



ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
& ΑΓΡΟΤΙΚΟΥ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
Αριθμ. Πρωτοκ. 51
Ημερομηνία 7-7-2004

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

*«Ανάπτυξη και περιβάλλον κατά την
ex vitro σκληραγώγηση φυταρίων
αμπέλου προερχομένων από
μικροπολλαπλασιασμό.»*



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
Της
Δοιτιά Ξανθής

Βόλος, 2004



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

Αριθ. Εισ.: 3874/1
Ημερ. Εισ.: 30-08-2004
Δωρεά: Συγγραφέας
Ταξιθετικός Κωδικός: ΠΤ – ΦΠΑΠ
2004
ΔΟΝ

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή:

Γ. Νάνος (Επιβλέπων) Επίκουρος Καθηγητής
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Κ. Κίττας (Μέλος) Καθηγητής
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας

Α. Πατάκας (Μέλος) Επίκουρος Καθηγητής
Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης

Πτυχιακή διατριβή

« Ανάπτυξη και περιβάλλον κατά την *ex vitro* σκληραγώγηση φυταρίων αμπέλου προερχομένων από μικροπολλαπλασιασμό. »

Δοντά Ξανθή
Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας, 2004

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε το μικροκλίμα (θερμοκρασία αέρα, υποστρώματος, φύλλου, σχετική υγρασία, PAR, UV, διάχυτο φως) κατά τη 2^η φάση *ex vitro* σκληραγώγησης φυταρίων δύο υποκειμένων αμπέλου (41B και SO₄) σε πάγκο χωρίς υδρονέφωση αλλά σε κλειστό χώρο, και κατά την ανάπτυξή τους σε δικτυοκήπιο που χρησιμοποιήθηκε για τον εγκλιματισμό τους σε φυσικό περιβάλλον. Μελετήθηκε επίσης η ανάπτυξη των ανωτέρω φυταρίων (νωπό και ξηρό βάρος, μήκος βλαστού και ριζών, επί τοις εκατό ποσοστό νωπού και ξηρού βάρους βλαστού αλλά και της ρίζας, αριθμός κόμβων βλαστού) κατά τη διάρκεια της δεύτερης φάσης *ex vitro* σκληραγώγησης.

Κατά τη 2^η φάση σκληραγώγησης βρέθηκε διαφορά μεταξύ PAR στο μέσο του πάγκου και στο άκρο του, μεταξύ θερμοκρασίας αέρος και υποστρώματος και τέλος μεταξύ θερμοκρασίας της άνω και της κάτω επιφάνειας του φύλλου. Βρέθηκε πως η PAR στο εσωτερικό του δικτυοκηπίου ήταν πολύ πιο χαμηλή από ότι στον έξω χώρο έως τις απογευματινές ώρες λόγω της σκίασης από παρακείμενα δέντρα. Παρόμοιες διαφορές (σε μικρότερο εύρος) βρέθηκαν και στη θερμοκρασία του αέρα. Η θερμοκρασία (που μετρήθηκε από τα θερμοζεύγη) και η PAR μειώθηκαν τουλάχιστο μια ώρα πιο νωρίς από τη μετρήσιμη αύξηση της σχετικής υγρασίας εντός του δικτυοκηπίου. Επίσης βρέθηκε ότι η υπερϊώδης ακτινοβολία και το διάχυτο φως μειώθηκαν τουλάχιστο στο μισό έως και το 1/3 της αντίστοιχης ακτινοβολίας εκτός του δικτυοκηπίου.

Οι μετρήσεις ανάπτυξης των φυταρίων κατά το 2^ο στάδιο σκληραγώγησης έδειξαν ότι τα φυτά αναπτύχθηκαν με διπλασιασμό του μήκους και του νωπού τους βάρους, με έντονη συσσώρευση ξηράς ουσίας στο βλαστό, μικρή αύξηση του αριθμού των κόμβων τους και καμία αλλαγή στον αριθμό ριζών ανά φυτάριο. Σημαντικές διαφορές βρέθηκαν μεταξύ των δύο υποκειμένων όπου το SO₄ φαίνεται να συσσωρεύει μεγάλες ποσότητες νωπού και ξηρού βάρους επιλεκτικά στο βλαστό πράγμα που πιθανόν να κάνει τα φυτά αυτά πιο ευαίσθητα κατά τη μετακίνησή τους στο ανοικτό περιβάλλον του δικτυοκηπίου σε σχέση με το 41B.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Για την πραγματοποίηση της εργασίας αυτής συνέβαλλαν αρκετά άτομα τα οποία θα ήταν παράληψη να μην αναφέρω αλλά και να μην ευχαριστήσω για την μεγάλη τους προσφορά.

Ένα μεγάλο ευχαριστώ οφείλω κατά κύριο λόγο στον καθηγητή μου κ. Γεώργιο Νάνο ο οποίος ανέλαβε την ευθύνη της επίβλεψης της πτυχιακής μου εργασίας. Χάρη στη μεταδοτικότητα του και τον δικό του τρόπο διδασκαλίας στο μάθημα του Αγενούς Πολλαπλασιασμού κατάφερε να με κάνει να αγαπήσω το συγκεκριμένο αντικείμενο και να επιλέξω να ασχοληθώ με αυτό. Αν και αρχικά υπήρξαν κάποια προβλήματα επικοινωνίας τελικά αυτά ξεπεράστηκαν με καλή διάθεση η οποία υπήρχε πάντα και έκανε τη συνεργασία μας πολύ ευχάριστη. Ευχαριστώ πολύ για το χρόνο που αφιέρωσε αν και γνωρίζω καλά πως λόγω υποχρεώσεων και διαφόρων άλλων καταστάσεων ήταν ελάχιστος. Παρόλα αυτά έκανε το καλύτερο δυνατό και για την εργασία αυτή..

Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου κ. Κωνσταντίνο Κίττα για την επίβλεψη της εργασίας μου και για τις παρατηρήσεις του πάνω στο συγκεκριμένο θέμα, οι οποίες έκαναν την εργασία πληρέστερη.

Ο κ. Άγγελος Πατακάς συνέβαλε κι εκείνος παρέχοντας μου πληροφορίες και κάνοντας τα δικά του σχόλια για τη βελτίωση της πτυχιακής αυτής εργασίας και γι' αυτό τον ευχαριστώ.

Σημαντικότερη ήταν η προσφορά του διευθυντή του Ινστιτούτου Προστασίας Φυτών Βόλου κ. Ιωάννη Ρούμπου στην πραγματοποίηση της εργασίας αυτής, ο οποίος και μου έδωσε τη δυνατότητα υλοποίησης του πειραματικού μέρους. Η ευκαιρία που μου έδωσε ήταν πολύ σημαντική για μένα και για το λόγο αυτό τον ευχαριστώ πολύ και εκείνον αλλά και όλο το προσωπικό του Ινστιτούτου το οποίο ήταν δίπλα μου σε κάθε δυσκολία που αντιμετώπισα.

Στην Αγγελική Σόρκου οφείλω επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ για την πολύτιμη βοήθειά της τόσο στο πειραματικό σκέλος όσο και στο θεωρητικό. Ήταν πάντα πρόθυμη να με βοηθήσει πάνω στο συγκεκριμένο αντικείμενο, με το οποίο είχε και η ίδια ασχοληθεί και την ευχαριστώ πολύ γι' αυτό.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω την οικογένειά μου η οποία με υποστήριξε τόσο ηθικά όσο και οικονομικά ώστε να πραγματοποιηθούν οι σπουδές μου, που τόσο πολύ επιθυμούσα.

Ευχαριστώ πολύ!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!!

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

1.1. Ιστοκαλλιέργεια.....	1
1.1.1 Γενικά για την ιστοκαλλιέργεια.....	1
1.1.2 Ιστορική αναδρομή.....	7
1.2 Επίδραση του φυσικού περιβάλλοντος στα καλλιεργούμενα φυτά <i>in vitro</i>....	10
1.2.1 Συνοχή του θρεπτικού υποστρώματος.....	11
1.2.2 Θερμοκρασία.....	11
1.2.2.1 Επίδραση στην αύξηση των φυτών.....	11
1.2.2.2 Επίδραση στη μορφογένεση.....	12
1.2.3 Σχετική υγρασία.....	13
1.2.4 Φωτισμός.....	14
1.2.4.1 Επίδραση στη μορφογένεση.....	15
1.3 Σκληραγώγηση (εγκλιματισμός) φυταρίων παραγόμενων <i>in vitro</i>.....	16
1.4 Αμπέλι.....	23
1.4.1 Η αμπελουργία ανά τον κόσμο.....	23
1.4.2 Η αμπελουργία στην Ελλάδα.....	25
1.4.3 Το γένος <i>Vitis</i>	26
1.4.4 Το υποκείμενο 41B.....	26
1.4.5 Το υποκείμενο SO ₄	27
1.5 Μεθοδολογία ιστοκαλλιέργειας αμπέλου.....	27
1.6 Σκοπός της εργασίας.....	30

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Τα φυτά.....	32
2.2 Παρασκευή του υποστρώματος.....	32
2.3 Σωλήνες ανάπτυξης.....	35
2.4 Τράπεζα νηματικής ροής και εργαλεία.....	36
2.5 Θάλαμος ανάπτυξης	36
2.6 Ο θάλαμος 1 ^{ου} σταδίου σκληραγώγησης και οι κλωβοί εγκλιματισμού.....	37
2.7 Θάλαμος 2 ^{ου} σταδίου σκληραγώγησης.....	38
2.8 Δικτυοκήπιο.....	39
2.9 Πολλαπλασιασμός.....	39
2.10 Πειραματική διαδικασία.....	40
2.11 Μετρήσεις περιβάλλοντος του θαλάμου 2 ^{ου} σταδίου σκληραγώγησης.....	41
2.12 Μετρήσεις περιβάλλοντος δικτυοκηπίου.....	42
2.13 Στατιστική ανάλυση των δεδομένων.....	42

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Αποτελέσματα μετρήσεων φωτός θαλάμου 2 ^{ου} σταδίου σκληραγώγησης....	43
3.2 Αποτελέσματα κλιματικών μετρήσεων θαλάμου 2 ^{ου} σταδίου σκληραγώγησης.....	43
3.3 Αποτελέσματα μετρήσεων φωτός δικτυοκηπίου.....	46
3.4 Αποτελέσματα κλιματικών δεδομένων δικτυοκηπίου.....	48
3.5 Μετρήσεις αύξησης.....	50

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1 Μελέτη περιβάλλοντος θαλάμου σκληραγώγησης 2 ^{ου} σταδίου και δικτυοκηπίου.....	57
4.2 Μελέτη αύξησης των φυτών.....	57
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	59

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας 1.1. Οι διάφοροι τύποι της ιστοκαλλιέργειας και ο λόγος για τον οποίο εφαρμόζονται.....	5
Πίνακας 1.2. Βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης και περιοριστικές θερμοκρασίες διαφόρων εκφύτων.....	12
Πίνακας 1.3. Σχετική υγρασία στους γυάλινους περιέκτες ανάλογα με το πόμα που χρησιμοποιείται.	14
Πίνακας 1.4. Τεχνητά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται κατά την σκληραγώγηση φυταρίων προερχόμενων από ιστοκαλλιέργεια.....	22
Πίνακας 1.5. Η καλλιεργούμενη έκταση με αμπέλι σε διάφορες χώρες.....	24
Πίνακας 1.6. Η καλλιεργούμενη έκταση με σταφύλια στις περιφέρειες της Ελλάδας.....	25
Πίνακας 1.7. Υπόστρωμα για την ιστοκαλλιέργεια αμπέλου.....	30
Πίνακας 2.1 Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την παρασκευή του υποστρώματος M ₄	34
Πίνακας 3.1 Αποτελέσματα μετρήσεων φωτός δικτυοκηπίου (14/7/2003).....	47
Πίνακας 3.2 Αποτελέσματα μετρήσεων φωτός δικτυοκηπίου (24/7/2003).....	47
Πίνακας 3.3. Μέσοι όροι νωπού βάρους βλαστού και ρίζας των δύο υποκειμένων (41B, SO ₄) και των δύο διαφορετικών χρονικών στιγμών λήψης μετρήσεων (πριν και μετά το 2 ^ο στάδιο σκληραγώγησης).	51
Πίνακας 3.4. Μέσοι όροι του επί τοις εκατό ποσοστού νωπού βάρους βλαστού και ρίζας των δύο υποκειμένων(41B, SO ₄) και των δύο διαφορετικών χρονικών στιγμών λήψης μετρήσεων(πριν και μετά το 2 ^ο στάδιο σκληραγώγησης), σημαντικότητα και Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά των μεταβλητών αυτών.....	52
Πίνακας 3.5. Μέσοι όροι του μήκους βλαστού και αριθμού κόμβων των δύο υποκειμένων (41B, SO ₄) και των δύο διαφορετικών χρονικών στιγμών λήψης μετρήσεων(πριν και μετά το 2 ^ο στάδιο σκληραγώγησης), σημαντικότητα και Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά των μεταβλητών αυτών.....	53
Πίνακας 3.6. Μέσοι όροι μήκους ρίζας, αριθμού και μήκους επί μέρους ριζών των δύο υποκειμένων (41B, SO ₄) και των δύο διαφορετικών χρονικών στιγμών λήψης μετρήσεων (πριν και μετά το 2 ^ο στάδιο σκληραγώγησης), σημαντικότητα και Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά των μεταβλητών αυτών.....	54
Πίνακας 3.7. Μέσοι όροι του επί τοις εκατό ποσοστού ξηρού βάρους βλαστού και το ξηρό βάρος του στα δύο υποκείμενα (41B, SO ₄) και τις δύο διαφορετικές χρονικές	

στιγμές λήψης μετρήσεων (πριν και μετά το 2 ^ο στάδιο σκληραγώγησης), σημαντικότητα και Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά των μεταβλητών αυτών.....	55
Πίνακας 3.8. Μέσοι όροι του επί τοις εκατό ποσοστού ξηρού βάρους ρίζας και το αντίστοιχο ξηρό βάρος της στα δύο υποκείμενα (41B, SO ₄) μετά το πέρας του 2 ^ο σταδίου σκληραγώγησης.....	56

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΣΧΗΜΑΤΩΝ

Σχήμα 3.1. Μετρούμενη PAR θαλάμου σκληραγώγησης 2 ^ο σταδίου ενός 24ώρου..	44
Σχήμα 3.2: Ημερήσια διακύμανση της θερμοκρασίας αέρα εντός του θαλάμου 2 ^ο σταδίου σκληραγώγησης.....	44
Σχήμα 3.3: Ημερήσια διακύμανση θερμοκρασίας υποστρώματος σε βάθος 20 mm..	45
Σχήμα 3.4: Ημερήσια διακύμανση θερμοκρασίας φύλλου.....	45
Σχήμα 3.5: Ημερήσια διακύμανση σχετικής υγρασίας αέρα στο θάλαμο 2 ^ο σταδίου σκληραγώγησης.....	46
Σχήμα 3.6: Ημερήσια διακύμανση της θερμοκρασίας εντός και εκτός του δικτυοκηπίου.....	48
Σχήμα 3.7: Ημερήσια διακύμανση θερμοκρασίας εντός του δικτυοκηπίου.....	49
Σχήμα 3.8: Ημερήσια διακύμανση της PAR εντός και εκτός του δικτυοκηπίου.....	49
Σχήμα 3.9: Ημερήσια διακύμανση σχετικής υγρασίας εντός του δικτυοκηπίου.....	50

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα 2.1 Κλίβανος υγρής αποστείρωσης.....	35
Εικόνα 2.2 Τράπεζα νηματικής ροής.....	36
Εικόνα 2.3. Ο θάλαμος ανάπτυξης.....	37
Εικόνα 2.4 Θάλαμος 1 ^ο σταδίου σκληραγώγησης-κλωβοί εγκλιματισμού.....	38
Εικόνα 2.5 Ο θάλαμος 2 ^ο σταδίου σκληραγώγησης.....	38
Εικόνα 2.6 Το δικτυοκήπιο.....	39
Εικόνα 2.7 Το φωτόμετρο.....	42

1. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ

1.1. Ιστοκαλλιέργεια

1.1.1 Γενικά για την ιστοκαλλιέργεια

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

Γενικά, οι τεχνικές της ιστοκαλλιέργειας χαρακτηρίζονται από τα παρακάτω:

- Λαμβάνουν χώρα σε μικρής έκτασης χώρο. Οι συνθήκες του περιβάλλοντος και της ανάπτυξης είναι άριστες (φυσικοί παράγοντες, θρέψη, ορμόνες)
- Όλοι οι μικροοργανισμοί καθώς και άλλοι εχθροί των ανώτερων φυτών αποκλείονται
- Ο συνήθης τρόπος ανάπτυξης των φυτών συχνά καταρρίπτεται ώστε ένα φυτό να αναπτύσσεται συνεχώς ή ένας ιστός μπορεί να δημιουργήσει κάλο και από αυτόν να προκληθεί οργανογένεση, σωματική εμβρυογένεση κ.λ.π.

- Η ικανότητα παραγωγής πρωτοπλαστών και μεμονωμένων κυττάρων δίνει την δυνατότητα πραγματοποίησης χειρισμών στα φυτά που δεν ήταν δυνατοί να γίνουν νωρίτερα με άλλο τρόπο.

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

Οι διαδικασίες που περιλαμβάνει η ιστοκαλλιέργεια είναι απλές. Ένα κομμάτι από το φυτό, το ονομαζόμενο έκφυτο, το οποίο μπορεί να προήλθε από το βλαστό, τη ρίζα, το φύλλο, τους οφθαλμούς ή ακόμα και ένα μόνο κύτταρο, τοποθετείται μέσα σε ένα δοκιμαστικό σωλήνα ή κάποιο άλλο περιέκτη σε περιβάλλον απαλλαγμένο από μικροοργανισμούς. Στην απλούστερη περίπτωση με την παροχή των απαραίτητων θρεπτικών στοιχείων μέσω του υγρού ή πηκτού μέσου ανάπτυξης, το έκφυτο παράγει φυτάρια τα οποία με τη σειρά τους μπορούν να πολλαπλασιαστούν.

Από το στάδιο του έκφυτου μέχρι την μεταφύτευση στο θερμοκήπιο ή το χωράφι, η ιστοκαλλιέργεια συμπεριλαμβάνει τέσσερα βασικά στάδια. Τα στάδια αυτά είναι: I) εγκατάσταση των εκφύτων, II) πολλαπλασιασμός, III) ριζοβόληση και IV) εγκλιματισμός ή σκληραγώγηση (Kyte & Kleyn, 1996, Ποντίκης, 1994).

