ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ (Τ.Ε.Ι.)
ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΠΙΛΟΓΗΣ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗΣ ΓΕΩΡΓΙΑΣ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΦΥΤΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

ΘΕΜΑ

«*In vitro* καλλιέργεια γαρυφαλλιάς»

Πτυχιακή εργασία του σπουδαστή

ΜΑΛΑΜΑ ΠΕΡΙΚΛΗ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ, ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2003

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ (Τ.Ε.Ι)
ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΣΠΟΥΔΩΝ ΕΠΙΛΟΓΗΣ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΕΣ ΟΛΟΚΛΗΡΩΜΕΝΗΣ ΓΕΩΡΓΙΑΣ
ΚΑΤΕΥΘΥΝΣΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΦΥΤΙΚΟΥ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

ΘΕΜΑ

«*In vitro* καλλιέργεια γαρυφαλλιάς»

Πτυχιακή εργασία του σπουδαστή

ΜΑΛΑΜΑ ΠΕΡΙΚΛΗ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ

ΔΡ. ΚΑΝΑΚΗΣ ΑΝΔΡΕΑΣ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ, ΣΕΠΤΕΜΒΡΙΟΣ 2003

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Θέλω να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου Δρ. Α. Κανάκη για την απεριόριστη συμπαράσταση και καθοριστική βοήθειά του.

Επίσης θέλω να ευχαριστήσω το Τ.Ε.Ι. Καλαμάτας για την παραχώρηση του εργαστηρίου ιστοκαλλιέργειας, για την διεκπεραίωση της πτυχιακής μου εργασίας, το βοηθητικό προσωπικό του εργαστηρίου, τον καθηγητή κ. Γ. Ζακυνθινό και την εταιρεία ΑΦΟΙ Κωστελένου και ιδιαίτερα τον κ. Γ. Κωστελένο.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΘΕΩΡΗΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗΝ *IN VITRO* ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1ο ____ *2*

1.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ____ 2

1.2. ΓΕΝΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ____ 2

1.2.3. Τύποι καλλιεργειών κατά Pierik, 1987 ____ 4

1.3. ΤΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΑ ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΩΝ ΣΥΜΒΑΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ____ 6

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ____ *9*

2.1. ΚΑΤΑΓΩΓΗ – ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΓΑΡΥΦΑΛΛΟΥ ____ 9

2.2. ΒΟΤΑΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ____ 10

2.3. ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ____ 11

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ____ *13*

3.1. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ____ 13

3.2. ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΑΡΥΦΑΛΛΟΥ ΜΕ ΜΕΡΙΣΤΩΜΑΤΙΚΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ____ 15

3.3. ΧΤΙΣΙΜΟ ΚΑΙ ΣΧΕΔΙΟ ΧΩΡΟΥ ____ 17

3.4. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΥΛΙΚΩΝ ____ 19

3.5. ΠΕΡΙΟΧΗ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ____ 19

3.6. ΧΩΡΟΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ____ 20

3.7. ΘΕΡΜΟΚΗΠΟ ____ 20

3.8. ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ ____ 21

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ____ *30*

4.1. ΑΝΑΓΚΑΙΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΣΤΗ ΓΑΡΥΦΑΛΛΙΑ ____ 30

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ ____ 32

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ____ 33

ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΚΑΛΛΕΙΕΡΓΕΙΑΣ ____ 36

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ____ 40

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ ____ *48*

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ ____ *51*

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ____ *54*

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1°

1.1. ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Η θεωρία της ολοδυναμικότητας των φυτικών κύτταρων χρονολογείται από το 1838, όταν οι ερευνητές Schwann και Schleiden θεώρησαν ότι τα κύτταρα είναι αυτόνομα και αυτοδύναμα, έτσι ώστε να είναι δυνατή η παραγωγή ενός αναγεννημένου και ολοκληρωμένου φυτου. Παρ' όλα αυτά πέρασε τουλάχιστον ένας αιώνας ώσπου το 1939 οι ερευνητές Nobecourt, Gautheret (1942) και White να πετύχουν την πρώτη πραγματική ιστοκαλλιέργεια.

Ο Reinert το 1959 παρατήρησε την δημιουργία των λεγόμενων σωματικών εμβρύων που προέρχονται από διαίρεση και ανάπτυξη σωματικών κυττάρων. Αυτό αποδείχτηκε οριστικά το 1965 από τους Vasil και Hildebrandt, όταν από καλλιέργεια μεμονωμένων φυτικών κύτταρων παράχθηκαν έμβρυα που αναπτύχθηκαν και έδωσαν φυτά, τα οποία έφθασαν μέχρι την ανθοφορία.

Ο Morel στα 1960, πέτυχε με την καλλιέργεια μεριστωμάτων την εξυγίανση φυτών (ορχιδέα) από ιώσεις. Στα 1966 ο Iguha και Maheshwari κατόρθωσαν να αποκτήσουν τέλεια απλοειδή φυτα. Το 1971 οι Takebe, Labib και Melchers πέτυχαν την παραγωγή τέλειων φυτών από *in vitro* καλλιέργεια πρωτοπλαστών.

Από τότε η έρευνα έχει προχωρήσει με σκοπό την βελτίωση της γεωργικής παραγωγής και την προστασία του περιβάλλοντος.

1.2. ΓΕΝΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Η ικανότητα ανάκτησης ολόκληρων φυτών από καλλιεργούμενα φυτικά κύτταρα θεωρήθηκε σαν μια ικανοποιητική μέθοδος παραγωγής μεγάλου αριθμού

κλωνικών φυτών, δηλαδή φυτών με το ίδιο γενετικό υπόβαθρο. Πολλά εμπορικά εργαστήρια σήμερα χρησιμοποιούν την ιστοκαλλιέργεια, και ιδιαίτερα την καλλιέργεια ακραίων μεριστωμάτων βλαστών, για το γρήγορο και ακριβή πολλαπλασιασμό ενός μεγάλου αριθμού καλλωπιστικών φυτών.

Θεωρητικά όλα τα φυτικά κύτταρα έχουν την αναγκαία γενετική πληροφορία για ανάπτυξη και αναγέννηση ολόκληρων γόνιμων φυτων. Παρ' όλα αυτά όμως η μορφογενετική ικανότητα δεν είναι δυνατόν να εκφραστεί πάντα μέσα από την ολοδυναμικότητα όλων των φυτικών κύτταρων.

Σε γενικές γραμμές τρεις είναι οι παράγοντες που κυβερνούν την ικανότητα των φυτικών κύτταρων για την αναγέννηση ολοκληρωμένων φυτών:

- Ο γενότυπος των φυτών.
- Το οντογενετικό και αναπτυξιακό στάδιο του έκφυτου και
- Οι συνθήκες καλλιέργειας.

Ο *in vitro* μεριστωματικός πολλαπλασιασμός θεωρείται σήμερα ως η πλέον επιτυχημένη εμπορική μέθοδος ιστοκαλλιέργειας σε σχέση με την *in vitro* καλλιέργεια άλλων οργάνων (πρωτοπλαστών, ωοθηκών, φύλλων, κ.λπ.).

Αυτή η τεχνική εφαρμόστηκε στην δεκαετία του 1950 και είχε ως σκοπό να απαλλάξει διάφορα είδη και ποικιλίες φυτών μεγάλου οικονομικού ενδιαφέροντος από τις ιώσεις. Η υγειονομική κατάσταση αυτών των φυτών ήταν απαγορευτική για την αναπαραγωγή τους με τους παραδοσιακά χρησιμοποιούμενους τρόπους, για δυο κυρίως λόγους:

- Τη χαμηλή απόδοση, οφειλόμενη στην δράση των παράσιτων.
- Την πηγή των επιδημιών που παρουσίαζε η καλλιέργεια.

Με τον όρο *in vitro* πολλαπλασιασμό σε θεωρητικό επίπεδο, εννοούμε τις διαδοχικές μιτωτικές διαιρέσεις που οδηγούν στον αγενή πολλαπλασιασμό, σε αντίθεση με τον εγγενή που περιλαμβάνει την διαδικασία της μειωτικής διαίρεσης των κύτταρων.

Για τους φυτωριούχους ο αγενής *in vitro* πολλαπλασιασμός έχει μια έννοια: την επιτυχημένη αναπαραγωγή κλώνων, ποικιλιών και ειδών που έχουν τα ίδια χαρακτηριστικά (βιολογικά, φυσιολογικά, αγρονομικά) γεγονός που επιτρέπει την παραγωγή φυτών ομοιότυπων με τον αρχικό επιλεγμένο γενότυπο. Ο αγενής

πολλαπλασιασμός επιτρέπει την διατήρηση των χαρακτηριστικών του επιλεγμένου φυτού, ενώ ο πολλαπλασιασμός με σπόρους αυτών των φυτών (που είναι συνήθως υβρίδια) δεν μας δίνει τη δυνατότητα να βρίσκουμε πάντα μέσα στις επόμενες γενιές τους ακριβείς χαρακτήρες των προγόνων τους.

Η τεχνική του *in vitro* αγενούς πολλαπλασιασμού εφαρμόστηκε κυρίως σε φυτά που ο πολλαπλασιασμός τους με τις κλασικές μεθόδους (και ειδικότερα εκείνος των μοσχευμάτων) ήταν αργός ή και αδύνατος. Παλαιότερα ο *in vitro* πολλαπλασιασμός δεν βρήκε ανταπόκριση σε φυτά τα οποία πολλαπλασιάζονται εύκολα με μοσχεύματα. Σήμερα όμως και στα φυτά αυτά η μέθοδος μικροπολλαπλασιασμού είναι συμφέρουσα διότι επιταχύνει την κλωνική παραγωγή λόγω της σημαντικής αύξησης του ρυθμού πολλαπλασιασμού. Ένα επιπλέον πλεονέκτημα της μεθόδου είναι ότι μπορούμε να διατηρούμε σε ένα πολύ μικρό χώρο μεγάλες ποσότητες φυτών ή μικρομοσχευμάτων αποφεύγοντας την χρησιμοποίηση μεγάλων εκτάσεων γης που απαιτούν τα φυτώρια.

Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα κατηγοριοποιούνται παρακάτω.

1.2.3. Τύποι καλλιεργειών κατά Pierik, 1987

• Καλλιέργεια ολόκληρων φυτών: ένας σπόρος μπορεί να σπαρεί *in vitro* και θα αναπτυχθεί σε ένα σπορόφυτο (π.χ. ορχιδέα).

• Καλλιέργεια εμβρύων: ένα έμβρυο απομονώνεται από ένα σπόρο, και αναπτύσσεται σε ένα τεχνητό υπόστρωμα σε συνθήκες ασηψίας.

• Καλλιέργεια οργάνων: ένα φυτικό όργανο, όπως κορυφή βλαστού, κορυφή ρίζας ή ανθήρας, απομονώνεται και καλλιεργείται *in vitro*.

• Καλλιέργεια ιστών: ένας ιστός, όπως για παράδειγμα μερίστωμα, κάμβιο, εντεριώνη, αγγεία ξύλου, ιθμώδης ιστός, απομονώνεται και καλλιεργείται *in vitro*.

• Καλλιέργεια κάλου: αν ένας διαφοροποιημένος ιστός απομονωθεί και καλλιεργηθεί *in vitro* παράγεται μια μάζα αδιαφοροποίητων κύτταρων που ονομάζεται κάλος.

• Καλλιέργεια κύτταρων: είναι η καλλιέργεια μεμονωμένων κύτταρων σε πηκτή αγαρόζη η σε υγρά διαλύματα με μορφή αιωρημάτων.

• Καλλιέργεια πρωτοπλαστών: οι πρωτοπλάστες αυτοί λαμβάνονται από κύτταρα, μετά από μηχανική ή ενζυμική καταστροφή του κυτταρικού τοιχώματος και καλλιεργούνται για τη δημιουργία υβριδίων, την εισαγωγή στον πρωτοπλάστη ξένου γενετικού υλικού κ.α.

• Σωματική εμβρυογένεση: έμβρυα παράγονται *in vitro* από σωματικά κύτταρα και στην συνεχεία με κατάλληλους χειρισμούς παράγονται φυτά.

Σύμφωνα με άλλους ερευνητές έχουμε την εξής διάκριση:

- οργανωμένες δομές
- μη οργανωμένες δομές
- μη οργανωμένες /οργανωμένες δομές

• **Οργανωμένες**. Η καλλιέργεια ολόκληρων φυτών, έμβρυα, σπόροι, και η καλλιέργεια οργάνων ανήκουν σ' αυτόν τον τύπο καλλιεργειών *in vitro*. Η χαρακτηριστική οργανωτική δομή του φυτού ή του μεμονωμένου οργάνου διατηρείται και η καλλιέργεια μοιάζει με *in vivo* αγενή πολλαπλασιασμό μοσχευμάτων.

• **Μη οργανωμένες**. Αν τα κύτταρα και οι ιστοί που απομονώνονται από ένα οργανωμένο μέρος του φυτού, αποδιαφοροποιούνται καλλιεργούμενα *in vitro* και προκύπτει από αυτά μια μη οργανωμένη μάζα κυττάρων (κάλος). Αν ο κάλος διασπασθεί προκύπτουν ομάδες κύτταρων (aggregates) ή μεμονωμένα κυτταρα. Αυτά επωάζονται είτε σαν καλλιέργεια «εν αιωρήσει» (suspension culture) ή σε ημιστερεά διαλύματα και παράγονται τέλεια φυτά.

Η μη οργανωμένη αναπαραγωγή φυτικών ιστών και κύτταρων υποκινείται κυρίως με την χρήση πολύ υψηλών συγκεντρώσεων αυξίνης και κυτοκινίνης στο θρεπτικό υπόστρωμα.

Η γενετική σταθερότητα των μη οργανωμένων καλλιεργειών είναι συχνά χαμηλή.

• **Μη οργανωμένες /οργανωμένες**. Αυτός ο τύπος των καλλιεργειών είναι ενδιάμεσος μεταξύ των προηγούμενων τύπων. Κύτταρα από ένα απομονωμένο όργανο ή ιστό, πρώτα αποδιαφοροποιούνται και μετά σχηματίζουν με διαίρεση,

ιστούς ή ένα στρώμα κάλου από τα οποία αναπτύσσονται διάφορα όργανα (ρίζες ή βλαστοί) ή ακόμα και ολόκληρα φυτά (έμβρυα ή προέμβρυα). Πρέπει να ληφθεί υπόψη ότι οργανωμένοι ιστοί μπορεί να αναπτυχθούν από οργανωμένες καλλιέργειες με τη χρήση ειδικών τεχνικών ή εντελώς τυχαία. Σε όλες αυτές τις περιπτώσεις οι απόγονοι δεν είναι συχνά ακριβώς όμοιοι με το αρχικό φυτικό υλικό.

Οι μέθοδοι του *in vitro* πολλαπλασιασμού μπορούν να θεωρηθούν σαν τρεις και αντιστοιχούν στην παρακάτω ιεράρχηση ανάλογα με τις δυσκολίες χρησιμοποίησης τους:

- Η καλλιέργεια των μεριστωμάτων ή βλαστικών κορυφών.
- Η ανασύσταση φυτών από νεοσχηματισμό βλαστών και ριζών πάνω σε κάλο.
- Η σωματική εμβρυογένεση.

Οι δυο τελευταίες μέθοδοι αποτελούν και σήμερα αντικείμενο βασικής έρευνας και δεν μπορούμε να μιλάμε για χρησιμοποίησή τους στην πράξη για πολλαπλασιασμό φυτών, που να διατηρούν τα χαρακτηριστικά του μητρικού φυτού. Αντίθετα η πρώτη μέθοδος έχει περάσει στην καθημερινή πρακτική και για πολλά είδη κυρίως στα ποώδη φυτά έχει αντικαταστήσει τις συμβατικές μεθόδους πολλαπλασιασμού.

1.3. ΤΑ ΣΗΜΑΝΤΙΚΟΤΕΡΑ ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΗΣ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΕΝΑΝΤΙ ΤΩΝ ΣΥΜΒΑΤΩΝ ΜΕΘΟΔΩΝ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ

- Η κλωνική αναπαραγωγή των μητρικών φυτών, δηλαδή η παραγωγή γενετικά όμοιων φυτών απογόνων, κυρίως όταν χρησιμοποιούνται μεριστωματικά έμφυτα.
- Η αυξημένη παραγωγή φυτών σε σύντομο χρονικό διάστημα.
- Με την καλλιέργεια ενός και μόνο έμφυτου μπορούν να παραχθούν, με συνεχείς υποκαλλιέργειες, πολλές εκατοντάδες χιλιάδες φυτά ετησίως.

- Η εξοικονόμηση χώρου. Επιφάνεια 100 τ.μ. είναι επαρκής για την παραγωγή ενός εκατομμυρίου φυτών ετησίως, ενώ θα απαιτείτο επιφάνεια κάποιων στρεμμάτων για την παραγωγή των ίδιων φυτών.
- Η αποδέσμευση της παραγωγής από εξωτερικές περιβαλλοντολογικές συνθήκες και περιορισμούς και παραγωγή φυτικού υλικού όλο τον χρόνο.
- Όλη η διαδικασία της ιστοκαλλιέργειας πραγματοποιείται σε κλειστό εργαστηριακό χώρο.
- Η παραγωγή άνοσου φυτικού υλικού.

Απαραίτητες προϋποθέσεις

Κατά την *in vitro* διαδικασία παραγωγής νέων μεριστωμάτων ή σωματικών εμβρύων υπάρχει ελάχιστη ή καθόλου αγγειακή σύνδεση με τους μητρικούς ιστούς. Έτσι θεωρητικά τα νεοσχηματιζόμενα ως άνω όργανα είναι απαλλαγμένα από ιώσεις, οι οποίες πιθανόν έχουν προσβάλλει τους μητρικούς ιστούς. Στην πράξη, επειδή η απομόνωση κορυφαίων μεριστωμάτων για να χρησιμοποιηθούν ως έκφυτα είναι δύσκολη και χρονοβόρα διαδικασία, αποσπώνται μεγαλύτερα τμήματα βλαστικών κορυφών που ενδεχομένως περιέχουν και ιούς. Για την ελαχιστοποίηση του κινδύνου μετάδοσης των ιώσεων γίνεται συνδυασμός θερμοθεραπείας ή και χημειοθεραπείας με *in vitro* καλλιέργεια αυτών των κορυφών. Η θερμοθεραπεία ή η χημειοθεραπεία εφαρμόζονται στο φυτό – δότη των έκφυτων και όχι στα ίδια τα έκφυτα κατά τη διάρκεια της *in vitro* καλλιέργειας.

Για πολλά φυτικά είδη, ο μικροπολλαπλασιασμός εξακολουθεί να είναι μοναδική μέθοδος πολλαπλασιασμού.

Η διατήρηση φυτικών ειδών σε τράπεζα γενετικού υλικού, έτσι ώστε να μπορούμε να διατηρήσουμε σε περιορισμένο χώρο, το γενετικό υλικό, πολλών ποικιλιών και κλώνων, χωρίς να υπάρχει η ανάγκη να περάσουμε από τον αγρό.

Τέλος διάφορες *in vitro* τεχνικές χρησιμοποιούνται για γενοτυπικό μετασχηματισμό (βελτίωση φυτών), παραγωγή βιοχημικών προϊόντων και άλλες

εφαρμογές (π.χ. συγχώνευση πρωτοπλαστών για δημιουργία πολυπλοειδικών φυτών κ.λπ.).

Τα σημαντικότερα μειονεκτήματα της ιστοκαλλιέργειας

- Η εκτεταμένη μόλυνση των καλλιεργειών, κυρίως όταν δεν υπάρχουν ασηπτικές συνθήκες.
- Η υαλοποίηση (υάλωση) των *in vitro* αναγεννώμενων φυτών, δηλαδή η υπερυδρωτική παραμόρφωση αυτών λόγω των ειδικών συνθηκών της *in vitro* ανάπτυξης.
- Η χαμηλή βιωσιμότητα των *in vitro* παραχθέντων φυτών, που οφείλεται κυρίως στην δυσκολία προσαρμογής ορισμένων φυτικών ειδών κατά τη μετάβαση από την ετεροτροφική ανάπτυξη *in vitro*, στη αυτοτροφική.
- Η μη κλωνική αναπαραγωγή, όταν δεν χρησιμοποιούνται μεριστωματικά έκφυτα (σωμακλωνική παραλλακτικότητα).
- Η μη επιτυχής αναγέννηση πλήρων φυτών από έκφυτα ορισμένων φυτικών ειδών.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

2.1. ΚΑΤΑΓΩΓΗ – ΕΞΕΛΙΞΗ ΤΟΥ ΓΑΡΥΦΑΛΛΟΥ

Το γαρύφαλλο ή γαρυφαλλιά ή γαρουφαλλιά ονομάζεται *Dianthus caryophyllus* και ανήκει στην οικογένεια *Caryophyllaceae*.

Το γένος *Dianthus* περιλαμβάνει περίπου 300 είδη ετήσιων ή πολυετών φυτών, ιθαγενών της Ευρώπης, των περιοχών της Μεσογείου, της Ασίας και των βουνών της τροπικής και νότιας Αμερικής.

Το *Dianthus caryophyllus* είναι ιθαγενές φυτό των χωρών της Μεσογείου και ειδικότερα της Ελλάδας, όπου καλλιεργήθηκε τουλάχιστον πριν 2000 χρόνια, λαμβανομένου υπόψη ότι ο Θεόφραστος αναφέρει την καλλιέργειά του το 300 π.Χ. Έχει $2\chi = 30$ χρωμοσώματα.

Η βελτίωσή του όμως άρχισε μόλις το 1600, ενώ η κύρια γενετική εργασία, δηλαδή διασταυρώσεις και επιλογή, είχε αφετηρία το 1840 στη Γαλλία, όπου ο Γάλλος ανθοκόμος Dalais δημιούργησε τον τύπο του γαρύφαλλου συνεχούς άνθησης και μεγαλύτερου μεγέθους. Ο υβριδισμός συνεχίστηκε για αρκετά χρόνια και το 1866 δημιουργήθηκε το γαρύφαλλο με στέρεο ανθικό στέλεχος.

Ενώ αυτά γίνονται στην Ευρώπη, το 1938 εμφανίζεται στις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής η πρώτη ποικιλία William Sim με κόκκινο χρώμα, από την οποία με μεταλλάξεις δημιουργούνται οι ποικιλίες William Sum με λευκό, ρόδινο, πορτοκαλί και αλλά χρώματα, που χαρακτηρίζονται για τα μεγάλα τους άνθη με μεγαλύτερη ποικιλία χρωμάτων και τα μακριά και ισχυρά τους ανθικά στελέχη.

Η δημιουργία των ποικιλιών William Sim που άρχισαν να εξάγονται από τις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής στον υπόλοιπο κόσμο το 1947, αποτελεί σημαντικό σταθμό στην ιστορία της καλλιέργειας του γαρύφαλλου. Κατά τον Steven Baley καμία άλλη ποικιλία δεν είχε τόση μεγάλη επίδραση στην καλλιέργεια οποιουδήποτε άνθους, όσο είχαν οι αμέτρητες μεταλλάξεις που προέκυψαν από την William Sim στην καλλιέργεια του γαρύφαλλου.

Η επιχειρηματική καλλιέργεια του γαρύφαλλου για την παραγωγή κομμένου άνθους, τόσο στο ύπαιθρο αλλά ιδίως στο θερμοκήπιο, αρχίζει από τις Ηνωμένες Πολιτείες Αμερικής αμέσως μετά το Β΄ παγκόσμιο πόλεμο (1941-1945) και επεκτείνεται γρήγορα στο Μεξικό, την Κολομβία, την Αυστραλία, την Κένυα, τη Νότια Γαλλία, την Ιταλία, την Ισπανία, το Ισραήλ και αλλού.

Στην Ελλάδα άρχισε να καλλιεργείται μόλις το 1960, σε πολύ μικρή έκταση. Σημερα όμως, έπειτα από 30 χρόνια, έχει διαδοθεί αρκετά η καλλιέργεια στην Κρήτη, Πελοπόννησο, Αττική και περιφέρεια Θεσσαλονίκης, ώστε να εξάγονται γαρύφαλλα στο εξωτερικό με αρκετό συναλλαγματικό κέρδος.

