

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ  
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ  
ΤΜΗΜΑ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΚΑΙ ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ

*IN VITRO* ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΤΟΥ ΓΛΑΔΙΟΛΟΥ.

Πτυχιακή εργασία  
της σπουδάστριας Αγγελικής Δούβα



Καλαμάτα, Ιούνιος 2003

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	ΣΕΛΙΔΑ
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	1
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	2

## ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ.

1. Ιστοκαλλιέργεια- Μικροπολλαπλασιασμός (Ορισμός-σημασία- χρήσεις).	3
1.1 Πλεονεκτήματα - Μειονεκτήματα	4
1.2 Ενδογενείς παράγοντες που επηρεάζουν τις <i>in vitro</i> καλλιέργειες.	5
1.3 Εξωγενείς παράγοντες που επηρεάζουν τις <i>in vitro</i> καλλιέργειες – (Υλικά).	5-7

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

2. Εξοπλισμός.	8-9
Πίνακες	10-12

## ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

1. <i>In vitro</i> καλλιέργεια των Βολβωδών	13-15
---	-------

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

2. Φυτό Γλαδίολος	
2α. Ιστορικό	16
2β. Περιγραφή	16-18
2γ. Εδαφοκλιματικές απαιτήσεις	19
2δ. Φύτευση	19
2ε. Σχηματισμός νέου βολβού και βολβιδίου ή βολβιδίνου.	19-21
2στ. Εκρίζωση και διατήρηση βολβών.	22
2ζ. Πολλαπλασιασμός	22
2η. Φυσιολογικές ανωμαλίες	23
2θ. Κάψιμο των κορυφών των φύλλων.	23

### ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

3. <i>In vitro</i> καλλιέργεια γλαδίολου.	24
3.1 Εξέλιξη της <i>in vitro</i> καλλιέργειας στο γλαδίολο.	24

3.2	Σύνθεση θρεπτικών υποστρωμάτων.	25
3.3	Μεριστωματική καλλιέργεια.	25-26
3.4	Ανθηροκαλλιέργεια.	26
3.5	Εφαρμογή της <i>in vitro</i> τεχνικής σε άλλα όργανα.	26-29
3.6	<i>In vitro</i> καλλιέργεια μασχαλαίων οφθαλμών βολβών και βολβιδίων.	30-32
3.7	Μεταφορά των φυτών στο έδαφος.	32-33
3.8	Πρωτόκολλα της <i>in vitro</i> καλλιέργειας γλαδίοιο.	33-37

## ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ (ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ). ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ

1.1	Γενικά	38
1.2	Παρασκευή ενός λίτρου θρεπτικού υποστρώματος.	39-40
1.3	Φυτικό υλικό (κοπή-μεταφορά μικρομοσχευμάτων-απολύμανση-μεταφύτευση).	41-44

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ

2.	Παρατηρήσεις-Διαπιστώσεις	45-46
2.1	Καλογένεση	47-48
2.1.2	Φάσεις ανάπτυξης κάλου	49
2.2	Οργανογένεση	50-51

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

3.	Αποτελέσματα-συμπεράσματα-σχολιασμός	52-53
4.	Περίληψη	54-55
5.	Παράρτημα Α (γραφικές παραστάσεις και ιστογράμματα).	56-60
6.	Παράρτημα Β (Φωτογραφίες).	61-72
7.	Βιβλιογραφία	73-75

## ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα πτυχιακή μελέτη πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο της Ιστοκαλλιέργειας του Τ.Ε.Ι. Καλαμάτας υπό την επίβλεψη του καθηγητή κ. Ανδρέα Κανάκη.

Εκτός από την συμβολή του στην μελέτη, η σε βάθος γνώση του, αλλά και η εμπειρία του σε σχέση με το αντικείμενο της Ιστοκαλλιέργειας, με βοήθησαν να επιλέξω την ειδικότητα αυτή (της Βιοτεχνολογικής παραγωγής φυτικού πολλαπλασιαστικού υλικού).

Θα ήθελα να τον ευχαριστήσω και επειδή με αυτή την εργασία μου δόθηκε η δυνατότητα να ασχοληθώ έστω για λίγο με το αντικείμενο που με ενδιαφέρει πολύ.

Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω τον καθηγητή κ. Δημήτριο Νικόπουλο πρόεδρο του Τ.Ε.Ι. Καλαμάτας επειδή μου εμφύσησε το ενδιαφέρον για την Ιστοκαλλιέργεια, καθώς και τον Επίκουρο καθηγητή κ. Γεώργιο Ζακυνθινό για τις σημαντικές πληροφορίες που μου έδωσε.

Τέλος ευχαριστώ τους υπεύθυνους του εργαστηρίου για την άριστη συνεργασία που είχαμε.



## ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε έχοντας σαν κύριο σκοπό, την εφαρμογή ιστοκαλλιέργειας στο ανθοκομικό φυτό Γλαδίολο (Gladiolus sp.)

Στο πρώτο μέρος αναφέρεται ο ορισμός της ιστοκαλλιέργειας, οι χρήσεις της, τα πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα της μεθόδου αυτής σε σχέση με τους συνήθεις τρόπους πολλαπλασιασμού καθώς και τους παράγοντες που επηρεάζουν τις καλλιέργειες *in vitro*. Ακόμη αναφέρονται τα υλικά και οι μέθοδοι που χρησιμοποιούνται για την ανάπτυξη των μικρομοσχευμάτων.

Στο δεύτερο μέρος δίνονται στοιχεία που αφορούν το συγκεκριμένο φυτό (βοτανικοί χαρακτήρες, οικολογικό περιβάλλον) καθώς και στοιχεία που προκύπτουν από έρευνες που έγιναν στην ιστοκαλλιέργεια του συγκεκριμένου φυτού.

Τέλος, στο τρίτο μέρος περιγράφονται τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν, ο τρόπος εργασίας (κοπή μικρομοσχευμάτων, απολύμανση, εμφύτευση) και τα αποτελέσματα και συμπεράσματα από την εφαρμογή της *in vitro* τεχνικής στην καλλιέργεια του Gladiolus sp.

## ΜΕΡΟΣ ΠΡΩΤΟ

### 1. ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ – ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ

(Ορισμός- Σημασία –Χρήσεις)

Ο μικροπολλαπλασιασμός *in vitro* ως μια νέα μέθοδος πολλαπλασιασμού των φυτών, αποτελεί σήμερα αντικείμενο μελέτης όλου σχεδόν του επιστημονικού κόσμου.

Με τον όρο αυτό εννοούμε την διαδικασία εκείνη κατά την οποία μικρά κομμάτια ζωντανού ιστού (έκφυτο) απομονώνονται, πάντα κάτω από ασηπτικές συνθήκες, και καλλιεργούνται σε τεχνητά θρεπτικά υποστρώματα για χρονική περίοδο που εξαρτάται από ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες.

Ο όρος έκφυτο σήμερα περιλαμβάνει όργανα (όπως έμβρυα, ανθήρες, σπερματικές βλάστες, ωοθήκες), ιστούς (κάμβιο, παρέγχυμα, σκληρέγχυμα, ακραίο μερίστωμα, ο αποθησαυριστικός ιστός του κονδύλου), κύτταρα, πρωτοπλάστες, και κάλο (μάζα αδιαφοροποιήτων κυττάρων που έχουν την ικανότητα γρήγορου πολλαπλασιασμού).

Η σημασία της μεθόδου αυτής πολλαπλασιασμού γίνεται εύκολα αντιληπτή και μόνο από το γεγονός ότι από ένα μητρικό φυτό μπορεί να παραχθούν κατά τη διάρκεια ενός έτους μέχρι και 1.000.000 φυτά όμοια μεταξύ τους αλλά και με το μητρικό φυτό (Murashige 1974).

Εκτός του γρήγορου πολλαπλασιασμού των φυτών, οι άλλες δυνατότητες της καλλιέργειας *in vitro* είναι:

1. Η εξάλειψη νόσων και ιών στο παραγόμενο υλικό.
2. Η διατήρηση γενετικού υλικού στις Τράπεζες, ιδίως στις περιπτώσεις που δεν μπορεί το πολλαπλασιαστικό υλικό να διατηρηθεί με τη μορφή σπόρων, βολβών ή άλλων φυτικών οργάνων,
3. Η βελτίωση φυτών με στόχο την παραγωγή καθαρών σειρών από *in vitro* καλλιέργεια απλοειδών κυττάρων.
4. Η διενέργεια θεμελιωδών κυτταρικών και ιστολογικών μελετών. Η ιστοκαλλιέργεια επιτρέπει επίσης την μελέτη βασικών βιοχημικών και φυσιολογικών φαινομένων στο φυτό, όπως: μελέτη της σύνθεσης των κυτταρικών τοιχωμάτων, μελέτη της σύνθεσης των πρωτεϊνών, μελέτη της φωτοσύνθεσης, μελέτη της δράσης των ζιζανιοκτόνων και
5. Οι βιοχημικές εφαρμογές. Χρήσιμες ουσίες είναι δυνατόν να παραχθούν από την *in vitro* καλλιέργεια κυττάρων. Έτσι η φαρμακευτική, χημική και αγροχημική βιομηχανία μπορεί να εκμεταλλευτεί τις παραγόμενες από την εφαρμογή της *in vitro* καλλιέργεια.

## 1.1. Πλεονεκτήματα –Μειονεκτήματα.

### **α. πλεονεκτήματα**

1. Μικρά τμήματα φυτών χρησιμοποιούνται για την παραγωγή μεγάλου αριθμού φυτών σε μικρό χώρο.
2. Υπάρχει η δυνατότητα παραγωγής μεγάλου αριθμού φυτών στο χρόνο.
3. Τα παραγόμενα φυτάρια είναι ελεύθερα από μύκητες και βακτήρια,σε αρκετές περιπτώσεις ελεύθερα και από ιούς.
4. Τα θρεπτικά στοιχεία, το φως, η θερμοκρασία, καθώς και άλλοι παράγοντες μπορούν πιο εύκολα να ελεγχθούν και να ρυθμιστούν ώστε να επιτύχουμε πολλαπλασιασμό των κυττάρων και αναγέννηση οργάνων ή τέλειων φυτών.
5. Στις περισσότερες περιπτώσεις ο μικροπολλαπλασιασμός είναι ανεξάρτητος των εποχών.
6. Τα φυτά σε *in vitro* συνθήκες απαιτούν ελάχιστη προσοχή μεταξύ των μεταφυτεύσεων και έτσι ούτε κόπος ούτε υλικά χρειάζονται για πότισμα, ράντισμα, βοτάνισμα,κ.λπ.

### **β. μειονεκτήματα**

1. Ο μικροπολλαπλασιασμός απαιτεί προχωρημένες ικανότητες ανθρώπινου δυναμικού και ειδικό εξοπλισμό και εγκαταστάσεις.
2. Ο προϋπολογισμός είναι σχετικά υψηλός, λόγω των εργαστηριακών μεθόδων που χρησιμοποιούνται.
3. Είναι απαραίτητος ο συνεχής έλεγχος γενετικής σταθερότητας των παραγόμενων φυτών.
4. Τα παραγόμενα φυτά αρχικώς είναι πολύ μικρά και πιο ευαίσθητα.

## 1.2. Ενδογενείς παράγοντες που επηρεάζουν τις *in vitro* καλλιέργειες.

1. Η φύση του εκφύτου επηρεάζει διαφορετικά τις *in vitro* καλλιέργειες (φύλλο, κοτυληδόνα).
2. Η απόσταση του εκφύτου από το σημείο σύνδεσης με το φυτό (κοντά στο φυτό παρουσιάζει μεγαλύτερη μορφογένεση).
3. Η ιστολογική σύνθεση του εκφύτου.
4. Το επίπεδο πολυπλοειδίας ( τα διπλοειδή αντιδρούν καλύτερα απ' ό,τι τα πολυπλοειδή).
5. Σε πολλά φυτά η μια επιφάνεια του εκφύτου είναι πιο δραστήρια (Solanaceae)
6. Η ηλικία του εκφύτου (νεαρή ηλικία μεγαλύτερη ολοδυναμία, δηλαδή μεγαλύτερη ικανότητα των μεμονωμένων κυττάρων να παράγουν τέλεια φυτά.

## 1.3. Εξωγενείς παράγοντες που επηρεάζουν τις *in vitro* καλλιέργειες-

### Υλικά.

Ο βαθμός επιτυχίας μιας *in vitro* καλλιέργειας επηρεάζεται κατά μέγιστο ποσοστό από τη σύνθεση του θρεπτικού διαλύματος. Έτσι για κάθε είδος εκφύτου το καταλληλότερο υπόστρωμα προκύπτει συνήθως μετά από πειραματισμό και την απόκτηση κάποιας εμπειρίας του ερευνητή.

Το θρεπτικό διάλυμα αποτελείται από **ανόργανα θρεπτικά στοιχεία** δηλαδή **α). τα κύρια στοιχεία ή μακροστοιχεία** όπως C, O, H, N, P, Ca, S, K και Mg (ενδιαφέρει η μορφή με την οποία χρησιμοποιούνται καθώς και η συγκέντρωση καθενός στοιχείου για την επίτευξη της μέγιστης ανάπτυξης της καλλιέργειας) και **β). τα ιχνοστοιχεία ή μικροστοιχεία**. Οι συγκεντρώσεις των ιχνοστοιχείων (Fe, Mn, B, Cu, Mo, Zn, Co, Cl και J) κυμαίνονται σε χαμηλά επίπεδα που εκφράζονται σε  $\mu\text{M}$  (μικρογραμμομόρια).

Παρακάτω δίνονται συγκριτικοί πίνακες που δείχνουν την διαφοροποίηση των ποσοτήτων των κύριων στοιχείων και των ιχνοστοιχείων (Πίνακες 1 και 2).

Από τους πίνακες που ακολουθούν καταλαβαίνουμε ότι το διάλυμα των Murashige και Skoog είναι το πιο πλούσιο σε άλατα. Το διάλυμα αυτό χρησιμοποιήθηκε από τους δύο ερευνητές το 1962, αρχίζοντας πειράματα για την παρατήρηση ανάπτυξης κάλου από φυτό καπνού *in vitro*.

**Οργανικές ενώσεις**, (Πηγή άνθρακα και ενέργειας). Για την παροχή του άνθρακα (C) και της απαραίτητης ενέργειας στα κύτταρα των *in vitro*



καλλιεργείων χρησιμοποιείται συνήθως ο διζαχαρίτης ζαχαρόζη ή ο μονοζαχαρίτης γλυκόζη σε συγκεντρώσεις κυμαινόμενες μεταξύ 20 και 30 γραμ. στο λίτρο.

**Βιταμίνες.** Όσο καιρό τα φυτικά κύτταρα είναι προσαρτισμένα στο σώμα του φυτού, είναι αυτότροφα βιοσυστήματα σε ό,τι αφορά τις βιταμίνες. Στις *in vitro* καλλιέργειες τα ίδια τα κύτταρα δεν συνθέτουν σε αρκετές ποσότητες τις βιταμίνες που χρειάζονται για την ανάπτυξή τους και γι' αυτό το λόγο επιβάλλεται η προσθήκη μερικών εξ' αυτών εξωγενώς.

Στις περισσότερες περιπτώσεις χρησιμοποιείται η βιταμίνη **ινοσίτης** (μυοϊνοσιτόλη) η οποία συνιστά το πολικό σημείο των συστατικών των λιπιδίων των κυτταρικών μεμβρανών. Κατά καιρούς έχουν προστεθεί στα θρεπτικά υποστρώματα σε μικροποσότητες και οι βιταμίνες όπως είναι το ασκορβικό οξύ, το φολικό οξύ, η ριβοφλαβίνη, η χολίνη, και το ρ-αμινοβενζοϊκό-οξύ.

Επίσης μπορούμε να προσθέσουμε και αμινοξέα όπως η γλυκίνη. Εκτός των πιο πάνω ουσιών μπορούμε σε ένα θρεπτικό υπόστρωμα να προσθέσουμε: α) υδρολυμένες πρωτεΐνες π.χ.καζεΐνη, β) χυμούς από ενδοσπέρμια π.χ. γάλα καρύδας, γ) χυμούς από εκχυλίσματα καρπών π.χ. τομάτας, μπανάνας, δ) ασκορβικό οξύ ιδίως όταν τα φυτά παρουσιάζουν αυξημένη παραγωγή ταννινών επειδή αυτό δρα ως αντιοξειδωτικό.

**Ρυθμιστές της ανάπτυξης.** Η σωστή επιλογή των ουσιών αυτών (ποιοτική και ποσοτική), ανάλογα με την κάθε περίπτωση και το επιδιωκόμενο αποτέλεσμα, είναι ένας πολύ σημαντικός παράγοντας για την επιτυχία μιας *in vitro* καλλιέργειας. Οι ρυθμιστές ανάπτυξης διακρίνονται ως εξής:

**α) αυξίνες.** Είναι σύνολο ενώσεων που δρουν στις αυξητικές διεργασίες αφ' ενός του βλαστού και αφ' ετέρου της ρίζας. Διεγείρουν την κυτταρική διαίρεση στα μεριστώματα. Συμβάλλουν στην κατά πάχος αύξηση των κυττάρων, στη διαφοροποίησή τους και στον σχηματισμό και ανάπτυξη των φυτικών οργάνων.

**β) κυτοκινίνες ή κυτταροκινίνες.** Αποτελούν μια δεύτερη ομάδα ρυθμιστών της ανάπτυξης, η οποία προάγει τη διαίρεση και τη διαφοροποίηση των κυττάρων. Οι κυτοκινίνες συμβάλλουν στην οργανογένεση προωθώντας την διαφοροποίηση των αγγειωδών ιστών και την ενεργοποίηση του καμβίου. Τέλος συμβάλλουν στην διατήρηση της νεανικότητας στα φυτά.

Έχει βρεθεί ότι υψηλές συγκεντρώσεις κυτοκινινών προάγουν τον σχηματισμό βλαστών (βλαστογένεση), ενώ αντίθετα, υψηλές συγκεντρώσεις αυξινών, οδηγούν στον σχηματισμό ριζών.



Αν όμως σε ένα θρεπτικό υπόστρωμα υπάρχουν περίπου ίσες ποσότητες αυξίνης και κυτοκινίνης σχηματίζεται κάλος που τείνει να παράγει αδιαφοροποίητα κύτταρα (καλογένεση).

**γ) γιββερελλίνες.** Προκαλούν επιμήκυνση των μεσογονατίων διαστημάτων με αποτέλεσμα την παραγωγή πολύ υψηλών βλαστών και δευτερευόντως έχει βρεθεί ότι δρα θετικά στην διακοπή του ληθάργου.

Στον πίνακα που ακολουθεί δίνονται οι χρησιμοποιούμενες στην πράξη αυξίνες και κυτοκινίνες.

**Νερό.** Το νερό που χρησιμοποιείται στις *in vitro* καλλιέργειες πρέπει τόσο για την προετοιμασία των εκφύτων όσο και για την παρασκευή των θρεπτικών υποστρωμάτων, να είναι απαλλαγμένο ξένων ουσιών (ανόργανων και οργανικών ενώσεων, αιωρούμενων σωματιδίων, κόκκων άμμου (κ.λ.π.). Τέτοιο νερό προκύπτει από την διπλή απόσταξη του νερού της βρύσης. Ενώ νερό απεσταγμένο και αποστειρωμένο χρειάζεται για την τριπλή έκπλυση των εκφύτων λίγο πριν την μεταφορά τους στα δοχεία των ιστοκαλλιιεργειών που περιέχουν το θρεπτικό υπόστρωμα.

**pH.** Η σπουδαιότητά του pH ενός θρεπτικού υποστρώματος δηλώνεται από την επιρροή που η τιμή του ασκεί στην απορρόφηση των ποικίλων θρεπτικών στοιχείων από τα κύτταρα των ιστών των εκφύτων. Η ρύθμιση της τιμής του pH των θρεπτικών υποστρωμάτων γίνεται πριν την προσθήκη της αγαρόζης και πριν την αποστείρωση, με τη χρήση μικρών ποσοτήτων (μερικών σταγόνων) διαλυμάτων NaOH, και HCl σε επίπεδα 5,2 έως 5,7. Στα επίπεδα αυτά διαλύονται όλα τα βασικά ανόργανα στοιχεία και οι οργανικές ενώσεις.

**Παράγοντας ζελοποίησης.** Συνήθως χρησιμοποιείται το Agar σε συγκέντρωση 7-10 gr στο ένα λίτρο διαλύματος.

**Περιβαλλοντικές συνθήκες στους θαλάμους.**

Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που ενδιαφέρουν τις *in vitro* καλλιέργειες είναι α) η θερμοκρασία, β) το φως, γ) η υγρασία. Τα επίπεδα των παραγόντων αυτών πρέπει να είναι σταθερά και να διαμορφώνονται ανάλογα με το είδος του εκφύτου. Έτσι η επώαση των καλλιιεργειών διενεργείται σε θαλάμους που έχουν δυνατότητα ρύθμισης των παραγόντων αυτών.

## 2. Εξοπλισμός.

Ο εξοπλισμός και οι εγκαταστάσεις που είναι απαραίτητες για την σωστή και επιτυχημένη εφαρμογή της καλλιέργειας *in vitro* παρουσιάζεται παρακάτω:

**α. Για την παρασκευή, αποστείρωση, και αποθήκευση των θρεπτικών υλικών:**

-Ηλεκτρικός ζυγός για την μέτρηση των ποσοτήτων των διαφόρων θρεπτικών στοιχείων οι οποίες είναι της τάξης των χιλιοστογραμμαρίων.

-Ογκομετρικοί σωλήνες για την μέτρηση του νερού και άλλων υγρών διαλυμάτων που χρησιμοποιούνται στην παρασκευή των θρεπτικών υποστρωμάτων.

-Πεχάμετρο για την μέτρηση του pH του θρεπτικού διαλύματος. Για την διόρθωσή του χρησιμοποιούμε NaOH, ή HCl.

-Εστία θερμότητας που είναι απαραίτητη για την θέρμανση του διαλύματος ώστε να διευκολύνει την διάλυση ενός σταθεροποιητικού υλικού όπως το agar.

-Τρυβλία petri για τα πρώτα στάδια των εκφύτων, δοκιμαστικοί σωλήνες και κωνικές φιάλες για τις μεταφυτεύσεις .

-Αλουμινόχαρτο για πόμα στους δοκιμαστικούς σωλήνες και κωνικές φιάλες.

-Κλίβανος υγρής αποστείρωσης (autoclave) για την αποστείρωση των δοκιμαστικών σωλήνων, των κωνικών φιαλών, του θρεπτικού υποστρώματος καθώς και όλων των εργαλείων που θα χρησιμοποιηθούν για το χειρισμό των εκφύτων.

**β. Για την προετοιμασία των εκφύτων, εμφύτευση και μεταφύτευσή τους στα διάφορα θρεπτικά υποστρώματα χρησιμοποιούνται:**

-γλωρίνη για την απολύμανση των εκφύτων,

-ανατομικές λεπίδες και λαβίδες για την κοπή και μεταχείριση των εκφύτων,

-στερεοσκόπιο για τη πιο σωστή λήψη των πολύ μικρών εκφύτων και τη λήψη των παρατηρήσεων,

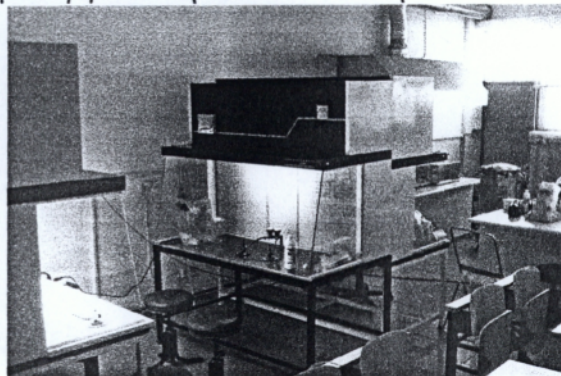
-αιθυλική αλκοόλη για την απολύμανση των χεριών και των εργαλείων μετά από κάθε χρήση.

-ειδικοί θάλαμοι προετοιμασίας των εκφύτων στους οποίους υπάρχουν μηχανισμοί που καθαρίζουν και αποστειρώνουν τους χώρους αυτούς από τους μικροοργανισμούς, όπως είναι η ασηπτική τράπεζα εργασίας (laminar air flow cabinet).

Στους ειδικούς θαλάμους ή θαλάμους νηματικής ροής υπάρχει και καμινέτο για να αποστειρώνουμε την λαβίδα και νυστέρι κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας *in vitro* (για καλύτερη δημιουργία ασηπτικών συνθηκών).



Το εργαστήριο της ιστοκαλλιέργειας.



Η τράπεζα νηματικής ροής αέρα στην οποία γίνονται όλοι οι χειρισμοί των εκφύτων (κάτω από ασηπτικές συνθήκες).

**γ. Θάλαμοι ανάπτυξης**, όπου τοποθετούνται και παραμένουν τα δοχεία που περιέχουν τα θρεπτικά υποστρώματα μαζί με τα έκφυτα. Στους θαλάμους αυτούς οι συνήθεις συνθήκες που επικρατούν είναι: σχετική υγρασία 70% , θερμοκρασία  $25 \pm 2^\circ \text{C}$  , φωτισμός 3000-5000 lux για 16 h την ημέρα.

**δ. Θερμοκήπιο και εδαφικά υποστρώματα.** Η μεταφύτευση των ριζοβολημένων φυταρίων γίνεται σε εδαφικό υπόστρωμα γλάστρας αποτελούμενο συνήθως από τύρφη και περλίτη. Οι γλάστρες διατηρούνται σε συνθήκες θερμοκηπίου.

