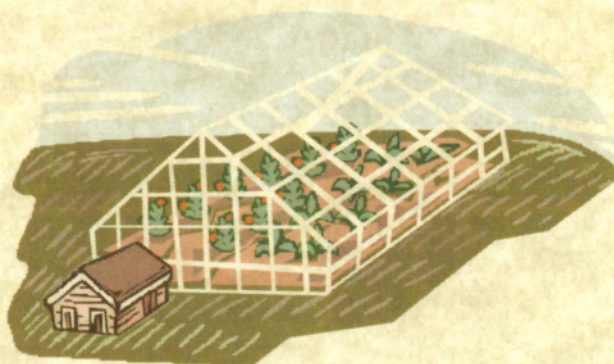


**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ (ΤΕΙ)
ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΘΕΜΑ: ΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΟΝ
ΕΓΚΛΙΜΑΤΙΣΜΟ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ
ΤΗΣ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ**



Της σπουδάστριας **Ευσταθίας Ζωντανού**

Καλαμάτα, Νοέμβριος 2004

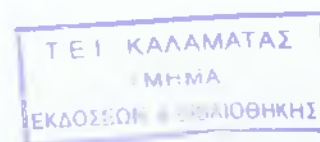
**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ (ΤΕΙ)
ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ**

**ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

ΕΡΓΑΣΙΑ

**ΘΕΜΑ: ΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΟΝ
ΕΓΚΛΙΜΑΤΙΣΜΟ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΜΕΤΑ ΑΠΟ ΤΗΝ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ
ΤΗΣ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ**

Πτυχιακή εργασία

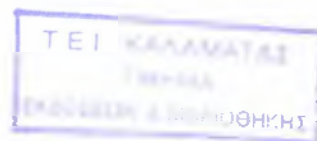


Της σπουδάστριας **Ευσταθίας Ζωντανού**

Επιβλέποντες Καθηγητές: Ανδρέας Κανάκης, Στέλιος Βασιλειάδης

Καλαμάτα, Νοέμβριος 2004

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ



ΠΡΟΛΟΓΟΣ.....	Σελ.3
---------------	-------

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο: ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

1.1 Εισαγωγή	Σελ.4
1.2 Ιστοκαλλιέργεια- Ιστορική αναδρομή	Σελ.5

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο: ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

2.1 Γενικά	Σελ.8
2.2 Μεθοδολογία	Σελ.8
2.2.1 Υποστρώματα	Σελ.9
2.2.2 Χαρακτηριστικά του ιστοκαλλιεργούμενου περιβάλλοντος	Σελ.12
2.3 Φυτικό υλικό.....	Σελ.13
2.4 Ειδικές περιπτώσεις (καλλιέργεια πρωτοπλαστών, κυττάρων).....	Σελ.14
2.4.1 Καλλιέργεια πρωτοπλαστών	Σελ.14
2.4.2 Καλλιέργεια κυττάρων	Σελ.15

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο: ΕΓΚΛΙΜΑΤΙΣΜΟΣ

3.1 Γενικά	Σελ.16
3.2 Αναγκαιότητα	Σελ.17
3.3 Παράγοντες που επηρεάζουν τον εγκλιματισμό.....	Σελ.18
3.3.1 Φως	Σελ.24
3.3.2 Σχετική Υγρασία.....	Σελ.26
3.3.3 Υπόστρωμα.....	Σελ.28
3.3.4 PPFD.....	Σελ.29
3.3.5 CO ₂	Σελ.35
3.3.6 Συνδυασμός παραγόντων	Σελ.41
3.4 Μέθοδοι εγκλιματισμού.	Σελ.43
3.4.1 Συμβατικός τύπος μεθόδου εγκλιματισμού.....	Σελ.46
3.4.2 Μέθοδος εγκλιματισμού μέσο της μονάδας	Σελ.44
3.4.3 Μέθοδος εγκλιματισμού με λάμπες	Σελ.60

3.4.4 Παραδείγματα	Σελ.60
--------------------------	--------

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο: ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

Συμπερασματικές αναφορές	Σελ.65
--------------------------------	--------

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	Σελ.66
-------------------	--------

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Η παρούσα εργασία έγινε στα πλαίσια της πτυχιακής μου εργασίας. Είναι μια εργασία, η οποία σκοπό έχει να δώσει στοιχεία και πληροφορίες οι οποίες αφορούν τον εγκλιματισμό των φυτικών ειδών έπειτα από in-vitro καλλιέργεια. Στόχος είναι η προσέγγιση, η ανάλυση και η μελέτη των παραγόντων, οι οποίοι επηρεάζουν τον εγκλιματισμό των φυτών.

Το περιεχόμενο της εργασίας αποτελείται από κάποια εισαγωγικά στοιχεία όσον αφορά την ιστορία των ιστοκαλλιιεργειών καθώς και στοιχεία τα οποία αφορούν την διαδικασία παραγωγής τους και τους παράγοντες οι οποίοι λαμβάνουν μέρος και καθορίζουν σε μεγάλο ποσοστό την όλη διαδικασία αυτών. Στην συνέχεια της εργασίας αυτής θα παρουσιαστούν και θα αναπτυχθούν όλα όσα χρειάζεται να γνωρίζουμε για τον εγκλιματισμό των φυτών έπειτα από την διαδικασία παραγωγής τους με την μέθοδο της ιστοκαλλιέργειας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

1.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ιστοκαλλιέργεια των φυτών είναι μια διαδικασία αναπαραγωγής, η οποία παίρνει μέρος πρακτικά σε εκατοντάδες μικρά και μεγάλα βιοτεχνολογικά εργαστήρια ανά τον κόσμο. Είναι η πιο πρόσφατη μέθοδος αναπαραγωγής κατά την οποία παράγεται μεγάλος αριθμός φυτών που θα χρησιμοποιηθούν στην γεωργία και θα είναι γενετικά ίδια.

Υπάρχουν περίπου 1000 φυτικά είδη τα οποία μπορούν να αναπαραχθούν με τη μέθοδο της ιστοκαλλιέργειας. Χιλιάδες φυτά μπορούν να παράγονται, να πωλούνται εγχώρια καθώς και να γίνεται εξαγωγή σε διάφορες χώρες του εξωτερικού. Πρόσφατα ενδιαφέρον έχει επικεντρωθεί τόσο σε καλλιεργούμενα είδη όπως πατάτα, φράουλα, μπανάνα, γαρύφαλλο όσο και σε φαρμακευτικά, αρωματικά φυτά και δένδρα. Κυρίως όμως σε αυτά στα οποία είναι δύσκολη η αναπαραγωγή τους με κάποιο άλλο τρόπο. Η χρήση των παραγόμενων φυτών μέσω της ιστοκαλλιέργειας, έχει επεκταθεί παγκοσμίως στην γεωργία και στην δασοπονία. Οπωσδήποτε, λόγω του μεγάλου κόστους παραγωγής, η ευρεία χρήση της είναι περιορισμένη. Κάποιοι από αυτούς τους λόγους είναι οι εξής:

- 1) υψηλός εργαστηριακός εξοπλισμός κατά την διάρκεια της λειτουργίας,
- 2) χαμηλός ρυθμός ανάπτυξης και διαφοροποίησης των in-vitro παραγόμενων φυταρίων,
- 3) φτωχό ριζικό σύστημα κατά τα στάδια της διαφοροποίησης και εγκλιματισμού και
- 4) χαμηλό ποσοστό επιβίωσης των φυταρίων κατά το στάδιο του εγκλιματισμού.

Τα τελευταία 10 χρόνια η ιστοκαλλιέργεια έχει δείξει θεαματική ανάπτυξη. Οπωσδήποτε, προς το παρόν η ευρέως διαδεδομένη χρήση της ιστοκαλλιέργειας είναι περιορισμένη για διάφορους λόγους. Ένας από αυτούς είναι και η υποβάθμιση της ποιότητας και η απώλεια των φυτών της ιστοκαλλιέργειας κατά το στάδιο του εγκλιματισμού και γίνεται κατά τη διάρκεια μεταφοράς του φυτού από το δοχείο στο χώμα. Λόγω του ειδικού περιβάλλοντος της ιστοκαλλιέργειας σε in-vitro συνθήκες, είναι

δύσκολο μετά να παραχθούν φυτά, τα οποία να μπορούν εύκολα να εγκλιματιστούν στο εξωτερικό περιβάλλον.

Η μεταφύτευση των φυταρίων, τα οποία καλλιεργήθηκαν κάτω από *in-vitro* συνθήκες, σε χώρο εκτός της καλλιέργειας μπορεί να είναι η αιτία για μείωση του αριθμού των φυταρίων ή ακόμη και το θάνατο σε πολλά φυτικά είδη εξ' αιτίας αυτής της εναλλαγής των συνθηκών περιβάλλοντος. Αυτό το πρόβλημα, όπως είναι φανερό σε όλους θα πρέπει να αντιμετωπιστεί και να ξεπεραστεί, ώστε να επιτευχθούν υψηλά ποσοστά επιβίωσης και αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης των φυταρίων.

Αυστηρές αναλύσεις, οι οποίες αφορούν την βιομηχανική παραγωγή φυτών, δείχνουν ότι η παραγωγή με την μέθοδο της ιστοκαλλιέργειας έχει βελτιωθεί σε επίπεδο βιομηχανίας σε πολλά σημεία. Κάποια εργαστήρια πωλούν γενετικό υλικό ή ριζοβολημένα φυτά καλλιεργημένα σε *in-vitro* συνθήκες, σε συμβατικά εργαστήρια, ενώ κάποια άλλα πωλούν ήδη εγκλιματιζόμενα νεαρά φυτά.

Ακόμα μια στρατηγική που ακολουθείται είναι η αύξηση εμβολιασμένων φυτών, τα οποία μεγαλώνουν σε θερμοκήπια. Εφαρμόζοντας την διαδικασία της μικρό-παραγωγής, γίνεται εμφανές ότι ικανοποιεί τις ανάγκες της αγοράς, ενώ ξεπερνάει αντιξοότητες στην παραγωγική διαδικασία του μικρό-πολλαπλασιασμού, ο οποίος μπορεί να παράγει κατευθείαν και να δίνει σε εργαστήρια, φυτά τα οποία είναι υγιή ή σε πολύ καλή κατάσταση με υψηλή γενετική σταθερότητα. Για να επιτευχθούν αυτοί οι στόχοι, θα πρέπει το εργαστήριο να είναι εφοδιασμένο, έτσι ώστε να μπορεί να εκπληρώσει έρευνες πάνω στην φυσιολογία των φυτών καθώς και στις δοκιμές γενώματος.

1.2 ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ- ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ

Οι διάφοροι ζωντανοί οργανισμοί παρουσιάζουν μεταξύ τους διαφορές ως προς την συνθεσή τους, τον τρόπο που αναπαράγονται αλλά και πολλαπλασιάζονται. Ανεξάρτητα με τα παραπάνω όλοι οι οργανισμοί πέρασαν από το στάδιο της μονοκύτταρης υπόστασης. Κάθε οργανισμός διέχεται από το στάδιο του κατάρου (σύζευξη του ωαρίου με τον αρσενικό γαμέτη).

Βρίσκοντας το κατάλληλο περιβάλλον, ο κάθε οργανισμός διαθέτει πληροφορίες και χαρακτηριστικά τα οποία είναι απαραίτητα για την αναπτυξή του και την αναπαραγωγή του. Κάθε κύτταρο (σωματικό) είναι ικανό κάτω από δεδομένες συνθήκες να παράγει έναν τέλειο οργανισμό. Αυτή είναι και η ιδιότητα που η οποία λέγεται ολοδυναμία ή αναπαραγωγική ικανότητα (totipotency). Από ένα απλό κύτταρο το οποίο μπορεί να αναπαράξει τον εαυτό του και σε αυτή την διαδικασία υπάρχει η δυνατότητα διαφοροποίησης αυτών ώστε να σχηματιστούν διάφοροι ιστοί και όργανα και η ιδιότητα αυτή απαντάται στα κύτταρα τα οποία δεν έχουν ακόμα διαφοροποιηθεί.

Ερώτημα το οποίο προκύπτει και απασχολεί τους επιστήμονες είναι το αν μπορεί ένα μεριστωματικό κύτταρο, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες να ξανβρεί την αναπαραγωγική του ικανότητα, διότι τα σωματικά κύτταρα επιτελούν άλλες λειτουργίες.

Μια πρώτη προσέγγιση έγινε από τους βιολόγους Γερμανούς M.J Scheiden και T. Schwann και οι οποίοι μίλησαν για την θεωρία του κυττάρου. Όπου συμπέραναν ότι το κάθε κύτταρο είναι ανεξάρτητο και ικανό να παράγει έναν οργανισμό ο οποίος να είναι τέλειος, κάτω από κατάλληλες συνθήκες διατηρώντας τις πληροφορίες οι οποίες είναι ίδιες με εκείνες του γονιμοποιημένου.

Ο Schwann το 1847 υποστήριξε ότι κάθε κύτταρο διαθέτει μια ιδιαίτερη δύναμη, το οποίο θα μπορεί να έχει ανεξάρτητη ζωή αν του δωθούν οι κατάλληλες συνθήκες περιβάλλοντος που υπάρχουν στον οργανισμό.

Στην συνέχεια υπήρξαν επιστήμονες οι οποίοι συμπέραναν, ότι απομονώνοντας τμήματα από κάθε φυτικό όργανο θα μπορούσε να παραχθεί ένα ολόκληρο φυτό με απαραίτητες τις κατάλληλες συνθήκες περιβάλλοντος, (Vochting 1878) και (Schleiden και Schwann). Χωρίς όμως να αποδείξουν κάποιο συγκεκριμένο τρόπο.

Ο P.R White ήταν αυτός ο οποίος έκανε με επιτυχία την πρώτη *in-vitro* καλλιέργεια και ο οποίος χρησιμοποίησε στο πειράμα του τις κορυφές από τις ρίζες της τομάτας και τις τοποθέτησε σε διάλυμα ανόργανων στοιχείων με ζάχαρη και εκχύλισμα ζύμης. Η ανάπτυξη τους ήταν συνεχής με την θειαμίνη, πυροδοξίνη και την νιασίνη.

Σήμερα οι προσπάθειες των ερευνητών εστιάζονται:

- μαζική παραγωγή πολλαπλασιαστικού υλικού,
- στην θεραπεία προσβεβλημένων από ασθένειες και ιώσεις σημαντικών δένδρων και φυτών,

- στην διαφύλαξη των φυτών που βρίσκονται σε κίνδυνο εξαφάνισης
- στην παραγωγή προϊόντων για άλλους σκοπούς και
- στην διάσωση και ανάπτυξη ζυγωτικών εμβρύων τα οποία δεν μπορούν να παράγουν τέλεια φυτά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

2.1. Γενικά

Η επιτυχία σε μια *in-vitro* καλλιέργεια, εξαρτάται κυρίως από το κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα δηλαδή από τη σύνθεση αυτού. Οπότε η σύνθεση θα πρέπει να αποτελείται από οργανικές ουσίες (σάκχαρα) οι οποίες θα παρέχουν στα έκφυτα τις βασικές πηγές ενέργειας έτσι ώστε να λειτουργούν όπως και το μητρικό φυτό από το οποίο προήλθαν. Τα κυριότερα στοιχεία είναι απαραίτητα και έχουν προκύψει έπειτα από έρευνες για τις *in-vitro* καλλιέργειες είναι ανόργανα στοιχεία (κόρια και ιχνοστοιχεία), ζάχαρη, θειαμίνη, γλυσίνη, πυριδοξίνη (B6) και νικοτινικό οξύ. Αναλόγως όμως με το είδος της *in-vitro* καλλιέργειας και του εκφύτου, προστέθηκαν κάποιες επιπλέον βιταμίνες, αποστάγματα ζυμών, αυξητικές ουσίες, ενεργός άνθρακας, αγαρόζη και οργανικά οξέα. Άρα προκύπτει ότι οι συνθέσεις των θρεπτικών διαλυμάτων ποικίλουν και διαφέρουν όσον αφορά το κάθε είδος εκφύτου, όπου αυτό προκύπτει ύστερα από έρευνες και πειραματισμούς.

2.2. Μεθοδολογία

Για την επίτευξη και την ολοκλήρωση μιας καλλιέργειας *in-vitro* θα πρέπει να παρέχεται ο κατάλληλος χώρος και ο κατάλληλος εξοπλισμός. Οι χώροι στους οποίους θα γίνονται οι απαραίτητες εργασίες και οι οποίοι θα είναι κατάλληλα εξοπλισμένοι με τους απαιτούμενους κανόνες διάταξης υλικών και αντικειμένων θα πρέπει να είναι απαραίτητως καθαροί και αποστειρωμένοι.

Έλεγχοι για την ύπαρξη μικροβίων και άλλων μικροοργανισμών θα πρέπει να γίνονται τόσο στα αντικείμενα και εργαλεία τα οποία χρησιμοποιούνται στη διαδικασία της παραγωγής όσο και στα έκφυτα τα οποία επιλέχθηκαν. Όλα αυτά γίνονται, λόγω του κινδύνου ανάπτυξης κάποιων παθογόνων μικροοργανισμών, κατά τις απαιτούμενες

εργασίες και κυρίως του φυτικού υλικού κατά την μεταφορά του και την τοποθέτησή του στα δοχεία για την αναπαραγωγή.

Οπότε η μεθοδολογία που ακολουθείται είναι επιλογή κατάλληλου, ελεγχόμενου χώρου επιλογή και χρήση των απαραίτητων εργαλείων-υλικών καθώς και επιλογή κατάλληλου φυτικού υλικού για την αναπαραγωγή, την εξέλιξη του σε φυτάριο το οποίο θα είναι έτοιμο για την εγκατάσταση στο εξωτερικό περιβάλλον (θερμοκήπιο-ύπαιθρο).

Το υπόστρωμα το οποίο θα χρησιμοποιηθεί θα πρέπει να είναι και αυτό κατάλληλο. Κυρίως χρησιμοποιούνται ζελοποιητές άγαρ(agar)οι οποίοι είναι υψηλής καθαρότητας με άριστη ικανότητα ζελοποίησης.

2.2.1. Υποστρώματα

Τα υποστρώματα τα οποία θα χρησιμοποιηθούν για την κάθε καλλιέργεια *in-vitro* θα πρέπει να διαφέρουν σε κάθε περίπτωση. Οι ποσότητες και οι αναλογίες διαφέρουν από θρεπτικό υπόστρωμα σε θρεπτικό υπόστρωμα. Για την παρασκευή σωστών θρεπτικών διαλυμάτων οι χημικές ενώσεις πρέπει να διαλύονται πλήρως και σε καμιά περίπτωση δεν γίνονται αποδεκτά τα αιωρήματα ενώσεων. Τα περισσότερα ανόργανα θρεπτικά στοιχεία που υπάρχουν στο εμπόριο είναι σε μορφή αλάτων τα οποία είναι ευδιάλυτα. Υπάρχουν όμως και πολλές οργανικές ενώσεις, όπως ορμόνες, αμινοξέα κ.α. που δεν διαλύονται εύκολα και θα πρέπει να γίνει χρήση κάποιου διαλύτη. Τέτοιοι διαλύτες είναι το νερό, το HCL, το NaOH, το οινόπνευμα καθώς και σε κάποιες περιπτώσεις ο αιθέρας, η βενζίνη κ.α. Η ποσότητα και οι αναλογίες θα πρέπει να είναι ακριβείς και σωστές, ώστε να μην υπάρξει πρόβλημα στην σύνθεση του θρεπτικού υποστρώματος από την μία και από την άλλη να μην γίνουν αλλαγές στην φυσιολογία και στις μορφογενετικές διεργασίες των κυττάρων.

Σημείο στο οποίο πρέπει, να σταθούμε είναι τα θρεπτικά διαλύματα των Murashige & Skoog 1962 (MS), Gamborg 1968 (B5), Heller 1965 και Linsmajer & Skoog 1965 η σύνθεση των οποίων φαίνεται στον πίνακα 1.

Οποιοδήποτε θρεπτικό υπόστρωμα και αν είναι αυτό, θα πρέπει να έχει παρασκευαστεί πρόσφατα ώστε να μην υπάρξει διαφοροποίηση της όλης διαδικασίας. Μέχρι και τις τελευταίες έρευνες που έχουν γίνει έχει προκύψει ότι φυτικά κύτταρα ή

ιστοί οι οποίοι δεν συμβαδίζουν με κάποιες in-vitro καλλιέργειες, κατάφεραν κάτω από την επίδραση κάποιου άλλου θρεπτικού υποστρώματος ή άλλων περιβαλλοντικών συνθηκών να παραχθούν in-vitro νέα φυτά. Οι δυσκολίες που πιστεύεται ότι μπορεί να υπάρχουν για την αναπαραγωγή φυτών μπορεί να οφείλονται:

1. στην μη γνώση μας για την ανάπτυξη των κυττάρων, καθώς και στο να επάγουμε στα κύτταρα τα στοιχεία του προσδιορισμού και της διαφοροποίησης

2. στην αναπαραγωγική ικανότητα

3. στην δυσκολία μας να δώσουμε το έναυσμα, ώστε τα κύτταρα να προχωρήσουν στην διαδικασία της μορφογένεσης που είναι και ο στόχος μας στην αδυναμία μας, να παρέχουμε κατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες στις in-vitro καλλιέργειες κάτω από τις οποίες θα προκύψει επιθυμητό μορφογενετικό υλικό.

Θρεπτικά στοιχεία

Τα θρεπτικά στοιχεία τα οποία απαιτούνται για την σύνθεση του υποστρώματος διακρίνονται στις εξής κατηγορίες

A) Ανόργανα θρεπτικά στοιχεία, τα οποία χωρίζονται σε κύρια στοιχεία ή μακροστοιχεία όπου είναι τα C,O,H,N,K,P,Ca,S και Mg. Τα κύρια αυτά στοιχεία ποικίλλουν ανάλογα με το φυτικό είδος καθώς και τις συγκεντρώσεις αυτών. Επίσης παρουσιάζονται και με τις ανάλογες μορφές τους π.χ το άζωτο με την μορφή αμμωνιακού αζώτου, το κάλλιο με την μορφή νιτρικού καλίου, το ασβέστιο με την μορφή του ένυδρου χλωριούχου ασβεστίου και το μαγνήσιο με την μορφή του ένυδρου θειικού μαγνησίου.

