

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗΣ ΤΟΠΙΟΥ

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΩΝ ΕΚΦΥΤΩΝ,
ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ
ΣΤΟΝ ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΤΟΥ *χMALOSORBUS FLORENTINA* ZUCC.



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗΣ ΝΙΚ. ΜΑΡΤΙΝΗ
Γεωπόνου MSc

ΑΘΗΝΑ 2013

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗΣ ΤΟΠΙΟΥ

**ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΕΠΙΔΡΑΣΗΣ ΤΗΣ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑΣ ΤΩΝ ΕΚΦΥΤΩΝ,
ΚΑΘΩΣ ΚΑΙ ΤΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΚΑΙ ΤΩΝ ΣΥΝΘΗΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ
ΣΤΟΝ ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΤΟΥ *χMALOSORBUS FLORENTINA ZUCC.***

ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΑΙΚΑΤΕΡΙΝΗΣ ΝΙΚ. ΜΑΡΤΙΝΗ
Γεωπόνου MSc

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Παπαφωτίου Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γ.Π.Α. (Επιβλέπουσα)

Βέμμος Σταύρος, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α. (Μέλος)

Φασσέας Κωνσταντίνος, Καθηγητής Γ.Π.Α. (Μέλος)

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Παπαφωτίου Μαρία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γ.Π.Α.

Βέμμος Σταύρος, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.

Φασσέας Κωνσταντίνος, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Ταραντίλης Πέτρος, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.

Μπεμπέλη Πηνελόπη, Καθηγήτρια Γ.Π.Α.

Κίντζιος Σπυρίδων, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Νεκτάριος Παναγιώτης, Αναπληρωτής Καθηγητής Γ.Π.Α.

Αφιερωμένο στη Διονυσία και το Νικόλα,

που γεννήθηκαν κατά τη διάρκεια της παρούσας διδακτορικής διατριβής,

και στο σύζυγό μου, που με στηρίζει σε κάθε μου προσπάθεια.

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ξεκινώντας θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους με βοήθησαν για την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής.

Κατ' αρχήν, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου κα Μαρία Παπαφωτίου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου, για την επιστημονική της καθοδήγηση και στήριξη κατά την εκπόνηση και συγγραφή της παρούσας διδακτορικής διατριβής, και κυρίως για την κατανόηση και την υπομονή της.

Ουσιαστική ήταν και η συμβολή του διδάκτορα Κων/νου Μπερτσουκλή, ΕΤΕΠ του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου, στην εκπόνηση της διατριβής με τις συμβουλές και τις υποδείξεις του, αλλά και με τη προθυμία του να βοηθήσει σε οποιαδήποτε δυσκολία προέκυπτε.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κο Σ. Βέμμο για τη φιλοξενία του στο Εργαστήριο Δενδροκομίας, τον κο Κ. Φασσέα για τη φιλοξενία του στο Εργαστήριο Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας και τον κο Π. Ταραντίλη για τη φιλοξενία του στο Εργαστήριο Χημείας, αλλά και για το χρόνο που αφιέρωσαν για την επεξεργασία και ερμηνεία των αποτελεσμάτων. Πολύτιμη ήταν και η βοήθεια του διδάκτορα Α. Κατσιλέρου, ΕΤΕΠ του Εργαστηρίου Βελτίωσης Φυτών και Γεωργικού Πειραματισμού, αλλά και της κας Νικολέτας Δεναξά, υποψήφιας διδάκτορα του Εργαστηρίου Δενδροκομίας.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλα τα μέλη της εξεταστικής επιτροπής για το χρόνο που αφιέρωσαν για την ανάγνωση και εξέταση της παρούσας διατριβής.

Μεγάλη είναι η ευγνωμοσύνη μου στο σύζυγό μου Πάγκαλο Σεϊμενάκη, στους γονείς μου Νικόλαο και Αθανασία Μαρτίνη και στα πεθερικά μου Γεώργιο και Διονυσία Σεϊμενάκη, που με συνόδευαν στις επισκέψεις μου στην Πάρνηθα, με στήριζαν, κρατούσαν τα παιδιά και έκαναν υπομονή, επειδή χωρίς τη βοήθειά τους δε θα είχα καταφέρει να ολοκληρώσω τη διδακτορική μου διατριβή.

Θέλω επίσης να ευχαριστήσω τα παιδιά μου, Διονυσία και Νικόλα, που με τον ερχομό τους στη ζωή μου, μπορεί να ανέτρεψαν τον προγραμματισμό των εργασιών και να καθυστέρησαν την ολοκλήρωση της παρούσας διατριβής, όμως δυνάμωσαν την αποφασιστικότητα και την επιμονή μου, βελτίωσαν την αποδοτικότητα της εργασίας μου, και φυσικά μου πρόσφεραν ευτυχία και αγάπη.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών, που χρηματοδότησε για τρία χρόνια τις μεταπτυχιακές μου σπουδές και που μου παρείχε κίνητρα για τη συνέχιση των σπουδών μου.

	ΣΕΛΙΔΑ
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	I
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	IX
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	XI
ABSTRACT	XIV
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	1
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	1
1.1. Σκοπός	1
1.2. Συστηματική κατάταξη και γεωγραφική κατανομή του είδους <i>xMalosorbus florentina</i>	3
1.3. Βοτανική περιγραφή του είδους <i>xMalosorbus florentina</i>	5
1.4. Πολλαπλασιασμός του <i>xMalosorbus florentina</i>	7
1.5. Αξιοποίηση αυτοφυών ειδών ως καλλωπιστικά	7
1.6. Ο μικροπολλαπλασιασμός ως μέσο διάσωσης απειλούμενων ειδών	12
1.7. <i>In vitro</i> πολλαπλασιασμός των γενών <i>Malus</i> και <i>Sorbus</i>	19
1.7.1. Εγκατάσταση <i>in vitro</i> καλλιέργειας του <i>Malus</i> sp.	19
1.7.1.1. Τύπος εκφύτου για εγκατάσταση <i>in vitro</i> καλλιέργειας του <i>Malus</i> sp.	19
1.7.1.2. Απολύμανση εκφύτων του <i>Malus</i> sp.	20
1.7.1.3. Καφέτιασμα εκφύτων του <i>Malus</i> sp.	21
1.7.2. Βλαστογένεση του <i>Malus</i> sp.	22
1.7.2.1. Επίδραση εποχής συλλογής εκφύτων και σταδίου ανάπτυξης βλαστών στη βλαστογένεση του <i>Malus</i> sp.	22
1.7.2.2. Θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας του <i>Malus</i> sp.	23
1.7.2.3. Επίδραση φυτορρυθμιστικών ουσιών στη βλαστογένεση του <i>Malus</i> sp.	23
1.7.2.4. Επίδραση thidiazuron στη βλαστογένεση του <i>Malus</i> sp.	26
1.7.3. Ριζογένεση του <i>Malus</i> sp.	27
1.7.3.1. Επίδραση της μεθόδου ριζοβολίας στη ριζοβολία μικροβλαστών του <i>Malus</i> sp.	27
1.7.3.2. Επίδραση του χρόνου παραμονής στο υπόστρωμα με αυξίνη στη ριζοβολία μικροβλαστών του <i>Malus</i> sp.	29
1.7.3.3. Επίδραση του τύπου και της συγκέντρωσης αυξίνης στη ριζοβολία μικροβλαστών του <i>Malus</i> sp.	30

1.7.3.4. Επίδραση εφαρμογής σκότους στη ριζοβολία μικροβλαστών του <i>Malus</i> sp.	32
1.7.3.5. Επίδραση ενεργού άνθρακα στη ριζοβολία μικροβλαστών του <i>Malus</i> sp.	32
1.7.3.6. Επίδραση κυτοκινινών στη ριζοβολία μικροβλαστών του <i>Malus</i> sp.	32
1.7.3.7. Επίδραση γιββερελλίνης στη ριζοβολία μικροβλαστών του <i>Malus</i> sp.	34
1.7.3.8. Επίδραση phloroglucinol στη ριζοβολία μικροβλαστών του <i>Malus</i> sp.	34
1.7.3.9. Επίδραση ποιότητας μικροβλαστών του <i>Malus</i> sp. στη ριζοβολία τους	35
1.7.3.10. Επίδραση υποκαλλιέργειας στη ριζοβολία μικροβλαστών του <i>Malus</i> sp.	35
1.7.3.11. Επίδραση άλλων παραγόντων στη ριζοβολία μικροβλαστών του <i>Malus</i> sp.	36
1.7.4. Εγκλιματισμός του <i>Malus</i> sp.	39
1.7.5. Βλαστογένεση του <i>Sorbus</i> sp.	42
1.7.5.1. Απολύμανση εκφύτων του <i>Sorbus</i> sp.	42
1.7.5.2. Θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας του <i>Sorbus</i> sp.	42
1.7.5.3. Επίδραση φυτορρυθμιστικών ουσιών στη βλαστογένεση του <i>Sorbus</i> sp.	42
1.7.6. Ριζογένεση του <i>Sorbus</i> sp.	44
1.7.7. Εγκλιματισμός του <i>Sorbus</i> sp.	45
1.8. <i>In vitro</i> πολλαπλασιασμός ενήλικων και νεανικών φυτών	46
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	51
2.1. Φυτικό υλικό	51
2.2. Υποστρώματα <i>in vitro</i> καλλιέργειας	51
2.2.1. Υλικά θρεπτικών υποστρωμάτων	51
2.2.2. Μέθοδος παρασκευής θρεπτικών υποστρωμάτων	52
2.2.3. Παρασκευή ‘stock’ διαλυμάτων φυτορρυθμιστικών ουσιών και βιταμινών	53
2.3. Μέθοδοι αποστείρωσης και απολύμανσης	53
2.3.1. Αποστείρωση εργαλείων και υλικών	53
2.3.2. Υλικά απολύμανσης εκφύτων και σπόρων	54
2.4. Έκφυτα	54
2.4.1. Έκφυτα εγκατάστασης αρχικών καλλιεργειών	54
2.4.2. Έκφυτα καλλιεργειών πολλαπλασιασμού των βλαστών	55
2.4.3. Μικροβλαστοί για ριζοβολία	55
2.4.4. Φυτάρια για εγκλιματισμό	56
2.5. Συνθήκες <i>in vitro</i> καλλιέργειας	56
2.5.1. Συνθήκες επώασης	56

2.5.2. Δοχεία <i>in vitro</i> καλλιέργειας και υλικά κάλυψης αυτών	56
2.6. Συνθήκες <i>ex vitro</i> εγκλιματισμού	57
2.6.1. Δοχεία και υποστρώματα εγκλιματισμού	57
2.6.2. Καλλιεργητικές φροντίδες φυταρίων κατά τον εγκλιματισμό	57
2.6.3. Συνθήκες θερμοκρασίας κατά τον εγκλιματισμό	57
2.7. Μικροσκοπική παρατήρηση μόνιμων παρασκευασμάτων εκφύτων με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης	58
2.8. Καφέτιασμα εκφύτων, εκχύλιση και προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών	59
2.9. Μελέτη φασματοσκοπικού προφίλ εκφύτων με τη μέθοδο FT-IR	61
2.10. Πειραματικό-Εκτίμηση αποτελεσμάτων	64
2.11. Στατιστική ανάλυση	64
ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	66
3. ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΤΟΥ <i>xM. florentina</i> ΣΤΗΝ ΠΑΡΝΗΘΑ	66
3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	66
3.2. ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ	66
3.2.1. Φαινολογικές παρατηρήσεις στους πληθυσμούς του <i>xMalosorbus florentina</i> στην Πάρνηθα	66
3.2.2. Επίδραση της καταστροφικής πυρκαγιάς του 2007 στην Πάρνηθα στους πληθυσμούς του σπάνιου και απειλούμενου <i>xMalosorbus florentina</i>	69
3.3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	72
3.3.1. Παρατήρηση των πληθυσμών του <i>xMalosorbus florentina</i> στην Πάρνηθα	72
3.3.2. Επιπτώσεις της καταστροφικής πυρκαγιάς του 2007 στην Πάρνηθα στους πληθυσμούς του σπάνιου και απειλούμενου <i>xMalosorbus florentina</i> και ο μικροπολλαπλασιασμός ως μέσο διάσωσης του είδους	74
4. ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗ <i>IN VITRO</i> ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΤΟΥ <i>xM. florentina</i>	76
4.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	76
4.1.1. Καφέτιασμα εκφύτων	76
4.1.2. Αρχές λειτουργίας και χρήσεις του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (ΗΜΣ)	80
4.1.3. Αρχές και χρήσεις της φασματοσκοπίας υπέρυθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (FT-IR)	83

4.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	88
4.2.1. Εγκατάσταση <i>in vitro</i> καλλιέργειας από έκφυτα ενήλικων φυτών	88
4.2.2. Εγκατάσταση <i>in vitro</i> καλλιέργειας από έκφυτα αναβλαστήσεων	92
4.2.3. Εγκατάσταση <i>in vitro</i> καλλιέργειας από έκφυτα φυταρίων παραγόμενων μέσω μικροπολλαπλασιασμού	94
4.2.4. Εγκατάσταση <i>in vitro</i> καλλιέργειας από σπορόφυτα	95
4.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	96
4.3.1. Εγκατάσταση <i>in vitro</i> καλλιέργειας από έκφυτα ενήλικων φυτών	96
4.3.1.1. Πρόβλημα καφετιάσματος εκφύτων και τρόποι περιορισμού του	98
4.3.1.2. Επίδραση τύπου εκφύτου από ενήλικα φυτά στην εγκατάσταση <i>in vitro</i> καλλιέργειας	100
4.3.1.3. Συσχέτιση μορφολογίας και ανατομίας εκφύτων από ενήλικα φυτά κατά τη διάρκεια ενός έτους με την αντίδρασή τους στην εγκατάσταση <i>in vitro</i> καλλιέργειας	102
4.3.2. Εγκατάσταση <i>in vitro</i> καλλιέργειας από έκφυτα αναβλαστήσεων	109
4.3.2.1. Επίδραση της θέσης των εκφύτων πάνω στις αναβλαστήσεις στην εγκατάσταση <i>in vitro</i> καλλιέργειας	112
4.3.2.2. Επίδραση της zeatin στην εγκατάσταση <i>in vitro</i> καλλιέργειας από έκφυτα αναβλαστήσεων	113
4.3.3. Εγκατάσταση <i>in vitro</i> καλλιέργειας από έκφυτα μικροπολλαπλασιασμένων φυταρίων	115
4.3.3.1. Επίδραση του είδους της κυτοκινίνης στην εγκατάσταση <i>in vitro</i> καλλιέργειας από έκφυτα μικροπολλαπλασιασμένων φυταρίων	115
4.3.3.2. Επίδραση του IBA στην εγκατάσταση <i>in vitro</i> καλλιέργειας από έκφυτα μικροπολλαπλασιασμένων φυταρίων	118
4.3.4. Εγκατάσταση <i>in vitro</i> καλλιέργειας από σπορόφυτα	119
4.3.5. Συσχέτιση περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά με το καφέτιασμα και την αντίδραση κατά την εγκατάσταση <i>in vitro</i> καλλιέργειας εκφύτων από ενήλικα φυτά, αναβλαστήσεις και μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια	120
4.3.6. Επίδραση της νεανικής ή ενήλικης προέλευσης εκφύτου στην εγκατάσταση <i>in vitro</i> καλλιέργειας	124
4.3.7. Μελέτη του φασματοσκοπικού προφίλ και προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε λιγνίνη με τη μέθοδο FT-IR εκφύτων που συλλέχθηκαν από φυτά διαφορετικής	

φυσιολογικής κατάστασης, από διάφορες θέσεις και σε διαφορετικές εποχές και χρησιμοποιήθηκαν για την εγκατάσταση <i>in vitro</i> καλλιέργειας	125
4.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	129
5. ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ ΒΛΑΣΤΩΝ <i>IN VITRO</i>	139
5.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	139
5.1.1. Υπερενυδάτωση βλαστών	139
5.1.2. Χρήση φυτορρυθμιστικών ουσιών <i>in vitro</i>	146
5.1.2.1. Αυξίνες	147
5.1.2.2. Κυτοκινίνες	148
5.1.2.3. Thidiazuron	149
5.1.2.4. Γιββερελλίνες	152
5.1.2.5. Αμψισικό οξύ, αιθυλένιο και άλλοι ρυθμιστές ανάπτυξης	152
5.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	154
5.2.1. Πολλαπλασιασμός βλαστών σε <i>in vitro</i> καλλιέργεια εγκατεστημένη από ενήλικα φυτά	154
5.2.2. Πολλαπλασιασμός βλαστών σε <i>in vitro</i> καλλιέργεια εγκατεστημένη από αναβλαστήσεις	157
5.2.3. Πολλαπλασιασμός βλαστών σε <i>in vitro</i> καλλιέργεια εγκατεστημένη από μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια	157
5.2.4. Πολλαπλασιασμός βλαστών σε <i>in vitro</i> καλλιέργεια εγκατεστημένη από σπορόφυτα	158
5.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	158
5.3.1. Δυναμικό πολλαπλασιασμού <i>in vitro</i> καλλιέργειας προερχόμενης από ενήλικα φυτά	158
5.3.1.1. Επίδραση συγκέντρωσης άγαρ και υλικού κάλυψης των δοχείων στον περιορισμό της υπερενυδάτωσης	160
5.3.1.2. Επίδραση τύπου εκφύτου στον πολλαπλασιασμό των βλαστών	161
5.3.1.3. Επίδραση μεγέθους δοχείου καλλιέργειας και υλικού κάλυψης στον πολλαπλασιασμό βλαστών	162
5.3.1.4. Επίδραση των θρεπτικών υποστρωμάτων MS και WPM στον πολλαπλασιασμό βλαστών	164
5.3.1.5. Επίδραση του thidiazuron στον πολλαπλασιασμό των βλαστών	167

5.3.1.6. Επίδραση της μειωμένης συγκέντρωσης BA/ IBA στον πολλαπλασιασμό βλαστών	174
5.3.1.7. Επίδραση του ενεργού άνθρακα στον πολλαπλασιασμό βλαστών	176
5.3.2. Δυναμικό πολλαπλασιασμού <i>in vitro</i> καλλιέργειας προερχόμενης από αναβλαστήσεις	176
5.3.2.1. Επίδραση θέσης εκφύτων πάνω στις αναβλαστήσεις στο δυναμικό πολλαπλασιασμού της καλλιέργειας	178
5.3.2.2. Επίδραση των κυτοκινινών BA, zeatin, kinetin και 2iP στον πολλαπλασιασμό των βλαστών	179
5.3.3. Δυναμικό πολλαπλασιασμού <i>in vitro</i> καλλιέργειας προερχόμενης από μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια	182
5.3.4. Δυναμικό πολλαπλασιασμού <i>in vitro</i> καλλιέργειας προερχόμενης από σπορόφυτα	183
5.3.5. Επίδραση της γιββερελλίνης στο δυναμικό πολλαπλασιασμού <i>in vitro</i> καλλιεργειών, που παρουσίαζαν χαμηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού	184
5.3.6. Επίδραση της νεανικής ή ενήλικης προέλευσης εκφύτου στον πολλαπλασιασμό των βλαστών <i>in vitro</i>	187
5.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	188
6. IN VITRO ΡΙΖΟΒΟΛΙΑ ΜΙΚΡΟΒΛΑΣΤΩΝ	197
6.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	197
6.1.1. Ριζοβολία <i>in vitro</i>	197
6.1.2. Νέκρωση κορυφής βλαστών	200
6.1.3. Χρήση ενεργού άνθρακα <i>in vitro</i>	203
6.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	206
6.2.1. Προέλευση μικροβλαστών για <i>in vitro</i> ριζοβολία	206
6.2.2. Πειράματα <i>in vitro</i> ριζοβολίας μικροβλαστών	207
6.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	214
6.3.1. Ριζοβολία μικροβλαστών μετά από καλλιέργεια σε στερεό υπόστρωμα με IBA ή NAA, συνεχώς ή για μία μόνο εβδομάδα	214
6.3.2. Ριζοβολία μικροβλαστών μετά από καλλιέργεια σε στερεό υπόστρωμα με IBA ή NAA ή IAA ή με συνδυασμούς αυτών για 1 εβδομάδα	217

6.3.3. Ριζοβολία μικροβλαστών μετά από σύντομη εμβάπτιση της βάσης τους σε υγρό διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης IBA ή συνδυασμού IBA/ IAA	220
6.3.4. Επίδραση εφαρμογής σκότους κατά την 1 ^η εβδομάδα ριζοβολίας	224
6.3.5. Επίδραση ενεργού άνθρακα στη ριζοβολία των μικροβλαστών	227
6.3.6. Επίδραση τύπου και συγκέντρωσης κυτοκινινών κατά τη φάση πολλαπλασιασμού στην ακόλουθη ριζοβολία των μικροβλαστών	233
6.3.7. Επίδραση εφαρμογής γιββερελλίνης κατά τον πολλαπλασιασμό στην ακόλουθη ριζοβολία των μικροβλαστών	239
6.3.8. Επίδραση μήκους των μικροβλαστών στη ριζοβολία τους	240
6.3.9. Επίδραση δοχείου καλλιέργειας και υλικού κάλυψης στη ριζοβολία των μικροβλαστών	241
6.3.10. Επίδραση θρεπτικού υποστρώματος στη ριζοβολία των μικροβλαστών	244
6.3.11. Επίδραση θέσης αρχικών εκφύτων πάνω στις αναβλαστήσεις στη ριζοβολία των μικροβλαστών	246
6.3.12. Επίδραση της φυσιολογίας των μητρικών φυτών από τα οποία προήλθαν οι μικροβλαστοί στη ριζοβολία τους	248
6.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	249
6.4.1. Επίδραση της συνεχούς ή για μία εβδομάδα παρουσίας IBA ή NAA στο στερεό υπόστρωμα καλλιέργειας	249
6.4.2. Επίδραση της παρουσίας IBA ή NAA ή IAA ή συνδυασμών αυτών για μία εβδομάδα στο στερεό υπόστρωμα καλλιέργειας	250
6.4.3. Επίδραση της σύντομης εμβάπτισης σε υγρό διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης IBA ή συνδυασμού IBA/IAA	251
6.4.4. Επίδραση της εφαρμογής σκότους κατά την πρώτη εβδομάδα ριζοβολίας	252
6.4.5. Επίδραση της χρήσης ενεργού άνθρακα	253
6.4.6. Επίδραση του τύπου και της συγκέντρωσης κυτοκινίνης στο υπόστρωμα πολλαπλασιασμού των βλαστών	254
6.4.7. Επίδραση της προσθήκης γιββερελλίνης στο υπόστρωμα πολλαπλασιασμού των βλαστών	256
6.4.8. Επίδραση του μήκους των μικροβλαστών	256
6.4.9. Επίδραση του δοχείου καλλιέργειας και του υλικού κάλυψης	256
6.4.10. Επίδραση του θρεπτικού υποστρώματος	258
	VII

6.4.11. Επίδραση της θέσης των αρχικών εκφύτων πάνω στις αναβλαστήσεις	258
6.4.12. Επίδραση της φυσιολογίας των μητρικών φυτών από τα οποία προήλθαν οι μικροβλαστοί	259
7. ΕΓΚΛΙΜΑΤΙΣΜΟΣ ΦΥΤΑΡΙΩΝ EX VITRO	261
7.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	261
7.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	263
7.2.1. Προκαταρκτικά πειράματα εγκλιματισμού	263
7.2.2. Κύρια πειράματα εγκλιματισμού	264
7.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	266
7.3.1. Αποτελέσματα προκαταρκτικών πειραμάτων εγκλιματισμού	266
7.3.2. Επίδραση της ποιότητας του ριζικού συστήματος των φυταρίων στον εγκλιματισμό	267
7.3.3. Επίδραση της φυσιολογικής κατάστασης των μητρικών φυτών στον εγκλιματισμό	268
7.3.4. Επίδραση της προσθήκης ενεργού άνθρακα στο υπόστρωμα ανάπτυξης των ριζών <i>in vitro</i> στον εγκλιματισμό των φυταρίων	269
7.3.5. Επίδραση της εποχής εγκλιματισμού στην ανάπτυξη των φυταρίων <i>ex vitro</i>	271
7.3.6. Επίδραση του υποστρώματος εγκλιματισμού στην ανάπτυξη των φυταρίων <i>ex vitro</i>	272
7.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	273
8. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	276
8.1. Παρατήρηση πληθυσμών του <i>xMalosorbus florentina</i> στην Πάρνηθα	276
8.2. Εγκατάσταση <i>in vitro</i> καλλιέργειας του <i>xMalosorbus florentina</i>	277
8.3. Πολλαπλασιασμός βλαστών <i>in vitro</i>	279
8.4. <i>In vitro</i> ριζοβολία μικροβλαστών	281
8.5. Εγκλιματισμός φυταρίων <i>ex vitro</i>	284
8.6. Επίλογος	285
9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	288
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι	319
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ	323

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

- ABA αμπισισικό οξύ, abscisic acid
- AA ασκορβικό οξύ, ascorbic acid
- AC ενεργός άνθρακας, activated charcoal
- BA 6-βενζυλαδερίνη, 6-benzyladenine
- BAP 6-βενζυλ-αμινοπουρίνη, 6-benzyl-aminopurine
- BAR βενζυλαδερίνη-ριβοζίδης, benzyladenine-riboside
- BTM Broad-leaved tree medium
- CC κίτρικό οξύ, citric acid
- CPD critical point dryer
- CPPU N-(2-χλωρο-4-πυριδύλ)-N'-φαινυλουρία, N-(2-chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea
- DMT N,N-dimethyltryptophan
- FTIR Fourier transform infrared
- GA₃ γιββεριλλικό οξύ, gibberellic acid
- GD Gresshoff-Doy
- GIS Geographic Information System
- HPLC High-performance liquid chromatography
- IAA ινδολο-3-οξικό οξύ, indole-3-acetic acid
- IAAsp ινδολο-3-ασπαρτικό οξύ, indole-3-aspartic acid
- IBA ινδολο-3-βουτυρικό οξύ, indole-3-butyric acid
- IBA-GE IBA-glucose ester
- iP ισοπεντενυλαδερίνη, isopentenyladenine
- iPA ισοπεντενυλαδενοσίνη, isopentenyladenosine
- 2iP 6-γ-γ-(διμεθυλαλληλάμινο)-πουρίνη, 6-γ-γ-(dimethylallylamino)-purine
- KIN κινετίνη, 6-φουρφοφυραμυνοπουρίνη, kinetin, 6-furfurylamino-purine
- MeOBAPR 6-(3-μεθοξυβενζυλάμινο)πουρίνη-9-β-D-ριβοφουρανοσίδη,
6-(3-methoxybenzylamino)purine-9-β-D-ribofuranoside
- MS Murashige and Skoog Medium
- mT μετα-τοπολίνη, meta-topolin
- mTR μετα-τοπολίνη ριβοσίδη, meta-topolin riboside
- NAA 1-ναφθαλινοξικό οξύ, 1-naphthelene acetic acid

NOA ναφθοξυοξικό οξύ, naphthoxyacetic acid
PG φλορογλυκινόλη, phloroglucinol
PVP πολυβίνυλο πυρολιδόνη, polyvinyl pyrrolidone
RH relative humidity
RWC relative water content
SH Schenk and Hilbebrandt
TDZ thidiazuron, N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-ylurea,
WPM Woody plant medium
ZEA τρανς-ζεατίνη, trans-zeatin
ΗΜΣ Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν να αναπτυχθεί ένα αποτελεσματικό πρωτόκολλο *in vitro* πολλαπλασιασμού του σπάνιου και απειλούμενου αυτοφυούς τη ελληνικής χλωρίδας *Malosorbus florentina* με στόχο την αξιοποίησή του ως καλλωπιστικό φυτό και συγχρόνως τη διατήρησή του. Βασικά προβλήματα που έπρεπε να αντιμετωπιστούν κατά την *in vitro* καλλιέργεια ήταν οι μολύνσεις και το καφέτιασμα των εκφύτων κατά την αρχική εγκατάσταση καλλιέργειών και η δυσκολία κατά την *in vitro* ριζοβολία των μικροβλαστών. Ως βασικό υπόστρωμα *in vitro* καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκε το MS με 1.0 mg l⁻¹ BA και 0.1 mg l⁻¹ IBA. Έκφυτα που ελήφθησαν από ενήλικα φυτά, έκφυτα κορυφής βλαστού και έκφυτα συλλεγμένα το Μάρτιο και Απρίλιο εμφάνισαν περισσότερο καφέτιασμα και είχαν υψηλότερο περιεχόμενο σε ολικά φαινολικά από ότι έκφυτα που ελήφθησαν από νεανικό ιστό, κομβικά έκφυτα και αυτά που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια οποιουδήποτε άλλου μήνα του χρόνου. Η περιεκτικότητά των εκφύτων σε λιγνίνη, η οποία υπολογίστηκε με τη χρήση φασματοσκοπίας FT-IR, ήταν χαμηλότερη στα επάκρια από ότι τα κατώτερα έκφυτα, ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ως προς την προέλευση ή την εποχή συλλογής των εκφύτων. Διακριτική ανάλυση των φασμάτων IR στην περιοχή 1450-1700 cm⁻¹, όπου βρίσκονται οι κορυφές των φαινολικών συστατικών και της λιγνίνης, με το πρόγραμμα TQ analyst ομαδοποίησε τα φάσματα των εκφύτων ως προς τη θέση, την προέλευση και την εποχή συλλογής τους. Μικροσκοπική παρατήρηση επάκριων εκφύτων που συλλέχθηκαν από κανονικές ή λογχοειδείς βλαστήσεις ενήλικων φυτών σε μηνιαία βάση κατά τη διάρκεια ενός έτους έδειξε πως υπήρχε αγγειακή σύνδεση των οφθαλμών με το βλαστό και πως τρίχες κάλυπταν τα λέπια και τα νεαρά φύλλα των οφθαλμών. Στα παρεγχυματικά κύτταρα παρατηρήθηκε συσσώρευση αμύλου από τον Ιούλιο μέχρι το Σεπτέμβριο και γέμισμα με ινώδεις κατασκευές από τον Οκτώβριο μέχρι τον Ιανουάριο, καθώς και κρύσταλλοι του οξαλικού ασβεστίου καθ' όλο το έτος. Έκφυτα κορυφής από ενήλικα φυτά του όρους Πάρνηθα ήταν πιο δύσκολο να εγκατασταθούν *in vitro* (14%) συγκριτικά με έκφυτα από μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια ή αναβλαστήσεις φυτών καμένων κατά την πυρκαγιά του 2007 στην Πάρνηθα (29-36%). Έκφυτα κόμβου από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα εγκαταστάθηκαν στο υψηλότερο ποσοστό (83%), δίνοντας τους περισσότερους βλαστούς ανά έκφυτο (5.2). Έκφυτα κόμβου από τη βάση αναβλαστήσεων παρήγαγαν βλαστούς σε υψηλότερο ποσοστό (60%) από ότι έκφυτα από

ανώτερες θέσεις (20-31%), αλλά οποιεσδήποτε διαφορές στους ρυθμούς πολλαπλασιασμού των εγκατεστημένων καλλιεργειών σταμάτησαν μετά την τρίτη υποκαλλιέργεια. Έκφυτα από μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια εγκαταστάθηκαν σε υψηλότερο ποσοστό όταν καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα με 1.0 mg l^{-1} TDZ (54%). Το TDZ και η BA έδωσαν περισσότερους βλαστούς ανά έκφυτο (3.3) από τις zeatin, kinetin και 2iP ή το μάρτυρα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, οι βλαστοί όμως στο υπόστρωμα με TDZ δεν επιμηκύνθηκαν. Μετά από υποκαλλιέργεια στο βασικό υπόστρωμα, τα έκφυτα από το TDZ ξεπέρασαν αυτά από τη BA και τα άλλα υποστρώματα στον αριθμό των βλαστών (4.0 βλαστοί/ έκφυτο) χωρίς να υπολείπονται στο μήκος των βλαστών. Γενικά, οι *in vitro* καλλιέργειες που εγκαταστάθηκαν από ενήλικα φυτά, εκτός μιας, επέδειξαν χαμηλότερους ρυθμούς πολλαπλασιασμού συγκρινόμενες με καλλιέργειες από αναβλαστήσεις ή μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια, ενώ τα έκφυτα από σπορόφυτα έπρεπε να μεταχειριστούν με 0.5 mg l^{-1} GA₃ για να αυξήσουν το δυναμικό πολλαπλασιασμού τους. Η κάλυψη των δοχείων καλλιέργειας με μεμβράνη sanitas περιόρισε το πρόβλημα της υπερενυδάτωσης των βλαστών που εμφανιζόταν με τη χρήση πλαστικού φιλμ ή πλαστικού καπακιού, ενώ ταυτόχρονα αύξησε το ρυθμό πολλαπλασιασμού των εκφύτων. Η BA αποδείχθηκε πιο αποτελεσματική για τον πολλαπλασιασμό των βλαστών σε σύγκριση με τις zeatin και 2iP, ενώ η kinetin θεωρήθηκε ακατάλληλη αφού οδήγησε στο σχηματισμό περιορισμένου αριθμού κοντών βλαστών ακατάλληλων για ριζοβολία. Η παρουσία IBA (0.1 mg l^{-1}) στο υπόστρωμα πολλαπλασιασμού των βλαστών αύξησε το δυναμικό πολλαπλασιασμού. Επίπεδα κυτοκινίνης μεταξύ 1.0 και 2.0 mg l^{-1} συντέλεσαν στην παραγωγή υψηλού αριθμού βλαστών χωρίς να περιορίζεται σημαντικά το μήκος τους. Η αντικατάσταση της BA του βασικού υποστρώματος από TDZ σε συγκεντρώσεις 0.1 - 2.0 mg l^{-1} έδωσε υψηλότερους ρυθμούς πολλαπλασιασμού των βλαστών, επέδρασε όμως αρνητικά στην επιμήκυνση των βλαστών. Η μεταφορά βλαστών και συσσωμάτων βλαστών από υπόστρωμα με TDZ στο βασικό υπόστρωμα με πλήρη ή μισή συγκέντρωση BA και IBA επέφερε την επιμήκυνσή τους. Η χρήση χαμηλής συγκέντρωσης TDZ (0.1 mg l^{-1}) προτείνεται σε εναλλασσόμενες με BA καλλιέργειες, δεδομένου ότι αυξάνει τη βλαστογένεση συγκριτικά με τη συνεχή χρήση του BA. Παρόλο που το WPM αύξησε τη βλαστογένεση, το MS προτιμήθηκε του WPM επειδή οι μικροβλαστοί που παράχθηκαν στο WPM εμφάνισαν συμπτώματα stress και ριζοβόλησαν σε χαμηλότερο ποσοστό από αυτούς που

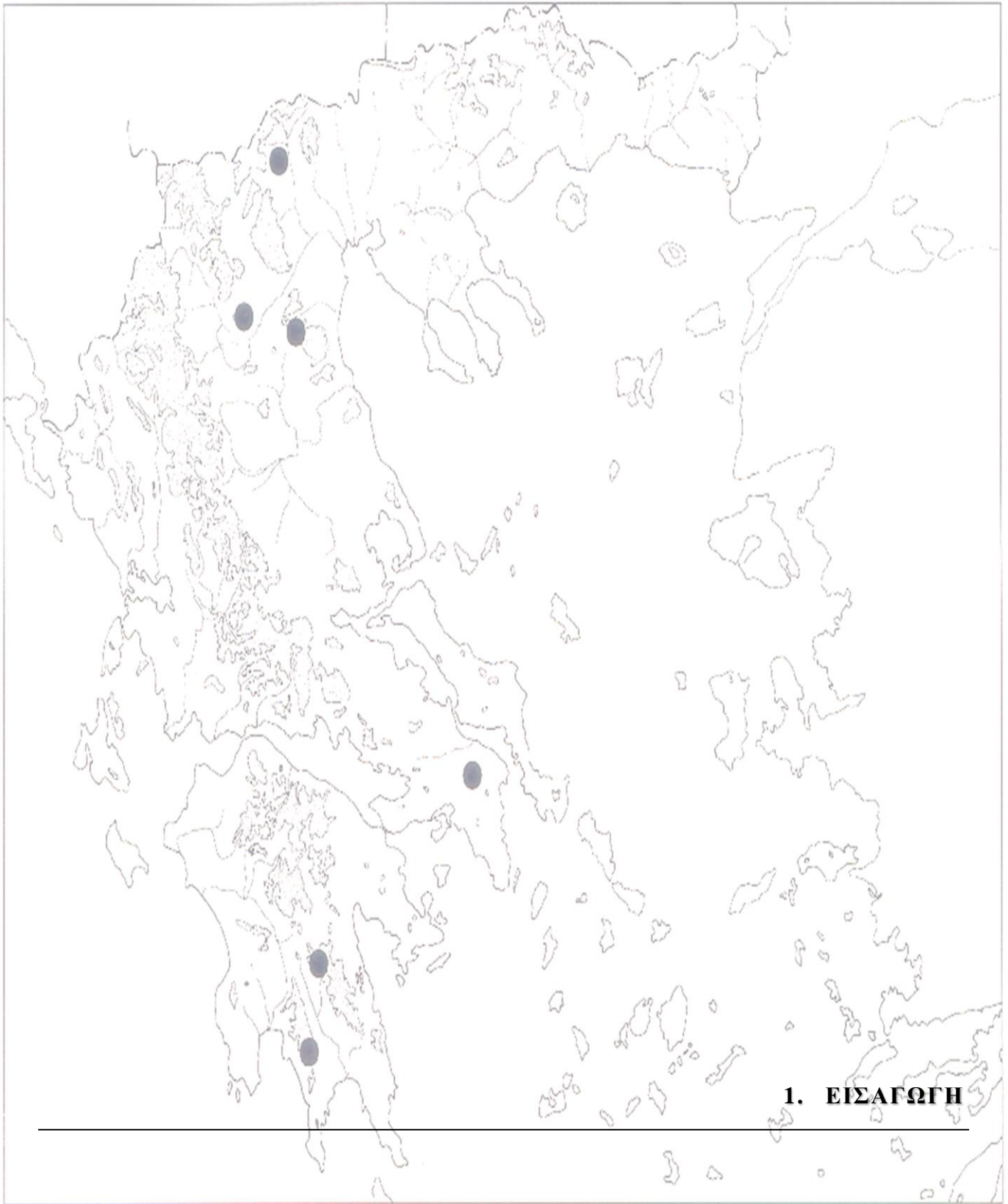
είχαν παραχθεί σε MS. Μικροβλαστοί που καλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS με αυξίνη για προτροπή ριζοβολίας για μία μόνο εβδομάδα ακολουθούμενη από καλλιέργεια σε υπόστρωμα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό και σχημάτισαν λιγότερο κάλο από αυτούς που καλλιεργήθηκαν συνεχώς στο υπόστρωμα με αυξίνη. Οι μικροβλαστοί που παράχθηκαν σε καλλιέργεια που προήλθε από ενήλικο φυτό ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό (32%) στο υπόστρωμα με συνδυασμό 0.5 mg l^{-1} IBA και 8.0 mg l^{-1} IAA, ενώ οι μικροβλαστοί που παράχθηκαν σε καλλιέργεια που προήλθε από αναβλαστήσεις ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό (65%) στο υπόστρωμα που περιείχε μόνο IAA (4.0 ή 8.0 mg l^{-1}). Η μέθοδος της σύντομης εμφάνισης της βάσης των μικροβλαστών σε υγρό διάλυμα 1000 mg l^{-1} IBA ήταν λιγότερο αποτελεσματική στην πρόκληση ριζοβολίας, ενώ αύξησε το σχηματισμό κάλου. Η εφαρμογή σκότους κατά την πρώτη εβδομάδα καλλιέργειας στο υπόστρωμα προτροπής ριζοβολίας δε συνιστάται επειδή οδήγησε στην παραγωγή υπερβολικής ποσότητας κάλου στη βάση των μικροβλαστών χωρίς να συνεισφέρει σημαντικά στη βελτίωση του ποσοστού ριζοβολίας. Προσθήκη ενεργού άνθρακα (2 g l^{-1}) στο υπόστρωμα προτροπής ριζοβολίας παρεμπόδισε πλήρως τη ριζοβολία των μικροβλαστών, ενώ όταν προστέθηκε στο υπόστρωμα ανάπτυξης των ριζών, κατά την πρώτη εβδομάδα μόνο, αύξησε το ποσοστό ριζοβολίας και μείωσε το σχηματισμό κάλου. Οι μικροβλαστοί που είχαν παραχθεί σε υπόστρωμα με χαμηλή συγκέντρωση κυτοκινίνης γενικά ριζοβόλησαν σε υψηλότερα ποσοστά από αυτούς που προέρχονταν από υψηλότερη συγκέντρωση κυτοκινίνης. Οι μικροβλαστοί από νεανικές καλλιέργειες ήταν πιο ικανοί για ριζοβολία (51-58%) σχηματίζοντας περισσότερες ρίζες από ότι αυτοί από καλλιέργειες ενήλικων φυτών (16-32%). Υψηλότερα ποσοστά εγκλιματισμού και ταχύτερος ρυθμός ανάπτυξης των φυταρίων επιτεύχθηκε από εύρωστα φυτάρια με πλούσιο ριζικό σύστημα, που μεταφέρθηκαν *ex vitro* σε υπόστρωμα τύρφης-περλίτη 1:1 (v/v), τέλος χειμώνα-αρχές άνοιξης. Το 83% των φυταρίων εγκλιματίστηκε *ex vitro* ανεξάρτητα από την προέλευσή τους, και τα φυτάρια νεανικής προέλευσης, παρόλο που ανέπτυξαν το ίδιο ύψος με αυτά που προέρχονταν από ενήλικα φυτά, είχαν κοντύτερα μεσογονάτια και συνεπώς πιο συνεκτική μορφή. Η προσθήκη ενεργού άνθρακα στο υπόστρωμα ανάπτυξης των ριζών *in vitro* ευνόησε τον ακόλουθο εγκλιματισμό, αυξάνοντας το ποσοστό επιβίωσης των φυταρίων (μέχρι 100%).

ABSTRACT

Aim of this study was to develop an effective *in vitro* protocol for the propagation of rare and endangered native plant of Greek flora x*Malosorbus florentina* in order to use it as an ornamental landscape plant as well as for its conservation. This species is, so its micropropagation will contribute to its conservation. Main problems that had to be addressed during *in vitro* culture were contamination and browning of explants during initial culture establishment and difficulty during *in vitro* rooting of microshoots. MS with 1.0 mg l⁻¹ BA and 0.1 mg l⁻¹ IBA was used as basal *in vitro* culture medium. Explants excised from adult plants, shoot tip explants and explants collected in March and April showed more browning and had higher content of total phenols than explants excised from juvenile tissue, nodal explants and those collected during any of the other months of the year. Explants content in lignin, which was estimated using FT-IR spectroscopy, was lower in apical than in lower explants, while differences as regards to origin or season of explants collection were not observed. Discriminant analysis of IR spectra in the region of 1450-1700 cm⁻¹, where peaks of phenolic compounds and lignin are found, with TQ analyst grouped spectra of explants as regards their location, their origin and the season of their collection. Microscopic observation of apical explants excised from normal shoots or spurs of adult plants, monthly during one year, showed that there was a vascular connection of buds with shoot and that hairs covered scales and young leaves of buds. In parenchymal cells, starch accumulation from July through September and fill with fibrous structures from October to January, as well as crystals of

calcium oxalate throughout the year were observed. Apical explants excised from adult plants growing wild on Mt. Parnitha were more difficult to establish *in vitro* (14%) compared to explants excised from micropropagated plantlets or sprouts of burned plants during fire of 2007 in Panitha (29-36%). Nodal explants excised from *in vitro* grown seedlings were established at the highest percentage (83%), giving the most shoots per explants (5.2). Nodal explants from the base of sprouts produced shoots at higher percentage (60%) than explants from upper locations (20-31%), but any differences in proliferation rates of established cultures ceased after the third subculture. Explants from micropropagated plantlets were established at higher percentage when they were cultured in medium with 1.0 mg l⁻¹ TDZ (54%). TDZ and BA gave more shoots per explants (3.3) than zeatin, kinetin and 2iP or the control without plant growth regulators, but shoots in medium with TDZ were not elongated. After subculture in basal medium, explants from TDZ surpassed those from BA and other media in shoot number (4.0 shoots/ explant) without falling short in shoot length. Generally, *in vitro* cultures established from adult plants, with the exception of one culture, showed lower multiplication rates compared to cultures from sprouts or micropropagated plantlets, while explants from seedlings had to be treated 0.5 mg l⁻¹ GA₃ in order to increase their proliferation potential. Cover of culture vessels with sanitas membrane limited the problem of shoots hyperhydricity that was appearing with the use of plastic film or plastic cap, while it simultaneously increased proliferation rate of explants. BA was proved more effective for shoot proliferation compared to zeatin and 2iP, while kinetin was considered inappropriate since it led to the formation of a limited number of short shoots unsuitable for rooting. Presence of IBA (0.1 mg l⁻¹) on the medium of shoot proliferation increased multiplication rate. Cytokinin levels between 1.0 and 2.0 mg l⁻¹ contributed to the production of high shoot number without significant restriction of their length. Replacement of BA of the basal medium from TDZ in concentrations 0.1-2.0 mg l⁻¹ gave higher shoot proliferation rates, having though a negative effect in shoots elongation. Transfer of shoots and shoot clusters from medium with TDZ to basal medium with full or half concentration of BA and IBA brought their elongation. Use of low concentration of TDZ (0.1 mg l⁻¹) in alternate cultures with BA is proposed, since it increases blastogenesis compared to continuous use of BA. Although WPM increased blastogenesis, MS was preferred to WPM because microshoots produced in WPM

showed symptoms of stress and rooted at lower percentage than those produced in MS. Microshoots cultured in solid $\frac{1}{2}$ MS medium with auxin for root induction for only one week followed by culture in medium without plant growth regulators rooted at higher percentage and formed less callus than those cultured continuously in medium with auxin. Microshoots produced in culture established from adult plant rooted at higher percentage (32%) in medium with combination of 0.5 mg l⁻¹ IBA and 8.0 mg l⁻¹ IAA, while microshoots produced in culture established from sprouts rooted at higher percentage (65%) in medium containing only IAA (4.0 or 8.0 mg l⁻¹). Method of brief dipping of microshoots base in liquid solution 1000 mg l⁻¹ IBA was less effective in root induction, while it increased callus formation. Application of darkness during the first week of culture in root induction medium is not recommended because it led to the production of excessive callus at the base of microshoots without contributing significantly to the improvement of rooting percentage. Addition of AC (2 g l⁻¹) on root induction medium completely inhibited microshoots rooting, while when it was added on the medium of root elongation, only during the first week, it increased rooting percentage and reduced callus formation. Microshoots produced in medium with low concentration of cytokinin generally rooted at higher percentages than those coming from higher cytokinin concentration. Microshoots excised from juvenile cultures were more capable to root (51-58%) forming more roots than those excised from cultures of adult plants (16-32%). Higher acclimatization percentages and faster growth rate of plantlets was succeeded by robust plantlets with rich root system, that were transferred *ex vitro* in mixture of peat-perlite 1:1 (v/v), end of winter-early spring. The 83% of plantlets was acclimatized *ex vitro* independently of their origin, and plantlets of juvenile origin, although developing the same height as those originating from adult plants, had shorter internodes and thus more compact shape. Addition of AC in the medium of root elongation *in vitro* favored following acclimatization, increasing percentage of plantlets survivor (up to 100%).



1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. Σκοπός

Το *Malosorbus florentina* (Zucc) Browicz (Εικ. 1) είναι ένα σπάνιο και απειλούμενο δασικό είδος, το οποίο θεωρείται φυσικό υβρίδιο μεταξύ των φυτών *Malus sylvestris* και *Sorbus torminalis*. Αυτοφύεται σε λίγες περιοχές στην Ελλάδα, σε δάση με *Abies* και *Pinus*, σε μικρούς πληθυσμούς, ενώ οι μεγαλύτεροι πληθυσμοί του βρίσκονται στον Εθνικό Δρυμό της Πάρνηθας και κοντά στις Καρυές της Λακωνίας (Christensen, 1995).

Το ελκυστικό φύλλωμα (φύλλα πλατιά ωοειδή, πριονωτά, με έντονους λοβούς, επάνω επιφάνεια σκουροπράσινη και γυαλιστερή, κάτω επιφάνεια γκριζοπράσινη και χνουδωτή, που γίνονται ορειχάλκινα το φθινόπωρο), η εντυπωσιακή άνθιση (άνθη με λευκά πέταλα, ανά 5-9 σε ταξιανθία χνουδωτή, κόρυμβο ή σκιάδιο, αργά την άνοιξη) και οι διακοσμητικοί καρποί (κόκκινοι ή κιτρινο-κόκκινοι, 8-14 mm σε διάμετρο, που ωριμάζουν νωρίς το φθινόπωρο) δίνουν στο *M. florentina* ιδιαίτερη καλλωπιστική αξία (Christensen, 1995) και το καθιστούν κατάλληλο για χρήση ως καλλωπιστικό φυτό κηποτεχνίας, αλλά και ως φυτό για αναδασώσεις.



ΕΙΚΟΝΑ 1. Ενήλικο φυτό του *Malosorbus florentina* Zucc. από τον πληθυσμό της Πάρνηθας, στην τοποθεσία Κορομηλιά τον Μάρτιο, Απρίλιο, Ιούνιο και Σεπτέμβριο 2009 (από αριστερά προς δεξιά).

Η ζήτηση για αυτοφυή είδη είναι αυξανόμενη και έχει οδηγήσει στην αξιοποίηση πολλών αυτοφυών ειδών ως καλλωπιστικά, καθώς πολλά από τα αυτοφυή, όχι μόνο δεν υστερούν σε ομορφιά από τα καλλιεργούμενα, αλλά έχουν και πολλά πλεονεκτήματα. Τα αυτοφυή φυτά είναι πολύ ανθεκτικά και μοναδικά προσαρμοσμένα στις τοπικές περιβαλλοντικές συνθήκες, με αποτέλεσμα να έχουν μειωμένες απαιτήσεις σε καλλιεργητικές

φροντίδες και φυτοπροστασία, ενώ σπάνια γίνονται επιθετικά. Επίσης, αποτελούν πηγή τροφής και καταφύγιο για πουλιά, πεταλούδες και άλλη επιθυμητή άγρια ζωή, ενώ μερικά έχουν εδώδιμη ή φαρμακευτική χρήση, είτε χρησιμοποιούνται για την παραγωγή διαφόρων χημικών προϊόντων. Έτσι, παρέχουν πολύτιμη πρακτική και οικολογική εναλλακτική λύση για προγράμματα αρχιτεκτονικής τοπίου, αλλά και για προγράμματα διάσωσης και διατήρησης (Δ1).

Στην Ελλάδα, είναι μεγάλο το ενδιαφέρον για την εξεύρεση αποτελεσματικών μεθόδων πολλαπλασιασμού αυτοφυών ειδών για τη διατήρησή τους και την αξιοποίησή τους ως καλλωπιστικά (Thanos and Doussi, 1995, Thanos *et al.*, 1995, Takos and Efthimiou, 2003, Maloupa *et al.*, 2005, 2008, Kartsonas and Papafotiou, 2007, 2009, Bertsouklis and Papafotiou, 2009, 2010, Papafotiou, 2010 κ.α.).

Για να αξιοποιηθεί το *xM. florentina* ως καλλωπιστικό φυτό θα πρέπει να αναπτυχθεί ένα αποτελεσματικό πρωτόκολλο πολλαπλασιασμού. Η καθιέρωση του εγγενούς τρόπου πολλαπλασιασμού του φυτού δεν κατέστη δυνατή, επειδή ήταν δύσκολο να βρεθούν σπέρματα στους πληθυσμούς του *xM. florentina* στην Πάρνηθα (προσωπικές παρατηρήσεις την περίοδο 2004-2011), καθώς είτε τα φυτά δεν παρήγαγαν καρπούς είτε οι παραγόμενοι καρποί δεν περιείχαν σπέρματα. Θεωρήθηκε σκόπιμο να πολλαπλασιαστεί με τη μέθοδο του *in vitro* πολλαπλασιασμού, δεδομένης της αυξανόμενης χρήσης του στη διάσωση απειλούμενων ειδών τα τελευταία χρόνια, καθώς παρέχει γρήγορο πολλαπλασιασμό μεγάλου αριθμού βλαστών από μικρές ποσότητες αρχικού υλικού (Fay, 1994; Sarasan *et al.*, 2006; Kartsonas and Papafotiou, 2007). Ιδιαίτερα μετά την καταστροφική πυρκαγιά του 2007 στην Πάρνηθα, που έκαψε σχεδόν όλα τα φυτά του *xM. florentina*, και την παρεμπόδιση της φυσικής αναγέννησης των καμένων φυτών από την επίμονη βόσκηση, πιθανότατα από τα ελάφια, ο *in vitro* πολλαπλασιασμός μπορεί να αποτελεί τη μόνη επιλογή για τον πολλαπλασιασμό αυτού του είδους.

Σκοπός της παρούσας διδακτορικής διατριβής ήταν η διερεύνηση του *in vitro* πολλαπλασιασμού του *xM. florentina* με απώτερο σκοπό τη δημιουργία ενός αποτελεσματικού πρωτοκόλλου πολλαπλασιασμού του είδους, το οποίο θα μπορούσε να επιτρέψει την αξιοποίησή του ως καλλωπιστικό φυτό ή φυτό αναδασώσεων, αλλά και να συμβάλλει στη διάσωση και διατήρησή του.

Εξετάστηκαν η επίδραση της προέλευσης του εκφύτου (ενήλικα φυτά, αναβλαστήσεις καμένων φυτών, μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια, σπορόφυτα), της θέσης του εκφύτου πάνω στους βλαστούς (επάκρια, κορυφαία, μεσαία, βασική), της εποχής (άνοιξη, καλοκαίρι, χειμώνας), των κυτοκινινών (BA, zeatin, kinetin, 2iP, TDZ), των αυξινών (IBA, NAA, IAA),

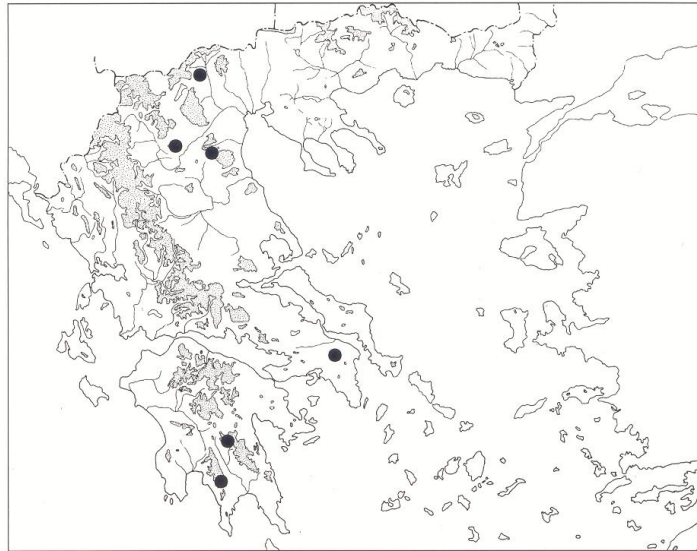
της γιββερελλίνης (GA₃), του θρεπτικού υποστρώματος (MS, WPM), του ενεργού άνθρακα (AC), του μεγέθους του δοχείου καλλιέργειας σε συνδυασμό με το υλικό κάλυψης και των συνθηκών καλλιέργειας (εφαρμογή σκότους κατά τη ριζοβολία *in vitro*, εποχή εγκλιματισμού φυταρίων *ex vitro*) σε κάποιες ή σε όλες τις φάσεις του *in vitro* πολλαπλασιασμού του *xMalosorbus florentina*. Επίσης, πραγματοποιήθηκε μικροσκοπική παρατήρηση των εκφύτων από ενήλικα φυτά σε μηνιαία βάση κατά τη διάρκεια ενός έτους, μελέτη του χημικού προφίλ και προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε λιγνίνη, καθώς και ο προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά εκφύτων από διάφορες θέσεις φυτών διαφορετικής φυσιολογικής κατάστασης σε διαφορετικές εποχές, με στόχο τη συσχέτιση των μετρήσεων αυτών με τη συμπεριφορά των εκφύτων στην *in vitro* καλλιέργεια.

1.2. Συστηματική κατάταξη και γεωγραφική κατανομή του είδους *xMalosorbus florentina*

Το *xMalosorbus florentina* (Zucc) Browicz ανήκει στην οικογένεια Rosaceae και αρχικά περιγράφηκε ως *Crataegus florentina* από τον ιταλό βοτανολόγο Zuccagni το 1809. Έχει μπερδεμένο ταξινομικό ιστορικό, μιας και έχει αναφερθεί ως *Pyrus*, *Mespilus*, *Torminaria* (*Torminalis*), *Sorbus*, *Cormus*, καθώς επίσης *Malus* και *Eriolobus*, και τελευταία ως το μονοτυπικό υβριδικό γένος *Malosorbus* (*Malus sylvestris* x *Sorbus torminalis*) (Browicz, 1970, 1983). Ο Σφήκας (1996) το ονομάζει «Φλωρεντινή αγριομηλιά» και ο Αραμπατζής (1998) «Μηλοσορβιά η πολυανθής».

Το *xMalosorbus* είναι ένα από τα έξι υβρίδια μεταξύ διαφορετικών γενών της οικογένειας Rosaceae υποοικογένεια Maloideae που έχουν το *Sorbus* σαν έναν από τους γονείς, και έχει ιδιαίτερο ενδιαφέρον για τους ερευνητές που μελετούν την πολύ περίπλοκη εξέλιξη των μηλοειδών (Christensen, 1995). Ο Samorodova-Bianki *et al.* (1990) διερεύνησαν 24 χαρακτηριστικά που σχετίζονταν με τη χημική σύσταση του καρπού (φλαβονοειδή, φαινολοκαρβονικά οξέα, φλαβάνες, φλαβόνες κ.α.) και ένα από τα συμπεράσματά τους ήταν ότι η θέση του *M. florentina* έξω από κάθε ομαδοποίηση αποτελεί ένδειξη για την υβριδική καταγωγή του μεταξύ των γενών *Malus* και *Sorbus*. Στο νέο σύστημα ταξινόμησης του γένους *Malus*, που προτείνεται από τον MingHao *et al.* (2000), το *M. florentina* αναγνωρίζεται ως ανεξάρτητο μέλος με μόνο ένα είδος και δε δείχνει κανένα σημάδι διαδοχής μεταξύ των ειδών. Οι Manganaris and Alston (1992), οι οποίοι μελέτησαν τη γενετική των ισοενζύμων εστεράσης από εκχυλίσματα φύλλου καλλιεργούμενων και άγριων ειδών *Malus* εξέφρασαν την άποψη ότι το *xM. florentina* είναι απίθανο να προέρχεται από το *M. sylvestris*, επειδή έχουν διαφορετικούς δεσμούς στα αλληλόμορφα του γονιδίου EST-1.

Το *Malosorbus* απαντάται σε ξηρά λιβάδια, βραχώδεις πλαγιές και σε δάση με *Abies* και *Pinus*, σε υψόμετρο μεταξύ 900 και 1400 m. Στην Ελλάδα απαντάται σε έξι διαφορετικές τοποθεσίες, στην Πάρνηθα, στη Λακωνία, στον Όλυμπο, στα Γρεβενά και στο Πάικο (Εικ. 2), όπου εμφανίζεται κυρίως ως μεμονωμένα δένδρα ή μικρές ομάδες δένδρων. Οι μεγαλύτεροι πληθυσμοί βρίσκονται στον Εθνικό Δρυμό της Πάρνηθας και κοντά στις Καρυές της Λακωνίας (Christensen, 1995).



ΕΙΚΟΝΑ 2. Γεωγραφική εξάπλωση του *Malosorbus florentina* στην Ελλάδα.

Το εύρος εξάπλωσής του επεκτείνεται ακόμη βορειότερα στη Βαλκανική Χερσόνησο, στην Ιταλία και στη Βόρεια Τουρκία. Είναι αρκετά κοινό είδος στην Ιταλία και στα Σκόπια, ενώ όσο περισσότερο νότια και ανατολικά πηγαίνει κανείς οι θέσεις του γίνονται όλο και περισσότερο αραιές και σπάνιες (Browicz, 1970, 1983).

Το *Malosorbus* στην Ελλάδα βρίσκεται σε κατάσταση “vulnerable”, δηλαδή είναι σπάνιο και ιδιαίτερα ευάλωτο και γι’ αυτό έχει συμπεριληφθεί στο «Red Data Book of rare and threatened plants of Greece» (Christensen, 1995). Για να χαρακτηριστεί ένα είδος “ευάλωτο” θα πρέπει να απαντάται σε μία περιοχή με πληθυσμό άνω των 100 ατόμων ή σε περισσότερες τοποθεσίες αλλά σε πολύ μικρούς, φθίνοντες πληθυσμούς και να υπάρχει κάποιος εμφανής κίνδυνος που μπορεί να οδηγήσει σε περαιτέρω μείωση του πληθυσμού του, όπως η υποβάθμιση του βιοτόπου του από υπερβόσκηση, η επέκταση των οικισμών και τουριστικών εγκαταστάσεων, η υπερβολική συλλογή, η διάνοιξη δρόμων κ.α. (Σφήκας, 2001).

Στη Σερβία το *M. florentina* είναι επίσης σε απειλούμενη κατάσταση (endangered έως vulnerable) και είναι γνωστή η ύπαρξή του σε εννέα τοποθεσίες. Στο βουνό Sokolovica (κεντρική Σερβία) υπάρχει ένας πολύ μικρός πληθυσμός του φυτού, που αποτελεί τη βορειότερη εξάπλωση του *Malosorbus* στη Βαλκανική Χερσόνησο (Tomovic *et al.*, 2003).

1.3. Βοτανική περιγραφή του είδους *Malosorbus florentina*

Το *Malosorbus florentina* (Zucc) Browicz (Εικ. 3) είναι ένας φυλλοβόλος θάμνος ή δένδρο με ύψος 4-6 m, αλλά μπορεί να φθάσει και τα 8-10 m. Έχει κλαδιά περισσότερο ή λιγότερο χνουδωτά χωρίς αγκάθια.



ΕΙΚΟΝΑ 3. Ενήλικα φυτά του *Malosorbus florentina* Zucc. από τον πληθυσμό της Πάρνηθας με πράσινο και ορειχάλκινο φύλλωμα το φθινόπωρο.

Τα φύλλα του (Εικ. 4) έχουν διαστάσεις 3-8 cm μήκος και 2-6 cm πλάτος, συνήθως 5 cm x 3.5 cm, είναι πλατιά ωοειδή έως ελλειπτικά και οξυκόρυφα με σχεδόν καρδιοειδή βάση. Επίσης, είναι πριονωτά με 4-6 ζεύγη έντονα οδοντωτών λοβών, που εκτείνονται μέχρι 0.3 φορές το πλάτος του ελάσματος μέχρι το κεντρικό νεύρο. Το μήκος του μίσχου μπορεί να φτάσει μέχρι και τα 2 cm. Η πάνω επιφάνεια των φύλλων είναι σκουροπράσινη και γυαλιστερή ή αραιά τριχωτή, ενώ η κάτω είναι γκριζοπράσινη και περισσότερο ή λιγότερο χνουδωτή (Christensen, 1995; Αραμπατζής, 1998). Το φθινόπωρο τα φύλλα λαμβάνουν χαρακτηριστικό ορειχάλκινο χρώμα (Εικ. 3, 4).



ΕΙΚΟΝΑ 4. Φύλλα του *Malosorbus florentina* πράσινα και ορειχάλκινα το φθινόπωρο.

Το *Malosorbus* ανθίζει από το Μάιο μέχρι νωρίς τον Ιούνιο. Τα άνθη του (Εικ. 5) έχουν διάμετρο 1.5-2 cm και εμφανίζονται ανά 5-9 σε ταξιανθία κόρυμβο ή σκιάδιο, που είναι χνουδωτή. Αποτελούνται από σέπαλα μήκους 3-4 mm, που δεν παραμένουν στον καρπό, πέταλα λευκά με μήκος μέχρι 9 mm, περίπου 30 στήμονες, ωθήκη υποφυή και 4-5 στύλους, συμφυείς στη βάση. Ο ποδίσκος των ανθέων έχει μήκος 2-4 cm (Christensen, 1995; Αραμπατζής, 1998). Τα άνθη του γονιμοποιούνται από έντομα και αναφέρεται ως καλός επικονιαστής για τις καλλιεργούμενες ποικιλίες μηλιάς (Δ4).



ΕΙΚΟΝΑ 5. Ανθη σε κορύμβους του *Malosorbus florentina* το Μάιο.

Οι καρποί του (Εικ. 6) είναι σφαιρικοί, ωοειδείς ή ελλειψοειδείς, κόκκινοι ή κίτρινοι με ερυθρές αποχρώσεις και έχουν διάμετρο 8-14 mm και ωριμάζουν Σεπτέμβριο με Οκτώβριο (Christensen, 1995; Αραμπατζής, 1998). Αποτελούν καλή πηγή τροφής για τα άγρια ζώα, ειδικά για τα πουλιά, καθώς επίσης χρησιμοποιούνται για την παρασκευή μαρμελάδας ή αλκοολούχων ποτών (Δ4).



ΕΙΚΟΝΑ 6. Νεαροί και ώριμοι καρποί του *Malosorbus florentina* τον Ιούνιο και Σεπτέμβριο, αντίστοιχα.

Εξετάζοντας την ανθεκτικότητα κάποιων άγριων ειδών και υβριδίων του *Malus* στο φουζικλάδιο (*Venturia inaequalis*) και στο ωίδιο (*Podosphaera leucotricha*), οι Vujanic-Varga and Ognjanon (1988) βρήκαν το *xM. florentina* να είναι ανθεκτικό στο ωίδιο, ενώ η Dziubiak (2004) παρατήρησε μικρή ή καθόλου ζημιά από το φουζικλάδιο και το ωίδιο. Το *Malosorbus* δοκιμάστηκε ως δότης της ανθεκτικότητας στο ωίδιο σε διασταύρωση με την ποικιλία μηλιάς 'Pinoval' και μόνο λίγα σπορόφυτα της F₁ γενιάς ήταν ευαίσθητα στο ωίδιο, αλλά η πλειοψηφία των σποροφύτων νεκρώθηκε στο στάδιο των 4-6 φύλλων σαν αποτέλεσμα της νέκρωσης των υβριδίων (Schuster *et al.*, 2000). Επίσης, το *xM. florentina* βρέθηκε να διαθέτει καλό επίπεδο ανθεκτικότητας στον καρκίνο *Valsa* (*Valsa ceratosperma*).

Στην Ιταλία το *xMalosorbus florentina* παρουσιάζει ιδιαίτερο φυτοτεχνολογικό ενδιαφέρον και καλλιεργείται για περισσότερο από 250 χρόνια (Christensen, 1995).

1.4. Πολλαπλασιασμός του *xMalosorbus florentina*

Υπάρχει μία βιβλιογραφική αναφορά σχετική με τον πολλαπλασιασμό του *xM. florentina*, στην οποία αναφέρεται εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας από σπόρο ύστερα από στρωμάτωση στους 4 °C για 4 μήνες. Παρήχθησαν μικροβλαστοί σε υπόστρωμα MS με BAP, IBA και GA₃, όλα σε συγκέντρωση 1 μM, αλλά η ριζοβολία σε υπόστρωμα ½MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες απέτυχε (Savic *et al.*, 2006).

Βρέθηκε επίσης αναφορά στο διαδίκτυο για πολλαπλασιασμό με σπόρο (Δ4). Ο φρέσκος σπόρος σπέρνεται αμέσως μετά την ωρίμανση το φθινόπωρο σε ψυχρό σπορείο και συνήθως φυτρώνει αργά το χειμώνα. Ο αποθηκευμένος σπόρος απαιτεί στρωμάτωση στους 1 °C για 3 μήνες πριν τη σπορά.

Υπάρχει και αναφορά για πολλαπλασιασμό με μοσχεύματα σκληρού ξύλου το Νοέμβριο σε θερμοκήπιο (Δ4).

1.5. Αξιοποίηση αυτοφυών ειδών ως καλλωπιστικά

Με τον όρο αυτοφυή φυτά εννοούμε τα φυτά που φυτρώνουν φυσικά σε μία περιοχή πριν οι άνθρωποι εισάγουν φυτά από μακρινές περιοχές. Τα φυτά εξελίσσονται στο γεωλογικό χρόνο σε απόκριση των φυσικών και βιοτικών εξελικτικών χαρακτηριστικών μιας περιοχής, όπως το κλίμα, το έδαφος, ο χρόνος βροχόπτωσης, ξηρασίας και ψύχους, καθώς και των αλληλεπιδράσεων με άλλα είδη που υπάρχουν στην τοπική φυτοκοινωνία. Έτσι, τα αυτοφυή φυτά διαθέτουν συγκεκριμένα χαρακτηριστικά που τα κάνουν μοναδικά προσαρμοσμένα στις τοπικές συνθήκες, παρέχοντας πολύτιμη πρακτική και οικολογική εναλλακτική λύση για προγράμματα αρχιτεκτονικής τοπίου, αλλά και για προγράμματα διάσωσης και διατήρησης.

Επιπλέον, τα αυτοφυή φυτά μπορούν να μοιάζουν με τα καλλιεργούμενα φυτά σε ομορφιά, ενώ συχνά ξεπερνούν τα μη-αυτοφυή σε ανθεκτικότητα και αντοχή στην ξηρασία, στα έντομα και στις ασθένειες (Δ1).

Η χρήση αυτοφυών φυτών ως καλλωπιστικά φυτά μπορεί να έχει τα ακόλουθα πλεονεκτήματα (Δ1):

- 1) Τα αυτοφυή είδη σπάνια γίνονται επιθετικά, όπως φυτά εισαγόμενα από άλλες περιοχές μπορεί να είναι. Η ισορροπία της φύσης διατηρεί κάθε είδος υπό έλεγχο, επιτρέποντάς του να ευδοκιμεί σε συνθήκες όπου ταιριάζει, αλλά αποτρέποντάς το να γίνει επιθετικό.
- 2) Τα αυτοφυή φυτά είναι καλά προσαρμοσμένα στις τοπικές περιβαλλοντικές συνθήκες. Πολλά βοηθούν να διατηρηθεί ή και να βελτιωθεί η γονιμότητα του εδάφους, μειώνουν τη διάβρωση, και συχνά απαιτούν λιγότερα λιπάσματα και φυτοφάρμακα από πολλά ξενικά φυτά.
- 3) Οι λειτουργικά υγιείς και εγκατεστημένες φυσικές φυτοκοινωνίες είναι περισσότερο ικανές να αντισταθούν στις εισβολές από ξενικά φυτικά είδη. Συνεπώς, η χρήση αυτοφυών ειδών μπορεί να βοηθήσει να αποτραπεί η εξάπλωση ξενικών ειδών που είδη βρίσκονται σε μια περιοχή και βοηθά να αποτραπούν μελλοντικές εισοδοι.
- 4) Τα αυτοφυή φυτά παρέχουν γνώριμες πηγές τροφής και καταφύγιο στα πουλιά, στις πεταλούδες και σε άλλη επιθυμητή άγρια ζωή. Καθώς τα φυσικά ενδιαίτηματα αντικαθίστανται από αστική και προαστιακή ανάπτυξη, η χρήση αυτοφυών φυτών στην αρχιτεκτονική τοπίου μπορεί να παρέχει βασικό καταφύγιο για την εκτοπισμένη άγρια ζωή. Όσο μεγαλύτερη ποικιλία αυτοφυών ειδών περιλαμβάνονται σε μια τοποθεσία, τόσο πιο πιθανό είναι ασυνήθιστα ή σπάνια είδη να προσελκυσθούν σε μια περιοχή.
- 5) Η φύτευση αυτοφυών ειδών συνεισφέρει στη συνολική υγεία των φυσικών φυτοκοινωνιών. Τα αυτοφυή φυτά, όντας εύρωστα και ανθεκτικά, μπορούν να επιβιώσουν στις εποχιακές αλλαγές των συνθηκών του περιβάλλοντος, δεν απαιτούν πότισμα ή λιπάσματα, έχουν μειωμένες απαιτήσεις σε φυτοφάρμακα και ζιζανιοκτόνα, και συχνά έχουν χαμηλότερο κόστος και λιγότερες απαιτήσεις συντήρησης, ακολουθώντας έτσι τη σύγχρονη τάση για “χαμηλής-συντήρησης” κηποτεχνία και αρχιτεκτονική.
- 6) Η αυτοφυής γλωρίδα προσφέρει μεγάλη ποικιλία σε ενδιαφέροντα άνθη, φυλλώματα, χρώματα, ύψη, σχήματα και υφές για τους κηπουρούς και τους αρχιτέκτονες τοπίου.
- 7) Τέλος, πολλά αυτοφυή είδη έχουν εδώδιμη ή φαρμακευτική χρήση, και άλλα χρησιμοποιούνται για την παραγωγή χημικών προϊόντων, όπως σχοινιά, υφάσματα, χρωστικές ουσίες, αιθέρια έλαια, αρώματα, εντομοκτόνα κ.α.

Η αυξανόμενη ζήτηση αυτοφυών ειδών, καθώς όλο και περισσότεροι ανακαλύπτουν τα πολλά πλεονεκτήματά τους, έχει οδηγήσει στην αξιοποίηση πολλών αυτοφυών ειδών ως καλλωπιστικά και στην επιχειρηματική καλλιέργειά τους. Κήποι με αυτοφυή φυτά μπορούν να σχεδιαστούν με τρόπους που οι άνθρωποι βρίσκουν ελκυστικούς. Σε αυτή την περίπτωση, η αρχιτεκτονική τοπίου προσεγγίζεται ως εγκατάσταση φυσικών τοπίων (Diekelmann and Schuster, 2002). Έχουν γραφτεί αρκετά βιβλία, που αφορούν στον τρόπο πολλαπλασιασμού και καλλιέργειας αυτοφυών ειδών, όπως του Ειρηνικού Ωκεανού (Rose *et al.*, 1998), της Νέας Ζηλανδίας (Metcalf, 2007) και της Αυστραλίας (Elliot *et al.*, 1980<1997>), αλλά και σε αυτοφυή είδη της Νέας Ζηλανδίας με οικονομικό ενδιαφέρον (Cooper and Cambie, 1991).

Σε μία έρευνα που εκπονήθηκε στο νοτιοανατολικό Μίσιγκαν, στην οποία παρουσιάστηκαν τέσσερα διαφορετικά σχέδια κήπου (τρία από τα οποία περιελάμβαναν αυτοφυή φυτά), με διαφορετικά μηνιαία κόστη διατήρησης για κάθε σχέδιο, οι άνθρωποι ήταν πρόθυμοι να πληρώσουν περισσότερα για έναν καλά-σχεδιασμένο κήπο που να περιλαμβάνει αυτοφυή φυτά από ότι για χλοοτάπητες. Αυτά θα έπρεπε να ενθαρρύνουν τους ιδιοκτήτες κατοικιών, τους αρχιτέκτονες τοπίου και τη βιομηχανία καλλωπιστικών φυτών να εργαστούν με αυτοφυή φυτά (Helfand *et al.*, 2006). Μια άλλη έρευνα στις νοτιοανατολικές ΗΠΑ έδειξε ότι οι αρχιτέκτονες τοπίου χρησιμοποιούν σημαντικό ποσοστό αυτοφυών φυτικών ειδών της περιοχής στα σχέδιά τους. Αντί να χρησιμοποιούν τα αυτοφυή φυτά αυστηρά ως μέτρα διάσωσης, οι αρχιτέκτονες τοπίου έχουν βρει τα τοπικά είδη να είναι καλύτερα προσαρμοσμένα στις δύσκολες και μοναδικές συνθήκες μιας περιοχής. Τα αποτελέσματα επίσης δείχνουν ότι υπάρχει πιθανότητα εξάπλωσης της παραγωγής και της εμπορίας φυτικών ειδών ενδημικών των νοτιοανατολικών ΗΠΑ (Brzuszek *et al.*, 2007).

Η αποκατάσταση της βλάστησης είναι ένα βασικό συστατικό της κατασκευής και βελτίωσης των πρανών των δρόμων (Tinsley *et al.*, 2006). Η Ομοσπονδιακή Διοίκηση Εθνικών Οδών (Federal Highway Administration, FHWA) των ΗΠΑ ενθαρρύνει τις κρατικές υπηρεσίες οδοποιίας να χρησιμοποιούν αυτοφυή φυτά για να δώσουν λύσεις σε προβλήματα στην άκρη των δρόμων, όπως να ελέγξουν τη διάβρωση, να αντικαταστήσουν λιγότερο ανθεκτικά φυτά, να επεκτείνουν το ενδιαίτημα της άγριας ζωής, να αυξήσουν τη βιοποικιλότητα, να επαναφέρουν τη φυσική κληρονομιά και να βελτιώσουν την εμπειρία των χρηστών των εθνικών οδών (Harper-Lore, 1996; Harper-Lore and Wilson, 2000). Στις νότιες ΗΠΑ, μη-αυτοφυή είδη συχνά περιλαμβάνονται σε μείγματα σπόρων που χρησιμοποιούνται από τις υπηρεσίες εθνικών οδών, τα οποία συχνά επιλέγονται για χαρακτηριστικά επιθετικής ανάπτυξης, τα ίδια όμως χαρακτηριστικά τα καθιστούν και πιθανά επιθετικά φυτά, και συνεπώς επικίνδυνα στις γειτονικές φυτοκοινωνίες. Τα χαρακτηριστικά εγκατάστασης τριών

μειγμάτων σπόρων (ένα που περιείχε μη-αυτοφυή είδη και δύο με μόνο αυτοφυή γρασίδια και ποώδη είδη) συγκρίθηκαν μετά από ανοιξιιάτικη και καλοκαιρινή σπορά στην άκρη δρόμων στο κεντρικό Τέξας. Εξήντα ημέρες μετά από τη σπορά, τα δύο μείγματα σπόρων με μόνο αυτοφυή είδη είχαν υψηλότερες πυκνότητες σπόρων από το συνιστώμενο μείγμα με αυτοφυή και μη-αυτοφυή, αποτελώντας άκρως αποτελεσματικά μείγματα για σχέδια αναβλάστησης, ενώ συγχρόνως μειώνουν τη πιθανότητα για αρνητικές οικολογικές επιπτώσεις και παρέχουν πρόσθετα οφέλη στις αυτοφυείς φυτοκοινωνίες (Tinsley *et al.*, 2006).

Σε μία έρευνα που χρησιμοποιήθηκε στην νοτιοανατολική Πενσυλβανία, η φυσική διαμόρφωση του τοπίου θετικά επηρέασε τη χωρητική ικανότητα σε πτηνά και λεπιδόπτερα των προαστίων και παρείχε ένα μηχανισμό μείωσης των απωλειών βιοποικιλότητας στα ανθρωπο-κυριαρχούμενα τοπία. Τα αυτοφυή τοπία συντηρούσαν σημαντικά περισσότερες κάμπιες και είδη καμπιών, και σημαντικά μεγαλύτερη αφθονία πουλιών, ποικιλομορφία, πληθώρα ειδών, βιομάζας και ζευγών αναπαραγωγής των τοπικών ειδών. Ιδιαίτερα τα είδη πουλιών τοπικού ενδιαφέροντος διάσωσης ήταν 8 φορές περισσότερο άφθονα και σημαντικά πιο ποικίλα στα αυτοφυή τοπία (Burghardt *et al.*, 2008).

Στην Ελλάδα, επίσης, είναι μεγάλο το ενδιαφέρον για την εξεύρεση αποτελεσματικών μεθόδων πολλαπλασιασμού και διατήρησης αυτοφυών ειδών. Στο Εργαστήριο Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, την τελευταία δεκαετία, έχει μελετηθεί ο μικροπολλαπλασιασμός ενός αριθμού αυτοφυών ξυλωδών ειδών, ως ένα πρώτο βήμα για την εισαγωγή τους σε εμπορική χρήση ως καλλωπιστικά. Τα είδη αυτά είναι το *Arbutus andrachne*, το *Arbutus unedo*, το *Dianthus fruticosus*, η *Euphorbia characias*, η *Globularia alypum*, η *Lithodora zahnii*, το *Malosorbus florentina*, το *Quercus euboica*, το *Sideritis athoa* και η *Thymelea hirsute* (Papafotiou, 2010). Το *Arbutus andrachne*, το οποίο θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί ως καλλωπιστικό σε αστικά και προαστιακά τοπία, αλλά και ως φυτό αναδάσωσης στα Μεσογειακά κλίματα, χάρη στην ικανότητά του να αναβλαστάνει μετά τη φωτιά, έχει πολλαπλασιαστεί *in vitro* (Bertsouklis and Papafotiou, 2009), ενώ έχει μελετηθεί και η επίδραση της αποθήκευσης στο φύτρωμα των σπόρων (Bertsouklis and Papafotiou, 2010). Το φύτρωμα των σπόρων και ο *in vitro* πολλαπλασιασμός του *Sideritis athoa* (Papafotiou and Kalantzis, 2009a), που είναι ένα αλπικό, αρωματικό πολυετές βότανο, και ο *in vitro* πολλαπλασιασμός της *Lithodora zahnii* (Papafotiou and Kalantzis, 2009b), που είναι απειλούμενο ενδημικό είδος, το οποίο βρίσκεται μόνο σε ορισμένα βραχώδη μέρη της νότιας Πελοποννήσου, μελετήθηκαν για να εισάγουν τα είδη αυτά ως εδαφοκαλυπτικά φυτά, φυτά για βραχόκηπους, για ταρατσόκηπους, για την αποκατάσταση υποβαθμισμένων τοπίων και τη σταθεροποίηση πρανών. Ο *in vitro*

πολλαπλασιασμός του *Quercus euboica*, που είναι ένα σπάνιο και απειλούμενο ενδημικό της Εύβοιας, έχει επίσης μελετηθεί για την αξιοποίησή του ως καλλωπιστικό σε αστικά και προαστιακά τοπία, αλλά και ως φυτό αναδάσωσης στα Μεσογειακά κλίματα, χάρη στην αντοχή του στη ξηρασία και στην ικανότητά του να αναβλαστάνει μετά τη φωτιά και τη βόσκηση (Kartsonas and Papafotiou, 2007, 2009).

Το Εργαστήριο Ανθοκομίας του Εθνικού Ιδρύματος Γεωργικών Ερευνών δραστηριοποιείται στη συλλογή, διατήρηση και μελέτη αυτοφυών Μεσογειακών και Βαλκανικών ειδών, τα οποία υλοποιούνται μέσω του Βαλκανικού Βοτανικού κήπου των Κρουσσιών, που βρίσκεται στην Κεντρική Μακεδονία. Επίσης, γίνεται πειραματισμός και μελέτες αγρού σχετικά με την καταλληλότητα ορισμένων ειδών για καλλωπιστικές χρήσεις, ως φυτά ταρατσόκηπων και για ξηροφυτική διαμόρφωση τοπίου, σύμφωνα με τα χαρακτηριστικά τους και την προσαρμοστικότητά τους σε ακραίες περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως η υδατική καταπόνηση (Maloupa *et al.*, 2005). Έξι αρωματικά είδη της οικογένειας Labiatae, το *Thymus plasonii*, το *Th. longicaulis* subsp. *chaubardii*, το *Th. degenii*, το *Teucrium divaricatum*, το *T. polium* και το *T. chamaedrys*, τα οποία παρουσιάζουν εντυπωσιακό αποτέλεσμα στην αρχιτεκτονική τοπίου χάρη στην άνθηση ή/ και στο φύλλωμα, πολλαπλασιάστηκαν επιτυχώς με μοσχεύματα μαλακού ξύλου, επέδειξαν αντοχή σε χαμηλά επίπεδα νερού και προτείνονται ως κατάλληλα για ξηροφυτική διαμόρφωση τοπίου, που είναι φιλική προς το περιβάλλον (Maloupa *et al.*, 2008). Για τη διάσωση σημαντικών φυτών από τα Ιόνια Νησιά χρησιμοποιήθηκε Γεωγραφικό Πληροφορικό Σύστημα (GIS) για να συνδέσει τα *in situ* δεδομένα συλλογής με τον πολλαπλασιασμό των φυτών και την *ex vitro* καλλιέργεια. Οι πληροφορίες συνδέθηκαν με διάφορα ψηφιακά GIS θεματικά στρώματα, συμπεριλαμβανομένου τοπογραφικών, γεωλογικών, εδαφικών, κλιματικών, βροχομετρικών και θερμοκρασιακών δεδομένων προερχόμενων από ψηφιακές βάσεις δεδομένων. Βασιζόμενοι σε αυτή τη προσέγγιση, αναπτύχθηκαν γρήγορα και αποτελεσματικά πρωτόκολλα αναφοράς εγγενούς και αγενούς πολλαπλασιασμού για τα ακόλουθα 29 είδη από τα Ιόνια Νησιά, *Aurinia saxatilis*, *Ajuga orientalis* ssp. *aenesia*, *Brassica cretica* ssp. *aegaea*, *Campanula garganica* ssp. *cephalenica*, *Centaurea alba* ssp. *deusta*, *Cerastium candissimum*, *Cymbalaria microcalyx* ssp. *minor*, *Dianthus fruticossus* ssp. *occidentalis*, *Dianthus sylvestris* ssp. *sylvestris*, *Galium peloponnesiacum*, *Galium circae*, *Limonium ithacense*, *Mentha pulugium* ssp. *cephalonica*, *Ornithogalum prasinantherum*, *Paeonia mascula* ssp. *russi*, *Poa cephalonica*, *Satureja cuneifolia*, *Scabiosa crenata* ssp. *dallaportae*, *Scutellaria rupestris* ssp. *cephalonica*, *Silene niceensis*, *Scrophularia heterophylla* ssp. *heterophylla*, *Silene cephalenia* ssp. *cephallenia*, *Stachys arvensis*, *Stachys ionica*, *Stachys parolinii*, *Teucrium halacsyanum*,

Thymus holosericeus, *Veronica chamaedrys* ssp. *chamaedrys*, *Vicia villosa* ssp. *microphylla*, *Viola cephalonica* (Krigas *et al.*, 2010). Ο *in vitro* πολλαπλασιασμός της *Achillea occulta* έχει επίσης διευκολυνθεί με τη χρήση GIS, το οποίο παρέχει χρήσιμες οδηγίες για αποτελεσματικό πολλαπλασιασμό (επιλογή θερμοκρασιών θερμοκηπίου, θερμοκρασιών κατά τη διάρκεια της *in vitro* καλλιέργειας, κατάλληλης περιόδου για μοσχεύματα και για εγκλιματισμός των φυταρίων) και *ex vitro* καλλιέργεια (επιλογή καθεστώτος ποτίσματος, θερμοκρασιών, τοποθεσιών και εκθέσεων για θέσεις ανάπτυξης) (Grigoriadou *et al.*, 2011).

Έχει αναφερθεί πολλαπλασιασμός της *Sternbergia sicula* με σπόρο και ιστοκαλλιέργεια (Antonidaki-Giatromanolaki *et al.*, 2008), και βλαστητικός πολλαπλασιασμός *in vivo* και *in vitro* της *Stachelina petiolata* (Antonidaki-Giatromanolaki *et al.*, 2006). Έχει επίσης μελετηθεί η οικοφυσιολογία του φυτρώματος των σπόρων σε τέσσερα αρωματικά φυτά της οικογένειας Labiatae, ενδημικών της Κρήτης, του *Origanum dictamnus*, του *Sideritis syriaca* ssp. *syriaca*, της *Salvia pomifera* ssp. *pomifera* και της *Salvia fruticosa* (Thanos and Doussi, 1995), αλλά και στα ευρέως διαδομένα ενδημικά της Μεσογείου, αρωματικά φυτά *Coridothymus capitatus*, *Satureja thymbra* και *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Thanos *et al.*, 1995).

Από το Τμήμα Δασοπονίας του ΤΕΙ Καβάλας, μελετήθηκε το φύτευμα κοιμώμενων σπόρων 15 γηγενών δασικών ειδών, που σπάρθηκαν στο δασικό φυτώριο του Λαγκαδά, χωρίς καμία μεταχείριση. Συγχρόνως, εκτελέστηκε εργαστηριακό φύτευμα και τεστ ζωτικότητας των σπόρων. Τα είδη αυτά είναι τα εξής: *Carpinus betulus*, *Celtis australis*, *Cercis siliquastrum*, *Cornus sanguinea*, *Cotinus coggygria*, *Euonymus europaeus*, *Fraxinus ornus*, *Laurus nobilis*, *Malus sylvestris*, *Sorbus torminalis*, *Phillyrea latifolia*, *Paliurus aculeatus*, *Pistacia terebinthus*, *Prunus spinosa*. Το φύτευμα για όλα τα είδη ολοκληρώθηκε αργά τον Απρίλιο και νωρίς την Άνοιξη, εκτός από τους σπόρους των *Rhus coronaria* και *Phillyrea latifolia*, που δε βλάστησαν καθόλου (Takos and Efthimiou, 2003).

1.6. Ο μικροπολλαπλασιασμός ως μέσο διάσωσης απειλούμενων ειδών

Η καλύτερη μέθοδος για εξασφάλιση της επιβίωσης των απειλούμενων φυτών είναι η διάσωση στο φυσικό τους περιβάλλον μέσω της διαχείρισης των άγριων πληθυσμών, αλλά η δημιουργία επαρκών προστατευόμενων περιοχών (εθνικών πάρκων και καταφυγίων) και η διατήρησή τους δεν είναι σε καμία περίπτωση μια εύκολη δουλειά στις περισσότερες Μεσογειακές χώρες όπου οι κίνδυνοι που απειλούν τα φυτά δε μπορούν να αποφευχθούν εντελώς (Broussalis, 1977). Αυτό αποδείχτηκε στην περίπτωση του *Malosorbus florentina* του οποίου οι πληθυσμοί κάηκαν και στη συνέχεια σοβαρά βοσκήθηκαν μέσα στον Εθνικό

Δρυμό της Πάρνηθας. Υπό αυτές τις συνθήκες, ο *in vitro* πολλαπλασιασμός μπορεί να είναι η μόνη επιλογή για τη διάσωση του είδους.

Πολλά σπάνια και απειλούμενα είδη από όλο τον κόσμο έχουν πολλαπλασιαστεί με τη χρήση *in vitro* μεθόδων. Ενδεικτικά αναφέρονται κάποιες περιπτώσεις μικροπολλαπλασιασμού φυτών από διάφορες οικογένειες, καθώς και ο τύπος των αρχικών εκφύτων που χρησιμοποιήθηκαν για την έναρξη της καλλιέργειας.

Ο μικροπολλαπλασιασμός έντεκα σπάνιων ή απειλούμενων ειδών κάκτου (Cactaceae) από το Μεξικό επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας έκφυτα κορυφής βλαστών που ελήφθησαν από σπορόφυτα των *Escobaria missouriensis*, *E. robbinsorum*, *Sclerocactus spinosior* και *Toumeyia paryracantha*, και από ενήλικα φυτά των *Mammillaria wrightii*, *Pediocactus bradyi*, *P. despainii*, *P. knowltonii*, *P. paradinei*, *P. winkleri* και *S. mesae-verdae* (Clayton *et al.*, 1990).

Η *Grevillea scapigera* (Proteaceae), ένα σπάνιο και απειλούμενο είδος της δυτικής Αυστραλίας, έχει πολλαπλασιαστεί *in vitro* με τη χρήση κορυφών βλαστού και πλάγιων κόμβων αλλά και με την ανάπτυξη τυχαίων βλαστών από τεμάχια *in vitro* φύλλων (Bunn and Dixon, 1992).

Αναγέννηση φυταρίων της απειλούμενης Red Vanda, *Renanthera imschootiana* (Orchidaceae) έχει επιτευχθεί από τμήματα βάσης φύλλων ανθισμένων φυτών (Seeni and Latha, 1992).

Έκφυτα από ώριμα ζυγωτικά έμβρυα που εξαιρέθηκαν από σπόρους του απειλούμενου Βραζιλιάνικου ξυλώδους δασικού δένδρου *Ocotea catharinensis* (Lauraceae) χρησιμοποιήθηκαν για την αναγέννηση φυταρίων μέσω ενός συστήματος σωματικής εμβρυογένεσης (Moura-Costa *et al.*, 1993).

Το *Gentiana kurroo* (Gentianaceae) είναι ένα απειλούμενο θαμνώδες ενδημικό φυτό της Ινδίας με φαρμακευτική χρήση, που έχει επίσης πολλαπλασιαστεί *in vitro* (Sharma *et al.*, 1993).

Οι ορχιδέες και οι κάκτοι έχουν πολλά είδη ευάλωτα στην εξαφάνιση εξαιτίας της υπερσυλλογής τους και της απώλειας του ενδιαιτήματός τους. Αποτελεσματικές τεχνικές πολλαπλασιασμού χρειάζονται επείγοντως για να βοηθήσουν στο σταμάτημα της εξαφάνισης αυτών των απειλούμενων ειδών. Ένα σχεδόν-εξαφανισμένο είδος κάκτου, το *Mammillaria san-angelensis* (Cactaceae), με μόνο πέντε άτομα εναπομείναντα στον κόσμο, καλλιεργήθηκε *in vitro* και επιτυχώς επαναφέρθηκε στο φυσικό του περιβάλλον, όπου άνθησε και παράγαγε γόνιμους σπόρους. Ακόμη δύο κάκτοι και εννέα ορχιδέες καλλιεργήθηκαν *in vitro* και μετά

από εγκλιματισμό επέστρεψαν στο φυσικό τους περιβάλλον όπου συνέχισαν τον κύκλο της ζωής τους (Rubluo *et al.*, 1993).

Κατά την αναζήτηση αποτελεσματικής μεθόδου *in vitro* πολλαπλασιασμού των σπάνιων και απειλούμενων βολβωδών ειδών *Leucojum aestivum* L. (Amaryllidaceae) και *Lilium rhodopaeum* Delip. (Liliaceae), εξετάστηκε το μορφογενετικό δυναμικό διαφόρων φυτικών οργάνων (βολβών, στελεχών, φύλλων, ωοθηκών). Υψηλότερη δραστηριότητα αναγέννησης επέδειξαν τα φύλλα του *Leucojum aestivum* και τα βασικά τμήματα του βολβού στο *Lilium rhodopaeum* (Stanilova *et al.*, 1994).

Η *Sterculia urens* (Sterculiaceae), ένα υπό εξαφάνιση ενδημικό δένδρο της Ινδίας, έχει πολλαπλασιαστεί από έκφυτα κοτυληδόνων από σπορόφυτα 20 ημερών που είχαν φυτρώσει *in vitro* (Purohit and Ashish, 1996).

Το *Citrus halimii* (Rutaceae), ένα απειλούμενο είδος της νοτιοανατολικής Ασίας, έχει πολλαπλασιαστεί από έκφυτα υποκοτυλίου και από έκφυτα κόμβου (Normah *et al.*, 1997).

Η *Minuartia valentina* (Caryophyllaceae), ένα υπό εξαφάνιση ενδημικό της Ισπανίας, έχει πολλαπλασιαστεί από έκφυτα κόμβων ενήλικων φυτών (Ibañez and Amo-Marco, 1998).

Ως έκφυτα για την εγκατάσταση *in vitro* καλλιεργειών δύο απειλούμενων ενδημικών της κοινότητας Valencia της ανατολικής Ισπανίας, του *Limonium cavanillesii* (Plumbaginaceae) και της *Centaurea prauii* (Compositae), χρησιμοποιήθηκαν τεμάχια από τη βάση ανώριμων ανθικών στελεχών (Amo-Marco and Ibañez, 1998) και (Cuenca *et al.*, 1998), αντίστοιχα.

Το *Syzygium travancoricum* (Myrtaceae), ένα σπάνιο και απειλούμενο είδος της Ινδίας, έχει πολλαπλασιαστεί από έκφυτα ενήλικων φυτών και σποροφύτων ηλικίας 1-2 ετών (Anand *et al.*, 1999).

Σπάνια και απειλούμενα CAM φυτά, όπως οι κάκτοι, συνήθως παρουσιάζουν μειωμένες ικανότητες αναπαραγωγής και πολύ αργούς ρυθμούς ανάπτυξης, τα οποία θα μπορούσαν να αντιμετωπιστούν με τη χρήση *in vitro* καλλιέργειας. Οι απειλούμενοι κάκτοι *Obregonia denegrii* και *Coryphantha minima* (Cactaceae) από το Μεξικό πολλαπλασιάστηκαν από σπορόφυτα ηλικίας 2 μηνών που φύτεψαν *in vitro*, ενώ το *in vitro* περιβάλλον επιτάχυνε σημαντικά την ανάπτυξη των κάκτων (Malda *et al.*, 1999).

Η *Primula scotica* (Primulaceae), ένα σπάνιο ενδημικό της βόρειας Σκωτίας, έχει πολλαπλασιαστεί χρησιμοποιώντας έκφυτα από σπορόφυτα που φύτεψαν *in vitro* (Benson *et al.*, 2000).

Το *Pittosporum napaulensis* (Pittosporaceae), ένα σπάνιο, ενδημικό, φαρμακευτικό δένδρο των Ιμαλάϊων, έχει πολλαπλασιαστεί με τη χρήση εκφύτων κόμβου από ενήλικα δένδρα (Dhar *et al.*, 2000).

Πρωτόκολλο μικροπολλαπλασιασμού αναπτύχθηκε για τη διάσωση του κρίσιμα απειλούμενου θάμνου της Δυτικής Αυστραλίας *Symonanthus bancroftii* (Solanaceae), ενώ ήταν απαραίτητη η μεταχείριση με αντιοξειδωτικά για να αποφευχθεί το καφέτιασμα των εκφύτων (Panaia *et al.*, 2000).

Η *Sophora toromiro* (Leguminosae), είναι ένα απειλούμενο ενδημικό των νησιών του Πάσχα, το οποίο έχει πολλαπλασιαστεί από έκφυτα κόμβου σποροφύτων ηλικίας 3-4 μηνών που φύτρωσαν *in vitro* (Iturriaga *et al.*, 1994).

Η *Aloe polyphylla* (Xanthorrhoeaceae) έχει πολλαπλασιαστεί χρησιμοποιώντας έκφυτα από σπορόφυτα (Abrie and Staden, 2001).

Η *Stackhousia tryonii* (Celastraceae), ένα σπάνιο ενδημικό των εδαφών με σερπεντίνη της Αυστραλίας, έχει πολλαπλασιαστεί με μεριστώματα κορυφής και έκφυτα κόμβων (Bhatia *et al.*, 2002).

Το *Holostemma ada-kodien* (Asclepiadaceae), ένα σπάνιο φαρμακευτικό φυτό της Ινδίας, πολλαπλασιάστηκε χρησιμοποιώντας έκφυτα κόμβου από ενήλικα φυτά αλλά και μέσω έμμεσης οργανογένεσης από τον κάλο που αναπτύχθηκε από την τομή της βάσης των κομβικών εκφύτων (Martin, 2002).

Αναγέννηση φυτών του *Maclura tinctoria* (Moraceae), ενός απειλούμενου ξυλώδους είδους που βρίσκεται σε περιοχές από το Μεξικό μέχρι τη νότια Βραζιλία, έχει επιτευχθεί από οργανογενετικό εύθρυπτο κάλο που σχηματίστηκε από κομβικά τμήματα (Gomes *et al.*, 2003).

Το *Kniphofia leucocephala* (Xanthorrhoeaceae), το οποίο σώζεται σε μία μόνο τοποθεσία της Ν. Αφρικής, έχει πολλαπλασιαστεί *in vitro* με στόχο την επανεισαγωγή των φυτών στη φύση (McCartan and Van Staden, 2003).

Η *Daphne cneorum* (Thymelaeaceae), ένα θαμνώδες φυτό της Τσεχίας με δραματική μείωση πληθυσμού, έχει πολλαπλασιαστεί με τη χρήση έκφυτων βλαστού με έναν επάκριο οφθαλμό και εκφύτων από σπορόφυτα που φύτρωσαν *in vitro* (Malá and Bylinsky, 2004).

Το *Rhododendron ponticum* L. subsp. baeticum (Ericaceae), ένα απειλούμενο είδος της Ισπανίας και Πορτογαλίας, έχει πολλαπλασιαστεί από έκφυτα κόμβων από ενήλικα φυτά (Almeida *et al.*, 2005).

Ο *Eucalyptus impensa* (Myrtaceae), φυτό της νοτιοδυτικής Αυστραλίας που απειλείται άμεσα με εξαφάνιση, έχει πολλαπλασιαστεί από έκφυτα κόμβων βλαστού (Bunn, 2005).

Το *Drosophyllum lusitanicum* (Drosophyllaceae), ενδημικό του Β. Μαρόκου και της Ιβηρικής Χερσονήσου, έχει πολλαπλασιαστεί από έκφυτα σποροφύτων που βλάστησαν *in vitro* (Gonçales and Romano, 2005).

Το *Lychnis senno* (Caryophyllaceae), είναι ένα σπάνιο φυτό της Κίνας με καλλωπιστική αξία που παρουσιάζει χαμηλά ποσοστά φυτρωτικότητας των σπόρων, για το οποίο αναπτύχθηκε πρωτόκολλο *in vitro* φυτρώματος των σπόρων με εφαρμογή GA₃ σε συνδυασμό με στρωμάτωση και πολλαπλασιάστηκε από κορυφές βλαστών *in vitro* σποροφύτων (Chen *et al.*, 2006).

Η *Centaurea tchihatcheffii* (Asteraceae), ένα κρίσιμα απειλούμενο ενδημικό της Τουρκίας, της οποίας οι σπόροι παρουσίασαν ισχυρό λήθαργο και φύτεψαν δύσκολα, πολλαπλασιάστηκε *in vitro* από ανώριμα ζυγωτικά έμβρυα (Ozel *et al.*, 2006).

Το *Santalum album* (Santalaceae), σπάνιο ενδημικό δένδρο της Ινδίας, έχει πολλαπλασιαστεί χρησιμοποιώντας έκφυτα από ενήλικα φυτά (Muthan *et al.*, 2006).

Το *Quercus euboica* (Fagaceae), ένα ενδημικό, σπάνιο και απειλούμενο είδος βελανιδιάς της Ελλάδας, έχει πολλαπλασιαστεί με τη χρήση εκφύτων κόμβου από σπορόφυτα και ενήλικα φυτά (Kartsonas and Papafotiou, 2007).

Το *Swertia chirata* (Gentianaceae), ένα κρίσιμα απειλούμενο φαρμακευτικό βότανο των Ιμαλαίων, πολλαπλασιάστηκε από έκφυτα κορυφής βλαστού που ελήφθησαν από *in vitro* αναπτυσσόμενα σπορόφυτα (Balaraju *et al.*, 2009).

Το απειλούμενο είδος *Tuberaria major* (Cistaceae) από την Πορτογαλία πολλαπλασιάστηκε χρησιμοποιώντας σπορόφυτα ως έκφυτα (Conçalves *et al.*, 2010).

Σε τεμάχια ρίζας, υποκοτυλίου και κοτυληδόνας του απειλούμενου φαρμακευτικού φυτού του Ιράν *Dorema ammoniacum* (Ariaceae) προωθήθηκε ο σχηματισμός κάλου και η αναγέννηση από αυτό φυταρίων. Ο κάλος από τα τεμάχια υποκοτυλίου έδειξαν σημαντικά υψηλότερη συχνότητα αναγέννησης φυταρίων και αριθμό φυταρίων από το κάλο που προερχόταν από τεμάχια ρίζας ή κοτυληδόνας (Irvani *et al.*, 2010).

Το *Cotoneaster wilsonii* (Rosaceae), ένα σπάνιο ενδημικό του νησιού Ulleung-Do της Ανατολικής Θάλασσας της Κορέας, πολλαπλασιάστηκε χρησιμοποιώντας έκφυτα κορυφής και κόμβων από ενήλικα φυτά, με τα δεύτερα να είναι πιο αποτελεσματικά στον πολλαπλασιασμό των βλαστών (Sivanesan *et al.*, 2011).

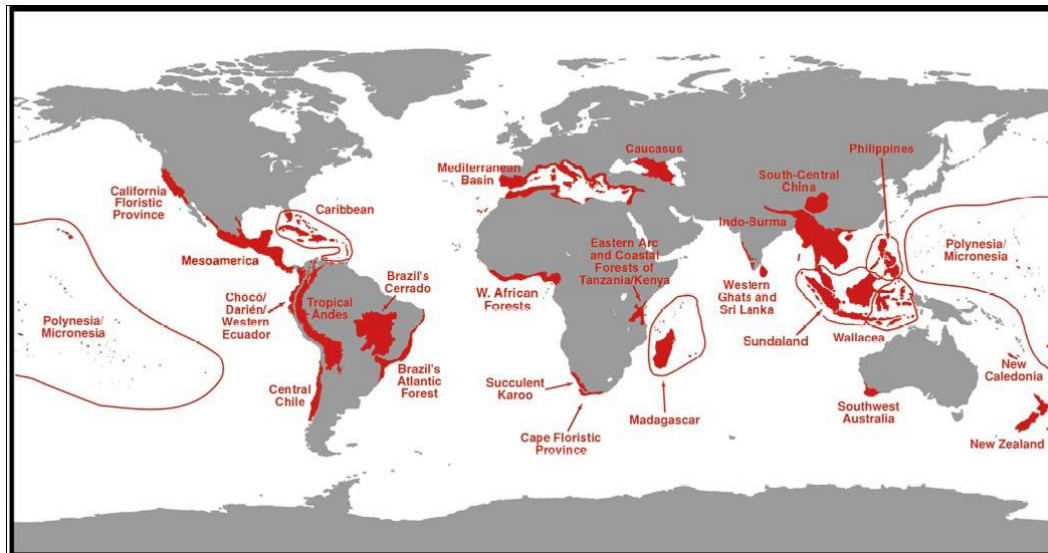
Οι *in vitro* τεχνικές παρέχουν γρήγορο πολλαπλασιασμό υπό ελεγχόμενες χωρίς-παθογόνα συνθήκες με τη προσθήκη φυτορρυθμιστικών ουσιών και μ' αυτό τον τρόπο μεγάλος αριθμός βλαστών μπορεί να παραχθεί από μικρές ποσότητες φυτικού υλικού, όπως είναι ένας οφθαλμός ή σπόρος. Το υλικό που προτιμάται να χρησιμοποιείται στην έναρξη *in vitro* καλλιέργειών, ώστε να υπάρχει γενετική παραλλακτικότητα στα παραγόμενα φυτά, είναι ο σπόρος, ενώ όπου οι σπόροι δεν είναι διαθέσιμοι, οι καλλιέργειες ξεκινούν από έκφυτα με μεριστωματική δραστηριότητα, όπως οι κοιμώμενοι ή οι ενεργά αναπτυσσόμενοι

επάκριοι ή πλάγιοι οφθαλμοί, χάρη στη γενετική τους σταθερότητα για να αποφευχθεί η σωμακλωνική παραλλακτικότητα. Οι τράπεζες σπόρων δίνουν τη δυνατότητα για μακράς διάρκειας αποθήκευση σε χαμηλή θερμοκρασία και υγρασία, ενώ οι τεχνικές κρυοδιατήρησης έχουν αρχίσει να χρησιμοποιούνται ως εναλλακτική μέθοδος σε σπάνια και απειλούμενα φυτά που σχηματίζουν πολύ λίγους ή καθόλου σπόρους ή έχουν ανορθόδοξους σπόρους (Fay, 1994).

Οι *in vitro* τεχνικές περιλαμβάνουν τη χρήση του συμβατικού μικροπολλαπλασιασμού, τις τεχνικές περιορισμένης ανάπτυξης καλλιεργειών μεριστωμάτων βλαστού και τις τεχνικές της κρυοδιατήρησης που παρέχουν μια εναλλακτική προσέγγιση μακράς διάρκειας αποθήκευσης για γενετικούς πόρους σε διάφορες μορφές, όπως σπόρων, γύρης, μεριστωμάτων και εμβρύων, ενώ και νέες τεχνικές έχουν αρχίσει να χρησιμοποιούνται, όπως η ‘encapsulation-dehydration’ και η ‘vitrification’, που δεν απαιτούν παγωμένη-προωθούμενη (freeze-induced) κυτταρική αφυδάτωση και αποφεύγουν το σχηματισμό κρυστάλλων πάγου μέσα στους ιστούς (Blakesley *et al.*, 1996).

Οι *in vitro* τεχνικές έχουν βρει αυξανόμενη χρήση στη διάσωση των απειλούμενων φυτών στις μέρες μας και αυτή η τάση είναι πιθανό να συνεχιστεί αφού περισσότερα είδη αντιμετωπίζουν τον κίνδυνο της εξαφάνισης. Η μονάδα μικροπολλαπλασιασμού των Royal Botanic Kew Gardens (UK) έχει μια εκτεταμένη συλλογή *in vitro* φυτών συμπεριλαμβανομένου πολλών απειλούμενων ειδών από όλο τον κόσμο. Η μελλοντική βιοτεχνολογική έρευνα διάσωσης και οι εφαρμογές της πρέπει να στοχεύουν στη διάσωση έντονα απειλούμενων, κυρίως ενδημικών, φυτών (Sarasan *et al.*, 2006).

Έχουν οριστεί 25 δυναμικές ζώνες βιοποικιλότητας ανά τον κόσμο (Εικ. 15), που περιλαμβάνουν το 44% όλων των ειδών αγγειωδών φυτών και το 35% των σπονδυλωτών ειδών και καλύπτουν μόνο το 1.4% της επιφάνειας της γης. Ο αριθμός των απειλούμενων με εξαφάνιση ειδών είναι πολύ μεγαλύτερος από τους διαθέσιμους πόρους για διάσωση και η κατάσταση δείχνει να γίνεται χειρότερη. Για να μπορέσουν να ενισχυθούν τα περισσότερα είδη με το λιγότερο κόστος θα πρέπει να αναγνωριστούν οι δυναμικές ζώνες που χαρακτηρίζονται από εξαιρετική συγκέντρωση ενδημικών ειδών και δοκιμάζουν εξαιρετική απώλεια του ενδιαιτημάτων τους. Ξεχώρισαν η Μαδαγασκάρη, οι Φιλιππίνες, η Sundaland, το Δάσος ατλαντικού Βραζιλίας, η Καραϊβική, η Indo-Burma, Western Ghats and Sri Lanka, Eastern Arc and Coastal Forests of Tanzania/Kenya. Η λεκάνη της Μεσογείου επίσης χρήζει ενίσχυσης διάσωσης λόγω του εξαιρετικά υψηλού αριθμού ενδημικών φυτών, που φθάνει τις 13.000 (Myers *et al.*, 2000).



ΕΙΚΟΝΑ 15. Οι 25 δυναμικές ζώνες βιοποικιλότητας (Myers *et al.*, 2000).

Περιοχές της Ευρώπης με ιδιαίτερα υψηλή παραλλακτικότητα φυτών είναι οι ορεινές περιοχές γύρω από τη Μεσόγειο και τη Μαύρη Θάλασσα με τις χλωρίδες της Ισπανίας, της Ελλάδας, της Ιταλίας, της Βουλγαρίας και της Ρουμανίας να περιλαμβάνουν τον υψηλότερο αριθμό και ενδημικών και απειλούμενων φυτικών ειδών. Τα φυτά απειλούνται από ένα συνδυασμό παραγόντων, όπως η υπερ-συλλογή, οι ακατάλληλες πρακτικές γεωργίας και δασοπονίας, η αστικοποίηση, η ρύπανση, η καταστροφή, ο κατακερματισμός και η υποβάθμιση του ενδιαιτήματος, η διασπορά επιθετικών ξενικών ειδών και η κλιματική αλλαγή. Η διάσωση των ειδών βασίζεται κυρίως στην *in situ* διάσωση στο φυσικό τους περιβάλλον και οι *ex situ* τεχνικές γενικά χρησιμοποιούνται για να συμπληρώσουν τις *in situ* μεθόδους, αν και σε κάποιες περιπτώσεις είναι οι μόνες πιθανές τεχνικές να διασώσουν κάποια είδη. Από τις πιο συνηθισμένες μεθόδους *ex situ* διάσωσης είναι η καλλιέργεια σε βοτανικούς κήπους, η αποθήκευση σπόρων και η *in vitro* καλλιέργεια. Η αποθήκευση σπόρων είναι η πιο κατάλληλη μέθοδος για μακράς διάρκειας διατήρηση, όμως μεγάλος αριθμός απειλούμενων ειδών παράγει ανώριμους, στείρους ή ανορθόδοξους σπόρους που χάνουν γρήγορα τη ζωτικότητα τους και δεν επιβιώνουν από την αφυδάτωση. Οι *in vitro* τεχνικές αποθήκευσης περιλαμβάνουν μέσης διάρκειας αποθήκευση (μερικούς μήνες μέχρι μερικά χρόνια) χρησιμοποιώντας τη στρατηγική της αργής ανάπτυξης ή την παραγωγή τεχνητού σπόρου και μακράς διάρκειας αποθήκευση (για αδιευκρίνιστη χρονική περίοδο) χρησιμοποιώντας την κρυοδιατήρηση. Η διατήρηση ή μη της γενετικής σταθερότητα του αποθηκευμένου δείγματος μπορεί να ελεγχθεί με τη χρήση βιοχημικών (πρωτεϊνικών) ή μοριακών (DNA) δεικτών. Η εγκατάσταση *in vitro* φυτικών συλλογών επιτρέπει τη

δημιουργία εκτεταμένων συλλογών σε ελάχιστο χώρο, μειώνει την πίεση συλλογής από τους άγριους πληθυσμούς και παρέχει πολύτιμο υλικό για την αποκατάσταση των άγριων πληθυσμών, για μοριακές έρευνες, οικολογικές μελέτες και οικονομικές χρήσεις (Paunescu, 2009).

1.7. *In vitro* πολλαπλασιασμός των γενών *Malus* και *Sorbus*

Αναζητήθηκαν πληροφορίες μικροπολλαπλασιασμού για τα συγγενικά του *Malosorbus* γένη *Malus* και *Sorbus*, με τα οποία όχι μόνο ανήκει στην ίδια οικογένεια αλλά θεωρείται και φυσικό τους υβρίδιο. Ο *in vitro* πολλαπλασιασμός της μηλιάς (*Malus* sp.) μελετάται για περισσότερο από 50 χρόνια με αποτέλεσμα να βρεθούν πολλές αναφορές και παρακάτω αναφέρονται κάποιες που φάνηκαν χρήσιμες στο σχεδιασμό των πειραμάτων και στην ερμηνεία των αποτελεσμάτων.

1.7.1. Εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας του *Malus* sp.

Τα κρίσιμα σημεία για την αποτελεσματική εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας μηλιάς σχετίζονται με την αποτελεσματικότητα της απολύμανσης των συλλεγόμενων εκφύτων και την αναστολή του φαινολικά-προκαλούμενου καφετιάσματος των εκφύτων. Αυτά εξαρτώνται από την επιλογή του εκφύτου, τη μέθοδο απολύμανσης, τις *in vitro* φυσικές και χημικές συνθήκες κ.α. (Dobránszki and Texeira da Silva, 2010).

1.7.1.1. Τύπος εκφύτου για εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας του *Malus* sp.

Έκφυτα για την έναρξη καλλιεργειών βλαστών μηλιάς μπορούν να ληφθούν από κοιμώμενους βλαστούς ή από ενεργά αναπτυσσόμενους βλαστούς από δένδρα θερμοκηπίου ή χωραφιού, με την πιο κατάλληλη πηγή να είναι οι κοιμώμενοι βλαστοί. Η κορυφή βλαστού είναι ο προτιμώμενος τύπος εκφύτου, αλλά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και οι πλάγιοι οφθαλμοί. Οι οφθαλμοί του βασικού άκρου των κοιμώμενων βλαστών είναι γενικά μικρότεροι, είναι πιο αργοί στην έναρξη της ανάπτυξης και αναπτύσσονται με λιγότερο σθένος από αυτούς που προέρχονται από το άνω άκρο. Μόνο τα έκφυτα με την καλύτερη αρχική ανάπτυξη θα πρέπει να επιλέγονται για μεταφορά σε φρέσκο υπόστρωμα (Lane, 1992).

Οι Kataeva and Butenko (1987) πολλαπλασίασαν *in vitro* τις ποικιλίες μηλιάς ‘Ougnoe’ και ‘Chernomorskoe letneey’ ξεκινώντας την καλλιέργεια με κορυφές βλαστών σε υπόστρωμα ½MS με thiamine (1 mg l⁻¹), pyridoxine (0.1 mg l⁻¹), nicotinic acid (0.1 mg l⁻¹), BAP (0.5 mg l⁻¹), σακχαρόζη (1%) και άγαρ (0.7%).

Μεριστώματα με 2 καταβολές φύλλων, που απομονώθηκαν από οφθαλμούς τριών υποκειμένων μηλιάς (M 26, M 27, MM 106) μετά τη χειμερινή περίοδο, καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS με 0.9-1.5 mg l⁻¹ BAP, οπότε σχηματίστηκαν ροζέττες φύλλων μετά από 6 εβδομάδες (Gološin and Radojevič, 1987).

Επιτυχής *in vitro* πολλαπλασιασμός του κλωνικού υποκειμένου μηλιάς MM106 επιτεύχθηκε με καλλιέργεια πλάγιων οφθαλμών σε βασικό υπόστρωμα MS με BAP (1 mg l⁻¹), GA₃ (0.5 mg l⁻¹) και IBA (0.1 mg l⁻¹) (Sharma *et al.*, 2000).

1.7.1.2. Απολύμανση εκφύτων του *Malus sp.*

Για την απολύμανση των εκφύτων έχουν χρησιμοποιηθεί διάφορες μέθοδοι, ενώ η εποχή και η προέλευση των εκφύτων έχουν βρεθεί να επηρεάζουν τα ποσοστά μόλυνσης. Έκφυτα που συλλέχθηκαν άνοιξη ή καλοκαίρι βρέθηκε να μολύνονται λιγότερο από αυτά που συλλέχθηκαν φθινόπωρο ή χειμώνα, ενώ έκφυτα συλλεγόμενα από φυτά σε ελεγχόμενο περιβάλλον, όπως το θερμοκήπιο, παρουσίασαν μειωμένη μικροβιακή μόλυνση από έκφυτα συλλεγόμενα από φυτά αναπτυσσόμενα στον αγρό (Dobrąnszki and Texeira da Silva, 2010).

Για να απολυμανθούν τα έκφυτα που λαμβάνονται από κοιμώμενους βλαστούς *Malus*, πρώτα απομακρύνονται ο φλοιός και τα λέπια των οφθαλμών με ένα λεπίδι για να μειωθούν τα πιθανά μολύσματα. Στη συνέχεια απολυμαίνονται με 20% διάλυμα χλωρίνης εμπορίου (5.25% sodium hypochlorite) για 10 min και ακολουθούν τρία ξεπλύματα με αποστειρωμένο νερό. Μετά απομακρύνονται τα εξωτερικά λέπια των οφθαλμών, απομονώνεται η κορυφή των βλαστών (μήκους 2 mm περίπου) και μεταφέρεται στο υπόστρωμα έναρξης της καλλιέργειας. Για έκφυτα που λαμβάνονται από ενεργά αναπτυσσόμενους οφθαλμούς ακολουθείται παρόμοια διαδικασία αλλά η συγκέντρωση της χλωρίνης πέφτει στο 10% (Lane, 1992).

Κομμένες κορυφές κοιμώμενων βλαστών της ποικιλίας μηλιάς ‘Julyred’ βυθίστηκαν σε νερό σε θερμοκρασία δωματίου για να προκληθεί η ανάδυση φύλλων από τους οφθαλμούς. Οι μεμονωμένοι οφθαλμοί με 2-3 φυλλάρια πλύθηκαν με τρεχούμενο νερό βρύσης για 2 h, απολυμάνθηκαν επιφανειακά με διάλυμα HgCl₂ (0.5%) για 5 min, ξεπλύθηκαν τρεις φορές και τοποθετήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα ½MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες. Την επόμενη ημέρα οι οφθαλμοί απολυμάνθηκαν επαναληπτικά με HgCl₂ (0.2%) για 2 min και ακολούθησαν 3 ξεπλύματα (Laszloffy *et al.*, 1991). Χρησιμοποιώντας την ίδια τεχνική φορτσαρίσματος της έκπτυξης των οφθαλμών από κορυφές βλαστών, που συλλέχθηκαν το Μάρτιο μετά το σπάσιμο του λήθαργου, και την ίδια απολύμανση η παραπάνω ερευνητική ομάδα πολλαπλασίασε *in vitro* επιτυχώς και τις ποικιλίες μηλιάς ‘Granny Smith’, ‘Mutsu’ και

‘Spur Golden Delicious’ σε υπόστρωμα ½MS με 0.5, 0.7 και 1.0 mg I⁻¹ BA και 0.1 mg I⁻¹ IBA, ενώ η απομάκρυνση των λεπίων των οφθαλμών μαζί με τα μεγαλύτερα φύλλα ήταν προαπαιτούμενο για την απολύμανση (Abdul Kader *et al.*, 1991).

Παρόμοια απολύμανση με των Laszloffy *et al.* (1991) είχαν χρησιμοποιήσει και οι Jones *et al.* (1977) ισχυριζόμενοι ότι οι ιστοί γίνονται πιο ανθεκτικοί μετά από μικρή περίοδο σε υπόστρωμα καλλιέργειας. Ακραία τμήματα βλαστών (2-4 cm), αναπτυσσόμενων σε θερμοκήπιο, συλλέχθηκαν σε νερό, μετά βυθίστηκαν για μερικά δευτερόλεπτα σε Mappoxol wetter (0.01%) και αμέσως μετά σε διάλυμα Sodium hypochloride (0.14% διαθέσιμο Cl) για 1 min, ακολούθησαν 3 ξεπλύματα. Οι κορυφές τοποθετήθηκαν για μία νύχτα σε μέσο καλλιέργειας και μετά εμβαπτίστηκαν στιγμιαίως σε Mappoxol, ακολούθησαν 40 min σε διάλυμα Sodium hypochloride (0.42% διαθέσιμο Cl) και έγιναν 3 ξεπλύματα.

1.7.1.3. Καφέτιασμα εκφύτων του *Malus sp.*

Ένα πρόβλημα με τους ενεργά αναπτυσσόμενους ιστούς μηλιάς είναι ότι τα προϊόντα φαινολικής οξειδωσης δημιουργούν μεγαλύτερο πρόβλημα από ότι οι κοιμώμενες πηγές. Η επίδραση των φαινολικών μπορεί να περιοριστεί με τη χρήση μικρού μεγέθους εκφύτων, τα οποία παράγουν μικρότερες ποσότητες που εκχύνονται μακριά αρκετά γρήγορα ώστε αποφεύγονται οι τοξικές συγκεντρώσεις στην περιοχή των εκφύτων (Lane, 1992).

Η ένταση του καφετιάσματος και η επιβίωση των εκφύτων μπορεί να επηρεαστεί από τη θέση και το μέγεθος των εκφύτων, τη φυσιολογική κατάσταση των μητρικών φυτών και την εποχή συλλογής των εκφύτων. Οι μέθοδοι που έχουν αναπτυχθεί για την αποτροπή και τον έλεγχο του καφετιάσματος των εκφύτων περιλαμβάνουν μεταχειρίσεις των μητρικών φυτών (μεταχείριση με σκοτάδι ή θερμότητα) για να έρθουν στην ιδανική φυσιολογική κατάσταση, απευθείας μεταχείριση των εκφύτων κατά την πρώτη φάση της έναρξης της καλλιέργειας (προ-μεταχείριση με αντιοξειδωτικά, με υγρή καλλιέργεια, σκοτεινή ή ψυχρή μεταχείριση) είτε προσθήκη στο αρχικό υπόστρωμα διαφόρων πρόσθετων που μπορούν να αποτρέψουν την παραγωγή φαινολικών ή μπορούν να απομακρύνουν τα παρεμποδιστικά φαινολικά συστατικά από τα υποστρώματα, όπως τα αντιοξειδωτικά, τα προσροφητικά κ.α. (Dobránszki and Teixeira da Silva, 2010).

Το στάδιο της αρχικής εγκατάστασης ήταν το πιο κρίσιμο στον *in vitro* πολλαπλασιασμό των ποικιλιών μηλιάς ‘Ougnoe’ και ‘Chernomorskoe letneey’ γιατί τα έκφυτα αμέσως μετά την απομόνωσή τους καφέτιαζαν, έβγαζαν τοξικά παράγωγα και νεκρώνονταν (απώλειες μέχρι 90%). Η προσθήκη στο παραπάνω υπόστρωμα πολυβινυλ πυρολιδόνης (polyvinyl pyrrolidone, PVP) (10 g I⁻¹) απέτρεψε το καφέτιασμα των αρχικών εκφύτων με αποτέλεσμα

το 90% των αποστειρωμένων εκφύτων να παραμένει πράσινο και να σχηματίζει μονούς βλαστούς (Kataeva and Butenko, 1987).

Η προσθήκη διαφόρων συνδυασμών και συγκεντρώσεων αντιοξειδωτικών, όπως το ασκορβικό οξύ (AA), το κιτρικό οξύ (CA) και η κυστεΐνη (cysteine), καθώς και προσροφητικών ουσιών, όπως η PVP και ο ενεργός άνθρακας (AC), στο υπόστρωμα της αρχικής φάσης καλλιέργειας μείωσε σε κάποιο βαθμό τη φαινολική οξείδωση και αύξησε το ποσοστό επιβίωσης των οφθαλμών της ποικιλίας μηλιάς Tydeman's Early Worcester (Modgil *et al.*, 1999).

Η χρήση AA και CA ως αντιοξειδωτικά και η καλλιέργεια σε στερεό υπόστρωμα με ενεργό άνθρακα για μία εβδομάδα πριν τη μεταφορά τους στο υπόστρωμα πολλαπλασιασμού ήταν αποτελεσματικά στον περιορισμό της οξείδωσης των φαινολικών των αρχικών εκφύτων από ενεργά αναπτυσσόμενες κορυφές δεκατριών ποικιλιών και υποκειμένων μηλιάς που εγκαταστάθηκαν *in vitro* (Yepes and Aldwinckle, 1994a).

1.7.2. Βλαστογένεση του *Malus* sp.

1.7.2.1. Επίδραση εποχής συλλογής εκφύτων και σταδίου ανάπτυξης βλαστών στη βλαστογένεση του *Malus* sp.

Τα έκφυτα διαφέρουν ως προς την προδιάθεσή τους να αναπτυχθούν, εξαρτώμενου από το στάδιο ανάπτυξης των βλαστών από τους οποίους απομονώθηκαν. Έτσι, έκφυτα από φουσκωμένους οφθαλμούς εγκαθίστανται πιο αξιόπιστα από όσα ελήφθησαν από βλαστούς στην αρχή του λήθαργου και έκφυτα από μεγαλύτερους οφθαλμούς είναι καλύτερη πηγή από αυτά από μικρούς. Οι ενεργά αναπτυσσόμενοι βλαστοί επίσης εγκαθίστανται καλά, όμως τα ποσοστά των μολύνσεων είναι συνήθως υψηλότερα, ενώ τα προϊόντα φαινολικής οξείδωσης αποτελούν μεγαλύτερο πρόβλημα από ότι στις κοιμώμενες πηγές. Τα έκφυτα ποικίλουν ως προς την αρχική τους ανάπτυξη και τα καλύτερα θα πρέπει να επιλέγονται για συνέχιση της καλλιέργειας (Lane, 1992).

Κορυφές βλαστών μηλιάς (ποικιλία Golden Delicious), που συλλέχθηκαν από ώριμα δένδρα διάφορες χρονικές στιγμές κατά τη διάρκεια της βλαστητικής ανάπτυξης την άνοιξη, διέφεραν σημαντικά ως προς την ικανότητά τους να ξεκινήσουν καλλιέργειες μικροπολλαπλασιασμού. Οι κορυφές βλαστών που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια ή στο τέλος της περιόδου ταχείας επιμήκυνσης των βλαστών επέδειξαν φτωχό δυναμικό πολλαπλασιασμού βλαστών, ενώ οι κορυφές βλαστών που συλλέχθηκαν πριν ή μετά από αυτή την περίοδο ήταν ικανές έντονου πολλαπλασιασμού βλαστών *in vitro* (Brand, 1993).

Κορυφές βλαστών μηλιάς (ποικιλίες Fuji και Red Star) απομονώνονταν κάθε μήνα από τον Οκτώβριο 1992 μέχρι το Σεπτέμβριο 1993 και καλλιεργούνταν σε υπόστρωμα MS με 1.0 mg l⁻¹ BA και 0.1 mg l⁻¹ GA₃. Η αποτελεσματικότητα της ιστοκαλλιέργειας συνδεόταν στενά με την περίοδο απομάκρυνσης των κορυφών, με τον ιδανικό χρόνο να είναι ο Ιούνιος και η περίοδος του χειμερινού λήθαργου. Κορυφές βλαστών που ελήφθησαν τον Ιούλιο και τον Αύγουστο ήταν οι λιγότερο κατάλληλες για *in vitro* καλλιέργεια (SongLin *et al.*, 1996).

Πλάγιοι οφθαλμοί της ποικιλίας μηλιάς Tydeman's Early Worcester που συλλέχθηκαν άνοιξη και καλοκαίρι παρουσίασαν λιγότερη μόλυνση και καφέτιασμα και έδωσαν σημαντικά υψηλότερο ποσοστό εγκατάστασης των εκφύτων (75%) και ταχύτερη ανάπτυξη στο υπόστρωμα MS με 1.0 mg l⁻¹ BAP, 1.0 mg l⁻¹ GA₃ και 0.1 mg l⁻¹ IBA συγκριτικά με οφθαλμούς που συλλέχθηκαν άλλες εποχές (Modgil *et al.*, 1999).

Οι Webster and Jones (1989) ανέφεραν ότι τα αρχικά έκφυτα κορυφής βλαστών ήταν δύσκολο να εγκατασταθούν *in vitro*. Μερικά μολύνθηκαν από βακτήρια, αλλά τα περισσότερα απλά απέτυχαν να αναπτυχθούν. Η παραγωγή βλαστών και η ικανότητα ριζοβολίας αυξήθηκαν με την υποκαλλιέργεια, ως αποτέλεσμα της ανανέωσης. Οι σειρές καλλιέργειας βλαστών που προέρχονται από διαφορετικά έκφυτα σταθερά επέδειξαν διαφορετικό βαθμό παραγωγής βλαστών και ικανότητας ριζοβολίας.

1.7.2.2. Θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας του *Malus sp.*

Το πιο κοινά χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα στο μικροπολλαπλασιασμό της μηλιάς είναι το MS (Lane, 1992).

Τα θρεπτικά υποστρώματα MS, WPM και Leroivre δοκιμάστηκαν για τον πολλαπλασιασμό του υποκειμένου μηλιάς M.26. Οι βλαστοί που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα MS πολλαπλασιάστηκαν και επιμηκύνθηκαν καλύτερα. Στο υπόστρωμα Leroivre το ποσοστό υαλωμένων βλαστών ήταν το χαμηλότερο, ενώ το υπόστρωμα WPM ήταν ακατάλληλο για τα μικρομοσχεύματα του M.26 (Vasar *et al.*, 2000).

1.7.2.3. Επίδραση φυτορρυθμιστικών ουσιών στη βλαστογένεση του *Malus sp.*

Ο πολλαπλασιασμός βλαστών της μηλιάς βασίζεται σε υποστρώματα που περιέχουν κυτοκινίνες ως κύρια φυτορρυθμιστική ουσία, σε μικρότερη συγκέντρωση επίσης αυξίνες και σε μερικές περιπτώσεις γιββερελλίνη, ενώ η επίδραση των διαφόρων φυτορρυθμιστικών ουσιών είναι ιδιαίτερα εξαρτώμενη από το γονότυπο. Στις περισσότερες εργασίες, η BA χρησιμοποιούταν ως πηγή κυτοκινίνης κυρίως σε ένα εύρος συγκέντρωσης μεταξύ 0.5 και 2.0 mg/l (Dobránszki and Texeira da Silva, 2010).

Αρκετές μελέτες έχουν γίνει και σχετικά με την αποτελεσματικότητα των κυτοκινινών στον πολλαπλασιασμό των βλαστών. Για την ποικιλία 'Northern Spy', η BAP ήταν ανώτερη από τις zeatin, kinetin και 2iP στον πολλαπλασιασμό των βλαστών, αλλά η αντίδραση εξαρτήθηκε από τη συγκέντρωση και τα επίπεδα φωτός (Hutchinson, 1984). Ο πολλαπλασιασμός των ποικιλιών 'Golden Delicious' και 'Majda' στο υπόστρωμα με kinetin (1 mg l^{-1}) ήταν φτωχός και σημαντικά μικρότερος από αυτόν στα υποστρώματα με BA (1 mg l^{-1}) ή BA (1 mg l^{-1}) και kinetin (1 mg l^{-1}) (Marn, 1988). Στα συστήματα αναγέννησης βλαστών μηλιάς το thidiazuron και η BA είναι οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες κυτοκινίνες, αλλά η αποτελεσματικότητά τους εξαρτάται από το γονότυπο και άλλους παράγοντες. Άλλες κυτοκινίνες, όπως η zeatin, η kinetin και η 2iP, έχουν επίσης δοκιμαστεί σε αρκετά πειράματα και έχουν βρεθεί γενικά να είναι λιγότερο ενεργές (Magyar-Tábori *et al.*, 2010).

Κατά τον Lane (1992), η πιο σημαντική φυτορρυθμιστική ουσία στον *in vitro* πολλαπλασιασμό μηλιάς είναι η BA, για την οποία υπάρχει απόλυτη απαίτηση. Για τις περισσότερες ποικιλίες, η ιδανική συγκέντρωση είναι 1.1 mg l^{-1} , αλλά και λίγο μικρότερες ή μεγαλύτερες συγκεντρώσεις επίσης χρησιμοποιούνται. Στις υψηλότερες συγκεντρώσεις ο αριθμός των βλαστών μπορεί να αυξηθεί, όμως το μέγεθος μειώνεται. Το αντίθετο συμβαίνει στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Ο αριθμός βλαστών σε μία συγκεκριμένη συγκέντρωση BA μπορεί να διαφέρει ανάλογα με την ποικιλία. Η ιδανική συγκέντρωση μπορεί επίσης να αλλάξει μετά από μερικές υποκαλλιέργειες, καθώς οι καλά προσαρμοσμένες καλλιέργειες χαρακτηρίζονται από ταχύτερη ανάπτυξη και μεγαλύτερη ανταπόκριση στη BA. Η αυξίνη σε συνδυασμό με κανονικές συγκεντρώσεις BA μπορεί να μειώσει τον αριθμό των βλαστών δίνοντας μεγαλύτερους βλαστούς που είναι πιο κατάλληλοι για ριζοβολία, ενώ το γιββερελλικό οξύ μπορεί να είναι ευεργετικό σε συγκεκριμένες συγκεντρώσεις σε συνδυασμό με άλλους ρυθμιστές ανάπτυξης. Η phloroglucinol, ένα φαινολικό που βρίσκεται στους ιστούς μηλιάς, μπορεί να είναι ευεργετική είτε παρεμποδιστική είτε αντιφατική στην επίδρασή της, ανάλογα με την ποικιλία και γι' αυτό συνήθως δεν περιλαμβάνεται στο υπόστρωμα (Lane, 1992).

Ο βαθμός πολλαπλασιασμού των βλαστών του υποκειμένου μηλιάς M.9 ήταν μεταξύ 2- και 4.5- φορές ανά μήνα εξαρτωμένου από τις συγκεντρώσεις αυξίνη:κυτοκινίνη με τις $1-2 \text{ mg l}^{-1}$ BAP και $0.1-0.5 \text{ mg l}^{-1}$ IBA να είναι οι πιο ευνοϊκές αν και η αυξίνη μπορούσε να παραληφθεί χωρίς να επηρεάσει το βαθμό πολλαπλασιασμού. Η φλορογλυκινόλη (PG) σε συγκέντρωση 162 mg l^{-1} δεν είχε καμία επίδραση στο ρυθμό πολλαπλασιασμού των βλαστών (James and Thurbon, 1981).

Το υπόστρωμα πολλαπλασιασμού των ποικιλιών μηλιάς ‘Ougnoe’ και ‘Chernomorskoe letneey’ περιείχε διάφορες συγκεντρώσεις (0.5-5 mg l⁻¹) κυτοκινινών (BAP, kinetin, zeatin) και αυξινών (IAA, IBA). Όλες οι κυτοκινίνες προκάλεσαν έκπτυξη πλευρικών βλαστών, αλλά η BAP ήταν καλύτερη επειδή η kinetin έδωσε χαμηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού των βλαστών και η zeatin προώθησε το σχηματισμό κάλου. Συγκέντρωση κυτοκινινών μεγαλύτερη από 3 mg l⁻¹ οδήγησε στο σχηματισμό βλαστών ροζέτας. Όταν το υπόστρωμα υποκαλλιέργειας περιείχε και αυξίνη το ποσοστό βλαστών ήταν μειωμένο κατά 20% (Kataeva and Butenko, 1987).

Πολλαπλασιασμός των βλαστών τριών υποκειμένων μηλιάς (M 26, M 27, MM 106) επιτεύχθηκε στο υπόστρωμα με (mg l⁻¹) BAP 0.9, IBA 0.1 και GA₃ 0.1 (Gološin and Radojevič, 1987).

Οι άριστες συγκεντρώσεις για καλλιέργεια εκφύτων βλαστού της ποικιλίας ‘Fuji’ ήταν 1.0-1.5 mg l⁻¹ BA και 0.5 mg l⁻¹ IBA, με υψηλότερες συγκεντρώσεις να δημιουργούν υαλωμένους βλαστούς (Ma *et al.*, 1990).

Ο Laszloffy *et al.* (1991) πολλαπλασίασαν *in vitro* την ποικιλία μηλιάς ‘Julyred’. Η αρχική εγκατάσταση και οι υποκαλλιέργειες έγιναν στο υπόστρωμα ½MS με BA (0.5, 0.7, 1.0 και 1.2 mg l⁻¹), IBA (0.1 mg l⁻¹), άγαρ (0.7%) και pH 5.7. Παρά τη δυσκολία στην εγκατάσταση ασηπτικών καλλιεργειών, οι πολλαπλασιαζόμενοι βλαστοί αυξήθηκαν σε μήκος και αριθμό στο προαναφερόμενο εύρος συγκεντρώσεων BA. Η υποκαλλιέργεια των βλαστών σε υπόστρωμα ½MS με 0.7 ή 1.0 mg l⁻¹ BA οδήγησε 9-11 φορές πολλαπλασιασμό ανά 4-6 εβδομάδες από μία μόνο κορυφή βλαστών ή πλάγιο οφθαλμό.

Οι ποικιλίες μηλιάς ‘Granny Smith’, ‘Mutsu’ και ‘Spur Golden Delicious’ διέφεραν ως προς την ιδανική συγκέντρωση BA για πολλαπλασιασμό των βλαστών (0.7 mg l⁻¹ για τη ‘Mutsu’, 1.0 mg l⁻¹ για τη ‘Granny Smith’ και 0.5 mg l⁻¹ για τη ‘Spur Golden Delicious’), το οποίο μπορεί να αποδοθεί σε γενετικές τους διαφορές και στα διαφορετικά επίπεδα των ενδογενών ορμονών τους (Abdul Kader *et al.*, 1991). Στις ίδιες αιτίες είχαν αποδώσει και οι Lane and McDougald (1982) τις διαφορές στα ιδανικά επίπεδα BA για πολλαπλασιασμό των βλαστών των ποικιλιών μηλιάς M.27, M.9, M.26, MM.111 και ‘Macspur’, τα οποία κυμαίνονταν μεταξύ 1.1 και 2.2 mg l⁻¹.

Ο μέγιστος αριθμός βλαστών κατά την υποκαλλιέργεια του κλωνικού υποκειμένου μηλιάς MM106 αποκτήθηκε όταν το υπόστρωμα MS συμπληρώθηκε με BAP (0.5 mg l⁻¹), GA₃ (1 mg l⁻¹), IBA (0.1 mg l⁻¹) και PG (100 mg l⁻¹) (Sharma *et al.*, 2000).

Ένας σημαντικός παράγοντας για επιμήκυνση βλαστών στη μηλιά είναι η ισορροπία μεταξύ GA₃ και IBA. Σε μια σταθερή συγκέντρωση BA (1 mg l⁻¹), αυξάνοντας τα επίπεδα

IBA ενεργοποιείται η επιμήκυνση των βλαστών μόνο με την παρουσία GA_3 , καθώς δεν παρατηρήθηκε σημαντική επιμήκυνση όταν η GA_3 παραλείφθηκε από το υπόστρωμα (Yepes and Aldwinckle, 1994a).

1.7.2.4. Επίδραση thidiazuron στη βλαστογένεση του *Malus sp.*

Η επίδραση του thidiazuron (TDZ) στον πολλαπλασιασμό των βλαστών του *Malus in vitro* είναι ένα ακόμη θέμα που ερευνήθηκε. Βλαστοί της ποικιλίας ‘Gala’ καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα Linsmaier-Skoog (Linsmaier and Skoog, 1965) που περιείχε 0.0002, 0.002, 0.02, 0.22 ή 2.2 $mg\ l^{-1}$ TDZ ή 1 $mg\ l^{-1}$ BA με 0.1 $mg\ l^{-1}$ IBA και 0.5 $mg\ l^{-1}$ GA_3 . Ο αριθμός των βλαστών με το TDZ (0.02, 0.22 και 2.2 $mg\ l^{-1}$) ήταν ισοδύναμος ή μεγαλύτερος από τον αριθμό που παράχθηκε χρησιμοποιώντας BA (1 $mg\ l^{-1}$) στο υπόστρωμα, αλλά οι βλαστοί ήταν κοντότεροι από αυτούς με το BA. Τα φύλλα στα έκφυτα στις δύο χαμηλότερες συγκεντρώσεις TDZ ήταν μεγάλα και είχαν μακριούς μίσχους, ενώ στις 3 υψηλότερες συγκεντρώσεις TDZ μεγάλα συσσωματώματα βλαστών σχηματίστηκαν, μερικοί εκπτυσσόμενοι τυχαία από σταθερό κάλο. Ο πολλαπλασιασμός των βλαστών συνεχίστηκε όταν τα έκφυτα από τις δύο υψηλότερες συγκεντρώσεις thidiazuron μεταφέρθηκαν σε υπόστρωμα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες (van Nieuwkerk *et al.*, 1985; 1986).

Τμήματα με τέσσερις οφθαλμούς (χωρίς το κορυφαίο μερίστωμα) *in vitro* βλαστών της ποικιλίας ‘Fugi’ καλλιεργήθηκαν στα υποστρώματα MS και $\frac{3}{4}MS$ με δύο ρυθμιστές ανάπτυξης (BAP ή TDZ) σε τέσσερις διαφορετικές συγκεντρώσεις (0, 0.66, 1.33, 2 $mg\ l^{-1}$). Μετά από 30 ημέρες φάνηκε ότι το υπόστρωμα $\frac{3}{4}MS$ έδωσε καλύτερο βαθμό πολλαπλασιασμού και μέσο αριθμό βλαστών. Το BAP και το TDZ έδωσαν παρόμοια αποτελέσματα σε ότι αφορά στο βαθμό πολλαπλασιασμού, όμως σε ότι αφορά το μέσο αριθμό βλαστών το TDZ ήταν ανώτερο από το BAP, ενώ για το μήκος των βλαστών το BAP ήταν ανώτερο. Η άριστη συγκέντρωση των BAP και TDZ ήταν μεταξύ 1.1 και 1.5 $mg\ l^{-1}$ (Erig *et al.*, 2002).

Το thidiazuron χρησιμοποιήθηκε επιτυχώς και στην αναγέννηση τυχαίων βλαστών από *in vitro* φύλλα μηλιάς σε συνδυασμούς 0.2 ή 2 $mg\ l^{-1}$ TDZ και 0.1 $mg\ l^{-1}$ IBA (Theiler-Hedtrich and Theiler-Hedtrich, 1990; JiHyae *et al.*, 1997; Virscek-Marn *et al.*, 1994, 1999), 0.6 $mg\ l^{-1}$ TDZ και 1.0 $mg\ l^{-1}$ NAA (Sriskandarajah *et al.*, 1990b) και 0.8 $mg\ l^{-1}$ TDZ και 0.5 $mg\ l^{-1}$ NAA (Korban *et al.*, 1992), ενώ και το BA έχει χρησιμοποιηθεί για αναγέννηση βλαστών από έκφυτο φύλλου σε συγκέντρωση 5 $mg\ l^{-1}$ (Theiler-Hedtrich and Theiler-Hedtrich, 1990; Famiani *et al.*, 1994; Yepes and Aldwinckle, 1994b).

Από τις συγκεντρώσεις TDZ που δοκιμάστηκαν (0.02, 0.2, 1.0, 2.0 ή 10.0 mg l⁻¹) σε συνδυασμό με NAA, τα 2.0 mg l⁻¹ ήταν πιο αποτελεσματικά και ήταν ισοδύναμα ή καλύτερα από τα 5.0 mg l⁻¹ BA τόσο στο ποσοστό φύλλων αρκετών ποικιλιών μηλιάς που αναγέννησαν βλαστούς όσο και στον αριθμό των σχηματισθέντων βλαστών ανά φύλλο σε κάθε σχεδόν πείραμα. Όμως, οι βλαστοί που παράχθηκαν σε φύλλα αναπτυσσόμενα σε 5.0 mg l⁻¹ BA επιμηκύνθηκαν, ενώ αυτοί που παράχθηκαν σε φύλλα αναπτυσσόμενα σε 2.0 mg l⁻¹ TDZ ήταν πολύ συμπαγείς με κοντά μεσογονάτια και μικρά φύλλα (Fasolo *et al.*, 1989).

