα που παρέμειναν υγιή, μετρήθηκε ο αριθμός βλαστών που εκπτύχθηκαν ανά έκφυτο και βρέθηκε ότι 53 % αυτών ήταν μήκους 0-1 cm και το 47 % ήταν μήκους > 1 cm. Δεκαοχτώ ημέρες μετά τη δεύτερη εγκατάσταση των εκφύτων με φύλλα, τα ποσοστά μόλυνσης από μύκητες και βακτήρια ήταν 5.25 %, το καθένα, ενώ νέκρωση της κορυφής δεν παρουσιάστηκε. Έτσι το συνολικό ποσοστό των αποτυχημένων επαναλήψεων ήταν 10.5 %. Στα υπόλοιπα έκφυτα που παρέμειναν υγιή, μετρήθηκε ο αριθμός βλαστών που εκπτύχθηκαν ανά έκφυτο και βρέθηκε ότι 95 % αυτών ήταν μήκους 0-1 cm και το 5 % ήταν μήκους > 1 cm. Όσον αφορά την εγκατάσταση των εκφύτων χωρίς φύλλα, 18 ημέρες μετά από αυτή, τα ποσοστά μόλυνσης από μύκητες και νέκρωσης της κορυφής ήταν 0 %, ενώ το ποσοστό μόλυνσης από βακτήρια και επομένως το συνολικό ποσοστό των αποτυχημένων επαναλήψεων ήταν 14.3 %. Στα υπόλοιπα έκφυτα που παρέμειναν υγιή, μετρήθηκε ο αριθμός βλαστών που εκπτύχθηκαν ανά έκφυτο και βρέθηκε ότι 100 % αυτών ήταν μήκους 0-1 cm ενώ βλαστοί μήκους > 1 cm δεν σχηματίστηκαν.

Στο ίδιο υπόστρωμα, τα ποσοστά μόλυνσεως δεν αυξήθηκαν με το χρόνο, ο αριθμός βλαστών μήκους 0-1 cm ελαττώθηκε αλλά όχι σημαντικά, μήκους > 1 cm ήταν στατιστικά μεγαλύτερος μετά από καλλιέργεια 28 ημερών και ο συνολικός αριθμός βλαστών αυξήθηκε μετά από καλλιέργεια 28 ημερών, αλλά όχι σημαντικά. Μεταξύ εκφύτων με φύλλα και χωρίς, ο αριθμός βλαστών μήκους 0-1 cm και ο συνολικός αριθμός βλαστών ήταν στατιστικά μεγαλύτερος στα έκφυτα με φύλλα (Πίν. 18 & 19).

Μεταξύ των δυο υποστρωμάτων, τα ποσοστά μόλυνσεως από μύκητες και βακτήρια, κυμάνθηκαν περίπου στα ίδια επίπεδα, όμως η νέκρωση της κορυφής δεν παρουσιάστηκε στο υπόστρωμα A₁, ενώ αντίθετα στο MS₃ έφτασε το 43.2 %, μετά από καλλιέργεια 28 ημερών. Ο συνολικός αριθμός βλαστών ανά έκφυτο, ήταν στατιστικώς μεγαλύτερος στο υπόστρωμα A₁, στις δυο εγκαταστάσεις εκφύτων με φύλλα, ο αριθμός βλαστών μήκους 0-1 cm ήταν επίσης στατιστικώς μεγαλύτερος στο υπόστρωμα A₁, στη δεύτερη εγκατάσταση με φύλλα, και εκείνος μήκους > 1 cm ήταν μεγαλύτερος αλλά όχι σημαντικά.

Παράλληλα με τις παρατηρήσεις που πάρθηκαν και τα αποτελέσματα που εξήχθησαν από τις εγκαταστάσεις της *Erica carnea* (Πίν. 18 & 19), τα υγιή έκφυτα

μεταφέρθηκαν σε γυάλινα βάζα, μετά από ανανέωση της βάσης τους. Μετά από καλλιέργεια 21 ημερών τα ποσοστά μόλυνσης από βακτήρια, στα υποστρώματα MS₃ και A₁, ήταν 62.5 % και 100 %, αντίστοιχα (Πίν. 20). Με συνεχείς επανακαλλιέργειες, ο αριθμός των βάζων ολόενα και ελαττωνόταν λόγω βακτηρίων, που δεν προέρχονταν από δευτερογενείς μολύνσεις αλλά που πιθανώς βρισκόταν σε λανθάνουσα κατάσταση μέσα στους ιστούς των εκφύτων.

Πίνακας 18. Αποτελέσματα των in vitro εγκαταστάσεων (15 και 25/4/98) της *Erica carnea* (ποικ. Springwood White), με αξιολόγηση του αριθμού (#) των μολυσμένων (από μύκητες και βακτήρια) επαναλήψεων (σωλήνων ή/και εκφύτων), του αριθμού των εκφύτων που παρουσίασαν νέκρωση της κορυφής και του συνολικού αριθμού των αποτυχημένων επαναλήψεων, στα υποστρώματα MS₃ και A₁. Τα έκφυτα στη πρώτη εγκατάσταση ήταν μόνο με φύλλα, ενώ στη δεύτερη ήταν με και χωρίς φύλλα. Οι παρατηρήσεις πάρθηκαν 28 και 18 ημέρες μετά από τις αντίστοιχες ημερομηνίες εγκατάστασης. (H.E. = ημερομηνία εγκατάστασης).

H.E.	Είδος εκφύτου	Αρχικός # σωλήνων	# μολυσμένων από μύκητες	# μολυσμένων από βακτήρια	# με νέκρωση της κορυφής	Συνολικός # αποτυχημένων (% αποτυχμ.)
MS₃						
15/4/98	Με φύλλα	95	3	2	41	46 (48.4)
25/4/98	Με φύλλα	56	0	4	7	11 (19.6)
25/4/98	Χωρίς φύλλα	14	0	0	2	2 (14.3)
A₁						
15/4/98	Με φύλλα	93	2	5	0	7 (7.5)
25/4/98	Με φύλλα	57	3	3	0	6 (10.5)
25/4/98	Χωρίς φύλλα	14	0	2	0	2 (14.3)

Πίνακας 19. Αποτελέσματα των in vitro εγκαταστάσεων (15 και 25/4/98) της *Erica carnea* (ποικ. Springwood White), με αξιολόγηση του αριθμού (#) των βλαστών (μήκους 0-1 cm, ≥1 cm και του συνολικού) που σχηματίστηκαν ανά υγιές έκφυτο (με ή χωρίς φύλλα), στα υποστρώματα MS₃ και A₁. Οι παρατηρήσεις πάρθηκαν 28 και 18 ημέρες μετά από τις αντίστοιχες ημερομηνίες εγκατάστασης.