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

Το ενδιαφέρον σ' αυτή την τεχνική είναι ότι ασθένειες από το μητρικό φυτό δεν μεταφέρονται στους απογόνους. Εξωτερικά παθογόνα όπως μύκητες, βακτήρια, σπόρια αλλά και έντομα απομακρύνονται με την απολύμανση του εκφύτου, ενώ εσωτερικά παθογόνα όπως οι ιοί μπορούν να απομονωθούν χρησιμοποιώντας ως έκφυτο στην ιστοκαλλιέργεια το ακραίο μερίστωμα, δηλαδή τον αδιαφοροποίητο ιστό στον οφθαλμό κορυφής βλαστού. Το ακραίο μερίστωμα είναι συνήθως απαλλαγμένο ιών σε ιομένα φυτά λόγω του ότι αυτά τα μεριστωματικά κύτταρα δεν έχουν ακόμα συνδεθεί με το αγγειακό σύστημα του φυτού ή προκαλούνται να αναπτυχθούν γρηγορότερα από τον ιό (θερμοθεραπεία) (Ελευθερίου, 1994).

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

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

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

Η ιστοκαλλιέργεια είναι συχνά ο μόνος πρακτικός τρόπος για την παραγωγή μεγάλου αριθμού φυτών. Αναφέρεται χαρακτηριστικά, ότι για τα ξυλώδη φυτά

αρκούν 8-12 εβδομάδες για να παραχθούν εκατοντάδες βλαστοί από μία και μόνο αρχική κορυφή (Lineberger, 2003).

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

Είναι σύνηθες να σπαταλάται χρόνος, κόπος και χώρος για μη παραγωγικούς σπόρους και μοσχεύματα που δεν θα δώσουν φυτά. Παράλληλα ένας μεγάλος αριθμός νεαρών φυταρίων χάνονται από προσβολές εχθρών, ασθενειών αλλά και από διάφορους περιβαλλοντικούς παράγοντες. Τα έκφυτα της ιστοκαλλιέργειας είναι λιγότερο ευπαθή σε τέτοιες προβολές εξ' αιτίας του αποστειρωμένου περιβάλλοντος στο οποίο βρίσκονται αλλά και υποφέρουν λιγότερο από ακραίες συνθήκες περιβάλλοντος λόγω των ελεγχόμενων συνθηκών στο εργαστήριο και τους χώρους παραγωγής τους. Σ' αυτό συντείνει και το γεγονός ότι το φυτικό υλικό που χρησιμοποιείται για την παραγωγή εκφύτων στην ιστοκαλλιέργεια είναι στην καλύτερη δυνατή υγιεινή κατάσταση, παράγοντας που διασφαλίζει στη συνέχεια την καλή υγεία των φυτών που θα προκύψουν.

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

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

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

Με την παραγωγή φυτών με ιστοκαλλιέργεια αποφεύγεται η καθημερινή φροντίδα που απαιτείται για τους σπόρους και τα μοσχεύματα. Συνήθως απαιτείται ο

διαχωρισμός των φυτών και η μεταφορά τους σε νέο καλλιεργητικό μέσο (θρεπτικό υπόστρωμα) κάθε 2 έως 6 εβδομάδες και ενδιάμεσα από αυτό το χρονικό διάστημα δεν απαιτείται άρδευση ή κάποια άλλη φροντίδα.

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

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

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

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

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

Καλλιέργεια πρωτοπλαστών, κυττάρων, ιστών και οργάνων	<p style="text-align: center;">ολόκληρων χρωμοσώμων και οργανιδίων</p> <ul style="list-style-type: none"> • Μελέτες γενετικών τροποποιήσεων • Ως εργαλείο στην φυτοπαθολογία <ul style="list-style-type: none"> -είσοδος ιών και πολλαπλασιασμός τους -καλλιέργεια υποχρεωτικών παρασίτων -αλληλεπιδράσεις ξενιστή-παθογόνου -καλλιέργεια νηματωδών σε καλλιέργειες ριζών -έλεγχος φυτοτοξινών -μελέτες σχηματισμού ογκιδίων • Ως εργαλείο στη φυσιολογία <ul style="list-style-type: none"> -μελέτες των κύκλων στα κύτταρα -μεταβολισμός -μελέτες θρέψης -μελέτες μορφογενετικές και ανάπτυξης
---	---

(Πηγή Pierik, 1997)

1.1.2 Ιστορική αναδρομή

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

Η πρώτη προσπάθεια καλλιέργειας κυττάρων σε καλλιεργητικό μέσο έγινε το 1902 από το γερμανό βοτανολόγο Gottlieb Haberlandt. Ο Haberlandt χρησιμοποιώντας το υπόστρωμα Knop και προσθέτοντας σακχαρόζη, ασπαραγίνη και πεπτόνη κατάφερε να επιζήσουν τα κύτταρα για μερικές μόνο εβδομάδες. Ωστόσο, προέβλεψε ότι έμβρυα των φυτών μπορούν να παραχθούν καλλιεργώντας βλαστικά κύτταρα. Δύο χρόνια αργότερα, ένας άλλος γερμανός βοτανολόγος, ο E. Hanning, προβλέποντας τη διαδικασία διάσωσης εμβρύων καλλιέργησε με επιτυχία ανώριμα έμβρυα σταυρανθών αποκόπτοντάς τα από το σπόρο. Παρατήρησε όμως ότι τοποθετώντας τα έμβρυα αυτά σε καλλιεργητικό μέσο, παρήχθησαν μικρά και ασθενικά φυτά σε αντίθεση με τα κανονικά αναπτυσσόμενα έμβρυα.

Με την πάροδο των χρόνων του 20^{ου} αιώνα, ο τομέας της ιστοκαλλιέργειας άρχισε να αναπτύσσεται με εκθετικούς ρυθμούς. Μεγάλης εμπορικής σημασίας επίτευγμα αποτέλεσε η βλάστηση σπόρων ορχιδέας σε θρεπτικό μέσο με άγαρ, ένα ζελατινώδη πολυσακχαρίτη που παράγεται από συγκεκριμένα είδη φυκιών. Αυτό το επίτευγμα αναφέρθηκε ανεξάρτητα, αλλά σχεδόν ταυτόχρονα, από τους L. Knudson, Noel Bernarf και H. Burgeff στις αρχές της δεκαετίας του 1920. Σχεδόν την ίδια εποχή, οι W. Kotte και W. J. Robbins παρουσίασαν με περιορισμένη επιτυχία την καλλιέργεια μεριστωμάτων από ρίζες.

Πειράματα επιβεβαίωσαν νωρίς ότι τα φυτά που παράγονται από ιστοκαλλιέργεια κατά την καλλιέργειά τους στο υπόστρωμα είναι ετερότροφοι οργανισμοί. Σε αντίθεση με τα φυτά που βρίσκονται στο χώμα, τα φυτά σε καλλιεργητικό μέσο δεν μπορούν να συνθέσουν πρωτεΐνες και υδατάνθρακες από ανόργανα συστατικά. Εμπειρικά ίσως ανακαλύφθηκε ότι η ζάχαρη και κάποια άλλα συστατικά όπως το γάλα της καρύδας, η μαγιά και οι χυμοί των φρούτων δρούσαν θετικά στην ανάπτυξη των φυτών που καλλιεργούνταν σε μέσα που τα περιείχαν εν αντιθέσει με τα ανόργανα χημικά συστατικά που δεν έδειχναν να έχουν θετικό αποτέλεσμα στην ανάπτυξη των φυτών. Σύμφωνα με αναφορές του Robbin, την καλλιέργεια ριζών ντομάτας βοηθούσε η προσθήκη μαγιάς στο καλλιεργητικό μέσο. Αναλύσεις που πραγματοποιήθηκαν αργότερα αποκάλυψαν ότι η μαγιά περιέχει αρκετές βιταμίνες και κυρίως θειαμίνη (βιταμίνη B₁).

Το 1924 δύο γιατροί, οι P. Blumenthal και P. Meyer ερεύνησαν την καλλιέργεια κάλων καρότων. Το αρχικό ενδιαφέρον τους εστιαζόταν στη λήψη συμπερασμάτων που θα αφορούσαν την παθολογία και θα συσχετίζαν τον δημιουργούμενο κάλο με την ανάπτυξη όγκων. Το συμπέρασμα όμως που ανακοινώθηκε ήταν ότι η καλλιέργεια κάλων από φέτες καρότου ήταν άσχετη με παθολογικά αίτια.

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

καλλιέργησε καμβιακό ιστό από τα είδη *Acer pseudoplatanus*, *Salix caprea* και *Sambucus*, μερικά από τα οποία κατάφεραν να παραμείνουν στο καλλιεργητικό μέσο για περισσότερο του ενός έτους.

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

Στα μέσα του 20^{ου} αιώνα αρκετοί επιστήμονες ασχολήθηκαν με την καλλιέργεια εμβρύων που αφαιρούσαν από τους σπόρους (διάσωση εμβρύων) ή την προσπάθεια προσομοίωσης της διαδικασίας παραγωγής εμβρύων από αδιαφοροποίητα κύτταρα (εμβρυογένεση). Με την υπάρχουσα γνώση, μελέτες εστιάστηκαν στη χρήση του γάλακτος της καρύδας (υγρό ενδοσπέρμιο) καθώς αποτελούσε έτοιμο φυσικό θρεπτικό μέσο που τρέφει το έμβρυο. Έτσι, το 1941 ανακαλύφθηκε από τους J. van Overbeek, M. E. Conklin και A. F. Blakeslee ότι το γάλα της καρύδας προκαλούσε τον σχηματισμό κάλων σε έμβρυα του ζιζανίου *Datura stramonium*, όταν αυτά καλλιεργούνταν στο μέσο αυτό. Αποτέλεσμα μελέτης και άλλων ερευνητών υπήρξε το γάλα της καρύδας με αποτέλεσμα να αποκαλυφθούν τα συστατικά του και να αποτελεί μέχρι και σήμερα ένα από τα καλλιεργητικά μέσα των ορχιδέων.

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

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

προς αυτή την κατεύθυνση, το 1955 ο C. O. Miller ανακάλυψε την κινετίνη, μία ορμόνη που προάγει τον σχηματισμό βλαστών και η οποία ανήκει σε μια ομάδα ρυθμιστών ανάπτυξης γνωστές ως κυτοκινίνες. Οι F. Went και F. Skoog συνεργάστηκαν για την εξέταση της αρνητικής επίδρασης της αυξίνης στη δημιουργία βλαστού καθώς και της αλληλεπίδρασής της με την κινετίνη. Οι Went και Thimann απέδειξαν την ιδιότητα της αυξίνης να προκαλεί έκπτυξη ριζών. Αργότερα, το 1957 οι Skoog και Miller δημοσίευσαν το “Χημική Ρύθμιση της Ανάπτυξης και Σχηματισμού Οργάνων σε Καλλιεργούμενους Φυτικούς Ιστούς *in vitro*” (“Chemical Regulation of Growth and Organ Formation in Plant Tissue Cultured *in vitro*”) στο οποίο και έκαναν λόγο για την επιθυμητή σχέση αυξίνης/κυτοκινίνης.

Το όνομα του Skoog είναι άμεσα αναγνωρίσιμο από τον οποιοδήποτε που ασχολείται με την ιστοκαλλιέργεια καθώς ενεπλάκη στη δημιουργία του υποστρώματος Murashige and Skoog, κοινά αναφερόμενο και ως M&S ή MS υπόστρωμα. Το υπόστρωμα αυτό αποτελεί το πιο κοινά χρησιμοποιούμενο παγκοσμίως και πρωτοαναφέρθηκε το 1962 στο κλασσικό άρθρο “A Revised Medium for Rapid Growth and Bioassay with Tobacco Tissue Cultures”. Το υπόστρωμα αυτό περιείχε περισσότερα άλατα από τα προηγούμενα από αυτό καθώς και συμπληρωματικά στοιχεία αποτελώντας ένα μαγικό κλειδί για την παραγωγή περισσότερων φυτών με τη μέθοδο της ιστοκαλλιέργειας σε σχέση με προηγούμενα υποστρώματα. Αργότερα, ο E. Linsmaier σε συνεργασία με τον Skoog, μελέτησε συστηματικά τις απαιτήσεις καλλιέργειας κάλων φυτών καπνού και υπόδειξε μερικές κατάλληλες αλλαγές στο υπόστρωμα MS ώστε να βρίσκει μεγαλύτερο πεδίο εφαρμογής (Kyte & Kleyn, 1996).

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

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

1.2.1 Συνοχή του θρεπτικού υποστρώματος

Η μορφή του θρεπτικού υποστρώματος μπορεί να είναι υγρή, ή ημιστερεή με την προσθήκη πηκτινώδους υλικού όπως το άγαρ ή το Gelrite. Η μορφή αυτή μπορεί

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

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

1.2.2 Θερμοκρασία

1.2.2.1 Επίδραση στην αύξηση των φυτών

Στην πράξη, πέρα από τις ενδείξεις ότι η εναλλαγή θερμοκρασίας έχει θετική επίδραση στην ανάπτυξη και την οργανογένεση, ακολουθείται ένα θερμοκρασιακό πρωτόκολλο. Η έρευνα έχει δείξει ότι ο μικρός χώρος των θαλάμων ανάπτυξης είναι προτιμότερος καθώς σε αυτόν επιτυγχάνεται ομοιομορφία και σταθερότητα στη θερμοκρασία που επικρατεί. Γενικά, τα φυτά *in vitro*, ανταποκρίνονται θετικά σε ένα

εύρος θερμοκρασιών, παρ' όλα αυτά σε κάποιες περιπτώσεις απαιτούνται κατάλληλες θερμοκρασίες για την ιδανική ανάπτυξη και μορφογένεση.

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

Πίνακας 1.2. Βέλτιστη θερμοκρασία ανάπτυξης και περιοριστικές θερμοκρασίες διαφόρων εκφύτων.

Είδος καλλιέργειας	Βέλτιστη θερμοκρασία (⁰ C)	Δοκιμασμένες περιοριστικές θερμοκρασίες (⁰ C)
Κορυφές βλαστών ροδακινιάς	21-24	28
Έμβρυα ελιάς	25	15,20,30
Βλαστοί τριανταφυλλιάς	18	12,24
Ρίζες	20-25	27-28

(Πηγή: Anonymous, 2003b)

1.2.2.2 Επίδραση στη μορφογένεση

Αντίθετα με την αύξηση, ένα στενό εύρος θερμοκρασιών είναι συνήθως άριστο για τη μορφογένεση, την ανάπτυξη των εμβρύων, των βλαστών και των ριζών. Μερικά είδη απαιτούν σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες (15⁰C) για το σχηματισμό βλαστών από έκφυτα φύλλου όπως η *Begonia x cheimanthia* αν και η συνεχής ανάπτυξη των βλαστών απαιτεί 24⁰C. Έκφυτα από το βλαστό της *Anemone coronaria* απαιτούν θερμοκρασίες 15-19⁰C προκειμένου να σχηματιστούν βλαστοφόροι οφθαλμοί. Άλλα φυτικά είδη απαιτούν υψηλότερες θερμοκρασίες της τάξης των 28-

30⁰C. Σε αυτή την κατηγορία ανήκει η ευρωπαϊκή άμπελος (*Vitis vinifera*) και το είδος *Pinus radiata*. Η πλειοψηφία των φυτικών ειδών έχουν κατά μέσο όρο βέλτιστη θερμοκρασία για μορφογένεση στο εύρος 22-26⁰C.

Ο σχηματισμός ριζών φαίνεται να εξαρτάται από τη θερμοκρασία σε αρκετά φυτικά είδη. Παρ' όλα αυτά κανόνας που να συμπεριλαμβάνει όλα τα ριζών ευνοείται στους 20⁰C, ενώ σε μικρομοσχεύματα μηλιάς απαιτείται θερμοκρασία 22-25⁰C προκειμένου να ριζοβολήσουν.

Η θερμοκρασία φαίνεται να είναι καθοριστικός παράγοντας στο σχηματισμό κονδύλων στις πατάτες. Μελέτες έδειξαν ότι θερμοκρασία 20⁰C έδωσε 10 φορές μεγαλύτερη παραγωγή κονδύλων από υψηλότερες θερμοκρασίες. Από αρκετά είδη απαιτούνται χαμηλές θερμοκρασίες για να σπάσουν το λήθαργο. Σε μερικά βολβώδη φυτά ο σχηματισμός βολβιδίων στους 30⁰C είχε ως αποτέλεσμα την αποφυγή του λήθαργου σε σχέση με βολβούς που σχηματίστηκαν σε χαμηλότερες θερμοκρασίες. Τα ξυλώδη φυτά που προέρχονται από ιστοκαλλιέργεια είναι γνωστόν ότι πρέπει να διακόψουν το λήθαργό τους, κυρίως όταν μεταφυτεύονται στο θερμοκήπιο. Για το σκοπό αυτό εφαρμόζονται χαμηλές θερμοκρασίες ενώ βρίσκονται ακόμα *in vitro*. Ξυλώδη είδη που έχουν πρόβλημα λήθαργου κατά την καλλιέργεια *in vitro* είναι η αχλαδιά, το είδος *Prunus insititia*, καθώς και ορισμένα είδη των *Malus* και *Prunus*. Στα είδη αυτά εφαρμόζονται χαμηλές θερμοκρασίες στους ριζωμένους βλαστούς σε σκοτάδι (2-4⁰C για τουλάχιστον 42 ημέρες) μιμούμενοι με τον τρόπο αυτό τις συνθήκες που απαιτούνται για το σπάσιμο του λήθαργου και την έκπτυξη των οφθαλμών την άνοιξη.

1.2.3 Σχετική υγρασία

Η σχετική υγρασία είναι ένας από τους λιγότερο εύκολα ελεγχόμενους παράγοντες του περιβάλλοντος κατά την ιστοκαλλιέργεια. Είναι δύσκολο να μετρηθεί με ακρίβεια μέσα στους σωλήνες λόγω του μικρού τους μεγέθους και συνήθως είναι δύσκολο να ελεγχθεί στους θαλάμους ανάπτυξης. Η σχετική υγρασία του θαλάμου ανάπτυξης είναι μεγάλης σημασίας όταν τα πώματα από τα δοχεία ανάπτυξης των φυτών δεν κλείνουν αεροστεγώς. Ενδεικτικά στον Πίνακα 1.3 δίνεται η σχετική υγρασία στους γυάλινους περιέκτες των φυτών ανάλογα με το κλείσιμό τους.

Πίνακας 1.3. Σχετική υγρασία στους γυάλινους περιέκτες ανάλογα με το πώμα που χρησιμοποιείται.