Για την αναγέννηση φυσιολογικών βλαστών από *in vitro* φύλλα του υποκειμένου μηλιάς 'Jork 9', μια υψηλή συγκέντρωση BA (5.0 mg l⁻¹) και μια πολύ χαμηλή συγκέντρωση NAA (0.02 mg l⁻¹) βρέθηκαν να είναι ο καλύτερος ορμονικός συνδυασμός. Το TDZ σε 2.0 mg l⁻¹ συγκέντρωση ήταν πιο αποτελεσματικό στην αναγέννησης βλαστών από τις άλλες συγκεντρώσεις TDZ (0.02, 0.2 ή 1.0 mg l⁻¹), ή τα 5.0 mg l⁻¹ BA, όμως οι περισσότεροι αναγεννημένοι βλαστοί ήταν υαλωμένοι ή δεσμιωμένοι (Pawlicki and Welander, 1994).

Με τη χρήση υψηλότερης συγκέντρωσης TDZ 5.0 mg l⁻¹ (σε συνδυασμό με 0.25 mg l⁻¹ NAA) σε *in vitro* φύλλα της ποικιλίας 'Gala' η οργανογένεση παρεμποδίστηκε ισχυρά. Όταν το BA σε συγκέντρωση 5.0 mg l⁻¹ (και 0.25 mg l⁻¹ NAA) χρησιμοποιήθηκε ως κυτοκίνη το ποσοστό αναγέννησης των επάκριων φύλλων έφτασε το 100%, ενώ ο συνδυασμός 2.5 mg l⁻¹ BA, 2.5 mg l⁻¹ TDZ και 0.25 mg l⁻¹ NAA είχε ενδιάμεσο αποτέλεσμα. Η παρουσία του TDZ οδήγησε σε σφαιρικούς σχηματισμού και ανώμαλους βλαστούς, ενώ η χρήση μόνο του BA εξασφάλισε το σχηματισμό βλαστών με ομαλή εμφάνιση (Montecelli *et al.*, 2000).

Τέλος, έχει αναφερθεί σχηματισμός τυχαίων βλαστών *in vitro* από έμβρυα και κοτυληδόνες μηλιάς με τη χρήση TDZ (Kouider *et al.*, 1984a, 1984b, 1985).

1.7.3. Ριζογένεση του *Malus sp.*

Οι μέθοδοι *in vitro* ριζοβολίας των μικρομοσχευμάτων βλαστών του *Malus sp.* μελετήθηκαν εκτενέστερα επειδή παρουσιάστηκαν ιδιαίτερες δυσκολίες στην παρούσα εργασία στη ριζοβολία των μικροβλαστών από ενήλικο φυτό του *xM. florentina*.

1.7.3.1. Επίδραση της μεθόδου ριζοβολίας στη ριζοβολία μικροβλαστών του *Malus sp.*

Μικροβλαστοί 27 ποικιλιών μηλιάς ριζοβόλησαν είτε σε ένα στερεό με άγαρ υπόστρωμα χαμηλό σε άλατα που περιείχε οργανικά πρόσθετα, πηγή άνθρακα και αυξίνη (0.1-1.0 mg l⁻¹) είτε σε ένα απλοποιημένο υγρό υπόστρωμα που περιείχε μόνο πηγή άνθρακα και αυξίνη (0.3 mg l⁻¹ IBA), οπότε τα ποσοστά ριζοβολίας στο στερεό με άγαρ και στο υγρό υπόστρωμα ήταν ισοδύναμα για τις περισσότερες ποικιλίες. Η 6-ωρη μεταχείριση εμβάπτυνσης σε υψηλότερη

συγκέντρωση αυξίνης (3.0, 10.0 ή 30.0 mg I⁻¹ IBA) δούλεψε όσο καλά και η 7-ημερη καλλιέργεια σε πολύ χαμηλή συγκέντρωση (Zimmerman *et al.*, 1987).

Για ριζοβολία, οι μικροβλαστοί των ποικιλιών μηλιάς ‘Ougnoe’ και ‘Chernomorskoe letneey’ μπήκαν στο υπόστρωμα ½MS με σακχαρόζη (1%) και άγαρ (0.7%) αφού πρώτα μεταχειρίστηκαν με αυξίνη: είτε βυθίστηκαν σε διάλυμα IBA ή IAA (100 mg I⁻¹) για 3-8 h, μετά παρέμειναν στο υπόστρωμα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες στο σκοτάδι για 7 ημέρες και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στο φως, είτε καλλιεργήθηκαν στο υπόστρωμα με ½MS και IBA ή IAA (1 mg I⁻¹) σε σκοτάδι για 7 ημέρες και μετά μεταφέρθηκαν σε σκέτο ½MS στο φως. Και με τους δύο τρόπους ριζοβολίας επιτεύχθηκε ριζοβολία σε ποσοστό γύρω στο 60% (Kataeva and Butenko, 1987).

Μικροβλαστοί των ποικιλιών Gravenstei και Tohoku, και του υποκειμένου M.26 έδωσαν καλύτερα αποτελέσματα ριζοβολίας (ποσοστό ριζοβολίας, αριθμό ριζών, απουσία κάλου) μετά από τη σύντομη μεταχείριση προτροπής με υψηλή συγκέντρωση IAA (Brief induction pretreatment-BIP), που περιελάμβανε σύντομη ολονύκτια εμβάπτυση (16 h) της βάσης των μικρομοσχευμάτων σε υδατικό διάλυμα IAA 200 mg I⁻¹, συγκριτικά με τη μακρά μεταχείριση προτροπής (Long induction pretreatment-LIP), που περιελάμβανε καλλιέργεια για 7 ημ. σε υπόστρωμα με 1.0 mg I⁻¹ IBA ή IAA (Collet and Le, 1987).

Οι διαφορές μεταξύ των υποκειμένων μηλιάς M.26 και M.9 στην ανταπόκριση στην *in vitro* ριζοβολία μπορούν να συσχετισθούν με διαφορές στα επίπεδα ελεύθερου IAA στα τμήματα της βάσης των βλαστών, οι οποίες μπορούν να αντικατοπτρίζουν διαφορές στο μεταβολισμό του IBA και/ ή στη συζυγία του IAA (Alvarez *et al.*, 1988). Η εξωγενής χορήγηση IBA (0.8 mg I⁻¹) σημαντικά αύξησε το σχηματισμό τυχαίων ριζών σε βλαστούς του M.26 που αναπτύσσονταν *in vitro*, καθώς μια πενθήμερη περίοδος μεταχείρισης με IBA επαρκούσε για να δώσει 100% ριζοβολία. Βρέθηκε ότι το IBA μετατρέπεται σε IAA μέσα στους βλαστούς (Alvarez *et al.*, 1989).

Ριζοβολία σε δύο στάδια με μεταφορά των βλαστών από 8 ποικιλίες και υποκείμενα μηλιάς σε υπόστρωμα ½MS μετά από καλλιέργεια σε υπόστρωμα ½MS με 0.3-1.0 mg I⁻¹ IBA ή NAA για 6 ημέρες έδωσε υψηλότερο ποσοστό ριζοβολίας από τη συνεχή καλλιέργεια σε υπόστρωμα με αυξίνη (Liu *et al.*, 1991).

Η ικανότητα ριζοβολίας *in vitro* των μικροβλαστών του υποκειμένου M9 σημαντικά ενισχύθηκε από ένα διαμήκες σχίσμο (2 mm) στη βάση τους, πιθανότατα λόγω της αυξημένη διείσδυσης του προστιθέμενου IBA μέσα στους ιστούς ή της διακοπής των σκληρογλυματικών ινών του φλοιώματος, οι οποίες έχει θεωρηθεί ότι δρουν ως φυσικό όριο ενάντια στον πολλαπλασιασμό του καμβίου (Puentes and Marin, 1992).

In vitro αναγεννημένοι βλαστοί του κλωνικού υποκειμένου μηλιάς MM106 τοποθετήθηκαν σε διάλυμα IBA (30 mg I⁻¹) για 3 h, στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε στερεό υπόστρωμα χωρίς αυξίνη και ριζοβόλησαν σε ποσοστό 80% περίπου (Sharma *et al.*, 2000).

Οι βάσεις μικροβλαστών του υποκειμένου M.9 εμβαπτίστηκαν σε 0, 500, 1000, 1500 mg I⁻¹ IBA για 10 sec και μετά τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένους δίσκους που περιείχαν 50 ml μίγματος φλοιών ρυζιού και βερμικουλίτη ανά θέση για να διευκρινιστεί η επίδραση των διαφόρων συγκεντρώσεων του IBA στη ριζοβολία και τον εγκλιματισμό. Το ποσοστό ριζοβολίας ήταν υψηλότερο στη μεταχείριση με 500 και 1000 mg I⁻¹ IBA, 82% και 84%, αντίστοιχα. Όμως, το ποσοστό επιβίωσης των φυταρίων μετά τη μεταφύτευση σε εμπορικές συσκευασίες ήταν υψηλότερο στη μεταχείριση με 500 mg I⁻¹ IBA (Pedrotii and Voltolini, 2001).

Μικροβλαστοί της μηλιάς MM106 τοποθετήθηκαν για απευθείας ριζοβολία στα *ex vitro* υποστρώματα (λεπτός περλίτης, χονδρός περλίτης, ποταμίσις άμμος, τύρφη, χρησιμοποιούμενα μεμονωμένα ή σε μείγματα) μετά από γρήγορη εμβάπτυση της βάσης τους σε ένα υδροαλκοολούχο (10:1 v/v) διάλυμα με 10 ppm IBA. Στα υποστρώματα με ανεβασμένη ικανότητα συγκράτησης υγρασίας υπάρχει μια μειωμένη αντίδραση ριζογένεσης και ένα αυξημένο ποσοστό θνησιμότητας των μικρομοσχευμάτων. Στα υποστρώματα με χονδρό περλίτη παρατηρήθηκε αυξημένο μέσο ποσοστό ριζοβολίας (48.9%), αριθμός και μήκος ριζών και μειωμένο μέσο ποσοστό θνησιμότητας (17.7%) συγκριτικά με τα υποστρώματα με λεπτό περλίτη (12.5% και 61.4%, αντίστοιχα). Επομένως, στην απευθείας ριζοβολία των μικροβλαστών *ex vitro* είναι απολύτως μη ενδεδειγμένη η χρήση λεπτού περλίτη εξαιτίας της ικανότητάς του, με τα μικροσκοπικά μόριά του, να χώνεται σε κάθε μεσοδιάστημα παρεμποδίζοντας την ικανότητα αερισμού των υποστρωμάτων και ευνοώντας την αύξηση της υδατοϊκανότητας. Η τύρφη και η άμμος χρησιμοποιούμενα χωριστά πρέπει επίσης να αποφεύγονται, ενώ, εάν αναμιγνύονται με χονδρό περλίτη, η ικανότητα συγκράτησης υγρασίας μειώνεται και ταυτόχρονα η αντίδραση ριζογένεσης βελτιώνεται. Ο χονδρός περλίτης χρησιμοποιούμενος από μόνος του χαρακτηρίζεται από μεγάλη ισορροπία μεταξύ ικανότητας αερισμού και ικανότητας συγκράτησης υγρασίας και από θετική επίδραση στην ανάπτυξη των ριζών (Avanzato and Cherubini, 1993).

1.7.3.2. Επίδραση του χρόνου παραμονής στο υπόστρωμα με αυξίνη στη ριζοβολία μικροβλαστών του *Malus* sp.

Η επιτυχής *in vitro* ριζοβολία του υποκειμένου μηλιάς M.9 συσχετίστηκε με την έκθεση των βλαστών σε υπόστρωμα με αυξίνη (2 mg I⁻¹ IBA) μόνο για 4 ημέρες ακολουθούμενη από

μεταφορά σε υπόστρωμα χωρίς αυξίνη, το οποίο απέτρεψε το σχηματισμό κάλου και οδήγησε σε τριπλασιασμό του αριθμού των ριζών ανά έρριζο βλαστό συγκριτικά με τη συνεχή παραμονή με αυξίνη (James and Thurbon, 1979).

Μια σύντομη περίοδος προώθησης της ριζοβολίας περίπου 5 ημερών, ακολουθούμενη από μεταφορά σε υπόστρωμα χωρίς αυξίνη, μπορεί να περιορίσει την υπερβολική ανάπτυξη κάλου και να επιτρέψει την ανάπτυξη των ριζικών καταβολών (Lane, 1992).

1.7.3.3. Επίδραση του τύπου και της συγκέντρωσης αυξίνης στη ριζοβολία μικροβλαστών του *Malus sp.*

Από τις αυξίνες που δοκιμάστηκαν στην προώθηση ριζοβολίας της ποικιλίας 'Northern Spy', μόνο το IBA και το IAA σε συγκεντρώσεις 0.2 ή 1.0 mg l⁻¹ ήταν κατάλληλες δίνοντας ποσοστά ριζοβολίας 70-100%, ενώ τόσο το NAA όσο και το NOA είχαν την τάση να παράγουν κάλο, με ρίζες να βγαίνουν από τον κάλο, χωρίς αγγειακή σύνδεση με τη βάση του βλαστού (Hutchinson, 1984).

Κατά την αξιολόγηση της ριζοβολίας μικροβλαστών διαφόρων ποικιλιών μηλιάς, το IAA ήταν όσο αποτελεσματικό ήταν και το NAA στη ριζοβολία των 6 από τις 7 ποικιλίες. Βέλτιστη ριζοβολία επιτεύχθηκε σε ένα εύρος συγκέντρωσης αυξίνης 0.1 έως 0.3 mg l⁻¹, ενώ υψηλότερες συγκεντρώσεις παρακίνησαν το σχηματισμό υπερβολικού κάλου στη βάση των μοσχευμάτων και παρεμπόδισε την ανάπτυξη των ριζών και των βλαστών (Zimmerman, 1983).

Κατά την εξέταση της ριζοβολίας μικροβλαστών δώδεκα ποικιλιών μηλιάς, το IBA ήταν η πιο αποτελεσματική αυξίνη που δοκιμάστηκε και το IAA η λιγότερο αποτελεσματική (Zimmerman and Fordam, 1985).

Η ριζοβολία μικροβλαστών της ποικ. Fuji παρακινήθηκε με τη χρήση IAA ή IBA σε συγκεντρώσεις 1.0-3.0 mg l⁻¹ και 0.5 mg l⁻¹, αντίστοιχα (Ma *et al.*, 1990).

Οι Liu *et al.* (1991) καλλιέργησαν βλαστούς από 8 ποικιλίες και υποκείμενα μηλιάς, που είχαν υποκαλλιεργηθεί για 6-7 γενιές, για ριζοβολία σε υπόστρωμα ½MS με IAA, IBA και NAA σε συγκεντρώσεις 0.1-3.0 mg l⁻¹ σε διάφορους συνδυασμούς. Οι άριστες συγκεντρώσεις ήταν 0.3 mg l⁻¹ IBA ή 0.3 mg l⁻¹ IBA + 0.1 mg l⁻¹ NAA ή 0.15 mg l⁻¹ IBA + 0.15 mg l⁻¹ NAA, οι οποίες έδωσαν ποσοστό ριζοβολίας 88.3-92.1%.

Η πιο κοινά χρησιμοποιούμενη αυξίνη στη ριζοβολία μικροβλαστών μηλιάς είναι το IBA. Το NAA επίσης δουλεύει καλά, όμως θα πρέπει να χρησιμοποιείται σε χαμηλότερη συγκέντρωση επειδή είναι πιο δραστική αυξίνη από το IBA. Το κυριότερο μειονέκτημα του NAA, εάν χρησιμοποιηθεί σε υψηλή συγκέντρωση, είναι ότι προωθεί την ανάπτυξη κάλου

περισσότερο από το IBA. Η ανταπόκριση στη ριζοβολία εξαρτάται από την ποικιλία με αποτέλεσμα μερικές ποικιλίες να ριζοβολούν πιο εύκολα από άλλες (Lane, 1992).

Για ριζοβολία *in vitro*, βλαστοί του υποκειμένου μηλιάς MM.111 καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS με IBA (0.5, 1, 1.5, 2 mg l⁻¹), myo-inositol (100 mg l⁻¹), σακχαρόζη (30 g l⁻¹) και άγαρ (6 g l⁻¹), με pH 5.9 για 30 ημέρες. Ο μεγαλύτερος αριθμός ριζών παράχθηκε στο υπόστρωμα με 1 mg l⁻¹ IBA (Ferri *et al.*, 1998).

Για ριζοβολία του υποκειμένου M.26 δοκιμάστηκαν το NAA και IBA σε συγκεντρώσεις 1, 2, 3, 4 mg l⁻¹ και το καλύτερο ριζικό σύστημα αναπτύχθηκε στο υπόστρωμα με 3 mg l⁻¹ IBA (Vasar *et al.*, 2000).

Η επίδραση των αυξινών διέφερε στα 3 στάδια ριζοβολίας. Το IBA προήγαγε έντονα τη ριζοβολία κατά τη φάση της προτροπής, αλλά την παρεμπόδιζε ελαφρώς κατά τη μορφολογική διαφοροποίηση. Το NAA είχε την ισχυρότερη προωθητική επίδραση κατά την προτροπή ριζοβολίας, αλλά και την ισχυρότερη παρεμποδιστική επίδραση κατά τη διαφοροποίηση (De Klerk *et al.*, 1995b). Μικροβλαστοί του *Malus Jork 9*, που εκτέθηκαν για 3 εβδ. σε κάθε μία από τις αυξίνες IAA, IBA και NAA στο σκοτάδι κατά τις πρώτες 5 ημέρες (περίοδος σχηματισμού ριζικών καταβολών) και στη συνέχεια στο φως, σχημάτισαν υψηλότερο ολικό αριθμό ριζών με το IAA και το IBA (15 ρίζες) συγκριτικά με το NAA (8 ρίζες). Ο μέγιστος αριθμός ριζών φτάστηκε σε ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων IAA (2.0-20.0 mg l⁻¹) αλλά μόνο σε μία συγκέντρωση IBA (2.0 mg l⁻¹) ή NAA (0.6 mg l⁻¹), ενώ η ανάπτυξη των ριζών και των βλαστών παρεμποδίστηκε περισσότερο με το NAA και το IBA από ότι με το IAA. Ο σχηματισμός κάλου ισχυρά προωθήθηκε από το NAA, κάπως λιγότερο από το IBA και μόνο ελαφρά από το IAA. Συνεπώς, το IAA ήταν η προτιμότερη αυξίνη για την *in vitro* ριζοβολία των βλαστών της μηλιάς Jork 9 (De Klerk *et al.*, 1997).

Εξετάστηκε η *in vitro* ριζοβολία του υποκειμένου μηλιάς M.9 εφαρμόζοντας τις αυξίνες IAA, NAA και IBA σε συγκεντρώσεις 0.1, 0.2, 1.0, 2.0, 4.0, 10.0, 20.0 mg l⁻¹ μόνο για 10 ημέρες ή για 30 ημέρες συνεχόμενα. Το IAA στις υψηλότερες συγκεντρώσεις έδωσε υψηλό ποσοστό ριζοβολίας και καλύτερο ριζικό σύστημα και φύλλα, ενώ αυτά τα χαρακτηριστικά παρατηρήθηκαν με χαμηλές συγκεντρώσεις των IBA και NAA. Καλύτερα αποτελέσματα ελήφθησαν όταν οι βλαστοί καλλιεργήθηκαν με αυξίνες για 10 ημέρες (Radmann *et al.*, 2002). Το IAA είχε βρεθεί πιο κατάλληλο και για την προώθηση ριζοβολίας μικροβλαστών μηλιάς της ποικ. Gale Gala, μετά από έλεγχο των αυξινών NAA, IBA, IAA και 2,4-D (Bommineni *et al.*, 2001).

1.7.3.4. Επίδραση εφαρμογής σκότους στη ριζοβολία μικροβλαστών του *Malus sp.*

Μικροβλαστοί δώδεκα ποικιλιών μηλιάς ριζοβόλησαν εύκολα όταν τοποθετήθηκαν για 3-7 ημέρες στο σκοτάδι σε υγρό υπόστρωμα που περιείχε μόνο 15 g I⁻¹ σουκρόζη και 0.3 mg I⁻¹ IBA. Ανεβάζοντας τη θερμοκρασία κατά τη σκοτεινή μεταχείριση από 25 στους 30 °C βελτίωσε τη ριζοβολία αρκετών ποικιλιών (Zimmerman and Fordam, 1985).

Κατά τη ριζοβολία μικροβλαστών των ποικιλιών μηλιάς ‘Ougnoe’ και ‘Chernomorskoe letneey’, η σκοτεινή περίοδος στην αρχή της ριζοβολίας βρέθηκε να είναι απαραίτητη (Kataeva and Butenko, 1987).

Μικροβλαστοί του υποκειμένου M.9 Jork που ριζοβόλησαν στο φως σχημάτισαν λιγότερο κάλο από αυτούς που ριζοβόλησαν μετά από μια σύντομη περίοδο στο σκοτάδι (Caboni *et al.*, 1992).

Η μέθοδος ριζοβολίας που χρησιμοποίησαν ο Bolar *et al.* (1998) σε διάφορες ποικιλίες μηλιάς περιελάμβανε μεταφορά σε υπόστρωμα προτροπής ριζοβολίας με 3 mg I⁻¹ IBA για 1 εβδομάδα στο σκοτάδι και ακολούθως στο ίδιο υπόστρωμα χωρίς IBA στο φως για επιμήκυνση των ριζών.

1.7.3.5. Επίδραση ενεργού άνθρακα στη ριζοβολία μικροβλαστών του *Malus sp.*

Μικροβλαστοί της ποικιλίας μηλιάς ‘Julyred’, μήκους 2-3 cm, που καλλιεργήθηκαν σε ½MS με 0.5 ή 1.0 mg I⁻¹ IBA, με ή χωρίς 0.1 mg I⁻¹ BA και 2 g I⁻¹ AC ριζοβόλησαν σε ποσοστό 90% μετά από 4 εβδομάδες, όμως αυτοί στο υπόστρωμα με 1.0 mg I⁻¹ IBA, BA και AC σχημάτισαν περισσότερες και πιο μακριές ρίζες (Laszloffy *et al.*, 1991).

Ηλικίας τεσσάρων εβδομάδων βλαστοί των υποκειμένων μηλιάς JTE-H, M.26 και MM.106 μεταφέρθηκαν σε υπόστρωμα ½MS με 1, 2 ή 3 mg I⁻¹ IBA για προτροπή ριζογένεσης, όπου παρέμειναν για μία εβδομάδα και μετά μεταφέρθηκαν σε υπόστρωμα ½MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες με ή χωρίς ενεργό άνθρακα (2.5 g I⁻¹). Το JTE-H έδειξε πολύ υψηλή ικανότητα ριζοβολίας σε κάθε επίπεδο IBA (91-100%), ενώ το MM.106 έδειξε πολύ φτωχή ριζοβολία (33-46%). Στο M.26, το υψηλότερο ποσοστό ριζοβολίας (94%) αποκτήθηκε με τη μικρότερη συγκέντρωση IBA. Η παρουσία ενεργού άνθρακα στο υπόστρωμα ανάπτυξης των ριζών μείωσε το ποσοστό ριζοβολίας εξαρτώμενου από την ποικιλία και τη συγκέντρωση του IBA (Magyar-Tábori *et al.*, 2002).

1.7.3.6. Επίδραση κυτοκινινών στη ριζοβολία μικροβλαστών του *Malus sp.*

Οι κυτοκινίνες μπορούν να παρεμποδίσουν ισχυρά τη ριζοβολία, αλλά επίσης σε χαμηλές συγκεντρώσεις, μερικές κυτοκινίνες ενθαρρύνουν τη ριζοβολία. Διάφορες κυτοκινίνες

παρεμπόδισαν τη ριζοβολία τεμαχίων βλαστού 1 mm του υποκειμένου Jork 9 σε διαφορετικό βαθμό, όμως την υψηλότερη παρεμπόδιση επέδειξαν το TDZ και η BAP. Αντίθετα, η iP και η iPA ενθάρρυναν τη ριζοβολία σε χαμηλή συγκέντρωση (0.02 mg l^{-1}). Οι παρεμποδιστές σύνθεσης κυτοκινινών, Iovastatin και simvastatin, και οι δύο παρεμπόδισαν τη ριζοβολία και η παρεμπόδιση αντιστράφηκε μερικώς από την ταυτόχρονη προσθήκη zeatin. Επομένως, η σύνθεση των κυτοκινινών είναι βασική κατά τη διάρκεια του σχηματισμού των ριζών, πιθανότατα επειδή η κυτταρική διαίρεση που ξεκινάει από ένα σχετικά υψηλό ενδογενές επίπεδο κυτοκινίνης αμέσως μετά το κόψιμο των τεμαχίων είναι ένα απαραίτητο αρχικό στάδιο στο σχηματισμό τυχαίων ριζών (De Klerk *et al.*, 2001).

Τεμάχια βλαστού του υποκειμένου M.9 cv Jork μεταφέρθηκαν στο φως σε υπόστρωμα χωρίς ορμόνες ή εκτέθηκαν σε υπόστρωμα εμπλουτισμένο με BA (0.3 mg l^{-1}) για διαφορετικές περιόδους μέσα στη διαδικασία ριζοβολίας, αφού πρώτα είχαν καλλιεργηθεί για 24 ώρες στο σκοτάδι στο υπόστρωμα ριζοβολίας με 5.0 mg l^{-1} IBA. Η μεταχείριση με BA ισχυρά παρεμπόδισε το σχηματισμό ριζών ιδιαίτερα όταν εφαρμόστηκε στην έναρξη της περιόδου ριζοβολίας (Pawlicki and Welander, 1992).

Η ικανότητα ριζοβολίας βλαστών της ποικιλίας 'Royal Gala' αναγεννημένων από τεμάχια *in vitro* φύλλων σε υποστρώματα με διαφορετικό περιεχόμενο κυτοκινίνης (TDZ, BA, BAR και mTR) παρατηρήθηκε αμέσως μετά την αναγέννηση και συγκρίθηκε μετά από υποκαλλιέργεια σε υπόστρωμα χωρίς ορμόνες (A), ή σε υπόστρωμα με μειωμένη συγκέντρωση κυτοκινίνης (B), ή με αυξημένο περιεχόμενο GA_3 (Γ) για μία εβδομάδα, ή μετά από μία υποκαλλιέργεια σε υπόστρωμα πολλαπλασιασμού με 1.0 mg l^{-1} BAR για τέσσερις εβδομάδες (μεταχείριση Δ). Η ριζοβολία και ο εγκλιματισμός των βλαστών δεν ήταν επιτυχής αμέσως μετά την αναγέννηση. Η υποκαλλιέργεια των βλαστών σε υπόστρωμα χωρίς ορμόνες δε βελτίωσε την ικανότητα ριζοβολίας των βλαστών, ενώ η υποκαλλιέργειά τους στα υποστρώματα B και Γ οδήγησε σε ποσοστό ριζοβολίας μέχρι 36%, εξαρτώμενου τούτου από το υπόστρωμα αναγέννησης από το οποίο προέρχονταν οι βλαστοί. Το καλύτερο ποσοστό ριζοβολίας (μέχρι 76%) επιτεύχθηκε σε βλαστούς που αναγεννήθηκαν σε υπόστρωμα με BAR μετά από τη μεταχείριση Δ, παρόμοια με την ικανότητα ριζοβολίας των μικροπολλαπλασιασμένων βλαστών (80%). Το περιεχόμενο κυτοκινίνης των υποστρωμάτων αναγέννησης επηρέασε την ικανότητα ριζοβολίας των αναγεννημένων βλαστών ακόμη και ύστερα από διαφορετικές μεταχειρίσεις υποκαλλιέργειας, όπου μπορούσαν να παρατηρηθούν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των υποστρωμάτων αναγέννησης και πολλαπλασιασμού. Όλοι οι ριζοβολημένοι βλαστοί επιβίωσαν μετά από εγκλιματισμό με μέγιστη αποτελεσματικότητα (Magyar-Tábori *et al.*, 2011).

1.7.3.7. Επίδραση γιββερελλίνης στη ριζοβολία μικροβλαστών του *Malus sp.*

Τεμάχια βλαστού του υποκειμένου M.9 cv Jork μεταφέρθηκαν στο φως σε υπόστρωμα χωρίς ορμόνες ή εκτέθηκαν σε υπόστρωμα εμπλουτισμένο με GA₃ (3.5 mg l⁻¹) για διαφορετικές περιόδους μέσα στη διαδικασία ριζοβολίας, αφού πρώτα είχαν καλλιεργηθεί για 24 ώρες στο σκοτάδι στο υπόστρωμα ριζοβολίας με 5.0 mg l⁻¹ IBA. Η μεταχείριση με GA₃ μείωσε τη ριζοβολία όταν εφαρμόστηκε τόσο στην έναρξη όσο και στο τέλος της περιόδου ριζοβολίας (Pawlicki and Welander, 1992).

Η GA₃ προστιθέμενη κατά τον πολλαπλασιασμό βλαστών του υποκειμένου M.9 Jork αύξησε κάπως την ικανότητα ριζοβολίας σε χαμηλή συγκέντρωση (1 mg l⁻¹), αλλά ήταν παρεμποδιστική σε υψηλότερες δόσεις (2 ή 4 mg l⁻¹) (Caboni *et al.*, 1992).

1.7.3.8. Επίδραση phloroglucinol στη ριζοβολία μικροβλαστών του *Malus sp.*

Η φλορογλυκινόλη (phloroglucinol, PG) και το phloretic acid, δύο προϊόντα διάσπασης της φλοριζίνης (phloridzin), περισσότερο από διπλασίασαν το ποσοστό βλαστών του υποκειμένου M.7 που ριζοβόλησαν όταν καλλιεργήθηκαν *in vitro* με αυξίνες (IBA, IAA, NAA), ενώ το καφεϊκό οξύ (caffeic acid), η κατεχόλη (catechol), η πυρογαλλόλη (pyrogallol) δεν αύξησαν σημαντικά τη ριζοβολία (Jones and Hatfield, 1976). Η προσθήκη IBA στο υπόστρωμα βελτίωσε τη ριζοβολία όλων των ποικιλιών μηλιάς που εξετάστηκαν, ενώ η PG μείωσε το σχηματισμό κάλου και την κακοδιαμόρφωση των ριζών σε μικρομοσχεύματα που δέχθηκαν μεταχείριση με IBA χωρίς να υπάρχει η ένδειξη ότι ήταν βασική για την *in vitro* ριζοβολία των μοσχευμάτων αυτών των ποικιλιών (Zimmerman and Broome, 1981).

Καλλιέργειες βλαστών του υποκειμένου μηλιάς M.9 που αναπτύχθηκαν παρουσία της phloroglucinol σε συγκέντρωση 162 mg l⁻¹ έδωσαν υψηλότερα ποσοστά ριζοβολίας από καλλιέργειες που αναπτύχθηκαν εν απουσία του (James and Thurbon, 1981). Η phloroglucinol έδρασε συνεργιστικά της αυξίνης στην προτροπή ριζοβολίας σε ένα εύρος συγκεντρώσεων από 16.2 έως 1620 mg l⁻¹. Ο πιο ευνοϊκός συνδυασμός για ανάπτυξη ριζών ήταν 3.0 mg l⁻¹ IBA και 1620 mg l⁻¹ PG (James and Thurbon, 1979, 1981).

Η phloroglucinol ελαφρώς ευνόησε τη ριζοβολία τριών ποικιλιών μηλιάς, ενώ δεν είχε καμία επίδραση στις υπόλοιπες 12 ποικιλίες. Επίσης, μείωσε την ποσότητα του κάλου που σχηματίστηκε από τα μοσχεύματα (Zimmerman, 1983; Zimmerman and Fordam, 1985).

Η ριζοβολία του υποκειμένου M.9 Jork αυξήθηκε με την προσθήκη PG (162 mg l⁻¹) κατά τη ριζοβολία στο φως παρουσία 2 mg l⁻¹ IBA. Άλλα φαινολικά (catechol, chlorogenic acid, *p*-coumaric acid και quercetin) δεν έδειξαν την ίδια συνεργιστική επίδραση (Caboni *et al.*, 1992).

Στο Παράρτημα II, δίνονται οι δομές της phloridzin (Σχ. 25), και των phloroglucinol και phloretic acid (Σχ. 26).

1.7.3.9. Επίδραση ποιότητας μικροβλαστών του *Malus sp.* στη ριζοβολία τους

Η ριζοβολία μικροβλαστών του υποκειμένου μηλιάς M.9 δεν σχετίστηκε με μήκος βλαστού μεταξύ 1.0 και 3.5 cm ή με τον αριθμό των φύλλων ανά βλαστό (James and Thurbon, 1981).

Οι μικροβλαστοί μηλιάς που επιλέγονται για ριζοβολία θα πρέπει να είναι παχύς και καλά ανεπτυγμένοι αφού θα βασιστούν στα ενδογενή αποθέματα αμύλου κατά τον εγκλιματισμό και την πρώτη ανάπτυξη στο θερμοκήπιο. Βλαστοί από καλά προσαρμοσμένες, γρήγορα αναπτυσσόμενες καλλιέργειες ριζοβολούν πιο εύκολα από ότι βλαστοί από πρόσφατα εγκατεστημένες ή υπερ-ώριμες ή υαλωμένες καλλιέργειες (Lane, 1992).

1.7.3.10. Επίδραση υποκαλλιέργειας στη ριζοβολία μικροβλαστών του *Malus sp.*

Τα ποσοστά σχηματισμού ριζών *in vitro* από βλαστούς της ποικιλίας 'Jonathan' μετά από 1, 7 και 31 υποκαλλιέργειες ήταν 5, 78 και 95%, αντίστοιχα. Τα επίπεδα γιββερελλίνης στους βλαστούς από την 1^η, 7^η και 31^η υποκαλλιέργεια ήταν 40, 19 και 14 ng ισοδυνάμων GA₃/g ξηρού βάρους ιστού, αντίστοιχα, μία τάση που υποδεικνύει μια αντίστροφη σχέση μεταξύ επιπέδου ενδογενούς γιββερελλίνης και ικανότητας ριζοβολίας. Αυτό είναι σύμφωνο με το γεγονός ότι η εφαρμοζόμενη GA₃ παρεμποδίζει τη ριζοβολία της μηλιάς και πολλών άλλων ειδών. Τα επίπεδα κυτοκινίνης αυξήθηκαν 1.5-2.7 φορές στις τελευταίες υποκαλλιέργειες (τα επίπεδα κυτοκινίνης ανά βλαστό μειώθηκαν ελαφρώς), ενώ η ικανότητα ριζοβολίας αυξήθηκε αισθητά, υποδεικνύοντας ότι η συνεχής υποκαλλιέργεια μπορεί να μειώσει την ευαισθησία του ιστού στις παρεμποδιστικές επιδράσεις των κυτοκινινών (Takeno *et al.*, 1982/83). Κι άλλοι ερευνητές έχουν αναφέρει ότι ο αριθμός των υποκαλλιεργειών μπορεί να προάγει την ικανότητα ριζοβολίας, ως αποτέλεσμα της ανανέωσης, που είναι η μετατροπή από την κανονικά επίμονη ενήλικη φάση σε νεανική (Sriskandarajah and Mullins, 1981; Welander, 1985; Webster and Jones, 1989).

Οι μικροβλαστοί της δύσκολης-να-ριζοβολήσει ποικιλίας μηλιάς 'Jonathan' απέκτησαν μια βελτιωμένη ικανότητα να σχηματίσουν τυχαίες ρίζες με την αύξηση του αριθμού των υποκαλλιεργειών *in vitro*. Η μετάβαση από τη δύσκολη-να-ριζοβολήσει στην εύκολη-να-ριζοβολήσει κατάσταση συνέβη στην τέταρτη υποκαλλιέργεια. Σε όλες τις υποκαλλιέργειες δεν υπήρξε διαφοροποίηση στην περιεκτικότητα των βλαστών σε IAA, αλλά μία μείωση στο περιεχόμενο των βλαστών σε ABA παρατηρήθηκε μετά την τέταρτη μεταφορά. Η αναλογία

IAA/ABA αυξήθηκε από 0.2 στους δύσκολους-να ριζοβολήσουν βλαστούς από την αρχική καλλιέργεια στο 0.7 στους εύκολους-να-ριζοβολήσουν βλαστούς από τη μακράς διάρκειας υποκαλλιέργεια (Noiton *et al.*, 1992).

Από τη μία υποκαλλιέργεια στην άλλη συχνά παρατηρούνται μεγάλες διακυμάνσεις στη ριζοβολία, οι οποίες μπορεί να οφείλονται σε συστηματικές ή τυχαίες διαφορές μεταξύ διαδοχικών πειραμάτων ριζοβολίας. Η ακρίβεια στην προετοιμασία του υποστρώματος δεν είχε σημαντική επίδραση στη ριζοβολία μικροβλαστών της ποικιλίας 'Golden Delicious', ενώ η τοποθέτηση στο θάλαμο ανάπτυξης, η αποθήκευση του υποστρώματος και ο συγκεκριμένος ερευνητής είχε. Έτσι, οι μικροβλαστοί που τοποθετήθηκαν μακριά από τον εξοπλισμό του air-condition σχημάτισαν λιγότερες ρίζες ανά βλαστό που ριζοβόλησε συγκριτικά με την ενδιάμεση ή κοντινή θέση, ενώ το ποσοστό ριζοβολίας δεν επηρεάστηκε. Υπόστρωμα που διατηρήθηκε για 6 ή 12 εβδ. στους 4 °C έδωσε καλύτερη ριζοβολία από φρέσκο υπόστρωμα, ενώ ο ένας από τους τέσσερις ερευνητές είχε πάντα τα καλύτερα αποτελέσματα ριζοβολίας, πιθανότατα λόγω της πιο προσεκτικής επιλογής βλαστών για ριζοβολία (Denissen *et al.*, 1992).

1.7.3.11. Επίδραση άλλων παραγόντων στη ριζοβολία μικροβλαστών του *Malus sp.*

Κατά τους De Klerk and Brugge (1992), η ικανότητα ριζοβολίας των μικρομοσχευμάτων *Malus* εξαρτήθηκε από: 1) το γενετικό τους υπόβαθρο (οι διάφορες ποικιλίες διέφεραν ως προς τη ριζοβολία), 2) το οντογενετικό τους στάδιο (τα μοσχεύματα από νεανικά φυτά ριζοβολούν εύκολα, ενώ η ικανότητα ριζοβολίας χάνεται μερικώς ή ολικώς κατά τη μετάβαση στο ενήλικο στάδιο), 3) την ύπαρξη ληθάργου (μοσχεύματα από φυτά σε λήθαργο συχνά ριζοβολούν δύσκολα), 4) την υάλωση (οι υαλωμένοι μικροβλαστοί είχαν ποσοστό ριζοβολίας 8%, συγκρινόμενο με το 92% των κανονικών βλαστών που ελήφθησαν από τον ίδιο κύκλο υποκαλλιέργειας), 5) τη διάρκεια του τελικού κύκλου πολλαπλασιασμού (ο καλύτερος χρόνος για τη συλλογή βλαστών ήταν 5 ή 6 εβδ. μετά την υποκαλλιέργεια, επειδή νωρίτερα στον κύκλο υποκαλλιέργειας οι βλαστοί είχαν χαμηλή ικανότητα ριζοβολίας), 6) τη συγκέντρωση IBA κατά τον πολλαπλασιασμό (χαμηλές συγκεντρώσεις IBA δεν είχαν καμία επίδραση, ενώ οι υψηλές συγκεντρώσεις οδήγησαν τόσο σε μείωση του πολλαπλασιασμού όσο και σε χαμηλά ποσοστά ριζοβολίας, πιθανότατα επειδή ή υψηλή συγκέντρωση IBA κατά τον πολλαπλασιασμό κατέστησε τους μικροβλαστούς λιγότερο ευαίσθητους στην αυξίνη ή μείωσε την ικανότητά τους να σχηματίσουν ρίζες), 7) το χρόνο εφαρμογής IBA κατά τη μεταχείριση ριζοβολίας (καλλιέργεια των μικροβλαστών για λίγες ημέρες σε βασικό υπόστρωμα ριζοβολίας χωρίς ορμόνες πριν τη μεταχείριση με IBA είχε σαν αποτέλεσμα την

έντονη μείωση της ριζοβολίας) και 8) τις φυσικές συνθήκες (όταν η ριζοβολία έγινε υπό συνεχές φωτισμό, η καμπύλη δόσης IBA-ανταναπόκρισης μετατοπίστηκε προς τα δεξιά, προς τις υψηλότερες συγκεντρώσεις IBA, δηλαδή το φως είχε ελαφρώς παρεμποδιστική επίδραση στις χαμηλές συγκεντρώσεις IBA και ελαφρώς προωθητική επίδραση στις υψηλές συγκεντρώσεις IBA). Επιπλέον, καθόρισαν το χρόνο των κύριων σταδίων σχηματισμού τυχαίων ριζών χρησιμοποιώντας 24-ωρες επεμβάσεις με 0.2 mg l^{-1} BAP κατά τη διάρκεια της κανονικής μεταχείρισης με 0.2 mg l^{-1} IBA. Όταν η επέμβαση με BAP δόθηκε μεταξύ 24-72 ωρών, η ριζοβολία παρεμποδίστηκε ισχυρά και οδήγησε στο συμπέρασμα ότι η διαφοροποίηση των ριζικών καταβολών συνέβη σε αυτό το χρονικό διάστημα. Σε αντιστοιχία με αυτό, 24-ωρες επεμβάσεις με αυξίνη είχαν μέγιστη επίδραση στη ριζοβολία όταν εφαρμόστηκαν σε αυτή τη χρονική περίοδο. Θεωρήθηκε ότι ο χρόνος από 0-24 ώρες αντιπροσώπευσε τη φάση της αποδιαφοροποίησης και ότι η φάση έκπτυξης των ριζικών καταβολών συνέβη μετά τις 72 ώρες, ενώ οι ρίζες αναδύθηκαν από τους βλαστούς μετά από 9 ημέρες.

Οι κατάλληλες συνθήκες των ρυθμιστών ανάπτυξης για ριζοβολία, δηλαδή υψηλά επίπεδα αυξίνης και χαμηλά επίπεδα κυτοκινίνης, απαιτούνται μόνο κατά τη διάρκεια της φάσης προτροπής. Για το υποκείμενο μηλιάς Jork 9, η αποδιαφοροποίηση έγινε από τις 0 έως 24 h, η προτροπή από τις 24 έως 72 ή 96 h και μετά η διαφοροποίηση (De Klerk *et al.*, 1995a). Μελέτη της ανατομίας του σχηματισμού τυχαίων ριζών από μικροβλαστούς της ποικιλίας 'Gala' σε ανταπόκριση του υποστρώματος προτροπής ριζοβολίας αποκάλυψε διαφοροποίηση ευδιάκριτων κυτταρικών στρωμάτων στο ακραίο τέλος των καταβολών μετά από 1 ημέρα, καταβολές με κωνικό σχήμα και αρκετές στρώσεις κυττάρων στο ακραίο τέλος μετά από 2-3 ημέρες, ρίζες με οργανωμένο σύστημα ιστών να αναδύονται από το βλαστό μετά από 4 ημέρες και πολυάριθμες αναδυόμενες ρίζες μετά από 6 ημέρες (Harbage *et al.*, 1993). Μικροβλαστοί του υποκειμένου MM106 που μεταφέρθηκαν στο υπόστρωμα ριζοβολίας με 1 mg l^{-1} IBA στο σκοτάδι μελετήθηκαν από ανατομικής και βιοχημικής άποψης μετά από 0, 3, 5, 7 και 10 ημέρες. Μερικά κύτταρα της καμβιακής ζώνης και του παρακείμενου φλοιώματος έγιναν πιο πυκνά στο κυτόπλασμα και τον πυρήνα και οι πρώτες κυτταρικές διαιρέσεις παρατηρήθηκαν την 3^η ημέρα. Τα μεριστώματα έγιναν ξεχωριστά, αποτελούμενα από πυκνά κύτταρα με μεγεθυμένο πυρήνα σχηματισμένα έξω από το ξύλωμα την 5^η ημέρα. Αναγνωρίσιμες ριζικές καταβολές με κωνικό σχήμα και αρκετές στρώσεις κυττάρων παρουσιάστηκαν την 7^η ημέρα. Ρίζες με οργανωμένο σύστημα ιστών αναδύθηκαν από το βλαστό 10 ημέρες μετά τη μεταχείριση προτροπής ριζοβολίας. Από τις ιστολογικές παρατηρήσεις, μπορεί να λεχθεί ότι το στάδιο προτροπής ριζοβολίας τελείωσε πριν την 3^η

ημέρα. Το στάδιο της έναρξης, με τις πρώτες ιστολογικές διαφοροποιήσεις μέχρι το σχηματισμό των μεριστωμάτων, θα μπορούσε να συσχετιστεί με την παροδική αύξηση της δραστηριότητας της περοξειδάσης (βιοχημικού δείκτη) μέχρι την 5^η ημέρα. Το γεγονός ότι το καλύτερο ποσοστό ριζοβολίας αποκτήθηκε από καλλιέργειες που παρέμειναν στην αυξίνη για 5 ημέρες επιβεβαιώνει αυτή την υπόθεση (Naija *et al.*, 2008).

Μελετώντας την επίδραση μερικών μακροστοιχείων στην ανάπτυξη των ριζών τριών ποικιλιών μηλιάς, η μείωση του επιπέδου NH_4NO_3 στο υπόστρωμα από πλήρης δύναμης στο 1/4 αυτής αύξησε σημαντικά το ποσοστό ριζοβολίας των 'Gala' και 'Royal Gala', αλλά όχι της 'Jonagold', η οποία ριζοβόλησε καλύτερα στη μηδενική συγκέντρωση NH_4NO_3 . Χωρίς NH_4NO_3 , τα ποσοστά ριζοβολίας έφθασαν το 100% και για τις τρεις ποικιλίες, όταν το KNO_3 δόθηκε σε πλήρη δύναμη (Sriskandarajah *et al.*, 1990a). Κατά τη βελτιστοποίηση του υποστρώματος καλλιέργειας για *in vitro* ριζοβολία της ποικιλίας 'Compact Spartan', η εμφάνιση των ριζών και η περαιτέρω ανάπτυξή τους παρεμποδίστηκε από την πολύ επιμηκυμένη μεταχείριση με αυξίνη, την παρουσία NH_4NO_3 και την έλλειψη αερισμού του υποστρώματος, ενώ το $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ προώθησε τη διαφοροποίηση, την ανάδυση και ανάπτυξη των ριζών και βελτίωσε την βιωσιμότητά τους (Druart, 1997).

Διαφορετικοί τύποι, συγκεντρώσεις και συνδυασμοί υδατανθράκων, καθώς και διαφορετικές συγκεντρώσεις αυξίνης και χρόνοι έκθεσης σε αυξίνη διερευνήθηκαν για να βρεθούν οι ιδανικές συνθήκες για διαφοροποίηση ριζών σε τεμάχια βλαστού του υποκειμένου Jork 9. Όταν δεν προστέθηκε ζάχαρη στο υπόστρωμα ριζοβολίας, τα τεμάχια βλαστού παρέμειναν πράσινα, αλλά δε σχημάτισαν ρίζες. Η σουκρόζη ($10\text{-}20 \text{ g l}^{-1}$) προώθησε το σχηματισμό ριζών αλλά και το σχηματισμό κάλου. Η σορβιτόλη χρειάστηκε υψηλότερες συγκεντρώσεις για βέλτιστη ριζοβολία, αλλά μείωσε το σχηματισμό κάλου. Συνδυασμός γλυκόζης και σορβιτόλης ($40/20 \text{ g l}^{-1}$) ή σουκρόζης και μαννιτόλης ($20/10 \text{ g l}^{-1}$) είχε σαν αποτέλεσμα το σχηματισμό ριζών στο 100% των τεμαχίων με περισσότερες από 6 ρίζες ανά τεμάχιο. Επίσης, με το συνδυασμό σουκρόζης/μαννιτόλης, ο χρόνος που απαιτείται για βέλτιστη ριζοβολία μειώθηκε συγκριτικά με άλλους συνδυασμούς. Έκθεση των τεμαχίων βλαστού για 540 λεπτά σε 17 g l^{-1} παρουσία συνδυασμού σουκρόζης/μαννιτόλης είχε ως αποτέλεσμα ριζοβολία στο 100% των δίσκων, τον υψηλότερο αριθμό ριζών ανά δίσκο και το χαμηλότερο ποσοστό σχηματισμού κάλου (Pawlicki and Welander, 1995). Η συγκέντρωση σουκρόζης επηρέασε τον αριθμό τυχαίων ριζών, αλλά σε ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων (1-9%) η επίδραση ήταν μικρή. Επιπλέον, υπήρχε αλληλεπίδραση μεταξύ σουκρόζης και αυξίνης: αύξηση της συγκέντρωσης σουκρόζης μετατόπισε την καμπύλη δόσης-αναταπόκρισης της αυξίνης προς τα δεξιά. Όταν τα 1-mm τεμάχια βλαστού καλλιεργήθηκαν

σε υπόστρωμα χωρίς σουκρόζη για την αρχική περίοδο (0-48 h) η ριζοβολία μειώθηκε, ενώ 48-ωρη καλλιέργεια χωρίς εφαρμογή σουκρόζης δεν είχε καμία επίδραση ή είχε μία ελαφρώς προωθητική επίδραση σε αργότερη περίοδο (48-120 h) (Calamar and De Klerk, 2002).

Το pH βρέθηκε να επηρεάζει τη ριζοβολία των μικρομοσχευμάτων καθορίζοντας την απώλεια του IBA από το υπόστρωμα προτροπής ριζοβολίας, καθώς και την πρόσληψη αυξίνης από τα μικρομοσχεύματα. Μειωμένα επίπεδα pH από 7 σε 5.5 σχετίστηκαν με μεγαλύτερη απώλεια IBA και υψηλότερες μετρήσεις ριζών (Harbage and Stimart, 1996b).

Συγκεντρώσεις άγαρ από 4.5-8.5 g l⁻¹ δεν επηρέασαν τη ριζοβολία δύο ποικιλιών που εξετάστηκαν. Ο αποπρασινισμός (etiolation) των καλλιεργειών πολλαπλασιασμού, ακολουθούμενος αρκετές ημέρες ξαναπρασινίσματος, βελτίωσε τη ριζοβολία σε τέσσερις ποικιλίες (Zimmerman, 1983).

Κατά τους Kataeva and Butenko (1987), η ιδανική θερμοκρασία για σχηματισμό ριζών ήταν 24-26 °C, ενώ υψηλότερες (28 °C) ή κατώτερες (20-22 °C) θερμοκρασίες μερικώς ανέστειλαν τη ριζοβολία.

Το αιθυλένιο δε βρέθηκε να εμπλέκεται στο σχηματισμό ριζών σε μικρομοσχεύματα μηλιάς (Harbage and Stimart, 1996a).

1.7.4. Εγκλιματισμός του *Malus* sp.

Ο εγκλιματισμός των *in vitro* μικροπολλαπλασιασμένων ξυλωδών φυτών είναι ένα κρίσιμο πρόβλημα του μεγάλης κλίμακας πολλαπλασιασμού. Η ποιότητα των φυτών (μέγεθος και ρίζες), οι εποχιακές διαφορές και η χρήση υγραντήρα αέρα αντί για περιοδική υδρονέφωση αποδείχτηκαν να είναι οι πιο σημαντικοί παράγοντες για επιβίωση φυτών υποκειμένων *Malus* M.26 και *Prunus* GF. 31. Έτσι, φυτά με καλό ριζικό σύστημα και απλωμένα φύλλα επιβίωσαν σε υψηλότερο ποσοστό περισσότερο από 20% από τα άρριζα μικρότερα φυτά. Το ποσοστό επιβίωσης αυτόριζων ποικιλιών μηλιάς σταθερά αυξήθηκε από το Φεβρουάριο μέχρι τον Ιούνιο, ενώ υπήρξε σημαντική διαφορά μεταξύ των ποικιλιών με τις πιο σφριγηλές να λειτουργούν καλύτερα. Φυτά που εγκλιματίστηκαν υπό συνθήκες θερμοκηπίου ήταν πιο υγιή και αναπτύχθηκαν ταχύτερα από φυτά στην υδρονέφωση, αν και τα αποτελέσματα διέφεραν ανάλογα με τη διάρκεια παραμονής στην υδρονέφωση. Εάν τα φυτά απομακρύνονταν μετά από 3 εβδομάδες στην υδρονέφωση, το ποσοστό επιβίωσης ήταν παρόμοιο με αυτό των συνθηκών θερμοκηπίου, ενώ αν παρέμεναν στην υδρονέφωση σε μη σκιαζόμενο θάλαμο αποκτούσαν ξηράνσεις και μεγάλη ποσότητα πέθαινε. Εάν εγκλιματίζονταν μέχρι τα μέσα Ιουνίου, τα υποκείμενα μπορούσαν να εμβολιαστούν τον Αύγουστο και να χρησιμοποιηθούν τον ίδιο χρόνο. Το σύστημα υδρονέφωσης μπορεί να

φανεί χρήσιμο στην επιτάχυνση του εγκλιματισμού, όμως θα πρέπει να εφαρμόζεται με μεγάλη προσοχή (Vértesy and Balla, 1987).

Σε φύλλα που εξαιρέθηκαν από *in vitro* καλλιεργημένα φυτά *Malus domestica* cv. Mac 9, τα οποία είχαν εκτεθεί σε χαμηλή υγρασία (30-40% σχετική υγρασία (RH) για 0 έως 6 ημέρες), και από εγκλιματισμένους μάρτυρες στο θερμοκήπιο μετρήθηκαν το σχετικό περιεχόμενο νερού (RWC) και το ποσοστό κλεισίματος των στοματίων. Το RWC των εξαιρεμένων φύλλων που εκτέθηκαν σε χαμηλή RH για 0 ή 1 ημέρα ήταν σημαντικά υψηλότερο από αυτό φύλλων που εκτέθηκαν 4.5 ημέρες ή των εγκλιματισμένων στο θερμοκήπιο φυτών. Η ταχύτητα κλεισίματος των στοματίων μετά την εξαίρεση των φύλλων αυξήθηκε με τη διάρκεια έκθεσης των φυτών στη χαμηλή υγρασία. Ο ρυθμός απώλειας νερού από τα εξαιρεμένα φύλλα σχετίστηκε γραμμικά με το κλείσιμο των στοματίων. Τα φύλλα από *in vitro* καλλιεργημένα φυτά συστηματικά έχασαν περισσότερο νερό από τα φύλλα θερμοκηπίου σε αντίστοιχα ποσοστά κλεισίματος των στοματίων. Αυτά τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι τα φύλλα από *in vitro* καλλιεργημένα φυτά μηλιάς μπορούν να εγκλιματιστούν σε χαμηλή υγρασία μέσα σε 4 έως 5 ημέρες έκθεσης σε 30 έως 40% σχετική υγρασία και ο εγκλιματισμός με χαμηλή υγρασία οδήγησε στην ανάπτυξη μιας επιταχυμένης ανταπόκρισης των στοματίων (Brainerd and Fuchigami, 1981).

Μελετήθηκαν οι σχετικές συνεισφορές της στοματικής και επιδερμικής απώλειας νερού στην αφυδάτωση των φύλλων των ιστοκαλλιεργημένων φυτών μηλιάς (*Malus domestica*), κερασιάς (*Prunus avium* x *P. pseudocerasus*) και sweetgum (*Liquidambar styraciflua*) μετά την απομάκρυνση από την καλλιέργεια. Η αγωγιμότητα από την άνω και κάτω επιφάνεια του φύλλου μετρήθηκε σε φυτά αμέσως μετά την απομάκρυνση από την καλλιέργεια, μετά τον εγκλιματισμό και μετά από έκθεση σε υδατικό stress. Σε όλα τα είδη, η στοματική αγωγιμότητα μειώθηκε σημαντικά μετά τον εγκλιματισμό. Η αγωγιμότητα της επιδερμίδας ήταν σημαντική υπό κάποιες συνθήκες και μπορεί να οφειλόταν σε ζημιά που έγινε από την αφυδάτωση του ιστού. Τα τρία είδη είχαν σχετικά διαφορετικές αποκρίσεις στο υποβαλλόμενο υδατικό stress, οι οποίες φάνηκαν να σχετίζονται με διαφορές στη λειτουργία των στοματίων, στην ακεραιότητα της επιδερμίδας και στο βαθμό εγκλιματισμού (Sutter, 1988).

Μικροπολλαπλασιασμένοι βλαστοί και φυτάρια (έρριζοι βλαστοί) του *Malus pumila* 'Greensleeves' εγκλιματίστηκαν με έκθεσή τους σε μια γραμμική μείωση της σχετικής υγρασίας (RH) από 99% σε 75% μέσα σε 4 ημέρες. Όταν η αγωγιμότητα των φύλλων μετρήθηκε σε 95% RH, οι *in vitro* βλαστοί και φυτάρια επέδειξαν πολύ υψηλή αρχική αγωγιμότητα, ακολουθούμενη από βαθμιαία μείωση, φθάνοντας τη σταθερή κατάσταση σε

12 ώρες. Οι εγκλιματισμένοι βλαστοί και φυτάρια είχαν 50% χαμηλότερη αρχική αγωγιμότητα συγκρινόμενοι με τους μη εγκλιματισμένους και έφτασαν τη σταθερή κατάσταση στις 4 ώρες. Η μείωση της αγωγιμότητας των φύλλων ως αποτέλεσμα του εγκλιματισμού πιθανότατα συντελεί στη μειωμένη αναπνοή υπό συνθήκες αυξημένης εξατμιστικής ζήτησης. Οι *in vitro* σχηματισμένες ρίζες σχετίστηκαν με μια υψηλότερη υδατική κατάσταση των φυτών, υποδεικνύοντας ότι αυτές οι ρίζες ήταν λειτουργικές στην πρόσληψη νερού. Το σχετικό περιεχόμενο νερού του βλαστού συσχετίστηκε θετικά με την αγωγιμότητα του φύλλου και την καθαρή φωτοσύνθεση. Προτείνεται ότι τα μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια συμπεριφέρονται σαν υδραυλικά ολοκληρωμένες μονάδες, στις οποίες πρέπει να υπάρχει συντονισμός μεταξύ της απώλειας νερού από το βλαστό και της πρόσληψης νερού από τη ρίζα για να διατηρηθεί μια ευνοϊκή υδατική ισορροπία στο φυτό. Τα αποτελέσματα επίσης δείχνουν ότι μέθοδοι που χρησιμοποιούν εξαιρεμένους βλαστούς ή φύλλα για να υπολογίσουν την αναπνοή βαρομετρικά μπορεί να μην αντιπροσωπεύουν επακριβώς τα χαρακτηριστικά στοματικής απώλειας νερού από τα μικροπολλαπλασιασμένα φυτά (Díaz-Peréz *et al.*, 1995a).

Εξετάστηκαν η επίδραση του εγκλιματισμού στην υδατική κατάσταση του φυτού μετά την απομάκρυνση των φυτών από την καλλιέργεια και τη μεταφύτευση στο χώμα, καθώς και η σχέση υδατικής κατάστασης με την επιβίωση και την ανάπτυξη μετά τον εγκλιματισμό. Μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια του *Malus pumila* 'Greensleeves' εγκλιματίστηκαν με έκθεση σε 4-ημερη σταδιακή μείωση της υγρασίας πριν τη μεταφύτευση. Από τη στιγμή που τα φυτά μεταφυτεύθηκαν, τα εγκλιματισμένα φυτάρια διατήρησαν ένα υψηλότερο σχετικό υδατικό περιεχόμενο από τα μη-εγκλιματισμένα φυτά, πιθανά λόγω μιας χαμηλότερης αρχικής στοματικής αγωγιμότητας και λιγότερης αναπνοής. Η υψηλή υδατική κατάσταση του φυτού, όπως υποδεικνύεται από το υψηλό σχετικό υδατικό περιεχόμενο, φάνηκε να είναι ένας σημαντικός παράγοντας τόσο για την επιβίωση του φυτού όσο και για την ανάπτυξη μετά τη μεταφύτευση των φυτών και σχετίστηκε με υψηλούς ρυθμούς ανάπτυξης και ποσοστά καθαρής αφομοίωσης. Συγκρινόμενα με τα *in vitro* φυτά, τα μεταφυτευμένα φυτά είχαν υψηλότερη υδατική κατάσταση και υψηλότερη αγωγιμότητα φύλλων και καθαρή φωτοσύνθεση. Υπήρξε επίσης αύξηση στην αναλογία φυλλικής επιφάνειας (λόγος φυλλικής επιφάνειας προς φυτική βιομάζα) μετά τη μεταφύτευση, η οποία μπορεί να είχε συνεισφέρει στο υψηλότερο ποσοστό καθαρής αφομοίωσης στα μεταφυτευμένα συγκριτικά με τα *in vitro* φυτά (Díaz-Peréz *et al.*, 1995b).

1.7.5. Βλαστογένεση του *Sorbus* sp.

1.7.5.1. Απολύμανση εκφύτων του *Sorbus* sp.

Κατά τον μικροπολλαπλασιασμό των *S. aucuparia* και *S. torminalis*, η μέθοδος απολύμανσης, που χρησιμοποιήθηκε όταν ενεργά αναπτυσσόμενοι βλαστοί χρησιμοποιήθηκαν ως αρχικά έκφυτα, περιελάμβανε απομάκρυνση των φύλλων, κόψιμο των βλαστών σε τμήματα μήκους 1-2 cm, με ένα ή δύο οφθαλμούς, επιφανειακή απολύμανση με ένα αραιό διάλυμα υποχλωριώδους ασβεστίου $[Ca(ClO)_2]$ ή χλωρίδιο του υδραργύρου ($HgCl_2$) για 15-40 min και τρία ξεπλύματα με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό. Η μόλυνση των βλαστών ήταν ελάχιστη αμέσως μετά την έκπτυξη την άνοιξη, ενώ η απολύμανση το φθινόπωρο και το χειμώνα ήταν δύσκολη. Οι βλαστοί που συλλέγονταν το χειμώνα συνήθως τοποθετούνταν σε νερό και φορτσάρονταν στο εργαστήριο υπό συνεχές φως. Μετά το σχηματισμό των νέων βλαστών από τους χειμερινούς οφθαλμούς, τα λέπια των οφθαλμών αφαιρούνταν και οι βλαστοί χρησιμοποιούνταν ως αρχικά έκφυτα (Chalupa, 1992).

1.7.5.2. Θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας του *Sorbus* sp.

Από τα θρεπτικά υποστρώματα που δοκιμάστηκαν στην καλλιέργειών βλαστών και κάλου των *S. aucuparia* και *S. torminalis* [GD (Gresshoff and Doy, 1972), MS, BTM (Chalupa, 1981, 1984) και WPM], καλύτερη ανάπτυξη και υψηλότερος ρυθμός πολλαπλασιασμού αποκτήθηκε στο υπόστρωμα MS (Chalupa, 1992, 2002). Επίσης, κατάλληλο υπόστρωμα ανάπτυξης για πολλαπλασιασμό πολύτιμων πληθυσμών των δασικών ειδών *S. domestica*, *S. torminalis*, *Prunus avium*, *Malus sylvestris* και *Pyrus pyraster* από αποκομμένες κορυφές πλήρως ανεπτυγμένων χειμερινών οφθαλμών μέσω προτροπής οργανογένεσης ήταν το MS (Malá *et al.*, 1999).

1.7.5.3. Επίδραση φυτορρυθμιστικών ουσιών στη βλαστογένεση του *Sorbus* sp.

Κορυφές βλαστών και κομβικά τμήματα του *S. torminalis* καλλιιεργήθηκαν για πολλαπλασιασμό των βλαστών σε υπόστρωμα MS με 0.6 mg l^{-1} BAP και 0.1 mg l^{-1} IBA (Chalupa, 1983). Ο πολλαπλασιασμός βλαστών του *S. aucuparia* παρακινήθηκε από την BAP σε συγκέντρωση $0.2\text{-}2.0 \text{ mg l}^{-1}$ και από το thidiazuron σε συγκέντρωση $0.005\text{-}0.05 \text{ mg l}^{-1}$ (Chalupa, 1985). Χαμηλές συγκεντρώσεις BAP ($0.2\text{-}1.0 \text{ mg l}^{-1}$) προώθησαν το σχηματισμό πλευρικών βλαστών και την επιμήκυνση των βλαστών του *S. aucuparia*, ενώ το TDZ επέδειξε υψηλή δραστηριότητα κυτοκινίνης σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις ($0.002\text{-}0.05 \text{ mg l}^{-1}$) δίνοντας μεγάλο αριθμό βλαστών (Chalupa, 1987).

Μικροπολλαπλασιασμός από σπορόφυτα και ενήλικα δένδρα του *S. domestica* επιτεύχθηκε μέσω καλλιέργειας εκφύτων κορυφής βλαστού ή κόμβου. Τα έκφυτα από σπορόφυτα εγκαταστάθηκαν σε υψηλότερο ποσοστό (85-100%) από τα ώριμα έκφυτα (60%). Η BA ήταν γενικά πιο αποτελεσματική από την kinetin στον πολλαπλασιασμό των βλαστών, με το τελικό μέγεθος των σχηματισθέντων βλαστών να εξαρτάται κυρίως από τον τύπο της κυτοκινίνης και τη χρησιμοποιηθείσα συγκέντρωση. Η ιδανική συγκέντρωση για ανάπτυξη βλαστών ήταν 5.0 mg l⁻¹ για την kinetin και μεταξύ 0.5 και 1.0 mg l⁻¹ για τη BA, ενώ το μεγαλύτερο μήκος αποκτήθηκε παρουσία 1.0 mg l⁻¹ BA (Arrillaga *et al.*, 1991).

Για την έναρξη *in vitro* καλλιέργειας των *S. aucuparia* και *S. torminalis*, χρησιμοποιούταν ένα υπόστρωμα MS με χαμηλή συγκέντρωση κυτοκινίνης (BAP ή PBA ή thidiazuron) και αυξίνης (IBA ή NAA), ενώ τα έκφυτα μεταφέρονταν σε φρέσκο υπόστρωμα, όταν απελευθερώνονταν πολυφαινολικά συστατικά. Η BAP σε συγκέντρωση 0.2-2.0 mg l⁻¹ και το thidiazuron σε συγκέντρωση 0.005-0.05 mg l⁻¹ προώθησαν τον πολλαπλασιασμό των βλαστών, ενώ οι βλαστοί που παράχθηκαν σε υποστρώματα με υψηλότερη συγκέντρωση κυτοκινίνης (BAP 2.0-4.0 mg l⁻¹ ή thidiazuron 0.05-0.1 mg l⁻¹) ήταν πολυάριθμοι και κοντοί. Γενικά, ο αριθμός των παραγόμενων βλαστών στα υποστρώματα με κυτοκινίνη αυξήθηκε με αύξηση της συγκέντρωσης κυτοκινίνης, ενώ το μήκος των βλαστών μειώθηκε (Chalupa, 1992).

Ο σχηματισμός μακρύτερων βλαστών σε τμήματα κόμβων ώριμων δένδρων του *S. aucuparia* προωθήθηκε σε υπόστρωμα MS με χαμηλή συγκέντρωση BA (0.2-0.4 mg l⁻¹) μαζί με IBA (0.1 mg l⁻¹), ενώ στα υποστρώματα με υψηλότερη συγκέντρωση BA (0.6-1.0 mg l⁻¹) σχηματίστηκαν πολυάριθμοι βλαστοί, οι οποίοι όμως ήταν κοντοί. Στο υπόστρωμα MS με TDZ (0.005-0.01 mg l⁻¹) μαζί με IBA (0.1-0.2 mg l⁻¹) επίσης προωθήθηκε ο σχηματισμός και πολλαπλασιασμός των βλαστών, αν και στα υποστρώματα με TDZ οι παραγόμενοι βλαστοί γενικά ήταν κοντότεροι (Chalupa, 2002).

Οι Jámbo-Benczúr *et al.* (1997) καλλιέργησαν βλαστούς του *S. rotundifolia* σε υπόστρωμα ½MS με 0.75 mg l⁻¹ BA, 0.1 mg l⁻¹ IBA και 0.1 mg l⁻¹ GA₃, μαζί με 5-30 g l⁻¹ σακχαρόζη ή γλυκόζη. Οι άριστες συγκεντρώσεις σακχαρόζης και γλυκόζης ήταν 15 και 20 g l⁻¹, αντίστοιχα.

Κατά τον πολλαπλασιασμό της ουγγρικής ποικιλίας *S. redliana* 'Buroknölgy', ο υψηλότερος αριθμός βλαστών παρατηρήθηκε χρησιμοποιώντας συνδυασμό 0.25-1.0 BA και 0.05 IBA (mg l⁻¹), ενώ η προσθήκη 0.5-2.0 kinetin και 0.05 IBA (mg l⁻¹) μείωσε τον αριθμό των βλαστών και αύξησε το μέγεθος των φύλλων (Ördögh *et al.*, 2006).

Υψηλότερο ρυθμός πολλαπλασιασμού των βλαστών του *S. torminalis* επιτεύχθηκε στα υποστρώματα με BAP συγκριτικά με αυτά που περιείχαν mT και MeOBAPR (Malá *et al.*, 2009).

Για το *S. domestica*, έχει ακόμη αναφερθεί καλογένεση και σωματική εμβρυογένεση από καλλιέργεια ανθήρων σε υποστρώματα με BA και IBA ή IAA (Arrillaga *et al.*, 1995), καθώς και σχηματισμός κάλου και τυχαία αναγέννηση βλαστών από καλλιέργεια υποκοτυλίου σε υποστρώματα με BA και IAA, ενώ τα έκφυτα υποκοτυλίου που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα με NAA και/ ή BA σχημάτισαν μόνο κάλο και ρίζες (Arrillaga and Segura, 1992).

1.7.6. Ριζογένεση του *Sorbus* sp.

Κατά το μικροπολλαπλασιασμό του *S. domestica* από σπορόφυτα και ενήλικα δένδρα, στις καλύτερες μεταχειρίσεις, ριζοβόλησε το 75-85% των βλαστών από νεανικό υλικό, ενώ η ικανότητα ριζοβολίας των βλαστών από ενήλικα έκφυτα ήταν χαμηλότερη (30%) (Arrillaga *et al.*, 1991).

Ριζοβολία *in vitro* του *S. domestica*, επιτεύχθηκε με εμβάπτιση κάθε βλαστού σε διάλυμα με 1000 mg l⁻¹ IBA και ακολούθως καλλιέργεια σε υπόστρωμα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, του οποίου τα ανόργανα άλατα είχαν μειωθεί στο μισό, οπότε περισσότεροι από τους μισούς βλαστούς ριζοβόλησαν μετά από 4 εβδομάδες. Αύξηση του IBA στα 2000 ή 3000 mg l⁻¹ βελτίωσε την ικανότητα ριζοβολίας, αλλά οδήγησε στο σχηματισμό παχιών, αδιακλάδωτων ριζών, οι οποίες δεν επέτρεψαν στα φυτάρια να ξεπεράσουν τη φάση εγκλιματισμού (Piagnani and Bassi, 2000).

Μικροβλαστοί του *S. aucuparia* που προέρχονταν από νεανικά μέρη ώριμων δένδρων επέδειξαν καλή ανταπόκριση στη ριζοβολία (ποσοστά ριζοβολίας 70-80%) και τα παραγόμενα φυτά ήταν καλά προσαρμοσμένα να αναπτυχθούν σε δασικά εδάφη (Chalupa, 2002).

Οι επιδράσεις των αρωματικών παραγώγων κυτοκινίνης BAP, mT και MeOBAPR στο υπόστρωμα πολλαπλασιασμού των βλαστών στην ακόλουθη ριζοβολία των μικροβλαστών του *S. torminalis* διερευνήθηκαν από τη Malá *et al.* (2009). Τα ποσοστά ριζοβολημένων φυταρίων ήταν χαμηλότερα (7±3%) στους μικροβλαστούς που είχαν πολλαπλασιαστεί σε BAP συγκριτικά με τις άλλες κυτοκινίνες (8.7-15.3±2.5-3.5%). Η συγκέντρωση του BAP9G, ενός σημαντικού μεταβολίτη ύποπτου να είναι υπεύθυνος για παρεμπόδιση ριζοβολίας και προβλήματα εγκλιματισμού των προσφάτως σχηματισθέντων φυταρίων, βρέθηκε να είναι η υψηλότερη στους μικροβλαστούς που αναπτύσσονταν σε υποστρώματα με BAP, ενώ και τα επίπεδα των πιο δραστικών ενδογενών ισοπρενοειδών κυτοκινίνης tZ, tZR και iPR, καθώς

και οι Ο-γλυκοζίτες ήταν υψηλότερα στα έκφυτα που είχαν μεταχειριστεί με BAP, το οποίο μπορεί να είναι αποτέλεσμα της υψηλής πρόσληψης BAP από τα έκφυτα που αναπτύσσονται σε αυτή την κυτοκινίνη. Τέλος, τα επίπεδα του ελεύθερου IAA των φυταρίων που αναπτύχθηκαν σε υποστρώματα με BAP ήταν τα χαμηλότερα, το οποίο είναι πάλι σύμφωνο με την απώλεια της ικανότητας ριζοβολίας.

In vitro πολλαπλασιασμένοι βλαστοί του *S. domestica* μεταχειρίστηκαν, για πρόκληση ριζοβολίας, με 2 mg I⁻¹ IBA για όλη τη φάση ριζοβολίας, με γρήγορη εμβάπτυση του βασικού τμήματος των μικρομοσχευμάτων σε διάλυμα 2 g I⁻¹ IBA για 1 ή 10 min και μεταφορά σε χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες υπόστρωμα με άγαρ, με εμβάπτυση των βασικών τμημάτων σε διάλυμα 20 g I⁻¹ σουκρόζης που περιείχε αυξημένες συγκεντρώσεις IBA (0-100 mg I⁻¹) για 1 ή 5 ημέρες και μεταφορά σε χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες υπόστρωμα με άγαρ ή με εμβάπτυση των βασικών τμημάτων των μικροβλαστών σε διάλυμα 20 g I⁻¹ σουκρόζης που περιείχε 80 mg I⁻¹ IBA για 1 ημέρα και μεταφορά σε χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες υπόστρωμα με ή χωρίς άγαρ και με ή χωρίς βερμικουλίτη. Η καλύτερη αντίδραση όσον αφορά τη ριζοβολία αποκτήθηκε με την προτροπή με διάλυμα 80 mg I⁻¹ IBA που εφαρμόστηκε για 1 ημέρα και μεταφορά σε υγρό υπόστρωμα με βερμικουλίτη, οπότε ριζοβόλησε το 80% των μικρομοσχευμάτων (Caboni *et al.*, 2009).

1.7.7. Εγκλιματισμός του *Sorbus sp.*

Φυτάρια του *S. domestica* από σπορόφυτα και ενήλικα δένδρα εγκαταστάθηκαν εύκολα στο χώμα και το ποσοστό επιβίωσης των φυτών και από τις δύο προελεύσεις ήταν 70% (Arrillaga *et al.*, 1991), ενώ φυτάρια του ίδιου είδους, που ριζοβόλησαν μετά από εμβάπτυση της βάσης τους σε διάλυμα 80 mg I⁻¹ IBA για 1 ημέρα και μεταφορά σε υγρό υπόστρωμα με βερμικουλίτη, εγκλιματίστηκαν σε ποσοστό 98% (Caboni *et al.*, 2009).

Η επιβίωση των μικροπολλαπλασιασμένων δένδρων του *S. aucuparia* που φυτεύτηκαν σε πειραματικά τεμάχια ήταν υψηλή και οι απώλειες το χειμώνα ήταν χαμηλές. Η πηγή των εκφύτων από τα ενήλικα δένδρα επηρέασε σημαντικά την ανάπτυξη των μικροπολλαπλασιασμένων δένδρων και μετά από πέντε χρόνια ανάπτυξης, το ύψος και η διάμετρος μόνο των φυτών από τα νεανικά μέρη των ώριμων δένδρων ήταν συγκρίσιμες με τις διαστάσεις δένδρων προερχόμενων από σπόρους (Chalupa, 2002).

Μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια προερχόμενα από ένα 90+ ετών αργά αναπτυσσόμενο δένδρο *S. domestica* εγκλιματίστηκαν με επιτυχία στο *ex vitro* περιβάλλον. Τα *in vitro* ριζοβολημένα φυτάρια ήδη είχαν ξεκινήσει τη λιγνιτοποίηση των κυττάρων του ξύλου, ενώ η ανάπτυξη των ξυλωδών ιστών ήταν αργή τις πρώτες μέρες μετά τη μεταφορά στις *ex vitro*

συνθήκες και αυξήθηκε μεταξύ της 7^{ης} και 35^{ης} ημέρας. Ο πρώιμος σχηματισμός ξύλου κατά τον *in vitro* εγκλιματισμό παρείχε στα εύθραυστα φυτάρια μηχανική υποστήριξη για να αντιμετωπίσουν καλύτερα την κακοδιαμόρφωση και τους μηχανικούς τραυματισμούς κατά τις ακόλουθες μεταφυτεύσεις (Đurković and Mišalová, 2009).

1.8. *In vitro* πολλαπλασιασμός ενήλικων και νεανικών φυτών

Το θέμα του μικροπολλαπλασιασμού με τη χρήση εκφύτων από ενήλικα ή νεανικά φυτά έχει αποτελέσει αντικείμενο μελέτης αρκετών εργασιών, κυρίως λόγω των διαφορών που παρουσιάζουν στην έναρξη *in vitro* καλλιέργειας, στο δυναμικό πολλαπλασιασμού των βλαστών και στην ικανότητα ριζοβολίας των μικροβλαστών, διαφορές που εξετάστηκαν και κατά τη διερεύνηση του *in vitro* πολλαπλασιασμού του *xM. florentina*.

Μικροπολλαπλασιασμός από σπορόφυτα και ενήλικα δένδρα του *Sorbus domestica* επιτεύχθηκε μέσω καλλιέργειας εκφύτων κορυφής βλαστού ή κόμβου. Τα έκφυτα από σπορόφυτα εγκαταστάθηκαν σε υψηλότερο ποσοστό (85-100%) από τα ώριμα έκφυτα (60%). Η ικανότητα ριζοβολίας των βλαστών από νεανικό υλικό ήταν υψηλότερη (75-85%) από αυτή των βλαστών από ενήλικα έκφυτα (30%). Τα φυτάρια και από τις δύο προελεύσεις εγκαταστάθηκαν εύκολα στο χώμα σε ποσοστό 70% (Arrillaga *et al.*, 1991).

Ο *in vitro* πολλαπλασιασμός ώριμων δένδρων των *S. aucuparia* και *S. torminalis* ήταν δυσκολότερος από αυτό των σποροφύτων και των νέων δένδρων, ενώ οι ρυθμοί πολλαπλασιασμού των βλαστών καλλιεργειών εγκατεστημένων από ώριμα δένδρα ήταν σημαντικά χαμηλότεροι από όσες ξεκίνησαν από νεαρά σπορόφυτα. Όμως διαφορετικά μέρη ενός ενήλικου δένδρου συχνά βρίσκονται σε διαφορετικό βαθμό ωριμότητας, όπως συμβαίνει με τα βασικά μέρη των ώριμων δένδρων που συχνά περιλαμβάνουν ιστούς με υψηλό βαθμό νεανικότητας (Chalupa, 1992, 2002). Έτσι, για τον μικροπολλαπλασιασμό ώριμων δένδρων, συχνά χρησιμοποιήθηκαν ως αρχική πηγή εκφύτων μέρη του δένδρου που διατηρούν τα νεανικά χαρακτηριστικά για πολύ χρόνο, όπως είναι οι βλαστοί που αναπτύσσονται από τις ρίζες ή τη βάση του κορμού (παραφυάδες), ενώ έχει επιτευχθεί μικροπολλαπλασιασμός και όταν οι βλαστοί συλλέχθηκαν από κλαδιά της κόμης (Chalupa, 1992). Όμως, έκφυτα από νεανικά μέρη ώριμων δένδρων του *S. aucuparia*, όπως είναι τα χαμηλότερα κλαδιά και οι βλαστοί πάνω στον κορμό, επέδειξαν υψηλότερους συντελεστές πολλαπλασιασμού των βλαστών συγκριτικά με τα έκφυτα από κλαδιά των κορυφαίων τμημάτων των δένδρων (Chalupa, 2002).

Ως έκφυτα για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό του *Fraxinus ornus* χρησιμοποιήθηκαν κορυφές βλαστών και έκφυτα κόμβων ασηπτικά αναπτυσσόμενων σποροφύτων ή κορυφές

βλαστών από ενήλικα δένδρα. Και οι δύο τύποι εκφύτων εγκαταστάθηκαν *in vitro* σε υψηλά ποσοστά (90-100%), ενώ και κατά το στάδιο πολλαπλασιασμού βλαστών, η αντίδραση των καλλιέργειών από ενήλικο φυτό ήταν παρόμοια με αυτή του νεανικού υλικού. Αντίθετα, η ικανότητα ριζοβολίας των βλαστών από ενήλικα έκφυτα ήταν κάπως χαμηλότερη (50%) από αυτή των νεανικών εκφύτων (71%) (Arrillaga *et al.*, 1992).

Καλλιέργειες βλαστών του *Quercus rubra* εγκαταστάθηκαν από νεανικό και ενήλικο φυτικό υλικό, από 3-μηνών και 4-ετών σπορόφυτα αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο και από 30-40 ετών δένδρα, αντίστοιχα. Τα αρχικά έκφυτα από επικορμικούς βλαστούς σχηματισμένους στη ζώνη της βάσης του κορμού των ενήλικων δένδρων είχαν μεγαλύτερη ικανότητα για εγκατάσταση *in vitro* (31-85%) από έκφυτα από τα κλαδιά της κόμης (4-24%). Τα έκφυτα από σπορόφυτα ηλικία 3-μηνών εγκαταστάθηκαν *in vitro* σε υψηλότερο ποσοστό (40%) από τα σπορόφυτα των 4-ετών (18.8%). Ο γονότυπος επέδρασε στην παραγωγή βλαστών, αν και οι κλώνοι από ενήλικη προέλευση είχαν την πιο φτωχή απόδοση (Vieitez *et al.*, 1993).

In vitro καλλιέργεια του *Artocarpus heterophyllus* (Moraceae) εγκαταστάθηκε από επάκριους οφθαλμούς που συλλέχθηκαν από ώριμα δένδρα. Βλαστοί που πολλαπλασιάστηκαν στις αρχικές υποκαλλιέργειες είχαν ώριμη μορφολογία και ήταν δύσκολοι στη ριζοβολία (5-40%), ενώ βλαστοί που αναπτύχθηκαν σε προχωρημένες υποκαλλιέργειες θεωρήθηκαν σαν νεανικοί και μπόρεσαν να ριζοβολήσουν με 60-80% επιτυχία χρησιμοποιώντας $\frac{1}{2}$ MS και 2 mg Γ^{-1} IBA ή NAA (Amin and Jaiswal, 1993).

Αξιολογήθηκε *in vitro*, η ικανότητα ριζοβολίας των μικροπολλαπλασιασμένων βλαστών από νεανικά και ενήλικα έκφυτα του *Pinus pinaster*, που προήλθαν από σπορόφυτα που φύτευαν *in vitro* και δένδρα ηλικίας 17 ετών, αντίστοιχα. Τα διάφορα χαρακτηριστικά ριζοβολίας που παρατηρήθηκαν, δηλαδή το ποσοστό ριζοβολίας, ο αριθμός και το μήκος των τυχαίων ριζών, επηρεάστηκαν σημαντικά από την ηλικία του μητρικού φυτού: το 98% των βλαστών από νεανικά έκφυτα ριζοβόλησε έναντι του 49% των βλαστών από ώριμα έκφυτα. Η προσθήκη AC (20 g Γ^{-1}) στο υπόστρωμα ριζοβολίας βελτίωσε τη συνολική ικανότητα ριζοβολίας των ώριμων εκφύτων από 21% σε 78% (Dumas and Monteuis, 1995).

Αναγέννηση τυχαίων βλαστών επιτεύχθηκε από φύλλα της αμυγδαλιάς *Prunus dulcis* cv. Boa Casta, που ελήφθησαν από *in vitro* καλλιέργειες νεανικού και ενήλικου υλικού. Τα έκφυτα φύλλου νεανικής προέλευσης έδωσαν υψηλότερα ποσοστά αναγέννησης (40% περίπου) και χρειάστηκαν υψηλότερη συγκέντρωση TDZ για προτροπή βλαστών (1.4 ή 1.8 mg Γ^{-1}) από ότι φύλλα ενήλικης προέλευσης, με ποσοστό αναγέννησης 28.9% στα 1.2 mg Γ^{-1} TDZ (Miguel *et al.*, 1996).

Έκφυτα του κυπαρισσιού *Cupressus sempervirens* από φυτά διαφόρων ηλικιών (ηλικίας πέντε εβδομάδων σπορόφυτα, 15 ετών δένδρα, περισσότερο από 150 ετών δένδρα) καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα SH (Schenk and Hilbebrandt, 1972) με 1.1 mg l^{-1} BA και 0.02 mg l^{-1} NAA για έκπτυξη των οφθαλμών και ο αριθμός των βλαστών ανά έκφυτο ήταν υψηλότερος (4.5) για το υλικό που συλλέχθηκε από τα πέντε εβδομάδων σπορόφυτα. Ήταν απαραίτητο οι οφθαλμοί να μεταφερθούν στο βασικό υπόστρωμα SH χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για περαιτέρω ανάπτυξη, ενώ για επιμήκυνση των βλαστών προστέθηκε 0.1 g l^{-1} AC στο υπόστρωμα χωρίς ορμόνες. Για ριζοβολία, πιο αποτελεσματική ήταν η μεταχείριση που περιελάμβανε 7 ημερών καλλιέργεια σε υπόστρωμα με 2.0 mg l^{-1} IBA. Η ηλικία των φυτών από τα οποία συλλέχθηκαν τα αρχικά έκφυτα ισχυρά επηρέασε όλες τις φάσεις του *in vitro* πολλαπλασιασμού: ο ρυθμός πολλαπλασιασμού, η επιτυχία ανάπτυξης και η ριζοβολία ήταν υψηλότερα για τα έκφυτα που συλλέχθηκαν από τα νεότερα φυτά. Η ριζοβολία ήταν το πιο προβληματικό στάδιο αφού το υλικό που πολλαπλασιάστηκε από ηλικιωμένα δένδρα έδωσε πολύ χαμηλά ποσοστά ριζοβολίας (5-14%) παρόλο που οι βλαστοί από τα νεαρά φυτά ριζοβόλησαν εύκολα σε ποσοστό 82% (Caruana and Giannini, 1997).

Η ικανότητα νεαρών και ώριμων κλώνων της *Sequoia sempervirens* να παράγουν ρίζες *in vitro* μελετήθηκε μετά από πλήγωμα και μεταχειρίσεις με IBA. Ριζοβολία δεν παρατηρήθηκε σε ώριμα ή νεαρά μοσχεύματα που καλλιεργήθηκαν για 30 ημέρες σε υπόστρωμα χωρίς IBA, ενώ η παρουσία 5.0 mg l^{-1} IBA στο υπόστρωμα συντέλεσε στην εμφάνιση ριζών στη βάση των μοσχευμάτων. Περισσότερες ρίζες εμφανίστηκαν και μεγάλωσαν ταχύτερα σε μοσχεύματα από νεανικό παρά από ώριμο κλώνο. Αυτές οι διαφορές στην ικανότητα ριζοβολίας μεταξύ νεανικών και ώριμων μοσχευμάτων μπορεί να σχετίζονται με διαφορές στα επίπεδα ορμονών στη βάση των 5 mm μήκους μοσχευμάτων κατά τη διάρκεια των πρώτων 4 ημερών της περιόδου προτροπής της ριζοβολίας. Μετά από διαχωρισμό με HPLC, το IAA, το IBA και σχετικά συστατικά, συμπεριλαμβανομένων των IAAsp και IBA-GE, προσδιορίστηκαν με MS και MS-MS και τα επίπεδά τους μετρήθηκαν με ELISA. Ένα ανοσοδραστικό συστατικό που έχει αναφερθεί να παρεμποδίζει την αυξίνο-προωθούμενη παραγωγή αιθυλενίου, το DMT, επίσης βρέθηκε και μετρήθηκε. Το πλήγωμα του βλαστού χωρίς IBA αποκάλυψε παροδική αύξηση των επιπέδων IAA, IAAsp και DMT στα νεαρά μοσχεύματα, ενώ στα ώριμα μοσχεύματα παρατηρήθηκε δραματική αύξηση των επιπέδων DMT. Ακολουθώντας μεταχείριση IBA, τα επίπεδα IAA αυξήθηκαν και στους δύο κλώνους, αλλά υψηλότερα επίπεδα μετρήθηκαν στο νεαρό από ότι στον ώριμο κλώνο. Το IBA και το IBA-GE βρέθηκαν επίσης αλλά σε υψηλότερα επίπεδα στον ώριμο κλώνο. Οπότε, ο

δύσκολος στη ριζοβολία ώριμος κλώνος διέφερε από τον νεαρό κλώνο ως προς το μεταβολισμό της αυξίνης του (Blažková *et al.*, 1997).

Κατά τη διερεύνηση της επίδρασης της προέλευσης των εκφύτων από διάφορες ζώνες (σε ύψος από 10 cm έως 180 cm) νεανικών (σπορόφυτα) ή ενήλικων (κλωνικά) φυτών καουτσούκ *Hevea brasiliensis* στην *in vitro* ανάπτυξη των οφθαλμών, το νεανικό φυτικό υλικό βρέθηκε πιο επιδεκτικό στην *in vitro* καλλιέργεια, ενώ στα ενήλικα φυτά τα νεανικά χαρακτηριστικά είναι περισσότερα στους ιστούς που είναι πιο κοντά στο ριζικό σύστημα (Seneviratne *et al.*, 1998).

Ο μικροπολλαπλασιασμός από ώριμα φυτά του *Taxus mairei* επιτεύχθηκε χρησιμοποιώντας έκφυτα οφθαλμού, μήκους 0.3 cm, από κορυφές βλαστών ή έκφυτα βλαστού, μήκους 1 ή 3 cm, με 1 ή 3 κόμβους προερχόμενα από δένδρα αναπτυσσόμενα στον αγρό ηλικίας περίπου 1000 ετών, τα οποία συγκρίθηκαν με έκφυτα οφθαλμού από φυτάρια ενός έτους που δημιουργήθηκαν από έρριζα μοσχεύματα αυτών των δένδρων. Έκφυτα από τα φυτάρια που συλλέχθηκαν σε διάφορες εποχές έδειξαν υψηλά ποσοστά επιβίωσης και καλή συμπεριφορά ανάπτυξης *in vitro*, ενώ η επιβίωση των εκφύτων από ώριμα δένδρα ήταν ισχυρά εξαρτώμενη από την εποχή, με ικανοποιητική επιβίωση μόνο νωρίς την άνοιξη. Κατά τη διάρκεια διαδοχικών υποκαλλιέργειών, παρατηρήθηκε καφέτιασμα των ιστών στις καλλιέργειες και από τις δύο προελεύσεις, αλλά το πρόβλημα σταμάτησε με τη προσθήκη στο βασικό υπόστρωμα 1 g l⁻¹ AC και 100 mg l⁻¹ AgNO₃. Οι καλλιέργειες από τα φυτάρια έδρασαν καλύτερα από τις καλλιέργειες από ώριμα δένδρα όσον αφορά τον πολλαπλασιασμό των βλαστών και την ικανότητα ριζοβολίας (55% και 35%, αντίστοιχα) (Chang *et al.*, 2001).

Μικροβλαστοί της *Acacia mangium* από νεανικούς και ώριμους γονοτύπους μικροπολλαπλασιάστηκαν μέσω τακτικού προγράμματος υποκαλλιέργειας για περισσότερο από 3 χρόνια *in vitro* σε υπόστρωμα εμπλουτισμένο ΒΑ. Οι μέσοι ρυθμοί πολλαπλασιασμού κατά τη διάρκεια αυτής της περιόδου ήταν 5.5 για τη νεανική πηγή και 3.9 για τον ενήλικο κλώνο. Αν και το νεανικό υλικό επέδειξε υψηλότερο δυναμικό για πλευρικούς βλαστούς και σχηματισμό ριζών από τον ενήλικο κλώνο συνολικά, οι διαφορές δεν ήταν στατιστικά σημαντικές με αξιοσημείωτες διαφορές κατά τη διάρκεια του χρόνου από τη μία υποκαλλιέργεια στην άλλη. Σε συγκεκριμένα υποστρώματα ριζοβολίας, το νεανικό υλικό ριζοβόλησε συνολικά σε υψηλότερα ποσοστά από το ενήλικο υλικό, με αξιοσημείωτες αλληλεπιδράσεις μεταξύ ηλικίας φυτικού υλικού και διαφόρων πειραματικών παραγόντων που δοκιμάστηκαν, όπως η συγκέντρωση σουκρόζης, ο σχηματισμός μικροαλάτων και το πρόγραμμα φωτισμού (Monteuuis, 2004).

Κατά τον μικροπολλαπλασιασμό του *Quercus euboica*, τα έκφυτα κόμβου από σπορόφυτα έδωσαν υψηλότερους ρυθμούς πολλαπλασιασμού των βλαστών από ότι έκφυτα από ενήλικα φυτά. Το ποσοστό ριζοβολίας επηρεάστηκε τόσο από τη συγκέντρωση IBA όσο και από την περίοδο εφαρμογής, με τα καλύτερα αποτελέσματα να λαμβάνονται κατά την καλλιέργεια σε υπόστρωμα με 2.0 mg l⁻¹ IBA την πρώτη εβδομάδα, ακολουθούμενη από καλλιέργεια σε υπόστρωμα χωρίς ορμόνες. Η χρήση πλαστικής μεμβράνης ως υλικού κάλυψης των δοχείων καλλιέργειας αύξησε το ποσοστό ριζοβολίας και τον αριθμό των ριζών (Kartsonas and Papafotiou, 2007).

Το απομικτικό σύστημα στο είδος *Malus* χρησιμοποιήθηκε σα μοντέλο για να εξεταστεί η ανανέωση με την αναγέννηση γενετικά ίδιων σειρών καλλιέργειας που είχαν δύο εντελώς διαφορετικές αναπτυξιακές προελεύσεις: είτε έμβρυο-προερχόμενους ιστούς (νεανικοί κλώνοι) είτε σωματικούς ιστούς από ενήλικο δένδρο (ώριμοι κλώνοι). Οι *in vitro* ώριμοι κλώνοι των *M. hupehensis* και *M. toringoides* είχαν σημαντικά λιγότερους ολικούς βλαστούς και βλαστούς με μήκος μεγαλύτερο των 2 cm ανά πολλαπλασιαζόμενο έκφυτο από ότι οι νεανικοί κλώνοι και επίσης ριζοβόλησαν λιγότερο αποτελεσματικά. Οι *ex vitro* (θερμοκηπίου) νεανικοί κλώνοι είχαν κοντύτερα μεσογονάτια, μεγαλύτερο αριθμό φύλλων και περισσότερο ξηρό βάρος συγκριτικά με τα ώριμα αντίγραφα τους (Ur-Rahman *et al.*, 2007).

Η ωρίμανση, ή αλλαγή φάσης στα δένδρα, είναι μια αναπτυξιακή διαδικασία που έχει ως αποτέλεσμα αλλαγές στη συμπεριφορά ανάπτυξης (μειωμένος ρυθμός ανάπτυξης, αλλαγές στη φυλλική μορφολογία, η έναρξη της άνθισης), αλλά και την αυξημένη δυσκολία στον βλαστητικό πολλαπλασιασμό (μειωμένη αποτελεσματικότητα στη ριζοβολία μοσχευμάτων, μειωμένη ικανότητα να πολλαπλασιαστούν ώριμα φυτά με ιστοκαλλιέργεια). Για την αντιστροφή της ωρίμανσης, που καλείται ανανέωση (rejuvenation), έχουν αναφερθεί διάφορες μέθοδοι που περιλαμβάνουν την εφαρμογή κυτοκινίνης είτε κατά τη διάρκεια είτε αμέσως μόλις τα έκφυτα τοποθετούνται στην καλλιέργεια, το διαδοχικό εμβολιασμό, τον πολλαπλασιασμό με βλαστήσεις από τον κορμό, ή το αυστηρό κλάδεμα (Greenwood, 1987). Ένα από τα πρώτα παραδείγματα ανανέωσης *in vitro* αφορά την ποικιλία αμπελιού Cabernet Sauvignon, η οποία επέδειξε νεανικά χαρακτηριστικά μετά από 3-7 υποκαλλιέργειες σε υποστρώματα με BA, ενώ η ανανεωμένη κατάσταση διατηρήθηκε με διαδοχική καλλιέργεια για σχεδόν 3 χρόνια (Mullins *et al.*, 1979). Ανανέωση της *Betula* έχει επίσης αναφερθεί κατά τον *in vitro* πολλαπλασιασμό, αλλά το επίπεδο νεανικότητας που ανακτήθηκε μπορεί να μην ήταν ισοδύναμο με αυτό ενός σποροφύτου (Brand and Lineberger, 1992).



2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Φυτικό υλικό

Τα έκφυτα (τεμάχια βλαστού με έναν οφθαλμό), που χρησιμοποιήθηκαν για την εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας, συλλέχθηκαν από ενήλικα φυτά *Malosorbus florentina* από άγριο πληθυσμό του Όρους Πάρνηθα, από αναβλαστήσεις καμένων ενήλικων φυτών μετά την πυρκαγιά του 2007 και από φυτάρια ηλικίας 5-8 μηνών που είχαν παραχθεί μέσω μικροπολλαπλασιασμού από οφθαλμούς αναβλαστήσεων και βρίσκονταν στον κήπο του εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου. Επίσης, λίγοι σπόροι που συλλέχθηκαν το φθινόπωρο του 2009 από ενήλικο φυτό που δεν κάηκε το 2007 στρωματώθηκαν και από τα σπορόφυτα, που φύτρωσαν *in vitro*, ελήφθησαν έκφυτα για εγκατάσταση καλλιέργειας *in vitro*. Περισσότερες λεπτομέρειες για το φυτικό υλικό και τον τύπο των εκφύτων δίνονται στο κεφάλαιο 4.2.

2.2. Υποστρώματα *in vitro* καλλιέργειας

2.2.1. Υλικά θρεπτικών υποστρωμάτων *in vitro* καλλιέργειας

Για την παρασκευή των θρεπτικών υποστρωμάτων για την *in vitro* καλλιέργεια του *M. florentina* χρησιμοποιήθηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις τα παρακάτω υλικά:

i) Θρεπτικό υπόστρωμα MS (MS basal mixture, Murashige and Skoog, 1962) σε μορφή σκόνης της εταιρείας SIGMA.

ii) Υπόστρωμα αλάτων WPM (WPM basal salt mixture, Lloyd and McCown, 1980) σε μορφή σκόνης της εταιρείας SIGMA.

iii) Βιταμίνες:

Μυοϊνοσιτόλη (myo-inositol) MB=180.16, της εταιρείας MERCK.

Θειαμίνη (thiamine hydrochloride, Vitamine B₁: Aneurine), MB=337.3, της εταιρείας SIGMA, διαλύτης το νερό.

Πυριδοξίνη (pyridoxol hydrochlorid, Vitamine B₆-Hydrochloride), MB=205.64, της εταιρείας MERCK, διαλύτης το νερό.

Νικοτινικό οξύ (nicotinic acid), MB=123.11, της εταιρείας MERCK, διαλύτης το νερό.

iv) Σακχαρόζη: κοινή ζάχαρη εμπορίου.

v) Αυξίνες:

Ναφθαλινοξικό οξύ (NAA, 1-naphthelene acetic acid), MB=170.0, της εταιρείας SIGMA.

Ινδολο-3-βουτυρικό οξύ (IBA, indole-3-butyric acid), MB=203.2, της εταιρείας SIGMA.

Ινδολο-3-οξικό οξύ (IAA, indole-3-acetic acid), MB=175.2, της εταιρείας SIGMA.

vi) Κυτοκινίνες:

Βενζυλαδενίνη (BA, 6-benzylamino-purine), MB=225.3, της εταιρείας SIGMA.

Ζεατίνη (ZEA, trans-zeatin), MB=219.24, της εταιρείας SIGMA.

Κινετίνη (KIN, kinetin, 6-furfurylamino-purine), MB=215.2, της εταιρείας SIGMA.

Θειντιαζουρόν (TDZ, thidiazuron), MB=220.3, της εταιρείας SIGMA.

2iP [6-(γ,γ -dimethylallylamino)purine], MB=203.20 της εταιρείας SIGMA.

vii) Γιββερελλίνη (GA₃, gibberellic acid), MB=346.38, της εταιρείας FLUKA chemica

viii) Ενεργός άνθρακας (AC, activated charcoal), της εταιρείας SIGMA.

ix) Άγαρ, της εταιρείας Ρουμπουλάκης Α.Ε. Χημικά.

x) Απεσταγμένο νερό.

Οι δομές των φυτορρυθμιστικών ουσιών δίνονται στο Παράρτημα Ι.

2.2.2. Μέθοδος παρασκευής θρεπτικών υποστρωμάτων

Σε δοχείο ζέσεως όγκου ανάλογου με τον όγκο του υπό παρασκευή υποστρώματος τοποθετούταν απεσταγμένο νερό σε ποσότητα μικρότερη από αυτή του τελικού όγκου. Στη συνέχεια, προσθέτονταν οι ακριβείς ποσότητες με βάση τον τελικό όγκο του θρεπτικού υποστρώματος Murashige and Skoog (4.4 g l⁻¹ MS) για τα υποστρώματα με βάση το MS ή των αλάτων Woody Plant Medium (2.3 g l⁻¹ WPM) με βιταμίνες Mullin (Mullin *et al.*, 1974): μυοϊνσιτόλη (100 mg l⁻¹), θειαμίνη (1 mg l⁻¹), πυριδοξίνη (0.5 mg l⁻¹) και νικοτινικό οξύ (0.5 mg l⁻¹), για τα υποστρώματα με βάση το WPM, της σακχαρόζης (3% στα υποστρώματα εγκατάστασης και πολλαπλασιασμού και 2% στα υποστρώματα ριζοβολίας) και των επιθυμητών κάθε φορά συγκεντρώσεων φυτορρυθμιστικών ουσιών από τα stock διαλύματα αυτών, υπό συνεχή ανάδευση με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα μέχρι να διαλυθούν πλήρως. Μετά γινόταν η ογκομέτρηση και η προσθήκη απεσταγμένου νερού μέχρι τον επιθυμητό όγκο και ακολουθούσε η pH-μέτρηση για ρύθμιση του pH στην τιμή 5.7 της κλίμακας με τη χρήση αραιού HCl 1N και NaOH 1N για μείωση και αύξηση του pH, αντίστοιχα. Έπειτα, προστίθετο το άγαρ στην απαιτούμενη ποσότητα (8 g l⁻¹) και ακολουθούσε η θέρμανση του διαλύματος υπό συνεχή ανάδευση για να λιώσει το άγαρ μέχρι που το διάλυμα πλησίαζε το σημείο βρασμού του και αποκτούσε πλήρη διαφάνεια. Μετά, το διάλυμα μοιραζόταν στα δοχεία *in vitro* καλλιέργειας (κεφάλαιο 2.5.2.) και σκεπαζόταν γρήγορα με αλουμινόχαρτο ή καπάκι για να περιοριστεί η εξάτμισή του και τέλος, τα δοχεία με το υπόστρωμα τοποθετούνταν στον κλίβανο υγρής αποστείρωσης.

2.2.3. Παρασκευή ‘stock’ διαλυμάτων φυτορρυθμιστικών ουσιών και βιταμινών

Ήταν απαραίτητη η παρασκευή ‘stock’ διαλυμάτων των φυτορρυθμιστικών ουσιών για να προστίθεται η απαιτούμενη συγκέντρωση με μεγαλύτερη ακρίβεια, επειδή αυτές χρησιμοποιήθηκαν σε πολύ μικρές ποσότητες.

α) Παρασκευή ‘stock’ διαλυμάτων αυξινών (NAA, IBA και IAA) 10% (10 mg ουσίας/ 100 ml διαλύματος).

Ζυγίζονταν 10 mg αυξίνης, τα οποία τοποθετούταν σε δοχείο όγκου 100 ml και διαλύονταν σε 4-5 σταγόνες αιθυλικής αλκοόλης υπό ήπια ανάδευση. Στη συνέχεια προστίθετο μικρή ποσότητα απεσταγμένου νερού και η ανάδευση συνεχιζόταν μέχρι να διαλυθεί καλά η αυξίνη. Στο τέλος, γινόταν ογκομέτρηση στα 100 ml με προσθήκη επιπλέον απεσταγμένου νερού.

β) Παρασκευή ‘stock’ διαλυμάτων κυτοκινινών (BA, zeatin, kinetin, TDZ, 2iP) 10%.

Με τον ίδιο τρόπο παρασκευάζονταν και τα διαλύματα κυτοκινινών 10%, μόνο που η διάλυση της κυτοκινίνης γινόταν σε 4-5 σταγόνες καυστικού νατρίου NaOH 1N.

γ) Παρασκευή ‘stock’ διαλυμάτων βιταμινών (thiamine, pyridoxine, nicotinic acid) 10%.

Οι βιταμίνες, που χρησιμοποιήθηκαν, δε χρήζουν διάλυσης σε οργανικό ή ανόργανο διαλύτη. Σε δοχείο όγκου 100 ml τοποθετήθηκαν 10 mg βιταμίνης και διαλύθηκαν σε μικρή ποσότητα απεσταγμένου νερού με ήπια ανάδευση. Μετά, έγινε ογκομέτρηση στα 100 ml με προσθήκη επιπλέον απεσταγμένου νερού.

Όλα τα ‘stock’ διαλύματα των φυτορρυθμιστικών ουσιών και βιταμινών αποθηκεύονταν στο ψυγείο για ένα μήνα το πολύ.

2.3. Μέθοδοι αποστείρωσης και απολύμανσης

2.3.1. Αποστείρωση εργαλείων και υλικών

Η αποστείρωση των υλικών γινόταν σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης (αυτόκλειστο) για 20 min, σε θερμοκρασία 121 °C και πίεση 1.2 atm ή σε χύτρα υγρής αποστείρωσης για 15 min, σε θερμοκρασία 125 °C και πίεση 1.2 atm. Όλα τα δοχεία με τα υποστρώματα ήταν καλυμμένα με αλουμινόχαρτο, καθώς και τα εργαλεία, που επρόκειτο να χρησιμοποιηθούν στις απολυμάνσεις και τις εμφυτεύσεις, όπως κωνικές φιάλες και μπουκάλια με απιονισμένο νερό, λαβίδες, νυστέρια και πλακάκια κοπής εκφύτων. Τα διαφανή πλαστικά φιλμ, με τα οποία καλύπτονταν δοχεία κάποιων μεταχειρίσεων μετά την εμφύτευση των εκφύτων, τοποθετούταν εναλλάξ με χαρτί κουζίνας μέσα σε γυάλινα τρυβλία petri, τα οποία τυλίγονταν με αλουμινόχαρτο. Η μεμβράνη sanitas, με την οποία καλύπτονταν δοχεία άλλων μεταχειρίσεων, παράγεται με θερμική επεξεργασία και είναι αποστειρωμένη.

Δοχεία με μολυσμένες καλλιέργειες αποστειρώνονταν για το διπλάσιο χρόνο, πριν ανοιχτούν και πλυθούν.

2.3.2. Υλικά απολύμανσης εκφύτων και σπόρων

Πριν την τοποθέτησή τους *in vitro* τα έκφυτα και οι σπόροι του *xM. florentina* απολυμαίνονταν χρησιμοποιώντας τα εξής υλικά:

α) Χλωρίνη εμπορίου (4.5% περιεκτικότητα σε διαθέσιμο χλώριο NaOCl₂)

β) Προσκολλητική ουσία Tween-20 (polyxyethylenesorbitan monolaurate) της εταιρείας MERCK.

γ) Αιθανόλη (ethanol absolute 99%) της εταιρείας Merck.

δ) Αποστειρωμένες κωνικές φιάλες όγκου 250 ml με απιονισμένο νερό σε ποσότητα που καθορίζεται από την επιθυμητή περιεκτικότητα σε χλωρίνη.

ε) Αποστειρωμένα μπουκάλια με απιονισμένο νερό για τα ξεπλύματα. Στην πορεία των πειραμάτων, στο νερό για τα ξεπλύματα προστέθηκαν και τα αντιοξειδωτικά ασκορβικό οξύ (AA, ascorbic acid, MB=176.12, της εταιρείας MP Biomedicals) και κιτρικό οξύ (CA, citric acid monohydrate, MB=210.14, της εταιρείας Riedel-dehaën), σε συγκέντρωση 150 mg l⁻¹ το καθένα, για περιορισμό του καφετιάσματος των εκφύτων. Η δομή των αντιοξειδωτικών, που χρησιμοποιήθηκαν, δίνεται στο Σχήμα 31 του Παραρτήματος II.

Η διαδικασία που ακολουθήθηκε για την απολύμανση των εκφύτων και των σπόρων περιγράφεται αναλυτικά στο κεφάλαιο 4.2.

2.4. Έκφυτα

2.4.1. Έκφυτα εγκατάστασης αρχικών καλλιεργειών

Μετά τη διαδικασία απολύμανσης των εκφύτων μέσα σε τράπεζα νηματικής ροής, πάνω σε αποστειρωμένο πλακάκι, που τακτικά καθαριζόταν με αιθανόλη 80%, και με τη χρήση νυστεριού, τα τμήματα βλαστού τεμαχίζονταν σε έκφυτα ενός συνήθως κόμβου μήκους 0.6-1.0 cm. Αφαιρούνταν επίσης τυχόν υπολείμματα φύλλων, καθώς και τα ακραία τμήματα του βλαστού που είχαν καταστραφεί από την απολύμανση. Τα έκφυτα, οι τύποι των οποίων περιγράφονται αναλυτικά στο κεφάλαιο 4.2., τοποθετούνταν μεμονωμένα σε δοκιμαστικούς σωλήνες όγκου 55 ml, που περιείχαν 10 ml θεραπευτικού υποστρώματος, κατακόρυφα σε αυτό και πιέζοντας ελαφρά ώστε να βυθιστούν λίγα χιλιοστά μέσα σε αυτό. Τέλος, οι σωλήνες καλύπτονταν με πλαστικό φιλμ ή μεμβράνη sanitas και τοποθετούνταν σε θάλαμο επώασης σταθερών συνθηκών.

2.4.2. Έκφυτα καλλιέργειών πολλαπλασιασμού των βλαστών

Σε τράπεζα νηματικής ροής, πάνω σε αποστειρωμένο πλακάκι, που τακτικά καθαριζόταν με αιθανόλη 80%, και με αποστειρωμένο νυστέρι, βλαστοί που είχαν σχηματιστεί *in vitro* τεμαχίζονταν σε έκφυτα κόμβων μήκους 0.5 cm περίπου, που περιελάμβαναν 1-2 οφθαλμούς, αφού αφαιρούνταν τα φύλλα τους. Τα έκφυτα κόμβων τοποθετούνταν ανά τρία κατακόρυφα στο υπόστρωμα σε δοχεία καλλιέργειας όγκου 75 ml με 20 ml θρεπτικό υπόστρωμα και πιέζονταν ελαφρά ώστε να βυθιστούν λίγα χιλιοστά μέσα σε αυτό. Στη συνέχεια, τα δοχεία καλύπτονταν με πλαστικό φιλμ ή μεμβράνη sanitas και τοποθετούνταν σε θάλαμο επώασης σταθερών συνθηκών.

2.4.3. Μικροβλαστοί για ριζοβολία

Για πειράματα ριζοβολίας επιλέγονταν βλαστοί που είχαν σχηματιστεί *in vitro*, εύρωστοι και μη υαλωμένοι, μήκους 0.8-1.5 cm, εάν αναπτύσσονταν σε δοχεία καλλιέργειας που καλύπτονταν με πλαστικό φιλμ, και μήκους 1.0-2.0 cm, εάν αναπτύσσονταν σε δοχεία με κάλυψη μεμβράνης sanitas (λόγω παραγωγής μακρύτερων βλαστών). Μέσα σε τράπεζα νηματικής ροής, πάνω σε αποστειρωμένο πλακάκι, που τακτικά καθαριζόταν με αιθανόλη 80%, οι βλαστοί αποκόπτονταν από τη βάση τους από το έκφυτο, αφαιρούνταν τα κατώτερα φύλλα μέχρι το μέσο σχεδόν του βλαστού και οι βλαστοί τοποθετούνταν στα δοχεία καλλιέργειας που περιείχαν το ανάλογο θρεπτικό υπόστρωμα, κατακόρυφα στο υπόστρωμα και πιέζονταν ελαφρά ώστε να βυθιστούν λίγα χιλιοστά μέσα σε αυτό.

Όταν οι βλαστοί παρέμεναν για διάστημα μιας εβδομάδας στο υπόστρωμα με αυξίνη (υπόστρωμα προτροπής ριζοβολίας) ακολουθούμενη από μεταφορά σε υπόστρωμα χωρίς αυξίνη (υπόστρωμα ανάπτυξης ριζών), η μεταφορά αυτή των βλαστών γινόταν μέσα σε τράπεζα νηματικής ροής, με αποστειρωμένη λαβίδα και οι βλαστοί τοποθετούνταν κατακόρυφα στο νέο υπόστρωμα χωρίς αυξίνη βυθιζόμενοι λίγα χιλιοστά μέσα σε αυτό.

Όταν χρησιμοποιούταν η τεχνική της εμβάπτισης σε πυκνά διαλύματα αυξίνης για πρόκληση ριζοβολίας σε μικροβλαστούς, οι βλαστοί κόβονταν μέσα στην τράπεζα νηματικής ροής, αφαιρούνταν τα κατώτερα φύλλα μέχρι το μέσο σχεδόν του βλαστού και εμβαπτιζόταν η βάση τους (0.5 cm) για 10 sec σε δοχείο με το πυκνό διάλυμα αυξίνης, το οποίο είχε αποστειρωθεί στους 121 °C για 15 min, πριν τοποθετηθούν στα δοχεία καλλιέργειας με υπόστρωμα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες.

Τοποθετούνταν τέσσερις βλαστοί ανά δοχείο όγκου 75 ml και πέντε-έξι βλαστοί ανά δοχείο όγκου 145 ml, με 20 ml και 25 ml υποστρώματος, αντίστοιχα. Τα δοχεία καλλιέργειας τοποθετούνταν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών σε 16 h πλήρες φως και 8 h σκοτάδι, με

εξαίρεση μερικά πειράματα, στα οποία εφαρμόστηκε συνεχές σκοτάδι κατά την πρώτη εβδομάδα προτροπής ριζοβολίας.

2.4.4. Φυτάρια για εγκλιματισμό

Ριζοβολημένοι μικροβλαστοί με καλά ανεπτυγμένο ριζικό σύστημα (μία ή περισσότερες ρίζες μήκους μεγαλύτερου των 0.6 cm) έβγαιναν από το υπόστρωμα 4-5 εβδομάδες μετά την τοποθέτησή τους για ριζοβολία, ξεπλένονταν καλά οι ρίζες τους με τρεχούμενο νερό βρύσης για να απομακρυνθεί εντελώς το υπόστρωμα από τις ρίζες τους, και τα φυτάρια τοποθετούνταν σε δοχεία εγκλιματισμού με το ανάλογο υπόστρωμα (κεφάλαιο 2.6.1.).

2.5. Συνθήκες *in vitro* καλλιέργειας

2.5.1. Συνθήκες επώασης

Μετά την εμφύτευσή τους τα έκφυτα τοποθετούνταν σε θάλαμο επώασης σταθερών συνθηκών με θερμοκρασία 25 ± 2 °C, φωτοπερίοδο 16 h και ένταση φωτισμού 4000 lx ($37.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), που παρεχόταν από λευκούς λαμπτήρες φθορισμού οι οποίοι βρίσκονταν στις πλευρές του θαλάμου επώασης (φωτισμός φυταρίων από τα πλάγια).

2.5.2. Δοχεία *in vitro* καλλιέργειας και υλικά κάλυψης αυτών

Για την αρχική εγκατάσταση εκφύτων *in vitro* χρησιμοποιούνταν γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες όγκου 55ml, που κατά τις πρώτες εγκαταστάσεις καλύπτονταν με διαφανές πλαστικό φιλμ από PVC κυκλικού σχήματος διαμέτρου 7 cm περίπου, το οποίο σταθεροποιούνταν με τη βοήθεια κοινών ελαστικών δακτυλίων, αφού πρώτα είχε αποστειρωθεί σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης. Στις μεταγενέστερες εγκαταστάσεις, το πλαστικό φιλμ αντικαταστάθηκε από μεμβράνη sanitas της εταιρείας Σαράντης Α.Ε., η οποία έχει τις εξής ιδιότητες: περατότητα σε διοξείδιο του άνθρακα $55000 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2}$ σε 24 h, περατότητα σε υδρατμούς $110 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2}$ σε 24 h, περατότητα σε οξυγόνο $8.5 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2}$ σε 24 h. Σε κάθε σωλήνα τοποθετούνταν 10 ml υποστρώματος και από ένα έκφυτο.

Για τη φάση του πολλαπλασιασμού των βλαστών *in vitro* χρησιμοποιήθηκαν βάζα από διαφανές γυαλί χωρίς καπάκι, που είχαν όγκο 75 ml. Για καπάκι αρχικά χρησιμοποιήθηκε διαφανές πλαστικό φιλμ από PVC κυκλικού σχήματος διαμέτρου 9 cm περίπου, το οποίο σταθεροποιούνταν με τη βοήθεια κοινών ελαστικών δακτυλίων, ενώ αργότερα χρησιμοποιήθηκε μεμβράνη sanitas για να περιοριστεί η υπερενυδάτωση των βλαστών. Σε κάθε βάζο τοποθετούνταν 20 ml υποστρώματος και από τρία έκφυτα. Επίσης, δοκιμάστηκαν οι γυάλινοι σωλήνες όγκου 55 ml (10 ml διαλύματος, 1 έκφυτο/ βάζο), γυάλινα βάζα όγκου

145 ml με πλαστικό καπάκι magenta (25 ml διαλύματος, 3 έκφυτα/ βάζο) και γυάλινα βάζα όγκου 375 ml με πλαστικό καπάκι (50 ml διαλύματος, 6 έκφυτα/ βάζο).

Για τη ριζοβολία των μικροβλαστών *in vitro* αρχικά χρησιμοποιήθηκαν τα γυάλινα βάζα όγκου 75 ml με κάλυψη διαφανές πλαστικό φιλμ από PVC ή μεμβράνη sanitas, όπου τοποθετούνταν 20 ml διαλύματος και από 4 μικροβλαστοί. Στη συνέχεια, αντικαταστάθηκαν από γυάλινα βάζα όγκου 145 ml με πλαστικό καπάκι magenta, όπου τοποθετούνταν 25 ml διαλύματος και 5 ή 6 μικροβλαστοί.

Κατά την περιγραφή της μεθοδολογίας των πειραμάτων θα αναφέρεται ποιο είδος βάζου και υλικό κάλυψης χρησιμοποιήθηκε.

2.6. Συνθήκες *ex vitro* εγκλιματισμού

2.6.1. Δοχεία και υποστρώματα εγκλιματισμού

Για τον εγκλιματισμό των φυταρίων χρησιμοποιούνταν δοχεία όγκου 500 ml από διάφανο πλαστικό, με διάτρητο πάτο. Τοποθετούνταν μέχρι οκτώ φυτάρια ανά δοχείο. Το σύνηθες υπόστρωμα εγκλιματισμού ήταν το τύρφη-περλίτης 1:1 (v/v), ενώ δοκιμάστηκαν το τύρφη-περλίτης 1:2 (v/v) και ο περλίτης.

2.6.2. Καλλιεργητικές φροντίδες φυταρίων κατά τον εγκλιματισμό

Τα δοχεία καλύπτονταν με μεμβράνη sanitas κατά την πρώτη εβδομάδα εγκλιματισμού και τοποθετούνταν σε θάλαμο σταθερών συνθηκών με σκοπό τη μείωση των απωλειών υγρασίας στα πρώτα στάδια εγκλιματισμού των φυταρίων. Στη συνέχεια, αφαιρούταν η μεμβράνη sanitas και τα φυτάρια μεταφέρονταν σε πάγκο γυάλινου θερμαινόμενου θερμοκηπίου, όπου αρδεύονταν 2-3 φορές την εβδομάδα και λιπαίνονταν ανά δεκαπενθήμερο με 2 g l⁻¹ υδατοδιαλυτό λίπασμα (Nutrileaf 60, 20-20-20 της εταιρείας Miller Chemical and Fertilizer Corp., Hanover, PA, USA).

2.6.3. Συνθήκες θερμοκρασίας κατά τον εγκλιματισμό

Κατά την εκπόνηση των κύριων πειραμάτων εγκλιματισμού (κεφάλαιο 7.2.2.), τα φυτάρια έβγαιναν *ex vitro* στο θερμοκήπιο για εγκλιματισμό σε μηνιαία βάση, την περίοδο από Οκτώβριο 2009 μέχρι Μάρτιο 2010, και παρακολουθούταν η ανάπτυξή τους μέχρι τις αρχές του Ιουνίου 2010, οπότε τα φυτά συνέχισαν υπαίθρια την ανάπτυξή τους στον κήπο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου.

Οι μέσες μηνιαίες θερμοκρασίες που επικράτησαν στο θερμοκήπιο κατά τη διάρκεια του εγκλιματισμού φαίνονται στον Πίνακα 1.

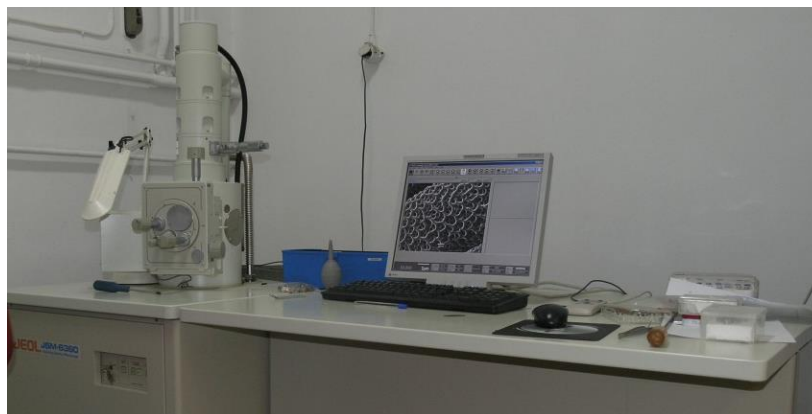
Πίνακας 1. Μέσες μηνιαίες θερμοκρασίες στο υαλόφρακτο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου, την περίοδο που διήρκησε ο *ex vitro* εγκλιματισμός των φυταρίων του *xM. florentina*.

Θερμοκρασία (°C)	Οκτ. 2009	Νοεμ. 2009	Δεκ. 2009	Ιαν. 2010	Φεβρ. 2010	Μαρτ. 2010	Απρ. 2010	Μαΐος 2010	Ιουν. 2010
Ελάχιστη	16.65	14.34	15.12	13.90	14.03	16.11	15.29	17.42	21.16
Μέγιστη	38.50	39.05	34.15	32.30	32.40	32.05	32.60	30.72	33.12

2.7. Μικροσκοπική παρατήρηση μόνιμων παρασκευασμάτων εκφύτων με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης

Από τα επάκρια έκφυτα, που λαμβάνονταν σε μηνιαία βάση από το Φεβρουάριο 2006 μέχρι και τον Μάρτιο 2007 από κανονικές και λογχοειδείς βλαστήσεις ενήλικων φυτών του *xM. florentina* για να χρησιμοποιηθούν στην εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας, πέντε-έξι δείγματα προετοιμάζονταν για μικροσκοπική παρατήρηση με ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (ΗΜΣ) μάρκας Jeol 6360 (Εικ. 8), ακολουθώντας το πρωτόκολλο που περιγράφεται στον Πίνακα 2, με στόχο να βρεθεί αν οι μορφολογικές-ανατομικές αλλαγές των οφθαλμών κατά τη διάρκεια του έτους επιδρούν στη συμπεριφορά των εκφύτων *in vitro*. Τα έκφυτα λαμβάνονταν από διαφορετικά φυτά κάθε φορά, από την ίδια όμως τοποθεσία (Πάρνηθα, σε απόσταση 1.5 Km από την Αγ. Τριάδα στο δρόμο προς τη Μόλα).

Η μικροσκοπική παρατήρηση μόνιμων παρασκευασμάτων εκφύτων με ΗΜΣ έγινε στο Εργαστήριο Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την καθοδήγηση του Καθηγητή κ. Κων/νου Φασσέα.



Εικόνα 8. Ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (ΗΜΣ) μάρκας Jeol 6360, που χρησιμοποιήθηκε για την παρατήρηση εκφύτων του *xM. florentina* (Δ3).

Πίνακας 2. Πρωτόκολλο προετοιμασίας δειγμάτων για το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης.

Ημέρα προετοιμασίας	Στάδιο	Χημικό	Χρόνος
1^η ημ.	Μονιμοποίηση	γλουταρική αλδεϋδη 2.5%	2 ημέρες
3^η ημ.	3 εκπλύσεις	ρυθμιστικό διάλυμα (απεσταγμένο νερό)	30 min η καθεμία
	Αφυδάτωση	ακετόνη 50% ακετόνη 70%	30 min 24 h
4^η ημ.	Αφυδάτωση με	ακετόνη 90%	30 min
		ακετόνη 100%	30 min
		ακετόνη 100%	30 min
		ακετόνη 100%	30 min
5^η ημ.	Ξήρανση CPD	σε συσκευή κρίσιμου σημείου με υγρό CO ₂	
	Επικόλληση σε stubs		
	Επικάλυψη με χρυσό	με εκκένωση αίγλης σε ατμόσφαιρα αργού στον εξαχνωτή	

2.8. Καφέτιασμα εκφύτων, εκχύλιση και προσδιορισμός ολικών φαινολικών συστατικών

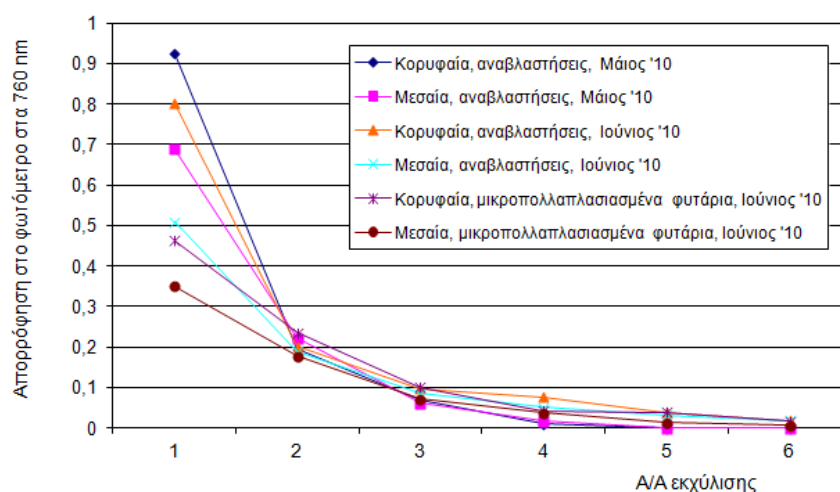
Παρατηρήσεις επί του καφετιάσματος των εκφύτων λαμβάνονταν κατά τη 2^η ημέρα της *in vitro* εγκατάστασης πριν τη μεταφορά τους σε φρέσκο υπόστρωμα, ενώ τα έκφυτα που έδειχναν έντονο καφέ μεταχρωματισμό και απελευθέρωναν φαινολικά στο υπόστρωμα καταγράφονταν σαν καφετιασμένα.

Με στόχο τον προσδιορισμό της περιεκτικότητας των εκφύτων σε ολικά φαινολικά και τη σύνδεσή της με το καφέτιασμα, περισσότερα από 20 έκφυτα από κάθε θέση, ήτοι επάκρια (κορυφής βλαστού), κορυφαία (από το πάνω τμήμα βλαστού), μεσαία, βασική, και προέλευση, ήτοι ενήλικα φυτά, αναβλαστήσεις από καμένα φυτά της Πάρνηθας, μικροπολλαπλασιασμένα φυτά, συλλέχθηκαν Απρίλιο-Μάιο, Ιούνιο-Ιούλιο και Νοέμβριο 2010, ενδεικτικά για τις περιόδους που τα έκφυτα επέδειξαν αντίστοιχα έντονο, χαμηλό και ελάχιστο καφέτιασμα. Συγκεκριμένα, τα έκφυτα από ενήλικα φυτά συλλέχθηκαν Απρίλιο, Μάιο και Νοέμβριο, τα έκφυτα από αναβλαστήσεις συλλέχθηκαν Απρίλιο, Μάιο, Ιούνιο και Νοέμβριο και αυτά από μικροπολλαπλασιασμένα φυτά συλλέχθηκαν Ιούνιο, Ιούλιο και Νοέμβριο. Τα έκφυτα λυοφιλιώθηκαν μέχρι σταθερής τιμής ξηρού βάρους για 2-3 ημέρες και

τα αποξηραμένα έκφυτα συντηρήθηκαν στην κατάψυξη μέχρι τη λειοτριβήσή τους με φυγοκεντρικό μύλο άλεσης (Retsch ZM1000). Τα φαινολικά συστατικά εκχυλίστηκαν από 50 mg σκόνης με 5 ml μεθανόλης 100% σε παγωμένο λουτρό υπερήχων για 10 min, ακολουθούμενο από φυγοκέντριση στα 4000 rpm για 6 min. Η υπερκείμενη φάση συλλέχθηκε και αυτή η διαδικασία επαναλήφθηκε τρεις ακόμη φορές για κάθε δείγμα. Οι τέσσερις εκχυλίσεις αναμίχθηκαν έτσι ώστε στο τέλος ο ολικός όγκος του εκχυλίσματος ήταν 20 ml.

Ο χρωματομετρικός προσδιορισμός των ολικών φαινολικών βασίστηκε στη μέθοδο των Folin-Ciocalteu όπως περιγράφεται από τους Waterman and Mole (1994). Εν συντομία, 50 μl της υπερκείμενης φάσης προστέθηκαν σε 3.75 ml απεσταγμένο νερό και αναδεύτηκαν καλά. Στη συνέχεια, προστέθηκαν 250 μl του αντιδραστήριου Folin-Ciocalteu, έγινε ανάδευση και μετά από 1 min προστέθηκαν ακόμη 750 μl άνυδρου Na_2CO_3 (20 g Na_2CO_3 /100 ml νερό) και αναδεύτηκαν ξανά. Το διάλυμα παρέμεινε σε θερμοκρασία δωματίου για 2 h και αμέσως μετά μετρήθηκε η απορρόφηση σε φωτόμετρο (Bausch and Lomb Spectronic 70) στα 760 nm χρησιμοποιώντας ένα αντιδραστήριο μάρτυρα, στο οποίο είχαν προστεθεί 50 μl καθαρής αιθανόλης αντί δείγματος.

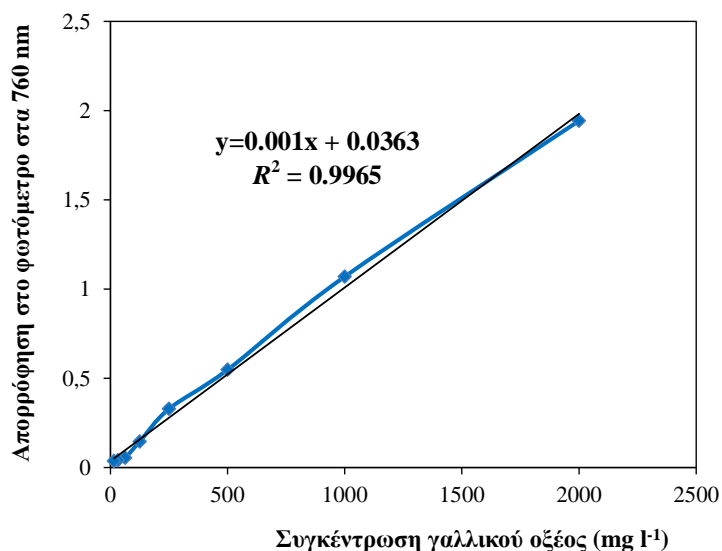
Ο ακριβής αριθμός των εκχυλίσεων, που απαιτούνται για να εκχυλιστεί η πλειονότητα των φαινολικών συστατικών, βρέθηκε πραγματοποιώντας έξι διαδοχικές εκχυλίσεις ενδεικτικά σε κάποια δείγματα και οξειδώνοντας τα φαινολικά συστατικά σε καθεμιά από τις εκχυλίσεις με το αντιδραστήριο Folin-Ciocalteu. Στη συνέχεια, μετρήθηκε η απορρόφηση στο φωτόμετρο στα 760 nm στα δείγματα από κάθε εκχύλιση, από όπου φάνηκε ότι με τέσσερις εκχυλίσεις λαμβάνονται σχεδόν όλα τα φαινολικά που περιέχονται στα έκφυτα (Σχήμα 1).



Σχήμα 1. Απορρόφηση που μετρήθηκε σε φωτόμετρο στα 760 nm ανά εκχύλιση που ελήφθη από τα αναγραφόμενα δείγματα.

Η καμπύλη αναφοράς έγινε με πρότυπη ένωση αναφοράς το γαλλικό οξύ (Σχ. 2), η δομή του οποίου δίνεται στο Σχήμα 27 του Παραρτήματος II, και τα αποτελέσματα εκφράστηκαν ως mg (ισοδυνάμων γαλλικού οξέος)/ g ξηρού βάρους κατά τους Waterman and Mole (1994). Αρχικά παρασκευάστηκε διάλυμα γαλλικού οξέος (2000 mg l⁻¹) και ακολούθως με διαδοχικές αραιώσεις παρασκευάστηκαν οι επιθυμητές συγκεντρώσεις για τη δημιουργία της πρότυπης καμπύλης. Στη συνέχεια ακολουθήθηκε η πειραματική πορεία όπως περιγράφεται παραπάνω.

Συγκέντρωση γαλλικού οξέος (mg l ⁻¹)	Απορρόφηση σε φωτόμετρο στα 760 nm
2000	1.943
1000	1.07
500	0.548
250	0.329
125	0.146
62.5	0.055
31.625	0.041
15.625	0.037



Σχήμα 2. Πρότυπη καμπύλη αναφοράς κατά Folin-Ciocalteu για τα ολικά φαινολικά συστατικά με τη χρήση γαλλικού οξέως ως ένωση αναφοράς.

Η λυοφιλίωση των εκφύτων έγινε στο Εργαστήριο Βελτίωσης Φυτών και Γεωργικού Πειραματισμού, από τον κ. Αναστάσιο Κατσιλέρο. Η λειοτριβήση των εκφύτων, η εκχύλιση και ο ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών φαινολικών συστατικών των εκφύτων έγινε στο Εργαστήριο Δενδροκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την επίβλεψη του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Σταύρου Βέμμου και τη βοήθεια της Υποψήφιας Διδάκτορα κας Νικολέτας Δεναζά.

2.9. Μελέτη φασματοσκοπικού προφίλ εκφύτων με τη μέθοδο FT-IR

Για την παραλαβή των φασμάτων IR χρησιμοποιήθηκαν τα λυοφιλωμένα δείγματα όλων των εκφύτων τα οποία αναλύθηκαν με την τεχνική διάχυτης ανάκλασης (Diffuse Reflectance Fourier Transformed Infrared spectroscopy – DRIFT) με τη χρήση φασματόμετρου υπεράυθρου Thermo Nicolet 7600 (Εικ. 9), το οποίο συνοδεύεται από το λογισμικό Omnic 7.1 για την επεξεργασία των δειγμάτων.

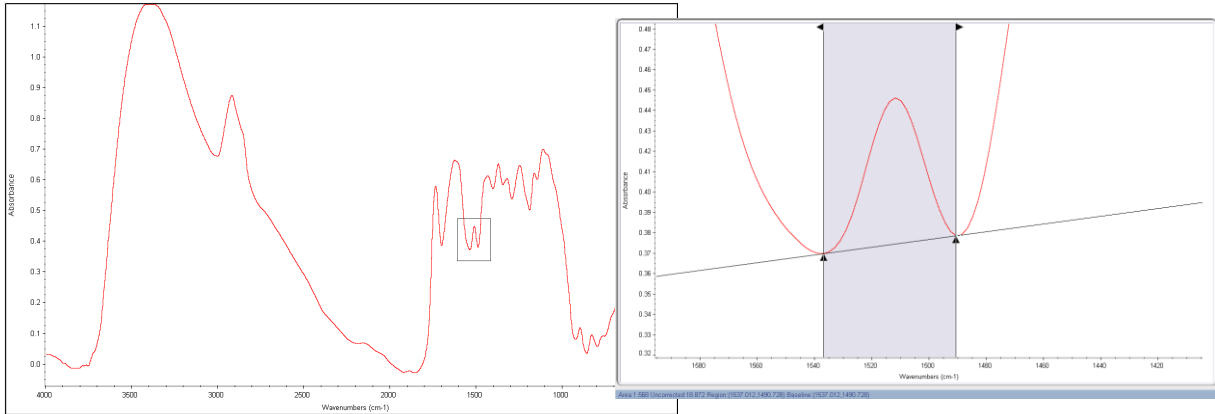


Εικόνα 9. Φασματόμετρο υπερύθρου Thermo Nicolet 7600, που χρησιμοποιήθηκε για την επεξεργασία των λυοφιλωμένων δειγμάτων εκφύτων του *xM. florentina*.

Πριν τη λήψη των φασμάτων έγινε η λήψη υπόβαθρου “background” με KBr για να προσδιοριστεί η περιεκτικότητα του χώρου σε υγρασία και CO₂, έτσι ώστε να αφαιρεθεί αργότερα από τα δείγματα μέσω του προγράμματος. Μετά τη λειοτρίβηση των δειγμάτων με φυγοκεντρικό μύλο άλεσης και πριν τον προσδιορισμό των φαινολικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, ελήφθη μικρή ποσότητα από κάθε δείγμα, η οποία τρίφτηκε ξανά σε μικρό γουδί για να γίνει σκόνη. Το γουδί καθαριζόταν επιμελώς πριν από κάθε δείγμα ή επανάληψη του ίδιου δείγματος. Κατόπιν γέμιζε με επαρκή ποσότητα δείγματος ο ειδικός μικροϋποδοχέας και τοποθετιόταν στην αντίστοιχη υποδοχή του φασματοφωτόμετρου για την καταγραφή του φάσματος. Τέσσερα φάσματα ελήφθησαν από κάθε δείγμα, από τα οποία αφαιρέθηκε ο θόρυβος που προκαλείται από την υγρασία μέσω της εντολής εξομάλυνσης «automating smoothing» και ακολούθως έγινε διόρθωση της βασικής γραμμής με την εντολή «automatic baseline correct» του προγράμματος Omnic 7.1, πριν επιλεγούν για να δώσουν το μέσο φάσμα (average).

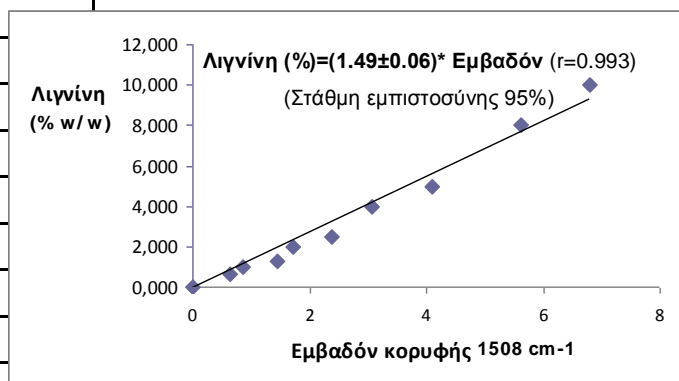
Η περιεκτικότητα (%) των εκφύτων σε λιγνίνη υπολογίστηκε από το μέσο φάσμα κάθε δείγματος, υπολογίζοντας το εμβαδόν της κορυφής που αντιστοιχεί στη λιγνίνη, στα 1510±4 cm⁻¹ περίπου (Σχ. 3). Με βάση την καμπύλη αναφοράς (Σχ. 4), υπολογίστηκε η περιεκτικότητα των εκφύτων σε λιγνίνη. Η καμπύλη αναφοράς έγινε στο Excell, αφού πρώτα καταγράφηκαν τρεις φορές τα φάσματα δειγμάτων γνωστής περιεκτικότητας λιγνίνης και υπολογίστηκε το εμβαδόν της κορυφής σε καθένα από τα φάσματα, και ακολούθως ο μέσος όρος των εμβαδών για κάθε συγκέντρωση λιγνίνης.

Στη συνέχεια, τα μέσα φάσματα πέρασαν στο λογιστικό πρόγραμμα TurboQuant analyst software (TQ analyst) έκδοση 7.2.0.161 by Thermo Electron Corp για να γίνει διακριτική ανάλυση (discriminant analysis), με στόχο την ανάδειξη πιθανών ομαδοποιήσεων με βάση τη χημική τους σύσταση ως προς την προέλευση και θέση των εκφύτων, καθώς και την εποχή συλλογής τους.



Σχήμα 3. Τρόπος υπολογισμού εμβαδού της κορυφής λιγνίνης στο μέσο φάσμα.

Περιοχή στα 1508 cm ⁻¹			Μέση περιοχή	Περιεκτικότητα σε λιγνίνη (%)
0	0	0	0	0.000
0.642	0.621	0.635	0.63	0.625
0.801	0.852	0.957	0.87	1.000
1.491	1.502	1.387	1.46	1.250
1.740	1.684	1.756	1.73	2.000
2.356	2.400	2.412	2.39	2.500
2.987	3.122	3.115	3.07	4.000
4.113	4.111	4.065	4.10	5.000
5.612	5.622	5.589	5.61	8.000
6.762	6.843	6.759	6.79	10.000



Σχήμα 4. Εξίσωση καμπύλης αναφοράς για περιεκτικότητα (%) σε λιγνίνη.

Η λήψη και η επεξεργασία των φασμάτων IR έγινε στο Εργαστήριο Χημείας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, υπό την καθοδήγηση του Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Πέτρου Ταραντίλη.

2.10. Πειραματικό - Εκτίμηση αποτελεσμάτων

Ο αριθμός των επαναλήψεων ανά επέμβαση γενικά ήταν υψηλός, αλλά δεν ήταν σταθερός εξαρτώμενου τούτου από τη διαθεσιμότητα του φυτικού υλικού σε κάθε στάδιο. Κατά την παρουσίαση των αποτελεσμάτων, ο αντιπροσωπευτικός αριθμός των επαναλήψεων κάθε σταδίου αναφέρεται στα διαγράμματα και τους πίνακες με το γράμμα n .

Το στάδιο της εγκατάστασης *in vitro* καλλιέργειας διαρκούσε έξι εβδομάδες και οι μετρήσεις λαμβάνονταν τη 2^η ημέρα, την 3^η και την 6^η εβδομάδα. Μετρήθηκαν το ποσοστό μόλυνσης, το ποσοστό έκχυσης φαινολικών, το ποσοστό σχηματισμού κάλου, το ποσοστό σχηματισμού βλαστών, ο αριθμός και το μήκος των βλαστών ανά έκφυτο που εμφάνισε βλαστογένεση.

Οι υποκαλλιέργειες με στόχο των πολλαπλασιασμό των βλαστών διαρκούσαν έξι εβδομάδες και οι μετρήσεις λαμβάνονταν κάθε έξι εβδομάδες. Καταγραφόταν το ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισε κάλο, το ποσοστό αυτών που σχημάτισε βλαστούς, ο αριθμός και το μήκος των βλαστών ανά έκφυτο που εμφάνισε βλαστογένεση. Σε κάποια στάδια μετρήθηκε και το ποσοστό των υαλωμένων βλαστών επί του συνόλου των σχηματισθέντων βλαστών.

Τα πειράματα ριζοβολίας, ενώ αρχικά διαρκούσαν και αυτά έξι εβδομάδες, η διάρκειά τους περιορίστηκε στις τέσσερις εβδομάδες γιατί ο χρόνος αυτός ήταν αρκετός για την ολοκλήρωση της ριζοβολίας των μικροβλαστών. Μετρήσεις λαμβάνονταν την 1^η, 2^η και 4^η εβδομάδα. Καταγραφόταν το ποσοστό των μικροβλαστών που σχημάτισε κάλο στη βάση του, το ποσοστό των μικροβλαστών με ξήρανση φύλλων και κορυφής, το ποσοστό αυτών που σχημάτισε ρίζες, ο αριθμός και το μήκος των ριζών ανά βλαστό που ριζοβόλησε.

Στον εγκλιματισμό των φυταρίων *ex vitro*, μετρήσεις λαμβάνονταν κάθε δύο εβδομάδες. Καταγραφόταν το ποσοστό των φυταρίων που εγκλιματίστηκε, το ύψος των φυταρίων και ο αριθμός των κόμβων ανά φυτάριο που εγκλιματίστηκε. Σε κάποια πειράματα, μετρήθηκε επίσης ο αριθμός και το μήκος των ριζών ανά φυτάριο που εγκλιματίστηκε.