## ΠΙΝΑΚΑΣ Ι

Ποσότητες μακροστοιχείων σε διάφορα επώνυμα διαλύματα ιστοκαλλιέργειας σε mg/l

Συστατικά	Gautheret (1942)	Hildebrandt et al (1946)	Burkholder & Nickell (1949)	Nitsch (1951)	Heller (1953)	Reinert & White (1956)	Murashige & Skoog (1962)	White (1963)	Camborg et al. (1968)	Schenk & Hildebrandt (1972)
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	134	-
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	125	180	246	250	250	360	370	720	500	400
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	-	800	-	-	-	200	-	200	-	-
MgCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	-	-	203	-	-	-	-	-	-	-
KCl	-	65	149	1.500	750	65	-	65	-	-
CaCl <sub>2</sub> .2H <sub>2</sub> O	-	-	441	25	75	-	440	-	150	200
NaNO <sub>3</sub>	-	-	-	-	600	-	-	-	-	-
KNO <sub>3</sub>	125	80	202	2.000	-	80	1.900	80	3.000	2.500
Ca(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> .4H <sub>2</sub> O	500	400	708	-	-	200	-	300	-	-
NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	-	-	-	-	-	-	1.650	-	-	-
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> .H <sub>2</sub> O	-	33	-	250	125	16,5	-	16,5	150	-
NH <sub>2</sub> H <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	-	300
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	125	-	1.088	-	-	-	170	-	-	-

Πηγή: Reinert, J. and Bajaj, Y.P.S. (1977)



ΠΙΝΑΚΑΣ II

Ποσότητες μικροστοιχείων σε διάφορα επώνυμα διαλύματα ιστοκαλλιέργειας σε mg/lit

Συστατικά	Gautheret (1942)	Hildebrandt et al (1946)	Nitsch (1951)	Heller (1953)	Reinert & White (1956)	Murashige & Skoog (1962)	White (1963)	Camborg et al. (1968)	Schenk & Hildebrandt (1972)
NiSO	0,05	-	-	-	-	-	-	-	-
FeSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	-	-	-	-	-	27,85	-	-	15
Na <sub>2</sub> .EDTA	-	-	-	-	-	37,25	-	-	20
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	3	4,5	3	0,1	4,5	22,3	7	10,0	10
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	0,18	6	0,5	1	1,5	8,6	3	2	1,0
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	0,05	-	0,025	0,03	-	0,025	-	0,025	0,2
BeSO <sub>4</sub>	0,1	-	-	-	-	-	-	-	-
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	1	-	0,5	-	-	-	-	-	-
Fe <sub>2</sub> (SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	50	-	-	-	2,5	-	2,5	-	-
Ti(SO <sub>4</sub> ) <sub>3</sub>	0,2	-	-	-	-	-	-	-	-
NiCl <sub>2</sub> .6H <sub>2</sub> O	-	-	-	0,03	-	-	-	-	-
CoCl <sub>2</sub> .CH <sub>2</sub> O	0,05	-	-	-	-	0,025	-	0,025	0,1
AlCl <sub>3</sub>	-	-	-	0,03	-	-	-	-	-
FeCl <sub>3</sub> .6H <sub>2</sub> O	-	-	-	1	-	-	-	-	-
Τρυγικός σίδηρος	-	40	-	-	-	-	-	-	-
FeC <sub>6</sub> O <sub>5</sub> H <sub>7</sub> .5H <sub>2</sub> O	-	-	10,0	-	-	-	-	-	-
Χηλικός σίδηρος	-	-	-	-	-	-	-	28	-
KJ	0,5	3	0,5	0,01	0,75	0,83	0,75	-	1,0
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,05	0,38	0,5	1	1,5	6,2	1,5	3	5
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> .2H <sub>2</sub> O	-	-	0,025	-	-	0,025	-	0,15	0,1
NH <sub>4</sub> H <sub>2</sub> FO <sub>4</sub>	-	-	-	-	-	-	-	-	300

Πηγή: Reinert, J. and Bajaj, Y.P.S. (1977)



**ΠΙΝΑΚΑΣ**  
**Χαρακτηριστικά των φυτορμονών (φυσικά – χημικά)**

Όνομα	Σύντηξη	Προέλευση	Διαλυτότης	Σταθερότης	Φύλαξις
<u>Αυξίνες</u>					
3-ινδολυλοξικό οξύ***	IAA	Φυσική	Λίγο διαλυτή στο νερό διαλυτή σε αιθανόλη 96%	Λίγο σταθερή αποσυντίθεται παρουσία φωτός	Μερικές μέρες σε 4-5°C και σε σκοτάδι
α-Ναφθαλινοξικό οξύ*	NAA	Συνθετική	Διαλυτή σε αιθανόλη 96% διαλυτότης στο νερό 38 mg/lit στους 17°C	Σταθερή και στους 120°C	Στο ψυγείο 4-5°C σε σκοτάδι ή στην κατάψυξη
2,4 Διχλωροφαινοξικό οξύ	2,4 D**	Συνθετική	Λίγο διαλυτή στο νερό, διαλύεται σε αιθανόλη	Σταθερή και στους 120°C	Στους 4-5°C σε σκοτάδι ή στην κατάψυξη
Ινδολυλοβουτυρικό οξύ	IBA	Συνθετική	Διαλυτή σε αιθανόλη	Σταθερή και στους 120°C	Στους 4-5°C σε σκοτάδι ή στην κατάψυξη
<u>Κυτοκινίνες</u>					
6-Φουρφουραμινοπουρίνη ή Κινετίνη	KIN ή FAP	Συνθετική	Διαλυτή σε NaOH 1 N ή HCl 1 N	Σταθερή και στους 120°C	Στους 4-5°C σε σκοτάδι ή στην κατάψυξη
6-Βενζυλαμινοπουρίνη ή Βενζυλαδενίνη	BAP ή BA	Συνθετική	Διαλυτή σε NaOH 1 N ή HCl 1 N	Σταθερή και στους 120°C	Στους 4-5°C σε σκοτάδι ή στην κατάψυξη
2-ισοπεντενυλαδενίνη	2-iP	Φυσική	Διαλυτή σε NaOH 1 N ή HCl 1 N	Σταθερή και στους 120°C	Στους 4-5°C σε σκοτάδι ή στην κατάψυξη
Ζεατίνη	Z	Φυσική	Διαλυτή σε NaOH 1 N ή HCl 1 N	Σταθερή και στους 120°C	Στους 4-5°C σε σκοτάδι ή στην κατάψυξη
<u>Γιββερελλίνες</u>					
A-3 Γιββερελλικό οξύ	GA <sub>3</sub>	Φυσική	Διαλυτή σε αιθανόλη, μέτρια διαλυτή στο νερό	Λίγο σταθερή, αποσυντίθεται σε υψηλές θερμοκρασίες	Σκοτάδι στους 4-5°C κατάψυξη

Πηγή: Augè, R. et al. (1985)

- \* Σαν συνθετική αυξίνη δεν υπόκειται στις ίδιες οξειδώσεις, όπως το IAA. Γι' αυτό το λόγο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε χαμηλές συγκεντρώσεις 0,1-2 mg/lit.
- \*\* Δυναμικό ζιζανιοκτόνο με χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις 0,1 (σχηματισμός κάλλου) έως 10 mg/lit (για κυτταροδιαίρεση). Ακόμα έχει σημειωθεί διττή δράση (αυξίνης και φυτοκινίνης μαζί), Dods, J.H. and Roberts, L.W. (1982).
- \*\*\* Ευαίσθητο στις ενζυματικές οξειδώσεις. Χρησιμοποιούμενες συγκεντρώσεις από 1-30 mg/lit επειδή η οξειδάση του IAA μπορεί να βρίσκεται σε μεγάλες συγκεντρώσεις.

## ΜΕΡΟΣ ΔΕΥΤΕΡΟ

### 1. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ *IN VITRO* ΤΩΝ ΒΟΛΒΟΔΩΝ.

Τα βολβώδη ανήκουν στην κλάση των μονοκοτυλήδων και συνιστούν μια ομάδα φυτών τα οποία στα πρώτα χρόνια της έρευνας, του πειραματισμού και της εφαρμογής της *in vitro* καλλιέργειας αποτελούσαν δύσκολο θέμα για τους ερευνητές.

Ο Gautheret (1959) αναφέρει μόνο 10 μονοκοτυλήδονα φυτά από τα 100 περίπου είδη που περιέγραψε για ιστοκαλλιέργεια.

Ακόμη πολλοί ερευνητές τους οποίους αναφέρει σε άρθρο του ο Hussey (1975), όπως οι Partenan (1963), Carter, Yamada and Takahashi (1967), Krikorion and Berguam (1969), είχαν σχολιάσει την φερόμενη ανυπότακτη φύση των μονοκοτυλήδων φυτών όσον αφορά την *in vitro* καλλιέργειά τους. Στα επόμενα χρόνια, έως και σήμερα αυξάνεται συνεχώς ο αριθμός των μονοκοτυλήδων φυτών και ειδικότερα των βολβοδών στα οποία η εφαρμογή του μικροπολλαπλασιασμού ήταν επιτυχής.

Μερικά από τα μονοκοτυλήδονα στα οποία εφαρμόστηκε η *in vitro* καλλιέργεια είναι τα μέλη της οικογένειας Gramineae: βρώμη (Carter, Yamada, Takahashi, 1967), Ρύζι (Yatazawa, Furihashi, Shimizu 1967) ακόμη Nishi, Yamada και Takahashi 1968), σιτάρι (Trione, Jones, και Metzger 1968), σόργο (Mastellar, και Holden, 1970), φυτά χλοοτάπητα (Atkin και Barton 1973) καθώς και μερικά βολβώδη και συνδεόμενα είδη κρεμμύδι (Fridborg, 1971), Hamorthia (Kaul και Sabharwal, 1972) και Gladiolus (Ziv, Halery, και Shilo, 1971) και Freesia (Davies, 1971-72).

Τα βολβώδη φυτά διακρίνονται σε τρεις οικογένειες οι οποίες είναι α) Liliaceae (με αντιπροσωπευτικά είδη το Lilium, την Tulipa, κ.λπ.), β) Iridaceae (π.χ. Gladiolus, Freesia), και γ) Amaryllidaceae (π.χ. Narcissus).

Στις οικογένειες Liliaceae και Amaryllidaceae τα έκφυτα παίρνονται από τα λέπια και τον βασικό δίσκο του βολβού. Μάλιστα καλύτερη αντίδραση είχαν τα έκφυτα που προέρχονταν από το κατώτερο μισό των λεπίων.

Στην οικογένεια Iridaceae έκφυτα αποτελούσαν και αποτελούν μέρη του βολβού καθώς και οι οφθαλμοί που βρίσκονται στο βολβό. Ακόμη έκφυτα παίρνονται και από φύλλα, βλαστό, τοίχωμα ωοθήκης, έμβρυα, κορυφαίο μερίστωμα κ.λπ.

Οι βολβοί είναι δύσκολοι ως προς την προστασία τους από τις μολύνσεις και αυτό οφείλεται στην ανοιχτή κατασκευή τους που επιτρέπει την είσοδο των μικροοργανισμών ανάμεσα στα λέπια. Έτσι οι μικροοργανισμοί είναι δύσκολο να αντιμετωπιστούν με τα συνηθισμένα αποστειρωτικά μέσα.

Αντίθετα σε φύλλα, μίσχους, ταξιανθίες, και ωοθήκες επιτυγχάνεται σχεδόν πλήρης απαλλαγή από μολύσματα.

Από πειράματα που έγιναν σε δώδεκα είδη βολβωδών οικογενειών Liliaceae (Hyacinthus, Muscari, Ornithogalum, Scilla, Tulipa), Amaryllidaceae (Hippeastrum, Ipheion, Narcissus) και Iridaceae (Freesia, Gladiolus, Schizosiulis, Sparaxis) βρέθηκε ότι τα δέκα παρουσιάζουν ικανότητα για αναγέννηση από ιστούς οργάνων (εξαιρούνται η Tulipa, και η Schizosiulis), εννέα από τα είδη αυτά παρουσίασαν αναγέννηση από άλλα μέρη του αναπτυσσόμενου φυτού, ενώ κάλοι επιτεύχθηκαν σε δέκα από τα δώδεκα. Απ'αυτά όμως μόνο σε επτά είδη αποκτήθηκαν τέλεια φυτά.

Τα είδη που ανήκουν στην οικογένεια Liliaceae με εξαίρεση την Tulipa (που δεν δίνει ούτε κάλο ούτε φυτό) αντιδρούν περισσότερο ομοιόμορφα από τα είδη των δύο άλλων οικογενειών.

Στον παρακάτω πίνακα φαίνεται η αντίδραση των δώδεκα ειδών βολβών ως προς την ικανότητά τους για πολλαπλασιασμό *in vitro* από διάφορα μέρη του φυτού.

**ΠΙΝΑΚΑΣ ΙΙΙ**  
**Οι in vitro αντιδράσεις 12 ειδών βολβών και κορμών**

	<i>Liliaceae</i>				<i>Iridaceae</i>				<i>Amaryllidaceae</i>			
	<i>Hyacinthus</i>	<i>Muscari</i>	<i>Ornithogalum</i>	<i>Scilla</i>	<i>Tulipa</i>	<i>Freesia</i>	<i>Gladiolus</i>	<i>Schizosiphis</i>	<i>Sparaxis</i>	<i>Hippeastrum</i>	<i>Ipheion</i>	<i>Narcissus</i>
Όργανα												
βολβός ή κορμός	PC	PC	PC	PC		PC	PC		PC	P..	PC	P..
φύλλο	PC	PC	PC	PC	..	..	..	..	..	..	..	..
ανθικός ποδίσκος	PC	PC	PC	PC	..	..C	PC	PC	PC	P..	PC	..
ωοθήκη	PC	PC	PC	PC	..	..	..	..	..	..	PC	..C
Για παραγωγή φυταρίων (από αναπτυσσόμενους ιστούς)												
απαιτούμενα mg/lit												
IAA	<8,0	<2,0	<2,0	<2,0	..	..	<0,8	2,0 8,0	0,5 2,0	..	2,0 8,0	..
NAA	<0,6	<0,03	<0,5	<0,12	..	..	<0,03	0,12 0,5	0,03 0,5	2,0	0,5 ..	..
2.4.D	<11,03	<0,03	<0,03		..	..	..	..	..	..	0,008 ..	..
Για παραγωγή κάλλων												
απαιτούμενα mg/lit												
IAA	..	2,0 8,0	2,0 8,0	..	..	..	..	..	..	..	..	..
NAA	0,5-8,0	0,12-8,0	0,5-8,0	0,12-0,8	..	0,5-0,8	0,12-8,0	0,5-8,0	0,5-8,00	..	0,5-8,0	8,0
2.4.D	0,12-2,0	0,12-2,0	0,12-8,0	0,12-0,8	..	0,12-2,0	0,12-2,0	0,12-2,0	0,12-2,0	..	0,12-2,0	2,0-8,0
Ημέρες ως την παραγωγή φυταρίων (από αναπτυσσόμενους ιστούς)	60	50	30	65	..	..	42	50	35	80	60	..
C → P	→ P	→ P	→ P	→ P	..	→ P	..	..	..	..	→ P	→ P

P = φυτάριο. C = κάλλος. .... = καμία αντίδραση

Πηγή: Hussey 1975

Hussey - Totipotency in Explanis

## 2. ΦΥΤΟ ΓΛΑΔΙΟΛΟΣ

Ο γλαδίολος (Gladiolus sp.) είναι φυτό που ανήκει στην υποδιαίρεση των Αγγειοσπέρμων, στην Κλάση των Μονοκοτυλήδων, στην Τάξη των Lilliiiflorae και στην οικογένεια Iridaceae ή Amaryllidaceae. Ο Γλαδίολος καλείται και Ξιφίας όνομα που το έδωσε ο Γεννάδιος κατά τη μετάφραση της λέξης Gladiolus. Υπάρχει το ενδεχόμενο ο γλαδίολος να είναι το φυτό Ξιφίον ή Ξίφιον που αναφερόταν στην αρχαιότητα από τον Θεόφραστο.

### α. Ιστορικό

Ο γλαδίολος πρωτοεμφανίστηκε ως εμπορικό είδος το 1839 όταν ο Beddinghous έκανε μια έκθεση στο Engien του Βελγίου. Πριν απ' αυτή την έκθεση μόνο μερικά άγρια είδη γλαδίολου ήταν γνωστά.

Στην Αγγλία όμως στα 1823 παράχθηκε το πρώτο υβρίδιο. Από τότε πολλές ομάδες υβριδίων γλαδίολου παράχθηκαν στις διάφορες ευρωπαϊκές χώρες και στα μέσα του 19ου αιώνα εισήχθηκαν τα πρώτα υβρίδια από τις Η.Π.Α., τα οποία είχαν ψηλά στελέχη με ζωηρόχρωμα άνθη, που χρησιμοποιήθηκαν για την παραγωγή κομμένων λουλουδιών αλλά και για υβριδισμό.

Από το 1941 και μετά σε πολλές άλλες χώρες της Ευρώπης όπως Ολλανδία, Γαλλία, Γερμανία, έγιναν πιο εντατικές εργαστηριακές έρευνες και δημιουργήθηκαν άπειρες ποικιλίες γλαδίολου. Αυτές χαρακτηρίζονται α) από μακριά ανθικά στελέχη, τα οποία φέρουν μεγάλα και ωραίου χρωματισμού άνθη που διατηρούνται αρκετά στο ανθοδοχείο και β) από την αντοχή τους στις ασθένειες.

Το γένος Gladiolus sp. περιλαμβάνει 180 είδη με περισσότερες από 10.000 ποικιλίες από τις οποίες μόνο 20 περίπου καλλιεργούνται για εμπορικούς λόγους και συγκεκριμένα για παραγωγή κομμένων λουλουδιών ( Wilfret 1980).

### β. Περιγραφή (εικ.1, 2)

Ο γλαδίολος είναι φυτό που σχηματίζει κονδυλόμορφο υπόγειο βολβό, δηλαδή βολβό διαμέτρου 2,5 –5cm που μπορεί να φτάσει και στα 10 cm, ο οποίος φέρει μερικούς πλάγιους οφθαλμούς. Η κορυφή του κορμού είναι κωνική, ενώ η βάση κοίλη και φέρει μια ουλή που δείχνει το μέγεθος του παλαιού βολβού (μεγάλη ουλή) ή του βολβιδίου (μικρή ουλή) από τον οποίο προήλθε αυτό.

Ο βολβός σκεπάζεται από ινώδεις λεπτούς χιτώνες το πάχος, το χρώμα και ο αριθμός των οποίων είναι επίσης μια ένδειξη εάν προήλθε από βολβό ή βολβίδιο.



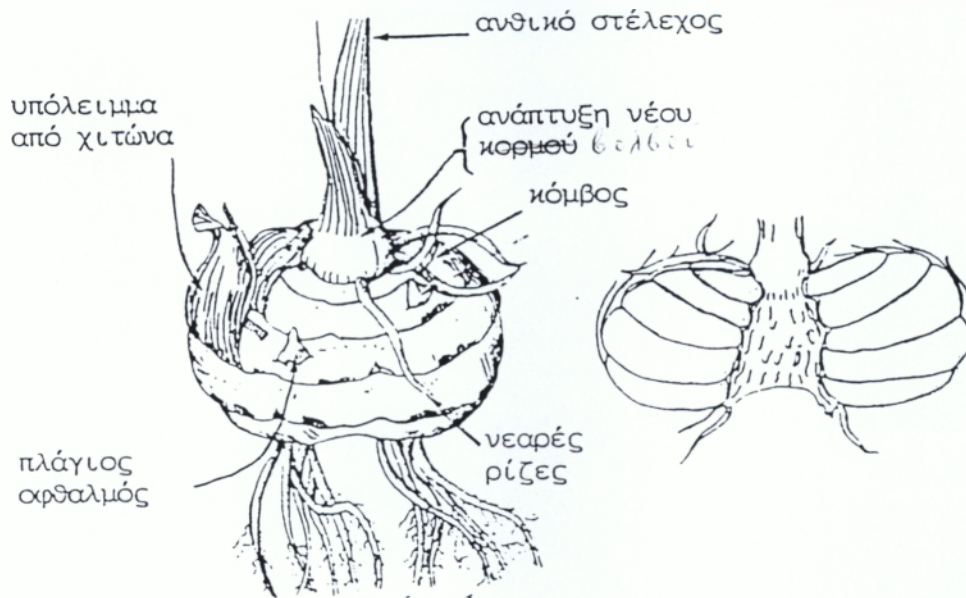
Βολβοί που προέρχονται από παλαιούς ανθίσαντες βολβούς έχουν 4 ή περισσότερους και σκοτεινότερου χρωματισμού χιτώνες, ενώ οι βολβοί που προέρχονται από βολβίδια έχουν λιγότερους λεπτότερους και πιο ανοιχτού χρωματισμού χιτώνες.

Υπάρχουν όμως και δύο τύποι φύλλων που αναπτύσσονται από τους ενεργούς βολβούς, και εντοπίζονται στους ανώτερους κόμβους (ρόζους) του βολβού: α) τα φύλλα- περιβλήματα και β) τα πραγματικά φύλλα, τα οποία συχνά είναι 10 και 12 αντίστοιχα.

Το ριζικό σύστημα διακρίνεται στο πρωτογενές το οποίο αποτελείται από ρίζες που εκφύονται από τη βάση του βολβού και το δευτερογενές το οποίο συνίσταται από ρίζες που αναπτύσσονται κατά τη διάρκεια της άνθησης του φυτού και εκφύονται από τα ανώτερα τμήματα του βολβού, όπου δημιουργούνται τα νέα βολβίδια.

Ο γλαδίολος έχει φύλλα μακριά λογχοειδή, ζωηρού πράσινου χρώματος, από το κέντρο των οποίων βγαίνει το ανθικό στέλεχος που μπορεί να φθάσει ή να ξεπεράσει το 1m σε ύψος.

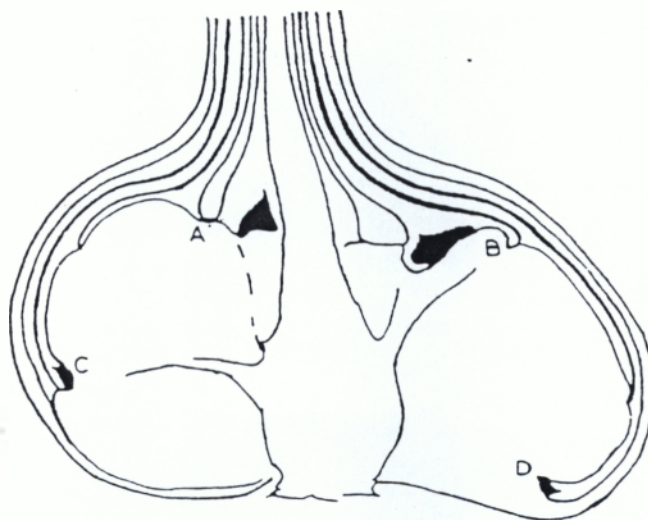
Στο ανώτερο τμήμα του ανθικού στελέχους βρίσκονται σε ταξιανθία στάχυ 8-24 μεγάλα άνθη.



Εικόνα 1

Αριστερά: Εξωτερική εμφάνιση

Δεξιά Επιμήκης τομή που δείχνει την εσωτερική συμπαγή κατασκευή.



Εικόνα 2

Επιμήκης τομή βολβού GLADIOLUS η οποία δείχνει τους μασχαλιαίους οφθαλμούς και τον τρόπο που καλύπτονται από τις βάσεις των φύλλων.

#### **γ. Εδαφοκλιματικές απαιτήσεις**

Το έδαφος που προορίζεται για καλλιέργεια γλαδίου πρέπει να δέχεται άφθονο φως για 7-8h την ημέρα .

Κατάλληλα για την καλλιέργεια του γλαδίου εδάφη θεωρούνται τα ελαφρά αμμοπηλώδη, πλούσια σε οργανική ουσία καλά αποστραγγιζόμενα, με pH από 6,0- 8,0.

Ο γλαδίος έχει ανάγκη των τριών κύριων θρεπτικών στοιχείων, δηλαδή του αζώτου, φωσφόρου, καλίου, προκειμένου να παράξει καλής ποιότητας άνθη.

#### **δ.Φύτευση**

Καλύτερη εποχή φύτευσης είναι νωρίς την άνοιξη, γύρω στον Μάρτιο στην Βόρεια Ελλάδα (για να αποφευχθούν οι όψιμοι παγετοί) και νωρίτερα στην Ν. Ελλάδα. Συνήθως συνιστάται η διαδοχική φύτευση κάθε 10-15 ημέρες, τόσο στους εμπορικούς όσο και στους ερασιτεχνικούς ανθόκηπους για να έχουμε διαδοχική άνθηση από τον Ιούνιο και μετά, ως αργά το φθινόπωρο.

Όσο όμως πρωιμότερη είναι η φύτευση τόσο οι νέοι βολβοί γίνονται μεγαλύτεροι και τα βολβίδια περισσότερα.

Η φύτευση των βολβών γίνεται σε γραμμές ή κατά θέσεις, ή σε αυλάκια βάθους 8-12 cm. Τοποθετούνται οι βολβοί σε αποστάσεις 20cm περίπου. Στους εμπορικούς ανθόκηπους οι αποστάσεις μεταξύ των βολβών είναι συνήθως μεγαλύτερες.

Οι βολβοί του εμπορίου ταξινομούνται συνήθως κατά μεγέθη, ανάλογα με το μήκος, την διάμετρο, ή την περίμετρό τους. Αυτοί προέρχονται συνήθως από βολβίδια που καλλιεργήθηκαν για 1-2 χρόνια. Οι τελευταίοι προτιμούνται έναντι αυτών που προήλθαν από παλιούς ανθίσαντες βολβούς (και συνεπώς εξαντλημένους) γιατί περιέχουν πολλές αποθησαυριστικές ουσίες και παράγουν μεγάλα φυτά και άνθη.

#### **ε.Σχηματισμός νέου βολβού και βολβιδίου (βολβιδίνου)εικ. 3.**

Ταυτόχρονα με την ανάπτυξη του υπέργειου τμήματος του φυτού, συμβαίνει και η εξέλιξη του υπόγειου τμήματος.

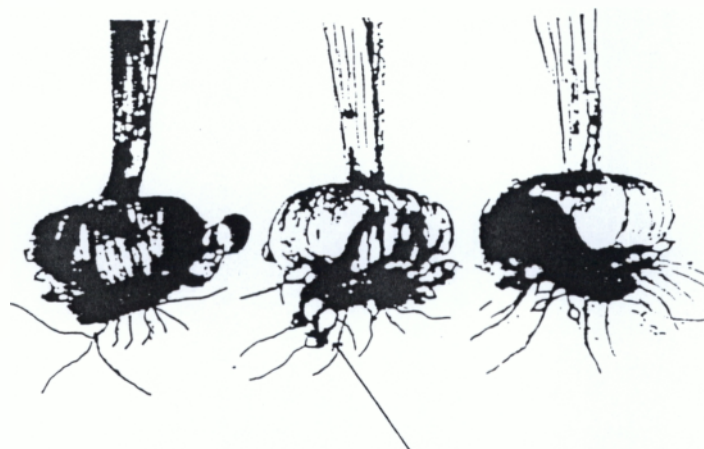
Οι πρώτες ρίζες μεγαλώνουν σχετικά λίγο και σύντομα αντικαθίστανται από άλλες που παρουσιάζονται στη βάση του βλαστού πάνω από τον βολβό. Καθώς ο βολβός αυτός δίνει φύλλα εξογκώνεται στην βάση του και σχηματίζεται ένας νέος βολβός. Συγχρόνως σχηματίζονται νέες ρίζες λευκές, σαρκώδεις μήκους 2-5cm, οι οποίες εξελίσσονται σε φυσιολογικές και μόνιμες ρίζες με τις οποίες στερεώνεται ο νέος βολβός στο έδαφος.

Λίγο πριν την άνθηση μεταξύ της βάσης του νέου βολβού και της κορυφής του παλαιού σχηματίζονται ομάδες από μικρά βολβίδια, δηλαδή απλά σχηματισμένα βολβίδια προσκολλημένα στέρεα στον μητρικό βολβό, που καθένα τους περικλείεται σε ένα χιτώνα, ο οποίος δύσκολα μπορεί να αποσπαστεί από το βολβίδιο.

Ένας μεγάλος βολβός είναι ικανός να παράγει 50-200 βολβίδια. Αυτό εξαρτάται από την ποικιλία και τις συνθήκες καλλιέργειας (Griesbach 1972).

Ο νέος βολβός και τα βολβίδια αναπτύσσονται καλύτερα, εφόσον οι καλλιεργητικές εργασίες συνεχίζονται και μετά την κοπή των ανθέων, μέχρι δηλαδή την εποχή της εκρίζωσής τους. Στο μεταξύ όμως ο παλαιός βολβός συρρικνώνεται και τελικά καταστρέφεται, ενώ κάποια υπολλείμματά του παραμένουν προσκολλημένα στον νέο βολβό μέχρις ότου αυτός ωριμάσει και φθάσει στο λήθαργο.