B) Τα ιχνοστοιχεία ή μικροστοιχεία, είναι και αυτά απαραίτητα στοιχεία (Fe,Mn,Zn,B,Cu,Mo,Cl και J) σε μικρότερο ποσοστό συγκέντρωσης αλλά πολύ καθοριστικά. Και σε αυτή την κατηγορία η χρήση των στοιχείων είναι ανάλογη με το φυτικό είδος το οποίο χρησιμοποιείται, ώστε να δραστηριοποιηθούν κάποιες λειτουργίες.

Γ) Οργανικές ενώσεις, σημαντικές και καθοριστικές κυρίως οι πηγές άνθρακα και ενέργειας. Στην περίπτωση αυτή έχουμε την χρήση της ζαχαρόζης και της γλυκόζης (μονοσακχαρίτης) καθώς και άλλων σακχάρων, όπως γαλακτόζη, μαλτόζη, λακτόζη και άμυλο.

Πίνακας1. Σύνθεση μερικών επιλεγμένων θρεπτικών διαλυμάτων για in-vitro καλλιέργειες. (Murashige & Skoog 1962 (MS), Gamborg 1968 (B5), Heller 1965 και Linsmajer & Skoog 1965)

Τ Ε Ι Κ Α Λ Α Μ Α Τ Α Σ
Τ Μ Η Μ Α
Ε Κ Δ Ο Σ Ι Ε Ω Ν * Β Ι Β Λ Ι Ο Θ Η Κ Η Σ

Χημική Ένωση	Όνομασίες διαλυμάτων (ονόματα ερευνητών)			
	Gamborg's B5 (1968)	Heller's 1965	Linsmajer & Skoog (1965)	Murashige & Skoog, MS (1962)
	ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ mg/l			
AlCl ₃	-	0.03	-	-
CaCl ₂ ·2H ₂ O	150.0	75.0	440.0	440.0
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	-	-	-	-
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	-	0.025	0.025
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.03	0.025	0.025
FeCl ₃ ·6H ₂ O	-	1.0	-	-
Fe ₂ (SO ₄) ₃	-	-	-	-
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8	-	27.85	27.8
H ₃ BO ₃	3.0	1.0	6.2	6.2
KCl	-	750.0	-	-
KH ₂ PO ₄	-	-	170.0	170.0
KI	0.75	0.01	0.83	0.83
KNO ₃	2500.0	-	1900.0	1900.0
MgSO ₄ ·7H ₂ O	246.0	250.0	370.0	370.0
MnSO ₄ ·H ₂ O	10.0	-	16.897	-
MnSO ₄ ·4H ₂ O	-	0.1	-	22.3
NaH ₂ PO ₄ anhydr	-	-	-	-
NaH ₂ PO ₄ ·H ₂ O	150.0	-	-	-
NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	-	141.0	-	-
NaNO ₃	-	600.0	-	-
Na ₂ EDTA	-	-	-	37.3
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	-	-	37.25	-
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	-	0.25	0.25
Na ₂ SO ₄	-	-	-	-
NH ₄ NO ₃	-	-	1650.0	1650.0
(NH ₄) ₂ SO ₄	134.0	-	-	-
NiCl ₂ ·6H ₂ O	-	0.03	-	-
Zn SO ₄ ·7H ₂ O	2.0	1.0	10.58	8.6
μυο-Ινοσιτόλη	100.0	-	100.0	100.0
Νικοτινικό οξύ	1.0	-	-	-
Παντοθενικό οξύ	0.4	-	-	-
Υδροχλωρική πυριδοξίνη	1.0	-	-	-
Ριβοφλαβίνη	0.015	-	-	-
Υδροχλωρική θειαμίνη	10.0	-	0.4	0.1

2.2.2. Χαρακτηριστικά του περιβάλλοντος ιστοκαλλιέργειας

Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες των καλλιεργούμενων εκφύτων εντοπίζονται κυρίως σε δύο βασικές περιοχές, στην αέρια περιοχή και στην περιοχή των ριζών. Ο μηχανισμός των περιβαλλοντικών αλλαγών είναι όμοιος ή σχεδόν όμοιος με εκείνων του θερμοκηπίου. Στην πραγματικότητα η καλλιέργεια εκφύτων *in-vitro* είναι σαν μια μινιατούρα θερμοκηπίου ή μικρού θαλάμου σε ασηπτικές συνθήκες. Οπωσδήποτε, στην προκειμένη περίπτωση υπάρχουν προβλήματα τα οποία είναι σημαντικά και τα οποία επηρεάζουν την ανάπτυξη και αύξηση των κυττάρων. Επίσης εντοπίζεται και προκύπτει ένα σοβαρό θέμα το οποίο έχει να κάνει με το υψηλό κόστος παραγωγής.

Τα γενικά χαρακτηριστικά του *in-vitro* περιβάλλοντος.

Α. Οι αέριες συνθήκες περιβάλλοντος, είναι η υψηλή σχετική υγρασία, η θερμοκρασία αέρος, η χαμηλή περιεκτικότητα CO₂ κατά την περίοδο του φωτός καθώς και η υψηλή περιεκτικότητα CO₂ κατά την περίοδο του σκότους, όπως και υψηλή περιεκτικότητα σε αιθυλένιο (C₂H₄). Την περιοχή των ριζών χαρακτηρίζει η υψηλή συγκέντρωση σακχάρων, η υψηλή αλατότητα, μικρό ποσοστό μικροοργανισμών και τέλος υψηλή περιεκτικότητα σε φυτοορμόνες. Επίσης, παρατηρείται όσον αφορά το νερό, χαμηλός ρυθμός πρόσληψης, αργή πρόσληψη ιόντων καθώς και χαμηλός ρυθμός πρόσληψης σακχάρων.

Β. Η συγκέντρωση του CO₂, του οποίου ο ρόλος είναι σημαντικός.

Γ. Το υδατικό δυναμικό του αέρος και του μέσου καλλιέργειας, το οποίο είναι μικρότερο στα δοχεία όπου γίνεται η καλλιέργεια σε σύγκριση με το υδατικό δυναμικό των έξω εκφύτων.

Δ. Το φως, το οποίο πρέπει να είναι σταθερό και να προγραμματίζεται ανάλογα με το είδος των εκφύτων. Το απαιτούμενο φως για κάθε καλλιέργεια ρυθμίζεται μέσω κάποιου μηχανισμού (χρονοδιακόπτη) και θα πρέπει να είναι ομοιόμορφο σε όλο το θάλαμο που υπάρχουν τα φυτάρια που καλλιεργούνται.

Ε. Η θερμοκρασία, το φως και η υγρασία όπως θα δούμε στην συνέχεια είναι

παράγοντες οι οποίοι πρέπει να παρουσιάζουν σταθερότητα και να διαμορφώνονται ανάλογα με το είδος των φυταρίων. Η θερμοκρασία αέρος κατά την διάρκεια της φωτοπεριόδου εντός των δοχείων είναι σχεδόν πάντα, 0,5-1°C βαθμούς υψηλότερη από την εξωτερική θερμοκρασία των δοχείων. Στην περίπτωση αυτή θα πρέπει να υπάρχει η δυνατότητα ελέγχου της θερμοκρασίας μέσω κάποιων μηχανημάτων, γιατί είναι απαραίτητο να γνωρίζουμε τα επίπεδα τα οποία βρίσκεται.

Στ. Το νερό το οποίο χρησιμοποιείται στις καλλιέργειες θα πρέπει να επιλέγεται με προσοχή. Θα πρέπει να είναι απαλλαγμένο από ξένες ουσίες και ξένα σωματίδια διότι θα χρησιμοποιηθεί για την προετοιμασία και την παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος.

ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΙΚΟΣ ΕΛΕΓΧΟΣ ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΟΣΤΑΣΙΑ ΤΗΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.

Τα τελευταία χρόνια, ένας αριθμός νέων τεχνολογιών έχει αναπτυχθεί σημαντικά για την προστασία των καλλιεργειών. Πρόσφατες μέθοδοι, οι οποίες έχουν εφαρμοστεί στην γεωργία μας δίνουν πληροφορίες ότι εφαρμόζοντας τις νέες τεχνολογίες έχουμε υψηλότερη ποιοτική παραγωγή με λιγότερη ενέργεια.

Η νέα, υψηλή τεχνολογία περιλαμβάνει άριστα ειδικά συστήματα ηλεκτρονικών υπολογιστών και νέα υλικά βιοτεχνολογίας κλπ.

Ο έλεγχος του περιβάλλοντος είναι πολύ σημαντικός γιατί οι κατάλληλες συνθήκες καλλιέργειας, θα βοηθήσουν τα φυτά να έχουν πιο γρήγορη και σωστή ανάπτυξη κανοντάς τα πιο εύρωστα και πιο ανθεκτικά στο στάδιο του εγκλιματισμού.

2.3. Φυτικό υλικό

Για να στηθεί μια *in-vitro* καλλιέργεια θα πρέπει πρώτα από όλα να γίνει η σωστή επιλογή του κατάλληλου εκφύτου. Το έκφυτο θα πρέπει να προέρχεται από υγιές φυτό απαλλαγμένο από τυχόν φορτίο παθογόνων μικροοργανισμών, να έχει ξεπλυθεί καλά και με μεγάλη προσοχή, ώστε να αποφευχθεί τυχόν αποτυχία του αποτελέσματος.

Το έκφυτο μπορεί να είναι:

α) μεριστώματα βλαστού, η ρίζας ή ένας παρεγχυματικός ιστός ή ένα τμήμα

αποθησαυριστικού ιστού

β) ένα τμήμα ή ολόκληρος ιστός

γ) κάποιο όργανο π.χ. ένα φύλλο, ένας οφθαλμός, μία κοτυληδόνα ή και ακόμα ένα ολόκληρο ζυγωτικό έμβρυο.

Επίσης διαφορές παρουσιάζονται και μεταξύ των εκφύτων που προέρχονται από μονοκότυλα ή δικότυλα φυτικά είδη λόγω διαφοράς στην φυσιολογία τους.

2.4. Ειδικές περιπτώσεις (καλλιέργεια πρωτοπλαστών, κυττάρων)

2.4.1. Καλλιέργεια πρωτοπλαστών

Ο πρωτοπλάστης είναι το ζωντανό μέρος των κυττάρων. Ο πρωτοπλάστης αποτελείται από τον πυρήνα, το κυτταρόπλασμα και την ημιπερατή πρωτοπλασματική μεμβράνη. Η καλλιέργεια των πρωτοπλαστών συναντά κάποιες δυσκολίες αλλά χρησιμοποιείται για την επίτευξη κάποιων σκοπών π.χ.:

α) δημιουργία υβριδίων. Στην περίπτωση αυτή έχουμε την συγχώνευση πρωτοπλαστών όπου έχουμε το φαινόμενο της συγχώνευσης ή σύμπληξης, κυρίως σε περιπτώσεις όπου η φυσική γονιμοποίηση είναι αδύνατο να πραγματοποιηθεί.

β) εισαγωγή κάποιου άλλου υλικού, όπως γίνεται και με την ενδοκύτωση. Όπως εισαγωγή σε πρωτοπλάστες πυρήνων, χλωροπλαστών, βακτηρίων, DNA

γ) μελέτη της βιοσύνθεσης του πληθυσμού των γυμνών πρωτοπλαστών ως ένα κυτταρικό σύστημα.

Κατά την περίπτωση των *in-vitro* καλλιέργειών έχουμε την απομόνωση των πρωτοπλαστών και την χρήση τους ως έκφυτα. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με μηχανικές αλλά και με ενζυματικές μεθόδους.

Οι τρόποι καλλιέργειας πρωτοπλαστών ποικίλουν, όπου και διαχωρίζονται στις εξής περιπτώσεις.

α) με την μορφή σταγόνων

β) σε μικρό-θαλάμους και

γ) σε αραιή ή πηκτή αгарόζη. Όπου και πιο σωστή και ακριβής θεωρείται η τρίτη, καθότι παρατηρείται καλύτερη στήριξη πρωτοπλαστών. Στην περίπτωση της πηκτής ή

αραιής αγαρόζης έχουμε την προσθήκη μέρους του θρεπτικού διαλύματος της *in-vitro* καλλιέργειας με κάποιο ποσοστό μαννιτόλης. Στη συνέχεια λαμβάνεται δείγμα από το αιώρημα και τοποθετείται σε τρυβλίο όπου και προστίθεται θρεπτικό διάλυμα MS (Murashige and Skoog) μαζί με μαννιτόλη. Η θερμοκρασία του είναι στους 40°C. Στην πορεία μπαίνει σε θάλαμο θερμοκρασίας 25°C. Στη συνέχεια θα πραγματοποιηθούν οι συγχωνεύσεις, θα αποκτηθούν τα απλοειδή ή εμβρυακά φυτά που επιζητούμε με νέο τοίχωμα όπου και θα αρχίσει πάλι η διαίρεση τους.

2.4.2 Καλλιέργεια κυττάρων

Η καλλιέργεια κυττάρων είναι μια καλλιέργεια η οποία λαμβάνει μέρος σε υγρό διάλυμα, όπου τα κύτταρα παραμένουν αιωρούμενα στο υγρό. Η κυτταροκαλλιέργεια προκύπτει από την τοποθέτηση τμήματος κάλου σε υγρό διάλυμα, όπου ανακινείται συνέχεια με την βοήθεια κάποιου δονητή, για το απαραίτητο οξυγόνο. Έτσι στην πορεία επέρχονται οι κυτταροδιαιρέσεις, όπου και προκύπτουν και συνυπάρχουν μέσα στην ίδια υγρή καλλιέργεια, μεμονωμένα κύτταρα, υπολείμματα του αρχικού εκφύτου και νεκρά κύτταρα. Θα πρέπει να γίνεται σωστή δόνηση των δοχείων καθώς και επαναλήψεις για πιο έγκυρα αποτελέσματα. Εκτός από τμήμα κάλου μπορεί να χρησιμοποιηθούν και τμήματα φυτικού ιστού.

Αυτού του είδους η καλλιέργεια θεωρείται από γενετικής άποψης πολύ σταθερή, λόγω του ότι τα φυτά τα οποία προκύπτουν προέρχονται από την διαδικασία της άμεσης σωματικής εμβρυογένεσης.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

ΕΓΚΛΙΜΑΤΙΣΜΟΣ

3.1 Γενικά

Πολλές έρευνες έχουν κληθεί να λύσουν τα προβλήματα τα οποία σχετίζονται με τον εγκλιματισμό των φυτών. Σε αυτό το κεφάλαιο θα αναλυθούν τα χαρακτηριστικά των καλλιεργούμενων φυταρίων σε *in-vitro* συνθήκες, καθώς και τα χαρακτηριστικά αυτών τα οποία θα βρεθούν σε *ex-vitro* κατάσταση. Ακόμη θα αναφερθούν και θα παρουσιαστούν μέθοδοι οι οποίες θα αναφέρονται στο ποσοστό αύξησης και ανάπτυξης των φυταρίων κατά το στάδιο εγκλιματισμού.

Κατά το στάδιο του εγκλιματισμού, τα μεγαλωμένα πλέον φυτάρια, παίρνονται και μεταφυτεύονται σε ασηπτικές συνθήκες μέσα σε κυψελοειδείς δίσκους. Έπειτα μεταφέρονται σε κάποιο θερμοκήπιο του οποίου το περιβάλλον είναι ελεγχόμενο, ώστε να αρχίσουν να εγκλιματίζονται. Τα εγκλιματιζόμενα πλέον φυτάρια ή αυτά τα οποία έχουν επιβιώσει, διαλέγονται στο τέλος αυτού του σταδίου και ξανά μεταφυτεύονται. Στην περίπτωση αυτή, η αυτοματοποιημένη μεταφύτευση που γίνεται είναι πολύ σημαντική στο στάδιο αυτό, για την μείωση του εργαστηριακού κόστους.

Η μέθοδος εγκλιματισμού χρησιμοποιείται ώστε να αποδώσει καλύτερες συνθήκες περιβάλλοντος για τα φυτάρια με υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης αυτών.

Ακολουθώντας την μέθοδο εγκλιματισμού, η θερμοκρασία, η υγρασία του αέρα, η ένταση του φωτός, η περιεκτικότητα σε CO₂ και η θερμοκρασία του θρεπτικού διαλύματος είναι ελεγχόμενα. Με την βοήθεια ενός υπολογιστή υπάρχει ο απόλυτος έλεγχος της μονάδας εγκλιματισμού καθώς καταγράφει και αναλύει τα διάφορα δεδομένα. Η μονάδα εγκλιματισμού μπορεί να λειτουργήσει, τόσο για εμπορικούς όσο και για ερευνητικούς σκοπούς ενώ ο περιβάλλοντας χώρος εντός της μονάδας, ελέγχεται βάση κάποιων καμπυλών, των καμπυλών εγκλιματισμού.

3.2 Αναγκαιότητα

Σε αυτό το κεφάλαιο θα δούμε, τα χαρακτηριστικά της *in-vitro* ιστοκαλλιέργειας σχετικά με το περιβάλλον και τον εγκλιματισμό των φυτών σε *ex-vitro* συνθήκες καθώς και ανάλυση με μεγάλη προσοχή του φυσικού περιβάλλοντος. Μέθοδοι και παράγοντες για την αύξηση του βαθμού επιβίωσης και αύξησης των φυταρίων θα περιληφθούν και θα αναλυθούν, καθώς τα συστήματα ελέγχου περιβάλλοντος για τον εγκλιματισμό των φυταρίων είναι ειδικά σχεδιασμένα, εξειδικευμένα και προγραμματισμένα για σωστά αποτελέσματα.

Κατά την συμβατική μέθοδο ιστοκαλλιέργειας παρουσιάζονται εργαστηριακά προβλήματα καθώς και υψηλό κόστος παραγωγής. Για να ξεπεραστούν αυτά τα προβλήματα ώστε να παραχθούν φυτά σε μεγάλες ποσότητες αυτοματοποιημένα και μηχανοποιημένα είναι απαραίτητο να γίνει εισαγωγή νέων μηχανημάτων και υπολογιστών ώστε να γίνεται έγκυρος έλεγχος των παραγόντων που επηρεάζουν τα φυτά κατά την παραγωγή τους. Σημαντικός επίσης είναι και ο ρόλος των μηχανημάτων ελέγχου στα θερμοκήπια, όπου έχουν βοηθήσει σημαντικά στον έλεγχο του περιβάλλοντος για την αύξηση των φυτών.

Η χρησιμότητα των μηχανημάτων, των συσκευών καταγραφής, των αυτοματοποιημένων γραμμών παραγωγής των συνθετικών σπόρων και της διατήρησης σε υγρό άζωτο του γενετικού υλικού είναι απαραίτητα για την πληροφόρηση, διαχείριση και ευκολία της παραγωγής της ιστοκαλλιέργειας. Οπωσδήποτε το κόστος παραγωγής εξακολουθεί να είναι το βασικό πρόβλημα. Κρίνοντας όμως από το μεγάλο ενδιαφέρον και τον μεγάλο ενθουσιασμό των επιστημόνων για αυτή τη δουλειά, πολύ σύντομα αυτές οι εργασίες θα γίνονται από προγραμματισμένους υπολογιστές για βιομηχανική μικρό-αναπαραγωγή.

Αυστηρές αναλύσεις, οι οποίες αφορούν την βιομηχανική παραγωγή φυτών, δείχνουν ότι η παραγωγή με την μέθοδο της ιστοκαλλιέργειας έχει βελτιωθεί σε επίπεδο βιομηχανίας σε πολλά σημεία.

3.3 Παράγοντες που επηρεάζουν τον εγκλιματισμό

Συζητώντας για την έναρξη λειτουργίας ενός μικρό-πολλαπλασιαστικού εργαστηρίου, η ανάγκη για ποιοτικό και εγγυημένο σύστημα είναι σημαντική ολοκλήρωση. Το κλειδί λειτουργίας για μια σωστή και εμπειριστατωμένη παραγωγή είναι οι κλώνοι και οι δοκιμές στο γενετικό υλικό. Η προσαρμογή των εκφύτων σε θερμοκήπιο είναι το σημαντικότερο κομμάτι και περιλαμβάνει εμπειριστατωμένες μελέτες στην εύκολη εγκαθίδρυση τους σε αυτό. Η επιτυχία του προγράμματος της παραγωγής εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως είναι η φύση και η προέλευση των εκφύτων, η μέθοδος αποστείρωσης, η ηλικία τα μέσα και οι συνθήκες του περιβάλλοντος καλλιέργειας.

Κατά τη καλλιέργεια των εκφύτων, όσον αφορά την άμεση αύξηση και εξέλιξη των μεθόδων κάτω από συνθήκες *in-vitro*, ειδικά προβλήματα υπάρχουν και τα οποία πρέπει να λυθούν, καθώς τα έκφυτα μεταφέρονται από ένα ολοκληρωμένο σύστημα από πολλαπλές εσωτερικές διασυνδέσεις και λειτουργικές δοκιμές, οι οποίες υφίσταται μεταξύ των ζωντανών οργανισμών. Οπότε, είναι απαραίτητη η δημιουργία ενός περιβάλλοντος το οποίο να επιτρέπει στα καλλιεργούμενα κύτταρα να αποκτούν ζωτικές λειτουργίες ως καινούργια συστήματα, με βασικούς βαθμούς αυτονομίας. Κατά την καλλιέργεια σε *in-vitro* συνθήκες το έκφυτο ζει πλέον ανεξάρτητο από το μητρικό φυτό έχοντας έτσι όλες τις γενετικές πληροφορίες που χρειάζεται. Ο μεταβολισμός των καλλιεργούμενων *in-vitro* κυττάρων, μπορεί να ελέγχεται μεταξύ των ορίων της προσαρμοστικότητας και να εξαρτάται από την κληρονομικότητα τους.

Στόχος των τεχνικών *in-vitro* είναι η διατήρηση των γονιδίων, η επίτευξη αντιγράφων τα οποία θα είναι γενετικά απαράλλακτα με το μητρικό ώστε να είναι έτοιμα να παραδοθούν για ιστοκαλλιέργεια και κλωνοποίηση.