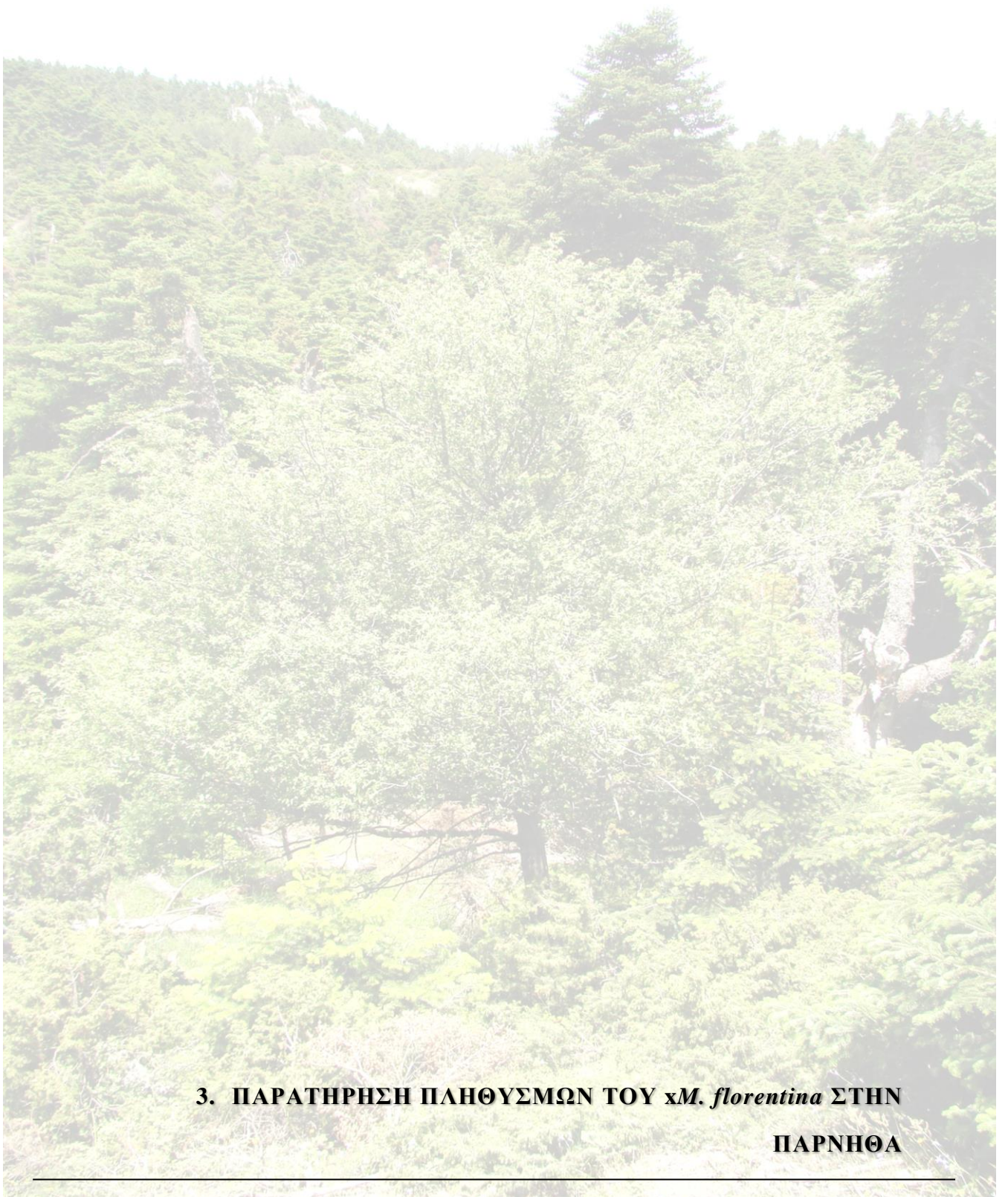
2.11. Στατιστική ανάλυση

Για τη διεξαγωγή της στατιστικής ανάλυσης των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκε το στατιστικό πρόγραμμα **JMP IN** (SAS Institute Inc.).

Στα πειράματα ακολουθήθηκε το **Εντελώς Τυχαιοποιημένο Σχέδιο**. Χρησιμοποιήθηκε το μονοπαραγοντικό ή διπαραγοντικό σχέδιο ανάλογα με την περίπτωση. Η σημαντικότητα όλων των αποτελεσμάτων εξετάστηκε με τη **δοκιμασία του F** (F test) για επίπεδο

σημαντικότητας $P \leq 0.05$ ή $P \leq 0.01$. Οι συγκρίσεις των μέσων έγιναν με την **H.S.D** της μεθόδου **Tukey-Kramer** για $P=0.05$ και $P=0.01$.

Στους πίνακες των διπαραγοντικών πειραμάτων, αναφέρονται οι τιμές του F για τις κύριες επιδράσεις και την αλληλεπίδρασή τους. Τα σύμβολα * ή ** δίπλα στις τιμές του F δηλώνει ότι οι συγκεκριμένες τιμές σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ή 1% ήταν σημαντικές. Το ίδιο σύμβολο χρησιμοποιείται και για τις τιμές του F της μονοπαραγοντικής ανάλυσης. Οι μέσοι των επεμβάσεων, που διέφεραν σημαντικά, σημειώνονται με διαφορετικά γράμματα του λατινικού αλφαβήτου στους πίνακες και τα διαγράμματα των αποτελεσμάτων. Ο αριθμός των επαναλήψεων που χρησιμοποιήθηκαν ανά πειραματική διαδικασία αναγράφεται σε κάθε πίνακα ή διάγραμμα αποτελεσμάτων.



3. ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΤΟΥ *xM. florentina* ΣΤΗΝ

ΠΑΡΝΗΘΑ

ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3. ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΗ ΠΛΗΘΥΣΜΩΝ ΤΟΥ *xM. florentina* ΣΤΗΝ ΠΑΡΝΗΘΑ

3.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Όπως ήδη αναφέρθηκε στην Εισαγωγή (ενότητα 1.2.), στην Ελλάδα το *xMalosorbus florentina* απαντάται σε έξι διαφορετικές τοποθεσίες, ενώ οι μεγαλύτεροι πληθυσμοί του βρίσκονται στον Εθνικό Δρυμό της Πάρνηθας (Christensen, 1995). Χάρη στην εύκολη πρόσβασή μας στους πληθυσμούς της Πάρνηθας, πραγματοποιήθηκαν συχνές επισκέψεις για τη λήψη φαινολογικών παρατηρήσεων επί της ανάπτυξης, της άνθισης και της καρποφορίας των φυτών κατά την περίοδο 2004-2010. Μετά τη φωτιά του 2007 στην Πάρνηθα, που έκαψε μεγάλο μέρος του πυρήνα του Δρυμού όπου βρίσκονται και οι πληθυσμοί του *xM. florentina*, έγινε καταγραφή της επίδρασής της καταστροφική πυρκαγιά στους πληθυσμούς του είδους και της δυνατότητας αναβλάστησης αυτών.

3.2. ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ

3.2.1. Φαινολογικές παρατηρήσεις στους πληθυσμούς του *xMalosorbus florentina* στην Πάρνηθα

Στην Πάρνηθα, οι πληθυσμοί του *xMalosorbus florentina* βρίσκονται στις τοποθεσίες Αγία Τριάδα, 1.5 km από την Αγ. Τριάδα στο δρόμο προς τη Μόλα και Κορομηλιά. Αντικείμενο της μελέτης μας από το 2004 αποτέλεσε ο πληθυσμός που βρίσκεται σε απόσταση 1.5 km από την Αγ. Τριάδα, στην πλαγιά πάνω από το δρόμο, και περιλαμβάνει 30 περίπου δένδρα, ύψους 2-6 m, και μερικά σπορόφυτα (Εικ. 3, 10).



Εικόνα 10. Μια συστάδα δένδρων του *xMalosorbus florentina* από τον πληθυσμό της Πάρνηθας σε απόσταση 1.5 km από την Αγ. Τριάδα στο δρόμο προς τη Μόλα (Μάιος 2006).

Το χρονικό διάστημα 2006-2007 πραγματοποιήθηκαν μηνιαίες επισκέψεις στην Πάρνηθα και συλλέχθηκαν χρήσιμες φαινολογικές παρατηρήσεις επί των σταδίων ανάπτυξης των φυτών στη διάρκεια του έτους. Η έκπτυξη των οφθαλμών έγινε τέλος Μαρτίου-αρχές Απριλίου, ακολουθούμενη από μία περίοδο ταχείας ανάπτυξης των βλαστών τον Απρίλιο και Μάιο. Ο χρόνος άνθισης των φυτών ήταν το δεύτερο δεκαπενθήμερο του Μαΐου με αρχές Ιουνίου, όμως δεν παρατηρήθηκαν άνθη σε όλα τα φυτά. Ο ρυθμός ανάπτυξης της βλάστησης επιβραδύνθηκε τον Ιούνιο και σταμάτησε μέσα Ιουλίου-αρχές Αυγούστου. Το Σεπτέμβριο άρχισε η αλλαγή του χρώματος των φύλλων σε ορειγάλκινο, ενώ τέλη Οκτωβρίου-αρχές Νοεμβρίου είχε ολοκληρωθεί η αποφύλλωση των φυτών. Το Σεπτέμβριο αναζητήθηκαν καρποί, όμως δε βρέθηκε κανένας το 2004, ενώ τα έτη 2005 και 2006 συλλέχθηκαν συνολικά 5 καρποί, που περιείχαν από 1-3 σπέρματα ανά καρπό. Πολλά φυτά έμοιαζαν στείρα, καθώς δεν άνθισαν ή δεν καρποφόρησαν καθόλου κατά τη διάρκεια αυτών των ετών.

Μετά την πυρκαγιά του 2007, ελήφθησαν φαινολογικές παρατηρήσεις ανάπτυξης από τα δύο απομονωμένα ενήλικα φυτά στην τοποθεσία Κορομηλιά, τα οποία δεν κάρηκαν. Το μεγαλύτερο από τα δύο (Εικ. 1), με ύψος 5 m περίπου, έφερε πολύ λίγους καρπούς το Σεπτέμβριο 2007, οι οποίοι όμως περιείχαν μόνο ατροφικά σπέρματα, ενώ στο τέλος Μαΐου 2009 βρέθηκε γεμάτο άνθη παράγοντας πολυάριθμους καρπούς το φθινόπωρο (Εικ. 11α). Την επόμενη χρονιά (Μάιος 2010) παρατηρήθηκε πολύ φτωχή ανθοφορία (Εικ. 11β). Το άλλο φυτό, με ύψος 3.5 m περίπου, δεν έφερε κανένα καρπό το 2007 ούτε άνθησε το 2009, ενώ είχε πλούσια ανθοφορία το 2010 (Εικ. 11γ). Οι παρατηρήσεις αυτές δείχνουν ότι το *xM. florentina* χαρακτηρίζεται από πολύ έντονη παρεννιαυτοφορία.



Εικόνα 11. Πλούσια καρποφορία από του ενός από τα δύο φυτά *xMalosorbus florentina* της τοποθεσίας Κορομηλιά το Σεπτέμβριο 2009 (α), ακολουθούμενη από φτωχή ανθοφορία το Μάιο 2010 (β) και πλούσια ανθοφορία του δεύτερου φυτού (Μάιος 2010) μετά από δύο χρονιές ακαρπίας (γ).

Από το μεγάλο φυτό της τοποθεσίας Κορομηλιά, το Σεπτέμβριο 2009, συλλέχθηκαν 310 καρποί. Μετρήθηκαν τα ακόλουθα μορφολογικά χαρακτηριστικά καρπών: μέση κατακόρυφη διάμετρος καρπού (9.7 mm), μέση οριζόντια διάμετρος καρπού (10.4 mm), μέσο μήκος ποδίσκου καρπού (4.7 cm) και μέσο βάρος καρπού (0.72 g). Καλοσχηματισμένα σπέρματα (Εικ. 12β) βρέθηκαν μόνο σε 6 από τους συλλεχθέντες καρπούς (στο 1.9% των καρπών), ενώ οι υπόλοιποι περιείχαν ατροφικά σπέρματα (Εικ. 12γ). Η διάκριση ποιοτικών κατηγοριών με βάση το βάρος των καρπών αποκάλυψε ότι μόνο το 11% των καρπών είχε βάρος μεγαλύτερο των 0.90 g (Εικ. 12α) και ότι μόνο σε μερικούς από τους μεγαλύτερους καρπούς (στο 20%) περιέχονταν από ένα καλοσχηματισμένο σπέρμα. Οι υπόλοιποι καρποί περιείχαν μόνο ατροφικά σπέρματα. Μετρήθηκαν και τα ακόλουθα χαρακτηριστικά του σπέρματος: μέσο μήκος σπέρματος (0.5 cm), μέσο πλάτος σπέρματος (0.3 cm) και μέσο βάρος σπέρματος (0.018 g).



ΕΙΚΟΝΑ 12. Καρποί που συλλέχθηκαν το Σεπτέμβριο 2009 και χωρίστηκαν στις αναγραφόμενες ποιοτικές κατηγορίες ανάλογα με το βάρος (g) τους (α), καλοσχηματισμένα σπέρματα (β) και ατροφικά σπέρματα του *Malosorbus florentina* (γ).

Την περίοδο από Μάρτιο μέχρι Μάιο 2010, χρονιά που ακολούθησε την πλούσια καρποφορία του 2009, ελήφθησαν παρατηρήσεις σχετικά με τον τρόπο που εξελίχθηκε η βλάστηση στο μεγάλο φυτό της τοποθεσίας Κορομηλιά, με στόχο να συσχετιστεί η εξέλιξη των οφθαλμών από κανονικές και λογχοειδείς βλαστήσεις πάνω στο φυτό με την ικανότητα εκφύτων που είχαν συλλεχθεί από αντίστοιχους βλαστούς, το Μάρτιο 2010, πριν την έκπτυξη της νέας βλάστησης, να εγκαταστήσουν *in vitro* καλλιέργεια (κεφάλαιο 4.2.1.).

Το *M. florentina*, ως μηλοειδές που είναι, σχηματίζει κανονικές βλαστήσεις και κοντές βλαστήσεις, τα λογχοειδή, που μπορεί να είναι ανθοφόρα ή φυλλοφόρα. Παρατηρήθηκαν λογχοειδή με έναν μικρό οφθαλμό επάκρια (Εικ. 13α), που όταν εκπτύχθηκε έδωσε πάλι λογχοειδές (Εικ. 13γ), λογχοειδή με έναν μεγάλο οφθαλμό επάκρια (Εικ. 13β), που όταν εκπτύχθηκε έδωσε λογχοειδές ή κανονική βλάστηση, καθώς και λογχοειδή με δύο

οφθαλμούς, που ήταν αυτά που ως επί το πλείστον είχαν καρποφορήσει την προηγούμενη χρονιά, αφού ήταν εμφανές το σημείο αποκοπής του ποδίσκου της ταξικαρπίας (Εικ. 13β). Ο ανώτερος οφθαλμός των μεγάλων λογχοειδών ήταν μεγαλύτερος από τον κατώτερο και έδινε λογχοειδές ή κανονική βλάστηση, ενώ ο κατώτερος συνήθως έδινε λογχοειδές είτε σχημάτιζε κοντύτερη κανονική βλάστηση (Εικ. 13δ). Οι επάκριοι οφθαλμοί των κανονικών βλαστήσεων (Εικ. 13α) έδωσαν ξανά κανονική βλάστηση (Εικ. 13ε). Επειδή ήμασταν σε χρονιά παρενειαυτοφορίας τα περισσότερα λογχοειδή ήταν φυλλοφόρα και η ανθοφορία ήταν πολύ φτωχότερη από το 2009.



Εικόνα 13. Κανονικές βλαστήσεις και λογχοειδή με έναν μικρό οφθαλμό (α) και λογχοειδή με έναν μεγάλο ή με δύο οφθαλμούς (β) το Μάρτιο 2010, πριν την έκπτυξη της νέας βλάστησης. Χαρακτηριστική εξέλιξη της βλάστησης από λογχοειδή με έναν οφθαλμό (γ), λογχοειδή με δύο οφθαλμούς (δ) και κανονικές βλαστήσεις (ε) του *xMalosorbus florentina* το Μάιο 2010 στην τοποθεσία Κορομηλιά.

3.2.2. Επίδραση της καταστροφικής πυρκαγιάς του 2007 στην Πάρνηθα στους πληθυσμούς του σπάνιου και απειλούμενου *xMalosorbus florentina*

Η καταστροφική πυρκαγιά του 2007 στην Πάρνηθα έκαψε μεγάλο τμήμα του πυρήνα του Δρυμού, όπου βρίσκονταν και οι πληθυσμοί του *xM. florentina*, με αποτέλεσμα να καούν όλα τα φυτά (Εικ. 14), με εξαίρεση τα δύο μόνο απομακρυσμένα φυτά στην τοποθεσία Κορομηλιά σε χαμηλότερο υψόμετρο (Εικ. 1).



Εικόνα 14. Καταστροφή πληθυσμού του *xMalosorbus florentina* που βρίσκεται σε απόσταση 1.5 km από την Αγ. Τριάδα στο δρόμο προς τη Μόλα από την πυρκαγιά του Ιουνίου 2007 στην Πάρνηθας (Ιούλιος 2007).

Ένα μήνα μετά την πυρκαγιά του Ιουνίου του 2007 στην Πάρνηθα, ξεκίνησε η μελέτη της αναβλάστησης των καμένων *M. florentina* στον πληθυσμό που βρίσκεται σε απόσταση 1.5 km από την Αγ. Τριάδα στο δρόμο προς τη Μόλα, στην πλαγιά πάνω από το δρόμο, και περιλαμβάνει 30 περίπου δένδρα, ύψους 2-6 m, και μερικά σπορόφυτα. Η αναβλάστηση των καμένων *xM. florentina*, τα οποία εν τω μεταξύ είχαν κοπεί χαμηλά στον κορμό για τη δημιουργία κορμοδεμάτων, ξεκίνησε δύο μήνες περίπου μετά τη φωτιά (Εικ. 15) και μέχρι το τέλος της βλαστητικής περιόδου (Νοέμβριος 2007), είχαν αναβλαστήσει όλα τα φυτά.



Εικόνα 15. Δημιουργία κορμοδεμάτων και αναβλάστηση των καμένων *xM. florentina* τον 3^ο μήνα μετά την πυρκαγιά (Σεπτέμβριος 2007).

Σημαντικό αποδείχθηκε το πρόβλημα της βόσκησης, πιθανότατα από τα ελάφια, αφού τον Μάρτιο 2009 τα φυτά βρέθηκαν να έχουν εκπτώξει παρά πολλούς ξυλοποιημένους βλαστούς από τη βάση τους, οι οποίοι όμως ήταν φαγωμένοι (Εικ. 16α). Τους μήνες που ακολούθησαν εκπτύχθηκε πλούσια βλάστηση, ακόμη και από ρίζες σε απόσταση από τον αρχικό κορμό, έτσι ώστε παντού γύρω από τα αρχικά φυτά να υπάρχουν αναβλαστήσεις (Εικ. 16γ). Όμως, τον Αύγουστο 2009 τα περισσότερα φυτά βρέθηκαν και πάλι με τους βλαστούς τους σοβαρά τραυματισμένους από βόσκηση (Εικ. 16β). Την επόμενη χρονιά το πρόβλημα ήταν ακόμη εντονότερο, αφού λόγω της ξηρασίας ο τραυματισμός των αναβλαστήσεων από τη βόσκηση ξεκίνησε ήδη από το Μάιο 2010 και συνεχίστηκε καθ' όλη τη διάρκεια του καλοκαιριού. Σε πρόσφατη επίσκεψη στην περιοχή (Οκτώβριος 2012), παρατηρήθηκε ότι το πρόβλημα της βόσκησης εξακολουθεί να είναι σοβαρό με αποτέλεσμα να παρεμποδίζεται η φυσική αναγέννηση των φυτών.



Εικόνα 16. Τραυματισμένοι από βόσκηση βλαστοί το Μάρτιο 2009 (α) και τον Αύγουστο 2009 (β), και έκπτυξη αναβλαστήσεων από τις ρίζες σε απόσταση από τον κορμό των καμένων *M. florentina* κατά τη διάρκεια της βλαστητικής περιόδου 2009 (γ).

Άλλα είδη που αναβλάστησαν στην περιοχή ήταν: το πουρνάρι (*Quercus coccifera*), δύο είδη βελανιδιάς (*Quercus pubescens* και *Q. ilex*), ο κράταιγος (*Crataegus heldreichii*), η βερβερίδα (*Berberis cretica*), η αγριοτριανταφυλλιά (*Rosa canica*), ο βάτος (*Rubus* sp.), όμως

σε αυτά δεν παρατηρήθηκαν τραυματισμένοι βλαστοί από βόσκηση (Εικ. 17α). Στην περιοχή φυτεύτηκε μεγάλος αριθμός ελάτων (*Abies cephalonica*) κατά μήκος των κορμοφραγμάτων τα οποία εγκαταστάθηκαν με επιτυχία (Εικ. 17β), ενώ η οξύκεδρη άρκευθος (*Juniperus oxycendrus* subsp. *oxycendrus*) ανήκει στα είδη που θα επανέλθουν με πολύ αργό ρυθμό την περιοχή, εξαιτίας της βραδείας ανάπτυξής του (Δ2).



Εικόνα 17. Εικόνα της περιοχής όπου φύονται τα φυτά *xM. florentina* το δεύτερο χρόνο μετά την πυρκαγιά (α), και επιτυχής φύτευση ελάτων (*Abies cephalonica*) κατά μήκος των κορμοφραγμάτων (β) (Αύγουστος 2009).

3.3. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

3.3.1. Παρατήρηση των πληθυσμών του *xMalosorbus florentina* στην Πάρνηθα

Η παρατήρηση ενήλικων φυτών του *xM. florentina* από τους πληθυσμούς της Πάρνηθας που βρίσκονται σε απόσταση 1.5 Km από την Αγ. Τριάδα στο δρόμο προς τη Μόλα (30 περίπου φυτά) και στην τοποθεσία Κορομηλιά (δύο φυτά), το χρονικό διάστημα 2006-2010, προσδιόρισε χρονικά μέσα στο έτος τα διάφορα στάδια ανάπτυξης των φυτών, όπως έκπτυξη βλάστησης, άνθιση, καρπόδεση, αναστολή βλάστησης, μεταχρωματισμός φύλλων, φυλλόπτωση, ενώ αποκάλυψε την έντονη παρεννευτοφορία που αυτά παρουσιάζουν.

Ήταν δύσκολο να βρεθούν καρποί, και ακόμη δυσκολότερο σπέρματα του φυτού, αφού το 98% των καρπών που συλλέχθηκαν περιείχε μόνο ατροφικά σπέρματα. Κανονικά σπέρματα βρέθηκαν μόνο στο 1/5 των μεγαλύτερων καρπών (βάρους μεγαλύτερου των 0.90 g). Επομένως, εάν κάποιος ενδιαφέρεται να συλλέξει σπέρματα του φυτού, θα πρέπει να επιλέξει τους μεγαλύτερους καρπούς, που είναι πιθανότερο να περιέχουν καλοσηματισμένα σπέρματα.

Το πρόβλημα της μη παραγωγής καρπών ή της παραγωγής καρπών με ατροφικά σπέρματα μάλλον σχετίζεται με κάποιο πρόβλημα στην επικονίαση και γονιμοποίηση. Το *xM. florentina*, ως μηλοειδές, πρέπει να είναι σταυρογονιμοποιούμενο και να χαρακτηρίζεται από γαμετοφυτική αυτό-ασυμβατότητα, όπως συμβαίνει και με το *Sorbus torminalis* (Bellelli *et al.*, 2008) και τα *Sorbus aucuparia* και *Crataegus monogyna* (Raspé and Kohn, 2002). Επομένως, τα φυτά στην τοποθεσία 1.5 km από την Αγ. Τριάδα μπορεί να μην έχουν ικανοποιητική γενετική παραλλακτικότητα για σταυρογονιμοποίηση, ενώ αυτά στην τοποθεσία Κορομηλιά είναι μόνο δύο και απομονωμένα σε μακρινή τοποθεσία, όπου δύσκολα μπορεί να μεταφερθεί η γύρη από τους άλλους πληθυσμούς της Πάρνηθας. Ιδιαίτερα μετά την πυρκαγιά, είναι αδύνατο να σταυρογονιμοποιηθούν τα δύο φυτά στην τοποθεσία Κορομηλιά, αφού τα υπόλοιπα φυτά έχουν καεί.

Εκτενείς έρευνες που έχουν γίνει πάνω στην επίδραση του μεγέθους του πληθυσμού και της απομόνωσης του χώρου στη σύγχρονη ροή γονιδίων μέσω της γύρης και τους τρόπους γονιμοποίησης του σπάνιου και αραιοκατανεμημένου *Sorbus torminalis*, μπορούν να δώσουν κάποιες εξηγήσεις για τη φτωχή ανθοφορία και καρποφορία, που παρατηρήθηκε στους πληθυσμούς του *xM. florentina* στην Πάρνηθα. Κατά τους Rasmussen and Kollmann (2004), φυτά που αναπτύσσονται σε μικρούς διασπασμένους πληθυσμούς υπό πιεστικές περιβαλλοντικές συνθήκες μπορεί να έχουν μειωμένη εγγενή αναπαραγωγή, η οποία μπορεί να προκαλέσει χαμηλή ροή γονιδίων μεταξύ των πληθυσμών και ενδεχομένως εξαφάνιση. Υπήρχε η ένδειξη πως η έλλειψη γονιμοποίησης και η αυθόρμητη αυτογονιμοποίηση προκάλεσε ιδιαίτερα υψηλή αποβολή καρπών, η οποία υποδεικνύει ότι η απόμιξη είναι απίθανη και η αυθόρμητη αυτογονιμοποίηση ανεπαρκής. Σε άλλη εργασία του Hoebee *et al.* (2007), ο μικρός (27 φυτά *S. torminalis*) και απομονωμένος πληθυσμός περιελάμβανε χαμηλότερο ποσοστό δένδρων που άνθιζαν, έδειξε λιγότερο έντονη ανθοφορία, χαμηλότερη καρποφορία, λιγότερα ανεπτυγμένα σπέρματα ανά καρπό, αυξημένη αυτογονιμοποίηση και δέχτηκε λιγότερη μεταναστευτική γύρη συγκριτικά με το μεγαλύτερο συνεχή πληθυσμό (96 φυτά *S. torminalis*), ενώ αυτοί οι παράμετροι διέφεραν από χρονιά σε χρονιά. Επίσης, ανέφεραν ότι μερικά δένδρα τα οποία άνθισαν δεν έδεσαν κανένα καρπό και στους δύο πληθυσμούς, ενώ ένα δένδρο παρήγαγε πολυάριθμους καρπούς, αλλά κανέναν από τις αρκετές εκατοντάδες καρπούς που εξετάστηκαν δεν περιείχε ανεπτυγμένα σπέρματα, τα οποία παρατηρήθηκαν και στους πληθυσμούς του *xM. florentina* της Πάρνηθας.

Από τον τρόπο που εξελίχθηκε η βλάστηση στο μεγάλο φυτό της τοποθεσίας Κορομηλιά την περίοδο από Μάρτιο μέχρι Μάιο 2010, φάνηκε ότι για την εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας από ενήλικα φυτά θα πρέπει να προτιμούνται οι οφθαλμοί από κλάδους που

ανθοφόρησαν την προηγούμενη χρονιά, επειδή την τρέχουσα χρονιά δε σχηματίζουν άνθη αλλά δίνουν αρκετές κανονικές βλαστήσεις, ιδιαίτερα οι επάκριοι οφθαλμοί των κανονικών βλαστήσεων και οι ανώτεροι οφθαλμοί των μεγάλων λογχοειδών, που έχουν την τάση να δίνουν κανονική βλάστηση. Τα αποτελέσματα της εγκατάστασης *in vitro* εκφύτων που είχαν συλλεχθεί το Μάρτιο 2010 από αντίστοιχες βλαστήσεις, που παρουσιάζονται στην ενότητα 4.3.1.2., θα δείξουν αν έχει βάση ο παραπάνω ισχυρισμός.

3.3.2. Επιπτώσεις της καταστροφικής πυρκαγιάς του 2007 στην Πάρνηθα στους πληθυσμούς του σπάνιου και απειλούμενου *Malosorbus florentina* και ο μικροπολλαπλασιασμός ως μέσο διάσωσης του είδους

Όλα τα φυτά του *M. florentina* από τους πληθυσμούς της Πάρνηθας κήκον από την καταστροφική πυρκαγιά του Ιουνίου 2007, με εξαίρεση τα δύο μόνο απομακρυσμένα φυτά στην τοποθεσία Κορομηλιά. Παρά την πλούσια αναβλάστηση από τη βάση του κορμού και τις ρίζες των καμένων φυτών, η φυσική αναγέννηση των φυτών παρεμποδίστηκε από την έντονη και επίμονη βόσκηση, πιθανότατα από τα ελάφια.

Σύμφωνα με τη μελέτη της Arlada *et al.* (2007), που δημοσιεύτηκε λίγο πριν την πυρκαγιά, ο τελευταίος εναπομείναν ελληνικός πληθυσμός του κόκκινου ελαφιού (*Cervus elaphus* L.) στην Πάρνηθα είναι μεγαλύτερος από ότι το δάσος μπορεί να συντηρήσει (εκτιμάται στα 400 άτομα) και σταθερά αυξανόμενος. Τα ελάφια ξεριζώνουν μικρά δένδρα και διάφορα φυτά και καταστρέφουν τον κορμό μεγαλύτερων δένδρων. Επίσης, στην Πάρνηθα έχει εισαχθεί μικρός πληθυσμός του κρητικού αγριοκάτσικου (*Caprus aegagrus* subsp. *cretica*) από το 1961, του οποίου η τωρινή κατάσταση και οι συνέπειες στα οικοσυστήματα του βουνού παραμένουν άγνωστες. Πάντως, η εισαγωγή του κρητικού αγριοκάτσικου σε μικρά νησιά της βόρειας Κρήτης που διατηρούν ενδημικά φυτά αποδείχτηκε καταστροφική για τα οικοσυστήματα αυτών των νησιών. Και για το *Sorbus torminalis* έχει αναφερθεί σοβαρή βόσκηση από ζαρκάδι (*Capreolus capreolus*) (Biednkorpf *et al.*, 2007), ενώ πολύ λίγα σπορόφυτα του *Malus sylvestris* επέζησαν υπό συνεχή βόσκηση (Buttenschøn and Buttenschøn, 1998). Η εντατική βόσκηση από κοπάδια αιγών και προβάτων που βόσκουν ελεύθερα έχει θεωρηθεί ως η σημαντικότερη απειλή για την ελληνική χλωρίδα, ιδιαίτερα επειδή μπορεί να επηρεάσει ορισμένους πληθυσμούς σπάνιων φυτών (Broussalis, 1977).

Από την άλλη υπάρχουν ενδείξεις ότι η μεγάλη έκταση και η ένταση της πυρκαγιάς του 2007 οφείλεται σε ένα βαθμό στη συσσώρευση βιομάζας που προέκυψε έπειτα από πολλές δεκαετίες απόλυτης προστασίας του ξυλώδους κεφαλαίου ή απλά την εγκατάλειψη των

παραδοσιακών δραστηριοτήτων που αφαιρούσαν ένα μέρος της βλάστησης, όπως είναι η βόσκηση από τα κτηνοτροφικά ζώα και ο καθαρισμός του υπορόφου στα ρητινευόμενα δάση χαλέπιου πεύκης. Σε αυτή την περίπτωση, τα ελάφια θα μπορούσαν να παίξουν το ρόλο του φυσικού βοσκητή, υποκαθιστώντας τα κτηνοτροφικά ζώα, περιορίζοντας την καύσιμη ύλη και περιορίζοντας το φαινόμενο της «ομογενοποίησης του τοπίου», δηλαδή της εισβολής θάμνων και δένδρων στο τοπίο που παλαιότερα περιελάμβανε πολλά ανοίγματα που αύξαναν τη συνολική βιοποικιλότητα της περιοχής. Ωστόσο, απουσία των μεγάλων θηρευτών του ελαφιού, όπως οι λύκοι, από την Πάρνηθα, δεν αποκλείεται τα ζώα να πιέσουν υπερβολικά το δασικό έδαφος και τη βλάστηση συνολικά ή ορισμένα είδη χλωρίδας, εάν ο πληθυσμός τους ξεπεράσει κάποια επίπεδα, που θα πρέπει να προσδιοριστούν. Θα πρέπει να εφαρμοστεί σχέδιο παρακολούθησης των επιπτώσεων της δραστηριότητας των ελαφιών στην βλάστηση, ιδιαίτερα στο ελατοδάσος, αλλά και να προβλεφθούν οι μελλοντικές επιπτώσεις της επίδρασης των ελαφιών στη βλάστηση, ιδιαίτερα εάν αυξηθεί περαιτέρω ο πληθυσμός τους (Δ2).

Άλλα είδη που αναβλάστησαν στην περιοχή, όπως το πουρνάρι, ο κράταιγος, η βερβερίδα, η αγριοτριανταφυλλιά και ο βάτος, τα οποία έχουν αγκαθωτά φύλλα ή αγκάθια στους βλαστούς τους, δεν έφεραν τραυματισμένους από βόσκηση βλαστούς, ενώ και τα δύο είδη βελανιδιάς που υπάρχουν στην περιοχή δε φάνηκαν να προτιμούνται από τα ελάφια. Τα φυτάρια κεφαλληνιακής ελάτης, που φυτεύθηκαν κατά μήκος των κορμοφραγμάτων, εγκαταστάθηκαν με επιτυχία.

Παρά την εκπληκτική ικανότητα αναβλάστησης μετά τη φωτιά που επέδειξαν τα καμένα φυτά του *xM. florentina*, οι πληθυσμοί του ακόμη απειλούνται από την επιλεκτική και επίμονη βόσκηση. Δεδομένης της σπανιότητας του είδους, ο μικροπολλαπλασιασμός, εκτός από τη δυνατότητα που προσφέρει για αξιοποίηση του φυτού ως καλλωπιστικό, θα μπορούσε να αποτελέσει μέσο για τη διάσωσή του και την παραγωγή φυταρίων για αναδασώσεις. Επιπλέον, οι τοποθεσίες όπου φυτρώνει θα πρέπει να περιφραχθούν για να αποτραπεί η βόσκηση και να συνεχιστεί απρόσκοπτα η φυσική αναγέννηση του είδους.



4. ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗ *IN VITRO* ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΤΟΥ

xM. florentina

4. ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗ *IN VITRO* ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ του *xM. florentina*

4.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η έναρξη καλλιέργειας είναι ίσως το πιο κρίσιμο στάδιο του μικροπολλαπλασιασμού, γιατί η δυναμικότητα για αναγέννηση πολλαπλών βλαστών χαρακτηρίζει μεμονωμένους οφθαλμούς (Marks and Myers, 1992a, 1992b). Καλλιέργειες βλαστών που προέρχονται από ίδιου τύπου έκφυτα μπορεί να επιδεικνύουν διαφορετικό βαθμό παραγωγής βλαστών και ικανότητα ριζοβολίας (Webster and Jones, 1989) και για τη συνέχιση της καλλιέργειας θα πρέπει να επιλέγονται μόνο τα καλύτερα έκφυτα (Lane, 1992).

Η επιτυχία της εγκατάστασης *in vitro* καλλιιεργειών του *xM. florentina* εξαρτήθηκε από την εξεύρεση αποτελεσματικής μεθόδου απολύμανσης των εκφύτων και περιορισμού του προβλήματος του καφετιάσματος των εκφύτων και της έκχυσης φαινολικών στο υπόστρωμα, που είχε ως αποτέλεσμα τη νέκρωση των εκφύτων. Σε αυτό το στάδιο του μικροπολλαπλασιασμού, εξετάσθηκε η επίδραση της ενήλικης ή νεανικής προέλευσης των εκφύτων, της θέσης των εκφύτων πάνω στο βλαστό, καθώς και των φυτορρυθμιστικών ουσιών στην ικανότητα βλαστογένεσης των εκφύτων. Επίσης, προσδιορίστηκε η περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά, με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu, και μελετήθηκε η χημική σύσταση και η περιεκτικότητα σε λιγνίνη, με την τεχνική FT-IR, εκφύτων από διάφορες θέσεις και μητρικά φυτά, καθώς και πραγματοποιήθηκε μικροσκοπική παρατήρηση των οφθαλμών από ενήλικα φυτά σε μηνιαία βάση κατά τη διάρκεια ενός έτους.

4.1.1. Καφέτιασμα εκφύτων

Το καφέτιασμα των εκφύτων είναι ένα κοινό πρόβλημα σε καλλιέργειες ξυλωδών ειδών, που έχει γενικά αποδοθεί στην οξειδωση των φαινολικών συστατικών στους ιστούς του εκφύτου σε κινόνες, που είναι υψηλής δραστηριότητας και παρεμποδίζουν την ενζυμική δραστηριότητα οδηγώντας στο θάνατο των εκφύτων (Hu and Wang, 1983).

Οι δομές σημαντικών φαινολικών και πολυφαινολικών ενώσεων δίνονται στο Παράρτημα II.

Έχουν αναπτυχθεί αρκετές μέθοδοι για να αποτρέψουν ή να ελέγξουν το καφέτιασμα των εκφύτων μηλιάς συμπεριλαμβανομένων των μεταχειρίσεων του μητρικού φυτού (συσκότιση ή μεταχείριση με θερμότητα), έτσι ώστε να έρθει σε

ιδανικές φυσιολογικές συνθήκες, απευθείας μεταχειρίσεις των εκφύτων κατά την έναρξη της καλλιέργειας (προμεταχείριση με αντιοξειδωτικά, ψυχρή ή σκοτεινή μεταχείριση), συμπληρώνοντας το αρχικό υπόστρωμα με διαφορετικά πρόσθετα που μπορούν να αποτρέψουν την παραγωγή των φαινολικών ή μπορούν να απομακρύνουν τις παρεμποδιστικές φαινολικές ουσίες, όπως τα αντιοξειδωτικά, τα χηλικά-σχηματισμένα υλικά ή τα προσροφητικά (Dobránszki and Teixeira da Silva, 2010), η χρήση μικρότερων εκφύτων, τα οποία παράγουν λιγότερα φαινολικά (Lane, 1992; Kaushal *et al.*, 2005) και η συχνή υποκαλλιέργεια σε φρέσκο υπόστρωμα (Hu and Wang, 1983).

Αρκετοί παράγοντες, που επηρεάζουν το φαινολο-προωθούμενο καφέτιασμα και την εγκατάσταση *in vitro* εκφύτων κορυφής βλαστού μηλιάς *Malus pumila* cv. Fuji και αχλαδιάς *Pyrus bretschneideri* cv. Jinhua, διερευνήθηκαν από τον Wang *et al.* (1994). Έκφυτα που συλλέχθηκαν από το Νοέμβριο μέχρι το Φεβρουάριο έδωσαν χαμηλά ποσοστά καφετιάσματος, ενώ τα ποσοστά καφετιάσματος αυξήθηκαν ταχέως, καθώς τα μητρικά φυτά μπήκαν στην εποχή ανάπτυξης, έφθασαν ένα μέγιστο κατά τον Απρίλιο μέχρι Αύγουστο και μετά μειώθηκαν. Η σκοτεινή μεταχείριση των μητρικών φυτών μείωσε το καφέτιασμα με τη χαμηλότερη συχνότητα καφετιάσματος και τα υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης να λαμβάνονται μετά από τεσσερις εβδομάδες μεταχείρισης. Όμως, το ποσοστό έκπτυξης των οφθαλμών, το νωπό βάρος και ο αριθμός των νέων φύλλων των εκφύτων που επιβίωσαν μειώθηκαν με αύξηση της διάρκειας της σκοτεινής μεταχείρισης. Όταν η σκοτεινή μεταχείριση χρησιμοποιήθηκε κατά την πρώτη φάση της έναρξης καλλιέργειας, 5 °C ήταν καλύτεροι από 24 °C για τη μείωση του καφετιάσματος και τη βελτίωση της εγκατάστασης των εκφύτων. Προσθήκη 2.5 g l⁻¹ ενεργού άνθρακα στο υπόστρωμα έναρξης ευνόησε την εγκατάσταση των εκφύτων αχλαδιάς και 100/ 150 mg l⁻¹ ασκορβικό/ κιτρικό οξύ ήταν αποτελεσματικά με τη μηλιά.

Για να ελεγχθεί το οξειδωτικό καφέτιασμα εκφύτων κορυφής βλαστού των υποκειμένων μηλιάς M.7 και M.9, τα ασηπτικά καλλιεργημένα έκφυτα μεταφέρθηκαν αμέσως σε χαμηλά επίπεδα θερμοκρασίας (4 °C) υπό πλήρες σκοτάδι για 2-3 ημέρες ακολουθούμενο από υποκαλλιέργεια σε φρέσκο υπόστρωμα και επώαση για 5 εβδομάδες στους 24 °C υπό 16/ 8 h φωτοπερίοδο. Αυτό είχε ως αποτέλεσμα τη σημαντική μείωση του καφετιάσματος των εκφύτων και της έκχυσης στο υπόστρωμα, συνοδευόμενο από βελτίωση της επιβίωσης των εκφύτων. Η ενίσχυση των υποστρωμάτων είτε με ασκορβικό οξύ ή με polyvinyl pyrrolidone (PVP) δεν επέδρασε σημαντικά στη μείωση

της σοβαρότητας του οξειδωτικού καφετιάσματος και της έκχυσης φαινολικών από τα έκφυτα στο υπόστρωμα (Dalal *et al.*, 2004).

Προσπάθειες να εγκατασταθούν καλλιέργειες κορυφής βλαστού διαφόρων γονοτύπων μάνγκο (*Magnifera indica*) υπέδειξαν ότι τα προβλήματα της έκχυσης φαινολικών, του αποχρωματισμού του υποστρώματος και του καφετιάσματος των εκφύτων ήταν αλληλένδετα και επηρεάστηκαν από ένα αριθμό παραγόντων συμπεριλαμβανομένων του υποστρώματος, του γονοτύπου, του εκφύτου, της εποχής και των μεταχειρίσεων απολύμανσης. Λιγότερη έκχυση φαινολικών και καλύτερη επιβίωση των εκφύτων παρατηρήθηκαν στο υπόστρωμα ½MS από το πλήρες MS και στο ημιστερέο από ότι στο υγρό υπόστρωμα. Ανάμεσα στους παράγοντες εκφύτου, ήταν σημαντικοί η ηλικία και η σκίαση των βλαστών, το μήκος, το πάχος και οι τραυματισμοί απολέπισης στο έκφυτο και οι κατώτερες τομές μίσχων ερχόμενες σε επαφή με το υπόστρωμα, ενώ δεν ήταν σημαντικοί παράγοντες η ηλικία του δένδρου και ο αριθμός των φύλλων στο βλαστό. Η χρήση ενεργού άνθρακα ήταν ευεργετική ενώ άλλα προσροφητικά, αντιοξειδωτικά, η σκοτεινή επώαση και η βυθισμένη καλλιέργεια δεν ήταν επωφελή. Η επίδραση της εποχής ήταν προφανής με λιγότερα φαινολικά, ελάχιστη μικροβιακή μόλυνση, καλύτερη επιβίωση και καλύτερη ανταπόκριση στην *in vitro* εγκατάσταση να παρουσιάζονται από τους τρέχουσας εποχής ημιώριμους βλαστούς που συλλέχθηκαν κατά τον Ιούνιο μέχρι Αύγουστο (Thomas and Ravindra, 1997).

Κορυφές βλαστού και έκφυτα ενός κόμβου από δένδρα ελιάς ‘Κορωνέικη’ αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο και στον αγρό ελέχθηκαν *in vitro* κατά την εποχή ανάπτυξης ως προς το δυναμικό καφετιάσμάτος τους στο στάδιο εγκατάστασης. Υψηλοί θετικοί συντελεστές συσχέτισης βρέθηκαν μεταξύ των ολικών φαινολικών, του περιεχομένου σε ο-διφαινόλες και της δραστηριότητας πολυφαινολοξειδάσης με το ποσοστό καφετιάσματος των εκφύτων ελιάς (Roussos and Pontikis, 2001a). Τα έκφυτα κορυφής βλαστού επέδειξαν υψηλότερα ποσοστά καφετιάσματος μαζί με υψηλότερο περιεχόμενο σε ολικά φαινολικά και ο-διφαινόλες και υψηλότερη δραστηριότητα πολυφαινολοξειδάσης συγκριτικά με τα έκφυτα κόμβου, ενώ έκφυτα προερχόμενα από αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο δένδρα παρουσίασαν υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης και χαμηλότερες τιμές των τριών παραγόντων που αναφέρονται παραπάνω από ότι τα αντίστοιχα έκφυτα από δένδρα αναπτυσσόμενα στον αγρό. Η εποχή συλλογής των εκφύτων δεν επηρέασε σημαντικά τα ποσοστά καφετιάσμάτος τους, ενώ είχε σημαντική

επίδραση στη δραστηριότητα των οξειδωτικών ενζύμων (Roussos and Pontikis, 2001a, 2001b). Ξεχωριστά φαινορικά συστατικά επέδειξαν διάφορους συντελεστές συσχέτισης με το ποσοστό καφετιάσματος. Ο 7-γλυκοζίτης της λουτεολίνης, η λουτεολίνη και η κερκετίνη παρουσίασαν σημαντική θετική συσχέτιση με το καφέτιασμα των εκφύτων, σε αντίθεση με την ελαιοευρωπεΐνη, το χλωρογενικό οξύ και τη ρουτίνη (Roussos and Pontikis, 2001b).

Κατά τον *in vitro* πολλαπλασιασμό κορυφών βλαστού της *Strelitzia reginae*, η εφαρμογή 1% ενεργού άνθρακα στο υπόστρωμα καλλιέργειας έλεγξε πλήρως το οξειδωτικό καφέτιασμα και απέτρεψε την επιβλαβή επίδρασή του. Μερικό ή ελαφρό καφέτιασμα επιδείχθηκε με την εφαρμογή 0.05% polyvinylpyrrolidone (PVP) ή 0.04% dithiotreitol (DTT), αντίστοιχα. Η βασική προμεταχείριση για την αποτροπή του οξειδωτικού καφετιάσματος περιλαμβάνει την εμβάπτιση σε διάλυμα με 100 mg l⁻¹ ασκορβικό οξύ και 150 mg l⁻¹ κιτρικό οξύ, την κοπή των κορυφών βλαστού επάνω σε διηθητικό χαρτί προεμποτισμένο σε 0.04% DTT και την αρχική επώαση των καλλιεργειών σε πλήρες σκοτάδι για 10 ημέρες (Hosni, 2001).

Μικρά (10 mm) ή μεγάλα (10-20 mm) έκφυτα από κορυφές βλαστού δύο ποικιλιών αμπέλου καλλιεργήθηκαν σε ημι-στερεό ή υγρό υπόστρωμα και υποκαλλιεργήθηκαν μία φορά μετά από 24, 48, 72, 96 ή 120 h. Τα μεγάλα έκφυτα επέδειξαν αυξημένο καφέτιασμα συγκριτικά με τα μικρά έκφυτα, ενώ το καφέτιασμα μειώθηκε στο υγρό υπόστρωμα και σε μικρότερο βαθμό στο ημι-στερεό υπόστρωμα καθυστερώντας την υποκαλλιέργεια για 72-96 h (Dalal *et al.*, 1993).

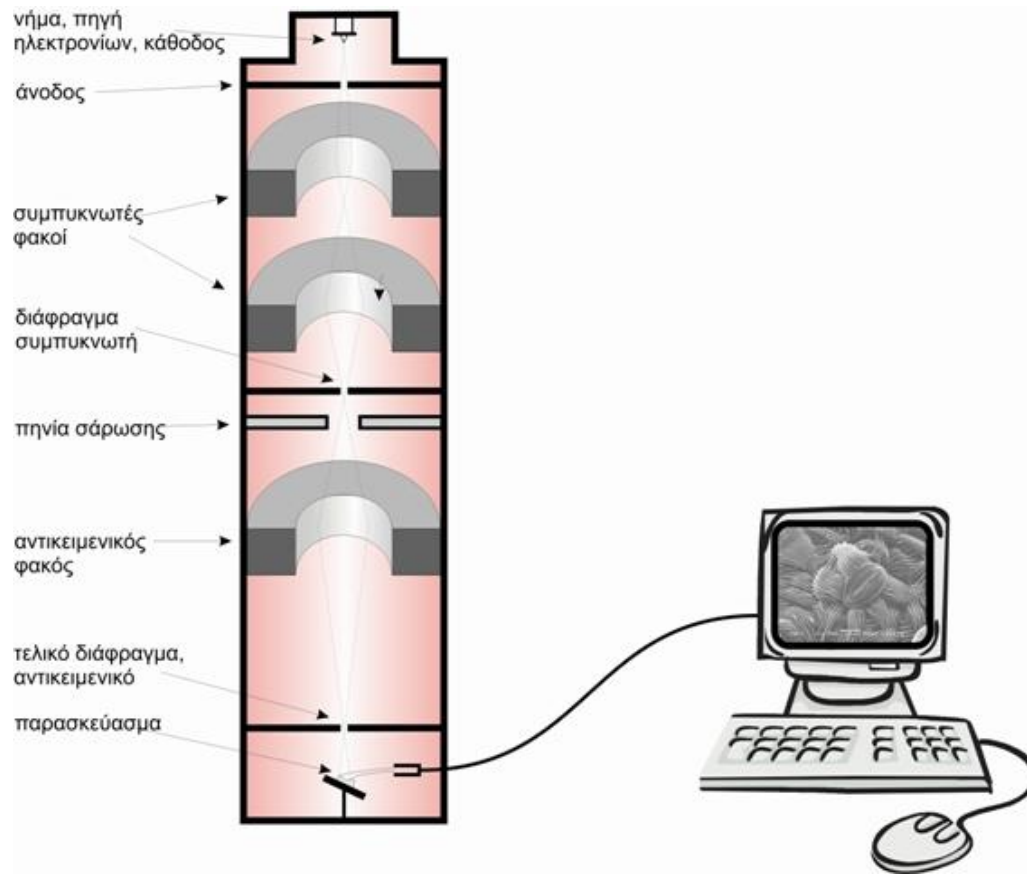
Κατά την εγκατάσταση *in vitro* καλλιεργειών από ενήλικα φυτά *Bauhinia valii*, το καφέτιασμα αποτέλεσε το μεγαλύτερο εμπόδιο. Έκφυτα που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της εποχής ανάπτυξης (Απρίλιο-Ιούνιο) έδειξαν μέγιστο καφέτιασμα, ενώ κατά την κοιμώμενη φάση το καφέτιασμα ήταν ελάχιστο. Το πρόβλημα αυτό παρακάμφθηκε με εμβάπτιση των αποστειρωμένων εκφύτων σε διάλυμα αντιοξειδωτικών (50 mg l⁻¹ ασκορβικό οξύ και 75 mg l⁻¹ κιτρικό οξύ) και αρχική επώαση στο σκοτάδι στους 4 °C για 48 h, πριν τη μεταφορά στις συνθήκες του θαλάμου καλλιέργειας (Dhar and Upreti, 1999).

Η χρήση αντιοξειδωτικών για τη μείωση του προβλήματος του καφετιάσματος των εκφύτων έχει χρησιμοποιηθεί εκτεταμένα σε διάφορα φυτά, όπως η *Prosopis cineraria* (Shekhawat *et al.*, 1993), η *Capparis decidua* (Deora and Shekhawat, 1995), ο

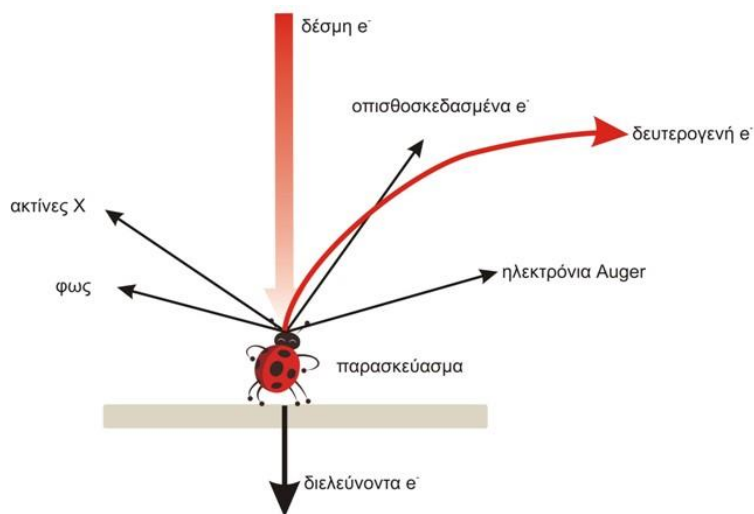
Symonanthus bancroftii (Panaia *et al.*, 2000) και η *Protea cynaroides* (Wu and du Toit, 2004). Για άλλα είδη, όπως η *Fragaria indica* (Bhatt and Dhar, 2000) και η *Aloe polyphylla* (Abrie and Van staden, 2001), πιο αποτελεσματική ήταν η διαδοχική μεταφορά των εκφύτων σε φρέσκο υπόστρωμα, ενώ στα είδη *Cleistanthus collinus* (Quraishi and Mishra, 1998) και *Lavandula stoechas* (Nobre, 1996) εφαρμόστηκε μεταχείριση με αντιοξειδωτικά και μεταφορά σε φρέσκο υπόστρωμα.

4.1.2. Αρχές λειτουργίας και χρήσεις του ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (ΗΜΣ)

Το ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (ΗΜΣ, Scanning Electron Microscope, SEM) δημιουργήθηκε από την ανάγκη παρατήρησης, αλλά και χημικής ανάλυσης επιφανειών και παράγει καλά εστιασμένες τρισδιάστατες εικόνες με μεγάλη λεπτομέρεια. Το ΗΜΣ (Εικ. 18) χρησιμοποιεί μια δέσμη ηλεκτρονίων που αντί να διαπερνούν το παρασκεύασμα, σαρώνουν την επιφάνειά του (όπως σαρώνουν τα μάτια μας τη σελίδα ενός βιβλίου όταν διαβάζουμε) με πολύ μεγάλη ταχύτητα. Η δέσμη των ηλεκτρονίων παράγεται από ένα νήμα, και ένα σύστημα ανόδου-καθόδου όπου εφαρμόζεται υψηλή τάση, συνήθως της τάξης των 15-40 kV, για την επιτάχυνση των ηλεκτρονίων. Η δέσμη των ηλεκτρονίων αφού εστιαστεί από σύστημα συγκεντρωτών φακών βομβαρδίζει το παρασκεύασμα με αποτέλεσμα κάποια από τα ηλεκτρόνια να το διαπερνούν, κάποια να σκεδάζονται ή να άγονται, ενώ συγχρόνως να προκαλείται η παραγωγή δευτερογενών ηλεκτρονίων, ακτινών X και ηλεκτρονίων Auger (Εικ. 19). Τα δευτερογενή ηλεκτρόνια, που προέρχονται από την επιφάνεια του παρασκευάσματος έχουν μικρή σχετικά ενέργεια που σχετίζεται με τη τοπογραφία του. Αυτά τα δευτερογενή ηλεκτρόνια συλλέγονται, μέσω κατάλληλων ανιχνευτών, και στέλνονται σαν ένα ηλεκτρονικό σήμα μέσω ενός ενισχυτή εικόνας σ' ένα καθοδικό σωλήνα (CRT) όπου γίνεται και η παρατήρηση ή και η φωτογράφιση του δείγματος. Τα υπόλοιπα ηλεκτρόνια ή ακτινοβολίες που παράγονται μπορούν να μας δώσουν άλλες πληροφορίες σχετικές με την υφή και σύσταση του παρασκευάσματος.



Εικόνα 18. Σχηματική παράσταση των διαφόρων τμημάτων ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης (ΗΜΣ) (Δ3).



Εικόνα 19. Οι διάφοροι τρόποι αλληλοεπίδρασης παρασκευάσματος και δέσμης επιταχυσμένων ηλεκτρονίων, όπως συμβαίνει και στο ΗΜΣ (Δ3).

Ένα παρασκεύασμα για να παρατηρηθεί με το κλασσικό ΗΜΣ θα πρέπει να έχει ορισμένες ιδιότητες που είναι:

- α. να αντέχει στο υψηλό κενό,
- β. να αντέχει στο βομβαρδισμό ηλεκτρονίων, και
- γ. να είναι αγώγιμο.

Έχοντας αυτές τις ιδιότητες υπ' όψη μπορούμε να κρίνουμε τι επεξεργασία χρειάζεται κάποιο παρασκεύασμα ανάλογα με την υφή του. Για παράδειγμα, τα μέταλλα δεν απαιτούν καμιά απολύτως προετοιμασία, μπορούν να παρατηρηθούν απ' ευθείας αφού πρώτα επικολληθούν στις ειδικές βάσεις (stubs) με ειδική αγώγιμη κόλλα όπως είναι ο κολλοειδής άργυρος (silver dug) ή ο κολλοειδής άνθρακας. Τα ορυκτά επικολλούνται σε stubs και επικαλύπτονται με λεπτό στρώμα μετάλλου (χρυσού), που συνήθως γίνεται με εκκένωση αίγλης σε ατμόσφαιρα αργού, για να γίνουν αγώγιμα. Σε ξηρά βιολογικά παρασκευάσματα, όπως οι γυρεόκοκκοι, τα φυτικά σπέρματα, το ξύλο κ.α. ακολουθείται η ίδια προετοιμασία όπως και για τα ορυκτά, ενώ σε βιολογικά παρασκευάσματα νωπά, ο κλασσικός τρόπος προετοιμασίας περιλαμβάνει χημική μονιμοποίηση, συνήθως με 2% γλουταρική αλδεϋδη και καμιά φορά και με OsO₄, σε ευαίσθητα παρασκευάσματα, ακολουθεί αφυδάτωση με αλκοόλη ή ακετόνη, ξήρανση σε συσκευή κρίσιμου σημείου (critical point dryer) και στη συνέχεια επικόλληση σε stubs και επικάλυψη με λεπτό στρώμα μετάλλου (χρυσού) σε ειδική συσκευή που λειτουργεί υπό κενό. Κατά την ξήρανση με τη μέθοδο «κρίσιμου σημείου», το υλικό τοποθετείται στο θάλαμο της συσκευής που πολύ γρήγορα γεμίζει με υγρό CO₂. Στη συνέχεια με κατάλληλους χειρισμούς εξαερώνεται το CO₂, που σιγά-σιγά αφήνεται να διαρρεύσει έξω από το θαλαμίσκο. Έτσι, οι δομές παρατηρούνται αναλλοίωτες χωρίς τις καταστρεπτικές επιπτώσεις της επιφανειακής τάσης, όπως αυτές εκδηλώνονται κατά την ξήρανση του δείγματος στον αέρα.

Το διακριτικό όριο ενός ηλεκτρονικού μικροσκοπίου σάρωσης περιορίζεται από τη διάμετρο της δέσμης ηλεκτρονίων σάρωσης και από τους κόκκους του υλικού κάλυψης και στα συμβατικά όργανα είναι της τάξης των 2.5-3.0 nm, αλλά οι παραγόμενες εικόνες είναι ιδιαίτερα εντυπωσιακές και περιέχουν πληθώρα χρήσιμων κυτταρομικροβιολογικών πληροφοριών. Τα τελευταία χρόνια έχει πραγματοποιηθεί θεαματική βελτίωση του διακριτικού ορίου στα 0.6 nm χρησιμοποιώντας ψυχρή κάθοδο (πηγή) ηλεκτρονίων και μαγνητικούς φακούς υψηλής ποιότητας.

Καλύτερη μονιμοποίηση επιτυγχάνεται με τη φυσική μονιμοποίηση, όπου το παρασκεύασμα παγώνεται πολύ γρήγορα και παρατηρείται παγωμένο. Η φυσική μονιμοποίηση (κρυοτεχνική) απαιτεί ειδικές τεχνικές για τη διατήρηση του παρασκευάσματος σε χαμηλή θερμοκρασία κατά τη διάρκεια της παρατήρησης. Λόγω του πολύ γρήγορου παγώματος τα παρασκευάσματα υφίστανται τις λιγότερες δυνατές τεχνητές αλλοιώσεις (artefacts). Με τη μέθοδο της φυσικής μονιμοποίησης, μπορεί να γίνει παρατήρηση σχεδόν οποιουδήποτε παρασκευάσματος, όπως είναι διάφορα τρόφιμα, γαλακτώματα, σε υγρή ή στερεή κατάσταση (Μαργαρίτης και άλλοι, 2004, Δ3).

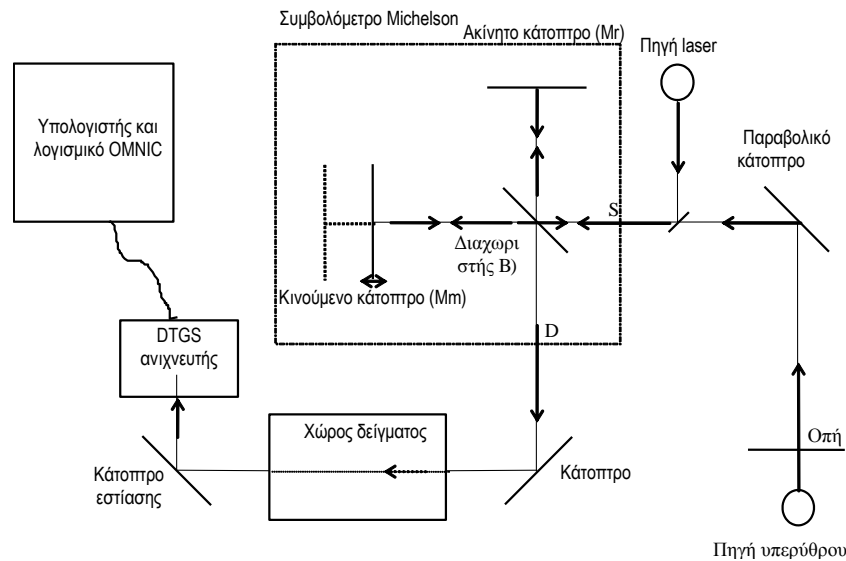
4.1.3. Αρχές και χρήσεις της φασματοσκοπία υπερέυθρου με μετασχηματισμό κατά Fourier (FT-IR)

Η φασματοσκοπία υπερέυθρου, είναι μία τεχνική που χρησιμοποιείται πολύ συχνά λόγω της ευκολίας σύγκρισης των φασμάτων που λαμβάνονται με άλλα γνωστά φάσματα. Χρησιμοποιείται κυρίως στην οργανική και στη φαρμακευτική χημεία, καθώς μέσω τέτοιων φασμάτων δίνεται η δυνατότητα διερεύνησης της μοριακής σύνταξης και της ταυτοποίησης άγνωστων ουσιών (Ταραντίλης και Πολυσίου, 2008).

Η υπέρυθη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος περιλαμβάνει ακτινοβολίες των οποίων οι κυματάρθρωμοι κυμαίνονται από 12800 έως 10 cm^{-1} και βρίσκεται μεταξύ του ορατού και του τμήματος των ραδιοσυχνοτήτων. Το φάσμα του υπέρυθρου χωρίζεται σε τρεις περιοχές: την εγγύς (near, NIR) από 12800 έως 4000 cm^{-1} , τη μέση (mid, MIR) από 4000 έως 200 cm^{-1} , και την άπω υπέρυθη περιοχή (far, FIR) από 200 έως 10 cm^{-1} , από τις οποίες πιο συχνά χρησιμοποιείται αυτή των 4000-600 cm^{-1} . Όλες σχεδόν οι ανόργανες και οργανικές ενώσεις είναι σε θέση να απορροφήσουν ορισμένες συχνότητες στην παραπάνω περιοχή (Santos *et al.*, 2010, Ταραντίλης και Πολυσίου, 2008).

Τα φασματοφωτόμετρα που χρησιμοποιούν το μετασχηματισμό Fourier παρέχουν φάσματα στο μεγαλύτερο τμήμα της μέσης περιοχής του υπέρυθρου, με λόγο σήματος προς θόρυβο μεγαλύτερο από τα καλής ποιότητας φασματομέτρα διασποράς. Η ανάλυση κατά Fourier ή μετασχηματισμός Fourier είναι η ανάλυση μιας μαθηματικής συνάρτησης ή μιας πειραματικά λαμβανομένης καμπύλης με τη μορφή μιας τριγωνομετρικής σειράς. Χρησιμοποιείται ως μέθοδος προσδιορισμού των συστατικών ενός πολύπλοκου περιοδικού κύματος (Ταραντίλης και Πολυσίου, 2008).

Το σημαντικότερο τμήμα ενός φασματοφωτόμετρου υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier είναι το συμβολόμετρο Michelson (Σχ. 5), το οποίο αποτελείται από: 1) την πηγή ακτινοβολίας, 2) το διαχωριστή δέσμης, 3) ένα σταθερό κάτοπτρο, 4) ένα κινητό κάτοπτρο με μηχανισμό κίνησης, 5) τον ανιχνευτή και 6) τον υποδοχέα του δείγματος ανάμεσα στο συμβολόμετρο και τον ανιχνευτή.



Σχήμα 5. Τρόπος λειτουργίας φασματοφωτόμετρου FT-IR (Πολυσιού, 1989).

Όταν η φωτεινή δέσμη της πηγής ακτινοβολίας προσπίπτει στο διαχωριστή δέσμης, ένα μέρος της ανακλάται στο κινητό κάτοπτρο και ένα μέρος της μεταδίδεται στο σταθερό κάτοπτρο. Κατόπιν, οι ακτίνες που ανακλώνται από τα κάτοπτρα επανέρχονται στο διαχωριστή, στον οποίο το μισό κάθε ακτίνας μεταδίδεται και το υπόλοιπο μισό ανακλάται. Έτσι, μια επανενωμένη δέσμη διέρχεται στη διεύθυνση του ανιχνευτή και μία άλλη επανέρχεται πίσω στην πηγή.

Οι διαχωριστές δέσμης κατασκευάζονται από διαφανή υλικά με κατάλληλα επιλεγμένους δείκτες διάθλασης, ώστε περίπου το 50% της ακτινοβολίας να ανακλάται και το υπόλοιπο 50% να τους διαπερνά.

Ο ανιχνευτής αντιλαμβάνεται την υπέρυθη ακτινοβολία που διέρχεται μέσα από το δείγμα. Οι πιο συνηθισμένοι τύποι ανιχνευτή είναι αυτοί που χρησιμοποιούν δευτεριωμένη θειική τριγλυκίνη (DTGS). Η λειτουργία αυτού του τύπου ανιχνευτών

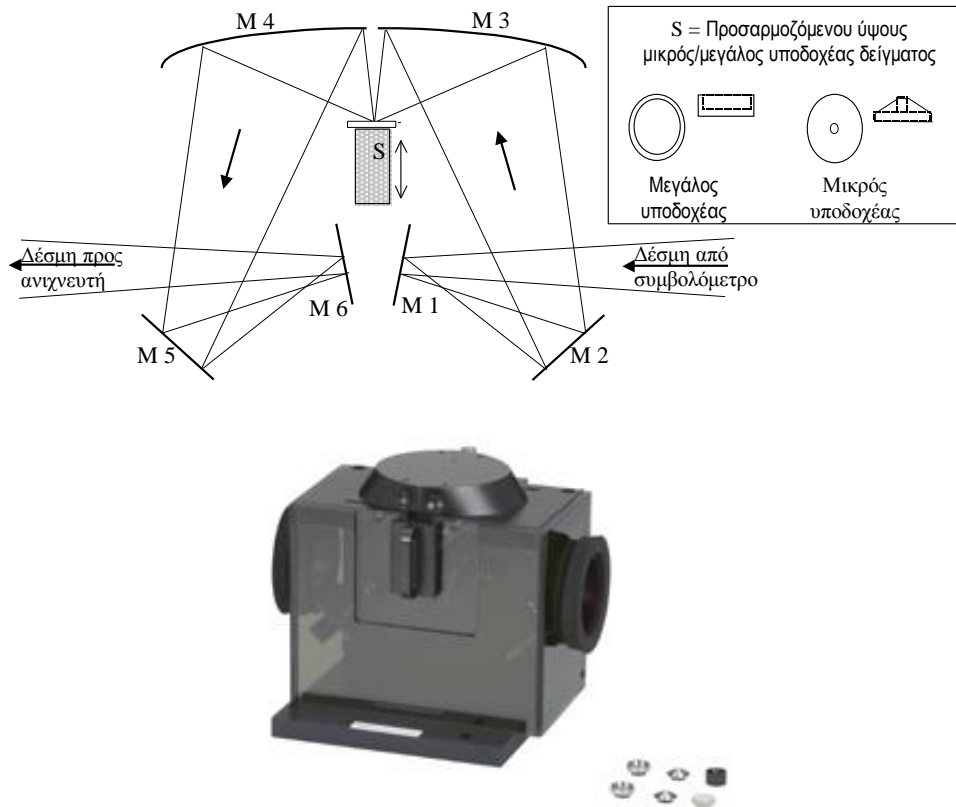
στηρίζεται στην αύξηση της θερμοκρασίας του, που προκαλείται από την πρόσπτωση της ακτινοβολίας, η οποία έχει προηγουμένως διέλθει από το δείγμα. Αποτέλεσμα αυτής της αύξησης θερμοκρασίας είναι η δημιουργία μιας διαφοράς δυναμικού.

Η επανενωμένη δέσμη που δημιουργείται τελικά από το διαχωριστή, περνά από το δείγμα, όπου πραγματοποιείται μερική ή ολική απορρόφηση ορισμένων συχνοτήτων της δέσμης. Κατόπιν, η δέσμη κινείται προς τον ανιχνευτή όπου προκαλεί μεταβολή της διαφοράς δυναμικού. Τέλος, γίνεται μετατροπή του αναλογικού σήματος σε ψηφιακό και εισέρχεται σε υπολογιστή, όπου με το κατάλληλο λογισμικό λαμβάνεται το συμβολόγραμμα. Αυτό μετά από μετασχηματισμό κατά Fourier παίρνει τη μορφή του τυπικού φάσματος υπέρυθρου μετασχηματισμού Fourier (Πολυσίου, 1989, Χατζηιωάννου και Κουπάρη, 1990, Skoog *et al.*, 2005).

Η φασματοσκοπία διάχυτης ανάκλασης (Diffuse Reflectance Fourier Transformed Infrared spectroscopy - DRIFT) είναι μια από τις τεχνικές λήψης FT-IR φασμάτων από δείγματα σε στερεά κατάσταση, συνήθως σε μορφή σκόνης, η οποία χρησιμοποιείται όλο και περισσότερο τα τελευταία χρόνια στην ποιοτική και ποσοτική ανάλυση πολλών χημικών ενώσεων γιατί είναι απλή και πάρα πολύ γρήγορη, δεν απαιτεί προηγούμενη κατεργασία του δείγματος και δεν καταστρέφει τα δείγματα. Η λήψη των φασμάτων γίνεται είτε με σκέτο το δείγμα είτε με ανάμειξη σε αναλογία συνήθως 1:100 με βρωμιούχο κάλιο ή χλωριούχο κάλιο, ενώ όταν εξετάζονται μείγματα, πρέπει να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στην ομογενοποίησή τους. Χρησιμοποιείται ειδικό εξάρτημα για την υποδοχή του δείγματος (Σχ. 6), το οποίο διαθέτει 6 κάτοπτρα. Τα κάτοπτρα M_1 , M_2 και M_3 εστιάζουν τη δέσμη της ακτινοβολίας που έρχεται από το συμβολόμετρο επάνω στο δείγμα, ενώ τα M_4 , M_5 και M_6 εστιάζουν την ανακλώμενη ακτινοβολία από το δείγμα προς τον ανιχνευτή. Ο χώρος όπου τοποθετείται το δείγμα (υποδοχέας) μπορεί να είναι δύο μεγεθών. Ο μεγαλύτερος έχει διάμετρο 13 mm και ύψος 2 mm ενώ ο μικρός 3 και 2 mm αντίστοιχα. Ο υποδοχέας του δείγματος ρυθμίζεται κατά μήκος και κατά ύψος. Με τον τρόπο αυτό μεταβάλλεται η γωνία πρόσπτωσης και βελτιστοποιείται η εστίαση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας στο δείγμα. Αυτό επιβεβαιώνεται από τη μεγιστοποίηση του σήματος IR στην οθόνη του υπολογιστή.

Όταν η υπέρυθρη ακτινοβολία προσπέσει στην επιφάνεια του υλικού ένα τμήμα της ανακλάται (ή διαχέεται), ένα τμήμα διαθλάται και ένα τμήμα περιθλάται. Ουσιαστικά η ανάκλαση είναι το φαινόμενο στο οποίο στηρίζεται η τεχνική DRIFT. Όμως η υπέρυθρη

ακτινοβολία υπόκειται σε τριών ειδών ανακλάσεις: την απορροφητική, τη διαχυτική και την αληθινή ανάκλαση, από τις οποίες μόνο η απορροφητική περιέχει πληροφορίες για το δείγμα. Το μέρος της ακτινοβολίας που θα απορροφηθεί και στη συνέχεια θα ανακλαστεί, δηλαδή η απορροφητική ανάκλαση, εξαρτάται από: α) το μέγεθος των σωματιδίων του δείγματος, β) τη μετωπική επιφάνεια και την πυκνότητα πακεταρίσματος του δείγματος στον υποδοχέα, γ) το δείκτη διάθλασης του δείγματος καθώς και δ) τη γωνία πρόσπτωσης της ακτινοβολίας επάνω στο δείγμα. Επιπλέον είναι άμεσα συνδεδεμένη με τη συλλογή και τη διοχέτευση της ακτινοβολίας αυτής στον ανιχνευτή (Ταραντίλης και Πολυσίου, 2008).



Σχήμα 6. Εξάρτημα με υποδοχέα δείγματος για τη λήψη φασμάτων υπερύθρου με τη τεχνική της διάχυτης ανάκλασης (DRIFTS) (Ταραντίλης και Πολυσίου, 2008).

Η φασματοσκοπία υπερύθρου σε συνδυασμό με τη χημειομετρία έχει αποδειχθεί ως ένα γρήγορο και ικανό εργαλείο για την πρόβλεψη ή και την ποσοτικοποίηση κύριων συστατικών, όπως η αλκοόλη, η σχετική πυκνότητα, το εκχύλισμα, το εκχύλισμα χωρίς

σάκχαρα, η διάθλαση, η αγωγιμότητα, η γλυκερόλη, οι ολικές φαινόλες, το αναγωγικό σάκχαρο, η φρουκτόζη, η γλυκόζη, η σακχαρόζη, τα ολικά οξέα, η τιμή pH, το πτητικό οξύ, το ολικό SO₂, το τρυγικό οξύ, το μηλικό οξύ, το γαλακτικό οξύ και το κιτρικό οξύ σε κρασί (Patz *et al.*, 2004), η καφεΐνη σε αναψυκτικά (Paradkar *et al.*, 2002), διάφορα αιθέρια έλαια (Petraakis *et al.*, 2009) και τα ολικά φαινολικά συστατικά σε εκχυλίσματα από αφεινήματα διαφόρων αρωματικών φυτών της ελληνικής χλωρίδας, προσδιορίζοντάς τα εξίσου αποτελεσματικά με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu (Κανέλλου, 2011). Η FT-IR φασματοσκοπία έχει επίσης χρησιμοποιηθεί για να επιβεβαιώσει το υψηλότερο περιεχόμενο σε φαινολικά συστατικά σε εκχυλίσματα από κέλυφος κάστανου συγκριτικά με εκχυλίσματα από φλοιό ευκάλυπτου (Vázquez *et al.*, 2008), ενώ η εγγύς (NIR) και η μέση (MIR) υπέρυθρη φασματοσκοπία έχουν χρησιμοποιηθεί για την εκτίμηση τόσο των δεικτών ωρίμανσης όσο και των διατροφικών-φαρμακευτικών ιδιοτήτων των μύρτιλων (blueberries) με στόχο να αντικαταστήσουν τις ενόργανες τεχνικές, όπως η LC-MS και η HPLC, που καταναλώνουν χρόνο και χημικά, και είναι επίπονες και ακριβές (Sinelli *et al.*, 2008).

Η φασματοσκοπία FT-IR έχει εκτεταμένα χρησιμοποιηθεί και για τον προσδιορισμό του περιεχομένου λιγνίνης σε πολτό (Friese and Banerjee, 1992), στο *Quercus suber* (Marques *et al.*, 1994), στο *Eucalyptus globulus* (Rodrigues *et al.*, 1998), σε είδη μαλακού (*Pinus roxberghii* και *Cupressus lusitanica*) και σκληρού (*Acacia auriculaeformis* και *Eucalyptus tereticornis*) ξύλου (Pandey, 1999), στον ιβίσκο *Hibiscus cannabinus* (Pappas *et al.*, 1998), καθώς και στην εξέταση της επίδρασης του καφέ και λευκού σαπίσματος, που προκαλείται από τους μύκητες *Coniophora puteana*, *Coriolus versicolor* και *Phanerochaete chrysosporium*, στη χημεία του ξύλου και το περιεχόμενο λιγνίνης στα είδη *Pinus sylvestris* και *Fagus sylvatica* (Pandey and Pitman, 2003, 2004).

Στο παράρτημα II, δίνονται οι δομές των πρόδρομων ουσιών της λιγνίνης (Σχ. 28), η χαρακτηριστική δομική μονάδα της λιγνίνης (Σχ. 29) και οι δομές συστατικών αποικοδόμησης της λιγνίνης (Σχ. 30).

Η φασματοσκοπική κορυφή στα 1508 cm⁻¹ (περίπου) σε φυτικά υλικά σχετίζεται με την απορρόφηση του αρωματικού δακτυλίου και έχει αποδοθεί αποκλειστικά στη λιγνίνη. Το εμβαδόν αυτής της κορυφής είναι δυνατόν να συσχετιστεί με την περιεκτικότητα σε λιγνίνη των δειγμάτων.

Η φασματοσκοπία FT-IR έχει επίσης χρησιμοποιηθεί στην ταυτοποίηση της γύρης (Pappas *et al.*, 2003), του κατσικίσιου και πρόβειου γάλακτος (Pappas *et al.*, 2008), του κρασιού (Tarantilis *et al.*, 2008), διαφόρων στελεχών εδώδιμων μανιταριών του γένους *Pleurotus* (Zervakis *et al.*, 2012, Μπεκιάρης, 2011), καθώς και άλλων μυκήτων (Mohacek-Grosev, 2001, Naumann *et al.*, 2005, Liker and Tsrer, 2008, Santos *et al.*, 2010). Στις παραπάνω εργασίες ελήφθησαν τα φάσματα από γνωστά δείγματα για τη δημιουργία μιας βάσης δεδομένων. Κατόπιν, εισάγοντας άγνωστα δείγματα στη συγκεκριμένη βάση δεδομένων, γινόταν η ταυτοποίησή τους.

Επιπλέον, η FT-IR φασματοσκοπία έχει εφαρμοστεί στον ποσοτικό προσδιορισμός της πουλεγόνης σε έλαιο από φλισκούνι *Mentha pulegium* (Petraakis *et al.*, 2009) και των ανθοκυανών σε κεράσια *Prunus avium* (Pappas *et al.*, 2011), στην παρακολούθηση της υποβάθμισης της πρωτεΐνης του βασιλικού πολτού κατά την αποθήκευση (Tarantilis *et al.*, 2012), και στην ταξινόμηση δειγμάτων ελληνικού φλισκουριού *M. pulegium* ανάλογα με τη γεωγραφική τοποθεσία (Kanakakis *et al.*, 2011).

4.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Έγιναν αρκετές προσπάθειες για να εγκατασταθούν *in vitro* καλλιέργειες του *xM. florentina* από κορυφές βλαστών ενήλικων φυτών. Το κάψιμο των ενήλικων φυτών στην Πάρνηθα κατά την πυρκαγιά του 2007 έδωσε τη δυνατότητα να χρησιμοποιηθεί νεανικός φυτικός ιστός από αναβλαστήσεις των καμένων φυτών. Χρησιμοποιήθηκαν επίσης φυτάρια παραγμένα μέσω μικροπολλαπλασιασμού, καθώς και σπορόφυτα ως πηγή εκφύτων για *in vitro* καλλιέργεια.

4.2.1. Εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας από έκφυτα ενήλικων φυτών

Έκφυτα κορυφής βλαστού από ένα ενήλικο φυτό αυτοφυές στην Πάρνηθα εγκαταστάθηκαν *in vitro* για πρώτη φορά το Μάρτιο και τον Ιούνιο '04 (Μαρτίνη, 2004, Parafotiou and Martini, 2009b).

Τεμάχια κορυφής βλαστού, μήκους 2.0-3.0 cm, συλλέγονταν από μακριούς βλαστούς και λογχοειδή διαφόρων ενήλικων φυτών κάθε μήνα από το Φεβρουάριο 2006 μέχρι το Μάρτιο 2007 (Εικ. 20), αποφυλλώνονταν, πλένονταν σε σαπουνάδα υπό ανάδευση για 10 min, ξεπλένονταν κάτω από τρεχούμενο νερό βρύσης, εμβαπτίζονταν σε 80% αιθανόλη για 10 sec και ξεπλένονταν ξανά με τρεχούμενο νερό βρύσης. Στα

τεμάχια βλαστού που συλλέγονταν από το Σεπτέμβριο μέχρι το Μάρτιο, τα εξωτερικά λέπια των επάκριων οφθαλμών μαζί με το φλοιό αφαιρούνταν πριν την επιφανειακή απολύμανση για να μειωθούν τα πιθανά μολύσματα (Εικ. 20μ). Μετά, απολυμαίνονταν επιφανειακά με 20 ή 25% (v/v) διάλυμα χλωρίνης εμπορείου (4.6% w/v sodium hypochlorite) με λίγες σταγόνες Tween 20 για 10 min, εκτός από τα τμήματα βλαστού που συλλέχθηκαν το Μάρτιο 2007, τα οποία απολυμάνθηκαν χρησιμοποιώντας 15% (v/v) διάλυμα χλωρίνης. Ακολουθούσαν τέσσερα τρίλεπτα-ξέπλυματα με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό συν ένα πρόσθετο ξέπλυμα πριν τη χρήση των εκφύτων για να απομακρυνθούν τα φαινολικά συστατικά που εκχύθηκαν. Τμήματα κορυφής βλαστού, μήκους 0.6-1.0 cm, χρησιμοποιούνταν ως έκφυτα και τοποθετούνταν μεμονωμένα σε δοκιμαστικούς σωλήνες (25x100 mm) με 10 ml στερεό υπόστρωμα MS που περιείχε 3% (w/v) σουκρόζη, 1.0 mg l⁻¹ BA και 0.1 mg l⁻¹ IBA, υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ. Από τον Ιούλιο 2006 και μετά, τα έκφυτα μεταφέρονταν σε φρέσκο υπόστρωμα μετά από μια-ημέρας καλλιέργεια για να μειωθεί η έκθεση στα εγχυμένα φαινολικά. Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την απολύμανση των εκφύτων περιγράφονται στο κεφάλαιο 2.3.2. Για την εκτίμηση του επιπέδου έκχυσης φαινολικών στο υπόστρωμα ορίστηκε κλίμακα από 1 έως 10, που χαρακτήριζε την ένταση και την έκταση του καφέ μεταχρωματισμού του υποστρώματος από τα οξειδωμένα φαινολικά που εκχύνονται από τη βάση των εκφύτων. Έτσι, με 1 χαρακτηριζόταν η πολύ μικρή έκχυση φαινολικών που περιοριζόταν στο υπόστρωμα γύρω από τα έκφυτα, με 10 ο πολύ έντονος καφέ μεταχρωματισμός του υποστρώματος σε όλη του την έκταση, και ενδιάμεσα βρίσκονταν οι υπόλοιπες βαθμίδες.

Η συλλογή των βλαστών το Μάρτιο γινόταν το δεύτερο δεκαπενθήμερο πριν την έκπτυξη της νέας βλάστησης. Στη συνέχεια, φορτσάρονταν ώστε να εκπτυχθούν με τοποθέτηση σε νερό σε θερμοκρασία δωματίου για 1-3 ημέρες, μέθοδος που έχει χρησιμοποιηθεί σε κοιμώμενες κορυφές βλαστών μηλιάς (Laszloffy *et al.*, 1991), με στόχο την επιλογή των πιο ικανών για βλάστηση οφθαλμών. Το Μάρτιο 2006 δοκιμάστηκε η εγκατάσταση καλλιέργειας την ίδια ημέρα που συλλέχθηκαν οι βλαστοί (0 ημέρες) και μετά από 3 ή 6 ημέρες για να προσδιοριστεί το κατάλληλο στάδιο έκπτυξης των οφθαλμών.



Εικόνα 20. Έκφυτα για την εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας που ελήφθησαν από κορυφές μακριών βλαστών (αριστερά) και λογχοειδών (δεξιά) ενήλικων φυτών *xM. florentina* τους μήνες: Μάρτιο 2006 (α), το Μάρτιο 2006 μετά από 3 ημέρες φορτσάρισμα με νερό σε θερμοκρασία δωματίου (β), τον Απρίλιο 2006 (γ), το Μάιο 2006 (δ), τον Ιούνιο 2006 (ε), τον Ιούλιο 2006 (στ), τον Αύγουστο 2006 (ζ), το Σεπτέμβριο 2006 (η), τον Οκτώβριο 2006 (θ), το Νοέμβριο 2006 (ι), το Φεβρουάριο 2006 (κ), το Μάρτιο 2007 μετά από δύο ημέρες φορτσαρίσματος (λ) και το Μάρτιο 2007 μετά την απομάκρυνση εξωτερικών λεπίων οφθαλμών και φλοιού (μ).

Μια ακόμη μέθοδος απολύμανσης, που δοκιμάστηκε το Φεβρουάριο 2006, ήταν η απολύμανση σε δύο στάδια. Αφού αφαιρέθηκαν τα λέπια των οφθαλμών και ο φλοιός, τα έκφυτα απολυμάνθηκαν με χλωρίνη 20% για 10 min και ξεπλύθηκαν 3 φορές (1^ο στάδιο), αφαιρέθηκαν μερικά ακόμη λέπια, περιορίστηκε το μέγεθος των εκφύτων και ακολούθησε το 2^ο στάδιο απολύμανσης με χλωρίνη 20% για 10 min και 4 συν 1 ξεπλύματα πριν τη χρήση των εκφύτων.

Το Μάρτιο 2007 εξετάστηκε η αποτελεσματικότητα της προμεταχείρισης με αντιοξειδωτικά και της μεταφοράς σε φρέσκο υπόστρωμα στον περιορισμό του καφετιάσματος των εκφύτων. Αφού αφαιρέθηκαν τα λέπια των οφθαλμών και ο φλοιός, τα έκφυτα είτε απολυμάνθηκαν με 15% χλωρίνη για 10 min και ξεπλύθηκαν με απιονισμένο αποστειρωμένο νερό, είτε εμβαπτίστηκαν σε υδατικό διάλυμα AA και CA (100 mg l⁻¹ το καθένα) για 1 h, απολυμάνθηκαν με 15% χλωρίνη για 10 min και ξεπλύθηκαν με αποστειρωμένο διάλυμα AA και CA. Στη συνέχεια, τα έκφυτα είτε τοποθετήθηκαν στο τελικό υπόστρωμα είτε μετά από 1-2 ημέρες καλλιέργειας μεταφέρθηκαν σε φρέσκο υπόστρωμα. Η ποσότητα των εκχυόμενων οξειδωμένων φαινολικών στο υπόστρωμα χαρακτηρίστηκε ως μικρή, μέτρια, αρκετή, μεγάλη, ανάλογα με την ένταση και την επέκταση του καφέ μεταχρωματισμού στο υπόστρωμα.

Μετά την πυρκαγιά του 2007 που έκαψε τα ενήλικα φυτά που χρησιμοποιήθηκαν στα παραπάνω πειράματα, τεμάχια βλαστού, μήκους 2.0-5.0 cm, συλλέχθηκαν από μακριούς βλαστούς και λογχοειδή ενός άλλου ενήλικου φυτού αυτοφυούς σε άλλη τοποθεσία της Πάρνηθας το Μάρτιο 2009 και 2010 (πριν την έκπτυξη της νέας βλάστησης), καθώς και μηνιαία από το Μάιο 2009 μέχρι τον Αύγουστο 2009. Τα τεμάχια βλαστού αποφυλλώνονταν, πλένονταν σε σαπουνάδα υπό ανάδευση για 10 min, ξεπλένονταν κάτω από τρεχούμενο νερό βρύσης, εμβαπτίζονταν σε 90% αιθανόλη για 10 sec, πλένονταν ξανά, εμβαπτίζονταν σε υδατικό διάλυμα ασκορβικού (AA) και κιτρικού (CA) οξέως (150 mg l⁻¹ το καθένα) για 30 min για να μειωθεί το καφέτιασμα των εκφύτων και απολυμαίνονταν επιφανειακά με 15% (έκφυτα του Μαρτίου) ή 30% (άλλα έκφυτα) (v/v) διάλυμα εμπορικής χλωρίνης με λίγες σταγόνες Tween 20 για 10 min. Τα εξωτερικά λέπια των οφθαλμών και ο φλοιός εκφύτων του Μαρτίου απομακρύνονταν πριν την απολύμανση και τα τμήματα βλαστού με έναν επάκριο οφθαλμό τοποθετούνταν αμέσως σε διάλυμα με AA-CA (150 mg l⁻¹ το καθένα) μέχρι να ολοκληρωθεί αυτή η μεταχείριση για όλα τα έκφυτα. Τέσσερα τρίλεπτα-ξεπλύματα με αποστειρωμένο

απιονισμένο νερό που περιείχε AA-CA (150 mg Γ^{-1} το καθένα) ακολουθούσαν, καθώς και ένα ακόμη ξέπλυμα πριν τη χρήση των εκφύτων για να απομακρυνθούν τα φαινολικά συστατικά που εκχύθηκαν. Τμήματα κορυφής βλαστού το Μάρτιο και επάκρια ή κομβικά τμήματα με έναν οφθαλμό τους άλλους μήνες, μήκους 0.6-1.0 cm, χρησιμοποιήθηκαν ως έκφυτα και καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS με 1.0 BA/ 0.1 IBA (mg Γ^{-1}) για δύο ημέρες, πριν τη μεταφορά τους σε φρέσκο υπόστρωμα για να μειωθεί η έκθεσή τους στα εγχυμένα φαινολικά. Η κάλυψη των σωλήνων έγινε με μεμβράνη sanitas.

Ανάλογα με τους βλαστούς από τους οποίους συλλέχθηκαν και τους οφθαλμούς που περιελάμβαναν, τα έκφυτα του Μαρτίου 2010 διακρίθηκαν σε: i) έκφυτα με επάκριο οφθαλμό από κανονική βλάστηση (Εικ. 13α), ii) έκφυτα με ένα μεγάλο οφθαλμό από λογχοειδή βλάστηση (Εικ. 13β), iii) έκφυτα με ένα μικρό οφθαλμό από λογχοειδή βλάστηση (Εικ. 13α), iv) έκφυτα με τον ανώτερο οφθαλμό από λογχοειδή βλάστηση με δύο οφθαλμούς (Εικ. 13β), v) έκφυτα με τον κατώτερο οφθαλμό από λογχοειδή βλάστηση με δύο οφθαλμούς (Εικ. 13β). Παράλληλα ελήφθησαν παρατηρήσεις επί της εξέλιξης αυτών των οφθαλμών πάνω στο φυτό (κεφάλαιο 3.2.1.), οι οποίες θα μπορούσαν να συσχετισθούν με την αντίδρασή τους *in vitro*, με απώτερο στόχο την εύρεση των οφθαλμών που θα μπορούσαν να εγκαταστήσουν παραγωγική καλλιέργεια.

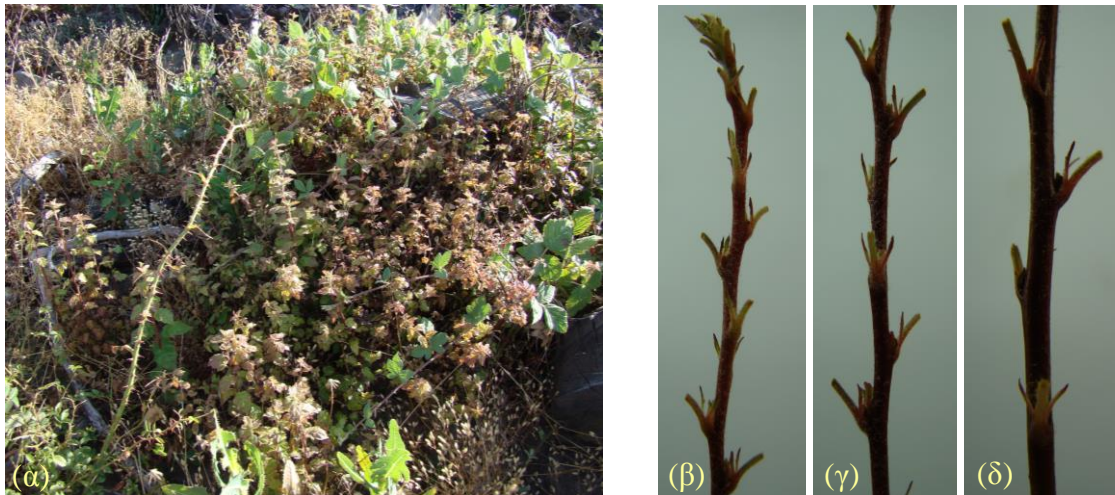
4.2.2. Εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας από έκφυτα αναβλαστήσεων

Τεμάχια βλαστού, μήκους 5.0-6.0 cm, συλλέχθηκαν από αναβλαστήσεις που εκπύχθηκαν από τη βάση των καμένων φυτών το Μάρτιο, Μάιο, Ιούνιο (Εικ. 21α), Ιούλιο και Αύγουστο 2009, καθώς και το Μάρτιο, Απρίλιο, Μάιο και Ιούνιο 2010. Τον Αύγουστο 2009 ήταν δύσκολο να βρεθούν αναβλαστήσεις επειδή τα φυτά είχαν φαγωθεί εντελώς από τα ελάφια, ενώ την επόμενη χρονιά η βόσκηση των αναβλαστήσεων ξεκίνησε ήδη από το Μάιο. Τον Ιούνιο και Ιούλιο 2009 τα τεμάχια βλαστού συλλέχθηκαν από ένα μόνο φυτό, από το οποίο είχε προκύψει και η καλλιέργεια από ενήλικο φυτό το Μάρτιο 2004. Τα τεμάχια διακρίνονταν όσον αφορά τη θέση τους πάνω στο βλαστό σε επάκρια (με επάκριο οφθαλμό), κορυφαία, μεσαία και βασικά (Εικ. 21β, γ, δ). Η μέθοδος απολύμανσης περιελάμβανε αποφύλλωση, πλύσιμο σε σαπουνάδα υπό ανάδευση για 10 min, ξέπλυμα κάτω από τρεχούμενο νερό βρύσης, εμβάπτιση σε 90% αιθανόλη για 10 sec, δεύτερο ξέπλυμα, εμβάπτιση σε υδατικό διάλυμα ασκορβικού

οξέως (AA) και κιτρικού οξέως (CA) (150 mg l^{-1} το καθένα) για 30 min για να μειωθεί το καφέτιασμα των εκφύτων και απολυμάνθηκαν επιφανειακά με 30% (v/v) διάλυμα χλωρίνης με λίγες σταγόνες Tween 20 για 10 min, εκτός από τα τεμάχια από τη βάση των αναβλαστήσεων που συλλέχθηκαν τον Ιούλιο και Αύγουστο, τα οποία αφέθηκαν στη χλωρίνη για 15 min. Το Μάρτιο, τα τεμάχια βλαστού συλλέγονταν πριν την έκπτυξη της νέας βλάστησης και απολυμαίνονταν επιφανειακά ακολουθώντας την παραπάνω μέθοδο εκτός του ότι τα εξωτερικά λέπια μαζί με το φλοιό αφαιρούνταν από τους οφθαλμούς πριν την απολύμανση, τα έκφυτα εμβαπτίζονταν σε διάλυμα με AA-CA αμέσως μετά από αυτή τη μεταχείριση και η συγκέντρωση του διαλύματος χλωρίνης ήταν 15% (v/v). Τέσσερα τρίλεπτα-ξέπλυματα με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό που περιείχε AA-CA (150 mg l^{-1} το καθένα) ακολούθησαν, καθώς και ένα ακόμη ξέπλυμα πριν τη χρήση των εκφύτων για να απομακρυνθούν τα φαινολικά συστατικά που εκχύθηκαν. Τμήματα κορυφής βλαστού ή κόμβου, μήκους 0.8-1.0 cm, με έναν (συνήθως) ή δύο οφθαλμούς χρησιμοποιούνταν ως έκφυτα, τα οποία καλλιεργούνταν μεμονωμένα σε σωλήνες με στερεό υπόστρωμα MS που περιείχε 3% (w/v) σουκρόζη και 1.0 mg l^{-1} BA/ 0.1 mg l^{-1} IBA, υπό κάλυψη μεμβράνης sanitas. Μετά από δύο ημέρες, τα έκφυτα μεταφέρονταν σε φρέσκο υπόστρωμα για να μειωθεί η έκθεσή τους στα εγχυμένα φαινολικά.

Τα έκφυτα διακρίνονταν σε επάκρια, κορυφαία, μεσαία και βασικά ανάλογα με τη θέση τους πάνω στις αναβλαστήσεις για να εξετασθεί η επίδραση της θέσης των εκφύτων στην εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας. Η διάκριση αυτή δεν έγινε για τα έκφυτα που συλλέγονταν το Μάρτιο, επειδή κριτήριο για την επιλογή τους ήταν να έχουν αρχίσει να φουσκώνουν οι οφθαλμοί και όχι η θέση τους πάνω στο βλαστό.

Τα έκφυτα που συλλέχθηκαν το Μάιο και Ιούνιο 2010 καλλιεργήθηκαν στο βασικό υπόστρωμα (MS με 1.0 mg l^{-1} BA/ 0.1 mg l^{-1} IBA, στο υπόστρωμα με 1.0 mg l^{-1} zeatin/ 0.1 mg l^{-1} IBA και σε αυτό χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για να εξετασθεί η επίδραση της ζεατίνης στην εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας.



Εικόνα 21. Αναβλαστήσεις από τη βάση καμένου φυτού *xM. florentina* (α) και επάκρια-κορυφαία (β), μεσαία (γ) και βασικά (δ) τεμάχια των αναβλαστήσεων από τα οποία ελήφθησαν έκφυτα για την εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας τον Ιούνιο 2009.

4.2.3. Εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας από έκφυτα φυταρίων παραγόμενων μέσω μικροπολλαπλασιασμού

Τον Ιούλιο 2010, τεμάχια βλαστού ελήφθησαν από το μεσαίο τμήμα φυταρίων ηλικίας 5 ή 8 μηνών (Εικ. 22α, β, γ), τα οποία είχαν παραχθεί από τις αναβλαστήσεις των καμένων φυτών μέσω μικροπολλαπλασιασμού. Είκοσι ημέρες αργότερα, συλλέχθηκαν επίσης τα κορυφαία τμήματα (μαζί με τον επάκριο) των βλαστών που εκπτύχθηκαν μετά το κλάδεμα των παραπάνω φυταρίων για λήψη εκφύτων (Εικ. 22δ). Η επιφανειακή απολύμανση έγινε με 30% (v/v) διάλυμα χλωρίνης για 10 min (τεμάχια κορυφής) ή 15 min (τεμάχια μέσης) ακολουθώντας την ίδια μέθοδο με αυτή των εκφύτων από τις αναβλαστήσεις. Έκφυτα κορυφής βλαστού και έκφυτα κόμβων, μήκους 0.8-1.0 cm, με ένα (συνήθως) ή δύο οφθαλμούς, καλλιεργήθηκαν μεμονωμένα σε σωλήνες υπό κάλυψη μεμβράνης sanitas στα υποστρώματα MS με 1.0 mg l^{-1} BA/ 0.1 mg l^{-1} IBA ή 1.0 mg l^{-1} zeatin/ 0.1 mg l^{-1} IBA ή 1.0 mg l^{-1} TDZ και σε υπόστρωμα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες (μάρτυρας) για να διερευνηθεί η επίδραση των κυτοκινινών στην εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας. Τα έκφυτα από το μεσαίο τμήμα των μικροπολλαπλασιασμένων φυταρίων καλλιεργήθηκαν και στα υποστρώματα με 1.0 mg l^{-1} kinetin/ 0.1 mg l^{-1} IBA ή 1.0 mg l^{-1} 2iP/ 0.1 mg l^{-1} IBA ή 0.1 mg l^{-1} TDZ, ενώ δοκιμάστηκαν και διάφορα επίπεδα BA (0.5, 1.0 ή 2.0 mg l^{-1}) με ή χωρίς 0.1 mg l^{-1} IBA για να εξετασθεί η επίδραση της

συγκέντρωσης του BA και του IBA στην εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας. Τα έκφυτα από το κορυφαίο τμήμα των 20-ημερών βλαστών καλλιεργήθηκαν επίσης σε υπόστρωμα χωρίς IBA, που περιείχε 1.0 mg l^{-1} BA. Μεταφορά σε φρέσκο υπόστρωμα δεν έγινε επειδή προηγούμενος πειραματισμός με τα έκφυτα από ενήλικα δένδρα είχε δείξει χαμηλή έκχυση φαινολικών από τα έκφυτα τον Ιούλιο.



Εικόνα 22. Μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια *xM. florentina* ηλικίας 5 και 8 μηνών (α), τα οποία χρησιμοποιήθηκαν για τη λήψη εκφύτων για εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας τον Ιούλιο 2010 από το μεσαίο τμήμα των 5-μηνών (β) και των 8-μηνών φυταρίων (γ), καθώς και από τα κορυφαία τμήματα βλαστών ηλικίας 20-ημερών, που εκπτώχθηκαν από τα παραπάνω φυτάρια μετά το κλάδεμα (δ).

4.2.4. Εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας από σπορόφυτα

Ελάχιστοι σπόροι, που βρέθηκαν στο ένα από τα δύο μη-καμένα φυτά στην Πάρνηθα το φθινόπωρο 2009, χωρίστηκαν από τη σάρκα του καρπού και πλύθηκαν καλά κάτω από τρεχούμενο νερό βρύσης, απολυμάνθηκαν επιφανειακά με 10% (v/v) διάλυμα χλωρίνης για 10 min ακολουθούμενο από τέσσερα τρίλεπτα-ξεπλύματα με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό και στρωματώθηκαν σε στερεό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες στους $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ για τρεις μήνες. Αμέσως μετά, οι σπόροι μεταφέρθηκαν για φύτρωμα σε φρέσκο υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS στους $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$ για επτά εβδομάδες. Κάθε σπορόφυτο (Εικ. 23) έδωσε δύο έκφυτα, ένα κορυφής βλαστού και ένα

κομβικό, μήκους 0.8 cm περίπου, τα οποία καλλιεργήθηκαν στο βασικό υπόστρωμα (MS με 1.0 mg l⁻¹ BA και 0.1 mg l⁻¹ IBA), υπό κάλυψη μεμβράνης sanitas.



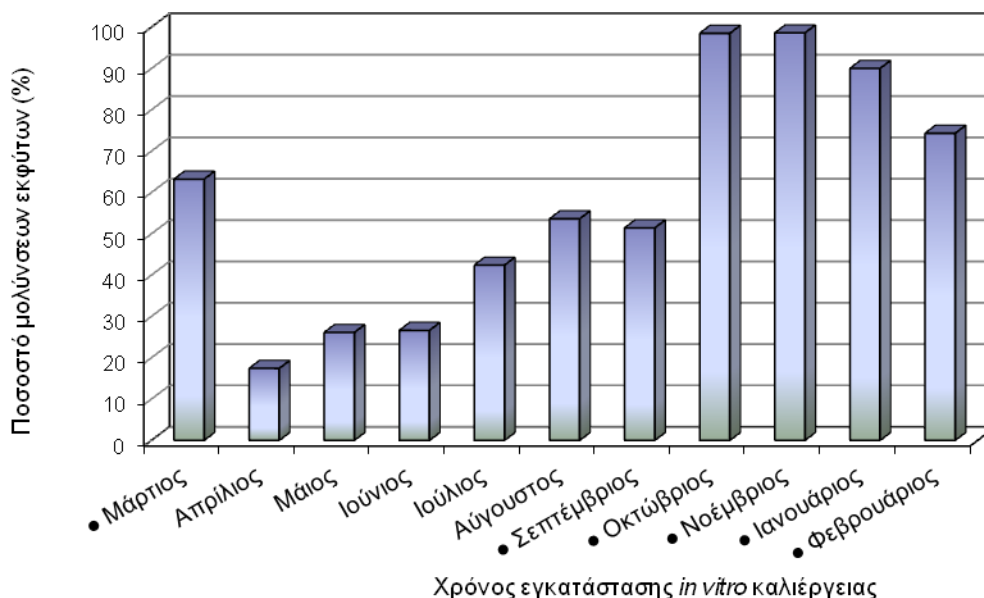
Εικόνα 23. Σπορόφυτο του x*M. florentina*, που φύτευσε *in vitro*, ηλικίας 4 εβδ. (α) και 7 εβδ. (β).

4.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.3.1. Εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας από έκφυτα ενηλίκων φυτών

Οι μολύνσεις των εκφύτων ελέγχθηκαν καλύτερα από τον Απρίλιο μέχρι τον Αύγουστο, ενώ κατά τη διάρκεια των χειμερινών μηνών η επιφανειακή απολύμανση δεν ήταν αποτελεσματική παρόλο που απομακρύνθηκαν τα εξωτερικά λέπια μαζί με το φλοιό (Σχ. 7). Η απολύμανση σε δύο στάδια, που εφαρμόστηκε σε έκφυτα συλλεγμένα το Φεβρουάριο, δε μείωσε το ποσοστό των μολύνσεων των εκφύτων και οδήγησε σε εντονότερο καφέτιασμα αυτών.

Εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας από ενήλικα φυτά επιτεύχθηκε κυρίως τους μήνες Μάρτιο (πριν την έκπτυξη της νέας βλάστησης) και Αύγουστο σε χαμηλά ποσοστά, σχηματίζοντας συνήθως ένα βλαστό ανά έκφυτο, μήκους μικρότερου των 0.5 cm (Πιν. 3).



Σχήμα 7. Ποσοστό μολύνσεων (%) κατά την *in vitro* εγκατάσταση εκφύτων που συλλέχθηκαν από ενήλικα φυτά τους αναγραφόμενους μήνες ($n=70-300$).

(• αφαίρεση λεπίων οφθαλμών και φλοιού πριν την απολύμανση)

Πίνακας 3. Ποσοστό έκπτυξης βλαστών, μέσος αριθμός και μέσο μήκος βλαστών σχηματισθέντων από έκφυτα που συλλέχθηκαν τους αναγραφόμενους μήνες από ενήλικα φυτά και καλλιεργήθηκαν *in vitro* στο βασικό υπόστρωμα (MS με 1.0 mg l^{-1} BA και 0.1 mg l^{-1} IBA) ($n=6-85$).

Εποχή εγκατάστασης <i>in vitro</i> καλλιέργειας	Έκπτυξη βλαστών (%)	Αριθμός βλαστών	Μήκος βλαστών (cm)
Μάρτιος 2004	33.3	1.5 a	0.4 a
Ιούνιος 2004	5.9	1.0 a	0.4 a
Αύγουστος 2006	12.5	1.0 a	0.4 a
Μάρτιος 2007	10.0	1.0 a	0.2 a
Αύγουστος 2009	23.1	1.0 a	0.5 a
Μάρτιος 2010	28.2	1.7 a	0.7 a
Ανάλυση της διασποράς			
	$F=$	0.6738 ^{NS}	2.3616 ^{NS}

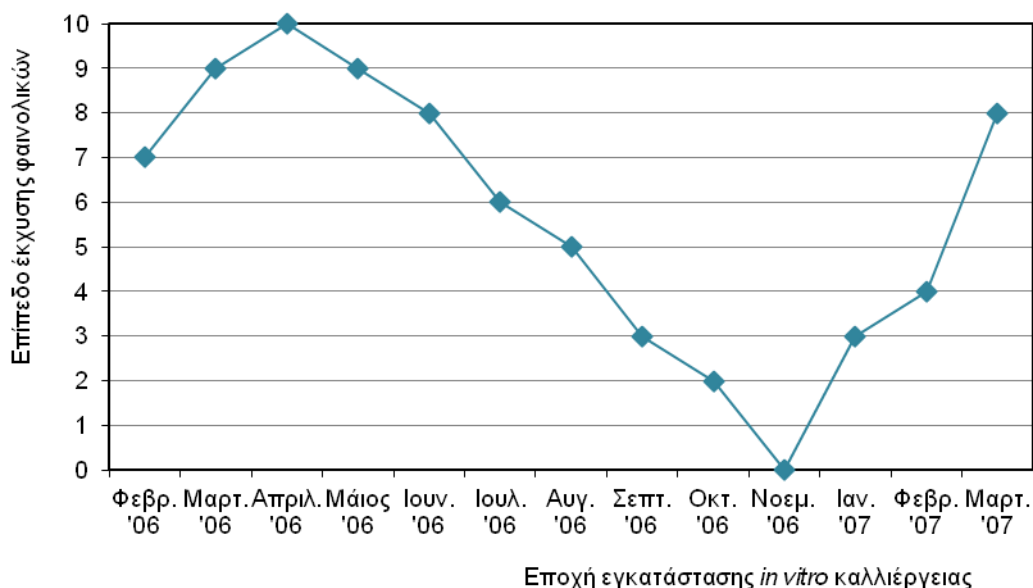
NS: μη σημαντικό σε επίπεδο $P=0.05$

Μεγάλης σημασίας για την εγκατάσταση καλλιέργειας το Μάρτιο είναι το κατάλληλο στάδιο έκπτυξης των οφθαλμών των εκφύτων. Το Μάρτιο 2006, παρόλο που απέτυχε η εγκατάσταση καλλιέργειας, φάνηκε ότι έκφυτα που ελήφθησαν από βλαστούς που είχαν φορτσαριστεί για 3 ημέρες ώστε να εκπτυχθούν οι οφθαλμοί παρουσίασαν χαμηλότερο ποσοστό μολύνσεων (52%) από τα έκφυτα που εγκαταστάθηκαν την ίδια μέρα που συλλέχθηκαν (88%), ενώ τα έκφυτα που ελήφθησαν από βλαστούς που είχαν φορτσαριστεί για 6 ημέρες παρουσίασαν εντονότερο καφέτιασμα. Συνεπώς, οι οφθαλμοί των εκφύτων θα πρέπει να είναι φουσκωμένοι και να έχουν αρχίσει να εκπτύσσονται, αλλά να μην έχουν εκπτυχθεί πολύ, γιατί το κορυφαίο μερίστωμα και τα νεαρά φύλλα είναι περισσότερο εκτεθειμένα στα μέσα απολύμανσης και πιο ευαίσθητα στο καφέτιασμα. Το φορτσάρισμα των βλαστών για έκπτυξη οφθαλμών θα πρέπει να διαρκεί από 1-3 ημέρες, ανάλογα με το στάδιο έκπτυξης των οφθαλμών κατά τη συλλογή.

4.3.1.1. Πρόβλημα καφετιάσματος εκφύτων και τρόποι περιορισμού του

Η εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας από έκφυτα ενήλικων φυτών ήταν δύσκολη γιατί τα έκφυτα καφέτιαζαν απελευθερώνοντας φαινολικά στο υπόστρωμα και τελικά νεκρώνονταν. Το καφέτιασμα των εκφύτων και η έκχυση φαινολικών ήταν πιο έντονα το Μάρτιο και Απρίλιο, ενώ μειωνόταν σταθερά μετά τον Ιούνιο και το χειμώνα δεν παρατηρούταν καθόλου (Σχ. 8, Εικ. 24). Η απομάκρυνση των λεπίων και του φλοιού από τους οφθαλμούς του Μαρτίου, που ήταν αναγκαία για να μειωθούν τα μολύσματα των οφθαλμών, το προχωρημένο στάδιο έκπτυξης των οφθαλμών, καθώς και η απολύμανση σε δύο στάδια επέτειναν το πρόβλημα του καφετιάσματος, ενώ η χρήση μικρού μεγέθους εκφύτων και τα 4 συν 1 (πριν τη χρήση των εκφύτων) ξεπλύματα μείωσαν την έκχυση φαινολικών.

Η προμεταχείριση των εκφύτων με αντιοξειδωτικά και η μεταφορά σε φρέσκο υπόστρωμα έλεγξαν μερικώς το καφέτιασμα των εκφύτων και την έκχυση φαινολικών στο υπόστρωμα (Πιν. 4, Εικ. 24στ), αλλά το πρόβλημα αυτό συνεχίστηκε.



Σχήμα 8. Επίπεδο έκχυσης φαινολικών στο υπόστρωμα κατά την εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας από έκφυτα κορυφής ενήλικων φυτών τους αναγραφόμενους μήνες.

Πίνακας 4. Επίδραση της μεθόδου απολύμανσης των εκφύτων, που συλλέχθηκαν τον Μάρτιο 2007 από ενήλικα φυτά, στην ποσότητα των εγχέομενων στο υπόστρωμα φαινολικών.

Μέθοδος απολύμανσης	Ποσότητα φαινολικών
Απολέπιση οφθαλμών, απολύμανση, καλλιέργεια στο τελικό υπόστρωμα	μεγάλη
Απολέπιση οφθαλμών, απολύμανση, καλλιέργεια για 1-2 ημ. στο υπόστρωμα και μεταφορά σε φρέσκο υπόστρωμα	μέτρια
Απολέπιση οφθαλμών, εμβάπτυση σε δ/μα CA-AA, απολύμανση, 4+1 ξεπλύματα με δ/μα CA-AA, μεταφορά σε φρέσκο υπόστρωμα μετά 1-2 ημ.	μικρή
Απολέπιση οφθαλμών, εμβάπτυση σε δ/μα CA-AA, απολύμανση, 4+1 ξεπλύματα με δ/μα CA-AA, καλλιέργεια στο τελικό υπόστρωμα	αρκετή



Εικόνα 24. Καφέτιασμα εκφύτων και έκχυση φαινολικών στο υπόστρωμα κατά την εγκατάσταση *in vitro* εκφύτων από ενήλικο φυτό (α) τον Απρίλιο 2006 χωρίς μεταφορά σε φρέσκο υπόστρωμα, (β) τον Αύγουστο 2006, (γ) τον Οκτώβριο 2006, (δ) τον Ιανουάριο 2007 και (ε) το Φεβρουάριο 2007 με μεταφορά σε φρέσκο υπόστρωμα μετά από 2 ημέρες καλλιέργειας και (στ) το Μάρτιο 2007 μετά από μεταχείριση με αντιοξειδωτικά και μεταφορά σε φρέσκο υπόστρωμα.

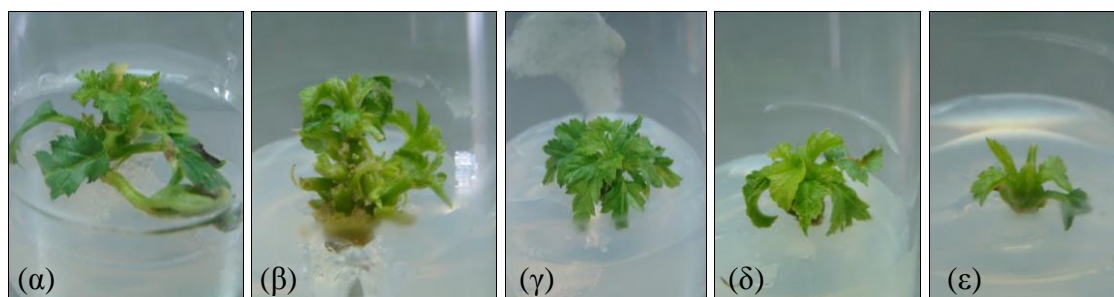
4.3.1.2. Επίδραση τύπου εκφύτου από ενήλικα φυτά στην εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας

Από τα έκφυτα, που συλλέχθηκαν το Μάρτιο 2010 από το ενήλικο φυτό από κανονική βλάστηση και από λογχοειδείς βλαστήσεις με ένα ή δύο οφθαλμούς (κεφάλαιο 4.2.1., Εικ. 13), σε υψηλότερο ποσοστό εκπτύχθηκαν τα έκφυτα από λογχοειδή βλάστηση με ένα μικρό βλαστό, ενώ περισσότεροι του ενός βλαστοί ανά έκφυτο σχηματίστηκαν από τα επάκρια έκφυτα της κανονικής βλάστησης και από αυτά από λογχοειδή βλάστηση με ένα μεγάλο οφθαλμό (Πιν. 5, Εικ. 25), το οποίο δείχνει τάση για εγκατάσταση καλλιέργειας με υψηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού. Χαρακτηριστικό είναι πως τα έκφυτα από λογχοειδή βλάστηση με ένα μικρό οφθαλμό και αυτά που περιελάμβαναν τον κατώτερο οφθαλμό των λογχοειδών με δύο οφθαλμούς σχημάτισαν κοντή ροζέττα φύλλων (Εικ. 25 γ, ε), κάτι που φαίνεται και από το χαμηλότερο μέσο μήκος βλαστών αυτών των εκφύτων (Πιν. 5), και φάνηκαν να εξελίσσονται πάλι σε φυλλοφόρα λογχοειδή. Μερικά από τα έκφυτα που περιελάμβαναν τον ανώτερο οφθαλμό των λογχοειδών με δύο οφθαλμούς επίσης φάνηκαν να έχουν την ίδια τάση (Εικ. 25δ).

Πίνακας 5. Ποσοστό έκπτυξης βλαστών, μέσος αριθμός και μέσο μήκος βλαστών σχηματισθέντων από τους αναγραφόμενους τύπους εκφύτων από ενήλικα φυτά που εγκαταστάθηκαν *in vitro* στο βασικό υπόστρωμα (MS με 1.0 mg l⁻¹ BA και 0.1 mg l⁻¹ IBA) το Μάρτιο 2010 πριν την έκπτυξη της βλάστησης (n=7-15).

Τύπος εκφύτου	Έκπτυξη βλαστών (%)	Αριθμός βλαστών	Μήκος βλαστών (cm)
Έκφυτο με επάκριο οφθαλμό κανονικής βλάστησης	22	1.5 b	0.7 a
Έκφυτο με ένα μεγάλο οφθαλμό από λογχοειδή βλάστηση	25	4.5 a	0.7 a
Έκφυτο με ένα μικρό οφθαλμό από λογχοειδή βλάστηση	43	1.0 b	0.6 a
Έκφυτο από λογχοειδή βλάστηση με δύο οφθαλμούς (ανώτερος οφθ.)	27	1.0 b	0.9 a
Έκφυτο από λογχοειδή βλάστηση με δύο οφθαλμούς (κατώτερος οφθ.)	21	1.0 b	0.4 a
Ανάλυση της διασποράς <i>F</i> =		45.9643**	0.7643 ^{NS}

** : σημαντικό σε επίπεδο $P=0.01$, NS: μη σημαντικό σε επίπεδο $P=0.05$



Εικόνα 25. Χαρακτηριστική αντίδραση κατά την αρχική εγκατάσταση *in vitro* εκφύτων από ενήλικο φυτό που περιελάμβαναν (α) επάκριο οφθαλμό κανονικής βλάστησης, (β) λογχοειδή βλάστηση με ένα μεγάλο οφθαλμό, (γ) λογχοειδή βλάστηση με ένα μικρό οφθαλμό, (δ) ανώτερο οφθαλμό λογχοειδούς βλάστησης με δύο οφθαλμούς και (ε) κατώτερο οφθαλμό λογχοειδούς βλάστησης με δύο οφθαλμούς και συλλέχθηκαν το Μάρτιο 2010 πριν την έκπτυξη της βλάστησης.

4.3.1.3. Συσχέτιση μορφολογίας και ανατομίας εκφύτων από ενήλικα φυτά κατά τη διάρκεια ενός έτους με την αντίδρασή τους στην εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας

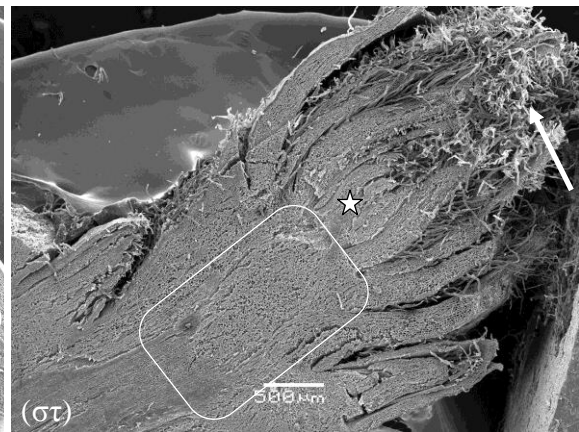
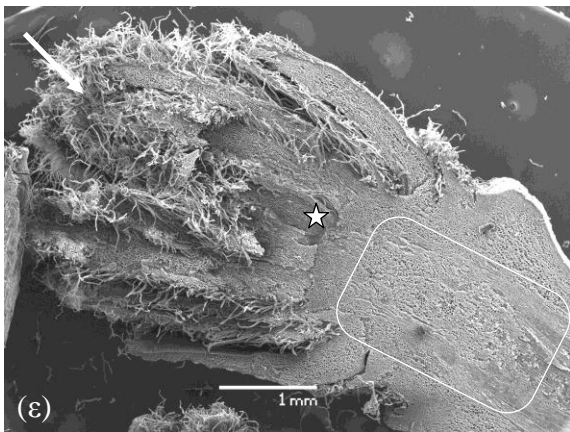
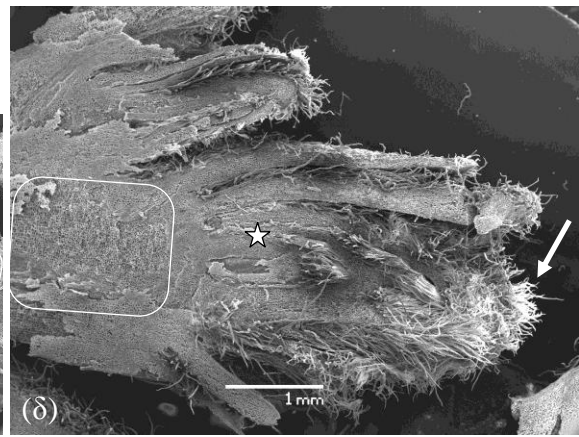
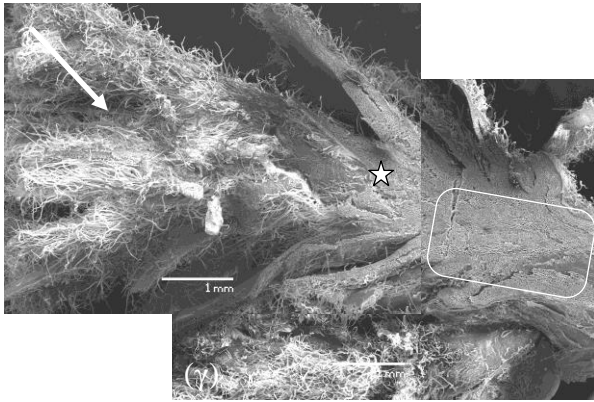
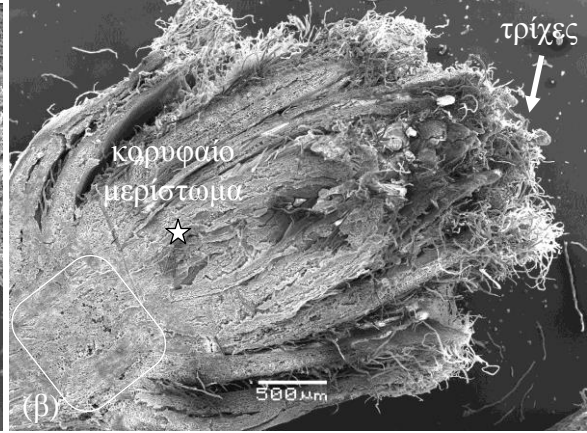
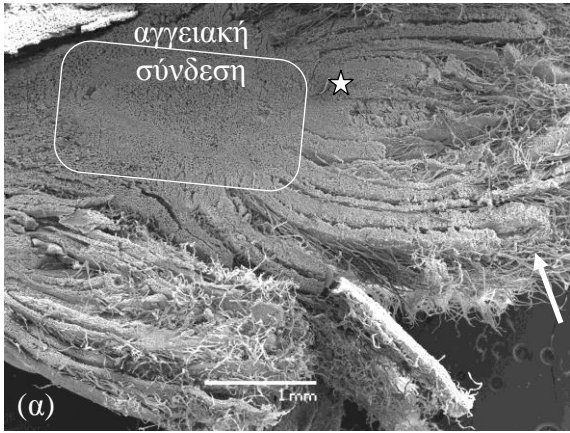
Μικροσκοπική παρατήρηση επάκριων εκφύτων που συλλέχθηκαν από κανονικές (Εικ. 26) ή λογχοειδείς (Εικ. 27) βλαστήσεις ενήλικων φυτών σε μηνιαία βάση κατά τη διάρκεια ενός έτους έδειξε πως υπήρχε αγγειακή σύνδεση των οφθαλμών με το βλαστό.

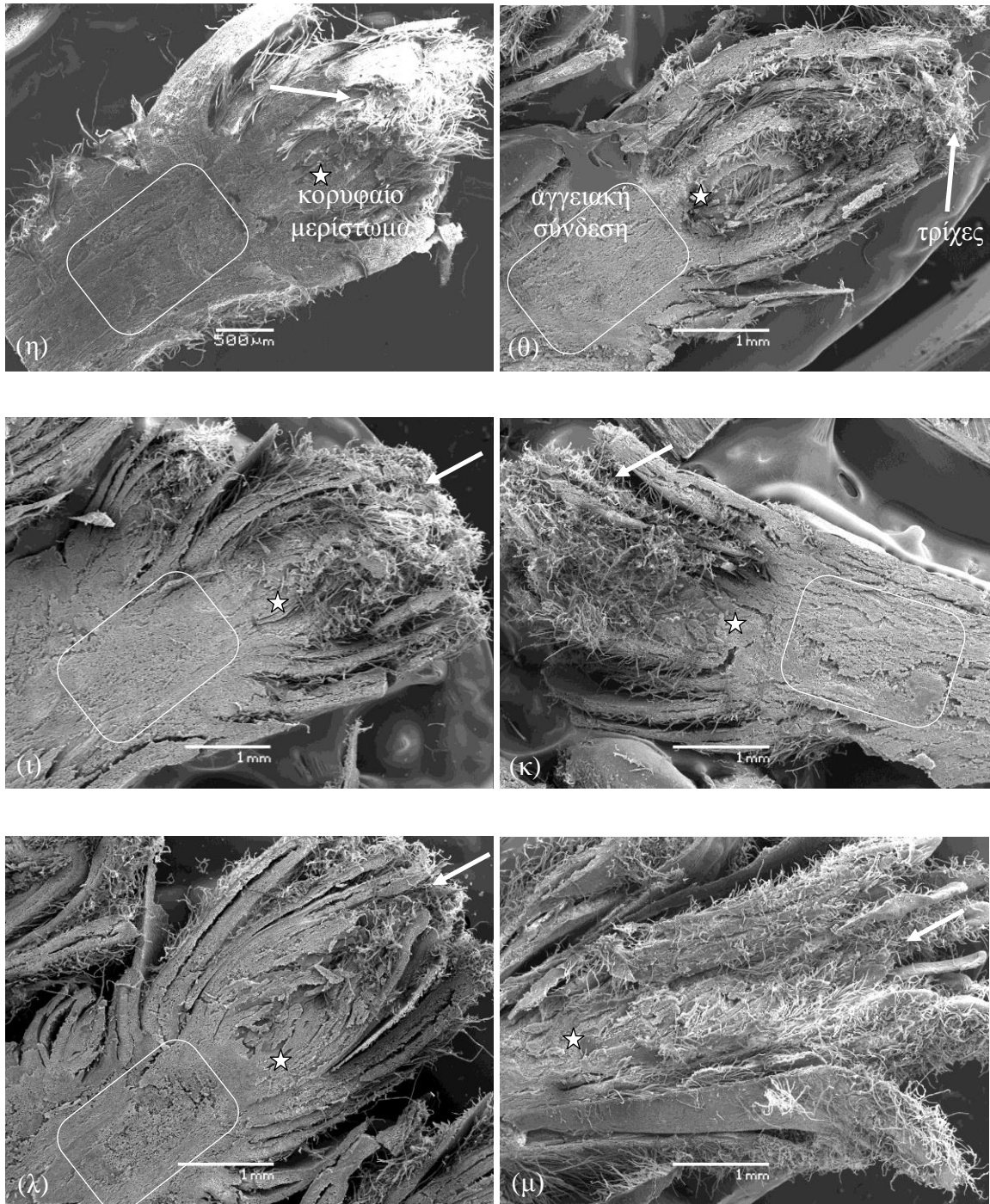
Στα λέπια και τα νεαρά φύλλα όλων των οφθαλμών ήταν έντονη η παρουσία μονοκύτταρων τριχών (Εικ. 26, Εικ. 27), οι οποίες δυσκόλεψαν την απολύμανση των εκφύτων, ιδιαίτερα τους χειμερινούς μήνες.

Την περίοδο της ταχείας ανάπτυξης των βλαστών, τον Απρίλιο 2006 (Εικ. 26γ, Εικ. 27γ), το κορυφαίο μερίστωμα περιβαλλόταν χαλαρά από αναπτυσσόμενα φύλλα, ενώ τους υπόλοιπους μήνες ήταν καλά προστατευμένο κάτω από πολλές σειρές λεπίων (Εικ. 26, Εικ. 27), ενώ το Μάρτιο 2007 (Εικ. 26μ, Εικ. 27ν) τα έκφυτα συλλέχθηκαν σε πιο προχωρημένο στάδιο έκπτυξης από ότι το Μάρτιο 2006 (Εικ. 26β, Εικ. 27β).

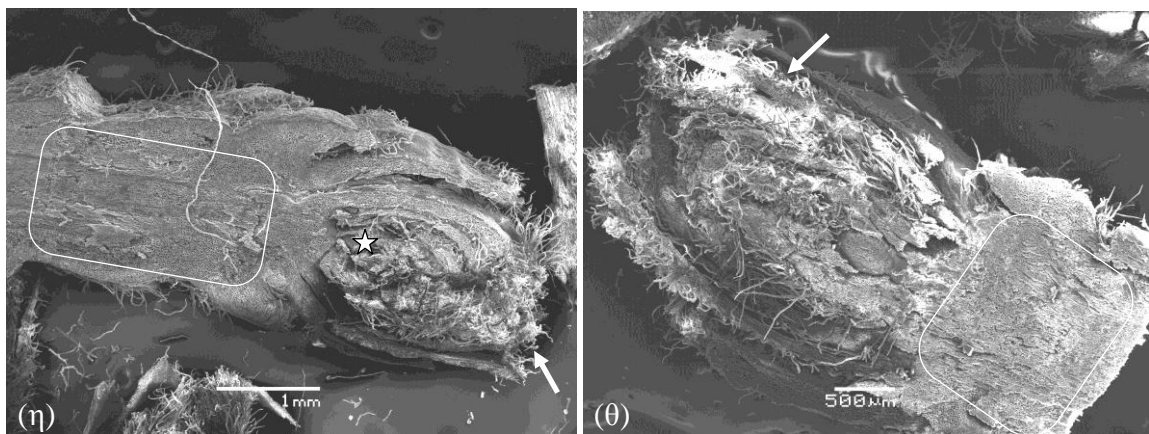
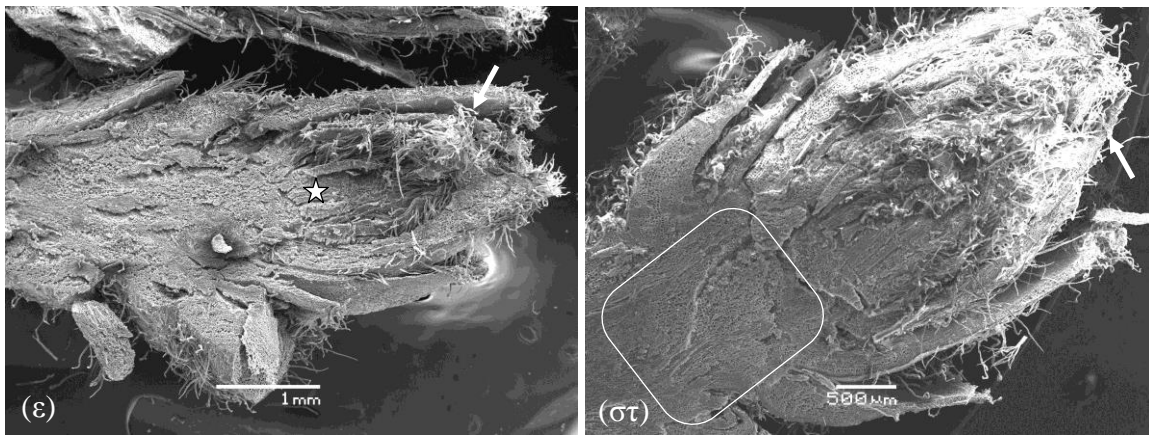
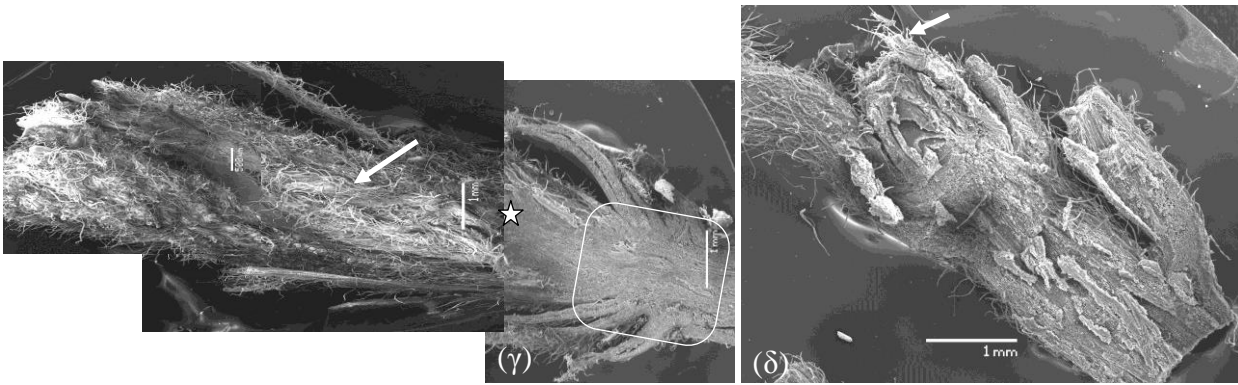
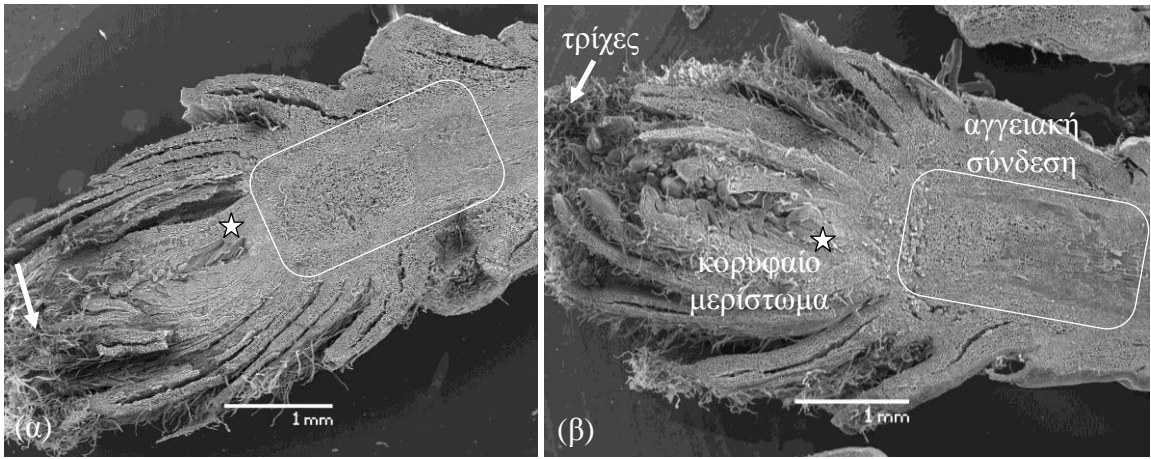
Μικροσκοπική παρατήρηση των παρεγχυματικών κυττάρων των εκφύτων φανέρωσε μια τάση συσσώρευσης αμύλου στα κύτταρα από τον Ιούλιο μέχρι το Σεπτέμβριο (Εικ. 28δ, ε, στ) και γεμίσματος των κυττάρων με ινώδεις κατασκευές από τον Οκτώβριο μέχρι τον Ιανουάριο (Εικ. 28η, θ, ι).

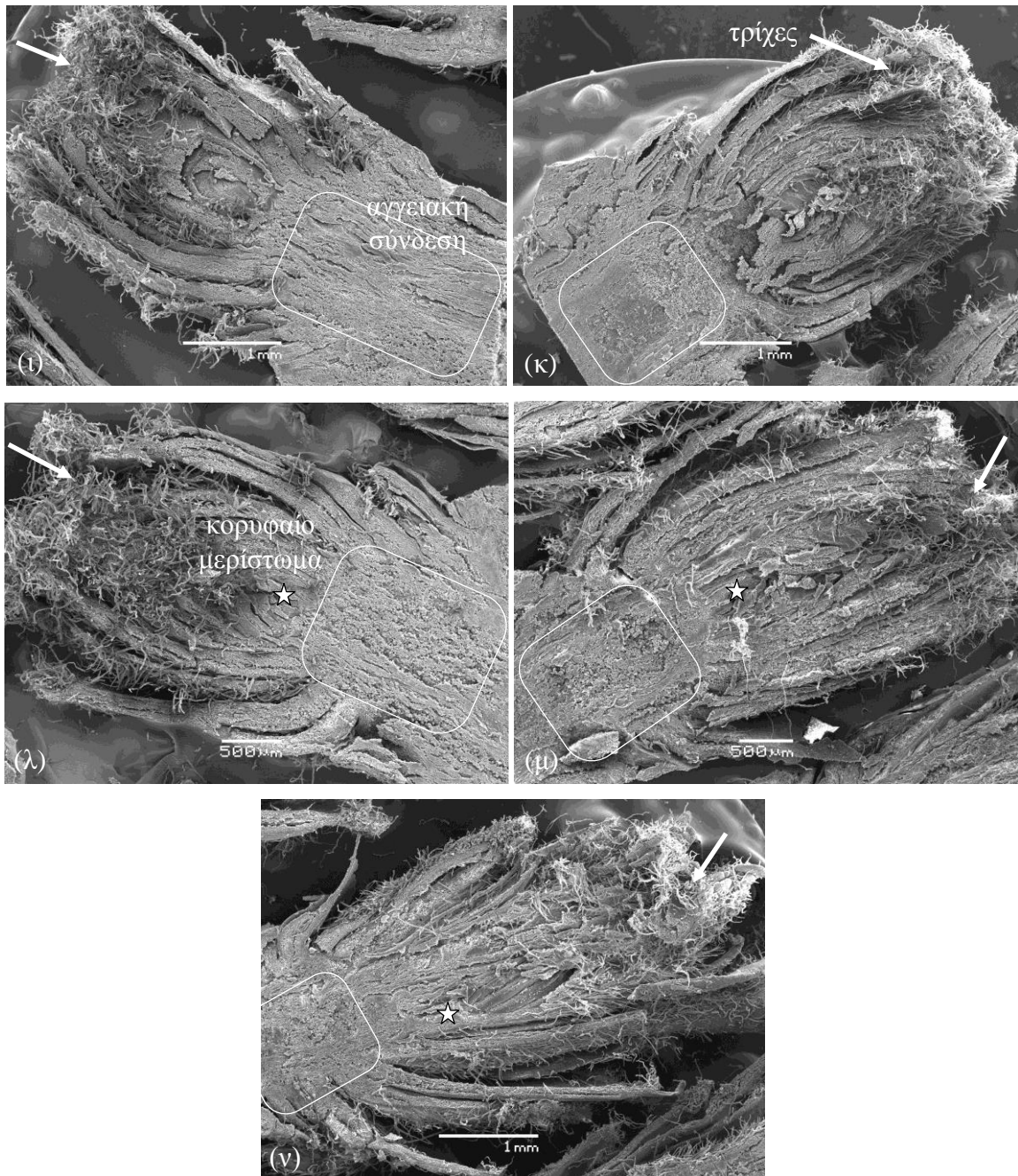
Σε έκφυτα που είχαν συλλεχθεί κατά τη διάρκεια όλων των μηνών του έτους παρατηρήθηκαν κρύσταλλοι του οξαλικού ασβεστίου με τη μορφή κρυσταλλικών αδένων, δηλαδή πολλών μεμονωμένων κρυστάλλων από κοινού αυξανόμενων από ένα κέντρο (Εικ. 29).



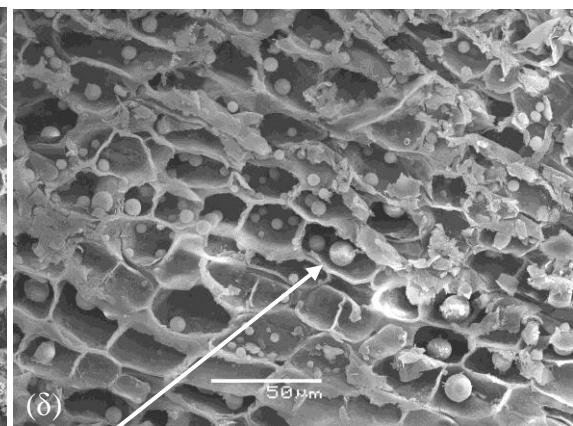
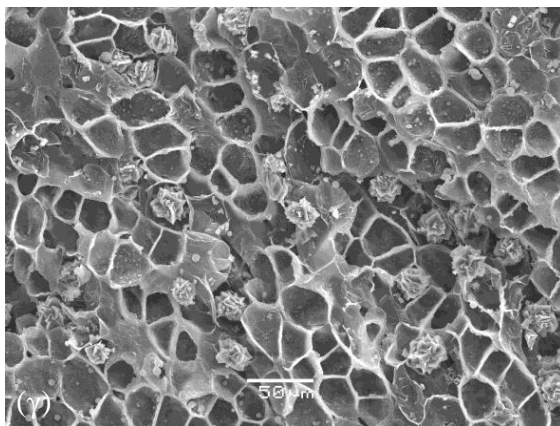
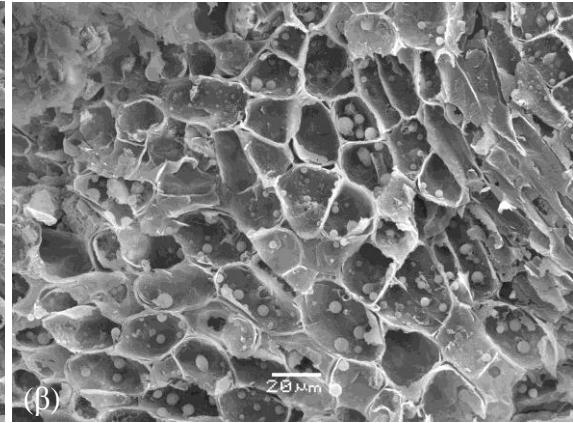
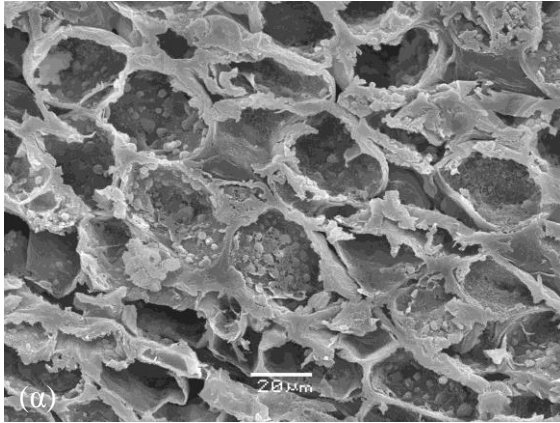


Εικόνα 26. Φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης επιμηκών τομών επάκριων εκφύτων από κανονικές βλαστήσεις του *xM. florentina*, που συλλέχθηκαν από ενήλικα φυτά το Φεβρουάριο 2006 (α), το Μάρτιο 2006 (β), τον Απρίλιο 2006 (γ), τον Ιούνιο 2006 (δ), τον Ιούλιο 2006 (ε), τον Αύγουστο 2006 (στ), το Σεπτέμβριο 2006 (η), τον Οκτώβριο 2006 (θ), το Νοέμβριο 2006 (ι), τον Ιανουάριο 2007 (κ), το Φεβρουάριο 2007 (λ) και το Μάρτιο 2007 (μ).

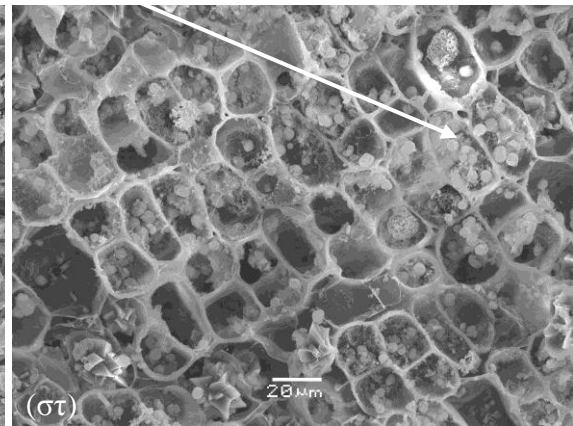
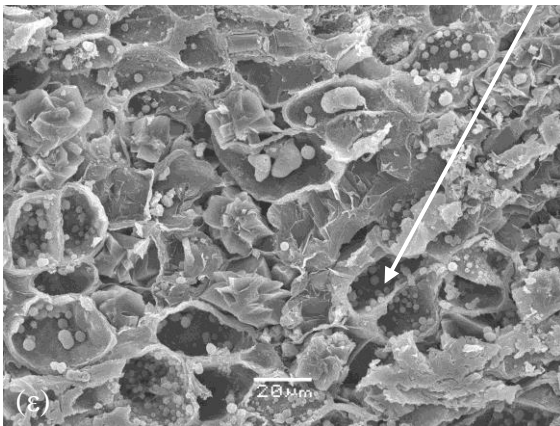


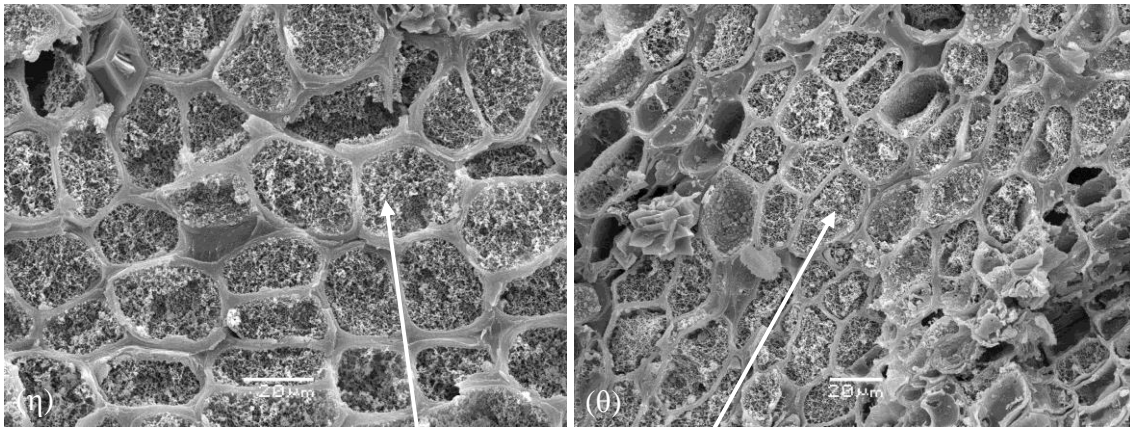


Εικόνα 27. Φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης επιμηκών τομών επάκριων εκφύτων από λογχοειδείς βλαστήσεις του *xM. florentina*, που συλλέχθηκαν από ενήλικα φυτά το Φεβρουάριο 2006 (α), το Μάρτιο 2006 (β), τον Απρίλιο 2006 (γ), τον Μάιο 2006 (δ), Ιούνιο 2006 (ε), τον Ιούλιο 2006 (στ), τον Αύγουστο 2006 (ση), το Σεπτέμβριο 2006 (θ), τον Οκτώβριο 2006 (ι), το Νοέμβριο 2006 (κ), τον Ιανουάριο 2007 (λ), το Φεβρουάριο 2007 (μ) και το Μάρτιο 2007 (ν).