Εικόνα 3



Στάδιο ανάπτυξης των βολβών προς το τέλος της καλλιεργητικής περιόδου. Πολλά μικρά βολβίδια (βολβιδίνιοι) αρχίζουν να σχηματίζονται στη βάση των μητρικών βολβών.



#### **στ. Εκρίζωση και διατήρηση βολβών.**

Αφού η ξήρανση προχωρήσει ως το 50% του φυλλώματος είναι καιρός να γίνει η εκρίζωση. Παραπέρα ξήρανση δεν ενδείκνυται γιατί οι βολβοί χάνουν το βάρος και την ζωτικότητα τους. Στην συνέχεια οι βολβοί συλλέγονται, καθαρίζονται από τα υπολείμματα των παλιών βολβών και αφήνονται για 3-4 ημέρες σε κλειστό χώρο για περαιτέρω ξήρανση. Οι βολβοί είναι πια έτοιμοι να αποθηκευτούν μέχρις ότου μεταφυτευθούν την άνοιξη.

Καλύτερες θερμοκρασίες αποθήκευσης είναι γύρω στους 0-4 ° C, ενώ ψηλότερες (15-20 ° C) μπορούν σε ορισμένες ποικιλίες να παρατείνουν το λήθαργο για έναν ολόκληρο χρόνο. Για την διακοπή του ληθάργου έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία το χλωρυδρικό αιθυλένιο.

Τα βολβίδια, όταν οι παλαιοί βολβοί χωρίζονται από τους νέους, καθαρίζονται από τις ρίζες και τοποθετούνται σε δροσερό και υγρό σχετικά περιβάλλον μέσα σε κιβώτια ή σακίδια. Ακολουθείται αυτός ο τρόπος αποθήκευσης γιατί τα βολβίδια περιβάλλονται από ένα χιτώνα ο οποίος είναι πολύ ξερός εμποδίζει αρκετά την έξοδο του βλαστιδίου και του ριζιδίου.

**ζ. Πολλαπλασιασμός:** Οι τρόποι πολλαπλασιασμού του γλαδίου είναι οι εξής:

**α) με σπόρο.** Τα παραγόμενα σπορόφυτα όμως δεν αποδίδουν πιστά την ποικιλία από την οποία προήλθαν. Αυτός ο τρόπος πολλαπλασιασμού χρησιμοποιείται μόνο όταν θέλουμε να παράγουμε νέες ποικιλίες και υβρίδια.

**β) με βολβούς και βολβίδια.** Όπως αναφέρθηκε και προηγούμενα κάθε βολβός παράγει πριν την άνθηση περιφερειακά της βάσης του βολβίδια (μικρά στην αρχή) τα οποία καλλιεργούνται για 1-3 χρόνια ώστε να μεγαλώσουν και αποκτήσουν το κατάλληλο μέγεθος που θα επιτρέψει την χρησιμοποίησή τους σε κανονική καλλιέργεια.

**γ) με την *in vitro* καλλιέργεια.** Η *in vitro* καλλιέργεια είναι ένας νέος τρόπος πολλαπλασιασμού, πολλά όμως υποσχόμενος τόσο για την καλλιέργεια του γλαδίου όσο και των υπολοίπων φυτών γενικότερα.

Τα πλεονεκτήματα της μεθόδου αυτής έναντι των ανωτέρω παραδοσιακών τεχνικών είναι ότι δίνει υγιές και πιστοποιημένο υλικό σε μεγάλο αριθμό φυτών, και μάλιστα σε σύντομο χρονικό διάστημα.

## **η. Φυσιολογικές ανωμαλίες**

### η1. Μαρασμός των φυτών.

Οφείλεται στην υπερβολική υγρασία του έδαφους, στη βαθιά φύτευση, στη φύτευση ανώριμων βολβών στην υπερβολική χρήση αζωτούχων λιπασμάτων και στην έλλειψη υγρασίας στο έδαφος.

### η2. Μάρανση της ταξιανθίας.

Σε αυτή την περίπτωση η ταξιανθία του γλαδίου μαραίνεται μόλις εμφανιστεί ή δεν εμφανίζεται καθόλου. Αυτό οφείλεται σε χαμηλή ένταση φωτισμού, χαμηλή θερμοκρασία, ακανόνιστα ποτίσματα, περίσσια αζωτούχων λιπασμάτων ή έλλειψη ενός θρεπτικού στοιχείου.

### η3. Κάμψη των στελεχών των ταξιανθιών.

Παρουσιάζεται σε μερικές ποικιλίες αν τα φυτά διψάσουν μετά την εμφάνιση της ταξιανθίας. Μερικές φορές είναι αποτέλεσμα χαμηλών θερμοκρασιών.

Ο γλαδίολος είναι ένα από τα πιο διάσημα φυτά. Πιο συγκεκριμένα τα μακριά στελέχη με τα πολύχρωμα και μεγάλα άνθη του δίνουν μια ξεχωριστή θέση μέσα στο βασίλειο των φυτών και τον κάνουν απαραίτητο σε όλες σχεδόν τις ανθοδετικές συνθέσεις.

### η4. Χλώρωση.

Είναι το κιτρίνισμα των φύλλων το οποίο παρουσιάζεται σε μερικές ποικιλίες όταν η ποσότητα του ασβεστίου στο έδαφος είναι υπερβολική ή το έδαφος είναι αλκαλικό.

### Θ. Κάψιμο των κορυφών των φύλλων.

Αυτή η φυσιολογική ανωμαλία οφείλεται αποκλειστικά σε έλλειψη νερού και δίψα των φυτών με υψηλή θερμοκρασία.

### **3. *IN VITRO* ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΓΛΑΔΙΟΛΟΥ.**

#### **3.1 Εξέλιξη της *in vitro* καλλιέργειας στο γλαδίολο.**

Οι χώρες που ασχολούνται με την παραγωγή του γλαδίου είναι οι Η.Π.Α. (Φλόριδα, Καλιφόρνια, Μίτσιγκαν, Ιλινόις, Νότια καρολίνα), Ολλανδία, Ιταλία, Γαλλία, Πολωνία, Βουλγαρία, Βραζιλία, Ινδία, Αυστραλία, και πρόσφατα το Ισραήλ.

Τα τελευταία χρόνια όμως η παραγωγή γλαδίου παρουσίασε πτώση τόσο στις Η.Π.Α όσο και στην Ευρώπη, όχι λόγω της μείωσης της αγοραστικής ζήτησης αλλά λόγω των ασθενειών και του υψηλού κόστους των αερομεταφορών. Έτσι έγιναν προσπάθειες για μείωση του κόστους παραγωγής φυτικού υλικού ελεύθερου από ασθένειες.

Η εφαρμογή της μεριστωματικής καλλιέργειας για παραγωγή ελεύθερων από ιούς και άλλα παθογόνα φυτών καθώς και οι μεταγενέστερες γρήγορες *in vitro* μέθοδοι πολλαπλασιασμού έκαναν τις τεχνικές της ιστοκαλλιέργειας να αποτελούν τη βάση των προγραμμάτων παραγωγής υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού γλαδίου.

Παρ' όλη όμως την ανάπτυξη της ιστοκαλλιέργειας στις ξένες χώρες, στην Ελλάδα γίνεται μόνο απλή εφαρμογή της χωρίς την παραγωγή πολλαπλασιαστικού υλικού, με αποτέλεσμα πολύτιμο συνάλλαγμα να φεύγει προς τα έξω. Αυτό συμβαίνει σε όλα τα βολβώδη φυτά.

Η μελέτη αυτή, καθώς και άλλες που έχουν προηγηθεί, έχει σαν σκοπό να παρουσιάσει τα θετικά στοιχεία της *in vitro* τεχνικής στην παραγωγή υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού με μικρό κόστος και σε σύντομο χρόνο. Αρκεί να σημειωθεί ότι για την παραγωγή ενός ικανοποιητικού αριθμού βολβών με εμπορικό προορισμό από ένα μητρικό βολβό, με τις συνήθεις πρακτικές, χρειάζονται 8-10 χρόνια, ενώ με την εφαρμογή της *in vitro* τεχνικής αυτό το χρονικό διάστημα μειώνεται στα 2 χρόνια (Reinert και Bajaj 1977).

Η τεχνική της ιστοκαλλιέργειας έχει εφαρμοστεί για τον πολλαπλασιασμό διαφόρων βολβωδών φυτών που ανήκουν στην οικογένεια Iridaceae (Hughes 1981). Η τεχνική αυτή βασίζεται στην *in vitro* καλλιέργεια εκφύτων γλαδίου, που προέρχονται από διάφορα όργανα και ιστούς ικανών για αναγέννηση και παραγωγή φυτών σε διαλύματα που έχουν βρεθεί κατάλληλα για τον σκοπό αυτό.

Η έρευνα πάνω στην τεχνική της *in vitro* καλλιέργειας ως μέθόδου πολλαπλασιασμού του γλαδίου ξεκίνησε εδώ και μια εικοσαετία περίπου με πρωτεργάτες τον Ziv (1970), Simonsen και Hildebrandt (1971), Wilfret (1971) κ.λπ.

### **3.2 Σύνθεση υποστρωμάτων.**

Τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν για τα διάφορα έκφυτα και τα οποία βοήθησαν στην μορφογενετική τους έκφραση και στον σχηματισμό κάλου στηρίχτηκαν πάνω στα θρεπτικά υποστρώματα MS (Murashige και Skoog, 1962) ή LS (Linsmayer και Skoog, 1965) τα οποία διατηρήθηκαν σε υγρή μορφή ή ζελοποιήθηκαν με άγαρ. Η συγκέντρωση των ρυθμιστών της ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκε από τους ερευνητές σε ποικίλα επίπεδα ανάλογα με το έκφυτο.

Η σειρά των συγκεντρώσεων οι οποίες έχουν αναφερθεί είναι.

IAA (3-ινδολλυλοξικό οξύ) από 5,7 - 45,7  $\mu\text{M}$ .

NAA ( $\alpha$ -ναφθαλινοξικό οξύ) από 0,16 – 53,8  $\mu\text{M}$ .

2,4D (διχλωροφαινοξικό οξύ) από 0,5 – 9,0  $\mu\text{M}$ .

Κινητίνη ή (6-φουρφοφυλαμινοπουρίνη) από 0,14 – 9,3  $\mu\text{M}$ .

BAP (6-βενζυλαμινοπουρίνη ή βενζυλαδενίνη) από 0,9 – 8,9  $\mu\text{M}$ .

Επίσης κάτι άλλο που αναφέρεται είναι η χρήση θεικής αδενίνης (0,7  $\mu\text{M}$ ) για έκφυτα προερχόμενα από ανθοφόρο στέλεχος ( Ziv *et al.*... 1970), 15% χυμό καρύδας (coconut water) για έκφυτα από κορυφές βλαστού γλαδίου (Simonsen και Hildebrandt 1971), coconut water 5% για καλλιέργεια ανθήρων (Bajaj *et al.*, 1983).

### **3.3 Μεριστωματική καλλιέργεια.**

Η καλλιέργεια μεριστωμάτων έχει εφαρμοστεί σε διάφορα είδη φυτών για την εξυγίανσή τους από τις ιώσεις με εξαιρετικά αποτελέσματα. Το μέγεθος του εκφύτου είναι σημαντικός παράγοντας στην εξάλειψη των ιών. Επί προσθέτως η θερμοθεραπεία εφαρμοζόμενη σε φυτά, βλαστούς ή βολβούς, πριν την κοπή του μεριστώματος, αυξάνει τις πιθανότητες για εξαφάνιση των ιών (Quak 1977).

Έτσι λοιπόν μεριστωματικά έκφυτα των ποικιλιών γλαδίου White Friendship και Carmen, αποτελούμενα από την στρογγυλή κορυφή και μία καταβολή φύλλου, εμφυτεύθηκαν αρχικά σε θρεπτικό υπόστρωμα MS μισής συγκέντρωσης σε ανόργανα στοιχεία και περιέχοντας 2,2  $\mu\text{M}$  BAP (Βενζυλαδενίνη). Στην συνέχεια μεταφυτεύθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα LS με 2,2 $\mu\text{M}$  BAP ή 9,3  $\mu\text{M}$  κινητίνη όπου έδωσαν τέλεια φυτάρια.



Τα φυτά αυτά όταν μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα MS χωρίς ρυθμιστές ανάπτυξης, το οποίο όμως περιείχε α) 43,8 μM σακχαρόζης, β) τη μισή συγκέντρωση των ανόργανων αλάτων του κανονικού MS και γ) όλες τις οργανικές ενώσεις του βασικού υποστρώματος LS (0,4 mg/l thiamine-HCl και 100mg/l iso- ή myo-inositol) παρήγαγαν βολβίδια. Μεριστώματα των ποικιλιών Eurovision, Spic και Spac, Judith και bannah, τα οποία ήταν μολυσμένα με τον ιό της κίτρινης μωσαϊκώσης του φασολιού (BYMV), όταν καλλιεργήθηκαν αρχικά σε θρεπτικό υπόστρωμα MS μισής συγκέντρωσης σε ανόργανα στοιχεία περιέχοντας και 0,9 μM BAP, ακολούθως μεταφυτεύθηκαν σε διάλυμα ίδιο με το προηγούμενο για να συνεχίσουν την ανάπτυξή τους και στην συνέχεια μεταφέρθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα για ριζοβόληση 1/2 MS και 0,5 μM NAA και 0,5% AC, δηλαδή ενεργό άνθρακα (active charcoal), παρήγαγαν τέλεια φυτά. Στα φυτά αυτά παρατηρήθηκε εξάλειψη του ιού, μέσω της μεριστωματικής καλλιέργειας, σε ποσοστό 90% (Alper *et al.*, 1985).

Επίσης οι Logan και Zettler 1985 αναπαρήγαγαν 23 ποικιλίες γλαδίου παίρνοντας τμήματα από ακραίες βλαστικές κορυφές (μεριστώματα) με μήκος εκφύτων 0,5-0,7mm και βρήκαν το 100% των παραχθέντων φυτών να είναι απαλλαγμένα από τις ιώσεις BYMV και CMV (μωσαϊκώση της αγγουριάς).

Αντίθετα, το 88% των φυταρίων που παράχθηκαν από *in vitro* καλλιέργεια μασχαλιαίων οφθαλμών (μήκους εκφύτων 0,3-0,5 mm) βρέθηκαν μολυσμένα.

### **3.4 Ανθηροκαλλιέργεια.**

Νέοι, μεσαίου μεγέθους ανθήρες όταν απομονώθηκαν και καλλιεργήθηκαν *in vitro* σε θρεπτικό υπόστρωμα MS το οποίο περιείχε και 2,3 μM 2,4-D, 0,46μM κινητίνη και 5% γάλα ινδικής καρύδας, μετά από 6-8 εβδομάδες ανέπτυξαν φύλλο σε σχήμα πετάλου. Αντίθετα, έκφυτα πλήρως ανεπτυγμένων ανθέρων που καλλιεργήθηκαν στο ίδιο διάλυμα επιμηκύνθηκαν και ανέπτυξαν κάλο και ρίζες. Στον κάλο αυτό παρατηρήθηκε πολυκύτταρη και πολυπύρινη γύρη (Bajaj, *et al.* 1983 και Bajaj and Pierik, 1974).

### **3.5 Εφαρμογή της *in vitro* τεχνικής σε άλλα όργανα και ιστούς.**

Έκφυτα από νεαρές ταξιανθίες (μήκους 3-5mm), από ποδίσκο άνθους (μήκους 3-5 mm), από γυμνό άνθος, από βράκτια, από περιάνθιο και από τμήματα φύλλου (μήκους 0,5-1,5 cm) καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικά υποστρώματα:



MS1=MS+2mg/l IAA +0,5 mg/l κινητίνη  
G1=MS+10mg/l NAA+0,5 mg /l κινητίνη  
G5=MS+0,1mg/l NAA +0,5mg/l κινητίνη (Bajaj, *et al.*, 1983)

Από τα τρία αυτά θρεπτικά υποστρώματα που εξετάστηκαν από τον Bajaj και τους συνεργάτες του, προέκυψε ότι το G1 προκάλεσε τον πολλαπλασιασμό όλων των εκφύτων και οδήγησε στον σχηματισμό κάλου σε διαφορετικό βαθμό όμως ως προς τα διάφορα έκφυτα. Το διάλυμα MS1 είχε ως αποτέλεσμα ότι κανένα από τα έκφυτα δεν σχημάτισε συγκροτημένο κάλο, και στο διάλυμα G5 προκλήθηκε περιορισμένος κάλος.

Μεγαλύτερη πολλαπλασιαστική αντίδραση από τα παραπάνω έκφυτα (ανθικός ποδίσκος, γυμνό άνθος, βράκτια, ανθοφόρα ταξιανθία), παρουσίασαν τα έκφυτα ανθικού ποδίσκου. Σε αυτά μετά από 1 εβδομάδα καλλιέργειας, παρατηρήθηκε διόγκωση και στις 2 τομές του εκφύτου. Ακολούθησαν σε ανταπόκριση στο ερέθισμα τα έκφυτα γυμνού οφθαλμού, τα έκφυτα ανθοφόρας ταξιανθίας, και τελευταία τα έκφυτα φύλλου. Στην συνέχεια αναπτύχθηκε κάλος, σκληρός, κίτρινος, ο οποίος μεγάλωνε αργά και έφερε ριζίδια που τελικά εξελίχθηκαν σε ρίζες.

Φαίνεται λοιπόν ότι γένεση καλύτερου κάλου προκλήθηκε παρουσία υψηλής συγκέντρωσης NAA σε έκφυτα ανθικού ποδίσκου. Όμως και η παρουσία 2,4-D επηρεάζει θετικά την παραγωγή κάλου.

Επίσης έκφυτα από βολβό, φύλλο, μίσχο και τοιχώματα ωοθήκης παρήγαγαν κάλο παρουσία μόνο 2,4- D (Hussey 1975).

Οι Simonsen και Hildebrandt (1971) βρήκαν ότι το θρεπτικό υπόστρωμα MS με 23μM κινητίνης προκαλούσε τους καλύτερους κάλους και ότι το άγαρ σ' αυτή την περίπτωση ήταν βοηθητικός παράγοντας, σε αντίθεση με το υγρό διάλυμα. Ο κάλος σε υγρά ανακινούμενα θρεπτικά υποστρώματα θρυμματίζονταν σε κάποιο βαθμό αλλά όχι σε μικρές αποικίες ή σε μεμονωμένα κύτταρα. Ο Wilfret (1971) μπόρεσε να συντηρήσει τον πολλαπλασιασμό του κάλου συμπεριλαμβάνοντας NAA στο υγρό υπόστρωμα σε όλη την διάρκεια της ανακίνησης.

Ο παραγόμενος στην συνέχεια κάλος περιοδικά υποκαλλιεργείται και συντηρείται σε διάλυμα G6=MS +2mg /l 2,4-D. Ο κάλος αυτός ήταν ικανός να προκαλέσει ριζογένεση ή επιπρόσθετο σχηματισμό κάλου ή να παράξει βλαστούς Wilfret 1971, Hussey 1977, Bajaj *et al.*, 1983, Zivetal 1970, Simonsen και Hildebrandt 1971, Wilfret 1971 .

Οι Bajaj, Sidhu, και Gill (1983) ερευνώντας την επίδραση των 2,4-D, IAA, NAA και κινητίνης πάνω στον κάλο εφάρμοσαν τα εξής θρεπτικά υποστρώματα:

MS2=MS +2mg/l IAA+0,05 mg /l κινητίνη

G1= MS +10mg/l NAA+0,5 mg/l κινητίνη

G5=MS+0,1mg/l NAA+0.5 mg/l κινητίνη

G6=MS+2mg/l 2,4-D

G2=MS +0,1 mg/l NAA+2mg /l κινητίνη

Έκφυτα κάλου που συνέχισαν να καλλιεργούνται στο διάλυμα G6 συνέχισαν επίσης να παράγουν κάλο χωρίς να παρουσιάζουν ίχνος ριζογένεσης. Αντίθετα ο κάλος που υποκαλλιεργήθηκε στο διάλυμα MS2 μέσα σε 3-4 εβδομάδες ανέπτυξε ολοκληρωμένες ρίζες. Επίσης ρίζες σχημάτισε και ο κάλος που μεταφυτεύθηκε στα διαλύματα G1 και G5 αλλά ο αριθμός των σχηματιζόμενων ριζών ήταν μικρότερος απ'αυτόν που επιτυγχάνετο στο MS2. Αντίθετα η εφαρμογή του διαλύματος G2 προωθούσε το σχηματισμό βλαστών.

Από τα παραπάνω φαίνεται ότι ο κάλος ωθείται σε ριζογένεση παρουσία αυξινών (π.χ. NAA, IAA, 2,4- D) ενώ σχηματίζουν βλαστούς παρουσία κινητίνης. Ακόμη έχει βρεθεί ότι το ποσοστό της κινητίνης που προστίθεται στο διάλυμα παίζει σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη βλαστών σε συνδυασμό και με την ποικιλία.

Έτσι διαπιστώθηκε ότι σε έκφυτα κάλου της ποικιλίας Eurovision καλλιεργούμενα σε υπόστρωμα που περιείχε 9,3μM κινητίνης παρήγαγαν 5-8 βλαστούς σε κάθε επανακαλλιέργεια (Ziv, 1979), ενώ σε συγκέντρωση 4,6μM κινητίνης τα ίδια έκφυτα, άλλων όμως ποικιλιών, παρήγαγαν κατά μέσο όρο 11-15 βλαστούς (Logan Zettler 1985). Η άριστη συγκέντρωση κυτοκινίνης είναι καθοριστική γιατί δίνει υψηλό αριθμό φυσιολογικά ανεπτυγμένων βλαστών χωρίς τον σχηματισμό κάλου. Όταν η κινητίνη και η NAA προστεθούν μαζί στο ίδιο θρεπτικό υπόστρωμα τότε προηγείται ο σχηματισμός ριζών και ακολουθεί εκείνος των βλαστών (Ziv *et al.*, 1970). Οι Ziv, Halevy και Shilo (1970) επίσης εργάστηκαν και με έκφυτα από τμήματα στελέχους τα οποία καλλιέργησαν σε MS το οποίο έφερε χαμηλή συγκέντρωση NAA (0,008-0,03 mg/l). Αποτέλεσμα αυτής της καλλιέργειας ήταν η παραγωγή πολλών φυταρίων. Άλλα πειράματα όμως έχουν δείξει ότι ο αριθμός των παραγόμενων φυταρίων αυξάνει αρκετά εάν προστεθεί κινητίνη (0,12 mg/l) και συνδυαστεί με αυξημένη συγκέντρωση του NAA π.χ. 0,5mg/l. Έχει βρεθεί ακόμη ότι υψηλές συγκεντρώσεις NAA και κινητίνης οδήγησαν στον σχηματισμό κάλου. Τελικά οι παραπάνω ερευνητές κατέληξαν στο ότι ο καλύτερος ορμονικός συνδυασμός για την έναρξη παραγωγής φυταρίων από έκφυτα τμημάτων στελέχους ήταν 10 mg/l NAA και 0,5 mg/l κινητίνη.

Τέλος σαν έκφυτα χρησιμοποιήθηκαν τεμάχια βολβού τα οποία προήλθαν από αποστειρωμένο βολβό, που κόπηκε από την κορυφή προς την βάση σε 2,4,8,16 ή 32 τμήματα. Κάθε κομμάτι καλλιεργήθηκε με το περίβλημά του κατά τα 2/3 του μήκους του μέσα στο θρεπτικό υπόστρωμα.

### 3.6 In vitro καλλιέργεια μασγαλαίων οφθαλμών βολβών και βολβιδίων.

Ο Ziv 1979 ασχολούμενος με την εφαρμογή της *in vitro* τεχνικής για τον πολλαπλασιασμό του γλαδίου χρησιμοποίησε ως έκφυτα μασγαλαίους οφθαλμούς βολβού. Τους οφθαλμούς αυτούς τους εγκατέστησε σε θρεπτικό μυο-ινοσιτόλη, 0,4mg/l υδροχλωρική θειαμίνη, 1,0 mg/l νικοτινικό οξύ, 1,0 mg/l πυριδοξίνη, 2,0 mg/l κινητίνη, 0,1 mg/l NAA (1-ναφθαλινοοξεικό οξύ, 30 gr/l ζάχαρη και 0,8% agar (ζελοποιητής).

Σαν μεταφυτευτικό υπόστρωμα χρησιμοποίησε είτε το ίδιο το MS (πλήρους σύνθεσης) ή MS μισής συγκέντρωσης σε ανόργανα στοιχεία το οποίο περιείχε και 0,4mg /l υδροχλωρική θειαμίνη, 0,5mg /l NAA (1-ναφθαλινοοξεικό οξύ) και 15 gr/l ζάχαρη, μαζί με ενεργό άνθρακα (active charcoal) σε ποσότητα 0,3 % (w/v) ώστε να βοηθήσει την ανάπτυξη των ριζών. Οι βλαστοί εμφανίστηκαν 12-18 ημέρες από την φύτευση και κάθε έκφυτο παρήγαγε 5-8 βλαστούς. Στην συνέχεια οι αναπαραγόμενοι βλαστοί καλλιεργήθηκαν είτε στο ίδιο μέσο για συνέχισή της αναπαραγωγής νέων βλαστών είτε σε ειδικό μέσο για να προωθηθεί η ριζοβόληση.

Τα νεαρά φυτά τα οποία προήλθαν από το αρχικό υπόστρωμα έφεραν συχνά λίγες ρίζες, κοντές και χοντρές. Αν τα φυτά αυτά συνέχιζαν να αναπτύσσονται στο αρχικό υπόστρωμα κατέληγαν σε κοιμώμενα βολβίδια διαστάσεων 2-4mm, ενώ αν συνέχιζαν την καλλιέργειά τους, στο μεταφυτευτικό διάλυμα ανέπτυξαν πλούσιο ριζικό σύστημα.

Αυτό οφείλεται στην παρουσία της αυξίνης NAA σε συγκέντρωση 0,5mg/l και στην ταυτόχρονη απουσία κυτοκινινών. Το ίδιο επιβεβαίωσαν οι Logan και Zettler (1985) και οι Lillien –Kipnis και Kochba (1987).

Η συγκέντρωση NAA επηρεάζει τον αριθμό, το μήκος, και την μορφολογία των ριζών, των υποκαλλιεργούμενων φυταρίων. Ο αριθμός των ριζών αυξάνει σε υψηλότερη συγκέντρωση NAA (πάνω από την άριστη τιμή), αλλά μειώνεται το μήκος τους. Εκτός από την προώθηση της ριζοβολίας η παρουσία NAA στο θρεπτικό υπόστρωμα βοηθά στην ανάπτυξη βολβών και φύλλων.

Επίσης ο Ziv (1979) βρήκε ότι, εκτός από την παρουσία NAA στο θρεπτικό υπόστρωμα, την ανάπτυξη των ριζών επηρεάζει και η προσθήκη ενεργού άνθρακα (0,3 %) στο μεταφυτευτικό υπόστρωμα. Οι Lillien –Kipnis και Kochba (1987) παρατήρησαν ότι το μήκος και η μορφολογία των αναπτυσσομένων ριζών επηρεάζεται περισσότερο από την παρουσία ενεργού άνθρακα σε σχέση με το NAA.



