



Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας και Τεχνολογίας Τροφίμων και  
Διατροφής  
Τμήμα Τεχνολόγων Γεωπόνων  
Κατεύθυνση Φυτικής Παραγωγής

## ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

Αγενής πολλαπλασιασμός φυτών με την εφαρμογή του  
μικροπολλαπλασιασμού



Σαλής Κωνσταντίνος      105/08  
Χριστοδούλου Δημήτριος      76/08

Επιβλέπων Καθηγητής: Παλάτος Γεώργιος

Θεσσαλονίκη 2014

## Περιεχόμενα

Περίληψη.....	3
Εισαγωγή.....	5
Κεφάλαιο 1: Πολλαπλασιασμός με καλλιέργεια ιστού.....	6
I. Εφαρμογή καλλιέργειας ιστού.....	7
II. Στάδια εγκατάστασης καλλιέργειας ιστού.....	7
Α)Εγκατάσταση	
Β)Πολλαπλασιασμός	
Γ) Προετοιμασία για την εγκατάσταση της εξωτερικής καλλιέργειας	
III. Διαδικασία για την προετοιμασία του θρεπτικού υλικού.....	9
Α)Προετοιμασία μητρικού διαλύματος	
Β)Προετοιμασία θρεπτικού υλικού Murashige and Skoog	
Γ) Αποστείρωση θρεπτικού υλικού	
IV. Προετοιμασία έκφυτου και αποστείρωση.....	13
Α)Αποστείρωση επιφάνειας	
Β)Οξειδωτική αμαύρωση	
Γ) Εσωτερική μόλυνση	
V. Κίνδυνοι για την υγεία από αποστειρωτικά και σχετικά προϊόντα.....	18
VI. Μεθοδολογία καλλιέργειας ιστού.....	19
Α) Καλλιέργεια κορυφής βλαστού	
Β) Πολλαπλασιασμός μασχαλαίων βλαστών	
Γ)Συμπτωματική βλαστική ανάπτυξη	
Δ) Οργανογένεση	
Ε) Εμβρυογένεση	
VII. Ρύθμιση της ανάπτυξης των έκφυτων στην ιστοκαλλιέργεια.....	24
VIII. Ριζοβολία και εγκλιματισμός μοσχευμάτων.....	25
IX. Απαραίτητος εξοπλισμός.....	26
X. Πίνακες και εικόνες.....	28
Κεφάλαιο 2: Πολλαπλασιασμός με τη χρήση μοσχευμάτων.....	33
Επίλογή του πολλαπλασιασμού με μοσχεύματα.....	34
I. Τύποι μοσχευμάτων.....	34
1) Μόσχευμα φύλλου	
2) Μόσχευμα βλαστού	
3) Μόσχευμα ρίζας	
II. Συλλογή και μεταχείριση μοσχευμάτων.....	39
III. Παράγοντες που επηρεάζουν τη ριζοβολία των μοσχευμάτων.....	40
1) Θρέψη, υδατάνθρακες, άζωτο	
2) Νεανικότητα	
3) Χρόνος ριζοβολίας	
4) Κατάσταση και τύπος φυτού	
5) Τραυματισμός	

6) Ορμόνες	
IV. Υποστρώματα.....	45
1) Τύρφη	
2) Άμμος	
3) Περλίτης	
4) Βερμικουλίτης	
V. Σύστημα υδρονέφωσης.....	49
VI. Σύστημα υδρονέφωσης FOG.....	52
VII. Φωτισμός.....	52
1) Για τον πολλαπλασιασμό	
2) Για την ανάπτυξη του μοσχεύματος	
VIII. Υγιεινή.....	54
IX. Φροντίδα μετά τη ριζοβολία.....	55
X. Περιβάλλον θερμοκηπίου και εξοπλισμός.....	55
Βιβλιογραφία.....	57

**Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας και Τεχνολογίας Τροφίμων και  
Διατροφής  
Τμήμα Τεχνολόγων Γεωπόνων  
Κατεύθυνση Φυτικής Παραγωγής**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ**

Αγενής πολλαπλασιασμός φυτών με την εφαρμογή του  
μικροπολλαπλασιασμού

Η υποβολή της Πτυχιακής Διατριβής αποτελεί μέρος των απαιτήσεων για την απονομή του Πτυχίου στο τμήμα Τεχνολόγων Γεωπόνων, της σχολής Τεχνολογίας Γεωπονίας και Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής, του Αλεξάνδρειου Τεχνολογικού Εκπαιδευτικού Ιδρύματος Θεσσαλονίκης.

Σαλής Κωνσταντίνος	105/08
Χριστοδούλου Δημήτριος	76/08

Επιβλέπων Καθηγητής: Παλάτος Γεώργιος

Θεσσαλονίκη 2014

## Ευχαριστίες

Ευχαριστούμε θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή κύριο Παλάτο Γεώργιο, για την βοήθεια, την στήριξη και την καθοδήγηση για όλο το χρονικό διάστημα που χρειάστηκε για την εκπόνηση της εργασίας. Επίσης ευχαριστούμε την εταιρία Hellenic Plants για την βοήθεια και το φωτογραφικό υλικό που μας παρείχε.

## Περίληψη

Οι μεταβλητές που λαμβάνουν χώρο στον επιτυχή πολλαπλασιασμό είναι πάρα πολλές σε αριθμό και τίποτα δεν αποτελεί εγγύηση για την επιτυχία του πολλαπλασιασμού από χρόνο σε χρόνο. Απαιτείται συνεχή έρευνα, δοκιμασία, ακόμα και συνεχόμενα λάθη ώστε να επιτευχθεί ο στόχος. Επίσης χρειάζεται μεγάλο μέρος χειρωνακτικής εργασίας και τεράστιο κόστος ώστε να δημιουργηθεί μία εγκατάσταση που να πληρεί όλες τις προδιαγραφές του επιτυχή πολλαπλασιασμού. Είναι τελείως διαφορετικό πράγμα η δημιουργία μιας πλήρως εξοπλισμένης εγκατάστασης και άλλο μια οικονομικά ενεργή εγκατάσταση. Το κόστος είναι ένας παράγοντας που θέλει λεπτομερή εξέταση καθώς μπορεί να κυμαίνεται από μερικές χιλιάδες ευρώ έως πολλές εκατοντάδες χιλιάδες ευρώ.

Για το μεγαλύτερο μέρος των πολλαπλασιαστών στην ερώτηση για το αν θα επιχειρούσαν ένα τέτοιο βήμα δεν υπάρχει σίγουρη απάντηση, θετική ή αρνητική καθώς ακόμα και η τύχη θεωρείται παράγοντας επιτυχίας. Το μόνο σίγουρο στον σύγχρονο πολλαπλασιασμό είναι πως ακόμα και μόνο ένας ιστός να βλαστήσει ή ένα μοναδικό μόσχευμα να ριζώσει, από ένα ολόκληρο είδος τότε όλα τα φυτά του είδους έχουν την πιθανότητα να το κάνουν.

## Abstract

The variables that take place in the successful propagation are too many in number and nothing is a guarantee for the success of propagation from year to year. Requires constant research , testing , and even consecutive errors to achieve the goal. We also need much manual labor and huge costs to create a facility that meets all the requirements of successful propagation . It's a completely different thing to create a fully -equipped facilities and another an economically active installation. Cost is one factor that wants detailed examination, can range from a few thousand euros to several hundred thousand euros .

For most of the multipliers to the question of whether to attempt such a step is not guaranteed response, positive or negative as even the luck factor is considered success . The only sure thing in the modern proliferation is that even just a tissue to sprout or a single graft to take root , by an entire genre then all the plants of the species have the potential to do so.

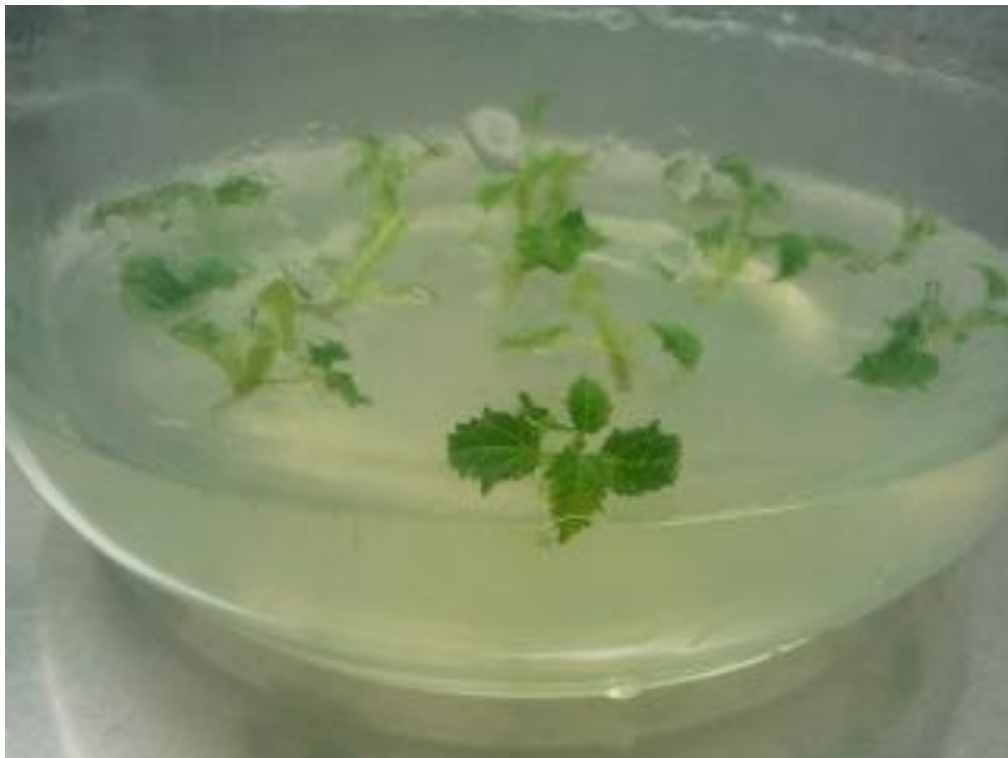
## Εισαγωγή

Πολλά χρόνια πριν, η ιδέα ότι ο μαζικός πολλαπλασιασμός φυτών μέσω της καλλιέργειας ιστού και της εκρίζωσης μοσχευμάτων θεωρούνταν σενάριο επιστημονικής φαντασίας. Σήμερα, αυτός ο τρόπος πολλαπλασιασμού αποτελεί την ανταγωνιστική δύναμη όλων των μονάδων παραγωγής πολλαπλασιαστικού υλικού. Εκατομμύρια φυτά παράγονται κάθε χρόνο παγκοσμίως με τη χρήση της τεχνολογίας.

Η διαδικασία της καλλιέργειας ιστού και του πολλαπλασιασμού με μοσχεύματα ουσιαστικά θεωρείται μέθοδος κλωνοποίησης, καθώς τα φυτά που παράγονται είναι πανομοιότυπα με τα φυτά από τα οποία προέρχονται. Η σύγχρονη διαδικασία πολλαπλασιασμού απαιτεί τεράστια προσοχή στη λεπτομέρεια. Είναι ένα πάντρεμα της τέχνης με την επιστήμη, το οποίο χρειάζεται συνεχή μελέτη και εξάσκηση. Πρόκειται για μια εγκατάσταση καλλιέργειας μέσα από ορμονικούς χειρισμούς, απαλλαγμένη από διάφορους μικροοργανισμούς, ρύθμιση των κλιματολογικών συνθηκών, ριζοβολία και πολλά άλλα στοιχεία, όπου το καθένα είναι απαραίτητο για την επίτευξη του στόχου και έχει τη δυνατότητα να επηρεάσει εξίσου το βαθμό επιτυχίας.



## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1: Πολλαπλασιασμός με καλλιέργεια ιστού**



## I. Εφαρμογή καλλιέργειας ιστού

Ο πολλαπλασιασμός με καλλιέργεια ιστού εφαρμόζεται για τέσσερις λόγους: α) Παραγωγή φυσικών προϊόντων, β) γενετική βελτίωση μιας καλλιέργειας και αποθήκευση γενετικού υλικού, γ) παραγωγή φυτών απαλλαγμένα από ασθένειες και δ) ταχύτατο και μεγάλο σε αριθμό πολλαπλασιασμό φυτών.

Ο ταχύτατος και μαζικός μικροπολλαπλασιασμός ξεκίνησε από πολλές προσπάθειες που έγιναν για να παραχθούν ορχιδέες απαλλαγμένες από ασθένειες μέσω της καλλιέργειας του μεριστώματος. Ο βλαστός έχει τη δυνατότητα να πολλαπλασιάζεται σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα, όπου μπορεί να διασπαστεί και να καλλιεργηθεί εκ νέου, ώστε να παράγει και άλλα φυτά. Εφόσον ο πολλαπλασιασμός της ορχιδέας είναι μια αργή διαδικασία, ο τρόπος αυτός δεν άργησε να αναγνωριστεί και να εφαρμοστεί με σκοπό την αυξημένη παραγωγή. Η επιτυχία της εφαρμογής της καλλιέργειας ιστού στις ορχιδέες έδωσε μεγάλο ενδιαφέρον στην καλλιέργεια ιστού ως μέσο πολλαπλασιασμού.

Το χαρακτηριστικό του μαζικού πολλαπλασιασμού είναι η παραγωγή μεγάλων αριθμών από κλωνικά φυτά σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα. Για παράδειγμα, ξεκινώντας με ένα βλαστικό έκφυτο και ένα ρυθμό πολλαπλασιασμού των πέντε κάθε μήνα, μέσα σε δέκα μήνες μπορούν να παραχθούν πάνω από ένα εκατομμύριο φυτά. Ο μικροπολλαπλασιασμός αυτή τη στιγμή εφαρμόζεται εμπορικά σε πολλές δενδρώδεις καλλιέργειες.

## II. Στάδια καλλιέργειας ιστού

Ο μικροπολλαπλασιασμός μπορεί να χωριστεί σε τρία στάδια: α) εγκατάσταση της ασηπτικής καλλιέργειας, β) πολλαπλασιασμός των μερών των φυτών (έκφυτα), γ) προετοιμασία για ριζοβολία και εγκατάσταση των φυτών στο

έδαφος. Το τελευταίο στάδιο θα μπορούσε να διαιρεθεί σε δύο στάδια με το τέταρτο να είναι ο εγκλιματισμός των φυταρίων από τις ασηπτικές συνθήκες σε συνθήκες εξωτερικού περιβάλλοντος.

#### A) Εγκατάσταση

Το αντικείμενο του πρώτου σταδίου είναι η εγκατάσταση μιας ασηπτικής (αποστειρωμένης) καλλιέργειας. Η επιτυχία της οφείλεται σε παράγοντες που περιλαμβάνουν την πηγή των έκφυτων, την εξάλειψη των μολύνσεων από τα έκφυτα, τα κατάλληλα μέσα καλλιέργειας, και τις καλλιεργητικές συνθήκες (θερμοκρασία και φωτισμός). Για την επιλογή του έκφυτου πρέπει να ληφθούν υπ όψη τα παρακάτω: 1) το όργανο που θα χρησιμοποιηθεί για τη λήψη του ιστού, 2) η φυσιολογική και αναπτυξιακή ηλικία του οργάνου, 3) η εποχή που θα ληφθούν τα έκφυτα, 4) το μέγεθος του έκφυτου, 5) η ποιότητα του φυτού από το οποίο παρέχεται το έκφυτο. Εφόσον οι πηγές έκφυτων από το ίδιο φυτό δεν είναι ισοδύναμες στην παραγωγή έκφυτων, η επιλογή του έκφυτου είναι κριτικής σημασίας για τον πολλαπλασιασμό. Μια καλλιέργεια μπορεί να εγκατασταθεί από πολλά όργανα ή ιστούς, όπως: κορυφές βλαστών, πλευρικούς οφθαλμούς, βολβούς, φύλλα, ρίζες, έμβρυα, κοτυληδόνες, υποκοτυληδόνες, μίσχο, σπορόφυτα, ριζώματα, ταξιανθία, ωοθήκες, κόνδυλους. Για τα περισσότερα είδη η ενεργά αυξανόμενη κορυφή βλαστού είναι η καλύτερη πηγή έκφυτων.