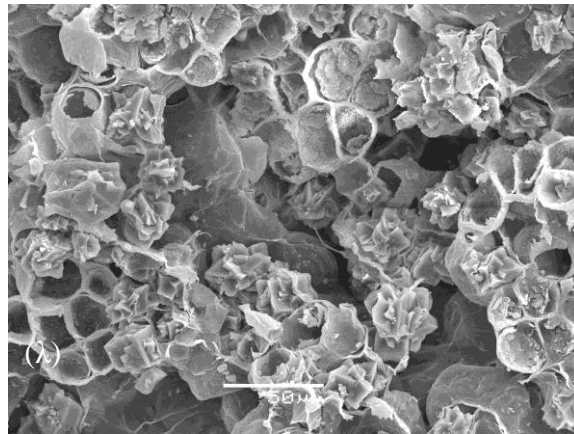
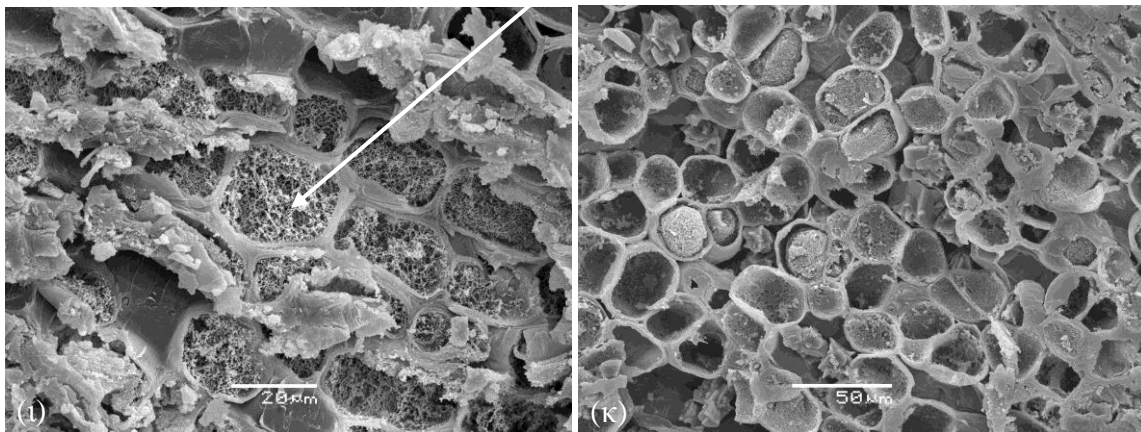


Συσώρευση αμύλου

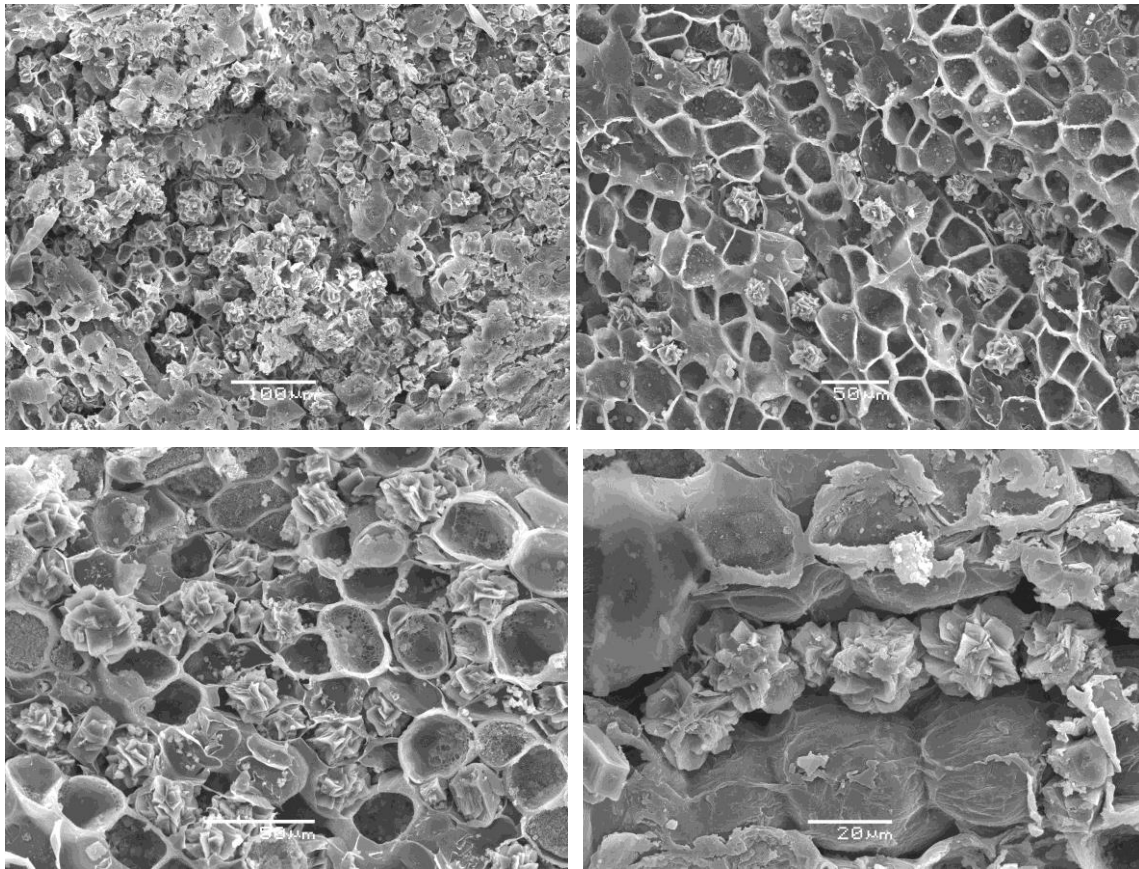




Γέμισμα κυττάρων με ινώδεις κατασκευές



Εικόνα 28. Φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης παρεγχυματικών κυττάρων επάκριων εκφύτων του *χM. florentina*, που συλλέχθηκαν τον Απρίλιο 2006 (α), τον Μάιο 2006 (β), Ιούνιο 2006 (γ), τον Ιούλιο 2006 (δ), τον Αύγουστο 2006 (ε), το Σεπτέμβριο 2006 (στ), τον Οκτώβριο 2006 (η), το Νοέμβριο 2006 (θ), τον Ιανουάριο 2007 (ι), το Φεβρουάριο 2007 (κ) και το Μάρτιο 2007 (λ).



Εικόνα 29. Φωτογραφίες από ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης κρυστάλλων οξαλικού ασβεστίου, που παρατηρήθηκαν σε έκφυτα του *xM. florentina* όλους τους μήνες του έτους.

4.3.2. Εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας από έκφυτα αναβλαστήσεων

Η εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειών του *xM. florentina* από επάκρια και έκφυτα κόμβου των αναβλαστήσεων των καμένων φυτών που επιχειρήθηκε κατά τη διάρκεια της βλαστητικής περιόδου (Μάρτιο έως Αύγουστο) επί δύο συναπτά έτη, 2009 και 2010, επηρεάστηκε από τις διαφορετικές καιρικές συνθήκες της κάθε χρονιάς και από το χρόνο που η νέα βλάστηση βοσκήθηκε από τα ελάφια. Το 2009, που ο καιρός ήταν ψυχρότερος, η νέα βλάστηση εκπύχθηκε γύρω στα τέλη Μαρτίου αναπτυσσόμενη αργά και οι αναβλαστήσεις βοσκήθηκαν σοβαρά μετά τον Ιούλιο, ενώ το 2010, ο καιρός ήταν θερμότερος, η έκπτυξη της νέας βλάστησης ξεκίνησε περίπου τρεις εβδομάδες νωρίτερα και λόγω της ξηρασίας οι αναβλαστήσεις βοσκήθηκαν ήδη από το Μάιο.

Τα ποσοστά μολύνσεων των εκφύτων που συλλέχθηκαν το Μάρτιο ήταν υψηλότερα από αυτά των εκφύτων που συλλέχθηκαν άνοιξη ή καλοκαίρι και ήταν απαραίτητη η απομάκρυνση λεπίων οφθαλμών και φλοιού για να μη μολυνθούν όλα τα έκφυτα (Πιν. 6).

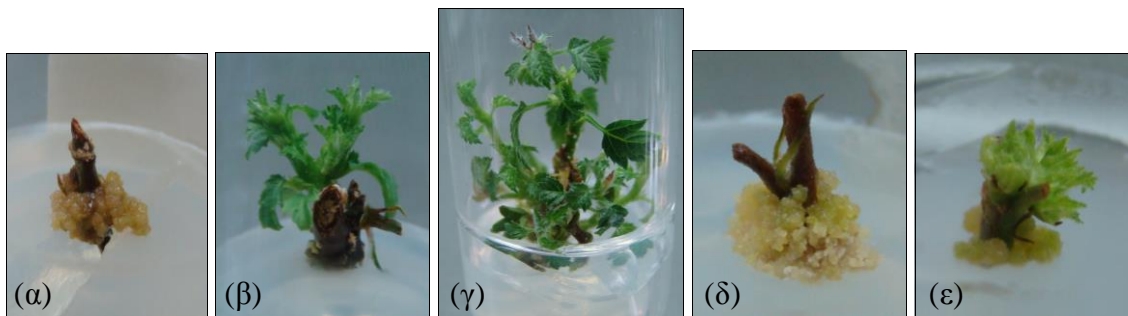
Τα έκφυτα που συλλέχθηκαν από ταχέως αυξανόμενους βλαστούς το Μάιο 2009, αντέδρασαν σχηματίζοντας μόνο κάλο (Εικ. 30α), ενώ μετά τον Ιούνιο 2009 παρατηρήθηκε έκπτυξη των οφθαλμών των εκφύτων χωρίς σχηματισμό κάλου (Πιν. 6, Εικ. 30β). Τον Αύγουστο 2009, το ποσοστό έκπτυξης των οφθαλμών βρέθηκε μειωμένο πιθανότατα επειδή τα έκφυτα ελήφθησαν από αναβλαστήσεις που εκπτύχθηκαν δευτερογενώς κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού μετά τη βόσκηση. Την επόμενη χρονιά, τα έκφυτα που συλλέχθηκαν πριν την έκπτυξη της βλάστησης (Μάρτιος 2010) έδωσαν το υψηλότερο ποσοστό έκπτυξης των οφθαλμών (Εικ. 30γ), σε αντίθεση με τα έκφυτα που συλλέχθηκαν το Μάρτιος 2009 που παρουσίασαν εξαιρετικά χαμηλό ποσοστό πιθανότατα επειδή βρίσκονταν σε προχωρημένο στάδιο έκπτυξης κατά τη συλλογή και εκδήλωσαν εντονότερο καφέτιασμα (Πιν. 6). Τα έκφυτα που συλλέχθηκαν την περίοδο Απριλίου-Μαΐου 2010 σχημάτισαν κάλο στη βάση τους, αλλά έδωσαν και χαμηλά ποσοστά έκπτυξης των οφθαλμών (Εικ. 30δ, ε), πιθανότατα επειδή βρίσκονταν σε πιο προχωρημένο στάδιο ανάπτυξης από τα αντίστοιχα έκφυτα του 2009 λόγω της πιο θερμής χρονιάς. Τα έκφυτα, που συλλέχθηκαν τον Ιούνιο 2010, προέρχονταν από αναβλαστήσεις εκπτυγμένες μετά από βόσκηση το Μάιο, εκπτύχθηκαν σε χαμηλά ποσοστά σχηματίζοντας και κάλο στη βάση τους, σε χαμηλότερο όμως ποσοστό από τους προηγούμενους μήνες (Πιν. 6).

Το Μάρτιο και Μάιο 2010 εκπτύχθηκαν περισσότεροι βλαστοί ανά έκφυτο και τον Ιούνιο 2009 και το Μάρτιο 2010 λίγο πιο μακριοί βλαστοί (Πιν. 6), τα οποία μπορούν να αποδοθούν τόσο σε γενετικούς παράγοντες, καθώς χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα από αναβλαστήσεις διαφόρων φυτών για την εγκατάσταση των καλλιεργειών, όσο και στην πιθανή επίδραση της εποχής συλλογής των εκφύτων.

Πίνακας 6. Ποσοστό μολύνσεων εκφύτων, ποσοστό σχηματισμού κάλου, ποσοστό έκπτυξης βλαστών, μέσος αριθμός και μέσο μήκος βλαστών ανά εκφυτο που συλλέχθηκε τους αναγραφόμενους μήνες από διάφορες θέσεις των αναβλαστήσεων και εγκαταστάθηκε *in vitro* (n=80-330).

Εποχή εγκατάστασης <i>in vitro</i>	Ποσοστό μολύνσεων (%)	Ποσοστό κάλου (%)	Έκπτυξη βλαστών (%)	Αριθμός βλαστών	Μήκος βλαστών (cm)
Μάρτιος 2009	35	0	5	1.0 ab	0.9 ab
Μάιος 2009	11	43	0	-	-
Ιούνιος 2009	33	0	33	1.9 ab	0.8 a
Ιούλιος 2009	23	0	33	1.4 b	0.6 ab
Αύγουστος 2009	10	0	12	1.8 ab	0.4 b
Μάρτιος 2010	73	0	64	3.8 a	0.8 a
Απρίλιος 2010	4	63	5	2.3 ab	0.5 ab
Μάιος 2010	17	68	18	3.7 a	0.5 ab
Ιούνιος 2010	57	28	18	2.6 ab	0.6 ab
Ανάλυση της διασποράς <i>F</i> =				4.3938**	2.8564*

*, **: σημαντικά σε επίπεδο $P=0.05$ και $P=0.01$, αντίστοιχα.



Εικόνα 30. Χαρακτηριστική αντίδραση κατά την αρχική εγκατάσταση *in vitro* εκφύτων από αναβλαστήσεις των καμένων φυτών, που συλλέχθηκαν τον Μάιο 2009 (α), τον Ιούνιο 2009 (β), το Μάρτιο 2010 (γ), τον Απρίλιο 2010 (δ) και το Μάιο 2010 (ε).

4.3.2.1. Επίδραση της θέσης των εκφύτων πάνω στις αναβλαστήσεις στην εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας

Εξετάζοντας την αντίδραση των εκφύτων στην εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας συνολικά και τις δύο χρονιές (2009, 2010) αναφορικά με τη θέση των οφθαλμών πάνω στις αναβλαστήσεις, τα έκφυτα από το μεσαίο και ιδιαίτερα το βασικό τμήμα των αναβλαστήσεων μολύνθηκαν σε υψηλότερο ποσοστό από τα επάκρια και κορυφαία έκφυτα, εκπύχθηκαν συνάμα σε υψηλότερο ποσοστό, αλλά έδωσαν λιγότερους και κοντύτερους βλαστούς σε σχέση με τα επάκρια έκφυτα (Πιν. 7).

Πίνακας 7. Ποσοστό μολύνσεων, ποσοστό έκπτυξης βλαστών, μέσος αριθμός και μέσο μήκος βλαστών ανά έκφυτο που συλλέχθηκε τον Ιούνιο, Ιούλιο και Αύγουστο 2009 και Μάιο και Ιούνιο 2010 από τις αναγραφόμενες θέσεις πάνω στις αναβλαστήσεις καμένων φυτών και καλλιεργήθηκε *in vitro* στο βασικό υπόστρωμα (MS με 1.0 mg l⁻¹ BA/ 0.1 mg l⁻¹ IBA) (n=55-165).

Θέση εκφύτων	Ποσοστό μολύνσεων (%)	Έκπτυξη βλαστών (%)	Αριθμός βλαστών	Μήκος βλαστών (cm)
Επάκρια	10	20	4.2 a	0.7 ab
Κορυφαία	17	14	1.7 b	0.8 a
Μεσαία	28	25	1.6 b	0.5 b
Βασική	48	38	1.4 b	0.5 b
Ανάλυση της διασποράς F=			11.1300**	4.8344*

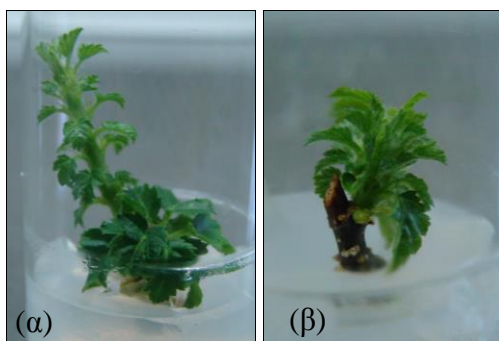
*, **: σημαντικά σε επίπεδο P=0.05 και P=0.01, αντίστοιχα.

Εξετάζοντας ξεχωριστά τα έκφυτα του Ιουνίου και Ιουλίου 2009, τα οποία είχαν συλλεχθεί από ένα μόνο φυτό που δε βοσκήθηκε αυτό το χρονικό διάστημα, το ποσοστό των μολύνσεων και το ποσοστό έκπτυξης των οφθαλμών από τα έκφυτα του βασικού τμήματος των αναβλαστήσεων βρέθηκε να είναι υψηλότερο από αυτό των εκφύτων από τις άλλες θέσεις (Πιν. 8). Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ως προς το μέσο αριθμό βλαστών ανά έκφυτο, ενώ τα έκφυτα από το επάκριο ή κορυφαίο τμήμα των αναβλαστήσεων έδωσαν μακρύτερους βλαστούς από τα κατώτερα έκφυτα (Πιν. 8, Εικ. 31).

Πίνακας 8. Ποσοστό μολύνσεων, ποσοστό έκπτυξης βλαστών, μέσος αριθμός και μέσο μήκος βλαστών ανά έκφυτο που σχηματίστηκαν από έκφυτα συλλεγμένα τον Ιούνιο και Ιούλιο 2009 από τις αναγραφόμενες θέσεις πάνω στις αναβλαστήσεις των καμένων φυτών και καλλιεργήθηκαν *in vitro* στο βασικό υπόστρωμα (MS με 1.0 mg l⁻¹ BA/ 0.1 mg l⁻¹ IBA) (n=16-75).

Θέση εκφύτων	Ποσοστό μολύνσεων (%)	Έκπτυξη βλαστών (%)	Αριθμός βλαστών	Μήκος βλαστών (cm)
Επάκρια	16	25	2.0 a	0.9 ab
Κορυφαία	22	20	1.7 a	0.9 a
Μεσαία	27	31	1.5 a	0.5 b
Βασική	41	60	1.3 a	0.5 b
Ανάλυση της διασποράς F=			2.5957 ^{NS}	4.8797*

*: σημαντικό σε επίπεδο P=0.05, NS: μη σημαντικό σε επίπεδο P=0.05



Εικόνα 31. Χαρακτηριστική αντίδραση κατά την εγκατάσταση στο υπόστρωμα MS με 1.0 BA/ 0.1 IBA (mg l⁻¹) εκφύτων κορυφής (α) και μέσης (β) των αναβλαστήσεων, που συλλέχθηκαν τον Ιούλιο 2009.

4.3.2.2. Επίδραση της zeatin στην εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας από έκφυτα αναβλαστήσεων

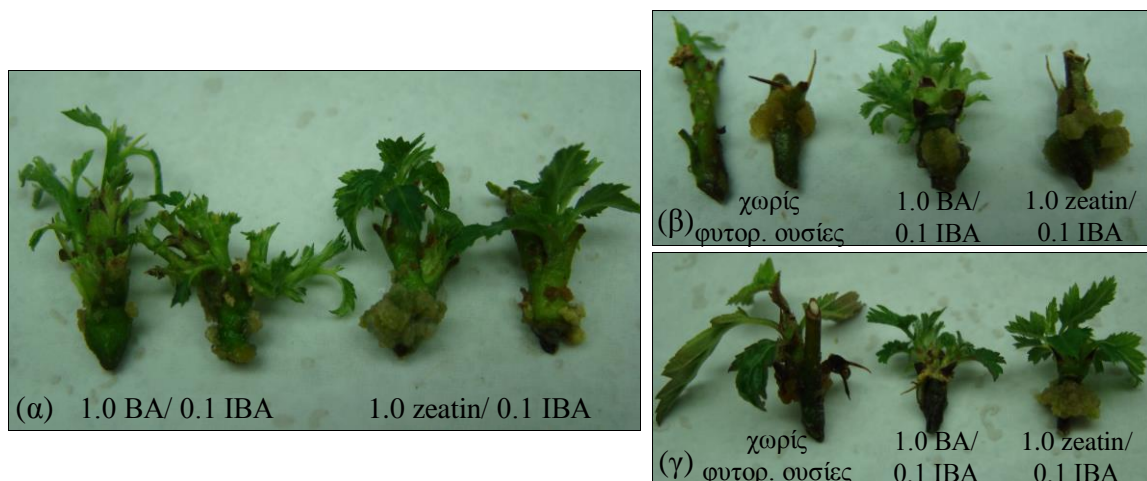
Κατά την εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας από έκφυτα αναβλαστήσεων που συλλέχθηκαν το Μάιο και Ιούνιο 2010, παρατηρήθηκαν υψηλά ποσοστά σχηματισμού κάλου στη βάση των εκφύτων και χαμηλά ποσοστά έκπτυξης των οφθαλμών (Πιν. 9). Η zeatin δε βρέθηκε να διαφέρει από τη BA ως προς το ποσοστό έκπτυξης των οφθαλμών, ενώ και οι δύο έδωσαν υψηλότερο ποσοστό από το υπόστρωμα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες. Περισσότεροι βλαστοί ανά έκφυτο φάνηκε ότι σχηματίστηκαν στο υπόστρωμα με

BA συγκριτικά με αυτό με zeatin ή τον μάρτυρα, χωρίς όμως να είναι στατιστικά σημαντική η διαφορά, ενώ δε βρέθηκαν διαφορές ως προς το μήκος των σχηματιζόμενων βλαστών (Πιν. 9, Εικ. 32).

Πίνακας 9. Ποσοστό σχηματισμού κάλου, ποσοστό έκπτυξης βλαστών, μέσος αριθμός βλαστών και μέσο μήκος βλαστών ανά έκφυτο κατά την αρχική καλλιέργεια εκφύτων που συλλέχθηκαν από αναβλαστήσεις τον Μάιο και Ιούνιο 2010 στα υποστρώματα MS με τις αναγραφόμενες φυτορρυθμιστικές ουσίες (mg l^{-1}) ($n=48-110$).

Υπόστρωμα αρχικής καλλιέργειας	Ποσοστό σχηματισμού κάλου (%)	Έκπτυξη βλαστών (%)	Αριθμός βλαστών	Μήκος βλαστών (cm)
χωρίς φυτορ. ουσίες	58	8	1.0 a	0.6 a
1.0 BA/ 0.1 IBA	46	18	3.1 a	0.6 a
1.0 zeatin/ 0.1 IBA	56	14	1.4 a	0.8 a
Ανάλυση της διασποράς $F=$			2.3087 ^{NS}	2.9503 ^{NS}

NS: μη σημαντικά σε επίπεδο $P=0.05$



Εικόνα 32. Χαρακτηριστική αντίδραση επάκριων εκφύτων (α), εκφύτων κορυφής (β) και μέσης (γ) των αναβλαστήσεων, που συλλέχθηκαν τον Ιούνιο 2010 και εγκαταστάθηκαν στα αναγραφόμενα υποστρώματα MS με BA ή zeatin (mg l^{-1}) ή χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες.

4.3.3. Εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας από έκφυτα μικροπολλαπλασιασμένων φυταρίων

Το ποσοστό μόλυνσης των εκφύτων από τη μέση του στελέχους των μικροπολλαπλασιασμένων φυταρίων ηλικίας 5 ή 8 μηνών ήταν υψηλότερο από αυτό των εκφύτων από το επάκριο (περιελάμβανε τον επάκριο οφθαλμό) και το κορυφαίο τμήμα των ηλικίας 20 ημερών βλαστών. Το ποσοστό έκπτυξης των οφθαλμών των μεσαίων εκφύτων ήταν υψηλότερο από αυτό των επάκριων και κορυφαίων εκφύτων, ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ως προς τον αριθμό και το μήκος των εκπτυσσόμενων βλαστών (Πιν. 10).

Πίνακας 10. Ποσοστό μολύνσεων, ποσοστό έκπτυξης βλαστών, μέσος αριθμός και μέσο μήκος σχηματισθέντων βλαστών ανά έκφυτο κατά την αρχική καλλιέργεια των αναγραφόμενων εκφύτων από μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια στο βασικό υπόστρωμα (MS με 1.0 mg l⁻¹ BA/ 0.1 mg l⁻¹ IBA) (n=5-20).

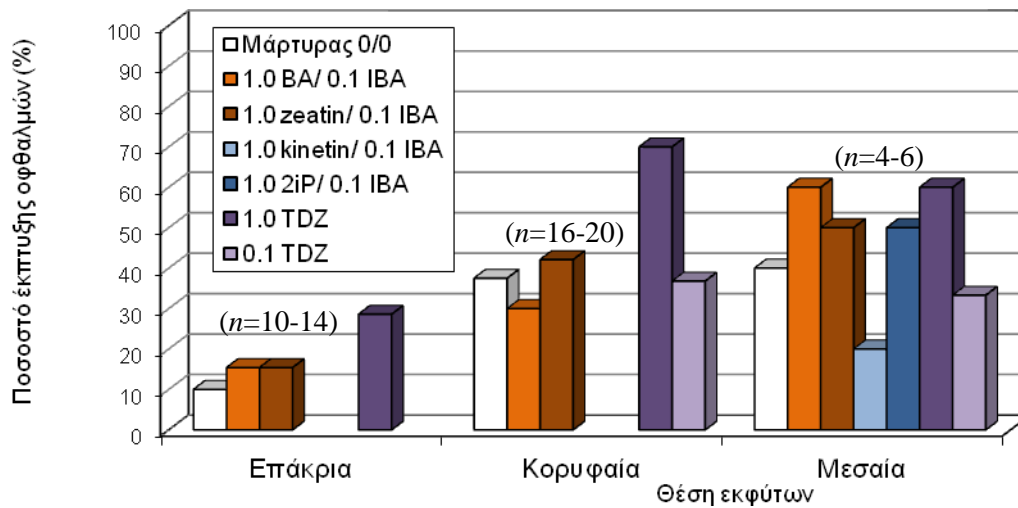
Προέλευση εκφύτων	Ποσοστό μολύνσεων (%)	Έκπτυξη βλαστών (%)	Αριθμός βλαστών	Μήκος βλαστών (cm)
Επάκριο έκφυτο (20 ημ. βλαστ)	6	15	2.5 a	0.4 a
Κορυφαίο τμήμα (20 ημ. βλαστ)	12	30	3.5 a	1.5 a
Μεσαίο τμήμα (φυτ. 5-8 μην)	72	60	2.7 a	1.3 a
Ανάλυση της διασποράς <i>F</i> =			0.2746 ^{NS}	1.2319 ^{NS}

** : σημαντικό σε επίπεδο $P=0.01$, NS: μη σημαντικά σε επίπεδο $P=0.05$

4.3.3.1. Επίδραση του είδους της κυτοκινίνης στην εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας από έκφυτα μικροπολλαπλασιασμένων φυταρίων

Μόνο τα έκφυτα από το μεσαίο τμήμα των ηλικίας 5 ή 8 μηνών φυταρίων καλλιεργήθηκαν σε όλα τα υποστρώματα κυτοκινινών (κεφάλαιο 4.2.3.), ενώ το υψηλό ποσοστό των μολύνσεων δεν άφησε επαρκή αριθμό επαναλήψεων για στατιστική επεξεργασία. Παρόλα αυτά, φάνηκε πως στο υπόστρωμα με kinetin οι οφθαλμοί των μεσαίων εκφύτων εκπτύχθηκαν σε χαμηλότερο ποσοστό, ενώ στα υποστρώματα με BA,

zeatin, 2iP ή 1.0 mg I⁻¹ TDZ τα ποσοστά έκπτυξης των οφθαλμών δε διέφεραν από του μάρτυρα (Σχ. 9). Περισσότεροι του ενός βλαστοί (κατά μέσο όρο 1.5-3.0 βλαστοί/έκφυτο) σχηματίστηκαν μόνο στα υποστρώματα με BA ή TDZ, ενώ το μήκος τους ήταν μεγαλύτερο στα υποστρώματα με BA, zeatin ή 2iP (Εικ. 33). Στα έκφυτα από το κορυφαίο τμήμα των ηλικίας 20 ημερών βλαστών, το ποσοστό έκπτυξης των οφθαλμών ήταν αξιοσημείωτα υψηλό στο υπόστρωμα με 1.0 mg I⁻¹ TDZ (Σχ. 9).



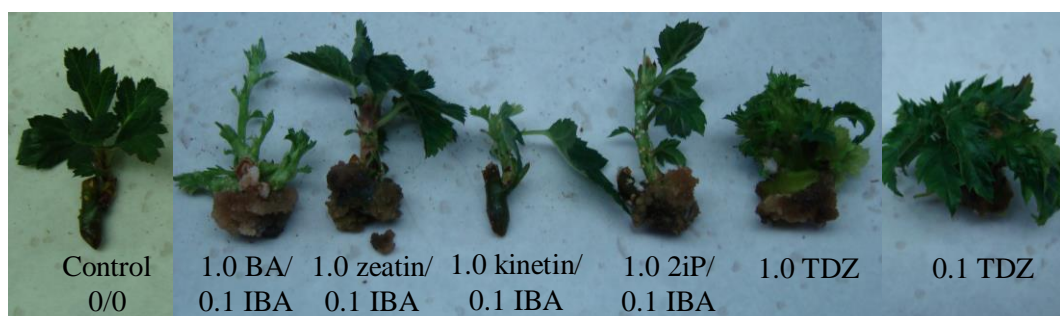
Σχήμα 9. Ποσοστό έκπτυξης των οφθαλμών που συλλέχθηκαν τον Ιούλιο 2010 από τις αναγραφόμενες θέσεις των μικροπολλαπλασιασμένων φυταρίων και καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις φυτορρυθμιστικών ουσιών (mg I⁻¹).

Όσον αφορά τα κοινά υποστρώματα συνολικά για όλους τους τύπους εκφύτων, το TDZ έδωσε το υψηλότερο ποσοστό έκπτυξης των οφθαλμών (Πιν. 11). Ο αριθμός των βλαστών ανά έκφυτο ήταν υψηλότερος στα υποστρώματα με TDZ ή BA από ότι στα υποστρώματα με zeatin ή χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες (μάρτυρας), ενώ πιο μακριοί βλαστοί σχηματίστηκαν στα υποστρώματα με BA ή zeatin συγκριτικά με αυτό με TDZ ή το μάρτυρα (Πιν. 11, Εικ. 33).

Πίνακας 11. Ποσοστό έκπτυξης βλαστών, μέσος αριθμός και μέσο μήκος βλαστών ανά έκφυτο κατά την αρχική καλλιέργεια συνολικά όλων των εκφύτων από μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια σε υπόστρωμα MS με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις φυτορρυθμιστικών ουσιών (mg l^{-1}) ($n=31-39$).

Υποστρώματα αρχικής καλλιέργειας	Έκπτυξη βλαστών (%)	Αριθμός βλαστών	Μήκος βλαστών (cm)
Μάρτυρας 0/0	29	1.0 b	0.6 b
1.0 BA/ 0.1 IBA	29	3.1 a	1.2 a
1.0 zeatin/ 0.1 IBA	32	1.0 b	1.3 a
1.0 TDZ	54	3.5 a	0.6 b
Ανάλυση της διασποράς $F=$		10.2477**	7.2874**

** : σημαντικά σε επίπεδο $P=0.01$



Εικόνα 33. Χαρακτηριστική αντίδραση των εκφύτων από το μεσαίο τμήμα μικροπολλαπλασιασμένων φυταρίων ηλικίας 5 ή 8 μηνών κατά την εγκατάσταση *in vitro* σε υπόστρωμα MS με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις (mg l^{-1}) φυτορρυθμιστικών ουσιών.

Τα έκφυτα από το μεσαίο τμήμα των φυταρίων, που καλλιεργήθηκαν σε διάφορες συγκεντρώσεις BA (κεφάλαιο 4.2.3.), επέδειξαν υψηλότερο ποσοστό έκπτυξης των οφθαλμών στις υψηλότερες συγκεντρώσεις BA (1.0 ή 2.0 mg l^{-1}) συγκριτικά με τα 0.5 mg l^{-1} BA, καθώς και όταν τα υποστρώματα εγκατάστασης περιείχαν IBA (Πιν. 12, Εικ. 34α). Περισσότεροι βλαστοί ανά έκφυτο εκπτύχθηκαν στις υψηλότερες συγκεντρώσεις BA, ενώ η προσθήκη IBA στο υπόστρωμα οδήγησε στην παραγωγή πιο μακριών βλαστών (Πιν. 12, Εικ. 34α).

Πίνακας 12. Ποσοστό έκπτυξης βλαστών, μέσος αριθμός βλαστών και μέσο μήκος βλαστών ανά έκφυτο κατά την αρχική καλλιέργεια εκφύτων από το μεσαίο τμήμα μικροπολλαπλασιασμένων φυταρίων σε υποστρώματα MS με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις (mg l^{-1}) BA με ή χωρίς IBA ($n=9$).

Υπόστρωμα αρχικής καλλιέργειας	Έκπτυξη βλαστών (%)	Αριθμός βλαστών	Μήκος βλαστών (cm)
0.5 BA	13	1.0	0.4
1.0 BA	18	2.5	0.5
2.0 BA	31	3.3	0.7
0.5 BA/ 0.1 IBA	33	1.7	1.8
1.0 BA/ 0.1 IBA	38	2.5	1.0
2.0 BA/ 0.1 IBA	46	2.8	0.9

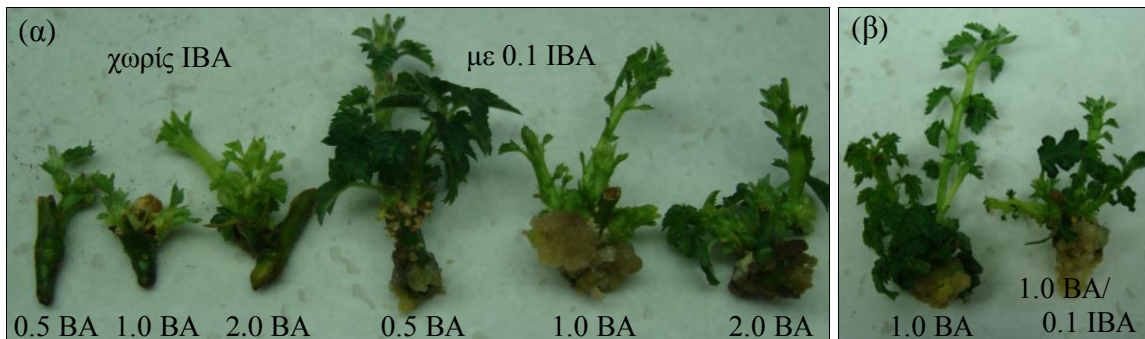
4.3.3.2. Επίδραση του IBA στην εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας από έκφυτα μικροπολλαπλασιασμένων φυταρίων

Ο τρόπος που επέδρασε το IBA στην εγκατάσταση εκφύτων από μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια εξαρτήθηκε από την προέλευσή τους. Έτσι, έκφυτα που ελήφθησαν από τη μέση των 5 ή 8 μηνών φυταρίων παρουσίασαν υψηλότερο ποσοστό έκπτυξης των οφθαλμών στο υπόστρωμα με IBA, σε αντίθεση με τα έκφυτα από την κορυφή των 20 ημερών (ενεργά αναπτυσσόμενων) βλαστών, οι οποίοι έδωσαν υψηλότερο ποσοστό έκπτυξης των οφθαλμών στο υπόστρωμα χωρίς IBA (Πιν. 13). Δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ως προς τον αριθμό και το μήκος των βλαστών, αν και λίγο περισσότεροι βλαστοί φάνηκε να σχηματίζονται από τα μεσαία έκφυτα στο υπόστρωμα χωρίς IBA και από τα κορυφαία έκφυτα στο υπόστρωμα με IBA, ενώ το αντίθετο παρατηρήθηκε με το μήκος των βλαστών (Πιν. 13, Εικ. 34).

Πίνακας 13. Ποσοστό έκπτυξης βλαστών (%), μέσος αριθμός βλαστών και μέσο μήκος βλαστών (cm) ανά έκφυτο κατά την αρχική καλλιέργεια εκφύτων από μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια σε υποστρώματα MS με 1.0 ή 2.0 mg I⁻¹ BA (σύμπτυξη αποτελεσμάτων) με ή χωρίς 0.1 mg I⁻¹ IBA (n=9-20).

Έκφυτα από:	Υποστρ. αρχικής καλλιέργειας	Έκπτυξη βλαστών (%)	Αριθμός βλαστών	Μήκος βλαστών (cm)
μεσαίο τμήμα 5 ή 8 μηνών φυταρίων	χωρίς IBA	44	3.8 a	0.7 a
	με 0.1 mg I ⁻¹ IBA	67	2.5 a	1.2 a
κορυφαίο τμήμα 20 ημερών βλαστών	χωρίς IBA	50	2.8 a	1.8 a
	με 0.1 mg I ⁻¹ IBA	30	3.5 a	1.4 a
Ανάλυση της διασποράς F=			0.5461 ^{NS}	1.9144 ^{NS}

NS: μη σημαντικά σε επίπεδο P=0.05



Εικόνα 34. Χαρακτηριστική αντίδραση των εκφύτων από το μεσαίο τμήμα μικροπολλαπλασιασμένων φυταρίων ηλικίας 5 ή 8 μηνών (α) και από το κορυφαίο τμήμα βλαστών 20 ημερών (β), κατά την εγκατάσταση *in vitro* σε υπόστρωμα MS με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις BA, με ή χωρίς 0.1 IBA (mg I⁻¹).

4.3.4. Εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας από σπορόφυτα

Με τη συμπλήρωση των τριών μηνών της στρωμάτωσης, οι περισσότεροι σπόροι άρχισαν να φυτρώνουν (εμφάνιση ριζιδίου) στους 4 °C. Οι μη μολυσμένοι σπόροι (το 57% των σπόρων) μεταφέρθηκαν σε φρέσκο υπόστρωμα στους 25 °C και φύτρωσαν σε ποσοστό 75%. Τα έκφυτα από τα σπορόφυτα εγκαταστάθηκαν *in vitro* σε υψηλό ποσοστό (83%), δίνοντας κατά μέσο όρο 5.2 βλαστούς/ έκφυτο, μέσου μήκους 0.7 cm.

4.3.5. Συσχέτιση περιεκτικότητας σε ολικά φαινολικά εκφύτων από διάφορες θέσεις και φυτά με το καφέτιασμα και την αντίδρασή τους κατά την εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας

Τα επάκρια και κορυφαία έκφυτα των αναβλαστήσεων απελευθέρωσαν φαινολικά σε υψηλότερο ποσοστό και σε μεγαλύτερη ποσότητα από τα κατώτερα έκφυτα, ενώ το αντίθετο παρατηρήθηκε με το ποσοστό έκπτυξης των οφθαλμών, που ήταν υψηλότερο στα έκφυτα του μεσαίου και βασικού τμήματος των αναβλαστήσεων. Τα επάκρια έκφυτα βρέθηκαν να περιέχουν σημαντικά περισσότερα φαινολικά από αυτά της μέσης και της βάσης των αναβλαστήσεων, το οποίο συντέλεσε και στο εντονότερο καφέτιασμά τους (Πιν. 14).

Κατά την εγκατάσταση *in vitro* εκφύτων από αναβλαστήσεις το διάστημα από Απρίλιο μέχρι Ιούλιο, παρατηρήθηκε μείωση του περιεχόμενου των εκφύτων σε ολικά φαινολικά ακολουθούμενη από μείωση του ποσοστού έκχυσης φαινολικών από τα έκφυτα. Αντίθετα, το ποσοστό έκπτυξης των οφθαλμών παρουσίασε αύξηση καθώς ο περιοριστικός παράγοντας του καφετιάσματος μειωνόταν (Πιν. 15).

Πίνακας 14. Ποσοστό έκχυσης φαινολικών, περιεχόμενο εκφύτων σε ολικά φαινολικά και ποσοστό έκπτυξης βλαστών κατά την αρχική καλλιέργεια εκφύτων από τις αναγραφόμενες θέσεις πάνω στις αναβλαστήσεις στο βασικό υπόστρωμα (MS με 1.0 mg Γ⁻¹ BA και 0.1 mg Γ⁻¹ IBA).

Θέση εκφύτων	Ποσοστό έκχυσης φαινολικών (%)	Ολικά φαινολικά (mg ισοδυν. γαλλικού οξέος/ g ξηράς ουσίας)	Ποσοστό έκπτυξης βλαστών (%)
Επάκρια	59 (πολλά)	111.0 a	20
Κορυφαία	39 (αρκετά)	87.4 ab	14
Μεσαία	30 (μέτρια)	79.0 b	25
Βασική	20 (λίγα)	61.8 b	38
Ανάλυση της διασποράς $F=$		9.3358**	
Αριθμός επαναλήψεων $n=135-330$		$n=12-16$	$n=63-192$

** : σημαντικό σε επίπεδο $P=0.01$

Πίνακας 15. Ποσοστό έκχυσης φαινολικών, περιεχόμενο εκφύτων σε ολικά φαινολικά και ποσοστό έκπτυξης βλαστών κατά την αρχική καλλιέργεια εκφύτων που συλλέχθηκαν από τις αναβλαστήσεις τους αναγραφόμενους μήνες στο βασικό υπόστρωμα (MS με 1.0 mg l⁻¹ BA και 0.1 mg l⁻¹ IBA).

Εποχή εγκατάστασης <i>in vitro</i> καλλιέργειας	Ποσοστό έκχυσης φαινολικών (%)	Ολικά φαινολικά (mg ισοδυν. γαλλικού οξέος/ g ξηράς ουσίας)	Ποσοστό έκπτυξης βλαστών (%)
Απρίλιος	51	114.5 a	5
Μάιος	41	96.8 ab	18
Ιούνιος	32	86.7 b	24
Ιούλιος	25	-	33
Νοέμβριος	-	47.9 c	-
Ανάλυση της διασποράς <i>F</i> =		25.3060**	
Αριθμός επαναλήψεων	<i>n</i> =108-379	<i>n</i> =12-16	<i>n</i> =50-116

** : σημαντικό σε επίπεδο *P*=0.01

Τα έκφυτα από μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια συλλέχθηκαν από βλαστούς διαφορετικής φυσιολογικής κατάστασης και ως εκ τούτου διέφεραν σημαντικά ως προς το περιεχόμενό τους σε φαινολικά συστατικά και την αντίδρασή τους *in vitro*. Έτσι, τα επάκρια έκφυτα από τους 20 ημερών βλαστούς περιείχαν περισσότερα φαινολικά, απελευθέρωσαν φαινολικά σε υψηλότερο ποσοστό και εκπύχθηκαν σε χαμηλότερο ποσοστό από τα κορυφαία έκφυτα των ίδιων βλαστών και τα μεσαία έκφυτα των 5 ή 8 μηνών φυταρίων (Πιν. 16).

Εκτιμώντας συνολικά την αντίδραση των εκφύτων από όλες τις θέσεις και τα φυτά, τα έκφυτα από ενήλικα φυτά απελευθέρωσαν φαινολικά στο υπόστρωμα σε μεγαλύτερο ποσοστό (52%) από ότι νεανικά έκφυτα από αναβλαστήσεις (33%) ή μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια (17%), ενώ το ποσοστό έκχυσης φαινολικών των επάκριων εκφύτων ήταν γενικά υψηλότερο (57%) από αυτό εκφύτων από χαμηλότερες θέσεις (34%). Το περιεχόμενο των επάκριων εκφύτων σε ολικά φαινολικά επίσης βρέθηκε υψηλότερο από αυτό εκφύτων από χαμηλότερες θέσεις (Σχ. 10α), ενώ τα έκφυτα από μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια περιείχαν λιγότερα φαινολικά συστατικά

συγκρινόμενα με έκφυτα από ενήλικα φυτά ή αναβλαστήσεις (Σχ. 10β). Τα έκφυτα από ενήλικα φυτά αποτύγχαναν να εκπτυχθούν ή εκπτύσσονταν σε ποσοστό γύρω στο 15%, δυσκολότερα από τα έκφυτα των αναβλαστήσεων και των μικροπολλαπλασιασμένων φυταρίων (23% και 31%, αντίστοιχα).

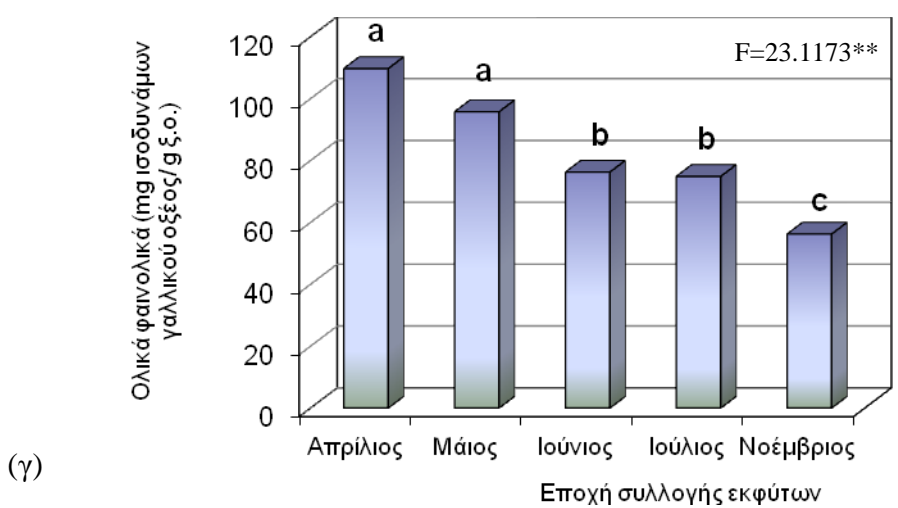
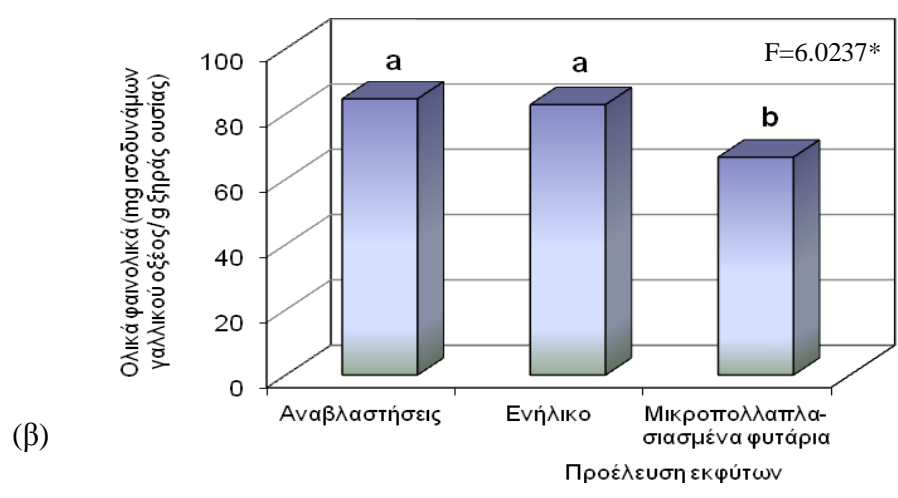
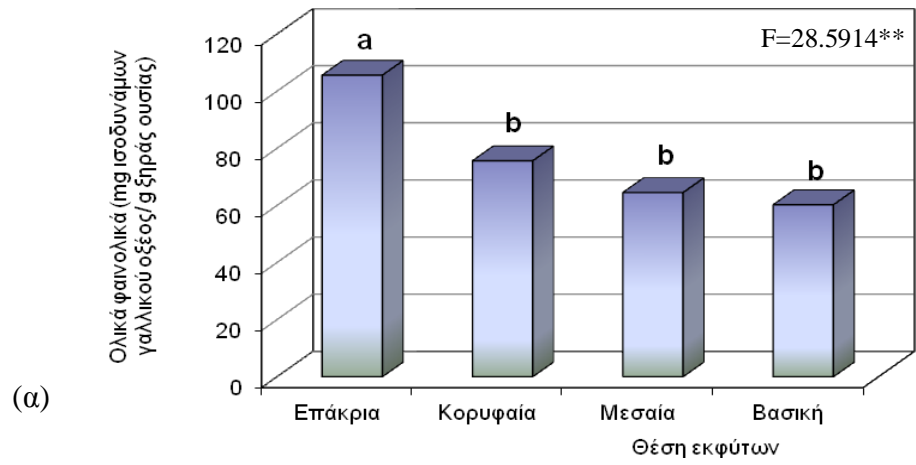
Πίνακας 16. Ποσοστό έκχυσης φαινολικών, περιεχόμενο εκφύτων σε ολικά φαινολικά και ποσοστό έκπτυξης βλαστών κατά την αρχική καλλιέργεια των αναγραφόμενων εκφύτων από μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια στο βασικό υπόστρωμα (MS με 1.0 mg l⁻¹ BA και 0.1 mg l⁻¹ IBA).

Έκφυτα από:		Ποσοστό έκχυσης φαινολικών (%)	Ολικά φαινολικά (mg ισοδυν. γαλλικού οξέος/ g ξηράς ουσίας)	Ποσοστό έκπτυξης βλαστών (%)
βλαστοί 20 ημερών	Επάκρια	40 (πολλά)	143.1 a	15
	Κορυφαία	7 (ελάχιστα)	100.0 b	30
φυτάρια 5 ή 8 μηνών	Μεσαία	0	41.2 c	60
Ανάλυση της διασποράς F=			1105.729**	
Αριθμός επαναλήψεων		n=19-77	n=4-8	n=5-20

**· σημαντικά σε επίπεδο P=0.01

Ο χρόνος συλλογής των εκφύτων επηρέασε την περιεκτικότητά τους σε ολικά φαινολικά αφού έκφυτα που συλλέχθηκαν τον Απρίλιο και Μάιο περιείχαν περισσότερα φαινολικά από αυτά που συλλέχθηκαν τον Ιούνιο και Ιούλιο, ενώ τα έκφυτα που συλλέχθηκαν το Νοέμβριο περιείχαν τα λιγότερα φαινολικά (Σχ. 10γ), επιβεβαιώνοντας προηγούμενες παρατηρήσεις επί εποχιακών μεταβολών του καφετιάσματος των εκφύτων από ενήλικα φυτά (κεφάλαιο 4.3.1.1.).

Από τα παραπάνω φάνηκε πως το υψηλότερο περιεχόμενο των εκφύτων σε φαινολικά συστατικά σχετιζόταν με εντονότερο καφέτιασμα και χαμηλότερα ποσοστά έκπτυξης των οφθαλμών.



Σχήμα 10. Περιεκτικότητα σε ολικά φαινολικά εκφύτων του *xM. florentina* όπως αυτή προσδιορίζεται από τη θέση των εκφύτων πάνω στο βλαστό (α), από την προέλευση των εκφύτων (β) και από την εποχή συλλογής των εκφύτων (γ).
 (n=20-60, και *, **: σημαντικό σε επίπεδο $P=0.05$ και $P=0.01$, αντίστοιχα)

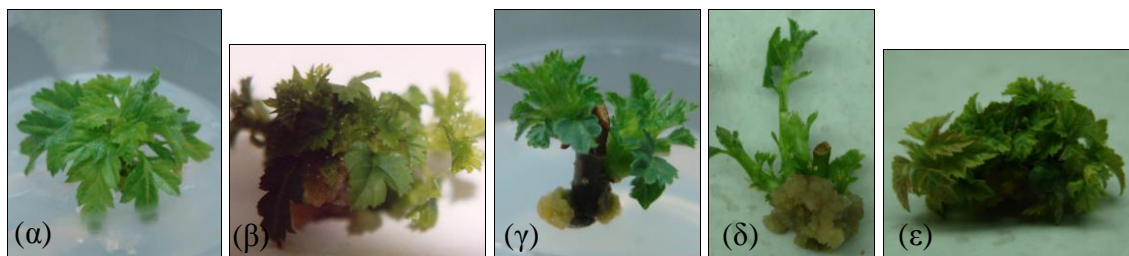
4.3.6. Επίδραση της νεανικής ή ενήλικης προέλευσης εκφύτου στην εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας

Το ποσοστό έκπτυξης των οφθαλμών ήταν χαμηλό είτε τα έκφυτα προέρχονταν από ενήλικο φυτό είτε από αναβλαστήσεις ή μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια, ενώ τα έκφυτα που ελήφθησαν από σπορόφυτα που φύτευαν *in vitro* έδωσαν βλαστούς σε υψηλό ποσοστό. Ένα ακόμη πλεονέκτημα των εκφύτων από τα σπορόφυτα ήταν πως δεν εκδήλωσαν το πρόβλημα του καφετιάσματος ούτε απελευθέρωσαν φαινολικά στο υπόστρωμα, όπως συνέβη ιδιαίτερα με τα έκφυτα από ενήλικα αλλά και με αυτά από τα νεανικά φυτά. Επιπλέον, τα αρχικά έκφυτα από τα σπορόφυτα έδωσαν περισσότερους βλαστούς ανά έκφυτο από ότι έκφυτα από ενήλικα φυτά ή αναβλαστήσεις. Όσον αφορά το μήκος βλαστού, τα έκφυτα από τα μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια έδωσαν τους πιο μακριούς βλαστούς (Πιν. 17, Εικ. 35).

Πίνακας 17. Συγκριτική αντίδραση ενήλικων και νεανικών εκφύτων από τις αναγραφόμενες προελεύσεις κατά την εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας στο βασικό υπόστρωμα (MS με 1.0 mg l⁻¹ BA και 0.1 mg l⁻¹ IBA).

Αρχική καλλιέργεια					
Προέλευση εκφύτου	Ποσοστό έκχυσης φαινολικών (%)	Ποσοστό έκπτυξης βλαστών (%)	Αριθμός βλαστών	Μήκος βλαστών (cm)	Αριθμός επαναλ.
Ενήλικο φυτό- Μάρτιος '04 (Υψηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού)	-	33	1.5 abc	0.4 ab	n=6
Ενήλικα φυτά (Χαμηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού)	52	14	1.3 c	0.5 b	n=175
Αναβλαστήσεις των καμένων φυτών	33	36	2.0 bc	0.6 b	n=244
Μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια	17	29	3.1 ab	1.2 a	n=38
Σπορόφυτα	0	83	5.2 a	0.7 ab	n=6
Ανάλυση της διασποράς F=			6.2646**	5.5666**	

**· σημαντικά σε επίπεδο P=0.01



Εικόνα 35. Χαρακτηριστική αντίδραση στην αρχική καλλιέργεια στο βασικό υπόστρωμα (MS με 1.0 mg l^{-1} BA και 0.1 mg l^{-1} IBA) εκφύτων κορυφής βλαστού από ενήλικα φυτά με χαμηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού (α) και από ενήλικο φυτό με υψηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού (β), κομβικών εκφύτων από αναβλαστήσεις (γ), κομβικών εκφύτων από μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια (δ) και εκφύτων από σπορόφυτα αναπτυσσόμενα *in vitro* (ε).

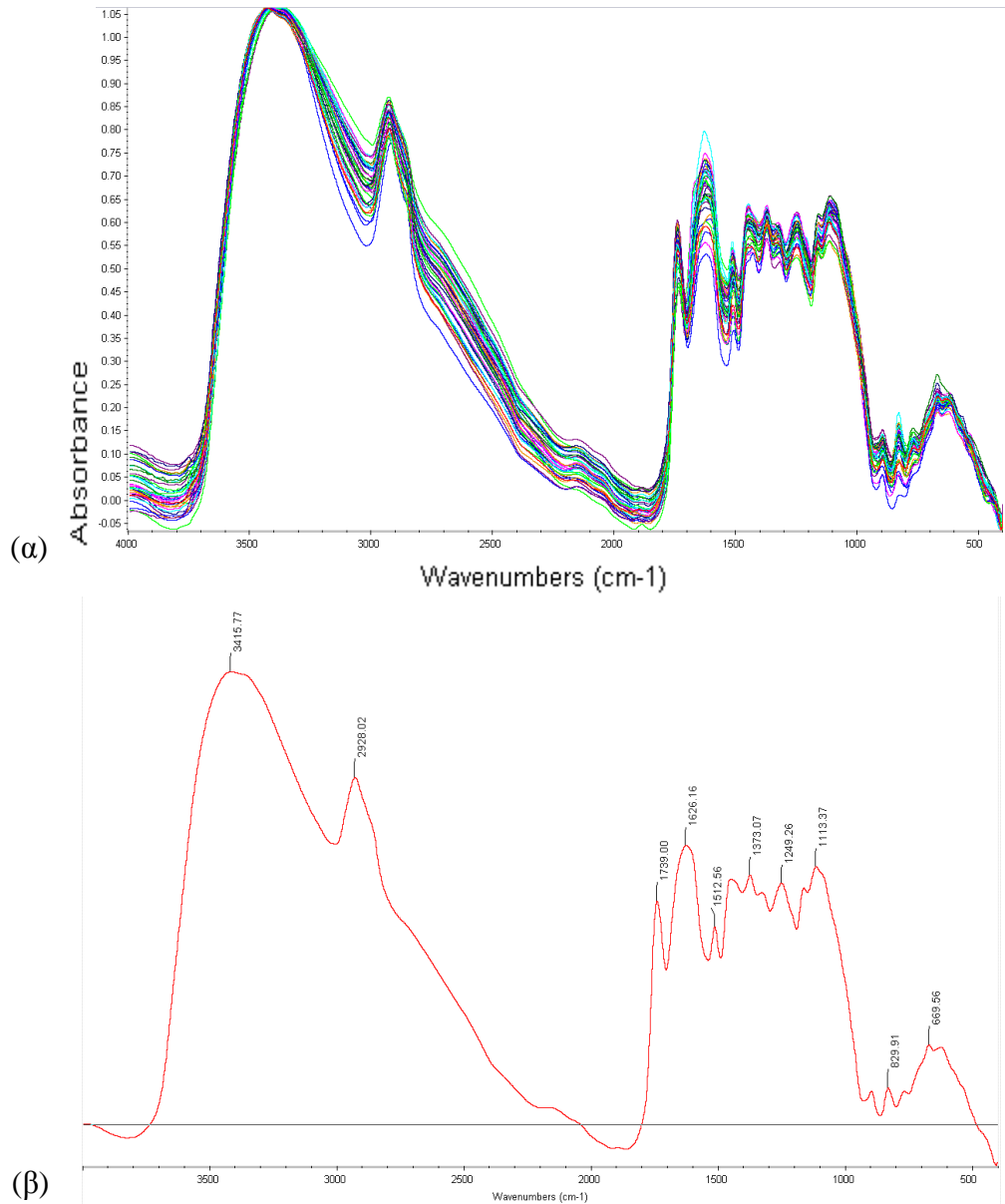
4.3.7. Μελέτη του φασματοσκοπικού προφίλ και προσδιορισμός της περιεκτικότητας σε λιγνίνη με τη μέθοδο FT-IR εκφύτων από διάφορες θέσεις και φυτά που χρησιμοποιήθηκαν για την εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας

Ελήφθησαν τα φάσματα IR όλων των δειγμάτων εκφύτων (Σχ. 11α) και υπολογίστηκε το μέσο φάσμα αυτών (Σχ. 11β). Από τις κορυφές του μέσου φάσματος, αυτή που είναι στα $1.626,16 \text{ cm}^{-1}$ αντιστοιχεί στις φαινολικές ενώσεις και αυτή που είναι στα $1.512,56 \text{ cm}^{-1}$ αντιστοιχεί στη λιγνίνη (Σχ. 11β). Από το Σχήμα 12α φαίνεται ότι τα επιμέρους φάσματα των εκφύτων διέφεραν μεταξύ τους σε αυτές τις κορυφές του φάσματος.

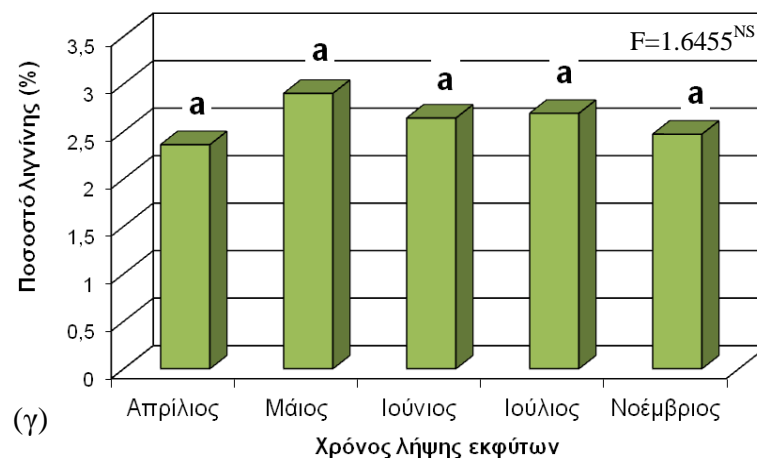
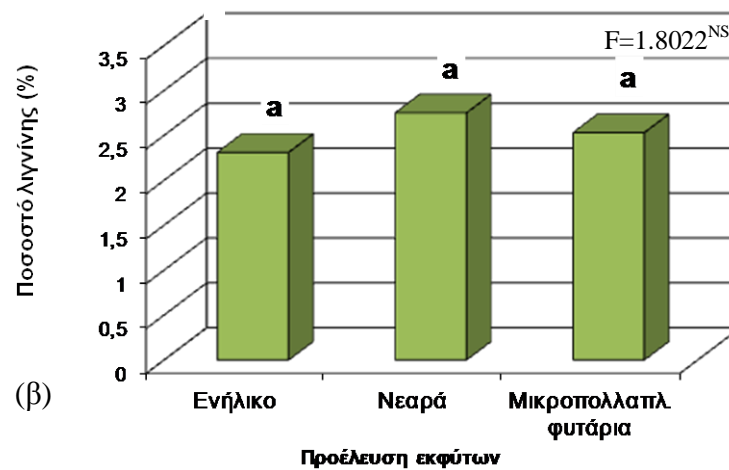
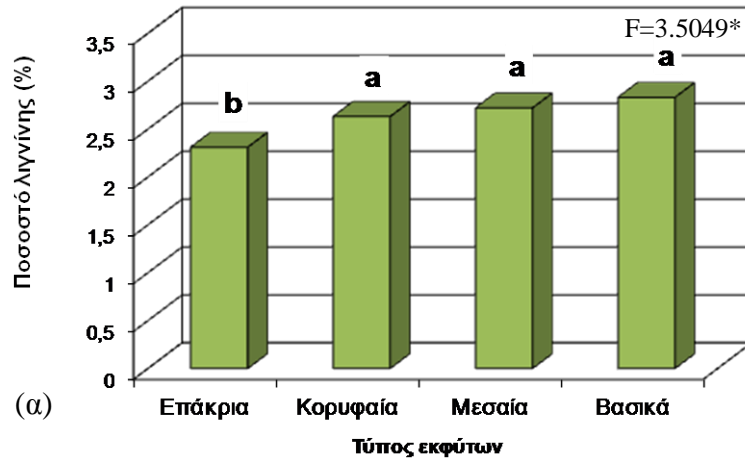
Μετά από μέτρηση του εμβαδού της κορυφής λιγνίνης στα φάσματα IR των εκφύτων και κατασκευή πρότυπης καμπύλης αναφοράς, υπολογίστηκε η περιεκτικότητά των εκφύτων σε λιγνίνη, όπως περιγράφεται στην ενότητα 2.8. Τα επάκρια έκφυτα βρέθηκαν να περιέχουν λιγότερη λιγνίνη από τα κατώτερα έκφυτα (Σχ. 12α), ενώ η προέλευση των εκφύτων και ο χρόνος λήψης των εκφύτων δεν επέδρασε σημαντικά στην περιεκτικότητά τους σε λιγνίνη (Σχ. 12β και Σχ. 12γ, αντίστοιχα).

Επεξεργασία των IR φασμάτων των εκφύτων με το πρόγραμμα TQ analyst, κάνοντας διακριτική ανάλυση (discriminant analysis) στην περιοχή $1450-1700 \text{ cm}^{-1}$, η οποία περιλαμβάνει τις κορυφές των φαινολικών και της λιγνίνης και στην οποία τα φάσματα φάνηκαν να διαφέρουν στο σχήμα 11α, έδειξε ότι:

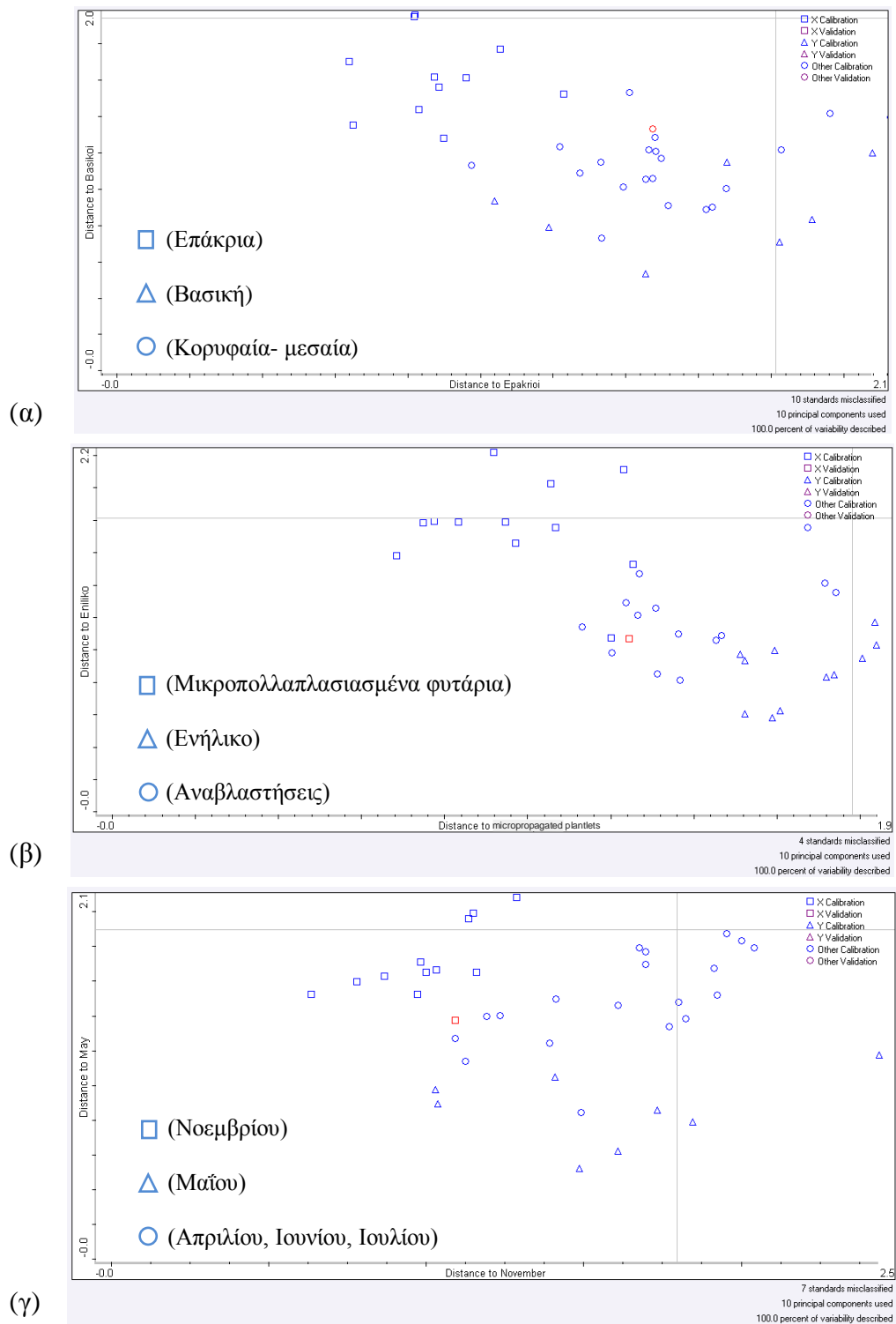
- 1) τα επάκρια έκφυτα απείχαν από τα βασικά και ανάμεσά τους βρίσκονταν τα κορυφαία και μεσαία έκφυτα (Σχ. 13α),
- 2) τα έκφυτα από μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια απείχαν από αυτά που προέρχονται από ενήλικο φυτό και ενδιάμεσα ήταν τα έκφυτα από αναβλαστήσεις (Σχ. 13β), και
- 3) τα έκφυτα που συλλέχθηκαν το Νοέμβριο απείχαν από αυτά που συλλέχθηκαν Μάιο ή άλλους μήνες κατά τη διάρκεια της άνοιξης και του καλοκαιριού (Σχ. 13γ).



Σχήμα 11. Φάσματα FT-IR όλων των δειγμάτων εκφύτων του *xM. florentina*, που ελήφθησαν με τη μέθοδο Drift (α) και κορυφές μέσου φάσματος (β).



Σχήμα 12. Περιεκτικότητα (%) σε λινίνη εκφύτων του *xM. florentina*, που προσδιορίστηκε με FT-IR φασματοσκοπία, αναφορικά με τη θέση των εκφύτων πάνω στο βλαστό (α), την προέλευση των εκφύτων (β) και την εποχή συλλογής των εκφύτων (γ). (n=6-16, *: σημαντικό και NS: μη σημαντικό σε επίπεδο $P=0.05$)



Σχήμα 13. Μελέτη FT-IR φασμάτων εκφύτων του *M. florentina* κάνοντας διακριτική ανάλυση (discriminant analysis) με το λογιστικό πρόγραμμα TQ analyst στην περιοχή από 1450 έως 1700 cm^{-1} , ανάλογα με τη θέση των εκφύτων (α), την προέλευση των εκφύτων (β) και την εποχή συλλογής των εκφύτων (γ).

4.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Κατά το στάδιο της εγκατάστασης *in vitro* καλλιέργειας του *xM. florentina* επιδιώχθηκε η έναρξη καλλιέργειας από έκφυτα ενήλικης και νεανικής προέλευσης, η εύρεση αποτελεσματικής μεθόδου απολύμανσης, ο έλεγχος του καφετιάσματος και της νέκρωσης των εκφύτων και η εύρεση κατάλληλου για την εγκατάσταση υποστρώματος.

Η εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας επιτεύχθηκε από όλες τις πηγές εκφύτων που χρησιμοποιήθηκαν (ενήλικα φυτά, αναβλαστήσεις καμένων φυτών, μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια και σπορόφυτα φυτρωμένα *in vitro*). Η έναρξη καλλιέργειών από έκφυτα ενήλικου φυτού ήταν δύσκολη, κάτι που έχει αναφερθεί και για τη μηλιά (Kataeva and Butenko, 1987; Webster and Jones, 1989), εξαιτίας του υψηλού ποσοστού μολύνσεων και του καφετιάσματος και νέκρωσης των εκφύτων. Έκφυτα που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια των χειμερινών μηνών μολύνθηκαν σε υψηλό ποσοστό παρόλο που τα εξωτερικά λέπια και ο φλοιός είχαν απομακρυνθεί, τεχνική που έχει εφαρμοστεί και σε κοιμώμενους οφθαλμούς *Malus* (Abdul Kader *et al.*, 1991; Lane, 1992) και *Sorbus* (Chalupa, 1992), ενώ από τον Απρίλιο μέχρι τον Αύγουστο, οι μολύνσεις των εκφύτων ελέγχθηκαν καλύτερα. Έκφυτα μηλιάς και *Sorbus* sp. που συλλέχθηκαν άνοιξη ή καλοκαίρι επίσης βρέθηκαν να μολύνονται λιγότερο από αυτά που συλλέχθηκαν φθινόπωρο ή χειμώνα (Dobránszki and Teixeira da Silva, 2010) και (Chalupa, 1992), αντίστοιχα. Τα έκφυτα που προέρχονται από ενήλικα φυτά γενικότερα μπορεί να παρουσιάσουν δυσκολίες στην καλλιέργεια εξαιτίας περιορισμών στην ανάπτυξη, της δύστροπης φύσης τους, της υψηλής συχνότητας των μικροβιακών μολύνσεων, των συχνά υψηλών επιπέδων πολυφαινολικής έκχυσης, της υπερενυδάτωσης και του χαμηλού επιπέδου αντίδρασης (Bonga, 1981; Zimmerman, 1986). Η επιτυχής εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειών μηλιάς (Dobránszki and Teixeira da Silva, 2010) και χαρουπιάς *Ceratonia siliqua* (Romano *et al.*, 2002) επίσης εξαρτήθηκε από την αποτελεσματικότητα της απολύμανσης των εκφύτων και την παρεμπόδιση του φαινολικά-προωθούμενου καφετιάσματος των εκφύτων, ενώ στους Βασιλικούς Βοτανικούς Κήπους Kew η επιτυχής εισαγωγή σε καλλιέργεια ενός μεγάλου αριθμού απειλούμενων ειδών ανακόπηκε από την έκχυση τοξικών υλικών από τις επιφάνειες κοπής των εκφύτων (Sarasan *et al.*, 2006).

Όσον αφορά το πρόβλημα του καφετιάσματος, το επέτειναν η απολέπιση και το προχωρημένο στάδιο έκπτυξης των οφθαλμών του Μαρτίου, καθώς και η απολύμανση

σε δύο στάδια, που έχει χρησιμοποιηθεί σε κοιμώμενες κορυφές μηλιάς (Jones *et al.*, 1977; Laszloffy *et al.*, 1991), ενώ η χρήση μικρού μεγέθους εκφύτων, τα οποία παρουσιάζουν λιγότερα φαινολικά και μειωμένο καφέτιασμα (Lane, 1992; Dalal *et al.*, 1993; Kaushal *et al.*, 2005), και τα 4 συν 1 (πριν τη χρήση των εκφύτων) ξεπλύματα μείωσαν την έκχυση φαινολικών. Η προμεταχείριση με αντιοξειδωτικά και η μεταφορά σε φρέσκο υπόστρωμα, τα οποία έχουν χρησιμοποιηθεί επιτυχώς στην αποτροπή του καφετιάσματος των εκφύτων στο *Malus* sp. (Yepes and Aldwinckle, 1994; Modgil *et al.*, 1999; Dobránszki and Teixeira da Silva, 2010), στη *Lavandula stoechas* (Nobre, 1996), στο *Cleistanthus collinus* (Quraishi and Mishra, 1998), στη *Bauhinia valii* (Dhar and Upreti, 1999), στη *Strelitzia reginae* (Hosni, 2001) κ.α., έλεγξαν μερικώς το καφέτιασμα των εκφύτων και του υποστρώματος. Επιπλέον, θα μπορούσε να δοκιμαστεί η σκοτεινή μεταχείριση κατά τις πρώτες ημέρες καλλιέργειας σε συνδυασμό με χαμηλή θερμοκρασία (4 °C), που βρέθηκαν αποτελεσματικά στη μείωση του καφετιάσματος εκφύτων μηλιάς (Wang *et al.*, 1994; Dalal *et al.*, 2004; Dobránszki and Teixeira da Silva, 2010) και της *Bauhinia valii* (Dhar and Upreti, 1999), ακολουθούμενη από μεταφορά σε φρέσκο υπόστρωμα υπό κανονική θερμοκρασία και φωτισμό.

Για τον περιορισμό του προβλήματος του καφετιάσματος πιο αποτελεσματικά θεωρήθηκαν η επιλογή της εποχής, της προέλευσης και της θέσης των εκφύτων. Τα έκφυτα ήταν προτιμότερο να συλλέγονται από τον Ιούνιο μέχρι τον Αύγουστο και δευτερευόντως το Μάρτιο πριν την έκπτυξη της νέας βλάστησης από ότι την περίοδο ταχείας ανάπτυξης των βλαστών (Απρίλιο-Μάιο), καθώς και να χρησιμοποιούνται έκφυτα από νεανικά φυτά αντί από ενήλικα φυτά και μασχαλαιά έκφυτα αντί των επάκριων εξαιτίας του υψηλότερου ποσοστού φαινολικών που απελευθερώνουν τα δεύτερα. Έκφυτα που συλλέχθηκαν τον Απρίλιο ή το Μάιο καθώς και τα επάκρια έκφυτα και αυτά από τα αναπτυσσόμενα στο βουνό φυτά βρέθηκαν να περιέχουν υψηλότερες συγκεντρώσεις φαινολικών συστατικών από έκφυτα που συλλέχθηκαν Ιούνιο-Ιούλιο και Νοέμβριο, έκφυτα από μασχαλαιές θέσεις και αυτά που ελήφθησαν από τα μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια που αναπτύσσονταν στον κήπο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου, το οποίο συνδέθηκε με το έντονο καφέτιασμα των πρώτων. Τα έκφυτα από τα ενήλικα φυτά παρόλο που παρουσίασαν εντονότερο καφέτιασμα από τα έκφυτα από αναβλαστήσεις, δε διέφεραν σημαντικά ως προς το περιεχόμενό τους σε ολικά φαινολικά. Είναι πιθανό τα έκφυτα από ενήλικη και νεανική

προέλευση να διέφεραν στη σύσταση των φαινολικών συστατικών ή στη δραστηριότητα της πολυφαινολοξειδάσης και συνεπώς να παρουσίασαν διαφορετικό βαθμό οξειδωσης. Η ένταση του καφετιάσματος και η επιβίωση των εκφύτων μηλιάς επίσης επηρεάστηκαν από τη θέση και το μέγεθος των εκφύτων, τη φυσιολογική κατάσταση των μητρικών φυτών και την εποχή συλλογής των εκφύτων (Dobránszki and Teixeira da Silva, 2010). Έκφυτα κορυφής βλαστού της μηλιάς ‘Fuji’ και της αχλαδιάς ‘Jinhua’ έδωσαν χαμηλά ποσοστά καφετιάσματος, όταν συλλέχθηκαν από το Νοέμβριο μέχρι το Φεβρουάριο, ενώ τα ποσοστά καφετιάσματος αυξήθηκαν ταχέως καθώς τα φυτά μπήκαν στην εποχή ανάπτυξης, φθάνοντας ένα μέγιστο την περίοδο από τον Απρίλιο μέχρι τον Αύγουστο (Wang *et al.*, 1994). Στη μηλιά, το καφέτιασμα των οφθαλμών ήταν έντονο εάν είχαν συλλεχθεί όταν ο λήθαργος τελείωσε ή την άνοιξη όταν η ανάπτυξη των βλαστών ήταν πολύ εντατική (Dobránszki *et al.*, 2000), σε αντίθεση με αυτούς που συλλέχθηκαν την άνοιξη ή το καλοκαίρι (Modgil *et al.*, 1999). Έκφυτα κορυφής βλαστού του μάνγκο (*Magnifera indica*) είχαν καλύτερη ανταπόκριση στην *in vitro* εγκατάσταση, ελάχιστη μικροβιακή μόλυνση και καλύτερη επιβίωση, όταν συλλέχθηκαν κατά τον Ιούνιο μέχρι Αύγουστο χάρη στα λιγότερα φαινολικά (Thomas and Ravindra, 1997), καθώς και έκφυτα από ενήλικα φυτά της *Bauhinia valii* έδειξαν μέγιστο καφέτιασμα όταν συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της εποχής ανάπτυξης (Απρίλιο-Ιούνιο), ενώ κατά την κοιμώμενη φάση το καφέτιασμα ήταν ελάχιστο (Dhar and Upreti, 1999). Έκφυτα από πλάγιες κορυφές βλαστών του *Vitis vinifera* είχαν υψηλότερο ποσοστό επιβίωσης από αυτά από ακραίες θέσεις και μια ισχυρή αρνητική συσχέτιση βρέθηκε μεταξύ της επιβίωσης *in vitro* και του προϋπάρχοντος φαινολικού περιεχομένου των εκφύτων (Yu and Meredith, 1986). Έκφυτα κορυφής βλαστού από δένδρα ελιάς ‘Κορωνέικη’ επέδειξαν υψηλότερα ποσοστά καφετιάσματος μαζί με υψηλότερο περιεχόμενο σε ολικά φαινολικά και ο-διφαινόλες και υψηλότερη δραστηριότητα πολυφαινολοξειδάσης συγκριτικά με τα μονοκομβικά έκφυτα, ενώ έκφυτα προερχόμενα από αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο δένδρα παρουσίασαν υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης και χαμηλότερες τιμές των τριών παραγόντων που αναφέρονται παραπάνω από ότι τα αντίστοιχα έκφυτα από δένδρα αναπτυσσόμενα στον αγρό. Η εποχή συλλογής των εκφύτων δεν επηρέασε σημαντικά τα ποσοστά καφετιάσματος τους, ενώ είχε σημαντική επίδραση στη δραστηριότητα των οξειδωτικών ενζύμων (Roussos and Pontikis, 2001a; 2001b).

Ξεχωριστά φαινολικά συστατικά επέδειξαν διάφορους συντελεστές συσχέτισης με το ποσοστό καφετιάσματος (Roussos and Pontikis, 2001b).

Ο έλεγχος της χημικής σύστασης των εκφύτων με τη λήψη φασμάτων IR από τα λυοφιλωμένα δείγματά τους έδειξε διαφορές στις κορυφές του φάσματος που αντιστοιχούν στις φαινολικές ενώσεις (στα $1626.16 \pm 4 \text{ cm}^{-1}$) και στη λιγνίνη (στα $1512.56 \pm 4 \text{ cm}^{-1}$). Η περιεκτικότητα των εκφύτων σε λιγνίνη υπολογίστηκε με επιτυχία, όπως έχει γίνει με άλλα ξυλώδη είδη (Owen and Thomas, 1989; Marque *et al.*, 1994; Rodrigues *et al.*, 1998; Pappas *et al.*, 1998; Pandey, 1999), μετά από εμβαδομέτρηση της κορυφής λιγνίνης, και η θέση των εκφύτων βρέθηκε να επιδρά σημαντικά με τα επάκρια έκφυτα να περιέχουν λιγότερη λιγνίνη από τα κατώτερα έκφυτα, ενώ η προέλευση και ο χρόνος λήψης των εκφύτων όχι. Η ελλιπής λιγνιτοποίηση των επάκριων εκφύτων είναι πιθανό να τα κάνει πιο ευαίσθητα στην απολύμανση με χλωρίνη και να ευθύνεται σε ένα μικρό βαθμό και αυτή για το εντονότερο καφέτιασμα τους σε σχέση με τα κατώτερα έκφυτα. Διακριτική ανάλυση (discriminant analysis) των φασμάτων IR με το πρόγραμμα TQ analyst στην περιοχή από 1450 έως 1700 cm^{-1} , η οποία περιλαμβάνει τις κορυφές των φαινολικών συστατικών και της λιγνίνης, πέτυχε την ομαδοποίηση των φασμάτων ανά κατηγορία εκφύτου που διακρίθηκε ως προς τη θέση, την προέλευση και την εποχή συλλογής των εκφύτων και έδειξε ότι τα επάκρια έκφυτα απείχαν από τα βασικά, τα έκφυτα από μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια απείχαν από τα έκφυτα που ελήφθησαν από ενήλικα φυτά και αυτά που συλλέχθηκαν το Νοέμβριο απείχαν από αυτά που συλλέχθηκαν Μάιο, ενώ ανάμεσά τους βρίσκονταν τα έκφυτα από τις υπόλοιπες κατηγορίες. Οι διαφορές αυτές αποδόθηκαν κυρίως στην περιεκτικότητα των εκφύτων σε φαινολικά συστατικά και επιβεβαιώθηκαν μετά τον υπολογισμό των ολικών φαινολικών με τη μέθοδο Folin-Ciocalteu. Σε εκχυλίσματα διαφόρων αρωματικών φυτών της ελληνικής χλωρίδας (Κανέλλου, 2011) και σε εκχυλίσματα από κέλυφος κάστανου και φλοιό ευκαλύπτου (Vásquez *et al.*, 2008) έχει επιτευχθεί και ποσοτικός προσδιορισμός των ολικών φαινολικών συστατικών με τη χρήση της FT-IR φασματοσκοπίας. Επομένως, η φασματοσκοπία FT-IR, η οποία είναι απλή, γρήγορη και δεν καταστρέφει το δείγμα (Ταραντίλης και Πολυσίου, 2008), θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί για μια πρώτη εκτίμηση της χημικής κατάστασης των εκφύτων με στόχο τον εντοπισμό των κορυφών του φάσματος όπου παρουσιάζονται διαφορές μεταξύ των δειγμάτων και στη συνέχεια αναλυτικές χημικές μέθοδοι θα μπορούσαν να εφαρμοσθούν για την ποσοτική

μέτρηση του παράγοντα που ενδιαφέρει. Επίσης, τα φάσματα IR θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για τη δημιουργία μιας βάσης δεδομένων, ώστε κάθε νέο δείγμα εκφύτου που λαμβάνεται να μπορεί να συσχετισθεί με κάποια από τις γνωστές κατηγορίες εκφύτων.

Εγκατάσταση καλλιέργειας από ενήλικα φυτά επιτεύχθηκε σε χαμηλά ποσοστά στο βασικό υπόστρωμα (MS με 1.0 mg l⁻¹ BA και 0.1 mg l⁻¹ IBA), κυρίως τους μήνες Μάρτιο (πριν την έκπτυξη της νέας βλάστησης) και Αύγουστο. Κορυφές βλαστού μηλιάς που συλλέχθηκαν διάφορες χρονικές στιγμές κατά τη βλαστητική ανάπτυξη επίσης βρέθηκαν να διαφέρουν σημαντικά, ως προς την ικανότητά τους να ξεκινήσουν *in vitro* καλλιέργειες, με αυτές που συλλέχθηκαν πριν ή μετά την περίοδο ταχείας επιμήκυνσης των βλαστών να είναι πιο ικανές από αυτές που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια ή στο τέλος αυτής της περιόδου (Brand, 1993). Κατά τον SongLin *et al.* (1996), ο ιδανικός χρόνος απομάκρυνσης των κορυφών ήταν ο Ιούνιος και η περίοδος του χειμερινού λήθαργου, ενώ κατά τον Lane (1992), τα έκφυτα που απομονώνονται από φουσκωμένους οφθαλμούς είναι πιο αξιόπιστα από αυτά που λαμβάνονται από βλαστούς στην αρχή του λήθαργου ή από ενεργά αναπτυσσόμενους βλαστούς.

Από τους τύπους εκφύτων που διακρίθηκαν το Μάρτιο 2010, τα έκφυτα με επάκριο οφθαλμό από κανονική βλάστηση και αυτά από τις λογχοειδείς βλαστήσεις με ένα μεγάλο οφθαλμό ή με τον ανώτερο από τους δύο οφθαλμούς θεωρήθηκαν καταλληλότερα για εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας, επειδή αυτοί οι οφθαλμοί επάνω στο φυτό συνήθως εξελίσσονταν σε κανονική βλάστηση, σε αντίθεση με αυτά από τα λογχοειδή με έναν μικρό οφθαλμό ή με τον κατώτερο οφθαλμό για τα λογχοειδή με δύο οφθαλμούς, τα οποία σχεδόν πάντα έδιναν ξανά λογχοειδή βλάστηση. Τα αποτελέσματα αυτά ελήφθησαν χρονιά που ακολούθησε έντονη ανθοφορία και οι οφθαλμοί από τα λογχοειδή ήταν στην πλειονότητά τους φυλλοφόροι. Είναι πιθανό σε χρονιά ανθοφορίας τα περισσότερα λογχοειδή να είναι ανθοφόρα και ως εκ τούτου να μην αποτελούν κατάλληλη πηγή εκφύτων. Στη μηλιά πάντως τα έκφυτα από μεγάλους οφθαλμούς θεωρούνται πιο ευνοϊκή πηγή παρά αυτά από μικρούς, καθώς και οι κορυφές βλαστού σε σχέση με τους πλάγιους οφθαλμούς (Lane, 1992).

Μικροσκοπική παρατήρηση επάκριων εκφύτων που συλλέχθηκαν από κανονικές ή λογχοειδείς βλαστήσεις ενήλικων φυτών σε μηνιαία βάση κατά τη διάρκεια ενός έτους έδειξε πως υπήρχε αγγειακή σύνδεση των οφθαλμών με το βλαστό, οπότε η δυσκολία

στην εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας από ενήλικα φυτά δεν οφειλόταν σε ελλιπή τροφοδοσία τους σε θρεπτικά συστατικά και φυτορυθμιστικές ουσίες. Στα λέπια και τα νεαρά φύλλα όλων των οφθαλμών ήταν έντονη η παρουσία μονοκύτταρων τριχών, οι οποίες παρουσιάζουν ποικιλότητα λειτουργιών, όπως είναι η προστασία από την ηλιακή ακτινοβολία, η απόθεση των εντόμων, η έκκριση διαφόρων ουσιών (Mauseth, 1988; Τσέκου και Ηλία, 2007), και οι οποίες θεωρήθηκαν υπεύθυνες για την αναποτελεσματικότητα της απολύμανσης και τα υψηλά ποσοστά των μολύνσεων των εκφύτων, ιδιαίτερα κατά τους χειμερινούς μήνες. Η συλλογή εκφύτων κατά την περίοδο της ταχείας ανάπτυξης των βλαστών τον Απρίλιο ή το προχωρημένο στάδιο έκπτυξης των οφθαλμών το Μάρτιο, όταν το κορυφαίο μερίστωμα ήταν περισσότερο εκτεθειμένο στην απολύμανση με χλωρίνη, είναι πιθανό να συντέλεσε στο εντονότερο καφέτιασμά τους και στη χαμηλότερη αντίδρασή τους κατά την εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας. Μεταβολές στα παρεγχυματικά κύτταρα, όπως η συσσώρευση αμύλου από τον Ιούλιο μέχρι το Σεπτέμβριο και το γέμισμα των κυττάρων με ινώδεις κατασκευές από τον Οκτώβριο μέχρι τον Ιανουάριο, που θα μπορούσαν να είναι συμπυκνωμένος κυτταρικός χυμός, κροκιδωμένες πρωτεΐνες κ.α., σχετίστηκαν με την ανάπτυξη μηχανισμών αντοχής στο ψύχος ή/ και με την είσοδο του φυτού σε λήθαργο, περίοδο κατά την οποία θα ήταν δύσκολο να εκπτυχθούν οι οφθαλμοί και να εγκατασταθεί *in vitro* καλλιέργεια. Επειδή τα φυτά είναι ποικιλόθερμοι οργανισμοί και δε διαθέτουν μηχανισμούς ρύθμισης της θερμοκρασίας τους, έχουν την ανάγκη μορφολογικών-ανατομικών και φυσιολογικών προσαρμογών στις χαμηλές θερμοκρασίες, όπως είναι οι αλλεπάλληλες επικαλύψεις των οφθαλμών με λέπια, η αποκοπή και πτώση των ευαίσθητων οργάνων (π.χ. φύλλων) και ο βιοχημικός εξοπλισμός για την αποφυγή σχηματισμού πάγου εντός των κυττάρων. Ο εγκλιματισμός των φυτικών ιστών στις χαμηλές θερμοκρασίες αποτελεί χαρακτηριστικό παράγοντα της ανθεκτικότητάς τους και επάγεται με τη σταθεροποίηση των μεμβρανών (μέσω μεταβολών στη σύσταση των μεμβρανών σε λιπίδια και στη σύνθεση των πρωτεϊνών, καθώς και με την ενεργοποίηση των αντιοξειδωτικών συστημάτων), με εκτεταμένες μεταβολικές αλλαγές (όπως η συγκέντρωση φωσφορυλιωμένων μεταβολιτών, η μετατροπή των αποθεμάτων αμύλου σε σάκχαρα, η συσσώρευση γλυκοπρωτεϊνών και αντιπαγωτικών πρωτεϊνών, η συσσώρευση συμβατών οσμωλυτών και η ανάπτυξη αντοχής του πρωτοπλάστη στην αφυδάτωση) και μέσω μεταβολών στην έκφραση των γονιδίων (Καραμπουρνιώτης, 2003). Τέλος, κατά τη διάρκεια όλων των

μηνών του έτους παρατηρήθηκαν στα έκφυτα κρύσταλλοι του οξαλικού ασβεστίου, υπό μορφή κρυσταλλικών αδένων (πολλοί από κοινού αυξανόμενοι από ένα κέντρο μεμονωμένοι κρύσταλλοι), οι οποίοι έχουν ευρεία εξάπλωση ως άχρηστα μεταβολικά προϊόντα της περίσσειας ανόργανων υλικών και μπορεί να εμφανιστούν σε κύτταρα παρόμοια με τα γειτονικά τους χωρίς κρυστάλλους είτε σε εξειδικευμένα κύτταρα του παρεγχυματικού ιστού, τα ιδιόβλαστα (Fahn, 1982; Mauseth, 1988; Evert, 2006; Cutler *et al.*, 2008; Τσέκου και Ηλία, 2007).

Διαφορετικά, ο μικροπολλαπλασιασμός των ενήλικων φυτών θα μπορούσε να διευκολυνθεί χρησιμοποιώντας μεθόδους ανανέωσης, οι οποίες θεωρούνται ότι επιστρέφουν τους ιστούς των εκφύτων από την ενήλικη στη νεανική φάση και περιλαμβάνουν εφαρμογή κυτοκινίνης, είτε κατά τη διάρκεια, είτε αμέσως μόλις τα έκφυτα τοποθετούνται στην καλλιέργεια, διαδοχικό εμβολιασμό, πολλαπλασιασμό με βλαστήσεις από τον κορμό, ή αυστηρό κλάδευμα (Greenwood, 1987). Το κάψιμο των ενήλικων φυτών του *xM. florentina* στην Πάρνηθα οδήγησε στην ανανέωσή τους μέσω της παραγωγής πολλών αναβλαστήσεων από τη βάση του κορμού και τις ρίζες.

Έκφυτα που συλλέχθηκαν το Μάρτιο από αναβλαστήσεις των καμένων φυτών μολύνθηκαν σε υψηλότερο ποσοστό από τα έκφυτα που συλλέχθηκαν άνοιξη ή καλοκαίρι, ενώ η απολέπιση των οφθαλμών ήταν απαραίτητη για να μη μολυνθούν όλα τα έκφυτα. Παρόλα αυτά, το Μάρτιο παρατηρήθηκε υψηλότερο ποσοστό έκπτυξης βλαστών στο βασικό υπόστρωμα από ότι τους καλοκαιρινούς μήνες, ενώ τα έκφυτα που συλλέχθηκαν Απρίλιο-Μάιο είτε σχημάτιζαν μόνο κάλο είτε έδιναν και χαμηλά ποσοστά έκπτυξης βλαστών. Έκφυτα που συλλέχθηκαν τον ίδιο μήνα διέφεραν ως προς τη φυσιολογική τους κατάσταση και κατ' επέκταση ως προς την *in vitro* συμπεριφορά τους από χρονιά σε χρονιά, εξαιτίας των διαφορετικών καιρικών συνθηκών και του χρόνου που έγινε η βόσκηση. Τα χαμηλά ποσοστά εγκατάστασης την περίοδο Απριλίου-Μαΐου μπορεί να οφείλονται στην υψηλότερη περιεκτικότητά τους σε φαινολικά συστατικά και το εντονότερο καφέτιασμά τους που παρεμπόδιζε την αντίδραση των εκφύτων είτε στη χρήση ακατάλληλου υποστρώματος καλλιέργειας. Αν είχε χρησιμοποιηθεί υπόστρωμα χωρίς αυξίνη ή με χαμηλότερη συγκέντρωση ΒΑ πιθανά να εκπύσσονταν οι οφθαλμοί των εκφύτων, όμως δεν ήταν δυνατός ο πειραματισμός με πολλά υποστρώματα λόγω της σπανιότητας του φυτικού υλικού.

Η θέση των εκφύτων πάνω στις αναβλαστήσεις επηρέασε την αντίδραση των εκφύτων κατά την εγκατάσταση. Τα έκφυτα από το μεσαίο και βασικό τμήμα των αναβλαστήσεων μολύνθηκαν σε υψηλότερο ποσοστό από αυτά του επάκριου και κορυφαίου τμήματος, όμως το ποσοστό έκπτυξης βλαστών από αυτά ήταν υψηλότερο, το οποίο μπορεί να οφείλεται στη χαμηλότερη περιεκτικότητά τους σε φαινολικά, στη μικρότερη έκχυση φαινολικών στο υπόστρωμα και στο λιγότερο έντονο καφέτιασμά τους σε σχέση με τα επάκρια και κορυφαία έκφυτα. Υψηλότερος αριθμός βλαστών σχηματίστηκε από τα επάκρια έκφυτα, ενώ το μήκος των βλαστών ήταν μεγαλύτερο στα επάκρια και κορυφαία συγκριτικά με τα έκφυτα από τα κατώτερα τμήματα των αναβλαστήσεων. Η θέση των οφθαλμών πάνω στον αναπτυσσόμενο βλαστό, καθώς και η θέση αυτού του βλαστού πάνω στο μητρικό φυτό, μπορεί να καθορίσει το αναπτυξιακό δυναμικό τους *in vitro*, ώστε η προκαθορισμένη ανάπτυξη από επάκριους και πλευρικούς οφθαλμούς να μπορεί ακόμη να εκφραστεί στην καλλιέργεια παρά το διαχωρισμό τους στην έναρξη της καλλιέργειας και την εφαρμογή φυτορρυθμιστικών ουσιών που σπάνε την αλληλεπίδρασή τους (Marks and Myers, 1992a; 1992b). Σε φυτά, όπως η *Daphne odora*, όπου η ανάπτυξη της βλάστησης επιτυγχάνεται μόνο με επάκρια επιμήκυνση, το μέγιστο δυναμικό ανάπτυξης *in vitro* βρίσκεται μέσα στους επάκριους και τους παρακείμενους πλάγιους οφθαλμούς, ενώ σε φυτά, όπως η *Betula pendula*, όπου οι ετήσιοι βλαστοί παράγουν πλάγια κλαδιά, το μέγιστο δυναμικό ανάπτυξης *in vitro* βρίσκεται σε οφθαλμούς που κανονικά θα αναπτύσσονταν σε πλάγιους βλαστούς (Marks and Myers, 1992a). Στην τριανταφυλλιά *Rosa hybrida*, η θέση το κόμβου από τον οποίο απομονώθηκαν οι πλάγιοι οφθαλμοί επηρέασε σημαντικά την ανάπτυξη και την εξέλιξη σε καλλιέργεια, με τους οφθαλμούς που ήταν κοντύτερα ή μακρύτερα από το κορυφαίο μερίστωμα, είτε να αποτυγχάνουν να εκπτυχθούν, είτε να χρειάζονται περισσότερο χρόνο να εξελιχθούν σε καλλιέργεια συγκριτικά με τους οφθαλμούς από το μεσαίο τμήμα του στελέχους (Bressan *et al.*, 1982). Στο αμπέλι *Vitis rotundifolia*, έκφυτα από τους 10 βασικούς κόμβους που συλλέχθηκαν από βλαστούς με τουλάχιστον 25 κόμβους έδωσαν καλύτερο πολλαπλασιασμό των βλαστών από έκφυτα που προέρχονταν από τους 10 άνω κόμβους (Sudarsono and Goldy, 1991).

Έκφυτα από αναβλαστήσεις που καλλιεργήθηκαν στα υποστρώματα MS με 1.0 mg Γ¹ BA ή zeatin και 0.1 mg Γ¹ IBA δε διέφεραν ως προς το ποσοστό έκπτυξης βλαστών,

ούτε ως προς το μήκος των παραγόμενων βλαστών, ενώ ο αριθμός των βλαστών ήταν μεγαλύτερος στο υπόστρωμα με BA.

Τα έκφυτα από το μεσαίο τμήμα των ηλικίας 5 ή 8 μηνών μικροπολλαπλασιασμένων φυταρίων μολύνθηκαν σε υψηλότερο ποσοστό και συνάμα εκπτώχθηκαν σε υψηλότερο ποσοστό από τα έκφυτα του επάκριου και κορυφαίου τμήματος των ηλικίας 20 ημερών βλαστών, ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ως προς τον αριθμό και το μήκος των παραγόμενων βλαστών. Το υψηλότερο ποσοστό εγκατάστασης των εκφύτων του μεσαίου τμήματος θα μπορούσε να αποδοθεί στο σημαντικά χαμηλότερο περιεχόμενο σε ολικά φαινολικά μαζί με το μηδενικό ποσοστό έκχυσης φαινολικών στο υπόστρωμα, που δεν παρεμπόδισαν την έκπτυξη. Επίσης, είναι πιθανό τα έκφυτα από τους 20 ημερών βλαστούς να είχαν εκπτυχθεί σε υψηλότερο ποσοστό εάν είχε χρησιμοποιηθεί κάποιο άλλο υπόστρωμα χωρίς αυξίνη ή με άλλη συγκέντρωση BA.

Από τις κυτοκινίνες που δοκιμάστηκαν στην αρχική καλλιέργεια των εκφύτων από μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια, το thidiazuron σε συγκέντρωση 1.0 mg l^{-1} έδωσε το υψηλότερο ποσοστό έκπτυξης των οφθαλμών, ενώ η kinetin έδωσε το χαμηλότερο ποσοστό έκπτυξης. Αυτό θα μπορούσε να αποδοθεί στη μοναδική ιδιότητα του TDZ να μιμείται τις επιδράσεις τόσο της αυξίνης όσο και της κυτοκινίνης στην ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των καλλιεργούμενων εκφύτων, παρόλο που, χημικά, είναι τελείως διαφορετικό από τις κοινά χρησιμοποιούμενες αυξίνες και κυτοκινίνες (Murthy *et al.*, 1998, Guo *et al.*, 2011), και στο χαρακτηρισμό του σα την πιο ενεργή παρόμοια με κυτοκινίνη ουσία για την ιστοκαλλιέργεια ξυλωδών φυτών (Huetteman and Preece, 1993, Khurana *et al.*, 2005) ή στην απουσία του IBA. Παρόλο που ο μηχανισμός δράσης του TDZ είναι άγνωστος, αρκετές αναφορές υποδεικνύουν ότι το TDZ μπορεί να δρα μέσω της τροποποίησης των ενδογενών φυτορρυθμιστικών ουσιών και άλλες περιλαμβάνουν την τροποποίηση των κυτταρικών μεμβρανών, των επιπέδων ενέργειας, της απορρόφησης ή αφομοίωσης θρεπτικών συστατικών (Murthy *et al.*, 1998, Guo *et al.*, 2011). Περισσότεροι βλαστοί ανά έκφυτο επίσης παράχθηκαν με το TDZ ή τη BA, ενώ οι βλαστοί είχαν μεγαλύτερο μήκος στα υποστρώματα με BA ή zeatin ή 2iP και δεν επιμηκύνθηκαν με το TDZ. Παρεμπόδιση της επιμήκυνσης των βλαστών από το TDZ έχει επίσης αναφερθεί για τη μηλιά (van Nieuwkerk *et al.*, 1986; Fasolo *et al.*, 1989; Pawlicki and Welander, 1994) και διάφορα ξυλώδη είδη (Huetteman and Preece, 1993). Το TDZ σε χαμηλές συγκεντρώσεις ($0.005\text{-}0.05 \text{ mg l}^{-1}$) έχει χρησιμοποιηθεί στην αρχική

καλλιέργεια και υποκαλλιέργεια του *Sorbus* (Chalupa, 1992). Όσον αφορά τη συγκέντρωση κυτοκινίνης, στα υποστρώματα με 1.0 ή 2.0 mg l⁻¹ BA με ή χωρίς IBA παρατηρήθηκαν υψηλότερο ποσοστό έκπτυξης των οφθαλμών και μεγαλύτερος αριθμός βλαστών ανά έκφυτο από ότι σε αυτό με 0.5 mg l⁻¹ BA.

Η αναγκαιότητα του IBA στο υπόστρωμα εγκατάστασης εξαρτήθηκε από το αναπτυξιακό στάδιο των βλαστών από τους οποίους συλλέχθηκαν τα έκφυτα, μιας και έκφυτα συλλεγμένα από την κορυφή ενεργά αναπτυσσόμενων βλαστών έδειξαν καλύτερη ανταπόκριση στην εγκατάσταση στο υπόστρωμα χωρίς IBA, ενώ τα έκφυτα από το μεσαίο τμήμα των ηλικίας 5-8 μηνών μικροπολλαπλασιασμένων φυταρίων τα πήγαν καλύτερα στο υπόστρωμα με IBA. Αυτή η παρατήρηση οδήγησε στη σκέψη ότι για τα χαμηλά ποσοστά έκπτυξης βλαστών, από τα έκφυτα που συλλέχθηκαν από τις αναβλαστήσεις την περίοδο ταχείας ανάπτυξης (Απρίλιο-Μάιο) και το σχηματισμό κυρίως κάλου, πιθανότατα ευθύνεται η καλλιέργεια σε ακατάλληλο υπόστρωμα λόγω της περιεκτικότητας IBA. Αυτή η πιθανότητα στηρίζεται στο ότι για την έναρξη καλλιεργειών των *Sorbus aucuparia* και *S. torminalis*, ενεργά αναπτυσσόμενοι βλαστοί που συλλέχθηκαν μετά την έκπτυξη την άνοιξη και νωρίς το καλοκαίρι ήταν κατάλληλες πηγές εκφύτων, όταν καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με χαμηλή συγκέντρωση κυτοκινίνης (0.2-0.4 mg l⁻¹ BA ή 0.005-0.01 mg l⁻¹ TDZ) και αυξίνης (0.1-0.2 mg l⁻¹ IBA) (Chalupa, 1992, 2002).

Παρά τη δυσκολία στην εξεύρεση σπόρων του *xM. florentina*, τα έκφυτα από τα σπορόφυτα που φύτεψαν *in vitro* εγκαταστάθηκαν σε υψηλότερο ποσοστό δίνοντας περισσότερους βλαστούς ανά έκφυτο συγκριτικά με τα έκφυτα βλαστού από ενήλικα φυτά, αναβλαστήσεις ή μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια, ενώ δεν καφέτιασαν καθόλου. Έκφυτα από σπορόφυτα του *Sorbus domestica* επίσης εγκαταστάθηκαν σε υψηλότερο ποσοστό από τα έκφυτα που προέρχονταν από ώριμα φυτά (Arrillaga *et al.*, 1991), ενώ στο *Fraxinus ornus* και οι δύο τύποι εκφύτων εγκαταστάθηκαν *in vitro* σε υψηλά ποσοστά (Arrillaga *et al.*, 1992). Επιπλέον, έκφυτα του *Taxus marei* που συλλέχθηκαν από φυτάρια ενός έτους σε διάφορες εποχές έδειξαν υψηλά ποσοστά επιβίωσης και καλή ανάπτυξη *in vitro*, σε αντίθεση με τα έκφυτα από ώριμα δένδρα ηλικίας περίπου 1000 ετών που επιβίωσαν σε ικανοποιητικό ποσοστό μόνο νωρίς την άνοιξη (Chang *et al.*, 2001).



5. ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ ΒΛΑΣΤΩΝ *IN VITRO*

5. ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ ΒΛΑΣΤΩΝ *IN VITRO*

5.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το στάδιο του πολλαπλασιασμού των *in vitro* καλλιεργειών είναι πολύ σημαντικό για τη δημιουργία ενός αποδοτικού πρωτοκόλλου πολλαπλασιασμού. Στην περίπτωση του *xM. florentina* επιδιώχθηκε αφενός η γρήγορη απόκτηση μεγάλου αριθμού βλαστών και αφετέρου η ικανοποιητική επιμήκυνσή τους για να μπορούν να προωθηθούν για ριζοβολία, καθώς και ο περιορισμός των υπερενυδατωμένων βλαστών. Οι καλλιέργειες που είχαν εγκατασταθεί από έκφυτα διαφορετικής προέλευσης (ενήλικα φυτά, αναβλαστήσεις, μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια, σπορόφυτα) και από διάφορες θέσεις πάνω στο βλαστό εξετάστηκαν ως προς το δυναμικό πολλαπλασιασμού τους. Διάφορα δοχεία καλλιέργειας και υλικά κάλυψης και διάφορες συγκεντρώσεις άγαρ χρησιμοποιήθηκαν για να περιοριστεί η υπερενυδάτωση των βλαστών και διάφοροι τύποι και συγκεντρώσεις φυτορρυθμιστικών ουσιών και θρεπτικών υποστρωμάτων δοκιμάστηκαν για να αυξηθεί η απόδοση του πρωτοκόλλου *in vitro* πολλαπλασιασμού.

5.1.1. Υπερενυδάτωση βλαστών

Η υπερενυδάτωση ή υάλωση έχει περιγραφεί ως η μορφολογική και φυσιολογική διαταραχή των *in vitro* αναπτυσσόμενων φυτών, που έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της ικανότητά τους να αναπτύσσονται κανονικά, προκαλώντας ως εκ τούτου προβλήματα κατά τον *in situ* εγκλιματισμό (Pâques and Boxus, 1987c).

Ο όρος υάλωση χρησιμοποιείται για να περιγράψει δύο τύπους διεργασιών που σχετίζονται με το ιστοκαλλιεργούμενο φυτικό υλικό: 1) τα όργανα και τους ιστούς που έχουν ανώμαλη μορφολογική εμφάνιση και φυσιολογική λειτουργία και 2) τη μετατροπή από την υγρή στην στερεή κατάσταση, δηλαδή το σχηματισμό πάγου κατά τη διατήρηση σε χαμηλή θερμοκρασία *in vitro* καλλιεργημένων κυττάρων, ιστών και οργάνων. Επειδή όμως η χρήση του ίδιου όρου για να προσδιορίσει δύο εντελώς διαφορετικές διεργασίες στην ίδια περιοχή έρευνας μπορεί μόνο να οδηγήσει σε σύγχυση, ο όρος “υάλωση” προτείνεται να αντικατασταθεί από τον όρο “υπερενυδάτωση” για να υποδείξει φυτικό υλικό με ανώμαλη μορφολογία και φυσιολογία (Debergh *et al.*, 1992).

Η υπερενυδάτωση είναι αποτέλεσμα του στρες που προκαλούν οι συνθήκες ανάπτυξης και καλλιέργειας, όπως το πλήγωμα, η διείδυση υγρού υποστρώματος καλλιέργειας, γενικά υψηλής ιοντικής δύναμης, πλούσιο σε άζωτο και φυτορρυθμιστικές

ουσίες σε ειδική ισορροπία, σε μια υγρή και φτωχή σε αέρα ατμόσφαιρα (Ziv, 1991, Kevers *et al.*, 2004). Οι υπερενυδατωμένοι βλαστοί εμφανίζονται διογκωμένοι, υδαρείς στην επιφάνεια, υπολιγνιτοποιημένοι και με όργανα ημιδιαφανή, λιγότερο πράσινα (σε κάποιες περιπτώσεις) και εύθραστα (Kevers *et al.*, 2004). Η υάλωση πρακτικά μειώνει το ρυθμό πολλαπλασιασμού, ιδιαίτερα όταν συμβαίνει στα αρχικά στάδια της καλλιέργειας, προκαλεί δυσκολίες στη ριζοβολία και στην προσαρμογή των φυταρίων στις *ex vitro* συνθήκες (Orlikowska, 1987), και επηρεάζει την ποιότητα των μικροπολλαπλασιασμένων φυταρίων (Ziv, 1991). Η κατανόηση των βαθύτερων μηχανισμών της υπερενυδάτωσης και ο έλεγχός τους *in vitro* μπορεί να συνεισφέρει σε έναν πιο αποτελεσματικό μικροπολλαπλασιασμό (Ziv, 1991).

Υπό κανονικές συνθήκες, οι νεοσχηματισμένοι βλαστοί και φύλλα σε καλλιέργεια έχουν διαφορετική ανατομία από βλαστούς και φύλλα που αναπτύσσονται *ex vitro*, και ως εκ τούτου, η φυσιολογία αυτών των οργάνων επίσης θα είναι διαφορετική. Εμφανή συμπτώματα (υπερενυδατωμένα φύλλα) εμφανίζονται μόνο αφού περάσει κάποιο χρονικό διάστημα και υπό ορισμένες συνθήκες καλλιέργειας και εκφύτου. Τα εμφανή συμπτώματα μπορούν να αποφευχθούν ελέγχοντας τη σύνθεση του υποστρώματος καλλιέργειας, τις περιβαλλοντικές συνθήκες στις οποίες διατηρούνται τα δοχεία καλλιέργειας και την ποιότητα των καλλιεργούμενων εκφύτων (Debergh *et al.*, 1992).

Οι υπερενυδατωμένοι βλαστοί συχνά έχουν κοντύτερα μεσογονάτια και είναι ροζέτες. Τα στελέχη παρουσιάζουν υπερτροφία του παρεγχύματος, μεγάλους μεσοκυττάριους χώρους, υπολιγνιτοποίηση του αγγειακού συστήματος, μειωμένο ή ανώμαλο αγγειακό σύστημα και με διάμετρο μεγαλύτερη ή μικρότερη του κανονικού. Τα φύλλα είναι παχιά, επιμηκυμένα, ζαρωμένα ή κατσαρά, εύθραυστα, ημιδιαφανή, με μειωμένη ή υπερτροφική επιφάνεια, πιθανά με χρώμα μη φυσιολογικό, με μειωμένο αριθμό στρωμάτων πασσαλωδών κυττάρων, με μεγάλα μεσοκυττάρια διαστήματα στο στρώμα κυττάρων μεσοφύλλου, με ελαττωματικό επιδερμικό ιστό, με λεπτή επιδερμίδα, με περισσότερα ή λιγότερα στομάτια και εσφαλμένη λειτουργία. Οι χλωροπλάστες έχουν ανώμαλη οργάνωση και μπορεί να έχουν χαμηλότερο περιεχόμενο σε χλωροφύλλη. Η αγγειακή σύνδεση μεταξύ ριζών και στελεχών μπορεί να είναι ελλιπής, ενώ ο σχηματισμός τυχαίων ριζών στους βλαστούς συχνά είναι δύσκολη. Οι υπερενυδατωμένοι βλαστοί και φύλλα έχουν χαμηλότερο ξηρό βάρος και υψηλότερο περιεχόμενο σε νερό, περιέχουν λιγότερη λιγνίνη και σελλουλόζη, έχουν αλλαγμένη δραστηριότητα διαφόρων

ενζύμων σε σχέση με τους κανονικούς ιστούς, χαμηλό περιεχόμενο σε ασβέστιο, λιγότερες διαλυτές φαινόλες και αυξημένη παραγωγή αιθυλενίου (Ziv, 1991; Debergh *et al.*, 1992; Kevers *et al.*, 2004). Μετρήσεις του ελλείμματος κορεσμού νερού σε φύλλα μηλιάς υπέδειξε πως η ημιδιαφανής όψη των υπερενυδατωμένων φύλλων ήταν αποτέλεσμα της παρουσίας νερού αντί για αέρα στα κενά (Pâques and Boxus, 1987b). Τα υπερενυδατωμένα φύλλα μηλιάς που συλλέχθηκαν από *in vitro* αναπτυσσόμενους βλαστούς επίσης είχαν ανώμαλη, συχνά ασυνεχή ανάπτυξη της επιδερμίδας, στομάτια κακοσχηματισμένα, παχύ έλασμα φύλλου με φτωχή διαφοροποίηση μεταξύ πασσαλώδους και σπογγώδους ιστού μεσοφύλλου και χαμηλότερο αριθμό χλωροπλαστών ανά κύτταρο συγκρινόμενα με αντίστοιχα υγιή φύλλα ή φύλλα από φυτά αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο. Επιπλέον, η υπερενυδάτωση συντέλεσε σε μια γενική μείωση στις συγκεντρώσεις των οξειδωμένων νουκλεοτιδίων πυριδίνης, αντικατοπτρίζοντας μια μείωση στη μεταβολική δραστηριότητα. Οι δραστηριότητες κάποιων αντιοξειδωτικών ενζύμων ήταν υψηλότερες στα υπερενυδατωμένα φύλλα, υποδεικνύοντας ότι η υπερενυδάτωση σχετιζόταν με οξειδωτικό στρες, ενώ οι μετρήσεις φθορισμού της χλωροφύλλης έδειξαν οξειδωτική βλάβη του φωτοσυνθετικού μηχανισμού στα υπερενυδατωμένα φύλλα (Chakrabarty *et al.*, 2006).

Αρκετοί παράγοντες θεωρούνται υπεύθυνοι για την υπερενυδάτωση, την οποία συνήθως προκαλούν μόνο όταν άλλες συνθήκες στο σύστημα καλλιέργειας (υπόστρωμα, δοχείο, περιβάλλον, έκφυτο) δεν είναι οι ιδανικές. Η συνεκτικότητα του υποστρώματος, που καθορίζεται από τη συγκέντρωση και τον τύπο του πηκτικού μέσου, το επίπεδο και ο τύπος της κυτοκινίνης, η συγκέντρωση και η σύνθεση αλάτων και η παρουσία ορισμένων ανόργανων στοιχείων σε αφθονία έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη υπερενυδάτωσης (Debergh *et al.*, 1992). Η υάλωση μπορεί να είναι αποτέλεσμα της υψηλής συγκέντρωσης κυτοκινίνης, του ωσμωτικού δυναμικού του υποστρώματος, των ιόντων Cl^- , της επίδρασης των ιόντων NH_4^+ , της συγκέντρωσης Ca , της συγκέντρωσης και της σύνθεσης του άγαρ, της θερμοκρασία και της σχετικής υγρασίας της ατμόσφαιρας. Το περιεχόμενο σε άγαρ του υποστρώματος φαίνεται να παρεμβαίνει με τους ανωτέρω παράγοντες ρυθμίζοντας το υδατικό δυναμικό, την διάχυση των μικροστοιχείων και την πρόσληψη των κυτοκινινών από τα φυτά (Pâques and Boxus, 1987a).

Το υλικό από το οποίο είναι φτιαγμένα το δοχείο και το κάλυμμα μπορεί να επιδράσει στην ανταλλαγή αερίων και έτσι να επηρεάσει τις συγκεντρώσεις υδρατμών, διοξειδίου του άνθρακα και του αιθυλενίου στον άνω χώρο του δοχείου. Ο όγκος του άνω χώρου σε σχέση με τον όγκο του υποστρώματος και τον αριθμό των εκφύτων μπορεί επίσης να επηρεάσει τις συγκεντρώσεις αερίων και τη σύνθεση του άνω χώρου. Η θερμοκρασία, η ένταση και η ποιότητα φωτός, η κίνηση αέρα, η σχετική υγρασία στο χώρο που περιβάλλει το δοχείο και η θέση του δοχείου στο ράφι μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη των φυτών στην καλλιέργεια. Η ευαισθησία στην υπερενυδάτωση ποικίλει με το είδος, την ποικιλία, το μήκος του χρόνου από την τελευταία υποκαλλιέργεια και το χρόνο από την εγκατάσταση της υποκαλλιέργεια (δηλαδή τον αριθμό των υποκαλλιεργειών), τον τρόπο κοπής των εκφύτων, την τοποθέτηση των εκφύτων στο υπόστρωμα και την απόσταση ενός οργάνου ή ιστού από την επιφάνεια του υποστρώματος (Debergh *et al.*, 1992).

Η διεργασία της υπερενυδάτωσης γενικά θεωρείται αντιστρεπτή, το οποίο σημαίνει ότι οι νέοι βλαστοί ή φύλλα που σχηματίζονται από υπερενυδατωμένους βλαστούς μετά από μεταφορά σε υπόστρωμα που δεν προκαλεί υπερενυδάτωση ή στο θερμοκήπιο μπορεί να έχουν μια μορφολογία ή ανατομία που να πλησιάζει εκείνες των κανονικών φυτών. Αντίθετα, η υποκαλλιέργεια των υπερενυδατωμένων βλαστών σε συνθήκες που προκαλούν υπερενυδάτωση μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές βλάβες, συμπεριλαμβανομένου του θανάτου ολόκληρων βλαστών, μέσω της νέκρωσης των βασικών μεριστωμάτων (Kervers *et al.*, 2004).

Πολλές διαφορετικές τεχνικές συστήνονται για τον έλεγχο της υπερενυδάτωσης, οι οποίες σχετίζονται με τους παράγοντες που προωθούν αυτή την κατάσταση. Η υπερενυδάτωση συμβαίνει πιο συχνά στα υγρά από ότι στα στερεοποιημένα υποστρώματα και σε αυτά με χαμηλές συγκεντρώσεις πηκτικού παράγοντα από τα υποστρώματα με υψηλές συγκεντρώσεις. Το χαμήλωμα της συγκέντρωσης κυτοκίνινης ή υποκατάσταση της μίας από άλλη (συνήθως αντικαθιστώντας τη BA με άλλη κυτοκίνινη), η αύξηση των ιόντων Ca^{2+} , η μείωση των ιόντων NH_4^+ ή Cl^- , η χρήση πηκτίνης ή υδρολυμένου άγαρ, phloridzin ή phloroglucinol, $CoCl_2$, Ni^{++} , φρουκτόζης ή γαλακτόζης σαν πηγή άνθρακα, μεθειονίνης, $AgNO_3$ και επιβραδυντών ανάπτυξης έχουν βρεθεί χρήσιμα στην αποφυγή ή μείωση της υπερενυδάτωσης. Η κάλυψη των δοχείων με αεριο-διαπερατές μεμβράνες ή ευλύγιστα πλαστικά, που επιτρέπουν την ανταλλαγή

αερίων και αποτρέπουν τη συσσώρευση αερίων, όπως το αιθυλένιο, στο πάνω μέρος των δοχείων. Η ψύξη του ραφιού στο οποίο τα δοχεία είναι τοποθετημένα δημιουργεί μια θερμοκρασιακή διαβάθμιση μέσα στο δοχείο και μειώνει τους υδρατμούς στον επάνω χώρο (Debergh *et al.*, 1992). Μέτρα, όπως η μείωση του υδατικού δυναμικού του υποστρώματος, η μείωση της σχετικής υγρασίας, τα χαμηλά επίπεδα NH_4^+ , οι αλλαγές στα επίπεδα Ca^{2+} και η απομάκρυνση του αιθυλενίου, έχουν βρεθεί όχι μόνο να μειώνουν την υπερενυδάτωση αλλά και να βελτιώνουν τη μορφογένεση των φύλλων, την επιβίωση και την ποιότητα αρκετών μικροπολλαπλασιασμένων φυτικών ειδών (Ziv, 1991). Εκτός της μείωσης της σχετικής υγρασίας που παρέχει καλή ανταλλαγή αερίων, ως διορθωτικά μέτρα έχουν προταθεί η αύξηση της συγκέντρωσης άγαρ στο υπόστρωμα, η χρήση ουσιών προσροφητικών του αιθυλενίου, όπως ο ενεργός άνθρακας ή το KMnO_4 , η χρήση μεγαλύτερων δοχείων καλλιέργειας και ο δυναμικός αερισμός (Park *et al.*, 2004).

Κατά τον Phan (1991), η αναπτυξιακή ανωμαλία της υπερενυδάτωσης έχει δειχθεί να είναι μια έλλειψη στην λιγνιτοποίηση, η οποία δεν προκαλείται ούτε από τη φυσική κατάσταση του υποστρώματος καλλιέργειας ούτε από το αιθυλένιο, αλλά από τις κυτοκινίνες, πιθανά με την υπερβολική προώθηση των κυτταροδιαιρέσεων σε βάρος της κυτταρο-διαφοροποίησης.

Κατά την *in vitro* καλλιέργεια βλαστών των φυτών *Camellia sinensis*, *Gerbera jamesonii*, *Malus domestica* και του υβριδίου *Populus tremula* x *P. alba*, οι σημαντικότεροι παράγοντες που επηρέασαν την υπερενυδάτωση ήταν η υψηλή υγρασία στα δοχεία καλλιέργειας και η υπέρβαση του BA στο υπόστρωμα, ενώ οι αυξίνες είχαν ελάχιστη επίδραση. Το περιεχόμενο των υπερενυδατωμένων βλαστών στις κυτοκινίνες IPA, 2iP, zeatin και zeatin riboside ήταν σημαντικά υψηλότερο από τους κανονικούς βλαστούς, το οποίο ενισχύει την υπόθεση ότι το πλεόνασμα κυτοκινίνης, προκαλώντας γρήγορη κυτταρική διαίρεση στα μεριστώματα σε ατμόσφαιρα υψηλής σχετικής υγρασίας, είναι υπεύθυνο για την υάλωση (Kataeva *et al.*, 1991).

Η υπερενυδάτωση σε έκφυτα του *Pyrus pyrifolia* επηρεάστηκε από τον τύπο της κυτοκινίνης, ενώ η συγκέντρωση είχε μικρή επίδραση. Με τα συνθετικά παράγωγα φαινυλουρίας (CPPU και TDZ) παράχθηκαν περισσότεροι υπερενυδατωμένοι βλαστοί από ότι με τα παράγωγα αδενίνης (BA και κινετίνη), με το TDZ να έχει ισχυρότερη επίδραση (Kadota and Niimi, 2003).

Μακράς διάρκειας καλλιέργειες της *Gypsophila paniculata* επέδειξαν υπερενυδατωμένη ανάπτυξη, που είχε ως αποτέλεσμα τη χαμηλή επιβίωση των μικροπολλαπλασιασμένων φυταρίων. Μια περιορισμένη περίοδος εξάτμισης στην αρχική φάση ανάπτυξης των καλλιεργειών (lag phase), όταν ο αριθμός των κυττάρων μένει σχετικά σταθερός πριν τη γρήγορη αύξηση, προώθησε τη φυσιολογική ανάπτυξη. Η επαναφορά της υψηλής σχετικής υγρασίας και της μικρότερης ανταλλαγής αερίων στη συνέχεια δεν οδήγησε σε υαλωμένη ανάπτυξη (Dillen and Buysens, 1989). Επιπλέον, η ανάπτυξη φυσιολογικών φυταρίων της *Gypsophila paniculata* σε υγρό υπόστρωμα σε ένα περιβάλλον όπου τα φυτάρια μπορούσαν να διαπνέουν ξεκαθάρισε ότι η απουσία της διαπνοής σε αντίθεση με την υψηλή διαθεσιμότητα νερού είναι η βασική αιτία για την προώθηση της υπερενυδατωμένης ανάπτυξης. Μικρές μειώσεις της σχετικής υγρασίας *in vitro* βρέθηκαν να είναι επαρκείς για να αυξήσουν τη διαπνοή των φυταρίων σε βαθμό που η υπερενυδάτωση να είναι πολύ μειωμένη και η επιβίωση *ex vitro* αυξημένη. Μικρές διαφορές στη σχετική υγρασία επίσης επηρέασαν τη μορφολογία των φυταρίων με τα φυτάρια που αναπτύσσονταν σε υψηλή σχετική υγρασία να είναι μεγαλύτερα και να αποτελούνται από περισσότερους βλαστούς από φυτάρια αναπτυσσόμενα σε χαμηλότερη σχετική υγρασία (Gribble, 1999).

Κατά τον μικροπολλαπλασιασμό της πατάτας, η ανάπτυξη ενισχύθηκε σημαντικά και η υπερενυδάτωση μειώθηκε αυξάνοντας την αποτελεσματικότητα του εξαερισμού χρησιμοποιώντας δοχεία καλυμμένα με μεμβράνη προπυλενίου (διάχυτος εξαερισμός) ή με μηχανισμό δυναμικού αερισμού ($5 \text{ cm}^3 \text{ min}^{-1}$) αντί των σφραγισμένων με ελαστικό πώμα σιλικόνης δοχείων, με τα αποτελέσματα να είναι μεγαλύτερα με τον δυναμικό αερισμό. Η απομάκρυνση του αιθυλενίου ήταν ξεκάθαρα ένας σημαντικός παράγοντας που συνείσφερε στην καλύτερη ανάπτυξη που επετεύχθη με το διάχυτο και ιδιαίτερα με το δυναμικό εξαερισμό. Επίσης, με τον δυναμικό εξαερισμό δεν παρατηρήθηκε σχηματισμός κάλου στη βάση των βλαστών, ενώ η *in vitro* κονδυλοποίηση βελτιώθηκε σημαντικά (Zobayed *et al.*, 2001). Ο Park *et al.* (2004), επίσης, βρήκαν τους *in vitro* αναπτυσσόμενους βλαστούς πατάτας σε εντελώς σφραγισμένα δοχεία να είναι σοβαρά υπερενυδατωμένοι, ενώ οι βλαστοί που καλλιεργήθηκαν σε δοχεία διαπερατά στα αέρια έδειξαν φυσιολογικό πολλαπλασιασμό βλαστών. Το ποσοστό ξηρού βάρους και το περιεχόμενο χλωροφύλλης ήταν χαμηλότερα στους υαλωμένους βλαστούς από ότι στους φυσιολογικούς βλαστούς. Τα επίπεδα αιθυλενίου και CO_2 ήταν σημαντικά υψηλότερα

στα εντελώς σφραγισμένα δοχεία, αλλά λίγο αιθυλένιο ανιχνεύτηκε και στο διαπερατό στα αέρια σύστημα. Όταν προστέθηκε ένας καθαριστής του αιθυλενίου (περλίτης μεταχειρισμένος με KMnO_4) στα εντελώς σφραγισμένα δοχεία, οι βλαστοί επέδειξαν φυσιολογική ανάπτυξη χωρίς κανένα σημάδι υπερενυδάτωσης, ενώ δε βρέθηκε καθόλου αιθυλένιο. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν ότι η υπερενυδάτωση σχετίζεται με τη συσσώρευση αιθυλενίου στα δοχεία *in vitro* καλλιέργειας (Park *et al.*, 2004).

Φυτάρια της *Thapsia garganica*, που είχαν αναπτυχθεί και ριζοβολήσει *in vitro* σε περιβάλλον με βελτιωμένο αερισμό με τη χρήση τροποποιημένων καπακιών, εμφάνισαν μειωμένη υπερενυδάτωση και μπόρεσαν να εγκλιματιστούν εύκολα (Makunga *et al.*, 2006).

Σε *in vitro* καλλιέργεια μηλιάς ‘Gala’, η υπερενυδάτωση των βλαστών επηρεάστηκε τόσο από το πηκτικό μέσο όσο και τη συγκέντρωση BA, ενώ η συγκέντρωση IBA είχε μικρή επίδραση. Αύξηση της συγκέντρωσης είτε του άγαρ είτε του Gerlite συντέλεσε σε ένα φθίνον ποσοστό υπερενυδατωμένων εκφύτων. Το υψηλότερο επίπεδο BA γενικά αύξησε την υάλωση, αλλά αύξηση της συγκέντρωσης άγαρ είχε την τάση να μειώσει τη διαφορά στην επίδραση των δύο επιπέδων BA (0.5 και 1.0 mg l⁻¹). Μερικοί συνδυασμοί των πηκτικών μέσων μηδένισαν την υπερενυδάτωση χωρίς μείωση του πολλαπλασιασμού των βλαστών (Pasqualetto *et al.*, 1986). Σε *in vitro* καλλιέργειες των ποικιλιών ‘York’ ‘Vermont Spur Delicious’, ο Gerlite σταθερά παρήγαγε υπερενυδατωμένα φύλλα και βλαστούς, ενώ το Difco Bacto άγαρ απέτρεψε την υπερενυδάτωση δίνοντας περισσότερους χρησιμοποιήσιμους βλαστούς, αν και μετρήθηκε μικρότερη επιμήκυνση βλαστών και λιγότεροι ολικοί βλαστοί. Επιπλέον, το χαμηλότερο επίπεδο K⁺ παρήγαγε ένα υψηλότερο ποσοστό υπερενυδατωμένων βλαστών, επηρέασε την εμφάνιση των ιστών, μείωσε τον αριθμό και την επιμήκυνση των βλαστών και εμφανώς άλλαξε τη μεταβολική δραστηριότητα των βλαστών (Pasqualetto *et al.*, 1988).

Η υπερενυδάτωση σε καλλιέργεια μηλιάς βρέθηκε μειωμένη σε απόκριση της αυξημένης συγκέντρωσης υδρολυμένου άγαρ. Η αντίστροφη συσχέτιση μεταξύ της συγκέντρωσης άγαρ και του βαθμού υπερενυδάτωσης των καλλιεργούμενων ιστών έχει αποδοθεί στη φυσιολογική κατάσταση του υποστρώματος, που επηρεάζει τη διείσδυση των φυτορρυθμιστικών ουσιών και θρεπτικών στοιχείων και στην τροποποίηση της

διαθεσιμότητας των διαλυτών ουσιών μέσω χημικών αλληλεπιδράσεων από το άγαρ (Marga *et al.*, 1997).

Κατά τον *in vitro* πολλαπλασιασμό βλαστών γαρύφαλλου, το υπόστρωμα με Gelrite έδωσε υψηλότερο ρυθμό πολλαπλασιασμού και υψηλότερο ποσοστό υαλωμένων βλαστών από αυτό που περιείχε Difco άγαρ. Το ποσοστό υπερενυδατωμένων βλαστών μειώθηκε με αύξηση των συγκεντρώσεων του Difco άγαρ στο υπόστρωμα, ενώ ο ρυθμός πολλαπλασιασμού μειώθηκε. Η παραγωγή βλαστών αυξήθηκε με αύξηση της συγκέντρωσης BA (από 0 σε 4 mg/l), όμως επίσης συντέλεσε στην αναλογική αύξηση της υπερενυδάτωσης των βλαστών. Η υψηλότερη αναλογία $\text{NO}_3^-/\text{NH}_4^+$ στο υπόστρωμα απέτρεψε την υπερενυδάτωση των φυταρίων γαρύφαλλου (Tsay, 1998).

5.1.2. Χρήση φυτορρυθμιστικών ουσιών *in vitro*

Στην ιστοκαλλιέργεια χρησιμοποιούνται διάφορες κλασικές και νέες, φυσικές και συνθετικές φυτικές ορμόνες και ρυθμιστές ανάπτυξης. Οι φυτικές ορμόνες σπάνια δρουν μόνες τους και για τις περισσότερες διαδικασίες πολλοί από αυτούς τους ρυθμιστές έχουν αλληλεπιδράσει ώστε να παραχθεί το τελικό αποτέλεσμα. Στις κλασικές ορμόνες περιλαμβάνονται οι αυξίνες, οι κυτοκινίνες, οι γιββερελλίνες, το αμπισισικό οξύ, το αιθυλένιο, καθώς και ρυθμιστικές της ανάπτυξης ουσίες με ίδια βιολογική δράση. Νέες, φυσικά εβρισκόμενες ουσίες σε αυτές τις κατηγορίες ακόμη ανακαλύπτονται ταυτόχρονα με τη συνεχή σύνθεση νέων δομικά σχετικών ενώσεων ή χημικά άσχετων ενώσεων με ίδια σαν ορμόνης δραστηριότητα. Η καλύτερη γνώση της πρόσληψης, της μεταφοράς, του μεταβολισμού και του τρόπου δράσης των φυτορμονών και η εμφάνιση χημικών που παρεμποδίζουν τη σύνθεση, τη μεταφορά και τη δράση των ενδογενών φυτικών ορμονών αύξησε τη γνώση στο ρόλο αυτών των ορμονών στην ανάπτυξη και την εξέλιξη. Οι αυξίνες, οι κυτοκινίνες και οι αλληλεπιδράσεις αυξίνης-κυτοκινίνης συνήθως θεωρούνται οι πιο σημαντικές για τη ρύθμιση της ανάπτυξης και την οργανωμένη εξέλιξη στις καλλιέργειες φυτικών ιστών και οργάνων, μιας και γενικά απαιτούνται αυτές οι δύο κατηγορίες ορμονών. Όμως, το αμπισισικό οξύ, το αιθυλένιο, οι γιββερελλίνες, και άλλες ουσίες σαν τις ορμόνες έχουν ρυθμιστικούς ρόλους που δεν θα πρέπει να αγνοούνται στα συστήματα καλλιέργειας. Περισσότερο, αυτές οι ορμόνες συντίθενται στους ιστούς και παίζουν έναν ενεργό, αλλά κρυμμένο ρόλο στην ανάπτυξη και την εξέλιξη αλληλεπιδρώντας με τις προστιθέμενες αυξίνες και κυτοκινίνες.

Στις πιο πρόσφατα ανακαλυμμένες φυσικές ουσίες ανάπτυξης με ρυθμιστικούς ρόλους σαν των φυτορμονών περιλαμβάνονται οι πολυαμίνες, οι ολιγοσακχαρίνες, τα σαλικυλικά (salicylates), τα τζασμονικά (jasmonates), οι στερόλες, τα μπρασσινοστεροϊδή (brassinosteroids), οι dehydrodiconiferyl alcohol γλυκοζίτες, οι τουργκορίνες (turgorins), η συστεμίνη (systemin), κάποιοι φυσικοί παρακινητές και παρεμποδιστές, και η μυοϊνοσιτόλη, και οι οποίες δεν έχουν ακόμη εξεταστεί όλες σε σχέση με την ανάπτυξη και την οργανωμένη εξέλιξη *in vitro*.

Οι επιδράσεις των φυσικών και συνθετικών φυτορυθμιστικών ουσιών σπάνια είναι εξειδικευμένες στη βασική τους επίδραση στην ανάπτυξη και εξέλιξη, και οι αντιδράσεις των κυττάρων, των ιστών και των οργάνων *in vitro* μπορεί να ποικίλει με τις καλλιεργητικές συνθήκες, τον τύπο του εκφύτου και το γονότυπο. Οι διαδικασίες ανάπτυξης και εξέλιξης *in vivo* και *ex vitro* είναι υπερβολικά πολύπλοκες και αποτελούνται από ανεξάρτητες φυσιολογικές φάσεις (προτροπή, προσδιορισμός, έναρξη, έκφραση) που έχουν διαφορετικές απαιτήσεις. Συνήθως ένας συνδυασμός δύο ή περισσοτέρων ρυθμιστών ανάπτυξης διαφορετικών κατηγοριών απαιτούνται, είτε ταυτόχρονα είτε διαδοχικά (Gaspar *et al.*, 1996).

Οι δομές των κυριότερων φυτορυθμιστικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν στα διάφορα στάδια του *in vitro* πολλαπλασιασμού ή απλά αναφέρθηκαν κατά την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας δίνονται στο Παράρτημα I.

5.1.2.1. Αυξίνες

Οι αυξίνες ασκούν μια ισχυρή επίδραση επί διαδικασιών όπως η αναπτυξιακή επέκταση των κυττάρων, η οξύνιση των κυτταρικών τοιχωμάτων, η έναρξη της κυτταροδιαίρεσης και η οργάνωση των μεριστωμάτων δίνοντας είτε ανοργάνωτο ιστό (κάλο) είτε συγκεκριμένα όργανα (γενικά ρίζες) και προωθώντας την αγγειακή διαφοροποίηση. Στον οργανωμένο ιστό, οι αυξίνες εμφανίζονται να είναι οι βασικοί παράγοντες που διατηρούν την κυριαρχία της κορυφής, επηρεάζουν την αποκοπή, προωθούν το σχηματισμό ριζών και τροπιστικών κάμψεων, καθυστερούν τη γήρανση των φύλλων και την ωρίμανση των καρπών.

Η πιο συχνά ανιχνεύσιμη φυσική αυξίνη είναι το ινδολο-3-οξικό οξύ (IAA), αλλά εξαρτωμένου του είδους, της ηλικίας του φυτού, της εποχής και των συνθηκών ανάπτυξης έχουν αναγνωριστεί και άλλες φυσικές αυξίνες, όπως το 4-χλωροϊνδολο-3-

οξικό οξύ, το ινδολο-3-ακρυλικό οξύ, το ινδολο-3-βουτυρικό οξύ (IBA). Μέσα στους φυτικούς ιστούς, οι φυσικές αυξίνες συνδυάζονται με μικρά μόρια (αλκοόλες, αμινοξέα, σάκχαρα) για να παράγουν συζεύξεις εστέρων, αμιδίων ή γλυκοζιτών, ενώ τα επίπεδα των ελεύθερων ενδογενών αυξινών εξαρτώνται από το βαθμό αναβολισμού, καταβολισμού, μεταφοράς και σύζευξής τους. Στα υποστρώματα ιστοκαλλιέργειας χρησιμοποιούνται ευρέως τα συνθετικά παρασκευασμένα IAA, IBA και NAA, και το 2,4-D για την προτροπή κάλου (Gaspar *et al.*, 1996).

5.1.2.2. Κυτοκινίνες

Δύο κύριες ιδιότητες των κυτοκινινών που είναι χρήσιμες στην καλλιέργεια είναι η ενεργοποίηση της κυτταρικής διαίρεσης (συντά μαζί με τις αυξίνες) και η απελευθέρωση του ληθάργου των πλάγιων οφθαλμών, ενώ προωθούν και το σχηματισμό τυχαίων οφθαλμών.

Οι φυσικές κυτοκινίνες έχουν προσδιοριστεί ως ελεύθερες ουσίες, γλυκοζίτες ή ριβοζίτες. Οι πιο κοινά χρησιμοποιούμενες φυσικές κυτοκινίνες στην ιστοκαλλιέργεια είναι η ζεατίνη, το 2-iP, η διυδρο-ζεατίνη και ο ριβοζίτης της ζεατίνης, και από τις συνθετικές, τα υποκατάστατα πουρίνης: η κινετίνη και η BA. Από τα υποκατάστατα ουρίας με δραστηριότητα κυτοκινίνης, το thidiazuron έχει βρεθεί πιο αποτελεσματικό από τις ουσίες με βάση την αδερίνη στην προτροπή πλάγιων ή τυχαίων βλαστών σε κάποια φυτά, όμως οι βλαστοί τείνουν να μην επιμηκύνονται επαρκώς και είναι ευπαθείς στην υπερενυδάτωση στις επαναληπτικές υποκαλλιέργειες παρουσία αυτής της ουσίας.

Πολλές πλευρές της κυτταρικής ανάπτυξης και διαφοροποίησης, καθώς και της οργανογένεσης στις καλλιέργειες ιστών και οργάνων έχουν βρεθεί να ελέγχονται από μια αλληλεπίδραση μεταξύ κυτοκινινών και αυξινών. Η απαιτούμενη συγκέντρωση κάθε φυτορμόνης ποικίλει σε μεγάλο βαθμό σύμφωνα με το είδος του φυτού που καλλιεργείται, τις καλλιεργητικές συνθήκες και τον τύπο της χρησιμοποιούμενης φυτορμόνης. Παρόλο που τόσο η αυξίνη όσο και η κυτοκινίνη συχνά απαιτούνται για ανάπτυξη και μορφογένεση, η αυξίνη μπορεί να παρεμποδίσει τη συσσώρευση κυτοκινίνης, ενώ οι κυτοκινίνες μπορούν να παρεμποδίσουν τουλάχιστον μερικές από τις δράσεις της αυξίνης. Κάποιες από τις επιδράσεις των κυτοκινινών στο μεταβολισμό, τη φυσιολογία και την ανάπτυξη μπορούν να ανταγωνιστούν από το αμπισικό οξύ, ενώ σε

πολλούς ιστούς οι κυτοκινίνες συχνά προάγουν τη βιοσύνθεση του αιθυλενίου (Gaspar *et al.*, 1996).

Όπως έχει αναφερθεί με λεπτομέρεια στην Εισαγωγή (κεφάλαιο 1.7.2.3.), στον πολλαπλασιασμό βλαστών μηλιάς η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη κυτοκινίνη είναι η BA (Dobrąnszki and Texeira da Silva, 2010) και στα συστήματα αναγέννησης βλαστών το thidiazuron και η BA (Magyar-Tábori *et al.*, 2010), ενώ άλλες κυτοκινίνες, όπως η zeatin, η kinetin και η 2iP, έχουν επίσης δοκιμαστεί σε αρκετά πειράματα και έχουν βρεθεί γενικά να είναι λιγότερο ενεργές (Hutchinson, 1984; Marn, 1988; Magyar-Tábori *et al.*, 2010). Στην αγλαδιά, η BA επίσης οδήγησε στο σχηματισμό περισσότερων βλαστών από το TDZ, τη CPPU και την κινετίνη, ενώ μεγαλύτερη υπερενυδάτωση στα καλλιεργούμενα έκφυτα προκλήθηκε από το TDZ και τη CPPU από ότι με τις BA και κινετίνη (Kadota and Niimi, 2003).