Η γρηγορότερη φυσιολογική ανάπτυξη των οφθαλμών βολβού, έλαβε χώρα σε υπόστρωμα που περιείχε 0,12-0,5 mg/l BAP όπου μέσα σε διάστημα 2-3 εβδομάδων παράχθηκαν βλαστοί μήκους 20-30 mm.

Ο ρυθμός ανάπτυξης των βλαστών, εκτός από την συγκέντρωση του BAP, εξαρτάται και από την ποικιλία. Σε συγκεντρώσεις ίσες ή μεγαλύτερες από 2mg /l BAP (βενζυλαμινοπουρίνη) οι οφθαλμοί διογκώθηκαν αρκετά στις βάσεις τους και άργησαν να παράξουν φύλλα.

Ο Hussey (1977) έκανε και μια σειρά πειραμάτων στα οποία πρόσθεσε εκτός από BAP και NAA σε συγκέντρωση λίγο μικρότερη ή ίση με αυτή του BAP. Η προσθήκη του NAA εμπόδιζε την ανάπτυξη βλαστών και αύξησε την διόγκωση της βάσης των οφθαλμών, καταλήγοντας στον σχηματισμό κάλου, ειδικά όταν η συγκέντρωση του NAA ήταν κοντά σ' αυτήν του BAP.

Ο Hussey (1977) παρατήρησε την επίδραση του BAP πάνω στα αναπτυγμένα φυτάρια και κατέληξε στα εξής συμπεράσματα.

Ότι η παρουσία BAP: α) προήγαγε την ανάπτυξη φύλλων, αν και σε υψηλές συγκεντρώσεις προκαλούσε παραμόρφωση και προοδευτική έλλειψη χλωροφύλλης, β) σε αυξημένες συγκεντρώσεις συνέβαλε στην παραγωγή πιο κοντών και πιο λεπτών ριζών, γ) προήγαγε την πρόωρη ανάπτυξη των μασχαλιαίων βλαστών έτσι ώστε τα φυτάρια να διακλαδίζονται, δ) σε υψηλές συγκεντρώσεις προέτρεψε τον σχηματισμό κάλου.

Ο Hussey προσπάθησε να αποφύγει τον λήθαργο των φυταρίων με συνεχείς επανακαλλιέργειες αυτών ανά 8 εβδομάδες σε φρέσκο θρεπτικό υπόστρωμα που περιείχε 0,03 mg/l BAP. Επίσης ο ερευνητής αυτός βρήκε ότι σε συγκεντρώσεις από 0,5-1 mg/l BAP επιτυγχάνεται η καλύτερη και η όσο το δυνατόν μεγαλύτερη διακλάδωση των βλαστών ενώ στα 0,5mg/l BAP οι ρίζες έγιναν πιο κοντές και πιο παχιές. Για συγκέντρωση από 1-2mg/lit BAP τα φύλλα παραμορφώθηκαν και έγιναν χλωρωτικά. Ενώ σε συγκέντρωση BAP από 2mg/lit και πάνω παρατηρήθηκε πλήρης παρεμπόδιση της ανάπτυξης ριζών.



### 3.7 Μεταφορά των φυτών στο έδαφος.

Στα θρεπτικά υποστρώματα των αρχικών καλλιεργειών που προτείνουν τόσο ο Hussey (1977) όσο και ο Ziv (1979) προκύπτουν αναγεννημένα φυτάρια τα οποία φέρουν λίγες κοντές ρίζες. Επομένως αν τα φυτάρια αυτά μεταφυτευθούν στο έδαφος, χωρίς προηγούμενη σκληραγώγηση, η επιβίωσή τους θα είναι αμφίβολη.

Γι' αυτό ο Ziv πρότεινε την υποκαλλιέργεια των φυταρίων σε ένα προμεταφυτευτικό υπόστρωμα με τις μισές ποσότητες θρεπτικών στοιχείων (1/2MS +0,4mg/l υδροχλωρική θειαμίνη +0,5mg/l κινητίνη) οι οποίες σε συνδυασμό με την υψηλή ένταση φωτισμού σκληραγωγούν τα φυτά και τα αποτρέπουν από την ξήρανση μετά την μεταφύτευση στο έδαφος.

Ένας άλλος λόγος που δυσκολεύει την απ' ευθείας φύτευση των φυταρίων στο έδαφος είναι ότι οι ρίζες των φυταρίων που αναπτύσσονται σε άγαρ, συχνά δεν επιζούν στο εδαφικό περιβάλλον. Αυτές είναι λιγότερο διακλαδισμένες από τις ρίζες που παράγονται *in vitro* και γενικώς στερούνται ριζικών τριχιδίων. Μια περίοδος εγκλιματισμού αμέσως μετά την μεταφορά στο έδαφος απαιτείται για την ανάπτυξη φυσιολογικών ριζών. Η θερμοκρασία αυτής της περιόδου είναι καθοριστική.

Δυο εβδομάδες μετά την μεταφορά στο έδαφος, παρατηρήθηκαν πολλές διαφορές ανάμεσα στα ριζικά συστήματα φυταρίων ανεπτυγμένων στους 17°C και στους 25°C. Κοντά στους 25°C το ριζικό σύστημα παρέμεινε το ίδιο όπως ήταν όταν βγήκε από τον δοκιμαστικό σωλήνα. Όμως στους 17°C οι ρίζες επιμηκύνθηκαν σημαντικά, διακλαδίστηκαν άφθονα και αναπτύχθηκαν απ' αυτές ριζικά τριχίδια. Επομένως τα φυτάρια επιβίωσαν σε ποσοστό 100 %, αναπτύχθηκαν ικανοποιητικά και παρήγαγαν βολβούς.

Οι Logan και Zettlen (1985) πρότειναν μια εναλλακτική μέθοδο που εξασφαλίζει ένα καλό ριζικό σύστημα για εύκολη μεταφύτευση στο έδαφος. Αυτοί πρότειναν την αντικατάσταση του άγαρ με κηπευτικό βελτιωμένο βερμικουλίτη εμπλουτισμένο με υγρό διάλυμα MS μισής συγκέντρωσης σε ανόργανα στοιχεία, συμπληρωμένο με NAA και ενεργό άνθρακα. Έτσι αν τα φυτάρια εγκλιματιστούν σωστά και αναπτυχθούν με ζωηρότητα τότε παράγουν πολλούς βολβούς και βολβίδια.

Ο χειρισμός των ήδη σχηματισθέντων βολβιδίων είναι ευκολότερος και φθηνότερος από τον χειρισμό ζωντανών αναπτυσσόμενων φυταρίων. Αυτοί (οι βολβοί) οδηγούνται σε λήθαργο μετά από 3-5 μήνες ανάπτυξης .

Η παραγωγή βολβδίων *in vitro* απαιτεί επιπλέον καλλιέργεια για περίοδο 3-4 μηνών σε θάλαμο ανάπτυξης και τέλος ακολουθεί ψυχρή μεταχείριση για σπάσιμο του ληθάργου πριν τα βολβίδια μπορούν να φυτευτούν στο έδαφος.

Όλοι οι ερευνητές που ασχολήθηκαν με τον γλαδίολο και κυρίως οι Ziv και Lilien - Kirnis πρότειναν μια σειρά βημάτων που πρέπει να ακολουθηθούν για την *in vitro* καλλιέργεια διαφόρων τμημάτων του φυτού Gladiolus sp. και αναπτύσσονται στο παρακάτω κεφάλαιο 3.8

### **3.8 Πρωτόκολλα *in vitro* καλλιέργειας.**

1. Απογυμνώνω μη κοιμώμενους βολβούς ή βολβίδια από τα εξωτερικά καφέ φύλλα και τα βράκτια.
2. Προτρέπω την βλάστησή τους, σε υγρό διηθητικό χαρτί στους 17°C.
3. Όταν οι βλαστοί αποκτήσουν μήκος 3 cm, αποκόπτονται μαζί με ένα μικρό κομμάτι βολβού.
4. Ακολουθεί απολύμανση σε διάλυμα 3 % υποχλωριώδους νάτριο συμπληρωμένο με 0,1%- 2% διαβρεκτικό (π.χ. twin) για 20 min και πλύσιμο των εκφύτων με απεσταγμένο νερό 3 φορές.
5. Κάτω από στερεοσκόπιο τέμνω διαδοχικά τα φύλλα μέχρι που το μερίστωμα να γίνει ευκρινώς ορατό.
6. Κόβω το μερίστωμα μαζί με την τελευταία καταβολή φύλλου και το τοποθετώ σε ένα μικρό τρυβλίο petri το οποίο περιέχει θρεπτικό υπόστρωμα MS συμπληρωμένο με NAA 0,01-0,1 μM και 0,3-3 μMBA, για τα νάνα υβρίδια, ή 0,5μM NAA και 2μM BA ή 5μM Κινητίνη για έκφυτα του Gladiolus grandiflorus.
7. Αυτά τα τρυβλία τοποθετούνται σε θάλαμο σταθερών συνθηκών με θερμοκρασία 23 -25°C και φως για 16 ώρες.
8. Όταν τα μεριστώματα βλαστήσουν και αρχίσει η παραγωγή βλαστών αποκόπτονται οι καλοσηματισμένοι βλαστοί και μεταφυτεύονται σε παρόμοιο θρεπτικό μέσο σε δοκιμαστικούς σωλήνες ή κωνικές φιάλες.
9. Για ριζοβολία, οι μεμονωμένοι βλαστοί υποκαλλιεργούνται σε θρεπτικό υπόστρωμα MS με 3μM NAA και 0,5% ενεργό άνθρακα, αφού πρώτα περιορίσω το μήκος των φύλλων γύρω στα 5mm. Όταν οι ρίζες γίνουν περίπου 2cm σε μήκος (2-3 εβδομάδες) και τα φύλλα γίνουν μακρύτερα μεταφέρονται στο έδαφος.
10. Αν ζητείται η παραγωγή βολβιδίων διατηρώ τα φυτάρια χωρίς επιπλέον υποκαλλιέργεια για παραπάνω από 3-4 μήνες κάτω από τις ίδιες συνθήκες.

### **β. Για μασχαλιαίους οφθαλμούς βολβού.**

1. Απομονώνω τα καφέ εξωτερικά φύλλα και τα βράκτια από τον βολβό και αυτά που επικαλύπτουν τους μασχαλιαίους οφθαλμούς.
2. Απολυμαίνεται όλος ο βολβός για 20 min σε 3% υποχλωριώδους νατρίου και 0,1% διαβρεχτικό (π.χ. twin).
3. Αφαιρώ ένα ή 2 από τα εξώτατα λευκά φύλλα κάθε οφθαλμού.
4. Αφαιρώ τους οφθαλμούς μαζί με ένα μικρό τμήμα ιστού βολβού και τους τοποθετώ στο θρεπτικό υπόστρωμα .
5. Τα έκφυτα τοποθετούνται σε θάλαμο σταθερών συνθηκών με θερμοκρασία 23-25° C και 16 ώρες φωτισμό.

### **γ. Ποδίσκος (στέλεχος) ταξιανθίας.**

1. Κόβω νεαρά στελέχη ταξιανθίας (μήκους 30-35cm) πριν αυτές εμφανίσουν πέταλα. Αφαιρώ τα εξωτερικά φύλλα και σκουπίζω τα φύλλα που απέμειναν με 70% αιθυλική αλκοόλη.
2. Κόβω τα στελέχη κάτω από ασηπτικές συνθήκες σε τμήματα μήκους 6-8 cm, σε σημείο που απέχει 5cm κάτω από τα άνθη.
3. Τα εμβαπτίζω σε 9% υποχλωριώδες ασβέστιο για 15 min και μετά ξεπλένω 3 φορές με απεσταγμένο νερό.
4. Ετοιμάζω έκφυτα κόβοντας τα τμήματα στελέχους σε δίσκους 3-4 mm λεπτούς, τους οποίους τοποθετώ σε τροποποιημένο διάλυμα MS το οποίο συμπεριλαμβάνει 1,23μM ένυδρο δισόξινο φωσφορικό νάτριο, 0,7 mM θειική αδενίνη 26,3 μM NAA και 2,3 μM κινητίνη.
5. Ακολούθως τα έκφυτα αναπτύσσονται και δίνουν κάλο. Διαιρώ τον δίσκο σε 5-6 τμήματα και τα καλλιεργώ σε παρόμοιο διάλυμα με 2,3 μM κινητίνη.
6. Η καλλιέργεια τοποθετείται σε 25 ± 1° C κάτω από 16 ώρες φθορίζοντα φωτισμό.
7. Για αναγέννηση βλαστών, υποκαλλιεργούνται σε MS μισής συγκέντρωσης σε ανόργανα στοιχεία, με 43,8 μM ζάχαρη και 2,7μM NAA.
8. Για παραγωγή βολβιδίων γίνεται μεταφύτευση σε MS μισής συγκέντρωσης σε ανόργανα στοιχεία και 5μM IBA.

**δ. Για παραγωγή κάλου από βολβό, βλαστό βολβιδίου ή μασχαλιαίο οφθαλμό βολβού.**

1. Η απολύμανση του βολβού ή του βλαστού βολβιδίου ή μασχαλιαίου οφθαλμού βολβού γίνεται με 70% αιθανόλη ακολουθούμενη με 9% υποχλωριώδες ασβέστιο για 15 min και ξέπλυμα των εκφύτων με απεσταγμένο νερό 3 φορές.
2. Ο σχηματισμός κάλου προάγεται σε θρεπτικό μέσο με 53,8 μm NAA και 2,3 μm κινητίνη.
4. Υποκαλλιέργεια κάλου ή κάλου μαζί με κομμάτι αρχικού εκφύτου γίνεται σε διάλυμα που περιέχει 2,3μm κινητίνη ή 1,1-4,4 μm BAP για αναγέννηση βλαστών.
5. Η καλλιέργεια τοποθετείται για ανάπτυξη σε θερμοκρασία  $25 \pm 1^\circ \text{C}$  και φωτισμό 16 ωρών.
6. Για ριζοβολία καλλιεργούνται σε διάλυμα MS με 3μM NAA και 0,5% ενεργό άνθρακα.

Τέλος στους παρακάτω πίνακες βρίσκονται συγκεντρωμένα τα θρεπτικά υποστρώματα που έχουν χρησιμοποιηθεί για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό του Gладиолus sp. από διάφορους ερευνητές.

## ΠΙΝΑΚΑΣ V

### Μορφογενετικές αντιδράσεις διαφόρων εκφύτων γλαδίου *in vitro*.

Έκφυτο	Στάδιο	Διάλυμα (ρυθμιστές ανάπτυξης) σε μM.	Έκφραση	Ερευνητές
Ανθικό Στέλεχος	I	MS: NAA 26,9, ή 53,8mg/l και 2,3 κινητίνη	κάλος, ρίζες βλαστοί	Ziv <i>et al.</i> (1970)
	I	MS: Κινητίνη 2,3 – 4,6	βλαστοί	
Κορυφαίο μερίστωμα	I	MS: ημιστερεό και υγρό IAA 5,7 και NAA 0,5 2,4-D 2,7, κινητίνη 2,3-4,6	κάλος, ρίζες και φύλλα	Simonnen και Hilde- brandt (1971)
Βλαστός	I	MS: NAA 26,9 LS: NAA 26,9 και κινητίνη 2,3	κάλος, ρίζες, βλαστοί	Wilfret (1971)
Τμήματα βολβού	I	MS: IAA 45,7 και NAA 0,16	φυτάρια	Hussey (1975)
Μασχαλιαίοι οφθαλμοί βολβού	I	MS: BAP 2,2	βλαστοί	Datu και Bhojwant (1987)
Οφθαλμοί βολβού	I	MS: BA 2,2-4,4 και NAA 2,3 ½ MS: NAA 2,3	βλαστιδία βολβίδια	Zhuo και Sun (1986)
	II			
Οφθαλμοί βολβού	I	½ MS: BA 1,1	βλαστοί	Hussey, (1977)
	I	½ MS: BA 2,2		
	I	½ MS: BA 4,4		
	II	½ MS: BA 0,4		



Έκφυτο	Στάδιο	Διάλυμα (ρυθμιστές ανάπτυξης) σε μΜ.	Έκφραση	Ερευνητές
Μασχαλιαίοι Οφθαλμοί	I	MS: NAA 2,7 , κινητίνη 9,9	βλαστοί, βολβοί	Ziv, (1979)
	II	½MS: NAA 2.7 και 0,3 % AC	ριζοβολημένα φυτάρια	
Στέλεχος ταξιανθίας, άνθος, οφθαλμός, βράκτιο φύλλο	I	MS: NAA 53, κινητίνη 2,3	κάλος, βλαστοί	Bajaj <u>et al.</u> (1983)
Τμήματα βολβού	I	MS: 2,4-D 45,2	κάλος	Kim, Choi,. και Knop (1988)
	II	MS: κινητίνη 46,5	φυτάρια	
Ανθήρες	I	MS: 2,4-D 2.3 Κινητίνη 0,46, και CW 5 %	κάλος, φύλλο με μορφή πετάλου, πολυκύτταρη γύρη	
Μερίστωμα	I	MS	φυτά, βολβοί	Sutton, (1978)
Κορυφαίο μερίστωμα	I	MS: NAA 2,7, κινητίνη 4,6	Εγκατάσταση	Logan, Zettler (1985)
	II	MS: κινητίνη 4,6-9,3	βλαστοί	
	III	½ MS: υγρός βερμικουλίτης, και NAA 5,3 και ενεργό άνθρακα 5 %	ριζοβολημένα φυτάρια	
Μασχαλιαίοι οφθαλμοί	I,II	MS: NAA 0,03 –0,1 και BAP 0,3-1	βλαστοί	Lilien- kipnis και Kochba (1987)
Μασχαλ. οφθαλμοί	I, II	MS: NAA 0,03 και κινητίνη 3	ριζοβολημένα φυτάρια	Lilien- kipnis, και Kochba (1987)
	III	MS: NAA 1 και ενεργό άνθρακα 0,5 %		

## ΜΕΡΟΣ ΤΡΙΤΟ (ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ)

### ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΣΜΟΣ ΠΑΝΩ ΣΕ ΜΙΚΡΟΜΟΣΧΕΥΜΑΤΑ ΒΟΛΒΟΥ GLADIOLUS SP.

#### 1. ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΥΛΙΚΩΝ (ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ).

##### 1.1. Γενικά:

Για εξοικονόμηση χρόνου αλλά και να για περιορισθούν οι πιθανότητες λάθους, λόγω του ότι μερικές φορές οι ποσότητες για μερικά ιχνοστοιχεία και άλλες χημικές ενώσεις είναι τόσο μικρές ώστε αυτές είναι δύσκολο να ζυγιστούν, χρησιμοποιήθηκε ένα από τα επώνυμα βασικά υποστρώματα αυτό των Murashige και Skoog(1962). Τα υποστρώματα αυτά τα τελευταία χρόνια οι χημικές βιομηχανίες τα έχουν παρασκευάσει σε μορφής σκόνης και τα διαθέτουν στην αγορά. Αυτό διευκολύνει τις επιχειρήσεις ιστοκαλλιέργειας, οι οποίες σε ρυθμό ρουτίνας χρησιμοποιούν πάντα της ίδιας σύνθεσης βασικά υποστρώματα.

Η σύνθεση του θρεπτικού διαλύματος που προορίζεται για την αρχική καλλιέργεια έχει μεγάλη σημασία, επειδή σ' αυτό γίνεται ο αποπροσδιορισμός των κυττάρων του εκφύτου και αμέσως μετά ο νέος προσδιορισμός τους προς την μορφογενετική έκφραση που έχει τεθεί ως στόχος. Οποιοδήποτε θρεπτικό υπόστρωμα και αν επιλέξουμε, πρέπει να έχει παρασκευαστεί πρόσφατα δηλαδή να είναι φρέσκο.

Εκτός από το βασικό μέρος του επώνυμου διαλύματος, η σύνθεση του οποίου περιλαμβάνει τα ανόργανα άλατα, μερικές βιταμίνες και αμινοξέα και το οποίο χρησιμοποιείται αυτούσιο, όλα τα υπόλοιπα συστατικά επιλέγονται, τόσο ως προς το είδος όσο και ως προς την συγκέντρωσή τους από εμάς, ανάλογα με το είδος του εκφύτου και το στόχο της καλλιέργειας.

## 1.2 παρασκευή ενός λίτρου θρεπτικού υποστρώματος MS (4-7).

Για την παρασκευή ενός λίτρου θρεπτικού υποστρώματος ακολουθούμε τα παρακάτω βήματα:

Σε 800 cc απιονισμένο νερό διαλύουμε με ανάδευση 4,708 g σκόνη MS.

Μετά τη διαπίστωση ότι το MS διαλύθηκε εντελώς, προσθέτουμε 40 g ζάχαρης και συνεχίζουμε την ανάδευση, οπότε προσθέτουμε και τα 100 mg της μυο-ινοσιτόλης. Ακολούθως συμπληρώνουμε στα 1000 cc με απιονισμένο ή αποσταγμένο νερό. Κανουμε τη διόρθωση του pH στο 5,7 με τη χρήση μερικών σταγόνων 1N NaOH ή 1N HCl. Έπεται η διανομή του θρεπτικού διαλύματος σε φιάλες του ενός λίτρου (για ένα λίτρο θρεπτικού υποστρώματος χρησιμοποιούμε 2 φιάλες του ενός λίτρου). Έτσι διανέμω: 500 cc θρεπτικού υποστρώματος και 3,5g/l agar (ζελοποιητής) στη μια φιάλη του ενός λίτρου και άλλα 500 cc θρεπτικό υπόστρωμα και 3,5 g/l agar στην δεύτερη φιάλη. Ανακινούμε τις φιάλες πολύ καλά και τις τοποθετούμε σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης τον οποίο βάζουμε σε λειτουργία. Ο κλίβανος υγρής αποστείρωσης λειτουργεί υπο πίεση 2 atm οπότε ο βρασμός του νερού γίνεται στους 121 ° C. Τον λειτουργούμε σύμφωνα με τις οδηγίες χρήσης του: η στρόφιγγα ασφαλείας πρέπει να είναι ανοιχτή, κλείνουμε τις βίδες χιαστή, γυρνάμε τον διακόπτη θερμοκρασίας στους 121 ° C, όταν περίπου στα 15 min αρχίσουν να βγαίνουν ατμοί κλείνουμε την στρόφιγγα, μετά από 20 περίπου min αφού σφυρίζει η βαλβίδα ασφαλείας γυρνάμε το χρόνο στα 20 min, μετά την λήξη του χρόνου και αφού σφυρίζει στρέφουμε το διακόπτη θερμοκρασίας στους 0° C, ύστερα από λίγο και αφού ο δείκτης του πιεσόμετρου πέσει στο 0 ανοίγουμε τη στρόφιγγα σιγά –σιγά μέχρι να φύγουν όλοι οι υδρατμοί, στη συνέχεια ανοίγουμε το καπάκι προσεχτικά με τη βοήθεια γαντιών προς αποφυγή καψίματος. Μετά την λήξη λειτουργίας του αυτόκαστου το διάλυμα τοποθετείται στο υδατόλουτρο στους 55 C για 15 min, στη συνέχεια μοιράζετε, κάτω από ασηπτικές συνθήκες στη τράπεζα νηματικής ροής αέρα (διαθέτει μικροβιοστατικά φίλτρα που αποστειρώνουν τον αέρα που διέρχεται απ' αυτά και αφετέρου αποστειρώνουν και τον εναέριο χώρο που περικλείεται από τα τοιχώματά της) σε τρυβλία, σε δοκιμαστικούς σωλήνες, ή σε κωνικές φιάλες. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες και οι κωνικές φιάλες αποστειρώνονται στο κλίβανο υγρής αποστείρωσης, αφού σφραγιστούν τα στόμιά τους με αλουμινόχαρτο.

Πριν από κάθε χρήση η τράπεζα νηματικής ροής αέρα καθαρίζεται και απολυμαίνεται με αιθανόλη και τίθεται σε λειτουργία ο θάλαμος. Μετά από 20 min λειτουργίας του θαλάμου, αυτός είναι έτοιμος για την διαδικασία της εμφύτευσης.

Κατόπιν τοποθετούνται στο χώρο της τράπεζας όλα τα απαραίτητα εργαλεία που θα χρησιμοποιηθούν (σωλήνες, λαβίδες, νυστέρια, τρυβλία, πυρίμαχα ποτηράκια). Η έκπλυση των εκφύτων μετά την απολύμανση γίνεται στην τράπεζα.

### 3.1 Φυτικό υλικό (κοπή- μεταφορά μικρομοσχευμάτων- απολύμανση- μεταφύτευση).

Για την εγκατάσταση μιας *in vitro* καλλιέργειας πρέπει καταρχήν να επιλέξουμε τα έκφυτα (οφθαλμούς βολβού και τμήματα βολβού) τα οποία είναι απαραίτητο να προέρχονται από υγιές φυτό, το οποίο να είναι εύρωστο και νεαρής ηλικίας.

Πειραματίστηκα με έκφυτα οφθαλμών βολβού και τμήματα βολβού της ποικιλίας γλαδίου (White Friendship) που πάρθηκαν τέλη του φθινοπώρου.

Όλοι οι βολβοί και βολβίδια αντιμετωπίζουν αυξημένο κίνδυνο μόλυνσεων λόγω του ό,τι το περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσονται είναι επιβαρυνμένο με πλήθος μικροοργανισμών.

Γι' αυτό χρειάζονται προσεχτικοί χειρισμοί και σωστή απολύμανση για να μειωθούν σημαντικά οι μολύνσεις.

Όμως και οι βολβοί και τα βολβίδια από μόνοι τους έχουν αναπτύξει ένα σύστημα προστασίας του εσωτερικού τους από την πληθώρα μικροοργανισμών που υπάρχουν στην εξωτερική επιφάνειά τους. Αυτό χάρη στην συμπαγή δομή τους και την κάλυψή τους εξωτερικά από αρκετούς σκληρούς χιτώνες (περίπου 4).

Έτσι λοιπόν πριν την αφαίρεση των χιτώνων ο βολβός πλένεται καλά με άφθονο νερό ώστε να απομακρυνθούν χώματα ή σκόνες. Στην συνέχεια σκουπίζεται εξωτερικά με ένα βαμβάκι εμποτισμένο με αλκοόλη ή για μεγαλύτερη προστασία τον εμβαπτίζουμε σε γυάλινο δοχείο με αιθανόλη 70% για 4-5 min περίπου.

Έχει μεγάλη σημασία να τηρηθούν σωστά οι κανόνες απολύμανσης γιατί διαφορετικά η καλλιέργεια θα αποτύχει και το αποτέλεσμα της αποτυχίας φαίνεται πολύ νωρίς, δηλαδή τις πρώτες ημέρες είτε με τη μορφή μολύνσεων του θρεπτικού υποστρώματος (δημιουργία μυκηλίου μύκητα ή αποικίας μικροβίων ή και τα δύο) είτε με καφέ χρωματισμό και θάνατο των εκφύτων, λόγω της υπερβολικής έκθεσής τους στο απολυμαντικό.

Έτσι λοιπόν αφαίρεσα τους χιτώνες του βολβού καθώς και τα επιμέρους βράκτια των οφθαλμών οπότε το φυτικό υλικό ήταν έτοιμο να υποστεί την απολύμανση.