#### B) Πολλαπλασιασμός

Το αντικείμενο αυτού του σταδίου είναι η ταχύτερη αύξηση των οργάνων που θα δώσουν εντέλει ένα ολοκληρωμένο φυτό. Η εμβρυογένεση χωρίς αναπαραγωγικά όργανα (σπόροι, κλωνικά) ή η τυχαία βλαστική αύξηση (από κάλο) παρέχουν γρηγορότερους ρυθμούς ανάπτυξης, αλλά περισσότερο επιθυμητοί για την παραγωγή είναι οι μασχαλιαίοι βλαστοί γιατί οι πρώτοι είναι πιθανόν να έχουν αυξημένη παραγωγή φυτών τα οποία παρεκκλίνουν γενετικά.

#### Γ) Προετοιμασία για την εγκατάσταση της εξωτερικής καλλιέργειας

Αυτό το στάδιο περιλαμβάνει την προετοιμασία των φυταρίων για την εγκατάστασή τους στο έδαφος, εξωτερικά σε συνθήκες εκτός του καλλιεργητικού περιβάλλοντος. Για να πετύχει η εγκατάσταση οι συνθήκες πρέπει να είναι διαφορετικές από τα προηγούμενα δύο στάδια. Η εγκατάσταση της εξωτερικής καλλιέργειας περιλαμβάνει την ριζοβολία των μικρομοσχευμάτων, την σκλήρυνση των φυταρίων για να αναπτύξουν αντοχή εναντίον της έντασης που προκαλεί η υγρασία, και να περάσουν από την εξάρτηση σε αυτοσυντηρούμενο στάδιο.

### III. Διαδικασία για την προετοιμασία του θρεπτικού υλικού

Η τυποποίηση του θρεπτικού υλικού μπορεί να προετοιμαστεί από διαλύματα τα οποία έχουν δημιουργηθεί ζυγίζοντας τα χημικά συστατικά απομονωμένα το ένα από το άλλο ή από προανεμειγμένα σκευάσματα σε σκόνη. Τα προανεμειγμένα σκευάσματα είναι πολύ ευκολότερα στη χρήση, αλλά πολύ ακριβότερα από το να αγοραστούν τα χημικά ξεχωριστά.

Για τις λειτουργίες εμπορικής καλλιέργειας ιστού, είναι αρκετό να χρησιμοποιηθεί κοινό αποσταγμένο νερό που κυκλοφορεί στην αγορά, χωρίς επιπλέον απολύμανση. Θα πρέπει όμως να δίνεται προσοχή και να ελέγχεται πριν τη χρήση η εμπορική πηγή του νερού γιατί μπορεί να εμπεριέχονται τοξικές προσμίξεις. Επίσης, θα πρέπει να αποφεύγεται εντελώς η εφαρμογή νερού βρύσης.

Το παρακάτω παράδειγμα δείχνει τα βήματα που ακολουθούνται για την προετοιμασία του θρεπτικού διαλύματος από μεμονωμένα χημικά συστατικά.

#### A) Προετοιμασία μητρικού διαλύματος

Το μητρικό διάλυμα είναι ένα συμπυκνωμένο διάλυμα από μία ή ομάδες χημικών ενώσεων, κλάσματα των οποίων θα συνδυαστούν ώστε να προετοιμαστεί το

θρεπτικό υλικό. Το μητρικό διάλυμα προετοιμάζεται εκ των προτέρων για να μειωθεί διάρκεια της προετοιμασίας του θρεπτικού υλικού και να ενισχυθεί η ακρίβεια της ζύγισης των ουσιών. Τα αλατούχα μητρικά διαλύματα δημιουργούνται συνήθως σε εκατό βαθμούς συγκέντρωση. Συχνά συνδυάζονται περισσότερες από μία ουσίες στο μητρικό διάλυμα. Ωστόσο, δεν χρησιμοποιούνται ποτέ ουσίες οι οποίες μπορεί να δημιουργήσουν ιζήματα στο διάλυμα. Τα ιζήματα είναι αδιάλυτες ουσίες που σχηματίζονται εξαιτίας της χημικής αντίδρασης των ουσιών με αποτέλεσμα το διάλυμα να χάσει την αποτελεσματικότητά του. Επίσης ουσίες που περιέχουν ασβέστιο και φωσφορικό άλας ή θειικό άλας και ουσίες που περιέχουν μαγνήσιο και φωσφορικό άλας δεν πρέπει να αναμιγνύονται μαζί. Υλικά όπως τα παρακάτω χρησιμοποιούνται για ανάμειξη χωρίς να σχηματίσουν ιζήματα: 1) νιτρικά άλατα, 2) θειικά άλατα, 3) βορικά άλατα, μολυβδικά και φωσφορικά άλατα, 4) αλογονίδια όπως χλωριούχα και ιωδιούχα. Ο σίδηρος προετοιμάζεται ξεχωριστά σαν χηλική ένωση. Μετά την προετοιμασία, το μητρικό διάλυμα αποθηκεύεται υπό ψύξη, εκτός των οργανικών αποθεμάτων, όπως οι βιταμίνες και οι ορμόνες, τα οποία λογικά είναι ήδη κατεψυγμένα. Εάν κατά την προετοιμασία προκύψει ιζήμα ή μικροβιακή μόλυνση το διάλυμα έχει καταστραφεί και πρέπει να πεταχτεί.

Τα μητρικά διαλύματα προετοιμάζονται με αποσταγμένο ή απιονισμένο νερό και χρησιμοποιούνται μόνο χημικά υψηλής καθαρότητας.

Τα παρακάτω διαλύματα (1-4) προστίθενται σε φιάλη του 1 Lt που περιέχει 750ml νερό. Αφού διαλυθούν τα χημικά προστίθεται νερό μέχρι το διάλυμα να γίνει 1000 ml. Χρησιμοποιούνται 10ml διαλύματος ανά λίτρο για την προετοιμασία του θρεπτικού υλικού καλλιέργειας ιστού.

1) KNO <sub>3</sub>	190gr/lit
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	165gr/lit
2) CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	2,5mg/lit
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	37gr/lit
MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	1,69gr/lit
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0,69gr/lit
3) CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	44gr/lit
CoCl <sub>2</sub> · 6H <sub>2</sub> O	2,5mg/lit

KI	83mg/lit
4) H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,62gr/lit
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17gr/lit
NaMoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	25mg/lit

Τα παρακάτω διαλύματα (5) προστίθενται σε φιάλη του 1lt που περιέχει 750ml αποσταγμένου νερού. Μετά την διάλυση των χημικών προστίθεται νερό μέχρι το διάλυμα να έχει όγκο 1000ml.

5) FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2,78gr/lit
Na <sub>2</sub> EDTA	3,72gr/lit

Τα παρακάτω διαλύματα (6) προστίθενται σε φιάλη του 1lt που περιέχει 750ml αποσταγμένου νερού. Μετά την διάλυση των χημικών προστίθεται νερό μέχρι το διάλυμα να φτάσει σε όγκο τα 1000ml.

6) Γλυκίνη	200mg/lit
Μυο-ινοσιτόλη	10gr/lit
Νικοτινικό οξύ	50mg/lit
Πυριδοξίνη HCl	50mg/lit
Θειαμίνη HCl	100mg/lit

7) Διάλυμα Κυτοκινίνης. Οι κυτοκινίνες είναι ασθενείς βάσεις και μπορούν να διαλυθούν σε αραιό διάλυμα οξέος. Ζυγίζονται 25mg N6Βενζυλαδενίνης και τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη των 250 ml. Προστίθενται 5ml αποσταγμένου νερού και σταγονόμετρο προστίθενται και 0,1 με 1 N HCl. Το διάλυμα ανακατεύεται μέχρι να διαλυθεί. Αυξάνεται ο όγκος του διαλύματος με αποσταγμένο νερό. Το διάλυμα πρέπει να περιέχει 0,1 mg/ml N6Βενζυλαδενλινης.

8) Διάλυμα αυξίνης. Οι αυξίνες είναι ασθενή οξέα, τα οποία μπορούν να διαλυθούν σε διαλύματα αραιών βάσεων. Ζυγίζονται 25mg ινδολο-3-οξικού οξέος και τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη 250ml. Προστίθενται 5ml αποσταγμένου

νερού και με σταγονόμετρο 0,1 με 1 N ΚΟΗ. Το διάλυμα ανακατεύεται μέχρι να διαλυθεί. Αυξάνεται ο όγκος του διαλύματος με αποσταγμένο νερό. Το διάλυμα πρέπει να περιέχει 0,1mg/ml ινδολο-3-οξικού οξέος.

## Β) Προετοιμασία θρεπτικού μέσου Murashige and Skoog (MS)

Η προετοιμασία του θρεπτικού μέσου MS απαιτεί την εκ των προταίρων προετοιμασία του μητρικού διαλύματος.

1) Ρίχνονται 700ml αποσταγμένου ή απιονισμένου νερού σε φιάλη ή ποτήρι ζέσεως των 2000 ml και τοποθετείται σε ζεστή πλάκα αναδευτήρα. Ο όγκος της φιάλης ή του ποτηριού ζέσεως πρέπει να είναι ο περίπου ο διπλάσιος του όγκου του θρεπτικού υλικού.

2) Προσεκτικά τοποθετείται μια μαγνητική ράβδος ανάδευσης μέσα στην φιάλη και θέτεται σε εφαρμογή η ζεστή πλάκα και ο αναδευτήρας.

3) Προστίθενται 10ml από τα μητρικά διαλύματα (1-6) που έχουν ήδη παρασκευαστεί.

4) Προστίθεται στο διάλυμα σακχαρόζη (30gr/lit)

5) Προστίθεται διάλυμα κυτοκινίνης στην επιθυμητή συγκέντρωση. Αν για παράδειγμα η επιθυμητή συγκέντρωση είναι 1mg/ml προστίθενται 10ml διαλύματος.

6) Προστίθεται διάλυμα αυξίνης στην επιθυμητή συγκέντρωση, ομοίως με το διάλυμα κυτοκινίνης.

7) Αυξάνεται ο όγκος του διαλύματος στα 1000ml.

8) Προσαρμόζεται το ΡΗ στα επιθυμητά επίπεδα ( συνήθως 4,5-6) με 0,1-1 N ΚΟΗ ή ΗCl, Καθώς αναδεύεται το διάλυμα.

9) Προστίθεται Άγαρ.

10) Θερμαίνεται το διάλυμα στους 92C με προσοχή χωρίς να αφηθεί και να βράσει.

11) Κατανέμεται το διάλυμα σε δοχεία τα οποία καλύπτονται. Ο καλύτερος τρόπος κατανομής στα δοχεία είναι με σιφόνιο που κατανέμει 10, 15, 20 ml διαλύματος.

12) Αποστειρώνεται των δοχείων σε χύτρα ταχύτητας ή κλίβανο για 15 με 20 λεπτά.

13) Δροσισμός, σημείωση και αποθήκευση των δοχείων σε καθαρό μέρος μέχρι να χρησιμοποιηθεί το θρεπτικό υλικό.

14) Με τις κατάλληλες συνθήκες, το θρεπτικό υλικό μπορεί να είναι έτοιμο για εφαρμογή αμέσως μετά την προετοιμασία του.

Γ) Αποστείρωση του θρεπτικού υλικού

Το θρεπτικό μέσο αποστειρώνεται σε κλίβανο, στους 120 C. Η διάρκεια της αποστείρωσης εξαρτάται από τον όγκο του θρεπτικού υλικού αλλά συνήθως διαρκεί 15 λεπτά. Όσο μεγαλύτερος είναι ο όγκος του θρεπτικού υλικού τόσο μεγαλύτερη είναι η διάρκεια ώστε να εισχωρήσει η ζέστη, συνεπώς χρειάζεται μεγαλύτερος χρόνος αποστείρωσης.

Μερικά συστατικά του θρεπτικού υλικού δεν μπορούν να αποστειρωθούν σε κλίβανο γιατί υπάρχει ο κίνδυνος καταστροφής τους από υψηλές θερμοκρασίες. Σε περιπτώσεις συστατικών ασταθών στη θερμότητα, η συνήθης τεχνική αποστείρωσης περιλαμβάνει αποστείρωση των συστατικών με φίλτρο μεμβράνης και πρόσθεσή τους στο θρεπτικό υλικό αφού έχει αποστειρωθεί και αυτό στον κλίβανο. Ο εξοπλισμός του φίλτρου μεμβράνης υπάρχει σε διάφορα μεγέθη. Για μεγάλους όγκους χρησιμοποιείται συσκευή τύπου χοάνης, ενώ για μικρές ποσότητες προτιμάται ο τύπος σύριγγας.

Ο εξοπλισμός φιλτραρίσματος έχει ήδη αποστειρωθεί σε κλίβανο. Τα ασταθή συστατικά σε θερμότητα προετοιμάζονται σε συμπυκνωμένα διαλύματα, με προσαρμοσμένο ΡΗ και στη συνέχεια φιλτράρονται και διανέμονται στο θρεπτικό υλικό το οποίο έχει ψυχθεί στους 35C.

#### IV. Προετοιμασία έκφυτου και αποστείρωση

Ο κύριος στόχος της αποστείρωσης είναι η εγκατάσταση μιας καλλιέργειας ελεύθερης από παθογόνα, δηλαδή τα φυτικά μέρη πρέπει να είναι απαλλαγμένα από βακτήρια, μύκητες και άλλους μικροοργανισμούς. Οι συνηθέστερες μολύνσεις είναι τα βακτήρια και οι μύκητες που βρίσκονται πάνω στην επιφάνεια του φυτικού υλικού



και η πιο κοινή μέθοδος για την απομάκρυνσή τους είναι η αποστείρωση της επιφάνειας. Οι μικροβιακές μολύνσεις είναι ανεπιθύμητες γιατί συχνά ξεπερνούν το έκφυτο σε ανάπτυξη, ανταγωνίζονται για τα θρεπτικά συστατικά και παράγουν τοξικά προϊόντα.

Όλοι οι μικροοργανισμοί είναι απαραίτητο να απομακρυνθούν με τις μεθόδους αποστείρωσης. Είναι προτιμότερο η συλλογή των εκφύτων να γίνεται από φυτά τα οποία αναπτύσσονται μέσα σε θερμοκήπια ή θαλάμους ανάπτυξης γιατί τα φυτά που αναπτύχθηκαν σε εξωτερικούς χώρους έχουν μεγαλύτερο αριθμό μικροοργανισμών. Υπάρχουν αρκετές χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται για την επιφανειακή αποστείρωση του φυτικού υλικού, όπως αντιβιοτικά, αιθανόλη, χλωριώδες ασβέστιο, υπεροξειδίο του υδρογόνου, χλωριούχο υδράργυρο και άλλα.

Οι συνηθέστερες χημικές ουσίες που χρησιμοποιούνται είναι η οικιακή χλωρίνη και η αιθανόλη. Ο χλωριούχος υδράργυρος έχει αποδειχθεί ότι είναι τοξικός για το φυτικό υλικό και αποφεύγεται λόγω του ότι περιέχει υδράργυρο. Για την ενίσχυση της αποτελεσματικότητας τους, οι περισσότερες απεντομοτικές χημικές ουσίες ενισχύονται με μια μικρή ποσότητα κάποιου διαβρεκτικού παράγοντα, όπως το απολυμαντικό. Η πρόσθεση διαβρεκτικού παράγοντα μειώνει την επιφανειακή ένταση και επιτρέπει την ευκολότερη διείσδυση στο φυτικό υλικό. Υποχρεωτικό είναι βέβαια να καθοριστούν οι βέλτιστες καταστάσεις για κάθε ιστό.

#### A) Αποστείρωση επιφάνειας

Μια τυπική διαδικασία αποστείρωσης της επιφάνειας του βλαστικού ιστού περιλαμβάνει τα εξής βήματα:

- 1) Προκαταρτικό πλύσιμο του έκφυτου πριν αποκοπεί με τρεχούμενο νερό για περίπου δέκα λεπτά. Μερικά εργαστήρια χρησιμοποιούν για το πλύσιμο του έκφυτου ασθενές διάλυμα χλωρίνης (1/100 ο:ο) σε συνδυασμό με ένα απορρυπαντικό.
- 2) Κοπή του έκφυτου. Η κοπή καθώς και τα επόμενα βήματα πραγματοποιούνται με αποστειρωμένο κάλυμμα μεταφοράς.

