



Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Σχολή Επιστημών των Φυτών
Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής
Εργαστήριο Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου
Π. Μ. Σ. Επιστήμες και Συστήματα Φυτικής Παραγωγής
Κατεύθυνση: Κηπευτικές Καλλιέργειες και Ανθοκομία

**Διερεύνηση του *in vitro* πολλαπλασιασμού
του είδους *Pittosporum angustifolium* Lodd.**

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

Μαρία Α. Μανιάτη

Επιβλέπουσα: Καθ. Παπαφωτίου Μαρία

ΑΘΗΝΑ 2019



Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Σχολή Επιστημών των Φυτών
Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής
Εργαστήριο Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου
Π. Μ. Σ. Επιστήμες και Συστήματα Φυτικής Παραγωγής
Κατεύθυνση: Κηπευτικές Καλλιέργειες και Ανθοκομία.

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**Διερεύνηση του *in vitro* πολλαπλασιασμού
του είδους *Pittosporum angustifolium* Lodd.**

**Investigation of *Pittosporum angustifolium* Lodd.
in vitro propagation**

Μαρία Α. Μανιάτη

Επιβλέπουσα: Καθηγήτρια Παπαφωτίου Μαρία

Εξεταστική Επιτροπή

Παπαφωτίου Μαρία - Καθηγήτρια

Νεκτάριος Παναγιώτης - Καθηγητής

Ακουμιανάκη - Ιωαννίδου Αναστασία - Αν. Καθηγήτρια

ΑΘΗΝΑ 2019

Περίληψη

Το *P. angustifolium* Lodd. (Pittosporaceae) είναι αειθαλές, πολυετές δέντρο μεσαίου μεγέθους και αργής ανάπτυξης, αυτοφυές της Αυστραλίας. Έχει υψηλή αισθητική αξία λόγω των κρεμάμενων κλάδων του, του ελκυστικού φυλλώματος, των εύοσμων λευκοκίτρινων ανθέων του και των πορτοκαλί καρπών του (διαρρηκτή κάψα), ενώ λόγω του ότι δεν χρειάζεται πολύ χώρο για να αναπτυχθεί είναι ένα όμορφο μικρό καλλωπιστικό δέντρο για στενούς αστικούς και περιαστικούς χώρους. Το είδος διαθέτει πλούσιες βιοχημικές ιδιότητες και βιολογική δραστικότητα που το καθιστούν ενδιαφέρον τόσο για την επιστημονική κοινότητα όσο και για τη βιομηχανία βοτάνων και φυτικών προϊόντων καθώς και για την εναλλακτική ιατρική. Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε ο μικροπολλαπλασιασμός του είδους με έκφυτα από νεαρή βλάστηση ενήλικου δέντρου που φύεται στον Βοτανικό Κήπο του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, Βοτανικός, Αθήνα, λόγω της δυσκολίας που εμφανίζει ο πολλαπλασιασμός του με σπόρο, με στόχο την αξιοποίηση του στην κηποτεχνία και την αρχιτεκτονική τοπίου αλλά και τη διευκόλυνση της μελέτης των χημικών του δομών. Κατά την αρχική εγκατάσταση, έκφυτα κορυφής βλαστού και κόμβων καλλιεργήθηκαν σε στερεό (8 g L^{-1} άγαρ) υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ 6-benzyladenine (BA). Το ποσοστό αντίδρασης των εκφύτων ήταν 83-100% και παράχθηκαν 1,4-1,7 βλαστοί/έκφυτο, ενώ δεν παρουσιάστηκαν προβλήματα μόλυνσεων. Ακολούθησε υποκαλλιέργεια εκφύτων τριών κόμβων σε στερεό υπόστρωμα MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες ή εμπλουτισμένο με $1,0$ ή $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ 6-benzyladenine (BA). Η προσθήκη κυτοκινίνης στο υπόστρωμα ήταν απαραίτητη για τη βλαστογένεση (77-80%), παράχθηκαν 2,7-2,9 βλαστοί/έκφυτο, ενώ παρατηρήθηκε η τάση του φυτού για παραγωγή βλαστών 2^{ns} τάξης (έκπτυξη κόμβων επί των μικροβλαστών χωρίς επιμήκυνση). Η καλλιέργεια των εκπτυγμένων κόμβων έδωσε απόλυτο ποσοστό βλαστογένεσης και παράχθηκαν 2,95 βλαστοί/έκφυτο εκπτυγμένου κόμβου. Η προέλευση του εκφύτου κατά την αρχική καλλιέργεια (κορυφή βλαστού, ή έκφυτο κόμβων) επηρέασε την παραγωγή βλαστών 2^{ns} τάξης κατά την υποκαλλιέργεια, καθώς έκφυτα από καλλιέργεια προέλευσης κόμβων μητρικού βλαστού παρουσίασαν σε μεγαλύτερο ποσοστό τάση για παραγωγή βλαστών 2^{ns} τάξης, έναντι αυτών από καλλιέργεια προέλευσης κορυφής μητρικού βλαστού (35% έναντι 9%, αντίστοιχα). Η αύξηση της συγκέντρωσης BA ($4,0 \text{ mg L}^{-1}$) σε επόμενη υποκαλλιέργεια, αύξησε τον αριθμό των

παραγόμενων βλαστών, αλλά μείωσε το μήκος τους. Ακολούθησαν υποκαλλιέργειες στις οποίες μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων της BA (0,5-4,0 mg L⁻¹) με ή χωρίς την προσθήκη 0,1 mg L⁻¹ 1-naphthaleneacetic acid (NAA) ή indole-3-butyric acid (IBA), καθώς και καλλιέργεια σε υγρό υπόστρωμα, με σκοπό την περαιτέρω βελτίωση της απόδοσης του πολλαπλασιασμού και την αύξηση του μήκους των μικροβλαστών. Η προσθήκη NAA δεν αύξησε το μήκος των βλαστών, αύξησε όμως τον αριθμό των βλαστών 1^{ης} τάξης, ενώ η προσθήκη IBA αύξησε μεν το μήκος, αλλά μείωσε το ποσοστό βλαστογένεσης σε όλες τις επεμβάσεις, τον αριθμό των βλαστών 1^{ης} τάξης, καθώς και τη διάρκεια διατήρησης των βλαστών *in vitro*, στα υποστρώματα με χαμηλές συγκεντρώσεις BA (0,5 και 1,0 mg L⁻¹). Η υγρή καλλιέργεια δεν ευνόησε τον πολλαπλασιασμό. Ο μέγιστος αριθμός βλαστών 2^{ης} τάξης (3,8-4,7 βλαστοί/ έκφυτο) παράχθηκε με ποσοστό βλαστογένεσης (2^{ης} τάξης) 73-81% στα στερεά υποστρώματα με 2,0 ή 4,0 mg L⁻¹ BA χωρίς αυξίνη, μετά από αύξηση της διάρκειας επώασης (90 ημέρες) στο θρεπτικό υπόστρωμα.

Μικροβλαστοί ηλικίας 45 ημερών (μήκους 2,0 και 3,0 cm) και ηλικίας 65 ημερών (μήκους 1,0 cm) προωθήθηκαν για ριζοβολία σε στερεό υπόστρωμα MS/2 είτε χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες ή εμπλουτισμένο με διαφορετικά επίπεδα συγκέντρωσης indole-3-butyric acid (IBA, 2,0-10,0 mg L⁻¹), σε συνεχές σκοτάδι ή σε φωτοπερίοδο 16 h φως/8 h σκοτάδι. Στο υπόστρωμα χωρίς αυξίνη σημειώθηκαν χαμηλά ποσοστά ριζοβολίας (0-40%), ενώ παρουσία IBA η ριζοβολία αυξήθηκε, όμως οι ρίζες αφενός παράχθηκαν μέσω κάλου, ιδίως στις υψηλές συγκεντρώσεις όπου ο κάλος ήταν αρκετά εκτενής, και αφετέρου δεν επιμηκύνονταν (max 0,5 cm). Υψηλά ποσοστά ριζοβολίας (85-95%), σχετικά ικανοποιητικό μήκος (0,3-0,5 cm) και αριθμό (6-7) ριζών έδωσαν οι επεμβάσεις σε μικροβλαστούς 2,0 cm και 1,0 cm, με 10,0 και 4,0 mg L⁻¹ IBA αντίστοιχα, σε συνεχές σκοτάδι. Η μείωση της διάρκειας επώασης σε υπόστρωμα με αυξίνη υψηλής συγκέντρωσης (10,0 mg L⁻¹) μείωσε πολύ την ποσότητα του κάλου, ενώ οι μικροβλαστοί ριζοβόλησαν κατά 83% και 100% σε συνεχές σκοτάδι και 16 h φως, αντίστοιχα, με πιο μακριές ρίζες στο σκοτάδι (0,37 cm). Η δημιουργία συνεχούς σκότους μόνο στη βάση των μικροβλαστών, κατά την επώαση τους σε υπόστρωμα εμπλουτισμένο με 2,0 mg L⁻¹ IBA έδωσε χαμηλότερο ποσοστό ριζοβολίας (75%) από τις προαναφερθείσες επεμβάσεις και πολύ μικρές ρίζες (0,15 cm). Ωστόσο, η υψηλή συγκέντρωση IBA ήταν ανασταλτική για τον *ex vitro* εγκλιματισμό σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (1:1 v/v) των έρριζων βλαστών. Έρριζοι μικροβλαστοί (φυτάρια), μήκους 3 και 1 cm, που ριζοβόλησαν (50% και

75%, αντίστοιχα) στη συγκέντρωση των $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ IBA, σε συνεχές σκοτάδι (είτε όλος ο βλαστός ή μόνο η βάση του), εγκλιματίστηκαν σε υψηλότερα ποσοστά (69-79%) *ex vitro*.

Λέξεις κλειδιά: Πιττόσπορον το στενόφυλλο, μικροπολλαπλασιασμός, πλάγιοι βλαστοί, δυσκολία στη ριζοβολία, σκοτάδι, εγκλιματισμός

ΑΘΗΝΑ

Abstract

P. angustifolium Lodd. (Pittosporaceae) is an Australian native, evergreen, medium-sized and slow growing perennial tree. It's of high aesthetic value due to its pendulous branches, attractive foliage, its white-yellow flowers and its orange fruits (dehiscent capsules). It is a beautiful small ornamental tree for narrow urban and peri-urban spaces as it doesn't need much space to grow. The species also has rich biochemical properties and biological activity that makes it interesting to both the scientific community and the herbal and plant industry, as well as alternative medicine. The adult plant that grows in the Botanical Garden of The National and Kapodistrian University of Athens appears to have difficulty in propagation by seed, so, this study investigates the micropropagation of the species from young vegetation of this plant in order to use it in gardening and landscape architecture but also to facilitate the study of its phytochemical variability. Initial culture of the species from nodal and shoot tip explants on a solid MS medium enriched with 2 mg l⁻¹ 6-benzyladenine (BA) was successful at 83-100% and 1.4-1.7 shoots / explant were produced, while there were no problems with infections. Subculture of three-node explants followed on solid MS medium without plant growth regulators or enriched with 1.0 or 2.0 mg l⁻¹ 6-benzyladenine (BA). The addition of cytokinin in the medium was necessary for blastogenesis (77-80%), 2.7-2.9 shoots / explants were produced, and the tendency of the plant to produce 2nd order shoots (node growth on the microshoots without elongation) was observed. Expanded nodes culture in MS medium enriched with 1.0 mg l⁻¹ BA gave 100% blastogenesis and 2,95 shoots per explant were produced. Origin of the explant in the initial culture (shoot tip, or nodes) influenced the production of second-order shoots in the subculture of node explants, as explants from the culture of nodes showed a higher tendency to produce second-order shoots than those from the shoot tip of mother shoot (35% vs. 9%, respectively). Increasing BA concentration (4.0 mg l⁻¹) in subsequent subculture increased the number of shoots produced but decreased their length. Subcultures were followed to study the effect of different concentrations of BA (0.5-4.0 mg l⁻¹) with or without the addition of 0.1 mg l⁻¹ 1-naphthaleneacetic acid (NAA) or indole-3-butyric acid (IBA), as well as liquid culture, with the aim of further improving the proliferation efficiency and increasing the length of the microshoots.

Addition of NAA did not increase shoot length but increased the number of 1st order shoots, whereas adding IBA increased the length but decreased the blastogenesis rate in all treatments, the number of 1st order shoots but also the *in vitro* survival of the microshoots in medium with low BA concentrations (0.5 and 1.0 mg L⁻¹). Liquid culture did not favor proliferation. The maximum number of 2nd order shoots (3.8-4.7 shoots / explant) was produced with a 73-81% blastogenesis rate (2nd order) on solid medium with 2.0 or 4.0 mg L⁻¹ BA without auxin, by increasing the incubation period (90 days) on the medium.

45-day-old (2.0 and 3.0 cm long) and 65 days old (1.0 cm long) microshoots were promoted for rooting on solid MS/2 medium either without plant growth regulators or enriched with different concentrations of indole-3-butyric acid (IBA, 2.0-10.0 mg L⁻¹), in continuous darkness or in photoperiod 16 h light / 8 h darkness. On the medium without auxin, low rooting percentages were observed (0-40%), whereas in the presence of IBA rooting increased, but the roots were callus mediated, especially at high concentrations where callus was sufficiently extensive and did not elongate (max 0.5 cm). High rooting percentages (85-95%), relatively good length (0.3-0.5 cm) and number of roots (6-7) gave the microshoots 2.0 cm and 1.0 cm, with 10.0 and 4.0 mg L⁻¹ IBA respectively, in continuous darkness. The decrease in medium incubation time with high concentration of auxin (10.0 mg L⁻¹) reduced the amount of callus, whereas microshoots were rooted 83% and 100% in continuous darkness and 16 h light, respectively, with longer roots in the darkness (0.37 cm). Basal microshoot darkening when incubated on a medium enriched with 2.0 mg L⁻¹ IBA gave a lower rooting percentage (75%) than the above mentioned treatments and very small roots (0.15 cm). However, the high IBA concentration was inhibitory to *ex vitro* acclimatization of plantlets in peat: perlite mixture (1: 1 v / v). Rooted microshoots (plantlets), 3 and 1 cm long, rooted (50% and 75%, respectively) at a concentration of 2.0 mg L⁻¹ IBA, in continuous darkness (either the whole shoot or only its base), were acclimatized at higher percentages (69-79%) *ex vitro*.

Key words: *Pittosporum angustifolium*, micropropagation, axillary shoots, difficult-to-root, darkness, acclimatization

ATHENS



Στην οικογένειά μου...

Ευχαριστίες

Στο σημείο αυτό θα ήθελα να εκφράσω τις ευχαριστίες μου σε όλους εκείνους που με βοήθησαν στην ολοκλήρωση του δεύτερου κύκλου των σπουδών μου πάνω στη γεωπονική επιστήμη.

Η παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη εκπονήθηκε τα ακαδημαϊκό έτος 2017-2018 στο Εργαστήριο Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου υπό την επίβλεψη της Καθηγήτριας και Διευθύντριας του εργαστηρίου Δρ. Παπαφωτίου Μαρίας.

Θα ήθελα λοιπόν να ευχαριστήσω θερμά την καθηγήτρια μου για τη ανάθεση του θέματος, το ενδιαφέρον, τις πολύτιμες συμβουλές, καθώς και για την επί σειρά ετών διδαχή της πάνω στην επιστήμη μας. Την ευχαριστώ επίσης για το χρόνο που διέθεσε, τόσο κατά τη διάρκεια του πειραματικού σταδίου όσο και κατά το στάδιο συγγραφής και διόρθωσης της παρούσας μελέτης αλλά και για την κατανόησή της.

Θα ήθελα ακόμη να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στον Δρ. Π. Νεκτάριο, Καθηγητή και την Δρ. Ακουμιανάκη – Ιωαννίδου Αναστασία Αν. Καθηγήτρια, του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου, μέλη της Τριμελούς Επιτροπής, για τον χρόνο που διέθεσαν για την εξέταση της μεταπτυχιακής μου μελέτης.

Ακόμη, ευχαριστώ τη Δρ. Κατερίνα Μαρτίνη και τον Δρ. Κωνσταντίνο Μπερτσουκλή για τις συμβουλές που πρόθυμα μου έδιναν όποτε τις ζητούσα. Ευχαριστώ ακόμη τη φίλη και συνάδελφο Δήμητρα Τσιάμα που συμπορευτήκαμε όλα τα χρόνια της φοιτητικής μας ζωής και τη Στέλλα στον κήπο για τη βοήθεια τους.

Τέλος, ευχαριστώ την οικογένειά μου που χωρίς την στήριξή της δεν θα μπορούσα να πραγματοποιήσω τα όνειρά μου.

Περιεχόμενα

Περίληψη	4
Abstract.....	7
Ευχαριστίες	10
Περιεχόμενα.....	11
Σκοπός της μελέτης	14
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	16
1.1 Το είδος <i>Pittosporum angustifolium</i> Lodd.	16
1.1.1 Βοτανική ταξινόμηση	16
1.1.2 Περιγραφή του είδους	21
1.1.2.1 Βοτανική περιγραφή, μορφολογικά χαρακτηριστικά και βιολογία	21
1.1.2.2 Γεωγραφική εξάπλωση, οικότοπος και περιβαλλοντικές απαιτήσεις	26
1.1.2.3. Καλλιεργητικές απαιτήσεις και ιδιότητες.....	28
1.1.2.4 Χρήσεις από τους ιθαγενείς της Αυστραλίας	30
1.1.2.5 Φυτοχημεία και βιολογική δραστηριότητα	30
1.1.2.4 Ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί του <i>P. angustifolium</i>	36
1.2 Το γένος <i>Pittosporum</i>	38
1.2.1 Χρήσεις του γένους <i>pittosporum</i> στην αρχιτεκτονική τοπίου και την κηποτεχνία	38
1.2.2 Πολλαπλασιασμός στο γένος <i>Pittosporum</i>	41
1.3. Μικροπολλαπλασιασμός	43
1.3.1 Μικροπολλαπλασιασμός στο γένος <i>pittosporum</i>	45
1.3.2 Υγρή καλλιέργεια	56
1.3.3 Πρόσφατες εξελίξεις στον πολλαπλασιασμό των ξυλωδών φυτών.....	59
1.3.3.1 Αλλαγή φάσης.....	60
1.3.3.2 Ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί και <i>in vitro</i> καλλιέργειες.....	62
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	64
2.1 Μητρικό υλικό.....	64
2.2 Έκφυτα	64
2.3 Υποστρώματα <i>in vitro</i> καλλιέργειας	65
2.3.1 Υλικά των θρεπτικών υποστρωμάτων <i>in vitro</i> καλλιέργειας.....	65
2.3.2 Θρεπτικά υποστρώματα και μέθοδος παρασκευής.....	66
2.3.3 Μέθοδος παρασκευής «stock» διαλυμάτων φυτορυθμιστικών ουσιών.....	68

2.4 Δοχεία και υλικά κάλυψης.....	69
2.4.1 Δοχεία <i>in vitro</i> καλλιέργειας και υλικά κάλυψης αυτών.....	69
2.4.2 Δοχεία εγκλιματισμού φυταρίων και υλικά κάλυψης.....	70
2.5 Αποστείρωση εργαλείων και υλικών καλλιέργειας.....	70
2.6 Επιφανειακή απολύμανση εκφύτων	71
2.7 Διαδικασία εγκατάστασης καλλιεργειών	71
2.7.1 Στάδιο αρχικής εγκατάστασης και πολλαπλασιασμού	71
2.7.2 Στάδιο ριζοβολίας βλαστών.....	72
2.7.2.1 Ριζοβολία βλαστών <i>in vitro</i>	72
2.7.2.2 Ριζοβολία βλαστών <i>ex vitro</i>	72
2.7.3 Στάδιο Εγκλιματισμού φυταρίων.....	73
2.8 Συνθήκες καλλιέργειας	74
2.8.1 Συνθήκες <i>in vitro</i> καλλιέργειας.....	74
2.9 Πειραματισμός και εκτίμηση πειραματικών δεδομένων.....	75
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	77
3.1 Αρχική εγκατάσταση.....	77
3.2 Στάδιο πολλαπλασιασμού	79
3.2.1 Πρώτη υποκαλλιέργεια.....	80
3.2.2 Δεύτερη Υποκαλλιέργεια	81
3.2.2.1 Διερεύνηση της επίδρασης της θέσης του εκφύτου στο μητρικό φυτό, στην βλαστογένεση κατά την υποκαλλιέργεια	81
3.2.2.2 Επίδραση του είδους του εκφύτου στη βλαστογένεση κατά την υποκαλλιέργεια	83
3.2.3. Τρίτη υποκαλλιέργεια.....	86
3.2.4 Τέταρτη υποκαλλιέργεια	87
3.2.5 Πέμπτη Υποκαλλιέργεια.....	90
3.2.6 Έκτη Υποκαλλιέργεια	94
3.3 Ριζοβολία και εγκλιματισμός.....	101
3.3.1 Πρώτο πείραμα ριζοβολίας	102
3.3.2 Δεύτερο πείραμα ριζοβολίας και εγκλιματισμός	102
3.3.3 Τρίτο πείραμα ριζοβολίας και εγκλιματισμός	109
3.3.4 Τέταρτο και πέμπτο πείραμα ριζοβολίας και εγκλιματισμός.....	111
3.3.5. Πείραμα <i>ex vitro</i> ριζοβολίας.....	116
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	117

4.1 Αρχική εγκατάσταση και πολλαπλασιασμός.....	117
4.2 Ριζοβολία και εγκλιματισμός.....	121
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	127
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ	143

Σκοπός της μελέτης

Το *P. angustifolium* είναι ένα είδος της οικογένειας Pittosporaceae ενδημικό της Αυστραλίας ευρέως διαδεδομένο σε όλη την Αυστραλιανή Ήπειρο, αλλά όχι συνηθισμένο. Το είδος γίνεται εύκολα αναγνωρίσιμο από τα στενά ελλειπτικά φύλλα του, τους κρεμάμενους κλάδους, τα λευκοκίτρινα εύοσμα καμπανοειδή άνθη του και τους πορτοκαλί καρπούς του. Το είδος έχει μεγάλο επιστημονικό ενδιαφέρον και πιθανή οικονομική αξία. Από τον άνθρωπο εκμεταλλεύεται στο εξωτερικό, για καλλωπιστικούς σκοπούς στην κηποτεχνία και την αρχιτεκτονική τοπίου. Πρόκειται για είδος με πλούσια φυτοχημεία που το καθιστά ενδιαφέρον για την επιστημονική κοινότητα, αλλά και για τη βιομηχανία βοτάνων και φυτικών προϊόντων, οι οποίες βασιζόμενες στην παλαιότερη χρήση του είδους από του ιθαγενείς της Αυστραλίας και στα πιθανά οφέλη αυτού για την ανθρώπινη υγεία, προωθούν πλειάδα προϊόντων που πολλοί άνθρωποι καταναλώνουν είτε αυτοβούλως είτε μετά από παρότρυνση ιατρών που ακολουθούν εναλλακτικές μεθόδους πρόληψης, ίασης ή επιμήκυνσης του προσδοκίμου ζωής. Τα τελευταία χρόνια βρίσκεται σε εξέλιξη εκτεταμένη έρευνα πάνω στη φυτοχημεία και τη βιολογική δραστηριότητα του είδους, έτσι ώστε να τεκμηριωθεί επιστημονικά η ακριβής χημική σύσταση, αλλά και η ευεργετική δράση των χημικών δομών στην ανθρώπινη υγεία. Ένα τέτοιο φυτό θα συναντήσει κανείς στον Βοτανικό κήπο του ΕΚΠΑ δίπλα στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Το συγκεκριμένο άτομο ανθοφορούσε και καρποφορούσε κανονικά, όμως όσο διήρκεσε η παρούσα μελέτη στις κάψες του δεν παρατηρήθηκαν οι χαρακτηριστικοί για το γένος σαρκώδεις σπόροι. Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε για πρώτη φορά η συμπεριφορά του είδους *in vitro* για την παραγωγή κλωνικών απογόνων με στόχο την αξιοποίηση της ιδιαίτερης καλλωπιστικής του αξίας στην κηποτεχνία και την αρχιτεκτονική τοπίου αλλά και τη διευκόλυνση της μελέτης των χημικών δομών αυτού του πολλά υποσχόμενου φαρμακευτικού φυτού.

Συντομογραφίες

MS Murashige and Skoog Basal Salt Mixture Medium

IBA Indole-3-butyric acid

BA 6-benzyladenine

NAA 1-Naphtheleneacetic acid

NSW New south Wales

Qld Queensland

Vic Victoria

SA South Australia

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Το είδος *Pittosporum angustifolium* Lodd.

1.1.1 Βοτανική ταξινόμηση

Το είδος *Pittosporum angustifolium* Lodd. (κοιν. weeping pittosporum (NSW, Qld, Vic.), butterbush, cattle bush (Qld), native apricot, apricot tree, gumby gumby, gumbi gumbi, cumby cumby, meeme, bitter bush, butter bush, poison berry bush (SA), berrigan (NSW), bell's orange (NSW) willow tree ή native willow ανήκει στην οικογένεια Pittosporaceae (Cayzer *et al.*, 2000). Η οικογένεια Pittosporaceae θεωρούνταν πάντοτε ως αρχαία αυστραλιανή αυτόχθον (Burbidge 1960, Raven και Axelrod 1974, Webb *et al.*, 1986) με βάση το υψηλό επίπεδο ενδημισμού εκεί. Περιλαμβάνει εννέα γένη (*Auranticarpa*, *Hymenosporum*, *Marianthus*, *Pittosporum*, *Bursaria*, *Bentleya*, *Rhytidosporum*, *Cheiranthra* and *Billardiera*) και περίπου 200-240 είδη. Το γένος *Pittosporum*¹ είναι το μόνο κοσμοπολίτικο αλλά και το πολυπληθέστερο γένος της, με περισσότερα από εκατό είδη (περίπου 150).

Στο παρελθόν η συστηματική κατάταξη της οικογένειας ήταν αμφιλεγόμενη. Έχει συνδεθεί με διάφορες οικογένειες όπως οι Rutaceae, Polygalaceae, Tremandraceae, Vochysiaceae, Celastraceae, Rhamnaceae, Caryophyllaceae, και Umbelliferae/Araliaceae (Pax, 1891). Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η οικογένεια αναφέρεται είτε στην τάξη Rosales (Schulze-Menz, 1964, Takhtajan 1980, Cronquist, 1981, Thorne, 1983) είτε στην τάξη Apiales (Dahlgren, 1975, Takhtajan, 1987, Thorne 1992). Σχετικά πρόσφατα η κατάταξη της οικογένειας Pittosporaceae στην τάξη Apiales επιβεβαιώθηκε μέσω μοριακών ερευνών (Chandler, 2007, Chase *et al.*, 1993, Olmstead *et al.*, 1992, 1993, Plunkett *et al.*, 1992)

¹ Η ετυμολογία της λέξης έχει τις ρίζες της στην ελληνική γλώσσα. Pittos (πίσσα)-sporum (σπόρος) και αναφέρεται στους χαρακτηριστικούς για το γένος κολώδεις, ρητινώδεις σπόρους. Αυτό το όνομα χρησιμοποιείται από το 1988 (ICBN 3252, Greuter *et al.*, 1988) ενώ σύμφωνα με τον Cayzer (1997 a) το όνομα *tobera* είχε προτεραιότητα.

Πίνακας 1. Βοτανική ταξινόμηση του είδους *P. angustifolium*.

Kingdom Βασίλειο	Plantae	Φυτά
Subkingdom Υποβασίλειο	Tracheobionta (vascular plants)	Αγγειώδη φυτά
Superdivision Υπερδιαίρεση	Spermatophyta (seed plants)	Σπερματοφύτα
Phylum Διαίρεση	Magnoliophyta (flowering plants)	Αγγειόσπερμα
Class Κλάση	Magnoliopsida (Dicotyledons)	Δικοτυλήδονα
Υποκλάση Subclass	Asterids	
Order Τάξη	Apiales	Σελινώδη
Family Οικογένεια	Pittosporaceae	Πιττοσπορίδες
Genus Γένος	<i>Pittosporum</i>	Πιττόσπορον
Species Είδος	<i>angustifolium</i>	“Στενόφυλλο”

Η ευρωπαϊκή ταξινομική ιστορία των αυστραλιανών ειδών ξεκινά με τον William Dampier, ο οποίος στις αρχές Σεπτεμβρίου του 1699 συνέλεξε διάφορα δείγματα από το Shark Bay στη βορειοδυτική Αυστραλία. Αυτά περιελάμβαναν το *P. phillyreoides*, που πλέον αποτελεί το λιγότερο γνωστό από την αυστραλιανά είδη *Pittosporum*. Αξίζει να αναφερθεί ότι ο Λινναίος δεν περιλαμβάνει το είδος στο Species plantarum (1753) (Cooper, 1956).

Το είδος *Pittosporum angustifolium* Lodd. (Pittosporaceae) (Πιν. 1) περιγράφηκε πρώτη φορά το 1832. Μέχρι πρόσφατα το *P. angustifolium* συμπεριλαμβανόταν στο είδος *P. phillyreoides* ως *P. phillyreoides* var. *microcarpa*. Φυλλογενετικές και μορφολογικές μελέτες όμως καθιέρωσαν το *Pittosporum* ως μονοφυλετικό γένος και εγκατέστησαν πάλι είδη του όπως το *P. angustifolium* αυτοτελή. Το είδος *P. phillyreoides* περιγράφηκε πρώτη φορά το 1699 από τον William Dampier, έπειτα βρέθηκε ξανά στο Shark Bay το 1802. Το είδος αυτό σε αντίθεση με το *P. angustifolium* χαρακτηρίζεται από μικρό γεωγραφικό εύρος όντας ενδημικό σε μια πολύ στενή περιοχή παράκτιων ασβεστολιθικών πεδιάδων στη

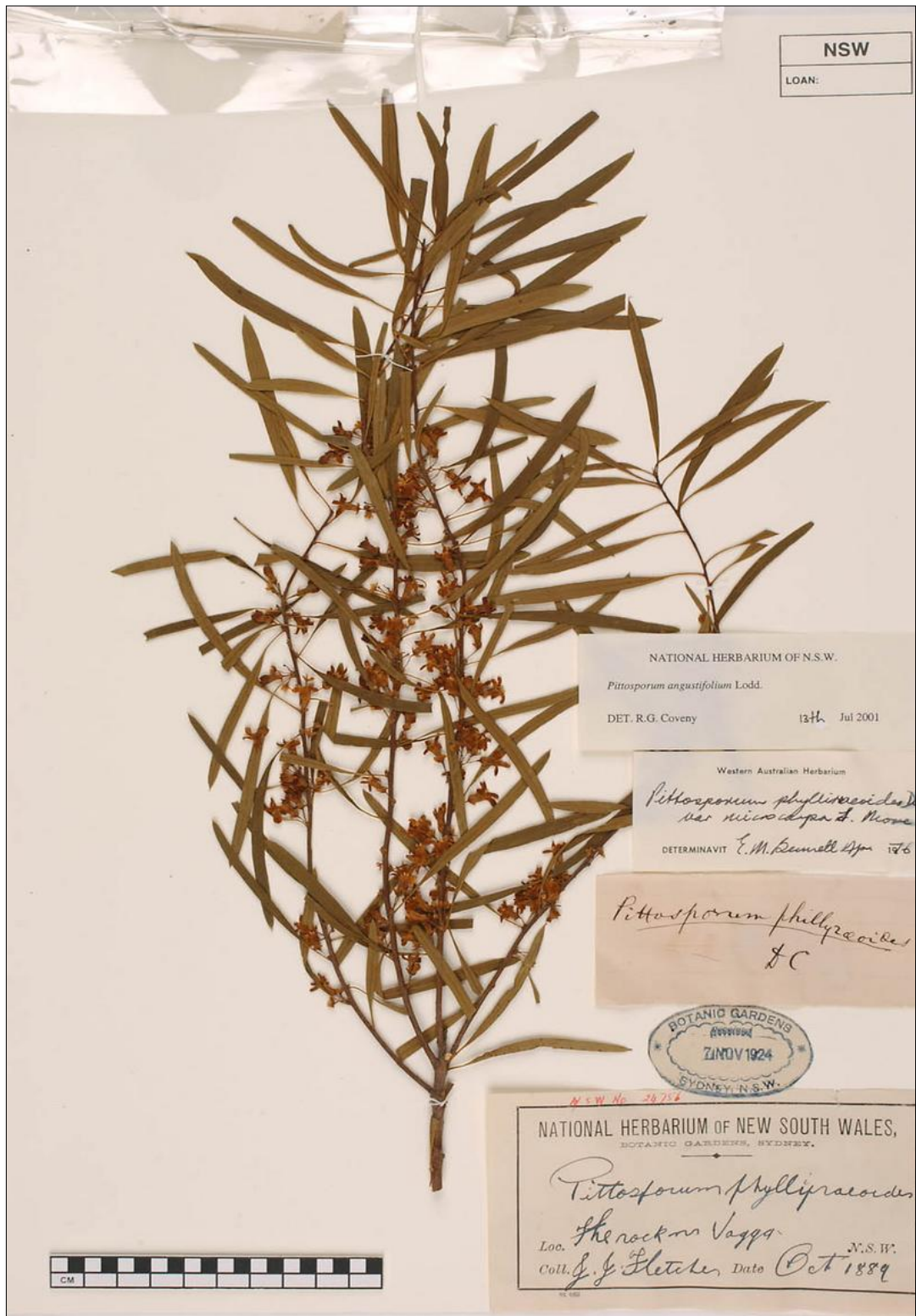
βορειοδυτική Αυστραλία (από το Dampier Archipelago² ως την περιοχή Kalbarri) (Εικ. 1).



Εικόνα 1. Χάρτης της Αυστραλίας όπου φαίνονται η περιοχή Kalbarri και το Dampier Archipelago. Πηγή: Google maps

Το *P. angustifolium* διαφέρει από το *P. phillyreoides* όχι μόνο λόγω των διαφορετικών περιβαλλοντικών απαιτήσεων όπως είναι ο τύπος του εδάφους (δεν ευδοκμεί στις ασβεστολιθικές πεδιάδες), αλλά γιατί είναι κρεμοκλαδές (οι δευτερεύοντες και τριτεύοντες κλάδοι του) και όχι ορθόκλαδο, δεν έχει στρογγυλό θόλο, τα φύλλα του είναι μεγαλύτερα, λεία, χωρίς ασημόλευκο τρίχωμα στην κάτω επιφάνεια και εξαπλώνεται ευρέως σε όλη την Αυστραλιανή Ήπειρο (Κεφ. 1.1.2.2) (Cayzer *et al.*, 2000). Ως κατάλοιπο βέβαια αυτής της ταξινομικής σύγχυσης σε ορισμένες αναφορές συμπεριλαμβάνονται τα δύο είδη ως συνώνυμα, ενώ η πλειονότητα των πρώτων αναφορών χρησιμοποιούν μόνο το όνομα *P. phillyreoides*. Αυτές οι αναφορές αφορούν το *P. angustifolium* και αυτό γίνεται εύκολα αντιληπτό λόγω της διαφορετικής γεωγραφικής εξάπλωσης των 2 ειδών (Cayzer *et al.*, 2000). Η φωτογραφία από το εθνικό φυτολόγιο του Royal Botanic Garden (NSW), που παρατίθεται (Εικ. 2) αποτελεί επιπλέον ένδειξη της σύγχυσης μεταξύ των δύο ειδών, αλλά και της εγκατάστασης του είδους *P. angustifolium* πλέον ως αυτοτελές.

² Πρόκειται για μια ομάδα νησιών κοντά στην περιοχή Dampier στη Δυτική Αυστραλία. Η περιοχή πήρε το όνομά της από τον William Dampier που την επισκέφτηκε το 1699.



Εικόνα 2. *Pittosporum angustifolium* Lodd. (Pittosporaceae).
National Herbarium of New South Wales Royal Botanic Garden, Sydney, Australia. Photo L. L. Lee aug 2002 ©the royal botanic gardens & domain trust.
Πηγή:<http://plantnet.rbgsvd.nsw.gov.au/cgi-bin/NSWfl.pl?page=nswfl&photo=31&file=11/217/24756.jpg>

Εκτός από το *P. phillyreoides* ένα στενά συνδεδεμένο είδος με το *P. angustifolium* είναι και το *P. ligustrifolium* (Εικ. 3γ), το οποίο εμφανίζεται επίσης στην ασβεστολιθική παράκτια πεδιάδα νότια του εθνικού πάρκου Kalbarri στην ακτή της Δυτικής Αυστραλίας. Αυτό το λείο³ είδος μοιάζει περισσότερο με το *P. angustifolium* αλλά διαφέρει στα εξής σημεία, έχει μικρότερα και πιο ελλειπτικά φύλλα, στρογγυλό θόλο και ορθόκλαδη ανάπτυξη. Τέλος το *P. angustifolium* είναι στενά συνδεδεμένο με το *P. bicolor* αλλά αυτό το είδος απαντάται σε πιο υγρές τοποθεσίες και υψηλότερα υψόμετρα, ενώ τα φύλλα του φέρουν πυκνές τρίχες στην κάτω επιφάνεια, τα άνθη του είναι καφεκίτρινα και οι καρποί είναι μαύροι με διαφορετικού χρώματος σπόρους (Cayzer, 1997 β).



Εικόνα 3. Τα είδη *P. angustifolium* (α), *phillyreoides* (β), *ligustrifolium* (γ).

Πηγή: <http://www.robertpowelltrees.org/coast-pittosporum-pittosporum-ligustrifolium/>
<https://gr.pinterest.com/pin/350788258459931192/>

³ Το *phillyreoides* φέρει ασημόλευκο τρίχωμα στην κάτω επιφάνεια των φύλλων.

1.1.2 Περιγραφή του είδους

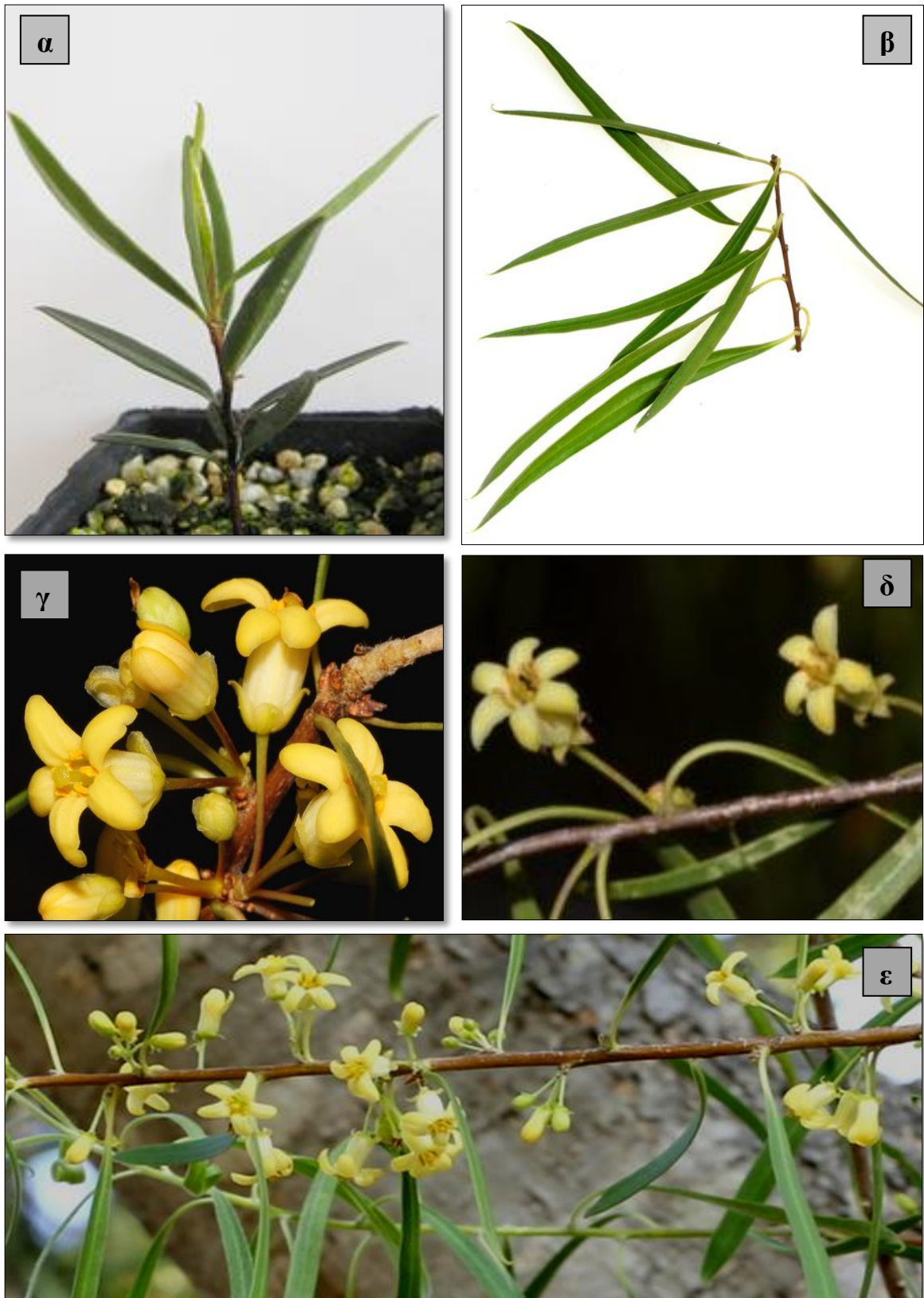
1.1.2.1 Βοτανική περιγραφή, μορφολογικά χαρακτηριστικά και βιολογία

Το *P. angustifolium* είναι αιθαλές, πολυετές δέντρο μεσαίου μεγέθους και αργής ανάπτυξης, που μπορεί να φτάσει τα 10 m ύψος (Εικ. 4). Ο κορμός του είναι ανοιχτού γκριζού χρώματος, λείος στο επάνω μέρος, σχισμένος και ινώδης προς τα κάτω, πολλές φορές με πολλούς βραχίονες. Οι κλάδοι του είναι ίδιου χρώματος με τον κορμό, ενώ οι νεαροί κλάδοι είναι στην αρχή πρασινωποί, μετά καστανοί και τελικά γίνονται γκριζοί. Οι δευτερεύοντες και τριτεύοντες κλάδοι του είναι αιωρούμενοι (Εικ. 6β). Τα παλαιότερα στελέχη τείνουν να ξεφλουδίσουν και έχουν οριζόντιες σχισμές ενώ μερικές φορές φέρουν μικρές τρίχες σχήματος T, οι οποίες απαντώνται πιο έντονα στη μέση. Οι νέοι βλαστοί δεν έχουν οριζόντιες σχισμές (Cayzer *et al.*, 2000).



Εικόνα 4. Το είδος *Pittosporum angustifolium* στον βοτανικό κήπο του Εθνικού Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών (Βοτανικός, Αθήνα), σε καρποφορία. Πηγή: Προσωπικό αρχείο

Συνήθως οι κοτυληδόνες είναι 2, (μερικές φορές όμως και τρεις), στενές ελλειπτικές, σφηνοειδούς σχήματος στη βάση, άμισχες, με οξεία κορυφή. Τα φύλλα των σποροφύτων (Εικ. 5α) είναι πολύ στενά ωοειδή, λεία (τείνουν να γίνουν λεία), οξύληκτα, με επίπεδα περιθώρια και μίσχο μήκους 3–5 mm. Τα ενηλικά φύλλα (Εικ. 5β) είναι κατ' εναλλαγή, απλά, γραμμοειδή ή στενά - ελλειπτικά, δρεπανοειδή, επίπεδα, ολόκληρα, λεία, γλαυκοπράσινα, έμισχα, με βάση μυτερή, οξύληκτα ή με ακιστροειδή κορυφή μήκους έως 3 mm. Ο μίσχος είναι ασπροπράσινος και γυμνός 5-14 mm (Cayzer *et al.*, 2000). Τα εύοσμα άνθη του φαίνονται τέλεια αλλά συνήθως λειτουργικά δεν είναι τέλεια. Τα σέπαλα είναι πέντε, ωοειδή, ελεύθερα, πρασινωπά και ελαφρώς τριχωτά στα περιθώρια. Τα πέταλα είναι πέντε, προμήκη, κάπως κοίλα, γυμνά, με κορυφή στρογγυλεμένη, χείλη που στρέφονται προς τα μέσα, μερικώς ενωμένα προς τη βάση τους σχηματίζοντας μια καμpanοειδή και με χλωμό κιτρινο χρώμα στεφάνη (Cayzer *et al.*, 2000). Τα αρσενικά άνθη εμφανίζονται σε ομάδες (μέχρι τεσσάρων) (Εικ. 5γ). Οι στήμονες έχουν νήμα ελεύθερο, παχύ, λευκό και κωνικό προς την κορυφή. Οι ανθήρες είναι επιμήκεις, χρυσοκίτρινοι και έχουν περίπου το ένα τρίτο του μήκους των νημάτων. Ο ύπερος είναι μικρός, στενός και σφιχτός. Η ωοθήκη είναι πράσινη και ο στύλος αρκετά επιμήκης πλησιάζοντας σε μήκος την ωοθήκη. Τα ωάρια είναι λίγα και μικρά (Cayzer *et al.*, 2000). Τα Θηλυκά άνθη εμφανίζονται μεμονωμένα ή κατά ζεύγη (Εικ. 5δ). Έχουν λεπτότερα και πιο επίπεδα νήματα πέντε φορές το μήκος των στενών τριγωνικών κίτρινων-καφέ ανθέρων. Η ωοθήκη είναι διογκωμένη, ατελώς δίχωρη και μερικές φορές τρίχωρη με ατελές διαχωριστικό και με μεγάλο αριθμό ωαρίων. Το στίγμα είναι παχύ δισχιδές ή τρισχιδές και κεφαλωτό και ο στύλος πολύ μικρός (Cayzer *et al.*, 2000). Το είδος ανθοφορεί και τον χειμώνα και την άνοιξη. Οι καρποί παραμένουν πάνω στο δέντρο για αρκετά μεγάλο χρονικό διάστημα. Η επικονίαση γίνεται από μη εξειδικευμένα έντομα επικονιαστές, ενώ η διασπορά των σπόρων πιθανότατα γίνεται από πτηνά νυχτερίδες ή μικρά θηλαστικά (Cayzer 1997 a). Οι καρποί είναι σχεδόν σφαιρικοί, με συχνά καρδιόσχημη βάση, παχύ κοτσάνι και ρυτιδωμένο σκούρου κιτρινοπορτοκαλί χρώματος περικάρπιο (Εικ. 6α) και ενδοκάρπιο ανοιχτό κίτρινο. Οι καρποί ξεραίνονται αργά και σχίζονται στα δύο ή στα 3 αναλόγως τους χώρους της ωοθήκης και γίνονται μια παχιά σχεδόν ξύλινη κάψα αναδεικνύοντας τους σπόρους οι οποίοι είναι μέχρι έξι ανά χώρο, ενωμένοι μεταξύ τους, ιξώδεις, σαρκώδεις και ρυτιδωμένοι, κοκκινοκαφέ χρώματος, γωνιώδεις και μήκους 4-5 mm (Εικ. 6γ) (Cayzer *et al.*, 2000).



Εικόνα 5. Σπορόφυτο 4 μηνών (α), φύλλα ενήλικου δέντρου (β), Άνθη (γ) Αρσενικά (δ) θηλυκά, κλάδος που φέρει αρσενικά άνθη και νεαρός βλαστός (ε).

Πηγή: <http://www.flickrriver.com/search/Pittosporum+angustifolium/>
<https://www.treeproject.org.au/seedling-database/pittosporum-angustifolium>
<https://selectree.calpoly.edu/tree-detail/pittosporum-angustifolium>



Εικόνα 6. Κάρποι *P. angustifolium* (α). Οι κρεμάμενοι κλάδοι του φέροντες καρπούς, κοσμοούν κήπο στη Λευκωσία και (γ) ανοιχτοί καρποί και ξυλοποιημένες κάψες. Εμφανείς οι κοκκινοκαφέ γωνιώδεις σπόροι.

Πηγή: <https://selectree.calpoly.edu/tree-detail/pittosporum-angustifolium>
<https://gr.pinterest.com/pin/345580971387082126/visualesearch/?x=16&y=16&w=530&h=671>
<https://savvastryfonosplants.com/category/%CE%BE%CE%B5%CE%BD%CE%B1-%CF%86%CF%85%CF%84%CE%B1/page/2/>

Στην οικογένεια Pittosporacee μόνο το γένος *Pittosporum* είναι δίοικο και κυρίως η διοικία είναι κρυπτική κυρίως στους στήμονες και μπορεί το άνθος να εμφανίζεται τέλειο αλλά δεν είναι λειτουργικό (Mayer and Charlesworth, 1991). Μπορεί να φαίνεται σαν γυνοδιοικία. Στη μελέτη του (Cayzer 1997a) μόνο ένα είδος (*P. moluccanum*) είχε υπέρους πολύ μικρού μεγέθους και μόνο στη Δυτική Αυστραλία. Θηλυκά άνθη με μειωμένους στήμονες είναι επίσης κρυπτικά αλλά λιγότερο με τους στήμονες να ποικίλουν από υποτυπώδεις (μόνο δύο είδη, *P. undulatum* and *P. xenicum*) έως σχεδόν τέλειους (*P. undulatum*). Συνήθως οι στήμονες μετα βίας φτάνουν τη βάση του στύλου. Από αυτά φαίνεται ότι η διοικία δεν εξαρτάται ούτε από το είδος ούτε από το γένος. Πολλά *Pittosporum* στην Αυστραλία είναι μόνοικα (*P. rubiginosum*, *P. spinescens*). Στο γένος είναι σπάνια η απόλυτη διοικία. Υπάρχουν διαρροές. Μερικές φορές εμφανίζονται καρποί σε αρσενικά φυτά, ενώ έχει παρατηρηθεί αυτογονιμοποίηση σε αρκετά θυληκά δέντρα σε απομονωμένες περιοχές στη Νέα Ζηλανδία (*P. eugenioides*, Godley 1979) και την Αυστραλία (*P. phillyreoides*, Maiden 1917). Από τα παραπάνω προκύπτει ότι υπάρχει διοικία (κρυπτοδιοικία) η οποία προκύπτει από τη μορφολογία του άνθους (αναλόγως του μεγέθους των αρσενικών ή θυληκών αναπαραγωγικών οργάνων) σε κάθε δέντρο.



Εικόνα 7. Η εξέλιξη του θηλυκού άνθους από τη στιγμή που ανοίγει μέχρι τη διάρρηξη και την ξυλοποίηση του καρπού. Στην εικόνα φαίνονται, (α) ανώριμο θυληκό άνθος (β) ώριμο θηλυκό άνθος (γ) διογκωμένη ωοθήκη και στήμονες (δ) ανώριμος καρπός (ε) ώριμος καρπός (διαρρηκτική κάψα) (ζ) Ξυλοποιημένη κάψα που φέρει τους σπόρους.

Πηγή: <https://savvastryfonosplants.com/category/%CE%BE%CE%B5%CE%BD%CE%B1-%CF%86%CF%85%CF%84%CE%B1/page/2/>

Τα *P. undulatum* και *P. bicolor* έχει βρεθεί ότι υβριδοποιούνται στη νοτιοανατολική Αυστραλία και αυτό το πρόβλημα φαίνεται να κλιμακώνεται με την ταχεία επέκταση του *P. undulatum* τον τελευταίο αιώνα. Ακόμη ένα νέο υποείδος έχει ήδη δημιουργηθεί αυτόν τον αιώνα (*P. undulatum* subsp. *emmettii*) και ο Floyd (1989) αναφέρει προβλήματα αναγνώρισης στη νοτιοδυτική Βικτώρια. Παρόμοιες ζώνες υβριδισμού φαίνεται να υπάρχουν στο εθνικό πάρκο Finch Hatton στο Queensland, μεταξύ των *P. revolutum* και *P. venulosum*, και πιθανότατα στη βορειοδυτική Αυστραλία μεταξύ του *P. angustifolium* και του *P. phillyreoides*. Γενικά φαίνεται ότι είναι πιθανή η διασταύρωση μεταξύ στενά συγγενικών ειδών αλλά αυτό συμβαίνει μόνο σε σπάνιες περιπτώσεις (Cayzer, 1997 β).

Ο αριθμός των χρωμοσωμάτων του *P. angustifolium* είναι $2n = 24$ (Gros 1965).