H.E.	Είδος εκφύτου	# υγιών σωλήνων	# βλαστών 0-1 cm	# βλαστών ≥1 cm	Συνολικός # βλαστών
MS₃					
15/4/98	Με φύλλα	49	1.49 ±1.65	1.20 ±1.24	2.69 ±1.84
25/4/98	Με φύλλα	45	1.35 ±1.17	0.82 ±1.47	2.17 ±1.59
25/4/98	Χωρίς φύλλα	12	2.17 ±1.4	0.42 ±0.67	2.58 ±1.24
A₁					
15/4/98	Με φύλλα	86	2.77 ±2.00	2.44 ±1.8	5.21 ±2.02
25/4/98	Με φύλλα	51	3.84 ±1.92	0.18 ±0.65	4.02 ±1.85
25/4/98	Χωρίς φύλλα	12	1.42 ±1.62	0 ±0	1.42 ±1.62

Πίνακας 20. Ποσοστά μολύνσεων από βακτήρια, μετά από *in vitro* επανακαλλιέργεια (21 ημερών) των υγιών εκφύτων των δυο πρώτων εγκαταστάσεων της *Erica carnea* (ποικ. Springwood White), σε βάζα, με MS₃ και A₁.

Υπόστρωμα	Αρχικός # βάζων	# μολυσμένων βάζων	Ποσοστό (%) μόλυνσης
MS ₃	8	5	62.5
A ₁	14	14	100

4.2.2. Νέα εγκατάσταση εκφύτων

Στο πείραμα αυτό δοκιμάστηκε η δυνατότητα εγκατάστασης της *Erica carnea*, με διαφορετική μέθοδο απολύμανσης, εφόσον η προηγούμενη απέτυχε, αλλά μόνο στο υπόστρωμα A₁ που από το προηγούμενο πείραμα αποδείχτηκε καλύτερο. Η απολύμανση περιλάμβανε ψεκασμό των μητρικών φυτών με μυκητοκτόνο και αντιβιοτικό (διασυστηματικό) και μετά την κοπή των εκφύτων απολύμανση με HgCl₂.

Μετά από 32 ημέρες, τα ποσοστά μόλυνσης από μύκητες και βακτήρια ήταν 1.3 % και 0 %, αντίστοιχα, νέκρωση της κορυφής δεν εμφανίστηκε, αλλά εμφανίστηκε τοξικότητα και νέκρωση εκφύτων από το HgCl₂ που χρησιμοποιήθηκε ως απολυμαντικό, σε ποσοστό 7.1 %. Έτσι το συνολικό ποσοστό των αποτυχημένων επαναλήψεων ήταν 9.2 % (Πίν. 21). Μετά από επανακαλλιέργειες των εκφύτων αυτών, δεν εμφανίστηκαν περαιτέρω μολύνσεις από βακτήρια, όπως συνέβη μετά την πρώτη μέθοδο απολύμανσης.

Πίνακας 21. Αποτελέσματα της νέας *in vitro* εγκατάστασης (29/6/98) της *Erica carnea* (ποικ. Springwood White) (διαφορετική απολύμανση), με αξιολόγηση του αριθμού (#) των μολυσμένων (από μύκητες και βακτήρια) επαναλήψεων (σωλήνων ή/και εκφύτων), του αριθμού των εκφύτων που νεκρώθηκαν από το απολυμαντικό (HgCl₂) και του συνολικού αριθμού των αποτυχημένων επαναλήψεων, μετά από καλλιέργεια 32 ημερών στο υπόστρωμα A₁.

Αρχικός # σωλήνων	# μολυσμένων από μύκητες	# μολυσμένων από βακτήρια	# αποτυχημένων εκφύτων λόγω HgCl ₂	Συνολικός # αποτυχημένων
76	1	0	6	7

4.2.3. Πολλαπλασιασμός

4.2.3.1. Πείραμα 1^ο

Στο πείραμα αυτό μελετήθηκε ο πολλαπλασιασμός της *Erica carnea*, στα υποστρώματα A₁, A₂ και A₃, όπου οι συγκεντρώσεις της 2iP ήταν 24.59, 49.19 και 73.77 μM, αντίστοιχα. Τα έκφυτα ήταν με και χωρίς κορυφή.

Ο αριθμός των βλαστών ανά έκφυτο των δυο κατηγοριών και του συνολικού, δεν διέφερε στατιστικώς σημαντικά μεταξύ εκφύτων με και χωρίς κορυφή.

Συγκρίνοντας τα τρία υποστρώματα, με την αύξηση της συγκέντρωσης της 2iP, αυξήθηκε σημαντικά ο αριθμός των εκπυσομένων βλαστών μήκους > 1cm και ο συνολικός. Όσον αφορά τον αριθμό βλαστών μήκους 0-1 cm, στο υπόστρωμα A₃, με 73.77 μM 2iP, ήταν στατιστικώς μεγαλύτερος απ' ότι στα άλλα δυο. Πρέπει να σημειωθεί ακόμη, ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης της 2iP, αυξήθηκε ταυτόχρονα και το ποσοστό της υάλωσης των εκφύτων.

Όσον αφορά τα ποσοστά των μικρών βλαστών με το σύνολο, ήταν μικρότερα από τα αντίστοιχα των μεγάλων. Συγκεκριμένα, στο υπόστρωμα A₁ (24.59 μM 2iP) ήταν 28 % και 72 %, στο A₂ (49.19 μM 2iP) ήταν 7.5 % και 92.5 % και στο A₃ (73.77 μM 2iP) ήταν 46 % και 54 %, αντίστοιχα (Πίν. 22).