- 3) Το έκφυτο τοποθετείται σε διάλυμα χλωρίνης ( ένα μέρος εμπορικής χλωρίνης και εννέα μέρη αποσταγμένου νερού) και ανακατεύεται για 15 περίπου λεπτά. Ορισμένα εργαστήρια χρησιμοποιούν αντλία κενού ή συσκευή καθαρισμού με υπερήχους.
- 4) Το έκφυτο ξεπλένεται με τρεις διαδοχικές αλλαγές αποστειρωμένου νερού και αφήνεται για πέντε λεπτά μέσα στο νερό στην τελευταία αλλαγή.
- 5) Κοπή του εκφύτου στο επιθυμητό μέγεθος εμφύτευσης και αφαίρεση κάθε κατεστραμμένου ιστού πριν μεταφερθεί στο αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό.

Όταν η επιφάνεια του υλικού δεν είναι μέρος του φυτικού υλικού, τότε χρειάζεται μια πιο δραστική αντιμετώπιση. Για παράδειγμα, η χρησιμοποίηση σπόρων για την παραγωγή αποστειρωμένων έκφυτων.

- 1) Τοποθετούνται οι σπόροι σε πανί και βυθίζονται για 10 δευτερόλεπτα σε 95% αιθανόλη και στη συνέχεια ξεπλένονται με αποσταγμένο νερό.
- 2) Οι σπόροι τοποθετούνται ανέγγιχτοι σε διάλυμα χλωρίνης ( ένα μέρος χλωρίνης και εννέα μέρη νερό) για 20-30 λεπτά περίπου.
- 3) Οι σπόροι ξεπλένονται με τρεις διαδοχικές αλλαγές σε αποσταγμένο νερό, βυθίζοντας για πέντε λεπτά στην τελευταία αλλαγή.
- 4) Οι σπόροι τοποθετούνται ανέπαφοι στο αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό. Τα έμβρυα μπορούν να συλλεχθούν από τους αποστειρωμένους σπόρους.

Ο σκοπός της αποστειρωτικής αγωγής είναι να εξαλείψει όλους τους μικροοργανισμούς και να παραδώσει ένα έκφυτο ικανό να αναπτυχθεί όταν τοποθετηθεί στο θρεπτικό υλικό. Χρειάζεται προσοχή γιατί υπάρχει η πιθανότητα τα έκφυτα να μην αναπτυχθούν ή να καταστραφούν από την υπερβολική αποστείρωση και μπορεί να χρειαστούν κάποιες τροποποιήσεις στη διαδικασία. Είναι απαραίτητο πριν την αποστείρωση να έχουν καθοριστεί οι βέλτιστες συνθήκες για κάθε τύπο έκφυτου. Η συγκέντρωση χλωρίνης και ο χρόνος βύθισης είναι μεταβλητές οι οποίες μπορούν εύκολα να τροποποιηθούν.

## B) Οξειδωτική αμαύρωση

Εάν οι ιστοί αποκτήσουν κούρο καφέ χρώμα μετά την συλλογή τους πρέπει να τοποθετηθούν σε αντιοξειδωτικό διάλυμα. Η εμφάνιση της αμαύρωσης είναι αποτέλεσμα της οξείδωσης των πολυφαινολικών ενώσεων. Δεν προκαλείται μόνο αμαύρωση στο έκφυτο, αλλά και ξεθώριασμα στο θρεπτικό υλικό. Τα έκφυτα τα οποία αλλάζουν χρώμα εξαιτίας της οξειδωτικής αμαύρωσης συνήθως δεν εγκαθίστανται στην καλλιέργεια. Το φαινόμενο αυτό μπορεί να ελεγχθεί ή να μειωθεί με: α) μείωση του ποσοστού των πολυφαινολικών ενώσεων και κατά συνέπεια των οξειδοτικών προϊόντων τους, β) με αναστολή της δράσης των πολυφαινολικών ενώσεων, γ) μειώνοντας την παροχή οξυγόνου.

Τα παραπάνω μπορούν να επιτευχθούν με τις παρακάτω μεθόδους:

- 1) Ελαχιστοποίηση των ζημιών κατά τη διάρκεια της κοπής των έκφυτων.
- 2) Τοποθέτηση των έκφυτων μετά την κοπή τους και πριν την απεντόμωσή τους, σε διάλυμα ασκορβικού οξέος (100mg/lit) ή κιτρικού οξέος (150mg/lit) ή σε συνδυασμό και των δύο.
- 3) Τοποθέτηση του έκφυτου σε αποστειρωμένο διάλυμα ασκορβικού οξέος ή κιτρικού οξέος ή ζέπλυμα με αποστειρωμένο διάλυμα υδροχλωρικής κυστεΐνης πριν την τοποθέτησή του στην καλλιέργεια.
- 4) Χρησιμοποίηση υγρού θρεπτικού υλικού αντί για ημι-στέρεο.
- 5) Αποφυγή ανακίνησης του υγρού θρεπτικού υλικού.
- 6) Μείωση του φωτισμού ή απόλυτο σκοτάδι κατά τη διάρκεια της εγκατάστασης του έκφυτου.
- 7) Τοποθέτηση του έκφυτου σε φρέσκο υγρό θρεπτικό υπόστρωμα καθημερινά για 7 μέρες, ξεκινώντας 12 ώρες μετά την εκκίνηση της καλλιέργειας.
- 8) Πρόσθεση ενεργού ξυλάνθρακα (600mg/lit) ή ενός αντιοξειδωτικού όπως το ασκορβικό ή το κιτρικό οξύ μέσα στο θρεπτικό υλικό.

### Γ) Εσωτερική μόλυνση

Τα κλωνικώς πολλαπλασιαζόμενα φυτά προσβάλλονται αρκετά συχνά από ιούς, βακτήρια και μύκητες. Συχνά, η καλλιέργεια μπορεί να έχει προσβληθεί εσωτερικά από κάποιον μικροοργανισμό αλλά η μόλυνση να μην γίνει φανερή μέχρι να προηγηθούν πολλές ανακαλλιέργειες. Οι άγνωστες μολύνσεις μπορεί να οδηγήσουν σε πού σοβαρά προβλήματα και πρέπει να αφαιρούνται το συντομότερο δυνατόν.

Η ανάρρωση του απαλλαγμένου από παθογόνα ιστού περιλαμβάνει την απομόνωση του ιστού από τα διάφορα παθογόνα. Μια χρήσιμη διαδικασία για την εξάλειψη των μολύνσεων είναι η καταγραφή και ευρετηρίαση της καλλιέργειας. Το πρώτο βήμα για την ευρετηρίαση της καλλιέργειας είναι η δοκιμή μεμονωμένων μοσχευμάτων ή φυτών για την παρουσία βακτηρίων ή μυκήτων. Η μέθοδος δοκιμής με θρεπτικό ζωμό παρέχει μια απλή ανάλυση για τον εντοπισμό τέτοιων μολύνσεων. Ο διαδικασία προετοιμάζεται διαλύοντας 8 γρ. θρεπτικού ζωμού σε 1000ml αποσταγμένου νερού. Τοποθετείται ανά 10ml διαλύματος σε σωληνάρια και αποστειρώνεται στον κλίβανο. Στη συνέχεια τοποθετούνται μέρη του ιστού του φυτού στα σωληνάρια, τα οποία αφήνονται στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου. Παίρνονται δύο παρατηρήσεις, μετά από 24 ώρες και μετά από 7 μέρες. Η ανάπτυξη θόλωσης ή νέφωσης στο σωληνάριο του ζωμού υποδεικνύει βακτηριακή μόλυνση. Η μόλυνση από μύκητα υποδηλώνεται από την παρουσία μυκηλίου και μπορεί να χρειαστεί περισσότερο χρόνο να αναπτυχθεί. Για να καθαριστούν τα μολυσμένα φυτά είναι μπορεί να χρησιμοποιηθεί η τεχνική της καλλιέργειας βλαστικών κορυφών. Εφόσον εξαλειφθούν οι μύκητες και τα βακτήρια τα φυτά τοποθετούνται σε σύστημα για την εξάλειψη των ιών. Ένα τέτοιο σύστημα περιλαμβάνει θερμοθεραπεία και καλλιέργεια της κορυφής του μεριστώματος, ακολουθούμενο από ευρετηρίαση για ανιχνεύσιμους ιούς. Κατά τη διάρκεια της θερμοθεραπείας, τα φυτά αναπτύσσονται

στους 37C κατά τη διάρκεια της ημέρας (16 ώρες) και στους 35C τη νύχτα (8ώρες) για τρεις εβδομάδες για να μειωθεί η συγκέντρωση σφαιρικών ινών στο φυτό.

Μετά τη θεραπεία οι μεριστωματικές κορυφές ύψους 0,1-0,5mm καλλιεργούνται σε in vitro συνθήκες. Μετά την ανάπτυξη και το ρίζωμα τα φυτά μεγαλώνουν απομονωμένα και οι ιοί κατατάσσονται στο ευρετήριο για επόμενες δοκιμές.

#### V. Κίνδυνοι για την υγεία από αποστειρωτικά και σχετικά προϊόντα

Πολλά από τα αποστειρωτικά προϊόντα που χρησιμοποιούνται συνήθως και ο εξοπλισμός τους μπορούν να δημιουργήσουν προβλήματα στην υγεία. Τα υποχλωριώδη διαλύματα ασβεστίου και νατρίου πρέπει να χρησιμοποιούνται με ιδιαίτερη προσοχή. Η εισπνοή μπορεί να προκαλέσει βρογχικό ερεθισμό και η επαφή με το δέρμα ερεθισμό του δέρματος. Τα υποχλωριώδη διαλύματα στην παρουσία υπεριώδους ακτινοβολίας απελευθερώνουν χλωριούχο αέριο που είναι ένας σοβαρός κίνδυνος. Επίσης, τα υποχλωριώδη διαλύματα δεν πρέπει ποτέ να έρχονται σε επαφή με το στόμα. Ακόμα, πρέπει να αποφεύγεται τελείως η χρήση δηλητηριωδών απολυμαντικών στα εργαστήρια πολλαπλασιασμού, όπως ο χλωριούχος υδράργυρος.

Κίνδυνος για την υγεία είναι επίσης η υπεριώδης ακτινοβολία. Υπάρχει μεγάλη πιθανότητα βλάβης των ματιών κοιτάζοντας την. Δουλεύοντας με υπεριώδη ακτινοβολία υπάρχει η πιθανότητα εμφάνισης καρκίνου. Τέλος, η υπεριώδης ακτινοβολία παράγει όζον, ένα ισχυρό οξειδωτικό παράγοντα.

## VI. Μεθοδολογία καλλιέργειας ιστού

Υπάρχουν πέντε βασικές τεχνικές φυτικής αναγέννησης στα συστήματα καλλιέργειας ιστού: α) Καλλιέργεια κορυφής βλαστού, β) Πολλαπλασιασμός μασχαλιαίων βλαστών, γ) Συμπτωματική βλαστική ανάπτυξη, δ) Οργανογένεση, ε) Εμβρυογένεση.

### A) Καλλιέργεια κορυφής βλαστού

Η καλλιέργεια της κορυφής του βλαστού έχει βρει εφαρμογή στην παραγωγή φυτικού υλικού ελεύθερου από παθογόνους μικροοργανισμούς. Είναι συνήθης πρακτική για τον πολλαπλασιασμό πολλών δενδρωδών αλλά και κηπευτικών καλλιεργειών όπως η ελιά, η πατάτα, το γεράνι και πολλά άλλα.

Οι *in vitro* απαιτήσεις για την ανάπτυξη απομονωμένων βλαστικών κορυφών ποικίλλει ανάλογα το μέγεθος, την επισκοπούμενη χρήση του φυτού και το γενότυπο του. Μία καλλιέργεια βλαστικής κορυφής μπορεί να χρειάζεται: υψηλή συγκέντρωση καλίου, αυξίνη ή γιββεριλίνη για την ανάπτυξη, ή κυτοκινίνη πολλαπλό βλαστικό σχηματισμό, ή να είναι ανεξάρτητη από απαιτήσεις σε ορμόνες. Για την καλλιέργεια κορυφής βλαστού χρειάζονται ταυτόχρονα και Άγαρ και θρεπτικό υλικό.

Διαδικασία: Το παρακάτω παράδειγμα της διαδικασίας περιγράφει τον πολλαπλασιασμό του γερανιού.

- 1) Προσθέτονται 10ml θρεπτικού υλικού MS συμπληρωμένα από 2mg/l IBA ή 1 mg/l NAA, 0.04γρ κινετίνης, 2 mg/l L-κυστεΐνης, 100mg/l m-ινοσιτόλης, 100mg/l γάλα καρύδας και Άγαρ με PH 5,5-7,5 σε δοκιμαστικού σωλήνες μεγέθους 25X150 mm. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες καλύπτονται και τοποθετούνται στον κλίβανο.
- 2) Κόβονται από τα φυτά κορυφές βλαστών περίπου 1 εκ. μήκους και τοποθετούνται σε διάλυμα υποχλωριώδους ασβεστίου για περίπου 15 λεπτά.

- 3) Πραγματοποιούνται τρία διαφορετικά ξεπλύματα των κορυφών με αποσταγμένο νερό και στη συνέχεια τοποθετούνται σε τριβλία τα οποία περιέχουν υγρά χάρτινα φίλτρα.
- 4) Προσεκτικά αφαιρούνται 0,5 με 1 mm του άκρου της κορυφής με τη βοήθεια ανατομικού μικροσκοπίου.
- 5) Οι κορυφές μεταφέρονται στο θρεπτικό υλικό με το άγαρ.
- 6) Τέλος, καλλιεργούνται σε θάλαμο ανάπτυξης στους 21C και φωτισμό στα 3000 lux με κύκλο 16 ώρες φωτός και 8 ώρες σκοταδιού. Σε λίγες εβδομάδες παρατηρείται ανάπτυξη ριζών. Όταν η ανάπτυξη του βλαστού και του ριζικού συστήματος είναι ικανοποιητική τότε μπορούν να μεταφερθούν στο χώμα.

## B) Πολλαπλασιασμός μασχαλιαίων βλαστών

Με τον πολλαπλασιασμό μασχαλιαίων βλαστών τα πλευρικά μεριστώματα παρακινούνται να σπάσουν και να αναπτυχθούν. Αυτός ο τρόπος πολλαπλασιασμού, με επαναλαμβανόμενη ανακαλλιέργεια, μπορεί να παράγει ένα εκθετικό τρόπο ανάπτυξης και διαμορφώνει τη βάση για το μεγαλύτερο όγκο του εμπορικού πολλαπλασιασμού.

Διαδικασία: Το παρακάτω παράδειγμα διαδικασίας είναι ο τρόπος πολλαπλασιασμού της δάφνης.

- 1) Προετοιμάζονται κωνικές φιάλες των 50ml που περιέχουν 15-20 ml θρεπτικού υλικού συμπληρωμένο από 0,8-3,2mg/l 2ip και τοποθετούνται στον κλίβανο.
- 2) Κόβονται βλαστοί 2-3εκ. μήκος από ανεπτυγμένα φυτά και αφαιρούνται όλα τα φύλλα που είναι μεγαλύτερα από 1εκ.
- 3) Βυθίζονται οι κομμένοι βλαστοί σε αιθανόλη και μετά σε διάλυμα με 10% χλωρίνης με ένα παράγοντα διαβροχής για 10-15 λεπτά.

- 4) Ξεπλένονται με 3 διαδοχικές αλλαγές αποσταγμένου νερού, αφαιρούνται οι τυχόν τραυματισμένοι βλαστοί ιστοί και τοποθετούνται σε μεμονωμένες φιάλες.
- 5) Το υγρό θρεπτικό υλικό πρέπει να αλλάζεται στις 12 ώρες, στις 24 ώρες και μετά κάθε μία μέρα για μία εβδομάδα. Μετά από μία εβδομάδα οι βλαστοί μεταφέρονται σε σταθερούς δοκιμαστικούς σωλήνες και το θρεπτικό υλικό μειώνεται στο ½ του ύψους. Το θρεπτικό αλλάζεται κάθε 3 εβδομάδες. Μετά από ένα με δύο μήνες οι μασχαλιαίοι βλαστοί αναπτύσσονται.
- 6) Όταν γίνουν 2εκ. απομακρύνονται και τοποθετούνται σε σταθερό θρεπτικό υλικό (6% άγαρ). Η καλλιέργεια πολλαπλασιάζεται απομακρύνοντας διαδοχικούς βλαστούς που επιμηκύνονται από τη βασική μάζα και ανακαλλιεργούνται.
- 7) Η καλλιέργεια αναπτύσσεται σε θάλαμο για 24 ώρες δροσιάς με φωτισμό λευκού φθορισμού και θερμοκρασία 28-30C.
- 8) Οι βλαστοί μετά την ανάπτυξη τους ριζώνουν σε υπόστρωμα τύρφης σε ζεστό (30-35C) με υψηλή υγρασία θάλαμο, με 24ωρο λευκού φθορισμού φωτισμό.