Ακολούθησα δύο τρόπους απολύμανσης. Αρχικά έκανα απολύμανση σε ολόκληρο τον βολβό και στην συνέχεια στην τράπεζα νηματικής ροής απομόνωσα τους μασχαλιαίους οφθαλμούς και τους φύτεψα στο θρεπτικό υπόστρωμα, ή έκανα απολύμανση μόνο στους οφθαλμούς (από τους οποίους είχα αφαιρέσει τον προστατευτικό χιτώνα) τους οποίους απέσπασα από τον βολβό μαζί με τμήμα αυτού.

Οι διαστάσεις των εκφύτων ήταν περίπου  $1 \times 1$  mm και το βάθος απόσπασης από τον βολβό περίπου 1-1,5 mm. Και με τους δύο τρόπους δεν παρατήρησα κάποια ουσιαστική διαφορά στο ποσοστό των μολύνσεων.

Η απολύμανση τόσο ολόκληρων των βολβών όσο και μεμονωμένων οφθαλμών έγινε σε διάλυμα κοινής χλωρίνης για 15 min.

Για τα τμήματα του βολβού που χρησιμοποίησα ως έκφυτα απολύμανα ολόκληρο τον βολβό για 2-3 min περίπου, αφού πρώτα τα ξέπλυνα 3 φορές με αποστειρωμένο –απεσταγμένο νερό σε διαφορετικά κάθε φορά γυάλινα δοχεία. Μετά την εμφύτευση των εκφύτων στο απολυμαντικό, όλοι οι άλλοι χειρισμοί έλαβαν χώρα εντός του θαλάμου νηματικής ροής αέρα του οποίου η λειτουργία άρχιζε τουλάχιστον 20 λεπτά νωρίτερα.

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας απολύμανσης και την απομάκρυνση του απολυμαντικού, τα έκφυτα υφίστανται τον τελευταίο χειρισμό που αφορά την τελική μορφή τους λίγο πριν την τοποθέτησή τους στο θρεπτικό υπόστρωμα. Τα έκφυτα των βολβών που είναι μεγαλύτερου μεγέθους κόβονται με το κοφτερό νυστέρι στα δυο τους άκρα. Αυτό έχει σαν στόχο την ανανέωση των τομών ώστε τα φρεσκοερεθισμένα κύτταρα όταν έρχονται σε επαφή με το υπόστρωμα αφενός προσλαμβάνουν ευκολότερα τα θρεπτικά στοιχεία και αφετέρου τίθεται σε λειτουργία το ερέθισμα της πληγής.

Έτσι εμφύτευσα τα τμήματα των βολβών και τους οφθαλμούς στο θρεπτικό υπόστρωμα το οποίο βρίσκεται σε τρυβλία petri. Το θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποίησα στην αρχή τόσο για τους οφθαλμούς των βολβών όσο και για τα τμήματα των βολβών ήταν :

Το θρεπτικό υπόστρωμα A (MS +4,5 % ζάχαρη +100 mg/l μυο-ινοσιτόλη +1mg/l BAP) και το θρεπτικό υπόστρωμα B (MS +4,5 % ζάχαρη +100 mg/l μυο-ινοσιτόλη +2 mg/l BAP), τα οποία διέφεραν μόνο ως προς τη συγκέντρωση της BAP.

Μετά την απολύμανση της τράπεζας νηματικής ροής (ή θαλάμου εμφύτευσης), τοποθετούμε το διάλυμα στην τράπεζα, και την επόμενη μέρα γίνεται η εγκατάσταση των εκφύτων στο υπόστρωμα.

Την εγκατάσταση των εκφύτων (οφθαλμών βολβών, και τμημάτων βολβών) στα υποστρώματα Α και Β ξεκίνησα 1-10-2002.

Με την εγκατάσταση των εκφύτων στο θρεπτικό υπόστρωμα αρχίζει η φάση επαγωγής ή εισόδου των κυττάρων στη διαδικασία αναγέννησης. Η φάση αυτή περιλαμβάνει τις πρώτες μέρες μετά τον εμβολιασμό των εκφύτων. Είναι η κρισιμότερη περίοδος γιατί τα κύτταρα των εκφύτων υφίσταται το shock (τον κραδασμό) από την αλλαγή του περιβάλλοντος.

Τόσο η σύνθεση του υποστρώματος (μέσο ανάπτυξης) όσο και οι συνθήκες του μικροπεριβάλλοντος χώρου διαφέρουν παντελώς εκείνων του μητρικού φυτού (δότη του εκφύτου) και συνεπώς τα κύτταρα οφείλουν να επιδείξουν τη μεγαλύτερη δυνατή ανοχή τους προκειμένου να επιζήσουν στο νέο περιβάλλον. Η περίοδος προσαρμογής μπορεί να είναι λίγες ώρες μέχρι και μερικές εβδομάδες. Η περίοδος της προσαρμογής όχι μόνο επηρεάζει άμεσα τη δυνατότητα επιβίωσης των κυττάρων, αλλά παίζει σημαντικό ρόλο στην παραπέρα πορεία εξέλιξής τους.

Από την στιγμή που τα έκφυτα μας θα επιβιώσουν δηλαδή θα προσαρμοστούν στο καινούργιο περιβάλλον της *in vitro* καλλιέργειας τότε ένα μέρος των κυττάρων τους και κυρίως αυτά της περιφέρειάς τους δέχονται τα ερεθίσματα είτε του μικροπεριβάλλοντος είτε του θρεπτικού μέσου και αρχίζουν να ανταποκρίνονται. Έτσι στην αρχή αποπροσδιορίζονται δηλαδή χάνουν τον αρχικό τους ρόλο που είχαν όταν ήταν ενσωματωμένα στο φυτό –δότη του εκφύτου .

Τα νέα κύτταρα που παράγονται έχουν ορισμένα χαρακτηριστικά που αντανακλούν το νέο τους ρόλο. Ο νέος ρόλος είναι αποτέλεσμα του νέου προσδιορισμού τους. Ο προσδιορισμός αυτός είναι αποτέλεσμα της επίδρασης των ερεθισμάτων που προσλαμβάνουν τα κύτταρα είτε από τα συστατικά του θρεπτικού μέσου (π.χ. ρυθμιστές της ανάπτυξης, βιταμίνες αμινοξέα κ,λπ.) είτε από τις συνθήκες του περιβάλλοντος χώρου. Ο νέος ρόλος εκφράζεται προς τα έξω είτε με την μορφή των ίδιων των κυττάρων (ως μεμονωμένων οντοτήτων), είτε με την μορφή κυτταρικών συνόλων. Για να γίνει αυτό πρέπει τα κύτταρα να έχουν την ικανότητα διαφοροποίησης, ώστε να εκφράσουν τη διαφορά τους από τα κύτταρα του εκφύτου. Η διαφοροποίηση των κυττάρων εκφράζεται με τις μορφογενετικές αλλαγές.

Έτσι εάν τα παραγόμενα κύτταρα είναι παρεγχυματικά (έχουν λεπτά κυτταρικά τοιχώματα, μεγάλα χυμοτόπια και μικρούς πυρήνες) και εξακολουθούν πολλαπλασιαζόμενα να αναπαράγουν τους εαυτούς τους, το παραγόμενο προϊόν μας είναι ο κάλος.

## 2.ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ-ΔΙΑΠΙΣΤΩΣΕΙΣ

### 2.1 Καλογένεση.

Κατά τον Yeoman (1970) ο *in vivo* σχηματισμός κάλου είναι ένα φαινόμενο με μικρή διάρκεια ζωής, ενώ ο *in vitro* σχηματισμός κάλου μπορεί να είναι συνεχής, αρκεί να υπάρχουν ελεγχόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες και κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα. Ο τύπος και ο ρυθμός παραγωγής κάλου εξαρτάται από τη φύση (είδος) του εκφύτου και από τις συνθήκες της *in vitro* καλλιέργειας.

#### 2.1.1 Στάδια καλογένεσης.

Σύμφωνα με τον Aitchison κ. α. (1977) κατά την ανάπτυξη του κάλου από τους ιστούς ενός εκφύτου (στην περίπτωση μας από τμήματα του βολβού του γλαδίου) διακρίνονται τα παρακάτω τρία οντογενετικά στάδια:

**α. Στάδιο της επαγωγής:** Χαρακτηρίζεται από τη δραστηριότητα του μεταβολισμού των κυττάρων, η οποία εξαρτάται από τη φυσιολογική κατάσταση των ιστών του εκφύτου και ρυθμίζεται από τις συνθήκες της *in vitro* καλλιέργειας. Η φυσιολογική κατάσταση των ιστών επηρεάζεται από πλήθος ενδογενών παραγόντων (κληρονομικότητα, ενδογενείς ορμόνες, θρεπτική κατάσταση, βαθμός διαφοροποίησης κ.λπ.). Στις συνθήκες της *in vitro* καλλιέργειας υπάγονται οι περιβαλλοντικές παράμετροι (φως θερμοκρασία, υγρασία, κυκλοφορία αέρα κ.λπ.) και η σύνθεση του θρεπτικού υποστρώματος.

**β. Στάδιο των κυτταροδιαϊρέσεων:** Μετά τη δραστηριοποίηση του μεταβολισμού τους τα κύτταρα της περιφέρειας του εκφύτου, και ιδιαίτερα εκείνα που έρχονται σε επαφή με το θρεπτικό υπόστρωμα, αρχίζουν να διαιρούνται οπότε παράγονται τα θυγατρικά τους. Στη συνέχεια τα θυγατρικά κύτταρα υφίστανται και αυτά την κυτταροδιαίρεση και το φαινόμενο επαναλαμβάνεται συνεχώς, έτσι που το προϊόν τους είναι η άμορφη μάζα που ονομάζεται κάλος. Κατά τη διαδικασία αυτή είναι φανερό ότι τα αρχικά κύτταρα του εκφύτου αποπροσδιορίζονται και έτσι τα παραγόμενα κύτταρα είναι κυρίως παρεγχυματικά.

**γ. Στάδιο διαφοροποίησης:** Τα παραγόμενα παρεγχυματικά κύτταρα, ανάλογα με τη σύνθεση του θρεπτικού υποστρώματος και κυρίως την παρουσία ορμονών, προσδιορίζονται εκ νέου και εμφανίζονται προς τα έξω με διαφοροποιημένες μορφογενετικές εκφράσεις (π.χ. μεριστωματικά κύτταρα, κύτταρα ξύλου, αναπαραγωγικά κύτταρα).

Τα θρεπτικά υποστρώματά μας Α και Β είναι εφοδιασμένα με την ορμόνη ανάπτυξης ΒΑΡ (συγκέντρωσης 1mg/l και 2mg/l αντίστοιχα). Η ανάπτυξη του κάλου έγινε ορατή μετά από 2 εβδομάδες καλλιέργειας σε αυτά τα υποστρώματα.

Για τη διατήρηση του κάλου σε ενεργό δραστηριότητα σε τακτά χρονικά διαστήματα μετέφερα τη μάζα του κάλου, ή τμήματα του κάλου (εάν αυτός ήταν μεγάλων διαστάσεων) σε φρέσκα θρεπτικά υποστρώματα, επειδή η παραμονή του κάλου στο ίδιο υπόστρωμα για μακρά χρονική περίοδο προκαλεί στασιμότητα τόσο στην παραγωγή νέων κυττάρων όσο και στην ανάπτυξη των ίδιων των κυττάρων.

Αυτό οφείλεται κυρίως στην εξάντληση των θρεπτικών στοιχείων, στη σταδιακή αποδιοργάνωση της πηκτής της αгарόζης, στα μειωμένα επίπεδα υγρασίας του υποστρώματος και του μικροπεριβάλλοντος, στον μεγάλο αριθμό κυττάρων στον περιορισμένο χώρο του δοχείου καλλιέργειας, στη συσσώρευση στο υπόστρωμα υψηλών συγκεντρώσεων τοξικών ουσιών που εκκρίνονται από τα κύτταρα και στην γήρανση των ιδίων κυττάρων.

Η ανανέωση των καλλιεργειών κάλου γινόταν κάθε 3 έως 6 εβδομάδες. Ο χρόνος περάσματος από τη μία καλλιέργεια στην άλλη εξαρτιώταν αποκλειστικά από το ρυθμό ανάπτυξης του κάλου. Οι καλλιέργειες που ακολούθησαν την αρχική καλλιέργεια καλούνται επανακαλλιέργειες ή υποκαλλιέργειες. Η επιτυχία μιας επανακαλλιέργειας εξαρτάται και από το μέγεθος του κάλου το οποίο δεν πρέπει να είναι ούτε μεγάλο ούτε πολύ μικρό. Για μεγάλο κομμάτι κάλου απαιτούνται συχνότερες επανακαλλιέργειες, ενώ πολύ μικρό μέγεθος μεταφερόμενου κάλου πιθανόν να προκαλέσει μικρό ρυθμό ανάπτυξης ή πλήρη στασιμότητα στην ανάπτυξη του κάλου. Έτσι το μέγεθος του μεταφερόμενου κάλου ήταν 5-10 mm ή είχε βάρος 20-100 mg.



### 2.1.2 Φάσεις ανάπτυξης κάλου.

Η ανάπτυξη του κάλου θεωρητικά ακολουθεί μία τυπική σιγμοειδή καμπύλη (εικ. 4) όπου διακρίνονται οι εξής φάσεις:

**α. Φάση υστέρησης:** κατά την οποία τα κύτταρα προετοιμάζονται να επιζήσουν στο νέο περιβάλλον.

**β. Εκθετική φάση:** όπου ο ρυθμός των κυτταροδιαίρέσεων είναι μέγιστος.

**γ. Γραμμική φάση:** όπου ο ρυθμός των κυτταροδιαίρέσεων, μονολότι μικρότερος της προηγούμενης φάσης, παραμένει σταθερός, όμως ο ρυθμός διόγκωσης των κυττάρων αυξάνεται.

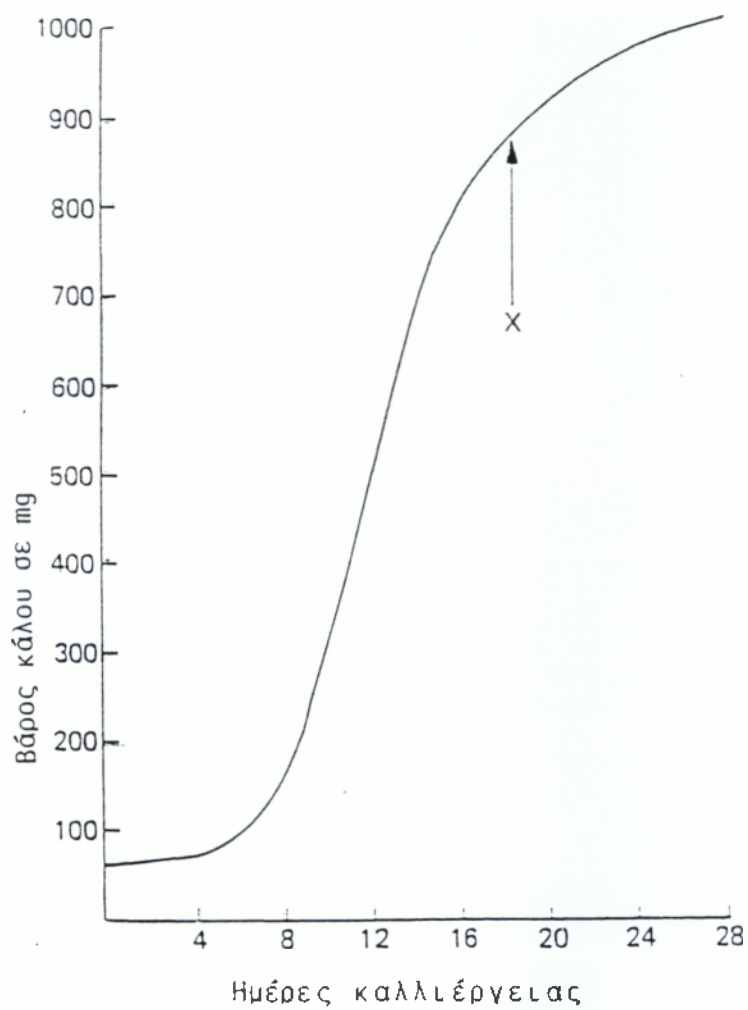
**δ. Φάση επιβράδυνσης:** όπου ο ρυθμός τόσο των κυτταροδιαίρέσεων όσο και της διόγκωσης των κυττάρων ελαττώνεται.

**ε. Φάση στασιμότητας:** όπου ο αριθμός και το μέγεθος των κυττάρων παραμένουν σταθεροί.

**στ. Φάση παρακμής:** όπου παρατηρείται λύση των κυττάρων. Η φάση αυτή εκδηλώνεται κυρίως σε γερασμένες καλλιέργειες.

Κατά την μεταφορά τμημάτων κάλου από καλλιέργεια σε υποκαλλιέργεια πρέπει να λαμβάνονται μόνο υγιή τεμάχια και να απορρίπτονται περιοχές του κάλου με νεκρωμένα ή μεταχρωματισμένα καφετί ή μαυρισμένα κύτταρα.

Έτσι συνέχισα την υποκαλλιέργεια του κάλου μέχρι 28-12-2002 και συγκέντρωσα αξιόλογο αριθμό τεμαχίων κάλου, τα οποία σε δεύτερη φάση θα μου εξασφάλιζαν εκ νέου τον προσδιορισμό των κυττάρων και προς τα έξω την εμφάνιση των διαφοροποιημένων μορφογενετικών εκφράσεων (μεριστωματικά κύτταρα, αναπαραγωγικά κύτταρα).



Εικόνα 4. Καμπύλη ανάπτυξης μιας τυπικής καλλιέργειας κάλλου. Η καλύτερη στιγμή για τη λήψη τεμαχίων κάλλου για υποκαλλιέργεια είναι η υποδεικνυόμενη με το βέλος. (πηγή Κανάκης, 2001)

## 2.2 Οργανογένεση.

Κατά τη διαδικασία της οργανογένεσης στα έκφυτα σχηματίζονται αρχικά τα μεριστωμοειδή ή μεριστωματοειδή. Κατά τους Bunning (1952), Torrey (1966), Thorpe (1966), Thorpe & Murashige (1970), Ross και συνεργάτες του (1973) και Thorpe (1978) μεριστωματοειδή είναι εξειδικευμένες ομάδες κυττάρων με ικανότητα οργανογένεσης.

Στις 20-12-2002 είχα την παρουσία μορφογενετικών εκφράσεων δηλαδή παρουσία μεριστωμάτων.

Από τις αρχές Ιανουαρίου 2003 και συγκεκριμένα 8-1-2003 ξεκίνησα τις μετρήσεις για τον ρυθμό αναπολλαπλασιασμού των μεριστωμάτων (Σχήματα 1, 2, ρυθμός αναγέννησης των οφθαλμών). Στη συνέχεια τους οφθαλμούς τους ξεχώρισα και τους εγκατέστησα στα παρακάτω θρεπτικά υποστρώματα. Στο MS+4,5 % ζάχαρη+100mg/l μνο-ινοσιτόλη +0,7% agar+1mg/l BAP, στο MS +4,5 % ζάχαρη+100mg/l μνο-ινοσιτόλη +0,7% agar+2mg/l BAP και στο υπόστρωμα MS+ (4,5% ζάχαρη +100mg μνο-ινοσιτόλη+0,7% agar+2mg/l BAP +0,01 NAA mg/l. Μετά από μια εβδομάδα (στις 16-01-2003) συνέχισα την μέτρηση των παραχθέντων μεριστωμάτων ακολούθησαν άλλες δύο μετρήσεις (στις 24-01-2003) και (στις 04-02-2003).

Τα μεριστώματα ακολούθησαν την διαδικασία σχηματισμού φυτικών οργάνων. Και εδώ έχουμε ταχύτατη παραγωγή οργάνων και συγκεκριμένα οφθαλμών δηλαδή με τη πάροδο λίγων ημερών στη περιφέρεια του έκφυτου συνυπάρχει μεγάλος αριθμός οφθαλμών και μικρών βλαστών (καλείται στάδιο συστάδας βλαστών ή εμπορικά –τούφα) (Φωτογραφία Β: αριθμός 4). Στην περίπτωση αυτή έχουμε την αποκαλούμενη έμμεση οργανογένεση.

**ΕΜΜΕΣΗ ΟΡΓΑΝΟΓΕΝΕΣΗ** (Φωτογραφία Β: αριθμοί 1,2,3,4,5,6,7).

Η έμμεση οργανογένεση παρίσταται γραμμικά ως εξής: αρχικό έκφυτο-παραγωγή κάλου- μεριστωματοειδή –όργανα (βλαστοί)

Όταν το κύριο ενδιαφέρον μιας *in vitro* καλλιέργειας είναι η απόκτηση τέλειων φυτών, ο σχηματισμός κάλου από τα έκφυτα είναι ανεπιθύμητος για δύο κυρίως λόγους: α) η χρωμοσωμική σύσταση των κυττάρων του κάλου είναι ασταθής και β) η πιθανότητα επίτευξης μιας κριτικής ανάλυσης των κυτταρικών περιστατικών που συμβαίνουν σε ένα πληθυσμό μεριστωματικών δομών περιστοιχισμένων από μία μάζα κάλου είναι δύσκολη έως αδύνατη.

Η δυσκολία συνίσταται στο γεγονός ότι η αναλογία των μεριστωματικών κυττάρων προς τη συνολική μάζα του κάλου είναι πολύ μικρή.

Στις 10-02-2003 μεταφύτευσα τους μικρούς βλαστούς σε θρεπτικά υποστρώματα τα οποία περιείχαν MS+2% ζάχαρη +100 mg/l μυο-ινοσιτόλη +0,01mg/l NAA ή 0,05mg/l NAA) + 0,4% agar, επίσης σε MS+2% ζάχαρη +100 mg/l μυο-ινοσιτόλη +0,4% agar +0,1mg/l NAA και σε θρεπτικό μέσο MS+ 2% ζάχαρη +100mg/l μυο-ινοσιτόλη +0,4% agar +0,5mg/l NAA για τη ριζοβολία των βλαστών αυτών (Φωτογραφία Β: Έμμεση οργανογένεση αριθμοί 4,5) (Φωτογραφία Γ: αριθμοί 1,2,3,4,5,). Στις 12-03-2003 είχαμε ταυτόχρονη ανάπτυξη βλαστών και ριζών. Και μάλιστα οι βλαστοί ήταν λεπτοί πράσινου χρώματος (Φωτογραφία Δ: αριθμοί 1,2,3,4,5,). Στο τέλος Απριλίου 2003 μετέφερα τα τέλεια φυτά σε συνθήκες σκληραγώγησης (Φωτογραφία Δ: αριθμοί 7,8,). Δηλαδή απομάκρυνα τα τέλεια φυτά από τις κωνικές φιάλες, τα ξέπλυνα από τα υπολλείματα των θρεπτικών μέσων και του άγαρ. Τούτο είναι επιβεβλημένο επειδή το άγαρ του θρεπτικού μέσου αποτελεί άριστη τροφή για τους παθογόνους και τους σαπροφυτικούς οργανισμούς, οι οποίοι τελικά καταστρέφουν τις υπάρχουσες ρίζες και παρεμποδίζουν την έκπτυξη νέων ριζών. Η κατάσταση αυτή οδηγεί ταχύτητα στο θάνατο των νεαρών φυτών και συνεπώς στην αποτυχία της όλης προσπάθειας. Τα νεαρά φυτά μεταφυτεύθηκαν σε μικρά φυτοδοχεία, τα οποία ήταν γεμισμένα με καλής ποιότητας κομπόστα ή εδαφικό μείγμα και περλίτη. Μεταφέρθηκαν στο θάλαμο σκληραγώγησης ώστε να εγκλιματιστούν και να μπορέσουν να συνεχίσουν να αναπτυχθούν κανονικά και στις συνθήκες του φυσικού περιβάλλοντος. Στο νέο τους περιβάλλον ειδικά τις πρώτες ώρες και ημέρες μετά τη μεταφύτευση, τα νεαρά φυτά έχουν ανάγκη σχετικά υψηλών θερμοκρασιών, παρόμοιων εκείνων που παρέχονταν στους θαλάμους των *in vitro* καλλιέργειών (20 –25 °C) και πολύ υψηλών επιπέδων σχετικής υγρασίας (100%). Τέτοια επίπεδα σχετικής υγρασίας επιβάλλονται εκ του γεγονότος ότι η λειτουργικότητα της εφυμενίδας στα *in vitro* παραγόμενα φυτά είναι μειωμένη, λόγω της μειωμένης εναπόθεσης κηρώδους ουσίας επί του ελάσματος των φύλλων. Τόσο υψηλά επίπεδα σχετικής υγρασίας πετυχαίνονται με την κάλυψη των φυτοδοχείων με γυάλινο σκεύος και με συχνό πότισμα ώστε να δημιουργηθούν συνθήκες υδρονέφωσης. Κάτω από τέτοιες συνθήκες τα φυτά παράγουν νέες ρίζες με τις οποίες προσλαμβάνουν το νερό και τα θρεπτικά στοιχεία από το εδαφικό μείγμα. Έχει παρατηρηθεί ότι οι ρίζες που το φυτό απέκτησε στην *in vitro* καλλιέργεια καταστρέφονται στο νέο περιβάλλον μετά την πάροδο 2-4 ημερών από τη μεταφύτευση.



Από το στάδιο σχηματισμού 3-5 νέων ριζών, γεγονός που διαρκεί 5-10 ημέρες μετά τη μεταφύτευση, αρχίζει η διαδικασία μείωσης της σχετικής υγρασίας στο περιβάλλοντα χώρο. Η μείωση είναι βαθμιαία και επιτυγχάνεται με την αραίωση των ποτισμάτων και ταυτόχρονα με το σταδιακό άνοιγμα του γυάλινου δοχείου με το οποίο έχουμε σκεπάσει τα φυτοδοχεία. Ταυτόχρονα με τη μείωση της σχετικής υγρασίας γίνεται και προοδευτική μείωση της θερμοκρασίας. Όταν τόσο η θερμοκρασία όσο και η υγρασία πέσουν στα επίπεδα του φυσικού περιβάλλοντος τα φυτά έχουν ολοκληρώσει τη σκληραγώγησή τους.

