

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΥΠΟΔΟΜΩΝ ΚΑΙ ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΕΝΔΡΟΚΟΜΙΑΣ

Μεταπτυχιακή διατριβή στα πλαίσια του Π.Μ.Σ. <<Επιστήμες και Συστήματα Φυτικής Παραγωγής>>

Κατεύθυνση Δενδροκομία Αμπελουργία, με θέμα:

**« ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΩΝ
ΕΣΠΕΡΙΔΟΕΙΔΩΝ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΥΤΩΝ »**

ΑΘΗΝΑ 2017

Σαλής Κωνσταντίνος

Επιβλέπων: Χατζηδημητρίου Μαριάννα

Μεταπτυχιακή διατριβή στα πλαίσια του Π.Μ.Σ.

<<Επιστήμες και Συστήματα Φυτικής Παραγωγής>>

Κατεύθυνση Δενδροκομία Αμπελουργία, με θέμα:

<< ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΜΟΣ ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΩΝ ΕΣΠΕΡΙΔΟΕΙΔΩΝ ΚΑΙ ΜΟΡΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΑΥΤΩΝ >>

ΣΑΛΗΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ

Επιβλέπων: Χατζηδημητρίου Μαριάννα

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Μ. Χατζηδημητρίου	Επιβλέπουσα	Αναπ. Καθηγήτρια
Ι. Παπαδάκης	Μέλος	Επικ. Καθηγητής
Κ. Μπινιάρη	Μέλος	Επικ. Καθηγήτρια

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Καταρχάς, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτρια της παρούσης μελέτης κ. Μ. Χατζηδημητρίου, για την πολύτιμη βοήθεια, τη στήριξη, την καθοδήγηση, καθώς και για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε κατά τη διάρκεια της μεταπτυχιακής μου διατριβής.

Επίσης, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερα τον κ. Ι. Παπαδάκη, για τις συμβουλές, την καθοδήγηση και την ενεργή βοήθεια που μου παρείχε σε όλη την διάρκεια της μελέτης μου.

Ευχαριστώ θερμά και τον Κοσμήτορα της Σχολής Τροφίμων, Βιοτεχνολογίας & Ανάπτυξης Καθηγητή κ. Σ. Κίντζιο για τη διάθεση του εργαστηριακού χώρου και τις πολύτιμες συμβουλές και καθοδήγηση του.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους υποψήφιους διδάκτορες και τους μεταπτυχιακούς και προπτυχιακούς φοιτητές για την άψογη συνεργασία που είχαμε στο εργαστήριο Δενδροκομίας.

Ευχαριστώ επίσης την Φυτωριακή επιχείρηση Hellenic Plants για την προμήθεια του φυτικού υλικού που χρησιμοποιήθηκε στο πείραμα.

Τέλος, θα ήθελα να ευχαριστήσω τους γονείς μου, για την στήριξη που μου προσέφεραν όλα αυτά τα χρόνια και για την υπομονή τους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα εσπεριδοειδή αποτελούν μία από τις σημαντικότερες εμπορικές καλλιέργειες, παγκοσμίως. Καλλιεργούνται σε πάνω από 100 χώρες, ανά τον κόσμο, κυρίως σε θερμά κλίματα, συμπεριλαμβανομένης της Μεσογειακής ζώνης. Για την καλλιέργεια των εσπεριδοειδών, η επιλογή του υποκειμένου είναι ζωτικής σημασίας για την ανάπτυξη, τη διατροφή, τη μακροζωία του δέντρου και λοιπών χαρακτηριστικών, καθώς και την αποδοτικότητα της καλλιέργειας.

Στην παρούσα εργασία ο *in vitro* πολλαπλασιασμός έξι υποκειμένων, *Volkameriana*, *Citrumelo* 'Swingle', *Citranges* 'Carrizo', *Poncirus Trifoliata* 'Serra', *P. Tr.* 'Rubidoux' and *P. Tr.* 'Flying Dragon', μελετήθηκε ως προς την βλαστογένεση και τη ριζογένεση. Βλαστικά έκφυτα, ηλικίας τριών μηνών, χρησιμοποιήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας Murashige and Skoog, σε πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις της ορμόνης κυτοκινίνης N6-benzyladenine (BA) (0, 0,5, 1, 2 και 4 ppm) για το στάδιο της βλαστογένεσης και πέντε διαφορετικές συγκεντρώσεις naphthaleneacetic acid (NAA) (0, 0,5, 1, 2 και 4 ppm) για το στάδιο της ριζογένεσης. Το ποσοστό βλαστογένεσης, ο αριθμός των βλαστών, το μήκος των βλαστών και ο αριθμός φύλλων ανά έκφυτο, αξιολογήθηκαν στο τέλος του σταδίου της βλαστογένεσης. Το ποσοστό ριζογένεσης, ο αριθμός των ριζών, το συνολικό μήκος ριζών ανά έκφυτο, ο συσχετισμός νωπού βάρους ανά μήκος ρίζας και η ξήρανση των εκφύτων αξιολογήθηκαν στο τέλος του σταδίου της ριζογένεσης. Επίσης μελετήθηκε η επίδραση του γονοτύπου στη βλαστογένεση και τη ριζογένεση. Τέλος, μελετήθηκε η γενετική παραλλακτικότητα των υπό μελέτη υποκειμένων και άλλων ειδών και ποικιλιών εσπεριδοειδών με τη χρήση των μοριακών δεικτών ISSR.

Η παρουσία της κυτοκινίνης BA αύξησε το ποσοστό βλαστογένεσης σε όλους τους γονότυπους, εκτός του *Volkameriana* όπου τα ποσοστά βλαστογένεσης ήταν όμοια σε παρουσία και απουσία κυτοκινίνης. Η παρουσία της κυτοκινίνης BA αύξησε στατιστικώς σημαντικά τον αριθμό των βλαστών ανά έκφυτο στα υποκείμενα *C.* 'Carrizo', *Volkameriana* και *P. tr.* 'Serra', το συνολικό μήκος των βλαστών ανά έκφυτο στα υποκείμενα *C.* 'Carrizo', *Volkameriana* και *P. tr.* 'Serra' και τον αριθμό των φύλλων ανά έκφυτο σε όλα τα υποκείμενα, εκτός του *C.* 'Swingle'. Το υψηλότερο ποσοστό βλαστογένεσης για τα περισσότερα υπό μελέτη υποκείμενα παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση των 2 ppm BA. Αυξάνοντας την συγκέντρωση της κυτοκινίνης BA από 2 σε 4 ppm, τα ποσοστά βλαστογένεσης μειώθηκαν σημαντικά στα περισσότερα υποκείμενα. Η παρουσία της αυξίνης NAA αύξησε στατιστικώς σημαντικά το ποσοστό ριζογένεσης σε όλα τα υποκείμενα, τον αριθμό των ριζών ανά έκφυτο σε όλα τα υποκείμενα, εκτός του *C.* 'Carrizo', ενώ δεν επηρέασε σημαντικά το συνολικό μήκος των ριζών ανά έκφυτο σε όλα τα υποκείμενα, εκτός του *C.* 'Carrizo'. Στα περισσότερα υποκείμενα που μελετήθηκαν, το μεγαλύτερο ποσοστό ριζογένεσης παρουσιάστηκε στη συγκέντρωση των 2 ppm NAA. Η επίδραση του γονοτύπου ήταν στατιστικώς σημαντική σε όλες τις μετρήσεις. Παρατηρήθηκε υψηλή γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ των υπό μελέτη υποκειμένων.

ABSTRACT

Citrus are one of the most commercially important cultivation, worldwide. They are being cultivated in more than 100 countries, mostly in warm climates, including the Mediterranean zone. For Citrus cultivation, the selection of the rootstock is vital for the development, nutrition, longevity and the rest characteristics of the tree and the productivity of the cultivation.

The in vitro propagation of six citrus rootstocks, *Volkameriana*, *Citrumelo* 'Swingle', *Citranges* 'Carrizo', *Poncirus Trifoliata* 'Serra', *P. Tr.* 'Rubidoux' and *P. Tr.* 'Flying Dragon', was studied for the shoot proliferation and rooting. Three months old, shoot explants, were used in Murashige and Skoog plant growth medium, supplemented with five different concentrations of BA for the shoot proliferation phase and five different concentrations of NAA for the rooting phase. Shoot proliferation percentage, number of shoots, total shoot length and number of leaves per explant were evaluated at the end of proliferation phase. Rooting percentage, number of roots, total root length per explant and drying rate of the explants were evaluated at the end of rooting phase. Also, the effect of the genotype in proliferation and rooting was studied. Furthermore, the genetic variability of the rootstocks studied and other citrus species and varieties was studied, using ISSR molecular markers.

The presence of BA significantly increased the proliferation percentage in all the rootstocks, except *Volkameriana*, which showed same results in the presence and absence of BA. The presence of BA significantly increased the number of shoots per explant in 'Carrizo', *Volkameriana* and *Poncirus Trifoliata* 'Serra', the total shoot length per explant in *C.* 'Carrizo', *Volkameriana* και *P. tr.* 'Serra' and the number of leaves per explant in all the rootstocks, except *C.* 'Swingle'. The highest percentage of proliferation percentage, for most of the rootstocks, was obtained in 2 ppm BA. Increasing the concentration of BA from 2 to 4 ppm, proliferation percentage was significantly decreased in most of the rootstocks. The presence of NAA significantly increased the rooting percentage in all the rootstocks, the number of roots per explant in all the rootstocks except 'Carrizo', but it did not affect the total root length per explants in all rootstocks except 'Carrizo'. In most rootstocks studied, highest rooting percentage was obtained in 2 ppm NAA. The effect of the genotype was statistically significant in all the evaluations. High genetic variability was observed among the rootstocks studied.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.	ΕΣΠΕΡΙΔΟΕΙΔΗ	- 10 -
1.1	ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	- 10 -
1.2	ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ	- 15 -
2.	ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ	- 16 -
2.1.	ΚΥΡΙΟΤΕΡΑ ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΑ	- 16 -
2.2	In vitro πολλαπλασιασμός	- 19 -
2.2.1	Εισαγωγή	- 19 -
2.2.2	Οργανογένεση	- 19 -
2.2.3	ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	- 21 -
2.3	ΠΟΛΥΕΜΡΥΓΟΝΙΑ – ΑΠΟΜΙΞΗ ΣΤΑ ΕΣΠΕΡΙΔΟΕΙΔΗ	- 23 -
2.3.1	ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΑΠΟΜΙΞΗΣ ΣΤΑ ΕΣΠΕΡΙΔΟΕΙΔΗ	- 24 -
3.1	ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΕΙΔΩΝ ΚΑΙ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ	- 25 -
3.1.1	ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ	- 25 -
3.1.2	ΚΑΡΥΟΤΥΠΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ	- 26 -
3.1.3	ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ	- 26 -
	Πρωτεϊνικοί Δείκτες:.....	- 27 -
3.1.4	ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ	- 27 -
3.2	ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΕΙ ΣΤΗΝ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΕΣΠΕΡΙΔΟΕΙΔΩΝ -	29
	-	
3.3	ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ .	30
	- 30 -
3.4.1	Συγκέντρωση Ταq πολυμεράσης	- 32 -
3.4.3	Γενικά για το MgCl ₂	- 33 -
3.4.4	Η θερμοκρασία και η διάρκεια υβριδισμού	- 34 -
	Σκοπός του πειράματος	- 36 -
1.	ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ.....	- 38 -
1.1	ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	- 38 -

1.2	Υπόστρωμα καλλιέργειας MS.....	- 39 -
1.3	ΣΤΑΔΙΟ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΠΟΛΛΑΠΛΩΝ ΒΛΑΣΤΩΝ	- 41 -
1.4	ΣΤΑΔΙΟ ΡΙΖΟΒΟΛΗΣΗΣ ΝΕΩΝ ΒΛΑΣΤΩΝ.....	- 41 -
2	Μοριακοί δείκτες	- 42 -
2.1	ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	- 42 -
2.2	ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ.....	- 44 -
2.3	ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΚΑΙ ΤΑ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥΣ	- 44 -
2.4	ΣΥΣΚΕΥΕΣ.....	- 46 -
2.5	ΜΕΘΟΔΟΙ	- 46 -
2.5.1	ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ DNA	- 46 -
2.5.2	ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ DNA	- 47 -
2.5.3	ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ DNA	- 49 -
2.5.4	ΜΙΓΜΑΤΑ PCR.....	- 49 -
2.5.5	ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ – ΜΕΓΕΘΗ ΤΩΝ ΕΝΙΣΧΥΜΕΝΩΝ ΖΩΝΩΝ – ΦΩΤΟΓΡΑΦΗΣΗ	- 50 -
2.5.6	ΑΡΙΘΜΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ	- 50 -
	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	- 51 -
	1.ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΣΕ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ / ΣΤΑΔΙΟ ΒΛΑΣΤΟΓΕΝΕΣΗΣ.....	- 52 -
1.1	Επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων της ορμόνης (BA) στη βλαστογένεση ανά γονότυπο.....	- 52 -
-	<i>Citranges 'Carrizo'</i>	- 52 -
-	<i>Volkameriana</i>	- 57 -
-	<i>Citrumelo 'Swingle'</i>	- 62 -
-	<i>Poncirus trifoliata 'Serra'</i>	- 67 -
-	<i>Poncirus trifoliata 'Flying Dragon'</i>	- 72 -
-	<i>Poncirus trifoliata 'Rubidoux'</i>	- 76 -
1.2	Επίδραση του γονοτύπου στο στάδιο της βλαστογένεσης	- 81 -
2.	ΣΤΑΔΙΟ ΡΙΖΟΓΕΝΕΣΗΣ.....	- 85 -
2.1.	Επίδραση των διαφόρων συγκεντρώσεων αυξίνης στη ριζογένεση των υπό μελέτη υποκειμένων.....	- 85 -
-	<i>Citranges 'Carrizo'</i>	- 85 -
-	<i>Volkameriana</i>	- 89 -
-	<i>Poncirus trifoliata 'Flying Dragon'</i>	- 94 -

-	<i>Citrumelo</i> 'Swingle'	- 99 -
-	<i>Poncirus trifoliata</i> 'Rubidouχ'	- 103 -
2.2	Επίδραση του γονότυπου στη ριζογένεση.....	- 106 -
3	Μελέτη της γενετικής παραλλακτικότητας των υποκειμένων με τη χρήση των μοριακών δεικτών ISSR - 109 -	
-	ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΜΕ ΤΟ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗ ΟΜΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ JACCARD.....	- 111 -
1.	Επίδραση της συγκέντρωσης κυτοκινίνης ΒΑ στην βλαστογένεση των εκφύτων των υπό μελέτη υποκειμένων.....	- 117 -
2.	Επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων αυξίνης στην ριζοβολία των νέων βλαστών των υπό μελέτη υποκειμένων	- 120 -
3.	Επίδραση του γονότυπου στην βλαστογένεση και ριζογένεση των υπό μελέτη υποκειμένων..	- 122 -
4.	Γενετική παραλλακτικότητα των υπό μελέτη υποκειμένων.....	- 124 -
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ		- 126 -
	Επίδραση της κυτοκινίνης ΒΑ στη βλαστογένεση.....	- 126 -
	Επίδραση της αυξίνης ΝΑΑ στη ριζογένεση	- 127 -
	Επίδραση του γονότυπου στη βλαστογένεση	- 128 -
	Επίδραση του γονότυπου στη ριζογένεση	- 129 -
	Γενετική παραλλακτικότητα των υποκειμένων	- 129 -
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	- 131 -

I

Εισαγωγή

1. ΕΣΠΕΡΙΔΟΕΙΔΗ

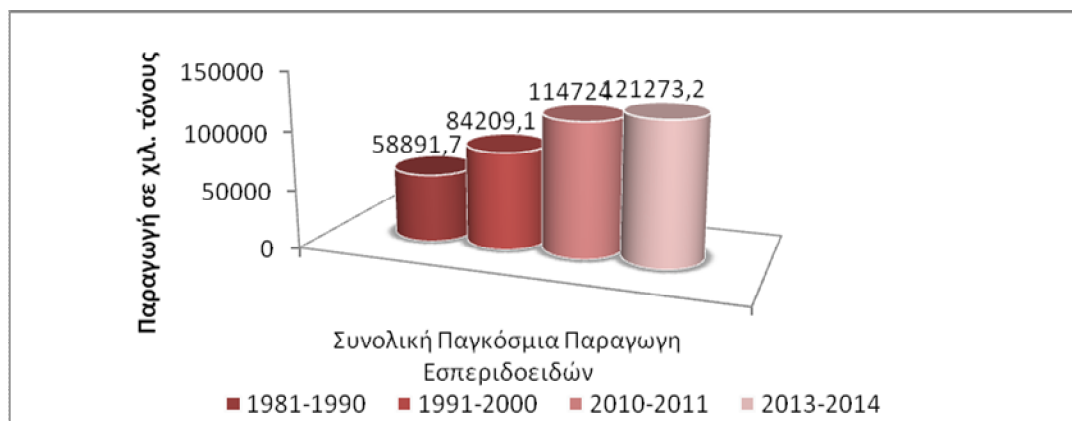
1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Ως κέντρο καταγωγής των εσπεριδοειδών είναι η Νοτιοανατολική Ασία και κυρίως η περιοχή μεταξύ Κίνας και Ινδίας (Gmitter και Hu 1990, Soost και Roose 1996). Η κοινή πορτοκαλιά πιθανώς προήλθε από την Ινδία, η τρίφυλλη πορτοκαλιά και το μανταρίνι από την Κίνα και οι όξινοι τύποι εσπεριδοειδών από την Μαλαισία. Η πραγματική τους όμως προέλευση, καθώς και η πορεία με την οποία διαδόθηκαν θεωρούνται άγνωστες (Moore, 2001).

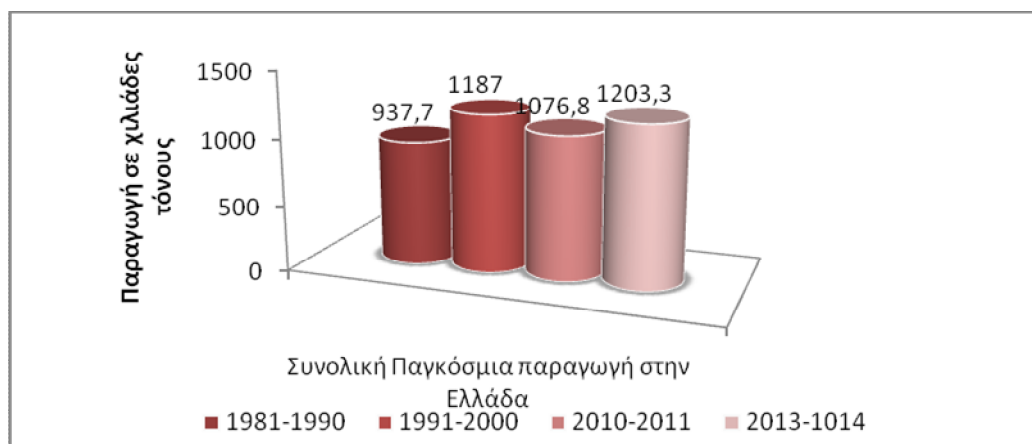
Αναφορές στη λογοτεχνία φαίνεται πως υπάρχουν πριν το 800 π.Χ. στην σανσκριτική λογοτεχνία καθώς και αναφορές στην κινέζικη, ελληνική και ρωμαϊκή λογοτεχνία. Η καλλιέργειά τους στην Ευρώπη περιγράφεται από το Θεόφραστο από το 300 π.Χ. Τα πρώτα εσπεριδοειδή που μεταφέρθηκαν στην Ευρώπη ήταν το κίτρο και στη συνέχεια ακολούθησαν το νεράντζι, το λεμόνι και το πορτοκάλι (Gmitter κ.ά. 2009). Τα εσπεριδοειδή άρχισαν να καλλιεργούνται στο χώρο της Μεσογείου μετά τις ανακαλύψεις και τα ταξίδια του 16^{ου} αιώνα, με εισαγωγές σπόρων από Πορτογάλους και Ισπανούς. Το μεγαλύτερο μέρος από τα καλλιεργήσιμα είδη εσπεριδοειδών στις μεγάλες παραγωγικές περιοχές είναι καθαρά είδη ή υβρίδια τα οποία προέκυψαν τυχαία ή από διασταυρώσεις (Βασιλακάκης και Θερίος 1996).

Τα εσπεριδοειδή αποτελούν μία από τις σημαντικότερες εμπορικές καλλιέργειες παγκοσμίως. Καλλιεργούνται σε πάνω από 100 χώρες παγκοσμίως, σε τροπικές και υποτροπικές περιοχές. Η καλλιεργούμενη έκτασή τους παγκοσμίως υπολογίζεται σε 24 εκατομμύρια στρέμματα, της οποίας το 80% ανήκει στις παραμεσόγειες χώρες και τις χώρες της Κεντρικής και Βόρειας Αμερικής. Το υπόλοιπο 20% κατανέμεται στην Νότια Αμερική, Άπω Ανατολή, και σε άλλες χώρες του Νότιου ημισφαιρίου.

Η παγκόσμια παραγωγή εσπεριδοειδών το έτος 2013/14 έφτασε τους 121.273,2 χιλ. τόνους (FAO, 2016). Τα σκήπτρα της παγκόσμιας παραγωγής κρατάει η Κίνα, η οποία παρήγαγε το ίδιο έτος 29.567 χιλ. τόνους εσπεριδοειδών. Σημαντικό μερίδιο της παγκόσμιας παραγωγής κατέχει η ευρωπαϊκή ζώνη καθώς το έτος 2013/14 παρήγαγε 241.64,1 χιλ. τόνους. Στην Ελλάδα, την ίδια περίοδο, η παραγωγή εσπεριδοειδών έφτασε τους 1.203,3 χιλ. τόνους. Στην ευρωπαϊκή ζώνη και ιδιαίτερα στη χώρα μας η παραγωγή εσπεριδοειδών παρουσίασε αύξηση τα τελευταία χρόνια. Μεγαλύτερο μέρος της παραγωγής εσπεριδοειδών καλύπτει η καλλιέργεια των πορτοκαλιών. Η συνολική παραγωγή παγκοσμίως, το έτος 2013/14 ξεπέρασε τους 68.925 χιλ. τόνους, ενώ στην χώρα μας έφτασε τους 970 χιλ. τόνους (FAO, 2016). Στη δεύτερη θέση της παγκόσμιας παραγωγής βρίσκονται οι καλλιέργειες μανταρινιών, καλύπτοντας 31.203,9 χιλ. τόνους παγκοσμίως και 148 χιλ. τόνους στην Ελλάδα. Στη συνέχεια έρχονται οι καλλιέργειες λεμονιών και λάιμ, οι οποίες κάλυψαν 10.490,3 χιλ τόνους παγκοσμίως και 79 χιλ. τόνους στη χώρα μας (FAO, 2016).



Γράφημα 1. Συνολική παγκόσμια παραγωγή εσπεριδοειδών σε χιλιάδες τόνους από το 1981 έως το 2014 σύμφωνα με στοιχεία του FAO.

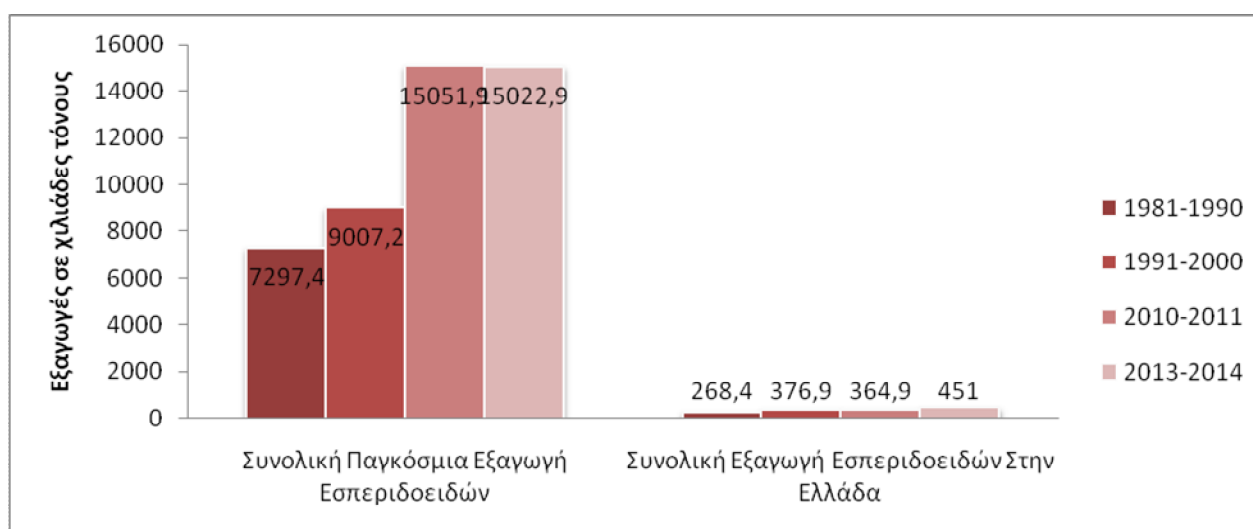


Γράφημα 2. Συνολική παραγωγή εσπεριδοειδών στην Ελλάδα σε χιλιάδες τόνους από το 1981 έως το 2014 σύμφωνα με στοιχεία του FAO.

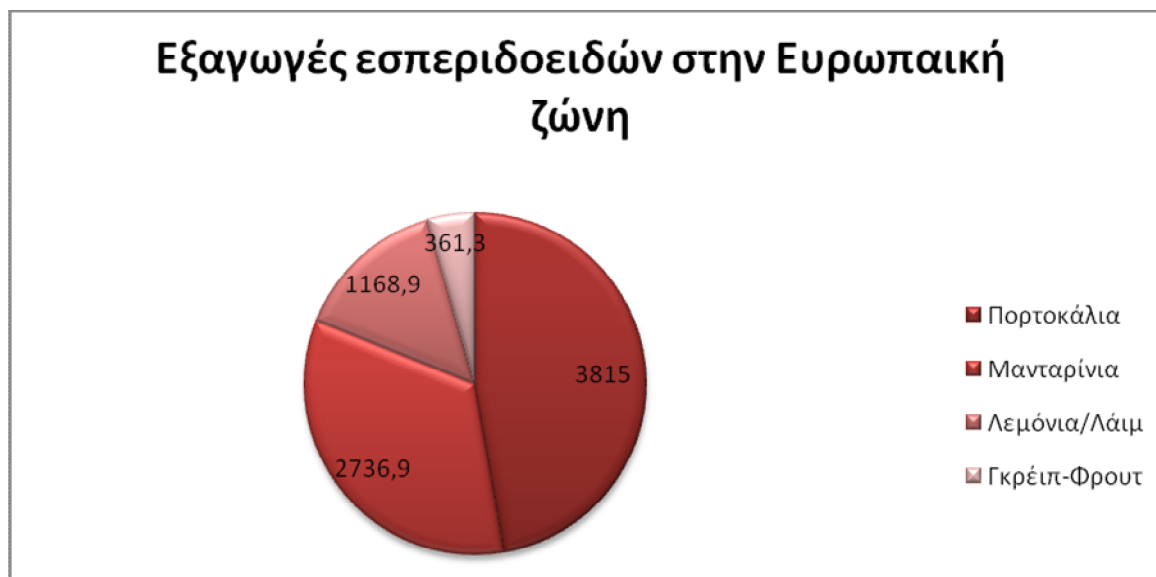


Γράφημα 3. Κατανομή κυρίων ειδών εσπεριδοειδών σε χιλιάδες τόνους στην Ευρωπαϊκή ζώνη σύμφωνα με στοιχεία του FAO.

Από την συνολική παραγωγή εσπεριδοειδών παγκοσμίως, 15.022,9 χιλ τόνοι, χρησιμοποιήθηκαν ως εξαγωγίμα προϊόντα, το έτος 2013/14 (FAO, 2016). Οι χώρες της μεσογειακής ζώνης κρατούν το μεγαλύτερο ποσοστό των εξαγωγών παγκοσμίως, με 12.282 χιλ. τόνους εξαγωγίμου προϊόντος, το ίδιο έτος. Η χώρα μας από τους 1.203,3 χιλ. τόνους παραγωγής εσπεριδοειδών το έτος 2013/14, εξήγαγε 451,6 χιλ. τόνους προϊόντων. Μεγαλύτερο μέρος των εξαγωγίμων προϊόντων καλύπτουν τα πορτοκάλια με 6599 χιλ. τόνους παγκοσμίως και 359 χιλ. τόνους για τη χώρα μας. Την δεύτερη θέση στις εξαγωγές καλύπτουν τα μανταρίνια, ακολουθούμενα από τα λεμόνια και τα λάιμ, με τη χώρα μας να εξάγει 83 χιλ. τόνου από τα πρώτα και μόλις 8 χιλ. τόνους από τα δεύτερα.



Γράφημα 4. Συνολική παγκόσμια και ελληνική εξαγωγή εσπεριδοειδών σε χιλιάδες τόνους από το 1981 έως το 2014 σύμφωνα με στοιχεία του FAO.

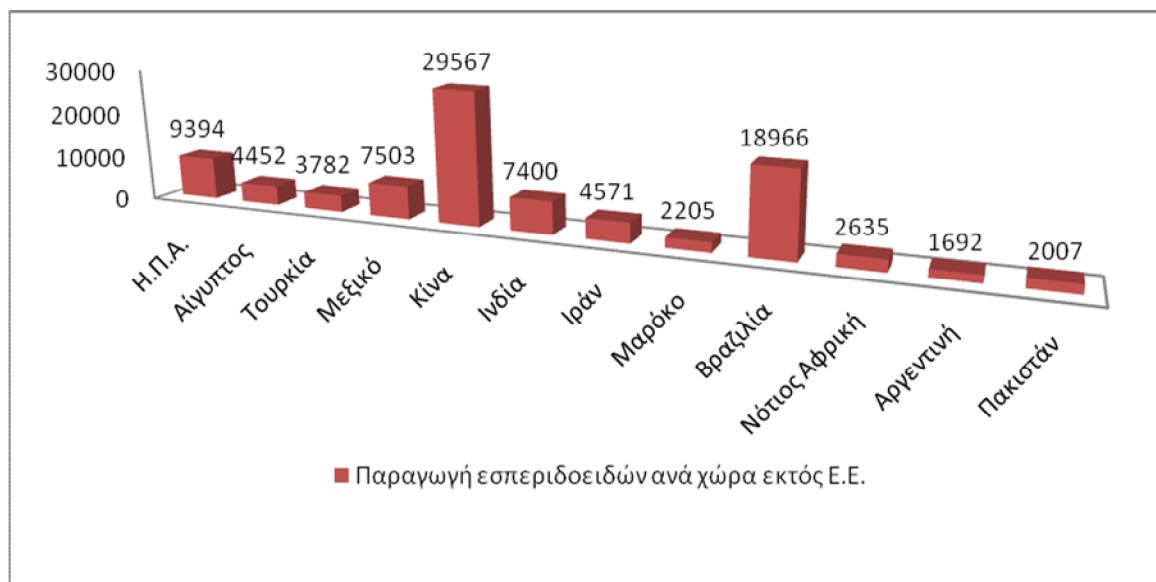


Γράφημα 5. Εξαγωγές ειδών εσπεριδοειδών σε χιλιάδες τόνους στην Ευρωπαϊκή ζώνη το έτος 2013-14 σύμφωνα με στοιχεία του FAO.

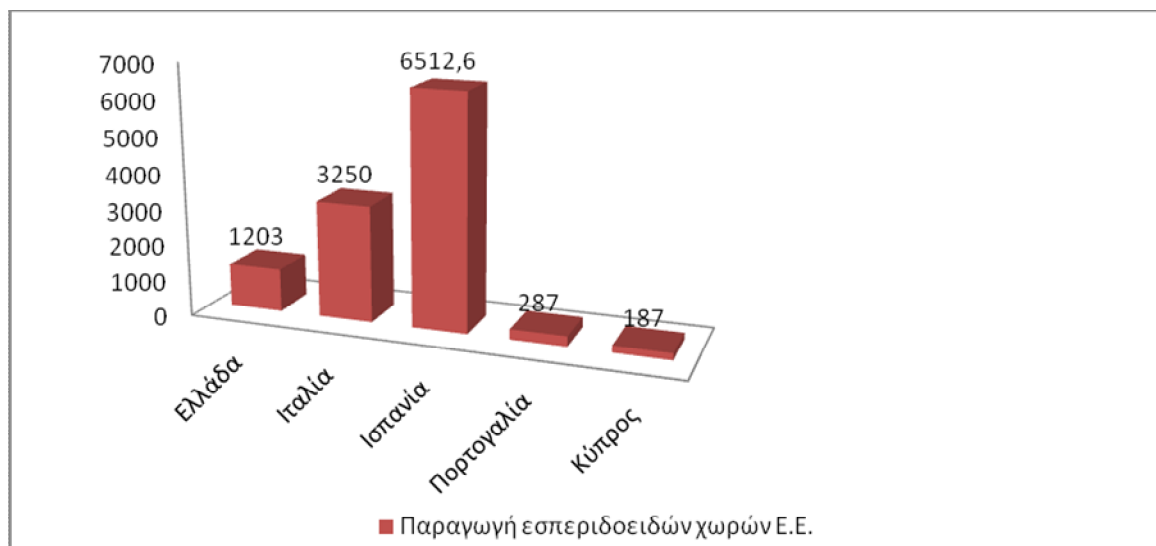
Η πρώτη σε παραγωγή χώρα στον κόσμο είναι η Κίνα. Στην Ευρωπαϊκή Ένωση μεγάλες εκτάσεις με εσπεριδοειδή υπάρχουν κυρίως στην Ιταλία, στην Ισπανία και την Ελλάδα. Στη χώρα μας, τα εσπεριδοειδή καλλιεργούνται σε πολλούς νομούς όπως οι νομοί Αργολίδας, Άρτας, Λακωνίας, Κορινθίας, Χανίων κ.α. Στις περισσότερες περιοχές από αυτές η εμπορία καρπών εσπεριδοειδών αποτελεί την κυριότερη πηγή εισοδήματος των αγροτών. Η συμβολή τους στις εξαγωγές της χώρας είναι ιδιαίτερα σημαντική καθώς περίπου το 30% των εξαγωγών οπωροκηπευτικών αντιστοιχεί στα εσπεριδοειδή.

Οι χώρες της μεσογείου διαθέτουν το 80% της εξαγόμενης παραγωγής τους σε φρέσκο καρπό και το υπόλοιπο 20% σε επεξεργασμένη μορφή. Αντίθετα η βόρειος και κεντρική Αμερική διαθέτουν μόνο το 20% της παραγωγής τους σε φρέσκο καρπό και το υπόλοιπο 80% σε επεξεργασμένη μορφή.

Η διατροφική σημασία των εσπεριδοειδών είναι πολύ μεγάλη καθώς τα εσπεριδοειδή διαθέτουν προστατευτική δράση για το ανοσοποιητικό σύστημα λόγω των υψηλών συγκεντρώσεων βιταμίνης C, και από το 1747 έχει συνδεθεί στη συνείδηση των ανθρώπων η κατανάλωση των εσπεριδοειδών με τη προστατευτική δράση στην υγεία των ναυτικών. Ωστόσο, είναι πλέον γνωστό σήμερα ότι τα εσπεριδοειδή επιπλέον διαθέτουν και άλλα πολύτιμα στοιχεία και βιταμίνες με πολύτιμη δράση.



Γράφημα 6. Παραγωγή εσπεριδοειδών σε χιλιάδες τόνους το έτος 2013-2014, σε χώρες εκτός της Ε.Ε. σύμφωνα με στοιχεία του FAO.



Γράφημα 7. Παραγωγή εσπεριδοειδών σε χιλιάδες τόνους το έτος 2013-2014, στις χώρες της Ε.Ε. σύμφωνα με στοιχεία του FAO.

1.2 ΤΑΞΙΝΟΜΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ

Τα εσπεριδοειδή ανήκουν στην οικογένεια Rutaceae, στην υποοικογένεια Aurantioideae, στην φυλή Citrae και στην υποφυλή Citrinae (Reuther, et al. 1967). Η υποοικογένεια Aurantioideae περιλαμβάνει το γένος Citrus και άλλα 32 συγγενή προς αυτό γένη. Τα είδη που ανήκουν στα Aurantioideae είναι δέντρα ή θάμνοι (σπάνια ποώδη) αειθαλή, με εξαίρεση το γένος Poncirus, Eagle, Feronia καθώς και 3 είδη του γένους Clausena και ενός είδους του γένους Murraya, που είναι φυλλοβόλα (Βασιλακάκης, 1996). Σήμερα υπάρχουν δύο κύρια συστήματα ταξινόμησης του γένους Citrus, το σύστημα κατά W.T. Swingle και το σύστημα κατά T. Tanaka. Στο ταξινομικό σύστημα Swingle (1943), το γένος Citrus ταξινομείται σε δύο υπογένη, το υπογένος Citrus ή Eucitrus και το υπογένος Papeda. Στα υπογένη αυτά υπάγονται 16 είδη, δέκα στο Citrus και έξι στο Papeda. Τα είδη αυτά διακρίνονται εύκολα από τους χαρακτήρες των φύλων, των ανθέων και των καρπών (Ποντίκης, 1993). Αντιθέτως ο Tanaka κατατάσσει τα εσπεριδοειδή σε 163 είδη (Πρωτοπαπαδάκης, 2004).

Εκτός από τα κύρια παραπάνω είδη υπάρχουν και υβρίδια μεταξύ διαφόρων ειδών των εσπεριδοειδών. Τα περισσότερα είδη του γένους Citrus διασταυρώνονται μεταξύ τους καθώς και με τα είδη των Poncirus και Fortunella. Παρά την ευκολία με την οποία τα είδη των εσπεριδοειδών μπορούν να διασταυρώνονται οι προσπάθειες των βελτιωτών να δημιουργήσουν νέες ποικιλίες δεν έχουν αποδώσει, εκτός μερικών εξαιρέσεων (Βασιλακάκης, 1996).

Επίσης εφαρμόστηκε ταξινόμηση των εσπεριδοειδών με βιοχημικά χαρακτηριστικά, συνδυάζοντας 146 μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά των φύλλων, των ανθέων, των καρπών και των δέντρων (Barret και Rhodes, 1976). Εφαρμόστηκε ακόμα η μέθοδος ισοενζύμων για την ταξινόμηση των εσπεριδοειδών (Torres et al., 1978). Έχουν χρησιμοποιηθεί πολλές μέθοδοι ταξινόμησης των εσπεριδοειδών, αλλά οι πιο σύγχρονες είναι αυτές της χρήσης των μοριακών δεικτών. Οι μοριακοί δείκτες που έχουν χρησιμοποιηθεί για την ταξινόμηση των εσπεριδοειδών είναι: η επαναλαμβανόμενη απλή ακολουθία (ISSR), οι μικροδορυφόροι (SSR), το τυχαία ενισχυμένο πολυμορφικό DNA (RAPD), ο πολυμορφισμός μήκους περιορισμένων τμημάτων DNA (RLFP), η ενισχυμένη περιοχική χαρακτηρισμένης ακολουθίας (SCAR) (Moore, 2001). Οι παραπάνω μοριακοί δείκτες βοήθησαν στην εξεύρεση της καταγωγής και εξέλιξης ορισμένων αμφιλεγόμενων ειδών. Για το είδος West Indian Key, βρέθηκε με μοριακούς δείκτες RFLP ότι ένας από τους γονείς τους είναι η κιτριά (Federiki, 1998). Με δείκτες ISSR υποστηρίχθηκε η προφυλετική καταγωγή του λεμονιού (Fang, 1998).

2. ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ

2.1. ΚΥΡΙΟΤΕΡΑ ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΑ

Τα εσπεριδοειδή πολλαπλασιάζονται κυρίως με εμβολιασμό της επιθυμητής ποικιλίας σε υποκείμενα. Πολλά όμως είδη μπορούν να πολλαπλασιαστούν και με φυλλοφόρα μοσχεύματα.

Για την εγκατάσταση μιας νέας καλλιέργειας εσπεριδοειδών είναι απαραίτητη η γνώση της σχέσης εδάφους-περιβάλλοντος-φυτού, προκειμένου να γίνει η επιλογή της ποικιλίας και του υποκειμένου που θα χρησιμοποιηθούν.

Η επιλογή του υποκειμένου βασίζεται: στην ικανότητα σύνδεσης του με την εκάστοτε ποικιλία, στη δομή του εδάφους, στη χημική σύσταση του εδάφους, στην ανθεκτικότητα του στις ασθένειες, στις υδατικές συνθήκες, στις ποσότητες και τύπους λιπασμάτων που θα χρησιμοποιηθούν, στην βελτίωση των χαρακτηριστικών του παραγόμενου αντικειμένου (όπως έναρξη παραγωγής, ποιότητα, παραγωγικότητα κτλ.).

Κυριότερα υποκείμενα

Νεραντζιά (Citrus aurantium)

Κανένα άλλο υποκείμενο δεν έχει χρησιμοποιηθεί σε τέτοιο βαθμό και σε βάθος χρόνου, όσο η νεραντζιά, η κοινή. Πρόκειται για ένα ζωντανό υποκείμενο, το οποίο μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε πλήθος εδαφών, καθώς αναπτύσσει βαθύ ριζικό σύστημα με ανοχή στο εδαφικό ασβέστιο, στο υψηλό pH και τα άλατα. Τα ιδανικότερα εδάφη για την εφαρμογή αυτού του υποκειμένου είναι τα αμμοπηλώδη και τα αργιλώδη. Επίσης, η αντοχή της στη φυτόφθορα ήταν ένας λόγος διάδοσης της, ιδιαίτερα στην Ελλάδα.

Όμως, το μεγάλο της μειονέκτημα που οδήγησε στην εγκατάλειψη της χρήσης της σε πολλές χώρες καθώς και την απαγόρευσή της σε μερικές περιπτώσεις είναι η ευπάθεια της στην ίωση tristeza. Είναι επίσης ευαίσθητο υποκείμενο στους νηματώδεις.

Η νεραντζιά είναι ένα υποκείμενο συμβατό με τις περισσότερες ποικιλίες εσπεριδοειδών. Προσδίδει στην εμβολιαζόμενη ποικιλία κανονικό μέγεθος δέντρου έως μεγάλο, καρπούς μικρού μεγέθους αλλά εξαιρετικής ποιότητας, καθώς και μεγάλης περιεκτικότητας σε ασκορβικό οξύ.

Citranges (Poncirus trifoliata X Citrus sinensis)

Τα υποκείμενα Citranges είναι υβρίδια προερχόμενα από την τρίφυλλη πορτοκαλιά και την κοινή. Από τα Citranges υποκείμενα, τα πιο ευρέως διαδεδομένα είναι τα υποκείμενα Troyer, τα οποία χρησιμοποιούνται στην Ισπανία και την Φλόριντα των ΗΠΑ, και τα

υποκείμενα Carrizo, τα οποία χρησιμοποιούνται πιο πολύ στην Καλιφόρνια (ΗΠΑ, αν και από πολλούς θεωρούνται ακριβώς το ίδιο υποκείμενο.

Μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε διαφόρων ειδών εδάφη, εκτός από τα πολύ ασβεστώδη. Παρουσιάζουν μέτρια αντοχή στην αλατότητα και δείχνουν ανοχή στον ιό tristeza και τη φυτόφθορα. Έχουν όμως μικρή αντοχή στο ψύχος, για αυτό προτιμώνται οι πιο θερμές περιοχές για την φύτευσή τους. Επίσης είναι ευαίσθητα είδη στον ιό exocortis. Η διαφορά του Carrizo από το Troyer είναι η αντοχή του πρώτου στο νηματώδη Radolus simititis.

Στα Citranges υποκείμενα εμβολιάζονται επιτυχώς πορτοκαλιές, μανταρινιές, γκρέιπ φρουτ και λεμονιές. Μεγάλο πλεονέκτημά τους είναι η υψηλή παραγωγικότητα σε συνδυασμό με το μεγάλο μέγεθος καρπών καλής ποιότητας, που προσδίδουν στην εμβολιαζόμενη ποικιλία.

Poncirus trifoliata (L) Raf

Πρόκειται για υποκείμενο τρίφυλλης πορτοκαλιάς με πιο διαδεδομένα τα υβρίδια 'Rubidoux', 'Serra' και 'Flying Dragon', με το τρίτο να προτιμάται από τα άλλα δύο, κυρίως στην Ιταλία για εγκατάσταση νάνων καλλιέργειών.

Είναι υποκείμενο που αντέχει στα βαριά, όξινα και υγρά εδάφη, γεγονός που του επιτρέπει να χρησιμοποιηθεί σε μέρη με βαρύ χειμώνα. Παρουσιάζει αντοχή στη φυτόφθορα και ανοχή στον ιό tristeza, όμως είναι ευαίσθητο στα άλατα, την τροφοπενία βορίου και τον ιό Exocortis.

Μεγάλη συμβατότητα δείχνει με μανταρινιές, πορτοκαλιές και κουμ-κουάτ, στα οποία προσδίδει υψηλό μέγεθος παραγωγής σε συνδυασμό με υψηλή ποιότητα καρπού, αλλά μέγεθος δέντρου μικρότερο από το κανονικό.

Citrumelos (Poncirus trifoliata X Citrus paradisi)

Τα υποκείμενα *Citrumelos* είναι υβρίδια τρίφυλλης πορτοκαλιάς με γκρέιπ φρουτ. Έχουν καταγωγή τη Φλόριντα (ΗΠΑ) και τα πιο διαδεδομένα είναι το 'Swingle' και το '1452'.

Τα *Citrumelos* προτιμούν ελαφρά και αμμώδη εδάφη και πρέπει να αποφεύγονται τα ασβεστούχα, λόγω της μεγάλης ευαισθησίας τους στο εδαφικό ασβέστιο. Παρουσιάζουν αντοχή στους νηματώδεις και είναι ανεκτικά στον ιό tristeza και τη φυτόφθορα.

Προσδίδουν στην εμβολιαζόμενη ποικιλία ικανοποιητική παραγωγικότητα, ικανοποιητική ποιότητα καρπού αλλά το αρνητικό είναι η καθυστέρηση της ωρίμανσης των προϊόντων.

Το υποκείμενο αυτό θεωρείται το ιδανικότερο για την ποικιλία Κλημεντίνη, καθώς αυξάνει το μέγεθος της παραγωγής, εισέρχεται νωρίς στην παραγωγή και δίνει ικανοποιητικό μέγεθος.

Cleopatra

Πρόκειται για υποκείμενο μανταρινιάς, το οποίο χρησιμοποιείται σχεδόν σε όλες τις χώρες τις οποίες καλλιεργούνται εσπεριδοειδή.

Μπορεί να καλλιεργηθεί σε μεγάλη ποικιλία εδαφών, ασβεστούχα, βαριά και με συνεχή υγρασία. Παρουσιάζει ανοχή στον ιό *tristeza*, στον ιό *exocortis*, την *xyloporosis*, τα άλατα και το ψύχος.

Εμβολιάζονται σε αυτό με μεγάλη επιτυχία τα γκρέιπ φρουτ και λιγότερο οι πορτοκαλιές. Προσδίδουν στο αντικείμενο εμβολιασμού μεγάλο μέγεθος δέντρου και υψηλή ποιότητα καρπού, αλλά τα αρνητικά είναι η αργή είσοδος στην παραγωγή, το μικρό μέγεθος καρπού, όπως και οι μεταχρωματισμοί του καρπού που μπορεί να συμβούν σε κάποιες περιπτώσεις.

Citrus macrophylla (Alemow)

Το υποκείμενο *Alemow* είναι ένα υποκείμενο που ανήκει στο υπογένος *Papeda* με καταγωγή τις Φιλιππίνες, το οποίο καλλιεργείται στην Ισπανία, την Καλιφόρνια και την Αριζόνα.

Προτιμά τις ζεστές περιοχές για την καλλιέργεια του και βρίσκει εφαρμογή σε πληθώρα εδαφών. Τα πλεονεκτήματα του είναι η αντοχή στη φυτόφθορα, το εδαφικό ασβέστιο, την αλατότητα και την χλώρωση σιδήρου. Παρουσιάζει όμως ευαισθησία στον ιό *tristeza*, στις χαμηλές θερμοκρασίες και την τροφοπενία ψευδαργύρου και μαγγανίου.

Είναι συμβατό με λεμονιά και μανταρινιά και δίνει μεγάλο μέγεθος δέντρου, με γρήγορη είσοδο στην παραγωγή, με κατώτερη όμως ποιότητα καρπού.

Volkameriana

Πιστεύεται ότι είναι υβρίδιο λεμονιάς με κιτριά.

Παρουσιάζει ανοχή στον ιό *tristeza* και είναι ανθεκτικό στο εδαφικό ασβέστιο και στις χαμηλές θερμοκρασίες, αλλά είναι ευαίσθητο στην κορυφοξήρα και τη φυτόφθορα.

Μπορεί να συμβιώσει με λεμονιά, πορτοκαλιά, μανταρινιά και γκρέιπ φρουτ. Η εμβολιαζόμενη ποικιλία εισέρχεται νωρίς στην παραγωγή με υψηλό βαθμό παραγωγικότητας αλλά μέτριας ποιότητας καρπού, κατώτερης από αυτής που προσδίδουν τα *Citranges* και η νεραντζιά.

2.2 In vitro πολλαπλασιασμός

2.2.1 Εισαγωγή

Ο μαζικός πολλαπλασιασμός φυτών μέσω της καλλιέργειας ιστού, σήμερα, αποτελεί την ανταγωνιστική δύναμη όλων των μονάδων παραγωγής πολλαπλασιαστικού υλικού. Με τη χρήση αυτής της τεχνολογίας εκατομμύρια φυτά παράγονται παγκοσμίως κάθε χρόνο. Η φιλοσοφία της ιστοκαλλιέργειας βασίζεται στη δυνατότητα ελέγχου της μορφογένεσης ενός φυτικού κυττάρου ιστού με τεχνητά μέσα.

Ο τρόπος αυτός πολλαπλασιασμού απαιτεί μεγάλη προσοχή στη λεπτομέρεια καθώς είναι μια σύνδεση επιστήμης και τέχνης, η οποία χρειάζεται συνεχή έρευνα και εξάσκηση. Η ιστοκαλλιέργεια αποτελεί μια μέθοδο εγκατάστασης καλλιεργειών μέσα από ορμονικούς χειρισμούς, απαλλαγμένη από μικροοργανισμούς, ρύθμιση κλιματολογικών συνθηκών, ριζοβολία και πολλά άλλα στοιχεία, από τα οποία το καθένα είναι απαραίτητο για την επίτευξη του τελικού αποτελέσματος και έχει τη δυνατότητα να επηρεάσει εξίσου τον τελικό στόχο.

Ο in vitro τρόπος πολλαπλασιασμού αναφέρεται στην ασηπτική καλλιέργεια κυττάρων ή ζωντανών φυτικών οργάνων καθώς και την μεταχείριση αυτών ανάλογα με το στόχο της εκάστοτε καλλιέργειας. Η ιστοκαλλιέργεια βασίζεται σε δύο σημαντικές ιδιότητες του φυτικού κυττάρου, στην ολοδυναμικότητα και στην ικανότητα αποδιαφοροποίησης του. Η ολοδυναμικότητα αναφέρεται στην ικανότητα του φυτικού κυττάρου να μπορεί να αναγεννήσει ολόκληρο το φυτό από το οποίο προήλθε, ενώ η αποδιαφοροποίηση αναφέρεται στην ικανότητα πλήρως διαφοροποιημένων κυττάρων να επανακτήσουν τις μεριστωματικές τους ιδιότητες. Η αναγέννηση με τη μέθοδο της ιστοκαλλιέργειας μπορεί να προκύψει με διάφορους τρόπους εκφύτων, όπως φύλλα (Rugini και Caricato 1995, Pareek και Kothari 2003, Yu κ.ά. 2003, Matt και Jehle 2005, Rao κ.ά. 2005, Zawadzka και Orlikowska 2006, Prado κ.ά. 2007, Ghimire κ.ά. 2010, Liberman κ.ά. 2010), ρίζες (Eapen και Gill 1986, Zheng κ.ά. 2003, Chaudhuri κ.ά. 2004), ωάρια (Litz και Conover 1982), κοτυληδόνες και ιστούς κοτυληδόνων (Mante κ.ά. 1989, Leva κ.ά. 1995, Naik κ.ά. 2000, Hokanson και Pooler 2000, Tang κ.ά. 2000, Saafi και Borthakur 2002, Joshi και Kothari 2007, Selvaraj κ.ά. 2007, Canli και Tian 2008, Tiwari και Tuli 2008), μασχαλιαίους οφθαλμούς (Reuveni κ.ά. 1990) κ.ά.

Λόγω της μεγάλης οικονομικής σημασίας των εσπεριδοειδών, μελετήθηκε από πολλούς ερευνητές παγκοσμίως η ιστοκαλλιέργεια υποκειμένων εσπεριδοειδών, χρησιμοποιώντας διάφορα όργανα φυτικού υλικού, με σκοπό τον πολλαπλασιασμό φυτών σε μικρό χρονικό διάστημα, το οποίο είναι υγιές και απαλλαγμένο από μικροοργανισμούς και φέρει τα επιθυμητά χαρακτηριστικά. Στα εσπεριδοειδή, ο ταχύτερος τρόπος πολλαπλασιασμού επιτυγχάνεται με τη χρήση νεανικών εκφύτων.

2.2.2 Οργανογένεση

Τα κύτταρα των εκφύτων μπορούν να ακολουθήσουν δύο μορφολογικές οδούς μέσω της in vitro καλλιέργειας, της οργανογένεσης ή της σωματικής εμβρυογένεσης. Αυτές οι δύο

διαδικασίες μπορούν να συμβούν άμεσα, δηλαδή πάνω στο καλλιεργούμενο έκφυτο, ή έμμεσα, αφού προηγηθεί αποδιαφοροποίηση και σχηματισμός κάλλου.

Σωματική εμβρυογένεση ονομάζεται η διαδικασία με την οποία σχηματίζονται εμβρυακές δομές στα καλλιεργούμενα έκφυτα χωρίς να έχει προηγηθεί καμία φάση γονιμοποίησης.