#### Γ) Συμπτωματική βλαστική ανάπτυξη

Τα κομμένα φυτικά μέρη μερικών φυτών μπορούν να αναπτύξουν τυχαίους βλαστούς. Αυτή η μέθοδος είναι χρήσιμη για τον πολλαπλασιασμό φυτών που παραδοσιακά πολλαπλασιάζονται με τυχαίους βλαστούς, αλλά έχει αποδειχθεί επίσης ότι προκύπτουν σε πολλά φυτά κατά τη διάρκεια πολλαπλασιασμού με μασχαλιαίους βλαστούς. Για παράδειγμα, έχει αποδειχθεί ότι επεκτείνοντας τα φύλλα που ακουμπούν το θρεπτικό υλικό της ανακαλλιέργειας βλαστών του βατόμουρου, αναπτύσσονται τυχαίοι βλαστοί και κάλος. Την ίδια συμπεριφορά έχει μεγάλος αριθμός φυτών.



Διαδικασία: Το παράδειγμα διαδικασίας περιγράφει τον πολλαπλασιασμό βιολέτας.

- 1) Προετοιμάζονται σωλήνες καλλιέργειας με 10ml MS θρεπτικού υλικού που περιέχουν 2,5% σακχαρόζη, 1% άγαρ, ναφθαλενοξικό οξύ 0.1mg/lit και βενζυλαδενίνη 0,01mg/lit.
- 2) Κόβονται πλήρως ανεπτυγμένα φύλλα μαζί με το μίσχο. Ξεπλένονται με νερό για να φύγει τυχόν χώμα και βυθίζονται σε αιθανόλη 95% πριν εμβαπτιστούν σε διάλυμα χλωρίνης για 15 λεπτά. Ξεπλένονται με 3 διαδοχικές αλλαγές αποστειρωμένου νερού, διπλά αποσταγμένου νερού και τοποθετούνται σε αποστειρωμένο τριβλίο.
- 3) Αφαιρούνται τα κατεστραμμένα κύτταρα και κόπτονται τεμάχια 2mm με εγκάρσιες τομές και τοποθετούνται σε σωλήνες καλλιέργειας. Η παραγωγή κάλου και η αναγέννηση των φυταρίων θα πρέπει να προκύψει σε 4-6 εβδομάδες. Μπορεί να προκύψει μεγαλύτερος αριθμός φυταρίων αν μετά την έναρξη της διαφοροποίησης τους οι τομές του μίσχου χωριστούν και μεταφερθούν σε φρέσκο θρεπτικό υλικό.

#### Δ) Οργανογένεση

Κατά την αρχική εργασία πάνω στο χημικό χαρακτηρισμό της κινετίνης, η καλλιέργεια εντεριώνης του ιστού χρησιμοποιούνταν εκτενώς. Παρατηρήθηκε ότι αν η κατάλληλη ισορροπία αυξίνης και κινετίνης ήταν παρούσα, η εντεριώνη του ιστού διαχωριζόταν, διευρυνόταν και παρήγαγε χαλαρά τοποθετημένη μάζα από μη διαφοροποιημένα κύτταρα. Επίσης βρέθηκε ότι όταν η αναλογία κινετίνης και αυξίνης αλλαζόταν σε σχετικά αυξημένη συγκέντρωση κυτοκινίνης, παράγονταν βλαστοί. Αντίθετα μια σχετική αύξηση αυξίνης σε σχέση με την κυτοκινίνη παρήγαγε ρίζες. Αυτές οι παρατηρήσεις οδήγησαν σε πολλές από τις διαδεδομένες τεχνικές που χρησιμοποιούνται στον μικροπολλαπλασιασμό.

Διαδικασία: Το παράδειγμα διαδικασίας περιγράφει την διαφοροποίηση των βλαστών από κάλο καπνού.

- 1) Προετοιμασία θρεπτικού υλικού MS, συμπληρωμένο από NAA 0,1mg/lit και βενζυλαδενίνη 1mg/lit. Ρύθμιση του PH στο 5,8 και πρόσθεση 1gr άγαρ. Μετά τη διάλυση του άγαρ, ρίχνονται 50ml σε κωνικές φιάλες των 125 ml και τοποθετούνται στον κλίβανο.
- 2) Με αποστειρωμένη τσιμπίδα μεταφέρεται ένα μεγάλο κομμάτι κάλου σε αποστειρωμένο τριβλίο. Κόπτεται ο κάλος σε μικρά κομμάτια και μεταφέρεται σε φιάλες.
- 3) Τοποθετούνται οι καλλιέργειες σε θαλάμους ανάπτυξης στους 27C, σε συνεχές φωτισμό για περίπου 5 με 8 εβδομάδες.

#### Ε) Εμβρυογένεση

Η ικανότητα των φυτών να παράγουν έμβρυα δεν είναι περιορισμένη στην παραγωγή γονιμοποιημένων ωαρίων. Τα έμβρυα μπορούν να σχηματίσουν φυτικώς καλλιεργήσιμους ιστούς. Το φαινόμενο αυτό παρατηρήθηκε πρώτη φορά στην καλλιέργεια του καρότου. Η σωματική εμβρυογένεση είναι ένα γενικό φαινόμενο στα φυτά και έχει αναφερθεί σε πάνω από 30 οικογένειες φυτών. Τα σωματικά εμβρυοειδή μπορούν να αναπτυχθούν σε ιστοκαλλιέργεια από τρεις πηγές: Α) βλαστικά κύτταρα ώριμων φυτών, Β) αναπαραγωγικούς ιστούς, Γ) ιστό σπορόφυτου όπως οι κοτυλυδόνες και οι υποκοτύλες. Τα σωματικά έμβρυα έχουν παραχθεί με 2 διαδικασίες, έμμεση και άμεση εμβρυοκαλλιέργεια. Η άμεση χρησιμοποιεί ιστούς που παράγουν έμβρυα απευθείας χωρίς την παρεμβολή του κάλου. Η έμμεση χρησιμοποιεί ένα ενδιάμεσο βήμα κάλου. Η εμβρυογένεση ακολουθεί μια διαδικασία δύο βημάτων. Το πρώτο βήμα περιλαμβάνει την ανάπτυξη του κάλου που έχει διεγερθεί από την παρουσία υψηλού επιπέδου αυξίνης. Το δεύτερο βήμα χρησιμοποιεί μια αλλαγή σε θρεπτικό υλικό χωρίς αυξίνη και άζωτο.

Διαδικασία: Το παράδειγμα διαδικασίας δείχνει την διαφοροποίηση των σωματικών εμβρύων του καρότου.

- 1) Προετοιμασία τριβλίου που περιέχει MS άλατα, ζεατίνη 0,2mg/lit, σακχαρόζη 2% β/ο, χωρίς την παρουσία αυξίνης.
- 2) Κλάσματα της καλλιέργειας τοποθετούνται με σταγονόμετρο στην επιφάνεια του θρεπτικού υλικού με άγαρ και διασκορπίζονται.
- 3) Σφράγιση των τριβλίων και επώαση στους 25C για 2-3 εβδομάδες.

## VII. Ρύθμιση της ανάπτυξης των έκφυτων στην ιστοκαλλιέργεια

Οι κυτοκινίνες και οι αυξίνες είναι πιθανώς οι πιο σημαντικές συνιστώσες του θρεπτικού υλικού και ρυθμίζουν σε μεγάλο μέρος την απόδοση του έκφυτου. Τα εμπορικά εργαστήρια χρησιμοποιούν θρεπτικό υλικό συμπληρωμένο με 1-2 mg/lit BA και εάν δεν λειτουργεί αυτή η προσέγγιση τότε αλλάζει η συγκέντρωση κυτοκινίνης. Γενικά, η BA είναι η επιλογή κυτοκινίνης για τα περισσότερα ξυλώδη και θαμνώδη φυτά και γι αυτό γίνονται μεγάλης κλίμακας δοκιμές συνδυάζοντας πολλές διαφορετικές κυτοκινίνες, κάνοντας έτσι τις αυξίνες περισσότερο δαπανηρές και πιο δύσκολο να κινηθούν.

Το θρεπτικό υλικό MS χρησιμοποιείται για το μεγαλύτερο εύρος των φυτών. Εάν τα έκφυτα επιμηκυνθούν αρκετά ή απλά μαραζώσουν τότε η αρχική συγκέντρωση των αλάτων μέσα στο θρεπτικό υλικό μπορούν να μειωθεί στο μισό. Ακόμα, η BA, η κινετίνη και άλλες κυτοκινίνες και αυξίνες μπορούν να συνδυαστούν εύκολα μέσα στο βασικό MS θρεπτικό υλικό.

Πρόσφατα, χρησιμοποιήθηκε για τον πολλαπλασιασμό μηλιάς κυρίως, μία συνθετική ένωση, η θειδιαζουρόνη. Είναι πολύ αποτελεσματική σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις, περισσότερο από την κυτοκινίνη στις φυσιολογικές συγκεντρώσεις για την βλαστική ανάπτυξη, και χρησιμοποιείται σε συγκεντρώσεις 0,5 ppm ή λιγότερο.

Τελικώς, δεν υπάρχει εύκολος τρόπος για να γνωρίζει κάποιος από πού να αρχίσει με κάθε φυτό. Κάθε κλώνος είναι διαφορετικός σε απαιτήσεις για την καλλιέργεια ιστού. Το πιο λογικό μέρος για να ξεκινήσει κάποιος είναι η βιβλιογραφία, όπου υπάρχουν πληροφορίες για σχεδόν όλα τα είδη και δίνονται οι σχετικές αναφορές όπου θα περιέχονται οι επιπλέον πληροφορίες.

### VIII. Ριζοβολία και εγκλιματισμός μικρομοσχευμάτων

Τα φυτά που προέρχονται από ιστοκαλλιέργεια συχνά δυσκολεύονται να εγκατασταθούν εκτός καλλιέργειας. Είναι πολύ τρυφερά και πρέπει να σκληρύνουν με πολύ προσοχή. Τα μικρομοσχεύματα προετοιμάζονται για μεταφύτευση από το τεχνητό περιβάλλον του σωλήνα καλλιέργειας στην ελεύθερη ύπαρξη μέσα από θερμοκήπιο ή όμοιο περιβάλλον. Μπορούν να διαχειριστούν με τρεις τρόπους για την εκρίζωση:

A) Μπορεί να επανακαλλιεργηθεί απομονωμένο κάθε μόσχευμα σε αποστειρωμένο θρεπτικό υλικό για ριζοβολία. Το θρεπτικό υλικό μπορεί να έχει αυξημένη περιεκτικότητα σε αυξίνες, χωρίς την παρουσία κυτοκινίνης και μειωμένη περιεκτικότητα σε μέταλλα. Σε άλλη περίπτωση τα μοσχεύματα εμβαπτίζονται σε αυξίνη πριν την καλλιέργεια ή αφήνονται σε θρεπτικό υλικό που περιέχει αυξίνες για μερικές μέρες και μετά μεταφέρονται σε θρεπτικό υλικό χωρίς.

B) Μπορεί το μόσχευμα να χρειάζεται μία περίοδο επιμήκυνσης. Σε αυτή την περίπτωση μεταφέρονται σε θρεπτικό υλικό χωρίς ή με χαμηλής συγκέντρωσης κυτοκινίνες, που περιέχουν γιββεριλικό οξύ.

Γ) Μπορούν να μεταφερθούν απευθείας σε υπόστρωμα ριζοβολίας εξωτερικά.

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν τρία συστήματα για την εκρίζωση των μοσχευμάτων. Σε όλα καθοριστικός παράγοντας είναι η υγρασία και είναι απολύτως απαραίτητο να μην στεγνώσουν τα μοσχεύματα.

A) Μπορούν να δημιουργηθούν διαμερίσματα μέσα σε θαλάμους για ελεγχόμενο περιβάλλον ριζοβολίας, είτε περιβάλλον θερμοκηπίου. Αυτό το σύστημα είναι χρήσιμο όταν η παραγωγή αποτελείται από μεγάλο αριθμό διαφορετικών τύπων φυτών.

B) Ένα άλλο σύστημα είναι ένα κουτί εφίδρωσης, το οποίο είναι κατασκευή πολυαιθυλενίου το οποίο πρέπει να περικλείει όλο τον πάγκο ριζοβολίας.

Γ) Η Τρίτη εναλλακτική είναι ένα σύστημα υδρονέφωσης σε όλο το θερμοκήπιο.

Για την αποφυγή ανάπτυξης μούχλας τα μοσχεύματα πλένονται για να απομακρυνθεί το θρεπτικό υλικό που πιθανόν να είναι ακόμα προσκολλημένο στα φυτά. Εάν είναι απαραίτητο κατά την ριζοβολία εφαρμόζονται τα κατάλληλα μυκητοκτόνα.

Τέλος, μετά την ριζοβολία το επόμενο βήμα είναι η σταδιακή μείωση της υγρασίας, η αύξηση του φωτισμού και ο εγκλιματισμός σε συνθήκες θερμοκηπίου.

#### IX. Απαραίτητος εξοπλισμός

- 1) Οριζόντιος θάλαμος νηματικής ροής: Εξασφαλίζει τις ασηπτικές συνθήκες κάτω από τις οποίες εξελίσσονται όλες οι διαδικασίες της ιστοκαλλιέργειας. Με τη λειτουργία του εξασφαλίζεται συνεχής ροή αέρα, ο οποίος φιλτράρεται με ένα φίλτρο HEPA, το οποίο συγκρατεί όλους τους μικροοργανισμούς που θα μπορούσαν να είναι αιτία μόλυνσης.
- 2) Κλίβανος υγρής αποστείρωσης: Είναι απαραίτητος για την αποστείρωση του θρεπτικού υποστρώματος που χρησιμοποιείται, αλλά και για την αποστείρωση των δοχείων καλλιέργειας και άλλων εργαλείων που χρησιμοποιούνται.
- 3) Κλίβανος ξηρής αποστείρωσης: Χρησιμοποιείται για την αποστείρωση εργαλείων(λαβίδες, μαχαίρια, κτλ), γυαλικών( τριβλίων, δοκιμαστικών σωλήνων, κτλ) και για τον απαραίτητο εξοπλισμό του εργαστηρίου.
- 4) Θάλαμος ανάπτυξης φυτών: Είναι θάλαμοι οι οποίοι έχουν τη δυνατότητα να ελέγχουν τις συνθήκες φωτισμού, θερμοκρασίας και σχετικής

υγρασίας, σύμφωνα με τις ανάγκες και τον τύπο της καλλιέργειας. Είναι συνήθως σε μέγεθος δωματίου, χωρίς παράθυρα και εφοδιασμένοι με ράφια. Ο φωτισμός γίνεται με λάμπες φθορισμού και υπάρχει σύστημα προγραμματισμού μέρας-νύχτας. Η θέρμανση και η ψύξη του θαλάμου πραγματοποιείται από ειδικά κλιματιστικά. Επίσης, είναι καλό να υπάρχει ανεμιστήρας για τη διασπορά του αέρα και μηχανισμός ελέγχου και σταθεροποίησης της υγρασίας.