Λαμβάνοντας υπόψη ότι το πρόβλημα της υάλωσης ήταν έντονο στη μεγαλύτερη συγκέντρωση της 2iP και ότι μόνο οι βλαστοί μήκους > 1cm παρουσιάζουν ενδιαφέρον στον πολλαπλασιασμό *in vitro*, το υπόστρωμα A₂, με 49.19 μM 2iP, ήταν καλύτερο για τον πολλαπλασιασμό της *Erica carnea*.

4.2.3.2. Πείραμα 2^ο

Τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού, όπου μελετήθηκε ο πολλαπλασιασμός της *Erica carnea*, στο βασικό υπόστρωμα του Anderson με IAA (5.71 μM) και 4 συγκεντρώσεις της BA (0, 5, 10 και 15 μM), δηλαδή στα υποστρώματα A_{B0}, A_{B1}, A_{B2} και A_{B3} (Πίν. 7), έδειξαν ότι μετά από 27 ημέρες καλλιέργειας, σε κανένα από τα 4 υποστρώματα δε σχηματίστηκαν βλαστοί. Επιπλέον, τα έκφυτα που ήταν σχετικά ανώριμα (όχι ξυλοποιημένα), κατά τη διάρκεια του πειράματος παρουσίασαν χλώρωση ακριβώς πάνω από την επιφάνεια του υποστρώματος.

Πρέπει να σημειωθεί ότι οι συγκεντρώσεις της BA ήταν πολύ μικρότερες από εκείνες της 2iP, που δοκιμάστηκαν στο προηγούμενο πείραμα πολλαπλασιασμού, αλλά αυτό αποτελεί και τη συνήθη χρησιμοποιούμενη αναλογία μεταξύ των δυο κυτοκινινών για ξυλώδη φυτά (Hartmann et al, 1997).

Πίνακας 22. Αποτελέσματα του 1^{ου} πειράματος in vitro πολλαπλασιασμού (10/8/98) της *Erica carnea* (ποικ. Springwood White), με αξιολόγηση του αριθμού των βλαστών (μήκους 0-1 cm, ≥ 1 cm και του συνολικού) που σχηματίστηκαν από εκφύτα με και χωρίς κορυφή, μετά από καλλιέργεια 60 ημερών, στο βασικό υπόστρωμα του Anderson, με τρεις συγκεντρώσεις της 2iP (24.59, 49.19 και 73.77 μM).

2iP (μM)	Είδος εκφύτου	# βλαστών 0-1 cm	# βλαστών ≥ 1 cm	Συνολικός # βλαστών
24.59	με κορυφή	0.27 \pm 0.59	1.00 \pm 0.38	1.27 \pm 0.80
	χωρίς κορ.	0.38 \pm 0.51	0.69 \pm 0.63	1.08 \pm 0.76
49.19	με κορυφή	0.13 \pm 0.35	1.33 \pm 0.72	1.47 \pm 0.92
	χωρίς κορ.	0.08 \pm 0.28	1.38 \pm 0.96	1.46 \pm 0.88
73.77	με κορυφή	1.73 \pm 2.68	1.67 \pm 1.05	3.40 \pm 3.27
	χωρίς κορ.	1.31 \pm 1.84	1.92 \pm 1.04	3.23 \pm 2.28

4.2.4. Ριζοβολία εκφύτων (in vitro)

4.2.4.1. Πείραμα 1^ο

Κανένα από τα 9 διαφορετικά υποστρώματα (RT₃, RT₄, RT₆, RT₇, MR₁, MR₁₂, 05, 06 και 10) που μελετήθηκαν, δεν προκάλεσε τη ριζοβολία των εκφύτων της *Erica carnea*, μετά από καλλιέργεια 39 ημερών. Συγκεκριμένα, το IBA (2.46 και 4.92 μM), το NAA (0.54 μM) μαζί με IBA (0.49 και 2.46 μM), το GA₃ (0.29 μM) μαζί με IBA (1.47, 2.46 και 4.92 μM), το IAA (11.42 μM) και η μείωση των μακροστοιχείων στο ήμισυ με IAA (11.42 μM), δεν βοήθησαν στο σχηματισμό ριζών.

4.2.4.2. Πείραμα 2^ο

Τα τρία υποστρώματα (MRT₁₄, MRT₁₄F, MRT₁₄C) που μελετήθηκαν σ' αυτό το πείραμα, περιείχαν 5.37 μM NAA και 0.49 μM IBA, το δεύτερο περιείχε επιπλέον 0.16 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ φλορογλυκίνη και το τρίτο 0.2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ενεργό άνθρακα. Τα αποτελέσματα μετά από 30 ημέρες έδειξαν ότι ούτε ο συνδυασμός μόνο των αυξινών, ούτε η προσθήκη φλορογλυκίνης αλλά ούτε και η προσθήκη του ενεργού άνθρακα, ευνόησαν το σχηματισμό ριζών της *Erica carnea*.

4.3. *Erica* \times *darleyensis* (ποικιλία Silberschmelze)

4.3.1. Εγκατάσταση εκφύτων

Στο πείραμα αυτό δοκιμάστηκε η δυνατότητα εγκατάστασης της *Erica* \times *darleyensis* στο υπόστρωμα A₁. Για την απολύμανση χρησιμοποιήθηκε HgCl₂ και πριν την κοπή των εκφύτων έγινε ψεκασμός με μυκητοκτόνο και αντιβιοτικό, όπως περιγράφηκε στην παράγραφο 3.2.4.

Μετά από 32 ημέρες, τα ποσοστά μόλυνσης από μύκητες και βακτήρια ήταν 11.1 % και 1.2 %, αντίστοιχα, ενώ νέκρωση της κορυφής και νέκρωση του εκφύτου λόγω τοξικότητας από το HgCl₂ δεν παρατηρήθηκαν. Έτσι το συνολικό ποσοστό των αποτυχημένων επαναλήψεων ήταν 12.3 % (Πίν. 23).

Πρέπει να αναφερθεί ακόμη, ότι στη βάση των περισσότερων εκφύτων σχηματίστηκε άμορφη μάζα κυττάρων, λόγω πολλών τυχαίων κυτταροδιαίρεσεων (Tissue Proliferation), όπως συμβαίνει και στα ροδόδενδρα (Brand & Kiyomoto, 1997), που και αυτά ανήκουν στην οικογένεια *Ericaceae*.