Βέβαια στο πείραμα, εκτός από την έμμεση οργανογένεση είχαμε και την απευθείας παραγωγή μεριστωματοειδών, όταν στα ίδια υποστρώματα ως έκφυτα χρησιμοποίησα μικρά τεμάχια βολβού γλαδίου. Δηλαδή έχουμε άμεση ή απευθείας οργανογένεση η οποία γραμμικά παρίσταται ως εξής: αρχικό έκφυτο- παραγωγή μεριστωματοειδών- παραγωγή οργάνων (π.χ. βλαστών). Στην αρχή τα έκφυτα εγκατέστησα στα θρεπτικά υποστρώματα Α (MS+4,5 % ζάχαρη +100mg/l μυο-ινοσιτόλη+1mg/l BAP)+0,7% agar, Β (MS+4,5% ζάχαρη +100mg/l μυο-ινοσιτόλη +2mg/l BAP) +0,7% agar, και Γ (MS+4,5% ζάχαρη+100mg/l μυο-ινοσιτόλη +2mg/l BAP+0,01mg/l NAA) +0,7% agar έχουμε την παραγωγή οφθαλμών και στη συνέχεια παραγωγή βλαστών (Φωτογραφία Α: αριθμοί 1,2,3,4,5) τους οποίους εγκατέστησα σε νέα θρεπτικά υποστρώματα MS+4,5% ζάχαρη +100mg/l μυο-ινοσιτόλη +0,25mg/l BAP +0,7% agar και MS +3% ζάχαρη+100mg/l μυο-ινοσιτόλη +0,2mg/l BAP +0,7% agar για την ανάπτυξη των βλαστών (Φωτογραφία Α: 6,7,8,9). Στη συνέχεια τους βλαστούς μετέφερα στα θρεπτικά υποστρώματα MS +3% ζάχαρη +100mg/l μυο-ινοσιτόλη +0,5mg/l NAA +0,4% agar και MS+3% ζάχαρη +100mg/l μυο-ινοσιτόλη +0,1mg/l NAA) +0,4% agar για ριζοβόληση (Φωτογραφία Γ: 5,6). Μετά από ένα μήνα είχαμε την ανάπτυξη ριζών (Φωτογραφία Δ: αριθμοί 6,9,10). Τα ριζοβολημένα φυτά μετέφερα (18-03-03) σε νέο θρεπτικό υπόστρωμα MS+3% ζάχαρη +100mg/l μυο-ινοσιτόλη +0,7% agar (Φωτογραφία Δ: αριθμοί 11,12,13,14), (Φωτογραφία Α: 10,11,12). Σε αυτό το υπόστρωμα αναπτύχθηκαν περισσότερο και μετά από 2,5 μήνες από την εγκατάστασή τους είχαμε το σχηματισμό βολβιδίων (17-05-03). Η παραμονή τους στο ίδιο υπόστρωμα ευνόησε την διόγκωση των βολβιδίων.



### 3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ (ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ-ΣΧΟΛΙΑΣΜΟΣ)

Στη φύτευση των εκφύτων στο θρεπτικό μέσο A (MS +2mg/l BAP) και στο θρεπτικό μέσο B (MS +1mg/l BAP) είχαμε α) σχηματισμό κάλου και β)σχηματισμό μεριστωματοειδών (με την άμεση οργανογένεση) μετά από την επανακαλλιέργειά τους ακολούθησε ο σχηματισμός οφθαλμών. Μετά από την παραμονή τους για δύο μήνες (κάθε μήνα μεταφέρονταν σε φρέσκο υπόστρωμα) στα υποστρώματα αυτά έκανα μετρήσεις για να προσδιορίσω το ρυθμό αναπολλαπλασιασμού των οφθαλμών από αρχές Ιανουαρίου 2003 έως τις αρχές Φεβρουαρίου 2003 (8-01-2003 μέχρι 04-02-2003). Διαπίστωσα ότι για μεν το θρεπτικό υπόστρωμα MS +2mg/l BAP ο μέσος όρος των οφθαλμών που αναγεννήθηκαν ανα έκφυτο αναπτύχθηκε την πρώτη εβδομάδα ήταν 4,5, τη δεύτερη 8,9, την τρίτη 14,2 και την τέταρτη 24,7 (Σχήμα 1).

Για το θρεπτικό υπόστρωμα MS+1mg/l BAP ο μέσος όρος των οφθαλμών που αναγεννήθηκαν την πρώτη εβδομάδα ήταν 9, τη δεύτερη 12,4, την τρίτη 25,4 και την τέταρτη 28,1 (Σχήμα 1).

Τέλος για το θρεπτικό υπόστρωμα MS +2mg/l BAP+0,01 mg/l NAA ο μέσος όρος των οφθαλμών που αναγεννήθηκαν ανα έκφυτο την πρώτη εβδομάδα ήταν 6,0 τη δεύτερη 13,9, την τρίτη 22,5, και την τέταρτη 31,1.

Από τα παραπάνω διαπίστωσα ότι το θρεπτικό υπόστρωμα MS+2mg/l BAP+0,01mg/l NAA έχει το μεγαλύτερο μέσο όρο οφθαλμών. Ακολουθεί το θρεπτικό υπόστρωμα MS +1mg/l BAP και τελευταίο το θρεπτικό υπόστρωμα MS +2 mg/l BAP (σχήματα 1,2,3,). Από τα αποτελέσματα αυτά θα μπορούσε κανείς να υποθέσει ότι η άριστη συγκέντρωση BAP για την αναγέννηση οφθαλμών από μεριστωματικά έκφυτα είναι μικρότερη από 2mg/l και πιθανώς να βρίσκεται κοντά στο 1mg/l. Συγκεντρώσεις BAP ίσες με 2mg/l ή και μεγαλύτερες δρούν ανασταλτικά (συμπιέζουν) επι της διαδικασίας παραγωγής νέων επίκτητων οφθαλμών και η ανασταλτική της δράση αίρεται από την παρουσία στο θρεπτικό υπόστρωμα της αυξίνης NAA σε συγκέντρωση 0,01mg/l, οπότε η ένταση της οργανογέννησης αποκαθίσταται και πάλι και μάλιστα σε υψηλότερα επίπεδα (Σχήμα 3).

Παρατήρησα ότι οι παραχθέντες οφθαλμοί όσο παρέμεναν στα παραπάνω θρεπτικά υποστρώματα, παρουσίαζαν αργή ανάπτυξη και παρήγαγαν βλαστούς ύψους μέχρι ενός εκατοστού και ειδικότερα στα υποστρώματα MS +2mg/l BAP και MS +2mg/l BAP+0,01mg/l NAA.

Στο υπόστρωμα MS +2mg/l BAP + 0,01 mg/l NAA είχαμε αργή ανάπτυξη των βλαστών (επειδή η συγκέντρωση ίσες με 2mg/l BAP αναστέλει την παραγωγή βλαστών ικανοποιητικού ύψους αλλά αναστέλει και την ανάπτυξη μικρών σαρκωδών ριζών). Στο υπόστρωμα MS +1mg/l BAP εμφανίστηκαν οι περισσότεροι βλαστοί, οι οποίοι ήταν αφενός μεγαλύτερου μήκους και αφετέρου συνοδευόταν από την ταυτόχρονη παρουσία ριζών. Αργότερα όταν τους βλαστούς αυτούς τους εγκατέστησα σε διαλύματα με μικρότερες συγκεντρώσεις BAP (0,25mg/l και 0,2mg/l) παρατήρησα ότι είχαν καλύτερη και γρηγορότερη ανάπτυξη. Αφού διαχώρησα τους βλαστούς, τους εμφύτευσα σε κωνικές φιάλες οι οποίες περιείχαν υπόστρωμα MS. Το υπόστρωμα MS χωρίς ορμόνη το ονόμασα «υπόστρωμα ανάπτυξης των βλαστών». Μετά από 20 ημέρες τα έκφυτα βλαστών είχαν το πάχος εκείνων που αναπτύχθηκαν *in vivo*. Για βλαστούς οι οποίοι δεν είχαν σχηματίσει ρίζες στο υπόστρωμα ανάπτυξης βλαστών ή σε άλλα υποστρώματα αναγέννησης βλαστών, χρησιμοποίησα ειδικά υποστρώματα ριζοβόλησης. Αυτά αποτελούνταν από τα βασικά συστατικά του MS στα οποία προστέθηκε η αυξίνη NAA σε διάφορα επίπεδα συγκέντρωσης ήτοι 0,01, 0,05, 0,1 και 0,5mg/l. Διαπιστώσα ότι τα υποστρώματα αυτά τα οποία βοήθησαν τη ριζοβόληση, είχαν ως αποτέλεσμα την ταυτόχρονη ανάπτυξη των μικρών βλαστών σε βλαστούς των οποίων το μήκος μετά πάροδο 3,5 εβδομάδων καλλιέργειας, έφθανε μέχρι τα 7 εκατοστά. Το καλύτερο υπόστρωμα για την ταυτόχρονη ανάπτυξη των βλαστών ήταν εκείνο που περιείχε 0,05mg/l NAA. Μετά τη διαπίστωση αυτή πραγματοποίησα συγκριτικό πείραμα κατά το οποίο εξέτασα το ρόλο των υποστρωμάτων που περιείχαν διάφορες συγκεντρώσεις της BAP σε σχέση με εκείνο που περιείχε ως μοναδική ορμόνη τα 0,05mg/l NAA. Τα αποτελέσματα του πειράματος αυτού φαίνονται στα ιστογράμματα του Σχήματος 4. Δηλαδή ο μέσος αριθμός των βλαστών που αναπτύχθηκαν ικανοποιητικά ανα έκφυτο ήταν ως εξής: στο υπόστρωμα MS+ 0,25mg/l BAP 2,77, στο MS +2mg/l 0,77, στο MS +1mg/l 1,03, στο MS +2mg/l +0,01mg/l NAA 0,7, και στο MS +0,05mg/l NAA 12,8, βλαστοί ανα έκφυτο. Έτσι προκύπτει ότι η NAA σε συγκέντρωση 0,05mg/l υπερέχει όλων των δοκιμασθέντων συγκεντρώσεων της BAP (είτε ως μόνης είτε σε συνδυασμό με 0,01mg/l NAA) σε ό,τι αφορά την παραγωγή ριζοβολημένων βλαστών ικανού μήκους, ώστε αυτοί να είναι έτοιμοι για τη μεταφορά τους σε συνθήκες σκληραγωγής και έπειτα σε συνθήκες φυσικού περιβάλλοντος.

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα μελέτη έγινε με σκοπό την όσο το δυνατόν καλύτερη αξιοποίηση των πλεονεκτημάτων της *in vitro* τεχνικής στον πολλαπλασιασμό του Gladiolus sp.

Χρησιμοποίησα δύο τρόπους για τον πολλαπλασιασμό του γλαδίου *in vitro* η οποία σχηματικά (γραμμικά) μπορούν να παρουσιαστούν ως εξής:

1. Τμήματα από τη βάση του βολβού του γλαδίου –σχηματισμός κάλου – αναγέννηση οφθαλμών (εμφάνιση μεριστωμάτων) –βλαστοί – αναπολλαπλασιασμός βλαστών –ριζοβολία βλαστών.
2. Οφθαλμοί που βρίσκονται στη βάση του βολβού του γλαδίου – αναπολλαπλασιασμός οφθαλμών –φυτάρια –διαχωρισμός των φυταρίων –ριζοβολία *in vitro*.

Από τα διάφορα θρεπτικά υποστρώματα και έκφυτα που χρησιμοποίησα κατέληξα σε μερικά συμπεράσματα ως εξής:

1. Στο θρεπτικό υπόστρωμα MS+1mg/l BAP είχα την παραγωγή 1 έως 2 ικανοποιητικά ανεπτυγμένων βλαστών.
2. Στο θρεπτικό υπόστρωμα MS+2mg/l BAP δεν υπήρξε ικανοποιητική παραγωγή βλαστών. Το μήκος των βλαστών αυτών ήταν μερικά μόνο χιλιοστά για όσο διάστημα παρέμεναν στο ίδιο υπόστρωμα δεν είχαμε ανάπτυξή τους.

Όταν τα έκφυτα μεταφέρονται σε άλλο θρεπτικό υπόστρωμα με μικρότερη συγκέντρωση BAP η ανάπτυξη των βλαστών ήταν πιο αισθητή, δηλαδή σε MS+0.25mg/l BAP ή MS+0,2mg/l BAP.

3. Τα θρεπτικά υποστρώματα MS+ 1mg/l BAP, MS+2 mg/l BAP και MS+2mg/l BAP+0,01 mg/l NAA ήταν ικανά να βοηθήσουν τα έκφυτα να παράγουν μεριστωματικά κύτταρα, τα οποία οδήγησαν στο σχηματισμό οφθαλμών. Καλύτερο από τα τρία υποστρώματα για έκπτυξη περισσότερων οφθαλμών ήταν το MS +2 mg/l BAP +0,01 mg/l NAA.

Παρατήρησα ότι σε μερικά τρυβλία στα υποστρώματα MS+2mg/l BAP και MS+1mg/l BAP από τα έκφυτα εκπύχθηκαν ρίζες.

Διαπίστωσα επίσης ότι στη περιφέρεια των εκφύτων συνυπήρχε μεγάλος αριθμός οφθαλμών και μικρών βλαστών (τούφα).

Στο στάδιο αυτό και προκειμένου να αυξηθεί ακόμη περισσότερο ο αριθμός των παραγόμενων οργάνων (βλαστών) τεμάχισα τα έκφυτα και τα μετάφερα σε ανανεωμένα και φρέσκα θρεπτικά υποστρώματα MS +0,25 mg/l BAP, και MS+0,2 mg/l BAP. Εκεί τα νέα έκφυτα όχι μόνο διατήρησαν αλλά αύξησαν την ικανότητά τους να παράγουν νέα όργανα με αποτέλεσμα οι ρυθμοί αναπαραγωγής να είναι μεγάλοι.

4. Η καλλιέργεια των εκφύτων στα θρεπτικά υποστρώματα MS+0,25mg/l BAP και MS +0,2 mg/l BAP οδήγησαν και στην ανάπτυξη μερικών μόνο βλαστών, επειδή ο συνωστισμός μεριστωμάτων σε συνδυασμό με τη σύνθεση του υποστρώματος (που ευνοεί την παραγωγή μεριστωμάτων) επιτρέπει μόνο σε λίγους βλαστούς να αναπτυχθούν. Έτσι επιβάλλεται η απομάκρυνση των ήδη ανεπτυγμένων βλαστών και η μεταφορά τους σε φρέσκα θρεπτικά υποστρώματα τα οποία στερούνται παντελώς ορμονών ή περιέχουν ελάχιστες συγκεντρώσεις αυξίνης. Τα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήσα ήταν MS χωρίς καμμία ορμόνη, και MS+0,1 mg/l NAA, MS+0,5mg/l NAA, MS+0,01 mg/l NAA, και MS+0,05mg/l NAA.

Διαπίστωσα ότι οι βλαστοί απέκτησαν κατά ύψος αύξηση αλλά ήταν πολύ λεπτοί και παρήγαγαν ρίζες.

5. Όταν τα νεαρά φυτά απέκτησαν 2-4 ρίζες και ανάλογο ύψος (μεγαλύτερο από 4 εκατοστά) τα απομάκρυνα από τις κωνικές φιάλες, τα καθάρισα καλά ώστε οι ρίζες τους να απαλλαγούν από το θρεπτικό υπόστρωμα και τα τοποθέτησα σε φυτοδοχεία τα οποία είχαν εδαφικό μείγμα και περλίτη. Εκεί παρέμειναν όσο χρειάστηκε να εγκλιματιστούν στις συνθήκες φυσικού περιβάλλοντος.

6. Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας σκληραγώγησης τα φυτά απέκτησαν αρκετές ρίζες και μπόρεσαν έτσι να ικανοποιήσουν τις ανάγκες των υπέργειων τμημάτων τους σε νερό και ανόργανα θρεπτικά στοιχεία, ενώ παράλληλα οι βλαστοί θα έχουν αποκτήσει το ανάλογο πάχος και την απαραίτητη φυλλική επιφάνεια για ικανοποιητική φωτοσύνθεση.

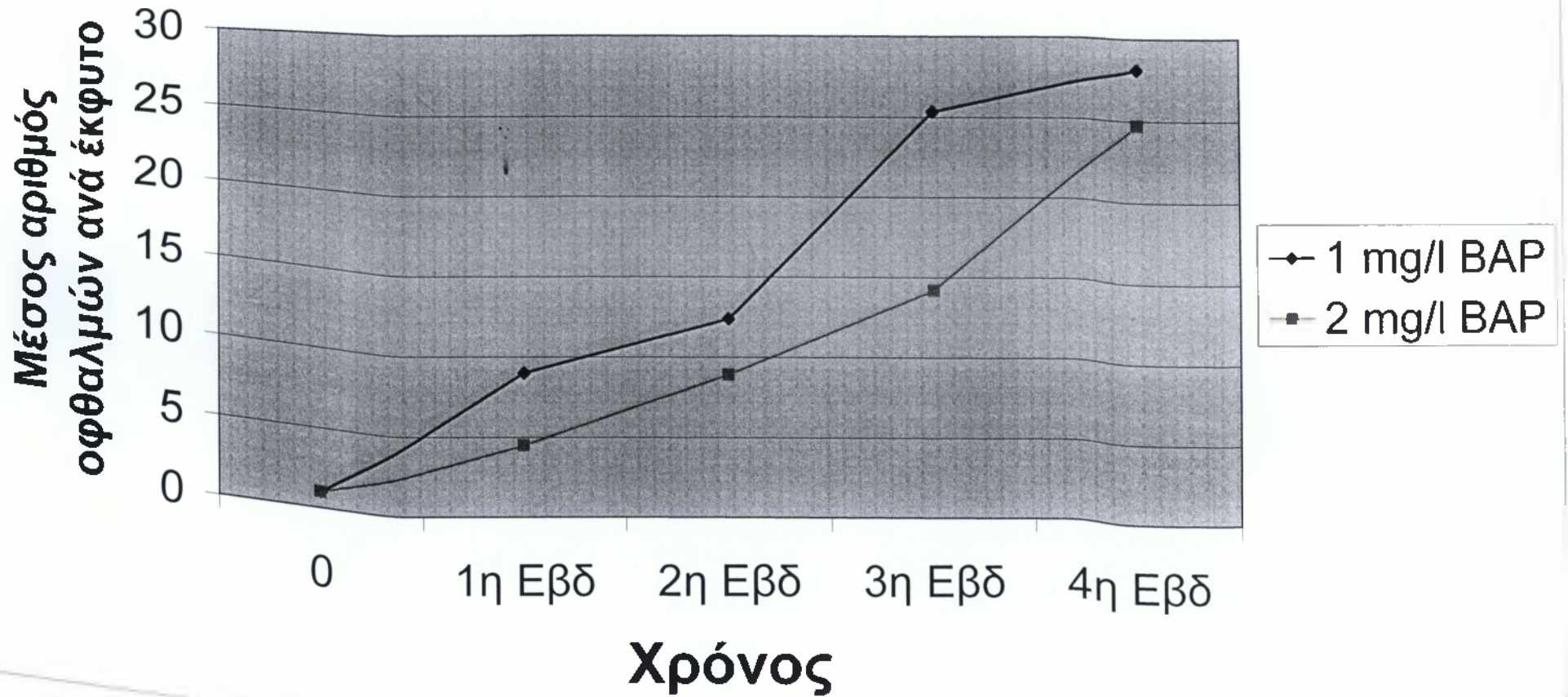
Έτσι τα φυτά ήταν έτοιμα να μεταφερθούν στην οριστική τους θέση στο χωράφι για την περαιτέρω ανάπτυξή τους.

## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Α

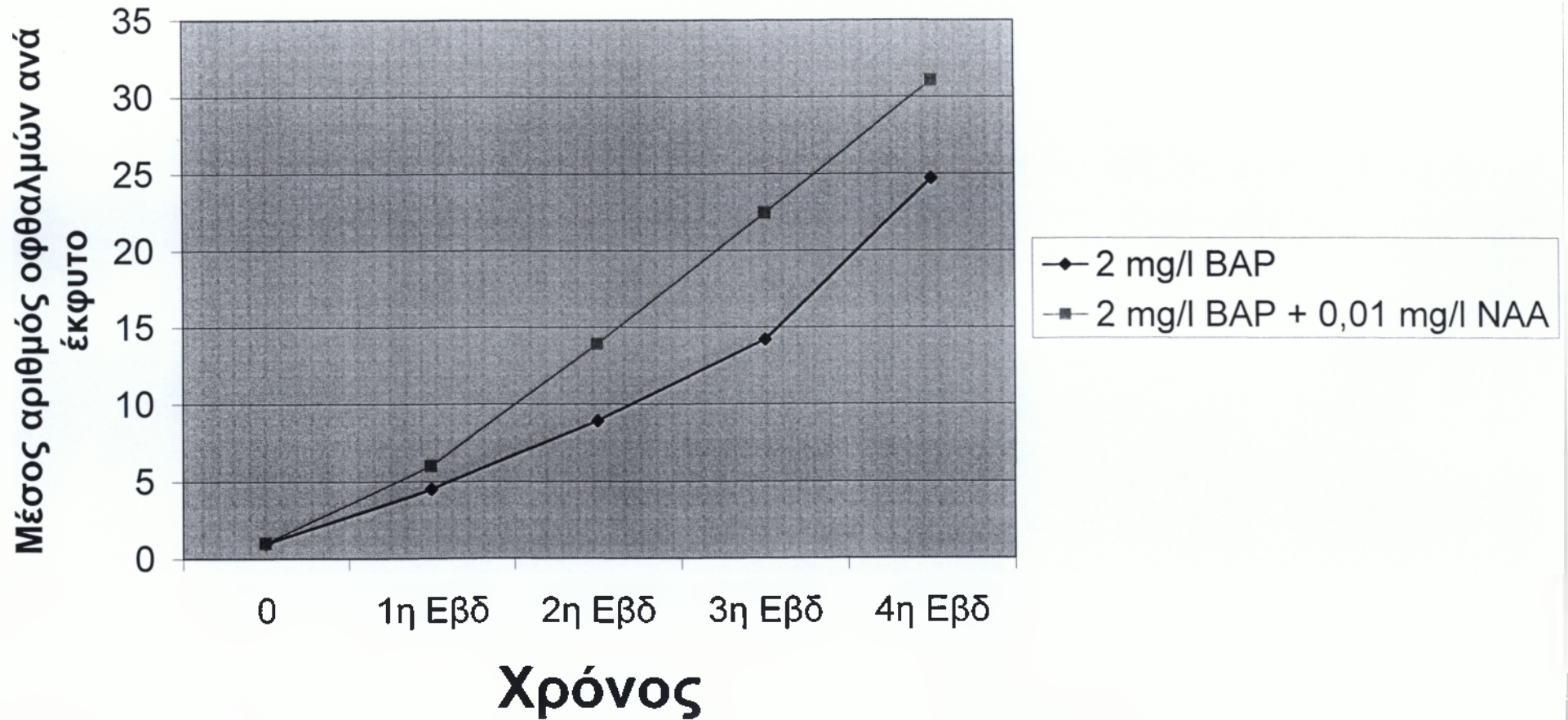
(Γραφικές παραστάσεις και ιστογράμματα)



**Σχήμα 1. ΡΥΘΜΟΣ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗΣ ΟΦΘΑΛΜΩΝ ΤΙΣ 4 ΠΡΩΤΕΣ ΕΒΔΟΜΑΔΕΣ ΑΠΟ *IN VITRO* ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΕΡΙΣΤΩΜΑΤΙΚΩΝ ΕΚΦΥΤΩΝ**

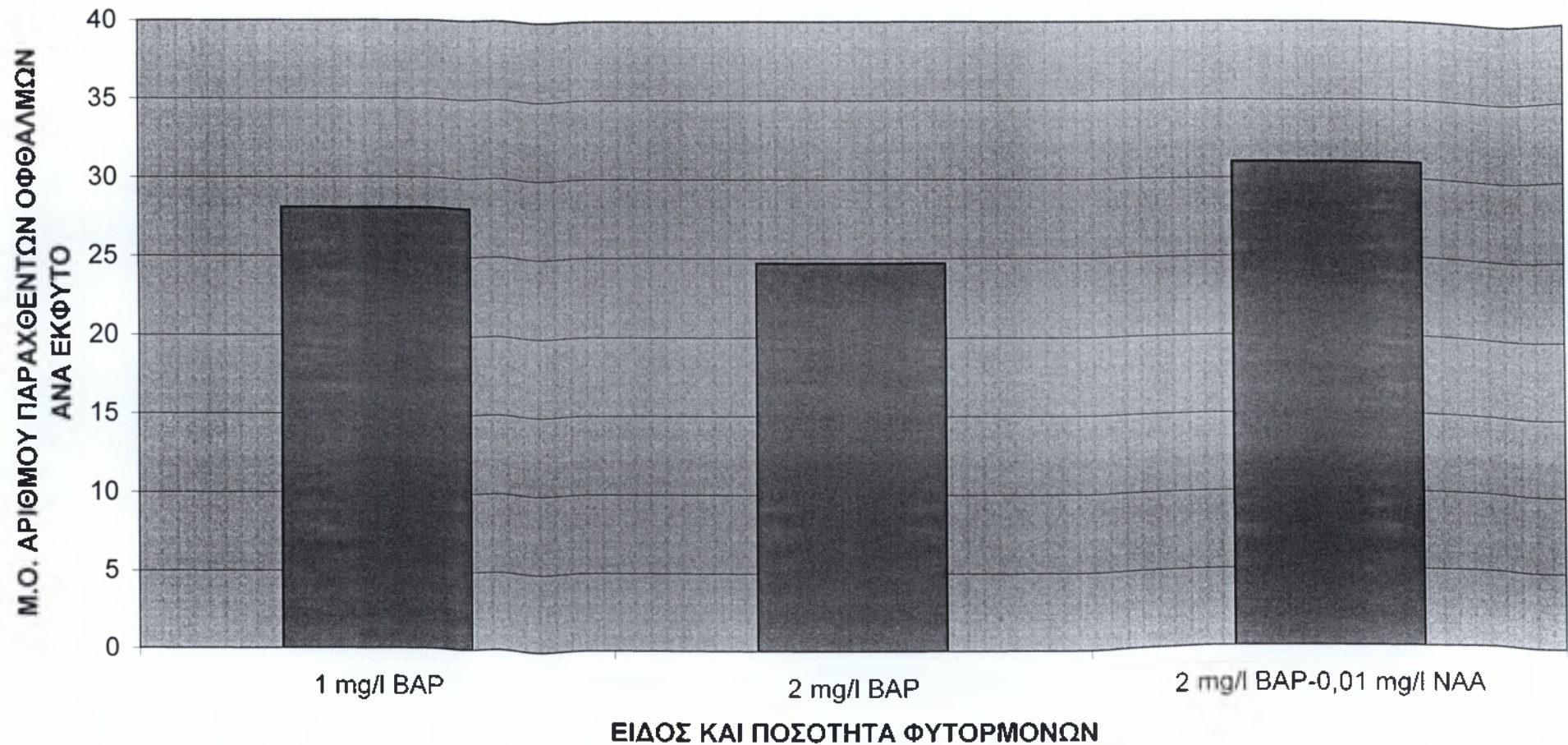


**Σχήμα 2. ΡΥΘΜΟΣ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗΣ ΟΦΘΑΛΜΩΝ ΚΑΤΑ ΤΙΣ 4 ΠΡΩΤΕΣ ΕΒΔΟΜΑΔΕΣ ΑΠΟ *IN VITRO* ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΕΡΙΣΤΩΜΑΤΙΚΩΝ ΕΚΦΥΤΩΝ**