- 5) Κινητοί θάλαμοι ανάπτυξης: Είναι θάλαμοι ανάπτυξης με τις ίδιες δυνατότητες που προαναφέρθηκαν, αλλά για μικρότερο όγκο καλλιέργειας. Το πλεονέκτημα τους είναι ότι μπορούν να ελέγξουν με μεγαλύτερη ικανότητα τις παραμέτρους που είναι απαραίτητοι για την ανάπτυξη των φυτών.
- 6) Συσκευή απιονισμού νερού: Είναι απαραίτητη συσκευή του εργαστηρίου, καθώς κάθε εργαστηριακή διαδικασία απαιτεί απιονισμένο νερό.
- 7) Ζυγοί ακριβείας: Θα πρέπει να είναι ψηφιακοί, υψηλής πιστότητας με ανάλυση τεσσάρων δεκαδικών, καθώς οι ποσότητες των αντιδραστηρίων που χρησιμοποιούνται είναι εξαιρετικά μικρές από χιλιοστά του mg έως gr.
- 8) ΡΗ-μέτρο: Πολλές φορές μπορεί να προκύψει η ανάγκη διόρθωσης του ΡΗ του θρεπτικού υλικού, γι αυτό είναι απαραίτητο να υπάρχει με ακρίβεια μέτρησης 0,01.
- 9) Θερμικοί μαγνητικοί αναδευτήρες: Είναι συσκευές που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή διαλυμάτων.
- 10) Πιπέτες ρυθμιζόμενου όγκου: Για την παρασκευή των υποστρωμάτων πολλές φορές χρειάζεται προσθήκη ποσοτήτων της τάξης των  $\mu\text{L}$ . Η μέτρηση αυτή γίνεται με ρυθμιζόμενες ψηφιακές πιπέτες.
- 11) Ψυγεία-Καταψύκτες: Χρησιμοποιούνται για τα διάφορα διαλύματα που χρειάζονται χαμηλές θερμοκρασίες.
- 12) Εργαστηριακό πλυντήριο: Χρησιμοποιείται για το άριστο πλύσιμο όλων των σκευών που χρησιμοποιούνται στην καλλιέργεια ιστού.
- 13) Στερεοσκόπιο: Απαραίτητο για τη λήψη ακραίων μεριστωμάτων.
- 14) Ανακινητήρες: Είναι κατάλληλες συσκευές για καλλιέργειες σε υγρά υποστρώματα υπό ανάδευση.

- 15) Ψυχρός θάλαμος: Χρειάζεται για την αποθήκευση καλλιεργειών που χρειάζονται σταθερή θερμοκρασία.
- 16) Μικροεργαλεία- Γυαλικά- Αναλώσιμα

#### X. Πίνακες και εικόνες

Sterilant	Concentration	Treatment time (minutes)
Antibiotics	4-50 mg/liter	30-60
Bromine water	1-2%	2-10
Calcium hypochlorite	9-10%	5-30
Ethanol/isopropanol	70%	quick dip
Hydrogen peroxide	10-12%	5-15
Mercuric chloride	0.1-1%	2-10
Sodium hypochlorite	10-20% <sup>1</sup>	5-30

<sup>1</sup> 10-20% (v/v) of a commercial bleach solution

Πίνακας 1: Ουσίες αποστείρωσης επιφάνειας των εκφύτων πριν την καλλιέργεια (πηγή διαδικτυο)



Substance	Concentration
<b>Auxins</b>	
2,4-Dichlorophenoxyacetic acid—2,4-D	0.01-10 mg/l
Indole-3-acetic acid—IAA	0.1-10 mg/l
Indole-3-butyric acid—IBA	0.1-10 mg/l
Naphthaleneacetic acid—NAA	0.1-10 mg/l
P-chlorophenoxyacetic acid	0.1-10 mg/l
<b>Cytokinins</b>	
6-( $\gamma,\gamma$ -dimethylallylamino) purine (2iP)	0.1-30 mg/l
Kinetin	0.1-10 mg/l
N <sub>6</sub> Benzyladenine-BA	0.1-10 mg/l
Thidiazuron	0.01-10 mg/l
<b>Other Organic Substances</b>	
Adenine sulfate	20-200 mg/l
Ascorbic acid	100 mg/l
Citric acid	150 mg/l
Sucrose	20-30 g/l
<b>Undefined Ingredients</b>	
Bacto malt extract	50-5000 mg/l
Bacto yeast extract	50-5000 mg/l
Casein hydrolysate	50-5000 mg/l
Coconut milk/water	100-150 ml/l
Orange juice	50-300 ml/l

Πίνακας 2: Ουσίες που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη των φυτών και οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται συνήθως (πηγή Διαδίκτυο)

Acid	Molecular weight	Molarity	Weight percent
Acetic	60.05	17.4	99.5
Hydrochloric	36.47	12.4	38.0
Phosphoric	98.00	14.7	85.0
Sulfuric	98.08	17.6	94.0

Πίνακας 3: Κοινά οξέα και οι χημικές και φυσικές τους ιδιότητες (πηγή διαδίκτυο)

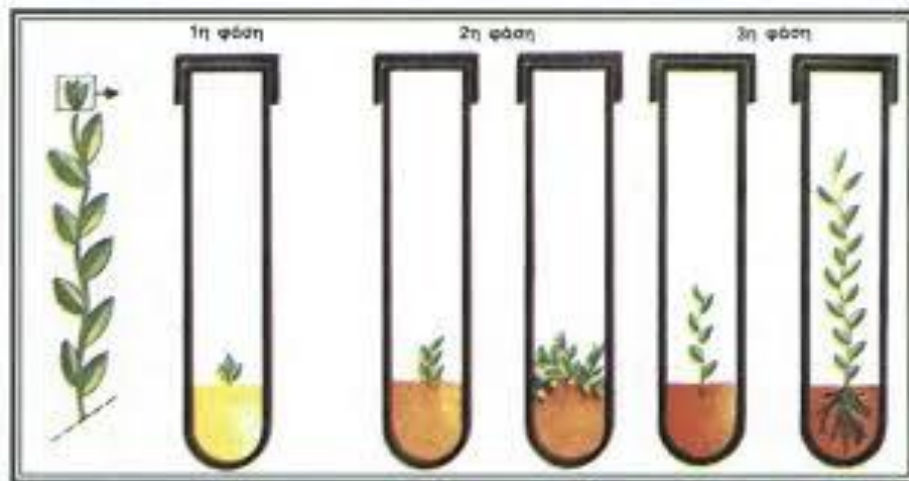


Compound	Murashige Skoog (21)	Woody Plant Medium (14)	Anderson (1)	White's (30)	Gamborg B5 (6)	Heller (9)	Nitsch's (22)	Linsmaier and Skoog (13)
	concentration (mg/liter)							
$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650	400	400					
$\text{KNO}_3$	1900		480				720	1650
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$		556		80	2500		950	1900
$\text{NaNO}_3$				300				
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$						600		
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370		370	720	134			
$\text{Na}_2\text{SO}_4$				200	250		185	
$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$								
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440	96	440					
$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170	170	380		150	75	166	440
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$				16.5	150	125	68	170
$\text{KCl}$				65				
$\text{K}_2\text{SO}_4$		990				750		
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$		370						
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8	27.8	55.7		27.5	250		370
$\text{Na}_2\text{EDTA}$	37.3	37.3	74.5		37.3		27.8	27.8
$\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$							37.3	37.3
$\text{Fe}_2(\text{C}_4\text{H}_4\text{O}_6)_3 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$						1		
$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$				2.5				
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$		22.3	16.9		10		18.9	
$\text{MnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	22.3							
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6	8.6	8.6	7		0.01		22.3
$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.2	6.2	6.2	3	2.0	1	10	8.6
$\text{KI}$	0.83			1.5	3.0	1	10	6.2
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	0.25	0.25	0.75	0.75	0.01		0.83
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.25	0.025		0.25		0.25	0.25
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025		0.025		0.025	0.03	0.025	0.025
$\text{NiCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$			0.025		0.025			0.025
$\text{AlCl}_3$						0.03		
myo-inositol	100	100	100		100		100	100
nicotinic acid	0.5	0.5		0.5	1.0		5.0	
pyridoxine HCl	0.5	0.5		0.1	1.0		0.5	
thiamine HCl	0.1	1.0		0.1	10.0	1.0	0.5	0.40
folic acid							0.05	
glycine							0.5	
Ca D-pantothenic acid	2.0	2.0		3.0			2.0	
				1.0				

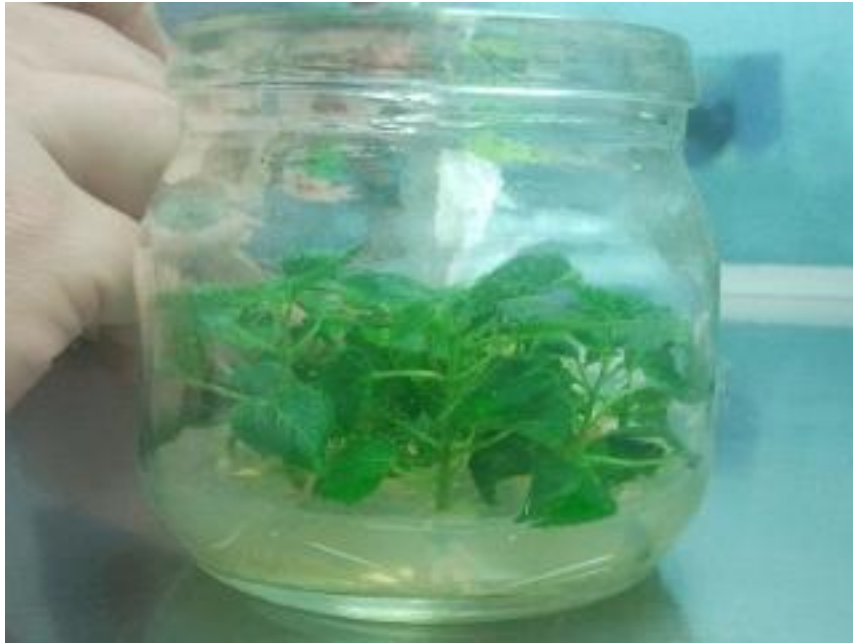
Πίνακας 4: Διαλύματα θρεπτικού υλικού ιστοκαλλιέργειας (πηγή διαδικτυο)



Εικόνα 1: Θάλαμος ανάπτυξης έκφυτων ( πηγή Διαδίκτυο)



Εικόνα 2: Φάσεις ανάπτυξης του έκφυτου ( πηγή διαδίκτυο)



Εικόνα 3: Έκφυτα σε θρεπτικό υλικό (πηγή διαδικτυο)

## Κεφάλαιο 2: Πολλαπλασιασμός με τη χρήση μοσχευμάτων



## Επιλογή του πολλαπλασιασμού με μοσχεύματα

Τα μοσχεύματα χρησιμοποιούνται για να διατηρήσουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά. Αυτή η αναπαραγωγική διαδικασία θεωρείται κλωνοποίηση εφόσον κάθε φυτό που παράγεται έχει όλα τα στοιχεία του φυτού από το οποίο προήλθε. Υπάρχουν πάρα πολλά παραδείγματα φυτών, τα οποία μπορούν να συγκρατήσουν τα αληθινά χαρακτηριστικά τους μόνο με πολλαπλασιασμό με μοσχεύματα, όπως το *Calicanthus floridus*, το οποίο έχει κίτρινα άνθη αλλά αν πολλαπλασιαστεί με σπόρους τότε τα άνθη του έχουν χρώμα κοκκινοκαφέ.

Άλλος ένας λόγος επιλογής αυτού του τρόπου είναι το κόστος. Είναι αισθητά πιο φθηνό να ριζώσει ένα μόσχευμα από το να εμβολιαστεί ένα φυτό. Το κατώτατο όριο απόδοσης για τα μοσχεύματα είναι 50-60% ενώ στον εμβολιασμό μπορεί να φτάσει ακόμα και το 90%. Αυτό ισχύει και για τον πολλαπλασιασμό με καλλιέργεια ιστού. Όσο πιο αποτελεσματικό είναι ένα εργαστήριο τόσο το κόστος παραγωγής μειώνεται.

### I. Τύποι μοσχευμάτων

#### 1) Μόσχευμα φύλλου

Κάθε φυτικό τμήμα ενός δέντρου μπορεί να χαρακτηριστεί μόσχευμα. Τα φύλλα πολλών κηπευτικών φυτών μπορούν να αναπαράγουν ρίζες και βλαστό. Όμως, τα μοσχεύματα φύλλου είναι πολύ μικρής στον πολλαπλασιασμό δενδρώδων καλλιέργειών. Τα μοσχεύματα φύλλου αποτελούνται από έλασμα του φύλλου, το μίσχο και ένα μικρό κομμάτι του βλαστού με το μασχαλιαίο οφθαλμό. Η καμέλια έχει πολλαπλασιαστεί επιτυχώς με μοσχεύματα φύλλου αλλά ο τρόπος αυτός δεν είναι εμπορικά δημοφιλής για τον πολλαπλασιασμό της.

## 2) Μόσχευμα βλαστού

Τα μοσχεύματα αυτής της κατηγορίας χωρίζονται σε μοσχεύματα μαλακού και μοσχεύματα σκληρού ξύλου:

A) Μοσχεύματα μαλακού ξύλου: Αποτελείται από τμήμα βλαστού με ορισμένο αριθμό φύλλων που διαφέρει από είδος σε είδος, μήκους περίπου 15εκ. Το μόσχευμα κόβεται και αφού εμβαπτιστεί σε κατάλληλο διάλυμα μυκητοκτόνου και σε διάλυμα αυξίνης ριζοβολίας φυτεύεται σε κατάλληλο υπόστρωμα. Στη συνέχεια μεταφέρεται σε κατάλληλο περιβάλλον για να ριζοβολήσει.

Τα μοσχεύματα μαλακού ξύλου ριζοβολούν υπό συνθήκες υψηλής υγρασίας που επιτυγχάνεται με το σύστημα υδρονέφωσης ή συστήματα ομίχλης. Τα φυλλοφόρα μοσχεύματα φωτοσυνθέτουν, γι αυτό το λόγο τα φύλλα τους πρέπει να βρίσκονται σε πολύ καλή κατάσταση.

Ο κύριος παράγοντας ριζοβολίας ενός μοσχεύματος είναι ο γενότυπος του κάθε φυτού. Για παράδειγμα, η ποικιλία ελιάς Χαλκιδικής ριζοβολεί πολύ καλά ενώ η ποικιλία Καλαμών καθόλου ικανοποιητικά. Μεγάλη σημασία έχει η εποχή κοπής των μοσχευμάτων. Το ξύλο των μοσχευμάτων θα πρέπει να έχει σκληροποιηθεί για να μην υποστεί αφυδάτωση. Επίσης ρόλο στη ριζοβολία έχει η θέση του βλαστού απ την οποία θα κοπεί το μόσχευμα. Τα μοσχεύματα που προέρχονται από την κορυφή του βλαστού ριζοβολούν πιο γρήγορα και σε μεγαλύτερο ποσοστό.

Η νεανικότητα του βλαστού από τον οποίο προέρχεται το μόσχευμα επηρεάζει το μόσχευμα ώστε να ριζώσει γρηγορότερα και σε μεγαλύτερο ποσοστό.

Τέλος, ο τραυματισμός της βάσης των μοσχευμάτων πολλές φορές βελτιώνει την επιτυχία των μοσχευμάτων.





Εικόνα 1: Ριζοβολημένο μόσχευμα μαλακού ξύλου (πηγή Hellenic Plants)

**B)** Μοσχεύματα σκληρού ξύλου: Αποτελείται από τμήματα βλαστού μήκους 15-50 εκ., χωρίς φύλλα, τα οποία κόβονται κατά την φθινοπωρινή κα χειμερινή

περίοδο και είτε φυτεύονται κατευθείαν στο φυτώριο για να ριζοβολήσουν, είτε σε ειδικές εγκαταστάσεις.

Η ριζοβολία εξαρτάται όπως στα φυλλοφόρα, από το γενότυπο, από την εποχή κοπής, από τη συγκέντρωση αυξίνης, από τη θερμοκρασία ριζοβολίας, από τη θέση του βλαστού από την οποία προήλθε το μόσχευμα, και από το μήκος του μοσχεύματος.

Πολλές φορές τα μοσχεύματα ριζώνουν εύκολα στους πάγκους ριζοβολίας αλλά κατά την μεταφύτευση τους στο φυτώριο αποτυγχάνουν σε μεγάλο ποσοστό. Συνεπώς, η εγκατάσταση των μοσχευμάτων έχει μικρό ποσοστό επιτυχίας. Σε αυτές τις περιπτώσεις είναι προτιμότερο τα μοσχεύματα να φυτεύονται νωρίς το φθινόπωρο όταν η θερμοκρασία εδάφους είναι υψηλότερη των 15C.