Καλλιεργούνται τόσο οι γαλλικές ποικιλίες της Νίκαιας, όσο και οι Αμερικανικές, οι περισσότερες από τις οποίες είναι μεταλλαγές της William Sim, γιατί οι τελευταίες αν και είναι ευπαθέστερες στις ασθένειες, υπερτερούν των Γαλλικών, αφού δίνουν ωραιότερα και μεγαλύτερα άνθη, μεγαλύτερη ποικιλία χρωμάτων, στέρεο κάλυκα, μακρύτερο και ισχυρότερο ανθικό στέλεχος και ανθοφορούν συνέχεια.

Ωστόσο όμως, η καλλιέργεια της γαρυφαλλιάς στην Ελλάδα, απέχει πολύ από την τελική δυναμική της μορφή, γιατί υπάρχουν τεράστιες ακόμη δυνατότητες βελτίωσης και επέκτασής της.

2.2. ΒΟΤΑΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Φυτό ποώδες, πολυετές, ημιξυλοποιημένο, πυκνής μάλλον βλάστησης, ύψους 40-80 εκ. συνήθως, με στελέχη ίσια, κατακόρυφα και γωνιώδη, ανοικτού πράσινου χρωματισμού, που έχουν πολλά διογκωμένα γόνατα.

Έχει φύλλα απλά, αντίθετα, επιμήκη, στενά και λογχοειδή, ανοικτού πράσινου ή γαλαζοπράσινου χρωματισμού, που εκφύονται ανά δύο σε κάθε κόμβο του στελέχους, μήκους 10-12 cm ή και περισσότερο και πλάτους 3-5 mm.

Παράγει αρωματικά και μεγάλα άνθη, διαμέτρου 4-8 cm, με πολλές σειρές πετάλων, ίσιων ή κατσαρών, οδοντωτών στην περιφέρεια, λευκού, κίτρινου, ρόδινου, κόκκινου, πορφυρού και άλλων χρωματισμών. Ο κάλυκας αποτελείται

από 4-5 σέπαλα, συμφυή ή χωρισμένα. Η στεφάνη αποτελείται από 4-5 πέταλα τα οποία εναλλάσσονται με τα σέπαλα. Τα πέταλα είναι ακέραια, δισχιδή, οδωντοτά ή λείπουν τελείως. Οι στήμονες είναι ισάριθμοι ή διπλάσιοι των πετάλων (5-10) σπάνια λιγότεροι, η ωοθήκη είναι επιφυής, η στίλοι είναι 2-5 σπάνια ένας.

Η ωοθήκη είναι μονόχωρη και έχει 2 καρπόφυλλα. Ο καρπός είναι κάψα.

Το ριζικό σύστημα είναι βαθύ και πυκνό, αποτελούμενο από μια πασσαλωτή ρίζα που φθάνει το βάθος των 40 cm ή και περισσότερο και περιβάλλεται από πολλά ριζικά τριχίδια, που εκμεταλλεύονται πολύ καλά και την ελάχιστη υγρασία ξηρών εδαφών. Για το λόγο αυτό η γαρυφαλλιά αντέχει στην ξηρασία.

2.3. ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ

Το γαρύφαλλο πολλαπλασιάζεται με σπόρο, καταβολάδες μοσχεύματα και με ιστοκαλλιέργεια.

Με σπόρο. Ο τρόπος αυτός πολλαπλασιασμού χρησιμοποιείται κυρίως από τους γενετιστές για τη δημιουργία νέων ποικιλιών ή από ανθοκαλλιεργητές που θέλουν να δημιουργήσουν ποικιλίες με επιλογή.

Η σπορά γίνεται τον Αύγουστο – Σεπτεμβριο. Τα σπορόφυτα μεταφυτεύονται τον Οκτώβριο – Νοέμβριο σε αποστάσεις 30-40 cm όταν αποκτήσουν 6-8 πραγματικά φύλλα και ανθίζουν την άνοιξη και το καλοκαίρι συνέχεια.

Σε ψυχρά όμως κλίματα όπου η θερμοκρασία κατεβαίνει αρκετούς βαθμούς κάτω από το μηδέν, καλύτερα είναι η σπορά να γίνεται το Μάρτιο – Απρίλιο, οπότε τα σπορόφυτα μεταφυτεύονται τον Απρίλιο – Μάιο και ανθίζουν το καλοκαίρι.

Με καταβολάδες. Ο τρόπος αυτός εφαρμόζεται σε ποικιλίες που διαθέτουν ευλύγιστους βλαστούς. Για το σκοπό αυτό, παίρνονται βλαστοί μονοετείς που έχουν τμήμα σκληρού ξύλου και λυγίζονται σε αυλάκια βάθους 5 εκ. περίπου. Στερεώνονται με ξύλινο δίχαλο και σκεπάζονται με ελαφρό αμμώδες έδαφος.

Έπειτα από 4-5 εβδομάδες θα ριζοβολήσουν, οπότε μπορούν να κοπούν από το μητρικό φυτό και να φυτευτούν στην οριστική τους θέση στον ερασιτεχνικό ανθόκηπο σε γραμμικές γαιοσωρεύσεις, κοινώς σαμάρια, ύψους 10 εκ. περίπου, στον εμπορικό ανθόκηπο. Διευκολύνεται η ριζοβολία των βλαστών εάν γίνουν τομές με εμβολιαστήρι ή με κοφτερό μαχαιράκι στο τμήμα του βλαστού που βρίσκεται στο έδαφος.

Με μοσχεύματα. Ο πολλαπλασιασμός με μοσχεύματα γίνεται όταν επιζητείται η απόκτηση μεγάλου αριθμού φυτών, που αποδίδουν πιστά τα χαρακτηριστικά μιας ποικιλίας, δηλαδή είναι ο κύριος τρόπος πολλαπλασιασμού σε επιχειρηματική καλλιέργεια γαρύφαλλου.

Η ορθή επιλογή μοσχευμάτων, αποτελεί εγγύηση επιτυχίας σε μια καλλιέργεια γαρύφαλλου, που προϋποθέτει την παρακολούθηση των φυτών για αρκετούς μήνες, τα οποία θα πρέπει να έχουν μεγάλη παραγωγικότητα, καλά ανθικά στελέχη, καλή ποιότητα ανθέων και να είναι ανθεκτικά στις διάφορες μυκητολογικές και εντομολογικές προσβολές. Έτσι τα μητρικά φυτά από τα οποία θα ληφθούν τα μοσχεύματα, θα πρέπει να φυτευτούν σε απολυμασμένο και καλής φυσικής και χημικής σύστασης έδαφος, που θα προεξοφλεί την ικανοποιητική ανάπτυξη των φυτών για την παραγωγή πολλών και υγιών μοσχευμάτων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

3.1. ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Η διαδικασία παραγωγής υγιών φυτών απαλλαγμένων από ιούς, τα οποία θα χρησιμοποιηθούν σαν φυτομάνες ή θα χρησιμοποιηθούν για κλωνικό αναπολλαπλασιασμό, θα περιγραφεί παρακάτω.

Ορισμένες ποικιλίες που χρησιμοποιούνται στο εμπόριο σήμερα για καλλιέργεια της γαρυφαλλιάς είναι

Α. ποικιλίες Sim

- Red Sim
- White Sim
- Socing Sim
- Pinc Discovery
- Oregon
- Atlanta
- Victoria

Β. Μεσογειακές ποικιλίες

- Pallas
- Candy
- Triymph
- Corso
- Cardinale
- Scania
- Valentino

Γ. Ποικιλίες Miniature

- Royalette
- Sam's Print
- Syndance
- Bolero

- Iceberg
- Promenade
- May Britt

Η καλλιέργεια γαρύφαλλου είναι μια από τις σημαντικότερες ανθοκομικές καλλιέργειες στον κόσμο. Κύριες παραγωγικές περιοχές βρίσκονται στην Ευρώπη, τη Βόρεια και Νότια Αμερική και την Ανατολική Ασία.

Οι συμβατοί τρόποι πολλαπλασιασμού του γαρύφαλλου είναι με σπόρους, μοσχεύματα και καταβολάδες. Από αυτές τις τρεις εμπορικά εφαρμόζεται η μέθοδος με μοσχεύματα.

• Οργανογένεση από καλλιέργειες κάλου

Σχηματισμός κάλου στο γαρύφαλλο έχει αναφερθεί σε έκφυτα από τους εξής ιστούς ή όργανα:

Α) Από κορυφές βλαστών (Haocket και Anderson 1967. Kakehi 1970, Earie και Lauhans 1974 και 1975, Petru και Landa 1974).

Β) Από βλαστό ή τμήματα εντεριώνης (Kakehi 1970, Engvild 1972).

Γ) Από υποκοτύλιο (Deburgu 1972, Malzewska κ.α. 1979).

Χρησιμοποιηθήκε ως μέσον το θρεπτικό διάλυμα MS (Murashige and Skoog, 1962) συμπληρωμένο με αυξίνη μόνο ή σε συνδυασμό με κυττοκινίνη. Ακόμα η συγκέντρωση ανόργανων αλάτων έπαιξε σημαντικό ρόλο για την δευτερεύουσα καλλιέργεια του ιστού κάλου.

Για της συνθήκες που θεωρούνται ικανοποιητικές έχουν βρεθεί για το pH 5.5-5.7 και για την θερμοκρασία από 20°C ως 26°C (Hauzinska κ.α. 1975), ενώ η επίδραση του φωτός όσον αφορά την έντασή του και την φωτοπερίοδο δεν έδειξε κάποια συγκεκριμένη επίδραση παρά μόνο ότι υπήρξε εθισμός του κάλου σε κόκκινο φως και στο απόλυτο σκοτάδι (Gimeli 1983, 1984).

• Μεριστωματικός πολλαπλασιασμός γαρυφαλλιάς

Η παραγωγή φυτών με μεριστωματικό πολλαπλασιασμό είναι μια πολύπλοκη διαδικασία που απαιτεί πολλά βήματα ή στάδια. Ο Murashige πρώτος πρότεινε την διαίρεση της διαδικασίας σε 4 ξεχωριστά σταδία που καθένα έχει

συγκεκριμένες απαιτήσεις και θεωρήσεις (Murashige 1974, 1978). Συγκεκριμένα τα στάδια αυτά είναι τα εξής:

α) Στάδιο προετοιμασίας,

β) Στάδιο ανάπτυξης της καλλιέργειας και πολλαπλασιασμού φυτών.

γ) Στάδιο ριζοβολίας,

δ) Στάδιο προσαρμογής στις συνθήκες *in vivo*.

Αυτή η διαίρεση έχει υιοθετηθεί και χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα στην βιομηχανία μικροαναπαραγωγής. Ως το στάδιο (γ) (στάδιο ριζοβολίας) χρησιμοποιούνται συνθήκες *in vitro* ενώ το τελευταίο στάδιο γίνεται σε θερμοκηπιακό περιβάλλον (Debergh και Maene 1981). Η υιοθέτηση αυτής της ορολογίας απλοποιεί όχι μόνο την ημερήσια λογιστική εργασία και ανάλυση κόστους προϊόντος από μια εμπορική εγκατάσταση αλλά ακόμη επιτρέπει μεγαλύτερη ευχέρεια στην επικοινωνία με τους πελάτες καθώς και με τα άλλα εργαστήρια. Για παράδειγμα ένα ειδικό φυτό μπορεί να εμπορευθεί ή να ζητηθεί ως το στάδιο (γ) (στάδιο ριζοβολίας).

3.2. ΟΡΓΑΝΩΣΗ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΓΑΡΥΦΑΛΛΟΥ ΜΕ ΜΕΡΙΣΤΩΜΑΤΙΚΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ

Η κατάσταση η οποία επικρατεί σήμερα στην φυτωριακή παραγωγή είναι αυτή η οποία επιβάλλει την ίδρυση μονάδων παραγωγής πολλαπλαστικού υλικού προηγμένης τεχνολογίας όπως *in vitro* παραγωγή πολλαπλασιαστικού υλικού. Και αυτό γιατί σήμερα στα φυτώρια που λειτουργούν δεν γίνεται κανένας έλεγχος, πλην ελάχιστων περιπτώσεων, και ο Έλληνας παραγωγός προμηθεύεται φυτωριακό υλικό χαμηλής ποιότητας, αναξιόπιστο και απιστοποίητο.

Και βέβαια είναι εμφανής η ζημία την οποία μπορούν να προκαλέσουν τέτοιου είδους φυτωριακές μονάδες, οι οποίες λειτουργούν ανεξέλεγκτα, αρκεί να σκεφτεί κανείς ότι η μετάδοση των ασθενειών σε αμόλυντες περιοχές είναι εύκολη και παράλληλα υπάρχει χάσιμο χρόνου παραγωγής και χρημάτων από τους παραγωγούς. Η ζημία αυτή γίνεται ακόμη πιο μεγάλη αν σκεφτούμε το πόσο καθοριστικός παράγοντας στην εξέλιξη και βιωσιμότητα μιας ανθοκομίας

θεωρείται το φυτωριακό υλικό κυρίως των δρεπτών ανθέων, λόγω μεγέθους, χρώματος, κ.λπ.

Όσες φορές αυτός ο παράγοντας παραμελήθηκε από τους παραγωγούς είχε καταστροφικό αποτέλεσμα για την εκμετάλλευση. Γενικά το φυτωριακό υλικό πρέπει να ανταποκρίνεται στην ποικιλία, να είναι απαλλαγμένο από ασθένειες (ιώσεις, μυκοπλασμώσεις κ.λπ.) και να παρουσιάζει μια κανονική ομοιομορφία.

Ένας άλλος σοβαρός λόγος είναι ο υπερβολικός αριθμός εισαγωγών πολλαπλασιαστικού υλικού.

Η ίδρυση λοιπόν τέτοιων μονάδων θα συμβάλλει στη διασφάλιση της εσωτερικής αγοράς καθώς και τη σταθερή και πλήρη κάλυψη των αναγκών των καλλιεργητών σε πολλαπλασιαστικό υλικό.

Στην *in vitro* καλλιέργεια το σημαντικότερο πρόβλημα είναι η μόλυνσή της κυρίως με περιβαντολογικούς μύκητες και σε μικρότερο βαθμό με βακτήρια. Για την αποφυγή τέτοιων καταστάσεων πρέπει να τηρούνται τα παρακάτω:

Η επιτυχία μιας εμπορικής μικροαναπαραγωγικής επιχείρησης στηρίζεται σε μεγάλο βαθμό στο σχέδιο και την περιοχή της εγκατάστασης. Οι βασικές αρχές συμπεριλαμβάνουν ειδικές περιοχές και εξοπλισμούς για την προετοιμασία των καλλιεργητικών υλικών, την αποστείρωση και αποθήκευση, τον καθαρισμό, την έναρξη και την ανάπτυξη της κύριας και της δευτερεύουσας καλλιέργειας. Επίσης προβλέπονται ειδικοί χώροι, για τη φύτευση, τον εγκλιματισμό και την εγκατάσταση των παραγόμενων φυτών καθώς και για τη συσκευασία και τη μεταφορά (Broome 1986, Browh και Thrope 1984, Kyte 1983).

• **Γενικά**

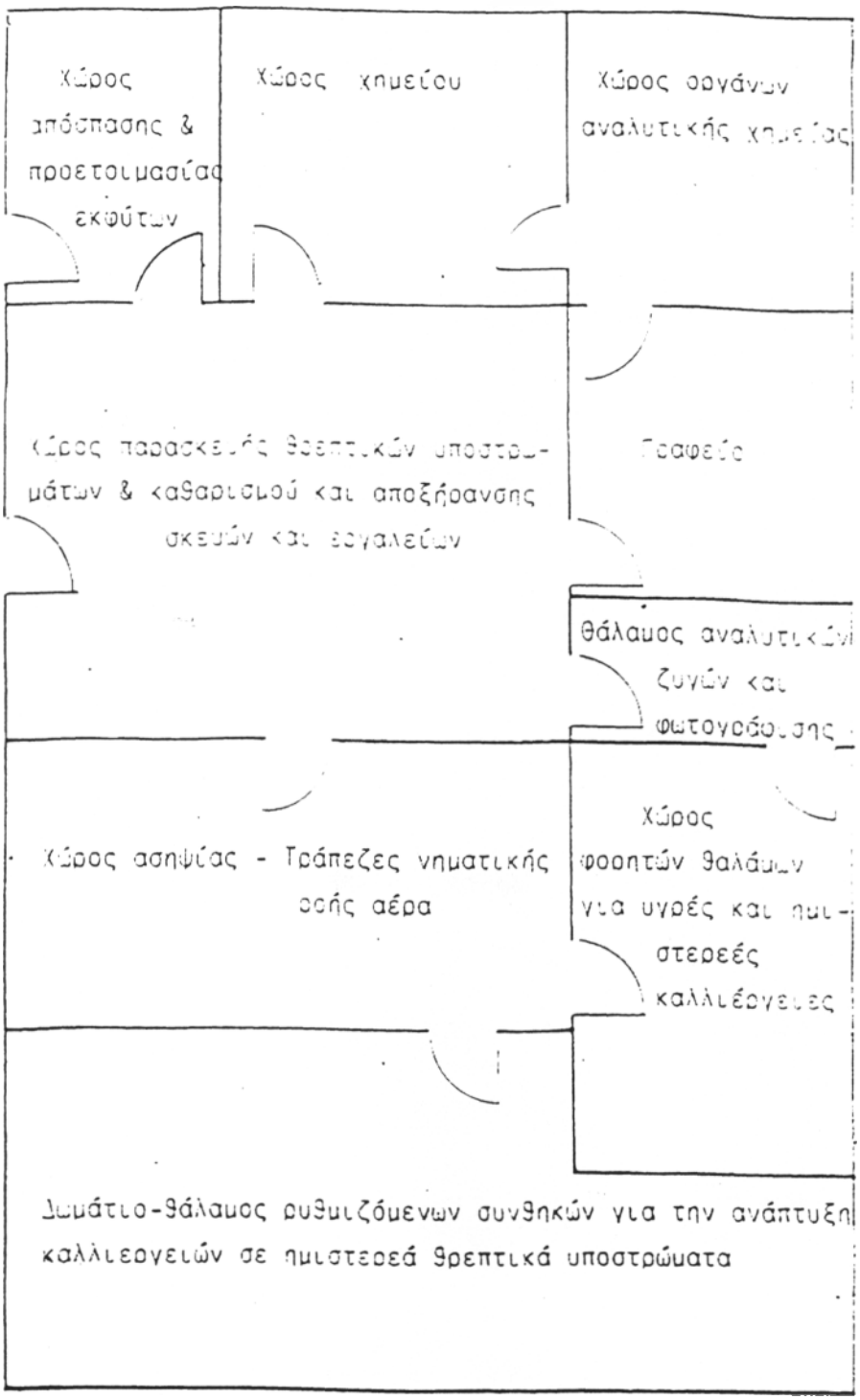
α) **Τοποθεσία**. Ειδικά όταν πρόκειται να δημιουργηθεί μια καινούργια εγκατάσταση θα πρέπει να γίνει προσεκτική επιλογή της τοποθεσίας. Αυτή η απόφαση μπορεί να έχει σημαντική επίδραση στην τελική επιτυχία της επιχείρησης. Σημαντικός καθοριστικός παράγοντας είναι η κατά το δυνατόν προσέγγιση στους επιθυμητούς στόχους εμπορικών περιοχών.

β) **Κλίμα**. Έχει επίδραση στην παραγωγή προϊόντων στο θερμοκήπιο κατά το στάδιο δ (προσαρμογή στις συνθήκες *in vivo*) καθώς και στη διάθεση των προϊόντων και στην απολαβή προμήθειας (η οποία είναι πολύ σημαντική αν στόχος της επιχείρησης είναι οι διεθνείς αγορές).

γ) **Άλλοι παράγοντες**. Τέτοιοι είναι η διαθεσιμότητα εργατικού δυναμικού, το κόστος εδάφους και η ύπαρξη υποδομών για την προμήθεια νερού, τη σύνδεση αποχέτευσης και την άδεια κτισίματος.

3.3. ΧΤΙΣΙΜΟ ΚΑΙ ΣΧΕΔΙΟ ΧΩΡΟΥ

Το ολοκληρωμένο σχέδιο θα πρέπει να περικλείει μηχανισμό για ένα σωστό έλεγχο της θερμοκρασίας, ειδικούς χώρους ανάπτυξης και σωστό αερισμό για την διατήρηση καθαρού περιβάλλοντος στους χώρους μεταφοράς των υποδοχέων των εκφύτων και ανάπτυξης των καλλιεργειών. Σημαντική προσοχή θα πρέπει να δοθεί στον αερισμό και στο επίπεδο πυκνότητας μολυσμάτων ώστε να ελαχιστοποιηθούν τυχόν πηγές μόλυνσης στις παραγωγικές περιοχές. Οπωσδήποτε οι περιοχές συσκευασίας και μεταφοράς στο θερμοκήπιο και στο εργαστήριο θα πρέπει να διατηρούνται καθαρές έτσι ώστε η προσβολή στις περιοχές αυτές να είναι περιορισμένη. Είναι επίσης σημαντικό να αφήσουμε αρκετό χώρο στο σχέδιο για μελλοντική επέκταση. Παρακάτω υπάρχει σχηματική παράσταση οργάνωσης μιας μονάδας παραγωγής φυτικού πολλαπλασιαστικού υλικού με *in vitro* καλλιέργειες.



Σχηματική παράσταση οργάνωσης μιας μονάδας παραγωγής Φυτικού Πολλαπλασιαστικού Υλικού με *in vitro* καλλιέργειες.

Πηγή: Α.Γ. Κανάκης, 2001. Μαθήματα Ιστοκαλλιέργειας. Έκδοση Τ.Ε.Ι. Καλαμάτας

3.4. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΥΛΙΚΩΝ

Η περιοχή της προετοιμασίας των υλικών για αποδοτική και αποτελεσματική παραγωγή μεγάλων ποσοτήτων θα πρέπει να συμπεριλαμβάνει: μια πηγή από διπλά απεσταγμένο ή απιονισμένο ή και ακόμη χαμηλής ώσμωσης νερό, ένα ζυγό, ένα πεχάμετρο, ένα ψύκτης, ένα μίκτη και αναδευτήρα, αρκετούς πάγκους και χώρους αποθήκευσης καθώς και ένα μηχάνημα, ειδικό για τη διανομή του θρεπτικού διαλύματος σε πολλαπλά καλλιεργητικά δοχεία. Αφού προετοιμαστούν τα υλικά γίνεται αποστείρωση με τους κλιβάνους.

Μερικά εργαστήρια είναι εξοπλισμένα με αυτόματους κλίβανους διπλών θυρών τα οποία επιτρέπουν τα υλικά να απολυμαίνονται στην περιοχή της προετοιμασίας ή στην περιοχή αποθήκευσης.

3.5. ΠΕΡΙΟΧΗ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ

Η έναρξη καλλιέργειας και η περιοχή μεταφοράς θα πρέπει να σχεδιαστούν έτσι ώστε να έχει ελαχιστοποιηθεί η μόλυνση. Γενικά ο αερισμός διενεργείται κάτω από πίεση σε τοποθετημένα καλύμματα δαπέδου που βρίσκονται στα σημεία εισόδου και εξόδου.

Όλες οι καλλιέργειες (αρχικές και δευτερεύουσες) εκτελούνται σε σκεπασμένο θάλαμο νηματικής ροής αέρα. Είναι αναγκαίο να καθαρίζουμε τα φίλτρα τακτικά και να ελέγχουμε την ταχύτητα αερισμού για να διατηρήσουμε ασηπτικές συνθήκες. Ως απολυμαντικό για τις λαβίδες, τα νυστέρια και λοιπά εργαλεία χρησιμοποιείται ένα ηλεκτρικά θερμαινόμενο κεραμικό σωληνάριο, ένας υπερηχητικός καθαριστής και ένα θερμαινόμενο δοχείο γεμισμένο με μικρές glass beads (Broome 1986). Η χρησιμοποίηση φλόγας οινοπνεύματος για την απολύμανση εργαλείων πρέπει να γίνεται με ιδιαίτερη προσοχή. Ο εξαερισμός και οέλεγχος της θερμοκρασίας είναι αναγκαία σ' αυτό το χώρο γιατί παράγεται ένα υψηλά θερμαινόμενο φορτίο από το θάλαμο νηματικής ροής και τον μηχανισμό απολύμανσης.