5.1.2.3. Thidiazuron

Το thidiazuron (TDZ, N-phenyl-N'-1,2,3-thidiazol-5-ylurea) είναι μια υποκατάστατη ένωση φαινυλουρίας, που αναπτύχθηκε για τη μηχανοποιημένη συγκομιδή των καμών του βαμβακιού, και τώρα έχει αναδυθεί σαν ένας έντονα αποτελεσματικός βιορυθμιστής της μορφογένεσης στην ιστοκαλλιέργεια πολλών φυτικών ειδών (Murthy *et al.*, 1998). Το TDZ είναι από τις πιο ενεργές σαν-κυτοκινίνη ουσίες για την ιστοκαλλιέργεια ξυλωδών φυτών (Huetteman and Preece, 1993), και επιδεικνύει τη μοναδική ιδιότητα να μιμείται τόσο τις επιδράσεις της αυξίνης όσο και της κυτοκινίνης στην ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση των καλλιεργούμενων εκφύτων, αν και δομικά είναι διαφορετικό τόσο από τις αυξίνες όσο και από τις βασιζόμενες στην πουρίνη κυτοκινίνες (Murthy *et al.*, 1998). Παρόλο που ο τρόπος δράσης του TDZ είναι άγνωστος, αρκετές αναφορές υποδεικνύουν ότι το TDZ μπορεί να δρα μέσω τροποποίησης των ενδογενών άλλες περιλαμβάνουν τροποποίηση στις κυτταρικές μεμβράνες, στα ενεργειακά επίπεδα, στην πρόσληψη ή στην αφομοίωση των θρεπτικών συστατικών (Murthy *et al.*, 1998, Guo *et al.*, 2011).

Το TDZ είναι αποτελεσματικό τόσο μόνο του ή σε συνδυασμό με άλλες φυτορυθμιστικές ουσίες στην πρόκληση των ακόλουθων αναγεννησιακών διαδικασιών στις *in vitro* καλλιέργειες: στο σχηματισμό κάλου (το TDZ έχει βρεθεί να προωθεί το σχηματισμό κάλου σε μια ποικιλία συστημάτων καλλιέργειας φυτών, σε μερικές

περιπτώσεις με ένα ρυθμό πολλαπλασιασμού υψηλότερο από αυτό που αποκτάται με άλλους φυτορρυθμιστές), στην παραγωγή βλαστών (η προώθηση πολλαπλών βλαστών ή σχηματισμού οφθαλμών, η οποία γενικά επιτυγχάνεται καλλιεργώντας έκφυτα σε υπόστρωμα εμπλουτισμένο με σχετικά υψηλά επίπεδα κυτοκινίνης, μπορεί να γίνει χρησιμοποιώντας πολύ χαμηλότερες συγκεντρώσεις του TDZ, ενώ η αναγέννηση των βλαστών συμβαίνει με αποτελεσματικότητα ανάλογη ή μεγαλύτερη από αυτή των άλλων κυτοκινινών), στη σωματική εμβρυογένεση (ο σχηματισμός εμβρυογενετικών ιστών από σωματικά κύτταρα, που συνήθως προωθείται από την αλλαγή είτε των επιπέδων των εξωγενώς εφαρμοζόμενων αυξινών ή της αναλογίας των αυξινών προς τις κυτοκινίνες, μπορεί να παρακινηθεί από το TDZ μόνο του, συχνά σε πολύ υψηλότερο βαθμό από αυτό που αποκτήθηκε προηγουμένως με άλλες φυτορμόνες. Σωματικά έμβρυα έχουν επίσης αναπτυχθεί σε διάφορες θέσεις ολόκληρων σποροφύτων φυτρωμένων σε υποστρώματα με TDZ χωρίς τη λήψη εκφύτων), στην καλλιέργεια πρωτοπλαστών (το TDZ έχει χρησιμοποιηθεί στην αναγέννηση φυτών από πρωτοπλάστες και βρέθηκε πιο αποτελεσματικό και σε μικρότερες δόσεις από άλλες κυτοκινίνες), αλλά και στην in vivo αναγέννηση σε ολόκληρα φυτά εκτός συστημάτων ιστοκαλλιέργειας (Murthy *et al.*, 1998).

Το TDZ έχει βρεθεί αποτελεσματικό *in vitro* σε ένα μεγάλο εύρος συγκεντρώσεων, εξαρτωμένου του είδους, της κατάστασης του εκφύτου και του σκοπού. Σχετικά χαμηλές συγκεντρώσεις (<0.2 mg l⁻¹) μπορούν να επιφέρουν μεγαλύτερο πολλαπλασιασμό από πολλές άλλες κυτοκινίνες, ενώ σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, το TDZ μπορεί να παρακινήσει το σχηματισμό κάλου, τυχαίων βλαστών ή σωματικών εμβρύων. Τα πιο κοινά έκφυτα για τυχαία αναγέννηση των ξυλωδών φυτών με TDZ είναι οι κοτυληδόνες από ώριμους ή ανώριμους σπόρους και ο φυλλικός ιστός από *in vitro* καλλιέργειες (Huetteman and Preece, 1993). Ο αριθμός των βλαστών που παράγονται σε υπόστρωμα που περιέχει TDZ είναι ισοδύναμος ή μεγαλύτερος από τους αριθμούς που σχηματίζονται σε υπόστρωμα με τύπου-πουρίνης κυτοκινίνες (Lu, 1993).

Το TDZ, όμως, μπορεί να προκαλέσει και ανεπιθύμητες παρενέργειες, όπως η παρεμπόδιση της επιμήκυνσης των βλαστών και της ριζοβολίας, η ανώμαλη μορφολογία βλαστών, οι δεσμιωμένοι βλαστοί ή η υπερενυδάτωση (Huetteman and Preece, 1993; Lu, 1993), τα οποία μπορεί να είναι αποτέλεσμα της υψηλής δραστηριότητας του TDZ, της χρήσης επιπέδων TDZ πάνω από το ιδανικό στα υποστρώματα, ή της επιμηκυμένης

παραμονής της ουσίας στους καλλιεργούμενους ιστούς. Προσοχή θα πρέπει να λαμβάνεται όταν το TDZ χρησιμοποιείται για κλωνικό μικροπολλαπλασιασμό γιατί δεν προωθεί μόνο τον πολλαπλασιασμό πλάγιων βλαστών, αλλά και το σχηματισμό κάλου και τυχαίων βλαστών. Το πρόβλημα της παρεμπόδισης της επιμήκυνσης των βλαστών μπορεί να ξεπεραστεί με μεταφορά των καλλιεργειών βλαστών σε δευτερεύον υπόστρωμα χωρίς TDZ ή με διαφορετική ισορροπία φυτορρυθμιστικών ουσιών, μετά από επαρκή χρόνο στο αρχικό υπόστρωμα με TDZ για μεγιστοποίηση του πολλαπλασιασμού των βλαστών. Η χρήση δευτερεύοντος υποστρώματος μετά τον πολλαπλασιασμό μπορεί επίσης να θεραπεύσει τα προβλήματα της σχετιζόμενης με το TDZ υπερενυδάτωσης και να αυξήσει την επιτυχία της ριζοβολίας. Αν και η ριζοβολία των εξαιρούμενων μικροβλαστών μπορεί να είναι δύσκολη εξαιτίας της ‘μεταφερόμενης’ επίδρασης των κυτοκινινών στο υπόστρωμα πολλαπλασιασμού, στα περισσότερα είδη το TDZ δε φαίνεται να παρεμποδίζει το σχηματισμό τυχαίων ριζών σε επικείμενο υπόστρωμα ριζολίας (Huetteman and Preece, 1993).

Το thidiazuron, σε συγκεντρώσεις από 0.0002 mg l⁻¹ έως 2.2 mg l⁻¹, έχει χρησιμοποιηθεί στην προώθηση του πολλαπλασιασμού βλαστών μηλιάς *in vitro* (van Nieuwkerk *et al.*, 1985, 1986, Marin *et al.*, 1993, Erig *et al.*, 2002, Magyar-Tábori *et al.*, 2010), καθώς και στο σχηματισμό τυχαίων βλαστών σε εξαιρεμένα φύλλα από *in vitro* αναπτυσσόμενους βλαστούς ποικιλιών μηλιάς (Fasolo *et al.*, 1989, Sriskandarajah *et al.*, 1990b, Theiler-Hedtrich and Theiler-Hedtrich, 1990, Korban *et al.*, 1992, Pawlicki and Welandar, 1994, JiHyae *et al.*, 1997, Virscek-Marn *et al.*, 1994, 1999), ενώ σε υψηλότερη συγκέντρωση TDZ (5.0 mg l⁻¹) έχει αναφερθεί ισχυρή παρεμπόδιση της οργανογένεσης σε *in vitro* ανεπτυγμένα φύλλα (Montecelli *et al.*, 2000). Ο πολλαπλασιασμός των βλαστών του *Sorbus aucuparia* επίσης παρακινήθηκε από το TDZ σε συγκεντρώσεις από 0.005 mg l⁻¹ έως 0.05 mg l⁻¹ (Chalupa, 1985, 1987, 1992, 2002). Αναγέννηση βλαστών από *in vitro* ανεπτυγμένα φύλλα αχλαδιάς (*Pyrus* sp.) και βάλτου (*Rubus* sp.) έχει επίσης αναφερθεί με τη χρήση του thidiazuron (Chevreau *et al.*, 1989, Leblay *et al.*, 1991, Lane *et al.*, 1998, Caboni *et al.*, 1999) και (Fiola *et al.*, 1990, Swartz *et al.*, 1990, Turk *et al.*, 1994), αντίστοιχα. Στα ξυλώδη είδη *Hibiscus Rosa-sinensis*, *Acer saccharinum* και *Juglans nigra*, το TDZ βρέθηκε πιο αποτελεσματικό από τη BA στο πολλαπλασιασμό των πλάγιων βλαστών (Preece *et al.*, 1987).

5.1.2.4. Γιββερελλίνες

Οι ενδογενείς γιββερελλίνες (GAs) μπορούν να επηρεάσουν ένα μεγάλο αριθμό αναπτυξιακών διαδικασιών, όπως η επιμήκυνση των βλαστών (αυξάνοντας την κυτταρική διαίρεση και επιμήκυνση), η ρύθμιση της μετάβασης από νεανική σε ενήλικη φάση, η προώθηση της ανθοφορίας, ο καθορισμός του φύλου των ανθέων, η προώθηση της ανάπτυξης των καρπών, η παρθενοκαρπία, η ανάπτυξη και το φύτερωμα των σπόρων, η έκπτυξη κοιμώμενων οφθαλμών (Gaspar *et al.*, 1996, Salisbury and Ross, 1992, Taiz and Zeiger, 2006). Στην ιστοκαλλιέργεια, η γιββερελλίνη (GA₃) έχει γενικά χρησιμοποιηθεί για να διεγείρει είτε την επιμήκυνση των βλαστών πριν τη ριζοβολία είτε τη μετατροπή των οφθαλμών σε βλαστούς (Gaspar *et al.*, 1996, Trigiano and Gray, 2005). Κάποιες επιδράσεις της γιββερελλίνης προκαλούνται από αυξήσεις ή μειώσεις στη βιοσύνθεση και τη δραστηριότητα συγκεκριμένων ενζύμων. Όταν οι GAs προστίθενται στα υποστρώματα ιστοκαλλιέργειας, συχνά περιορίζουν ή αποτρέπουν το σχηματισμό ριζών, βλαστών ή σωματικών εμβρύων, αν και το αντίθετο έχει επίσης παρατηρηθεί (Gaspar *et al.*, 1996).

Περίπου 90 φυσικές γιββερελλίνες είναι γνωστές, οι οποίες έχουν πολυάριθμες αλληλεπιδράσεις με άλλες ορμόνες. Για παράδειγμα, η προωθούμενη από τη GA δραστηριότητα της α-αμυλάσης ανταγωνίζεται από το ABA, το αιθυλένιο μπλοκάρει (ή στο ρύζι, προωθεί) την ικανότητα των στελεχών να ανταποκριθούν στις GAs και η GA ανταγωνίζεται τις επιδράσεις προώθησης της γήρανσης των ABA και αιθυλενίου στα φύλλα και τα πέταλα (Gaspar *et al.*, 1996).

5.1.2.5. Αμψισικό οξύ, αιθυλένιο και άλλοι ρυθμιστές ανάπτυξης

Το αμψισικό οξύ (ABA) συχνά θεωρείται ότι είναι ένας παρεμποδιστής, καθώς διατηρεί το λήθαργο των οφθαλμών και των σπόρων, παρεμποδίζει την αυξινο-προωθούμενη χαλάρωση της οξύνισης των κυτταρικών τοιχωμάτων και επιβραδύνει την κυτταρική επιμήκυνση. Το ABA παίζει ένα ρόλο κλειδί στο κλείσιμο των στοματικών πόρων (μειώνοντας την διαπνοή), στον έλεγχο της πρόσληψης νερού και ιόντων από τις ρίζες (μειώνοντας την υδραυλική αγωγιμότητα) και στην προώθηση της αποκοπής των φύλλων και της γήρανσης. Επίσης, είναι σημαντικό στην ωρίμανση των σπόρων, μιας και προτρέπει τη σύνθεση αποθηκευτικών πρωτεϊνών στους αναπτυσσόμενους σπόρους. Το ABA δρα ανταγωνιστικά με τις GAs σε πολλά συστήματα, ενώ μαζί με το αιθυλένιο

(και το τζασμονικό οξύ) βοηθούν στην άμυνα ενάντια στον τραυματισμό από έντομα και εμπλέκονται στενά στην ανταπόκριση των φυτών σε ένα μεγάλο εύρος περιβαλλοντικών καταπονήσεων.

Στην ιστοκαλλιέργεια, το εξωγενώς εφαρμοζόμενο ABA μπορεί να επηρεάσει (γενικά θετικά σε χαμηλές συγκεντρώσεις, ενώ υψηλές συγκεντρώσεις παρεμποδίζουν) την ανάπτυξη του κάλου και την οργανογένεση (οφθαλμούς, ρίζες, έμβρυα). Μερικό ABA είναι απαραίτητο για την ωρίμανση και την ομαλή ανάπτυξη των σωματικών εμβρύων.

Εξαρτωμένου του χρόνου μετά την υποκαλλιέργεια, το αιθυλένιο μπορεί να προωθήσει ή να παρεμποδίσει την ανάπτυξη και οργανογένεση στις *in vitro* καλλιέργειες. Το αιθυλένιο μπορεί να επηρεάσει την ανάπτυξη του κάλου και των εναιωρούμενων καλλιεργειών, την επιμήκυνση των στελεχών και των ριζών, το σχηματισμό πλάγιων και τυχαίων οφθαλμών, τη ριζοβολία και την εμβρυογένεση. Ο ρόλος του αιθυλενίου είναι δύσκολο να γίνει κατανοητός επειδή οι επιδράσεις του ποικίλουν με το στάδιο ανάπτυξης και επειδή χαμηλές συγκεντρώσεις μπορούν να προωθήσουν (ή μερικές φορές να παρεμποδίσουν) μια διαδικασία, ενώ τα υψηλότερα επίπεδα έχουν το αντίθετο αποτέλεσμα. Συχνά υπάρχει μια αυτορυθμιζόμενη ισορροπία μεταξύ φυσικής αυξίνης και επιπέδων αιθυλενίου.

Καθώς το αιθυλένιο παράγεται από τις καλλιέργειες όλων των φυτών συσσωρεύεται στον ανώτερο χώρο των σφραγισμένων δοχείων. Οι καλλιεργούμενοι ιστοί μπορεί να επηρεαστούν από αυτό το αέριο, η παραγωγή του οποίου εξαρτάται από τον τύπο και το βάρος του αναπτυσσόμενου ιστού, τον όγκο του δοχείου καλλιέργειας, τον τρόπο που έχει σφραγιστεί και τις καλλιεργητικές συνθήκες. Οι αυξίνες συνήθως ενεργοποιούν την παραγωγή αιθυλενίου και οι κυτοκινίνες μπορεί να μπλοκάρουν τη δράση του αιθυλενίου, αν και έχει παρατηρηθεί συνεργισμός μεταξύ αυξίνης και κυτοκινίνης στην παραγωγή αιθυλενίου.

Οι πολυαμίνες (PAs) απαιτούν υψηλότερες συγκεντρώσεις για να παράγουν αποτέλεσμα από ότι κάνουν οι πιο παραδοσιακές φυτικές ορμόνες, όμως οι PAs φαίνονται να εμπλέκονται σε ένα μεγάλο εύρος αναπτυξιακών και εξελικτικών φαινομένων, καθώς οι ιστοί που είναι ανεπαρκείς σε PAs είναι ανώμαλοι. Οι πιο κοινές πολυαμίνες είναι η πουτρεσκίνη, η σπερμιδίνη και η σπερμίνη.

Οι ολιγοσακαχαρίνες είναι τεμάχια του κυτταρικού τοιχώματος, τα οποία σε χαμηλές συγκεντρώσεις, ασκούν βιολογικές επιδράσεις στους φυτικούς ιστούς διαφορετικές από τις πηγές άνθρακα ή ενέργειας.

Το σαλικυλικό οξύ (SA) και τα παράγωγά του ανήκουν σε μια μεγάλη ομάδα φυτικών φαινολικών και είναι πιθανά διαδεδομένο στα ανώτερα φυτά.

Πολλά φυσικά τζασμονικά έχουν αναγνωριστεί. Το πλήγωμα και τα παθογόνα μπορούν να προωθήσουν τη σύνθεση τζασμονικού οξέως (JA), το οποίο στη συνέχεια ενεργοποιεί τους γόνους για το σχηματισμό των πρωτεϊνών καταπόνησης.

Μια ποικιλία ουσιών συντεθειμένων από φυτά και μικροοργανισμούς έχουν βρεθεί να διαθέτουν ενεργές ιδιότητες ανάπτυξης, όπως η συστεμίνη, οι στερόλες, τα μπρασσινοστεροΐδη και οι τουργκορίνες.

Η ανάπτυξη των περισσότερων καλλιεργειών *in vitro* βελτιώνεται με την προσθήκη μυοϊνσιτόλης στο υπόστρωμα. Η πλειονότητα της εξωγενούς μυοϊνσιτόλης ενσωματώνεται σε phosphatidylinositol, η οποία θεωρείται πως είναι σημαντικός παράγοντας στη λειτουργία των μεμβρανών.

Τέλος, υπάρχει μεγάλος αριθμός φυσικών χημικών, πολλά μικροβιακής προέλευσης, τα οποία έχουν βρεθεί να προωθούν ή να παρεμποδίζουν διαδικασίες όπως το φύτερωμα των σπόρων και η έναρξη ριζοβολίας σε συγκεντρώσεις 10^{-4} M και κάτω (Gaspar *et al.*, 1996).

5.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

5.2.1. Πολλαπλασιασμός βλαστών σε *in vitro* καλλιέργεια εγκατεστημένη από ενήλικα φυτά

Έκφυτα κόμβου μικροβλαστών, που ελήφθησαν από τις καλλιέργειες που εγκαταστάθηκαν από ενήλικα φυτά το Μάρτιο και Ιούνιο 2004, τον Αύγουστο 2006 και 2009, και το Μάρτιο 2007 και 2010 (κεφάλαιο 4.3.1.), υποκαλλιεργήθηκαν αρκετές φορές στο βασικό υπόστρωμα (MS με 1.0 mg l^{-1} BA/ 0.1 mg l^{-1} IBA) και οι μέσοι όροι των αποτελεσμάτων από 2-8 υποκαλλιέργειες χρησιμοποιήθηκαν για να συγκριθούν οι καλλιέργειες ως προς το δυναμικό πολλαπλασιασμού τους. Για τον ίδιο λόγο υποκαλλιεργήθηκαν στο βασικό υπόστρωμα έκφυτα από τις καλλιέργειες που εγκαταστάθηκαν από διάφορους τύπους εκφύτων (επάκρια έκφυτα από κανονικές

βλαστήσεις και διάφορα έκφυτα από λογχοειδείς βλαστήσεις) το Μάρτιο '10 (κεφάλαιο 4.3.1.2.).

Η καλλιέργεια, που εγκαταστάθηκε το Μάρτιο του 2004 (Μαρτίνη, 2004, Parafotiou and Martini, 2009b) και επέδειξε υψηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού, διατηρήθηκε στο βασικό υπόστρωμα για περισσότερο από πενήντα υποκαλλιέργειες. Από αυτή την καλλιέργεια ελήφθη το υλικό για τα ακόλουθα πειράματα πολλαπλασιασμού βλαστών που ως στόχους είχαν την αύξηση του δυναμικού πολλαπλασιασμού της καλλιέργειας, τη μείωση του προβλήματος της υπερενυδάτωσης των βλαστών και τη λήψη εύρωστων μικροβλαστών για πειράματα ριζοβολίας. Κατά τις υποκαλλιέργειες χρησιμοποιούνταν επάκρια και έκφυτα κόμβου βλαστού, μήκους 0.5 cm περίπου, με 2 συνήθως κόμβους που τοποθετούνταν στο βασικό ή άλλο υπόστρωμα σε γυάλινα δοχεία όγκου 75 ml με κάλυψη πλαστικού φιλμ (στις πρώτες υποκαλλιέργειες), το οποίο αντικαταστάθηκε από τη μεμβράνη sanitas στη συνέχεια.

Έκφυτα βλαστού υποκαλλιεργήθηκαν στο βασικό υπόστρωμα MS με διάφορες συγκεντρώσεις άγαρ (8, 14 ή 20 g l⁻¹), υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ ή μεμβράνης sanitas, με στόχο τον περιορισμό της υπερενυδάτωσης των βλαστών.

Για να διαπιστωθεί εάν από τα έκφυτα του κορυφαίου τμήματος των μικροβλαστών θα πρέπει να αφαιρείται ο επάκριος οφθαλμός ή όχι, εάν τα επάκρια και έκφυτα κόμβου διαφέρουν ως προς το δυναμικό πολλαπλασιασμού τους και αν οι κοντοί βλαστοί θα μπορούσαν να χρησιμοποιούνται ως έκφυτα διακρίθηκαν οι εξής κατηγορίες εκφύτων: επάκρια (επάκριο τμήμα βλαστού με επάκριο οφθαλμό), κορυφαία (κορυφαίο τμήμα βλαστού μετά από αφαίρεση επάκριου οφθαλμού), βασικά (βασικό τμήμα βλαστού) και κοντοί βλαστοί με κορυφαίο μερίστωμα (μήκους 0.3-0.6 cm), τα οποία καλλιεργήθηκαν στο βασικό υπόστρωμα, υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ ή μεμβράνης sanitas.

Έκφυτα βλαστού υποκαλλιεργήθηκαν στο βασικό υπόστρωμα σε διάφορους συνδυασμούς δοχείων καλλιέργειας και υλικών κάλυψης, με στόχο τον περιορισμό του ποσοστού των υπερενυδατωμένων βλαστών και τη διατήρηση υψηλού ρυθμού πολλαπλασιασμού. Δοκιμάστηκαν: α) δοκιμαστικοί σωλήνες όγκου 55 ml, υπό κάλυψη μεμβράνης περιτυλίγματος sanitas (1 έκφυτο/ σωλήνα, 10 ml διάλυμα), β) γυάλινα βάζα όγκου 75 ml, υπό κάλυψη μεμβράνης sanitas ή πλαστικού φιλμ (3 έκφυτα/ βάζο, 20 ml διάλυμα) γ) γυάλινα βάζα όγκου 145 ml, υπό κάλυψη μεμβράνης sanitas ή πλαστικού

καπακιού magenta (3 έκφυτα/ βάζο, 25 ml διάλυμα) και δ) γυάλινα βάζα όγκου 375 ml, υπό κάλυψη μεμβράνης sanitas ή πλαστικού καπακιού (6 έκφυτα/ βάζο, 50ml διάλυμα).

Η επίδραση του θρεπτικού υποστρώματος στον πολλαπλασιασμό των βλαστών εξετάστηκε με την καλλιέργεια εκφύτων βλαστού στα υποστρώματα MS και WPM με 1.0 BA/ 0.1 IBA (mg l^{-1}), σε γυάλινα βάζα όγκου 75 ml υπό κάλυψη μεμβράνης sanitas (3 έκφυτα/ βάζο), σε γυάλινα βάζα όγκου 145 ml με πλαστικό καπάκι magenta (3 έκφυτα/ βάζο) και σε γυάλινα βάζα όγκου 375 ml με πλαστικό καπάκι (6 έκφυτα/ βάζο).

Για να εξεταστεί η επίδραση του thidiazuron (TDZ) στη βλαστογένεση, έκφυτα βλαστού υποκαλλιεργήθηκαν (1^η υποκαλλιέργεια) είτε στο βασικό υπόστρωμα είτε σε υποστρώματα MS με 0.1 ή 0.2 ή 0.5 ή 1.0 ή 2.0 mg l^{-1} TDZ με ή χωρίς αντίστοιχη υποδεκαπλάσια ποσότητα IBA (0.01 ή 0.02 ή 0.05 ή 0.1 ή 0.2 mg l^{-1} IBA) σε βάζα όγκου 75 ml, υπό κάλυψη διαπερατής μεμβράνης sanitas. Στη συνέχεια, βλαστοί μήκους 0.5-0.7 cm, από τα υποστρώματα με 0.1-0.5 mg l^{-1} TDZ με ή χωρίς IBA, καθώς και συσσωματώματα με 2-3 κοντούς βλαστούς, από όλα τα υποστρώματα, υποκαλλιεργήθηκαν (2^η υποκαλλιέργεια) σε MS με 1 BA/ 0.1 IBA ή 0.5 BA/ 0.05 IBA (mg l^{-1}). Ακολούθησε και τρίτη υποκαλλιέργεια στα ανωτέρω υποστρώματα μόνο εκφύτων βλαστού, εκτός από τους βλαστούς που προέρχονταν από το υπόστρωμα με 2.0 mg l^{-1} TDZ, οι οποίοι παρέμειναν πολύ κοντοί και υποκαλλιεργήθηκαν ως συσσωματώματα βλαστών.

Έκφυτα βλαστού επίσης καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS με 0.5 mg l^{-1} BA και 0.05 mg l^{-1} IBA, για να εξετασθεί η επίδραση της μειωμένης συγκέντρωσης BA στο δυναμικό πολλαπλασιασμού, αλλά και για να ληφθούν μικροβλαστοί από μειωμένα επίπεδα κυτοκινίνης για ριζοβολία.

Η επίδραση του ενεργού άνθρακα (AC) στη βλαστογένεση εξετάστηκε με την προσθήκη 2.0 g l^{-1} στο βασικό υπόστρωμα πολλαπλασιασμού των βλαστών.

Έκφυτα βλαστού από τις αρχικές υποκαλλιέργειες στο βασικό υπόστρωμα, υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ, καλλιεργήθηκαν στο βασικό υπόστρωμα με προσθήκη 0.1 ή 0.5 ή 1.0 ή 2.0 mg l^{-1} GA₃, με στόχο την επιμήκυνση και την πρόκληση νεανικότητας στους μικροβλαστούς για βελτίωση επικείμενης ριζοβολίας. Ως μαρτυρας χρησιμοποιήθηκε το βασικό υπόστρωμα χωρίς GA₃.

5.2.2. Πολλαπλασιασμός βλαστών σε *in vitro* καλλιέργεια εγκατεστημένη από αναβλαστήσεις

Οι καλλιέργειες που εγκαταστάθηκαν από αναβλαστήσεις των καμένων φυτών το Μάρτιο, Ιούνιο, Ιούλιο και Αύγουστο 2009, και το Μάρτιο, Απρίλιο, Μάιο και Ιούνιο 2010 (κεφάλαιο 4.3.2.) συγκρίθηκαν ως προς το δυναμικό πολλαπλασιασμού τους υποκαλλιεργώντας έκφυτα βλαστού με δύο συνήθως κόμβους, μήκους 0.5 cm περίπου, στο βασικό υπόστρωμα.

Έκφυτα βλαστού από καλλιέργειες εγκατεστημένες από επάκρια, κορυφαία, μεσαία και βασικά έκφυτα των αναβλαστήσεων τον Ιούνιο και Ιούλιο '09 (κεφάλαιο 4.3.2.1.) υποκαλλιεργήθηκαν αρκετές φορές στο βασικό υπόστρωμα κρατώντας αρχείο για την αρχική θέση των εκφύτων πάνω στις αναβλαστήσεις για να εξετασθεί η επίδραση της θέσης από την οποία προέρχονται τα έκφυτα στον πολλαπλασιασμό των βλαστών. Μετά την τέταρτη υποκαλλιέργεια, τα έκφυτα από τις διάφορες θέσεις αναμίχθηκαν.

Η επίδραση των κυτοκινινών στη βλαστογένεση διερευνήθηκε καλλιεργώντας αρχικά έκφυτα βλαστού σε υποστρώματα MS με BA ή zeatin σε συγκεντρώσεις 0.5 ή 1.0 ή 2.0 ή 4.0 (mg l⁻¹) με ή χωρίς 0.1 mg l⁻¹ IBA, αλλά και σε υπόστρωμα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες ως μάρτυρα. Στη συνέχεια, έκφυτα βλαστού από τα παραπάνω υποστρώματα με 0.5-2.0 mg l⁻¹ BA και 0.1 mg l⁻¹ IBA υποκαλλιεργήθηκαν σε υποστρώματα MS με 0.5 ή 1.0 ή 2.0 ή 4.0 mg l⁻¹ BA ή zeatin ή kinetin ή 2iP και 0.1 mg l⁻¹ IBA.

Επίσης, έκφυτα βλαστού από *in vitro* καλλιέργεια με φτωχό δυναμικό πολλαπλασιασμού, εγκατεστημένη στο βασικό υπόστρωμα από οφθαλμούς του μεσαίου τμήματος των αναβλαστήσεων τον Ιούνιο '09, καλλιεργήθηκαν στο ίδιο υπόστρωμα με προσθήκη σε αυτό 0.1 ή 0.5 mg l⁻¹ GA₃ ή στο μάρτυρα χωρίς GA₃ με στόχο την αύξηση του δυναμικού πολλαπλασιασμού.

5.2.3. Πολλαπλασιασμός βλαστών σε *in vitro* καλλιέργεια εγκατεστημένη από μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια

Επάκρια και έκφυτα κόμβου βλαστού, μήκους 0.5 cm περίπου, που ελήφθησαν από καλλιέργειες εγκατεστημένες από μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια σε υπόστρωμα MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες ή με 1.0 BA/ 0.1 IBA ή 1.0 zeatin/ 0.1 IBA ή 1.0 kinetin/ 0.1 IBA ή 1.0 2iP/ 0.1 IBA ή 1.0 TDZ ή 0.1 TDZ (κεφάλαιο 4.3.3.1.)

υποκαλλιεργήθηκαν όλα για μία φορά στο βασικό, για να εξετασθεί αν το υπόστρωμα εγκατάστασης της καλλιέργειας μπορεί να επιδράσει στον πολλαπλασιασμό των βλαστών κατά την ακόλουθη υποκαλλιέργεια.

5.2.4. Πολλαπλασιασμός βλαστών σε *in vitro* καλλιέργεια εγκατεστημένη από σπορόφυτα

Έκφυτα βλαστού, μήκους 0.3-0.5 cm, από *in vitro* καλλιέργειες εγκατεστημένες από τρία σπορόφυτα (κεφάλαιο 4.3.4.) υποκαλλιεργήθηκαν δύο φορές στο βασικό υπόστρωμα και συγκρίθηκαν ως προς το δυναμικό πολλαπλασιασμού τους.

Στη συνέχεια, έκφυτα βλαστού προερχόμενα από το λίγο πιο παραγωγικό σπορόφυτο καλλιεργήθηκαν στο βασικό υπόστρωμα με προσθήκη σε αυτό 0.1 ή 0.5 mg Γ^1 GA₃ ή στο μάρτυρα χωρίς GA₃ με στόχο την αύξηση του δυναμικού πολλαπλασιασμού.

5.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.3.1. Δυναμικό πολλαπλασιασμού *in vitro* καλλιέργειας προερχόμενης από ενήλικα φυτά

Οι καλλιέργειες που εγκαταστάθηκαν από ενήλικα φυτά βρέθηκαν να διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το δυναμικό πολλαπλασιασμού τους κατά τις υποκαλλιέργειες. Η καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί το Μάρτιο '04 ξεχώρισε σχηματίζοντας τους περισσότερους βλαστούς ανά έκφυτο, ενώ οι υπόλοιπες καλλιέργειες επέδειξαν χαμηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού των βλαστών (Πιν. 18).

Οι καλλιέργειες που εγκαταστάθηκαν το Μάρτιο '10 από διάφορους τύπους εκφύτων επέδειξαν και αυτές χαμηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού, οπότε τα έκφυτα με επάκριο οφθαλμό από κανονική βλάστηση και τα έκφυτα από λογχοειδή βλάστηση με ένα μεγάλο ή με τον ανώτερο οφθαλμό δεν έδωσαν πιο παραγωγική καλλιέργεια. Αν και τα έκφυτα από λογχοειδή βλάστηση με ένα μεγάλο οφθαλμό σχημάτισαν πιο μακριούς βλαστούς από τα άλλα έκφυτα, ο αριθμός των βλαστών ανά έκφυτο ήταν χαμηλός, όπως και στους υπόλοιπους τύπους εκφύτων (Πιν. 19).

Πίνακας 18. Ποσοστό σχηματισμού βλαστών (%), μέσος αριθμός και μέσο μήκος (cm) βλαστών ανά έκφυτο σχηματισθέντων κατά τις υποκαλλιέργειες σε υπόστρωμα MS με 1.0 BA/ 0.1 IBA (mg l⁻¹) από εκφύτα που προέρχονταν από καλλιέργειες εγκατεστημένες από ενήλικα φυτά τους αναγραφόμενους μήνες.

Χρόνος εγκατάστασης <i>in vitro</i> καλλιέργειας	Ποσοστό βλαστών (%)	Αριθμός βλαστών	Μήκος βλαστών (cm)	Αριθμός επαναλήψεων
Μάρτιος '04	90	6.3 a	0.58 bc	n=500
Ιούνιος '04	77	2.6 bc	0.50 abcd	n=13
Αύγουστος '06	92	2.4 b	0.62 ab	n=103
Μάρτιος '07	92	1.6 bc	0.71 a	n=76
Αύγουστος '09	64	1.0 bc	0.36 d	n=14
Μάρτιος '10	83	1.3 c	0.50 cd	n=86
Ανάλυση της διασποράς <i>F</i> =		193.7641**	9.2846**	

** : σημαντικά σε επίπεδο $P=0.01$

Πίνακας 19. Ποσοστό σχηματισμού βλαστών (%), μέσος αριθμός και μέσο μήκος (cm) βλαστών σχηματισθέντων κατά τις υποκαλλιέργειες σε υπόστρωμα MS με 1.0 BA/ 0.1 IBA (mg l⁻¹) από εκφύτα που προέρχονταν από καλλιέργειες εγκατεστημένες από τα αναγραφόμενα έκφυτα, που είχαν συλλεχθεί από ενήλικα φυτά το Μάρτιο '10 (n=3-27).

Προέλευση εκφύτων	Ποσοστό βλαστών (%)	Αριθμός βλαστών	Μήκος βλαστών (cm)
Έκφυτο με επάκριο οφθαλμό κανονικής βλάστησης	75	1.7 a	0.4 b
Έκφυτο με ένα μεγάλο οφθαλμό από λογχοειδή βλάστηση	85	1.3 a	0.6 a
Έκφυτο με ένα μικρό οφθαλμό από λογχοειδή βλάστηση	80	1.4 a	0.4 b
Έκφυτο από λογχοειδή βλάστηση με δύο οφθαλμούς (ανώτερος οφθ.)	100	1.2 a	0.4 b
Έκφυτο από λογχοειδή βλάστηση με δύο οφθαλμούς (κατώτερος οφθ.)	33	1.0 NI	0.3 NI
Ανάλυση της διασποράς		<i>F</i> = 0.5015	<i>F</i> = 7.5688**

** : σημαντικό σε επίπεδο $P=0.01$, NI: δε συμπεριλήφθηκαν στη στατιστική ανάλυση λόγω του πολύ χαμηλού αριθμού εκφύτων που αντέδρασαν

5.3.1.1. Επίδραση συγκέντρωσης άγαρ και υλικού κάλυψης των δοχείων στον περιορισμό της υπερενυδάτωσης

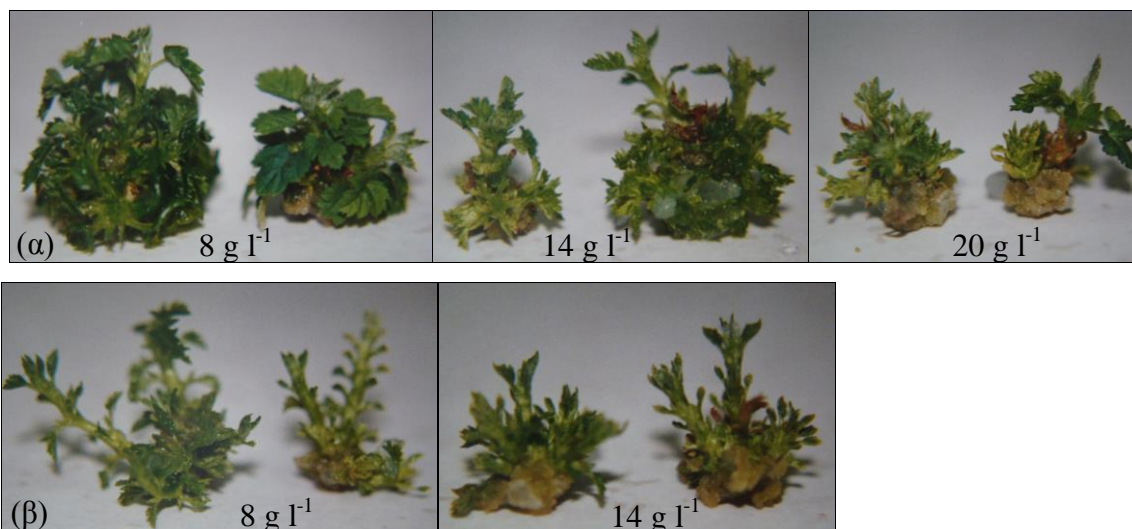
Για να περιοριστούν τα υψηλά ποσοστά υπερενυδατωμένων βλαστών (40-80%) που παρατηρήθηκαν κατά τις υποκαλλιέργειες εκφύτων βλαστού από την καλλιέργεια του Μαρτίου '04 υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ, δοκιμάστηκαν αυξημένες συγκεντρώσεις άγαρ (14 ή 20 g l⁻¹), οι οποίες οδήγησαν μεν σε μείωση του ποσοστού υπερενυδατωμένων βλαστών έχοντας όμως ανεπιθύμητες επιδράσεις στη βλαστογένεση, αφού μειώθηκε ο αριθμός και το μήκος των βλαστών και παρατηρήθηκαν μορφολογικές διαφορές στους βλαστούς (μείωση μεγέθους φύλλων, χλώρωση στην υψηλή συγκέντρωση άγαρ) (Πιν. 20, Εικ. 36α). Αντιθέτως, η κάλυψη των βάζων καλλιέργειας με μεμβράνη sanitas αντί του πλαστικού φιλμ όχι μόνο περιόρισε το ποσοστό υαλωμένων βλαστών αλλά αύξησε και τον αριθμό των παραγόμενων βλαστών (Πιν. 20, Εικ. 36β).

Στις υποκαλλιέργειες που ακολούθησαν το πλαστικό φιλμ αντικαταστάθηκε από μεμβράνη sanitas, ενώ η συγκέντρωση άγαρ διατηρήθηκε στα κανονικά επίπεδα (8 g l⁻¹).

Πίνακας 20. Ποσοστό σχηματισμού βλαστών (%), μέσος αριθμός και μέσο μήκος (cm) βλαστών ανά έκφυτο και ποσοστό υαλωμένων βλαστών (%) κατά την καλλιέργεια εκφύτων από ενήλικο φυτό σε υπόστρωμα με 1.0 BA/ 0.1 IBA (mg l⁻¹) με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις άγαρ και υλικό κάλυψης (n=36-105).

Υλικό κάλυψης	Συγκέντρωση άγαρ (g l ⁻¹)	Ποσοστό βλαστών (%)	Αριθμός βλαστών	Μήκος βλαστών (cm)	Ποσοστό υαλωμ. βλαστών (%)
Πλαστικό φιλμ	8	99	5.1 bc	0.6 a	77
	14	97	4.3 cd	0.6 ab	54
	20	83	3.8 d	0.5 b	0
Μεμβράνη sanitas	8	100	6.7 a	0.6 a	16
	14	100	5.8 ab	0.6 ab	0
Ανάλυση της διασποράς F=			24.7495**	5.1957**	

** : σημαντικά σε επίπεδο P=0.01



Εικόνα 36. Χαρακτηριστική αντίδραση εκφύτων από ενήλικο φυτό κατά την καλλιέργεια σε υπόστρωμα MS με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις άγαρ και 1.0 BA/ 0.1 IBA (mg l⁻¹) υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ (α) ή μεμβράνης sanitas (β).

5.3.1.2. Επίδραση τύπου εκφύτου στον πολλαπλασιασμό των βλαστών

Όλοι οι τύποι εκφύτων σχημάτισαν βλαστούς σε υψηλό ποσοστό. Τα κορυφαία έκφυτα από τα οποία είχε αφαιρεθεί ο επάκριος σχημάτισαν περισσότερους βλαστούς ανά έκφυτο, σε βάρος όμως του μήκους των βλαστών που ήταν χαμηλότερο (Πιν. 21).

Όταν εξετάστηκαν οι βλαστοί που είχαν μήκος μεγαλύτερο από 0.6 cm, οι οποίοι ενδιαφέρουν επειδή μπορούν να χρησιμοποιηθούν τόσο για ριζοβολία (όταν είναι μεγαλύτεροι από 0.8 cm) όσο και στις υποκαλλιέργειες δίνοντας περισσότερα του ενός έκφυτα, τα έκφυτα δε βρέθηκαν να διαφέρουν ως προς τη βλαστογένεση. Έκφυτα που είχαν δώσει μικρότερο συνολικό αριθμό βλαστών παρουσίασαν υψηλότερο ποσοστό βλαστών με μήκος μεγαλύτερο από 0.6 cm επί του συνόλου των βλαστών με αποτέλεσμα να παράγουν ίσο αριθμό μακρών βλαστών που δε διέφεραν ως προς το μέσο μήκος τους (Πιν. 21).

Αφού γενικά δε βρέθηκαν διαφορές στην αντίδραση των εκφύτων, στις υποκαλλιέργειες που ακολούθησαν χρησιμοποιούνταν όλοι οι τύποι εκφύτων χωρίς να αφαιρείται ο επάκριος οφθαλμός από τα κορυφαία έκφυτα, ενώ οι καλύτεροι βλαστοί, μήκους 1.0-2.0 cm, επιλέγονταν για ριζοβολία.

Πίνακας 21. Ποσοστό σχηματισμού βλαστών (%), μέσος αριθμός και μέσο μήκος (cm) βλαστών ανά έκφυτο, ποσοστό (%), μέσος αριθμός και μέσο μήκος (cm) βλαστών μήκους μεγαλύτερου των 0.6 cm και ποσοστό (%) υαλωμένων βλαστών κατά την καλλιέργεια των αναγραφόμενων τύπων εκφύτου από ενήλικο φυτό σε υπόστρωμα MS με 1.0 BA/ 0.1 IBA (mg Γ⁻¹) (n=30-120).

Τύπος εκφύτου	Ποσοστό βλαστών (%)	Αριθμός βλαστών	Μήκος βλαστών (cm)	Ποσοστό (%) βλ. μ>0.6cm	Αριθμός βλαστών μ>0.6cm	Μήκος βλαστών μ>0.6cm
Επάκρια	92	5.7 b	0.5 ab	34	2.3 a	0.8 ab
Κορυφαία	92	6.3 a	0.5 b	31	2.3 a	0.8 ab
Βασικά	96	5.6 b	0.6 a	37	2.4 a	0.9 a
Κοντοί Βλαστοί	100	5.4 b	0.6 ab	38	2.2 a	0.8 b
Ανάλυση της διασποράς						
	<i>F</i> =	5.6543**	6.3219**		0.3679 ^{NS}	3.0207*

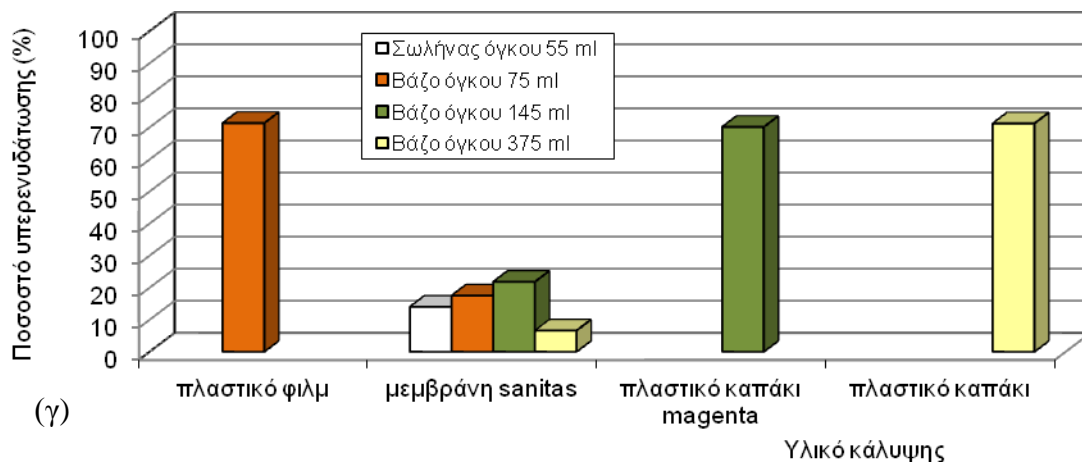
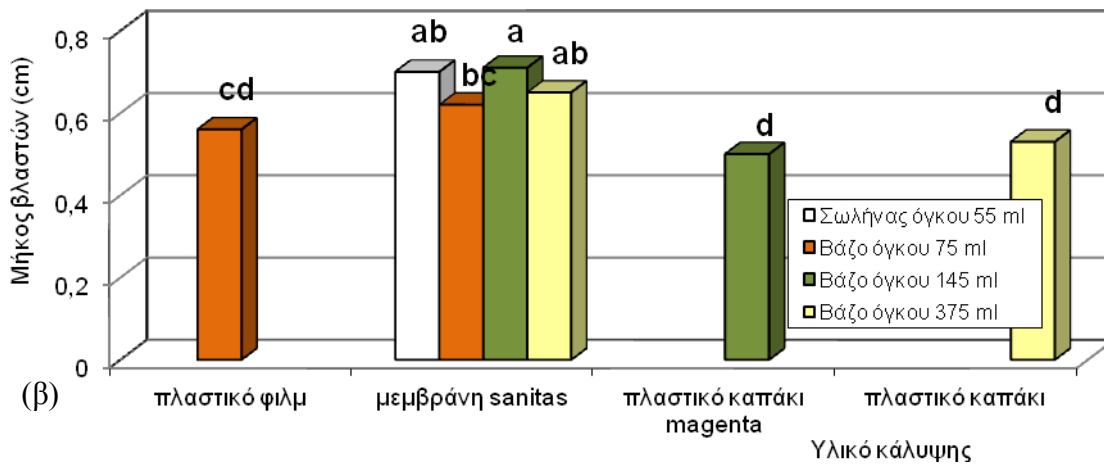
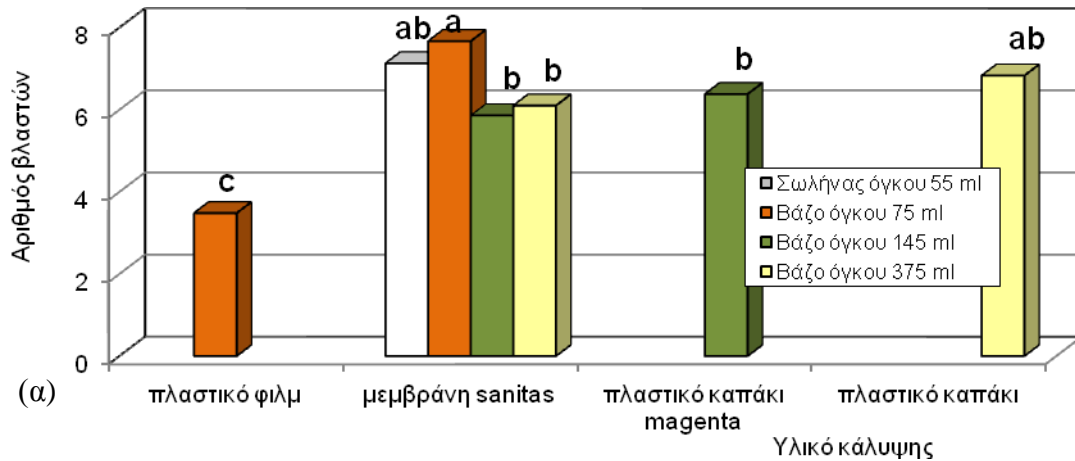
*, **: σημαντικά σε επίπεδο $P=0.05$ και $P=0.01$, αντίστοιχα. NS: μη σημαντικά σε επίπεδο $P=0.05$

5.3.1.3. Επίδραση μεγέθους δοχείου καλλιέργειας και υλικού κάλυψης στον πολλαπλασιασμό βλαστών

Το ποσοστό σχηματισμού βλαστών έφτασε το 100%, με εξαίρεση τα έκφυτα που καλλιεργήθηκαν σε βάζα 75 ml υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ που σχημάτισαν βλαστούς σε ποσοστό 83%.

Όταν τα έκφυτα βλαστού υποκαλλιεργήθηκαν σε βάζα 75 ml υπό κάλυψη μεμβράνης sanitas παρατηρήθηκε εντυπωσιακή αύξηση του αριθμού των βλαστών συγκριτικά με την κάλυψη πλαστικού φιλμ, ενώ στα βάζα όγκου 145 και 375 ml, η μεμβράνη sanitas και το πλαστικό καπάκι δε διέφεραν ως προς τον αριθμό των βλαστών (Σχ. 14α, Εικ. 37). Όταν η κάλυψη έγινε με μεμβράνη sanitas, στα βάζα όγκου 75 ml και στους σωλήνες όγκου 55 ml σχηματίστηκαν περισσότεροι βλαστοί από ότι στα βάζα όγκου 145 και 375 ml (Σχ. 14α, Εικ. 37β).

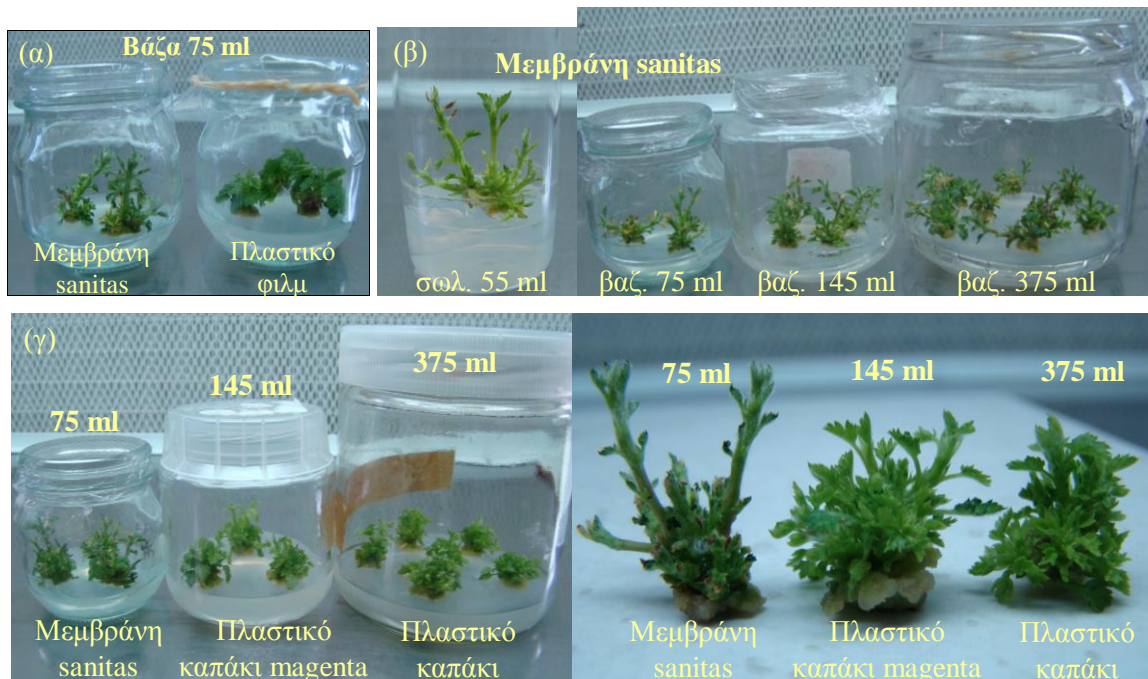
Το μήκος των βλαστών ήταν μεγαλύτερο με την κάλυψη μεμβράνης sanitas σε όλα τα δοχεία καλλιέργειας σε σύγκριση με το πλαστικό φιλμ ή το πλαστικό καπάκι (Σχ. 14β, Εικ. 37α, γ).



Σχήμα 14. Μέσο αριθμός βλαστών (α) και μέσο μήκος βλαστών (cm) ανά έκφυτο (β), καθώς και ποσοστό (%) υπερενυδατωμένων βλαστών (γ) κατά την υποκαλλιέργεια εκφύτων από ενήλικο φυτό στο υπόστρωμα MS με 1.0 BA/ 0.1 IBA (mg l⁻¹) στα αναγραφόμενα δοχεία και υλικά κάλυψης (n=25-84).

(*F*_{αρ.βλαστών}=17.1640**, *F*_{μηκ.βλαστών}=14.9591**, όπου ** σημαντικό σε επίπεδο *P*=0.01)

Η υπερενυδάτωση των βλαστών περιορίστηκε όταν τα δοχεία καλλιέργειας καλύφθηκαν με μεμβράνη sanitas, ενώ το πλαστικό φιλμ και το πλαστικό καπάκι οδήγησαν σε υψηλά ποσοστά υπερενυδάτωσης (Σχ. 14γ, Εικ. 37α, γ). Στα βάζα 75 ml που καλύφθηκαν με πλαστικό φιλμ σχηματίστηκαν βλαστοί με καλύτερα ανεπτυγμένο το έλασμα των φύλλων σε σύγκριση με τη μεμβράνη sanitas (Εικ. 37α), όμως ήταν υπερενυδατωμένοι σε υψηλότερο ποσοστό (Σχ. 14γ).



Εικόνα 37. Χαρακτηριστική αντίδραση εκφύτων από ενήλικο φυτό κατά την υποκαλλιέργεια σε βάζα 75 ml υπό κάλυψη μεμβράνης sanitas ή πλαστικού φιλμ (α), σε διάφορα δοχεία καλλιέργειας υπό κάλυψη μεμβράνης sanitas (β) και στους αναγραφόμενους συνδυασμούς βάζων και υλικών κάλυψης (γ).

5.3.1.4. Επίδραση των θρεπτικών υποστρωμάτων MS και WPM στον πολλαπλασιασμό βλαστών

Ο τρόπος όμως που επέδρασε το θρεπτικό υπόστρωμα στον πολλαπλασιασμό των βλαστών διέφερε ανάλογα με το δοχείο καλλιέργειας. Έτσι, στα βάζα όγκου 75 ml με κάλυψη μεμβράνης sanitas μπορεί να σχηματίστηκαν περισσότεροι βλαστοί ανά έκφυτο στο WPM συγκριτικά με το MS, όμως τα υποστρώματα δε διέφεραν ως προς τον αριθμό των βλαστών με μήκος μεγαλύτερο από 0.6 cm, ενώ το μέσο μήκος αυτών των βλαστών

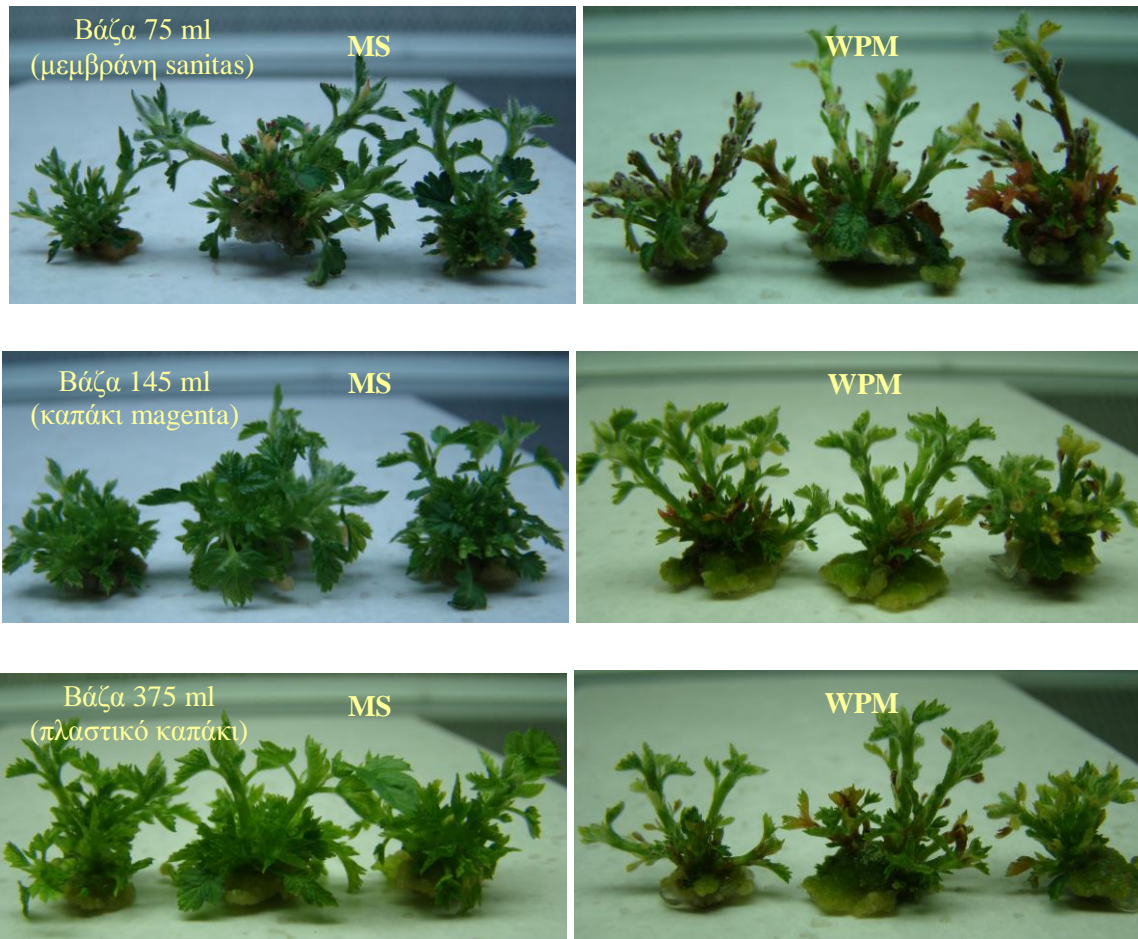
βρέθηκε μεγαλύτερο στο MS. Επίσης, στο WPM το ποσοστό υπερενυδατωμένων βλαστών ήταν μεγαλύτερο από ότι στο MS, ενώ παρατηρήθηκαν μικρότερα φύλλα, κοκκίνισμα κάποιων βλαστών και κιτρίνισμα ή ξήρανση των φύλλων, τα οποία πιθανά αποτελούν ένδειξη stress ή ελλείψεως κάποιων θρεπτικών στοιχείων (Πιν. 22, Εικ. 38). Αντίθετα, στα βάζα όγκου 145 και 375 ml με πλαστικό καπάκι, το WPM ήταν ξεκάθαρα ανώτερο από το MS δίνοντας υψηλότερο αριθμό και μήκος βλαστών και χαμηλότερο ποσοστό υπερενυδατωμένων βλαστών, ενώ τα συμπτώματα stress ήταν λιγότερο έντονα (Πιν. 22, Εικ. 38).

Όπως αιτιολογείται στο προηγούμενο κεφάλαιο (5.3.1.3.), για την καλλιέργεια των εκφύτων επιλέχθηκαν τα βάζα όγκου 75 ml με τη μεμβράνη sanitas και σε αυτά το MS ήταν καλύτερο του WPM γιατί οδήγησε μεν στην παραγωγή λιγότερων βλαστών, αλλά ο αριθμός των μακριών βλαστών δε διέφερε, το μήκος των μακριών βλαστών ήταν μεγαλύτερο στο MS και οι βλαστοί υγιείς χωρίς ξηράνσεις ή κοκκίνισμα.

Πίνακας 22. Ποσοστό σχηματισμού βλαστών (%), μέσος αριθμός και μέσο μήκος (cm) βλαστών ανά έκφυτο, ποσοστό (%), μέσος αριθμός και μέσο μήκος (cm) βλαστών μήκους μεγαλύτερου των 0.6 cm και ποσοστό (%) υαλωμένων βλαστών κατά την καλλιέργεια εκφύτων από ενήλικο φυτό στα αναγραφόμενα δοχεία καλλιέργειας και θρεπτικά υποστρώματα με 1.0 BA/ 0.1 IBA (mg l^{-1}) ($n=40-80$).

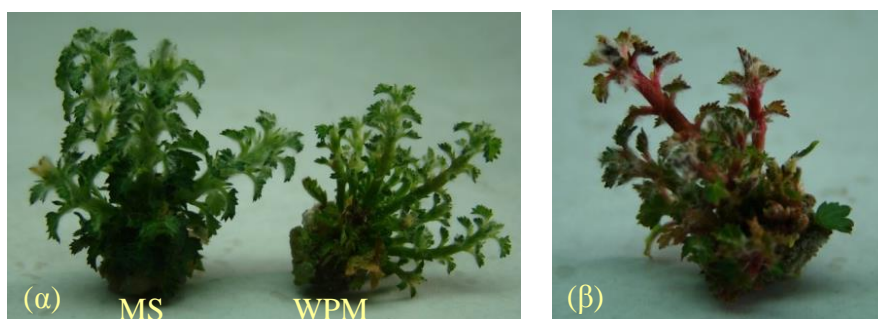
Δοχείο καλ./ Υλικό κάλυψης	Θρεπ. υποστρ. καλ.	Ποσοστό βλαστών (%)	Αριθμός βλαστών	Μήκος βλαστών (cm)	Ποσοστό (%) βλ. >0.6cm	Αριθμός βλαστών >0.6cm	Μήκος βλαστών >0.6cm	Ποσοστό (%) υαλωμ. βλαστών
Βαζ.75ml (Μεμβράνη sanitas)	MS	100	8.9 b	0.6 a	44	3.9 b	1.0 a	23
	WPM	100	9.9 a	0.6 a	42	4.2 ab	0.9 b	34
Βαζ.145ml (Καπάκι magenta)	MS	100	7.2 c	0.4 b	17	1.9 c	0.7 c	88
	WPM	100	9.1 ab	0.7 a	52	4.8 a	0.9 bc	53
Βαζ.375ml (Πλαστικό καπάκι)	MS	100	7.2 c	0.5 b	24	2.2 c	0.8 bc	96
	WPM	98	8.2 bc	0.7 a	47	4.1 ab	0.9 ab	52
Ανάλυση της διασποράς								
$F=$			14.4495**	25.9746**		20.7195**	7.5041**	

** : σημαντικά σε επίπεδο $P=0.01$



Εικόνα 38. Χαρακτηριστική αντίδραση εκφύτων από ενήλικο φυτό κατά την καλλιέργεια στα θρεπτικά υποστρώματα MS και WPM με 1.0 BA/ 0.1 IBA (mg l^{-1}) στους αναγραφόμενους συνδυασμούς βάζων και υλικών κάλυψης.

Έκφυτα βλαστού προερχόμενα από αναβλαστήσεις επίσης σχημάτισαν περισσότερους βλαστούς (σχεδόν διπλάσιους στον αριθμό) στο υπόστρωμα WPM συγκριτικά με το MS, ενώ το μήκος τους ήταν μεγαλύτερο στο MS (Πιν. 23, Εικ. 39α). Πάλι, οι βλαστοί που παράχθηκαν στο WPM εμφάνισαν έντονα συμπτώματα κοκκινίσματος ή ξηράνσεις φύλλων (Εικ. 39β).



Εικόνα 39. Χαρακτηριστική αντίδραση κατά την καλλιέργεια εκφύτων από αναβλαστήσεις στα αναγραφόμενα θρεπτικά υποστρώματα με 1.0 BA/ 0.1 IBA (mg l^{-1}) (α) και έντονο κοκκίνισμα βλαστών παραγόμενων στο WPM (β).

Πίνακας 23. Ποσοστό σχηματισμού βλαστών (%), μέσος αριθμός και μέσο μήκος (cm) βλαστών ανά έκφυτο, και ποσοστό (%) υαλωμένων βλαστών κατά την καλλιέργεια εκφύτων από αναβλαστήσεις στα αναγραφόμενα θρεπτικά υποστρώματα με 1.0 BA/ 0.1 IBA (mg l^{-1}) ($n=30$).

Δοχείο καλλιέργειας/ Υλικό κάλυψης	Θρεπτικό υπόστρωμα	Ποσοστό βλαστών (%)	Αριθμός βλαστών	Μήκος βλαστών (cm)	Ποσοστό (%) υαλωμένων βλαστών
Βάζα 75ml (Μεμβράνη sanitas)	MS	100	6.0 b	1.0 a	6
	WPM	100	11.2 a	0.8 b	21
Ανάλυση της διασποράς $F=$			79.4894**	35.4811**	

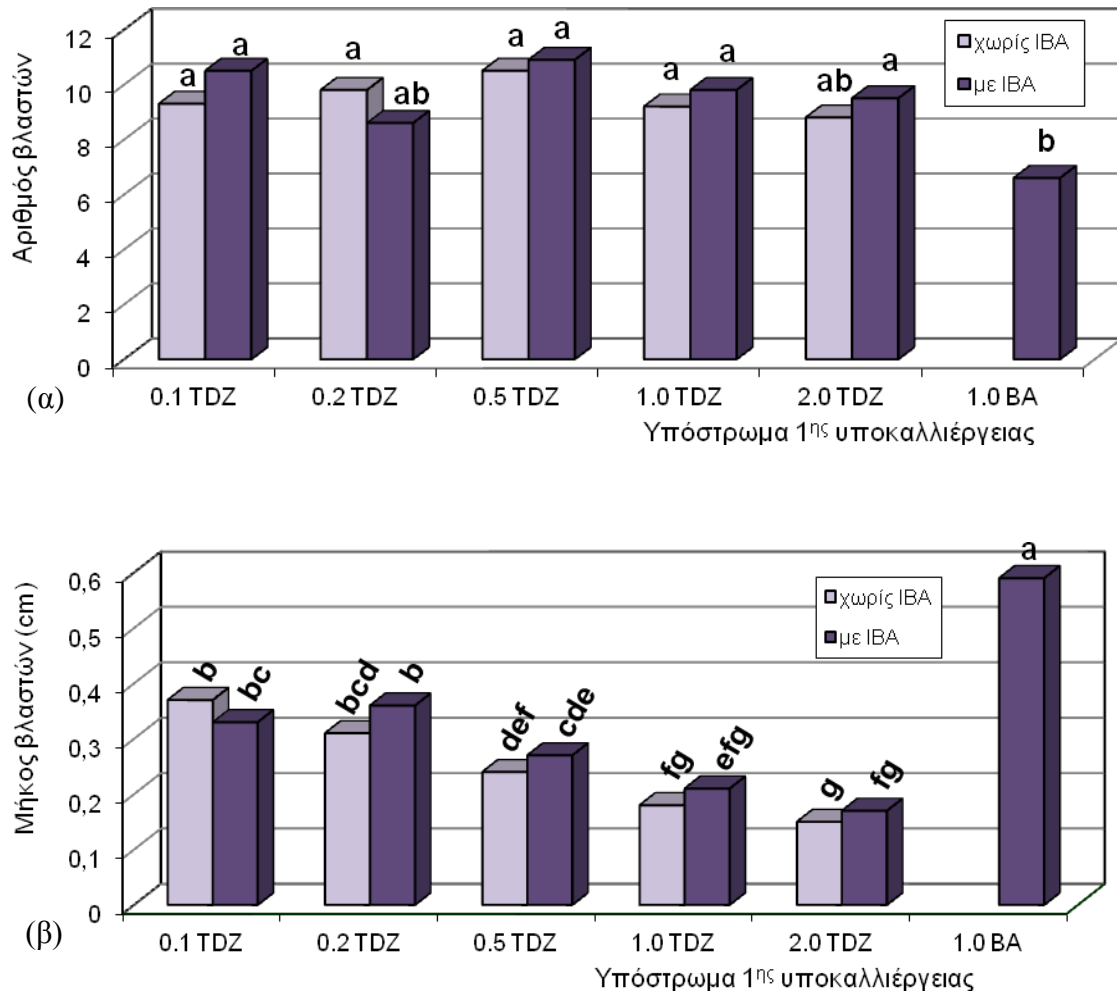
** : σημαντικά σε επίπεδο $P=0.01$

5.3.1.5. Επίδραση του thidiazuron στον πολλαπλασιασμό των βλαστών

Πρώτη υποκαλλιέργεια

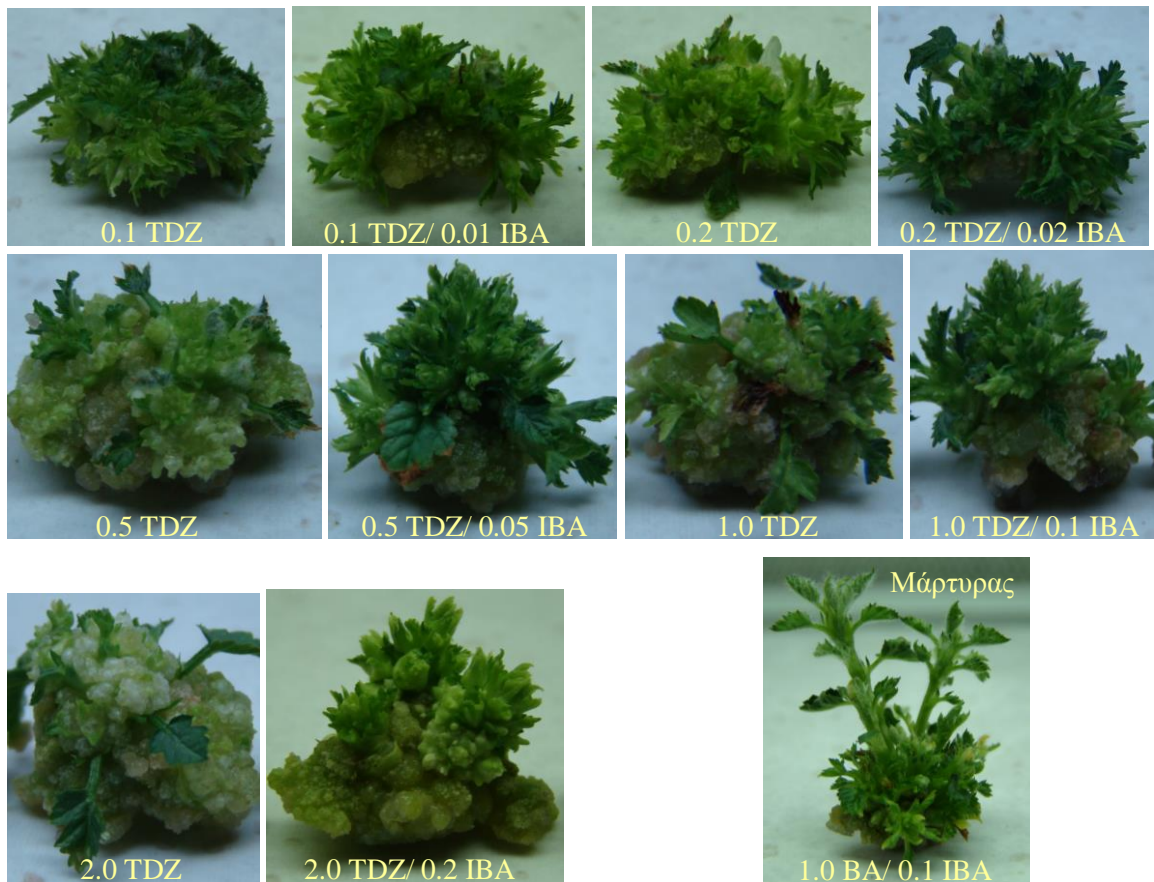
Το ποσοστό έκπτυξης βλαστών γενικά ήταν υψηλό (94-100%) κατά την πρώτη υποκαλλιέργεια. Στα υποστρώματα με TDZ σχηματίστηκαν περισσότεροι βλαστοί ανά έκφυτο συγκριτικά με αυτό που περιείχε BA (μάρτυρας) (Σχ. 15α, Εικ. 40), ενώ η επιμήκυνση των βλαστών παρεμποδίστηκε (Σχ. 15β, Εικ. 40). Η σταδιακή αύξηση της συγκέντρωσης του TDZ προκάλεσε αναλογική μείωση του μήκους των βλαστών, που περιγράφεται από την ακόλουθη εξίσωση 2^{ου} βαθμού: Μήκος βλαστών = $0.3312025 - 0.1493157 \cdot \text{TDZ} + 0.0851326 \cdot (\text{TDZ} - 0.76867)^2$ ($R^2=0.719315$), καθώς και αύξηση του

κάλου ανάμεσα στους βλαστούς, χωρίς αξιόλογη μεταβολή του αριθμού των βλαστών. Η προσθήκη IBA στο υπόστρωμα δεν επέδρασε στον αριθμό και το μήκος των βλαστών (Σχ. 15), ενώ αύξησε την ποσότητα του σχηματιζόμενου κάλου. Τα ποσοστά υπερενυδατωμένων βλαστών ήταν χαμηλά (0-16 %) κατά την πρώτη υποκαλλιέργεια.



Σχήμα 15. Μέσος αριθμός (α) και μέσο μήκος (cm) (β) βλαστών ανά έκφυτο από ενήλικο φυτό κατά την 1^η υποκαλλιέργεια σε υποστρώματα με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις TDZ και BA (mg l^{-1}) με ή χωρίς IBA ($n=24$).

($F_{\text{αρ.βλαστών}}=5.6504^{**}$, $F_{\text{μηκ.βλαστών}}=82.8484^{**}$, όπου ** σημαντικό σε επίπεδο $P=0.01$)



Εικόνα 40. Χαρακτηριστική αντίδραση εκφύτων βλαστού από ενήλικο φυτό κατά την 1^η υποκαλλιέργεια στα αναγραφόμενα υποστρώματα με TDZ με ή χωρίς IBA και στο μάρτυρα με BA και IBA (mg l^{-1}).

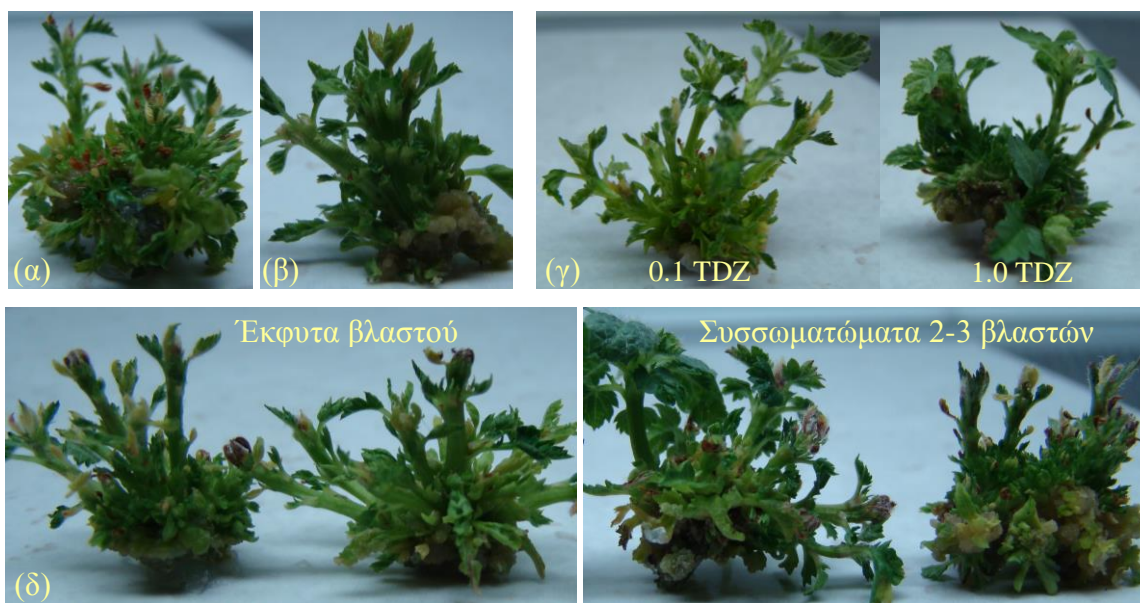
Δεύτερη υποκαλλιέργεια

Στη δεύτερη υποκαλλιέργεια εκφύτων από TDZ σε υπόστρωμα με BA, παράχθηκαν επιμηκυμένοι βλαστοί, οι οποίοι όμως ήταν υαλωμένοι (Εικ. 41α) ή παραμορφωμένοι (Εικ. 41β) σε υψηλό ποσοστό (Πιν. 24). Τα έκφυτα από χαμηλές συγκεντρώσεις TDZ (0.1 και 0.2 mg l^{-1}) και αυτά από BA (μάρτυρα) είχαν παρόμοια αντίδραση σχηματίζοντας λιγότερους και μακρύτερους βλαστούς συγκρινόμενα με τα έκφυτα από υψηλές συγκεντρώσεις TDZ (0.5, 1.0 και 2.0 mg l^{-1}) (Πιν. 24, Εικ. 41γ).

Πίνακας 24. Ποσοστό σχηματισμού βλαστών (%), μέσος αριθμός και μέσο μήκος (cm) βλαστών ανά έκφυτο και ποσοστό υαλωμένων ή παραμορφωμένων βλαστών (%) που σχηματίστηκαν κατά τη 2^η υποκαλλιέργεια σε υπόστρωμα με BA και IBA από εκφύτα από ενήλικο φυτό που προέρχονταν από τα αναγραφόμενα υποστρώματα (mg l^{-1}) ($n=30-120$).

Υπόστρωμα 1 ^{ης} υποκαλλιέργειας	Ποσοστό βλαστών (%)	Αριθμός βλαστών	Μήκος βλαστών (cm)	Ποσοστό υαλωμένων ή παραμορφωμένων βλαστών (%)
0.1 TDZ \pm IBA	97	7.5 c	0.7 a	81
0.2 TDZ \pm IBA	100	8.3 c	0.6 b	88
0.5 TDZ \pm IBA	100	10.6 b	0.5 c	96
1.0 TDZ \pm IBA	100	10.6 b	0.5 c	98
2.0 TDZ \pm IBA	100	14.5 a	0.3 d	100
1.0 BA/ 0.1 IBA	100	6.9 c	0.6 b	34
Ανάλυση της διασποράς $F=$		55.9944**	58.7555**	

** : σημαντικά σε επίπεδο $P=0.01$



Εικόνα 41. Υαλωμένοι οι κοντύτεροι βλαστοί (α) και παραμορφωμένοι (δεσμιωμένοι) βλαστοί (β). Χαρακτηριστική αντίδραση εκφύτων βλαστού από ενήλικο φυτό προερχόμενων από χαμηλή και υψηλή συγκέντρωση TDZ (γ) και έκφυτων βλαστού και συσσωματωμάτων 2-3 βλαστών κατά τη 2^η υποκαλλιέργεια σε υπόστρωμα με BA (δ).

Τα συσσωματώματα βλαστών έδωσαν περισσότερους βλαστούς ανά έκφυτο συγκριτικά με τα έκφυτα βλαστού, όμως οι βλαστοί αυτοί ήταν κοντύτεροι και το ποσοστό υαλωμένων ή παραμορφωμένων βλαστών υψηλότερο (Πιν. 25, Εικ. 41δ).

Εκτιμώντας την επίδραση των υποστρωμάτων 2^{ns} υποκαλλιέργειας, τα έκφυτα που υποκαλλιεργήθηκαν στο υπόστρωμα με 1.0 BA και 0.1 IBA σχημάτισαν περισσότερους βλαστούς από τα έκφυτα στο υπόστρωμα με 0.5 BA και 0.05 IBA (mg l⁻¹), χωρίς όμως να διαφέρουν ως προς το μέσο μήκος των σχηματιζόμενων βλαστών (Πιν. 26).

Πίνακας 25. Ποσοστό σχηματισμού βλαστών (%), μέσος αριθμός και μέσο μήκος (cm) βλαστών ανά έκφυτο και ποσοστό υαλωμένων ή παραμορφωμένων βλαστών (%) που σχηματίστηκαν από έκφυτα από ενήλικο φυτό προερχόμενα μόνο από TDZ κατά τη 2^η υποκαλλιέργεια σε υπόστρωμα με BA και IBA από τους αναγραφόμενους τύπους εκφύτων (n=30-120).

Τύπος εκφύτου 2 ^{ns} υποκαλλιέργειας	Ποσοστό βλαστών (%)	Αριθμός βλαστών	Μήκος βλαστών (cm)	Ποσοστό υαλωμένων ή παραμορφωμένων βλαστών (%)
Βλαστοί μήκους 0.5-0.7 cm	99	7.4 b	0.6 a	81
Συσσωματώματα με 2-3 βλαστούς	100	10.8 a	0.5 b	96
Ανάλυση της διασποράς F=		92.1703**	59.5754**	

** : σημαντικά σε επίπεδο P=0.01

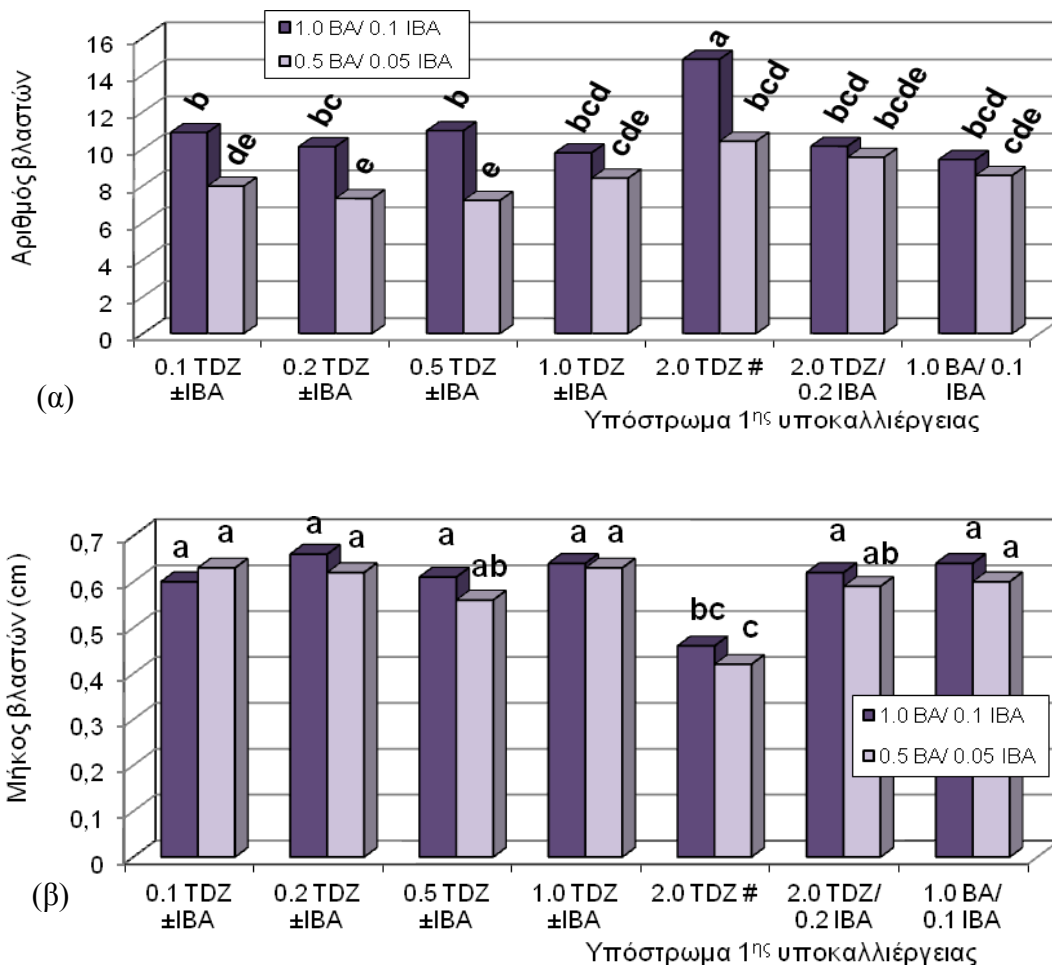
Πίνακας 26. Ποσοστό σχηματισμού βλαστών (%), μέσος αριθμός και μέσο μήκος (cm) βλαστών ανά έκφυτο και ποσοστό υαλωμένων ή παραμορφωμένων βλαστών (%) που σχηματίστηκαν από έκφυτα από ενήλικο φυτό προερχόμενα μόνο από TDZ κατά τη 2^η υποκαλλιέργεια στα αναγραφόμενα υπόστρωμα με BA και IBA (mg l⁻¹) (n=221-227).

Υπόστρωμα 2 ^{ns} υποκαλλιέργειας	Ποσοστό βλαστών (%)	Αριθμός βλαστών	Μήκος βλαστών (cm)	Ποσοστό υαλωμένων ή παραμορφωμένων βλαστών (%)
0.5 BA/ 0.05 IBA	99	9.1 b	0.6 a	92
1.0 BA/ 0.1 IBA	99	10.2 a	0.6 a	92
Ανάλυση της διασποράς F=		8.6855**	0.1034 ^{NS}	

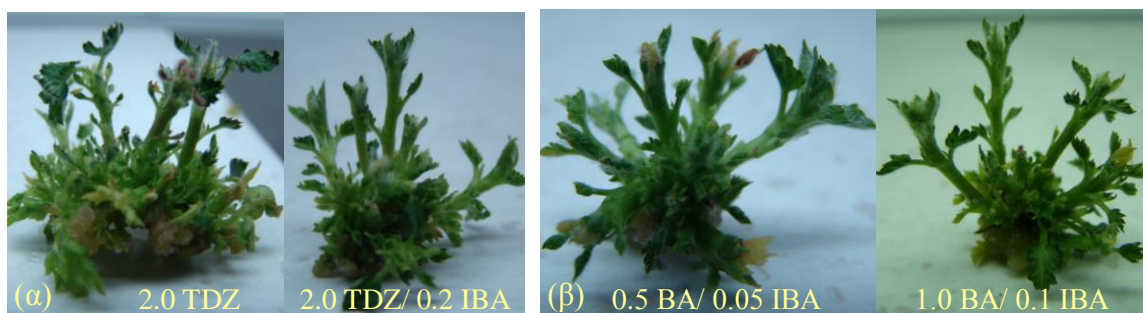
** : σημαντικό σε επίπεδο P=0.01, NS: μη σημαντικό σε επίπεδο P=0.05

Τρίτη υποκαλλιέργεια

Κατά την 3^η υποκαλλιέργεια εκφύτων βλαστού σε υπόστρωμα με BA, η δράση του TDZ στη βλαστογένεση περιορίστηκε, αφού τα έκφυτα από όλες τις συγκεντρώσεις TDZ και αυτά από το μάρτυρα με BA δε διέφεραν πλέον ως προς την αντίδρασή τους (Σχ. 16). Τα συσσωματώματα βλαστών από το υπόστρωμα με 2.0 mg l⁻¹ TDZ έδωσαν περισσότερους βλαστούς από τους μικροβλαστούς από τα άλλα υποστρώματα, οι οποίοι όμως ήταν κοντότεροι (Σχ. 16, Εικ. 42α).



Σχήμα 16. Μέσος αριθμός (α) και μέσο μήκος (cm) (β) βλαστών ανά έκφυτο που παράχθηκαν όταν μικροβλαστοί (εξαιρέση #: συσσωματώματα 2-3 βλαστών) προερχόμενοι από τα υποστρώματα με TDZ ή BA υποκαλλιεργήθηκαν (3^η υποκαλ.) σε υπόστρωμα με BA/ IBA στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις (mg l⁻¹) (n=15-30). (F_{αρ.βλαστών}=12.9952**, F_{μηκ.βλαστών}=6.7007**, όπου ** σημαντικό σε επίπεδο P=0.01)



Εικόνα 42. Χαρακτηριστική αντίδραση κατά τη 3^η υποκαλλιέργεια συσσωματωμάτων βλαστών προερχόμενων από 2.0 TDZ και εκφύτων βλαστού προερχόμενων από 2.0 TDZ/ 0.2 IBA (α), καθώς και εκφύτων βλαστού που υποκαλλιεργήθηκαν στα αναγραφόμενα υποστρώματα με BA και IBA (mg l^{-1}) (β).

Όσον αφορά τα υποστρώματα υποκαλλιέργειας, ο μέσος αριθμός των βλαστών ανά έκφυτο ήταν και πάλι μεγαλύτερος στο υπόστρωμα με 1.0 BA/ 0.1 IBA συγκριτικά με το 0.5 BA/ 0.05 IBA (mg l^{-1}) (Σχ. 17α, Πιν. 27, Εικ. 42β). Το μήκος των βλαστών βρέθηκε οριακά μεγαλύτερο επίσης στο υπόστρωμα με 1.0 BA/ 0.1 IBA (mg l^{-1}), μόνο όταν εκτιμήθηκε συνολικά η αντίδραση των εκφύτων ανεξάρτητα από το υπόστρωμα 1^{ης} υποκαλλιέργειας (Σχ. 17β, Πιν. 27). Το ποσοστό υαλωμένων ή παραμορφωμένων βλαστών διατηρήθηκε σε μέτριο επίπεδο με τους κοντύτερους βλαστούς κυρίως να είναι υαλωμένοι και ήταν υψηλότερο στο υπόστρωμα με 0.5 BA/ 0.05 IBA (mg l^{-1}) (Πιν. 27).

Πίνακας 27. Μέσος αριθμός και μέσο μήκος (cm) βλαστών ανά έκφυτο από ενήλικο φυτό κατά την 3^η υποκαλλιέργεια στα αναγραφόμενα υπόστρωμα με BA και IBA (mg l^{-1}) ($n=175-179$).

Υπόστρωμα 3 ^{ης} υποκαλλιέργειας	Ποσοστό βλαστών (%)	Αριθμός βλαστών	Μήκος βλαστών (cm)	Ποσοστό υαλωμένων ή παραμορφωμένων βλαστών (%)
0.5 BA/ 0.05 IBA	100	8.2 b	0.59 b	57
1.0 BA/ 0.1 IBA	100	10.5 a	0.62 a	44
Ανάλυση της διασποράς $F=$		71.5651**	4.2163*	

*, **: σημαντικά σε επίπεδο $P=0.05$ και $P=0.01$, αντίστοιχα.

5.3.1.6. Επίδραση της μειωμένης συγκέντρωσης BA/ IBA στον πολλαπλασιασμό βλαστών

Μειώνοντας τις συγκεντρώσεις BA και IBA στο μισό από αυτές του βασικού υποστρώματος παρατηρήθηκε μείωση του αριθμού και του μήκους των βλαστών, ενώ παράλληλα αυξήθηκε λίγο το ποσοστό υπερευδατωμένων βλαστών. Οι αριθμός των βλαστών με μήκος μεγαλύτερο από 0.6 cm επίσης ήταν μειωμένος στο υπόστρωμα με 0.5 BA/ 0.05 IBA συγκριτικά με το 1.0 BA/ 0.1 IBA (mg l^{-1}), ενώ το μήκος τους δε διέφερε (Πιν. 28, Εικ. 43).

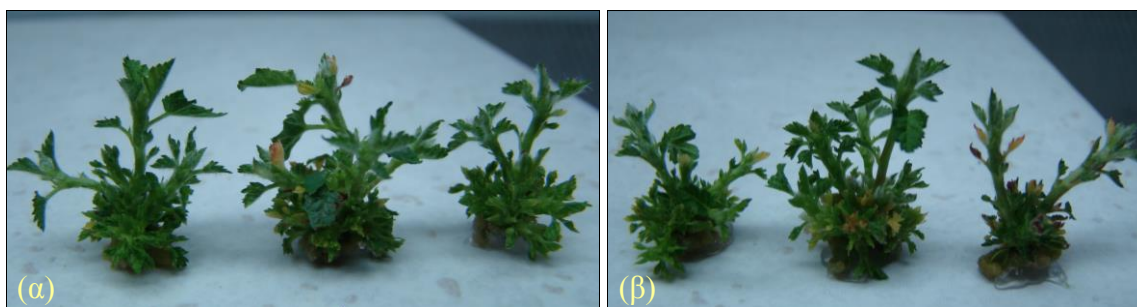
Παρά τη μείωση στον πολλαπλασιασμό των βλαστών που παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα με τις μειωμένες συγκεντρώσεις BA και IBA, πραγματοποιήθηκαν αρκετές υποκαλλιέργειες σε αυτό το υπόστρωμα για τη λήψη βλαστών για ριζοβολία μιας και υπήρξε η ένδειξη σε παράλληλα πειράματα ριζοβολίας πως οι μικροβλαστοί από μειωμένη συγκέντρωση BA ριζοβολούν σε υψηλότερο ποσοστό.

Και τα έκφυτα βλαστού που προέρχονταν από αναβλαστήσεις σχημάτισαν λιγότερους βλαστούς κατά την καλλιέργεια στο υπόστρωμα με 0.5 BA/ 0.05 IBA συγκριτικά με το 1.0 BA/ 0.1 IBA, ενώ το μήκος τους δε διέφερε (Πιν. 29, Εικ. 44).

Πίνακας 28. Ποσοστό σχηματισμού βλαστών (%), μέσος αριθμός και μέσο μήκος (cm) βλαστών ανά έκφυτο, ποσοστό (%), μέσος αριθμός και μέσο μήκος (cm) βλαστών μήκους μεγαλύτερου των 0.6 cm και ποσοστό (%) υαλωμένων βλαστών κατά την καλλιέργεια εκφύτων από ενήλικο φυτό στα αναγραφόμενα υποστρώματα (mg l^{-1}) ($n=160$).

Υπόστρωμα καλλιέργειας	Ποσοστό βλαστών (%)	Αριθμός βλαστών	Μήκος βλαστών (cm)	Ποσοστό (%) βλ. $\mu > 0.6 \text{cm}$	Αριθμός βλαστών $\mu > 0.6 \text{cm}$	Μήκος βλαστών $\mu > 0.6 \text{cm}$	Ποσοστό (%) υαλωμ. βλαστών
0.5 BA/ 0.05 IBA	100	8.0 b	0.6 b	40	3.1 b	1.0 a	45
1.0 BA/ 0.1 IBA	100	9.3 a	0.7 a	44	4.3 a	1.0 a	34
Ανάλυση της διασποράς							
<i>F</i> =		29.6320**	10.0194*		47.8088**	1.5487 ^{NS}	

*, **: σημαντικά σε επίπεδο $P=0.05$ και $P=0.01$, αντίστοιχα. NS: μη σημαντικό σε επίπεδο $P=0.05$

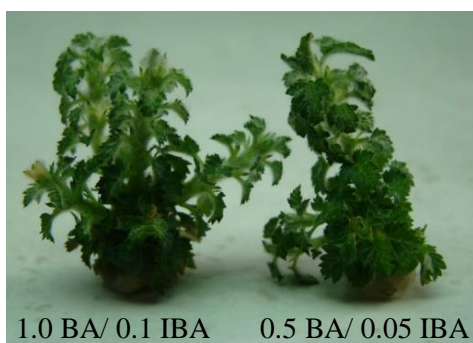


Εικόνα 43. Χαρακτηριστική αντίδραση κατά την καλλιέργεια εκφύτων από ενήλικο φυτό σε υπόστρωμα MS με 0.5 BA/ 0.05 IBA (α) και 1.0 BA/ 0.1 IBA (β) (mg l^{-1}).

Πίνακας 29. Ποσοστό σχηματισμού βλαστών (%), μέσος αριθμός και μέσο μήκος (cm) βλαστών ανά έκφυτο, και ποσοστό (%) υαλωμένων βλαστών κατά την καλλιέργεια εκφύτων από αναβλαστήσεις σε υποστρώματα MS με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις BA και IBA (mg l^{-1}) ($n=30$).

Υπόστρωμα καλλιέργειας	Ποσοστό βλαστών (%)	Αριθμός βλαστών	Μήκος βλαστών (cm)	Ποσοστό (%) υαλωμ. βλαστών
0.5 BA/ 0.05 IBA	100	4.3 a	1.1 a	13
1.0 BA/ 0.1 IBA	100	6.0 b	1.0 a	6
Ανάλυση της διασποράς				
$F=$		26.1090**	0.8191 ^{NS}	

** : σημαντικό σε επίπεδο $P=0.01$, NS: μη σημαντικό σε επίπεδο $P=0.05$



Εικόνα 44. Χαρακτηριστική αντίδραση κατά την καλλιέργεια εκφύτων από αναβλαστήσεις στα αναγραφόμενα υποστρώματα MS (mg l^{-1}).

5.3.1.7. Επίδραση του ενεργού άνθρακα στον πολλαπλασιασμό βλαστών

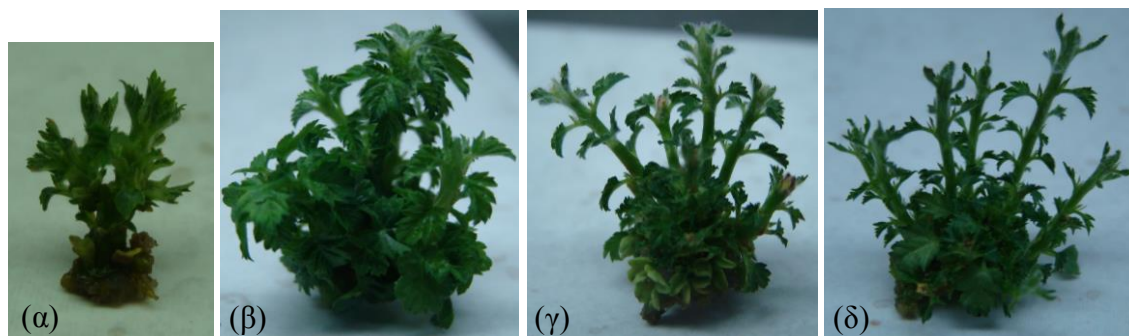
Όταν στο βασικό υπόστρωμα πολλαπλασιασμού των βλαστών συμπεριλήφθηκε ενεργός άνθρακας (AC) παρεμποδίστηκε πλήρως η βλαστογένεση και δεν σχηματίστηκε κάλος στη βάση των εκφύτων (Εικ. 45).



Εικόνα 45. Παρεμπόδιση βλαστογένεσης από την προσθήκη 2 g l⁻¹ ενεργού άνθρακα στο βασικό υπόστρωμα πολλαπλασιασμού.

5.3.2. Δυναμικό πολλαπλασιασμού *in vitro* καλλιέργειας προερχόμενης από αναβλαστήσεις

Οι *in vitro* καλλιέργειες που εγκαταστάθηκαν από αναβλαστήσεις γενικά επέδειξαν υψηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού των βλαστών σχηματίζοντας αρκετούς ικανοποιητικού μήκους βλαστούς ανά έκφυτο (Πιν. 30, Εικ. 46). Εξαίρεση αποτέλεσε η καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί το Μάρτιο 2009 που επέδειξε φτωχό δυναμικό πολλαπλασιασμού (Πιν. 30, Εικ. 46α) και η οποία, όπως αναφέρεται στο κεφάλαιο 4.3.2., είχε εγκατασταθεί σε χαμηλό ποσοστό, πιθανά εξαιτίας του προχωρημένου σταδίου έκπτυξης των οφθαλμών των αρχικών εκφύτων. Εντυπωσιακή ήταν η αντίδραση των εκφύτων από την καλλιέργεια που εγκαταστάθηκε το Μάιο 2010, τα οποία σχημάτισαν τους περισσότερους βλαστούς ανά έκφυτο (Πιν. 30, Εικ. 46δ).



Εικόνα 46. Χαρακτηριστική αντίδραση κατά τις υποκαλλιέργειες σε υπόστρωμα MS με 1.0 BA/ 0.1 IBA (mg l^{-1}) εκφύτων που προέρχονταν από καλλιέργειες εγκατεστημένες από αναβλαστήσεις των καμένων φυτών το Μάρτιο 2009 (α), τον Ιούλιο 2009 (β), τον Αύγουστο 2009 (γ) και το Μάιο 2010 (δ).

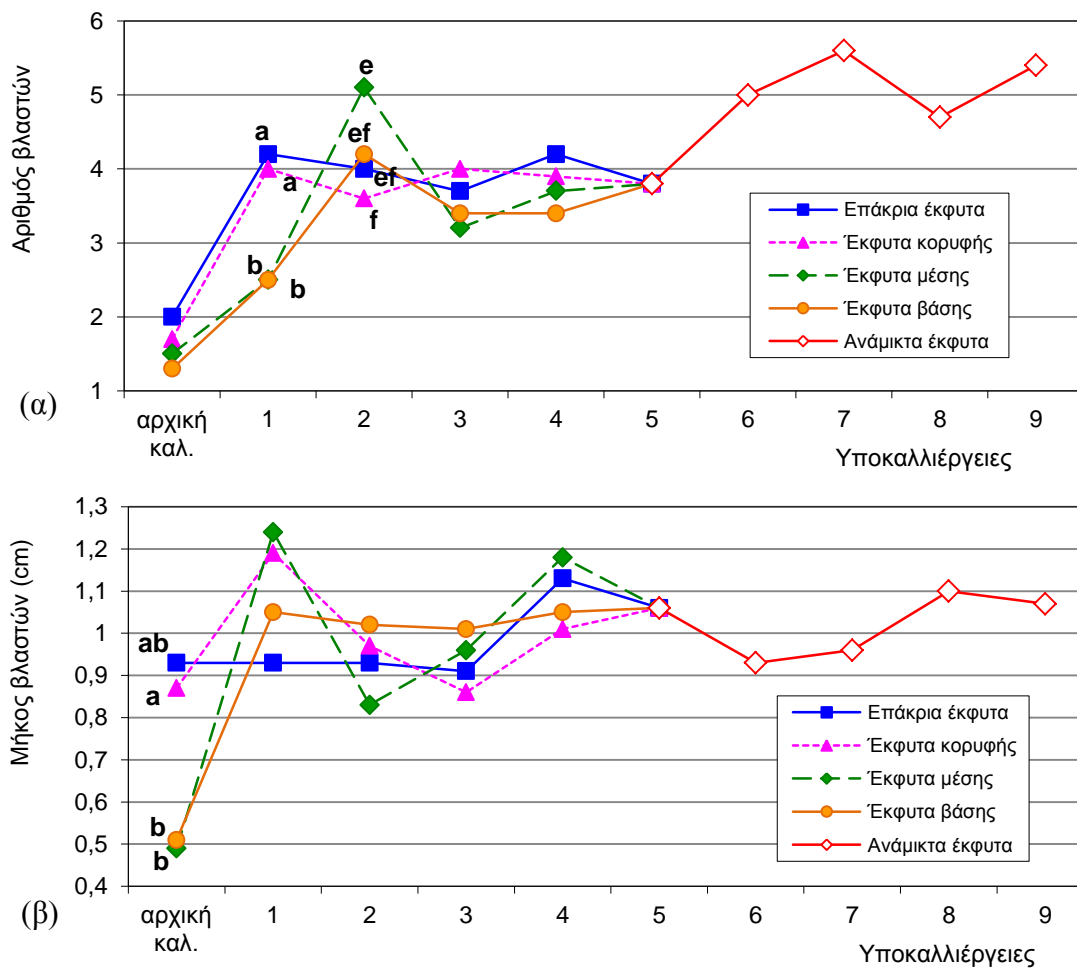
Πίνακας 30. Ποσοστό σχηματισμού βλαστών (%), μέσος αριθμός και μέσο μήκος (cm) βλαστών ανά έκφυτο σχηματισθέντων κατά τις υποκαλλιέργειες σε υπόστρωμα MS με 1.0 BA/ 0.1 IBA (mg l^{-1}) από εκφύτα που προέρχονταν από καλλιέργειες εγκατεστημένες από αναβλαστήσεις των καμένων φυτών τους αναγραφόμενους μήνες.

Χρόνος εγκατάστασης <i>in vitro</i> καλλιέργειας	Ποσοστό βλαστών (%)	Αριθμός βλαστών	Μήκος βλαστών (cm)	Αριθμός επαναλήψεων
Μάρτιος 2009	80	1.6 e	0.6 c	<i>n</i> =30
Ιούνιος 2009	100	4.5 c	1.0 a	<i>n</i> =464
Ιούλιος 2009	100	3.7 d	1.1 a	<i>n</i> =767
Αύγουστος 2009	100	5.3 b	0.8 b	<i>n</i> =172
Μάρτιος 2010	100	4.8 bc	0.8 bc	<i>n</i> =272
Απρίλιος 2010	100	3.8 bcde	0.6 bc	<i>n</i> =13
Μάιος 2010	96	9.1 a	0.7 bc	<i>n</i> =123
Ιούνιος 2010	82	5.5 bc	0.7 bc	<i>n</i> =41
Ανάλυση της διασποράς <i>F</i> =		96.4644**	26.7461**	

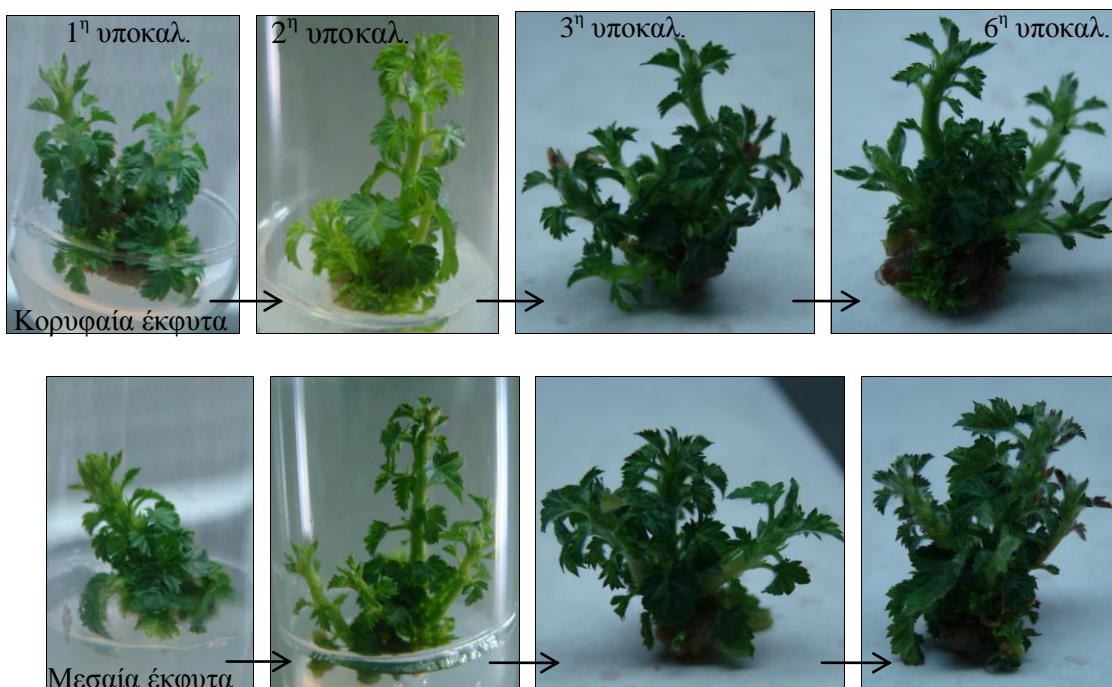
** : σημαντικά σε επίπεδο $P=0.01$

5.3.2.1. Επίδραση θέσης εκφύτων πάνω στις αναβλαστήσεις στο δυναμικό πολλαπλασιασμού της καλλιέργειας

Κατά την πρώτη και δεύτερη υποκαλλιέργεια, τα έκφυτα που προέρχονταν από τις ανώτερες θέσεις των αναβλαστήσεων και αυτά από τις κατώτερες θέσεις διέφεραν ως προς τον αριθμό των παραγόμενων βλαστών (Σχ. 17α, Εικ. 47), ενώ μετά την τρίτη υποκαλλιέργεια τα έκφυτα δε διέφεραν ως προς τη βλαστογένεση πια και γι' αυτό αναμίχθηκαν και υποκαλλιεργούνταν ως μία καλλιέργεια (Σχ. 17).



Σχήμα 17. Μέσος αριθμός (α) και μέσο μήκος (cm) βλαστών (β) ανά έκφυτο που παράχθηκαν κατά την αρχική καλλιέργεια και τις υποκαλλιέργειες εκφύτων συλλεγμένων τον Ιούνιο και Ιούλιο 2009 από τις αναγραφόμενες θέσεις πάνω στις αναβλαστήσεις στο βασικό υπόστρωμα MS με 1.0 mg Γ⁻¹ BA και 0.1 mg Γ⁻¹ IBA (Σημαντικά σε επίπεδο $P=0.05$, $n=4-28$ κατά την αρχική καλλιέργεια, $n=18-84$ κατά τις υποκαλλιέργειες).



Εικόνα 47. Χαρακτηριστική αντίδραση κατά τις υποκαλλιέργειες σε υπόστρωμα MS με 1.0 BA/ 0.1 IBA (mg l^{-1}) εκφύτων βλαστού προερχόμενων από κορυφαία και μεσαία έκφυτα των αναβλαστήσεων που είχαν συλλεχθεί τον Ιούλιο 2009.

5.3.2.2. Επίδραση των κυτοκινινών BA, zeatin, kinetin και 2iP στον πολλαπλασιασμό των βλαστών

Στα υποστρώματα με BA ή ζεατίνη σχηματίστηκαν βλαστοί στο 100% των εκφύτων, ενώ στο υπόστρωμα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες δεν παρατηρήθηκε βλαστογένεση. Περισσότεροι βλαστοί ανά έκφυτο (περισσότεροι στις υψηλότερες συγκεντρώσεις) σχηματίστηκαν στα υποστρώματα με BA σε σύγκριση με αυτά με zeatin, ενώ το μήκος των βλαστών ήταν μεγαλύτερο στη zeatin (μεγαλύτερο στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις) σε σχέση με τα υποστρώματα με BA. Στα υποστρώματα που περιείχαν και IBA, παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση του αριθμού και του μήκους των βλαστών συγκριτικά με αυτά χωρίς IBA (Πιν. 31).

Πίνακας 31. Μέσος αριθμός και μέσο μήκος βλαστών ανά έκφυτο από αναβλαστήσεις, που παράχθηκαν σε υποστρώματα με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις BA ή zeatin με ή χωρίς 0.1 mg l⁻¹ IBA (n=30).

Κυτοκινίνη	Συγκέντρωση (mg l ⁻¹)	Αριθμός βλαστών		Μήκος βλαστών (cm)	
		χωρίς IBA	με IBA	χωρίς IBA	με IBA
BA	0.5	2.9 cd	5.0 b	0.84 def	1.03 bcd
	1.0	5.4 b	5.6 b	0.87 cdef	0.94 bcde
	2.0	6.2 ab	6.6 a	0.78 efg	0.82 def
	4.0	5.9 ab	6.0 ab	0.52 h	0.58 gh
ζεατίνη	0.5	1.2 e	1.1 e	1.07 bc	1.57 a
	1.0	1.7 e	1.6 e	1.12 b	0.95 bcde
	2.0	3.1 c	1.8 de	0.84 def	0.81 ef
	4.0	3.8 c	3.5 c	0.72 fgh	0.79 efg
M.O.		3.7 B	4.2 A	0.85 B	0.94 A
Ανάλυση της διασποράς					
<i>F</i> _{επεμβάσεων} =		71.0140**		28.9700**	
<i>F</i> _{IBA} =		7.1056*		10.0521*	

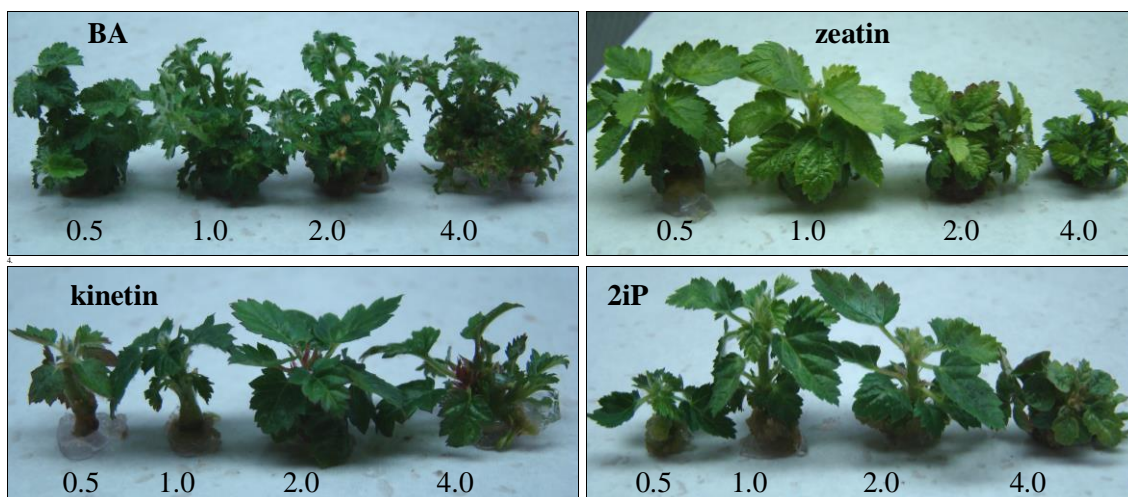
*, **: σημαντικά σε επίπεδο $P=0.05$ και $P=0.01$, αντίστοιχα. Κεφαλαία γράμματα μεταξύ των μέσων τιμών και μικρά γράμματα μεταξύ των τιμών των επεμβάσεων.

Όταν δοκιμάστηκαν περισσότερες κυτοκινίνες, ο αριθμός των βλαστών ανά έκφυτο ήταν μεγαλύτερος στα υποστρώματα που περιείχαν BA συγκριτικά με αυτά με zeatin, kinetin ή 2iP, ενώ κοντότεροι βλαστοί σχηματίστηκαν στα υποστρώματα με kinetin σε σύγκριση με τα υποστρώματα με άλλες κυτοκινίνες. Η αύξηση της συγκέντρωσης των κυτοκινινών από 0.5 σε 4.0 mg l⁻¹ οδήγησε σε αύξηση του αριθμού των βλαστών και ταυτόχρονη μείωση του μήκους των βλαστών (Πιν. 32, Εικ. 48).

Πίνακας 32. Ποσοστό σχηματισμού βλαστών (%), μέσος αριθμός και μέσο μήκος βλαστών ανά έκφυτο από αναβλαστήσεις, που παράχθηκαν σε υποστρώματα με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις κυτοκινινών και 0.1 mg l⁻¹ IBA (n=30).

Κυτοκινίνη	Συγκέντρωση (mg l ⁻¹)	Ποσοστό σχηματ. βλαστών (%)	Αριθμός βλαστών	Μήκος βλαστών (cm)
BA	0.5	100	3.1 c	1.22 abc
	1.0	100	5.3 b	1.04 bcd
	2.0	100	6.2 b	0.91 def
	4.0	100	7.3 a	0.76 efg
ζεατίνη	0.5	100	1.3 ef	1.30 ab
	1.0	97	1.3 ef	1.08 bcd
	2.0	100	2.3 cde	0.99 cde
	4.0	100	2.8 cd	0.74 efg
κινετίνη	0.5	17	1.0 def	0.46 fgh
	1.0	30	1.0 ef	0.47 gh
	2.0	70	1.1 f	0.53 gh
	4.0	67	2.0 def	0.44 h
2iP	0.5	37	1.1 ef	0.95 bcdef
	1.0	63	1.1 f	1.39 a
	2.0	83	1.6 ef	0.92 def
	4.0	87	2.0 def	0.56 gh
Ανάλυση της διασποράς				
<i>F</i> επεμβάσεων=			75.9826**	20.7836**
Ανάλυση της συνδιασποράς				
<i>F</i> κυτοκινίνης=			286.2818**	35.4579**
<i>F</i> συγκέντρωσης=			34.2871**	26.2581**
<i>F</i> κυτοκινίνη x συγκέντρωση=			8.0718**	5.6183**

** : σημαντικό σε επίπεδο $P=0.01$



Εικόνα 48. Χαρακτηριστική αντίδραση εκφύτων βλαστού από αναβλαστήσεις κατά την υποκαλλιέργεια σε υποστρώματα με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις κυτοκινινών και 0.1 IBA (mg l^{-1}).

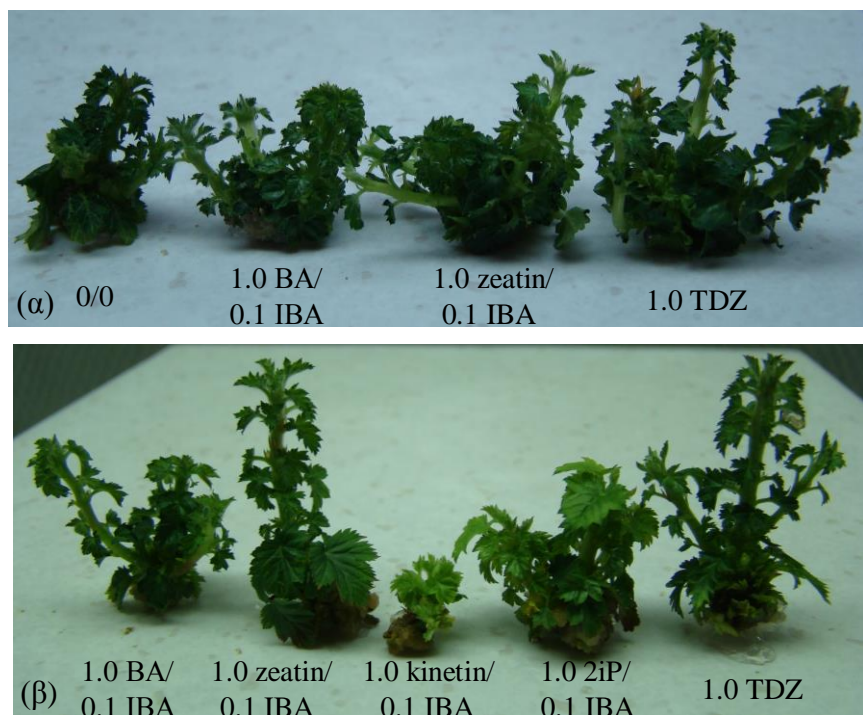
5.3.3. Δυναμικό πολλαπλασιασμού *in vitro* καλλιέργειας προερχόμενης από μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια

Μετά από μία υποκαλλιέργεια στο βασικό υπόστρωμα εκφύτων που είχαν αρχικά καλλιεργηθεί με διάφορες κυτοκινίνες, αυτά που είχαν αρχικά καλλιεργηθεί στο υπόστρωμα με TDZ έδωσαν τον υψηλότερο αριθμό βλαστών ανά έκφυτο χωρίς το μήκος τους να υπολείπεται αυτό βλαστών από τα άλλα υποστρώματα (Πιν. 33, Εικ. 49).

Πίνακας 33. Ποσοστό σχηματισμού βλαστών, μέσος αριθμός και μέσο μήκος βλαστών ανά έκφυτο σχηματισθέντων κατά την υποκαλλιέργεια σε κοινό υπόστρωμα MS με 1.0 BA/ 0.1 IBA (mg l^{-1}) από εκφύτα που προέρχονταν από καλλιέργειες εγκατεστημένες από μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια στα αναγραφόμενα υποστρώματα.

Υπόστρωμα εγκατάστασης <i>in vitro</i> καλλιέργειας (mg l^{-1})	Ποσοστό βλαστών (%)	Αριθμός βλαστών	Μήκος βλαστών (cm)	Αριθμός επαναλήψεων
Μάρτυρας 0/0	100	1.9 b	1.6 ab	$n=10$
1.0 BA/ 0.1 IBA	100	2.6 b	1.0 cd	$n=56$
1.0 zeatin/ 0.1 IBA	100	2.6 b	1.4 abc	$n=21$
1.0 2iP/ 0.1 IBA	100	2.0 b	1.0 bcd	$n=10$
1.0 kinetin/ 0.1 IBA	100	1.5 b	0.5 d	$n=4$
0.1 TDZ	100	1.8 b	1.7 a	$n=11$
1.0 TDZ	100	4.0 a	1.2 bcd	$n=65$
Ανάλυση της διασποράς $F=$		7.9618**	6.3400**	

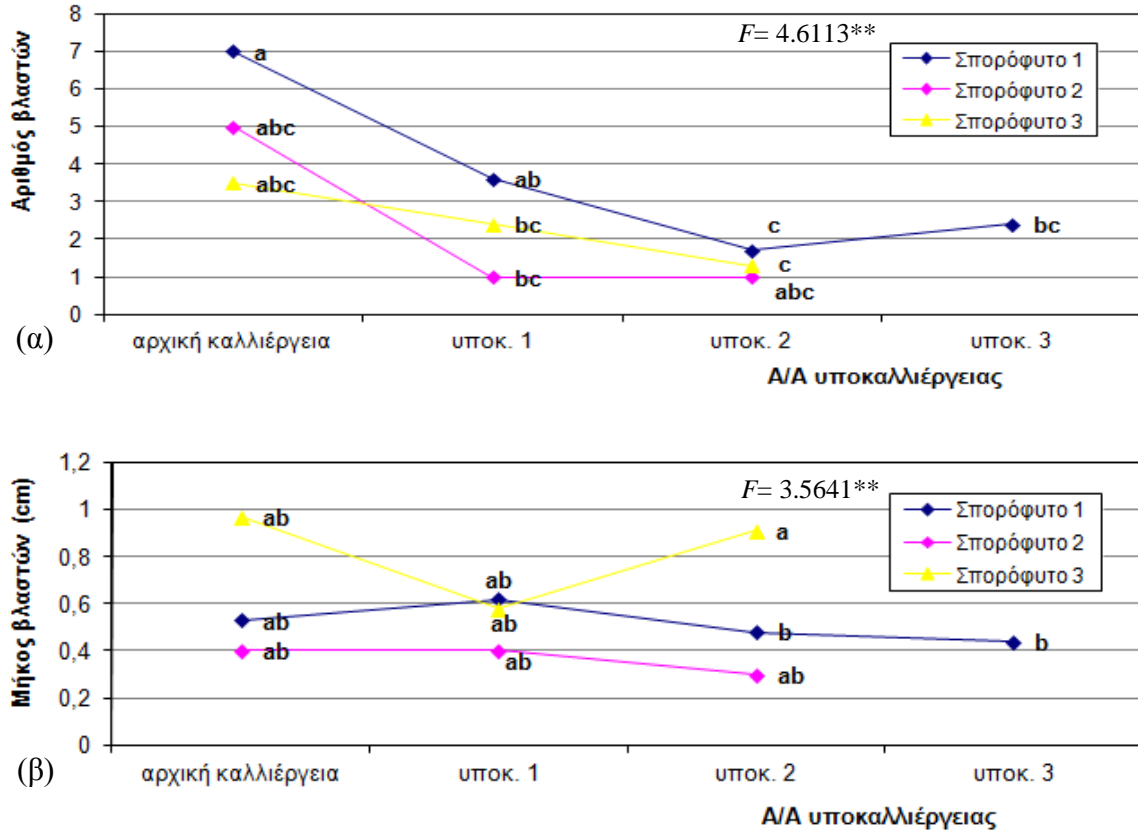
** : σημαντικά σε επίπεδο $P=0.01$



Εικόνα 49. Χαρακτηριστική αντίδραση κατά την πρώτη υποκαλλιέργεια σε κοινό υπόστρωμα MS με 1.0 BA/ 0.1 IBA (mg l^{-1}) εκφύτων προερχόμενων από το κορυφαίο (α) και μεσαίο (β) τμήμα των μικροπολλαπλασιασμένων φυταρίων, που είχαν καλλιεργηθεί κατά την εγκατάσταση στα αναγραφόμενα υποστρώματα.

5.3.4. Δυναμικό πολλαπλασιασμού *in vitro* καλλιέργειας προερχόμενης από σπορόφυτα

Τα έκφυτα από σπορόφυτα, παρόλο που είχαν σχηματίσει υψηλό αριθμό βλαστών κατά την αρχική καλλιέργεια, επέδειξαν φτωχό δυναμικό πολλαπλασιασμού κατά τις υποκαλλιέργεια σχηματίζοντας λίγους βλαστούς ανά έκφυτο (Σχ. 18α), οι οποίοι όμως δεν επιμηκύνονταν (Σχ. 18β). Γι' αυτό οι υποκαλλιέργειες διακόπηκαν και μόνο έκφυτα από το σπορόφυτο 1, που ήταν λίγο πιο αποδοτικά στον πολλαπλασιασμό των βλαστών, καλλιεργήθηκαν με γιββερελλίνη με στόχο την αύξηση του δυναμικού πολλαπλασιασμού τους και τα αποτελέσματα παρουσιάζονται στο επόμενο κεφάλαιο (5.3.5.).



Σχήμα 18. Μέσος αριθμός (α) και μέσο μήκος (cm) (β) βλαστών ανά έκφυτο σχηματισθέντων κατά τις υποκαλλιέργειες σε υπόστρωμα MS με 1.0 BA/ 0.1 IBA (mg l^{-1}) από εκφύτα που προέρχονταν από καλλιέργειες εγκατεστημένες από σπορόφυτα ($n=1-31$, **: σημαντικά σε επίπεδο $P=0.01$).

5.3.5. Επίδραση της γιββερελλίνης στο δυναμικό πολλαπλασιασμού *in vitro* καλλιιεργειών, που παρουσίαζαν χαμηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού

Στα έκφυτα από ενήλικο φυτό, παρατηρήθηκε μη σημαντική αύξηση του αριθμού των βλαστών με την προσθήκη 0.5-2.0 mg l^{-1} GA_3 , ενώ το μέσο μήκος των βλαστών μειώθηκε (Πιν. 34, Εικ. 20). Ως ανεπιθύμητο παράπλευρο αποτέλεσμα, ελαφρώς παραμορφωμένοι βλαστοί εμφανίστηκαν στο 24-55% των εκφύτων στα υποστρώματα με GA_3 (Εικ. 50).

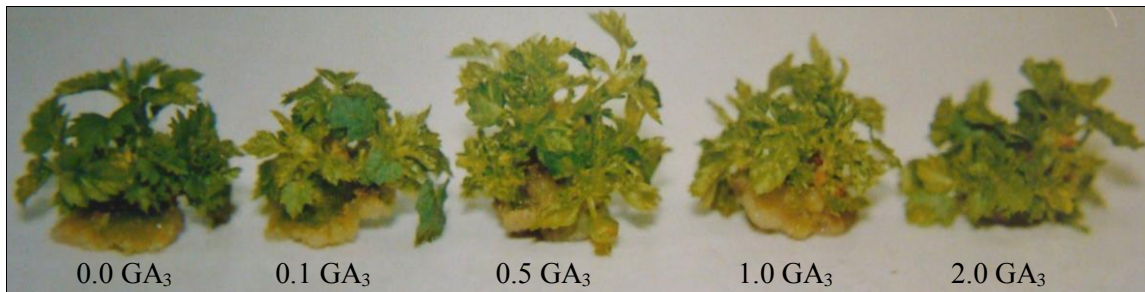
Στα έκφυτα από οφθαλμούς αναβλαστήσεων, ο αριθμός των βλαστών ανά έκφυτο παρέμεινε χαμηλός, ενώ το μήκος τους δεν αυξήθηκε σημαντικά με τη χρήση γιββερελλίνης (Πιν. 35).

Στα έκφυτα από σπορόφυτο, η προσθήκη GA₃ στο υπόστρωμα αύξησε τον αριθμό των βλαστών ανά έκφυτο σε σχέση με το μάρτυρα, ενώ η επιμήκυνση των βλαστών ήταν μεγαλύτερη με την προσθήκη 0.5 mg l⁻¹ GA₃ συγκριτικά με την προσθήκη 0.1 mg l⁻¹ GA₃ ή την απουσία GA₃ (Πιν. 36, Εικ. 51).

Πίνακας 34. Ποσοστό σχηματισμού βλαστών (%), μέσος αριθμός και μέσο μήκος (cm) βλαστών ανά έκφυτο και ποσοστό εκφύτων με παραμορφωμένους βλαστούς (%) κατά την καλλιέργεια εκφύτων από ενήλικο φυτό σε υποστρώματα με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις γιββερελλίνης (mg l⁻¹), υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ (n=24-27).

Συγκέντρωση γιββερελλίνης (mg l ⁻¹)	Ποσοστό βλαστών (%)	Αριθμός βλαστών	Μήκος βλαστών (cm)	Ποσοστό παραμόρφωσης (%)
0.0	52	5.0 a	0.5 a	0
0.1	46	5.0 a	0.5 a	55
0.5	63	6.1 a	0.4 ab	24
1.0	59	5.6 a	0.4 ab	44
2.0	52	5.9 a	0.4 b	29
Ανάλυση της διασποράς F=		0.9297 ^{NS}	4.6434*	

*: σημαντικό σε επίπεδο P=0.05, NS: μη σημαντικό σε επίπεδο P=0.05



Εικόνα 50. Χαρακτηριστική αντίδραση κατά την καλλιέργεια εκφύτων από ενήλικο φυτό στα υποστρώματα MS με 1.0 BA/ 0.1 IBA και τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις γιββερελλίνης (mg l⁻¹).

Πίνακας 35. Ποσοστό σχηματισμού βλαστών (%), μέσος αριθμός και μέσο μήκος (cm) βλαστών κατά την καλλιέργεια εκφύτων από αναβλαστήσεις με φτωχό δυναμικό πολλαπλασιασμού σε υποστρώματα με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις γιββερελλίνης ($n=27-48$).

Συγκέντρωση γιββερελλίνης (mg l ⁻¹)	Ποσοστό βλαστών (%)	Αριθμός βλαστών	Μήκος βλαστών (cm)
0.0	100	2.1 a	0.7 a
0.1	100	2.3 a	0.7 a
0.5	100	2.1 a	0.8 a
Ανάλυση της διασποράς $F=$		0.0689 ^{NS}	0.8933 ^{NS}

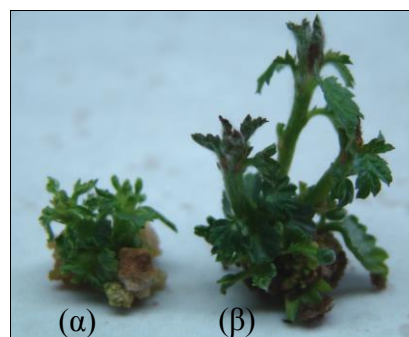
NS: μη σημαντικά σε επίπεδο $P=0.05$

Πίνακας 36. Ποσοστό σχηματισμού βλαστών (%), μέσος αριθμός και μέσο μήκος (cm) βλαστών κατά την καλλιέργεια εκφύτων από σπορόφυτο σε υποστρώματα με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις γιββερελλίνης ($n=60-80$).

Συγκέντρωση γιββερελλίνης (mg l ⁻¹)	Ποσοστό βλαστών (%)	Αριθμός βλαστών	Μήκος βλαστών (cm)
0.0	98	2.3 b	0.5 c
0.1	99	3.4 a	0.7 b
0.5	100	3.6 a	0.8 a
Ανάλυση της διασποράς $F=$		8.4562**	15.0923**

** : σημαντικά σε επίπεδο $P=0.01$

Εικόνα 51. Χαρακτηριστική αντίδραση κατά την καλλιέργεια εκφύτων από σπορόφυτο σε υπόστρωμα χωρίς (α) ή με (β) γιββερελλίνη.



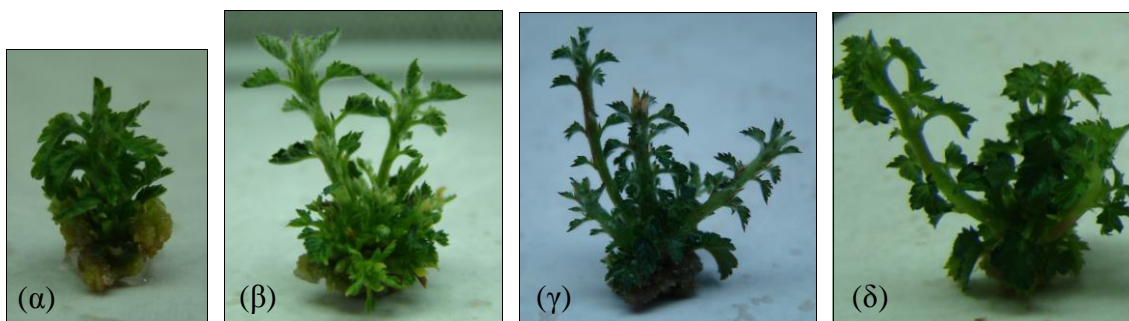
5.3.6. Επίδραση της νεανικής ή ενήλικης προέλευσης εκφύτου στον πολλαπλασιασμό των βλαστών *in vitro*

Οι καλλιέργειες που εγκαταστάθηκαν από έκφυτα ενήλικων φυτών, με εξαίρεση την καλλιέργεια του Μαρτίου 2004, παρουσίασαν χαμηλότερους ρυθμούς πολλαπλασιασμού κατά τις υποκαλλιέργειες από ότι καλλιέργειες από αναβλαστήσεις, μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια και σπορόφυτα που χειρίστηκαν με $0.5 \text{ mg l}^{-1} \text{ GA}_3$. Η καλλιέργεια του Μαρτίου '04 από ενήλικο φυτό έδωσε τους περισσότερους βλαστούς ανά έκφυτο, οι οποίοι όμως υπολείπονταν σε μήκος από τους βλαστούς των νεανικών καλλιεργειών (Πιν. 37, Εικ. 52). Συγκεκριμένα, τα έκφυτα από την καλλιέργεια του Μαρτίου '04 σχημάτιζαν μόνο 2-3 μακριούς και αρκετούς κοντούς βλαστούς (Εικ. 52β) έχοντας ως αποτέλεσμα τη μείωση του μέσου μήκους των βλαστών.

Πίνακας 37. Συγκριτική αντίδραση ενήλικων και νεανικών εκφύτων κατά τις υποκαλλιέργειες στο υπόστρωμα MS με $1.0 \text{ BA} / 0.1 \text{ IBA}$ (mg l^{-1}).

Υποκαλλιέργειες				
Προέλευση εκφύτου	Ποσοστό βλαστών (%)	Αριθμός βλαστών	Μήκος βλαστών (cm)	Αριθμός επαναλ.
Ενήλικο φυτό- Μάρτιος '04 (Υψηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού)	90	6.3 a	0.6 b	n=480
Ενήλικα φυτά (Χαμηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού)	87	1.8 d	0.6 b	n=265
Αναβλαστήσεις των καμένων φυτών	99	4.6 b	0.9 a	n=1895
Μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια	100	2.6 cd	1.0 a	n=60
Σπορόφυτα	99	2.3 d	0.5 b	n=60
Σπορόφυτα +GA ₃	100	3.6 c	0.8 a	n=60
Ανάλυση της διασποράς F=		125.1224**	93.9001**	

** : σημαντικά σε επίπεδο $P=0.01$



Εικόνα 52. Χαρακτηριστική αντίδραση κατά την υποκαλλιέργεια σε MS με 1.0 BA/ 0.1 IBA (mg l^{-1}) εκφύτων βλαστού από ενήλικα φυτά με χαμηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού (α), από ενήλικο φυτό με υψηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού (β), από αναβλαστήσεις (γ) και από μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια (δ).

5.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Κατά το στάδιο του πολλαπλασιασμού των *in vitro* καλλιιεργειών του *xM. florentina* επιδιώχθηκε η γρήγορη απόκτηση μεγάλου αριθμού βλαστών και η ικανοποιητική επιμήκυνσή τους για να μπορούν να προωθηθούν για ριζοβολία, καθώς και ο περιορισμός των υπερενυδατωμένων βλαστών. Για το σκοπό αυτό εξετάστηκε η επίδραση του θρεπτικού υποστρώματος, του δοχείου καλλιέργειας και υλικού κάλυψης, της συγκέντρωσης άγαρ, του τύπου και της συγκέντρωσης των φυτορρυθμιστικών ουσιών, καθώς και της προέλευσης και θέσης των αρχικών εκφύτων.

Οι καλλιέργειες που εγκαταστάθηκαν από ενήλικα φυτά βρέθηκαν να διαφέρουν ως προς το δυναμικό πολλαπλασιασμού τους κατά τις υποκαλλιέργειες στο βασικό υπόστρωμα (MS με 1.0 mg l^{-1} BA και 0.1 mg l^{-1} IBA), με την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί το Μάρτιο 2004 να σχηματίζει τους περισσότερους βλαστούς ανά έκφυτο, ενώ οι υπόλοιπες καλλιέργειες επέδειξαν χαμηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού των βλαστών. Το υψηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού της καλλιέργειας του Μαρτίου 2004 θα μπορούσε να εξηγηθεί από το διαφορετικό βαθμό ωριμότητας των διαφορετικών τμημάτων των ενήλικων δένδρων. Χρησιμοποιώντας έκφυτα από νεανικούς ιστούς που συχνά είναι στα βασικά τμήματα των ενήλικων δένδρων, μπορεί να επιτευχθεί με μεγαλύτερη επιτυχία ο *in vitro* πολλαπλασιασμός. Έτσι, έκφυτα που ελήφθησαν από νεανικά τμήματα (επικορμικοί βλαστοί, κατώτερα κλαδιά, εμβολιασμένα κλαδιά) των ενήλικων δένδρων των *Sorbus aucuparia* και *S. torminalis*, επέδειξαν υψηλότερους

ρυθμούς πολλαπλασιασμού και καλύτερη ανταπόκριση στη ριζοβολία από έκφυτα από ώριμα τμήματα (κλαδιά στα ανώτερα τμήματα της κόμης) των δένδρων (Chalupa, 1992, 2002), καθώς επίσης έκφυτα από επικορμικούς βλαστούς του *Quercus rubra* σχηματισμένους στη βασική ζώνη του κορμού είχαν μεγαλύτερη ικανότητα για εγκατάσταση *in vitro* από έκφυτα από τα κλαδιά της κόμης (Vieitez *et al.*, 1993). Στη *Hevea brasiliensis*, επίσης, τα νεανικά χαρακτηριστικά ήταν περισσότερα σε ιστούς που ήταν πιο κοντά στο ριζικό σύστημα ενήλικων φυτών (Seneviratne *et al.*, 1998).

Οι καλλιέργειες που εγκαταστάθηκαν το Μάρτιο 2010 από διάφορους τύπους εκφύτων, που ελήφθησαν από κανονικές και λογχοειδής βλαστήσεις ενήλικου φυτού, επέδειξαν και αυτές χαμηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού. Παρά τη προδιάθεση για έκπτυξη σε κανονική ή λογχοειδή βλάστηση που είχαν οι οφθαλμοί πάνω στο φυτό, τα έκφυτα που ελήφθησαν δε μπόρεσαν να εκδηλώσουν αυτή τη συμπεριφορά *in vitro* αποδεικνύοντας για μια ακόμη φορά τη δυσκολία του *in vitro* πολλαπλασιασμού των ενήλικων φυτών.

Δεδομένου ότι το περιεχόμενο σε άγαρ του υποστρώματος μπορεί να παρέμβει στην εμφάνιση υπερενυδάτωσης μέσω της ρύθμισης του ωσμωτικού δυναμικού του υποστρώματος, της διάχυσης των θρεπτικών στοιχείων και της πρόσληψης των κυτοκινινών από τα έκφυτα (Pâques and Boxus, 1987a; Debergh *et al.*, 1992), δοκιμάστηκαν αυξημένες συγκεντρώσεις άγαρ (14 ή 20 g l⁻¹ από 8 g l⁻¹), οι οποίες οδήγησαν σε μείωση του ποσοστού υπερενυδατωμένων βλαστών έχοντας όμως ανεπιθύμητες επιδράσεις στη βλαστογένεση (μείωση αριθμού και μήκους βλαστών, μορφολογικές αλλαγές), για τις οποίες μπορεί να ευθύνονται οι ιδιαίτερα υψηλές συγκεντρώσεις άγαρ που χρησιμοποιήθηκαν. Η αύξηση της συγκέντρωσης άγαρ έχει επίσης αναφερθεί να μειώνει το ποσοστό υπερενυδατωμένων βλαστών σε *in vitro* καλλιέργειες μηλιάς (Parqualeto *et al.*, 1986, 1988; Marga *et al.*, 1997), πατάτας (Park *et al.*, 2004) και γαρυφάλλου (Tsay, 1998), ενώ ο ρυθμός πολλαπλασιασμού μειώθηκε (Parqualeto *et al.*, 1988; Tsay, 1998). Αντίθετα, η κάλυψη των βάζων καλλιέργειας με μεμβράνη sanitas, αντί του πλαστικού φιλμ, όχι μόνο περιόρισε το ποσοστό υπερενυδατωμένων βλαστών αλλά αύξησε και τον αριθμό των παραγόμενων βλαστών. Η κάλυψη των δοχείων με αεριο-διαπερατές μεμβράνες συνιστάται για τον έλεγχο της υπερενυδάτωσης επειδή επιτρέπουν την ανταλλαγή αερίων και αποτρέπουν τη

συσσώρευση αερίων, όπως το αιθυλένιο, στο πάνω μέρος των δοχείων (Debergh *et al.*, 1992).

Ο συνδυασμός δοχείου καλλιέργειας και υλικού κάλυψης ήταν καθοριστικός τόσο για το δυναμικό πολλαπλασιασμού των βλαστών όσο για τον περιορισμό της υπερενυδάτωσης των βλαστών, το οποίο μπορεί να αποδοθεί στο ότι το δοχείο και το υλικό κάλυψης μαζί με τον όγκο του άνω χώρου σε σχέση με τον όγκο του υποστρώματος και τον αριθμό των εκφύτων μπορεί να επιδράσει στην ανταλλαγή αερίων και να επηρεάσει τη σύνθεση των αερίων (υδρατμών, CO₂, αιθυλενίου) στον άνω χώρο (Debergh *et al.*, 1992). Στα βάζα όγκου 75 ml η κάλυψη με μεμβράνη sanitas προκάλεσε εντυπωσιακή αύξηση του αριθμού των βλαστών συγκριτικά με την κάλυψη πλαστικού φιλμ, ενώ στα βάζα όγκου 145 και 375 ml η μεμβράνη sanitas και το πλαστικό καπάκι δε διέφεραν ως προς τον αριθμό των βλαστών. Υπό την κάλυψη μεμβράνης sanitas, στα βάζα όγκου 75 ml και στους σωλήνες όγκου 55 ml σχηματίστηκαν περισσότεροι βλαστοί από ότι στα βάζα όγκου 145 ml και 375 ml, το οποίο πιθανότατα οφείλεται στην εντονότερη αφυδάτωση του υποστρώματος λόγω εξάτμισης από το μεγαλύτερο στόμιο των μεγάλων δοχείων. Παράλληλα, η κάλυψη με μεμβράνη sanitas αύξησε το μήκος των βλαστών σε όλα τα δοχεία καλλιέργειας και περιόρισε την υπερενυδάτωση των βλαστών, πιθανότατα χάρη στη μείωση της υγρασίας στα δοχεία καλλιέργειας, που μαζί με την υπέρβαση BA στο υπόστρωμα είναι οι σημαντικότεροι παράγοντες πρόκλησης υπερενυδάτωσης στη μηλιά και άλλα φυτά (Kataeva *et al.*, 1991). Από την άλλη, το πλαστικό φιλμ και πλαστικό καπάκι διατήρησαν υψηλά τα ποσοστά υπερενυδάτωσης ανεξαρτήτως του δοχείου καλλιέργειας. Με βάση τα παραπάνω κριτήρια, ο συνδυασμός που ξεχωρίζει είναι τα βάζα όγκου 75 ml με την κάλυψη μεμβράνης sanitas. Στην πατάτα παρατηρήθηκε μείωση της υπερενυδάτωσης συνοδευόμενη από αύξηση της ανάπτυξης με αύξηση του αερισμού μέσω εξαναγκαστικού αερισμού (Zoybayed *et al.*, 2001), είτε με τη χρήση δοχείων διαπερατών στα αέρια (Park *et al.*, 2004). Η κάλυψη των δοχείων καλλιέργειας με παραφιλμ επέδρασε στην ποιότητα των μικροβλαστών στα είδη *Amelanchier spicata*, *Acer rubrum*, *Forsythia x intermedia*, *Malus x domestica* και *Betula nigra*, ανάλογα με το κάθε είδους, ενώ η αντίδρασή τους σε βλαστούς μεγιστοποιήθηκε στα μεγαλύτερα δοχεία (βάζα όγκου 200 ή 350 ml αντί γυάλινων σωλήνων όγκου 60 ml) (McClelland and Smith, 1990), αντίθετα από ότι συνέβη στην παρούσα εργασία.

Όσον αφορά τους τύπους των εκφύτων που ελήφθησαν από τους *in vitro* βλαστούς, η αφαίρεση του επάκριου οφθαλμού από τα κορυφαία έκφυτα οδήγησε σε αύξηση του αριθμού των βλαστών ανά έκφυτο και μείωση του μήκους τους, ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ως προς τον αριθμό και το μήκος των μεγάλου μήκους (>0.6 cm) βλαστών. Κατά τους Marks and Myers (1992a), οι οφθαλμοί πάνω στους *in vitro* αναπτυσσόμενους βλαστούς εκφράζουν διαφορετικό αναπτυξιακό δυναμικό παράλληλο με αυτό του αρχικού εκφύτου που επιλέχθηκε, στην περίπτωση όμως του *xM. florentina* δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές. Έτσι, οι εύρωστοι μακριοί βλαστοί, μήκους 1.0-2.0 cm, επιλέγονταν για ριζοβολία και για τη συνέχιση της καλλιέργειας χρησιμοποιούνταν όλοι οι τύποι εκφύτων χωρίς να αφαιρείται ο επάκριος οφθαλμός από τα κορυφαία έκφυτα, ακόμη και οι κοντοί βλαστοί με την προϋπόθεση ότι δεν ήταν υπερενυδατωμένοι.