Ο όρος οργανογένεση αναφέρεται στη διαδικασία η οποία οδηγεί στο σχηματισμό καταβολών οργάνων πάνω στα έκφυτα. Τα όργανα αυτά μπορούν να ανήκουν σε διάφορες κατηγορίες, συνεπώς η οργανογένεση ορίζεται ανάλογα με το είδος του παραγόμενου οργάνου, έτσι ορίζεται σε βλαστογένεση, ριζογένεση, οφθαλμογένεση, κτλ. Επίσης η οργανογένεση μπορεί να αναφέρεται σε τυχαία οργανογένεση, επειδή μπορεί να σχηματιστούν καταβολές οργάνων διαφορετικές από τον τύπο των εκφύτων, όπως για παράδειγμα σχηματισμός ριζών σε έκφυτα φύλλου. Τα σχηματιζόμενα όργανα θεωρούνται μονοπολικές μορφολογικές δομές, καθώς δεν εξελίσσονται άμεσα σε ολόκληρα φυτά, δηλαδή παραγόμενοι βλαστοί μέσω ιστοκαλλιέργειας πρέπει να καλλιεργηθούν ξανά ώστε να σχηματίσουν ρίζες. Συγκεκριμένα στα εσπεριδοειδή έχουν παρατηρηθεί πολλές φορές σχηματισμοί τυχαίας οργανογένεσης βλαστών και οφθαλμών (Barlass and Skene, 1986; Gmitter et al., 1992). Η διαδικασία αυτή ελέγχεται ορμονικά καθώς η παρουσία της κυτοκινίνης BA είναι καθοριστική για την ύπαρξη οργανογένεσης, αλλά η ιδανική συγκέντρωσή της εξαρτάται από το γονότυπο του φυτού (Barlass and Skene, 1986).

Η επιλογή της έμμεσης ή άμεσης οργανογένεσης εξαρτάται από πλήθος παραμέτρων, οι οποίες ορίζονται από το σκοπό της έρευνας και τις συνθήκες ιστοκαλλιέργειας. Η διαφοροποίηση σχετίζεται με την ικανότητα αναγέννησης, την αντίδραση στις προστιθέμενες ορμόνες και τη σειρά των διαδικασιών που ακολουθείται από τον ερευνητή. Επίσης η αντίδραση στις ορισμένες συνθήκες οφείλεται κατά ένα μέρος στον γονότυπο (Vardi κ.ά. 1982, Gmitter κ.ά. 1992, Pérez-Molphe-Balch και Ochoa-Alejo 1997, Carimi κ.ά. 1998b, Ghorbel κ.ά. 1998, Perez κ.ά. 1998, Bordón κ.ά. 2000). Διαφορές επίσης προκύπτουν από τον τύπο του εκφύτου και το προσανατολισμό του κατά την καλλιέργειά του (Burger και Hackett 1986, Sim κ.ά. 1989, Gill κ.ά. 1994, Goh κ.ά. 1995, Maggon και Singh 1995, Pérez-Molphe-Balch και Ochoa-Alejo 1997, Perez κ.ά. 1998, García-Luis κ.ά. 1999, 2006, Bordón κ.ά. 2000, Moreina-Dias κ.ά. 2000, 2001). Επιπλέον το αποτέλεσμα της οργανογένεσης εξαρτάται από τη σύνθεση του μέσου και τις συνθήκες καλλιέργειας (Sauton κ.ά. 1982, Burger και Hackett 1986, Sim κ.ά. 1989, Gill κ.ά. 1994, Goh κ.ά. 1995, Maggon και Singh 1995, Pérez-Molphe-Balch και Ochoa-Alejo 1997, Carimi κ.ά. 1998b, Chakravarty και Goswami 1999, Bordón κ.ά. 2000, Moreina-Dias κ.ά. 2000, 2001, Molina κ.ά. 2007, Duran-Vila κ.ά. 1992, Cabasson κ.ά. 1997, Pérez-Molphe-Balch και Ochoa-Alejo 1997, Perez κ.ά. 1998, García-Luis κ.ά. 1999, Bordón κ.ά. 2000, Moreina-Dias κ.ά. 2000, 2001).

2.2.3 ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Το υπόστρωμα καλλιέργειας πρέπει να παρέχει θρεπτικά στοιχεία και νερό στα καλλιεργούμενα κύτταρα και ιστούς, να ρυθμίζει το pH του περιβάλλοντος, να ρυθμίζει την ανάπτυξη και τη διαφοροποίηση της καλλιέργειας. Το κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα περιλαμβάνει μακροστοιχεία, ιχνοστοιχεία, βιταμίνες, αμινοξέα και αμίδια, σάκχαρα και αλκοολοσάκχαρα ανοιχτής μακράς αλυσίδας, οργανικά οξέα, άλατα οργανικών οξέων και ρυθμιστικά διαλύματα. Εκτός από αυτές τις ουσίες περιλαμβάνει και τις παρακάτω:

A) Πηκτικοί παράγοντες

Στην ιστοκαλλιέργεια χρησιμοποιούνται διαφόρων ειδών πηκτικοί παράγοντες με σκοπό τη μετατροπή του υποστρώματος από υγρό σε ημιστερεό θρεπτικό υπόστρωμα. Ο πιο συνηθισμένος παράγοντας για αυτή τη διαδικασία είναι το άγαρ. Η ιδανική συγκέντρωση που πρέπει να χρησιμοποιηθεί σε κάθε καλλιέργεια διαφέρει σε κάθε καλλιέργεια και εξαρτάται από το είδος του υποστρώματος και του εκφύτου, καθώς η συγκέντρωση του επηρεάζει σημαντικά το αποτέλεσμα του καλλιεργούμενου ιστού (Owens and Wozniac, 1991; Pereira-Neto et al., 2007).

Η υψηλή συγκέντρωση άγαρ μπορεί να προκαλέσει υδατική καταπόνηση του εκφύτου (Williams, 1992), μπορεί επίσης να προκαλέσει μείωση διάχυσης θρεπτικών και φωτορυθμιστικών ουσιών, συνεπώς πρόβλημα στην απορρόφηση τους στη βάση του εκφύτου (Romberger and Tabor, 1971), επίσης είναι πιθανό να προκαλέσει μείωση της επιφάνειας απορρόφησης του εκφύτου το οποίο έχει ως αποτέλεσμα μείωση απορρόφησης θρεπτικών στοιχείων και ρυθμιστών αύξησης (Debergh, 1983). Η χαμηλή συγκέντρωση άγαρ μπορεί να προκαλέσει αύξηση της διαθεσιμότητας νερού (Williams, 1992), υάλωση των ιστών (Deberg et al., 1992; Cazanova et al., 2008).

B) pH

Στην καλλιέργεια φυτικών ιστών η διαθεσιμότητα και απορρόφηση των θρεπτικών στοιχείων, όπως και η ενζυμική και ορμονική δραστηριότητα του εκφύτου εξαρτάται από την τιμή του pH. Το pH επηρεάζει αρκετές διεργασίες του μικροπολλαπλασιασμού όπως η οργανογένεση (Zhang and Stoltz, 1989), ο ρυθμός βλαστογένεσης (Reeves et al, 1983) κ.α. Για τα περισσότερα φυτικά είδη η ιδανική του pH ορίζεται στο 5,7 με 5,8.

Σε χαμηλή συγκέντρωση του pH, η πηκτική ουσία είναι πιθανόν να μην στερεοποιηθεί ικανοποιητικά, αυξητικές ουσίες όπως το ινδολυλοξικό και το γιββεριλικό να διασπαστούν

αρκετά εύκολα, να διασπαστεί η βιταμίνη B1 κ.α. Σε υψηλή συγκέντρωση του pH είναι δυνατόν το υπόστρωμα να σταθεροποιηθεί σε μεγαλύτερο βαθμό, καθιστώντας έτσι δυσκολότερη την απορρόφηση ουσιών ή σε μείωση του ρυθμού βλαστογένεσης (Bornman and Vogelmann, 1984).

Γ) Σακχαρόζη

Για την αύξηση των κυττάρων, των ιστών και των εκφύτων είναι απαραίτητη η τροφοδότηση με μια πηγή άνθρακα. Η σπουδαιότερη από τις πηγές άνθρακα είναι η σακχαρόζη (Petersen et al., 1999; Fuentes et al., 2000). Οι ενεργειακές απαιτήσεις των ιστών στο υπόστρωμα φαίνεται ότι καλύπτονται από την παρουσία σακχαρόζης (Hazarika, 2003). Η άριστη συγκέντρωση σακχαρόζης εξαρτάται από το φυτικό είδος.

Η σακχαρόζη επηρεάζει το σχηματισμό και την αύξηση των βλαστών (Gurel και Gulsen, 1998), παρέχει ενώσεις δομικών και λειτουργικών συστατικών (Marino et al., 1993), βοηθά στη διατήρηση της οσμωτικής ισορροπίας και της σπαργής των κυττάρων (Hazarika, 2003), αυξάνει τα επίπεδα αμύλου και σακχαρόζης στα μικροπολλαπλασιαζόμενα φυτά (Jo et al., 2009), βοηθά στον ex vitro εγκλιματισμό και επιταχύνει τις προσαρμογές των φυσιολογικών διεργασιών (Pospíšilová et al., 1999).

Δ) Ρυθμιστές Ανάπτυξης

i) Αυξίνες

Οι αυξίνες προάγουν κυρίως την επιμήκυνση των κυττάρων και χρησιμοποιούνται στο στάδιο της ριζοβολίας. Σχεδόν στο σύνολο των φυτικών ειδών η εμφάνιση ριζών επιτυγχάνεται με τη χρήση αυξίνης. Η επιλογή της κατάλληλης αυξίνης καθώς και η ιδανική συγκέντρωσή της εξαρτάται από το φυτικό είδος (George, 1996). Ο αριθμός των ριζών που θα εμφανιστούν σε κάθε βλαστό είναι ανάλογο με τη συγκέντρωση της αυξίνης μέχρι ενός ορίου, το οποίο είναι το ιδανικό. Εάν αυτό το όριο ξεπεραστεί τότε σχηματίζεται κάλλος και οι ρίζες μπορεί να μην έχουν την επιθυμητή εμφάνιση και να έχουν μικρότερο μήκος. Από τις αυξίνες, στα εσπεριδοειδή χρησιμοποιούνται ευρέως το ινδολυλοβουτυρικό (IBA) και το ναφθαλινοξικό οξύ (NAA) διότι είναι σταθερές όταν αποστειρώνονται στους 121 °C και μπορούν να προστεθούν στο υπόστρωμα πριν την ριζοβολία (Rugini, 1990).

ii) Κυτοκινίνες

Οι κυτοκινίνες, ευνοούν κυρίως την διαίρεση των κυττάρων και αύξηση των στους καλλιεργούμενους φυτικούς βλαστούς και χρησιμοποιούνται στο στάδιο της βλαστογένεσης. Οι κυτοκινίνες χωρίζονται σε δύο μεγάλες ομάδες, στα παράγωγα της αδενίνης όπως η βενζυλαδενίνη (BA) και η ζεατίνη και στα συνθετικά παράγωγα φαινυλουρίας όπως η θειδιαζουρόνη (TDZ) (Nandi et al., 1989). Στα εσπεριδοειδή χρησιμοποιείται κυρίως η βενζυλαδενίνη (BA) για το λόγο ότι είναι πιο οικονομική, αποτελεσματική και μπορεί να αποστειρωθεί στους 121 °C (Thomas και Blakesley, 1987; Carimi και De Pasquale, 2003). Η ζεατίνη έχει υψηλό κόστος, για αυτό η χρήση της αποφεύγεται.

iii) Γιββερελλίνες

Οι γιββερελλίνες προάγουν την διαίρεση των κυττάρων και για αυτό το λόγο χρησιμοποιούνται στο στάδιο της βλαστογένεσης. Η προσθήκη γιββερελλίνης συχνά διεγείρει την έκπτυξη οφθαλμών (Ferne και Willimitzer, 2001).

iv) Πολυαμίνες

Οι πολυαμίνες εμπλέκονται σε πολλές διεργασίες όπως η κυτταρική διαίρεση, ο πολλαπλασιασμός, η διαφοροποίηση, η μορφογένεση ριζών, η αύξηση, ο σχηματισμός ανθών και καρπών και ο γηρασμός των φύλλων (Kumar et al., 1997; Bagni και Tassoni, 2001; Martin-Tanguy, 2001; Bais και Ravishankar, 2002; Couée et al., 2004). Η σπερμιδίνη, η σπερμίνη και η πουτρεσκίνη είναι οι συνηθέστερες πολυαμίνες στα φυτά.

v) Το αιθυλένιο και το αμπισικό οξύ είναι και αυτά ρυθμιστές ανάπτυξης οι οποίοι προωθούν τη γήρανση. Δεν χρησιμοποιούνται συχνά στην ιστοκαλλιέργεια.

2.3 ΠΟΛΥΕΜΠΡΥΟΓΟΝΙΑ – ΑΠΟΜΙΞΗ ΣΤΑ ΕΣΠΕΡΙΔΟΕΙΔΗ

Πολυεμβρυογονία είναι η δημιουργία δύο ή περισσότερων εμβρύων μέσα σε ένα σπέρμα και εξαρτάται από το είδος και την ποικιλία. Στα εσπεριδοειδή, τα υπεράριθμα έμβρυα παράγονται κατά δύο τρόπους : α. Από σωματικά κύτταρα του νούκελλου και β. Διά

της παραγωγής δύο ή περισσότερων ζυγωτικών εμβρύων, είτε διά διαιρέσεως ενός γονιμοποιημένου ωοκυττάρου, ή από δύο ή περισσότερους λειτουργικούς εμβρυόσακκους σε μια σπερματική βλάστη (Ποντίκης, 1993). Έτσι οι περισσότερες πολυεμβρυογονικές ποικιλίες θεωρούνται απομικτικές σε αντίθεση με τις μονοεμβρυογονικές ποικιλίες που είναι ζυγωτικές (Garcia, 1999).

Στα εσπεριδοειδή, ο πρώτος τρόπος παραγωγής εμβρύων σε ένα σπέρμα είναι ο πιο συνήθης. Τα έμβρυα σε ένα πολυεμβρυονικό σπέρμα διαφέρουν σε μέγεθος και σχήμα, ο δε μέσος όρος του αριθμού των παραγόμενων σπορόφυτων κατά σπέρμα συνήθως είναι πολύ μικρότερος από το σύνολο των εμβρύων (Ποντίκης, 1999). Μετά τη σπορά των πολυεμβρυονικών σπερμάτων, φυτρώνουν μερικά από τα έμβρυα και συνήθως μόνο τα μεγαλύτερα, αλλά τα ζυγωτικά δεν είναι κατά ανάγκη τα μεγαλύτερα. Αυτό οφείλεται στο ότι τα ζυγωτικά έμβρυα αναπτύσσονται με βραδύτερο ρυθμό από τα απομικτικά και έτσι δεν προλαβαίνουν να γίνουν αρκετά μεγάλα.

2.3.1 ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΗΣ ΑΠΟΜΕΙΞΗΣ ΣΤΑ ΕΣΠΕΡΙΔΟΕΙΔΗ

Η απόμειξη παίζει σημαντικό ρόλο στη βελτίωση των φυτών, όπως για παράδειγμα η παραγωγή υβριδικών σπόρων. Η παραγωγή υβριδίων είναι πολύπλοκη και πολυέξοδη, συνεπώς απαιτεί πολλές διασταυρώσεις κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες (Grimanelli, 2001). Η χρήση της απόμειξης μπορεί να μειώσει το κόστος παραγωγής σπόρων και να επιτρέψει στους καλλιεργητές να αποθηκεύσουν σπόρους από την καλλιέργεια των υβριδίων για την επόμενη καλλιεργητική περίοδο, καθώς και να διατηρήσουν τα πλεονεκτήματα των υβριδίων που υπό κανονικές συνθήκες θα χανόντουσαν λόγω της διάσχισης των γονιδίων (Grimanelli, 2001).

Η διάδοση των υποκειμένων των εσπεριδοειδών εξαρτάται από την παραγωγή κλωνικών φυτών από τα νουκελλικά σπορόφυτα. Οι περισσότερες ποικιλίες υποκειμένων που χρησιμοποιούνται είναι πολυεμβρυογονικές και παράγουν σπόρους που περιέχουν νουκελλικά και ζυγωτικά έμβρυα. Αν οι εμβολιασμοί γίνουν σε υποκείμενα που προέρχονται από ζυγωτικά σπορόφυτα τότε ίσως να επηρεάσουν την απόδοσή τους. Έτσι σε ένα πρόγραμμα παραγωγής υποκειμένων, θα πρέπει να ληφθεί σοβαρά υπόψη η παραγωγή υποκειμένων από απομικτικούς σπόρους (Garcia, 1999).

Στα εσπεριδοειδή, ο αγενής πολλαπλασιασμός θα μπορούσε να γίνεται με σπορά για την παραγωγή κλωνικών φυτών, τα οποία δεν θα είναι φορείς ιώσεων, και αυτό πραγματοποιείται με την καλλιέργεια των απομικτικών εμβρύων. Αυτό για τους γενετιστές, είναι ένας στόχος που ασχολούνται με τα άλλα οπωροφόρα.

Το βασικό πρόβλημα, είναι ότι τα σπορόφυτα βρίσκονται σε νεαρό στάδιο και είναι πολύ δύσκολο να διαχωριστούν μακροσκοπικά σε απομικτικά ή απογαμικά. Μόνο εάν ένας από τους δύο γονείς είναι *Poncirus trifoliata* μπορούμε να διακρίνουμε αν ένα από τα φυτά που θα αναπτυχθούν είναι απογαμικό, δεδομένου ότι θα έχει φύλλο σύνθετο. Έτσι πολλοί φυτωριόχοι εκμεταλλευόμενοι αυτή την ιδιότητα των απομικτικών σπερμάτων να δίνουν ομοιόμορφα φυτά, τα καλλιεργούσαν με αποτέλεσμα όμως να υπάρχουν φυτά τόσο στο

φυτώριο όσο και στο χωράφι αργότερα, άλλοτε σε μεγαλύτερο και άλλοτε σε μικρότερο ποσοστό που ήταν ανομοιόμορφα.

Από την άλλη οι μοριακοί δείκτες είναι επαρκές και δυναμικό εργαλείο στη διασταύρωση των φυτών αφού επιτρέπουν την γενετική ανάλυση των πολυγονιδιακών (ποσοτικών) χαρακτηριστικών και την προεπιλογή των επιθυμητών γονοτύπων (García, 1999). Ο Lugo (1995) χρησιμοποίησε την τεχνική των μικροδορυφόρων για την αναγνώριση των ζυγωτικών από τα απομεικτικά σπορόφυτα των οποίων μητρικό φυτό ήταν το *C. Volkameriana*. Αν η μοριακή γνώση των γονιδίων που εμπλέκονται στην έναρξη και τον έλεγχο της απόμιξης ήταν διαθέσιμη, τότε θα μπορούσαμε να τα μεταφέρουμε, στις καλλιέργειες που μας ενδιαφέρουν, μέσω μοριακού ανασχηματισμού (García, 1999).

3.1 ΜΕΘΟΔΟΙ ΤΑΥΤΟΠΟΙΗΣΗΣ ΕΙΔΩΝ ΚΑΙ ΠΟΙΚΙΛΙΩΝ

Η ταυτοποίηση των ποικιλιών γίνεται με τη βοήθεια διαφόρων δεικτών (markers). Όταν η διάκριση γίνεται μακροσκοπικά, οι δείκτες ονομάζονται μορφολογικοί, ενώ όταν η διάκριση γίνεται με την μικροσκοπική μελέτη των χρωμοσωμάτων τότε οι δείκτες ονομάζονται καρυοτυπικοί ή κυτταρογενετικοί. Όταν η διάκριση γίνεται είτε με τη βοήθεια δευτερογενών μεταβολιτών είτε πρωτεϊνών, οι δείκτες ονομάζονται βιοχημικοί. Οι γενετικοί δείκτες αποτελούν τρόπο διάκρισης των διαφορών μεταξύ των γενετικών πληροφοριών που φέρουν δύο ή περισσότερα άτομα. Οι δείκτες αυτοί ονομάζονται μοριακοί (DNA markers) όταν η διάκρισή τους βασίζεται στις διαφορές στην αλληλουχία των βάσεων του DNA (Bretting and Widrlechner, 1995).

3.1.1 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Οι δείκτες αυτοί είναι πολυμορφικά, μορφολογικά, κληρονομήσιμα χαρακτηριστικά, που αρχικά χρησιμοποιήθηκαν από ερευνητές για την εύρεση διαφορών μεταξύ ειδών και ποικιλιών. Επίσης, μπορούν να χρησιμοποιηθούν σε ορισμένες εφαρμογές διαχείρισης γενετικού υλικού, όπως η καθαρότητα των σειρών. Δεν υπάρχει απαίτηση εξειδικευμένου προσωπικού, αναλώσιμων και ειδικού εξοπλισμού. Συνεπώς, η καταγραφή μονογονιδιακών ή ολιγογονιδιακών χαρακτηριστικών είναι μια γρήγορη και οικονομική μέθοδος. Όμως για τα πολυγονιδιακά χαρακτηριστικά, η χρήση μορφολογικών δεικτών δεν είναι το ίδιο

αποτελεσματική κυρίως λόγω χαμηλού συντελεστή κληρονομικότητας (Patterson and Weatherup, 1984). Οι μορφολογικοί δείκτες έχουν εφαρμοστεί στην πλειονότητα των φυτών. Αυτοί που χρησιμοποιούνται και επίσημα για την ταυτοποίηση των ποικιλιών (Malik N. M. Et al., 1974, στη λεμονιά) ονομάζονται περιγραφητές.

3.1.2 ΚΑΡΥΟΤΥΠΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Οι καρυοτυπικές, κυτταρογενετικές παρατηρήσεις απαιτούν εξειδικευμένο εξοπλισμό (π.χ. μικροσκόπια) αλλά τα προπαρασκευαστικά πρωτόκολλα είναι απλά και χαμηλού κόστους. Η σωστή ερμηνεία κυτταρομορφολογικών γνωρισμάτων απαιτεί ικανή εκπαίδευση, εμπειρία και σε αρκετές περιπτώσεις προχωρημένη γνώση κυτταρογενετικής (Bretting and Widrlechner, 1995).

Τύποι κυτταρογενετικών δεικτών:

- α) Χρωμοσωμικός αριθμός (π.χ. σε σιτάρι και πατάτες)
- β) Χρωμοσωμικά μορφολογικά χαρακτηριστικά (όπως μέγεθος)
- γ) Ειδικά πρωτόκολλα χρώσης του κυττάρου (π.χ. C-ζώνωση και G-ζώνωση)
- δ) In situ υβριδισμός (Bretting and Widrlechner, 1995)

3.1.3 ΒΙΟΧΗΜΙΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Οι δευτερογενείς μεταβολίτες και οι πρωτεΐνες ονομάζονται βιοχημικοί δείκτες.

Δευτερογενείς μεταβολίτες:

Είναι οργανικές ενώσεις, προϊόντα δευτερογενούς μεταβολισμού ανώτερων φυτών όπως χρωστικές (ανθοκυανίνες ή άλλες ενώσεις φλαβονοειδών). Είναι κληρονομήσιμοι και πολυμορφικοί δείκτες, κυρίως σε ενδοειδικό και διειδικό επίπεδο. Σήμερα δεν χρησιμοποιούνται συχνά λόγω της ύπαρξης άλλων δεικτών με περισσότερα πλεονεκτήματα (Bretting and Widrlechner, 1995).

Πρωτεϊνικοί Δείκτες:

Οι πρωτεΐνες, όπως και το DNA, αποτελούν δείκτες για συγκεκριμένες εφαρμογές διαχείρισης του γενετικού υλικού. Οι πληροφορίες που παρέχουν θεωρούνται μικρότερης αξίας από τις πληροφορίες που παρέχουν οι δείκτες DNA γιατί αντιπροσωπεύουν μόνο τα προϊόντα των γονιδίων που κωδικοποιούν πολυπεπτίδια που δεν είναι τυχαία διασκορπισμένα σ όλο το γονιδίωμα (Bretting and Widrlechner, 1995).

Οι κυριότεροι πρωτεϊνικοί δείκτες είναι :

- α) Ορολογικές αναλύσεις (π.χ. στον αραβόσιτο, Bretting and Widrlechner, 1995).
- β) Πρωτεΐνες αποθήκευσης (π.χ. στο γένος *Gossypium*, Ladizinsky and Hymowitz, 1979).
- γ) Ισοένζυμα (π.χ. στον αραβόσιτο και στο σόργο, Bretting and Widrlechner, 1995)

3.1.4 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ

Οι μοριακοί δείκτες ή δείκτες DNA έχουν το πλεονέκτημα ότι ο πολυμορφισμός τους οφείλεται σε διαφορές στην ακολουθία των βάσεων του DNA, δεν επηρεάζονται από το περιβάλλον, ανιχνεύονται σε πολύ νεαρά στάδια του φυτού ή και στο σπόρο, ο προσδιορισμός τους γίνεται γρήγορα και καλύπτουν όλο το γονιδίωμα (Morell et al., 1995).

Στην κατηγορία των μοριακών δεικτών ανήκουν οι δείκτες RFLP και οι δείκτες που χρησιμοποιούν την τεχνολογία PCR.

3.1.4.1 Δείκτες RFLP

Οι δείκτες RFLP (Restriction Fragment Length Polymorfisms: Πολυμορφισμοί Μήκους Θραυσμάτων από Περιορισμό) ήταν οι πρώτοι μοριακοί δείκτες που χρησιμοποιήθηκαν (Tanhuaara, 1996). Ο πολυμορφισμός των RFLP προέρχεται από την “κοπή” του DNA σε θραύσματα από περιοριστικά ένζυμα. Ακολουθεί διαχωρισμός αυτών κατά την διέλευση τους από πηκτή αγαρόζης, αποτύπωση κατά Southern σε μεμβράνη, υβριδισμός με κατάλληλο ανιχνευτή DNA (DNA probe) και τέλος λήψη της οπτικής εικόνας με αυτοραδιογραφία με

ραδιενεργό φώσφορο (32P) ή και με άλλες μεθόδους (Bebeli and Kaltsikes, 1993). Οι RFLP δείκτες είναι αρκετά επαναλήψιμοι και χαρακτηρίζονται από συγκυριαρχία στην κληρονομικότητα τους (Tanksley et al., 1989). Συγκυριαρχία στην κληρονομικότητα σημαίνει ότι οι συνδυασμοί που παρέχουν υπολειπόμενους αλληλόμορφους όπως αα ή Αα, κληρονομούνται διαφορετικά από τον ΑΑ. Άρα οι συνδυασμοί αλληλόμορφων ΑΑ, Αα και αα έχουν διαφορετική έκφραση των αποτελεσμάτων κατά την ηλεκτροφόρηση τους. Τα μειονεκτήματα των δεικτών RFLP είναι οι απαιτήσεις σε χρόνο και εξειδικευμένο προσωπικό, η δυσκολία στην εύρεση του κατάλληλου κάθε φορά ανιχνευτή και η έκθεσή του χρήστη σε ραδιενεργό ακτινοβολία, όταν γίνεται χρήση ραδιενεργού 32P.

3.1.4.2 Δείκτες που χρησιμοποιούν την τεχνολογία PCR

Με την PCR (Polymerase Chain Reaction: Αλυσιδωτή αντίδραση της Πολυμεράσης) είναι δυνατή η παραγωγή ενός πολύ μεγάλου αριθμού αντιγράφων μιας συγκεκριμένης ακολουθίας βάσεων του DNA με τη βοήθεια μιας DNA πολυμεράσης, της Taq πολυμεράσης. Το ένζυμο αυτό χρησιμοποιεί μονή αλυσίδα DNA (single stranded DNA ή ssDNA) ως μήτρα για να συνθέσει το συμπληρωματικό του κλώνο, με κατεύθυνση από το 5' προς το 3' άκρο. Η σύνθεση αυτή πρέπει να ξεκινήσει από ένα δίκλωνο τμήμα.

Τα μόρια του μονόκλωνου DNA παράγονται με θέρμανση κοντά στο σημείο βρασμού. Ο εκκινητής (primer) είναι συμπληρωματικός ως προς την αλληλουχία του επιθυμητού σημείου έναρξης της σύνθεσης και όταν υβριδίζεται στην θέση αυτή παρέχει ένα δίκλωνο τμήμα απαραίτητο για την δράση της πολυμεράσης. Το δίκλωνο τμήμα στην αλυσίδα του DNA αποτελεί την αρχή της σύνθεσης της νέας αλυσίδας DNA (Saiki et al., 1985) η όλη διαδικασία γίνεται με ένα ειδικό όργανο (θερμοκυκλοποιητής ή PCR) που μεταβάλλει την θερμοκρασία ανάλογα με το στάδιο της αντίδρασης.

Οι δείκτες που βασίζονται στην αλυσιδωτή αντίδραση της πολυμεράσης (PCR) είναι: τυχαία ενισχυμένο πολυμορφικό DNA (RAPD: Random Amplified Polymorphic DNA), επαναλαμβανόμενες απλές ακολουθίες (SSR: Simple Sequence Repeats), ενδο-επαναλαμβανόμενες απλές ακολουθίες (ISSR: Inter Simple Sequence Repeats), πολυμορφισμός μήκους ενισχυμένων θραυσμάτων (AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphism) (Staub et al., 1995; Morell et al., 1995)

Η ανάλυση των δεικτών RAPD, έχει αρχικά περιγραφεί από τους Williams et al. (1990), και έχει προταθεί ως ένα χρήσιμο εργαλείο για την γενετική χαρτογράφηση. Οι εκκινητές που χρησιμοποιούνται είναι συνήθως τυχαία δεκαμερή ολιγονουκλεοτίδια, οι οποίοι υβριδίζονται σε συμπληρωματικές θέσεις, ως προς την αλληλουχία DNA του επιθυμητού σημείου έναρξης. Ο εκκινητής ως ολιγονουκλεοτίδιο θα βρει αρκετές θέσεις υβριδισμού πάνω στην αλυσίδα του DNA. Σε λίγες περιπτώσεις θα υπάρχει σε σχετικά μικρή απόσταση (<2000 – 3000 bp) δεύτερη αλληλουχία, συμπληρωματική του εκκινητή αλλά ανεστραμμένη, δηλαδή σε αντίθετη κατεύθυνση. Σε κάθε κύκλο της διαδικασίας το μεγαλύτερο τμήμα του γονιδιώματος που δεν βρίσκεται μεταξύ ενός τέτοιου ζεύγους, αντιγράφεται μια μόνο φορά ενώ οι περιοχές του γονιδιώματος που βρίσκονται μεταξύ δύο αντιστρόφων θέσεων υβριδισμού αντιγράφονται

δύο φορές. Έτσι την πρώτη φορά η ενίσχυση ακολουθεί γραμμική αύξηση ενώ την δεύτερη φορά εκθετική (Williams et al., 1990).

Τα προϊόντα της ενίσχυσης διαχωρίζονται με ηλεκτροφόρηση σε πηκτή αγαρόζης ή πολυακρυλαμίδιου και γίνονται ορατά μετά από χρώση με βρωμιούχο αιθίδιο ή νιτρικό άργυρο (Williams et al., 1990).

Ο πολυμορφισμός που εμφανίζεται στο ηλεκτρογράφημα μπορεί να οφείλεται:

α) Σε απαλοιφή μιας θέσης εκκινήτη

β) Σε αλλαγές βάσεων που κάνουν μια θέση εκκίνησης μη αναγνωρίσιμη

γ) Σε προσθήκες που κάνουν την απόσταση μεταξύ ενός ζεύγους θέσεων εκκίνησης πολύ μεγάλο για να γίνει ενίσχυση της μεταξύ τους ακολουθίας.

δ) Σε προσθήκες ή απαλοιφές που διαφοροποιούν το μέγεθος των ακολουθιών που ενισχύονται με αποτέλεσμα να εμφανίζονται διαφορετικές ζώνες.

Οι δείκτες RAPD είναι κυρίαρχοι στην έκφραση της κληρονομικότητας τους. Οι συνδυασμοί που περιέχουν κυρίαρχο αλληλόμορφο AA και Aa εκφράζονται με την παρουσία ενισχυμένης ζώνης DNA, ενώ ο συνδυασμός aa με απουσία ενισχυμένης ζώνης (Clark and Lanigan, 1993; Staud and Serquen, 1996). Ο πολυμορφισμός μεταξύ των ατόμων εκδηλώνεται με την παρουσία ή με την απουσία μια συγκεκριμένης ζώνης (Williams et al., 1990).

3.2 ΜΟΡΙΑΚΟΙ ΔΕΙΚΤΕΣ ΠΟΥ ΕΧΟΥΝ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΕΙ ΣΤΗΝ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΕΣΠΕΡΙΔΟΕΙΔΩΝ

Στο παρελθόν οι μελέτες που αφορούσαν τις φυλογενετικές σχέσεις εντός και μεταξύ του γένους και των ειδών των εσπεριδοειδών περιλάμβαναν μόνο τα μορφολογικά χαρακτηριστικά τους.

Οι πρώτες ταξινομήσεις ξεκίνησαν να γίνονται τη δεκαετία του 1970, από τους Barret και Rhodes, με χρήση βιοχημικών χαρακτηριστικών, καθώς και εφαρμόστηκε η μέθοδος των ισοενζύμων για την ταξινόμηση των εσπεριδοειδών (Πρωτοπαπαδάκης, 2004).

Μέχρι σήμερα έχουν χρησιμοποιηθεί πολλές μέθοδοι ταξινόμησης των εσπεριδοειδών αλλά οι πιο σύγχρονες είναι αυτές της χρήσης μοριακών δεικτών. Οι μοριακοί δείκτες που έχουν χρησιμοποιηθεί στην ταξινόμηση εσπεριδοειδών είναι:

-Η ενδο-επαναλαμβανόμενη απλή ακολουθία (ISSR): Ενίσχυση PCR του DNA χρησιμοποιώντας ένα μόνο εκκινήτη που αποτελείται από μια ακολουθία μικροδορυφόρων όπως ο (CA)₈ που προσφύεται στο 5' ή στο 3' άκρο από δύο ή τέσσερα νουκλεοτίδια (Scarano et al., 2002)

-Το τυχαία ενισχυμένο πολυμορφικό DNA (RAPD): Παραγωγή χαρακτηριστικά κυρίαρχου δείκτη μέσω της χρήσης ενός απλού, δεκαμερούς, τυχαία υβριδίζοντος εκκινήτη σε μια απλή αντίδραση PCR (Asadi et al., 2003).

- Οι μικροδορυφόροι (SSR): Σύντομες επαναλαμβανόμενες ακολουθίες νουκλεοτιδίων που χρησιμοποιούνται είτε ραδιενεργά σημασμένοι για την υβριδοποίηση τους με το περιορισμένο DNA εσπεριδοειδών είτε ως χωριστοί εκκινήτες στην αντίδραση της PCR (Corazza-Nunes et al., 2002).

- Ο πολυμορφισμός μήκους περιορισμένων τμημάτων DNA (RFLP): Διαφορές στο μέγεθος των ζωνών μετά από την κοπή του DNA με ένα συγκεκριμένο ένζυμο περιορισμού, ηλεκτροφόρηση και υβριδιοποίηση σε μεμβράνη με έναν συγκεκριμένο ιχνηλάτη (Fang et al., 1997).

- Ενισχυμένη περιοχή χαρακτηρισμένης ακολουθίας (SCAR): Μια απλή πολυμορφική ζώνη, που ενισχύεται από συγκεκριμένους εκκινητές. Προέρχεται από μετατροπή δεικτών RAPD ή AFLP (Nicolosi et al., 2000).

Σε κάθε περίπτωση η ταξινόμηση των εσπεριδοειδών είναι πολύπλοκη και αμφισβητούμενη διαδικασία, κυρίως λόγω της σεξουαλικής συμβατότητας ανάμεσα στα εσπεριδοειδή και τα συγγενή γένη, της υψηλής συχνότητας των μεταλλαγών στους οφθαλμούς, της μεγάλης ιστορίας της καλλιέργειας και της ευρείας διασποράς τους (Nicolosi, 2000).

Οι μοριακοί δείκτες χρησιμοποιούνται από ερευνητές όλο και περισσότερο τα τελευταία χρόνια για τον προσδιορισμό της φυλογενετικής και την γενετική καταγωγή πολλών φυτών συμπεριλαμβανομένων και των εσπεριδοειδών. Πολλοί ερευνητές έχουν ασχοληθεί με συγκεκριμένα είδη εσπεριδοειδών όπως, ο Πρωτοπαπαδάκης (1998) που χρησιμοποίησε την τεχνική των ισοενζύμων για την άντληση πληροφοριών όσο αναφορά την γενετική ποικιλομορφία των καλλιεργούμενων ειδών του *Citrus medica*, ο Matteo (1998) που χαρτογράφησε το γένωμα των *C. aurantium* και *C. latipes* με τη χρήση των RAPD, AFLP, και RFLP, ο Coletta (1998) για να μελετήσει τη γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ των μανταρινιών με RAPD, καθώς και ο Breto (2001) για να διαφοροποιήσει τις ποικιλίες της Κλημεντίνης (*C. clementina*) με τη χρήση RAPD, ISSR, AFLP και SSR).

3.3 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΚΑΙ ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΜΟΡΙΑΚΩΝ ΔΕΙΚΤΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ

Στη μέθοδο ISSR χρησιμοποιείται ένας μόνο εκκινητής, ο οποίος δεν είναι τυχαίος και αποτελείται από μια ακολουθία μικροδορυφόρων. Τα ενισχυμένα τμήματα του DNA (ή τα αντιγραφόμενα τμήματα) δημιουργούνται μόνο στις περιοχές του γονιδιώματος που υβριδίζει ο εκκινητής, με κατάλληλο προσανατολισμό, και σε απόσταση από 50 έως 3000 βάσεων. Εν συντομία, τα μονόκλωνα μόρια του γονιδιωματικού DNA μετά από αποδιάταξη υβριδίζουν κατά προτίμηση με τον εκκινητή λόγω της αυξημένης συγκέντρωσης τους στο διάλυμα. Ακολουθώς η θερμοανθεκτική πολυμεράση, πολυμερίζει με κατεύθυνση 5' → 3' όταν υπάρχει εκκινητής με ελεύθερο 3'-OH και μήτρα (μονόκλωνο DNA). Ο εκκινητής μπορεί να υβριδίζει σε εκατοντάδες θέσεις μέσα στο γονιδίωμα, όμως μόνο εκείνοι που υβριδίζουν σε δύο θέσεις στις αντίθετες αλυσίδες του DNA μέσα σε 50 έως 3000 βάσεις έχουν τη δυνατότητα παραγωγής και εμφάνισης ζωνών PCR. Ο κύκλος υβριδισμού, αποδιάταξης και πολυμερισμού επαναλαμβάνεται με αποτέλεσμα τη λογαριθμική αύξηση της συγκέντρωσης του μέρους αυτού του γονιδιώματος.

ISSR

Πλεονεκτήματα της μεθόδου:

1. Δεν προαπαιτείται ιδιαίτερη γνώση του γονιδιώματος του ατόμου
2. Σαρώνεται όλο το γονιδίωμα – πολλοί γενετικοί τόποι
3. Αυξημένη επαναληψιμότητα μεθόδου μεταξύ εργαστηρίων
4. Υψηλότερη ευαισθησία σε σχέση με τα RAPD
5. Ελέγχονται περισσότεροι από έναν γενετικοί τόποι ανά αντίδραση
6. Μεγάλο εύρος χρήσης (χαρτογράφηση, ταυτοποίηση, βελτίωση)
7. Απαιτούνται μικρότερες ποσότητες DNA από άλλες μεθόδους
8. Δεν απαιτεί πολύ χρόνο
9. Χαρακτηρίζεται από απλότητα – δεν χρειάζεται υβριδισμός, αυτοραδιογραφία

Μειονεκτήματα της μεθόδου

1. Οι δείκτες ISSR είναι κυρίαρχοι
2. Οι δείκτες ISSR δεν παρέχουν καμία πληροφορία για τις αλληλουχίες εντός των εκκινητών παρά μόνο μεγέθους.
3. Η παρουσία μιας ζώνης δεν σημαίνει αυτόματα το ίδιο το προϊόν
4. Μια ζώνη δεν αποτελείται από το ίδιο τμήμα DNA
5. Το πρότυπο ηλεκτροφόρησης εξαρτάται από την συγκέντρωση της DNA μήτρας.
6. Το κόστος της τεχνικής είναι υψηλότερο σε σχέση με τα RAPD.
7. Απαιτεί πιο εξειδικευμένες γνώσεις σε σχέση με τα RAPD.
8. Προβλήματα συν-μεταφοράς.

3.4.1 Συγκέντρωση Ταq πολυμεράσης

Για να μπορέσει η αλυσίδα του DNA να επιμηκυνθεί, θα πρέπει να υπάρχει μια μικρή νουκλεοτική αλληλουχία που παρέχει το ελεύθερο 3'-OH, για την ενσωμάτωση του επόμενου νουκλεοτιδίου από την DNA πολυμεράση, ώστε με αυτό τον τρόπο να γίνει η σύνθεση του DNA 5' → 3' διεύθυνση.

Στην πρωταρχική αντίδραση PCR (Saiki et al., 1988), χρησιμοποιήθηκε η DNA πολυμεράση I από *Escherichia coli*. Το ένζυμο ήταν ασταθές στις μεταβολές της θερμοκρασίας και έπρεπε να χρησιμοποιείται νέο ένζυμο σε κάθε κύκλο, μετά την αποδιάταξη της μήτρας DNA. Η ανακάλυψη της θερμοσταθερής Ταq πολυμεράσης (Saiki et al., 1988), εξάλειψε το πρόβλημα αυτό και έκανε δυνατή την αυτοματοποίηση του PCR. Μελέτες έχουν αποδείξει πως διαφορετικές πολυμεράσες έχουν ξεχωριστές ιδιότητες που επηρεάζουν την αποτελεσματικότητα του PCR. Οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται είναι συνήθως 0,5 – 5,0 μονάδες ένζυμου/100 μl αντίδρασης (Νικολουδάκης, 2005). Ως μονάδα ένζυμου ορίζεται η ποσότητα του που απαιτείται για να ενσωματώσει 10 nmol μίγματος δεοξυ-τρισφωφορικών νουκλεοτιδίων (dNTP's) στους 72°C σε χρόνο μισής ώρας.

Οι Henegarju et al. (1997) δοκίμασαν διαφορετικές συγκεντρώσεις Ταq πολυμεράσης. Η πιο αποτελεσματική συγκέντρωση του ένζυμου φαίνεται να είναι περίπου στα 1 Unit/25μl διαλύματος αντίδρασης. Υπερβολική ποσότητα του ένζυμου, πιθανότατα εξαιτίας της υψηλής συγκέντρωσης γλυκερούς στο συμπυκνωμένο διάλυμα, έχει σαν αποτέλεσμα μια ανισόρροπη ενίσχυση σε πολλά τμήματα του DNA καθώς επίσης και μια αμελητέα αύξηση του ίχνους (background). Πολύ χαμηλή συγκέντρωση του ένζυμου είχε ως αποτέλεσμα την έλλειψη κάποιων προϊόντων ενίσχυσης.

3.4.2 Μήτρα DNA

Η ποσότητα του DNA που χρησιμοποιείται ως μήτρα θα πρέπει να υπολογίζεται σε μοριακή βάση. Αυτός ο υπολογισμός θα καθορίσει την αρχική ποσότητα αλλά και τον αριθμό των κύκλων του PCR, ώστε να επιτευχθεί η επιθυμητή συγκέντρωση προϊόντος. Η πιστότητα της αντίδρασης εξαρτάται τόσο από το ρυθμό λάθους ενσωμάτωσης της πολυμεράσης όσο και από την συγκέντρωση της μήτρας DNA. Ο ρυθμός λάθους ενσωμάτωσης νουκλεοτιδίων είναι αντιστρόφως ανάλογος της συγκέντρωσης της μήτρας του DNA. Πάντως πολύ αραιά δείγματα κάνουν πιο δύσκολη την ενίσχυση του στόχου DNA, αφού η πιθανότητα συνδυασμού των εκκινητών και του DNA μειώνεται αισθητά, σε σημείο που οι επαφές μεταξύ των μορίων των εκκινητών είναι πολύ πιο συχνές. Αυτό βέβαια αποβαίνει αρνητικό στην πιστότητα της αντίδρασης αφού παράγονται διμερή εκκινητών και άλλα παραπροϊόντα. Ποικίλες συγκεντρώσεις DNA μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μήτρα. Συνήθως απαιτούνται 5-500 ng γονιδιωματικού DNA. Εδώ θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη μνεία στην μεγάλη απόκλιση μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων DNA που μπορεί να χρησιμοποιηθούν ως μήτρα. Αν

θεωρήσουμε ως 'στόχο' ένα γονίδιο το οποίο βρίσκεται μόνο μια φορά και κάνουμε την αποδοχή πως σε ποσότητα DNA, που αντιστοιχεί στον αριθμό ενός μόνο γονιδιώματος, περιέχεται μόνο ένας 'στόχος', τότε η διαφοροποίηση στις πιθανές συγκεντρώσεις DNA μήτρας γίνεται κατανοητή. Ένα ζεύγος βάσεων έχει μάζα περίπου 1×10^{-9} pg. Για έναν οργανισμό ο οποίος έχει μέγεθος γονιδιώματος περί τα 10 (9) ζεύγη βάσεων, αυτό σημαίνει πως ολόκληρο το γονιδίωμα (1pg) περιέχει ένα μόνο 'στόχο'. Άρα θα χρησιμοποιηθεί ως μήτρα γονιδιωματικό DNA συγκέντρωσης 5ng, θα περιέχονται περί τους 5000 'στόχους'. Αν αντίθετα ο οργανισμός έχει μέγεθος γονιδιώματος περί τα 10 (12) ζεύγη βάσεων, σε συγκέντρωση γονιδιωματικού DNA 5ng, θα περιέχονται μόνο 5 'στόχοι'. Είναι προφανές λοιπόν πως εκτός από τη μεγάλη σημασία που θα έχει η συγκέντρωση της μήτρας DNA, εξίσου μεγάλη σημασία έχει και το μέγεθος του γονιδιώματος.

3.4.3 Γενικά για το $MgCl_2$

Από τις πιο σημαντικές παραμέτρους στο διάλυμα της αντίδρασης είναι αυτή της συγκέντρωσης των ιόντων μαγνησίου. Από αυτή εξαρτάται τόσο η πιστότητα όσο και η απόδοση σε προϊόν. Υψηλές συγκεντρώσεις Mg^{2+} έχουν αποτέλεσμα τη σταθεροποίηση του δίκλωνου DNA και δρουν περιοριστικά στην επαρκή αποδιάταξη, οδηγώντας σε χαμηλή απόδοση προϊόντος. Επίσης υπερβολική συγκέντρωση Mg^{2+} σταθεροποιεί την ενσωμάτωση εκκινητών σε λάθος τμήματα της μήτρας DNA. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα την αύξηση των παραπροϊόντων και την ελάττωση της πιστότητας της αντίδρασης. Από την άλλη, χαμηλές συγκεντρώσεις Mg^{2+} εξασθενούν την επιμήκυνση της νουκλεοτικής αλυσίδας, αφού το Mg^{2+} απαιτείται ως συνπαραγοντας του ένζυμου της πολυμεράσης.

Πρέπει να ληφθεί υπόψη πως μέρος των ιόντων Mg^{2+} θα δεσμευτεί από δεοξυ-νουκλεοτίδια λόγω του αρνητικού τους φορτίου. Οι συνηθέστερες συγκεντρώσεις που χρησιμοποιούνται κυμαίνονται από 0,5 – 2,5 mM παραπάνω από τη συγκέντρωση των δεοξυ-νουκλεοτιδίων. Συγκέντρωση δεοξυ-νουκλεοτιδίων μεταξύ 20-200 μM , οδηγεί σε άριστη ισορροπία μεταξύ παραγωγής, εξειδίκευσης και πιστότητας. Τα τέσσερα δεοξυ-νουκλεοτίδια θα πρέπει να χρησιμοποιούνται σε ισόποσες συγκεντρώσεις για να αποφευχθούν λάθη της πολυμεράσης. Η εξειδίκευση και πιστότητα της αντίδρασης αυξάνει με μειωμένη συγκέντρωση των δεοξυ-νουκλεοτιδίων από τις συνιστώμενες. Χαμηλή συγκέντρωση περιορίζει τη λάθος ενσωμάτωση σε μη-στόχους περιοχές και μειώνει την πιθανότητα επιμήκυνσης της νουκλεοτικής αλυσίδας (Innis et al., 1988). Η χαμηλότερη δυνατή συγκέντρωση των δεοξυ-νουκλεοτιδίων καθορίζεται από το μήκος και σύσταση της ακολουθίας στόχου. Πειραματικά αποτελέσματα δείχνουν την ύπαρξη συσχέτισης μεταξύ μαγνησίου και συγκέντρωσης dNTP. Συγκέντρωση 200 μM συνήθως συστήνεται για κάθε dNTP για την Taq πολυμεράση, ε συγκέντρωση $MgCl_2$ 1,5 μM . Σε ένα διάλυμα αντίδρασης των 25 μl , θεωρητικά αυτά τα νουκλεοτίδια επιτρέπουν την σύνθεση 6-6,5 μg DNA. Η ποσότητα είναι επαρκής για

πολλαπλές αντιδράσεις κατά τις οποίες πέντε ως οχτώ εκκινητές ή και περισσότεροι χρησιμοποιούνται την ίδια στιγμή. Για να δουλέψει σωστά μια αντίδραση εκτός του μαγνησίου που περιορίζεται από τα dNTP και το DNA, απαιτεί και η Taq πολυμεράση ελεύθερο μαγνήσιο. Αυτός είναι πιθανότατα ο λόγος κατά τον οποίο μικρές αυξήσεις στις συγκεντρώσεις των dNTPs μπορούν γρήγορα να παρεμποδίσουν την αντίδραση της PCR (το μαγνήσιο <<παγιδεύεται>>). Αυξήσεις στη συγκέντρωση του μαγνησίου έχουν συνήθως θετικά αποτελέσματα.

Η σχέση μεταξύ συγκέντρωσης μαγνησίου και αυτής των dNTPs ερευνήθηκε με την εκτέλεση PCR με εκφυλισμένο εκκινητή σε αντιδράσεις οι οποίες περιείχαν 200,400, 600 και 800 μM από κάθε dNTP, συνδυάζοντας αυτές με 1.5, 2, 3, 4, και mM MgCl_2 . Η παραπάνω δοκιμή αποδεικνύει ότι οποιαδήποτε αύξηση στη συγκέντρωση των dNTPs, απαιτεί μια αύξηση στη συγκέντρωση των ιόντων μαγνησίου για να τρέξει η αντίδραση. Στη συγκέντρωση των 200 μM για κάθε dNTP, η αντίδραση δουλεύει σε όλες τις συγκεντρώσεις μαγνησίου, αλλά για αυτόν τον εκκινητή δούλεψε καλύτερα στα 3mM (ποσότητα μαγνησίου η οποία είναι διπλάσια από τη συνιστώμενη για την συγκεκριμένη ποσότητα dNTP). Στη συγκέντρωση των 800 μM , η αντίδραση δούλεψε μόνο όταν η συγκέντρωση του μαγνησίου ήταν μεγαλύτερη ή ίση των 3mM.

Εκτός από τη συγκέντρωση Mg, σημαντικός είναι και ο παράγοντας της ιοντικής ισχύος. Διαλύματα KCl είναι τα πλέον χρησιμοποιούμενα και είναι επαρκή για τις περισσότερες εφαρμογές. Όμως μερικά τμήματα DNA είναι δύσκολο να πολλαπλασιαστούν σε αυτό το περιβάλλον, ασχέτως της συγκέντρωσης Mg αυτά τα τμήματα που είναι πλούσια σε GC, μπορεί να πολλαπλασιαστούν ικανοποιητικά σε διάλυμα με βάση το NaCl, πιθανόν λόγω καλύτερης αποδιάταξης. Επίσης έχει δειχθεί πως διαλύματα που περιέχουν θειικό αμμώνιο μειώνουν το ποσοστό προϊόντων με ανεπαρκή επιμήκυνση. Τέλος κρίσιμος παράγοντας είναι και το pH του διαλύματος. Τα περισσότερα από τα διαλύματα αντίδρασης έχουν συγκέντρωση 10-50mM Tris-HCl και pH ρυθμισμένο στο 8.3. Όμως το pH θα μειωθεί, αυξανόμενης της θερμοκρασίας. Συνήθως το pH σε μια αντίδραση PCR κυμαίνεται μεταξύ 6.8 – 7.8 (Innis et al., 1988). Είναι πιθανόν για ορισμένα τμήματα του DNA η διακύμανση του pH να απομακρύνει την αντίδραση από τις ιδανικές συνθήκες και έτσι να χρειαστεί εμπειρική ρύθμιση του pH. Οι Henegariu et al., (1997) θέλησαν να μελετήσουν την μεμονωμένη αντίδραση της μεταβολής της συγκέντρωσης του MgCl_2 σε μια τυπική PCR αντίδραση με σταθερή τη συγκέντρωση των dNTPs (200mM το καθένα) καθώς και των άλλων παραγόντων. Η συγκέντρωση του MgCl_2 βαθμιαία αυξήθηκε από 1.8 στα 10.8 mM. Η συνολική ενίσχυση έγινε σταδιακά λιγότερο εξειδικευμένη (και μη συγκεκριμένες ζώνες εμφανίστηκαν). Παρόλα αυτά μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μαγνησίου φάνηκε ότι παρεμποδίζουν τη δράση της πολυμεράσης μειώνοντας την ποσότητα των προϊόντων. Λαμβάνοντας υπόψη την ποσότητα των PCR προϊόντων, η καλύτερη συγκέντρωση μαγνησίου φαίνεται να είναι μεταξύ των 1.8 και 3.6 mM (Henegariu et al., 1997)

3.4.4 Η θερμοκρασία και η διάρκεια υβριδισμού

Είναι μια από τις σημαντικές παραμέτρους που χρειάζονται ρύθμιση στην αντίδραση της PCR. Συνήθως στις αντιδράσεις PCR χρησιμοποιείται διάρκεια υβριδισμού από 30 – 45

δευτερόλεπτα. Αύξηση της διάρκειας έως τα 2-3 λεπτά δεν επηρεάζει σημαντικά το αποτέλεσμα της PCR αντίδρασης. Μεγαλύτερη διάρκεια υβριδισμού αυξάνει την πιθανότητα ενίσχυσης μη εξειδικευμένων προϊόντων.

