

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΕΝΔΡΟΚΟΜΙΑΣ
«ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΑΝΔΡΕΑ Π. ΤΣΙΡΜΠΑ



«ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ *IN VITRO* ΕΣΠΕΡΙΔΟΕΙΔΩΝ-ΕΠΙΔΡΑΣΗ
ΦΥΤΟΡΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ, ΤΟΥ ΜΗΚΟΥΣ ΚΥΜΑΤΟΣ
ΦΩΤΟΣ ΚΑΙ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΕΚΦΥΤΩΝ ΣΕ ΚΑΨΙΔΙΟ»

Επιβλέπων: Ρούσος Πέτρος-Αναπληρωτής Καθηγητής

ΑΘΗΝΑ 2018

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΕΝΔΡΟΚΟΜΙΑΣ
«ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΑΝΔΡΕΑ Π. ΤΣΙΡΜΠΑ

«ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ *IN VITRO* ΕΣΠΕΡΙΔΟΕΙΔΩΝ-ΕΠΙΔΡΑΣΗ
ΦΥΤΟΡΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ, ΤΟΥ ΜΗΚΟΥΣ ΚΥΜΑΤΟΣ
ΦΩΤΟΣ ΚΑΙ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΕΚΦΥΤΩΝ ΣΕ ΚΑΨΙΔΙΟ»

Επιβλέπων: Ρούσος Πέτρος-Αναπληρωτής Καθηγητής

ΑΘΗΝΑ 2018

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΕΝΔΡΟΚΟΜΙΑΣ
«ΕΠΙΣΤΗΜΕΣ ΚΑΙ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ»

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ
ΑΝΔΡΕΑ Π. ΤΣΙΡΜΠΑ

«ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ *IN VITRO* ΕΣΠΕΡΙΔΟΕΙΔΩΝ-ΕΠΙΔΡΑΣΗ
ΦΥΤΟΡΡΥΘΜΙΣΤΙΚΩΝ ΠΑΡΑΓΟΝΤΩΝ, ΤΟΥ ΜΗΚΟΥΣ ΚΥΜΑΤΟΣ
ΦΩΤΟΣ ΚΑΙ ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΕΚΦΥΤΩΝ ΣΕ ΚΑΨΙΔΙΟ»

ΤΡΙΜΕΛΗΣ ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ:

Ρούσος Πέτρος-Αναπληρωτής Καθηγητής (Επιβλέπων)

Βέμμος Σταύρος-Καθηγητής

Παπαδάκης Ιωάννης-Επίκουρος Καθηγητής

ΑΘΗΝΑ 2018

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν, να αξιολογηθεί η επίδραση των κυτοκινινών 6-βενζυλαδεσνίνη (BA), 2-ισοπεντενυλαδεσνίνη (2iP), κινετίνη (KIN), thidiazuron (TDZ) και forchlorfenuron (FCF ή CPPU) και των συγκεντρώσεών τους στα χαρακτηριστικά των βλαστών, χρησιμοποιώντας ως έκφυτα τμήματα βλαστού με οφθαλμό, τα οποία προέκυψαν από σπορόφυτα των ειδών νεραντζιά (*Citrus aurantium*) και βολκαμεριάνα (*Citrus volkameriana*), καλλιεργούμενα *in vitro* σε υπόστρωμα DKW. Επίσης, διερευνήθηκε αν το διαφορετικό μήκος κύματος φωτός καθώς και η τροποποίηση της αναλογίας των σακχάρων του υποστρώματος επηρεάζουν τα χαρακτηριστικά των βλαστών ενώ αξιολογήθηκε η επίδραση των αυξινών ινδολοβουτυρικό οξύ (IBA) και α-ναφθαλινοξικό οξύ (NAA) σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και συνδυασμούς, στο ποσοστό ριζοβολίας και στα χαρακτηριστικά των ριζών.

Τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν ότι η BA έδωσε, ανεξαρτήτου συγκέντρωσης, το μεγαλύτερο αριθμό και μήκος βλαστών καθώς και αριθμό κόμβων στο *Citrus aurantium* ενώ εξίσου καλά αποτελέσματα έδωσε η FCF ως προς τον αριθμό των βλαστών και των κόμβων. Η TDZ έδωσε το μικρότερο μήκος βλαστών και στα δύο, υπό μελέτη, είδη. Ωστόσο, στο *Citrus volkameriana* έδωσε το μεγαλύτερο αριθμό βλαστών και κόμβων, όμως, οι βλαστοί της παρουσίαζαν μορφολογικές ανωμαλίες.

Τόσο ο αριθμός όσο και το μήκος των βλαστών, και στα δύο είδη, δεν επηρεάστηκαν από το διαφορετικό μήκος κύματος φωτός. Ωστόσο, παρατηρήθηκε τάση σχηματισμού περισσότερων βλαστών υπό την επίδραση του μπλε φωτός ενώ λιγότερων υπό την επίδραση του πράσινου. Ο αριθμός των κόμβων ανά έκφυτο μειώθηκε σημαντικά υπό την επίδραση του πράσινου φωτός στο είδος *Citrus volkameriana* ενώ το μπλε και το λευκό φώς έδωσαν το μεγαλύτερο αριθμό. Η νέα αναλογία σακχάρων στο *Citrus aurantium* δεν επηρέασε τα χαρακτηριστικά των βλαστών ενώ στο *Citrus volkameriana* το μήκος των βλαστών επηρεάστηκε αρνητικά.

Τα δύο μεγαλύτερα ποσοστά ριζοβολίας 75% για το *Citrus aurantium* και 100% για το *Citrus volkameriana* παρατηρήθηκαν με την επέμβαση 1ppm NAA και με το συνδυασμό IBA+NAA (4ppm) αντίστοιχα. Τα έκφυτα υπό την παρουσία του NAA ανέπτυξαν, γενικά, περισσότερες ρίζες ενώ το μήκος το ριζών υπό την παρουσία μόνο του IBA ήταν μεγαλύτερο. Τα νεαρά φυτάρια εγκλιματίστηκαν σε μονάδα υδρονέφωσης με ποσοστά επιβίωσης 85% για το *Citrus volkameriana* και 65% για το *Citrus aurantium*.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε εγκλεισμός (encapsulation) εκφύτων, και των δύο ειδών, σε καμίδιο, αποθήκευσή τους σε χαμηλές θερμοκρασίες (-2°C και 4°C) και έλεγχος της ικανότητας αναβλάστησής τους. Η ζωτικότητα των εκφύτων, μάλλον, δεν επηρεάστηκε από

τη θερμοκρασία και το χρόνο αποθήκευσης αλλά τα έκφυτα δεν κατάφεραν να εξέλθουν από τα καψίδια, όταν τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα με σκοπό την αναβλάστησή τους. Αντιθέτως, τα έκφυτα των καψιδίων που κόπηκαν ημιτελώς, πριν τη φύτευσή τους στο υπόστρωμα, βλάστησαν σε ποσοστό περίπου 40%.

Τέλος, έγινε προσπάθεια μικροεμβολιασμού (micrografting) σπορόφυτων του *Citrus volkameriana* με έκφυτα (εμβόλια) του ίδιου είδους και του *Citrus aurantium*. Τα ποσοστά επιτυχίας του μικροεμβολιασμού ήταν 70% με τα εμβόλια του *Citrus volkameriana* και 60% με τα εμβόλια του *Citrus aurantium* ενώ το ποσοστό επιβίωσης, και στις δύο περιπτώσεις, μετά τον εγκλιματισμό των εμβολιασμένων φυταρίων σε μονάδα υδρονέφωσης ήταν 60%.

Λέξεις κλειδιά: *Citrus aurantium*, *Citrus volkameriana*, *in vitro*, DKW, κυτοκινίνες, αυξίνες, μήκος κύματος φωτός, αναλογία σακχάρων, εγκλεισμός, μικροεμβολιασμός.

ABSTRACT

The main purpose of this study was to evaluate the effect of cytokinins 6-benzylaminopurine (BA), 2-isopentenyladenine (2iP), kinetin (KIN), thidiazuron (TDZ) and forchlorfenuron (FCF or CPPU) at various concentrations on the shoot characteristics, using as explants nodal segments derived from *Citrus aurantium* and *Citrus volkameriana* seedlings cultured *in vitro* in DKW media. Furthermore the effect of exposing the explants to different light wavelength and changing the sugars ratio of the substrate on these characteristics was investigated. At rooting stage, the influence of auxins indolebutyric acid (IBA) and α -naphthaleneacetic acid (NAA), alone or in combination, on the rooting percentage and root characteristics was evaluated as well.

The results showed that BA, regardless of concentration, led to the highest shoot number, shoot length and node number in *Citrus aurantium*. Similar results showed FCF as regards the shoot number. On the other hand TDZ led to the lowest shoot length in both species. However gave the highest shoot and node number in *Citrus volkameriana* but shoots were morphologically abnormal.

Both the number and the length of the shoots were not affected by the exposure to different light wavelength. However, the explants had the tendency to form more shoots under the exposure of blue light and less shoots under the exposure of green light. Node number per explant was significantly reduced by the effect of green light in *Citrus volkameriana* while blue and white light led to higher number. None of shoot characteristics in *Citrus aurantium* were affected by the new sugars ratio of the media while in *Citrus volkameriana* the shoot length was negatively affected.

The two highest rooting percentages 75% in *Citrus aurantium* and 100% in *Citrus volkameriana* were observed with the application of 1ppm NAA and the combination of IBA+NAA (4ppm) respectively. Generally the explants formed higher number of roots in the presence of NAA while formed longer roots in the presence of only IBA. The survival rates after acclimatization of the plantlets under mist were 85% in *Citrus volkameriana* and 65% in *Citrus aurantium*.

A secondary aim of the present study was to examine the encapsulation of both species explants and to evaluate the influence of a short time storage at different cold temperatures (-2°C and 4°C) on their viability and regrowth. The viability was not negatively affected by the temperature and the storage time but the explants did not manage to get out of the capsules after their placement in the media in order to regrowth. On the contrary, when the capsules were slightly cut with lancet before their placement in the media the regrowth percentage was about 40%.

At the same time a micrografting experiment was conducted using *Citrus volkameriana* seedlings as rootstock and shoot tips of both species as scions. Grafting success rate was 70% with *Citrus volkameriana* scions and 60% with *Citrus aurantium* scions while the survival rate, in both cases, after acclimatization of the grafted plantlets under mist was 60%.

Key words: *Citrus aurantium*, *Citrus volkameriana*, *in vitro*, DKW, cytokinins, auxins, light wavelength, sugars ratio, encapsulation, micrografting.

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ θερμά τον Αναπληρωτή Καθηγητή κύριο Πέτρο Ρούσσο για την ανάθεση της μεταπτυχιακής μελέτης και την καθοδήγηση κατά την εκπόνηση και συγγραφή της. Ευχαριστώ, επίσης, τους υπόλοιπους Καθηγητές του Εργαστηρίου Δενδροκομίας και ιδιαίτερα τον Επίκουρο Καθηγητή κύριο Ιωάννη Παπαδάκη για τις γενικότερες συμβουλές του. Τέλος, ευχαριστώ τους μεταπτυχιακούς φοιτητές και υποψήφιους διδάκτορες του Εργαστηρίου για τη συνεργασία μας, κατά την διεξαγωγή του πειράματος.

*Στην οικογένειά μου
που με μεγάλωσε
στηριζόμενη στην αγροτική παραγωγή*

Πίνακας περιεχομένων

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	3
1.1 Καταγωγή-Εξάπλωση Εσπεριδοειδών	3
1.2 Βοτανική Ταξινόμηση Εσπεριδοειδών	4
1.3 Πολλαπλασιασμός Εσπεριδοειδών.....	4
1.3.1 Πολλαπλασιασμός με σπόρο	5
1.3.2 Πολλαπλασιασμός με μοσχεύματα	5
1.3.3 Εμβολιασμός	6
1.4 Υποκείμενα Εσπεριδοειδών	6
1.4.1 Νεραντζιά (<i>Citrus aurantium</i>).....	7
1.4.2 <i>Citrus volkameriana</i>	7
1.5 Μικροπολλαπλασιασμός Εσπεριδοειδών.....	8
1.5.1 Πλεονεκτήματα μικροπολλαπλασιασμού.....	8
1.5.2 Στάδια μικροπολλαπλασιασμού	9
1.5.3 Παράγοντες που επηρεάζουν τον μικροπολλαπλασιασμό	10
1.5.4 Οργανογένεση	16
1.6 Ανασκόπηση βιβλιογραφίας	17
1.7 Σκοπός του πειράματος.....	20
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	21
2.1 Εισαγωγή	21
2.2 Παρασκευή υποστρώματος	21
2.3 Προετοιμασία φυτικού υλικού	23
2.3.1 Συλλογή και φύτευση σπόρων.....	23
2.3.2 Ανάπτυξη σπορόφυτων και παραλαβή εκφύτων	23
2.4 Επεμβάσεις.....	24
2.5 Στατιστική ανάλυση.....	28
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	29
3.1 <i>Citrus aurantium</i> (Νεραντζιά).....	29
3.2 <i>Citrus volkameriana</i>	44
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	59
4.1 Επίδραση των κυτοκινινών στα χαρακτηριστικά των βλαστών.....	59

4.2 Επίδραση του διαφορετικού μήκους κύματος φωτός στα χαρακτηριστικά των βλαστών	62
4.3 Επίδραση της διαφορετικής αναλογίας σακχάρων στα χαρακτηριστικά των βλαστών ..	65
4.3 Επίδραση των αυξινών στη ριζοβολία (%) και στα χαρακτηριστικά των ριζών.....	67
5. ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΣΕ ΚΑΨΙΔΙΟ	69
5.1 Εισαγωγή	69
5.2 Υλικά & Μέθοδοι.....	70
5.3 Αποτελέσματα & Συζήτηση	71
6. ΜΙΚΡΟΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ	74
6.1 Εισαγωγή	74
6.2 Υλικά & Μέθοδοι.....	74
6.3 Αποτελέσματα	76
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	77

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Καταγωγή-Εξάπλωση Εσπεριδοειδών

Τα εσπεριδοειδή απαντώνται ως ιθαγενή φυτά στη Ν. Α. Ασία και ιδιαίτερα στο Ν. Βιετνάμ και στην Ν. Κίνα από το 2004 π.Χ. (Βασιλακάκης & Θεριός, 2006). Παρουσιάζουν, όμως, συγγενείς φυλογενετικές μορφές, που εκτείνονται μέχρι την κεντρική Κίνα, την Ιαπωνία, την Αυστραλία και την Αφρική (Ποντίκης, 2003).

Στο δυτικό ημισφαίριο ήταν άγνωστα μέχρι τον ερχομό του Κολόμβου, ο οποίος το 1482 μετέφερε σπόρους από πορτοκάλια και λεμόνια στη Β. Αμερική (Βασιλακάκης & Θεριός, 2006) ενώ κατά το δεύτερο ταξίδι του, το 1493, μετέφερε σπόρους από πορτοκάλια, λεμόνια και κίτρα στη νήσο Ταϊτή (Ποντίκης, 2003). Στην Ευρώπη μεταφέρθηκαν από τους Πορτογάλους τον 16^ο αιώνα (Βασιλακάκης & Θεριός, 2006) και το πρώτο γνωστό είδος ήταν η κιτριά (Ποντίκης, 2003).

Τα εσπεριδοειδή, αποδεδειγμένα, αποτελούν καλλιέργεια παγκόσμιου ενδιαφέροντος, αφού καλλιεργούνται σε περισσότερες από 100 χώρες (Αλγερία, Μαρόκο, Τυνησία, Ιταλία, Ισπανία, Ελλάδα, ΗΠΑ, Βραζιλία, Μεξικό, Αυστραλία, Κίνα, Ιαπωνία κ.α.) και σε όλες τις ηπείρους, όπου υπάρχουν κατάλληλες κλιματικές και εδαφολογικές συνθήκες (Βασιλακάκης & Θεριός, 2006).

Η κύρια ζώνη καλλιέργειάς τους (τροπική και υποτροπική) εκτείνεται 35^ο βόρεια και νότια του Ισημερινού. Υπάρχουν, όμως, περιοχές πέραν των 35^ο, όπου τα εσπεριδοειδή ευδοκίμουν, αναπτύσσονται και παράγουν ικανοποιητικά, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τις περιοχές της Μεσογείου και την Καλιφόρνια. Περιοριστικό παράγοντα σε αυτές τις περιοχές αποτελούν οι χαμηλές θερμοκρασίες του χειμώνα (Πρωτοπαπαδάκης, 2004).

Οι παραμεσόγειες χώρες καθώς και η Βόρεια και Κεντρική Αμερική κατέχουν περίπου το 80% της παγκόσμιας καλλιεργούμενης έκτασης ενώ το υπόλοιπο 20% κατανέμεται στην Άπω Ανατολή, στη Νότια Αμερική και σε άλλες χώρες του Νότιου ημισφαιρίου. Για κάθε είδος αντιστοιχούν κατά προσέγγιση τα εξής ποσοστά: πορτοκάλια 65%, λεμόνια 10%, γκρέιπφρουτ 10%, μανταρίνια 12%, λοιπά είδη 3% (Ποντίκης, 2003).

Στη χώρα μας, τα εσπεριδοειδή καλλιεργούνται σποραδικά σε αρκετούς νομούς (Αργολίδας, Λακωνίας, Άρτας, Χανίων, Ηλείας, κ.α.). Η έκτασή τους υπολογίζεται περίπου σε 500.000 στρέμματα ενώ παράγονται ετησίως περίπου 1.000.000 τόνοι καρπών. Μεταξύ των δενδροκομικών καλλιεργειών, κατέχουν τη δεύτερη θέση τόσο σε έκταση όσο και σε συνολική παραγωγή καρπών (<http://www.statistics.gr>).

1.2 Βοτανική Ταξινόμηση Εσπεριδοειδών

Τα εσπεριδοειδή ανήκουν στην οικογένεια Rutaceae, η οποία ανήκει στη διαίρεση Spermaphyta, στην υποδιαίρεση Angiosperme, στην κλάση Dicotyledoneae, στην τάξη Geraniales και στην υπόταξη Geraniineae, μαζί με άλλες έντεκα οικογένειες φυτών. Η οικογένεια Rutaceae ταξινομείται σε 7 υποοικογένειες, στη μία εκ των οποίων (Aurantioideae) υπάγεται το γένος *Citrus* και άλλα 32 συγγενή γένη (Ποντίκης, 2003).

Με την ταξινόμηση των εσπεριδοειδών ασχολήθηκαν, κυρίως, δύο επιστήμονες, ο T. Tanaka και ο W. T. Swingle. Το σύστημα που ακολουθεί ο πρώτος είναι αρκετά πολύπλοκο, οπότε το πιο αποδεκτό σύστημα βοτανικής ταξινόμησης τα τελευταία χρόνια είναι του W. T. Swingle (1943) (Βασιλακάκης & Θεριός, 2006).

Σύμφωνα μ' αυτό, το γένος *Citrus* χωρίζεται σε δύο υπογένη: το *Citrus* ή *Eucitrus* και το *Papeda*. Στο μεν πρώτο υπάγονται 10 είδη ενώ στο δεύτερο 6 είδη, τα οποία διακρίνονται εύκολα από τους χαρακτήρες των φύλλων, των ανθέων και των καρπών τους (Ποντίκης, 2003). Το υπογένος *Citrus* ή *Eucitrus* περιλαμβάνει όλα τα καλλιεργούμενα είδη, τα οποία χαρακτηρίζονται από εδώδιμο καρπό ή χυμό με γεύση γλυκιά ή υπόξινη και αρωματική, με χαρακτηριστική πικράδα ή μη. Το υπογένος *Papeda* περιλαμβάνει είδη με μη εδώδιμο καρπό, καθώς επίσης τα άνθη και οι καρποί τους είναι πολύ μικρού μεγέθους (Βασιλακάκης & Θεριός 2006).

1.3 Πολλαπλασιασμός Εσπεριδοειδών

Η σύγχρονη και επιτυχημένη καλλιέργεια των εσπεριδοειδών, όπως και πολλών άλλων οπορωφόρων δένδρων, στηρίζεται στον εμβολιασμό της επιθυμητής ποικιλίας στο κατάλληλο υποκείμενο. Τα υποκείμενα των εσπεριδοειδών επηρεάζουν θετικά τις εμβολιαζόμενες ποικιλίες, επιταχύνοντας την είσοδο των δένδρων σε καρποφορία, παρέχοντας ομοιόμορφο σχήμα και μέγεθος στην κόμη και αυξάνοντας τόσο την παραγωγή τους όσο και την ποιότητα των καρπών τους. Επιπλέον, είναι ανθεκτικά σε δυσμενείς συνθήκες του εδάφους (π.χ. παρουσία αλάτων, κακή στράγγιση, υψηλό pH, υψηλή περιεκτικότητα σε ανθρακικό ασβέστιο), στους νηματώδεις αλλά και σε διάφορες ιώσεις και μυκητολογικές ασθένειες (Ποντίκης, 2003). Στόχος, λοιπόν, του πολλαπλασιασμού είναι η μαζική παραγωγή υποκειμένων με επιθυμητά χαρακτηριστικά και ο εμβολιασμός τους με εμπορικού και διατροφικού ενδιαφέροντος ποικιλίες.

Τα εσπεριδοειδή μπορούν να πολλαπλασιαστούν είτε εγγενώς με σπόρο είτε αγενώς με φυλλοφόρα μοσχεύματα, πιο σπάνια με καταβολάδες και με ιστοκαλλιέργεια (μικροπολλαπλασιασμό), σε συνδυασμό με θερμοθεραπεία, στοχεύοντας και στην απαλλαγή

των φυτών από διάφορες ιώσεις (Βασιλακάκης & Θεριός, 2006). Η τελευταία μέθοδος θα αναλυθεί λεπτομερώς, σε ξεχωριστό κεφάλαιο, αφού αποτελεί το θέμα της παρούσας μελέτης. Τονίζεται, ότι οι μητρικές φυτείες τόσο για τη λήψη σπόρων όσο και μοσχευμάτων ή βλαστών προς ριζοβολία ή εμβολιασμό αντίστοιχα, πρέπει, να είναι υγιείς. Αυτό συνεπάγεται τη λήψη όλων των προληπτικών μέτρων που αποσκοπούν στην αποφυγή της μόλυνσής τους από ιώσεις και άλλα φυτοπαθογόνα καθώς και τη διεξαγωγή τακτικών φυτοϋγειονομικών ελέγχων.

1.3.1 Πολλαπλασιασμός με σπόρο

Τα δύο, ίσως, πιο πρακτικά πλεονεκτήματα του πολλαπλασιασμού με σπόρο είναι το χαμηλό κόστος και ο περιορισμός της διάδοσης ιών. Με τη μέθοδο, όμως, αυτή δεν αναπαράγεται πιστά η ποικιλία ή ο κλώνος που επιθυμούμε (Ρούσσο, 2009).

Ωστόσο, οι σπόροι των πιο πολλών εσπεριδοειδών, που χρησιμοποιούνται για την παραγωγή υποκειμένων χαρακτηρίζονται από υψηλό βαθμό πολυεμβρυονίας. Το ζυγωτικό σπορόφυτο είναι συνήθως αδύνατο. Τα υπόλοιπα, όμως, σπορόφυτα που προέρχονται από το νούκελλο και ονομάζονται νουκελλικά ή απογαμικά, έχουν τους ίδιους χαρακτήρες με το μητρικό φυτό. Επομένως, είναι ομοιόμορφα και δίνουν καλά υποκείμενα, αν οι σπόροι προέρχονται από μητρικό φυτό με επιθυμητούς χαρακτήρες. Τα νουκελλικά σπορόφυτα είναι ζωνρά, φέρουν αγκάθια και έχουν ορθόκλαδη βλάστηση, αλλά καθυστερούν να εισέλθουν σε καρποφορία, αν παραμείνουν ανεμβολίαστα (Ποντίκης, 2003).

Οι σπόροι των εσπεριδοειδών, μάλλον, στερούνται ληθάργου, αλλά χάνουν την βλαστική τους ικανότητα, αν ξηρανθούν. Γι' αυτό, πρέπει, να φυτεύονται αμέσως μόλις εξαχθούν από τους ώριμους καρπούς. Διαφορετικά, πρέπει, να διατηρηθούν σε συνθήκες υγρής ψύξης (-1° έως 4°C). Η σπορά γίνεται, συνήθως, την άνοιξη σε τελάρα (ενιαία ή με ατομικές θέσεις), σε ατομικές γλάστρες ή σακούλες και σπανιότερα απευθείας στο έδαφος, αφού προηγουμένως οι σπόροι έχουν απολυμανθεί με κάποιο μυκητοκτόνο. Αφού τα σπορόφυτα αποκτήσουν ικανοποιητικό μέγεθος (20-30cm) μεταφυτεύονται σε γλάστρες ή σακούλες (εκτός αν είχαν φυτευτεί εξαρχής) για να αναπτυχθούν και να εμβολιαστούν (Hartmann & Kester, 2002).

1.3.2 Πολλαπλασιασμός με μοσχεύματα

Ο πολλαπλασιασμός με φυλλοφόρα μοσχεύματα είναι η πιο διαδεδομένη πρακτική αγενούς πολλαπλασιασμού στον κόσμο. Όλα τα σύγχρονα φυτώρια διαθέτουν, πλέον, την τεχνογνωσία, ώστε να επιτυγχάνουν υψηλά ποσοστά πολλαπλασιασμού των ειδών με τα

οποία ασχολούνται. Η μέθοδος αυτή εξασφαλίζει την παραγωγή φυτών όμοιων με το μητρικό (Ρούσσο, 2009).

Τα μοσχεύματα λαμβάνονται από καλά ανεπτυγμένους βλαστούς τρέχουσας βλάστησης ή του παρελθόντος κύματος, έχουν μήκος συνήθως 8-15cm και 3-4 φύλλα. Η ριζοβολία τους επιτυγχάνεται σε κατάλληλο υπόστρωμα, σε μονάδα υδρονέφωσης και ως ορμόνες ριζοβολίας χρησιμοποιούνται οι αυξίνες. Οι κυριότερες είναι το ινδολοβουτυρικό οξύ (IBA), το α-ναφθαλινοξικό οξύ (α-NAA), το ινδολοξικό οξύ (IAA) καθώς και τα άλατά τους ενώ οι συγκεντρώσεις τους ποικίλουν από 500-5000ppm (Ρούσσο, 2009 ; Βασιλακάκης & Θερίος, 2006).

Η επιτυχία και ο χρόνος που απαιτείται για τη ριζοβολία των μοσχευμάτων εξαρτάται από πολλούς παράγοντες, όπως το είδος, η κατάσταση του μητρικού φυτού, οι συνθήκες κατά την παραμονή τους στην υδρονέφωση, το υπόστρωμα καθώς και το είδος και η συγκέντρωση της αυξίνης που χρησιμοποιήθηκε. Όταν ολοκληρωθεί η ριζοβολία, τα νεαρά, πλέον, φυτά μεταφυτεύονται σε γλάστρες ή σακούλες και αφού αποκτήσουν κατάλληλο μέγεθος εμβολιάζονται.

1.3.3 Εμβολιασμός

Τα περισσότερα φυτάρια, με εντατική φροντίδα, μπορούν, να αποκτήσουν το κατάλληλο πάχος βλαστού και να εμβολιαστούν την ίδια χρόνια (τέλη καλοκαιριού-φθινόπωρο). Ο πιο διαδεδομένη μέθοδος εμβολιασμού είναι αυτή του ασπιδιωτού ή T-ενοφθαλισμού. Μπορεί να χρησιμοποιηθεί, όμως, και ο ανεστραμμένος T-ενοφθαλισμός.

Επίσης, χρησιμοποιείται η μέθοδος του μικροενοφθαλισμού, όπου ένα πολύ μικρό τεμάχιο βλαστού της ποικιλίας, που φέρει τον οφθαλμό, εισάγεται κάτω από τον φλοιό του βλαστού του υποκειμένου. Τέλος, μια εναλλακτική μέθοδο αποτελεί ο εμβολιασμός μοσχευμάτων υποκειμένων με κάποιο είδος εγκεντρισμού, τοποθέτησή τους σε μονάδα υδρονέφωσης για ταυτόχρονη ριζοβολία και συγκόλληση και μεταφύτευσή τους, στη συνέχεια, σε γλάστρα ή σακούλα (Hartmann & Kester, 2002).

1.4 Υποκείμενα Εσπεριδοειδών

Οι καλλιεργητές εσπεριδοειδών έχουν, πλέον, στη διάθεσή τους μια μεγάλη γκάμα υποκειμένων, που παρήχθησαν τις τελευταίες δεκαετίες στα μεγάλα κέντρα καλλιέργειας εσπεριδοειδών. Έτσι, μπορούν, να επιλέξουν το κατάλληλο υποκείμενο, που θα ανταποκριθεί καλύτερα στις εδαφικές συνθήκες του εκάστοτε αγροτεμαχίου, θα παρουσιάζει αντοχή σε

ασθένειες, που είναι πιο διαδεδομένες και θα επιδράσει θετικά στην εμβολιαζόμενη ποικιλία (π.χ. αντοχή στο ψύχος, ζωηρότητα, πρωίμιση, ποιότητα καρπών).

Τα πιο γνωστά και ευρέως χρησιμοποιούμενα υποκείμενα με τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα που παρουσιάζουν είναι τα εξής: Πορτοκαλιά (*Citrus sinensis*), Νεραντζιά (*Citrus aurantium*), *Citrus volkameriana*, Τρίφυλλος Πορτοκαλιά (*Poncirus trifoliata*), Κλεοπάτρα (*Citrus reshni*), Citranges Troyer και Carrizo, Citrumelo swingle ή 4475, Citrumelo 1452 κ.α. (Ποντίκης, 2003 ; Πρωτοπαπαδάκης, 2008). Πιο λεπτομερής αναφορά θα γίνει στα υποκείμενα Νεραντζιά (*Citrus aurantium*) και *Citrus volkameriana* που χρησιμοποιήθηκαν στην παρούσα μελέτη.

1.4.1 Νεραντζιά (*Citrus aurantium*)

Η νεραντζιά έχει χρησιμοποιηθεί σαν υποκείμενο περισσότερο από κάθε άλλο, ποσοτικά και ιστορικά. Έχασε, όμως, την ηγεμονική της θέση εξαιτίας της ευαισθησίας της στην ίωση tristeza. Είναι ζωηρό υποκείμενο και αναπτύσσεται γρήγορα, ενώ παρουσιάζει καλή προσαρμογή σε διάφορους τύπους εδαφών. Είναι ανθεκτική στο ψύχος και στην ξηρασία, όπως, επίσης, στη φυτόφθορα και στα διάφορα ιοειδή (exocortis, cachexia κ.α.) (Πρωτοπαπαδάκης, 2008) ενώ παρουσιάζει ευαισθησία στους νηματώδεις.

Οι ποικιλίες που είναι εμβολιασμένες πάνω της είναι ευπαθείς στην κορυφοξήρα (Ποντίκης, 2003), δίνουν, ωστόσο, καλής ποιότητας καρπούς, πλούσιους σε σάκχαρα και βιταμίνη C. Οι συνδυασμοί της με ποικιλίες πορτοκαλιάς, γκρέιπφρουτ και μανταρινιάς είναι ευαίσθητοι στην tristeza, ενώ με ποικιλίες λεμονιάς είναι ανεκτικοί, γι' αυτό και στην Ισπανία χρησιμοποιείται ως υποκείμενο μόνο στις λεμονιές (Πρωτοπαπαδάκης, 2008).

1.4.2 *Citrus volkameriana*

Είναι, μάλλον, υβρίδιο μεταξύ λεμονιάς και νεραντζιάς (Βασιλακάκης & Θεριός, 2006) ή μεταξύ λεμονιάς και κιτριάς (Ποντίκης, 2003). Πολύ ζωηρό και παραγωγικό υποκείμενο. Οι καρποί των ποικιλιών που είναι εμβολιασμένες σε αυτό έχουν μειωμένα ποσοστά οξέων (Πρωτοπαπαδάκης, 2008). Είναι ανθεκτικό στην κορυφοξήρα (Ποντίκης, 2003), ανεκτικό στην tristeza και στα ιοειδή και, όπως και η νεραντζιά, ανεκτικό στα αλατούχα εδάφη ενώ αναπτύσσεται καλά και στα ασβεστούχα εδάφη. (Πρωτοπαπαδάκης, 2008). Είναι, όμως, ευαίσθητο υποκείμενο στους νηματώδεις (Βασιλακάκης & Θεριός, 2006).

Στην Ιταλία χρησιμοποιείται για τις λεμονιές, στο Ισραήλ για τα μανταρίνια Minneola και στην Κύπρο για όλα τα είδη εσπεριδοειδών. Στην Ελλάδα χρησιμοποιείται, κυρίως, για τις λεμονιές ενώ, τώρα, αρχίζει να χρησιμοποιείται και για τα πορτοκάλια Navelate και τα μανταρίνια Encore (Πρωτοπαπαδάκης, 2008).

1.5 Μικροπολλαπλασιασμός Εσπεριδοειδών

Η ιστοκαλλιέργεια (tissue culture), πεδίο της οποίας αποτελεί ο μικροπολλαπλασιασμός (micropropagation) ή *in vitro* πολλαπλασιασμός, είναι αναπόσπαστο κομμάτι της βιοτεχνολογίας φυτών και έχει, πλέον, καθιερωθεί ως η κατεξοχήν μέθοδος αγενούς αναπαραγωγής των φυτών, ιδιαίτερα των δενδρωδών και ανθοκομικών ειδών.

Με τα σημερινά δεδομένα, ως τεχνική *in vitro* χαρακτηρίζουμε οποιαδήποτε μέθοδο ή διαδικασία αναφέρεται στην αποκοπή κυττάρων, ιστών ή οργάνων από έναν οργανισμό και στη διατήρησή τους σε ένα τεχνητό περιβάλλον καλλιέργειας, όπου προσπαθούμε να ελέγξουμε τη φυσιολογική τους λειτουργία. Ο έλεγχος αυτός επιτυγχάνεται με εφαρμογή διαφόρων φυσικών μεθόδων (π.χ. τροποποίηση θερμοκρασίας, φωτισμού, σύστασης ατμόσφαιρας) και/ή με προσθήκη χημικών ουσιών (π.χ. θρεπτικών μέσων, ρυθμιστών αύξησης κ.α.).

Ο μικροπολλαπλασιασμός αποτελεί την κυριότερη πρακτική και εμπορική εφαρμογή της ιστοκαλλιέργειας φυτών και όπου είναι εφαρμόσιμος (τυπικό παράδειγμα τα ανθοκομικά φυτά), υπερέχει σε απόδοση έως και χιλιάδες φορές σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους. Σε μικρή κλίμακα παραγωγής και εφόσον υπάρχουν διαθέσιμα τα κατάλληλα πρωτόκολλα, χαρακτηρίζεται από μέτριο επίπεδο δυσκολίας ενώ αυτή αυξάνεται, όταν πρόκειται για είδη με χαμηλή απόκριση ή όταν επιθυμούμε παραγωγή σε μεγάλη κλίμακα.

Πρέπει να σημειωθεί, ότι η ιστοκαλλιέργεια και κατ' επέκταση ο *in vitro* πολλαπλασιασμός βασίζεται στην περίφημη αρχή της ολοδυναμίας (totipotency). Πρόκειται για την ικανότητα των φυτικών κυττάρων και ιστών να αναγεννούν, υπό κατάλληλες συνθήκες και κατάλληλους χειρισμούς, το φυτό, από το οποίο προήλθαν. Το τμήμα του φυτού που χρησιμοποιείται, ονομάζεται έκφυτο (explant) και μπορεί, να είναι οφθαλμός, κόμβος, επικοτύλιο, φύλλο, ρίζα, γυρεόκοκκος κ.α. Το γεγονός ότι σε εμπορικό επίπεδο παράγονται ετησίως περίπου ένα δισεκατομμύριο φυτά, μέσα από τη διεθνή δραστηριότητα περισσότερων των 600 εταιριών ιστοκαλλιέργειας, αποδεικνύει ότι ο μικροπολλαπλασιασμός αποτελεί τη σπουδαιότερη εφαρμογή της ολοδυναμίας στη γεωπονική πράξη (Κίντζιος, 2015).