1.1.2.2 Γεωγραφική εξάπλωση, οικότοπος και περιβαλλοντικές απαιτήσεις

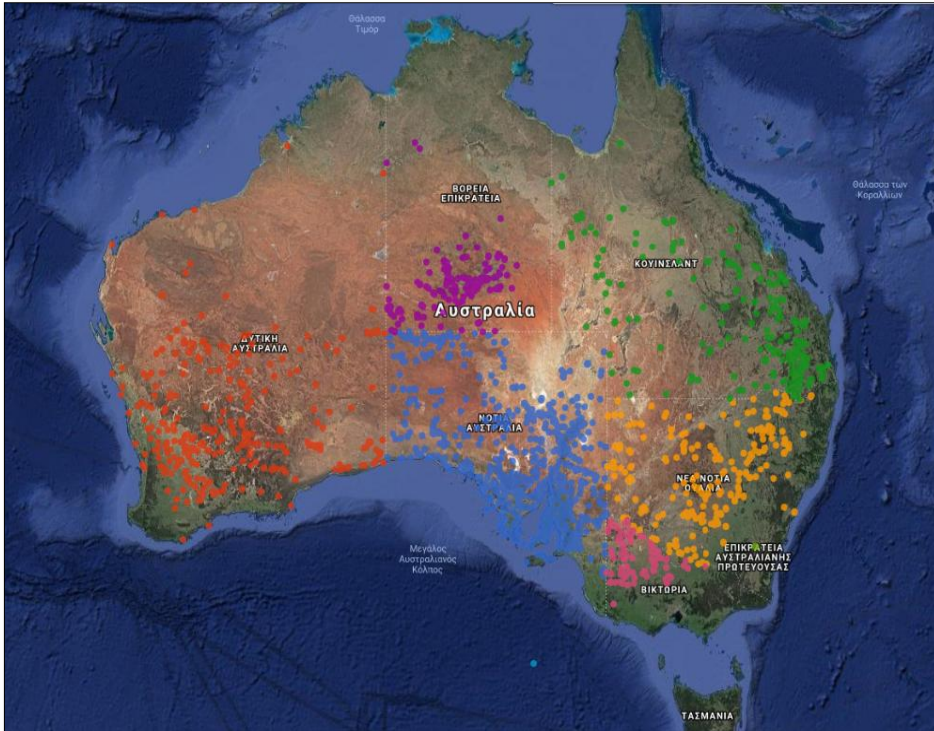
Η οικογένεια Pittosporaceae είναι μια μικρή οικογένεια που αποτελείται από εννέα γένη τα οποία απαντώνται μόνο στην Αυστραλία με εξαίρεση το γένος *Pittosporum*. Στην Αυστραλία, τα είδη της απαντώνται κυρίως στο τροπικό βόρειο τμήμα και τις εύκρατες ζώνες της νότιας ανατολικής και δυτικής Αυστραλίας. Το γένος *Pittosporum* είναι το μόνο που απαντάται πέρα από την αυστραλιανή πλάκα και ήταν ένα από τα τρία γένη που αναγνώρισε ο Robert Brown όταν περιέγραψε για πρώτη φορά αυτή την οικογένεια το 1814. Το μεγαλύτερο μέρος της κατανομής του *Pittosporum* βρίσκεται στο νότιο ημισφαίριο (Weston and Crisp 1996, Audley Charles 1987). Εξαπλώνεται στη Νέα Ζηλανδία, μέσω των νησιών του Ειρηνικού στη Χαβάη, στην ηπειρωτική Ασία, από την Ινδία στην Κίνα και την Ιαπωνία και στην ανατολική ηπειρωτική Αφρική και τα παράκτια νησιά. Σε αυτές τις περιοχές, η οικογένεια χαρακτηρίζεται από υψηλό βαθμό ενδημισμού με λίγα είδη ευρείας ποικιλίας είτε εντός είτε μεταξύ περιοχών. Ωστόσο, όλες οι υψηλότερες ταξινομικές διαφοροποιήσεις στην οικογένεια αυτή συμβαίνουν στην Αυστραλία και υπάρχουν περίπου εβδομήντα είδη στα εννέα γένη που εμφανίζονται σε όλα τα κράτη και τις περιοχές της. Το γένος δεν αυτοφύεται στην Ευρώπη, ούτε στην Αμερική αλλά εισήχθη και στις δύο αυτές ηπείρους για φυτοκομικούς σκοπούς (Cayzer 1997 a). Το πρώτο είδος *pittosporum* που παρατηρήθηκε από τους Ευρωπαίους συλλέχθηκε στην Ιαπωνία από τον Kaempfer μεταξύ 1690 -1692 (Gowda, 1951) και ήταν το *Pittosporum tobera*, (τώρα *P. tobira*).

Το *P. angustifolium* είναι αυτοφυές ενδημικό της Αυστραλίας και είναι ευρέως διαδεδομένο σε όλη την ενδοχώρα της (Εικ.9) (Cayzer *et al.*, 2000). Απαντάται σε όλη τη νότια Αυστραλία εκτός από το κάτω νοτιοανατολικό τμήμα της. Απαντάται επίσης στη δυτική Αυστραλία, στη βόρεια επικράτεια, στο Κουίνσλαντ (Queensland), στη Νέα Νότια Ουαλία (New South Wales) (δυτικά από το Muswellbrook) και τη Βικτώρια (Cayzer *et al.*, 2000, Cunningham, 1992). Γενικά προτιμά τις πιο ξηρές (Εικ. 8) και απομακρυσμένες περιοχές (Cayzer, 1997a). Φύεται σε οικοτόπους με ανοικτές δασικές εκτάσεις ευκαλύπτου, στις βιογεωγραφικές περιοχές (κοινότητες) Malle (νοτιοδυτική Αυστραλία) σε αλλουβιακά προσχωσιγενή εδάφη, σε κορυφογραμμές, σε ξηρά δασικά εδάφη, κοντά σε λίμνες σε υγρές περιοχές και σε γραμμές αποστράγγισης και αμμώδη εδάφη, στις πιο ξηρές ζώνες. Είναι το πιο διαδεδομένο αυστραλιανό είδος του γένους *Pittosporum*, όμως δεν είναι συνηθισμένο. Σε μια έκταση 400 km² βρίσκει κανείς κατά μέσο όρο ένα δείγμα φυτού (Cayzer *et al.*, 2000).



Εικόνα 8. *P. angustifolium* στην έρημο Great Victoria (Νοτιοδυτική Αυστραλία). Πρόκειται για τη μεγαλύτερη έρημο της ηπείρου.

Πηγή: <https://www.exploroz.com/wildflowers/581+native-apricot>



Εικόνα 9. Γεωγραφική εξάπλωση *P. angustifolium*.

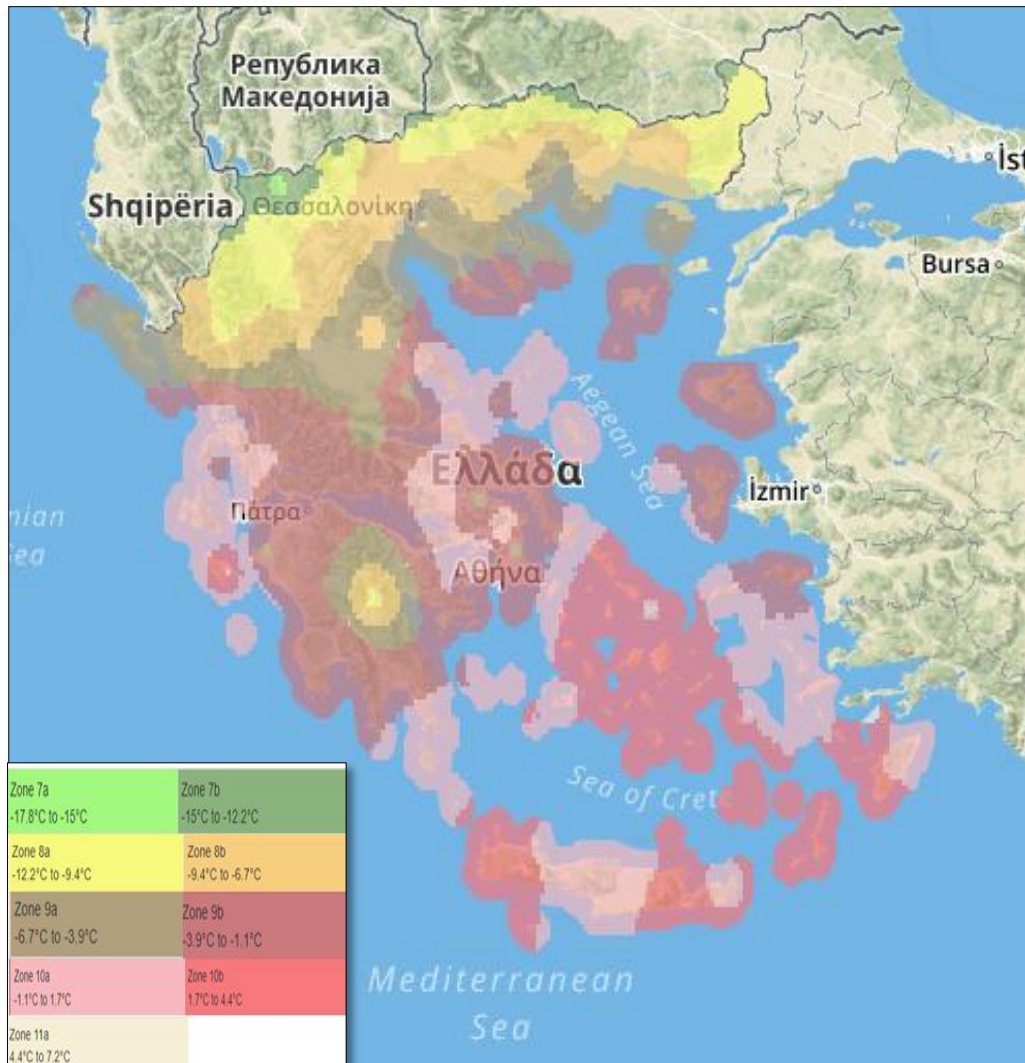
Πηγή: https://avh.ala.org.au/occurrences/search?taxa=Pittosporum+angustifolium#tab_mapView

1.1.2.3. Καλλιεργητικές απαιτήσεις και ιδιότητες

Πρόκειται για ένα δέντρο αργής ανάπτυξης που μπορεί να καλλιεργηθεί σε μεγάλη ποικιλία καλά στραγγιζόμενων εδαφών (αμμώδους ή ελαφρώς αργιλώδους σύστασης) και ευρέως φάσματος pH (ανέχεται και τα αλκαλικά). Δεν έχει ιδιαίτερες υδατικές απαιτήσεις, αρέσκεται στα στεγνά εδάφη, αλλά στην καλλιέργεια μπορεί να αντέξει περισσότερο νερό συγκριτικά με τον φυσικό οικότοπο (Bean, 1981, Holliday and Hill, 1974). Κατά την καλλιέργεια του απαιτεί καλά ηλιαζόμενες θέσεις ή ελαφρά σκιασμένες, ενώ δεν αναπτύσσεται σε σκιά (Huxley, 1992), καθώς έχει χαμηλό δυναμικό δέσμευσης άνθρακα. Σύμφωνα με τον Καββαδά (1956) μπορεί να ευδοκιμήσει στη χώρα μας (αναφέρεται ως *P. phyllireoides*). Είναι ανθεκτικό στον παγετό και την ξηρασία (Cayzer *et al.*, 2000, Cunningham *et al.*, 1992) και κατατάσσεται στις ζώνες ανθεκτικότητας κατά USDA⁴ 8-11 (Διαδίκτυο 1). Σύμφωνα με αυτή την κατάταξη μπορεί να καλλιεργηθεί σε όλη την ελληνική επικράτεια εκτός

⁴ Η ακριβής πρόβλεψη της ανταπόκρισης των πολυετών ποωδών και ξυλωδών φυτών στον παγετό είναι μείζονος σημασίας για την αποτελεσματική καλλιέργεια αλλά και την επιβίωση τους σε διαφορετικά κλίματα. Για τον σκοπό αυτό το υπουργείο γεωργίας των Η.Π.Α έχει δημιουργήσει χάρτες με ζώνες ανθεκτικότητας στον παγετό (Widrichner, 2012).

από μικρά τμήματα των νομών Καστοριάς, Φλώρινας, Πέλλας, Κιλκίς, Σερρών, Δράμας, Ξάνθης και Έβρου, όπως φαίνονται στον χάρτη (Εικ. 10)



Εικόνα 10. Χάρτης με ζώνες ανθεκτικότητας φυτών για την Ελλάδα, βασισμένος στο χάρτη ζωνών ανθεκτικότητας κατά USDA. Αυτή η διαδραστική έκδοση καλύπτει τη χώρα μας που κυμαίνεται από τη ζώνη 7a ως τη ζώνη 11a.

Πηγή: <https://www.plantmaps.com/interactive-greece-plant-hardiness-zone-map-celsius.php>

Σε ό, τι αφορά την αλατότητα, έχει μέτρια αντοχή σε εδάφη υψηλής ηλεκτρικής αγωγιμότητας (8 ds m^{-1}) και υψηλή σε εδάφη μικρότερης ηλεκτρικής αγωγιμότητας ($2-4 \text{ ds m}^{-1}$), ενώ έχει μηδενική αντοχή στο υφάλμυρο νερό. Ακόμη, το ριζικό του σύστημα φτάνει σε μέτριο έως μεγάλο βάθος και έχει εξαιρετικό δυναμικό ελέγχου διάβρωσης τόσο για αργιλώδεις όσο και για αμμώδεις τοποθεσίες (Cunningham *et al.*, 1992).

1.1.2.4 Χρήσεις από τους ιθαγενείς της Αυστραλίας

Ως κατάλοιπο της ταξινομικής σύγχυσης όπως αναφέρθηκε στο κεφάλαιο της βοτανικής ταξινόμησης του είδους *P. angustifolium* ορισμένες αναφορές συμπεριλαμβάνουν τα είδη *P. angustifolium* και *P. phillyreoides* ως συνώνυμα. Ωστόσο η πλειονότητα των πρώτων αναφορών χρησιμοποιούν μόνο το όνομα *P. phillyreoides*. Οι περισσότερες αναφορές που περιγράφουν την παραδοσιακή χρήση του *P. phillyreoides* από τους ιθαγενείς αφορούν κυρίως το *P. angustifolium* και αυτό γίνεται εύκολα αντιληπτό λόγω της διαφορετικής γεωγραφικής εξάπλωσης των 2 ειδών, ιδιαίτερα εάν οι πληροφορίες αυτές προέρχονται από τη φαρμακοποιία των ιθαγενών φυλών, των οποίων η επικράτεια βρίσκεται σε διάφορες τοποθεσίες στην κεντρική, νότια και ανατολική Αυστραλία (Cayzer *et al.*, 2000).

Το Ξύλο του είναι συμπαγές, ανοιχτού χρώματος, πολύ σκληρό, χρήσιμο για τόννευση, και ενδεχομένως για σκάλισμα (Maiden 1904). Εμφανίστηκε επανειλημμένα ως πολύτιμο κτηνοτροφικό φυτό στις περιοχές της αυστραλιανής ενδοχώρας σε περιόδους ξηρασίας (Maiden 1904, Makinson, 1992, Lazarides and Hince, 1993), όμως ο Everist (1986) θεωρεί ότι αυτό είναι αμφισβητήσιμο λόγω της στυφής γεύσης των φύλλων, παρ' όλα αυτά, τρώγονταν από καμήλες, όμως είναι πιθανό ότι προκαλούσε ερεθισμό σε πτηνά και άλογα (Cayzer *et al.*, 2000).

Οι Lassak και McCarthy (1987) δηλώνουν ότι οι ιθαγενείς χρησιμοποιούσαν την έγχυση των σπόρων και τον πολτό των φρούτων, των φύλλων ή του εσωτερικού ξύλου για την ανακούφιση από τον πόνο και τις κράμπες. Το αφέψημα των καρπών καταναλωνόταν ή εφαρμοζόταν για εκζέματα και κνησμό και για θεραπεία κρυολογημάτων. Η αιμολυτική σαπωνίνη που λέγεται ότι περιέχει μπορεί να αποδειχθεί επιβλαβής και έτσι δεν χρησιμοποιούνταν με μεγάλη συχνότητα. Οι Rijantjatjara (φυλή ιθαγενών) φημολογείται ότι χρησιμοποιούν αυτό το φυτό για ιατρικούς σκοπούς. Οι σπόροι λειοτριβόνταν και χρησιμοποιούνταν ως κατάπλασμα. Φημολογείται επίσης ότι κομπρέσες θερμών φύλλων χρησιμοποιούνταν για να προκαλέσουν γαλακτόρροια σε νέες μητέρες (Latz, 1995).

1.1.2.5 Φυτοχημεία και βιολογική δραστηριότητα

Σε αντίθεση με τα περισσότερα φαρμακευτικά φυτά που χρησιμοποιούνται παραδοσιακά από Αυστραλούς Ιθαγενείς, το *P. angustifolium* τείνει να γίνει ένα από τα πιο ευρέως κυκλοφορούντα συμπληρωματικά φάρμακα στην Αυστραλία. Σήμερα, χρησιμοποιείται ως συμπλήρωμα βασικών φαρμάκων ακόμη και ως υποκατάστατο φάρμακων στην αντιμετώπιση τοπικών παθήσεων όπως το έκζεμα ή η ψωρίαση, ή πιο σοβαρών ασθενειών όπως οι καρδιαγγειακές παθήσεις, η νόσος του Crohn και ο καρκίνος. Η φαρμακευτική ιδιαιτερότητα και η αποτελεσματικότητα του σήμερα επικοινωνείται μόνο από στόμα σε στόμα και η ρύθμιση του φαρμακευτικού υλικού εξαρτάται από την εμπειρία όσων ασχολούνται με βότανα (Sandgrove and Jones 2016). Λόγω αυτής της πρόκλησης, διάφορες μελέτες έχουν προσπαθήσει να εξετάσουν περαιτέρω τις θεραπευτικές του ιδιότητες. Τέτοιες μελέτες επικεντρώθηκαν κατά κύριο λόγο στη φυτοχημική ανάλυση (Backer, 2014, Sandgrove and Jones, 2013) και στις προκαταρκτικές φαρμακολογικές δοκιμασίες, συμπεριλαμβανομένων των αντιμικροβιακών δοκιμών (Vesoul and Cock, 2011, Sandgrove and Jones, 2013), την αντική δοκιμή (Semple *et al.*, 1998) και την τοξικότητα έναντι καρκινικών κυττάρων (Bäcker *et al.*, 2013).

Υπάρχουν αρκετές σελίδες αυστραλιανής προέλευσης στο διαδίκτυο (Διαδίκτυο 5, 6, 7) που προωθούν προϊόντα (κάψουλες, τσάι, έλαια, κρέμες, σαπούνια) (Εικ.11) που προκύπτουν από τα φύλλα ή τους καρπούς. Οι επιχειρήσεις αυτές (Εικ. 11) προωθούν τα προϊόντα τους βασιζόμενες στα πιθανά οφέλη του είδους για την ανθρώπινη υγεία.

Οι άνθρωποι που ασχολούνται με βότανα βασίζονται στην εμπειρία και διαμορφώνουν την κρίση τους όσον αφορά τις ιδιότητες και την αποτελεσματικότητα του είδους. Υπάρχουν υποθέσεις για επίδραση των μορφολογικών χαρακτηριστικών και της γεωγραφικής τοποθεσίας στην φαρμακευτική αποτελεσματικότητα. Για παράδειγμα λέγεται ότι τα στελέχη είναι πιο αποδοτικά από τα φύλλα. Μι άλλη θεωρία θέλει τον ασημενιο-γκρι κορμό να υποδηλώνει ένα ιδιαίτερα ισχυρό δέντρο από φαρμακευτικής απόψεως. Είναι ξεκάθαρο ότι απαιτείται φυτοχημική ανάλυση έτσι ώστε να εξεταστούν αυτοί οι ισχυρισμοί (Sandgrove and Jones 2016).



Εικόνα 11. Διαφημίσεις, προϊόντα και εγκαταστάσεις εταιριών αυστραλιανής προέλευσης. Πηγή: (Διαδίκτυο 5, 6, 7) και λογαριασμοί των εταιριών στο instagram.

Οι έρευνες των Hellmund (2007) και Crüsemann (2009) θεωρούνται θεμελιώδεις για τη μελέτη της φυτοχημείας του *P. angustifolium*. Ο Hellmund πραγματοποίησε χρωματογραφικές αναλύσεις λεπτών στρωμάτων, οι οποίες παρείχαν αρχικές ενδείξεις για την παρουσία τερπενοειδών και φαινολικών δομών. Ακόμη, ανιχνεύθηκαν μέτριες κυτταροτοξικές επιδράσεις σε κύτταρα καρκινώματος ανθρώπινου πνεύμονα (A427) και σε ανθρώπινα επιθηλιακά κύτταρα αμνίου (κύτταρα FL) καθώς και διεγερτικά αποτελέσματα επί ανθρώπινων λευκοκυττάρων από πολικά εκχυλίσματα. Οι αντιμικροβιακές ιδιότητες έναντι gram θετικών και αρνητικών κατά Gram βακτηρίων καθώς και ειδών *Candida* δεν ήταν δυνατόν να καταγραφούν. Ο Crüsemann αφιερώθηκε στον καθορισμό και την απομόνωση των πρώτων ενώσεων που αποδόθηκαν στις τριτερπενοειδείς σαπωνίνες. Η ύπαρξη αυτής της κατηγορίας ουσιών συζητάται επίσης από τους Lassak και McCarthy (1987). Δεν ήταν δυνατόν να γίνει μια ακριβής δομική ανάλυση των απομονώσεων που ελήφθησαν από το Crüsemann. Από τη σημερινή σκοπιά, λόγω της ανεπαρκούς

ενόργανης ανάλυσης (ακατάλληλη φάση διαχωρισμού HPLC), αμφισβητείται η πραγματική απομόνωση των καθαρών ουσιών. Με βάση το έργο του Crüsemann (2009), ο Sach (2011) ήταν σε θέση να επιδείξει κυτταροτοξικότητα έναντι κυττάρων καρκινώματος της ανθρώπινης ουροδόχου κύστης και επιπλέον, την επίδραση απόπτωσης και νέκρωσης. Σε αναφορά ως *P. phillyraeoides* var. *microcarpa* ανιχνεύθηκε αντική δράση κατά του ιού του ποταμού Ross (Semple *et al.*, 1998), αλλά δεν ανιχνεύθηκαν αντιβακτηριακές δράσεις (Palombo and Semple, 2001). Σε άλλη μελέτη δεν παρατηρήθηκε αντιμικροβιακή δράση κατά των μικροβίων της εντερικής χλωρίδας των μηρυκαστικών (Durmic *et al.*, 2008). Πριν την ολοκλήρωση της διατριβής του Backer (2014) δημοσιεύθηκε η πρώτη εργασία σχετικά με τη φυτοχημεία (εκχυλίσματα και αιθέρια έλαια) και τις βιολογικές δράσεις υπό την ταξινομική ονομασία *P. angustifolium* (Backer, 2013). Εδώ, αναλόγως τη θέση, μπορούσαν να αποδειχθούν αδύναμες έως ισχυρές αντιμικροβιακές ιδιότητες του αιθέριου ελαίου και των εκχυλισμάτων. Επιπρόσθετα, εντοπίστηκαν μεμονωμένα συστατικά με αναλγητικά αποτελέσματα στο αιθέριο έλαιο.

Στη μελέτη του Backer (2014) από αυστραλιανό φυτικό υλικό (φύλλα και σπόρους), καθώς και από φυτά καλλιέργειας (φύλλα), απομονώθηκαν συνολικά 55 τριτερπενοειδείς σαπωνίνες (σε 33 εξ' αυτών αποσαφινίστηκε και η δομή). Τέλικά, 29 ενώσεις, που ονομάστηκαν pittangretosides A-Z και A1-C1, χαρακτηρίστηκαν ως νέα φυσικά προϊόντα και αναφέρονται εκεί για πρώτη φορά. Οι σκελετοί της αγκυρόνης αποτελούνται από το ολεανάνιο (oleanane), ένα ασυνήθιστο 17, 22-σεκολεανολικό οξύ (seco oleanolic acid) και τον τύπο ταραξαστερόλης (taraxasterol type) που συνδέονται σε μία ή δύο αλυσίδες σακχάρων, δημιουργώντας μονο- και δισδεσμοσιδικές δομές, αντίστοιχα. Σε όλα τα τμήματα του φυτού που εξετάστηκαν (φύλλα, σπόροι, στελέχη, ρίζες) ανιχνεύθηκαν τριτερπενοειδείς σαπωνίνες σε διαφορετική ποιότητα και ποσότητα. Επιπλέον, από τα φύλλα απομονώθηκαν 13 πολυφαινολικές ενώσεις. Πιο ειδικά, διασαφηνίστηκαν δομικά τρεις γλυκοζίδες φλαβονόλης (flavonol glycosides) και τρία παράγωγα κινικού οξέος. Όλες είναι γνωστές ενώσεις. Περαιτέρω ανάλυση έδωσε ενδείξεις για την εμφάνιση ορισμένων λιπαρών οξέων καθώς και μονο-σεσκιτερπενίων και ισοπρενοειδών C13 ως συστατικά του αιθέριου ελαίου. Η βιολογική δραστηριότητα των πολυφαινολών και ιδιαίτερα των σαπωνινών τριτερπενίου ελέγχθηκαν με αρκετές αναλύσεις και

συστήματα δοκιμών. Οι γλυκοζίτες τριτερπενίου (triterpene glycosides) αποδείχθηκε ότι αναστέλλουν την ανάπτυξη διαφόρων *Candida* spp., ενώ εδειξαν κυτταροτοξικές επιδράσεις έναντι τεσσάρων διαφορετικών κυτταρικών σειρών και αιμόλυσης επίσης (αντιθρομβωτική δράση). Περαιτέρω, παρατηρήθηκε καθαρά αναστολή της ανθρώπινης τοποϊσομεράσης I (ενζύμο που βοηθάει στο σωστό ξετύλιγμα της διπλής έλικας του DNA κατά την αντιγραφή). Όλες αυτές οι δραστηριότητες εξαρτώνται προφανώς από το πρότυπο ακυλίωσης και τη διακλάδωση των συνδεδεμένων σακχάρων. Σύμφωνα με αυτό, θα μπορούσαν να προκύψουν κάποιες ενδιαφέρουσες σχέσεις δομικής δραστηριότητας. Για παράδειγμα, C5 ακυλο στη θέση C-22 ή C-21 και C-22, αντίστοιχα, φαίνεται να είναι ουσιώδης για τις περισσότερες από τις παρατηρούμενες βιολογικές επιδράσεις, ενώ μια ελλειμματική ακυλίωση ή ακυλίωση στο C-28 έδειξε μόνο αδύναμη ή καθόλου βιολογική δραστηριότητα. Για τις πολυφαινολικές ενώσεις βρέθηκαν αντιοξειδωτικές επιδράσεις (Backer, 2014).

Μια σχετικά πρόσφατη μελέτη από τους Sadgrove και Jones (2013) εξήγαγε τα αιθέρια έλαια του *P. angustifolium* και αξιολόγησε την ανασταλτική δράση τους έναντι διάφορων μικροβιακών ειδών. Τα έλαια από τους καρπούς και τα φύλλα δύο φυτών *P. angustifolium* παρουσίασαν μέτρια αντιμικροβιακή δράση έναντι των τριών μικροβίων που ελέγχθηκαν (*Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis* και *Candida albicans*), ενώ ο καρπός ενός άλλου ατόμου *P. angustifolium* παρουσίασε σχετικά υψηλή αναστολή. Η διαφορά στην αντιμικροβιακή δραστηριότητα κάθε φυτού μπορεί να οφείλεται σε διαφορετικές χημικές ενώσεις ατόμων διαφορετικών γεωγραφικών τοποθεσιών. Η ανάλυση της χημικής σύνθεσης των εκχυλισμάτων αιθέριου ελαίου *P. angustifolium* αποκάλυψε 51 διαφορετικές χημικές ουσίες, η σύνθεση των οποίων διέφερε για κάθε γεωγραφικά διακριτό άτομο καθώς και μεταξύ των φύλλων και των καρπών των φυτών. Για παράδειγμα, τα αιθέρια έλαια φύλλων έδωσαν μεγαλύτερες ποσότητες εστέρων και σεσκιτερπενολών από τα έλαια του καρπού. Η χημική διαλογή των εκχυλισμάτων αποκάλυψε την παρουσία σαπωνινών, φαινολών (διαλυτών και αδιάλυτων), φλαβονοειδών (κυρίως στα εκχυλίσματα μεθανόλης και εξανίου) και τανινών (Sadgrove and Jones, 2013). Οι ερευνητές αυτοί πρότειναν ότι τα συστατικά αιθέριου ελαίου limonene, sabinene, terpinenes, απινένιο και biclogermacrene μπορεί να είναι η αιτία της αντιμικροβιακής δραστηριότητας στη μελέτη. Ακόμη η σύνθεση αιθέριου ελαίου που παρουσιάζεται περιλαμβάνει συστατικά που

εμπλέκονται στην ταυτοποίηση μητέρας-βρέφους, τα οποία μπορεί να έχουν σχέση με τις παραδοσιακές εφαρμογές του είδους ως λακταγωγό (Sandgrove and Jones, 2013).

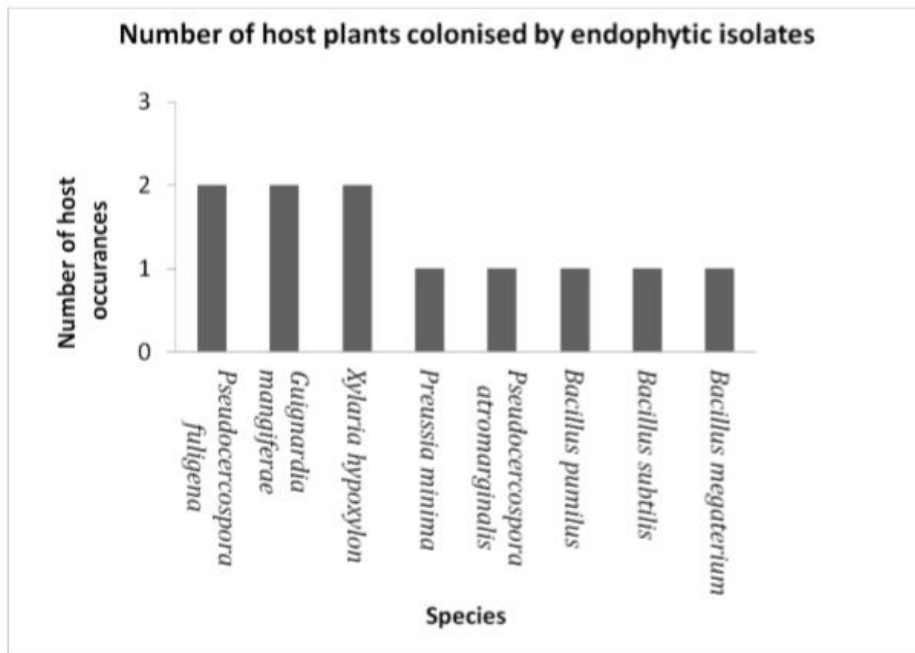
Τέλος, οι Sandgrove and Jones (2016) διεξήγαγαν επιπλέον φυτοχημική ανάλυση σε μια προσπάθεια να συσχετιστούν γεωγραφικά ή μορφολογικά μοτίβα με τη σχετική αναλογία των εκχυλισμένων διαλυτών συστατικών. Συγκεκριμένα, η προσέγγιση αυτή επικεντρώθηκε στη χημική μεταβλητότητα μεταξύ φύλλων και κλαδιών (σύνθεση ελεύθερων λιπαρών οξέων) και στη γεωγραφική μεταβλητότητα. Ήταν η πρώτη μελέτη που ασχολήθηκε με την περιεκτικότητα του είδους σε λιπαρά οξέα. Η ανάλυση αποκάλυψε ένα εύρος ελεύθερων λιπαρών οξέων και η-αλκανίων, αλλά μόνο δύο (λινελαϊκό οξύ και α-λινολενικό οξύ) ήταν τα κυρίαρχα λιπαρά οξέα.

Η εμφάνιση αυτών των δύο βασικών λιπαρών οξέων δίνει κάποια αξιοπιστία στη χρήση του *P. angustifolium* ως φάρμακο, αν και αυτά τα συστατικά δεν δικαιολογούν τη θεραπευτική δραστηριότητα αυτή καθαυτή. Όμως μπορεί να συμπληρώσουν τη φτωχή διατροφή και να βελτιώσουν την κατάσταση της ανθρώπινης υγείας με αυτόν τον τρόπο. Τα φύλλα περιέχουν υψηλότερη αναλογία α-λινολενικού οξέος σε σχέση με το λινελαϊκό οξύ, ενώ το αντίστροφο ισχύει για κλαδιά. Επειδή αυτά τα ελεύθερα λιπαρά οξέα προέρχονται συνήθως από πρόδρομα τριγλυκερίδια, αυτό το αποτέλεσμα καταδεικνύει την πιθανότητα διαφορετικού λιπιδικού προφίλ μεταξύ φύλλων και κλάδων. Όσον αφορά τη γεωγραφική μεταβλητότητα, η HPLC έδωσε διαφορετικά αποτελέσματα (μικρότερης περιεκτικότητας) μόνο για μία περιοχή. Δεν ήταν όμως σαφές αν αυτό μπορεί να επηρεάσει τη θρεπτική ή φαρμακευτική ιδιότητα του εκχυλίσματος (Sandgrove and Jones, 2016).

Κλείνοντας, οι έρευνες επιβεβαιώνουν σε ένα βαθμό τις θεωρίες που θέλουν το *P. angustifolium* πηγή πολλών χημικών ενώσεων, ενώ μερικά από αυτά τα αποτελέσματα ταιριάζουν με αναφερόμενες από την εναλλακτική ιατρική επιδράσεις του φυτού όπως για παράδειγμα η επίδραση σε κακοήθεις ασθένειες. Το σίγουρο σε γενικές γραμμές είναι ότι το είδος είναι ευεργετικό για τον άνθρωπο, όμως ορισμένες εθνοφαρμακευτικές εφαρμογές πρέπει να εξεταστούν πιο προσεκτικά και να διερευνηθούν περισσότερο.

1.1.2.4 Ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί του *P. angustifolium*

Στη μελέτη του Thompson (2014) απομονώθηκαν πολλοί ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί. Ωστόσο, μόνο οκτώ από τα 54 προϊόντα απομόνωσης αναγνωρίστηκαν μέχρι το επίπεδο του είδους (Εικ.12). Αυτά τα προϊόντα απομόνωσης μπορεί να ήταν νέα είδη γνωστών γενών. Το *P. angustifolium* βρέθηκε να έχει περισσότερους μυκητιακούς ενδοφυτικούς μικροοργανισμούς (38) από βακτηριακούς (16), ωστόσο, αυτό μπορεί να μην είναι μια καλή αναπαράσταση ολόκληρης της ενδοφυτικής ποικιλότητας του φυτού. Δεν παρατηρήθηκε καμία συγκεκριμένη σχέση ξενιστή-παρασίτου. Ωστόσο, αυτή η μελέτη διερεύνησε μόνο τα φύλλα επτά φυτών. Η δειγματοληψία από περισσότερα φυτά, φύλλα ή από άλλους τύπους φυτικών ιστών μπορεί να δώσει διαφορετικά αποτελέσματα. Τρεις από τους οκτώ μικροοργανισμούς απομονώθηκαν από 2 άτομα (*Pseudocercospora fuligena*, *Guignardia mangiferae* *Xylaria hypoxylon*) (Εικ.12). Οι πέντε άλλοι βρέθηκαν σε ένα άτομο ο καθένας.



Εικόνα 12. Οι 8 μικροοργανισμοί που αναγνωρίστηκαν μέχρι το επίπεδο του είδους και ο αριθμός των ξενιστών στα οποία παρασίτησαν αυτοί (Thompson, 2014).

Η μελέτη αυτή ενισχύει την άποψη ότι οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί είναι ικανοί να παράγουν πολύτιμες αντιμικροβιακές ενώσεις. Ένα ακατέργαστο εκχύλισμα από έναν μύκητα (*P. fuligena*) έδειξε βακτηριοκτόνο δράση έναντι του

ανθρώπινου παθογόνου *S. marcescens*. Η μελέτη αυτή καταδεικνύει το δυναμικό του *P. angustifolium* ως πηγή ανεξερεύνητων ενδοφυτικών ειδών και αντιμικροβιακών ενώσεων.

Ένα ενδοφυτικό Gram+ ακτινοβακτήριο, (στέλεχος PIP 158T) απομονώθηκε από το στέλεχος ενός ατόμου *P. angustifolium* που συλλέχθηκε από τον κήπο του Πανεπιστημίου Flinders στην Αδελαΐδα. Φυλογενετική αξιολόγηση το τοποθέτησε στην οικογένεια Nocardioideae. Συνδέθηκε στενότερα με τα *Kribbella sandramycini* (ATCC 39419T) και *Kribbella albertanoniae* (BC640T) που μοιράζονται ομοιότητα 99,26 και 99,18% με το *Kribbella hippodromi* (S1.4T), αντίστοιχα. Τα χημειοταξικά στοιχεία που περιλαμβάνουν συστατικά κυτταρικού τοιχώματος και κύρια λιπαρά οξέα επιβεβαίωσαν την υπαγωγή του στελέχους PIP 158T στο γένος *Kribbella*. Τα αποτελέσματα της φυλογενετικής ανάλυσης, συμπεριλαμβανομένων των φυσιολογικών και βιοχημικών μελετών σε συνδυασμό με υβριδισμό DNA-DNA, επέτρεψαν τη γενοτυπική και φαινοτυπική διαφοροποίηση του στελέχους PIP 158T από τα πλησιέστερα είδη με έγκυρα δημοσιευμένα ονόματα. Το προτεινόμενο όνομα για το νέο είδος είναι το *Kribbella pittospori* sp. nov (Kaewkla, 2016).

1.2 Το γένος *Pittosporum*

1.2.1 Χρήσεις του γένους *pittosporum* στην αρχιτεκτονική τοπίου και την κηποτεχνία

Η Pittosporaceae είναι μια οικογένεια που περιέχει μια σειρά από ενδιαφέροντες θάμνους όπως τα είδη του γένους *Bursaria*, αλλά και πολύχρωμα αναρριχώμενα φυτά όπως το *Sollya billardiera* και είδη του γένους *Marianthus*, πολλά από τα οποία βρίσκονται μόνο στη Δυτική Αυστραλία (Καββαδάς, 1956). Το γένος *Pittosporum* εισήχθη σε Ευρώπη και Αμερική για καλλωπιστικούς σκοπούς. Πολλά από τα είδη *Pittosporum* της Αυστραλίας και της Νέας Ζηλανδίας έχουν από καιρό αξιοποιηθεί σε κήπους της Αυστραλίας, της Νέας Ζηλανδίας, της Γαλλίας και της Αγγλίας, για τα άνθη, το φύλλωμα και το γλυκό άρωμά τους, ενώ μερικά είναι κοινά καλλωπιστικά φυτά και φυτά φρακτών στην Καλιφόρνια και τη Φλόριντα (Cayzer, 1997α). Γενικά τα είδη του γένους *Pittosporum* χρησιμοποιούνται ως καλλωπιστικά σε γλάστρες και ζαρντινιέρες ή στην ύπαιθρο μεμονωμένα ή σε συστάδες, σε πάρκα και παρτέρια, πάνω σε χλοοτάπητες. Σχηματίζουν πυκνές και συμπαγείς συστάδες, ενώ μπορούν να διαμορφωθούν σε ποικίλα σχήματα λόγω της επιδεκτικότητας στο κλάδεμα, δίνοντας ευελιξία στους κηποτέχνες. Στην Ελλάδα καλλιεργούνται εδώ και χρόνια σε κήπους με το όνομα Αγγελική (Καββαδάς, 1956).

Μετά την άφιξη των Ευρωπαίων στην Αυστραλία αναδείχθηκε η καλλωπιστική αξία του γένους. Εως τότε, η άγνοια για τα αυστραλιανά είδη οδηγούσε στη χρήση φυτών του γένους από άλλες περιοχές και ιδιαίτερα από τη Νέα Ζηλανδία. Αυτά πολλαπλασιάζονταν με μοσχεύματα και σπόρο και χρησιμοποιούνταν για τη δημιουργία φράχτη είτε ως μεμονωμένα κλλωπιστικά φυτά σε κήπους και παρτέρια. Τέτοια είδη είναι τα *P. crassifolium* και *P. tobira*, ευρέως διαδεδομένα στην Ασία, και ιδιαίτερα χρήσιμα σε περιοχές με έντονη ρύπανση όπως οι εσωτερικές οδοί πόλεων. Το *P. tobira* (κν.Αγγελική) χρησιμοποιείται ευρέως στην κηποτεχνία και την αρχιτεκτονική τοπίου παγκοσμίως χάρη στο πυκνό φύλλωμα και τα ομορφα λευκά και εύοσμα άνθη του. Ενδείκνυται για ζωντανούς φράχτες (Εικ. 14α) και για δημιουργία ορίων. Από τα αυστραλιανά είδη του γένους το *P. undulatum* είναι το συνηθέστερο για χρήση στην κηποτεχνία, πρόκειται για τη δεινρόδη Αγγελική (Εικ. 13) που είναι πλέον δηλωμένο ζιζάνιο σε τέσσερις ηπείρους συμπεριλαμβανομένης της Αυστραλίας (Cayzer, 1997 β). Το *P. undulatum*

ενδείκνυται επίσης για δημιουργία φραχτών (Εικ.13α), αλλά και για δενδροστοιχίες οδών και λεωφόρων είτε για χρήση ως μεμονωμένο δέντρο (Εικ.13β) όπως το *P. tobira*. Άλλα είδη ή ποικιλίες που χρησιμοποιούνται μεμονωμένα ή σε φράχτη είναι τα *P. heterophyllum* (κν. Αγγελική η μικρόφυλλη) (Εικ.14γ), *P. tobira nana* (κν. Αγγελική νάνα) (Εικ.14δ), *P. tobira variegatum nana* (Εικ.) και το *P. eugenioides* που χρησιμεύει ως ανεμοθραύστης (Καββαδάς, 1956).



Εικόνα 13. *P. undulatum* Φράχτης (α) και μεμονωμένο (β) καθώς και *P. undulatum* στη φύση (γ) (Central Tilba, NSW).

Πηγή: <https://atlasoflife.naturemapr.org/Community/Sighting/3379859>
<https://selectree.calpoly.edu/tree-detail/pittosporum-undulatum>

Εικόνα 14. Φράχτης *P. tobira* (α) *P. tobira variegatum* (β) και *P. heterophyllum* (γ) και *P. tobira nana* (δ) *P. tobira variegatum* (στ) *P. tenuifolium* σε μεμονωμένη φύτευση σε παρτέρια και πάρκο.

Πηγές: https://topio.eu/index.php?id_product=128&id_product_attribute=0&rewrite=-15-&controller=product
<https://www.monrovia.com/plant-catalog/plants/2450/variegated-japanese-mock-orange/>
https://www.fitoriatsakiris.gr/el/plants-catalog/shrubs-plants.html?ground_type=89
<https://www.kipogeorgiki.gr/Pittosporum-tobira-Variegatum%CE%91%CE%B3%CE%B3%CE%B5%CE%BB%CE%B9%CE%BA%CE%AE-%CE%A0%CE%B1%CE%BD%CE%B1%CF%83%CE%AD-%CE%98%CE%AC%CE%BC%CE%BD%CE%BF%CF%82>

Το *P. angustifolium* έχει υψηλή αισθητική αξία λόγω των κρεμάμενων κλάδων του, του ελκυστικού φυλλώματος, της φιλτραρισμένης απαλής σκιάς που δημιουργεί η κόμη του, των όμορφων και εύοσμων ανθέων του, των πορτοκαλί

καρπών του, αλλά και του πολλές φορές πολλαπλού κορμού του. Είναι κατάλληλο για κήπους, για ξηρικά τοπία, καθώς είναι ανθεκτικό στην ξηρασία, ενώ λόγω της ανάπτυξης του (δεν χρειάζεται πολύ χώρο για να αναπτυχθεί) είναι ένα όμορφο μικρό καλλωπιστικό δέντρο για στενούς αστικούς και περιαστικούς χώρους (Fitzgibbon, 2003, Διαδίκτυο 1, Διαδίκτυο 2, Διαδίκτυο 3). Οι κρεμάμενοι κλάδοι και τα λεπτά φύλλα, του δίνουν μια χαριτωμένη όψη παρόμοια μ' αυτή της κλαίουσας ιτιάς *Salix babylonica* (Εικ. 15), με τη διαφορά ότι είναι αειθαλές (Καββαδάς, 1956). Είναι επιδεκτικό στο κλάδεμα (200). Τέλος υπάρχουν φυτώρια που παράγουν *P. angustifolium* στην Αμερική, όπως το San Marcos Gardeners (Santa Barbara, California) (Διαδίκτυο 3).



Εικόνα 15. *Salix babylonica* (α) και *Pittosporum angustifolium* (β).

Το *P. angustifolium* χρησιμοποιείται στην Αυστραλία από λάτρεις των κήπων (Cayzer, 1997 β). Από το διαδίκτυο προκύπτει χρήση του στην κηποτεχνία και την αρχιτεκτονική τοπίου τόσο στην Αυστραλία όσο και στην Αμερική. Το είδος συμπεριλαμβάνεται ως ενδημικό είδος της Αυστραλίας σε προτάσεις για τη διαμόρφωση αστικών και βιομηχανικών τοπίων σε δήμους όπως οι Wagga Wagga και Hume, τα έτη 2013 και 2005 αντίστοιχα (Διαδίκτυο 8,9). Στην Ευρώπη υπάρχει στην Κύπρο (Λευκωσία) σε κήπους (Διαδίκτυο 4), ενώ απαντάται στον βοτανικό κήπο του ΕΚΠΑ (προσωπική παρατήρηση). Περιστασιακά εμφανίζεται σε τοπία του

Φοίνιξ κοντά σε πηγές νερού, ενώ στην ίδια περιοχή χρησιμοποιείται σε πρόχειρο φόντο ή σε πρόχειρο φράχτη (Διαδίκτυο 1). Για όλα αυτά όμως δεν υπάρχουν αναφορές σε επιστημονικές εργασίες. Υπάρχουν αναφορές για χρήση του *P. phillyraeoides* σε φράχτες, ως ανεμοθραύστη και ως καλλωπιστικό δέντρο στις Ηνωμένες Πολιτείες (Καλιφόρνια, Αριζόνα και Φλόριντα), τη Γαλλία, την Αυστραλία και τη Νέα Ζηλανδία (Cooper, 1956). Πιθανότατα λόγω ημερομηνίας της δημοσίευσης αυτό να αφορά το *P. angustifolium*.

1.2.2 Πολλαπλασιασμός στο γένος *Pittosporum*

Σύμφωνα με τον Καββαδά (1956) τα είδη του γένους *Pittosporum* πολλαπλασιάζονται είτε με σπόρο είτε με μοσχεύματα ημιώριμου ξύλου. Η μεταφύτευση των σποροφύτων γίνεται όταν τα φυτάρια αποκτήσουν 2-8 φύλλα, ενώ συχνός είναι ο εμβολιασμός σε σπορόφυτα *P. undulatum* με σκοπό τη διατήρηση της κομπότητας των ειδών. Ο Gunn (2001) βρήκε ότι οι σπόροι *P. angustifolium* βλαστάνουν σε περίπου 17 ημέρες στους 25°C (20 περίπου βιώσιμοι σπόροι ανά γραμμάριο), χωρίς ιδιαίτερη δυσκολία και χωρίς κάποια προεργασία. Σύμφωνα με άλλες πηγές, απαιτείται πλύσιμο με νερό σε θερμοκρασία δωματίου για αφαίρεση της ιξώδους ουσίας που τους περιβάλλει και δυσκολεύει τη βλάστηση. Μετά από φύτευση σε άμμο ή χώμα οι σπόροι θα βλαστήσουν μέσα σε τρεις εβδομάδες (Government of South Australia Northern and Yorke Natural Resources Management Board). Οι σπόροι πολλών ειδών του γένους, όπως τα *P. tenuifolium*, *P. tobira* και *P. narpaulensis* βλαστάνουν με μεγάλη ευκολία ή τα είδη αυτά πολλαπλασιάζονται με μοσχεύματα ημιώριμου ξύλου μετά από εμβάπτιση σε διάλυμα IBA ή εφαρμογή σκόνης ριζοβολίας (Dirr and Heuser, 1987, Hartmann *et al.*, 2002). Η επίδραση του IBA στη ριζοβολία *P. tobira* var. *variegatum* αναφέρθηκε ως μη σημαντική (Conover *et al.*, 1963). Στον πολλαπλασιασμό με σπόρο σε γενικές γραμμές ένας περιορισμός είναι η ιξώδης ουσία που περιβάλλει τους σαρκώδεις σπόρους του γένους.

Το *P. eriocarpon* μπορεί να πολλαπλασιαστεί με σπόρο. Για καλύτερα αποτελέσματα απαιτείται προμεταχείριση πριν τη σπορά και έτσι επιτυγχάνεται βλαστογένεση των σπόρων σε ποσοστό 85%. Μπορεί επίσης να πολλαπλασιαστεί με μοσχεύματα που δέχονται επεμβάσεις με φυτορρυθμιστικές ουσίες, με στρωμάτωση και ιστοκαλλιέργεια (Srivastava *et al.*, 2016). Σύμφωνα με τους Singh

και Goel (1999) το *P. eriocarpum* μπορεί να πολλαπλασιαστεί με στρωμάτωση ή σπορά, αλλά απαιτούνται περιοδικά υγρές και ξηρές συνθήκες σε μέτρια ψυχρή θερμοκρασία. Ο σπόρος περιβάλλεται από παχύρρευστη ουσία (όπως σε άλλα τα είδη *pittosporum*) που καθυστερεί τη βλάστηση των σπόρων. Ο πολλαπλασιασμός με σπόρο για το συγκεκριμένο είδος στη φύση είναι μειωμένος ή αμελητέος. Υπάρχει επείγουσα ανάγκη να παραχθούν περισσότερα φυτά μέσω μικροπολλαπλασιασμού που πλεονεκτεί έναντι των συμβατικών μεθόδων (Rawat *et al.*, 2013). Το *P. eriocarpum* (Pittosporaceae), είναι ένα είδος με φαρμακευτική αξία ενδημικό στη βορειοδυτική πλευρά της οροσειράς των Ιμαλαίων (Uttarakhand) και αναπτύσσεται βραχώδεις πλαγιές μέχρι τα 2.400 μέτρα (Thapliyal, 1994). Θεωρείται απειλούμενο (Walter and Gillet, 1998) λόγω της υπερβολικής συλλογής φυτικού υλικού και συμπεριλαμβάνεται στην Διεθνή Ένωση για τη διατήρηση της φύσης (IUCN), Κόκκινη λίστα ως είδος υπό εξαφάνιση.

Το *P. napaulensis* (DC.) Rehder & Wilson (Pittosporaceae) είναι ένα σπάνιο (Pangtey and Samant, 1988) φαρμακευτικό δέντρο, ενδημικό των Ιμαλαίων (Samant *et al.*, 1998). Το *P. napaulensis* πολλαπλασιάζεται κυρίως με σπόρο. Παρόλο που με πολλές μεταχειρίσεις το ποσοστό βλαστογένεσης αγγίζει το 83% (Airi *et al.*, 1998) οι επιθυμητοί χαρακτήρες δεν μεταδίδονται με τον εγγενή πολλαπλασιασμό. Ως εκ τούτου, ο κλωνικός πολλαπλασιασμός έχει ιδιαίτερη σημασία, ιδίως ενόψει της σπανιότητας του είδους.

Σε μελέτη ριζοβολίας μοσχευμάτων κορυφής βλαστού για το είδος *P. pendandrum* ο αριθμός και η πυκνότητα των ριζών ήταν υψηλότερος στα μοσχεύματα που μεταχειρίστηκαν με 75 ppm NAA, ενώ το μήκος της ρίζας ήταν μεγαλύτερο στην επέμβαση με 50 ppm NAA. Το αποτέλεσμα του εγκλιματισμού μετά από δύο μήνες έδειξε ότι το ύψος των κλώνων αυξήθηκε σημαντικά με την καλλιέργεια τους σε χώμα αντί για μείγμα χώματος και άμμου. Ωστόσο, δεν υπήρξαν σημαντικές επιδράσεις της εφαρμογής λιπασμάτων ούτε αλληλεπιδράσεις της με τα υποστρώματα καλλιέργειας και τα επίπεδα ορμονών σε παραμέτρους ανάπτυξης όπως η πυκνότητα ριζών, το μήκος ρίζας και ο σχηματισμός φύλλων. Ο ερευνητής προτείνει υποβολή των κλώνων σε μεγαλύτερες περιόδους εγκλιματισμού για να επιτραπούν η σταθεροποίηση του εμβολίου και η επίδραση του λιπάσματος στη σύνθεση των ιστών (Oporto, 1998).

1.3. Μικροπολλαπλασιασμός

Ο μικροπολλαπλασιασμός αποτελεί την κυριότερη πρακτική αλλά και εμπορική εφαρμογή της ιστοκαλλιέργειας φυτών αντικαθιστώντας τον συμβατικό τρόπο αγενούς πολλαπλασιασμού με μοσχεύματα. Πρόκειται για μια εξαιρετικά προηγμένη μέθοδο αγενούς πολλαπλασιασμού η οποία πλεονεκτεί συγκριτικά με τις συμβατικές μεθόδους στα εξής σημεία:

- 1) Υφίσταται κλωνική αναπαραγωγή μητρικών φυτών, δηλαδή παράγονται γενετικά πανομοιότυποι απόγονοι φυτών, ιδιαίτερα όταν χρησιμοποιούνται μεριστωματικά έκφυτα.
- 2) Παράγονται άφθονα φυτά ταχύτατα και με ταυτόχρονη εξοικονόμηση χώρου.
- 3) Το πολλαπλασιαστικό υλικό που παράγεται είναι άνοσο.
- 4) Για ορισμένα είδη αποτελεί τον μοναδικό τρόπο διάδοσης.