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

(Πηγή: Anonymus, 2003b)

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

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

1.2.4 Φωτισμός

Στα φυτά που αναπτύσσονται *in vitro*, τόσο η ένταση όσο και η ποιότητα του φωτός επηρεάζουν την ανάπτυξή τους. Αν και τα φυτά του εξωτερικού περιβάλλοντος απαιτούν φως να φωτοσυνθέσουν, τα φυτά *in vitro* μπορούν να παρακάμψουν την φωτοσύνθεση καθώς έχουν στο θρεπτικό υπόστρωμα την απαραίτητη πηγή άνθρακα (σακχαρόζη). Ο φωτισμός απαιτείται σ' αυτή την περίπτωση για τη δημιουργία της χλωροφύλλης και τη φωτομορφογένεση. Αναφέρεται ότι το φως είναι απαραίτητο για το σχηματισμό βλαστού (Nebel & Naylor, 1968), για τη δημιουργία ριζών (Leroux, 1968, Letouze & Beauchesne 1969, Ueda & Torikata, 1972), τη διαφοροποίηση των κλαδόφυλλων (Hasegawa et al., 1973) και τη σωματική εμβρυογένεση (Haccious, & Lakshmanan, 1965).

Ο φωτισμός στους θαλάμους ανάπτυξης παρέχεται συνήθως από λαμπτήρες φθορισμού τύπου cool white. Οι λάμπες αυτές παρέχουν αρκετό φωτισμό στην ερυθρή περιοχή του φάσματος (600-700nm). Κάποιες έρευνες χρησιμοποίησαν συμπληρωματικό φωτισμό με λάμπες πυρακτώσεως αλλά δεν φάνηκε η πρακτική αυτή να είναι απαραίτητη στην πλειοψηφία των περιπτώσεων. Παράλληλα, οι λάμπες πυρακτώσεως παρουσιάζουν το μειονέκτημα της αύξησης της θερμοκρασίας στο θάλαμο ανάπτυξης. Η ένταση του φωτισμού έχει βρεθεί ότι επιδρά στην ανάπτυξη των φυτών *in vitro* (Nebel & Naylor, 1968). Όταν η ένταση είναι μεγαλύτερη των $150 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ παρουσιάζονται προβλήματα λόγω της υπερβολικής έκθεσης και λεύκανση των βλαστών.

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

1.2.4.1 Επίδραση στη μορφογένεση

Περισσότερο το μήκος κύματος και λιγότερο η ένταση του φωτισμού έχει βρεθεί ότι έχει σημαντική επίδραση στο σχηματισμό κάλου, βλαστών και ριζών. Γενικά, το μπλε φως και οι κοντινές περιοχές στο UV (420-467nm) φαίνεται να προάγουν τη δημιουργία κάλου και το σχηματισμό ριζών. Αρκετά φυτά ακολουθούν αυτό, όπως για παράδειγμα ο καπνός και το γεράνι (*Pelargonium*). Αρκετές έρευνες απέδειξαν ότι η ένταση του φωτός αλληλεπιδρά με το μήκος κύματος. Έτσι, ο μπλε φωτισμός είναι αποτελεσματικότερος στη μορφογένεση των βλαστών όταν η ένταση είναι χαμηλή ($0,24 \text{ W m}^{-2}$) (Weis & Jaffe, 1969, Seibert, 1973). Σε μεγαλύτερες εντάσεις φωτός η ανάπτυξη παρεμποδίζεται.

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

κυτοκινίνης χρησιμοποιούνται σε συνδυασμό με μπλε φωτισμό, η ανωτέρω διαδικασία παρεμποδίζεται.

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

1.3 Σκληραγώγηση (εγκλιματισμός) φυταρίων παραγόμενων *in vitro*

Τα φυτά που έχουν προέλθει από ιστοκαλλιέργεια έχουν λάβει ιδιαίτερη φροντίδα και προσοχή ώστε να έχουν τη μεγαλύτερη και καλύτερη ανάπτυξη. Η μεταφορά σε ένα ασταθές περιβάλλον όσον αφορά τη θερμοκρασία και τη σχετική υγρασία είναι η πρώτη δυσκολία την οποία θα πρέπει να αντιμετωπίσουν όταν βρεθούν σε *ex vitro* συνθήκες. Τα φυτά που έχουν μεγαλώσει κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες σταθερής θερμοκρασίας και υψηλής σχετικής υγρασίας, έχουν αναπτύξει κάπως διαφορετικά τα χαρακτηριστικά τους. Δύο σημαντικές διαφορές που εντοπίζονται σε σχέση με τα φυτά που έχουν αναπτυχθεί σε συνθήκες περιβάλλοντος είναι ότι τα φυτά που μεγαλώνουν κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες έχουν πιο φαρδιά φύλλα και λεπτότερη εφυμενίδα. Η εφυμενίδα είναι μέρος της επιδερμίδας των φυτών και είναι υδρόφοβη. Παρέχει στην επιδερμίδα υδατοστεγανότητα και ρυθμίζει την υδατική ισορροπία των φυτικών ιστών αποτρέποντας την ανεξέλεγκτη απώλεια νερού προς το περιβάλλον. Επίσης χάρη στη στιλπνότητά της αντανακλά ένα μέρος της υπέρμετρης ηλιακής ακτινοβολίας. Συνεπώς λεπτότερη εφυμενίδα σημαίνει μικρότερη προστασία φυτού από αφυδάτωση.

Κατά τη μεταφορά των φυτών στο έξω περιβάλλον θα υπάρχει επίσης και αλλαγή της ποιότητας του φωτισμού. Οι λάμπες φθορισμού και το φιλταρισμένο φως δεν έχουν την ποιότητα της υπεριώδους και υπέρυθρης ακτινοβολίας του ηλιακού φωτός. Τα φυτά που αναπτύσσονται κάτω από λάμπες φθορισμού έχουν χλωροπλάστες οι οποίοι είναι διασκορπισμένοι σε όλο το φύλλωμα ώστε να δεσμεύουν κάθε ακτίνα φωτός. Τα φύλλα τους είναι δηλαδή εξαιρετοι ηλιακοί συλλέκτες. Όταν όμως τα φυτά αυτά βγουν έξω τότε η ένταση της ηλιακής ακτινοβολίας δεν θα είναι η ίδια αλλά πολύ πιο ισχυρή. Τα φυτά που έχουν

μεγαλώσει σε απευθείας ηλιακό φως αντιδρούν στην ένταση αυτή του φωτός παράγοντας ελαφρώς μικρότερα φύλλα και οι χλωροπλάστες τους είναι διατεταγμένοι μέσα στα κύτταρα του φύλλου κατά τέτοιο τρόπο ώστε να μην είναι πολύ εκτεθειμένοι στο φως. Είναι πολύ πυκνά διατεταγμένοι και όχι διασκορπισμένοι.

Χρειάζεται λοιπόν ένα αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα για να καταφέρουν τα φυτά που έχουν αναπτυχθεί κάτω από ιδανικές συνθήκες να κάνουν αυτές τις απαραίτητες αλλαγές ώστε να μπορούν να αντεπεξέλθουν στις δύσκολες συνθήκες του περιβάλλοντος. Το χρονικό αυτό διάστημα έχει ονομαστεί χρόνος σκληραγώγησης (C. Allen, 1989).

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

Ο συνήθης επαγγελματικός τρόπος σκληραγώγησης των φυταρίων που προέρχονται από ιστοκαλλιέργεια παρουσιάζεται συνοπτικά παρακάτω: Σε γλαστράκια τοποθετούμε λίπασμα pellets και κατόπιν γεμίζουμε με αποστειρωμένο πυκνό μείγμα τύρφης:βερμικουλίτη:άμμος σε αναλογία 1:1:1. Το pH του εκχυλίσματος πρέπει να είναι περίπου 5.7. Ποτίζουμε το υπόστρωμα με αποστειρωμένο νερό και αφήνουμε να στεγνώσει. Παίρνουμε τα φυτά μας από τους σωλήνες ανάπτυξης και τα πλένουμε με αποστειρωμένο νερό ώστε να απομακρυνθεί όλο το ζελέ από τις ρίζες επειδή περιέχει σάκχαρα και άλλες ουσίες που προσελκύουν και αποτελούν τροφή για παθογόνα. Τοποθετούμε τα φυτά στα γλαστράκια σε μέρος με 90% σκότος και θερμοκρασία 25°C που είναι ιδανικές συνθήκες για την αρχή μαζί με σύστημα υδρονέφωσης όπου είναι δυνατό. Αφήνουμε τα φυτά σε αυτήν την κατάσταση για 1-4 εβδομάδες ελέγχοντας πάντα για αφυδάτωση και αφαιρώντας φυτά

τα οποία έχουν μολυνθεί. Μετά από δύο εβδομάδες αυξάνουμε το φωτισμό τοποθετώντας τα φυτά σε σκιά 70% για 14 ημέρες. Από τη δεύτερη εβδομάδα επίσης αρδεύουμε 2 φορές εβδομαδιαίως με αραιό διάλυμα πλήρους λιπάσματος εκτός αν στο υπόστρωμα έχει προστεθεί slow-release λίπασμα εξ αρχής. Κατόπιν βάζουμε σε σκιά 30 % για 7 μέρες. Τα φυτά μπορούν να μεταφυτευτούν όταν οι ρίζες αναπτυχθούν αρκετά και αρχίζουν να φαίνονται στον πάτο από το γλαστράκι. Χρησιμοποιείται τότε για υπόστρωμα τύρφη: βερμικουλίτης: άμμος σε αναλογία 1:1:3 και επίσης εφαρμόζεται η κατάλληλη λίπανση. Δεν ψεκάζουμε ποτέ με παρασιτοκτόνα κατά τη διάρκεια σκληραγώγησης. Σε περίπτωση μόλυνσης αφαιρούμε τα φυτά και απολυμαίνουμε το χώμα με διάλυμα χλωρίνης 1%. Τα φυτά μπορεί να χάσουν μερικά φύλλα στα πρώτα στάδια της σκληραγώγησης αλλά είναι σύνηθες φαινόμενο για ορισμένα είδη (Anonymous, 2003).

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

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

Ένα πολύ βασικό πρόβλημα που παρουσιάζεται κατά τον εγκλιματισμό είναι η απώλεια νερού μέσω των στομάτων. Αν και φυσιολογικά τα στόματα

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

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

Εξ' αιτίας όλων αυτών των αλλαγών στη μορφολογία και τη διαπνοή, όλη η διαδικασία της φωτοσύνθεσης διαταράσσεται στα έκφυτα *in vitro*. Τα έκφυτα που βρίσκονται μέσα σε θρεπτικά υποστρώματα κάνουν λίγη χρήση CO₂ γιατί παίρνουν από το μέσο σακχαρόζη την οποία και χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας αντί να είναι εξαρτώμενα από την φωτοσύνθεση. Στην προσπάθεια αύξησης της φωτοσύνθεσης στα φυτάρια, μπορεί να εισαχθεί CO₂ μέσα στις γυάλες που αναπτύσσονται ή αργότερα στο θερμοκήπιο. Αυτό μπορεί να γίνει πρακτικά ευκολότερα στο θάλαμο σκληραγώγησης παρά στα δοχεία ανάπτυξης των φυτών. Εάν εισαχθεί επιπλέον CO₂, είναι παράλληλα απαραίτητο να αυξηθεί το φως για να αυξηθεί η αποτελεσματικότητα χρήσης του CO₂. Σύμφωνα με τους Mudge et al (1992), αρκετά ξυλώδη φυτά, όπως το αμπέλι (*Vitis*), η μηλιά (*Malus*), τα βατόμουρα (*Rubus*), ευνοούνται σημαντικά όταν εισαχθεί CO₂ στον θάλαμο εγκλιματισμού.

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

Εάν πρόκειται τα φυτά να ριζοβολήσουν στο στάδιο III, υπάρχουν αρκετοί τρόποι ώστε να προετοιμαστούν για την σκληραγώγηση. Μπορούν να τοποθετηθούν στους γυάλινους περιέκτες με τα φυτά μικρές σακουλίτσες με silica gel έτσι ώστε να μειωθεί η σχετική υγρασία, προσέχοντας όμως να μην αφυδατωθεί ιδιαίτερα γρήγορα το φυτό. Μία εναλλακτική λύση είναι η χαλαρή τοποθέτηση των καλυμμάτων ώστε να επιτρέπουν μεγαλύτερη απώλεια νερού. Αναφέρεται στη βιβλιογραφία ότι τα γαρύφαλλα (*Dianthus*), είχαν ποσοστό επιτυχίας 90% όταν οι περιέκτες έμεναν χωρίς κάλυμμα για 9 ημέρες μέσα σε δωμάτιο με σχετική υγρασία 50-70% πριν μεταφυτευθούν στο έδαφος (Ziv, 1986). Άλλοι ερευνητές έκαναν χρήση αυτής της τεχνικής τόσο μέσα σε δωμάτιο όσο και σε συνθήκες θερμοκηπίου. Το βασικό συμπέρασμα ήταν ότι, ανάλογα και με τις συνθήκες του χώρου, είναι προτιμότερο η αφαίρεση του καπακιού να γίνεται σταδιακά. Άλλη τεχνική σκληραγώγησης είναι αυτή της χρήσης καπακιών με ειδικά φίλτρα που επιτρέπουν μερική ανταλλαγή αερίων μεταξύ του περιέκτη και του περιβάλλοντος, με αποτέλεσμα τη γρηγορότερη σκληραγώγηση των φυτών σε σχέση με την σταδιακή αφαίρεση του καπακιού. Τέλος, μια άλλη τεχνική που αναφέρεται στη βιβλιογραφία είναι αυτή της ψύξης του πυθμένα των περιεκτών έτσι ώστε να μειωθεί η σχετική υγρασία στα υψηλότερα μέρη του περιέκτη. Η μεθοδολογία αυτή βρέθηκε ιδιαίτερα αποτελεσματική σε είδη όπως η *Cynara*, *Iris*, *Rosa* και *Marantha* (Maene και Debergh, 1983).

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

Μειώνοντας τα επίπεδα των αλάτων, κυρίως των νιτρικών, συχνά ευνοείται ο σχηματισμός ριζών. Παράλληλα η ποσότητα και ο τύπος της κυτοκίνης που χρησιμοποιείται στο στάδιο II μπορεί να επηρεάσει τη ριζοβολία. Φυτά όπως η *Lilione*, η *Schefflera* και το *Philodendron* φάνηκε να έχουν μεγαλύτερο ποσοστό επιβίωσης από 80% κατά τη μεταφύτευση όταν χρησιμοποιήθηκε στο στάδιο II 2iP ή κινετίνη αντί για BA. Συνήθως, στο στάδιο III, η κυτοκίνη μειώνεται δραστικά ενώ τα επίπεδα αυξίνης αυξάνουν. Τα επίπεδα αυξίνης είναι πολύ σημαντικά καθώς

μεγάλες συγκεντρώσεις μπορεί να έχουν δυσμενέστερα αποτελέσματα από την παντελή απουσία της. Αρκετές φορές, δύο αυξίνες φαίνεται να λειτουργούν καλύτερα σε σχέση με την χρήση κάθε μίας χωριστά. Χαμηλότερη συγκέντρωση σακχαρόζης στο στάδιο III μπορεί να αυξήσει τη φωτοσύνθεση αλλά μεγαλύτερη συγκέντρωση μπορεί να δρα θετικά στο υδατικό δυναμικό. Στη ριζοβόληση ορισμένων οπωροφόρων ειδών φαίνεται ότι η φλορογλυκινόλη δρα θετικά.

Αν και οι απαιτήσεις σε φωτισμό ποικίλουν μεταξύ των διαφόρων φυτών, πολλά φυτά ριζοβολούν καλύτερα σε συνθήκες υψηλού φωτισμού (350 έως 600 κηρίων). Αντίθετα, κάποια είδη βολβωδών και *Rosaceae* φυτών σχηματίζουν ρίζες ευκολότερα στο σκοτάδι από ότι στο φως.

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

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

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

οποίοι καλύπτονται με πλαστικό κάλυμμα. Με α μίνι- θερμοκήπια και οι συνθήκες του περιβάλλοντος ελέγχονται καλύτερα.

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

Τα τεχνητά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται κατά την *ex vitro* σκληραγώγηση φυταρίων προερχόμενων από ιστοκαλλιέργεια είναι πάρα πολλά (Πίνακας 1.4).

Πίνακας 1.4. Τεχνητά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται κατά την σκληραγώγηση φυταρίων προερχόμενων από ιστοκαλλιέργεια

ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ	ΑΝΑΛΟΓΙΑ	ΦΥΤΑ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΕΙΤΑΙ
Ψιλόκοκκο κάρβουνο/ λεπτοτεμαχισμένος φλοιός από σεκόγια ή έλατο/ περλίτης	1/1/1	ορχιδέες
Πελλέτες τύρφης που διογκώνονται στο νερό (Jiffy 7)		<i>Dianthus, Rubus</i>
Αλεσμένα βρύα σφάγνου		Tsuga
Τύρφη		Rhododendron
Τύρφη		Kalmia
Τύρφη/ φλοιού/ άμμος/ πριονίδι/	1/1/1/1	Ξυλώδη φυτά
Τύρφη/ περλίτης	1/1	Betula, Malus, Rhododendron, Rubus
Τύρφη/ περλίτης	1/2	Rhododendron
Τύρφη/ περλίτης/ πριονίδι		Rhododendron
Τύρφη/ περλίτης/ πριονίδι/		Ξυλώδη φυτά
ηφαιστειακή στάχτη/ βερμικουλίτης	3/2/1/1/1	
Τύρφη/ περλίτης/ βερμικουλίτης		<i>Acacia, Larix, Pinus</i>

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

(Πηγή: Kyte & Kleyn,1996)

1.4 Αμπέλι

Στην παρούσα εργασία πρόκειται να μελετηθεί η ανάπτυξη υποκειμένων φυτών αμπέλου τα οποία προήλθαν από ιστοκαλλιέργεια, κατά την *ex vitro* σκληραγώγησή τους. Κρίνεται σκόπιμο λοιπόν να γίνει αναφορά στην καλλιέργεια του συγκεκριμένου φυτού.

1.4.1 Η αμπελουργία ανά τον κόσμο

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

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

Η συνολική καλλιεργούμενη έκταση με αμπέλι παγκοσμίως υπολογίζεται σε 73.053.550 στρέμματα (FAO, 2001). Η κατανομή ανά χώρα σε αμπελουργική έκταση φαίνεται στον Πίνακα 1.5.