3.6. ΧΩΡΟΙ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ

Οι καλλιέργειες αναπτύσσονται σε τεχνητά ελεγχόμενη ατμόσφαιρα με προσεκτικά ρυθμιζόμενη θερμοκρασία, ποσότητα και ένταση φωτισμού και φωτοπεριόδο. Σε σχέση με την περιοχή μεταφοράς ο αερισμός πρέπει να είναι φιλτραρισμένος και γενικά διατηρούμενος κάτω από υψηλή πίεση. Φωτισμένα ράφια θα πρέπει να είναι ανοιχτά στην κατασκευή για να επιτρέπεται ροή αέρος και να βοηθούν στον έλεγχο της θερμοκρασίας. Σε μερικά εργαστήρια τα ράφια πραγματικά αποτελούνται από σχάρες με κινούμενα καλάθια στα οποία οι καλλιέργειες μπορούν εύκολα να μεταφερθούν και να υποστούν διάφορους χειρισμούς. Αν απαιτείται μεγέθυνση και καλύτερη χρησιμότητα του χώρου μπορεί να χρησιμοποιηθούν κινητά ή κυλιόμενα ράφια. Για τη δημιουργία εστιών θέρμανσης πάνω από τα ράφια χρησιμοποιούνται λάμπες φθορισμού οι οποίες τοποθετούνται πάνω από τα ράφια. Στην ελάττωση του φορτίου θέρμανσης και στην διευκόλυνση του έλεγχου θερμότητας συμβάλλουν αποτελεσματικά φωτισμένα ballasts τα οποία τοποθετούνται έξω από το δωμάτιο ανάπτυξης. Επίσης είναι σημαντική η ύπαρξη κλιματισμού για τον έλεγχο της θερμοκρασίας.

3.7. ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΟ

Οι εταιρίες μικροαναπαραγωγής που παράγουν προϊόν σταδίου δ (στάδιο προσαρμογής στις συνθήκες *in vivo*) θα πρέπει να έχουν χώρους για φύτευση και εγκλιματισμό. Αυτοί οι χώροι είναι καλύτερα να είναι τοποθετημένοι μακριά από το εργαστήριο για την ελαχιστοποίηση της πιθανότητας μόλυνσης.

Μολονότι θα πρέπει να δώσουμε έμφαση στο καλό σχέδιο εγκατάστασης ειδική προσοχή θα πρέπει να δοθεί και στην ροή του προϊόντος και τις μεθόδους χειρισμού υλικών από το εργαστήριο στην τοποθεσία φύτευσης και στο θερμοκήπιο και τελικά στην συσκευασία και μεταφορά.

Μετά την μεταφορά των βλαστών του σταδίου ή των φυτών του β σταδίου γ, δ σ' ένα οργανικό μίγμα (κομπόστα) ή σε αλλά τεχνικά υποστρώματα τα φυτά γενικά εγκλιματίζονται είτε σ' ένα χώρο με ομίχλη το οποίο είναι εξοπλισμένο

κατάλληλα ώστε να παράγει πολύ λεπτά σταγονίδια υγρασίας με ρυθμισμένο υγρόμετρο είτε σ' ένα άλλου τύπου χώρο υψηλής σχετικής υγρασίας. Η θέρμανση του εδάφους μπορεί να επιταχύνει την ανάπτυξη των ριζών. Όταν οι βλαστοί φυτευτούν τα φυντάνια εγκλιματίζονται και μεταφέρονται σε καθιερωμένα θερμοκήπια.

Κατά την διάρκεια του εγκλιματισμού και της περιόδου ανάπτυξης θα πρέπει να δοθεί ειδική προσοχή στην ποιότητα του νερού, τον έλεγχο της θερμοκρασίας, την ένταση του φωτισμού, τη λίπανση και βεβαίως στον έλεγχο των ασθενειών και των εντομών.

3.8. ΕΞΟΠΛΙΣΜΟΣ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟΥ

Για την βασική οργάνωση του εργαστηρίου απαιτούνται:

- Συσκευή αποστείρωσης των θρεπτικών διαλυμάτων, των εργαλείων, των σωλήνων και των δοχείων καλλιέργειας.
- Πεχαμετρο
- Στερεοσκόπιο
- Συσκευή απόσταξης ή και απιονισμένου νερού
- Μαγνητικός αναδευτήρας και θερμαινόμενη πλάκα
- Μαγνητικός αναδευτήρας απλός
- Ζυγός ακρίβειας
- Συσκευή διανομής θρεπτικών διαλυμάτων
- Υγρασιομετρο – θερμόμετρο ή αν υπάρχει η δυνατότητα ένας θερμοϋγρογράφος
- Θερμοσίφωνας
- Ψυγεία οικιακού τύπου

Τα εργαλεια τα οποια απαιτουνται είναι:

- Λαβίδες μήκους 20 cm και άνω
- Βραχίονες νυστεριών

- Λεπίδες. Συνήθως χρησιμοποιούνται τα νούμερα 10, 11, 15
- Ταινία ενδεικτική της αποστείρωσης
- Ταινία Para film
- Τρυβλία petri μιας χρήσεως πλαστικά αποστειρωμένα για έρευνες
- Τρυβλία petri γυάλινα
- Υποδοχές αποστείρωσης τρυβλίων petri
- Βάζα καλλιέργειας διαφόρων μεγεθών
- Σπάτουλες διαφόρων μεγεθών
- Μαχαίρια ή ψαλίδια
- Σύριγγες διαφόρων μεγεθών

Τα σκεύη τα οποία απαιτούνται είναι:

- Ογκομετρικοί σωληνες, τα μεγέθη των οποίων θα είναι από 10 ml έως 2 λίτρα
- Σιφώνια τα μεγέθη των οποίων θα είναι από 0,1 ml έως 25 ml
- Αυτόματοι αναρροφητήρες σιφωνίων
- Ποτήρια ζέσεως γυάλινα τα μεγέθη των οποίων θα είναι από 50 ml έως 3 lt
- Πλαστικά δοχεία άνω των 3 λίτρων
- Φιάλες ογκομετρικές ιστοκαλλιέργειας με πώματα, μεγέθους από 100 ml έως 2 ή 3 λίτρα
- Διάφορα χωνιά με διαπερατή πλάκα
- Διάφορα φιαλίδια πλαστικά
- Φιαλίδια σταγονόμετρα
- Φιαλίδια γυάλινα διαφανή η διάφορα από 25 ml έως 2 ή και 3 λίτρα
- Πλαστικά γλαστράκια σκληραγώγησης διατομής 7 ή 9 cm

Διάφορα υλικά τα οποία θα χρησιμοποιηθούν είναι:

- Μάσκες προσώπου απλές

- Σκουφάκια μαλλιών, μπλούζες, γάντια για πλύσιμο και αποστειρωμένα γάντια αντοχής σε υψηλές θερμοκρασίες
- Διηθητικό χαρτί διαφόρων ειδών
- Αλουμινόχαρτο
- Διαφανής μεμβράνη περιτυλίγματος
- Μικροβιοστατικά φίλτρα

Οι χημικές ουσίες με τις οποίες θα πρέπει να είναι εξοπλισμένο το εργαστήριο είναι οι εξής:

Α) για της απαιτήσεις μακροστοιχείων

- χλωριούχο ασβέστιο
- νιτρική αμμωνία
- νιτρικό κάλιο
- δισόξινο φωσφορικό κάλιο
- θειικό μαγνήσιο
- θειικός σίδηρος
- οργανικός σίδηρος

Β) για τις απαιτήσεις μικροστοιχείων

- θειικός ψευδάργυρος
- θειικό μαγγάνιο
- θειικός χαλκός
- θειική αμμωνία
- βορικό οξύ
- ιωδιούχο κάλιο
- χλωριούχο κοβάλτιο
- μολυβδαινιούχο νάτριο ή μολυβδαινικό νάτριο
- νικοτινικό οξύ
- υδροχλωρική θειαμίνη, πυροδοξίνη, γλυσίνη

- φολικό οξύ
- μυο-ινοσιτόλη ή μυο-ινοσίτης
- ενεργός άνθρακας
- ασκορβικό οξύ

Τα φυτά για να αναπτυχθούν κανονικά τόσο στο έδαφος όσο και *in vitro* χρειάζονται κάποια μακροστοιχεια N, P, K, Mg και ιχνοστοιχεία Fe, Cu, Zn, B, Mo, Ca, S, τα οποία προστιθενται στην *in vitro* καλλιέργεια με την μορφή των ανόργανων αλάτων, χρειάζονται επίσης υδρογόνο και οξυγόνο με τη μορφή του νερού, καθώς και αέριο οξυγόνο. Τα φυτά που αναπτύσσονται στην φύση είναι αυτότροφα, τα έκφυτα που αναπτύσσονται στην ιστοκαλλιέργεια είναι ετερότροφα. Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται η σύνθεση των πέντε πιο γνωστών θρεπτικών υποστρωμάτων που χρησιμοποιούνται στην ιστοκαλλιέργεια.

Πίν.1. Σύνθεση των πιο γνωστών θρεπτικών υποστρωμάτων, που χρησιμοποιούνται στην ιστοκαλλιέργεια.

Χημική Ένωση	Murashige &Skoog,(MS), 1962.	Woody Plant Medium(WPM)	Camborg et al. B5 (1968)	Lismajer& Skoog(LS) 1965	White S-3 (1934)
	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΕΙΣ ΣΙ mg/l				
$AlCl_3$	-	-	-	-	-
$CaCl_2\ 2H_2O$	440	96	150	440	-
$Ca(NO_3)_2 4H_2O$	-	550.6	-	-	300
$CoCl_2\ 6H_2O$	0.025	-	0.025	0.025	-
$CuSO_4\ 5H_2O$	0.025	0.025	0.025	0.025	
$FeCl_3\ 6H_2O$	-	-	-	-	-
$Fe_2(SO_4)_3$	-	-	-	-	2.5
$Fe_2SO_4\ 7H_2O$	27.8	20.78		27.8	-
H_3BO_3	6.2	6.2	3	6.2	1.5
KCl	-	-	-	-	65
KH_2PO_4	170	170	-	170	68
KI	0.83	-	0.75	0.83	0.75
K_2SO_4	-	990	-	-	-
KNO_3	1900	-	2500	1900	80
$MgSO_4\ 7H_2O$	370	370	246	370	720
$MnSO_4 H_2O$	-	20.23	10	16.897	-
$MnSO_4\ 4H_2O$	22.3	-	-	-	7
NaH_2PO_4anhydr	-	-	-	-	16.5
$NaH_2PO_4 H_2O$	-	-	150	-	-
$NaH_2PO_4 2H_2O$	-	-	-	-	-
$NaNO_3$	-	-	-	-	-
Na_2EDTA	37.3	37.3	-	-	-
$Na_2EDTA 2H_2O$	-	-	-	37.25	-
$Na_2MoO_4 2H_2O$	0.25	0.25	0.25	0.25	-
Na_2SO_4	-	-	-	-	200
NH_4NO_3	1650	400	-	1650	-
$(NH_4)_2SO_2$	-	-	134	-	-
$NiCl_2\ 6H_2O$	-	-	-	-	-
$Zn\ SO_4\ 7H_2O$	8.6	8.6	2	10.58	3
Μυο-ινοσιτόλη	100	100	100	100	-
Νικοτινικό οξύ	0.50	0.5	1	0.50	0.5
Παντοθενικό οξύ	-	-	0.4	-	1
Υδροχλωρική πυριδοξίνη	0.50	0.5	1	0.50	0.1
Ριβοφλαβίνη	-	-	0.015	-	-
Υδροχλωρική θειαμίνη.	0.1	0.1	10	0.1	0.1
Γλυκίνη	0.2	0.2	-	0.2	3
ΦΥΤΟΡΜΟΝΕ ς	Κατά περίπτωση.	Κατά Περίπτωση	Κατά Περίπτωση	Κατά περίπτωση.	Κατά περίπτωση.

Πηγή: Α.Γ. Κανάκης, 2001. Μαθήματα Ιστοκαλλιέργειας. Έκδοση Τ.Ε.Ι. Καλαμάτας

Θα χρειαστούν ακόμη: καυστικό νάτριο πυκνότητας 1 N και 0.1 N, υδροχλωρικό οξύ πυκνότητας 1 N και 0.1 N. Στάνταρ διαλύματα για πεχαμέτρηση σε pH 4 ή 7. Χλωριούχο κάλιο, οξικό οξύ, μανιτόλη, σορβιτόλη, ζάχαρη, κετόνη, μικρές ποσότητες μεθανόλης και φορμαλδεΰδης, άγαρ.

Οι αυξητικοί παράγοντες θα είναι: 2,4D, IAA, IBA, NAA, BA, BAP, κινετίνη, ζεατίνη, GA3, ABA και διάφορες άλλες αυξίνες και κυτοκινίνες.

Φυτορρυθμιστικές ουσίες. Η εξέλιξη του φυτικού ιστού επηρεάζεται από κάποιες χημικές ουσίες που βρίσκονται ενδογενώς μέσα στους φυτικούς ιστούς, φαίνεται λοιπόν ότι έχουν ένα ρυθμιστικό ρόλο, στην αύξηση και την ανάπτυξη. Η δράση αυτών των ουσιών εκδηλώνεται ακόμη και σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις. Οι ρυθμιστές της αύξησης παρασκευάζονται συνθετικά ή μέσω διαδικασιών ζυμώσεων. Όταν αυτές προστίθενται σε υποστρώματα ιστοκαλλιέργειας ονομάζονται ρυθμιστές της αύξησης, οι οποίοι προστίθενται εξωγενώς.

Από της πιο αναγνωρισμένες και πιο διαδεδομένες ορμόνες είναι οι αυξίνες, οι κυτοκινίνες και οι γιββερελλίνες.

Οι ενώσεις που επηρεάζουν μερικές διακριτές διαδικασίες, όπως η αύξηση και η επιμήκυνση των κύτταρων και των βλαστών ονομάζονται αυξίνες π.χ. IAA, NAA.

Οι αυξίνες συμβάλουν στην έναρξη της κυτταρικής διαιρέσεως και εμπλέκονται στην προέλευση των μεριστωμάτων, δίνοντας αύξηση σε ορισμένα όργανα. Στην ιστοκαλλιέργεια επιδρούν στον σχηματισμό τυχαίων ριζών και την ανάπτυξη βλαστών.

Η επίδρασή τους πιστεύεται ότι οφείλεται στην παρακίνηση της έκκρισης ιόντων υδρογόνου εντός και διαμέσου του κυτταρικού τοιχώματος. Η δέσμευση των αυξινών οδηγεί στη διάλυση των λιπιδίων, διάταση του τοιχώματος και αύξηση της περατότητάς του. Ιόντα καλίου περνούν έτσι το κυτταρικό τοίχωμα, για να εξουδετερώσουν την ηλεκτρική αγωγιμότητα των ιόντων υδρογόνου Η και αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την μείωση του υδατικού δυναμικού του κύτταρου και έχουμε εισχώρηση νερού λόγω διαφοράς οσμωτικού δυναμικού και το κύτταρο επεκτείνεται.

Επίσης πιστεύεται ότι οι αυξίνες επιδρούν στον μεταβολισμό του RNA και μέχρι την πρωτεϊνική σύνθεση, επηρεάζοντας πιθανώς έτσι τη μεταγραφή ειδικών μορίων αγγελιοφόρων RNA (mRNA).

Τα mRNA πιστεύεται ότι κωδικοποιούν πρωτεΐνες που απαιτούνται για να υποστηρίξουν την ανάπτυξη.

Γιββερελλίνες. Η σύνθεση των γιββερελλινών γίνεται κυρίως στα νεαρά φύλλα και μερικώς στις ρίζες, μεταφέρονται διαμέσου των ηθμωδών αγγείων από τα φύλλα και των ξυλωδών αγγείων από τις ρίζες.

Οι γιββερίλλινες έχουν δραματικές επιπτώσεις στην επιμήκυνση του στελέχους και των φύλλων, διεγείροντας τόσο την κυτταρική διαίρεση όσο και την κυτταρική επιμήκυνση.

Κυτοκινίνες. Οι κυτοκινίνες π.χ. BAP είναι ως επί το πλείστον παράγωγα αδενίνης και έχουν μεγάλη σχέση με την κυτταροδιαίρεση στην ιστοκαλλιέργεια, καθώς και τον αναπολλαπλασιασμό των μεριστωμάτων.

Στην ιστοκαλλιέργεια οι κυτοκινίνες φαίνεται να είναι αναγκαίες για την κυτταρική διαίρεση. Οι κυτοκινίνες απαιτούνται για να ρυθμίσουν την σύνθεση μιας πρωτεΐνης, που εμπλέκεται στον σχηματισμό και την λειτουργία του μιτωτικού ατρακτοειδούς μηχανισμού.

Οι κυτοκινίνες σε ιδιαίτερα μικρές συγκεντρώσεις και σε συνδυασμό με τις αυξίνες προάγουν την κυτταρική διαίρεση, ενώ σε λίγο μεγαλύτερες 1-10 ml/l προκαλούν τον σχηματισμό τυχαίων βλαστών και αναστέλλουν των σχηματισμό ριζών. Παρακάτω υπάρχει πίνακας με τα κύρια χαρακτηριστικά των φυτορμονών (φυσικά – χημικά), που χρησιμοποιούνται στην *in vitro* καλλιέργεια.

Πιν.2. Κύρια χαρακτηριστικά των φυτορμονών (φυσικά χημικά), που χρησιμοποιούνται στην *in vitro* καλλιέργεια.

ΟΝΟΜΑ	ΣΥΝ/ΣΗ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ.	ΔΙΑΛΥΤΟΤΗΤΑ.	ΣΤΑΘΕΡΟΤΗΤΑ.	ΦΥΛΑΞΙΣ	ΧΗΜΙΚΟΣ ΤΥΠΟΣ.	ΜΟΡΙΑΚΟ ΒΑΡΟΣ.
ΑΥΞΙΝΕΣ							
3-Ινδολυλοξεικό οξύ	IAA	Φυσική	Λίγο διαλυτή σε νερό, διαλυτή σε αιθανόλη 96%.	Αποσυντίθεται παρουσία φωτός.	Σε ψύξη και σε σκοτάδι.	$C_{10}H_9NO_2$	175,18
Ινδολυλοβουτυρικό οξύ	IBA	Συνθετική	Διαλυτή σε αιθανόλη 96%.	Σταθερή και στους 120 °C	Σκοτάδι 4-5 °C ή κατάψυξη	$C_{12}H_{13}NO_2$	203,23
α-Ναφθαλινοξεικό οξύ	NAA	Συνθετική	Διαλυτή σε αιθανόλη, σε νερό στους 20 °C, 250mg/l.	Σταθερή και στους 120 °C.	Σκοτάδι 4-5 °C ή κατάψυξη	$C_{12}H_{10}O_2$	186,21
2,4 Διχλωροφαινοξεικό οξύ	2,4-D	Συνθετική	Λίγο διαλυτή σε νερό, διαλυτή σε αιθανόλη 96%.	Σταθερή και στους 120 °C.	Σκοτάδι 4-5 °C ή κατάψυξη	$C_8H_6Cl_2O_3$	221,04
ΚΥΤΟΚΙΝΙΝΕΣ							
6-Φουρφουρυλαμινοπουρίνη ή Κινετίνη	KIN ή FAP	Συνθετική	Διαλυτή σε NaOH 1N ή HCl 1N.	Σταθερή και στους 120 °C.	Σκοτάδι 4-5 °C ή κατάψυξη	$C_{15}H_{12}N_5$	215,2
6-Βενζυλαμινοπουρίνη ή Βενζυλαδενίνη	BAP ή BA	Συνθετική	Διαλυτή σε NaOH 1N ή HCl 1N.	Σταθερή και στους 120 °C.	Σκοτάδι 4-5 °C ή κατάψυξη	$C_{12}H_{11}N_5$	225,3
Ζεατίνη	Z	Φυσική	Διαλυτή σε NaOH 1N ή HCl 1N.	Σταθερή και στους 120 °C.	Σκοτάδι 4-5 °C ή κατάψυξη	$C_{10}H_{13}N_5O$	219,2
ΓΙΒΒΕΡΙΛΛΙΝΕΣ							
Α-3 Γιββερελικό οξύ	GA3	Φυσική	Διαλυτή σε αιθανόλη, μέτρια διαλυτή σε νερό.	Λίγο σταθερή, αποσυντίθεται σε υψηλές θερμοκρασίες.	Σκοτάδι 4-5 °C ή κατάψυξη	$C_{19}H_{22}O_6$	346,4

• **Αναπαραγωγικό υλικό και μικροαναπαραγωγή**

Τα εμπόδια που παρουσιάζονται στις καλλιέργειες κατά την παραγωγή των μητρικών φυτειών έγιναν εμφανή μετά από πολυετείς παρατηρήσεις. Κατά τη διαδικασία του παραδοσιακού πολλαπλασιασμού με μοσχεύματα καμία ίωση δεν μειώθηκε, ούτε έσπασε ο κύκλος των ασθενειών στο εξωτερικό μέρος των οφθαλμών των φυτών που προορίζονται για πολλαπλασιασμό. Ιδιαίτερα η διάδοση του *Fusarium roseum* φαίνεται να ευνοείται από τον πολλαπλασιασμό των μοσχευμάτων παρά τον σχολαστικό ψεκασμό με μυκητοκτόνα.

Στα τέλη της δεκαετίας του 1950, ο Quak (1957) απέδειξε την δυνατότητα παραγωγής μητρικών φυτών χωρίς ιούς μεγαλώνοντας μεριστώματα κορυφών σε συνθήκες αποστείρωσης προερχόμενες από φυτά που είχαν αναπτυχθεί προηγουμένως στους 100°F για 60 ημέρες. Αυτή η εργασία που είναι μια μορφή θερμοθεραπείας, είχε προταθεί από τον Morel (1948) και ήταν παρόμοια με την τεχνική που χρησιμοποιόταν εδώ και καιρό για το φύτρωμα των σπόρων ορχιδέας. Η μέθοδος του Quak, με ελαφρές βελτιώσεις, έφτασε στο Πανεπιστήμιο του Κολοράντο στις αρχές της δεκαετίας του 1960, και ο Phillips την υιοθέτησε για εμπορική χρήση για μια περίοδο 6 ετών. Επιπλέον, η δουλειά των Hollings και Stone στην Αγγλία επιβεβαίωσε την μείωση των ιών μέσω της καλλιέργειας κορυφαίων οφθαλμών στις αρχές της δεκαετίας του 1960.

Η έρευνα για την καλλιέργεια κορυφαίων οφθαλμών έδωσε έμφαση:

1. στην μείωση των ιών,
2. στην μείωση των μυκητολογικών και βακτηριδιακών παθογενειών και
3. στην ποιότητα των καθαρών φυτών που παρέχονται μέσω αυτής της τεχνικής.

Από τη στιγμή που η διαδικασία αυτή έγινε ευρέως αποδεκτή μεταξύ των εμπορικών παραγωγών, οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται πρέπει να είναι απλές και εύκολες, ώστε να μπορεί να τις υιοθετήσει και να τις προσαρμόσει ένας τεχνικός. Θα πρέπει να παρέχουν φυτά χωρίς παθογένειες σε μεγάλο αριθμό, χωρίς να διακινδυνεύουν τη γενετική σταθερότητα του φυτικού ιστού.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

4.1. ΑΝΑΓΚΑΙΟΤΗΤΑ ΤΗΣ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΣΤΗ ΓΑΡΥΦΑΛΛΙΑ

Η καλλιέργεια ακραίων οφθαλμών (γνωστή επίσης ως μερίστωμα) έχει εφαρμοστεί ευρέως τόσο για για την ανάκτηση μοσχευμάτων χωρίς ιούς, όσο και για την γρήγορη αναπαραγωγή με κλωνοποίηση μεγάλου αριθμού φυτών. Όταν στόχος είναι ο αποκλεισμός των ιών, η τεχνική καλλιέργειας κατευθύνεται προς την παραγωγή ενός μόνο έκφυτου με ρίζες από κάθε καλλιέργεια. Ένα απλό θρεπτικό υπόστρωμα συμπληρωμένο με ορμόνες για τις ρίζες συνήθως ικανοποιεί τις ανάγκες μιας καλλιέργειας βλαστών που θα χρησιμοποιηθεί για την δημιουργία ενός μεμονωμένου έκφυτου με ρίζα. Αντίθετα, για τον πολλαπλασιασμό μέσω κλωνοποίησης το έκφυτο που χρησιμοποιείται από την εκβλάστηση διεγείρεται χημικά για να παράγει πολλαπλούς βλαστούς. Χρησιμοποιείται συνήθως ένα υπόστρωμα που περιέχει υψηλή συγκέντρωση με κυτοκινίνης.