1.5.1 Πλεονεκτήματα μικροπολλαπλασιασμού

Ο μικροπολλαπλασιασμός αποτελεί, πλέον, μία από τις σημαντικότερες μεθόδους αγενούς αναπαραγωγής πολλών ειδών σε εμπορικό επίπεδο. Τα πλεονεκτήματα που παρουσιάζει, έχουν αναφερθεί από πολλούς ερευνητές και μπορούν να συνοψιστούν ως εξής:

- i. **Μαζικός πολλαπλασιασμός** φυτών ή κλώνων, γενετικά όμοιων με το μητρικό φυτό και σε, σαφώς, μεγαλύτερο αριθμό σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους.
- ii. **Παραγωγή άνοσου και υγιούς φυτικού υλικού**, απαλλαγμένου, κυρίως, από ιώσεις και άλλα φυτοπαθογόνα με την καλλιέργεια μεριστωμάτων, την εφαρμογή θερμοθεραπείας και άλλων τεχνικών.
- iii. **Συνεχής παραγωγή** καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου, αφού η αναπαραγωγή των φυτών λαμβάνει χώρα σε εργαστήριο και θερμοκήπια με ελεγχόμενες συνθήκες.
- iv. **Διατήρηση γενετικού υλικού** (στην προκειμένη περίπτωση ιστών και οργάνων) για σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα με τη μέθοδο της κρυοδιατήρησης (Hartmann & Kester, 2002).

1.5.2 Στάδια μικροπολλαπλασιασμού

Η συνολική διαδικασία του μικροπολλαπλασιασμού, από το αρχικό στάδιο της επιλογής και παραλαβής των εκφύτων μέχρι τη μεταφορά των νεαρών φυτών σε συνθήκες θερμοκηπίου και στη συνέχεια στον αγρό, περιλαμβάνει τέσσερα, επιμέρους, βασικά στάδια:

- i. Στάδιο Εγκατάστασης (Establishment-Stage I)
- ii. Στάδιο Βλαστογένεσης (Multiplication ή Proliferation-Stage II)
- iii. Στάδιο Ριζοβολίας (Rooting-Stage III)
- iv. Στάδιο Εγκλιματισμού ή Σκληραγώγησης (Acclimatization ή Hardening off-Stage IV)

Το πρώτο στάδιο περιλαμβάνει την επιλογή και παραλαβή των εκφύτων από το μητρικό φυτό, την απολύμανσή τους και την τοποθέτησή τους σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα, εμπλουτισμένο, συνήθως, με κυτοκίνινες, με σκοπό την παραγωγή βλαστών. Στο επόμενο στάδιο, οι βλαστοί που παρήχθησαν, κόβονται και φυτεύονται, εκ νέου, σε καινούριο υπόστρωμα ίδιας, συνήθως, σύστασης, με σκοπό την περαιτέρω παραγωγή νέων βλαστών. Στο τρίτο στάδιο, οι βλαστοί κόβονται και φυτεύονται σε υπόστρωμα εμπλουτισμένο με αυξίνες έως ότου ριζοβολήσουν. Μπορεί, όμως, να δεχτούν μόνο την επαγωγή (ερέθισμα) για 5-10 ημέρες και να φυτευτούν, ως μικρο-μοσχεύματα, προς ριζοβολία σε μονάδα υδρονέφωσης.

Πολλές φορές, μεταξύ των σταδίων II και III παρεμβάλλεται ένα ακόμη στάδιο, αυτό της επιμήκυνσης (elongation). Σ' αυτό, οι βλαστοί φυτεύονται σε υπόστρωμα χωρίς κυτοκίνινες και εμπλουτισμένο με γιββερελλίνες ή ενεργό άνθρακα περίπου για 15 ημέρες, με

σκοπό την αύξηση του μήκους των βλαστών που προορίζονται για ριζοβολία. Επισημαίνεται, ότι στα τρία πρώτα στάδια όλες οι εργασίες γίνονται υπό ασηπτικές συνθήκες.

Στο τελευταίο στάδιο, τα ριζοβολημένα έκφυτα μεταφέρονται σε θερμοκήπιο με ελεγχόμενες συνθήκες, μεταφυτεύονται σε ατομικές θέσεις και προσαρμόζονται σταδιακά στις εξωτερικές συνθήκες (Hartmann & Kester, 2002 ; Kyte & Kleyn, 1999).

1.5.3 Παράγοντες που επηρεάζουν το μικροπολλαπλασιασμό

Η επιτυχία του μικροπολλαπλασιασμού εξαρτάται από πληθώρα παραγόντων, τους οποίους μπορούμε να ταξινομήσουμε σε τρεις βασικές κατηγορίες:

- i. Παράγοντες που σχετίζονται με το **μητρικό φυτό**, όπως ο γονότυπος, η οικογένεια, το είδος και η ποικιλία.
- ii. Παράγοντες που σχετίζονται με το **έκφυτο**, όπως το είδος του εκφύτου, η θέση του πάνω στο μητρικό φυτό και η ηλικία του.
- iii. Παράγοντες που σχετίζονται με τις **συνθήκες της καλλιέργειας**, όπως το είδος του θρεπτικού υποστρώματος, οι ρυθμιστές αύξησης, το δοχείο καλλιέργειας και περιβαλλοντικές παράμετροι, όπως το φως και η θερμοκρασία επώασης της καλλιέργειας.

Μητρικό φυτό

Το μητρικό φυτό αποτελεί την πηγή των εκφύτων, τα οποία θα χρησιμοποιηθούν στην ιστοκαλλιέργεια και έτσι οι ιδιότητές του, μεταφερόμενες στα έκφυτα, επηρεάζουν σημαντικά την απόκριση αυτών στους διάφορους χειρισμούς μας. Η σπουδαιότερη επίδραση του μητρικού φυτού προέρχεται από τον γονότυπό του, δηλαδή το φυτικό είδος ή ακόμα και την ποικιλία. Σε γενικές γραμμές μπορούμε, να πούμε, ότι υπάρχουν οικογένειες φυτών, οι οποίες αντιδρούν πολύ καλύτερα στην ιστοκαλλιέργεια από άλλες.

Οι συνθήκες ανάπτυξης του μητρικού φυτού μπορούν, να επηρεάσουν άμεσα ή έμμεσα την επιτυχία της ιστοκαλλιέργειας. Εξαιρετικής σημασίας είναι η φυσιολογική κατάσταση και υγεία του μητρικού φυτού. Φυτά ηλικιωμένα ή προσβεβλημένα από διάφορα φυτοπαθογόνα θα δώσουν, πιθανότατα, έκφυτα με σημαντικά χαμηλότερη απόκριση απ' ό,τι νέα και υγιή φυτά. Σημαντική είναι, επίσης, η εποχή του χρόνου, επηρεάζοντας το μικροβιακό φορτίο των φυτών, το οποίο είναι αυξημένο το καλοκαίρι (λόγω υψηλών θερμοκρασιών), με αποτέλεσμα να πρέπει, να γίνεται ισχυρότερη επιφανειακή απολύμανση των εκφύτων πριν καλλιεργηθούν *in vitro* (Κίντζιος, 2015).

Έκφυτο

Η επίδραση που ασκεί το είδος του εκφύτου (οφθαλμός, κόμβος, επικοτύλιο, φύλλο, ρίζα, γυρεόκοκκος κ.α.) στην επιτυχία του μικροπολλαπλασιασμού έγκειται στο γεγονός, ότι διαφορετικοί φυτικοί ιστοί περιέχουν διάφορα είδη κυττάρων σε διαφορετική αναλογία. Η δυνατότητα απόκρισης ενός εκφύτου στην ιστοκαλλιέργεια, εκτός από τους γενετικούς παράγοντες, καθορίζεται από τη σχετική αναλογία μεριστωματικών και μεσοφυλλικών κυττάρων. Όσο περισσότερα είναι τα μεριστωματικά κύτταρα τόσο μεγαλύτερη είναι και η πιθανότητα να αντιδράσει το έκφυτο στους χειρισμούς. Επομένως, ιστοί με μεγαλύτερη συγκέντρωση μεριστωματικών κυττάρων, όπως τα κορυφαία μεριστώματα και οι οφθαλμοί, είναι δεκτικότεροι στην ιστοκαλλιέργεια από τα φύλλα και τους βλαστούς, που περιέχουν κυρίως μεσοφυλλικά κύτταρα. Τη μικρότερη απόκριση, συνήθως, δείχνουν ιστοί με μικρή περιεκτικότητα τόσο σε μεριστωματικά όσο και σε μεσοφυλλικά κύτταρα, όπως οι ρίζες ενώ ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι σπόροι που, αν και περιέχουν το έμβρυο (μεριστωματικός ιστός), πολλές φορές δεν μπορούν, να αντιδράσουν στην ιστοκαλλιέργεια, λόγω του φαινομένου του λήθαργου.

Τέλος, σημαντική επίδραση ασκεί η σχετική θέση του εκφύτου πάνω στο μητρικό φυτό, γεγονός, που εξηγείται από τη διαβάθμιση της συγκέντρωσης ορμονικών και θρεπτικών παραγόντων κατά μήκος του άξονα τροφοδοσίας. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, το ίδιο είδος εκφύτου να παρουσιάζει διαφορετική προδιάθεση στην ιστοκαλλιέργεια, ανάλογα με τη αρχική του θέση στο μητρικό φυτό (Κίντζιος, 2015).

Συνθήκες Καλλιέργειας

α. Θρεπτικό υπόστρωμα

Το θρεπτικό υπόστρωμα αποτελεί το μέσο πάνω στο οποίο πραγματοποιείται η καλλιέργεια των εκφύτων. Για το λόγο αυτό, η σύστασή του πρέπει, να είναι τέτοια, ώστε αφενός να εξασφαλίζει την τροφοδοσία των εκφύτων με απαραίτητους, για την επιβίωσή τους, χημικούς παράγοντες και αφετέρου να κατευθύνει την κυτταρική διαφοροποίηση ανάλογα με τον επιδιωκόμενο σκοπό. Η επιλογή του εξαρτάται από το είδος του φυτού και του εκφύτου που καλλιεργείται, καθώς και από την κατεύθυνση της καλλιέργειας.

Αποτελείται, κυρίως, από νερό, μακροστοιχεία και ιχνοστοιχεία, βιταμίνες, αμινοξέα, ρυθμιστές αύξησης (ορμόνες), πηγές άνθρακα (συνήθως υδατάνθρακες), στερεοποιητικό παράγοντα (συνήθως άγαρ), σε περίπτωση καλλιέργειας σε στερεό υπόστρωμα και διάφορες πρόσθετες ουσίες γνωστής ή μη καθορισμένης σύστασης, όπως ενεργός άνθρακας ή χυμοί και εκχυλίσματα διάφορων καρπών.

Το **νερό** που χρησιμοποιείται για την παρασκευή μέσου καλλιέργειας, πρέπει, να είναι διπλά απεσταγμένο ή απιονισμένο και απεσταγμένο. Ιδιαίτερη προσοχή χρειάζεται στην περίπτωση της παρατεταμένης αποθήκευσής του.

Τα **μακροστοιχεία** (macronutrient elements) που προστίθενται στο θρεπτικό υπόστρωμα είναι το άζωτο, ο φώσφορος, το κάλιο, το ασβέστιο, το μαγνήσιο και το θείο ενώ τα **ιχνοστοιχεία** (trace elements) τα οποία χορηγούνται σε μικρές έως πολύ μικρές, σε σχέση με τα μακροστοιχεία, ποσότητες είναι ο σίδηρος, το μαγγάνιο, ο ψευδάργυρος, το βόριο, ο χαλκός, το μολυβδαίνιο, το κοβάλτιο και το χλώριο. Το pH του υποστρώματος ρυθμίζεται, συνήθως, σε μια ορισμένη τιμή μεταξύ 5,6-5,8. Οι περισσότεροι φυτικοί ιστοί αναπτύσσονται καλύτερα σε πλούσια θρεπτικά μέσα, όπως αυτό των Murashige και Skoog (MS). Μερικά από τα πιο γνωστά θρεπτικά υποστρώματα είναι τα MT, WPM, DKW, EME, B5 και WHITE.

Οι **βιταμίνες** δρουν ως βιοκαταλύτες σε πολλές μεταβολικές διεργασίες και η έλλειψή τους θεωρείται περιοριστικός παράγοντας για την οργανογένεση. Η προσθήκη τους στο μέσο καλλιέργειας κρίνεται απαραίτητη, καθώς οι ιστοί που καλλιεργούνται *in vitro* στερούνται της ικανότητας σύνθεσής τους. Οι συχνότερα χρησιμοποιούμενες βιταμίνες είναι η θειαμίνη (B1), το νικοτινικό οξύ και η πυριδοξίνη (B6). Το ασκορβικό οξύ (βιταμίνη C) χρησιμοποιείται, συνήθως, ως αντιοξειδωτικό για την αποφυγή μεταχρωματισμού των ιστών ορισμένων ειδών.

Αντιθέτως, τα απαραίτητα **αμινοξέα** μπορούν να συντεθούν από τους καλλιεργούμενους ιστούς. Παρόλα αυτά, η προσθήκη τους στο θρεπτικό υπόστρωμα προωθεί την ανάπτυξη και την επιμήκυνση των κυττάρων. Συνήθως, χρησιμοποιείται η γλυκίνη, η γλουταμίνη, η ασπαράγινη, η αδενίνη, το ασπαρτικό οξύ, το γλουταμινικό οξύ, η αργινίνη, καθώς και μείγματα αμινοξέων, όπως υδρολύομενη καζεΐνη.

Οι **ρυθμιστές αύξησης** είναι οργανικές ουσίες, οι οποίες δρουν σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις και διεγείρουν, τροποποιούν ή παρεμποδίζουν βιοχημικές ή φυσιολογικές διεργασίες των ιστών. Διακρίνονται σε αυξίνες (auxins), κυτοκινίνες (cytokinins), γιββερελλίνες (gibberellins), αμπσισικό οξύ (abscisic acid) και αιθυλένιο (ethylene). Η προσθήκη, κάποιων εξ αυτών, στο θρεπτικό μέσο, η συγκέντρωσή τους καθώς και οι μεταξύ τους αναλογίες είναι, ίσως, ο κυριότερος παράγοντας που προωθεί και κατευθύνει την οργανογένεση.

Οι **αυξίνες** έχουν πολύπλευρη δράση στις φυσιολογικές λειτουργίες των ιστών, συμβάλλοντας στον γενικότερο μεταβολισμό των κυττάρων. Κύρια δραστηριότητά τους είναι η επιμήκυνση των κυττάρων στους βλαστούς και στις ρίζες, αποτέλεσμα της ικανότητάς τους να συνθέτουν πρωτεΐνες και RNA. Το ινδολοξικό οξύ (IAA) είναι η ιδανική αυξίνη για χρήση στην ιστοκαλλιέργεια, λόγω του ευρέως φάσματος δράσης που παρουσιάζει. Ωστόσο, μειονεκτεί, διότι με την επίδραση του φωτός υποβιβάζεται η δραστηριότητά του. Οι αυξίνες που, συνήθως, χρησιμοποιούνται στην ιστοκαλλιέργεια είναι το ινδολοβουτυρικό οξύ (IBA)

που είναι συνθετική αυξίνη και διεγείρει ιδιαίτερα τη ριζογένεση, το α-ναφθαλινοξικό οξύ (NAA), επίσης συνθετική αυξίνη, που χρησιμοποιείται για την επαγωγή και την ανάπτυξη κάλου, όπως, επίσης, και το 2,4-διχλωροφαινοξικό οξύ (2,4-D).

Οι **κυτοκινίνες** ενισχύουν τις κυτταροδιαίρεσεις και τη βλαστογένεση, ενώ ανταγωνίζονται τη ριζογένεση. Σε συνδυασμό με το IAA αποτελούν θεμελιώδεις παράγοντες της οργανογένεσης σε καλλιέργειες φυτικών ιστών και επηρεάζουν τις διεργασίες διαφοροποίησης οργάνων και ιστών. Στην ιστοκαλλιέργεια, συνήθως, χρησιμοποιείται η κινετίνη (KIN), η βενζυλαδεσνίνη (BA), η 2-ισοπεντενυλαδεσνίνη (2iP) και η ζεατίνη (ZEA) ενώ σε μικρότερο βαθμό έχουν χρησιμοποιηθεί η meta-topolin, το thidiazuron (TDZ) και το forchlorfenuron (FCF ή CPPU).

Οι **γιββερελλίνες** είναι ρυθμιστές ανάπτυξης που εμπλέκονται σε αρκετές φυσιολογικές λειτουργίες των οργάνων και των ιστών. Δε χρησιμοποιούνται, όμως, τόσο συχνά στην ιστοκαλλιέργεια, διότι παρεμποδίζουν την οργανογένεση και ιδίως τη ριζογένεση. Συνήθως, προστίθενται στο μέσο καλλιέργειας στο στάδιο της βλαστογένεσης, με σκοπό την αύξηση του μήκους των βλαστών. Η συχνότερα χρησιμοποιούμενη γιββερελλίνη είναι το γιββεριλλικό οξύ (GA_3).

Τέλος, το **αιθυλένιο** (C_2H_4) και το **αμπσιικό οξύ** (ABA) δε χρησιμοποιούνται ιδιαίτερα συχνά (έως καθόλου), διότι δεν έχουν δείξει να έχουν, γενικά, αξιόλογη θετική επίδραση στην ιστοκαλλιέργεια, παρά μόνο σε ελάχιστες περιπτώσεις. Θεωρούνται «καταστροφικοί» παράγοντες και για το λόγο αυτό, όχι μόνο δεν προστίθενται εξωγενώς, αλλά στόχος είναι η απομάκρυνσή τους (π.χ. αιθυλένιο) από τις *in vitro* καλλιέργειες. (Κίντζιος, 2015).

Τα καλλιεργούμενα κύτταρα, τουλάχιστον στην αρχική φάση της ιστοκαλλιέργειας, δεν έχουν την ικανότητα να φωτοσυνθέτουν και, κατά συνέπεια, να παράγουν **υδατάνθρακες** τους οποίους χρησιμοποιούν ως πηγή ενέργειας. Επομένως, η προσθήκη υδατανθράκων στο θρεπτικό μέσο κρίνεται απαραίτητη. Ως κύρια πηγή υδατανθράκων χρησιμοποιείται η σακχαρόζη ενώ η γλυκόζη χρησιμοποιείται σε λίγα μόνο είδη, όπου δίνει, με διαφορά, καλύτερα αποτελέσματα από την σακχαρόζη, συνυπολογίζοντας και την ακριβότερη τιμή της. Αρκετοί ερευνητές έχουν πειραματιστεί και με άλλους υδατάνθρακες (μονοσακχαρίτες, δισακχαρίτες, αλκοολοσάκχαρα κ.α.) (Κίντζιος, 2015 ; George *et al.*, 2008).

Η καλλιέργεια των ιστών μπορεί, να πραγματοποιηθεί σε υγρό ή στερεό υπόστρωμα. Το υγρό υπόστρωμα χρησιμοποιείται, κυρίως, για την ελεγχόμενη καλλιέργεια σε βιοαντιδραστήρες. Πιο σύνηθες, βέβαια, είναι το στερεό υπόστρωμα, για την στερεοποίηση του οποίου χρησιμοποιούνται διάφορες ουσίες φυσικής ή τεχνητής προέλευσης, που ονομάζονται **στερεοποιητές**. Κύριος στερεοποιητής φυσικής προέλευσης είναι το άγαρ, η χρήση του οποίου προτιμάται έναντι των άλλων, λόγω των πλεονεκτημάτων που

παρουσιάζει. Ως υποκατάστατα του άγαρ έχουν χρησιμοποιηθεί, πιο σπάνια, το πολυμερές άμυλο, το gerlite, η πολυμερής σακχαρόζη και η ζελατίνη.

Ο ενεργός άνθρακας έχει θετική επίδραση σε ορισμένες καλλιέργειες, γεγονός που οφείλεται στη δυνατότητά του να απορροφά από το υπόστρωμα καλλιέργειας παρεμποδιστικές ενώσεις ή μολύσματα, όπως τα τοξικά φαινολικά παράγωγα, τα οποία εκκρίνονται από τους φυτικούς ιστούς και παρεμποδίζουν την αύξηση των κυττάρων. Φαίνεται, να έχει, επίσης, τη δυνατότητα να απορροφά τις εξωγενώς προστιθέμενες ορμόνες KIN, BA, 2iP, IAA, NAA. Ιδιαίτερη σημασία για το θετικό ή όχι αποτέλεσμα έχει ο τύπος του ενεργού άνθρακα που χρησιμοποιείται, τα χαρακτηριστικά απορροφητικότητας του οποίου εξαρτώνται από τη διαδικασία παρασκευής του (Κίντζιος, 2015).

β. Θερμοκρασία και υγρασία

Τα φυτά, στο φυσικό τους περιβάλλον, αντιμετωπίζουν θερμοκρασιακές διακυμάνσεις μεταξύ ημέρας και νύχτας. Το γεγονός αυτό, όμως, δεν καθιστά απαραίτητη την προσομοίωση αυτή κατά τη διάρκεια της ιστοκαλλιέργειας, γι' αυτό η συνήθης πρακτική των περισσότερων εργαστηρίων είναι να διατηρούν την ίδια θερμοκρασία μεταξύ ημέρας και νύχτας. Οι θερμοκρασίες που εφαρμόζονται, συνήθως, είναι 17-32°C, ανάλογα με το είδος του φυτού που καλλιεργείται (π.χ. για τα *Citrus* 25°C).

Έχει παρατηρηθεί, σε αρκετές περιπτώσεις, ότι η τυχαία οργανογένεση επηρεάζεται από το εφαρμοζόμενο εύρος θερμοκρασιών, ωστόσο τα αποτελέσματα μεταξύ των ειδών ποικίλουν. Για παράδειγμα, σε μερικά είδη η επαγωγή και ο σχηματισμός τυχαίων οφθαλμών ευνοείται από υψηλότερες θερμοκρασίες σε σχέση με αυτές που απαιτούνται για την ανάπτυξη των βλαστών ενώ σε άλλα είδη όχι. Επίσης, μερικά είδη απαιτούν μικρότερες θερμοκρασίες για την επαγωγή και τον σχηματισμό ριζών σε σχέση με αυτές που εφαρμόζονται στο στάδιο της βλαστογένεσης ενώ άλλα είδη υψηλότερες. Εν τούτοις, η εφαρμογή διαφορετικών θερμοκρασιών στα διάφορα στάδια της ιστοκαλλιέργειας, συμπεριλαμβανόμενου και του ενδεχόμενου επαυξημένου κόστους (λόγω εξοπλισμού, ειδικής διαρρύθμισης χώρου και διαχείρισης), καθίσταται πρακτικά δύσκολη. Τέλος, το γεγονός ότι πολλά εργαστήρια αναπαράγουν διάφορα είδη φυτών με διαφορετικές θερμοκρασιακές απαιτήσεις, πολλές φορές, στο ίδιο χώρο, έχει οδηγήσει στην πρακτική διατήρησης μιας μέσης, ενιαίας και σταθερής θερμοκρασίας στους θαλάμους καλλιέργειας.

Η υγρασία εντός των δοχείων καλλιέργειας είναι ένας από τους σημαντικότερους παράγοντες που διασφαλίζουν την επιβίωση των εκφύτων και την επιτυχία της ιστοκαλλιέργειας. Αν η θερμοκρασία του αέρα στους θαλάμους είναι ίση με αυτή του υποστρώματος και το δοχείο είναι καλά κλεισμένο, τότε, θεωρητικά, η σχετική υγρασία εντός του δοχείου θα είναι 98-99,5%, ποσοστό που αποτρέπει την αφυδάτωση των εκφύτων. Το

ποσοστό της σχετικής υγρασίας που συνιστάται για τους θαλάμους καλλιέργειας είναι 70% (George *et al.*, 2008).

γ. Συνθήκες φωτισμού

Η διάρκεια, η ένταση και το μήκος κύματος του φωτός επιδρούν έντονα σε όλα τα στάδια της ιστοκαλλιέργειας με διαφορετικό τρόπο. Για την παροχή φωτός στους θαλάμους καλλιέργειας χρησιμοποιούνται, συνήθως, λάμπες φθορισμού οι οποίες παράγουν ικανοποιητική ποσότητα φωτός, χωρίς ταυτόχρονα να θερμαίνουν υπερβολικά το χώρο και να αυξάνουν έτσι το κόστος διατήρησης της θερμοκρασίας. Χρησιμοποιούνται, βέβαια, πολλοί τύποι λαμπτήρων ο καθένας με τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα που παρουσιάζει.

Όσον αφορά τη φωτοπερίοδο, υπάρχει η παραδοχή, για πολλά είδη, ότι η βλαστική τους ανάπτυξη, καθώς και, αρκετές φορές, η οργανογένεση ευνοείται από τη μεγάλη διάρκεια φωτός στους θαλάμους καλλιέργειας. Επίσης, τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των βλαστών και των φύλλων είναι καλύτερα υπό αυτές τις συνθήκες, χωρίς όμως, να μην υπάρχουν και οι εξαιρέσεις. Συνήθως, εφαρμόζεται φωτοπερίοδος 16 ωρών.

Η επίδραση της έντασης του φωτός διαφέρει μεταξύ των ειδών. Υπάρχουν οικογένειες και γένη φυτών, των οποίων η βλαστογένεση ευνοείται από υψηλές εντάσεις ενώ κάποια είδη είναι ευαίσθητα σε αυτές. Ένα άριστο επίπεδο φωτεινότητας για πολλά είδη φυτών θεωρείται αυτό των 1000 lux.

Έχει αποδειχθεί ότι συγκεκριμένα μήκη κύματος φωτός μπορούν, να προκαλέσουν μορφογενετικές και βιοχημικές αντιδράσεις παρόμοιες ή αντίθετες με αυτές των κυτοκινινών, σε μεγάλο αριθμό διαφορετικών φυτικών ειδών. Υπάρχει, μάλιστα, η υπόθεση ότι το κόκκινο φως επιδρά θετικά στο στάδιο της βλαστογένεσης υπό την προϋπόθεση ύπαρξης κυτοκινίνης, σε μικρή συγκέντρωση, στο θρεπτικό υπόστρωμα. Σε περίπτωση μεγαλύτερης συγκέντρωσης, δρα μάλλον ανασταλτικά. Επιπλέον, το μπλε χρώμα φαίνεται να έχει αρνητική επίδραση στη βιοσύνθεση των κυτοκινινών και κατ' επέκταση στη παραγωγή βλαστών. Με την προσθήκη, όμως, κυτοκινίνης στο μέσο καλλιέργειας η επίδραση αυτή αναιρείται. Το φαινόμενο αυτό, βέβαια, χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση λόγω της πολυπλοκότητας που παρουσιάζει (George *et al.*, 2008).

1.5.4 Οργανογένεση

Κάτω από την επίδραση συγκεκριμένων ερεθισμάτων, όπως, για παράδειγμα, την προσθήκη χημικών ουσιών, τα κύτταρα που καλλιεργούνται *in vitro* μπορούν, να αποκτήσουν μια συγκεκριμένη δομή και λειτουργία η οποία μπορεί, να διαφέρει εντελώς από την αρχική. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται διαφοροποίηση (differentiation). Υπάρχει, όμως, και η περίπτωση τα κύτταρα να χάσουν τον εξειδικευμένο χαρακτήρα τους και να μετατραπούν σε κύτταρα χωρίς συγκεκριμένη λειτουργία, να εισέλθουν, δηλαδή, σε φάση αποδιαφοροποίησης (dedifferentiation). Το σύνολο των φυτικών κυττάρων που έχουν αποδιαφοροποιηθεί, σχηματίζουν μια μορφολογικά διακριτή μάζα, η οποία είναι γνωστή ως κάλος (callus). Στην περίπτωση κατά την οποία αποδιαφοροποιημένα κύτταρα αρχίσουν να διαφοροποιούνται ξανά, η διαδικασία ονομάζεται επαναδιαφοροποίηση (redifferentiation).

Η οργανογένεση (organogenesis) είναι η διαδικασία, η οποία οδηγεί στο σχηματισμό καταβολών οργάνων πάνω στα καλλιεργούμενα έκφυτα. Τα όργανα αυτά μπορεί, να ανήκουν σε διαφορετικές κατηγορίες, οπότε η οργανογένεση διακρίνεται, ανάλογα με τον τύπο του παραγόμενου οργάνου, σε βλαστογένεση, ριζογένεση, οφθαλμογένεση κ.α. Η οργανογένεση, επίσης, συχνά αναφέρεται και ως τυχαία ή επίκτητη οργανογένεση (adventitious organogenesis), επειδή μπορούν, να σχηματιστούν καταβολές οργάνων σε άσχετα από αυτές έκφυτα (π.χ. ριζικές καταβολές σε φύλλα). Τα σχηματιζόμενα όργανα θεωρούνται μονοπολικές μορφολογικές δομές, επειδή δε μπορούν, να εξελιχθούν άμεσα σε ολόκληρα φυτά. Για παράδειγμα, παραγόμενοι *in vitro* βλαστοί πρέπει, να καλλιεργηθούν ξανά, ώστε να σχηματίσουν και ρίζες. Με τον τρόπο αυτό, η τυχαία οργανογένεση διακρίνεται, σαφώς, από τη σωματική εμβρυογένεση, όπου η βλάστηση των εμβρύων δίνει ολοκληρωμένα φυτά διπολικής δομής με ταυτόχρονο σχηματισμό βλαστών και ριζών.

Η οργανογένεση διακρίνεται σε άμεση και έμμεση, ανάλογα με το εάν λαμβάνει χώρα σε διαφοροποιημένο ή αποδιαφοροποιημένο ιστό (κάλο). Κατά την άμεση οργανογένεση ο σχηματισμός του νέου οργάνου αρχίζει από επιδερμικά ή υποδερμικά παρεγχυματικά κύτταρα, από τα οποία προκύπτει το μεριστωματοειδές, δηλαδή μια ομάδα ταχέως διαιρούμενων κυττάρων που μοιάζουν με μεριστωματικά. Όλη η διαδικασία βρίσκεται υπό τον άμεσο έλεγχο των ρυθμιστών αύξησης, καθοριστικής, όμως, σημασίας παράγοντες είναι οι συνθήκες φωτισμού και η σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος.

Οι δύο κύριες κατηγορίες ορμονών που εμπλέκονται στην οργανογένεση είναι οι κυτοκινίνες και οι αυξίνες, η μορφογενετική επίδραση των οποίων καθορίζεται σε μεγάλο βαθμό τόσο από τη συγκέντρωσή τους όσο και από την μεταξύ τους αναλογία. Με την παραδοχή, ότι μικρή συγκέντρωση φυτορρυθμιστικής ουσίας θεωρείται αυτή κάτω των 10 μΜ, οι αυξίνες σε μικρή συγκέντρωση προωθούν τη διαφοροποίηση των ιστών προς σχηματισμό ριζών ενώ σε μεγάλη συγκέντρωση προωθούν την αποδιαφοροποίηση των ιστών

προς σχηματισμό κάλου. Αντιθέτως, οι κυτοκινίνες σε μικρή συγκέντρωση προωθούν τόσο την αποδιαφοροποίηση των ιστών προς σχηματισμό κάλου όσο και τη διαφοροποίηση των ιστών προς σχηματισμό βλαστών ενώ σε μεγάλη συγκέντρωση προωθούν μόνο τη διαφοροποίηση των ιστών προς σχηματισμό βλαστών.

Όσον αφορά στην αναλογία μεταξύ τους, όταν η αναλογία αυξίνης προς κυτοκινίνη είναι υψηλή προωθείται η επαγωγή κάλλου ή ρίζας, ενώ όταν είναι χαμηλή η παραγωγή πλευρικών βλαστών. Γενικότερα, όταν ο λόγος αυξίνης προς κυτοκινίνη είναι μεγαλύτερος της μονάδας ευνοείται η ριζογένεση, όταν είναι μικρότερος ευνοείται η βλαστογένεση ενώ όταν είναι, περίπου, ίσος με την μονάδα ευνοείται η καλλογένεση.

Τέλος, πρέπει να τονιστεί, ότι η βιοσύνθεση των διάφορων ρυθμιστών αύξησης είναι άμεσα αλληλοεξαρτημένη, καθώς οι κυτοκινίνες προωθούν τη βιοσύνθεση των αυξινών αλλά οι παραγόμενες αυξίνες παρεμποδίζουν τη βιοσύνθεση των κυτοκινινών (μειώνοντας έτσι τελικά και τη δική τους βιοσύνθεση). Με τον ίδιο ακριβώς τρόπο, οι αυξίνες προωθούν τη βιοσύνθεση του αιθυλενίου, το οποίο στη συνέχεια παρεμποδίζει τη δική τους ενώ μπορούν, επίσης, να προωθήσουν τη βιοσύνθεση του γιββερελλικού οξέος (Κίντζιος, 2015).

1.6 Ανασκόπηση βιβλιογραφίας

Ο μικροπολλαπλασιασμός των εσπεριδοειδών έχει μελετηθεί αρκετά, αφού, τουλάχιστον τα τελευταία 30 χρόνια, έχει δημοσιευτεί ένας αξιοσημείωτος αριθμός ερευνών, που αφορούν στην οργανογένεση αλλά και στη σωματική εμβρυογένεση πολλών ειδών, ποικιλιών, καθώς και υποκειμένων του γένους *Citrus*. Οι Murashige *et al.* (1972) ήταν οι πρώτοι που ασχολήθηκαν με το μικροπολλαπλασιασμό των εσπεριδοειδών και προσπάθησαν να αναπτύξουν τεχνικές για την παραγωγή υγιών φυτών, με σκοπό τη μείωση των οικονομικών απωλειών, τις οποίες προκαλούσαν ιώσεις και ιοειδή.

Στα περισσότερα πειράματα άμεσης οργανογένεσης, που αφορούν στο γένος *Citrus*, έχει χρησιμοποιηθεί ως υπόστρωμα το MS ή το MT ενώ οι αναφορές για τη χρήση του DKW είναι ελάχιστες, για παράδειγμα των Kotsias & Roussos (2001) και Perez-Tornero *et al.* (2010). Η επικρατέστερη αξιολογηθείσα κυτοκινίνη στο στάδιο της βλαστογένεσης είναι η BA και ακολουθεί η KIN ενώ λίγες είναι οι αναφορές για την αξιολόγηση της TDZ και της FCF (CPPU). Από την ομάδα των αυξινών, έχουν χρησιμοποιηθεί στο στάδιο της ριζοβολίας περισσότερο το NAA και το IBA και λιγότερο το IAA. Το NAA έχει αξιολογηθεί από αρκετούς ερευνητές και στο στάδιο της βλαστογένεσης σε συνδυασμό, κυρίως, με τη BA. Τέλος, στο στάδιο της βλαστογένεσης έχει χρησιμοποιηθεί, επίσης, η γιββερελλίνη GA₃.

Από τις πρώτες επιτυχημένες προσπάθειες αναγέννησης φυτών, χρησιμοποιώντας τις ορμόνες BA και NAA σε διάφορες αναλογίες, είναι αυτές των Chaturvedi & Mitra (1974)

στο *Citrus grandis*, των Barlass & Skene (1982) στα *Citrus reshni*, *Citrus sinensis*, *Poncirus trifoliata*, Carrizo Citrange και Rangpur Lime και των Edriss & Burger (1984) στο Troyer Citrange.