Πίνακας 23. Αποτελέσματα της *in vitro* εγκατάστασης (29/6/98) της *Erica × darleyensis* (ποικ. Silberschmelze), με αξιολόγηση του αριθμού (#) των μολυσμένων (από μύκητες και βακτήρια) επαναλήψεων (σωλήνων ή/και εκφύτων), του αριθμού των εκφύτων που νεκρώθηκαν από το απολυμαντικό (HgCl₂) και του συνολικού αριθμού των αποτυχημένων επαναλήψεων, μετά από καλλιέργεια 32 ημερών στο υπόστρωμα A₁.

Αρχικός # σωλήνων	# μολυσμένων από μύκητες	# μολυσμένων από βακτήρια	# αποτυχημένων εκφύτων λόγω HgCl ₂	Συνολικός # αποτυχημένων
81	9	1	0	10

4.3.2. Πολλαπλασιασμός

Στο πείραμα αυτό μελετήθηκε ο πολλαπλασιασμός της *Erica × darleyensis* στα υποστρώματα A₁, A₂ και A₃, όπου οι συγκεντρώσεις της 2iP ήταν 24.59, 49.19 και 73.77 μM, αντίστοιχα.

Με την αύξηση της συγκέντρωσης της 2iP, παρατηρήθηκε μια τάση μη σημαντικής αύξησης του αριθμού των βλαστών των δυο κατηγοριών και του συνολικού αριθμού βλαστών. Μόνο ο αριθμός βλαστών μήκους 0-1 cm και ο συνολικός, στο υπόστρωμα A₃, ήταν στατιστικά μεγαλύτερος από τους αντίστοιχους αριθμούς στο υπόστρωμα A₁. Παρατηρήθηκε ακόμη, πως με την αύξηση της συγκέντρωσης της 2iP, αυξήθηκε το ποσοστό υάλωσης των εκφύτων.

Όσον αφορά τα ποσοστά των μικρών βλαστών με το σύνολο, ήταν μικρότερα από τα αντίστοιχα των μεγάλων. Συγκεκριμένα, στο υπόστρωμα A₁ (24.59 μM 2iP) ήταν 16 % και 84 %, στο A₂ (49.19 μM 2iP) ήταν 20 % και 80 % και στο A₃ (73.77 μM 2iP) ήταν 49.5 % και 50.5 %, αντίστοιχα (Πίν. 24).

Λαμβάνοντας υπόψη ότι το πρόβλημα της υάλωσης ήταν έντονο στη μεγαλύτερη συγκέντρωση της 2iP και ότι μόνο οι βλαστοί μήκους > 1cm παρουσιάζουν

ενδιαφέρον στον πολλαπλασιασμό *in vitro*, το υπόστρωμα A₂, με 49.19 μ M 2iP, ήταν καλύτερο για τον πολλαπλασιασμό της *Erica x darleyensis*.

Πίνακας 24. Αποτελέσματα του πειράματος *in vitro* πολλαπλασιασμού (3/8/98) της *Erica x darleyensis* (ποικ. Silberschmelze), με αξιολόγηση του αριθμού των βλαστών (μήκους 0-1 cm, ≥ 1 cm και του συνολικού) που σχηματίστηκαν ανά έκφυτο, μετά από καλλιέργεια 56 ημερών, στο βασικό υπόστρωμα του Anderson, με τρεις συγκεντρώσεις της 2iP (24.59, 49.19 και 73.77 μ M).

2iP (μ M)	# βλαστών 0-1 cm	# βλαστών ≥ 1 cm	Συνολικός # βλαστών
24.59	0.16 \pm 0.45	1.03 \pm 0.40	1.25 \pm 0.62
49.19	0.38 \pm 1.01	1.65 \pm 1.00	2.03 \pm 1.49
73.77	2.31 \pm 2.09	2.34 \pm 1.58	4.66 \pm 3.01

4.3.3. Ριζοβολία εκφύτων (*in vitro*)

Στο πείραμα αυτό μελετήθηκε η δράση του NAA, σε συγκεντρώσεις 0, 0.54, 2.69 και 5.37 μ M, και του IBA, σε συγκεντρώσεις 0, 0.49, 2.46 και 4.92 μ M, σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς μεταξύ τους (Πίν. 9).

Μετά από 48 ημέρες, το 60 % των εκφύτων που καλλιεργήθηκαν στο υπόστρωμα απουσία ορμονών και σ' εκείνο μόνο με 0.49 μ M IBA, σχημάτισαν ρίζες μικρού μήκους (Πίν. 25).

Πίνακας 25. Αριθμός εκφύτων της *Erica × darleyensis* (ποικ. Silberschmelze) που σχημάτισαν ρίζες μικρού μήκους, μετά από 48 ημέρες καλλιέργειας, σε 16 υποστρώματα in vitro ριζοβολίας MRT₁₋₁₆, που περιείχαν NAA και IBA. Ο αριθμός των επαναλήψεων – εκφύτων ήταν 5 για κάθε μεταχείριση.

NAA (μM)	IBA (μM)	# εκφύτων με ρίζες
0	0	3
	0.49	3
	2.46	0
	4.92	0
0.54	0	0
	0.49	0
	2.46	0
	4.92	0
2.69	0	0
	0.49	0
	2.46	0
	4.92	0
5.37	0	0
	0.49	0
	2.46	0
	4.92	0

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

5.1. *Arbutus unedo*

Κατά την εγκατάσταση του *Arbutus unedo*, όταν η απολύμανση του φυτικού υλικού έγινε με NaOCl, στα υποστρώματα WPM₁ και MS₁ (με 11.1 μM BA), το συνολικό ποσοστό των αποτυχημένων επαναλήψεων – σωλήνων 41 ημέρες μετά την εγκατάσταση ήταν 69 % και 81 %, αντίστοιχα. Όλες οι μολύνσεις από μύκητες και Browning παρουσιάστηκαν τις πρώτες 18 ημέρες καλλιέργειας, ενώ αντίθετα μολύνσεις από βακτήρια συνέχισαν να εμφανίζονται και μετά τις 18 ημέρες καλλιέργειας. Η εμφάνιση των μολύνσεων από βακτήρια, μετά από ένα ορισμένο χρονικό διάστημα, ακόμη και μερικών μηνών (Hartmann et al, 1997), είναι συνηθισμένο φαινόμενο σε πολλές in vitro καλλιέργειες και συμβαίνει διότι πολλά είδη βακτηρίων βρίσκονται στο εσωτερικό των φυτικών ιστών και το μολύνουν ακόμα και μετά την εγκατάσταση και σταθεροποίηση της καλλιέργειας.