Ο μικροπολλαπλασιασμός βέβαια έχει υψηλό κόστος λόγω εξοπλισμού αλλά και λειτουργικών εξόδων και απαιτεί υψηλή γνώση, σε συνδυασμό με αποτελεσματική επίβλεψη και έλεγχο όλων των σταδίων παραγωγής. Τέλος το κόστος για την παραγωγή φυτών με *in vitro* καλλιέργεια είναι συχνά σημαντικά υψηλότερο από αυτό των συμβατικών μεθόδων. Βέβαια τα πλεονεκτήματα της μεθόδου υπερτερούν σε πολλές περιπτώσεις των μειονεκτημάτων της και γι αυτό τον λόγο χρησιμοποιείται, για τον πολλαπλασιασμό εμπορικών ανθοκομικών και δενδροκομικών ειδών με στόχο την ταχεία παραγωγή άφθονου και άνοσου κλωνικού πολλαπλασιαστικού υλικού (Πίν. 2) (Μετζάκης, 2005, Παπαφωτίου 2008, Νάνος, 2011, Κίντζιος, 2015). Αξίζει να αναφερθεί η χρήση του μικροπολλαπλασιασμού στον πολλαπλασιασμό οπωροφόρων, όπως η φράουλα (Ben Mahmoud *et al.*, 2017), καθώς και στον πολλαπλασιασμό του κηπευτικού με την υψηλότερη παραγωγή παγκοσμίως, της πατάτας. Εδώ και χρόνια, γίνεται καλλιέργεια ακραίων μεριστωμάτων πατάτας με σκοπό την εξυγείανση του φυτικού υλικού η οποία σε συνδυασμό με θερμοθεραπεία αποτελεί μια ολοκληρωμένη μέθοδο αντιμετώπισης των ιών που προσβάλλουν αυτό το φυτό. Η πατάτα προσβάλλεται από περισσότερους από 20 ιούς εκ των οποίων οι 6 εμφανίζονται σε επίπεδο πανδημίας, (Slack and Tufford, 1995).

Πίνακας 2. Ευρωπαϊκή παραγωγή φυτών κάθε έτος σε εκατομμύρια με ιστοκαλλιέργεια (Νάνος, 2011).

Είδος	Εκατ. Φυτά	Είδος	Εκατ. Φυτά
Ζέρμπερα	18,4	Φρέζια	2,8
Νεφρολέπις	14,5	Ορχιδοειδή	2,2
Είδη <i>Prunus</i>	10,7	Φυλλόδενδρο	2,1
Σπαθίφυλλο	9,8	Εσπεριδοειδή	2,0
Λίλιο	7,1	Αγλαδιά	1,8
Φράουλα	7,0	Μπεγκόνια	1,7
Φίκος	7,0	Κορδουλίνη	1,1
Σενπόλια	6,0	Ακτινίδια	1,1
Αγγινάρα	5,7	<i>Beta vulgaris</i>	1,1
Τριανταφυλλιά	5,7	Είδη <i>Rubus</i>	1,0
Συγγκόνιο	4,8	Κάλμια	1,0
Ανθούριο	4,4	Σημύδα	0,8
Είδη <i>triticum</i>	4,0	Καπνός	0,7
Ροδόδενδρο	3,9	Πλατυκέριο	0,7
Πατάτα	2,8	Λιφενμπάγια	0,7

Στη χώρα μας ο κλάδος της ιστοκαλλιέργειας δεν έχει σημειώσει μεγάλη ανάπτυξη σε βιομηχανικό επίπεδο πιθανότατα λόγω του υψηλού κόστους, αλλά και λόγω έλλειψης εμπειρίας και γνώσης από τους παραγωγούς. Στο Εργαστήριο Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου, Γ.Π.Α. λαμβάνει χώρα εκτεταμένη έρευνα τα τελευταία είκοσι χρόνια τουλάχιστον, κυρίως πάνω στον πολλαπλασιασμό αυτοφυών ειδών (ποωδών και ξυλωδών) της Ελλάδας και της Μεσογείου (Paparotiou *et al.*, 2017, Paparotiou, 2010). Ακόμη έχει γίνει έρευνα πάνω στον μικροπολλαπλασιασμό παχυφύτων όπως το *Euphorbia rugniformis* (Balotis and Paparotiou, 2003) και το *Phytolacca dioica* (Παπαφωτίου και Μανιάτη, 2017). Η έρευνα έχει σκοπό την διατήρηση των αυτοφυών ειδών στην τοπική χλωρίδα, πρακτική ιδιαίτερα σημαντική παγκοσμίως για τη διατήρηση της βιοποικιλότητας των οικοσυστημάτων, ιδίως όταν πρόκειται για σπάνια ή απειλούμενα είδη (Chandra *et al.*, 2010, Rout and Hauser, 2009, Mc Naughton, 1989, Akeroyd and Jackson, 1995, Ren *et al.*, 2012, Wu *et al.*, 2014, Pereira, 2006) και την αξιοποίηση των ειδών (αυτοφυών και μη) ως καλλωπιστικά φυτά στην κηποτεχνία και την αρχιτεκτονική τοπίου, αλλά και τη διευκόλυνση της μελέτης των χημικών δομών και του πολλαπλασιασμού επιθυμητών γονοτύπων των φαρμακευτικών ειδών. Ο εγγενής πολλαπλασιασμός δεν εξασφαλίζει γενετική ομοιομορφία και σταθερότητα και τα ιδιαίτερα χαρακτηριστικά ενός γονότυπου μπορεί να εξαφανιστούν. Η κλωνική

πιστότητα όμως είναι μείζονος σημασίας τόσο για την ανθοκομία όσο και για την απομόνωση φαρμακευτικών ουσιών από αυτούς. Ο μικροπολλαπλασιασμός είναι το κλειδί για την απόκτηση της.

1.3.1 Μικροπολλαπλασιασμός στο γένος *pittosporum*

Η επιστημονική κοινότητα ανατρέχει στη διερεύνηση του μικροπολλαπλασιασμού κυρίως σπάνιων και απειλούμενων ή φαρμακευτικών ειδών *pittosporum* με σκοπό τη διατήρηση των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών των γονοτύπων. Η επιβίωση των απειλούμενων ειδών και η διάσωσή τους μπορεί να εξασφαλιστεί με τον *in vitro* πολλαπλασιασμό, εκεί όπου η διάσωση των απειλούμενων ειδών στο φυσικό τους περιβάλλον είναι ανεπαρκής, καθώς οι κίνδυνοι που απειλούν τα φυτά δεν μπορούν να αποφευχθούν ολοκληρωτικά (Broussalis, 1977). Ακόμη, υπάρχουν αναφορές στον μικροπολλαπλασιασμό κοινών ειδών του γένους όπως το *P. tobira* με σκοπό την παραγωγή διαγονιδιακών φυτών. Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία ο μικροπολλαπλασιασμός του *P. angustifolium* δεν έχει μελετηθεί ξανά, όμως υπάρχουν επιστημονικές δημοσιεύσεις για τα είδη *P. napaulensis* (Dhar *et al.*, 2000), *P. eriocarpum* (Panwar *et al.*, 2016, Thakur *et al.*, 2016), *P. tobira* (Kondo *et al.*, 2002), *P. pentandrum* (Edmiston, 2002, Zamora *et al.*, 1999, Folosco, 1997α, Zamora, 1995) και *P. resiniferum* (Zamora, 1992), μια διδακτορική διατριβή που εξετάζει σε ένα κομμάτι της τον μικροπολλαπλασιασμό του *P. dasycaulon* (Bince, 2015) και δύο εργασίες σε επίπεδο μεταπτυχιακής και πτυχιακής μελέτης για τα *P. confertiflorum* (Spencer, 2010) και *P. undulatum* (Ντόρκος, 2004) αντίστοιχα. Οι έρευνες που έχουν διεξαχθεί αφορούν τόσο τον πολλαπλασιασμό μασχαλιαίων βλαστών αλλά και τον πολλαπλασιασμό τυχαίων βλαστών, μέσω κάλου.

Σε ό, τι αφορά την εγκατάσταση καλλιεργειών και τον πολλαπλασιασμό βλαστών, η υψηλή συγκέντρωση ιόντων του υποστρώματος MS έχει βρεθεί ως η καταλληλότερη για την επαγωγή του πολλαπλασιασμού και την ανάπτυξη βλαστών των ειδών του γένους. Το BA ή το BAP έχουν βρεθεί ως οι καταλληλότερες κυτοκινίνες για εγκατάσταση και πολλαπλασιασμό βλαστών. Παρακάτω περιγράφονται αναλυτικά τα πειράματα που έχουν γίνει πάνω στον μικροπολλαπλασιασμό των ειδών του γένους.

Για το *P. undulatum* διεξάχθηκε πείραμα καλλιέργειας κόμβων και εξετάστηκε η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων του BAP με ή χωρίς διαφορετικές συγκεντρώσεις NAA σε υπόστρωμα MS. Ως καλύτερο θρεπτικό υπόστρωμα εγκατάστασης του είδους προτάθηκε το MS εμπλουτισμένο με $5,0 \text{ mg l}^{-1}$ BAP χωρίς αυξίνη (Εικ. 16), όμως δεν αναπτύχθηκε ολοκληρωμένο πρωτόκολλο μικροπολλαπλασιασμού (Ντόρκος, 2004).

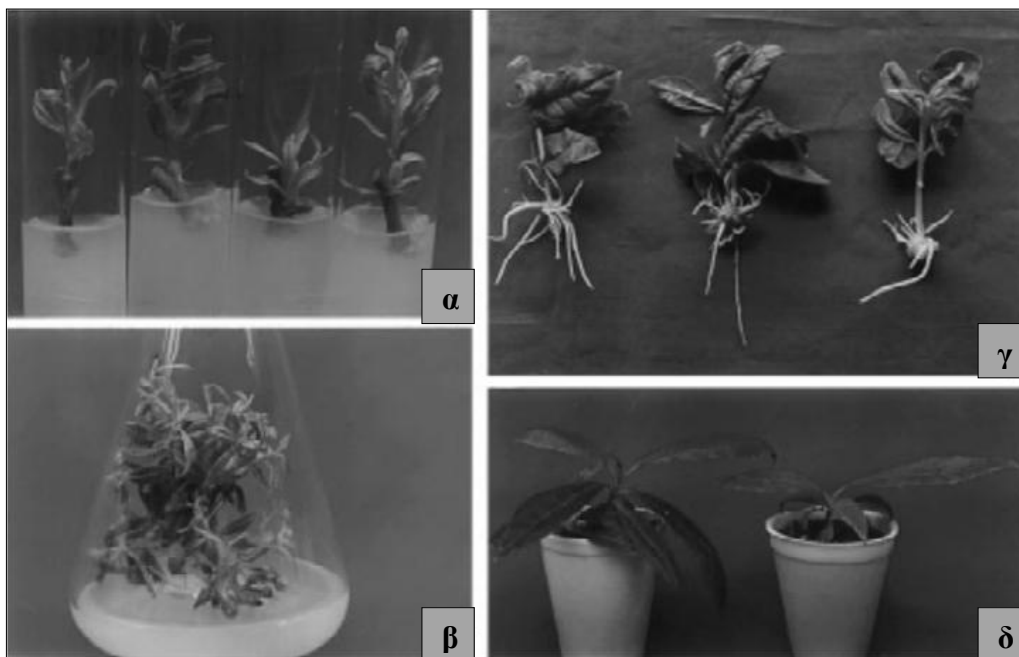


Εικόνα 16. Αρχική εγκατάσταση από έκφυτα κόμβου *P. undulatum* σε θρεπτικό υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με διαφορετικές συγκεντρώσεις BAP με ή χωρίς NAA (Ντόρκος, 2004).

Ο Bruschi *et al.* (1998) αναφέρουν ότι παράχθηκε κάλος από έκφυτα βλαστού τρέχουσας βλάστησης ενήλικων φυτών *P. tobira* που επώαστηκαν σε MS εμπλουτισμένο με 3 mg l^{-1} NAA και 3 mg l^{-1} BA, ωστόσο δεν παράχθηκε ούτε σε αυτή την περίπτωση ολοκληρωμένο πρωτόκολλο μικροπολλαπλασιασμού.

Επιτυχημένη ήταν η αναγέννηση φυτών *P. napaulensis* από έκφυτα ενός κόμβου μήκους 2 – 2,5 cm, ενήλικου φυτού που συλλέχθηκαν το μήνα Οκτώβριο. Το υψηλότερο ποσοστό αντίδρασης κατά την αρχική εγκατάσταση (83,1 %) (μέτρηση 30 ημέρες μετά), καθώς και ο μεγαλύτερος αριθμός πλάγιων βλαστών (21 βλαστοί/ έκφυτο) και το μεγαλύτερο μήκος (5,5 cm) μετά από επώαση των παραγόμενων βλαστών με μήκος μεγαλύτερο από 2 cm για 4 εβδομάδες επιτεύχθηκε σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ BA σε συνδιασμό με $0,02 \text{ mg l}^{-1}$ NAA. Από τις τρεις κυτοκινίνες που δοκιμάστηκαν (BA, kinetin και thidiazuron), το BA όπως συμβαίνει και σε πολλά άλλα δένδρώδη είδη (Siril and Dhar, 1997), αποδείχτηκε το αποτελεσματικότερο για την επαγωγή βλαστών, τον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη, ενώ η προσθήκη κυτοκινίνης ήταν απαραίτητη για την παραγωγή βλαστών, καθώς στο μάρτυρα η αντίδραση ήταν μηδενική. Το BA αλλά και το NAA εμφάνισαν ξεχωριστά το καθένα στατιστικώς σημαντική επίδραση

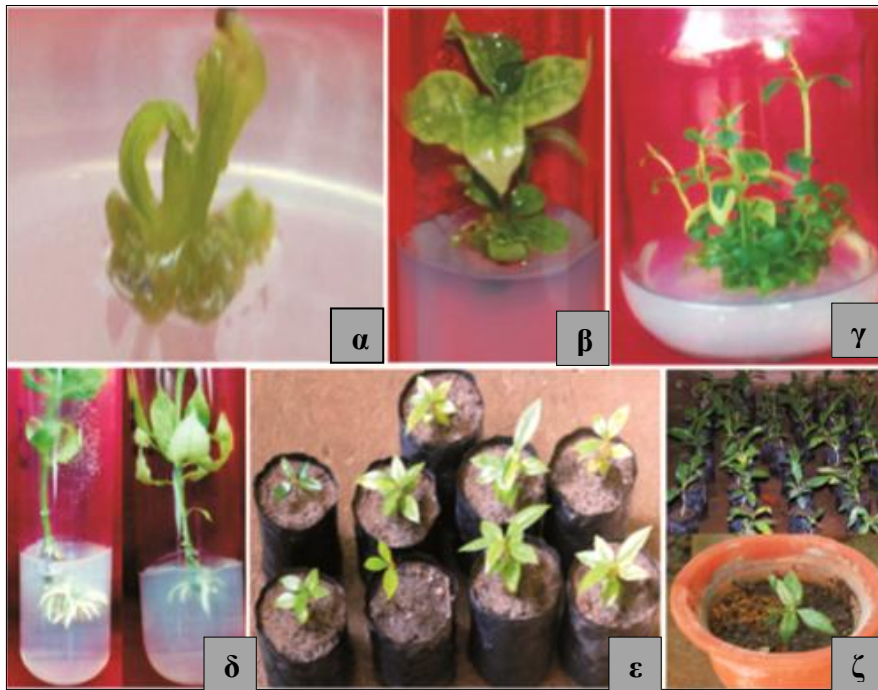
στην εγκατάσταση του είδους, στον πολλαπλασιασμό των βλαστών και στο μήκος αυτών. Τα χαμηλά επίπεδα αυξίνης σε συνδυασμό με κυτοκινίνη διεγείρουν τον αριθμό και την επιμήκυνση των βλαστών σε διάφορα είδη δένδρων (Chalupa, 1987). Η υψηλότερη συγκέντρωση BA ($2,0 \text{ mg l}^{-1}$), ανεξαρτήτως της συγκέντρωσης NAA μείωσε τον αριθμό και το μήκος των βλαστών. Το MS αποδείχθηκε το καλύτερο για επαγωγή βλαστογένεσης, αλλά και για την ανάπτυξη των βλαστών όπως έχει αποδείχθει και για άλλα δικοτυλήδονα αγγειόσπερμα δέντρα (Dunstan and Thorpe, 1986). Οι παραγόμενοι βλαστοί ριζοβόλησαν μετά από εμφύπτιση για 48 ώρες σε υγρό διάλυμα μισής δύναμης MS το οποίο περιείχε $4,0 \text{ mg l}^{-1}$ IBA, ενώ στη συνέχεια επώαστηκαν σε υπόστρωμα MS/2 χωρίς αυξίνη για 15 ημέρες οπότε και παρατηρήθηκαν 10,4 ρίζες/βλαστό μήκους 26,4 mm οι οποίες έβγαιναν απευθείας από τη βάση των βλαστών. Στην υψηλότερη συγκεντρώση IBA των $8,0 \text{ mg l}^{-1}$ παρατηρήθηκε και κάλος στη βάση των βλαστών. Οι ριζοβολημένοι βλαστοί προωθήθηκαν για εγκλιματισμό αφού παρέμειναν στο υπόστρωμα MS/2 για 4 εβδομάδες. Οι ριζοβολημένοι βλαστοί εγκλιματίστηκαν σε ποσοστό 70% σε υπόστρωμα soilrite + sand + soil (1:1:1), ενώ μέρα παρα μέρα ποτίζονταν με υδατικό διάλυμα MS/4 (Dhar *et al.*, 2000).



Εικόνα 17 (α-δ). Στάδια μικροπολλαπλασιασμού του *P. paraulensis* από έκφυτα κόμβου. (α) Βλαστογένεση μετά από δύο εβδομάδες σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ BA + $0,02 \text{ mg l}^{-1}$ NAA. (β) Πολλαπλασιασμός βλαστών μετά από τέσσερις εβδομάδες επώασης σε MS $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ BA + $0,02 \text{ mg l}^{-1}$ NAA. (γ) Ριζοβολημένοι μικροβλαστοί έπειτα από επώαση σε θρεπτικό υπόστρωμα 1/2 MS εμπλουτισμένο με $4,0 \text{ mg l}^{-1}$ IBA, (δ) Φυτά που παράχθηκαν με τη μέθοδο του μικροπολλαπλασιασμού, μετά από τη μεταφύτευσή τους σε υπόστρωμα soilrite + sand + soil (1:1:1) (Dhar *et al.*, 2000).

Η μελέτη των Dhar *et al.* 2000 ήταν η πρώτη ολοκληρωμένη έρευνα πάνω στον μικροπολλαπλασιασμό είδους του γένους *Pittosporum* και αποτέλεσε τη βάση για την πλειοψηφία των μελέτων πολλαπλασιασμού μασχαλαιών βλαστών που την διαδέχθηκαν (Panwar *et al.*, 2016, Thakur *et al.*, 2016, Bince, 2015, Spencer, 2010) κυρίως σε ό,τι αφορά το στάδιο αρχικής εγκατάστασης και πολλαπλασιασμού.

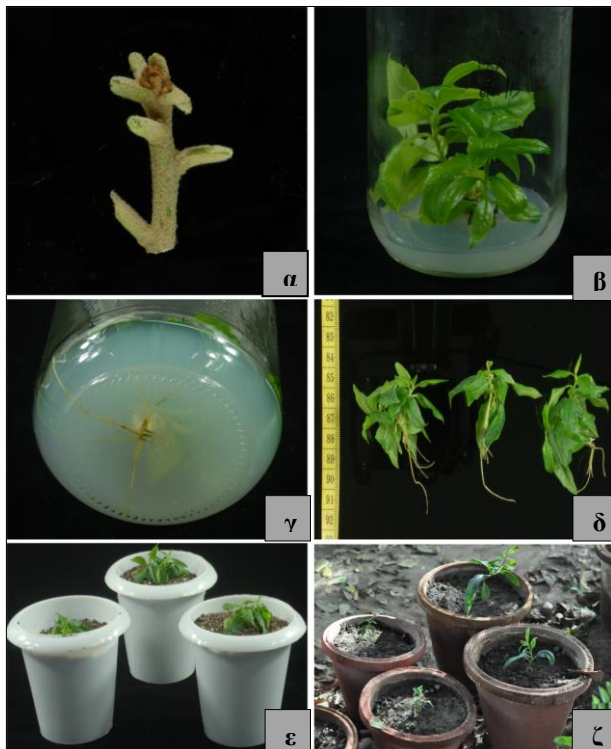
Δεδομένου ότι ο πολλαπλασιασμός με σπόρο για το *P. eriocarpum* παρουσιάζει προβλήματα έχουν αναπτυχθεί δύο πρωτόκολλα μικροπολλαπλασιασμού χρησιμοποιώντας έκφυτα κόμβου και βλαστικής κορυφής. Οι Panwar *et al.* (2016) ανέπτυξαν πρωτόκολλο μικροπολλαπλασιασμού για το *P. eriocarpum* χρησιμοποιώντας έκφυτα βλαστικής κορυφής από νεαρή βλάστηση του είδους (εποχή Μάρτιος). Μεταξύ των διαφορετικών κυτοκινινών που δοκιμάστηκαν (BAP και kinetin) αλλά και του TDZ (ουσία με μη διασαφηνισμένη δράση ακριβώς αλλά ομοιάζει με κυτοκινίνη), το BAP αποδείχθηκε η καλύτερη ουσία για εγκατάσταση της καλλιέργειας *in vitro* αλλά και για πολλαπλασιασμό. Το υψηλότερο ποσοστό βλαστογένεσης κατά τις υποκαλλιέργειες ήταν 94% σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με BAP ($1,0 \text{ mg l}^{-1}$) και NAA ($0,3 \text{ mg l}^{-1}$) με 24.6 βλαστούς/έκφυτο, μήκους 5.8 cm (Εικ. 18γ). Υπόστρωμα MS υποτετραπλασιασμένης δύναμης εμπλουτισμένο με τη φυτορρυθμιστική ουσία IBA ($1,5 \text{ mg l}^{-1}$) έδωσε το υψηλότερο ποσοστό ριζοβολίας βλαστών μήκους $>5,0 \text{ cm}$ (96%) με 17 ρίζες μήκους 3.6 cm (Εικ. 18 δ). Ο υποτετραπλασιασμός της δύναμης του MS αποδείχθηκε ευεργετικός για τη ριζοβολία των μικροβλαστών συγκριτικά με τον υποδιπλασιασμό ή το ολόκληρης δύναμης υπόστρωμα. Ειδικά στο τελευταίο κανένας μικροβλαστός δεν ριζοβόλησε. Τα φυτάρια που ριζοβόλησαν προωθήθηκαν για εγκλιματισμό μετά από 3 εβδομάδες παραμονής στο υπόστρωμα ριζοβολίας ενώ αρδεύονταν κάθε δεύτερη μέρα με υποτετραπλασιασμένης δύναμης τροποποιημένο διάλυμα Hoagland's. Το ποσοστό εγκλιματισμού των φυταρίων σε υπόστρωμα βερμικουλίτη: χόμα (1:1w/v) ήταν 84% (Εικ. 18 ε,ζ), (Panwar *et al.*, 2016).



Εικόνα 18. Στάδια μικροπολλαπλασιασμού του *P. eriocarpum* (α-ζ). (α) Εγκατάσταση από έκφυτα κορυφής (β) Επαγωγή βλαστών. (γ) Πολλαπλασιασμός βλαστών. (δ) Ριζογένεση (ε, ζ) Εγκλιματισμός (Panwar *et al.*, 2016).

Οι Thakur *et al.* (2016) ανέπτυξαν πρωτόκολλο μικροπολλαπλασιασμού για το *P. eriocarpum* χρησιμοποιώντας έκφυτα κόμβου, παρατήρησαν υψηλή αναγέννηση βλαστών (95%) σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με BAP 0,4 mg l⁻¹ σε συνδυασμό με IBA 0,6 mg l⁻¹. Το BAP σε συνδυασμό με το IBA έδωσε υψηλότερα ποσοστά βλαστογένεσης απ'ότι το BAP μόνο του. Σε ό,τι αφορά το μήκος των παραγόμενων βλαστών το BAP είχε μεγαλύτερη επίδραση ακοκλούθησε η αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων και τελευταίο το IBA. Μετά από τρεις υποκαλλιέργειες οι ερευνητές εμβάπτισαν τους παραγόμενους από την υποκαλλιέργεια βλαστούς σε διάλυμα IBA για 1 ώρα και μετά τοποθετήσαν τους βλαστούς σε υποστρώματα καλλιέργειας. Μετά από αυτή την επέμβαση παρατηρήθηκε αλλαγή στον αριθμό των παραγόμενων βλαστών και στον αριθμό των κόμβων. Μετά από 5 μήνες επώασης παρατηρήθηκαν 14,4 βλαστοί /έκφυτο στο υπόστρωμα με BAP 0.4 mg l⁻¹ σε συνδυασμό με IBA 0.6 mg l⁻¹. Παρατηρήθηκε σημαντική αύξηση στον πολλαπλασιασμό των βλαστών μετά την υποκαλλιέργεια του μητρικού φυτού. Αυτό θεωρήθηκε ότι μπορεί να οφείλεται στην καταστολή της κυριαρχίας της κορυφής λόγω επαναλαμβανόμενων υποκαλλιεργειών που με τη σειρά τους προκαλούν βασικά μεριστωματικά κύτταρα να παράγουν νέους βλαστούς (Tripathi and Kumari, 2010). Η επέμβαση με χαμηλό επίπεδο αυξίνης σε συνδυασμό με κυτοκίνη στο μέσο καλλιέργειας είναι γνωστό ότι διεγείρει τον αριθμό και την

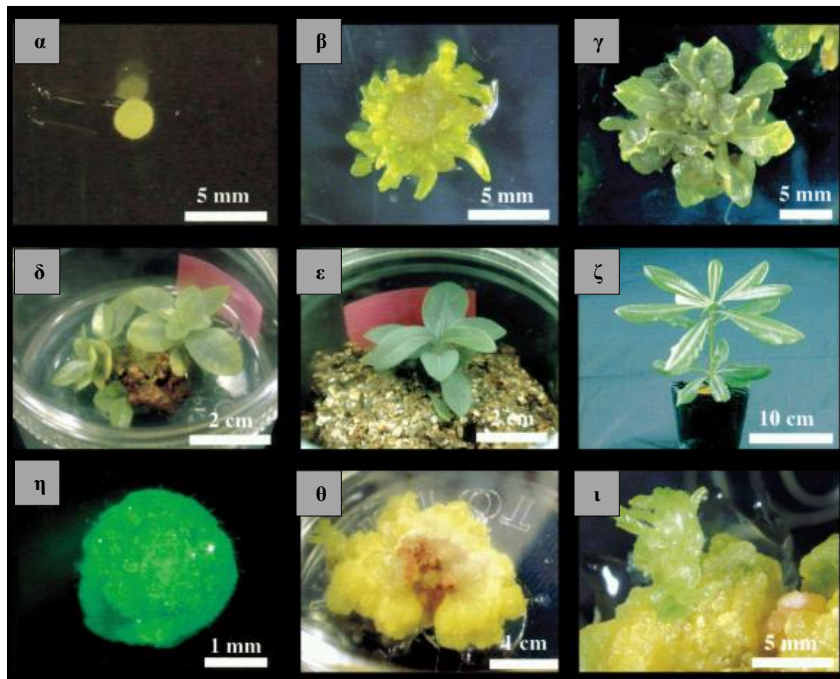
επιμήκυνση των βλαστών σε πολλά είδη δένδρων (Chalupa, 1987). Οι αναγεννημένοι βλαστοί *P. eriocarpum* παρέμειναν βιώσιμοι για περισσότερο από οκτώ μήνες όταν αφέθηκαν στο αρχικό μέσο καλλιέργειας. *In vitro* αναγεννημένοι βλαστοί ριζοβόλησαν σε υπόστρωμα εμπλουτισμένο με αυξίνες τριών ειδών (IBA, IAA, NAA) από τις οποίες το IBA αποδείχθηκε η καλύτερη αυξίνη για τη ριζοβολία βλαστών του είδους. Το IBA σε συγκέντρωση 0.6 mg l^{-1} έδωσε το υψηλότερο ποσοστό ριζοβολίας (90%) με τον μεγαλύτερο αριθμό ριζών (13) ανά βλαστό και το μεγαλύτερο μήκος ριζών (3,6 cm), χωρίς τη μεσολάβηση κάλου. Το ποσοστό ριζοβολίας μειωνόταν όσο αύξανε η συγκέντρωση του IBA. Για εγκλιματισμό προωθήθηκαν όλα τα φυτάρια που είχαν τουλάχιστον 2-3 ρίζες σε υπόστρωμα αμμός: χώμα 1:1. Τα φυτά καλύφθηκαν με ένα καπάκι από πολυαιθυλένιο για ένα μήνα και έγιναν μικρές σχισμές στις άκρες για να διατηρηθεί υψηλή σχετική υγρασία ενώ αρδεύονταν κάθε δεύτερη μέρα με υδατικό διάλυμα MS/2 ενώ επωάζονταν σε δωμάτιο καλλιέργειας. Μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια τουλάχιστον 5 cm, μετά από ορισμένο χρόνο εγκλιματισμού μεταφέρθηκαν σε χώμα στο θάλαμο καλλιέργειας. Σταδιακά φυτά μεταφέρθηκαν σε συνθήκες θερμοκηπίου για να εγκλιματιστούν για 10 ημέρες ακόμη και έγινε σταδιακή χαλάρωση των καπακιών πολυαιθυλενίου και τέλος αφαιρέθηκαν τα καπάκια μετά από 15 ημέρες. Μετά από 3 μήνες έκθεσης σε συνθήκες θερμοκηπίου, τα φυτά μεταφέρθηκαν στο φυτώριο. Σχεδόν το 73% των φυταρίων επιβίωσαν και συνέχισαν να αναπτύσσονται.



Εικόνα 19. *P. eriocarpum*. (Α) Έκφυτα κόμβου (Β) Επαγωγή βλαστών σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με BA (αρχική εγκατάσταση). (Γ) Επαγωγή ριζών σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με IBA (mg l^{-1}). (Δ) Φυτάρια που παράχθηκαν *in vitro* (Ε) *In vitro* grown plantlets in soil rite. (F) *In vitro* πολλαπλασιασμένα φυτάρια σε συνθήκες φυσικού περιβάλλοντος (Thakur *et al.*, 2016).

Σε πολλά άλλα είδη, έχει αναφερθεί υψηλό ποσοστό θνησιμότητας για φυτά που έχουν αναπτυχθεί *in vitro* όταν μεταφέρονται σε φυσιολογικές συνθήκες (Mathur *et al.*, 2008, Chandra *et al.*, 2010). Στην μελέτη αυτή, δεν βρέθηκε φαινοτυπική διακύμανση μεταξύ των φυτών που παράχθηκαν *in vitro*.

Το *P. tobira* κατατάχθηκε μεταξύ 217 ειδών στην 137η θέση όσον αφορά την ικανότητά του να αφομοιώνει το διοξείδιο του αζώτου (NO_2). Ακόμη έχει αποδειχθεί ότι τα διαγονιδιακά φυτά που υπερεκφράζουν το cDNA του γονιδίου της νιτρώδους ρεδουκτάσης έχουν αυξημένη ικανότητα αφομοίωσης NO_2 . Οι Kondo *et al.* (2002) στη μελέτη τους προσδιόρισαν αρχικά τις βέλτιστες συνθήκες για την αναγέννηση πολλαπλών βλαστών από έκφυτα υποκοτηλίου *in vitro* ανεπτυγμένων σποροφύτων του είδους *P. tobira*. Έπειτα παρήγαγαν διαγονιδιακά φυτά αυτού του είδους μέσω εμβολιασμού των εκφύτων υποκοτηλίου με το cDNA της νιτρώδους ρεδουκτάσης. Ως θρεπτικό υπόστρωμα επώασης χρησιμοποιήθηκε το WPM εμπλουτισμένο με διαφορετικές συγκεντρώσεις TDZ και NAA. Το υψηλότερο ποσοστό βλαστογένεσης ήταν 75% και σημειώθηκε μετά από έξι εβδομάδες επώασης από τα έκφυτα υποκοτηλίου που επωάζονταν σε WPM με 10 μM TDZ και 3.2 μM NAA. Οι βλαστοί μεταφέρθηκαν αρχικά σε υπόστρωμα WPM εμπλουτισμένο με 2,0 mg l^{-1} TDZ και 0,6 mg l^{-1} NAA για επιμήκυνση καθώς αυτός ο συνδυασμός απεδείχθη ότι προωθεί περισσότερο την επιμήκυνση των μικροβλαστών. Έπειτα οι βλαστοί προωθήθηκαν για ριζοβολία *ex vitro*. Τα φυτάρια εγκλιματίστηκαν και ολόκληρα φυτά δημιουργήθηκαν δέκα μήνες μετά την έναρξη της καλλιέργειας (Εικ. 20ζ). Σε ό, τι αφορά τη δημιουργία διαγονιδιακών φυτών, πλασμίδιο που έφερε το γονίδιο της νιτρώδους ρεδουκτάσης από το φυτό μοντέλο *Arabidopsis thaliana* υπό τον έλεγχο του υποκινητή 35S του ιού του μωσαϊκού του κουνουπιδιού και του τερματιστή συνθάσης της νοπαλίνης εμβολιάστηκε μαζί με γονίδιο αντοχής στην υδρομυκίνη σε έκφυτα υποκοτηλίου του *P. tobira*. Παράχθηκαν κάλοι ανθεκτικοί στην υδρομυκίνη απ' τους οποίους αναγεννήθηκαν βλαστοί. Η ενσωμάτωση του γονιδίου της νιτρώδους ρεδουκτάσης στο γονιδίωμα του *P. tobira* ανιχνεύτηκε με τη βοήθεια της αλυσιδωτής αντίδρασης πολυμεράσης (PCR) και επιβαιβεώθηκε ότι αυτοί οι βλαστοί ήταν διαγονιδιακοί.



Εικόνα 20. Αναγέννηση και μεταφόρφωση *P. tobira* (α-ι). (α) Έκφυτα υποκοτυλίου μετά από μια εβδομάδα σε υπόστρωμα WPM με $2,0 \text{ mg l}^{-1}$ TDZ και $0,6 \text{ mg l}^{-1}$ NAA. (β) Μικροβλαστοί που σχηματίστηκαν από τα έκφυτα υποκοτυλίου μετά από 4 εβδομάδες επώασης στο ίδιο υπόστρωμα. (γ) Μικροβλαστοί από έκφυτα υποκοτυλίου μετά από 10 εβδομάδες επώασης στο ίδιο υπόστρωμα. (δ) Επιμηκυσμένοι μικροβλαστοί μετά από 12 εβδομάδες στο υπόστρωμα επιμήκυνσης. (ε) Φυτό που προήλθε από βλαστό που εμβαιπίστηκε αρχικά σε διάλυμα IBA $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ και έπειτα μεταφέρθηκε σε υπόστρωμα Florialite εμπλουτισμένο με WPM και καλλιεργήθηκε υπό ασηπτικές συνθήκες για ένα μήνα. (ζ) Αναγεννημένο φυτό μετά από μεταφύτευση σε υπόστρωμα βερμικουλίτη: περλίτη 1:1(v/v) και καλλιέργεια σε δωμάτιο ανάπτυξης στους 22 σε φυσικό φως και υγρασία 70%. (η) Ένα τυπικό έκφυτο υποκοτυλίου σε φθορίζων μικροσκόπιο όπου φαίνονται περίπου δέκα κύτταρα λευκά χρωματισμένα, φορείς του γόνου ανθεκτικότητας στην υδρομυκίνη. (θ) Κάλος που έδωσε τους διαγονιδιακούς βλαστούς. (ι) Διαγονιδιακοί βλαστοί αναγεννώνται από τον κάλο (Kondo *et al.*, 2002).

Ο Bince (2015) μελέτησε σε κομμάτι της διδακτορικής του διατριβής τον μικροπολλαπλασιασμό του είδους *P. dasycaulon* ενός είδους ενδημικού στα δυτικά Γκατ (οροσειρά στην Ινδία), με σκοπό τη διατήρησή του. Μητρικό φυτό αποτέλεσε δέντρο 25 χρόνων από το οποίο ελήφθησαν έκφυτα κόμβου μήκους 2-3 cm. Για την αρχική εγκατάσταση χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα MS ή WPM εμπλουτισμένο με BA ή Kin και NAA. Το υπόστρωμα MS υπερίσχησε του WPM και το BA της Kin στην αναγέννηση βλαστών όπως και στη μελέτη των Dhar *et al.* (2000) για το *P. paraulensis*. Βλαστογένεση επιτεύχθηκε σε όλους τους συνδυασμούς φυτορρυθμιστικών ουσιών η οποία κυμαινόταν από 4% έως 58% ενώ στο μάρτυρα δεν παρατηρήθηκε βλαστογένεση. Ο αριθμός των βλαστών κυμάνθηκε μεταξύ 1,0 κ 1,3 και το μήκος μεταξύ 1,4-2,6cm με το μέγιστο αριθμό βλαστών καθώς και το μέγιστο μήκος 2.6 cm να παρατηρείται στο υπόστρωμα με $2,0 \text{ mg l}^{-1}$ BA με $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ NAA. Η καταγραφή των αποτελεσμάτων για τον αριθμό βλαστών έγινε 60 μέρες

μετά την εγκατάσταση όμως του μήκους 70 ημέρες μετά. Σημειώνεται ότι σε πίνακα μέσα στη διατριβή φαίνεται ότι ο αριθμός βλαστών είναι μεν ο μέγιστος σε αυτή την επέμβαση, όμως κυμαίνεται από 1,2 έως 3,6. Βέβαια από τη φωτογραφία που παρατίθεται εξαγεται το συμπέρασμα ότι πιθανότατα έγινε αναγωγή σε έναν κόμβο χωρίς όμως αυτό να αναφέρεται κάπου. Μικροβλαστοί 2.0–2.5 cm προωθήθηκαν για ριζοβολία σε υποστρώματα μισής δυναμής MS εμπλουτισμένο με διαφορετικές συγκεντρώσεις IBA ή NAA. Στον μάρτυρα οι μικροβλαστοί δεν ριζοβόλησαν. Το IBA έδωσε υψηλότερα ποσοστά ριζοβολίας που κυμάνθηκαν από 27-92% με τη βέλτιστη τιμή για τις συγκεντρώσεις 8,0 mg l⁻¹ και 10 mg l⁻¹ με μέγιστο αριθμό ριζών για τις ίδιες συγκεντρώσεις IBA 16 ρίζες/βλαστό. Το μήκος των ριζών κυμάνθηκε από 2,9-3,5 με το μήκος ριζών που αντιστοιχεί στη συγκέντρωση 2,0 mg l⁻¹ να εμφανίζει τη χαμηλότερη τιμή (2,9), διαφέροντας στατιστικώς σημαντικά απ'όλες τις άλλες τιμές. Οι μετρήσεις ριζοβολίας έγιναν την 40^η μέρα επώασης ενώ οι βλαστοί ξεκίνησαν να ριζοβολούν την 25η. Το υπόστρωμα ½ MS εμπλουτισμένο με 8,0 mg l⁻¹ IBA πρότάθηκε ως το καταλληλότερο για επαγωγή ριζών. Φυτάρια που παρέμειναν στο υπόστρωμα ριζοβολίας για 8 εβδομάδες προωθήθηκαν για εγκλιματισμό και ποτίζονταν κάθε 2^η μέρα με υδατικό διάλυμα MS/4. Τα φυτάρια εγκλιματίστηκαν σε ποσοστό 80%. Τα φυτάρια δεν παρουσίασαν φαινοτυπικές διαφορές μεταξύ τους.



Εικόνα 21. Στάδια πολλαπλασιασμού *P. dasycaulon* από έκφυτα κόμβου. (α) Έκφυτα κόμβου σε θρεπτικό υπόστρωμα. (β, γ) Βλαστούγένεση από έκφυτα κόμβου (δ) Βλαστοί σε υπόστρωμα ριζοβολίας. (ε) Ριζογένεση σε υπόστρωμα ριζοβολίας MS/2 + 8,0 mg l⁻¹ IBA. Μετά από 40 μέρες καλλιέργειας. (ζ) Εγκλιματισμένο φυτάριο 56 ημερών (Bince, 2015).

Το είδος *P. confertiflorum* είναι είδος ενδημικό στη Χαβάη. Είναι αιθαλής θάμνος ή μικρό δέντρο αργής ανάπτυξης, με πυκνό ανοιχτού πράσινου χρώματος φύλλωμα και μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην αρχιτεκτονική τοπίου. Ωστόσο, η χρήση του είναι περιορισμένη λόγω της αργής ανάπτυξης του καθιστώντας τον μικροπολλαπλασιασμό κατάλληλο για την κλωνική αναπαραγωγή του. Οι νεαροί βλαστοί του *P. confertiflorum* φέρουν τρίχες με αποτέλεσμα οι μολύνσεις να αποτελούν βασικό πρόβλημα για την εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας του είδους σε συνδυασμό όμως με το καφέτιασμα των βλαστών λόγω εξίδρωσης φαινολικών. Ο Spencer (2010) πραγματοποίησε πειράματα με σκοπό τη δημιουργία επιτυχημένου πρωτοκόλλου αρχικής εγκατάστασης του είδους *in vitro*. Έλαβαν χώρα διάφορα πειράματα για την αντιμετώπιση των ανωτέρω προβλημάτων. Για την αντιμετώπιση της οξειδωσης χρησιμοποιήθηκε ως αντιξειδωτικό μέσο το ασκορβικό οξύ σε συνδυασμό με κιτρικό οξύ ως μέσο οξίνισης. Αρχικά έγινε εμβάπτιση σε διάλυμα ασκορβικού οξέος συγκέντρωσης $0,15 \text{ g l}^{-1}$ σε συνδυασμό με κιτρικό οξύ (μέσο οξίνισης) σε συγκέντρωση $0,10 \text{ g l}^{-1}$ και ακολούθησε ξέπλυμα. Σε επόμενα πειράματα το διάλυμα προστέθηκε είτε στο διάλυμα απολύμανσης είτε μέσα στο υπόστρωμα ανάπτυξης, πρακτικές που μείωσαν το καφέτιασμα. Σε ό,τι αφορά την αντιμετώπιση των μολύνσεων οι καλύτερες πρακτικές για την προετοιμασία των μητρικών φυτών περιλάμβαναν εγκατάσταση φυτών στο θερμοκήπιο, κλάδεμα και μεταχείριση των πληγών με 0,1- 0,3 mL 0,4% BA και ψεκασμό των οφθαλμών με 70% διάλυμα αλκοόλης την προηγούμενη μέρα από τη λήψη των εκφύτων. Τα έκφυτα αυτά απολυμάνθηκαν σε δύο στάδια με χρήση δύο διαφορετικών συγκεντρώσεων απολυμαντικού διαλύματος (10% και 5%) για διαφορετικά χρονικά διαστήματα. Τέλος όταν χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα κορυφής βλαστού αντί για έκφυτα κόμβου οι μολύνσεις μειώθηκαν στο 6% και η νέκρωση στο 25%. Συμπερασματικά, οι μέθοδοι απολύμανσης καθώς και η προμεταχείριση των μητρικών φυτών μείωσε τις μολύνσεις και τη νέκρωση των εκφύτων και επιτεύχθηκε η εγκατάσταση του είδους *in vitro* καθώς και η μείωση του καφετιάσματος. Ακόμη οι παραγόμενοι βλαστοί μπορούσαν να διατηρηθούν *in vitro* το λιγότερο για 6 εβδομάδες μέχρι να ξεραθούν (Spencer, 2010).

Το είδος *Pittosporum pentandrum* (Pittosporaceae) είναι ένα φαρμακευτικό απειλούμενο φυτό. Θεωρείται απειλούμενο είδος λόγω της αποψίλωσης των δασών στα οποία φύεται, και λόγω του ότι σχηματίζει δύσκολα καρπό. Ακόμη ο

πολλαπλασιασμός με μοσχεύματα είναι αργός και συμβαίνει δύσκολα για το συγκεκριμένο είδος. Σε έρευνα δημοσιευμένη από το FAO παρουσιάζεται το πρώτο επιτυχημένο πρωτόκολο μικροπολλαπλασιασμού του είδους, από έκφυτα κόμβου ενήλικου φυτού. Έγινε μελέτη της επίδρασης των αυξινών NAA και 2,4D σε συνδυασμό ή όχι, σε υπόστρωμα MS με 8,0 mg l⁻¹ BA. Στις υψηλές συγκεντρώσεις των αυξινών ξεχωριστά ή στον συνδυασμό τους τα έκφυτα έδωσαν πλούσιο κάλο και ρίζες που προκλήθηκαν απ'τον κάλο, ενώ αυτό συνέβη πιο έντονα 100-140 μέρες μετά την εγκατάσταση. Η βλαστογένεση άγγιξε το 55-66% και ξεκίνησε πέντε ημέρες μετά την εγκατάσταση σε MS με BA με ή χωρίς NAA και 2,4D σε χαμηλή συγκέντρωση 0,1 mg l⁻¹ και 0,15 mg l⁻¹ αντίστοιχα. Ο μέγιστος αριθμός βλαστών ανά κόμβο ήταν 1,4-2 σε αυτές τις επεμβάσεις. Βλαστοί 61-80 ημερών ριζοβόλησαν 100% σε υπόστρωμα Gresshoff and Doy's εμπλουτισμένο με 10 mg l⁻¹ IAA μετά από 20 ημέρες και ανταποκρίθηκαν καλύτερα στη ριζοβολία από βλαστούς 40- 60 ημερών (Edmiston, 2002).

Σε άλλη έρευνα για το ίδιο είδος, το υπόστρωμα MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες χρησιμοποιήθηκε επίσης, ως μάρτυρας. Οι επεμβάσεις με ρυθμιστές ανάπτυξης 9 mg l⁻¹ BA με διαφορετικές συγκεντρώσεις NAA και 2,4-D μεμονωμένα ή σε συνδυασμό σε χαμηλές (0,3 mg l⁻¹), μεσαίες (1,3 mg l⁻¹) και υψηλές (2,5 mg l⁻¹) συγκεντρώσεις, αντίστοιχα και οι ημέρες παρατήρησης μετά την εγκατάσταση (5, 15, 25, 40, 55, 70, 85, 100, 120 και 140) επηρέασαν τη βιωσιμότητα των εκφύτων, τον σχηματισμό κάλων, τον σχηματισμό ριζών που σχηματίστηκαν μέσω κάλου και τη βλαστογένεση σε έκφυτα κόμβων. Ο μάρτυρας προκάλεσε πρόιμη νέκρωση σε έκφυτα φύλλου και στελέχους, ενώ τα πρώτα ήταν πιο ευαίσθητα από τα δεύτερα. Ο σχηματισμός ριζών με τη μεσολάβηση κάλου και ο σχηματισμός του κάλου σε έκφυτα φύλλου έγινε σε MS εμπλουτισμένο με 9 mg l⁻¹ BA με NAA ή 2,4-D μόνο στην υψηλή συγκέντρωση, όμως ο συνδυασμός των δύο αυξινών ήταν ανασταλτικός. Παρόμοιες μορφογενετικές αποκρίσεις σε έκφυτα στελεχών ευνοήθηκαν από υψηλά επίπεδα 2,4-D μόνο ή όταν συνδυάστηκαν με υψηλά επίπεδα NAA. Ο σχηματισμός κάλου και ριζών με τη μεσολάβηση του κάλου συνέβη καλύτερα μεταξύ 100-140 ημερών μετά την εγκατάσταση. Ο σχηματισμός μασχαλιαίων βλαστών ήταν 42-69 % σε MS με 9 mg l⁻¹ BA με NAA και 2,4-D ξεχωριστά ή σε συνδυασμό στις χαμηλές συγκεντρώσεις. Οι βλαστοί άρχιζαν να

εμφανίζονται 5 ημέρες μετά την εγκατάσταση. Ένας μέσος όρος επτά βλαστών ανά εκφύτο ενός παρήχθη μέχρι την τέταρτη υποκαλλιέργεια (Folosco, 1997a).

Σε άλλη έρευνα για το *P. pentandrum* δοκιμάστηκαν αρκετά εκφύτα (φύλλων, κορυφών στελέχους και στελέχους) αλλά τα πολύ νεαρά φύλλα (midrib and blade) 5 έως 6 mm που καλλιεργήθηκαν σε αναθεωρημένο μέσο Murashige και Skoog Medium συμπληρωμένο με BA 10 ή 15 mg l⁻¹ σε συνδυασμό με 0,25 mg l⁻¹ NAA και 0,20 mg l⁻¹ 2,4-D ήταν τα πιο αποτελεσματικά, δίνοντας αρχικά κάλους και έπειτα βλαστούς (Zamora, 1995). Το ίδιο έχει δημοσιευθεί ξανά από τον ίδιο ερευνητή για το ίδιο είδος, όπου αναφέρει πως οι κάλοι παρατηρήθηκαν 21 ημέρες μετά την εγκατάσταση και όταν αυτοί υποκαλλιεργήθηκαν έδωσαν βλαστούς. Σ' αυτή τη δημοσίευση αναφέρει ότι η αυτή η μορφογενετική απόκριση του εκφύτου νεαρού φύλλου ήταν παρόμοια και για άλλα είδη του γένους χωρίς όμως να τα κατονομάζει. Βέβαια τονίζει ότι *P. pendandrum* έδωσε πιο υψηλά ποσοστά βλαστογένεσης μετά την υποκαλλιέργεια των κάλων (Zamora *et al.*, 1999).

1.3.2 Υγρή καλλιέργεια

Το μεγάλο κόστος είναι ένα σοβαρό μειονέκτημα του μικροπολλαπλασιασμού και περιορίζει τη χρήση του σε βιομηχανικό επίπεδο, συνεπώς η μείωση του κόστους παραγωγής αποτελεί εδώ και χρόνια μεγάλη πρόκληση. Μια απ' τις στρατηγικές που έχουν αναπτυχθεί τα τελευταία σαράντα έτη για να ξεπεραστεί αυτός ο περιορισμός για τον μαζικό πολλαπλασιασμό καλλωπιστικών φυτών (ξυλωδών και μη) είναι η χρήση υγρού μέσου καλλιέργειας μόνο (Weathers and Giles, 1988, Etienne and Berthouly, 2002) ή σε συνδυασμό με στερεό μέσο καλλιέργειας (Debergh and Maene, 1981, Aitken-Christie and Jones, 1987). Στο παρελθόν η καλλιέργεια ανατάραξης (shake culture) αναπτύχθηκε και χρησιμοποιήθηκε από διάφορους ερευνητές (Earle and Langhans, 1975, Takayama and Misawa, 1981, Takayama, 1991, Paque *et al.*, 1992, Chu *et al.*, 1993). Κυρίως όμως χρησιμοποιείται σε καλλιέργειες κυττάρων και σωματικών εμβρύων (συνθετικών σπόρων), τόσο σε αναδεδυμένη φιάλη, όσο και σε βιοαντιδραστήρες (Smart and Fowler, 1984, Attree *et al.*, 1994, Tautorius and Dunstan, 1995) και λιγότερο για μικροπολλαπλασιασμό. Ωστόσο, η μέθοδος αυτή είναι ελπιδοφόρος για τη μείωση του κόστους του μικροπολλαπλασιασμού. Στο υγρό υπόστρωμα, η στενή

επαφή του ιστού με αυτό μπορεί να διεγείρει και να διευκολύνει την απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών και των φυτοορμονών και να οδηγήσει σε καλύτερη ανάπτυξη βλαστών και ριζών (Ziv, 1989, Smith and Spomer, 1994, Sandal *et al.*, 2001, Etienne and Berthouly, 2002). Η χαλιναγώγιση ή ακόμη και η εξάλειψη της κυριαρχίας της κορυφής λόγω της συνεχούς ανάδευσης των ιστών στο μέσο είναι ένα άλλο σημαντικό πλεονέκτημα των υγρών καλλιιεργειών, το οποίο αυξάνει την επαγωγή και τον πολλαπλασιασμό πολυάριθμων μασχαλιαίων οφθαλμών. Αυτό οδηγεί στην ανάπτυξη συστάδων οφθαλμών που είναι επιδεκτικοί στον έλεγχο των συστατικών του μέσου, στον μηχανικό διαχωρισμό και στον αυτοματοποιημένο εμβολιασμό, ως ένα αποδοτικό σύστημα μεταφοράς στο τελικό στάδιο ανάπτυξης των φυτών (Levin *et al.*, 1997, Ziv *et al.*, 1998). Ο σχηματισμός συμπυκνωμένων οργανωμένων δομών έχει αναφερθεί για διάφορα φυτικά είδη που αναπτύσσονται σε υγρό υπόστρωμα. Αυτές οι συστάδες είναι κατασκευασμένες από πυκνά συσσωρευμένα μεριστωματικά κύτταρα που διανέμονται ενεργά και σχηματίζουν νέα μεριστώματα στην εξωτερική επιφάνεια (McCown *et al.*, 1998, Ziv *et al.*, 1998, 1990; Young *et al.*, 2000). Η πρόωθηση ανάπτυξης μεγαλύτερου αριθμού μασχαλιαίων οφθαλμών ευνοεί την παραγωγή μεγάλου αριθμού φυτών που είναι περισσότερο πανομοιότυπα μεταξύ τους (Takayama and Misawa, 1981; Harris and Mason, 1983; Douglas, 1984; Pierik, 1987; Chu *et al.*, 1993). Ακόμη, στις υγρές καλλιέργειες ο ρυθμός ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού των βλαστών ενισχύεται λόγω καλύτερου αερισμού, αφού η συνεχής ανατάραξη του μέσου παρέχει επαρκή ποσότητα οξυγόνου στον ιστό. Εκτός αυτών των πλεονεκτημάτων, η παρασκευή του υγρού μέσου και ο χειρισμός των καλλιιεργειών αυτών είναι ευκολότερος συγκριτικά με την ημι-στερεή καλλιέργεια. Από την άλλη πλευρά όμως η υάλωση των ιστών αποτελεί ένα σημαντικό μειονέκτημα των υγρών καλλιιεργειών και έχει παρατηρηθεί από πολλούς ερευνητές εδώ και χρόνια (Kevers *et al.*, 1984, Gasper *et al.*, 1987, Debergh *et al.*, 1992). Η υάλωση, γνωστή και ως υπερενυδάτωση υποδηλώνει τις υπερ-υδρικές δυσπλασίες που συχνά επηρεάζουν τους ποώδεις και ξυλώδεις βλαστούς κατά τη διάρκεια του *in vitro* πολλαπλασιασμού τους (Trigka and Papafotiou, 2017, Kevers *et al.*, 2004). Το μέσο καλλιέργειας συνήθως είναι η αιτία της υάλωσης των ιστών. Υπάρχουν πολλές ενδείξεις, οι οποίες υποδηλώνουν ότι η μείωση της συγκέντρωσης άγαρ ή η απουσία του στο μέσο καλλιέργειας προκαλεί υάλωση κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης του ιστού (Hakkaart and Versluijs, 1983, John, 1986, Densco, 1987, Kevers *et al.*, 1987, Bottcher *et al.*, 1988). Ενώ έχει

βρεθεί για είδη που κατά την καλλιέργεια τους εμφανίζουν υάλωση όπως τα είδη *G. alypum*, *L. zahni* and *S. athoa* ότι ή αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ (από 8 σε 12 ή 20 mg/l) ή της συγκέντρωσης της ζάχαρης στο θρεπτικό υπόστρωμα 20 σε 30 g/L λύνει το πρόβλημα (Bertsouklis *et al.*, 2003; Papafotiou and Kalantzis, 2009a,b). Ενώ το διαφορετικό υλικό κάλυψης των βάζων καλλιέργειας μπορεί επίσης να συμβάλει στην μείωση του φαινομένου (π.χ μεμβράνη αντί για πλαστικό καπάκι) (Papafotiou, 2010). Μια σειρά από μελέτες υποστηρίζουν ότι δεν εμφανίζουν όλα τα φυτικά είδη υπερενυδάτωση όταν καλλιεργούνται σε υγρό υπόστρωμα όπως για παράδειγμα η ιτιά *Salix viminalis* (Vidal *et al.*, 2013). Τέλος σε ορισμένες καλλιέργειες έχει παρατηρηθεί το πρόβλημα της ασφυξίας το οποίο μπορεί να αποφευχθεί αν ο αναπτυσσόμενος ιστός δεν βυθίζεται εντελώς στο υγρό μέσο (Debergh *et al.*, 1981, Leshem, 1983, Skidmore *et al.*, 1988, Dillen and Buysens, 1989).