Το θρεπτικό υπόστρωμα, που ήταν κατάλληλο για τον πολλαπλασιασμό των βλαστών, διέφερε ανάλογα με το βάζο καλλιέργειας και το αντίστοιχο υλικό κάλυψης. Στα βάζα όγκου 75 ml με κάλυψη μεμβράνης sanitas, το υπόστρωμα MS προτιμήθηκε του WPM γιατί παρά τις μικρές τους διαφορές στον πολλαπλασιασμό των βλαστών, στα έκφυτα που καλλιεργήθηκαν σε WPM παρατηρήθηκε κοκκίνισμα βλαστών και κιτρίνισμα ή ξήρανση φύλλων πιθανά ως αποτέλεσμα stress ή τροφοπενίας. Αντίθετα, στα βάζα όγκου 145 ml και 375 ml με πλαστικό καπάκι, το WPM ήταν ξεκάθαρα ανώτερο από το MS δίνοντας υψηλότερο αριθμό και μήκος βλαστών και χαμηλότερο ποσοστό υπερενυδατωμένων βλαστών, ενώ τα ανεπιθύμητα συμπτώματα ήταν λιγότερο έντονα. Είναι πιθανό η υψηλότερη ικανότητα εξάτμισης της μεμβράνης sanitas συγκριτικά με το πλαστικό φιλμ, σε συνδυασμό με την έντονη βλαστογένεση που εκδήλωσαν τα έκφυτα που καλλιεργήθηκαν με WPM να συντέλεσαν στην εκδήλωση των παραπάνω συμπτωμάτων στα βάζα όγκου 75 ml. Επειδή όμως για την καλλιέργεια των εκφύτων επιλέχθηκαν τα βάζα όγκου 75 ml με τη μεμβράνη sanitas και σε αυτά το MS υπερείχε του WPM, τελικά καθιερώθηκε η χρήση του MS. Το MS είναι το πιο κοινά χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα στη μηλιά επίσης (Lane, 1992), καθώς βλαστοί που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα MS πολλαπλασιάστηκαν και επιμηκύνθηκαν καλύτερα συγκριτικά με τα υποστρώματα WPM και Lepoivre που δοκιμάστηκαν (Vasar *et al.*, 2000), ενώ και στο *Sorbus* sp. καλύτερη ανάπτυξη και υψηλότερος βαθμός πολλαπλασιασμού επιτεύχθηκε στο MS συγκριτικά με τα υποστρώματα WPM, GD και

BTM που δοκιμάστηκαν (Chalupa, 1992, 2002; Malá *et al.*, 1999). Το MS ήταν καλύτερο από το WPM στον πολλαπλασιασμό των βλαστών και στα είδη *Alnus* sp. (Tremblay and Lalonde, 1984), *Garcinia mangostana* (Normah *et al.*, 1995), *Juglans regia* (Saadat and Hennerty, 2002) και *Vaccinium* spp. (Tetsumura *et al.*, 2008), αν και στο *Vaccinium* οι βλαστοί που αναπτύχθηκαν στο MS έτειναν προς την υπερενυδάτωση.

Το TDZ παρακίνησε υψηλότερους ρυθμούς πολλαπλασιασμού των βλαστών σε σύγκριση με το BA, επέδρασε όμως αρνητικά στην επιμήκυνση των βλαστών, όπως έχει ήδη αναφερθεί για τη μηλιά (van Nieuwkerk *et al.*, 1986; Fasolo *et al.*, 1989; Pawlicki and Welander, 1994) και για διάφορα ξυλώδη είδη (Huetteman and Preece, 1993; Lu, 1993). Σε πολύ χαμηλές συγκεντρώσεις (0.001-0.05 mg l⁻¹), το TDZ έχει επίσης προωθήσει το σχηματισμό υψηλού αριθμού βλαστών στα είδη *Tilia*, *Sorbus* και *Robinia* (Chalupa, 1987), *Quercus robur* (Chalupa, 1988) και *Camelia sinensis* (Mondal *et al.*, 1998), ενώ κατά τον *in vitro* πολλαπλασιασμό της ροδιάς *Punica granatum* το TDZ ήταν λιγότερο αποτελεσματικό από τη BA και τη zeatin riboside στον πολλαπλασιασμό βλαστών (Naik *et al.*, 1999). Στη δεύτερη υποκαλλιέργεια εκφύτων από TDZ σε υπόστρωμα με BA, παράχθηκαν επιμηκυμένοι βλαστοί, όπως έχει δειχθεί και σε άλλα ξυλώδη είδη (Huetteman and Preece, 1993), οι οποίοι όμως ήταν υαλωμένοι ή παραμορφωμένοι σε υψηλό ποσοστό πιθανότατα ως αποτέλεσμα της χρήσης μεγαλύτερων από των κανονικών επιπέδων TDZ στα υποστρώματα ή της επιμηκυμένης παραμονής του συστατικού στους καλλιεργούμενους ιστούς (Huetteman and Preece, 1993; Lu, 1993). Ο τύπος και το επίπεδο της κυτοκινίνης έχουν συσχετιστεί με την ανάπτυξη υπερενυδάτωσης (Debergh *et al.*, 1992), ενώ η παρουσία του TDZ έχει οδηγήσει στην παραγωγή υπερενυδατωμένων και δεσμιωμένων ή ανώμαλων βλαστών στη μηλιά (Pawlicki and Welander, 1994; Montecelli *et al.*, 2000) και σε περισσότερους ενυδατωμένους βλαστούς από το BA στην αχλαδιά *Pyrus pyrifolia* (Kadota and Niimi, 2003). Στο *Rhododendron* sp., το TDZ έδωσε περισσότερους βλαστούς από το 2iP, που συνήθως χρησιμοποιείται, οι οποίοι όμως ήταν χαμηλότερης ποιότητας εξαιτίας της συμπαγής υπερενυδατωμένης ανάπτυξής τους (Briggs *et al.*, 1988), ενώ στην *Aloe polyphylla*, η χρήση του TDZ συντέλεσε σε πολύ χαμηλή αναγέννηση βλαστών και υψηλή υπερενυδάτωση (Ivanova and Van Staden, 2011). Τα έκφυτα που προέρχονταν από χαμηλές συγκεντρώσεις TDZ (0.1 και 0.2 mg l⁻¹) και αυτά από BA και IBA (βασικό υπόστρωμα) είχαν παρόμοια αντίδραση σχηματίζοντας λιγότερους και μακρύτερους

βλαστούς συγκρινόμενα με τα έκφυτα από υψηλές συγκεντρώσεις TDZ (0.5, 1.0 και 2.0 mg I⁻¹), ενώ όσα υποκαλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα με 1.0 BA και 0.1 IBA (mg I⁻¹) σχημάτισαν περισσότερους βλαστούς από τα έκφυτα στο υπόστρωμα με 0.5 BA και 0.05 IBA (mg I⁻¹), χωρίς να διαφέρουν ως προς το μέσο μήκος των σχηματιζόμενων βλαστών. Τα συσσωματώματα βλαστών έδωσαν περισσότερους αλλά κοντύτερους βλαστούς ανά έκφυτο συγκριτικά με τα έκφυτα βλαστού, όμως το ποσοστό υπερενυδατωμένων ή παραμορφωμένων βλαστών ήταν υψηλότερο. Κατά την τρίτη υποκαλλιέργεια εκφύτων βλαστού σε υπόστρωμα με BA, η δράση του TDZ στη βλαστογένεση περιορίστηκε, αφού τα έκφυτα από όλες τις συγκεντρώσεις TDZ και αυτά από το μάρτυρα με BA δε διέφεραν πλέον ως προς την αντίδρασή τους, ενώ τα συσσωματώματα βλαστών από το υπόστρωμα με 2.0 mg I⁻¹ TDZ έδωσαν περισσότερους βλαστούς από τους μικροβλαστούς από τα άλλα υποστρώματα, οι οποίοι όμως ήταν κοντύτεροι.

Η καλλιέργεια εκφύτων από το υπόστρωμα με 1.0 BA/ 0.1 IBA (mg I⁻¹) σε υπόστρωμα με τις μισές συγκεντρώσεις φυτορρυθμιστικών ουσιών είχε ως αποτέλεσμα τη μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού των βλαστών παράλληλα με μικρή αύξηση του ποσοστού υπερενυδατωμένων βλαστών (κυρίως των κοντύτερων βλαστών), όμως πραγματοποιήθηκαν αρκετές υποκαλλιέργειες στο υπόστρωμα με 0.5 BA/ 0.05 IBA (mg I⁻¹) για τη λήψη βλαστών από μειωμένη συγκέντρωση BA για τα πειράματα ριζοβολίας.

Η προσθήκη ενεργού άνθρακα (AC) στο υπόστρωμα πολλαπλασιασμού των βλαστών παρεμπόδισε πλήρως τον πολλαπλασιασμό των βλαστών, το οποίο επίσης παρατηρήθηκε κατά τον μικροπολλαπλασιασμό της συκιάς *Ficus carica* (Fráguas *et al.*, 2004), ενώ για τα είδη *Garcinia mangostana* (Normah *et al.*, 1995) και *Rehmannia glutinosa* (Paek *et al.*, 1995) έχει αναφερθεί μείωση του πολλαπλασιασμού των βλαστών από την προσθήκη AC. Η παρεμπόδιση της βλαστογένεσης είναι πιθανότατα αποτέλεσμα της μη-επιλεκτικής προσροφητικής επίδρασης του AC, ο οποίος μπορεί να προσροφήσει και φυτορρυθμιστικές ή άλλες ωφέλιμες ουσίες (Pan and Van Staden, 1998; Thomas, 2008).

Οι *in vitro* καλλιέργειες που εγκαταστάθηκαν από αναβλαστήσεις επέδειξαν υψηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού των βλαστών. Οι όποιες διαφορές στο δυναμικό πολλαπλασιασμού μεταξύ των καλλιεργειών θα μπορούσαν να αποδοθούν στην εποχή

συλλογής των αρχικών εκφύτων αλλά κυρίως στις γενετικές διαφορές των μητρικών φυτών, αφού τα αρχικά έκφυτα είχαν συλλεχθεί από διάφορα φυτά.

Η θέση των αρχικών εκφύτων πάνω στις αναβλαστήσεις των καμένων φυτών επηρέασε τους ρυθμούς πολλαπλασιασμού των βλαστών κατά τις δύο πρώτες υποκαλλιέργειες, ενώ αργότερα τα έκφυτα από διάφορες θέσεις δε διέφεραν ως προς την αντίδρασή τους και αναμίχθηκαν. Κατά τους Marks and Myers (1994), οι αποφάσεις που λαμβάνονται κατά την επιλογή των τύπων βλαστών *in vitro* και ο χειρισμός τους κατά την υποκαλλιέργεια μπορούν να επηρεάσουν την ακόλουθη επίδοση και την ομοιομορφία των μικροπολλαπλασιασμένων φυτών. Τύποι βλαστών ή τμήματα των βλαστών με διαφορετικά αναπτυξιακά δυναμικά πρέπει να υποκαλλιεργούνται ξεχωριστά και να εφαρμόζονται ομοιόμορφες μεταχειρίσεις για να μειωθεί η παραλλακτικότητα των μικροπολλαπλασιασμένων φυτών.

Από τις κυτοκινίνες που δοκιμάστηκαν, η BA αποδείχτηκε πιο αποτελεσματική στον πολλαπλασιασμό των βλαστών του *xM. florentina* συγκριτικά με τις zeatin, kinetin και 2iP, κάτι που έχει αναφερθεί και για τη μηλιά (Hutchinson, 1984; Kataeva and Butenko, 1987; Marn, 1988) και το *Sorbus* sp. (Arrillaga *et al.*, 1991; Ördögh *et al.*, 2006), δίνοντας περισσότερους βλαστούς ανά έκφυτο, ενώ στα υποστρώματα με kinetin σχηματίστηκαν κοντότεροι βλαστοί σε σύγκριση με τα υποστρώματα με άλλες κυτοκινίνες. Η πιο συχνά χρησιμοποιούμενη κυτοκινίνη στον πολλαπλασιασμό βλαστών μηλιάς είναι η BA (Lane, 1992; Dobránszki and Texeira da Silva, 2010) και στα συστήματα αναγέννησης βλαστών το thidiazuron και η BA (Magyar-Tábori *et al.*, 2010), ενώ και στο *Sorbus* sp. ο πολλαπλασιασμός των βλαστών διεγέρθηκε από τη BA (Chalupa, 1992). Η προσθήκη IBA στα υποστρώματα αύξησε το ρυθμό πολλαπλασιασμού των βλαστών συγκριτικά με αυτά χωρίς IBA, παρόλο που για τη μηλιά έχει αναφερθεί ότι η αυξίνη σε συνδυασμό με κανονικές συγκεντρώσεις BA μπορεί να μειώσει τον αριθμό των βλαστών αυξάνοντας όμως το μήκος τους (Lane, 1992). Η αύξηση της συγκέντρωσης των κυτοκινινών αύξησε τον αριθμό των βλαστών και μείωσε του μήκος τους, το οποίο έχει επίσης αναφερθεί στο *Malus* sp. (Lane, 1992) και στο *Sorbus* sp. (Chalupa, 1992, 2002). Επομένως, τα επίπεδα κυτοκινινών θα πρέπει να κυμαίνονται μεταξύ 1.0 και 2.0 mg l⁻¹, έτσι ώστε ένας μεγάλος αριθμός βλαστών να παράγεται χωρίς όμως σημαντικό περιορισμό του μήκους τους. Η ιδανική συγκέντρωση

BA για την καλλιέργεια εκφύτων βλαστού μηλιάς επίσης ήταν μεταξύ 1.0 και 2.0 mg I⁻¹ (James and Thunborn, 1981; Ma *et al.*, 1990; Lane, 1992; Erig *et al.*, 2002; Dobránszki and Teixeira da Silva, 2010), ενώ στο *Sorbus* sp., ο πολλαπλασιασμός των βλαστών παρακινήθηκε από 0.2-2.0 mg I⁻¹ BA (Chalupa, 1985, 1992).

Κατά την πρώτη υποκαλλιέργεια εκφύτων από μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια, που αρχικά είχαν καλλιεργηθεί με διάφορες κυτοκινίνες, στο βασικό υπόστρωμα (MS με 1.0 mg I⁻¹ BA και 0.1 mg I⁻¹ IBA), τα έκφυτα από το thidiazuron ξεπέρασαν αυτά από τη BA, τη zeatin, το 2iP και την kinetin στον αριθμό βλαστών χωρίς να υπολείπονται στο μήκος βλαστού. Μεταφορά των TDZ-επαγόμενων συσσωματωμάτων βλαστών σε δεύτερο υπόστρωμα χωρίς ή με διαφορετική ισορροπία φυτορυθμιστικών ουσιών, μετά από επαρκή χρόνο στο αρχικό υπόστρωμα με TDZ με στόχο τη μεγιστοποίηση του πολλαπλασιασμού βλαστών, είναι μια συνήθης πρακτική που χρησιμοποιείται για να ξεπεραστούν οι ανεπιθύμητες επιδράσεις του TDZ (Huetteman and Preece, 1993; Parveen and Shahrada, 2010).

Τα έκφυτα από σπορόφυτα επέδειξαν φτωχό δυναμικό πολλαπλασιασμού κατά τις υποκαλλιέργειες στο βασικό υπόστρωμα σχηματίζοντας λίγους βλαστούς ανά έκφυτο, οι οποίοι δεν επιμηκύνονταν.

Η εφαρμογή γιββερελλίνης (0.1-2.0 mg I⁻¹) στο υπόστρωμα πολλαπλασιασμού *in vitro* καλλιεργειών του *xM. florentina* εγκατεστημένων από ώριμο φυτό ή αναβλαστήσεις δεν προώθησε την επιμήκυνση των βλαστών, ενώ οδήγησε στην εμφάνιση ελαφρώς παραμορφωμένων βλαστών στα έκφυτα από ενήλικη καλλιέργεια. Φυτά κανονικής ανάπτυξης μπορεί να μην παρουσιάσουν δραματική επιμήκυνση του στελέχους τους με την εφαρμογή γιββερελλίνης, αντίθετα με ότι συμβαίνει με τα γενετικά νάνα φυτά ή τα φυτά τύπου ροζέττας (Taiz and Zeiger, 2006). Η επιμήκυνση των τμημάτων του φύλλου (μίσχου-ελάσματος) και η υπερβολική επιμήκυνση των βλαστών έχουν επίσης αναφερθεί ως ανεπιθύμητα παράπλευρα αποτελέσματα της χρήσης γιββερελλινών (Trigiano and Gray, 2005). Αντίθετα, η χρήση της γιββερελλίνης (0.1 ή 0.5 mg I⁻¹) στην περίπτωση της καλλιέργειας από σπορόφυτο αύξησε τόσο τον αριθμό όσο και το μήκος των βλαστών, το οποίο δείχνει ότι για το χαμηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού αυτής της καλλιέργειας πιθανόν να ευθύνονταν τα μειωμένα επίπεδα γιββερελλινών στα σπορόφυτα. Στη μηλιά επίσης, η ισορροπία μεταξύ GA₃ και IBA ήταν σημαντική για την επιμήκυνση των βλαστών (Yepes and Aldwinckle, 1994a).

Οι καλλιέργειες που εγκαταστάθηκαν από έκφυτα ενήλικων φυτών, με εξαίρεση την καλλιέργεια του Μαρτίου 2004, παρουσίασαν χαμηλότερους ρυθμούς πολλαπλασιασμού κατά τις υποκαλλιέργειες από ότι καλλιέργειες από αναβλαστήσεις, μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια και σπορόφυτα που χειρίστηκαν με 0.5 mg l⁻¹ GA₃. Η καλλιέργεια του Μαρτίου 2004 από ενήλικο φυτό έδωσε τους περισσότερους βλαστούς ανά έκφυτο, οι οποίοι όμως υπολείπονταν σε μήκος από τους βλαστούς των νεανικών καλλιεργειών. Υψηλότεροι ρυθμοί πολλαπλασιασμού των βλαστών καλλιεργειών εγκατεστημένων από νεαρά φυτά συγκριτικά με αυτές από ώριμα δένδρα έχουν επίσης αναφερθεί για τα είδη *Sorbus aucuparia* και *S. torminalis* (Chalupa, 1992), *Malus* sp. (Ur-Rahman *et al.*, 2007), *Quercus euboica* (Kartsonas and Papafotiou, 2007), *Acacia mangium* (Monteuuis, 2004), *Corylus avellana* (Messeguer and Melé, 1987), *Cupressus sempervirens* (Capuana and Giannini, 1997) και *Taxus mairei* (Chang *et al.*, 2001), ενώ στο *Fraxinus ornus* οι καλλιέργειες από ενήλικο ή νεανικό υλικό είχαν παρόμοια αντίδραση ως προς τον πολλαπλασιασμό των βλαστών (Arrillaga *et al.*, 1992). Στην αμυγδαλιά *Prunus dulcis*, υψηλότερα ποσοστά αναγέννησης έδωσαν έκφυτα φύλλου που ελήφθησαν από *in vitro* καλλιέργεια νεανικής προέλευσης, ενώ από τα φύλλα ενήλικης προέλευσης απαιτήθηκαν υψηλότερες συγκεντρώσεις TDZ για προτροπή βλαστών (Miguel *et al.*, 1996).



6. *IN VITRO* ΡΙΖΟΒΟΛΙΑ ΜΙΚΡΟΒΛΑΣΤΩΝ

6. *IN VITRO* ΡΙΖΟΒΟΛΙΑ ΜΙΚΡΟΒΛΑΣΤΩΝ

6.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Κατά τα πρώτα χρόνια εκπόνησης της παρούσας διατριβής, η δυσκολία στην εξεύρεση νεανικού μητρικού υλικού (σποροφύτων) για την εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας είχε ως αποτέλεσμα τη χρήση μικροβλαστών ενήλικης προέλευσης στα πειράματα *in vitro* ριζοβολίας του *xM. florentina*, οι οποίοι όμως ριζοβολούσαν δύσκολα, ενώ η ξήρανση της κορυφής και των φύλλων των μικροβλαστών που παρατηρήθηκε σε υψηλά ποσοστά απέτρεπε την προώθηση των ριζοβολημένων βλαστών για εγκλιματισμό *ex vitro*.

Με στόχο τη βελτίωση των ποσοστών ριζοβολίας των μικροβλαστών και της ποιότητας των παραγόμενων φυταρίων (απουσία ξήρανσης κορυφής και φύλλων, αυξημένος αριθμός και μήκος ριζών) δοκιμάστηκαν: i) διάφοροι τύποι και συγκεντρώσεις αυξινών ή συνδυασμοί αυτών, ii) η προτροπή ριζοβολίας μετά από καλλιέργεια σε στερεό υπόστρωμα με αυξίνη και μετά από σύντομη εμβάπτιση της βάσης των μικροβλαστών σε πυκνά διαλύματα αυξίνης, iii) διάφοροι χρόνοι καλλιέργειας, iv) η εφαρμογή σκότους την πρώτη εβδομάδα καλλιέργειας, v) η προσθήκη ενεργού άνθρακα στο υπόστρωμα, vi) διάφορα βάζα και υλικά κάλυψης, vii) διάφορα θρεπτικά υποστρώματα και viii) διάφορα μήκη μικροβλαστών. Επίσης, εξετάστηκε η επίδραση διαφόρων κυτοκινινών και της γιββερελλίνης στην ακόλουθη ριζοβολία των μικροβλαστών.

Μετά την εγκατάσταση *in vitro* καλλιεργειών από αναβλαστήσεις, μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια και σπορόφυτα, ελήφθησαν νεανικοί μικροβλαστοί που ριζοβολούσαν με μεγαλύτερη ευχέρεια και οι οποίοι χρησιμοποιήθηκαν σε επαναληπτικά πειράματα για να εξακριβωθεί η επίδραση των παραπάνω παραγόντων και σε νεανικό υλικό, αλλά και για να συγκριθούν με τους μικροβλαστούς ενήλικης προέλευσης ως προς την ικανότητα ριζοβολίας τους.

6.1.1. Ριζοβολία *in vitro*

Λεπτομερής ανασκόπηση βιβλιογραφίας σχετική με την *in vitro* ριζοβολία μικροβλαστών των ειδών *Malus* sp. και *Sorbus* sp. παρουσιάζεται στα κεφάλαια 1.7.3. και 1.7.6., αντίστοιχα. Σε αυτό το κεφάλαιο, παρουσιάζονται εργασίες που αφορούν την *in vitro* ριζοβολία άλλων ειδών.

Μια κορυφή της ειδικής δραστηριότητας της υπεροξειδάσης (αύξηση στη δραστηριότητα του ενζύμου ακολουθούμενη από μείωση) έχει γενικά βρεθεί σε ακατέργαστα εκχυλίσματα από τεμάχια βλαστού πριν το σχηματισμό ριζών. Οι ενεργοποιητές, μερικοί από αυτούς φαινολικής φύσης, παίζουν ρόλο σε αυτές τις αλλαγές στη δραστηριότητα της υπεροξειδάσης. Η κορυφή της υπεροξειδάσης δεν τερματίζει την περίοδο της προτροπής ριζοβολίας όπως προτάθηκε μερικά χρόνια νωρίτερα, αλλά μάλλον τη φάση έναρξης πριν την αναγνώριση και ανάπτυξη των ενδογενών ριζικών καταβολών. Χαρακτηριστικά της κορυφής της υπεροξειδάσης, όπως η πρόωρη ανάπτυξη της εμφάνισης, το ύψος και η ταχύτητα της μείωσης, έχουν συσχετιστεί με απώτερη επίδοση ριζοβολίας. Φυσικοί ή/ και χημικοί παράγοντες που ήταν ικανοί να τροποποιήσουν την κορυφή επίσης είχαν επιδράσεις στο ακόλουθο ποσοστό ριζοβολίας. Ένα πρόωρο τεστ που χρησιμοποιεί τη δραστηριότητα υπεροξειδάσης σε εκχυλίσματα που φτιάχνονται από βλαστούς πριν τη μεταφορά στα υποστρώματα ριζοβολίας προσδιόρισε τα φαινορικά συστατικά που είναι ικανά να ενισχύσουν τη διαδικασία ριζοβολίας και τη στιγμή εφαρμογής σε σχέση με την κορυφή της υπεροξειδάσης (Gaspar *et al.*, 1992).

Η ριζοβολία των ποικιλιών αχλαδιάς ‘Passe Crassane’ και ‘Williams’, η οποία είναι δύσκολη με τις συμβατικές μεθόδους πολλαπλασιασμού, επιτεύχθηκε *in vitro* με την εφαρμογή 0.2 mg I⁻¹ NAA. Το ποσοστό ριζοβολίας στη ‘Williams’ βελτιώθηκε με την αύξηση του αριθμού των υποκαλλιεργειών πιθανά μέσω της πρόκλησης ανανέωσης, ενώ η προσθήκη phloroglucinol στο υπόστρωμα ριζοβολίας δεν αύξησαν το ποσοστό των βλαστών που σχημάτισαν ρίζες (Al-Maarri *et al.*, 1994).

Τα ενδογενή επίπεδα του IAA και ο μεταβολισμός του IBA μελετήθηκαν σε σχέση με τη διαδικασία *in vitro* ριζοβολίας δύο ποικιλιών αχλαδιάς, της εύκολης στη ριζοβολία ‘Conference’ και της δύσκολης στη ριζοβολία ‘Doyenne d’Hiver’. Η ‘Doyenne d’Hiver’ χρειάστηκε περί τις 10 φορές υψηλότερη συγκέντρωση IBA για να πετύχει ποσοστό ριζοβολίας παρόμοιο με αυτό της ‘Conference’. Μονο- ή δι-ήμερες εκθέσεις στο IBA ήταν επαρκείς για να ενεργοποιήσουν τη ριζοβολία αλλά με διαφορετική αποτελεσματικότητα για κάθε ποικιλία. Μακρύτερη έκθεση στην αυξίνη αύξησε πολύ τον αριθμό των ριζών στην ‘Conference’, ενώ η επιμήκυνση των ριζών παρεμποδίστηκε και στις δύο ποικιλίες. Ο μεταβολισμός του IBA στις δύο ποικιλίες δε διέφερε σημαντικά, όταν το IBA χρησιμοποιήθηκε σε υψηλή συγκέντρωση για να προκαλέσει

μέγιστη ριζοβολία στην ‘Doyenne d’Hiver’. Το IBA ήταν κυρίως συζευγμένο σε γλυκόζη IBA, που ήταν συσσωρευμένο, και μια μικρή ποσότητα μετατράπηκε σε ελεύθερο IAA και στις δύο ποικιλίες. Όμως, στην ‘Doyenne d’Hiver’ αυτό το μεταβολικό μονοπάτι φαίνεται να είναι ενεργό μόνο σε υψηλότερη συγκέντρωση IBA. Είναι πιθανό οι διαφορές στην πρόσληψη και το μεταβολισμό των εφαρμοζόμενων αυξινών να επηρεάζουν την ικανότητα ριζοβολίας και την ακόλουθη ανάπτυξη των τυχαίων ριζών σε μικρομοσχεύματα αχλαδιάς (Baraldi *et al.*, 1995).

Μικρομοσχεύματα από επτά γονοτύπους της αμυγδαλιάς *Prunus dulcis*, που χρησιμοποιείται ως υποκείμενο ροδακινιάς, επέδειξαν διαφορετική ικανότητα ριζοβολίας *in vitro*. Δε βρέθηκε καμία απευθείας σχέση μεταξύ της δραστηριότητας της υπεροξειδάσης και του περιεχομένου σε ολικά φαινολικά, που προσδιορίστηκαν σε ολόκληρο το μικρομόσχευμα πριν τη μεταχείριση προτροπής ριζοβολίας, και της ικανότητας ριζοβολίας αυτών των γονοτύπων. Όμως, βρέθηκε μια θετική σχέση μεταξύ του επιπέδου ελεύθερου IAA και IAA-aspartate και της αντίδρασης ριζοβολίας. Μετά τη μεταφορά στο υπόστρωμα ριζοβολίας, η δραστηριότητα της υπεροξειδάσης στον εύκολο στη ριζοβολία γονότυπο αυξήθηκε μέχρι μια κορυφή και μετά μειώθηκε, ενώ το περιεχόμενο σε ολικά φαινολικά έδειξε την αντίθετη τάση. Αυτές οι μεταβολές δεν συνέβησαν στον πιο δύσκολο στη ριζοβολία γονότυπο (Caboni *et al.*, 1997).

Οι μικροβλαστοί της *Castanea mollissima* απέκτησαν μια βελτιωμένη ικανότητα ριζοβολίας με την αύξηση του αριθμού των υποκαλλιεργειών. Τα επίπεδα ενδογενών ορμονών (IAA, ABA, κυτοκινίνες, GA₃) και οι δραστηριότητες ενζύμων (οξειδάση του ινδολοξικού οξέος-IAAO, οξειδάση της υπεροξειδάσης-POD, πολυφαινολοξειδάση-PPO) προσδιορίστηκαν με τη μέθοδο HPLC μετά την προτροπή ριζοβολίας κατά τη 2^η, 4^η, 6^η και 8^η υποκαλλιέργεια, για να διερευνηθεί η επίδραση της διαδοχικής υποκαλλιέργειας στο σχηματισμό τυχαίων ριζών *in vitro*. Τα επίπεδα ενδογενούς IAA στους μικροβλαστούς σταδιακά αυξήθηκαν, ενώ τα ενδογενή επίπεδα ABA, κυτοκινινών και GA₃ στους μικροβλαστούς μειώθηκαν ελαφρώς μετά από διαδοχικές υποκαλλιέργειες. Το επίπεδο IAA συσχετίστηκε ισχυρά με τους αριθμούς υποκαλλιέργειας και τα ποσοστά ριζοβολίας. Οι αναλογίες IAA/ABA και IAA/κυτοκινίνες αυξήθηκαν έντονα με την αύξηση του ποσοστού ριζοβολίας κατά τις διαδοχικές καλλιέργειες και είχε υψηλές συσχετίσεις με το ποσοστό ριζοβολίας. Η δραστηριότητα των IAAO και POD σημαντικά συσχετίστηκε αρνητικά με τους αριθμούς

υποκαλλιέργειας, και η δραστηριότητα της PPO αυξήθηκε μετά τις υποκαλλιέργειες (Hou *et al.*, 2010).

Στα συμβατικά μοσχεύματα, η αυξίνη που εφαρμόζεται για την επίτευξη ριζοβολίας λαμβάνεται κυρίως μέσω της επιφάνειας της τομής και όχι μέσω της επιδερμικής επιφάνειας του βλαστού. Παρόλο που στα ιστοκαλλιεργημένα φυτά η επιδερμίδα είναι ανεπαρκώς ανεπτυγμένη και τα στομάτια δε δουλεύουν κανονικά, τεμάχια βλαστού από μικρομοσχεύματα μηλιάς πήραν το σημασμένο IAA επίσης κυρίως από την επιφάνεια της τομής. Τεμάχια βλαστού με επιδερμίδα με κενά, που προκλήθηκαν από την αφαίρεση των μίσχων, χρειάστηκαν μικρότερη συγκέντρωση αυξίνης για να επιτύχουν ριζοβολία από τεμάχια με ακέραια επιδερμίδα, υποδεικνύοντας ότι τα κενά διευκολύνουν την πρόσληψη της αυξίνης από το υπόστρωμα (Guan and De Klerk, 2000).

6.1.2. Νέκρωση κορυφής βλαστών

Η νέκρωση της κορυφής των βλαστών είναι μια φυσιολογική διαταραχή στην ανάπτυξη των φυταρίων, που συνήθως παρουσιάζεται στις *in vitro* καλλιέργειες ενός αριθμού ειδών, είτε στα στάδια πολλαπλασιασμού και επιμήκυνσης είτε κατά τη ριζοβολία, και έχει αποδοθεί στην ανεπάρκεια ασβεστίου, στην έλλειψη κυτοκινινών και στην παρουσία αυξίνης στο υπόστρωμα καλλιέργειας (Vietez *et al.*, 1989).

Κατά την επιμήκυνση και ριζοβολία καλλιεργειών καστανιάς (*Castanea sativa*) και βελανιδιάς (*Quercus robur*) παρατηρήθηκε νέκρωση κορυφής, η οποία μπορούσε να επεκταθεί προς τα κάτω στο βλαστό και στα φύλλα. Σε μερικές καλλιέργειες, ο ρόλος της κυριαρχίας κορυφής αναλήφθηκε από ένα από τους πλευρικούς οφθαλμούς, γενικά τον κοντινότερο στην κορυφή, και το φυτό επιβίωσε. Οι προσπάθειες να αποτραπεί η νέκρωση με τη προσθήκη χαμηλής συγκέντρωσης BA στο υπόστρωμα ριζοβολίας, απέτρεψαν τη νέκρωση σε μεγάλο βαθμό, αλλά τα ποσοστά ριζοβολίας μειώθηκαν σημαντικά. Η αφαίρεση της κορυφής του βλαστού και η εφαρμογή στην τομή μιας σταγόνας 25 mg l⁻¹ BA σε άγαρ προώθησε τη μασχαλιαία ανάπτυξη, με τον καταλληλότερο χρόνο για αποκεφαλισμό και μεταχείριση με BA να είναι μετά από 10 ημέρες στο υπόστρωμα ριζοβολίας, επειδή περιόρισε το πρόβλημα χωρίς να μειώσει το ποσοστό ριζοβολίας, αφού οι ριζικές καταβολές είχαν ήδη διαφοροποιηθεί. Προτάθηκε ότι η αιτία της νέκρωσης της κορυφής βλαστού ήταν η απουσία κυτοκινίνης από το υπόστρωμα ριζοβολίας σε σύνδεση με τη μεταχείριση αυξίνης για προτροπή ριζοβολίας.

Η παρουσία υγιών ριζών φάνηκε να αποτρέπει τη νέκρωση κορυφής, είτε λόγω της ενδογενούς παραγωγής κυτοκινίνης στις ρίζες, είτε λόγω της βελτιωμένης πρόσληψης θρεπτικών στοιχείων (Vietez *et al.*, 1989).

Νέκρωση κορυφής έχει επίσης παρατηρηθεί σε καλλιέργειες ενεργά αναπτυσσόμενων βλαστών διαφόρων ειδών, όπως της σημύδας, της μηλιάς, της φτελιάς, του ροδόδενδρου και της πατάτα. Χρησιμοποιώντας τρεις ποικιλίες πατάτας αναπτυσσόμενες σε υποστρώματα με διαφορετικές συγκεντρώσεις Ca (0.3, 3.0 και 30 mM) η χαρακτηριστική νέκρωση προωθήθηκε ή καταστάληκε. Καλλιέργειες πατάτας αναπτυσσόμενες σε 0.3 mM Ca περιείχαν περίπου 0.1% Ca ανά g ξηρού βάρους βλαστού και εμφάνισαν το υψηλότερο ποσοστό νέκρωσης κορυφής, που κυμαινόταν από 48% έως 72%, εξαρτώμενου της ποικιλίας. Καλλιέργειες πατάτας σε 3 ή 30 mM Ca περιείχαν 0.5% ή 3% Ca ανά g ξηρού βάρους βλαστού, αντίστοιχα, και σχημάτισαν μόνο 0% έως 9% νεκρωτικούς βλαστούς, εξαρτώμενου της ποικιλίας. Το parafilm που χρησιμοποιήθηκε για το κλείσιμο των δοχείων προώθησε τη νέκρωση της κορυφής βλαστού, αλλά τα αυξημένα επίπεδα Ca στο υπόστρωμα είχαν την τάση να ξεπεράσουν την επίδραση αυτή. Προτάθηκε ότι η αιτία της νέκρωσης κορυφής μπορεί να ήταν η ανεπάρκεια ασβεστίου λόγω χαμηλής πρόσληψης των ιόντων Ca, ως αποτέλεσμα της υψηλής υγρασίας στα δοχεία καλλιέργειας, που περιόρισε το ρυθμό διαπνοής και μείωσε την κινητικότητα των ιόντων ασβεστίου μέσω του ξυλώδους ιστού. Το parafilm πιθανότατα διατήρησε υψηλότερη υγρασία κλείνοντας σφικτά το δοχείο καλλιέργειας, κάτι που επιδείνωσε το πρόβλημα ροής Ca. Εάν η νέκρωση κορυφής εμφανίζεται σε ένα σύστημα καλλιέργειας, ο συνδυασμός αυξημένης ανταλλαγής αερίων των δοχείων με τα αυξημένα επίπεδα Ca στο υπόστρωμα θα μπορούσαν να φανούν ιδιαίτερα αποτελεσματικά στη λύση αυτού του προβλήματος (Sha *et al.*, 1989).

Η νέκρωση της κορυφής των δύσκολων στη ριζοβολία φυταρίων *Malus domestica* που εμφανίστηκε κατά την επιμηκυμένη υποκαλλιέργεια σε υπόστρωμα χωρίς κυτοκινίνη (συνθήκες ευνοϊκές για ριζοβολία) σχετίστηκε με μειωμένα επίπεδα ενδογενών ορμονών. Ανάλυση με τη μέθοδο ELISA των ενδογενών ορμονών των καλλιεργούμενων βλαστών μηλιάς έδειξε ότι οι βλαστοί με νέκρωση κορυφής περιείχαν 1.5-3 φορές λιγότερες κυτοκινίνες (IPA, 2iP, zeatin ribozide) και ABA, 8-10 φορές λιγότερη zeatin και 20-30 φορές λιγότερο IAA από αυτούς που αναπτύσσονταν σε υπόστρωμα με κυτοκινίνη. Η νέκρωση της κορυφής θεωρήθηκε ότι προκλήθηκε από την

παρακάτω ακολουθία γεγονότων: Η καλλιέργεια των βλαστών μηλιάς για αρκετούς μήνες σε υπόστρωμα χωρίς κυτοκινίνη οδήγησε στη σταδιακή εξάντληση της κυτοκινίνης από τους βλαστούς. Όταν δε σχηματίστηκαν καθόλου ρίζες, οι βλαστοί στερήθηκαν την πηγή ενδογενών κυτοκινινών. Η ανεπάρκεια κυτοκινίνης οδήγησε σε σταμάτημα των διαιρέσεων στο κορυφαίο μεριστώμα και σε κυτταρική νέκρωση, το οποίο, με τη σειρά του, επέφερε μείωση στη σύνθεση IAA και ABA (Kataeva *et al.*, 1991).

Η νέκρωση της κορυφής βλαστών αποτελεί ένα συχνό και επίμονο πρόβλημα σε καλλιέργειες της *Pistacia vera*, της οποίας η επίδραση επιχειρήθηκε να μειωθεί με τον εμπλουτισμό του υποστρώματος με αυξημένα επίπεδα είτε βορίου είτε ασβεστίου. Πειραματικές αποδείξεις ελήφθησαν για την υποστήριξη προηγούμενων αναφορών, ότι η νέκρωση της κορυφής είναι μια σχετιζόμενη με το ασβέστιο φυσιολογική διαταραχή, που επιδεινώνεται από το χαμηλό έλλειμμα πίεσης υδρατμών μέσα στα δοχεία *in vitro* καλλιέργειας. Ο εμπλουτισμός των υγρών υποστρωμάτων καλλιέργειας με είτε 100-1000 μM βορίου ή αυξημένα επίπεδα ασβεστίου ως γλυκονικό ασβέστιο (0.3-30 mM), σε επίπεδα πολύ πάνω από αυτά που αναμένεται να απαιτούνται για κανονική υγιή ανάπτυξη, μείωσε σημαντικά την ανάπτυξη των συμπτωμάτων νέκρωσης αλλά δεν απέτρεψε τη νέκρωση κορυφής βλαστών. Ήταν πιθανό αυτά τα ιόντα να μην ήταν άμεσα διαθέσιμα στους επάκριους βλαστούς. Ένας λόγος για αυτό μπορεί να ήταν το γεγονός ότι η διαπνοή ήταν τόσο χαμηλή στους μικροβλαστούς που τα ιόντα, ιδιαίτερα του ασβεστίου, δεν μεταφέρονταν στις κορυφές και τα μεριστώματα των μικροβλαστών (Abousalim and Mantell, 1994). Οι Barghchii and Anderson (1996), επίσης, μελέτησαν την επίδραση των αυξημένων συγκεντρώσεων Ca (3-24 mM) και B (100-800 μM) στην ύπαρξη νέκρωσης κορυφής βλαστού σε καλλιέργειες της *Pistacia vera*. Η νέκρωση κορυφής βλαστού μειώθηκε σημαντικά με την εφαρμογή Ca ή B, όμως τα υποστρώματα με περισσότερο από 200 μM B έδωσαν μειωμένο πολλαπλασιασμό βλαστών. Το Ca (12-24 mM), που χορηγήθηκε ως χλωριούχο ασβέστιο μείωσε τη νέκρωση κορυφής βλαστού χωρίς καμία δυσμενή επίπτωση στον πολλαπλασιασμό ή την επιμήκυνση των βλαστών, ενώ το οξικό ασβέστιο μείωσε την επιμήκυνση. Βγήκε το συμπέρασμα ότι η νέκρωση κορυφής βλαστού είναι μια φυσιολογική ανωμαλία που σχετίζεται με την ανεπάρκεια Ca και/ ή B στις μεριστωματικές περιοχές των ενεργά αναπτυσσόμενων βλαστών. Η μείωση της υγρασίας ή ο αυξημένος αερισμός στα δοχεία καλλιέργειας δεν είχε καμία σημαντική

επίδραση στην εμφάνιση της ξήρανσης κορυφής βλαστών, αντίθετα με ότι βρέθηκε από τους Sha *et al.* (1989).

Νέκρωση κορυφής βλαστών παρατηρήθηκε και σε φυτάρια αμπελιού (*Vitis vinifera*), ιδιαίτερα σε αυτά που προέρχονταν από μεγάλα φυλλοφόρα μοσχεύματα. Τέτοια μοσχεύματα επέδειξαν εύρωστες ρίζες και καθυστερημένη αλλά γρήγορη ανάπτυξη βλαστού που κατέληξε σε ξήρανση κορυφής βλαστού. Τα φυτάρια που εμφάνισαν ξήρανση κορυφής βλαστού είχαν λιγότερο Ca^{++} και Mg^{++} στον ιστό του βλαστού από ότι βλαστοί από κανονικά φυτάρια, ενώ οι ρίζες τους είχαν παρόμοιο περιεχόμενο Ca^{++} ή υψηλότερο περιεχόμενο Mg^{++} , το οποίο υποδηλώνει ότι δεν ήταν η διαθεσιμότητα στις ρίζες, αλλά η μεταφορά στο βλαστό που ήταν κρίσιμη. Και τα δύο είχαν συγκρίσιμα ποσά κυτοκινινών στους ιστούς βλαστού και ρίζας (Thomas, 2000).

6.1.3. Χρήση ενεργού άνθρακα *in vitro*

Ο ενεργός άνθρακας (AC) αποτελείται από άνθρακα διατεταγμένο σε μικρό μέγεθος σωματιδίου. Είναι ένα πορώδες και άγευστο υλικό και προκύπτει από το στοιχείο του άνθρακα με απομάκρυνση όλων των μη ανθρακικών προσμίξεων και την οξείδωση της ανθρακικής επιφάνειας. Ο AC έχει ένα πολύ λεπτό δίκτυο πόρων με μια εξαιρετικά μεγάλη εσωτερική επιφάνεια στην οποία μπορούν να προσροφηθούν πολλές ουσίες (Thomas, 2008).

Ο ενεργός άνθρακας χρησιμοποιείται ευρέως στα υποστρώματα ιστοκαλλιέργειας. Έχει μια προσροφητική προτίμηση για μετρίως πολικές παρά για μη πολικές ή πολύ πολικές οργανικές ενώσεις, εμφανίζοντας μεγαλύτερη προσρόφηση σε αρωματικά προϊόντα, όπως είναι τα φαινολικά και τα οξειδωμένα παράγωγά τους, οι αυξίνες (IAA, NAA, IBA), οι κυτοκινίνες (BA) και άλλες ορμόνες με ετεροκυκλική και ακόρεστη δομή δακτυλίου. Αντίθετα, τα πολύ πολικά και εύκολα υδατοδιαλυτά σάκχαρα (σουκρόζη, σορβιτόλη, μαννιτόλη και ινοσιτόλη) μπορεί να μην απομακρυνθούν από το υπόστρωμα. Οι διαλυμένες ουσίες σε ένα διάλυμα που έρχονται σε επαφή με τον ενεργό άνθρακα θα προσροφηθούν μέχρι να εγκατασταθεί μια ισορροπία μεταξύ των προσροφημένων και μη μορίων. Η προσροφητική ικανότητα του άνθρακα γενικά εξαρτάται από μια ποικιλία παραγόντων, όπως η πυκνότητα, η καθαρότητα και το pH, ενώ μπορούν να την επηρεάσουν τα ανόργανα άλατα (Pan and van Staden, 1998).

Οι επιδράσεις του ενεργού άνθρακα στην αντίδραση του ιστού στην *in vitro* καλλιέργεια εμφανίζονται να εξαρτώνται τόσο από το είδος του άνθρακα και το βαθμό ενεργοποίησής του, όσο και από το καλλιεργούμενο φυτικό είδος. Η προσθήκη ενεργού άνθρακα στο υπόστρωμα καλλιέργειας μπορεί είτε να προωθήσει, είτε να παρεμποδίσει την *in vitro* ανάπτυξη και εξέλιξη, εξαρτώμενου του υποστρώματος, του χρησιμοποιούμενου ιστού και του στόχου του ερευνητή (Pan and van Staden, 1998).

Οι επιδράσεις του ενεργού άνθρακα γενικά μπορούν να αποδοθούν στα ακόλουθα:

i) εγκατάσταση ενός σκοτεινού περιβάλλοντος

Ο AC μπορεί να επηρεάσει τη δραστηριότητα και/ ή τη σταθερότητα των φυτορρυθμιστικών ουσιών μειώνοντας ή εξαιρώντας το φως στην *in vitro* καλλιέργεια. Η μείωση του φωτός στη βάση ενός βλαστού μπορεί να παρέχει ένα ευνοϊκό περιβάλλον για τη συσσώρευση της φωτοευαίσθητης αυξίνης ή συμπαραγόντων.

ii) προσρόφηση ανεπιθύμητων ή παρεμποδιστικών ουσιών παραγόμενων από τα υποστρώματα ή τα έκφυτα

Η ενσωμάτωση του AC στις καλλιέργειες μπορεί να ανακουφίσει το πρόβλημα του καφετιάσματος και της νέκρωσης των ιστών, που συχνά παρατηρείται κατά τα αρχικά στάδια καλλιέργειας εξαιτίας της υπερβολικής παραγωγής πολυφαινολών. Αν και η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος αποτροπής αυτού του προβλήματος είναι η μεταφορά των εκφύτων σε φρέσκο υπόστρωμα, ο AC μπορεί να αποτρέψει το μεταχρωματισμό με προσρόφηση των φαινολικών και να καταστήσει την πολυφαινολική οξειδάση και τη περοξειδάση ανενεργές. Ο αποκλεισμός του φωτός από τον AC μπορεί να έχει μια δευτερεύουσα επίδραση στη μείωση του μεταχρωματισμού, αφού το φως έχει προταθεί ότι αυξάνει τη δραστηριότητα των ενζύμων που σχετίζονται με τη φαινολική οξείδωση.

iii) προσρόφηση φυτορρυθμιστικών ουσιών και άλλων οργανικών ουσιών

Ο AC είναι ικανός να προσροφήσει υψηλές συγκεντρώσεις των ρυθμιστών ανάπτυξης, αυξινών (IAA, IBA, NAA), κυτοκινινών (BA, κινετίνη) αλλά και του αιθυλενίου. Η επίδραση του AC στο αέριο αιθυλένιο, που παράγεται από το φυτικό ιστό και/ ή το υπόστρωμα, εξαρτάται από τις καλλιεργητικές συνθήκες, όπως ο όγκος και το σχήμα του δοχείου, ο όγκος του υποστρώματος και η επιφάνεια που εκτίθεται στην εσωτερική ατμόσφαιρα.

iv) απελευθέρωση ουσιών προωθητικών της ανάπτυξης που υπάρχουν στον ή είναι προσροφημένες από τον ενεργό άνθρακα

Οι επιδράσεις του AC είναι πιθανό να οφείλονται στη συνεισφορά μεταλλικών στοιχείων. Η απελευθέρωση ουσιών από τον AC είναι μια πολύ αργή διαδικασία που εξαρτάται από το διαλύτη και τις συνθήκες διάλυσης και μπορεί να επηρεαστεί από το βαθμό ενεργοποίησης του AC, τη θερμοκρασία, το pH του διαλύματος και τον τύπο του διαλύτη. Πάντως, οι προσροφημένες ουσίες μπορεί να είναι λιγότερο κινητικές από ότι στο έδαφος, εξαιτίας της υψηλότερης εσωτερικής επιφάνειας του AC (Pan and van Staden, 1998).

Κατά τον Thomas (2008), η πιο σημαντική επίπτωση της προσθήκης του AC στα υποστρώματα καλλιέργειας είναι μια δραστική βουτιά στη συγκέντρωση των φυτορρυθμιστικών ουσιών και άλλων οργανικών συμπληρωμάτων, εξαιτίας της προσρόφησης αυτών των χημικών ουσιών από τον AC. Αυτό κάνει τους ερευνητές που χρησιμοποιούν τον AC να μη γνωρίζουν την ακριβή ποσότητα που είναι διαθέσιμη στους φυτικούς ιστούς.

Ο AC παίζει σημαντικό ρόλο στο μικροπολλαπλασιασμό, τη ριζοβολία, την επιμήκυνση του βλαστού, τη σωματική εμβρυογένεση, τη βλάστηση σπόρων ορχιδεών, την καλλιέργεια ανθέρων, την παραγωγή συνθετικών σπόρων, την καλλιέργεια πρωτοπλαστών, το σχηματισμό βολβών κ.α. Η συγκέντρωση του AC διαφέρει σημαντικά στην καλλιέργεια φυτικών ιστών και μπορεί να κυμαίνεται από 0.002 g/l μέχρι 150 g/l (Thomas, 2008).

Κατά την *in vitro* ριζοβολία μικροπολλαπλασιασμένων βλαστών από νεανικό ή ώριμο *Pinus pinaster*, η προσθήκη AC στο υπόστρωμα ριζοβολίας βελτίωσε το δυναμικό για τυχαία ριζοβολία, όχι μόνο από την άποψη των ποσοστών ριζοβολίας, αλλά επίσης επαυξάνοντας τον αριθμό και το μήκος των ριζών. Αυτή η προωθητική επίδραση του AC στην ικανότητα ριζοβολίας συνδέθηκε ιδιαίτερα με τα ώριμα έκφυτα (Dumas and Monteuis, 1995).

Μικροβλαστοί προερχόμενοι από σταθεροποιημένες καλλιέργειες, που ξεκίνησαν από ενήλικα δένδρα *Quercus robur* και *Quercus rubra*, ριζοβόλησαν πιο αποτελεσματικά μετά από καλλιέργεια σε υπόστρωμα που περιείχε 25 mg l⁻¹ IBA για 24 h και ακόλουθη μεταφορά σε υπόστρωμα χωρίς αυξίνη που περιείχε 1% AC. Για όλους τους κλώνους που δοκιμάστηκαν, ο ενεργός άνθρακας ωφέλησε τόσο την ποιότητα των βλαστών όσο και την ανάπτυξη του ριζικού συστήματος, το οποίο ενισχύθηκε από το σχηματισμό πολλών πλευρικών ριζών. Η συνολική περιοχή του ριζικού συστήματος και το μήκος,

μετρημένα με ψηφιακό αναλυτή εικόνας, ήταν σημαντικά μεγαλύτερα στο υπόστρωμα που περιείχε ενεργό άνθρακα από αυτό που δεν είχε. Επειδή το σκοτεινίασμα του βασικού τμήματος των βλαστών με αλουμινόχαρτο κατά τη φάση ριζοβολίας προκάλεσε μόνο μια μικρή αύξηση στη ριζοβολία, βγήκε το συμπέρασμα ότι η μεγάλη επίδραση του AC στη ριζοβολία ήταν αποτέλεσμα της προσρόφησης παρεμποδιστικών ουσιών από το υπόστρωμα ή τα έκφυτα ή και τα δύο, παρά της συσκότισης της βάσης (Sanchez *et al.*, 1996).

Σπόροι των Βραζιλιάνικων ορχιδεών *Miltonia flavescens*, *Laelia flava* και *Oncidium trulliferum* φύτρωσαν *in vitro* και μετά από τρεις μήνες μεταφέρθηκαν για ανάπτυξη σε υποστρώματα πλήρους ή μισής δύναμης MS, χωρίς ή με 1 ή 2 g l⁻¹ AC. Μετά από έξι μήνες μετρήθηκαν το ύψος των φυταρίων, ο αριθμός των διακλαδώσεων ανά φυτάριο, ο αριθμός των ριζών ανά φυτάριο, το μήκος των ριζών και το φρέσκο βάρος, και τα φυτάρια βγήκαν για εγκλιματισμό. Ο ενεργός άνθρακας βελτίωσε την ποιότητα των *in vitro* φυτών και αύξησε την επιβίωσή τους μετά τη μεταφύτευση και στα τρία είδη που αξιολογήθηκαν. Καλύτερα αποτελέσματα για τις *M. flavescens* και *L. flava* ελήφθησαν στο μισής δύναμης MS με 2 g l⁻¹ AC και για την *O. trulliferum* στο πλήρες MS με 1 g l⁻¹ AC (Moraes *et al.*, 2005).

Οι περισσότερες δημοσιεύσεις είναι επικεντρωμένες στις προωθητικές επιδράσεις επί της αντίδρασης των ιστών στην *in vitro* καλλιέργεια, όμως ο AC, ταυτόχρονα με τις επιβλαβείς ή παρεμποδιστικές ουσίες, μπορεί να προσροφήσει και φυτορρυθμιστικές και άλλες ουσίες, οπότε αυτή η μη-επιλεκτική προσροφητική επίδραση του AC μπορεί να έχει και αρνητικές επιδράσεις στα καλλιεργούμενα έκφυτα. Η διερεύνηση του μηχανισμού προσρόφησης του ενεργού άνθρακα και ο προσδιορισμός των ουσιών που προσροφώνται και απελευθερώνονται από τον AC θα βοηθήσουν στην κατανόηση του τρόπου δράσης του AC στην ανάπτυξη και εξέλιξη των φυταρίων (Pan and van Staden, 1998; Thomas, 2008).

6.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

6.2.1. Προέλευση μικροβλαστών για *in vitro* ριζοβολία

Στα πειράματα *in vitro* ριζοβολίας χρησιμοποιήθηκαν μικροβλαστοί που προέρχονταν κυρίως από την ενήλικη καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί το Μάρτιο '04 παρουσιάζοντας πλούσιο δυναμικό πολλαπλασιασμού και από τις νεανικές καλλιέργειες

που είχαν εγκατασταθεί από αναβλαστήσεις τον Ιούνιο και Ιούλιο '09. Το πλεονέκτημα της χρήσης μικροβλαστών από αυτές τις καλλιέργειες ήταν ότι προέρχονταν από έκφυτα που ελήφθησαν από το ίδιο ακριβώς φυτό πριν και μετά την πυρκαγιά με αποτέλεσμα ο γονότυπος να μην επηρεάζει τα αποτελέσματα.

Μικροβλαστοί από όλες τις *in vitro* καλλιέργειες, που είχαν εγκατασταθεί από ενήλικα φυτά, αναβλαστήσεις, μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια και σπορόφυτα, χρησιμοποιήθηκαν κυρίως για να εξετασθούν συγκριτικά ως προς την ικανότητα ριζοβολίας τους.

6.2.2. Πειράματα *in vitro* ριζοβολίας μικροβλαστών

Κατά τη διερεύνηση της *in vitro* ριζοβολίας μικροβλαστών που ελήφθησαν από ενήλικη ή νεανική καλλιέργεια εξετάστηκε η επίδραση των παρακάτω παραγόντων:

1) της συνεχούς ή για μία εβδομάδα παρουσίας IBA ή NAA σε στερεό υπόστρωμα καλλιέργειας

Μικροβλαστοί από ενήλικο φυτό, μήκους 0.8-2.0 cm, καλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS με 20 g l^{-1} σακχαρόζη, το οποίο περιείχε 0.5 ή 1.0 ή 2.0 ή 3.0 mg l^{-1} IBA για 8 εβδομάδες είτε για 1 εβδομάδα και ακολούθως μεταφέρθηκαν σε $\frac{1}{2}$ MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για τις περαιτέρω 7 εβδομάδες. Η καλλιέργεια έγινε σε βάζα όγκου 75 ml υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ.

Μικροβλαστοί από αναβλαστήσεις, μήκους 1.0-2.0 cm, καλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS με 0.5 ή 1.0 ή 2.0 mg l^{-1} IBA ή NAA ή χωρίς αυξίνη είτε συνεχώς για 5 εβδομάδες είτε για 1 εβδομάδα και στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν σε $\frac{1}{2}$ MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για ακόμη 4 εβδομάδες, σε βάζα όγκου 145 ml με καπάκι magenta.

2) της παρουσίας IBA ή NAA ή IAA ή συνδυασμών αυτών για μία εβδομάδα στο στερεό υπόστρωμα καλλιέργειας

Μικροβλαστοί από ενήλικο φυτό, μήκους 0.8-1.5 cm, καλλιεργήθηκαν για 1 εβδομάδα σε στερεό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS με 0.0 ή 0.5 mg l^{-1} IBA και 0 ή 2 ή 8 ή 14 ή 20 mg l^{-1} IAA σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς, και ακολούθως μεταφέρθηκαν σε

½MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για ακόμη 7 εβδομάδες, σε βάζα όγκου 75 ml υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ.

Επίσης, μικροβλαστοί από ενήλικο φυτό, μήκους 0.8-2.0 cm, καλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα ½MS με 0.5 ή 1.0 mg I⁻¹ IBA και 8.0 mg I⁻¹ IAA για 1 εβδομάδα, και μετά σε ½MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για ακόμη 5 εβδομάδες, σε βάζα όγκου 75 ml υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ ή μεμβράνης sanitas.

Μικροβλαστοί από αναβλαστήσεις, μήκους 1.0-2.0 cm, καλλιεργήθηκαν για 1 εβδομάδα σε στερεό υπόστρωμα ½MS με 0.0 ή 0.5 ή 1.0 mg I⁻¹ IBA ή NAA και 0.0 ή 4.0 ή 8.0 mg I⁻¹ IAA σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς, και ακολούθως μεταφέρθηκαν σε ½MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για ακόμη 4 εβδομάδες, σε βάζα όγκου 145 ml με καπάκι magenta.

3) της σύντομης εμφάνισης σε υγρό διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης IBA ή συνδυασμού IBA/IAA

Μικροβλαστοί από ενήλικο φυτό, μήκους 0.8-1.5 cm, παρακινήθηκαν να ριζοβολήσουν μετά από εμφάνιση της βάσης τους για 10 sec σε υγρό διάλυμα με 500 ή 1000 ή 1500 mg I⁻¹ IBA και μεταφορά είτε σε στερεό υπόστρωμα ½MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, με ή χωρίς AC (2 g I⁻¹), είτε σε αποστειρωμένο υπόστρωμα τύρφης ή τύρφης-περλίτη 1:1, για 8 εβδομάδες για ανάπτυξη των ριζών, σε βάζα όγκου 75 ml υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ.

Επίσης, μικροβλαστοί από ενήλικο φυτό παρακινήθηκαν να ριζοβολήσουν μετά από εμφάνιση της βάσης τους για 10 sec σε υγρό διάλυμα που περιείχε είτε μόνο 500 ή 1000 mg I⁻¹ IBA είτε 500 ή 1000 mg I⁻¹ IBA σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς με 250 ή 500 ή 1000 mg I⁻¹ IAA, ακολουθούμενη από καλλιέργεια σε ½MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες με ή χωρίς AC (2 g I⁻¹) για 8 εβδομάδες για ανάπτυξη των ριζών, σε βάζα όγκου 75 ml υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ. Τα αποτελέσματα για κάθε επέμβαση με αυξίνη προέκυψαν μετά από άθροιση των επιμέρους μετρήσεων που ελήφθησαν κατά την καλλιέργεια σε υπόστρωμα ½MS με και χωρίς AC.

Μικροβλαστοί, μήκους 1.0-2.0 cm, που ελήφθησαν από καλλιέργειες εγκατεστημένες από αναβλαστήσεις και από μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια παρακινήθηκαν να ριζοβολήσουν μετά από εμφάνιση της βάσης τους σε υγρό διάλυμα 500 ή 1000 mg I⁻¹ IBA για 10 sec ακολουθούμενη από καλλιέργεια σε ½MS χωρίς

φυτορυθμιστικές ουσίες για 5 εβδομάδες, σε βάζα όγκου 145 ml και καπάκι magenta, και τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με αυτά που ελήφθησαν μετά από καλλιέργεια σε $\frac{1}{2}$ MS με 0.5 IBA/ 8 IAA (mg l^{-1}) για 1 εβδομάδα και μεταφορά σε $\frac{1}{2}$ MS χωρίς φυτορυθμιστικές ουσίες για ακόμη 4 εβδομάδες.

4) της εφαρμογής σκότους κατά την πρώτη εβδομάδα ριζοβολίας

Μικροβλαστοί από ενήλικο φυτό, μήκους 0.8-1.5 cm, καλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS χωρίς ή με 0.5 mg l^{-1} IBA και 2 ή 8 ή 14 ή 20 mg l^{-1} IAA σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς, υπό συνθήκες 16 h φωτός ή σε συνεχές σκοτάδι, για 1 εβδομάδα, και ακολούθως μεταφέρθηκαν σε $\frac{1}{2}$ MS χωρίς φυτορυθμιστικές ουσίες υπό 16 h φωτοπερίοδο για ακόμη 7 εβδομάδες, σε βάζα όγκου 75 ml υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ.

Επίσης, μικροβλαστοί από ενήλικο φυτό καλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS με 1.0 mg l^{-1} IBA και 2 ή 4 ή 8 ή 12 mg l^{-1} IAA, υπό συνθήκες 16 h φωτός ή σε συνεχές σκοτάδι, για 1 εβδομάδα, και ακολούθως μεταφέρθηκαν σε $\frac{1}{2}$ MS χωρίς φυτορυθμιστικές ουσίες υπό 16 h φωτοπερίοδο για ακόμη 7 εβδομάδες, σε βάζα όγκου 75 ml υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ.

Μικροβλαστοί από αναβλαστήσεις, μήκους 1.0-2.0 cm, καλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg l^{-1}) υπό συνθήκες 16 h φωτός ή σε συνεχές σκοτάδι για 1 εβδομάδα και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε $\frac{1}{2}$ MS χωρίς φυτορυθμιστικές ουσίες υπό 16 h φωτοπερίοδο για ακόμη 4 εβδομάδες, σε βάζα όγκου 145 ml με καπάκι magenta.

5) της χρήσης ενεργού άνθρακα

Μικροβλαστοί από ενήλικο φυτό, μήκους 0.8-1.5 cm, καλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS με 1.0 mg l^{-1} IBA και 2 ή 4 ή 8 ή 12 mg l^{-1} IAA, με ή χωρίς AC (2 g l^{-1}), υπό συνθήκες 16 h φωτός ή σε συνεχές σκοτάδι για 1 εβδομάδα, και ακολούθως μεταφέρθηκαν αντίστοιχα σε $\frac{1}{2}$ MS χωρίς φυτορυθμιστικές ουσίες με ή χωρίς AC υπό 16 h φωτοπερίοδο για ακόμη 7 εβδομάδες, σε βάζα όγκου 75 ml υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ. Τα αποτελέσματα για κάθε επέμβαση με αυξίνη προέκυψαν μετά από άθροιση των επιμέρους μετρήσεων που ελήφθησαν κατά την καλλιέργεια σε συνθήκες φωτός και σκότους.

Οι μικροβλαστοί από ενήλικο φυτό, καλλιεργήθηκαν επίσης σε στερεό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS χωρίς ή με 0.5 mg Γ^{-1} IBA και 2 ή 8 ή 14 ή 20 mg Γ^{-1} IAA σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς, υπό συνθήκες 16 h φωτός ή σε συνεχές σκοτάδι για 1 εβδομάδα, και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε $\frac{1}{2}$ MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες με ή χωρίς AC υπό 16 h φωτοπερίοδο για ακόμη 7 εβδομάδες, σε βάζα όγκου 75 ml υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ. Τα αποτελέσματα για κάθε επέμβαση με αυξίνη προέκυψαν μετά από άθροιση των επιμέρους μετρήσεων που ελήφθησαν κατά την καλλιέργεια σε συνθήκες φωτός και σκότους.

Επίσης, μικροβλαστοί από ενήλικο φυτό παρακινήθηκαν να ριζοβολήσουν μετά από εμβάπτιση της βάσης τους για 10 sec σε υγρό διάλυμα που περιείχε 500 ή 1000 mg Γ^{-1} IBA και 0 ή 250 ή 500 ή 1000 mg Γ^{-1} IAA σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς, ακολουθούμενη από καλλιέργεια σε $\frac{1}{2}$ MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, με ή χωρίς AC (2 g Γ^{-1}), για 8 εβδομάδες για ανάπτυξη των ριζών, σε βάζα όγκου 75 ml υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ.

Για να διαπιστωθεί αν η διάρκεια της καλλιέργειας σε AC επιδρά στην *in vitro* ριζοβολία, μικροβλαστοί από ενήλικο φυτό, των οποίων η βάση είχε εμβαπτισθεί για 10 sec σε υγρό διάλυμα με 1000 mg Γ^{-1} IBA για προτροπή ριζοβολίας, καλλιεργήθηκαν σε: i) $\frac{1}{2}$ MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για 8 εβδομάδες, ii) $\frac{1}{2}$ MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες με ενεργό άνθρακα (2 g Γ^{-1} AC) για 8 εβδομάδες και iii) $\frac{1}{2}$ MS με AC για 1 εβδομάδα και ακολούθως σε $\frac{1}{2}$ MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για ακόμη 7 εβδομάδες, για ανάπτυξη των ριζών, σε βάζα όγκου 75 ml υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ. Το πείραμα επαναλήφθηκε και σε βάζα όγκου 75 ml υπό κάλυψη μεμβράνης sanitas, μόνο που το στάδιο ανάπτυξης των ριζών διήρκησε συνολικά 6 εβδομάδες.

Μικροβλαστοί από ενήλικο φυτό και από αναβλαστήσεις, μήκους 1.0-2.0 cm, καλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg Γ^{-1}) είτε συνεχώς για 6 εβδομάδες είτε για 1 εβδομάδα και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε $\frac{1}{2}$ MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για 5 εβδομάδες ή σε $\frac{1}{2}$ MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες με ενεργό άνθρακα (2 g Γ^{-1} AC) για 5 εβδομάδες ή σε $\frac{1}{2}$ MS με AC για 1 εβδομάδα και ακολούθως σε σκέτο $\frac{1}{2}$ MS για ακόμη 4 εβδομάδες, σε βάζα όγκου 145 ml και καπάκι magenta.

6) του τύπου και της συγκέντρωσης κυτοκινίνης στο υπόστρωμα πολλαπλασιασμού των βλαστών

Μικροβλαστοί από ενήλικο φυτό, μήκους 0.8-2.0 cm, που ελήφθησαν από την τρίτη υποκαλλιέργεια σε MS με 0.5 BA/ 0.05 IBA και 1.0 BA/ 0.1 IBA (mg l^{-1}) εκφύτων βλαστού που είχαν πρώτα καλλιεργηθεί στα υποστρώματα MS με 0.1 ή 0.2 ή 0.5 ή 1.0 ή 2.0 mg l^{-1} TDZ με ή χωρίς υποδεκαπλάσια συγκέντρωση IBA, καθώς και μικροβλαστοί που είχαν καλλιεργηθεί μόνο στο βασικό υπόστρωμα MS με 1.0 BA/ 0.1 IBA (mg l^{-1}) ως μάρτυρες, καλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg l^{-1}) για 1 εβδομάδα για προτροπή ριζοβολία, μετά σε $\frac{1}{2}$ MS με AC (2 g l^{-1}) για 1 εβδομάδα και τέλος σε $\frac{1}{2}$ MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για ακόμη 4 εβδομάδες για ανάπτυξη των ριζών, σε βάζα όγκου 145 ml με καπάκι magenta (5-6 μικροβλαστοί/ βάζο).

Μικροβλαστοί από αναβλαστήσεις, μήκους 1.0-2.0 cm, που είχαν καλλιεργηθεί για πολλαπλασιασμό των βλαστών στα υποστρώματα MS με 0.5 ή 1.0 ή 2.0 ή 4.0 mg l^{-1} BA ή zeatin και 0.1 mg l^{-1} IBA, καλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg l^{-1}) για 1 εβδομάδα ακολουθούμενη από καλλιέργεια σε $\frac{1}{2}$ MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για ακόμη 4 εβδομάδες, σε βάζα όγκου 145 ml και καπάκι magenta. Μικροβλαστοί από επόμενη υποκαλλιέργεια, που προέρχονταν από τα υποστρώματα με 0.5-4.0 mg l^{-1} BA ή 0.5-2.0 mg l^{-1} zeatin ή 2iP και 0.1 mg l^{-1} IBA, επίσης προωθήθηκαν για ριζοβολία ακολουθώντας την ίδια μέθοδο, ενώ μικροβλαστοί από υπόστρωμα με kinetin δε χρησιμοποιήθηκαν επειδή ήταν πολύ κοντοί ακατάλληλοι για ριζοβολία.

Μικροβλαστοί από ενήλικο φυτό και αναβλαστήσεις, μήκους 1.0-2.0 cm, που είχαν καλλιεργηθεί για πολλαπλασιασμό των βλαστών στα υποστρώματα MS με 0.5 BA/ 0.05 IBA και 1.0 BA/ 0.1 IBA (mg l^{-1}), καλλιεργήθηκαν για προτροπή ριζοβολίας σε στερεό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg l^{-1}) για 1 εβδομάδα και ακολούθως σε $\frac{1}{2}$ MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για ακόμη 4 εβδομάδες για ανάπτυξη των ριζών, σε βάζα όγκου 145 ml και καπάκι magenta.

7) της προσθήκης γιββερελλίνης στο υπόστρωμα πολλαπλασιασμού των βλαστών

Μικροβλαστοί από ενήλικο φυτό, μήκους 0.8-1.5 cm, που είχαν καλλιεργηθεί για πολλαπλασιασμό των βλαστών στο βασικό υπόστρωμα MS με 1.0 BA/ 0.1 IBA (mg l^{-1}) χωρίς γιββερελλίνη ή με την προσθήκη 0.1 ή 0.5 ή 1.0 ή 2.0 mg l^{-1} GA₃,

καλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg l^{-1}) για 1 εβδομάδα για προτροπή ριζοβολία και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε $\frac{1}{2}$ MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για ακόμη 4 εβδομάδες για ανάπτυξη των ριζών, σε βάζα όγκου 75 ml υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ.

8) *του μήκους των μικροβλαστών*

Μικροβλαστοί από ενήλικο φυτό, με μήκος : i) 0.7-1.0 cm, ii) 1.0-2.0 cm iii) 2.0-3.0 cm, καλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg l^{-1}) για 1 εβδομάδα για προτροπή ριζοβολίας και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε $\frac{1}{2}$ MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για ακόμη 4 εβδομάδες για ανάπτυξη των ριζών, σε βάζα όγκου 75 ml υπό κάλυψη μεμβράνης sanitas.

9) *του δοχείου καλλιέργειας και του υλικού κάλυψης*

Μικροβλαστοί από ενήλικο φυτό, μήκους 0.8-1.5 cm, που είχαν καλλιεργηθεί για πολλαπλασιασμό των βλαστών σε βάζα όγκου 75 ml υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ ή μεμβράνης sanitas, καλλιεργήθηκαν για προτροπή ριζοβολίας σε στερεό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg l^{-1}) για 1 εβδομάδα και μετά σε $\frac{1}{2}$ MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για ακόμη 5 εβδομάδες για ανάπτυξη των ριζών, αντίστοιχα σε βάζα όγκου 75 ml υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ ή μεμβράνης sanitas.

Επίσης, μικροβλαστοί από ενήλικο φυτό, που είχαν καλλιεργηθεί για πολλαπλασιασμό των βλαστών σε βάζα όγκου 75 ή 145 ή 375 ml υπό κάλυψη μεμβράνης sanitas, προωθήθηκαν για ριζοβολία ακολουθώντας την παραπάνω μέθοδο σε βάζα όγκου 75 ml υπό κάλυψη μεμβράνης sanitas (20 ml υποστρώματος, 3 βλαστοί/ βάζο), σε βάζα όγκου 145 ml με πλαστικό καπάκι magenta (25 ml υποστρώματος, 4 βλαστοί/ βάζο) και σε βάζα όγκου 375 ml με πλαστικό καπάκι (50 ml υποστρώματος, 7 βλαστοί/ βάζο), ενώ μικροβλαστοί που είχαν καλλιεργηθεί για πολλαπλασιασμό των βλαστών σε βάζα όγκου 145 και 375 ml με πλαστικό καπάκι, προωθήθηκαν για ριζοβολία ακολουθώντας την ίδια πάντα μέθοδο, αντίστοιχα, σε βάζα όγκου 145 ml με πλαστικό καπάκι magenta (3 βλαστοί/ βάζο) και βάζα όγκου 375 ml με πλαστικό καπάκι (5 βλαστοί/ βάζο). Τοποθετήθηκαν λιγότεροι βλαστοί ανά δοχείο καλλιέργειας στην περίπτωση των μικροβλαστών που προέρχονταν από βάζα όγκου 145 και 375 ml με πλαστικό καπάκι, επειδή αυτοί είχαν μεγαλύτερα και πλατύτερα φύλλα συγκριτικά με

τους μικροβλαστούς που είχαν καλλιεργηθεί υπό κάλυψη μεμβράνης sanitas και έτσι έπρεπε να τοποθετηθούν πιο αραιά.

Μικροβλαστοί από αναβλαστήσεις, μήκους 1.0-2.0 cm, που είχαν καλλιεργηθεί για πολλαπλασιασμό των βλαστών σε βάζα όγκου 75 ml υπό κάλυψη μόνο μεμβράνης sanitas, καλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg l^{-1}) για 1 εβδομάδα και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε $\frac{1}{2}$ MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για ακόμη 4 εβδομάδες, σε βάζα όγκου 75 ml υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ ή μεμβράνης sanitas.

10) του θρεπτικού υποστρώματος

Μικροβλαστοί προερχόμενοι από ενήλικο φυτό και από αναβλαστήσεις, μήκους 1.0-2.0 cm, που είχαν καλλιεργηθεί για πολλαπλασιασμό των βλαστών στα υποστρώματα MS ή WPM με 1.0 BA/ 0.1 IBA (mg l^{-1}), καλλιεργήθηκαν στα υποστρώματα $\frac{1}{2}$ MS ή $\frac{1}{2}$ WPM με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg l^{-1}) για 1 εβδομάδα και ακολούθως σε $\frac{1}{2}$ MS ή $\frac{1}{2}$ WPM χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, σε όλους τους δυνατούς συνδυασμούς, για ακόμη 4 εβδομάδες, σε βάζα όγκου 145 ml με καπάκι magenta.

11) της θέσης των αρχικών εκφύτων πάνω στις αναβλαστήσεις

Μικροβλαστοί, μήκους 1.0-2.0 cm, που ελήφθησαν από τη δεύτερη υποκαλλιέργεια της καλλιέργειας που εγκαταστάθηκε τον Ιούνιο '09 και από την τρίτη και τέταρτη υποκαλλιέργεια της καλλιέργειας που εγκαταστάθηκε τον Ιούλιο '09, από έκφυτα προερχόμενα από διάφορες θέσεις (επάκρια, κορυφαία, μεσαία, βασική) πάνω στις αναβλαστήσεις που εκπύχθηκαν από τη βάση του ίδιου φυτού, καλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg l^{-1}) για 1 εβδομάδα και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε $\frac{1}{2}$ MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για ακόμη 4 εβδομάδες, σε βάζα όγκου 145 ml και καπάκι magenta, για να διαπιστωθεί αν η θέση των αρχικών εκφύτων πάνω στο βλαστό επιδρά στη ριζοβολία των μικροβλαστών που λαμβάνονται από τις καλλιέργειες που ξεκινούν από αυτά.

12) της φυσιολογίας των μητρικών φυτών από τα οποία προέρχονταν οι μικροβλαστοί

Μικροβλαστοί, μήκους 0.8-2.0 cm, που προέρχονταν από καλλιέργειες που είχαν εγκατασταθεί από ενήλικα φυτά με υψηλό ή χαμηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού, από

αναβλαστήσεις, από μικροπολλαπλασιασμένα φυτά και σπορόφυτα μεταχειρισμένα με 0.5 mg I⁻¹ GA₃, καλλιεργήθηκαν για προτροπή ριζοβολίας στο ίδιο στερεό υπόστρωμα ½MS με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg I⁻¹) για 1 εβδομάδα και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε ½MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες στο φως για ακόμη 4 εβδομάδες για ανάπτυξη των ριζών. Η ριζοβολία των μικροβλαστών ενήλικης προέλευσης έγινε σε βάζα όγκου 75 ml υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ ή μεμβράνης sanitas, ενώ οι μικροβλαστοί νεανικής προέλευσης ριζοβόλησαν σε βάζα όγκου 145 ml με καπάκι magenta.

6.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

6.3.1. Ριζοβολία μικροβλαστών μετά από καλλιέργεια σε στερεό υπόστρωμα με IBA ή NAA, συνεχώς ή για μία μόνο εβδομάδα

Ο χρόνος παραμονής σε υπόστρωμα με αυξίνη επέδρασε στη ριζοβολία των μικροβλαστών από ενήλικο φυτό. Η συνεχής καλλιέργεια για 8 εβδομάδες στο υπόστρωμα με αυξίνη οδήγησε σε υψηλότερα ποσοστά σχηματισμού κάλου στη βάση των μικροβλαστών και ξήρανσης κορυφής βλαστού και φύλλων συγκριτικά με την καλλιέργεια για μία μόνο εβδομάδα, και παρεμπόδισε πλήρως τη ριζοβολία των μικροβλαστών σε αντίθεση με την καλλιέργεια σε αυξίνη για μία εβδομάδα, που οδήγησε ριζοβολία σε χαμηλά όμως ποσοστά στις υψηλότερες συγκεντρώσεις IBA (Πιν. 38). Όλοι οι ριζοβολημένοι βλαστοί είχαν ξερή κορυφή και φύλλα.

Πίνακας 38. Ριζοβολία μικροβλαστών από ενήλικο φυτό, που καλλιεργήθηκαν σε στερεό ½MS με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις IBA, είτε συνεχώς για 8 εβδομάδες, είτε για 1 εβδομάδα και ακολούθως σε ½MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για ακόμη 7 εβδομάδες, σε βάζα όγκου 75 ml υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ (n=13-33).

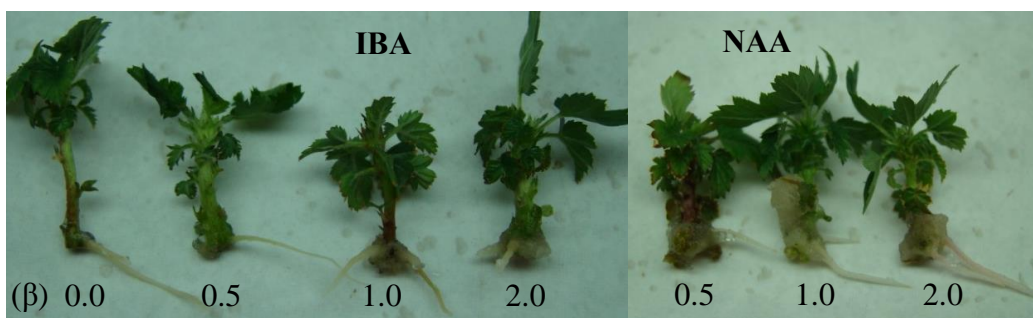
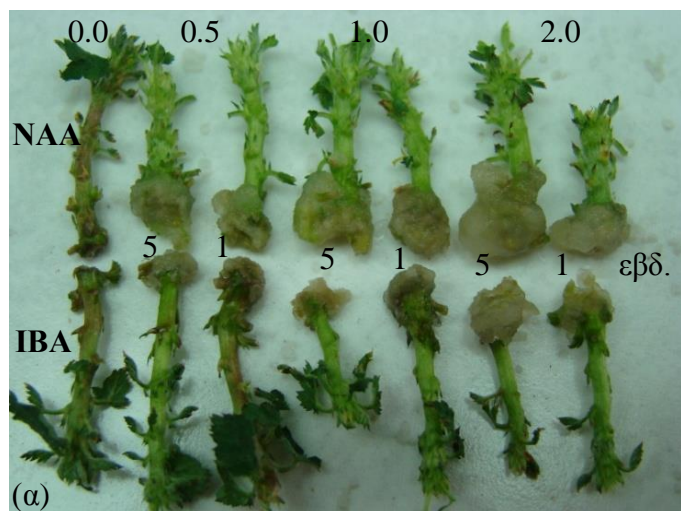
Συγκ. IBA (mg I ⁻¹)	Καλογένεση (%)		Ξήρανση κορυφής (%)		Ριζοβολία (%)		Αριθμός ριζών ανά μικροβλαστό		Μέσο μήκος ριζών (cm)	
	8 εβδ.	1 εβδ.	8 εβδ.	1 εβδ.	8 εβδ.	1 εβδ.	8 εβδ.	1 εβδ.	8 εβδ.	1 εβδ.
0.5	22	4	85	57	0	0	-	-	-	-
1.0	42	23	92	57	0	7	-	1.0	-	1.4
2.0	96	58	74	61	0	12	-	1.3	-	0.6
3.0	100	88	100	50	0	13	-	1.0	-	1.1

Στους μικροβλαστούς από αναβλαστήσεις, ο χρόνος παραμονής στο υπόστρωμα προτροπής ριζοβολίας με IBA ή NAA είχε μικρότερη επίδραση στη ριζοβολία από ότι στους μικροβλαστούς από ενήλικο φυτό. Έτσι, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στα ποσοστά του σχηματιζόμενου στη βάση των βλαστών κάλου αντίθετα με την ποσότητα του που ήταν μεγαλύτερη κατά τη συνεχή καλλιέργεια για 5 εβδομάδες στο υπόστρωμα με αυξίνη συγκριτικά με τη μιας εβδομάδας καλλιέργεια και το οποίο ήταν εντονότερο στην περίπτωση του NAA (Πιν. 39, Εικ. 53α). Επιπλέον, οι μικροβλαστοί ριζοβόλησαν σε μέτρια ποσοστά ανεξαρτήτως του χρόνου παραμονής στο υπόστρωμα με αυξίνη, αν και λίγο υψηλότερα ποσοστά ριζοβολίας μετρήθηκαν όταν οι μικροβλαστοί είχαν καλλιεργηθεί για μία μόνο εβδομάδα και στα υποστρώματα με NAA (Πιν. 39, Εικ. 53β).

Πίνακας 39. Ριζοβολία μικροβλαστών από αναβλαστήσεις, που καλλιεργήθηκαν σε στερεό ½MS με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις IBA ή NAA, είτε συνεχώς για 5 εβδομάδες, είτε για 1 εβδομάδα και ακολούθως σε ½MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για ακόμη 4 εβδομάδες, σε βάζα όγκου 145 ml και καπάκι magenta (n=17-53).

Συγκέντρωση IBA ή NAA (mg l ⁻¹)	Καλογένεση (%)		Ριζοβολία (%)		Αριθμός ριζών ανά μικροβλαστό		Μέσο μήκος ριζών (cm)	
	5 εβδ.	1 εβδ.	5 εβδ.	1 εβδ.	5 εβδ.	1 εβδ.	5 εβδ.	1 εβδ.
0.0 (μάρτυρας)	0	-	12	-	1.5 ^{NI}	-	2.4 ^{NI}	-
0.5-2.0 IBA	75 αρκετός	74 αρκετός	18	21	1.0 a	1.4 a	1.6 a	1.4 a
0.5-2.0 NAA	100 πάρα πολύς	100 πολύς	25	31	1.5 a	1.9 a	2.0 a	1.7 a
Ανάλυση της διασποράς F=					1.0063 ^{NS}		0.6081 ^{NS}	

NS: μη σημαντικά σε επίπεδο P=0.05, NI: δε συμπεριλήφθηκαν στη στατιστική επεξεργασία



Εικόνα 53. Σχηματισμός κάλου στη βάση μικροβλαστών από αναβλαστήσεις που καλλιεργήθηκαν στα αναγραφόμενα υποστρώματα αυξινών (mg l^{-1}) για 1 εβδομάδα ή συνεχώς για 5 εβδομάδες (α) και χαρακτηριστική ριζοβολία μικροβλαστών μετά από καλλιέργεια μιας εβδομάδας στα αναγραφόμενα υποστρώματα (mg l^{-1}) και μεταφορά σε $\frac{1}{2}\text{MS}$ χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για ακόμη 4 εβδομάδες (β).

6.3.2. Ριζοβολία μικροβλαστών μετά από καλλιέργεια σε στερεό υπόστρωμα με IBA ή NAA ή IAA ή με συνδυασμούς αυτών για 1 εβδ.

Μικροβλαστοί από ενήλικο φυτό που είχαν καλλιεργηθεί την πρώτη εβδομάδα σε υπόστρωμα με συνδυασμό IBA και IAA, ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό από αυτούς που είχαν καλλιεργηθεί σε υπόστρωμα με μόνο IBA ή IAA, με το συνδυασμό 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg l^{-1}) να ξεχωρίζει. Κάλος στη βάση των μικροβλαστών σχηματίστηκε σε χαμηλά ποσοστά, ενώ ξήρανση κορυφής και φύλλων παρατηρήθηκε σε υψηλό ποσοστό ανεξαρτήτως επέμβασης (Πιν. 40). Όλοι οι ριζοβολημένοι βλαστοί είχαν ξερή κορυφή και φύλλα.

Πίνακας 40. Ριζοβολία μικροβλαστών από ενήλικο φυτό, που καλλιεργήθηκαν σε στερεό $\frac{1}{2}$ MS με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις IBA ή/ και IAA για 1 εβδομάδα και ακολούθως σε $\frac{1}{2}$ MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για ακόμη 7 εβδομάδες, σε βάζα όγκου 75 ml υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ ($n=22$).

Συγκέντρωση IBA/ IAA (mg l^{-1})	Καλογένεση (%)	Ξήρανση κορυφής (%)	Ριζοβολία (%)	Αριθμός ριζών ανά μικροβλαστό	Μέσο μήκος ριζών (cm)
0.5 IBA	0	88	0	-	-
2 IAA	14	91	0	-	-
8 IAA	0	82	0	-	-
14 IAA	9	82	5	1.0	1.6
20 IAA	0	91	9	1.0	2.5
0.5 IBA/ 2 IAA	0	86	14	1.0	0.7
0.5 IBA/ 8 IAA	0	73	32	1.3	1.4
0.5 IBA/ 14 IAA	14	86	18	1.5	1.0
0.5 IBA/ 20 IAA	0	86	9	1.0	2.7

Μικροβλαστοί από ενήλικο φυτό που καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα με συνδυασμό 0.5 ή 1.0 IBA και 8.0 IAA (mg l^{-1}) δε διέφεραν ως προς το ποσοστό ριζοβολίας τους όταν η κάλυψη των δοχείων καλλιέργειας έγινε με πλαστικό φιλμ, ενώ όταν χρησιμοποιήθηκε μεμβράνη sanitas οι μικροβλαστοί που είχαν καλλιεργηθεί στο υπόστρωμα με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg l^{-1}) ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό από αυτούς που είχαν καλλιεργηθεί σε υπόστρωμα με 1.0 IBA/ 8.0 IAA (mg l^{-1}). Εκτιμώντας συνολικά την επίδραση των υποστρωμάτων, ανεξαρτήτως υλικού κάλυψης, δε βρέθηκαν σημαντικές διαφορές στη ριζοβολία των μικροβλαστών (Πιν. 41). Όλοι οι βλαστοί που ριζοβόλησαν υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ είχαν ξερή κορυφή και φύλλα σε αντίθεση με αυτούς που ριζοβόλησαν υπό κάλυψη μεμβράνης sanitas οι οποίοι παρέμειναν πράσινοι.

Πίνακας 41. Ριζοβολία μικροβλαστών από ενήλικο φυτό, που καλλιεργήθηκαν σε στερεό $\frac{1}{2}$ MS με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις IBA και IAA για 1 εβδομάδα και ακολούθως σε $\frac{1}{2}$ MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για ακόμη 5 εβδομάδες, σε βάζα όγκου 75 ml υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ ή μεμβράνης sanitas ($n=20-45$).

Υλικό κάλυψης	Συγκέντρωση IBA/ IAA (mg l^{-1})	Καλο-γένεση (%)	Ξήρανση κορυφής (%)	Ριζοβολία (%)	Αριθμός ριζών ανά μικροβλ.	Μέσο μήκος ριζών (cm)
πλαστικό φιλμ	0.5 IBA/ 8 IAA	0	84	24	1.3 a	1.4 b
	1.0 IBA/ 8 IAA	0	91	22	1.6 a	1.3 b
μεμβράνη sanitas	0.5 IBA/ 8 IAA	100	15	50	2.7 a	3.1 a
	1.0 IBA/ 8 IAA	100	5	30	2.6 a	2.6 ab
Μέσος όρος	0.5 IBA/ 8 IAA	31	63	32	2.0 a	2.2 a
	1.0 IBA/ 8 IAA	38	58	27	2.1 a	2.0 a
Ανάλυση της διασποράς						
$F_{\text{επεμβάσεων}}$ =					2.0591 ^{NS}	6.9605*
$F_{\text{μέσων όρων}}$ =					0.0457 ^{NS}	0.3005 ^{NS}

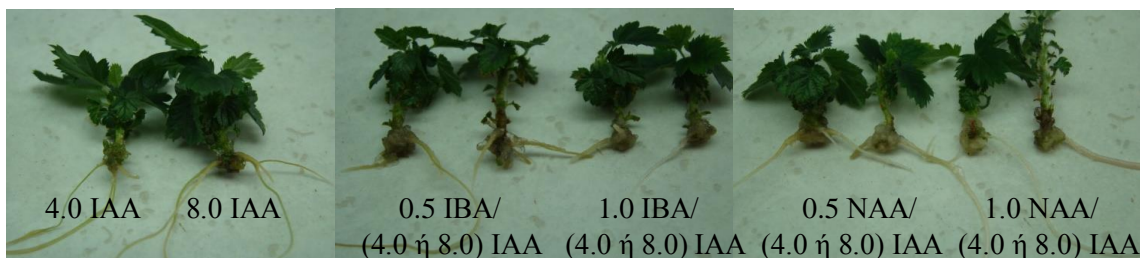
*: σημαντικό σε επίπεδο $P=0.05$, NS: μη σημαντικά σε επίπεδο $P=0.05$

Μικροβλαστοί από αναβλαστήσεις που καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα που περιείχε μόνο IAA ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό από αυτούς στο υπόστρωμα με IBA ή NAA με ή χωρίς IAA, ενώ στο υπόστρωμα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες (μάρτυρας) ελάχιστοι μικροβλαστοί ριζοβόλησαν. Η προσθήκη IAA στο υπόστρωμα βελτίωσε τα ποσοστά ριζοβολίας των μικροβλαστών που καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα που περιείχε μόνο IBA ή NAA (Πιν. 42). Το ποσοστό σχηματισμού κάλου στη βάση των μικροβλαστών καθώς και η ποσότητα του κάλου ήταν χαμηλότερα στο υπόστρωμα που περιείχε μόνο IAA συγκριτικά με τα υποστρώματα που περιείχαν και IBA ή NAA (Πιν. 42, Εικ. 54). Δεν υπήρξαν διαφορές μεταξύ των υποστρωμάτων ως προς τον αριθμό των ριζών, ενώ οι ρίζες ήταν μακρύτερες στα υποστρώματα με NAA συγκριτικά με αυτές με IBA (Πιν. 42).

Πίνακας 42. Ριζοβολία μικροβλαστών από αναβλαστήσεις, που καλλιεργήθηκαν σε στερεό ½MS με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις IBA ή NAA ή IAA για 1 εβδομάδα και ακολούθως μεταφέρθηκαν σε ½MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για ακόμη 4 εβδομάδες, σε βάζα όγκου 145 ml και καπάκι magenta (n=37-127).

Συγκεντρώσεις αυξινών (mg l ⁻¹)	Καλογένεση (%)	Ριζοβολία (%)	Αριθμός ριζών ανά μικροβλαστό	Μέσο μήκος ριζών (cm)
0.0 (μάρτυρας)	0	5	1.5 ^{NI}	2.4 ^{NI}
0.5 ή 1.0 IBA	61 αρκετός	22	1.3 a	1.5 ab
0.5 ή 1.0 IBA/ 4.0 ή 8.0 IAA	75 αρκετός	49	2.6 a	1.5 b
0.5 ή 1.0 NAA	100 πολύς	23	2.1 a	1.7 ab
0.5 ή 1.0 NAA/ 4.0 ή 8.0 IAA	100 πολύς	38	2.0 a	2.5 a
4.0 ή 8.0 IAA	50 λίγος	65	2.5 a	1.7 ab
Ανάλυση της διασποράς <i>F</i> =			1.4639 ^{NS}	4.3613*

*: σημαντικό σε επίπεδο $P=0.05$, NS: μη σημαντικό σε επίπεδο $P=0.05$, NI: δε συμπεριλήφθηκαν στη στατιστική επεξεργασία



Εικόνα 54. Χαρακτηριστική ριζοβολία μικροβλαστών από αναβλαστήσεις μετά από καλλιέργεια μιας εβδομάδας στα αναγραφόμενα υποστρώματα με IAA ή συνδυασμό IBA ή NAA και IAA και μεταφορά σε $\frac{1}{2}$ MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για ακόμη 4 εβδομάδες.

6.3.3. Ριζοβολία μικροβλαστών μετά από σύντομη εμβάπτιση της βάσης τους σε υγρό διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης IBA ή συνδυασμού IBA/ IAA

Μικροβλαστοί από ενήλικο φυτό των οποίων η βάση εμβαπτίσθηκε για 10 sec σε υγρά διαλύματα υψηλής συγκέντρωσης IBA και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στα υποστρώματα τύρφης ή τύρφης-περλίτη 1:1 παρουσίασαν καθολική ξήρανση, ενώ όταν μεταφέρθηκαν σε $\frac{1}{2}$ MS υπόστρωμα με AC παρατηρήθηκαν χαμηλότερα ποσοστά σχηματισμού κάλου και ξήρανσης κορυφής και φύλλων βλαστού, καθώς και υψηλότερο ποσοστό ριζοβολίας και περισσότερες ρίζες που δεν περιβάλλονταν από κάλο (Πιν. 43). Όλοι οι ριζοβολημένοι βλαστοί είχαν ξερή κορυφή και φύλλα.

Η χρήση διαλυμάτων υψηλής συγκέντρωσης αυξίνης που περιείχαν συνδυασμό IBA και IAA δε βελτίωσε τη ριζοβολία των μικροβλαστών. Έτσι, οι μικροβλαστοί των οποίων η βάση είχε εμβαπτισθεί σε διάλυμα που περιείχε μόνο IBA ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό από αυτούς που μεταχειρίστηκαν με διαλύματα που περιείχαν συνδυασμό IBA και IAA. Υψηλότερα ποσοστά ριζοβολίας επιτεύχθηκαν με την εμβάπτιση της βάσης των μικροβλαστών σε διάλυμα με 1000 mg l^{-1} IBA (Πιν. 44). Σχεδόν όλοι οι ριζοβολημένοι βλαστοί είχαν ξερή κορυφή και φύλλα.

Πίνακας 43. Ριζοβολία μικροβλαστών από ενήλικο φυτό, των οποίων η βάση εμβάπτιστηκε για 10 sec στα αναγραφόμενα υγρά διαλύματα IBA ακολουθούμενη από μεταφορά στα αναγραφόμενα υποστρώματα για 8 εβδομάδες, σε βάζα όγκου 75 ml υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ ($n=9-12$).

Εμβάπτιση για 10 sec σε:	Μεταφορά σε:	Καλο-γένεση (%)	Ξήρανση κορυφής (%)	Ριζοβολία (%)	Αριθμός ριζών ανά μικροβλ.	Μέσο μήκος ριζών (cm)
500 mg l ⁻¹ IBA	½ MS	25	92	0	-	-
	½ MS+AC	0	50	25	1.7	1.8
	τύρφη	καθολική ξήρανση	100	0	-	-
	τύρφη-περλίτης 1:1	καθολική ξήρανση	100	0	-	-
1000 mg l ⁻¹ IBA	½ MS	67	83	8	1.0	2.0
	½ MS+AC	25	42	17	2.5	0.7
	τύρφη	καθολική ξήρανση	100	0	-	-
	τύρφη-περλίτης 1:1	καθολική ξήρανση	100	0	-	-
1500 mg l ⁻¹ IBA	½ MS	100	89	11	1.0	1.6
	½ MS+AC	56	56	22	1.5	0.7
	τύρφη	καθολική ξήρανση	100	0	-	-
	τύρφη-περλίτης 1:1	καθολική ξήρανση	100	0	-	-

Πίνακας 44. Ριζοβολία μικροβλαστών από ενήλικο φυτό, των οποίων η βάση εμβάπτιστηκε για 10 sec σε υγρά διαλύματα με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις IBA και IAA (mg l^{-1}), ακολουθούμενη από καλλιέργεια σε $\frac{1}{2}$ MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες με ή χωρίς AC για 8 εβδομάδες, σε βάζα όγκου 75 ml υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ ($n=35-44$). Παρουσίαση αποτελεσμάτων αθροιστικά για καλλιέργεια σε υπόστρωμα με ή χωρίς AC.

Εμβάπτιση για 10 sec σε:	Καλογένεση (%)	Ξήρανση κορυφής (%)	Ριζοβολία (%)	Αριθμός ριζών ανά μικροβλ.	Μέσο μήκος ριζών (cm)
500 IBA	28	35	10	1.3	2.1
500 IBA/ 250 IAA	26	23	9	1.0	1.5
500 IBA/ 500 IAA	13	39	8	2.3	0.8
500 IBA/ 1000 IAA	21	32	5	1.0	0.7
1000 IBA	61	59	23	1.2	0.9
1000 IBA/ 250 IAA	40	61	5	1.5	0.5
1000 IBA/ 500 IAA	29	58	3	1.0	1.2
1000 IBA/ 1000 IAA	21	45	11	1.0	1.1

Μικροβλαστοί από αναβλαστήσεις που παρακινήθηκαν να ριζοβολήσουν μετά από εμβάπτιση της βάσης τους σε υγρό διάλυμα 1000 mg l^{-1} IBA για 10 sec ριζοβόλησαν σε ισοδύναμο ποσοστό με αυτούς που είχαν καλλιεργηθεί σε στερεό υπόστρωμα με $0.5 \text{ IBA/ } 8 \text{ IAA (mg l}^{-1})$, αν και η πρώτη μέθοδος οδήγησε σε αύξηση του ποσοστού και της ποσότητας του παραγόμενου κάλου και μείωσε τον αριθμό των σχηματιζόμενων ριζών (Πιν. 45). Αντίθετα, μικροβλαστοί από μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια παρουσίασαν σημαντική μείωση του ποσοστού ριζοβολίας τους με τη μέθοδο της εμβάπτισης της βάσης τους σε διάλυμα 1000 mg l^{-1} IBA συγκριτικά με την καλλιέργεια σε υπόστρωμα με $0.5 \text{ IBA/ } 8 \text{ IAA (mg l}^{-1})$, σχηματίζοντας υπερβολικό κάλο επίσης (Πιν. 45, Εικ. 55). Εξετάζοντας συνολικά την επίδραση των δύο μεθόδων ριζοβολίας, η μέθοδος της εμβάπτισης σε πυκνό διάλυμα IBA οδήγησε στην παραγωγή υψηλού ποσοστού και υπερβολικής ποσότητας κάλου στη βάση των μικροβλαστών, ενώ ταυτόχρονα μείωσε τον αριθμό και το μήκος των παραγόμενων ριζών συγκριτικά με την καλλιέργεια στο υπόστρωμα με IBA/ IAA (Πιν. 45).

Πίνακας 45. Ριζοβολία μικροβλαστών από αναβλαστήσεις και μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια, οι οποίοι προωθήθηκαν να ριζοβολήσουν μετά από εμβάπτιση της βάσης τους για 10 sec σε υγρό διάλυμα 1000 mg Γ⁻¹ IBA ή καλλιέργεια σε στερεό υπόστρωμα ½MS με 0.5 IBA/ 8 IAA (mg Γ⁻¹) για 1 εβδομάδα, και μετά καλλιεργήθηκαν σε ½MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για 5 ή 4 εβδομάδες, αντίστοιχα, σε βάζα όγκου 145 ml και καπάκι magenta (n=31-208).

Μέθοδος ριζοβολίας	Προέλευση βλαστών	Καλογένεση (%)	Ριζοβολία (%)	Αριθμός ριζών ανά μικροβλ.	Μέσο μήκος ριζών (cm)	
A. Εμβάπτιση για 10 sec σε δ/μα 1000 IBA	Αναβλαστήσεις	93 πάρα πολύς	51	2.0 ab	2.4 ab	
	Μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια	100 Υπερβολικά πολύς	18	1.4 b	1.3 b	
Μέσος όρος μεθόδου (A)				1.8 B	2.0 B	
B. Καλλιέργεια σε στερεό ½ MS με 0.5 IBA/ 8 IAA	Αναβλαστήσεις	40 μέτριος	52	3.1 a	2.9 a	
	Μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια	77 μέτριος	51	2.7 ab	1.8 b	
Μέσος όρος μεθόδου (B)				3.0 A	2.7 A	
Ανάλυση της διασποράς						
				<i>F</i> επεμβάσεων=	3.5266*	7.2699*
				<i>F</i> μέσων όρων=	9.3082*	5.4154*

*: σημαντικά σε επίπεδο $P=0.05$, μικρά γράμματα μεταξύ των τιμών των μεταχειρίσεων, κεφαλαία γράμματα μεταξύ των μέσων τιμών.



Εικόνα 55. Σχηματισμός υπερβολικής ποσότητας κάλου στη βάση (α) και χαρακτηριστική ριζοβολία μικροβλαστών από μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια (β) μετά από εμβάπτιση της βάσης τους για 10 sec σε υγρό διάλυμα 1000 mg Γ⁻¹ IBA και καλλιέργεια σε ½MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για 5 εβδομάδες.

6.3.4. Επίδραση εφαρμογής σκότους κατά την 1^η εβδομάδα ριζοβολίας

Η εφαρμογή σκότους την πρώτη εβδομάδα καλλιέργειας μικροβλαστών από ενήλικο φυτό σε υποστρώματα με συνδυασμό 0.5 mg I⁻¹ IBA και IAA αύξησε λίγο το ποσοστό ριζοβολίας, όμως ταυτόχρονα αύξησε το ποσοστό και την ποσότητα του παραγόμενου κάλου στη βάση τους, που συχνά οδηγούσε στο σχηματισμό ριζών με μικρή συνάφεια με τον βλαστό που εύκολα αποκόπτονταν όταν οι βλαστοί απομακρύνονταν από το υπόστρωμα. Επίσης, οι μικροβλαστοί που είχαν καλλιεργηθεί την πρώτη εβδομάδα στο σκοτάδι παρουσίασαν χαμηλότερα ποσοστά ξήρανσης της κορυφής και των φύλλων συγκριτικά με την καλλιέργεια στο φως (Πιν. 46A). Μικροβλαστοί που είχαν καλλιεργηθεί σε υποστρώματα με συνδυασμό 1.0 IBA και 4.0 ή 8.0 IAA (mg I⁻¹) εφαρμόζοντας σκότος την πρώτη εβδομάδα επίσης ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό, ενώ τόσο το ποσοστό σχηματισμού κάλου όσο και το ποσοστό ξήρανσης κορυφής και φύλλων βλαστού αυξήθηκαν (Πιν. 46B). Σχεδόν όλοι οι ριζοβολημένοι βλαστοί είχαν ξερή κορυφή και φύλλα.

Πίνακας 46. Ριζοβολία μικροβλαστών από ενήλικο φυτό, που καλλιεργήθηκαν σε στερεό ½MS με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις (mg I⁻¹) IAA ή/ και IBA υπό συνθήκες 16 h φωτός (Φ) ή σε συνεχές σκοτάδι (Σ) για 1 εβδομάδα και ακολούθως σε ½MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες στο φως για ακόμη 7 εβδομάδες, σε βάζα όγκου 75 ml υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ.

A. (n=22)

Συγκέντρωση IBA/ IAA (mg I ⁻¹)	Καλογένεση (%)		Ξήρανση κορυφής (%)		Ριζοβολία (%)		Αριθμός ριζών ανά μικροβλ.		Μέσο μήκος ριζών (cm)	
	Φ	Σ	Φ	Σ	Φ	Σ	Φ	Σ	Φ	Σ
2 IAA	14	14	91	79	0	0	-	-	-	-
8 IAA	0	7	82	86	0	7	-	2.0	-	1.0
14 IAA	9	0	82	57	5	21	1.0	1.0	1.6	0.5
20 IAA	0	43	91	79	9	14	1.0	2.0	2.5	2.4
0.5 IBA/ 2 IAA	0	7	86	71	14	7	1.0	1.0	0.7	1.4
0.5 IBA/ 8 IAA	0	43	73	79	32	36	1.3	1.4	1.4	1.8
0.5 IBA/ 14 IAA	14	43	86	71	18	36	1.5	1.2	1.0	1.1
0.5 IBA/ 20 IAA	0	43	86	71	9	14	1.0	1.5	2.7	1.1

Πίνακας 46B. (n=9)

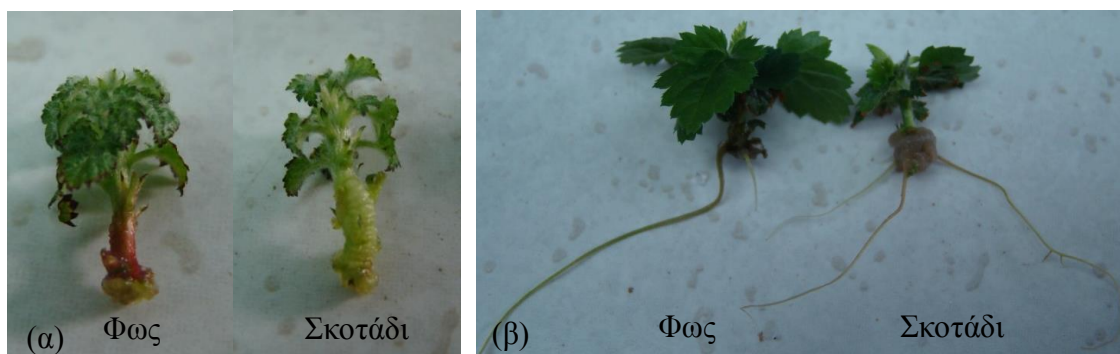
Συγκέντρωση IBA/ IAA (mg l ⁻¹)	Καλογένεση (%)		Ξήρανση κορυφής (%)		Ριζοβολία (%)		Αριθμός ριζών ανά μικροβλ.		Μέσο μήκος ριζών (cm)	
	Φ	Σ	Φ	Σ	Φ	Σ	Φ	Σ	Φ	Σ
1.0 IBA/ 2 IAA	0	33	67	100	11	11	1.0	1.0	0.8	0.5
1.0 IBA/ 4 IAA	22	56	78	78	22	56	1.0	1.4	2.5	1.6
1.0 IBA/ 8 IAA	0	67	67	100	11	67	1.0	1.5	0.3	1.8
1.0 IBA/ 12 IAA	11	0	78	89	11	0	1.0	-	2.5	-

Μικροβλαστοί προερχόμενοι τόσο από ενήλικο φυτό όσο και από αναβλαστήσεις, που καλλιεργήθηκαν την πρώτη εβδομάδα σε ½MS με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg l⁻¹) υπό συνθήκες φωτός ή σκότους, παρουσίασαν αμελητέα αύξηση στο ποσοστό ριζοβολίας τους με την εφαρμογή σκότους, η οποία όμως συνοδεύτηκε από σημαντική αύξηση του ποσοστού και της ποσότητας του παραγόμενου κάλου (Πιν. 47, Εικ. 56β). Μία ακόμη παρατήρηση, που έγινε μετά την πρώτη εβδομάδα καλλιέργειας στο υπόστρωμα με αυξίνες και η οποία ίσως χρήζει περαιτέρω διερεύνησης, ήταν ότι οι μικροβλαστοί που είχαν καλλιεργηθεί υπό συνθήκες 16 h φωτός ήταν κόκκινοι στη βάση και λίγος κάλος είχε σχηματισθεί από την τομή, ενώ οι βλαστοί που είχαν καλλιεργηθεί υπό συνεχές σκοτάδι παρέμειναν πράσινοι με το βασικό τους τμήμα να έχει διογκωθεί πιθανά λόγω του σχηματισμού κάλου στο εσωτερικό του (Εικ. 56α). Οι ριζοβολημένοι βλαστοί από ενήλικο φυτό, που είχαν αναπτυχθεί υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ, είχαν ξερή κορυφή και φύλλα, αντίθετα με τους μικροβλαστούς από αναβλαστήσεις που είχαν αναπτυχθεί υπό πλαστικό καπάκι magenta και παρέμειναν πράσινοι.

Πίνακας 47. Ριζοβολία μικροβλαστών από ενήλικο φυτό ή αναβλαστήσεις, που καλλιεργήθηκαν σε στερεό ½MS με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg l⁻¹) υπό συνθήκες 16 h φωτός ή σε συνεχές σκοτάδι για 1 εβδομάδα και ακολούθως σε ½MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες στο φως, για ακόμη 7 εβδομάδες, σε βάζα όγκου 75 ml υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ (μικροβλαστοί από ενήλικο φυτό, n=14-22) ή για ακόμη 4 εβδομάδες σε βάζα όγκου 145 ml και καπάκι magenta (μικροβλαστοί από αναβλαστήσεις, n=134-139).

Προέλευση μικροβλαστών	Συνθήκες καλλιέργειας	Καλογένεση (%)	Ριζοβολία (%)	Αριθμός ριζών ανά μικροβλ.	Μέσο μήκος ριζών (cm)
Ενήλικο φυτό	Φως	0 λίγος	32	1.3 a	1.4 a
	Σκοτάδι	43 αρκετός	36	1.4 a	1.8 a
Αναβλαστήσεις	Φως	33 λίγος	43	2.6 a	1.7 a
	Σκοτάδι	88 αρκετός	47	2.2 a	1.7 a
Ανάλυση της διασποράς <i>F</i> =				3.2854 ^{NS}	0.1586 ^{NS}

NS: μη σημαντικά σε επίπεδο *P*=0.05



Εικόνα 56. Χαρακτηριστική αντίδραση μικροβλαστών από αναβλαστήσεις μετά από μιας εβδομάδας καλλιέργεια σε στερεό ½MS με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg l⁻¹) υπό συνθήκες 16 h φωτός ή σε συνεχές σκοτάδι (α) και χαρακτηριστική ριζοβολία των παραπάνω μικροβλαστών μετά τη μεταφορά σε ½MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για ακόμη 4 εβδομάδες (β).

6.3.5. Επίδραση ενεργού άνθρακα στη ριζοβολία των μικροβλαστών

Όταν μικροβλαστοί από ενήλικο φυτό καλλιεργήθηκαν κατά την πρώτη εβδομάδα προτροπής ριζοβολίας σε υπόστρωμα που περιείχε AC κανένας βλαστός δε ριζοβόλησε ούτε σχημάτισε κάλο στη βάση του, ενώ μικροβλαστοί που είχαν καλλιεργηθεί στα αντίστοιχα υποστρώματα χωρίς AC ριζοβόλησαν σε υψηλότερα ποσοστά σε αυτά που περιείχαν 1.0 IBA και 4.0 ή 8.0 IAA (mg l^{-1}) (Πιν. 48). Σχεδόν όλοι οι ριζοβολημένοι βλαστοί είχαν ξερή κορυφή και φύλλα.

Πίνακας 48. Ριζοβολία μικροβλαστών από ενήλικο φυτό, που καλλιεργήθηκαν σε στερεό $\frac{1}{2}$ MS με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις IAA και 1.0 IBA (mg l^{-1}), με ή χωρίς AC (2 g l^{-1}), υπό συνθήκες 16 h φωτός ή σε συνεχές σκοτάδι, για 1 εβδομάδα και μεταφέρθηκαν αντίστοιχα σε $\frac{1}{2}$ MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, με ή χωρίς AC, στο φως για ακόμη 7 εβδομάδες, σε βάζα όγκου 75 ml υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ ($n=18$). Παρουσίαση αποτελεσμάτων αθροιστικά για καλλιέργεια υπό συνθήκες φωτός και σκότους.

Παρουσία ενεργού άνθρακα	Συγκέντρωση IBA/ IAA (mg l^{-1})	Καλο-γένεση (%)	Ξήρανση κορυφής (%)	Ριζοβολία (%)	Αριθμός ριζών ανά μικροβλ.	Μέσο μήκος ριζών (cm)
Χωρίς AC	1.0/ 2.0	17	83	11	1.0	0.7
	1.0/ 4.0	39	78	39	1.3	1.8
	1.0/ 8.0	33	83	39	1.4	1.5
	1.0/ 12.0	39	83	11	1.0	2.1
Με AC	1.0/ 2.0	0	89	0	-	-
	1.0/ 4.0	0	61	0	-	-
	1.0/ 8.0	0	67	0	-	-
	1.0/ 12.0	0	67	0	-	-

Μικροβλαστοί που είχαν καλλιεργηθεί σε υποστρώματα με συνδυασμό 0.5 IBA και IAA ριζοβόλησαν σε λίγο υψηλότερο ποσοστό όταν μεταφέρθηκαν σε υπόστρωμα με AC για ανάπτυξη των ριζών, ενώ το ποσοστό σχηματισμού κάλου αυξήθηκε. Το ποσοστό ξήρανσης κορυφής και φύλλων των βλαστών δεν επηρεάστηκε από την παρουσία ή μη του AC στο υπόστρωμα ανάπτυξης των ριζών (Πιν. 49). Όλοι οι ριζοβολημένοι βλαστοί είχαν ξερή κορυφή και φύλλα με εξαίρεση αυτούς που είχαν καλλιεργηθεί σε ½MS με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg l⁻¹) στο φως για μία εβδομάδα ακολουθούμενη από καλλιέργεια σε ½MS με AC, που ήταν πράσινοι.

Πίνακας 49. Ριζοβολία μικροβλαστών από ενήλικο φυτό, που καλλιεργήθηκαν σε στερεό ½MS με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις IAA χωρίς ή με 0.5 IBA (mg l⁻¹), υπό συνθήκες 16 h φωτός ή σε συνεχές σκοτάδι, για 1 εβδομάδα και μεταφέρθηκαν σε ½MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, με ή χωρίς AC (2 g l⁻¹), στο φως για ακόμη 7 εβδομάδες, σε βάζα όγκου 75 ml υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ (n=18 ή 36). Παρουσίαση αποτελεσμάτων αθροιστικά για καλλιέργεια υπό συνθήκες φωτός και σκότους.

Συγκέντρωση IBA/ IAA (mg l ⁻¹)	Καλογένεση (%)		Ξήρανση κορυφής (%)		Ριζοβολία (%)		Αριθμός ριζών ανά μικροβλ.		Μέσο μήκος ριζών (cm)	
	-	+AC	-	+AC	-	+AC	-	+AC	-	+AC
2 IAA	14	0	86	83	0	0	-	-	-	-
8 IAA	3	6	100	78	3	6	2.0	2.0	1.0	3.9
14 IAA	0	11	72	89	11	28	1.0	1.6	0.8	2.0
20 IAA	17	17	86	83	11	22	1.5	1.0	2.4	1.9
0.5 IBA/ 2 IAA	3	44	81	78	11	22	1.0	1.0	0.9	0.9
0.5 IBA/ 8 IAA	17	67	75	72	33	33	1.3	1.2	1.6	1.8
0.5 IBA/ 14 IAA	25	56	81	89	25	11	1.3	1.0	1.0	3.0
0.5 IBA/ 20 IAA	17	39	81	83	11	17	1.3	1.3	1.9	1.5

Μικροβλαστοί, των οποίων η βάση εμβάπτιστηκε σε πυκνά διαλύματα IBA/ IAA, ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό μετά από εμβάπτιση σε διάλυμα με 1000 mg I⁻¹ IBA και καλλιέργεια σε υπόστρωμα που περιείχε AC. Το ποσοστό μικροβλαστών που ριζοβόλησαν και είχαν πράσινη κορυφή και φύλλα, επίσης, ήταν υψηλότερο μετά από την παραπάνω επέμβαση, ενώ γενικά χαμηλότερα ποσοστά ξήρανσης κορυφής και φύλλων των βλαστών παρατηρήθηκαν μετά από καλλιέργεια σε υπόστρωμα με AC σε σχέση με αυτό χωρίς AC. Η προσθήκη AC στο υπόστρωμα ανάπτυξης των ριζών περιόρισε το σχηματισμό κάλου στη βάση τους (Πιν. 50).

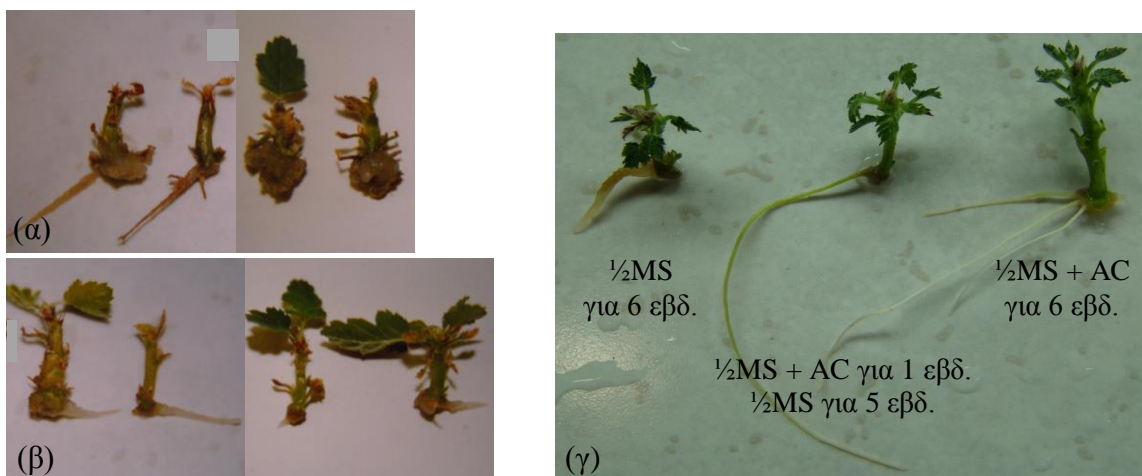
Πίνακας 50. Ριζοβολία μικροβλαστών από ενήλικο φυτό, που παρακινήθηκαν να ριζοβολήσουν μετά από εμβάπτιση της βάσης τους για 10 sec σε υγρό διάλυμα με IBA και IAA στις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις (mg I⁻¹) και στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν σε ½MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, με ή χωρίς AC (2 g I⁻¹), για 8 εβδομάδες, σε βάζα όγκου 75 ml υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ (n=19-22).

Εμβάπτιση για 10 sec σε:	Καλο- γένεση (%)		Ξήρανση κορυφής (%)		Ριζοβολία (%)		Πράσινοι έρριζοι μικροβλ. (%)		Αριθμός ριζών ανά μικροβλ.		Μέσο μήκος ριζών (cm)	
	-	+AC	-	+AC	-	+AC	-	+AC	-	+AC	-	+AC
500 IBA	36	11	41	28	9	11	5	6	1.0	1.5	0.4	3.9
500 IBA/ 250 IAA	31	21	44	11	19	0	6	0	1.0	-	1.5	-
500 IBA/ 500 IAA	21	5	56	20	11	5	5	5	3.0	1.0	1.0	0.4
500 IBA/ 1000 IAA	32	11	53	11	5	5	5	5	1.0	1.0	0.7	0.7
1000 IBA	82	41	73	45	18	27	0	18	1.0	1.3	0.9	0.8
1000 IBA/ 250 IAA	53	26	74	47	5	5	0	5	1.0	2.0	0.6	0.3
1000 IBA/ 500 IAA	42	16	84	32	5	0	0	0	1.0	-	1.2	-
1000 IBA/ 1000 IAA	32	11	58	32	16	5	5	0	1.0	1.0	1.3	0.5

Μικροβλαστοί από ενήλικο φυτό, των οποίων η βάση είχε εμβαπτισθεί σε διάλυμα 1000 mg I⁻¹ IBA και οι οποίοι είχαν καλλιεργηθεί υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ, ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό μετά από καλλιέργεια για μια μόνο εβδομάδα σε υπόστρωμα που περιείχε AC συγκριτικά με την καλλιέργεια για 8 εβδ. σε ½MS με ή χωρίς AC, ενώ όταν τα δοχεία καλλιέργειας είχαν καλυφθεί με μεμβράνη sanitas, τα ποσοστά ριζοβολίας ήταν υψηλότερα στο υπόστρωμα με AC ανεξαρτήτως χρόνου καλλιέργειας (Πιν. 51). Και με τα δύο υλικά κάλυψης, κάλος σε χαμηλότερο ποσοστό σχηματίστηκε στη βάση των βλαστών και μεγαλύτερου μήκους ρίζες παράχθηκαν, όταν η καλλιέργεια στο υπόστρωμα με AC διήρκησε μία μόνο εβδομάδα (Πιν. 51, Εικ. 57). Από τους ριζοβολημένους μικροβλαστούς που είχαν καλλιεργηθεί υπό πλαστικό φιλμ πράσινη κορυφή και φύλλα είχαν μόνο μερικοί από όσους είχαν καλλιεργηθεί σε ½MS με AC για μία εβδομάδα (Εικ. 57β), ενώ από αυτούς που είχαν καλλιεργηθεί υπό μεμβράνη sanitas όλοι (Πιν. 51, Εικ. 57γ).

Πίνακας 51. Ριζοβολία μικροβλαστών από ενήλικο φυτό, που παρακινήθηκαν να ριζοβολήσουν μετά από εμβάπτιση της βάσης τους για 10 sec σε υγρό διάλυμα με 1000 mg I⁻¹ IBA και ακολούθως καλλιεργήθηκαν στα αναγραφόμενα υποστρώματα ½MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, με ή χωρίς AC (2 g I⁻¹), σε βάζα όγκου 75 ml, είτε υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ για συνολικά 8 εβδομάδες, (n=12) είτε υπό κάλυψη μεμβράνης sanitas για συνολικά 6 εβδομάδες (n=24).

Υλικό κάλυψης	Υπόστρωμα ανάπτυξης ριζών	Καλο-γένεση (%)	Ξήρανση κορυφής (%)	Ριζο-βολία (%)	Πράσινοι έρριζοι μικροβλ. (%)	Αριθμός ριζών ανά μικροβλ.	Μέσο μήκος ριζών (cm)
Πλαστικό φιλμ	½MS για 8 εβδ.	50	100	17	0	1.0	1.2
	½MS +AC για 1 εβδ. ½MS για 7 εβδ.	36	46	27	18	1.0	1.9
	½MS +AC για 8 εβδ.	42	67	17	0	1.0	0.6
Μεμβράνη sanitas	½MS για 6 εβδ.	38	79	8	8	1.0	0.8
	½MS +AC για 1 εβδ. ½MS για 5 εβδ.	21	50	21	21	1.6	5.0
	½MS +AC για 6 εβδ.	46	38	21	21	1.6	3.5



Εικόνα 57. Χαρακτηριστική ριζοβολία μετά από εμβάπτιση της βάσης μικροβλαστών από ενήλικο φυτό σε υγρό διάλυμα με 1000 mg l^{-1} IBA για 10 sec και ακόλουθη καλλιέργεια σε $\frac{1}{2}\text{MS}$ χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες χωρίς AC για 8 εβδομάδες (α) ή σε $\frac{1}{2}\text{MS}$ με AC για 1 εβδομάδα ακολουθούμενο από μεταφορά σε $\frac{1}{2}\text{MS}$ χωρίς AC για 7 εβδομάδες (β) υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ είτε στα αναγραφόμενα υποστρώματα για συνολικά 6 εβδομάδες υπό κάλυψη μεμβράνης sanitas (γ).

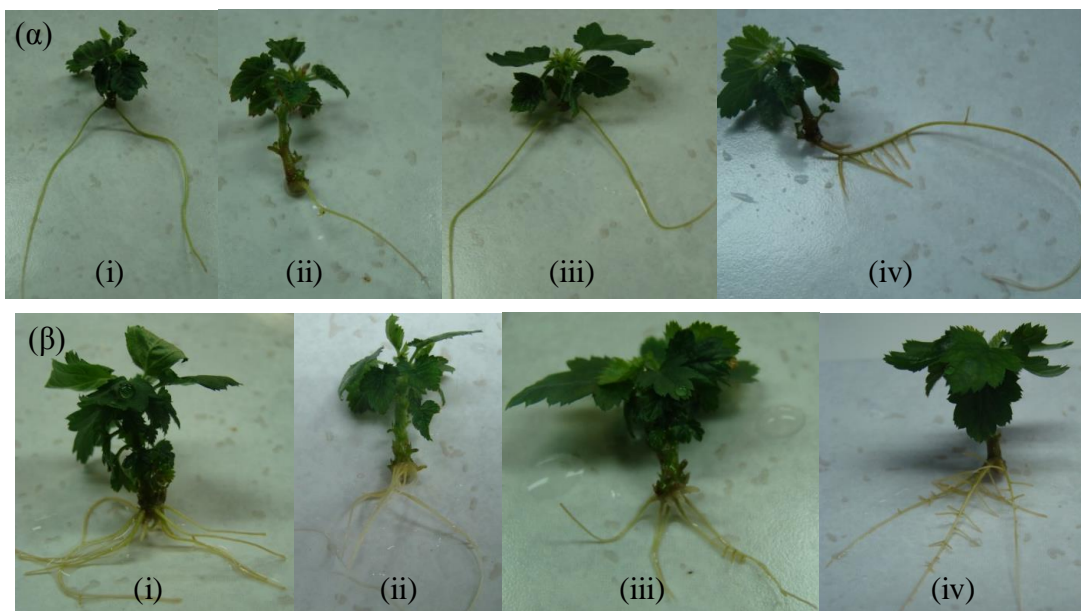
Κατά την προτροπή ριζοβολίας με καλλιέργεια σε $\frac{1}{2}\text{MS}$ με $0.5 \text{ IBA} / 8.0 \text{ IAA}$ (mg l^{-1}), οι μικροβλαστοί που προέρχονταν από ενήλικο φυτό ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό μετά από καλλιέργεια σε $\frac{1}{2}\text{MS}$ χωρίς AC συγκριτικά με την καλλιέργεια σε $\frac{1}{2}\text{MS}$ με AC ή την παραμονή στο υπόστρωμα με $0.5 \text{ IBA} / 8.0 \text{ IAA}$ (mg l^{-1}) (Πιν. 52, Εικ. 58α). Οι μικροβλαστοί από αναβλαστήσεις ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό μετά από καλλιέργεια σε $\frac{1}{2}\text{MS}$ με AC για μία μόνο εβδομάδα ή παραμονή στο υπόστρωμα με $0.5 \text{ IBA} / 8.0 \text{ IAA}$ (mg l^{-1}) σε σύγκριση με την καλλιέργεια σε $\frac{1}{2}\text{MS}$ με ή χωρίς AC για 5 εβδομάδες (Πιν. 52, Εικ. 58β), ενώ ο μέσος αριθμός ριζών ήταν μεγαλύτερος στους μικροβλαστούς που καλλιεργήθηκαν σε $\frac{1}{2}\text{MS}$ με ή χωρίς AC για 5 εβδομάδες (Πιν. 52, Εικ. 58β- i, iii) και το μέσο μήκος ριζών μικρότερο μετά από καλλιέργεια σε $\frac{1}{2}\text{MS}$ με AC για μία μόνο εβδομάδα (Πιν. 52, Εικ. 58β- ii). Χαρακτηριστική είναι επίσης η παραγωγή ριζών με ριζικά τριχίδια μόνο από τους μικροβλαστούς που καλλιεργήθηκαν συνεχώς στο υπόστρωμα με $0.5 \text{ IBA} / 8.0 \text{ IAA}$ (mg l^{-1}) (Εικ. 58α-, β- iv). Εκτιμώντας συνολικά την επίδραση των υποστρωμάτων ανάπτυξης των ριζών, το χαμηλότερο ποσοστό ριζοβολίας παρατηρήθηκε μετά από καλλιέργεια σε $\frac{1}{2}\text{MS}$ με AC για 5 εβδομάδες, το

οποίο συνοδεύτηκε από το υψηλότερο ποσοστό παραγωγής κάλου, ενώ δε βρέθηκαν σημαντικές διαφορές ως προς τον αριθμό και το μήκος των ριζών (Πιν. 52).

Πίνακας 52. Ριζοβολία μικροβλαστών από ενήλικο φυτό ή από αναβλαστήσεις, που καλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα ½MS με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg l⁻¹) για 1 εβδομάδα ακολουθούμενο από καλλιέργεια στα αναγραφόμενα υποστρώματα για ακόμη 5 εβδομάδες, σε βάζα όγκου 75 ml υπό κάλυψη μεμβράνης sanitas (μικροβλαστοί από ενήλικο φυτό) ή σε βάζα όγκου 145 ml και καπάκι magenta (μικροβλαστοί από αναβλαστήσεις) (n=23-93).

Προέλευση μικροβλαστών	Υπόστρωμα ανάπτυξης ριζών	Καλο-γένεση (%)	Ξήρανση κορυφής (%)	Ριζο-βολία (%)	Αριθμός ριζών ανά μικροβλ.	Μέσο μήκος ριζών (cm)
Ενήλικο φυτό	½MS για 5 εβδ.	42 λίγος	19	39	2.0 c	3.9 ab
	½MS +AC για 1 εβδ.	21 λίγος	9	28	1.5 c	3.3 abc
	½MS για 4 εβδ.	50 λίγος	11	13	1.1 c	3.5 abc
	½MS +AC για 5 εβδ.	26 λίγος	0	17	1.3 bc	6.1 a
	½MS με 0.5 IBA/ 8IAA για 5 εβδ	8 αρκετός	0	31	5.5 a	2.0 bc
Αναβλα-στήσεις	½MS +AC για 1 εβδ.	17 λίγος	0	47	3.5 abc	1.8 c
	½MS για 4 εβδ.	42 αρκετός	0	33	4.8 ab	2.6 abc
	½MS +AC για 5 εβδ.	38 πολύς	0	44	2.4 bc	2.8 abc
	½MS με 0.5 IBA/ 8IAA για 5 εβδ	33	14	36	2.8 A	3.4 A
Μέσος όρος	½MS για 5 εβδ.	20	6	34	2.4 A	2.7 A
	½MS +AC για 1 εβδ.	47	7	19	3.2 A	3.0 A
	½MS για 4 εβδ.	33	0	33	2.2 A	3.5 A
	½MS +AC για 5 εβδ.					
Ανάλυση της διασποράς						
Fεπεμβάσεων=					6.3039**	3.4795*
Fμέσων όρων=					0.6746 ^{NS}	1.0700 ^{NS}

*, **: σημαντικά σε επίπεδο $P=0.05$ και $P=0.01$, αντίστοιχα, NS: μη σημαντικά σε επίπεδο $P=0.05$, μικρά γράμματα μεταξύ των τιμών των μεταχειρίσεων, κεφαλαία γράμματα μεταξύ των μέσων τιμών.

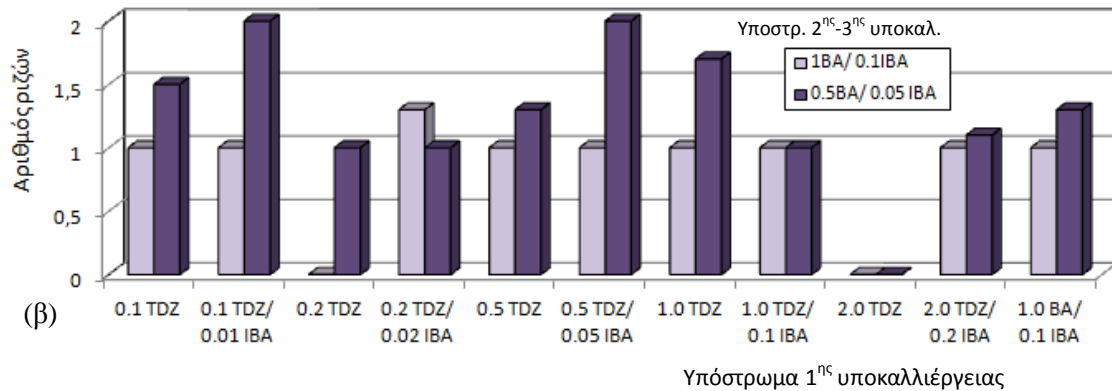
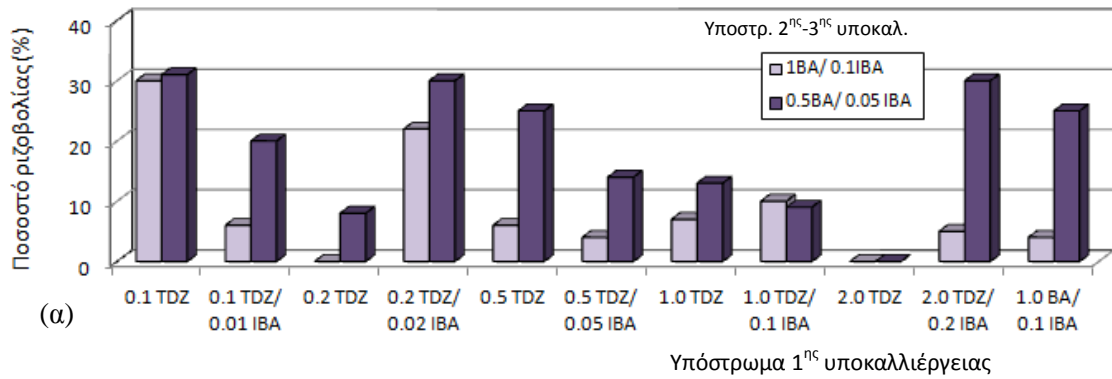


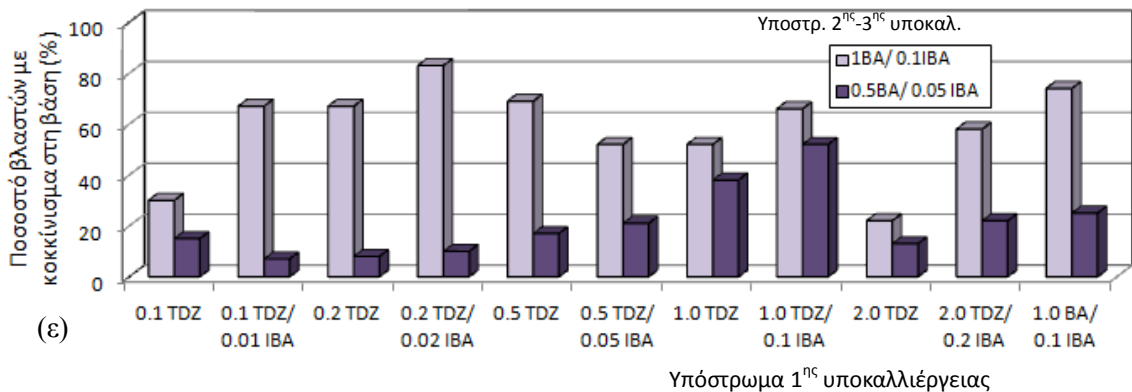
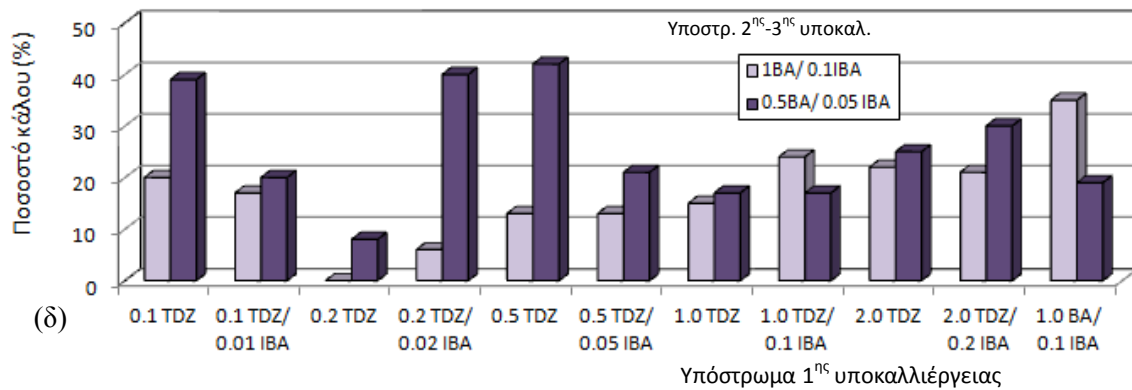
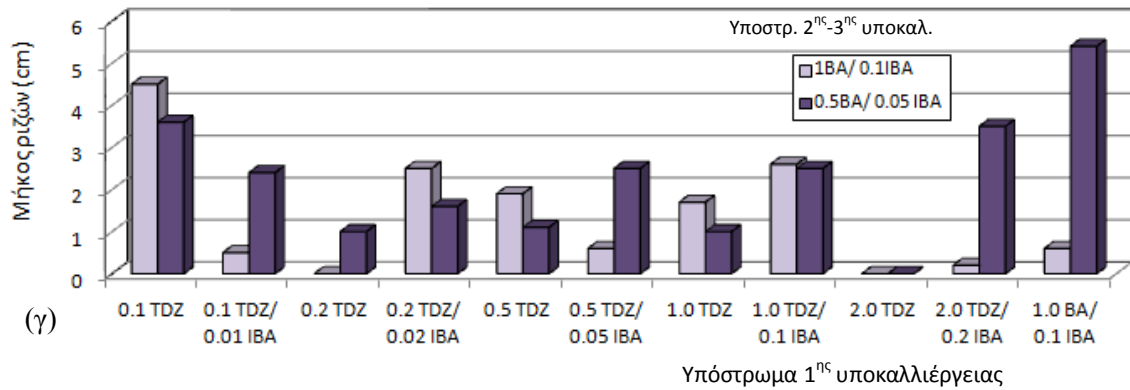
Εικόνα 58. Χαρακτηριστική ριζοβολία μικροβλαστών από ενήλικο φυτό (α) και από αναβλαστήσεις (β) που καλλιεργήθηκαν για μία εβδομάδα σε $\frac{1}{2}$ MS με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg l^{-1}) και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε $\frac{1}{2}$ MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για 5 εβδομάδες (i) ή σε $\frac{1}{2}$ MS με AC για 5 εβδομάδες (ii) ή σε $\frac{1}{2}$ MS με AC για 1 εβδομάδα και ακολούθως σε $\frac{1}{2}$ MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για ακόμη 4 εβδομάδες (iii) είτε παρέμειναν στο υπόστρωμα με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg l^{-1}) για ακόμη 5 εβδομάδες (iv).

6.3.6. Επίδραση τύπου και συγκέντρωσης κυτοκινινών κατά τη φάση πολλαπλασιασμού στην ακόλουθη ριζοβολία των μικροβλαστών

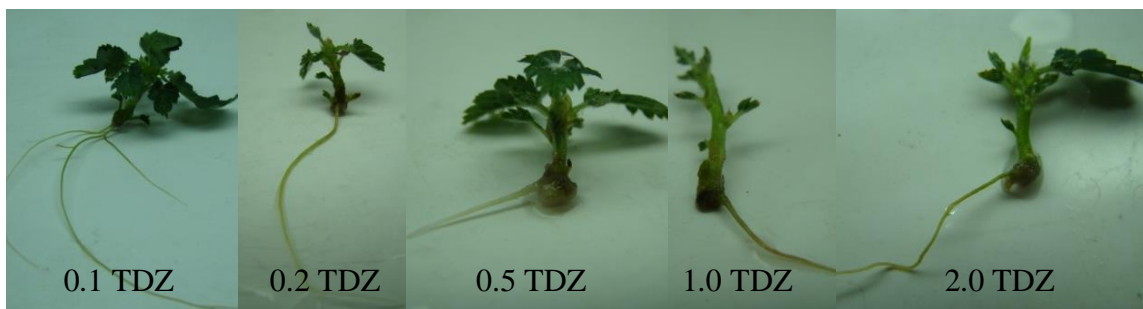
Μικροβλαστοί, που προέρχονταν από καλλιέργεια σε υποστρώματα με TDZ ή BA ακολουθούμενη από δύο υποκαλλιέργειες σε υποστρώματα με BA και IBA, ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό (Σχ. 19α) και σχημάτισαν περισσότερες ρίζες (Σχ. 19β) όταν είχαν υποκαλλιεργηθεί στο υπόστρωμα με 0.5 BA/ 0.05 IBA από ότι σε αυτό με 1.0 BA/ 0.1 IBA (mg l^{-1}). Μικροβλαστοί που είχαν αρχικά καλλιεργηθεί σε υπόστρωμα με υψηλές συγκεντρώσεις TDZ (0.5-2.0 mg l^{-1}) φάνηκαν να ριζοβολούν σε σχετικά χαμηλότερο ποσοστό από αυτούς που προέρχονταν από χαμηλές συγκεντρώσεις TDZ (Σχ. 19α). Οι μικροβλαστοί από τη χαμηλότερη συγκέντρωση του TDZ (0.1 mg l^{-1}) καθώς και αυτοί από BA, που είχαν υποκαλλιεργηθεί σε 0.5 BA/ 0.05 IBA (mg l^{-1}), ήταν οι πιο εύρωστοι με καλά ανεπτυγμένο ριζικό σύστημα όσον αφορά τον αριθμό και το

μήκος των ριζών (Σχ. 19β, γ, Εικ. 59). Το ποσοστό σχηματισμού κάλου στη βάση τους ήταν λίγο υψηλότερο σε αυτούς που είχαν υποκαλλιεργηθεί με 0.5 BA/ 0.05 IBA (mg l^{-1}) (Σχ. 19δ). Τέλος, σημαντική ήταν η επίδραση των υποστρωμάτων υποκαλλιέργειας στο κοκκίνισμα που εμφάνισαν οι μικροβλαστοί στη βάση τους, πιθανά ως αντίδραση στη μεταχείρισή τους με αυξίνη ή λόγω έλειψης κυτοκίνης κατά τη ριζοβολία, και το οποίο παρουσιάστηκε σε υψηλότερο ποσοστό στους μικροβλαστούς που είχαν καλλιεργηθεί στο υπόστρωμα με 0.5 BA/ 0.05 IBA από αυτούς στο 1.0 BA/ 0.1 IBA (mg l^{-1}) (Σχ. 19ε).





Σχήμα 19. Ποσοστό μικροβλαστών από ενήλικο φυτό που ριζοβόλησαν (α), μέσος αριθμός ριζών (β), μέσο μήκος ριζών (γ), ποσοστό σχηματισμού κάλλου στη βάση των μικροβλαστών (δ) και ποσοστό μικροβλαστών που εμφάνισαν κοκκίνισμα στη βάση τους (ε), οι οποίοι είχαν υποκαλλιεργηθεί στα αναγραφόμενα υποστρώματα με TDZ ή BA με ή χωρίς IBA (mg l^{-1}), ελήφθησαν από την τρίτη υποκαλλιέργεια και καλλιεργήθηκαν σε $\frac{1}{2}\text{MS}$ με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg l^{-1}) για 1 εβδομάδα και ακολούθως σε $\frac{1}{2}\text{MS}$ με AC (2 g l^{-1}) για 1 εβδομάδα και τέλος σε $\frac{1}{2}\text{MS}$ χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για ακόμη 4 εβδομάδες, σε βάζα όγκου 145 ml και καπάκι magenta ($n=10-29$).



Εικόνα 59. Χαρακτηριστική ριζοβολία μικροβλαστών από ενήλικο φυτό που προέρχονταν από τα αναγραφόμενα υποστρώματα με TDZ (mg l^{-1}) και καλλιεργήθηκαν σε $\frac{1}{2}\text{MS}$ με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg l^{-1}) για μία εβδομάδα ακολουθούμενη από μεταφορά σε $\frac{1}{2}\text{MS}$ με AC για 1 εβδομάδα και μετά σε $\frac{1}{2}\text{MS}$ χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για ακόμη 4 εβδομάδες.

Οι μικροβλαστοί που είχαν υποκαλλιεργηθεί σε υποστρώματα με διάφορους τύπους (BA, zeatin, kinetin, 2iP) και συγκεντρώσεις (0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg l^{-1}) κυτοκινινών βρέθηκαν να διαφέρουν ως προς την ικανότητά τους για ριζοβολία. Οι μικροβλαστοί που προέρχονταν από υπόστρωμα με BA ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό σε σύγκριση με αυτούς από zeatin ή 2iP, ενώ δε διέφεραν ως προς τον αριθμό και το μήκος των ριζών (Πιν. 53A, Εικ. 60). Οι μικροβλαστοί από τα υποστρώματα με kinetin ήταν πολύ κοντοί και θεωρήθηκαν ακατάλληλοι για ριζοβολία. Όσον αφορά τη συγκέντρωση κυτοκινίνης, μικροβλαστοί που προέρχονταν από υπόστρωμα με 0.5 έως 2.0 mg l^{-1} BA ριζοβόλησαν σε υψηλό ποσοστό, ενώ αυτοί από την υψηλότερη συγκέντρωση BA (4.0 mg l^{-1}) παρουσίασαν μειωμένο ποσοστό ριζοβολίας, αριθμό και μήκος παραγόμενων ριζών. Οι μικροβλαστοί από zeatin ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό όταν είχαν καλλιεργηθεί σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των 0.5 mg l^{-1} . Σημαντικές διαφορές στον αριθμό και το μήκος των ριζών δεν παρατηρήθηκαν, αν και οι μικροβλαστούς που προέρχονταν από BA είχαν την τάση να παράγουν περισσότερες ρίζες σε σχέση με αυτούς από zeatin (Πιν. 53B).