Θερμοκρασία υβριδισμού (Κύκλοι της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης)

Κάθε κύκλος περιλαμβάνει:

1. Θέρμανση σε υψηλή θερμοκρασία για την αποδιάταξη του DNA (93-95⁰C). Υπολογίζεται ότι για την αποδιάταξη DNA μεγέθους 1kb χρειάζεται περίπου 1 λεπτό στους 94⁰C.
2. Θερμοκρασία υβριδισμού ή αναδιάταξης, κατά την διάρκεια της οποίας οι εκκινητές υβριδίζουν με το στόχο DNA. Η θερμοκρασία υβριδισμού εξαρτάται από το μήκος του εκκινητή και την περιεκτικότητα του σε G και C. Η ιδανική θερμοκρασία υβριδισμού εκκινητή DNA διαφέρει από την υπολογισμένη T_m (melting temperature) τιμή, ακόμη και όταν οι δύο εκκινητές έχουν την ίδια T_m. Έτσι η θερμοκρασία υβριδισμού εκκινητή DNA είναι συνήθως 5⁰C μικρότερη από την υπολογισμένη T_m, όπου για εκκινητές $T_m = \Delta H / (\Delta S + R \ln(c/4)) - 273, 15^{\circ}\text{C} + 16.6 \log_{10}(K^+)$, (ΔH και ΔS είναι η ενθαλπία και η εντροπία αντίστοιχα για τον σχηματισμό της έλικας, R είναι η γραμμομοριακή σταθερά των αερίων και η c είναι η συγκέντρωση του εκκινητή). Ένας πιο εύκολος και πρακτικός τρόπος υπολογισμού της T_m τιμής είναι $T_m = 2(A+T) + 4(C+G)$.

Εάν η θερμοκρασία υβριδισμού είναι πολύ υψηλή οι εκκινητές και ο στόχος DNA παραμένουν διαχωρισμένα (δεν υπάρχει υβριδισμός). Αντίθετα αν η θερμοκρασία είναι πολύ χαμηλή τότε οι εκκινητές υβριδίζουν με DNA αλληλουχίες χωρίς να υπάρχει 100% ομολογία μεταξύ τους. Σαν αποτέλεσμα, μετά την ολοκλήρωση της αντίδρασης, υπάρχουν προϊόντα που έχουν πολλαπλασιαστεί και δεν αντιστοιχούν στον επιθυμητό στόχο DNA. Ο χρόνος στην θερμοκρασία υβριδισμού είναι από 30 δευτερόλεπτα έως 1 λεπτό.

3. Θερμοκρασία επιμήκυνσης ή πολυμερισμού κατά την διάρκεια της οποίας η πολυμεράση συνθέτει την συμπληρωματική αλυσίδα του στόχου DNA, με κατεύθυνση από το 5' άκρο προς το 3' άκρο. Η ταχύτητα επιμήκυνσης είναι 35-70 νουκλεοτίδια ανά δευτερόλεπτο. Για περιοχή στόχο περίπου 1kb αρκεί 1 λεπτό στους 72⁰C. Οι τρεις αυτές διαδικασίες επαναλαμβάνονται από 20 έως 40 φορές, με αποτέλεσμα η DNA αλληλουχία στόχος να πολλαπλασιάζεται εκθετικά.

Σκοπός του πειράματος

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η μελέτη του *in vitro* πολλαπλασιασμού έξι υποκειμένων εσπεριδοειδών, 'Volkameriana', 'Citrumelo Swingle', 'Citranges Carrizo', 'Poncirus Trifogliato Serra', 'P. Tr. Rubidoux' and 'P. Tr. Flying Dragon'. Συγκεκριμένα μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων της ορμόνης κυτοκίνης BA στη βλαστογένεση των εκφύτων, η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων της ορμόνης αυξίνης NAA στη ριζογένεση των νέων βλαστών, καθώς και η επίδραση του γονοτύπου στη βλαστογένεση και τη ριζογένεση. Επίσης μελετήθηκε η γενετική παραλλακτικότητα των υπό μελέτη υποκειμένων και άλλων ειδών και ποικιλιών εσπεριδοειδών με τη χρήση των μοριακών δεικτών ISSR.

II

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ
ΜΕΘΟΔΟΙ

1. ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ

1.1 ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Ως φυτικό υλικό χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα βλαστών από σπορόφυτα υποκειμένων εσπεριδοειδών, *Poncirus trifoliata* 'Serra', *Poncirus trifoliata* 'Flying Dragon', *Poncirus trifoliata* 'Rubidoux', *Siamelo*, *Volkameriana*, *Citrumelo Swingle* και *Citranges Carrizo* (Πίνακας 1). Η λήψη βλαστικών εκφύτων έγινε από νεαρές κορυφές μητρικών φυτών, ηλικίας 3 ετών. Η λήψη των εκφύτων έγινε από την φυτωριακή επιχείρηση Hellenic Plants - Ξυλόκαστρο Κορινθίας. Το υλικό βρισκόταν σε θερμοκήπιο με εντομοστεγές δίχτυ και ήταν απαλλαγμένο από παθογόνους μικροοργανισμούς ή προσβολές από έντομα. Μετά την κοπή τους τα έκφυτα μεταφέρθηκαν αμέσως στο εργαστήριο Δενδροκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, όπου και πραγματοποιήθηκε το πείραμα.

Το φυτικό υλικό χρησιμοποιήθηκε απ' ευθείας μετά την κοπή του από τα μητρικά φυτά. Σε περιπτώσεις που δεν χρησιμοποιήθηκε αμέσως το υλικό διατηρήθηκε σε ψυγείο για την διατήρηση της υγρασίας των εκφύτων.

ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΟ	ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ	ΑΡΧΙΚΗ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ
<i>Citranges</i> 'Carrizo'	Hellenic Plants	Δενδροκομικός Σταθμός Πόρου
<i>Volkameriana</i>	Hellenic Plants	Δενδροκομικός Σταθμός Πόρου
<i>Citrumelo</i> 'Swingle'	Hellenic Plants	CRSFA (Ιταλία)
<i>P. tr.</i> 'Serra'	Hellenic Plants	CRSFA (Ιταλία)
<i>P. tr.</i> 'Rubidoux'	Hellenic Plants	CRSFA (Ιταλία)
<i>P. tr.</i> 'Flying Dragon'	Hellenic Plants	CRSFA (Ιταλία)

Πίνακας 1. Υποκείμενα που χρησιμοποιήθηκαν για *in vitro* πολλαπλασιασμό και η προέλευση τους.

Μεταχείριση κατά την εγκατάσταση και απολύμανση φυτικού υλικού

Οι αποφυλλωμένοι βλαστοί τεμαχίστηκαν σε επιμέρους τμήματα μήκους 2-3 cm περίπου με ένα γόνατο ανά τμήμα βλαστού. Τα τμήματα αυτά αποτέλεσαν τα αρχικά έκφυτα που χρησιμοποιήθηκαν για την εγκατάσταση του φυτικού υλικού σε in vitro περιβάλλον.

Στη συνέχεια ακολούθησε απολύμανση των εκφύτων με την εξής τακτική:

- Διάλυμα χλωρίνης εμπορίου 20% για επτά λεπτά
- Δύο ξεπλύματα των πέντε λεπτών με αποστειρωμένο νερό
- Διάλυμα αιθανόλης 70% για ένα λεπτό
- Τρία ξεπλύματα των πέντε λεπτών με αποστειρωμένο νερό

1.2 Υπόστρωμα καλλιέργειας MS

Το θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε για το πείραμα ήταν το υπόστρωμα MS (Murashige and Skoog, 1962) (Πίνακας 2), το οποίο κατά περίπτωση περιείχε διαφορετικές συγκεντρώσεις ρυθμιστών αύξησης (κυτοκινίνες και αυξίνες). Η κυτοκινίνη και η αυξίνη προστέθηκαν στο θρεπτικό υπόστρωμα πριν την αποστείρωσή του. Στο θρεπτικό υπόστρωμα προστέθηκαν επίσης 30gr/l σακχαρόζη και 6 gr/l άγαρ, και το pH του υποστρώματος ρυθμίστηκε στο 5.7 με 5.8. Στη συνέχεια το υγρό υπόστρωμα τοποθετήθηκε σε σωλήνες 25X100 mm (10 ml ανά σωλήνα). Ακολούθησε αποστείρωση του υποστρώματος σε αυτόκαυστο για 21 λεπτά στους 120⁰C. Σε κάθε σωλήνα τοποθετήθηκε ένα έκφυτο. Οι σωλήνες με τα έκφυτα μεταφέρθηκαν σε θάλαμο ανάπτυξης με θερμοκρασία 24C (+/-1), φωτοπερίοδο 16/8 ωρών και ένταση φωτός 3000lux για 8 εβδομάδες εκτός αν αναφέρεται διαφορετικά στα επιμέρους πειράματα.

Καθαρό Θρεπτικό υπόστρωμα MS

Χημική ουσία	ΣΤΟ ΤΕΛΙΚΟ (1L)	Stock Solution	mg l
		g/1000 ml	
NH ₄ NO ₃		16,5	1650
KNO ₃		19	1900
CaCl ₂ .2H ₂ O	100 ml	4,4	440
MgSO ₄ .7H ₂ O		3,7	370
KH ₂ PO ₄		1,7	170
		mg/1000 ml	
H ₃ BO ₃		620	6,2
MnSO ₄ .H ₂ O		1690	16,9
ZnSO ₄ .7H ₂ O		860	8,6
KI	10 ml	83	0,83
NaMoO ₄ .2H ₂ O		25	0,25
CuSO ₄ .5H ₂ O		10 ml από 25mg/ 100 ml	0,025
CoCl ₂ .6H ₂ O		10 ml από 25mg/ 100 ml	0,025
		g/1000 ml	
Na ₂ .EDTA.2H ₂ O			
FeSO ₄ .7H ₂ O	20 ml	3,725	
		2,785	
Νικοτινικό οξύ	5 ml	10 mg/100 ml	0,5
Πυριδοξίνη - HCl	5 ml	10 mg/100 ml	0,5
Θειαμίνη - HCl	1 ml	10 mg/100 ml	0,1
Γλυκίνη	10 ml	20 mg/100 ml	2
Ινοσιτόλη	100 mg		100
Malt extract			
Σακχαρόζη	30 g		30000
Άγαρ	6 g		6000
pH		5,7	0,1 N KOH - 0,1N NaOH

Πίνακας 2. Θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας MS (Murashige and Skoog, 1968).

1.3 ΣΤΑΔΙΟ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑΣ ΠΟΛΛΑΠΛΩΝ ΒΛΑΣΤΩΝ

Για το στάδιο δημιουργίας πολλαπλών βλαστών χρησιμοποιήθηκαν τα έκφυτα μετά την κοπή και απολύμανση τους. Τα έκφυτα μεταφέρθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες σε σωλήνες με θρεπτικό υπόστρωμα MS, που περιείχε πέντε συγκεντρώσεις της κυτοκινίνης benzyladenine (BA). Η κυτοκινίνη αυτή ανήκει στην κατηγορία των ρυθμιστών της φυτικής αύξησης και βοηθά στο σχηματισμό νέων βλαστών. Οι συγκεντρώσεις της προαναφερθείσας κυτοκινίνης αναφέρονται αναλυτικά στον Πίνακα 3.

Υπόστρωμα	BA (mg/L)
Π1	0
Π2	0,5
Π3	1
Π4	2
Π5	4

Πίνακας 3. Συγκέντρωση κυτοκινίνης BA που χρησιμοποιήθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας MS, στο στάδιο της βλαστογένεσης.

Μετά την παραμονή των εκφύτων για περίπου δύο μήνες στα προαναφερόμενα υποστρώματα αξιολογήθηκε η επίδραση της αυξητικής ουσίας στη βλαστογένεση (αριθμός βλαστών ανά βλαστική κορυφή, συνολικός αριθμός φύλλων νέων βλαστών ανά βλαστική κορυφή και συνολικό μήκος βλαστών ανά βλαστική κορυφή).

1.4 ΣΤΑΔΙΟ ΡΙΖΟΒΟΛΗΣΗΣ ΝΕΩΝ ΒΛΑΣΤΩΝ

Σε αυτό το στάδιο χρησιμοποιήθηκαν ως έκφυτα οι νέοι βλαστοί που δημιουργήθηκαν στο προηγούμενο στάδιο (στάδιο δημιουργίας πολλαπλών βλαστών). Από τους βλαστούς που δημιουργήθηκαν πάρθηκαν σαν έκφυτα βλαστικές κορυφές 1 με 3 cm και μεταφέρθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν στερεό θρεπτικό υπόστρωμα MS, που περιείχε 5 συγκεντρώσεις της α -naphthaleneacetic acid (α -NAA). Η NAA ανήκει στην κατηγορία των ρυθμιστών φυτικής αύξησης και βοηθά στη ριζογένεση. Στον Πίνακα 4 παρουσιάζονται αναλυτικά οι συγκεντρώσεις της προαναφερθείσας ουσίας.

Υπόστρωμα	α -NAA (mg/L)
P1	0
P2	0,5
P3	1
P4	2
P5	4

Πίνακας 4. Συγκέντρωση αυξίνης που χρησιμοποιήθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας MS, στο στάδιο της ριζογένεσης.

Μετά την παραμονή των εκφύτων στα προαναφερόμενα υποστρώματα για περίπου 70 μέρες, αξιολογήθηκε η επίδραση της ουσίας στην ικανότητα ριζοβόλησης των εκφύτων και η συμπεριφορά τους.

2 Μοριακοί δείκτες

2.1 ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Τα δείγματα συλλέχθηκαν από την Φυτωριακή επιχείρηση Hellenic Plants (Ξυλόκαστρο Κορινθίας) και τα περισσότερα από αυτά προήλθαν από το Ιταλικό Κρατικό Ινστιτούτο CRSFA (Centro di Riserca Sperimentazione e Formazione in Agricoltura)-Μπάρι και κάποια από τον Δενδροκομικό Σταθμό Πόρου (Πίνακας 4). Συλλέχθηκαν φύλλα από 29 δέντρα. Τα δείγματα αποτελούσαν τα φύλλα της νεότερης βλάστησης και ήταν απαλλαγμένα από παθογόνα. Η λήψη νεαρών καθαρών φύλλων είχε σκοπό την αποφυγή ύπαρξης στο υλικό μεγάλης συγκέντρωσης ουσιών που παρεμποδίζουν τον χειρισμό του DNA και την αύξηση της αποδοτικότητας της απομόνωσης λόγω του μικρότερου μεγέθους των χυμοτοπίων σε αυτήν την περίοδο ανάπτυξης. Μετά την κοπή των φύλλων τοποθετούνταν σε αριθμημένα πλαστικά σακουλάκια με silica gel και αμέσως μετά ακολούθησε η μεταφορά τους στο εργαστήριο денδροκομίας του Γ.Π.Α. και η κατάψυξή τους στους -20°C . Τα είδη και οι ποικιλίες που ελήφθησαν παρατίθενται στον Πίνακα 5.

<u>ΕΙΔΟΣ</u>	<u>ΠΡΟΕΛΕΥΣΗ</u>	<u>ΑΡΧΙΚΟΣ ΤΟΠΟΣ ΠΡΟΕΛΕΥΣΗΣ</u>
<i>Poncirus trifoliata</i> 'Rubidoux'	Hellenic Plants	CRSFA (Ιταλία)
'Siamelo'	Hellenic Plants	CRSFA (Ιταλία)
<i>Poncirus trifoliata</i> 'Flying Dragon'	Hellenic Plants	CRSFA (Ιταλία)
<i>Poncirus trifoliata</i> 'Serra'	Hellenic Plants	CRSFA (Ιταλία)
<i>Citrus aurantium</i>	Hellenic Plants	CRSFA (Ιταλία)
<i>Citrus macrophylla</i> (Alemow)	Hellenic Plants	CRSFA (Ιταλία)
<i>Citrus lemon</i> 'Eureka'	Hellenic Plants	CRSFA (Ιταλία)
<i>Citrus lemon</i> 'Meyer'	Hellenic Plants	CRSFA (Ιταλία)
<i>Citrus sinensis</i> 'Navellate'	Hellenic Plants	CRSFA (Ιταλία)
<i>Citrus sinensis</i> 'Tarocco Rosso'	Hellenic Plants	CRSFA (Ιταλία)
<i>Citrus paradisi</i> 'Marsh Seedless'	Hellenic Plants	CRSFA (Ιταλία)
<i>Poncirus trifoliata</i>	Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών	
<i>Citrumelo</i> 'Swingle'	Hellenic Plants	CRSFA (Ιταλία)
<i>Citrumelo</i> '4475'	Hellenic Plants	Δενδροκομικός Σταθμός Πόρου
<i>Citrumelo</i> '1452'	Hellenic Plants	Δενδροκομικός Σταθμός Πόρου
<i>Volkameriana</i>	Hellenic Plants	Δενδροκομικός Σταθμός Πόρου
<i>Cleopatra</i>	Hellenic Plants	CRSFA (Ιταλία)
<i>Citrance</i> 'Troyer'	Hellenic Plants	CRSFA (Ιταλία)
<i>Citrance</i> 'Carrizo'	Hellenic Plants	Δενδροκομικός Σταθμός Πόρου

Πίνακας 5. Είδη και υποκείμενα που χρησιμοποιήθηκαν ως φυτικό υλικό για το πείραμα και η προέλευση τους.

2.2 ΕΚΚΙΝΗΤΕΣ

Στο παρόν πείραμα χρησιμοποιήθηκαν 5 ISSR εκκινήτες για κάθε μοριακό δείκτη. Οι εκκινήτες αναφέρονται στον Πίνακα 6.

ISSR PRIMERS	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ 5'→3'	ΣΥΝΟΛΟ ΖΩΝΩΝ	ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΚΕΣ ΖΩΝΕΣ
UBC-807	(AG) ₈ T	8	7
UBC-810	(GA) ₈ T	10	10
UBC-812	(GA) ₈ A	12	10
UBC-817	(CA) ₈ A	8	8
UBC-818	(CA) ₈ G	7	7
	ΣΥΝΟΛΟ	45	42

Πίνακας 6. Οι εκκινήτες που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα, η αλληλουχία των βάσεων κάθε εκκινήτη και ο αριθμός ενισχυμένων και πολυμορφικών ζωνών DNA.

2.3 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΔΙΑΛΥΜΑΤΩΝ ΠΟΥ ΧΡΗΣΙΜΟΠΟΙΗΘΗΚΑΝ ΚΑΙ ΤΑ ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥΣ

Παρασκευή διαλυμάτων

- Καυστικό Νάτριο NaOH 4M (Pellets)

Για την δημιουργία διαλύματος NaOH 4M τελικού όγκου 100ml προστέθηκαν 16 gr NaOH (Pellets) σε απεσταγμένο νερό και αναδεύτηκε το διάλυμα στον μαγνητικό αναδευτήρα. Όταν διαλυθήκαν εντελώς τα Pellets συμπληρώθηκε απεσταγμένο νερό μέχρι τελικό όγκο 100ml.

- Υδροχλωρικό οξύ HCl 1M

Για την δημιουργία διαλύματος HCl 1M τελικού όγκου 100ml προστέθηκαν 10ml πυκνό HCl 10M (37%) σε 90ml απεσταγμένο νερό και αναδεύτηκε το διάλυμα στον μαγνητικό αναδευτήρα.

- Tris HCl 1M (pH 7.5)

Για την δημιουργία διαλύματος Tris HCl 1M τελικού όγκου 100ml προστέθηκαν 12,114 gr TRIS METHYLAMINE ή TRIS BASE σε περίπου 80ml απεσταγμένου νερού και περίπου 4ml πυκνό HCl. Αναδεύτηκε το διάλυμα στον μαγνητικό αναδευτήρα και βάζοντας μέσα στο διάλυμα το ηλεκτρόδιο του pHμέτρου σταθεροποιήθηκε το pH στο 7.5 (+/- 0.1-0.2) χρησιμοποιώντας είτε πυκνό HCl είτε το λιγότερο πυκνό διάλυμα HCl 1M.

- EDTA 0.5M (pH 8) (Ethylene Diaminate Traacetic Acid)

Για την δημιουργία διαλύματος EDTA 0.5M τελικού όγκου 100ml προστέθηκαν 18,61gr EDTA σε περίπου 75ml απεσταγμένο νερό και περίπου 1.7-2gr NaOH (pellets). Το EDTA δεν διαλύεται αν το pH του διαλύματος δεν φτάσει το 8. Αναδεύτηκε το διάλυμα στον μαγνητικό αναδευτήρα και βάζοντας μέσα στο διάλυμα το ηλεκτρόδιο του pHμέτρου σταθεροποιήθηκε το pH στο 8 χρησιμοποιώντας pellets NaOH επιπρόσθετα της αρχικής ποσότητας 1.7-2gr.

- TAE 50X (Trisma Base)

Για την δημιουργία διαλύματος TAE τελικού όγκου 500ml προστέθηκαν 18,61gr TAE σε περίπου 200ml απεσταγμένο νερό. Αναδεύτηκε το διάλυμα στον μαγνητικό αναδευτήρα και αφού διαλύθηκε προστέθηκαν 50ml EDTA. Εν συνεχεία προστέθηκαν 28,55ml παγόμορφου οξικού οξέος (Clasial Acetic Acid). Αφού το διάλυμα αναδεύτηκε καλά και με τη βοήθεια ογκομετρικού σωλήνα προστέθηκε απεσταγμένο νερό μέχρι τον τελικό όγκο των 500ml.

- TAE IX

Τόσο για την παρασκευή του Gel αγαρόζης όσο και για την Παρασκευή του ρυθμιστικού διαλύματος για την ηλεκτροφόρηση χρειάζεται διάλυμα TAE IX. Για την Παρασκευή 1lt διαλύματος TAE IX προστέθηκε 20ml διαλύματος TAE 50X σε 880ml απεσταγμένο νερό.

- Na – Acetate (Ammonium Acetate)

Για την δημιουργία διαλύματος οξικού αμμωνίου τελικού όγκου 100ml προστέθηκαν 40,8gr οξικού αμμωνίου σε απεσταγμένο νερό. Αναδεύτηκε το διάλυμα στον μαγνητικό αναδευτήρα. Όταν διαλύθηκε προστέθηκε απεσταγμένο νερό μέχρι τον τελικό όγκο των 100ml.

- CTAB 2% & 5%

Για την δημιουργία του CTAB τα δοχεία και σκεύη καθώς και όλα τα διαλύματα που χρησιμοποιήθηκαν αποστειρώθηκαν.

Το CTAB για να διαλυθεί πρέπει να φτάσει σε θερμοκρασία 65C (+/- 1) υπό ανάδευση.

- TE

Για την δημιουργία διαλύματος TE τελικού όγκου 100 ml προστέθηκαν 0,2ml EDTA και 0,5 ml διάλυμα Tris σε απεσταγμένο νερό. Αναδεύτηκε το διάλυμα στον μαγνητικό αναδευτήρα. Όταν διαλύθηκε προστέθηκε απεσταγμένο νερό μέχρι τον τελικό όγκο των 100ml.

- CIAA

Για την δημιουργία διαλύματος CIAA τελικού όγκου 250ml προστέθηκαν 10ml ισοαμυλικής Αλκοόλης και 240ml χλωροφόρμιο (αναλογία 24:1).

2.4 ΣΥΣΚΕΥΕΣ

- Φυγόκεντρος (Heraeus instruments Labofuse 400)
- Μικροφυγόκεντρος (Hermle Z160M)
- Απαγωγός εστία
- Υδατόλουτρο
- Συσκευή στροβιλίσματος (Vortex)
- pH meter (Jen Way 3310)
- Ζυγαριά ακριβείας
- Θερμικός αναδευτήρας
- Συσκευή PCR (CreaCon T-CY60)
- Συσκευή οριζόντιας ηλεκτροφόρησης (Clyber Max)
- Τροφοδοτικό ρεύματος (Consort E8650)
- Τράπεζα υπεριώδους ακτινοβολίας (UVP)
- Φωτογραφική κάμερα (Canon A630)
- Φασματοφωτόμετρο

2.5 ΜΕΘΟΔΟΙ

2.5.1 ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΑΠΟΜΟΝΩΣΗΣ DNA

- Τοποθέτηση 60-80 mg φυτικού ιστού σε tube 2ml με 500 μl PD1 + 70μl PD2
- Πρόσθεση 3 μl RNase A
- Ανάμειξη Vortex (10min)
- Φυγοκέντρηση 13.000g X 2 min
- Μεταφορά υπερκειμένου διαλύματος σε tube 2ml
- Πρόσθεση 200 μl PD3 + Vortex 5 sec

- Επώαση στους 4C – 5min
- Φυγοκέντρηση 13.000g X 2min
- Μεταφορά υπερκείμενου διαλύματος σε tube 2ml
- Πρόσθεση 600μL PD4 + 600 μL PD6 + Vortex 5 sec
- Φόρτωση 600 ml διαλύματος στο φίλτρο και φυγοκέντρηση 10.000g x 30sec και απόρριψη του εκκρέοντος υγρού (επαναλαμβάνεται 3 φορές)
- Πρόσθεση 500μl PD5 στο φίλτρο και φυγοκέντρηση 10.000g x 30 sec και απόρριψη εκκρέοντος υγρού
- Πρόσθεση 500μl PD6 στο φίλτρο και φυγοκέντρηση 10.000g x 30 sec και απόρριψη εκκρέοντος υγρού
- Φυγοκέντρηση για 3 min στα 14.000g
- Τοποθέτηση φίλτρου σε καθαρό tube 2ml
- 70μl PD7 στο φίλτρο και επώαση σε θερμοκρασία δωματίου για 2 min
- Φυγοκέντρηση 10.000 X 3 min
- Επαναφόρτωση εκκρέοντος υγρού στο φίλτρο και φυγοκέντρηση 10.000g x 30 sec
- Απόρριψη φίλτρου

2.5.2 ΚΑΘΑΡΙΣΜΟΣ DNA

Μετά την απομόνωση του DNA ακολούθησε ο καθαρισμός του DNA. Τα βήματα που ακολουθούνται για τον καθαρισμό του DNA είναι τα εξής:

- Ενεργοποιείται το υδατόλουτρο στους 37⁰C.
- Στα δείγματα προστίθενται 7-8 μl RNAase (συγκέντρωση 10 mg/ml).
- Τα δείγματα τοποθετούνται στο υδατόλουτρο για 1 ώρα (ή και παραπάνω).
- Ακολούθως προστίθενται 500 μl φαινόλης (ίση ποσότητα με το TE που είχε προστεθεί).
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 5 λεπτά στις 13.000 – 14.000 rpm.
- Μεταφέρεται η άνω φάση σε νέα ependorfs.
- Γίνεται επανάληψη του καθαρισμού με φαινόλη για δεύτερη φορά αν τα δείγματα δεν είναι αρκετά καθαρά.
- Προστίθενται 250 μl φαινόλης και 250 μl CIAA.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση των δειγμάτων για 5 λεπτά στις 13.000 – 14.000 rpm.

- Μεταφέρεται η άνω φάση σε νέα erendorfs, και προστίθενται 1 όγκος CIAA (ίσο όγκο περίπου με την ποσότητα που έχουμε στα erendorfs από την άνω φάση που έχει συλλεχθεί).
- Φυγοκεντρώνται τα δείγματα για 5 λεπτά στις 13.000 – 14.000 rpm.
- Μεταφέρεται η άνω φάση σε νέα erendorfs και προστίθεται το 1/10, του υπάρχοντος στα erendorfs όγκου, οξικό νάτριο (Sodium Acetate) και περίπου δυόμιση φορές τον όγκο παγωμένης αιθανόλης (absolute), π.χ. αν στα erendorfs έχουμε 400 μl δείγματος προσθέτουμε 40 μl Sodium acetate και 1060 μl αιθανόλη.
- Τα δείγματα μεταφέρονται στους -20°C για περίπου 30 λεπτά.
- Ακολουθεί φυγοκέντρηση για 15 λεπτά στις 13.000 – 14.000 rpm.
- Αφήνουμε το στερεό υπόλειμμα 1-2 ώρες ώσπου να εξατμιστεί εντελώς η υγρή φάση.
- Τέλος προστίθενται 190-200 μl TE.
- Τα δείγματα, αφού διαλυθούν, τοποθετούνται στους -20°C .

ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΠΗΚΤΗΣ ΑΓΑΡΟΖΗΣ

- Σε κωνική φιάλη των 500ml προστίθενται 200ml TAE IX και 5gr αγαρόζης.
- Ζεσταίνεται το διάλυμα σε φούρνο μικροκυμάτων μέχρι το σημείο βρασμού του διαλύματος.
- Ανακινείται το διάλυμα μέχρι να διαλυθεί πλήρως η αγαρόζη και αφήνεται να ηρεμήσει ωσότου φτάσει την θερμοκρασία των 50°C περίπου. Κατασκευάζεται το καλούπι και τοποθετούνται οι χτένες που θα δημιουργήσουν τα 'πηγαδάκια' στα οποία θα τοποθετηθεί το δείγμα του DNA για την ηλεκτροφόρηση.
- Ανακινείται το διάλυμα και τοποθετείται αργά και με σταθερή ροή στο καλούπι και αφήνεται σε θερμοκρασία έως ότου πήξει.
- Αφαιρούνται προσεκτικά οι χτένες και τοποθετείται η πηκτή αγαρόζης στη συσκευή ηλεκτροφόρησης.

2.5.3 ΜΕΤΡΗΣΗ ΤΗΣ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗΣ ΚΑΙ ΤΗΣ ΚΑΘΑΡΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ DNA

Η μέτρηση της καθαρότητας και της συγκέντρωσης του DNA έγινε με μέτρηση απορρόφησης στα 260nm και στα 280nm με φασματοφωτόμετρο (Unicam Ηελιος γ). Ο λόγος της απορρόφησης του οργάνου στα 260nm προς την ένδειξη στα 280nm έδινε μια ένδειξη της καθαρότητας του DNA. Αν ο λόγος ήταν κοντά στην τιμή 1,8 τότε το DNA ήταν αρκετά «καθαρό». Μια πρώτη ένδειξη της ποιότητας του DNA λαμβανόταν από την απορρόφηση του οργάνου στο μήκος κύματος 320nm. Όσο πιο μικρή είναι αυτή η τιμή τόσο πιο καλή ποιότητα έχει το DNA (Sambrook et al., 1989). Η ποιότητα που ελέγχθηκε και με ηλεκτρογράφημα πηκτικής αγαρόζης 1% (w/v).

Με βάση τις μετρήσεις αυτές υπολογίστηκε η συγκέντρωση του DNA και έγινε αραίωση ποσότητας του κάθε δείγματος στα 25ng/μl, με την προσθήκη διαλύματος TE. Αυτή είναι η συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε στη διαδικασία αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης. Το DNA μπορεί να αποθηκευτεί στους 4⁰C σε αιώρηση μέσα σε διάλυμα TE για αρκετές εβδομάδες ή στους -20⁰C ή -80⁰C για μεγάλο χρονικό διάστημα.

2.5.4 ΜΙΓΜΑΤΑ PCR

Το μίγμα της αλυσιδωτής αντίδρασης της πολυμεράσης για τα ISSR αποτελείται από 200μM dNTPs, 1X από το ρυθμιστικό διάλυμα αντίδρασης, 2,0 nM MgCl₂, 0,5μM από τον εκκινητή, 1U Taq πολυμεράσης και 35ng από το DNA. Ο τελικό όγκος της αντίδρασης ήταν 35μl.

ΤΑ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑΤΑ ΤΗΣ ΣΥΣΚΕΥΗΣ PCR

Η συσκευή που χρησιμοποιήθηκε ήταν η CreaCon (μοντέλο T-CY60).

Η θερμοκρασία της συσκευής ανέρχεται στους 94⁰ C με την μέγιστη ταχύτητα της και αρχίζει η διαδικασία ενίσχυσης του DNA. Η συσκευή μένει στην θερμοκρασία αυτή για 4 λεπτά. Ο κύκλος που εκτελεί η συσκευή είναι: στους 94⁰ C για 30 δευτερόλεπτα, στους 50⁰ C για 45 δευτερόλεπτα και στους 72⁰ C για 2 λεπτά. Η διαδικασία επαναλαμβάνεται για 35 φορές. Μετά την ολοκλήρωση των κύκλων, η συσκευή μένει στη θερμοκρασία των 72⁰ C για 7 λεπτά.

2.5.5 ΗΛΕΚΤΡΟΦΟΡΗΣΗ – ΜΕΓΕΘΗ ΤΩΝ ΕΝΙΣΧΥΜΕΝΩΝ ΖΩΝΩΝ – ΦΩΤΟΓΡΑΦΗΣΗ

Η ανάλυση των ζωνών του ενισχυμένου DNA έγινε σε πηκτή αγαρόζης 2,5%, διαλυμένη σε 1X TAE. Το δείγμα που τοποθετείτο στην ηλεκτροφόρηση αποτελούνταν από το ενισχυμένο DNA και το ρυθμιστικό διάλυμα γεμίσματος κελιών. Ο συνολικός όγκος ήταν 15 μl ανά κελί. Η τάση του ηλεκτρικού ρεύματος που διέρχονταν από την πηκτή ήταν 65V. Ο χρόνος που χρειαζόταν το κάθε δείγμα να αναλυθεί στην πηκτή αγαρόζης ήταν περίπου 3,5 ώρες. Τα πρότυπα μεγέθη DNA δίνουν 12 θραύσματα με μεγέθη 1517, 1200, 1000, 900, 800, 700, 600, 500, 400, 300, 200, 104 ζεύγη βάσεων. Το πρότυπο μέγεθος DNA τοποθετείτο κάθε φορά στην αρχή και στο τέλος της κάθε γραμμής των κελιών της πηκτής.

Η πηκτή αγαρόζης τοποθετούνταν σε τράπεζα UV φωτός και φωτογραφίζονταν με φωτογραφική κάμερα χειρός Canon A630. Οι φωτογραφίες που προέκυπταν χρησιμοποιούνταν στην ανάλυση των αποτελεσμάτων.

Κατά την ανάλυση των αποτελεσμάτων κατασκευαζόταν μια μήτρα, στην οποία εμφανίζονταν για κάθε εκκινητή η παρουσία ή απουσία ενισχυμένης ζώνης DNA. Ο συμβολισμός ήταν 1 (ένα) για την παρουσία και 0 (μηδέν) για την απουσία της ενισχυμένης ζώνης. Η μήτρα που κατασκευάστηκε χρησιμοποιήθηκε στην αριθμητική επεξεργασία των αποτελεσμάτων.

2.5.6 ΑΡΙΘΜΗΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΩΝ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ

Η ανάλυση δεδομένων έγινε με τη βοήθεια του στατιστικού πακέτου NTSYS pc 2.2i (Rolf 1998). Για τον προσδιορισμό της συγγένειας των ποικιλιών χρησιμοποιήθηκε ο συντελεστής ομοιότητας του Jaccard όπως αυτός ορίζεται και περιγράφεται από τους Sneath and Socol (1973). Ο συντελεστής αυτός χρησιμοποιείται ευρέως για κυρίαρχους δείκτες όπως τα RAPD και τα ISSR (Link et al., 1995), και δίνεται από τον τύπο:

$$J_{ij} = a/(n-d)$$

Έτσι τα a και d εκφράζουν ταυτόχρονη παρουσία (a) ή απουσία (d) και για τις δύο ενισχυμένες ζώνες DNA, σε δυο διαφορετικές ποικιλίες. Αντίστοιχα μπορεί να υπάρχει παρουσία μιας ενισχυμένης ζώνης στην μια ποικιλία αλλά απουσία στην άλλη, οπότε έχουμε τις περιπτώσεις c και d . Επίσης το σύμβολο n είναι το άθροισμα των $a+b+c+d$.

Σχηματικά αυτό φαίνεται στην παράσταση που ακολουθεί όπου έχουμε όλες τις δυνατές περιπτώσεις (a,b,c,d) που μπορεί να έχουν δυο ενισχυμένες ζώνες DNA για δύο ποικιλίες (i και j).

Η παρουσία μιας ζώνης ISSR (σημειώνεται με 1) και για το i και για το j ορίζεται ως a . Ομοίως η απουσία μιας ζώνης (σημειώνεται με 0) και για το i και το j ορίζεται ως d . Ο συνολικός αριθμός των ενισχυμένων ζωνών σημειώνεται ως n . Με βάση το συντελεστή αυτό κατασκευάζεται μια μήτρα ομοιότητας (πίνακας γενετικών αποστάσεων) από την οποία αντλούνται τα στοιχεία για την ανάλυση συστάδων (cluster analysis) με τη μέθοδο UPGMA (unweighted pair group method with arithmetic means) και τη μέθοδο N.J. (Join Neighborhood).

III

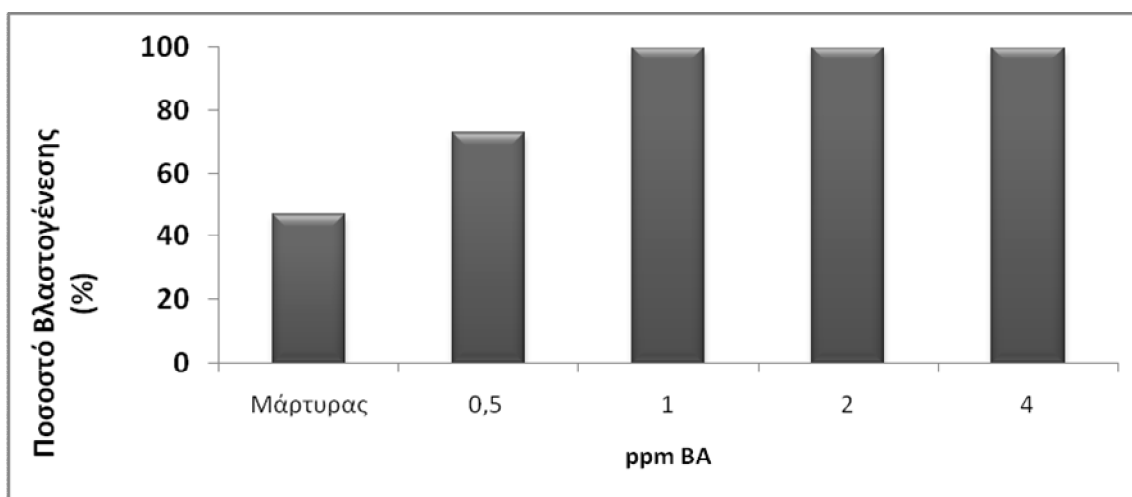
ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

1.ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΣΕ ΘΡΕΠΤΙΚΟ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ / ΣΤΑΔΙΟ ΒΛΑΣΤΟΓΕΝΕΣΗΣ

1.1 Επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων της ορμόνης BA στη βλαστογένεση ανά γονότυπο

- *Citranges Carrizo*'

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, στο υποκείμενο *C. 'Carrizo'* η παρουσία της ορμόνης BA αύξησε το ποσοστό σχηματισμού βλαστών στα νεαρά έκφυτα (Γράφημα 1.1.1). Το ποσοστό σχηματισμού βλαστών κυμάνθηκε από 47% στον μάρτυρα έως 100% στις συγκεντρώσεις 1, 2 και 4 ppm BA. Στη χαμηλή συγκέντρωση BA (0,5 ppm) το ποσοστό βλαστογένεσης ήταν 73%.

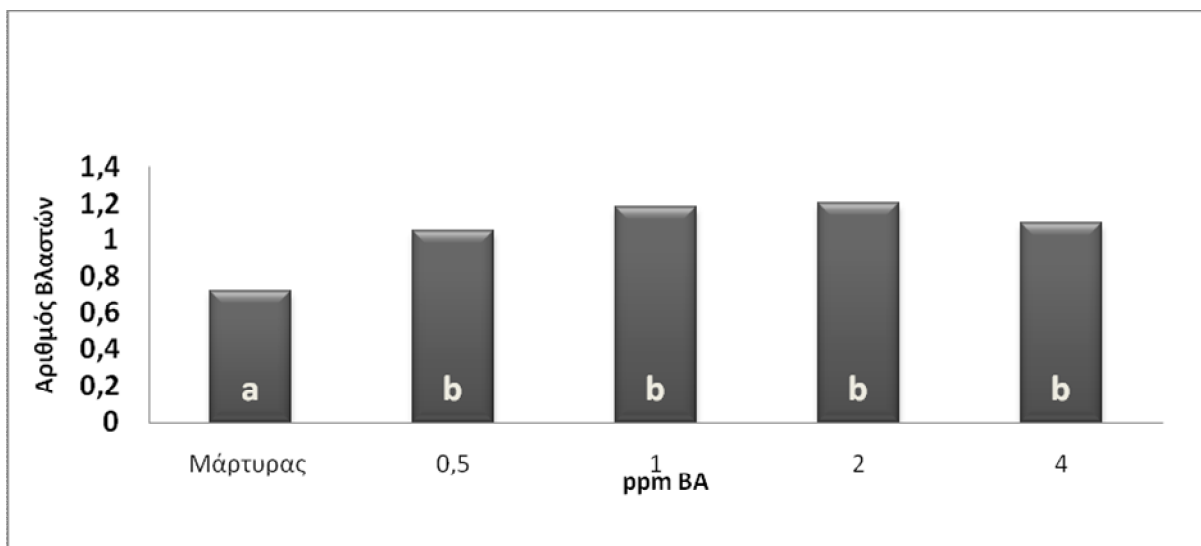


Γράφημα 1.1.1. Επίδραση της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης (BA), στην έκπτυξη νέων βλαστών, σε νεαρά έκφυτα του υποκειμένου *C. 'Carrizo'* σε θρεπτικό υπόστρωμα MS.



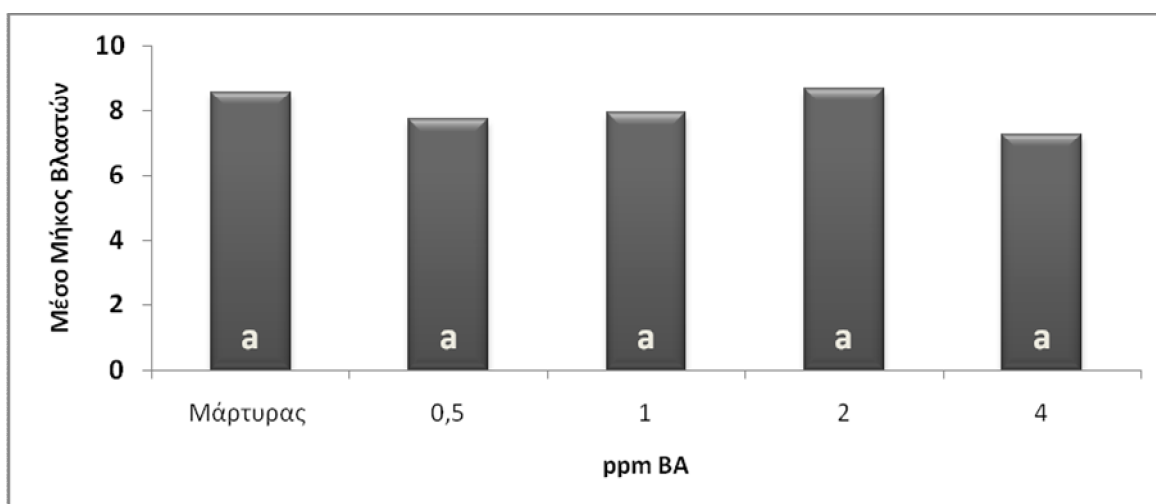
Εικόνα 1.1.1. Βλαστογένεση έκφυτων του *C. 'Carrizo'*, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS και 2 ppm BA.

Η παρουσία της ορμόνης κυτοκινίνης (BA) έδωσε στατιστικώς σημαντικά υψηλότερο αριθμό εκπυττούμενων βλαστών. Ο αριθμός των βλαστών που σχηματίστηκαν κατά μέσο όρο ανά έκφυτο, κυμάνθηκε από 0,72 στο μάρτυρα έως 1,20 στα 2 ppm BA (Γράφημα 1.1.2). Σε όλες τις συγκεντρώσεις της BA ο αριθμός των βλαστών ανά έκφυτο ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερος από ότι στο μάρτυρα. Ο αριθμός των βλαστών μεταξύ των διαφόρων συγκεντρώσεων της ορμόνης δε διέφερε στατιστικώς σημαντικά, ωστόσο ο υψηλότερος αριθμός βλαστών ανά έκφυτο παρουσιάστηκε στα 2 ppm BA (1,20) και αμέσως μετά στο 1 ppm BA (1,18) (Γράφημα 1.1.2).



Γράφημα 1.1.2. Επίδραση της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης (BA), στον αριθμό των βλαστών ανά έκφυτο του υποκειμένου C. 'Carrizo', σε θρεπτικό υπόστρωμα MS.

Η παρουσία της BA δεν επηρέασε στατιστικώς σημαντικά το μέσο μήκος των βλαστών που σχηματίστηκαν. Όλες οι συγκεντρώσεις της BA (0, 0,5, 1, 2, 4 ppm) δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά μεταξύ τους (Γράφημα 3). Το μέσο μήκος των βλαστών κυμάνθηκε από 7,71 mm στα 4 ppm BA έως 8,69 στα 2 ppm BA (Γράφημα 1.1.3).

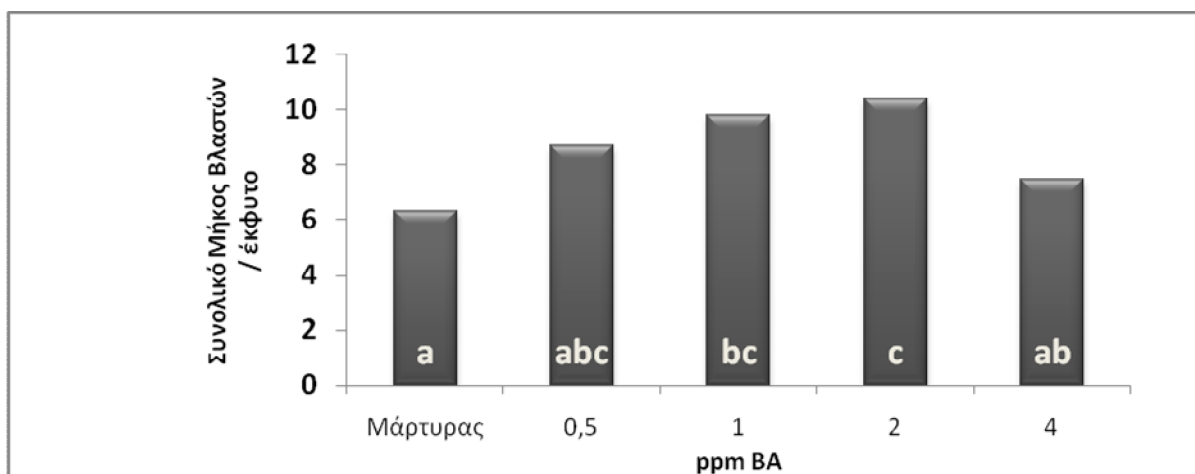


Γράφημα 1.1.3. Επίδραση της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης (BA) στο μέσο μήκος (mm) ανά νέο βλαστό που σχηματίζεται σε νεαρά έκφυτα του υποκειμένου C. 'Carrizo', σε θρεπτικό υπόστρωμα MS.



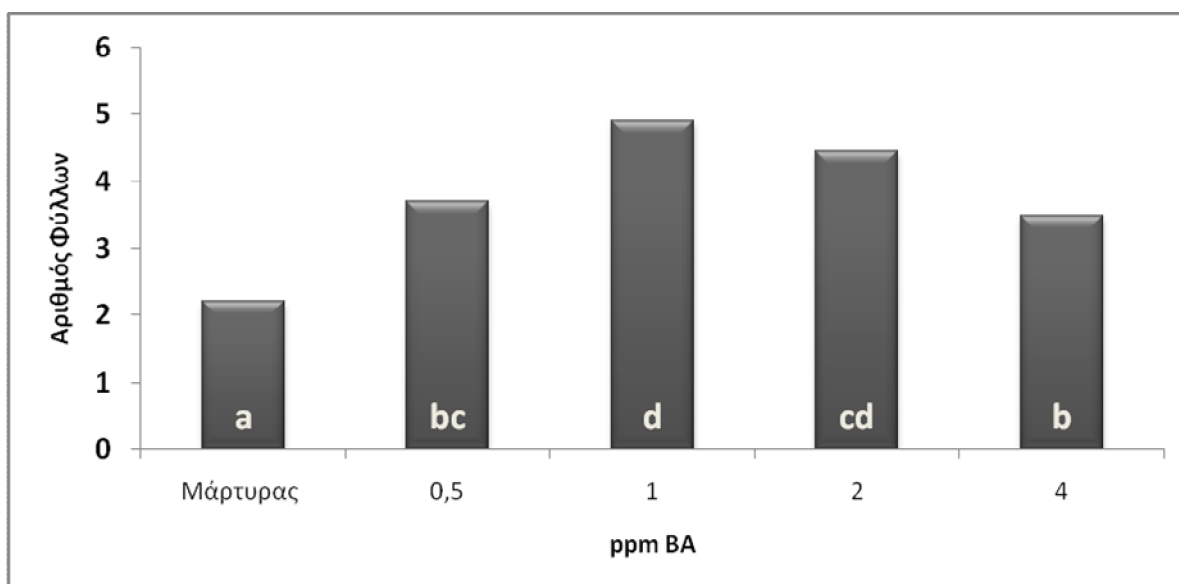
Εικόνα 1.1.2. Βλαστογένεση εκφύτων του *C. 'Caggizo'*, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS χωρίς την επίδραση κυτοκινίνης.

Η παρουσία της κυτοκινίνης επηρέασε στατιστικώς σημαντικά το συνολικό μήκος βλαστών ανά έκφυτο. Το υψηλότερο συνολικό μήκος εμφανίστηκε στα 2 ppm (10,40 mm) BA, όπου η συγκέντρωση διέφερε στατιστικώς σημαντικά από τη συγκέντρωση των 4 ppm και του μάρτυρα (Γράφημα 1.1.4). Το χαμηλότερο συνολικό μήκος (6,29 mm) εμφανίστηκε στο μάρτυρα, το οποίο διέφερε στατιστικώς σημαντικά με τις συγκεντρώσεις των 2 και 1 ppm BA (Γράφημα 1.1.4).



Γράφημα 1.1.4. Επίδραση της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης (BA), στο συνολικό μήκος (mm) των νέων βλαστών που προκύπτουν ανά έκφυτο στο υποκείμενο C. 'Carrizo', σε θρεπτικό υπόστρωμα MS.

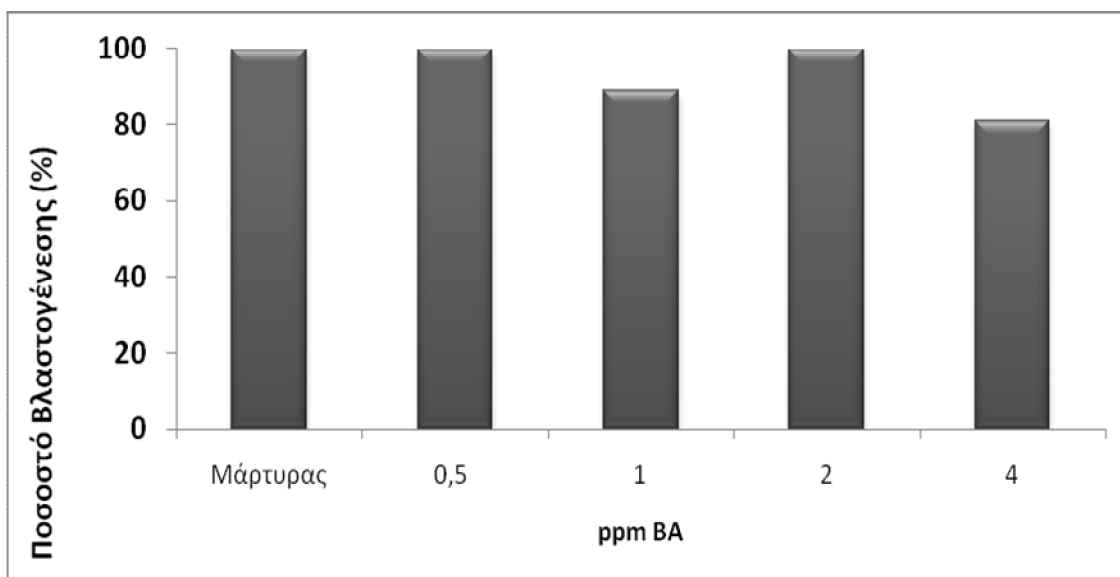
Η παρουσία της κυτοκινίνης επίσης επηρέασε στατιστικώς σημαντικά το μέσο αριθμό φύλλων ανά έκφυτο. Ο μάρτυρας παρουσίασε το στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερο μέσο αριθμό φύλλων (2,21). Υψηλότερος αριθμός φύλλων παρουσιάστηκε στη συγκέντρωση 1 ppm BA (4,91), ακολουθούμενος από τη συγκέντρωση των 2 ppm BA (Γράφημα 1.1.5).



Γράφημα 1.1.5. Επίδραση της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης (BA), στον αριθμό φύλλων ανά έκφυτο που σχηματίζονται στους νέους βλαστούς του υποκειμένου C. 'Carrizo', σε θρεπτικό υπόστρωμα MS.