Πολλά υποσχόμενη για την ανάπτυξη του μικροπολλαπλασιασμού και τη χρήση του σε βιομηχανική κλίμακα είναι η χρήση των βιοαντιδραστήρων. Οι βιοαντιδραστήρες παρέχουν ένα γρήγορο και αποτελεσματικό σύστημα κλωνικού πολλαπλασιασμού χρησιμοποιώντας υγρό υπόστρωμα καλλιέργειας για την αποφυγή ανάγκης εντατικού χειρισμού από τον άνθρωπο. Ο αυτοματοποιημένος μικροπολλαπλασιασμός σε βιοαντιδραστήρες έχει προωθηθεί από πολλούς συγγραφείς ως ένας πιθανός τρόπος μείωσης του κόστους, ενώ πολλά φυτά με οικονομικό ενδιαφέρον έχουν πολλαπλασιαστεί επιτυχώς σε βιοαντιδραστήρες (Εικ. 22) (Mehrota *et al.*, 2007).

Οι Vidal *et al.* (2013) συνέκριναν την ανταπόκριση των ειδών *Castanea sativa* και *Salix viminalis* στην καλλιέργεια σε υγρό μέσο. Εξετάστηκαν παράμετροι όπως το είδος του εκφύτου, το υλικό υποστήριξης, ο αριθμός εμβυθίσεων και / ή ο αερισμός. Στους βλαστούς της Ιτιάς δεν παρατηρήθηκε υάλωση, αλλά η υάλωση επηρέασε τις καλλιέργειες καστανιάς σε όλες τις επεμβάσεις εκτός από όταν χρησιμοποιήθηκαν υλικά υποστήριξης όπως οι κύβοι πετροβάμβακα. Οι βλαστοί ιτιάς ριζοβόλησαν σε υπόστρωμα χωρίς την προσθήκη αυξίνης, ενώ οι βλαστοί καστανιάς απαιτήσαν αυξίνη για να ριζοβολήσουν. Παρά τις διαφορές αυτές, και τα δύο είδη παρουσίασαν καλύτερη απόδοση σε υγρή καλλιέργεια απ' ότι σε καλλιέργεια σε ημιστερεό μέσο. Ο εγκλιματισμός ήταν επιτυχής και για τα δύο είδη.

Plant	Propagable units Produced	Reference(s)
<i>Amaryllis hippeastrum</i>	Buds, bulblets	Takayama and Akita, 1998
<i>Ananas comosus</i>	Shoot clusters	-
<i>Apium graveolens</i>	Somatic embryos	Nade et al., 1990
Araceae species	Plants	Takayama and Akita, 1998
<i>Acanthopanax koreanum</i>	Somatic embryos	Son et al., 1999b
<i>Artemisa annua</i>	Plants	Park et al., 1989
<i>Asparagus officinalis</i>	-	Takayama, 1991
<i>Atropa belladonna</i>	-	Takayama, 1991
<i>Begonia</i>	Multiple shoots	Takayama and Misawa, 1981
<i>Brodiaea species</i>	Bud clusters, corms	Ilan et al., 1995
<i>Caladium species</i>	-	Takayama, 1991
<i>Colocasia species</i>	-	Takayama, 1991
<i>Coffea arabica</i>	Shoot clusters, plants	Teisson and Alard, 1995
<i>Cyclamen persicum</i>	Somatic embryos	Hvoslef-Eide and Munstar, 1998
<i>Daucus carota</i>	Somatic embryos	Jay et al., 1992
<i>Dianthus caryophyllus</i>	Shoots, plants	Chatterjee et al., 1997
<i>Dioscorea species</i>	-	Takayama, 1991
<i>Dieffenbachia species</i>	-	Takayama, 1991
<i>Digitalis lanata</i>	Somatic embryos	Greidziak et al., 1990
<i>Eschscholtzia californica</i>	Somatic embryos	Archambault et al., 1994
<i>Euphorbia puleherrima</i>	Somatic embryos	Preil, 1991
<i>Fragaria ananasa</i>	Shoots, plants	Takayama and Akita, 1998
<i>Gentiana species</i>	Plants	Hosokawa et al., 1998
<i>Gladiolus grandiflorum</i>	Bud clusters, corms	Ziv et al., 1994; Teisson and Alvard, 1995
<i>Gloximia</i>	Shoots	Takayama, 1991
<i>Hevea brasiliensis</i>	Buds, plants	Alvard et al., 1993; Teisson and Alvard, 1995
<i>Hyacinthus orientalis</i>	Bulblets, plants	Takayama and Akita, 1998
<i>Lilium species</i>	Plants, bulblets	Takayama 1991
<i>Medicago sativa</i>	Somatic embryos	Stuart et al., 1987
<i>Musa species</i>	Buds, plants	Alvard et al., 1993
<i>Nephrolepis exaltata</i>	Buds, plants	Levin et al., 1997; Ziv et al., 1998
<i>Nerine sarniensis</i>	Bulblets, somatic embryos	Lilien-Kipnis et al., 1994; Ziv et al., 1994
<i>Ornithogalum dubium</i>	Shoots, bulblets, plants	Ziv and Lilien Kipnis, 1997
<i>Populus tremula</i>	Bud cluster, shoots	McCown et al., 1988
<i>Picea species</i>	Somatic embryos	Tautorius et al., 1994; Attree et al., 1994
<i>Pinellia ternate</i>	Shoots, corm	Takayama et al., 1991
<i>Pelargonium graveolense</i>	-	Katagi et al., 1986
<i>Phalaenopsis</i>	Protocorm	Young et al., 2000
<i>Solanum tuberosum</i>	Clusters, shoots	Takayama and Akita, 1998; Ziv et al., 1998
<i>Stevia rebaudiana</i>	Shoots	Akita et al., 1994

Εικόνα 22. Μερικά οικονομικά σημαντικά φυτά που έχουν καλλιεργηθεί σε βιοαντιδραστήρα (Mehrotra, 2007).

1.3.3 Πρόσφατες εξελίξεις στον πολλαπλασιασμό των ξυλωδών φυτών

Η εκτίμηση των διαφόρων τρόπων πολλαπλασιασμού στα είδη των ξυλωδών φυτών συμπεριλαμβανομένων των δασικών ειδών, αποκαλύπτει ότι ο πολλαπλασιασμός με σπόρο είναι μακράν η μέθοδος με την οποία παράγεται η μεγάλη πλειοψηφία των φυτών. Οι εκτιμήσεις για τη Γερμανία αναφέρουν ότι περίπου 860 εκατομμύρια ξυλώδη φυτά ανά έτος προέρχονται από σπόρους. Πρόκειται κυρίως για είδη που παρουσιάζουν ενδιαφέρον για τη δασοκομία, όπου είναι απαραίτητη ή αποδεκτή η γενετική ποικιλότητα. Ωστόσο, όταν πρόκειται για

καλλωπιστικά ξυλώδη φυτά, απαιτούνται τεχνικές αγενούς πολλαπλασιασμού για να διατηρηθεί ο επιλεγμένος φαινότυπος. Από τα περίπου 130-140 εκατομμύρια φυτά που παράγονται ετησίως στη Γερμανία με αγενή πολλαπλασιασμό, 110 εκατομμύρια αποδίδονται σε μοσχεύματα, 15-20 εκατομμύρια σε εμβολιασμούς, περίπου 3 εκατομμύρια φυτά προέρχονται από τεχνικές στρωματοποίησης και μόνο 2 εκατομμύρια φυτά μικροπολλαπλασιάζονται (Winkelmann, 2013).

Ένα πρόβλημα που δεν έχει ακόμη επιλυθεί είναι η δυσκολία πολλαπλασιασμού ενήλικων ξυλωδών φυτών. Αυτό δεν οφείλεται μόνο σε πειραματικές ή βιολογικές δυσκολίες, αλλά και στον χρόνο που απαιτείται για την πλήρη αξιολόγηση ενός συστήματος πολλαπλασιασμού για τα πολυετή ξυλώδη φυτά. Οι τεχνικές *in vitro* καλλιέργειας εξακολουθούν να μην εφαρμόζονται σε βαθμό που να αντιστοιχεί στις τεράστιες δυνατότητες που προσφέρει αυτή η τεχνική. Στην αρχή ο *in vitro* πολλαπλασιασμός θεωρήθηκε ως ένα πολλά υποσχόμενο εργαλείο για τα ξυλώδη φυτά. Εντούτοις, οι αριθμοί *in vitro* πολλαπλασιασμένων ξυλωδών φυτών μειώνονται στα γερμανικά εμπορικά εργαστήρια. Τα κυριότερα προβλήματα που αντιμετωπίζονται είναι οι μολύνσεις από τα ενδοφυτικά βακτήρια, η ελλιπής κατανόηση του ρυθμού ανάπτυξης και ο λήθαργος, τα μη νεανικά έκφυτα από τα μητρικά φυτά, η εξίδρωση φαινολικών κατά την καλλιέργεια, καθώς επίσης και η δυσκολία στη ριζοβολία και τον εγκλιματισμό. Για είδη που ριζοβολούν δύσκολα έχουν δοκιμαστεί κατά καιρούς διάφορες πρακτικές, όπως η δημιουργία σκότους στη βάση του βλαστού με φύλλα αλουμινίου (Rugini, *et al.*, 1993, Sanchez *et al.*, 1996), η επώαση των μικροβλαστών σε σκοτάδι (Sanchez *et al.*, 1996), προσθήκη ενεργού άνθρακα στο υπόστρωμα (Thomas, 2008, Sanchez, 1996) και η μείωση περιόδου επώασης σε υπόστρωμα με IBA (James and Thurbon 1979, Snir και Erez 1980, Μαρτίνη, 2014). Στο μέλλον, η καλύτερη κατανόηση των μοριακών διεργασιών που αποτελούν τη βάση της γήρανσης και του τυχαίου σχηματισμού ριζών θα συμβάλει στη βελτίωση των πρωτοκόλλων. Η συντριπτική πλειοψηφία των φυτών που παράγονται εμπορικά *in vitro* προέρχεται απ' τον πολλαπλασιασμό μασχαλιαίων βλαστών, ενώ σπάνια εφαρμόζονται οι αποτελεσματικές οδοί αναγέννησης του τυχαίου σχηματισμού βλαστών και της σωματικής εμβρυογένεσης (Winkelmann, 2013).

1.3.3.1 Αλλαγή φάσης

Ο πολλαπλασιασμός των ξυλωδών φυτών διαφέρει από τον πολλαπλασιασμό των ετήσιων και ποωδών φυτών, ιδίως επειδή η γήρανση και οι αλλαγές φάσης επηρεάζουν έντονα την επιτυχία του. Κατά τη διάρκεια της ζωής τους τα φυτά περνούν από διαφορετικές φάσεις που συνδέονται με διαφορετικές ιδιότητες από φυσιολογική και μορφολογική άποψη (ετεροβλαστία όπως ορίζεται από τον Goebel, 1900). Μετά την εμβρυϊκή φάση, υπάρχουν τρεις κύριες φάσεις, προτού τα φυτά φτάσουν στην τελική φάση της γήρανσης: νεανική, ενήλικη βλαστική και ενήλικη αναπαραγωγική. Η μετάβαση από τη νεανική στην ενήλικη φυτική φάση ονομάζεται αλλαγή φυτικής φάσης (Poethig, 1990) και περιλαμβάνει σημαντικές αλλαγές στην ικανότητα πολλαπλασιασμού. Η γήρανση επηρεάζεται από εξωτερικές περιβαλλοντικές συνθήκες και ενδογενείς παράγοντες. Τα δίκτυα που υποκινούν την αλλαγή από τη νεανική στην ενήλικη φάση και εκείνα που οδηγούν τη μετάβαση στην αναπαραγωγική ενήλικη φάση παρουσιάζουν ομοιότητες (Huijser and Schmid, 2011). Τα τελευταία χρόνια έχει αποδειχθεί σε ποώδη μοντέλα, ο ιδιαίτερος ρόλο δύο microRNAs (miRNAs), miR156 και miR172 που ελέγχουν τα γενετικά δίκτυα που οδηγούν σε μεταβολές φάσης (Huijser and Schmid, 2011). Σχετικά πρόσφατα οι Wang *et al.* (2011) υποστηρίζουν ότι τα ίδια miRNAs είναι υπεύθυνα για την αλλαγή της βλαστικής φάσης στα ξυλώδη φυτά. Οι ερευνητές αυτοί συσχετίζουν νεανικά και ενήλικα φύλλα, των *Eucalyptus globules*, *Hedera helix*, *Quercus acutissima* και δύο ειδών Ακακίας, με χαμηλά και υψηλά επίπεδα miR156 και υψηλή και χαμηλή αφθονία miR172 αντίστοιχα. Επιπλέον, αυτά τα δύο miRNAs απεδείχθη ότι εκφράζονται χωρικά σε ένα σχέδιο που αντικατοπτρίζει καλά την τοπόφυση σε μια υβριδική λεύκα. Ως εκ τούτου, είναι πλέον διαθέσιμοι οι μοριακοί δείκτες που υποδεικνύουν τη φάση ανάπτυξης και την πραγματική φυσιολογική ηλικία ενός συγκεκριμένου τμήματος του φυτού εργαλεία που αναζητούνταν για μεγάλο χρονικό διάστημα. Οι μηχανισμοί που ελέγχουν την έκφραση αυτών των miRNAs είναι ακόμα άγνωστοι και η ανακάλυψή τους θα εξηγήσει πώς τα φυτά αισθάνονται τη γήρανση. Πολλά από τα γονίδια που στοχεύουν τα miR156 και miR172 έχουν εντοπιστεί ήδη στην αραβίδοψη και στον αραβόσιτο (φυτά μοντέλα) (Huijser and Schmid, 2011) και σίγουρα θα εντοπισθούν και για ξυλώδη φυτά όπως λεύκες (πρώτα βήματα από Wang *et al.*, 2011).

Τα εργαλεία που βρίσκονται στα χέρια της επιστήμης θα επιτρέψουν να διερευνήσουν των παραγόντων που επηρεάζουν την αλλαγή φάσης και τη γήρανση με

μεγαλύτερη ακρίβεια. Δεδομένου ότι το miR156 υποτίθεται ότι ελέγχει πολλά σημαντικά χαρακτηριστικά όπως παραμέτρους ανάπτυξης, τυχαίο σχηματισμό ριζών καθώς και χρόνο άνθησης (Poethig, 2010), αυτές οι πληροφορίες θα έχουν πρακτικές συνέπειες στον πολλαπλασιασμό των ξυλωδών φυτών.

1.3.3.2 Ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί και *in vitro* καλλιέργειες

Τα τελευταία χρόνια, αυξάνονται οι έρευνες για τον εντοπισμό και τον έλεγχο των ενδοφυτικών μικροοργανισμών (Winkelmann, 2013). Ενδοφυτικοί είναι οι μικροοργανισμοί που αποικίζουν εσωτερικά τα φυτά και αποκτούν ουδέτερες ή ευεργετικές αλληλεπιδράσεις με τον ξενιστή τους (Anand *et al.*, 2006). Ωστόσο, ο ορισμός αυτός δημιουργήθηκε για τα φυτά που αναπτύσσονται *in vivo*, όταν εξετάζονται *in vitro* καλλιεργούμενα φυτά, ειδικά στις πρώτες ημέρες καλλιεργειών ιστών, οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί έχουν συχνά αρνητικές επιδράσεις (vitrocontaminants), (Leifert and Cassells, 2001). Οι αρνητικές επιδράσεις που αποδίδονται στις ενδοφυτικές μολύνσεις είναι η μείωση του ποσοστού ανάπτυξης και πολλαπλασιασμού, η καθυστερημένη ριζοβολία και τέλος η απώλεια των καλλιεργειών (Cornu and Michel, 1987, Boine *et al.*, 2008, Scherling *et al.*, 2009). Επιπλέον, η αέρια ατμόσφαιρα μέσα στα βάζα καλλιέργειας αποδείχθηκε ότι επηρεάζεται από ενδοφυτικούς μικροοργανισμούς στα βερίκοκα (Marino *et al.*, 1996), όσον αφορά την αύξηση του διοξειδίου του άνθρακα και τη μείωση της συγκέντρωσης οξυγόνου. Επομένως, οι ενδοφυτικοί μικροοργανισμοί μπορεί να είναι υπεύθυνοι για την φτωχή ανταπόκριση σε πολλά πειράματα καλλιέργειας *in vitro* (Thomas *et al.*, 2007), ιδιαίτερα στα ξυλώδη φυτά.

Σε αρκετές μελέτες εντοπίστηκαν διάφορα είδη ενδοφυτικών βακτηρίων, συχνά με ένα κύριο είδος (π.χ., Cornu and Michel, 1987, Pirttilä *et al.*, 2000, Boine *et al.*, 2008, Ulrich *et al.*, 2008). Ωστόσο, η άποψη γι' αυτά αρχίζει να αλλάζει και σχετικά πρόσφατα παρατηρήθηκαν θετικά αποτελέσματα ενός στελέχους *Paenibacillus* που είχε αποδειχθεί ότι υπήρχε σε διάφορα ξυλώδη είδη (Ulrich *et al.*, 2008, Scherling *et al.*, 2009). Φυτά λεύκας χωρίς ενδοφυτικά βακτήρια εμβολιάστηκαν με εναιωρήματα *Paenibacillus* στα οποία η ριζοβολία βελτιώθηκε σημαντικά και οι μεταβολικές μετατοπίσεις metabolic shifts προκλήθηκαν

υποδεικνύοντας την ικανότητα της παραγωγής αυξίνης και της σταθεροποίησης αζώτου (nitrogen fixation) αυτού του βακτηριακού στελέχους.

Ακόμη στις μέρες μας προσδιορίζονται οι μικροβιακοί πληθυσμοί του *Prunus avium* με στόχο την καλύτερη κατανόηση των ευεργετικών και μη μικροοργανισμών και της δυναμικής του πληθυσμού τους σε διαφορετικές φάσεις καλλιέργειας. Μελλοντικά, υπάρχει η ελπίδα αποφυγής της χρήσης αντιβιοτικών, που απλώς καταστέλλουν τα συμπτώματα για περιορισμένο χρονικό διάστημα και φέρουν τον κίνδυνο επιλογής ανθεκτικών στελεχών. Επιπλέον, η αναγνώριση των ευνοϊκών (αυτών που προάγουν την ανάπτυξη) ενδοφυτικών μικροοργανισμών μπορεί να βοηθήσει στην αντιμετώπιση των σημερινών μεγάλων προβλημάτων του *in vitro* πολλαπλασιασμού των ξυλωδών φυτών και συγκεκριμένα της ριζοβολίας και του εγκλιματισμού (Winkelmann, 2013).

Κλείνοντας, πολλά από τα προβλήματα που αφορούν τον πολλαπλασιασμό των ξυλωδών φυτών εξακολουθούν να είναι άλυτα. Αυτό δεν οφείλεται μόνο σε πειραματικές ή βιολογικές δυσκολίες, αλλά προκαλείται επίσης και από το χρόνο που απαιτείται για τα πολυετή ξυλώδη φυτά για την πλήρη αξιολόγηση ενός συστήματος διάδοσης. Ωστόσο, οι πρόσφατες εξελίξεις στην απόκτηση γνώσης σχετικά με τους μοριακούς μηχανισμούς που ελέγχουν τη μεταβολή της βλαστικής φάσης, τον τυχαίο σχηματισμό ριζών και την σωματική εμβρυογένεση αποτελούν ένα κομμάτι στο παζλ για την καλύτερη κατανόηση και χειρισμό των βασικών παραγόντων επιτυχούς διάδοσης των ξυλωδών φυτών.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Μητρικό υλικό

Μητρικό υλικό για την *in vitro* εγκατάσταση του είδους *P. angustifolium* αποτέλεσε η νεαρή βλάστηση (Εικ. 23) ενήλικου φυτού που βρισκόταν σε άνθηση και καρποφορία (15/02/2018), το οποίο φύεται στον Βοτανικό κήπο του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών. Οι βλαστοί αμέσως μετά την αποκοπή τους από το φυτό και μέχρι να γίνει η επιφανειακή απολύμανση τους (Κεφ. 3.6) παρέμειναν ολόκληροι μέσα σε δοχεία γεμισμένα με νερό. Στόχος ήταν η αποφυγή της αφυδάτωσής τους.

2.2 Έκφυτα

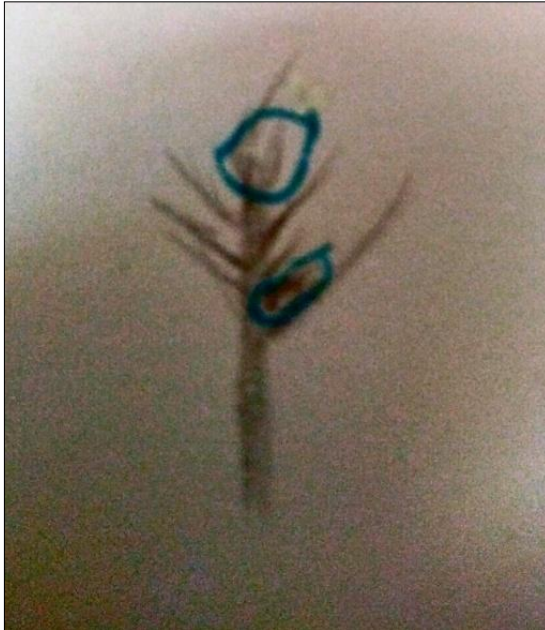
Για την αρχική εγκατάσταση *in vitro* λήφθηκαν έκφυτα 1-2 κόμβων καθώς και έκφυτα κορυφής βλαστού (μαζί με τους δύο πρώτους κόμβους) μήκους 1,0 cm (Εικ. 23).



Εικόνα 23. Νεαρή βλάστηση *P. angustifolium*. Με κόκκινο σημειώνονται τα έκφυτα κορυφής βλαστού, με λευκό τα έκφυτα δύο κόμβων και με μαύρο τα έκφυτα ενός κόμβου, που λήφθηκαν για την αρχική εγκατάσταση *in vitro*.

Στο στάδιο του πολλαπλασιασμού έγινε λήψη εκφύτων 1-3 κόμβων μήκους 2-3 mm. Ακόμη, στο στάδιο του πολλαπλασιασμού χρησιμοποιήθηκαν και έκφυτα κορυφής βλαστού και εκπτυγμένων κόμβων (Εικ. 24). Κατά το στάδιο του πολλαπλασιασμού, ως έκφυτο κορυφής βλαστού θεωρήθηκε η κορυφή του βλαστού

μήκους 3-4 mm που περιλάμβανε το κορυφαίο μερίστωμα μαζί με τους κόμβους που αντιστοιχούσαν σε αυτό το κομμάτι. Έκφυτα εκπτυγμένου κόμβου αποτέλεσαν οι κόμβοι που στην προηγούμενη καλλιέργεια εκπτύχθηκαν σε μήκος 3-4 mm. Στο στάδιο της ριζοβολίας χρησιμοποιήθηκαν βλαστοί μήκους 2,0 και 3,0 cm ηλικίας 45 ημερών και βλαστοί μήκους 1,0 cm ηλικίας 65 ημερών.



Εικόνα 24. Σκίτσο βλαστού στο οποίο σημειώνονται με μπλε τα έκφυτα κορυφής βλαστού (που εμπεριέχουν το κορυφαίο μερίστωμα και τους κόμβους που είναι πολύ κοντά) και εκπτυγμένων κόμβων (κόμβων που εκπτύχθηκαν επί του κύριου βλαστού χωρίς όμως να δώσουν πλάγιο βλαστό) που λήφθηκαν κατά την υποκαλλιέργεια. Το μήκος των εκφύτων αυτών ήταν 3-4 mm.

2.3 Υποστρώματα *in vitro* καλλιέργειας

2.3.1 Υλικά των θρεπτικών υποστρωμάτων *in vitro* καλλιέργειας

Για την παρασκευή των θρεπτικών υποστρωμάτων, στα οποία τοποθετήθηκαν τα έκφυτα και οι μικροβλαστοί, χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα συστατικά:

1. Υπόστρωμα MS (Murashige and Skoog basal mixture της εταιρείας Sigma-Aldrich) σε μορφή σκόνης (Murashige and Skoog, 1962) (Πίν. 3)
2. Σακχαρόζη εμπορίου (sucrose).
3. Αυξίνες:
 - Ινδολο-3-βουτυρικό οξύ, IBA, (Indole-3-butyric acid, MB= 230,24 g/mol), της εταιρείας Sigma-Aldrich.

- α -ναφθαλινοξικό οξύ, NAA, (1-Naphthaleneacetic acid, MB= 186.21 g/mol), της εταιρείας Sigma-Aldrich.

4. Κυτοκινίνες:

- Βενζυλαδενίνη, BA, (N6-benzyladenine, MB= 225,26 g/mol), της εταιρείας Sigma-Aldrich

5. Στερεοποιητικός παράγοντας-Άγαρ (Ρουμπουλάκης Α. Ε. Χημικά)

6. Διπλά Απέσταγμένο νερό

Κατά τη διάρκεια του πειράματος έγιναν καλλιέργειες σε στερεό αλλά και σε υγρό υπόστρωμα. Στη δημιουργία υγρού υποστρώματος καλλιέργειας δεν προσετίθετο στο διάλυμα ο στερεοποιητικός παράγοντας άγαρ.

Πίνακας 3. Συστατικά του θρεπτικού υποστρώματος MS (Murashige and Skoog, 1962) με μακροστοιχεία - ιχνοστοιχεία – βιταμίνες.

Συστατικά	MS (mg l ⁻¹)
NH ₄ NO ₃	1.650
CaCl ₂ ·2H ₂ O	332,2
Ca(NO ₃) ₂ · 4H ₂ O	440
MgSO ₄ · 7H ₂ O	370
KNO ₃	1.900
KH ₂ PO ₄	170
H ₃ BO ₃	6,2
CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,025
CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,02
Na ₂ EDTA·2H ₂ O	37,3
FeSO ₄ · 7H ₂ O	27,8
MnSO ₄ · H ₂ O	1,69
KI	0,83
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8,6
Myo-inositol	100
Glycine	2,0
Nicotinic acid	0,5
Pyridoxine HCl	0,5
Thiamine HCl	0,1
L-Glutamine	250

2.3.2 Θρεπτικά υποστρώματα και μέθοδος παρασκευής

Για την παρασκευή του θρεπτικού υποστρώματος των καλλιεργειών γινόταν προσθήκη, σε δοχείο ζέσεως, απεσταγμένου νερού με λιγότερο όγκο από του

τελικού, καθώς και οι ακριβείς ποσότητες πλήρους MS για τα υποστρώματα αρχικής εγκατάστασης και πολλαπλασιασμού ($4,4 \text{ g l}^{-1}$) ή μισής δύναμης MS για τα υποστρώματα ριζοβολίας ($2,2 \text{ g l}^{-1}$), σακχαρόζης 30 g l^{-1} [οι ποσότητες ζυγίζονταν με τη βοήθεια ζυγού 2 δεκαδικών ψηφίων (Εικ. 25ε)] και των επιθυμητών κάθε φορά φυτορρυθμιστικών ουσιών, από τα stock διαλύματα αυτών (Κεφ. 3.3.3). Στη συνέχεια γινόταν συνεχής ανάδευση του μίγματος με τη βοήθεια ενός μαγνητικού αναδευτήρα (Εικ. 25α) μέχρι το στάδιο της πλήρους διάλυσης των υλικών (δημιουργία διαλύματος). Έπειτα το διάλυμα ογκομετρούνταν και συμπληρωνόταν με απεσταγμένο νερό μέχρι τον επιθυμητό όγκο. Ακολουθούσε μέτρηση του pH και ρύθμιση αυτού στην τιμή 5,6-5,7 της κλίμακας με τη βοήθεια διαλυμάτων 0,1 ή 1 N NaOH και 0,1 ή 1 N HCl (Εικ. 25β). Η ολοκλήρωση της διαδικασίας για τα στερεά υποστρώματα γινόταν με την προσθήκη ακριβούς ποσότητας άγαρ (8 g l^{-1}) και τη θέρμανση του μίγματος (Εικ. 25δ), υπό συνεχή ανάδευση μέχρι την πλήρη και ομοιόμορφη διάλυση του άγαρ (διαυγές διάλυμα) (Εικ. 25γ). Κατά τη διάρκεια της θέρμανσης τα δοχεία ζέσεως σκεπάζονταν με αλουμινόχαρτο προς αποφυγήν εξάτμισης μεγάλου μέρους του υγρού. Για την παρασκευή υγρών υποστρωμάτων η διαδικασία σταματούσε στη μέτρηση του pH. Τα διαλύματα μετά το πέρας της διαδικασίας μοιραζόταν αναλόγως το στάδιο καλλιέργειας σε δοκιμαστικούς σωλήνες ή γυάλινα βάζα καλλιέργειας και τοποθετούνταν στον κλίβανο υγρής αποστείρωσης του εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου.



Εικόνα 25. (α) Αναδευτήρας, (β) Πεχάμετρο και διαλύματα ρύθμισης pH, δοχεία ζέσεως που περιέχουν θρεπτικό υπόστρωμα (γ) λίγο πριν γίνει διαυγές διάλυμα και (δ) αμέσως μετά την έναρξη της θέρμανσης, (ε) ζυγός.

Κατά την αρχική εγκατάσταση και τον πολλαπλασιασμό των βλαστών χρησιμοποιήθηκε MS ολόκληρης δύναμης ενώ κατά το στάδιο της ριζοβολίας χρησιμοποιήθηκε MS μισής δύναμης. Όπως προαναφέρθηκε στα υποστρώματα υγρής καλλιέργειας δεν προσετίθετο ο στερεοποιητικός παράγοντας άγαρ. Η ποσότητα της σουκρόζης ήταν η ίδια σε όλα τα είδη υποστρωμάτων (30 g l^{-1}). Οι συγκεντρώσεις και τα είδη των φυτορρυθμιστικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν στα διάφορα στάδια φαίνονται στον πίνακα 4 κατωτέρω.

Πίνακας 4. Οι συγκεντρώσεις και τα είδη των φυτορρυθμιστικών ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν στα διάφορα στάδια του πειράματος.

Αρχική εγκατάσταση
2,0 mg l^{-1} BA
Πρώτη υποκαλλιέργεια
1,0 ή 2,0 mg l^{-1} BA
Δεύτερη υποκαλλιέργεια
1,0 mg l^{-1} BA
Τρίτη υποκαλλιέργεια
1,0 mg l^{-1} BA
Τέταρτη υποκαλλιέργεια
1,0 ή 4,0 mg l^{-1} BA
Πέμπτη υποκαλλιέργεια
1,0 ή 2,0 ή 4,0 mg l^{-1} με ή χωρίς την προσθήκη 0,1 mg l^{-1} NAA
Έκτη υποκαλλιέργεια (υγρή και στερεή)
0,5 ή 1,0 ή 2,0 ή 4,0 mg l^{-1} με ή χωρίς την προσθήκη 0,1 mg l^{-1} IBA
Πρώτο πείραμα ριζοβολίας
1,0 mg l^{-1} IBA
Δεύτερο πείραμα ριζοβολίας
2,0 ή 4,0 ή 6,0 ή 8,0 ή 10,0 mg l^{-1} IBA
Τρίτο πείραμα ριζοβολίας
10,0 mg l^{-1} IBA
Τέταρτο πείραμα ριζοβολίας
2,0 ή 4,0 ή 6,0 mg l^{-1} IBA
Πέμπτο πείραμα ριζοβολίας
2,0 ή 10,0 mg l^{-1} IBA

2.3.3 Μέθοδος παρασκευής «stock» διαλυμάτων φυτορρυθμιστικών ουσιών

Παρασκευή «stock» διαλύματος BA: Σε δοχείο ζέσεως 100 ml τοποθετούνταν 10 mg BA μετρημένα σε ζυγό ακριβείας 4 δεκαδικών ψηφίων, τα οποία διαλύονταν με ανάδευση σε 2-3 σταγόνες 1N καυστικού νατρίου (NaOH). Στη συνέχεια προστίθεντο 100 ml διπλά απεσταγμένου νερού.

Παρασκευή «stock» διαλύματος NNA: Σε δοχείο ζέσεως 100 ml τοποθετούνταν 10 mg NAA μετρημένα σε ζυγό ακριβείας 4 δεκαδικών ψηφίων, τα οποία διαλύονταν με ανάδευση σε 2-3 σταγόνες καθαρής αιθανόλης (99,9 %). Στη συνέχεια προστίθεντο 100 ml διπλά απεσταγμένου νερού.

Παρασκευή «stock» διαλύματος IBA: Σε δοχείο ζέσεως 100 ml τοποθετούνταν 10 mg IBA μετρημένα σε ζυγό ακριβείας 4 δεκαδικών ψηφίων, τα οποία διαλύονταν με ανάδευση σε 2-3 σταγόνες καθαρής αιθανόλης (99,9 %). Στη συνέχεια προστίθεντο 100 ml διπλά απεσταγμένου νερού.

Μετά την παρασκευή τους όλα τα «stock» διαλύματα των φυτορρυθμιστικών ουσιών αποθηκεύονταν σε ψυγείο θερμοκρασίας 4-6 °C, για διάστημα 30 περίπου ημερών.

2.4 Δοχεία και υλικά κάλυψης

2.4.1 Δοχεία *in vitro* καλλιέργειας και υλικά κάλυψης αυτών

Στο στάδιο της εγκατάστασης *in vitro* των αρχικών καλλιεργειών από κόμβους και βλαστικές κορυφές νεαρής βλάστησης, ως δοχεία καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκαν γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες όγκου 50 ml (25 x 100 mm), που περιείχαν 10 ml υπόστρωμα ο καθένας. Μετά την τοποθέτηση του υποστρώματος οι σωλήνες καλύφθηκαν με αλουμινόχαρτο προκειμένου να αποστειρωθούν στον κλίβανο υγρής αποστείρωσης, ενώ μετά την τοποθέτηση των εκφύτων, στην Τράπεζα Νηματικής Ροής, ως υλικό κάλυψης των σωληνών χρησιμοποιήθηκε διαφανής μεμβράνη sanitas (πλαστική μεμβράνη περιτυλίγματος με το εμπορικό όνομα sanitas της εταιρείας Σαράντης Α.Ε.

Ιδιότητες μεμβράνης:

- περατότητα σε O₂ 8,5 cm³ m⁻² σε 24 h
- περατότητα σε CO₂ 55.000 cm³ m⁻² σε 24 h
- περατότητα σε υδρατμούς 110 g m⁻² σε 24 h).

Στο στάδιο του πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών *in vitro* τόσο στην στερεή όσο και στην υγρή καλλιέργεια, αλλά και σε αυτό της ριζοβολίας, χρησιμοποιήθηκαν ως δοχεία καλλιέργειας γυάλινα βάζα όγκου 100 ml, τα οποία

περιείχαν 25 ml υποστρώματος το κάθε ένα. Τα βάζα καλλιέργειας πριν την αποστείρωσή τους σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης, καθώς και μετά την τοποθέτηση των εκφύτων στην Τράπεζα Νηματικής Ροής καλύπτονταν με σκληρό πλαστικό καπάκι (Magenta B-caps, Sigma). Ακόμη, στα πειράματα ριζοβολίας χρησιμοποιήθηκαν χάρτινα κουτιά για δημιουργία συνεχούς σκότους και αλουμινόχαρτο εμπορίου για κάλυψη της βάσης των βάζων καλλιέργειας και δημιουργία σκότους μόνο στη βάση των βλαστών.

2.4.2 Δοχεία εγκλιματισμού φυταρίων και υλικά κάλυψης

Στο στάδιο του εγκλιματισμού τα ριζοβολημένα φυτάρια μεταφυτεύθηκαν για περαιτέρω ανάπτυξη σε πλαστικά φυτοδοχεία όγκου 2.000 ml. Τα φυτοδοχεία περιείχαν υπόστρωμα τύρφης : περλίτη 1:1 (v/v). Τα δοχεία καλύπτονταν τελείως με μεμβράνη Sanitas, ώστε να εξασφαλιστεί η μέγιστη δυνατή υγρασία, η οποία σταδιακά αφαιρούνταν και τελικά απομακρυνόταν τελείως.

2.5 Αποστείρωση εργαλείων και υλικών καλλιέργειας

Οι στείρες συνθήκες είναι μείζονος σημασίας για όλες τις διαδικασίες ιστοκαλλιέργειας. Για την εκτέλεση όλων των πειραμάτων έγινε αποστείρωση όλων των εργαλείων και υλικών καλλιέργειας. Η αποστείρωση των εργαλείων και υλικών γινόταν σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης (αυτόκλειστο) για χρονικό διάστημα 20 min, σε θερμοκρασία 121 °C και πίεση 1.1 atm. Τα γυάλινα βάζα που περιείχαν τα θρεπτικά υποστρώματα είχαν χαλαρά καλυμμένο το ελεύθερο στόμιό τους με τα πλαστικά καπάκια τους. Ακόμη, γινόταν κάλυψη όλων των εργαλείων που θα χρησιμοποιούνταν στην διαδικασία εμφύτευσης των εκφύτων ή στις απολυμάνσεις με φύλλο αλουμινίου (κοινό αλουμινόχαρτο εμπορίου), όπως λαβίδες, νυστέρια, πλακάκια πάνω στα οποία θα λάμβανε χώρα η κοπή των εκφύτων προκειμένου να εμφυτευτούν στο υπόστρωμα καλλιέργειας, κωνικές φιάλες με καλυμμένο το στόμιό τους με φύλλο αλουμινίου και δοχεία με απεσταγμένο νερό για τις μεταχειρίσεις απολυμάνσεως έχοντας χαλαρά τοποθετημένα τα βιδωτά καπάκια τους. Τα γυάλινα βάζα και οι σωλήνες με μολυσμένες καλλιέργειες πριν ανοιχτούν και πλυθούν αποστειρώνονταν για 40 min, σε θερμοκρασία 121 °C και σε πίεση 1,1 atm στον κλίβανο υγρής αποστείρωσης.

2.6 Επιφανειακή απολύμανση εκφύτων

Πριν την τοποθέτηση των εκφύτων στους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν το θρεπτικό υπόστρωμα, έγινε επιφανειακή απολύμανση τεμαχίων βλαστών. Μετά την αφαίρεση των φύλλων, τα τεμάχια βλαστών ξεπλύθηκαν το καθένα ξεχωριστά πολύ καλά με άφθονο τρεχούμενο νερό βρύσης για 1 min περίπου και έπειτα τοποθετήθηκαν για 10 min σε σαπουνάδα από απορρυπαντικό πιάτων υπό συνεχή ανάδευση. Ακολούθησε απολύμανση με διάλυμα αιθυλικής αλκοόλης 90% (Ethanol Absolute 99%, Scharlau) για 10 sec. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε κωνικές φιάλες που περιείχαν 15% διάλυμα χλωρίνης εμπορίου (4,5% υποχλωριώδες νάτριο) συνολικού όγκου 200 ml αποτελούμενο από απεσταγμένο-αποστειρωμένο νερό και 0.1% Tween-20 (προσκολλητική ουσία, Polyoxyethylene (20) sorbitan Monolaurate, MERCK) και ανακινούνταν για 10 min. Ακολούθησαν τέσσερα τρίλεπτα ξεπλύματα των βλαστών με απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό υπό συνεχή ανάδευση.

2.7 Διαδικασία εγκατάστασης καλλιέργειών

2.7.1 Στάδιο αρχικής εγκατάστασης και πολλαπλασιασμού

Κατά το στάδιο της αρχικής *in vitro* εγκατάστασης λήφθηκαν έκφυτα κορυφής βλαστού μαζί με τους δύο πρώτους κόμβους μήκους 1,0 cm και έκφυτα 1-2 κόμβων μήκους επίσης 1,0 cm (Εικ. 23). Τα φύλλα των βλαστών αποκόπηκαν πριν από την έναρξη της διαδικασίας απολύμανσης. Οι βλαστοί που σχηματίζονταν *in vitro* τεμαχίζονταν σε έκφυτα 1-3 κόμβων μήκους 2-3 mm λόγω μικρών μεσογονατίων αλλά και σε έκφυτα εκπτυγμένων κόμβων και κορυφής βλαστού. Τα φύλλα που είχαν σχηματιστεί αφαιρούνταν με τη χρήση αποστειρωμένου νυστεριού και λαβίδας, μέσα στην τράπεζα νηματικής ροής, πάνω σε αποστειρωμένο πλακάκι, που απολυμαινόταν τακτικά με υδατικό διάλυμα αιθανόλης (80%). Τα έκφυτα τοποθετούνταν στα δοχεία καλλιέργειας με το ανάλογο θρεπτικό υπόστρωμα, κατακόρυφα, 4 έκφυτα ανά δοχείο όγκου 100 ml και 1 έκφυτο ανά σωλήνα αρχικής εγκατάστασης και πιέζονταν ελαφρά ώστε να έρθει σε επαφή η βάση του εκφύτου με το υπόστρωμα. Στην υγρή καλλιέργεια 4 έκφυτα ανά βαζάκι καλλιέργειας αφήνονταν απλά στο υγρό υπόστρωμα.

2.7.2 Στάδιο ριζοβολίας βλαστών

2.7.2.1 Ριζοβολία βλαστών *in vitro*

Κατά τη διάρκεια της μελέτης αυτής προωθήθηκαν για ριζοβολία μικροβλαστοί μήκους 2,0 και 3,0 cm ηλικίας 45 και μικροβλαστοί 65 ημερών μήκους 1,0 cm. Στην τράπεζα νηματικής ροής, πάνω σε αποστειρωμένο πλακάκι, το οποίο απολυμαινόταν τακτικά με υδατικό διάλυμα αιθανόλης 80%, αφαιρούνταν τα κατώτερα φύλλα των βλαστών με τη βοήθεια αποστειρωμένου νυστεριού και λαβίδας. Οι βλαστοί έπειτα τοποθετούνταν κατακόρυφα στα γυάλινα βάζα καλλιέργειας (4 βλαστοί / βάζο) με το ανάλογο θρεπτικό υπόστρωμα ριζοβολίας και πιέζονταν ελαφρά ώστε να βυθιστούν λίγα χιλιοστά μέσα σε αυτό. Στη συνέχεια τα βάζα καλύπτονταν και τοποθετούνταν τυχαία στο θάλαμο με φωτοπερίοδο 16 h πλήρους φωτός ή πρώτα τυχαία μέσα σε κουτιά για δημιουργία συνεχούς σκότους και έπειτα στο θάλαμο καλλιέργειας. Στο πείραμα για δημιουργία συνεχούς σκότους μόνο στη βάση των βλαστών έγινε κάλυψη του βασικού τμήματος των βάζων (υπόστρωμα) με φύλλα αλουμινίου και στερεοποίηση αυτού με parafilm και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στο θάλαμο φωτοπεριόδου 16 ωρών. Όλοι οι μικροβλαστοί που προωθήθηκαν για ριζοβολία προέρχονταν από το βασικό υπόστρωμα MS με 1 mg l^{-1} BA.

2.7.2.2 Ριζοβολία βλαστών *ex vitro*

Μικροβλαστοί 65 ημερών, ανεπτυγμένοι *in vitro*, μήκους 2,0 cm που είχαν αρχίσει να ξυλοποιούνται, προωθήθηκαν για ριζοβολία *ex vitro*. Η βάση του κάθε μικροβλαστού βυθίστηκε είτε σε σκόνη ριζοβολίας (Εικ. 26α) αφού πρώτα είχε βραχεί για να κολλήσει η σκόνη είτε για 1 min σε διάλυμα 1000 ppm IBA (Εικ. 26β) για ριζοβολία. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν με πρόσοχη για να μην απομακρυνθεί η σκόνη σε υπόστρωμα τύρφης:περλίτη 1:1 (v/v) το οποίο περιεχόταν σε πλαστικά κεσεδάκια όγκου 2000 ml. Τα κεσεδάκια τοποθετήθηκαν για μία εβδομάδα σε θάλαμο σταθερών συνθηκών σε θερμοκρασία 20 °C, με φωτοπερίοδο 16 h, και ένταση φωτισμού $37,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ από λαμπτήρες φθορισμού και 30% υγρασία (μη ελεγχόμενη) ενώ ανά δύο ημέρες εφαρμοζόταν ελαφρύ πότισμα. Την τρίτη ημέρα επώασης δημιουργήθηκαν οπές στη μεμβράνη κάλυψης η οποία αφαιρέθηκε τελείως με την έξοδο των δοχείων από το θάλαμο. Τα δοχεία λόγω βλάβης στην υδρονέφωση

του θερμοκηπίου τοποθετήθηκαν σε εξωτερικό σκιερό μέρος, στην Τρίπολη Αρκαδίας (μέση ελάχιστη και μέγιστη μηνιαία θερμοκρασία 14,5°C και 30,1°C αντίστοιχα ενώ μέση μηνιαία υγρασία 46,4 %) όπου αρδεύονταν τακτικά.



Εικόνα 26. (α) Η Σκόνη ριζοβολίας στην οποία βυθίστηκε η βάση των μικροβλαστών και (β) η σκόνη IBA που χρησιμοποιήθηκε για τη δημιουργία διαλύματος 1000ppm IBA στο οποίο βυθίστηκε η βάση των μικροβλαστών με σκοπό την *ex vitro* ριζοβολία τους.

2.7.3 Στάδιο Εγκλιματισμού φυταρίων

Σε διάστημα 30 ημερών μετά την εγκατάσταση στα υποστρώματα ριζοβολίας, ριζοβολημένοι μικροβλαστοί, τοποθετήθηκαν σε δοχεία για εγκλιματισμό. Τα φυτάρια απομακρύνονταν από το υπόστρωμα και στη συνέχεια γινόταν επιμελές πλύσιμο του ριζικού συστήματος με τρεχούμενο νερό βρύσης, ώστε να απομακρυνθεί πλήρως το θρεπτικό στερεό υπόστρωμα προς αποφυγή μολύνσεων από παθογόνα μετά την μεταφύτευση στα δοχεία εγκλιματισμού. Ακολουθούσε η μεταφύτευση των ριζοβολημένων φυταρίων σε ορθογώνια, διάφανα, πλαστικά δοχεία όγκου 2 L τα οποία περιείχαν υπόστρωμα τύρφης : περλίτη 1:1 (v/v). Τα φυτάρια τοποθετήθηκαν στα δοχεία ανά επέμβαση ριζοβολίας με σκοπό την εξαγωγή συμπερασμάτων όχι μόνο για τον εγκλιματισμό συνολικά αλλά και για την πιθανή επίδραση άλλων παραγόντων στην επιτυχία αυτού, όπως είναι η φωτοπερίοδος και η συγκέντρωση της αυξίνης στο υπόστρωμα κατά τη διάρκεια της επαγωγής των ριζών αλλά και το μήκος των βλαστών που προωθήθηκαν για ριζοβολία. Την πρώτη εβδομάδα τα δοχεία καλύπτονταν τελείως με μεμβράνη Sanitas η οποία σταδιακά αφαιρούνταν μέχρι που απομακρυνόταν τελείως. Σκοπός ήταν η εξασφάλιση της μέγιστης δυνατής υγρασίας. Τα φυτάρια την πρώτη

εβδομάδα τοποθετούνταν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών στους 20 °C, με φωτοπερίοδο 16 h, και σε ένταση φωτισμού 37,5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ από λαμπτήρες φθορισμού, 30% υγρασία και ανά δύο ημέρες εφαρμοζόταν ελαφρύ πότισμα. Στη συνέχεια σε όλα τα πειράματα εγκλιματισμού εκτός του πρώτου μεταφέρονταν για μια βδομάδα στην υδρονέφωση του θερμαινόμενου θερμοκηπίου του εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου. Μετά την υδρονέφωση τοποθετούνταν σε σκιερό μέρος στον πάγκο του θερμοκηπίου, όπου παρέμειναν για άλλες δύο εβδομάδες. Αυτές τις δύο εβδομάδες εφαρμόζόταν άρδευση δύο φορές την εβδομάδα. Με το πέρας των δύο εβδομάδων τα φυτά μεταφυτεύτηκαν σε ατομικά γλαστρίδια τα οποία περιείχαν υπόστρωμα τύρφης : περλίτη 1:1, συνεχίστηκε η περιοδική άρδευση δύο φορές την εβδομάδα ενώ μία φορά την εβδομάδα τα φυτά λιπαίνονταν με υδατοδιαλυτό πλήρες λίπασμα Nutrileaf 20:20:20 (Miller Chemical and Fertilizer Corp., Hanover, PA, USA) αρχικά (πρώτη εβδομάδα μετά τη μεταφύτευση) σε αναλογία 2 g l⁻¹ και σε αναλογία 4 g l⁻¹ στη συνέχεια. Στο πρώτο πείραμα εγκλιματισμού μετά τη μία εβδομάδα στο θάλαμο σταθερών συνθηκών λόγω βλάβης στην υδρονέφωση τα φυτά μεταφέρθηκαν όπως και στην *ex vitro* ριζοβολία σε σκιερό μέρος στην Τρίπολη Αρκαδίας (μέση ελάχιστη και μέγιστη μηνιαία θερμοκρασία 14,5°C και 30,1°C αντίστοιχα ενώ μέση μηνιαία υγρασία 46,4 %) για τρεις εβδομάδες όπου και αρδεύονταν κάθε μέρα, τακτικά κατά την πρώτη εβδομάδα και ανά δύο μέρες τη δεύτερη. Με το πέρας των τριών εβδομάδων τα φυτά μεταφυτεύτηκαν σε ατομικά γλαστρίδια και εφαρμόζόταν άρδευση κάθε δύο μέρες και μια φορά την εβδομάδα λίπανση με υδατοδιαλυτό πλήρες λίπασμα Nutrileaf 20:20:20 (Miller Chemical and Fertilizer Corp., Hanover, PA, USA), σε αναλογία 2 g l⁻¹ αρχικά (πρώτη εβδομάδα μεταφύτευσης) και στη συνέχεια 4 g l⁻¹.

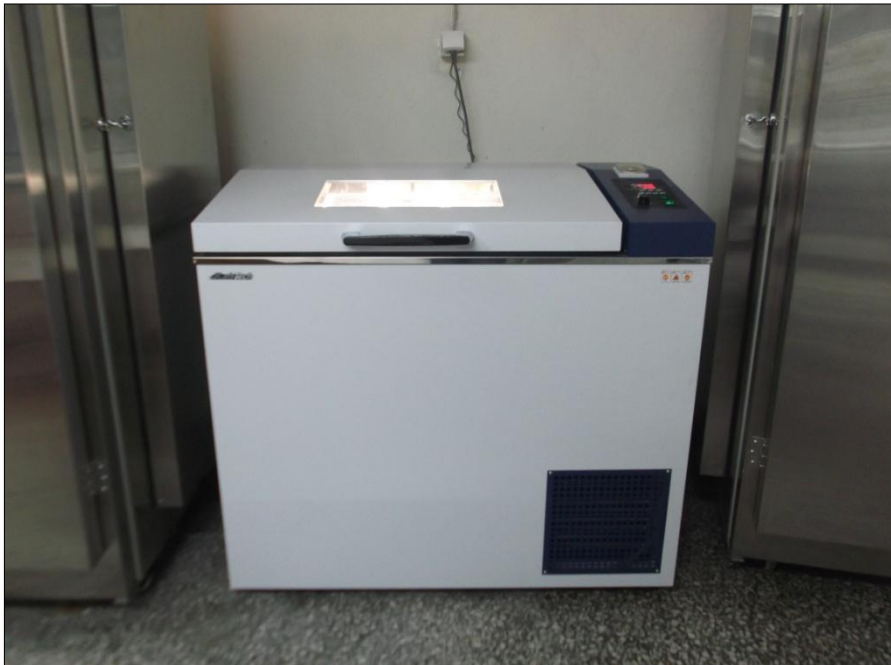
2.8 Συνθήκες καλλιέργειας

2.8.1 Συνθήκες *in vitro* καλλιέργειας

Για την ανάπτυξη των εκφύτων σε στερεό υπόστρωμα, οι δοκιμαστικοί σωλήνες και τα γυάλινα βάζα καλλιέργειας, τοποθετούνταν σε θάλαμο ανάπτυξης ελεγχόμενων σταθερών συνθηκών, σε θερμοκρασία 25±2 °C, με φωτοπερίοδο 16 h πλήρους φωτός έντασης 37,5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (4.000 lx fluorescent light) που παρέχονταν από λευκούς λαμπτήρες φθορισμού, οι οποίοι βρίσκονταν στις πλευρές

του θαλάμου. Η επώαση διαρκούσε 35-45 ημέρες, ενώ για τους βλαστούς που ήταν προς ριζοβολία η επώαση διαρκούσε 25-30 ημέρες.