Αρκετές τροποποιήσεις του υποστρώματος που δημιουργήθηκε από τον Morel (1964) έχουν χρησιμοποιηθεί στην παραγωγή μεμονομένων φυντανιών γαρυφαλλιών (*Dianthus caryophyllus L.*). Οι Baker και Phillips (1962), ο Stone (1963) και ο Phillips (1968) χρησιμοποίησαν διαφορα υποστρώματα για να ερευνήσουν ποικίλλους παράγοντες που επηρεάζουν την ανάπτυξη των γαρυφαλλιών από κορυφές βλαστών. Ο Stone (1968) χρησιμοποίησε επίσης την τεχνική καλλιέργειας βλαστών για την μείωση συγκεκριμένων ιών που έπληταν τα γαρύφαλλα.

Για να επιτύχουν τον πολλαπλασιασμό μέσω κλωνοποίησης των γαρύφαλλων, οι Hackett και Anderson (1967) χρησιμοποίησαν την φόρμουλα του White με 5 φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση ανόργανων αλάτων και μια τροποποιημένη φόρμουλα των Murashige και Skoog (MS). Οι Earle και Langhans (1975) πέτυχαν ένα υψηλό ποσοστό πολλαπλασιασμού χρησιμοποιώντας ένα ελαφρώς αναταραγμένο υγρό υπόστρωμα MS, ενώ οι Davis et al. (1977)

ανακάλυψαν ότι ένας συνδυασμός στάσιμου ή ελαφρώς αναταραγμένου υγρού υποστρώματος MS έδινε τα καλύτερα αποτελέσματα.

Το κύριο αντικείμενο της παρούσας εργασίας ειναι να βρεθεί το καλύτερο θρεπτικό υπόστρωμα και οι καλύτεροι χειρισμοί των εκφύτων για την παραγωγή γαρυφαλλιών από κορυφές βλαστών που καλλιεργούνται *in vitro*. Έμφαση δόθηκε στις διαδικασίες που οδηγούν στην παραγωγή ενός έκφυτου ανά εκβλάστηση, αφού αυτή η τεχνική θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για την παραγωγή βλαστών χωρίς ιούς για μητρικά φυτά υψηλής καθαρότητας. Παράλληλα, η παραγωγή γαρύφαλλων μέσω κλωνοποίησης ερευνήθηκε επίσης εφόσον μια επιτυχημένη τεχνική κλωνοποίησης θα μπορούσε να ενσωματωθεί αποτελεσματικά σε ένα πρόγραμμα παραγωγής βλαστών για γρήγορο πολλαπλασιασμό γαρυφαλλιών χωρίς παθογένειες, παραγόμενες με την τεχνική του μεμονομένου φυτού.

ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μικροσκοπικές κορυφές βλαστών της ποικιλίας Corso (κορυφαίο μερίστωμα) χρησιμοποιήθηκαν για τον πολλαπλασιασμό της γαρυφαλλιάς (*Dianthus cryophilic*) με τη μέθοδο της ιστοκαλλιέργειας (μεριστωματική καλλιέργεια). Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται κυρίως για παραγωγή υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού καθώς επίσης και για κλωνικό πολλαπλασιασμό των φυτών. Στην πρώτη περίπτωση επιδιώκεται η παραγωγή ενός μόνο φυτού από κάθε έκφυτο του μητρικού φυτού που καλλιεργείται, ενώ στην δεύτερη περίπτωση, με την χρήση αυξημένης συγκέντρωσης ορμονών, επιδιώκεται η παραγωγή μεγάλου αριθμού φυτών από κάθε καλλιέργεια.

Για την πρώτη περίπτωση πραγματοποιήθηκε μια σειρά πειραμάτων και χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα από μητρικά φυτά μεγέθους 0.1-0.2 mm και δοκιμάστηκαν με βασικό το MS οι ορμονες 0,01-0,03 mg/l NAA+0,1-0,3 mg/l GA3, καθώς 0,1-0,3 mg/l IAA+0.1-0,3 mg/l GA3. Επίσης δοκιμάστηκαν 0,01-0,03 mg/l NAA, και 0,1-0,3 mg/l IAA, και τελος 0,1-0,3 mg/l GA3 θρεπτικά διαλύματα με σκοπό την παραγωγή ενός μόνο φυτού από κάθε έκφυτο. Τα καλύτερα αποτελέσματα τα εδωσε το θρεπτικό διαλυμα 0,02 mg/l NAA+0.2 mg/l GA3 και 0,2 mg/l GA3+0,2mg/l IAA. Δεν έγιναν μετρήσεις, αξιολογήθηκαν οπτικά.

Στα θρεπτικά αυτά υπόστρωματα παράχθηκαν έρριζα φυτάρια που μπορούσαν να μεταφερθούν σε γλάστρες σε 8-10 εβδομάδες μετά την έναρξη της καλλιέργειας όταν είχαν ύψος 1 ως 2 cm, και εφόσον είχαν περάσει το στάδιο της σκληραγώγησης. Πρέπει να σημειωθεί ότι άριζα και έρριζα με ελάχιστο σχηματισμό ρίζας φυτάρια σε ειδικές συσκευασίες *in vitro* μπορουν να διατεθούν κατευθείαν στον καταναλωτή (εικόνα 6). Η τεχνική αυτή θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για παραγωγή υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού στη γαρυφαλλιά.

Εκφυτα από μητρικό φυτό μεγέθους 0.1-0.2 mm χρησιμοποιήθηκαν στην δεύτερη περίπτωση, μια σειρά πειραμάτων πραγματοποιήθηκε και αποσκοπούσε στην παραγωγή πολλών φυτών από κάθε καλλιέργεια (κλωνικός πολλαπλασιασμός). Χρησιμοποιήθηκε μεταξύ άλλων και το βασικό πρωτόκολλο των Murasgige και Skoog στο οποίο δοκιμάστηκαν συγκεντρώσεις κυτοκινίνης BAP σε συνδυασμό με α-ναφθαλινοξικού οξέος NAA. Το υψηλότερο ποσοστό πολλαπλασιασμού επιτεύχθηκε μετά από μακρύ και πολυσύνθετο συνδυασμό και φυσικά από έρευνες που έχουν διεξαχθεί μέχρι σήμερα, δοκιμάστηκαν τα διαλύματα 0,5-3 mg/l BAP, μετά 1,5mg/l BAP+0,01, 0,02 ή 0,03 mg/l NAA επίσης 1,5mg/l BAP+0,1, 0,2 ή 0,3 mg/l IAA. Τα καλύτερα αποτελέσματα τα έδωσε το 1,5 mg/l BAP. Η ανάπτυξη των βλαστών και ριζών επιτεύχθηκε ικανοποιητικά με τον συνδυασμό ορμονών 0,2 mg/l GA3+0,02 mg/l NAA και 0,2 mg/l GA3+0,2 mg/l IAA mg/l. Για την τοποθέτησή τους σε γλάστρες τα φυτά περνάν από ένα σχετικά μεγάλο στάδιο σκληραγώγησης σε ελεγχόμενο περιβάλλον ή επίσης μπορούν να πουληθούν στον καταναλωτή μέσω άριζων *in vitro* καλλιεργειών σε ειδικές συσκευασίες (εικόνα 6).

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

α. Προετοιμασία βλαστών και απόσπαση εκφύτων

Ως δότες εκφύτων χρησιμοποιήθηκαν φυτά γαρυφαλλιάς της ποικιλίας Corso. Συνοπτικά χωρίς απολύμανση έγιναν τομές σε απόσταση 15 - 20 cm από τις κορυφές βλαστών γαρυφαλλιών που είχαν αναπτυχθεί σε θερμοκήπιο. Κάθε τμήμα βλαστού μειώθηκε κατά 2 cm και αφαιρέθηκαν όλα τα φύλλα με μήκος έως 0,5 cm. Η απολύμανση της επιφάνειας της άκρης των βλαστών δεν ήταν απαραίτητη (Stone, 1963). Δοκιμάστηκε και απολύμανση η οποία είχε τα ίδια αποτελέσματα. Τα ανοιγμένα και ανακυπτόμενα φύλλα αφαιρέθηκαν από το μίσχο με μία βελόνα. Το ακρινό μέρος του βλαστού μήκους 0,1 με 0,2 mm, που περιλαμβάνει τον θόλο του μεριστώματος καθώς και ίσως 2 καταβολές φύλλων, αποκόπηκε χρησιμοποιώντας ένα χειρουργικό νυστέρι No. 11 και έτσι παράχθηκε

ένα έκφυτο για καλλιέργεια. Ίδια έκφυτα χρησιμοποιήθηκαν και για πολλαπλασιασμό με κλωνοποίηση. Με τη χρήση μιας αποστειρωμένης βελόνας, κάθε άκρο μεταφέρθηκε προσεκτικά στη φιάλη καλλιέργειας που περιέχει το επιθυμητό θρεπτικό υπόστρωμα.

Η διαδικασία αυτή γινόταν σε στερεοσκόπιο το οποίο βρίσκονταν μόνιμα μέσα στο θάλαμο νηματικής ροής. Η αφαίρεση μεριστωμάτων γινόταν μόνο από τους κορυφαίους οφθαλμούς, η μεγέθυνση του στερεοσκοπίου ήταν 10-50X. Διαδοχικά αφαιρούνταν τα εξωτερικά περιβλήματα.

Στο επόμενο στάδιο περνάμε μεμονωμένα μεριστώματα και τα τοποθετούσαμε στα δοχεία καλλιέργειας, δηλαδή σε τρυβλία petri διαμέτρου 100 mm και ύψους 10 mm, τα οποία περιείχαν 15-20 ml θρεπτικού υποστρώματος. Η εργασία αυτή περιελάμβανε διαδοχικές και πάρα πολύ προσεκτικές απολυμάνσεις των λαβίδων και των νυστεριών με κάψιμο σε κυανή φλόγα.

Σε κάθε τρυβλίο εμφυτεύονταν 4 μεριστώματα ίσως και περισότερα. Σε όλες αυτές τις διαδικασίες η απολύμανση των χεριών είναι συνεχής, είτε με πλύση τους με αλκοόλη είτε με τη χρήση γαντιών.

Τέλος τα τρυβλία κλείνονταν με ημιπερατή ταινία παραφίλμ FM και πάνω σε αυτά αναγράφονται γράμματα. Η ημερομηνία αναγράφεται επάνω στο τρυβλίο, τα άλλα όπως, είδος θρεπτικού υποστρώματος, αρίθμηση κ.λπ. καταχωρούνται με τα γράμματα της αλφαβήτου, κατόπιν μεταφέρονται σε θάλαμο ρυθμιζόμενων συνθηκών για την περαιτέρω ανάπτυξή τους.

β. Υλικά

Για την παρασκευή των θρεπτικών υποστρωμάτων χρησιμοποιήθηκαν:

- Ηλεκτρικός ζυγός για τη ζύγισή τους.
- Ογκομετρικός κύλινδρος, ποτήρια ζέσεως και άλλα όργανα μικρής και μεγάλης χωριτικότητας.
- Πεχάμετρο για να μετρήσουμε το pH του θρεπτικού διαλύματος καθώς και αντιδραστήρια NaOH για την άνοδο και HCl την για πτωση της τιμής του pH.
- Φλόγα κυανή για την αποστείρωση των εργαλείων.

- Κλίβανος υγρής αποστείρωσης autoclave, για την αποστείρωση όλων των εργαλείων και σκευών που χρησιμοποιήθηκαν στην ιστοκαλλειέργεια.

Για την παρασκευή 1 lt διαλύματος αναπαραγωγής MS χρησιμοποιήθηκαν:

- 800 ml απιονισμενο νερο
- 4,708 γραμμάρια σκόνης εμπορικού σκευάσματος MS
- 40 γρ. ζαχαρη
- 100 mg μυο-ινοσιτόλης
- προσθήκη φυτορμονών ανάλογα με το υπόστρωμα
- συμπλήρωση στα 1000 με απιονισμένο νερό
- διόρθωση του pH
- διανομή σε φιάλες χωρητικότητας του 1 λίτρου
- 500 διαλύματος 1,3-1,5 gr άγαρ
- 500 διαλύματος 1,3-1,5 gr άγαρ
- πολύ καλή ανακίνηση των φιαλών
- τοποθέτηση των φιαλών στο θάλαμο υγρής αποστείρωσης.
- και αποστείρωση σύμφωνα με τον κατασκευαστή (π.χ. 121°C και πίεση 1,7 bar)
- τοποθέτηση στο υδατόλουτρο στους 55°C για 15΄ για ομοιόμορφη κάθοδο της θερμοκρασίας
- διανομή του διαλύματος σε τρυβλία ή σε φιάλες, κάτω από ασηπτικές συνθήκες.

• Ρυθμιστες της αυξησης

Οι ρυθμιστές της αύξησης δρουν σε μικρές ποσότητες. Η ζύγιση των ποσοτήτων αυτών είναι δύσκολη γι' αυτό φτιάχνουμε πυκνά διαλύματα. Δεν χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος αυτή για παρασκευή υποστρώματος γιατί χρησιμοποιήσαμε έτοιμο MS. Χρησιμοποιήθηκε μόνο για την διάλυση των ορμονών.

Αν θελουμε να χρησιμοποιησουμε 2 mg/l μιας φυτορμόνης τοποθετούμε μια μικρή ποσότητα τυχαία της συγκεκριμένης φυτορμόνης στο ζυγό ακριβείας. Αφού την διαλύσουμε καλά με μερικές σταγόνες του κατάλληλου κάθε φορά διαλύτη, προσθέτουμε απιονισμένο νερό μέχρι μιας αναλογίας 1/10, 1/100, 1/1000 συνήθως. Έτσι λέμε: 0,1 mg διαλυμένης ουσίας ανά 1 ml διαλύτη ή 0,01 mg/1 ml διαλυμένης ουσίας ανά 1 ml διαλύματος κ.λπ.

Αν για παράδειγμα θέλουμε να προσθέσουμε 1,5 mg/l μιας φυτορμόνης στο θρεπτικό υπόστρωμα διαλυτότητας 0,1 mg/1 ml τότε προσθέτουμε 1,5 mg/0,1 mg = 15 ml διαλύματος.

Στο πείραμά μας χρησιμοποιήθηκαν οι ρυθμιστές αύξησης NAA, IAA και GA3. Η διάλυσή του πραγματοποιήθηκε με τον παραπάνω τρόπο.

Το βασικό υπόστρωμα είναι το MS στερεοποιημένο με άγαρ 2,6-3,8 gr/l χρησιμοποιείται κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας. Το pH του υποστρώματος προσαρμόζεται στο 5.5-5,7 πριν την αποστείρωση και προτού προστεθεί το άγαρ. Το διάλυμα αποστειρώνεται για 20 λεπτά σε θερμοκρασία 120°C και πίεση 1,7 bar ώστε να διαλυθεί το άγαρ και μετά μοιράζεται σε κωνικές φιάλες (15-20 ml ανά βάζο) και σε τρυβλία. Τα φιαλίδια σκεπάζονταν με αλουμινόχαρτο.

ΜΕΘΟΔΟΙ ΚΑΙ ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ ΚΑΛΛΕΙΕΡΓΕΙΑΣ

Παραγωγή μεμονωμένων φυτών. Η διαδικασία καλλιέργειας σε αυτή την περίπτωση ολοκληρώθηκε σε τρία κύρια στάδια. Στο πρώτο στάδιο, οι κορυφές των βλαστών τοποθετήθηκαν η κάθε μια ξεχωριστά σε τρυβλία που περιέχουν θρεπτικό υπόστρωμα συμπληρωμένο είτε με την αυξίνη α-ναφθαλινοξικού οξέος (NAA) από 0,01, 0,02 ή 0,03 mg/l + GA3 συγκεντρωσης 0,1, 0,2 ή 0,3 mg/l είτε με 0,1, 0,2 ή 0,3 IAA mg/l + 0,1, 0,2 ή 0,3 mg/l GA3, καθως επισης ξεχωριστά οι παρακάτω ορμόνες:

0,01, 0,02, 0,03 mg/l NAA και 0,1, 0,2, 0,3 mg/l IAA καθώς επίσης 0,1, 0,2, 0,3 mg/l GA3 έγιναν δοκιμές σε καθαρό MS.

Κάθε κορυφή βλαστού τοποθετήθηκε με την κορυφή προς τα πάνω με σκοπό την προμήθεια του έκφυτου με υγρό ενώ παρέχει στήριξη και κάνει εφικτό τον σωστό αερισμό της (Phillips και Danielson 1961b). Οι καλλιέργειες τοποθετήθηκαν σε ένα επωαστήρα κάτω από συνεχή φωτισμό έντασης 3000-4500 lux θερμοκρασία ημέρας 25°C και νύχτας 18°C, σχετική υγρασία θαλάμου 55-60%.

Μετά από 15 μέρες, όλες οι κορυφές που έφεραν ρίζες ανεξαρτήτως μεγέθους, μεταφέρθηκαν σε καινούργιο υπόστρωμα MS χωρίς ορμόνες, για να προωθηθεί η περαιτέρω ανάπτυξη των βλαστών και των ριζών (δεύτερο στάδιο). Τα έκφυτα παρέμειναν σε αυτό το υποστρωμα για 4 με 6 εβδομάδες.

Στο τρίτο στάδιο, οι υγιείς ριζωμένοι βλαστοί με μήκος 1.5 με 2 cm μεταφυτεύτηκαν σε μικρές γλάστρες που περιέχουν ένα μείγμα αποστειρωμένου υποστρώματος από τύρφη, κομπόστ, περλίτη σε αναλογία 1:1:3. Τα φυτά στα κυπελάκια τοποθετήθηκαν σε δωμάτιο ανάπτυξης με τεχνητό φωτισμό (φωτοπερίοδος 16 ωρών) στους 20±2°C και ποτίζονταν με διάλυμα Hoagland μισής συγκέντρωσης στοιχείων. Ανάστροφα γυάλινα ποτήρια ζέσεως χρησιμοποιήθηκαν για να προστατέψουν τα νεαρά φυτά από την αφυδάτωση κατά την εγκατάστασή τους σε χώμα. Τα φυτά μεταφέρθηκαν σε συνθήκες θερμοκηπίου 10 με 15 μέρες μετά την τοποθέτησή τους σε γλάστρες.

- **Παραγωγή πολλαπλών έκφυτων** (γρήγορη αναπαραγωγή μέσω κλωνοποίησης)

Η διαδικασία καλλιέργειας για πολλαπλασιασμό μέσω κλωνοποίησης έχει τέσσερα στάδια. Στο πρώτο στάδιο, οι αποκομμένες κορυφές των βλαστών (μήκους 0.1 με 0.2 mm) καλλιεργούνται σε υπόστρωμα με ζελατινοποιημένη αγαρόζη (άγαρ) μέσα σε βάζα των 50 ml. Αρκετή κυτοκινίνη σε μεγάλη αναλογία έναντι της αυξίνης χρησιμοποιείται για να καταστείλει την αύξηση της κορυφής και να προκαλλέσει την παραγωγή βοηθητικών οθαλμών (Murashige, 1979), επίσης δοκιμάστηκε καθαρό MS χωρίς αυξητικούς παράγοντες.

Δοκιμαστηκαν οι παρακατω συγκεντρώσεις:

0,5, 1,0, 1,5, 2,0 ή 3 mg/l BAP (διάγραμμα 3) κυτοκινίνης (BAP) για οπτικό έλεγχο της αποτελεσματικότητας και μετά εγινε επανάληψη της 1,5 mg/l BAP για λήψη των παρατηρήσεων.

Δοκιμάστηκαν επίσης 1,5 mg/l BAP σε συνδυασμό με 0,01, 0,02 ή 0,03 mg/l NAA καθώς επίσης 1,5 mg/l BAP σε συνδυασμό με 0,1, 0,2 ή 0,3 mg/l IAA.

Τέσσερις (4) εβδομάδες μετά την καλλιέργεια, τα αρχικά έκφυτα μεταφέρονταν σε καινούργιο υπόστρωμα για περαιτέρω πολλαπλασιασμό (στάδιο 2). Χρησιμοποιήθηκε ίδιο βασικό υπόστρωμα όπως και στο στάδιο 1, συμπληρωμένο όμως με την αυξίνη α-ναφθαλινοξικό οξύ σε συγκεντρώσεις 0,01, 0,02 ή 0,03 mg/l σε συνδυασμό με 1,5 mg/l BAP. Επίσης χρησιμοποιήθηκε η BAP (1,5 mg/l) σε συνδυασμό με 0,1, 0,2 ή 0,3 mg/l IAA.

Εφαρμόστηκε επίσης 0,2 mg/l GA3 +0,02 mg/l NAA και 0.2 mg/l GA3 + 0,2 mg/l IAA. Οι βλαστοί παρέμειναν σε αυτά τα υποστρώματα για 6 εβδομάδες.

Στο στάδιο 3, οι μεμονωμένοι βλαστοί μήκους 0.5 με 1 cm αποσπώνταν και μεταφέρονταν σε καινούργιο υπόστρωμα καθαρό MS (χωρίς ορμόνες) για περαιτέρω ανάπτυξη και ρίζοβόληση.

Οι καλλιέργειες σε όλα τα στάδια επωάζονται σε τεχνητό φωτισμό με ένταση φωτισμού 3000-4500 lux στους 25°C την ημέρα και 18°C την νύχτα και σχετική υγρασία θαλάμου 60%.

Μετά από 3 εβδομάδες στο υπόστρωμα ριζοβόλησης, τα έκφυτα με ρίζες (μήκους 2 με 3 cm) μεταφυτεύονταν σε μείγμα χώματος EIK 26 (στάδιο 4). Όταν μετακινηθούν από το υπόστρωμα οι ρίζες πλένονται προσεκτικά για να απομακρυνθεί το υπόστρωμα και τα φυτά φυτεύονται σε μείγμα αποστειρωμένου χώματος που αποτελούνταν από τύρφη, κομπόστ και περλίτη σε αναλογία 1:1:3. Οι διαδικασίες χειρισμού και αποκοπής των έκφυτων είναι παρόμοιες με αυτές που ήδη περιγράφθηκαν για την παραγωγή μεμονωμένων έκφυτων.

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

α. ΠΡΟΚΑΤΑΡΚΤΙΚΕΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ

Για την παραγωγή μεμονωμένων εκφύτων τοποθετήθηκαν κορυφές βλαστών σε καθαρό MS χωρίς ιδιαίτερα αποτελέσματα (εικόνα 23). Για την παραγωγή πολλαπλών εκφύτων τοποθετήθηκαν βλαστικές κορυφές σε καθαρό MS χωρίς ιδιαίτερα αποτελέσματα (εικόνα 22). Για την παραγωγή πολλαπλών εκφύτων χρησιμοποιήθηκαν ορμόνες 1,5 mg/l BAP + NAA 0,01, 0,02, 0,03 mg/l καθώς επίσης και 1,5 mg/l BAP + IAA 0,1, 0,2, 0,3 mg/l χωρίς ικανοποιητικα αποτελέσματα (εικόνες 16, 18, 19, 21). Επίσης χρησιμοποιήθηκαν 1,5 mg/l BAP + 0,2 mg/l IAA χωρίς ικανοποιητικά αποτελέσματα (εικόνες 17, 20). Τέλος, η εφαρμογή σε σχέτο MS έδειξε μέτρια αποτελέσματα (εικόνες 24, 25).

Οι ορμονες NAA και IAA σε συνδυασμό με την BAP δημιουργούν κάλο, ο οποίος συνιστά πρόβλημα, ενώ με την GA3 όχι μόνο δεν δημιουργείται πρόβλημα αλλά η επίδρασή τους πάνω στην ανάπτυξη και επιμήκυνση των βλαστών που προέρχονται από τους παραχθέντες επίκτητους οφθαλμούς είναι πολύ καλή θα μπορούσαμε να πούμε άριστη. Οι αυξίνες NAA και IAA από μόνες τους δεν φαίνεται να δημιουργούν πρόβλημα στις μικρές συγκεντρώσεις (για την NAA <0,02 mg/l και για την IAA <0,1 mg/l).