Το φαινόμενο της οξείδωσης των φαινολικών ουσιών (Browning), οι οποίες παράγονται από τα πληγωμένα κύτταρα της βάσης του εκφύτου, συνήθως εμφανίζεται στα πολυετή ξυλώδη φυτά και πριν τη σταθεροποίηση της καλλιέργειας (Hartmann et al, 1997). Οι Seneviratne & Wijesekara (1996) βρήκαν ότι στην in vitro καλλιέργεια του είδους *Hevea brasiliensis*, η προεμβάπτιση των εκφύτων με αντιοξειδωτικές ουσίες (κιτρικό ή ασκορβικό οξύ), η παρουσία του ενεργού άνθρακα στο υπόστρωμα, η συχνή μεταφορά των εκφύτων σε νέο υπόστρωμα, η απολύμανση του φυτικού υλικού με HgCl₂, η καλλιέργεια στους 20°C στο σκοτάδι και η μείωση των ανόργανων αλάτων του υποστρώματος MS στο ½ ή στο ¼, πολλές φορές βοηθάει στην αντιμετώπιση του προβλήματος. Στην παρούσα εργασία βρέθηκε ότι το ποσοστό εμφάνισης του Browning στο MS₁ ήταν σχεδόν 5πλάσιο από εκείνο στο WPM₁. Η διαφορά μεταξύ των συστατικών των δυο υποστρωμάτων, βρίσκεται κυρίως στο NH₄NO₃, KNO₃ και K₂SO₄ (Πίν. 2). Η συγκέντρωση του NH₄NO₃ στο MS είναι σχεδόν 4πλάσια από την αντίστοιχη στο WPM. Στο MS υπάρχει KNO₃ δεν υπάρχει όμως K₂SO₄ και στο WPM ισχύει το αντίστροφο. Κατόπιν των ανωτέρω, φαίνεται ότι το αμμωνιακό άλας (NH₄NO₃) που βρίσκεται στο MS σε 4πλάσια ποσότητα απ' ότι στο WPM ή και τα νιτρικά ιόντα που βρίσκονται επίσης σε υψηλή συγκέντρωση στο MS, πιθανώς να είναι υπεύθυνα για την έντονη οξείδωση των

φαινολικών ουσιών στο υπόστρωμα αυτό. Ο Linington (1991) βρήκε ότι κατά τον μικροπολλαπλασιασμό των ειδών *Dipterocarpus alatus* και *D. intricatus* το καλύτερο υπόστρωμα είναι το WPM χωρίς NH_4NO_3 . Επίσης, οι Dalal et al (1991), τροποποιώντας το υπόστρωμα του MS, κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι το Browning στην in vitro καλλιέργεια της αμπέλου, ελαττώθηκε όταν τα ανόργανα άλατα των μακροστοιχείων μειώθηκαν στο ήμισυ ή όταν μόνο το NH_4NO_3 μειώθηκε στο ήμισυ.

Κατά το στάδιο πολλαπλασιασμού του *Arbutus unedo*, στα υποστρώματα WPM με 3 συγκεντρώσεις της BA (5.5, 11.1 και 22.2 μM), παρατηρήθηκε μια τάση μη σημαντικής αύξησης του αριθμού βλαστών αλλά και του ποσοστού υάλωσης, με την αύξηση της συγκέντρωσης της BA. Οι Hartmann et al (1997) αναφέρουν επίσης ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης στο υπόστρωμα, αυξάνεται ο αριθμός των βλαστών, αλλά ταυτόχρονα αυξάνεται και το ποσοστό υάλωσης. Μεταξύ εκφύτων με ή χωρίς κορυφή, βρέθηκε μια τάση μη σημαντικής αύξησης, όταν τα έκφυτα ήταν χωρίς κορυφή, που εξηγείται λόγω της κυριαρχίας της κορυφής που επικρατεί στα έκφυτα με κορυφή.

Στα υποστρώματα MS, η παρουσία 11.1 μM BA στο υπόστρωμα ευνόησε την παραγωγή βλαστών σε σχέση με τις άλλες συγκεντρώσεις. Σ' αυτά τα υποστρώματα σχηματίστηκαν περισσότεροι βλαστοί μήκους 0-1 cm σε σχέση με τα WPM, όμως όσον αφορά τον αριθμό βλαστών μήκους > 1 cm δεν υπήρχαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των δυο υποστρωμάτων. Πρέπει να σημειωθεί ότι μόνο βλαστοί μήκους > 1 cm παρουσιάζουν ενδιαφέρον στον πολλαπλασιασμό και είναι κατάλληλοι για επανακαλλιέργεια.

Κατά τις επόμενες επανακαλλιέργειες, έκφυτα από το WPM_1 (με 11.1 μM BA) παρήγαγαν περισσότερους βλαστούς μήκους > 1 cm απ' ότι στο MS_1 όπου και σημειώθηκε σταδιακή απώλεια της ευρωστίας των εκφύτων.

Συμπερασματικά, το WPM_1 (με βιταμίνες του MS και 11.1 μM BA) είναι καλύτερο για τον πολλαπλασιασμό του *Arbutus unedo*. Σε παρόμοια αποτελέσματα κατέληξε ο Mackay (1996) για το είδος *Arbutus xalapensis*. Συγκεκριμένα βρήκε ότι το υπόστρωμα με ανόργανα άλατα του WPM, βιταμίνες του MS και 11.1 ή 22.2 μM BA, ήταν το καλύτερο για τον πολλαπλασιασμό του είδους αυτού. Αντίθετα, οι Banko & Stefani (1989) βρήκαν ότι, στο υπόστρωμα WPM, η BA επέδρασε αρνητικά στον πολλαπλασιασμό του *Oxydendrum arboreum*, ένα άλλο είδος της οικογένειας *Ericaceae*, ενώ ευνοϊκή ήταν η δράση της ζεατίνης.