Η απολύμανση του εδάφους παίζει σημαντικό ρόλο στην επιτυχία της εγκατάστασης στο φυτώριο γι αυτό συνίσταται η απολύμανση του εδάφους και η εμφάνιση των μοσχευμάτων σε σκόνη Cartan πριν τη φύτευση στο φυτώριο. Επίσης, απαραίτητο είναι το πότισμα μετά την εγκατάστασή τους στο φυτώριο.

Τέλος, εάν τα μοσχεύματα ριζοβολήσουν στους πάγκους ριζοβολίας αλλά οι καιρικές συνθήκες δεν επιτρέπουν τη φύτευσή τους στο φυτώριο, μπορούν να συντηρηθούν στους 5C χωρίς κανένα πρόβλημα, αρκεί να υπάρχει υψηλή υγρασία και να προστατεύεται το ριζικό σύστημα.





Εικόνα 2: Μοσχεύματα σκληρού ξύλου τοποθετημένα σε περλίτη στον πάγκο ριζοβολίας (πηγή Hellenic Plants)

3) Μοσχεύματα ρίζας: Πολύ μικρός αριθμός φυτών χρησιμοποιεί αυτή τη μέθοδο πολλαπλασιασμού λόγω του χρόνου και του κόστους που απαιτείται. Τα μοσχεύματα ρίζας συλλέγονται από Δεκέμβρη έως Μάρτιο ανάλογα με τις καιρικές συνθήκες. Οι ρίζες των νεώτερων φυτών και αυτές που είναι πιο κοντά στο βλαστό επιδεικνύουν μεγαλύτερη άνεση στο να σχηματίσουν βλαστούς.

Οι ρίζες μπορούν να παρθούν, να καθαριστούν, να απολυμανθούν και να αποθηκευτούν στα τέλη φθινοπώρου ή να παρθούν τέλη του χειμώνα εάν το επιτρέπει το χώμα. Τα μοσχεύματα ποικίλουν σε μήκος ανάλογα με τη διάμετρο της ρίζας. Τα μοσχεύματα ρίζας χρειάζονται πότισμα και και περισσότερη υγρασία για αυτό θα ήταν καλό οι

πάγκοι ριζοβολίας να καλύπτονται με πλαστικό. Με την εμφάνιση των βλαστών, η διαχείρισή τους είναι όμοια με τα μοσχεύματα μαλακού ξύλου.

## II. Συλλογή και μεταχείριση μοσχευμάτων

Η ιδανική ώρα για συλλογή των μοσχευμάτων είναι νωρίς το πρωί, όταν ακόμα τα μοσχεύματα είναι διογκωμένα και η θερμοκρασία του αέρα πιο δροσερή. Για τη μεταφορά τους μπορούν να χρησιμοποιηθούν πλαστικές σακούλες με κατάλληλη υγρασία, δοχεία με πάγο κτλ. Χρειάζεται προσοχή ώστε να διατηρηθούν στη σκιά και να μην υποστούν ζημιές κατά τη συλλογή η μεταφορά τους.

Μετά τη συλλογή τους, τα μοσχεύματα πρέπει να μεταφερθούν στο χώρο προετοιμασίας τους και να προετοιμαστούν για την εισαγωγή τους στο υπόστρωμα ριζοβολίας όσο το δυνατόν πιο σύντομα. Εάν δεν είναι αυτό δυνατόν, μπορούν να αφεθούν για κάποιο χρονικό διάστημα σε πάγκους από συρματόπλεγμα αφού καταβρέχονται από ψεκαστήρες για να μην χάσουν την υγρασία τους ή να αποθηκευτούν σε ψυχρούς χώρους για μερικές μέρες, χωρίς να χάσουν τη δυνατότητά τους να ριζοβολήσουν. Επίσης, μπορούν να αποθηκευτούν για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα εάν είναι απαραίτητο σε αποθηκευτικούς χώρους χαμηλής πίεσης.

Η συλλογή των μοσχευμάτων δεν μπορεί να γίνεται από δέντρα κήπων, πάρκων κτλ, προτιμάται η συλλογή τους από πιστοποιημένες μητρικές φυτείες, από βοτανικούς κήπους, από κρατικά ιδρύματα κτλ. Η συλλογή τους από δέντρα που προέρχονται από φυτώρια με πιστοποιημένο πολλαπλασιαστικό είναι καλύτερη επιλογή καθώς τα δέντρα έχουν υποστεί όλες τις απαραίτητες διαδικασίες για να αναπτυχθούν και είναι απαλλαγμένα από ασθένειες και μικροοργανισμούς.

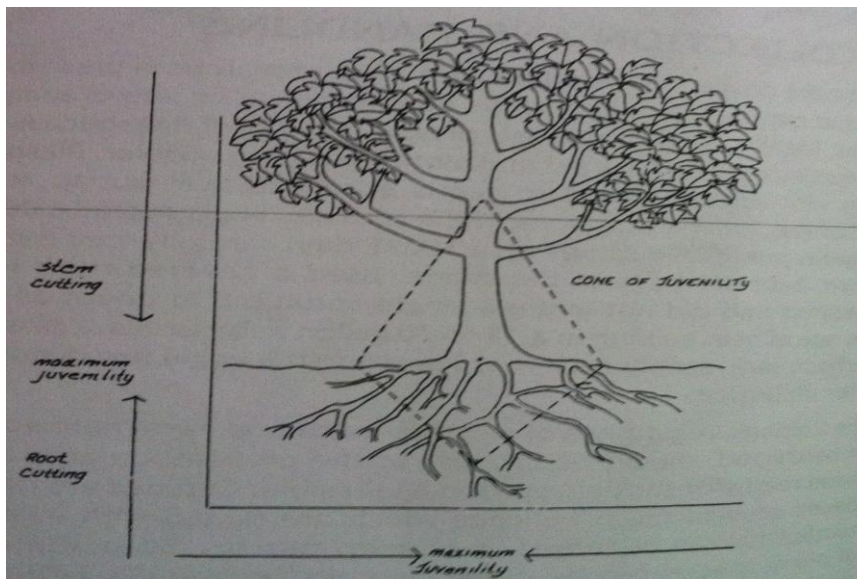
Σαν προαιρετικό μέτρο, τα μοσχεύματα μπορούν να εμβαπτιστούν σε Cartan πριν ή και μετά την τοποθέτησή τους στους πάγκους ριζοβολίας.

### III. Παράγοντες που επηρεάζουν την ριζοβολία των μοσχευμάτων

#### 1) Θρέψη, υδατάνθρακες και άζωτο

Ιδανικά, τα μοσχεύματα δεν πρέπει να στρεσάρονται από υπερβολικό πότισμα, θα πρέπει να έχουν επαρκή ποσότητα υδατανθράκων και λογική περιεκτικότητα σε θρεπτικά. Όλα τα χημικά στοιχεία και οι ενώσεις παίζουν σημαντικό ρόλο στην διαδικασία της ριζοβολίας και είναι άδικο να σταθούμε μόνο σε ένα ή δύο. Παρόλα ταύτα, οι υδατάνθρακες παρέχουν όλη την απαραίτητη ενέργεια και πιθανότατα επηρεάζει την ποιότητα της αντίδρασης της ριζοβολίας περισσότερο από οποιαδήποτε ενδογενή, βιοχημικά στοιχεία. Από τη μεριά του άζωτο είναι ένα στοιχείο που αποτελείται από αμινοξέα, πρωτεΐνες και νουκλειακά οξέα, τα οποία είναι απαραίτητα για την επιτυχή ριζοβολία και ανάπτυξη των μοσχευμάτων. Επίσημα όμως δεν έχουν οριστεί τα κατώτατα όρια των ουσιών κάτω από τα οποία είναι ή δεν είναι επιτυχημένη η ριζοβολία των μοσχευμάτων.

#### 2) Νεανικότητα



Εικόνα 3: Ο κώνος νεανικότητας όπου δείχνει τα σημεία του δέντρου για την καλύτερη λήψη μοσχευμάτων (πηγή διαδικτυο)

Η νεανικότητα είναι ένας σημαντικός παράγοντας που συχνά δεν δίνεται η απαραίτητη προσοχή. Τα μοσχεύματα τα οποία συλλέγονται από νεαρά δέντρα είναι εξαιρετικά πιο εύκολο να ριζώσουν από μοσχεύματα που έχουν παρθεί από σχετικά γερασμένα δέντρα. Για παράδειγμα, στον πολλαπλασιασμό του κυπαρισσιού μοσχεύματα που προήλθαν από δέντρα 5 ετών είχαν επιτυχία ριζοβολίας 94%, ενώ τα μοσχεύματα που προήλθαν από 20 και 50 ετών δέντρα, 34 και 5 % επιτυχία αντίστοιχα.

Όσο το δέντρο μεγαλώνει σε ηλικία, οι αναστολές ριζοβολίας αυξάνονται. Σε πολλά φυτά, όσο αυξάνεται η ηλικία τα φαινορικά μειώνονται επηρεάζοντας έτσι τη ριζοβολία των μοσχευμάτων καθώς λειτουργούν σαν συμπαράγοντας της αυξίνης για την διαδικασία της ριζοβολίας. Κυτοκινίνες και γιβερριλίνες που έχουν προστεθεί σε διάφορα είδη μοσχευμάτων εισήγαγαν τη νεανικότητα μέσα στο μόσχευμα και είχαν ως αποτέλεσμα την βελτιωμένη ριζοβολία.

Η πιο λογική μέθοδος διατήρησης των δέντρων στη νεανικότητα είναι το συνεχές κλάδεμα. Γενικά, όσο πιο μακριά βρίσκεται το μόσχευμα από τη ρίζα του δέντρου από το ποίο προέρχεται τόσο πιο δύσκολο είναι να ριζώσει.

### 3) Χρόνος ριζοβολίας

Ορισμένα φυτά έχουν τη δυνατότητα να ριζώνουν καθ όλη τη διάρκεια του χρόνου ενώ άλλα προτιμούν συγκεκριμένη χρονική στιγμή. Για κάθε είδος και ποικιλία χρειάζεται καταγραφή σε αρχείο του χρόνου, τον οποίο συλλέγονται τα μοσχεύματα αλλά και την κατάσταση του ιστού την συγκεκριμένη χρονική στιγμή. Στα περισσότερα φυτά, το χρονικό περιθώριο συλλογής και μοσχευμάτων και ριζοβολίας αυτών είναι πολύ μικρό και αν ξεπεραστεί ολόκληρη η καλλιέργεια του έτους μπορεί να αποτύχει. Οι επιπτώσεις του χρονικού περιθωρίου είναι γενικά η αντανάκλαση των περιβαλλοντικών συνθηκών, οι οποίες επηρεάζουν την φυσιολογία των φυτών. Τα μοσχεύματα μαλακού ξύλου ανταποκρίνονται στις ανοιξιάτικες συνθήκες καθώς και της αρχής του καλοκαιριού. Τα μοσχεύματα σκληρού ξύλου αντίθετα αδρανούν σε τέτοιες συνθήκες και χρειάζονται μείωση της φωτοπεριόδου

και χαμηλές θερμοκρασίες. Όμως, ταυτόχρονη δουλειά για τη ριζοβολία με τη σωστή χρονική περίοδο κάνουν οι προαγωγοί ή αναστολείς ριζοβολίας, οι υδατάνθρακες, η θρεπτική ισορροπία ή ανισορροπία, η μαλακότητα ή σκληρότητα του μοσχεύματος, τα φυσικά εμπόδια κτλ. Αναμφίβολα, ο επιστημονικός τομέας δεν έχει ακόμα εξελιχθεί σε τέτοιο βαθμό ώστε οι παραπάνω παράμετροι να έχουν αναλυθεί πλήρως ώστε να υπάρχουν ακριβείς οδηγίες ριζοβολίας με σίγουρη επιτυχία, οπότε η απόδοση της ριζοβολίας των μοσχευμάτων καθορίζεται από τις δοκιμές και τα λάθη.

#### 4) Κατάσταση και τύπος φυτού

A) Κλωνικό υλικό: Το μητρικό υλικό από το οποίο προέρχονται τα μοσχεύματα, ειδικά αν είναι σπορόφυτο, επηρεάζει την μεταγενέστερη ριζοβολία. Υπάρχουν μεγάλες διαφορές στην ικανότητα ριζοβολίας μεταξύ φυτών που προέρχονται από σπόρους και των φυτών κλώνων. Για παράδειγμα σε πείραμα που πραγματοποιήθηκε για το *Ulmus parvifolia*, χρησιμοποιήθηκαν 13 κλώνοι από τους οποίους 3 δεν ρίζωσαν, 5 ρίζωσαν με ποσοστό μικρότερο του 25% και 5 είχαν ποσοστό πάνω από 25%, από 65% έως 96%. Από όλα αυτά μόνο δύο αναπτύχθηκαν σωστά ώστε να γίνουν δέντρα. Συνεπώς κάθε πολλαπλασιαστής πρέπει να είναι σε μεγάλο ποσοστό βέβαιος για μία καλλιέργεια πριν συστήσει κάποια ποικιλία γιατί μέχρι και τα φυτά μεταξύ έχουν διαφορά στη ριζοβολία.

Τα μοσχεύματα πρέπει να προέρχονται από βλαστούς χωρίς ταξιανθία. Πολλές μελέτες έχουν δείξει πως τα μοσχεύματα βλαστού αναπτύσσονται καλύτερα όταν συλλέγονται πριν ή μετά, παρά την περίοδο της άνθησης. Αυτή την περίοδο υπάρχουν διαφορετικές ορμονικές σχέσεις και οι υδατάνθρακες και το νάτριο μπορεί να είναι ανεπαρκή για να αναπτυχθούν τα άνθη και οι καρποί. Για παράδειγμα, μοσχεύματα σκληρού ξύλου που συλλέχθηκαν από μύρτιλο από βλαστούς με ταξιανθία και καρπούς είχαν μεγάλη διαφορά στην απόδοση ριζοβολίας από αυτά που συλλέχθηκαν από μόνο φυλλώδεις βλαστούς.

#### B) Θέση του βλαστού πάνω στο φυτό

Με τον όρο “topophysis” εννοείται η διαφορετικότητα των χαρακτηριστικών ανάπτυξης όταν διαφορετικά μέρη του φυτού χρησιμοποιούνται ως μοσχεύματα. Ορθοτροπικά ονομάζονται τα μοσχεύματα τα οποία αναπτύσσονται κάθετα. Πλαγιοτροπικά, ονομάζονται τα μοσχεύματα τα οποία αναπτύσσονται οριζόντια. Η τοποφυτική διαφορετικότητα δεν είναι σημαντικό πρόβλημα για τα περισσότερα είδη φυτών που πολλαπλασιάζονται με μοσχεύματα αλλά είναι ένα φαινόμενο που πρέπει να ληφθεί υπ όψιν πριν τον πολλαπλασιασμό.

Έχει παρατηρηθεί ότι τα μοσχεύματα που προέρχονται από οριζόντιους βλαστούς έχουν μεγαλύτερο ποσοστό ριζοβολίας από αυτά που προέρχονται από κάθετους και κορυφαίους βλαστούς. Βέβαια αυτό μπορεί να οφείλεται στον παράγοντα της νεανικότητας ή σε ορμονικές σχέσεις. Ο μόνος σίγουρος τρόπος να αποφασιστεί ποια είναι η κατάλληλη θέση συλλογής των μοσχευμάτων είναι μόνο μέσω δοκιμασίας τους.

## 5) Τραυματισμός

Για τα περισσότερα είδη φυτών ο τραυματισμός δεν είναι απαραίτητος, όμως μερικά είδη μπορεί να τα ωφελήσει σε μεγάλο βαθμό. Η πληγή που ανοίγεται είναι 2-3 mm και μπορεί να είναι ελαφριά ή βαθιά, από τη μία πλευρά ή και από τις δύο. Ο τραυματισμός επιφέρει εσωτερικές ορμονικές αλλαγές και μπορεί να βελτιώσουν την ριζοβολία, εκθέτει ζωντανά κύτταρα στην ορμονική προετοιμασία και διευκολύνει τη ρίζα να διεισδύσει από τα φυσιολογικά εμπόδια.