Πίνακας 1.5. Η καλλιεργούμενη έκταση με αμπέλι σε διάφορες χώρες.

Χώρα	Καλλιεργούμενη έκταση (χιλιάδες στρέμματα)
Ισπανία	11.000
Γαλλία	8.700
Ιταλία	7.970
Πορτογαλία	2.473
Ελλάδα	1.240
Γερμανία	1.015
Αυστρία	480
Ρωσία	630
Ουκρανία	1.000
Ουζμπεκιστάν	1.120
Ρουμανία	2.450
Μολδαβία	1.106
FYROM	278
Κροατία	590
Τουρκία	5.350
Ουγγαρία	900
Βουλγαρία	1.150
Χώρες Β.Αφρικής (Μαρόκο, Αλγερία, Τυνησία)	1.260
Αίγυπτος	617
Νότια Αφρική	1.167
Ιράν	2.500
Συρία	688
Η.Π.Α. (Καλιφόρνια)	3.957
Αργεντινή	2.070
Χιλή	1.550
Αυστραλία	1.150

1.4.2 Η αμπελουργία στην Ελλάδα

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

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

Στην Ελλάδα, η καλλιεργούμενη έκταση με οινοποιήσιμα, επιτραπέζια σταφύλια και σταφίδα το 1993 ανερχόταν σε 1.317.748 στρέμματα. Η καλλιεργούμενη έκταση κατά κατηγορία χρήσης και περιφέρεια παρουσιάζεται στον Πίνακα 1.6 (στοιχεία Υπουργείου Γεωργίας).

Πίνακας 1.6. Η καλλιεργούμενη έκταση με σταφύλια στις περιφέρειες της Ελλάδας.

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

Νοτ. Αιγαίου	63.750	4.705	300
Κρήτης	88.470	16.385	159.825

(Πηγή: Ρουμπελάκη-Αγγελάκη, 1998)

1.4.3 Το γένος *Vitis*

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

Η βοτανική κατάταξη της αμπέλου έχει ως εξής:

Άθροισμα: Σπερματοφύτα

Συνομοταξία: Αγγειόσπερμα

Κλάση: Δικότυλα

Υπόκλαση: Διαλυπέταλα

Τάξη: Rhamnales

Οικογένεια: Vitaceae

Γένος: *Vitis*

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

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

1.4.4 Το υποκείμενο 41B

Έχει εντυπωσιακά σκούρα μεγάλα, με μεταλλική λάμψη φύλλα και επιμήκεις έρπουσες κληματίδες με μεγάλα μεσογονάτια διαστήματα, πράγματα που το κάνουν να ξεχωρίζει εύκολα από τα άλλα υποκείμενα. Εάν εξαιρέσουμε τα μετρίως συμπαγή ξηρά εδάφη με μέτρια περιεκτικότητα σε ασβέστιο, στα οποία το 110 R χρησιμοποιούταν κυρίως, σε όλες τις άλλες περιπτώσεις το 41B ήταν το υποκείμενο που αντεπεξήλθε επιτυχώς στο δύσκολο ρόλο του. Το συγκεκριμένο υποκείμενο διαθέτει επιπόλαιο μεν αλλά πολύ πλούσιο ριζικό σύστημα κι εκμεταλλεύεται έτσι καλύτερα τα υπάρχοντα θρεπτικά στοιχεία εφ' όσον μπορούμε να έχουμε και πρόσθετη (με άρδευση) υγρασία. Αυτός ίσως είναι και ο λόγος για τον οποίο το συγκεκριμένο υποκείμενο δεν μπόρεσε να κερδίσει την εμπιστοσύνη των παραγωγών αφού πράγματι στον πρώτο και στους μετέπειτα αρχικούς χρόνους της φύτευσής του έχει ανάγκη από νερό για να παχύνει και να εμβολιαστεί επιτόπου, συνήθως το 2^ο χρόνο από τη φύτευσή του. Ενώ πράγματι τα 3-4 πρώτα χρόνια της φυτείας του καθυστερεί, μετέπειτα δημιουργεί αμπελώνα ισχυρό, ενώ μερικοί ερευνητές το θεωρούν -μαζί με το 3309- ότι είναι το υποκείμενο που συνιστάται για ποικιλίες και εδάφη αμπελώνων που έχουν σαν επιδίωξη την πρωίμιση της παραγωγής. Το 41B αντέχει μέχρι 40% ενεργό ασβέστιο (Βλάχος, 1991).

1.4.5 Το υποκείμενο SO₄

Έχει φύλλα κιτρινοπράσινα, όχι πολύ γυαλιστερά, οδοντωτά, με επιφάνεια λίγο ανώμαλη. Ο μισχικός του κόλπος είναι αρκετά βαθύς. Αντέχει σε ασβέστιο περίπου 18%. Αντέχει σε όλους τους τύπους εδάφους εφόσον έχουν αρκετή υγρασία. Είναι πολύ ζωνρό υποκείμενο ενώ σε χρονιές με μεγάλες βροχοπτώσεις μπορεί να οψιμίσει την παραγωγή. Προτιμάται στις περιπτώσεις που χρησιμοποιείται μηχανικός τρυγητός γιατί κάνει κορμό ευθύ και ισχυρό που δέχεται τα χτυπήματα της μηχανής χωρίς να δημιουργούνται ιδιαίτερα προβλήματα. Στη χώρα μας ταιριάζει πολύ καλά σε ελαφρά αμμουδερά παραθαλάσσια εδάφη με αρκετή υγρασία (Βλάχος, 1991).

1.5 Μεθοδολογία ιστοκαλλιέργειας αμπέλου

Η ιστοκαλλιέργεια ως μέθοδος πολλαπλασιασμού έχει εφαρμοστεί με επιτυχία σε πολλά είδη αμπέλου, υβρίδια και καλλιεργούμενες ποικιλίες (Gray & Fisher, 1985, Gray & Klein, 1987, Gray & Klein, 1989), με ή χωρίς την προσθήκη φυτορρυθμιστικών ουσιών στο θρεπτικό μέσο (Galzy, 1969, 1977, Galzy et al., 1990,

Goussard, 1982, Chee & Pool, 1983, Roubelakis-Agelakis & Zinanovits, 1991, Jona & Webb, 1978, Grenan, 1977). Ο πολλαπλασιασμός της αμπέλου με ιστοκαλλιέργεια είναι απαραίτητη τεχνική όταν απαιτείται παραγωγή μεγάλου αριθμού φυτών (Barlass & Skene, 1978, Chee & Pool, 1982, Chee et al., 1984, Gray & Klein, 1987) ή είναι άμεση προτεραιότητα η παραγωγή φυτών απαλλαγμένων από ιώσεις (Barlass et al., 1982, Gifford & Hewitt, 1961, Hoefler & Gifford, 1964, Bini, 1976, Robacker & Chang, 1992). Γενότυποι υποκειμένων ή ποικιλιών που εξυγιάνθηκαν με τη μέθοδο αυτή χορηγήθηκαν μετά από έγκριση στα φυτώρια για περαιτέρω πολλαπλασιασμό (Galzy, 1964, Deloire et al., 1995). Για την παραγωγή φυτών αμπέλου με τη μέθοδο της ιστοκαλλιέργειας έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορα είδη εκφύτων όπως μεριστώματα (Chee & Pool, 1983, Gray & Benton, 1991, Huang et al., 1990, Cholvadova, 1989, Minas, 2002, Κανάκης & Σταυρακάκης, 1998-9), βλαστικές κορυφές (Barlass & Skene, 1978, 1980a,b, Rui & Eaton, 1984, Martinez & Tizio, 1989, Σταυρακάκης & Κανάκης, 1997), μικρομοσχεύματα ενός κόμβου (Norton & Skirvin, 2001, Lee & Wetzstein, 1990, Novak & Juvona, 1982/83, Roubelakis-Angelakis και Katsirdakis, 1990, Alleweldt & Radler, 1962, Ρούμπος, 1987, Roubelakis-Agelakis & Zinanovits, 1991), τμήματα ή ολόκληρα φύλλα (Katsirdakis & Roubelakis-Angelakis, 1991, Συμινής κ.α., 1998/9, Das et al., 2002), σωματικά κύτταρα (Mullins & Srinivasan, 1976, Krul & Worley, 1977, Krul & Myerson, 1980, Srinivasan & Mullins, 1980), ωοθήκες (Nakagawa et al., 1983) κλπ.

Μία μεθοδολογία περιλαμβάνει τη χρήση του ακραίου μεριστώματος. Έκφυτα μήκους 2mm λαμβάνονται από φυτά που βρίσκονται σε αμπελώνες ή από stock υλικό που ήδη πολλαπλασιάζεται με ιστοκαλλιέργεια και είναι πρακτικά απαλλαγμένο από ιώσεις. Από τα φυτά που είναι ήδη απαλλαγμένα από ιώσεις συνιστάται να λαμβάνονται μεγαλύτερα σε μέγεθος έκφυτα έτσι ώστε να είναι γρηγορότερη η παραγωγή νέων φυταρίων. Αξίζει να σημειωθεί ότι με τις συμβατικές μεθοδολογίες, η εξάλειψη των ιώσεων από φυτά αμπέλου είναι εξαιρετικά χρονοβόρα και αρκετά δαπανηρή διαδικασία. Απαιτούνται αρκετά χρόνια για περαιτέρω πολλαπλασιασμό και παραγωγή λίγων εκατοντάδων φυτών από ένα υγιές, ή δύο χρόνια για την παραγωγή έτοιμων φυτών στο χωράφι με εμβολιασμό. Σε αντίθεση, εκατοντάδες φυτά προερχόμενα από ιστοκαλλιέργεια μπορούν να φυτευτούν στο χωράφι μέσα σε ένα χρόνο είτε αυτόριζα είτε εμβολιασμένα σε άλλο υποκείμενο.

Αν και οι προοπτικές είναι ευοίωνες για την ιστοκαλλιέργεια της αμπέλου, το γένος *Vitis* παραμένει δύσκολο στον χειρισμό του εξ' αιτίας των συχνών αλλαγών

που πρέπει να πραγματοποιούνται κατά τη διαδικασία του πολλαπλασιασμού. Οι συχνές μεταφορές του φυτικού υλικού από δοχείο σε δοχείο, με σύνθητες ενδιάμεσο χρονικό διάστημα αυτό των 2 εβδομάδων, η προσοχή στη λεπτομέρεια και η προσεκτική παρατήρηση του φυταρίου κατά την ανάπτυξή του είναι μεγάλης σπουδαιότητας γι' αυτό το φυτό.

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

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

Το υπόστρωμα που χρησιμοποιείται είναι $\frac{3}{4}$ -συγκέντρωση MS μαζί με άλλα πρόσθετα (Πίνακας 1.7). Ο απαραίτητος φωτισμός είναι 300 κηρία από φθορίζοντες λαμπτήρες με φωτοπερίοδο 16 ώρες φως/ 8 ώρες σκοτάδι.

Προτιμώμενη θερμοκρασία είναι αυτή των 23-30°C. Οι σχετικές παραπομπές είναι οι εξής: Barlass & Skene, 1978, Chee et al., 1984, Harris & Stevenson, 1982, Krul & Myerson, 1980, Monette, 1983, Murashige, 1974, Murashige & Skoog, 1962, Smith et al., 1992, Li & Eaton, 1984).

Πίνακας 1.7. Υπόστρωμα για την ιστοκαλλιέργεια αμπέλου

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

1.6 Σκοπός της εργασίας

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

Λίγη δουλειά έχει γίνει σχετικά με τη μελέτη της επίδρασης του περιβάλλοντος κατά την ιστοκαλλιέργεια και ιδιαίτερα κατά τον εγκλιματισμό των φυταρίων. Η σκληραγώγηση παίζει σημαντικότατο ρόλο στην αποτελεσματικότητα της ιστοκαλλιέργειας καθώς αποτελεί το κρισιμότερο στάδιό της, στο οποίο χάνεται

και ο μεγαλύτερος αριθμός φυτών. Μελέτες βελτίωσης των συνθηκών σκληραγώγησης παρουσιάζουν ενδιαφέρον.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη και σύγκριση των διαφόρων χαρακτηριστικών της αύξησης των δύο υποκειμένων αμπέλου (41B και SO₄) καλλιεργούμενων *in vitro* μετά την έξοδό τους από το θάλαμο 2^{ου} σταδίου σκληραγώγησης. Παράλληλα, πραγματοποιήθηκε μελέτη των συνθηκών του μικροπεριβάλλοντος των φυτών στο συγκεκριμένο θάλαμο αλλά και του δικτυοκηπίου (εντός και εκτός αυτού) που ήταν το αμέσως επόμενο στάδιο σκληραγώγησης.



2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Τα φυτά:

Τα φυτά αμπέλου που χρησιμοποιήθηκαν στο συγκεκριμένο πείραμα ήταν Αμερικάνικα υποκείμενα 41B και SO4. Τα φυτά αυτά είχαν προέλθει από ιστοκαλλιέργεια και χρησιμοποιήθηκαν ως αρχικό υλικό για το πείραμά μας. Είχε γίνει ο απαραίτητος έλεγχος για μυκητολογικές προσβολές αλλά και προσβολές από ιούς, ώστε να θεωρούνται απαλλαγμένα από φυτοπαθογόνα.

2.2 Παρασκευή του υποστρώματος

Το θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα εργασία ήταν το M₄ (τροποποιημένο MS). Πριν την παρασκευή του υποστρώματος M₄, προηγούνταν η παρασκευή των ακόλουθων stock διαλυμάτων. Σημειώνεται ότι οι ζυγίσεις για τα ιχνοστοιχεία, τις βιταμίνες και την ορμόνη γίνονταν με ζυγό KERN 770 (KERN, Germany) ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων.

1. Παρασκευή stock διαλυμάτων ιχνοστοιχείων

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

- Διάλυμα $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ συγκέντρωσης $C_1=25\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
- Διάλυμα $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ συγκέντρωσης $C_2=25\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
- Διάλυμα KJ συγκέντρωσης $C_3=830\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
- Διάλυμα $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ συγκέντρωσης $C_4=8450\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
- Διάλυμα $\text{BeSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ συγκέντρωσης $C_5 = 100\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
- Διάλυμα $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ συγκέντρωσης $C_6=183,9\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
- Διάλυμα $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ συγκέντρωσης $C_7=8600\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
- Διάλυμα H_3BO_3 συγκέντρωσης $C_8=6200\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$
- Διάλυμα $\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ συγκέντρωσης $C_9=50\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$

2. Παρασκευή stock διαλύματος σιδήρου (Fe) Σεκεστρέν

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

3. Παρασκευή stock διαλυμάτων βιταμινών και αμινοξέων

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

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

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

4. Παρασκευή stock διαλύματος αυξίνης

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

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

Η παρασκευή του υποστρώματος M_4 γινόταν κάθε φορά ως εξής: Τα μακροστοιχεία ζυγίζονταν ένα-ένα και προστίθονταν σε ογκομετρική φιάλη του ενός λίτρου που περιείχε απεσταγμένο νερό. Οι ζυγίσεις των μακροστοιχείων γίνονταν με ζυγό KERN ακριβείας δύο δεκαδικών ψηφίων (KERN, Germany) σε ποσότητες που φαίνονται στον Πίνακα 2.1. Η ογκομετρική φιάλη βρισκόταν συνεχώς επάνω σε μαγνητικό αναδευτήρα. Στη συνέχεια, ακολουθούσε η πρόσθεση των διαλυμάτων των ιχνοστοιχείων. Την προσθήκη των διαλυμάτων ιχνοστοιχείων ακολουθούσε pHμέτρηση με τη βοήθεια pHμέτρου τύπου 3310 JENWAY (JENWAY LTD, UK) με ρύθμιση του pH στο $6,1\pm 0,1$ με τη βοήθεια διαλύματος KOH συγκέντρωσης $70\text{g}/100\text{mL}$. Στη συνέχεια ακολουθούσε η προσθήκη της ζάχαρης και του άγαρ. Μετά από τη διαδικασία αυτή, το υλικό θερμαίνονταν επάνω στο μαγνητικό αναδευτήρα με

αντίστοιχη θέρμανση ώστε να διαλυθεί το άγαρ που προστίθεται σε μορφή σκόνης και να ομογενοποιηθεί το μίγμα. Όταν το διάλυμα γινόταν διαυγές, παρέμενε σε ανάδευση χωρίς θέρμανση μέχρι να ψυχθεί ελαφρά και να προστεθούν θερμοευαίσθητες βιταμίνες. Ακολουθούσε λίγη ώρα ανάδευσης και το υλικό τοποθετούνταν στις γυάλες, και οι γυάλες κλείνονταν ερμητικά και τοποθετούνταν σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης 16KW (Εικόνα 2.1). Η αποστείρωση γινόταν στους 121⁰C και για 20 λεπτά.

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

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

Θειαμίνη	337,3	0,4	1,186	Sigma
Πυριδοξίνη	205,6	0,5	2,432	Sigma
Νικοτινικό οξύ	123,1	0,5	4,062	Sigma
Παντοθεικό Ασβέστιο	238,3	1	4,196	Sigma
Ινοζιτόλη	180,2	100	554,939	Sigma
Γλυσίνη	75,07	2	26,642	Merck
Βιοτίνη	244,3	0,01	40,93	Sigma
ΟΡΜΟΝΕΣ	(gr*mol⁻¹)	(mg*L⁻¹)	μmoles	
IAA	175,19	0,1	0,571	Fluka
ΥΔΑΤΑΝΘΡΑΚΕΣ	(gr*mol⁻¹)	(mg*L⁻¹)	mmoles	
Σακχαρόζη	342	15000	43,86	
ΛΟΙΠΑ	(gr*mol⁻¹)	(mg*L⁻¹)	mmoles	
Agar	3000-9000	6000		Fluka



Εικόνα 2.1 Κλίβανος υγρής αποστείρωσης

2.3 Σωλήνες ανάπτυξης:

Είναι γυάλινοι σωλήνες μήκους 200 mm και διαμέτρου 25mm οι οποίοι κλείνουν με φελλό. Σε αυτούς τοποθετείται το υπόστρωμα (το οποίο έχει παραχθεί

προηγούμενος) από 16mL στον καθένα και κατόπιν μέσα σε αυτούς γίνεται η εγκατάσταση και η αρχική ανάπτυξη των φυτών. Τοποθετείται 1 φυτό σε κάθε σωλήνα.