- *Volkameriana*

Το ποσοστό σχηματισμού βλαστών στο υποκείμενο *Volkameriana* κυμάνθηκε από 81% έως 100% (Γράφημα 1.1.6). Τα υψηλότερα αποτελέσματα (100%) παρατηρήθηκαν στις συγκεντρώσεις 0,5 και 2 ppm BA και στον μάρτυρα. Το χαμηλότερο ποσοστό βλαστών (81%) παρατηρήθηκε στην υψηλότερη συγκέντρωση BA (4 ppm).

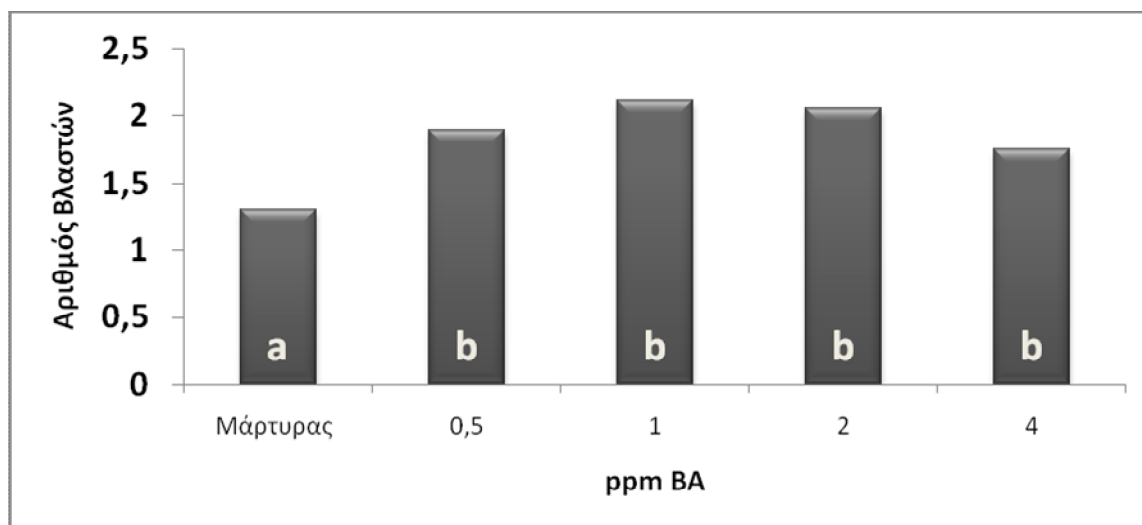


Γράφημα 1.1.6. Επίδραση της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης (BA), στην έκπτυξη νέων βλαστών του υποκειμένου *Volkameriana*, σε νεαρά έκφυτα, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS.



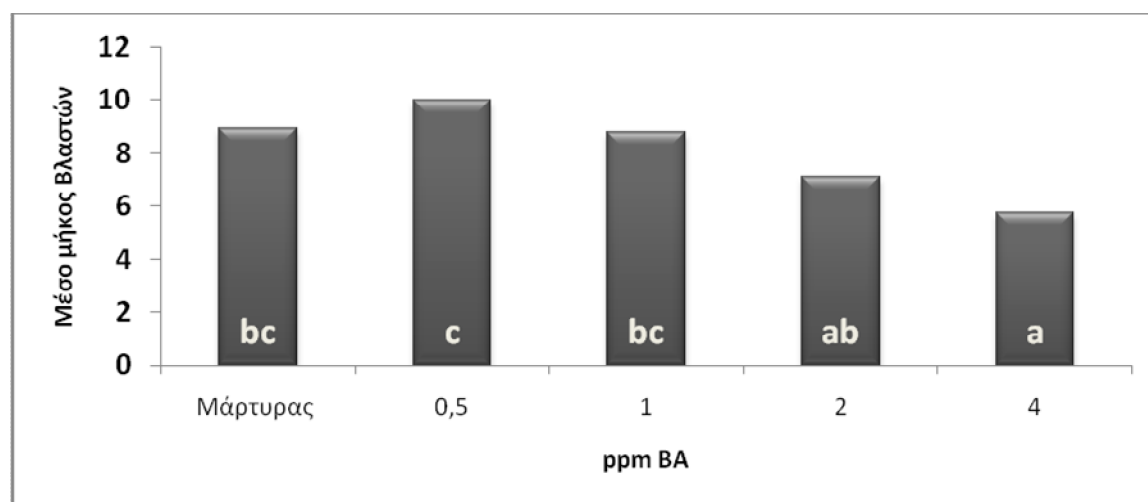
Εικόνα 1.1.3. Βλαστογένεση εκφύτου του *Volkmamegiana*, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS και 4 ppm BA.

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα ο αριθμός των βλαστών που σχηματίστηκαν ανά έκφυτο ήταν στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερος στο μάρτυρα (0 ppm) από ότι στις διάφορες συγκεντρώσεις BA που δεν διέφεραν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους (Γράφημα 1.1.7). Ο μεγαλύτερος αριθμός βλαστών ανά έκφυτο παρουσιάστηκε στη συγκέντρωση του 1 ppm BA (2,11 βλαστοί/έκφυτο), ακολουθούμενος από τη συγκέντρωση των 2 ppm BA (2,05 βλαστοί/έκφυτο), τη συγκέντρωση των 0,5 ppm BA (1,89 βλαστοί/έκφυτο) και τη συγκέντρωση των 4 ppm BA (1,75 βλαστοί/έκφυτο).



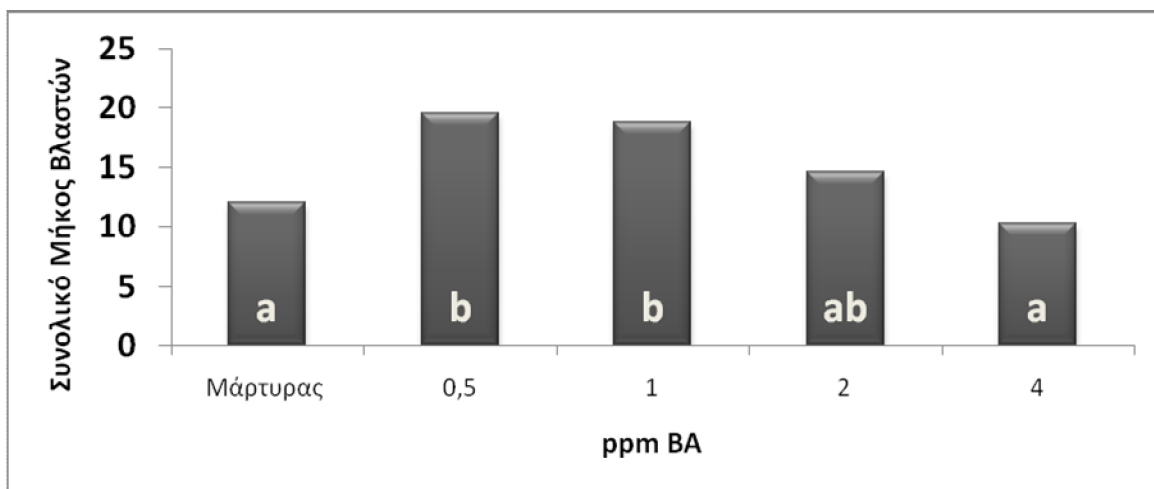
Γράφημα 1.1.7. Επίδραση της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης (BA), στον αριθμό των βλαστών ανά έκφυτο του υποκειμένου *Volkameriana*, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS.

Το μέσο μήκος βλαστού κυμάνθηκε από 5,77 mm (4 ppm BA) έως 10,02 mm (0,5 ppm BA) (Γράφημα 1.1.8). Το μεγαλύτερο μήκος βλαστών παρατηρήθηκε στις συγκεντρώσεις 0,5 και 1 ppm BA και στο μάρτυρα και δεν διέφεραν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους. Στατιστικώς σημαντική διαφορά στο μέσο μήκος των βλαστών που σχηματίστηκαν παρατηρήθηκε μεταξύ των συγκεντρώσεων 4 και 0,5 ppm BA.



Γράφημα 1.1. 8. Επίδραση της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης (BA) στο μέσο μήκος (mm) ανά νέο βλαστό που σχηματίζεται σε νεαρά έκφυτα του υποκειμένου *Volkameriana*, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS.

Το συνολικό μήκος βλαστών ανά έκφυτο ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερο από το μάρτυρα (0 ppm, 12,00 mm) στις συγκεντρώσεις 0,5 ppm BA (19,52 mm) και 1 ppm BA (18,83mm) (Γράφημα 1.1.9). Οι συγκεντρώσεις 0 και 4 ppm έδωσαν το χαμηλότερο συνολικό μήκος βλαστών ανά έκφυτο (12,00 και 10,31 mm) και δεν διέφεραν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους.

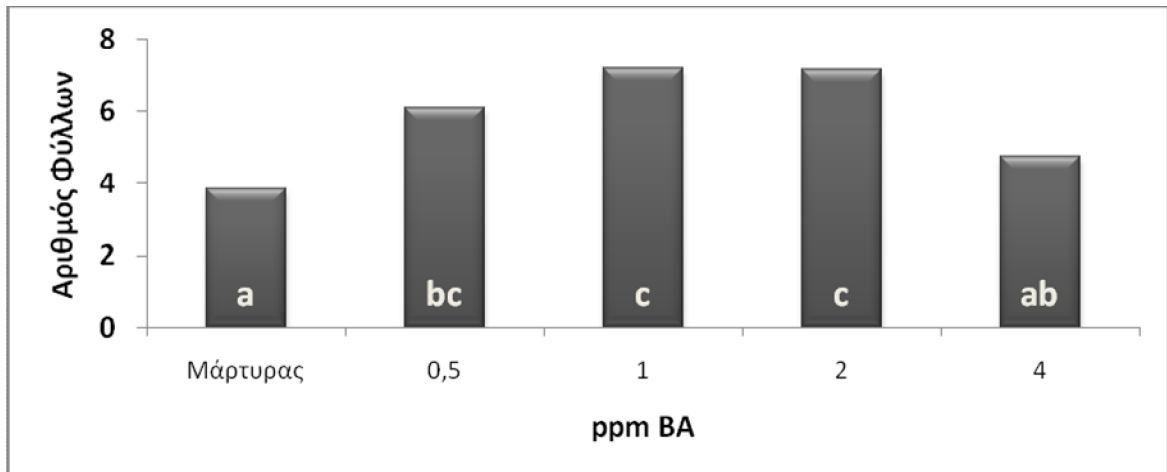


Γράφημα 1.1.9. Επίδραση της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης (BA), στο συνολικό μήκος (mm) των νέων βλαστών που προκύπτουν ανά έκφυτο στο υποκείμενο *Volkameriana*, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS.



Εικόνα 1.1.4. Βλαστογένεση εκφύτων του *Volkameriana*, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS και 0,5 ppm BA.

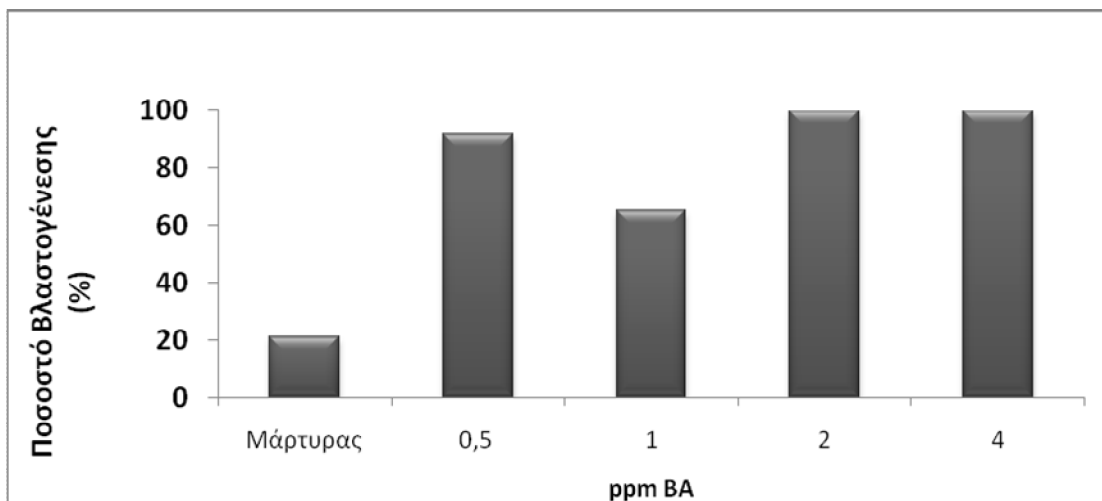
Ο μεγαλύτερος αριθμός φύλλων ανά έκφυτο παρατηρήθηκε στις συγκεντρώσεις 1 ppm BA (7,22) και 2 ppm BA (7,16) και διέφεραν στατιστικώς σημαντικά από το μάρτυρα (3,85) και τα 4 ppm BA (4,75) (Γράφημα 1.1.10).



Γράφημα 1.1.10. Επίδραση της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης (BA), στον αριθμό φύλλων ανά έκφυτο που σχηματίζονται στους νέους βλαστούς του υποκειμένου *Volkameriana*, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS.

- *Citrumelo* 'Swingle'

Στο υποκείμενο *Citrumelo* 'Swingle' το υψηλότερο ποσοστό έκπτυξης νέων βλαστών παρατηρήθηκε στις συγκεντρώσεις 2 και 4 ppm BA (100%), ακολουθούμενο από τη συγκέντρωση των 0,5 ppm BA (92%) (Γράφημα 1.1.11). Ο μάρτυρας είχε το χαμηλότερο ποσοστό έκπτυξης νέων βλαστών (21%).

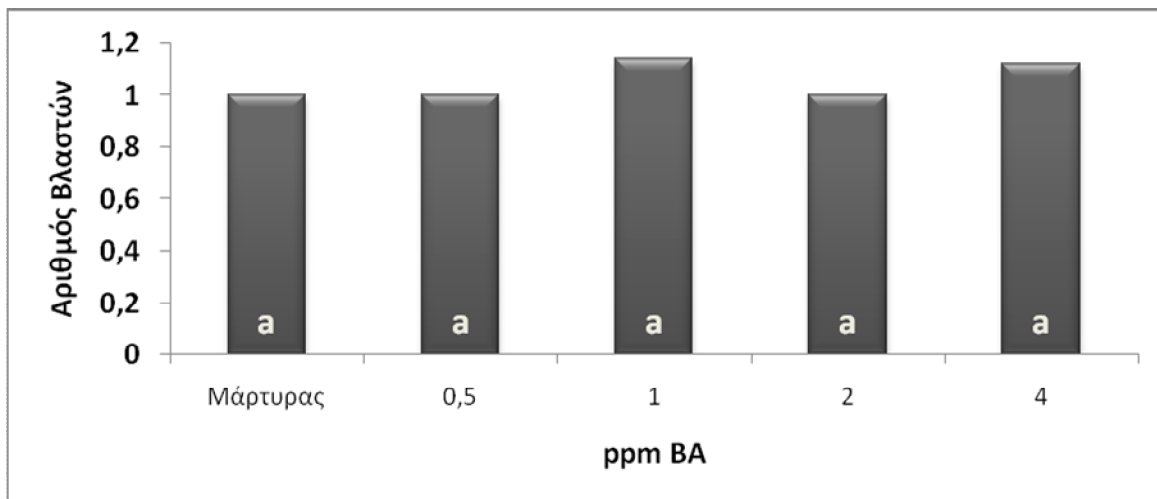


Γράφημα 1.1.11. Επίδραση της συγκέντρωσης της κυτοκίνης (BA), στην έκπτυξη νέων βλαστών, σε νεαρά έκφυτα του υποκειμένου *C. 'Swingle'*, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS.



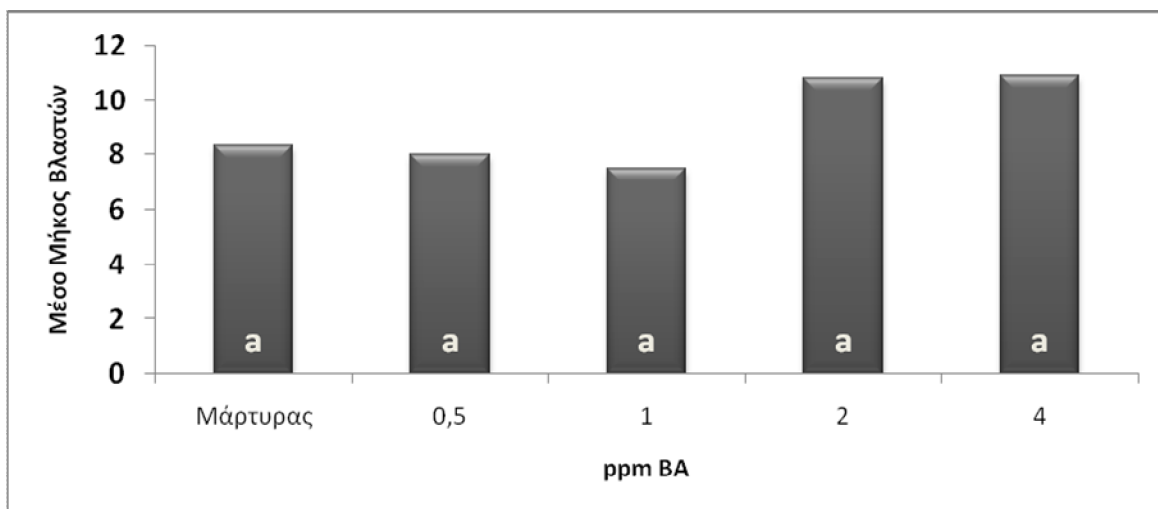
Εικόνα 1.1.5. Βλαστογένεση εκφύτου του *C. 'Swingle'*, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS και 2 ppm BA.

Ο αριθμός των βλαστών ανά έκφυτο που εκπύχθηκαν δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις διαφορετικές συγκεντρώσεις κυτοκινίνης και στο μάρτυρα (Γράφημα 1.1.12). Ο αριθμός των βλαστών που εμφανίστηκαν ανά έκφυτο κυμάνθηκε από 1 (0, 0,5 και 2 ppm BA) ως 1,14 (1 ppm BA) βλαστούς ανά έκφυτο.



Γράφημα 1.1.12. Επίδραση της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης (BA), στον αριθμό των βλαστών ανά έκφυτο του υποκειμένου *C. 'Swingle'*, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS.

Το μέσο μήκος βλαστού επίσης δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντικές διαφορές στις διαφορετικές συγκεντρώσεις της ορμόνης BA και το μάρτυρα (Γράφημα 1.1.13).

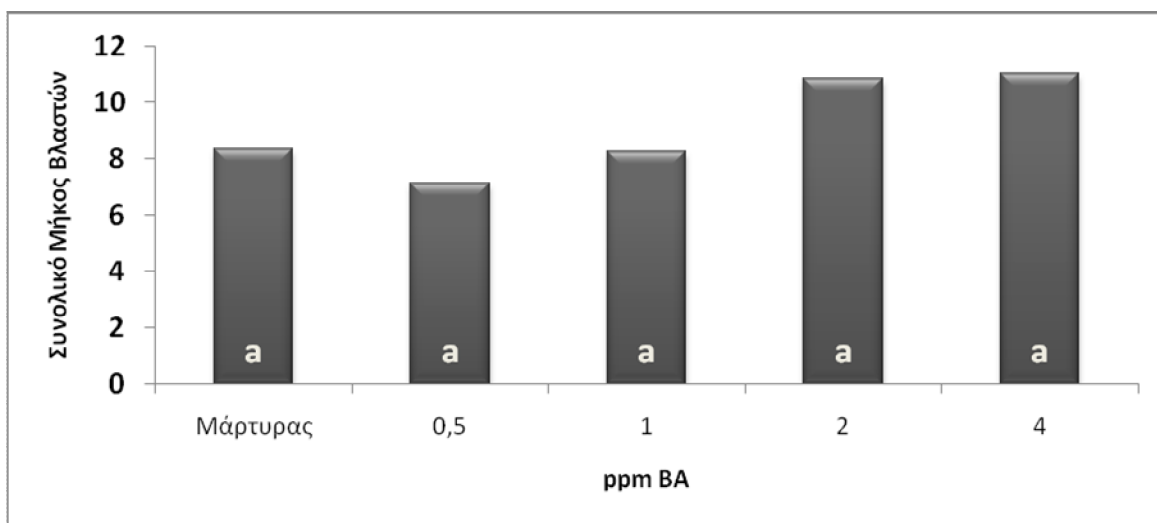


Γράφημα 1.1. 13. Επίδραση της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης (BA) στο μέσο μήκος (mm) ανά νέο βλαστό που σχηματίζεται σε νεαρά έκφυτα του υποκειμένου *C. 'Swingle'*, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS.



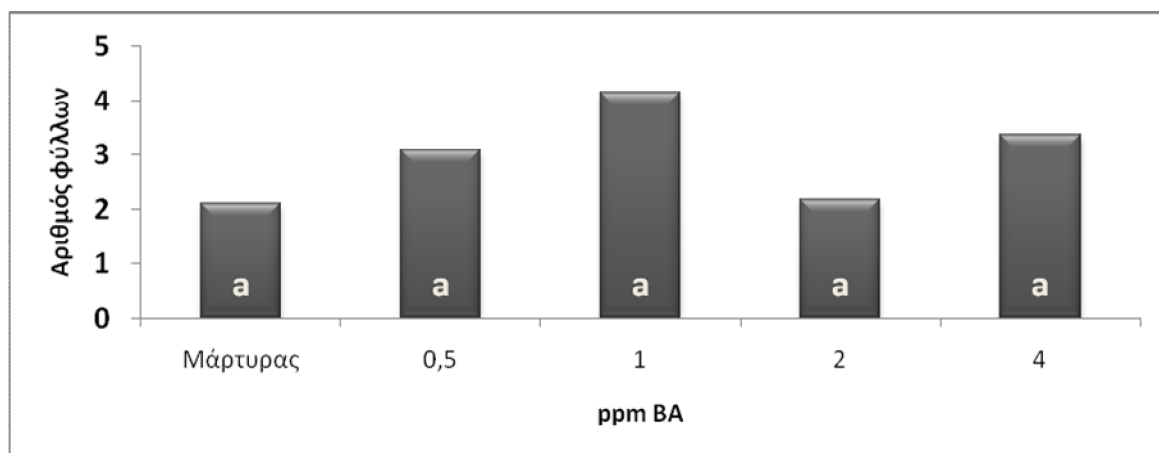
Εικόνα 1.1.6. Βλαστογένεση εκφύτων του *C. 'Swingle'*, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS και 4 ppm BA.

Το συνολικό μήκος βλαστών ανά έκφυτο, επίσης, δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντικές διαφορές στις διαφορετικές συγκεντρώσεις της κυτοκινίνης και στο μάρτυρα (Γράφημα 1.1.14).



Γράφημα 1.1.14. Επίδραση της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης (BA), στο συνολικό μήκος (mm) των νέων βλαστών που προκύπτουν ανά έκφυτο στο υποκείμενο *C. 'Swingle'*, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS.

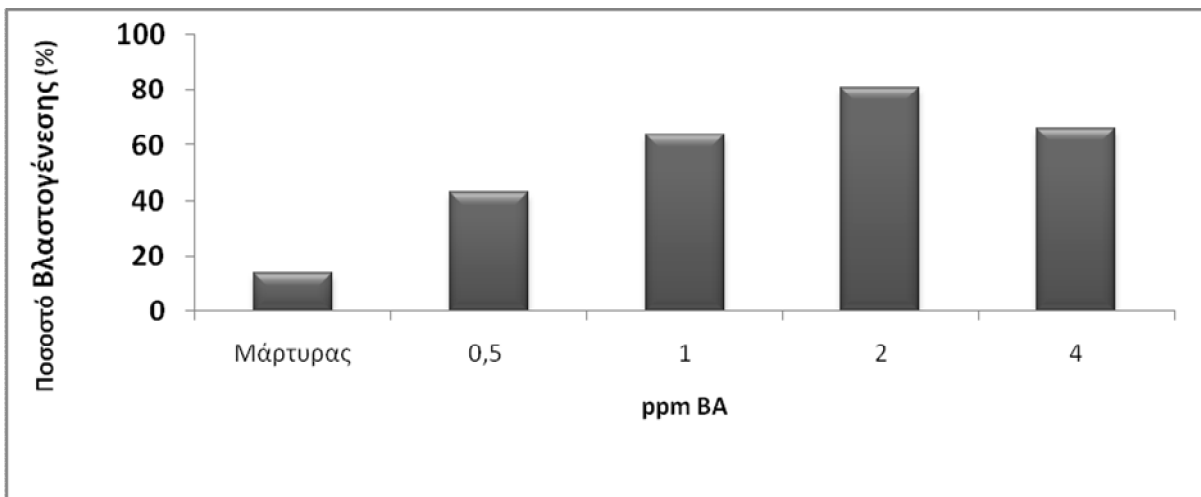
Τέλος, ο αριθμός των φύλλων ανά έκφυτο δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις διάφορες συγκεντρώσεις και το μάρτυρα. (Γράφημα 1.1.15).



Γράφημα 1.1. 15. Επίδραση της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης (BA), στον αριθμό φύλλων ανά έκφυτο που σχηματίζονται στους νέους βλαστούς, του υποκειμένου *C. 'Swingle'*, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS.

- *Poncirus trifoliata* 'Serra'

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το υποκείμενο *P. tr.* 'Serra', παρουσίασε το μεγαλύτερο ποσοστό έκπτυξης νέων βλαστών (81,20%) στη συγκέντρωση των 2 ppm BA, ακολουθούμενο από τη συγκέντρωση των 4 ppm (66,60%), τη συγκέντρωση του 1 ppm BA (64,20%) και τη συγκέντρωση των 0,5 ppm BA (43,70%). Το μικρότερο ποσοστό έκπτυξης νέων βλαστών εμφανίστηκε στο μάρτυρα (12,50%). (Γράφημα 1.1.16).

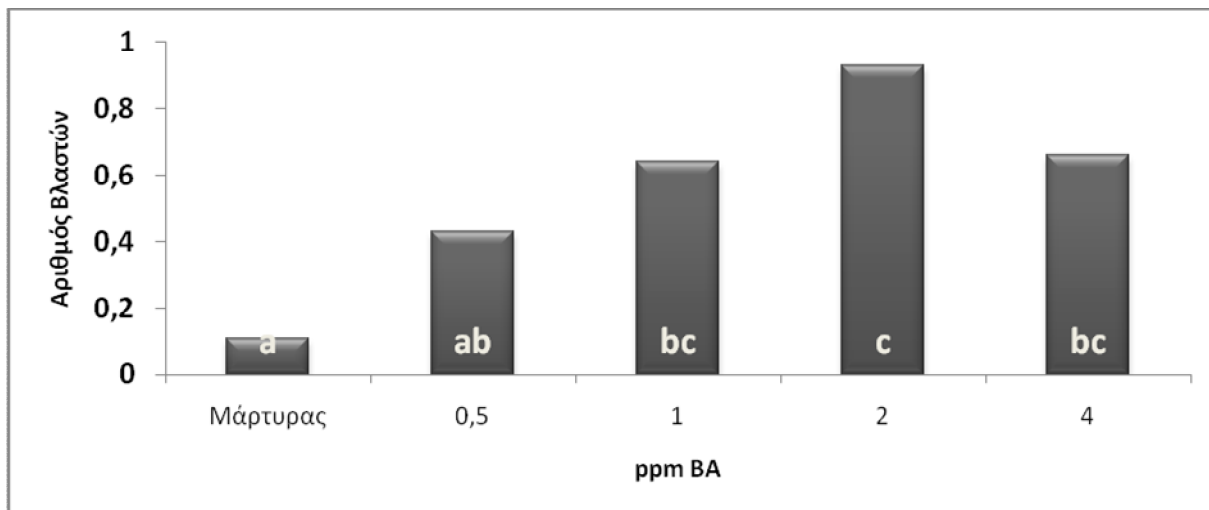


Γράφημα 1.1.16. Επίδραση της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης (BA), στην έκπτυξη νέων βλαστών, του υποκειμένου *P. tr.* 'Serra', σε νεαρά έκφυτα, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS.



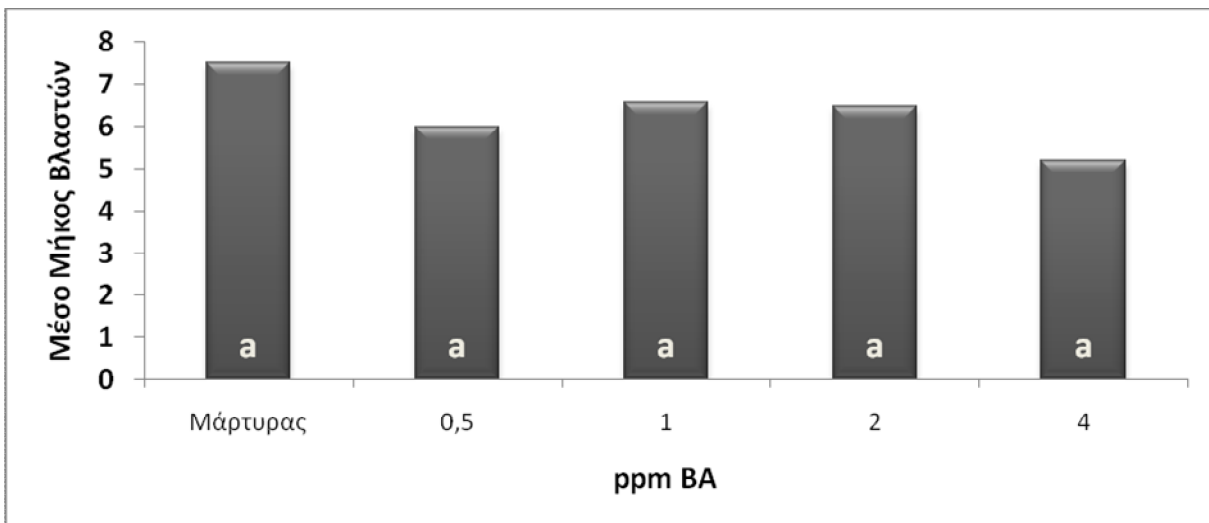
Εικόνα 1.1.7. Βλαστογένεση εκφύτων του *P. tr.* 'Serra', σε θρεπτικό υπόστρωμα MS και 2 ppm BA.

Ο υψηλότερος μέσος αριθμός των βλαστών που σχηματίστηκαν ανά έκφυτο παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση των 2 ppm BA (0,93) και διέφερε στατιστικώς σημαντικά από τη συγκέντρωση 0,5 ppm BA (0,43) και τον μάρτυρα (0,11) (Γράφημα 1.1.17).



Γράφημα 1.1.17. Επίδραση της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης (BA), στον αριθμό των βλαστών ανά έκφυτο του υποκειμένου *P. tr.* 'Serra', σε θρεπτικό υπόστρωμα MS.

Το μέσο μήκος των βλαστών που σχηματίστηκαν δεν εμφάνισε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων της κυτοκινίνης καθώς και του μάρτυρα (Γράφημα 1.1.18).



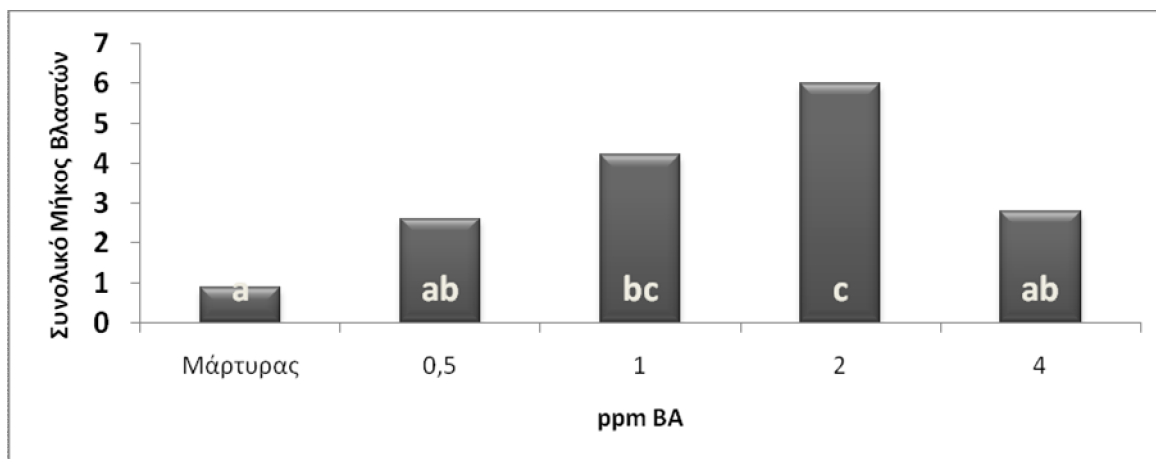
Γράφημα 1.1.18. Επίδραση της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης (BA) στο μέσο μήκος (mm) ανά νέο βλαστό που σχηματίζεται σε νεαρά έκφυτα του υποκειμένου *P. tr.* 'Serra', σε θρεπτικό υπόστρωμα MS.



Εικόνα 1.1.8. Βλαστογένεση εκφύτων του *P. tr.* 'Serra', σε θρεπτικό υπόστρωμα MS χωρίς την επίδραση κυτοκινίνης.

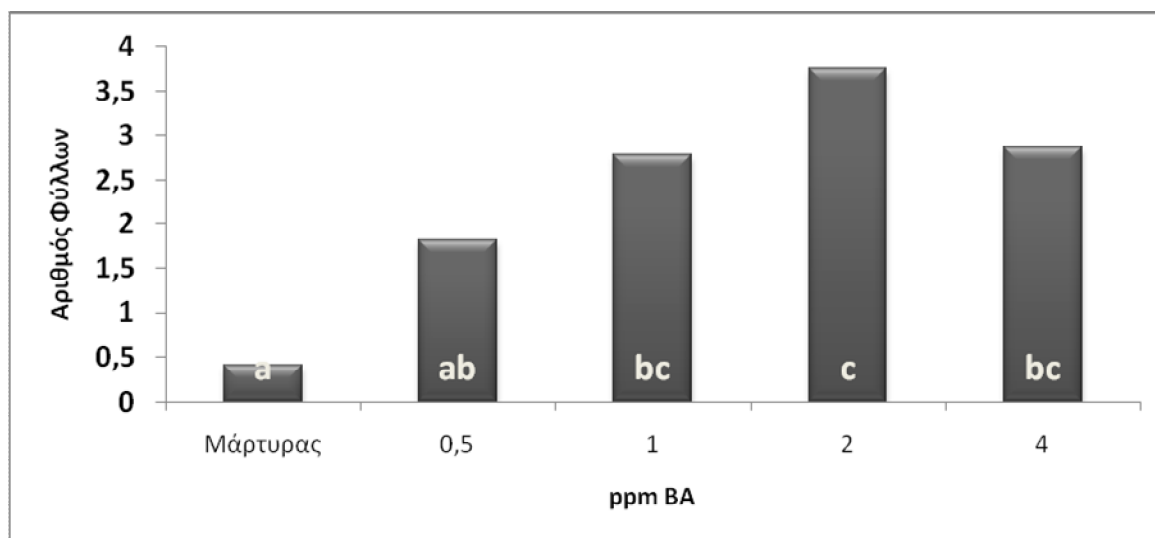
Όσον αφορά το συνολικό μήκος βλαστών ανά έκφυτο, στατιστικώς σημαντικές διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ του μάρτυρα (0,88 mm) και της συγκέντρωσης των 2

ppm BA (6 mm). Οι συγκεντρώσεις 0,5, 1 και 4 ppm BA δεν παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους (Γράφημα 1.1.19).



Γράφημα 1.1.19. Επίδραση της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης (BA), στο συνολικό μήκος (mm) των νέων βλαστών που προκύπτουν ανά έκφυτο στο υποκειμένο P. tr. 'Serra', σε θρεπτικό υπόστρωμα MS.

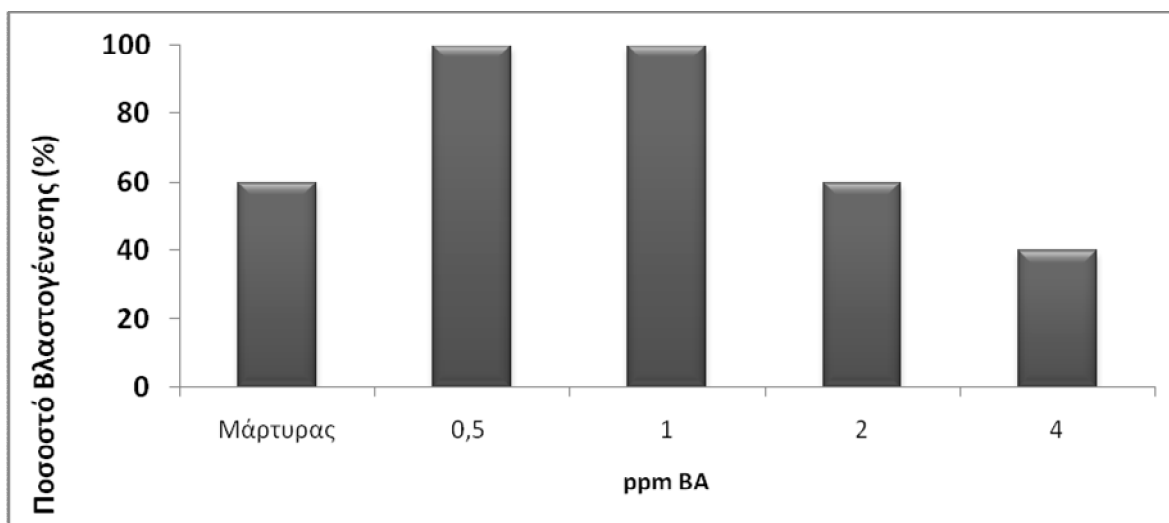
Ο αριθμός των φύλλων που σχηματίστηκαν ανά έκφυτο κυμάνθηκε από 0,41 στο μάρτυρα έως 3,75 στη συγκέντρωση των 2 ppm BA (Γράφημα 1.1.20). Στον αριθμό των φύλλων που σχηματίστηκαν, παρουσιάστηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ του μάρτυρα και των συγκεντρώσεων 1,2 και 4 ppm BA.



Γράφημα 1.1.20. Επίδραση της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης (BA), στον αριθμό φύλλων ανά έκφυτο που σχηματίζονται στους νέους βλαστούς του υποκειμένου P. tr. 'Serra', σε θρεπτικό υπόστρωμα MS.

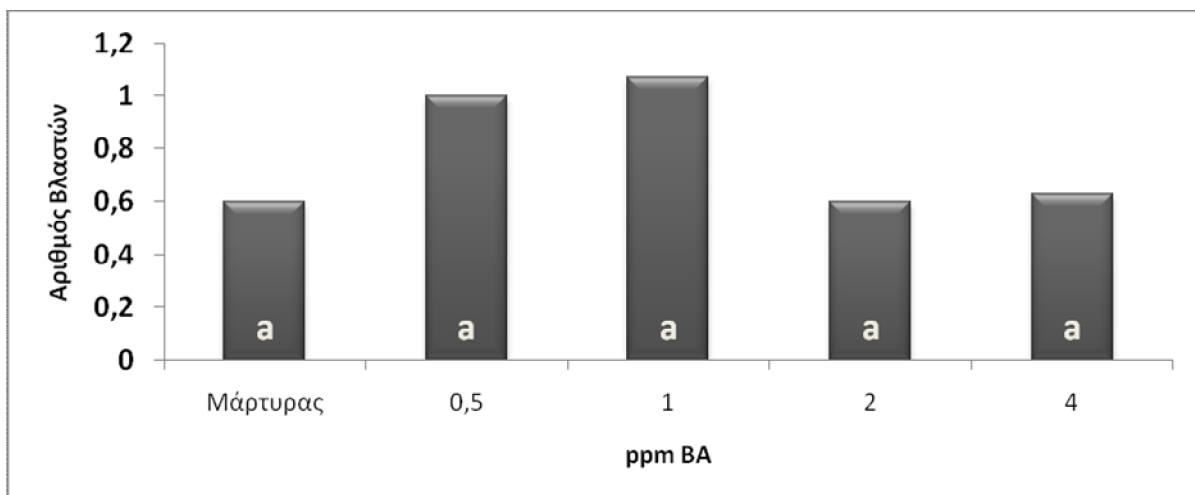
- *Poncirus trifoliata* 'Flying Dragon'

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα, το ποσοστό έκπτυξης των νέων βλαστών του υποκειμένου *P. tr.* 'Flying Dragon' κυμάνθηκε από 40% στη συγκέντρωση των 4 ppm BA έως 100% στις συγκεντρώσεις των 0,5 και 1 ppm BA (Γράφημα 1.1.21.). Ο μάρτυρας και η συγκέντρωση 2 ppm BA έδωσαν ποσοστό βλαστογένεσης 60%.

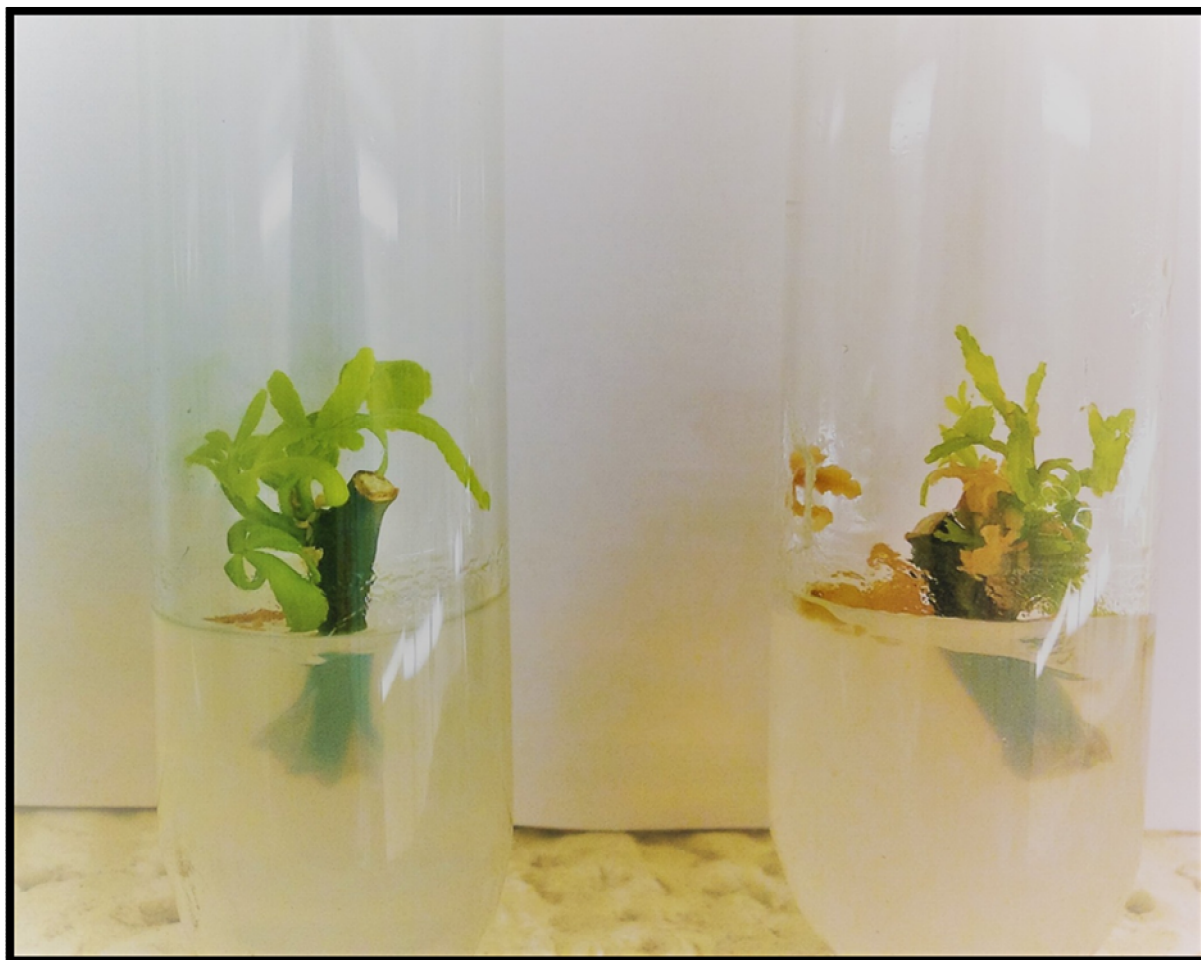


Γράφημα 1.1.21. Επίδραση της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης (BA), στην έκπτυξη νέων βλαστών, σε νεαρά έκφυτα του υποκειμένου *P. tr.* 'Flying Dragon', σε θρεπτικό υπόστρωμα MS.

Οι διαφορετικές συγκεντρώσεις κυτοκινίνης δεν παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στον αριθμό των βλαστών που σχηματίστηκαν κατά μέσο όρο ανά έκφυτο (Γράφημα 1.1.22). Ο μεγαλύτερος αριθμός βλαστών παρουσιάστηκε στη συγκέντρωση του 1 ppm BA (1,07 βλαστοί), ακολουθούμενος από τη συγκέντρωση των 0,5 ppm BA (1,00 βλαστοί). Ο χαμηλότερος αριθμός βλαστών παρουσιάστηκε στο μάρτυρα (0 ppm BA, 0,11 βλαστοί).

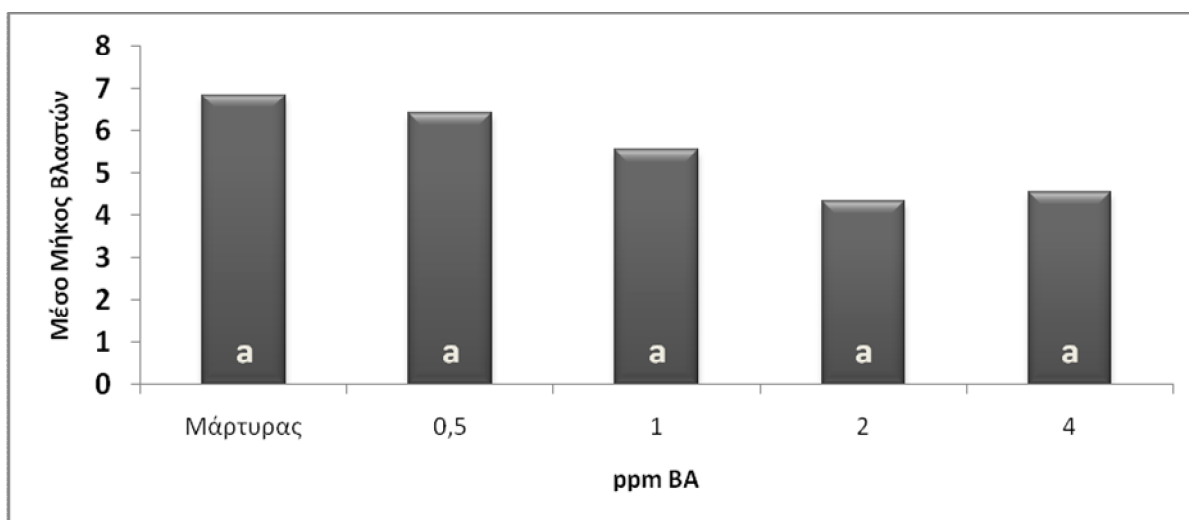


Γράφημα 1.1.22. Επίδραση της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης (BA), στον αριθμό των βλαστών ανά έκφυτο του υποκειμένου *P. tr.* 'Flying Dragon', σε θρεπτικό υπόστρωμα MS.



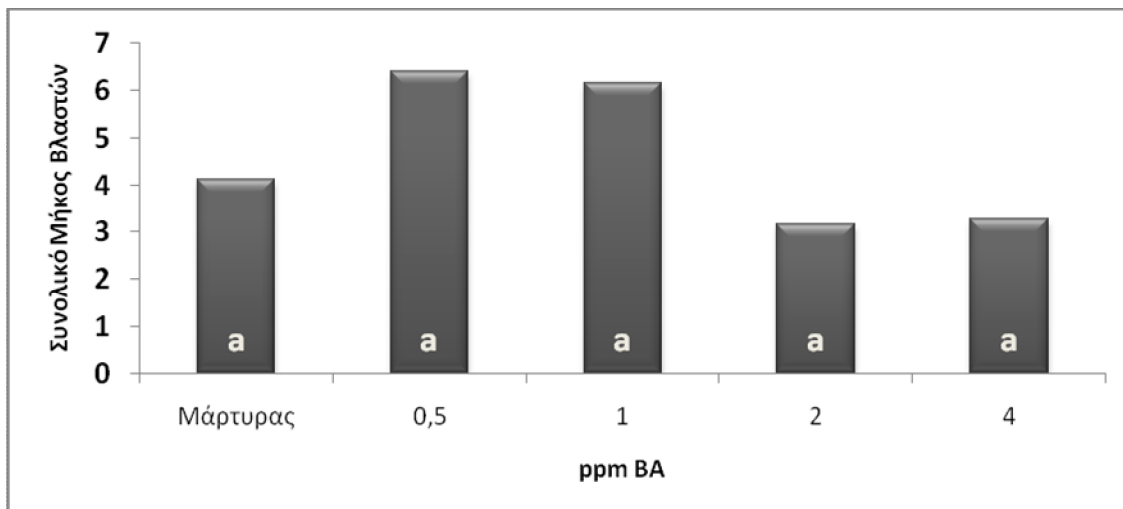
Εικόνα 1.1.9. Βλαστογένεση εκφύτων του *P. tr.* 'Flying Dragon', σε θρεπτικό υπόστρωμα MS και 4 ppm BA.

Ομοίως, το μέσο μήκος βλαστού που παρουσιάστηκε δεν επηρεάστηκε από τις διαφορετικές συγκεντρώσεις BA, καθώς και το μάρτυρα, καθώς δεν παρουσιάστηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις διαφορετικές συγκεντρώσεις BA (Γράφημα 1.1.23). Το μεγαλύτερο μέσο μήκος βλαστού παρουσιάστηκε στο μάρτυρα (6,83 mm), ακολουθούμενο από τη συγκέντρωση των 0,5 ppm BA (6,40 mm). Η υψηλότερη συγκέντρωση BA (4 ppm) έδωσε το μικρότερο μέσο μήκος βλαστού (4,20 mm).



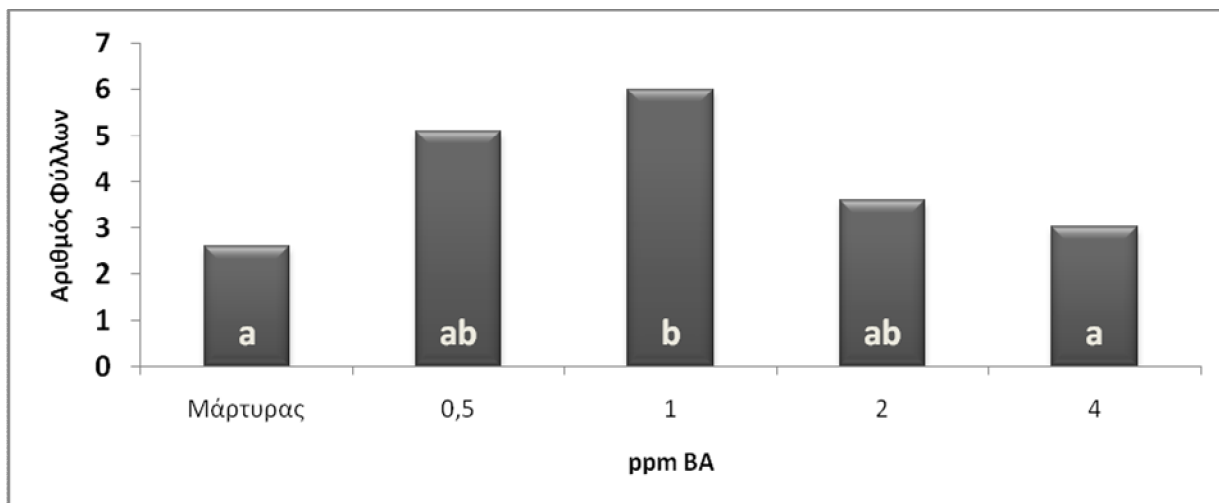
Γράφημα 1.1.23. Επίδραση της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης (BA) στο μέσο μήκος (mm) ανά νέο βλαστό που σχηματίζεται σε νεαρά έκφυτα του υποκειμένου *P. tr. 'Flying Dragon'*, σε θρεπτικό υπότρωμα MS.

Επίσης, το συνολικό μήκος βλαστών ανά έκφυτο δεν διέφερε στατιστικώς σημαντικά μεταξύ των συγκεντρώσεων καθώς και του μάρτυρα (Γράφημα 1.1.24).



Γράφημα 1.1.24. Επίδραση της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης (BA), στο συνολικό μήκος (mm) των νέων βλαστών που προκύπτουν ανά έκφυτο στο υποκειμένο *P. tr.* 'Flying Dragon', σε θρεπτικό υπόστρωμα MS.

Ο μεγαλύτερος μέσος αριθμός φύλλων ανά έκφυτο παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση 1 ppm BA (6 φύλλα ανά έκφυτο) και διέφερε στατιστικώς σημαντικά από το μάρτυρα (2,60 φύλλα ανά έκφυτο) και τη συγκέντρωση 4 ppm BA (3,27 φύλλα ανά έκφυτο)(Γράφημα 1.1.25).