Πίνακας 53. Ριζοβολία μικροβλαστών από αναβλαστήσεις, που είχαν καλλιεργηθεί για πολλαπλασιασμό των βλαστών στα υποστρώματα MS με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις BA ή zeatin ή 2iP και 0.1 IBA (mg l⁻¹) και καλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα ½MS με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg l⁻¹) για 1 εβδομάδα ακολουθούμενη από καλλιέργεια σε ½MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για ακόμη 4 εβδομάδες, σε βάζα όγκου 145 ml και καπάκι magenta (n=20-35).

A.

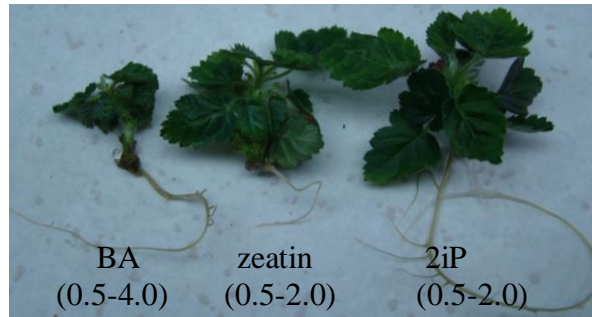
Υπόστρωμα πολ/σμου βλαστών (mg l ⁻¹)	Καλογένεση (%)	Ριζοβολία (%)	Αριθμός ριζών ανά μικροβλαστό	Μέσο μήκος ριζών (cm)
0.5-4.0 BA/ 0.1 IBA	19	28	2.1 a	2.6 a
0.5-2.0 zeatin/ 0.1 IBA	33	17	1.4 a	1.9 a
0.5-2.0 2iP/ 0.1 IBA	28	7	1.0 a	4.7 a
Ανάλυση της διασποράς <i>F</i> =			1.7117 ^{NS}	1.1626 ^{NS}

NS: μη σημαντικό σε επίπεδο *P*=0.05

B.

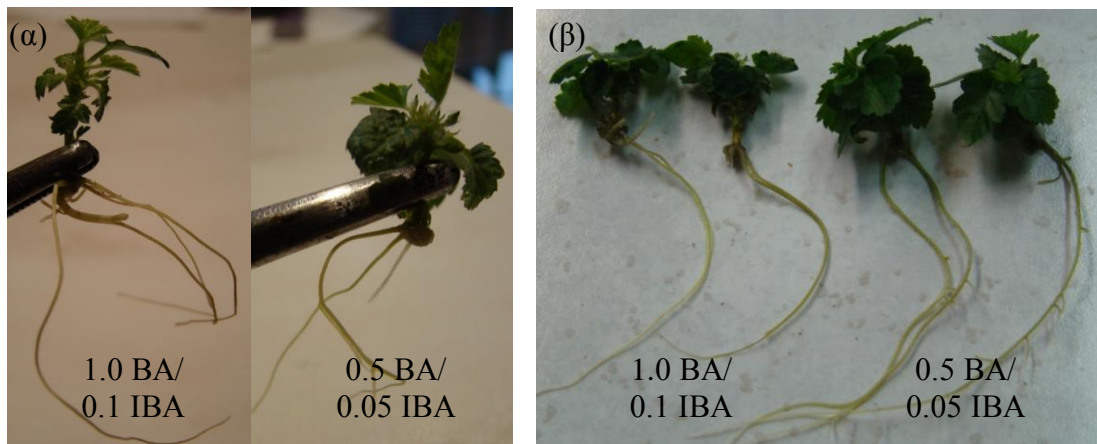
Υπόστρωμα πολ/σμου βλαστών (mg l ⁻¹)	Καλογένεση (%)	Ριζοβολία (%)	Αριθμός ριζών ανά μικροβλαστό	Μέσο μήκος ριζών (cm)
0.5 BA/ 0.1 IBA	17	43	2.8 a	4.7 a
1.0 BA/ 0.1 IBA	34	46	3.9 a	3.0 a
2.0 BA/ 0.1 IBA	31	60	2.3 a	3.1 a
4.0 BA/ 0.1 IBA	19	38	1.5 a	2.4 a
0.5 zeatin/ 0.1 IBA	26	6	1.0 NI	1.2 NI
1.0 zeatin / 0.1 IBA	30	30	1.7 a	4.7 a
2.0 zeatin / 0.1 IBA	50	0	-	-
4.0 zeatin / 0.1 IBA	17	26	1.9 a	3.6 a
Ανάλυση της διασποράς <i>F</i> =			2.6815 ^{NS}	1.9195 ^{NS}

NS: μη σημαντικό σε επίπεδο *P*=0.05, NI: δε συμπεριλήφθηκαν στη στατιστική επεξεργασία



Εικόνα 60. Χαρακτηριστική ριζοβολία μικροβλαστών από αναβλαστήσεις που προέρχονταν από υποστρώματα με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις κυτοκινινών και 0.1 IBA (mg l^{-1}) και καλλιεργήθηκαν σε $\frac{1}{2}\text{MS}$ με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg l^{-1}) για μία εβδομάδα ακολουθούμενη από μεταφορά σε $\frac{1}{2}\text{MS}$ χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για 4 εβδομάδες.

Μικροβλαστοί από ενήλικο φυτό και από αναβλαστήσεις ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό όταν προέρχονταν από το υπόστρωμα με μειωμένη συγκέντρωση BA/ IBA 0.5/ 0.05 σε σύγκριση με αυτούς από 1.0/ 0.1 (mg l^{-1}), ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ως προς τον αριθμό των παραγόμενων ριζών. Οι μικροβλαστοί από αναβλαστήσεις που είχαν υποκαλλιεργηθεί στο υπόστρωμα με 0.5 BA/ 0.05 IBA σχημάτισαν μακρύτερες ρίζες από αυτούς που προέρχονταν από 1.0 BA/ 0.1 IBA (mg l^{-1}), ενώ στους μικροβλαστούς από ενήλικο φυτό δεν παρατηρήθηκε διαφορά στο μήκος των ριζών (Πιν. 54, Εικ. 61).



Εικόνα 61. Χαρακτηριστική ριζοβολία μικροβλαστών από ενήλικο φυτό (α) ή αναβλαστήσεις (β) που προέρχονταν από τα αναγραφόμενα υποστρώματα κανονικής ή μειωμένης συγκέντρωσης BA και IBA (mg l^{-1}) και καλλιεργήθηκαν σε $\frac{1}{2}\text{MS}$ με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg l^{-1}) για μία εβδομάδα ακολουθούμενη από μεταφορά σε $\frac{1}{2}\text{MS}$ χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για 4 εβδομάδες.

Πίνακας 54. Ριζοβολία μικροβλαστών από ενήλικο φυτό και αναβλαστήσεις, που είχαν καλλιεργηθεί για πολλαπλασιασμό των βλαστών στα αναγραφόμενα υποστρώματα MS με κανονικής ή μειωμένης συγκέντρωσης BA (mg l^{-1}) και καλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg l^{-1}) για 1 εβδομάδα ακολουθούμενη από καλλιέργεια σε $\frac{1}{2}$ MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για ακόμη 4 εβδομάδες, σε βάζο όγκου 145 ml και καπάκι magenta (μικροβλαστοί από: ενήλικο φυτό $n=76-86$, αναβλαστήσεις $n=35$).

Προέλευση μικροβλαστών	Υπόστρωμα πολ/σμου βλαστών (mg l^{-1})	Καλογένεση (%)	Ριζοβολία (%)	Αριθμός ριζών ανά μικροβλ.	Μέσο μήκος ριζών (cm)
Ενήλικο φυτό	1.0 BA/ 0.1 IBA	48 αρκετός	20	2.5 a	3.7 ab
	0.5 BA/ 0.05 IBA	71 αρκετός	36	2.0 a	3.3 b
Αναβλαστήσεις	1.0 BA/ 0.1 IBA	46 λίγος	31	1.9 a	1.6 b
	0.5 BA/ 0.05 IBA	6 λίγος	50	1.6 a	5.4 a
Μέσος όρος	1.0 BA/ 0.1 IBA		23	2.3 A	2.9 B
	0.5 BA/ 0.05 IBA		40	1.8 A	4.1 A
Ανάλυση της διασποράς					
				$F_{\text{επεμβάσεων}}=$	1.5048 ^{NS}
				$F_{\text{μέσων όρων}}=$	7.5952 ^{**}
					2.1885 ^{NS}
					5.1232*

*, **: σημαντικό σε επίπεδο $P=0.05$ και $P=0.01$, αντίστοιχα, NS: μη σημαντικό σε επίπεδο $P=0.05$, μικρά γράμματα μεταξύ των τιμών των μεταχειρίσεων, κεφαλαία γράμματα μεταξύ των μέσων τιμών.

6.3.7. Επίδραση εφαρμογής γιββερελλίνης κατά τον πολλαπλασιασμό στην ακόλουθη ριζοβολία των μικροβλαστών

Μικροβλαστοί από ενήλικο φυτό που είχαν καλλιεργηθεί σε υποστρώματα με 0.1-2.0 mg l^{-1} GA₃ ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό από αυτούς που είχαν καλλιεργηθεί στο βασικό υπόστρωμα χωρίς GA₃, ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ως προς την αριθμό και το μήκος των ριζών (Πιν. 55).

Πίνακας 55. Ριζοβολία μικροβλαστών από ενήλικο φυτό, που είχαν καλλιεργηθεί για πολλαπλασιασμό των βλαστών σε υπόστρωμα MS με 1.0 BA/ 0.1 IBA, χωρίς ή με 0.1-2.0 GA₃ (mg l⁻¹), και καλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα ½MS με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg l⁻¹) για 1 εβδομάδα ακολουθούμενη από καλλιέργεια σε ½MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για ακόμη 4 εβδομάδες, σε βάζα όγκου 75 ml υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ (n=37-39).

Υπόστρωμα πολ/σμου βλαστών	Καλογένεση (%)	Ριζοβολία (%)	Αριθμός ριζών ανά μικροβλαστό	Μέσο μήκος ριζών (cm)
Χωρίς GA ₃	0	24	1.3 a	1.7 a
Με 0.1-2.0 mg l ⁻¹ GA ₃	18	44	1.8 a	1.5 a
Ανάλυση της διασποράς F=			1.7452 ^{NS}	0.3840 ^{NS}

NS: μη σημαντικό σε επίπεδο P=0.05

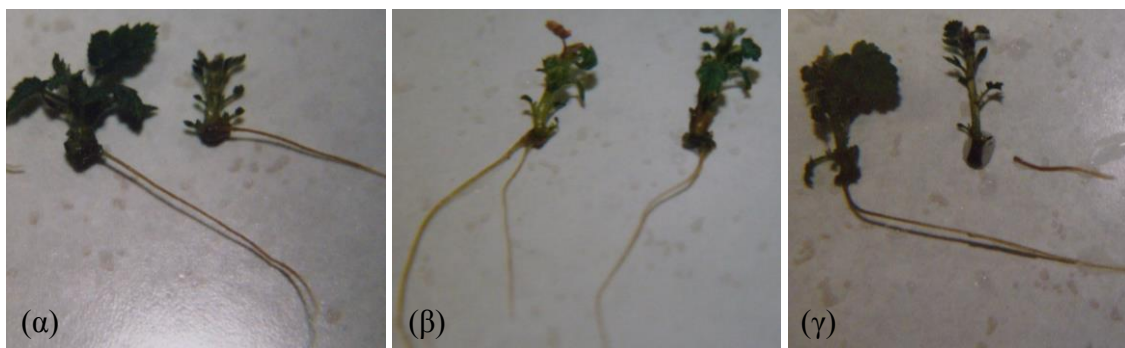
6.3.8. Επίδραση μήκους των μικροβλαστών στη ριζοβολία τους

Το μήκος των μικροβλαστών επέδρασε στη ριζοβολία τους, καθώς βλαστοί μεγάλου μήκους (2.0-3.0 cm) ριζοβόλησαν σε χαμηλότερο ποσοστό από βλαστούς μικρού (0.7-1.0 cm) ή μέσου μήκους (1.0-2.0 cm), ενώ οι μεγάλοι μήκους βλαστοί είχαν την τάση να σχηματίζουν πιο μακριές ρίζες (Πιν. 56, Εικ. 62).

Πίνακας 56. Ριζοβολία μικροβλαστών από ενήλικο φυτό με τα αναγραφόμενα μήκη, που καλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα ½MS με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg l⁻¹) για 1 εβδομάδα και μεταφέρθηκαν σε ½MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για ακόμη 4 εβδομάδες, σε βάζα όγκου 75 ml υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ (n=24-28).

Μήκος μικροβλαστών	Καλογένεση (%)	Ριζοβολία (%)	Αριθμός ριζών ανά μικροβλαστό	Μέσο μήκος ριζών (cm)
0.7-1.0 cm	18	29	1.3 a	1.5 a
1.0-2.0 cm	29	29	1.6 a	3.4 a
2.0-3.0 cm	39	7	1.0 a	5.2 a
Ανάλυση της διασποράς F=			0.4703 ^{NS}	2.2312 ^{NS}

NS: μη σημαντικά σε επίπεδο P=0.05



Εικόνα 62. Χαρακτηριστική ριζοβολία μικροβλαστών από ενήλικο φυτό με μήκη 0.7-1.0 cm (α), 1.0-2.0 cm (β) και 2.0-3.0 cm (γ) που καλλιεργήθηκαν σε $\frac{1}{2}$ MS με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg l^{-1}) για μία εβδομάδα ακολουθούμενη από μεταφορά σε $\frac{1}{2}$ MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για 4 εβδομάδες.

Στα πειράματα ριζοβολίας που ακολούθησαν προτιμήθηκε η χρήση μικροβλαστών μέσου μήκους (1.0-2.0 cm), που ριζοβόλησαν αποτελεσματικά, σχηματίζοντας ικανοποιητικό αριθμό και μήκος ριζών και οι οποίοι έχουν μήκος που διευκολύνει τους χειρισμούς στο επόμενο στάδιο του εγκλιματισμού.

6.3.9. Επίδραση δοχείου καλλιέργειας και υλικού κάλυψης στη ριζοβολία των μικροβλαστών

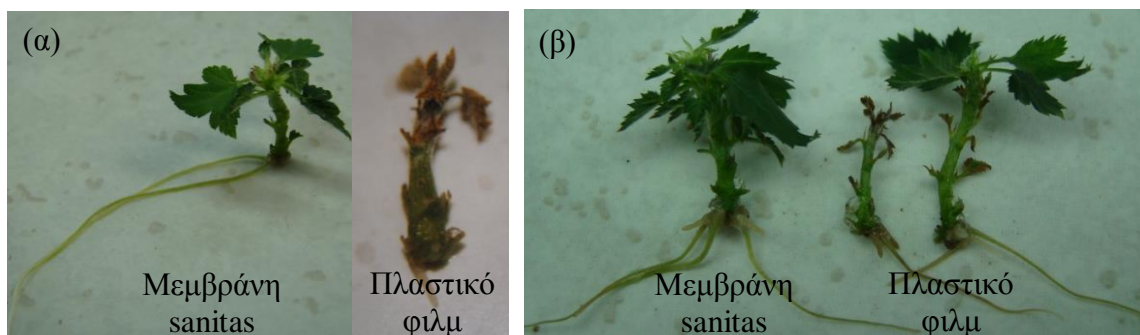
Μικροβλαστοί από ενήλικο φυτό, που είχαν καλλιεργηθεί για πολλαπλασιασμό των βλαστών υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ ή μεμβράνης sanitas και καλλιεργήθηκαν για ριζοβολία αντίστοιχα υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ ή μεμβράνης sanitas, ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό και σχημάτισαν περισσότερες και πιο μακριές ρίζες όταν η κάλυψη έγινε με μεμβράνη sanitas αντί του πλαστικό φιλμ, ενώ το πρόβλημα της ξήρανσης κορυφής και φύλλων βλαστού περιορίστηκε σε σημαντικό βαθμό (Πιν. 57, Εικ. 63α).

Μικροβλαστοί από αναβλαστήσεις, που είχαν καλλιεργηθεί για πολλαπλασιασμό των βλαστών υπό κάλυψη μεμβράνης sanitas και καλλιεργήθηκαν για ριζοβολία υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ ή μεμβράνης sanitas, δε παρουσίασαν διαφορές ως προς τη ριζοβολία τους, όμως το πρόβλημα της ξήρανσης κορυφής και φύλλων βλαστού εμφανίστηκε και πάλι σε υψηλό ποσοστό όταν η κάλυψη έγινε με πλαστικό φιλμ (Πιν. 57, Εικ. 63β).

Πίνακας 57. Ριζοβολία μικροβλαστών από ενήλικο φυτό και αναβλαστήσεις, που καλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα ½MS με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg l⁻¹) για 1 εβδομάδα ακολουθούμενη από καλλιέργεια σε ½MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για ακόμη 4 ή 5 εβδομάδες, σε βάζα όγκου 75 ml υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ ή μεμβράνης sanitas (n=45-130).

Προέλευση βλαστών	Υλικό κάλυψης	Καλογένεση (%)	Ξήρανση κορυφής (%)	Ριζοβολία (%)	Αριθμός ριζών ανά μικροβλ.	Μέσο μήκος ριζών (cm)
Ενήλικο φυτό	Πλαστικό φιλμ	0	84	24	1.3 b	1.3 b
	Μεμβράνη sanitas	46	14	39	2.2 ab	3.9 a
Αναβλαστήσεις	Πλαστικό φιλμ	17	62	57	3.0 a	1.4 b
	Μεμβράνη sanitas	30	0	53	3.0 a	1.6 b
Μέσος όρος	Πλαστικό φιλμ	12	71	49	2.7 A	1.4 B
	Μεμβράνη sanitas	38	9	46	2.7 A	2.5 A
Ανάλυση της διασποράς						
Fεπεμβάσεων=					4.7923*	34.9467**
Fμέσων όρων=					0.0634 ^{NS}	22.6777**

*, **: σημαντικό σε επίπεδο $P=0.05$ και $P=0.01$, αντίστοιχα, NS: μη σημαντικό σε επίπεδο $P=0.05$, μικρά γράμματα μεταξύ των τιμών των μεταχειρίσεων, κεφαλαία γράμματα μεταξύ των μέσων τιμών.

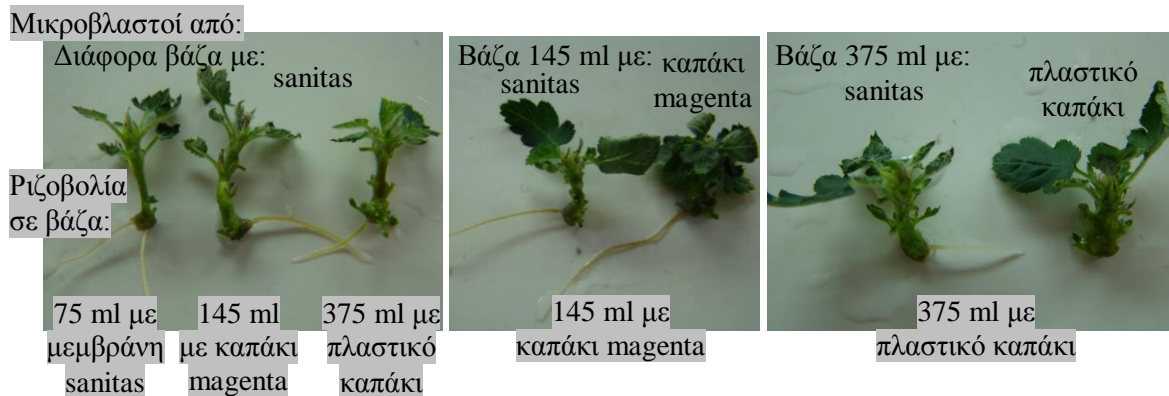


Εικόνα 63. Χαρακτηριστική ριζοβολία μικροβλαστών από ενήλικο φυτό (α) και αναβλαστήσεις (β) που καλλιεργήθηκαν σε ½MS με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg l⁻¹) για μία εβδομάδα ακολουθούμενη από μεταφορά σε ½MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για 4-5 εβδομάδες υπό κάλυψη μεμβράνης sanitas ή πλαστικού φιλμ.

Μικροβλαστοί από ενήλικο φυτό που είχαν καλλιεργηθεί για πολλαπλασιασμό των βλαστών σε διάφορα βάζα και υλικά κάλυψης ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό όταν είχαν καλλιεργηθεί για πολλαπλασιασμό των βλαστών υπό κάλυψη μεμβράνης sanitas και για ριζοβολία σε βάζα όγκου 145 ή 375 ml και καπάκι magenta ή πλαστικό καπάκι, αντίστοιχα (Πιν. 58). Η επιλογή του υλικού κάλυψης επέδρασε σημαντικά και στη μορφή του φυλλώματος των μικροβλαστών με αυτούς που είχαν καλλιεργηθεί για ριζοβολία σε βάζα με καπάκι magenta ή πλαστικό καπάκι να αναπτύσσουν μεγάλα πλατιά φύλλα σε σύγκριση με αυτούς που είχαν καλλιεργηθεί υπό κάλυψη μεμβράνης sanitas που είχαν μικρά φύλλα. Ιδιαίτερα οι μικροβλαστοί που είχαν καλλιεργηθεί και κατά τον πολλαπλασιασμό των βλαστών σε βάζα με καπάκι magenta ή πλαστικό καπάκι ανέπτυξαν ακόμη πιο μεγάλα και πλατιά φύλλα από αυτούς που είχαν καλλιεργηθεί σε βάζα με μεμβράνη sanitas (Εικ. 64).

Πίνακας 58. Ριζοβολία μικροβλαστών από ενήλικο φυτό, που είχαν καλλιεργηθεί για πολλαπλασιασμό των βλαστών στα αναγραφόμενα βάζα και υλικά κάλυψης και καλλιεργήθηκαν για προτροπή ριζοβολία σε στερεό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg l^{-1}) για 1 εβδομάδα ακολουθούμενη από μεταφορά σε $\frac{1}{2}$ MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για ακόμη 5 εβδομάδες, στα αναγραφόμενα βάζα και υλικά κάλυψης ($n=16-30$).

Όγκος βάζου καλλιέργειας/ υλικό κάλυψης κατά: τον πολ/σμο βλαστών	τη ριζοβολία βλαστών	Καλο- γένεση (%)	Ριζοβολία (%)	Αριθμός ριζών ανά μικροβλ.	Μέσο μήκος ριζών (cm)
75, 145, 375 ml/ μεμβράνη sanitas	75 ml/ μεμβράνη sanitas	47	8	1.5	0.8
	145 ml/ καπάκι magenta	47	20	1.2	1.4
	375 ml/ πλαστικό καπάκι	44	26	1.1	0.9
145 ml/ καπάκι magenta	145 ml/ καπάκι magenta	56	6	1.0	2.9
375 ml/ πλαστικό καπάκι	375 ml/ πλαστικό καπάκι	39	6	1.0	0.6



Εικόνα 64. Χαρακτηριστική ριζοβολία μικροβλαστών από ενήλικο φυτό που είχαν παραχθεί στα αναγραφόμενα βάζα και υλικά κάλυψης και καλλιεργήθηκαν σε $\frac{1}{2}$ MS με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg l^{-1}) για μία εβδομάδα ακολουθούμενη από μεταφορά σε $\frac{1}{2}$ MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για 5 εβδομάδες στα αναγραφόμενα βάζα και υλικά κάλυψης.

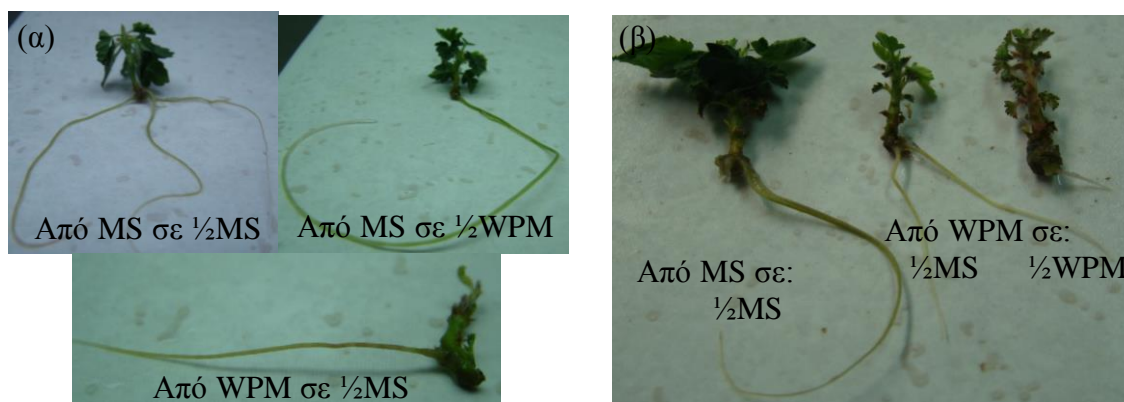
Επειδή το μέγεθος της φυλλικής επιφάνειας επιδρά στην ικανότητα φωτοσύνθεσης και συνεπώς αυτοτροφίας των ριζοβολημένων μικροβλαστών που θα βγουν για εγκλιματισμό, αλλά και στην απώλεια νερού μέσω της εξατμισοδιαπνοής, τα βάζα όγκου 145 ml με καπάκι magenta θεωρήθηκαν καταλληλότερα για ριζοβολία των μικροβλαστών επειδή δίνουν φυτάρια με καλύτερα ανεπτυγμένο φύλλωμα από τα βάζα όγκου 75 ml με μεμβράνη sanitas, αλλά όχι τόσο πλατιά φύλλα επιρρεπή στην απώλεια υγρασία όπως τα βάζα όγκου 375 ml με πλαστικό καπάκι. Έτσι, στα πειράματα που ακολούθησαν η ριζοβολία των μικροβλαστών γινόταν σε βάζα όγκου 145 ml με καπάκι magenta.

6.3.10. Επίδραση θρεπτικού υποστρώματος στη ριζοβολία των μικροβλαστών

Μικροβλαστοί από ενήλικο φυτό που είχαν καλλιεργηθεί για πολλαπλασιασμό των βλαστών με θρεπτικό υπόστρωμα WPM ριζοβόλησαν σε χαμηλότερα ποσοστά από αυτούς που είχαν καλλιεργηθεί σε MS (Πιν. 59, Εικ. 65α), αλλά επειδή τα ποσοστά αντίδρασης ήταν πολύ χαμηλά το πείραμα επαναλήφθηκε με μικροβλαστούς από αναβλαστήσεις, οπότε επιβεβαιώθηκε η παραπάνω παρατήρηση (Πιν. 59, Εικ. 65β). Μικροβλαστοί από αναβλαστήσεις, που προέρχονταν από MS, ριζοβόλησαν εξίσου αποτελεσματικά μετά από καλλιέργεια σε $\frac{1}{2}$ MS ή σε $\frac{1}{2}$ WPM, ενώ το WPM φάνηκε να ευνοεί την επιμήκυνση των ριζών (Πιν. 59).

Πίνακας 59. Ριζοβολία μικροβλαστών από ενήλικο φυτό και από αναβλαστήσεις, που είχαν καλλιεργηθεί για πολλαπλασιασμό των βλαστών στα υποστρώματα MS ή WPM με 1.0 BA/ 0.1 IBA (mg Γ⁻¹), και καλλιεργήθηκαν στα υποστρώματα ½MS ή ½WPM με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg Γ⁻¹) για 1 εβδομάδα και στη συνέχεια αντίστοιχα σε ½MS ή ½WPM χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για ακόμη 4 εβδομάδες, σε βάζα όγκου 145 ml και καπάκι magenta (n=22-45).

Μικρο-βλαστοί από:	Υπόστρωμα πολ/σμου βλαστών	Υπόστρωμα ριζοβολίας	Καλο-γένεση (%)	Ριζοβολία (%)	Αριθμός ριζών ανά μικροβλ.	Μέσο μήκος ριζών (cm)
Ενήλικο φυτό	MS	½MS	18	9	1.5	3.3
		½WPM	55	9	1.0	8.5
	WPM	½MS	0	3	1.0	3.7
		½WPM	51	0	-	-
Αναβλαστήσεις	MS	½MS	46	31	1.9	1.6
		½WPM	31	34	1.7	3.9
	WPM	½MS	25	21	2.0	3.3
		½WPM	17	8	1.0	5.0



Εικόνα 65. Χαρακτηριστική ριζοβολία μικροβλαστών από ενήλικο φυτό (α) και αναβλαστήσεις (β) που προέρχονται από υπόστρωμα MS ή WPM και καλλιεργήθηκαν σε ½MS ή ½WPM με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg Γ⁻¹) για μία εβδομάδα και ακολούθως αντίστοιχα σε ½MS ή ½WPM χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για 4 εβδομάδες.

6.3.11. Επίδραση θέσης αρχικών εκφύτων πάνω στις αναβλαστήσεις στη ριζοβολία των μικροβλαστών *in vitro*

Η θέση των αρχικών εκφύτων πάνω στις αναβλαστήσεις επέδρασε στη ριζοβολία των μικροβλαστών. Έτσι, μικροβλαστοί που ελήφθησαν από τη δεύτερη υποκαλλιέργεια της καλλιέργειας που εγκαταστάθηκε τον Ιούνιο '09 από επάκρια έκφυτα ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό και σχημάτισαν περισσότερες και κοντύτερες ρίζες από αυτούς που προέρχονταν από κορυφαία ή μεσαία έκφυτα (Πιν. 60A, Εικ. 66α). Παρομοίως, μικροβλαστοί από την τρίτη υποκαλλιέργεια της καλλιέργειας που εγκαταστάθηκε τον Ιούλιο '09 από μεσαία έκφυτα ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό από τους μικροβλαστούς που προέρχονταν από άλλες θέσεις εκφύτων, ενώ αυτή η διαφορά εξομαλύνθηκε μετά την τέταρτη υποκαλλιέργεια (Πιν. 60B, Εικ. 66β). Επίσης, παρατηρήθηκε ότι οι μικροβλαστοί από τις αρχικές υποκαλλιέργειες επέδειξαν υψηλότερα ποσοστά ριζοβολίας (40-86%) από αυτά μικροβλαστών που ελήφθησαν από την 5^η μέχρι τη 10^η υποκαλλιέργεια και κυμαίνονταν μεταξύ 40% και 50%.

Πίνακας 60. Ριζοβολία μικροβλαστών προερχόμενων από καλλιέργειες εγκατεστημένες τον Ιούνιο και Ιούλιο '09, από τις αναγραφόμενες θέσεις εκφύτων πάνω στις αναβλαστήσεις, που καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα ½MS με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg l⁻¹) για 1 εβδομάδα και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε ½MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για ακόμη 4 εβδομάδες, σε βάζα όγκου 145 ml και καπάκι magenta (n=15-40).

A. καλλιέργεια εγκατεστημένη τον Ιούνιο '09

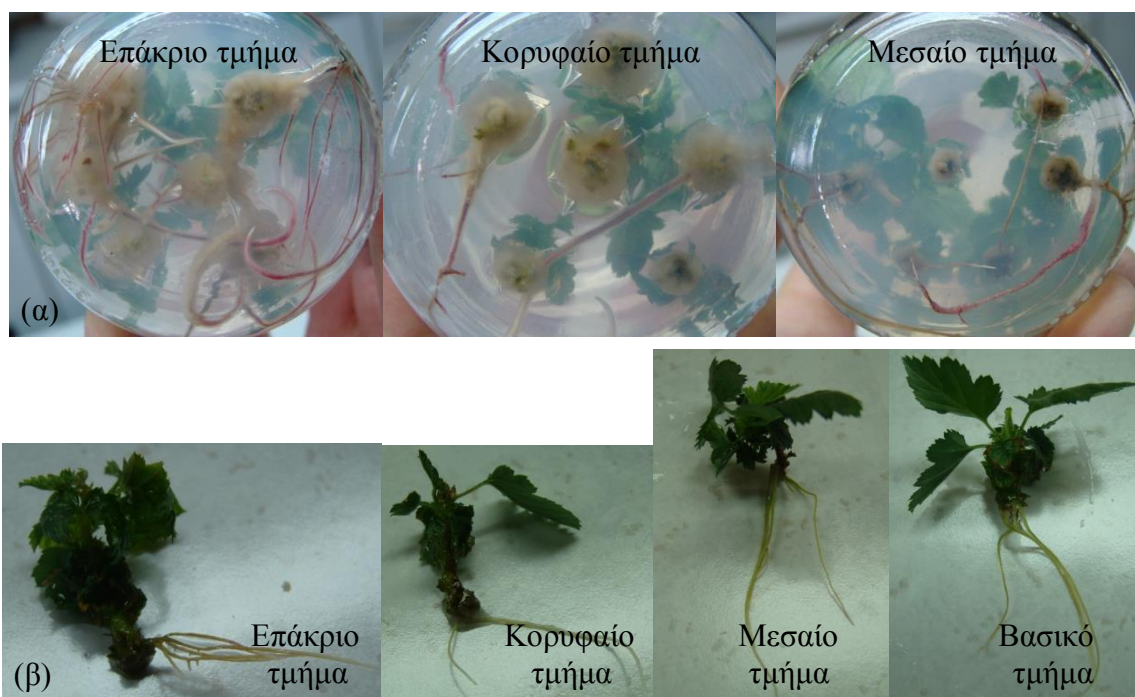
Προέλευση μικροβλαστών	Δεύτερη υποκαλλιέργεια		
	Ριζοβολία (%)	Αριθμός ριζών ανά μικροβλαστό	Μέσο μήκος ριζών (cm)
Επάκρια έκφυτα	86	5.4 a	1.6 b
Κορυφαία έκφυτα	55	4.3 a	2.5 a
Μεσαία έκφυτα	40	2.8 a	2.1 ab
Ανάλυση της διασποράς	<i>F</i> =	1.3437 ^{NS}	4.2888*

*: σημαντικό σε επίπεδο $P=0.05$, NS: μη σημαντικό σε επίπεδο $P=0.05$

Πίνακας 60B. καλλιέργεια εγκατεστημένη τον Ιούλιο '09

Προέλευση μικροβλαστών	Τρίτη υποκαλλιέργεια				Τέταρτη υποκαλλιέργεια			
	Κάλος (%)	Ρίζες (%)	Αρ. ριζών	Μηκ. ριζών (cm)	Κάλος (%)	Ρίζες (%)	Αρ. ριζών	Μηκ. ριζών (cm)
Επάκρια έκφυτα	44	44	1.9 a	2.1 a	31	69	5.1 a	2.0 a
Κορυφαία έκφυτα	88	38	2.3 a	2.5 a	37	60	2.3 b	3.1 a
Μεσαία έκφυτα	18	68	3.0 a	3.6 a	49	57	3.1 ab	2.6 a
Βασικά έκφυτα	34	40	3.1 a	2.9 a	23	53	4.0 ab	2.9 a
Ανάλυση της διασποράς								
<i>F</i> =			1.4256 NS	1.4748 NS			3.7657 *	2.1644 NS

*: σημαντικό σε επίπεδο $P=0.05$, NS: μη σημαντικό σε επίπεδο $P=0.05$



Εικόνα 66. Χαρακτηριστική ριζοβολία μικροβλαστών που προέρχονταν από τη δεύτερη υποκαλλιέργεια της καλλιέργειας του Ιουνίου '09 (α) και από την τρίτη υποκαλλιέργεια της καλλιέργειας που εγκαταστάθηκε τον Ιούλιο '09 (β), από έκφυτα που ελήφθησαν από τις αναγραφόμενες θέσεις πάνω στις αναβλαστήσεις, και καλλιεργήθηκαν σε $\frac{1}{2}MS$ με $0.5 IBA / 8.0 IAA$ ($mg l^{-1}$) για 1 εβδομάδα και ακολούθως σε $\frac{1}{2}MS$ χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για ακόμη 4 εβδομάδες.

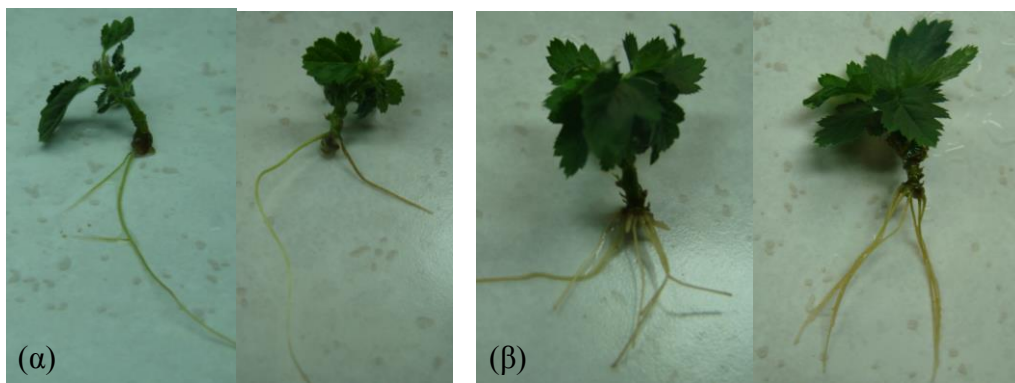
6.3.12. Επίδραση της φυσιολογίας των μητρικών φυτών από τα οποία προήλθαν οι μικροβλαστοί στη ριζοβολία τους

Οι μικροβλαστοί που ελήφθησαν από καλλιέργειες εγκατεστημένες από αναβλαστήσεις, μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια και σπορόφυτα ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό από αυτούς που προέρχονταν από ενήλικα φυτά, αν και το ποσοστό ριζοβολίας γενικά δεν ξεπέρασε το 58%. Περισσότερες ρίζες σχηματίστηκαν από τους μικροβλαστούς από νεανικές καλλιέργειες, ενώ το μήκος τους ήταν μεγαλύτερο στους μικροβλαστούς από ενήλικες καλλιέργειες (Πιν. 61, Εικ. 67).

Πίνακας 61. Συγκριτική αντίδραση μικροβλαστών από ενήλικη ή νεανική καλλιέργεια ως προς τη ριζοβολία τους μετά από καλλιέργεια σε υπόστρωμα ½MS με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg l⁻¹) για 1 εβδομάδα και μεταφορά σε ½MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες στο φως για ακόμη 4 εβδομάδες, σε βάζα όγκου 75 ml υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ ή μεμβράνης sanitas οι μικροβλαστοί ενήλικης προέλευσης και σε βάζα όγκου 145 ml και καπάκι magenta οι μικροβλαστοί νεανικής προέλευσης.

Προέλευση εκφύτου	Ριζοβολία μικροβλαστών			
	Ριζοβολία (%)	Αριθμός ριζών ανά μικροβλαστό	Μέσο μήκος ριζών (cm)	Αριθμός επαναλήψεων
Ενήλικο φυτό- Μάρτιος '04 (Υψηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού)	32	2.1 b	3.6 a	n=205
Ενήλικα φυτά (Χαμηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού)	16	1.4 b	4.4 a	n=114
Αναβλαστήσεις των καμένων φυτών	51	3.2 a	2.5 b	n=489
Μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια	51	2.7 ab	1.8 b	n=43
Σπορόφυτα +GA ₃	58	3.3 ab	1.3 b	n=26
Ανάλυση της διασποράς F=		6.1185**	14.3092**	

**· σημαντικό σε επίπεδο P=0.01



Εικόνα 67. Χαρακτηριστική ριζοβολία μικροβλαστών από ενήλικο φυτό (α) και αναβλαστήσεις (β) που καλλιεργήθηκαν σε $\frac{1}{2}$ MS με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg l^{-1}) για μία εβδομάδα και ακολούθως σε $\frac{1}{2}$ MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για 4 εβδομάδες.

6.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Εξαιτίας της φτωχής ριζοβολίας που επέδειξαν οι μικροβλαστοί του *xM. florentina* που προέρχονταν από ενήλικο φυτό, το στάδιο της *in vitro* ριζοβολίας μελετήθηκε διεξοδικά με στόχο τη βελτίωση των ποσοστών ριζοβολίας και της ποιότητας των παραγόμενων φυταρίων. Μικροβλαστοί ενήλικης και νεανικής προέλευσης χρησιμοποιήθηκαν σε συγκριτικά πειράματα για να διαπιστωθεί η επίδραση διαφόρων παραγόντων (αυξινών, τεχνητής ριζοβολίας, σκότους, ενεργού άνθρακα, βάζου καλλιέργειας και υλικού κάλυψης, θρεπτικού υποστρώματος, μήκους μικροβλαστών, κυτοκινινών, γιββερελλίνης, προέλευσης μικροβλαστών) στη ριζοβολία τους.

6.4.1. Επίδραση της συνεχούς ή για μία εβδομάδα παρουσίας IBA ή NAA στο στερεό υπόστρωμα καλλιέργειας

Ο χρόνος παραμονής στο υπόστρωμα προτροπής ριζοβολίας επέδρασε σημαντικά στη ριζοβολία των μικροβλαστών, ιδιαίτερα αυτών που προέρχονταν από ενήλικο φυτό. Όταν η καλλιέργεια μικροβλαστών ενήλικης προέλευσης σε υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS με 0.5-3.0 mg l^{-1} IBA διήρκησε 8 εβδομάδες η ριζοβολία παρεμποδίστηκε πλήρως, ενώ τα ποσοστά σχηματισμού κάλου στη βάση των μικροβλαστών και ξήρανσης κορυφής και φύλλων ήταν υψηλότερα από ότι μετά από καλλιέργεια μιας εβδομάδας και μεταφορά σε υπόστρωμα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, το οποίο οδήγησε σε χαμηλά ποσοστά

ριζοβολίας (7-13%) στις υψηλότερες συγκεντρώσεις IBA. Στους μικροβλαστούς από αναβλαστήσεις, τα ποσοστά ριζοβολίας των μικροβλαστών δε διέφεραν σημαντικά μετά από καλλιέργεια μίας ή πέντε εβδομάδων (21-31% και 18-25 %, αντίστοιχα) σε $\frac{1}{2}$ MS με 0.5-2.0 mg Γ^{-1} IBA ή NAA, όμως η ποσότητα του σχηματιζόμενου κάλου στη βάση των βλαστών ήταν μεγαλύτερη μετά από 5 εβδομάδες καλλιέργειας συγκριτικά με τη μιας εβδομάδας καλλιέργεια, ιδιαίτερα όταν χρησιμοποιήθηκε το NAA. Η καλλιέργεια μικροβλαστών μηλιάς σε υπόστρωμα με IBA μόνο για 4-6 ημέρες επίσης βελτίωσε τη ριζοβολία τους συγκριτικά με τη συνεχή επαφή με IBA, ενώ απέτρεψε το σχηματισμό κάλου (James and Thunborn, 1979; Liu *et al.*, 1991; Lane, 1992).

6.4.2. Επίδραση της παρουσίας IBA ή NAA ή IAA ή συνδυασμών αυτών για μία εβδομάδα στο στερεό υπόστρωμα καλλιέργειας

Όταν εξετάστηκε η ριζοβολία των μικροβλαστών μετά από καλλιέργεια μιας εβδομάδας σε υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS με μία αυξίνη (IBA ή NAA ή IAA) ή με συνδυασμό αυξινών (IBA/ IAA, NAA/ IAA) και μεταφορά σε υπόστρωμα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, οι μικροβλαστοί από ενήλικο φυτό, που καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα με 0.5 mg Γ^{-1} IBA ή με 2-20 mg Γ^{-1} IAA ή με συνδυασμό αυτών, σχημάτισαν κάλο στη βάση των βλαστών σε χαμηλό ποσοστό και ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό μετά από καλλιέργεια σε υπόστρωμα με συνδυασμό IBA και IAA, ιδιαίτερα σε αυτό με 0.5 IBA και 8.0 IAA (32%). Αντίθετα, μικροβλαστοί από αναβλαστήσεις που καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα με μόνο IAA (4.0 ή 8.0 mg Γ^{-1}) ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό (65%) από αυτούς που καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα με 0.5 ή 1.0 mg Γ^{-1} IBA ή NAA, χωρίς (23%) ή με (38-49%) IAA, ενώ στο υπόστρωμα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες ριζοβόλησαν ελάχιστοι μικροβλαστοί (5%). Επιπλέον, στα υποστρώματα που περιείχαν μόνο IAA σχηματίστηκε κάλος στη βάση των μικροβλαστών σε χαμηλότερο ποσοστό και μικρότερη ποσότητα από ότι σε αυτά με IBA ή NAA. Οι αυξίνες IBA και IAA ήταν κατάλληλες για την *in vitro* ριζοβολία μικροβλαστών της μηλιάς ‘Northern Spy’, ενώ το NAA είχε την τάση να παράγει κάλο και ρίζες χωρίς αγγειακή σύνδεση με τη βάση του βλαστού (Hutchinson, 1984). Για την *in vitro* ριζοβολία μικροβλαστών της μηλιάς ‘Jork 9’, το IAA ήταν προτιμότερο του IBA, ενώ το NAA έδωσε φτωχή ριζοβολία και παρακίνησε ισχυρά το σχηματισμό κάλου. Η διαφορετική αποτελεσματικότητα που παρατηρήθηκε μεταξύ των τριών αυξινών πιθανά αντικατοπτρίζει διαφορές στην

πρόσληψη, στη μεταφορά και το μεταβολισμό τους (De Klerk *et al.*, 1997). Οι διαφορές στην ικανότητα ριζοβολίας και στην ακόλουθη ανάπτυξη των ριζών μικροβλαστών από δύο ποικιλίες αγλαδιάς αποδόθηκαν σε διαφορές στην πρόσληψη και το μεταβολισμό των εφαρμοζόμενων αυξινών (Baraldi *et al.*, 1995). Το IBA προσλαμβάνεται τέσσερις φορές γρηγορότερα από το IAA σε βλαστούς μηλιάς, ενώ το IAA αποδομείται ταχύτερα από το IBA (Van Der Kriecken *et al.*, 1993). Οι Bommineni *et al.* (2001) επίσης βρήκαν το IAA πιο κατάλληλο για βέλτιστη προτροπή ριζοβολίας σε μικροβλαστούς μηλιάς ποικ. Gale Gala, μετά από εξέταση των αυξινών NAA, IBA, IAA και 2,4-D. Σε μικροβλαστούς του υποκειμένου μηλιάς M.9, το IAA στις υψηλότερες συγκεντρώσεις (4.0-20.0 mg l⁻¹) έδωσε υψηλότερο ποσοστό ριζοβολίας και καλύτερο ριζικό σύστημα και φύλλα, ενώ αυτά τα χαρακτηριστικά παρατηρήθηκαν με χαμηλές συγκεντρώσεις (0.1-2.0 mg l⁻¹) των IBA και NAA (Radmann *et al.*, 2002).

6.4.3. Επίδραση της σύντομης εμβάπτισης σε υγρό διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης IBA ή συνδυασμού IBA/IAA

Μικροβλαστοί από ενήλικο φυτό των οποίων η βάση εμβαπτίστηκε για 10 sec σε υγρά διαλύματα υψηλής συγκέντρωσης IBA (500-1500 mg l⁻¹) και ακολούθως μεταφέρθηκαν σε υπόστρωμα τύρφης ή τύρφης-περλίτη 1:1 ξεράθηκαν, ενώ όταν μεταφέρθηκαν σε υπόστρωμα ½MS με AC ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό (17-25%), σχημάτισαν κάλο στη βάση τους και παρουσίασαν ξήρανση κορυφής και φύλλων σε χαμηλότερα ποσοστά από μικροβλαστούς που μεταφέρθηκαν σε υπόστρωμα χωρίς AC (0-11%). Απευθείας ριζοβολία μικροβλαστών μηλιάς έχει επιτευχθεί σε ικανοποιητικά ποσοστά (49%) σε υποστρώματα με χονδρό περλίτη, ενώ η χρήση σκέτης τύρφης δε συνιστάται εξαιτίας της υψηλής υδατοϊκανότητας που παρουσιάζει (Avanzato and Cherubini, 1993). Η χρήση διαλυμάτων που περιείχαν συνδυασμό 500 ή 1000 mg l⁻¹ IBA και 250-1000 mg l⁻¹ IAA οδήγησε σε χαμηλότερα ποσοστά ριζοβολίας από τα διαλύματα που περιείχαν μόνο IBA, πιθανά λόγω της αδιαλυτότητας και καθίζησης ρόδινου ιζήματος που τα πρώτα εμφάνισαν μετά την αποστείρωση, κάτι που δεν παρατηρήθηκε στα υποστρώματα που περιείχαν υψηλή συγκέντρωση μόνο IBA. Μικροβλαστοί των οποίων η βάση εμβαπτίστηκε σε διάλυμα με 1000 mg l⁻¹ IBA ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό (23%) από αυτούς που εμβαπτίστηκαν σε 500 mg l⁻¹ IBA (10%). Μικροβλαστοί από αναβλαστήσεις, των οποίων η βάση εμβαπτίστηκε για

10 sec σε διάλυμα με 1000 mg I⁻¹ IBA ριζοβόλησαν σε ίσο ποσοστό (52%) με αυτούς που είχαν καλλιεργηθεί σε στερεό υπόστρωμα με 0.5 IBA και 8.0 IAA (mg I⁻¹) για μία εβδομάδα, ενώ οι μικροβλαστοί από μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια παρουσίασαν σημαντική μείωση στο ποσοστό ριζοβολίας τους (από 51% στο 18%) με τη μέθοδο της εμβάπτισης σε διάλυμα 1000 mg I⁻¹ IBA. Και στις δύο κατηγορίες μικροβλαστών νεανικής προέλευσης, η μέθοδος της εμβάπτισης σε 1000 mg I⁻¹ IBA οδήγησε στο σχηματισμό υψηλότερου ποσοστού και μεγαλύτερης ποσότητας κάλου στη βάση των βλαστών, καθώς και στην παραγωγή λιγότερων και κοντύτερων ριζών συγκριτικά με την καλλιέργεια σε στερεό υπόστρωμα με 0.5 IBA και 8.0 IAA (mg I⁻¹). Είναι πιθανό υγρά διαλύματα χαμηλότερης συγκέντρωσης IBA να ενδείκνυνται για την πρόκληση ριζοβολίας σε μικροβλαστούς νεανικής προέλευσης δεδομένου ότι οι νεανικοί μικροβλαστοί ριζοβολούν με μεγαλύτερη ευχέρεια από τους ενήλικους. Για διάφορες ποικιλίες μηλιάς που εξετάστηκαν, η σύντομη εμβάπτιση σε υγρό υπόστρωμα υψηλής συγκέντρωσης αυξίνης ήταν εξίσου (Zimmerman *et al.*, 1987) ή περισσότερο (Collet and Le, 1987) αποτελεσματική από την 7-ημερη καλλιέργεια σε υπόστρωμα χαμηλής συγκέντρωσης αυξίνης στη ριζοβολία των μικροβλαστών.

6.4.4. Επίδραση της εφαρμογής σκότους κατά την πρώτη εβδομάδα ριζοβολίας

Η εφαρμογή σκότους την πρώτη εβδομάδα καλλιέργειας σε διάφορα υποστρώματα προτροπής ριζοβολίας με συνδυασμούς IBA και IAA προκάλεσε μικρή αύξηση στα ποσοστά ριζοβολίας των μικροβλαστών, η οποία όμως συνοδεύτηκε από σημαντική αύξηση του ποσοστού και της ποσότητας του παραγόμενου κάλου, σε σημείο που οι παραγόμενες ρίζες να εμφανίζουν μικρή συνάφεια με το βλαστό. Η σκοτεινή περίοδος στην αρχή της ριζοβολίας μικροβλαστών μηλιάς έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε διάφορες ποικιλίες μηλιάς (Welander, 1983; Kataeva and Butenko, 1987; Bolan *et al.*, 1998), αν και έχει αναφερθεί αύξηση του σχηματισμού κάλου σε μικροβλαστούς του υποκειμένου μηλιάς M.9 Jork (Caboni *et al.*, 1992). Εφαρμογή της σκοτεινής μεταχείρισης κατά το στάδιο πολλαπλασιασμού (etiolation) ήταν λιγότερο αποτελεσματικό σε σύγκριση με την εφαρμογή στην αρχή του σταδίου ριζοβολίας για 4 έως 7 ημέρες (Zimmerman, 1984). Το συνεχές σκοτάδι ήταν βασικό και για τη ριζοβολία μικροβλαστών του *Quercus robur* 'Fastigiata' (Pierik *et al.*, 1997), ενώ στο *Quercus euboica* το σκοτάδι στην αρχή της περιόδου ριζοβολίας δε βελτίωσε τη ριζοβολία

(Kartsonas and Papafotiou, 2007). Στην *Acacia mangium*, η ριζοβολία του ώριμου κλώνου αυξήθηκε σημαντικά με έκθεση των μικροβλαστών σε αυξίνες στο σκοτάδι, ενώ η προωθητική επίδραση του σκότους ήταν περισσότερο χρονο-περιορισμένη για τους νεανικής προέλευσης μικροβλαστούς (Monteuuis and Bon, 2000).

6.4.5. Επίδραση της χρήσης ενεργού άνθρακα

Μικροβλαστοί που καλλιεργήθηκαν την πρώτη εβδομάδα σε υπόστρωμα προτροπής ριζοβολίας που περιείχε ενεργό άνθρακα δε ριζοβόλησαν ούτε σχημάτισαν κάλο στη βάση τους, το οποίο έχει επίσης αναφερθεί σε μικροβλαστούς του υποκειμένου αγλαδιάς BP10030 (Wang, 1991). Μικροβλαστοί που είχαν καλλιεργηθεί για μία εβδομάδα σε υποστρώματα με συνδυασμό IBA/ IAA, καθώς και αυτοί των οποίων η βάση εμβαπτίστηκε για 10 sec σε πυκνά διαλύματα IBA/ IAA και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS με AC, ριζοβόλησαν σε λίγο υψηλότερο ποσοστό από αυτούς σε υπόστρωμα χωρίς AC, το οποίο έχει επίσης αναφερθεί στα είδη *Pinus pinaster* (Dumas and Monteuuis, 1995), *Quercus robur* και *Q. rubra* (Sanchez *et al.*, 1996), ενώ ο σχηματισμός κάλου αυξήθηκε με την πρώτη μέθοδο και μειώθηκε με τη δεύτερη. Περιορισμός της παραγωγής κάλου στη βάση των βλαστών με τη χρήση AC έχει αναφερθεί επίσης για τη *Simmondsia chinensis* ‘jojoba’ (Agrawal *et al.*, 2002), τη *Carrya elliptica* (Woodward and Thomson, 1996) και τη *Salvia africana-lutea* (Makunga and Van Staden, 2008). Η παρουσία AC στο υπόστρωμα ριζοβολίας μικροβλαστών από υποκείμενα μηλιάς βελτίωσε την ποιότητα των ριζών, αλλά μείωσε το ποσοστό ριζοβολίας (Sharma *et al.*, 2007).

Υψηλότερα ποσοστά ριζοβολημένων βλαστών που δεν εκδήλωσαν ξήρανση κορυφής και φύλλων βλαστών επιτεύχθηκαν μετά από καλλιέργεια μιας εβδομάδας σε $\frac{1}{2}$ MS με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg l^{-1}) και μετά από εμβάπτιση σε διάλυμα με 1000 mg l^{-1} IBA ακολουθούμενες από καλλιέργεια σε υπόστρωμα με AC (33% και 18%, αντίστοιχα). Στη *Rehmannia glutinosa*, η προσθήκη AC σε συγκέντρωση 0.1-0.3 % αύξησε σημαντικά την ανάπτυξη του βλαστού και προώθησε το σχηματισμό και την ανάπτυξη των ριζών (Paek *et al.*, 1995).

Μικροβλαστοί από ενήλικο φυτό, των οποίων η βάση είχε εμβαπτισθεί σε διάλυμα 1000 mg l^{-1} IBA ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό, σχημάτισαν κάλο σε χαμηλότερο ποσοστό και παρήγαγαν πιο μακριές ρίζες, όταν η καλλιέργεια στο υπόστρωμα με AC

διήρησε μία μόνο εβδομάδα συγκριτικά με τη συνεχή καλλιέργεια σε ½MS με ή χωρίς AC. Κατά την προτροπή ριζοβολίας με καλλιέργεια σε ½MS με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg I⁻¹), οι μικροβλαστοί που προέρχονταν από ενήλικο φυτό ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό (39%) μετά από καλλιέργεια σε ½MS χωρίς AC συγκριτικά με την καλλιέργεια σε ½MS με AC ή την παραμονή στο υπόστρωμα με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg I⁻¹), ενώ οι μικροβλαστοί από αναβλαστήσεις ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό (44-47%) μετά από καλλιέργεια σε ½MS με AC για μία μόνο εβδομάδα ή παραμονή στο υπόστρωμα με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg I⁻¹) σε σύγκριση με την καλλιέργεια σε ½MS με ή χωρίς AC για 5 εβδομάδες. Χαρακτηριστική ήταν η παραγωγή ριζών με ριζικά τριχίδια μόνο από τους μικροβλαστούς που καλλιεργήθηκαν συνεχώς στο υπόστρωμα με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg I⁻¹). Εκτιμώντας συνολικά την επίδραση των υποστρωμάτων ανάπτυξης των ριζών, το χαμηλότερο ποσοστό ριζοβολίας παρατηρήθηκε μετά από καλλιέργεια σε ½MS με AC για 5 εβδομάδες. Η παρουσία AC στο υπόστρωμα ανάπτυξης των ριζών μικροβλαστών από διάφορα υποκείμενα μηλιάς, επίσης, μείωσε τα ποσοστά ριζοβολίας τους εξαρτωμένου της ποικιλίας και της συγκέντρωσης του IBA (Magyar-Tábori *et al.*, 2002).

6.4.6. Επίδραση του τύπου και της συγκέντρωσης κυτοκινίνης στο υπόστρωμα πολλαπλασιασμού των βλαστών

Ο τύπος και η συγκέντρωση των κυτοκινινών στο υπόστρωμα πολλαπλασιασμού των βλαστών βρέθηκε να επιδρά στην ακόλουθη ριζοβολία τους. Μικροβλαστοί από ενήλικο φυτό, που είχαν αρχικά καλλιεργηθεί σε υποστρώματα με 0.1-2.0 mg I⁻¹ TDZ ή στο βασικό με BA και ακολούθως για δύο υποκαλλιέργειες σε υποστρώματα με BA και IBA, ριζοβόλησαν σε σχετικά υψηλότερο ποσοστό όταν προέρχονταν από τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις TDZ (0.1-0.2 mg I⁻¹). Οι μικροβλαστοί που είχαν υποκαλλιεργηθεί στο υπόστρωμα με μειωμένες συγκεντρώσεις BA/ IBA (0.5/ 0.05) επίσης ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό και σχημάτισαν περισσότερες ρίζες από ότι αυτοί από 1.0 BA/ 0.1 IBA (mg I⁻¹). Οι μικροβλαστοί από τη χαμηλότερη συγκέντρωση του TDZ (0.1 mg I⁻¹) καθώς και αυτοί από BA, που είχαν υποκαλλιεργηθεί σε 0.5 BA/ 0.05 IBA (mg I⁻¹), ήταν οι πιο εύρωστοι με καλά ανεπτυγμένο ριζικό σύστημα όσον αφορά τον αριθμό και το μήκος των ριζών. Στη *Rosa hybrida*, καμία διαφορά δεν παρατηρήθηκε στη ριζοβολία των μικροβλαστών που παράχθηκαν σε υπόστρωμα που περιείχε TDZ ή BA (Barna and Wakhlu, 1995). Μικροβλαστοί από αναβλαστήσεις που

είχαν καλλιεργηθεί σε υπόστρωμα με BA ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό από αυτούς σε υπόστρωμα με zeatin ή 2iP, ενώ αυτοί από την kinetin ήταν πολύ κοντοί ακατάλληλοι για ριζοβολία. Μικροβλαστοί που προέρχονταν από συγκέντρωση BA 0.5 έως 2.0 mg l⁻¹ ριζοβόλησαν σε υψηλό ποσοστό, ενώ αυτοί από την υψηλότερη συγκέντρωση BA (4.0 mg l⁻¹) παρουσίασαν μειωμένο ποσοστό ριζοβολίας, αριθμό και μήκος παραγόμενων ριζών. Μικροβλαστοί τόσο ενήλικης όσο και νεανικής προέλευσης από το βασικό υπόστρωμα με 1.0 BA/ 0.1 IBA που υποκαλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα με τις μισές συγκεντρώσεις φυτορρυθμιστικών ουσιών (0.5 BA/ 0.05 IBA) ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό από αυτούς που υποκαλλιεργήθηκαν στο βασικό υπόστρωμα. Στους μικροβλαστούς από αναβλαστήσεις που είχαν υποκαλλιεργηθεί σε 0.5 BA/ 0.05 IBA (mg l⁻¹) το μήκος των ριζών ήταν επίσης μεγαλύτερο. Οι μικροβλαστοί που είχαν καλλιεργηθεί σε υπόστρωμα με χαμηλή συγκέντρωση κυτοκινίνης γενικά βρέθηκαν να ριζοβολούν καλύτερα από αυτούς που προέρχονταν από υψηλή συγκέντρωση. Η ικανότητα ριζοβολίας μικροβλαστών μηλιάς επίσης επηρεάστηκε από το περιεχόμενο κυτοκινίνης των υποστρωμάτων αναγέννησης, ακόμη και μετά από διαφορετικές μεταχειρίσεις υποκαλλιέργειας (Magyar-Tábori *et al.*, 2011). Η παρουσία των κυτοκινινών είναι βασική για την προτροπή της κυτταρικής διαίρεσης στην έναρξη του σχηματισμού ριζών (De Klerk *et al.*, 2001), αλλά υψηλότερα επίπεδα κυτοκινινών παρεμποδίζουν την τυχαία ριζοβολία (Bollmark *et al.*, 1988). Εάν το επίπεδο ενδογενής κυτοκινίνης είναι πολύ υψηλό, η έναρξη της ριζοβολίας μπορεί να παρεμποδιστεί και εάν είναι πολύ χαμηλό οι βλαστοί γερνάνε πριν γίνουν αυτόνομοι σε κυτοκινίνη, το οποίο συμβαίνει μετά την έναρξη ριζοβολίας (Bressan *et al.*, 1982). Η παρεμπόδιση της ριζοβολίας των μικροβλαστών από προηγούμενη έκθεση σε υψηλή συγκέντρωση κυτοκινίνης μπορεί να αποδοθεί στη 'μεταφερόμενη' επίδραση των κυτοκινινών από το υπόστρωμα πολλαπλασιασμού των βλαστών, ιδιαίτερα του TDZ, που έχει ισχυρή δραστηριότητα κυτοκινίνης και αυξημένη υπολλειμματικότητα στους φυτικούς ιστούς συγκριτικά με τις αμινοπουρίνες (Huetteman and Preece, 1993). Η μεταχείριση με BA για διαφορετικές περιόδους μέσα στη διαδικασία ριζοβολίας παρεμπόδισε ισχυρά το σχηματισμό ριζών από τεμάχια βλαστού του υποκειμένου μηλιάς 'M.9 Jork', ιδιαίτερα όταν εφαρμόστηκε στην έναρξη της περιόδου ριζοβολίας (Pawlicki and Welander, 1992).

6.4.7. Επίδραση της προσθήκης γιββερελλίνης στο υπόστρωμα πολλαπλασιασμού των βλαστών

Οι μικροβλαστοί από ενήλικο φυτό που είχαν καλλιεργηθεί σε υποστρώματα με 0.1-2.0 mg I⁻¹ GA₃ ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό σε σύγκριση με τους μικροβλαστούς από το βασικό υπόστρωμα χωρίς GA₃, σε αντίθεση με ότι συνήθως συμβαίνει όπου οι γιββερελλίνες παρεμποδίζουν το σχηματισμό των ριζών (Takeno *et al.*, 1982/83; Pawlicki and Welander, 1992; Gaspar *et al.*, 1996; Trigiano and Gray, 2005). Αντίστροφη σχέση μεταξύ ενδογενών επιπέδων γιββερελλίνης και ικανότητας ριζοβολίας βρήκαν ο Takeno και οι συνεργάτες του (1982/83). Η μεταχείριση με GA₃ για διαφορετικές περιόδους μέσα στη διαδικασία ριζοβολίας μείωσε τη ριζοβολία τεμαχίων βλαστού του υποκειμένου μηλιάς ‘M.9 Jork’ όταν εφαρμόστηκε τόσο στην έναρξη όσο και στο τέλος της περιόδου ριζοβολίας (Pawlicki and Welander, 1992), ενώ όταν η γιββερελλίνη προστέθηκε σε χαμηλή συγκέντρωση (1.0 mg I⁻¹) στο υπόστρωμα πολλαπλασιασμού αύξησε την ικανότητα ριζοβολίας των μικροβλαστών, αντίθετα με τις υψηλότερες δόσεις (2.0 ή 4.0 mg I⁻¹) που ήταν παρεμποδιστικές (Caboni *et al.*, 1992).

6.4.8. Επίδραση του μήκους των μικροβλαστών

Οι μεγάλου μήκους (2.0-3.0 cm) μικροβλαστοί ριζοβόλησαν σε χαμηλότερο ποσοστό από τους μικρού (0.7-1.0 cm) ή μεσαίου (1.0-2.0 cm) μήκους βλαστούς, πιθανά επειδή ήταν περισσότερο ξυλοποιημένοι, ενώ η ριζοβολία μικροβλαστών του υποκειμένου μηλιάς M.9 δε σχετίστηκε με μήκος βλαστού μεταξύ 1.0 και 3.5 cm (James and Thunborn, 1981). Οι μεγαλύτερου μήκους βλαστοί είχαν την τάση να σχηματίζουν πιο μακριές ρίζες, το οποίο θα μπορούσε να αποδοθεί στο ότι όσο μεγαλύτερο είναι το μήκος των βλαστών τόσο περισσότεροι υδατάνθρακες μπορούν εν δυνάμει να αποθηκευτούν. Ο Lane (1992) συνιστά την επιλογή μικροβλαστοί μηλιάς που είναι παχείς και καλά ανεπτυγμένοι για ριζοβολία επειδή περιέχουν περισσότερα αποθέματα αμύλου, στα οποία μπορούν να βασιστούν τα φυτάρια κατά τον εγκλιματισμό και την πρώτη ανάπτυξη στο θερμοκήπιο.

6.4.9. Επίδραση του δοχείου καλλιέργειας και του υλικού κάλυψης

Μικροβλαστοί από ενήλικο φυτό που είχαν καλλιεργηθεί για πολλαπλασιασμό των βλαστών και για ριζοβολία σε βάζα όγκου 75 ml υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ

ριζοβόλησαν σε χαμηλότερο ποσοστό από αυτούς που είχαν καλλιεργηθεί με μεμβράνη sanitas, ενώ οι μικροβλαστοί από αναβλαστήσεις που είχαν καλλιεργηθεί για πολλαπλασιασμό των βλαστών υπό κάλυψη μεμβράνης sanitas δεν παρουσίασαν διαφορά ως προς το ποσοστό ριζοβολίας τους όταν ριζοβόλησαν υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ ή μεμβράνης sanitas. Βελτίωση της ριζοβολίας μικροβλαστών με χρήση μεμβράνης sanitas έχει επίσης αναφερθεί για το *Quercus euboica*, η οποία αποδόθηκε στην καλύτερη ανταλλαγή αερίων στο βάζο καλλιέργειας (Kartsonas and Papafotiou, 2007). Τα υψηλά ποσοστά ξήρανσης κορυφής και φύλλων των βλαστών, που παρατηρήθηκαν όταν η ριζοβολία έγινε σε βάζα καλλιέργειας καλυμμένα με πλαστικό φιλμ, περιορίστηκε με τη χρήση της μεμβράνης sanitas. Σε φυτάρια *Malus domestica*, που ριζοβολούν δύσκολα, παρουσιάστηκε νέκρωση της κορυφής κατά την παρατεταμένη υποκαλλιέργεια σε υπόστρωμα χωρίς κυτοκινίνη (συνθήκες ευνοϊκές για ριζοβολία), η οποία θεωρήθηκε ότι προκλήθηκε από τη σταδιακή εξάντληση των αποθεμάτων κυτοκινίνης στους βλαστούς, οι οποίοι δε σχημάτισαν ρίζες και στερήθηκαν τη πηγή ενδογενών κυτοκινινών. Η ανεπάρκεια κυτοκινίνης οδήγησε σε σταμάτημα των διαιρέσεων στο κορυφαίο μερίστωμα και σε κυτταρική νέκρωση, το οποίο, με τη σειρά του, επέφερε μείωση στη σύνθεση IAA και ABA (Kataeva *et al.*, 1991). Νέκρωση κορυφής παρατηρήθηκε και κατά τη ριζοβολία μικροβλαστών *Castanea sativa* και *Quercus robur*, η οποία επίσης αποδόθηκε στη απουσία κυτοκινίνης από το υπόστρωμα ριζοβολίας σε σύνδεση με τη μεταχείριση αυξίνης για προτροπή ριζοβολίας (Vietez *et al.*, 1989). Η νέκρωση που παρατηρήθηκε σε καλλιέργειες πατάτας αποδόθηκε σε ανεπάρκεια Ca λόγω χαμηλής πρόσληψης ιόντων Ca ως αποτέλεσμα της υψηλής υγρασίας στα δοχεία καλλιέργειας που είχαν σφραγιστεί με parafilm περιορίζοντας το ρυθμό διαπνοής και την κινητικότητα των ιόντων (Sha *et al.*, 1989), ενώ η νέκρωση κορυφής βλαστών, που αποτελεί συχνό και επίμονο πρόβλημα σε καλλιέργειες *Pistacia vera*, σχετίστηκε με την ανεπάρκεια Ca και/ ή B στις μεριστωματικές περιοχές ενεργά αναπτυσσόμενων βλαστών και δεν περιορίστηκε με μείωση της υγρασίας ή με τον αυξημένο αερισμό στα δοχεία καλλιέργειας (Abousalim and Mantell, 1994; Barghchii and Anderson, 1996).

Μικροβλαστοί ενήλικης προέλευσης που είχαν καλλιεργηθεί για πολλαπλασιασμό των βλαστών σε διάφορα βάζα υπό κάλυψη μεμβράνης sanitas ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό όταν καλλιεργήθηκαν για ριζοβολία σε βάζα όγκου 145 ml με καπάκι magenta ή 375 ml με πλαστικό καπάκι συγκριτικά με αυτούς που είχαν

καλλιεργηθεί για πολλαπλασιασμό των βλαστών υπό κάλυψη καπάκι magenta ή πλαστικό καπάκι είτε αυτούς που είχαν ριζοβολήσει σε βάζα όγκου 75 ml υπό κάλυψη μεμβράνης sanitas. Η *in vitro* ριζοβολία μικροβλαστών των ειδών *Amelanchier spirata*, *Acer rubrum*, *Forsythia x intermedia*, *Malus x domestica* και *Betula nigra* σημαντικά ενισχύθηκε στα μεγαλύτερα βάζα (McClelland and Smith, 1990). Οι μικροβλαστοί που καλλιεργήθηκαν σε βάζα με καπάκι magenta ή πλαστικό καπάκι ανέπτυξαν μεγαλύτερα και πιο πλατιά φύλλα από αυτούς που είχαν καλυφθεί με μεμβράνη sanitas. Προτείνεται η κάλυψη των δοχείων καλλιέργειας κατά το στάδιο του πολλαπλασιασμού των βλαστών να γίνεται με μεμβράνη sanitas, επειδή έδωσε μικροβλαστούς που ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό από αυτούς που αναπτύχθηκαν καλυμμένοι με πλαστικό φιλμ, καπάκι magenta ή πλαστικό καπάκι πιθανά χάρη στη μείωση της υπερενυδάτωσης των βλαστών, και για τη ριζοβολία των μικροβλαστών να χρησιμοποιούνται βάζα όγκου 145 ml με καπάκι magenta, στα οποία οι μικροβλαστοί ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό και ανέπτυξαν καλύτερα ανεπτυγμένο φύλλωμα. Φυτάρια της *Thapsia garganica*, που είχαν αναπτυχθεί και ριζοβολήσει *in vitro* σε περιβάλλον με βελτιωμένο αερισμό με τη χρήση τροποποιημένων καπακιών, εμφάνισαν μειωμένη υπερενυδάτωση και μπόρεσαν να εγκλιματιστούν εύκολα (Makunga *et al.*, 2006).

6.4.10. Επίδραση του θρεπτικού υποστρώματος

Μικροβλαστοί τόσο από ενήλικο φυτό όσο και από αναβλαστήσεις που είχαν καλλιεργηθεί στο θρεπτικό υπόστρωμα MS ριζοβόλησαν σε υψηλότερα ποσοστά από αυτούς που προέρχονταν από WPM. Οι μικροβλαστοί που προέρχονταν από MS ριζοβόλησαν εξίσου αποτελεσματικά και στα δύο υποστρώματα, ενώ το WPM φάνηκε να ευνοεί την επιμήκυνση των ριζών. Καλύτερη ανταπόκριση στη ριζοβολία βλαστών που πολλαπλασιάστηκαν σε υπόστρωμα MS σε σύγκριση με αυτούς σε WPM έχει επίσης δειχθεί στα είδη *Vaccinium spp.* (Tetsumura *et al.*, 2008) και *Hagenia abyssinica* (Feyissa *et al.*, 2005), καθώς και στο υποκείμενο ροδακινιάς P.S. B2 (Morini and Concetti, 1985), αν και στο τελευταίο το WPM φάνηκε πιο κατάλληλο για τη ριζοβολία.

6.4.11. Επίδραση της θέσης των αρχικών εκφύτων πάνω στις αναβλαστήσεις

Η θέση των αρχικών εκφύτων πάνω στις αναβλαστήσεις επέδρασε στη ριζοβολία των μικροβλαστών που ελήφθησαν από τις αρχικές υποκαλλιέργειες, ενώ μετά την

τέταρτη υποκαλλιέργεια οι όποιες διαφορές εξομαλύνθηκαν. Μικροβλαστοί που ελήφθησαν από τις αρχικές υποκαλλιέργειες ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό από αυτούς που ελήφθησαν μετά την πέμπτη υποκαλλιέργεια, το οποίο έρχεται σε αντίθεση με ότι έχει αναφερθεί για βλαστούς της δύσκολης στη ριζοβολία ποικιλίας μηλιάς 'Jonathan' (Noiton *et al.*, 1992), της αγλαδιάς (Al-Maarri *et al.*, 1994), της *Castanea mollissima* (Hou *et al.*, 2010) και του *Artocarpus heterophyllus* (Amin and Jaiswal, 1993), οι οποίοι απέκτησαν βελτιωμένη ικανότητα ριζοβολίας με την αύξηση του αριθμού των υποκαλλιεργειών. Τα επίπεδα ενδογενούς IAA στους μικροβλαστούς της *C. mollissima* σταδιακά αυξήθηκαν, ενώ τα ενδογενή επίπεδα ABA, κυτοκινινών και GA₃ στους μικροβλαστούς μειώθηκαν ελαφρώς μετά από διαδοχικές υποκαλλιέργειες (Hou *et al.*, 2010).

6.4.12. Επίδραση της φυσιολογίας των μητρικών φυτών από τα οποία προήλθαν οι μικροβλαστοί

Οι μικροβλαστοί που ελήφθησαν από καλλιέργειες εγκατεστημένες από αναβλαστήσεις, μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια και σπορόφυτα ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό από αυτούς που προέρχονταν από ενήλικα φυτά, αν και το ποσοστό ριζοβολίας γενικά δεν ξεπέρασε το 58%. Οι μικροβλαστοί από νεανικές καλλιέργειες σχημάτισαν περισσότερες ρίζες και αυτοί από ενήλικες καλλιέργειες πιο μακριές ρίζες. Σε πολλά ακόμη είδη, όπως το *Sorbus domestica* (Arrillaga *et al.*, 1991), το *Fraxinus ornus* (Arrillaga *et al.*, 1992), το *Malus* sp. (Ur-Rahman *et al.*, 2007), η *Acacia mangium* (Monteuuis, 2004), το *Cupressus sempervirens* (Capuana and Giannini, 1997), το *Taxus mairei* (Chang *et al.*, 2001), η *Sequoia sempervirens* (Blažková *et al.*, 1997) και το *Pinus pinaster* (Dumas and Monteuuis, 1995), η ικανότητα ριζοβολίας των μικροβλαστών από νεανικό υλικό έχει βρεθεί υψηλότερη από αυτή των μικροβλαστών από ενήλικα φυτά, ενώ οι μικροβλαστοί που προέρχονταν από νεανικά μέρη ώριμων δένδρων επέδειξαν καλή ανταπόκριση στη ριζοβολία στα είδη *Sorbus aucuparia* και *S. torminalis* (Chalupa, 1992). Κατά τους Marks and Myers (1992b), η ικανότητα μερικών σειρών καλλιέργειας να ριζοβολούν καλύτερα από άλλες θα μπορούσε να αποδοθεί στο γεγονός ότι προέρχονταν από πηγές καλλιέργειας με τους υψηλότερους ρυθμούς ανάπτυξης. Στη *Betula*, η επίδραση της προέλευσης του εκφύτου στη ριζοβολία μπορεί να ανιχνευτεί ακόμη και 10 μήνες μετά την έναρξη των σειρών καλλιέργειας (Marks and Myers,

1992a). Οι διαφορές στην ικανότητα ριζοβολίας νεαρών και ώριμων μικρομοσχευμάτων μπορεί να σχετίζεται με διαφορές στα επίπεδα ορμονών στη βάση των μοσχευμάτων κατά τη διάρκεια των πρώτων ημερών της περιόδου προτροπής ριζοβολίας. Στη *Sequoia sempervirens*, ο δύσκολος-να-ριζοβολήσει ώριμος κλώνος διέφερε από το νεαρό κλώνο στον μεταβολισμό της αυξίνης του (Blažková *et al.*, 1997), ενώ οι διαφορές στην ικανότητα ριζοβολίας μεταξύ των υποκειμένων μηλιάς M.26 και M.9 μπορεί να σχετίζονται με διαφορές στα επίπεδα ελεύθερου IAA στη βάση του βλαστού (Alvarez *et al.*, 1989). Επίσης, διαφορετικά επίπεδα ενδογενών συστατικών IAA και ABA βρέθηκαν να αντιστοιχούν με διαφορετική ικανότητα ριζοβολίας. Χαμηλά επίπεδα IAA και υψηλά ABA ανιχνεύτηκαν σε ξυλώδη μοσχεύματα υποκειμένων αμπέλου που είχαν χαμηλό ποσοστό ριζοβολίας, ενώ υψηλά επίπεδα IAA και χαμηλά ABA ανιχνεύτηκαν σε μοσχεύματα που είχαν υψηλό ποσοστό ριζοβολίας (Kelen and Ozkan, 2003). Σε μικρομοσχεύματα της μηλιάς 'Jonathan', η αναλογία IAA/ABA αυξήθηκε από 0.2 στους δύσκολους-να-ριζοβολήσουν βλαστούς από την αρχική καλλιέργεια στο 0.7 στους εύκολους-να-ριζοβολήσουν βλαστούς από μακράς-διάρκειας υποκαλλιέργεια (Noiton *et al.*, 1992).



7. ΕΓΚΛΙΜΑΤΙΣΜΟΣ ΦΥΤΑΡΙΩΝ *EX VITRO*

7. ΕΓΚΛΙΜΑΤΙΣΜΟΣ ΦΥΤΑΡΙΩΝ *EX VITRO*

7.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Σε αυτό το κεφάλαιο περιγράφεται η διαδικασία που ακολουθήθηκε στο τελευταίο στάδιο του μικροπολλαπλασιασμού, κατά τη μεταφορά των *in vitro* φυταρίων στις *ex vitro* συνθήκες του θερμοκηπίου, και διερευνάται η επίδραση της ποιότητας του ριζικού συστήματος των φυταρίων, της φυσιολογικής κατάστασης των μητρικών φυτών, της παρουσίας ενεργού άνθρακα (AC) στο υπόστρωμα ανάπτυξης των ριζών *in vitro*, καθώς και της εποχής και του υποστρώματος εγκλιματισμού στην επιτυχία του εγκλιματισμού των φυταρίων.

Κατά τον *in vitro* πολλαπλασιασμό, τα φυτάρια αναπτύσσονταν μέσα στα δοχεία καλλιέργειας σε ένα ιδιαίτερο μικροπεριβάλλον με πολύ χαμηλότερα επίπεδα φωτεινής ακτινοβολίας και υψηλότερα επίπεδα υγρασίας από τη συμβατική καλλιέργεια, υπό ασηπτικές συνθήκες, χωρίς συμπληρωματικό CO₂, σε υπόστρωμα με θρεπτικά συστατικά, άφθονα σάκχαρα και φυτορρυθμιστικές ουσίες που επιτρέπει την ετεροτροφική ανάπτυξή τους, οπότε σχηματίζονται φυτάρια με ανώμαλη μορφολογία, ανατομία και φυσιολογία που δε μπορούν να επιβιώσουν με απευθείας μεταφορά στο περιβάλλον του θερμοκηπίου ή του χωραφιού. Μόνο με τον επιτυχή εγκλιματισμό των φυταρίων στις *ex vitro* συνθήκες μπορούν να διορθωθούν αυτές οι ανωμαλίες και να ολοκληρωθεί η αποτελεσματικότητα ενός συστήματος μικροπολλαπλασιασμού (Hazarika, 2003, 2006; Pospíšilová *et al.*, 1999, 2007).

Τα φυτάρια που αναπτύσσονται *in vitro* παρουσιάζουν ορισμένα ιδιαίτερα φυσιολογικά χαρακτηριστικά, όπως είναι ο μειωμένος ρυθμός φωτοσύνθεσης, η μειωμένη παραγωγή χλωροφύλλης, η παραγωγή αιθυλενίου, ABA και CO₂ σε διαφορετικές από τις φυσιολογικές συγκεντρώσεις και η αυξημένη ταχύτητα απώλειας υγρασίας από τα φύλλα, τα οποία προκαλούν μη φυσιολογική ανάπτυξη και οδηγούν στη δημιουργία ανατομικών και μορφολογικών ανωμαλιών (Kozai, 1991). Η κατανόηση της φυσιολογίας των *in vitro* καλλιεργημένων φυτών και των αλλαγών που υφίστανται κατά τη διαδικασία σκληραγώγησης θα μπορούσε να διευκολύνει την ανάπτυξη ενός επιτυχημένου πρωτοκόλλου μεταφοράς των φυταρίων *ex vitro* (Hazarika, 2006).

Το μεγαλύτερο πρόβλημα κατά την *ex vitro* μεταφορά είναι ο υψηλός ρυθμός απώλειας νερού από τους βλαστούς των φυταρίων που βγαίνουν έξω από τα δοχεία καλλιέργειας, που προκαλείται από τον απεριόριστο ρυθμό αναπνοής εξαιτίας της καθυστέρησης ανάπτυξης της επιδερμίδας, των επιδερμικών κηρών και λειτουργικής στοματικής συσκευής. Η πυκνότητα των στοματίων στα φύλλα των φυταρίων μπορεί να είναι υψηλότερη ή χαμηλότερη από τα φύλλα των αντίστοιχων φυτών που αναπτύσσονται *ex vitro*, ενώ και το μέγεθος των

στοματίων (μήκος, περιοχή καταφρακτικών κυττάρων και περιοχή πόρου) μπορεί να είναι αυξημένο. Τα στόματα των *in vitro* αναπτυσσόμενων φυταρίων συχνά αποτυγχάνουν να κλείσουν πλήρως σε απόκριση στα εξωτερικά ερεθίσματα. Η ανάπτυξη του φωτοσυνθετικού μηχανισμού συνήθως δεν καθυστερείται από τις συνθήκες *in vitro* καλλιέργειας, όσο οι παραπάνω παράμετροι που ρυθμίζουν τις υδατικές σχέσεις του φυτού. Το χαμηλό ποσοστό καθαρής φωτοσύνθεσης και ως συνέπεια ο χαμηλός ρυθμός ανάπτυξης των φυταρίων οφείλεται στη χαμηλή συγκέντρωση CO₂ στα σφικτά κλεισμένα δοχεία καλλιέργειας. Το περιεχόμενο σε χλωροφύλλες α και β μπορεί να είναι υψηλότερο ή χαμηλότερο στα φύλλα των *in vitro* αναπτυσσόμενων φυταρίων από ότι στα αντίστοιχα *ex vitro* αναπτυσσόμενα φυτά και συνήθως εξαρτάται από τη φωτεινή ακτινοβολία και τη συγκέντρωση σακχάρων στο υπόστρωμα (Pospíšilová *et al.*, 2007).

Κατά τον εγκλιματισμό στις *ex vitro* συνθήκες, το πάχος του φύλλου γενικά αυξάνεται, το μεσόφυλλο του φύλλου προχωρεί σε διαφοροποίηση του παρεγχύματος σε πασσαλώδες και σπογγώδες, η πυκνότητα των στοματίων μειώνεται και το σχήμα των στοματίων αλλάζει από κυκλικό σε ελλειπτικό. Οι πιο σημαντικές αλλαγές, όμως, για την επιβίωση των φυτών είναι η ανάπτυξη της επιδερμίδας και των επιδερμικών κηρών, καθώς και η αποτελεσματική ρύθμιση της διαπνοής από τα στομάτια, που οδηγούν στη σταθεροποίηση της υδατικής κατάστασης. Αυτές προωθούνται με τη σταδιακή μείωση της ατμοσφαιρικής υγρασίας. Ενώ, για την ανάπτυξη των φυτών πιο σημαντική είναι η βελτίωση των φωτοσυνθετικών παραμέτρων (περιεχόμενο χλωροφυλλών, αριθμός και δομή χλωροπλαστών, φωτοχημική ικανότητα, καθαρό ποσοστό φωτοσύνθεσης), που διασφαλίζουν την πλήρως αυτότροφη ανάπτυξη. Αυτές οι αλλαγές επηρεάζονται από την ακτινοβολία και τη συγκέντρωση CO₂, τόσο κατά την προηγούμενη *in vitro* ανάπτυξη, όσο και κατά τον εγκλιματισμό.

Ο εγκλιματισμός στις *ex vitro* συνθήκες μπορεί να επιταχυνθεί με σκληραγώγηση των φυταρίων *in vitro*, που μπορεί να γίνει μειώνοντας την υγρασία του αέρα, αυξάνοντας την ακτινοβολία ή αυξάνοντας τη συγκέντρωση CO₂ (με τη χρήση διαπερατής στα αέρια μεμβράνης για το κλείσιμο των δοχείων, αυξάνοντας τη συγκέντρωση CO₂ γύρω από τα βάζα καλλιέργειας ή με απευθείας τροφοδοσία CO₂ μέσα στα δοχεία), με αυτότροφη ανάπτυξη των φυταρίων σε υπόστρωμα χωρίς σάκχαρα που επιτρέπει την ανάπτυξη ενός πλήρως ανεπτυγμένου φωτοσυνθετικού συστήματος, είτε μετά τη μεταφύτευση μειώνοντας το ρυθμό διαπνοής με αντιδιαπνευστικά συμπεριλαμβανομένου του αμπισσικού οξέος ή με αυξημένη συγκέντρωση CO₂ που αυξάνει το ρυθμό φωτοσύνθεσης και ταυτόχρονα λειτουργεί ως αντιδιαπνευστικό (Pospíšilová *et al.*, 1999, 2007).

Οι βασικές στρατηγικές που ακολουθούνται για τον επιτυχή εγκλιματισμό των δασικών δένδρων περιλαμβάνουν την ενθάρρυνση των μικροπολλαπλασιασμένων φυταρίων να γίνουν αυτότροφα και τη μείωση του υδατικού stress αλλάζοντας το περιβάλλον καλλιέργειας. Και οι δύο αυτές στρατηγικές μπορούν να εφαρμοστούν *in vitro* κατά το προπαρασκευαστικό στάδιο ή *ex vitro* στο βασικό στάδιο εγκλιματισμού. Αρκετές τροποποιήσεις των περιβαλλοντικών παραγόντων που εμπλέκονται στη φωτοσύνθεση μπορούν να γίνουν στο προπαρασκευαστικό στάδιο, όπως η μείωση της συγκέντρωσης σακχάρων στο υπόστρωμα, η αύξηση της έντασης φωτός και οι τροποποιήσεις στην ανταλλαγή αερίων (Rohr *et al.*, 2003).

Έχουν αναπτυχθεί διάφορα συστήματα καλλιέργειας χωρίς σάκχαρα (φωτοαυτοτροφικά), τα οποία έχουν τα ακόλουθα πλεονεκτήματα σε σχέση με τα συμβατικά (ετεροτροφικά ή φωτομικτοτροφικά) συστήματα μικροπολλαπλασιασμού: ταχύτερη και πιο ομοιόμορφη *in vitro* ανάπτυξη και εξέλιξη των φυταρίων, φυτάρια *in vitro* με λιγότερες φυσιολογικές και μορφολογικές ανωμαλίες, λιγότερες μολύνσεις, δυνατότητα χρήσης μεγαλύτερων δοχείων καλλιέργειας χάρη στις μειωμένες μολύνσεις και τέλος, υψηλότερο ποσοστό επιβίωσης των φυταρίων κατά τον εγκλιματισμό *ex vitro*. Συνεπώς, το κόστος παραγωγής θα μπορούσε να μειωθεί και η ποιότητα των φυταρίων να βελτιωθεί σημαντικά από τον φωτοαυτοτροφικό μικροπολλαπλασιασμό (Kozai *et al.*, 1997).

7.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

7.2.1. Προκαταρκτικά πειράματα εγκλιματισμού

Τα χαμηλά ποσοστά ριζοβολίας των μικροβλαστών από ενήλικη καλλιέργεια σε συνδυασμό με το πρόβλημα της ξήρανσης της κορυφής σχεδόν όλων των μικροβλαστών κατά τη ριζοβολία, που ήταν έντονο μέχρι την 25^η υποκαλλιέργεια, οπότε το πλαστικό φιλμ με το οποίο καλύπτονταν τα δοχεία καλλιέργειας αντικαταστάθηκε από μεμβράνη sanitas, είχαν σαν αποτέλεσμα την παραγωγή λιγοστών ριζοβολημένων μικροβλαστών που θα μπορούσαν να προωθηθούν για εγκλιματισμό. Έτσι, τα πρώτα χρόνια της διδακτορικής διατριβής και μέχρι να εγκατασταθούν νεανικές καλλιέργειες από τις αναβλαστήσεις των καμένων φυτών το 2009 πραγματοποιήθηκαν μεν κάποια πειράματα εγκλιματισμού, με λίγες επαναλήψεις ανά επέμβαση, τα οποία φάνηκαν χρήσιμα στον καθορισμό της τεχνικής εγκλιματισμού των φυταρίων *ex vitro* που ακολουθήθηκε στα κύρια πειράματα, και στη λήψη κάποιων αποτελεσμάτων-ενδείξεων που χρήζουν περαιτέρω διερεύνησης.

Στα προκαταρκτικά πειράματα εγκλιματισμού χρησιμοποιήθηκαν έρριζοι βλαστοί, που προέρχονταν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από ενήλικο φυτό το Μάρτιο 2004, και είχαν ριζοβολήσει *in vitro* μετά από καλλιέργεια σε υπόστρωμα ½MS με 0.5 mg l⁻¹ IBA

και 8.0 mg I^{-1} IAA για μία εβδομάδα ή μετά από εμβάπτυση της βάσης των βλαστών σε πυκνό διάλυμα με 500 ή 1000 mg I^{-1} IBA για 10 sec και ακολούθως μεταφορά σε $\frac{1}{2}\text{MS}$ χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, με ή χωρίς AC (2 g I^{-1}), για συνολικά 6-8 εβδομάδες. Οι έρριζοι βλαστοί χωρίς ξήρανση κορυφής εξαιρούνταν με προσοχή από το υπόστρωμα και το ριζικό τους σύστημα πλενόταν καλά με άφθονο νερό κάτω από τη βρύση για απομάκρυνση υπολειμμάτων υποστρώματος. Τα φυτάρια τοποθετούνταν σε τρυβλίο με νερό για περιορισμό της αφυδάτωσής τους μέχρι την τελική τοποθέτησή τους σε αλουμινένια δοχεία εγκλιματισμού, όγκου 400 ml , με διάτρητο πάτο (μέχρι 8 φυτάρια/ φυτοδοχείο), που περιείχαν μη αποστειρωμένο μείγμα τύρφης-περλίτη 1:1 (v/v) και την κάλυψή τους με μεμβράνη sanitas. Μετά τοποθετούνταν σε θάλαμο σταθερών συνθηκών (θερμοκρασία $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, φωτοπερίοδο 16 h , ένταση φωτισμού 4000 lx), από 1 έως 5 εβδομάδες, πριν την αφαίρεση της μεμβράνης και τη μεταφορά τους στον πάγκο του θερμοκηπίου.

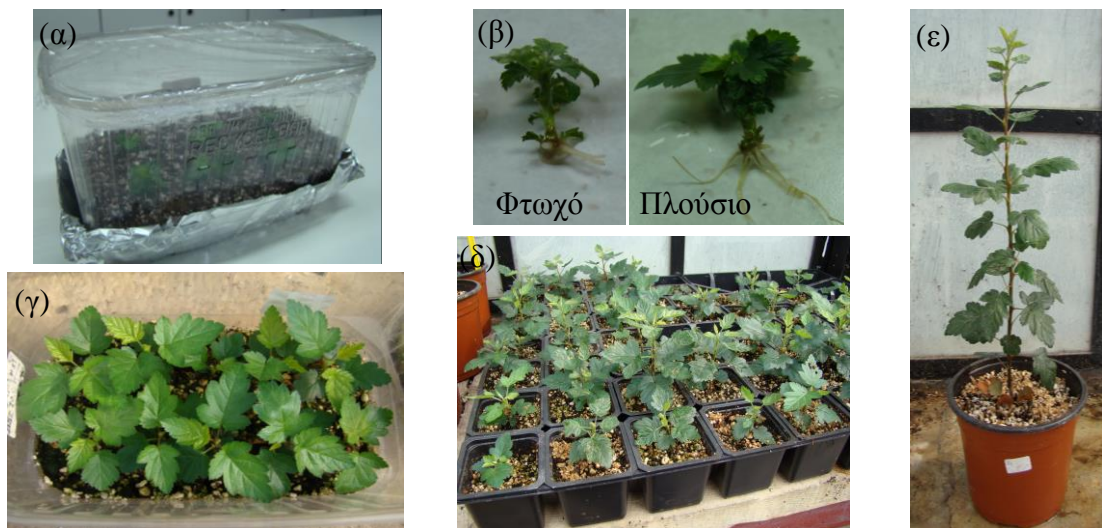
Έρριζοι βλαστοί, που είχαν καλλιεργηθεί κατά τη φάση του πολλαπλασιασμού των βλαστών σε δοχεία 75 ml και για ριζοβολία σε δοχεία 75 ml με κάλυψη μεμβράνης sanitas, σε δοχεία 145 ml με καπάκι magenta και σε δοχεία 375 ml με πλαστικό καπάκι, βγήκαν *ex vitro* για εγκλιματισμό ακολουθώντας την παραπάνω τεχνική.

Επίσης, οδηγήθηκαν για εγκλιματισμό βλαστοί που ελήφθησαν από υποστρώματα με διάφορες συγκεντρώσεις BA ($1.0 \text{ BA}/ 0.1 \text{ IBA}$ και $0.5 \text{ BA}/ 0.05 \text{ IBA}$) ή TDZ ($0.1, 0.2, 0.5, 1.0$ και 2.0 , με ή χωρίς υποδεκαπλάσια συγκέντρωση IBA) (mg I^{-1}) και ριζοβόλησαν μετά από καλλιέργεια σε $\frac{1}{2}\text{MS}$ με $0.5 \text{ IBA}/ 8.0 \text{ IAA}$ (mg I^{-1}) για 1 εβδομάδα, μετά σε $\frac{1}{2}\text{MS}+\text{AC}$ για 1 εβδομάδα και τέλος σε $\frac{1}{2}\text{MS}$ για ακόμη 4 εβδομάδες.

7.2.2. Κύρια πειράματα εγκλιματισμού

Στα κύρια πειράματα εγκλιματισμού χρησιμοποιήθηκαν φυτάρια, ύψους $1.0\text{-}2.0 \text{ cm}$, που είχαν ριζοβολήσει *in vitro* μετά από καλλιέργεια σε υπόστρωμα $\frac{1}{2}\text{MS}$ με 0.5 mg I^{-1} IBA και 8.0 mg I^{-1} IAA για μία εβδομάδα και ακολούθως μεταφορά σε $\frac{1}{2}\text{MS}$ χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες για ακόμη τέσσερις εβδομάδες, και προέρχονταν ως επί το πλείστον από τις νεανικές καλλιέργειες που είχαν εγκατασταθεί τον Ιούνιο και Ιούλιο του 2009 από αναβλαστήσεις (μετά την πυρκαγιά) του ίδιου ενήλικου φυτού, που είχε δώσει την καλλιέργεια του Μαρτίου 2004 και τα φυτάρια για τα προκαταρκτικά πειράματα εγκλιματισμού. Τα φυτάρια, μετά από προσεκτική αφαίρεση από το υπόστρωμα, καλό πλύσιμο του ριζικού τους συστήματος και τοποθέτηση σε τρυβλίο με νερό, τοποθετούνταν ανά οκτώ σε διαφανή πλαστικά δοχεία εγκλιματισμού όγκου 500 ml , με διάτρητο πάτο, με μείγμα τύρφης-περλίτη 1:1 (v/v) και καλύπτονταν με μεμβράνη sanitas (Εικ. 68α). Η παραπάνω διαδικασία ολοκληρωνόταν σε

σύντομο χρονικό διάστημα για να μη καταπονηθούν τα φυτάρια από την απότομη μείωση της σχετικής υγρασίας. Μετά τοποθετούνταν στο θάλαμο σταθερών συνθηκών (κεφάλαιο 7.2.1.), όπου 3 ημέρες αργότερα ανοίγονταν οπές στη μεμβράνη και μετά από 1 εβδ. αφαιρούταν η μεμβράνη, τα φυτάρια ποτίζονταν ελαφρά και μεταφέρονταν στον πάγκο του θερμοκηπίου. Η συχνότητα των ποτισμάτων ήταν 2-3 φορές την εβδομάδα και των λιπάνσεων κάθε δεύτερη εβδομάδα με 2 g l⁻¹ πλήρες υδατοδιαλυτό λίπασμα (Nutrileaf 60, 20-20-20 της εταιρείας Miller Chemical and Fertilizer Corp., Hanover PA, USA). Ανάλογα με την ανάπτυξη των φυταρίων, πραγματοποιούνταν η πρώτη μεταφύτευση των φυταρίων σε ατομικό γλαστράκι μετά από 6-8 εβδ. (Εικ. 68γ, δ) και μία δεύτερη μεταφύτευση σε μεγαλύτερη γλάστρα μετά τη 10^η εβδ. εγκλιματισμού (Εικ. 68δ, ε).



Εικόνα 68. Φυτάρια τοποθετημένα για εγκλιματισμό (α), φυτάρια με φτωχό και πλούσιο ριζικό σύστημα *in vitro* (β), και εγκλιματισμένα *ex vitro* φυτάρια του *xMalosorbus florentina* την 6^η εβδ. (χρόνος 1^{ης} μεταφύτευσης) (γ), την 10^η εβδ. (χρόνος 2^{ης} μεταφύτευσης) (δ) και την 20^η εβδ. (ε) από την έναρξη του εγκλιματισμού.

Κατά τη διερεύνηση του εγκλιματισμού διακρίθηκαν:

- i) φυτάρια που είχαν αναπτύξει *in vitro* φτωχό (1-3 ρίζες, μήκους ≤ 0.6 cm) ή πλούσιο (ρίζες μήκους > 0.6 cm) ριζικό σύστημα (Εικ. 68β),
- ii) φυτάρια που προέρχονταν από καλλιέργεια εγκατεστημένη *in vitro* από οφθαλμούς ενήλικου ή νεανικού μητρικού φυτού,
- iii) φυτάρια που είχαν καλλιεργηθεί *in vitro* για ανάπτυξη των ριζών σε υπόστρωμα ½MS με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg l⁻¹) είτε για 1 εβδ., ακολουθούμενο από υπόστρωμα ½MS χωρίς

φυτορυθμιστικές ουσίες με ή χωρίς AC (2 g l^{-1}) για ακόμη 5 εβδ. ή από το υπόστρωμα $\frac{1}{2}\text{MS}+\text{AC}$ για 1εβδ. και ακολούθως το $\frac{1}{2}\text{MS}$ για 4 εβδ., είτε συνεχώς για 6 εβδ. (κεφάλαιο 6.3.5., Πιν. 51) και

iv) φυτάρια που έβγαιναν στο θερμοκήπιο για εγκλιματισμό κάθε μήνα από τον Οκτώβριο 2009 μέχρι και το Μάρτιο 2010.

v) Εκτός της τύρφης-περλίτη 1:1, για τον εγκλιματισμό των φυταρίων δοκιμάστηκε υπόστρωμα τύρφης-περλίτη 1:2 (v/v) και σκέτος περλίτης.

7.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

7.3.1. Αποτελέσματα προκαταρκτικών πειραμάτων εγκλιματισμού

Ο χρόνος παραμονής των μεταφυτευμένων φυταρίων στο θάλαμο σταθερών συνθηκών ήταν καθοριστικός για την επιβίωσή τους. Φυτάρια που έμεναν στο θάλαμο σταθερών συνθηκών για περισσότερο από δύο εβδομάδες αποτύγχαναν να εγκλιματιστούν όταν έβγαιναν στο θερμοκήπιο, ενώ κάποιες φορές παρατηρήθηκε δημιουργία μούχλας στο υπόστρωμα και σάπισμα των φυταρίων όσο ήταν στο θάλαμο, ιδιαίτερα όταν είχαν παραποτιστεί. Αντιθέτως, το άνοιγμα οπών στη μεμβράνη τη 2^η με 3^η ημέρα και η σύντομη παραμονή (για μια εβδομάδα) στο θάλαμο σταθερών συνθηκών πριν την έξοδο των φυταρίων στο θερμοκήπιο επέτρεψαν τον εγκλιματισμό των φυταρίων.

Φυτάρια που είχαν καλλιεργηθεί *in vitro* σε υπόστρωμα με AC για την ανάπτυξη των ριζών φάνηκε να εγκλιματίζονται *ex vitro* σε υψηλότερο ποσοστό (50%) συγκριτικά με αυτά που είχαν καλλιεργηθεί σε $\frac{1}{2}\text{MS}$ χωρίς AC (0-10%).

Παρόλο που τα φυτάρια που είχαν ριζοβολήσει *in vitro* σε διάφορα δοχεία καλλιέργειας απέτυχαν να εγκλιματιστούν λόγω των υψηλών θερμοκρασιών στο θερμοκήπιο, που επικράτησαν κατά τη διενέργεια αυτού του πειράματος, φάνηκε πως οι βλαστοί από τα βάζα 75 ml και μεμβράνη sanitas είχαν μικρότερα φύλλα από τους βλαστούς που είχαν καλλιεργηθεί σε βάζα 145 και 375 ml και πλαστικό καπάκι, οι οποίοι είχαν πιο εύρωστο κορυφαίο μερίστωμα και πιο πλατιά καλύτερα ανεπτυγμένα φύλλα. Μετά από αυτή την παρατήρηση, οι ριζοβόληση των βλαστών *in vitro* γινόταν σε βάζα 145 ml και πλαστικό καπάκι magenta.

Η συγκέντρωση κυτοκινίνης στο υπόστρωμα από το οποίο ελήφθησαν οι βλαστοί για ριζοβολία φάνηκε να επηρεάζει την επιβίωση των φυταρίων. Έτσι, φυτάρια που είχαν καλλιεργηθεί σε υπόστρωμα με τη μισή συγκέντρωση BA και IBA από αυτή του βασικού υποστρώματος (MS με 1.0 mg l^{-1} BA/ 0.1 mg l^{-1} IBA) εγκλιματίστηκαν σε υψηλότερο ποσοστό και σχημάτισαν πολύ καλό ριζικό σύστημα *ex vitro* (Πιν. 62). Το ίδιο συνέβη και με

τα φυτάρια που προέρχονταν από τη χαμηλότερη συγκέντρωση του TDZ (0.1 mg l⁻¹), ενώ τα φυτάρια από την υψηλότερη συγκέντρωση TDZ (2.0 mg l⁻¹) παρότι εγκλιματίστηκαν σε υψηλό ποσοστό είχαν λεπτές ρίζες και μέτριας κατάστασης φύλλωμα (Πιν. 62). Γενικά, υπήρξε η ένδειξη πως οι μικροβλαστοί που ελήφθησαν από καλλιέργεια με χαμηλή συγκέντρωση κυτοκινίνης ανέπτυξαν πιο εύρωστα φυτάρια που εγκλιματίστηκαν καλύτερα και σχημάτισαν καλύτερο ριζικό σύστημα *ex vitro*.

Πίνακας 62. Ποσοστά εγκλιματισμού φυταρίων προερχόμενων από υποστρώματα με τις αναγραφόμενες συγκεντρώσεις BA/ IBA ή TDZ (\pm IBA) την 5^η εβδομάδα.

	1.0 BA/ 0.1IBA	0.5 BA/ 0.05 IBA	0.1 TDZ	0.2 TDZ	0.5 TDZ	1.0 TDZ	2.0 TDZ
Εγκλιματισμός (%)	0.0	75.0	40.0	12.5	0.0	0.0	37.5
	n=2-4		n=7-10				

7.3.2. Επίδραση της ποιότητας ριζικού συστήματος *in vitro* στον εγκλιματισμό των φυταρίων *ex vitro*

Η ποιότητα του ριζικού συστήματος των φυταρίων επηρέασε τόσο την επιβίωση όσο και την ανάπτυξή τους. Έτσι, φυτάρια που είχαν αναπτύξει *in vitro* φτωχό ριζικό σύστημα εγκλιματίστηκαν σε σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό και είχαν μικρότερο ύψος μετά από 16 εβδ. σε σύγκριση με φυτάρια με πλούσιο ριζικό σύστημα (Πιν. 63).

Πίνακας 63. Ποσοστό εγκλιματισμού και ύψος φυταρίων που είχαν αναπτύξει *in vitro* φτωχό ή πλούσιο ριζικό σύστημα, την 16^η εβδ. από την έναρξη του εγκλιματισμού (n=48-78).

Ριζικό σύστημα φυταρίων <i>in vitro</i>	Εγκλιματισμός (%)	Ύψος φυταρίων (cm)
ΦΤΩΧΟ	27.1 b	11.3 b
ΠΛΟΥΣΙΟ	83.0 a	16.3 a
Ανάλυση της διασποράς	F= 177.2008 **	F= 5.5240 *

*, **: σημαντικό σε P=0.05 και P=0.01, αντίστοιχα.

7.3.3. Επίδραση της φυσιολογικής κατάστασης μητρικών φυτών στον εγκλιματισμό των φυταρίων

Τα φυτάρια που προέρχονταν από *in vitro* καλλιέργεια εγκατεστημένη από νεανικό και ενήλικο μητρικό φυτό (Εικ. 69) δε παρουσίασαν διαφορές ως προς το ποσοστό εγκλιματισμού, ούτε ως προς το ύψος τους μετά από 22 εβδ., ενώ ο αριθμός των κόμβων βρέθηκε υψηλότερος στα φυτάρια νεανικής προέλευσης συγκριτικά με αυτά από ενήλικο μητρικό φυτό (Πιν. 64).

Πίνακας 64. Ποσοστό εγκλιματισμού, ύψος και αριθμός κόμβων φυταρίων που προέρχονταν από καλλιέργεια εγκατεστημένη *in vitro* από νεανικό και ενήλικο μητρικό φυτό, την 22^η εβδ. από την έναρξη του εγκλιματισμού ($n=12-24$).

Φυσιολογική κατάσταση μητρικών φυτών	Εγκλιματισμός (%)	Ύψος φυταρίων (cm)	Αριθμός κόμβων
ΝΕΑΝΙΚΗ	83.0	28.8 a	34.6 a
ΕΝΗΛΙΚΗ	83.0	29.1 a	25.9 b

Ανάλυση της διασποράς

$F= 0.0550$ $F=7.2523 *$

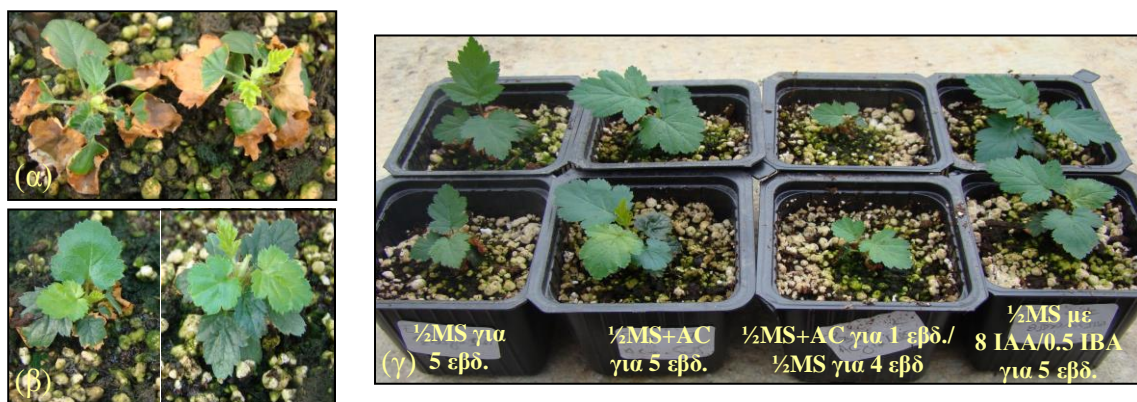
*: σημαντικό σε επίπεδο $P=0.05$



Εικόνα 69. Εγκλιματισμένα φυτάρια του *xMalosorbus florentina* προερχόμενα από καλλιέργεια εγκατεστημένη από νεανικό (α) και ενήλικο (β) μητρικό φυτό και ριζικό σύστημα αυτών, την 6^η εβδ. από την έναρξη του εγκλιματισμού.

7.3.4. Επίδραση της προσθήκης ενεργού άνθρακα στο υπόστρωμα ανάπτυξης των ριζών *in vitro* στον εγκλιματισμό των φυταρίων

Το stress ελλείψεως νερού, που υποβλήθηκαν από λάθος τα φυτάρια νεανικής προέλευσης τη 2^η εβδομάδα εγκλιματισμού εξαιτίας της καθυστέρησης του ποτίσματος, οδήγησε σε μια σημαντική παρατήρηση. Τα φυτάρια που είχαν καλλιεργηθεί *in vitro* για ανάπτυξη των ριζών σε υπόστρωμα ½MS με AC για 5 εβδ. (κεφάλαιο 6.3.5., Πιν. 52) δεν επηρεάστηκαν καθόλου από την υδατική καταπόνηση παραμένοντας καταπράσινα (Εικ. 70β), σε αντίθεση με τα φυτάρια από τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις τα οποία στρεσαρίστηκαν έντονα με αποτέλεσμα περιφερειακές ξηράνσεις στα φύλλα ή την ολική ξήρανση αυτών (Εικ. 70α).

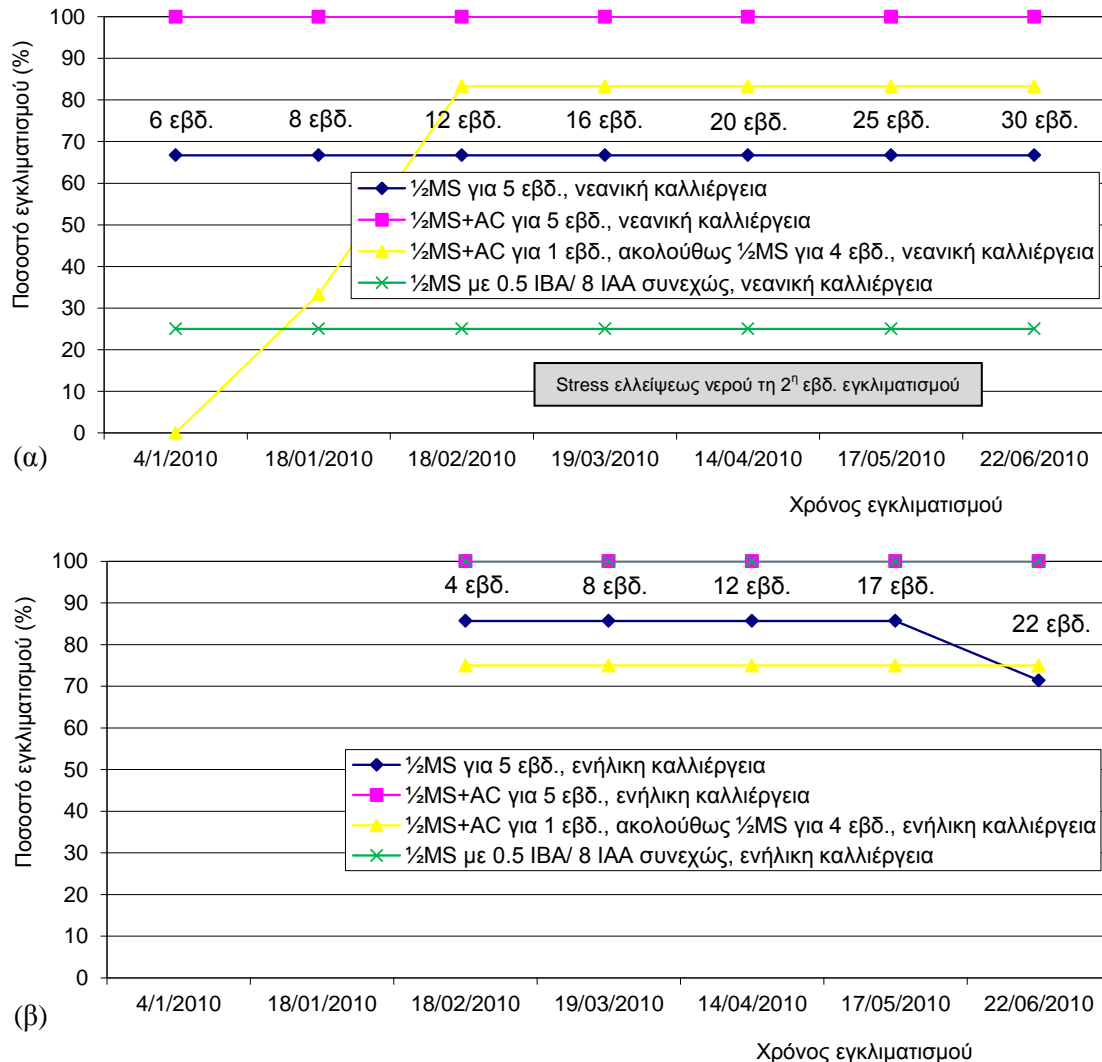


Εικόνα 70. Ανταπόκριση φυταρίων του *Malosorbus florentina* στο stress ελλείψεως νερού που υπέστησαν τη 2^η εβδ. του εγκλιματισμού. Εγκλιματισμένα φυτάρια, ηλικίας 6 εβδ., που είχαν καλλιεργηθεί *in vitro* σε υπόστρωμα ½MS (α) και ½MS με AC για 5 εβδ. (β) και φυτάρια, ηλικίας 8 εβδ., που είχαν καλλιεργηθεί για ανάπτυξη των ριζών *in vitro* στα αναγραφόμενα υποστρώματα (γ).

Έτσι, το ποσοστό εγκλιματισμού για τα φυτάρια από τη μεταχείριση με ½MS με AC για 5 εβδ. έφτασε το 100%, υψηλότερα από όλες τις άλλες μεταχειρίσεις (Σχ. 20α). Αξιοσημείωτο είναι επίσης πως τα φυτάρια από τη μεταχείριση με ½MS με AC για 1 εβδ., που είχαν ξεραθεί ολοκληρωτικά αλλά συνεχίστηκε να ποτίζονται, άρχισαν να αναβλαστάνουν μετά από 8 εβδ. εγκλιματισμού (Εικ. 70γ) φθάνοντας τη 12^η εβδ. εγκλιματισμού να έχουν ένα ικανοποιητικό ποσοστό εγκλιματισμού. Αντίθετα, τα φυτάρια από τη μεταχείριση με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg l^{-1}) για 5 εβδ., τα οποία είχαν επίσης ξεραθεί σε μεγάλο ποσοστό, δε μπόρεσαν να αναβλαστήσουν (Σχ. 20α).

Τα φυτάρια ενήλικης προέλευσης, που είχαν δεχθεί τις ίδιες μεταχειρίσεις πρόκλησης ριζοβολίας *in vitro*, δεν υπέστησαν υδατική καταπόνηση και ως εκ τούτου εγκλιματίστηκαν

σε υψηλό ποσοστό (>75%). Πάλι τα φυτάρια από τη μεταχείριση με ½MS με AC για 5 εβδ. εγκλιματίστηκαν σε ποσοστό 100%, ενώ το ίδιο συνέβη και για τα φυτάρια που είχαν καλλιεργηθεί *in vitro* σε ½MS με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg l⁻¹) για 5 εβδομάδες (Σχ. 20β).



Σχήμα 20. Εξέλιξη ποσοστών εγκλιματισμού φυταρίων από νεανική καλλιέργεια που υπέστησαν stress ελλείψεως νερού τη 2^η εβδ. εγκλιματισμού (α) και φυταρίων από ενήλικη καλλιέργεια (β), που είχαν ριζοβολήσει *in vitro* μετά από καλλιέργεια σε ½MS με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg l⁻¹) για μία εβδομάδα και μεταφορά για ανάπτυξη των ριζών στα αναγραφόμενα υπόστρωμα με ή χωρίς AC.

Εξετάζοντας την αντίδραση των φυταρίων νεανικής και ενήλικης προέλευσης συνολικά, την 22^η εβδ. εγκλιματισμού, τα ποσοστά εγκλιματισμού των φυταρίων που είχαν καλλιεργηθεί *in vitro* για ανάπτυξη των ριζών σε ½MS με AC ήταν υψηλότερα από αυτά των φυταρίων από υπόστρωμα χωρίς AC, ιδιαίτερα όταν τα φυτάρια είχαν καλλιεργηθεί σε AC

για όλο το διάστημα ριζοβολίας το ποσοστό αυτό ήταν 100% (Πιν. 65). Το χαμηλό ποσοστό εγκλιματισμού των φυταρίων που είχαν μεταχειριστεί με 0.5 IBA/ 8 IAA ήταν αποτέλεσμα της έντονης ξήρανσης των νεανικών φυταρίων εξαιτίας του stress ελλείψεως νερού, αφού τα αντίστοιχα ενήλικα φυτά εγκλιματίστηκαν σε ποσοστό 100%.

Το ύψος και ο αριθμός κόμβων των φυταρίων δε βρέθηκαν να διαφέρουν μεταξύ των μεταχειρίσεων με ή χωρίς AC όταν οι μικροβλαστοί είχαν παραμείνει στο υπόστρωμα προτροπής ριζοβολίας *in vitro* συνεχώς για 5 εβδ., ενώ όταν είχαν καλλιεργηθεί σε ½MS με AC μόνο για 1 εβδ. και οι δύο αυτές παράμετροι ήταν σημαντικά μικρότεροι (Πιν. 65, Εικ. 70γ).

Πίνακας 65. Ποσοστό εγκλιματισμού, ύψος και αριθμός κόμβων φυταρίων (φυτάρια νεανικής και ενήλικης προέλευσης μαζί) που είχαν καλλιεργηθεί *in vitro* για ανάπτυξη των ριζών στα αναγραφόμενα υπόστρωμα με ή χωρίς AC, την 22^η εβδ. από την έναρξη του εγκλιματισμού (n=10-16).

Υπόστρωμα ανάπτυξης των ριζών <i>in vitro</i>	Εγκλιματισμός (%)	Ύψος φυταρίων (cm)	Αριθμός κόμβων
½MS για 5 εβδ.	69.0 ab	30.7 a	32.7 a
½MS+AC για 5 εβδ.	100.0 a	30.4 a	31.9 a
½MS+AC για 1 εβδ./ ½MS για 4 εβδ.	80.0 ab	17.1 b	22.6 a
0.5IBA/ 8IAA για 5 εβδ.	45.5 b	29.2 ab	29.6 a
Ανάλυση της διασποράς	F= 7.8352 **	F=3.1743 *	F=1.8852

*, **: σημαντικά σε επίπεδο P=0.05 και P=0.01, αντίστοιχα.

7.3.5. Επίδραση της εποχής εγκλιματισμού στην ανάπτυξη των φυταρίων *ex vitro*

Η έκπτυξη νέων φύλλων από τα φυτάρια ξεκινούσε γύρω στην 5^η εβδ. από την έναρξη του εγκλιματισμού για όσα βγήκαν *ex vitro* στο θερμοκήπιο την περίοδο από Οκτώβριο μέχρι Δεκέμβριο και λίγο νωρίτερα, γύρω στην 4^η εβδ., για όσα βγήκαν για εγκλιματισμό την περίοδο από Ιανουάριο μέχρι Μάρτιο. Δύο εβδομάδες αργότερα μπορούσαν να μεταφυτευθούν σε ατομικό γλαστράκι. Η εποχή του εγκλιματισμού βρέθηκε να επηρεάζει τόσο την επιβίωση όσο και την ανάπτυξη των φυταρίων. Όταν ο εγκλιματισμός ξεκίνησε Φεβρουάριο-Μάρτιο τα φυτάρια εγκλιματίστηκαν σε υψηλότερο ποσοστό και αναπτύχθηκαν ταχύτερα από ότι τους προηγούμενους μήνες αποκτώντας μεγαλύτερο ύψος μετά από 16 εβδ. (Πιν. 66).

Πίνακας 66. Ποσοστό εγκλιματισμού και ύψος φυταρίων που βγήκαν στο θερμοκήπιο για εγκλιματισμό τις αναγραφόμενες περιόδους, την 16^η εβδ. από την έναρξη του εγκλιματισμού ($n=16-59$).

Εποχή εγκλιματισμού	Οκτώβριος- Νοέμβριος	Δεκέμβριος- Ιανουάριος	Φεβρ.- Μάρτιος	Ανάλυση της διασποράς
Εγκλιματισμός (%)	65.0 b	75.0 ab	85.0 a	$F= 6.5856 *$
Ύψος φυταρίων (cm)	7.1 b	11.6 b	16.6 a	$F= 19.0824 **$

*, **: σημαντικά σε επίπεδο $P=0.05$ και $P=0.01$, αντίστοιχα.

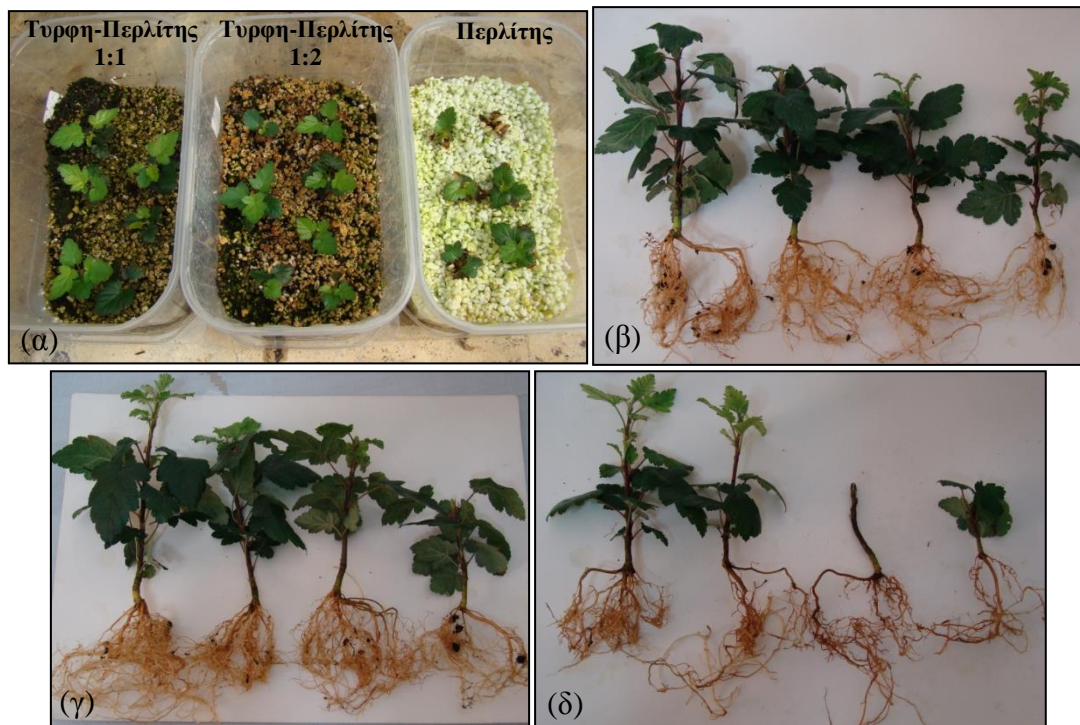
7.3.6. Επίδραση του υποστρώματος εγκλιματισμού στην ανάπτυξη των φυταρίων *ex vitro*

Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ως προς το ποσοστό εγκλιματισμού των φυταρίων (Εικ. 71α) ούτε τον συνολικό αριθμό και το μήκος των ριζών στα διάφορα υποστρώματα εγκλιματισμού, όμως το ύψος και ο αριθμός κόμβων των φυταρίων στο υπόστρωμα τύρφης-περλίτη ήταν μεγαλύτερο από ότι στο σκέτο περλίτη, αποτέλεσμα που ήταν στατιστικά σημαντικό μόνο για το υπόστρωμα τύρφης-περλίτη 1:1 (Πιν. 67, Εικ. 71β, γ, δ). Οι κύριες ρίζες όμως είχαν μεγαλύτερο μήκος στα υποστρώματα τύρφης-περλίτη 1:2 και σκέτου περλίτη σε σχέση με το τύρφη-περλίτης 1:1 (Πιν. 67), ενώ στον περλίτη το ριζικό σύστημα ήταν φτωχό σε ριζικά τριχίδια (Εικ. 71δ).

Πίνακας 67. Ποσοστό εγκλιματισμού, ύψος και αριθμός κόμβων φυταρίων, αριθμός και μήκος ριζών τη 16^η εβδ. μετά τη μεταφύτευση των φυταρίων στα αναγραφόμενα υποστρώματα εγκλιματισμού ($n=36-37$).

Υποστρωμα εγκλιματισμού	Εγκλιματι- σμός (%)	Ύψος φυταρίων (cm)	Αριθμός κόμβων	Αριθμός ριζών	Μήκος ριζών (cm)	Αριθμός κύριων ριζών	Μήκος κύριων ριζών (cm)
Τύρφη- Περλίτης 1:1	68.0 a	10.2 a	17.1 a	6.4 a	9.2 a	3.3 a	10.8 b
Τύρφη- Περλίτης 1:2	69.0 a	8.9 ab	13.1 ab	6.5 a	11.5 a	2.4 a	16.8 a
σκέτος Περλίτης	61.0 a	6.1 b	9.7 b	7.0 a	9.7 a	2.4 a	16.8 a
Ανάλυση της διασποράς							
$F=$	0.5532	4.4673 *	6.7844 *	0.1028	1.2465	2.2102	6.4099 *

*: σημαντικό σε επίπεδο $P=0.05$



Εικόνα 71. Κατάσταση φυταρίων του *Malosorbus florentina* την 4^η εβδ. εγκλιματισμού στα αναγραφόμενα υποστρώματα (α) και ριζικό σύστημα *ex vitro* φυταρίων σε τύρφη-περλίτη 1:1 (β), σε τύρφη-περλίτη 1:2 (γ) και σε περλίτη (δ), μετά από 16 εβδ. εγκλιματισμού.

7.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η τεχνική εγκλιματισμού που περιελάμβανε σύντομη παραμονή μιας εβδομάδας των μεταφυτευμένων φυταρίων στο θάλαμο επώασης πριν την έξοδο στο θερμοκήπιο ήταν προτιμότερη γιατί φυτάρια που έμεναν στο θάλαμο επώασης για περισσότερο από δύο εβδομάδες συνήθως αποτύγχαναν να εγκλιματιστούν όταν έβγαιναν στο θερμοκήπιο. Φύλλα από ασηπτικά καλλιεργημένα φυτά μηλιάς *Malus domestica* cv. Mac 9 επίσης εγκλιματίστηκαν σε σύντομο χρονικό διάστημα (4-5 ημέρες) μετά από έκθεση σε 30 έως 40% σχετική υγρασία μέσω της ανάπτυξης μιας επιταχυμένης ανταπόκρισης των στοματίων (Brainerd and Fuchigami, 1981).

Το είδος του δοχείου και το υλικό κάλυψης που χρησιμοποιήθηκε για τη ριζοβολία των φυταρίων *in vitro* επηρέασε την ποιότητα του φυλλώματος, που είναι σημαντικό για να μπορέσουν τα φυτάρια να φωτοσυνθέσουν και να γίνουν αυτόρρηκτα. Βλαστοί που είχαν ριζοβολήσει *in vitro* σε βάζα 145 και 375 ml και πλαστικό καπάκι είχαν πιο πλατιά, καλά ανεπτυγμένα φύλλα και πιο εύρωστη κορυφή από τους βλαστούς σε βάζα 75 ml και μεμβράνη sanitas, και θεωρήθηκαν πιο κατάλληλοι για τον εγκλιματισμό των φυταρίων.

Μικροβλαστοί που ελήφθησαν από καλλιέργεια με χαμηλότερη συγκέντρωση κυτοκινίνης ανέπτυξαν πιο εύρωστα φυτάρια που εγκλιματίστηκαν καλύτερα και σχημάτισαν πιο πλούσιο ριζικό σύστημα *ex vitro*. Βλαστοί πέντε υβριδίων τριανταφυλλιάς, που σχηματίστηκαν σε υποστρώματα με 0.25, 0.5, 1.0 ή 2.0 mg/l BAP, επίσης ριζοβόλησαν και εγκλιματίστηκαν καλύτερα όταν προέρχονταν από τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις BAP (Podwyszynska and Hempel, 1988).

Τα φυτάρια που είχαν αναπτύξει *in vitro* φτωχό ριζικό σύστημα εγκλιματίστηκαν σε χαμηλότερο ποσοστό και είχαν μικρότερο ρυθμό ανάπτυξης σε σύγκριση με φυτάρια με πλούσιο ριζικό σύστημα. Οι Vértesy and Balla (1978), επίσης, τόνισαν την επίδραση της ποιότητας (μέγεθος και ρίζες) των φυταρίων ξυλωδών φυτών στον εγκλιματισμό τους, ενώ ο Díaz-Pérez *et al.* (1995a) έδειξαν πως οι ρίζες που σχηματίστηκαν *in vitro* ήταν λειτουργικές στην απορρόφηση νερού και σχετίζονταν με υψηλότερη υδατική κατάσταση των φυτών κατά τον εγκλιματισμό.

Η φυσιολογική κατάσταση των μητρικών φυτών δεν επέδρασε στην επιβίωση των φυταρίων. Φυτάρια που προέρχονταν από *in vitro* καλλιέργεια εγκατεστημένη από ενήλικο ή νεανικό μητρικό φυτό δε παρουσίασαν διαφορές ως προς το ποσοστό εγκλιματισμού ούτε ως προς το ύψος τους, ενώ ο αριθμός των κόμβων ήταν μεγαλύτερος στα φυτάρια από νεανικό υλικό, συντελώντας σε πιο συνεκτικό σχήμα φυτού, το οποίο είναι σύμφωνο με αποτελέσματα για το *Malus sp.*, στο οποίο νεανικοί κλώνοι θερμοκηπίου του απομικτικού *Malus sp.* είχαν κοντύτερα μεσογονάτια, μεγαλύτερο αριθμό φύλλων και περισσότερο ξηρό βάρος από ότι τα ώριμα αντίγραφά τους (Ur-Rahman *et al.*, 2007). Φυτάρια του *Sorbus domestica* που προέρχονταν από σπορόφυτα και ώριμα φυτά εγκαταστάθηκαν εξίσου εύκολα στο χώμα (Arrillaga *et al.*, 1991), ενώ η προέλευση των εκφύτων από τα ενήλικα δένδρα του *Sorbus aucuparia* επηρέασε την ανάπτυξη των μικροπολλαπλασιασμένων δένδρων έτσι ώστε μετά από πέντε χρόνια ανάπτυξης, το ύψος και η διάμετρος μόνο των φυτών από νεανικά μέρη των ώριμων δένδρων ήταν συγκρίσιμα με τις διαστάσεις δένδρων από σπορόφυτα (Chalupa, 2002).

Τα φυτάρια που είχαν καλλιεργηθεί *in vitro* σε ½MS με AC για ανάπτυξη των ριζών εγκλιματίστηκαν σε υψηλότερο ποσοστό από τα φυτάρια που είχαν καλλιεργηθεί σε ½MS χωρίς AC. Για τρεις Βραζιλιάνικες ορχιδέες, τις *Miltonia flavescens*, *Laelia flava* και *Oncidium trulliferum*, έχει επίσης αναφερθεί βελτίωση της ποιότητας των *in vitro* φυτών και αύξηση της επιβιώσής τους μετά τη μεταφύτευση, όταν προστέθηκε AC σε συγκεντρώσεις 1 ή 2 g l⁻¹ στα υποστρώματα *in vitro* ανάπτυξης (Moraes *et al.*, 2005). Ο AC ενδεχομένως προκαλεί στα φυτάρια κάποια σκληραγώγηση *in vitro*, η οποία, κατά τον Pospíšilová *et al.*

(1999, 2007), μπορεί να επιταχύνει τον εγκλιματισμό στις *ex vitro* συνθήκες. Η μειωμένη ανάπτυξη των φυταρίων που είχαν καλλιεργηθεί *in vitro* σε ½MS με AC μόνο για 1 εβδομάδα πιθανότατα οφείλεται στην καθυστέρηση έναρξης της ανάπτυξης των φυταρίων νεανικής προέλευσης που είχαν υποστεί σοβαρή υδατική καταπόνηση.

Όταν ο εγκλιματισμός ξεκίνησε Φεβρουάριο-Μάρτιο τα φυτάρια εγκλιματίστηκαν σε υψηλότερο ποσοστό και αναπτύχθηκαν ταχύτερα από όταν ξεκίνησε Οκτώβριο-Νοέμβριο ή Δεκέμβριο-Ιανουάριο. Οι Vértesy and Balla (1978), επίσης, βρήκαν επίδραση της εποχής στον εγκλιματισμό φυταρίων ποικιλιών μηλιάς με το ποσοστό επιβίωσης να αυξάνεται σταθερά από το Φεβρουάριο μέχρι τον Ιούνιο. Αυτό μπορεί να οφείλεται στην αύξηση της θερμοκρασίας, της διάρκειας της ημέρας και των επιπέδων της ηλιακής ακτινοβολίας στο θερμοκήπιο. Ιδιαίτερα η ακτινοβολία, τόσο κατά την ανάπτυξη *in vitro* όσο και κατά τον εγκλιματισμό, αποτελεί σημαντικό παράγοντα στη βελτίωση των φωτοσυνθετικών παραμέτρων των φυταρίων, οι οποίοι εξασφαλίζουν την αυτότροφη ανάπτυξή τους (Pospišiloná *et al.*, 2007). Σύμφωνα με τους Rohr *et al.* (2003), η ενθάρρυνση των μικροπολλαπλασιασμένων φυταρίων να γίνουν αυτότροφα, μαζί με τη μείωση του υδατικού stress από την αλλαγή του περιβάλλοντος καλλιέργειας, αποτελούν δύο βασικές στρατηγικές για τον επιτυχή εγκλιματισμό των δασικών δένδρων. Από την άλλη, η υδατική καταπόνηση και η φτωχή φωτοσυνθετική ικανότητα είναι οι δύο κύριοι παράγοντες, που ευθύνονται για τη φτωχή επιβίωση των φυταρίων (Preece and Sutter, 1991).

Το υπόστρωμα εγκλιματισμού δεν επέδρασε στο ποσοστό εγκλιματισμού των φυταρίων ούτε στο συνολικό αριθμό και μήκος των ριζών, ενώ το ύψος των φυταρίων ήταν μικρότερο και το ριζικό σύστημα φτωχότερο σε ριζικά τριχίδια στο σκέτο περλίτη συγκριτικά με τα υποστρώματα τύρφης-περλίτη 1:1 και 1:2 (v/v).



8. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

8. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

8.1. Παρατήρηση πληθυσμών του *xMalosorbus florentina* στην Πάρνηθα

Το *xMalosorbus florentina* απαντάται στην Ελλάδα σε έξι διαφορετικές τοποθεσίες, ενώ οι μεγαλύτεροι πληθυσμοί του βρίσκονται στον Εθνικό Δρυμό της Πάρνηθας (Christensen, 1995). Από τους πληθυσμούς της Πάρνηθας, αυτός που βρίσκεται σε απόσταση 1.5 km από την Αγ. Τριάδα στο δρόμο προς τη Μόλα και περιλαμβάνει 30 περίπου φυτά, καθώς και αυτός στην τοποθεσία Κορομηλιά που αριθμεί δύο φυτά, αποτέλεσαν αντικείμενο μελέτης μας το χρονικό διάστημα 2006-2010.

Φαινολογικές παρατηρήσεις επί των σταδίων ανάπτυξης ενήλικων φυτών έδειξαν ότι η νέα βλάστηση ξεκίνησε να εκπτύσσεται τέλη Μαρτίου-αρχές Απριλίου, ακολουθούμενη από μία περίοδο ταχείας ανάπτυξης την άνοιξη. Η ανάπτυξη της βλάστησης σταμάτησε μετά τα μέσα καλοκαιριού, ενώ το Σεπτέμβριο άρχισε ο μεταχρωματισμός των φύλλων σε ορειχάλκινο και μέχρι τα τέλη φθινοπώρου ολοκληρώθηκε η πτώση των φύλλων των φυτών.

Όσον αφορά την άνθιση των φυτών βρέθηκε ότι το *xM. florentina* χαρακτηρίζεται από πολύ έντονη παρεννιαυτοφορία, καθώς και ότι μερικά δένδρα δεν άνθισαν καθόλου.

Το πρόβλημα της μη παραγωγής καρπών ή της παραγωγής καρπών με ατροφικά σπέρματα σχετίστηκε με πρόβλημα στην επικονίαση και γονιμοποίηση, δεδομένου ότι το *xM. florentina* ως μηλοειδές πρέπει να είναι σταυρογονιμοποιούμενο και να χαρακτηρίζεται από γαμετοφυτική αυτό-ασυμβατότητα. Επιπλέον, οι μικροί και διασπασμένοι πληθυσμοί τείνουν να έχουν μειωμένη εγγενή αναπαραγωγή.

Κατά την αναζήτηση σπερμάτων του *xM. florentina* θα πρέπει να επιλέγονται οι μεγαλύτεροι καρποί, οι οποίοι είναι πιθανότερο να περιέχουν κανονικά και όχι ατροφικά σπέρματα.

Από τον τρόπο που εξελίχθηκε η βλάστηση από τους οφθαλμούς κανονικών και λογχοειδών βλαστήσεων, φάνηκε ότι για την εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας από ενήλικα φυτά θα πρέπει να προτιμούνται οι οφθαλμοί από κλάδους που ανθοφόρησαν την προηγούμενη χρονιά, επειδή την τρέχουσα χρονιά δε σχηματίζουν άνθη αλλά δίνουν αρκετές κανονικές βλαστήσεις, ιδιαίτερα οι επάκριοι οφθαλμοί των κανονικών βλαστήσεων και οι ανώτεροι οφθαλμοί των μεγάλων λογχοειδών.

Η καταστροφική πυρκαγιά του Ιουνίου 2007 στην Πάρνηθα έκαψε μεγάλο τμήμα του πυρήνα του Δρυμού, με αποτέλεσμα να καούν όλα τα φυτά του *xM. florentina*, με εξαίρεση τα δύο μόνο απομακρυσμένα φυτά στην τοποθεσία Κορομηλιά. Όλα τα καμένα φυτά του *xM. florentina* μπόρεσαν να αναβλαστήσουν, όμως η φυσική αναγέννηση των φυτών παρεμποδίστηκε από την έντονη και επίμονη βόσκηση, πιθανότατα από τα ελάφια.

Δεδομένης της σπανιότητας του είδους και της πίεσης που εξακολουθούν να δέχονται οι πληθυσμοί του από τη βόσκηση, ο μικροπολλαπλασιασμός, εκτός από τη δυνατότητα που προσφέρει για αξιοποίηση του φυτού ως καλλωπιστικό, μπορεί να αποτελέσει και μέσο για τη διάσωσή του και την παραγωγή φυταρίων για αναδασώσεις. Επιπλέον, οι τοποθεσίες όπου φυτρώνει θα μπορούσαν να περιφραχθούν για να αποτραπεί η βόσκηση και να συνεχιστεί απρόσκοπτα η φυσική αναγέννηση του είδους.

8.2. Εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας του *xMalosorbus florentina*

Η επιτυχής εγκατάσταση *in vitro* καλλιεργειών του *xMalosorbus florentina* εξαρτήθηκε από την αποτελεσματικότητα της απολύμανσης και την παρεμπόδιση του φαινολικά-προωθούμενου καφετιάσματος των εκφύτων, αλλά και από την ενήλικη ή νεανική προέλευση των εκφύτων.

Έκφυτα που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια των χειμερινών μηνών και αυτά από το μεσαίο και βασικό τμήμα των βλαστών μολύνθηκαν σε υψηλότερο ποσοστό από αυτά που συλλέχθηκαν από τον Απρίλιο μέχρι τον Αύγουστο, καθώς και αυτά που προέρχονταν από το επάκριο και κορυφαίο τμήμα των βλαστών.

Το καφέτιασμα των εκφύτων μειώθηκε με τη χρήση μικρού μεγέθους εκφύτων, με την προμεταχείρισή τους με αντιοξειδωτικά, με τα 4 συν 1 (πριν τη χρήση των εκφύτων) ξεπλύματα και τη μεταφορά σε φρέσκο υπόστρωμα, ενώ η απολέπιση και το προχωρημένο στάδιο έκπτυξης των οφθαλμών του Μαρτίου, και η απολύμανση σε δύο στάδια ενέτειναν το πρόβλημα.

Σημαντική στην εκδήλωση καφετιάσματος ήταν η επίδραση της εποχής συλλογής, της προέλευσης και της θέσης των εκφύτων. Εντονότερο ήταν το καφέτιασμα των εκφύτων που συλλέχθηκαν κατά τη διάρκεια της ταχείας ανάπτυξης των βλαστών (Απρίλιο-Μάιο) από ότι την περίοδο Ιουνίου-Αυγούστου ή τους χειμερινούς μήνες, των εκφύτων από ενήλικα παρά από νεανικά φυτά, καθώς και των επάκριων εκφύτων από ότι των μασχαλιαίων. Μέτρηση του περιεχόμενου των εκφύτων σε ολικά φαινολικά έδειξε πως τα έκφυτα που συλλέχθηκαν Απρίλιο-Μάιο, αυτά από επάκρια θέση και αυτά από ενήλικα φυτά και αναβλαστήσεις που αναπτύσσονταν στο βουνό περιείχαν περισσότερα φαινολικά από αυτά που συλλέχθηκαν καλοκαίρι ή χειμώνα, από αυτά που ελήφθησαν από μασχαλιαίες θέσεις του βλαστού και αυτά από μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια αναπτυσσόμενα στον κήπο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου.

Μέσω των φασμάτων IR που ελήφθησαν από τα λυοφιλωμένα δείγματα των εκφύτων υπολογίστηκε η περιεκτικότητά τους σε λιγνίνη. Τα επάκρια έκφυτα βρέθηκαν να περιέχουν

λιγότερη λιγνίνη από τα κατώτερα έκφυτα, ενώ δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ως προς την προέλευση ή την εποχή συλλογής των εκφύτων. Διακριτική ανάλυση (discriminant analysis) των φασμάτων στην περιοχή $1450-1700\text{ cm}^{-1}$, όπου βρίσκονται οι κορυφές των φαινολικών συστατικών και της λιγνίνης, με το πρόγραμμα TQ analyst οδήγησε σε επιτυχή ομαδοποίηση των φασμάτων ανά κατηγορία εκφύτου που διακρίθηκε ως προς τη θέση, την προέλευση και την εποχή συλλογής των εκφύτων και έδειξε πόσο απέχει η μια κατηγορία εκφύτου από τις άλλες.

Μικροσκοπική παρατήρηση επάκριων εκφύτων που συλλέχθηκαν από κανονικές ή λογχοειδείς βλαστήσεις ενήλικων φυτών σε μηνιαία βάση κατά τη διάρκεια ενός έτους έδειξε πως υπήρχε αγγειακή σύνδεση των οφθαλμών με το βλαστό, που είναι αναγκαία για την τροφοδοσία τους σε θρεπτικά συστατικά και φυτορρυθμιστικές ουσίες, και πως τρίχες κάλυπταν τα λέπια και τα νεαρά φύλλα των οφθαλμών δυσχεραίνοντας την απολύμανση των εκφύτων. Κατά την περίοδο έκπτυξης των οφθαλμών και ταχείας ανάπτυξης των βλαστών (τέλος Μαρτίου-Απρίλιο), το κορυφαίο μερίστωμα περιβαλλόταν χαλαρά από τα αναπτυσσόμενα φύλλα και ως εκ τούτου ήταν περισσότερο εκτεθειμένο στην απολύμανση με χλωρίνη. Στα παρεγχυματικά κύτταρα, παρατηρήθηκε συσσώρευση αμύλου από τον Ιούλιο μέχρι το Σεπτέμβριο και γέμισμα των κυττάρων με ινώδεις κατασκευές από τον Οκτώβριο μέχρι τον Ιανουάριο, στα πλαίσια της ανάπτυξης μηχανισμών αντοχής στο ψύχος και της εγκατάστασης λήθαργου, καθώς και κρύσταλλοι του οξαλικού ασβεστίου καθ' όλο το έτος.