2.4 Τράπεζα νηματικής ροής και εργαλεία:

Η όλη διαδικασία πολλαπλασιασμού των φυτών με τη μέθοδο της ιστοκαλλιέργειας έγινε μέσα στην τράπεζα νηματικής ροής (Εικόνα 2.2) και χρησιμοποιήθηκαν τα εξής εργαλεία:

- Λαβίδες με τις οποίες πιάναμε τα φυτά
- Ψαλίδι με το οποίο γινόταν ο τεμαχισμός των αρχικών φυτών.
- Τριβλία μέσα στα οποία τοποθετούνται τα τεμαχισμένα φυτά πριν γίνει η εγκατάστασή τους στους σωλήνες ανάπτυξης .
- Οι σωλήνες αρχικής ανάπτυξης όπου τοποθετούνται τα φυτά

Πρέπει να σημειωθεί ότι όλα τα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αποστειρωμένα και επαναποστειρώνονταν σε φλόγα κάθε φορά που γινόταν αλλαγή φυτού το οποίο χρησιμοποιούταν για πολλαπλασιασμό.



Εικόνα 2.2 Τράπεζα νηματικής ροής

2.5 Θάλαμος ανάπτυξης:

Στο θάλαμο ανάπτυξης οι γυάλινοι σωλήνες τοποθετήθηκαν σε μεταλλικά ράφια πλάτους 400 mm (Εικόνα 2.3). Κάθε ράφι φωτιζόταν με 3 λάμπες φθορισμού Philips τύπου TLD 36W/33, οι οποίες βρίσκονταν σε απόσταση 500 mm από την

επιφάνεια του ραφιού, τοποθετημένες κατά τέτοιο τρόπο ώστε να βρίσκονται στοιχισμένες ως προς το κέντρο του πλάτους του ραφιού .

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



Εικόνα 2.3. Ο θάλαμος ανάπτυξης.

2.6 Ο θάλαμος 1^{ου} σταδίου σκληραγώγησης και οι κλωβοί εγκλιματισμού :

Στο θάλαμο σκληραγώγησης που χρησιμοποιήθηκε για την παρούσα εργασία (Εικόνα 2.4) υπήρχαν μεγάλα χαμηλά μεταλλικά τραπέζια ύψους 600 mm επάνω στα οποία ήταν τοποθετημένοι οι κλωβοί εγκλιματισμού. Επάνω από τους κλωβούς, και σε ύψος 960 mm από τη βάση τους, υπήρχαν 4 λαμπτήρες φθορισμού Philips τύπου TLD 58W/54, ώστε να εξασφαλίζεται ο απαραίτητος φωτισμός. Η θερμοκρασία στον θάλαμο σκληραγώγησης διατηρούνταν σταθερή στους 25⁰C με τη βοήθεια κλιματιστικού που διέθετε θερμοστάτη. Η εφαρμοζόμενη φωτοπερίοδος ήταν 16 ώρες φως και 8 ώρες σκοτάδι. Το φως άναβε στις 6:06 και έκλεινε στις 22:05.

Οι κλωβοί εγκλιματισμού ήταν κατασκευασμένοι από plexy glass και στεγανοποιημένοι με σιλικόνη στα σημεία ένωσης των πλευρών τους. Οι διαστάσεις τους ήταν: 1000 mm μήκος, 450 mm πλάτος και 300 mm ύψος. Το καπάκι τους ήταν επίσης κατασκευασμένο από plexy glass.



Εικόνα 2.4 Θάλαμος 1^{ου} σταδίου σκληραγώγησης-κλωβοί εγκλιματισμού

2.7 Θάλαμος 2^{ου} σταδίου σκληραγώγησης:

Στο συγκεκριμένο θάλαμο τοποθετήθηκαν τα φυτά μετά την έξοδό τους από το πρώτο στάδιο σκληραγώγησης και αφού έγινε μεταφύτευσή τους σε μεγαλύτερες γλάστρες. Στο θάλαμο αυτό (Εικόνα 2.5) υπήρχαν μεταλλικά τραπέζια ύψους 600 mm επάνω στα οποία ήταν τοποθετημένες οι γλάστρες. Πάνω από τα τραπέζια και σε ύψος 500 mm από τα φυτά υπήρχαν λαμπτήρες φθορισμού τύπου TLD 58W/83. Η φωτοπερίοδος σε αυτόν το θάλαμο ήταν μεγαλύτερη. Το φως έσβηνε μόνο για 5 ώρες από τις 2:28 μέχρι τις 7:18, ενώ το υπόλοιπο της ημέρας οι λάμπες ήταν σε λειτουργία. Η θερμοκρασία δεν είναι ελεγχόμενη στο θάλαμο αυτό.



Εικόνα 2.5 Ο θάλαμος 2^{ου} σταδίου σκληραγώγησης

2.8 Δικτυοκήπιο:

Μετά το θάλαμο του 2^{ου} σταδίου σκληραγώγησης τα φυτά οδηγήθηκαν στο χώρο του δικτυοκηπίου (Εικόνα 2.6). Ο τύπος του δικτυοκηπίου είναι τροποποιημένο τοξωτό μήκους 30 m, πλάτους 9 m και συνολικού ύψους 3,8 m. Το υλικό κάλυψής του είναι ένα πολύ πυκνό δίχτυ από πολυαιθυλένιο. Σε ορισμένα σημεία ψηλά στην οροφή εντός του δικτυοκηπίου έχει τοποθετηθεί ένα μαύρο πιο αραιό δίχτυ για την περαιτέρω μείωση της ηλιακής ακτινοβολίας και την καλύτερη προστασία των φυτών από αυτή. Τα φυτά ήταν τοποθετημένα επάνω σε μεταλλικά τραπέζια, ενώ υπήρχαν και δύο διάδρομοι μεταξύ των τραπεζιών ώστε να διευκολύνονται οι διάφορες



περιποιήσεις των φυτών (άρδευση, λίπανση).

Εικόνα 2.6 Το δικτυοκήπιο

2.9 Πολλαπλασιασμός:

Φυτά τα οποία έχουν προέλθει από ιστοκαλλιέργεια, ύψους περίπου 100 mm και τα οποία βρίσκονται μέσα στους σωλήνες ανάπτυξης τεμαχίζονται με αποστειρωμένο ψαλίδι μέσα στην τράπεζα νηματικής ροής. Ο τεμαχισμός γίνεται σε κάθε μεσογονάτιο διάστημα και το κάθε τμήμα που παίρνουμε αποτελείται από μέρος βλαστού με έναν οφθαλμό. Το κάθε τμήμα τοποθετείται με τη βοήθεια λαβίδας σε

ένα γυάλινο σωλήνα ανάπτυξης ο οποίος περιέχει 16mL υποστρώματος. Τέλος εφαρμόζεται ο φελλός στην κορυφή κάθε σωλήνα.

2.10 Πειραματική διαδικασία:

Με την παραπάνω διαδικασία πολλαπλασιασμού παράχθηκαν 40 φυτά του υποκειμένου 41B και άλλα 40 φυτά του SO₄. Οι σωλήνες ανάπτυξης που περιείχαν τα φυτά οδηγήθηκαν στο θάλαμο ανάπτυξης όπου παρέμειναν για 3 εβδομάδες. Μετά το χρονικό αυτό διάστημα και αφού τα φυτά είχαν αναπτυχθεί περίπου 100 mm έγινε μεταφύτευσή τους σε γλαστράκια . Το υπόστρωμα περιείχε μίγμα τύρφης-περλίτη σε αναλογία 3:1. Τα γλαστράκια αυτά τοποθετήθηκαν πολύ γρήγορα στον θάλαμο εγκλιματισμού μέσα σε κλωβούς διαστάσεων 1000×450×300 mm, που περιγράφηκαν παραπάνω. Οι κλωβοί ήταν ήδη απολυμασμένοι με χλωρίνη και περιείχαν στις γωνίες τους δοχεία με νερό ώστε να προκαλείται η σχετική υγρασία να διατηρείται σχετικά υψηλή μέσα στον κλωβό. Μετά την τοποθέτηση των γλαστρών μέσα στους κλωβούς, ψεκάστηκαν τα φυτά και τα εσωτερικά τοιχώματα του κλωβού με νερό ώστε να δημιουργηθούν συνθήκες υψηλής σχετικής υγρασίας. Τέλος, κλείστηκε το καπάκι του κλωβού.

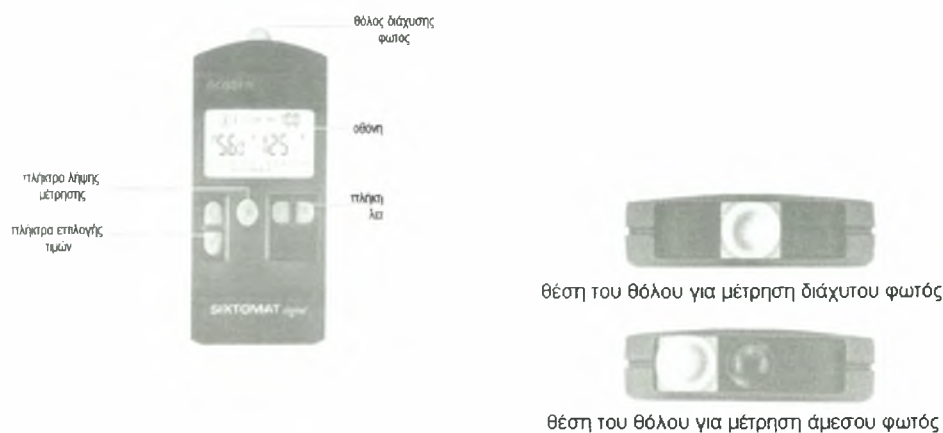
Τα φυτά παρέμειναν στο θάλαμο αυτό για 20 ημέρες. Μόλις πέρασε το χρονικό αυτό διάστημα πάρθηκαν οι πρώτες μετρήσεις. Τα 15 από τα 40 φυτά κάθε υποκειμένου οδηγήθηκαν στο εργαστήριο όπου μετρήθηκαν: μήκος βλαστού, αριθμός κόμβων, νωπό βάρος βλαστού, νωπό βάρος ρίζας, αριθμός κύριων ριζών και μήκος κύριων ριζών. Οι ζυγίσεις νωπού και ξηρού βάρους βλαστών και ριζών έγιναν με ζυγό OHAUS GA 200D ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων (OHAUS, Germany). Οι μετρήσεις του μήκους των βλαστών και ριζών έγιναν με τη βοήθεια υποδεκάμετρου. Κατόπιν οι βλαστοί και οι ρίζες τοποθετήθηκαν για τρία εικοσιτετράωρα σε ξηραντήριο στους 80⁰C και στη συνέχεια επαναζυγίστηκαν για τη λήψη του ξηρού βάρους.

Τα υπόλοιπα 25 φυτά της κάθε ποικιλίας μεταφυτεύτηκαν σε μεγαλύτερες γλάστρες και τοποθετήθηκαν στο θάλαμο 2^{ov} σταδίου σκληραγώγησης όπου και παρέμειναν για 20 μέρες ενώ παράλληλα τους παρεχόταν η απαραίτητη λίπανση και άρδευση. Μετά το χρονικό αυτό διάστημα έγιναν ξανά οι ίδιες μετρήσεις σε 12 φυτά από κάθε ποικιλία. Μετρήθηκε μήκος βλαστού, αριθμός κόμβων, νωπό βάρος βλαστού, νωπό βάρος ρίζας, αριθμός κύριων ριζών και μήκος κύριων ριζών. Ξανά οι

βλαστοί και οι ρίζες τοποθετήθηκαν για τρία εικοσιτετράωρα σε ξηραντήριο στους 80°C και στη συνέχεια επαναζυγίστηκαν για τη λήψη του ξηρού βάρους.

2.11 Μετρήσεις περιβάλλοντος του θαλάμου 2^{ου} σταδίου σκληραγώγησης:

Κατά τη διάρκεια του δεύτερου αυτού σταδίου σκληραγώγησης πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις του περιβάλλοντος του θαλάμου με τη βοήθεια καταγραφικού Delta-T (DL-2e, Delta-T Devices, UK). Ο αισθητήρας σχετικής υγρασίας ήταν τύπου SKH 2001 (SKYE Instruments LTD, UK) ακρίβειας ±2% σε σχετική υγρασία 1-75% στους 27°C. Τα θερμομέτρα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν thermistor's τύπου MT2 (Delta-T Devices LTD, UK) ακρίβειας ±0,1°C σε θερμοκρασία 0-70°C. Οι αισθητήρες PAR ήταν τύπου QS2 (Delta-T Devices LTD, UK) ακρίβειας ±5% στους 20°C. Οι μετρήσεις που πάρθηκαν αφορούσαν στη θερμοκρασία του υποστρώματος των γλαστρών σε βάθος 20 mm από την επιφάνειά τους, τη θερμοκρασία του φύλλου (άνω και κάτω επιφάνειας), τη σχετική υγρασία στο ύψος των φυτών, η PAR στο ύψος των φυτών σε δύο διαφορετικές τοποθεσίες πάνω στα τραπέζια που υπήρχαν τα φυτά μας (στο μέσο του τραπεζιού και στην άκρη). Οι παραπάνω μετρήσεις παίρνονταν με τη βοήθεια καταγραφικού, ανά 1min και οι μέσοι όροι των τιμών αυτών καταγράφονταν κάθε 10min. Παράλληλα έγινε και λήψη μετρήσεων που αφορούσαν στη UV ακτινοβολία, το διάχυτο και το προσπίπτον φως στο ύψος των φυτών κατά το στάδιο αυτό της σκληραγώγησης. Οι μετρήσεις αυτές πάρθηκαν από διάφορα σημεία επάνω στα τραπέζια, στις άκρες τους αλλά και στο μέσο τους. Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις αυτές είναι το φωτόμετρο GOSSEN SIXTOMAT digital (GOSSEN, Germany) (Εικόνα 2.7) το οποίο επιτρέπει τη μέτρηση τόσο του άμεσου φωτός όσο και του διάχυτου, με τη βοήθεια ενός προσαρμοζόμενου θόλου που προκαλεί την προαιρετική διάχυση του φωτός που φτάνει στην συσκευή και τελικά μετράται. Οι τιμές που εμφανίζει στην οθόνη του είναι σε μονάδες EV (Exposure Values). Η μετατροπή τους σε μονάδες LUX έγινε με τη χρήση τυπολογίου. Αναφέρεται συγκεκριμένα ότι η εξίσωση αντιστοίχισης EV (x) σε LUX (y) είναι: $y=5,6802e^{0,6913x}$



Εικόνα 2.7 Το φωτόμετρο

2.12 Μετρήσεις περιβάλλοντος δικτυοκηπίου:

Μετά το πέρας του δευτέρου σταδίου σκληραγώγησης πραγματοποιήθηκαν μετρήσεις για τη μελέτη και σύγκριση των κλιματικών συνθηκών που επικρατούσαν εντός και εκτός του δικτυοκηπίου. Πρέπει να σημειωθεί πως οι μετρήσεις εντός δικτυοκηπίου πάρθηκαν από σημεία στα οποία είχε τοποθετηθεί ένα μαύρο, πλαστικό, αραιό δίχτυ ακριβώς κάτω από το δίχτυ του δικτυοκηπίου για την περαιτέρω μείωση της ηλιακής ακτινοβολίας και την καλύτερη προστασία των φυτών από αυτή. Οι μετρήσεις αφορούσαν στην PAR και στη θερμοκρασία εντός και εκτός δικτυοκηπίου, και τη σχετική υγρασία εντός δικτυοκηπίου. Η καταγραφή των μετρήσεων έγινε για 5 ημέρες από τις 21 μέχρι 25 Αυγούστου 2003. Οι μετρήσεις παίρνονταν ανά 1min και οι μέσοι όροι των τιμών αυτών καταγράφονταν ανά 10min με τη βοήθεια καταγραφικού Delta-T (DL-2e, Delta-T Devices, UK) του οποίου τα χαρακτηριστικά έχουν αναφερθεί παραπάνω. Επίσης πάρθηκαν και μετρήσεις της UV ακτινοβολίας και του διάχυτου φωτός σε διάφορες θέσεις εντός του δικτυοκηπίου, αλλά και εκτός αυτού σε απόσταση περίπου 2m. Το όργανο που χρησιμοποιήθηκε για τις μετρήσεις αυτές είναι και πάλι το φωτόμετρο GOSSEN SIXTOMAT digital (GOSSEN, Germany) το οποίο περιγράφηκε παραπάνω.

2.13 Στατιστική ανάλυση των δεδομένων

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

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

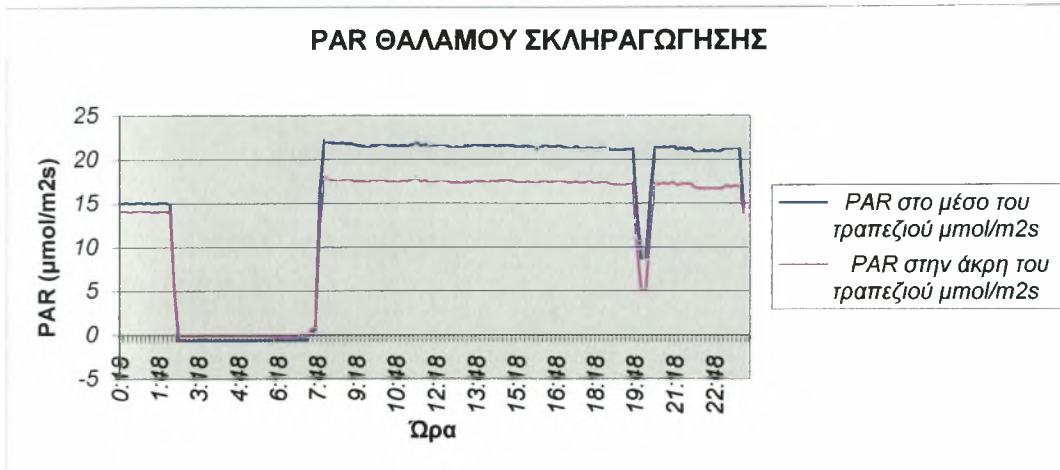
3.1 Αποτελέσματα μετρήσεων φωτός θαλάμου 2^{ου} σταδίου σκληραγώγησης.