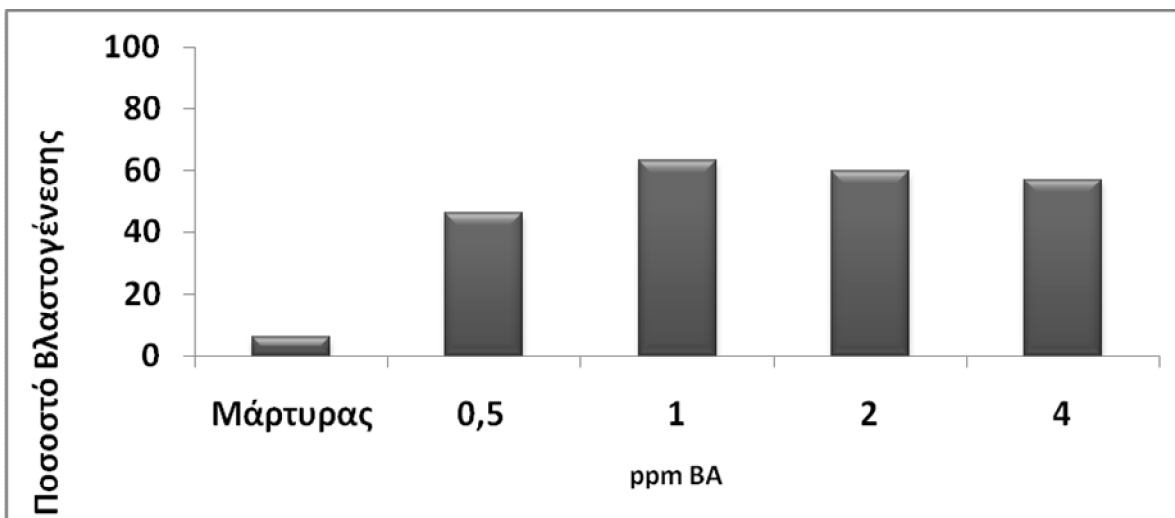
Γράφημα 1.1.25. Επίδραση της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης (BA), στον αριθμό φύλλων ανά έκφυτο που σχηματίζονται στους νέους βλαστούς, του υποκειμένου *P. tr.* 'Flying Dragon', σε θρεπτικό υπόστρωμα MS.



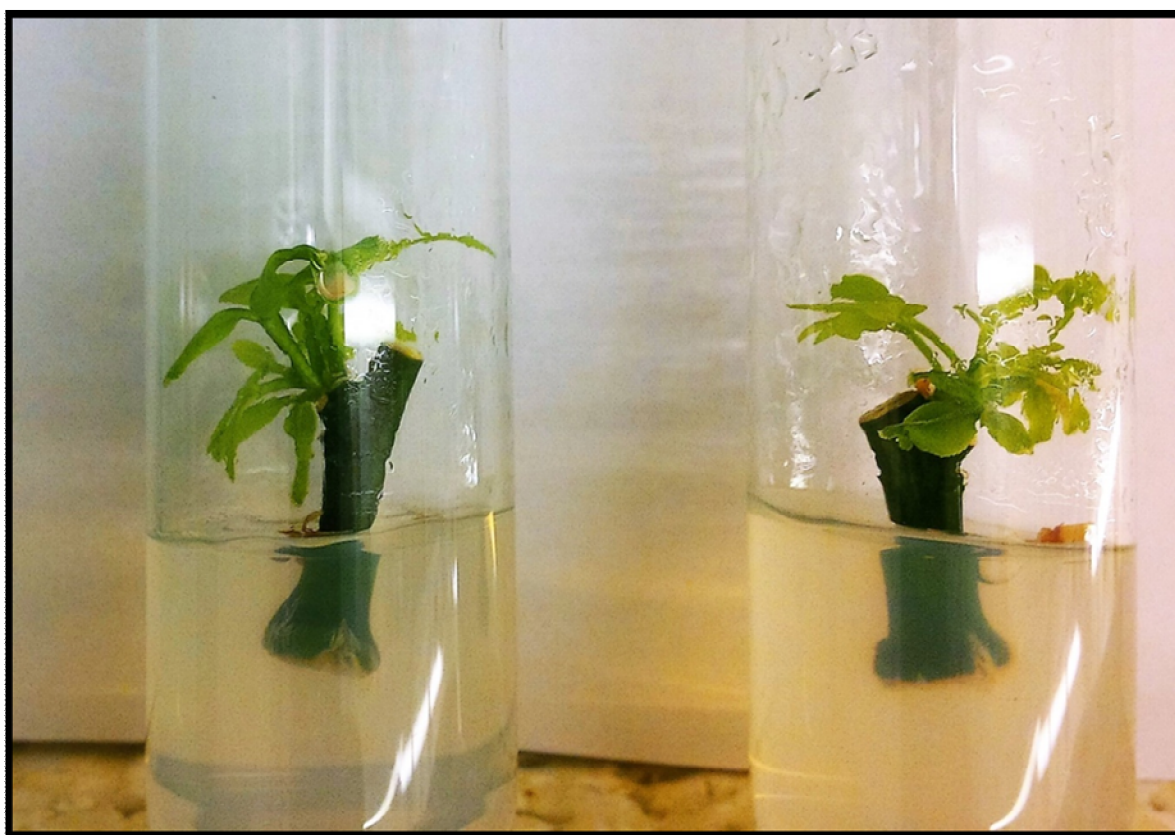
Εικόνα 1.1.10. Βλαστογένεση εκφύτων του *P. tr.* 'Flying Dragon', σε θρεπτικό υπόστρωμα MS και 1 ppmBA.

- *Poncirus trifoliata* 'Rubidoux'

Το υποκείμενο *P. tr.* 'Rubidoux' εμφάνισε ποσοστό έκπτυξης βλαστών μεγαλύτερο του 50% υπό την επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων κυτοκινίνης (0,5, 1, 2 και 4 ppm BA), παρουσιάζοντας τα μεγαλύτερα αποτελέσματα στη συγκέντρωση του 1 ppm BA (63%) (Γράφημα 1.1.26). Ο μάρτυρας έδωσε τα χαμηλότερα ποσοστά έκπτυξης νέων βλαστών (6%).

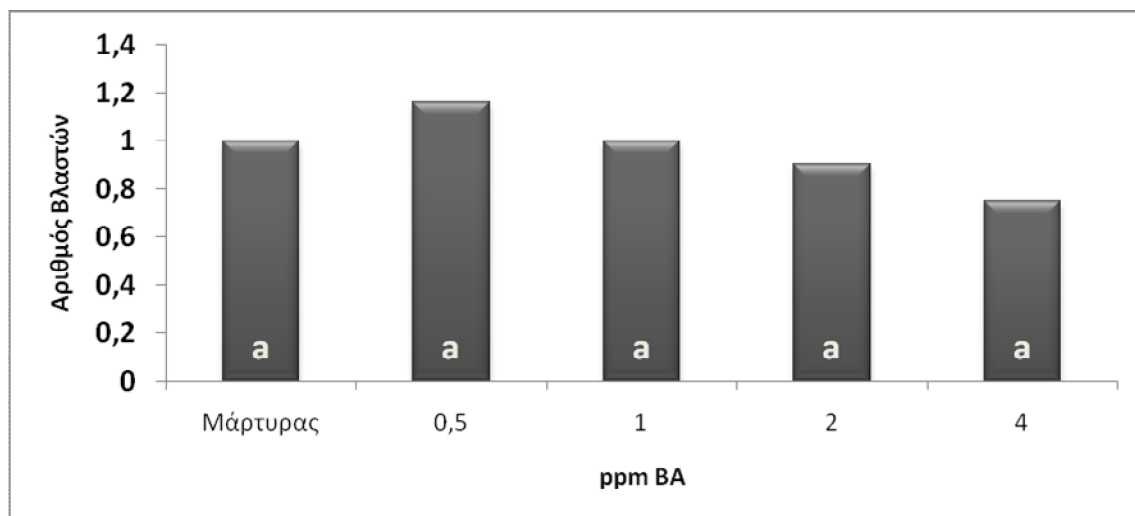


Γράφημα 1.1.26. Επίδραση της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης (BA), στην έκπτυξη νέων βλαστών, σε νεαρά έκφυτα του υποκειμένου *P. tr.* 'Rubidoux', σε θρεπτικό υπόστρωμα MS.



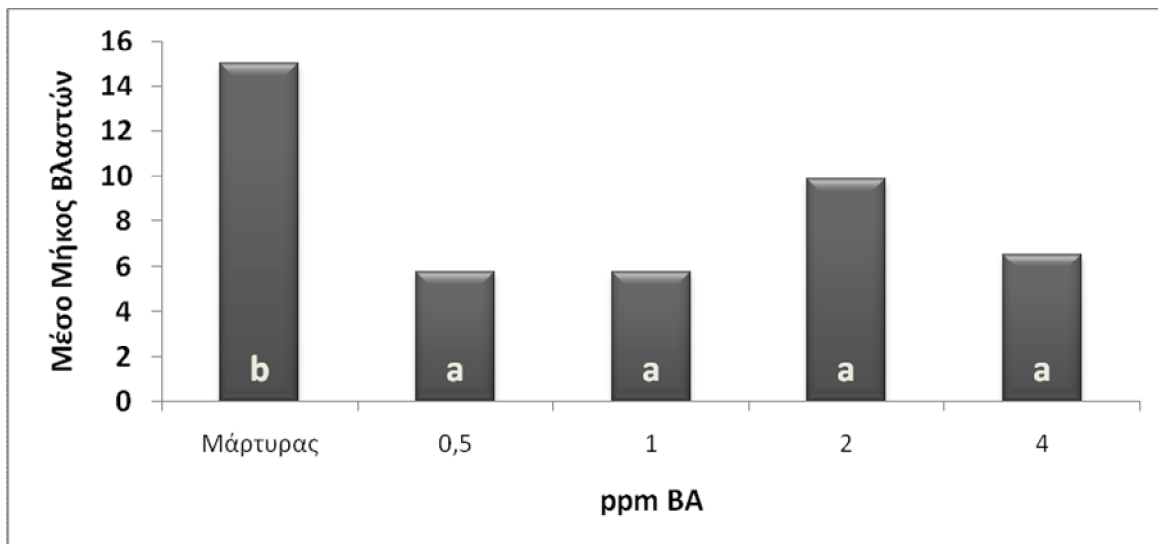
Εικόνα 1.1.11. Βλαστογένεση εκφύτων του *P. tr.* 'Rubidoux', σε θρεπτικό υπόστρωμα MS και 1 ppm BA.

Οι διαφορετικές συγκεντρώσεις κυτοκινίνης και ο μάρτυρας δεν παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στον μέσο αριθμό των νέων βλαστών που αναπτύχθηκαν ανά έκφυτο. Ο αριθμός των βλαστών που σχηματίστηκαν ανά έκφυτο κυμάνθηκε από 0,75 (4 ppm BA) έως 1,16 (0,5 ppm BA) (Γράφημα 1.1.27).

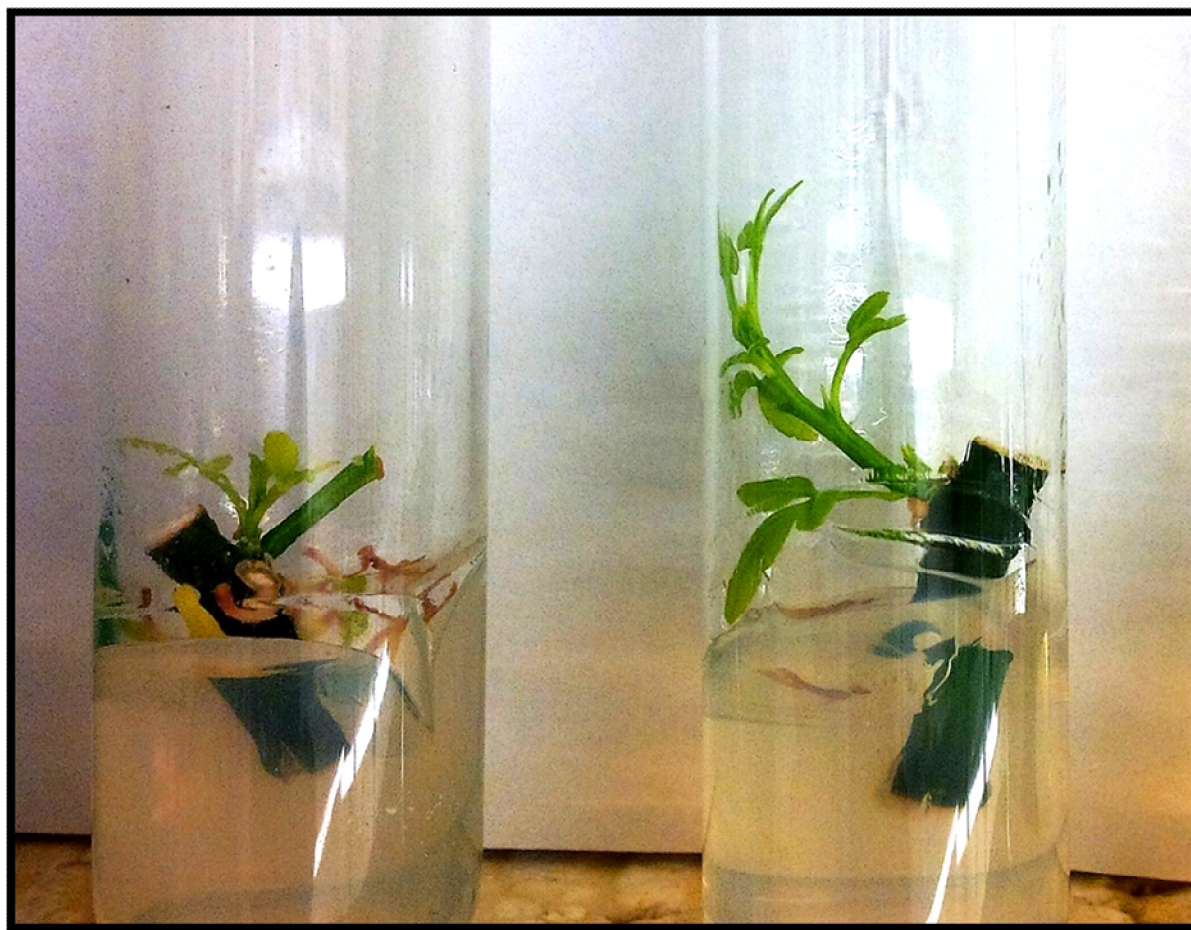


Γράφημα 1.1.27. Επίδραση της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης (BA), στον αριθμό των βλαστών ανά έκφυτο του υποκειμένου *P. tr. 'Rubidoux'*, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS.

Το μέσο μήκος βλαστού ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερο στο μάρτυρα (15,00 mm) (Γράφημα 1.1.28). Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων BA. Το μικρότερο μέσο μήκος βλαστού παρουσιάστηκε στις συγκεντρώσεις των 0,5 και 1 ppm BA.

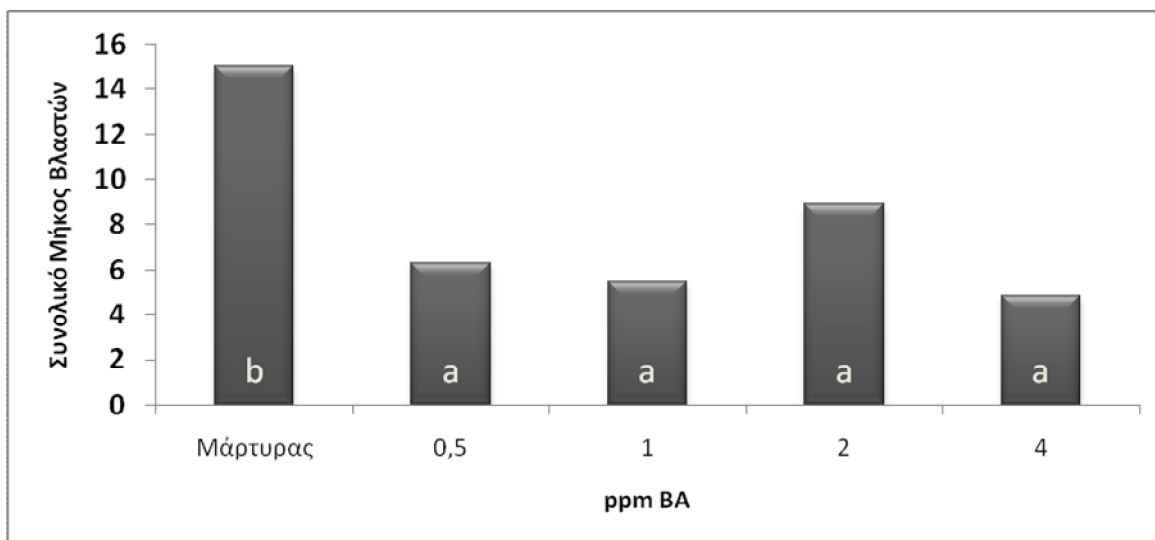


Γράφημα 1.1.28. Επίδραση της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης (BA) στο μέσο μήκος (mm) ανά νέο βλαστό που σχηματίζεται σε νεαρά έκφυτα του υποκειμένου *P. tr.* 'Rubidouχ', σε θρεπτικό υπόπρωμα MS.



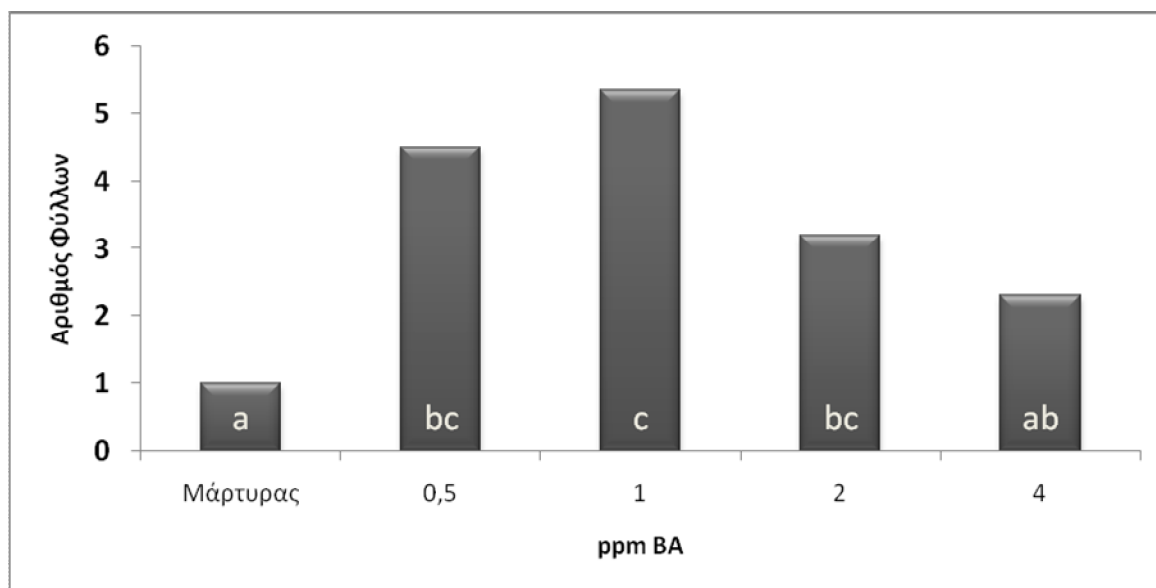
Εικόνα 1.1.12. Βλαστογένεση εκφύτων του *P. tr.* 'Rubidouχ', σε θρεπτικό υπόστρωμα MS και 2 ppm BA.

Ομοίως στο συνολικό μήκος βλαστών ανά έκφυτο εμφανίστηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ του μάρτυρα και των υπολοίπων συγκεντρώσεων (Γράφημα 1.1.29). Το συνολικό μήκος βλαστών ανά έκφυτο κυμάνθηκε από 4,81 mm στη συγκέντρωση των 4 ppm BA έως 15,00 mm στο μάρτυρα.



Γράφημα 1.1.29. Επίδραση της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης (BA), στο συνολικό μήκος (mm) των νέων βλαστών που προκύπτουν ανά έκφυτο του υποκειμένου *P. tr.* 'Rubidouχ', σε θρεπτικό υπόστρωμα MS.

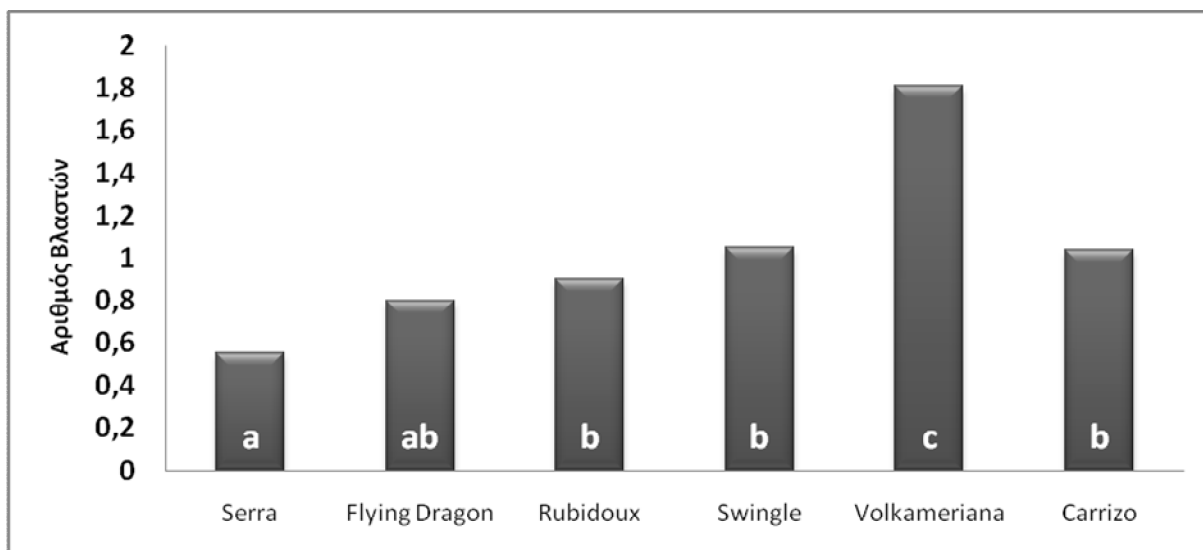
Ο μέσος αριθμός φύλλων ανά έκφυτο ήταν υψηλότερος στη συγκέντρωση 1 ppm BA (5,36) και διέφερε στατιστικώς σημαντικά από τη συγκέντρωση 4 ppm BA και το μάρτυρα (1,0) (Γράφημα 1.1.30).



Γράφημα 1.1.30. Επίδραση της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης (BA), στον αριθμό φύλλων ανά έκφυτο που σχηματίζονται στους νέους βλαστού, του υποκειμένου *P. tr.* 'Rubidouχ', σε θρεπτικό υπόστρωμα MS.

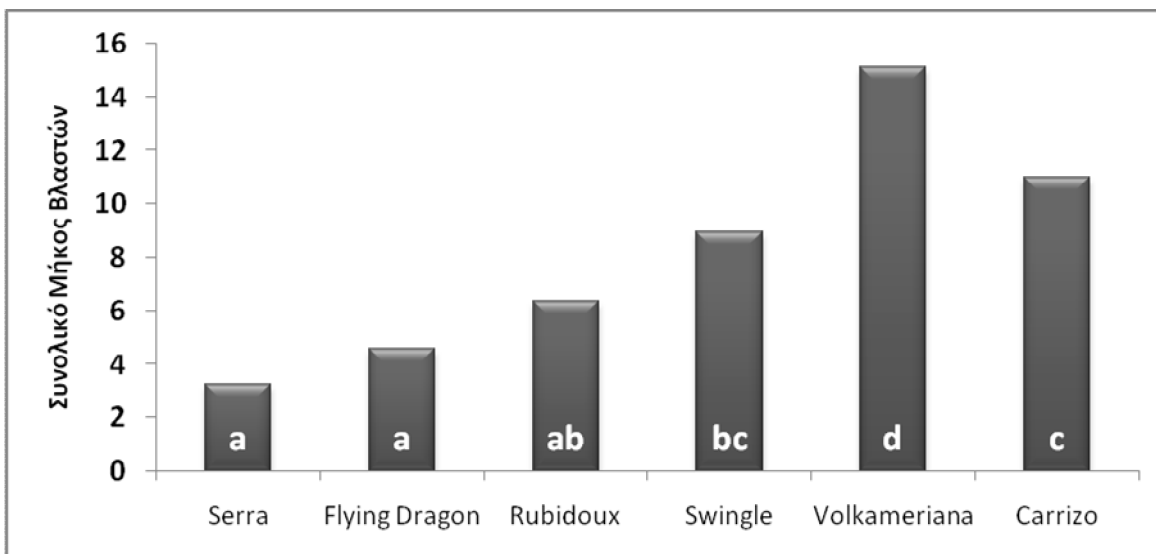
1.2 Επίδραση του γονοτύπου στο στάδιο της βλαστογένεσης

Συγκρίνοντας τα διαφορετικά υποκείμενα του πειράματος ως προς των αριθμό των βλαστών που εμφανίστηκαν στο στάδιο της βλαστογένεσης, το υποκείμενο *Volkameriana* παρουσίασε στατιστικώς σημαντικά υψηλότερο αριθμό βλαστών (1,81) από τα υπόλοιπα υποκείμενα (Γράφημα 1.2.1). Ο μικρότερος αριθμός βλαστών ανά έκφυτο (0,55 βλαστοί/έκφυτο) παρατηρήθηκε στο υποκείμενο *P. tr.* 'Serra', το οποίο εμφάνισε στατιστικώς σημαντικές διαφορές από τα υπόλοιπα υποκείμενα εκτός του *P. tr.* 'Flying Dragon'. Τα υποκείμενα *P. tr.* 'Flying Dragon', *P. tr.* 'Rubidouχ', *C.* 'Swingle' και *C.* 'Carrizo' δεν παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους.



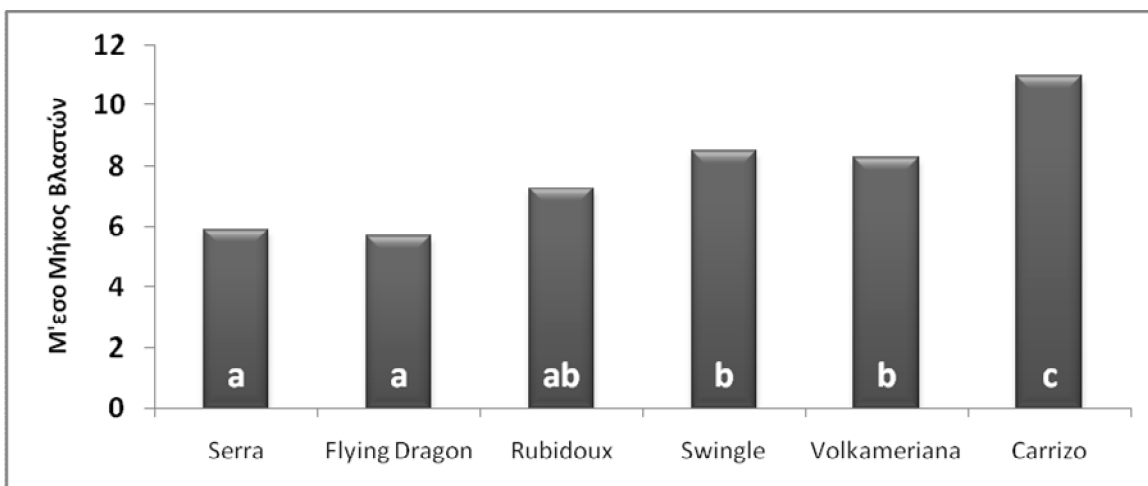
Γράφημα 1.2.1. Επίδραση του γονότυπου στον αριθμό των βλαστών ανά έκφυτο που προκύπτουν στο στάδιο της βλαστογένεσης σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας MS και 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις κυτοκινίνης (BA).

Το στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερο συνολικό μήκος βλαστών ανά έκφυτο παρατηρήθηκε στο υποκείμενο *Volkameriana* (15,14 mm) (Γράφημα 1.2.2). το υποκείμενο C. 'Carrizo' (10,98) που διέφερε στατιστικώς σημαντικά από όλα τα υποκείμενα εκτός του C. 'Swingle'. Το χαμηλότερο συνολικό μήκος βλαστών (3,25 mm) παρουσίασε το υποκείμενο *P. tr.* 'Serra' το οποίο εμφάνισε στατιστικώς σημαντικές διαφορές από τα υπόλοιπα υποκείμενα εκτός του *P. tr.* 'Flying Dragon'.



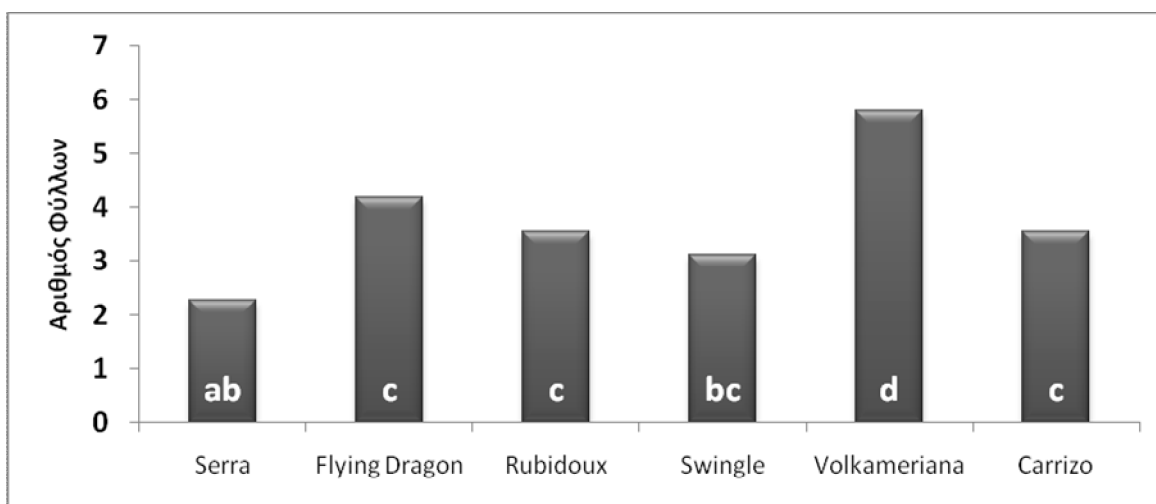
Γράφημα 1.2.2. Επίδραση του γονότυπου, στο συνολικό μήκος (mm) των βλαστών που εκπύχθηκαν ανά έκφυτο, σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας MS και 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις κυτοκινίνης BA.

Το στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερο μέσο μήκος βλαστού παρατηρήθηκε στο υποκείμενο C. 'Carrizo' (10,98 mm) (Γράφημα 1.3.4). Τα υποκείμενα *Volkameriana* και C. 'Swingle' ακολούθησαν δίνοντας μέσο μήκος βλαστού 8,27 mm και 8,46 αντίστοιχα χωρίς να διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους, ενώ εμφάνισαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές από τα υποκείμενα *P. tr.* 'Serra' και *P. tr.* 'Flying dragon' και το C. 'Carrizo'. Το υποκείμενο *P. tr.* 'Flying Dragon' παρουσίασε το χαμηλότερο μέσο μήκος βλαστού (5,67 mm).



Γράφημα 1.3.4. Επίδραση των γονοτύπων στο μέσο μήκος (mm) βλαστού, σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας MS και 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις κυτοκινίνης (BA).

Ομοίως, συγκρίνοντας τα υποκείμενα ως προς τον αριθμό φύλλων που εμφανίστηκαν ανά έκφυτο το υποκείμενο *Volkameriana* παρουσίασε στατιστικώς σημαντικές διαφορές από τα υπόλοιπα υποκείμενα, καθώς έδωσε το μεγαλύτερο αριθμό φύλλων ανά έκφυτο (5,80) (Γράφημα 1.2.3). Ο χαμηλότερος αριθμός φύλλων ανά έκφυτο παρουσιάστηκε στο υποκείμενο *P. tr.* 'Serra', τα αποτελέσματα του οποίου διέφεραν στατιστικώς σημαντικά από τα υπόλοιπα υποκείμενα εκτός του *C.* 'Swingle'. Τα υποκείμενα *P. tr.* 'Flying Dragon', *C.* 'Swingle', *P. tr.* 'Rubidoux' και *C.* 'Carrizo' δεν παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους.



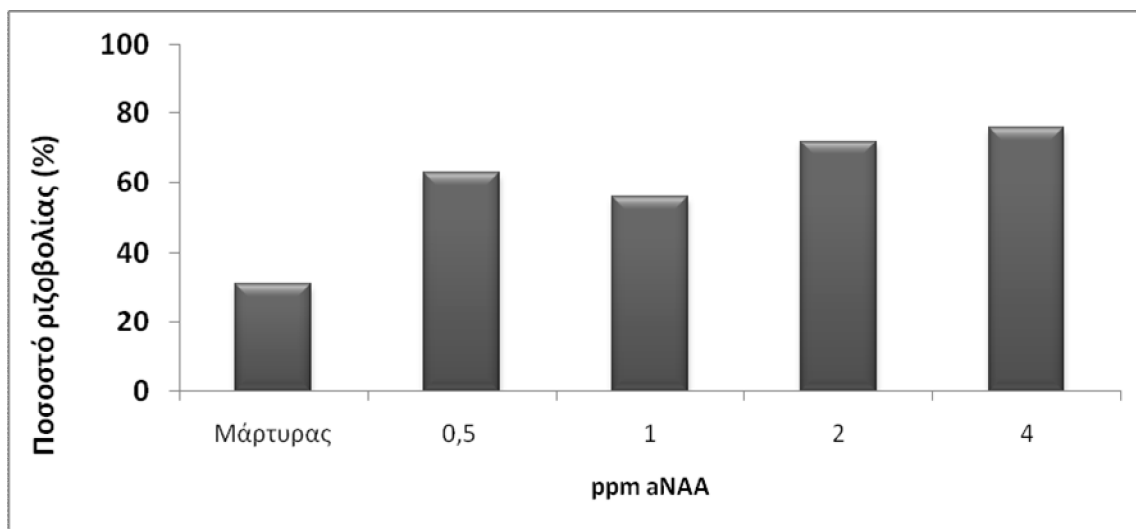
Γράφημα 1.2.3. Επίδραση του γονοτύπου στον αριθμό των φύλλων που σχηματίστηκαν ανά έκφυτο, σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας MS και 5 διαφορετικές συγκεντρώσεις κυτοκινίνης (BA).

2. ΣΤΑΔΙΟ ΡΙΖΟΓΕΝΕΣΗΣ

2.1. Επίδραση των διαφόρων συγκεντρώσεων αυξίνης στη ριζογένεση των υπό μελέτη υποκειμένων

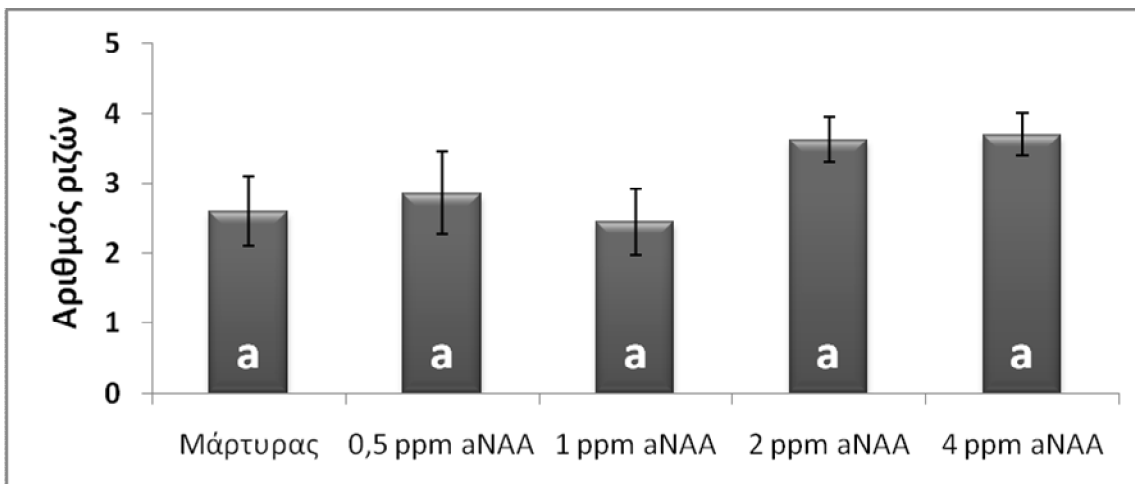
- *Citranges 'Carrizo'*

Στο υποκείμενο *C. 'Carrizo'* το μεγαλύτερο ποσοστό ριζοβολίας εμφανίστηκε στη συγκέντρωση των 4 ppm NAA, ακολουθούμενο από τη συγκέντρωση των 2 ppm NAA (72%) και τη συγκέντρωση των 0,5 ppm NAA (63%) (Γράφημα 2.1.1). Η συγκέντρωση του 1 ppm NAA παρουσίασε ποσοστό ριζοβολίας ίσο με 56%. Το μικρότερο ποσοστό ριζογένεσης εμφανίστηκε στο μάρτυρα (31%).



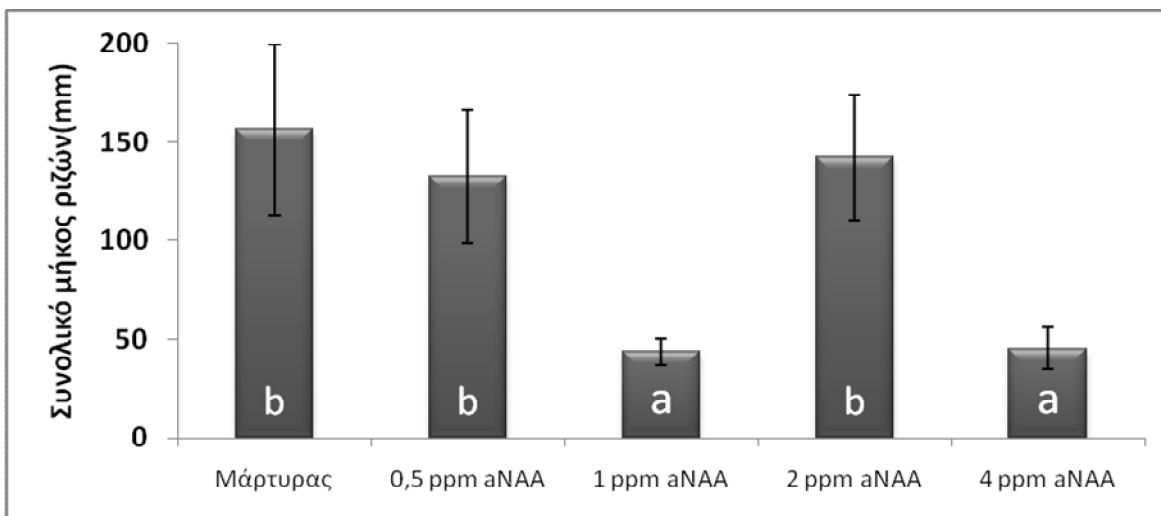
Γράφημα 2.1.1. Επίδραση της συγκέντρωσης της αυξίνης (NAA), στο ποσοστό ριζοβολίας των αναγεννημένων βλαστών του υποκειμένου *C. 'Carrizo'*, σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας MS.

Ο αριθμός των ριζών που παρατηρήθηκε ανά έκφυτο δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις διαφορετικές συγκεντρώσεις αυξίνης που δοκιμάστηκαν όπως και στον μάρτυρα (Γράφημα 2.1.2). Ο μεγαλύτερος αριθμός ριζών ανά έκφυτο παρουσιάστηκε στην συγκέντρωση των 4 ppm NAA (3,70). Ο μικρότερος αριθμός ριζών ανά έκφυτο παρουσιάστηκε στη συγκέντρωση του 1 ppm NAA (2,44).



Γράφημα 2.1.2. Επίδραση της συγκέντρωσης της αυξίνης (NAA), στον αριθμό ριζών που εμφανίζονται ανά έκφυτο του υποκειμένου *C. 'Carrizo'*, σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας MS.

Ως προς το συνολικό μήκος ριζών ανά έκφυτο, δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ της παρουσίας και της απουσίας της αυξίνης. Οι συγκεντρώσεις 1 και 4 ppm NAA παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερες τιμές από τις συγκεντρώσεις 0, 0,5 και 2 ppm NAA (Γράφημα 2.1.3). Σημαντικά μεγαλύτερο συνολικό μήκος ριζών ανά έκφυτο εμφανίστηκε στο μάρτυρα (156,4 mm). Η συγκέντρωση των 4 ppm NAA έδωσε το στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερο συνολικό μήκος ριζών ανά έκφυτο (45, 30 mm).

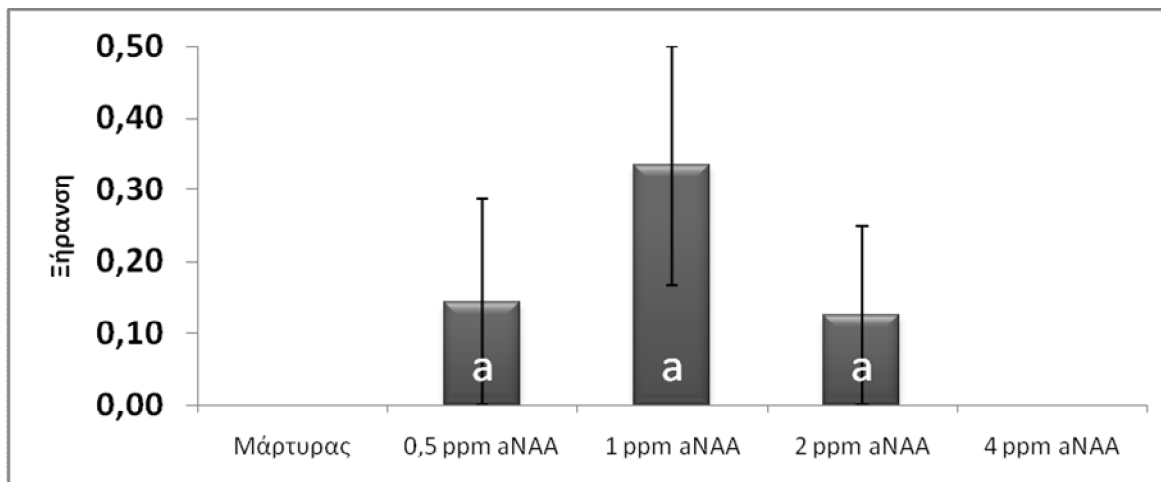


Γράφημα 2.1.3. Επίδραση της συγκέντρωσης της αυξίνης (NAA), στο συνολικό μήκος των ριζών που εμφανίζονται ανά έκφυτο του υποκειμένου *C. 'Carrizo'*, σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας MS, στο στάδιο της ριζοβολίας.



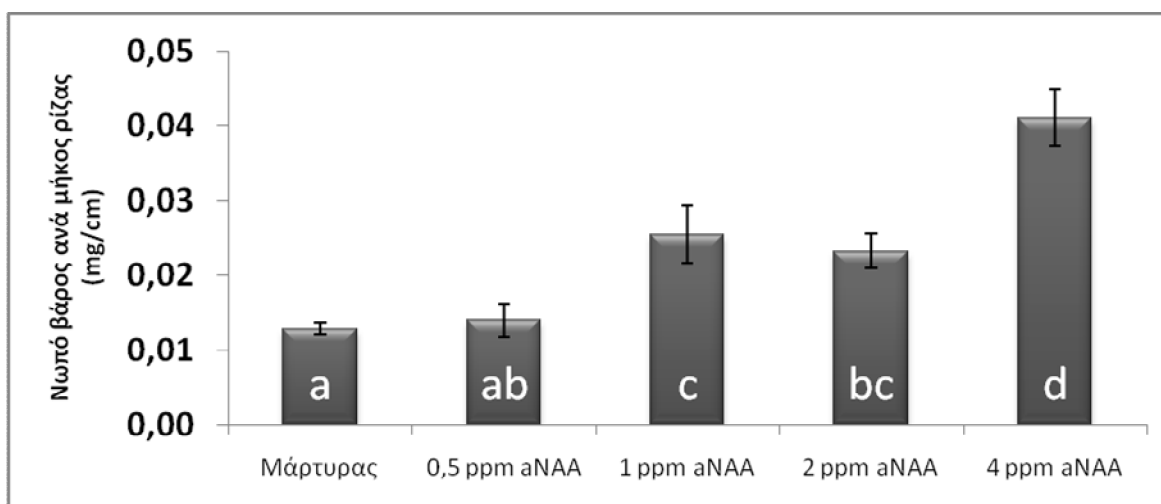
Εικόνα 2.1.1. Ριζογένεση εκφύτων του *C. 'Carrizo'*, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS και 2 ppm NAA.

Ως προς την εμφάνιση μερικής ή ολικής ξήρανσης στα έκφυτα, η συγκέντρωση 4 ppm NAA και ο μάρτυρας δεν εμφάνισαν καθόλου ξηράνσεις, ενώ ο μεγαλύτερος αριθμός ξήρανσης παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση 1 ppm NAA (0,33) (Γράφημα 2.1.4).



Γράφημα 2.1.4. Επίδραση συγκέντρωσης της αυξίνης (NAA), στην εμφάνιση ξήρανσης (μερικής ή ολικής) στα έκφυτα του υποκειμένου *C. 'Carrizo'*, σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας MS.

Ο λόγος νωπού βάρους ανά μήκος ρίζας ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερος στα 4 ppm NAA και στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερος στη συγκέντρωση 0,5 ppm NAA και στο μάρτυρα (Γράφημα 2.1.5).



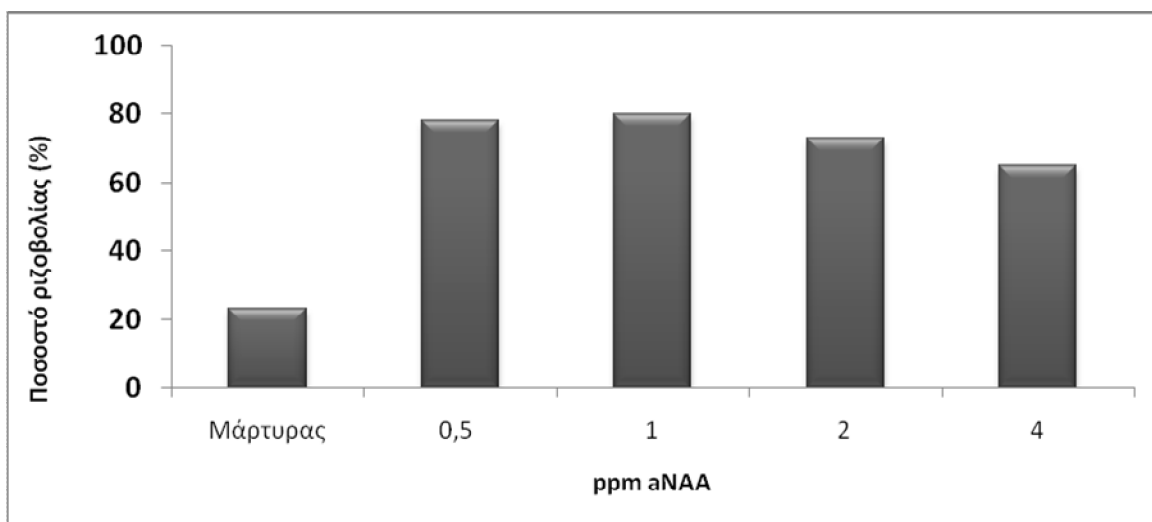
Γράφημα 2.1.5. Επίδραση της συγκέντρωσης της αυξίνης (NAA), στο νωπό βάρος ανά μήκος ρίζας των εκφύτων του υποκειμένου *C. 'Carrizo'* σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας MS.



Εικόνα 2.1.2. Ριζογένεση εκφύτων του *C. 'Carrizo'*, σε θρεπτικό υπόστρωμα *MS*, σε απουσία αυξίνης.

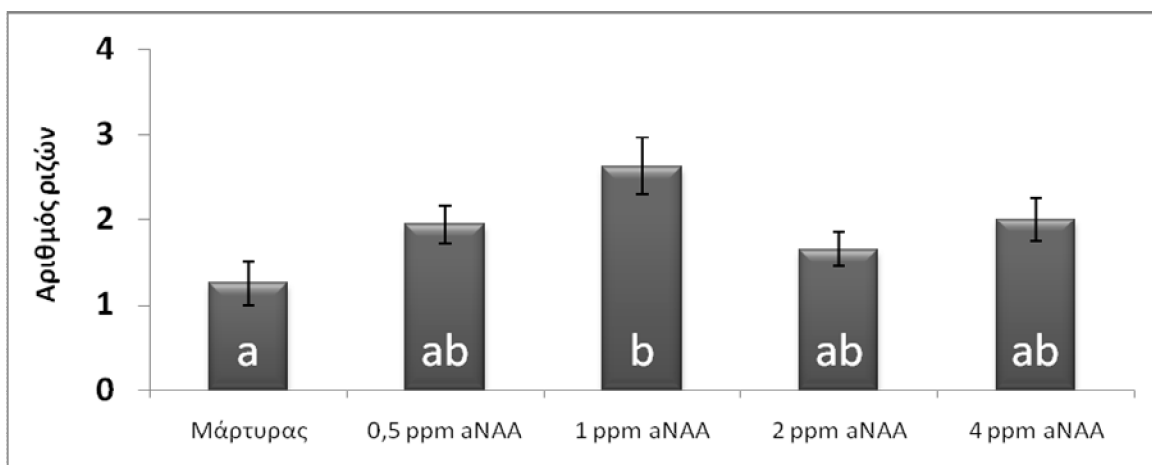
- *Volkameriana*

Το ποσοστό ριζογένεσης στο υποκείμενο *Volkameriana* κυμάνθηκε από 23% έως 80% (Γράφημα 2.1.6). Η συγκέντρωση 1 ppm NAA έδωσε τα μεγαλύτερα αποτελέσματα (80%), ακολουθούμενη από τη συγκέντρωση των 0,5 ppm NAA (78%). Τα χαμηλότερα αποτελέσματα (23%) εμφανίστηκαν στον μάρτυρα (0 ppm NAA).

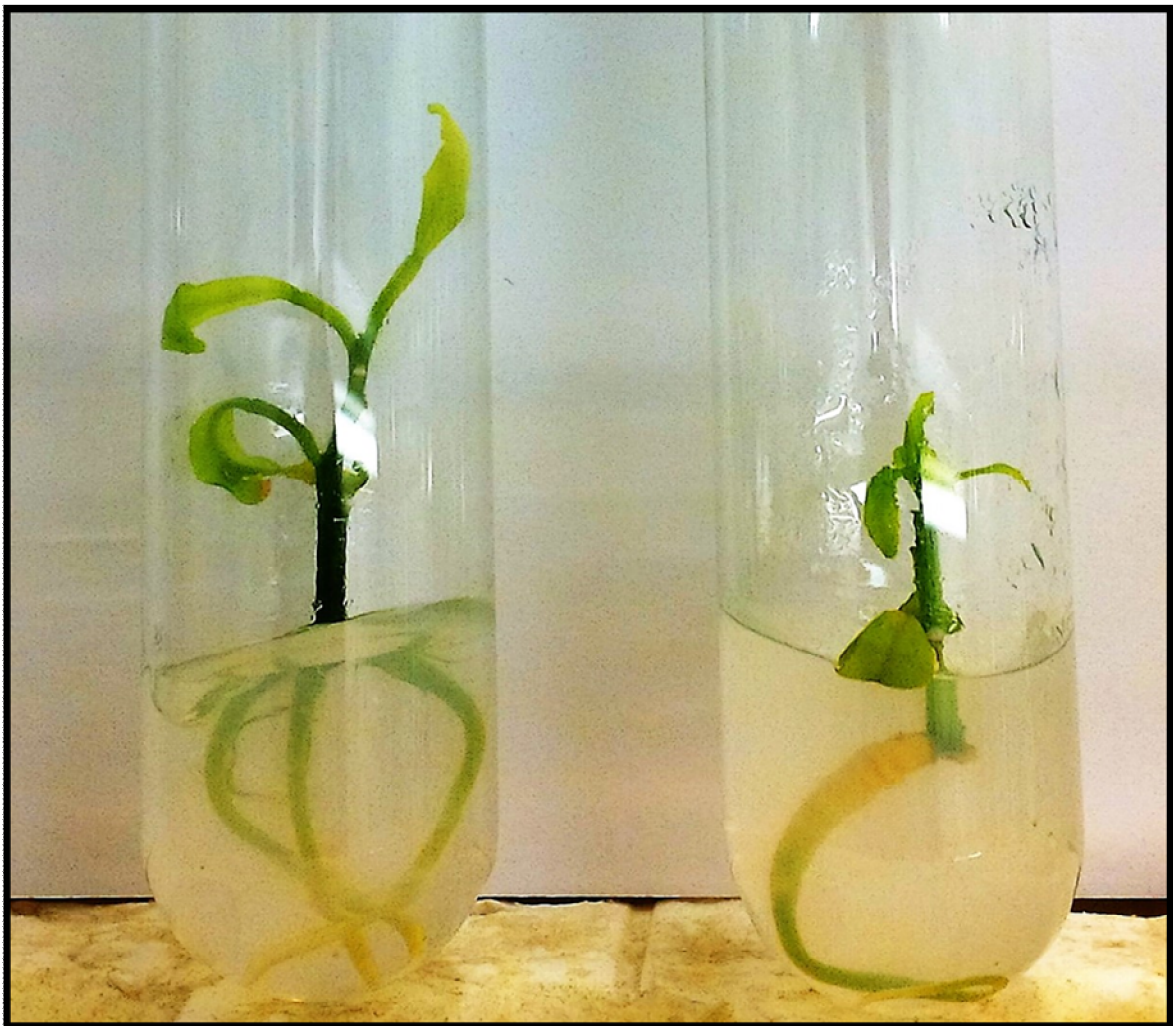


Γράφημα 2.1.6. Επίδραση της συγκέντρωσης της αυξίνης (NAA), στο ποσοστό ριζοβολίας των αναγεννημένων βλαστών του υποκειμένου *Volkameriana*, σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας MS.

Ως προς τον αριθμό των ριζών που εμφανίστηκαν ανά έκφυτο παρουσιάστηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ της συγκέντρωσης του 1 ppm NAA και του μάρτυρα (Γράφημα 2.1.7). Στη συγκέντρωση του 1 ppm NAA εμφανίστηκε ο μεγαλύτερος αριθμός ριζών ανά έκφυτο (2,62 ρίζες), ενώ στο μάρτυρα ο μικρότερος (1,25 ρίζες). Μεταξύ των υπολοίπων συγκεντρώσεων δεν παρουσιάστηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές.