Τα προβλήματα που συχνά παρουσιάζονται είναι το καφέτιασμα του ιστού, η υάλωση των κυττάρων και η δυσκολία στον εγκλιματισμό.

Το καφέτιασμα των εκφύτων, είναι ένα πρόβλημα που παρουσιάζεται κυρίως στα ξυλώδη φυτικά είδη και το οποίο οφείλεται στις φεννόλες και στις τανίνες που

περιέχονται στους ιστούς. Το πρόβλημα αυτό όμως μπορεί να ξεπεραστεί χρησιμοποιώντας αντιοξειδωτικά όπως π.χ το ασκορβικό οξύ.

Η υάλωση είναι η κατάσταση η οποία χαρακτηρίζει την υπερενυδάτωση των στοματίων των φυτών, όπως είναι τα αρωματικά, τα ξυλώδη φυτά και άλλα διάφορα φυτά κατά την διάρκεια της *in-vitro* παραγωγής τους. Η υάλωση είναι μια φυσιολογική διαταραχή η οποία παρατηρείται στα φυτάρια και η οποία γίνεται αντιληπτή λόγω της φαινομενικής κατάστασης τους. Σε πολλές περιπτώσεις όργανα του φυτού τα οποία είναι υαλωμένα παρουσιάζονται λιγότερο πράσινα και ελαφρώς εύθραυστα

Αυτή η διαταραχή της υάλωσης επέρχεται μόνο κατά την διάρκεια του πολλαπλασιασμού και ορισμένες φορές και κατά το στάδιο της ριζοβολίας. Φυτά τα οποία υποβάλλονται σε εντατικούς πολλαπλασιασμούς είναι περισσότερο ευάλωτα στην υάλωση. Οι φυσιολογικές συνθήκες υάλωσης λέγεται ότι σχετίζονται με την πολλαπλότητα των φυσικών (οσμωτική πίεση) και χημικών (αιθυλένιο, κυτοκινίνες) παραγόντων οι οποίοι εμπλέκονται στην όλη διαδικασία. Μεγάλο ποσοστό απωλειών φυταρίων στο στάδιο του εγκλιματισμού οφείλονται στις αιτίες υάλωσης. Στα χαρακτηριστικά του περιβάλλοντος, αναφέρεται ότι είναι πάνω από όλα ο κύριος λόγος του σχετικά χαμηλού ποσοστού επιβίωσης και του σχετικά χαμηλού ρυθμού αύξησης των φυταρίων στο στάδιο του εγκλιματισμού.

Μορφολογικά οι βλαστοί που προσβάλλονται από υάλωση παρουσιάζονται σκληρότεροι των κανονικών. Επίσης τα μεσογονάτια διαστήματα είναι κοντότερα από εκείνα των φυσιολογικών βλαστών. Τα φύλλα τους είναι μαζεμένα ενώ συχνά είναι πολύ επιμήκη, ζαρωμένα, κατσαρωμένα και πολύ γυαλιστερά.

Ανατομικά παρουσιάζεται υπερτροφικό το παρέγχυμα του βλαστού με υπερτροφία των κυττάρων και μεγάλους υαλώδεις χώρους. Επίσης, το μεσόφυλλο μοιάζει σπογγώδες. Ακόμη τα στομάτια των *in-vitro* φυτών δεν φαίνεται να έχουν σωστή λειτουργία του μηχανισμού τους και αυτό πρέπει να είναι ο κύριος λόγος της άμεσης απώλειας νερού κατά την διάρκεια του εγκλιματισμού κάτω από χαμηλές συνθήκες σχετικής υγρασίας.

Με την προσθήκη σακχάρων στο μέσο, το περιβάλλον γίνεται διαφορετικό σε πολλά στοιχεία έναντι του περιβάλλοντος εγκλιματισμού ή από του *ex-vitro* περιβάλλοντος.

Στον πίνακα 2 συνοψίζονται τα χαρακτηριστικά του περιβάλλοντος καλλιέργειας, στα στάδια του πολλαπλασιασμού και της ριζοβολίας, καθώς και οι επιδράσεις στην ανάπτυξη των εκφύτων στα συγκεκριμένα στάδια

Τα ακριβή χαρακτηριστικά του περιβάλλοντος, όσον αφορά την χαμηλή αέρια εναλλαγή που εκτιμούνται από το δοχείο είναι τα εξής:

1.υψηλή σχετική υγρασία (Ziv et al. 1983 Vanderscheaghe and Debergh 1987)

2.χαμηλή συγκέντρωση CO₂ κατά την διάρκεια της φωτοπεριόδου, υψηλή συγκέντρωση CO₂ κατά την διάρκεια της μη φωτοπεριόδου (Fujiwara et al. 1987, Kozai et al. 1987) και

3.υψηλή συγκέντρωση αιθυλενίου ιδιαίτερα όταν τα φυτά είναι υαλωμένα,(De Proft et al. 1985).

Πίνακας 2. Χαρακτηριστικά του περιβάλλοντος ιστοκαλλιέργειας στα στάδια του πολλαπλασιασμού και ριζοβολίας καθώς και οι επιδράσεις στην ανάπτυξη των φυταρίων στα στάδια πολλαπλασιασμού, ριζοβολίας και εγκλιματισμού.

Χαρακτηριστικά περιβάλλοντος	Οι επιδράσεις σε in-vitro συνθήκες	Οι επιδράσεις σε ex-vitro συνθήκες
Χαμηλή ανταλλαγή αερίων		
Υψηλή υγρασία	Μη δομημένη επικαλυμμένη επιφάνεια εφυμενίδας με κερί	
	Χαμηλός ρυθμός διαπνοής	Έντονη διαπνοή
	Δυσκολία στην ριζοβολία	Δυσκολία στην πρόσληψη νερού
	Δυσκολία στην πρόσληψη θρεπτικών συστατικών	Δυσκολία στην πρόσληψη θρεπτικών συστατικών
Υψηλή συγκέντρωση αιθυλενίου	Γήρανση των ιστών	Γήρανση των φυταρίων
Υψηλή συγκέντρωση CO ₂ κατά την διάρκεια της σκοτεινής περιόδου	Προώθηση της διαφοροποίησης	
Χαμηλό CO ₂ κατά την διάρκεια της φωτοπεριόδου	Χαμηλός ρυθμός φωτοσύνθεσης	
	Μικρή ή καθόλου ύπαρξη της φυλλικής επιφάνειας	Καταστολή της φωτοσύνθεσης
Χαμηλή ένταση φωτός	Δυσκολία στην εξέλιξη του αυτοτροφισμού	
Σταθερότητα των αέριων θερμοκρασιών	Υψηλή αναπνοή κατά την σκοτεινή περίοδο	Ευαισθησία στη περιβαλλοντική καταπόνηση
Χαμηλή διαλυτότητα οξυγόνου στο μέσο	Δυσκολία στην ριζοβολία	Θάνατος των φυτών
Υψηλή συγκέντρωση ανόργανων ιόντων	Υψηλή οσμωτική πίεση στο μέσο και υψηλή παραγωγή αιθυλενίου	Επιβράδυνση της αύξησης κατά την διάρκεια του χαμηλού ρυθμού φωτοσύνθεσης
Παρουσία υψηλής συγκέντρωσης ζάχαρης στο μέσο	Υάλωση καθώς και άλλες φυσιολογικές δυσλειτουργίες	
	Βακτηριακή ή μυκητολογική μόλυνση	
	Απώλειες φυτών	
Σταθερότητα του αέρα και της σύνθεσης του μέσου	Χαμηλή μεταφορά αερίων, και ιόντων	

Άλλα χαρακτηριστικά του περιβάλλοντος είναι:

- Χαμηλή ένταση φωτός.
- Σταθερές θερμοκρασίες καθ'όλη τη διάρκεια της ημέρας.

- Υψηλές συγκεντρώσεις ανόργανων ιόντων και οπότε υψηλή οσμωτική πίεση στο μέσο.

- Η στασιμότητα του αέρα μέσα στο δοχείο και η στασιμότητα των θρεπτικών συστατικών στο ζελώδες μέσο.

Οι αντιδράσεις των φυτών που παρουσιάζονται στο στάδιο του πολλαπλασιασμού και στα στάδια της ριζοβολίας κατά την ύπαρξη υψηλής υγρασίας είναι σε κάποιες περιπτώσεις η αιτία των εξής προβλημάτων:

- δυσλειτουργία των στοματίων
- μικρή ποσότητα από υγιείς δευτερεύουσες ρίζες.

Τα φυτάρια για το λόγω αυτό είναι ευαίσθητα στην καταπόνηση του περιβάλλοντος και ιδιαίτερα στην υδατική καταπόνηση κατά το στάδιο του εγκλιματισμού. Η υψηλή σχετική υγρασία σε συνδυασμό με την στασιμότητα του εσωτερικού αέρα του θρεπτικού ζελώδες μέσου και με την καταστολή πρόσληψης νερού και θρεπτικών συστατικών από τα φυτάρια, στα στάδια του πολλαπλασιασμού και της ριζοβόλησης, έχουν σαν συνέπεια κάποιες επιπτώσεις όπως, επιβράδυνση της αύξησης, φυσιολογικές διαταραχές των οργάνων καθώς και αλλαγή του μεγέθους τους. Οι αντιδράσεις των φυταρίων στα στάδια του πολλαπλασιασμού και της ριζοβόλησης σε συνδυασμό με τη χαμηλή ένταση του φωτός, την χαμηλή συγκέντρωση του CO₂ κατά την διάρκεια της φωτοπεριόδου και την παρουσία ζάχαρη στο μέσο έχουν ως αποτέλεσμα:

- χαμηλό ρυθμό φωτοσύνθεσης,
- μικρή ή καθόλου εμφάνιση φυλλικής επιφάνειας και
- χαμηλό βαθμό αύξησης των φυταρίων

Επίσης, τα καλλιεργούμενα *in-vitro* φυτάρια μεγαλώνουν σχετικά αργά κατά το στάδιο του πολλαπλασιασμού. Συνήθως οι απώλειες των φυταρίων οφείλονται σε μυκητολογικούς ή βακτηριακούς παράγοντες. Μετά τον πολλαπλασιασμό θα χρειαστούν μερικές εβδομάδες ή και περισσότερο για τον εγκλιματισμό τους πριν την μεταφορά τους σε συνθήκες υπαίθρου. Κατά την διάρκεια του εγκλιματισμού, περίπου ένα 20-50% των φυταρίων χάνεται, λόγω της μικρής ανθεκτικότητας τους στο στρες του περιβάλλοντος και της μη σωστής ισορροπίας του διοξειδίου άνθρακα. Οι πιθανότεροι παράγοντες του μειωμένου ποσοστού επιβίωσης και της μειωμένης ανάπτυξης των φυταρίων κατά το στάδιο του εγκλιματισμού είναι οι

- Χαμηλός ρυθμός φωτοσύνθεσης.
- Ημιτελής αυτοτροφισμός.
- Υψηλός ρυθμός διαπνοής σε κάποιο αδύνατο τμήμα του φυτού καθώς και μη φυσιολογική λειτουργία των στοματιών.
- Ημιτελές ριζικό σύστημα.
- Φυσιολογικές διαταραχές όπως η υάλωση.

Κατά την συμβατική μέθοδο τα ετερότροφα (φυτά τα οποία κατά την αναπτυξή τους χρειάζονται σάκχαρα), μιξότροφα και αυτότροφα, αναπτυσσόμενα φυτάρια, σύμφωνα με την μέθοδο της ιστοκαλλιέργειας στα στάδια της διαφοροποίησης πολλαπλασιασμού και ριζοβόλησης αναπτύσσονται σε μέσο με την παρουσία ζάχαρης εντός αυτού. Κατά την περίπτωση όμως της μεθόδου εγκλιματισμού, τα φυτάρια μεγαλώνουν χωρίς την παρουσία ζάχαρης στο υπόστρωμα. Με άλλα λόγια, τα φυτάρια στα στάδια της διαφοροποίησης, πολλαπλασιασμού και ριζοβόλησης αναπτύσσονται ετερότροφα ή μιξότροφα.

Στην περίπτωση όμως του σταδίου του εγκλιματισμού, τα φυτάρια αναγκάζονται να αναπτύσσονται αυτότροφα. Τα ετερότροφα ή μιξότροφα αναπτυσσόμενα φυτά, χρειάζονται οργανικά θρεπτικά στοιχεία όπως την ζάχαρη για ενέργεια και πηγή άνθρακα για την ανάπτυξη τους. Κατά την άλλη περίπτωση, τα αυτότροφα φυτάρια χρειάζονται μόνο ανόργανες πηγές ενέργειας, κυρίως φωτεινή ενέργεια, CO₂, νερό και θρεπτικά στοιχεία. Οι αυτότροφοι έχουν την ικανότητα δια μέσου της φωτοσύνθεσης να χρησιμοποιούν ανόργανα στοιχεία για να παράγουν ανόργανες ενώσεις. Οι μιξότροφοι είναι οι μερικώς ετερότροφοι ή μερικώς αυτότροφοι οργανισμοί.

Αυτή η δραστική αλλαγή στην αρχή του εγκλιματισμού από ετερότροφοι ή μιξότροφοι σε αυτότροφοι θα πρέπει πάντα να υπάρχει κατά νου στην προσπάθεια της ανεύρεσης βασικών και λογικών στρατηγικών όσον αφορά τον εγκλιματισμό των φυτών. Η εξέλιξη της αυτοματοποιημένης παραγωγής in-vitro φυταρίων, με χαμηλό κόστος μπορεί να γίνει ακόμη περισσότερο σημαντική στην γεωργία.

Τα in-vitro φυτάρια έχουν σημαντικά μικρή φωτοσυνθετική ικανότητα, οπότε τα σάκχαρα είναι απαραίτητα για αυτά και την λειτουργία τους. Όπως γίνεται με το διοξείδιο του άνθρακα για τα ετερότροφα και μιξότροφα φυτάρια κατά την ανάπτυξή τους. Οπωσδήποτε, βρέθηκε ότι είναι σημαντική και απαραίτητη η ικανότητα

φωτοσύνθεσης για τα in-vitro φυτάρια ώστε να εξελιχθούν σε αυτοτροφικά, εφοδιασμένα απαραίτητα από τους φυσικούς παράγοντες περιβάλλοντος όπως το CO₂ και το φως στο δοχείο καλλιέργειας οι οποίοι θα πρέπει απαραίτητως να ελέγχονται.

Κατά τα συμβατικά δοχεία της in-vitro καλλιέργειας για παράδειγμα, η συγκέντρωση του CO₂ εντός των δοχείων είναι συνήθως στα 100 ppm κατά την φωτοπερίοδο. Όπου τα φυτάρια δεν μπορούν να εξελιχθούν και να έχουν μια ισορροπημένη ποσότητα διοξειδίου του άνθρακα στις περισσότερες περιπτώσεις.

Επίσης, βρέθηκε ότι η ανάπτυξη των φυταρίων in-vitro προάγεται από τον εμπλουτισμό με διοξείδιο του άνθρακα σε συνδυασμό με υψηλές τιμές πυκνότητας φωτονίων, χωρίς καθόλου ζάχαρη στο μέσο. Κατά τα άλλα τα φυτάρια γίνονται πιο εύρωστα χωρίς την παρουσία ζάχαρης, οπότε στις περισσότερες περιπτώσεις δεν απαιτείται εγκλιματισμός.

Η μεγαλύτερη απώλεια φυταρίων, παρουσιάζεται κατά την μεταφορά των φυταρίων από τα δοχεία καλλιέργειας στο χώμα. Όπου και εκεί παρουσιάζονται οι ανησυχίες για τον εγκλιματισμό των φυτών. Για την αύξηση της επιβίωσης των φυτών εμπλέκονται παράγοντες όπως οι καταλύτες, συνθήκες υγρασίας, παροχής φωτισμού και εμπλουτισμός με CO₂. Ο έλεγχος της μεθόδου εγκλιματισμού μέσω Η/Υ έχει περιληφθεί ώστε να παρέχει καλύτερες συνθήκες περιβαλλοντικού ελέγχου με στόχο τον υψηλό βαθμό επιβίωσης καθώς και γρήγορη αύξηση των φυτών.

3.3.1 Φως

Το μέγεθος της ενέργειας του φωτός είναι ένας από τους παράγοντες που θα δούμε όσον αφορά τον εγκλιματισμό των φυτών σε ex-vitro συνθήκες καλλιέργειας. Η ενέργεια του φωτός καθίσταται τόσο σημαντική διότι παίζει καθοριστικό και ουσιαστικό ρόλο στην ανάπτυξη και στην ριζοβολία των φυταρίων.

ΟΙ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΟΥ ΚΟΚΚΙΝΟΥ ΚΑΙ ΤΟΥ ΜΠΛΕ ΦΩΤΟΣ ΣΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΦΥΤΑΡΙΩΝ ΣΕ IN-VITRO ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ.

Ο έλεγχος της μορφολογίας των φυταρίων είναι σημαντικός στην διαδικασία της παραγωγής με την μέθοδο της ιστοκαλλιέργειας γιατί περιλαμβάνει φυτάρια επιθυμητής ποιότητας σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης και εξέλιξης. Για παράδειγμα, φυτάρια με μεγάλα μεσογονάτια διαστήματα είναι ιδανικά για να χρησιμοποιηθούν σε *in-vitro* καλλιέργεια, ενώ φυτάρια με κοντούς και αδύνατους βλαστούς είναι κατάλληλα για εγκλιματισμό σε *ex-vitro* συνθήκες.

Η εφαρμογή του κόκκινου και του μπλέ χρώματος έχει εμφανή επίδραση στην μορφολογία του φυτού. Η ανάπτυξη, η μορφολογία και η διαφοροποίηση των *in-vitro* φυταρίων επηρεάζονται από την ποιότητα του φωτός.

Έχει παρατηρηθεί ότι η εφαρμογή του κόκκινου φωτός στο φυτό *Pelargonium* είναι σπουδαίας σημασίας διότι ενθαρρύνει την επιμήκυνση του στελέχους, ενώ το μπλέ φως την αναστέλλει. Οι λάμπες φθορίου κυρίως χρησιμοποιούνται ως πηγές φωτός στην διαδικασία της ιστοκαλλιέργειας, όμως είναι δύσκολο να ελέγχεται η ποιότητα του φωτός κάνοντας χρήση μόνο λάμπες φθορίου.

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΗΣ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΕΝΤΑΣΗΣ ΤΟΥ ΦΩΤΟΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ ΚΑΙ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΦΥΤΑΡΙΩΝ ΓΙΑ ΚΑΛΥΤΕΡΗ ΠΟΙΟΤΗΤΑ ΦΥΤΑΡΙΩΝ

Η επίδραση της θερμοκρασίας καθώς και η επίδραση της έντασης του φωτός κατά την διατήρηση των φυταρίων, παίζουν σημαντικό ρόλο στην καλή ποιότητα φυταρίων κατά την αποθήκευσή τους.

Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι των Hayashi και Kozai 1987, "Biotechnology in Agricultura and Forestry" η περίπτωση, όπου διαλέχτηκαν σπόροι από μπρόκολο (*Brassica oleracea*), οι οποίοι βλάστησαν σε ασηπτικές συνθήκες και καλλιεργήθηκαν φωτοαυτοτροφικά για 3 εβδομάδες στους 23°C και στα 160 μmol m⁻² s⁻¹ P.P.F.D. Στην συνέχεια, οι θερμοκρασίες οι οποίες και αποθηκεύτηκαν ήταν στους 5, 10 και 15°C ενώ οι συνθήκες φωτισμού στους 2 ή 5 μmol m⁻² s⁻¹ P.P.F.D.

Τα φυτάρια εκείνα τα οποία παρουσίασαν τα καλύτερα αποτελέσματα ήταν εκείνα όπου αποθηκεύτηκαν για έξι εβδομάδες στους 5 και στους 10°C και στα δύο επίπεδα

φωτισμού, ενώ εκείνα τα οποία η αποθήκευση τους έγινε στους 15°C και στα δύο επίπεδα φωτισμού δεν παρουσίασαν τα αντίστοιχα αποτελέσματα. Υψηλά ποσοστά παρατηρήθηκαν όσον αφορά την περιεκτικότητα της χλωροφύλλης, στους 10 και 15°C καθώς και στα $5\mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ P.P.F.D, ενώ και στο ξηρό βάρος των φυταρίων παρουσιάστηκε αύξηση κατά την διάρκεια της αποθήκευσης στους 5 και στους 10°C. Τα αποτελέσματα αυτά είναι πολύ σημαντικά, γιατί είναι από τους κύριους παράγοντες οι οποίοι θα συντελέσουν στην καλύτερη και επιθυμητή ποιότητα των φυταρίων κατά την διάρκεια της αποθήκευσης τους.

3.3.2 Σχετική Υγρασία

Η σχετική υγρασία είναι ένα από τα κλειδιά των περιβαλλοντικών παραγόντων, η οποία έχει επίδραση στον ρυθμό της φωτοσύνθεσης των φυταρίων καθώς και στην επιβίωση αυτών μετά την μεταφύτευση. Τα φυτάρια τα οποία μεταφέρθηκαν σε ένα διαφορετικό περιβάλλον για να γίνουν περισσότερο επιδεκτικά στις ποικίλες καταπονήσεις, είναι η περίπτωση όπου τα φυτάρια καλλιεργήθηκαν ετερο-μιξοτροφικά (συμβατικά) σε in-vitro συνθήκες κάτω από υψηλή σχετική υγρασία. Αυτά τα φυτάρια συχνά δεν επιβιώνουν κατά την ex-vitro καλλιέργεια.

Η σχετική υγρασία στα δοχεία καλλιέργειας είναι σημαντικός περιβαλλοντικός παράγοντας ο οποίος επιδρά στις σχέσεις νερού-φυτού και των οργάνων αυτού. Συχνά η σχετική υγρασία στα δοχεία καλλιέργειας έχει επίδραση όσον αφορά την εξέλιξη της μορφολογίας, της δομής των φύλλων, της λειτουργίας των στοματίων καθώς και της επιβίωσης των φυταρίων όταν αυτά θα πρέπει να μεταφερθούν σε ex-vitro συνθήκες.