Κατά την υγρή καλλιέργεια *in vitro* τα βάζακια που περιείχαν τα έκφυτα τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων σταθερών συνθηκών με σύστημα ανάδευσης (Εικ. 27) για καλή ανταλλαγή αερίων μεταξύ καλλιέργειας και αέρα αλλά και για ομοιόμορφη κατανομή των εκφύτων μέσα στο υγρό υπόστρωμα. Η θερμοκρασία εντός του αναδευτήρα ήταν 25 ± 2 °C, η φωτοπερίοδος 16h πλήρους φωτός έντασης $37,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (4.000 lx fluorescent light) ενώ η ταχύτητα ανάδευσης ήταν 70 rad/min.



Εικόνα 27. Θάλαμος ελεγχόμενων σταθερών συνθηκών, με σύστημα ανάδευσης, στο Εργαστήριο Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου.

2.9 Πειραματισμός και εκτίμηση πειραματικών δεδομένων

Για την εκτίμηση των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το Εντελώς Τυχαιοποιημένο Σχέδιο (ΕΤΣ) και εφαρμόστηκαν μονοπαραγοντικά, διπαραγοντικά και τριπαραγοντικά πειράματα. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων έγινε με το στατιστικό πρόγραμμα Statgraphics Centurion XVI και το Jump 8.0 (SAS Institute Inc.). Η σημαντικότητα των αποτελεσμάτων ελέγχθηκε με

ανάλυση της διασποράς (Analysis of Variance, one-tow or three-way ANOVA) και η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο LSD σε επίπεδο σημαντικότητας 5%. Στους πίνακες των αποτελεσμάτων οι μέσοι των επεμβάσεων που ακολουθούνται από διαφορετικά γράμματα της λατινικής αλφαβήτου διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά. Ο έλεγχος της επίδρασης των παραγόντων στη βλαστογένεση, στην εκπτυξή κόμβων επί των βλαστών καθώς και στη ριζοβολία και τον εγκλιματισμό έγινε με crosstabulation test. Στο τέλος κάθε πίνακα αποτελεσμάτων αναγράφεται ο αριθμός των επαναλήψεων που χρησιμοποιήθηκαν ανά επέμβαση.

Στις 15 Φεβρουαρίου 2018 έγινε η αρχική εγκατάσταση εκφύτων (αρχική καλλιέργεια) και μετά από 45 ημέρες έγινε η 1η υποκαλλιέργεια. Η Δεύτερη υποκαλλιέργεια έγινε μετά το πέρας 35 ημερών. Οι υπόλοιπες υποκαλλιέργειες έγιναν μετά το πέρας 40 ημερών εκτός από την 6^η που έγινε μετά από 50 ημέρες. Πριν από κάθε υποκαλλιέργεια⁵ καταγράφηκε το ποσοστό εκφύτων που αντέδρασαν ως προς την παραγωγή βλαστών 1^{ης} τάξης (βλαστογένεση, %), το ποσοστό των εκφύτων που έδωσαν βλαστούς 2^{ης} τάξης, ο μέσος αριθμός των βλαστών 1^{ης} και 2^{ης} τάξης που σχηματίστηκαν ανά έκφυτο, το μέσο μήκος των βλαστών που σχηματίστηκαν και ο μέσος αριθμός κόμβων ανά βλαστό. Καταγράφηκε επίσης, το ποσοστό των εκφύτων που έδωσαν εκπτυγμένους κόμβους (εν δυνάμει βλαστούς 2^{ης} τάξης) το μήκος και ο μέσος αριθμός των εκτυγμένων κόμβων⁶ ανά έκφυτο. Ακόμη, έγινε καταγραφή των ανωτέρω χαρακτηριστικών 50 και 90 ημέρες μετά την εγκατάσταση της 5^{ης} και 6^{ης} υποκαλλιέργειας αντίστοιχα. Κατά τη δεύτερη μέτρηση της 6^{ης} υποκαλλιέργειας καταγράφηκε επίσης το ποσοστό των βλαστών που καταστράφηκαν μετά από 90 ημέρες επώασης στα θρεπτικά υποστρώματα.

Κατά το στάδιο της ριζοβολίας η εκτίμηση των αποτελεσμάτων έγινε 25 ημέρες μετά από την μεταφορά των μικροβλαστών στα υποστρώματα ριζοβολίας και καταγράφηκε το ποσοστό των μικροβλαστών που σχημάτισαν ρίζες, ο αριθμός και το μήκος των ριζών. Κατά το τρίτο, τέταρτο και πέμπτο πείραμα ριζοβολίας καταγράφηκε και το μήκος των βλαστών των ριζοβολημένων φυταρίων. Στο στάδιο του εγκλιματισμού η *ex vitro* επιβίωση των φυταρίων καταγράφηκε περίπου ένα μήνα μετά τη μεταφύτευση των φυταρίων.

⁵ Στην πρώτη υποκαλλιέργεια δεν καταγράφηκε ο αριθμός των εκτυγμένων κόμβων αλλά παρατηρήθηκε η τάση των βλαστών να εκπτώσσουν ορισμένους από τους κόμβους τους.

⁶ Ως εκπτυγμένος κόμβος θεωρήθηκε κάθε κόμβος που εκπτύχθηκε κατά 0,1-0,5 cm χωρίς να δώσει βλαστό δεύτερης τάξης).

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Αρχική εγκατάσταση

Μετά την επιφανειακή απολύμανση (2.6) των βλαστών του μητρικού φυτού (2.1) έκφυτα ενός και δύο κόμβων καθώς και έκφυτα κορυφής βλαστού (2.2) εγκαταστάθηκαν σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με 2 mg l^{-1} BA. Η αρχική εγκατάσταση *in vitro* έγινε με επιτυχία σε ποσοστό 83-100% (Πίν. 5) και δεν παρουσιάστηκαν προβλήματα μόλυνσεων με εξαίρεση μια μόλυνση ενός εκφύτου ενός κόμβου (4% ποσοστό μόλυνσης σε αυτή την κατηγορία εκφύτου). Τα έκφυτα κορυφής βλαστού αποδείχθηκαν ευαίσθητα στην απολύμανση, εμφανίζοντας νέκρωση σε ποσοστό 65%. Ο αριθμός των επαναλήψεων για τα έκφυτα κορυφής, λόγω της νέκρωσης από την απολύμανση, ήταν πολύ μικρός ($z=8$) (Πίν. 5). Τα έκφυτα ενός κόμβου αντέδρασαν σε χαμηλότερο ποσοστό συγκριτικά με τα έκφυτα 2 κόμβων (Πίν. 5). Τα έκφυτα ενός κόμβου και κορυφής βλαστού έδωσαν βλαστούς μεγαλύτερου μήκους απ' ό,τι τα έκφυτα δύο κόμβων (Πίν. 5, Εικ. 28). Σε ό,τι αφορά τον αριθμό των βλαστών ανά έκφυτο και τον αριθμό των κόμβων ανά βλαστό δεν βρέθηκε σημαντική διαφορά (Πίν. 5).

Πίνακας 5. Επίδραση του είδους του εκφύτου στην αρχική εγκατάσταση του *P. angustifolium* σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με 2 mg l^{-1} BA.

Είδος Εκφύτου	Βλαστογένεση (%)	Μέσος αριθμός βλαστών	Μέσο μήκος βλαστών	Μέσος αριθμός κόμβων
Έκφυτα κορυφής βλαστού	(100) ^z	1,71a	2,40a	6,66a
Έκφυτα ενός κόμβου	83	1,40a	2,13a	8,86a
Έκφυτα δύο κόμβων	100	1,45a	1,54b	8,64a
F one-way ANOVA		NS	*	NS

Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο LSD, $P \leq 0,05$, $n=24$

z: Το ποσοστό προκύπτει από τα έκφυτα κορυφής βλαστού που επέζησαν της επιφανειακής απολύμανσης ($z=8$)

NS: Μη σημαντικό σε επίπεδο, $P \leq 0,05$

* : Σημαντικό σε επίπεδο, $P \leq 0,05$

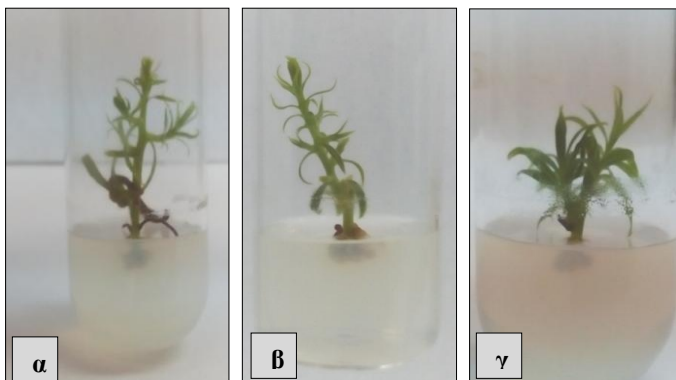
Σε δύο έκφυτα κορυφής και έξι έκφυτα ενός κόμβου ορισμένοι κόμβοι των βλαστών που παράχθηκαν εκπτύχθηκαν (Πίν. 6, Εικ. 28 α, β) όμως δεν βρέθηκε σημαντική διαφορά ούτε στον αριθμό ούτε στο μήκος των εκπτυγμένων κόμβων (Πίν. 6). Τέλος δύο έκφυτα κορυφής (Εικ. 28α) και ένα έκφυτο ενός κόμβου έδωσαν και βλαστούς 2^{ης} τάξης.

Πίνακας 6. Επίδραση του είδους του εκφύτου στην έκπτυξη κόμβων επί των βλαστών 1^{ης} τάξης κατά την αρχική εγκατάσταση του είδους *P. angustifolium* σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με 2 mg l⁻¹ BA.

Είδος Εκφύτου	Ποσοστό (%) εκφύτων με εκπτυγμένους κόμβους	Μ. αρ. εκπτυγμένων Κόμβων/έκφυτο	Μ. μήκος εκπτυγμένων κόμβων
Έκφυτα κορυφής βλαστού	25	3a	0,3a
Έκφυτα ενός κόμβου	30	5a	0,32a
Έκφυτα δύο κόμβων	0	-	-
F_{one-way ANOVA}		NS	NS

Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο LSD, $P \leq 0,05$.

NS: Μη σημαντικό σε επίπεδο, $P < 0,05$



Εικόνα 28. Μικρόβλαστοί που παράχθηκαν κατά την αρχική εγκατάσταση εκφύτων (α) κορυφής, (β) ενός κόμβου και (γ) δύο κόμβων του είδους *P. angustifolium* σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με 2 mg l⁻¹ BA.

3.2 Στάδιο πολλαπλασιασμού



3.2.1 Πρώτη υποκαλλιέργεια

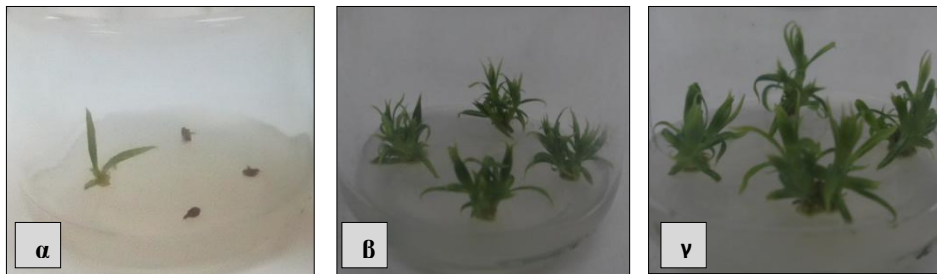
Σύμφωνα με τις μελέτες που έχουν γίνει σε διαφορετικά είδη *Pittosporum* το υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με BA ή την ισοδύναμή της BAP (da Silva, 2012) έχει αποδειχθεί το καταλληλότερο θρεπτικό υπόστρωμα για τον μικροπολλαπλασιασμό του γένους *Pittosporum* (Panwar *et al.*, 2016, Bince, 2015, Dhar *et al.*, 2000). Στην πρώτη υποκαλλιέργεια έκφυτα τριών κόμβων υποκαλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο ή όχι με διαφορετικές συγκεντρώσεις BA. Η υποκαλλιέργεια αυτή έγινε με στόχο αφενός τον πολλαπλασιασμό των βλαστών για τη συνέχιση του πειράματος και αφετέρου την μελέτη της επίδρασης του BA στο σχηματισμό βλαστών, στο μήκος και τον αριθμό των κόμβων ανά βλαστό του είδους *P. angustifolium*. Το ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν βλαστούς επηρεάστηκε από την πρόσθήκη BA στο θρεπτικό υπόστρωμα και κυμάνθηκε μεταξύ 77-80% παρουσία BA ενώ όταν το BA απουσίαζε από το υπόστρωμα (μάρτυρας) το ποσοστό βλαστογένεσης ήταν χαμηλό (30%) (Πίν. 7). Στο μάρτυρα ουσιαστικά δεν παρατηρήθηκε βλαστογένεση αλλά έκπτυξη φύλλων (Εικ. 29α). Το BA επέδρασε σημαντικά σε όλα τα χαρακτηριστικά μελέτης (Πίν. 7), αυξάνοντας τον αριθμό, το μήκος των βλαστών και τον αριθμό των κόμβων ανά βλαστό (Πίν. 7, Εικ. 29). Στις 2 επεμβάσεις με BA δεν παρατηρήθηκε σημαντική διαφορά σε κανένα από τα μελετηθέντα χαρακτηριστικά (Πίν. 7, Εικ. 29). Ακόμη, έγινε υποκαλλιέργεια και των βλαστών που προήλθαν από έκφυτα κορυφής βλαστού μητρικού φυτού. Όλα τα έκφυτα αντέδρασαν στη συγκέντρωση του 1 mg l^{-1} δίνοντας 3 βλαστούς, μέσου μήκους 2,3 cm και μέσου αριθμού κόμβων 11,5. Στη συγκέντρωση των 2 mg l^{-1} αντέδρασαν τα 7 από τα 8 έκφυτα δίνοντας 3,4 βλαστούς, μέσου μήκους 1,74 cm και μέσου αριθμού κόμβων 12,5. Όμως ο αριθμός των επαναλήψεων ανά επέμβαση ήταν μικρός ($n=8$) και τα αποτελέσματα μπορούν να αποτελέσουν μόνο μια ένδειξη. Το φυτικό υλικό αυτό χρησιμοποιήθηκε για πείραμα στη δεύτερη υποκαλλιέργεια. Τέλος, παρατηρήθηκε και εδώ όπως και κατά την αρχική εγκατάσταση η τάση ορισμένων κόμβων των μικροβλαστών να εκπτύσσονται, χαρακτηριστικό που μετρήθηκε αναλυτικά στη συνέχεια του πειράματος. Η διάρκεια επώασης σε αυτή την υποκαλλιέργεια ήταν 35 ημέρες.

Πίνακας 7. Επίδραση της BA στο σχηματισμό βλαστών από εκφύτα τριών κόμβων του *P. angustifolium* κατά την $1^{\text{η}}$ υποκαλλιέργεια του είδους.

Συγκέντρωση BA (mg l^{-1})	Βλαστογένεση (%)	Μέσος αριθμός βλαστών	Μέσο μήκος βλαστών	Μέσος αριθμός κόμβων
0	30	1,00b	0,31b	2,00b
1,0	80	2,87a	1,37a	7,74a
2,0	77	2,70a	1,47a	7,43a
F _{one-way ANOVA}		***	***	***

Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο LSD, $P \leq 0,05$, $n=56$

*** : Σημαντικό σε επίπεδο , $P \leq 0,001$



Εικόνα 29. Αντίδραση εκφύτων 3 κόμβων κατά την πρώτη υποκαλλιέργεια του είδους *P. angustifolium* σε υπόστρωμα MS (α) χωρίς φυτορρυθμιστική ουσία (control) ή εμπλουτισμένο με (β) 1 mg l^{-1} BA ή (γ) 2 mg l^{-1} BA μετά από 35 ημέρες επώασης.

3.2.2 Δεύτερη Υποκαλλιέργεια

3.2.2.1 Διερεύνηση της επίδρασης της θέσης του εκφύτου στο μητρικό φυτό, στην βλαστογένεση κατά την υποκαλλιέργεια

Μελετήθηκε η επίδραση της θέσης του εκφύτου στο μητρικό φυτό στη βλαστογένεση κατά την υποκαλλιέργεια. Πιο συγκεκριμένα έγινε σύγκριση της αντίδρασης εκφύτων τριών κόμβων που προήλθαν από κορυφή βλαστού της νεαρής βλάστησης του μητρικού φυτού με την αντίδραση εκφύτων τριών κόμβων που προήλθαν από κόμβους της νεαρής βλάστησης του μητρικού φυτού. Δεδομένου ότι οι διαφορετικές συγκεντρώσεις BA δεν επηρέασαν σημαντικά τα υπό μελέτη χαρακτηριστικά στην πρώτη υποκαλλιέργεια η επώαση των εκφύτων έγινε σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με 1 mg l^{-1} BA. Η επώαση διήρκεσε 40 ημέρες σε αντίθεση με την πρώτη υποκαλλιέργεια που διήρκεσε 35 ημέρες.

Το ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν βλαστούς δεν επηρεάστηκε από τη θέση στο μητρικό φυτό και ήταν 83-85% (Πίν. 8). Η θέση στο μητρικό φυτό επηρέασε σημαντικά το μήκος των βλαστών και τον μέσο αριθμό των κόμβων ανά βλαστό με τα έκφυτα που προήλθαν από κορυφή μητρικού φυτού να δίνουν πιο μακρείς βλαστούς 1^{ης} τάξης και με περισσότερους κόμβους (Πίν. 8, Εικ. 30). Όμως ο αριθμός των παραγόμενων βλαστών δεν διέφερε σημαντικά (Πίν. 8, Εικ. 30).

Πίνακας 8. Επίδραση της θέσης του εκφύτου στο μητρικό φυτό, στην παραγωγή βλαστών 1^{ης} τάξης κατά την υποκαλλιέργεια του είδους *P. angustifolium*.

Θέση στο μητρικό φυτό	Βλαστογένεση (%)	Μέσος αριθμός βλαστών 1 ^{ης} τάξης	Μέσο μήκος βλαστών	Μέσος αριθμός κόμβων
Κόμβοι	85	3,0a	1,82b	10,39b
Κορυφή	83	3,12a	2,83a	17,71a
F_{one-way ANOVA}		NS	***	***

Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο LSD, $P \leq 0,05$, $n=60-180$

***: Σημαντικό σε επίπεδο $P \leq 0,001$

NS: Μη σημαντικό σε επίπεδο $P \leq 0,05$

Τα έκφυτα που προήλθαν από κορυφή νεαρής βλάστησης του μητρικού φυτού έδωσαν σε μικρότερο ποσοστό βλαστούς 1^{ης} τάξης με εκπτυγμένους κόμβους (Πιν. 9). Η θέση στο μητρικό φυτό δεν επέδρασε σημαντικά ούτε τον αριθμό των κόμβων που εκπτύχθηκαν αλλά ούτε και το μήκος τους (Πίν. 9). Βέβαια το ποσοστό των εκφύτων που έδωσαν εκπτυγμένους κόμβους ήταν χαμηλό ανεξαρτήτως της θέσης στο μητρικό φυτό. Τέλος, η θέση στο μητρικό φυτό δεν επηρέασε το ποσοστό των εκφύτων που έδωσαν βλαστούς 2^{ης} τάξης κατά την υποκαλλιέργεια και τα έκφυτα που έδωσαν βλαστούς 2ης τάξης ήταν πολύ λίγα ανεξαρτήτως της θέσης στο μητρικό φυτό (Πιν. 10). Η θέση στο μητρικό φυτό δεν επηρέασε σημαντικά, ούτε τον αριθμό αλλά ούτε και το μήκος και τον αριθμό των κόμβων των βλαστών 2^{ης} τάξης (Πιν. 10).

Πίνακας 9. Επίδραση της θέσης του εκφύτου στο μητρικό φυτό, στην έκπτυξη κόμβων επί των βλαστών 1^{ης} τάξης κατά την υποκαλλιέργεια του είδους *P. angustifolium*.

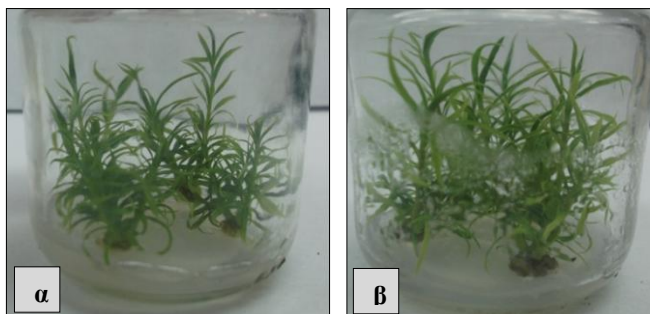
Θέση στο μητρικό φυτό	Ποσοστό (%) εκφύτων που έδωσαν εκπτυγμένους κόμβους	Μ. αριθμός εκπτυγμένων κόμβων/ έκφυτο	Μ. μήκος εκπτυγμένων κόμβων
Κόμβοι	35	3,8a	0,26a
Κορυφή	9	2,25a	0,2a
F_{one-way} ANOVA		NS	NS

Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο LSD, $P \leq 0,05$
NS: Μη σημαντικό σε επίπεδο $P \leq 0,05$

Πίνακας 10. Επίδραση της θέσης του εκφύτου στο μητρικό φυτό, στην παραγωγή βλαστών 2^{ης} τάξης κατά την υποκαλλιέργεια του είδους *P. angustifolium*.

Θέση στο μητρικό φυτό	Ποσοστό εκφύτων (%) που έδωσαν πλάγιους βλαστούς	Μ. αριθμός βλαστών 2 ^{ης} τάξης / έκφυτο	Μ. μήκος πλαγίων	Μ. αριθμός κόμβων πλαγίων
Κόμβοι	3	2,75a	1,89a	9,83a
Κορυφή	7	1,0a	2,2a	11,33a
F_{one-way} ANOVA	NS	NS	NS	NS

Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο LSD, $P \leq 0,05$.
NS: Μη σημαντικό σε επίπεδο $P \leq 0,05$



Εικόνα 30. Αντίδραση κατά την υποκαλλιέργεια σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με 1 mg l^{-1} εκφύτων τριών κόμβων που προήλθαν (α) από κόμβους και (β) από κορυφή μητρικού βλαστού.

3.2.2.2 Επίδραση του είδους του εκφύτου στη βλαστογένεση κατά την υποκαλλιέργεια

Λόγω της τάσης των βλαστών να εκπτύσσουν ορισμένους από τους κόμβους τους γεννήθηκε το ερώτημα κατά πόσο οι εκπτυγμένοι αυτοί κόμβοι μπορούν να

αποτελεσουν έκφυτα για πολλαπλασιασμό βλαστών κατά την υποκαλλιέργεια του είδους. Πραγματοποιήθηκε σύγκριση της αντίδρασης των εκπτυγμένων κόμβων με έκφυτα κορυφής βλαστού που περιείχαν και το κορυφαίο μερίστωμα και με έκφυτα τριών κόμβων. Το ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν βλαστούς επηρεάστηκε από το είδος του εκφύτου με το ποσοστό βλαστογένεσης για τα έκφυτα κορυφής βλαστού και εκπτυγμένων κόμβων να είναι απόλυτο (100%) (Πίν. 11) ενώ για τα έκφυτα κόμβων 85%. Τα έκφυτα κορυφής βλαστού έδωσαν λιγότερους βλαστούς 1^{ης} τάξης ανά έκφυτο από τα έκφυτα εκπτυγμένου κόμβου και τριών κόμβων λόγω κυριαρχίας της κορυφής (Πιν. 11). Η πλειοψηφία των εκφύτων κορυφής βλαστού έδωσαν έναν βλαστό 1^{ης} τάξης ανά έκφυτο (Εικ. 31γ), όμως υπηρχαν έκφυτα που έδωσαν 2-9 βλαστούς (Εικ. 31δ). Το είδος του εκφύτου επέδρασε σημαντικά στο μέσο μήκος των βλαστών 1^{ης} τάξης και στον μέσο αριθμό των κόμβων ανά βλαστό, όπου τα έκφυτα κορυφής υπερίσχυσαν των δύο άλλων ειδών εκφύτου (Πιν. 11) (Εικ. 31).

Πίνακας 11. Επίδραση του είδους του εκφύτου στην παραγωγή βλαστών 1^{ης} τάξης κατά την υποκαλλιέργεια του είδους *Pittosporum angustifolium*.

Είδος Εκφύτου	Βλαστογένεση (%)	Μέσος αριθμός βλαστών 1 ^{ης} τάξης	Μέσο μήκος βλαστών	Μέσος αριθμός κόμβων
Έκφυτα κόμβων	85	3,00a	1,82c	10,39c
Έκφυτα εκπτυγμένων κόμβων	100	2,95a	2,9b	15,50b
Έκφυτα βλαστικής κορυφής	100	2,35b	3,57a	20,93a
F _{one-way ANOVA}		**	***	***

Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μεθοδο LSD, $P \leq 0,05$, $n=100-180$

***: Σημαντικό σε επίπεδο $P \leq 0,001$

** : Σημαντικό σε επίπεδο $P \leq 0,01$

Τα έκφυτα κορυφής βλαστού έδωσαν σε μικρότερο ποσοστό βλαστούς 1^{ης} τάξης με εκπτυγμένους κόμβους συγκριτικά με τα άλλα δύο είδη εκφύτων (Πιν. 12). Το είδος του εκφύτου δεν επέδρασε σημαντικά στον μέσο αριθμό των εκπτυγμένων κόμβων όμως σημαντική ήταν η επίδραση στο μέσο μήκος των εκπτυγμένων

κόμβων όπου τα έκφυτα εκπτυγμένου κόμβου και τα έκφυτα τριών κόμβων υπερίσχυσαν των εκφύτων κορυφής βλαστού.

Πίνακας 12. Επίδραση είδους εκφύτου στην έκπτυξη κόμβων επί των βλαστών 1^{ης} τάξης κατά την δεύτερη υποκαλλιέργεια του είδους.

Είδος Εκφύτου	Ποσοστό εκφύτων (%) που έδωσαν εκπτυγμένους κόμβους	Μ. αριθμός εκπτυγμένων κόμβων/ έκφυτο	Μ.μήκος εκπτυγμένων κόμβων
Έκφυτα κόμβων	35	3,80a	0,26a
Έκφυτα εκπτυγμένων κόμβων	36	4,53a	0,29a
Έκφυτα βλαστικής κορυφής	9	4,90a	0,1b
F _{one-way ANOVA}		NS	**

Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο LSD, $P \leq 0,05$

NS: Μη σημαντικό σε επίπεδο $P \leq 0,05$

** : Σημαντικό σε επίπεδο $P \leq 0,01$

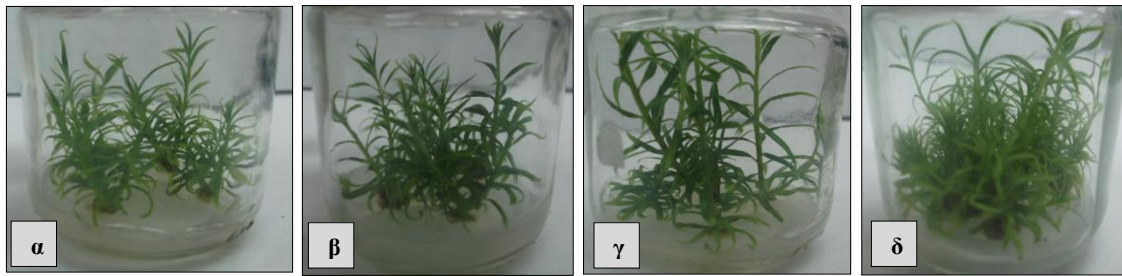
Τέλος, τα έκφυτα εκπτυγμένου κόμβου έδωσαν σε υψηλότερο ποσοστό βλαστούς 2^{ης} τάξης (Πιν. 13). Το είδος του εκφύτου όμως δεν επέδρασε σημαντικά στον αριθμό των βλαστών 2^{ης} τάξης καθώς ούτε και στο μήκος και στον αριθμό των κόμβων τους (Πίν. 13).

Πίνακας 13. Επίδραση του είδους του εκφύτου στην παραγωγή βλαστών 2^{ης} τάξης κατά την 2^η υποκαλλιέργεια του είδους.

Είδος εκφύτου	Ποσοστό εκφύτων (%) που έδωσαν πλάγιους βλαστούς	Μ. αριθμός βλαστών 2 ^{ης} τάξης	Μ. μήκος βλαστών	Μ. αριθμός κόμβων πλαγίων
Έκφυτα κόμβων	3	2,75a	1,89a	9,83a
Έκφυτα εκπτυγμένων κόμβων	37	2,59a	1,37a	7,59a
Έκφυτα βλαστικής κορυφής	3	1,00a	2,0a	12a
F _{one-way ANOVA}		NS	NS	NS

Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο LSD, $P \leq 0,05$

NS: Μη σημαντικό σε επίπεδο $P \leq 0,05$



Εικόνα 31. Αντίδραση εκφύτων (α) τριών κόμβων (β) εκπτυγμένου κόμβου και (γ,δ) κορυφής βλαστού σε υπόστρωμα MS με 1 mg l^{-1} BA κατά την υποκαλλιέργεια του είδους *P. angustifolium*.

3.2.3. Τρίτη υποκαλλιέργεια

Ακολούθησε υποκαλλιέργεια εκφύτων κόμβου αφενός για τον πολλαπλασιασμό του φυτικού υλικού καθώς η πλειοψηφία των βλαστών που παράχθηκαν στην καλλιέργεια που προηγήθηκε προωθήθηκαν για ριζοβολία και αφετέρου για την επιβεβαίωση της αναγκαιότητας προσθήκης BA στο υπόστρωμα MS για παραγωγή βλαστών του είδους. Η BA επέδρασε σημαντικά σε όλα τα υπό μελέτη χαρακτηριστικά, αυξάνοντας τη βλαστογένεση, τον αριθμό των βλαστών, το μέσο μήκος και τον αριθμό των κόμβων ανά βλαστό σε σχέση με τον μάρτυρα (Πιν. 14, Εικ. 32). Το ποσοστό εκφύτων που έδωσαν εκπτυγμένους κόμβους κατά την επώαση σε υπόστρωμα MS με 1 mg l^{-1} ήταν 32% (Πίν. 15) και δεν αυξήθηκε συγκριτικά με την προηγούμενη υποκαλλιέργεια για τα έκφυτα κόμβου, ομοίως αύξηση δεν σημειώθηκε και στο ποσοστό των εκφύτων που έδωσαν πλάγιους βλαστούς το οποίο ήταν χαμηλό (2%) (Πίν. 16).

Πίνακας 14. Επίδραση BA στο σχηματισμό βλαστών 1^{ης} τάξης από έκφυτα ενός κόμβου κατά την τρίτη υποκαλλιέργεια του είδους *P. angustifolium*.

Συγκέντρωση BA (mg l^{-1})	Βλαστογένεση	Μέσος αριθμός βλαστών 1 ^{ης} τάξης/έκφυτο	Μέσο μήκος βλαστών	Μέσος αριθμός κόμβων
0	40%	1,00b	0,23b	2,44b
1,0	70%	1,46a	2,10a	9,40a
F one-way ANOVA		***	***	***

Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο LSD, $P \leq 0,05$ $n=40-140$

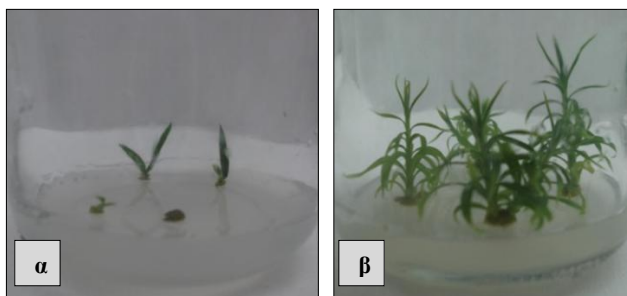
***: Σημαντικό σε επίπεδο $P \leq 0,001$

Πίνακας 15. Επίδραση BA στην έκπτυξη κόμβων επί των βλαστών 1^{ης} τάξης κατά την τρίτη υποκαλλιέργεια του είδους *P. angustifolium*.

Συγκέντρωση BA (mg l ⁻¹)	Ποσοστό (%) εκφύτων που έδωσαν εκπτυγμένους κόμβους	Μ. αριθμός εκπτυγμένων κόμβων/ έκφυτο	Μ.μήκος εκπτυγμένων κόμβων
0	0	-	-
1,0	32	5,40	0,49

Πίνακας 16. Επίδραση BA στην παραγωγή βλαστών 2^{ης} τάξης κατά την τρίτη υποκαλλιέργεια του είδους *P. angustifolium*.

Συγκέντρωση BA (mg l ⁻¹)	Ποσοστό (%) εκφύτων που έδωσαν πλάγιους βλαστούς	Μ. αριθμός βλαστών 2 ^{ης} τάξης/έκφυτο	Μ. μήκος βλαστών 2 ^{ης} τάξης	Μ. αριθμός κόμβων
0	0	-	-	-
1,0	2	3	1,02	5,5



Εικόνα 32. Αντίδραση εκφύτων ενός κόμβου σε υπόστρωμα MS (α) χωρίς φυτορρυθμιστική ουσία ή (β) εμπλουτισμένο με 1 mg l⁻¹ BA (β) κατά την τρίτη υποκαλλιέργεια του είδους.

3.2.4 Τέταρτη υποκαλλιέργεια

Ακολούθησε τέταρτη υποκαλλιέργεια εκφύτων ενός κόμβου του είδους, στην οποία αυξήθηκε η συγκέντρωση της κυτοκινίνης με σκοπό την παραγωγή περισσότερων βλαστών ή/και εκπτυγμένων κόμβων (εν δυνάμει βλαστών 2^{ης} τάξης). Τα ποσοστά βλαστογένεσης κυμάνθηκαν μεταξύ 73% και 79% (Πίν. 17). Η αύξηση της συγκέντρωσης BA στα 4 mg l⁻¹ αύξησε σημαντικά τον αριθμό των βλαστών 1^{ης} τάξης συγκριτικά με τη συγκέντρωση 1 mg l⁻¹ BA, μείωσε όμως σημαντικά το μήκος τους (Πίν. 17, Εικ. 33). Ο μέσος αριθμός των κόμβων των βλαστών 1^{ης} τάξης δεν

διέφερε σημαντικά μεταξύ των δύο συγκεντρώσεων BA. Στους βλαστούς που προήλθαν από υπόστρωμα με 4 mg I⁻¹ BA οι κόμβοι ήταν πολύ κοντά.

Πίνακας 17. Επίδραση της συγκέντρωσης BA στον σχηματισμό βλαστών 1^{ης} τάξης από έκφυτα ενός κόμβου κατά την 4^η υποκαλλιέργεια του είδους *P. angustifolium*.

Συγκέντρωση BA (mg I ⁻¹)	Βλαστογένεση (%)	Μέσος αριθμός βλαστών 1 ^{ης} τάξης	Μέσο μήκος βλαστών	Μέσος αριθμός κόμβων
1,0	73	1,16b	1,87a	6,30a
4,0	79	1,97a	0,88b	7,70a
F _{one-way ANOVA}		**	***	NS

Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο LSD, $P \leq 0,05$, $n=80$

** : Σημαντικό σε επίπεδο $P \leq 0,01$

*** : Σημαντικό σε επίπεδο $P \leq 0,001$

NS: Μη σημαντικό σε επίπεδο $P \leq 0,05$

Τα έκφυτα που επώαστηκαν σε 1 mg I⁻¹ έδωσαν σε υψηλότερο ποσοστό εκπτυγμένους κόμβους επί των βλαστών 1^{ης} τάξης (Πιν. 18). Ο μέσος αριθμός των εκπτυγμένων κόμβων και το μέσο μήκος τους δεν βρέθηκαν να διαφέρουν σημαντικά στις δύο συγκεντρώσεις (Πιν. 18). Το ποσοστό εκφύτων που έδωσαν εκπτυγμένους κόμβους στη συγκέντρωση 1 mg I⁻¹ BA αυξήθηκε συγκριτικά με την προηγούμενη υποκαλλιέργεια (Πίν. 15).

Πίνακας 18. Επίδραση της συγκέντρωσης BA στην έκπτυξη κόμβων επί των βλαστών 1^{ης} τάξης που παράχθηκαν από έκφυτα ενός κόμβου κατά την τέταρτη υποκαλλιέργεια του είδους *P. angustifolium*.

Συγκέντρωση BA (mg I ⁻¹)	Ποσοστό εκφύτων (%) που έδωσαν εκπτυγμένους κόμβους	Μ. αριθμός εκπτυγμένων κόμβων/ έκφυτο	Μ. μήκος εκπτυγμένων κόμβων
1,0	68	3,5a	0,26a
4,0	40	3,77a	0,23a
F _{one-way ANOVA}		NS	NS

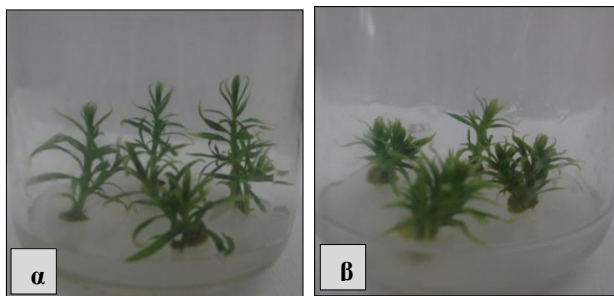
Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο LSD, $P \leq 0,05$

NS: Μη σημαντικό σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$

Μόλις το 4% των εκφύτων που επώαστηκαν σε υπόστρωμα με 1 mg I⁻¹ BA έδωσαν βλαστούς 2^{ης} τάξης (Πιν. 19).

Πίνακας 19. Επίδραση συγκέντρωσης BA στον σχηματισμό βλαστών 2^{ης} τάξης κατά την τέταρτη υποκαλλιέργεια του είδους *P. angustifolium*.

Συγκέντρωση BA (mg l ⁻¹)	Ποσοστό εκφύτων (%) που έδωσαν πλάγιους Βλαστούς	Μ. αριθμός βλαστών 2 ^{ης} τάξης/ έκφυτο	Μ.μήκος Πλαγίων	Μ.αριθμός κόμβων πλάγιων
1,0	4	1	0,7	10
4,0	0	-	-	-

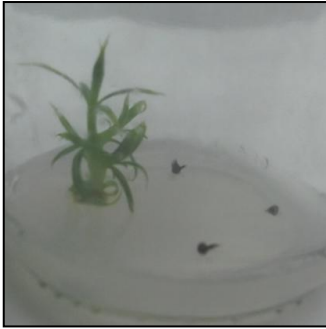


Εικόνα 33. Αντίδραση εκφύτων ενός κόμβου σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με (α) 1 mg l⁻¹ BA και (β) 4 mg l⁻¹ BA κατά την 4^η υποκαλλιέργεια εκφύτων ενός κόμβου.

Ακόμη, κατά τη διάρκεια της μελέτης παρατηρήθηκε ότι μικροβλαστοί από την 2^η υποκαλλιέργεια που παρέμειναν στο βαζάκι καλλιέργειας (συγκέντρωση BA 1,0 mg l⁻¹) συνέχισαν την ανάπτυξη τους, αυξήθηκαν πολύ σε μήκος και άρχισαν να ξυλοποιούνται. Από αυτή την παρατήρηση γεννήθηκαν δύο ερωτήματα πρώτον πώς ακριβώς επηρεάζεται η ανάπτυξη των μικροβλαστών από τη διάρκεια επώασης στο θρεπτικό υπόστρωμα αλλά και αν από ξυλοποιημένους βλαστούς μπορούν να αναγεννηθούν νέοι βλαστοί. Προς απάντηση του δεύτερου ερωτήματος ξυλοποιημένα έκφυτα ενός κόμβου ηλικίας (80 ημερών) υποκαλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS με 1mg l⁻¹ BA (Πιν. 20). Το ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν βλαστούς επηρεάστηκε από την ηλικία του εκφύτου. Τα αποτελέσματα έδειξαν πολύ μικρό ποσοστό βλαστογένεσης για τα ξυλοποιημένα έκφυτα.

Πίνακας 20. Επίδραση της ηλικίας βλαστού στη βλαστογένεση εκφύτων ενός κόμβου του είδους *P. angustifolium* σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με 1mg l⁻¹ BA.

Ηλικία Βλαστού	Βλαστογένεση (%)
40 ημερών	73
80 ημερών	8



Εικόνα 34. Αντίδραση ξυλοποιημένου εκφύτου ενός κόμβου 80 ημερών σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με 1 mg l^{-1} BA.

3.2.5 Πέμπτη Υποκαλλιέργεια

Στην Πέμπτη υποκαλλιέργεια δοκιμάστηκαν διάφορες συγκεντρώσεις BA με σκοπό τον εντοπισμό της βέλτιστης συγκέντρωσης κυτοκινίνης για πολλαπλασιασμό, ενώ μελετήθηκε και η επίδραση της αυξίνης NAA καθώς τα χαμηλά επίπεδα αυξίνης σε συνδυασμό με κυτοκινίνη διεγείρουν τον αριθμό και την επιμήκυνση των βλαστών σε διάφορα είδη δένδρων (Chalupa 1987), ενώ το NAA επέδρασε σημαντικά τόσο στο μήκος όσο και στον πολλαπλασιασμό των βλαστών *P. paraulensis* (Dhar *et al.*, 2000). Οι μετρήσεις λήφθηκαν δύο φορές (40 και 50 ημέρες επώασης) έτσι ώστε να εκτιμηθεί η επίδραση της διάρκειας επώασης στο θρεπτικό υπόστρωμα στην ανάπτυξη των μικροβλαστών. Προκειμένου να ελεγχθεί η επίδραση των παραγόντων (συγκέντρωση BA και συγκέντρωση NAA) στις διαμορφούμενες τιμές των μελετηθέντων χαρακτηριστικών πραγματοποιήθηκε tow-way ANOVA.

Η βλαστογένεση (%) των βλαστών $1^{ης}$ τάξης δεν άλλαξε από τη μία μέτρηση στην άλλη. Το ποσοστό βλαστογένεσης ήταν υψηλότερο στη συγκέντρωση $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ ενώ η προσθήκη NAA μείωσε το ποσοστό βλαστογένεσης. Η αύξηση της συγκέντρωσης BA και στις δύο καταγραφές δεδομένων αύξησε τον αριθμό των παραγόμενων ανά έκφυτο βλαστών $1^{ης}$ τάξης (Πίν. 21). Σύμφωνα με την πρώτη μέτρηση η προσθήκη NAA αύξησε το μέσο αριθμό βλαστών $1^{ης}$ τάξης ενώ κατά τη δεύτερη μέτρηση δεν επέδρασε σημαντικά σε αυτό το χαρακτηριστικό. Μεγαλύτερη παραγωγή βλαστών $1^{ης}$ τάξης υπήρξε και στις δύο καταγραφές δεδομένων στις επεμβάσεις με $2,0 \text{ mg l}^{-1}$ BA και $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ NAA και σε αυτές με $4,0 \text{ mg l}^{-1}$ BA με ή χωρίς NAA (Πίν. 21, Εικ. 35).

Σε ό, τι αφορά το μήκος των βλαστών 1^{ης} τάξης κατά την πρώτη μέτρηση επέδρασε σημαντικά μόνο η συγκέντρωση BA (Πίν. 21) όπου το μήκος των βλαστών αυξήθηκε αντιστρόφως ανάλογα της συγκέντρωσης της ενώ κατά τη δεύτερη μέτρηση βρέθηκε αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων (συγκέντρωση BA και NAA) (Πίν. 21). Τα μεγαλύτερα μήκη βλαστών 1^{ης} τάξης σημειώθηκαν κατά την πρώτη καταγραφή στη συγκέντρωση 1,0 mg l⁻¹ BA με 0,1 mg l⁻¹ NAA και κατά τη δεύτερη καταγραφή στην προαναφερθείσα επέμβαση και στην επέμβαση με 2,0 mg l⁻¹ BA χωρίς NAA (Πίν. 21).

Σύμφωνα και με τις δύο καταγραφές η προσθήκη 0,1 mg l⁻¹ NAA αύξησε τον αριθμό των κόμβων ανά βλαστό και στις δύο μετρήσεις (Πίν. 21), ενώ η αύξηση της συγκέντρωσης BA μείωσε τον αριθμό τους (Πίν. 21). Κατά την πρώτη μέτρηση περισσότερους κόμβους ανά βλαστό 1^{ης} τάξης είχαν οι βλαστοί από τη συγκέντρωση του 1,0 mg l⁻¹ σε συνδυασμό με 0,1 mg l⁻¹ NAA ενώ κατά τη δεύτερη μέτρηση οι βλαστοί 1^{ης} τάξης που προήλθαν από την προαναφερθείσα επέμβαση αλλά και από τις επεμβάσεις με 2,0 mg l⁻¹ BA με ή χωρίς NAA (Πίν. 21). Η αύξηση της διάρκειας επώασης αύξησε το μήκος των βλαστών 1^{ης} τάξης (Πίν. 21, Εικ.35).

Πίνακας 21. Επίδραση συγκέντρωσης BA και NAA στο σχηματισμό βλαστών 1^{ης} τάξης κατά την 5^η υποκαλλιέργεια του είδους *P. angustifolium*.

Συγκέντρωση BA (mg l ⁻¹) NAA (mg l ⁻¹)	Βλαστογένεση (%)	Μ. αρ. βλαστών 1 ^{ης} τάξης/έκφυτο		Μ. μήκος βλαστού		Μ. αριθμός κόμβων/βλαστό	
		1 ^η	2 ^η	1 ^η	2 ^η	1 ^η	2 ^η
Μέτρηση		1 ^η	2 ^η	1 ^η	2 ^η	1 ^η	2 ^η
1,0/0	89	1,28b	1,26d	2,18b	2,87bc	11,57b	16,78b
2,0/0	75	1,29b	1,43bcd	1,82c	3,12ab	8,33c	18,23ab
4,0/0	81	1,50ab	1,83ab	1,33e	1,73e	7,72c	11,77c
1,0/0,1	71	1,30b	1,3cd	2,61a	3,56a	14,30a	20,05a
2,0/0,1	68	1,68ab	1,8abc	1,72cd	2,50cd	9,08bc	18,53ab
4,0/0,1	65	1,88a	2,05a	1,40de	2,25d	10,38bc	16,47b
F_[BA]	-	*	**	***	-	***	***
F_[NAA]		*	NS	NS	-	*	***
F_{[BA]*[NAA]}		NS	NS	NS	***	NS	NS
F_{one-way ANOVA}		*	**	***	***	***	***
F_{διάρκειας επώασης}		NS		***		-	
F_{[BA]*διάρκεια επώασης}		NS		NS		**	

Η σύγκριση των μέσων έγινε με Student's t-test, $P \leq 0,05$, $n=36-40$

NS: Μη σημαντικό σε $P \leq 0,05$

*: Σημαντικό σε $P \leq 0,05$

**: Σημαντικό σε επίπεδο $P \leq 0,01$

***: Σημαντικό σε επίπεδο $P \leq 0,001$

Κατά την πρώτη μέτρηση η επέμβαση δεν επέδρασε σημαντικά στην έκπτυξη κόμβων επί των βλαστών 1^{ης} τάξης, όμως κατά τη δεύτερη μέτρηση επέδρασε σημαντικά, και περισσότερα έκφυτα (80%) από την επέμβαση με 2,0 mg l⁻¹ BA σε συνδυασμό με 0,1 mg l⁻¹ NAA έδωσαν βλαστούς 1^{ης} τάξης με εκπτυγμένους κόμβους (Πίν. 22). Κατά την πρώτη μέτρηση η αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο παραγόντων στο αριθμό των εκπτυγμένων κόμβων και στο μήκος στο οποίο αυτοί εκπύχθηκαν ήταν σημαντική (Πίν. 22). Περισσότερους εκπτυγμένους κόμβους έδωσε η επέμβαση με 4,0 mg l⁻¹ χωρίς να διαφέρει σημαντικά με καμία από τις επεμβάσεις πλην αυτής με 1,0 mg l⁻¹ BA χωρίς NAA. Το μήκος των εκπτυγμενων κόμβων ήταν μεγαλύτερο στην επέμβαση με 4,0 mg l⁻¹ (Πίν. 22). Κατά τη δεύτερη καταγραφή δεν υπήρξε διαφορά μεταξύ των επεμβάσεων για αυτά τα δύο χαρακτηριστικά (Πίν.22). Η αύξηση της διάρκειας επώασης μείωσε το μέσο μήκος των εκπτυγμένων κόμβων (Πίν. 22).

Πίνακας 22. Επίδραση της BA και της NAA στην έκπτυξη κόμβων επί των βλαστών 1^{ης} τάξης κατά την 5^η υποκαλλιέργεια του είδους *P. angustifolium*.

Συγκέντρωση BA (mg l ⁻¹)/NAA (mg l ⁻¹)	Ποσοστό εκφύτων (%) που έδωσαν εκπτυγμένους κόμβους		Μ. αρ. εκπτυγμένων κόμβων/έκφυτο		Μ. μήκος εκπτυγμένων κόμβων	
	1 ^η	2 ^η	1 ^η	2 ^η	1 ^η	2 ^η
Μέτρηση						
1,0/0	44	61	3,36b	4,21a	0,27b	0,23a
2,0/0	62	38	4,00ab	4,00a	0,32b	0,23a
4,0/0	69	39	5,66a	4,66a	0,30b	0,27a
1,0/0,1	45	30	5,77ab	5,00a	0,26b	0,25a
2,0/0,1	58	80	5,36ab	4,33a	0,29b	0,21a
4,0/0,1	31	14	3,00ab	3,00a	0,44a	0,16a
F_[BA]			-	NS	-	NS
F_[NAA]			-	NS	-	NS
F_{[BA]*[NAA]}			*	NS	*	NS
F_{one-way ANOVA}			*	NS	*	NS
F_{διάρκειας επώασης}				NS		***
F_{[BA]*διάρκεια επώασης}				NS		NS

Η σύγκριση των μέσων έγινε με Student's t-test, $P \leq 0,05$

*: Σημαντικό σε $P \leq 0,05$, NS: Μη σημαντικό σε $P \leq 0,05$

Η επέμβαση επέδρασε στην παραγωγή βλαστών 2^{ης} τάξης τόσο κατά την πρώτη όσο και κατά τη δεύτερη καταγραφή δεδομένων. Κατά την πρώτη καταγραφή σε μεγαλύτερο ποσοστό έδωσαν βλαστούς 2^{ης} τάξης έκφυτα από την επέμβαση με 4,0 mg l⁻¹ BA σε συνδυασμό με NAA (Πίν. 23) ενώ κατά τη δεύτερη καταγραφή

βλαστούς 2^{ης} τάξης έδωσαν σε μεγαλύτερο ποσοστό έκφυτα από την προαναφερθείσα επέμβαση και από αυτή με 2,0 mg l⁻¹ BA χωρίς NAA. Κατά την πρώτη μέτρηση δεν διέφερε ο αριθμός των βλαστών 2^{ης} τάξης μεταξύ των επεμβάσεων (Πίν. 23). Κατά τη δεύτερη μέτρηση ήταν σημαντική η αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο παραγόντων. Περισσότερους βλαστούς 2^{ης} τάξης σύμφωνα με τη 2^η καταγραφή έδωσαν οι επεμβάσεις με 4,0 mg l⁻¹ BA με ή χωρίς NAA και αυτή με 2,0 mg l⁻¹ BA (Πίν. 23).

Το μήκος των βλαστών 2^{ης} τάξης δεν διέφερε σημαντικά μεταξύ των επεμβάσεων. Στον μέσο αριθμό των κόμβων των βλαστών 2^{ης} τάξης κατά την πρώτη καταγραφή βρέθηκε σημαντική επίδραση της συσγκέντρωσης BA και η προσθήκη 2,0 mg l⁻¹ BA έδωσε βλαστούς 2^{ης} τάξης με λιγότερους κόμβους. Κατά τη δεύτερη καταγραφή ήταν σημαντική η αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο παραγόντων (συσγκέντρωση BA και NAA). Περισσότερους κόμβους είχαν οι βλαστοί 2^{ης} τάξης από την επέμβαση με 4,0 mg l⁻¹ BA και 0,1 mg l⁻¹ NAA χωρίς διαφορά από τις επεμβάσεις με 2,0 mg l⁻¹ και 1,0 mg l⁻¹ BA με ή χωρίς NAA (Πίν. 23). Η διάρκεια επώασης δεν επέδρασε σημαντικά στον αριθμό των βλαστών 2^{ης} τάξης καθώς ούτε στο μήκος και τον αριθμό των κόμβων τους (Πίν. 23).

Πίνακας 23. Επίδραση της BA και της NAA στην παραγωγή βλαστών 2^{ης} τάξης κατά την 5^η υποκαλλιέργεια του είδους *P. agustifolium* (1^η και 2^η μέτρηση).