Οι Duran-Vila et al. (1989) αξιολογώντας, σε υπόστρωμα MS, την επίδραση της BA και του NAA στη βλαστογένεση και στη ριζοβολία αντίστοιχα, σε 3 είδη εσπεριδοειδών, αναφέρουν, ότι οι άριστες συγκεντρώσεις της BA είναι 3ppm για τα είδη *Citrus sinensis* και *Citrus medica* και 1ppm για το *Citrus aurantifolia*. Ως προς τη ριζοβολία, το καλύτερο αποτέλεσμα έδωσε η συγκέντρωση 10ppm NAA στα *Citrus sinensis* και *Citrus aurantifolia* και 3ppm στο *Citrus medica*. Οι Can et al. (1992) αναφέρουν, ότι σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με 2ppm BA (με ή χωρίς 4ppm GA₃) παρατηρήθηκε ο μέγιστος αριθμός βλαστών στα έκφυτα (επικοτύλια) του *Citrus aurantium* ενώ η ριζοβολία επιτεύχθηκε με το συνδυασμό 1ppm IBA+NAA. Ανάλογα πειράματα με τα παραπάνω έχουν πραγματοποιηθεί, κατά τους Parthasarathy et al. (1998), σε 33 είδη του γένους *Citrus* (Mohan Jain & Ishii, 2003).

Οι αναφορές που υπάρχουν για την FCF στο γένος *Citrus* αφορούν, κυρίως, σε πειράματα σωματικής εμβρυογένεσης, όπως αυτά των Siragusa et al. (2007), Fiore et al. (2002) κ.α. Η μόνη, ίσως, αναφορά που υπάρχει για την άμεση οργανογένεση είναι αυτή των Roussos et al. (2011) οι οποίοι υποστηρίζουν, ότι η FCF μπορεί, να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά της BA, δίνοντας ανάλογα αποτελέσματα στα ποσοστά οργανογένεσης και στα χαρακτηριστικά των βλαστών στο *Citrus aurantium*.

Αρκετοί ερευνητές, όπως οι Almeida et al. (2002), Garcia-Luis et al. (2006), Duan et al. (2007), Tavano et al. (2009) κ.α. έχουν πειραματιστεί, επίσης, με την επίδραση που ασκεί το είδος του εκφύτου και ο τρόπος τοποθέτησής του στο υπόστρωμα (κάθετα ή οριζόντια), στο ποσοστό οργανογένεσης και στα χαρακτηριστικά των βλαστών. Ως έκφυτα έχουν χρησιμοποιηθεί μεριστώματα, τμήματα βλαστού με οφθαλμό, μεσογονάτια τμήματα, επικοτύλια, υποκοτύλια, τμήματα βλαστού σπορόφυτων, φύλλα σπορόφυτων κ.α.

Οι Tavano et al. (2009) χρησιμοποιώντας ως έκφυτα επικοτύλια, υποκοτύλια και μεσογονάτια τμήματα των ειδών *Citrus volkameriana* και *Citrus aurantium*, σε υπόστρωμα EME και BA σε διάφορες συγκεντρώσεις, παρατήρησαν, ότι τα υποκοτύλια έδωσαν, γενικά, μεγαλύτερα ποσοστά οργανογένεσης. Επιπλέον, τα επικοτύλια έδωσαν μεγαλύτερο ποσοστό οργανογένεσης και αριθμό βλαστών ανά έκφυτο σε σχέση με τα μεσογονάτια τμήματα, ανεξαρτήτως συγκέντρωσης της BA.

Μικρή μερίδα ερευνητών έχει πειραματιστεί με την αποτελεσματικότητα του τύπου των σακχάρων, ως πηγών άνθρακα, στην ιστοκαλλιέργεια του γένους *Citrus*. Οι περισσότερες αναφορές εντοπίζονται σε πειράματα σωματικής εμβρυογένεσης, όπως αυτό των Kochba et al. (1978) οι οποίοι αναφέρουν, ότι η γαλακτόζη μπορεί, να διεγείρει τη σωματική εμβρυογένεση στο είδος *Citrus sinensis* σε ανάλογο βαθμό με την σακχαρόζη (Mohan Jain &

Ishii, 2003). Παρόμοια πειράματα έχουν γίνει από τον Button (1978), τους Ricci *et al.* (2002) και άλλους ερευνητές, οι οποίοι συγκρίνουν διάφορους τύπους σακχάρων ως προς την αποτελεσματικότητά τους στην ανάπτυξη του κάλου στο σχηματισμό σωματικών εμβρύων στο γένους *Citrus*.

Οι Kitto & Young (1981), αξιολογώντας την επίδραση της συγκέντρωσης της σακχαρόζης, αναφέρουν, ότι ο αριθμός των εκπυσσόμενων βλαστών σε έκφυτα του Carrizo Citrange ήταν μεγαλύτερος, όταν αυτά καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα που περιείχε 30 ή 40g/L σακχαρόζη σε σχέση με αυτά που περιείχαν 50 ή 60g/L. Παρόμοια αποτελέσματα (30-50g/L) παρουσιάζουν και οι Perez-Molphe-Balch & Ochoa-Alejo (1997), ως προς τον αριθμό των βλαστών, στα είδη *Citrus aurantifolia* και *Citrus reticulata* (Mohan Jain & Ishii, 2003). Η μόνη, ίσως, αναφορά για την επίδραση του τύπου των σακχάρων στην οργανογένεση είναι αυτή των Singh & Rajam (2010), οι οποίοι αναφέρουν, ότι η σακχαρόζη και η μαλτόζη, ως πηγές άνθρακα, παρουσίασαν όμοια αποτελέσματα ως προς την αναγέννηση των βλαστών στο είδος *Citrus sinensis*.

Όσον αφορά στις λοιπές συνθήκες τις ιστοκαλλιέργειας, υπάρχουν ορισμένες αναφορές για την επίδραση του φωτός στην οργανογένεση και στα χαρακτηριστικά των βλαστών του γένους *Citrus*. Οι ιδιότητες του φωτός που έχουν μελετηθεί περισσότερο, είναι η ένταση (πυκνότητα ροής φωτονίων) και η διάρκεια (φωτοπερίοδος). Οι Moreira-Dias *et al.* (2001) διαπίστωσαν δύο βέλτιστες συνθήκες φωτισμού για την αναγέννηση βλαστών από επικοτύλια του Troyer Citrange. Η πρώτη με φωτοπερίοδο 8 ωρών και πυκνότητα ροής φωτονίων $74\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ υπό την παρουσία 2,2μM BA και η δεύτερη με φωτοπερίοδο 16 ωρών και πυκνότητα ροής φωτονίων $37\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ υπό την παρουσία 22μM BA. Παρόμοια πειράματα έχουν πραγματοποιηθεί από τους Perez-Molphe-Balch & Ochoa-Alejo (1997), τους Duran-Vila *et al.* (1992) κ.α. Τέλος, δεν υπάρχουν αναφορές για την επίδραση του μήκους κύματος φωτός στην οργανογένεση του γένους *Citrus* (Mohan Jain & Ishii, 2003).

1.7 Σκοπός του πειράματος

Το υποκείμενο *Citrus volkameriana* έχει αντικαταστήσει σε μεγάλο βαθμό τη νεραντζιά (*Citrus aurantium*), εξαιτίας της ευαισθησίας της στην ίωση tristeza. Ωστόσο, στις μέρες μας, γίνονται προσπάθειες δημιουργίας διαγονιδιακών φυτών νεραντζιάς, συνήθως με την τεχνική μεταφοράς γονιδίων ανθεκτικότητας σε έκφυτα, μέσω του βακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens*. Επομένως, κρίνεται απαραίτητη η βελτιστοποίηση των συνθηκών του μικροπολλαπλασιασμού και των δύο αυτών υποκειμένων, με στόχο την δημιουργία υγιών φυτών.

Από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας συμπεραίνουμε, ότι στο γένος *Citrus* οι κυτοκινίνες TDZ και FCF (CPPU) έχουν μελετηθεί σε πολύ μικρότερο βαθμό ως προς τη μορφογενετική τους επίδραση σε σχέση με τις BA και KIN, των οποίων τα αποτελέσματα έχουν αναφερθεί από πολλούς ερευνητές σε αρκετά είδη. Παρατηρούμε, επίσης, ότι το υπόστρωμα DKW έχει χρησιμοποιηθεί σε πολύ λίγα πειράματα, που αφορούν στην οργανογένεση των εσπεριδοειδών. Τέλος, οι αναφορές τόσο για την επίδραση του τύπου ή της αναλογίας σακχάρων του υποστρώματος όσο και για τη μορφογενετική επίδραση του φωτός στα χαρακτηριστικά των βλαστών είναι μηδαμινές ή ελάχιστες σε σχέση με άλλα είδη φυτών.

Πρωταρχικός σκοπός, λοιπόν, του παρόντος πειράματος ήταν, να αξιολογηθεί η επίδραση των κυτοκινινών BA, 2iP, KIN, TDZ και FCF (CPPU) και των συγκεντρώσεών τους στα χαρακτηριστικά των βλαστών, χρησιμοποιώντας ως έκφυτα τμήματα βλαστού με οφθαλμό, τα οποία προέκυψαν από σπορόφυτα των ειδών *Citrus aurantium* και *Citrus volkameriana*, σε υπόστρωμα DKW.

Σκοπός ήταν, επίσης, αφενός να διερευνηθεί, αν η τροποποίηση της αναλογίας των σακχάρων και το διαφορετικό μήκος κύματος φωτός επηρεάζουν τα χαρακτηριστικά των βλαστών και αφετέρου να αξιολογηθεί η επίδραση των αυξινών IBA και NAA ως προς το ποσοστό ριζοβολίας και τα χαρακτηριστικά των ριζών, με τελικό στόχο την αναγέννηση φυτών και τον εγκλιματισμό τους σε μονάδα υδρονέφωσης.

Επιπλέον, πραγματοποιήθηκε εγκλεισμός (encapsulation) εκφύτων, και των δύο ειδών, σε καψίδιο, αποθήκευσή τους σε χαμηλές θερμοκρασίες και έλεγχος της ικανότητας αναβλάστησής τους ενώ έγινε προσπάθεια μικροεμβολιασμού (micrografting) σπορόφυτων του *Citrus volkameriana* με έκφυτα (εμβόλια) του ίδιου είδους και του *Citrus aurantium*. Οι δύο τελευταίες τεχνικές, οι οποίες αποσκοπούν στη διατήρηση γενετικού υλικού και στην ανάκτηση φυτών απαλλαγμένων από παθογόνα αντίστοιχα, περιγράφονται σε ξεχωριστά κεφάλαια της παρούσας μελέτης.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Εισαγωγή

Το πείραμα διεξάχθηκε στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, στους χώρους του Εργαστηρίου Δενδροκομίας του τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, κατά το ακαδημαϊκό έτος 2015-2016 και χωρίστηκε σε τρία μέρη.

Στο πρώτο μέρος ερευνήθηκε η επίδραση των κυτοκινινών 6-βενζυλαδεσίνη (BA), 2-ισοπεντενυλαδεσίνη (2iP), κινετίνη (KIN), thidiazuron (TDZ), forchlorfenuron (FCF ή CCPU) και των συγκεντρώσεών τους στον αριθμό των βλαστών, στο μήκος των βλαστών, στο συνολικό αριθμό κόμβων και στον αριθμό κόμβων ανά εκατοστό (cm), σε έκφυτα των ειδών *Citrus aurantium* και *Citrus volkameriana*. Στο δεύτερο μέρος εξετάστηκαν η επίδραση του διαφορετικού μήκους κύματος φωτός και της διαφορετικής αναλογίας σακχάρων του υποστρώματος στα προαναφερθέντα χαρακτηριστικά των βλαστών. Τέλος, στο τρίτο μέρος ερευνήθηκε η επίδραση των αυξινών ινδολοβουτυρικό οξύ (IBA), α-ναφθαλινοξικό οξύ (NAA) και του συνδυασμού τους στο ποσοστό ριζοβολίας καθώς και στον αριθμό και στο μήκος των ριζών, που προέκυψαν από τα έκφυτα των παραπάνω ειδών. Τα αναγεννημένα φυτάρια μεταφέρθηκαν για εγκλιματισμό σε μονάδα υδρονέφωσης, όπου και μετρήθηκε το ποσοστό επιβίωσής τους.

2.2 Παρασκευή υποστρώματος

Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε τόσο για την ανάπτυξη των σπορόφυτων όσο και γι' αυτή των εκφύτων ήταν το Driver Kunijuki Walnut (DKW) (Driver & Kunijuki, 1984), η ακριβής σύσταση του οποίου φαίνεται στον Πίνακα 1. Τα στάδια που ακολουθήθηκαν για την παρασκευή του είναι τα εξής:

- i. Ζύγιση των θρεπτικών στοιχείων σε ζυγό ακριβείας, προσθήκη αυτών σε ποτήρι ζέσεως με απεσταγμένο νερό και ανάδευσή τους προς διάλυση.
- ii. Προσθήκη σακχαρόζης (30g/L υποστρώματος) και ογκομέτρηση του διαλύματος.
- iii. Ρύθμιση του pH στο 5,2 με τη βοήθεια NaOH ή HCL.

- iv. Προσθήκη άγαρ (8g/L υποστρώματος) και θέρμανση, υπό συνεχή ανάδευση, έως ότου το διάλυμα βράσει και καταστεί διαυγές.
- v. Προσθήκη φυτορρυθμιστικών ουσιών στις επιθυμητές συγκεντρώσεις.
- vi. Τοποθέτηση του υποστρώματος σε θερμοάντοχα (pyrex) δοχεία (σωλήνες για την ανάπτυξη των σπορόφυτων και κωνικές φιάλες για την ανάπτυξη των εκφύτων) και κλείσιμο αυτών προς αποστείρωση.
- vii. Αποστείρωση του υποστρώματος στον κλίβανο, υπό πίεση περίπου 1,5atm στους 121°C, για 20-30min ανάλογα με τον όγκο του ανά δοχείο. Στο σημείο αυτό πρέπει, να αναφερθεί ότι η κυτοκινίνη FCF, η οποία δε μπορεί, να αποστειρωθεί στον κλίβανο, αποστειρώθηκε περνώντας την από αντιμικροβιακό φίλτρο (διάμετρος πόρων 0,22μm), που είχε αποστειρωθεί προηγουμένως. Στη συνέχεια, το αποστειρωμένο διάλυμα της φυτορρυθμιστικής ουσίας προστέθηκε στο ήδη αποστειρωμένο υπόστρωμα. Η διαδικασία έλαβε χώρα στο θάλαμο νηματικής ροής.
- viii. Έξοδος των δοχείων από τον κλίβανο και μεταφορά τους στο θάλαμο ανάπτυξης της καλλιέργειας, ώστε το υπόστρωμα να κρυώσει και να στερεοποιηθεί.

Πίνακας 1. Σύσταση του υποστρώματος Driver Kunijuki Walnut (DKW).

Θρεπτικά στοιχεία	Συγκέντρωση (mg/L)
K ₂ SO ₄	782.3
NH ₄ NO ₃	1417.7
MgSO ₄ 7H ₂ O	1500
Ca(NO ₃) ₂ 4H ₂ O	1958.8
KH ₂ PO ₄	269.2
CaCl ₂ 2H ₂ O	146.7
NaFeEDTA	89.28
MnSO ₄ H ₂ O	33.8
Zn(NO ₃) ₂ 6H ₂ O	17.8
H ₃ BO ₃	6
NaMoO ₄	0.2
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.25
Ινοσιτόλη	999.6
Γλουταμίνη	1200
Νικοτινικό οξύ	0.5

Γλυσίνη	1.9
Κυστίνη	10
Υδροχλωριούχος Θειαμίνη	1.96
Υδροχλωριούχος Πυριδοξίνη	0.5
Φολικό οξύ	0.5
pH	5.2

2.3 Προετοιμασία φυτικού υλικού

2.3.1 Συλλογή και φύτευση σπόρων

Για την εγκατάσταση της καλλιέργειας συλλέχθηκαν ώριμοι καρποί, χωρίς εμφανή συμπτώματα ασθενειών, των ειδών *Citrus volkameriana* και *Citrus aurantium* από μητρικά δένδρα του δενδροκομείου του ΓΠΑ και μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο. Ακολούθησε πλύσιμο των καρπών εξωτερικά, κόψιμο και στη συνέχεια, με λαβίδα, εξήχθησαν οι σπόροι, οι οποίοι πλύθηκαν καλά με τρεχούμενο νερό, ώστε να απομακρυνθεί η ζελατινώδης ουσία, που τους περιβάλλει και στέγνωσαν σε διηθητικό χαρτί.

Οι σπόροι απολυμάνθηκαν με υποχλωριώδες νάτριο 60% κ.ο. για 12min υπό συνεχή ανάδευση και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν στο θάλαμο νηματικής ροής, όπου ξεπλύθηκαν τρεις φορές με απεσταγμένο-αποστειρωμένο νερό και φυτεύθηκαν, αμέσως, στους σωλήνες (3 ανά σωλήνα), που περιείχαν το αποστειρωμένο και στερεοποιημένο υπόστρωμα DKW.



Εικόνα 1. Εξαγωγή σπόρων από καρπούς.



Εικόνα 2. Φύτευση σπόρων σε υπόστρωμα.

2.3.2 Ανάπτυξη sporόφυτων και παραλαβή εκφύτων

Οι σωλήνες μεταφέρθηκαν, αμέσως, στο θάλαμο ανάπτυξης και οι σπόροι παρέμειναν υπό συνεχές σκοτάδι για 35 ημέρες, στους 21°C. Στη συνέχεια, εφαρμόστηκε φωτοπερίοδος

16 ωρών για 35 και 75 ημέρες, για τα είδη *Citrus volkameriana* και *Citrus aurantium* αντίστοιχα. Μετά το πέρας αυτής της περιόδου, η ανάπτυξη των σπορόφυτων ήταν τέτοια, που μπορούσε, να παρθεί ικανοποιητικός αριθμός εκφύτων για τη διεξαγωγή του πειράματος.

Οι σωλήνες με τα σπορόφυτα μεταφέρθηκαν στο θάλαμο νηματικής ροής, όπου και ξεκίνησε η διαδικασία παραλαβής των εκφύτων. Τα έκφυτα που χρησιμοποιήθηκαν, ήταν τμήματα βλαστού με οφθαλμό (περίπου 1,5cm). Κόβονταν, μετά την έξοδο των σπορόφυτων από τους σωλήνες, με νυστέρι πάνω σε αποστειρωμένη γυάλινη πλάκα και στη συνέχεια φυτεύονταν σε κωνικές φιάλες, με λαβίδα, κάθετα, σε υπόστρωμα εμπλουτισμένο με κυτοκινίνες.



Εικόνες 3 & 4. Παραλαβή εκφύτων από τα σπορόφυτα και φύτευσή τους σε υπόστρωμα με κυτοκινίνες.

2.4 Επεμβάσεις

Τα αρχικά έκφυτα φυτεύθηκαν σε υπόστρωμα εμπλουτισμένο με διαφορετικές συγκεντρώσεις κυτοκινινών και μεταφέρθηκαν στο θάλαμο ανάπτυξης, ξεκινώντας έτσι το στάδιο της βλαστογένεσης. Αφού τα έκφυτα παρέμειναν για 60 ημέρες σε φωτοπερίοδο 16 ωρών και θερμοκρασία 21°C, πάρθηκαν οι μετρήσεις, που αφορούσαν στα χαρακτηριστικά των βλαστών και στη συνέχεια τα καινούργια έκφυτα που προέκυψαν απ' την παραπάνω διαδικασία, χρησιμοποιήθηκαν στα επόμενα στάδια του πειράματος. Πιο συγκεκριμένα, ένα μέρος των εκφύτων χρησιμοποιήθηκε για να ερευνηθεί η επίδραση του διαφορετικού μήκους κύματος φωτός και της διαφορετικής αναλογίας σακχάρων του υποστρώματος στα χαρακτηριστικά των βλαστών ενώ ένα άλλο μέρος στο στάδιο της ριζοβολίας. Τα υπόλοιπα έκφυτα χρησιμοποιήθηκαν για τη διεξαγωγή των τεχνικών του εγκλεισμού σε καψίδιο και του μικροεμβολιασμού, οι οποίες περιγράφονται σε ξεχωριστά κεφάλαια.

Οι κυτοκινίνες που χρησιμοποιήθηκαν στο στάδιο διερεύνησης της επίδρασης των ορμονών στα χαρακτηριστικά των βλαστών, καθώς και οι συγκεντρώσεις τους,

παρουσιάζονται στον Πίνακα 2. Για κάθε επέμβαση πραγματοποιήθηκαν 5 επαναλήψεις, δηλαδή χρησιμοποιήθηκαν 5 κωνικές φιάλες, εντός των οποίων φυτεύθηκαν 4 έκφυτα. Το εν λόγω υπόστρωμα ήταν εμπλουτισμένο με 0,5ppm GA₃.

Πίνακας 2. Εφαρμοζόμενες κυτοκινίνες και οι συγκεντρώσεις τους.

<i>Citrus volkameriana</i>				<i>Citrus aurantium</i>			
Κυτοκινίνη	Συγκέντρωση (ppm)			Κυτοκινίνη	Συγκέντρωση (ppm)		
	LOW	MEDIUM	HIGH		LOW	MEDIUM	HIGH
BA	0,25	0,5	1	BA	0.5	1	2
2iP	0,25	0,5	1	2iP	0.5	1	2
KIN	0,25	0,5	1	KIN	0.5	1	2
TDZ	0,025	0,05	0,1	TDZ	0.5	1	2
FCF (CPPU)	0,025	0,05	0,1	FCF (CPPU)	0.5	1	2

Στο στάδιο διερεύνησης της επίδρασης του διαφορετικού μήκους κύματος φωτός στα χαρακτηριστικά των βλαστών, στο θρεπτικό υπόστρωμα προστέθηκε η κυτοκινίνη BA σε συγκέντρωση 2ppm, αφού μετά από στατιστική ανάλυση και αξιολόγηση όλων των κυτοκινινών, έδωσε, συνολικά, τα καλύτερα αποτελέσματα τόσο στα ποσοτικά όσο και στα ποιοτικά χαρακτηριστικά των βλαστών και στα δύο, υπό μελέτη, είδη. Το υπόστρωμα περιείχε, επίσης, 0,5ppm GA₃. Τα έκφυτα φυτεύθηκαν σε κωνικές φιάλες, μεταφέρθηκαν σε 4 ξεχωριστούς θαλάμους με λάμπες φθορισμού διαφορετικού χρώματος, τα μήκη κύματος των οποίων μετρήθηκαν με φασματοσκόπιο (Πίνακας 3) και παρέμειναν για 60 ημέρες σε φωτοπερίοδο 16 ωρών και θερμοκρασία 21°C. Όπως και στο προηγούμενο στάδιο, πραγματοποιήθηκαν 5 επαναλήψεις, δηλαδή 5 κωνικές φιάλες με 4 έκφυτα η κάθε μία.

Πίνακας 3. Μήκη κύματος στα οποία εξέπεμπαν οι λάμπες φθορισμού διαφορετικού χρώματος.

Χρώμα	Μήκος κύματος (nm)
Μπλε	550, 439, 585 ± 2.5
Πράσινο	550-555 ± 1
Κόκκινο	630-670 ± 5
Λευκό	550-560, 437, 585, 600-650



Εικόνες 5, 6, 7 & 8. Καλλιέργεια εκφύτων σε θαλάμους με λάμπες διαφορετικού χρώματος.

Στο στάδιο διερεύνησης της επίδρασης της διαφορετικής αναλογίας σακχάρων στα χαρακτηριστικά των βλαστών, το υπόστρωμα ήταν, επίσης, εμπλουτισμένο με 2ppm BA και 0,5ppm GA₃ και τα έκφυτα παρέμειναν για 60 ημέρες σε φωτοπερίοδο 16 ωρών, στους 21°C. Πραγματοποιήθηκαν 5 επαναλήψεις, δηλαδή 5 κωνικές φιάλες με 4 έκφυτα η κάθε μία. Όπως περιγράφηκε προηγουμένως, στην παρασκευή του υποστρώματος, σε όλα τα υπόλοιπα στάδια του πειράματος χρησιμοποιήθηκε, ως πηγή άνθρακα, μόνο η σακχαρόζη στην «τυπική» αναλογία 30g/L. Στο συγκεκριμένο στάδιο, χρησιμοποιήθηκαν εκτός από τη σακχαρόζη δύο ακόμη σάκχαρα, η γλυκόζη και η φρουκτόζη, οι αναλογίες των οποίων (Πίνακας 4) καθορίστηκαν με βάση την αρχική αναλογία στα φύλλα των μητρικών φυτών, από τα οποία πάρθηκαν οι καρποί, οι σπόροι και προέκυψαν, κατ' επέκταση, τα αρχικά έκφυτα.

Πίνακας 4. Νέες αναλογίες σακχάρων του υποστρώματος (g/L).

Σάκχαρα	<i>Citrus volkameriana</i>	<i>Citrus aurantium</i>
Σακχαρόζη	13.6	25
Γλυκόζη	13.6	2.5
Φρουκτόζη	2.8	2.5
Σύνολο	30	30

Για τον προσδιορισμό της αρχικής αναλογίας σακχάρων στα φύλλα των μητρικών φυτών ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

- i. Συλλογή φύλλων από τα μητρικά φυτά και μεταφορά τους στο εργαστήριο.
- ii. Πλύσιμο, τεμαχισμός αυτών με ψαλίδι και τοποθέτηση σε falcons των 50ml.
- iii. Προσθήκη 10ml H₂O για HPLC και ομογενοποίηση του δείγματος με Ultra turrax.
- iv. Τοποθέτηση των falcons στο φούρνο μικροκυμάτων (400Watt) για 20sec.
- v. Φυγοκέντρηση του δείγματος στις 6000 στροφές για 6min.
- vi. Παραλαβή του υπερκειμένου και φιλτράρισμα (διάμετρος πόρων 0,22μm).
- vii. Προσδιορισμός της αναλογίας σακχάρων του δείγματος με υγρή χρωματογραφία (High Performance Liquid Chromatography).

Τέλος, στο στάδιο της ριζοβολίας, όπως φαίνεται στον Πίνακα 5, χρησιμοποιήθηκαν σε διαφορετικές συγκεντρώσεις οι αυξίνες IBA και NAA, καθώς και ο συνδυασμός τους. Πραγματοποιήθηκαν 5 επαναλήψεις με τη διαφορά, ότι τα έκφυτα φυτεύθηκαν σε 20 σωλήνες (1 ανά σωλήνα) και ομαδοποιήθηκαν, με αποτέλεσμα η κάθε επανάληψη να αποτελείται από 4 έκφυτα (4x5=20). Μετά την πάροδο 30 ημερών σε φωτοπερίοδο 16 ωρών, στους 21°C, πάρθηκαν οι μετρήσεις, που αφορούσαν στο ποσοστό ριζοβολίας των εκφύτων και στα χαρακτηριστικά των ριζών.

Πίνακας 5. Εφαρμοζόμενες αυξίνες και οι συγκεντρώσεις τους.

<i>Citrus volkameriana & Citrus aurantium</i>			
Αυξίνη	Συγκέντρωση (ppm)		
IBA	1	2	4
NAA	1	2	4
IBA+NAA	1+1	2+2	4+4

Τα ριζοβολημένα φυτάρια, που προέκυψαν από την παραπάνω διαδικασία, μεταφέρθηκαν από το εργαστήριο, στη μονάδα υδρονέφωσης του δενδροκομείου του ΓΠΑ για εγκλιματισμό. Μεταφυτεύθηκαν σε πλαστικά γλαστράκια, που περιείχαν τύρφη και περλίτη σε αναλογία 1:1, όπου και παρέμειναν για 30 ημέρες, με σκοπό να διαπιστωθεί το ποσοστό επιβίωσής τους σε *ex vitro* συνθήκες.



Εικόνα 9. Έκφυτα στο στάδιο ριζοβολίας.



Εικόνα 10. Φυτάρια σε μονάδα υδρονέφωσης.

2.5 Στατιστική ανάλυση

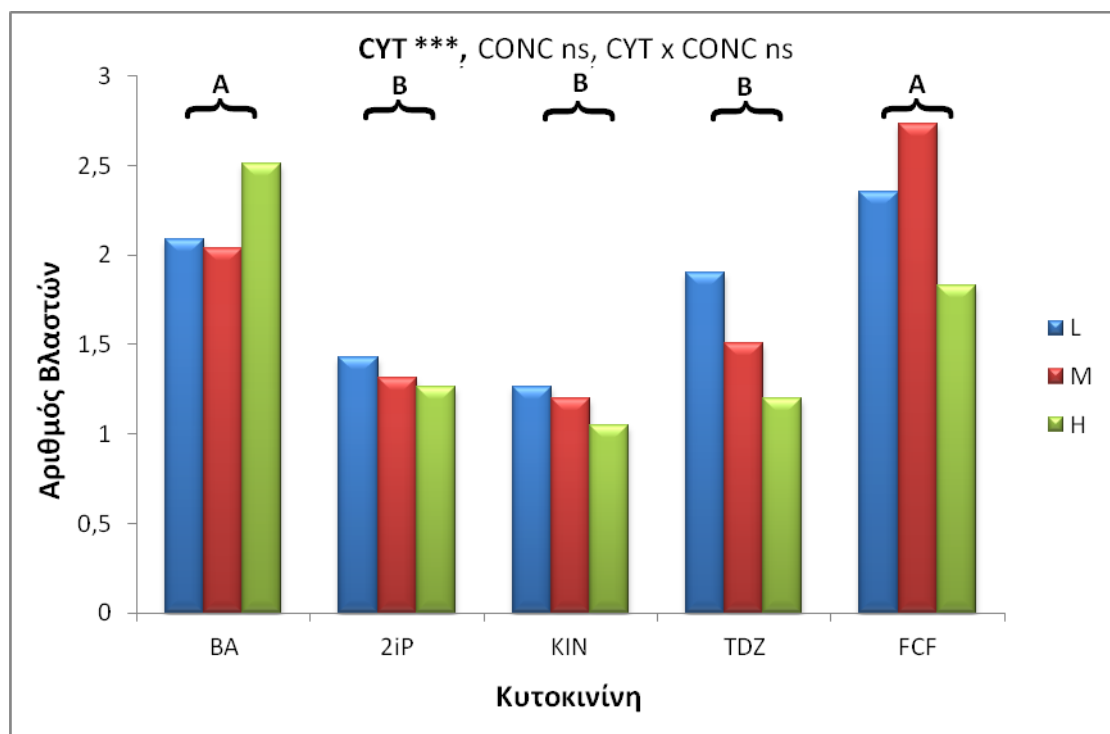
Το πείραμα σχεδιάστηκε και αναλύθηκε σύμφωνα με το Εντελώς Τυχαιοποιημένο Σχέδιο (Ε.Τ.Σ.). Η στατιστική ανάλυση πραγματοποιήθηκε με το στατιστικό πακέτο JMP 7.0 (SAS). Ο αριθμός των επαναλήψεων ήταν $n=5$, με την κάθε επανάληψη να αποτελείται από 4 έκφυτα. Στο στάδιο διερεύνησης της επίδρασης των κυτοκινινών στα χαρακτηριστικά των βλαστών πραγματοποιήθηκε διπαραγοντική ανάλυση, με πρώτο παράγοντα την ορμόνη (κυτοκινίνη) και δεύτερο την συγκέντρωσή της. Οι διαφορές προσδιορίστηκαν με τη δοκιμασία πολλαπλών μέσων του Tuckey HSD σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05. Στα υπόλοιπα στάδια του πειράματος πραγματοποιήθηκε μονοπαραγοντική ανάλυση. Πιο συγκεκριμένα, στο στάδιο διερεύνησης της επίδρασης του διαφορετικού μήκους κύματος φωτός και της αναλογίας σακχάρων του υποστρώματος στα χαρακτηριστικά των βλαστών, οι διαφορές προσδιορίστηκαν σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05 με Tuckey HSD και T-Test αντίστοιχα. Τέλος, στο στάδιο της ριζοβολίας οι διαφορές προσδιορίστηκαν με τη δοκιμασία πολλαπλών μέσων του Tuckey HSD σε επίπεδο σημαντικότητας 0,05.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 *Citrus aurantium* (Νεραντζιά)

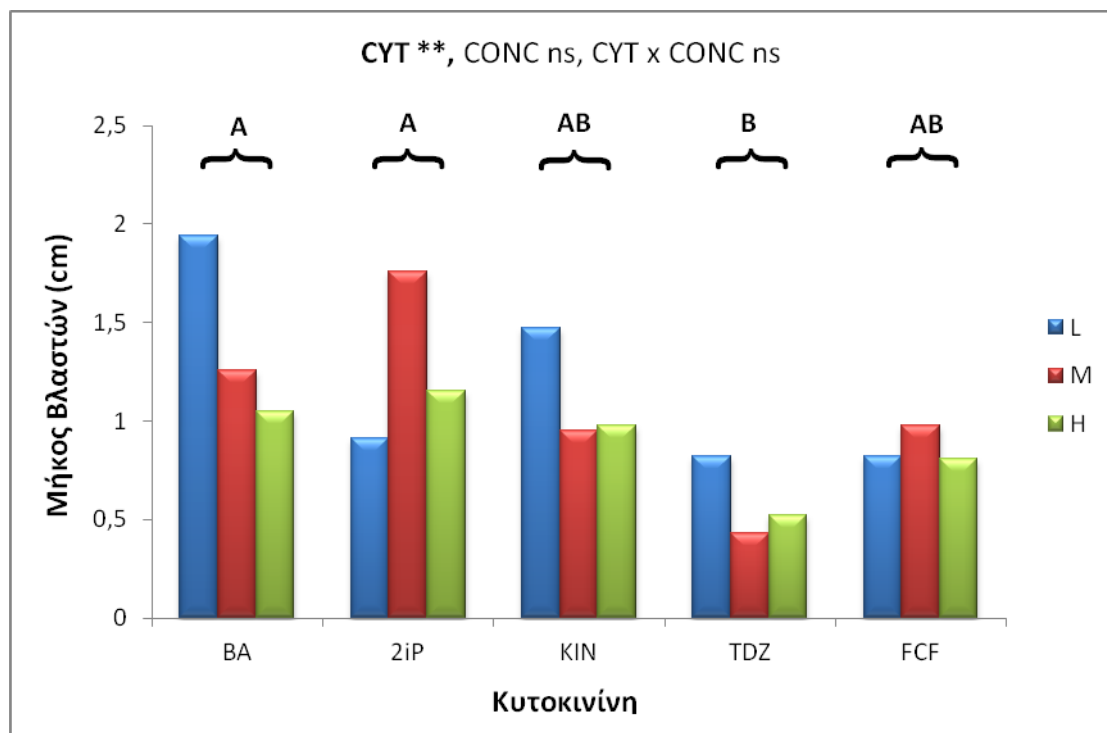
Στάδιο βλαστογένεσης-Επίδραση κυτοκινινών

Αξιολογώντας την επίδραση των κυτοκινινών επί του αριθμού των βλαστών ανά έκφυτο (Διάγραμμα 1), παρατηρούμε ότι οι επεμβάσεις **BA** και **FCF**, ανεξαρτήτου συγκέντρωσης, έδωσαν τα καλύτερα αποτελέσματα, διαφέροντας στατιστικώς σημαντικά από τις υπόλοιπες κυτοκινίνες, η επίδραση των οποίων έδωσε όμοια, μεταξύ τους, αποτελέσματα και σαφώς μικρότερο αριθμό βλαστών.