Στα διάφορα πειράματα *in vitro* ριζοβολίας του *Arbutus unedo*, το βασικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν του MS. Όταν προστέθηκε IBA σε συγκεντρώσεις 0, 3, 6 και 9 μM , τα έκφυτα δεν ριζοβόλησαν. Ο Mackay (1996) πέτυχε τη ριζοβολία των εκφύτων του *Arbutus xalapensis*, όταν αυτά καλλιεργήθηκαν 1 εβδομάδα σε υπόστρωμα WPM με 6.1 μM IBA και μεταφέρθηκαν μετά σε υπόστρωμα χωρίς αυξίνη. Οι Banko & Stefani (1989) βρήκαν ότι, στο υπόστρωμα WPM με 2.5-10 μM IBA, το *Oxydendrum arboreum* ριζοβόλησε σε 6 εβδομάδες.

Όταν προστέθηκαν NAA και IBA σε διάφορους συνδυασμούς συγκεντρώσεων, το 50 % των εκφύτων σχημάτισαν ρίζες όταν οι συγκεντρώσεις ήταν 5.37 και 0.49 μM , αντίστοιχα. Από αυτό φαίνεται ότι η αυξημένη συγκέντρωση του NAA με ελάχιστη συγκέντρωση του IBA, ευνοεί την *in vitro* ριζοβολία του *Arbutus unedo*. Ο Mackay (1996), επίσης, βρήκε ότι η προσθήκη 6.7 μM NAA στο WPM, προκαλεί τη ριζοβολία του 77 % των εκφύτων του *Arbutus xalapensis*.

Στα υπόλοιπα πειράματα, βρέθηκε ότι το GA_3 , το GA_3 με IBA, το IAA, το IAA με μείωση των μακροστοιχείων στο ήμισυ, η φλορογλυκίνη και ο ενεργός άνθρακας δεν επέδρασαν θετικά στη ριζοβολία *in vitro* του *Arbutus unedo*.

Επομένως, η καταλληλότερη αυξίνη για *in vitro* ριζοβολία εκφύτων του *Arbutus unedo* είναι πιθανότατα η NAA.

Ένας πιθανός τρόπος *in vitro* ριζοβολίας του *Arbutus unedo*, θα ήταν η καλλιέργειά του για μια εβδομάδα σε υπόστρωμα WPM με διάφορες συγκεντρώσεις του IBA και κατόπιν μεταφορά σε υπόστρωμα χωρίς αυξίνη όπως έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στο *A. xalapensis* (Mackay, 1996). Ακόμη θα μπορούσε να μελετηθεί η μείωση των ανόργανων αλάτων του υποστρώματος WPM παρουσία IBA ή NAA.

Στα πειράματα *ex vitro* ριζοβολίας του *Arbutus unedo*, βρέθηκε ότι το σύστημα υδρονέφωσης (mist) είναι καλύτερο από το σύστημα ομίχλης (fog). Στο σύστημα υδρονέφωσης, έκφυτα από το υπόστρωμα πολλαπλασιασμού WPM_1 , σχημάτισαν ρίζες σε ποσοστό 61 % και σε σχετικά μικρό χρονικό διάστημα. Αντίθετα, έκφυτα από το υπόστρωμα πολλαπλασιασμού MS_1 και μη ριζοβόλησαν από διάφορα υποστρώματα *in vitro* ριζοβολίας, δεν ριζοβόλησαν ικανοποιητικά, πιθανώς λόγω της μικρότερης ευρωστίας που είχαν.

Συμπερασματικά, ένας ικανοποιητικά αποτελεσματικός τρόπος πολλαπλασιασμού του *Arbutus unedo*, είναι η απολύμανση του φυτικού υλικού με NaOCl , η εγκατάσταση και ο πολλαπλασιασμός σε υπόστρωμα WPM_1 (με ανόργανα άλατα του

WPM, βιταμίνες του MS και 11.1 μM BA) και η ριζοβολία του σε σύστημα υδρονέφωσης στο θερμοκήπιο (ex vitro).

5.2. *Erica carnea* (ποικιλία Springwood White)

Για την πρώτη εγκατάσταση της *Erica carnea* το φυτικό υλικό απολυμάνθηκε με διάλυμα NaOCl. Στα υποστρώματα MS₃ και A₁ (με 5.71 μM IAA και 24.59 μM 2iP), στα οποία έγινε η εγκατάσταση, μολύνσεις από μύκητες και βακτήρια εμφανίστηκαν σε μικρό ποσοστό αρχικά, σε έκφυτα με ή χωρίς φύλλα. Όσον αφορά τον αριθμό των βλαστών που σχηματίστηκαν ανά έκφυτο, στο MS₃ δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ εκφύτων με ή χωρίς φύλλα, όμως στο A₁ ο αντίστοιχος αριθμός στα έκφυτα με φύλλα ήταν στατιστικά μεγαλύτερος από εκείνον χωρίς φύλλα. Ο αριθμός δε των βλαστών που σχηματίστηκαν ανά έκφυτο (με ή χωρίς φύλλα) στο υπόστρωμα A₁ ήταν μεγαλύτερος από εκείνον στο MS₃, ενώ το μέγεθος και ο αριθμός αυτών αυξήθηκε με το χρόνο και στα δυο υποστρώματα.

Το ποσοστό όμως των αποτυχημένων επαναλήψεων λόγω νέκρωσης της κορυφής των εκφύτων ήταν υψηλό στο υπόστρωμα MS₃ και μηδενικό στο A₁. Το πρόβλημα αυξήθηκε με το χρόνο και έφτασε το 43 % μετά από καλλιέργεια 28 ημερών στο MS₃. Η νέκρωση αυτή της κορυφής κατέληξε στην καθολική ξήρανση των εκφύτων. Το ίδιο πρόβλημα αντιμετώπισε ο Anderson (1984), κατά την καλλιέργεια του ροδόδενδρου, που ανήκει στην ίδια οικογένεια με την *Erica carnea*. Συγκεκριμένα, όταν καλλιεργήσε το ροδόδενδρο στο υπόστρωμα MS, τα έκφυτα εμφάνισαν συμπτώματα παρόμοια με αυτά που εμφανίστηκαν στην *Erica carnea*. Όταν όμως τροποποίησε τα συστατικά του MS, και ειδικότερα όταν μείωσε στο 1/4 περίπου το NH₄NO₃ και το KNO₃ (υπόστρωμα Anderson, όπως και το A₁) (Πίν. 2), το πρόβλημα δεν εμφανίστηκε. Απέδωσε έτσι το πρόβλημα σε τοξικότητα αλάτων.