Το ποσοστό έκπτυξης των οφθαλμών κατά την εγκατάσταση *in vitro* ήταν χαμηλό (μικρότερο του 30%) είτε τα έκφυτα προέρχονταν από ενήλικο φυτό είτε από αναβλαστήσεις ή μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια, ενώ τα έκφυτα που ελήφθησαν από σπορόφυτα φυτρωμένα *in vitro* έδωσαν βλαστούς σε υψηλό ποσοστό (83%) και περισσότερους βλαστούς ανά έκφυτο από ότι έκφυτα από ενήλικα φυτά ή αναβλαστήσεις. Ένα ακόμη πλεονέκτημα των εκφύτων από τα *in vitro* σπορόφυτα ήταν πως δεν εμφάνισαν καθόλου καφέτιασμα, όπως συνέβη ιδιαίτερα με τα έκφυτα από ενήλικα φυτά, αλλά και με αυτά από αναβλαστήσεις και μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια. Τους πιο μακριούς βλαστούς σχημάτισαν τα έκφυτα από τα μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια.

Στο βασικό υπόστρωμα, MS με 1.0 mg l^{-1} και 0.1 mg l^{-1} IBA: i) τα έκφυτα από ενήλικα φυτά εγκαταστάθηκαν κυρίως το Μάρτιο (πριν την έκπτυξη της νέας βλάστησης) και τον Αύγουστο, ii) τα έκφυτα από αναβλαστήσεις εγκαταστάθηκαν σε υψηλότερο ποσοστό το Μάρτιο από ότι την περίοδο Ιουνίου-Αυγούστου, ενώ όσα συλλέχθηκαν Απρίλιο-Μάιο σχημάτισαν μόνο κάλο ή εκτύχθηκαν σε πολύ χαμηλά ποσοστά, και iii) τα έκφυτα από το μεσαίο τμήμα των μικροπολλαπλασιασμένων φυταρίων ηλικίας 5 ή 8 μηνών εκτύχθηκαν σε

υψηλότερο ποσοστό από τα έκφυτα του επάκριου ή κορυφαίου τμήματος των ηλικίας 20 ημερών βλαστών, που εκπύχθηκαν μετά το κλάδεμα των φυταρίων.

Η θέση των εκφύτων βρέθηκε να επιδρά στην αντίδρασή τους. Έκφυτα που προέρχονταν από το μεσαίο ή βασικό τμήμα των αναβλαστήσεων εκπύχθηκαν σε υψηλότερο ποσοστό από αυτά του επάκριου ή κορυφαίου τμήματος, ενώ περισσότεροι βλαστοί σχηματίστηκαν από τα επάκρια έκφυτα και πιο μακριοί από τα επάκρια και κορυφαία έκφυτα.

Από τις κυτοκινίνες που δοκιμάστηκαν σε συγκέντρωση 1.0 mg l^{-1} μαζί με 0.1 mg l^{-1} IBA (πλην του TDZ που χρησιμοποιήθηκε σκέτο), το TDZ και η BA αποδείχτηκαν καταλληλότερες από τις zeatin, kinetin και 2iP για την εγκατάσταση εκφύτων από μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια. Το TDZ έδωσε το υψηλότερο ποσοστό έκπτυξης και μαζί με τη BA περισσότερους βλαστούς ανά έκφυτο, αν και οι βλαστοί δεν επιμηκύνθηκαν με το TDZ. Έκφυτα που καλλιεργήθηκαν με kinetin εκπύχθηκαν στο χαμηλότερο ποσοστό και σχημάτισαν λίγους κοντούς βλαστούς.

Συγκεντρώσεις BA 1.0 ή 2.0 mg l^{-1} , με ή χωρίς 0.1 mg l^{-1} IBA, οδήγησαν σε υψηλότερα ποσοστά έκπτυξης των εκφύτων και στο σχηματισμό περισσότερων βλαστών ανά έκφυτο από ότι τα 0.5 mg l^{-1} BA.

Έκφυτα από το κορυφαίο τμήμα ενεργά αναπτυσσόμενων βλαστών που ελήφθησαν από κλαδεμένα μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια εγκαταστάθηκαν σε υψηλότερο ποσοστό όταν καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα χωρίς IBA.

8.3. Πολλαπλασιασμός βλαστών *in vitro*

Η προέλευση των αρχικών εκφύτων επέδρασε σημαντικά στο δυναμικό πολλαπλασιασμού των *in vitro* καλλιεργειών με αυτές που εγκαταστάθηκαν από ενήλικα φυτά, με εξαίρεση την καλλιέργεια του Μαρτίου '04, να παρουσιάζουν χαμηλότερους ρυθμούς πολλαπλασιασμού κατά τις υποκαλλιέργειες στο βασικό υπόστρωμα MS με $1.0 \text{ BA} / 0.1 \text{ IBA} (\text{mg l}^{-1})$ από ότι καλλιέργειες από αναβλαστήσεις, μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια και σπορόφυτα που μεταχειρίστηκαν με $0.5 \text{ mg l}^{-1} \text{ GA}_3$. Τα έκφυτα από σπορόφυτα πριν τη μεταχείρισή τους με GA_3 επέδειξαν φτωχό δυναμικό πολλαπλασιασμού σχηματίζοντας λίγους κοντούς βλαστούς. Η καλλιέργεια του Μαρτίου '04 από ενήλικο φυτό έδωσε τους περισσότερους βλαστούς ανά έκφυτο, οι οποίοι όμως υπολείπονταν σε μήκος από τους βλαστούς των καλλιεργειών νεανικής προέλευσης.

Για να περιοριστεί η υπερενυδάτωση των βλαστών δοκιμάστηκε η αύξηση της συγκέντρωσης άγαρ από 8 g l^{-1} σε 14 ή 20 g l^{-1} , η οποία μείωσε το ποσοστό υπερενυδατωμένων βλαστών, όμως ταυτόχρονα μείωσε τον αριθμό και το μήκος των

βλαστών και προκάλεσε χλώρωση, ενώ αντίθετα η κάλυψη των βάζων καλλιέργειας με μεμβράνη sanitas αντί του πλαστικού φιλμ περιόρισε το ποσοστό υπερενυδατωμένων βλαστών αυξάνοντας ταυτόχρονα τον αριθμό των βλαστών.

Καλύτερος συνδυασμός δοχείου καλλιέργειας και υλικού κάλυψης για τον πολλαπλασιασμό των βλαστών αναδείχθηκε ο συνδυασμός βάζων όγκου 75 ml και μεμβράνης sanitas που αυξάνει τον αριθμό και το μήκος των βλαστών περιορίζοντας ταυτόχρονα την υπερενυδάτωση των βλαστών. Το πλαστικό φιλμ και το πλαστικό καπάκι διατήρησαν υψηλά τα ποσοστά υπερενυδάτωσης, ενώ στα μεγαλύτερα δοχεία καλλιέργειας όγκου 145 και 375 ml υπό κάλυψη μεμβράνης sanitas σχηματίστηκαν λιγότεροι βλαστοί από ότι στα βάζα όγκου 75ml και τους σωλήνες όγκου 55ml.

Οι διάφοροι τύποι εκφύτων (επάκρια, κορυφαία, βασικά, κοντοί βλαστοί) που ελήφθησαν από τους *in vitro* βλαστούς δε διέφεραν σημαντικά ως προς το δυναμικό πολλαπλασιασμού των βλαστών. Η αφαίρεση του επάκριου οφθαλμού από τα κορυφαία έκφυτα αύξησε τον αριθμό των παραγόμενων βλαστών εις βάρος όμως της επιμήκυνσής τους.

Στα βάζα όγκου 75 ml υπό κάλυψη μεμβράνης sanitas που επιλέχθηκαν για την καλλιέργεια των εκφύτων, το MS ήταν προτιμότερο του WPM γιατί το δεύτερο προκάλεσε συμπτώματα stress στους παραγόμενους βλαστούς (κοκκίνισμα βλαστών, κιτρίνισμα ή ξήρανση φύλλων). Στα βάζα όγκου 145 ή 375 ml με πλαστικό καπάκι, αντίθετα, το WPM ήταν καλύτερο του MS δίνοντας υψηλότερο αριθμό και μήκος βλαστών και χαμηλότερο ποσοστό υπερενυδατωμένων βλαστών συγκριτικά με το MS.

Το TDZ σε συγκεντρώσεις $0.1-2.0 \text{ mg l}^{-1}$ παρακίνησε υψηλότερους ρυθμούς πολλαπλασιασμού των βλαστών από το βασικό υπόστρωμα με BA, επέδρασε όμως αρνητικά στην επιμήκυνση των βλαστών. Επιμηκυνμένοι βλαστοί παράχθηκαν μετά από υποκαλλιέργεια εκφύτων από TDZ σε υπόστρωμα με BA, οι οποίοι όμως ήταν υπερενυδατωμένοι ή παραμορφωμένοι σε υψηλό ποσοστό. Μετά από δύο υποκαλλιέργειες σε υπόστρωμα με BA, περιορίστηκε η υπολειμματική επίδραση του TDZ στη βλαστογένεση. Προτείνεται η χρήση χαμηλής συγκέντρωσης TDZ (0.1 mg l^{-1}), υποδεκαπλάσια αυτής του BA, σε εναλλακτικές καλλιέργειες με BA δεδομένου ότι αυξάνει τη βλαστογένεση συγκριτικά με τη συνεχή χρήση του BA.

Συγκριτικά με τις zeatin, kinetin και 2iP, η BA αποδείχθηκε πιο αποτελεσματική στον πολλαπλασιασμό των βλαστών. Η kinetin μπορεί να θεωρηθεί ακατάλληλη αφού οδήγησε στο σχηματισμό λίγων κοντών βλαστών ακατάλληλων για ριζοβολία. Η προσθήκη και IBA (0.1 mg l^{-1}) στα υποστρώματα αύξησε το δυναμικό πολλαπλασιασμού των βλαστών σε σχέση

με αυτά χωρίς IBA. Επίπεδα κυτοκινίνης μεταξύ 1.0 και 2.0 mg l⁻¹ συντέλεσαν στην παραγωγή υψηλού αριθμού βλαστών χωρίς να περιορίζεται σημαντικά το μήκος τους.

Κατά την πρώτη υποκαλλιέργεια στο βασικό υπόστρωμα με BA εκφύτων από μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια που είχαν εγκατασταθεί σε υποστρώματα με διάφορες κυτοκινίνες, τα έκφυτα που είχαν αρχικά καλλιεργηθεί με 1.0 mg l⁻¹ TDZ ξεπέρασαν αυτά από τη BA, τη zeatin, την kinetin και το 2iP στον αριθμό των βλαστών χωρίς να υπολείπονται στο μήκος βλαστού.

Η καλλιέργεια στο υπόστρωμα με 0.5 mg l⁻¹ BA και 0.05 mg l⁻¹ IBA, με τις μισές συγκεντρώσεις φυτορρυθμιστικών ουσιών από αυτές του βασικού υποστρώματος, μείωσε το ρυθμό πολλαπλασιασμού των βλαστών και αύξησε ελαφρώς το ποσοστό υπερενυδατωμένων βλαστών σε σχέση με το βασικό υπόστρωμα (1.0 mg l⁻¹ BA και 0.1 mg l⁻¹ IBA).

Η προσθήκη AC στο υπόστρωμα πολλαπλασιασμού των βλαστών παρεμπόδισε πλήρως τη βλαστογένεση.

Η εφαρμογή γιββερελλίνης, 0.1-2.0 mg l⁻¹ GA₃, στο υπόστρωμα πολλαπλασιασμού καλλιεργειών, που παρουσίασαν χαμηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού, εγκατεστημένων από ώριμο φυτό ή αναβλαστήσεις δεν προώθησε την επιμήκυνση των βλαστών, ενώ στην καλλιέργεια από σπορόφυτο η χρήση 0.5 mg l⁻¹ GA₃ αύξησε τόσο τον αριθμό όσο και το μήκος των βλαστών.

Η θέση των αρχικών εκφύτων πάνω στις αναβλαστήσεις επηρέασε το ρυθμό πολλαπλασιασμού των βλαστών κατά τις δύο πρώτες υποκαλλιέργειες, ενώ αργότερα τα έκφυτα από διάφορες θέσεις δε διέφεραν ως προς την αντίδρασή τους και αναμίχθηκαν.

8.4. *In vitro* ριζοβολία μικροβλαστών

Η καλλιέργεια των μικροβλαστών σε στερεό υπόστρωμα προτροπής ριζοβολίας για μία μόνο εβδομάδα ακολουθούμενη από καλλιέργεια σε υπόστρωμα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες ήταν προτιμότερη από τη συνεχή καλλιέργεια στο υπόστρωμα με αυξίνη γιατί οδήγησε σε υψηλότερο ποσοστό ριζοβολίας των μικροβλαστών και στο σχηματισμό κάλου στη βάση των μικροβλαστών σε χαμηλότερο ποσοστό και σε μικρότερη ποσότητα.

Η επίδραση της καλλιέργειας για 1 εβδομάδα σε στερεό υπόστρωμα με IBA ή NAA ή IAA ή συνδυασμό IBA/ IAA και NAA/ IAA ακολουθούμενη από καλλιέργεια σε υπόστρωμα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες στη ριζοβολία των μικροβλαστών διέφερε ανάλογα με την προέλευσή τους. Οι μικροβλαστοί από ενήλικο φυτό ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό σε υπόστρωμα με συνδυασμό IBA και IAA συγκριτικά με το υπόστρωμα με μόνο 0.5 IBA ή 2.0-20.0 IAA, ενώ ο συνδυασμός 0.5 IBA και 8.0 IAA (mg l⁻¹) έδωσε καλύτερα ποσοστά

ριζοβολίας (32%). Αντίθετα, οι μικροβλαστοί από αναβλαστήσεις που καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα με μόνο IAA (4.0 ή 8.0 mg l^{-1}) ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό (65%) και σχημάτισαν λιγότερο κάλο στη βάση τους συγκρινόμενοι με αυτούς στα υποστρώματα με μόνο 0.5 ή 1.0 mg l^{-1} IBA ή NAA ή με συνδυασμό IBA/ IAA και NAA/ IAA.

Μικροβλαστοί από ενήλικο φυτό των οποίων η βάση εμβάπτιστηκε για 10 sec σε υγρά διαλύματα υψηλής συγκέντρωσης IBA ($500-1500 \text{ mg l}^{-1}$) ξεράθηκαν όταν μεταφέρθηκαν σε υπόστρωμα τύρφης ή τύρφης-περλίτη 1:1, ενώ όταν μεταφέρθηκαν σε $\frac{1}{2}$ MS με AC ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό (17-25%) από όταν μεταφέρθηκαν σε $\frac{1}{2}$ MS χωρίς AC (0-11%).

Η εμβάπτιση της βάσης των μικροβλαστών από ενήλικο φυτό σε διαλύματα που περιείχαν συνδυασμό (500 ή 1000 mg l^{-1}) IBA και ($250-1000 \text{ mg l}^{-1}$) IAA έδωσε χαμηλότερα ποσοστά ριζοβολίας (3-11%) από την εμβάπτιση σε διάλυμα που περιείχε μόνο 1000 IBA (23%).

Παρόλο που μικροβλαστοί από αναβλαστήσεις, που παρακινήθηκαν να ριζοβολήσουν μετά από εμβάπτιση της βάσης τους σε υγρό διάλυμα 1000 mg l^{-1} IBA για 10 sec και μετά από καλλιέργεια σε στερεό $\frac{1}{2}$ MS με 0.5 IBA και 8.0 IAA (mg l^{-1}) για μία εβδομάδα, ριζοβόλησαν σε ίσο ποσοστό (52%) και με τις δύο μεθόδους, η μέθοδος της εμβάπτισης σε τόσο υψηλή συγκέντρωση IBA θεωρήθηκε λιγότερο αποτελεσματική από την καλλιέργεια σε στερεό υπόστρωμα με IBA/ IAA για τη ριζοβολία μικροβλαστών νεανικής προέλευσης, επειδή όχι μόνο μείωσε το ποσοστό ριζοβολίας των μικροβλαστών από μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια από 51% σε 18%, αλλά ταυτόχρονα αύξησε το ποσοστό και την ποσότητα του σχηματιζόμενου κάλου, και μείωσε τον αριθμό και το μήκος των ριζών και στις δύο κατηγορίες μικροβλαστών. Προτείνεται να δοκιμαστεί η εμβάπτιση σε υγρά διαλύματα χαμηλότερης συγκέντρωσης IBA.

Η εφαρμογή σκότους την πρώτη εβδομάδα καλλιέργειας στο υπόστρωμα προτροπής ριζοβολίας δε συνιστάται επειδή οδήγησε στην παραγωγή υπερβολικής ποσότητας κάλου στη βάση των μικροβλαστών, ενώ δε συνεισέφερε σημαντικά στην βελτίωση της ριζοβολίας των μικροβλαστών.

Προσθήκη ενεργού άνθρακα (2 g l^{-1}) στο υπόστρωμα προτροπής ριζοβολίας παρεμπόδισε πλήρως τη ριζοβολία των μικροβλαστών. Όταν ο ενεργός άνθρακας προστέθηκε στο υπόστρωμα ανάπτυξης των ριζών, μικροβλαστοί που είχαν καλλιεργηθεί για μία εβδομάδα σε υποστρώματα με IBA/ IAA ή είχε εμβάπτισθεί η βάση τους σε διαλύματα με IBA/ IAA ριζοβόλησαν σε λίγο υψηλότερο ποσοστό από ότι μετά από μεταφορά σε $\frac{1}{2}$ MS χωρίς AC. Μικροβλαστοί που καλλιεργήθηκαν σε $\frac{1}{2}$ MS με 0.5 IBA/ 8.0 IAA (mg l^{-1}) για μία εβδομάδα

ή εμβαπτίσθηκε η βάση τους σε διάλυμα 1000 mg l^{-1} IBA για 10 sec και ακολούθως καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα με AC έδωσαν υψηλότερα ποσοστά ριζοβολημένων βλαστών που δεν εκδήλωσαν ξήρανση κορυφής και φύλλων βλαστών (33% και 18%, αντίστοιχα).

Μικροβλαστοί από ενήλικο φυτό, των οποίων η βάση είχε εμβαπτισθεί σε διάλυμα 1000 mg l^{-1} IBA ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό, σχημάτισαν κάλο σε χαμηλότερο ποσοστό και παρήγαγαν πιο μακριές ρίζες, όταν η καλλιέργεια στο υπόστρωμα με AC διήρκησε μία μόνο εβδομάδα συγκριτικά με τη συνεχή καλλιέργεια σε $\frac{1}{2}$ MS με ή χωρίς AC. Μετά από καλλιέργεια μιας εβδομάδας σε $\frac{1}{2}$ MS με $0.5 \text{ IBA} / 8.0 \text{ IAA} (\text{mg l}^{-1})$, οι μικροβλαστοί που προέρχονταν από ενήλικο φυτό ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό (39%) όταν καλλιεργήθηκαν σε $\frac{1}{2}$ MS χωρίς AC, ενώ οι μικροβλαστοί από αναβλαστήσεις ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό (44-47%) όταν καλλιεργήθηκαν σε $\frac{1}{2}$ MS με AC για μία μόνο εβδομάδα ή παραμονή στο υπόστρωμα με $0.5 \text{ IBA} / 8.0 \text{ IAA} (\text{mg l}^{-1})$. Όταν η καλλιέργεια σε $\frac{1}{2}$ MS με AC διήρκησε 5 εβδομάδες παρατηρήθηκαν τα χαμηλότερα ποσοστά ριζοβολίας. Χαρακτηριστική ήταν η παραγωγή ριζών με ριζικά τριχίδια από τους μικροβλαστούς που καλλιεργήθηκαν συνεχώς στο υπόστρωμα με $0.5 \text{ IBA} / 8.0 \text{ IAA} (\text{mg l}^{-1})$.

Τόσο ο τύπος όσο και η συγκέντρωση των κυτοκινινών στο υπόστρωμα πολλαπλασιασμού επέδρασαν στην ακόλουθη ριζοβολία των μικροβλαστών: i) Μικροβλαστοί από ενήλικο φυτό, που είχαν καλλιεργηθεί σε υποστρώματα με χαμηλή συγκέντρωση TDZ ($0.1-0.2 \text{ mg l}^{-1}$) ακολουθούμενη από δύο υποκαλλιέργειες σε υπόστρωμα με BA και IBA, ριζοβόλησαν σε σχετικά υψηλότερο ποσοστό από αυτούς που είχαν καλλιεργηθεί με υψηλότερες συγκεντρώσεις TDZ ($0.5-2.0 \text{ mg l}^{-1}$) ή συνεχώς με BA. Οι μικροβλαστοί που υποκαλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα με μειωμένη συγκέντρωση BA/ IBA ($0.5 / 0.05$) ριζοβόλησαν πιο αποτελεσματικά από αυτούς σε $1.0 \text{ BA} / 0.1 \text{ IBA} (\text{mg l}^{-1})$, ενώ οι μικροβλαστοί από 0.1 mg l^{-1} TDZ και αυτοί από BA, που είχαν υποκαλλιεργηθεί σε $0.5 \text{ BA} / 0.05 \text{ IBA} (\text{mg l}^{-1})$, σχημάτισαν πιο πλούσιο ριζικό σύστημα. ii) Μικροβλαστοί από αναβλαστήσεις που είχαν καλλιεργηθεί με BA ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό από αυτούς με zeatin ή 2iP, ενώ αυτοί από την kinetin ήταν πολύ κοντοί ακατάλληλοι για ριζοβολία. iii) Μικροβλαστοί που προέρχονταν από συγκέντρωση BA 0.5 έως 2.0 mg l^{-1} ριζοβόλησαν πιο αποτελεσματικά από αυτούς που είχαν καλλιεργηθεί με 4.0 mg l^{-1} BA. iv) Μικροβλαστοί ενήλικης και νεανικής προέλευσης καλλιεργημένοι στο βασικό υπόστρωμα που υποκαλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα με $0.5 \text{ BA} / 0.05 \text{ IBA}$ ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό από αυτούς που υποκαλλιεργήθηκαν με $1.0 \text{ BA} / 0.1 \text{ IBA} (\text{mg l}^{-1})$. Γενικά, οι μικροβλαστοί που είχαν καλλιεργηθεί σε υπόστρωμα με χαμηλή συγκέντρωση κυτοκινίνης βρέθηκαν να ριζοβολούν καλύτερα από αυτούς που προέρχονταν από υψηλή συγκέντρωση.

Μικροβλαστοί από ενήλικο φυτό που είχαν καλλιεργηθεί στο βασικό υπόστρωμα, στο οποίο είχε προστεθεί γιββερελλίνη σε συγκέντρωση 0.1-2.0 mg l⁻¹, ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό από αυτούς που είχαν καλλιεργηθεί χωρίς GA₃.

Προτείνεται η χρήση μικροβλαστών μέσου μήκους (1.0-2.0 cm), οι οποίοι ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό από τους μεγαλύτερου μήκους βλαστούς και σχημάτισαν ικανοποιητικό αριθμό και μήκος ριζών, ενώ έχουν μήκος που διευκολύνει τους χειρισμούς κατά τον εγκλιματισμό.

Το πρόβλημα της ξήρανσης της κορυφής και των φύλλων των μικροβλαστών, που παρατηρήθηκε κατά τη ριζοβολία σε βάζα όγκου 75 ml υπό κάλυψη πλαστικού φιλμ, αντιμετωπίστηκε όταν χρησιμοποιήθηκε η μεμβράνη sanitas ως υλικό κάλυψης, η οποία επίσης οδήγησε σε υψηλότερα ποσοστά ριζοβολίας στους μικροβλαστούς ενήλικης προέλευσης. Στα βάζα όγκου 145 ml με καπάκι magenta ή 375 ml με πλαστικό καπάκι, που επίσης δοκιμάστηκαν, μικροβλαστοί που είχαν καλλιεργηθεί για πολλαπλασιασμό των βλαστών σε διάφορα βάζα υπό κάλυψη μεμβράνης sanitas ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό και ανέπτυξαν μεγαλύτερα και πλατύτερα φύλλα από ότι στα βάζα όγκου 75 ml υπό κάλυψη μεμβράνης sanitas, ενώ μικροβλαστοί που είχαν καλλιεργηθεί για πολλαπλασιασμό των βλαστών σε βάζα όγκου 145 ml με καπάκι magenta ή 375 ml με πλαστικό καπάκι ριζοβόλησαν σε χαμηλό ποσοστό. Για τη ριζοβολία των μικροβλαστών προτείνεται η χρήση βάζων όγκου 145 ml με καπάκι magenta.

Μικροβλαστοί που είχαν καλλιεργηθεί σε θρεπτικό υπόστρωμα MS ριζοβόλησαν σε υψηλότερα ποσοστά από αυτούς που προέρχονταν από WPM, ενώ οι μικροβλαστοί από το MS ριζοβόλησαν εξίσου αποτελεσματικά και στα δύο υποστρώματα ½MS και ½WPM.

Η θέση των αρχικών εκφύτων πάνω στις αναβλαστήσεις επέδρασε μόνο στη ριζοβολία μικροβλαστών που ελήφθησαν από τις αρχικές υποκαλλιέργειες, κατά τις οποίες γενικά μετρήθηκαν υψηλότερα ποσοστά ριζοβολίας από ότι μετά την πέμπτη υποκαλλιέργεια.

Η προέλευση των μικροβλαστών ήταν καθοριστική για την ικανότητα ριζοβολίας τους, αφού αυτοί που ελήφθησαν από νεανικές καλλιέργειες ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό και σχημάτισαν περισσότερες ρίζες από αυτούς που προέρχονταν από ενήλικες, ενώ το μήκος των ριζών ήταν μεγαλύτερο στους μικροβλαστούς από ενήλικες καλλιέργειες.

8.5. Εγκλιματισμός φυταρίων *ex vitro*

Τα μεταφυτευμένα φυτάρια του *xM. florentina* γενικά εγκλιματίστηκαν σε υψηλά ποσοστά (μεγαλύτερα του 70%) μετά από παραμονή μιας εβδομάδας σε θάλαμο σταθερών συνθηκών και έξοδο στον πάγκο του θερμοκηπίου. Υψηλότερα ποσοστά εγκλιματισμού και

ταχύτερος ρυθμός ανάπτυξης των φυταρίων επιτεύχθηκε από τα εύρωστα φυτάρια με πλούσιο ριζικό σύστημα, που μεταφέρθηκαν *ex vitro* σε υπόστρωμα τύρφης-περλίτη, κατά προτίμηση 1:1 (v/v), τέλος χειμώνα-αρχές άνοιξης. Η φυσιολογική κατάσταση των μητρικών φυτών δεν επέδρασε στην επιβίωση των φυταρίων, ενώ η προσθήκη ενεργού άνθρακα στο υπόστρωμα ανάπτυξης των ριζών *in vitro* ευνόησε τον εγκλιματισμό πιθανά μέσω της σκληραγώγησης των φυταρίων.

Επίσης, υπήρξαν οι ενδείξεις πως μικροβλαστοί που ελήφθησαν από καλλιέργεια με χαμηλότερη συγκέντρωση κυτοκινίνης ανέπτυξαν πιο εύρωστα φυτάρια που εγκλιματίστηκαν σε υψηλότερο ποσοστό και σχημάτισαν καλύτερο ριζικό σύστημα *ex vitro*, ενώ η ριζοβολία *in vitro* σε δοχεία με πλαστικό καπάκι οδήγησε στο σχηματισμό φυταρίων με καλύτερα ανεπτυγμένα φύλλα, πιθανά πιο ικανών για έναρξη φωτοσύνθεσης και ταχύτερο εγκλιματισμό, από ότι τα φυτάρια στα δοχεία με μεμβράνη sanitas.

8.6. Επίλογος

Από τους παράγοντες που εξετάστηκαν κατά τη διερεύνηση του μικροπολλαπλασιασμού του *xM. florentina*, η προέλευση των εκφύτων, η θέση, και η εποχή συλλογής επέδρασαν σημαντικά στις μολύνσεις και στο καφέτιασμα των εκφύτων, τα οποία αποτελούν σοβαρά προβλήματα κατά την εγκατάσταση *in vitro* καλλιεργειών του είδους. Οι παράγοντες αυτοί επίσης επέδρασαν σημαντικά στο περιεχόμενο των εκφύτων σε ολικά φαινολικά συστατικά, ενώ η αναποτελεσματικότητα της απολύμανσης των εκφύτων αποδόθηκε εν μέρη στην παρουσία άφθονων τριχών στα λέπια και τα νεαρά φύλλα των οφθαλμών.

Η προέλευση των εκφύτων από ενήλικο ή νεανικό φυτικό ιστό ήταν επίσης καθοριστική για το ρυθμό πολλαπλασιασμού των βλαστών των εγκατεστημένων καλλιεργειών, την ικανότητα ριζοβολίας των εξαιρεμένων μικροβλαστών και τη μορφολογία των φυταρίων μετά τον εγκλιματισμό.

Ο τύπος και η συγκέντρωση κυτοκινίνης είχαν καθοριστική επίδραση όχι μόνο επί της εγκατάστασης *in vitro* καλλιεργειών και τον πολλαπλασιασμό των βλαστών, αλλά και επί της ακόλουθης ριζοβολίας των εξαιρεθέντων μικροβλαστών.

Ο τύπος, η συγκέντρωση και η τεχνική εφαρμογής αυξίνης επέδρασαν σημαντικά στην *in vitro* ριζοβολία των μικροβλαστών, ενώ μικρή ποσότητα αυξίνης σε συνδυασμό με κυτοκινίνη ευνόησε τη βλαστογένεση.

Η γιββερελλίνη βελτίωσε τη βλαστογένεση μόνο των εκφύτων που προέρχονταν από σπορόφυτα.

Παρόλο που τα έκφυτα που καλλιεργήθηκαν σε WPM επέδειξαν υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού των βλαστών συγκριτικά με τα καλλιεργημένα σε MS, το MS προτιμήθηκε του WPM, όχι μόνο εξαιτίας των συμπτωμάτων καταπόνησης που συχνά έφεραν οι μικροβλαστοί που είχαν καλλιεργηθεί σε WPM, αλλά κυρίως επειδή ριζοβόλησαν σε χαμηλότερο ποσοστό από αυτούς που είχαν καλλιεργηθεί σε MS.

Η προσθήκη AC, κατά την πρώτη εβδομάδα καλλιέργειας, στο υπόστρωμα ανάπτυξης των ριζών *in vitro*, επέδρασε θετικά τόσο επί της ριζοβολίας των μικροβλαστών όσο και κατά τον ακόλουθο εγκλιματισμό των φυταρίων *ex vitro*, ενώ όταν συμπεριλήφθηκε στο υπόστρωμα πολλαπλασιασμού και προτροπής ριζοβολίας παρεμπόδισε, πλήρως τη βλαστογένεση και τη ριζογένεση, αντίστοιχα.

Ο συνδυασμός δοχείου καλλιέργειας και υλικού κάλυψης επέδρασε διαφορετικά ανά στάδιο καλλιέργειας. Έτσι, κατά τον πολλαπλασιασμό των βλαστών ο συνδυασμός βάζου όγκου 75 ml και μεμβράνης sanitas αναδείχτηκε καλύτερος από τα βάζα όγκου 145 ή 375 ml και την κάλυψη με πλαστικό φιλμ ή πλαστικό καπάκι, επειδή περιορίσε την υπερενυδάτωση των βλαστών, αυξάνοντας ταυτόχρονα τη βλαστογένεση. Κατά τη ριζοβολία των μικροβλαστών σε βάζα όγκου 75 ml, η αντικατάσταση του πλαστικού φιλμ από μεμβράνη sanitas αντιμετώπισε το πρόβλημα της ξήρανσης της κορυφής και των φύλλων των μικροβλαστών και αύξησε το ποσοστό ριζοβολίας των μικροβλαστών. Όταν, όμως, οι μικροβλαστοί ριζοβόλησαν σε βάζα όγκου 145 ml με καπάκι magenta ή 375 ml με πλαστικό καπάκι, παρατηρήθηκαν υψηλότερα ποσοστά ριζοβολίας και τα φυτάρια ανέπτυξαν πλουσιότερο φύλλωμα από ότι στα βάζα όγκου 75 ml υπό κάλυψη μεμβράνης sanitas.

Αναφορικά με τις συνθήκες καλλιέργειας, η εφαρμογή σκότους την πρώτη εβδομάδα καλλιέργειας στο υπόστρωμα προτροπής ριζοβολίας όχι μόνο δε βελτίωσε τη ριζοβολία των μικροβλαστών, αλλά οδήγησε στην παραγωγή υπερβολικής ποσότητας κάλου στη βάση των μικροβλαστών. Επίσης, η εποχή εξόδου των φυταρίων *ex vitro* για εγκλιματισμό επέδρασε σημαντικά τόσο στην επιβίωση όσο και στην ανάπτυξη των φυταρίων.

Συνεπώς, ένα αποτελεσματικό πρωτόκολλο *in vitro* πολλαπλασιασμού του *xM. florentina* θα πρέπει να ακολουθεί τις παρακάτω αρχές: 1) για την εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας είναι καλύτερο να χρησιμοποιούνται έκφυτα κόμβου, συλλεγμένα κατά τους καλοκαιρινούς μήνες από νεανικά ή ανανεωμένα μητρικά φυτά, τα οποία περιέχουν λιγότερα φαινολικά και παρουσιάζουν λιγότερο καφέτιασμα, έχουν το δυνατότητα να εγκαθίστανται σε υψηλότερα ποσοστά *in vitro*, πολλαπλασιάζονται και ριζοβολούν πιο αποτελεσματικά, και δίνουν πιο συμπαγή φυτά, 2) η καλλιέργεια ενδείκνυται να γίνεται σε θρεπτικό υπόστρωμα MS, 3) το υπόστρωμα εγκατάστασης μπορεί να περιέχει TDZ αντί για BA/ IBA, 4) στο στάδιο του

πολλαπλασιασμού των βλαστών να χρησιμοποιούνται 1-2 mg I⁻¹ BA αντί για zeatin, kinetin ή 2iP, συνδυασμένα με 0.1 mg I⁻¹ IBA, 5) χαμηλής συγκέντρωσης TDZ (0.1 mg I⁻¹), υποδεκαπλάσια αυτής του BA, μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε εναλλακτικές καλλιέργειες με BA, 6) το χαμηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού εκφύτων από σπορόφυτα μπορεί να αυξηθεί με την προσθήκη 0.5 mg I⁻¹ GA₃ στο υπόστρωμα πολλαπλασιασμού, 7) προτείνεται η χρήση δοχείων όγκου 75 ml υπό κάλυψη μεμβράνης sanitas κατά το στάδιο του πολλαπλασιασμού και δοχείων όγκου 145 ml με καπάκι magenta για τη ριζοβολία των μικροβλαστών, 8) η καλλιέργεια στο υπόστρωμα με αυξίνη (στάδιο προτροπής ριζοβολίας) θα πρέπει να διαρκεί μία εβδομάδα ακολουθούμενη από μεταφορά σε υπόστρωμα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες (στάδιο ανάπτυξης των ριζών), 9) επειδή η καλλιέργεια σε στερεό υπόστρωμα χαμηλής συγκέντρωσης αυξίνης (0.5 mg I⁻¹ IBA/ 8.0 mg I⁻¹ IBA) ήταν περισσότερο αποτελεσματική στην πρόκληση ριζοβολίας από την η εμβάπτιση της βάσης των μικροβλαστών σε διάλυμα με υψηλή συγκέντρωση IBA (1000 mg I⁻¹), καλό θα ήταν να δοκιμαστούν και διαλύματα με χαμηλότερη συγκέντρωση IBA, 10) προτείνεται η χρήση IAA αντί για IBA ή NAA στο υπόστρωμα προτροπής ριζοβολίας, 11) στην τελευταία υποκαλλιέργεια πριν τη λήψη των μικροβλαστών για ριζοβολία καλό θα ήταν να χρησιμοποιείται χαμηλή συγκέντρωση κυτοκινίνης, 12) ο AC μπορεί να βελτιώσει τη ριζοβολία των μικροβλαστών όταν προστίθεται στο υπόστρωμα ανάπτυξης των ριζών μόνο την πρώτη εβδομάδα, ενώ φυτάρια ριζοβολημένα σε υπόστρωμα με AC εγκλιματίζονται σε υψηλότερο ποσοστό, 13) μόνο τα φυτάρια που ανέπτυξαν πλούσιο ριζικό σύστημα *in vitro* θα πρέπει να χρησιμοποιούνται για εγκλιματισμό και 14) καλύτερος εγκλιματισμός των φυταρίων μπορεί να επιτευχθεί νωρίς την άνοιξη συγκριτικά με το φθινόπωρο ή χειμώνα, σε υπόστρωμα τύρφης-περλίτη 1:1.

Με βάση τα ανωτέρω, η παρούσα εργασία εξασφαλίζει ένα αποδοτικό πρωτόκολλο μικροπολλαπλασιασμού του *xMalosorbus florentina*, που δίνει τη δυνατότητα αξιοποίησής του ως καλλωπιστικό φυτό κηποτεχνίας, αλλά και τη δυνατότητα παραγωγής φυτών για αναδασώσεις με στόχο τη διάσωση του είδους.



9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

9. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ABDUL KADER, A.M., MATHÉ, A. and LASZLOFFY, K. (1991). *In vitro* propagation of apple: comparative response of three cultivars to cytokinin and auxin. *Acta Horticulturae*, 300, 155-161.
- ABE, K., KOTODA, N., KATO, H. and SOEJIMA, J. (2007). Resistance sources to Valsa canker (*Valsa ceratosperma*) in germplasm collection of diverse *Malus* species. *Plant Breeding*, 126, 449-453.
- ABOUSALIM, A. and MANTELL, S.H. (1994). A practical method for alleviating shoot-tip necrosis symptoms in *in vitro* shoot cultures of *Pistacia vera* cv. Mateur. *Journal of Horticultural Science*, 69 (2), 357-365.
- ABRIE, A.L. and VAN STADEN, J. (2001). Micropropagation of the endangered *Aloe polyphylla*. *Plant Growth Regulation*, 33, 19-23.
- AGRAWAL, V., PRAKASH, S. and GUPTA, S.C. (2002). Effective protocol for *in vitro* shoot production through nodal explants of *Simmondsia chinensis*. *Biol. Plant*, 45, 449-453.
- AL-MAARRI, K., ARNAUD, Y. and MIGINIAC, E. (1994). Micropropagation of *Pyrus communis* cultivar 'Passe Crassane' seedlings and cultivar 'Williams: factors affecting root formation *in vitro* and *ex vitro*. *Scientia Horticulturae*, 58, 207-214.
- ALMEIDA, R., GONÇALVES, S. and ROMANO, A. (2005). *In vitro* micropropagation of endangered *Rhododendron ponticum* L. subsp. baeticum (Boissier and Reuter) Handel-Mazzetti. *Biodiversity and Conservation*, 14, 1059-1069.
- ALVAREZ, R., NISSEN, S.J. and SUTTER E.G. (1988). Relationship between indole-3-acetic acid levels in apple (*Malus pumila* Mill) rootstocks cultured *in vitro* and adventitious root formation in the presence of indole-3-butyric acid. *Plant Physiol.* 89, 439-443.
- ALVAREZ, R., NISSEN, S.J. and SUTTER, E.G. (1989). Relationship of indole-3-butyric acid and adventitious rooting in M. 26 apple (*Malus pumila* Mill.) shoots cultured *in vitro*. *J. Plant Growth Regul.*, 8, 263-272.
- AMIN, M.N. and JAISWAL, V.S. (1993). *In vitro* response of apical bud explants from mature trees of jackfruit (*Artocarpus heterophyllus*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 33, 59-65.
- AMO-MARCO, J.B. and IBÁÑEZ, M.R. (1998). Micropropagation of *Limonium cavanillesii* Erben, a threatend statice, from inflorescence stems. *Plant growth Regulation*, 24(1), 49-54.

- AMO-MARCO, J.B. and LLEDO, M.D. (1996). *In vitro* propagation of *Salix tarraconensis* Pau ex Font Quer, an endemic and threatend plant. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant, 32, 42-46.
- ANAND, A., SRINIVASA RAO, C. and BALAKRISHNA, P. (1999). *In vitro* propagation of *Syzygium travancoricum* Gamble - an endangered tree species. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 56, 59-63.
- ANTONIDAKI-GIATROMANOLAKI, A., DRAGASSAKI, M., VLAHOS, I. and PAPADIMIGTRIOU, M. (2006). Vegetative propagation *in vivo* and *in vitro* of *Staezelina petiolata* (L.) Hilliard et Burt. Propagation of Ornamental Plants, 6, 187-193.
- ANTONIDAKI-GIATROMANOLAKI, A., ORCHARD, J.E., DRAGASSAKI, M. and VLAHOS, J.C. (2008). Propagation of *Sternbergia sicula*, by seed and tissue culture, Acta Hort., 766, 149-154.
- APLADA, E., GEORGIADIS, T., TINIAKOU, A. and THEOCHAROPOULOS, M. (2007). Phytogeography and ecological evaluation of the flora and vegetation of Mt. Parnitha (Attica, Greece). Edinburgh Journal of Botany, 64 (2), 185-207.
- ARRILLAGA, I. and SEGURA, J. (1992). Adventitious shoot regeneration from hypocotyl cultures of service tree (*Sorbus domestica* L.). Journal of Horticultural Science, 67 (3), 371-373.
- ARRILLAGA, I., LERMA, V., PÉREZ-BERMÚDEZ, P. and SEGURA, J. (1995). Callus and somatic embryogenesis from cultured anthers of service tree (*Sorbus domestica* L.). HortScience, 30 (5), 1078-1079.
- ARRILLAGA, I., LERMA, V. and SEGURA, J. (1992). Micropropagation of juvenile and adult flowering ash. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 117(2), 346-350.
- ARRILLAGA, I., MARZO, T. and SEGURA, J. (1991). Micropropagation of juvenile and adult *Sorbus domestica* L. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 27, 341-348.
- AVANZATO, D. and CHERUBINI, S. (1993). Influence of the substrates on the direct rooting *ex vitro*, MM106 apple microcuttings. Acta Horticulturae, 342, 297-302.
- BALARAJU, K., AGASTIAN, P. and IGNACIMUTHU, S. (2009). Micropropagation of *Swertia chirata* Buch.-Hams. Ex Wall.: a critically endangered medicinal herb. Acta Physiologiae Plantarum, 31(3), 487-494.
- BARALDI, R., BERTAZZA, G., BREGOLI, A.M., FASOLO, F., ROTONDI, A., PREDIERI, D., SERAFINI-FRACASSINI, D., SLOVIN, J.P. and COHEN, J.D. (1995). Auxins and polyamines in relation to differential *in vitro* root induction on microcuttings of two pear cultivars. J. Plant Growth Regul., 14, 49-59.

- BARGHCHI, M. and ALDERSON, P.G. (1996). The control of shoot tip necrosis in *Pistacia vera* L. *in vitro*. *Plant Growth Regulation*, 20, 31-35.
- BARNA, K.S. and WAKHLU, A.K. (1995). Effects of thidiazuron on micropropagation of rose. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 31(1), 44-46.
- BELLETTI, P., MONTELEONE, I. and FERRAZZINI, D. (2008). A population genetic study in a scattered forest species, wild service tree [*Sorbus torminalis* (L.) Crantz.], using RAPD markers. *European Journal of Forest Research*, 127(2), 103-114.
- BENSON, E.E., DANAHER, J.E., PIMBLEY, I.M., ANDERSON, C.T., WAKE, J.E., DALEY, S. and ADAMS, L.K. (2000). *In vitro* propagation of *Primula scotica*: a rare Scottish plant. *Biodiversity and Conservation*, 9, 711-726.
- BERTSOUKLIS, K.F. and PAPAFOIOTI, M. (2009). *In vitro* propagation of *Arbutus andrachne* L. *Acta Hort.*, 813, 477-480.
- BERTSOUKLIS, K.F. and PAPAFOIOTI, M. (2010). Effect of storage on *Arbutus andrachne* L. seed germination. *Acta Hort.*, 885, 65-71.
- BHATIA, P., BHATIA, N.P. and ASHWATH, N. (2002). *In vitro* propagation of *Stackhousia tryonii* Bailey (Stackhousiaceae): a rare and serpentine-endemic species of central Queensland, Australia. *Biodiversity and Conservation*, 11, 1469-1477.
- BHATT, I.D., and DHAR, U. (2000). Micropropagation of Indian wild strawberry. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 60, 83-88.
- BIEDENKOPF, S., AMMER, C. and MÜLLER-STARCK, G. (2007). Genetic aspects of seed harvests of the artificial regeneration of wild service tree (*Sorbus torminalis* [L.] Crantz). *New Forests*, 33, 1-12.
- BLAKESLEY, D., PASK, N., HENSHAW, G.G. and FAY, M.F. (1996). Biotechnology and the conservation of forest genetic resources: *in vitro* strategies and cryopreservation. *Plant Growth Regulation*, 20, 11-16.
- BLAŽKOVÁ, A., SOTTA, B., TRANVAN, H., MALDINEY, R., BONNET, M., EINHORN, J., KERHOAS, L., MIGINIAC, E. (1997). Auxin metabolism and rooting in young and mature clones of *Sequoia sempervirens*. *Physiologia Plantarum* 99(1): 73-80.
- BOLAR, J.P., NORELLI, J.L. and ALDWINCKLE, H.S. (1998). An efficient method for rooting and acclimation of micropropagated apple cultivars. *HortScience*, 33(7), 1251-1252.
- BOLLMARK, M., KUBÁT, B. and ELIASSON, L. (1988). Variation in endogenous cytokinin content during adventitious root formation in pea cuttings. *J. Plant Physiol.*, 132, 262-265.

- BOMMINENI, V.R., MATHEWS, H., SAMUEL, S.B., KRAMER, M. and WAGNER, D.R. (2001). A new method for rapid *in vitro* propagation of apple and pear. *HortScience*, 36 (6), 1102-1106.
- BONGA, J.M. (1981). Vegetative propagation of mature trees by tissue culture. In: Rao, A.N. (ed) Proc. Costed Sym. On Tissue Cult. Eco. Imp. Plants, Singapore, pp. 191-196.
- BRAINERD, K.E. and FUCHIGAMI, L.H. (1981). Acclimatization of aseptically cultured apple plants to low relative humidity. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 106 (4), 515-518.
- BRAND, M.H. (1993). Initiating cultures of *Halesia* and *Malus*: influence of flushing stage and benzyladenine. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 33, 129-132.
- BRAND, M.H. and LINEBERGER, R.D. (1992). *In vitro* rejuvenation of *Betula* (Betulaceae): morphological evaluation. *American Journal of Botany*, 79 (6), 618-625.
- BRESSAN, P.H., KIM, Y.J., HYNDMAN, S.E., HASEGAWA, P.M. and BRESSAN, R.A. (1982). Factors affecting *in vitro* propagation of rose. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 107 (6): 979-990.
- BRIGGS, B.A., McCULLOCH, S.M. and EDICK, L.A. (1988). Micropropagation of azaleas using thidiazuron. *Acta Horticulturae*, 227, 330-333.
- BROUSSALIS, P. (1977). The protection of the flora in Greece and its problems. *Ann. Mus. Goulandris*, 3, 23-30.
- BROWICZ, K. (1970). "*Malus florentina*" – its history, systematic position and geographical distribution. *Fragm. Flor. Geobot.*, 16, 61-83.
- BROWICZ, K. (1983). *XMalosorbus florentina* (Zuccagni) Browicz (Rosaceae) in Greece. *Ann. Musei Goulandris*, 6, 27-35.
- BRZUSZEK, R.F., HARKESS, R.L. and MULLEY, S.J. (2007). Landscape architects' use of native plants in the southeastern United States. *HortTechnology*, 17, 78-81.
- BUNN, E. (2005). Development of *in vitro* methods for *ex situ* conservation of *Eucalyptus impensa*, an endangered mallee from southwest Western Australia. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 83, 97-102.
- BUNN, E. and DIXON, K.W. (1992). *In vitro* propagation of the rare and endangered *Grevillea scapigera* (Proteaceae). *HortScience*, 27 (3), 261-262.
- BURGHARDT, K.T., TALLAMY, D.W. and SHRIVER, W.G. (2008). Impact of native plants on bird and butterfly biodiversity in suburban landscapes. *Conservation Biology*, 23, 219-224.

- BUTTENSCHØN, R.M. and BUTTENSCHØN, J. (1998). Population dynamics of *Malus sylvestris* stands in grazed and ungrazed, semi-natural grasslands and fragmented woodlands in Mols Bjerge, Denmark. *Ann. Bot. Fennici*, 35, 233-246.
- CABONI, E., BOUMIS, G. and DAMIANO, C. (1992). Effects of phenols, gibberellic acid and carbohydrates on the rooting of apple rootstock M9 Jork. *Agronomie*, 12, 789-794.
- CABONI, E., TONELLI, M.G., LAURI, P., D'ANGELI, S. and DAMIANO, C. (1999). *In vitro* shoot regeneration from leaves of wild pear. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 59, 1-7.
- CABONI, E., TONELLI, M. and DAMIANO, C. (2009). *In vitro* rooting and acclimatization of service tree (*Sorbus domestica* L.). *Acta Horticulturae*, 812, 563-567.
- CALAMAR, A. and DE KLERK, G.J. (2002). Effects of sucrose on adventitious root regeneration in apple. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 70, 207-212.
- CAPUANA, M. and GIANNINI, R. (1997). Micropropagation of young and adult plants of cypress (*Cupressus sempervirens* L.). *Journal of Horticultural Science*, 72 (3), 453-460.
- CHAKRABARTY, D., PARK, S.Y., ALI, M.B., SHIN, K.S. and PAEK, K.Y. (2006). Hyperhydricity in apple: ultrastructural and physiological aspects. *Tree Physiology*, 26, 377-388.
- CHALUPA, V. (1981). Clonal propagation of broad-leaved forest trees *in vitro*. *Commun Inst. Forest. Čechosl.*, 12, 255-271.
- CHALUPA, V. (1983). Micropropagation of conifer and broadleaved forest trees. *Commun Inst. Forest. Čechosl.*, 13, 7-39.
- CHALUPA, V. (1984). *In vitro* propagation of oak (*Quercus robur* L.) and linden (*Tilia corbata* Mill.). *Biol. Plant.*, 26, 374-377.
- CHALUPA, V. (1985). *In vitro* propagation of *Larix*, *Picea*, *Pinus*, *Quercus*, *Fagus* and other species using adenine-type cytokinins and thidiazuron. *Commun Inst. For Cech.*, 14, 65-90.
- CHALUPA, V. (1987). Effect of benzylaminopurine and thidiazuron on *in vitro* shoot proliferation of *Tilia cordata* Mill., *Sorbus aucuparia* L. and *Robinia pseudoacacia* L. field performance of micropropagated trees. *Biologia Plantarum*, 29(6), 425-429.
- CHALUPA, V. (1988). Large scale micropropagation of *Quercus robur* L. using adenine-type cytokinins and thidiazuron to stimulate shoot proliferation. *Biologia Plantarum*, 30(6), 414-421.
- CHALUPA, V. (1992). Micropropagation of European mountain ash (*Sorbus aucuparia* L.) and wild service tree [*Sorbus torminalis* (L.) Cr.]. In: BAJAJ, Y.P.S. (ed), *Biotechnology*

- in agriculture and forestry, vol. 18. High-tech and micropropagation II. Springer-Verlag, Berlin, pp. 212-226.
- CHALUPA, V. (2002). *In vitro* propagation of mature trees of *Sorbus aucuparia* L. and field performance of micropropagated trees. *Journal of forest science*, 48(12), 529-535.
- CHANG, S.-H., HO, C.-K., CHEN, Z.-Z. and TSAY, J.-Y. (2001). Micropropagation of *Taxus mairei* from mature trees. *Plant Cell Reports*, 20, 496-502.
- CHEN, L., WANG, Y., XU, C., ZHAO, M. and WU, J. (2006). *In vitro* propagation of *Lynchnis senno* Siebold et Zucc., a rare plant with potential ornamental value. *Scientia Horticulturae*, 107, 183-186.
- CHEVREAU, E., SKIRVIN, R.M., ABU-QAOUD, H.A., KORBAN, S.S. and SULLIVAN, J.G. (1989). Adventitious shoot regeneration from leaf tissue of three pear (*Pyrus* sp.) cultivars *in vitro*. *Plant Cell Reports*, 7, 688-691.
- CHRISTENSEN, K.I. (1995). *Malosorbus florentina*. In: D. PHITOS, A. STRID, S. SNOGERUP and W. GREUTER (eds), *The Red Data Book of rare and threatened plants of Greece*. Financed by the World Wide Fund for Nature (WWF), K. Michalas S.A., pp. 358-359.
- CLAYTONL, P.W., HUBSTENBERGER, J.F. and PHILLIPS, G.C. (1990). Micropropagation of members of the Cactaceae subtribe Cactinae. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 115, 337-343.
- COLLET, G.F. and LE, C.L. (1987). Role of auxin during *in vitro* rhizogenesis of rose and apple-trees. *Acta Horticulturae*, 212, 273-280.
- COOPER, R.C. and CAMBIE, R.C. (1991). *New Zealand's economic native plants*. Oxford University Press.
- CUENCA, S., AMO-MARCO, J.B. and PARRA, R. (1998). Micropropagation from inflorescence stems of the Spanish endemic plant *Centaurea paui* Loscos ex Willk. (Compositae). *Plant Cell Reports*, 18(7-8), 674-679.
- CUTLER, D.F., BOTHA, T. and STEVENSON, D.W. (2008). *Plant anatomy. An applied approach*. Blackwell Publishing, USA, p. 98-100.
- DALAL, M.A., DAS, B., RATHER, M.A. and BILAL, S. (2004). Effect of media additives, incubation culture conditions and subculturing on control of oxidative browning in *in vitro* culture of apple (*Malus domestica*). *Indian Journal of Agricultural Research*, 74(11), 600-603.

- DALAL, M.A., SHARMA, B.B., MIR, N.A. and SAHNI, C.K. (1993). Initiation culture mode and subculturing in *in vitro* culture of grapevine-control of oxidative browning. *Annals of Agricultural Research*, 14(2), 168-172.
- DE KLERK, G.J. and TER BRUGGE, J. (1992). Factors affecting adventitious root formation in microcuttings of *Malus*. *Agronomie*, 12, 747-755.
- DE KLERK, G.J., KEPPEL, M., TER BRUGGE, J. and MEEKES, H. (1995a). Timing of the phases in adventitious root formation in apple microcuttings. *Journal of Experimental Botany*, 46 (289), 965-972.
- DE KLERK, G.J., TERZI, M., CELLA, R. and FALAVIGNA, A. (1995b). Hormone requirements during the successive phases of rooting *Malus* microcuttings. *Current issues in plant molecular and cellular biology. Proceedings of the 8th international congress on plant tissue and cell culture, Florence, Italy, 12-17 June, 1994*, 111-116.
- DE KLERK, G.J., TER BRUGGE, J. and MARINOVA, S. (1997). Effectiveness of indoleacetic acid, indolebutyric acid and naphthaleneacetic acid during adventitious root formation *in vitro* in *Malus* 'Jork 9'. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 49, 39-44.
- DE KLERK, G.J., HANEČÁKOVÁ, J. and JASIK, J. (2001). The role of cytokinins in rooting of stem slices cut from apple microcuttings. *Plant Biosyst.*, 135, 79-84.
- DEBERGH, P., AITKEN-CHRISTIE, J., COHEN, D., GROUT, B., VON ARNOLD, S., ZIMMERMAN, R. and ZIV, M. (1992). Reconsideration of the term 'vitrification' as used in micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 30, 135-140.
- DENISSEN, C.J.M., DE KLERK, G.J., ALBERS, M.R.J., TER BRUGGE, J. and KUNNEMAN, B.P.A.M. (1992). Effect of accidental factors on rooting of *Malus* Golden Delicious. *Agronomie*, 12, 799-802.
- DEORA, N.S. and SHEKHAWAT, N.S. (1995). Micropropagation of *Capparis decidua* (Forsk.) Edgew.- a tree of arid horticulture. *Plant Cell Reports*, 15, 278-281.
- DHAR, U. and UPRETI, J. (1999). *In vitro* regeneration of a mature leguminous liana (*Bauhinia vahlii* Wight & Arnott). *Plant Cell Reports*, 18, 664-669.
- DHAR, U., UPRETI, J. and BHATT, I.D. (2000). Micropropagation of *Pittosporum napaulensis* (DC.) Rehder & Wilson - a rare, endemic Himalayan medicinal tree. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 63, 231-235.
- DÍAZ-PÉREZ, J.C., SHACKEL, K.A. and SUTTER, E.G. (1995a). Effects of *in vitro*-formed roots and acclimatization on water status and gas exchange of tissue-cultured apple shoots. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 120(3), 435-440.

- DÍAZ-PÉREZ, J.C., SUTTER, E.G. and SHACKEL, K.A. (1995b). Acclimatization and subsequent gas exchange, water relations, survival and growth of microcultured apple plantlets after transplanting them in soil. *Physiologia Plantarum*, 95, 225-232.
- DIEKELMANN, J. and SCHUSTER, R.M. (2002). Natural landscaping. Designing with native plant communities. 2nd edition. University of Wisconsin Press, Canada.
- DILLEN, W. and BUYSSENS, S. (1989). A simple technique to overcome vitrification in *Gypsophila paniculata* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 19, 181-188.
- DOBRANSZKI, J., ABDUL-KADER, A., MAGYAR-TABORI, K., JAMBOR-BENCZUR, E., BUBAN, T. and SZALAI, J. *et al.* (2000). *In vitro* shoot multiplication of apple: comparative response of three rootstocks to cytokinins and auxin. *International Journal of Horticultural Science*, 6, 36-39.
- DOBRÁNSZKI, J. and TEXEIRA da SILVA, J.A. (2010). Micropropagation of apple - A review. *Biotechnology Advances*, 28, 462-488.
- DRUART, P. (1997). Optimization of culture media for *in vitro* rooting of *Malus domestica* Borkh. cv. Compact Spartan. *Biologia Plantarum*, 39(1), 67-77.
- DUMAS, E. and MONTEUUIS, O. (1995). *In vitro* rooting of micropropagated shoots from juvenile and mature *Pinus pinaster* explants: influence of activated charcoal. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 40, 231-235.
- ĐURKOVIČ, J. and MIŠALOVÁ, A. (2009). Wood formation during *ex vitro* acclimatization in micropropagated true service tree (*Sorbus domestica* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 96, 343-348.
- DZIUBIAK, M. (2004). Collection of the genus *Malus* Mill. in the Botanical Garden of the Polish Academy of Science in Warsaw. *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research*, special ed., 12, 121-128.
- ELLIOT, W.R., JONES, D.L. and BLAKE, T.L. (1980<1997>). *Encyclopaedia of Australian plants suitable for cultivation*. Ten volumes. Lothian Publishing Co. Pty. Ltd., Melbourne.
- ERIG, A.C., SCHUCH, M.W., DA SILVA, L.C. and BRAGA, E.J.B. (2002). Nitrogen and growth regulators on *in vitro* multiplication of apple cv. Fuji. *Revista Científica Rural*, 7 (1), 66-73.
- EVERT, R.F. (2006). *Esau's plant anatomy. Meristems, cells and tissues of the plant body: their structure, function and development*. 3rd edition. John Wiley and Sons Inc, New Jersey, p. 56-58.

- FAHN, A. (1982). Plant anatomy. Third edition. Pergamon Press, England, p. 23-24.
- FAMIANI, F., FERRADINI, N., STAFFOLANI, P. and STANDARDI, A. (1994). Effect of leaf excision time and age, BA concentration and dark treatments on *in vitro* shoot regeneration of M.26 apple rootstock. Journal of Horticultural Science, 69 (4), 679-685.
- FASOLO, F., ZIMMERMAN, R.H. and FORDHAM, I. (1989). Adventitious shoot formation on excised leaves of *in vitro* grown shoots of apple cultivars. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 16, 75-87.
- FAY, M.F. (1994). In what situations is *in vitro* culture appropriate to plant conservation? Biodiversity and Conservation, 3, 176-183.
- FERRI, V.C., CENTELLAS, A.Q., HELBIG, V.E. and FORTES, G.R. de L. (1998). Use of agar, starch and indole butyric acid for *in vitro* rooting of apple rootstock MM. 111. Ciência Rural, 28(4), 561-565.
- FEYISSA, T., WELANDER, M. and NEGASH, L. (2005). Micropropagation of *Hagenia abyssinica*: a multipurpose tree. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 80(2), 119-127.
- FIOLA, J.A., HASSAN, M.A., SWARTZ, H.J., BORS, R.H. and MCNICOLS, R. (1990). Effect of thidiazuron, light fluence rates and kanamycin on *in vitro* shoot organogenesis from excised *Rubus* cotyledons and leaves. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 20, 223-228.
- FRÁGUAS, C.B., PASQUAL, M., DUTRA, L.F. and CAZETTA, J.O. (2004). Micropropagation of fig (*Ficus carica* L.) 'Roxo de Valinhos' plants. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant, 40(5), 471-474.
- FRIESE, M.A. and BANERJEE, S. (1992). Lignin determination by FT-IR. Applied Spectroscopy, 46(2), 246-248.
- GASPAR, T., KEVERS, C., HAUSMAN, J.F., BERTHON, J.Y. and RIPETTI, V. (1992). Practical uses of peroxidase activity as a predictive marker of rooting performance of micropropagated shoots. Agronomie, 12, 757-765.
- GASPAR, T., KEVERS, C., PENEL, C., GREPPIN, H., REID, D.M. and THORPE, T.A. (1996). Review. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant, 32, 272-289.
- GOLOŠIN, B. and RADOJEVIĆ, L. (1987). Micropropagation of apple rootstocks. Acta Horticulturae, 212, 589-594.

- GOMES, G.A.C., PAIVA, R., PAIVA, P.D.O. and DE SANTIAGO, E.J.A. (2003). Plant regeneration from callus cultures of *Maclura tinctoria*, an endangered woody species. In *Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 39, 293-295.
- GONÇALVES, S. and ROMANO, A. (2005). Micropropagation of *Drosophyllum lusitanicum* (Dewy pine) an endangered West Mediterranean endemic insectivorous plant. *Biodiversity and Conservation*, 14, 1071-1081.
- GONÇALVES, S., FERNANDES, L. and ROMANO, A. (2010). High-frequency *in vitro* propagation of the endangered species *Tuberaria major*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 101(3), 359-363.
- GREENWOOD, M.S. (1987). Rejuvenation of forest trees. *Plant Growth Regulation*, 6, 1-12.
- GRESSHOFF, P.M. and DOY, C.H. (1972). Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (tomato). *Planta*, 107, 161-170.
- GRIBBLE, K. (1999). The influence of relative humidity on vitrification, growth and morphology of *Gypsophila paniculata* L. *Plant Growth Regulation*, 27, 179-188.
- GRIGORIADOU, K., KRIGAS, N. and MALOUPA, E. (2011). GIS-facilitated *in vitro* propagation and *ex situ* conservation of *Achillea occulta*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 107, 531-540.
- GUAN, H. and DE KLERK, G.J. (2000). Stem segments of apple microcuttings take up auxin predominantly via the cut surface and not via the epidermal surface. *Scientia Horticulturae*, 86, 23-32.
- GUO, B., ABBASI, B.H., ZEB, A., XU, L.L., WEI, Y.H. (2011). Thidiazuron: a multi-dimensional plant growth regulator. *African Journal of Biotechnology*, 10, 8984-9000.
- HARBAGE, J.F. and STIMART, D.P. (1996a). Ethylene does not promote adventitious root initiation on apple microcuttings. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121 (5), 880-885.
- HARBAGE, J.F. and STIMART, D.P. (1996b). Effect of pH and 1H-indole-3-butyric acid (IBA) on rooting of apple microcuttings. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 121 (6), 1049-1053.
- HARBAGE, J.F., STIMART, D.P. and EVERT, R.F. (1993). Anatomy of adventitious root formation in microcuttings of *Malus domestica* Borkh. 'Gala'. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 118(5), 680-688.
- HARPER-LORE, B.L. (1996). Using native plants as problem-solvers. *Environmental Management*, 20, 827-830.

- HARPER-LORE, B. and WILSON, M. (2000). Roadside use of native plants. Island Press, Canada.
- HAZARIKA, B.N. 2003. Acclimatization of tissue-cultured plants. *Current Science* 85(12): 1704-1712.
- HAZARIKA, B.N. 2006. Review. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. *Scientia Horticulturae*, 108: 105-120.
- HELFAND, G.E., PARK, J.S., NASSAUER, J.I. and KOSEK, S. (2006). The economics of native plants in residential landscape designs. *Landscape and Urban Planning*, 78, 229-240.
- HOEBEE, S.E., ARNOLD, U., DÜGGELIN, C., GUGERLI, F., BRODBECK, S., ROTACH, P. and HOLDEREGGER, R. (2007). Mating patterns and contemporary gene flow by pollen in a large continuous and a small isolated population of the scattered forest tree *Sorbus torminalis*. *Heredity*, 99, 47-55.
- HOSNI, A.M. (2001). Increasing the potential of *in vitro* propagation of *Strelitzia reginae* Ait. by controlling oxidative browning of explants tissues. *Arab Universities Journal of agricultural Sciences*, 9(2), 839-852.
- HOU, JING-WEI, GUO, SU-JUAN and WANG, GUI-YUN (2010). Effects of *in vitro* subculture on the physiological characteristics of adventitious root formation of *Castanea mollissima* cv ‘yanshanhong’. *Journal of Forestry Research*, 21(2), 155-160.
- HU, C.Y. and WANG, P.G. (1983). Meristem, shoot tip and bud culture. In: Evans DA, Sharp WR, Ammirato PV, Yamada Y (eds) *Handbook of plant cell culture*, Vol. 1, Macmillan, New York, 177-227.
- HUETTEMAN, C.A. and PREECE, J.E. (1993). Thidiazuron: a potent cytokinin for woody plant tissue culture. *Plant Cell, tissue and Organ Culture*, 33, 105-119.
- HUTCHINSON, J.F. (1984). Factors affecting shoot proliferation and root initiation in organ cultures of the apple ‘Northern Spy’. *Scientia Horticulturae*, 22, 347-358.
- IBAÑEZ, M.R. and AMO-MARCO, J.B. (1998). Promotion by phloroglucinol of micropropagation of *Minuartia valentina*, an endangered and endemic Spanish plant. *Plant Growth Regulation*, 26, 49-56.
- IRVANI, N., SOLOUKI, M., OMIDI, M., ZARE, A.R. and SHAHNAZI, S. (2010). Callus induction and plant regeneration in *Dorema ammoniacum* D., an endangered medicinal plant. *Plant Cell, Tissue and Organ culture*, 100(3), 293-299.

- ITURRIAGA, L., JORDAN, M., ROVERARO, C. and GOREUX, A. (1994). *In vitro* culture of *Sophora toromiro* (Papilionaceae), an endangered species. *Plant Cell, tissue and Organ Culture*, 37, 201-204.
- IVANOVA, M. and VAN STADEN, J. (2011). Influence of gelling agent and cytokinins on the control of hyperhydricity in *Aloe polyphylla*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 104(1), 13-21.
- JÁMBOR-BENCZÚR, E., ONADI, K., KISSIMON, J. and HORVÁTH, G. (1997). The effect of carbon source on *in vitro* multiplication, photosynthesis and anatomical structure of *Sorbus rotundifolia* L. *Acta Horticulturae*, 447, 157-159.
- JAMES, D.J. and THURBON, I.J. (1979). Rapid *in vitro* rooting of the apple rootstock M.9. *Journal of Horticultural Science*, 54 (4), 309-311.
- JAMES, D.J. and THURBON, I.J. (1981). Shoot and root initiation *in vitro* in the apple rootstock M.9 and the promotive effects of phloroglucinol. *Journal of Horticultural Science*, 56 (1), 15-20.
- JIHYAE, J., BYEONGWOO, Y., JUNGHWAN, H. and YONGUK, S. (1997). Plant regeneration from leaf tissue of *Malus domestica* cv. 'Fuji' *in vitro*. *RDA Journal of Horticulture Science*, 39 (2), 102-105.
- JONES, O.P. and HATFIELD, S.G.S. (1976). Root initiation in apple shoots cultured *in vitro* with auxins and phenolic compounds. *Journal of Horticultural Science*, 51, 495-499.
- JONES, O.P., HOPGOOD, M.E. and O'FARRELL, D. (1977). Propagation *in vitro* of M.26 apple rootstocks. *Journal of Horticultural Science*, 52, 235-238.
- KADOTA, M. and NIIMI, Y. (2003). Effects of cytokinin types and their concentrations on shoot proliferation and hyperhydricity in *in vitro* pear cultivar shoots. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72, 261-265.
- KANAKIS, C.D., PETRAKIS, E.A., KIMBARIS, A.C., PAPPAS, C., TARANTILIS, P.A. and POLISSIOU, M.G. (2012). Classification of Greek *Mentha pulegium* L. (pennyroyal) samples, according to geographical location by Fourier transform infrared spectroscopy. *Phytochemical analysis*, 23, 34-43.
- KARTSONAS, E. and PAPAFOITIOU, M. (2007). Mother plant age and seasonal influence on *in vitro* propagation of *Quercus euboica* Pap., an endemic, rare and endangered oak species of Greece. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 90, 111-116.
- KARTSONAS, E. and PAPAFOITIOU, M. (2009). Micropropagation of *Quercus euboica* Pap., a rare endemic oak species in Greece. *Acta Hort.*, 485-490.

- KATAEVA, N.V. and BUTENKO, R.G. (1987). Clonal micropropagation of apple trees. *Acta Horticulturae*, 212, 585-588.
- KATAEVA, N.V., ALEXANDROVA, I.G., BUTENKO, R.G. and DRAGAVTCEVA, E.V. (1991). Effect of applied and internal hormones on vitrification and apical necrosis of different plants cultured *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 27, 149-154.
- KAUSHAL, N., MODGIL, M., THAKUR, M. and SHARMA, D.R. (2005). *In vitro* clonal multiplication of an apple rootstock by culture of shoot apices and axillary buds. *Indian J Exp Biol* 43: 561-565.
- KELEN, M. and OZKAN, G. (2003). Relationships between rooting ability and changes of endogenous IAA and ABA during rooting of hardwood cuttings of some grapevine rootstocks. *European Journal of Horticultural Science*, 68(1), 8-13.
- KEVERS, C., FRANCK, T., STRASSER, R.J., DOMMES, J. and GASPAR, T. (2004). Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 77, 181-191.
- KHURANA, P., BHATNAGAR, S., KUMARI, S. (2005). Thidiazuron and woody plant tissue culture. *Journal of Plant Biology*, 32, 1-12.
- KORBAN, S.S., O'CONNOR, P.A. and ELOBEIDY, A. (1992). Effects of thidiazuron, naphthaleneacetic acid, dark incubation and genotype on shoot organogenesis from *Malus* leaves. *Journal of Horticultural Science*, 67(3), 341-349.
- KOUIDER, M., KORBAN, S.S., SKIRVIN, R.M. and CHU, M.C. (1984a). Influence of embryonic dominance and polarity on adventitious shoot formation from apple cotyledons *in vitro*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 109(3), 381-385.
- KOUIDER, M., SKIRVIN, R.M., KORBAN, S.S., WIDHOLM, J.M. and HAUPTMANN, R. (1984b). Adventitious shoot formation from Red Delicious apple cotyledons *in vitro*. *Journal of Horticultural Science*, 59(3), 295-302.
- KOUIDER, M., KORBAN, S.S., SKIRVIN, R.M. and JOUNG, H. (1985). The relationship of apple embryos and their cotyledons to maturity, dormancy, and the potential to form shoots *in vitro*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 110(1), 93-96.
- KOZAI, T. (1991). Micropropagation under photoautotrophic conditions. In: Deberg, P. and Zimmerman, R.H. (Eds). *Micropropagation: Technology and Application*. Kluwer Academic Publ., Dordrecht, pp 449-471.

- KOZAI, T., KUBOTA, C. and JEONG, B.R. (1997). Environmental control for the large-scale production of plants through *in vitro* techniques. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 51, 49-56.
- KRIGAS, N., MOUFLIS, G., GRIGORIADOU, K. and MALOUPA, E. (2010). Conservation of important plants from the Ionian Islands at the Balkan Botanic Garden of Kroussia, N. Greece: using GIS to link the *in situ* collection data with plant propagation and *ex situ* cultivation. *Biodivers. Conserv.*, 19, 3583-3603.
- LANE, W.D. (1992). Micropropagation of apple (*Malus domestica* Borkh.). In: BAJAJ, Y.P.S. (ed), *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol. 18. High-tech and micropropagation II. Springer-Verlag, Berlin, pp. 229-243.
- LANE, W.D. and McDOUGALD, J.M. (1982). Shoot tissue culture of apple: comparative response of five cultivars to cytokinin and auxin. *Canadian Journal of Plant Science*, 62, 689-694.
- LANE, W.D., IKETANI, H. and HAYASHI, T. (1998). Shoot regeneration from cultured leaves of Japanese pear (*Pyrus pyrifolia*). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 54, 9-14.
- LASZLOFFY, K., ABDUL KADER, A.M. and MATHÉ, A. (1991). *In vitro* propagation of 'Julyred' apple. *Acta Horticulturae*, 300, 149-154.
- LEBLAY, C., CHEVREAU, E. and RABOIN, L.M. (1991). Adventitious shoot regeneration from *in vitro* leaves of several pear cultivars (*Pyrus communis* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 25, 99-105.
- LINKER, R. and TSROR, L. (2008). Discrimination of soil-borne fungi using Fourier transform infrared attenuated total reflection spectroscopy. *Society for Applied Spectroscopy*, 62, 302-305.
- LINSMAIER, E.M. and SKOOG, F. (1965). Organic growth factor requirements of tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 18, 100-127.
- LIU, P.Z., HE, S.T., HAN, L.X. and WANG, J.S. (1991). Study on rooting techniques for apple *in vitro*. *Journal of Fruit Science*, 8(3), 139-144.
- LLOYD, G.B. and MCCOWN, B.H. (1980). Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel (*Kalmia latifolia*) by use of shoot-tip culture. *Proceeding of International Plant Propagation Society*, 30, 421-427.
- LU, C.Y. (1993). The use of thidiazuron in tissue culture. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 29(2), 92-96.
- MA, F.W., WANG, J.C. and RONG, W. (1990). Effects of plant growth regulators on *in vitro* propagation of apple cultivar Fuji. *Journal of Fruit Science*, 7(4), 201-206.

- MAGYAR-TÁBORI, K., DOBRÁNSZKI, J., JÁMBOR-BENCZÚR, E., LAZÁNYI, J., SZALAI, J. and FERENCZY, A. (2002). Effects of indole-3-butyric acid levels and activated charcoal on the rooting of *in vitro* shoots of apple rootstocks. *International Journal of Horticultural Science*, 8 (3-4), 25-28.
- MAGYAR-TÁBORI, K., DOBRÁNSZKI, J., TEXEIRA DA SILVA, J.A., BULLEY, S.M. and HUDÁK, I. (2010). The role of cytokinins in shoot organogenesis in apple. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 101, 251-267.
- MAGYAR-TÁBORI, K., DOBRÁNSZKI, J. and HUDÁK, I. (2011). Effect of cytokinin content of regeneration media on *in vitro* rooting ability of adventitious apple shoots. *Scientia Hort.*, 129, 910-913.
- MAKUNGA, N.P., JÄGER, A.K. and VAN STADEN, J. (2006). Improved *in vitro* rooting and hyperhydricity in regenerating tissues of *Thapsia garganica* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 86, 77-86.
- MAKUNGA, N.P. and VAN STADEN, J. (2008). An efficient system for the production of clonal plantlets of the medicinally important aromatic plant: *Salvia africana-lutea*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 92, 63-72.
- MALÁ, J. and BYLINSKY, V. (2004). Micropropagation of endangered *Daphne cneorum*. *Biologia Plantarum*, 48(4), 633-636.
- MALÁ, J., CVRČKOVÁ, H., MÁCHOVÁ, P. and SIMÁ, P. (1999). Use of micropropagation for the conservation of valuable populations of noble hardwoods. *Zprávy Lesnického Výzkumu*, 44(4), 6-10.
- MALÁ, J., MÁCHOVÁ, P., CVRČKOVÁ, H., KARADY, M., NOVÁK, O., MIKULÍK, J., HAUSEROVÁ, E., GREPLOVÁ, J., STRNAD, M. and DOLEŽAL, K. (2009). Micropropagation of wild service tree (*Sorbus torminalis* [L.] Crantz): The regulative role of different aromatic cytokinins during organogenesis. *J. Plant Growth Regul.*, 28, 341-348.
- MALDA, G., SUZÁN, H. and BACKHAUS, R. (1999). *In vitro* culture as a potential method for the conservation of endangered plants possessing crassulean acid metabolism. *Scientia Horticulturae*, 81, 71-87.
- MALOUPA, E., GRIGORIADOU, K., PAPANASTASSI, K. and KRIGAS, N. (2008). Conservation, propagation, development and utilization of xerophytic species of the native Greek flora towards commercial floriculture. *Acta Hort.*, 766, 205-214.

- MALOUPA, E., GRIGORIADOU, K., ZERVAKI, D. and PAPANASTASSI, K. (2005). Management of the Balkan native flora for sustainable floricultural commercial use. *Acta Hort.*, 683, 189-196.
- MANGANARIS, A.G. and ALSTON, F.H. (1992). Genetics of esterase isoenzymes in *Malus*. *Theor. Appl. Genet.*, 83, 467-475.
- MARGA, F., VEBRET, L. and MORVAN, H. (1997). Agar fractions could protect apple shoots cultured in liquid media against hyperhydricity. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 49, 1-5.
- MARIN, J.A., JONES, O.P. and HADLOW, W.C.C. (1993). Micropropagation of columnar apple trees. *Journal of Horticultural Science*, 68(2), 289-297.
- MARKS, T.R. and MYERS, P.E. (1992a). Evidence for bud origin influencing performance during micropropagation. *Acta Horticulturae*, 314, 205-212.
- MARKS, T.R. and MYERS, P.E. (1992b). Effect of explant location upon early culture development *in vitro*. *Journal of Horticultural Science*, 67(5), 583-591.
- MARKS, T.R. and MYERS, P.E. (1994). Physiological variability arising from *in vitro* culture is induced by shoot selection and manipulation strategies. *Journal of Horticultural Science*, 69 (1), 1-9.
- MARN, M. (1988). Effect of phytohormones on *in vitro* multiplication and shoot lengthening in the apple varieties Majda and Golden Delicious. *Jugoslovensko Vocarstvo*, 22 (4), 417-422.
- MARQUES, A.V., PEREIRA, H., MEIER, D. and FAIX, O. (1994). Quantitative analysis of cork (*Quercus suber* L.) and milled cork lignin by FTIR spectroscopy, analytical pyrolysis, and total hydrolysis. *Holzforschung*, 48(1), 43-50.
- MARTIN, K.P. (2002). Rapid propagation of *Holostemma ada-kodien* Schult., a rare medicinal plant, through axillary bud multiplication and indirect organogenesis. *Plant Cell Reports*, 21, 112-117.
- MAUSETH, J.D. (1988). *Plant anatomy*. The Benjamin/ Cummings Publishing Company Inc, USA, p. 32-34, 189-193.
- McCARTAN, S.A. and VAN STADEN, J. (2003). Micropropagation of the endangered *Kniphofia leucocephala* Baijnath. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 39(5), 496-499.
- McCLELLAND, M.T. and SMITH, M.A.L. (1990). Vessel type, closure, and explant orientation influence *in vitro* performance of five woody species. *HortScience*, 25 (7), 797-800.

- MESSEGUER, J. and MELÉ, E. (1987). *In vitro* propagation of adult material and seedlings of *Corylus avellana*. *Acta Horticulturae*, 212, 499-504.
- METCALF, L. (2007). The propagation of New Zealand native plants. Revised edition. Godwit Publishing, New Zealand.
- MIGUEL, C.M., DRUART, P. and OLIVEIRA, M.M. (1996). Shoot regeneration from adventitious buds induced on juvenile and adult almond (*Prunus dulcis* Mill.) explants. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 32, 148-153.
- MINGHAO, C., YUNGUI, Z. and XIAOLIN, L. (2000). Studies on the flora of the genus *Malus* Mill. *Acta Horticulturae Sinica*, 27, 469-474.
- MODGIL, M., SHARMA, D.R. and BHARDWAJ, S.V. (1999). Micropropagation of apple cv. Tydeman's Early Worcester. *Scientia Horticulturae*, 81, 179-188.
- MOHACEK-GROSEV, V., BOZAC, R. and PUPPELS, G.J. (2001). Vibrational spectroscopic characterization of wild growing mushrooms and toadstools. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, 57, 2815-2829.
- MONDAL, T.K., BHATTACHARYA, A., SOOD A. and AHUJA, P.S. (1998). Micropropagation of tea (*Camelia sinensis* (L.) O. Kuntze) using Thidiazuron. *Plant Growth Regulation*, 26(1), 57-61.
- MONTECELLI, S., GENTILE, A. and DAMIANO, C. (2000). *In vitro* shoot regeneration of apple cultivar Gala. *Acta Horticulturae*, 530, 219-223.
- MONTEUUIS, O. (2004). *In vitro* micropropagation and rooting of *Acacia mangium* microshoots from juvenile and mature origins. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant* 40(1): 102-107.
- MONTEUUIS, O. and BON, M.-C. (2000). Influence of auxins and darkness on *in vitro* rooting of micropropagated shoots from mature and juvenile *Acacia mangium*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 63(3), 173-177.
- MORAES, L.M., FARIA, R.T. and CUQUEL, F.L. (2005). Activated charcoal for *in vitro* propagation of Brazilian orchids. *Acta Horticulturae*, 683, 383-390.
- MORINI, S. and CONCETTI, S. (1985). *In vitro* propagation of P.S. B2 peach rootstock. *Acta Horticulturae*, 173, 205-210.
- MOURA-COSTA, P.H., VIANA. A.M. and MANTELL, S.H. (1993). *In vitro* plantlet regeneration of *Ocotea catharinensis*, an endangered Brazilian hardwood forest tree. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 35, 279-286.

- MULLIN, R.H., SMITH, S.H., FRAZIER, N.W., SCHLEGEL, D.E. and McCALL, S.R. (1974). Meristem cultures free Strawberries of mild yellow edge, Pallidosis and Mottle Diseases. *Phytopathology*, 64, 1425-1429.
- MULLINS, M.G., NAIR, Y. and SAMPET, P. (1979). Rejuvenation *in vitro*: induction of juvenile characters in an adult clone of *Vitis vinifera* L. *Annals of Botany*, 44, 623-627.
- MURASHIGE, T. and SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497.
- MURTHY, B.N.S., MURCH, S.J. and SAXEVA, P.K. (1998). Review. Thidiazuron: a potent regulator of *in vitro* plant morphogenesis. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 34, 267-275.
- MUTHAN, S.B., RATHORE, T.S. and RAI, V.R. (2006). Micropropagation of an endangered Indian sandalwood (*Santalum album* L.). *Journal of Forest Research*, 11(3), 203-209.
- MYERS, N., MITTERMEIER, R.A., MITTERMEIER, C.G., DA FONSECA, G.A.B. and KENT, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature*, 403, 853-858.
- NAIJA, S., ELLOUMI, N., JBIR, N., AMMAR, S. and KEVERS, C. (2008). Anatomical and biochemical changes during adventitious rooting of apple rootstocks MM 106 cultured *in vitro*. *C. R. Biologies*, 331, 518-525.
- NAIK, S.K., PATTNAIK, S. and CHAND, P.K. (1999). *In vitro* propagation of pomegranate (*Punica granatum* L. cv. Ganesh) through axillary shoot proliferation from nodal segments of mature tree. *Scientia Horticulturae*, 79(3-4), 175-183.
- NAUMANN, A., NAVARRO-GONZALEZ, M., PEDDIREDDI, S., KÓES, U. and POLLE, A. (2005). Fourier transform infrared microscopy and imaging: detection of fungi in wood. *Fungal Genetics and Biology*, 42, 829-835.
- NOBRE, J. (1996). *In vitro* cloning and micropropagation of *Lavandula stoechas* from field-grown plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 46, 151-155.
- NOITON, D., VINE, J.H. and MULLINS, M.G. (1992). Effects of serial subculture *in vitro* on the endogenous levels of indole-3-acetic acid and abscisic acid and rootability in microcuttings of 'Jonathan' apple. *Plant Growth Regulation*, 11, 377-383.
- NORMAH, M.N., HAMIDAH, S. and GHANI, F.D. (1997). Micropropagation of *Citrus halimii* - an endangered species of South-east Asia. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 50, 225-227.

- NORMAH, M.N., NOR-AZZA, A.B. and ALIUDIN, R. (1995). Factors affecting *in vitro* shoot proliferation and *ex vitro* establishment of mangosteen. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 43(3), 291-294.
- ÖRDÖGH, M., JÁMBOR-BENCZÚR, E., TILLY-MÁNDY, A. and LELIK, L. (2006). The effects of growth regulators in proliferation of *Sorbus redliana* 'Burokvölgy'. *Int. J. of Hort. Sci.*, 12(1), 77-83.
- ORLIKOWSKA, T. (1987). Vitrification problem in the *in vitro* culture of fruit tree rootstocks. *Acta Horticulturae*, 212, 239-244.
- OWEN, N.L. and THOMAS, D.W. (1989). Infrared studies of "hard" and "soft" woods. *Applied Spectroscopy*, 43, 451-455.
- OZEL, C.A., KHAWAR, K.M., MIRICI, S., OZCAN, S. and ARSLAN, O. (2006). Factors affecting *in vitro* plant regeneration of the critically endangered Mediterranean knapweed (*Centaurea tchihatcheffii* Fitch et Mey). *Naturwissenschaften*, 93(10), 511-517.
- PAEK, K.Y., YU, K.J., PARK, S.I., SUNG, N.S. and PARK, C.H. (1995). Micropropagation of *Rehmannia glutinosa* as medicinal plant by shoot tip and root segment culture. *Acta Horticulturae*, 390, 113-120.
- PAN, M.J. and VAN STADEN, J. (1998). The use of charcoal in *in vitro* culture – A review. *Plant Growth Regulation*, 26, 155-163.
- PANAIA, M., SENARATNA, T., BUNN, E., DIXON, K.W. and SIVASITHAMPARAM, K. (2000). Micropropagation of the critically endangered Western Australian species, *Symonanthus bancroftii* (F. Muell.) L. Haegi (Solanaceae). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 63, 23-29.
- PANDEY, K.K. (1999). Study of chemical structure of soft and hardwood and wood polymers by FTIR spectroscopy. *J. Appl. Polym. Sci.*, 71, 1969-1975.
- PANDEY, K.K. and PITMAN, A.J. (2003). FTIR studies of the changes in wood chemistry following decay by brown-rot and white-rot fungi. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 52(3), 151-160.
- PANDEY, K.K. and PITMAN, A.J. (2004). Examination of the lignin content in a softwood and a hardwood decayed by a brown-rot fungus with acetyl bromide method and Fourier transform infrared spectroscopy. *J. Polym. Sci. A Polym. Chem.*, 42(10), 2340-2346.
- PAPAFOTIOU, M. (2010). *In vitro* propagation of temperate zone woody plants with potential ornamental use. *Acta Horticulturae*, 885, 255-262.

- PAPAFOTIOU, M. and KALANTZIS, A. (2009a). Seed germination and *in vitro* propagation of *Sideritis athoa*. *Acta Horticulturae*, 813, 471-476.
- PAPAFOTIOU, M. and KALANTZIS, A. (2009b). Studies on *in vitro* propagation of *Lithodora zahnii*. *Acta Horticulturae*, 813, 465-470.
- PAPAFOTIOU, M. and MARTINI, A.N. (2009a). Effect of growth medium on *in vitro* regeneration of *X Malosorbus florentina* Zucc. *Acta Horticulturae*, 813: 497-501.
- PAPAFOTIOU, M. and MARTINI, A.N. (2009b). Effect of season and sterilization method on response of *X Malosorbus florentina* (Zucc.) Browicz (Rosaceae) buds to *in vitro* culture. *Acta Horticulturae*, 813: 503-508.
- PAPPAS, C., TARANTILIS, P.A. and POLISSIOU, M. (1998). Determination of kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) lignin in crude plant material using diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy. *Applied Spectroscopy*, 52, 1399-1402.
- PAPPAS, C.S., TAKIDELLI, C., TSANTILI, E., TARANTILIS, P.A. and POLISSIOU, M.G. (2011). Quantitative determination of anthocyanins in three sweet cherry varieties using diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy. *Journal of Food Composition and analysis*, 24, 17-21.
- PAPPAS, C.S., TARANTILIS, P.A., HARIZANIS, P.C. and POLISSIOU, M.G. (2003). New method for pollen identification by FT-IR spectroscopy. *Society for Applied Spectroscopy*, 57, 23-27.
- PAPPAS, C.S., TARANTILIS, P.A., MOSCHOPOULOU, E., MOATSOU, G., KANDARAKIS, I. and POLISSIOU, M.G. (2008). Identification and differentiation of goat and sheep milk based on diffuse reflectance infrared Fourier transform spectroscopy (DRIFTS) using cluster analysis. *Food Chemistry*, 106, 1271-1277.
- PÂQUES, M. and BOXUS, P. (1987a). A model to learn “vitrification”, the rootstock apple M.26 present results. *Acta Horticulturae*, 212, 193-197.
- PÂQUES, M. and BOXUS, P. (1987b). Vitrification: a phenomenon related to tissue water content? *Acta Horticulturae*, 212, 245-252.
- PÂQUES, M. and BOXUS, P. (1987c). Vitrification: review of literature. *Acta Horticulturae*, 212, 155-166.
- PARADKAR, M.M. and IRUDAYARAJ, J. (2002). Rapid determination of caffeine content in soft drinks using FTIR-ATR spectroscopy. *Food Chemistry*, 78(2), 261-266.

- PARK, S.W., JEON, J.H., KIM, H.S., PARK, Y.M., ASWATH, C. and JOUNG, H. (2004). Effect of sealed and vented gaseous microenvironments on the hyperhydricity of potato shoots *in vitro*. *Scientia Horticulturae*, 99, 199-205.
- PARVEEN S. and SHAHZAD A. (2010). TDZ-induced high frequency shoot regeneration in *Cassia sophera* Linn. via cotyledonary node explants. *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 16, 201-206.
- PASQUALETTO, P.L., ZIMMERMAN, R.H. and FORDHAM, I. (1986). Gelling agent and growth regulator effects on shoot vitrification of 'Gala' apple *in vitro*. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 111 (6), 976-980.
- PASQUALETTO, P.L., ZIMMERMAN, R.H. and FORDHAM, I. (1988). The influence of cation and gelling agent concentrations on vitrification of apple cultivars *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 14, 31-40.
- PATZ, C.D., BLIEKE, A., RISTOW, R. and DIETRICH, H. (2004). Application of FT-MIR spectrometry in wine analysis. *Analytica. Chimica. Acta* , 513, 81-89.
- PAUNESCU, A. (2009). Biotechnology for endangered plant conservation: A critical review. *Romanian Biotechnological Letters*, 14(1), 4095-4103.
- PAWLICKI, N. and WELANDER, M. (1992). The effect of benzyladenine and gibberellic acid on adventitious root formation in apple stem discs. *Agronomie*, 12, 783-788.
- PAWLICKI, N. and WELANDER, M. (1994). Adventitious shoot regeneration from leaf segments of *in vitro* cultured shoots of the apple rootstock Jork 9. *Journal of horticultural Science*, 69(4), 687-696.
- PAWLICKI, N. and WELANDER, M. (1995). Influence of carbohydrate source, auxin concentration and time of exposure on adventitious rooting of apple rootstock Jork 9. *Plant Science*, 106, 167-176.
- PEDROTII, E.L. and VOLTOLINI, J.A. (2001). *Ex vitro* rooting and acclimatization of M. 9 apple rootstock. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 23(2), 234-239.
- PETRAKIS, E., KIMBARIS, A., PAPPAS, C., TARANTILIS, P. and POLISSIOU, M. (2009). Quantitative determination of 254 pennyroyal oil by FT-IR spectroscopy. *Journal Agricultural Food Chemistry*, 57, 10044-10048.
- PHAN, C.T. (1991). Vitreous state *in vitro* culture: ethylene versus cytokinin. *Plant Cell Reports*, 9, 517-519.

- PIERIK, R.L.M., OOSTERKAMP, J and EBBING, M.A.C. (1997). Factors controlling adventitious root formation of explants from juvenile and adult *Quercus robur* 'Fastigiata'. *Scientia Horticulturae*, 71(1-2), 87-92.
- PODWYSZYNSKA, M. and HEMPEL, M. (1988). The factors influencing acclimatization of *Rosa hybrida* plants multiplied *in vitro* to greenhouse conditions. *Acta Horticulturae*, 226, 639-642.
- POSPÍŠILOVÁ, J., TICHÁ, I., KADLEČEK, P., HAISEL, D. AND PLZÁKOVÁ, Š. (1999). Review. Acclimatization of micropropagated plants to *ex vitro* conditions. *Biol. Plant.* 42(4): 481-497.
- POSPÍŠILOVÁ, J., SYNKOVÁ, H., HAISEL, D. AND SEMORÁDOVÁ, Š. (2007). Acclimatization of plantlets to *ex vitro* conditions: Effects of air humidity, irradiance, CO₂ concentration and abscisic acid (a review). *Acta Hort.* 748: 29-38.
- PREECE J.E. and SUTTER E.G. (1991). Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: Debergh P.C., Zimmerman R.H. (eds). *Micropropagation. Technology and Application*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 71-93.
- PREECE, J.E., HUETTEMAN, C.A., PUELLO, C.H. and NEUMAN, M.C. (1987). The influence of thidiazuron on *in vitro* culture of woody plants. *HortScience*, 22 (5), 1071.
- PUENTE, J. and MARÍN, J.A. (1992). Splitting of *Malus* microcuttings enhances rooting. *Agronomie*, 12, 795-797.
- PUROHIT, S.D. and ASHISH, D. (1996). Micropropagation of *Sterculia urens* Roxb.- an endangered tree species. *Plant Cell Reports*, 15, 704-706.
- QURAIISHI, A. and MISHRA, S.K. (1998). Micropropagation of nodal explants from adult trees of *Cleistanthus collinus*. *Plant Cell Reports*, 17, 430-433.
- RADMANN, E.B., FACHINELLO, J.C. and PETERS, J.A. (2002). Effect of auxins and culture conditions on rooting *in vitro* of apple M.9 rootstock. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 24(3), 624-628.
- RASMUSSEN, K.K. and KOLLMANN, J. (2004). Poor sexual reproduction on the distribution limit of the rare tree *Sorbus torminalis*. *Acta Oecologica*, 25(3), 211-218.
- RASPÉ, O. and KOHN, J.R. (2002). S-allele diversity in *Sorbus aucuparia* and *Crataegus monogyna* (Rosaceae: Maloideae). *Heredity*, 88, 458-465.
- RODRIGUES, J., FAIX, O. and PEREIRA, H. (1998). Determination of lignin content of *Eucalyptus globulus* wood using FTIR spectroscopy. *Holzforschung*, 52(1), 46-50.

- ROHR R., ILIEV, I., SCALTSOYIANNES, A. and TSOULPHA, P. (2003). Acclimatization of micropropagated forest trees. *Acta Horticulturae*, 616, 59-69.
- ROMANO, A., BARROS, S. and MARTINS-LOUÇÃO, M.A. (2002). Micropropagation of the Mediterranean tree *Ceratonia siliqua*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 68, 35-41.
- ROSE, R., CHACHULSKI, C.E.C. and HAASE, D.L. (1998). Propagation of Pacific Northwest native plants. Oregon State University Press, Oregon.
- ROUSSOS, P.A. and PONTIKIS, C.A. (2001a). Oxidative browning in 'Koroneiki' olive explants as influenced by oxidative enzyme activities and endogenous phenolic compounds. *Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 76(4), 441-446.
- ROUSSOS, P.A. and PONTIKIS, C.A. (2001b). Phenolic compounds in olive explants and their contribution to browning during the establishment stage *in vitro*. *Gartenbauwissenschaft*, 66(6), 298-303.
- RUBLUO, A., CHÁVEZ, V., MARTÍNEZ, A.P. and MARTÍNEZ-VÁZQUEZ, O. (1993). Strategies for the recovery of endangered orchids and cacti through *in vitro* culture. *Biological Conservation*, 63(2), 163-169.
- SAADAT, Y.A. and HENNERTY, M.J. (2002). Factors affecting the shoot multiplication of Persian walnut (*Juglans regia* L.). *Scientia Horticulturae*, 95(3), 251-260.
- SALISBURY, F.B. and ROSS, C.W. (1992). *Plant physiology*. Fourth edition. Wadsworth, Inc., California, 372-381.
- SAMORODOVA-BIANKI, G.B., VITOKOVSKII, V.L., STREL'TSINA, S.A. and ROSTOVA, N.S. (1990). Use of multivariate analysis of biochemical characters to investigate the relationship between species of the genus *Malus* (Rosaceae). *Botanicheskii Zhurnal*, 75(2), 145-158.
- SANCHEZ, M.C., SAN-JOSE, M.C., BALLESTER, A. and VIEITEZ, A.M. (1996). Requirements for *in vitro* rooting of *Quercus robur* and *Q. rubra* shoots derived from mature trees. *Tree Physiology*, 16, 673-680.
- SANTOS, C., FRAGA, M.E., KOZAKIEWICZ, Z. and LIMA, N. (2010). Fourier transform infrared as a powerful technique for the identification and characterization of filamentous fungi and yeasts. *Research in Microbiology*, 161, 168-175.
- SARASAN, V., CRIPPS, R., RAMSAY, M.M, ATHERTON, C., McMICHEN, M., PRENDERGAST, G. and ROWNTREE, J.K. (2006). Conservation *in vitro* of threatened plants - Progress in the past decade. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*, 42, 206-214.

- SAVIC, J., DEVIC, M., GIBA, Z. and GRUBISIC, D. (2006). *In vitro* propagation of endangered relic plant species *Malosorbus florentina*. International Scientific Conference Sustainable Use of Forest Ecosystems – the Challenge of the 21st Century, 8-10 Nov 2006, Donji Milanovac, Serbia. Summary: 529-533.
- SCHENK, R.U. and HILDEBRANDT, A.C. (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Canadian Journal of Botany, 50, 199-204.
- SEENI, S. and LATHA, P.G. (1992). Foliar regeneration of the endangered Red Vanda, *Renanthera imschootiana* Rolfe (Orchidaceae). Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 29(3), 167-172.
- SENEVIRATNE, P., GAMMANALIYANAGE, S.S. and WIJESEKARA, G.A.S. (1998). The effect of the origin of the explants on *in vitro* growth of axillary buds of *Hevea brasiliensis*. Tropical Agricultural Research and Extension, 1(2), 98-102.
- SHA, L., McCOWN, B.H. and PETERSON, L.A. (1985). Occurrence and cause of shoot-tip necrosis in shoot cultures. Journal of the American Society for Horticultural Science, 110 (5), 631-634.
- SHARMA, M., MODGIL, M. and SHARMA, D.R. (2000). Successful propagation *in vitro* of apple rootstock MM106 and influence of phloroglucinol. Indian Journal of Experimental Botany, 38(12), 1236-1240.
- SHARMA, M., MODGIL, M. and THAKUR, M. (2007). Factors affecting induction and development of *in vitro* rooting in apple rootstocks. Indian Journal of Experimental Biology, 45(9), 824-829.
- SHARMA, N., CHANDEL, K.P.S. and ANDERSON, P. (1993). *In vitro* propagation of *Gentiana kurroo* an indigenous threatened plant of medicinal importance. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 34, 307-309.
- SHEKHAWAT, N.S., RATHORE, T.S., SINGH, R.P., DEORA, N.S. and RAO, S.R. (1993). Factors affecting *in vitro* clonal propagation of *Prosopis cineraria*. Plant Growth Regulation, 12, 273-280.
- SINELLI, N., SPINARDI, A., DI EGIDIO, V., MIGNANI, I. and CASIRAGHI, E. (2008). Evaluation of quality and nutraceutical content of blueberries (*Vaccinium corymbosum* L.) by near and mid-infrared spectroscopy. Postharvest Biology and Technology, 50(1), 31-36.

- SIVANESAN, I., SONG, J.Y., HWANG, S.J. and JEONG, B.R. (2011). Micropropagation of *Cotoneaster wilsonii* Nakai – a rare endemic ornamental plant. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 105(1), 55-63.
- SKOOG, D.A., HOLLER, F.J. and NIEMAN, T.A. (2005). Αρχές ενόργανης ανάλυσης. Πέμπτη έκδοση. Εκδόσεις Κωσταράκης Α.Ε., Αθήνα, σελ. 446-500.
- SONGLIN, H., DAOYU, Z., NINGHUI, R. and XIAN, W. (1996). A study on the relationship between apple shoot-tip culture and explants excision time. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 11 (supplement), 166-168.
- SRISKANDARAJAH, S. and MULLINS, G. (1981). Micropropagation of Granny Smith apple: factors affecting root formation *in vitro*. *Journal of Horticultural Science*, 56, 71-76.
- SRISKANDARAJAH, S., SKIRVIN, R.M. and ABU-QAOD, H. (1990a). The effect of some macronutrients on adventitious root development on scion apple cultivars *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 21, 185-189.
- SRISKANDARAJAH, S., SKIRVIN, R.M., ABU-QAOD, H. and KORBAN, S.S. (1990b). Factors involved in shoot elongation and growth of adventitious and axillary shoots of three apple scion cultivars *in vitro*. *Journal of Horticultural Science*, 65(2), 113-121.
- STANILOVA, M.I., ILCHEVA, V.P. and ZAGORSKA, N.A. (1994). Morphogenetic potential and *in vitro* micropropagation of endangered plant species *Leucojum aestivum* L. and *Lilium rhodopaeum* Delip. *Plant Cell Reports*, 13(8), 451-453.
- SUDARSONO and GOLDY, R.G. (1991). Growth regulator and axillary bud position effects on *in vitro* establishment of *Vitis rotundifolia*. *HortScience*, 26(3), 304-307.
- SUTTER, E. (1988). Stomatal and cuticular water loss from apple, cherry, and sweetgum plants after removal from *in vitro* culture. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 113 (2), 234-238.
- SWARTZ, H.J., BORS, R., MOHAMED, F. and NAESS, S.K. (1990). The effect of *in vitro* pretreatments on subsequent shoot organogenesis from excised *Rubus* and *Malus* leaves. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 21, 179-184.
- TAIZ, L. and ZEIGER, E. (2006). *Plant physiology*. Fourth edition. Sinauer Associates, Inc., USA, 509-539.
- TAKENO, K., TAYLOR, J.S., SRISKANDARAJAH, S., PHARIS, R.P. and MULLINS, M.G. (1982/83). Endogenous gibberellins- and cytokinin-like substances in cultured

- shoot tissues of apple, *Malus pumila* cv. Jonathan, in relation to adventitious root formation. *Plant Growth Regulation*, 1, 261-268.
- TAKOS, I.A. and EFTHIMIOU, G.SP. (2003). Germination results on dormant seeds of fifteen tree species autumn sown in a northern Greek nursery, *Silvae Genetica*, 52, 67-70.
- TARANTILIS, P.A., PAPPAS C.S., ALISSANDRAKIS, E., HARIZANIS, P.C. and POLISSIOU, M.G. (2012). Monitoring of royal jelly protein degradation during storage using Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. *Journal of Apicultural Research*, 51, 185-192.
- TARANTILIS, P.A., TROIANOU, V.E., PAPPAS, C.S., KOTSERIDIS, Y.S. and POLISSIOU, M.G. (2008). Differentiation of Greek red wines on the basis of grape variety using attenuated total reflectance Fourier transform infrared spectroscopy. *Food chemistry*, 111, 192-196.
- TETSUMURA, T., MATSUMOTO, Y., SATO, M., HONSHO, C., YAMASHITA, K., KOMATSU, H., SUGIMOTO, Y. and KUNITAKE, H. (2008). Evaluation of basal media for micropropagation of four highbush blueberry cultivars. *Scientia Horticulturae*, 119(1), 72-74.
- TEXEIRA da SILVA, J.A. (2012). Is BA (6-benzyladenine) BAP (6-benzylaminopurine)? *The Asian and Australasian Journal of Plant Science and Biotechnology*, 6, 121-124.
- THANOS, C.A. and DOUSSI, M.A. (1995). Ecophysiology of seed germination in endemic labiates of Crete. *Israel Journal of Plant Sciences*, 43, 227-237.
- THANOS, C.A., KADIS C.C. and SKAROU, F. (1995). Ecophysiology of germination in the aromatic plants thyme, savory and oregano (Labiatae). *Seed Science Research*, 5, 161-170.
- THEILER-HEDTRICH, C. and THEILER-HEDTRICH, R. (1990). Influence of TDZ and BA on adventitious shoot regeneration from apple leaves. *Acta Horticulturae*, 280, 195-199.
- THOMAS, P. (2000). Microcuttings leaf area, weight and position on the stock shoot influence root vigour, shoot growth and incidence of shoot tip necrosis in grape plantlets *in vitro*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 61, 189-198.
- THOMAS, P. and RAVINDRA, M.B. (1997). Shoot tip culture in mango: influence of medium, genotype, explant factors, season and decontamination treatments on phenolic exudation, explant survival and axenic culture establishment. *Journal of Horticultural Science*, 72(5), 713-722.

- THOMAS, T.D. (2008). The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances*, 26, 618-631.
- TINSLEY, M.J., SIMMONS, M.T. and WINDHAGER, S. (2006). The establishment success of native versus non-native herbaceous seed mixes on a revegetated roadside in Central Texas. *Ecological Engineering*, 26, 231-240.
- TOMOVIC, G., NIKETIC, M. and STEFANOVIC, V. (2003). *Malosorbus florentina* (Rosaceae-Maloideae) – Distribution, synecology and threatened status in Serbia. *Phyton* (Horn), 43(2), 295-306.
- TREMBLAY, F.M. and LALONDE, M. (1984). Requirements for *in vitro* propagation of seven nitrogen-fixing *Alnus* species. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 3(3), 189-199.
- TRIGIANO, R.N. and GRAY, D.J. (2005). *Plant development and biotechnology*. CRC Press, USA, 92-93.
- TSAY, H.S. (1998). Effects of medium composition at different recultures on vitrification of carnation (*Dianthus caryophyllus*) *in vitro* shoot proliferation. *Acta Horticulturae*, 461, 243-249.
- TURK, B.A., SWARTZ, H.J. and ZIMMERMAN, R.H. (1994). Adventitious shoot regeneration from *in vitro*-cultured leaves of *Rubus* genotypes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 38, 11-17.
- UR-RAHMAN, H., JAMES, D.J., CALIGARI, P.D.S. and WETTEN, A. (2007). Difference in competence for *in vitro* proliferation and *ex vitro* growth of genetically identical mature and juvenile clones of apomictic *Malus* species. *Pak. J. Bot.* 39(4): 1197-1206.
- VAN DER KRIEKEN, W.M., BRETELER, H., VISSER, M.H.M. and MAVRIDOU, D. (1993). The role of conversion of IBA into IAA on root regeneration in apple: introduction of a test system. *Plant Cell Rep.*, 12, 203-206.
- VAN NIEUWKERK, J.P., ZIMMERMAN, R.H. and FORDHAM, I. (1985). Response of apple cultivars *in vitro* to thidiazuron. *HortScience*, 20 (3), 523.
- VAN NIEUWKERK, J.P., ZIMMERMAN, R.H. and FORDHAM, I. (1986). Thidiazuron stimulation of apple shoot proliferation *in vitro*. *HortScience*, 21 (3), 516-518.
- VASAR, V., RANNU, T. and SAAREMAGI, H. (2000). Micropropagation of apple clonal dwarf rootstocks. *Proceedings of the International Conference Fruit Production and Fruit Breeding*, Tartu, Estonia, 12-13 September, 2000, 111-115.
- VÁZQUEZ, G., FONTENLA, E., SANTOS, J., FREIRE, M.S., GONZÁLEZ-ÁLVAREZ, J. and ANTORRENA, G. (2008). Antioxidant activity and phenolic content of chestnut

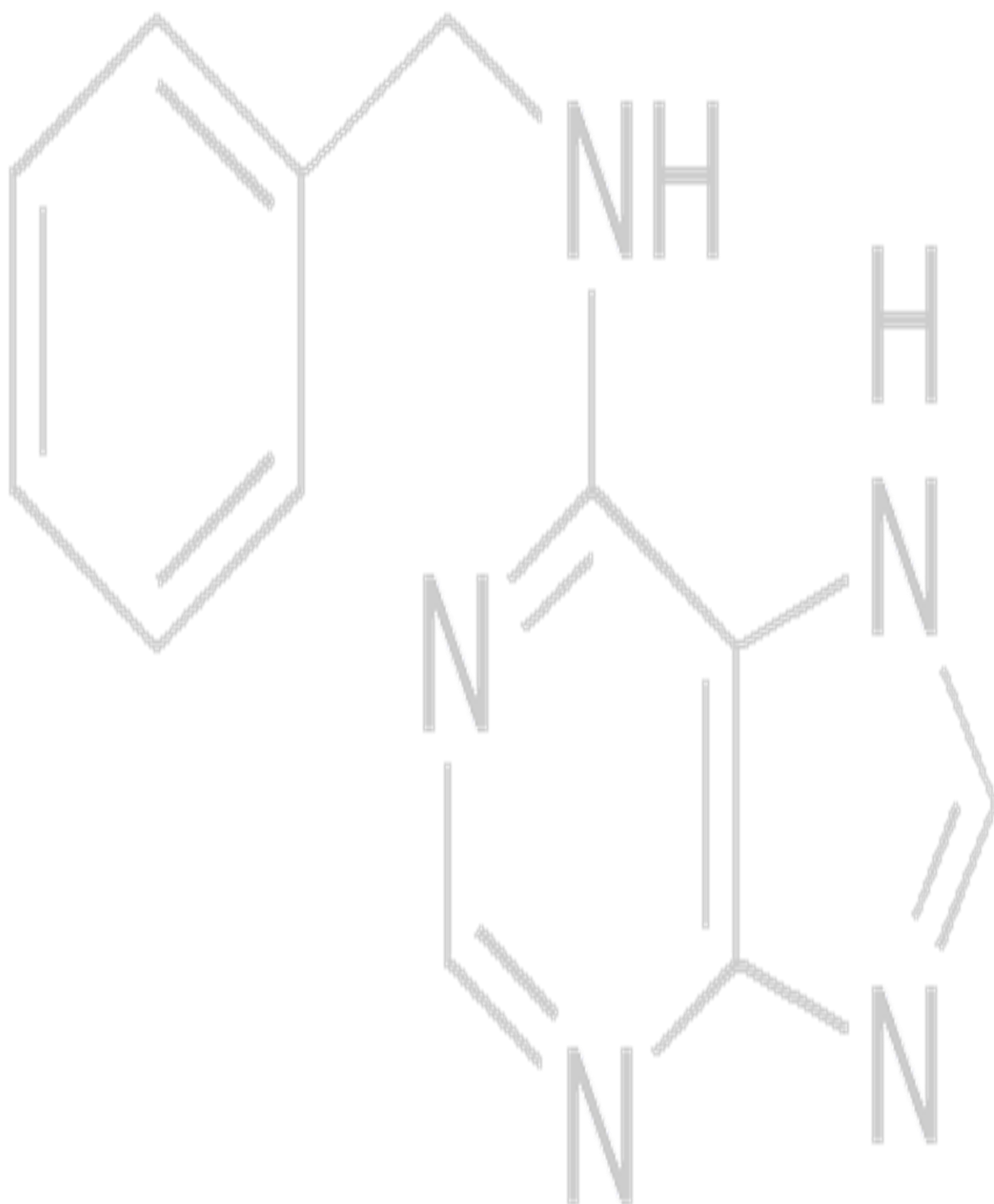
- (*Castanea sativa*) shell and eucalyptus (*Eucalyptus globulus*) bark extracts. *Industrial Crops and Products*, 28(3), 279-285.
- VÉRTESY, J. and BALLA, I. (1987). Acclimatization of woody plants under continental climatic conditions. *Acta Horticulturae*, 212, 311-314.
- VIEITEZ, A.M., PINTOS, F., SAN-JOSÉ, M.C., BALLESTER, A. (1993). *In vitro* shoot proliferation determined by explants orientation of juvenile and mature *Quercus rubra* L. *Tree Physiology* 12: 107-117.
- VIEITEZ, A.M., SÁNCHEZ, C. and SAN-JOSÉ, C. (1989). Prevention of shoot-tip necrosis in shoot cultures of chestnut and oak. *Scientia Horticulturae*, 41, 151-159.
- VIRSCEK-MARN, M., JAVORNIK, B., BOHANEC, B. and KREFT, I. (1994). Thidiazuron stimulated shoot regeneration from *in vitro* leaves of apple cultivars. *Proceedings of the International Colloquium on Impact of Plant Biotechnology on Agriculture*, Rogla, Slovenia, 5-7 December 1994, 91-95.
- VIRSCEK-MARN, M., BOHANEC, B. and JAVORNIK, B. (1999). Adventitious shoot regeneration from apple leaves-optimisation of the protocol and assessment of genetic variation among regenerants. *Phyton (Horn)*, 39 (1), 61-70.
- WANG, Q. (1991). Factors affecting rooting of microshoots of pear rootstock BP10030. *Scientia Horticulturae*, 45(3-4), 209-213.
- WANG, Q., TANG, H., QUAN, Y. and ZHOU, G. (1994). Phenol induced browning and establishment of shoot tip explants of 'Fuji' apple and 'Jinhua' pear cultured *in vitro*. *Journal of Horticultural Science*, 69(5), 833-839.
- WATERMAN, P.G. and MOLE, S. (1994). *Analysis of phenolic plant metabolites*. Blackwell Scientific Publications, Oxford, London, 238.
- WEBSTER, C.A. and JONES, O.P. (1989). Micropropagation of the apple rootstock M.9: effect of sustained subculture on apparent rejuvenation *in vitro*. *Journal of Horticultural Science*, 64 (4), 421-428.
- WELANDER, M. (1983). *In vitro* rooting of the apple rootstock M 26 in adult and juvenile growth phases and acclimatization of the plantlets. *Physiologia Plantarum*, 58(3), 231-238.
- WELANDER, M. (1985). *In vitro* shoot and root formation in the apple cultivar Åkerö. *Annals of Botany*, 55, 249-261.
- WOODWARD, S. and THOMSON, R.J. (1996). Micropropagation of the silk tassel bush, *Garrya elliptica* Dougl. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 44, 31-35.

- WU, H.C. and DU TOIT, E.S. (2004). Reducing oxidative browning during *in vitro* establishment of *Protea cynaroides*. *Scientia Horticulturae*, 100, 355-358.
- YEPES, L.M. and ALDWINCKLE, H.S. (1994a). Micropropagation of thirteen *Malus* cultivars and rootstocks, and effect of antibiotics on proliferation. *Plant Growth Regulation*, 15, 55-67.
- YEPES, L.M. and ALDWINCKLE, H.S. (1994b). Factors that affect leaf regeneration efficiency in apple, and effect of antibiotics in morphogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 37, 257-269.
- YU, D.H. and MEREDITH, C.P. (1986). The influence of explant origin on tissue browning and shoot production in shoot tip cultures of grapevine. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 111(6), 972-975.
- ZERVAKIS, G.I., BEKIARIS, G., TARANTILIS, P.A. and PAPPAS, C.S. (2012). Rapid strain classification and taxa delimitation within the edible mushroom genus *Pleurotus* through the use of diffuse reflectance infrared Fourier transform (DRIFT) spectroscopy. *Fungal Biology*, 116, 715-728.
- ZIMMERMAN, R.H. (1983). Factors affecting *in vitro* propagation of apple cultivars. *Acta Horticulturae*, 131, 171-178.
- ZIMMERMAN, R.H. (1984). Rooting apple cultivars *in vitro*: Interactions among light, temperature, phloroglucinol and auxin. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 3(4), 301-311.
- ZIMMERMAN, R.H. (1986). Regeneration in woody ornamentals and fruit trees. In: Vasil, I.K. (ed). *Cell Culture and Somatic Cell Genetics*. Vol. 3: Plant Regeneration and Genetic Variability, academic Press, pp. 243-258.
- ZIMMERMAN, R.H. and BROOME, O.C. (1981). Phloroglucinol and *in vitro* rooting of apple cultivar cuttings. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 106 (5), 648-652.
- ZIMMERMAN, R.H. and FORDHAM, I. (1985). Simplified method for rooting apple cultivars *in vitro*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 110 (1), 34-38.
- ZIMMERMAN, R.H., YAE, B.W. and FORDHAM, I. (1987). Comparison of rooting methods for apple cultivars *in vitro*. *Acta Horticulturae*, 212, 303-310.
- ZIV, M. (1991). Quality of micropropagated plants – Vitrification. *In Vitro Cell. Dev. Biol.-Plant*, 27, 64-69.

- ZOBAYED, S.M.A., ARMSTRONG, J. and ARMSTRONG, W. (2001). Micropropagation of potato: evaluation of closed, diffusive and forced ventilation on growth and tuberization. *Annals of Botany*, 87, 53-59.
- ΑΡΑΜΠΑΤΖΗΣ, Θ.Ι. (1998). Θάμνοι και δένδρα στην Ελλάδα. Τόμος Ι. Οικολογική Κίνηση Δράμας, Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Καβάλας, Δράμα, σελ. 201-202.
- ΚΑΝΕΛΛΟΥ, Γ. (2011). Μελέτη της αντιοξειδωτικής ικανότητας αφεψημάτων από αρωματικά φυτά της ελληνικής χλωρίδας. Μεταπτυχιακή εργασία, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.
- ΚΑΡΑΜΠΟΥΡΝΙΩΤΗΣ, Γ.Α. (2003). Φυσιολογία καταπονήσεων των φυτών. Οι λειτουργίες των φυτών κάτω από αντίξοες συνθήκες. Εκδόσεις Έμβρυο, Αιγάλεω, σελ. 64-65, 72-78.
- ΜΑΡΓΑΡΙΤΗΣ, Λ.Χ., ΓΑΛΑΝΟΠΟΥΛΟΣ, Β.Κ., ΚΕΡΑΜΑΡΗΣ, Κ.Ε., ΜΑΡΙΝΟΣ, Ε.Σ., ΠΑΠΑΣΙΔΕΡΗ, Ι.Σ., ΣΤΡΑΒΟΠΟΔΗΣ, Δ.Ι. και ΤΡΟΥΓΚΑΚΟΣ, Ι.Π. (2004). Βιολογία κυττάρου. Τέταρτη έκδοση. Ιατρικές Εκδόσεις Λίτσας, Αθήνα, σελ. 152-155.
- ΜΑΡΤΙΝΗ, Α.Ν. (2004). Διερεύνηση του *in vitro* πολλαπλασιασμού του *Malosorbus florentina* Zucc. Μεταπτυχιακή μελέτη, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.
- ΜΠΕΚΙΑΡΗΣ, Γ.Κ. (2011). Χαρακτηρισμός στελεχών βασιδιομυκήτων με τη χρήση φασματοσκοπίας FT-IR. Μεταπτυχιακή εργασία, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.
- ΠΟΛΥΣΙΟΥ, Μ.Γ. (1989). Μαθήματα οργανικής στερεοχημείας και ενόργανης ανάλυσης GC, UV-Vis, IR, NMR. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα
- ΣΦΗΚΑΣ, Γ. (1996). Τα δάση των ορεινών περιοχών. Εκδόσεις Πατάκη, Αθήνα, σελ. 16.
- ΣΦΗΚΑΣ, Γ. (2001). Οι βοτανικοί παράδεισοι της Ελλάδας. Εκδόσεις Μιχάλης Τούμπης Α.Ε., Αθήνα, σελ. 12, 151-153.
- ΤΑΡΑΝΤΙΔΗΣ, Π. και ΠΟΛΥΣΙΟΥ, Μ. (2008). Ενόργανη ανάλυση. Πανεπιστημιακές σημειώσεις, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα, σελ. 6, 8, 23-85, 119-122.
- ΤΣΕΚΟΥ, Ι.Β. και ΗΛΙΑ, Η.Φ. (2007). Μορφολογία και ανατομία φυτών. Εκδοτικός Οίκος Αδελφών Κυριακίδη Α.Ε., Θεσσαλονίκη, σελ. 191-192, 249, 257-260.
- ΧΑΤΖΗΩΑΝΝΟΥ, Θ.Π. και ΚΟΥΠΠΑΡΗ, Μ.Α. (1990). Ενόργανη Ανάλυση. Πανεπιστήμιο Αθηνών, Εκδόσεις Δ. Μαυρομάτης, Αθήνα, σελ. 229-245.

ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ

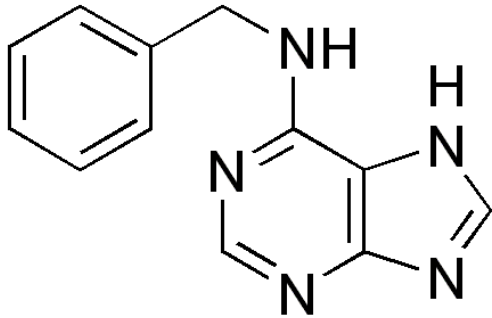
- Δ1. <http://infohouse.p2ric.org/ref/21/20747.pdf>
- Δ2. http://politics.wwf.gr/images/stories/fireparnisreport2007_14.pdf
- Δ3. <http://www.aua.gr/fasseas/electron%20microscopes.htm>
- Δ4. <http://www.pfaf.org/user/Plant.aspx?LatinName=Malus+florentina>
- Δ5. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/9/91/Abscisic_acid.svg
- Δ6. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e7/L-Ascorbic_acid.svg
- Δ7. <http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c4/Benzylaminopurine.png>
- Δ8. <http://images-a.chemnet.com/suppliers/chembase/cas/cas4294-16-0.gif>
- Δ9. http://en.wikipedia.org/wiki/File:Zitronens%C3%A4ure_-_Citric_acid.svg
- Δ10. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/c2791?lang=en®ion=GR>
- Δ11. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/a/ac/Gibberellic_acid.svg
- Δ12. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/d/d3/Indol-3-ylacetic_acid.svg
- Δ13. <http://www.chemspider.com/Chemical-Structure.393931.html>
- Δ14. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e1/Indole-3-butyric_acid.svg
- Δ15. <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d7660?lang=en®ion=GR>
- Δ16. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/summary/summary.cgi?cid=24405>
- Δ17. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/structurefly.cgi?cid=3830&width=400&height=400>
- Δ18. http://en.wikipedia.org/wiki/File:Kwas_naftyloctowy.svg
- Δ19. <http://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/image/structurefly.cgi?cid=8422&width=400&height=400>
- Δ20. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f9/Phloroglucinol_structure.png
- Δ21. http://www.pesticideinfo.org/Detail_Chemical.jsp?Rec_Id=PC34583
- Δ22. <https://www.caymanchem.com/app/template/Product.vm/catalog/13226>
- Δ23. http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/6/6f/Phloretic_acid.png
- Δ24. <http://www.chemspider.com/ImageView.aspx?id=16498836>



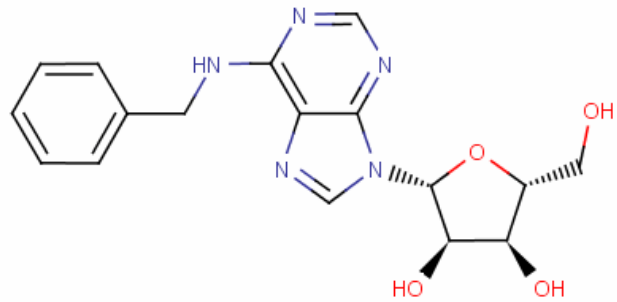
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι

Οι δομές των κυριότερων φυτορρυθμιστικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν στα διάφορα στάδια του *in vitro* πολλαπλασιασμού ή απλά αναφέρθηκαν κατά την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας είναι οι ακόλουθες:

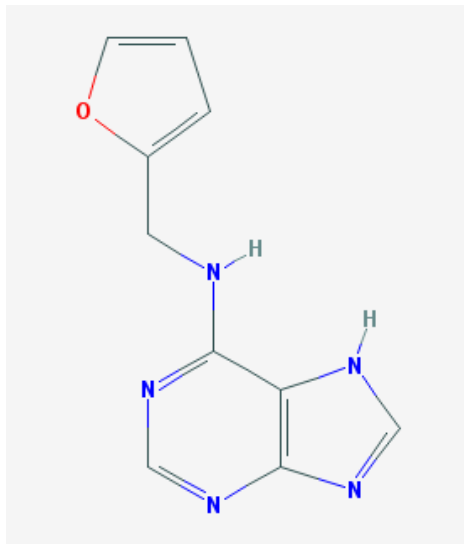


6-βενζυλαδενίνη (Teixeira da Silva, 2012)
(6-benzyladenine, BA)

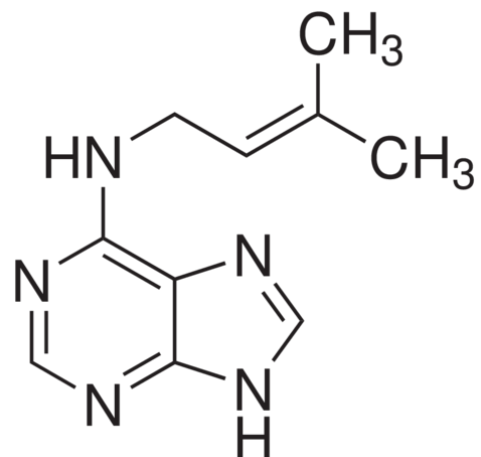


βενζυλαδενίνη-ριβοζίδης (Δ8)
benzyladenine-ribose (BAR)

6-βενζυλ-αμινοπουρίνη (6-benzyl-aminopurine, BAP) (Δ7)

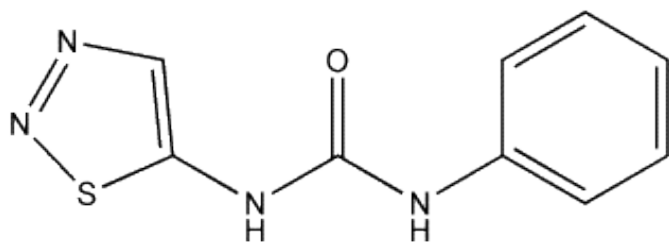


6-φουρφυρυλαμινοπουρίνη, κινετίνη (Δ17)
(6-furfurylamino-purine, kinetin, KIN)

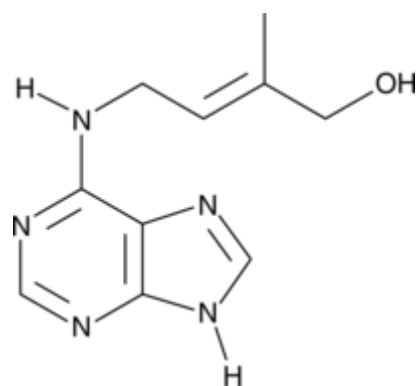


6-γ-γ-(διμεθυλαλληλάμινο)-πουρίνη (Δ15)
[6-γ-γ-(dimethylallylamino)-purine, 2iP]

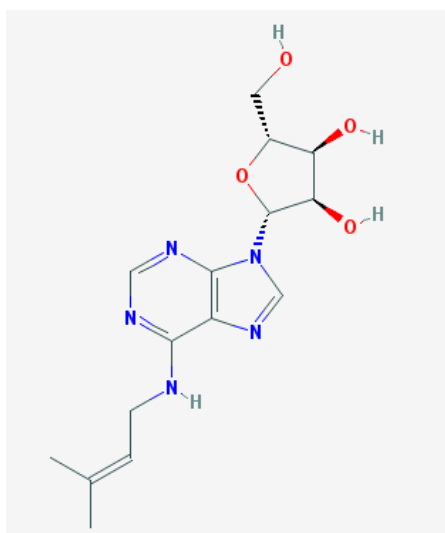
Σχήμα 21.



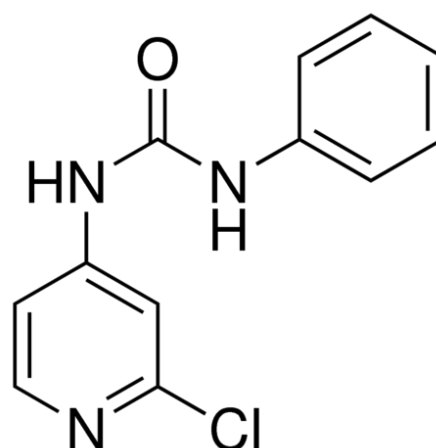
θειντιαζουρόν, thiazuron (Δ21)
(N-phenyl-N'-1,2,3-thiadiazol-5-ylurea, TDZ)



τρανς-ζεατίνη (Δ22)
trans-zeatin

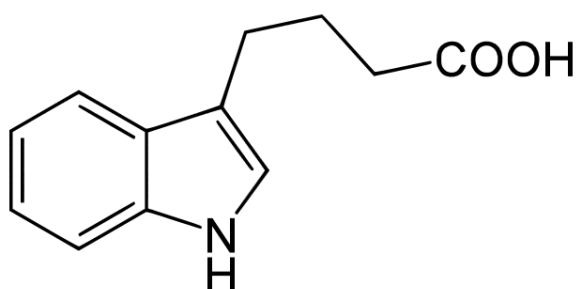


ισοπεντενυλαδενοσίνη (Δ16)
(isopentenyladenosine, iPA)

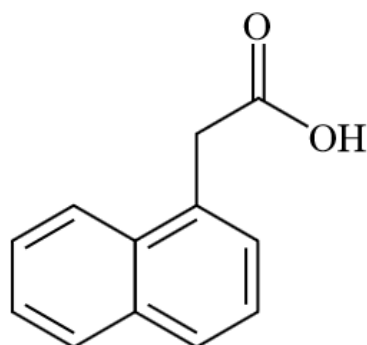


N-(2-χλωρο-4-πυριδυλ)-N'-φαινυλουρία (Δ10)
(N-(2-Chloro-4-pyridyl)-N'-phenylurea, CPPU)

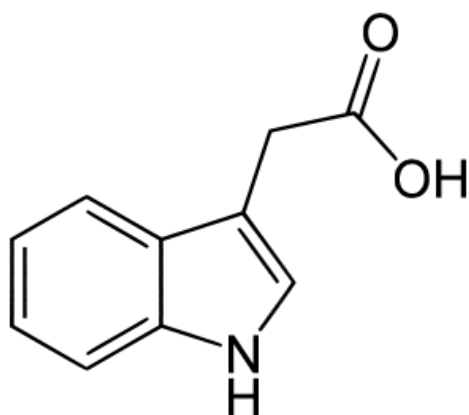
Σχήμα 21. Δομές κυτοκινινών



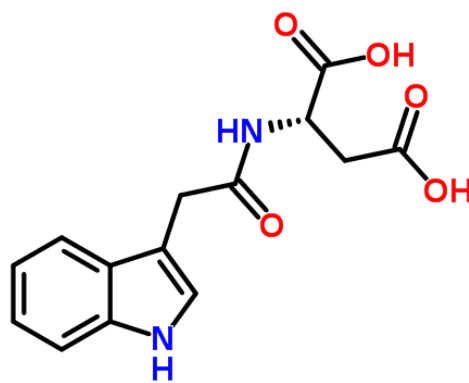
ινδολο-3-βουτυρικό οξύ (Δ14)
(indole-3-butyric acid, IBA)



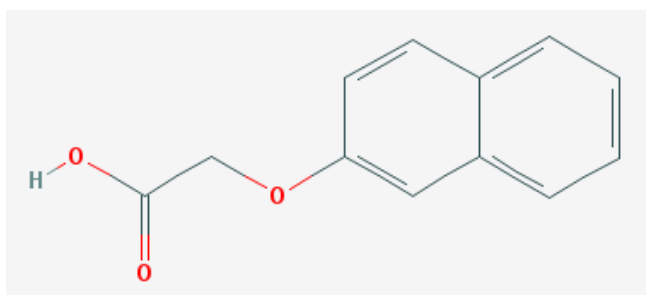
ναφθαλινοξικό οξύ (Δ18)
(1-naphthelene acetic acid, NAA)



ινδολο-3-οξικό οξύ (Δ12)
(indolo-3-acetic acid, IAA)

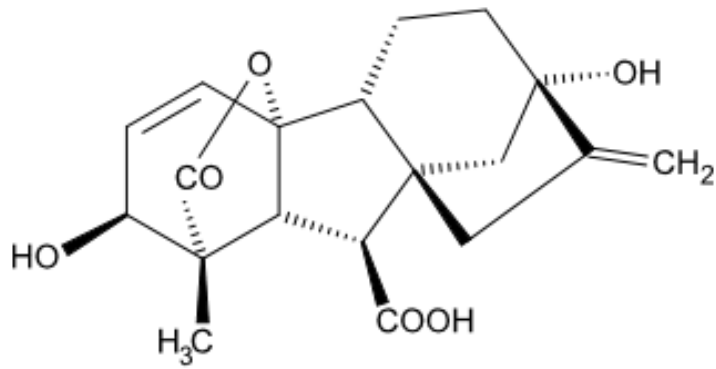


ινδολο-3-ασπαρτικό οξύ (Δ13)
(indole-3-aspartic acid, IAAsp)

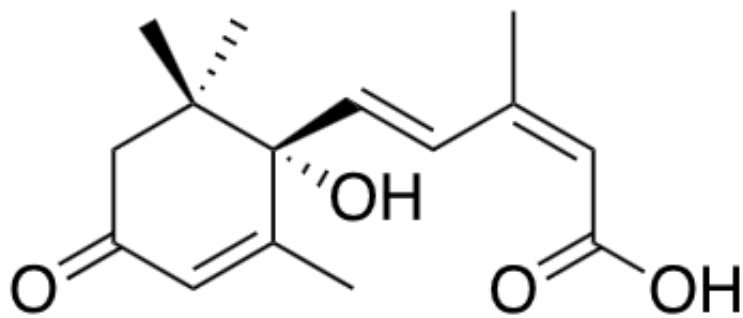


ναφθοξοξικό οξύ (naphthoxyacetic acid, NOA) (Δ19)

Σχήμα 22. Δομές αυξινών



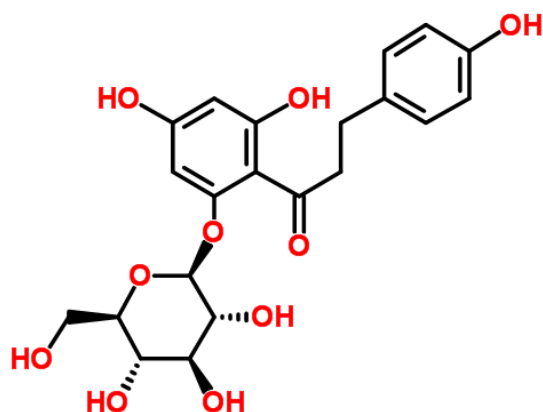
Σχήμα 23. Δομή γιββερελλικού οξέος (gibberellic acid, GA₃) (Δ11)



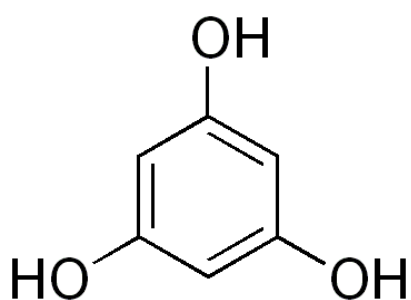
Σχήμα 24. Δομή αμπισικού οξέος (abscisic acid, ABA) (Δ5)

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ

Παρουσιάζονται δομές άλλων ουσιών που ενδιαφέρουν την παρούσα διατριβή.

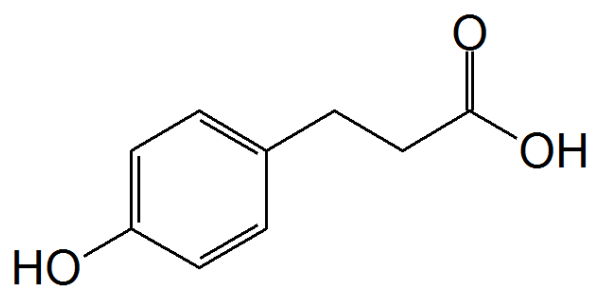


Σχήμα 25. Δομή της φλοριζίνης (phloridzin), που είναι το κυρίαρχο διαλυτό φαινολικό συστατικό σε φύλλα *Malus* (Δ24)



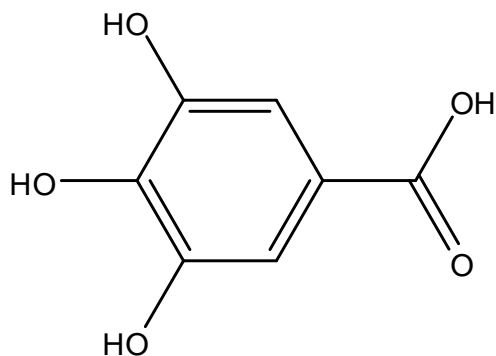
φλορογλυκινόλη

phloroglucinol (PG) (Δ20)

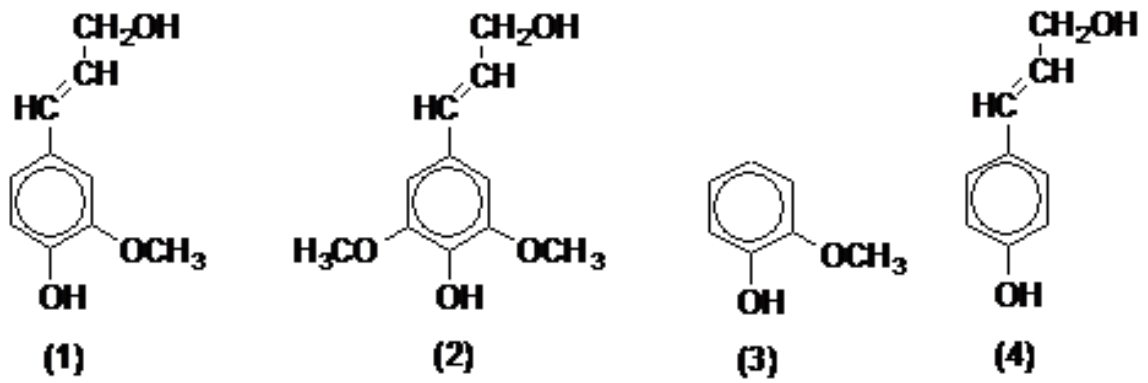


phloretic acid (Δ23)

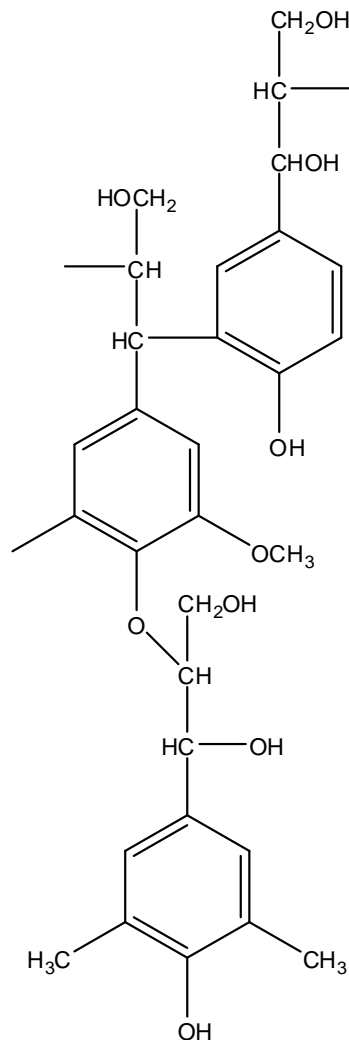
Σχήμα 26. Δομές φαινολικών παραγώγων της φλοριζίνης.



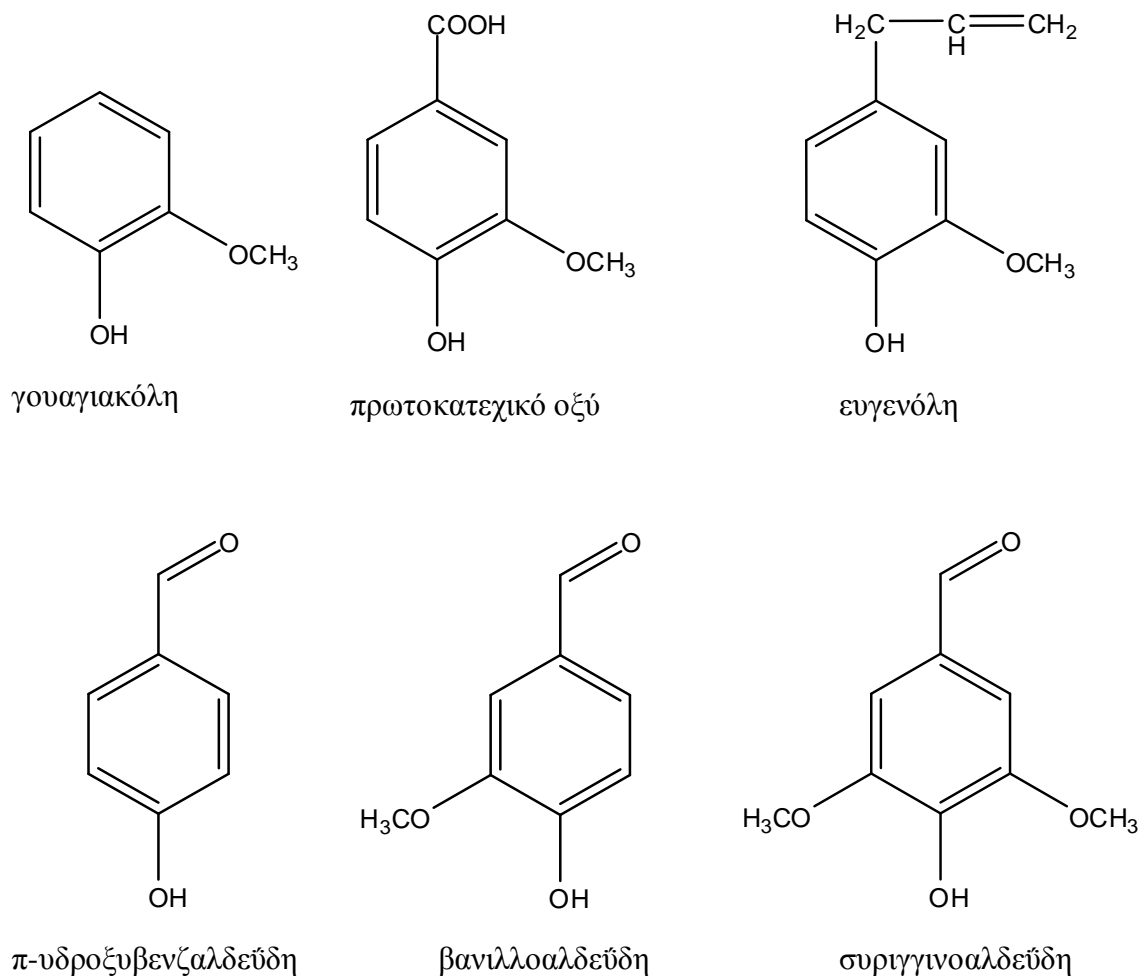
Σχήμα 27. Δομή γαλλικού οξέος, το οποίο χρησιμοποιήθηκε ως ένωση αναφοράς για τη δημιουργία πρότυπης καμπύλης αναφοράς κατά Folin-Ciocalteu για τα ολικά φαινολικά συστατικά.



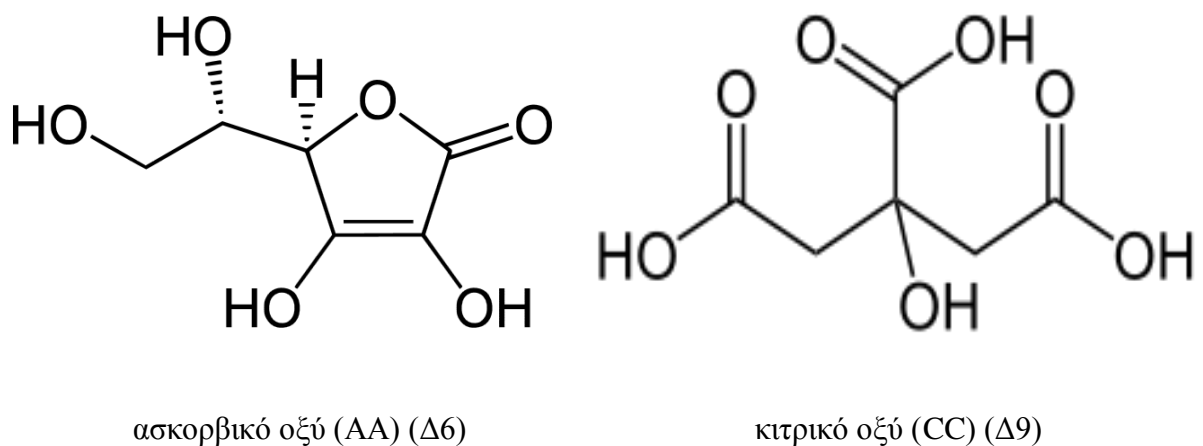
Σχήμα 28. Η λιγνίνη είναι αρωματικό βιοπολυμερές αποτελούμενο από κωνιφερυλική αλκοόλη (1), σιναπυλική αλκοόλη (2), γουαϊκόλη (3) και π-κουμαρυλική αλκοόλη (4).



Σχήμα 29. Χαρακτηριστική δομική μονάδα λιγνίνης



Σχήμα 30. Δομές συστατικών αποικοδόμησης της λιγνίνης



Σχήμα 31. Δομές αντιοξειδωτικών, που χρησιμοποιήθηκαν κατά την απολύμανση των εκφύτων για περιορισμό του καφετιάσματος τους.