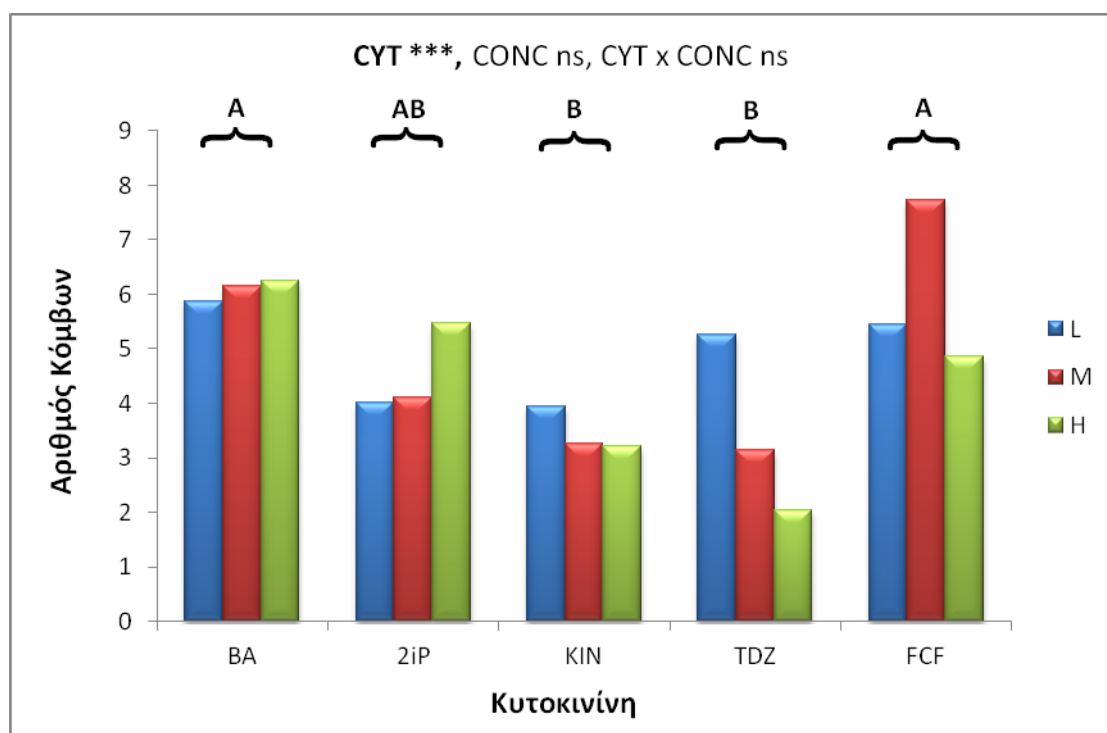
Διάγραμμα 1. Επίδραση των κυτοκινινών και των συγκεντρώσεών τους στον αριθμό των εκπυτσομένων βλαστών. Τα διαφορετικά γράμματα στις αγκύλες δηλώνουν την ύπαρξη στατιστικώς σημαντικής διαφοράς μεταξύ των ορμονών, σύμφωνα με τη δοκιμασία πολλαπλών μέσων του Tukey HSD σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$. **Σχόλιο:** ns = non significant, *** δηλώνει $P<0.001$.

Στο Διάγραμμα 2 φαίνεται, ότι το μεγαλύτερο μήκος βλαστών έδωσαν οι ορμόνες **BA** και **2iP**, χωρίς, όμως, να παρατηρείται επίδραση των συγκεντρώσεών τους ενώ η μόνη επέμβαση που διαφέρει στατιστικώς σημαντικά απ' αυτές είναι αυτή της **TDZ**, που έδωσε και το μικρότερο μήκος.



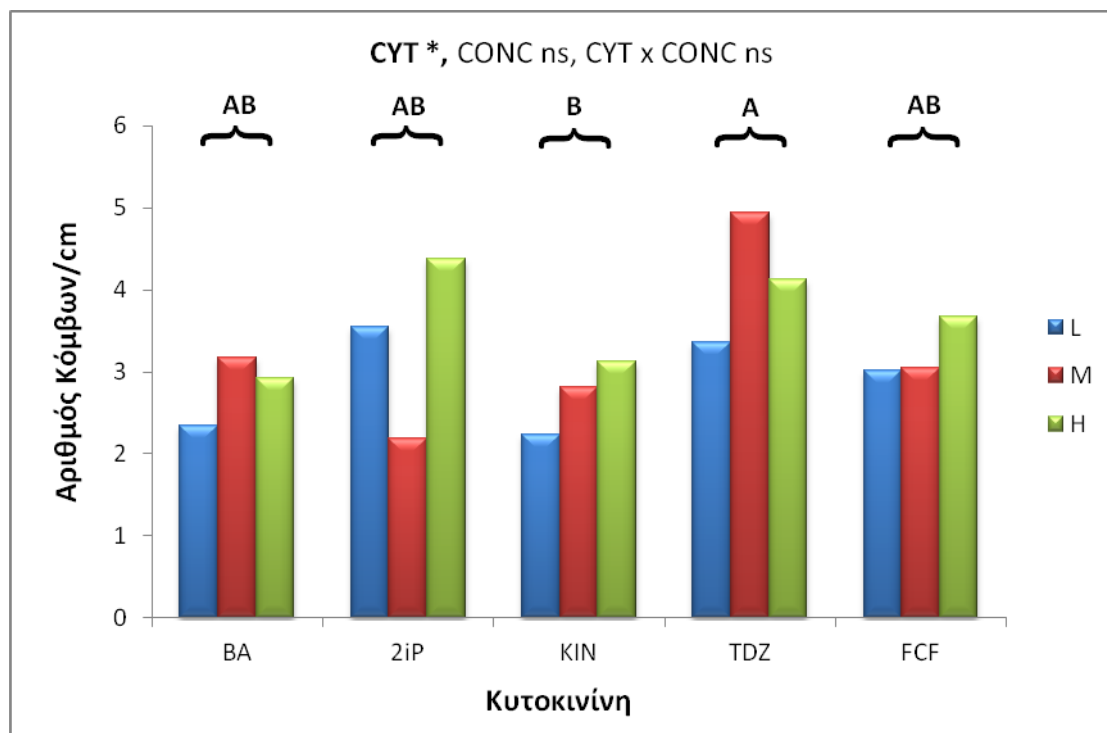
Διάγραμμα 2. Επίδραση των κυτοκινινών και των συγκεντρώσεών τους στο μήκος των εκπυσσόμενων βλαστών. Τα διαφορετικά γράμματα στις αγκύλες δηλώνουν την ύπαρξη στατιστικώς σημαντικής διαφοράς μεταξύ των ορμονών, σύμφωνα με τη δοκιμασία πολλαπλών μέσων του Tukey HSD σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$. **Σχόλιο:** ns = non significant, ** δηλώνει $P<0.01$.

Παρόμοια αποτελέσματα με αυτά του Διαγράμματος 1 παρατηρούνται και στο Διάγραμμα 3, στο οποίο απεικονίζεται η επίδραση των ορμονών επί του αριθμού των κόμβων ανά έκφυτο, με τις επεμβάσεις **BA** και **FCF** να διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά από τις **KIN** και **TDZ**, δίνοντας το μεγαλύτερο αριθμό κόμβων. Μεταξύ των δύο πρώτων, το καλύτερο αποτέλεσμα έδωσε η FCF σε συγκέντρωση 1ppm (μεσαία), χωρίς να παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των συγκεντρώσεων των δύο επεμβάσεων.



Διάγραμμα 3. Επίδραση των κυτοκινινών και των συγκεντρώσεών τους στον αριθμό των κόμβων. Τα διαφορετικά γράμματα στις αγκύλες δηλώνουν την ύπαρξη στατιστικώς σημαντικής διαφοράς μεταξύ των ορμονών, σύμφωνα με τη δοκιμασία πολλαπλών μέσων του Tukey HSD σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$. **Σχόλιο:** ns = non significant, *** δηλώνει $P<0,001$.

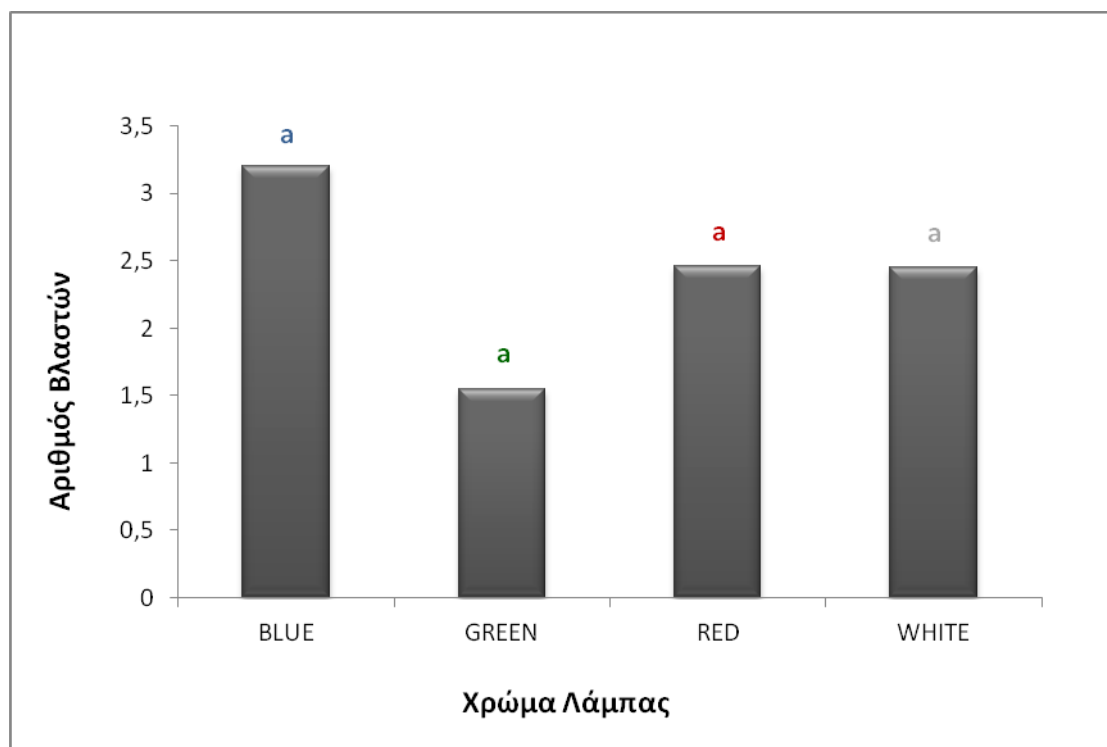
Τέλος, όσον αφορά στον αριθμό των κόμβων/cm (Διάγραμμα 4), η μόνη στατιστικώς σημαντική διαφορά που παρατηρείται, είναι αυτή μεταξύ των **KIN** και **TDZ**, που έδωσαν το μικρότερο και μεγαλύτερο αριθμό αντίστοιχα ενώ οι υπόλοιπες επεμβάσεις κυμάνθηκαν σε ενδιάμεσο επίπεδο μεταξύ αυτών, χωρίς να διαφέρουν μεταξύ τους.



Διάγραμμα 4. Επίδραση των κυτοκινινών και των συγκεντρώσεών τους στον αριθμό των κόμβων/cm. Τα διαφορετικά γράμματα στις αγκύλες δηλώνουν την ύπαρξη στατιστικώς σημαντικής διαφοράς μεταξύ των ορμονών, σύμφωνα με τη δοκιμασία πολλαπλών μέσων του Tukey HSD σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$. **Σχόλιο:** ns = non significant, * δηλώνει $P<0.05$.

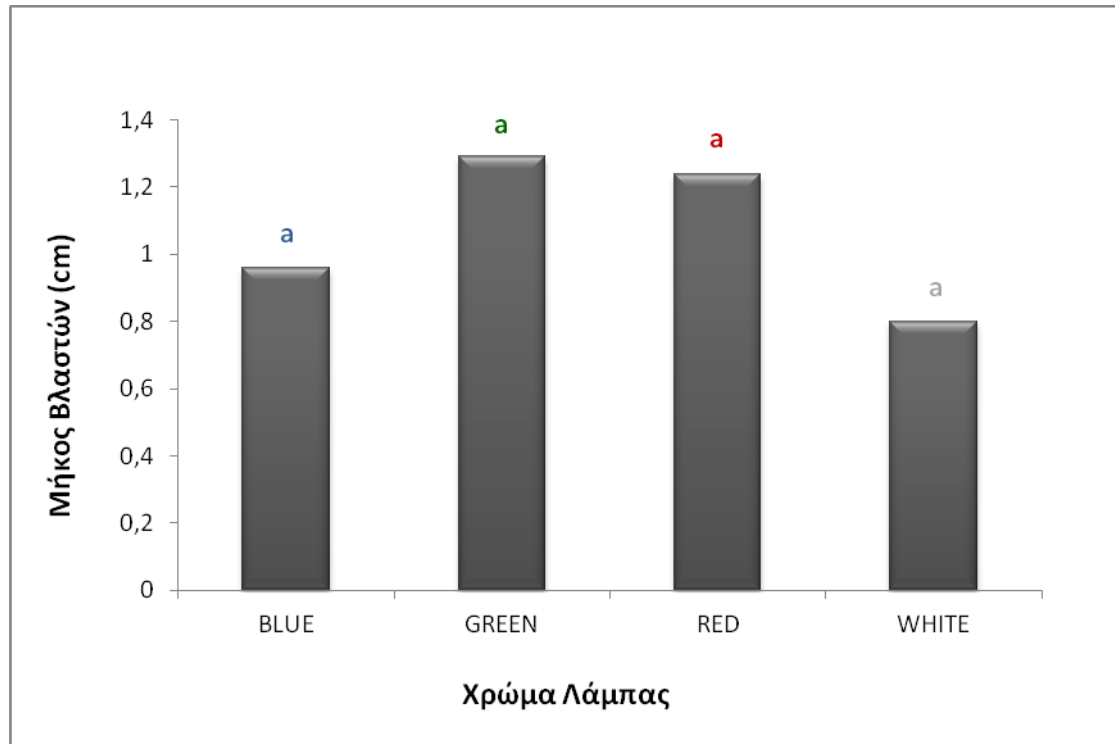
Στάδιο βλαστογένεσης-Επίδραση διαφορετικού μήκους κύματος φωτός

Στο Διάγραμμα 5 φαίνεται, ότι τα έκφυτα αντέδρασαν καλύτερα υπό την παρουσία μπλε φωτός, κατά την παραμονή τους στο θάλαμο καλλιέργειας, σχηματίζοντας περισσότερους βλαστούς. Αντιθέτως, υπό την παρουσία πράσινου φωτός παρατηρείται ο μικρότερος αριθμός βλαστών. Δεν υπάρχει, ωστόσο, στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των τεσσάρων επεμβάσεων.



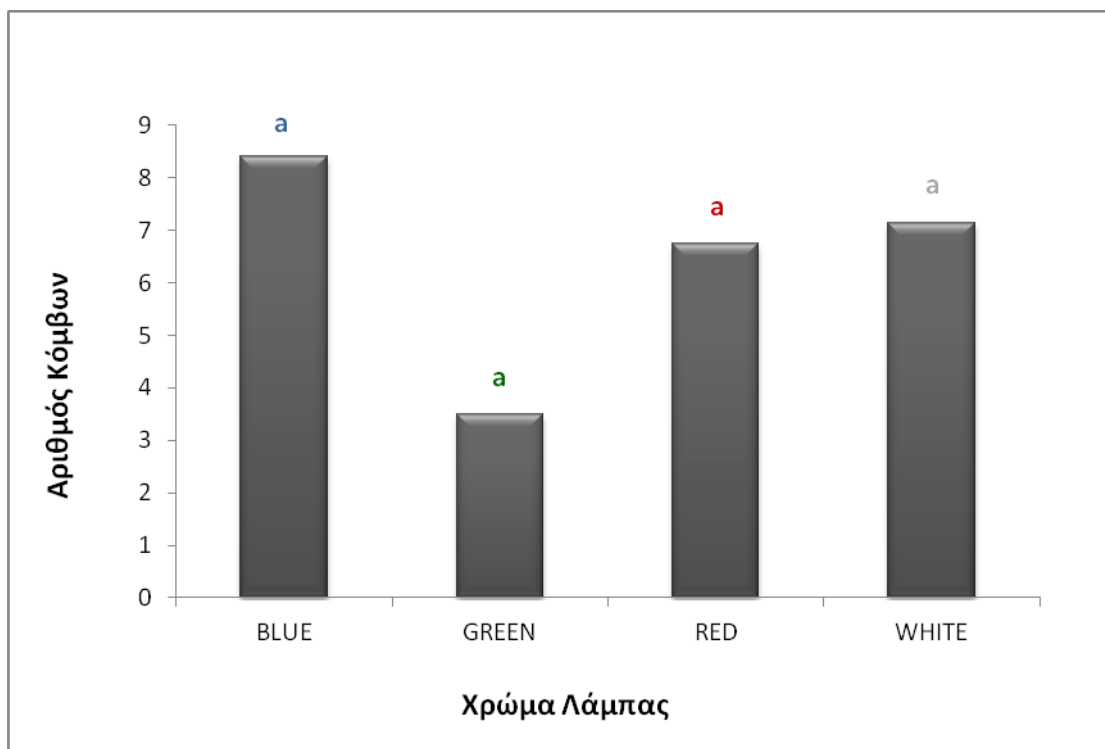
Διάγραμμα 5. Επίδραση του διαφορετικού μήκους κύματος φωτός (χρώμα λάμπας) στον αριθμό των εκπυσσόμενων βλαστών. Τα διαφορετικά γράμματα στις μπάρες δηλώνουν την ύπαρξη στατιστικώς σημαντικής διαφοράς μεταξύ των επεμβάσεων, σύμφωνα με τη δοκιμασία πολλαπλών μέσων του Tukey HSD σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$.

Στο Διάγραμμα 6 παρατηρείται, ότι οι επεμβάσεις του πράσινου και του κόκκινου χρώματος έδωσαν μεγαλύτερο και περίπου ίσο μεταξύ τους μήκος βλαστών σε σχέση με τις άλλες δύο επεμβάσεις, χωρίς βέβαια να υπάρχει, και εδώ, στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων.



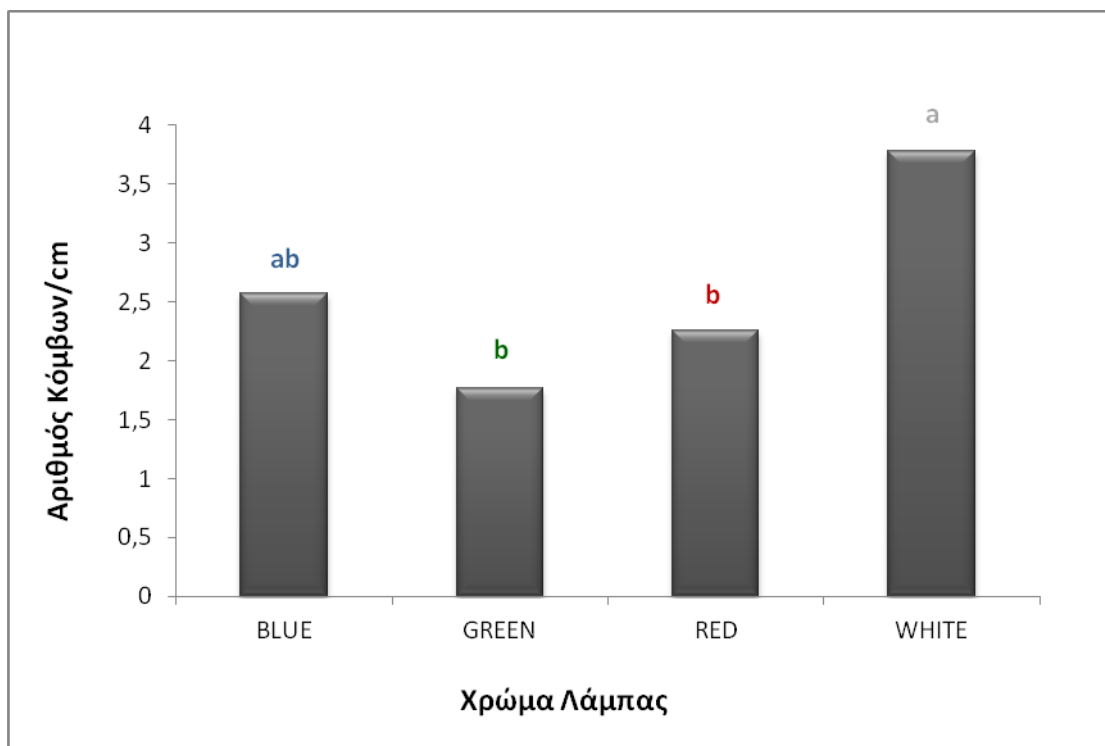
Διάγραμμα 6. Επίδραση του διαφορετικού μήκους κύματος φωτός (χρώμα λάμπας) στο μήκος των εκπυσοσόμενων βλαστών. Τα διαφορετικά γράμματα στις μπάρες δηλώνουν την ύπαρξη στατιστικώς σημαντικής διαφοράς μεταξύ των επεμβάσεων, σύμφωνα με τη δοκιμασία πολλαπλών μέσων του Tukey HSD σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$.

Όπως παρουσιάζεται στο Διάγραμμα 7, τα έκφυτα υπό την παρουσία μπλε φωτός ανέπτυξαν τον υψηλότερο αριθμό κόμβων ενώ υπό την παρουσία πράσινου φωτός το χαμηλότερο. Παρόλα αυτά, καμία από τις τέσσερις επεμβάσεις δε διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από κάποια άλλη.



Διάγραμμα 7. Επίδραση του διαφορετικού μήκους κύματος φωτός (χρώμα λάμπας) στον αριθμό των κόμβων. Τα διαφορετικά γράμματα στις μπάρες δηλώνουν την ύπαρξη στατιστικώς σημαντικής διαφοράς μεταξύ των επεμβάσεων, σύμφωνα με τη δοκιμασία πολλαπλών μέσων του Tukey HSD σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$.

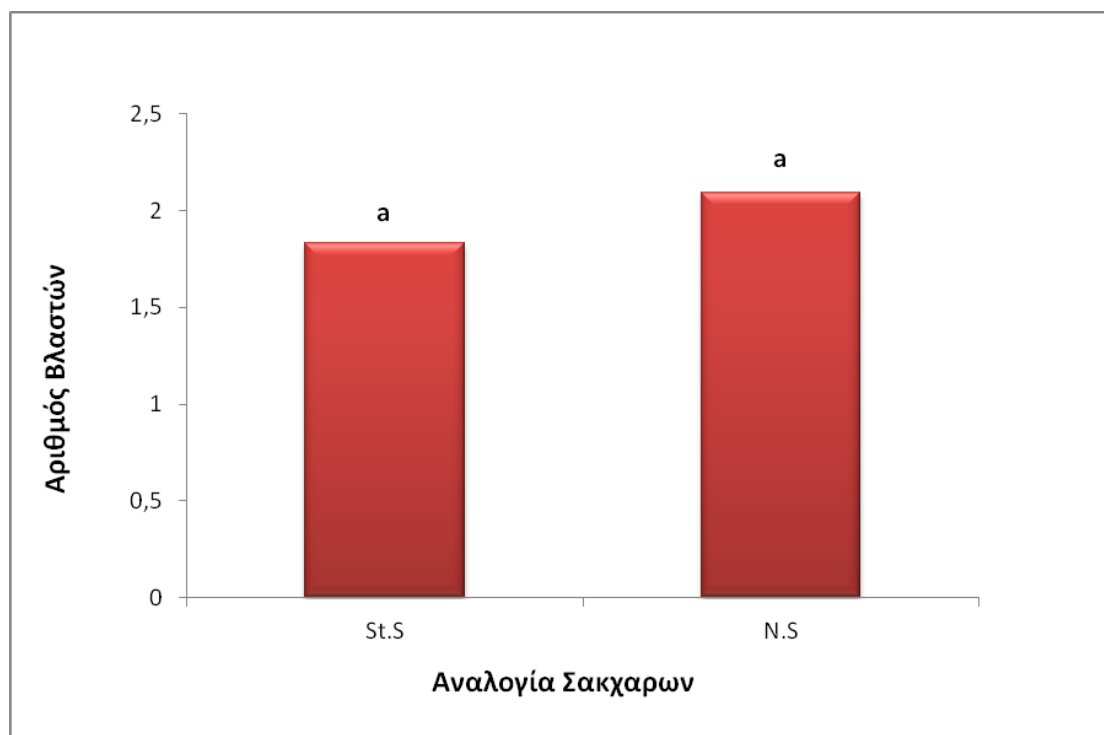
Τέλος, στο Διάγραμμα 8 παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων, καθώς τα έκφυτα υπό την επίδραση **λευκού φωτός** έδωσαν το μεγαλύτερο αριθμό κόμβων/cm ενώ τα αντίστοιχα των επεμβάσεων με **πράσινο** και **κόκκινο φως** το μικρότερο, χωρίς, όμως, να διαφέρουν σημαντικά μεταξύ τους.



Διάγραμμα 8. Επίδραση του διαφορετικού μήκους κύματος φωτός (χρώμα λάμπας) στον αριθμό των κόμβων/cm. Τα διαφορετικά γράμματα στις μπάρες δηλώνουν την ύπαρξη στατιστικώς σημαντικής διαφοράς μεταξύ των επεμβάσεων, σύμφωνα με τη δοκιμασία πολλαπλών μέσων του Tukey HSD σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$.

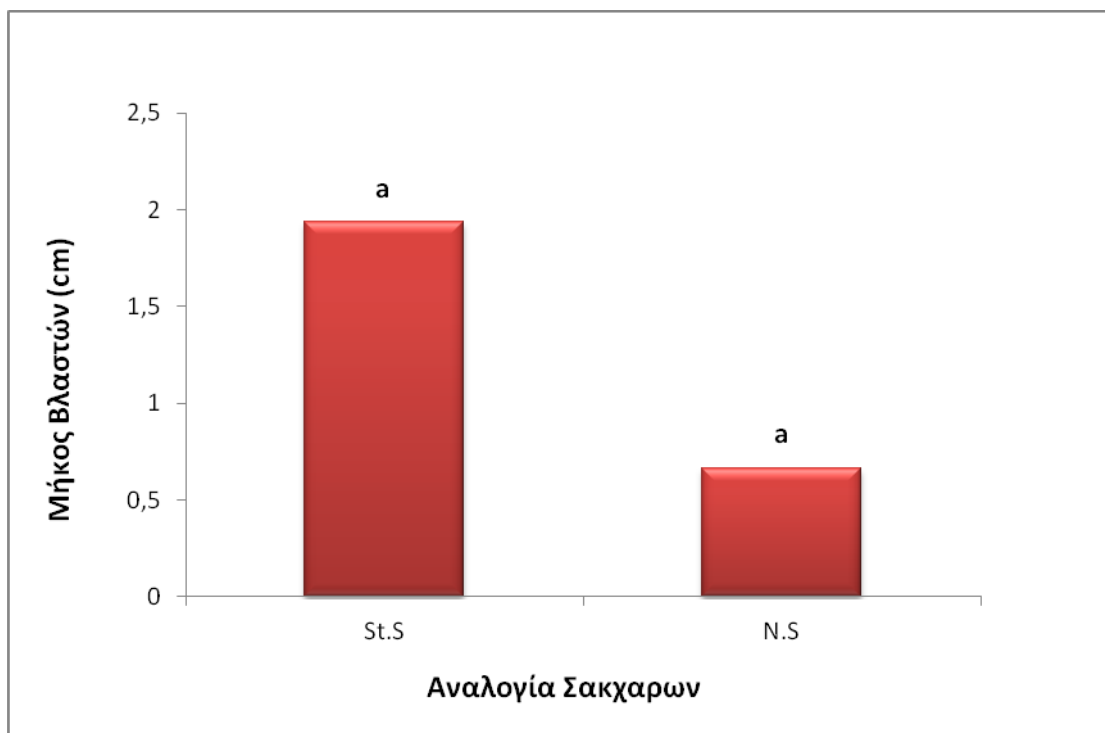
Στάδιο βλαστογένεσης-Επίδραση διαφορετικής αναλογίας σακχάρων

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 9, η διαφορετική αναλογία σακχάρων του υποστρώματος δεν επηρέασε τον αριθμό των εκπτυσσόμενων βλαστών, αφού δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο επεμβάσεων.



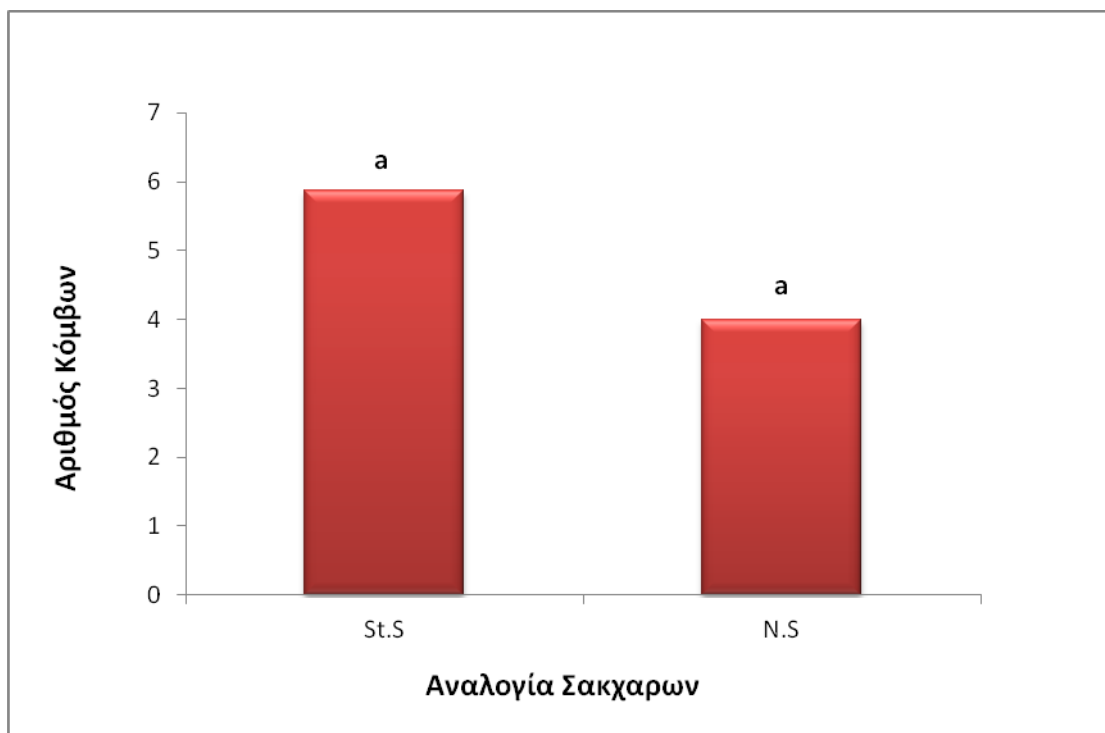
Διάγραμμα 9. Επίδραση της διαφορετικής αναλογίας σακχάρων του υποστρώματος στον αριθμό των εκπτυσσόμενων βλαστών. Μέσοι όροι ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα (άνωθεν της μπάρας) δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά, σύμφωνα με τη δοκιμασία T-test σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$. **Σχόλιο:** St.S = Standard Sugars (30g σακχαρόζης/L), N.S = New Sugars (αναλογία σακχάρων στα φύλλα του μητρικού φυτού από το οποίο προέκυψαν τα έκφυτα).

Όσον αφορά στο μήκος των βλαστών (Διάγραμμα 10), η διαφορετική αναλογία σακχάρων έδωσε μικρότερο μήκος σε σχέση με την «τυπική» αναλογία (30g σακχαρόζης/L), χωρίς ωστόσο να παρατηρείται, και εδώ, στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων.



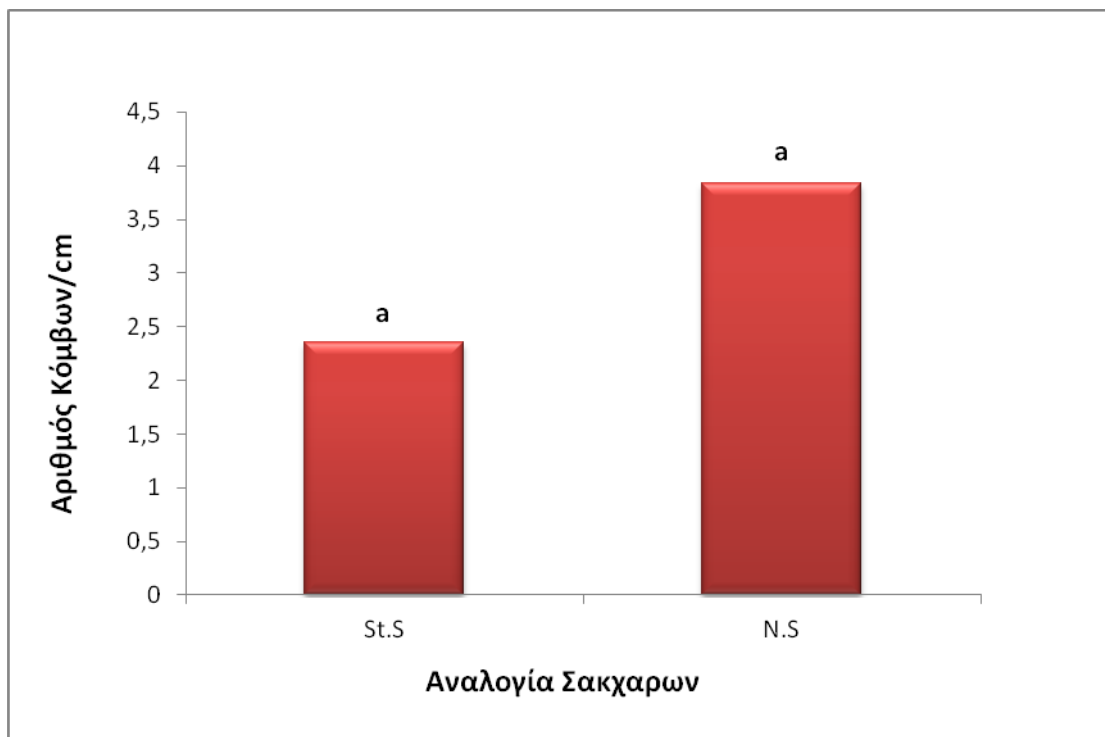
Διάγραμμα 10. Επίδραση της διαφορετικής αναλογίας σακχάρων του υποστρώματος στο μήκος των εκπυσσόμενων βλαστών. Μέσοι όροι ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα (άνωθεν της μπάρας) δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά, σύμφωνα με τη δοκιμασία T-test σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$. **Σχόλιο:** St.S = Standard Sugars (30g σακχαρόζης/L), N.S = New Sugars (αναλογία σακχάρων στα φύλλα του μητρικού φυτού από το οποίο προέκυψαν τα έκφυτα).

Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρούνται στο Διάγραμμα 11, όπου η νέα αναλογία σακχάρων έδωσε μικρότερο αριθμό κόμβων ανά έκφυτο συγκρινόμενη με την «τυπική» αναλογία (30g σακχαρόζης/L), χωρίς, όμως, η διαφορά αυτή να θεωρείται στατιστικώς σημαντική.



Διάγραμμα 11. Επίδραση της διαφορετικής αναλογίας σακχάρων του υποστρώματος στον αριθμό των κόμβων. Μέσοι όροι ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα (άνωθεν της μπάρας) δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά, σύμφωνα με τη δοκιμασία T-test σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$. **Σχόλιο:** St.S = Standard Sugars (30g σακχαρόζης/L), N.S = New Sugars (αναλογία σακχάρων στα φύλλα του μητρικού φυτού από το οποίο προέκυψαν τα έκφυτα).