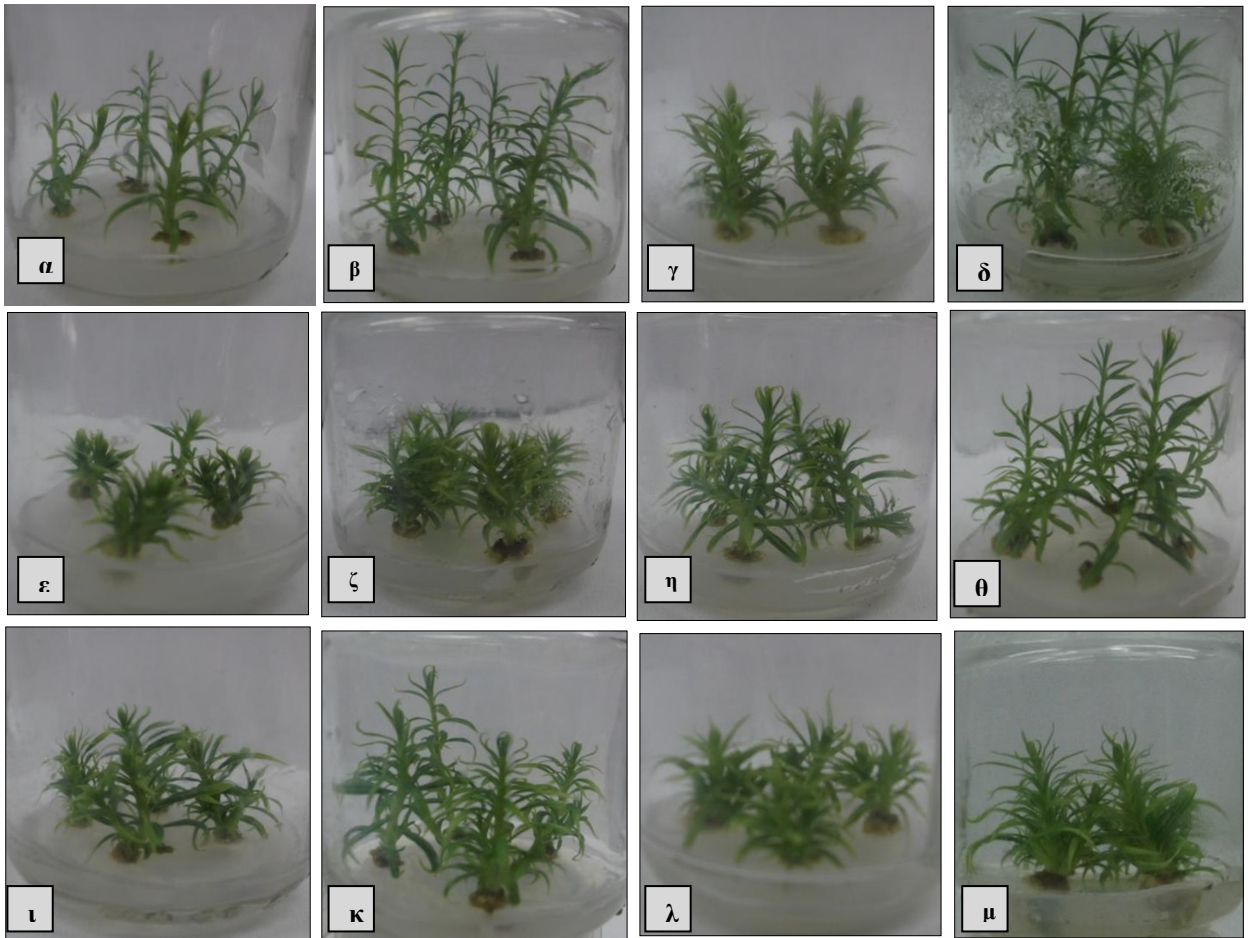
Συσγκέντρωση BA (mg l ⁻¹ ¹)/NAA (mg l ⁻¹ ¹)	Ποσοστό εκφύτων (%) που έδωσαν βλαστούς 2 ^{ης} τάξης		Μ. αρ. βλαστών 2 ^{ης} τάξης/έκφυτο		Μ. μήκος		Μ. αριθμός κόμβων	
	1 ^η	2 ^η	1 ^η	2 ^η	1 ^η	2 ^η	1 ^η	2 ^η
Μέτρηση								
1,0/0	20	35	2,6a	2,13c	2,36a	1,19ab	8,32abc	8,31ab
2,0/0	43	81	4,33a	4,24ab	0,80a	1,16ab	6,55bc	9,28ab
4,0/0	8	70	3,00a	4,5a	0,77a	0,87b	10,33ab	7,46b
1,0/0,1	45	60	2,78a	3,08bc	1,66a	1,37a	9,62a	8,92ab
2,0/0,1	42	53	2,75a	2,7bc	0,83a	1,04a	5,56c	7,69b
4,0/0,1	73	81	3,55a	3,41abc	0,84a	1,31a	7,54abc	11,07a
F_[BA]			NS	-	NS	NS	**	-
F_[NAA]			NS	-	NS	NS	NS	-
F_{[BA]*[NAA]}			NS	*	NS	NS	NS	*
F_{one-way ANOVA}			NS	*	NS	NS	*	*
F_{διάρκειας επώασης}				NS		NS		NS
F_{[BA]*διάρκειας επώασης}				NS		NS		NS

Η σύγκριση των μέσων έγινε με Student's t-test, $P \leq 0,05$

NS: Μη σημαντικό σε $P \leq 0,05$

*: Σημαντικό σε $P \leq 0,05$

** : Σημαντικό σε επίπεδο $P \leq 0,01$



Εικόνα 35. Αντίδραση εκφύτων ενός κόμβου κατά την 5η υποκαλλιέργεια σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με 1 mg l^{-1} (1^η μέτρηση) (α) (2^η μέτρηση) (β), με 2 mg l^{-1} (1^η μέτρηση) (γ) (2^η μέτρηση) (δ), 4 mg l^{-1} (1^η μέτρηση) (ε) (2^η μέτρηση) (ζ), με $1 \text{ mg l}^{-1} / 0,1 \text{ NAA mg l}^{-1}$ (1^η μέτρηση) (η) (2^η μέτρηση) (θ), με $2 \text{ mg l}^{-1} / 0,1 \text{ NAA mg l}^{-1}$ (1^η μέτρηση) (ι) (2^η μέτρηση) (κ), με $4 \text{ mg l}^{-1} / 0,1 \text{ NAA mg l}^{-1}$ (1^η μέτρηση) (λ) (2^η μέτρηση) (μ).

3.2.6 Έκτη Υποκαλλιέργεια

Στην έκτη υποκαλλιέργεια δοκιμάστηκαν διάφορες συγκεντρώσεις BA με σκοπό την επιβεβαίωση της βέλτιστης συγκέντρωσης κυτοκίνης για πολλαπλασιασμό, ενώ μελετήθηκε και η επίδραση της αυξίνης IBA στα μελετηθέντα χαρακτηριστικά και κυρίως στο μήκος των παραγόμενων από την υποκαλλιέργεια βλαστών καθώς σύμφωνα με μελέτη των Thakur *et al.* (2016) το IBA επέδρασε σημαντικά αυξάνοντας το μήκος των βλαστών του *P. eriocarpum*. Οι μετρήσεις λήφθηκαν δύο φορές και σε αυτή την υποκαλλιέργεια. Προκειμένου να ελεγχθεί η επίδραση των παραγόντων (συγκέντρωση BA και συγκέντρωση IBA) στις διαμορφούμενες τιμές των μελετηθέντων χαρακτηριστικών πραγματοποιήθηκε tow-way ANOVA.

Η προσθήκη IBA μείωσε το ποσοστό βλαστογένεσης βλαστών 1^{ης} τάξης το οποίο ήταν το ίδιο και στις δυο μετρήσεις (Πίν. 24). Το υψηλότερο ποσοστό βλαστογένεσης σημειώθηκε στην επέμβαση με 2,0 mg I⁻¹ (Πίν. 24). Τόσο η συγκέντρωση BA όσο και η συγκέντρωση IBA επέδρασαν σημαντικά στον μέσο αριθμό των βλαστών 1^{ης} τάξης και στις δύο καταγραφές δεδομένων. Η συγκέντρωση των 4, 0 mg I⁻¹ αύξησε τον αριθμό των παραγόμενων βλαστών 1^{ης} τάξης συγκριτικά με τις υπόλοιπες (Εικ. 36), ενώ η προσθήκη IBA στο θρεπτικό υπόστρωμα μείωσε τον αριθμό τους. Κατά την πρώτη καταγραφή μεγαλύτερο αριθμός βλαστών 1^{ης} τάξης έδωσε η επέμβαση με 4,0 mg I⁻¹ ενώ κατά τη δεύτερη καταγραφή η προαναφερθείσα συγκέντρωση με ή χωρίς IBA και η συγκέντρωση των 2,0 mg I⁻¹ χωρίς IBA (Πίν. 24). Κατά την πρώτη μέτρηση και οι δύο παράγοντες επέδρασαν σημαντικά στο μέσο μήκος των βλαστών 1^{ης} τάξης (Πίν. 24). Τα υψηλότερα μήκη σημειώθηκαν στις δύο μικρότερες συγκεντρώσεις (0,5 και 1,0 mg I⁻¹) και η προσθήκη IBA αύξησε το μήκος των βλαστών (Εικ. 36). Τα μεγαλύτερα μήκη σημειώθηκαν στις επεμβάσεις με 0,5 και 1,0 mg I⁻¹ BA με 0,1 mg I⁻¹ (Πίν. 24, Εικ. 36). Κατά τη δεύτερη μέτρηση βρέθηκε αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο παραγόντων σε ό,τι αφορά αυτό το χαρακτηριστικό και τα μεγαλύτερα μήκη σημειώθηκαν στα υποστρώματα με 2,0 mg I⁻¹ BA με ή χωρίς IBA χωρίς διαφορά από το υπόστρωμα με 1,0 mg I⁻¹ BA χωρίς IBA (Πίν. 24). Σε ό,τι αφορά τον αριθμό των κόμβων των βλαστών 1^{ης} τάξης βρέθηκε σημαντική αλληλεπίδραση και στις δύο καταγραφές δεδομένων. Κατά την πρώτη καταγραφή περισσότερους κόμβους είχαν οι βλαστοί από τις συγκεντρώσεις 0,5 και 1,0 mg I⁻¹ BA με 0,1 mg I⁻¹ IBA, ενώ κατά τη δεύτερη καταγραφή οι βλαστοί από τα υποστρώματα με 2,0 mg I⁻¹ με ή χωρίς IBA χωρίς διαφορά από το υπόστρωμα με 4,0 mg I⁻¹ BA με 0,1 mg I⁻¹ IBA (Πίν. 24). Η μικρή αριθμητική μείωση στον αριθμό των βλαστών 1^{ης} τάξης από τη μια μέτρηση στην άλλη οφείλεται σε αποκλίσεις κατά την καταγραφή των δεδομένων.

Πίνακας 24. Επίδραση της BA και της IBA στον σχηματισμό βλαστών 1^{ης} τάξης από εκφύτα ενός κόμβου *P. angustifolium* κατά την 6^η υποκαλλιέργεια (πρώτη και δεύτερη μέτρηση).

Συγκέντρωση BA (mg l ⁻¹)/IBA (mg l ⁻¹)	Βλαστογένεση η (%)	Μ. αρ. βλαστών 1 ^{ης} τάξης/έκφυτο		Μ. μήκος βλαστού		Μ. αριθμός κόμβων/βλαστό	
		1 ^η	2 ^η	1 ^η	2 ^η	1 ^η	2 ^η
Μέτρηση	1 ^η /2 ^η	1 ^η	2 ^η	1 ^η	2 ^η	1 ^η	2 ^η
0,5/0	86	1,37bc	1,37bc	2,04c	2,23c	10,36c	11,80f
1,0/0	87	1,44bc	1,40bc	2,35b	5,66a	13,11b	25,80bc
2,0/0	93	1,49b	1,53ab	1,80c	5,74a	9,66c	28,41a
4,0/0	80	2,11a	1,81a	1,30d	4,40b	11,29bc	24,40cd
0,5/0,1	44	1,24bc	1,25bc	3,15a	3,62b	15,66a	18,94e
1,0/0,1	40	1,1c	1,16c	3,05a	3,70b	16,5a	22,5d
2,0/0,1	58	1,29bc	1,34bc	2,56b	6,35a	10,05c	28,20a
4,0/0,1	67	1,45bc	1,55ab	1,75c	4,53b	11,57bc	27,40ab
F_[BA]	-	***	*	***	-	-	-
F_[IBA]	-	***	**	***	-	-	-
F_{[BA]*[IBA]}	-	NS	NS	NS	***	*	***
F_{one-way ANOVA}		***	**	***	***	***	***
F_{διάρκειας επώασης}		NS		-		-	
F_{[BA]*διάρκεια επώασης}		NS		***		***	

Η σύγκριση των μέσων έγινε με Student's t-test, $P \leq 0,05$, $n=44-52$

NS: Μη σημαντικό σε $P \leq 0,05$

*: Σημαντικό σε $P \leq 0,05$

**: Σημαντικό σε επίπεδο $P \leq 0,01$

***: Σημαντικό σε επίπεδο $P \leq 0,001$

Τα ποσοστά των εκφύτων που έδωσαν βλαστούς με εκπτυγμένους κόμβους διέφεραν από επέμβαση σε επέμβαση και στις δύο καταγραφές δεδομένων (Πίν. 25). Το ποσοστό των εκφύτων που έδωσαν εκπτυγμένους κόμβους κατά την 1^η καταγραφή ήταν μεγαλύτερο στην επέμβαση με 2,0 mg l⁻¹ BA σε συνδυασμό με 0,1 mg l⁻¹ IBA ενώ κατά τη δεύτερη καταγραφή ήταν μεγαλύτερο στις επεμβάσεις με 1,0 mg l⁻¹ χωρίς IBA. Στις επεμβάσεις με IBA κατά την πρώτη καταγραφή τα ποσοστά των εκφύτων που έδωσαν εκπτυγμένους κόμβους, ήταν μεγαλύτερα (Πίν. 25). Στον μέσο αριθμό των εκπτυγμένων κόμβων επί των βλαστών 1^{ης} τάξης κατά την 1^η καταγραφή επέδρασε μόνο η συγκέντρωση του BA. Η προσθήκη 2,0 mg l⁻¹ BA αύξησε τον αριθμό των εκπτυγμένων κόμβων. Κατά την πρώτη καταγραφή περισσότεροι κόμβοι εκπύχθηκαν σε βλαστούς από τις επεμβάσεις με 2,0 mg l⁻¹ BA με ή χωρίς IBA, σε αυτή με 1,0 mg l⁻¹ BA και 0,1 mg l⁻¹ IBA και σε αυτή με 4,0 mg l⁻¹ χωρίς IBA και μεγαλύτερο μήκος εκπτυγμένων κόμβων σημειώθηκε στην επέμβαση με 4,0 mg l⁻¹ BA χωρίς IBA (Πίν. 25).

Πίνακας 25. Επίδραση της BA και της IBA στην έκπτυξη κόμβων επί των βλαστών 1^{ης} τάξης που παράχθηκαν από έκφυτα ενός κόμβου κατά την 6^η υποκαλλιέργεια του είδους *P. angustifolium* (1^η και 2^η μέτρηση).

Συγκέντρωση BA (mg l ⁻¹)/IBA (mg l ⁻¹) ¹	Ποσοστό (%) εκφύτων που έδωσαν εκπτυγμένους κόμβους		Μ. αρ. εκπτυγμένων κόμβων/έκφυτο		Μ. μήκος εκπτυγμένων κόμβων	
	1 ^η	2 ^η	1 ^η	2 ^η	1 ^η	2 ^η
Μέτρηση	1 ^η	2 ^η	1 ^η	2 ^η	1 ^η	2 ^η
0,5/0	5	8	2,00c	2,33b	0,15bc	0,15bc
1,0/0	47	51	3,71ac	4,60a	0,24b	0,21b
2,0/0	83	40	4,88a	3,25b	0,27b	0,26ab
4,0/0	63	8	3,93abc	2,66ab	0,46a	0,37a
0,5/0,1	38	30	3,00c	3,83ab	0,11c	0,10c
1,0/0,1	48	21	3,50abc	2,60b	0,22bc	0,36a
2,0/0,1	95	10	4,90ab	2,33b	0,30b	0,30ab
4,0/0,1	52	0	3,44c	-	0,31b	-
F_[BA]			**	*	-	*
F_[IBA]			NS	-	-	-
F_{[BA]*[IBA]}			NS	-	*	-
F_{one-wayANOVA}			*	*	***	**
F_{διάρκειας επώασης}				-		NS
F_{[BA]*διάρκεια επώασης}				**		NS

Η σύγκριση των μέσων έγινε με Student's t-test, $P \leq 0,05$

NS: Μη σημαντικό σε $P \leq 0,05$

*: Σημαντικό σε $P \leq 0,05$

***: Σημαντικό σε επίπεδο $P \leq 0,01$

Το ποσοστό των εκφύτων που έδωσαν βλαστούς 2^{ης} τάξης, κατά την πρώτη μέτρηση ήταν μεγαλύτερο στις επεμβάσεις με 2,0 ή 4,0 mg l⁻¹ BA με 0,1 mg l⁻¹ IBA (Πίν. 26) ενώ κατά την 2^η καταγραφή τα ποσοστά ήταν υψηλά στις επεμβάσεις με 2,0 ή 4,0 BA με ή χωρίς IBA με μεγαλύτερο το ποσοστό για την επέμβαση με 4,0 mg l⁻¹ BA χωρίς IBA (Πίν. 26). Στο μέσο αριθμό βλαστών 2^{ης} τάξης επεδράσε σημαντικά η συγκέντρωση BA και αυτό κατά η δεύτερη καταγραφή δεδομένων (Πίν. 26). Περισσότερους βλαστούς 2^{ης} τάξης έδωσαν τα έκφυτα που επώαστηκαν σε υπόστρωμα εμπλουτισμένο με 2,0 ή 4,0 mg l⁻¹ BA (Πίν. 26, Εικ. 36). Κατά τη δεύτερη καταγραφή η συγκέντρωση BA επεδράσε στον αριθμό των κόμβων των βλαστών 2^{ης} τάξης (Πίν 26). Η συγκέντρωση των 4,0 mg l⁻¹ BA αύξησε τον αριθμό των κόμβων στους βλαστούς 2^{ης} τάξης. Με την αύξηση της διάρκειας επώασης αυξήθηκε και ο αριθμός των βλαστών 2^{ης} τάξης, το μήκος καθώς και ο αριθμός των κόμβων τους (Πίν. 26, Εικ. 36).

Πίνακας 26. Επίδραση της BA και της IBA στην παραγωγή βλαστών 2^{ης} τάξης από έκφυτα ενός κόμβου κατά την 6^η υποκαλλιέργεια του είδους *P. angustifolium* (1^η και 2^η μέτρηση).

Συγκέντρωση BA (mg l ⁻¹)/IBA (mg l ⁻¹)	Ποσοστό (%) εκφύτων που έδωσαν βλαστούς 2 ^{ης} τάξης		Μ. αρ. βλαστών 2 ^{ης} τάξης/έκφυτο		Μ. μήκος βλαστών 2 ^{ης} τάξης		Μ. αριθμός κόμβων βλαστών 2 ^{ης} τάξης	
	1 ^η	2 ^η	1 ^η	2 ^η	1 ^η	2 ^η	1 ^η	2 ^η
Μέτρηση	1 ^η	2 ^η	1 ^η	2 ^η	1 ^η	2 ^η	1 ^η	2 ^η
0,5/0	0	-	-	-	-	-	-	-
1,0/0	7	13	1,00b	1,33d	1,20a	2,48a	8,67a	15,42ab
2,0/0	29	73	1,42ab	3,83ab	1,34a	2,02a	9,42a	14,60ab
4,0/0	15	81	1,60ab	4,73a	0,96a	1,98a	8,20a	16,53a
0,5/0,1	0	-	-	-	-	-	-	-
1,0/0,1	10	11	1,00ab	1,00cd	1,65a	1,75a	10,5a	11,00ab
2,0/0,1	38	76	2,00a	3,41bc	1,40a	2,04a	8,00a	11,40b
4,0/0,1	39	71	1,66ab	3,40bc	1,33a	2,43a	9,36a	17,45a
F_[BA]			NS	**	NS	NS	NS	**
F_[IBA]			NS	NS	NS	NS	NS	NS
F_[BA*IBA]			NS	NS	NS	NS	NS	NS
F_{one-wayANOVA}			NS	***	NS	NS	NS	*
F_{διάρκειας επώασης}				***		***		***
F_{[BA]*διάρκεια επώασης}				NS		NS		NS

Η σύγκριση των μέσων έγινε με Student's t-test, P≤0,05

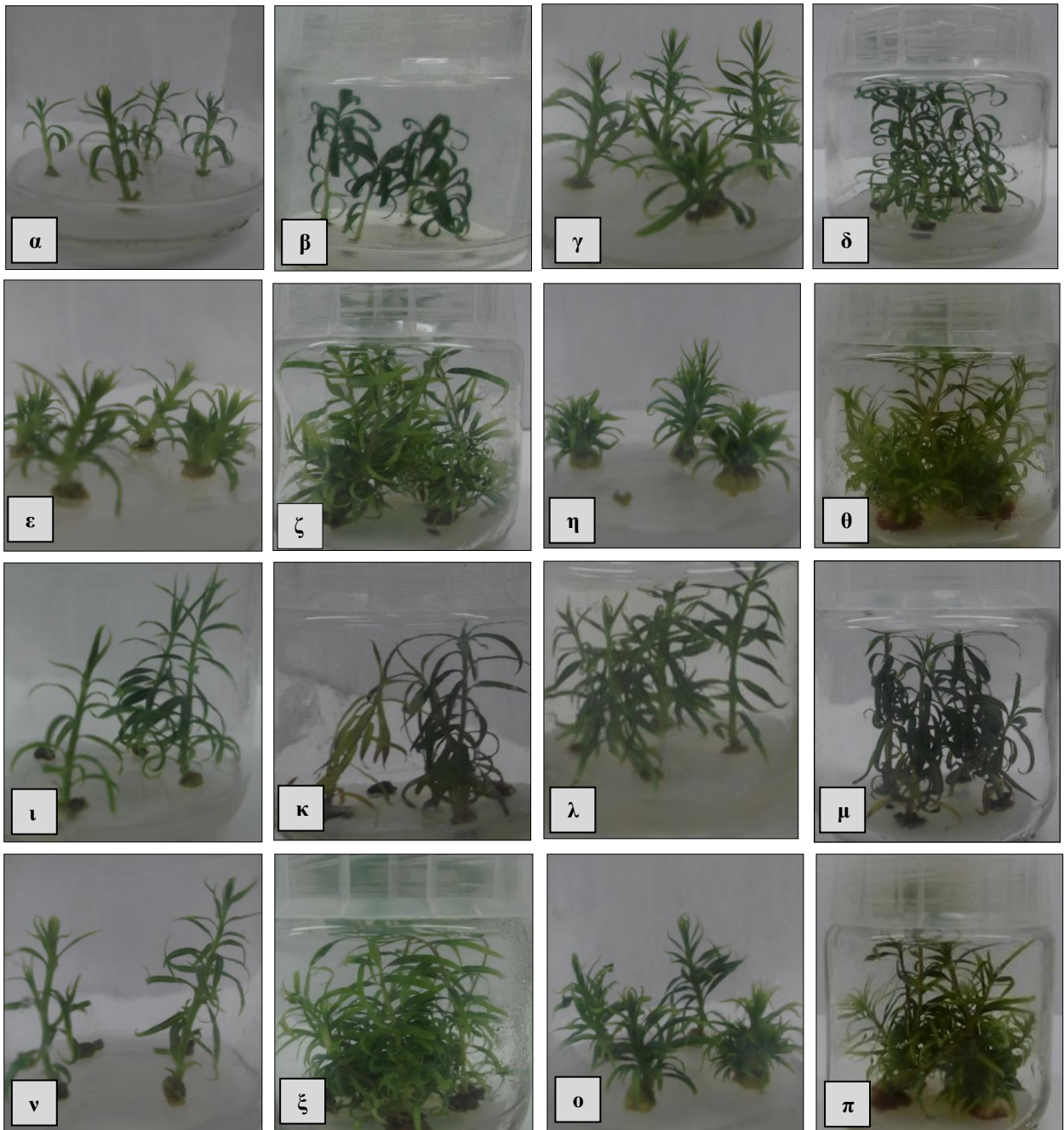
NS: Μη σημαντικό σε P≤0,05

***:Σημαντικό σε επίπεδο P≤0,01

Κατά τη δεύτερη καταγραφή δεδομένων έγινε η εξής παρατήρηση: Οι βλαστοί που επωάζονταν σε υποστρώματα εμπλουτισμένα με χαμηλές συγκεντρώσεις BA (0,5 και 1,0 mg l⁻¹) και με IBA (0,1 mg l⁻¹) υπέστησαν καταστροφές σε μεγάλο ποσοστό (Πίν. 27 Εικ. 36) εν αντιθέσει με τους βλαστούς που επωάζονταν σε υποστρώματα υψηλών συγκεντρώσεων (2,0 και 4,0 mg l⁻¹) με ή χωρίς IBA οποίοι εμφάνισαν σε μηδενικό ή πολύ μικρό ποσοστό καταστροφή (Πίν. 27, Εικ. 36) ή σε αυτούς που επωάζονταν σε υποστρώματα με χαμηλές συγκεντρώσεις κυτοκινίνης οι οποίοι εμφάνισαν μόνο μια συστροφή στα φύλλα χωρίς όμως ξηράνσεις ή αλλαγή στο χρώμα τους (Εικ. 36).

Πίνακας 27. Επίδραση υποστρώματος ανάπτυξης στην καταστροφή των μικροβλαστών.

Συγκέντρωση BA(mg l ⁻¹)/IBA (mg l ⁻¹)	0,5/0	1,0/0	2,0/0	4,0/0	0,5/0,1	1,0/0,1	2,0/0,1	4,0/0,1
Ποσοστό(%) βλαστών που καταστράφηκαν	0	0	0	0	90	74	3,5	0



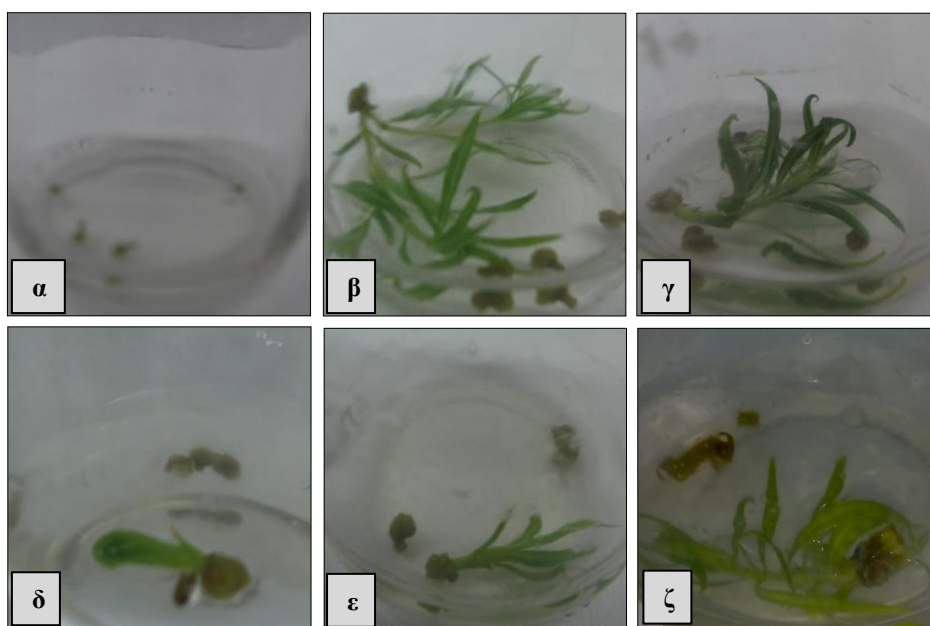
Εικόνα 36. Μικροβλαστοί που παράχθηκαν κατά την 6η υποκαλλιέργεια εκφύτων κόμβου σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ (1^η μέτρηση) (α) (2^η μέτρηση) (β), με 1 mg l^{-1} (1^η μέτρηση) (γ) (2^η μέτρηση) (δ), 2 mg l^{-1} (1^η μέτρηση) (ε) (2^η μέτρηση) (ζ), με 4 mg l^{-1} (1^η μέτρηση) (η) (2^η μέτρηση) (θ), με $0,5 \text{ mg l}^{-1} / 0,1 \text{ IBA mg l}^{-1}$ (1^η μέτρηση) (ι) (2^η μέτρηση) (κ), με $1 \text{ mg l}^{-1} / 0,1 \text{ IBA mg l}^{-1}$ (1^η μέτρηση) (λ) (2^η μέτρηση) (μ), με $2 \text{ mg l}^{-1} / 0,1 \text{ IBA mg l}^{-1}$ (1^η μέτρηση) (ν) (2^η μέτρηση) (ξ), με $4 \text{ mg l}^{-1} / 0,1 \text{ IBA mg l}^{-1}$ (1^η μέτρηση) (ο) (2^η μέτρηση) (π).

Ακόμη, λαμβάνοντας υπ' όψιν ότι η καλλιέργεια σε υγρό υπόστρωμα οδηγεί σε χαλιναγώγηση της κυριαρχίας της κορυφής και σε παραγωγή πολυάριθμων πλάγιων βλαστών για διάφορα ξυλωδη είδη όπως η ιτιά *Salix viminalis* (Vidal *et al.*,

2013) διερευνήθηκε η επίδραση του υγρού υποστρώματος στον μικροπολλαπλασιασμό του είδους ωστόσο τα αποτελέσματα έδειξαν πολύ χαμηλή ή μηδενική βλαστογένεση σε όλες τις επεμβάσεις. Υπερενυδάτωση στους παραγόμενους βλαστούς εμφανίστηκε μόνο στις επεμβάσεις με 2,0 mg l⁻¹ BA και σε αυτή με 1,0 mg l⁻¹ BA με 0,1 mg l⁻¹ IBA (Εικ. 37), όμως το ποσοστό βλαστογένεσης ήταν πολύ μικρό για να μπορεί να είναι ασφαλές το συμπέρασμα. Στις υπόλοιπες επεμβάσεις που υπήρξε βλαστογένεση δεν εμφανίστηκε το φαινόμενο της υπερενυδάτωσης (Πίν. 28).

Πίνακας 28. Επίδραση του υγρού υποστρώματος στη βλαστογένεση εκφύτων ενός κόμβου κατά την 6^η υποκαλλιέργεια του είδους (n=28).

Υπόστρωμα /συγκέντρωση BA (mg l ⁻¹)/IBA (mg l ⁻¹)	Βλαστογένεση (%)	Μ. αρ. Βλαστών/έκφυτο	Μ. μήκος βλαστού	Μ. αριθμός κόμβων/βλαστό	Υπερενυδάτωση (%)
MS/0/0	0%	-	-	-	-
MS/0,5/0	9%	1,20	2,44	8,60	0
MS/1/0	5%	1,00	3,40	14,00	0
MS/2/0	4%	1,00	1,15	3,50	100
MS/4/0	0%	-	-	-	-
MS/0,5/0,1	0%	-	-	-	-
MS/1/0,1	5%	1,00	1,43	5,00	67
MS/2/0,1	0%	-	-	-	-
MS/4/0,1	2%	1,00	3,00	20	0



Εικόνα 37. Αντίδραση εκφύτων ενός κόμβου σε υγρό υπόστρωμα MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες (α) ή εμπλουτισμένο με 0,5 mg l⁻¹ BA(β) με 1,0 mg l⁻¹ BA(γ) 2,0 mg l⁻¹ BA(δ) 1,0 mg l⁻¹ BA /0,1 IBA mg l⁻¹ (ε) και 4,0 mg l⁻¹ BA /0,1 IBA mg l⁻¹ (ζ).

3.3 Ριζοβολία και εγκλιματισμός

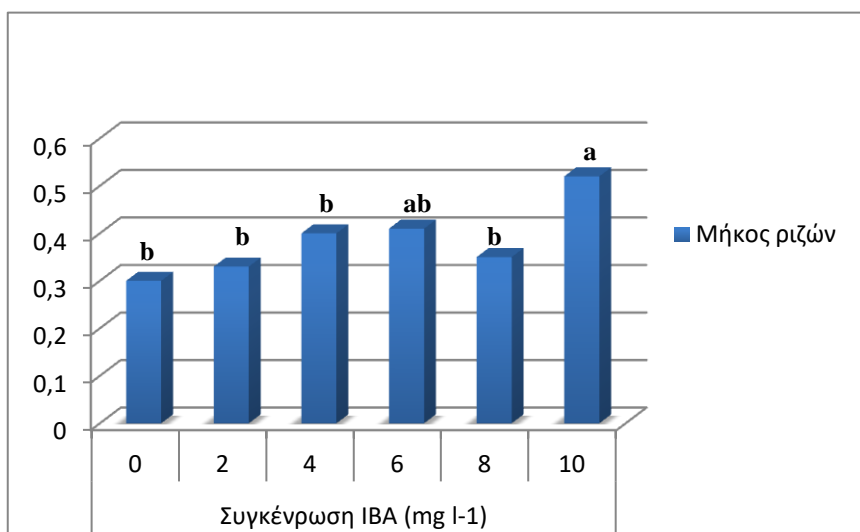


3.3.1 Πρώτο πείραμα ριζοβολίας

Σύμφωνα με τις μελέτες των Thakur *et al.* (2016) και του Bince (2015) το IBA έχει αποδειχθεί η καταλληλότερη αυξίνη για ριζοβολία μικροβλαστών σε είδη του γένους *Pittosporum* ενώ η μειωμένη συγκέντρωση ιόντων υποστρώματος MS καταλληλότερο θρεπτικό υπόστρωμα για επαγωγή ριζών. Έτσι λοιπόν αρχικά, μικροβλαστοί προερχόμενοι από την πρώτη υποκαλλιέργεια (υπόστρωμα προέλευσης: MS εμπλουτισμένο με $1,0 \text{ mg l}^{-1}$) προωθήθηκαν για ριζοβολία σε υπόστρωμα MS/2 εμπλουτισμένο με 1 mg l^{-1} IBA ($n=52$) όμως κανένας μικροβλαστός δεν ριζοβόλησε.

3.3.2 Δεύτερο πείραμα ριζοβολίας και εγκλιματισμός

Σε επόμενο πείραμα προωθήθηκαν για ριζοβολία μικροβλαστοί από την δεύτερη υποκαλλιέργεια (υπόστρωμα προέλευσης: MS εμπλουτισμένο με $1,0 \text{ mg l}^{-1}$) και μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων της αυξίνης IBA, παράλληλα όμως με τη μελέτη της επίδρασης της φωτοπεριόδου καθώς και του μήκους του μικροβλαστού που προωθήθηκε για ριζοβολία στην επαγωγή των ριζών, στον αριθμό και το μήκος τους. Οι επεμβάσεις επέδρασαν στη ριζοβολία των μικροβλαστών. Τα υψηλότερα ποσοστά ριζοβολίας σημειώθηκαν στις επεμβάσεις σε βλαστούς μήκους 3cm και 2cm με $6,0$ και 10 mg l^{-1} IBA, και φωτοπερίοδο 16h πλήρους φωτός και συνεχές σκοτάδι αντίστοιχα (Πίν. 29). Η συγκέντρωση IBA είχε σημαντική επίδραση στο μέσο μήκος των ριζών με τις συγκεντρώσεις των 6 και 10 mg l^{-1} να δίνουν μεγαλύτερες ρίζες (Σχ. 1).



Σχήμα 1. Επίδραση συγκέντρωσης IBA στο μήκος των ριζών.

Τέλος, βρέθηκε αλληλεπίδραση της φωτοπερίόδου και του μήκους των βλαστών που προωθήθηκαν για ριζοβολία στο μέσο αριθμό των ριζών και στο μέσο μήκος τους (Πίν. 29). Οι ρίζες παράχθηκαν μέσω κάλου στα υποστρώματα με IBA ενώ στα φύλλα των μικροβλαστών που επώαστηκαν σε συνθήκες 16 h φωτός παρουσιάστηκε ελαφρύ καφέτιασμα. Η επώαση των μικρόβλαστών σε συνεχές σκτάδι είχε αρνητική επίδραση στην εμφάνισή τους. Τα μεσογονάτια αυξήθηκαν πολύ και ο βλαστός απέκτησε έναν λευκοκίτρινο χρωματισμό (Εικ. 38 α,β,δ,ε,θ,ι,μ,ν,π,ρ,υ,φ).

Πίνακας 29. Επίδραση των επεμβάσεων στη ριζοβολία μικροβλαστών (συγκέντρωση IBA, φωτοπερίοδος και μήκος μικροβλαστών που προωθήθηκαν για ριζοβολία) κατά το δεύτερο πείραμα ριζοβολίας.

Επεμβάσεις	Ποσοστό (%) ριζοβολίας	Μ. αριθμός ριζών	Μ. μήκος ριζών
MS/2 /φως/2cm	10	2,50bcdef	0,28abcdef
MS/2 /φως/3cm	0	-	-
MS/2 /Σκοτάδι/2cm	30	3,66cdef	0,29cef
MS/2 /Σκοτάδι/3cm	40	4,63abcde	0,31cef
2IBA /φως/2cm	25	4,6abcdef	0,16f
2IBA /φως/3cm	75	4,5bcde	0,29ef
2IBA/Σκοτάδι/2cm	50	5,4abcde	0,40bcdef
2IBA /Σκοτάδι/3cm	50	1,70f	0,41bcdef
4IBA /φως/2cm	20	2,75def	0,23ef
4IBA /φως/3cm	70	5,1abcde	0,36bcdef
4IBA/Σκοτάδι/2cm	60	4,5bcde	0,45abcde
4IBA /Σκοτάδι/3cm	35	6,00abcd	0,51abcde
6IBA /φως/2cm	25	4,25abcdef	0,28bcdef
6IBA /φως/3cm	85	4,47cde	0,29ef
6IBA/Σκοτάδι/2cm	50	6,75abc	0,57ab
6IBA /Σκοτάδι/3cm	60	3,10ef	0,40bcdef
8IBA /φως/2cm	45	4,33bcdef	0,22f
8IBA /φως/3cm	38	4,22bcdef	0,34bcdef
8IBA/Σκοτάδι/2cm	55	6,82ab	0,53abcd
8IBA /Σκοτάδι/3cm	56	4,44bcdef	0,29ef
10IBA /φως/2cm	30	5,17abcde	0,30cdef
10IBA /φως/3cm	65	4,23cde	0,64a
10IBA/Σκοτάδι/2cm	85	7,12a	0,53abd
10IBA /Σκοτάδι/3cm	70	6,18abcd	0,47abcde
F _[IBA]	-	NS	**
F _{φωτοπεριόδου}	-	-	-
F _{μήκους βλαστού}	-	-	-
F _{[IBA]*φωτοπεριόδου}	-	NS	NS
F _{[IBA]*μήκους βλαστού}	-	NS	NS
F _{φωτοπ*μήκους βλαστού}	-	*	*
F _{[IBA]*φωτοπεριόδου*μήκουςβλαστού}	-	NS	NS

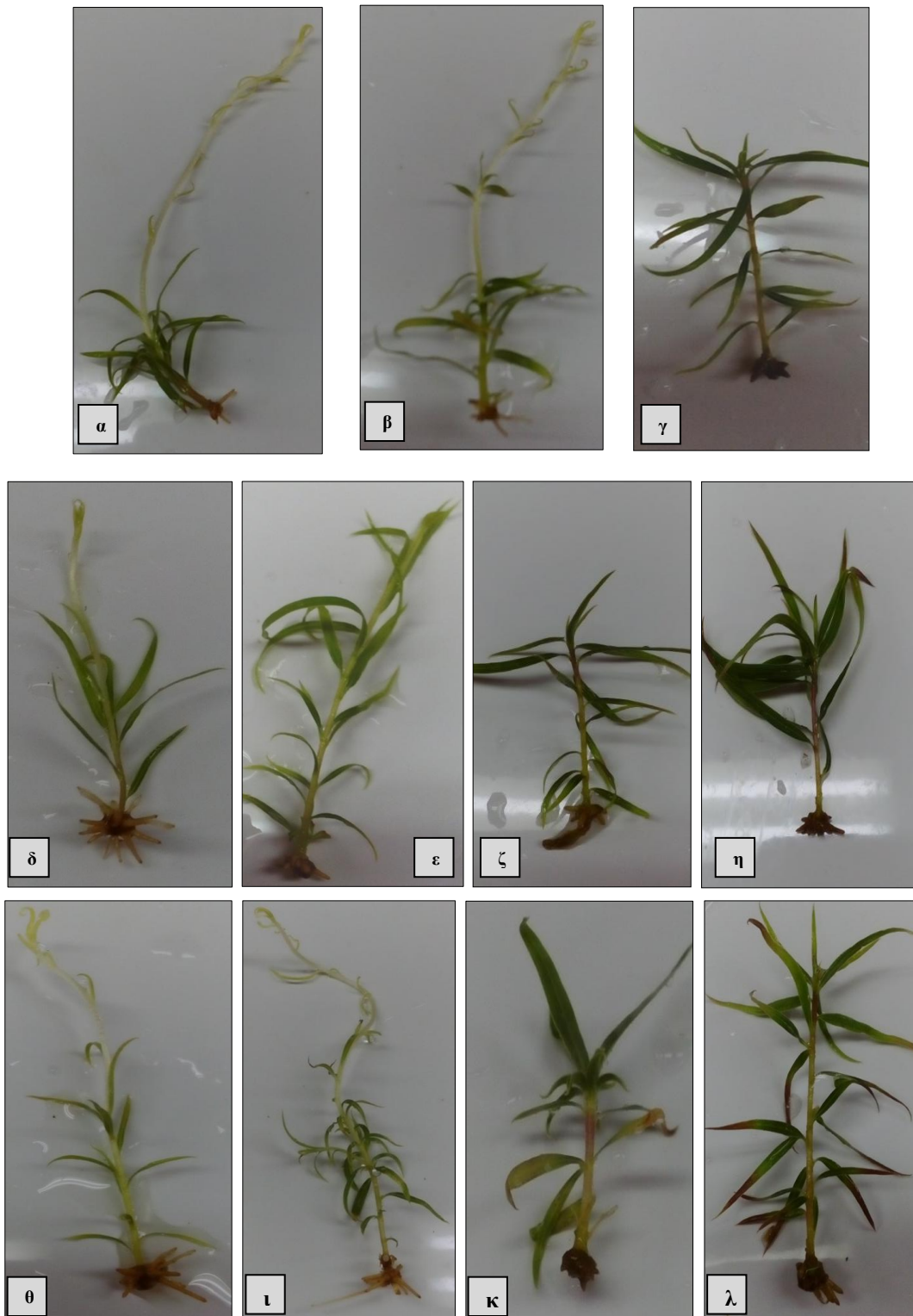
Η σύγκριση των μέσων έγινε με Student's t-test, $P \leq 0,05$

Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο LSD, $P \leq 0,05$, $n=20-24$

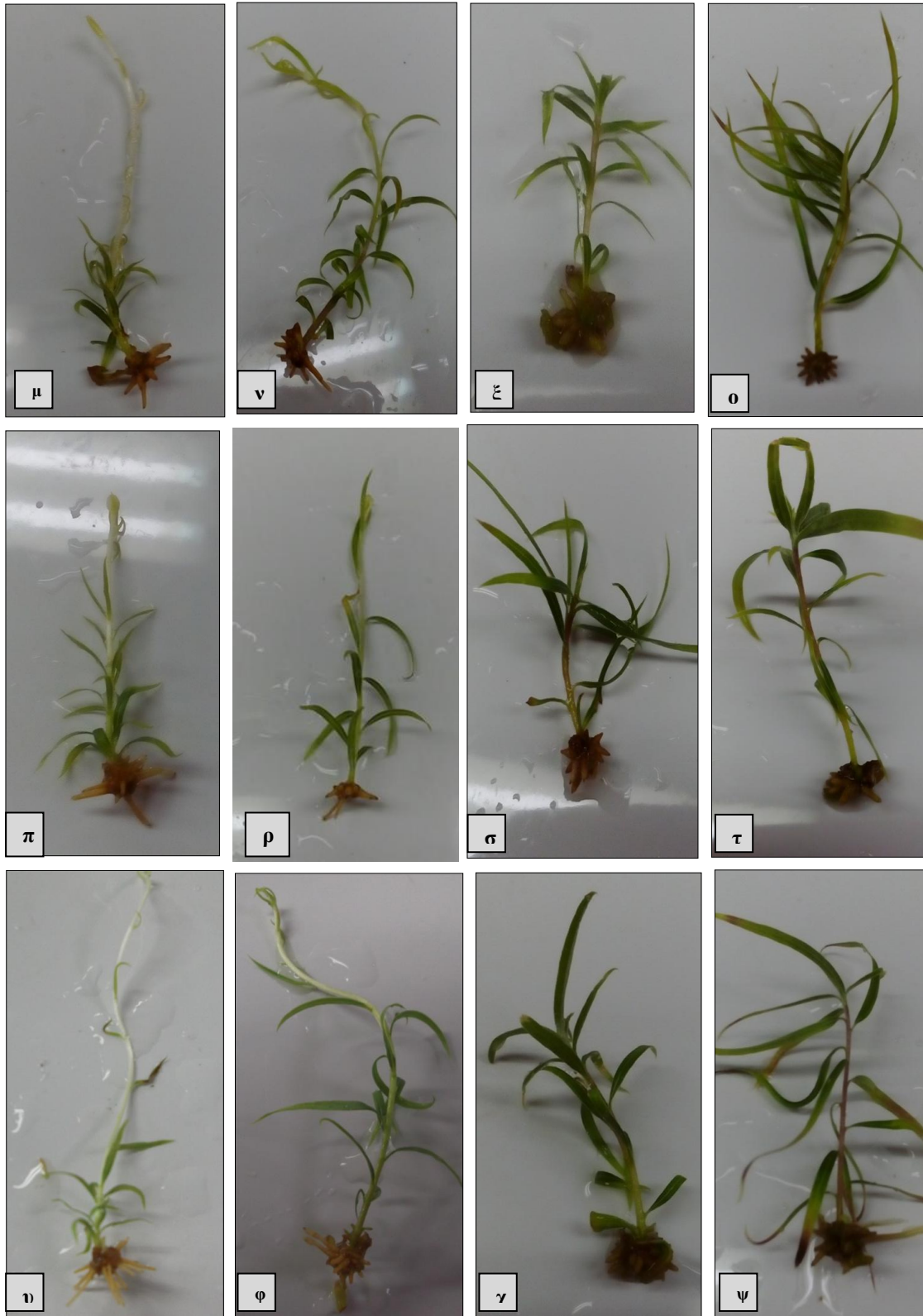
NS: Μη σημαντικό σε $P \leq 0,05$

*: Σημαντικό σε $P \leq 0,05$

**::Σημαντικό σε επίπεδο $P \leq 0,01$



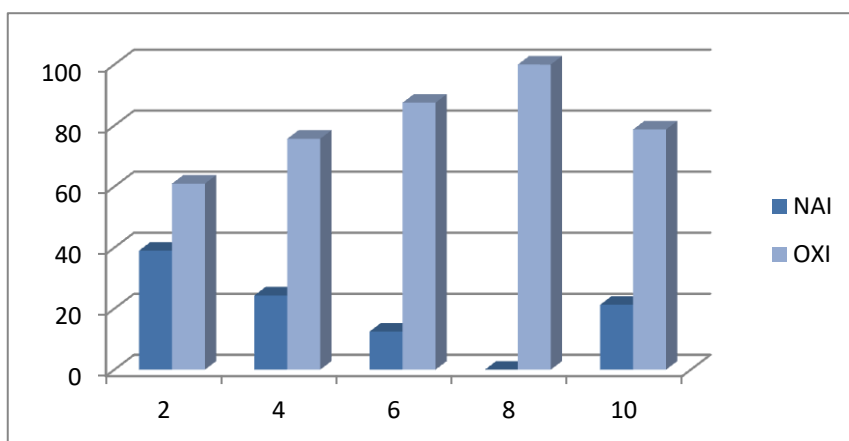
Εικόνα 38. Ριζοβολημένοι μικροβλαστοί σε υπόστρωμα MS/2 χωρίς φυτορρυθμιστική ουσία (από σκοτάδι, 2 cm) [α], χωρίς φυτορρυθμιστική ουσία (από σκοτάδι, 3 cm) [β], χωρίς φυτορρυθμιστική ουσία (από 16 h φώς, 2 cm) [γ], με 2 mg Γ⁻¹ (από σκοτάδι, 2 cm) [δ], με 2 mg Γ⁻¹ (από σκοτάδι, 3cm) [ε], με 2 mg Γ⁻¹ (από 16h φώς, 2 cm) [ζ], με 2 mg Γ⁻¹ (από 16h φώς, 3 cm [η], με 4 mg Γ⁻¹ (από σκοτάδι, 2 cm) [θ], με 4 mg Γ⁻¹ (από σκοτάδι, 3 cm) [ι], με 4 mg Γ⁻¹ (από 16 h φώς, 2 cm) [κ], με 4 mg Γ⁻¹ (από 16 h φώς, 3 cm) [λ].



Εικόνα 38. Ριζοβολημένοι μικροβλαστοί σε υπόστρωμα MS/2 εμπλουτισμένο με 6 mg l^{-1} (από σκοτάδι, 2 cm) [μ], 6 mg l^{-1} (από σκοτάδι, 3 cm) [ν], 6 mg l^{-1} (από 16 h φώς, 2 cm) [ξ], 6 mg l^{-1} (από 16 h φώς, 3 cm) [ο], 8 mg l^{-1} (από σκοτάδι, 2 cm) [π], 8 mg l^{-1} (από σκοτάδι, 3 cm) [ρ], 8 mg l^{-1} (από 16 h φώς, 2 cm) [σ], με 8 mg l^{-1} (από 16 h φώς, 3 cm) [τ], 10 mg l^{-1} (από σκοτάδι, 2 cm), [υ], 10 mg l^{-1} (από σκοτάδι, 3 cm) [φ], 10 mg l^{-1} (από 16 h φώς, 2 cm) [χ], 10 mg l^{-1} (από 16 h φώς, 3 cm) [ψ].

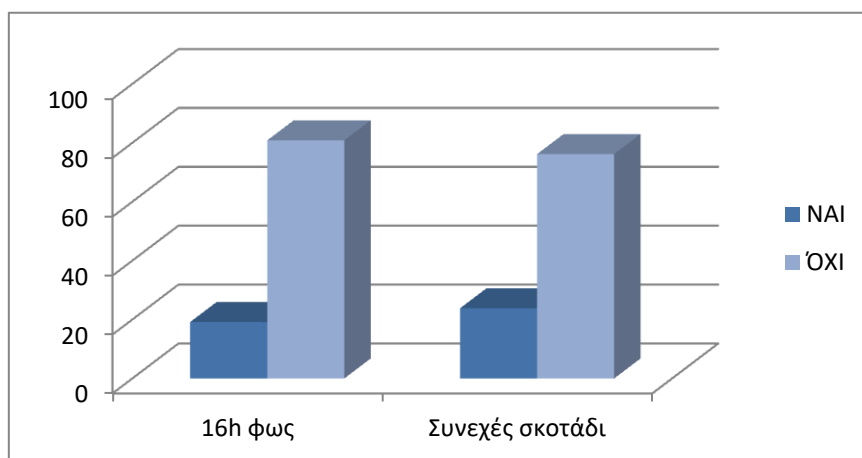
Οι μικροβλαστοί που ριζοβόλησαν κατά το πείραμα ριζοβολίας που περιγράφηκε ανωτέρω προωθήθηκαν για εγκλιματισμό. Κατά τον εγκλιματισμό τα ριζοβολημένα φυτάρια τοποθετήθηκαν ανά επέμβαση ριζοβολίας με σκοπό την εξαγωγή συμπεράσματος για την επίδραση των προαναφερθέντων παραγόντων (συγκέντρωση IBA, φωτοπερίοδος κατά τη ριζοβολία και μήκος βλαστού). Γενικά, τα ποσοστά του εγκλιματισμού δεν ήταν πολύ υψηλά.

Αρχικά, ελέγχθηκε η επίδραση του κάθε παράγοντα ξεχωριστά. Ο εγκλιματισμός επηρεάστηκε από τη συγκέντρωση IBA. Σε υψηλότερο ποσοστό εγκλιματίστηκαν τα φυτάρια από το υπόστρωμα με 2 mg l^{-1} IBA (Σχ. 2).



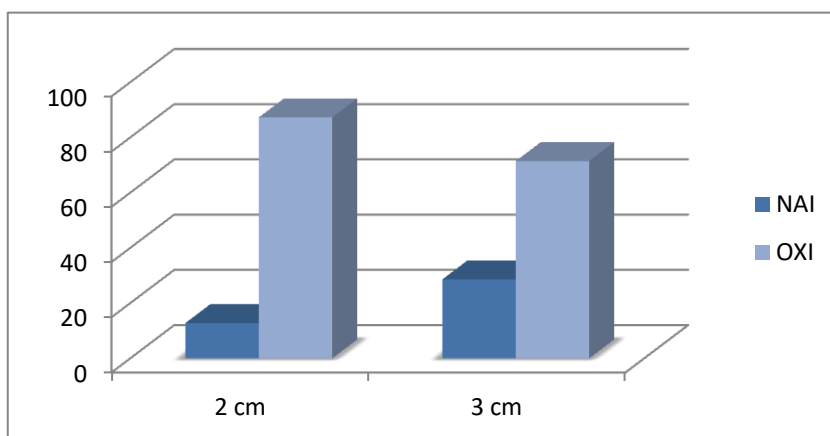
Σχήμα 2. Επίδραση της συγκέντρωσης IBA στον εγκλιματισμό φυταρίων του είδους *P. angustifolium* (n=37-47).