Στις επανακαλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν εμφανίστηκαν μολύνσεις από βακτήρια, με αποτέλεσμα την εξολοκλήρου αποτυχία της καλλιέργειας της *Erica carnea*. Η εμφάνιση των μολύνσεων από βακτήρια, μετά από ένα ορισμένο χρονικό διάστημα, ακόμη και μερικών μηνών (Hartmann et al, 1997), είναι συνηθισμένο φαινόμενο σε πολλές in vitro καλλιέργειες και συμβαίνει διότι πολλά είδη βακτηρίων βρίσκονται στο εσωτερικό των φυτικών ιστών και μολύνουν το έκφυτο, μετά από την εγκατάσταση και σταθεροποίηση της καλλιέργειας.

Η νέα μέθοδος απολύμανσης εκφύτων με φύλλα, με στόχο την καταπολέμηση κυρίως των βακτηρίων, που δοκιμάστηκε στη νέα εγκατάσταση ήταν επιτυχής.

Συγκεκριμένα, με ψεκασμό με διασυστηματικό μυκητοκτόνο και διασυστηματικό αντιβιοτικό των μητρικών φυτών και κατόπιν απολύμανση των εκφύτων με HgCl_2 , οι μολύνσεις *in vitro* από μύκητες και βακτήρια ήταν αμελητέες. Η καταπολέμηση των βακτηρίων πιθανότερο είναι να οφείλεται στον ψεκασμό των μητρικών φυτών με τα ανωτέρω διασυστηματικά φυτοπροστατευτικά.

Κατά το στάδιο πολλαπλασιασμού της *Erica carnea*, που μελετήθηκαν 3 συγκεντρώσεις της 2iP μόνο στο υπόστρωμα του Anderson (με 5.71 μM IAA) που ήταν καλύτερο για την εγκατάστασή της, βρέθηκε ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης αυξήθηκε ο αριθμός βλαστών ανά έκφυτο αλλά ταυτόχρονα αυξήθηκε και το ποσοστό της υάλωσης. Το ποσοστό δε των βλαστών μήκους > 1 cm, που είναι κατάλληλοι για επανακαλλιέργεια, σε σχέση με το σύνολο, ήταν μεγαλύτερο στο υπόστρωμα με 49.19 μM 2iP. Κατόπιν των ανωτέρω, το υπόστρωμα A₂ (με 5.71 μM IAA και 49.19 μM 2iP) ήταν το καλύτερο για τον πολλαπλασιασμό της *Erica carnea*. Το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται για τον πολλαπλασιασμό των ροδόδενδρων (Hartmann et al, 1997), είναι παρόμοιο με αυτό που αναφέρθηκε παραπάνω, με μόνη διαφορά στη συγκέντρωση της 2iP, που βρέθηκε ότι είναι 24.59 μM .

Η προσπάθεια πολλαπλασιασμού της *Erica carnea* με προσθήκη BA αντί της 2iP απέτυχε. Το *Oxydendrum arboreum*, ένα άλλο είδος της οικογένειας *Ericaceae*, επίσης δεν ευνοείται από την προσθήκη της BA κατά τον πολλαπλασιασμό του (Banko & Stefani, 1989).

Το βασικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε στα δυο πειράματα *in vitro* ριζοβολίας της *Erica carnea*, ήταν το MS. Σ' αυτά βρέθηκε ότι το IBA, το NAA με IBA, το GA₃ με IBA, το IAA, το IAA με μείωση των μακροστοιχείων στο ήμισυ, η φλορογλυκίνη με NAA και IBA και ο ενεργός άνθρακας με NAA και IBA, δεν επέδρασαν θετικά στη ριζοβολία.

Τα ροδόδενδρα ριζοβολούν ικανοποιητικά *in vitro* σε υπόστρωμα του Anderson με 26.85 μM NAA και ενεργό άνθρακα ή σε υπόστρωμα ½ MS με 9.84-34.45 μM IBA και ενεργό άνθρακα (Hartmann et al, 1997). Επίσης, σε υπόστρωμα ¼ Anderson με 28 μM IAA, οι Iapichino et al (1991), βρήκαν ότι το *Rhododendron laetum* × *aurigeratum* ριζοβολεί σε ποσοστό 43 %. Τα τρία αυτά υποστρώματα ίσως να είναι κατάλληλα και για τη ριζοβολία της *Erica carnea*.

5.3. *Erica* × *darleyensis* (ποικιλία *Silberschmelze*)

Ο ψεκασμός των μητρικών φυτών με μυκητοκτόνο και διασυστηματικό αντιβιοτικό και η απολύμανση του φυτικού υλικού με HgCl_2 , ήταν αποτελεσματική μέθοδος απόλύμανσης και για την *Erica* × *darleyensis*. Το κατάλληλο υπόστρωμα για την εγκατάσταση ήταν όμοιο με εκείνο που βρέθηκε καλύτερο για την εγκατάσταση της *Erica carnea*, δηλαδή του Anderson με 5.71 μM IAA και 24.59 μM 2iP.

Πρέπει να σημειωθεί ότι στο υβρίδιο αυτό παρουσιάστηκε το φαινόμενο των ακανόνιστων κυτταροδιαιρέσεων (Tissue Proliferation) και ο σχηματισμός πολυάριθμων μικρών βλαστών στη βάση των εκφύτων. Το ίδιο φαινόμενο έχει παρατηρηθεί από τους Brand & Kiyomoto (1997) στην *in vitro* καλλιέργεια του *Rhododendron* 'Montego', αλλά και σε πολλές άλλες ποικιλίες ροδόδενδρου. Το αίτιο δεν είναι γνωστό μέχρι σήμερα αλλά προφανώς δεν οφείλεται σε παθογόνο αίτιο αλλά σε γενετικά αίτια καθόσον παρόμοιες ακανόνιστες κυτταροδιαιρέσεις παρουσιάζονται και κατά την ανάπτυξη των φυτών στο χωράφι (LaMondia et al, 1997).