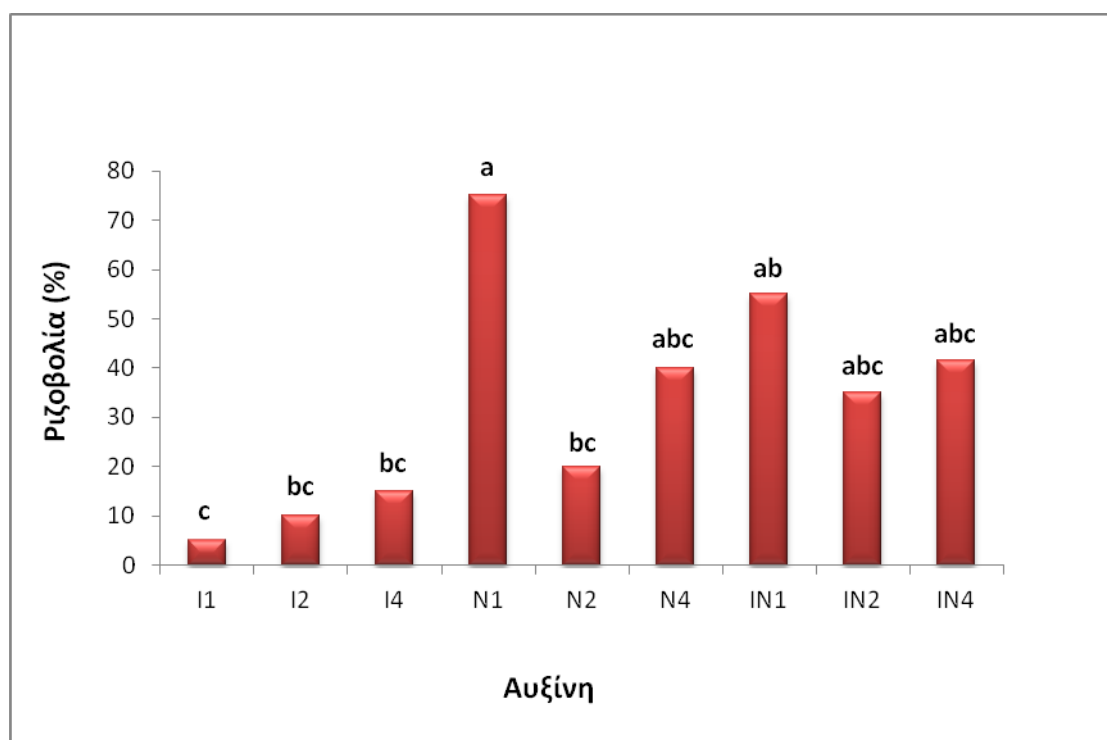
Τέλος, ο αριθμός των κόμβων/cm δεν επηρεάστηκε από την νέα αναλογία σακχάρων, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 12, αφού η διαφορά που υπάρχει, και εδώ, μεταξύ των επεμβάσεων δε θεωρείται στατιστικώς σημαντική.



Διάγραμμα 12. Επίδραση της διαφορετικής αναλογίας σακχάρων του υποστρώματος στον αριθμό των κόμβων/cm. Μέσοι όροι ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα (άνωθεν της μπάρας) δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά, σύμφωνα με τη δοκιμασία T-test σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$. **Σχόλιο:** St.S = Standard Sugars (30g σακχαρόζης/L), N.S = New Sugars (αναλογία σακχάρων στα φύλλα του μητρικού φυτού από το οποίο προέκυψαν τα έκφυτα).

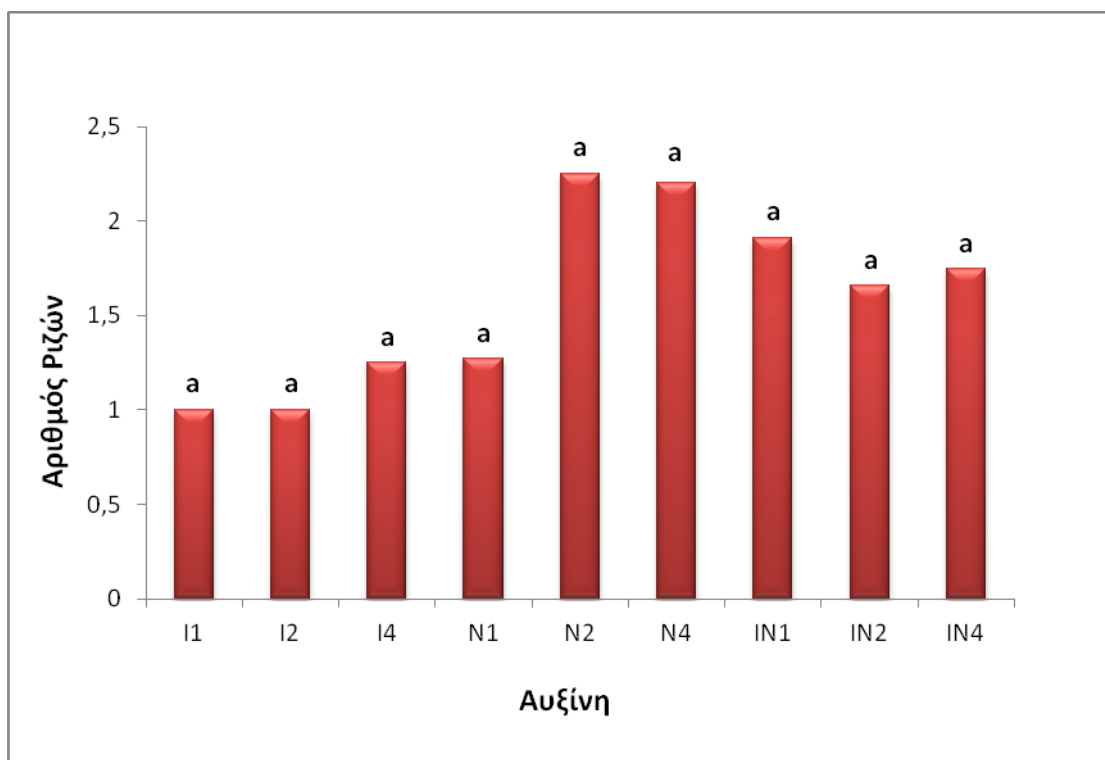
Στάδιο ριζοβολίας-Επίδραση αυξινών

Το ποσοστό ριζοβολίας παρουσίασε έντονη διακύμανση μεταξύ των επεμβάσεων (Διάγραμμα 13). Αξιοσημείωτο είναι το γεγονός ότι οι επτά από τις εννέα επεμβάσεις δεν ξεπέρασαν το 50% ενώ το καλύτερο αποτέλεσμα, το οποίο έδωσε η αυξίνη **NAA** σε συγκέντρωση **1ppm**, ήταν **75%**. Στατιστικώς σημαντικές διαφορές παρατηρούνται μεταξύ της προαναφερθείσας επέμβασης **N1** και της επέμβασης **N2** αλλά και των τριών επεμβάσεων **I1**, **I2**, **I4**, η πρώτη εκ των οποίων, έδωσε το χαμηλότερο ποσοστό (**5%**). Τέλος, ο συνδυασμός των δύο αυξινών έδωσε ενδιάμεσα αποτελέσματα.



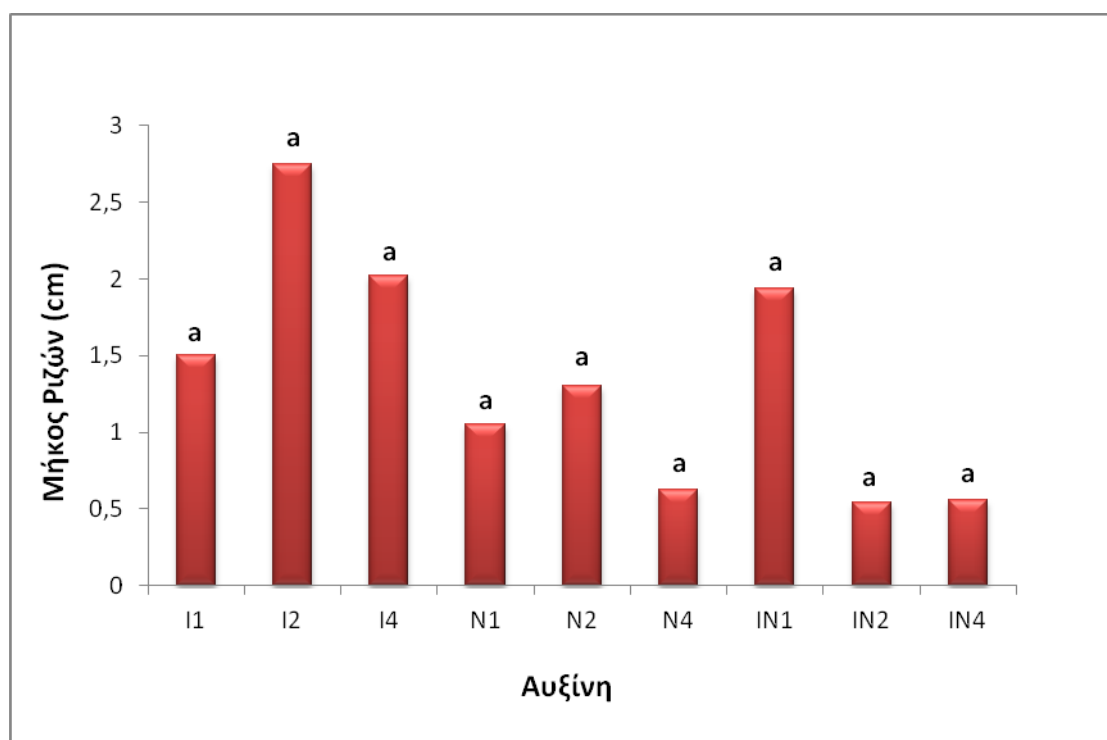
Διάγραμμα 13. Επίδραση των αυξινών και των συγκεντρώσεών τους στο ποσοστό ριζοβολίας των εκφύτων. Τα διαφορετικά γράμματα άνωθεν της μπάρας δηλώνουν την ύπαρξη στατιστικώς σημαντικής διαφοράς μεταξύ των επεμβάσεων, σύμφωνα με τη δοκιμασία πολλαπλών μέσων του Tukey HSD σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$. **Σχόλιο:** I = IBA, N = NAA, IN = IBA + NAA. Ο αριθμός που ακολουθεί, αντιστοιχεί στη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε (ppm).

Στο Διάγραμμα 14 παρατηρείται, ότι οι επεμβάσεις N2 και N4 έδωσαν το μεγαλύτερο αριθμό ριζών ενώ οι επεμβάσεις I1 και I2 το μικρότερο. Παρόλα αυτά, καμία από τις εννέα επεμβάσεις δε διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από κάποια άλλη. Αξίζει, όμως, να σημειωθεί, ότι τα έκφυτα υπό την παρουσία της αυξίνης NAA είχαν την τάση να σχηματίσουν περισσότερες ρίζες.



Διάγραμμα 14. Επίδραση των αυξινών και των συγκεντρώσεών τους στον αριθμό των εκπυσομένων ριζών. Τα διαφορετικά γράμματα άνωθεν της μπάρας δηλώνουν την ύπαρξη στατιστικώς σημαντικής διαφοράς μεταξύ των επεμβάσεων, σύμφωνα με τη δοκιμασία πολλαπλών μέσων του Tukey HSD σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$. **Σχόλιο:** I = IBA, N = NAA, IN = IBA + NAA. Ο αριθμός που ακολουθεί, αντιστοιχεί στη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε (ppm).

Αξιολογώντας την επίδραση των αυξινών επί του μήκους των εκπυσσόμενων ριζών (Διάγραμμα 15), παρατηρείται, ότι η αυξίνη IBA έδωσε, γενικά, καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με την αυξίνη NAA ή των συνδυασμό των δύο αυξινών. Όπως φαίνεται στο επόμενο διάγραμμα, το μεγαλύτερο μήκος ριζών επετεύχθη με την επέμβαση I2. Αντιθέτως, οι επεμβάσεις N4, IN2 και IN4 έδωσαν το μικρότερο μήκος ριζών. Ωστόσο, δεν παρατηρείται, και εδώ, στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των εννέα επεμβάσεων.

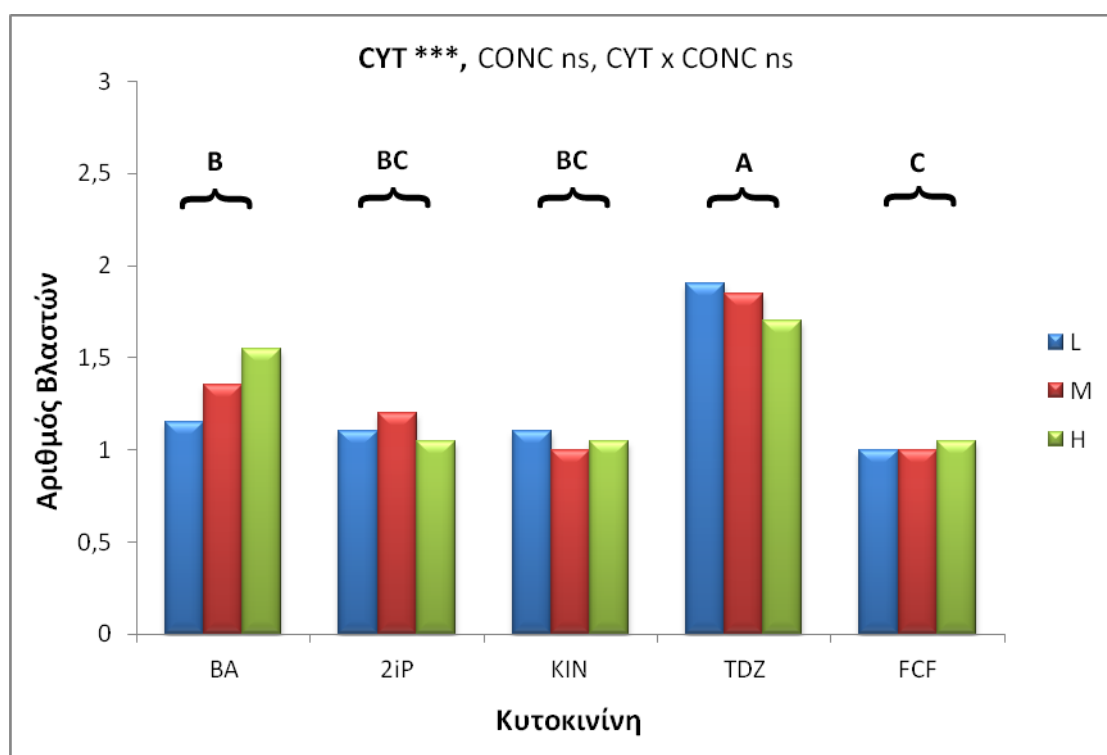


Διάγραμμα 15. Επίδραση των αυξινών και των συγκεντρώσεών τους στο μήκος των εκπυσσόμενων ριζών. Τα διαφορετικά γράμματα άνωθεν της μπάρας δηλώνουν την ύπαρξη στατιστικώς σημαντικής διαφοράς μεταξύ των επεμβάσεων, σύμφωνα με τη δοκιμασία πολλαπλών μέσων του Tukey HSD σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$. **Σχόλιο:** I = IBA, N = NAA, IN = IBA + NAA. Ο αριθμός που ακολουθεί, αντιστοιχεί στη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε (ppm).

3.2 *Citrus volkameriana*

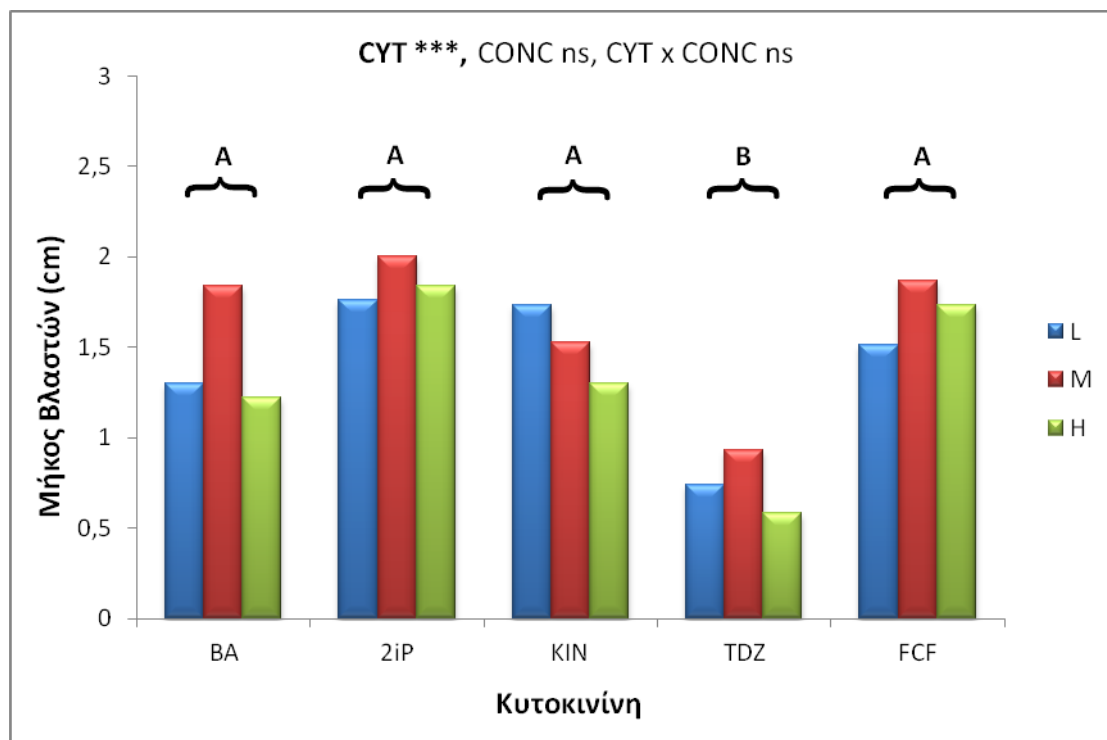
Στάδιο βλαστογένεσης-Επίδραση κυτοκινινών

Στο Διάγραμμα 16 παρατηρείται, ότι οι επεμβάσεις μεταξύ των οποίων υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά είναι η **TDZ**, που έδωσε και το μεγαλύτερο αριθμό βλαστών, ακολουθούμενη από την **BA** και στη συνέχεια από την **FCF**, που έδωσε το μικρότερο αριθμό βλαστών. Επιπλέον, δεν παρατηρείται επίδραση των συγκεντρώσεων των ορμονών στη συγκεκριμένη παράμετρο.



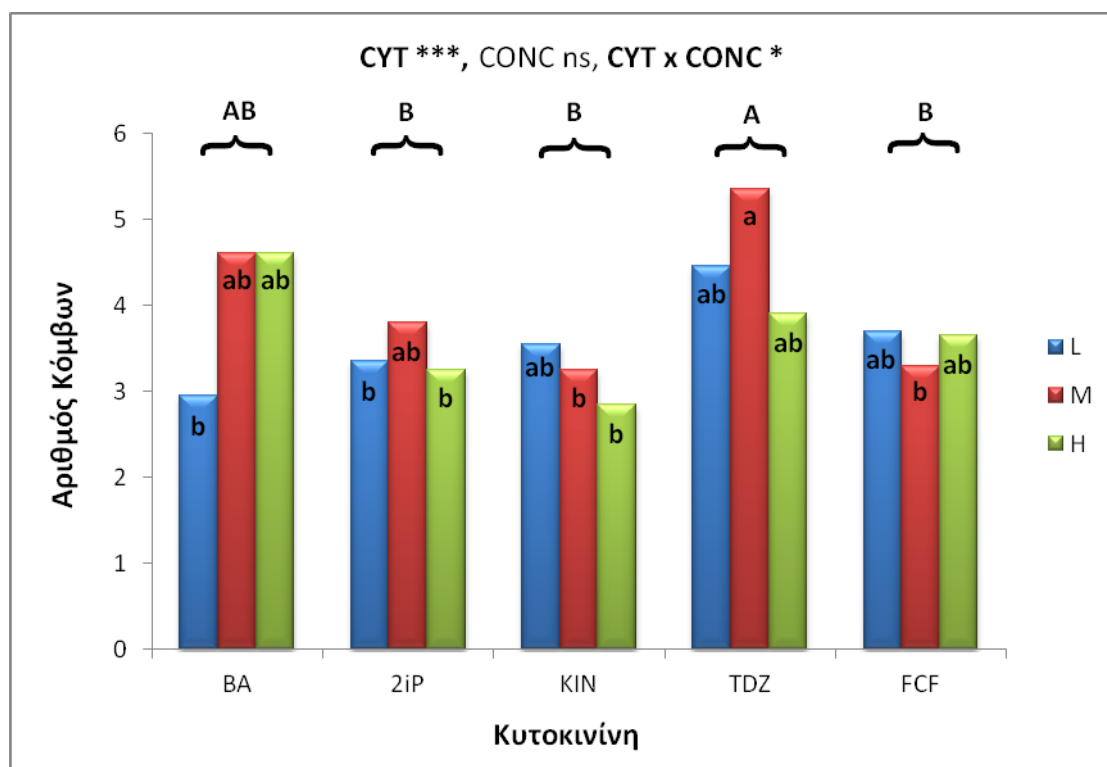
Διάγραμμα 16. Επίδραση των κυτοκινινών και των συγκεντρώσεών τους στον αριθμό των εκπυτσόμενων βλαστών. Τα διαφορετικά γράμματα στις αγκύλες δηλώνουν την ύπαρξη στατιστικώς σημαντικής διαφοράς μεταξύ των ορμονών, σύμφωνα με τη δοκιμασία πολλαπλών μέσων του Tukey HSD σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$. **Σχόλιο:** ns = non significant, *** δηλώνει $P<0.001$.

Όσον αφορά στο μήκος των εκπυσσόμενων βλαστών (Διάγραμμα 17), παρατηρείται, ότι όλες οι επεμβάσεις, πλην της TDZ, έδωσαν όμοια μεταξύ τους αποτελέσματα, ανεξαρτήτου συγκέντρωσης. Η επέμβαση **TDZ** είναι αυτή, που έδωσε το μικρότερο μήκος βλαστών και διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από τις υπόλοιπες.



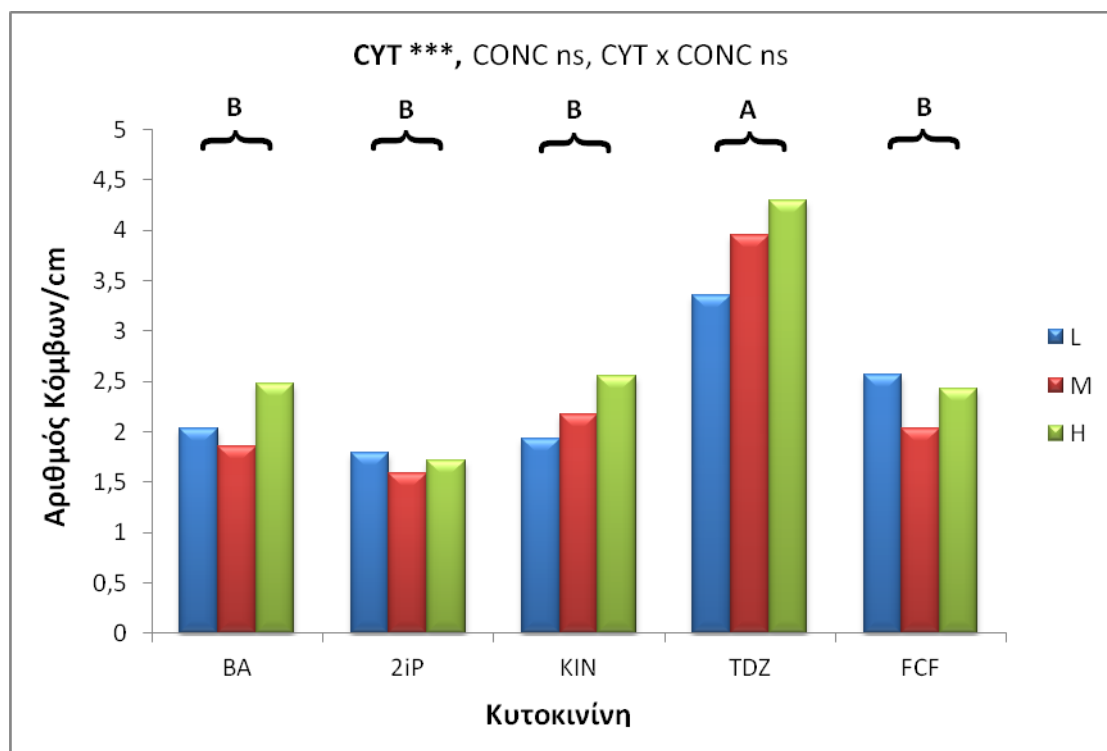
Διάγραμμα 17. Επίδραση των κυτοκινινών και των συγκεντρώσεών τους στο μήκος των εκπυσσόμενων βλαστών. Τα διαφορετικά γράμματα στις αγκύλες δηλώνουν την ύπαρξη στατιστικώς σημαντικής διαφοράς μεταξύ των ορμονών, σύμφωνα με τη δοκιμασία πολλαπλών μέσων του Tukey HSD σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$. **Σχόλιο:** ns = non significant, *** δηλώνει $P<0.001$.

Αξιολογώντας την επίδραση των κυτοκινινών επί του αριθμού των κόμβων των εκφύτων (Διάγραμμα 18), παρατηρείται, ότι η **TDZ** έδωσε το καλύτερο αποτέλεσμα. Οι επεμβάσεις που διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά απ' αυτή, ανεξαρτήτου συγκέντρωσης, είναι οι **2iP**, **KIN** και **FCF**. Επιπρόσθετα, υπάρχει αλληλεπίδραση κυτοκινίνης και συγκέντρωσης. Πιο συγκεκριμένα, η κυτοκινίνη **TDZ** και μάλιστα στη **μεσαία** συγκέντρωση (**0,05ppm**) έδωσε το μεγαλύτερο αριθμό κόμβων και διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από τις συγκεντρώσεις των υπόλοιπων κυτοκινινών, που εμφανίζουν το γράμμα **b** στις μπάρες τους.



Διάγραμμα 18. Επίδραση των κυτοκινινών και των συγκεντρώσεών τους στον αριθμό των κόμβων. Τα διαφορετικά γράμματα στις αγκύλες δηλώνουν την ύπαρξη στατιστικώς σημαντικής διαφοράς μεταξύ των ορμονών ενώ εντός της μπάρας μεταξύ των συγκεντρώσεών τους, σύμφωνα με τη δοκιμασία πολλαπλών μέσων του Tukey HSD σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$. **Σχόλιο:** ns = non significant, *** δηλώνει $P<0.001$, * δηλώνει $P<0.05$.

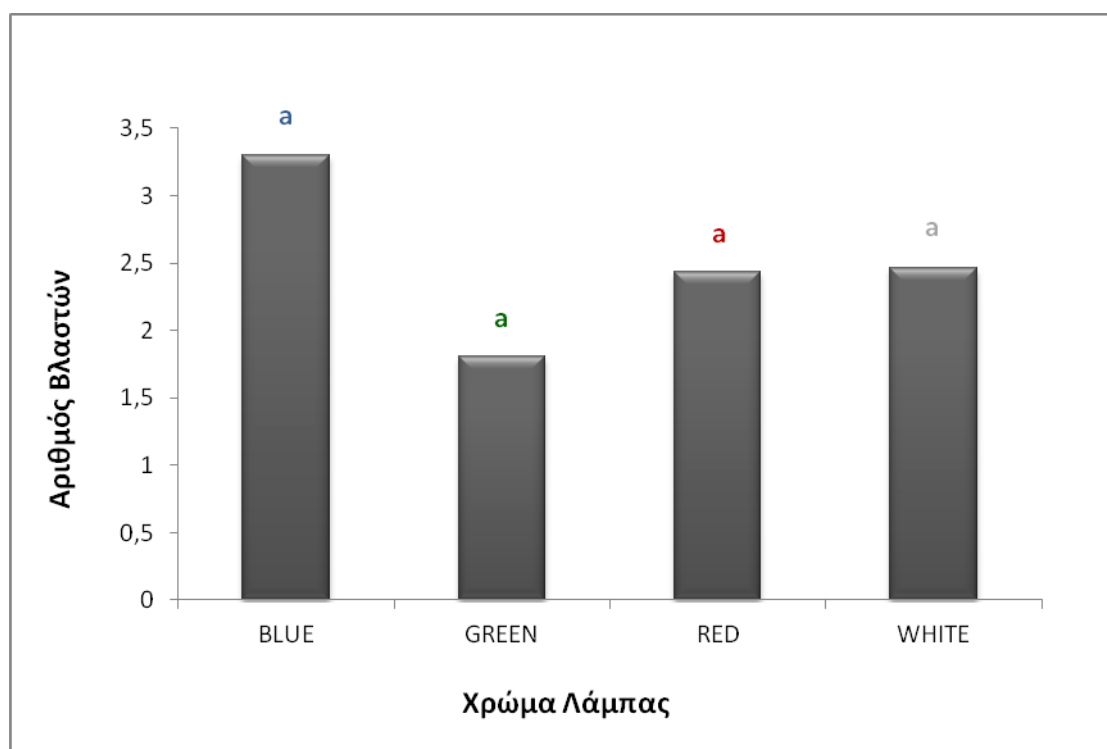
Τέλος, στο Διάγραμμα 19 φαίνεται ξεκάθαρα, ότι η επέμβαση **TDZ** έδωσε, ανεξαρτήτου συγκέντρωσης, σημαντικά μεγαλύτερο αριθμό κόμβων/cm συγκρινόμενη με τις υπόλοιπες επεμβάσεις, των οποίων τα αποτελέσματα ήταν όμοια.



Διάγραμμα 19. Επίδραση των κυτοκινινών και των συγκεντρώσεών τους στον αριθμό των κόμβων/cm. Τα διαφορετικά γράμματα στις αγκύλες δηλώνουν την ύπαρξη στατιστικής σημαντικής διαφοράς μεταξύ των ορμονών, σύμφωνα με τη δοκιμασία πολλαπλών μέσων του Tukey HSD σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$. **Σχόλιο:** ns = non significant, *** δηλώνει $P<0.001$.

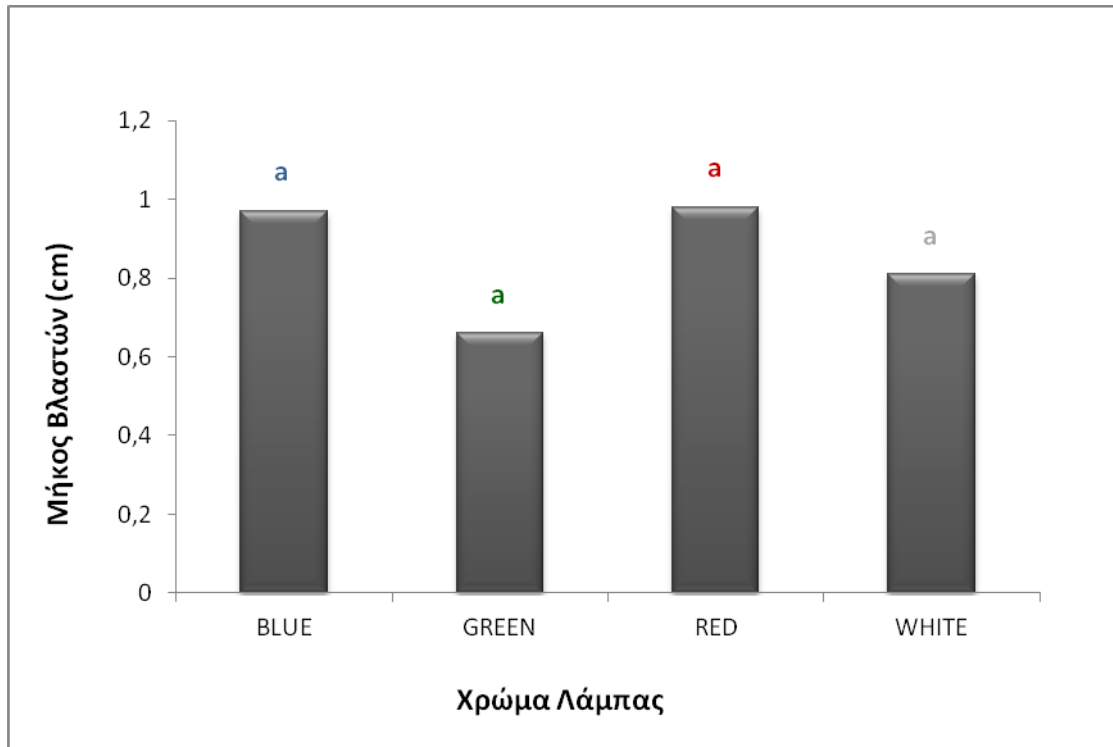
Στάδιο βλαστογένεσης-Επίδραση διαφορετικού μήκους κύματος φωτός

Στο Διάγραμμα 20 φαίνεται, ότι τα έκφυτα αντέδρασαν καλύτερα υπό την παρουσία μπλε φωτός, σχηματίζοντας περισσότερους βλαστούς. Αντιθέτως, υπό την παρουσία πράσινου φωτός παρατηρείται ο μικρότερος αριθμός βλαστών. Δεν υπάρχει, ωστόσο, στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των τεσσάρων επεμβάσεων.



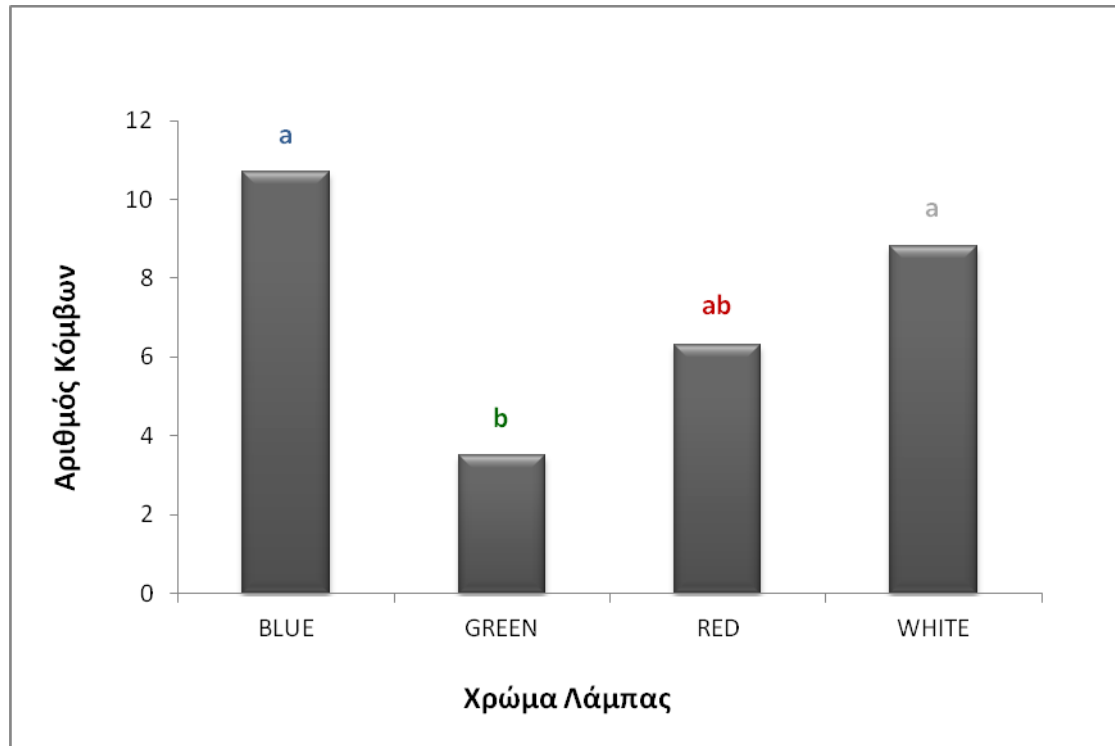
Διάγραμμα 20. Επίδραση του διαφορετικού μήκους κύματος φωτός (χρώμα λάμπας) στον αριθμό των εκπυσοσόμενων βλαστών. Τα διαφορετικά γράμματα στις μπάρες δηλώνουν την ύπαρξη στατιστικώς σημαντικής διαφοράς μεταξύ των επεμβάσεων, σύμφωνα με τη δοκιμασία πολλαπλών μέσων του Tukey HSD σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$.