Πολλές μελέτες έχουν δείξει ότι χαμηλή σχετική υγρασία εντός του δοχείου καλλιέργειας βελτιώνει την αντοχή στην απώλεια νερού και ως εκ τούτου την επιβίωση των φυταρίων σε ex-vitro συνθήκες.

Η αλλαγή της σχετικής υγρασίας εντός των δοχείων καλλιέργειας μπορεί να έχει επίδραση στην γενικότερη αύξηση και εξέλιξη των φυταρίων στα δοχεία πριν την μεταφύτευση σε ex-vitro συνθήκες, με αποτέλεσμα την αλλαγή της δομής και της λειτουργίας των φύλλων.

ΥΨΗΛΟΣ ΒΑΘΜΟΣ ΕΠΙΒΙΩΣΗΣ IN-VITRO ΟΠΟΡΩΦΟΡΩΝ ΔΕΝΤΡΩΝ ΣΤΗΝ ΔΙΑΡΚΕΙΑ ΤΟΥ ΕΓΚΛΙΜΑΤΙΣΜΟΥ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΚΘΕΣΗ ΤΟΥΣ ΣΕ ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΧΑΜΗΛΗΣ ΥΓΡΑΣΙΑΣ.

Τα φυτά τα οποία καλλιεργούνται σε συνθήκες in-vitro με υψηλή υγρασία και χαμηλή ένταση φωτός, παίρνουν θρεπτικά συστατικά και ενέργεια από το μέσο το οποίο καλλιεργούνται. Κατά την διάρκεια του εγκλιματισμού, φυσικές και δομικές αλλαγές επιτρέπουν στα φυτά να προσαρμοστούν στις νέες συνθήκες περιβάλλοντος, κυρίως στην χαμηλή σχετική υγρασία και στην υψηλή ένταση του φωτός. Ως αποτέλεσμα αυτού, τα φυτά γίνονται αυτοτροφικά και εξελίσσονται ως φυσιολογικά φυτά. Οπωσδήποτε ο εγκλιματισμός δεν είναι εύκολος σε πολλά φυτικά είδη με αποτέλεσμα το χαμηλό ποσοστό επιβίωσης τους. Στην περίπτωση αυτή του εγκλιματισμού, ο υψηλός βαθμός επιβίωσης των φυτών, βασίζεται στην ελεγχόμενη έκθεση τους στην χαμηλή σχετική υγρασία.

Τα καλλιεργούμενα in- vitro φυτά, εκτίθενται την ημέρα κάτω από συνθήκες χαμηλής σχετικής υγρασίας, δείχνοντας υψηλά ποσοστά επιβίωσης κατά την διάρκεια του εγκλιματισμού τους μέσα σε πλαστικό τούνελ εντός του θερμοκηπίου. Στην περίπτωση όμως, όπου η σχετική υγρασία κρατηθεί σε συνεχόμενα υψηλά επίπεδα, μόνο μερικά φυτά μπορούν να επιβιώσουν, γεγονός το οποίο είχε σαν ένδειξη ότι η έκθεση των φυτών σε χαμηλές συνθήκες υγρασίας μπορεί να οδηγήσει σε αλλαγές οι οποίες θα κάνουν τα φυτά λειτουργικά. Σε αυτό στο οποίο πρέπει να δίνεται προσοχή, ώστε η διατήρηση της υγρασίας του υποστρώματος να είναι εξισορροπημένη με το ποσοστό το ποσοστό της υγρασίας που χάνεται λόγω της διαδικασίας της διαπνοής. Σε αυτή την περίπτωση τα φυτά γρήγορα αρχίζουν να προσαρμόζονται και νέα φυλλαράκια κάνουν την εμφάνιση τους κατά την διάρκεια της πρώτης εβδομάδας εγκλιματισμού. Επίσης η απορρόφηση του νερού από τις ρίζες των φυτών είναι μια διαδικασία η οποία επαναφέρει τα φυτά από έναν μέτριο μαρασμό, ύστερα από την έκθεσή τους σε συνθήκες χαμηλής σχετικής υγρασίας.

3.3.3 Υπόστρωμα

Η κάθε καλλιέργεια όπως αναφέραμε και σε προηγούμενο κεφάλαιο χρειάζεται το κατάλληλο υπόστρωμα για κάθε ξεχωριστό φυτικό είδος. Οπότε λόγω της διαφορετικότητας των φυτών μεταξύ τους, η επιλογή του υποστρώματος καθώς και η ποσότητα και οι αναλογίες αυτών θα πρέπει να είναι οι κατάλληλες για κάθε φυτικό είδος.

ΟΙ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΤΩΝ ΧΗΜΙΚΩΝ ΣΤΗΝ ΡΙΖΟΒΟΛΙΑ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΕΓΚΑΘΙΔΡΥΣΗ ΤΟΥ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΟΥΜΕΝΟΥ ΦΥΤΙΚΟΥ ΕΙΔΟΥΣ (Picrorhiza kurroa) ΣΤΟ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΟ

Το κομμάτι της διαδικασίας της ιστοκαλλιέργειας για το φυτό Picrorhiza kurroa (Scrophulariaceae) όσον αφορά την επίδραση των συνθηκών ριζοβολίας κατά την εγκατάσταση των φυταρίων σε ex-vitro συνθήκες ερευνάται. Προκειμένου να γίνει σαφές αυτό παρατίθεται η παρακάτω εργασία των Hayashi και Kozai (1987)

Η ριζοβολία in-vitro έγινε σε υπόστρωμα MS (Murashige & Skoog) εμπλουτισμένο με IAA, IBA και NAA σε επίπεδο του 1 μΜ. Το ποσοστό των ριζοβολημένων βλαστών που προέκυψε ήταν υψηλό σε όλα τα μέσα εκτός του μάρτυρα ο οποίος δεν περιείχε αυξίνη. Στην περίπτωση όπου χρησιμοποιήθηκε ως ρυθμιστής το IBA προέκυψαν ρίζες με μεγάλο μήκος καθώς και ο κάλος ο οποίος παρουσιάστηκε σε όλες τις περιπτώσεις δεν παρουσίασε κανένα πρόβλημα.

Η εγκατάσταση των φυταρίων εντός του θερμοκηπίου ήταν περισσότερο επιτυχής όταν οι βλαστοί ριζοβόλησαν στο IBA μέσο, όπου το ποσοστό της επιβίωσης έφτασε το 100%. Στην συνέχεια ακολουθούν τα φυτάρια εκείνα τα οποία ριζοβόλησαν με ποσοστό 84% στο μέσο το οποίο περιείχε ως ρυθμιστή το IAA. Μόνο το 24% των φυταρίων επιβίωσαν από εκείνα τα οποία ριζοβόλησαν στο μέσο με το NAA, καθώς υπάρχει απόδειξη η οποία δείχνει ότι η επιβίωση και η εξέλιξη των φυταρίων έχει άμεση σχέση με την ποσότητα του κάλου που παράχθηκε.

3.3.4 P.P.F.D (photosynthetic photon flux density)

Πυκνότητα Ροής Ακτινοβολίας

Παράγων που επιδρά στην προώθηση του ρυθμού της φωτοσύνθεσης, στην φωτοσυνθετική ικανότητα, στην επιβίωση των φυταρίων μετά την μεταφύτευση και στην αύξηση του ξηρού βάρους. Επιτυχημένο το σύστημα μικρό-πολλαπλασιασμού θα θεωρηθεί από την επιτυχή ή μη μεταφορά των φυταρίων από το περιβάλλον καλλιέργειας στο θερμοκήπιο ή στο χωράφι. Ένα συνηθισμένο πρόβλημα που συναντάμε κατά την μεταφύτευση είναι η ανεπαρκής φωτοσυνθετική ικανότητα ώστε να επιτευχθεί μια θετική ισορροπία άνθρακα. Το P.P.F.D και η σχετική υγρασία είναι τα κλειδιά των περιβαλλοντικών παραγόντων τα οποία επιδρούν στον ρυθμό φωτοσύνθεσης αλλά και στην επιβίωση των φυταρίων μετά την μεταφύτευση.

Η εξέταση αυτού του παράγοντα είναι ιδιαίτερης σημασίας διότι παίζει σημαντικό ρόλο στον πλήρη εγκλιματισμό των φυταρίων κατά την περίπτωση της διάρκειας της μιας ημέρας εγκλιματισμού με διαφορετικό P.P.F.D και σχετική υγρασία. Η αύξηση της φωτοσυνθετικής ικανότητας των φυτών αμέσως μετά την μεταφύτευση παρατηρήθηκε σε σχέση με την ανάπτυξη και την επιβίωση κάτω από τεχνητές συνθήκες εφαρμογής στον αγρό.

ΓΡΗΓΟΡΟΣ ΕΓΚΛΙΜΑΤΙΣΜΟΣ ΦΥΤΑΡΙΩΝ ΕΥΚΑΛΥΠΤΟΥ (Eucalyptus calmadulensis) ΜΕ ΕΛΕΓΧΟΜΕΝΗ ΤΗΝ ΠΥΚΝΟΤΗΤΑ ΦΩΤΟΝΙΩΝ ΚΑΙ ΤΗΝ ΣΧΕΤΙΚΗ ΥΓΡΑΣΙΑ.

Το φυτικό είδος Eucalyptus camaldulensis, το οποίο χρησιμοποίησαν ο Kirdmanee C. και οι συνεργάτες του (1995) ως παράδειγμα σε αυτό τον συνδυασμό παραγόντων ώστε να δωθούν οι μετρήσεις και τα αποτελέσματα όσον αφορά το P.P.F.D και πια γενικότερα η επίδρασή του.

Ανά τον κόσμο εφαρμόζεται η μέθοδος μικρό-πολλαπλασιασμού σε πολλά φυτικά είδη (Pierik, 1988), αλλά το κόστος παραγωγής παραμένει ακόμα υψηλό. Σε πολλά είδη, οι απώλειες λόγω του εγκλιματισμού καθώς και το παρασκευαστικό κόστος έχουν περιορίσει την αποδοτικότητα των μεθόδων (Kozai,1991). Φυτάρια με εύρωστα χαρακτηριστικά είναι κυρίως ευάλωτα στην υπερβολική έκθεση κατά την διάρκεια της ex-vitro καλλιέργειας. Απώλεια σε φωτοσυνθετικά τμήματα, όπως η χλωροφύλλη από τα φύλλα, μπορεί να είναι ένας από τους βασικούς και κύριους παράγοντες υπεύθυνος για τον χαμηλό ρυθμό της φωτοσύνθεσης και το χαμηλό ποσοστό επιβίωσης των φυταρίων κατά την διάρκεια της ex-vitro καλλιέργειας. Η πυκνότητα του P.P.F.D και η σχετική υγρασία είναι τα κλειδιά των περιβαλλοντικών παραγόντων όπου επιδρούν στον ρυθμό της φωτοσύνθεσης και στο ποσοστό επιβίωσης των φυταρίων. Κατά την μέθοδο μικρό-πολλαπλασιασμού η μέθοδος εγκλιματισμού συνήθως αποτελείται:

- 1) από μέρη όπου τα φυτάρια βρίσκονται σε υψηλές συνθήκες σχετικής υγρασίας και
- 2) από σταδιακή μείωση της σχετικής υγρασίας και βαθμιαία αύξηση της έντασης του φωτός ανά τον χρόνο (Donnelly 1985, Kozai 1987).

Καμία έρευνα δεν έχει πραγματοποιηθεί έτσι ώστε να εξεταστούν οι παράγοντες της σχετικής υγρασίας και του P.P.F.D για μια ημέρα εγκλιματισμού σε ex-vitro συνθήκες κατά την αλλαγή του ρυθμού της διαπνοής των φυταρίων, λαμβάνοντας πάντα υπόψη το μεταγενέστερο ποσοστό απώλειας της φυλλικής επιφάνειας, του ποσοστού απώλειάς της χλωροφύλλης, του ρυθμού φωτοσύνθεσης, της ανάπτυξης καθώς και του ποσοστού επιβίωσης των φυταρίων.

Το αντικείμενο των μελετητών είναι να επινοήσουν διαδικασίες για την μείωση της περιόδου της μεθόδου του εγκλιματισμού σε ex-vitro συνθήκες και να επισημάνει διαφορές στον βαθμό της διαπνοής, του ποσοστού απωλειών της φυλλικής επιφάνειας, του ποσοστού απωλειών της χλωροφύλλης των φυταρίων Eucalyptus έπειτα από μια ημέρα εγκλιματισμού σε ex-vitro συνθήκες κάτω από διαφορετικές τιμές σχετικής υγρασίας και πυκνότητας φωτονίων (P.P.F.D). Το ποσοστό απώλειας της χλωροφύλλης παρατηρήθηκε σε σχέση με τον ρυθμό της φωτοσύνθεσης των φυταρίων κατά την διάρκεια της ex-vitro καλλιέργειας.

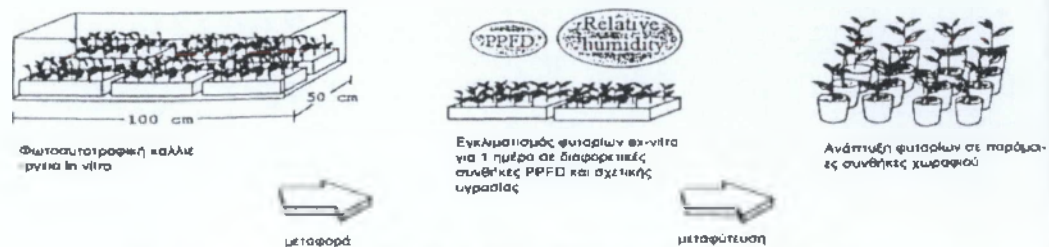
Στο παράδειγμα των Hoshi και Kozai έγινε επιλογή βλαστών (2-2.4 cm) των οποίων η καλλιέργεια έγινε σε in-vitro περιβάλλον, κάτω από δεδομένες συνθήκες περιβάλλοντος όπως 23°C η θερμοκρασία, 60-70% η σχετική υγρασία και 16h d⁻¹ το P.P.F.D.

Έπειτα από 21 ημέρες καλλιέργειας σε in-vitro περιβάλλον και έχοντας αναπτύξει το κατάλληλο ριζικό σύστημα, μεταφέρθηκαν από τα δοχεία καλλιέργειας σε θάλαμο ελεγχόμενου περιβάλλοντος, όπου εκεί πραγματοποιήθηκε ο μίας ημέρας εγκλιματισμός σε ex-vitro συνθήκες. Οι τιμές του περιβάλλοντος καθορίστηκαν στα 10,100 και 1000 μmol m⁻² s⁻¹ για το P.P.F.D, 50-60 ή 80-90% για την σχετική υγρασία (πίνακας 3) 35°C για την θερμοκρασία και 12 h d⁻¹ h για την φωτοπερίοδο. (Σχεδ. 1β).

Στην συνέχεια τα φυτάρια μεταφυτεύθηκαν σε θάλαμο, σε συνθήκες ίδιες με εκείνες του αγρού όπου και έμειναν εκεί για 13 ημέρες, σε θερμοκρασία 35°C και σε 50-60% σχετική υγρασία καθώς η φωτοπερίοδος ήταν στους 12 h d⁻¹ και στους 1000μmol m⁻² s⁻¹ όσον αφορά το P.P.F.D.

Η φωτοσύνθεση των φυταρίων σε ex-vitro περιβάλλον είναι σημαντική για την επιβίωση και αύξησή τους. Η μία ημέρα εγκλιματισμού πριν την μεταφύτευση επέδρασε θετικά έτσι ώστε να επέλθει αύξηση της φυλλικής επιφάνειας, της συγκέντρωσης της χλωροφύλλης και του ρυθμού φωτοσύνθεσης των φυτών, μετά την μεταφύτευσή τους με κάθε συνδυασμό του υψηλού P.P.F.D και της σχετικής υγρασίας ή του χαμηλού P.P.F.D και σχετικής υγρασίας (πίνακας 4 και σχεδ.2). Υψηλό ποσοστό επιβίωσης παρατηρήθηκε στα φυτάρια με υψηλό ρυθμό φωτοσύνθεσης μετά την μεταφύτευση. (Σχεδ.2). Όσον αφορά το ξηρό βάρος των ex-vitro φυταρίων, αυξήθηκε λόγω της αυξημένης τιμής του P.P.F.D σε συνδυασμό με την υψηλή σχετική υγρασία ενώ μειώθηκε σε συνδυασμό με το χαμηλό ποσοστό της σχετικής υγρασίας. (Σχεδ.3)

Οι ερευνητές, οραματίζονται και προσδοκούν στην εξέλιξη της μεθόδου του εγκλιματισμού σε ένα μεγαλύτερο επίπεδο παραγωγής για την in-vitro καλλιέργεια με όσο το δυνατό ελαχιστοποίηση του κόστους.



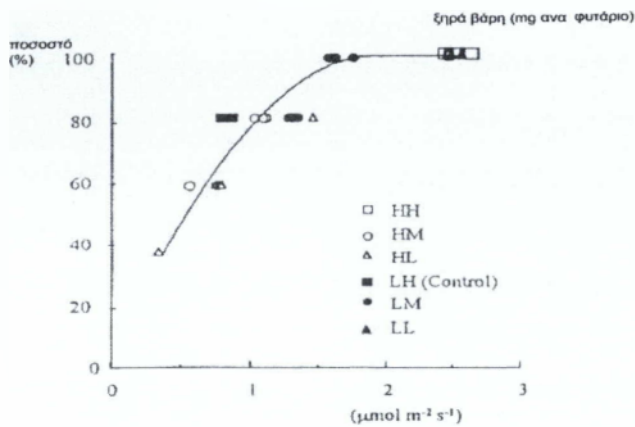
Σχέδ 1. Σχεδιάγραμμα του πειράματος της πρώτης ημέρας εγκλιματισμού σε ex-vitro συνθήκες

Πίνακας 3. Περιγραφή της πρώτης ημέρας εγκλιματισμού σε ex-vitro συνθήκες

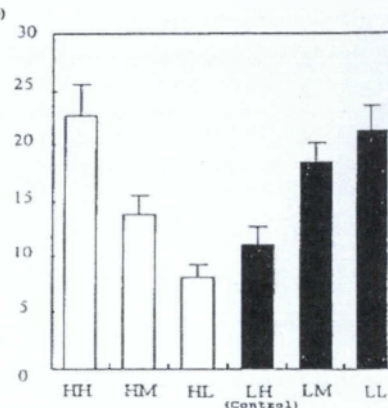
Treatment code	Relative humidity (%)	PPFD ^a ($\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$)
HH		1000
HM	80-90	100
HL		10
LH (Control)		1000
LM	50-60	100
LL		10

Πίνακας 4. Η φυλλική περιοχή και η συγκέντρωση της χλωροφύλλης των φυταρίων δυο ημέρες μετά την μεταφύτευση

Treatment code	leaf area (10^{-4}m^2)	Chlorophyll concentration (mg m^{-2})
HH	11 ab ²	141 a
HM	9 bc	124 b
HL	8 c	103 b
LH (Control)	8 c	96 b
LM	10 bc	117 b
LL	11 ab	136 a



Σχέδ 2. Επίδραση στον φωτοσυνθετικό ρυθμό, δυο ημέρες μετά την μεταφύτευση και το ποσοστό της επιβίωσης του *Eucalyptus* 13 ημέρες μετά την μεταφύτευση



Σχέδ 3. Το ξηρό των φυταρίων *Eucalyptus* 13 ημέρες μετά τη μεταφύτευση

Πηγή: Lab of Environmental Control Engineering, Chiba. Kozai 1991 VOL1(1986-1991)

Το P.P.F.D στην κατάσταση της φωτοαυτοτροφικής καλλιέργειας ήταν περίπου τρεις φορές μεγαλύτερο από εκείνο της ετερο-φωτομιξοτροφικής καλλιέργειας.

Φυτάρια με υψηλό ρυθμό φωτοσύνθεσης και με μεγάλο ριζικό σύστημα, παρατηρήθηκαν κατά την αυτοτροφική καλλιέργεια και χρησιμοποιήθηκαν ως φυτικό υλικό σε πειράματα

Τα φυτάρια, τα οποία καλλιεργήθηκαν φωτοαυτοτροφικά σε in-vitro συνθήκες εκδήλωσαν εύρωστα χαρακτηριστικά, πιθανότατα έχοντας υψηλή σχετική υγρασία (85+5%) σε in-vitro συνθήκες, όταν συγκρίθηκαν με φυτά που καλλιεργήθηκαν σε ex-vitro συνθήκες. Κάτω από in-vitro συνθήκες καλλιέργειας με υψηλή σχετική υγρασία, τα στομάτια των φύλλων των φυταρίων δεν λειτούργησαν. Ο ρυθμός διαπνοής των στοματίων, των φυταρίων κατά την ex-vitro καλλιέργεια φαίνεται να είναι υψηλός. Αυτό πρέπει να είναι και ο κύριος λόγος της απώλειας νερού, όπου και επακολούθησε εμφανή φωτοσυνθετική απώλεια διαφόρων τμημάτων των φυταρίων, κατά την διάρκεια της ex-vitro καλλιέργειας.