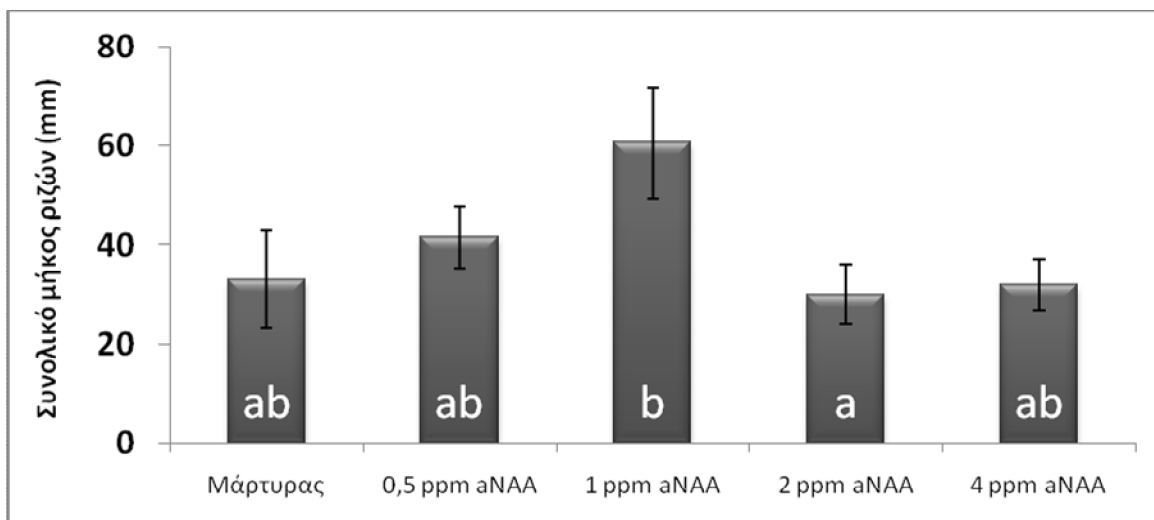


Γράφημα 2.1.7. Επίδραση της συγκέντρωσης της αυξίνης (NAA), στον αριθμό ριζών που εμφανίζονται ανά έκφυτο του υποκειμένου *Volkameriana*, σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας MS.



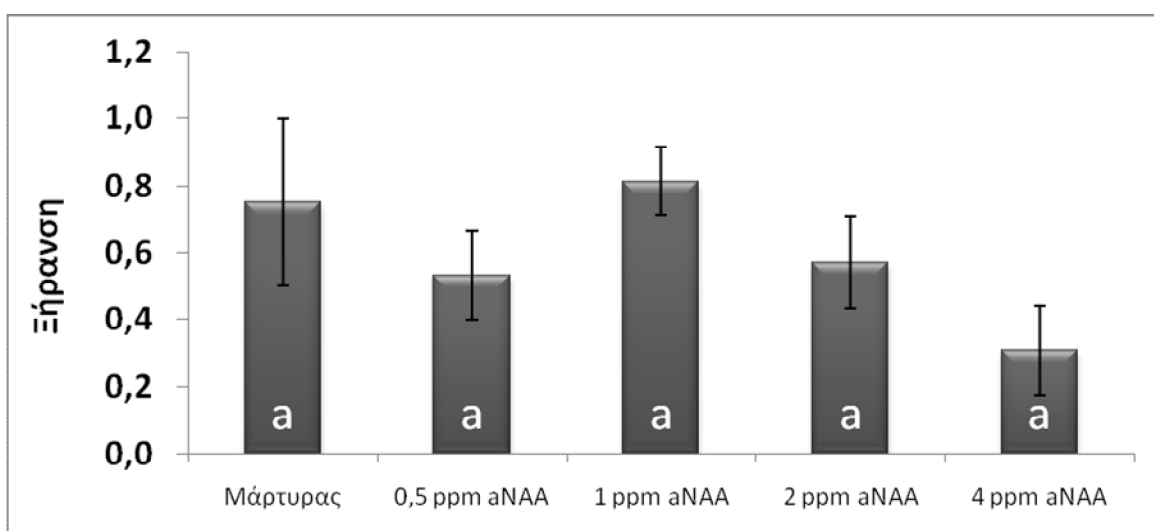
Εικόνα 2.1.3. Ριζογένεση εκφύτων του *Volkameriana*, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS και 0,5 ppm NAA.

Ως προς το συνολικό μήκος ριζών ανά έκφυτο, δεν υπήρξαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ της παρουσίας και της απουσίας της αυξίνης. Στατιστικώς σημαντικές διαφορές εμφανίστηκαν μεταξύ της συγκέντρωσης του 1 ppm NAA (60,62 mm) και της συγκέντρωσης των 2 ppm NAA (30,00 mm) (Γράφημα 2.1.8). Οι υπόλοιπες συγκεντρώσεις δεν έδωσαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους.



Γράφημα 2.1.8. Επίδραση της συγκέντρωσης της αυξίνης (NAA), στο συνολικό μήκος των ριζών που εμφανίζονται ανά έκφυτο του υποκειμένου *Volkameriana* σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας MS, στο στάδιο της ριζοβολίας.

Η επίδραση της αυξίνης δεν επηρέασε στατιστικώς σημαντικά την εμφάνιση μερικών ή ολικών ξηράνσεων των εκφύτων σε καμία συγκέντρωση (Γράφημα 2.1.9). Το ποσοστό ξήρασης των εκφύτων κυμάνθηκε από 30% στη συγκέντρωση των 4 ppm NAA έως 81% στη συγκέντρωση του 1 ppm NAA.

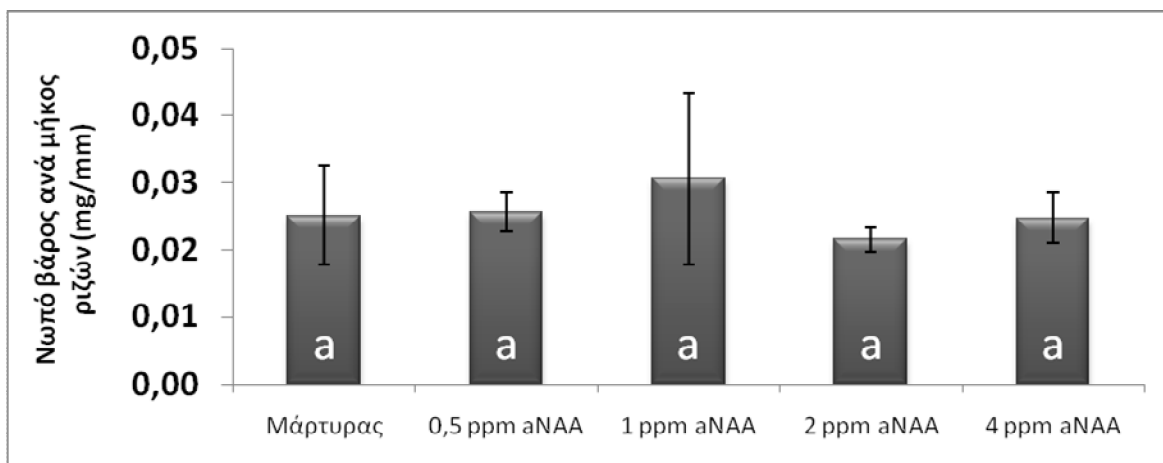


Γράφημα 2.1.9. Επίδραση συγκέντρωσης της αυξίνης (NAA), στην εμφάνιση ξήρασης (μερικής ή ολικής) στα έκφυτα του υποκειμένου *Volkameriana*, σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας MS.



Εικόνα 2.1.4. Ριζογένεση εκφύτων του *Volkameriana*, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS και 1 ppm NAA.

Ο λόγος νωπού βάρους ως προς το μήκος των ριζών δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντικές διαφορές σε καμία συγκέντρωση της αυξίνης (Γράφημα 2.1.10). Ο μεγαλύτερος λόγος νωπού βάρους ως προς το βάρος της ρίζας εμφανίστηκε στη συγκέντρωση του 1 ppm NAA (0,030 mg/cm).

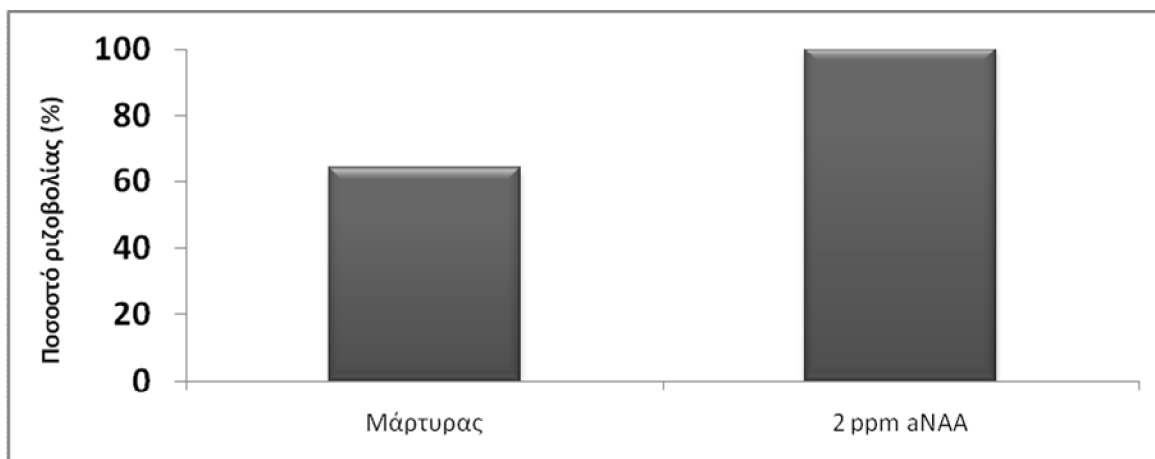


Γράφημα 2.1.10. Επίδραση της συγκέντρωσης της αυξίνης (NAA), στο νωπό βάρος ανά μήκος ρίζας των εκφύτων του υποκειμένου *Volckameriana* σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας MS.

Τα παρακάτω υποκείμενα ερευνήθηκαν μόνο σε δύο επίπεδα αυξίνης (μηδενικής συγκέντρωσης και 2 ppm NAA), λόγω του χαμηλού αριθμού βλαστών που παρουσίασαν στο στάδιο της βλαστογένεσης.

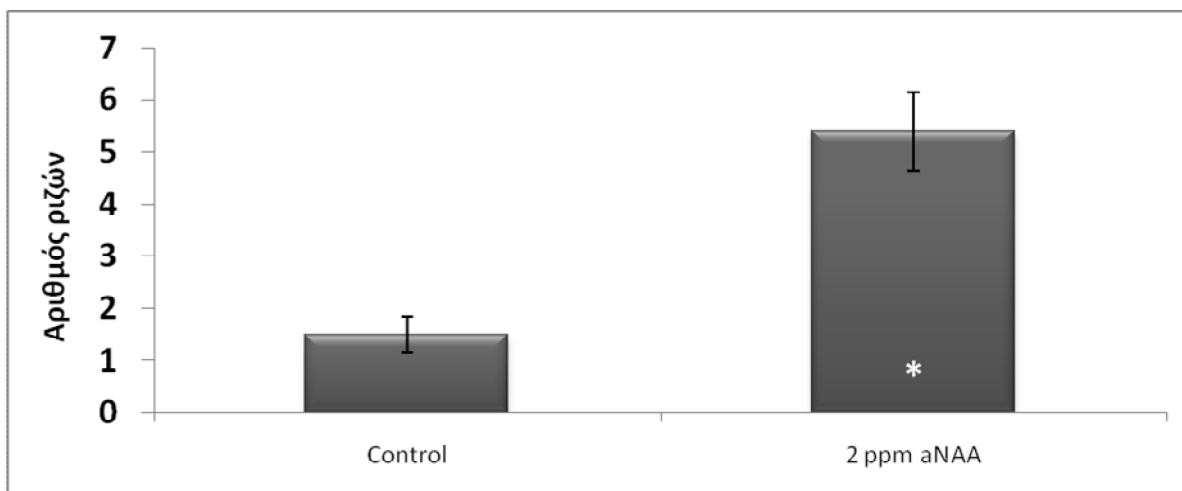
- *Poncirus trifoliata* 'Flying Dragon'

Το υποκείμενο *P. tr.* 'Flying Dragon', υπό την επίδραση της συγκέντρωσης της αυξίνης (2 ppm NAA) παρουσίασε ριζογένεση στο σύνολο των εκφύτων (100%). Χωρίς την επίδραση της αυξίνης (0 ppm NAA) το υποκείμενο παρουσίασε ριζογένεση στο 64% των εκφύτων (Γράφημα 2.1.11).

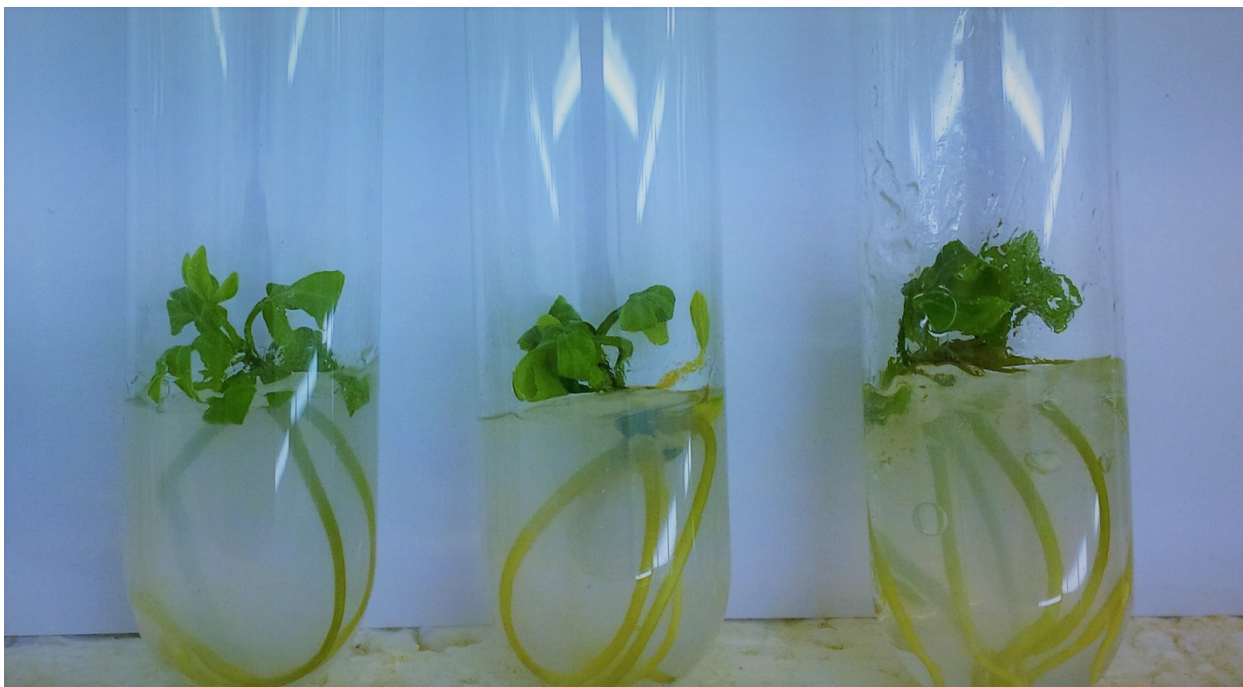


Γράφημα 2.1.11. Επίδραση της συγκέντρωσης της αυξίνης (NAA), στο ποσοστό ριζοβολίας των αναγεννημένων βλαστών του υποκειμένου *P. tr.* 'Flying Dragon' σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας MS.

Ως προς τον αριθμό των ριζών που εμφανίστηκαν ανά έκφυτο, τα αποτελέσματα παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Με την παρουσία αυξίνης, το υποκείμενο επέδειξε ικανοποιητικό αριθμό ριζών (5,40) ανά έκφυτο, αντίθετα με τον αριθμό ριζών που εμφανίστηκε κατά την απουσία της, όπου τα έκφυτα με δυσκολία εμφάνισαν πάνω από ένα βλαστό (1,50) (Γράφημα 2.1.12).

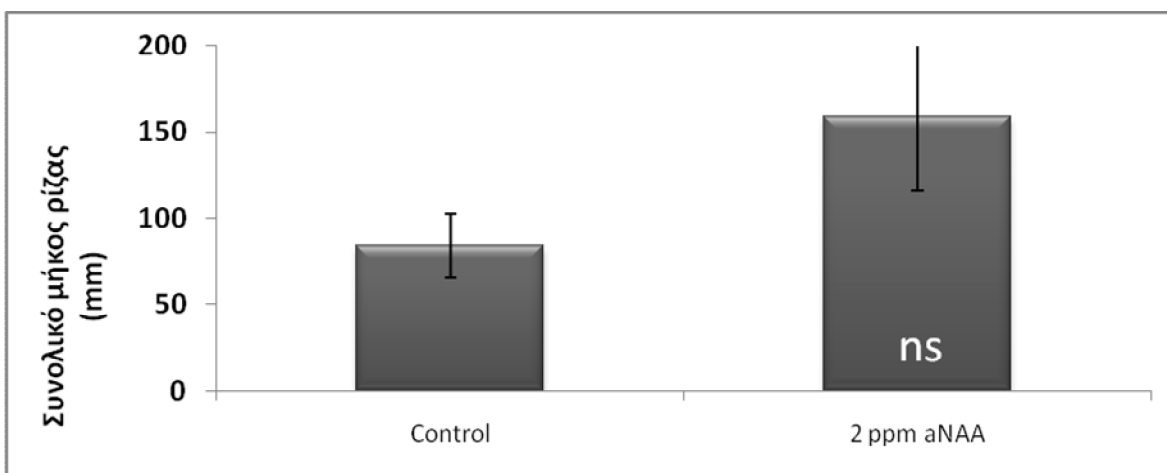


Γράφημα 2.1.12. Επίδραση της συγκέντρωσης της αυξίνης (NAA), στον αριθμό ριζών που εμφανίζονται ανά έκφυτο του υποκειμένου *P. tr.* 'Flying Dragon', σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας MS.



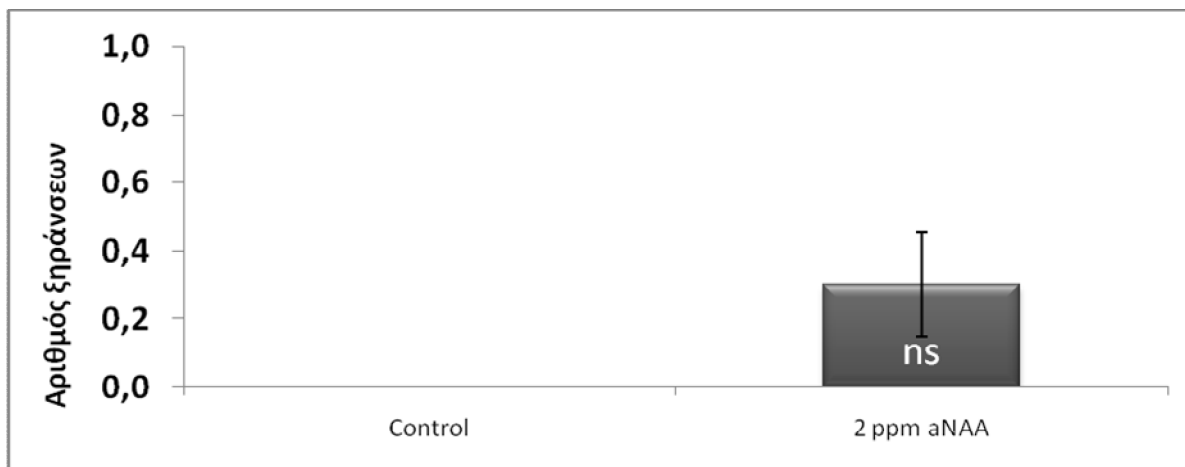
Εικόνα 2.1.7. Ριζογένεση εκφύτων του *P. tr.* 'Flying Dragon', σε θρεπτικό υπόστρωμα MS και 2 ppm NAA.

Δεν παρουσιάστηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ παρουσίας και απουσίας της αυξίνης ως προς το συνολικό μήκος ριζών ανά έκφυτο (Γράφημα 2.1.13). Το μεγαλύτερο συνολικό μήκος ριζών ανά έκφυτο (159,30 mm) εμφανίστηκε στη συγκέντρωση των 2 ppm NAA.



Γράφημα 2.1.13. Επίδραση της συγκέντρωσης της αυξίνης (NAA), στο συνολικό μήκος των ριζών που εμφανίζονται ανά έκφυτο του υποκειμένου *P. tr.* 'Flying Dragon' σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας MS.

Ομοίως, υπό την επίδραση της αυξίνης δεν παρουσιάστηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις διαφορετικές συγκεντρώσεις αυτής, ως προς την ολική ή μερική ξήρανση των εκφύτων (Γράφημα 2.1.14).

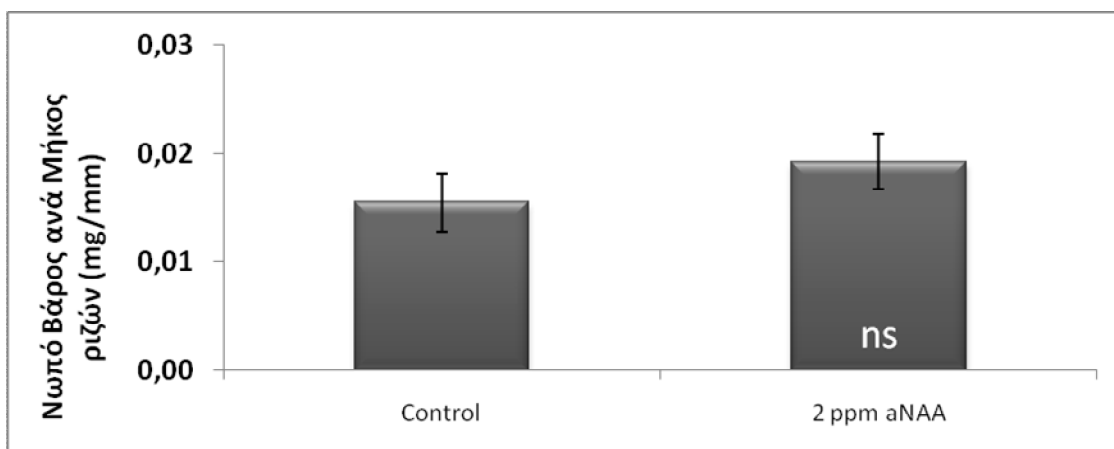


Γράφημα 2.1.14. Επίδραση συγκέντρωσης της αυξίνης (NAA), στην εμφάνιση ξήρανσης (μερικής ή ολικής) στα έκφυτα του υποκειμένου *P. tr.* 'Flying Dragon', σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας MS.



Εικόνα 2.1.8. Ριζογένεση εκφύτων του *P. tr. Flying Dragon*, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS, χωρίς την επίδραση αυξίνης.

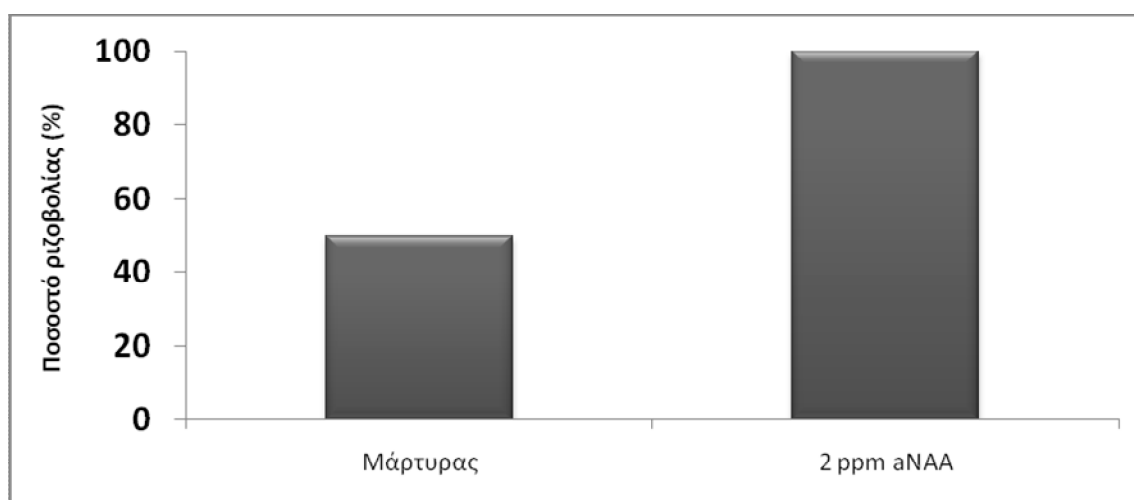
Επίσης, ο λόγος νωπού βάρους ως προς το μήκος των ριζών δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις διαφορετικές συγκεντρώσεις της αυξίνης (Γράφημα 2.1.15).



Γράφημα 2.1.15. Επίδραση της συγκέντρωσης της αυξίνης (NAA), , στο νωπό βάρος ανά μήκος ρίζας των εκφύτων του υποκειμένου *P. tr. Flying Dragon* σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας MS.

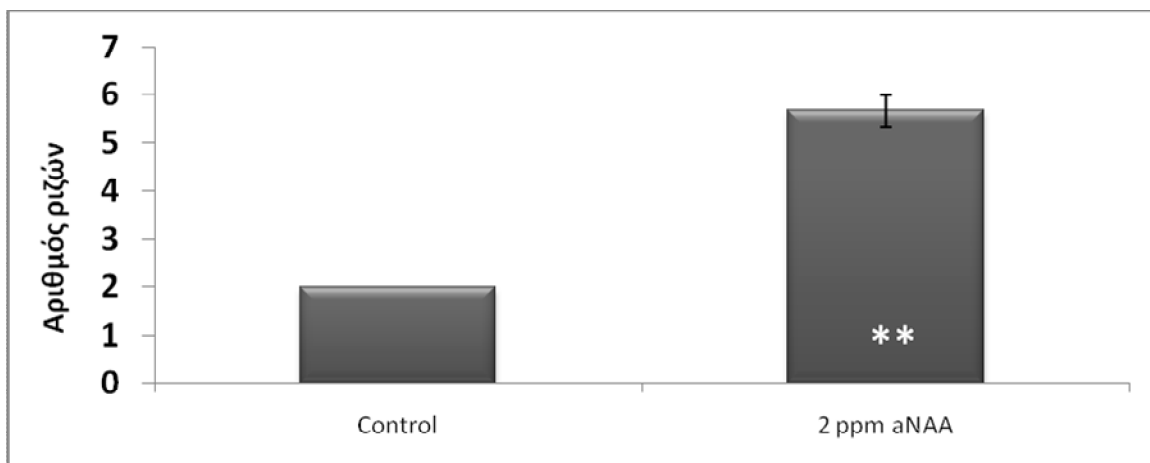
- *Citrumelo 'Swingle'*

Το υποκείμενο *C. 'Swingle'* ανέπτυξε ρίζες κατά το στάδιο της ριζογένεσης, υπό και χωρίς την επίδραση της αυξίνης (Γράφημα 2.1.16). Υπό την επίδραση 2 ppm NAA το σύνολο των εκφύτων (100%) παρουσίασε σχηματισμό ριζών. Ο μάρτυρας παρουσίασε σχηματισμό ριζών στο μισό του συνόλου των εκφύτων (50%).



Γράφημα 2.1.16. Επίδραση της συγκέντρωσης της αυξίνης (NAA), στο ποσοστό ριζοβολίας των αναγεννημένων βλαστών , του υποκειμένου *C. 'Swingle'*, σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας MS.

Ο αριθμός των ριζών που σχηματίστηκαν ανά έκφυτο παρουσίασε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των συγκεντρώσεων αυξίνης (Γράφημα 2.1.17). Υπό την επίδραση των 2 ppm NAA, ο αριθμός ριζών που εμφανίστηκαν ανά έκφυτο ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερος (5,66 ρίζες) από τον μάρτυρα (2,00 ρίζες).

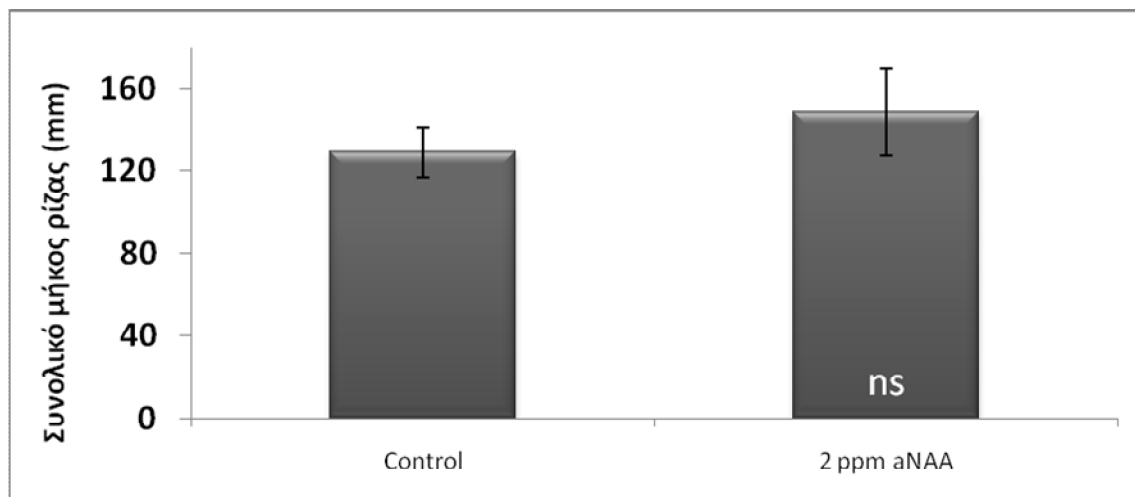


Γράφημα 2.1.17. Επίδραση της συγκέντρωσης της αυξίνης (NAA), στον αριθμό ριζών που εμφανίζονται ανά έκφυτο, του υποκειμένου *C. 'Swingle'*, σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας MS.



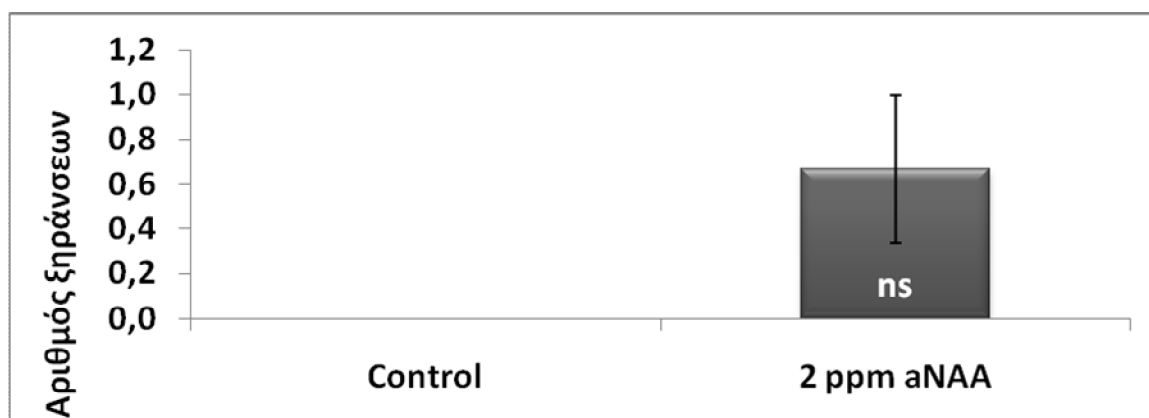
Εικόνα 2.1.9. Ριζογένεση εκφύτων του *C. 'Swingle'*, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS και 2 ppm NAA.

Το συνολικό μήκος ριζών ανά έκφυτο δεν παρουσίασε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ της παρουσίας και της απουσίας της αυξίνης (Γράφημα 2.1.18). Το υψηλότερο συνολικό μήκος ανά έκφυτο (148,00 mm) παρουσιάστηκε στην συγκέντρωση των 2 ppm NAA.



Γράφημα 2.1.18. Επίδραση της συγκέντρωσης της αυξίνης (NAA), στο συνολικό μήκος των ριζών που εμφανίζονται ανά έκφυτο του υποκειμένου *C. 'Swingle'* σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας MS.

Ομοίως, ως προς την εμφάνιση μερικής ή ολικής ξήρανσης των εκφύτων δεν παρουσιάστηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των αποτελεσμάτων (Γράφημα 2.1.19).

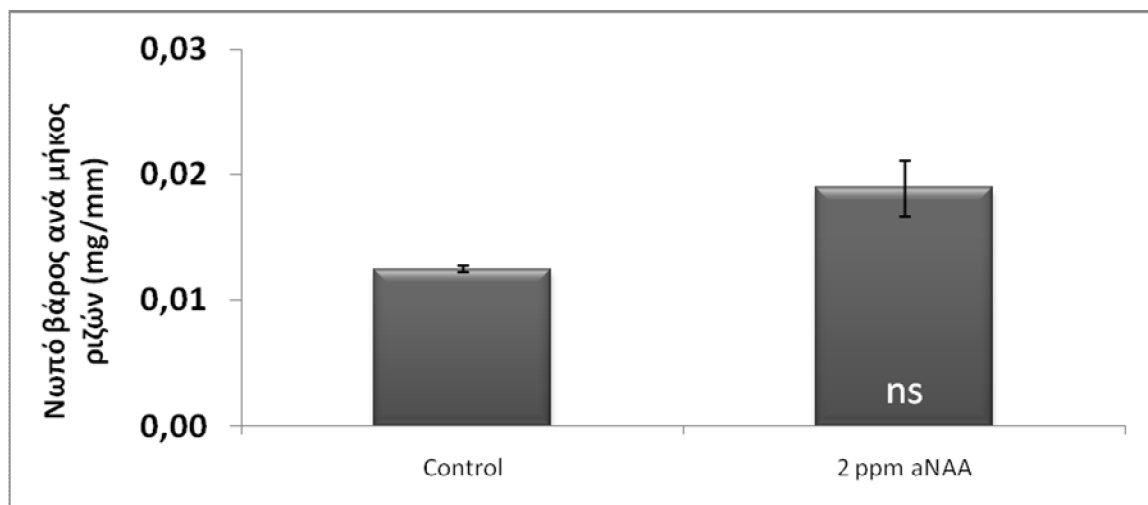


Γράφημα 2.1.19. Επίδραση συγκέντρωσης της αυξίνης (NAA), στην εμφάνιση ξήρανσης (μερικής ή ολικής) στα έκφυτα, του υποκειμένου *C. 'Swingle'*, σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας MS.



Εικόνα 2.1.10. Ριζογένεση εκφύτων του C. 'Swingle', σε θρεπτικό υπόστρωμα MS, σε απουσία αυξίνης.

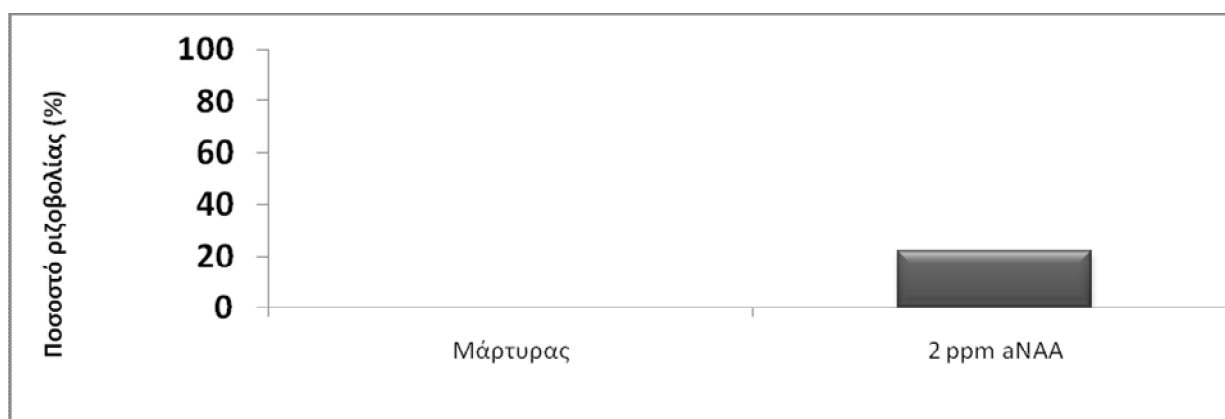
Ως προς τον συσχετισμό νωπού βάρους ανά μήκος ρίζας, επίσης δεν παρουσιάστηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις συγκεντρώσεις της αυξίνης (Γράφημα 2.1.20).



Γράφημα 2.1.20. Επίδραση της συγκέντρωσης της αυξίνης (NAA), , στο νωπό βάρος ανά μήκος ρίζας των εκφύτων του υποκειμένου *C. 'Swingle'* σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας MS.

- *Poncirus trifoliata* 'Rubidoux'

Το υποκείμενο *P. tr.* 'Rubidoux' παρουσίασε ριζογένεση στη συγκέντρωση των 2 ppm NAA , σε ποσοστό 22%. Στο μάρτυρα κανένα έκφυτο δεν εμφάνισε ριζες (Γράφημα 2.1.21)



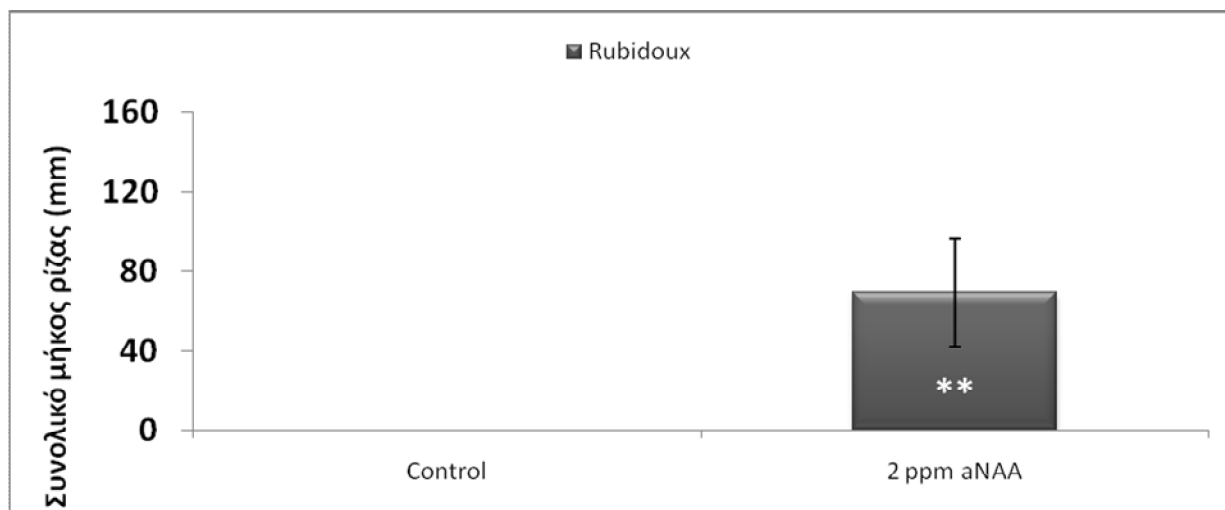
Γράφημα 2.1.21. Επίδραση της συγκέντρωσης της αυξίνης (NAA), στο ποσοστό ριζοβολίας των αναγεννημένων βλαστών του υποκειμένου *P. tr.* 'Rubidoux', σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας MS.

Ως προς τον αριθμό των ριζών που εμφανίστηκαν ανά έκφυτο παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ του μάρτυρα (μηδενική ριζογένεση) και της συγκέντρωσης 2 ppm NAA (1,5) (Γράφημα 2.1.22).

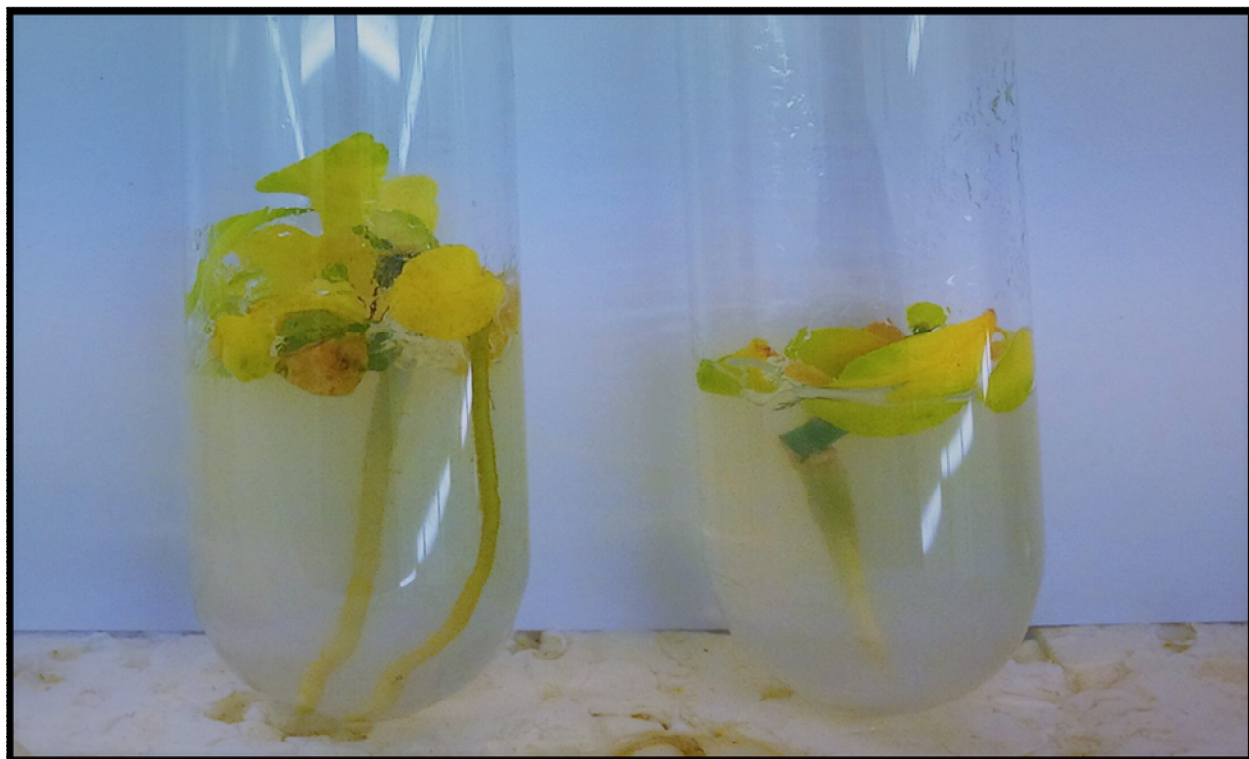


Γράφημα 2.1.22. Επίδραση της συγκέντρωσης της αυξίνης (NAA), στον αριθμό ριζών που εμφανίζονται ανά έκφυτο του υποκειμένου *P. tr.* 'Rubidoux', σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας MS.

Το συνολικό μήκος των ριζών ανά έκφυτο παρουσίασε στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ του μάρτυρα (0 mm) και της συγκέντρωσης 2 ppm NAA (69 mm), καθώς στο μάρτυρα υπήρξε μηδενική ριζοβολία (Γράφημα 2.1.23).

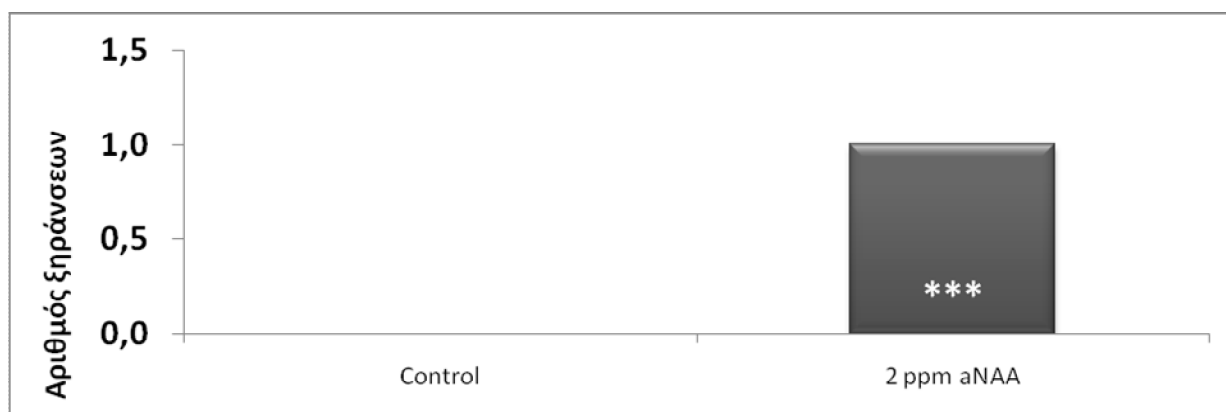


Γράφημα 2.1.23. Επίδραση της συγκέντρωσης της αυξίνης (NAA), στο συνολικό μήκος των ριζών που εμφανίζονται ανά έκφυτο του υποκειμένου *P. tr.* 'Rubidoux' σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας MS.



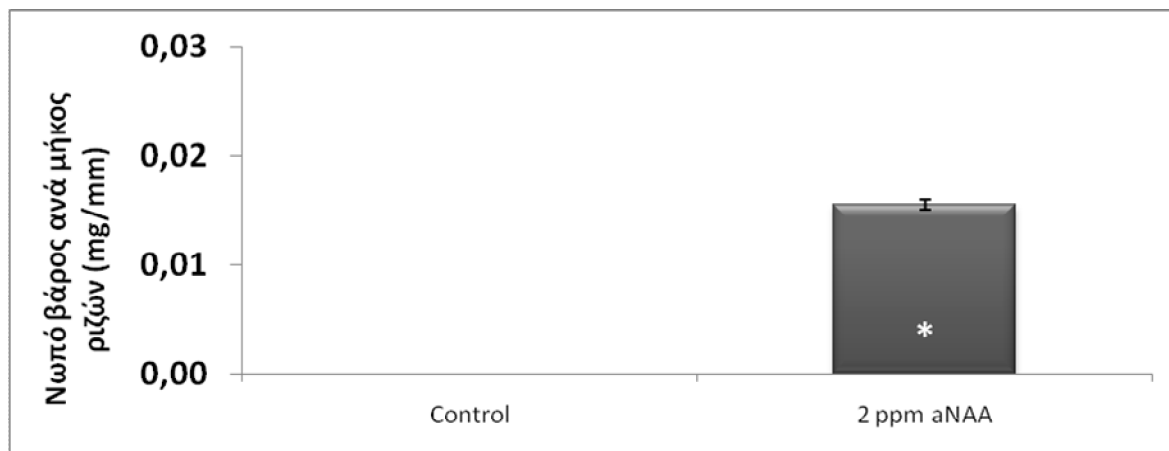
Εικόνα 2.1.11. Ριζογένεση εκφύτων του *P. tr.* 'Rubidouh', σε θρεπτικό υπόστρωμα MS και 2 ppm NAA.

Ξήρανση των εκφύτων παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση των 2 ppm NAA (Γράφημα 2.1.24).



Γράφημα 2.1.24. Επίδραση συγκέντρωσης της αυξίνης (NAA), στην εμφάνιση ξήρανσης (μερικής ή ολικής) στα έκφυτα, του υποκειμένου *P. tr.* 'Rubidouh' σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας MS.

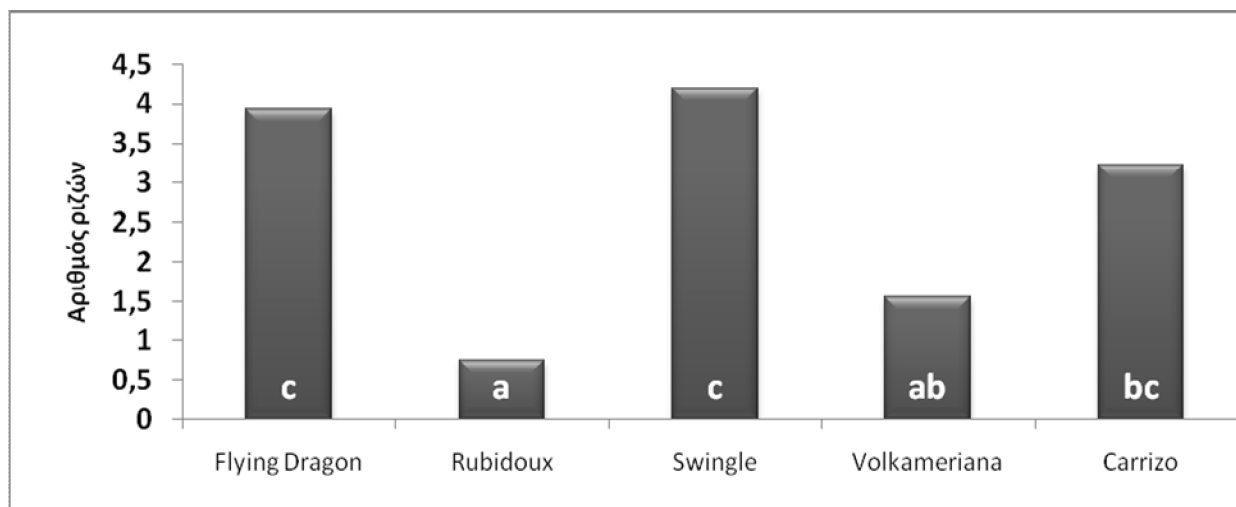
Ο λόγος νωπού βάρους ριζών ως προς το μήκος των ριζών στη συγκέντρωση 2 ppm NAA ήταν 0,015 mg/cm (Γράφημα 2.1.25).



Γράφημα 2.1.25. Επίδραση της συγκέντρωσης της αυξίνης (NAA), , στο νωπό βάρος ανά μήκος ρίζας των εκφύτων του υποκειμένου *P. tr.* 'Rubidouχ' σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας MS.

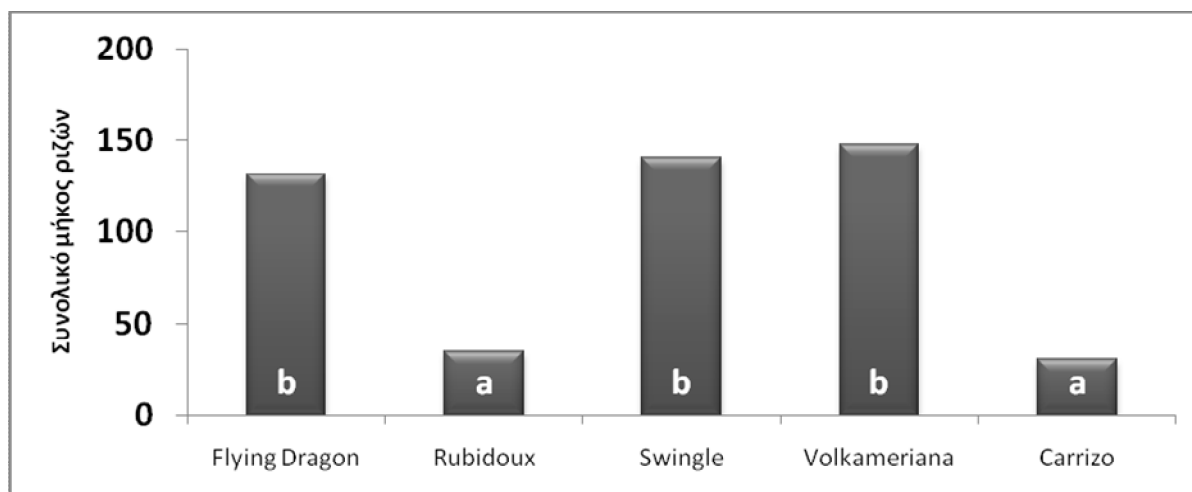
2.2 Επίδραση του γονότυπου στη ριζογένεση

Σύμφωνα με τα αποτελέσματα , στατιστικώς σημαντικά υψηλότερο αριθμό ριζών ανά έκφυτο εμφάνισε το υποκείμενο *C.* 'Swingle' (4,20), ακολουθούμενο από το υποκείμενο *P. tr.* 'Flying Dragon' (3,93). Στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερο αριθμό ριζών ανά έκφυτο έδωσε το υποκείμενο *P. tr.* 'Rubidouχ' (0,75), ακολουθούμενο από το υποκείμενο *Volkameriana* (1,55) (Γράφημα 2.2.1).



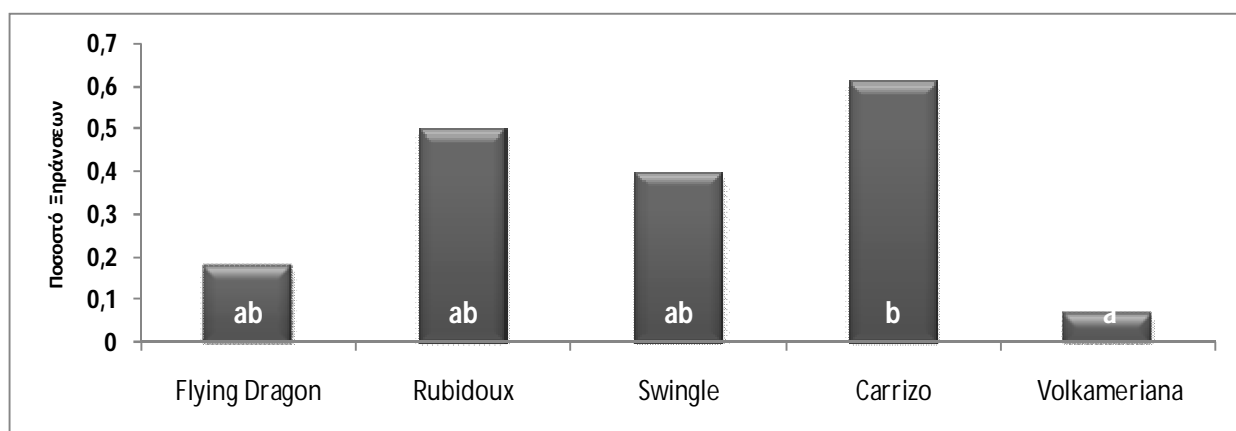
Γράφημα 2.2.1. Επίδραση των γονοτύπων, στον αριθμό ριζών που σχηματίζονται ανά έκφυτο, σε δύο επίπεδα, σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας MS.