Στο Διάγραμμα 21 παρατηρείται, ότι το διαφορετικό μήκος κύματος φωτός δεν επηρέασε το μήκος των εκπυσσομένων βλαστών, καθώς, και εδώ, καμία επέμβαση δε διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από κάποια άλλη.



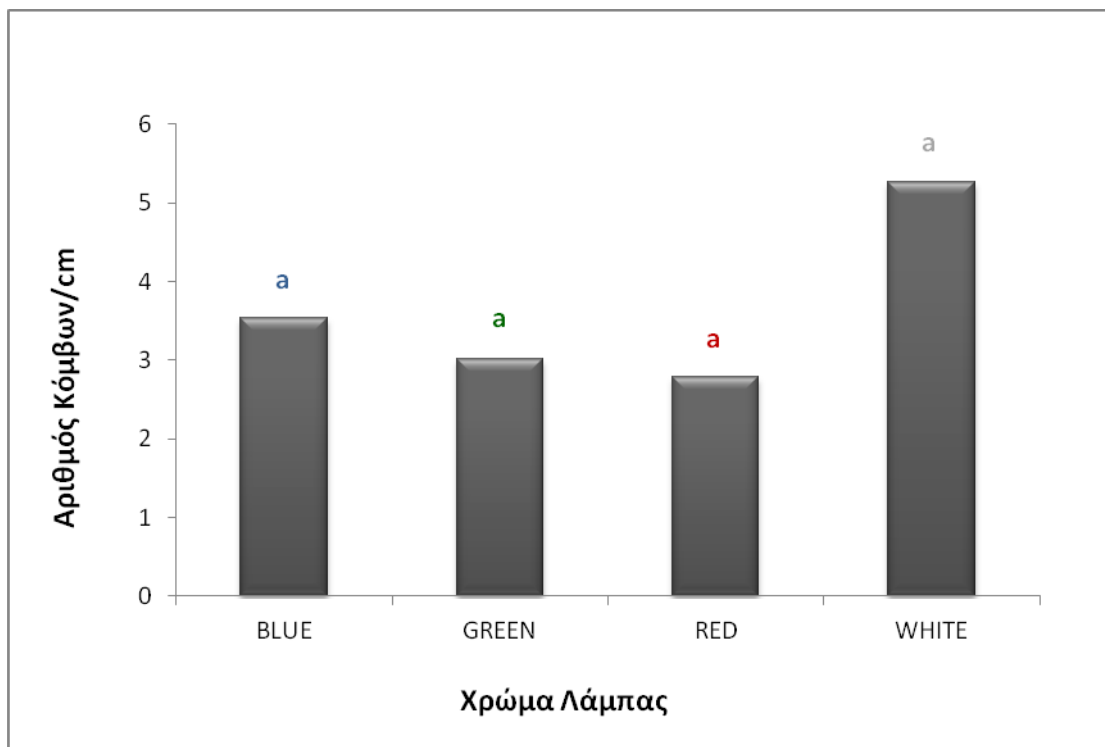
Διάγραμμα 21. Επίδραση του διαφορετικού μήκους κύματος φωτός (χρώμα λάμπας) στο μήκος των εκπυσσομένων βλαστών. Τα διαφορετικά γράμματα στις μπάρες δηλώνουν την ύπαρξη στατιστικώς σημαντικής διαφοράς μεταξύ των επεμβάσεων, σύμφωνα με τη δοκιμασία πολλαπλών μέσων του Tukey HSD σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$.

Στο Διάγραμμα 22 είναι φανερό, ότι τα έκφυτα υπό την παρουσία **μπλε** και **λευκού φωτός** σχημάτισαν περισσότερους κόμβους, διαφέροντας σημαντικά από την επέμβαση με **πράσινο χρώμα**, η οποία έδωσε τον μικρότερο αριθμό κόμβων. Η επέμβαση με κόκκινο χρώμα κυμάνθηκε σε ενδιάμεσο επίπεδο.



Διάγραμμα 22. Επίδραση του διαφορετικού μήκους κύματος φωτός (χρώμα λάμπας) στον αριθμό των κόμβων. Τα διαφορετικά γράμματα στις μπάρες δηλώνουν την ύπαρξη στατιστικώς σημαντικής διαφοράς μεταξύ των επεμβάσεων, σύμφωνα με τη δοκιμασία πολλαπλών μέσων του Tukey HSD σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$.

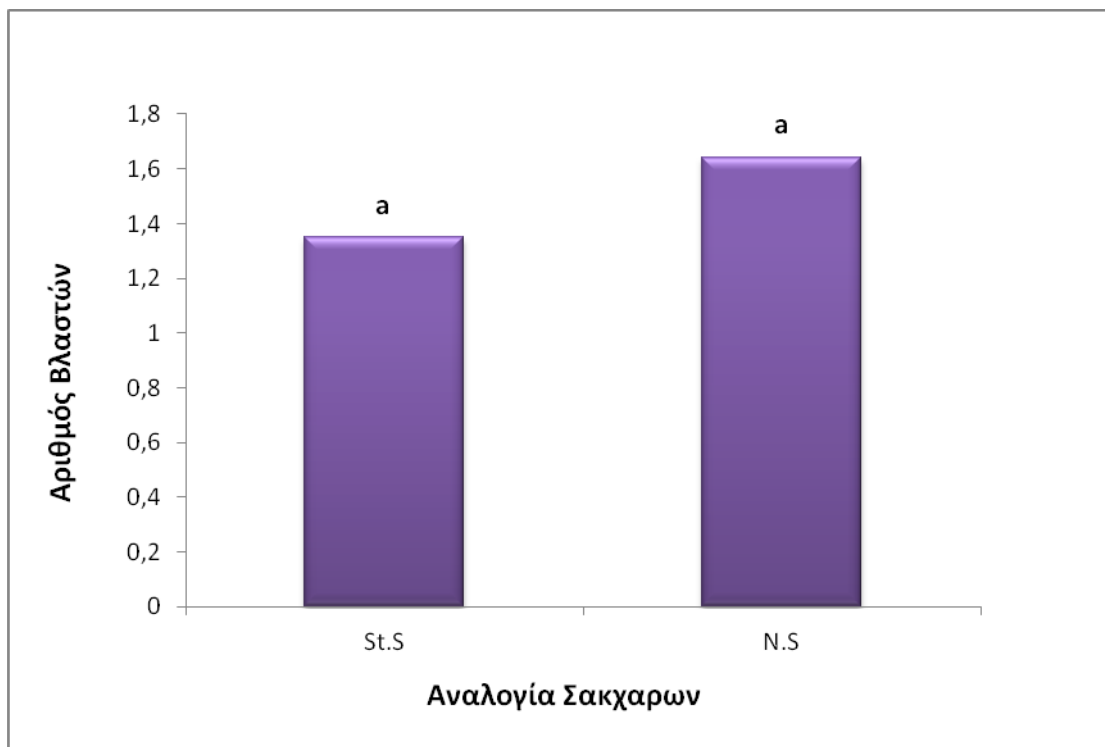
Όσον αφορά στον αριθμό των κόμβων/cm (Διάγραμμα 23), δεν επηρεάστηκε από το διαφορετικό μήκος κύματος φωτός, αφού καμία στατιστικώς σημαντική διαφορά δεν παρατηρείται μεταξύ των τεσσάρων επεμβάσεων.



Διάγραμμα 23. Επίδραση του διαφορετικού μήκους κύματος φωτός (χρώμα λάμπας) στον αριθμό των κόμβων/cm. Τα διαφορετικά γράμματα στις μπάρες δηλώνουν την ύπαρξη στατιστικώς σημαντικής διαφοράς μεταξύ των επεμβάσεων, σύμφωνα με τη δοκιμασία πολλαπλών μέσων του Tukey HSD σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$.

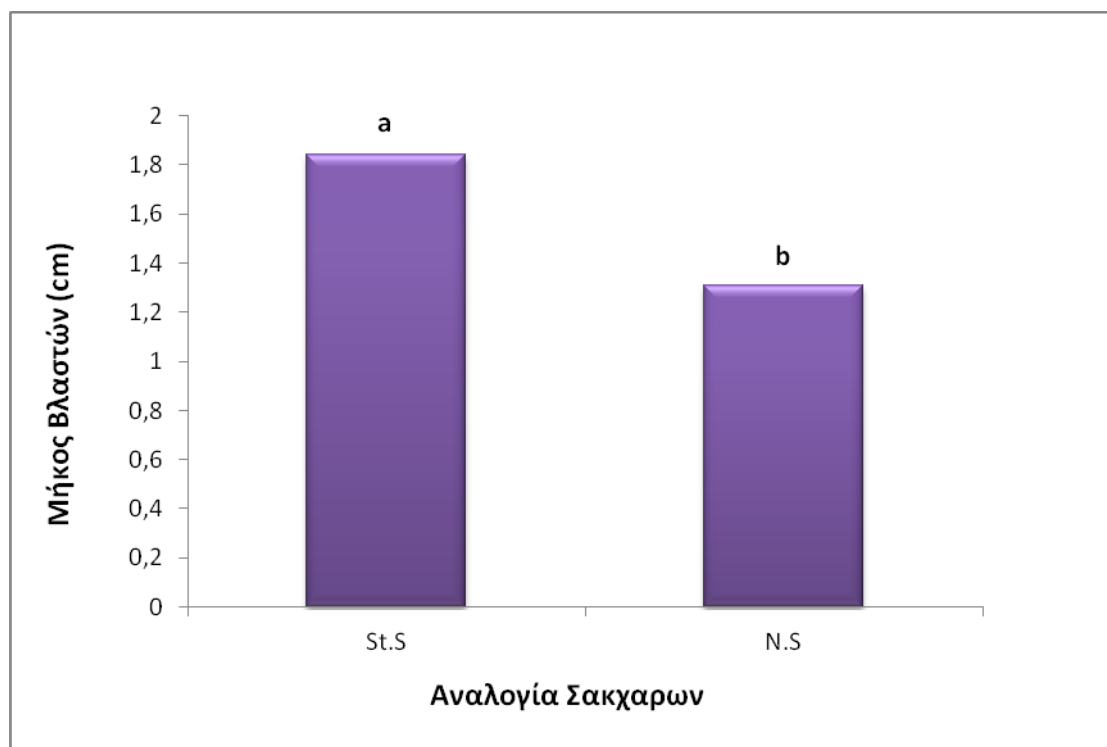
Στάδιο βλαστογένεσης-Επίδραση διαφορετικής αναλογίας σακχάρων

Όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 24, η διαφορετική αναλογία σακχάρων του υποστρώματος δεν επηρέασε τον αριθμό των εκπυσόμενων βλαστών, αφού δεν παρατηρείται στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο επεμβάσεων.



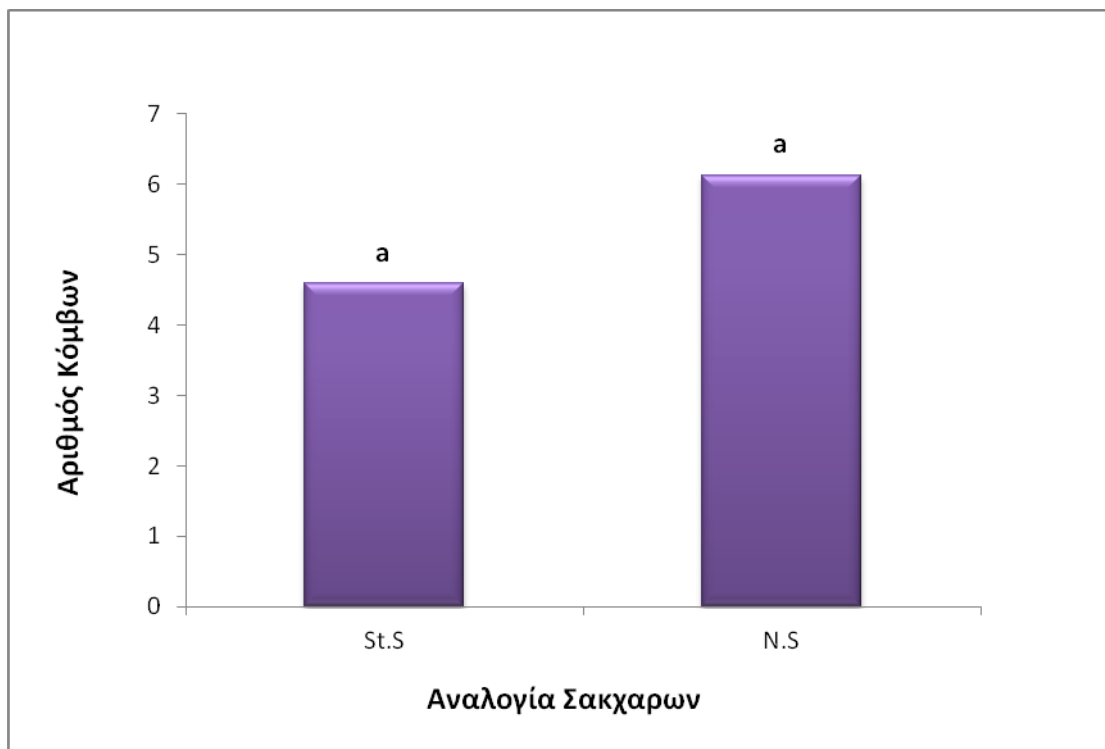
Διάγραμμα 24. Επίδραση της διαφορετικής αναλογίας σακχάρων του υποστρώματος στον αριθμό των εκπυσόμενων βλαστών. Μέσοι όροι ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα (άνωθεν της μπάρας) δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά, σύμφωνα με τη δοκιμασία T-test σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$. **Σχόλιο:** St.S = Standard Sugars (30g σακχαρόζης/L), N.S = New Sugars (αναλογία σακχάρων στα φύλλα του μητρικού φυτού από το οποίο προέκυψαν τα έκφυτα).

Αντιθέτως, στο Διάγραμμα 25 παρατηρείται, ότι η διαφορετική αναλογία σακχάρων επηρέασε αρνητικά το μήκος των εκπυσσόμενων βλαστών, δίνοντας σημαντικά μικρότερο μήκος σε σχέση με την «τυπική» αναλογία (30g σακχαρόζης/L).



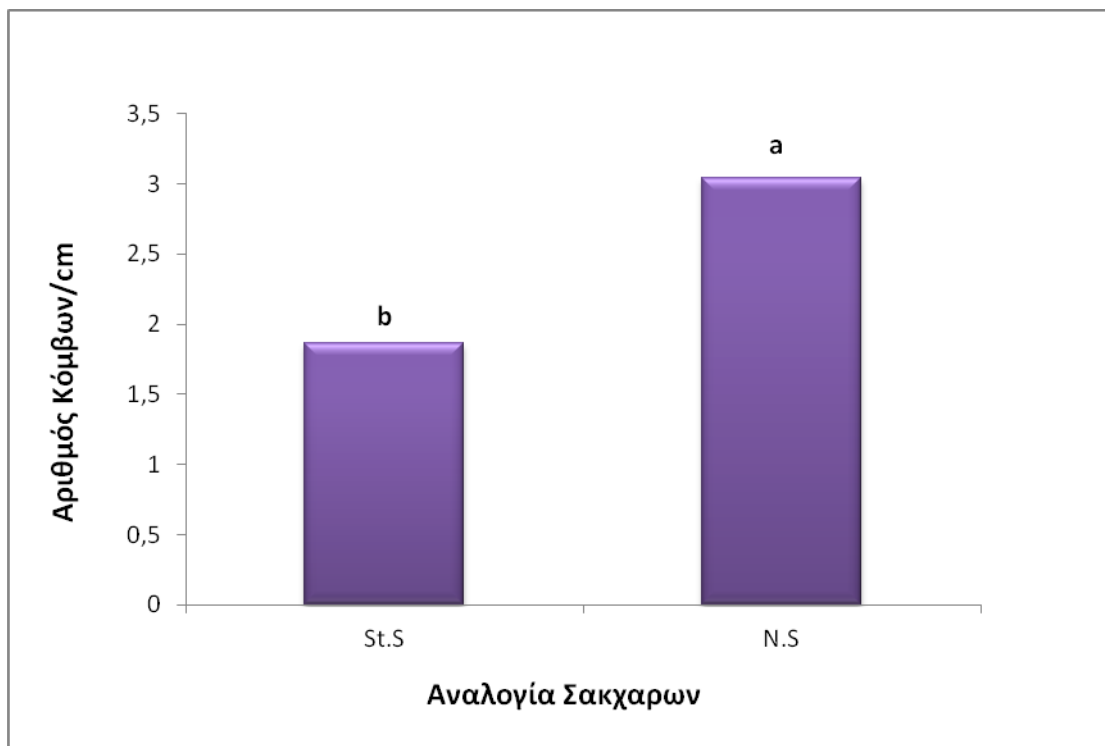
Διάγραμμα 25. Επίδραση της διαφορετικής αναλογίας σακχάρων του υποστρώματος στο μήκος των εκπυσσόμενων βλαστών. Μέσοι όροι ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα (άνωθεν της μπάρας) δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά, σύμφωνα με τη δοκιμασία T-test σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$. **Σχόλιο:** St.S = Standard Sugars (30g σακχαρόζης/L), N.S = New Sugars (αναλογία σακχάρων στα φύλλα του μητρικού φυτού από το οποίο προέκυψαν τα έκφυτα).

Η νέα αναλογία σακχάρων δεν επηρέασε τον αριθμό των κόμβων των εκφύτων, όπως φαίνεται στο Διάγραμμα 26, αφού η διαφορά που υπάρχει μεταξύ των δύο επεμβάσεων δε θεωρείται στατιστικώς σημαντική.



Διάγραμμα 26. Επίδραση της διαφορετικής αναλογίας σακχάρων του υποστρώματος στον αριθμό των κόμβων. Μέσοι όροι ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα (άνωθεν της μπάρας) δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά, σύμφωνα με τη δοκιμασία T-test σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$. **Σχόλιο:** St.S = Standard Sugars (30g σακχαρόζης/L), N.S = New Sugars (αναλογία σακχάρων στα φύλλα του μητρικού φυτού από το οποίο προέκυψαν τα έκφυτα).

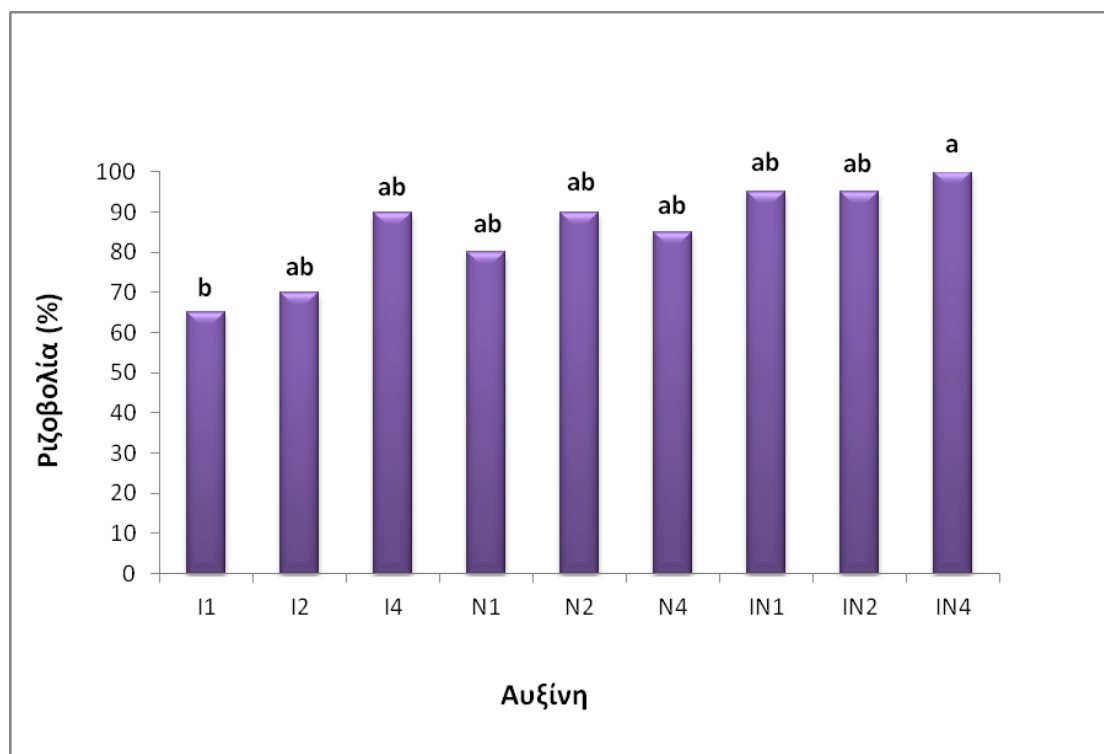
Τέλος, στο Διάγραμμα 27 παρατηρείται, ότι η διαφορετική αναλογία σακχάρων έδωσε μεγαλύτερο αριθμό κόμβων/cm σε σχέση με την «τυπική» αναλογία (30g σακχαρόζης/L), διαφέροντας στατιστικά σημαντικά απ' αυτή.



Διάγραμμα 27. Επίδραση της διαφορετικής αναλογίας σακχάρων του υποστρώματος στον αριθμό των κόμβων/cm. Μέσοι όροι ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα (άνωθεν της μπάρας) δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά, σύμφωνα με τη δοκιμασία T-test σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$. **Σχόλιο:** St.S = Standard Sugars (30g σακχαρόζης/L), N.S = New Sugars (αναλογία σακχάρων στα φύλλα του μητρικού φυτού από το οποίο προέκυψαν τα έκφυτα).

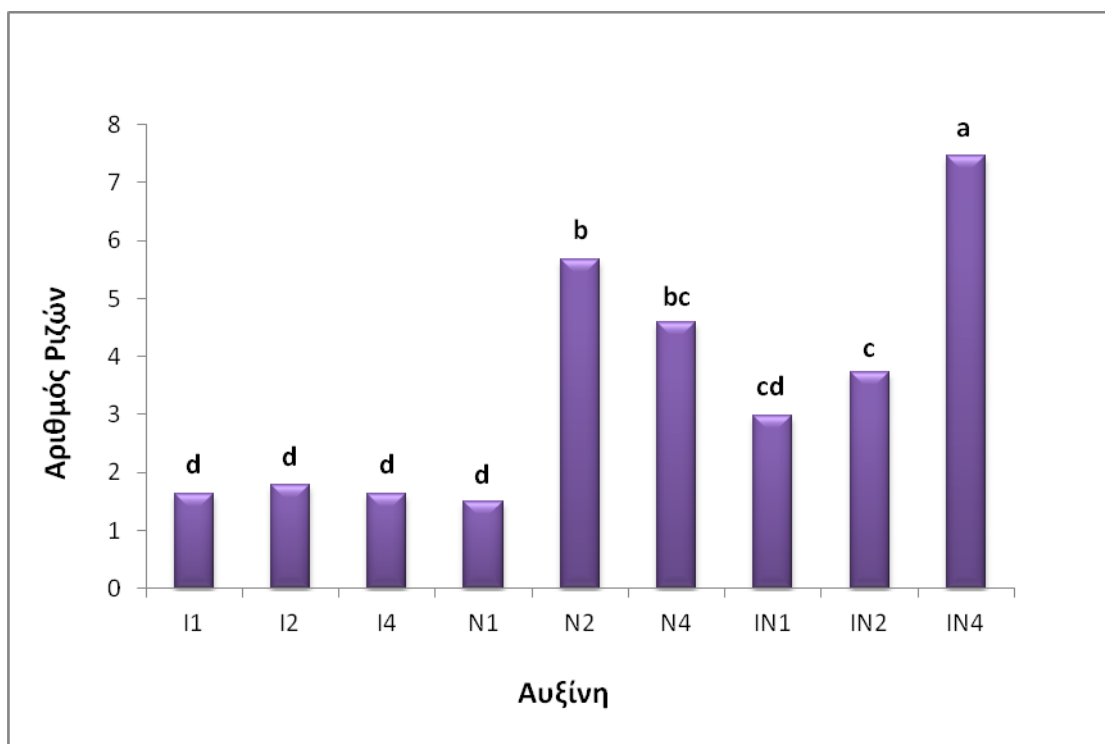
Στάδιο ριζοβολίας-Επίδραση αυξινών

Στο Διάγραμμα 28 παρατηρείται, ότι τα προς ριζοβολία έκφυτα του είδους *Citrus volkameriana* αντέδρασαν ικανοποιητικά υπό την παρουσία των αυξινών. Το μεγαλύτερο ποσοστό ριζοβολίας (**100%**) επετεύχθη με το συνδυασμό **IBA+NAA** σε συγκέντρωση **4ppm** ενώ το μικρότερο (**65%**) με την αυξίνη **IBA** σε συγκέντρωση **1ppm**. Αυτή είναι και η μόνη στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των εννέα επεμβάσεων.



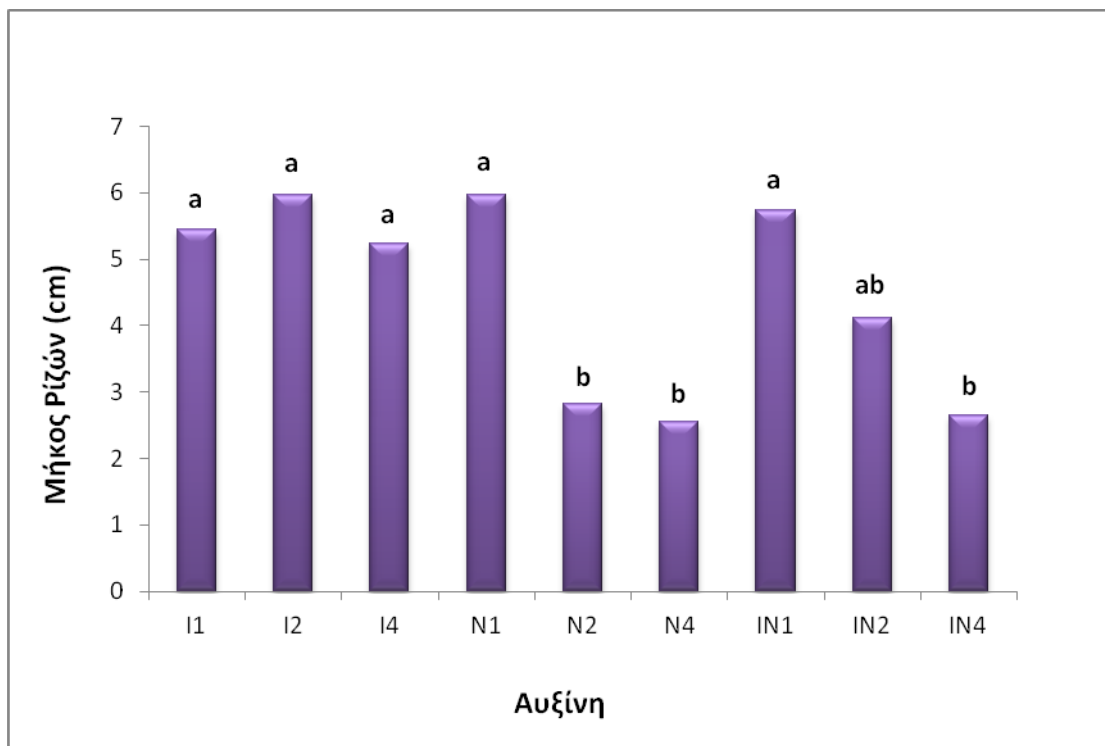
Διάγραμμα 28. Επίδραση των αυξινών και των συγκεντρώσεών τους στο ποσοστό ριζοβολίας των εκφύτων. Τα διαφορετικά γράμματα άνωθεν της μπάρας δηλώνουν την ύπαρξη στατιστικώς σημαντικής διαφοράς μεταξύ των επεμβάσεων, σύμφωνα με τη δοκιμασία πολλαπλών μέσων του Tukey HSD σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$. **Σχόλιο:** I = IBA, N = NAA, IN = IBA+NAA. Ο αριθμός που ακολουθεί, αντιστοιχεί στη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε (ppm).

Όσον αφορά στον αριθμό των εκπτυσσόμενων ριζών (Διάγραμμα 29), τα έκφυτα υπό την παρουσία της αυξίνης **NAA** έδωσαν, γενικά, καλύτερα αποτελέσματα. Φαίνεται ξεκάθαρα, ότι οι επεμβάσεις **I1, I2, I4** αλλά και η επέμβαση **N1** έδωσαν σημαντικά μικρότερο αριθμό ριζών σε σχέση με τις υπόλοιπες. Παρατηρούμε, επίσης, ότι η επέμβαση **IN4** έδωσε το μεγαλύτερο αριθμό ριζών, ακολουθούμενη από τις επεμβάσεις **N2** και **IN2**, οι οποίες διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά τόσο μεταξύ τους όσο και με την πρώτη.



Διάγραμμα 29. Επίδραση των αυξινών και των συγκεντρώσεών τους στον αριθμό των εκπτυσσόμενων ριζών. Τα διαφορετικά γράμματα άνωθεν της μπάρας δηλώνουν την ύπαρξη στατιστικώς σημαντικής διαφοράς μεταξύ των επεμβάσεων, σύμφωνα με τη δοκιμασία πολλαπλών μέσων του Tukey HSD σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$. **Σχόλιο:** I = IBA, N = NAA, IN = IBA + NAA. Ο αριθμός που ακολουθεί, αντιστοιχεί στη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε (ppm).

Τέλος, στο Διάγραμμα 30 φαίνεται, ότι αυξάνοντας τη συγκέντρωση της αυξίνης NAA παρατηρείται μια τάση μείωσης του μήκους των ριζών. Πιο συγκεκριμένα, οι επεμβάσεις **N2**, **N4** και **IN4** έδωσαν σημαντικά μικρότερο μήκος ριζών συγκρινόμενες με τις υπόλοιπες επεμβάσεις (πλην της IN2), στις οποίες η αυξίνη NAA είτε δεν είχε προστεθεί είτε βρισκόταν σε μικρότερη συγκέντρωση.



Διάγραμμα 30. Επίδραση των αυξινών και των συγκεντρώσεών τους στο μήκος των εκπυσσόμενων ριζών. Τα διαφορετικά γράμματα άνωθεν της μπάρας δηλώνουν την ύπαρξη στατιστικής σημαντικής διαφοράς μεταξύ των επεμβάσεων, σύμφωνα με τη δοκιμασία πολλαπλών μέσων του Tukey HSD σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$. **Σχόλιο:** I = IBA, N = NAA, IN = IBA + NAA. Ο αριθμός που ακολουθεί, αντιστοιχεί στη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκε (ppm).

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

4.1 Επίδραση των κυτοκινινών στα χαρακτηριστικά των βλαστών

Όπως συμπεραίνουμε, από τα αποτελέσματα του παρόντος πειράματος αλλά και από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας, η *in vitro* οργανογένεση των εσπεριδοειδών ελέγχεται, κατά το πλείστον, ορμονικά, ανεξαρτήτως λοιπών πειραματικών συνθηκών, οι οποίες, βέβαια, δρουν επιβοηθητικά.

Οι ορμόνες που χρησιμοποιήθηκαν στο στάδιο της βλαστογένεσης ήταν κυτοκινίνες, οι οποίες διακρίνονται σε δύο κύριες ομάδες ενώσεων, τα παράγωγα αδενίνης και τα συνθετικά παράγωγα φαινυλουρίας, όπως η TDZ και η FCF (CPPU). Τα παράγωγα φαινυλουρίας χρησιμοποιούνται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις όντας εξίσου αποτελεσματικά. Αυτό, πιθανόν, να οφείλεται, στο ότι η φαινυλουρία προωθεί την παραγωγή ενδογενών κυτοκινινών (Magioli *et al*, 1998) ενώ, μάλλον, παρουσιάζει σχετική ανεκτικότητα στις ενδογενείς οξειδάσες τους (Arinaitwe *et al*, 2000).

Υπενθυμίζεται, ότι στο παρόν πείραμα, στο είδος *Citrus volkameriana* οι συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν για τις κυτοκινίνες BA, 2iP και KIN ήταν **0.25, 0.5 και 1ppm** ενώ για τις TDZ και FCF **0.025, 0.05 και 0.1ppm**. Στο είδος *Citrus aurantium* όλες οι κυτοκινίνες εφαρμόστηκαν σε συγκεντρώσεις **0.5, 1 και 2ppm**, οι οποίες για τις δύο φαινυλουρίες θεωρούνται αρκετά υψηλές.

Συγκεντρωτικά, στο πείραμά μας, στο είδος *Citrus aurantium* η **BA** έδωσε, συνολικά, ανεξαρτήτου συγκέντρωσης (0.5, 1, 2ppm), τα καλύτερα αποτελέσματα και στα τρία, κύρια, χαρακτηριστικά των βλαστών που μελετήθηκαν. Εξίσου καλά αποτελέσματα, έδωσε η **FCF** στον αριθμό των βλαστών και των κόμβων ενώ η 2iP μόνο στο μήκος των βλαστών. Η TDZ, σε αντίθεση με τη BA, έδωσε τα χειρότερα αποτελέσματα και στα τρία χαρακτηριστικά ενώ παρόμοια αποτελέσματα έδωσε η KIN.

Στο είδος *Citrus volkameriana* όλες οι κυτοκινίνες έδωσαν καλά αποτελέσματα ως προς το μήκος των βλαστών, πλην της TDZ, η οποία έδωσε το μικρότερο μήκος. Παρόλα αυτά, η TDZ έδωσε το μεγαλύτερο αριθμό βλαστών και κόμβων ανά έκφυτο, συγκρινόμενη με τις υπόλοιπες κυτοκινίνες. Συγκεκριμένα, ο μεγαλύτερος αριθμός κόμβων επιτεύχθηκε σε συγκέντρωση **0,05ppm**, η οποία διέφερε σημαντικά από ορισμένες συγκεντρώσεις των υπολοίπων κυτοκινινών και ήταν η μόνη περίπτωση, στο παρόν πείραμα, που παρατηρήθηκε επίδραση της συγκέντρωσης των κυτοκινινών στα χαρακτηριστικά των βλαστών.

Επίσης, παρατηρείται, ότι η **TDZ**, γενικά, εφαρμοζόμενη σε **υψηλές** συγκεντρώσεις (**0.5, 1 και 2ppm**) στο *Citrus aurantium* δεν έδωσε καλά αποτελέσματα ενώ σε **χαμηλές** συγκεντρώσεις (**0.025, 0.05 και 0.1ppm**) στο *Citrus volkameriana* έδωσε, γενικά, καλύτερα αποτελέσματα. Παράλληλα, και στα δύο είδη, ανεξαρτήτου συγκέντρωσης, έδωσε το μικρότερο μήκος βλαστών αλλά το μεγαλύτερο αριθμό κόμβων/cm. Αντιθέτως, η **FCF** στις υψηλές συγκεντρώσεις έδωσε, γενικά, καλά αποτελέσματα (*Citrus aurantium*) ενώ στις χαμηλές όχι, πλην του μήκους των βλαστών (*Citrus volkameriana*).

Τέλος, πρέπει να σημειωθεί, ότι οι εκπυσσομένοι βλαστοί υπό την επίδραση της **TDZ**, πέραν του μικρού τους μήκους, στο *Citrus aurantium* παρουσίαζαν **μορφολογικές ανωμαλίες**, όπως κύρτωση, στενόμακρα φύλλα κ.α. (Εικ. 13) ενώ στο *Citrus volkameriana* είχαν πολύ λεπτά και χλωρωτικά φύλλα. (Εικ. 14) Για το λόγο αυτό, αν και η TDZ έδωσε, θεωρητικά, τα καλύτερα αποτελέσματα στο *Citrus volkameriana*, η κυτοκινίνη που επιλέχθηκε να χρησιμοποιηθεί στα επόμενα στάδια του πειράματος, ήταν η BA, η οποία έδωσε τα αμέσως καλύτερα αποτελέσματα (σημαντικά μικρότερο αριθμό βλαστών αλλά σημαντικά μεγαλύτερο μήκος). Επομένως, συνυπολογίζοντας, τόσο τα ποσοτικά όσο και τα ποιοτικά χαρακτηριστικά των βλαστών και των δύο ειδών, η **BA** ήταν η κυτοκινίνη, που χρησιμοποιήθηκε στο στάδιο διερεύνησης της επίδρασης του διαφορετικού μήκους κύματος φωτός και της διαφορετικής αναλογίας σακχάρων στα χαρακτηριστικά των βλαστών.