Μετά από μετρήσεις που έγιναν στο θάλαμο του 2^{ου} σταδίου σκληραγώγησης βρέθηκε πως :

- UV= $0,308 \pm 0,07 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$
- Διάχυτο φως= $49,6 \pm 4,34 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$
- Προσπίπτον= $655,2 \pm 92,7 \mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$

3.2 Αποτελέσματα κλιματικών μετρήσεων θαλάμου 2^{ου} σταδίου σκληραγώγησης

Η φωτοσυνθετικά ενεργή ακτινοβολία (PAR) στο θάλαμο του 2^{ου} σταδίου σκληραγώγησης κατά τη διάρκεια ενός τυπικού 24ώρου (12/6/2003) φαίνεται στο Σχήμα3.1. Η μέτρησή της έγινε σε δύο διαφορετικά σημεία πάνω στα τραπεζάκια. Το ένα σημείο ήταν ακριβώς στο κέντρο του τραπεζιού (κάτω από τις λάμπες) και το άλλο στην άκρη του τραπεζιού, που απείχε λίγο από τις λάμπες. Από το σχεδιάγραμμα φαίνεται πως η PAR που έφτανε στο άκρο του τραπεζιού ήταν περίπου 19% λιγότερη από αυτή που έφτανε στο κέντρο του τραπεζιού. Πρέπει να σημειωθεί ότι όπως καθαρά φαίνεται και από το σχήμα οι λάμπες ήταν σβηστές από τις 2:18 μέχρι τις 7:18, οπότε και η τιμή της PAR είναι μηδέν. Στο υπόλοιπο της ημέρας η PAR είχε κατά το μεγαλύτερο διάστημα μια σχετικά σταθερή τιμή περίπου 21 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ (στο μέσο του τραπεζιού) ενώ στις 19:48 παρατηρήθηκε μια απότομη μείωση της PAR η οποία στις 20:08 έφτασε στο 8.7 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ ενώ στις 20:28 επανήλθε στην κανονική της τιμή. Τέλος παρατηρήθηκε πως από την αρχή της ημέρας μέχρι τα φώτα να σβήσουν η PAR κυμάνθηκε περίπου στα 15 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ (μέσο τραπεζιού). Έτσι μπορούμε να πούμε ότι τα φυτά που βρίσκονται στην άκρη του τραπεζιού υπολείπονται σε PAR και αυτό πιθανόν να επηρεάσει την ανάπτυξή τους αλλά και την αντοχή τους μετά την έξοδο στο δικτυοκήπιο.



Σχήμα 3.1. Μετρούμενη PAR θαλάμου σκληραγωγησης 2^{ου} σταδίου ενός 24ώρου

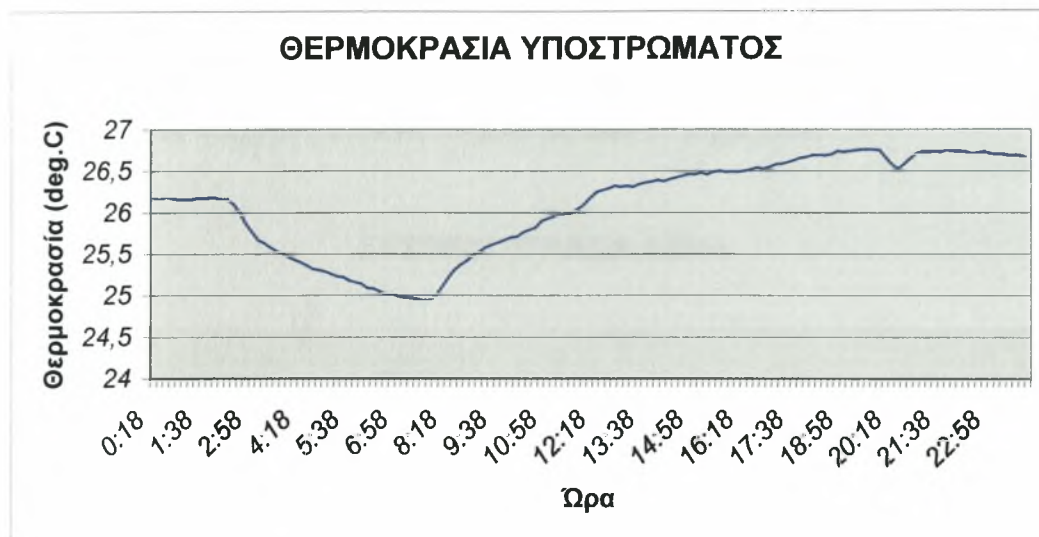
Η θερμοκρασία του αέρα στο θάλαμο σκληραγωγησης κατά τη διάρκεια ενός τυπικού 24ώρου φαίνεται στο Σχήμα 3.2. Η θερμοκρασία δεν παρουσίασε μεγάλη απόκλιση αφού η μέγιστη ήταν 28.4°C (παρουσιάστηκε στις 19:48), ενώ η ελάχιστη ήταν 25.8°C (στις 7:38). Την ώρα που οι λάμπες ήταν σβηστές (2:48 μέχρι 7:48) η θερμοκρασία συνεχώς μειωνόταν για να πάρει τη μικρότερη τιμή της (25.8°C) ακριβώς πριν ανάψουν οι λάμπες ξανά.



Σχήμα 3.2: Ημερήσια διακύμανση της θερμοκρασίας αέρα εντός του θαλάμου 2^{ου} σταδίου σκληραγωγησης

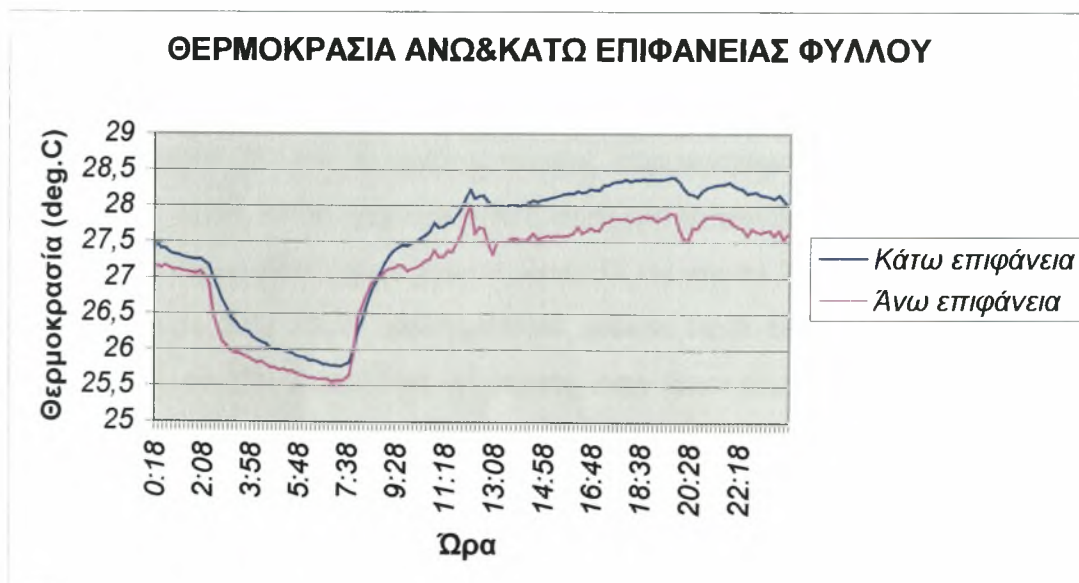
Η θερμοκρασία υποστρώματος (Σχήμα 3.3) όπως και η θερμοκρασία αέρα που είδαμε προηγουμένως ακολουθεί μια καθοδική πορεία από τη στιγμή που οι λάμπες σβήνουν μέχρι να ανάψουν ξανά. Η ελάχιστη τιμή θερμοκρασίας σημειώθηκε

και εδώ στις 7:48 (λίγο πριν ανάψουν οι λάμπες) και ήταν 24.9°C, ενώ η μέγιστη ήταν στις 19:48 και ήταν 26.76°C.



Σχήμα 3.3: Ημερήσια διακύμανση θερμοκρασίας υποστρώματος σε βάθος 20 mm.

Όπως φαίνεται από το Σχήμα 3.4 η κάτω επιφάνεια του φύλλου ήταν πάντα θερμότερη από την επάνω. Η μέγιστη διαφορά τους ήταν περίπου 0,5°C (19:48). Στις 7:18 παρατηρήθηκε ότι είχαμε και στην άνω αλλά και στην κάτω επιφάνεια του φύλλου την ελάχιστη τιμή τους, που ήταν 25.57°C και 25.77°C αντίστοιχα. Η μέγιστη τιμή για την κάτω επιφάνεια του φύλλου παρατηρήθηκε στις 19:48. Για την άνω επιφάνεια η μέγιστη τιμή θερμοκρασίας σημειώθηκε στις 12:08 που έφτασε στους 28°C, αλλά και κατά το απόγευμα στις 19:38 που ήταν 27.9°C.



Σχήμα 3.4: Ημερήσια διακύμανση θερμοκρασίας φύλλου

Η σχετική υγρασία του αέρα στο θάλαμο όπως φαίνεται και στο Σχήμα 3.5 δεν παρουσίασε μεγάλες διακυμάνσεις. Παρατηρούμε πως την ώρα που οι λάμπες ήταν σβηστές η σχετική υγρασία συνεχώς αυξανόταν για να πάρει τη μέγιστη τιμή 57% στις 7:38. την υπόλοιπη μέρα που οι λάμπες ήταν ανοιχτές δεν είχαμε μεγάλες αποκλίσεις και η σχετική υγρασία κυμάνθηκε από 49 μέχρι 52%.



Σχήμα 3.5: Ημερήσια διακύμανση σχετικής υγρασίας αέρα στο θάλαμο 2^{ου} σταδίου σκληραγωγησης.

3.3 Αποτελέσματα μετρήσεων φωτός δικτυοκηπίου

Τα αποτελέσματα που ακολουθούν αφορούν στο μέσο όρο της υπεριώδους ακτινοβολίας και του διάχυτου φωτός των δύο ημερών στις τέσσερις διαφορετικές χρονικές στιγμές που πραγματοποιήθηκαν οι μετρήσεις μας.

Σύμφωνα με τους παρακάτω πίνακες παρατηρήθηκε μια μείωση της UV ακτινοβολίας αλλά και του διάχυτου φωτός εντός του δικτυοκηπίου.

Συγκεκριμένα στις 9:00 είχαμε μείωση κατά 53,1% και 61,7% σε UV και διάχυτο φως αντίστοιχα. Στις 10:30 παρατηρήθηκε μείωση κατά 60,2% σε UV ενώ στο διάχυτο κατά 66,1%. Στις 12:00 η μείωση αυτή ήταν 61,5% για UV ενώ του διάχυτου ήταν 57,8%. Τέλος στις 14:00 η μείωση του UV ήταν 61% και η αντίστοιχη του διάχυτου φωτός ήταν 54%.

Φαίνεται λοιπόν πως η μείωση που μετρήθηκε με τα συγκεκριμένα όργανα λόγω της σκίασης του δικτυοκηπίου και του επιπλέον δικτύου που είχε τοποθετηθεί, ήταν

σημαντικότερη και ξεπερνούσε το μισό της αντίστοιχης ακτινοβολίας εκτός του δικτυοκηπίου.

Πίνακας 3.1 Αποτελέσματα μετρήσεων φωτός δικτυοκηπίου (14/7/2003)

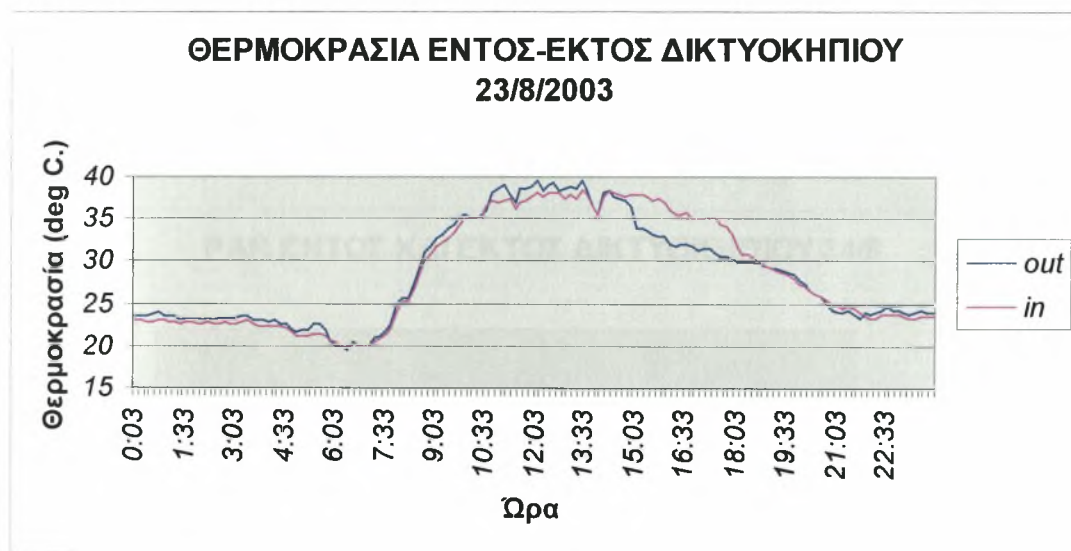
ΩΡΑ		UV($\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$)	ΔΙΑΧΥΤΟ($\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$)
9:00	ΕΝΤΟΣ	18 ± 2,3	650,9 ± 114,5
	ΕΚΤΟΣ	37,1 ± 2,8	1740,9 ± 80,6
10:30	ΕΝΤΟΣ	32,4 ± 0,9	843 ± 52,2
	ΕΚΤΟΣ	82,6 ± 1,3	2347,6 ± 74,6
12:00	ΕΝΤΟΣ	45,3 ± 0,6	1079 ± 44,9
	ΕΚΤΟΣ	116,6 ± 3,6	2574,7 ± 91
14:00	ΕΝΤΟΣ	47,7 ± 3,3	1118,5 ± 77,3
	ΕΚΤΟΣ	120,4 ± 2,8	2487,2 ± 88,9

Πίνακας 3.2 Αποτελέσματα μετρήσεων φωτός δικτυοκηπίου (24/7/2003)

ΩΡΑ		UV($\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$)	ΔΙΑΧΥΤΟ($\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$)
9:00	ΕΝΤΟΣ	20,6 ± 3,4	865,3 ± 165,3
	ΕΚΤΟΣ	45,4 ± 1,6	2203,7 ± 75,8
10:30	ΕΝΤΟΣ	36,2 ± 1,3	923,2 ± 28,3
	ΕΚΤΟΣ	89,5 ± 1,41	2888,7 ± 91,8
12:00	ΕΝΤΟΣ	47,4 ± 2	1359,9 ± 83,7
	ΕΚΤΟΣ	124,5 ± 3,7	3204,3 ± 98,4
14:00	ΕΝΤΟΣ	49,5 ± 3,2	1499,1 ± 78,9
	ΕΚΤΟΣ	128,7 ± 3,3	3186,2 ± 107,1

3.4 Αποτελέσματα κλιματικών δεδομένων δικτυοκηπίου

Η διακύμανση της θερμοκρασίας εντός και εκτός του δικτυοκηπίου, η PAR και η σχετική υγρασία καταγράφηκαν για διάστημα 5 ημερών (21/8/2003 μέχρι 25/8/2003). Παρακάτω παρουσιάζονται οι πιο αντιπροσωπευτικές μετρήσεις που πήραμε. Συγκεκριμένα στο Σχήμα 3.6 φαίνεται η διακύμανση της θερμοκρασίας εντός και εκτός του δικτυοκηπίου κατά τη διάρκεια ενός τυπικού 24ώρου με τη χρήση επικαλυμμένων θερμοζευγών. Από το σχήμα φαίνεται πως η διακύμανση είναι αρκετά μεγάλη αφού η μέγιστη θερμοκρασία εντός έφτασε μέχρι 38.4°C (13:23) ενώ η μικρότερη ήταν 19.9°C (6:53), ενώ οι αντίστοιχες τιμές εκτός ήταν 39.5 °C (13:23) και 19.5 °C (6:23). Η θερμοκρασία εντός του δικτυοκηπίου μέχρι το μεσημέρι (13:33) ήταν μικρότερη από την εξωτερική. Η διαφορά αυτή έγινε μέγιστη στις 11:03 και ήταν 1.8°C. Από τις 13:33 όμως μέχρι 21:53 η θερμοκρασία εντός του δικτυοκηπίου γίνεται μεγαλύτερη από την εξωτερική με το μέγιστο της διαφοράς αυτής στις 15:43, που η θερμοκρασία εντός ήταν κατά 4.3°C μεγαλύτερη.



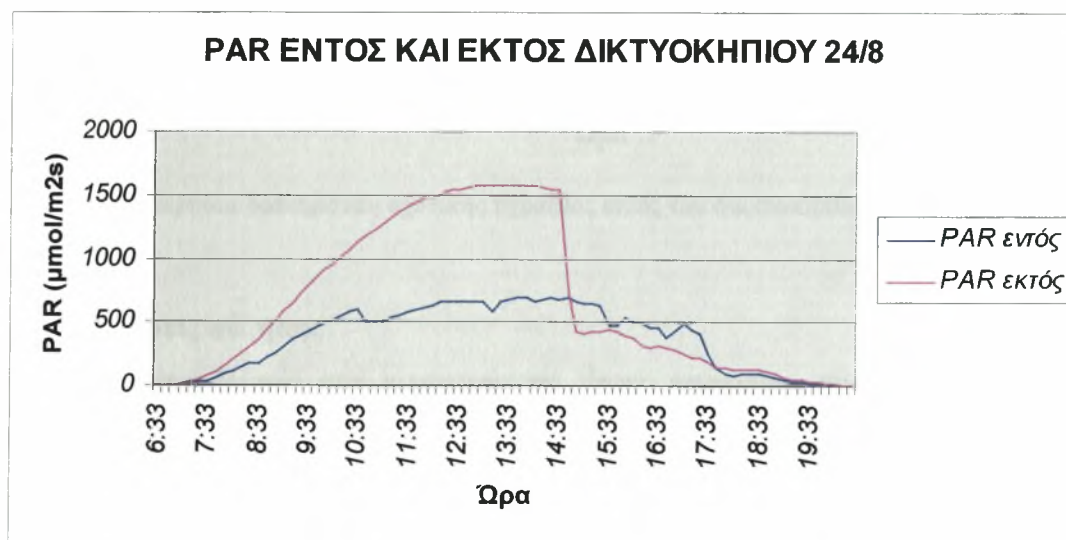
Σχήμα 3.6: Ημερήσια διακύμανση της θερμοκρασίας εντός και εκτός του δικτυοκηπίου

Η θερμοκρασία εντός του δικτυοκηπίου μετρήθηκε επίσης και με thermistor (Σχήμα 3.7). Εδώ η μεγαλύτερη θερμοκρασία καταγράφηκε στις 15:13 και ήταν 38.17°C, ενώ η μικρότερη στις 7:03 και ήταν 19.63 °C. Οι αντίστοιχες τιμές που καταγράφηκαν από τα θερμοζεύγη (δες παραπάνω) ήταν 37.78 °C και 19.98 °C. Παρατηρούμε δηλαδή πως υπάρχει μια μικρή διαφορά στις μετρήσεις που πήραμε από τα δύο όργανα.