Ως προς το συνολικό μήκος ριζών ανά έκφυτο, τα υποκείμενα *P. tr.* 'Flying Dragon', C. 'Swingle' και *Volkameriana* εμφάνισαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές συγκριτικά με τα υποκείμενα *P. tr.* 'Rubidoux' και C. 'Carrizo' (Γράφημα 61). Το συνολικό μήκος ριζών ανά έκφυτο κυμάνθηκε από 30,66 mm (C. 'Carrizo') έως 147,69 mm (*Volkameriana*) (Γράφημα 2.2.2).



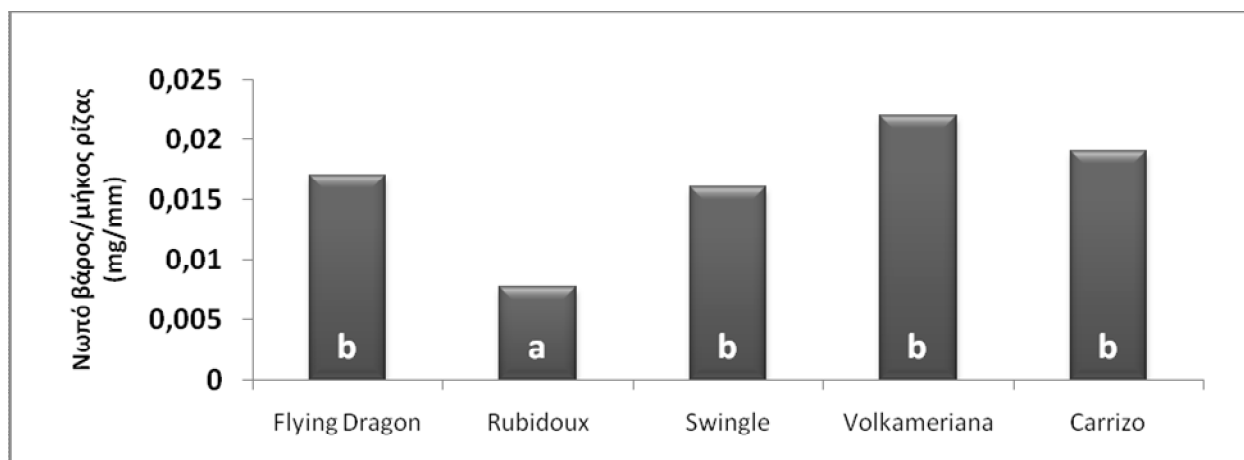
Γράφημα 2.2.2. Επίδραση των γονοτύπων στο συνολικό μήκος ριζών που σχηματίστηκαν ανά έκφυτο, σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας MS.

Ως προς την εμφάνιση ξηράνσεων, το υψηλότερο ποσοστό παρουσίασε το υποκείμενο C. 'Carrizo' (0,61) και το χαμηλότερο το *Volkameriana* (0,07), και διέφεραν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους (Γράφημα 2.2.3).



Γράφημα 2.2.3. Επίδραση των γονοτύπων, στην εμφάνιση μερικής ή ολικής ξήρανσης στα έκφυτα, σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας MS.

Τέλος, ως προς τον λόγο νωπού βάρους ρίζας προς το μήκος ρίζας, το υποκείμενο *P. tr.* 'Rubidoux' παρουσίασε το στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερο λόγο από τα υπόλοιπα υποκείμενα (Γράφημα 2.2.4). Μεταξύ των υπολοίπων υποκειμένων δεν εντοπίστηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές.



Γράφημα 2.2.4. Επίδραση των γονοτύπων στο νωπό βάρος ανά μήκος ρίζας που σχηματίστηκε, σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας MS. .

3 Μελέτη της γενετικής παραλλακτικότητας των υποκειμένων με τη χρήση των μοριακών δεικτών ISSR

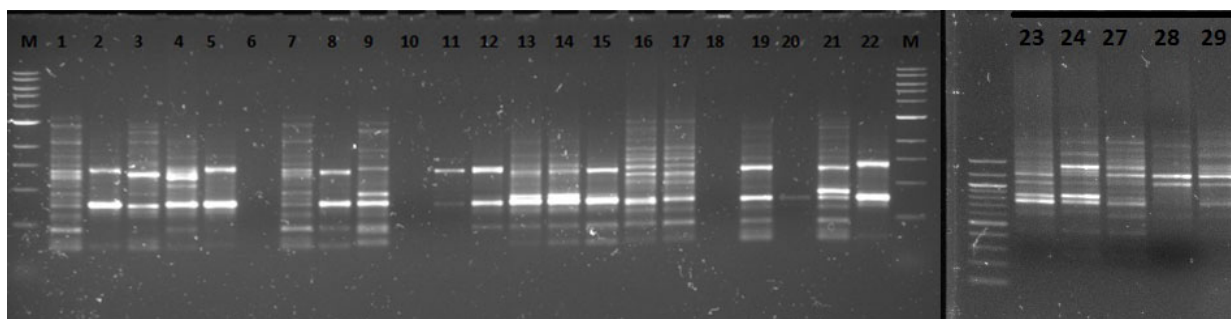
Για την μελέτη της γενετικής παραλλακτικότητας των υποκειμένων δοκιμάστηκαν δέκα ISSR εκκινητές και από αυτούς επιλέχθηκαν πέντε εκκινητές ISSR, οι οποίοι έδωσαν ευκρινή αριθμό ενισχυμένων ζωνών και ικανοποιητικό πολυμορφισμό.

Ο αριθμός των ενισχυμένων ζωνών DNA που έδωσαν οι ISSR εκκινητές ήταν 45, εκ των οποίων 43 ήταν πολυμορφικές (Πίνακας 3.1). Το ποσοστό του πολυμορφισμού ανήλθε στο 89,36%. Ο αριθμός των ενισχυμένων ζωνών κυμάνθηκε από 7 έως 12. Κατά μέσο όρο, σε κάθε εκκινητή αντιστοιχούν 9 ενισχυμένες ζώνες DNA, εκ των οποίων οι 8,4 είναι πολυμορφικές. Ο UBC-812 παρουσίασε τις περισσότερες ενισχυμένες ζώνες (12 ενισχυμένες ζώνες DNA), ενώ ο UBC-818 παρουσίασε τις λιγότερες (7 ενισχυμένες ζώνες DNA). Ο UBC-810 και ο UBC-818 παρουσίασαν ποσοστό πολυμορφισμού 100%.

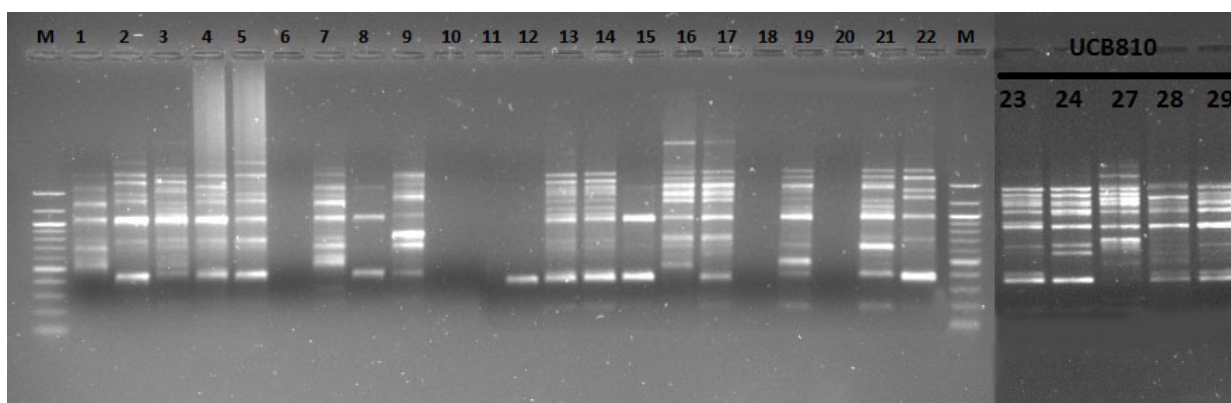
ISSR PRIMERS	ΑΛΛΗΛΟΥΧΙΑ ΕΚΚΙΝΗΤΩΝ 5'→3'	ΣΥΝΟΛΟ ΖΩΝΩΝ	ΠΟΛΥΜΟΡΦΙΚΕΣ ΖΩΝΕΣ
UBC-807	(AG) ₈ T	8	7
UBC-810	(GA) ₈ T	10	10
UBC-812	(GA) ₈ A	12	10
UBC-817	(CA) ₈ A	8	8
UBC-818	(CA) ₈ G	7	7
	ΣΥΝΟΛΟ	45	42

Πίνακας 3.1. Οι εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα, η αλληλουχία των βάσεων κάθε εκκινητή και ο αριθμός ενισχυμένων και πολυμορφικών ζωνών DNA.

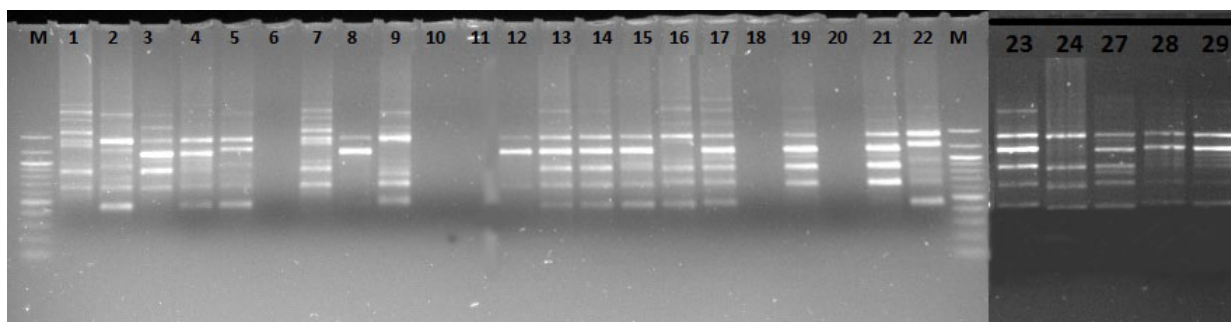
Στις εικόνες 3.1, 3.2, 3.3, 3.4, 3.5 απεικονίζονται τα αποτελέσματα των UBC-807, UBC-810, UBC-812, UBC-817 και UBC-818.



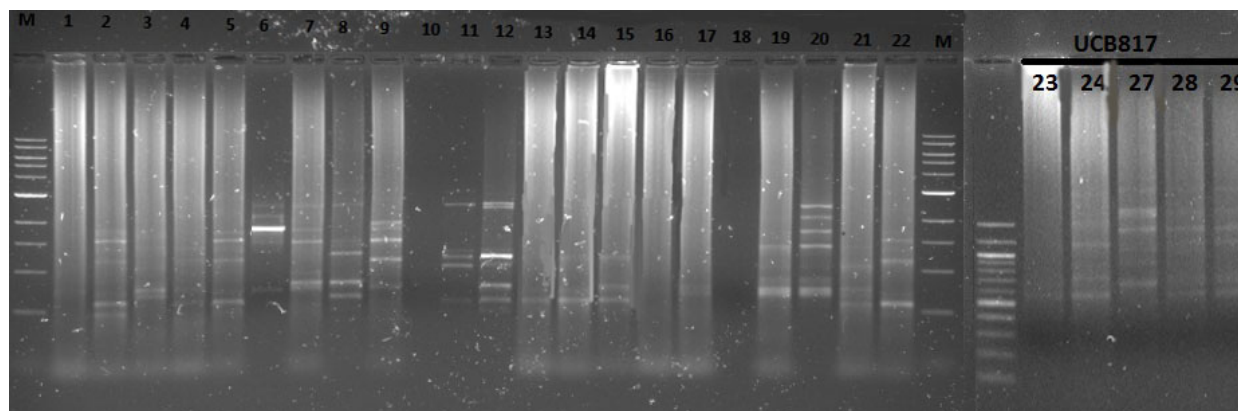
Εικόνα 3.1. Πηκτή αγαρόζης των δειγμάτων του πειράματος μετά από ενίσχυση με τον εκκινητή UBC-807.



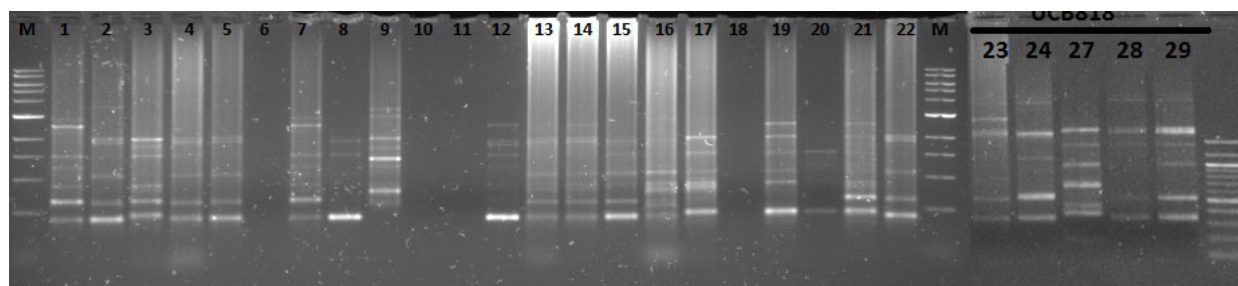
Εικόνα 3.2. Πηκτή αγαρόζης των δειγμάτων του πειράματος μετά από ενίσχυση με τον εκκινητή UBC-810.



Εικόνα 3.3. Πηκτή αγαρόζης των δειγμάτων του πειράματος μετά από ενίσχυση με τον εκκινητή UBC-812.



Εικόνα 3.4. Πηκτή αγαρόζης των δειγμάτων του πειράματος μετά από ενίσχυση με τον εκκινητή UBC-817.



Εικόνα 3.5. Πηκτή αγαρόζης των δειγμάτων του πειράματος μετά από ενίσχυση με τον εκκινητή UBC-818.

- ΑΝΑΛΥΣΗ ΔΕΔΟΜΕΝΩΝ ΜΕ ΤΟ ΣΥΝΤΕΛΕΣΤΗ ΟΜΟΙΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ JACCARD

Ξεκινώντας την ανάλυση δεδομένων, υπολογίστηκε αρχικά ο συντελεστής ομοιότητας του Jaccard (Sneath and Sokal, 1873) για τα δείγματα και ακολούθησε η ομαδοποίηση τους με βάση το συντελεστή ομοιότητας, η οποία έγινε με τη μέθοδο N.J. (Neighbor-joining).

Ο συντελεστής ομοιότητας μπορεί να λάβει τιμές μεταξύ μηδέν (0) και ένα (1). Όσο πλησιέστερα βρίσκεται ο συντελεστής ομοιότητας στην τιμή ένα, τόσο περισσότερο μοιάζουν γενετικά τα δείγματα. Αντίθετα, όσο πιο κοντά βρίσκεται στην τιμή μηδέν, τόσο αυξάνεται η γενετική διαφοροποίηση των δειγμάτων. Συνεπώς, όταν ο συντελεστής ομοιότητας για δύο δείγματα παίρνει την τιμή ένα, τότε τα δείγματα ταυτίζονται γενετικά.

Οι συντελεστές ομοιότητας των δειγμάτων, ως αποτέλεσμα της στατιστικής επεξεργασίας, παρουσιάζονται στον Εικόνα 3.6, ενώ οι γενετικές σχέσεις παρουσιάζονται στο δενδρόγραμμα (Εικόνα 3.7) και στην απεικόνιση σε δύο άξονες (Εικόνα 3.8).

Παρατηρήθηκε μεγάλη γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ των δειγμάτων. Το 'Alemow', που ανήκει στο υπογένος 'Papeda' και χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας ομαδοποίησης, ενώθηκε εξωτερικά και παρουσίασε τη μικρότερη γενετική ομοιότητα με όλα τα δείγματα.

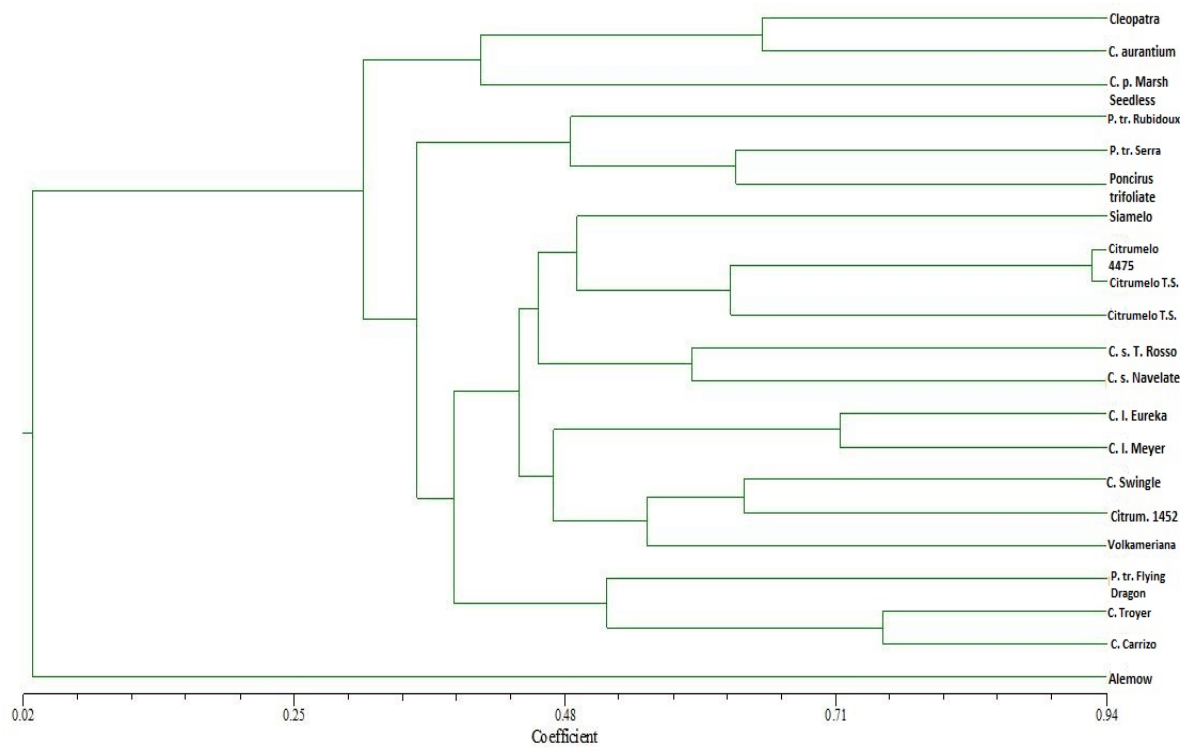
Μεταξύ των υπόλοιπων δειγμάτων παρατηρήθηκε ότι:

- το *Citrumelo* '4475' και το ένα δείγμα *Citrumelo* '4475' από μικροπολλαπλασιασμό ομαδοποιήθηκαν στο δενδρόγραμμα και παρουσίασαν γενετική ομοιότητα 0,93, ενώ το δεύτερο δείγμα *Citrumelo* '4475' από μικροπολλαπλασιασμό συνδέθηκε με τα υπόλοιπα δύο και παρουσίασε γενετική ομοιότητα 0,60 και 0,64 αντίστοιχα,
- τα *Citranges* 'Troger' και *Citranges* 'Carrizo' ομαδοποιήθηκαν στο δενδρόγραμμα και παρουσίασαν γενετική ομοιότητα 0,75,
- το *C. limon* 'Eureka' και *C. limon* 'Meyer' ομαδοποιήθηκαν στο δενδρόγραμμα και παρουσίασαν γενετική ομοιότητα 0,71,
- το *Citrumelo* 'Swingle' και *Citrumelo* '1452' ομαδοποιήθηκαν στο δενδρόγραμμα και παρουσίασαν γενετική ομοιότητα 0,63,
- το *P. Trifoliata* και *P. tr.* 'Serra' ομαδοποιήθηκαν στο δενδρόγραμμα και παρουσίασαν γενετική ομοιότητα 0,63, μαζί τους συνδέθηκε εξωτερικά το *P. tr.* 'Rubidoux',
- οι δύο ποικιλίες πορτοκαλιάς *C. s.* 'Navellate' και *C. s.* 'Tarocco Rosso' ομαδοποιήθηκαν στο δενδρόγραμμα και παρουσίασαν γενετική ομοιότητα 0,59,
- το *Volkameriana* συνδέθηκε εξωτερικά με τα *C. limon* 'Eureka' και *C. limon* 'Meyer'.
- Το *Cleopatra* ομαδοποιήθηκε με το *C. Aurantium* και παρουσίασαν γενετική ομοιότητα 0.65.
- Συγκρίνοντας μεταξύ τους τα έξι υπό μελέτη υποκείμενα παρατηρήθηκε υψηλή γενετική παραλλακτικότητα που κυμάνθηκε μεταξύ 0,29 ('Swingle' και 'Serra') και 0,60 ('Swingle' και *Volkameriana*). Μικρή γενετική ομοιότητα να παρατηρήθηκε επίσης μεταξύ των: *P. tr.* 'Rubidoux' και *C.* 'Carrizo' (0,32), *Volkameriana* και *P. tr.* 'Serra' (0,32), *C.* 'Carrizo' και *P. tr.* 'Serra' (0,33).

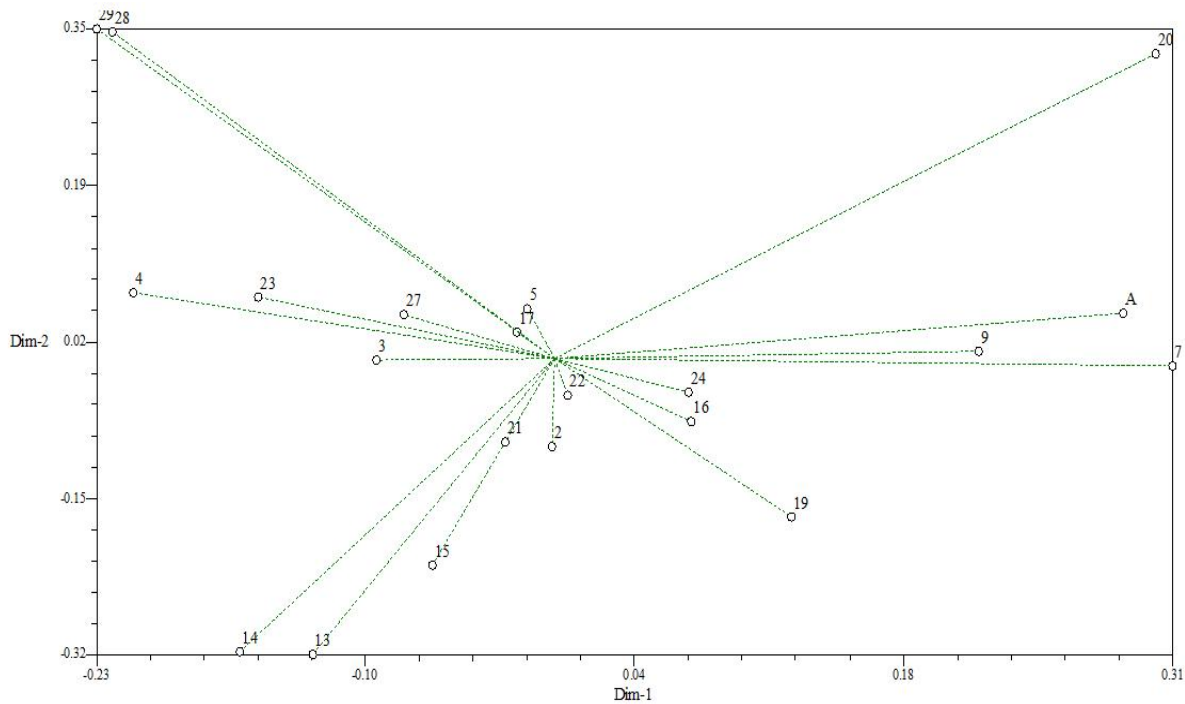
Εικόνα 3.6. Ο συντελεστής ομοιότητας των δειγμάτων όπως προέκυψε με τη χρήση του συντελεστή του Jaccard για τους ISSR.

ΕΙΔΟΣ	ΑΡΙΘΜΗΣΗ
<i>Poncirus trifoliata</i> 'Rubidoux'	2
'Siamelo'	3
<i>Poncirus trifoliata</i> 'Flying Dragon'	4
<i>Poncirus trifoliata</i> 'Serra'	5
<i>Citrus aurantium</i>	7
<i>Citrus macrophylla</i> (Alemow)	20
<i>Citrumelo</i> '4475'	13
<i>Citrus lemon</i> 'Eureka'	16
<i>Citrus lemon</i> 'Meyer'	17
<i>Citrus sinensis</i> 'Navellate'	21
<i>Citrus sinensis</i> 'Tarocco Rosso'	19
<i>Citrus paradisi</i> 'Marsh Seedless'	9
<i>Poncirus trifoliata</i>	22
<i>Citrumelo</i> 'Swingle'	23
<i>Citrumelo</i> '1452'	27
<i>Volkameriana</i>	24
<i>Cleopatra</i>	6
<i>Citrange</i> 'Troyer'	28
<i>Citrange</i> 'Carrizo'	29

Πίνακας 3.2. Είδη, υποκείμενα και ποικιλίες που μελετήθηκαν.



Εικόνα 3.7. Δενδρόγραμμα ISSR με τη μέθοδο UPGMA.



Εικόνα 3.8. Απεικόνιση των γενετικών σχέσεων σε δύο άξονες (PCOORDA) για τους ISSR.

IV

ΣΥΖΗΤΗΣΗ- ΣΥΜΠΕΡΑΣΜ ΑΤΑ

1. Επίδραση της συγκέντρωσης κυτοκινίνης BA στην βλαστογένεση των εκφύτων των υπό μελέτη υποκειμένων

Οι κυτοκινίνες και οι αυξίνες είναι οι δύο πιο σημαντικοί ρυθμιστές αύξησης. Μαζί με τις γιββερελλίνες, οι οποίες συμβάλλουν στην επιμήκυνση των βλαστών, χρησιμοποιούνται περισσότερο από όλες τις ρυθμιστικές ουσίες για τον πολλαπλασιασμό στα διάφορα είδη των εσπεριδοειδών (Kotsias and Roussos, 2001; Carimi and De Pasquale, 2003). Στα εσπεριδοειδή ο συνδυασμός κυτοκινινών με αυξίνες, μπορεί να βελτιώσει το σχηματισμό πολλαπλών βλαστών (Singh et al, 1994). Οι κυτοκινίνες χρησιμοποιούνται στην *in vitro* καλλιέργεια κυρίως για να προωθήσουν την ανάπτυξη πλάγιων βλαστών, περιορίζοντας την κυριαρχία της κορυφής, όπως επίσης και για το σχηματισμό τυχαίων βλαστών (George, 1993). Ο σχηματισμός βλαστικών εκφύτων, στα εσπεριδοειδή, έχει συνδεθεί με την προσθήκη στο θρεπτικό υπόστρωμα της κυτοκινίνης Βενζυλαδενίνης. Η κυτοκινίνη BA, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις εφαρμογής είναι ο πιο σύνηθες φυτικός ρυθμιστής αύξησης για την μέγιστη παραγωγή βλαστών στα διάφορα είδη των εσπεριδοειδών (Carimi and de Pasquale, 2003).

Στην παρούσα μελέτη η παρουσία της κυτοκινίνης BA επηρέασε θετικά το ποσοστό (%) επιτυχίας βλαστογένεσης σε όλα τα υποκείμενα, καθώς στην απουσία της BA όλα τα υποκείμενα εμφάνισαν χαμηλότερο ποσοστό παραγωγής βλαστών, εκτός του υποκειμένου *Volkameriana*, το οποίο ακόμα και στον μάρτυρα (απουσία BA) παρουσίασε έκπτυξη βλαστών στο 100% των εκφύτων. Το υψηλότερο ποσοστό βλαστογένεσης για τα περισσότερα υπό μελέτη υποκείμενα παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση των 2 ppm BA. Τα υποκείμενα *C. 'Carrizo'*, *C. 'Swingle'* και *Volkameriana* παρουσίασαν στη συγκέντρωση των 2 ppm BA ποσοστό βλαστογένεσης 100%, και το *P. tr. 'Serra'* ποσοστό βλαστογένεσης 81,20%. Στα υποκείμενα *C. 'Carrizo'* και *Volkameriana* παρατηρήθηκε ποσοστό βλαστογένεσης 100% και στο επίπεδο του 1 ppm BA. Το υποκείμενο *P. tr. 'Rubidoux'* παρουσίασε ποσοστό βλαστογένεσης 63% στην συγκέντρωση 1 ppm BA και 60,75% στη συγκέντρωση 2 ppm BA. Παρατηρήθηκε επίσης πως αυξάνοντας την συγκέντρωση της κυτοκινίνης BA από 2 σε 4 ppm, τα ποσοστά βλαστογένεσης μειώθηκαν σημαντικά στα περισσότερα υποκείμενα. Οι Talon et al (2012) σε έρευνα σε υποκείμενα εσπεριδοειδών *Alemow* και *Cleopatra*, παρατήρησαν επίσης ότι τα μεγαλύτερα ποσοστά βλαστογένεσης εμφανίστηκαν στη συγκέντρωση των 2 ppm BA. Σύμφωνα με τους Natalia T. Marques et al (2009) σε έρευνα που έγινε στο *Citrus aurantium* παρατηρήθηκε πως η ιδανική βλαστογένεση επιτυγχάνεται σε συγκέντρωση 1 ppm BA. Ομοίως και οι ερευνητές Sharma et al (2009), Pena et al (1995), Rani et al (2004) παρατήρησαν σε διάφορα είδη εσπεριδοειδών πως τα μεγαλύτερα ποσοστά βλαστογένεσης επιτυγχάνονται στη συγκέντρωση του 1 ppm BA. Αντιθέτως, οι ερευνητές Savita et al (2011) και Duran-Vila et al (1998) στα εσπεριδοειδή *Citrus jambhiri 'Lush'*, *Citrus sinensis* και *Citrus medica*, παρατήρησαν μέγιστη βλαστογένεση στη συγκέντρωση των 3 ppm BA. Οι Savita et al (2011) παρατήρησαν πως στο *Citrus jambhiri 'Lush'*, σε θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας χωρίς την παρουσία κυτοκινίνης δεν υπήρξε βλαστογένεση σε κανένα έκφυτο.

Η παρουσία της κυτοκινίνης BA αύξησε στατιστικώς σημαντικά τον αριθμό των βλαστών που σχηματίστηκαν ανά έκφυτο σε σύγκριση με το μάρτυρα στα υποκείμενα *Volkameriana* και *C. 'Carrizo'* και *P. tr. 'Serra'*. Δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων BA, ως προς τον αριθμό των βλαστών ανά έκφυτο, στα υποκείμενα *Volkameriana* και *C. 'Carrizo'*. Στο υποκείμενο *P. tr. 'Serra'* παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των συγκεντρώσεων, με τη συγκέντρωση 2 ppm BA να δίνει το μεγαλύτερο αριθμό βλαστών ανά έκφυτο, η οποία ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερη από τη συγκέντρωση των 0,5 ppm BA. Δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά στον αριθμό των βλαστών ανά έκφυτο μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων BA και του μάρτυρα στα υποκείμενα *C. 'Swingle'*, *P. tr. 'Flying Dragon'* και *P. tr. 'Rubidoux'*. Ο μεγαλύτερος αριθμός βλαστών ανά έκφυτο παρατηρήθηκε στο υποκείμενο *Volkameriana* στη συγκέντρωση 1 ppm BA (2,11), ενώ ο μικρότερος αριθμός βλαστών ανά έκφυτο παρατηρήθηκε στο υποκείμενο *P. tr. 'Serra'* στον μάρτυρα (0,11). Οι Talon et al (2012) σε έρευνα που πραγματοποίησαν σε υποκείμενα εσπεριδοειδών *Alemow* και *Cleopatra* παρατήρησαν πως η παρουσία της κυτοκινίνης BA στο θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας επηρέασε σημαντικά τον αριθμό των βλαστών που σχηματίστηκαν ανά έκφυτο, με τις συγκεντρώσεις 1 και 2 ppm BA να παρουσιάζουν τα υψηλότερα αποτελέσματα. Οι Savita et al (2011), επίσης, σε έρευνα που έγινε στο *Citrus jambhiri 'Lush'*, παρατήρησαν πως η παρουσία κυτοκινίνης BA αύξησε στατιστικώς σημαντικά τον αριθμό βλαστών ανά έκφυτο, με τον μεγαλύτερο αριθμό βλαστών ανά έκφυτο να παρουσιάζεται στη συγκέντρωση 3 ppm BA. Σύμφωνα με τους Perez-Tornero et al (2009) οι οποίοι μελέτησαν τις ποικιλίες λεμονιάς 'Fino 49', 'Fino 77' και 'Messina' παρατηρήθηκε πως η βέλτιστη συγκέντρωση για τον μεγαλύτερο αριθμό βλαστών είναι η συγκέντρωση των 2 ppm BA. Σύμφωνα με παρόμοιες έρευνες (Begum et al, 2008; Natalia T. Marques et al, 2011) σε είδη εσπεριδοειδών όπως το *Citrus aurantium*, παρατηρήθηκε πως η συγκέντρωση του 1 ppm BA είναι η ιδανική για την εμφάνιση του μέγιστου αριθμού βλαστών ανά έκφυτο, όπως για παράδειγμα 7,80 βλαστούς ανά έκφυτο. Οι ερευνητές Kitto and Young, σε μελέτη που πραγματοποιήθηκε για το υποκείμενο *C. 'Carrizo'* παρατήρησαν πως η BA αύξησε στατιστικώς σημαντικά τον αριθμό των βλαστών ανά έκφυτο, αλλά σε πολύ υψηλές συγκεντρώσεις κυτοκινίνης, όπως η συγκέντρωση των 5 ppm BA. Στην παρούσα έρευνα το συγκεκριμένο υποκείμενο αντέδρασε καλύτερα σε χαμηλές συγκεντρώσεις κυτοκινίνης, όπως το 1 ppm BA. Επίσης, οι Talon et al (2012) στο υποκείμενο εσπεριδοειδών *Alemow*, παρατήρησαν πως ο μέγιστος αριθμός βλαστών ανά έκφυτο επιτυγχάνεται επίσης σε υψηλές συγκεντρώσεις κυτοκινίνης, των 3 ppm BA. Τέλος, οι Carimi and De Pasquale, (2003) υποστηρίζουν πως ο αριθμός των βλαστών που προκύπτει ανά έκφυτο έχει παρατηρηθεί πως διαφέρει ανάλογα με το γονότυπο που ερευνάται.

Στο μέσο μήκος βλαστού δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων συγκεντρώσεων BA και του μάρτυρα, στα υποκείμενα που μελετήθηκαν εκτός του *Volkameriana*, στο οποίο παρουσιάστηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις διάφορες συγκεντρώσεις BA που δοκιμάστηκαν και του *P. tr. 'Rubidoux'*, στο οποίο η επίδραση της BA έδωσε στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερο μέσο μήκος βλαστού από το μάρτυρα. Το μέσο μήκος που αποκτούν οι βλαστοί φαίνεται πως επηρεάζεται από τον γονότυπο, καθώς τα υποκείμενα εμφάνισαν το μεγαλύτερο μέσο μήκος βλαστού σε διαφορετικές συγκεντρώσεις το καθένα από το μάρτυρα ως τα 4 ppm BA. Το μεγαλύτερο μέσο μήκος βλαστού παρατηρήθηκε στα 4 ppm BA στο υποκείμενο *C. 'Swingle'*, ενώ το μικρότερο μέσο μήκος

βλαστού παρατηρήθηκε στα 4 ppm BA στο υποκείμενο *P. tr. 'Serra'*. Οι Talon et al (2012) μελετώντας το *Sour Orange* παρατήρησαν πως δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική αύξηση του μέσου μήκους των βλαστών υπό την επίδραση της BA. Οι ίδιοι παρατήρησαν όμως πως στα υποκείμενα *Alemow* και *Cleopatra* αύξησε σημαντικά το μέσο μήκος των βλαστών στη συγκέντρωση 1 και 2 ppm BA. Οι Perez – Tornero et al (2009) σε έρευνα που έκαναν σε ποικιλίες λεμονιάς όπως οι 'Fino 77', 'Fino 49' και 'Messina' παρατήρησαν πως η παρουσία BA αύξησε σημαντικά το μέσο μήκος των βλαστών, με το μεγαλύτερο μέσο μήκος να εμφανίζεται στη συγκέντρωση 1 ppm BA. Σε όμοια έρευνα που έγινε από τους Kotsias and Roussos (2001) σε λεμονιά βρέθηκε πως το μεγαλύτερο μέσο μήκος βλαστού προέκυψε στη συγκέντρωση 2 ppm BA. Οι Savita et al (2012) παρατήρησαν πως η BA σε συγκέντρωση 3 ppm αύξησε σημαντικά το μέσο μήκος των βλαστών στο *Citrus jambhiri 'Lush'*. Σύμφωνα με αρκετές έρευνες (Talon et al, 2012; Morshy and Millet, 1996; Normah et al, 1997) που έγιναν σε διάφορα είδη εσπεριδοειδών παρατηρήθηκε πως οι υψηλότερες συγκεντρώσεις κυτοκινίνης BA επέδρασαν αρνητικά στην *in vitro* ανάπτυξη των βλαστικών εκφύτων.

Η παρουσία της BA αύξησε στατιστικώς σημαντικά το συνολικό μήκος βλαστών ανά έκφυτο στα υποκείμενα *Volkameriana* και *C. 'Carrizo'* και *P. tr. 'Serra'*, ενώ δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στο συνολικό μήκος βλαστού ανά έκφυτο στα υποκείμενα *C. 'Swingle'* και *P. tr. 'Flying Dragon'*. παρουσίασε διακυμάνσεις ανάμεσα στις διαφορετικές συγκεντρώσεις της κυτοκινίνης. Φαίνεται όμως πως ο γονότυπος ήταν ο κύριος παράγοντας εμφάνισης των αποτελεσμάτων καθώς τα αποτελέσματα διέφεραν από υποκείμενο σε υποκείμενο. Η συγκέντρωση που παρουσίασε τα υψηλότερα αποτελέσματα, στα περισσότερα υποκείμενα που μελετήθηκαν ήταν τα 2 ppm BA. Παρόλα αυτά, το μεγαλύτερο συνολικό μήκος βλαστών ανά έκφυτο εμφανίστηκε στο υποκείμενο *Volkameriana* σε χαμηλή συγκέντρωση, 0,5 ppm BA.

Όσον αφορά τον αριθμό φύλλων που σχηματίστηκαν ανά έκφυτο κατά το στάδιο της βλαστογένεσης, η αντίδραση των γονοτύπων παρουσίασε διακυμάνσεις ανάμεσα στις διαφορετικές συγκεντρώσεις επίδρασης της κυτοκινίνης. Μοναδική εξαίρεση το υποκείμενο *C. 'Swingle'*, στο οποίο σε όλες τις συγκεντρώσεις δεν παρουσίασε σημαντικές διακυμάνσεις. Κοινό φαινόμενο σε όλους τους γονοτύπους φαίνεται πως ήταν ο ελάχιστος αριθμός φύλλων που παρουσιάστηκαν ανά έκφυτο, καθώς στην μηδενική συγκέντρωση κυτοκινίνης όλοι οι γονότυποι εμφάνισαν τον ελάχιστο αριθμό φύλλων ανά έκφυτο. Επίσης ιδιαίτερα χαμηλά αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στην υψηλότερη συγκέντρωση των 4 ppm BA. Ο μεγαλύτερος αριθμός των υποκειμένων που μελετήθηκαν παρουσίασαν όμοια αποτελέσματα. Ο μέγιστος αριθμός φύλλων ανά έκφυτο παρουσιάστηκε στη συγκέντρωση του 1 ppm BA, με το *Volkameriana* να παρουσιάζει τον υψηλότερο αριθμό, με 7,22 φύλλα ανά έκφυτο κατά μέσο όρο. Επίσης, στα 2ppm BA, μέγιστο αριθμό φύλλων ανά έκφυτο εμφάνισε το υποκείμενο *P. tr. 'Serra'*. Σε έρευνα (Mei-Chun Lu, 2002) που έγινε στο είδος *Morus Latifolia*, φαίνεται πως η ιδανική συγκέντρωση κυτοκινίνης για την εμφάνιση του μέγιστου αριθμού φύλλων είναι τα 2 ppm BA.

2. Επίδραση των διαφορετικών συγκεντρώσεων αυξίνης στην ριζοβολία των νέων βλαστών των υπό μελέτη υποκειμένων

Το είδος και η συγκέντρωση της αυξίνης που προστίθενται στο υπόστρωμα διαδραματίζουν κυρίαρχο ρόλο στην *in vitro* ριζογένεση και επηρεάζονται από το φυτικό είδος και την ποικιλία (George 1996). Επίσης όταν οι ρυθμιστές αύξησης και κυρίως οι κυτοκινίνες που χρησιμοποιούνται στο στάδιο του *in vitro* πολλαπλασιασμού των βλαστών βρίσκονται σε περίσσεια, μπορεί να εμποδίσουν την επιμήκυνση των βλαστών και να αναστείλουν το σχηματισμό ρίζας (George, 1996). Γενικά, η παρουσία αυξίνης, IBA ή NAA, στο θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας θεωρείται απαραίτητη για την προώθηση του σχηματισμού ρίζας στην *in vitro* καλλιέργεια των εσπεριδοειδών (Carimi and De Pasquale, 2003). Οι Starantino και Caruso (1998) σε μελέτη που έγινε για το γένος *Poncirus Trifoliata*, υποστήριξαν πως η αυξίνη NAA προωθεί τη ριζοβολία.

Στην παρούσα μελέτη η παρουσία της αυξίνης στο θρεπτικό υπόστρωμα αύξησε τα ποσοστά ριζογένεσης, καθώς η ριζογένεση σε παρουσία NAA σε όλα τα υποκείμενα που μελετήθηκαν ήταν υψηλότερα συγκριτικά με αυτά χωρίς την παρουσία της αυξίνης. Στα περισσότερα υποκείμενα που μελετήθηκαν, το μεγαλύτερο ποσοστό ριζογένεσης παρουσιάστηκε στη συγκέντρωση των 2 ppm NAA, με τα υποκείμενα *P. tr.* 'Flying Dragon' και *C.* 'Swingle' να παρουσιάζουν ποσοστό 100% στην εμφάνιση ριζών σε αυτή τη συγκέντρωση αυξίνης. Το μοναδικό υποκείμενο το οποίο παρουσίασε την υψηλότερη ριζογένεση στο υψηλότερο επίπεδο αυξίνης (4 ppm NAA) ήταν το *C.* 'Carrizo'. Τα χαμηλότερα ποσοστά εμφάνισης ριζών, στο παρόν πείραμα, εμφανίστηκαν στον μάρτυρα, όπου το ποσοστό ριζοβολίας σε όλα τα υποκείμενα κυμάνθηκε σε χαμηλά επίπεδα. Στο υποκείμενο *P. tr.* 'Rubidoux', κανένα έκφυτο δεν παρουσίασε ριζογένεση σε απουσία αυξίνης. Σε έρευνα (Edriss and Burger, 1988) που έγινε στο υποκείμενο εσπεριδοειδών *C.* 'Troyer', παρατηρήθηκε πως η βέλτιστη συγκέντρωση για την επίτευξη του μέγιστου ποσοστού ριζοβολίας είναι η συγκέντρωση των 2 ppm NAA. Η παραπάνω παρατήρηση φαίνεται πως επιβεβαιώνεται από πλήθος ερευνών, όπως για παράδειγμα σε μελέτη του *Sour Orange* (Talon et al, 2012), το οποίο είχε 95% επιτυχία σε αυτή τη συγκέντρωση όπως και σε μελέτη που έγινε στο *Citrus reticulate* 'Blanco' (M.I.S. et al, 1995) όπου ομοίως το υψηλότερο ποσοστό ριζογένεσης εμφανίστηκε στα 2 ppm NAA. Σε άλλες όμως έρευνες που έχουν γίνει παρατηρήθηκε πως η μέγιστη ριζογένεση μπορεί να επιτευχθεί σε χαμηλές συγκεντρώσεις αυξίνης. Για παράδειγμα, οι Bardon et al (2000), παρατήρησαν πως στο *Sour Orange* η ιδανική συγκέντρωση αυξίνης για μέγιστη ριζογένεση είναι το 1 ppm NAA. Όμοιες παρατηρήσεις έκαναν και άλλοι ερευνητές (Kitto and Young, 1981; Rathore et al, 2007; Al Bahranay, 2002) σε διάφορα είδη εσπεριδοειδών, όπως το *Citrus aurantifolia*. Επίσης, σε άλλη έρευνα (Savita et al, 2011) στο *Citrus jambhiri* 'Lush', παρατήρησαν πως η μεγαλύτερη επιτυχία ριζογένεσης των βλαστών προκύπτει σε ακόμα χαμηλότερη συγκέντρωση αυξίνης, των 0,5 ppm NAA. Όσον αφορά την απουσία αυξίνης, σε έρευνα που έγινε στο *Citrus aurantifolia* (Al Bahranay, 2002), παρατηρήθηκε πως σε απουσία αυξίνης το ποσοστό επιτυχίας εμφάνισης ριζών ήταν 0%.

Η παρουσία της αυξίνης ήταν απαραίτητη για την αύξηση του αριθμού των ριζών που σχηματίστηκαν ανά έκφυτο. Η παρουσία της αυξίνης αύξησε στατιστικώς σημαντικά τον αριθμό των ριζών που εμφανίστηκαν ανά έκφυτο στα υποκείμενα που μελετήθηκαν, εκτός του *C.* 'Carrizo' που δεν παρουσιάστηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές στον αριθμό ριζών ανά

έκφυτο. Η βέλτιστη όμως συγκέντρωση της αυξίνης διέφερε ανά γονότυπο. Στην παρούσα μελέτη τα υποκείμενα *P. tr.* 'Flying Dragon', *C.* 'Swingle' και *P. tr.* 'Rubidoux' παρουσίασαν το μεγαλύτερο αριθμό ριζών ανά έκφυτο στη συγκέντρωση των 2 ppm NAA. Ο μεγαλύτερος αριθμός ριζών ανά έκφυτο παρουσιάστηκε στο υποκείμενο '*C. Swingle*', στο οποίο κατά μέσο όρο εμφανίστηκαν 5,66 ρίζες ανά έκφυτο. Στο υποκείμενο *Volkameriana*, ο υψηλότερος αριθμός ριζών ανά έκφυτο (2,62), εμφανίστηκε στην συγκέντρωση του 1 ppm αυξίνης. Στο υποκείμενο, όμως, *C.* 'Carrizo' ο μέγιστος αριθμός ριζών ανά έκφυτο εμφανίστηκε στην υψηλότερη συγκέντρωση αυξίνης, 4 ppm NAA. Φαίνεται πως η παρουσία αυξίνης στο θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας βοηθάει στην εμφάνιση μεγαλύτερου αριθμού ριζών στα έκφυτα. Τα έκφυτα, στο παρόν πείραμα, παρουσίασαν το χαμηλότερο αριθμό ριζών στην απουσία αυξίνης από το θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας. Ο ερευνητής A.M. Al-BAhrany (2002), παρατήρησε πως στο *C. aurantifolia* 'Swingle' ο αριθμός των ριζών που εμφανίζονται αυξάνεται σημαντικά με την ταυτόχρονη αύξηση της αυξίνης NAA, καταλήγοντας στο ότι τα 2 ppm NAA είναι η συγκέντρωση που εμφανίζεται ο μεγαλύτερος αριθμός ριζών. Επίσης, άλλοι ερευνητές (Talon et al, 2012) σε μελέτη που έγινε στα υποκείμενα εσπεριδοειδών *Cleopatra* και *Sour Orange* παρατήρησαν πως η επίδραση της NAA αύξησε σημαντικά τον αριθμό των ριζών ανά έκφυτο και πως ο μέγιστος αριθμός ριζών ανά έκφυτο εμφανίστηκε στα 1 και 2 ppm NAA, με 2,5 και 3,65 ρίζες ανά έκφυτο αντίστοιχα. Στην ίδια μελέτη όμως ο αριθμός ριζών ανά έκφυτο στο υποκείμενο *Alemow* δεν επηρεάστηκε στατιστικώς σημαντικά από την επίδραση της NAA. Σε όμοιες έρευνες που έγιναν στα είδη *Citrus macrophylla* (Ghorbel et al, 1998; Bardon et al, 2000) και *Citrus reticulata* 'Blanco' (M.I.S. et al, 1995), παρατηρήθηκε πως ο μεγαλύτερος αριθμός ριζών ανά έκφυτο παρουσιάστηκε στη συγκέντρωση του 1 ppm NAA. Τέλος, σε μία μελέτη που έγινε στο *Citrus jambhiri* 'Lush' (Savita et al, 2011), παρατηρήθηκε πως η NAA αύξησε σημαντικά των αριθμό ριζών ανά έκφυτο με την ιδανική συγκέντρωση για την ανάπτυξη του μέγιστου αριθμού ριζών να είναι η χαμηλή συγκέντρωση αυξίνης, 0,5 ppm NAA.

Μελετώντας το συνολικό μήκος ριζών ανά έκφυτο, η παρουσία της αυξίνης δεν επηρέασε στατιστικώς σημαντικά. Μόνο στο υποκείμενο *P. tr.* 'Rubidoux' παρουσιάστηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά, με υψηλότερο συνολικό μήκος ριζών στα 2 ppm, καθώς στο μάρτυρα παρατηρήθηκε μηδενική ριζοβολία. Στα υποκείμενα *C.* 'Carrizo' και *Volkameriana* παρουσιάστηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις διάφορες συγκεντρώσεις NAA, όπου στο *C.* 'Carrizo' το χαμηλότερο συνολικό μήκος ριζών παρατηρήθηκε στις συγκεντρώσεις 1 και 4 ppm, ενώ στο *Volkameriana* το μεγαλύτερο συνολικό μήκος παρατηρήθηκε στο 1 ppm NAA που διέφερε σημαντικά από τη συγκέντρωση των 2 ppm NAA.

Σύμφωνα με μελέτες που έγιναν στο *Citrus jambhiri* 'Lush' (Savita et al, 2011) το μέγιστο μέσο μήκος ανά ρίζα εμφανίστηκε στη συγκέντρωση των 0,5 ppm NAA και 0,1 ppm NAA αντίστοιχα. Άλλη έρευνα (Talon et al, 2011) που έγινε στα υποκείμενα εσπεριδοειδών, *Cleopatra* και *Sour Orange* παρουσίασε διαφορετικά από τα παραπάνω αποτελέσματα υποστηρίζοντας πως το μέγιστο μέσο μήκος ριζών επιτυγχάνεται στη συγκέντρωση του 1 ppm NAA. Τέλος, άλλοι ερευνητές (M.I.S. et al, 1995), παρατήρησαν πως στην ποικιλία *Citrus reticulata* 'Blanco' το μέγιστο μέσο μήκος ανά ρίζα επιτυγχάνεται στα 2 ppm NAA.

Ερευνήθηκε επίσης το ποσοστό ξηράνσεων για να βρεθεί αν υπάρχει τοξικότητα ως προς τα έκφυτα από την εφαρμογή αυξίνης. Στο υποκείμενο *C.* 'Carrizo' στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερο ποσοστό ξήρανσης παρατηρήθηκε στο μάρτυρα και στη συγκέντρωση 4 ppm NAA.

Στα υπόλοιπα υποκείμενα δεν υπήρξε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ του μάρτυρα και της παρουσίας αυξίνης, καθώς και μεταξύ των διαφορετικών συγκεντρώσεων αυξίνης. Φαίνεται πως και η εμφάνιση ξηράνσεων εξαρτάται από το γονότυπο και άλλους παράγοντες και όχι από την παρουσία αυξίνης.

Τέλος, μετρήθηκε το νωπό βάρος των ριζών ώστε να ελεγχθεί αν υπάρχει συσχέτιση του βάρους της ρίζας ως προς το μήκος της. Παρατηρήθηκε πως και εδώ η παρουσία αυξίνης δεν επηρεάζει αυτό το συσχετισμό. Η μέτρηση του νωπού βάρους κάθε ρίζας ως προς το μήκος της δεν παρουσίασε σημαντικές μεταβολές στα διάφορα επίπεδα αυξίνης. Εξαιρέση αποτέλεσε το υποκείμενο C. 'Carrizo', όπου τα διάφορα επίπεδα παρουσίασαν σημαντικές μεταβολές μεταξύ τους, με υψηλότερη συσχέτιση του νωπού βάρους βάρους ανά μήκος ρίζας στη συγκέντρωση 4 ppm NAA.

3. Επίδραση του γονότυπου στην βλαστογένεση και ριζογένεση των υπό μελέτη υποκειμένων

Ο γονότυπος ήταν ένας παράγοντας που επηρέασε τον αριθμό των βλαστών που εκπύχθηκαν ανά έκφυτο καθώς παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα υποκείμενα που μελετήθηκαν. Το υποκείμενο *Volkameriana* παρουσίασε το στατιστικώς σημαντικά υψηλότερο αριθμό βλαστών ανά έκφυτο (1,81) συγκριτικά με τα υπόλοιπα υποκείμενα. Το υποκείμενο *P. tr. 'Serra'* εμφάνισε το στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερο αριθμό βλαστών (0,55) και διέφερε σημαντικά από τα άλλα υποκείμενα εκτός του *P. tr. 'Flying Dragon'*. Στα υποκείμενα *P. tr. 'Fl. Dragon'*, *P. tr. 'Rubidouχ'*, C. 'Swingle' και C. 'Carrizo' δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Οι Carimi and De Pasquale, (2003) υποστηρίζουν πως ο αριθμός των βλαστών που προκύπτει ανά έκφυτο έχει παρατηρηθεί πως διαφέρει ανάλογα με το γονότυπο που ερευνάται.