Τα αποτελέσματα του πειράματός μας, ως προς την BA, συμφωνούν με αυτά των Nhan *et al.* (2018) οι οποίοι χρησιμοποίησαν ως έκφυτα, επικοτύλια των υποκειμένων *Citrus volkameriana* και Carrizo Citrange, σε υπόστρωμα MT με διάφορες συγκεντρώσεις BA και αναφέρουν, ότι δεν υπήρχε διαφορά μεταξύ των συγκεντρώσεων 0.5 και 1ppm στον αριθμό των εκπυσσομένων βλαστών και στα δύο υποκείμενα. Ανάλογα αποτελέσματα παρατήρησαν και οι Almeida *et al.* (2002) σε δύο ποικιλίες του είδους *Citrus sinensis* και στο είδος *Citrus limonia* (0.5, 1, 2ppm BA), χρησιμοποιώντας έκφυτα επικοτυλίου σε υπόστρωμα MT.

Αντίθετα, οι Tavano *et al.* (2009), χρησιμοποιώντας έκφυτα επικοτυλίου των ειδών *Citrus volkameriana* και *Citrus aurantium* σε υπόστρωμα EME και BA σε συγκεντρώσεις 0, 0.5, 1, 1.5 και 2ppm, παρατήρησαν, ότι στο είδος *Citrus volkameriana* η συγκέντρωση 1ppm BA έδωσε μεγαλύτερο αριθμό βλαστών από αυτή των 0.5ppm ενώ στο *Citrus aurantium* η συγκέντρωση 0.5ppm έδωσε περισσότερους βλαστούς από τις συγκεντρώσεις 1.5 και 2ppm.

Οι Parthasarathy *et al.* (2002) αξιολόγησαν την επίδραση των κυτοκινινών BA και KIN σε συγκεντρώσεις (0.5-2ppm) στα χαρακτηριστικά των βλαστών (υπόστρωμα MS), σε 5 είδη του γένους *Citrus* (συμπεριλαμβανομένου του *Citrus volkameriana*), χρησιμοποιώντας, ως έκφυτα, βλαστούς που είχαν προέλθει από ιστοκαλλιέργεια. Στα αποτελέσματά τους αναφέρουν, ότι στο *Citrus volkameriana*, τον μεγαλύτερο αριθμό βλαστών και κόμβων έδωσε η BA ενώ το μεγαλύτερο μήκος βλαστών η KIN. Το παραπάνω συμφωνεί, μερικώς, με

τα αποτελέσματά μας, καθώς η BA έδωσε περισσότερους βλαστούς και κόμβους από την KIN, χωρίς όμως, στατιστικώς σημαντική διαφορά. Όσον αφορά στο μήκος των βλαστών, τα αποτελέσματα μεταξύ των δύο κυτοκινινών ήταν ίδια. Οι ίδιοι ερευνητές αναφέρουν, επίσης, ότι, ανεξάρτητα από το είδος, η BA έδωσε, γενικά, καλύτερα αποτελέσματα από την KIN στα χαρακτηριστικά των βλαστών. Αυτό συμφωνεί, επίσης, με τα αποτελέσματά μας, και για τα δύο είδη, όπου η BA έδωσε, γενικά, καλύτερα αποτελέσματα από την KIN, άλλοτε με στατιστικώς σημαντική διαφορά και άλλοτε όχι.

Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν, επίσης, με αυτά των Samaan *et al.* (2009) οι οποίοι κάνουν λόγο για υπεροχή της BA έναντι της KIN, ως προς τον αριθμό των βλαστών, στο είδος *Citrus volkameriana*, χρησιμοποιώντας δύο τύπους εκφύτων (βλαστούς προερχόμενους από ιστοκαλλιέργεια και επικοτύλια) σε υπόστρωμα MS. Ωστόσο, στο πείραμά μας, στατιστικώς σημαντική διαφορά παρατηρείται στο *Citrus aurantium*, μεταξύ των δύο αυτών κυτοκινινών, ενώ στο *Citrus volkameriana* η διαφορά δεν θεωρείται σημαντική.

Οι Roussos *et al.* (2011) σε ανάλογο πείραμα στο οποίο εξετάστηκε η επίδραση πέντε διαφορετικών κυτοκινινών (BA, 2iP, KIN, TDZ, FCF) στα χαρακτηριστικά των βλαστών, χρησιμοποιώντας επικοτύλια του είδους *Citrus aurantium*, σε υπόστρωμα MT, παρατήρησαν ότι το μεγαλύτερο αριθμό βλαστών, ανεξαρτήτου συγκέντρωσης, έδωσαν η BA, η KIN και η FCF ενώ το μικρότερο η TDZ. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν με τα παραπάνω, ως προς την BA, την FCF και την TDZ. Πρέπει, όμως, να σημειωθεί, ότι στο παρόν πείραμα η BA εφαρμόστηκε σε διπλάσιες και η FCF σε δεκαπλάσιες συγκεντρώσεις, οδηγώντας στο σχηματισμό περισσότερων βλαστών.

Όσον αφορά στην FCF, πρέπει, να αναφερθεί, ότι δεν έχει μελετηθεί αρκετά, ως προς την επίδρασή της στην άμεση οργανογένεση, τόσο σε είδη του γένους *Citrus* όσο και σε άλλα είδη. Αναφορές για τη συγκεκριμένη κυτοκινίνη υπάρχουν, κυρίως, σε πειράματα σωματικής εμβρυογένεσης. Οι Roussos *et al.* (2011) υποστηρίζουν, ότι η FCF μπορεί, να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά της BA, δίνοντας ανάλογα αποτελέσματα στα ποσοστά οργανογένεσης και στα χαρακτηριστικά των βλαστών, τουλάχιστον στο είδος *Citrus aurantium* που μελέτησαν.

Οι Nesi *et al.* (2000) συγκρίνοντας την FCF με την BA σε δύο υποκείμενα μηλιάς (M111 και M7) αναφέρουν, ότι FCF έδωσε καλύτερα αποτελέσματα για το M111 ως προς τον αριθμό των βλαστών ενώ στο M7 δεν υπήρξε διαφορά μεταξύ των δύο ορμονών. Η καλύτερη συγκέντρωση για την FCF ήταν 4,7μM ενώ για την BA 5,5μM. Για τη θετική επίδραση της FCF στην άμεση οργανογένεση και στο σχηματισμό οφθαλμών και βλαστών κάνουν λόγο, επίσης, οι Caboni *et al.* (2009) στα είδη *Actinidia chinensis* και *Actinidia deliciosa*.

Τα αποτελέσματά μας έρχονται σε αντιπαράθεση με αυτά των Germana *et al.* (2011) οι οποίοι μελέτησαν την επίδραση της BA και της TDZ (σε συγκέντρωση 1ppm) σε επικοτύλια του υποκειμένου Carrizo citrange, σε υπόστρωμα MS και αναφέρουν, ότι δεν υπάρχει

διαφορά μεταξύ των δύο αυτών κυτοκινινών, ως προς τον αριθμό και το μήκος των βλαστών. Παρόμοια αποτελέσματα παρουσιάζουν οι Germana *et al.* (2008) για το είδος *Citrus macrophylla*. Στο παρόν πείραμα, αντιθέτως, παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των δύο αυτών ορμονών στο *Citrus aurantium*, όπου οι δύο αυτές κυτοκινίνες εφαρμόστηκαν σε συγκέντρωση 1ppm με την BA να δίνει καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με την TDZ.

Συνοψίζοντας, οι περισσότεροι ερευνητές συμφωνούν για την έντονη μορφογενετική επίδραση της BA που, σε αρκετές περιπτώσεις, έχει αποδειχτεί μεγαλύτερη από αυτή της KIN. Όσον αφορά στις συγκεντρώσεις της, υποστηρίζεται, μάλιστα, ότι μέχρι το επίπεδο του 1-1,5ppm επιδρά θετικά στο σχηματισμό οφθαλμών και βλαστών ενώ πάνω από 2ppm, επιδρά, μάλλον αρνητικά (Almeida *et al.*, 2002). Η επίδραση της FCF δεν έχει μελετηθεί επαρκώς στην άμεση οργανογένεση, ωστόσο έχει δείξει θετικά αποτελέσματα και κάποιες φορές όμοια, με αυτά της BA. Τέλος, οι αναφορές που υπάρχουν για την τη TDZ έχουν δείξει αντιφατικά αποτελέσματα, γεγονός που μπορεί, να οφείλεται στις εφαρμοζόμενες συγκεντρώσεις της.

Σε αυτό το σημείο πρέπει, να τονιστεί, ότι διαφορές που εντοπίζονται μεταξύ των αποτελεσμάτων του παρόντος πειράματος και των αποτελεσμάτων άλλων ερευνητών, κυρίως ως προς το μήκος των βλαστών και δευτερευόντως ως προς τον αριθμό τους, μπορεί, να οφείλονται στην παρουσία της γιββερελλίνης GA₃ σε συγκέντρωση 0,5ppm στο θρεπτικό υπόστρωμα. Η παραπάνω υπόθεση έχει επιβεβαιωθεί από τους Perez-Tornero *et al.* (2010) οι οποίοι παρατήρησαν, ότι η παρουσία γιββερελλίνης επέδρασε θετικά στον αριθμό και στο μήκος των βλαστών των εκφύτων (τμήμα βλαστού με οφθαλμό), σε 6 ποικιλίες του είδους *Citrus limon*. Τέλος, οι διαφορές αυτές μπορεί, να οφείλονται, ακόμα, στη χρήση διαφορετικού υποστρώματος, στον τύπο του εκφύτου και στον τρόπο τοποθέτησής στο υπόστρωμα (οριζόντια ή κάθετα) αλλά και στην διαφορετική απόκριση του εκάστοτε είδους και γονότυπου στις εφαρμοζόμενες κυτοκινίνες και στις συγκεντρώσεις τους.

4.2 Επίδραση του διαφορετικού μήκους κύματος φωτός στα χαρακτηριστικά των βλαστών

Τα φυτικά κύτταρα διαθέτουν, τουλάχιστον, τρία διαφορετικά συστήματα φωτοϋποδοχέων που εμπλέκονται στη ρύθμιση της αύξησης και της ανάπτυξης, το καθένα από τα οποία είναι περισσότερο ευαίσθητο σε διαφορετικό μήκος κύματος. Αυτά είναι τα φυτοχρώματα, οι υποδοχείς μπλε φωτός/UV-A και οι υποδοχείς UV-B (Κίντζιος, 2015). Σε αρκετά φυτικά είδη, σε αντίθεση με το γένος *Citrus*, έχει αποδειχτεί, ότι η εφαρμογή συγκεκριμένου μήκους κύματος φωτός κατά τη διάρκεια της ιστοκαλλιέργειας μπορεί, να

περιορίσει ή να διεγείρει και να κατευθύνει την οργανογένεση, επηρεάζοντας επίσης τα χαρακτηριστικά των βλαστών. Επισημαίνεται, ότι στο συγκεκριμένο στάδιο αξιολογήθηκε η επίδραση 4 διαφορετικών χρωμάτων (μπλε, πράσινο, κόκκινο, λευκό) στα χαρακτηριστικά των βλαστών. Το θρεπτικό υπόστρωμα ήταν εμπλουτισμένο με **2ppm BA** και **0,5ppm GA₃**. Τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν, ότι τόσο ο αριθμός όσο και το μήκος των βλαστών, και στα δύο είδη, δεν επηρεάστηκαν από το διαφορετικό μήκος κύματος φωτός. Ωστόσο, παρατηρήθηκε τάση σχηματισμού περισσότερων βλαστών υπό την επίδραση του μπλε φωτός ενώ λιγότερων υπό την επίδραση του πράσινου. Οι βλαστοί, όμως, υπό την επίδραση του μπλε φωτός ήταν ποιοτικά κατώτεροι, με μικρή διάμετρο και στενόμακρα φύλλα. Ο αριθμός των κόμβων ανά έκφυτο μειώθηκε σημαντικά υπό την επίδραση του πράσινου φωτός στο είδος *Citrus volkameriana* ενώ το μπλε και το λευκό φως έδωσαν το μεγαλύτερο αριθμό. Η τάση αυτή, ως προς τον αριθμό των κόμβων στο πράσινο φως, παρατηρήθηκε και στο *Citrus aurantium* χωρίς, όμως, να υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά. Τέλος, στο είδος *Citrus aurantium* ο αριθμός των κόμβων/cm επηρεάστηκε αρνητικά υπό την επίδραση του πράσινου και του κόκκινου χρώματος. Γενικά, μπορούμε να πούμε, ότι τα καλύτερα αποτελέσματα έδωσαν οι επεμβάσεις με λευκό και μπλε φως, στη συνέχεια ακολούθησε η επέμβαση με κόκκινο και τελευταία η επέμβαση με πράσινο φως.

Οι Behrouz & Lineberger (1981) αναφέρουν ότι τα έκφυτα του γένους *Amelanchier* sp. (Juneberry) σχημάτισαν περισσότερους βλαστούς υπό την παρουσία μπλε και λευκού φωτός σε συνδυασμό με 0,1ppm NAA και 2,5ppm BA, σε σχέση με τα έκφυτα που καλλιεργήθηκαν υπό την παρουσία πράσινου και κόκκινου φωτός. Ο Chee (1986) αναφέρει, επίσης, ότι τα έκφυτα του υβριδίου “Remaily Seedless” του γένους *Vitis* σχημάτισαν περισσότερους βλαστούς υπό την παρουσία μπλε φωτός από αυτά της επέμβασης με κόκκινο φως, σε υπόστρωμα MS με 5μM BA. Τα αποτελέσματά μας συμφωνούν, εν μέρει, με αυτά των παραπάνω ερευνητών, από την άποψη, ότι υπό την παρουσία μπλε φωτός τα έκφυτα είχαν την τάση να σχηματίζουν περισσότερους βλαστούς. Όπως προαναφέρθηκε, όμως, δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των τεσσάρων επεμβάσεων.

Οι Geng *et al.* (2015) μελέτησαν την επίδραση λευκού, κόκκινου και μπλε φωτός στα χαρακτηριστικά των βλαστών, χρησιμοποιώντας έκφυτα των υποκειμένων Budagovsky 9 (B.9), Geneva 30 (G.30) και Geneva 41 (G.41) του είδους *Malus domestica*. Στα αποτελέσματά τους αναφέρουν, ότι το κόκκινο φως αύξησε τον αριθμό και το μήκος των βλαστών στα υποκείμενα B.9 και G.30, σε σχέση με το λευκό και το μπλε φως. Αντίθετα, τα χαρακτηριστικά των βλαστών του υποκειμένου G41 δεν παρουσίασαν διαφορές μεταξύ των τριών επεμβάσεων. Τέλος, η παρουσία 0,5ppm GA₃ στο θρεπτικό υπόστρωμα προώθησε την ανάπτυξη των βλαστών υπό την παρουσία κόκκινου και μπλε φωτός.

Οι Gabryszewska & Rudnicki (1997) αξιολογώντας την επίδραση του λευκού, πράσινου, κόκκινου και μπλε φωτός στην ανάπτυξη των βλαστών σε έκφυτα του είδους *Ficus*

benjamina cv. Golden King παρατήρησαν, ότι υπό την παρουσία κόκκινου φωτός τα έκφυτα ανέπτυξαν περισσότερους βλαστούς, σε συνδυασμό με 15ppm 2iP στο θρεπτικό υπόστρωμα. Τα αποτελέσματά μας δε συμφωνούν με τα παραπάνω, καθώς το κόκκινο φως δεν προώθησε το σχηματισμό περισσότερων βλαστών ή το μήκος τους.

Η μορφογενετική επίδραση του φωτός διερευνήθηκε, επίσης, από τους Muleo & Thomas (2015) σε έκφυτα του κλώνου M₁S 2/5 του είδους *Prunus cerasifera*, συσχετιζόμενη με την κυριαρχία κορυφής και τον σχηματισμό κόμβων-οφθαλμών. Οι παραπάνω ερευνητές παρατήρησαν, ότι το μπλε και το λευκό φως παρήγαγαν μεγαλύτερο αριθμό κόμβων ανά έκφυτο σε σχέση με το κόκκινο και το υπέρυθρο φως ή το σκοτάδι. Το παραπάνω συμφωνεί με τα αποτελέσματά μας, κυρίως, για το *Citrus volkameriana*. Οι ίδιοι ερευνητές διαπίστωσαν, επίσης, ότι το ποσοστό των κόμβων (οφθαλμών) που παρήγαγαν πλευρικούς βλαστούς ήταν υψηλότερο στο κόκκινο και στο υπέρυθρο φως σε σχέση με το λευκό και το μπλε ή το σκοτάδι. Επιπλέον, στα έκφυτα που είχε αφαιρεθεί το κορυφαίο μερίστωμα η κυριαρχία της κορυφής εξαλείφθηκε σε όλες τις επεμβάσεις με φως αλλά όχι στο σκοτάδι.

Λαμβάνοντας υπόψη όλα τα δεδομένα, οι Muleo & Thomas (2015) ισχυρίζονται, ότι ο συντελεστής πολλαπλασιασμού (proliferation rate) εξαρτάται αφενός από την επαγωγή των οφθαλμών και αφετέρου από την εξάλειψη της κυριαρχίας της κορυφής, φαινόμενα τα οποία επηρεάζονται με διαφορετικό τρόπο από την ποιότητα του φωτός. Τέλος, υποστηρίζουν, ότι το μειωμένο ποσοστό των οφθαλμών που έδωσαν βλαστούς υπό την παρουσία του μπλε φωτός σε σχέση με το κόκκινο υποδηλώνει, ότι το μπλε φως, μάλλον, δρα ανασταλτικά στην εξάλειψη της κυριαρχίας της κορυφής, κάτι που το κόκκινο φως προωθεί μέσω του φυτοχρώματος, το οποίο απορροφά στην περιοχή του κόκκινου και του υπέρυθρου φωτός.

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα του πειράματος μας και αυτά των παραπάνω ερευνητών μπορεί, να διατυπωθεί η υπόθεση, ότι η επαγωγή των οφθαλμών και η κυριαρχία της κορυφής, φαινόμενα τα οποία έχουν άμεση συσχέτιση με το συντελεστή πολλαπλασιασμού (proliferation rate), επηρεάζονται από την ποιότητα φωτός, αλλά ελέγχονται, μάλλον, από διαφορετικά μήκη κύματος. Επιπλέον η ένταση του φαινομένου της κυριαρχίας της κορυφής, η οποία είναι μικρότερη στα είδη που υπερεκφράζεται το φυτόχρωμα, διαφέρει μεταξύ των ειδών. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη διαφορετική απόκριση των ειδών και των γονότυπων στις επεμβάσεις με διαφορετικά μήκη κύματος φωτός.

4.3 Επίδραση της διαφορετικής αναλογίας σακχάρων στα χαρακτηριστικά των βλαστών

Γενικά, στο μικροπολλαπλασιασμό μπορούν να χρησιμοποιηθούν, ως πηγές άνθρακα, αρκετοί τύποι σακχάρων, μεταβάλλοντας το μορφογενετικό δυναμικό των φυτικών ιστών, ανάλογα με τον τύπο, τη συγκέντρωση και την μεταξύ τους αναλογία. Εν τούτοις, χρησιμοποιείται, συχνότερα, η σακχαρόζη, καθώς είναι το κύριο μεταφερόμενο σάκχαρο στο φλοιό των φυτών. (Yaseen *et al.*, 2013). Κατά την αξιολόγηση, όμως, του τύπου των σακχάρων πρέπει, να λαμβάνεται υπόψη η συμπεριφορά τους στο θρεπτικό υπόστρωμα. Οι περισσότεροι ερευνητές, για παράδειγμα, συμφωνούν, ότι η σακχαρόζη κατά τη διάρκεια της αποστείρωσης στον κλίβανο υπόκειται σε μερική υδρόλυση και περίπου το 10-15% μετατρέπεται σε γλυκόζη και φρουκτόζη. Μετατροπή της σακχαρόζης σε γλυκόζη και φρουκτόζη μπορεί, επίσης, να συμβεί εντός του υποστρώματος, λόγω ενζυματικής διάσπασης από την ιμβερτάση, ή άλλα ένζυμα που εκκρίνονται κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας (George *et al.*, 2008).

Επισημαίνεται, ότι στο συγκεκριμένο στάδιο του πειράματος δεν έγινε αξιολόγηση της επίδρασης διαφορετικών σακχάρων και των συγκεντρώσεων τους στα χαρακτηριστικά των βλαστών αλλά ένα μέρος της σακχαρόζης, η οποία χρησιμοποιήθηκε ως πηγή άνθρακα, στην «τυπική» αναλογία 30g/L υποστρώματος, σε όλα τα στάδια του πειράματος, αντικαταστάθηκε από τη γλυκόζη και τη φρουκτόζη. Στο είδος *Citrus volkameriana* εφαρμόστηκε η αναλογία: **13,6g σακχαρόζη/13,6g γλυκόζη/2,8g φρουκτόζη = 30g/L** ενώ στο είδος *Citrus aurantium* η αναλογία: **25g σακχαρόζη/2,5g γλυκόζη/2,5g φρουκτόζη = 30g/L**. Οι παραπάνω αναλογίες καθορίστηκαν με βάση την αρχική αναλογία των σακχάρων αυτών στα φύλλα των μητρικών φυτών, από τα οποία πάρθηκαν οι καρποί, οι σπόροι και προέκυψαν κατ' επέκταση τα αρχικά έκφυτα. Το υπόστρωμα ήταν εμπλουτισμένο με **2ppm BA** και **0,5ppm GA**.

Τα αποτελέσματα του πειράματος έδειξαν, ότι η νέα αναλογία σακχάρων στο *Citrus aurantium* δεν επηρέασε κανένα από τα χαρακτηριστικά των βλαστών που μελετήθηκαν. Αυτό, ίσως οφείλεται, στο ότι η αναλογία που εφαρμόστηκε δε διέφερε πολύ από την «τυπική» αναλογία. Στο *Citrus volkameriana*, το μόνο χαρακτηριστικό το οποίο επηρεάστηκε, και μάλιστα αρνητικά, από τη νέα αναλογία σακχάρων ήταν το μήκος των βλαστών. Αυτό είχε ως συνέπεια, η παράμετρος αριθμός κόμβων/cm να είναι μεγαλύτερη με τη νέα αναλογία, αφού υπολογίζεται ως: αριθμός κόμβων/(αριθμός βλαστών x μήκος βλαστών) και ο παρονομαστής του κλάσματος μειώθηκε.

Γενικά, δεν υπάρχουν αναφορές σχετικά με την επίδραση του τύπου των σακχάρων στην άμεση οργανογένεση και στα χαρακτηριστικά των βλαστών για το γένος *Citrus*, εκτός από αυτήν των Singh & Rajam (2010), οι οποίοι αναφέρουν, ότι η σακχαρόζη και η μαλτόζη,

ως πηγές άνθρακα, παρουσίασαν όμοια αποτελέσματα ως προς την αναγέννηση των βλαστών στο είδος *Citrus sinensis*.

Όσες αναφορές υπάρχουν για το γένος *Citrus*, αφορούν, κυρίως, σε πειράματα σωματικής εμβρυογένεσης, όπου εξετάζεται η επίδραση των σακχάρων και των συγκεντρώσεών τους στο σχηματισμό κάλου ή εμβρύων και τη μετέπειτα εξέλιξη τους. Ο Button (1978) αναφέρει, ότι η σακχαρόζη έδωσε καλύτερα αποτελέσματα στην ανάπτυξη και στο τελικό μέγεθος του καλού, ακολουθούμενη από τη γλυκόζη, τη φρουκτόζη και άλλα σάκχαρα, σε πείραμα σωματικής εμβρυογένεσης στο γένους *Citrus* ενώ οι Ricci *et al.* (2002) αναφέρουν ότι η γαλακτόζη και η λακτόζη οδήγησαν στο σχηματισμό περισσότερων σωματικών εμβρύων συγκρινόμενες με τη σακχαρόζη, τη γλυκόζη και τη μαλτόζη στα είδη *Citrus reticulata*, *Citrus sinensis* και *Citrus nobilis* x *Citrus deliciosa*.

Ο Debnath (2005) αναφέρει, ότι η απόκριση των εκφύτων 5 ποικιλιών του είδους *Vaccinium vitis-idaea* ήταν καλύτερη υπό την παρουσία σακχαρόζης (20g/L) στο υπόστρωμα, ως προς το σχηματισμό βλαστών, συγκρινόμενη με την παρουσία γλυκόζης ή σορβιτόλης. Ωστόσο, η γλυκόζη υποστήριξε, εξίσου, καλά την ανάπτυξη των βλαστών. Ο Al-Khateeb (2008) ισχυρίζεται, ότι η γλυκόζη, η φρουκτόζη και η μαλτόζη είναι, ως πηγές άνθρακα, σχεδόν ισοδύναμες της σακχαρόζης, ως προς την επίδρασή τους στα χαρακτηριστικά των βλαστών του είδους *Phoenix dactylifera*. Οι Hsia & Korban (1996) αναφέρουν, ότι υπό την παρουσία φρουκτόζης στο υπόστρωμα καλλιέργειας τα έκφυτα της ποικιλίας Carefree Beauty, του είδους *Rosa hybrida* σχημάτισαν περισσότερους βλαστούς, σε σχέση με την παρουσία σακχαρόζης. Αντίθετα, στην ποικιλία Cuthert Grant, του ίδιου είδους, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των δύο αυτών σακχάρων. Στο παρόν πείραμα, ο αριθμός των βλαστών ανά έκφυτο δεν επηρεάστηκε από την νέα αναλογία σακχάρων και στα δύο είδη.

Οι Sridhar & Naidu (2011) αναφέρουν, ότι το μέγιστο μήκος βλαστών στα έκφυτα του είδους *Solanum nigrum* παρατηρήθηκε υπό την παρουσία σακχαρόζης (40g/L) στο θρεπτικό υπόστρωμα, σε σχέση με την παρουσία φρουκτόζης, γλυκόζης ή μαλτόζης. Οι Romano *et al.* (1995) αναφέρουν, επίσης, ότι το μέγιστο μήκος βλαστών στα έκφυτα του είδους *Quercus suber* παρατηρήθηκε υπό την παρουσία σακχαρόζης (30g/L) στο θρεπτικό υπόστρωμα, σε σχέση με την παρουσία φρουκτόζης, γλυκόζης ή σορβιτόλης. Τα παραπάνω αποτελέσματα συμφωνούν μερικώς με τα δικά μας για το είδος *Citrus volkameriana*, όπου η αντικατάσταση της μισής, περίπου, ποσότητας σακχαρόζης, κυρίως, με γλυκόζη μείωσε σημαντικά το μήκος των εκπυσσόμενων βλαστών.

Οι διαφορές που παρατηρούνται στην επίδραση των διαφορετικών τύπων σακχάρων στα χαρακτηριστικά των βλαστών, μπορεί, να οφείλονται στην ευκολία ή στη δυσκολία απορρόφησής τους από τους φυτικούς ιστούς, λόγω οσμωτικών φαινομένων που, ίσως, δημιουργούν στο θρεπτικό υπόστρωμα ή ακόμα και στην ικανότητα ορισμένων σακχάρων να

μεταφέρονται πιο γρήγορα (π.χ. σακχαρόζη) από κάποια άλλα στα κορυφαία μεριστώματα (George *et al.*, 2008). Οι περισσότεροι ερευνητές, πάντως, συμφωνούν, ότι σημαντικός παράγοντας είναι, επίσης, η απόκριση του εκάστοτε είδους και γονότυπου στον εφαρμοζόμενο τύπο σακχάρων και στις συγκεντρώσεις τους.

4.3 Επίδραση των αυξινών στη ριζοβολία (%) και στα χαρακτηριστικά των ριζών

Η προσθήκη αυξινών στο θρεπτικό υπόστρωμα, θεωρείται, πλέον, απαραίτητη για την επαγωγή της ριζογένεσης και την περαιτέρω ανάπτυξη των ριζών, καθώς η ευεργετική τους δράση στο στάδιο της ριζοβολίας έχει αναφερθεί, σε πολλά είδη, από την πλειονότητα των ερευνητών. Παρόλα αυτά, η απόκριση των ειδών και των ποικιλιών στον εφαρμοζόμενο τύπο αυξινών και στις συγκεντρώσεις τους παρουσιάζει διαφορές, με αποτέλεσμα να διαφοροποιούνται και τα ποσοστά ριζοβολίας. Οι Almeida *et al.* (2002) αναφέρουν, ότι 3 ποικιλίες του είδους *Citrus sinensis* παρουσίασαν διαφορετικά ποσοστά ριζοβολίας με την προσθήκη 1ppm IBA σε υπόστρωμα MT ενώ αντίστοιχα αποτελέσματα παρουσιάζουν οι Perez-Tornero *et al.* (2010) μεταξύ 6 ποικιλιών του είδους *Citrus limon*.

Στο παρόν πείραμα, το ποσοστό ριζοβολίας κυμάνθηκε, ανάλογα με την επέμβαση, από 65% έως 100% για το είδος *Citrus volkameriana* ενώ από 5% έως 75% για το *Citrus aurantium*. Ανάλογο ποσοστό ριζοβολίας (67%) παρουσιάζουν για το *Citrus volkameriana* οι Al- Khazali & Hamad (2016) με 1ppm IBA σε υπόστρωμα MS^{1/2}. Αντίθετα, σε υπόστρωμα MS με 1ppm NAA το ποσοστό ριζοβολίας ήταν 56% ενώ στο παρόν πείραμα 80%. Ο Al-Bahrany (2002) αναφέρει, ότι το μεγαλύτερο ποσοστό ριζοβολίας στο είδος *Citrus aurantifolia* επιτεύχθηκε με την προσθήκη είτε 1ppm NAA είτε με το συνδυασμό 2ppm IBA+0,5ppm NAA. Το παραπάνω συμφωνεί με τα αποτελέσματά μας, καθώς τα δύο μεγαλύτερα ποσοστά 75% για το *Citrus aurantium* και 100% για το *Citrus volkameriana* παρατηρήθηκαν με την επέμβαση 1ppm NAA και με συνδυασμό IBA+NAA (4ppm) αντίστοιχα.

Οι Tallón *et al.* (2012) αναφέρουν, ότι ο συνδυασμός IBA+IAA σε διάφορες συγκεντρώσεις έδωσε πολύ χαμηλά ποσοστά ριζοβολίας στο είδος *Citrus aurantium*. Αντιθέτως, όταν δοκιμάστηκε ο συνδυασμός IBA+NAA το ποσοστό ριζοβολίας ήταν σχεδόν 100%. Στον παρόν πείραμα, παρατηρείται, ότι τα έκφυτα, και των δύο ειδών, έδωσαν, γενικά, μεγαλύτερα ποσοστά ριζοβολίας υπό την παρουσία του NAA στο θρεπτικό υπόστρωμα.

Τα αποτελέσματα του πειράματός μας έδειξαν, για το *Citrus volkameriana*, την ύπαρξη μίας αντίθετης σχέσης μεταξύ του IBA και του NAA, ως προς τον αριθμό και το μήκος των ριζών. Τα έκφυτα υπό την παρουσία του NAA ανέπτυξαν, γενικά, περισσότερες ρίζες.

Αυξάνοντας, όμως, τη συγκέντρωσή του στα 2ppm και 4ppm παρατηρήθηκε σημαντική μείωση του μήκους των ριζών. Επιπλέον, το μήκος το ριζών υπό την παρουσία μόνο του IBA ήταν μεγαλύτερο. Στο *Citrus aurantium* δεν παρατηρήθηκε στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων, ως προς τα δύο αυτά χαρακτηριστικά, ωστόσο ακολουθήθηκε η ίδια τάση.

Οι Samaan *et al.* (2009) παρατήρησε ότι τα έκφυτα του *Citrus volkameriana* ανέπτυξαν το μεγαλύτερο αριθμό και μήκος ριζών σε υπόστρωμα MS με προσθήκη 2ppm IBA+NAA. Το παραπάνω συμφωνεί με τα αποτελέσματά μας, μόνο ως προς τον αριθμό των ριζών, όπου ο μεγαλύτερος αριθμός επιτεύχθηκε με το συνδυασμό IBA+NAA, στη διπλάσια, όμως, συγκέντρωση (4ppm).

Το σχηματισμό περισσότερων ριζών με συνδυασμό αυξινών διαπίστωσαν και οι Perez-Tornero *et al.* (2010), σε έκφυτα του είδους *Citrus limon* χρησιμοποιώντας, όμως, 1ppm IBA+IAA. Οι ίδιοι ερευνητές αναφέρουν, επίσης, ότι το μεγαλύτερο μήκος ριζών παρατηρήθηκε με την προσθήκη μόνο του IBA (3ppm) στο υπόστρωμα και όχι με το συνδυασμό αυξινών, κάτι που παρατηρήθηκε και στον παρόν πείραμα. Όλα τα παραπάνω συμφωνούν με τα αποτελέσματα του Al-Bahrany (2002) ο οποίος αναφέρει, ότι στο είδος *Citrus aurantifolia* ο μεγαλύτερος αριθμός ριζών επιτεύχθηκε με το συνδυασμό IBA+NAA (2ppm) και το μήκος των ριζών ήταν μεγαλύτερο, όταν στο υπόστρωμα είχε προστεθεί μόνο IBA.

Συνοψίζοντας τα αποτελέσματα του παρόντος πειράματος και των άλλων ερευνητών, συμπεραίνουμε ότι και οι δύο αυξίνες (IBA και NAA) ευνοούν τη ριζογένεση. Ωστόσο, παρατηρείται σε αρκετές περιπτώσεις, τουλάχιστον στο γένος *Citrus*, ότι το NAA προωθεί το σχηματισμό περισσότερων ριζών ενώ το IBA το μεγαλύτερο μήκος τους. Πιθανόν το NAA ως πιο σταθερή αυξίνη μπορεί να προωθεί το σχηματισμό ριζών, όμως η συνεχής παρουσία του στο υπόστρωμα αναστέλλει την αύξηση αυτών (George *et al.*, 2008). Λαμβάνοντας υπόψη την διαφορετική απόκριση του κάθε είδους και γονότυπου, για να επιτευχθεί το καλύτερο αποτέλεσμα στο ποσοστό ριζοβολίας αλλά και στα χαρακτηριστικά των ριζών θεωρείται, μάλλον, αναγκαία η προσθήκη και των δυο αυξινών μέχρι τη συγκέντρωση των 2ppm στο υπόστρωμα καλλιέργειας.

Τέλος, πρέπει, να αναφερθεί, ότι το ποσοστό επιβίωσης των νεαρών φυταρίων, μετά την παραμονή τους για 30 ημέρες σε μονάδα υδρονέφωσης, το οποίο εξαρτάται, πιθανώς, από τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των ριζών, ήταν 85% για το *Citrus volkameriana* και 65% για το *Citrus aurantium*.

5. ΕΓΚΛΕΙΣΜΟΣ ΣΕ ΚΑΨΙΔΙΟ

5.1 Εισαγωγή

Η διατήρηση γενετικού υλικού πολλών φυτικών ειδών πραγματοποιείται με τη μέθοδο συλλογής και συντήρησης των σπόρων τους. Οι σπόροι, όμως, των εσπεριδοειδών είναι ευπαθείς και χάνουν σχετικά γρήγορα τη ζωτικότητα τους, όταν αποθηκεύονται για μεγάλα χρονιά διαστήματα. Επομένως, στις περισσότερες περιπτώσεις, η διατήρηση του γενετικού τους υλικού βασίζεται, κυρίως, στην καλλιέργεια ολόκληρων φυτών ως συλλογές στον αγρό, στην εγκατάσταση και διατήρηση *in vitro* καλλιέργειών, καθώς και στη μέθοδο της κρυοδιατήρησης (cryopreservation) (Marin & Duran-Vila, 1991).