Η φωτοπερίοδος κατά τη ριζοβολία δεν επηρέασε τον εγκλιματισμό των φυταρίων. (Σχ.3).



Σχήμα 3. Επίδραση της φωτοπεριόδου κατά τη ριζοβολία στον εγκλιματισμό των φυταρίων (n=94-126).

Ακόμη, ο εγκλιματισμός επηρεάστηκε από το μήκος των μικροβλαστών. Οι μεγαλύτεροι βλαστοί εγκλιματίστηκαν σε υψηλότερο ποσοστό (Σχ. 4).



Σχήμα 4. Επίδραση του μήκους των βλαστών στον εγκλιματισμό φυταρίων του είδους (n=94-126).

Τέλος οι επεμβάσεις κατά τη ριζοβολία επέδρασαν στον εγκλιματισμό, Τα υψηλότερα ποσοστά εγκλιματισμού σημειώθηκαν στην επέμβαση σε βλαστούς 3 cm με 2 mg l⁻¹ IBA σε συνεχές σκοτάδι οι οποίοι εγκλιματίστηκαν (Εικ. 39,40) σε ποσοστό 79% . Ωστόσο ο αριθμός των επαναλήψεων ήταν αρκετά μικρός σε κάποιες από τις επεμβάσεις.

Πίνακας 30. Επίδραση των επεμβάσεων ριζοβολίας στον εγκλιματισμό των *in vitro* πολλαπλασιασμένων φυταρίων του είδους *P. angustifolium* (n=5-17).

Επέμβαση	Ποσοστό εγκλιματισμού (%)
2IBA /φως/2cm	0
2IBA /φως/3cm	25
2IBA/Σκοτάδι/2cm	20
2IBA /Σκοτάδι/3cm	79
4IBA /φως/2cm	0
4IBA /φως/3cm	36
4IBA/Σκοτάδι/2cm	8
4IBA /Σκοτάδι/3cm	43
6IBA /φως/2cm	0
6IBA /φως/3cm	25
6IBA/Σκοτάδι/2cm	0
6IBA /Σκοτάδι/3cm	8
8IBA /φως/2cm	0
8IBA /φως/3cm	0
8IBA/Σκοτάδι/2cm	0
8IBA /Σκοτάδι/3cm	0
10IBA /φως/2cm	17
10IBA /φως/3cm	38
10IBA/Σκοτάδι/2cm	18
10IBA /Σκοτάδι/3cm	9



Εικόνα 39. Εγκλιματισμένα φυτάρια που προήλθαν από υπόστρωμα ριζοβολίας MS/2 εμπλουτισμένο με 2 mg l^{-1} IBA και ριζοβόλησαν σε συνθήκες πλήρους σκότους (το μήκος των μικροβλαστών που προωθήθηκαν για ριζοβολία ήταν 3cm). 29/08/2018



Εικόνα 40. Φυτάρια ηλικίας περίπου 2 μηνών 28/09/2018 (α) 3 μηνών 23/11/2018 (β) και 6 μηνών 19/03/2019 (γ) που προήλθαν από υπόστρωμα ριζοβολίας MS/2 εμπλουτισμένο με 2 mg l^{-1} IBA και ριζοβόλησαν σε συνθήκες πλήρους σκότους, (το μήκος των μικροβλαστών που προωθήθηκαν για ριζοβολία ήταν 3cm) σε ατομικά γλαστρίδια, σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (1: 1 v/v).

3.3.3 Τρίτο πείραμα ριζοβολίας και εγκλιματισμός

Στόχος του πειράματος ήταν η μείωση της ποσότητας του κάλου στη βάση των βλαστών καθώς η παραγωγή κάλου είναι επιζήμια για την επιβίωση των φυταρίων ξυλωδών ειδών κατά τη διάρκεια του εγκλιματισμού (Welandar, 1983). Καθοριστικό ρόλο έχει βρεθεί ότι παίζει ο χρόνος παραμονής στο υπόστρωμα ριζοβολίας (Gaspar *et al*, 1977). Η μεταφορά μικροβλαστών από θρεπτικό διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης IBA σε υπόστρωμα MS/2 χωρίς φυτορρυθμιστική ουσία χρησιμοποιήθηκε από τους Dhar *et al* (2000) καθιστώντας τη ριζοβολία των *in vitro* ανεπτυγμένων μικροβλαστών του *P. napaulensis* επιτυχή. Για τους ανωτέρω λόγους μελετήθηκε και η επίδραση της παραμονής των βλαστών μήκους 2 cm για 7 ημέρες σε υπόστρωμα συγκέντρωσης 10 mg l⁻¹ με μετέπειτα μεταφορά των βλαστών σε υπόστρωμα MS/2 για περαιτέρω επώαση εφόσον η συγκέντρωση 10 mg l⁻¹ έδωσε υψηλότερα ποσοστά ριζοβολίας και μεγαλύτερες ρίζες. Ταυτόχρονα μελετήθηκε και η επίδραση της φωτοπερίοδου στη ριζοβολία των μικροβλαστών. Η ριζοβολία επηρεάστηκε από τη φωτοπερίοδο. Οι μικροβλαστοί που επώαστηκαν σε 16 h πλήρους φωτός έδωσαν υπό αυτή την επέμβαση υψηλότερο ποσοστό ριζοβολίας όμως μικρότερο μήκος ριζών σε συγκριση με τους μικροβλαστούς που επώαστηκαν σε συνθήκες πλήρους σκότους (Πίν. 31, Εικ. 41). Οι ρίζες δεν βγήκαν απευθείας από τη βάση του βλαστού, όμως η ποσότητα του κάλου που σχηματίστηκε ήταν μικρότερη συγκριτικά με την παραμονή καθ'ολη τη διάρκεια της επώασης σε υπόστρωμα με 10 mg l⁻¹. Η επώαση των μικρόβλαστών σε συνεχές σκοτάδι είχε ως επακόλουθο την αύξηση των μεσογονατίων και τον λευκοκίτρινο χρωματισμό των βλαστών, κάτι που δεν συνεπάγεται ευρωστία.

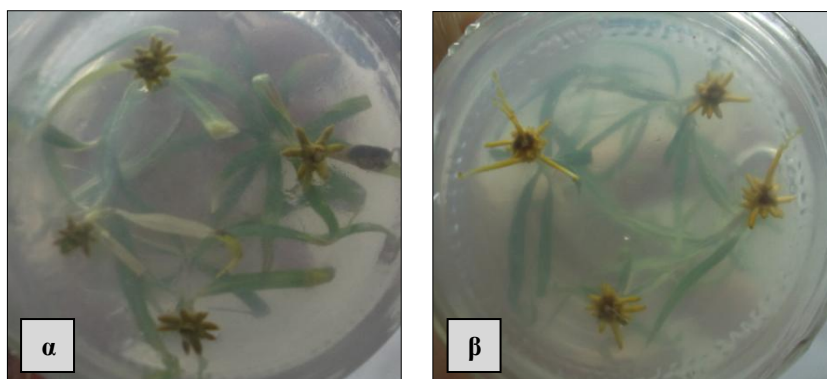
Πίνακας 31. Επίδραση διάρκειας σκότους σε μικροβλαστούς που επώαστηκαν αρχικά σε υπόστρωμα MS/2 με 10 mg l⁻¹ και μεταφέρθηκαν έπειτα σε υπόστρωμα MS/2 χωρίς αυξίνη.

Επέμβαση	Ποσοστό ριζοβολίας (%)	Μ. αριθμός ριζών	Μ. μήκος ριζών	Μ.Μήκος Βλαστών
Φώς	100	8,03a	0,22b	2,31b
Σκοτάδι	83	7,39a	0,37a	6,00a
F _{One-way ANOVA}		NS	*	***

Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο LSD, P≤0,05, n=24

NS: Μη σημαντικό σε P≤0,05

*: Σημαντικό σε P≤0,05



Εικόνα 41. Ριζοβολημένοι μικροβλαστοί οι οποίοι επώαστηκαν αρχικά για μια εβδομάδα σε υπόστρωμα MS/2 εμπλουτισμένο με 10 mg l^{-1} και έπειτα για 18 ημέρες σε υπόστρωμα MS/2 χωρίς φυτορρυθμιστική ουσία (α) σε συνθήκες 16 ωρών πλήρους φωτός και (β) σε συνθήκες συνεχούς σκότους.

Τα ριζοβολημένα φυτάρια προωθήθηκαν για εγκλιματισμό. Ο εγκλιματισμός δεν επηρεάστηκε από τη φωτοπερίοδο κατά τη ριζοβολία. Τα ποσοστά εγκλιματισμού ήταν χαμηλά (Πίν. 32), όμως μεγαλύτερα συγκριτικά με τα ποσοστά εγκλιματισμού φυταρίων (μήκος βλαστού 2cm) που παρέμειναν καθ'όλη τη διάρκεια της ριζοβολίας σε θρεπτικό υπόστρωμα με 10 mg l^{-1} IBA στο προηγούμενο πείραμα ριζοβολίας (Πίν. 31).

Πίνακας 32. εγκλιματισμός μικροβλαστών που κατά τη ριζοβολία επώαστηκαν για μια εβδομάδα σε MS/2 +10 mg l^{-1} IBA και έπειτα σε MS/2 χωρίς IBA.

Επέμβαση	Εγκλιματισμός (%)
Φώς	35
Σκοτάδι	43



Εικόνα 42. Εγκλιματισμένα φυτάρια 2 περίπου μηνών. Προκειται για φυτάρια που προήλθαν από επώαση μικροβλαστών για μια εβδομάδα σε υπόστρωμα MS/2 εμπλουτισμένο με 10 mg l^{-1} και έπειτα για 18 ημέρες σε υπόστρωμα MS/2 χωρίς φυτορρυθμιστική ουσία σε συνθήκες 16 ωρών πλήρους φωτός (α) και σε συνθήκες πλήρους σκότους (β).

3.3.4 Τέταρτο και πέμπτο πείραμα ριζοβολίας και εγκλιματισμός

Σε επόμενο πείραμα ριζοβολίας μελετήθηκε η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων IBA και της φωτοπεριόδου σε μικροβλαστούς μεγαλύτερης ηλικίας (65 ημερών) και μήκους 1cm με προέλευση από την τρίτη υποκαλλιέργεια (υπόστρωμα προέλευσης 1,0 mg I⁻¹). Η προώθηση μικροβλαστών μεγαλύτερης ηλικίας για ριζοβολία έγινε διότι ο Edmiston (2002) βρήκε για το *P. pentandrum* ότι οι μικροβλαστοί μεγαλύτερης ηλικίας ανταποκρίθηκαν καλύτερα. Η μελέτη αυτού του πειράματος έγινε μέχρι τη συγκέντρωση 6 mg I⁻¹ IBA καθώς από την εκτίμηση του εγκλιματισμού του πρώτου πειράματος τα ριζοβολημένα φυτάρια των υψηλών συγκεντρώσεων εγκλιματίστηκαν σε πολύ μικρό ποσοστό.

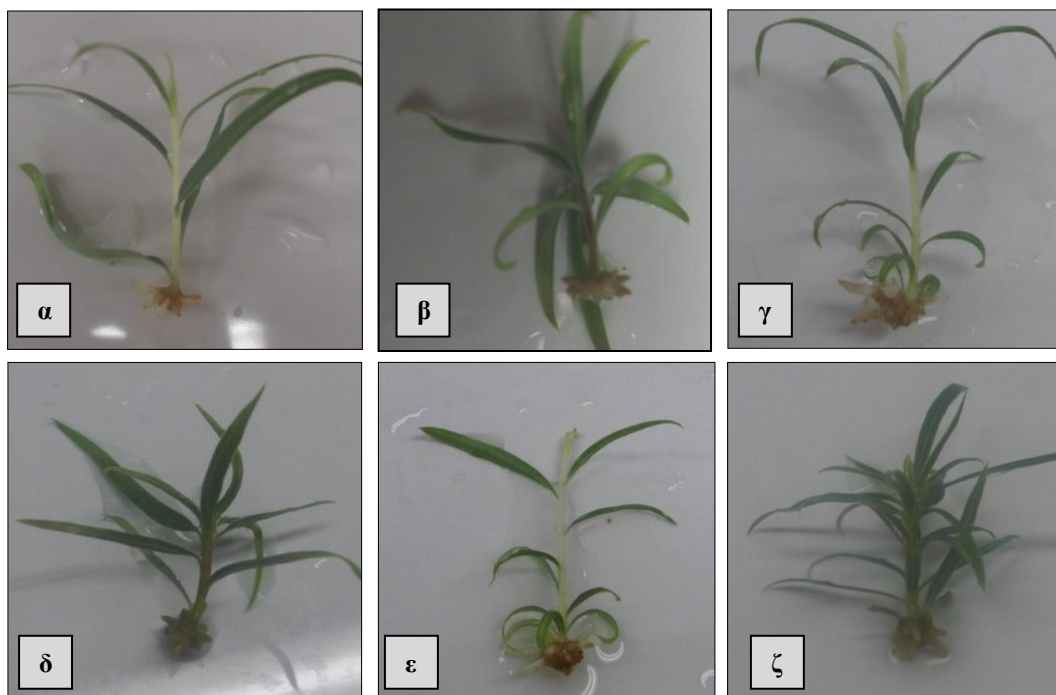
Αρχικά πραγματοποιήθηκε ανάλυση ως προς το κάθε παράγοντα ξεχωριστά και στη συνέχεια έλεγχος για πιθανή αλληλεπίδραση μεταξύ των παραγόντων. Η επέμβαση δεν επηρέασε τη ριζοβολία των μικροβλαστών (Πίν. 33). Βρέθηκε αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο παραγόντων (συγκέντρωση IBA και φωτοπερίοδος) στον αριθμό και στο μήκος των ριζών (Πίν. 33). Οι ρίζες των φυταρίων που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα MS/2 εμπλουτισμένο με 4 mg I⁻¹ IBA και σε συνεχές σκοτάδι ήταν σημαντικά μεγαλύτερες από τις ρίζες των υπόλοιπων επεμβάσεων (Πίν 33., Εικ. 43). Οι ρίζες σχηματίστηκαν μέσω κάλου σε όλες τις επεμβάσεις. Τα ποσοστά ριζοβολίας ήταν υψηλότερα συγκριτικά με τα ποσοστά ριζοβολίας των μικροβλαστών μικρότερης ηλικίας ενώ δεν παρουσιάστηκε καφέτιασμα κατά την επώαση σε 16 h φως.

Πίνακας 33. Επίδραση της συγκέντρωσης IBA mg I⁻¹ και της φωτοπεριόδου στη ριζοβολία μικροβλαστών *P. angustifolium* ηλικίας 65 ημερών και μήκους 1 cm.

Επέμβαση	Ριζοβολία (%)	Μ. αριθμός ριζών	Μ. μήκος ριζών	Μ. Μήκος βλαστού
2IBA/Φως	95	4,53b	0,23bc	1,00d
2IBA/Σκοτάδι	95	6,21a	0,20bc	2,62b
4IBA/Φως	85	5,18ab	0,18c	1,03d
4IBA/Σκοτάδι	95	5,68ab	0,31a	3,23a
6IBA/Φως	90	6,22a	0,20bc	1,03d
6IBA/Σκοτάδι	85	6,71a	0,25b	2,56b
F _{φωτοπεριόδου}		NS	-	-
F _[IBA]		NS	-	-
F _{φωτοπεριόδου*IBA]}		NS	***	***
F _{one-wayANOVA}		NS	***	***

Η σύγκριση των μέσων έγινε με Student's t-test, P≤0,05, n=20

NS: Μη σημαντικό σε P≤0,05 ***: Σημαντικό σε επίπεδο P≤0,001



Εικόνα 43. Ριζοβολημένοι μικροβλαστοί που επώαστηκαν σε υπόστρωμα MS/2 εμπλουτισμένο με 2 mg l^{-1} IBA σε συνθήκες πλήρους σκότους (α) και σε συνθήκες 16 h πλήρους φωτός (β), με 4 mg l^{-1} IBA σε συνθήκες πλήρους σκότους (γ) και σε συνθήκες 16 h πλήρους φωτός (δ), με 6 mg l^{-1} IBA σε συνθήκες πλήρους σκότους (ε) και σε συνθήκες 16 h πλήρους φωτός (ζ).

Η δημιουργία σκότους μόνο στη βάση του βλαστού με χρήση φύλλων αλουμινίου έχει βρεθεί ότι ευνοεί τη ριζοβολία σε κάποια είδη που ριζοβολούν δύσκολα *in vitro* όπως η καστανιά, η φουντουκιά και η αμυγδαλιά (Rugini, *et al.*, 1993) γι' αυτό και πραγματοποιήθηκε τέτοιου είδους επέμβαση. Η εμφάνιση των φυταρίων δεν επηρεάστηκε αρνητικά στην επέμβαση με «μισό σκοτάδι» (Εικ. 44), όπως συνέβη στο συνεχές σκοτάδι (Πίν. 33, Εικ. 34 α,γ,ε) όμως, το ποσοστό ριζοβολίας ήταν χαμηλότερο και το μήκος των ριζών ήταν σημαντικά μικρότερο (Πίν. 34). Οι ρίζες σχηματίστηκαν μέσω κάλου σε όλες τις επεμβάσεις.

Πίνακας 34. Επίδραση σκότους συνολικά και σκότους μόνο στη βάση των μικροβλαστών στη ριζοβολία μικροβλαστών σε υπόστρωμα MS/2 εμπλουτισμένο με 2 mg l^{-1} IBA.

Επέμβαση	Ριζοβολία (%)	Μ. αριθμός ριζών	Μ. μήκος ριζών	Μ. Μήκος βλαστού
2IBA/Σκοτάδι	95	6,21a	0,20a	2,62a
2IBA/Μισό σκοτάδι	75	5,60a	0,15b	1,80b
2IBA/Φώς	95	4,53a	0,23a	1,00c
$F_{\text{one-wayANOVA}}$		NS	*	***

Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο LSD, $P \leq 0,05$, $n=20-24$

NS: Μη σημαντικό σε $P \leq 0,05$

*: Σημαντικό σε $P \leq 0,05$

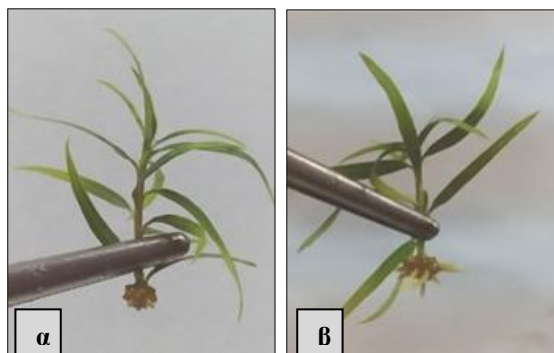
***: Σημαντικό σε επίπεδο $P \leq 0,001$

Η διαφορετική συγκέντρωση IBA δεν επέδρασε στη ριζοβολία των μικροβλαστών ενώ μόνο η βάση αυτών βρισκόταν σε σκοτάδι. Η συγκέντρωση 10 mg l⁻¹ έδωσε πιο μακρύτες ρίζες (Πιν.35, Εικ. 44). Οι ρίζες σχηματίστηκαν μέσω κάλου ανεαρτήτως συγκέντρωσης.

Πίνακας 35. Επίδραση της συγκέντρωσης IBA στη ριζοβολία μικροβλαστών ενώ μόνο η βάση τους βρισκόταν σε σκοτάδι.

Επεμβάσεις	Ριζοβολία (%)	Μ. αριθμός ριζών	Μ. μήκος ριζών	Μ. μήκος βλαστών
2IBA/Μισό σκοτάδι	75	5,60a	0,15b	1,80b
10IBA/Μισό σκοτάδι	70	4,00a	0,24a	2,15a
F_{one-way}ANOVA		NS	*	**

Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο LSD, P≤0,05, n=24



Εικόνα 44. Ριζοβολημένοι μικροβλαστοί που επώστηκαν σε υπόστρωμα MS/2 εμπλουτισμένο με (α) 2 mg l⁻¹ και (β) 10 mg l⁻¹ ενώ η βάση των βλαστών βρισκόταν σε συνθήκη σκότους.

Οι μικροβλαστοί και από τα τρία πειράματα προωθήθηκαν για εγκλιματισμό. Η φωτοπερίοδος κατά τη ριζοβολία επέδρασε στον εγκλιματισμό και οι βλαστοί που ριζοβόλησαν σε 16 h φως δεν εγκλιματίστηκαν (Πιν. 36).

Πίνακας 36. Επίδραση της φωτοπερίοδου κατά τη ριζοβολία στον εγκλιματισμό των φυταρίων.

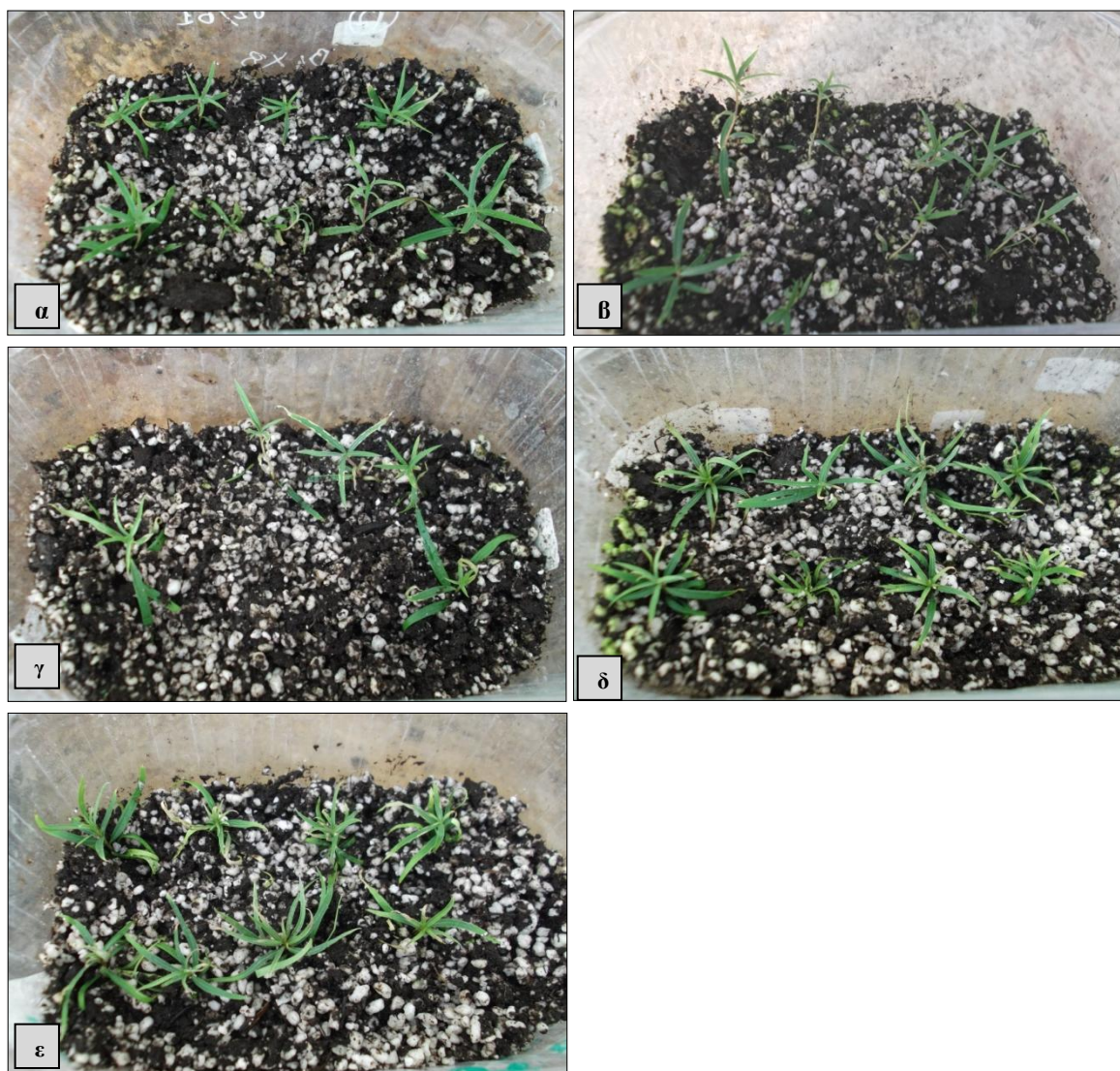
Φωτοπερίοδος	Εγκλιματισμός (%)
16h φως	0
Συνεχές σκοτάδι	48

Η συγκέντρωση IBA δεν επέδρασε στον εγκλιματισμό (Εικ. 45-47) όμως η επέμβαση επηρέασε τον εγκλιματισμό των φυταρίων με τα φυτάρια που

αναπτύχθηκαν σε μισό σκοτάδι και 2 mg l⁻¹ IBA να εγκλιματίζονται σε μεγαλύτερο ποσοστό (Πίν. 37).

Πίνακας 37. Επίδραση της επέμβασης ριζοβολίας στον εγκλιματισμό φυταρίων *P. angustifolium*.

Επέμβαση	Εγκλιματισμός (%)
2IBA/Φως	0
2IBA/Σκοτάδι	37,5
2IBA/Μισό σκοτάδι	66,67
4IBA/Φως	0
4IBA/Σκοτάδι	50
6IBA/Φως	0
6IBA/Σκοτάδι	56,25
10IBA/Μισό σκοτάδι	42,86



Εικόνα 45. Εγκλιματισμένα φυτάρια που προήλθαν από υπόστρωμα ριζοβολίας MS/2 εμπλουτισμένα με 2 mg l⁻¹ IBA (συνολικά σε σκοτάδι) [α], με 4 mg l⁻¹ IBA (συνολικά σε σκοτάδι) [β], με 6 mg l⁻¹ IBA (συνολικά σε σκοτάδι) [γ], με 2 mg l⁻¹ IBA (μόνο η βάση σε σκοτάδι) (δ) και με 10 mg l⁻¹ IBA (μόνο η βάση σε σκοτάδι) [ε]. 9/11/2018.



Εικόνα 46. Εγκλιματισμένα φυτάρια ηλικίας 3,5 περίπου μηνών προερχόμενα από υποστρώματα με 2 mg Γ¹ (συνολικά σε σκοτάδι) [α], 4 mg Γ¹ (συνολικά σε σκοτάδι) [β], 6 mg Γ¹ (συνολικά σε σκοτάδι) [γ], 2 mg Γ¹ (μόνο η βάση σε σκοτάδι) [δ] και 10 mg Γ¹ (μόνο η βάση σε σκοτάδι) [ε]. 29/01/2019



Εικόνα 47. Εγκλιματισμένα φυτάρια ηλικίας περίπου 5 μηνών. 19/03/2019

3.3.5. Πείραμα *ex vitro* ριζοβολίας

Σε ό,τι αφορά το πείραμα ριζοβολίας που πραγματοποιήθηκε σε ξυποποιημένους μικροβλαστούς ηλικίας 65 ημερών (2.7.2.2) που προήλθαν από την πρώτη υποκαλλιέργεια του είδους, οι βλαστοί αυτοί δεν ριζοβόλησαν ούτε στην επέμβαση με εμβάπτιση για 1 λεπτό σε διάλυμα 1000 ppm IBA ούτε στην επέμβαση με σκόνη ριζοβολίας και δεν εγκλιματίστηκαν.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΚΑΙ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Από τη διερεύνηση της βιβλιογραφίας διαπιστώθηκε ότι παρά τη σπουδαιότητα του είδους *Pittosporum angustifolium* ως καλλωπιστικό και φαρμακευτικό φυτό η παρούσα μελέτη ήταν η πρώτη ερευνητική εργασία πάνω στον μικροπολλαπλασιασμό του. Θα ακολουθήσει συζήτηση και παράθεση των συμπερασμάτων που προέκυψαν από την παρούσα μελέτη καθώς και την μελέτη του μικροπολλαπλασιασμού άλλων ειδών του γένους *Pittosporum* αλλά και άλλων ξυλωδών ειδών.

4.1 Αρχική εγκατάσταση και πολλαπλασιασμός

Η απολύμανση με αλκοόλη 90% για 10 sec και με διάλυμα 15% χλωρίνης εμπορίου για 10 min είναι αποτελεσματική για αφαίρεση μικροβιακού φορτίου από νεαρή βλάστηση του είδους. Όμως, τα έκφυτα βλαστικής κορυφής αποδείχθηκαν ευαίσθητα σ' αυτό το πρωτόκολο απολύμανσης αφού εμφάνισαν νέκρωση σε μεγάλο ποσοστό εν αντιθέσει με τα έκφυτα κόμβου. Γενικά η απολύμανση νεαρής βλάστησης των ειδών του γένους *Pittosporum* που έχουν πολλαπλασιαστεί με ιστοκαλλιέργεια φαίνεται να μην αποτελεί πρόβλημα (Dhar *et al.*, 2000, Thakur *et al.*, 2016, Panwar *et al.*, 2016, Bince, 2015) με εξαίρεση το είδος *P. confertiflorum* το οποίο φέρει τρίχες στο στελεχός του. Το υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με 2 mg I⁻¹ BA αποδείχθηκε αποτελεσματικό για την αρχική εγκατάσταση του είδους από έκφυτα κόμβου και βλαστικής κορυφής νεαρής βλάστησης ενήλικου φυτού. Το BA μόνο του ή σε συνδυασμό με NAA έχει αποδειχθεί αποτελεσματικό και για την αρχική εγκατάσταση άλλων ειδών του γένους όπως το *P. undulatum* όπου η προσθήκη 5,0 mg I⁻¹ BA αποδείχθηκε η καλύτερη επέμβαση για αρχική εγκατάσταση από έκφυτα κόμβου του είδους (Ντόρκος, 2004), το *P. napaulensis* όπου η προσθήκη 1,0 mg I⁻¹ BA σε συνδυασμό με 0,02 mg I⁻¹ NAA ήταν η καλύτερη επέμβαση για αρχική εγκατάσταση από έκφυτα κόμβου του είδους (Dhar *et al.*, 2000), το *P. eriocarpum* όπου συνδυασμός 1,0 mg I⁻¹ BA με 0,3 mg I⁻¹ NAA ήταν ο καταλληλότερος για αρχική εγκατάσταση του είδους από έκφυτα βλαστικής κορυφής (Panwar *et al.*, 2016) και το *P. dasycaulon* όπου ο συνδυασμός 2,0 mg I⁻¹ BA με 0,1 mg I⁻¹ NAA αποδείχθηκε η καλύτερη επέμβαση για αρχική εγκατάσταση του είδους από έκφυτα κόμβου (Bince, 2015).

Η υψηλή συγκέντρωση ιόντων του υποστρώματος MS είναι ευεργετική τόσο για την αρχική εγκατάσταση όσο και για τον πολλαπλασιασμό και την ανάπτυξη *in vitro* του γένους *Pittosporum* (Dhar *et al.*, 2000, Bince, 2015), ενώ το ίδιο ισχύει και για άλλα δικοτυλήδονα αγγειόσπερμα (Dunstan and Thorpe, 1986). Το BA έχει αποδειχθεί η καταλληλότερη κυτοκινίνη για τον μικροπολλαπλασιασμό ειδών του γένους *Pittosporum* (Dhar *et al.*, 2000, Bince, 2015, Panwar *et al.*, 2016) και γι' αυτόν τον λόγο χρησιμοποιήθηκε για την επώαση εκφύτων κατά τις υποκαλλιέργειες του είδους *P. angustifolium*, ενώ το ίδιο ισχύει και για άλλα ξυλώδη είδη (Paparotiou, 2010). Η προσθήκη κυτοκινίνης ήταν απαραίτητη για την αναγέννηση βλαστών *P. angustifolium*, *in vitro* κάτι που συμφωνεί με τις μελέτες των Dhar *et al.* (2000), Panwar *et al.* (2016), Thakur *et al.* (2016) Bince (2015) για τα είδη *P. napaulensis*, *P. eriocarpum* και *P. dasycaulon* αντιστοίχα. Το ίδιο ισχύει και για άλλα ξυλώδη είδη όπως τα *Arbutus andrachne*, *Arbutus unedo*, *Dianthus fruticosus*, *Euphorbia characias*, *Lithodora zahnii*, *Malosorbus florentina*, *Quercus euboica*, *Sideritis athoa* (Paparotiou, 2010). Αρκετές κυτοκινίνες χρησιμοποιούνται στον μικροπολλαπλασιασμό για τον πολλαπλασιασμό βλαστών και η επίδραση τους εξαρτάται απ'τον γονότυπο του κάθε φυτού (Uddin *et al.*, 1988) (π.χ. Kinetin, Zeatine, 2ip). Απ' όλες τις κυτοκινίνες, συνήθως προτιμάται το BA επειδή είναι αποτελεσματικό σε πολλά φυτά αλλά και φθηνότερο σε σχέση με τις υπόλοιπες (π.χ. ZEA) (Lindgren and McCown 1992; Edison *et al.*, 1994; Yeo and Reed, 1995; Chee, 1985; Chisimba *et al.*, 1990).

Στην πρώτη υποκαλλιέργεια δεν παρατηρήθηκε διαφορά στον πολλαπλασιασμό των βλαστών στις δύο μελετηθέντες συγκεντρώσεις BA (1 και 2 mg l⁻¹) όμως παρατηρήθηκε η τάση των εκπτυχθέντων από το έκφυτο βλαστών να εκπτύσσουν μερικούς από τους κόμβους τους χωρίς όμως να δίνουν πλάγιους βλαστούς. Η μελέτη της επίδρασης της θέσης του εκφύτου στο μητρικό φυτό στη βλαστογένεση κατά την υποκαλλιέργεια έδειξε ότι η βλαστογένεση και ο αριθμός των παραγόμενων βλαστών 1^{ης} τάξης δεν επηρεάστηκε από το είδος του έκφυτου αρχικής εγκατάστασης όμως το μήκος των παραγόμενων βλαστών αυξήθηκε όταν η αρχική εγκατάσταση έγινε με έκφυτα βλαστικής κορυφής νεαρής βλάστησης του μητρικού φυτού ενώ τα έκφυτα που προήλθαν από αρχική εγκατάσταση κόμβων έδωσαν σε μεγαλύτερο ποσοστό εκπτυγμένους κόμβους οι οποίοι κατά την

υποκαλλιέργεια έδωσαν απόλυτο ποσοστό βλαστογένεσης (100%) καθιστώντας αυτό το είδος εκφύτου επιθυμητό για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό.

Η επιθυμία παραγωγής περισσότερων βλαστών ανά έκφυτο ή/και εκπτυγμένων κόμβων ώθησε στην αύξηση της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης στο θρεπτικό υπόστρωμα στα 4 mg l⁻¹. Η αύξηση της συγκέντρωσης BA σε 4 mg l⁻¹ κατά την τέταρτη υποκαλλιέργεια αύξησε μεν τον αριθμό των βλαστών ανά έκφυτο, μείωσε όμως σημαντικά το μήκος τους συγκριτικά με τη συγκέντρωση 1 mg l⁻¹ γεγονός που διαπιστώθηκε και στις δύο επόμενες υποκαλλιέργειες όπου το μήκος το βλαστών μειωνόταν ανάλογα με την αύξηση της συγκέντρωσης του BA αυτό έρχεται σε συμφωνία με την έρευνα των Dhar *et al.* (2000) για το *P. napaulensis*, όπου το μήκος μίκραινε σημαντικά όσο αυξανόταν η συγκέντρωση BA.

Η μείωση του μήκους σε συνδυασμό με το γεγονός ότι τα χαμηλά επιπέδα αυξίνης σε συνδυασμό με κυτοκινίνη διεγείρουν τον αριθμό και την επιμήκυνση των βλαστών σε διάφορα είδη δένδρων (Chalupa 1987), ώθησε στην προσθήκη αυξινών στο θρεπτικό υπόστρωμα. Το NAA δεν επέδρασε σημαντικά στο μήκος των βλαστών, εν αντιθέσει με την έρευνα των Dhar *et al.* (2000) για το *P. napaulensis* όπου το NAA επέδρασε σημαντικά τόσο στο μήκος όσο και στον πολλαπλασιασμό των βλαστών. Βέβαια στην παρούσα μελέτη κατά την πρώτη μέτρηση (40 ημέρες) το NAA βρέθηκε να επιδρά στον πολλαπλασιασμό των βλαστών/έκφυτο συμφωνώντας με την μελέτη των Dhar *et al.* (2000). Ακόμη κατά την πρώτη μέτρηση για το *P. anustifolium* δεν βρέθηκε αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο παραγόντων σε ότι αφορά το μήκος των μικροβλαστών συμφωνώντας με τους Dhar *et al.* (2000) αλλά κατα την δεύτερη μέτρηση βρέθηκε αλληλεπίδραση μεταξύ των δύο παραγόντων.

Από την άλλη πλευρά το IBA επέδρασε σημαντικά στην αύξηση του μήκους των μικροβλαστών κατά την πρώτη μέτρηση (40 ημέρες) όπως βρήκαν και οι Thakur *et al.* (2016) για το *P. eriocarpum* και η Μαρτίνη (2014) για το *xMalosorbis Florentina*, όμως μείωσε τον αριθμό των βλαστών ανά έκφυτο, καθώς και το ποσοστό βλαστογένεσης ανεξαρτήτως συγκέντρωσης BA καθώς και την αντοχή των μικροβλαστών που αναπτύσσονταν σε υποστρώματα με χαμηλές συγκεντρώσεις BA (0, 5 και 1, 0 mg l⁻¹BA) οι οποίοι καταστράφηκαν μετά από τρεις μήνες επώασης εμφανίζοντας έντονο καφέτιασμα και ξηράνσεις, σε αντιθεση με τους

μικροβλαστούς που αναπτύσσονταν σε υπόστρωμα χωρίς IBA (στις χαμηλές συγκεντρώσεις των 1,0 και 0,5 mg I⁻¹ μόνο ελαφριά συστροφή των φύλλων) ή σε υπόστρωμα με 2 ή 4 mg I⁻¹ BA με προσθήκη IBA. Η μείωση του ποσοστού βλαστογένεσης με την προσθήκη IBA καθιστά την IBA ακατάλληλη αυξίνη για προσθήκη στο θρεπτικό υπόστρωμα πολλαπλασιασμού του είδους. Οι μικροβλαστοί που επωάστηκαν σε υπόστρωμα με 2 και 4 mg I⁻¹ BA με ή χωρίς IBA όχι μόνο δεν υπέστησαν καταστροφή αλλά συνέχισαν να ευνοούνται αναπτυξιακά αυξάνοντας κατά πολύ σε μήκος ενώ αυξήθηκε ο αριθμός και το μήκος των πλαγίων βλαστών συνάμα με το ποσοστό των εκφύτων που έδωσαν πλαγίους. Όσο οι βλαστοί επιμηκύνονταν απομακρυνόταν η κορυφή από τους κόμβους της βάσης που εκπτύσσονταν.

Γενικά, καθ'όλη τη διάρκεια της μελέτης η διάρκεια της επώασης θεωρήθηκε καθοριστική για την ανάπτυξη των παραγόμενων βλαστών κατά την υποκαλλιέργεια και γι' αυτό το λόγο άλλαξε ο χρόνος επώασης από την πρώτη υποκαλλιέργεια στις υπόλοιπες. Η λήψη διπλών μετρήσεων κατά τις δύο τελευταίες υποκαλλιέργειες επιβεβαίωσε αυτή τη θεωρία. Η επίδραση της διάρκειας επώασης φαίνεται να επηρεάζει την ανάπτυξη και άλλων ειδών *Pittosporum*, όπως το είδος *P. dasycaulon*, όπου η καταγραφή των αποτελεσμάτων για τον αριθμό βλαστών έγινε 60 μέρες μετά την εγκατάσταση, όμως του μήκους 70 ημέρες μετά (Bince, 2015), Ακόμη ο Dhar *et al.* (2000) τοποθέτησε ολόκληρους τους παραγόμενους κατά την αρχική εγκατάσταση βλαστούς για 4 εβδομάδες σε MS εμπλουτισμένο με 1, 0 mg I⁻¹ BA σε συνδυασμό με 0.02 mg I⁻¹ NAA για παραγωγή πλάγιων βλαστών (2^{ης} τάξης) και όντως παράχθηκαν 21 βλαστοί ανά έκφυτο με αυτόν τον τρόπο. Κατά τη διάρκεια της μελέτης αρχικά θεωρήθηκε ως καταλληλότερο υπόστρωμα για πολλαπλασιασμό το MS εμπλουτισμένο με 1 mg I⁻¹ BA, όμως όταν αυξήθηκε η διάρκεια επώασης ως καταλληλότερο υπόστρωμα θεωρήθηκε το MS εμπλουτισμένο με 2 ή 4 mg I⁻¹ BA, καθώς σε αυτά τα υποστρώματα παράχθηκαν περισσότεροι βλαστοί 2^{ης} τάξης, μη ξυλοποιημένοι, οι οποίοι μπορούσαν να υποκαλλιεργηθούν. Η επίλογή λοιπόν της συγκέντρωσης BA εξαρτάται από το χρονικό περιθώριο που υπάρχει για τον πολλαπλασιασμό. Οι μικροβλαστοί χωρίς το IBA στο θρεπτικό υπόστρωμα μπορούν να διατηρηθούν για τουλάχιστον τρεις μήνες χωρίς να καταστραφούν. Η μεγάλη διάρκεια ιστοκαλλιέργειας των μικροβλαστών φαίνεται να χαρακτηρίζει το γένος *Pittosporum*, καθώς οι μικροβλαστοί του *P. dasycaulon* μπορούν να διατηρηθούν για

τουλάχιστον 70 ημέρες (Bince, 2015), του *P. eriocarpum* για 5 μήνες (Thakur, 2016), ενώ ο Spencer (2010) για το *P. confertiflorum* το οποίο παρουσίαζε και προβλήματα καφετιάσματος κατά την καλλιέργεια αναφέρει για διατήρηση τουλάχιστον 6 εβδομάδων. Τα είδη του γένους *Pittosporum* φαίνεται να αντιδρούν με τον ίδιο τρόπο κατά το στάδιο του πολλαπλασιασμού εκπύσσοντας πλάγιους οφθαλμούς μετά από μεγάλη διάρκεια επώασης και δίνοντας πλάγιους βλαστούς όπως τα *P. eriocarpum* και *P. napaulensis* (Dhar *et al.*, 2000, Thakur *et al.*, 2016, Panwar *et al.*, 2016). Ωστόσο κατά τη διάρκεια της μελέτης του Bince (2015) για το *P. dasycaulon* δεν φαίνεται να παράγονται μασχαλιαίοι βλαστοί και ο αριθμός των βλαστών που παράχθηκαν από τα έκφυτα ήταν μικρός όπως και στο *P. angustifolium* και εξαρτήθηκε από τον αριθμό των οφθαλμών των εκφύτων (π.χ. 1,0-1,33 ανά οφθαλμό στο υπόστρωμα 2 mg I⁻¹/0,1 mg I⁻¹ NAA για το *P. dasycaulon* και 1,68/οφθαλμό στον ίδιο συνδυασμό φυτορρυθμιστικών για το *P. angustifolium*).

Ακόμη, η καλλιέργεια του *P. angustifolium* σε υγρό υπόστρωμα δεν στέφθηκε με επιτυχία, εν αντιθέσει με τα ξυλώδη είδη *Salix viminalis* και *Castanea sativa* όπου η υγρή καλλιέργεια αύξησε την απόδοση τους *in vitro* (Vidal *et al.*, 2016). Ωστόσο η βλαστογένεση μπορεί να μειώθηκε λόγω ασφυξίας των εκφύτων (Mehrota, 2007) και πιθανότατα η αύξηση της ταχύτητας ανάδευσης του αναδευτήρα για καλύτερο αερισμό (δημιουργία παφλασμού) ή η χρήση κάποιου υλικού στήριξης ((Debergh *et al.*, 1981, Leshem, 1983, Skidmore *et al.*, 1988, Dillen and Buysens, 1989), να αυξήσει την βλαστογένεση εκφύτων κόμβου *P. angustifolium* σε υγρό υπόστρωμα. Ακόμη, στις περισσότερες επεμβάσεις με φυτορρυθμιστικές ουσίες, το είδος δεν εμφάνισε προβλήματα υπερενυδάτωσης στους ιστούς του κατά την καλλιέργεια του σε υγρό θρεπτικό υπόστρωμα. Η απουσία υπερενυδάτωσης των ιστών έχει αναφερθεί και για την ιτιά *Salix viminalis* (Vidal *et al.*, 2013). Υπήρξαν όμως και δύο επεμβάσεις που έδωσαν υπερενυδατωμένους βλαστούς. Για την εξαγωγή σαφούς συμπεράσματος για την υάλωση απαιτείται μεγαλύτερος αριθμός επαναλήψεων δηλαδή υψηλότερη βλαστογένεση.

4.2 Ριζοβολία και εγκλιματισμός

Η ευεργετική επίδραση της υποδιπλασιασμένης δύναμης για επαγωγή ριζών είναι μια πρακτική που έχει αναφερθεί από πολλούς ερευνητές για ξυλώδη είδη

(Papafotiou *et al.*, 2013, Mostafa *et al.*, 2010, Cheruvathur and Thomas 2014, Cheruvathur *et al.*, 2012), ενώ συνήθως η χαμηλή συγκέντρωση αλάτων και η αυξίνη IBA προωθούν επαρκή ριζοβολία βλαστών, ειδικά σε ξυλώδη είδη (Klerk 2002, Ramesh *et al.*, 2005, Pandey *et al.*, 2006, Rai *et al.*, 2010, Tripathi and Kumari 2010, Asthana *et al.*). Οι έρευνες που έχουν γίνει συγκεκριμένα για είδη του γένους *Pittosporum* συμφωνούν με την άποψη ότι η μειωμένη συγκέντρωση αλάτων στο θρεπτικό υπόστρωμα είναι ευεργετική για τη ριζοβολία μικροβλαστών του γένους (Thakur *et al.*, 2016, Bince, 2015) και υποδεικνύουν το IBA ως καταλληλότερη αυξίνη για ριζοβολία *in vitro* ανεπτυγμένων μικροβλαστών (Thakur *et al.*, 2016, Bince, 2015, Panwar *et al.*, 2016), ενώ το IBA είναι ευεργετικό και στη ριζοβολία άλλων ξυλωδών ειδών όπως τα *Dianthus fruticosus* και *Lithodora zahni* (Papafotiou and Stragas, 2009, Papafotiou and Kalantzis, 2009).

Λόγω των προαναφερθέντων έγινε χρήση υποστρώματος μισής δύναμης MS και αυξίνης IBA για προώθηση ριζοβολίας. Γενικά η ριζοβολία στο είδος *P. angustifolium* δεν έγινε με μεγάλη ευχέρεια. Η προσθήκη IBA ήταν απαραίτητη για ριζοβολία. Σημειώθηκαν μεν υψηλά ποσοστά ριζοβολίας σε κάποιες επεμβάσεις, όμως το μήκος των ριζών, καθώς και ο αριθμός τους, ήταν μικρός και οι ρίζες παράγονταν μέσω κάλου και όχι απευθείας από τη βάση του βλαστού. Τα *in vitro* πολλαπλασιασμένα φυτάρια του γένους *Pittosporum* φαίνεται να εμφανίζουν πρόβλημα στον εγκλιματισμό και αυτό φαίνεται από τα χαμηλά μεν ποσοστά εγκλιματισμού του *P. angustifolium*, αλλά και από το γεγονός ότι οι Dhar *et al.*, 2000, Thakur *et al.*, 2016, Panwar *et al.*, 2016 και Bince, 2015 για να επιτύχουν σχετικά υψηλά ποσοστά εγκλιματισμού άρδευαν κατά τον εγκλιματισμό τα μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια με υδατικό διάλυμα MS/2 ή MS/4 ή Hoagland's/4. Σε πολλά άλλα είδη, έχει αναφερθεί υψηλό ποσοστό θνησιμότητας για φυτά που έχουν αναπτυχθεί *in vitro* όταν μεταφέρονται σε αυτότροφες συνθήκες (Mathur *et al.*, 2008, Chandra *et al.*, 2010).

Πιο αναλυτικά, στους μικροβλαστούς ηλικίας 45 ημερών η συγκέντρωση 10 mg l⁻¹ IBA έδωσε το μεγαλύτερο ποσοστό ριζοβολίας και το μεγαλύτερο μήκος ριζών εν αντιθέσει με το πείραμα των (Thakur *et al.* 2016), όπου όσο αυξανόταν η συγκέντρωση IBA μειωνόταν το ποσοστό ριζοβολίας. Οι βλαστοί μήκους 3 cm ριζοβόλησαν σε μεγαλύτερο ποσοστό όμως έδωσαν λιγότερες ρίζες συγκριτικά με τους βλαστούς 2 cm. Το συνεχές σκοτάδι αύξησε τόσο το ποσοστό ριζοβολίας όσο

και το μήκος των ριζών, αλλά ήταν επιζήμιο για την εμφάνιση των φυταρίων. Η αρνητική επίδραση του σκότους στην εμφάνιση των φυταρίων έχει αναφερθεί και για άλλα είδη όπως τα *Quercus robur* και *Q. rubra* (Sanchez *et al.*, 1996). Ακόμη, οι μικροβλαστοί κατά την επώαση τους στα υποστρώματα ριζοβολίας σε συνθήκες 16 h φωτοπεριόδου εμφάνισαν την τάση για καφέτιασμα μη επιτρέποντας την παραμονή στο υπόστρωμα για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα, ώστε να αυξηθούν σε μήκος οι ρίζες, όπως συνέβαινε σε άλλα είδη *Pittosporum*, όπως το *P. dasycaulon*, όπου οι βλαστοί αφήνονταν για 40 ημέρες στο υπόστρωμα ριζοβολίας δίνοντας μήκη ριζών 2,87-3,52cm. Το IBA φαίνεται να προωθεί το καφέτιασμα αν ληφθεί υπ' όψιν και η καταστροφή των μικροβλαστών που επωάζονταν σε χαμηλές συγκεντρώσεις κυτοκινίνης με IBA κατά την 6^η υποκαλλιέργεια. Πιθανόν η χρήση κάποιου αντιοξειδωτικού σε συνδυασμό με μέσο οξίνισης στο θρεπτικό υπόστρωμα να μειώσει την τάση για καφέτιασμα και να επιτρέψει την παραμονή των βλαστών για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα στο υπόστρωμα ριζοβολίας για αύξηση των ριζών. Η φωτοπερίοδος κατά τη ριζοβολία δεν επηρέασε τον εγκλιματισμό των φυταρίων. Τα φυτάρια από χαμηλές συγκεντρώσεις IBA έδειξαν την τάση για εγκλιματισμό σε μεγαλύτερο ποσοστό. Οι βλαστοί μεγαλύτερου μήκους εγκλιματίστηκαν σε μεγαλύτερο ποσοστό.

Δεδομένου ότι η παραγωγή κάλου είναι επιζήμια για την επιβίωση των φυταρίων κατά τη διάρκεια του εγκλιματισμού, η βελτίωση της ριζογένεσης και ο μειωμένος σχηματισμός κάλου έχει ιδιαίτερη σημασία. Καθοριστικό ρόλο παίζει ο χρόνος παραμονής στο υπόστρωμα (Gaspar *et al.*, 1977). Άφθονος σχηματισμός κάλου που προκύπτει όταν οι βλαστοί αφήνονται σε συνεχή επαφή με τα μέσα ριζοβολίας μπορεί να αποφευχθεί αν μειωθεί η περίοδος επώασης σε IBA (James and Thurbon 1979, Snir και Erez 1980). Η επώαση αρχικά σε θρεπτικό διάλυμα υψηλής συγκέντρωσης IBA και η μετέπειτα μεταφορά των μικροβλαστών σε υπόστρωμα MS/2, χωρίς φυτορρυθμιστική ουσία χρησιμοποιήθηκε και από τους Dhar *et al.* (2000) καθιστώντας τη ριζοβολία των *in vitro* ανεπτυγμένων μικροβλαστών του *P. napaulensis* επιτυχή σε ποσοστό 76,2 % μετά από 4 εβδομάδες επώασης στο υπόστρωμα MS/2 με ρίζες 2,6 cm που έβγαιναν κατευθείαν από τη βάση του βλαστού. Η παραμονή των μικροβλαστών *P. angustifolium* αρχικά σε υπόστρωμα υψηλής συγκέντρωσης (10 mg l^{-1}) με μετέπειτα μεταφορά των βλαστών σε υπόστρωμα MS/2 χωρίς φυτορρυθμιστική ουσία για περαιτέρω επώαση έδωσε υψηλά

ποσοστά ριζοβολίας (83-100%) με μεγαλύτερες ρίζες στο συνεχές σκοτάδι (0,37cm). Οι ρίζες παράχθηκαν μεν μέσω κάλου όμως η ποσότητα του κάλου ήταν μικρότερη συγκριτικά με τη συνεχή παραμονή σε IBA, ενώ η μείωση του κάλου με αυτόν τον τρόπο έχει γίνει και στο *Malosorbus florentina* (Μαρτίνη, 2014). Σε αυτό το πείραμα προωθήθηκαν για ριζοβολία βλαστοί 2 cm καθώς στο προηγούμενο πείραμα αυτού του μήκους οι βλαστοί έδωσαν περισσότερες ρίζες. Όπως και στο προηγούμενο πείραμα η φωτοπερίοδος κατά τη ριζοβολία δεν επηρέασε τον εγκλιματισμό. Τα ποσοστά του εγκλιματισμού ήταν χαμηλά (34,78-43,48%), όμως υψηλότερα συγκριτικά με τα φυτάρια που είχαν αναπτυχθεί καθ'όλη τη διάρκεια της επώασης σε υπόστρωμα με 10 mg I^{-1} στο προηγούμενο πείραμα ριζοβολίας.