Ο τραυματισμός των μοσχευμάτων είναι μια δύσκολη και χρονοβόρα διαδικασία και αν δεν υπάρχει σημαντική διαφορά στην απόδοση της ριζοβολίας μπορεί να αποφευχθεί. Κατά την διαδικασία αφαιρείται πολύ λεπτό κομμάτι του φλοιού. Η τομή πραγματοποιείται με νυστέρι ή άλλα ειδικά εργαλεία που κάνουν πιο εύκολη την διαδικασία. Για καλλιέργειες που ριζώνουν εξαιρετικά δύσκολα είναι

απαραίτητο να μελετηθεί ο παράγοντας του τραυματισμού διότι συνήθως είναι το κλειδί της επιτυχίας της ριζοβολίας.

## 6) Ορμόνες

Με μία σύντομη έρευνα στη βιβλιογραφία γίνεται αντιληπτό ότι έχει δοκιμαστεί ένας πολύ μεγάλος αριθμός χημικών ενώσεων για την βελτιστοποίηση της ριζοβολίας. Εκτιμάται ότι πάνω από 10.000 χημικές ενώσεις έχουν θετική επίδραση στη ριζοβολία μοσχευμάτων. Σχετικά νωρίς ανακαλύφθηκε μία φυσική αυξίνη η IAA (indole-3-acetic acid). Αργότερα βρέθηκε από τους Zimmerman και Wilcoxon ότι δύο συνθετικές αυξίνες, η IBA (indole-3-butyric acid) και η NAA (naphthaleneacetic acid), έχουν μεγαλύτερα ποσοστά επιτυχίας κατά την ριζοβολία.

Πρόσφατα, πολλές νέες συνθετικές εστερικές ενώσεις IAA και IBA έχουν αποδειχθεί ανώτερες των αρχικών οξικών ενώσεων. Η φαινολική IAA έχει ως αποτέλεσμα 95-154 % μεγαλύτερο ποσοστό ριζοβολίας από την αγωγή με IAA. Αύξηση της ριζοβολίας επίσης είχε η αντικατάσταση της IBA με 3-υδροξυφαιολική IBA. Σε μοριακή βάση και οι δύο παραπάνω ενώσεις ήταν 10 φορές πιο αποτελεσματικές από την IAA. Επίσης αναγνωρίστηκε ότι η ουσία WRS έχει βελτιώσει την ριζοβολία πολλών καλλιέργειών. Όταν χρησιμοποιήθηκε σε συνδυασμό με την IBA είχε άριστα αποτελέσματα σε σχέση με τα μοσχεύματα που εμβαιπίστηκαν μόνο σε IBA.

Μερικές εμπορικά συσκευασμένες ορμόνες που προορίζονται για φυτωριακές μονάδες είναι: Hormodin, Hormo-root, Hormex, Rootone, Dip n Grow και Woods. Οι πρώτες τέσσερις είναι ενώσεις σκόνης που περιέχουν IBA και άλλες ορμόνες σε διάφορες συγκεντρώσεις.

Κάθε είδος και καλλιέργεια αντιδρά με διαφορετικό τρόπο στην ορμονική αγωγή. Η βέλτιστη συγκέντρωση IBA για ένα είδος μπορεί να μην είναι καθόλου αποτελεσματικό στην προώθηση της ριζοβολίας για κάποιο άλλο. Θεωρητικά, μια

καμπύλη συγκέντρωσης ορμόνης ριζοβολίας θα μπορούσε να γίνει για κάθε είδος και καλλιέργεια. Πρακτικά όμως, το ζητούμενο είναι να βρεθεί η καλύτερη μέση συγκέντρωση για το μεγαλύτερο αριθμό φυτών που πολλαπλασιάζονται. Για το μεγαλύτερο αριθμό καλλιεργειών μια συγκέντρωση 2500-5000 ppm IBA είναι η καταλληλότερη συγκέντρωση για ριζοβολία. Εάν κάποιος πολλαπλασιαστής ενδιαφέρεται στο να βρει την ιδανικότερη συγκέντρωση ορμόνης για κάποιο είδος το καλύτερο που μπορεί να κάνει είναι να εργαστεί σε κλίμακα 0, 2500, 5000, 10000, 20000 ppm IBA.

Για τη διάλυση των ορμονών χρειάζεται διαλύτης αλκοόλης. Συνήθως χρησιμοποιείται καθαρό οινόπνευμα. Η ορμόνη διαλύεται σε όγκο οινόπνευματος περίπου στο μισό αυτού που θέλουμε να παρασκευάσουμε και μετά το διάλυμα συμπληρώνεται με νερό μέχρι τον τελικό όγκο. Το δοχείο αποθήκευσης πρέπει να διατηρείται πάντοτε κλειστό, επειδή εξαιτίας της εξάτμισης μεταβάλλεται η συγκέντρωση του διαλύματος.

#### IV. Υποστρώματα

Τα μοσχεύματα μπορούν να ριζώσουν σε οποιοδήποτε υπόστρωμα αρκεί να του παρέχεται καλός αερισμός και νερό. Για τους εμπορικούς πολλαπλασιαστές σημασία έχει το κόστος, η ευκολία στη διαχείριση, η διαθεσιμότητα και η αποτελεσματικότητα της παραγωγής. Εξαιρετικά αποτελέσματα ριζοβολίας δείχνουν η τύρφη και ο περλίτης αλλά είναι τα πιο ακριβά. Η άμμος που είναι ένα φθινό υπόστρωμα αλλά πολύ δύσκολο στη διαχείρισή του λόγω βάρους. Έχουν γίνει αμέτρητες έρευνες για την εύρεση του καταλληλότερου υποστρώματος αλλά το αποτέλεσμά τους είναι ότι δεν υπάρχει ένα και μοναδικό που να είναι το πιο κατάλληλο. Εάν έπρεπε να επιλεγεί ένα τότε αυτό θα ήταν ο περλίτης για τα περισσότερα είδη φυτών αλλά όχι για όλα.



## 1) Τύρφη



Εικόνα 4: Η τύρφη όπως κυκλοφορεί στην αγορά ( πηγή Hellenic Plants)

Η τύρφη σχηματίζεται από φυτά που αναπτύσσονται στο νερό και υψηλό ποσοστό οργανικής ύλης και χαμηλό ποσοστό ανόργανης. Οι φυσικές και χημικές ιδιότητες της τύρφης ποικίλουν ανάλογα με την γεωγραφική περιοχή, το είδος του φυτού και το βαθμό αποσύνθεσης.

Ταξινομείται σε τέσσερις τύπους σύμφωνα με τη σύστασή της. Ο πρώτος σχηματίζεται από ποώδη φυτά, είναι σπογγώδης, σε στρώσεις, χρώματος καφέ και όξινης αντίδρασης PH 3,5-4,5. Ο δεύτερος τύπος σχηματίζεται από αποσύνθεση φυτών, όπως βρύα, και έχει ουδέτερη ή ελαφρά αλκαλική αντίδραση και χρώμα που ποικίλλει από ανοιχτό καφέ σε πρασινοκαφέ. Ο τρίτος τύπος σχηματίζεται από αποσυντεθημένα αγρωστώδη φυτά και ποικίλει σε χρωματισμό από κίτρινος έως κόκκινος και μαύρος και είναι ινώδης στην υφή. Ο τέταρτος τύπος σχηματίζεται από φυτά της οικογένειας Ericaceae κυρίως, δεν είναι ομοιόμορφη σε υφή, αλλά

αποτελείται από χονδρά και λεπτά υλικά όπως φλοιούς βλαστούς και κλάδους των φυτών από τα οποία σχηματίστηκε.

Η τύρφη όπως κυκλοφορεί στην αγορά είναι ένα ξηρό υλικό, μαλακό και χρώματος καφέ. Έχει μεγάλη υδατοικανότητα και το ποσοστό υγρασίας ποικίλει από 30-70%. Γενικά περιέχει 1-3,3% άζωτο και μικρή περιεκτικότητα σε φώσφορο και κάλιο. Είναι απαλλαγμένη από ζιζάνια, αλλά μπορεί να περιέχει σε πολύ μικρό ποσοστό ζημιογόνους μύκητες.

## 2) Άμμος

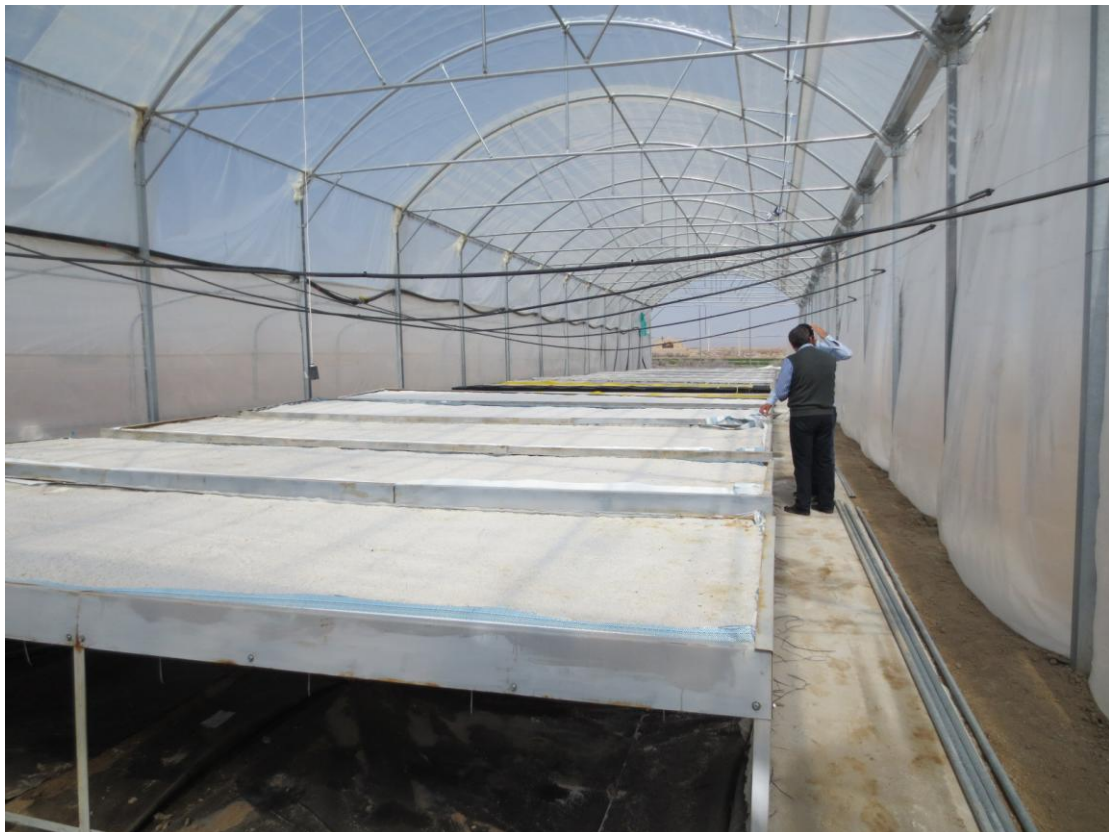
Για τον πολλαπλασιασμό φυτών προτείνεται η άμμος με διάμετρο κόκκων 0,5-2mm. Η ανάμιξη της με κάποιο άλλο υλικό μπορεί να μειώσει τον αερισμό και τη σράγγισή. Τα μοσχεύματα τα οποία ριζώνουν στην άμμο έχουν τραχιά δομή ρίζας. Η άμμος είναι εξαιρετικά βαρύ υλικό, χαμηλό σε θρεπτικά και με ικανότητα συγκράτησης της υγρασίας. Πρέπει πάντα να απολυμαίνεται πριν τη χρήση. Το PH της άμμου ποικίλλει ανάλογα με το PH του νερού. Το πραγματικό πλεονέκτημα της άμμου είναι το χαμηλό κόστος και μπορεί να χρησιμοποιηθεί μαζί με τύρφη, περλίτη και άλλα υλικά και να αποδώσει ένα κατάλληλο για ριζοβολία υπόστρωμα.

## 3) Περλίτης



Εικόνα 5: Πάγκοι ριζοβολίας με περλίτη (πηγή Hellenic Plants)

Ο περλίτης είναι ένα γκριζόλευκο πυρολιθικό υλικό το οποίο εξάγεται από την ηφαιστιογενή λάβα. Το ακατέργαστο υλικό συνθλίβεται, κοσκινίζεται και θερμαίνεται στους 760C και μετατρέπεται από εξάτμιση της υγρασίας, σε σπογγώδη μικροτεμαχίδια μικρού βάρους. Λόγω της υψηλής θερμοκρασίας επεξεργασίας το υλικό είναι αποστειρωμένο. Έχει υδατοικανότητα τετραπλάσια του βάρους του και PH 6-8. Δεν έχει ικανότητα ανταλλαγής ιόντων και δεν περιέχει ανόργανα στοιχεία. Ο πιο κατάλληλος για φυτωριακές εργασίες είναι αυτός με διάμετρο 0.15-0,30mm.



Εικόνα 6: Πάγκοι ριζοβολίας με περλίτη (πηγή Hellenic Plants)

#### 4) Βερμικουλίτης

Ο βερμικουλίτης είναι ένα ορυκτό αργίλου το οποίο περιέχει υψηλά ποσοστά από κάλιο και μαγνήσιο τα οποία παράγονται όταν ζεσταθεί σε θερμοκρασίες 760C.

Έχει μεγάλη ικανότητα συγκράτησης του νερού και διατήρησης των θρεπτικών στοιχείων. Είναι ήδη αποστειρωμένος λόγω της κατεργασίας του και πολύ ελαφρύς σαν υλικό. Με υψηλή υγρασία συμπιέζεται και με τον καιρό συρρικνώνεται ο όγκος του. Σαν υπόστρωμα ριζοβολίας προτείνεται φια φυτά γρήγορης ριζοβολίας και δεν έχει αξία για πολλαπλασιασμό μακράς διάρκειας. Το ΡΗ του κυμαίνεται από 7 έως 7,5. ο βερμικουλίτης είναι ένα καλό υπόστρωμα για ανάπτυξη σπόρων και μπορεί να συνδυαστεί εύκολα με τύρφη.

## V. Σύστημα υδρονέφωσης

Τα φύλλα των μοσχευμάτων μαλακού ξύλου και τα μοσχεύματα σκληρού ξύλου θα μαραθούν και θα πεθάνουν εάν δεν διατηρηθεί η υγρασία στα επιθυμητά επίπεδα με κάποια μέθοδο. Η διακοπτόμενη υδρονέφωση έχει γίνει το πρότυπο για τον σύγχρονο πολλαπλασιασμό μοσχευμάτων. Το ηλεκτρικό σύστημα παρέχει στα φύλλα μια λεπτή επικάλυψη νερού η οποία χαμηλώνει την θερμοκρασία τους, αυξάνει την υγρασία και μειώνει την διαπνοή και την αναπνοή. Η ανάπτυξη του συστήματος υδρονέφωσης έχει κάνει τον πολλαπλασιασμό μοσχευμάτων μαλακού ξύλου και των δύσκολα πολλαπλασιαζόμενων μοσχευμάτων μια εύκολη διαδικασία. Στην πραγματικότητα, τα δύο πιο σημαντικά μέρη του πολλαπλασιασμού μοσχευμάτων είναι η ανάπτυξη της ορμόνης και το σύστημα νέφωσης.

Η διακοπτόμενη υδρονέφωση μειώνει τον όγκο του νερού που διανέμεται στα μοσχεύματα και μπορεί να ελαφρώσει το υπόστρωμα από την υπερβολική συσσώρευση υγρασίας. Όμως, όπως οποιαδήποτε άλλη ηλεκτρική συσκευή δεν είναι αλάνθαστη και πρέπει να ελέγχεται καθημερινά.

Μέρη:

A) Ακροφύσια (μπεκ): Τα μπεκ απόκλισης και περιστροφής είναι οι κυριότεροι τύποι για την εγκατάσταση των γραμμών δημιουργίας νέφωσης. Τα Μπεκ απόκλισης είναι αυτά που χρησιμοποιούνται κυρίως στις περισσότερες εγκαταστάσεις και υπάρχουν σε μεγάλη ποικιλία τιμών και σχεδίων. Παρέχουν έναν επίπεδο κύκλο νέφωσης, ψεκασμό και ανάλογα με το στόμιο τους παρέχουν 18 με 50 lt ανά ώρα. Τα μπεκ μπορεί να είναι υψηλής πίεσης 40-80 atm, ή χαμηλής 8-15atm. Τοποθετούνται σε αποστάσεις 90-120εκ μεταξύ τους και περίπου 50εκ. πάνω από τα μοσχεύματα.