Το υψηλό P.P.F.D προωθεί τη φωτοσύνθεση και ως εκ τούτου ευθύνεται και για την μείωση της συγκέντρωσης του CO₂ στο εσωτερικό των κυττάρων. Αυτή η μείωση μπορεί να είναι η αιτία του ανοίγματος των στοματίων των φυταρίων σε συνδυασμό με το υψηλό P.P.F.D. Η απώλεια νερού των φυταρίων με υψηλό P.P.F.D πρέπει να είναι υψηλότερη από εκείνη με χαμηλό P.P.F.D κατά την διάρκεια μιας ημέρας εγκλιματισμού σε ex-vitro συνθήκες. Κάτω από χαμηλή σχετική υγρασία, οι ουσιαστικοί ρυθμοί της απώλειας νερού, συνήθως οφείλονται στην απευθείας έκθεση της επιφάνειας. Τα φυτάρια κατά την περίπτωση LH και LM πρέπει να έχουν χάσει ένα σημαντικό ποσό νερού μέσω της επικάλυψης των στοματίων κατά την διάρκεια της μιας ημέρας εγκλιματισμού σε ex-vitro συνθήκες. Μεγαλύτερη απώλεια των φύλλων και των βλαστών παρατηρήθηκαν στην περίπτωση LH και LM μετά από την μια ημέρα εγκλιματισμού σε ex-vitro συνθήκες. Τα φυτάρια στην περίπτωση HM και HL πρέπει ακόμη να έχουν χάσει αρκετή ποσότητα νερού από την κηρώδη επικαλυμμένη επιφάνεια καθώς και από τα στομάτια κατά την καλλιέργεια ex-vitro. Η μεγάλη στοματική ευπάθεια των φυταρίων πρέπει να ελεγχθεί ώστε να μειώσει την απώλεια νερού στην περίπτωση HH και LL κατά την διάρκεια της καλλιέργειας σε ex-vitro συνθήκες. Τα ελλείμματα νερού είναι συνηθισμένα έως κάποιο σημείο όσον αφορά τον ρυθμό της φωτοσύνθεσης, λόγω της

μείωσης του βαθμού της ενυδάτωσης του πρωτοπλάστη. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την μεταβολή της δομής του κολλοειδούς και την μείωση της ενζυματικής δραστηριότητας, με επακόλουθο την μείωση του ρυθμού των περισσότερων μεθόδων μεταβολής. Η φωτοσύνθεση είναι πολύ περισσότερο ευαίσθητη στην αφυδάτωση παρά σε οποιαδήποτε άλλη μέθοδο μεταβολής, πιθανότατα λόγω της διατάραξης του ακριβούς προσανατολισμού των μορίων εντός των θυλακοειδών και για αυτό το λόγο είναι τόσο απαραίτητη για την καλή λειτουργία των φωτοσυνθετικών αντιδράσεων. Το P.P.F.D και οι σχετικές υγρασίες επιδρούν στις αλλαγές κατά τον ρυθμό διαπνοής των φυταρίων στο τέλος της 1^{ης} και 2^{ης} ημέρας εγκλιματισμού. Το υψηλό ποσοστό απώλειας της χλωροφύλλης από την φυλλική επιφάνεια φαίνεται να σχετίζεται με τον υψηλό ρυθμό διαπνοής των φυταρίων. Κατά την συμβατική μέθοδο μικροπολλαπλασιασμού, τα χαμηλότερα φύλλα των φυταρίων είναι φωτοσυνθετικά αδρανή και εκφυλισμένα προτού τα νέα φύλλα εξελιχθούν, κατά την διάρκεια της ex-vitro καλλιέργειας (Preece και Sutter, 1991). Στο πείραμα, τα χαμηλότερα φύλλα των φυταρίων αναπτύχθηκαν καλά κατά τις περιπτώσεις HH και LL.

Κατά την διάρκεια των ημερών 8 έως 14 μια σημαντική αύξηση παρατηρήθηκε στο ξηρό βάρος κατά τις περιπτώσεις HH και LL, πιθανότατα από την φάση της μικρής ζημίας της φυλλικής επιφάνειας ως την εξέλιξη της νέας μεγάλης φυλλικής επιφάνειας. Το ποσοστό των επιζώντων φυταρίων αυξήθηκε με την παράλληλη αύξηση του καθαρού ρυθμού φωτοσύνθεσης της κατά την διάρκεια της ex-vitro καλλιέργειας. Αυτό αποδεικνύει ότι τα παράγωγα της φωτοσύνθεσης είναι απαραίτητα για την μεταγενέστερη ανάπτυξη και επιβίωση των φυταρίων κατά την διάρκεια της ex-vitro καλλιέργειας.

Το συμπέρασμα το οποίο προκύπτει είναι ότι τα φυτάρια με υψηλό ρυθμό φωτοσύνθεσης καθώς και με μεγάλο ριζικό σύστημα, μπορούν να εισέλθουν κατευθείαν σε συνθήκες θερμοκηπίου και υπαίθρου μετά από μια ημέρα εγκλιματισμού σε ex-vitro συνθήκες με υψηλό P.P.F.D και υψηλή σχετική υγρασία. Το χαμηλό P.P.F.D και η χαμηλή σχετική υγρασία, επιδρούν στις μορφολογικές αλλαγές, όπως η πολλαπλότητα των πλευρικών βλαστών και η αύξηση του αριθμού των μικρών φύλλων. Η προώθηση του φωτοαυτοτροφικού μεταβολισμού καθώς και η μείωση της απώλειας νερού των φυταρίων κατά την καλλιέργεια σε ex-vitro συνθήκες είναι σημαντικά για την καλύτερη

ανάπτυξη και το ποσοστό επιβίωσης καθώς είναι το κλειδί για επιτυχημένη εμπορευσιμότητα του μικροπολλαπλασιασμού.

Η επιβράδυνση της μεθόδου του εγκλιματισμού, της μιας ημέρας, έχει ως αποτέλεσμα τη μείωση του εργαστηριακού κόστους και του κόστους εξοπλισμού καθώς και άλλων λειτουργικών κόστων.

3.3.5 CO₂

Η μονάδα εγκλιματισμού έχει σχεδιαστεί, ώστε να μπορεί να παρέχει ταχεία αύξηση και υψηλά ποσοστά επιβίωσης των φυταρίων κατά το στάδιο του εγκλιματισμού τους. Μελέτες έχουν δείξει ότι τα φυτάρια που καλλιεργούνται σε δοχεία δεν έχουν την δυνατότητα ώστε να επιτύχουν μια υψηλή φωτοσυνθετική ικανότητα, λόγω της χαμηλής συγκέντρωσης του CO₂ στα δοχεία κατά την διάρκεια της φωτοπεριόδου. Δοκιμές οι οποίες έγιναν σε κάποια φυτικά είδη έδειξαν ότι η αυξησή τους προωθήθηκε από τον εμπλουτισμό των δοχείων τους σε CO₂ σε συνδυασμό με την σχετικά υψηλή πυκνότητα φωτονίων κατά την διαδικασία της προετοιμασίας πριν το στάδιο του εγκλιματισμού.

Ο εμπλουτισμός σε CO₂ σε συνδυασμό με την υψηλή πυκνότητα φωτονίων, επιδρά θετικά στην προώθηση της φωτοσύνθεσης καθώς και στην ανάπτυξη πολλών ιστοκαλλιεργούμενων φυτικών ειδών (έκφυτα, βλαστοί, φυτάρια). Τέτοια φυτικά είδη είναι τα γαρύφαλλα (*Dianthus carvophyllus*), οι φράουλες (*Fragaria γ ananassa Duch*), οι πατάτες (*Solanum tuberosum*), τα βατόμουρα καθώς και άλλα φυτά. Από φυτικό είδος σε φυτικό είδος όμως αυτό διαφοροποιείται, άλλες ανάγκες και άλλες απαιτήσεις δημιουργούνται. Σε αρκετά είδη όμως έχει παρατηρηθεί ότι συνδυασμός CO₂ και συμπληρωματικού φωτός, οδηγούν τα φυτάρια κατά το στάδιο του εγκλιματισμού πιο γρήγορα στον αυτοτροφισμό, στην ανάπτυξη τους καθώς και σε βελτίωση της παραγωγικότητας.

ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟΣ ΤΗΣ ΦΡΑΟΥΛΑΣ (*Fragaria x ananassa Duch*) ΜΕ CO₂ ΚΑΤΑ ΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΤΟΥ ΕΓΚΛΙΜΑΤΙΣΜΟΥ

Κατά το στάδιο του εγκλιματισμού, φυτάρια που έχουν καλλιεργηθεί με την μέθοδο της ιστοκαλλιέργειας σε MS (Murashige & Skoog) μέσο χωρίς την προσθήκη σακχάρων, μεταφύτευτηκαν σε κύβους με περλίτη ατομικών θέσεων και μεγάλωσαν σε διάλυμα καλλιέργειας, μέσα στην μονάδα εγκλιματισμού.

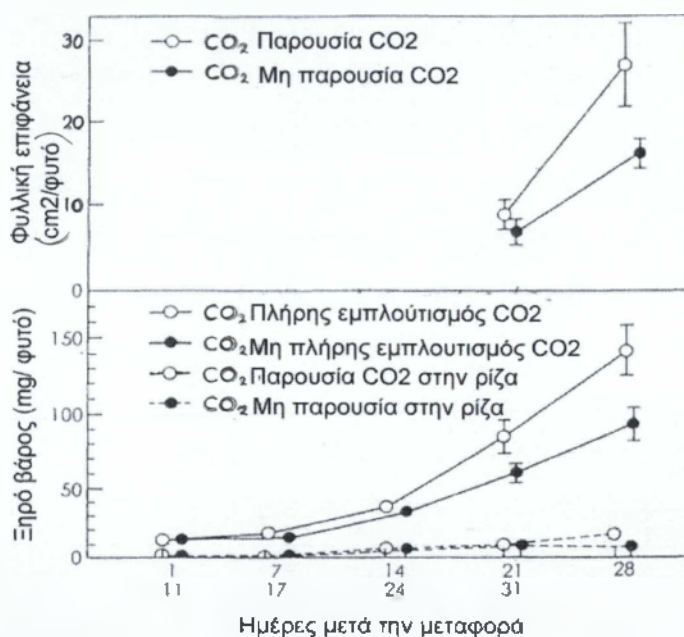
Το πείραμα αυτό πραγματοποιήθηκε από τους Hayashi και Kozai, 'Biotechnology in agriculture and forestry' vol.17. Στη συνέχεια χρησιμοποιήσαν δυο μεθόδους εγκλιματισμού, όπου η συγκέντρωση του CO₂ της μιας μεθόδου ελεγχόταν και ήταν περίπου τα 750 ppm, όταν η ακτινοβολία του φωτός ήταν πάνω από 58 w/m², αρχίζοντας από την 8^η ημέρα μετά την μεταφύτευση. Ενώ κατά την άλλη μέθοδο, η συγκέντρωση του CO₂ δεν ήταν ελεγχόμενη.

Το σχεδιάγραμμα 4 δείχνει τα αποτελέσματα της ανάπτυξης των φυταρίων και των δυο μεθόδων.

Τα αποτελέσματα ως την 14^η ημέρα εγκλιματισμού δεν ήταν εμφανή όσον αφορά τις διαφορές μεταξύ τους ως προς την αύξηση αλλά και ως προς τα συνολικά ξηρά βάρη των ριζών τους, το ύψος τους ή τον αριθμό των αποκαλυπτόμενων φύλλων ανά φυτάριο, μεταξύ των δύο περιπτώσεων. Την 21^η ημέρα προκύπτει ότι το συνολικό ξηρό βάρος και το ύψος των φυτών ήταν μεγαλύτερα στην περίπτωση της ύπαρξης CO₂ ενώ στην πορεία της διαδικασίας θα προκύψει ότι κατά την πρώτη περίπτωση οι αλλαγές ήταν μεγαλύτερες όσον αφορά το συνολικό ξηρό βάρος και ύψος των φυταρίων.

Οπότε, προκύπτει ότι η ύπαρξη CO₂ και φωτισμού κατά το στάδιο του εγκλιματισμού, οδηγεί πιο γρήγορα τα φυτά στον αυτοτροφισμό, στην επιτάχυνση της αύξησης τους και στην σίγουρη βελτίωση της παραγωγικότητας των καλλιεργούμενων *in-vitro* φυτών φράουλας, βατόμουρου και σπαραγγιού.

Σχεδ 4. Αλλαγές στην φυλλική επιφάνεια και τα ξηρά βάρη των φραουλών, μετά την μεταφορά από την *in-vitro* καλλιέργεια στην μονάδα εγκλιματισμού με την παρουσία CO₂ (O) και την μη παρουσία CO₂ (*) (Hayashi και Kozai 1987)



ΟΙ ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΑΠΟ ΤΟΝ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟ ΤΟΥ CO₂ ΚΑΙ ΤΗΣ ΥΨΗΛΗΣ ΕΝΕΡΓΕΙΑΣ ΦΩΤΟΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΥΤΑΡΙΩΝ ΠΑΤΑΤΑΣ (*Solanum tuberosum*) ΣΕ ΑΠΕΥΘΕΙΑΣ EX-VITRO ΣΥΝΘΗΚΕΣ ΡΙΖΟΒΟΛΗΣΗΣ.

Στην περίπτωση αυτή θα εξετάσουμε την επίδραση του CO₂ καθώς και της υψηλής ηλιακής ενέργειας κατά την ανάπτυξη φυταρίων πατάτας σε απευθείας *ex-vitro* συνθήκες ριζοβολίας. Τα έκφυτα των φυταρίων τα οποία χρησιμοποιήθηκαν είναι προερχόμενα από βλαστούς οι οποίοι έχουν καλλιεργηθεί με την μέθοδο της ιστοκαλλιέργειας. Τα

μοσχεύματα αυτά αποτελούνται από φύλλα τα οποία και θα τοποθετηθούν αμέσως σε θέσεις όπου η καλλιέργεια τους θα γίνει μέσα στην μονάδα ελεγχόμενου περιβάλλοντος και σε διαφορετικές εντάσεις ηλιακής ενέργειας χωρίς την ύπαρξη CO₂.

Προχωρώντας τη διαδικασία αυτής της μελέτης των παραγόντων, θα προκύψει ότι το νωπό βάρος, το ξηρό βάρος καθώς και ο αριθμός των φύλλων των φυταρίων τα οποία είχαν στην διάθεση τους υψηλή ενέργεια φωτός και την παρουσία του CO₂, είναι μεγαλύτερα σε σχέση με εκείνα τα οποία δοκιμάστηκαν σε χαμηλή ενέργεια φωτός και χωρίς την παρουσία του CO₂. Το νωπό βάρος των ευνοούμενων φυταρίων από τους παράγοντες είναι 2.4, το ξηρό βάρος είναι 3.1 ενώ ο αριθμός των φύλλων 1.7 υψηλότερα σε σχέση με τα αντίστοιχα των μη ευνοούμενων φυταρίων, λόγω της έλλειψης των παραγόντων οι οποίοι θα τα ευνοούσαν και θα τους έδιναν τα επιθυμητά αποτελέσματα, αντίστοιχα με εκείνων της πρώτης κατηγορίας.

Οπότε, συγκρίνοντας τα αποτελέσματα τα οποία προκύπτουν βλέπουμε πως η υψηλή ενέργεια φωτός σε συνδυασμό με την παρουσία του CO₂, προωθούν την ανάπτυξη και την ριζοβολία των φυταρίων, ενώ τα ποσοστά των νωπών καθώς και των ξηρών βαρών των φυταρίων κάτω από αυτές τις συνθήκες κατά την απευθείας ex-vitro, ριζοβόληση είναι μεγαλύτερα από εκείνων της συμβατικής μεθόδου εγκλιματισμού.

Πίνακας 5. Σημεία της μέγιστης ηλιακής ακτινοβολίας, της συγκέντρωσης CO₂, της θερμοκρασίας αέρος και της σχετικής υγρασίας στις περιπτώσεις A1-C για τον έλεγχο του περιβάλλοντος εσωτερικά της μονάδας, βασιζόμενα στην καμπύλη εγκλιματισμού (Kozai 1987).

Σύμβολα	Ημέρες μετά την κά- θε περίπτωση (d)	Μαχ ηλιακή ακτινοβολία (W·m ⁻²)	Συγκέντ. CO ₂ (ppm)	Αέρας θερμοκρα- C		Σχετική υγρασία (%)		
				Max.	Min.	Max.	Min.	
Απευθείας ex-vitro μέθοδος ριζοβολίας	A1 Υψηλό φως, υψη- λό CO ₂	0-5	116	800	25	25	95	95
		30-35	582	800	30	15	85	60
	A2 Υψηλό φως, χα- μηλό CO ₂	0-5	116	—***	25	25	95	95
		30-35	582	—	30	15	85	60
	B1 Υψηλό φως, υ- ψηλό CO ₂	0-5	64	800	25	25	95	95
		30-35	320	800	30	15	85	60
B2 Χαμηλό φως, χα- μηλό CO ₂	0-5	64	—	25	25	95	95	
	30-35	320	—	30	15	85	60	
Συμβατική μέθοδος	C** Χαμηλό μέσο, χαμηλό CO ₂	20-23	116	—	25	25	95	95
		35	445	—	28.5	18	88	70

* 8-18 ** πειραματικές συνθήκες *** Μη ελεγχόμενα

ΜΕΤΡΗΣΕΙΣ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΤΟΥ CO₂ ΣΕ ΚΛΕΙΣΤΑ ΔΟΧΕΙΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΟΥΜΕΝΩΝ IN-VITRO ΦΥΤΑΡΙΩΝ ΚΑΙ ΟΙ ΥΠΟΛΟΓΙΣΜΟΙ ΤΟΥ ΡΥΘΜΟΥ ΦΩΤΟΣΥΝΘΕΣΗΣ ΤΩΝ ΦΥΤΑΡΙΩΝ

Οι μετρήσεις αυτές έγιναν από τους Heo,C Kubota και Kozai. 'Effects of CO₂ and P.P.F.D'. Οι αλλαγές που επέρχονται με το πέρασμα του χρόνου όσον αφορά την συγκέντρωση του CO₂ σε κλειστά δοχεία, τα οποία περιέχουν καλλιεργητικό υπόστρωμα κατάλληλο για την ανάπτυξη φυταρίων.

Επίσης θα παρουσιαστούν οι τιμές του ρυθμού φωτοσύνθεσης των καλλιεργούμενων φυταρίων σε κλειστά δοχεία, ενώ τέλος υπολογίζονται και οι επιδράσεις του CO₂ ως προς τον ρυθμό φωτοσύνθεσης σε ένα από τα χρησιμοποιούμενα φυτάρια.

Οι μετρήσεις έγιναν από τους J.W Heo,C.Kubota και T.Kozai στο Τμήμα Βιοπαγωγής του Πανεπιστημίου της Chiba στην Ιαπωνία.

Στο παράδειγμα αυτό χρησιμοποιήθηκαν οχτώ δείγματα από κάποια αντίστοιχα φυλλώδη καλλωπιστικά φυτά όπου προέκυψε ότι η ανάπτυξη τους στο δοχείο ήταν πολύ ικανοποιητική.

Παρακάτω συνοψίζονται τα αποτελέσματα

Σε όλα τα κλειστά δοχεία, το CO₂ διαχέεται στην σκοτεινή περίοδο και συσσωρεύεται σε επίπεδα συγκέντρωσης από 3000 ως 9000nrm. Μια ή δύο ώρες αργότερα κατά την έναρξη της φωτεινής περιόδου, η συγκέντρωση του CO₂ στα δοχεία, γρήγορα μειώνεται σε λιγότερο από 9 nrm λόγω της φωτοσύνθεσης των φυταρίων. Όπου, φαίνεται ξεκάθαρα ότι όλα τα φυτάρια έχουν φωτοσυνθετική ικανότητα κατά την περίοδο φωτός.

Τα φυτάρια μπορεί να μην έχουν πλήρης φωτοσυνθετική ικανότητα, επειδή η συγκέντρωση του CO₂ στα κλειστά δοχεία ήταν πολύ χαμηλή κατά το μεγαλύτερο μέρος της φωτεινής περιόδου.

Οι υπολογισμοί του CO₂ που παίρνονταν κάθε μέρα από όλα τα φυτάρια των κλειστών δοχείων ήταν αρνητικοί για το λόγο ότι τα φυτάρια είχαν αναπτυχθεί χρησιμοποιώντας σάκχαρα στο μέσο τους ως κύρια πηγή υδατάνθρακα.

Τα αποτελέσματα των υπολογισμών από τις επιδράσεις του εμπλουτισμού με CO₂ κυρίως κατά τον ρυθμό φωτοσύνθεσης του φυταρίου μπορεί να αυξηθεί, όχι μόνο αυξάνοντας την εσωτερική συγκέντρωση του CO₂, αλλά επίσης αυξάνοντας και την εξωτερική συγκέντρωση του CO₂ ή αυξάνοντας τα νούμερα των αέριων αλλαγών των δοχείων, όταν η εξωτερική συγκέντρωση είναι υψηλότερη από την εσωτερική κατά την περίοδο φωτός.

Τα παραπάνω αποτελέσματα υποδηλώνουν ότι τα ιστοκαλλιεργούμενα φυτά εντός κλειστών δοχείων μπορούν να αναπτυχθούν φωτοαυτοτροφικά κατά την διάρκεια καθώς και μετά το στάδιο πολλαπλασιασμού, βελτιώνοντας το CO₂ και την ένταση του φωτός εντός των κλειστών δοχείων καλλιέργειας.

3.3.6 Συνδυασμός παραγόντων

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ ΤΟΥ IN-VITRO ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΣΤΑ ΣΠΟΡΟΦΥΤΑ ΚΑΙ ΦΥΤΑΡΙΑ ΚΑΠΝΟΥ (Nicotiana tabacum) ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ ΤΟΥΣ.

Η επίδραση του CO₂, του P.P.F.D καθώς και η παρουσία ή μη του ζαχαρώδους διαλύματος εντός του χώρου καλλιέργειας των φυταρίων καπνού (Nicotiana tabacum) είναι μια κατάσταση η οποία ερευνάται.

Οι καμπύλες μέτρησης των σπορόφυτων και φυταρίων σε in-vitro συνθήκες είναι παρόμοιες όταν αυτά καλλιεργούνται κάτω από τις ίδιες συνθήκες. Το ξηρό βάρος των σποροφύτων και φυταρίων αυξάνεται και είναι μεγαλύτερο όπου υπάρχει CO₂ παρά στην περίπτωση που δεν υπάρχει. Επίσης υψηλό ποσοστό παρουσιάστηκε και στην περίπτωση του συνδυασμού CO₂ με υψηλό P.P.F.D. Επίσης αύξηση παρατηρήθηκε όταν το μέσο περιείχε σάκχαρα τόσο σε υψηλή όσο και σε χαμηλή πυκνότητα P.P.F.D.

Η επίδραση του in-vitro περιβάλλοντος στο νωπό βάρος, στη φυλλική επιφάνεια και στην αύξηση των φυταρίων είναι μια περίπτωση η οποία ακόμα ερευνάται με σκοπό την περαιτέρω φωτοαυτοτροφική αύξηση των φυτών.