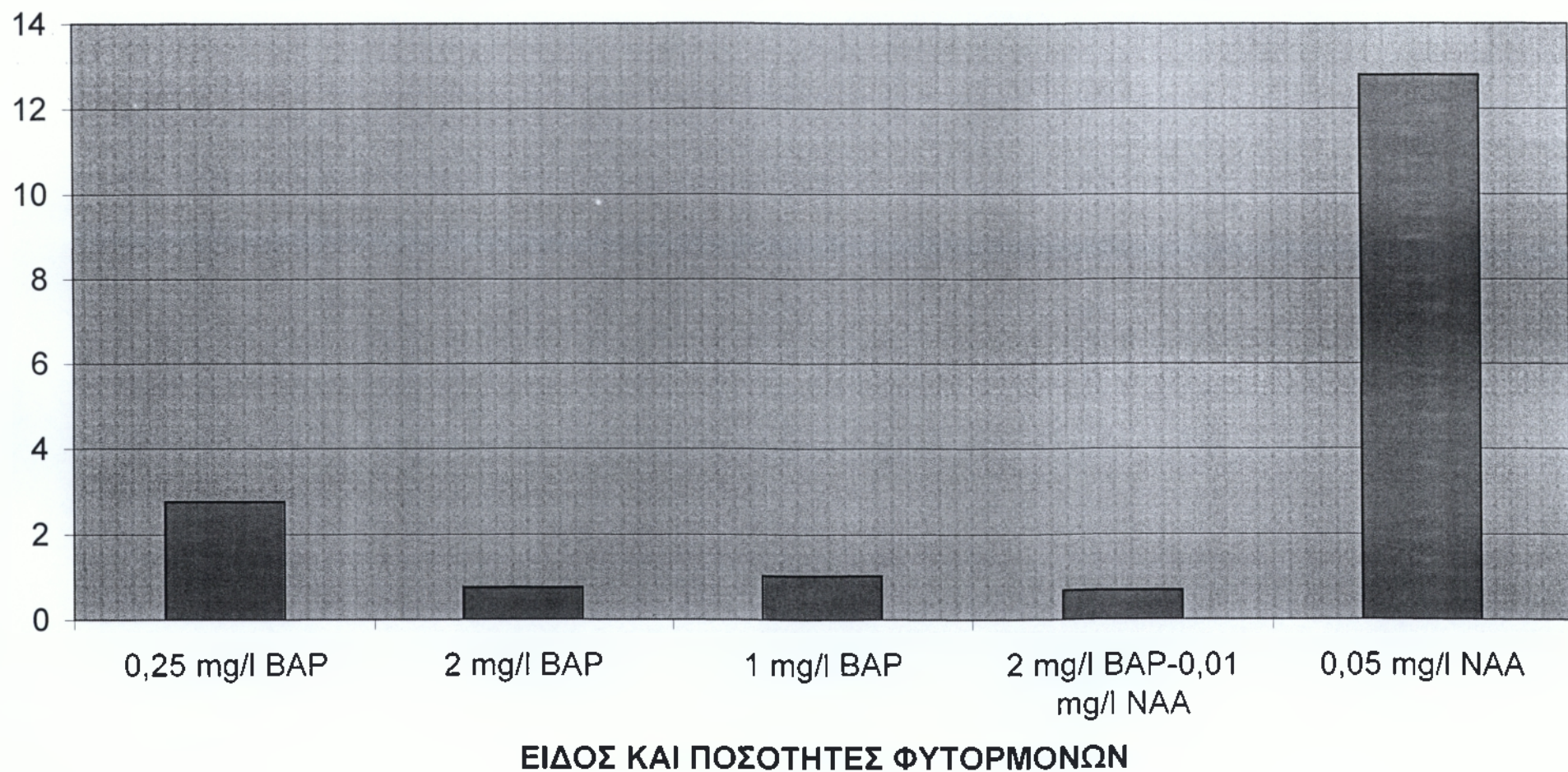


Σχήμα 3. ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΑΥΞΗΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΒΑΡ ΚΑΙ ΝΑΑ ΕΠΙ ΤΟΥ ΡΥΘΜΟΥ ΑΝΑΓΕΝΝΗΣΗΣ ΕΠΙΚΤΗΤΩΝ ΟΦΘΑΛΜΩΝ ΑΠΟ ΜΕΡΙΣΤΩΜΑΤΙΚΑ ΕΚΦΥΤΑ ΤΑ ΟΠΟΙΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΗΘΗΚΑΝ IN VITRO ΣΕ ΒΑΣΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΜΣ. ΟΙ ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΕΓΙΝΑΝ ΣΤΟ ΤΕΛΟΣ ΤΗΣ 4ης ΕΒΔΟΜΑΔΑΣ





**Μ.Ο. ΑΡΙΘΜΟΥ ΠΑΡΑΧΘΕΝΤΩΝ ΒΛΑΣΤΩΝ ΜΕΤΑ 6 ΕΒΔΟΜΑΔΩΝ  
ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΣΕ ΔΙΑΦΟΡΕΣ ΔΟΣΕΙΣ ΚΑΙ ΤΥΠΟΥΣ ΦΥΤΟΡΜΟΝΩΝ**



## ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Β

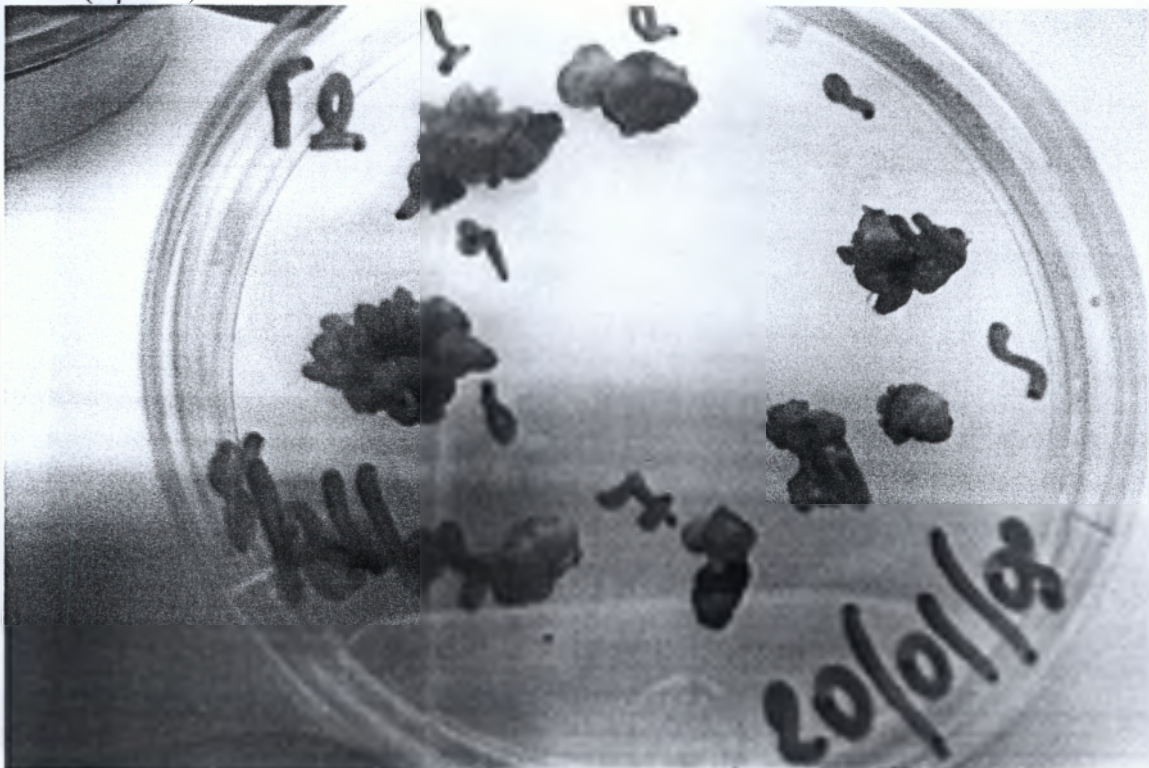
(Φωτογραφίες)



Φωτογραφία Α: Άμεση ή απευθείας οργανογένεση.



Έκφυτα βολβού γλαδίου το οποίο κόπηκε σε 4 τεμάχια και μεταφέρθηκε σε MS+2mg/l BAP. (Αριθ. 1).

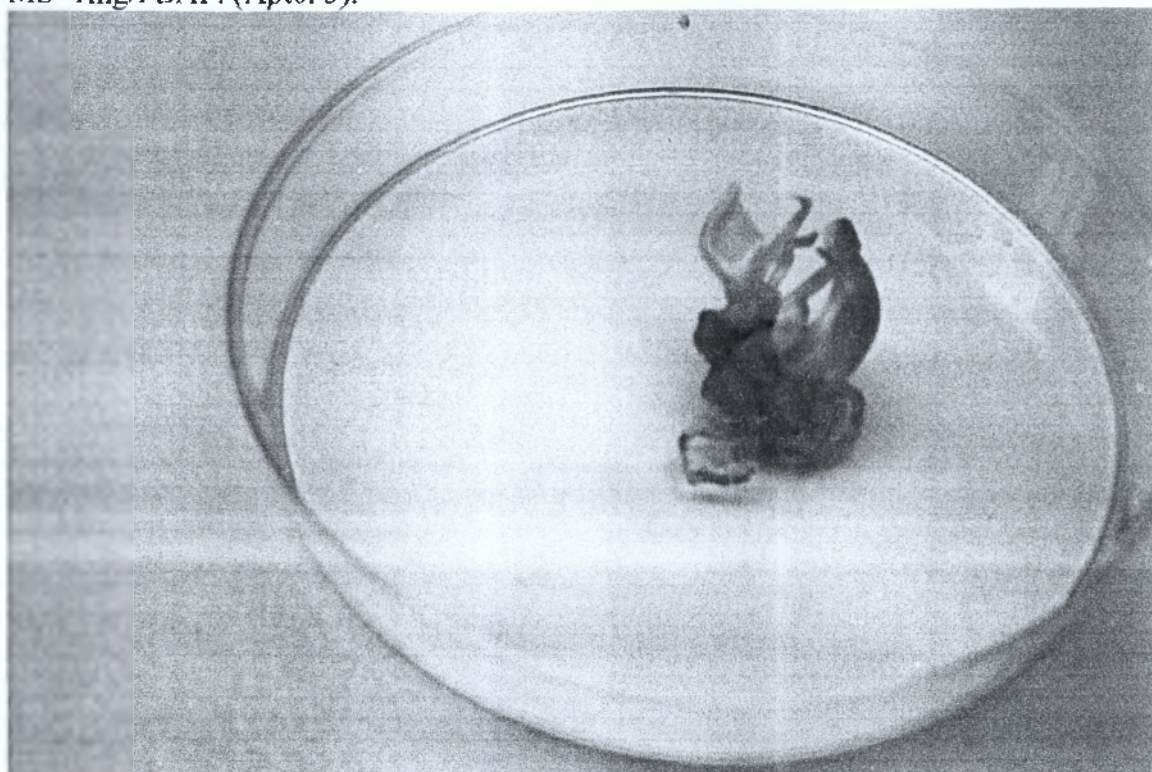


Σχηματισμός μεριστωμοειδών και μεριστώματα. (Αριθ. 2).



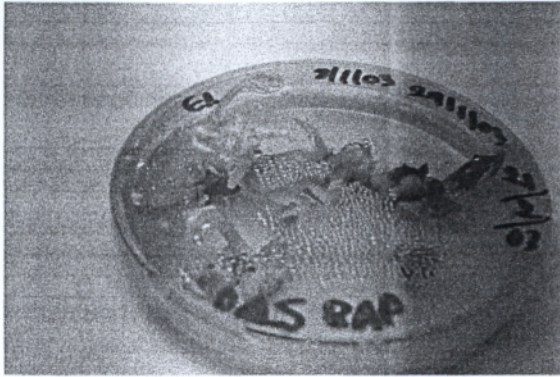


Έκφυτο βολβού γλαδίου στο οποίο έχουν εκπτυχθεί μικροί βλαστοί σε υπόστρωμα MS+1mg/l BAP. (Αριθ. 5).



Εξέλιξη των *in vitro* παραχθέντων επίκτητων οφθαλμών σε βλαστούς επί του υποστρώματος MS+0,25mg/l BAP. (Αριθ. 6)

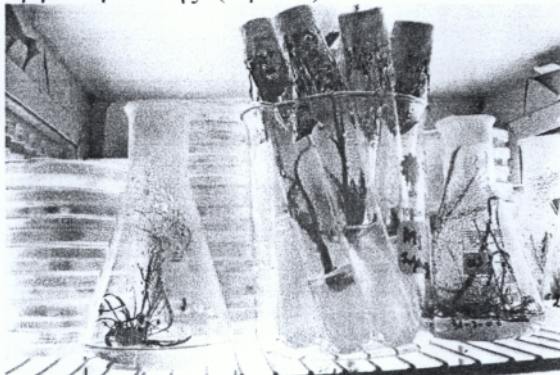




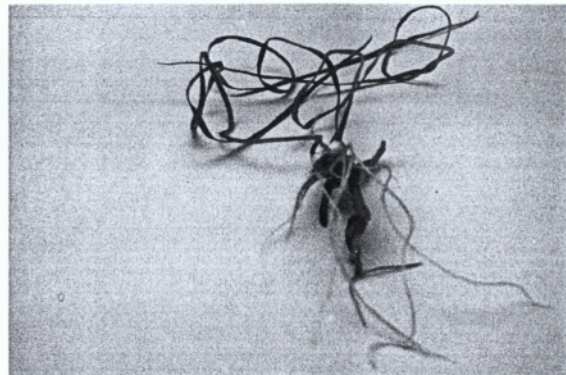
Μεξεύλιξη των *in vitro* παραχθέντων οφθαλμών από έκφυτα βολβού γλαδίου με τη διαδικασία της άμεσης οργανογένεσης. (Αριθ.7).



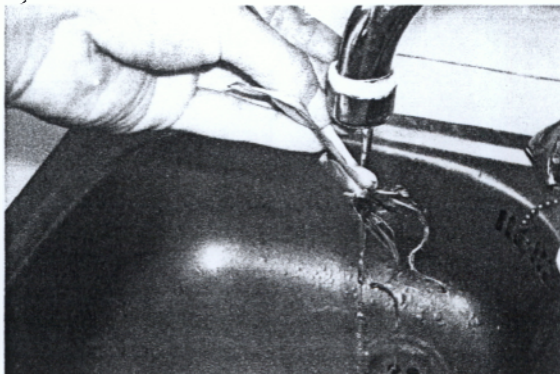
Έκφυτο βολβού γλαδίου στο οποίο ένας οφθαλμός είναι ανεπτυγμένος ενώ δίπλα του βρίσκονται και άλλοι. (Αριθ.8).



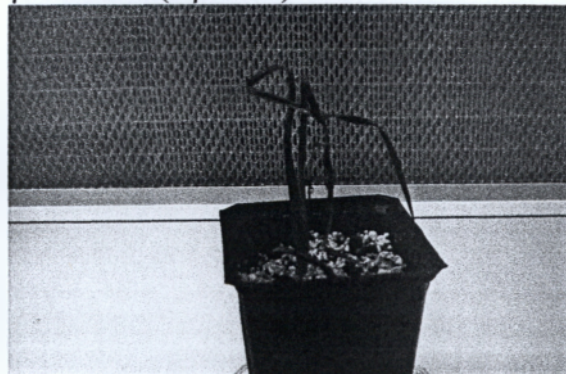
Φυτά γλαδίου που παράχθηκαν από *in vitro* καλλιέργεια εκφύτων βολβού. (Αριθ. 9).



Τέλειο φυτό γλαδίου το οποίο προήλθε από *in vitro* καλλιέργεια εκφύτων βολβού γλαδίου. (Αριθ. 10).



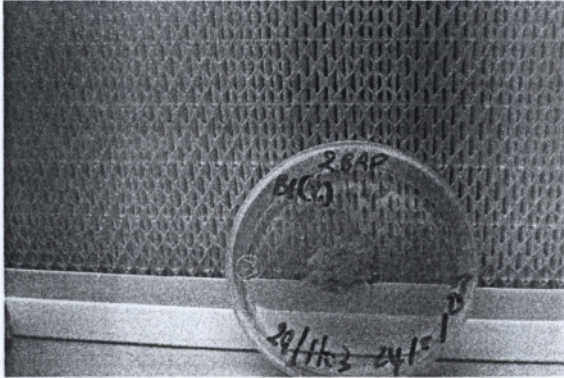
Τέλειο φυτό ξεπλένεται από το υπόστρωμα για να φυτευθεί σε γλαστράκι. (Αριθ. 11).



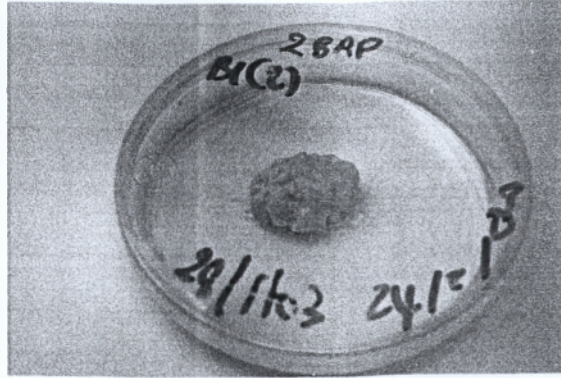
Τέλειο φυτό μεταφέρεται στο θάλαμο σκληραγώγησης για εγκλιματισμό. (Αριθ. 12).



Φωτογραφία Β: Έμμεση οργανογένεση.



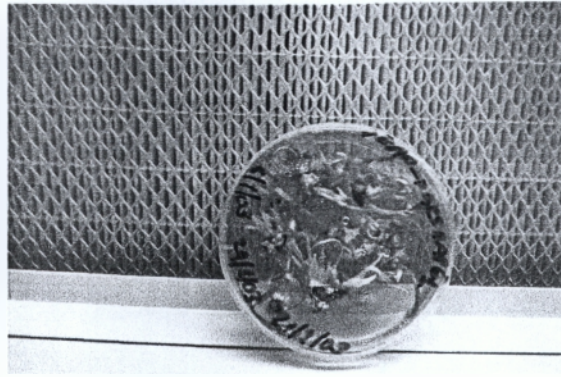
Σχηματισμός συμπαγούς κάλου από έκφυτο βολβού που καλλιεργήθηκε σε υπόστρωμα MS+2mg/l BAP, μετά από 4 εβδομάδες καλλιέργεια (Αριθ.1).



Καλλιέργεια του κάλου στο ίδιο θρεπτικό υπόστρωμα που έχει ως στόχο την μορφογένεση (Αριθ. 2).

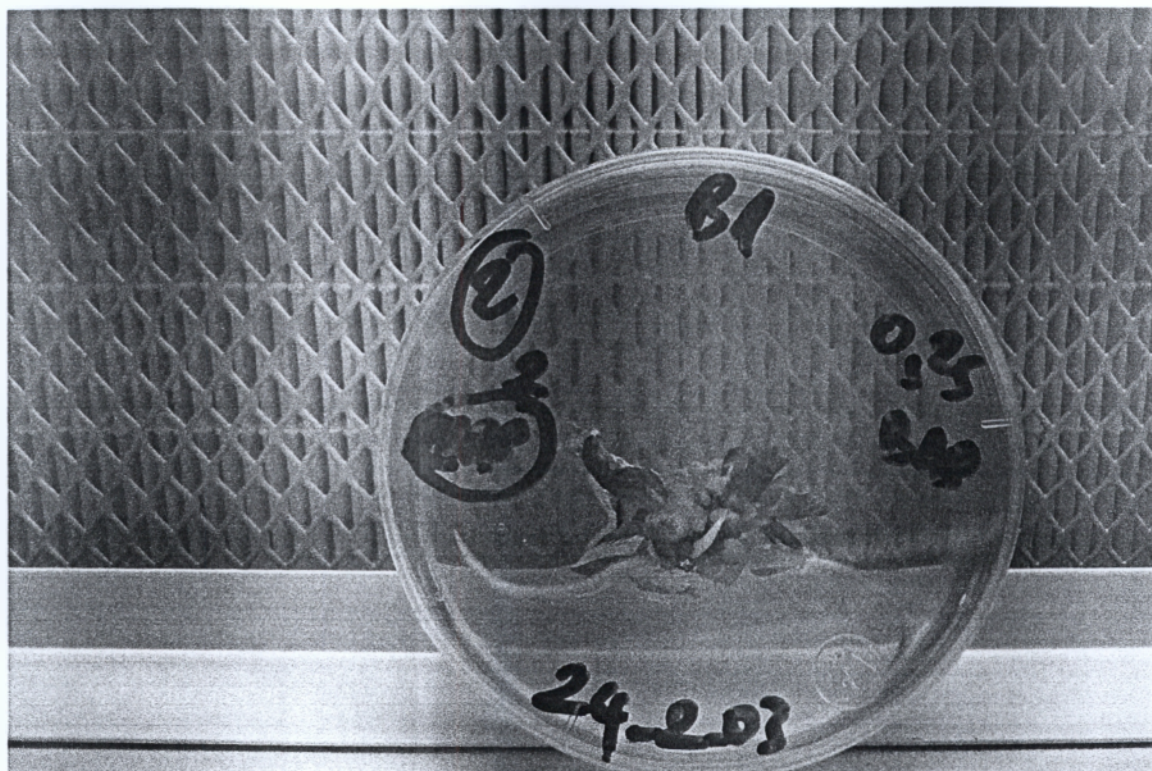


Ανάπτυξη οφθαλμών και βλαστών από έκφυτα κάλου γλαδίου σε θρεπτικό υπόστρωμα MS +1mg/l BAP (Αριθ.3).

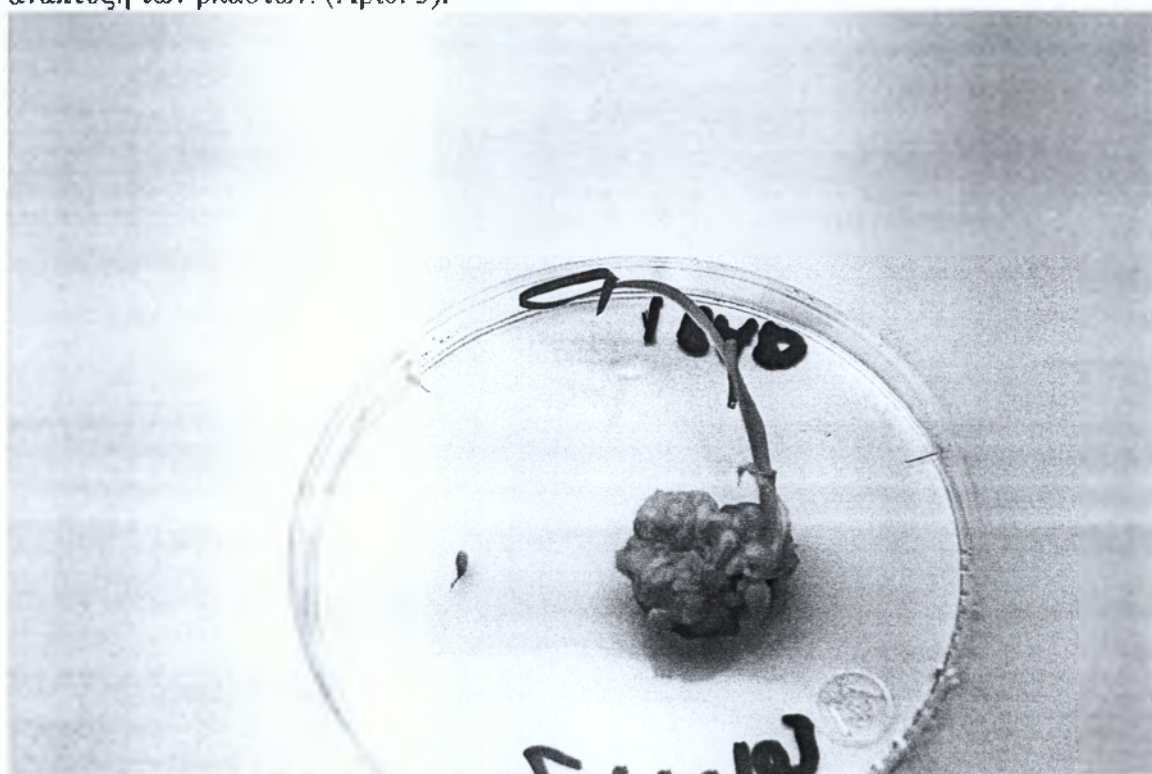


Μετεξέλιξη των *in vitro* παραχθέντων οφθαλμών από έκφυτα κάλου σε τούφες, με τη διαδικασία της έμμεσης οργανογένεσης, επί υποστρώματος MS+0,25mg/l BAP (Αριθ.4).



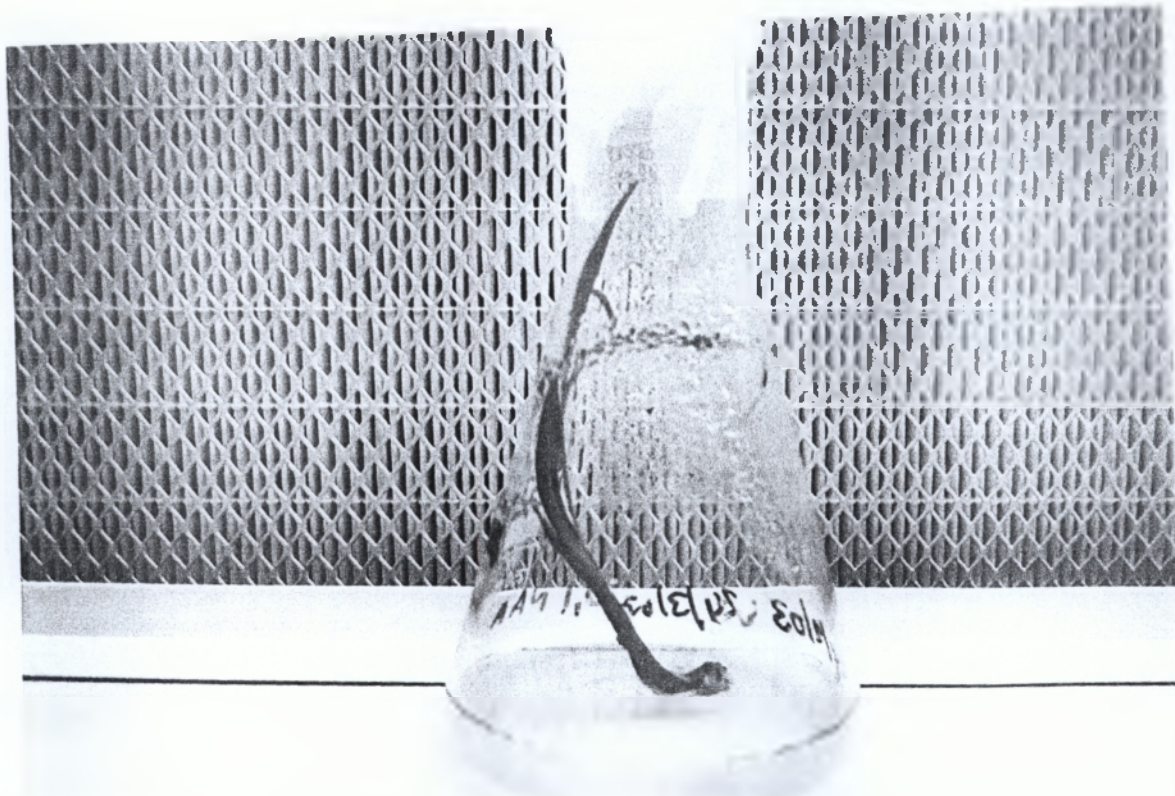


Οφθαλμοί που έχουν εκπτυχθεί, μικροί βλαστοί και εμφάνιση ρίζας σε υπόστρωμα MS+0,25mg/l BAP. Τα έκφυτα μεταφέρθηκαν σε αυτό το υπόστρωμα για περαιτέρω ανάπτυξη των βλαστών. (Αριθ. 5).