Σχήμα 3.7: Ημερήσια διακύμανση θερμοκρασίας εντός του δικτυοκηπίου

Στο Σχήμα 3.8 φαίνεται η ένταση της φωτοσυνθετικά ενεργούς ακτινοβολίας (PAR) εντός και εκτός του δικτυοκηπίου. Μέχρι 14:43 η ακτινοβολία αυτή ήταν μεγαλύτερη στο έξω περιβάλλον και η μέγιστή της τιμή έφτασε στα 1582 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$ (13:33). Από τις 14:43 όμως και μετά εντός του δικτυοκηπίου καταγράφηκαν μεγαλύτερες τιμές της PAR από ότι εκτός. Η μέγιστη τιμή εντός του δικτυοκηπίου όπου υπάρχουν τα φυτά μας καταγράφηκε στις 14:23 και ήταν 696 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$.



Σχήμα 3.8: Ημερήσια διακύμανση της PAR εντός και εκτός του δικτυοκηπίου

Η αύξηση της θερμοκρασίας και η υψηλή τιμή της PAR εντός του δικτυοκηπίου τις απογευματινές ώρες οφείλεται αφενός στη θέση του ηλίου ο οποίος διαπερνά πια φυλλωσιές παρακείμενων δέντρων και αφ' εταίρου οι αισθητήρες εκτός του δικτυοκηπίου σκιάζονται περαιτέρω από το ίδιο το δικτυοκήπιο.

Η σχετική υγρασία όπως φαίνεται στο Σχήμα 3.9 παρουσίασε μεγάλες διαφορές κατά τη διάρκεια του 24ώρου. Η μέγιστη τιμή της επί τοις εκατό σχετικής υγρασίας ήταν 76 (00:03) ενώ η ελάχιστη ήταν 24 (13:33). Παρατηρούμε πως κατά τις τελευταίες πρωινές και τις μεσημεριανές ώρες είχαμε απότομη μείωση της σχετικής υγρασίας. Όμως από το απόγευμα και μετά τα επίπεδα σχετικής υγρασίας αυξήθηκαν ξανά. Βέβαια παρατηρείται μια υστέρηση στην αναμενόμενη συσχέτιση μεταξύ της πτώσης της θερμοκρασίας (βάση των θερμοζευγών) και της σχετικής υγρασίας για τουλάχιστο μια ώρα. Αντίθετα συσχετίζονται χρονικά η θερμοκρασία του thermistor με τη σχετική υγρασία. Τέλος η πτώση της PAR ξεκίνησε αρκετά πιο νωρίς από την αύξηση της σχετικής υγρασίας.



Σχήμα 3.9: Ημερήσια διακύμανση σχετικής υγρασίας εντός του δικτυοκηπίου.

3.5 Μετρήσεις αύξησης

Τα αποτελέσματα που αναγράφονται στους παρακάτω πίνακες αναφέρονται στους μέσους όρους που προέκυψαν από τα τρία φυτά που χρησιμοποιήθηκαν για κάθε επανάληψη και τις 5 επαναλήψεις ανά μεταχείριση. Από αυτά λοιπόν φαίνεται ότι κατά το δεύτερο στάδιο σκληραγώγησης το νωπό βάρος του βλαστού αυξήθηκε κατά 185% (Πίνακας 3.3). Η αύξηση αυτή παρατηρήθηκε και στα δύο υποκείμενα ήταν όμως πιο έντονη στο SO₄. Η διαφορά των δύο υποκειμένων δεν ήταν τόσο αισθητή στο πέρας του πρώτου σταδίου σκληραγώγησης, αλλά ήταν έντονη στο τέλος του δευτέρου όπου το υποκείμενο SO₄ ήταν κατά 51% μεγαλύτερο από το 41B.

Σχετικά με το νωπό βάρος της ρίζας παρατηρήθηκε μια αύξηση κατά 150% κατά το δεύτερο στάδιο σκληραγώγησης (Πίνακας 3.3). Η αύξηση αυτή παρατηρήθηκε και στα δύο υποκείμενα κατά το ίδιο ποσοστό περίπου 61% με ελαφρώς μεγαλύτερο ποσοστό αύξησης στο 41B. Το νωπό βάρος της ρίζας του 41B φαίνεται να είναι κατά 38.4% μεγαλύτερο από του SO₄ μετά το πέρας του δεύτερου σταδίου σκληραγώγησης.

Πίνακας 3.3. Μέσοι όροι νωπού βάρους βλαστού και ρίζας των δύο υποκειμένων (41B, SO₄) και των δύο διαφορετικών χρονικών στιγμών λήψης μετρήσεων (πριν και μετά το 2^ο στάδιο σκληραγώγησης).

Ημερομηνία	Υποκείμενο	Νωπό Βάρος Βλαστού (g)	Νωπό βάρος Ρίζας (g)
Πριν το 2 ^ο στάδιο σκληραγώγησης 8/5/2003	41 B	0,276	0,141
	SO ₄	0,249	0,106
Μετά το 2 ^ο στάδιο σκληραγώγησης 28/5/2003	41B	0,597	0,369
	SO ₄	0,903	0,274
ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΗΤΑ			
Κατά το 2 ^ο στάδιο		***	***
Υποκειμένου		*	**
E.Σ.Δ. _{0,05}		0,173	0,059

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

Το επί τοις εκατό ποσοστό νωπού βάρους που βρέθηκε στο βλαστό των δύο υποκειμένων φαίνεται να μην έχει παρουσιάσει σημαντική διαφορά από την αρχή μέχρι το τέλος του δευτέρου σταδίου σκληραγώγησης(Πίνακας 3.4). Όμως αυτό ισχύει για το υποκείμενο 41B το οποίο δεν παρουσίασε αξιόλογη μεταβολή στο ποσοστό νωπού βάρους που συσσωρεύτηκε στο βλαστό του κατά το στάδιο αυτό, ενώ αντίθετα το SO₄ αύξησε το ποσοστό αυτό κατά 11% έχοντας ως αποτέλεσμα τελικώς να παρουσιάζει κατά 25% μεγαλύτερο ποσοστό νωπού βάρους από το υποκείμενο 41B.

Το επί τοις εκατό ποσοστό νωπού βάρους που συσσωρεύτηκε στις ρίζες των δύο υποκειμένων δεν παρουσίασε σημαντική διαφορά κατά τη διάρκεια του δευτέρου σταδίου σκληραγώγησης (Πίνακας 3.4). Στην έναρξή του τα δύο υποκείμενα δεν παρουσίασαν διαφορές μεταξύ τους ως προς το ποσοστό αυτό, όμως στο τέλος του σταδίου τα δύο υποκείμενα διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους αφού το υποκείμενο SO₄ παρουσίασε μια μείωση του ποσοστού νωπού βάρους που συσσωρεύτηκε στη ρίζα του της τάξης του 26%, και τελικά τα δύο υποκείμενα διέφεραν σημαντικά μεταξύ τους με το 41B να έχει ποσοστό νωπού βάρους κατά 70% μεγαλύτερο από το αντίστοιχο του SO₄ υποκειμένου. Φαίνεται λοιπόν ότι κατά την ex vitro σκληραγώγησή τους τα δύο υποκείμενα πιθανόν να συμπεριφέρονται διαφορετικά με το SO₄ να δημιουργεί περισσότερο βλαστό και το 41B περισσότερη ρίζα.

Πίνακας 3.4. Μέσοι όροι του επί τοις εκατό ποσοστού νωπού βάρους βλαστού και ρίζας των δύο υποκειμένων(41B, SO₄) και των δύο διαφορετικών χρονικών στιγμών λήψης μετρήσεων(πριν και μετά το 2^ο στάδιο σκληραγώγησης), σημαντικότητα και Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά των μεταβλητών αυτών.

Ημερομηνία	Υποκείμενο	%Νωπού Βάρους Στο Βλαστό	%Νωπού Βάρους Στη Ρίζα
Πριν το 2 ^ο στάδιο σκληραγώγησης 8/5/2003	41 B	66,2	33,7
	SO ₄	69,9	30,1
Μετά το 2 ^ο στάδιο σκληραγώγησης 28/5/2003	41B	62	37,9
	SO ₄	77,5	22,4

ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΗΤΑ

Κατά το 2^ο στάδιο

N,S

N,S

Υποκειμένου

E.Σ.Δ.0.05

5,51

5,52

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

Ο μέσος όρος του μήκους βλαστών των δύο υποκειμένων στο τέλος του δεύτερου σταδίου σκληραγώγησης παρουσίασε αύξηση κατά 88% (Πίνακας 3.5) σε σχέση με αυτό στην έναρξη του 2^{ου} σταδίου σκληραγώγησης. Κατά την έναρξη του δεύτερου

σταδίου σκληραγώγησης τα δυο υποκείμενα δεν διέφεραν μεταξύ τους σημαντικά. Όμως μετά την αύξηση που παρουσίασαν και τα δύο, με μεγαλύτερη αυτή του SO₄, το οποίο αύξησε το μήκος του βλαστού του κατά 122%, είχαμε ως αποτέλεσμα το μήκος βλαστού του SO₄ να είναι κατά 41% μεγαλύτερο από του 41B.

Ο αριθμός των κόμβων βλαστού παρουσίασε συνολική αύξηση κατά 32% (Πίνακας 3.5) κατά το δεύτερο στάδιο σκληραγώγησης. Στην αρχή του σταδίου αυτού το υποκείμενο 41B είχε 23% περισσότερους κόμβους από το υποκείμενο SO₄, ενώ στο τέλος του σταδίου αυτού τα δύο υποκείμενα παρουσίαζαν τον ίδιο αριθμό κόμβων. Η συνολική αυτή αύξηση οφείλεται σε μεγαλύτερο ποσοστό στο υποκείμενο SO₄ του οποίου οι κόμβοι αυξήθηκαν στο δεύτερο στάδιο σκληραγώγησης κατά 47%.

Πίνακας 3.5. Μέσοι όροι του μήκους βλαστού και αριθμού κόμβων των δύο υποκειμένων (41B, SO₄) και των δύο διαφορετικών χρονικών στιγμών λήψης μετρήσεων (πριν και μετά το 2^ο στάδιο σκληραγώγησης), σημαντικότητα και Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά των μεταβλητών αυτών.

Ημερομηνία	Υποκείμενο	Μήκος Βλαστού (cm)	Αριθμός Κόμβων Βλαστού
Πριν το 2 ^ο στάδιο σκληραγώγησης 8/5/2003	41 B	12,5	5,3
	SO ₄	10,9	4,3
Μετά το 2 ^ο στάδιο σκληραγώγησης 28/5/2003	41B	19,9	6,3
	SO ₄	24,2	6,3

ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΗΤΑ

Κατά το 2^ο στάδιο

Υποκειμένου

N,S

N,S

E.Σ.Δ.0.05

2,92

0,97

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

Το μέσο μήκος των ριζών των δύο υποκειμένων με το πέρας του δεύτερου σταδίου σκληραγώγησης ήταν αυξημένο κατά 84% (Πίνακας 3.6). Η αύξηση αυτή οφείλεται κυρίως στο υποκείμενο 41B του οποίου το μήκος ρίζας αυξήθηκε κατά 98% στο

στάδιο αυτό. Τα δύο υποκείμενα δεν φαίνεται τελικά να διέφεραν ως προς αυτό το χαρακτηριστικό.

Ο αριθμός των ριζών του ριζικού συστήματος των φυτών δεν φαίνεται να έχει παρουσιάσει καμία σημαντική μεταβολή κατά το δεύτερο στάδιο σκληραγώγησης όπως επίσης και τα δύο υποκείμενα δεν φαίνεται να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους, ως προς το χαρακτηριστικό αυτό, ούτε στην αρχή αλλά ούτε και στο τέλος του σταδίου αυτού (Πίνακας 3.6). Επομένως κατά το 2^ο στάδιο σκληραγώγησης είχαμε βασικά ανάπτυξη των ήδη υπάρχοντων ριζών και όχι τη δημιουργία νέων.

Το μήκος ανά ρίζα των δύο υποκειμένων παρουσίασε αύξηση του 81% κατά το δεύτερο στάδιο σκληραγώγησης (Πίνακας 3.6). Στην αύξηση αυτή συμβάλλει κυρίως το υποκείμενο 41B το οποίο αύξησε το μήκος ανά ρίζα του κατά 155%. Παρόλα αυτά τα δύο υποκείμενα δεν φαίνεται τελικά να διαφέρουν μεταξύ τους ενώ αρχικά το υποκείμενο SO₄ είχε κατά 64% μεγαλύτερο μήκος ανά ρίζα.

Πίνακας 3.6. Μέσοι όροι μήκους ρίζας, αριθμού και μήκους επί μέρους ριζών των δύο υποκειμένων (41B, SO₄) και των δύο διαφορετικών χρονικών στιγμών λήψης μετρήσεων (πριν και μετά το 2^ο στάδιο σκληραγώγησης), σημαντικότητα και Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά των μεταβλητών αυτών.

Ημερομηνία	Υποκείμενο	Μήκος Ρίζας (cm)	Αριθμός ριζών	Μήκος /Ρίζα (cm)
Πριν το 2 ^ο στάδιο σκληραγώγησης 8/5/2003	41 B	9,6	2,8	3,4
	SO ₄	11,1	2,1	5,6
Μετά το 2 ^ο στάδιο σκληραγώγησης 28/5/2003	41B	19,2	2,4	8,7
	SO ₄	18,9	2,6	7,6
ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΗΤΑ				
Κατά το 2 ^ο στάδιο		***	N,S	***
Υποκειμένου		N,S	N,S	N,S
E.Σ.Δ.0.05		4,29	0,78	2

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

Μετά το πέρας του δεύτερου σταδίου σκληραγώγησης βρέθηκε να υπάρχει αυξημένο το επί τοις εκατό ποσοστό ξηρού βάρους του βλαστού κατά 142% (Πίνακας 3.7). Η αύξηση αυτή συνέβη κατά το ίδιο σχεδόν ποσοστό και στα δύο υποκείμενα, τα οποία τελικώς δεν διέφεραν μεταξύ τους.

Όσον αφορά στο ξηρό βάρος βλαστού παρουσιάστηκε σημαντική αύξηση κατά 595% κατά το δεύτερο στάδιο σκληραγώγησης (Πίνακας 3.7). Το μεγαλύτερο ποσοστό αύξησης παρουσιάστηκε στο SO₄ υποκείμενο το οποίο έφτασε στα 863%. Η διαφορά των δύο υποκειμένων τελικά δεν ήταν σημαντική λόγω έντονης παραλλακτικότητας μεταξύ των φυτών και τυχαίοποιημένη επιλογή των τριών φυτών ανά επανάληψη.

Το επί τοις εκατό ποσοστό του ξηρού βάρους ρίζας στο τέλος του δεύτερου σταδίου σκληραγώγησης βρέθηκε να είναι ελαφρώς μεγαλύτερο στο υποκείμενο 41B κατά 16,4% (Πίνακας 3.8), ενώ το ξηρό βάρος του ήταν κατά 72,7% περισσότερο από του SO₄.

Πίνακας 3.7. Μέσοι όροι του επί τοις εκατό ποσοστού ξηρού βάρους βλαστού και το ξηρό βάρος του στα δύο υποκείμενα (41B, SO₄) και τις δύο διαφορετικές χρονικές στιγμές λήψης μετρήσεων (πριν και μετά το 2^ο στάδιο σκληραγώγησης), σημαντικότητα και Ελάχιστη Σημαντική Διαφορά των μεταβλητών αυτών.

Ημερομηνία Βλαστού	Υποκείμενο	% Ξηρού Βάρους Βλαστού	Ξηρό Βάρος (mg)
Πριν το 2 ^ο στάδιο σκληραγώγησης 8/5/2003	41 B	8,2	21,6
	SO ₄	6,2	15,2
Μετά το 2 ^ο στάδιο σκληραγώγησης 28/5/2003	41B	18,3	110
	SO ₄	16,3	146,4
ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΗΤΑ			
Κατά το 2 ^ο στάδιο		***	***
Υποκειμένου		N,S	N,S
E.Σ.Δ._{0,05}		3,35	30,6

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

Πίνακας 3.8. Μέσοι όροι του επί τοις εκατό ποσοστού ξηρού βάρους ρίζας και το αντίστοιχο ξηρό βάρος της στα δύο υποκείμενα (41B, SO₄) μετά το πέρας του 2^{ου} σταδίου σκληραγώγησης.

Ημερομηνία	Υποκείμενο	% Ξηρού Βάρους Ρίζας	Ξηρό Βάρος Ρίζας (mg)
Μετά το 2 ^ο στάδιο σκληραγώγησης 28/5/2003	41B	10,6	38,7
	SO ₄	9,11	22,4
ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΗΤΑ			
	Υποκειμένου	*	***
	Ε.Σ.Δ. 0,05	1,2	7,82

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

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1 Μελέτη περιβάλλοντος θαλάμου σκληραγώγησης 2^{ου} σταδίου και δικτυοκηπίου

Πρέπει να σημειωθεί ότι η παντελώς σχεδόν έλλειψη διεθνούς βιβλιογραφίας στο θέμα του μικροπεριβάλλοντος σκληραγώγησης και φυσιολογικών παραμέτρων σε αυτή, δεν μας επιτρέπει να επεκταθούμε αρκετά στο συγκεκριμένο θέμα.

Οι συνθήκες που επικρατούν στο θάλαμο του 2^{ου} σταδίου σκληραγώγησης διαφέρουν αρκετά από αυτές του δικτυοκηπίου. Η PAR του θαλάμου είναι κατά πολύ μικρότερη από αυτή του δικτυοκηπίου, αλλά παρόλα αυτά είναι αρκετή για έντονη φωτοσύνθεση και συσσώρευση μάζας στα νεαρά φυτά, με διαφορές βέβαια στα δύο υποκείμενα. Επίσης η θερμοκρασία και η υγρασία είναι χαμηλότερες από αυτές που επικρατούν στο δικτυοκήπιο, πράγμα αναμενόμενο αφού τα φυτά μας βρίσκονται σε κλειστό χώρο. Οι συγκεκριμένες συνθήκες φαίνεται να είναι κατάλληλες για την αρχική ανάπτυξη των φυτών.