Η έρευνα αυτή πραγματοποιήθηκε από τους C.Kubota, K. Fujiwara και T.Kozai στο Τμήμα Βιοπαραγωγής του Πανεπιστημίου της Chiba στην Χώρα της Ιαπωνίας.

ΕΠΙΔΡΑΣΕΙΣ ΑΠΟ ΤΟΝ ΕΜΠΛΟΥΤΙΣΜΟ ΜΕ CO₂ ΣΕ ΣΥΝΔΥΑΣΜΟ ΜΕ ΤΑ ΥΛΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΥΤΑΡΙΩΝ ΕΥΚΑΛΥΠΤΟΥ (*Eucalyptus camaldulensis*) ΣΕ IN-VITRO ΚΑΙ ΣΕ EX-VITRO ΣΥΝΘΗΚΕΣ.

Η παρουσία του CO₂ σε συνδυασμό με κάποια υλικά που χρησιμοποιούνται ως υποστρώματα για τις καλλιέργειες των φυταρίων, θα παρουσιάσουν κάποιες διαφορές όσον αφορά την ανάπτυξη των φυταρίων, τα οποία υποβλήθηκαν και μετρήθηκαν κάτω από την επίδραση αυτών των παραγόντων.

Το πείραμα έγινε από τον T.Kozai ,Y.Kitaya και C.Kubota και δημοσιεύθηκε στο 'Environmental control in microporagation' Vol.2

Οι δοκιμές έγιναν σε βλαστούς του *Eucalyptus camaldulensis*, οι οποίοι καλλιεργήθηκαν σε in-vitro συνθήκες για έξι εβδομάδες εντός ¼ MS(Murashige&Skoog) μέσου καλλιέργειας και χωρίς την προσθήκη σακχάρων. Σε κάθε μια περίπτωση χρησιμοποιήθηκε και διαφορετικό υλικό ως υπόστρωμα με την παρουσία οξυγόνου και χωρίς την παρουσία CO₂ στον χώρο δοκιμής. Στην πορεία τα φυτά αναπτύχθηκαν σε θερμοκήπιο σε ex-vitro συνθήκες για τέσσερις εβδομάδες, όπου στην προκειμένη περίπτωση η θερμοκρασία αέρος ήταν 33± 5°C ενώ η σχετική υγρασία κυμαινόταν στους 50±5%. Σε in-vitro τώρα συνθήκες με αυξημένο το CO₂, η ανάπτυξη (συνολικό ξηρό βάρος, φυλλική επιφάνεια και αριθμός πρωτογενών ριζών) και ο καθαρός ρυθμός της φωτοσύνθεσης των φυταρίων in-vitro ήταν εξίσου σε επιθυμητά επίπεδα σε σχέση με την ανάπτυξη καθώς και με την επιβίωση των ex-vitro φυταρίων που χρησιμοποιήθηκαν.

Σε σχέση όμως με τα υλικά των υποστρωμάτων που έλαβαν χώρα σε κάθε μια περίπτωση ξεχωριστά, διαπιστώνεται ότι τα ποσοστά της ανάπτυξης και ο ρυθμός φωτοσύνθεσης των in-vitro φυτών ήταν πιο υψηλά όπου υπήρχε ως υπόστρωμα το υλικό βερμικουλίτης, ενώ ακολουθούν βαθμιαία κατά σειρά το plastic net, το gelrite και το άγαρ.

Συμπέρασμα που προκύπτει και πρέπει να επισημανθεί είναι ότι η ανάπτυξη και ο βαθμός επιβίωσης των ex-vitro φυτών ήταν υψηλότερος στην περίπτωση όπου υπήρξε συνδυασμός του CO₂ και του βερμικουλίτη.

3.4 Μέθοδοι εγκλιματισμού

Για την αύξηση του ποσοστού επιβίωσης των φυτών όπως έχουμε προαναφέρει, θα πρέπει να εφαρμόζονται έλεγχοι του περιβάλλοντος κυρίως κατά τα αρχικά στάδια του εγκλιματισμού, έτσι ώστε να μπορούν τα φυτά να ανταποκριθούν στις περιβαλλοντικές συνθήκες κάτω από τις οποίες βρισκόταν στα στάδια πολλαπλασιασμού και ριζοβολίας.

Για την αύξηση του ρυθμού ανάπτυξης και την αποφυγή ζημιών και θανάτου των φυτών μετά τον εγκλιματισμό (όταν μεταφυτεύονται έξω στο ύπαιθρο ή στο θερμοκήπιο) το περιβάλλον στο μετέπειτα στάδιο του εγκλιματισμού πρέπει να ελέγχεται ώστε τα φυτά να ανταποκρίνονται στις περιβαλλοντικές συνθήκες κάτω από τις οποίες τα φυτά θα αναπτυχθούν μετέπειτα. Επιπλέον, η ανάπτυξη και η φωτοσύνθεση των φυταρίων στο στάδιο του εγκλιματισμού πρέπει να γίνεται με όσο το δυνατόν λιγότερες απώλειες φυταρίων.

Σε ένα συμβατικό τύπο εγκλιματισμού, η κυριότερη προσπάθεια για τον έλεγχο του περιβάλλοντος στο στάδιο του εγκλιματισμού, είναι η δυνατότητα να διατηρηθεί η σχετική υγρασία σε υψηλά επίπεδα, ιδιαίτερα στα αρχικά στάδια του εγκλιματισμού. Η υψηλή υγρασία συνήθως επιτυγχάνεται καλύπτοντας τα φυτά με πλαστικό film κάτω από σκιά με ταυτόχρονους και συχνούς ψεκασμούς υδρονέφωσης.

Η σκίαση είναι απαραίτητη, αφενός γιατί η απευθείας επαφή του έντονου ηλιακού φωτός θα τραυματίσει τα φυτά και αφετέρου η διακύμανση της έντασης της ηλιακής ακτινοβολίας σε σχέση με τον χρόνο οδηγεί σε διακυμάνσεις της θερμοκρασίας και της σχετικής υγρασίας και εκτός αυτού σε ακραίες απώλειες νερού από τα φυτά. Η υδρονέφωση υπό σκιάν είναι ο ευκολότερος τρόπος ώστε να διατηρηθεί η υγρασία σε υψηλά ποσοστά.

Ο επαναλαμβανόμενος κύκλος του ελέγχου του περιβάλλοντος στο στάδιο του εγκλιματισμού συνοψίζεται στον πίνακα 6. Ο βαθμός της σκίασης και η συχνότητα της υδρονέφωσης, ελέγχονται βαθμιαία καθώς τα φυτά αναπτύσσονται αυτοτροφικά.

Κατά το στάδιο του εγκλιματισμού θα πρέπει να βρεθεί ένας αποδοτικός τρόπος για την ανάπτυξη εύρωστων φυταρίων όπως και μετά το στάδιο αυτού, έχοντας όσο γίνεται λιγότερες αλλά και λογικές απώλειες φυταρίων.

Φαίνεται, να υπάρχουν δυο πιθανές λύσεις προσέγγισης του προβλήματος. Η μια είναι, με σύστημα ελέγχου του περιβάλλοντος μέσω ηλεκτρονικού υπολογιστή για μεγαλύτερη ακρίβεια, για παράδειγμα η σχετική υγρασία στα αρχικά στάδια του εγκλιματισμού, είναι ελεγχόμενη με ακρίβεια σε προκαθορισμένο υψηλό επίπεδο, ταυτόχρονα με εφοδιασμό από φως και επαρκές CO₂ για φωτοσύνθεση την ίδια χρονική στιγμή.

Η άλλη λύση είναι ο έλεγχος περιβάλλοντος της ιστοκαλλιέργειας στα στάδια του πολλαπλασιασμού και της ριζοβόλησης, όμοια με εκείνον του εγκλιματισμού και του περιβάλλοντος του θερμοκηπίου. Υπάρχει όμως τότε μια μικρή αλλαγή στον περιβάλλοντα χώρο όταν μεταφέρονται από την καλλιέργεια (in-vitro) σε συνθήκες (ex-vitro). Η προαναφερθείσα μέθοδος ονομάζεται Αυτοτροφικός Μικρό-Πολλαπλασιασμός (χωρίς σάκχαρα).

Πίνακας 6.Ο επαναλαμβανόμενος κύκλος ελέγχου του περιβάλλοντος σε συμβατικό τύπο εγκλιματισμού. (Kozai 1991)

- Τα φυτάρια είναι ευαίσθητα στην υδατική καταπόνηση και δεν αναπτύσσονται αυτότροφα στα αρχικά στάδια του εγκλιματισμού
- Η σχετική υγρασία θα πρέπει να διατηρείται σε υψηλά επίπεδα ώστε να μειώνει τις ζημιές ή το θάνατο των φυταρίων.
- Η βαριά σκίαση με την υδρονέφωση είναι απαραίτητα κατά την διάρκεια της ημέρας ώστε να διατηρείται η υγρασία σε υψηλά επίπεδα.
- Η φωτοσύνθεση των φυταρίων καταστέλλεται όταν επικρατούν υψηλές συνθήκες σκίασης.
- Η καταστολή της φωτοσύνθεσης μπορεί να είναι αιτία για την καταστολή της ανάπτυξης του αυτοτροφισμού των φυταρίων.
- Η καταστολή της φωτοσύνθεσης μπορεί να είναι η αιτία της καταστολής της ριζοβολίας και της εμφάνισης των φύλλων στα φυτάρια.
- Η πρόσληψη νερού και θρεπτικών στοιχείων, καταστέλλονται ακριβώς όταν γίνεται η εμφάνιση των δευτερογενών ριζών.
- Μικρή ποσότητα πρόσληψης νερού καθώς και υπερβολική διαπνοή, οδηγούν σε ζημιές ή θανάτωση των φυταρίων.
- Μέρος των φύλλων θα πρέπει να μεταφέρεται όταν εγκλιματίζονται για μείωση της υπερβολικής διαπνοής.

ΑΥΤΟΤΡΟΦΙΚΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ (ΧΩΡΙΣ ΣΑΚΧΑΡΑ) ΓΙΑ ΤΗΝ ΠΡΟΩΘΗΣΗ ΤΩΝ IN-VITRO ΦΥΤΑΡΙΩΝ ΚΑΙ ΤΗΝ ΜΕΙΩΣΗ ΤΩΝ ΜΟΛΥΝΣΕΩΝ

Γίνεται όλο και περισσότερο σημαντική για την γεωργία και δασοπονία, η εξέλιξη του συστήματος αυτοματισμού όσον αφορά την ιστοκαλλιέργεια, για την παραγωγή in-vitro φυταρίων με χαμηλό κόστος.

Τα in-vitro φυτάρια έχει διαπιστωθεί ότι έχουν μικρή φωτοσυνθετική ικανότητα, οπότε

τα σάκχαρα είναι απαραίτητα για την παροχή άνθρακα στο μέσο της καλλιέργειας για την ετεροτροφική ή μιξοτροφική αύξησή τους.

Οπωσδήποτε, έχει αποδειχθεί ότι τα φυτάρια *in-vitro*, έχουν φωτοσυνθετική ικανότητα όπου και μπορούν να εξελιχθούν αυτοτροφικά, εφόσον κάποιος φυσιολογικοί παράγοντες όπως το CO₂ και το φως στο δοχείο καλλιέργειας ελέγχονται σωστά. Άρα η ζάχαρη δεν είναι αναγκαία στο μέσο για την αύξηση των αυτοτροφικών φυταρίων.

Σε ένα συμβατικό μέσο καλλιέργειας η συγκέντρωση CO₂ για παράδειγμα, στην αέρια περιοχή του δοχείου είναι συχνά χαμηλή γύρω στα 100ppm κατά την διάρκεια της φωτοσυνθετικής περιόδου. Οπότε στις περισσότερες περιπτώσεις, τα φυτάρια δεν μπορούν να έχουν μια θετική ισορροπία άνθρακα.

Επίσης έχει προκύψει ότι η αύξηση και η φωτοσυνθετική ικανότητα των *in-vitro* φυταρίων προωθούνται από τον εμπλουτισμό τους με CO₂ σε μέσο χωρίς σάκχαρα. Ένα πρόβλημα το οποίο μπορεί να προκύψει κάτω από αυτές τις συνθήκες είναι κάποια μικρή βακτηριακή και μυκητολογική μόλυνση εντός των δοχείων καλλιέργειας κατά την διάρκεια του πολλαπλασιασμού. Οπότε, θα πρέπει να βρεθούν τρόποι ώστε να μειωθεί το εργαστηριακό κόστος και τα φυτάρια να γίνουν περισσότερο εύρωστα, όπου και δεν θα χρειάζεται στην συνέχεια κάποιος ιδιαίτερος εγκλιματισμός στις περισσότερες περιπτώσεις.

Ο εμπλουτισμός σε CO₂, μπορεί να επιτευχθεί, κρατώντας την συγκέντρωση του CO₂ στο θάλαμο καλλιέργειας κατά την διάρκεια της φωτοπεριόδου στο επίπεδο των 2000ppm, χρησιμοποιώντας τον κλασικό τρόπο ελέγχου του CO₂ για τον εμπλουτισμό του, όπως και στο θερμοκήπιο. Στην συνέχεια η συγκέντρωση του CO₂ εντός του δοχείου μπορεί να συντηρηθεί στο επίπεδο των 300-600ppm εξαρτώμενο από τον περιορισμένο αέρα του δοχείου και των φωτοσυνθετικών χαρακτηριστικών των φυταρίων.

3.4.1 Συμβατικός τύπος μεθόδου εγκλιματισμού

Όλες οι καλλιέργειες των οποίων τα φυτά τους αποτελούνται από πράσινα μέρη και λαμβάνουν μέρος στην διαδικασία της φωτοσύνθεσης έχουν μεγάλο ποσοστό φωτοσυνθετικής ικανότητας. Σε πολλές περιπτώσεις, μεγαλώνουν γρηγορότερα κάτω από συνθήκες αυτοτροφισμού παρά κάτω από ετεροτροφικές ή μιξοτροφικές συνθήκες

καλλιέργειας και κυρίως όταν τους παρέχονται οι απαραίτητες, φυσικές και χημικές περιβαλλοντικές συνθήκες για την προώθηση της φωτοσύνθεσης των φυταρίων της καλλιέργειας. Επίσης, έχει φανεί ότι προβλήματα φυσιολογικής και μορφολογικής φύσης των in-vitro φυταρίων, όπως η υπερενυδάτωση και η μη φυσιολογική επιμήκυνση του βλαστού, μπορούν να λυθούν, ελέγχοντας το in-vitro περιβάλλοντα χώρο. Ακόμα και ο εγκλιματισμός σε ex-vitro συνθήκες δεν θα είναι απαραίτητος εάν και εφόσον το in-vitro περιβάλλον ελέγχεται, ώστε να είναι τέτοιο το οποίο να μπορεί να ολοκληρώσει το ίδιο τον εγκλιματισμό των φυτών.

Ο έλεγχος του in-vitro περιβάλλοντος είναι πολύ ουσιαστικός και αναγκαίος διότι έτσι μπορεί να επιτευχθεί η παραγωγή φυτών με μικρότερο κόστος. Απαραίτητο είναι η κατανόηση των σχέσεων μεταξύ των περιβαλλοντικών παραγόντων και των φυσιολογικών χαρακτηριστικών των καλλιεργειών. Αυτό είναι και το κλειδί της εξέλιξης ως προς την παραγωγή ενός συστήματος το οποίο θα μπορεί να παράγει καλλιεργούμενα in-vitro φυτά με τα κατάλληλα επιθυμητά χαρακτηριστικά.

Η συμβατική μέθοδος εγκλιματισμού παρουσιάζει όμως μειονεκτήματα τα οποία είναι εις βάρος της εξέλιξης της διαδικασίας.

Τέτοια προβλήματα είναι:

- 1) το χαμηλό ποσοστό επιβίωσης των φυταρίων,
- 2) η δυσκολία προσαρμογή τους στο περιβάλλον,
- 3) η μειωμένη φωτοσυνθετική τους ικανότητα και
- 4) το μικρό ποσοστό αύξησής τους.

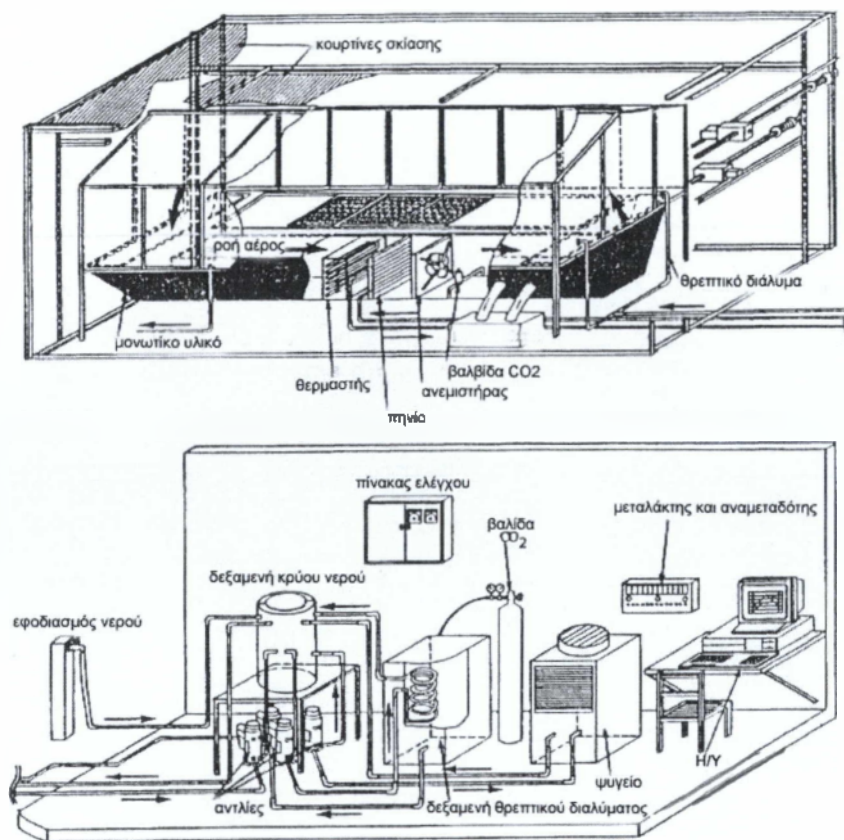
3.4.2 Μέθοδος εγκλιματισμού μέσω της μονάδας

Η μονάδα αυτή δημιουργήθηκε με προϋποθέσεις τέτοιες ώστε να έχει καλύτερο έλεγχο του περιβάλλοντος, μεγαλύτερα ποσοστά επιβίωσης και μεγαλύτερη ταχύτητα ανάπτυξης φυταρίων. Μέσω της μονάδας εγκλιματισμού γίνεται έλεγχος της θερμοκρασίας, της σχετικής υγρασίας, της έντασης του φωτός, της συγκέντρωσης CO₂, της ταχύτητας κίνησης του αέρα καθώς και της θερμοκρασίας του θρεπτικού διαλύματος.

Το σχεδιάγραμμα 5 δείχνει την μονάδα εγκλιματισμού. Η μονάδα αποτελείται από το χώρο αύξησης και από το δωμάτιο συνθηκών αέρος, όπου ο έλεγχος γίνεται βάση του

ηλεκτρονικού υπολογιστή. Το βασικό μέρος της μονάδας είναι περίπου 1.5μ πλάτος, 3μ μήκος και 2μ ύψος. Ο χώρος αύξεσης μπορεί να περιλάβει περισσότερα από 2000 φυτάρια. Η μονάδα δημιουργήθηκε κυρίως για ερευνητικούς σκοπούς, αλλά μπορεί να επεκταθεί και για εμπορικές χρήσεις, χωρίς καμία αλλαγή στο λειτουργικό της σύστημα.

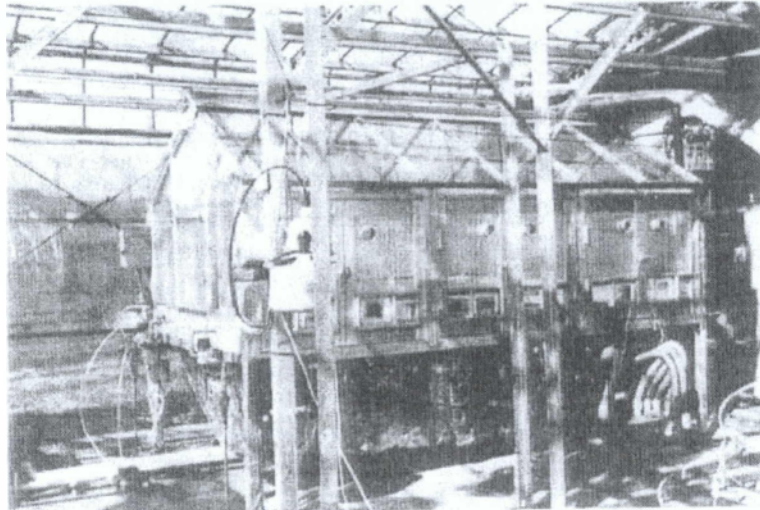
Σχεδ 5. Σχηματικό διάγραμμα της μονάδας εγκλιματισμού. (Kozai, 1987)



Σχεδ 1 Σχηματικό διάγραμμα της μονάδας εγκλιματισμού

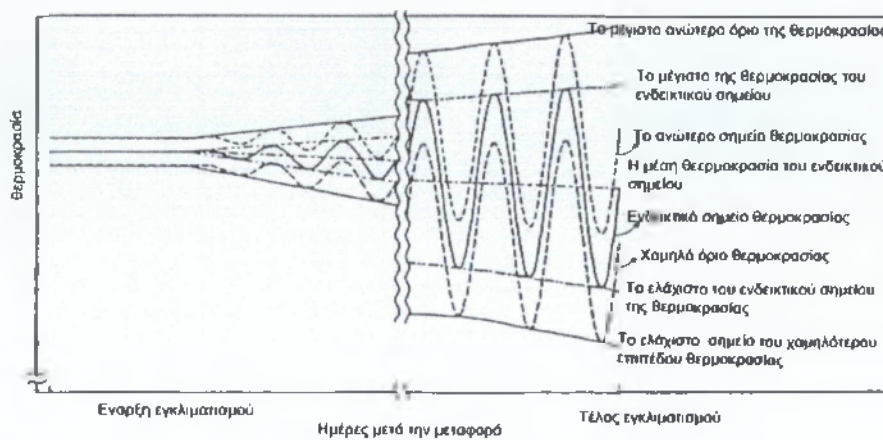
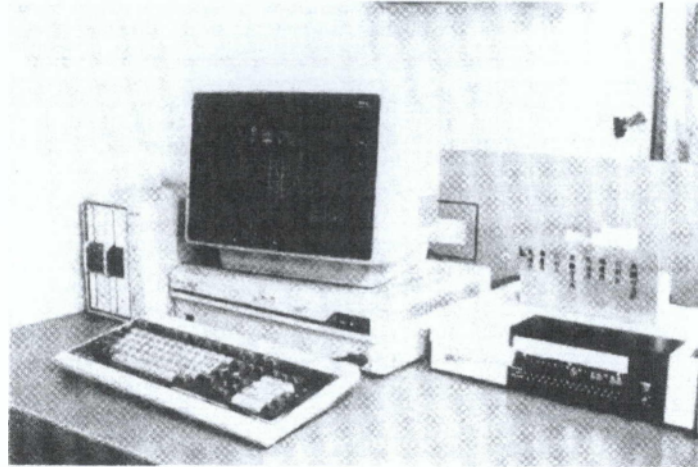
Η εικόνα 1 δείχνει το εξωτερικό τμήμα της μονάδας εγκλιματισμού. Ο Η/Υ (εικόνα 2) ελέγχει τη μονάδα εγκλιματισμού καθώς γράφει και αναλύει τα δεδομένα. Το περιβάλλον μέσα στο χώρο αύξεσης ελέγχεται με βάση την καμπύλη εγκλιματισμού.