Οι βλαστοί που καλλιεργούνται στο υπόστρωμα MS σε συνδυασμό με τις ορμόνες NAA 0,02 mg/l ή IAA 0,1 mg/l και άγαρ 1,5 gr/l (ημίρευστο υπόστρωμα) ρίζωσαν και μεγάλωσαν γρήγορα. Παρ' όλ' αυτά, όλα τα έκφυτα είχαν πολύ διογκωμένους βλαστούς με ημιδιάφανα φύλλα, και τους έλειπε το μπλε-πράσινο χρώμα που χαρακτηρίζει όλα τα κανονικά φυτά γαρυφαλλιάς. Κάποια βελτίωση στην εμφάνιση των εκφύτων παρατηρήθηκε μετά την ανάπτυξή τους για 2 εβδομάδες σε ένα υπόστρωμα χωρίς ορμόνες και με μεγαλύτερη συγκέντρωση αγαρόζης (2,6 gr/l), κατά τη διάρκεια του σταδίου 2. Παρ' όλ' αυτά, η επιβίωσή τους κατά τη διάρκεια της μεταφοράς τους σε χώμα ήταν μάλλον μικρή, με ποσοστό από 10 έως 60%. Καλύτερα αποτελέσματα επιτεύχθησαν όταν η περιεκτικότητα σε άγαρ στο αρχικό υπόστρωμα ήταν 2,6 gr/l (εικόνα 26) σύμφωνα με τον Hauzins K.A.E., 1975.

Τα αποτελέσματα των βλαστών που αναπτύχθηκαν στο βασικό υπόστρωμα MS εφοδιασμένου με αρκετή κυτοκίνη (BAP 1,5 mg/l) ή σε συνδυασμό της με τις αυξίνες NAA και IAA, καθώς και με τους συνδυασμούς των ορμονών GA3 0,2 mg/l, + NAA 0,02 mg/l ή GA3 0,2 mg/l + IAA 0,2 mg/l φαίνονται στον Πίνακα 3.

Ο μέσος αριθμός παραχθέντων επίκτητων οφθαλμών αυξήθηκε από 2-5 καθώς η συγκέντρωση της κυτοκινίνης BAP στο υπόστρωμα αυξήθηκε από 0.5 σε 1,5 mg/l. (Διάγραμμα 3). Όλοι οι βλαστοί που χωρίστηκαν και μεταφέρθηκαν σε υπόστρωμα χωρίς ορμόνες μεγάλωσαν. Όμως τα καλύτερα αποτελέσματα για καλή ανάπτυξη των βλαστών σε φύτα με ρίζες τα έδωσε οι συνδυασμοί των ορμονών 0,2 mg/l GA3 + 0,2 mg/l IAA ή 0.2 mg/l GA3+0,02 mg/l NAA.

Σε όλα τα πειράματα, η μόλυνση ήταν αρκετά χαμηλή, μεταξύ 2 και 6%. Έγινε απολύμανση της επιφάνειας των βλαστών προληπτικά, αν και δεν είχε διαφορά από την μη αποστείρωση. Προηγούμενες εργασίες, έδειξαν ότι αυτή δεν είναι απαραίτητη (Stone, 1963).

β. ΚΑΝΟΝΙΚΕΣ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ

Ι. Ανάπτυξη κορυφών σε βλαστούς

Για την παραγωγή μεμονωμένων φυτών έγινε τοποθέτηση των εκφύτων σε υπόστρωμα MS εφοδιασμένου είτε με μόνες τις ορμόνες NAA, IAA και GA3 είτε σε μεταξύ τους συνδυασμούς όπως π.χ. 0,02 mg/l NAA + 0,2mg/l GA3 και το 0,2 mg/l IAA + 0,2 mg/l GA3. Έγινε οπτική παρακολούθηση των καλλιεργειών (εικόνες 1, 2, 3, 4, 5). Μέσα σε 15 ημέρες τα έκφυτα των βλαστικών κορυφών εξελίχθηκαν σε βλαστούς και απέκτησαν ύψος 1,5 με 2 cm ενώ ταυτόχρονα ανέπτυξαν άφθονες ρίζες. Τα καλύτερα αποτελέσματα για την ανάπτυξη μεμονομένων φυτών από μεριστώμα τα έδωσαν οι συνδυασμοί 0,02 mg/l NAA+0,2 mg/l GA3 και 0,2 mg/lIAA+0,2 mg/l GA3 (διάγραμμα 1-2). Στο σταδιο αυτό μπορούν να μεταφερθούν σε καθαρό διάλυμα MS (χωρίς ορμόνες), να συσκευαστούν σε ειδικά κουτάκια και να διατεθούν κατεθείαν στον καταναλωτή (εικόνα 6).

II. Αναγέννηση επίκτητων οφθαλμών

Για την παραγωγή πολλαπλών εκφύτων τα αρχικά μεριστωματικά έκφυτα τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα MS εφοδιασμένο με 0,5 ή 1,0 ή 1,5 ή 2,0 ή 3,0 mg/l της BAP. Μετά από ένα μεγαλο χρονικό διάστημα μέσα στο οποίο είχε πραγματοποιηθεί η επιτυχής *in vitro* αναγέννηση επίκτητων μεριστωμάτων, καθώς επίσης η επανακαλλιέργεια αυτών και ο αναπολλαπλασιασμός τους υπήρχε αρκετό υλικό *in vitro*, άρχισε ο κανονικός πειραματισμός με διάφορες συγκεντρώσεις ρυθμιστών της αύξησης και ακολούθησε η συγκριτική αξιολόγηση των αποτελεσμάτων. Καλύτερα αποτελέσματα στην αναγέννηση επίκτητων οφθαλμών παρουσίασε η συγκέντρωση 1,5 mg/l BAP. Στο διάγραμμα 3 φαίνονται οι μέσοι όροι των παραχθέντων οφθαλμών στις προαναφερόμενες συγκεντρώσεις (εικόνες 7, 8, 9, 10 και 11).

Στα διαγράμματα 4, 5 και 6 φαίνεται η πορεία αναπολλαπλασιασμού των μεριστωμάτων, όταν στο υπόστρωμα υπήρχε συνδυασμός της BAP με μια αυξίνη (NAA ή IAA), ενώ στο διάγραμμα 7, φαίνεται ο συνολικός αριθμός παραχθέντων οφθαλμών, μετά από 4 εβδομάδες καλλιέργειας στα ανωτέρω υποστρώματα.

Στις περιπτώσεις χρήσης της BAP σε συνδυασμό NAA και IAA προκλήθηκε κάλος, πράγμα ανεπιθύμητο.

Τα έκφυτα στο επόμενο στάδιο τοποθετήθηκαν χωρίς τεμαχισμό σε νέα δοχεία καλλιέργειας για να παρακολουθηθεί πλέον η εξέλιξη ανάπτυξης των οφθαλμών σε βλαστούς, οι οποίοι αρχίζουν και εμφανίζονται την τρίτη εβδομάδα.

Όσα έκφυτα δεν χρειάζονταν για τις μετρήσεις τοποθετούνταν σε συνδυασμό ορμονών για ανάπτυξη και επιμήκυνση, δηλαδή σε υποστρώματα που περιείχαν 0,2 mg/l GA3 + 0,02 mg/l NAA είτε 0,2 mg/l GA3 + 0,2 mg/l IAA (εικόνες 12, 13, 14, 15).

Τα έκφυτα που χρησιμοποιήθηκαν για την μέτρηση του αριθμού των παραχθέντων βλαστών μήκους >0,5 cm τοποθετήθηκαν μετά τις 4 πρώτες εβδομάδες, σε περιέκτες με βασικό υπόστρωμα MS εφοδιασμένου με τις ορμόνες που φαίνονται στα διαγράμματα 8, 9 και τον πίνακα 3. Στο πέρας δύο ακόμα

εβδομάδων (6 συνολικά) γινόταν μέτρηση των παραχθέντων βλαστών, αποκοπή τους και τοποθέτηση τους σε υπόστρωμα για ριζοβολία.

ΠΙΝΑΚΑΣ 3

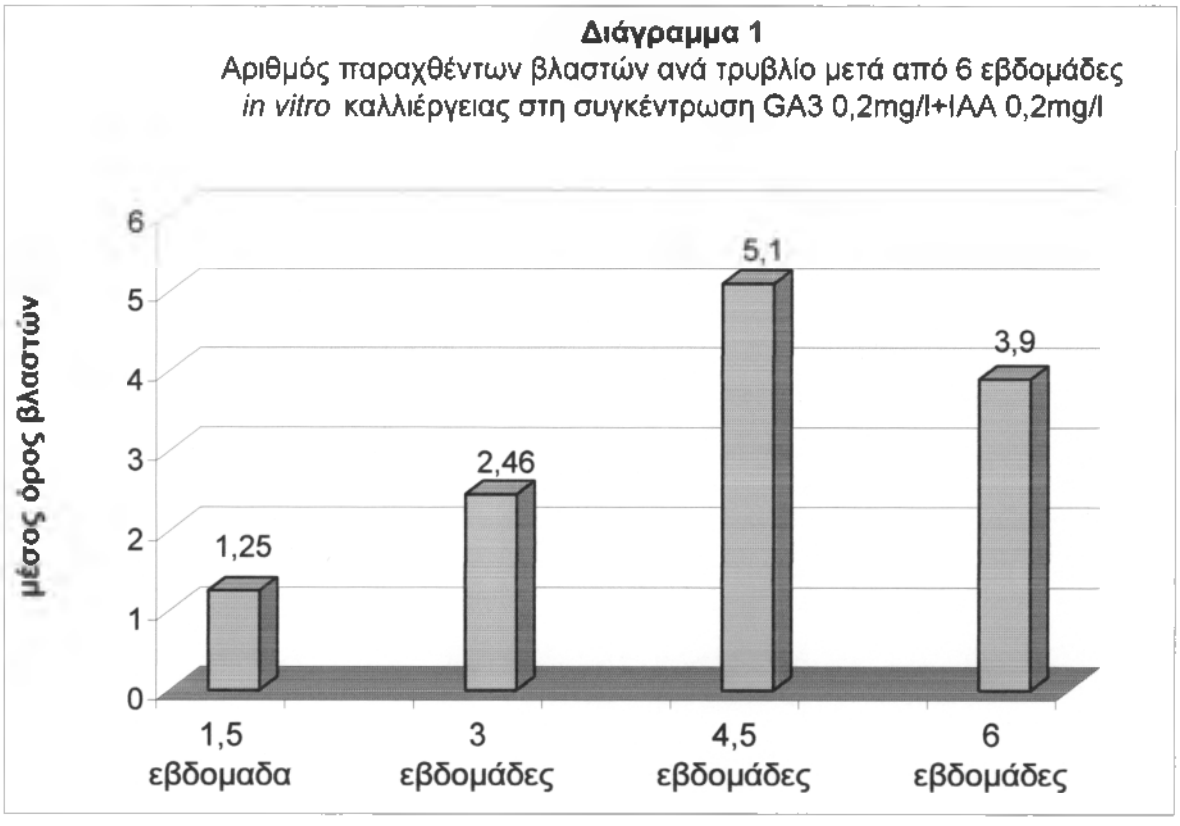
Παραγωγή πολλαπλών έκφυτων γαρυφαλλιάς

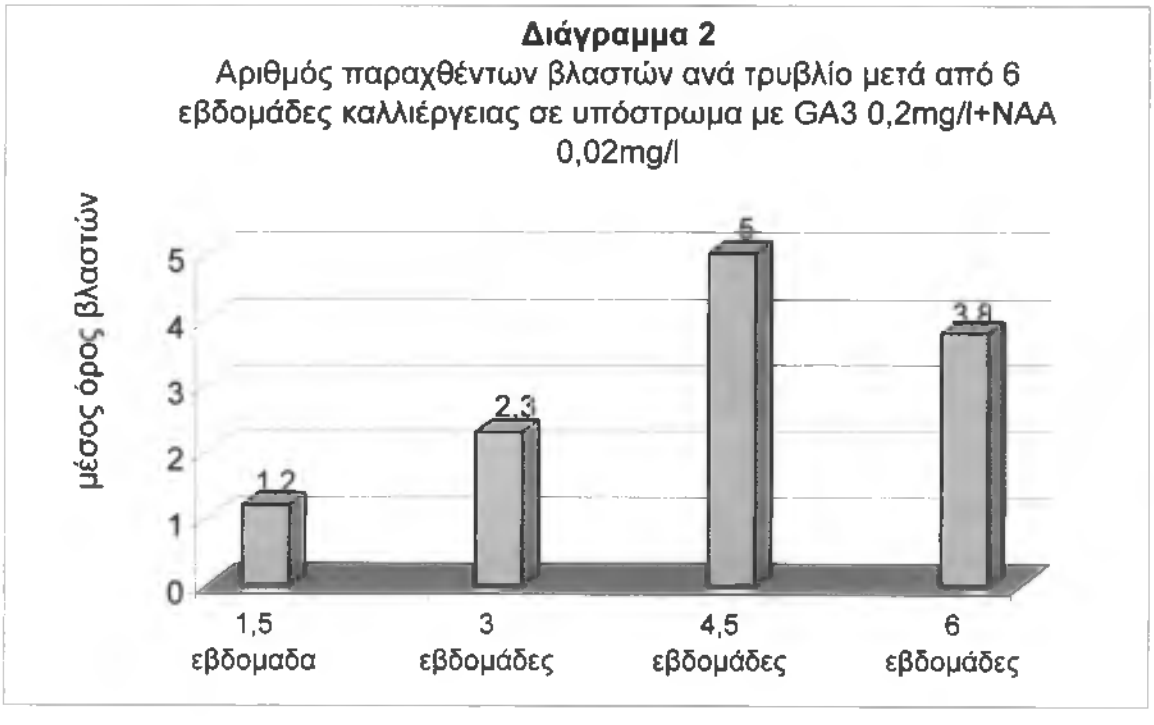
της Μεσογειακής ποικιλίας *Corso*

Αριθμός παραχθέντων βλαστών ανά έκφυτο, μετά από 6 εβδομάδες *in vitro* καλλιέργειας

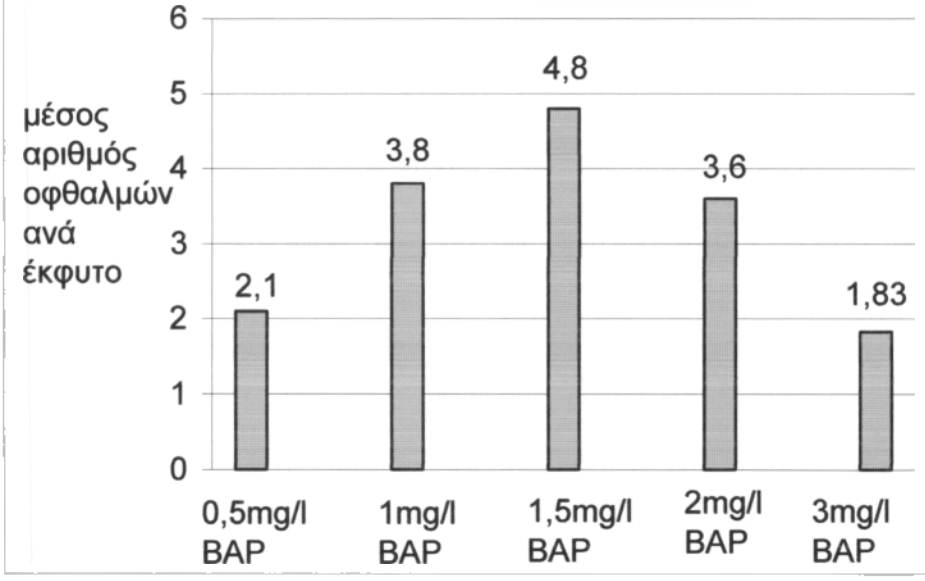
Συγκέντρωση ορμόνης mg/l	Αριθμός αρχικών έκφυτων	Έκφυτα που αντέδρασαν Αριθ./ποσοστό		Μ.Ο. βλαστών ανά έκφυτο	Έκφυτα που ανέπτυξαν έως 3 βλαστούς		3-5 βλαστούς		5 και άνω βλαστούς	
1,5 BAP	60	47	78%	4,8	18	30%	20	33%	9	15%
0,2 GA3+0,2 IAA	60	55	92%	5,1	17	28%	20	33%	18	30%
0,2 GA3+0,02 NAA	60	58	96%	5	20	33%	21	35%	17	28%
1,5 BAP+0,02 NAA	60	39	65%	3.1	20	33%	15	25%	4	6%
1,5 BAP+0,2 IAA	60	43	71%	3.3	20	33%	18	30%	5	8%

Διαγραματα

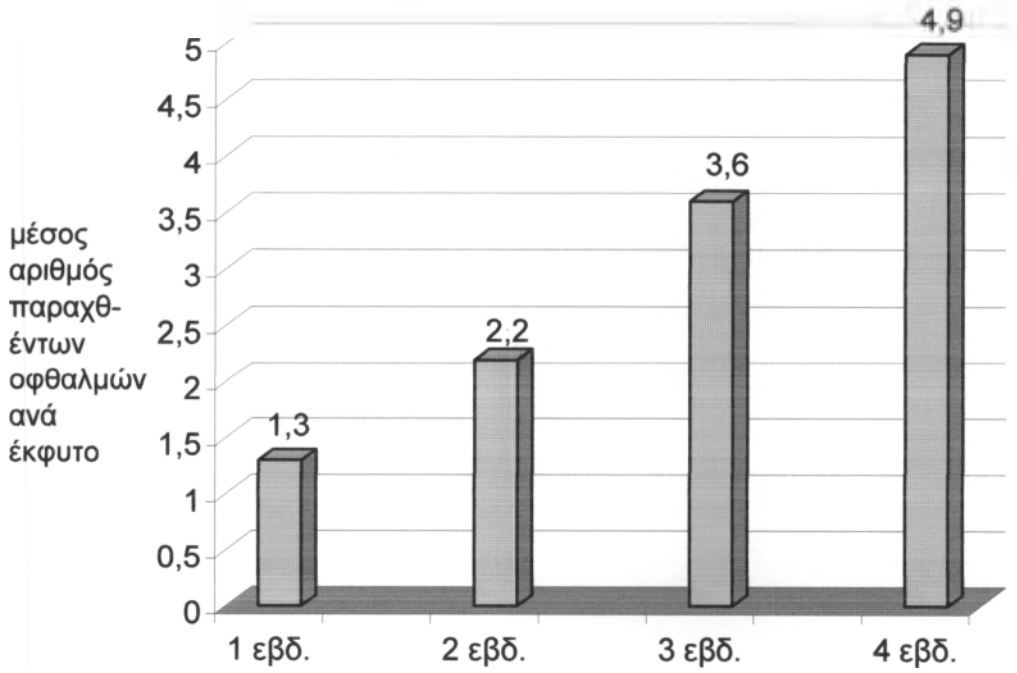

Διάγραμμα 1
Αριθμός παραχθέντων βλαστών ανά τρυβλίο μετά από 6 εβδομάδες *in vitro* καλλιέργειας στη συγκέντρωση GA3 0,2mg/l+IAA 0,2mg/l
μέσος όρος βλαστών
0
1
2
3
4
5
6
1,25
2,46
5,1
3,9
1,5 εβδομαδα
3 εβδομάδες
4,5 εβδομάδες
6 εβδομάδες


Διάγραμμα 2
Αριθμός παραχθέντων βλαστών ανά τρυβλίο μετά από 6 εβδομάδες καλλιέργειας σε υπόστρωμα με GA3 0,2mg/l+NAA 0,02mg/l
μέσος όρος βλαστών
0
1
2
3
4
5
1,2
2,3
5
3,9
1,5 εβδομαδα
3 εβδομάδες
4,5 εβδομάδες
6 εβδομάδες

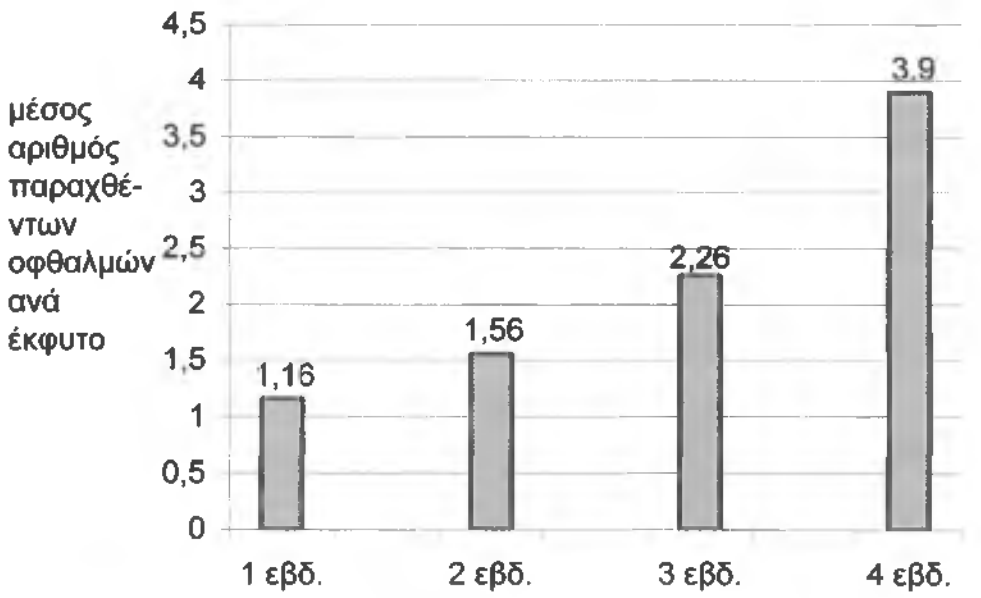
Διάγραμμα 3
Μέσος αριθμός παραχθέντων επίκτητων οφθαλμών από μεριστωματικά



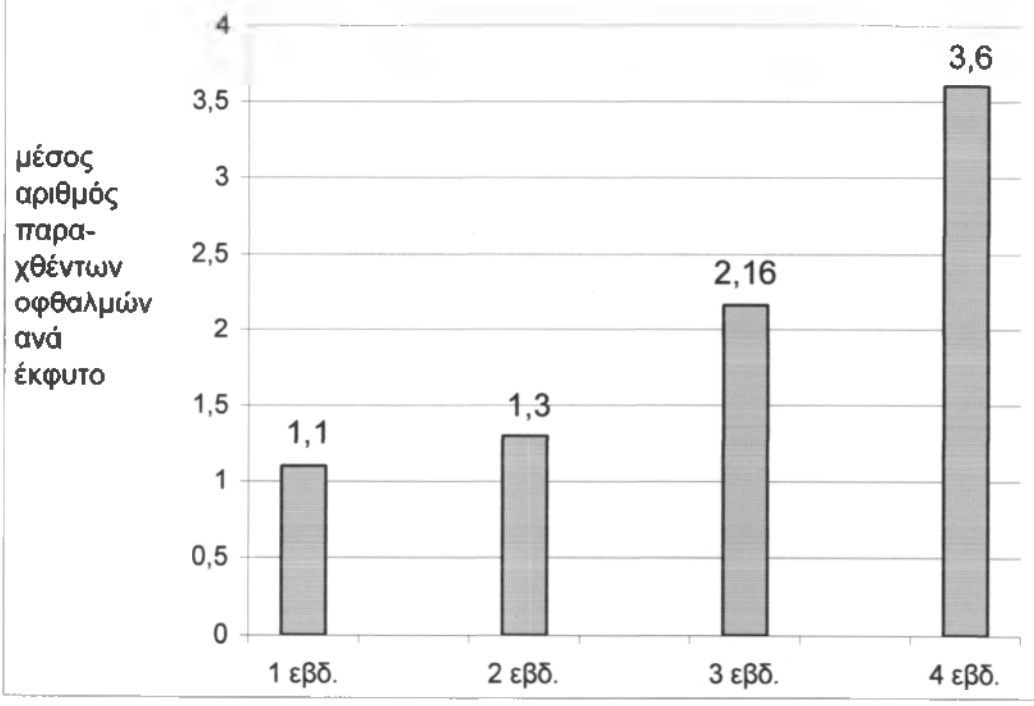
Διάγραμμα 4
Επίδραση του 1,5 mg/l BAP επί του ρυθμού αναγέννησης επίκτητων οφθαλμών από μεριστωματικά έκφυτα της ποικιλίας *corso*