Το μικροπεριβάλλον που δημιουργείται εντός του δικτυοκηπίου είναι κάπως διαφοροποιημένο από το εξωτερικό ώστε να βοηθήσει τα φυτά μας να εγκλιματιστούν σιγά-σιγά σε φυσικές συνθήκες. Η PAR είναι αυτή που παρουσιάζει τη μεγαλύτερη διαφορά εντός και εκτός, σε σχέση με τα υπόλοιπα κλιματικά δεδομένα, η οποία φαίνεται να είναι μέχρι και 50% μειωμένη εντός του δικτυοκηπίου σε σχέση με τις εξωτερικές συνθήκες, κατά τις μεσημεριανές ώρες. Πρέπει όμως να σημειωθεί ότι η PAR στο θάλαμο 2^{ου} σταδίου σκληραγώγησης ήταν κατά πολύ μικρότερη από αυτή του δικτυοκηπίου.

4.2 Μελέτη αύξησης των φυτών

Κατά την παραμονή των φυτών στο 2^ο στάδιο σκληραγώγησης υπήρξαν κάποιες διαφορές στην ανάπτυξη του βλαστού και της ρίζας μεταξύ των δύο υποκειμένων, όπου το SO₄ συσσώρευσε μεγαλύτερη ποσότητα νωπού και ξηρού βάρους στο βλαστό, ενώ το 41B στις ρίζες. Το SO₄ εξ' αιτίας του γεγονότος αυτού πιθανόν να αντιμετωπίσει δυσκολίες κατά τη μεταφορά του στο δικτυοκήπιο σε περίοδο με ακραίες συνθήκες. Καλό είναι η μεταφορά να γίνεται μέσα άνοιξης ή φθινοπώρου

ώστε να μην αντιμετωπίσει το συγκεκριμένο υποκείμενο μεγάλα προβλήματα. Το υποκείμενο 41B πιθανόν να έχει μικρότερο πρόβλημα προσαρμογής λόγω της καλής αναλογίας του βάρους βλαστού και ρίζας του. Επίσης τα ποσοστά του επί τοις εκατό ξηρού βάρους στο βλαστό και στη ρίζα παρουσίασαν ουσιαστικές διαφορές στο τέλος του 2^{ου} σταδίου σκληραγώγησης. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο ότι η σχετική υγρασία αέρα ήταν περίπου 50% ώστε ο βλαστός να υφίσταται συνθήκες καταπόνησης και να συσσωρεύει αντίστοιχα ξηρό βάρος ενώ οι ρίζες βρίσκονταν πάντα σε άριστες υδατικές συνθήκες ώστε να μην καταπονηθούν και σαν αποτέλεσμα να συσσωρεύουν περισσότερη ξηρή ουσία.

Το μήκος του βλαστού κατά το στάδιο αυτό παρουσίασε αξιόλογη αύξηση, που ήταν και το αναμενόμενο να συμβεί.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ:

- ✓ Allen, C. (1989). The vine. *In*: www.klis.com/scove/vine2000.htm
- ✓ Alleweldt, G., and Radler, F. (1962). Interrelationship between photoperiodic behavior of grapes and growth of plant tissue cultures. *Plant Physiol.* 37: 376-379.
- ✓ Anonymous (2003c). The professional method of deflasking most species of tissueculture. *In*: www.shaman-australis.com/website/cultivation/tissuecultureMethod3.htm
- ✓
- ✓ Anonymous (2003b). Effects of the physical environment on plant cultures. *In*: www.ucdavis.edu
- ✓ Anonymous, (2003a). Acclimatization of tissue cultured plants. *In*: www.oglesbytc.com
- ✓ Barlass, M., and Skene, K. G. M. (1978). *In vitro* propagation of grapevine (*Vitis vinifera* L.) from fragmented shoot apices. *Vitis* 17: 335-340.
- ✓ Barlass, M., and Skene, K. G. M. (1980a). Studies on the fragmented shoot apex of grapevine. I. The regenerative capacity of leaf promordia fragments *in vitro*. *J. Exp. Bot.* 31 :483-488.
- ✓ Barlass, M., and Skene, K. G. M. (1980b). Studies on the fragmented shoot apex of grapevine. II. Factors affecting growth and differentiation *in vitro*. *J. Exp. Bot.* 31:489-495.
- ✓ Barlass, M., Skene, K. G. M., Woodham, R. C., and Krake, L.R. (1982). Regeneration of virus-free grapevines using *in vitro* apical culture. *J. appl. Biol.* 101: 291-295.
- ✓ Bini, G. (1976). Prove di cultura *in vitro* di meristemi apicali di *Vitis vinifera* L. *Riv. Ortoflorofruttic. Ital.* 60: 289-296.
- ✓ Chee, R., and Pool, R. M. (1983). *In vitro* vegetative propagation of *Vitis*: Application of previously defined culture conditions to a selection of genotypes. *Vitis* 22: 363-374.

- ✓ Chee, R., Pool, R. M. and Bucher, D. (1984). A method for large scale *in vitro* propagation of *Vitis*. New York's Food and Life Sciences Bulletin, No. 109. Geneva, NY: New York State Agricultural Experiment Station.
- ✓ Cholvadova, B. (1989). Cultivating of meristem cultures of the grapevine (*Vitis vinifera* L.). Acta facultatis renum naturalium universitatis comenianae, Physiologia plantarum. No 24, 31-44.
- ✓ Das, D. K., Reddy, M. K., Upadhyaya, K. C., and Sopory, S. K. (2002). An efficient leaf disk culture method for the regeneration via somatic embryogenesis and transformation of grape (*Vitis vinifera* L.). In: www.springer.de
- ✓ Deloire, A. , Charpentier, M., Berlioz, G., Colin, A., and Gimonet, G. (1995). Micropropagation of the grapevine: Results of 10 years of experiments in the champagne vineyard and results of the first vinification. Am. J. Eno. Vitic. 43: 571-578.
- ✓ Galzy, R. (1964). Techique de thermotherapie des viroses de la vigne. Ann. Epiphytol. 15: 245-256.
- ✓ Galzy, R. (1969). Recherchers sur la criossance de *Vitis rupestris* Scheele sain et court none cultivate *in vitro* a differentes temoeratures. Ann. Phytopathol., 1: 149-166.
- ✓ Galzy, R. (1977). Recherche d' un milieu permettant la culture *in vitro* des apex de *Vitis rupestris* comportant trois ebauches foliaires. In: R. J. Gautheret (Editor), Les cultures des tissus et des cellules des vegetaux. Masson, Paris, pp. 134-146.
- ✓ Galzy, R., Haffner, V., and Compan, D. (1990). Influence of three factors on the growth and nutrition of grapevine microcuttings. J. Exp. Bot. 41: 295-301.
- ✓ Gifford, E. M., and Hewitt, W. M. B. (1961). The use of heat therapy and *in vitro* shoot tip culture to eliminate fanleaf virus from the grapevine. Am. J. Enol. Vitic. 12: 129-135.
- ✓ Gmelin K. C. (1805). Flora Badensis Alsatica et confinium regionum Cis et Transrhenana plantas a lacu Botanico usque ad confluentem Mossellae et Rheni sponte nacentes exhibens. Karlsruhe 1: 543-545.

- ✓ Goussard, P. G. (1982). Morphological responses of shoot apices of grapevine cultured *in vitro*. Effect of cytokinins in routine subculturing. *Vitis* 21: 293-298.
- ✓ Gray, D. J., and Fisher, L.C. (1985). *In vitro* shoot propagation of grape species, hybrids and cultivars. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 98: 172-174.
- ✓ Gray, D. J., and Klein, C. M. (1987). *In vitro* shoot micropropagation and plant establishment of 'Orlando Seedless' grape and 'Tampa' rootstock. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 100: 308-309.
- ✓ Gray, D. J., and Klein, C. M. (1989). *In vitro* micropropagation and plant establishment of 'Blunc Du Bois' grape. *Proc. Fla. State Hort. Soc.* 102: 221-223.
- ✓ Gray, D.J. and Benton, C. M. (1991). *In vitro* micropropagation and plant establishment of muscadine grape cultivars (*Vitis rotundifolia*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture.* 27: 7-14.
- ✓ Grenan, S. (1977). Rhizogenese de bourgeons apicaux de boutures de vigne cultivées *in vitro*. *Connaissance Vigne Vin.* 13: 125-136.
- ✓ Haccious, B. and Lakshmanan, K. K. (1965). *Planta* 65: 102-104.
- ✓ Harris, R. E. and Stevenson, J. H. (1982). *In vitro* propagation of *Vitis*. *Vitis* 21: 22-32.
- ✓ Hasegawa, P. M., Murashige, T., Takatori, F. H. (1973). Propagation of asparagus through shoot apex culture. 2. Light and temperature requirements transability of plants and cytological-histological characteristics. *J. Am. Soc. Hort. Sci.* 98: 143-148.
- ✓ Hoefler, L. L., and Gifford, E. M. (1964). Growth *in vitro* of excised stem tips of *Vitis vinifera*. *Am. J. Bot.* 51: 677 (abstract).
- ✓ Huang, Z.G., Tan, S.Y., Li, S. J., Wang, Q. M., Shi, N. W., and Shen, J. C. (1990). *In vitro* rapid propagation and shoot apical meristem culture of grape. *J. Fruit Sci.* 7: 13-18.
- ✓ Jona, R. and Webb, K. J. (1978). Callus and auxillary bud culture of *Vitis vinifera* 'Sylvaner Riesling'. *Scientia Hort.* 9: 55-60.
- ✓ Katsirdakis, K. C. and Roubelakis-Angelakis, K. A. (1991). Callogenic potentially of leaf segments and shoot proliferation response of *Vitis spp.* genotypes. *J. Wine Research* 2: 83-95.

- ✓ Kessell, R. J. H. and Carr, A. H. (1972). Effect of dissolved oxygen concentration on growth and differentiation of carrot (*Daucus carota*) tissue. *J. Exp. Bot.* 23: 996-1007.
- ✓ Krul W. R and Myerson, J. (1980). *In vitro* propagation of grape. *In: Proc. Conf. Nursery Production of Fruit Plants through Tissue Culture-Application and Feasability*, U.S. Dep. Agric. Beltsville, MD, pp. 35-43.
- ✓ Krul, W. R. and Worley, J. F. (1977). Formation of adventitious embryos in callus cultures of ‘Seyval’, a French hybrid grape. *J. Am. Soc. Hort. Sc.* 102: 360-363.
- ✓ Kyte, L. and Kleyn, J. (1996). *Plants from test tubes*. Timber Press. Portland, Oregon.
- ✓ Lattin (De), G. (1939). Ueber den Ursprung und die Verbreitung der Reben Zuchter, 11: 217-225.
- ✓ Lee, N. and Wetzstein, H.Y. (1990). *In vitro* propagation and plant establishment of ‘Blunk du Bois’ grape. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 115: 324-329.,
- ✓ Leroux, R. (1968). *C. R. Acad. Sci.* 226: 106-108.
- ✓ Letouze, R. and Beauchesne, G. (1969). *C. R. Acad. Sci.* 269: 1528-1531.
- ✓ Li, Jia-Rui and Eaton, G.W. (1984). Growth and rooting of grape shoot apices *in vitro*. *HortScience* 19: 64-66.
- ✓ Lineberger, D. R. (2003). *In: www.aggie-horticulture.tamu.edu*
- ✓ Maene, L. J., and Debergh, P. C. (1983). Rooting of tissue cultured plants under *in vitro* conditions. *Acta Horticulturae* 212: 335-357.
- ✓ Marston, M. E. (1967). *Sci. Hort. J. Hort. Educ.* 19: 80-86.
- ✓ Martinez, E. and Tizio, R. (1989). Grapevine micropropagation through shoot tips and minicuttings from *in vitro* cultured one-node cuttings. *HortScience* 24: 513
- ✓ Mikkelsen, E. P., and Sink, K. C. (1978). *In vitro* propagation of Rieger Elatior begonias. *HortScience* 13: 242-244.
- ✓ Minas, G. J. (2002). *In vitro* propagation of ‘Veriko’ grape from apical meristem. *Miscellaneous reports 86*. Agricultural Research Institute Ministry of Agriculture, Natural Resources and the Environment, Nicosia Cyprus.

- ✓ Monette, P. L. (1983). Influence of size of culture vessel on *in vitro* propagation of grape in a liquid medium. *Plant cell, Tissue, and Organ Culture* 6: 73-82.
- ✓ Mudge, K.W., Larden, J. P., and Eckenrode, K. L. (1992). Effects of lighting and CO₂ enrichment on acclimatization of micropropagated woody plants. *In: Proceedings of the International Plant Propagators Society*. 42: 421-426.
- ✓ Mullins, M. G. and Srinivasan, C. (1976). Somatic embryos and plantlets from an ancient clone of the grapevine (cv Cabernet-Sauvignon) by apomixis *in vitro*. *J. Exp. Bot.* 27: 1022-1030.
- ✓ Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- ✓ Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue cultures. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 25: 135-166.
- ✓ Nakagawa, S., Tomoko Kazama, Horiuchi, S., and Yuda, E. (1983). Culture of grape ovary *in vitro*. *Acta Hortic.* 131: 259-.
- ✓ Nebel, B. J. and Naylor, A. W. (1968). *Am. J. Bot.* 55: 38-44.
- ✓ Norton, M. A. and Skirvin, R. M. (2001). Micropropagation of 'Norton' grape. *HortTechnology* 11: 206-208.
- ✓ Novak, F. J. and Juvova, Z. (1982/83). Clonal propagation of grapevine through *in vitro* axillary bud culture. *Sc. Hortic.* 18: 231-240.
- ✓ Pierik, R. L. M. (1997). *In vitro* culture of higher plants. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
- ✓ Planchon, J. E. (1887). Ambelideae in D.C. Suites au Prodromus systematis Naturalis. *Monographia Phanerogamarum*. Masson ed., Paris, 5: 305-654.
- ✓ Preece, J. E., and Sutter, E. G. (1991). Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. *In: Micropropagation, Technology and Application*, edited by P. C. Deberg and R. H. Zimmerman. Dordrecht: Kluwer Academic.
- ✓ Robacker, C.D. and Chang, C. J. (1992). Shoot tip culture of Muscadine grape to eliminate Pierce's disease bacteria. *HortScience* 27: 449-450.

- ✓ Roubelakis-Angelakis, K. A. and Katsirdakis, K.C. (1990). *In vitro* micromultiplication of grapevine: Effect of age, genotype and culture conditions on inducing of callus in *Vitis spp.* Leaf segments. p.89-95. *In*: R. Rodrigues, R. Tames, and D. J. Durzan (eds.). Plant aging: basic and applied approaches. Kluwer Academic, New York.
- ✓ Roubelakis-Angelakis, K. A. and Zinanovitch, S. B. (1991). A new culture medium for *in vitro* rhizogenesis of grapevine. HortScience 26: 1551-1553.
- ✓ Rui, J-R., and Eaton, G. W. (1984). Growth and rooting of grape shoot apices *in vitro*. HortScience 19: 64-66
- ✓ Seibert, M. (1973). *In vitro* 8: 435.
- ✓ Skoog, F. (1944). Am. J. Bot. 31: 19-24.
- ✓ Smith, E. F., Gribaudo, I., Roberts, A. V. and Mottley, J. (1992). Paclobutrazol and reduced humidity improve resistance to wilting of micropropagated grapevine. HortScience 27: 111-113.
- ✓ Srinivasan, C. and Mullins, M. G. (1980). Flowering in *Vitis*. Effects of genotype on cytokinin-induced conversion of tendrils into inflorescences. *Vitis* 19: 293-300.,
- ✓ Taiz, L. and Zeiger, E. (1998). Plant physiology. Sinauer. USA. pp 727.
- ✓ Tanne, E., Spiegel-Roy, P., and Shlamovitz, N. (1996). Rapid *in vitro* indexing of grapevine viral diseases: the effect of stress inducing agents on the diagnosis of leafroll. Plant. Dis. 80: 972-974.
- ✓ Toogood, A. (editor in chief) (1999). Propagating plants. pp 14-15. The royal horticultural society. London.
- ✓ Ueda, H. and Torikata, H. (1972). Am. Orchid Soc. Bull. 41: 322-327.
- ✓ Weis, J. S., and Jaffe, M. F. (1969). *Physiol. Plant.* 22: 171-176.
- ✓ Ziv, M. (1986). *In vitro* hardening and acclimation of tissue culture plants. *In*: Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications, edited by L. A. Withers and P. G. Alderson. London: Butterworth.
- ✓ Βλάχος Μ. Β. (1991). Αμπελογραφία. Θεσσαλονίκη
- ✓ Ελευθερίου, Ε. Π. (1994). Τεχνολογία φυτικού πολλαπλασιαστικού υλικού. Art of Text. Θεσσαλονίκη.
- ✓ Κανάκης, Α. Γ., και Σταυρακάκης, Μ. Ν. (1998/9). Αναγέννηση επίκτητων βλαστών από *in vitro* καλλιέργεια μεριστωματικών εκφύτων

μερικών ποικιλιών και υποκειμένων αμπέλου (*Vitis sp.*) καλλιεργούμενων στην Ελλάδα. Αγροτική Έρευνα 22: 13-20.

- ✓ Καραμπουρνιώτης, Γ. Α. (2003). Φυσιολογία καταπονήσεων των φυτών. Εκδόσεις Έμβρυο. Αθήνα. pp 38-39.
- ✓ Ποντίκης, Κ. Α. (1994). Πολλαπλασιασμός καρποφόρων δέντρων και θάμνων. Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα-Πειραιάς. pp 197-222.
- ✓ Ρουμπελάκη- Αγγελάκη, Κ. Α. (1998). Η αμπελουργία στην Κρήτη- Προβλήματα και προοπτικές. ΓΕΩΤ.Ε.Ε., Παράρτημα Κρήτης. Ηράκλειο Κρήτης.
- ✓ Ρούμπος, Ι. Χ. (1987). Έρευνες επί του ικτέρου της αμπέλου. Καλλιέργεια προσβεβλημένων μοσχευμάτων σε θρεπτικό υπόστρωμα. Γεωτεχνικά 1: 42-48.
- ✓ Σταυρακάκης, Μ. Ν. και Κανάκης, Α. Γ. (1997). Σύγχρονες μέθοδοι ταχέως αγενούς πολλαπλασιασμού μερικών ποικιλιών και υποκειμένων αμπέλου που καλλιεργούνται στην Ελλάδα. *In vitro* καλλιέργεια βλαστικών κορυφών. Γεωργική Έρευνα 21: 68-74.
- ✓ Συμινής, Ι. Χ. Μπινιάρη, Κ. και Σταυρακάκης, Ν. Μ. (1998/9). Μελέτη της μορφογένεσης *in vitro* σε ελληνικές ποικιλίες αμπελιού.



ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΘΕΣΣΑΛΙΑΣ



004000072228