Εικόνα 1. Το εξωτερικό τμήμα της μονάδας εγκλιματισμού. (Kozai 1987)



Το σχεδιάγραμμα 6 δείχνει την καμπύλη εγκλιματισμού για τον έλεγχο της θερμοκρασίας αέρος. Το σύστημα ψύξης αρχίζει την λειτουργία του όταν η θερμοκρασία του αέρα μέσα στο δωμάτιο ανάπτυξης γίνει υψηλότερη από το ανώτερο όριο το οποίο έχει καθοριστεί και σταματάει όταν φτάσει στην προκαθορισμένη τιμή η οποία είναι και η επιθυμητή. Το σύστημα θέρμανσης μπαίνει σε λειτουργία, όταν η θερμοκρασία γίνει χαμηλότερη από το χαμηλότερο όριο, το οποίο έχει καθοριστεί και σταματάει όταν φτάσει στο προκαθορισμένο σημείο.

Εικόνα 2. Ο Η/Υ της μονάδας. (Hoshi και Kozai, 1984)



Σχεδ 6. Καμπύλη εγκλιματισμού για τον έλεγχο της θερμοκρασίας αέρος. (Kozai et al. 1987)

Η προκαθορισμένη τιμή της θερμοκρασίας αέρος την πρώτη ημέρα του εγκλιματισμού είναι σταθερή στις ίδιες συνθήκες κάτω από τις όποιες ήταν τα φυτάρια στην διάρκεια της *in-vitro* καλλιέργειας. Η προκαθορισμένη τιμή της θερμοκρασίας αέρος την τελευταία ημέρα του εγκλιματισμού είναι παρόμοια με αυτή του θερμοκηπίου ή του χωραφιού, όπου τα εγκλιματιζόμενα ήδη φυτάρια θα μεταφυτευτούν. Χρησιμοποιώντας την καμπύλη εγκλιματισμού, η ημερήσια αλλαγή της θερμοκρασίας αέρος μπορεί να μεγαλώσει βαθμιαία μέρα με την ημέρα.

Η καμπύλη εγκλιματισμού της σχετικής υγρασίας, της έντασης του φωτός και της θερμοκρασίας του θρεπτικού διαλύματος περιλαμβάνεται και αυτή στο σύστημα ελέγχου. Η καμπύλη για κάθε περιβαλλοντικό παράγοντα μπορεί να τροποποιηθεί, εξαρτάται όμως από το φυτό και την εποχή όπου τα εγκλιματιζόμενα φυτάρια θα μεταφυτευτούν στο θερμοκήπιο ή στο χωράφι.

Το σχεδιάγραμμα 7 δείχνει ένα παράδειγμα των μετρήσεων που πάρθηκαν για τις αντίστοιχες ενδεικτικές τιμές του περιβάλλοντος, εντός και εκτός της μονάδας εγκλιματισμού. Στην περίπτωση αυτή βλέπουμε ότι η θερμοκρασία, η σχετική υγρασία και η συγκέντρωση του CO₂ ελέγχονται, ώστε να διατηρούνται στα επιθυμητά επίπεδα.

Η ανάπτυξη των καλλιεργούμενων φυταρίων όπου γίνεται στην μονάδα εγκλιματισμού συγκρίνεται με αυτή της συμβατικής μεθόδου. Τα φυτάρια μεγαλώνουν γρηγορότερα και είναι περισσότερο εύρωστα με την μέθοδο της μονάδας εγκλιματισμού παρά με την συμβατική μέθοδο, όπως δείχνει το σχεδιάγραμμα 8. Για το λόγο ότι το περιβάλλον είναι το ιδανικότερο για την ανάπτυξη και την ριζοβολία των εκφύτων με την μέθοδο της μονάδας εγκλιματισμού, όπου οι συνθήκες *ex-vitro* είναι τέτοιες ώστε να επιτρέπουν να γίνονται σωστά όλες οι διαδικασίες ανάπτυξης και επιβίωσης των φυταρίων.

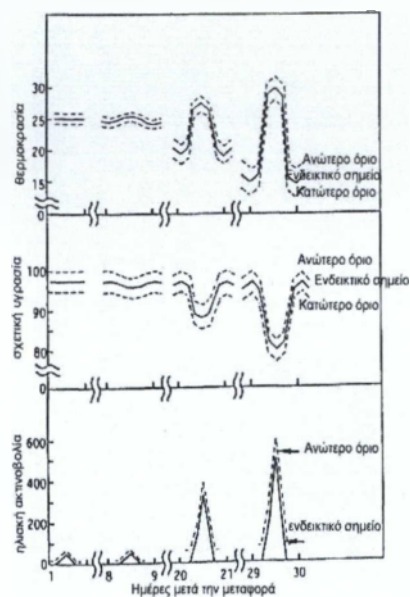
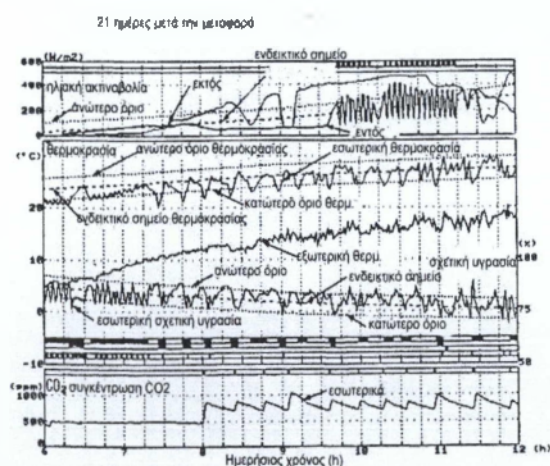
Το σχεδιάγραμμα 9 δείχνει τις ημερήσιες αλλαγές της θερμοκρασίας, της σχετικής υγρασίας, της ηλιακής ακτινοβολίας και της συγκέντρωσης του CO₂ εντός της μονάδας εγκλιματισμού. Η ημερήσια εμβέλεια της θερμοκρασίας και της σχετικής υγρασίας μεταξύ των δύο μεθόδων στην αρχή ήταν μικρή, έπειτα όμως αυξήθηκε σταδιακά. Ο μέσος όρος της συγκέντρωσης του CO₂ εντός της μονάδας από την 8^η έως την 28^η ημέρα μετά την μεταφορά τους, ήταν περίπου στα 750ppm, όπου ήταν περίπου 400ppm υψηλότερη από εκείνη της συμβατικής.

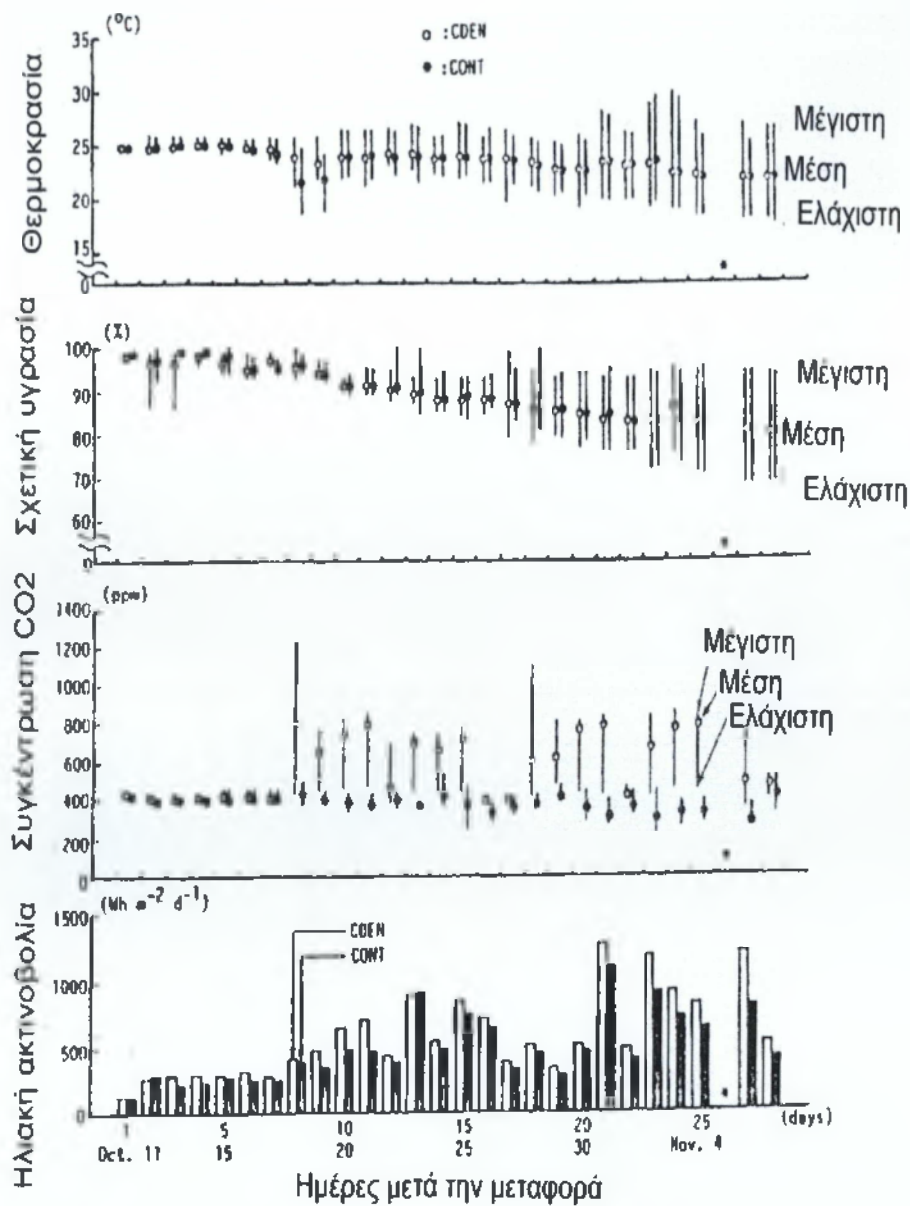
Το επίπεδο φωτισμού στην μονάδα εγκλιματισμού ήταν 20% μεγαλύτερο από εκείνο της συμβατικής. Το επίπεδο φωτισμού στην μονάδα εγκλιματισμού αυξήθηκε σταδιακά εκτός από τις ημέρες που επικρατούσε συννεφιά. Οι περιβαλλοντικές συνθήκες και στις δύο περιπτώσεις ελέγχονταν επιτυχώς εντός των επιθυμητών πλαισίων. Στο σχεδιάγραμμα 10 φαίνονται τα αποτελέσματα από την αύξηση των φυταρίων. Κατά την διάρκεια των πρώτων δεκατεσσάρων ημερών, δεν υπήρχαν αισθητές αλλαγές όσον αφορά το σύνολο της ριζοβολίας, το ύψος, το βάρος και τον αριθμό των φύλλων ανά φυτάριο μεταξύ των δύο μεθόδων. Μέχρι το τέλος όμως της 28^{ης} ημέρας οι διαφορές ήταν μεγάλες.

Υπάρχουν αρκετά πλεονεκτήματα σε πολλά σημεία όσον αφορά την μονάδα εγκλιματισμού σε αντίθεση με την συμβατική μέθοδο εγκλιματισμού. Τέτοια πλεονεκτήματα είναι η μικρότερη καλλιεργητική περίοδος, η μη μεταφύτευση κατά την διάρκεια ριζοβολίας και εγκλιματισμού, περισσότερα εύρωστα φυτά.

Σχεδ 7. Παραδείγματα των ενδεικτικών τιμών και μετρήσεων εντός και εκτός της μονάδας εγκλιματισμού. (Kozai, Hayashi, Hirozawa, Kodama και Watanabe 1987)

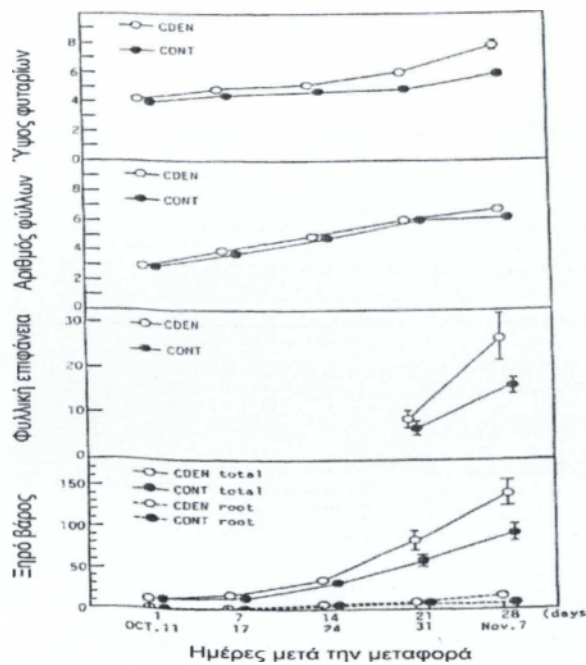
Σχεδ 8. Ημερήσιες αλλαγές της θερμοκρασίας, της σχετικής υγρασίας και της ηλιακής ακτινοβολίας εντός της μονάδας εγκλιματισμού. (M. Hayashi και T. Kozai)





Σχεδ 9. Ημερήσιες αλλαγές στην συγκέντρωση του CO₂, της θερμοκρασίας, της σχετικής υγρασίας και της ηλιακής ακτινοβολίας εντός της μονάδας εγκλιματισμού με την παρουσία του CO₂. (M. Hayashi και T. Kozai)

Σχεδ 10. Αλλαγές στο ύψος των φυτών, στον αριθμό των φύλλων, στην φυλλική επιφάνεια και στο ξηρό βάρος φυταρίων φράουλας έπειτα από την μεταφορά τους από *in-vitro* καλλιέργεια, καθώς και η περίοδος στις δυο μεθόδους εγκλιματισμού. (Hori, 1966)



ΒΕΛΤΙΩΜΕΝΟ ΣΥΣΤΗΜΑ ΡΙΖΟΒΟΛΗΣΗΣ ΚΑΙ ΕΓΚΛΙΜΑΤΙΣΜΟΥ ΚΑΛΛΙΕΡΓΟΥΜΕΝΩΝ IN-VITRO ΦΥΤΩΝ

Η εξέλιξη ενός πρωτότυπου νέου συστήματος για την ριζοβολία και τον εγκλιματισμό των in-vitro φυταρίων φαίνεται στο σχεδ. 11.

Το σύστημα αυτό είναι σχεδιασμένο όχι μόνο για την προώθηση της αύξησης των φυταρίων, αλλά και για την αύξηση της ανεκτικότητας τους στους περιβαλλοντικούς παράγοντες και της φωτοσυνθετικής ικανότητας των φυταρίων στο στάδιο της ριζοβολίας και του εγκλιματισμού.

Επίσης, το σύστημα μπορεί να χρησιμεύσει και για τον πολλαπλασιασμό των φυταρίων εάν η μέθοδος της αποστείρωσης είναι κατάλληλη και πλήρης.

Το σύστημα αυτό αποτελείται από το χώρο καλλιέργειας των φυτών, την παροχή αερίου, το τμήμα παροχής του θρεπτικού διαλύματος και το μέρος παροχής φωτός. Το τμήμα το οποίο αποτελείται από το δοχείο καλλιέργειας, τα υλικά υποστήριξης των φυταρίων και το πλαστικό διαχωρισμού του εναέριου τμήματος από την ζώνη των ριζών φαίνεται στο σχεδιάγραμμα 12. Το θρεπτικό διάλυμα δεν περιέχει σάκχαρα ενώ τα φυτάρια εξελίσσονται αυτοτροφικά.

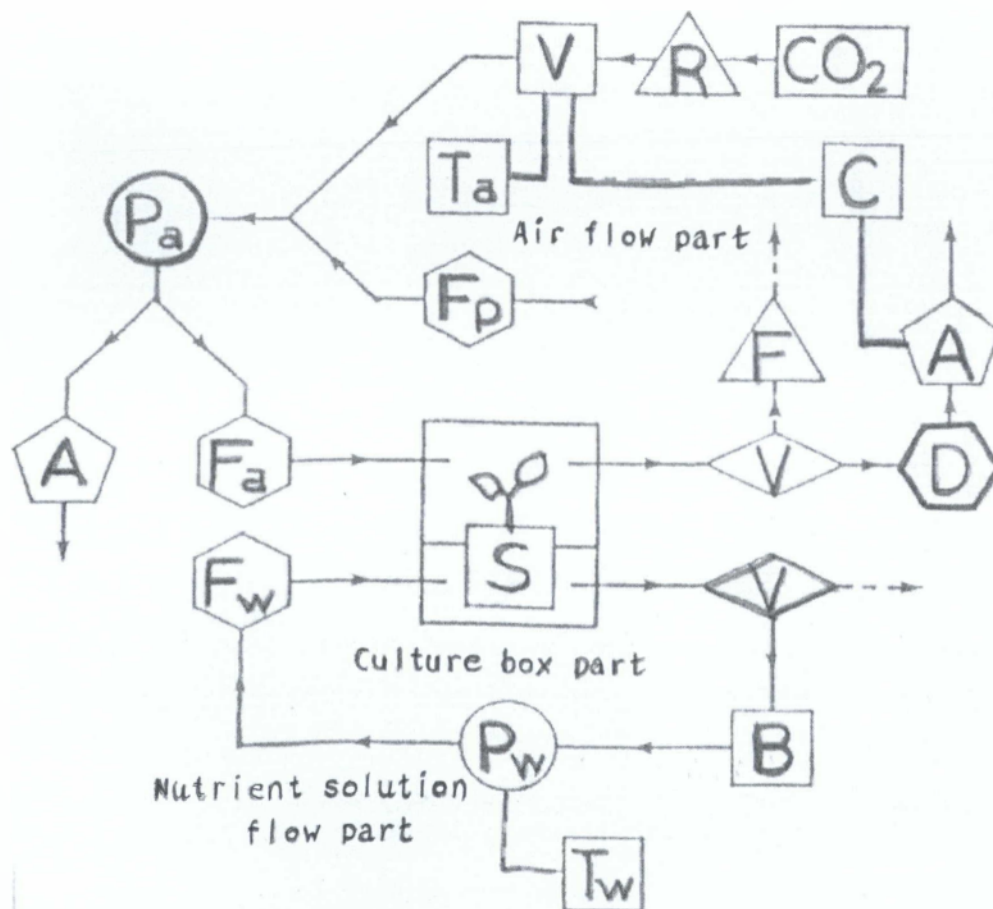
Σύμφωνα με αυτό το σύστημα υπάρχει η δυνατότητα ελέγχου της θερμοκρασίας, της υγρασίας, της συγκέντρωσης του CO₂, του P.P.F.D και του pH του θρεπτικού διαλύματος.

Από πειράματα που έγιναν σύμφωνα με αυτό το σύστημα, έδειξαν ότι οι περιβαλλοντικοί παράγοντες ήταν ελεγχόμενοι σε επιθυμητά επίπεδα καθώς και πειράματα που έγιναν για την προώθηση της ριζοβολίας και της αυτοτροφικής αύξησης των φυταρίων έδωσαν ελπιδοφόρα αποτελέσματα.

Τα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου είναι τα εξής: 1) Προώθηση της ανάπτυξης και εξέλιξης των φυταρίων 2) Βελτίωση της ποιότητας των φυταρίων λόγω του ελέγχου κάποιων φυσιολογικών και μορφολογικών χαρακτηριστικών 3) Απλοποίηση των μεθόδων ριζοβολίας και εγκλιματισμού 4) Μείωση του ποσοστού απωλειών των φυταρίων από τυχόν μολύνσεις 5) Ευκολότερος έλεγχος του περιβάλλοντος του χώρου καλλιέργειας 6) Ευκολότερος έλεγχος του περιβάλλοντος ανάπτυξης και εξέλιξης των φυταρίων 7) μείωση του κόστους παραγωγής.