B) Χρονοδιακόπτης: Είναι πιθανότατα η πιο αλάνθαστη μέθοδος. Υπάρχουν δύο χρονοδιακόπτες. Ένας 24ωρος και ο άλλος ανάλογα με το χρονικό διάστημα που έχει ρυθμιστεί. Ο πρώτος ανοιγοκλείνει το σύστημα το πρωί και το βράδυ και ο δεύτερος ενεργοποιεί τους ψεκαστήρες σύμφωνα με την επιθυμητή συχνότητα.

Γ) Ζυγός ισορροπίας: Μία οθόνη τοποθετημένη στο ύψος των μοσχευμάτων αναπαριστά μια προσομοίωση ενός φύλλου και είναι συνδεδεμένη με ένα μοχλό που ενεργοποιεί το διακόπτη. Όταν η επιφάνεια των μοσχευμάτων είναι στεγνή, συνεπώς και η επιφάνεια του ζυγού, ο μοχλός σηκώνεται και ενεργοποιεί το διακόπτη ώστε να ανοίξει το σύστημα ψεκασμού. Όταν το νερό καλύψει την επιφάνεια ζυγίσεως ο μοχλός επιστρέφει στη θέση του και ενεργοποιεί το διακόπτη ώστε να κλείσει το σύστημα. Πρόκειται ουσιαστικά για ένα σύστημα που μπορεί να διαβάζει τις συνθήκες του περιβάλλοντος. Όμως, χρειάζεται συνεχή έλεγχο και καθαρισμό διότι η σκόνη ή οι βρωμιές ή ακόμα και τα έντομα να το κάνουν να έχει προβλήματα στη λειτουργία του.

Δ) Ηλεκτρονικό φύλλο: Τοποθετείται μεταξύ των μοσχευμάτων. Όταν το ηλεκτρονικό φύλλο στεγνώσει ανοίγει το ηλεκτρικό κύκλωμα ώστε να ψεκάζεται νερό μέχρι να διαβραχεί πλήρως ώστε να κλείσει το ηλεκτρικό κύκλωμα.



Δυσλειτουργία μπορεί να προκαλέσει η συγκέντρωση αλάτων, οπότε πρέπει να καθαρίζεται αρκετά συχνά.

Ε) Θερμοστάτης- χρονοδιακόπτης: Ένας θερμοστάτης τοποθετείται ανάμεσα από τα μοσχεύματα. Όταν η θερμοκρασία των μοσχευμάτων φτάσει ένα συγκεκριμένο σημείο, το σύστημα ενεργοποιείται και ψεκάζεται νερό. Η μείωση της θερμοκρασίας λόγω του ψεκασμού έχει ως αποτέλεσμα το κλείσιμο του ψεκασμού.

ΣΤ) Φωτοκύτταρο: Ανοιγοκλείνει το σύστημα συναρτήσει της φωτεινής έντασης έτσι ώστε να ψεκάζεται νερό συχνότερα όταν επικρατεί μεγάλη ηλιοφάνεια και λίγο ή καθόλου νερό όταν το φως λιγοστεύει.



Εικόνα 7: Σύστημα υδρονέφωσης-FOG. Πάγκοι ριζοβολίας, μπεκ δροσισμού, μπεκ ψεκασμού, θερμοκουρτίνες. (πηγή Hellenic Plants)

## VI. Σύστημα υδρονέφωσης-FOG

Το σύστημα FOG δραστηριοποιείται κυρίως τα τελευταία χρόνια λόγω του εκσυγχρονισμού του εξοπλισμού. Παράγει λιγότερη υγρασία από το απλό σύστημα υδρονέφωσης και διευκολύνει την ριζοβολία μοσχευμάτων που παραδοσιακά αποτύγχαναν στην υδρονέφωση. Διαφέρει από το απλό σύστημα στο ότι παράγει σωματίδια νερού μικρότερου μεγέθους τα οποία μένουν αιωρούμενα στον αέρα για περισσότερη ώρα παράγοντας υγρασία. Πλεονεκτεί γιατί: διατηρεί συνεχώς υγρασία γύρω από τα φύλλα των μοσχευμάτων σε πολύ υψηλά επίπεδα χωρίς να περιορίζει τον εξαερισμό και κρατάει τη θερμοκρασία του χώρου χαμηλά και έτσι τα μοσχεύματα μπορούν να εκτεθούν σε αρκετό φωτισμό για περισσότερη ώρα.

## VII. Φωτισμός

- 1) Για τον πολλαπλασιασμό: Γενικά τα μοσχεύματα δεν χρειάζονται υψηλά επίπεδα φωτισμού μέχρι να ριζώσουν. Αυτό συμβαίνει γιατί οι ορμόνες που παράγονται στις ρίζες του φυτού δίνουν το έναυσμα στα φύλλα να ενεργοποιήσουν τους φωτοσυνθετικούς τους μηχανισμούς. Ουσιαστικά το μόσχευμα βρίσκεται σε κατάσταση αναστολής της αναπνοής και προτεραιότητα έχει το ριζικό σύστημα.

Μετά από κάποιο σημείο, τα μοσχεύματα χρειάζεται να σκιαστούν ώστε να μειωθεί η απώλεια νερού και η θερμοκρασία. Τα περισσότερα είδη φυτών αποτυγχάνουν τελείως αν αφεθούν να στεγνώσουν και ξεραθούν. Είναι λοιπόν πλεονέκτημα να μειωθεί η θερμότητα στο θάλαμο ριζοβολίας με κουρτίνες σκίασης. Για παράδειγμα

μία ηλιόλουστη καλοκαιρινή μέρα ισοδυναμεί με κατά μέσο όρο με τον φωτισμό που παράγουν 10000 λάμπες μέσα στο θάλαμο ριζοβολίας. Για να ελεγχτεί με 100% αποτελεσματικότητα η φωτοσύνθεση των μοσχευμάτων δεν θα χρειάζονταν πάνω από 1000 λάμπες.



Εικόνα 8: Θερμοκουρτίνες (πηγή Hellenic Plants)

2) Για την ανάπτυξη του μοσχεύματος: Για μερικά είδη φυτών είναι συχνά απαραίτητο να παρακινηθεί η ανάπτυξη τους μετά το ριζώμα το οποίο έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση σε αποθέματα υδατανθράκων. Αυτά τα αποθέματα είναι συγκεντρωμένα στο ριζικό σύστημα και παρέχουν την πηγή ενέργειας κατά τη διάρκεια του χειμώνα και κατά τη διάρκεια της έκπτυξης των οφθαλμών την Άνοιξη. Πολλά είδη όπως η αζαλέα χρειάζονται συμπληρωματικό φωτισμό, συνεχή ή διακοπτόμενο με σκοπό να αναπτυχθούν μετά τα χειμώνα και να αναπτύξουν οφθαλμούς από τις 10π.μ. έως 2μμ.

Σ αυτές τις περιπτώσεις τοποθετούνται ηλεκτρικές λάμπες των



60-75 watt, τοποθετημένες 1 μέτρο πάνω από την επιφάνεια των μοσχευμάτων και σε απόσταση 1 μέτρου μεταξύ τους. Συνήθως τοποθετούνται κατά σειρά κατά μήκος των πάγκων ριζοβολίας. Η περίοδος λειτουργίας τους κυμαίνεται από 6 με 8 εβδομάδες μετά την εμφάνιση της ρίζας.

### VIII. Υγιεινή

Η καθαριότητα είναι μια απαραίτητη προϋπόθεση για τον επιτυχή πολλαπλασιασμό των μοσχευμάτων. Καθαροί πάγκοι ριζοβολίας, αποστειρωμένο υπόστρωμα, καθαρό νερό και μια εφαρμογή προληπτικού μυκητοκτόνου είναι απαραίτητες ενέργειες.

Τα μυκητολογικά προβλήματα μπορούν να μειωθούν στο ελάχιστο εάν το ξεκίνημα του πολλαπλασιασμού γίνει με συλλογή των μοσχευμάτων από υγιή μητρικά φυτά. Προτείνεται εμβάπτιση των μοσχευμάτων σε Captan ή Banlate. πριν την εγκατάστασή τους στο ριζωτήριο. Επίσης, όταν εγκατασταθούν τα μοσχεύματα στους πάγκους ριζοβολίας μπορεί να γίνεται εβδομαδιαία εφαρμογή με Benlate. Έχει παρατηρηθεί σε διάφορες καλλιέργειες ότι εκτός της καταπολέμησης των μυκητών τα σκευάσματα βοήθησαν στην αύξηση του ποσοστού ριζοβολίας και στην ποιότητα των φυτών. Όμως με την εφαρμογή χημικών υπάρχει πάντα η πιθανότητα τραυματισμού κάποιας καλλιέργειας. Ο κάθε πολλαπλασιαστής οφείλει να κρατάει αρχείο σχετικά με τη χημική φυτοτοξικότητα.

## IX. Φροντίδα μετά τη ριζοβολία

Μετά τη ριζοβολία των μοσχευμάτων, στο περιβάλλον ριζοβολίας πρέπει να μειωθεί η υγρασία και η νέφωση, οι πάγκοι ριζοβολίας να έχουν καλό αερισμό και τα μοσχεύματα να αφεθούν να σκληρύνουν σταδιακά. Σε αυτή την κατάσταση το ιδανικό είναι τα μοσχεύματα να πωληθούν, αλλιώς μεταφυτεύονται ή αφήνονται στους πάγκους για το χειμώνα. Η μεταφύτευσή τους είναι αμέσως μετά την ριζοβολία μπορεί να είναι επικίνδυνη για τα φυτά. Η επιτυχία της μεταφύτευσης οφείλεται κυρίως στα ορμονικά και τα επίπεδα υδατανθράκων.

Μερικά είδη φυτών μπορούν να αποθηκευτούν για μεγάλο χρονικό διάστημα έως και 5 μήνες σε σακούλες πολυαιθυλενίου σε θερμοκρασία 1,4 με 4,5C. Όσο αφορά την αποθήκευση των φυτών πρέπει να γίνεται αρκετή έρευνα σχετικά με τη δυνατότητα του φυτού να αποθηκευτεί σε κρύο περιβάλλον και η μόνη επιτυχής λύση είναι η δοκιμασία της κάθε ποικιλίας. Γενικά, η ιδανικότερη θερμοκρασία αποθήκευσης είναι οι θερμοκρασίες που αναφέρθηκαν παραπάνω.

Πολλοί πολλαπλασιαστές επιλέγουν να αφήσουν τα ριζωμένα μοσχεύματα στους πάγκους ριζοβολίας να διαχειμάσουν. Η κάλυψή τους με λευκό πλαστικό είναι η καλύτερη επιλογή καθώς είναι μειωμένη η διείσδυση του φωτός και οι θερμοκρασία δεν έχει μεγάλες διακυμάνσεις. Επιτυχής επίσης σε μοσχεύματα που διαχειμάζουν δύσκολα ήταν η εφαρμογή σκαμμένων λάκκων στο έδαφος καθώς εκμεταλλεύονταν τη θερμότητα του εδάφους.

## X. Περιβάλλον θερμοκηπίου και εξοπλισμός

- 1) Αερισμός: Α) φυσικός: προκαλείται από διαφορές πίεσης μεταξύ του εξωτερικού και εσωτερικού χώρου που προκαλούνται λόγω του ανέμου και της διαφοράς θερμοκρασίας.

B) Δυναμικός: Οι διαφορά πίεσης δημιουργείται με μηχανικά μέσα ( π.χ. ανεμιστήρες)

- 2) Θέρμανση: Ανάλογα με το μέγεθος της μονάδας εγκαθίστανται συστήματα θέρμανσης προσαρμοσμένα στις ιδιαιτερότητες της περιοχής και της μονάδας. Σε μεγάλες μονάδες διοχετεύεται ζεστό νερό μέσω σωληνώσεων κυρίως. Σε μικρές η χρήση αερόθερμων είναι αρκετή.
- 3) Ψύξη- δροσισμός: Μια καλή μέθοδος δροσισμού είναι τα πάνελ που χρησιμοποιούν ανεμιστήρες χαμηλής περιστροφής και έλικα μεγάλης διαμέτρου. Η άλλη λύση είναι το σύστημα FOG.
- 4) Σκίαση: Αποτελεί σημαντική παράμετρο κλίματος για την προστασία από την ένταση της ηλιακής ακτινοβολίας και για την εξοικονόμηση ενέργειας από την απώλεια θερμότητας. Βοηθάει επίσης στην συσκότιση για καλλιέργειες που απαιτούν μεγαλύτερη διάρκεια νύχτας και αυτό δεν είναι εφικτό φυσιολογικά. Επιτυγχάνεται με τη χρησιμοποίηση ειδικών κουρτινών που ονομάζονται θερμοκουρτίνες και χωρίζονται σε: κουρτίνες εξοικονόμησης ενέργειας, κουρτίνες εξοικονόμησης ενέργειας και σκίασης, κουρτίνες σκίασης, κουρτίνες συσκότισης, κουρτίνες γενικής χρήσης, κουρτίνες εξωτερικής χρήσης.
- 5) Άρδευση: Το είδος της καλλιέργειας, το υπόστρωμα, το κλιματολογικό και το υδρολογικό περιβάλλον είναι οι παράγοντες που προσδιορίζουν το σύστημα για την αντιμετώπιση των αρδευτικών αναγκών της καλλιέργειας. Τα τελευταία χρόνια έχει γενικευτεί η χρήση της στάγδην άρδευσης εξαιτίας της εξοικονόμησης νερού, του χαμηλού κόστους, τη μείωση της σχετικής υγρασίας και την ομοιόμορφη άρδευση που προσφέρει.

Απαραίτητος εξοπλισμός είναι οι δεξαμενές νερού. Υπάρχει μεγάλη ποικιλία διαστάσεων, είναι εύκολες στην τοποθέτηση και την αποσυναρμολόγησή τους και δεν απαιτείται ειδική άδεια εγκατάστασης. Είναι κατασκευασμένες συνήθως από υλικό που δεν επιτρέπει την είσοδο του φωτός και της σκόνης για να παρέχεται προστασία στο νερό ύδρευσης.

## Βιβλιογραφία

- 1) Γρηγοριάδου Αικατερίνη, 2010, Πολλαπλασιασμός οπωροκηπευτικών φυτών, Θεσσαλονίκη
- 2) Κίντζιος Σπυρίδων, 1994, Επιχειρηματική ιστοκαλλιέργεια, Αθήνα
- 3) Νάνος Γεώργιος, 2011, Παραγωγή αγενώς πολλαπλασιαστικού υλικού, Αθήνα
- 4) Μετζάκης Δημήτριος, 2005, Καλλιέργειες in vitro, Αθήνα
- 5) Ποντίκης Κωνσταντίνος, 1994, Πολλαπλασιασμός Καρποφόρων δέντρων και θάμνων, Αθήνα
- 6) Κ. Δαμάση Θέριου και Ι. Θέριος, 2006, Γενική δενδροκομία, Μέρος Α, Αθήνα
- 7) Brown, D.C.W. και T.A. Thorpe, 1984, Οργάνωση ενός εργαστηρίου ιστοκαλλιέργειας, Αγγλία
- 8) George E.F. και P.D. Sherrington, 1984, Πολλαπλασιασμός φυτών με ιστοκαλλιέργεια, Hants, Αγγλία
- 9) Dodds E.F. και L.W. Roberts, 1982, Πειράματα στην καλλιέργεια Ιστού, Cambridge, Αγγλία
- 10) Michael A. Dirr και Charles W. Heuser, 1987, Από τον σπόρο στην ιστοκαλλιέργεια, Athens, Georgia
- 11) Kyte L., 1983, Φυτά από δοκιμαστικούς σωλήνες: Εισαγωγή στον μικροπολλαπλασιασμό, Portland, OR

- 12) Wetherell, D.F., 1982, Εισαγωγή στον in vitro πολλαπλασιασμό, NJ
- 13) Hartmann H.T. και D.F. Kester, 1983, Πολλαπλασιασμός φυτών- Αρχές και πρακτικές, 4<sup>η</sup> έκδοση, NJ
- 14) Ρούσσοι Πέτρος, 2011, πολλαπλασιασμός καρποφόρων δέντρων και θάμνων, Αθήνα
- 15) Cushie John, 2009, Ο τέλειος πολλαπλασιασμός, Αθήνα