Κατά το στάδιο πολλαπλασιασμού της *Erica* × *darleyensis*, που μελετήθηκαν 3 συγκεντρώσεις της 2iP στο υπόστρωμα του Anderson (με 5.71 μM IAA), βρέθηκε ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης αυξήθηκε ο αριθμός βλαστών ανά έκφυτο αλλά ταυτόχρονα αυξήθηκε και το ποσοστό της υάλωσης. Τα ποσοστά των βλαστών μήκους 0-1 cm σε σχέση με το σύνολο ήταν μικρά όταν οι συγκεντρώσεις της 2iP ήταν 24.59 και 49.19 μM . Κατόπιν των ανωτέρω, το υπόστρωμα A₂ (με 5.71 μM IAA και 49.19 μM 2iP) ήταν καλύτερο και για τον πολλαπλασιασμό της *Erica* × *darleyensis*.

Το βασικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα *in vitro* ριζοβολίας της *Erica* × *darleyensis*, ήταν το MS, με 4 συγκεντρώσεις των ορμονών NAA και IBA. Το 60 % των εκφύτων που καλλιεργήθηκαν στο υπόστρωμα απουσία ορμονών και σ' εκείνο μόνο με 0.49 μM IBA, σχημάτισε ρίζες μικρού μήκους, μετά από 48 ημέρες. Το αποτέλεσμα όμως αυτό δεν ήταν ικανοποιητικό λόγω των μικρών επαναλήψεων και λόγω του μεγάλου χρονικού διαστήματος που απαιτήθηκε.

Τα υποστρώματα που προτάθηκαν για την *in vitro* ριζοβολία της *Erica carnea*, θα μπορούσαν να μελετηθούν και για τη ριζοβολία της *Erica* × *darleyensis*.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Anderson, W. C., 1975. Propagation of rhododendrons by tissue culture: Part 1. Development of a culture medium for multiplication of shoots. Proc. Intl. Plant Prop. Soc., 25: 129-135.
- Anderson, W. C., 1984. A revised tissue culture medium for shoot multiplication of rhododendron. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 109 (3): 343-347.
- Anonymous, 1993. The hillier colour dictionary of trees & shrubs, 2nd edition. David & Charles Inc., Gr. Britain, pp. 46-47 and 89-92.
- Banko, T. J. and Stefani, M. A., 1989. In vitro propagation of *Oxydendrum arboreum* from mature trees. HortScience, 24 (4): 683-685.
- Brand, M. H. and Kiyomoto, R., 1997. The induction of Tissue Proliferation – like characteristics in In vitro cultures of *rhododendron* “Montego”. HortScience, 32 (6): 989-994.
- Dalal, M. A., Sharma, B. B. and Sharma, H. C., 1991. Effect of macro salts modification in MS culture medium on oxidative browning in in vitro culture of grape. Indian J. of Hort., 48 (3): 187-191.
- Εκπαιδευτική Ελληνική Εγκυκλοπαίδεια, 1983. Θετικές επιστήμες, Φυτολογία, τόμος 10. Εκδοτική Αθηνών, Αθήνα, σελ. 108-109 και 154-155.
- Ελευθερίου, Ε. Π., 1994. Τεχνολογία φυτικού πολλαπλασιαστικού υλικού. Εκδόσεις Art of Text, Θεσσαλονίκη.
- Hartmann, H. T., Kester, D. E., Davies, F. T. and Geneve, R. L., 1997. Plant Propagation: Principles and Practices, 6th edition. Prentice Hall, New Jersey.
- Iapichino, G., Chen, T. H. H. and Fuchigami, L. H., 1991. Adventitious shoot production from a *Vireya* Hybrid of *rhododendron*. HortScience, 26 (5): 594-596.
- Καράταγλης, Σ., 1995. Φυσιολογία φυτών. Εκδόσεις Art of text, Θεσσαλονίκη, σελ. 77, 79 και 84-85.
- Κίντζιος, Σ. Ε., 1994. Επιχειρηματική ιστοκαλλιέργεια. Εκδόσεις Α. Σταμούλης, Πειραιάς, σελ. 28-29.
- LaMondia, J. A., Smith, V. L. and Rathier, T. M., 1997. Tissue Proliferation in Rhododendron: Lack of association with disease and effect on plants in the landscape. HortScience, 32 (6): 1001-1003.

- Linington, I. M., 1991. In vitro propagation of *Dipterocarpus alatus* and *D. intricatus*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 27 (1): 81-88.
- Lloyd, G. and McCown, B., 1980. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. *Comb. Proc. Inter. Plant Prop. Soc.*, 30: 421-427.
- Lovato, P. E., Gianinazzi-Pearson, V., Trouvelot, A. and Gianinazzi, S., 1996. The state of art of mycorrhizas and micropropagation. *Adv. Hort. Sci.*, 10: 46-52.
- Mackay, W. A., 1996. Micropropagation of Texas madrone, *Arbutus xalapensis* H. B. *K. HortScience*, 31 (6): 1028-1029.
- Μαυρογιαννόπουλος, Γ. Ν., 1990. Θερμοκήπια, Περιβάλλον – Υλικά – Κατασκευή – Εξοπλισμός. Εκδόσεις Α. Σταμούλης, Πειραιάς, σελ. 171-175.
- Pierik, R. L. M., 1998. In vitro culture of Higher Plants. Kluwer Academic Publishers, Holland, pp. 34-43.
- Ποντίκης, Κ. Α., 1994. Πολλαπλασιασμός καρποφόρων δένδρων και θάμνων. Εκδόσεις Α. Σταμούλης, Πειραιάς.
- Polunin, O., 1969. A field guide flowers of Europe. Oxford University Press, London, pp. 294-297.
- Σφήκας, Γ., 1983. Δένδρα και θάμνοι της Ελλάδας. Εκδόσεις Π. Ευσταθιάδης και Υιοί Α. Ε., Αθήνα, σελ. 170-173.
- Seneviratne, P. and Wijesekara, G. A. S., 1996. The problem of phenolic exudates in in vitro cultures of mature *Hevea brasiliensis*. *J. of Plantation Crops*, 24 (1): 54-62.
- Tutin, T. G., Heywood, V. H., Burges, N. A., Moore, D. M., Valentine, D. H., Walters, S. M. and Webb, D. A., 1972. *Flora Europaea*, Vol. 3. Cambridge University Press, Gr. Britain, pp. 7 and 11.