Διάγραμμα 5
Επίδραση του συνδυασμού 1,5mg/l BAP+0.02mg/l NAA επί του ρυθμού αναγέννησης επίκτητων οφθαλμών

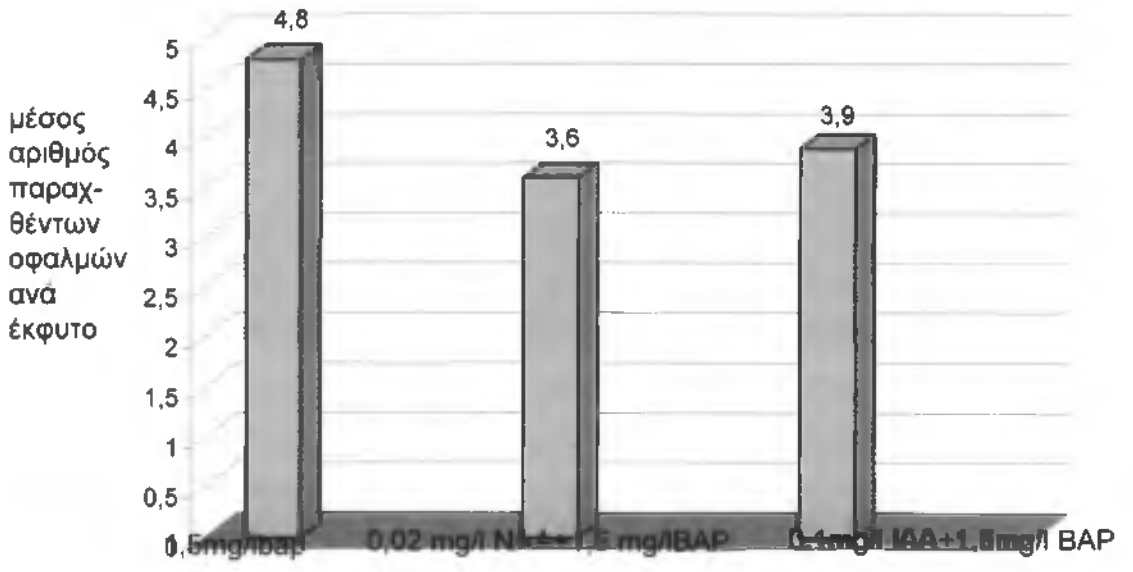


Διάγραμμα 6
Επίδραση του συνδυασμού 1,5mg/l BAP+0,2 mg/l IAA επί του ρυθμού αναγέννησης επίκτητων οφθαλμών



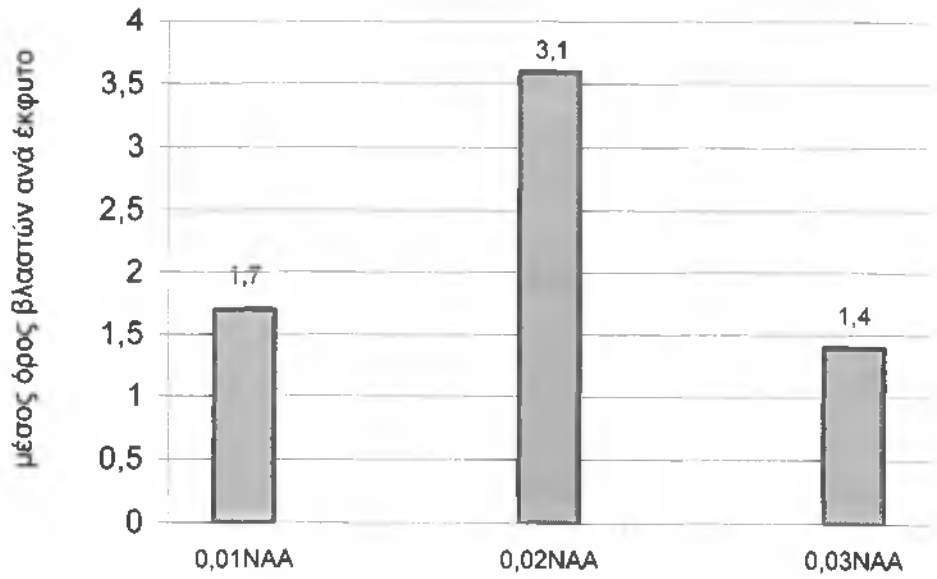
Διάγραμμα 7

Συγκριτική μελέτη της επίδρασης διαφόρων συνδυασμών φυτορμονών επί της αναγέννησης επίκτητων οφθαλμών από μεριστωματικά έκφυτα της ποικιλίας *corso*. Οι μετρήσεις έγιναν στο τέλος της 4ης εβδομάδας της *in vitro* καλλιέργειας.



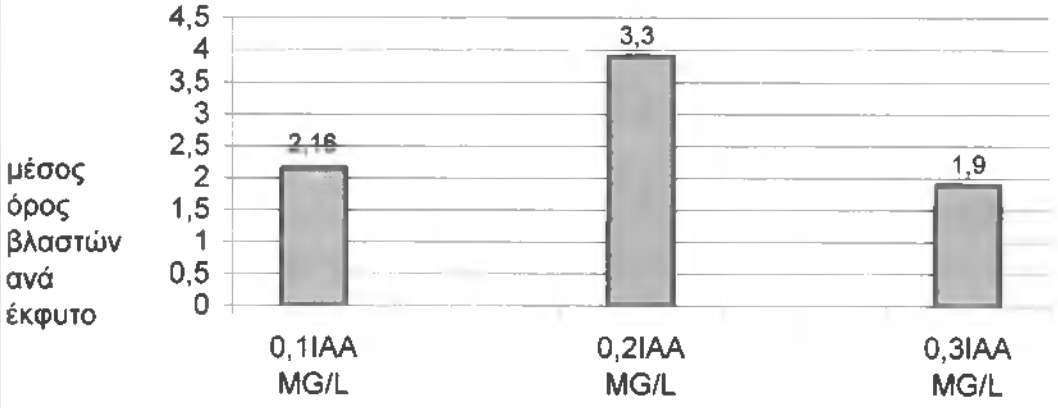
Διάγραμμα 8

Αριθμός παραχθέντων βλαστών ανά έκφυτο μετά από 6 εβδομάδες καλλιέργειας σε διάφορες συγκεντρώσεις της NAA σε συνδυασμό με την 1,5 mg/l BAP



Διάγραμμα 9

Αριθμός παραχθέντων βλαστών ανά έκφυτο μετά από 6 εβδομάδες *in vitro* καλλιέργειας σε διάφορες συγκεντρώσεις της IAA σε συνδυασμο με 1,5 mg/l BAP



ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ – ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως αναλύθηκε πιο πάνω με την μεριστωματική καλλιέργεια της γαρυφαλλιάς επιτυγχάνεται παραγωγή άνοσου φυτικού πολλαπλαστικού υλικού, καθώς επίσης και μεγάλη παραγωγή φυτών μέσω κλωνοποιήσης, σε μικρό χρονικό διάστημα.

Αν πάρουμε τα στοιχεία του πειράματός μας και υπολογίσουμε τον μέσο όρο ρυθμού αναπολλαπλασιασμού των μεριστωμάτων κατά μήνα και την παραγωγή βλαστών ανά έκφυτο, μετά από 6 εβδομάδες καλλιέργειας, τότε θα δούμε ότι μπορούμε να παράγουμε πάνω από 1000 φυτά, από ένα και μοναδικό έκφυτο. Στους 12 μήνες τα φυτά που μπορούμε να πάρουμε μπορεί να είναι και 1000.000 από ένα έκφυτο. Αυτό είναι θεωρητικό. Για ένα εργαστήριο ιστοκαλλειέργειας το οποίο δεν έχει τον κατάλληλο εξοπλισμό και το κατάλληλο προσωπικό οι παραπάνω αριθμοί ίσως είναι ανέφικτοι, όμως οργανωμένες επιχειρήσεις με κατάλληλο εξοπλισμό και έμπειρο προσωπικό μπορούν να τους πετύχουν.

Ο μεγάλος αυτός αριθμός φυτών μπορεί να επιτευχθεί με τον σχηματισμό όλο και περισσότερων επίκτητων οφθαλμών, από τον αρχικό οφθαλμό του έκφυτου. Οι επιπλέον αυτοί βλαστοί μπορεί να προέρχονται από την ανάπτυξη των ήδη προϋπαρχόντων οφθαλμών ή των καταβολών οφθαλμών, οι οποίοι είναι τόσο μικρού μεγέθους που δεν εντοπίζονται ακόμα και με ισχυρό στερεοσκόπιο ή από τη δημιουργία νέων επίκτητων μεριστωμάτων, ως αποτέλεσμα της δράσης των θρεπτικών υποστρωμάτων και κυρίως των ρυθμιστών της αύξησης. Αυτοί δημιουργούνται στο σημείο της βάσης του έκφυτου και ο αριθμός τους βρίσκεται σε αρνητική εξάρτηση με τον νεοδημιουργημένο κάλο (Κανάκης, 1997).

Στα πειράματά μας για την παραγωγή πολλαπλών εκφύτων χρησιμοποιήθηκε μία κυτοκινίνη (BAP) και συνδυασμός αυτής με μια αυξίνη. Τα καλύτερα αποτελέσματα τα έδωσε η χρήση μόνης της BAP σε συγκέντρωση 1,5 mg/l. Αυτό συμφωνεί με τα αποτελέσματα των Nakano et al (1994).

Στην περίπτωση αυτής της συγκέντρωσης παρατηρούνται τα καλύτερα δυνατά αποτελέσματα αναπολλαπλασιασμού των μεριστωμάτων, με ρυθμό αναπολλαπλασιασμού αυτόν του 4,8 για την ποικιλία *Corso*.

Επίσης πρέπει να αναφερθεί ότι ο αριθμός των παραχθέντων οφθαλμών στα έκφυτα είναι πολύ μεγαλύτερος στα στάδια 2 και 3 απ' ότι του πρώτου σταδίου της καλλιέργειας των μεριστωμάτων και σε πολλές περιπτώσεις ο αριθμός αυτός είναι μεγαλύτερος των 100 ανά έκφυτο. Αυτό μας δείχνει πιθανόν ότι τις 4 πρώτες εβδομάδες καλλιέργειας (στάδιο 1) γίνεται αναπολλαπλασιασμός από ένα μοναδικό μερίστωμα ενώ στο επόμενο στάδιο, εφόσον έχουμε την συνέχιση της χρήσης των ίδιων συγκεντρώσεων φυτορυθμιστικών ουσιών, ο αναπολλαπλασιασμός γίνεται από μεγαλύτερο αριθμό μεριστωμάτων, αυτών δηλαδή που παράχθηκαν στο πρώτο στάδιο. Λόγω του υπερβολικά μεγάλου αριθμού μεριστωμάτων, στα στάδια αυτά η μέτρησή τους ήταν αδύνατη.

Άλλοι ερευνητές χρησιμοποίησαν στο παρελθόν την NAA και IAA σε συνδυασμό με την BAP και τα αποτελέσματα δεν ήταν καλά. Υπάρχει πρόβλημα λόγω δημιουργίας κάλου και το πρόβλημα αυτό είναι οξύ και έντονο κατά τον αναπολλαπλασιασμό των μεριστωμάτων.

Στην περίπτωσή μας απορρίφθηκαν από τις μετρήσεις τα έκφυτα που παρήγαγαν κάλο σ' όλη τους την επιφάνεια. Υπήρξαν όμως και περιπτώσεις που τα έκφυτα παρήγαγαν κάλο κατά περιοχές, ενώ στην υπόλοιπη επιφάνεια τους παρήγαγαν σε μικρό αριθμό επίκτητους οφθαλμούς. Τα έκφυτα αυτά ελήφθησαν υπόψη κατά τη λήψη των μετρήσεων και είχαν ως αποτέλεσμα τη μείωση του μέσου αριθμητικού όρου των παραχθέντων επίκτητων οφθαλμών ανά έκφυτο. Τον σχηματισμό κάλου παρατήρησε και ο Phillips 1965.

Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας αναγέννησης επίκτητων οφθαλμών ακολουθεί η φάση ανάπτυξης και εξέλιξής τους σε βλαστούς.

Η γιββερλίνη GA3 σε συνδυασμό με μια αυξίνη (NAA, IAA), στις συγκεντρώσεις 0,02 mg/l NAA + 0,2 mg/l GA3 και 0,2 mg/l GA3 + 0,2 mg/l IAA, θεωρείται, όπως προελέχθη, ως ένα άριστο ερέθισμα για ανάπτυξη του ακραίου και των επίκτητων μεριστωμάτων και εξέλιξή τους σε βλαστό. Οι ίδιοι συνδυασμοί ορμονών αναδείχθηκαν κατάλληλοι και για πρόκληση ριζοβολίας.

Αυτό είναι γεγονός για την ποικιλία *Corso* (διάγραμμα 1 και 2) και βρίσκεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα του Pennazio (1975). Ο Phillips (1968) χρησιμοποίησε επίσης και μεγαλύτερες συγκεντρώσεις NAA 1 mg/l χωρίς ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Σε όλους τους εφαρμοσθέντες συνδυασμούς φυτορμονών το μεγαλύτερο ποσοστό (33%) των έκφυτων παρήγαγε μέχρι 3 βλαστούς και το 35% από 3-5 βλαστούς. Επίσης πρέπει να σημειωθεί ότι οι συνδυασμοί GA3+NAA και GA3+IAA ήταν ο αποτελεσματικότερος αφού με αυτόν παρήχθησαν πάνω από 6 βλαστοί ανά έκφυτο σε ποσοστό 30% και 28%, πίνακας 3 και αυτό συμφωνεί με τα αποτελέσματα του Pennazio (1975).

Γενικά για τα συστήματα μικροπολλαπλασιασμού, ο συνδυασμός των ορμονών και η δράση τους έχουν τεράστια σημασία, γιατί παρέχουν ένα αποτελεσματικό μέσο στη διάθεση των ερευνητών, έτσι που να ρυθμίζουν κατά βούληση την επαγωγή της μορφογένεσης, δηλαδή να κατευθύνουν το σχηματισμό βλαστών η ριζών. Για αυτό οι *in vitro* καλλιέργειες είναι σχεδον αδύνατες χωρίς τους ρυθμιστές της αύξησης. Το ίδιο ισχύει και για την γαρυφαλλιά αλλά απαιτείται πειραματισμός για κάθε ποικιλία χωριστά, ώστε να βρεθούν οι καλύτερες σχέσεις των ρυθμιστών της αύξησης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Baker, R. and D. J. Phillips.1962. obtaining pathogen-free stock by shoot-tip culture. Phytopathology 52:1242-1244

Bush, S.R., E.D. Earle AHD R.W. Langhans. 1976. Plantles from petal segments, petal epidermis ahd shoot tips of the periclinal chimeraq, chysahthemum morifolium Amer.j.Bot. 63:729—73

Constantine, D. R. 1986. Micropropagation in the commercial environment. Plant Tissue Culture and its Agricultural Applications 175—186 University Press,Cambridge

Davis, M.J.,R. Baker ahd J.J. Hanan. 1977. Clonal myltiplication of carnation by micropropagation. J.amer.soc.hort.sci. 102:48--53

Earle, E.D,ahd R.W.Langhans. 1975. Carnation propagation from shoot tips cultured in liguid medium. HortScience 10:608—610

Gautheret,R.J. 1942. Manual technigue de cuiture des tissue vegetaux. Masson, paris.

George E.F. Plant Propagation by tissue culture, part 1-2.

Hackett,W.P. and J.M.Anderson. 1967. Aseptic multiplication ahd maintenance of differehtial carnation shoot tissue derived from shoot apices.proc.Amer.soc.Hort.Sci.90:365—369

Hanan,J.J., Holley.W.D. and k.L.Goldsberry, 1978. Greenhouse Management. Springer-verlag. Berlin heidelberg new york. 530p.

Hauzinska, E. 1975.Organogeneisis in tissue culture of greenhouse cernation. Hodowla Roslin Aklimatyzacja Nasiennictwo 19(4) 374--376

Heller, R.1963. Some aspects of the inorganic nutrition of plant tissue cultures. IN proc.int Conf.on Plant Tissue Culture mcCutchan Pub, Corp.,Berkeley,CA

Holley and G.Nilsson.1972.Carnation mutation freguency related to size and position of shoot tip.Colo Flower Growers Assoc.bui. 268,1—4.

Holley, W, D. and R. Baker.1963.Carnation production. Wm.C.Brown Company Publishers,Dubugue,Iowa.142p.

Hollings,M. 1965. Disease control though virus-free stock. Ann. Rev. Phytopathology 3:367—396

Κανάκης, Α. 2001. Μαθήματα ιστοκαλλιέργειας. Έκδοση Τ.Ε.Ι. Καλαμάτας. Καλαμάτα

Leshem,B.1986. Carnation plantlets from vitrified plants as a source of somaclonal variation.HortScience 21(2):320---321

Morel,G.1948. Recherches sur la culture associee de parasites abligatoires et de tissues vegetaux.Ann.Epiphyt.N.S.14:123

Murashige,T.and F. Skoog.1962.A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures.Phsiool.Plant. 15:473---497

Nakano M., Hoshinoy Y. & Mii M. 1994. Adventitions shoot regeneration from Cultured petal explants of carnation. Plant cell tiss. organ. cult. 36, 15-19.

Nitsch, J.P. and C. Nitsch.1956. Auxin-dependent growth of excised Helianthus tuberosus tissues.Amer.J.Bot.43:839—851

Nitsch, J.P.and C. Nitsch. 1969. Haploid plants from pollen grains.Science 163:85—87

Pennazios, 1975, Effects of adenine and kinetin on development of carnation meristem tips cultured *in vitro*. J. Hort. Sci., 50, 161-164.

Phillips, D.J. and G.J. Matthews. 1964.Growth and development of carnation shoot tips *in vitro*.Botan.Gaz.125:7—12

Phillips,D.J.1962.The clean stock program and the shoot tip.colo.Flower growers Assoc.Bul.145,1—4

Phillips,D.J.1968.Carnation shoot tip culture. colo. St. Univ. Expt. Sta. Tech. Bul.102.22p

Quak, F. 1967.Meristeemcultur gecombineerd met warmtebehandeling voor het vekrijgenvan virusvrije anjerplanten.Tijdschr.Pl.Ziekt.63:13-14

Schleiden, J.M. 1983. Beiträge, zure, Phytogenesis. Archiv. für Anatomie, physiologie und wissen schaftliche Madizin, 4: 137-170

Schwann, T. 1838. Mikroskopische untersuchungen über die übereinstimmung in der structur und dem wachstrume der thiere und pflanzen. Ostwalds Klassiker, Nr. 176, Leipzig, Englemann.

Stone. O. M. 1963.Factors affecting the growth of carnation plants from shoot apices.Ann.Appl.Biol. 52:199---209

Van Os, H. 1964.Production of virus—free carnations by means of meristem cultyre.Neth.J.Plant Path. 70:18----26

White, P. R. 1964.The Cultivation of Animal and Plant Cells Ronald Press Co.,New York.239p

Ζαχαριουδάκης, Γ., 1991. Αναπαραγωγή φυτών: Μεριστωματική καλλιέργεια της γαρυφαλλιάς. Γεωργ. Τεχνολογία, 11/91: 72-80.

Zimmerman, R. H., and J. Barnbill Jones, 1991. Commercial micropropagation in North America. In: Micropropagation:Technology and application (eds. P.C. Debergh and R.H. Zimmerman), Kluwer, Dordrecht: 173-180.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

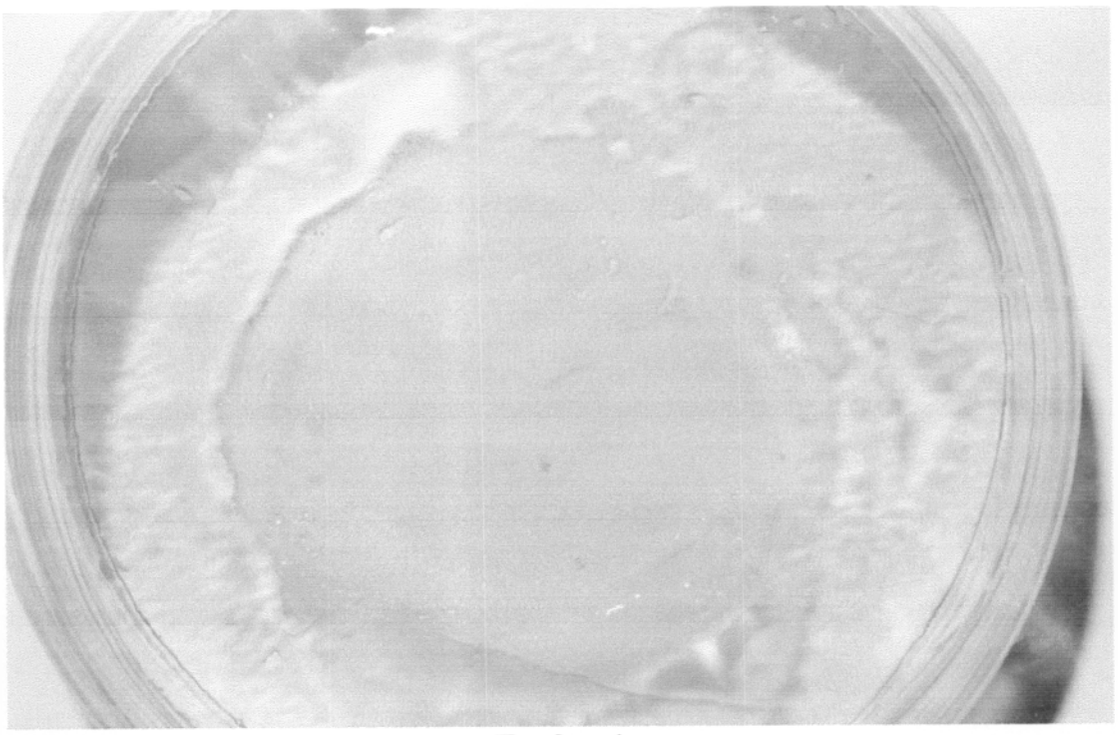
• **ΣΥΝΤΜΗΣΕΙΣ**

BAP 6-benzylaminopurpurine 6-βενζιλοαμινοπουρπουρίνη (κυτοκινίνη)

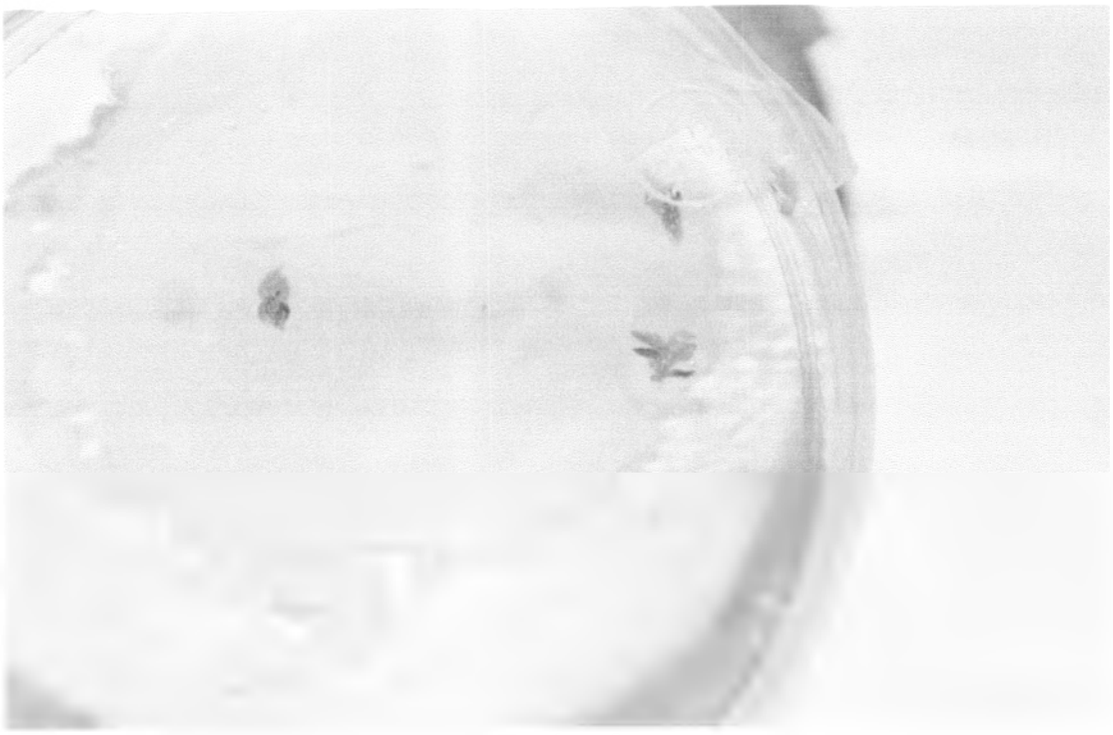
GA3 gibberilic acid γιββερυλλικό οξύ (γιββερυλλίνη)