Επίσης, το συνολικό μήκος των βλαστών ανά έκφυτο επηρεάστηκε από το γονότυπο, καθώς τα υποκείμενα παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους. Στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερο συνολικό μήκος βλαστών ανά έκφυτο παρατηρήθηκε στο υποκείμενο *Volkameriana* (15,14 mm). Το υποκείμενο C. 'Carrizo' διέφερε στατιστικώς σημαντικά με τα υπόλοιπα υποκείμενα εκτός του C. 'Swingle'. Στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερο συνολικό μήκος βλαστών ανά έκφυτο παρατηρήθηκε στα υποκείμενα *P. tr. 'Serra'* και *P. tr. 'Flying Dragon'* τα οποία διέφεραν στατιστικώς σημαντικά με τα υποκείμενα C. 'Swingle', *Volkameriana* και C. 'Carrizo'.

Το μέσο μήκος βλαστού επίσης επηρεάστηκε από το γονότυπο καθώς παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των υποκειμένων. Στο

υποκείμενο C. 'Carrizo' παρατηρήθηκε το στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερο μέσο μήκος βλαστού (10,98 mm). Μεταξύ των υποκειμένων *P. tr.* 'Rubidouxx', C. 'Swingle' και *Volkameriana* δεν παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές. Τα υποκείμενα 'P. tr. Serra' και *P. tr.* 'Fl. Dragon' παρουσίασαν το στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερο μέσο μήκος βλαστού (5,82 και 5,67 mm αντίστοιχα), καθώς διέφεραν σημαντικά από τα υπόλοιπα υποκείμενα εκτός του *P. tr.* 'Rubidouxx'.

Ο γονότυπος επηρέασε και τον αριθμό φύλλων που σχηματίστηκαν ανά έκφυτο, καθώς ανάμεσα στα υποκείμενα παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές. Στατιστικώς σημαντικά μεγαλύτερο αριθμό φύλλων ανά έκφυτο παρουσίασε το υποκείμενο *Volkameriana* (5,80). Τα υποκείμενα C. 'Swingle', C. 'Carrizo', *P. tr.* 'Rubidouxx' και *P. tr.* 'Flying Dragon' δεν παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικές μεταξύ τους. Το υποκείμενο *P. tr.* 'Serra', το οποίο παρουσίασε το χαμηλότερο αριθμό φύλλων ανά έκφυτο (1,6) διέφερε σημαντικά με τα υπόλοιπα υποκείμενα εκτός του C. 'Swingle'.

Όσον αφορά το στάδιο της ριζογένεσης παρατηρήθηκε ότι επίσης ο γονότυπος επηρέασε σημαντικά την συμπεριφορά των υποκειμένων. Ο αριθμός ριζών ανά έκφυτο επηρεάστηκε από το γονότυπο καθώς παρατηρήθηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές ανάμεσα στα υπό μελέτη υποκείμενα. Στατιστικώς σημαντικά υψηλότερο αριθμό ριζών παρουσίασε το C. 'Swingle' (4,20), ακολουθούμενο από το *P. tr.* 'Fl. Dragon' και το 'C. Carrizo', χωρίς να διαφέρουν στατιστικά μεταξύ τους. Στατιστικώς σημαντικά χαμηλότερο αριθμό ριζών παρουσίασε το υποκείμενο *P. tr.* 'Rubidouxx' (0,75) το οποίο διέφερε σημαντικά με τα υπόλοιπα υποκείμενα εκτός του *Volkameriana*.

Ο γονότυπος επηρέασε και το συνολικό μήκος ριζών καθώς παρουσιάστηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των υποκειμένων. Τα υποκείμενα *Volkameriana*, C. 'Swingle' και *P. tr.* 'Fl. Dragon' παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερο συνολικό μήκος ριζών ανά έκφυτο από τα υποκείμενα 'C. Carrizo' και *P. tr.* 'Rubidouxx', με το *Volkameriana* να παρουσιάζει το μεγαλύτερο συνολικό μήκος βλαστών (147,69 mm). Το C. 'Carrizo' παρουσίασε το χαμηλότερο συνολικό μήκος ριζών (30,66 mm).

Το ποσοστό ξηράνσεων επηρεάστηκε από το γονότυπο, καθώς παρουσιάστηκαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των υποκειμένων. Στατιστικώς σημαντική διαφορά παρατηρήθηκε μεταξύ του C. 'Carrizo', το οποίο παρουσίασε το μεγαλύτερο ποσοστό ξήρανσης (61%) και του *Volkameriana*, το οποίο παρουσίασε το χαμηλότερο ποσοστό ξήρανσης (7%). Τα υποκείμενα C. 'Carrizo', C. 'Swingle', *P. tr.* 'Rubidouxx', και *P. tr.* 'Fl. Dragon' δεν διέφεραν στατιστικώς σημαντικά μεταξύ τους.

Στατιστικώς σημαντικές διαφορές ως προς το λόγο νωπού βάρους προς μήκος ρίζας παρατηρήθηκε μεταξύ του *P. tr.* 'Rubidouxx', το οποίο παρουσίασε το χαμηλότερο νωπό βάρος ρίζας ως προς το μήκος ρίζας και των υπολοίπων υποκειμένων.

4. Γενετική παραλλακτικότητα των υπό μελέτη υποκειμένων

Μέχρι το 1970 η ταξινόμηση των εσπεριδοειδών βασιζόταν μόνο σε μορφολογικά και γεωγραφικά δεδομένα. Το 1943, ο Swingle δημιούργησε ένα σύστημα κατάταξης των *Citrus* κατά το οποίο στο υπογένος *Citrus* ανήκουν δέκα είδη. Αργότερα, το 1954, ο Tanaka διέκρινε 147 διαφορετικά είδη. Η ταξινόμηση του υπογένους *Citrus* ήταν ιδιαίτερα δύσκολη λόγω των πολλών μορφολογικών και γεωγραφικών χαρακτηριστικών, και της αναπαραγωγικής βιολογίας του γένους. Πολλοί τύποι εσπεριδοειδών αναπαράγονται αγενώς μέσω των σπόρων (απόμειξη) με τη διαδικασία της νουκελικής εμβρυονίας (Soost and Roose, 1996), όπου συνήθως εμφανίζονται πολλά νουκελικά έμβρυα αλλά στις περισσότερες περιπτώσεις αναπτύσσονται δύο ή τρία από αυτά. Ο τρόπος αυτός αναπαραγωγής περιπλέκει την ταξινομική ανάλυση του γένους, καθώς τα εσπεριδοειδή περιέχουν ένα μεγάλο βαθμό ποικιλομορφίας, με άφθονο φυσικό υβριδισμό και ο τύπος αυτός απόμειξης είναι πολύ διαδεδομένος μέσα στα γένη, όπου η ανταλλαγή γονιδίων συχνά παρεμποδίζεται, οδηγώντας σε αναπαραγωγική απομόνωση.

Σήμερα με τη χρήση μοριακών τεχνικών έχει καταστεί δυνατή η ταξινομική περιγραφή των *Citrus* με περισσότερη ακρίβεια. Η γνώση της γενετικής ποικιλομορφίας και της σχέσης μεταξύ διαφορετικών γονοτύπων είναι πολύ σημαντικός παράγοντας για την αποτελεσματική αξιοποίηση του δυναμικού των ποικιλιών (Russell et al, 1997). Η ανάγκη αυτή οδήγησε στην αύξηση των τεχνικών και μοριακών δεικτών που βασίζονται στην PCR, όπως τα RAPD, τα ISSR, τα AFLP και τα SSR που χρησιμοποιούνται ως επί το πλείστον σε προγράμματα αναπαραγωγής και στο διαχωρισμό ποικιλιών. Οι μοριακοί δείκτες διαφέρουν στο ποσοστό ποικιλομορφίας που εντοπίζουν και η αποτελεσματικότητά τους διαφοροποιείται ανάλογα με το είδος που εξετάζεται (Lonn et al, 1995). Έτσι η επιτυχία χρήσης των μοριακών δεικτών εξαρτάται από τους γονότυπους που μελετώνται και το σκοπό της μελέτης αυτής.

Στο παρών πείραμα η χρησιμοποίηση ενός ικανοποιητικού αριθμού εκκινητών καθώς και η βελτιστοποίηση των συνθηκών ενίσχυσης του γονιδιωματικού DNA και της ηλεκτροφόρησης των ενισχυμένων προϊόντων, έδωσαν ευκρινείς ηλεκτροφορητικές εικόνες, έτσι ώστε να είναι ευχερής η διάκριση μεταξύ των ειδών και των ποικιλιών που χρησιμοποιήθηκαν στο πείραμα. Η μέθοδος μοριακών δεικτών (ISSR) που χρησιμοποιήθηκαν διαχώρισαν τα είδη, τις ποικιλίες και τα υποκείμενα μεταξύ τους. Οι πολυμορφισμοί που εντοπίστηκαν από τους πέντε εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν ήταν αρκετοί για να διαχωρίσουν τα 21 διαφορετικά δείγματα μεταξύ τους, αφού κανένα δεν παρουσίασε γενετική ομοιότητα ίση με 1.00. Άλλοι ερευνητές, όπως οι Fang et al (1997) δοκίμασαν μεγάλο αριθμό ISSR εκκινητών (46) αλλά χρησιμοποίησαν μόνο 11 που ήταν πολυμορφικοί. Οι Scarano et al (2002) στην εργασία τους χρησιμοποίησαν 12 εκκινητές για τον διαχωρισμό αλλοτετραπλοειδών σωματικών υβριδίων μανταρινιάς. Οι Pasquale et al (2006) χρησιμοποίησαν 11 ISSR και 6 RAPD για το διαχωρισμό πέντε κλώνων νερατζιάς.

Στο δενδρόγραμμα (Εικόνα 3.7) τα τρία υποκείμενα *P. Trifoliata*, *P. tr.* 'Rubidoux' και *P. tr.* 'Serra' ομαδοποιούνται με μεγαλύτερη γενετική ομοιότητα να παρουσιάζουν τα *P. trifoliata* και *P. tr.* 'Serra' (0,63). Τα *P. tr.* 'Rubidoux' και *P. tr.* 'Serra' είναι υποκείμενα που προέρχονται από το *P. Trifoliata*. Τα υποκείμενα *C.* 'Carrizo' και *C.* 'Troyer' παρουσίασαν υψηλή γενετική ομοιότητα (0,75) και συνδέθηκαν με το *P. tr.* 'Flying Dragon'. Και τα τρία αυτά υποκείμενα έχουν κοινά στοιχεία προέλευσης καθώς τα *Citranges* προέρχονται από το *P. Trifoliata* και το *C.*

Sinensis και το *P. tr.* 'Flying Dragon' από το *P. Trifoliata*. Σε έρευνες που έγιναν από τους Tripolitsiotis et al (2008) με ISSR και RAPD εκκινητές και από τους A. Uzum et al (2009) με SRAP εκκινητές, ομοίως τα *C.* 'Carrizo' και 'Troyer' βρίσκονται γενετικά κοντά. Οι τελευταίοι επίσης τοποθετούν το 'Flying Dragon' στην ίδια ομάδα με τα *P. trifoliata* 'Yamaguchi' και 'Benecke'. Οι Manosh Kumar Biswas et al (2010) χρησιμοποιώντας εκκινητές ISSR, RAPD, IRAP και REMAP, βρήκαν πως το *P. Trifoliata* εμφανίζει γενετικές ομοιότητες με το 'Flying Dragon' (0,85).

Το *Citrumelo* '4475' παρουσιάζει υψηλή γενετική ομοιότητα με το ένα από τα δύο δείγματα του *C.* '4475' που προήλθε από μικροπολλασιασμό (0,93) και χαμηλότερη γενετική ομοιότητα (0,60) με το δεύτερο δείγμα του *C.* '4475' που προήλθε από μικροπολλασιασμό. Πιθανόν το πρώτο έκφυτο που πάρθηκε για το μικροπολλαπλασιασμό να προέρχεται από το ίδιο φυτό από το οποίο απομονώθηκε το DNA, για αυτό παρουσιάζουν υψηλή γενετική ομοιότητα, ενώ το δεύτερο δείγμα του *C.* '4475' μπορεί να προέρχεται από άλλο φυτό του ίδιου υποκειμένου, υποδηλώνοντας γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ των φυτών του ίδιου υποκειμένου. Γενικά, η διαδικασία της ιστοκαλλιέργειας μπορεί να προκαλέσει την εμφάνιση μεταλλάξεων και νέων φαινοτύπων, μετά από πολλές επανακαλλιέργειες, για αυτό δεν συνίσταται σαν τρόπος διατήρησης ποικιλιών για κάποια είδη (Κίντζιος Σπ., 2015). Τα *C.* 'Swingle' και '*C.* 1452' ομαδοποιήθηκαν σε άλλο κλάδο και παρουσίασαν γενετική ομοιότητα 0,63. Οι A. Uzum et al (2009) τοποθετούν το '*C.* 1452' σε γενετική ομάδα με τα *C.* 'Troyer', *C.* 'Carrizo' και το *Citrumelo* 'Sacaton'. Οι Meriam Ben Romdhane et al (2016) τοποθετούν το *C.* 'Swingle' σε κοινή ομάδα με το *C.* 'Troyer'. Οι Mohamed Hamdy Amar et al (2011) υποστηρίζουν πως υπάρχει γενετική ομοιότητα μεταξύ των τοπικών *Citrumelo* και των *Citrango* (0,83).

Στο δενδρόγραμμα το *Volkameriana* συνδέθηκε εξωτερικά με τα *C. limon* 'Eureka' και *C. limon* 'Meyer'. Το '*Volkameriana*' είναι υποκείμενο που πρέπει να προέρχεται από την κιτριά και την λεμονιά. Οι A. Uzum et al (2009) χρησιμοποιώντας 21 SRAP εκκινητές διαπίστωσαν πως το *Volkameriana* φέρει γενετικές ομοιότητες με διάφορες ποικιλίες λεμονιάς, συμπεριλαμβανομένων των *C. l.* 'Meyer' και *C. l.* 'Eureka' και με το *C. Jambhiri* 'Schaub'. Τα αποτελέσματα άλλης μελέτης (Meriam Ben Romdhane et al, 2016), στην οποία 15 ISSR εκκινητές χρησιμοποιήθηκαν, καθώς και 3 διαφορετικά δείγματα από κάθε είδος, έδειξαν πως το *Volkameriana* βρίσκεται σε κοινή γενετική ομάδα με το *C. limon* 'Rough lemon'. Οι Tripolitsiotis et al (2008) παρατήρησαν πως το '*Volkameriana*' παρουσιάζει γενετικές ομοιότητες με την κιτριά και διάφορες ποικιλίες λεμονιάς. Άλλοι ερευνητές (Behrouz Golein et al, 2012; Ebtsam M. Hamza, 2013) τοποθετούν το '*Volkameriana*' σε γενετική ομάδα με διάφορες ποικιλίες Lime.

Γενετική ομοιότητα παρατηρείται και μεταξύ των *C. Aurantium*, *Cleopatra* και *C. p.* 'Marsh seedless' στην παρούσα μελέτη. Το *Cleopatra* είναι υποκείμενο το οποίο προέρχεται από την μανταρινιά και το 'Marsh seedless' είναι ποικιλία γκρεπ φρουτ. Σύμφωνα με τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης είναι και τα αποτελέσματα έρευνας των Meriam Ben Romdhane et al (2016) στην οποία χρησιμοποιώντας 15 ISSR εκκινητές και 3 δείγματα από κάθε είδος βρήκαν πως τα τρία δείγματα νεραντζιάς φέρουν γενετικές ομοιότητες με τα δύο δείγματα του *Cleopatra*. Το τρίτο δείγμα του *Cleopatra* εμφάνισε γενετική ομοιότητα με το 'Carrizo'. Άλλοι μελετητές (Francois Luro et al, 2012) παρατήρησαν πως το '*Cleopatra*' βρίσκεται γενετικά κοντά με την ποικιλία νεραντζιάς Gramito και την ποικιλία μανταρινιάς

'Willo leaf'. Σε άλλες έρευνες όμως φαίνεται πως η νεραντζιά εμφανίζει ομοιότητες με τα *C. paradisi* 'Macf' και *C. maxima* 'Meril' (Behrouz Golein et al, 2012).

Στο δενδρόγραμμα το *Alemow*, που είναι υπογένος *Papeda*, ξεχώρισε γενετικά από τα υπόλοιπα δείγματα παρουσιάζοντας ελάχιστη γενετική ομοιότητα. Σε άλλες μελέτες παρουσιάζεται γενετικά όμοιο (0,84) με το 'West Indian Lime' (A. Uzun et al, 2009) ή με το 'Rangpur Lime' (0,78) (Ebtsam M. Hamza, 2013).

Όπως παρατηρήθηκε στο δενδρόγραμμα, το *Citrumelo* '4475' δεν ομαδοποιήθηκε με τα *C. 'Swingle'* και *C. '1452'*, όπως και το 'Flying Dragon' με τα *P. Trifoliata*, *P. tr. 'Rubidouχ'* και *P. tr. 'Serra'*, κάτι που μπορεί να οφείλεται είτε σε υψηλή γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ των υποκειμένων μέσα στο είδος ίσως όμως και σε λάθος ταυτοποίηση τονίζοντας την σημαντικότητα της ταυτοποίησης με μοριακούς δείκτες των μητρικών φυτών και του πολλαπλασιαστικού υλικού που προέρχονται από αυτά σε δενδροκομικούς σταθμούς και συλλογές ειδών και υποκειμένων για αποφυγή τυχών λάθος ταυτοποίησης.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Επίδραση της κυτοκινίνης BA στη βλαστογένεση

- Η παρουσία της κυτοκινίνης BA αύξησε το ποσοστό βλαστογένεσης σε όλους τους γονότυπους, εκτός του *Volkameriana* όπου τα ποσοστά βλαστογένεσης ήταν όμοια σε παρουσία και απουσία κυτοκινίνης.
- Το υψηλότερο ποσοστό βλαστογένεσης για τα περισσότερα υπό μελέτη υποκείμενα παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση των 2 ppm BA. Αυξάνοντας την συγκέντρωση της κυτοκινίνης BA από 2 σε 4 ppm, τα ποσοστά βλαστογένεσης μειώθηκαν σημαντικά στα περισσότερα υποκείμενα.
- Η παρουσία της κυτοκινίνης BA αύξησε σημαντικά τον αριθμό των βλαστών ανά έκφυτο στα υποκείμενα *C. 'Carrizo'*, *Volkameriana* και *P. tr. 'Serra'*. Ο αριθμός των βλαστών ανά έκφυτο δεν επηρεάστηκε από την παρουσία της ορμόνης στα υποκείμενα *C. 'Swingle'*, *P. tr. 'Flying Dragon'* και *P. tr. 'Rubidouχ'*.

- Η παρουσία της BA αύξησε σημαντικά το συνολικό μήκος των βλαστών ανά έκφυτο στα υποκείμενα *C. 'Carrizo'*, *Volkameriana* και *P. tr. 'Serra'*. Το συνολικό μήκος βλαστών δεν επηρεάστηκε από την παρουσία της BA στα υποκείμενα *C. 'Swingle'* και *P. tr. 'Flying Dragon'*. Η παρουσία της BA μείωσε το συνολικό μήκος βλαστών ανά έκφυτο στο υποκείμενο *P. tr. 'Rubidouχ'*.
- Η παρουσία της ορμόνης δεν επηρέασε σημαντικά το μέσο μήκος βλαστού σε κανένα υποκείμενο, εκτός του *P. tr. 'Rubidouχ'* όπου το μείωσε.
- Η παρουσία της BA αύξησε σημαντικά τον αριθμό των φύλλων ανά έκφυτο σε όλα τα υποκείμενα, εκτός του *C. 'Swingle'* όπου ο αριθμός των φύλλων δεν επηρεάστηκε από την παρουσία της BA.

Επίδραση της αυξίνης NAA στη ριζογένεση

- Η παρουσία της αυξίνης NAA αύξησε το ποσοστό ριζογένεσης σε όλα τα υποκείμενα που μελετήθηκαν.
- Στα περισσότερα υποκείμενα που μελετήθηκαν, το μεγαλύτερο ποσοστό ριζογένεσης παρουσιάστηκε στη συγκέντρωση των 2 ppm NAA, με τα υποκείμενα *P. tr. 'Flying Dragon'* και *C. 'Swingle'* να παρουσιάζουν ποσοστό 100% στην εμφάνιση ριζών σε αυτή τη συγκέντρωση αυξίνης.
- Η παρουσία της NAA αύξησε σημαντικά τον αριθμό των ριζών ανά έκφυτο σε όλα τα υποκείμενα, εκτός του *C. 'Carrizo'* όπου ο αριθμός των ριζών δεν επηρεάστηκε σημαντικά από την παρουσία της NAA.
- Η παρουσία της ορμόνης δεν επηρέασε σημαντικά το συνολικό μήκος των ριζών ανά έκφυτο σε όλα τα υποκείμενα, εκτός του *C. 'Carrizo'* όπου το συνολικό μήκος ριζών μειώθηκε σημαντικά υπό την επίδραση της NAA.

- Το ποσοστό ξήρανσης των εκφύτων αυξήθηκε σημαντικά υπό την επίδραση της NAA σε όλα τα υποκείμενα, εκτός του *Volkameriana* του οποίου το ποσοστό ξήρανσης δεν επηρεάστηκε σημαντικά από την παρουσία της NAA.
- Ο λόγος νωπού βάρους ανά μήκος ρίζας δεν επηρεάστηκε σημαντικά από την παρουσία της αυξίνης σε όλα τα υποκείμενα εκτός του C. 'Carrizo' όπου αυξήθηκε σημαντικά υπό την επίδραση της αυξίνης.

Επίδραση του γονότυπου στη βλαστογένεση

- Ο γονότυπος έπαιξε σημαντικό ρόλο στον αριθμό βλαστών ανά έκφυτο που σχηματίστηκαν στα υποκείμενα, με το υποκείμενο *Volkameriana* να εμφανίζει σημαντικά μεγαλύτερο αριθμό βλαστών από τα υπόλοιπα υποκείμενα, ακολουθούμενο από το C. 'Swingle' και το C. 'Carrizo'. Ο σημαντικά χαμηλότερος αριθμός βλαστών εμφανίστηκε στο υποκείμενο *P. tr.* 'Serra'.
- Ο γονότυπος επηρέασε σημαντικά το συνολικό μήκος βλαστών ανά έκφυτο μεταξύ των υποκειμένων. Μεταξύ των υποκειμένων σημαντικά υψηλότερο συνολικό μήκος βλαστού παρουσίασε το *Volkameriana* ακολουθούμενο από το C. 'Carrizo' και το C. 'Swingle'. Το σημαντικά χαμηλότερο συνολικό μήκος βλαστών εμφανίστηκε στο υποκείμενο *P. tr.* 'Serra'.
- Ο γονότυπος επηρέασε σημαντικά το μέσο μήκος βλαστού μεταξύ των υποκειμένων. Σημαντικά υψηλότερο μέσο μήκος βλαστού εμφάνισε το υποκείμενο C. 'Carrizo', ενώ σημαντικά χαμηλότερο μέσο μήκος βλαστού παρουσίασαν τα υποκείμενα *P. tr.* 'Fl. Dragon' και *P. tr.* 'Serra'.
- Ο γονότυπος επηρέασε σημαντικά τον αριθμό των φύλλων που εμφανίστηκαν ανά έκφυτο. Μεταξύ των υποκειμένων σημαντικά υψηλότερος αριθμός φύλλων ανά έκφυτο παρουσιάστηκε στο υποκείμενο *Volkameriana*, ενώ ο σημαντικά χαμηλότερος αριθμός εμφανίστηκε στο υποκείμενο *P. tr.* 'Serra'.

Επίδραση του γονότυπου στη ριζογένεση

- Ο γονότυπος επηρέασε σημαντικά τον αριθμό των ριζών που εμφανίστηκαν ανά έκφυτο. Σημαντικά υψηλότερος αριθμός ριζών ανά έκφυτο μεταξύ των υποκειμένων παρουσιάστηκε στα υποκείμενα *C. 'Swingle'* και *P. tr. 'Fl. Dragon'*, ενώ ο σημαντικά χαμηλότερος παρουσιάστηκε στο υποκείμενο *P. tr. 'Rubidouχ'*.
- Ο γονότυπος επηρέασε σημαντικά το συνολικό μήκος ριζών ανά έκφυτο. Τα υποκείμενα *Volkameriana*, *C. 'Swingle'* και *P. tr. 'Fl. Dragon'* εμφάνισαν σημαντικά μεγαλύτερο συνολικό μήκος ριζών ανά έκφυτο συγκριτικά με τα *C. 'Carrizo'* και *P. tr. 'Rubidouχ'*.
- Ο γονότυπος επηρέασε σημαντικά το ποσοστό ξηράνσεων των εκφύτων μεταξύ των υποκειμένων. Σημαντικά υψηλότερο ποσοστό ξήρανσης εμφάνισε το υποκείμενο *C. 'Carrizo'*, ενώ σημαντικά χαμηλότερο το υποκείμενο *Volkameriana*.
- Ο γονότυπος επηρέασε σημαντικά το λόγο νωπού βάρους ανά μήκος ρίζας μεταξύ των υποκειμένων. Το υποκείμενο *P. tr. 'Rubidouχ'* παρουσίασε σημαντικά χαμηλότερο λόγο νωπού βάρους ανά μήκος ρίζας συγκριτικά με τα υπόλοιπα υποκείμενα, τα οποία δεν διέφεραν μεταξύ τους.

Γενετική παραλλακτικότητα των υποκειμένων

- Για την μελέτη της γενετικής παραλλακτικότητας των υποκειμένων οι ISSR εκκινητές που χρησιμοποιήθηκαν έδωσαν ευκρινή αριθμό ενισχυμένων ζωνών και ικανοποιητικό πολυμορφισμό και διαχώρισαν τα είδη, τις ποικιλίες και τα υποκείμενα μεταξύ τους.
- Ο αριθμός των ενισχυμένων ζωνών DNA που έδωσαν οι ISSR εκκινητές ήταν 45, εκ των οποίων 43 ήταν πολυμορφικές. Το ποσοστό του πολυμορφισμού ανήλθε στο 89,36%.

- Παρατηρήθηκε μεγάλη γενετική παραλλακτικότητα μεταξύ των δειγμάτων.
- Τα τρία υποκείμενα *P. Trifoliata*, *P. tr. 'Rubidouχ'* και *P. tr. 'Serra'* ομαδοποιούνται στο δενδρόγραμμα με μεγαλύτερη γενετική ομοιότητα να παρουσιάζουν τα *P. Trifoliata* και *P. tr. 'Serra'* (0,63).
- Τα *C. 'Troger'* και *C. 'Carrizo'* ομαδοποιήθηκαν στο δενδρόγραμμα παρουσιάζοντας γενετική ομοιότητα 0,75.
- Το υποκείμενο *Citrumelo '4475'* παρουσίασε μεγάλη γενετική ομοιότητα (0,93) με το ένα δείγμα *Citrumelo '4475'* από μικροπολλαπλασιασμό και μικρότερη με το δεύτερο δείγμα *Citrumelo '4475'* από μικροπολλαπλασιασμό.
- Τα *C. 'Swingle'* και *C. '1452'* ομαδοποιήθηκαν σε άλλο κλάδο και παρουσίασαν γενετική ομοιότητα 0,63.
- Το υποκείμενο *Volkameriana* συνδέθηκε εξωτερικά με τις ποικιλίες λεμονιάς *C. limon 'Eureka'* και *C. limon 'Meyer'*, οι οποίες παρουσίασαν γενετική ομοιότητα μεταξύ τους 0,71.
- Η Κλεοπάτρα ομαδοποιήθηκε στο δενδρόγραμμα με το *C. Aurantium* και παρουσίασαν γενετική ομοιότητα 0.65.
- Το *Alomow*, που είναι υπογένος *Papeda*, ξεχώρισε γενετικά από τα υπόλοιπα δείγματα παρουσιάζοντας ελάχιστη γενετική ομοιότητα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Abkenar, Asadi, and S. Isshiki. "Molecular characterization and genetic diversity among Japanese acid citrus (*Citrus* spp.) based on RAPD markers." *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 78.1 (2003): 108-112.

Al-Bahrany, Abdulaziz M. "Effect of phytohormones on in vitro shoot multiplication and rooting of lime *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing." *Scientia Horticulturae* 95.4 (2002): 285-295.

Amar, Mohamed Hamdy, et al. "Exploitation of SSR, SRAP and CAPS-SNP markers for genetic diversity of *Citrus* germplasm collection." *Scientia Horticulturae* 128.3 (2011): 220-227.

Βασιλακάκης Μ. και Θεριός Ι. 2006. Μαθήματα ειδικής δενδροκομίας – Εσπεριδοειδή. 2η Έκδοση, εκδόση, Θεσσαλονίκη, σελ. 9-53.

Bais H.P. and Ravishankar G.A. 2002. Role of polyamines in the ontogeny of plants and their biotechnological applications. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 69: 1-34.

Bagni N. and Tassoni A. 2001. Biosynthesis, oxidation and conjugation of aliphatic polyamines in higher plants. *Amino Acids* 20: 301-317.

Begum, Yasmin, et al. "Radiation induced alterations in *Vigna radiata* during in vitro somatic embryogenesis." *International journal of radiation biology* 84.2 (2008): 165-175.

Barrett, H. C., and A. M. Rhodes. "A numerical taxonomic study of affinity relationships in cultivated *Citrus* and its close relatives." *Systematic Botany* (1976): 105-136.

Biswas, Manosh Kumar, Qiang Xu, and Xiu-xin Deng. "Utility of RAPD, ISSR, IRAP and REMAP markers for the genetic analysis of *Citrus* spp." *Scientia Horticulturae* 124.2 (2010): 254-261.

Bordón, Y., J. L. Guardiola, and A. García-Luis. "Genotype affects the morphogenic response in vitro of epicotyl segments of *Citrus* rootstocks." *Annals of Botany* 86.1 (2000): 159-166.

Bornman C.H. and Vogelmann T.C. 1984. Effect of rigidity of gel medium on benzyladenine-induced adventitious bud formation and vitrification in vitro in *Picea abies*. *Physiologia Plantarum* 61: 505-512.

Bretting, P. K., and Mark P. Widrechner. "Genetic markers and plant genetic resource management." *Plant Breeding Reviews, Volume 13* (1995): 11-86.

Bretó, M. P., et al. "The diversification of *Citrus clementina* Hort. ex Tan., a vegetatively propagated crop species." *Molecular phylogenetics and evolution* 21.2 (2001): 285-293.

Burger, D. W., and W. P. Hackett. "Gradients of adventitious bud formation on excised epicotyl and root sections of *Citrus*." *Plant Science* 43.3 (1986): 229-232.

Burger, D. W., and W. P. Hackett. "Gradients of adventitious bud formation on excised epicotyl and root sections of *Citrus*." *Plant Science* 43.3 (1986): 229-232.

Cabasson, C., et al. "Improvement of *Citrus* somatic embryo development by temporary immersion." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 50.1 (1997): 33-37.

Canli, F. A., and L. Tian. "In vitro shoot regeneration from stored mature cotyledons of sweet cherry (*Prunus avium* L.) cultivars." *Scientia Horticulturae* 116.1 (2008): 34-40.

Carimi, Francesco, et al. "Somatic embryogenesis and plant regeneration from undeveloped ovules and stigma/style explants of sweet orange navel group [*Citrus sinensis* (L.) Osb.]." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 54.3 (1998): 183-189.

Carimi, Francesco, and Fabio De Pasquale. "Micropropagation of citrus." *Micropropagation of woody trees and fruits*. Springer Netherlands, 2003. 589-619.

Carimi F., De Pasquale F. and Crescimanno F.G. 1995. Somatic embryogenesis in *Citrus* from styles culture. *Plant Science* 105: 81-86.

Carimi F., De Pasquale F. and Puglia A.M. 1998a. In vitro rescue of zygotic embryos of sour orange, *Citrus aurantium* L., and their detection based on RFLP analysis. *Plant Breeding* 117: 261-266.

Citrus Fruit Statistics 2015, Food and Agriculture Organization of the United Nations

Clark, Andrew G., and C. M. Lanigan. "Prospects for estimating nucleotide divergence with RAPDs." *Molecular biology and evolution* 10.5 (1993): 1096-1111.

Coletta Filho, H. D., et al. "Analysis of the genetic diversity among mandarins (*Citrus* spp.) using RAPD markers." *Euphytica* 102.1 (1998): 133-139.

Corazza-Nunes, M. J., et al. "Assessment of genetic variability in grapefruits (*Citrus paradisi* Macf.) and pummelos (*C. maxima* (Burm.) Merr.) using RAPD and SSR markers." *Euphytica* 126.2 (2002): 169-176.

Couée I., Hummel I., Sulmon C., Gouestbet C. and Amrani A.E. 2004. Involvement of polyamines in root development. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 76: 1-10.

Chakravarty, Bipasha, and B. C. Goswami. "Plantlet regeneration from long-term callus cultures of *Citrus acida* Roxb. and the uniformity of regenerated plants." *Scientia Horticulturae* 82.1 (1999): 159-169.

Duran-Vila, N., et al. "Morphogenesis and tissue culture of sweet orange (*Citrus sinensis* (L.) Osb.): effect of temperature and photosynthetic radiation." *Plant cell, tissue and organ culture* 29.1 (1992): 11-18.

Debergh, P. C. "Effects of agar brand and concentration on the tissue culture medium." *Physiologia Plantarum* 59.2 (1983): 270-276.

Druart, Ph, et al. "Fruit Trees." *Trees I*. Springer Berlin Heidelberg, 1986. 130-273.

Hamza, Ebtsam Moubark. "Genetic diversity of some citrus varieties based on microsatellite and RAPD molecular markers in Egypt." *World J. Agri. Sci* 9.4 (2013): 316-324.

Fang, D. Q., and M. L. Roose. "Identification of closely related citrus cultivars with inter-simple sequence repeat markers." *Theoretical and Applied Genetics* 95.3 (1997): 408-417.

Fang, D. Q., et al. "Fingerprinting trifoliolate orange germ plasm accessions with isozymes, RFLPs, and inter-simple sequence repeat markers." *Theoretical and Applied Genetics* 95.1-2 (1997): 211-219.

Federici, C. T., et al. "Phylogenetic relationships within the genus *Citrus* (Rutaceae) and related genera as revealed by RFLP and RAPD analysis." *Theoretical and Applied Genetics* 96.6-7 (1998): 812-822.

Fernie A.R. and Willimitzer L. 2001. Molecular and biochemical triggers of potato tuber development. *Plant Physiology* 127: 1459-1465.

Fuentes S.R.L., Calheiros M.B.P., Manetti-Filho J. and Vieira L.G.E. 2000. The effect of silver nitrate and different carbohydrate sources on somatic embryogenesis in *Coffea canephora*. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 60: 5-13.

Garcia, R., et al. "Genetic analysis of apomixis in *Citrus* and *Poncirus* by molecular markers." *Theoretical and Applied Genetics* 99.3-4 (1999): 511-518.

George E.F. 1996. Plant propagation by tissue culture. In practice. Part II. Exegetics Limited, pp. 575-576, 654-669, 671

Ghorbel, R., L. Navarro, and N. Duran-Vila. "Morphogenesis and regeneration of whole plants of grapefruit (*Citrus paradisi*), sour orange (*C. aurantium*) and alemow (*C. macrophylla*)." *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology* 73.3 (1998): 323-327.

Gill, Ravinder, and S. Eapen. "Plant regeneration from hypocotyl protoplasts of mothbean (*Vigna aconitifolia*)." *Current science* 55.2 (1986): 100-102.

Gill, M. I. S., et al. "Somatic embryogenesis and plantlet regeneration in mandarin (*Citrus reticulata* Blanco)." *Scientia Horticulturae* 63.3 (1995): 167-174.

Gmitter, Frederick G., and Xulan Hu. "The possible role of Yunnan, China, in the origin of contemporary Citrus species (Rutaceae)." *Economic Botany* 44.2 (1990): 267-277.

Golein, Behrouz, et al. "Analysis of genetic relationship between 'Bakraee'(Citrus sp.) and some known Citrus genotypes through SSR and PCR-RFLP markers." *Scientia horticulturae* 148 (2012): 147-153.

Goh, J. C., P. Y. Lee, and K. A. M. A. L. Bose. "A cadaver study of the function of the oblique part of vastus medialis." *Bone & Joint Journal* 77.2 (1995): 225-231.

Grimanelli, Daniel, et al. "Developmental genetics of gametophytic apomixis." *TRENDS in Genetics* 17.10 (2001): 597-604.

Gurel S. and Gulsen Y. 1998. The effects of sucrose agar and pH levels on in vitro shoot production of Almond (*Amygdalus communis* L.). *Tr Journal of Bot* 22: 363-373.

Hagidimitriou M., Katsiotis A., Menexes G., Pontikis C., Loukas M. 2005. Genetic Diversity of major Greek Olive Cultivars Using Molecular (AFLPs and RAPDs) markers and morphological traits. *J. Amer. Soc. Hort. So.* 130(2):211-217

Hamza, Ebtsam Moubark. "Genetic diversity of some citrus varieties based on microsatellite and RAPD molecular markers in Egypt." *World J. Agri. Sci* 9.4 (2013): 316-324.

Hazarika B.N. 2003. Acclimatization of tissue-cultured plants. *Current Science* 85: 1704-1712.

Henegariu, O., et al. "Multiplex PCR: critical parameters and step-by-step protocol." *Biotechniques* 23.3 (1997): 504-511.

Hokanson, Karen E., and Margaret R. Pooler. "Regeneration of ornamental cherry (*Prunus*) taxa from mature stored seed." *HortScience* 35.4 (2000): 745-748.

Joshi, A., and S. L. Kothari. "High copper levels in the medium improves shoot bud differentiation and elongation from the cultured cotyledons of *Capsicum annuum* L." *Plant cell, tissue and organ culture* 88.2 (2007): 127-133.

Jo E.-A., Tewari R.K., Hahn E.-J. and Paek K.-Y. 2009. In vitro sucrose concentration

affects growth and acclimatization of *Alocasia amazonica* plantlets. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 96: 307-315.

Kaltsikes, P. J., and P. J. Bebeli. "Somaclonal variation causes changes in the inter-relationships between traits in hexaploid Triticale." *JAPANESE JOURNAL OF BREEDING* 43 (1993): 45-45.

Katsiotis A., HAgidimitriou M., Drossou A., Pontikis C and Loukas M. 2003. Genetic relationships among species and cultivars of *Pistacia* using RAPDs and AFLPs. *Euphytica* 132: 279-286, 2003

Kiepiela, Photini, et al. "CD8+ T-cell responses to different HIV proteins have discordant associations with viral load." *Nature medicine* 13.1 (2007): 46-53.

Kitto, S. L., and M. J. Young. "In vitro propagation of Carrizo citrange." *HortScience* (1981).

Kotsias, D., and P. A. Roussos. "An investigation on the effect of different plant growth regulating compounds in in vitro shoot tip and node culture of lemon seedlings." *Scientia horticulturae* 89.2 (2001): 115-128.

Lewin, Maite, et al. "Tat peptide-derivatized magnetic nanoparticles allow in vivo tracking and recovery of progenitor cells." *Nature biotechnology* 18.4 (2000): 410-414.

Leva, Annarita, R. Muleo, and Raffaella Petruccelli. "Long-term somatic embryogenesis from immature olive cotyledons." *Journal of horticultural science* 70.3 (1995): 417-421.

Litz, R. E., and R. A. Conover. "In vitro somatic embryogenesis and plant regeneration from *Carica papaya* L. ovular callus." *Plant Science Letters* 26.2-3 (1982): 153-158.

Lonn M, Prentice HC, TegelstrGM H (1995) Genetic differentiation in *Hippocrepis emerus* (Leguminosae): allozyme and DNA fingerprint variation in disjunct Scandinavian populations. *Mol Ecol* 4:39-48

Lu, Mei-Chun. "Micropropagation of *Morus latifolia* Poilet using axillary buds from mature trees." *Scientia Horticulturae* 96.1 (2002): 329-341.

Luro, François, et al. "Genetic and chemical diversity of citron (*Citrus medica* L.) based on nuclear and cytoplasmic markers and leaf essential oil composition." *Phytochemistry* 77 (2012): 186-196.

Luro, François, et al. "DNA amplified fingerprinting, a useful tool for determination of genetic origin and diversity analysis in Citrus." *HortScience* 30.5 (1995): 1063-1067.

Malik, Mahmood Niaz, Rainer Walter Scora, and Robert K. Soost. *Studies on the origin of the lemon*. University of California, 1974.

Maggon, Ruchi, and Brahma Deo Singh. "Promotion of adventitious bud regeneration by ABA in combination with BAP in epicotyl and hypocotyl explants of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck)." *Scientia Horticulturae* 63.1 (1995): 123-128.

Mante, Seth, Ralph Scorza, and John M. Cordts. "Plant regeneration from cotyledons of *Prunus persica*, *Prunus domestica*, and *Prunus cerasus*." *Plant cell, tissue and organ culture* 19.1 (1989): 1-11.

Marino G., Bertazza G., Magnanini E. and Altan A.D. 1993. Comparative effects of sorbitol and sucrose as main carbon energy sources in micropropagation of apricot. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 34: 235-244.

Martin-Tanguy J. 2001. Metabolism and function of polyamines in plants: recent development (new approaches). *Plant Growth Regulation* 34: 135-148.

Marques, Natália T., Gustavo B. Nolasco, and José P. Leitão. "Factors affecting in vitro adventitious shoot formation on internode explants of *Citrus aurantium* L. cv. Brazilian." *Scientia horticulturae* 129.2 (2011): 176-182.

Matt, Andrea, and Johannes A. Jehle. "In vitro plant regeneration from leaves and internode sections of sweet cherry cultivars (*Prunus avium* L.)." *Plant cell reports* 24.8 (2005): 468-476.

Miscanthus x ogiformis Honda Giganteus. *Plant Cell Tissue and Organ Culture* 58: 189-197.

Mitalipova, Maisam M., et al. "Preserving the genetic integrity of human embryonic stem cells." *Nature biotechnology* 23.1 (2005): 19-20.

Moore, G. A. "In vitro propagation of Citrus rootstocks." *HortScience* 21.2 (1986): 300-301.

Moore, Gloria A. "Oranges and lemons: clues to the taxonomy of Citrus from molecular markers." *TRENDS in Genetics* 17.9 (2001): 536-540.

Morell, M. K., et al. "DNA profiling techniques for plant variety identification." *Animal Production Science* 35.6 (1995): 807-819.

Mukherjee, Papiya, et al. "In vitro propagation of a grape rootstock, deGrasset (*Vitis champinii* Planch.): Effects of medium compositions and plant growth regulators." *Scientia horticulturae* 126.1 (2010): 13-19.

Nandi S.K., Letham D.S., Palni L.M.S., Wong O.C. and Summons R.E. 1989. 6-benzylaminopurine and its glycosides as naturally occurring cytokinins. *Plant Science* 61: 189-196

Nicolosi, E., et al. "Citrus phylogeny and genetic origin of important species as investigated by molecular markers." *Theoretical and Applied Genetics* 100.8 (2000): 1155-1166.

Νικολουδάκης Νικόλαος (2005). Νέες προσεγγίσεις στο διαχωρισμό ποικιλιών ελιάς με μοριακούς δείκτες.

Normah, M. N., S. Hamidah, and F. D. Ghani. "Micropropagation of Citrus halimii—an endangered species of South-east Asia." *Plant cell, tissue and organ culture* 50.3 (1997): 225-227.

Owens, Lowell D., and Chris A. Wozniak. "Measurement and effects of gel matrix potential and expressibility on production of morphogenic callus by cultured sugarbeet leaf discs." *Plant cell, tissue and organ culture* 26.2 (1991): 127-133.

Pareek, Aparna, and S. L. Kothari. "Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf cultures of ornamental species of Dianthus." *Scientia horticultrae* 98.4 (2003): 449-459.

Pasquale De F., Siragusa M., Abbate L., Tusa N., Pasquale De C. and Alonzo G. 2006. Characterization of five sour orange clones through molecular markers and leaf essential oils analysis. *Scientia Horticulturae* Vol. 109, Issue 1, P. 54-59

Patterson, H. D., and S. T. C. Weatherup. "Statistical criteria for distinctness between varieties of herbage crops." *The Journal of Agricultural Science* 102.01 (1984): 59-68.

Paudyal, K. P., and N. Haq. "In vitro propagation of pummelo (Citrus grandis L. Osbeck)." *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 36.6 (2000): 511-516.

Pérez-Molphe-Balch, Eugenio, and Neftalí Ochoa-Alejo. "In vitro plant regeneration of Mexican lime and mandarin by direct organogenesis." *HortScience* 32.5 (1997): 931-934.

Pérez-Tornero, Olaya, et al. "Physiological and growth changes in micropropagated Citrus macrophylla explants due to salinity." *Journal of plant physiology* 166.17 (2009): 1923-1933.

Pérez-Tornero, O., C. I. Tallón, and I. Porras. "An efficient protocol for micropropagation of lemon (Citrus limon) from mature nodal segments." *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)* 100.3 (2010): 263-271.

Peña, Leandro, et al. "Agrobacterium-mediated transformation of sweet orange and regeneration of transgenic plants." *Plant Cell Reports* 14.10 (1995): 616-619.

Peters, K., et al. "Targeted expression of a dominant negative FGF receptor blocks branching morphogenesis and epithelial differentiation of the mouse lung." *The EMBO Journal* 13.14 (1994): 3296.

Petersen K.K., Hansen J. and Krogstrup P. 1999. Significance of different carbon sources and sterilization methods on callus induction and plant regeneration of

Pospíšilová J., Tichá I., Kadleček P., Haisel D. and Plzáková Š. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions. *Biologia Plantarum* 42: 481-497.

Ποντίκης Κ. 1993, Εσπεριδοειδή, Κεφ. 2 23-25, Κεφ. 10 175-284, 288-291

Πρωτοπαπαδάκης Ε. 2004. Τα εσπεριδοειδή Κεφ. 3 18-19, Κεφ. 4 28, 35-37, 42

Rani, G., et al. "Micropropagation of Kinnow (*Citrus nobilis* x *Citrus deliciosa*) through nodal segments." *J Ind Bot Soc* 83 (2004): 26-29.

Rathore, J. S., et al. "Micropropagation of mature tree of *Citrus limon*." *Indian Journal of Biotechnology* 6.2 (2007): 239.

Reuther, Walter, L. D. Batchelor, and H. J. Webber. "The Citrus Industry. Vol." *University of California, Berkeley* (1967).

Romberger, J. A., and C. A. Tabor. "The *Picea abies* shoot apical meristem in culture. I. Agar and autoclaving effects." *American Journal of Botany* (1971): 131-140.

Romdhane, Meriam Ben, et al. "Patterns of genetic structure and evidence of gene flow among Tunisian Citrus species based on informative nSSR markers." *Comptes Rendus Biologies* 339.9 (2016): 371-377.

Rugini E. 1990. In vitro culture of olive: an overview of the present scientific status. *Acta Horticulturae* 286: 93-96.

Rugini E. and Caricato G. 1995. Somatic embryogenesis and plant recovery from mature tissues of olive cultivars (*Olea europea* L.) "Canino and Moraiolo". *Plant Cell Reports* 14: 257-260.

Rugini E. and Pannelli G. 1993. Preliminary results on increasing fruit set in olive (*Olea europea* L.) by chemical and mechanical treatments. *Acta Horticulturae* 329: 209-220.

Russell JR, Fuller JD, Macaulay M, Hatz BG, Jahoor A, Powell W and Waugh R (1997) Direct comparison of levels of genetic variation among barley accessions detected by RFLPs, AFLPs, SSRs and RAPDs. *Theor Appl Genet* 95:714-722

Saafi, Havila, and Dulal Borthakur. "In vitro plantlet regeneration from cotyledons of the tree-legume *Leucaena leucocephala*." *Plant growth regulation* 38.3 (2002): 279-285.

Saiki, Randall K., et al. "Enzymatic amplification of b-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia." *Science* 230.4732 (1985): 1350-1354.

Sauton, Annie, A. Mouras, and A. Lutz. "Plant regeneration from citrus root meristems." *Journal of Horticultural Science* 57.2 (1982): 227-231.

Savita, Singh B., G. S. Virk, and A. Nagpal. "Efficient micropropagation protocol for regeneration of *Citrus jambhiri* Lush." *Physiol Mol Biol Plants* 17 (2011): 161-169.

Scarano, M-T., et al. "ISSR-PCR technique: a useful method for characterizing new allotetraploid somatic hybrids of mandarin." *Plant Cell Reports* 20.12 (2002): 1162-1166.

Selvaraj, Ramesh K., and Terrence L. Geiger. "A kinetic and dynamic analysis of Foxp3 induced in T cells by TGF- β ." *The Journal of Immunology* 178.12 (2007): 7667-7677.

Sharma, Suneel, Atam Prakash, and T. E. L. E. Ajinath. "In vitro propagation of *Citrus* rootstocks." *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 37.1 (2009): 84.

Shibli, R. A., et al. "Micropropagation in wild pear (*Pyrus syriaca*)." *Scientia Horticulturae* 68.1 (1997): 237-242.

Shrestha, Shankar Prasad, et al. "Properties of ZnO: Al films prepared by spin coating of aged precursor solution." *Bulletin of the Korean Chemical Society* 31.1 (2010): 112-115.

Sneath, Peter HA, and Robert R. Sokal. *Numerical taxonomy. The principles and practice of numerical classification*. 1973.

Soost, R.K. and Roose, M.L. (1996) *Citrus*. In fruit breeding, Volume 1: Tree and tropical fruits (Janick, J. and Moore, J.N., eds), pp. 257-323, John Wiley and Sons.

Staub, Jack E., Felix C. Serquen, and Manju Gupta. "Genetic markers, map construction, and their application in plant breeding." *HortScience* 31.5 (1996): 729-741.

Swingle, W. "The botany of *Citrus* and its wild relatives of the orange subfamily (Family Rutaceae, subfamily Aurnatioidideae)." *The citrus industry* 1 (1943): 399.

Swingle, W. T. "*Citrus trifoliata* in relation to citrus culture." *Proc. Amer. Pomol. Soc* 32 (1911): 218-221.

Tallón, Carlos I., Ignacio Porras, and Olaya Pérez-Tornero. "Efficient propagation and rooting of three citrus rootstocks using different plant growth regulators." *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 48.5 (2012): 488-499.

Tallón, Carlos I., Ignacio Porras, and Olaya Pérez-Tornero. "High efficiency in vitro organogenesis from mature tissue explants of *Citrus macrophylla* and *C. aurantium*." *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant* 49.2 (2013): 145-155.

Tanaka, Tyozaburo. "Species problem in Citrus." (1954).

Tanhuanpää, P. K., J. P. Vilkki, and H. J. Vilkki. "Mapping of a QTL for oleic acid concentration in spring turnip rape (*Brassica rapa* ssp. *oleifera*)." *Theoretical and Applied Genetics* 92.8 (1996): 952-956.

Tanksley, S. D., et al. "RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science." *Nature Biotechnology* 7.3 (1989): 257-264.

Thomas T.D. 2003. Thidiazuron induced multiple shoot induction and plant regeneration from cotyledonary explants of mulberry. *Biologia Plantarum* 46: 529-533.

Thomas T.H. and Blakesley D. 1987. Practical and potential uses of cytokinins in agriculture and horticulture. British Plant Growth Regulation Group, Monograph 14, pp. 69-83.

Tiwari, Siddharth, et al. "Expression of a synthetic cry1EC gene for resistance against *Spodoptera litura* in transgenic peanut (*Arachis hypogaea* L.)." *Plant cell reports* 27.6 (2008): 1017-1025.

Tripolitsiotis, Constantinos, et al. "Molecular characterization and analysis of the greek citrus germplasm." *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca* 41.2 (2013): 463.

Uzun, A., et al. "Genetic diversity and relationships within Citrus and related genera based on sequence related amplified polymorphism markers (SRAPs)." *Scientia Horticulturae* 121.3 (2009): 306-312.

Vardi, Aliza, Donald J. Hutchison, and Esra Galun. "A protoplast-to-tree system in *Microcitrus* based on protoplasts derived from a sustained embryogenic callus." *Plant cell reports* 5.6 (1986): 412-414.

Williams, John GK, et al. "DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers." *Nucleic acids research* 18.22 (1990): 6531-6535.

Yablonka-Reuveni, Zipora, Thomas M. Balestreri, and Daniel F. Bowen-Pope. "Regulation of proliferation and differentiation of myoblasts derived from adult mouse skeletal muscle by specific isoforms of PDGF." *The Journal of cell biology* 111.4 (1990): 1623-1629.

Yu, Jian, and Lin Zhang. "No PUMA, no death: implications for p53-dependent apoptosis." *Cancer cell* 4.4 (2003): 248-249.

Zawadzka, Marta, and Teresa Orlikowska. "Factors modifying regeneration in vitro of adventitious shoots in five red raspberry cultivars." *Journal of Fruit and Ornamental Plant Research* 14 (2006): 105.

Zheng, Ming, et al. "Structure-based carbon nanotube sorting by sequence-dependent DNA assembly." *Science* 302.5650 (2003): 1545-1548.

Zhang B. and Stolz L.P. 1989. Shoot proliferation of *Euphorbia fulgens* in vitro affected by medium components. *HortScience* 24: 503-504

Zhang, B. A. O. L. I. N., L. P. Stoltz, and J. C. Snyder. "In vitro propagation of *Euphorbia fulgens*." *HortScience (USA)* (1987).