Η εφαρμογή της τελευταίας μεθόδου μπορεί, να συνδυαστεί με τον εγκλεισμό φυτικών οργάνων σε καψίδια (encapsulation), τα οποία αναφέρονται συχνά και ως συνθετικοί σπόροι (synthetic seeds) όταν το όργανο που εγκλείεται είναι εμβρυοειδές. Το καψίδιο είναι ένα τεχνητό πήγμα (γέλη), το οποίο παρασκευάζεται, συνήθως, από θρεπτικό υπόστρωμα, άλας νατρίου αλγινικού οξέος και γλωριούχο ασβέστιο, εντός του οποίου μπορούν, να εγκλωβιστούν σωματικά έμβρυα, έκφυτα με οφθαλμούς, μεριστώματα κ.α. Με τη μέθοδο αυτή, εξασφαλίζεται η διατήρηση των οργάνων σε χαμηλές θερμοκρασίες για σχετικά μεγάλο χρονικό διάστημα, αφού όταν είναι επιθυμητό οι συνθετικοί σπόροι, τοποθετούμενοι σε κατάλληλο υπόστρωμα, μπορούν, να αναγεννήσουν μέρος του φυτού ή και ολόκληρο το φυτό στην περίπτωση σωματικών εμβρύων (Perveen & Anis, 2014 ; Κίντζιος, 2015).

Η μέθοδος της κρυοδιατήρησης, σε συνδυασμό με το μικροπολλαπλασιασμό, έχει αποτελέσει τα τελευταία χρόνια πεδίο έρευνας για πολλά είδη φυτών, λόγω των πλεονεκτημάτων που παρουσιάζει. Σε ορισμένες περιπτώσεις, για παράδειγμα, η μέθοδος αυτή είναι πιο απλή, φθηνότερη και εξίσου ή περισσότερο αποτελεσματική σε σχέση με άλλες μεθόδους διατήρησης γενετικού υλικού. Επίσης, επιτρέπει την *in vitro* καλλιέργεια σε περιόδους, που υπάρχει δυσκολία εξεύρεσης φυτικού υλικού. Επιπλέον, μπορεί, να διευκολύνει τη μεταφορά γενετικού υλικού καθώς και να μειώσει την πιθανότητα εμφάνισης γενετικής αστάθειας, φαινόμενο που μπορεί, να εμφανιστεί με τη συνεχή *in vitro* καλλιέργεια. Τέλος, αποτελεί χρήσιμη μέθοδο για τη διατήρηση και αναπαραγωγή σπάνιων υβριδίων, εκλεκτών γονότυπων και γενετικά τροποποιημένων φυτών, των οποίων οι σπόροι είναι πολύ ακριβοί ή μη, άμεσα, διαθέσιμοι (Sakhanokho *et al.*, 2013 ; Perveen & Anis, 2014).

5.2 Υλικά & Μέθοδοι

Σε αυτό το μέρος του πειράματος, πραγματοποιήθηκε εγκλεισμός εκφύτων (τμήμα βλαστού με οφθαλμό), και των δύο ειδών, σε καψίδια, αποθήκευσή τους σε χαμηλές θερμοκρασίες (-2°C και 4°C) και έλεγχος της ικανότητας αναβλάστησής τους, μετά από τοποθέτηση σε κατάλληλο υπόστρωμα. Πρόκειται, ουσιαστικά, για την παρασκευή ενός τεχνητού πήγματος με σφαιρικό σχήμα, εντός του οποίου κλείνεται το κάθε έκφυτο και απομονώνεται, κατά κάποιο τρόπο, από το εξωτερικό περιβάλλον, με σκοπό τη σχετικά μακρόχρονη διατήρησή του.

Για την παρασκευή των καψιδίων ακολουθήθηκαν τα παρακάτω βήματα:

- i. Σε 100ml υπόστρωμα DKW (χωρίς άγαρ και σακχαρόζη) έγινε προσθήκη 3g άλατος νατρίου αλγινικού οξέος, 2ppm BA, 0.5ppm GA₃ και 0.5g/L Glycine betaine και ακολούθησε θέρμανση υπό συνεχή ανάδευση (Διάλυμα Α).
- ii. Παρασκευή διαλύματος χλωριούχου ασβεστίου (CaCl₂) 1% και 2% w/v (Διάλυμα Β).
- iii. Κόψιμο 2-3 tips πιπέτας (1-5ml) με μαχαίρι, ώστε η διάμετρος τους να είναι περίπου 0,8cm.
- iv. Αποστείρωση των διαλυμάτων, των tips και των απαραίτητων εργαλείων στους 121°C, για 20min (περίπου 1,5atm).
- v. Μεταφορά όλων των παραπάνω στο θάλαμο νηματικής ροής.
- vi. Κόψιμο των εκφύτων και μεταφορά τους στο Διάλυμα Α.
- vii. Αναρρόφηση των εκφύτων (ένα έκφυτο κάθε φορά), με τη βοήθεια της πιπέτας, μαζί με μικρή ποσότητα διαλύματος Α.
- viii. Μεταφορά τους στο διάλυμα Β και παραμονή για 15min ή 5min, ώστε να δημιουργηθεί το καψίδιο.
- ix. Εμβάπτιση των καψιδίων σε αποστειρωμένο νερό, ώστε να απομακρυνθεί η περίσσεια CaCl₂ και τοποθέτησή τους, με λαβίδα, σε αποστειρωμένα falcons των 50ml.

Στη συνέχεια, τα καψίδια αποθηκεύθηκαν σε δύο ξεχωριστούς θαλάμους με -2°C και 4°C. Μετά την πάροδο 45 ημερών, φυτεύθηκαν σε κωνικές φιάλες, που περιείχαν υπόστρωμα DKW εμπλουτισμένο με 2ppm BA και 0,5ppm GA₃ (περίπου το μισό καψίδιο εντός του υποστρώματος) και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο με φωτοπερίοδο 16 ωρών, στους 21°C, με σκοπό την αναβλάστησή τους. Μερικά καψίδια φυτεύθηκαν στο παραπάνω υπόστρωμα,

αμέσως μετά την παρασκευή τους, και τοποθετήθηκαν, απευθείας, στους 21°C, ώστε να γίνει σύγκριση με αυτά, που είχαν, προηγουμένως, αποθηκευθεί σε χαμηλότερες θερμοκρασίες.



Εικόνες 11, 12 & 13. Αναρρόφηση εκφύτου με διάλυμα αλγινικού νατρίου και μεταφορά του στο διάλυμα CaCl_2 (αριστερά), δημιουργία καψιδίου (μέση) και έτοιμα καψίδια προς αποθήκευση (δεξιά).

Επιπλέον, κάποια καψίδια κόπηκαν ημιτελώς με αποστειρωμένο νυστέρι, πριν τη φύτευσή τους στο καινούργιο υπόστρωμα, ενώ άλλα όχι, για να παρατηρηθούν τυχόν διαφορές κατά τη διαδικασία εξόδου των βλαστών των εκφύτων από το καψίδιο. Τέλος, πρέπει, να αναφερθεί, ότι σε αυτό το μέρος του πειράματος δεν έγινε στατιστική ανάλυση, απλώς εξετάστηκε η επιτυχία ή όχι της αναβλάστης των εκφύτων.

5.3 Αποτελέσματα & Συζήτηση

Η παρασκευή των καψιδίων και ο εγκλεισμός των εκφύτων ήταν επιτυχής και με τις δυο διαφορετικές αναλογίες CaCl_2 (1% και 2% w/v). Ωστόσο, τα καψίδια που παρασκευάστηκαν με 2% CaCl_2 είχαν πιο ομοιόμορφο, σφαιρικό σχήμα και για το σχηματισμό τους χρειάστηκε, να παραμείνουν στο διάλυμα για 5min, σε σχέση με αυτά που παρασκευάστηκαν με 1% CaCl_2 (παραμονή στο διάλυμα για 15min), έχοντας την ίδια, περίπου, σκληρότητα. Οι περισσότεροι ερευνητές συμφωνούν, πως ο καταλληλότερος συνδυασμός για την παρασκευή καψιδίων είναι 3% w/v άλας νατρίου αλγινικό οξέος και 1,1% w/v CaCl_2 .

Τα έκφυτα, αμέσως μετά την έξοδό τους από τον θάλαμο αποθήκευσης στους -2°C και 4°C, δεν παρουσίασαν καμία αλλοίωση εξωτερικά. Παρόλα αυτά, όταν τα καψίδια, ανεξάρτητα με τον τρόπο παρασκευής τους, τοποθετήθηκαν στο υπόστρωμα, τα έκφυτα, μετά την πάροδο περίπου 7 ημερών, εμφάνισαν καφέτιασμα και τελικά ξεράθηκαν. Το ίδιο συνέβη και με τα έκφυτα των καψιδίων, που φυτεύθηκαν αμέσως μετά την παρασκευή τους στο υπόστρωμα αναβλάστησης.

Αντιθέτως, τα έκφυτα των καψιδίων που κόπηκαν ημιτελώς πριν τη φύτευσή τους στο καινούργιο υπόστρωμα, ανεξάρτητα με το αν αποθηκεύθηκαν σε χαμηλές θερμοκρασίες ή όχι, δεν παρουσίασαν το παραπάνω φαινόμενο. Έτσι, ερχόμενα σε επαφή με το υπόστρωμα

και με το περιβάλλον εκτός των καψιδίων, περίπου το 40% αναβλάστησε. Βάσει των αποτελεσμάτων, η ζωτικότητα των εκφύτων, μάλλον, δεν επηρεάστηκε από τη θερμοκρασία και το χρόνο αποθήκευσης ενώ η σύσταση (σκληρότητα) των καψιδίων ήταν, πιθανώς, ο παράγοντας που εμπόδισε τη βλάστηση και την έξοδο των εκφύτων από τα καψίδια, που δεν κόπηκαν.



Εικόνες 14 & 15. Βλάστηση εκφύτων μετά την αποθήκευση και την κοπή των καψιδίων.

Οι Germana *et al.* (2011) πραγματοποίησαν εγκλεισμό εκφύτων (τιμήματα βλαστών προερχόμενων από ιστοκαλλιέργεια), του υποκειμένου Carrizo citrange. Τα καψίδια παρασκευάστηκαν με υπόστρωμα MS^{1/2} (εμπλουτισμένο με 50 g/L σακχαρόζη), άλας νατρίου αλγινικό οξύ (2,5% w/v) και CaCl₂ 1,1% (w/v) και στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν για 30 ημέρες στους 4°C. Στα αποτελέσματά τους αναφέρουν, ότι η ζωτικότητα των εκφύτων δεν επηρεάστηκε από την αποθήκευσή τους στους 4°C και το ποσοστό αναβλάστησης των εκφύτων ήταν 56%.

Οι Gholami & Alavi (2016) πραγματοποίησαν εγκλεισμό εκφύτων (τιμήματα βλαστού με οφθαλμό από σπορόφυτα που είχαν βλαστήσει *in vitro*) του είδους *Citrus sinensis* var. Thamsom navel, παρασκευάζοντας τρεις διαφορετικούς τύπους καψιδίων με 4% w/v άλας νατρίου αλγινικό οξύ και 1,1% w/v CaCl₂. Ο πρώτος περιείχε αποστειρωμένο νερό με 50g/L σακχαρόζη, ο δεύτερος υπόστρωμα MS με 50g/L σακχαρόζη και ο τρίτος υπόστρωμα MS με 50g/L σακχαρόζη και ορμόνες (10ppm BA και 1ppm NAA). Τα καψίδια αποθηκεύτηκαν στους 4°C για 1-8 εβδομάδες. Στα αποτελέσματά τους αναφέρουν, ότι το ποσοστό επιτυχούς αναβλάστησης των εκφύτων, μετά από τοποθέτηση των καψιδίων σε υπόστρωμα MS με 10ppm BA και 1ppm NAA, μειώθηκε με την πρόοδο της αποθήκευσης, ανεξαρτήτως του τύπου των καψιδίων. Οι παραπάνω ερευνητές παρατήρησαν, επίσης, ότι τα καψίδια με υπόστρωμα MS και ορμόνες έδωσαν τα μεγαλύτερα ποσοστά αναβλάστησης, ακολούθησαν τα καψίδια με υπόστρωμα MS χωρίς ορμόνες και τέλος αυτά με αποστειρωμένο νερό.

Παρόμοια αποτελέσματα παρατήρησαν οι Gholami *et al.* (2013) σε ανάλογο πείραμα, με τους τρεις, προαναφερθέντες, διαφορετικούς τύπους καψιδίων και ίδιο χρόνο αποθήκευσης τους στους 4°C, χρησιμοποιώντας έκφυτα της ποικιλίας Eureka του *Citrus limon*. Επιπλέον, αναφέρουν ότι, μετά από αξιολόγηση τριών διαφορετικών συγκεντρώσεων αλγινικού νατρίου (3%, 4%, 5%) με 1,1% CaCl₂, η συγκέντρωση 4% ήταν η καταλληλότερη για την παρασκευή των καψιδίων. Τέλος, μετά την τοποθέτηση των καψιδίων σε δύο διαφορετικά υποστρώματα, MS με 10ppm BA και 1ppm NAA και χωρίς ορμόνες, στο πρώτο το ποσοστό αναβλάστησης των εκφύτων ήταν μεγαλύτερο.

Οι Wang *et al.* (2002) αναφέρουν, ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της σακχαρόζης στο υπόστρωμα από το οποίο πάρθηκαν βλαστοί-έκφυτα του είδους Troyer citrange, ώστε να πραγματοποιηθεί εγκλεισμός τους σε καψίδιο (3% αλγινικό νάτριο και 1,1% CaCl₂) αύξησε το ποσοστό επιβίωσης τους, μετά την αποθήκευση. Επίσης, η παρουσία BA στο υπόστρωμα που τοποθετήθηκαν τα καψίδια, μετά την αποθήκευση, αύξησε το ποσοστό αναβλάστησης των εκφύτων, σε σχέση με αυτό που δεν παρείχε BA και η καλύτερη συγκέντρωση ήταν 2μM.

Συμπεραίνουμε, λοιπόν, ότι καθοριστικός παράγοντας για τον επιτυχή εγκλεισμό και την διατήρηση των εκφύτων είναι η σωστή σύσταση των καψιδίων. Επιπλέον, οι συνθήκες καλλιέργειας των βλαστών από τους οποίους παραλαμβάνονται τα έκφυτα καθώς και η σύσταση του υποστρώματος που τοποθετούνται τα καψίδια, μετά την αποθήκευση, μπορούν, να επηρεάσουν το ποσοστό αναβλάστησης των εκφύτων. Τέλος, η επιβίωση των εκφύτων, σε ορισμένες περιπτώσεις, φαίνεται, να επηρεάζεται αρνητικά με την πρόοδο της αποθήκευσης.

6. ΜΙΚΡΟΕΜΒΟΛΙΑΣΜΟΣ

6.1 Εισαγωγή

Η ικανότητα των βλαστών που έχουν προέλθει από μικροπολλαπλασιασμό να αναπτύσσονται πάνω σε διάφορα υποκείμενα, χρησιμοποιώντας την τεχνική του *in vitro* και *in vivo* μικροεμβολιασμού (micrografting) έχει ερευνηθεί εδώ και αρκετά χρόνια. Οι Murashige *et al.* (1972) ήταν οι πρώτοι ερευνητές, που ασχολήθηκαν με το μικροπολλαπλασιασμό των εσπεριδοειδών και προσπάθησαν να αναπτύξουν την τεχνική του μικροεμβολιασμού με σκοπό την παραγωγή υγιών φυτών, ενώ ακολούθησαν οι Navarro *et al.* (1975), οι Edriss and Burger (1984), οι Tusa *et al.* (1988) κ.α.

Η παραπάνω τεχνική, η οποία αναφέρεται συχνά και ως “shoot tip grafting” (STG), χρησιμοποιείται σε συνδυασμό με τη θερμοθεραπεία για την παραγωγή υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού, απαλλαγμένο από διάφορες ιώσεις και ιοειδή. Επιπλέον, επιτρέπει την αξιολόγηση της συμβατότητας μεταξύ υποκειμένων και εμβολίων και μπορεί, να μειώσει το χρόνο, που απαιτείται για την επιτυχή μεταφορά φυταρίων, που έχουν προέλθει από μικροπολλαπλασιασμό, στον αγρό.

Η τεχνική του μικροεμβολιασμού έχει απασχολήσει τα τελευταία χρόνια πολλούς ερευνητές και σύγχρονες φυτωριακές επιχειρήσεις, λόγω των πλεονεκτημάτων που παρουσιάζει. Οι πιο διαδεδομένοι τύποι εμβολιασμού είναι ο σχιστός εγκεντρισμός και ο ανεστραμμένος T- ενοφθαλμισμός. Το φυτικό υλικό που προκύπτει από το μικροεμβολιασμό μπορεί, να καλλιεργηθεί *in vitro* για τον περεταίρω πολλαπλασιασμό του ή να εγκλιματιστεί *in vivo* (Samaan *et al.*, 2009 ; Rehman & Gill, 2015).

6.2 Υλικά & Μέθοδοι

Σε αυτό το μέρος του πειράματος, πραγματοποιήθηκε μικροεμβολιασμός σπορόφυτων του είδους *Citrus volkameriana*, χρησιμοποιώντας ως εμβόλια, έκφυτα του ίδιου είδους αλλά και του είδους *Citrus aurantium*. Στη συνέχεια, παρατηρήθηκε η παραγωγή κάλου στη ζώνη ένωσης εμβολίου-υποκειμένου και εξετάστηκε το ποσοστό επιτυχίας του εμβολιασμού και το ποσοστό επιβίωσης των φυταρίων, μετά τον εγκλιματισμό τους σε μονάδα υδρονέφωσης.

Παραλαβή υποκειμένων και εμβολίων

Ως υποκείμενα χρησιμοποιήθηκαν σπορόφυτα, δύο περίπου μηνών, του είδους *Citrus volkameriana*, τα οποία είχαν βλαστήσει *in vitro* σε στερεοποιημένο υπόστρωμα DKW, μετά από συλλογή και απολύμανση των σπόρων με υποχλωριώδες νάτριο 60% v/v. Ως εμβόλια χρησιμοποιήθηκαν τμήματα βλαστού με οφθαλμό των ειδών *Citrus volkameriana* και *Citrus aurantium*, τα οποία πάρθηκαν από καλλιεργούμενα έκφυτα των προηγούμενων σταδίων του πειράματος.

Διεξαγωγή της τεχνικής

Ο τύπος του εμβολιασμού που πραγματοποιήθηκε, ήταν ο σχιστός, δηλαδή μικρόεγκεντρισμός. Οι σωλήνες με τα σπορόφυτα και οι κωνικές φιάλες μετά τα έκφυτα μεταφέρθηκαν στο θάλαμο νηματικής ροής. Το κάθε σπορόφυτο τοποθετήθηκε πάνω σε αποστειρωμένη γυάλινη πλάκα και με αποστειρωμένο νυστέρι, πραγματοποιήθηκε, αρχικά μία εγκάρσια τομή, αφήνοντας τμήμα βλαστού μήκους περίπου 2cm. Στη συνέχεια, πραγματοποιήθηκε μία επιμήκης τομή (περίπου 0.5cm) στο μέσο βλαστού, ώστε να δημιουργηθεί μία σχισμή.

Τα έκφυτα-εμβόλια (περίπου 1cm) προέκυψαν μετά από εγκάρσια κοπή των βλαστών περίπου 0.5cm πάνω και κάτω από κάθε κόμβο. Έπειτα, στο κάθε έκφυτο πραγματοποιήθηκαν δύο πλαγίες τομές 45° κάτω από τον κόμβο, δημιουργώντας μία «σφήνα» και στη συνέχεια το κάθε εμβόλιο προσαρμόστηκε στη σχισμή του κάθε υποκειμένου. Τα εμβολιασμένα, πλέον, σπορόφυτα τοποθετήθηκαν σε υγρό υπόστρωμα DKW (χωρίς άγαρ) και μεταφέρθηκαν σε θάλαμο με φωτοπερίοδο 16 ωρών και 21°C, όπου παρέμειναν για 30 ημέρες.



Εικόνα 16. Προετοιμασία του εμβολίου και του υποκειμένου και ένωσή τους.

Όσα σπορόφυτα εμβολιάστηκαν επιτυχώς, μεταφέρθηκαν στη μονάδα υδρονέφωσης, φυτεύθηκαν σε ατομικά, πλαστικά γλαστράκια με τύρφη και περλίτη σε αναλογία 1:1 και παρέμειναν 30 ημέρες, ώστε να εγκλιματιστούν. Επισημαίνεται, ότι σε αυτό το μέρος του πειράματος δεν έγινε στατιστική ανάλυση, απλώς εξετάστηκε η επιτυχία του μικροεμβολιασμού και η επιβίωση των φυταρίων.

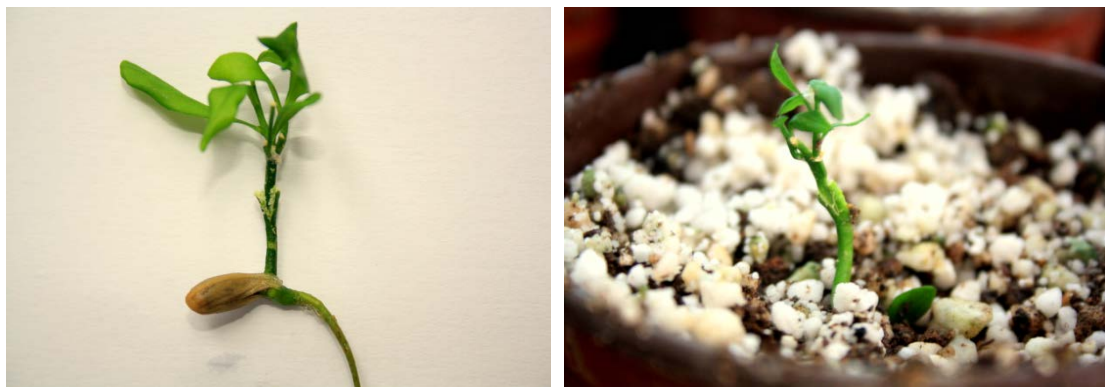
6.3 Αποτελέσματα

Παρατηρώντας τη ζώνη εμβολιασμού με στερεοσκόπιο, μετά την πάροδο 7 ημερών, η παραγωγή κάλου στα περισσότερα σπορόφυτα είχε ήδη ξεκινήσει ενώ έγινε εμφανής με γυμνό οφθαλμό 15 ημέρες μετά τον εμβολιασμό.



Εικόνες 17, 18 & 19. Παραγωγή κάλου στη σημείο ένωσης εμβολίου-υποκειμένου.

Τα ποσοστά επιτυχίας του μικροεμβολιασμού, μετά την πάροδο 30 ημερών, ήταν 70% με τα εμβόλια του *Citrus volkameriana* και 60% με τα εμβόλια του *Citrus aurantium* ενώ το ποσοστό επιβίωσης, και στις δύο περιπτώσεις, μετά την παραμονή των εμβολιασμένων φυταρίων για 30 ημέρες στη μονάδα υδρονέφωσης ήταν 60%.



Εικόνες 20 & 21. Σπορόφυτο επιτυχώς εμβολιασμένο (αριστερά) και εγκλιματισμένο (δεξιά).

Τα ποσοστά επιτυχίας του *in vitro* μικροεμβολιασμού αλλά και της επιβίωσης των φυταρίων μετά τον εγκλιματισμό τους, διαφέρουν μεταξύ των ερευνητών. Αυτό οφείλεται, πιθανότατα, στα χαρακτηριστικά του εμβολίου και του υποκειμένου (μήκος, διάμετρος, ηλικία κ.α.), στη συμβατότητα μεταξύ τους και στον τύπο του εμβολιασμού. Έχει αποδειχτεί, επίσης, ότι η σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος αλλά και οι συνθήκες μετά τον εμβολιασμό και κατά τον εγκλιματισμό μπορούν, να επηρεάσουν την επιτυχία του μικροεμβολιασμού και το ποσοστό επιβίωσης των φυταρίων αντίστοιχα.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Al-Bahrany A. M. (2002). Effect of phytohormones on *in vitro* shoot multiplication and rooting of lime *Citrus aurantifolia* (Christm.) Swing. *Scientia Horticulturae*. Volume95. Issue4. Pages 285-295.

Al-Khateeb A. A. (2008). Regulation of *in vitro* bud formation of date palm (*Phoenix dactylifera* L.) cv. Khanezi by different carbon sources. *BioresourceTechnology*. Vol. 99. Issue 14. Pp. 6550-6555.

Al- Khazali S. R. KH. & Hamad M. Sh. (2016). Influence of auxins and polyamines on rooting of shoots of *Citrus volkameriana* rootstock *in vitro*. *The Iraqi Journal of Agricultural Sciences*. 47. (3) : 732-737.

Almeida W. A. B., Assis Alves Mourão Filho F., Mendes B. M. J. & Rodriguez A.P.M. (2002). *In vitro* organogenesis optimization and plantlet regeneration in *Citrus sinensis* and *C. limonia*. *Scientia Agricola*. vol.59. no.1.

Arinaitwe G., P. R. Rubaihayo, M. J. S. Magambo. (2000). Proliferation rate effects of cytokinins on banana (*Musa* spp.) cultivars. *Scientia Horticulturae*. 86. 13-21.

Button J. (1978). The Effects of some Carbohydrates on the Growth and Organization of *Citrus* Ovular Callus. *Zeitschrift für Pflanzenphysiologie*. Volume88. Issue1. Pages 61-68.

Caboni E., R. Biasi, G. Delia & M. Tonelli. (2009). Effect of CPPU on *in vitro* axillary shoot proliferation and adventitious shoot regeneration in kiwifruit. *Plant Biosystems*. 143 : 3. 456-461.

Chée R. (1986). *In vitro* culture of *Vitis*: the effects of light spectrum, manganese sulfate and potassium iodide on morphogenesis. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 7 : 121.

Debnath S. C. (2005). Effects of carbon source and concentration on development of lingonberry (*Vaccinium vitis-idaea* L.) shoots cultivated *in vitro* from nodal explants. *In vitro cellular & developmental biology*. 41 (2) : 145-150.

Driver J. A. & Kuniyuki A. H. (1984). *In vitro* propagation of Paradox walnut rootstock (*Juglans hindsii* x *Juglans regia*). HortScience.

Duan Y. X., Liu X., Fan J., Li D. L., Wu R. C. & Guo W. W. (2007). Multiple Shoot Induction from Seedling Epicotyls and Transgenic *Citrus* Plant Regeneration Containing the Green Fluorescent Protein Gene. Botanical Studies. 48. 2. P. 165-171.

Fiore S., De Pasquale F., Carimi F. et al. (2002). Effect of 2,4-D and 4-CPPU on somatic embryogenesis from stigma and style transverse thin cell layers of *Citrus*. Plant Cell. Tissue and Organ Culture. 68 : 57.

Gabryszewska E. & Rudnicki R. M. (1997). The effects of light quality on the growth and development of shoots and roots of *Ficus benjamina* *in vitro*. Acta Horticulturae. 418. 163-168.

García-Luis, A., Molina R., Varona V. et al. (2006). The influence of explant orientation and contact with the medium on the pathway of shoot regeneration *in vitro* in epicotyl cuttings of Troyer Citrange. Plant Cell Tissue Organ Culture. 85 : 137.

Geng F., Moran R., Day M., Halteman W. & Zhang D. (2015). *In Vitro* Shoot Proliferation of Apple Rootstocks ‘B.9’, ‘G.30’, and ‘G.41’ grown under Red and Blue Light. HortScience. vol.50. no.3. 430-433.

George E.F., Hall M.A. & Klerk G.-J. (2008). Plant Propagation by Tissue Culture. 3rd Edition. Vol 1. Springer. Dordrecht.

Germanà M. A., L. Macaluso, G. Patricolo & B. Chiancone. (2008). Morphogenic response *in vitro* of epicotyl segments of *Citrus macrophylla*. Plant Biosystems. 142 : 3. 661-664.

Germanà M. A., Micheli M., Chiancone B. et al. (2011). Organogenesis and encapsulation of *in vitro*-derived propagules of Carrizo citrange [*Citrus sinensis* (L.) Osb. × *Poncirus trifoliata* (L.) Raf]. Plant Cell. Tissue and Organ Culture. 106 : 299.

Gholami A. A. & Alavi S. V. (2016). Plant regeneration of *Citrus sinensis* var. Thamson navel using sodium alginate-encapsulated shoot tips. Iranian Journal of Plant Physiology. 6. (3) : 1737-1743.

Gholami A. A., Alavi S. V., Majd A. & Fallahian F. (2013). Plant regeneration and cold preservation of Eureka lemon (*Citrus limon* [L.] Burm. f. ['Eureka']) by using sodium alginate-encapsulated shoot tips. *Annals of Biological Research*. 4. (5) : 279-285.

Hartmann T. H. & Kester E. D. (2002). *Plant Propagation. Principles and Practices*. 7th Edition. Prentice Hall. New Jersey.

Hsia Chi-Ni & Korban S. S. (1996). Factors affecting *in vitro* establishment and shoot proliferation of *Rosa hybrida* L. and *Rosa chinensis minima*. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. 32 : 217-222.

Kyte L. & Kleyn J. (1999). *Plants from Test Tubes. An Introduction to Micropropagation*. 3rd Edition. Timber Press. Portland.

Magioli C., Rocha A., De Oliveira D. et al. (1998). Efficient shoot organogenesis of eggplant (*Solanum melongena* L.) induced by thidiazuron. *Plant Cell Reports*. 17 : 661.

Marin M. L. & Duran-Vila N. (1991). Conservation of *Citrus* Germplasm *in Vitro*. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 116 (4) : 740-746.

Mohan Jain S. & Ishii K. (2003). *Micropropagation of Woody Trees and Fruits*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht.

Muleo R. & Thomas B. (2015). Effects of light quality on shoot proliferation of *Prunus cerasifera in vitro* are the result of differential effects on bud induction and apical dominance. *Journal of Horticultural Science*. 72 : 3. 483-499.

Nesi A. N., De L. Fortes G. R., Da Silva J. B. & De M. Dantas A. C. (2000). Influence of BAP and CPPU on the *in Vitro* Shoot and Bud Proliferation of Apple Rootstocks M.111 and M.7. *HortScience*. vol.35. no.3. p.445-446.

Nhan N.T., Hoa L. V. N., Binh N. T., Hidaka T. & Chau N. M. (2018). High-Efficiency Direct Organogenesis of The Key Citrus Cultivars in The Mekong Delta as Useful 'Nucellar' Shootbud Materials for Citrus Genetic Improvement.

Parthasarathy V. A., Barua A., Nagaraju V. & Parthasarathy U.U. (2002). Effect of cytokinins on morphological, physiological and biochemical characteristics of shoots of *citrus in vitro*. Fruits. vol.57. p. 153–160.

Pérez-Tornero O., Tallón C. I. & Porras I. (2010). An efficient protocol for micropropagation of lemon (*Citrus limon*) from mature nodal segments. Plant Cell. Tissue and Organ Culture. 100: 263.

Perveen S. & Anis M. (2014). Encapsulation of internode regenerated adventitious shoot buds of Indian Siris in alginate beads for temporary storage and twofold clonal plant production. Acta Physiol. Plant. 36 : 2067-2077.

Rehman HU & Gill MIS. (2015). Micrografting of Fruit Crops-A Review. Journal of Horticulture. 2 : 151.

Ricci A. P., Filho F. A. A. M., Mendes B. M. J. & Piedade S. M. S. (2002). Somatic embryogenesis in *Citrus sinensis*, *C. reticulata* and *C. nobilis* x *C. deliciosa*. Scientia Agricola. vol.59. no.1.

Romano A., Noronha C. & Martins-Loucao M. A. (1995). Role of carbohydrates in micropropagation of cork oak. Plant Cell. Tissue and Organ Culture. 40 : 159-167.

Roussos P. A., Dimitriou G. & Voloudakis A. E. (2011). Short communication. N-(2-chloro-4-pyridyl)-N-phenylurea (4-CPPU) enhances *in vitro* direct shoot organogenesis of *Citrus aurantium* L. epicotyl segments compared to other commonly used cytokinins. Spanish Journal of Agricultural Research. 9 (2), 504-509.

Sakhanokho H. F., Pounders C. T. & Blythe E.K. (2013). Alginate Encapsulation of *Begonia* Microshoots for Short-Term Storage and Distribution. The Scientific World Journal.

Samaan L. G., EL-Boray M. S. S., EL-Refaey E. F. & HelaL M. E. (2009). *In vitro* propagation and grafting technology to promote root and shoot proliferation and grafting operation of volkamer lemon rootstock (*Citrus volkameriana* Ten.). J. Agric. Sci. 34 (7) : 7929-7951.

Singh S. & Rajam M. V. J. (2010). Highly Efficient and Rapid Plant Regeneration in *Citrus sinensis*. Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology. 19 : 195.

Siragusa M., Carra A., Salvia L. et al. (2007). Genetic instability in calamondin (*Citrus madurensis* Lour.) plants derived from somatic embryogenesis induced by diphenylurea derivatives. *Plant Cell Reports*. 26 : 1289.

Sridhar T. M. & Naidu C. V. (2011). Effect of Different Carbon Sources on *In Vitro* Shoot Regeneration of *Solanum nigrum* (Linn.) - An Important Antiulcer Medicinal Plant. *Journal of Phytology*. 3 (2) : 78-82.

Tallón C. I., Porras I. & Pérez-Tornero O. (2012). Efficient propagation and rooting of three citrus rootstocks using different plant growth regulators. *In Vitro Cellular & Developmental Biology*. Volume48. Issue5. pp. 488–499.

Tavano E. C. R., Stipp L. C. L., Muniz F. R., Mourao Fihlo F. F. A. & Mendes B. M. J. (2009). *In vitro* organogenesis of *Citrus volkameriana* and *Citrus aurantium*. *Biologia Plantarum*. 53 (2) : 395-399.

Wang Q. C., Batuman Ö., Li P., Bar-Joseph M. & Gafny R. (2002). Cryopreservation of *in vitro*-grown shoot tips of ‘Troyer’ citrange [*Poncirus trifoliata* (L.) Raf. x *Citrus sinensis* (L.) Osbeck.] by encapsulation-dehydration. *Plant Cell Reports*. 20 : 901–906.

Yaseen M., Ahmad T., Sablok G. et al. (2013). Review: role of carbon sources for *in vitro* plant growth and development. *Molecular Biology Reports*. 40 : 2837.

<http://www.statistics.gr>

Βασιλακάκης Μ. & Θεριός Ι. (2006). Μαθήματα Ειδικής Δενδροκομίας. Εσπεριδοειδή. Εκδόσεις Άγις-Σάββας Δ. Γαρταγάνης. Θεσσαλονίκη.

Κίντζιος Σ. (2015). Εισαγωγή στον μικροπολλαπλασιασμό των φυτών. Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών. Αθήνα.

Ποντίκης Κ. Α. (2003). Ειδική Δενδροκομία. Εσπεριδοειδή. Τόμος Δ. Εκδόσεις Σταμούλη. Αθήνα.

Πρωτοπαπαδάκης Ε. (2004). Τα Εσπεριδοειδή. Εκδόσεις Ψύχαλου. Αθήνα.

Πρωτοπαπαδάκης Ε. (2008). Γεωργία-Κτηνοτροφία. Τεύχος 10. Εκδόσεις Αγροτύπος. Αθήνα.

Ρούσσοι Π. Α. (2009). Πολλαπλασιασμός Καρποφόρων Δένδρων και Θάμνων. Εργαστηριακές Ασκήσεις. Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Γ.Π.Α. Αθήνα.