IAA indoleacetic acid ινδολυλοξικό οξύ (αυξίνη)

NAA naphataleneacetic acid ναφφθαλινικό οξύ (αυξίνη)

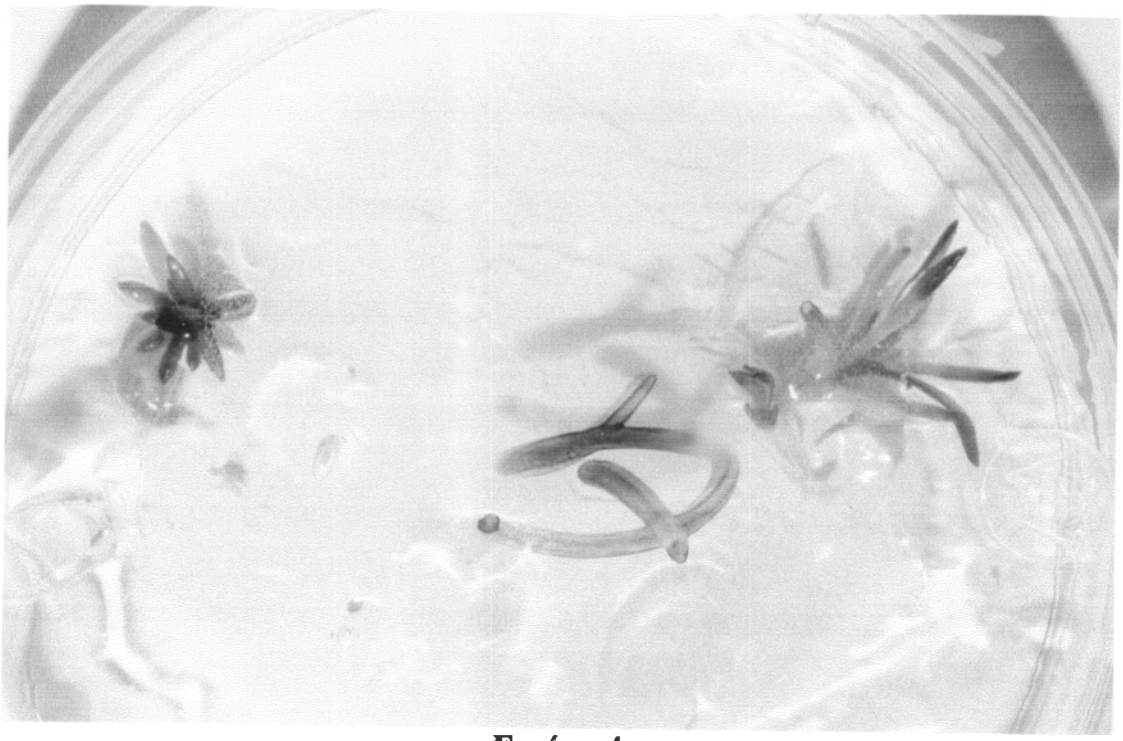


Εικόνα 1

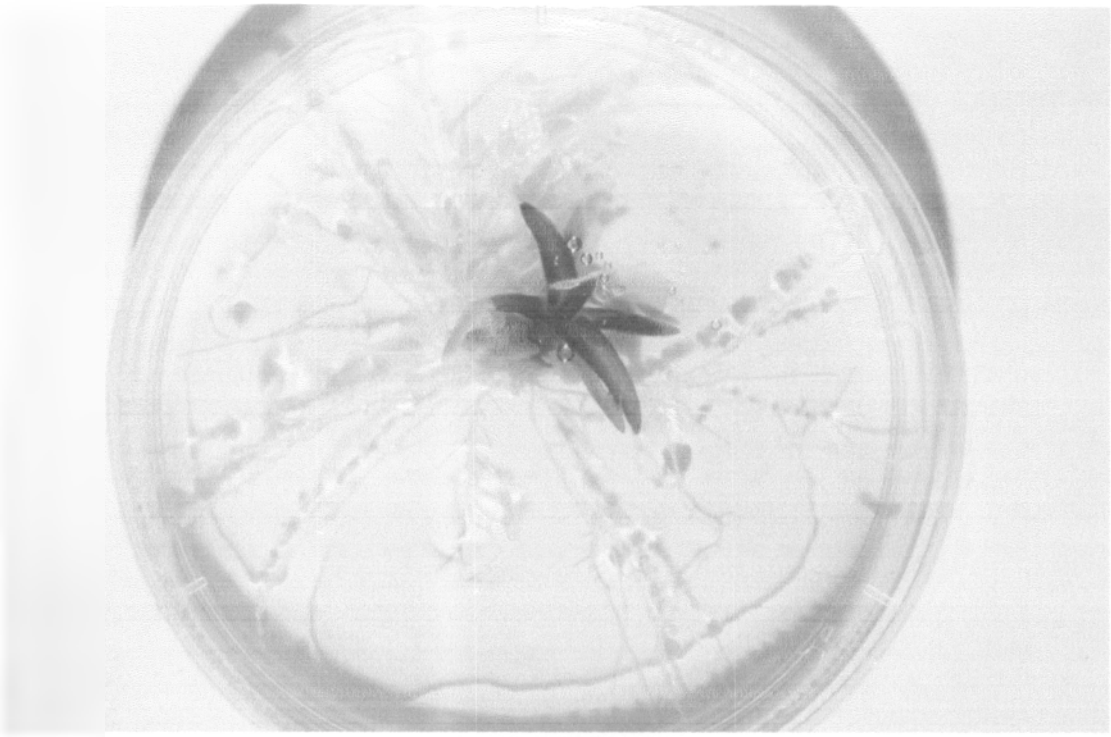


Εικόνα 2

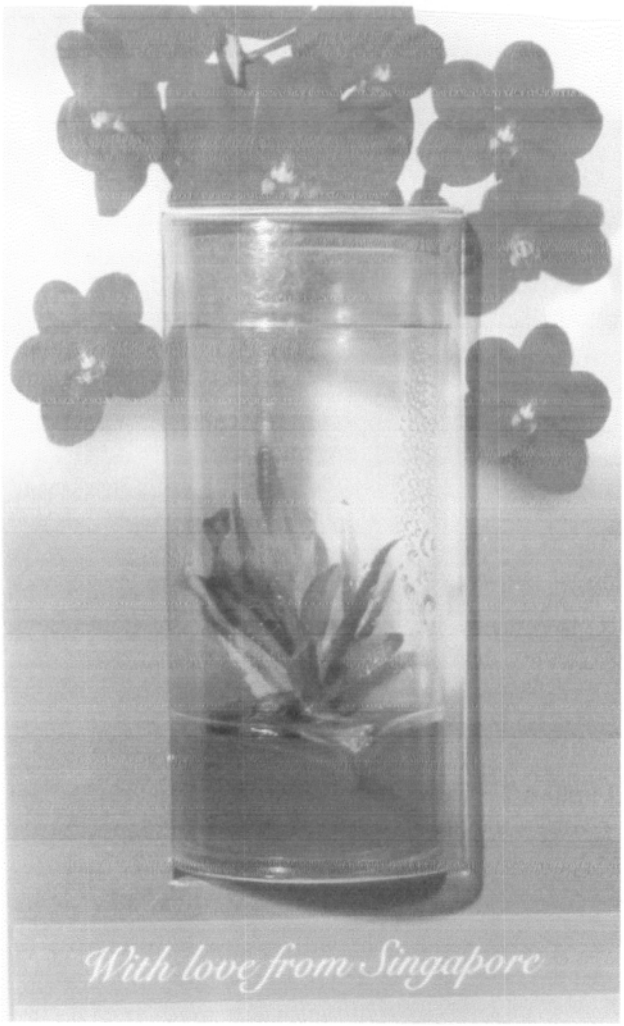
Εικόνα 3



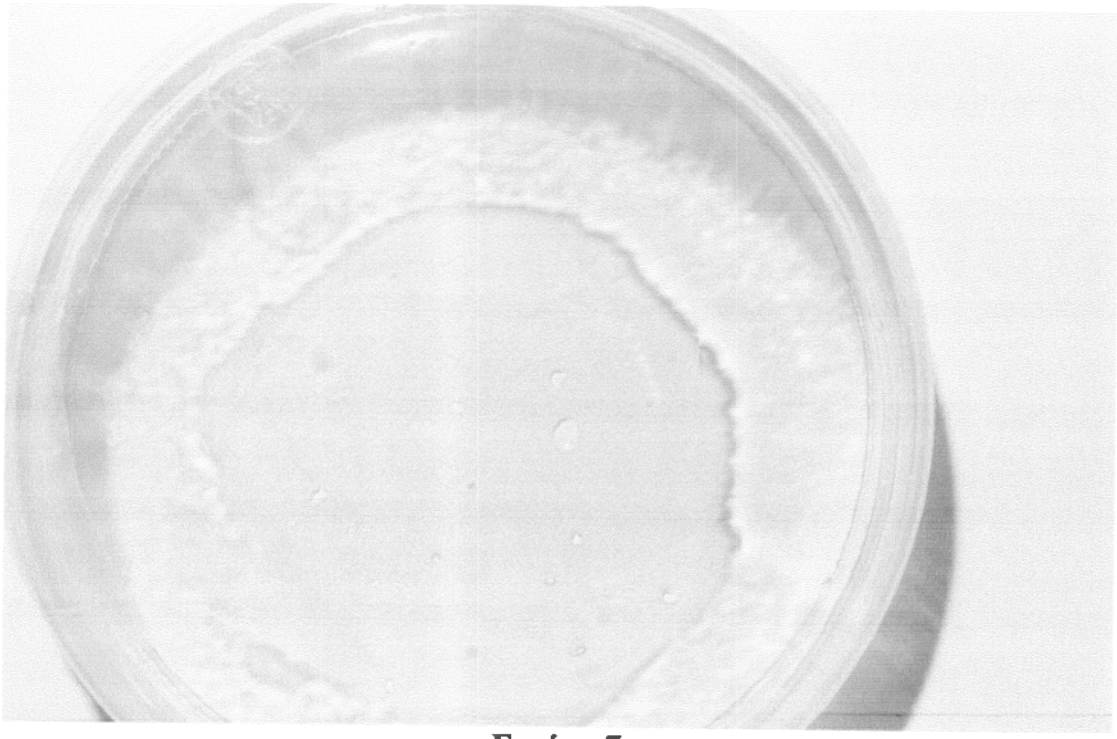
Εικόνα 4



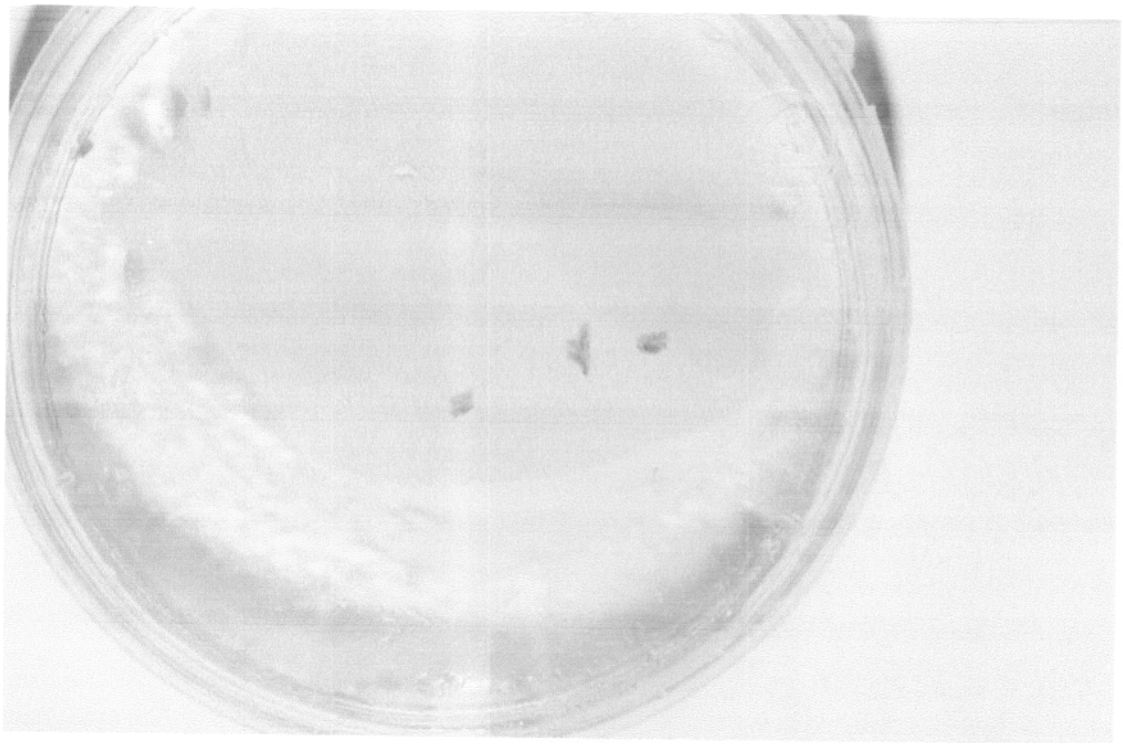
Εικόνα 5



Εικόνα 6

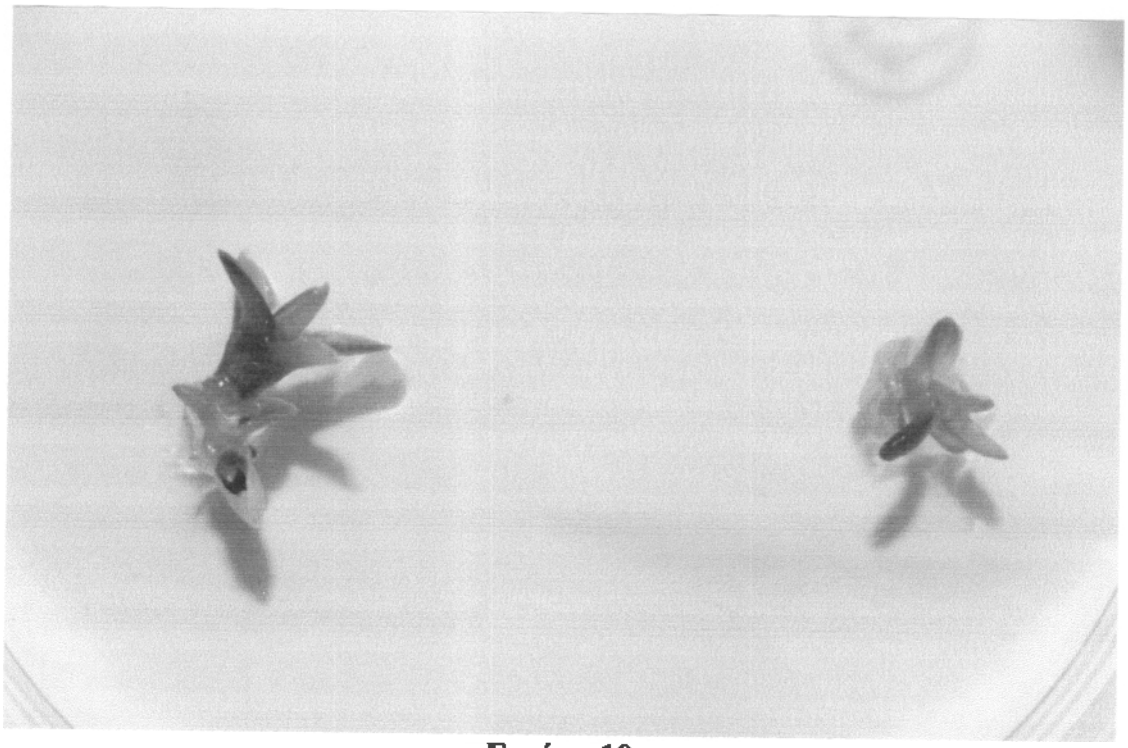


Εικόνα 7

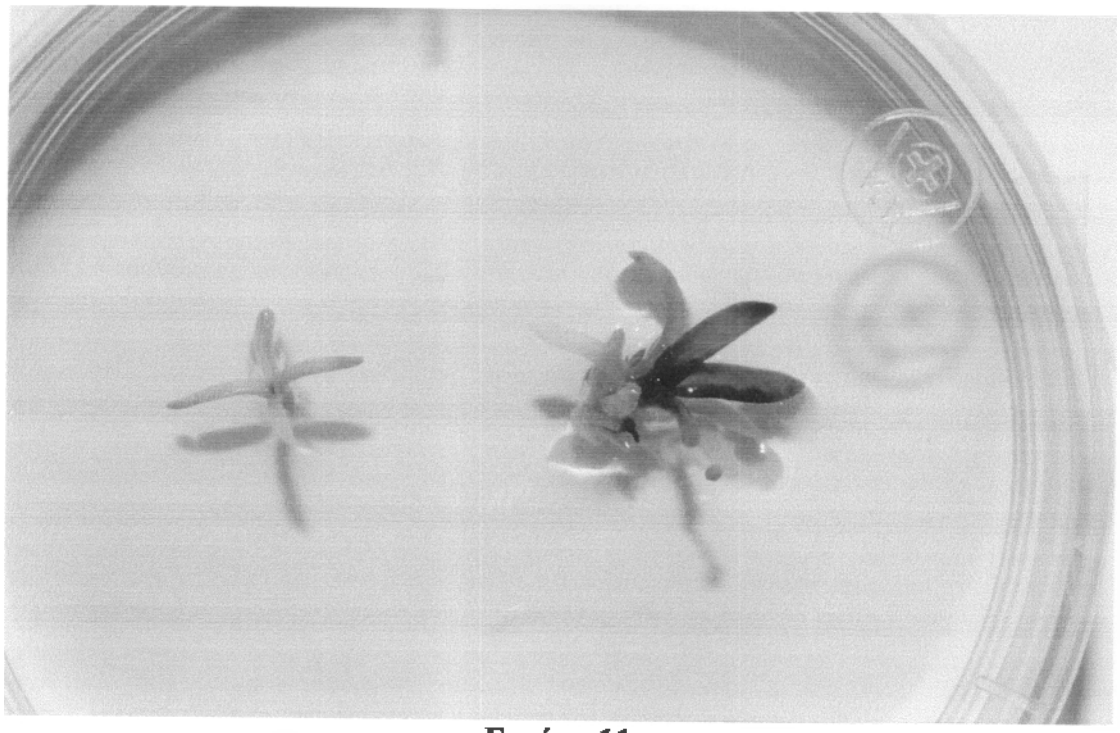


Εικόνα 8

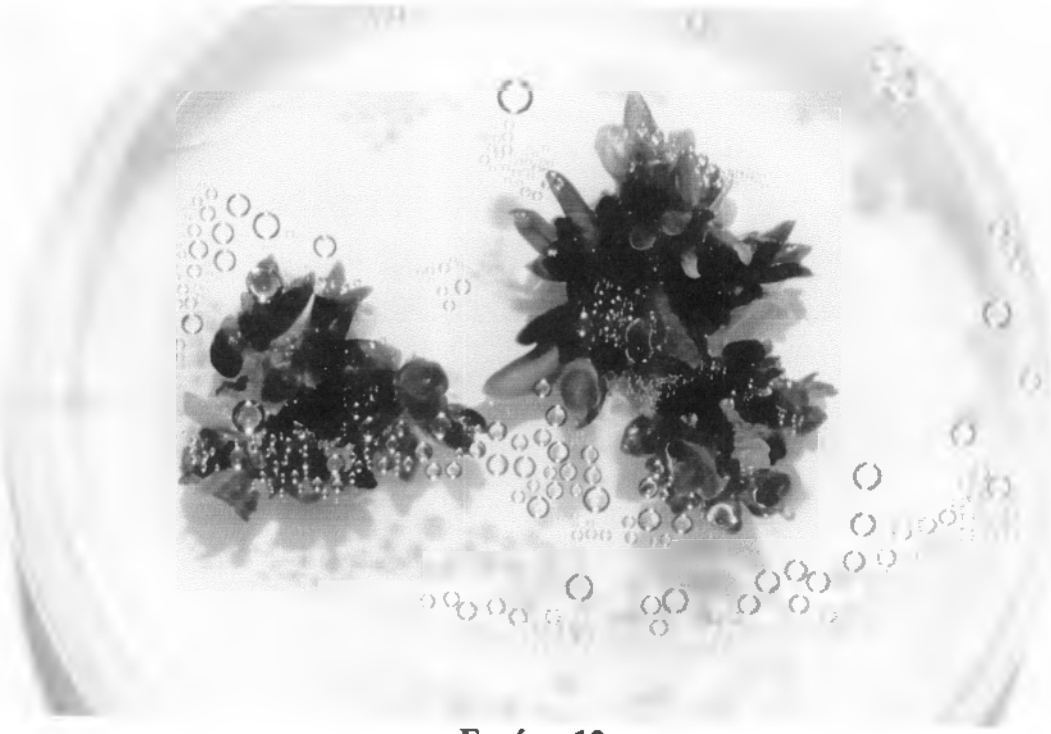
Εικόνα 9



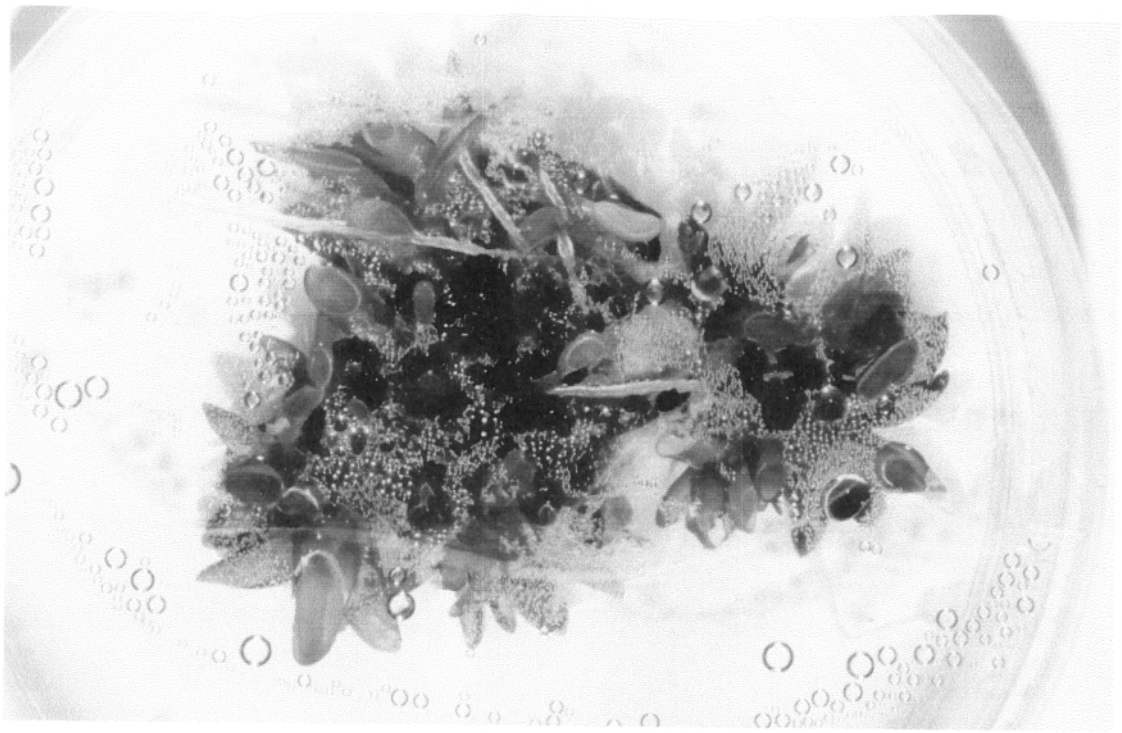
Εικόνα 10