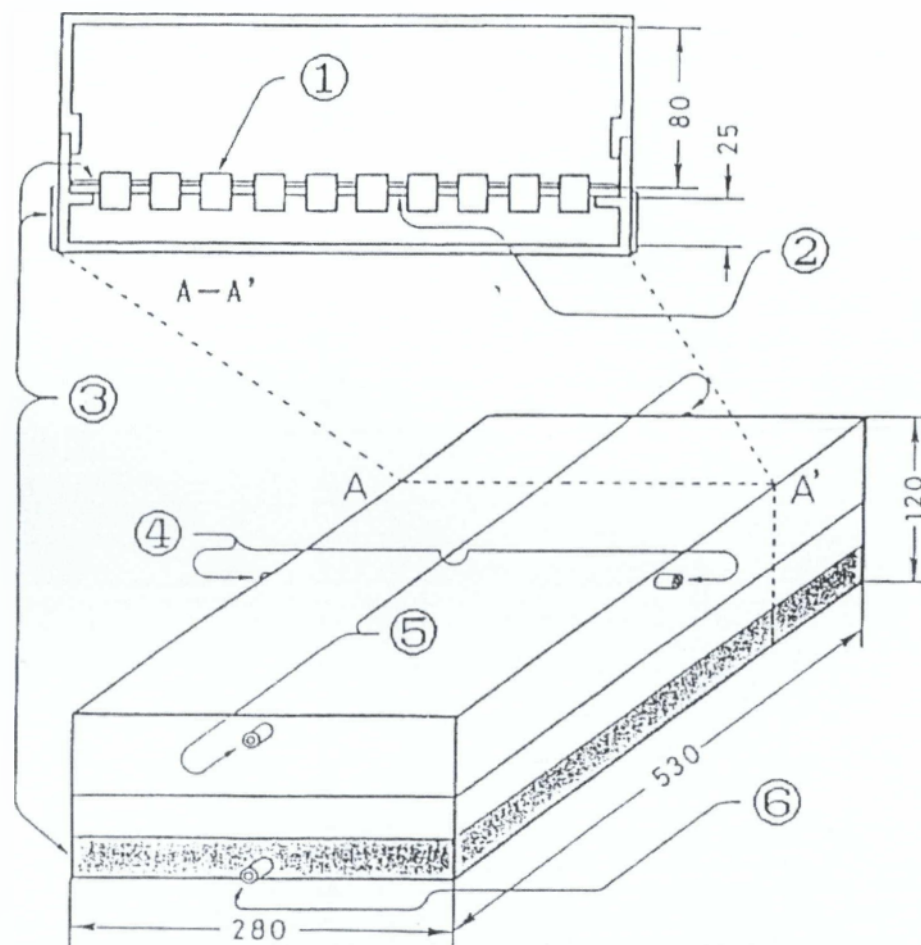
Οπωσδήποτε, θα πρέπει να υπάρχει προσοχή και σύνεση στην ενδεχόμενη εισαγωγή κάποιας υψηλής τεχνολογίας. Πρώτα, θα πρέπει να παρέχεται ένα άνετο περιβάλλον εργασίας για τον χειριστή γιατί μόνο έτσι θα μπορέσει να υπάρξει ουσιαστική απόδοση ενώ δεύτερον η αξιοπιστία και η ασφάλεια είναι πολύ σημαντικά ακόμα περισσότερο και από την αποδοτικότητα του συστήματος. Ακόμη το σύστημα θα πρέπει να είναι ευέλικτο, πολυλειτουργικό και να μπορεί να προσαρμοστεί στις αλλαγές του περιβάλλοντος.

Σχεδιάγραμμα 11. Το φωτοαυτοτροφικό σύστημα καλλιέργειας των φυταρίων στα στάδια του εγκλιματισμού και της ριζοβολίας. (Fujiwara, 1987)



CO₂→κύλινδρος του CO₂
R→ μετρητής ροής με ρυθμιστή πίεσης
V→ βαλβίδα
TA→ χρονοδιακόπτης για έλεγχο του V
FP→φίλτρο σκόνης αέρος
Pa→ τρόμπα αέρος
V→ μεταστάτης βαλβίδας
F→ μέτρηση ροής
D→όργανο μείωσης της υγρασίας
A→ ανάλυση του CO₂
C→ έλεγχος του CO₂
B→δοχείο θρεπτικού διαλύματος
Paw→ βαλβίδα υγρού
Two→ χρονοδιακόπτης για τον έλεγχο της βαλβίδας υγρού
FW→ φίλτρο υγρού
S→ υλικό υποστήριξης για τα φυτά

Σχεδ 12. Σχηματικό διάγραμμα του χώρου καλλιέργειας, τμήματος του φωτοαυτοτροφικού συστήματος για τα *in-vitro* φυτάρια στα στάδια ριζοβολίας και εγκλιματισμού. (Fujiwara, 1987)



1. υλικό υποστήριξης 2. λαμαρίνα για την κράτηση του υλικού υποστήριξης 3. προφίλ αλουμινίου 4. εξαγωγή αέρος 5. εισαγωγή αέρος 6. εισαγωγή θρεπτικού διαλύματος. (η έξοδος βρίσκεται στην αντίθετη πλευρά)

3.4.3 Μέθοδος εγκλιματισμού με λάμπες

Η όλη έννοια και η λειτουργία της μεθόδου του εγκλιματισμού με λάμπες είναι παρόμοια με αυτή της μονάδας κάτω από το ηλιακό φως, μόνο που στην περίπτωση του εγκλιματισμού με λάμπες το περιβάλλον είναι πιο ελεγχόμενο σε σχέση με την άλλη μέθοδο.

3.4.4 Παραδείγματα

Σε αυτή την ενότητα θα παρουσιαστούν παραδείγματα κάποιων φυτικών ειδών σε σχέση με την μονάδα εγκλιματισμού και τις επιδράσεις των παραγόντων όσον αφορά την αύξηση της ριζοβολίας και του εγκλιματισμού αυτών. Είναι παραδείγματα διαφόρων φυτικών ειδών τα οποία δοκιμάστηκαν και εγκλιματίστηκαν και με τις δύο μεθόδους εγκλιματισμού.

ΕΦΑΡΜΟΓΗ ΤΗΣ ΜΟΝΑΔΑΣ ΕΓΚΛΙΜΑΤΙΣΜΟΥ ΓΙΑ ΤΗΝ ΑΥΞΗΣΗ ΤΩΝ ΓΑΡΥΦΑΛΛΩΝ (Dianthus carvophyllus) ΓΙΑ ΤΗΝ ΡΙΖΟΒΟΛΗΣΗ ΚΑΙ ΤΟΝ ΕΓΚΛΙΜΑΤΙΣΜΟ ΤΩΝ ΕΚΦΥΤΩΝ.

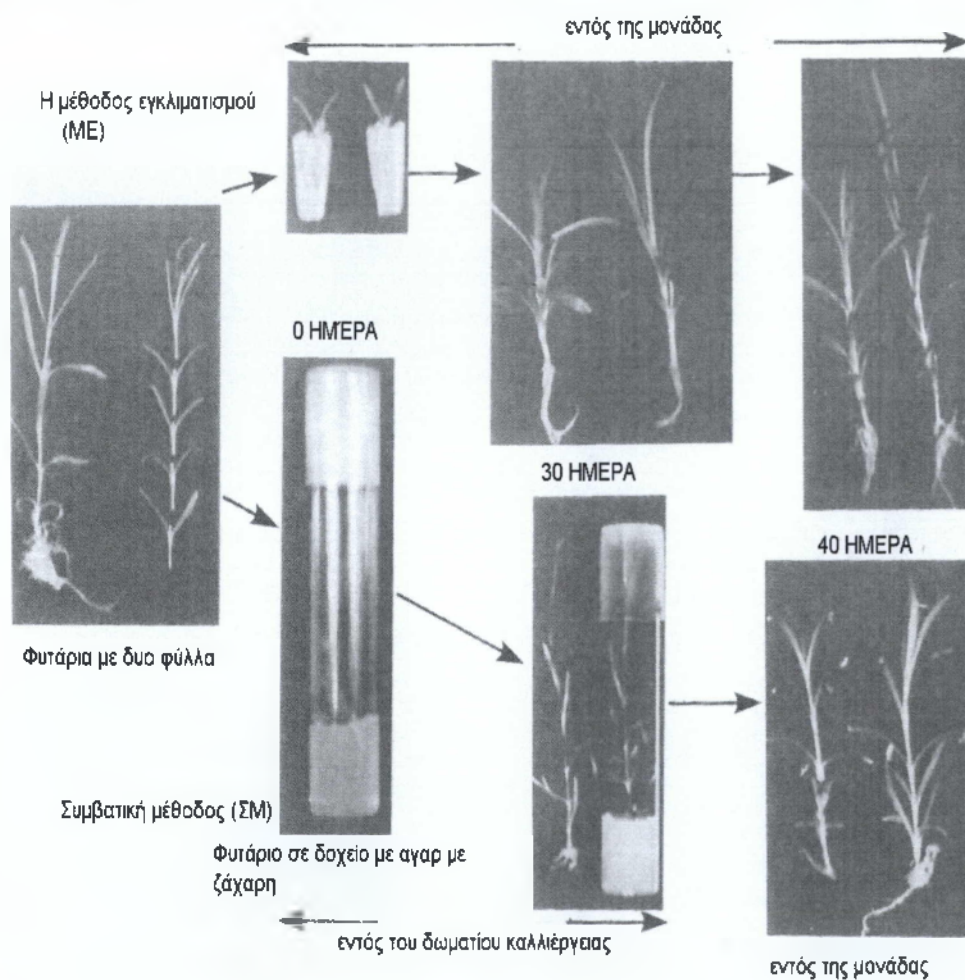
Έκφυτα γαρυφάλλων τα οποία προέρχονται από φυτάρια που καλλιεργούνται σε in-vitro συνθήκες, κόβονται σε ξεχωριστά κομμάτια έχοντας το καθένα από δύο φύλλα αλλά καθόλου ριζικό σύστημα. Το παρακάτω πείραμα πραγματοποιήθηκε από τον Hayashi το 1988 και δημοσιεύθηκε στο 'Florizel on Plant Micropropagation in Horticulture' Έπειτα τοποθετούνται σε δοχεία με περλίτη εντός κατάλληλου υδροπονικού διαλύματος όπου και μεταφέρονται αμέσως στη μονάδα εγκλιματισμού.

Η ανάπτυξη των φυταρίων με τη μέθοδο αυτή, συγκρίνεται με εκείνη της συμβατικής μεθόδου. Κατά την περίπτωση της συμβατικής μεθόδου τα έκφυτα καλλιεργήθηκαν και ριζοβόλησαν σε MS (Murashige & Skoog) άγαρ το οποίο περιέχει 20g/l ζάχαρης για διάστημα 30 ημερών, όπου στην συνέχεια μεταφέρθηκαν εντός της μονάδας εγκλιματισμού. Σαν αποτέλεσμα αυτού, έχουμε τα φυτάρια που προέρχονται από την

μονάδα εγκλιματισμού να μεγαλώσουν γρηγορότερα και να είναι περισσότερο εύρωστα, σε σχέση με εκείνα της συμβατικής μεθόδου (Εικόνα 3).

Το συμπέρασμα το οποίο προκύπτει δείχνει ολοφάνερα ότι τα φυτάρια τα οποία εγκλιματίστηκαν σύμφωνα με την μέθοδο της μονάδας εγκλιματισμού παρουσιάζουν πιο γρήγορη αύξηση καθώς και μεγαλύτερη ευρωστία σε αντίθεση με εκείνα της συμβατικής μεθόδου. Γεγονός είναι ότι υπάρχουν πολλά πλεονεκτήματα στην μέθοδο εγκλιματισμού έναντι της συμβατικής μεθόδου όπως: 1) μικρότερη καλλιεργητική περίοδος 2) δεν είναι απαραίτητη η μεταφύτευση κατά την ριζοβολία και τον εγκλιματισμό 3) περισσότερα εύρωστα φυτά και 4) εκμηδενισμός των πιθανοτήτων μόλυνσεως κατά την ριζοβολία.

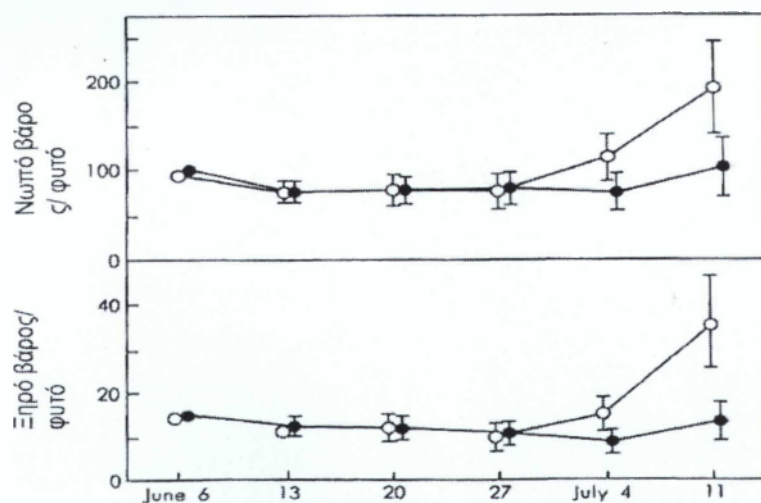
Εικόνα 3. Έκφυτα γαρυφάλων κατά την 0,30^η και 40^η ημέρα κατά την μέθοδο εγκλιματισμού και κατά την συμβατική μέθοδο. (Hayashi et al. 1988)



ΥΑΛΩΜΕΝΑ ΦΥΤΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΟΥΜΕΝΑ IN-VITRO ΚΑΙ ΚΑΤΑΔΥΟΜΕΝΑ ΣΕ ΥΓΡΟ ΜΕΣΟ

Κάποια πειραματικά αποτελέσματα, έδειξαν ότι παίρνοντας υαλωμένα φυτάρια φράουλας (*Fragaria xanapassa* Duch) και εμβαπτίζοντας τα σε υγρό μέσο με την παρουσία κάποιου βιοαντιδραστήρα, το ποσοστό επιβίωσης των εγκλιματιζόμενων φυτών εντός της μονάδας ανέρχεται γύρω στο 96%, ενώ κατά την συμβατική μέθοδο μέσα στο θερμοκήπιο και με την παρουσία ενός έμπειρου καλλιεργητή ανέρχεται στο 80%. Στην μονάδα εγκλιματισμού για 35 ημέρες μετά την έναρξη της διαδικασίας, το ξηρό βάρος ήταν 2.8 gr, το ύψος των φυτών 1.4cm και ο αριθμός των αποκαλυπτόμενων φύλλων 1.3 φορές μεγαλύτερος από εκείνων των αντίστοιχων που εγκλιματίστηκαν σε θερμοκήπιο βάση της συμβατικής μεθόδου. Οι αλλαγές σε συνάρτηση με το χρόνο όσον αφορά το υγρό βάρος, το ξηρό βάρος, το ύψος των φυτών και τον αριθμό των αποκαλυπτόμενων φύλλων ανά φυτάριο φαίνονται στο σχεδιάγραμμα 13.

Σχεδ 13. Αλλαγές στο νωπό βάρος και ξηρό βάρος φυταρίων φράουλας, μετά την μεταφορά τους από την in-vitro καλλιέργεια για τον εγκλιματισμό τους στην μονάδα εγκλιματισμού (○) καθώς και της συμβατικής (●). (Kozai et al. 1987)



Το μικρό ποσοστό θανάτου των φυταρίων όπου παρατηρείται σε κάποιες περιπτώσεις εντός της μονάδας εγκλιματισμού, οφείλεται στην υψηλή σχετική υγρασία, στο σχετικά χαμηλό επίπεδο φωτισμού και στην σταθερότητα της θερμοκρασίας κατά το πρώτο στάδιο, επίσης το υψηλό ποσοστό αυξησής τους εντός της μονάδας, το οποίο παρατηρείται, οφείλεται στο υψηλό ποσοστό ριζοβόλησης και στον υψηλό ρυθμό της φωτοσυνθετικής τους ικανότητας κατά το επόμενο στάδιο.

Ενδεικτική διαφορά έχει παρατηρηθεί και στον ρυθμό ανάπτυξης των φυταρίων ανάμεσα στις δυο μεθόδους. Έχει παρατηρηθεί ότι το υγρό και το ξηρό βάρος μειώνονται με το χρόνο μετά τη μεταφορά των φυταρίων από την μονάδα ιστοκαλλιέργειας κατευθείαν στην συμβατική μέθοδο εγκλιματισμού (θερμοκήπιο).

ΧΑΜΗΛΗ ΘΕΡΜΟΚΡΑΣΙΑ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ ΚΑΤΑ ΤΗΝ ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ ΤΩΝ ΜΕΤΑΦΥΤΕΥΜΕΝΩΝ ΦΥΤΩΝ

Η αποθήκευση των μεταφυτευμένων *in-vitro* φυταρίων, είχε άριστα αποτελέσματα όταν χρησιμοποιήθηκαν κατά την διάρκεια της αποθήκευσης χαμηλές θερμοκρασίες. Ως πρότυπα χρησιμοποιήθηκαν φυτάρια μπρόκολων τα οποία καλλιεργήθηκαν για τρεις εβδομάδες σε *in-vitro* συνθήκες στους 23°C θερμοκρασία αέρος και στους 160 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ P.P.F.D. Πριν την αποθήκευση, οι θερμοκρασίες ήταν γύρω στους 3, 5, 10 και 15°C βαθμούς Κελσίου για τα καλλιεργούμενα φυτάρια με την προσθήκη ή χωρίς την προσθήκη σακχάρων στο μέσο καλλιέργειας. Τα φυτάρια αποθηκεύθηκαν για έξι εβδομάδες στους 5, 10, και 15°C βαθμούς Κελσίου και κάτω από 0 ή 2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ σε συνθήκες P.P.F.D.

Η θερμοκρασία αέρος ποικίλει σε όλα τα επίπεδα του μέσου το οποίο περιέχει σάκχαρα. Για την καλύτερη διατήρηση του ξηρού βάρους κατά την αποθήκευση θα πρέπει ο βαθμός ανταλλαγής του διοξειδίου του άνθρακα μεταξύ των φυταρίων να διατηρείται κοντά στο μηδέν καθ' όλη την περίοδο της αποθήκευσης. Καλής ποιότητας φυτάρια, τα οποία διατηρήθηκαν με επιτυχία ήταν αυτά των οποίων οι συνθήκες ήταν οι εξής: 2 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ P.P.F.D στους 5-10°C βαθμούς Κελσίου χωρίς την προσθήκη σακχάρων και στους 5°C βαθμούς Κελσίου με προσθήκη σακχάρων. Η εργασία

πραγματοποιήθηκε από τους Kubota και Kozai(1995)και δημοσιεύθηκε απο το 'Scientia Horticulture.'

Αυτή η μέθοδος μπορεί να εφαρμοστεί για διάφορα άλλα φυτάρια, μοσχεύματα και σπορόφυτα με την ίδια επιτυχία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4^ο

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΙΚΕΣ ΑΝΑΦΟΡΕΣ

Ο εγκλιματισμός των παραγόμενων in-vitro φυτών παρουσιάζει σημαντικό ενδιαφέρον όσον αφορά την επιστήμη της γεωπονίας. Πολλές έρευνες έχουν γίνει πάνω στον εγκλιματισμό εκ των οποίων αρκετές αναφέρονται στο κομμάτι το οποίο αφορά κυρίως την φυσιολογία των εγκλιματιζόμενων φυτών. Πολλά προβλήματα όμως πάνω στον εγκλιματισμό παραμένουν άλυτα.

Μέσω αυτής της εργασίας η οποία αποτελείται από αναφορές, πειράματα και εργασίες επιστημόνων που έχουν δουλέψει εμπειριστατωμένα πάνω στο συγκεκριμένο αντικείμενο του εγκλιματισμού, διαπιστώνουμε ότι η μέθοδος εγκλιματισμού έχει αποτελέσματα. Ο σκοπός, όπως αναφέραμε και αρχικά της εργασίας είναι.

- 1) πιο μικρή περίοδος καλλιέργειας
- 2) πιο εύρωστα και δυνατά φυτάρια
- 3) αύξηση του ποσοστού επιβίωσης των φυταρίων
- 4) πιο εύκολη προσαρμογή των φυταρίων στο ex-vitro περιβάλλον

Εφαρμόζοντας σωστό εγκλιματισμό με ελεγχόμενο το περιβάλλον του, η επιτυχία του αποτελέσματος θα είναι μεγάλη λαμβάνοντας έτσι φυτά με επιθυμητά χαρακτηριστικά και με δυνατότητα να μπορέσουν να ανταπεξέλθουν σε τυχόν προβλήματα που μπορεί να παρουσιαστούν.

Τα μηνύματα είναι ελπιδοφόρα και η θετική πορεία πάνω σε αυτό τον τομέα της επιστήμης μας γεμίζει με αισιοδοξία.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

A. ΚΑΝΑΚΗΣ. Μαθήματα ιστοκαλλιέργειας – Παραγωγή φυτικού πολλαπλασιαστικού υλικού. (Σημειώσεις του Τ.Ε.Ι Καλαμάτας)

KOZAI, Y.KITAYA AND C.KUBOTA. Environmental control in micropopagation.

Volume 1 (1986-1991)

Volume 2 (1992-1994)

Volume 3 (1994-1995)

Iv. et al 1983 Vanderscheaghe and Deborah 1987. Acclimatization of micropropagated plants. Biotechnology in agriculture and forestry.

Fujiwara et al 1987, Kozai et al 1987. Acclimatization of micropropagated plants. Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 17.

De Profit et al, 1985. Acclimatization of micropropagated plants. Biotechnology in agriculture and forestry.

C. Kinden, Y. Kite and T.Kozai, 1987. Faculty of Horticulture, Chiba University.

Hayashi and Kozai, 1987. Biotechnology in agriculture and forestry vol. 17.

Kozai et al, 1987. Effects of CO₂ enrichment and high solar radiation on growth potato plants in direct ex-vitro rooting method.

Kozai, 1991. Lab. Of Environmental Control Engineering, Chiba.

Hoshi and Kozai, 1984. Development of a facility for accelerating the acclimatization of tissue cultured plants.

Fujiwara, 1987. New system for rooting and acclimatization of in-vitro plant. High technology in protected cultivation Chiba University Matsudo, Chiba 271 Japan.

Hayashi et al, 1988. Application of the acclimatization unit for growing explants ex-vitro. Acclimatization of micropropagated plants.

Pierik, 1998. Effects of P.P.F.D and humidity on Eucalyptus calmadulensis Murashige & Skoog 1962 (MS), Gamborg 1968

Heller 1965 and Linsmager & Skoog (1965)

Kubota C and Kozai T (1995). Low temperature storage of transplants at the light compensation point. 'Scientia Horticulture'

Kirdmanee C et al.(1995) Rapid acclimatization of Eucalyptus plantlets by controlling PPFD and relative humidity. Environmental Control Biol.