Μετεξέλιξη του *in vitro* παραχθέντος οφθαλμού από έκφυτο κάλου γλαδίου σε βλαστό με τη διαδικασία της έμμεσης οργανογένεσης, σε υπόστρωμα MS+0,25mg/l BAP. (Αρ.6)

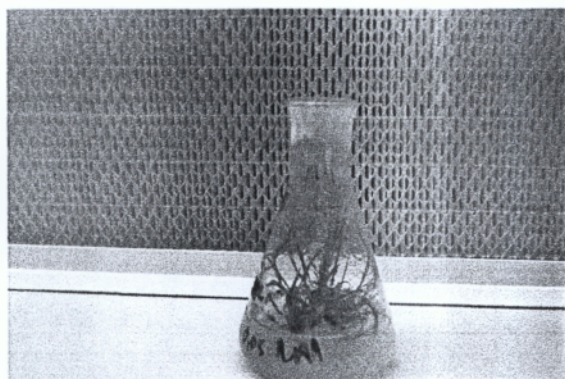




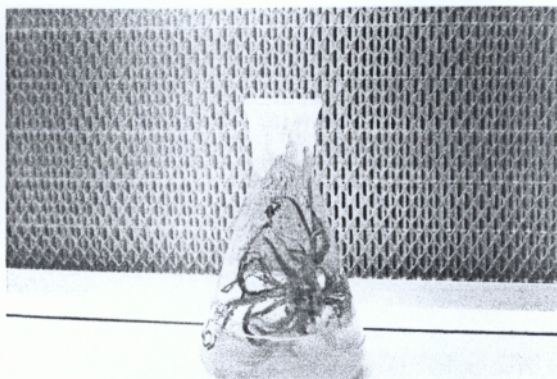
Ανεπτυγμένος βλαστός από έκφυτο κάλου γλαδίου, με τη διαδικασία της έμμεσης οργανογένεσης, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS+0,05mg/l NAA για ριζοβόληση. (Αριθ. 7).



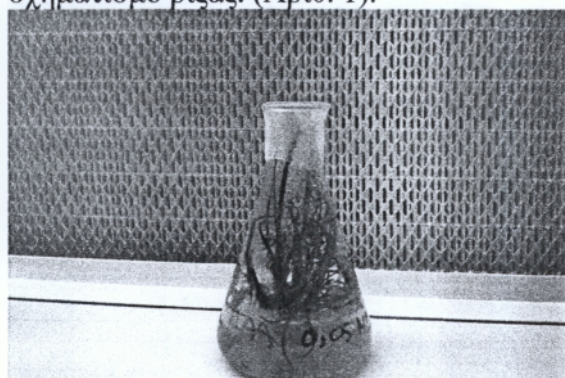
Φωτογραφία Γ: Ανάπτυξη βλαστών από *in vitro* παρεχθέντες επίκτητους οφθαλμούς.



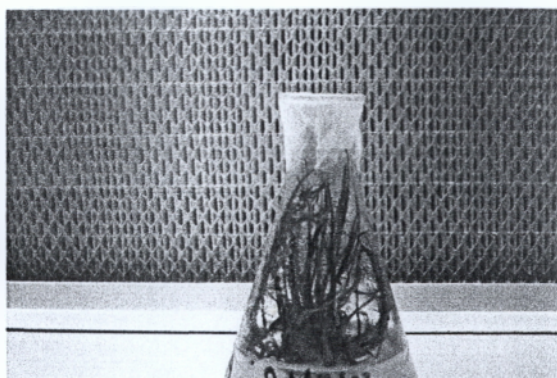
Μετά από 2 εβδομάδες καλλιέργειας βλαστών σε υπόστρωμα MS+0,05mg/l NAA. Έχουμε ανάπτυξη βλαστών και σχηματισμό ρίζας. (Αριθ. 1).



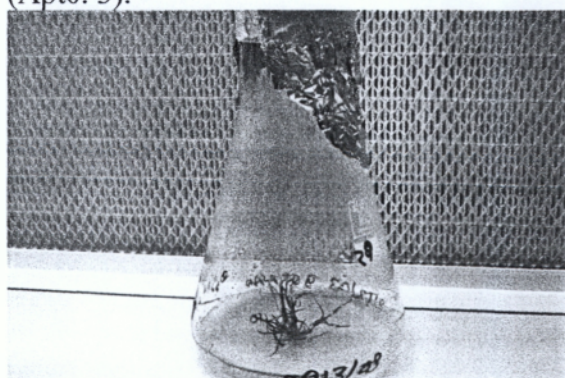
Σχηματισμός ρίζας και ανάπτυξη βλαστών και στο υπόστρωμα MS+0,01mg/l NAA. (Αριθ. 2).



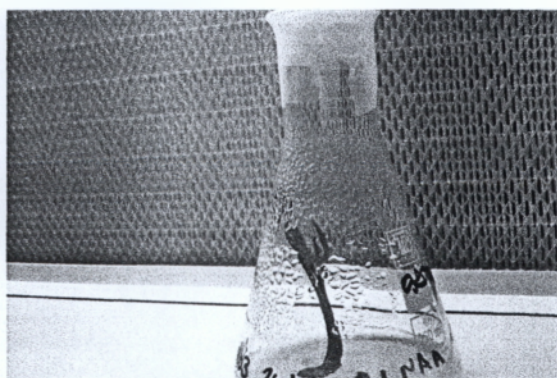
Μετά από 1 μήνα καλλιέργειας σε θρεπτικό υπόστρωμα MS+0,05mg/l NAA. (Αριθ. 3).



Μετά από 1 μήνα καλλιέργειας σε υπόστρωμα MS+0,01mg/l NAA. (Αριθ.4).



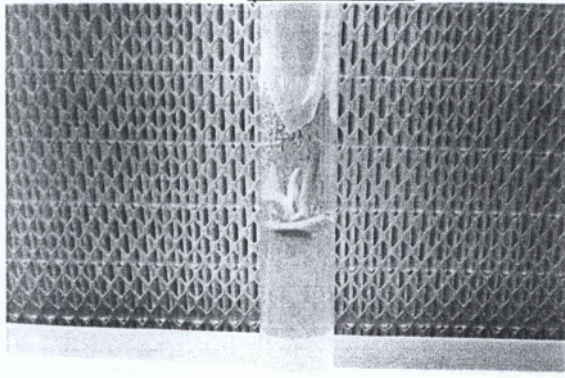
Εγκατάσταση μικρών βλαστών σε υπόστρωμα MS+0,1mg/l NAA (Αριθ.5).



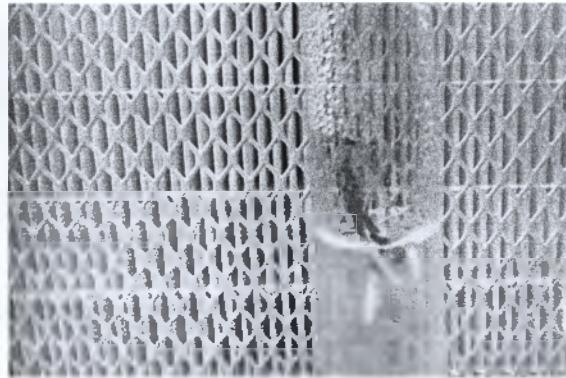
Ανάπτυξη βλαστού μετά από 1 μήνα καλλιέργειάς του σε υπόστρωμα MS+0,1mg/l NAA. (Αριθ.6).



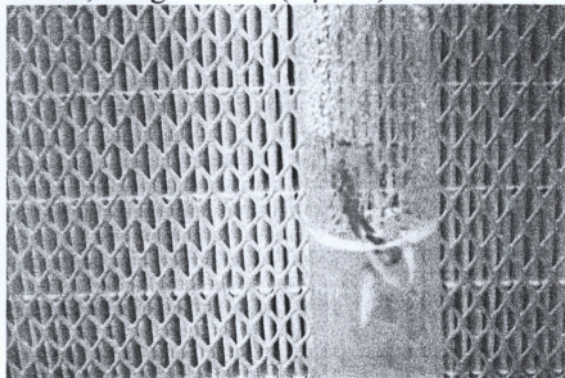
Φωτογραφία Δ: Διαδικασία ριζοβόλησης *in vitro* παραγθέντων βλαστών γλαδίουλου.



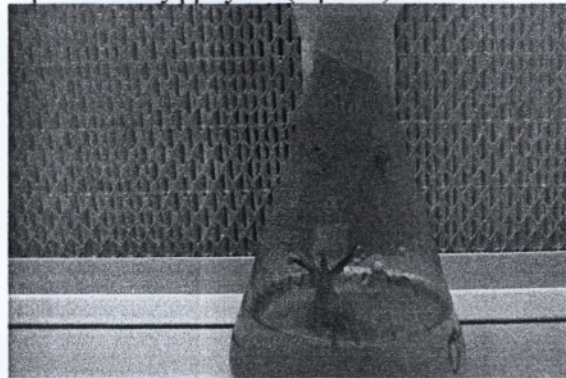
Βλαστοί σε θρεπτικό υπόστρωμα MS+0,01mg/l NAA. (Αριθ.1).



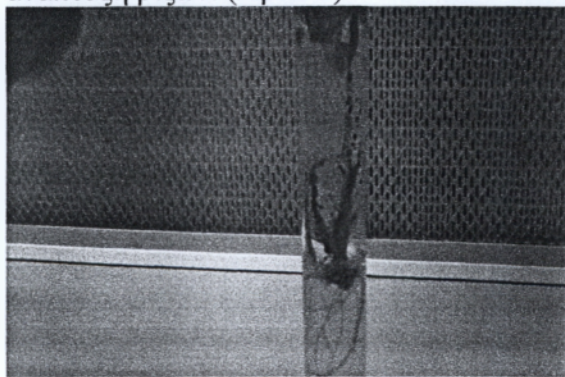
Βλαστός σε MS+0,05mg/l NAA, έχουμε την ανάπτυξη ριζών. (Αριθ.2).



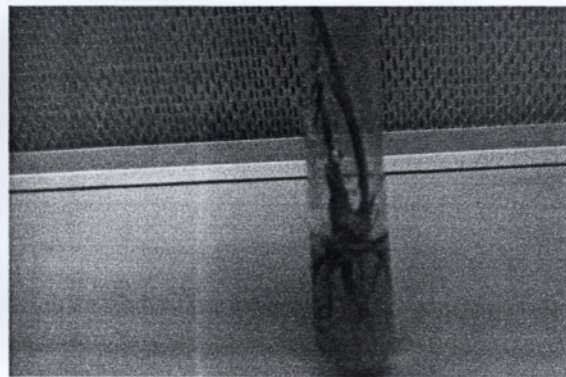
Βλαστός σε MS+0,01mg/l NAA και σε αυτή τη συγκέντρωση έχουμε την ανάπτυξη ριζών. (Αριθ. 3)



Βλαστοί σε MS+0,05mg/l NAA για ριζοβολία. (Αριθ. 4)

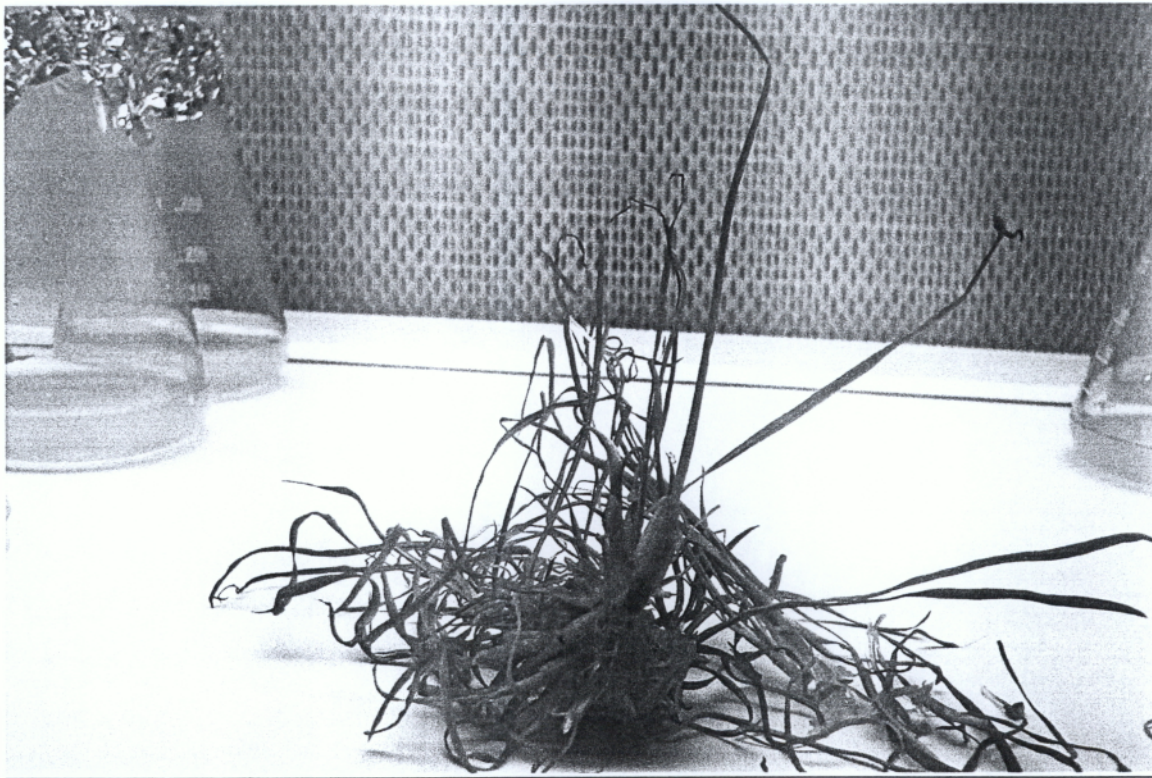


Στις 24-03-03 εγκατέστησα το έκφυτο (το οποίο είχε μικρές ρίζες) σε MS για επιμήκυνση του βλαστού. Μετά από 1 μήνα καλλιέργειας έχουμε επιμήκυνση του βλαστού αλλά και της ρίζας. (Αριθ. 5)

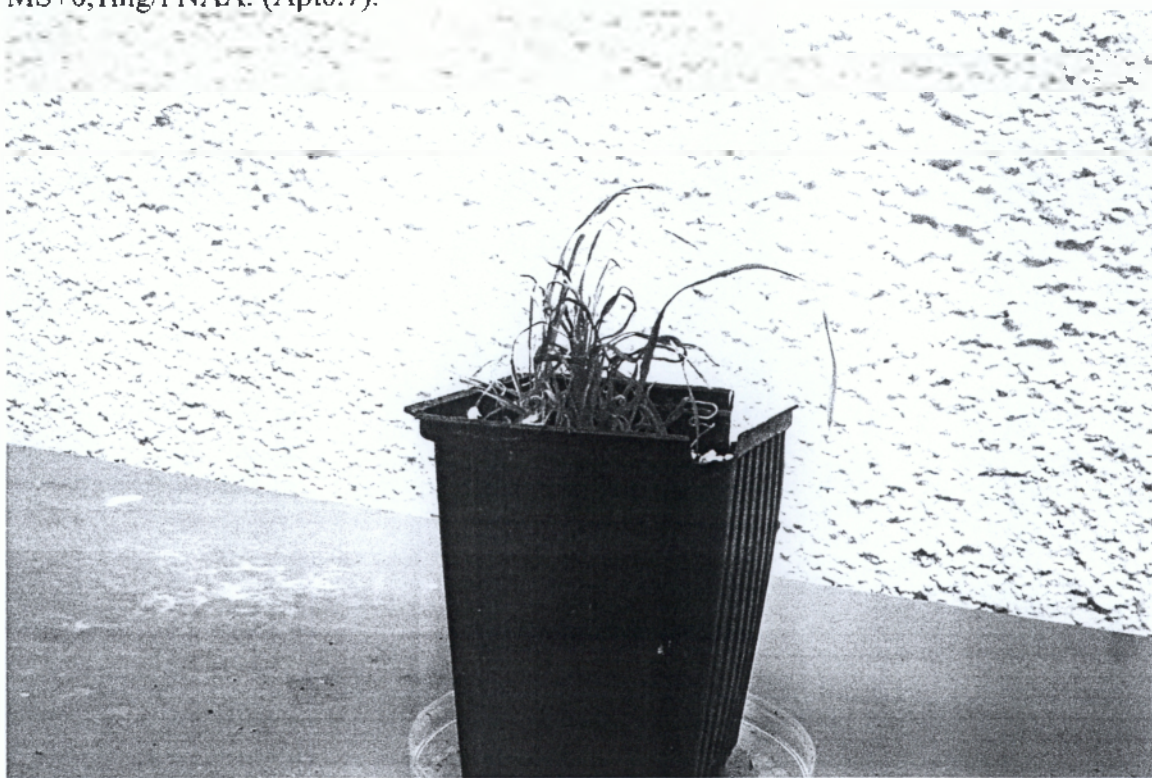


Μετά από 2μήνες καλλιέργειας σε MS έχουμε ανάπτυξη του ριζικού συστήματος και το σχηματισμό μικρού βολβιδίου. (Αριθ. 6).



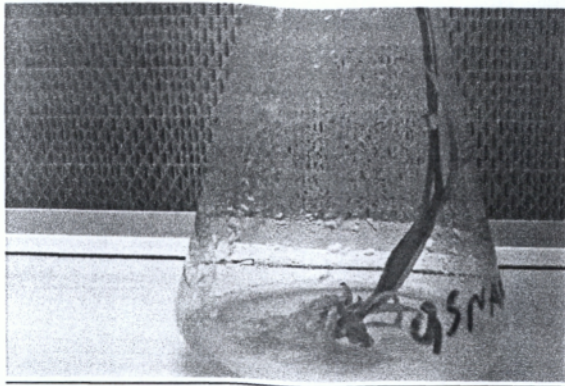


Τέλεια φυτά (τα οποία καλλιεργήθηκαν για 2 μήνες περίπου σε θρεπτικό υπόστρωμα MS+0,1mg/l NAA. (Αριθ.7).

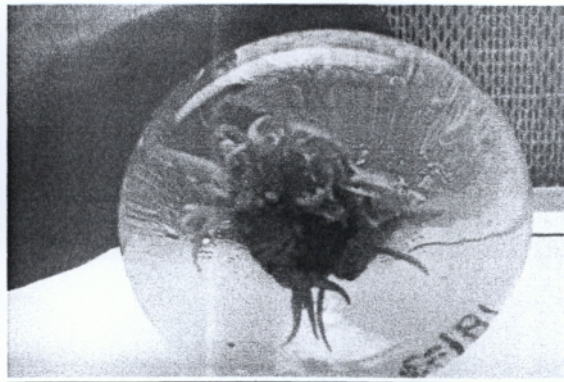


Τέλεια φυτά φυτεύτηκαν σε φυτοδοχείο για να μεταφερθούν στο θάλαμο σκληραγώγησης (Αριθ.8).

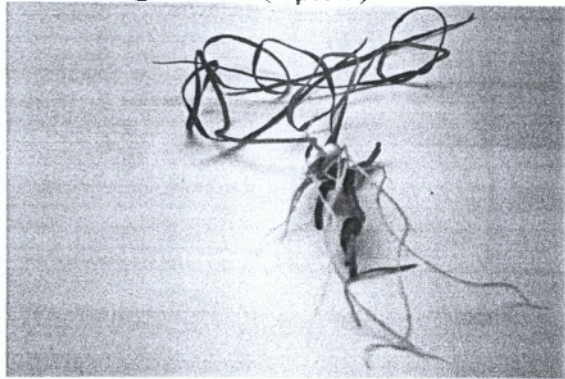




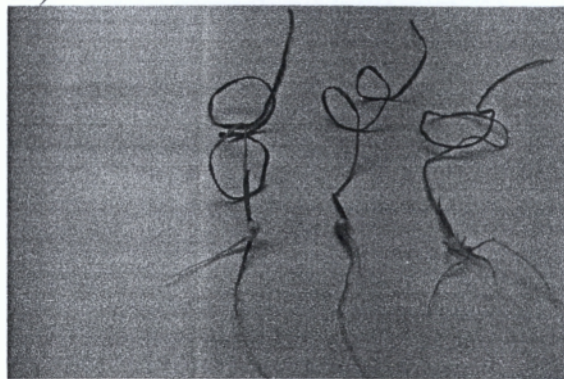
Δημιουργία ανεπτυγμένου ριζικού συστήματος σε θρεπτικό υπόστρωμα MS+0,5mg/l NAA. (Αριθ 9).



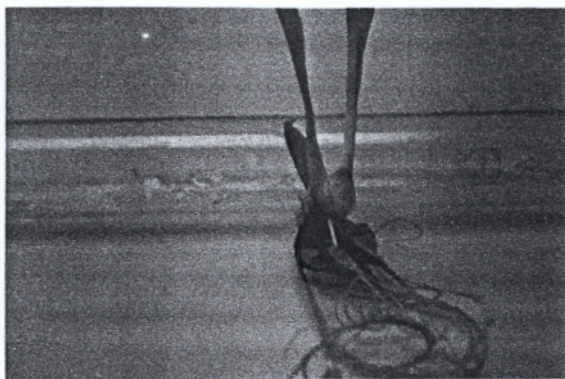
Οι ρίζες ενός εκφύτου όπως φαίνονται στο κάτω μέρος μιας κωνικής φιάλης. (Αριθ 10).



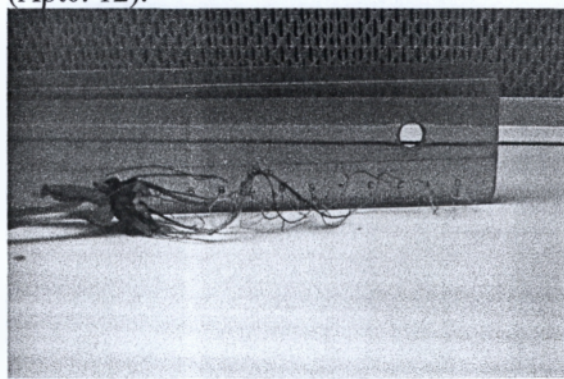
Τέλειο φυτό στο οποίο υπάρχει εκτός από τις ρίζες και βολβίδιο. (Αριθ. 11).



Τέλεια φυτά γλαδίου με σχηματισμένο και το βολβίδιο μετά την απομάκρυνσή τους από το θρεπτικό υπόστρωμα MS. (Αριθ. 12).



Μετά από 3,5 μήνες καλλιέργεια σε MS έχουμε διόγκωση του βολβού και ανάπτυξη της ρίζας. (Αριθ. 13).



Μετά από 3,5 μήνες καλλιέργεια σε MS έχουμε επιμήκυνση του ριζικού συστήματος. (Αριθ. 14).



## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Alper, M., Stein, A., Loebenstein, G., Lawson, R. and Zettler F. W. (1985). Detection and control of viral diseases in gladiolus, bulbous, iris and lilies. Final Report to BARD Project No 1-302-80. (available in USDA Library).

Auge, R., Beauchesne, G., Boccon- Gibod, J., Decourtye, L., Digat, B., Galandrin, J.- Cl., Minier, R., Morand, J. -Cl., and Vidalie, H. (1984). La culture *in vitro* et ses applications horticole. Technique et Documentation. (Lavoisier Paris).

Bajaj, Y.P.S., Pierik, R.L.M. (1974). Vegetative propagation of Freesia through callus cultures. Neth. J. Agric. Sci. 22:153-159

Bajaj, Y.P.S., Sidhu, M.M.S. and Gill, A.P.S. (1983). Some factors effecting the *in vitro* propagation of Gladiolus. Sci.Hort 18: 269-275

Dantu, P. and K.Bhojwani (1987). *In vitro* propagation and corm formation in gladiolus. Gartenbauwiss.52: 90-93.

Gautheret, R.J. (1959). Le culture des tissus vegetaux. Masson et Cie, Paris.

Ginzburg, C., Ziv, M. (1973). Hormonal regulation of coemel formation in Gladiolus stolons grown *in vitro*. Ann. Bot. 37:219-224.

Griesbach, R. A. (1972). The life structure and function in gladiolus. In: The world of Gladiolus, (N. Koenig and W. Crowley, eds), p.p. 8-40 North Am. Glad. Council Edgerton Press, Md.

Hartman, H. T., and Kester, D.E. (1975) Plant propagation: Principles and Practices, Third Edition, p.p.519-520.

Hughes, K.W. 1981. Ornamental species. In: Cloning Agricultural Plants via *in vitro* Techniques, (B. V. Conger, ed.), p.p. 5-50. CRC Press, Boca Raton, Fla.

Hussey,G. ( 1975). Totipotency in tissus explant and callus of some members of the Liliaceae, Iridaceae and Amaryllidaceae. J. Exp. Bot. 26:253-262.

Hussey,G. (1977). *In vitro* propagation of Gladiolus by precocious axillary shoot formation. Sci.Hort.6: 287-296.

Καββαδάς, Δ. Εικονογραφημένο Βοτανικό λεξικό, Αθήνα 1965.

Κανάκης, Α. Μαθήματα Ιστοκαλλιέργειας, Καλαμάτα 2000.

Κανταρτζής, Ν. (1991). Παραγωγική ανθοκομία, Αθήνα.

Linsmajer, E.M, and Skoog, F. (1965). Organic growth factor requirements of tobacco tissus cultures. Physiol. Plant.18: 100-127.

Lilien- Kipnis, and Kochba, M. ,(1987). Mass propagation of new Gladiolus hybrids .Acta Hort.212: 631-638.

Magie, R.O. and Poe, S.L. (1982). Disease and pest associates of bulbs and plants. In : The World of Gladiolus (N. Koenig and W. Crowley, eds ),p.p. 155-167. North Am.Glad. Council Edgerton Press, Md.

Murashige,T.,and Skoog,F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassay with tobacco tissus cultures. Physiol. Plant. 15 : 473-497.

Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissus culture. Ann. Rev. Plant Physiol. 25: 135-166.

Quak,F. (1977). Meristem culture and virus –free plants. In : Applied and Fundamental Aspects of Plant Cell,Tissue and Organ Culture, (J. Reinert and Y.P.S. Bajaj,eds), p.p.: 598-615. Springer –Verlag, Berlin.

Sachs, T., and Thimann, K. V. (1967). The role of auxins and cytokinins in the release of buds from dominance. Am.J. Bot. 54: 136-144.

Simonsen, J., and Hildebrandt, A.C. (1971). *In vitro* growth and differentiation of Gladiolus plants from callus cultures. Can. J. Bot. 49: 1817-1819.

Sutter, E.G. (1986). Micropropagation of Ixia viridifolia and a Gladiolus X Homoglossum hybrid. Sci. Hort. 29 : 181-189.

Wilfret, G. J. (1971). Shoottip culture of Gladiolus. Proc. Fla.State Hort. Soc. 84: 389-393 .

Wilfret, G.J. (1980). Gladiolus. In: Introduction to Floriculture (R. A. Larson ed.), pp. 166-181. Academic Press , New York.

Zhuo, W. and Sun, Z. (1986). Flower bud and dormant bud culture and plant redifferentiation of Gladiolus hybridus *in vitro*. Acta Agriculture 12: 191-194.

Ziv, M., Halevy, A .H., and Shilo, R. (1970). Organs and plantlet regeneration of Gladiolus through tissue culture. Ann. Bot. 34: 671-676.

Ziv, M. (1979). Transplanting Gladiolus plants propagated *in vitro*. Sxi .Hort. 11: 257-260.