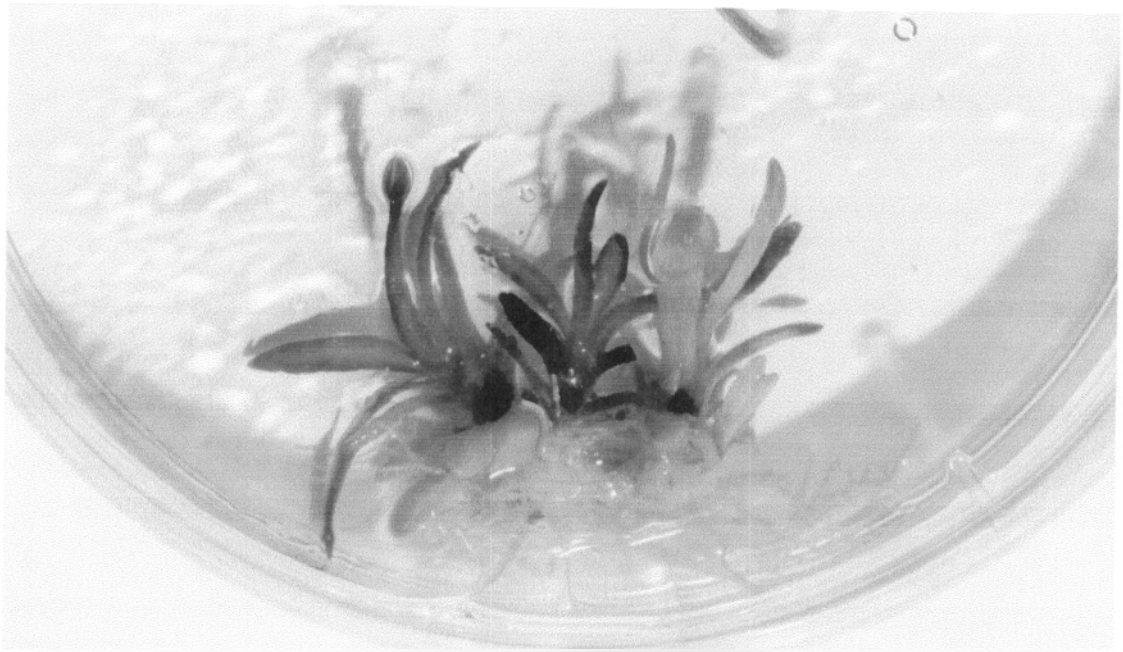
Εικόνα 11



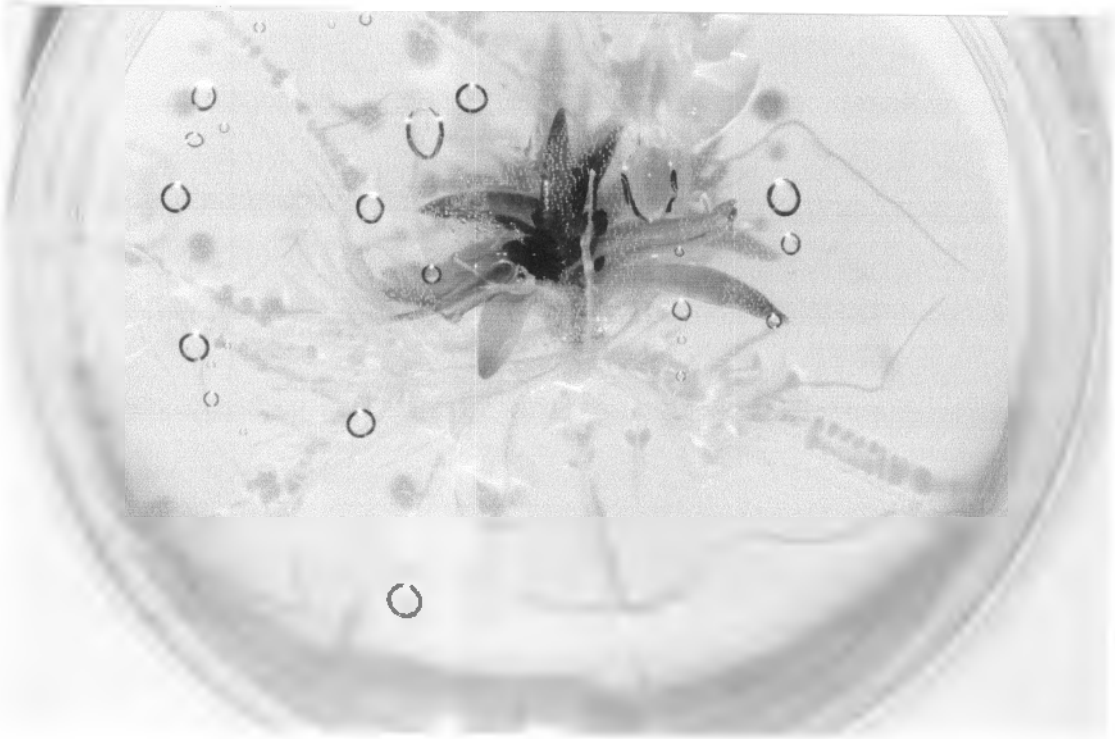
Εικόνα 12



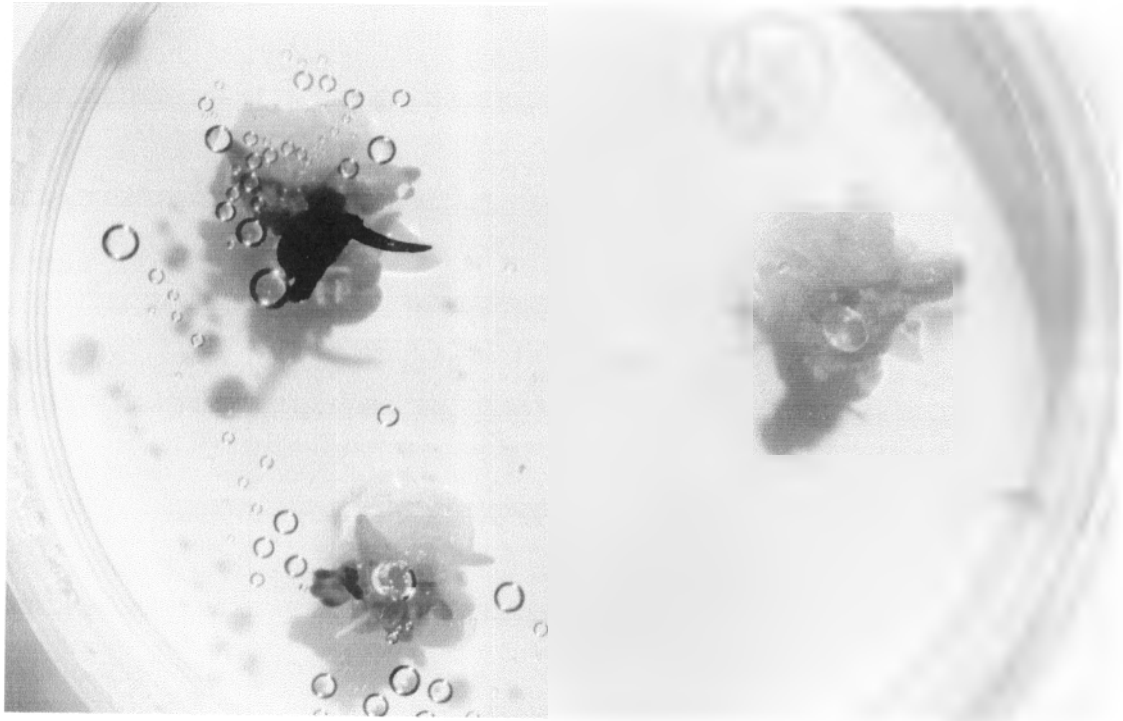
Εικόνα 13



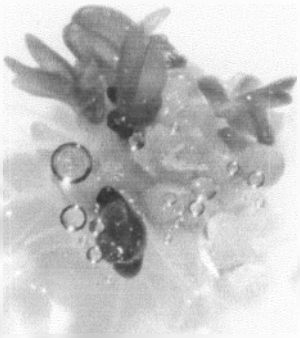
Εικόνα 14



Εικόνα 15

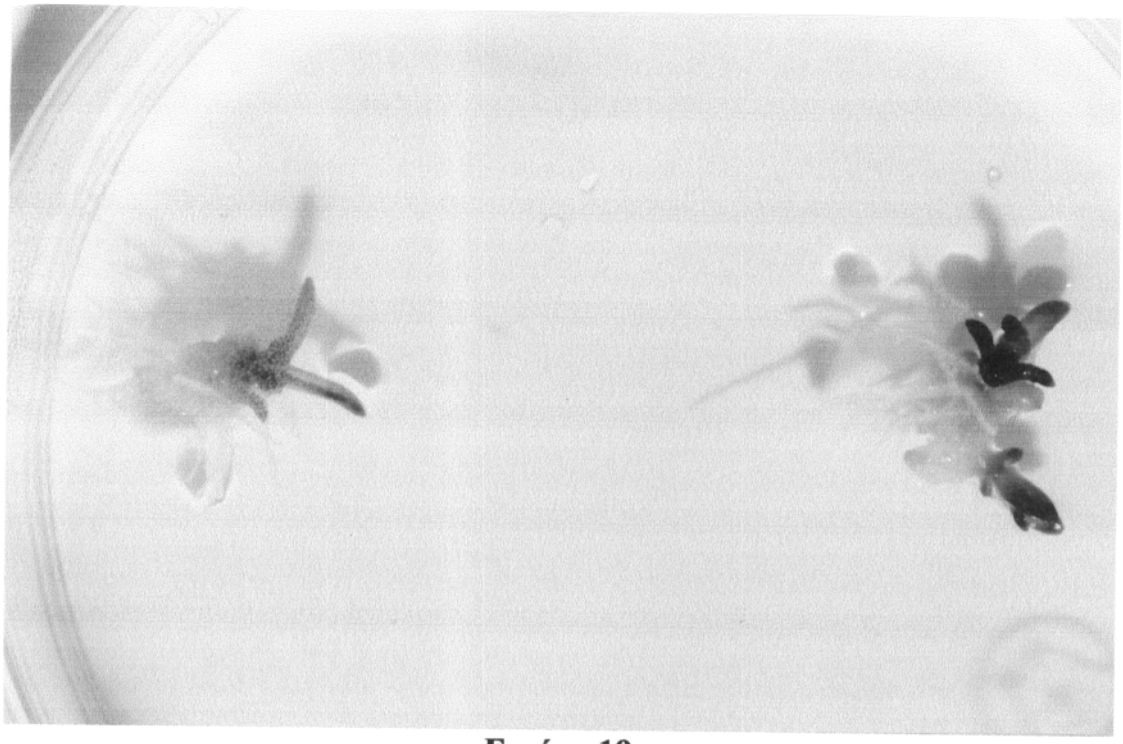


Εικόνα 16

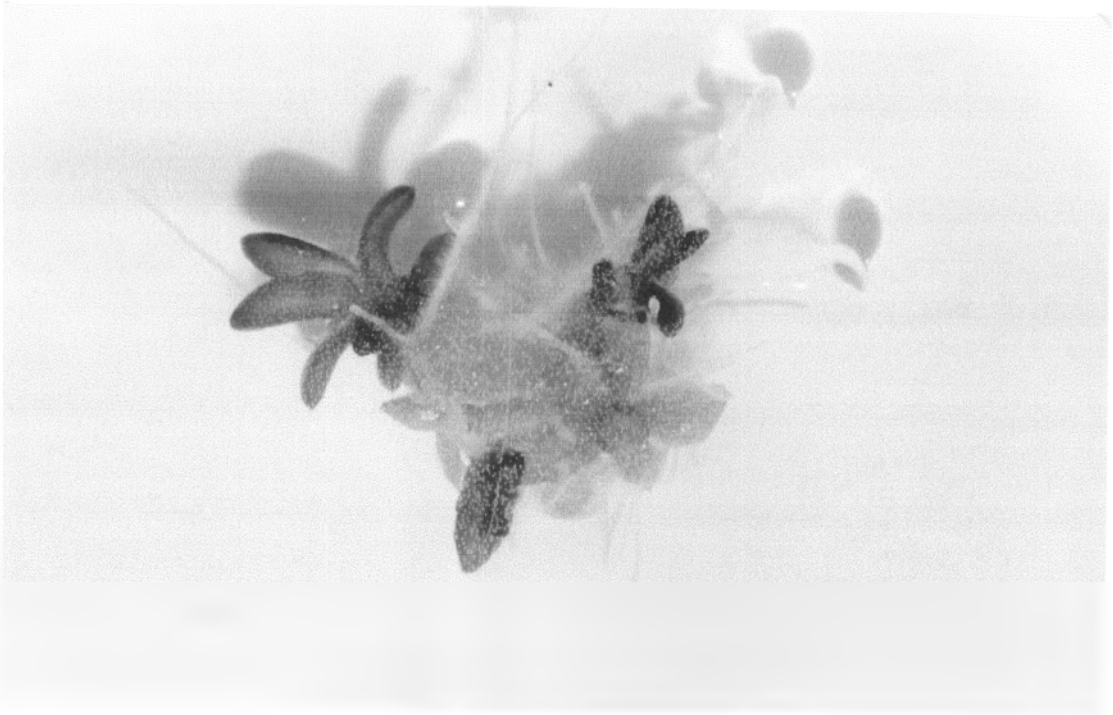


Εικόνα 17

Εικόνα 18

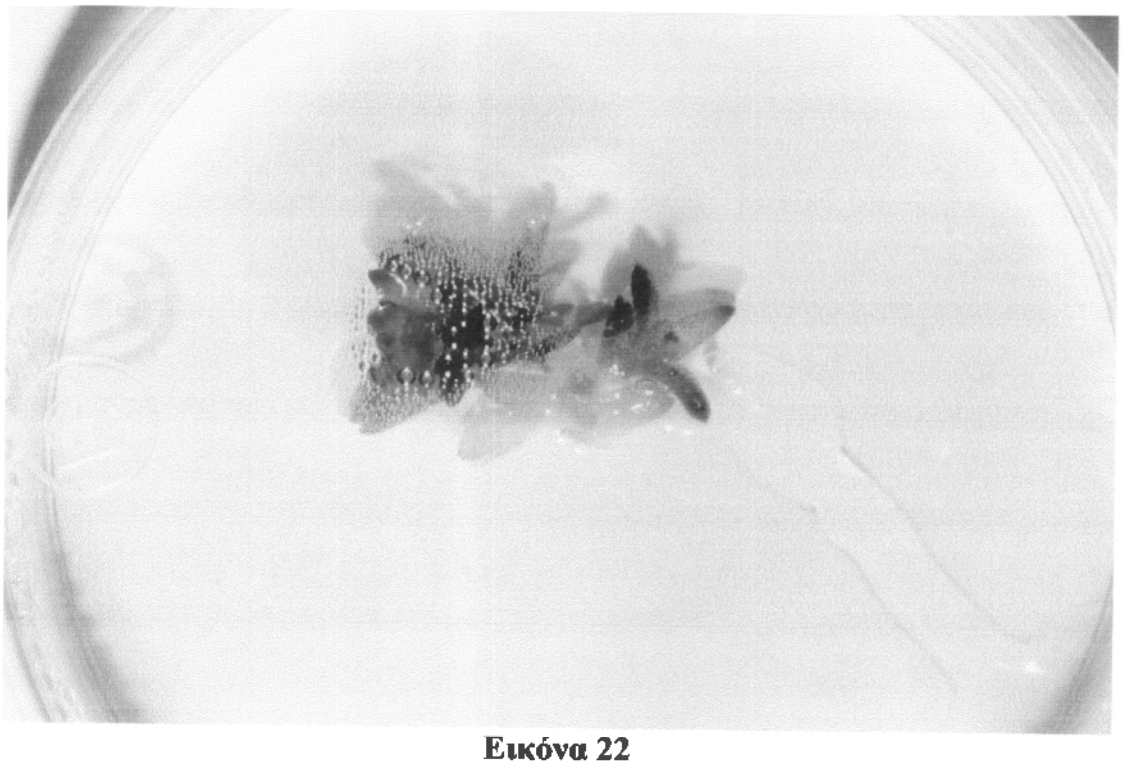


Εικόνα 19

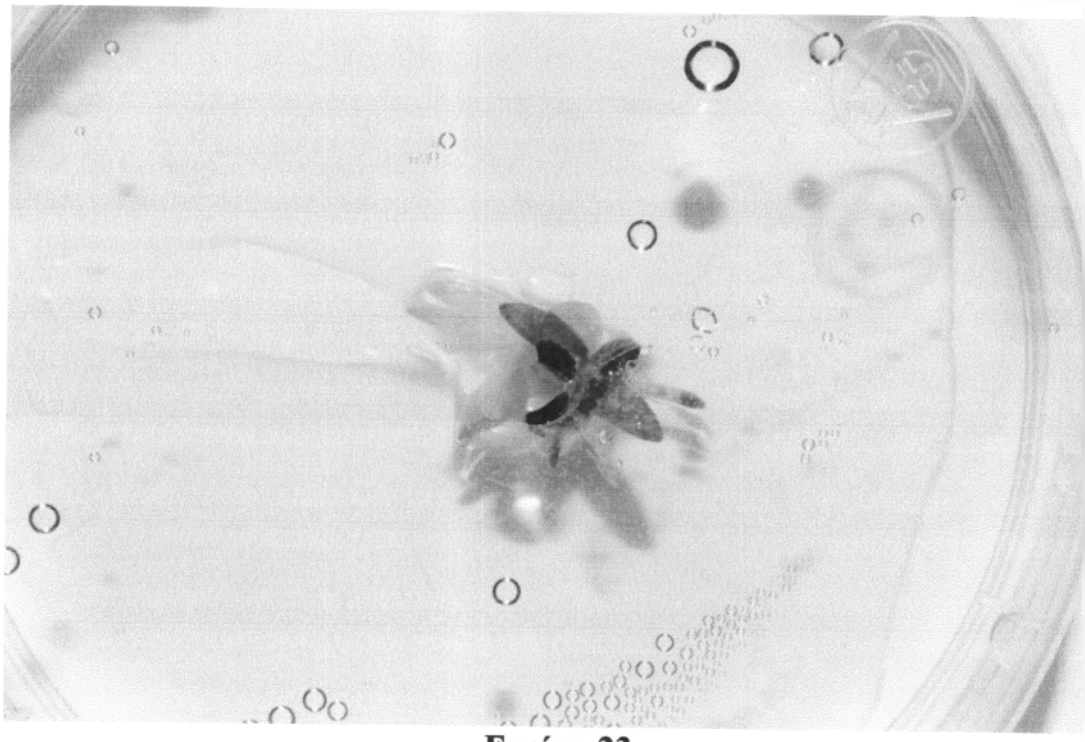


Εικόνα 20

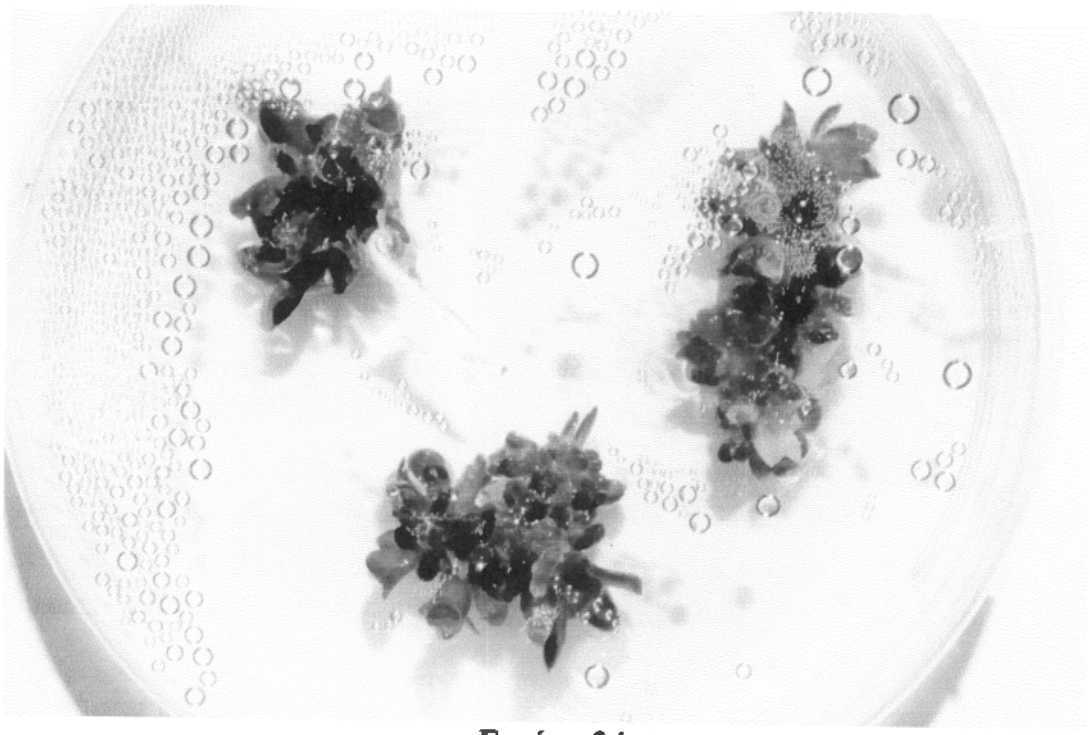
Εικόνα 21



Εικόνα 22

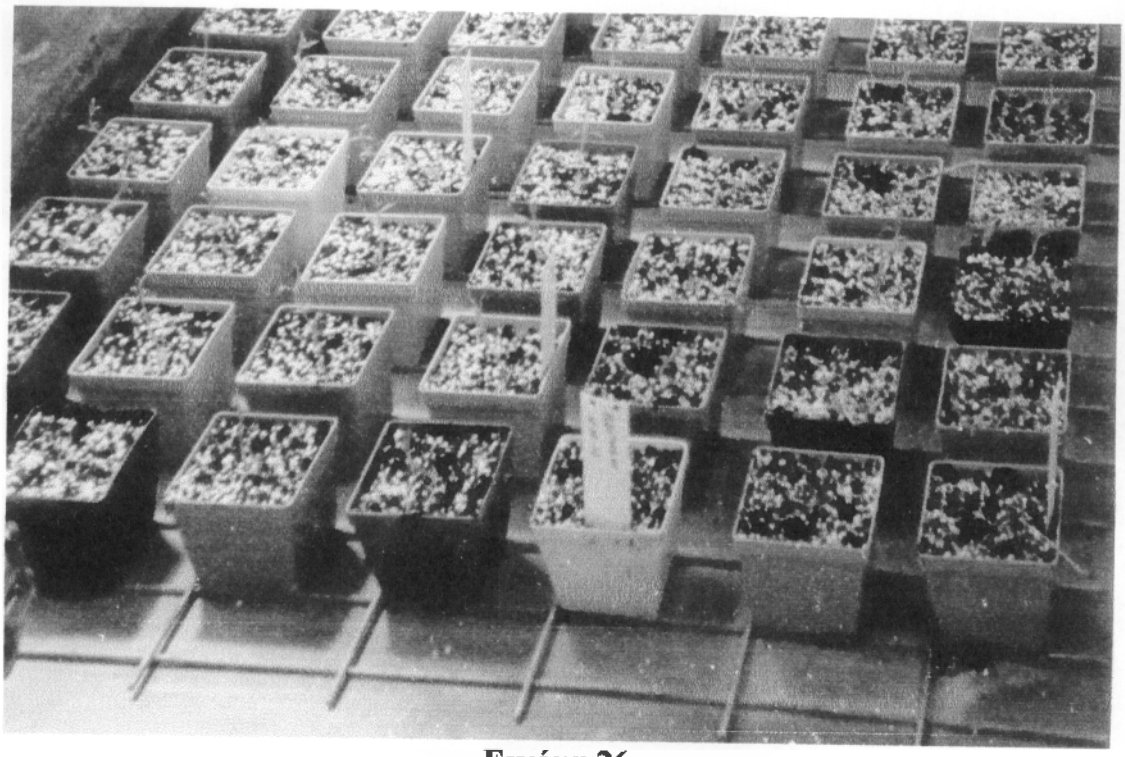


Εικόνα 23



Εικόνα 24

Εικόνα 25



Εικόνα 26