Οι μικροβλαστοί μεγαλύτερης ηλικίας και μήκους 1cm ανταποκρίθηκαν καλύτερα στη ριζοβολία (υψηλότερα ποσοστά) από τους βλαστούς μικρότερης ηλικίας, όπως και στο *P. pendandrum* σύμφωνα με τον Edmiston (2002), ενώ δεν εμφάνισαν καφέτιασμα κατά την επώαση στο υπόστρωμα ριζοβολίας. Όμως το μήκος των παραγόμενων ριζών παρέμεινε μικρό, ενώ και σε αυτή την περίπτωση το μήκος των ριζών ήταν μεγαλύτερο σε συνεχές σκοτάδι. Η συγκέντρωση των 4 mg I^{-1} σε συνδυασμό με την επώαση σε συνεχές σκοτάδι έδωσε υψηλό ποσοστό ριζοβολίας, ικανοποιητικό αριθμό ριζών και με μεγαλύτερο μήκος από τις υπόλοιπες επεμβάσεις. Τα φυτάρια που ριζοβόλησαν σε 16 h πλήρους φωτός δεν εγκλιματίστηκαν καθόλου, ενώ αυτά που ριζοβόλησαν σε συνεχές σκοτάδι σημείωσαν ποσοστά εγκλιματισμού (37,50-56,25%). Αυτό δημιουργεί ερωτήματα καθώς η εμφάνιση των φυταρίων που δημιουργήθηκαν σε σκοτάδι δεν συνεπάγεται ευρωστία. Τα φυτάρια που ριζοβόλησαν σε φως πιθανότατα δεν εγκλιματίστηκαν λόγω μικρότερων ριζών σε συνδυασμό με το μικρό μήκος (1,0cm). Αν ληφθεί υπ'όψιν ότι κατά το δεύτερο πείραμα ριζοβολίας τα φυτάρια μεγαλύτερου μήκους εγκλιματίστηκαν σε μεγαλύτερο ποσοστό σε συνδυασμό με το χαμηλό δυναμικό δέσμευσης ανθρακα και την αργή ανάπτυξη που χαρακτηρίζει το είδος *P. angustifolium* (Cayzer *et al.*, 2000, Huxley, 1992) μπορεί να ερμηνευθεί η ακαταλληλότητα των βλαστών μήκους 1cm που ριζοβόλησαν σε φως. Η δημιουργία σκότους στη βάση του βλαστού με χρήση φύλλων αλουμινίου έχει βρεθεί ότι ευνοεί τη ριζοβολία σε κάποια είδη που ριζοβολούν δύσκολα *in vitro*, όπως η καστανιά, η φουντουκιά και η αμυγδαλιά (Rugini, *et al.*, 1993), ενώ στα είδη *Quercus robur* και *Quercus rubra* αύξησε ελάχιστα τη ριζοβολία (Sanchez *et al.*, 1996). Σε

μικροβλαστούς *P. angustifolium* που επωάστηκαν σε υπόστρωμα με 2 mg l^{-1} IBA (χρησιμοποιήθηκε αυτή η συγκέντρωση λόγω υπεροχής της στο πρώτο πείραμα εγκλιματισμού) η δημιουργία σκότους στη βάση έδωσε μικρότερο ποσοστό ριζοβολίας και μικρότερο μήκος ριζών από τους βλαστούς που ριζοβόλησαν σε συνεχές σκοτάδι ή 16 h φώς, όμως τα φυτά αυτά εγκλιματίστηκαν σε μεγαλύτερο ποσοστό πιθανότατα λόγω καλύτερης κατάστασης του υπέργειου μέρους.

Κλείνοντας, το μέσο μήκος των ριζών παρέμεινε μικρό ενώ ο κάλος μειώθηκε αρκετά μόνο όταν μειώθηκε η παραμονή σε υπόστρωμα με 10 mg l^{-1} , με σχετικά καλό μήκος ριζών στο συνεχές σκοτάδι. Ωστόσο, το γεγονός ότι βλαστοί μεγαλύτερης ηλικίας έδωσαν υψηλότερα ποσοστά ριζοβολίας συγκριτικά με βλαστούς μικρότερης ηλικίας και δεν παρουσίασαν καφέτιασμα κατά την επώαση τους σε 16 h πλήρους φωτός και αν ληφθεί υπ'όψιν ότι η συγκέντρωση 10 mg l^{-1} είναι μια αρκετά υψηλή συγκέντρωση, οπότε λιγότερο συμφέρουσα οικονομικά, σίγουρα απαιτείται περαιτέρω έρευνα στο κομμάτι της ριζοβολίας με κατεύθυνση την επίδραση χαμηλής συγκέντρωσης IBA σε βλαστούς που παράγονται από υποκαλλιέργεια σε 2 ή 4 mg l^{-1} BA. Αυτό θα μπορούσε να αφορά προσθήκη ενεργού άνθρακα στο υπόστρωμα, ο οποίος πιθανόν να ευνοήσει τη μορφογένεση ριζών και την εμφάνιση των φυταρίων απορροφώντας ανασταλτικές για τη ριζοβολία ουσίες απ' τους ιστούς ή το υπόστρωμα (μη αναστρέψιμη απορρόφηση), με ταυτόχρονη δημιουργία σκότους στη βάση του βλαστού (Thomas, 2008, Sanchez, 1996). Αυτό θα μπορούσε να συνδυαστεί με μείωση της δύναμης του MS από MS/2 σε MS/4 καθώς οι Panwar *et al.* (2016) βρήκαν για το *P. eriocarpum* ότι η υποτετραπλασιασμένη δύναμη MS δίνει υψηλότερα ποσοστά ριζοβολίας αλλά και μεγαλύτερου μήκους ρίζες. Σε ό,τι αφορά τον εγκλιματισμό, το μήκος των ριζών και των βλαστών των φυταρίων φαίνεται να είναι κρίσιμο. Στην αύξηση του εγκλιματισμού πιθανόν να βοηθήσει και η πρακτική των Dhar *et al.* (2000), Thakur *et al.* (2016), Panwar *et al.* (2016) και Bince, (2015) οι οποίοι πότιζαν τα φυτά κατά τη διάρκεια του εγκλιματισμού με υδατικό θρεπτικό διάλυμα.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Airi, S., Rawal, R. S, Samant, S. S and Dhar, U. (1998) Treatments to improve germination of four multipurpose trees of central subHimalaya. *Seed Sci. Tech.*, 26: 347–354.
- Aitken-Christie J. and Jones, C. (1987). Towards automation: Radiata pine shoot hedges *in vitro*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 8:185-196.
- Akeroyd, J. and Jackson, P. W. (1995). A handbook for botanical gardens on the reintroduction of plants to the wild. *Botanical gardens conservation international and IUCN*.
- Anand, R., Paul, L. and Chanway, C. (2006). Research on Endophytic Bacteria: Recent Advances with Forest Trees. In: B. Schulz, C. Boyle and T. N. Sieber (eds.), *Soil Biology, Vol. 9: Microbial Root Endophytes*. Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, pp.89-106.
- Attree, S. M., Pomery, M. K., Fowke, L. C. (1994). Production of vigorous, desiccation tolerant white spruce [*Picea glauca* (Moench.) Voss.] synthetic seeds in a bioreactor. *Plant Cell Rep.*, 13:601-606.
- Audley-Charles, M. G. (1987). Dispersal of Gondwanaland: relevance to evolution of the angiosperms. In: *Biogeographical evolution of the Malay archipelago*. Clarendon Press: Oxford.
- Bäcker, C. (2014). Untersuchungen zur Phytochemie und zur biologischen Aktivität von *Pittosporum angustifolium* Lodd. *Doktors der Naturwissenschaften*. Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald.
- Bäcker, C., Jenett-Siems, K., Bodtke, A., and Lindequist, U. (2014). Polyphenolic compounds from the leaves of *Pittosporum angustifolium*. *Biochem. Syst. Ecol.*, 55:101–103.
- Bäcker, C., Jenett-Siems, K., Siems, K., Wurster, M., Bodtke, A., Chamseddin, C., Crüsemann, M., and Lindequist, U. (2013). Triterpene glycosides from the leaves of *Pittosporum angustifolium*. *Planta Med.*, 79(15):1461–1469.
- Balotis, G., & Papafotiou, M. (2003). Micropropagation and stability of *Euphorbia pugniformis* cristate form. *Acta Horticulturae*, 616:471–474.
- Banerjee, P. (2013) *In vitro* plant regeneration of *Bauhinia variegata* Linn. through direct and indirect shoot bud development from different explants on MS solid and liquid media. *Indian J Appl Pure Biol.*, 28:181–192
- Bean. W. (1981) *Trees and Shrubs Hardy in Great Britain*. Vol 1 - 4 and Supplement.

- Ben Mahmoud, K., Najar, A., Jedid, E., Jemai N. and Jemmali, A. (2017). Tissue culture techniques for clonal propagation, viral sanitation and germplasm improvement in strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). *Agriculture and Biotechnology*, 47(2):2564-2576.
- Bentham, G. (1863). *Flora Australiensis*. Vol. 1. London.
- Bentham, G., and Hooker, J. D. (1862). *Genera Plantarum*. Vol. 1. London.
- Bertouklis, K. F., Papafotiou, M. and Chronopoulos, I. (2007b). Effect of cytokinin on shoot regeneration of *Arbutus andrachne*. *Proc. Hel. Soc. Hort. Sci.*, 22ed, Patra, Greece, 19- 21 Oct. 2005, 12(a):153-156 (In Greek).
- Bertsouklis, K. F. and Papafotiou, M. (2007). *In vitro* propagation of *Arbutus andrachne* L. *Acta Horticulturae*, 813:477–480.
- Bertsouklis, K., Papafotiou, M. and Balotis, G. (2003). Effect of medium on *in vitro* growth and *ex vitro* establishment of *Globularia alypum*. *Acta Hort.*, 616:177-180.
- Bhojwani, S. and S, Razdan M. K. (1996). *Plant tissue culture: theory and practice*, a revised edition. Elsevier Amsterdam-Lausanne-New York-Oxford-Shannon-Tokyo.
- Bince, M. (2015) Bioactivities, genetic analysis and conservation of *Pittosporum dasycaulon* (Pittosporaceae) from the western Ghats. Doctor of Philosophy thesis. Mahatma Gandhi University, Kottayam. 118 pp.
- Boine, B., Naujoks, G. and Stauber, T. (2008). Investigations on influencing plant-associated bacteria in tissue cultures of black locust (*Robinia pseudoacacia* L.). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 94:219-223.
- Bottcher, I., Zoglauer, K. and Goring, H. (1988). Induction and reversion of vitrification of plants cultured *in vitro*. *Physiol. Plant.* 72:560-654
- Broussalis, P. (1977). The protection of the flora in Greece and its problems. *Ann. Mus. Goulandris*, 3:23-30.
- Brown, R. (1814). In a Voyage to Australia. Appendix III (Ed. M . Flinders.) Vol. II. G. & W. Nicol, London.
- Bruschi, P., Schiff, S., Bennici, A. and Mori, B. (1998). An example of *in vitro* test to study the effects of surfactants in plant materials. *Chemosphere*, 36(4-5): 715-720.
- Burbidge, N. T. (1960). The phytogeography of the. Australian region. *Austral. J Bot.*, 8:75 - 209.
- Cayzer, L. W. (1997a). Revision of the family Pittosporaceae in Australia. Taxonomy. A thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy. Australian National University, Canberra, Australia.

- Cayzer, L. W. (1997b). Revision of the family Pittosporaceae in Australia. Systematics and Biogeography. A thesis submitted for the degree of Doctor of Philosophy. Australian National University, Canberra, Australia.
- Cayzer, L. W., Crisp, M. D., and Telford, I. R. H. (2000). Revision of *Pittosporum* (Pittosporaceae) in Australia. *Aust. Syst. Bot.*, 13(6):845–902.
- Chalupa, V. (1987) European hardwoods. In: Bonga JM & Durzan,DJ (eds) Cell and Tissue Culture in Forestry. Martinus Nijhoff Publishers, Dordrecht. pp. 224–246.
- Chandler, G. T., Plunkett, G. M., Pinney, S. M., Cayzer, L. W., Gemmill, C. E. C. (2007) Molecular and morphological agreement in Pittosporaceae: phylogenetic analysis with nuclear ITS and plastid trnL-trnF sequence data. *Aust Syst Bot*, 20:390-401.
- Chandra, S., Bandopadhyay, R., Kumar, V. and Chandra, R. (2010). Acclimatization of tissue cultured plantlets: from laboratory to land. *Biotechnol Lett.*, 32:1199–1205.
- Chase, M. W., Soltis, D. E., Omstead, R. G., Morgan, D., Les, D. H., Mishler, B.D., Duvall, M. R., Hills, H. G., Conti, E., Palmer, J. D., Manhart, J. R., Sytsma, K. J., Michaels, H. J., Kress, W. J., Karol, K. G., Clark, W. D., Hedn, M., Gaut, B. S., Jansen, R. K., Kim, K. J., Wimpee, C. F., Smith, J. F., Furnier, G. R., Strauss, S. H., Xiang, Q.Y., Plunkett, G. M., Soltis, P. S., Swensen, S. M., Williams, S. E., Gadek, P. A., Quinn, C. J., Eguiarte, L. E., Golenberg, E., Learn, J. R., Graham, S.W., Barrett, S. C. H., Dayanandan. S., Albert, V. A. (1993). Phylogenetics of seed plants: an analysis of nucleotide sequences from the plastid gene rbcL. *Ann. Missouri Bot. Card.*, 80:528-580.
- Chu, C. Y., Knight, S. L. and Smith, M. A. L. (1993). Effect of liquid culture on the growth and development of minature rose *Rosa chinensis* Jacq. *Minima. Plant Cell Tissue Organ Cult.* 32: 329-334.
- Conover, C. A, Joiner J. N. (1963). Rooting response of *Pittosporum tobira variegatum* as affected by 3-Indolebutyric acid, Rooting media and age of wood. *Florida State Horticult Soc*, 1781: 480–483.
- Cooper, R. C. (1956). The Australian and New Zealand Species of *Pittosporum*. *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 43(2):87-188.
- Cornu, D. and Michel, M. F. (1987). Bacteria contaminants in shoot cultures of *Prunus avium* L. Choice and toxicity of antibiotics. *Acta Hort.*, 212:83-86.
- Cronquist, A. (1981). *An Integrated System of Classification of Flowering Plants*. New York.

- Crüsemann, M. (2009). Isolierung und Charakterisierung bioaktiver Inhaltsstoffe von *Pittosporum angustifolium*, Diplomarbeit, Institut für Pharmazie, Lehrstuhl Pharmazeutische Biologie, Universität Greifswald.
- Cunningham, G. M., Mulham, W. E., Milthorpe, P. L. and Leigh, J. H. (1992) Plants of Western New South Wales, Inkata Press.
- Da Silva, J. A. (2012). Is BA (6-benzyladenine) BAP (6-benzylaminopurine)? Asian Australasian J Plant Sci Biotech., 6: 121–124.
- Dahlgren, R. 1975, A system of classification of the angiosperms to be used to demonstrate the distribution of characters. Bot. Not., 128:119-147.
- Debergh, P. C. and Mane, L. J. (1981). A scheme for commercial propagation of ornamental plants by tissue culture. Sci. Hortic. 14: 335-345.
- Debergh, P. C., Aitken-Christic, J., Cohen, B., Von Arnold, S., Zimmerman, R. and Ziv, M. (1992). Reconsideration of the term "vitrification" as used in micropropagation. Plant Cell Tissue Organ Cult. 30: 135-140.
- Densco, I. (1987). Factors influencing vitrification of carnation and conifers. Acta Hortic., 212: 167-176.
- Dhar, U., Upreti, J. and Bhatt, I. D. (2000). Micropropagation of *Pittosporum napaulensis* (DC.) Rehder & Wilson – a rare, endemic Himalayan medicinal tree. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 63: 231–235.
- Dillen, W. and Buysens, S. A. (1989). Simple technique to overcome vitrification in *Gypsophila paniculata* L. Plant Cell Tissue Organ Cult. 19: 181-188.
- Dir, M. A. and Heuser, C.W. (1987). The reference manual of woody plant propagation: from seed to tissue culture. Varsity Press, Atlanta. pp. 65-77.
- Douglas, G. C. (1984). Propagation of eight cultivars of *Rhododendron in vitro* using agar solidified and liquid medium and direct rooting of shoots in vivo. Sci. Hortic., 24:337-347.
- Dunstan, D. J. and Thorpe, T. A. (1986) Regeneration of forest trees. In: Vasil IK (ed) Cell Culture and Somatic Cell Genetics of Plants, Vol. 3. Academic Press, New York. pp.223–241.
- Durmic, Z., McSweeney, C. S., Kemp, G. W., Hutton, P., Wallace, R. J. and Vercoe P. E. (2008). Australian plants with potential to inhibit bacteria and processes involved in ruminal biohydrogenation of fatty acids. Anim Feed Sci Technol., 145:271284.
- Earle, E. D. and Langhans, L. W. (1975). Carnation propagation from shoot tip cultured in liquid medium. Hortic. Sci. 10:608-610.

- Edmiston, M. P. F. (2002). Morphogenetic responses of stem explants and axillary shooting in node segments from adult trees of *Pittosporum pentandrum* (Blco.) Merr. *Agris*, 11(1):1-8.
- Erbar, C., and Leins, P. (1996). An analysis of the early floral development of *Pittosporum tobira* (Thunb.) AITON and some remarks on the systematic position of the family Pittosporaceae. *Feddes Repertorium*, 106(5-8):463–473.
- Errington, S. G., and Jefferies, P. R. (1988). Triterpenoid sapogenins of *Pittosporum phyllyraeoides*. *Phytochemistry*, 27 (2):543–545.
- Everist, S. L. (1986). Use of Fodder Trees and Shrubs. Queensland Department of Primary Industries: Brisbane.
- Fitzgibbon, J. (2003). Treenet trials: A tree grower's perspective. 4th national street tree symposium. Adelaide University.
- Floyd, A. G. (1989). Rainforest Trees of Mainland South-eastern Australia. Inkata Press. Melbourne.
- Follosco, M. P., Halos, S. C. and Rivero, G. C. (1997). Morphogenetic responses of leaf and stem explants of *Pittosporum pentadrum* (BL.) Merr cultured *in vitro*. *Agris*, 22(1):21.
- Follosco, M. P., Halos, S. C. and Zamora, C.V. (1997β). Effects of cytokinin and auxins on *Pittosporum pentandrum* (BL.) Merr. cultured *in vitro*. *Agris*, 19(1):38.
- Gaspar, T., Smith, D. and Thorpe, T. (1977). Arguments supplementaires en faveur d'une variation inverse du niveau auxinique endogene au cours des deux premieres phases de la rhizogenese. *C. R. Acad. Sci. Ser. D.*, 285: 327-330.
- Gaspar, T. H., Kevers, C., Debergh, P., Maene, L., Paques, M., and Boxus, P. H. (1987). Vitrification: morphological, physiological and ecological aspects. In: Bonga, J. M., Duran, D. J. (eds.) *Cell and tissue culture in forestry*. Vol. 1. General principles and Biotechnology, Martinus Nijhoff, Dordrecht., pp. 152-166.
- Godley, E. J. (1979). Flower biology in New Zealand. *New Zealand J Bot.*,17:441-66 .
- Gowda, M . (1951). The genus *Pittosporun* in the Sino-Indian region. *J Arn. Arb.*, XXXII:263 - 343 .
- Greuter, W., Burdet, H. M., Chaloner, W. G., Demoulin, V., Grolle, R., Hawksworth, D. L., Nicholson, D. H., Silva, P. C., Stafleu, F. A., Voss, E. G., and McNeill, J. (Eds) (1988). *International Code of Botanical Nomenclature*. Koeltz Scientific Books: Berlin.
- Gros, J. P. (1965). Contribution a l'étude cyto-taxinomique des Pittosporacées. *Memoire de la Museum d'Histoire Naturelle de Paris*, ser. B. Botanique, 16:61–90.

- Gunn, B. V. (2001) Australian Tree Seed Centre Operations Manual. Internal Publication, CSIRO Australian Tree Seed Centre, ACT. [Online at <http://www.ensisjv.com/Portals/0/atsc-opmanualcomplete.pdf> Accessed March 2008] <https://publications.csiro.au/rpr/download?pid=legacy:482&dsid=DS1>
- Hakkaart, F. A. and Versluijs, J. M. (1983). Some factors affecting glassiness in carnation meristem tip cultures. Neth. J. Plant Pathol., 89: 7-53.
- Harris, R. E. and Mason, E. D. D. (1983). Two machines for *in vitro* propagation of plants using liquid media. Can. J. Plant Sci., 63:311-316.
- Hartmann, H. T., Kester, D. E. Davies, F. T. and Geneve, R.L. (2002). Plant propagation: principles and practices. Seventh edition. Prentice Hall, Inc. New Jersey.
- Heller, R. (1953) Researches on the mineral nutrition of plant tissues. Ann Sci Nat Bot Biol Veg, 14:1-223
- Hellmund, S. (2007). Biologische und chemische Untersuchungen von *Pittosporum phillyraeoides*, Diplomarbeit, Institut für Pharmazie, Lehrstuhl Pharmazeutische Biologie, Universität Greifswald.
- Holliday. I. and Hill. R. (1974) *A Field Guide to Australian Trees*. Frederick Muller
- Huijser, P. and Schmid, M. (2011). The control of developmental phase transitions in plants. Development, 138:4117-4129.
- Huxley. A. (1992) *The New RHS Dictionary of Gardening*. MacMillan Press, London.
- James, D. J. and Thurbon, I. J. (1979). Rapid *in vitro* rooting of the apple rootstock M 9. J. Hortic. Sci., 54: 309-311.
- Kaewkla, O. and Mathew Franco, C. M. (2016). *Kribbella pittospori* sp. nov., an endophytic actinobacterium isolated from the surface-sterilized stem of an Australian native apricot tree, *Pittosporum angustifolium*. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 66: 2284-2290.
- Kartsonas, E. and Papafotiou, M. (2007a). Mother plant age and seasonal influence on *in vitro* propagation of *Quercus euboica* Pap., an endemic, rare and endangered oak species of Greece. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 90(1):111-116.
- Kartsonas, E. and Papafotiou, M. (2007b). Studies on *ex vitro* acclimatization of *Quercus euboica*. Proc. Hel. Soc. Hort. Sci. 23ed, Chania, Greece, 23-26 Oct. 2005, 13: in press. Abstract p. 263 (in Greek).
- Kevers, C., Comans, M., Coumans-Gilles, M. E. and Gasper, T. H. (1984). Physiological and biochemical events leading to vitrification in plant cultured *in vitro*. Physiol. Plantarum., 61:69-74.

- Kondo, K., Takahashi, M., and Morikawa, H. (2002). Regeneration and Transformation of a Roadside Tree *Pittosporum tobira* A. Plant Biotechnology, 19(2), 135–139.
- Kumar, N. and Reddy, M. P. (2011). *In vitro* plant propagation. J Forest Sci., 27:61-72.
- Lassak, E. V. and McCarthy, T. (1987). Australian Medicinal Plants.
- Latz, P. K. (1995). Bushfires and Bushtucker: Aboriginal Plant Use in Central Australia. IAD Press:Alice Springs, NT.
- Lazarides, M., and Hince, B. (1993). CSIRO Handbook of Economic Plants of Australia. Canberra.
- Leifert, C. and Cassells, A. C. (2001). Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant, 37:133-138.
- Levin, R., Stav, R., Alper, Y. and Watad, A. A. (1997). A technique for repeated axenic subculture of plant tissues in a bioreactor on liquid medium containing sucrose. Plant Tissue Cult. Biotechnol., 3:41-45.
- Limiatas, P., Papafotiou, M. and Chronopoulos, I. (2001). Studies on *in vitro* propagation of *Arbutus unedo* L. Proc. Hel. Soc. Hort. Sci. 19th, Heraclion, Greece, 25-27 Oct 1999, 9: 453-456 (in Greek).
- Lloyd, G. and McCown, B. (1980) Commercially-feasible micropropagation of mountain laurel, *Kalmia latifolia*, by use of shoot-tip culture. In: Combined proceedings, International Plant Propagators' Society. pp. 421–427.
- Loyola-Vargas, V. M., Ochoa-Alejo N. (2018) An Introduction to Plant Tissue Culture: Advances and Perspectives. In: Loyola-Vargas V., Ochoa-Alejo N. (eds) Plant Cell Culture Protocols. Methods in Molecular Biology, vol 1815. Humana Press, New York. pp. 3-13.
- Maiden, J. H. (1904). The Forest Flora of New South Wales. Vol. 1, parts 1–10. Government Printer: Sydney, NSW.
- Maiden, J. H. (1917). The Forest Flora of New South Wales. Vol. 7, part 64. Government Printer: Sydney, NSW.
- Makinson, R. O. (1992). Pittosporaceae. In: Flora of New South Wales. (Ed. G. Harden.) Vol. 3. New South Wales University Press, Kensington. pp. 65–74.
- Marino, G., Altan, A. D. and Biavati, B. (1996). The effect of bacterial contamination on the growth and gas evolution of *in vitro* cultured apricot shoots. *In vitro* Cell. Dev. Biol. Plant, 32:51-56.

- Marks, T. R., and Simpson, S. E. (2000). Interaction of explant type and indole-3-butyric acid during rooting *in vitro* in a range of difficult and easy-to-root woody plants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 62(1): 65–74.
- Mathur, A., Mathur, A. K., Verma, P., Yadav, S., Gupta, M. L., Darokar, M. P., *et al.* (2008). Biological hardening and genetic fidelity testing of micro-cloned progeny of *Chlorophytum borivillianum* Sant. et Fernand. *Afr J Biotechnol*, 7:1046–1053.
- Mayer, S. S., and Charlesworth, D. (1991). Cryptic dioecy in flowering plants. *TREE*, 6:320-325.
- Mc Naughton, S. J. (1989). Ecosystems and conservation in the twenty-first century In: Western D., Pearl M (Eds.), *Conservation for the Twenty-first Century*. Oxford University Press, New York. pp.109–120.
- Mehrotra, S., Goel, M. K., Kukreja A. K., and Mishra, B. N. (2007). Efficiency of liquid culture systems over conventional micropropagation: A progress towards commercialization. *Afr J Biotechnol.*, 6:1484–1492.
- Murashige, T. (1974). Plant propagation through tissue cultures. *Annu Rev Plant Physiol.*, 25:135–166.
- Murashige, T. (1977). Plant cell and organ cultures as horticultural practices. *Symp Tissue Cult Hortic Purp.*, 78:17–30.
- Murashige, T. and Skoog, F., (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15:473–497.
- Olmstead, R. G., Bremer, B. J., Scott, K. M. and Palmer, J. D. (1993). A parsimony analysis of the Asteridae sensu lato based on rbcL sequences. *Ann. Missouri Bot. Card.*, 80:700-722.
- Olmstead, R. G., Michaels, H. J., Scott, K. M. and Palmer, J. D. (1992) Monophyly of the Asteridae and identification of their major lineages inferred from DNA sequences of rbcL. *Ann. Missouri Bot. Card.*, 79:249-265.
- Oporto, D. A. (1998). Mass propagation of mamalis (*Pittosporum pentandrum* [Blco.] Merr) through shoot tip cuttings. *Agris*.
- Palombo, E. A. and Semple, S. J. (2001). Antibacterial activity of traditional Australian medicinal plants. *J Ethnopharmacology*, 77:151-157.
- Pangtey, Y. P. S. and Samant, S. S. (1988) Observation on the threatened, rare and endangered flowering plants and ferns in the flora of Kumaun Himalaya. *Adv. For. Res. India* 3: 65–74.

- Panwar, G. S., Srivastava, A. and Srivastava, S. K. (2016). Micropropagation of *Pittosporum eriocarpum* royle- an endangered and endemic medicinal tree of north-west himalaya. *Indian Forester*, 142(8):769-773.
- Papafotiou M. and Stragas, J. (2009). Seed germination and *in vitro* propagation of *Dianthus fruticosus* L. *Acta Hort.*, 813:481-484.
- Papafotiou, M. (2010). *In vitro* propagation of temperate zone woody plants with potential ornamental use. *Acta Horticulturae*, (885):255–262.
- Papafotiou, M. and Kalantzis, A. (2009a). Studies on *in vitro* propagation of *Lithodora zahni*. *Acta Hort.*, 813:465-470.
- Papafotiou, M. and Kalantzis, A. (2009b). Seed germination and *in vitro* propagation of *Sideritis athoa*. *Acta Hort.*, 813:471-476.
- Papafotiou, M. and Martini, A. (2009a). Effect of growth medium on *in vitro* shoot regeneration of \times *Malosorbus florentina* Zucc. *Acta Hort.*, 813:497-502.
- Papafotiou, M. and Martini, A. (2009b). Influence of season and sterilization method on response of \times *Malosorbus florentina* buds to *in vitro* culture. *Acta Hort.* 813:497-502.
- Papafotiou, M., Bertsouklis, K. F., and Trigka, M. (2013). Micropropagation of *Arbutus unedo*, *A. andrachne*, and their natural hybrid *A.xandrachnoides* from seedling explants. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 88(6):768–775.
- Papafotiou, M., Martini, A. N., and Vlachou, G. (2017). *In vitro* propagation as a tool to enhance the use of native ornamentals in archaeological sites of Greece. *Acta Horticulturae*, 1155:301–308.
- Papagianni, A., Papafotiou, M. and Bertsouklis, K. F. (2016). *In vitro* propagation of *Arbutus unedo* var. *rubra* starting from seedlings and adult parental plants
- Paque, M., Bercetche, J. and Dumas, E. (1992). Liquid media to improve and reduce the cost of *in vitro* conifer propagation. *Acta Horticult.*, 319:95-100.
- Patena, L., Sutter, E. G., and Dandekar, A. M. (1988). Root induction by *Agrobacterium rhizogenes* in a difficult-to-root woody species. *Acta Horticulturae*, (227):324–329.
- Pax, F. (1891). Pittosporaceae. In: *Die Naturalischen Pflanzenfamilien*. (Eds A. Engler and K. Prantl.) (Wilhelm Engelmann: Leipzig.). pp. 106–114.
- Pereira, M. J. (2006). Conservation of *Vaccinium cylindraceum* Smith (Ericaceae) by micropropagation using seedling nodal explants. *In vitro Cell. Dev. Biol.Plant*, 42:65–68.

- Pirttilä, A. M., Laukkanen, H., Pospiech, H., Myllyla, R. and Hohtola, A. (2000). Detection of Intracellular Bacteria in the Buds of Scotch Pine (*Pinus sylvestris* L.) by In Situ Hybridization. *Appl. Environment. Microbiol.*, 66:3073-3077.
- Plunkett, G. M., Soltis, D. E., Soltis, P. S., (1992). Molecular phylogenetic study of Apiales (Apiaceae, Araliaceae. and Pittosporaceae). *Amer. J. Bot*, 79:158.
- Poethig, R.S. (1990). Phase change and the regulation of shoot morphogenesis in plants. *Science*, 250:923-930.
- Poethig, R.S. (2010). The past, present, and future of vegetative phase change. *Plant Physiol.*, 154:541-544.
- Raven, P. H., and Axelrod, D. I. (1974). Angiosperm biogeography and past continental movements. *Ann. Missouri Bot. Gard*, 61:539-673 .
- Rawat, J. M., Rawat, B., Agnihotri, R. K., Chandra, A. and Nautiyal, S. (2013). *In vitro* propagation, genetic and secondary metabolite analysis of *Aconitum violaceum* Jacq., a threatened medicinal herb. *Acta Physiol Plant*, 35: 2589–2599.
- Rawat, V. S. and Rawat, Y. S. (2010). Indigenous knowledge and sustainable development in the Tones Valley of Garhwal Himalaya, *J. of Medicinal Plant Research*, 4(19):2043-2047.
- Read, P. E. and Fellman, C. D. (1985). Accelerating acclimation of *in vitro* propagated woody ornamentals. *Acta Horticulturae*, 166:15-20.
- Ren, H., Zeng, S. J., Li, L. N., Zhang, Q. M., Yang, L., *et al.* (2012) Community ecology and reintroduction of *Tigridiopalma magnifica*, a rare and endangered herb. *Oryx*, 46(3):371–398.
- Rout, G., Samantaray, S. and Das P. (2000). *In vitro* manipulation and propagation of medicinal plants. *Biotechnol Adv.*, 18:91–120.
- Rout, T. M., Hauser, C. E. and Possingham, P. (2009). Optimal adaptive management for translocation of a threatened species. *Ecol Appl.*, 19: 515–526.
- Rugini, E., Jacoboni, A. and Luppino, M. (1993). Role of basal shoot darkening and exogenous putrescine treatments on *in vitro* rooting and on endogenous polyamine changes in difficult-to- root woody species. *Scientia Horticulturae*, 53:63-72.
- Sach, J. (2011). Zellbiologische Untersuchungen von Extrakten und Substanzen einer Pittosporum-Art, Dissertation, Institute für Pharmakologie und Pharmazie, Universität Greifswald.
- Sadgrove, N. J. and Jones, G. L. (2013). Chemical and biological characterisation of solvent extracts and essential oils from leaves and fruit of two Australian species of

- Pittosporum* (Pittosporaceae) used in aboriginal medicinal practice. J Ethnopharmacol., 145:813-821.
- Sadgrove, N. J., and Jones, G. L. (2013). Chemical and biological characterisation of solvent extracts and essential oils from leaves and fruit of two Australian species of *Pittosporum* (Pittosporaceae) used in aboriginal medicinal practice. J Ethnopharmacol., 145(3):813–821.
- Sadgrove, N. J., and Jones, G. L. (2016). Phytochemical variability of *Pittosporum angustifolium* Lodd. (Pittosporaceae): a traditional and contemporary Aboriginal Australian medicine. Acta Horticulturae, (1125):303–308.
- Samant, S. S., Dhar, U. and Palni, L. M. S. (1998) Medicinal Plants of Indian Himalaya: diversity, distribution and potential values.
- Sanchez, M. C., San-Jose M. C., Ballester, A. and Vieitez, A. M. (1996). Requirements for *in vitro* rooting of *Quercus robur* and *Q. rubra* shoots derived from mature trees. Tree Physiology, 16(8):673–680.
- Sandal, I., Bhattacharya, A. and Ahuja, P. S. (2001). An efficient liquid culture system for tea shoot proliferation. Plant Cell Tissue Organ Cult., 65:75-80.
- Scherling, C., Ulrich, K., Ewald, D. and Weckwerth, W. (2009). A metabolic signature of the beneficial interaction of the endophyte *Paenibacillus* sp. isolate and *in vitro*-grown poplar plants revealed by metabolomics. Molec. Plant-Microbe Interact., 22:1032-1037.
- Schulze-Menz, G. K. (1964). Reihe Rosales. In: MELchior, H. (ed.), A. ENGLER Syllabus der Pflanzenfamilien, 11:193-242.
- Semple, S. J., Reynolds, G. D., O’Leary, M.C., and Flower, R.L. (1998). Screening of Australian medicinal plants for antiviral activity. J Ethnopharmacol 60 (2), 163–172
- Shahzad, A., Sharma, S., Parveen, S., Saeed, T., Shaheen, A., Akhtar, R. and Ahmad, Z. (2017). Historical Perspective and Basic Principles of Plant Tissue Culture. Plant Biotechnology: Principles and Applications. pp. 1–36.
- Singh, D. and Goel R. (1999). *Pittosporum eriocarpum* (Pittosporaceae)-an endangered species with its new distribution record from Tehri district. Ann Forest, 7(2):185–191.
- Singh, D. and Goel, R. (1999). *Pittosporum eriocarpum* – an endangered species with its new distribution recorded from Tehri District, Annals of Forestry, 7(2): 185-197.
- Skidmore, D. I, Simons, A. J. and Bedi, S. (1988). *In vitro* culture of shoots of *Pinus caribaea* on a liquid medium. Plant Cell Tissue Organ Cult., 14:129-136.

- Smart, N. J. and Fowler, M. W. (1984). An airlift column bioreactor suitable for large scale cultivation of plant cell suspensions. *J. Exp. Bot.*, 35:531-537.
- Smith, M. A. L. and Spomer, L. A. (1994). Vessels, gels, liquid media and support systems. In: Aiktken-Christie, J., Kosai, T. and Smith, M. A. L. (eds.). (1994). *Automation and Environmental control in plant tissue culture*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht., 371-404.
- Snir, J. and Erez, A. (1980). In vitro propagation of MaUing Merton apple rootstocks. - *Hortic. Sci.* 15: 597-598.
- Spencer, K. K. P. (2010). *In vitro* establishment of *Pittosporum confertiflorum* gray, an endemic plant of hawaii. Master of science thesis. University of Hawaii. 40 pp.
- Srivastava, A., Srivastava, S. K. and Dangwal, L. R. (2016). *Pittosporum eriocarpum* Royle (Pittosporaceae): An Endemic, Endangered Species of North-West Himalaya Facing Threat. *Indian Journal of Forestry*, 39(2):169-172.
- Stephen M, Nagarajan S. and Ganesh, D. (2010) Phloroglucinol and silver nitrate enhances axillary shoot proliferation in nodal explants of *Vitex negundo* L. â aromatic medicinal plant. *Iran J Biotechnol.*, 8:82–89.
- Takayama, S. (1991). Mass propagation of plants through shake and bioreactor culture techniques. In: Bajaj, Y. P. S. (ed.) *Hightech. and Micropropagation*. Springer-Verlag, Berlin. *Biotechnol. Agricul. For.*, 17:1-46.
- Takayama, S. and Misawa, M. (1981). Mass propagation of *Begonia x hiemalis* plantlets by shake culture. *Plant Cell Physiol.*, 22:461-467.
- Takayama, S. and Misawa, M. (1981). Mass propagation of *Begonia x hiemalis* plantlets by shake culture. *Plant Cell Physiol.* 22:461-467.
- Takhtajan, A., (1980). Outline of the classification of flowering plants (Magnoliophyta). *Bot. Rev.*, 46:225-359.
- Takhtajan, A., (1987). *System Magnoliophytorum*. Leningrad. (In Russian).
- Tautorius, T. E. and Dunstan, D. I. (1995). Scale up of embryogenic plant suspension cultures in bioreactors. In: Jain, M., Gupta, P. K. and Newton, R, J. (eds.) *Somatic embryogenesis in woody plants*. Vol. 1. Kluwer Acad Publ. Dordrecht. The Netherlands, pp. 265-269.
- Thakur, J., Dwivedi, M. D., Sourabh, P., Uniyal, P. L. and Pandey, A. K. (2016) Genetic Homogeneity Revealed Using SCoT, ISSR and RAPD Markers in micropropagated *Pittosporum eriocarpum* Royle-An Endemic and Endangered Medicinal Plant. *Plos one*,11(7):e0159050.
- Thapliyal, R. C. (1994). Seed set, seed dispersal, dormancy and germination in some temperate forest species of Western Himalaya: Problems and research needs. In:

- Forestry Research and Education in India. Dogra, P. S. and Dhiman, R.C. (eds.) Indian National Science Academy, New Delhi.
- Thomas, P., Kumari, S., Swarna, G. K., Prakash, D. P. and Dinesh, M. R. (2007). Ubiquitous presence of fastidious endophytic bacteria in field shoots and index-negative apparently clean shoot-tip cultures of papaya. *Plant Cell Rep.*, 26:1491-1499.
- Thomas, T. D. (2008). The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnology Advances*, 26(6):618–631.
- Thompson, M. (2014). An investigation of the ecology and bioactive compounds of *Pittosporum angustifolium* endophytes. BSc Thesis. University of Southern Queensland.
- Thorne, R. F. (1983). Proposed new realignments in the angiosperms. *Nord. J. Bot.*, 3:85-117.
- Thorne, R. F. (1992). Classification and geography of the flowering plants. *Bot. Rev.*, 58:225-348.
- Trigka, M., and Papafotiou, M. (2017). *In vitro* propagation of *Anthyllis barba-jovis* from seedling tissues. *Acta Horticulturae*, 1189:473–748.
- Tripathi, M. and Kumari, N. (2010). Micropropagation of a tropical fruit tree *Spondias mangifera* Willd. through direct organogenesis. *Acta Physiol Plant*, 32:1011–1015.
- Ulrich, K., Stauber, T. and Ewald, D. (2008). *Paenibacillus* – a predominant endophytic bacterium colonising tissue cultures of woody plants. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 93: 347-351.
- Vesoul, J., and Cock, I. E. (2011). An examination of the medicinal potential of *Pittosporum phylliraeoides*: toxicity, antibacterial and antifungal activities. *Pharmacog. Comm.*, 1(2):8–17.
- Vidal, N., Correa, B., Rial, E., Regueira, M., Sánchez, C. and Cuenca, B. (2015). Comparison of temporary and continuous immersion systems for micropropagation of axillary shoots of chestnut and willow. *Acta Horticulturae*, (1083):227–233.
- Vijaya, S., Udayasri, P., Aswani, K., Ravi, B., Phani, K. and Vijay, V. (2010). Advancements in the production of secondary metabolites. *J Nat Prod.*, 3:112–123.
- Walter, K. S. and Gillett, H. J. (1998). IUCN red list of threatened plants.
- Wang, J. W., Park, M.Y., Wang, L. J., Koo, Y., Chen, X. Y., Weigel, D. and Poethig, R. S. (2011). MiRNA control of vegetative phase change in trees. *Plos Genet*, 7: e1002012.

- Weathers, P. J. and Giles, K. L. (1988). Regeneration of lentils utilizing nutrient mist culture. *In vitro Cell Dev. Biol. Plant.*, 24(7):727-732.
- Webb, L. J., Tracey, J. G., and Jessup, L. W. (1986). Recent evidence for autochthony of Australian tropical and subtropical rainforest floristic elements. *Telopea*, 2:575-589.
- Welander, M. (1983). In vitro rooting of the apple rootstock M 26 in adult and juvenile growth phases and acclimatization of the plantlets. *Physiologia Plantarum*, 58(3), 231–238.
- Weston, P. and Crisp, M. D . (1996). Trans-pacific biogeographic patterns in the Proteaceae. In: The origin and evolution of Pacific Island biotas. New Guinea to Eastern Polynesia: patterns and processes. (Eds A. Keast and S. E . Millar.) (SPB Academic Publishing: Amsterdam.)
- Widrechner, M. P., Daly, C., Keller, M. and Kaplan, K. (2012). Horticultural Applications of a Newly Revised USDA Plant Hardiness Zone Map. *Hort Technology*, 22(1):6-19.
- Winkelmann, T. (2013). Recent advances in propagation of woody plants. *Acta Horticulturae*, 990:375–381.
- Wu, K., Zeng, S., Lin, D., Silva, J. A. T. D., Bu, Z., Zhang, J., *et al.* *In vitro* propagation and Reintroduction of the Endangered *Renanthera imschootiana* Rolfe. *PloS one*, 9:1–12.
- Young, P. S., Murthy, H. N. and Paek, K. Y. (2000). Mass multiplication of protocorm like bodies using bioreactor system and subsequent plant regeneration in *Phalaenopsis*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 63:67-72.
- Zamora, C. V. (1992). Tissue culture of *Pittosporum resiniferum* Hemsl. (Petroleum nut tree). *Agris*, 3:46-66.
- Zamora, C. V. (1995) *In vitro* culture of *Pittosporum pentandrum* (B1) Merr. (Mamalis). *Agris*, 17(1):31.
- Zamora, C. V., Vargas, N. S. and Silva, L. B (1999). Tissue culture of *Pittosporum pentandrum* (Bl.) Merr. (Mamalis) and plantlet regeneration of *P. resiniferum* Hemsli (hanga-hanga). *Agris*, 2(2):51-52.
- Ziv, M. (1989). Enhanced shoot and cornlet proliferation in liquid cultured gladiolus buds by growth retardants. *Plant Cell Tissue Organ Cult.*, 17: 101-110.
- Ziv, M., Ronen, G. and Raviv, M. (1998). Proliferation of meristematic clusters in disposable presterilized plastic bioreactors for large scale micropropagation of plants. *In vitro Cell Dev. Biol. Plant.*, 34:152-158

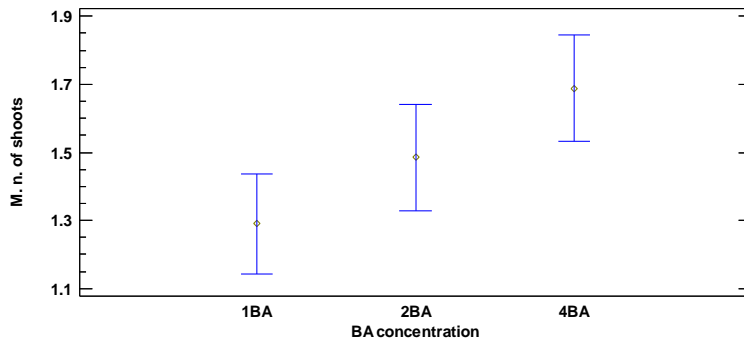
- Καββάδας, Σ. Δ. (1956). Εικονογραφημένο Βοτανικόν-Φυτολογικόν Λεξικόν. Αθήνα, Εκδόσεις Πελεκάνος, τόμ. Ζ, σελ. 3151-3152
- Κίντζιος, Σ. (1994). Επιχειρηματική Ιστοκαλλιέργεια. Αθήνα, Εκδόσεις Σταμούλη, 139 σελ.
- Κίντζιος, Σ. (2015). Εισαγωγή στον μικροπολλαπλασιασμό των φυτών. Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών. Αθήνα.
- Μαρτίνη, Α. Ν. (2013). Διερεύνηση της επίδρασης της φυσιολογίας των εκφύτων, καθώς και του ποϋστρώματος και των συνθηκών καλλιέργειας στον μικροπολλαπλασιασμό του *Malosorbus florentina* zucc. Διδακτορική διατριβή.
- Μετζάκης, Δ. (2005). Καλλιέργειες *in vitro*. Εκδόσεις ΙΩΝ. Αθήνα. 198 σελ.
- Μπερτσουκλής, Κ. Φ. (2012). Διερεύνηση Μεθόδων *In vitro* Πολλαπλασιασμού, της Οικοφυσιολογίας του Σπόρου και των Φυλογενετικών Σχέσεων των Ειδών *Arbutus* της Ελλάδας. Διδακτορική διατριβή.
- Νάνος, Γ. Δ. (2011) Σημειώσεις για το μάθημα παραγωγή αγενώς πολλαπλασιαζόμενου υλικού. Πανεπιστήμιο Θεσσαλίας. Σελ. 24.
- Ντόρκος, Α. (2004). Μικροπολλαπλασιασμός διάφορων καλλωπιστικών θάμνων. Α.Τ.Ε.Ι. Κρήτης. Πτυχιακή μελέτη. 93 σελ.
- Παπαγιάννη, Α. (2018). Διερεύνηση του *in vitro* πολλαπλασιασμού του *Arbutus unedo* var. *rubra* και συγκριτική μελέτη της συγκέντρωσης των ολικών φαινολικών του με άλλων ειδών *Arbutus*. Μεταπτυχιακή Μελέτη. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Παπαφωτίου Μ. (2008). Εργαστηριακές Σημειώσεις «Ανθοκομία ΙΙ», τεύχος Β, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.
- Παπαφωτίου, Μ. και Μανιάτη Μ. (2017) Διερεύνηση του μικροπολλαπλασιασμού του *Phytolacca dioica*. 28ο Συνέδριο Ε.Ε.Ε.Ο.
- Τρίγκα, Μ. (2017). Διερεύνηση της οικοφυσιολογίας του σπόρου της *Anthyllis barba-jonis* L. και του *in vitro* πολλαπλασιασμού του είδους. Μεταπτυχιακή Μελέτη. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.

ΔΙΑΔΙΚΤΥΟ

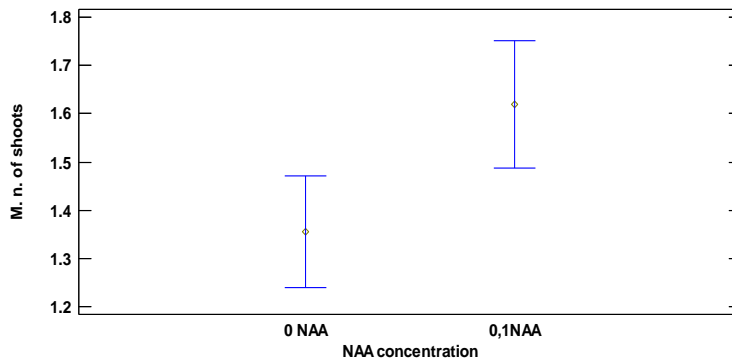
- 1) <http://www.public.asu.edu/~camartin/plants/Plant%20html%20files/pittosporumangustifolium.html>
- 2) <https://apps.cals.arizona.edu/arboretum/taxon.aspx?id=220>
- 3) https://www.smgrowers.com/products/plants/plantdisplay.asp?plant_id=3436
- 4) <https://savvastryfonosplants.com/category/%CE%BE%CE%B5%CE%BD%CE%B1-%CF%86%CF%85%CF%84%CE%B1/page/2/>
- 5) <https://www.gumbygumby.com/index.html>
- 6) <https://traditionalbushmedicine.com>
- 7) <https://www.australianmade.com.au/licensees/gumby-gumby-australia>
- 8) http://www.hume.vic.gov.au/files/b40e9eb4-4b5b-4127-b076-9e2300e5ccec/landscape_guidelines
- 9) https://www.wagga.nsw.gov.au/_data/assets/pdf_file/0008/23678/130618_Landscape-guidelinesFINAL.pdf

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ

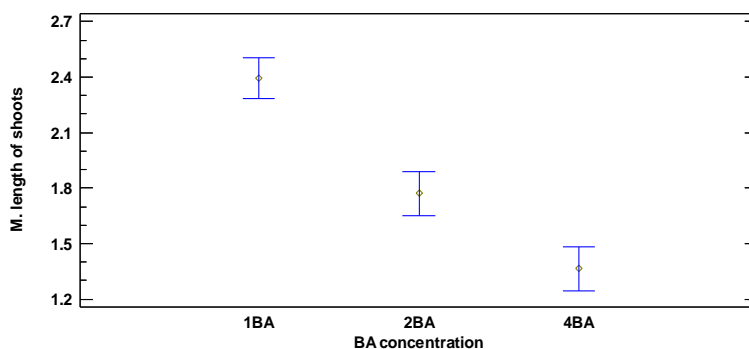
- Γραφήματα των μέσων όρων (Means and 95.0 percent LSD intervals) που δείχνουν την επίδραση του κάθε παράγοντα στα υπό μελέτη χαρακτηριστικά κατά την 5^η και 6^η υποκαλλιέργεια.
- Γραφήματα της αλληλεπίδρασης (interaction plots) μεταξύ των παραγόντων στα υπό μελέτη χαρακτηριστικά κατά την 5^η και 6^η υποκαλλιέργεια.

5^η υποκαλλιέργεια

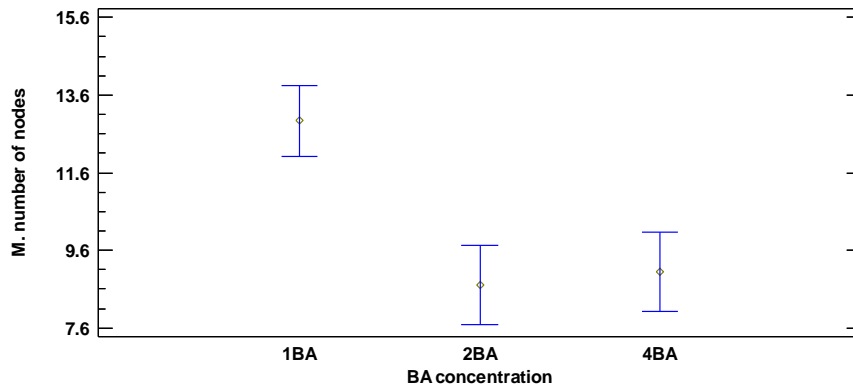
Σχήμα 1. Επίδραση της συγκέντρωσης BA στον μέσο αριθμό των βλαστών 1^{ης} τάξης ανά έκφυτο κατά την 1^η μέτρηση της 5^{ης} υποκαλλιέργειας. Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο LSD, $P \leq 0,05$.



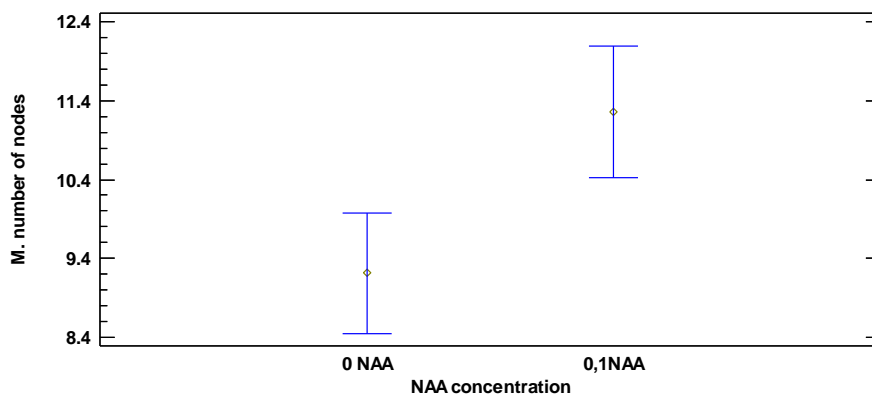
Σχήμα 2. Επίδραση της συγκέντρωσης NAA στον μέσο αριθμό των βλαστών 1^{ης} τάξης ανά έκφυτο, κατά την 1^η μέτρηση της 5^{ης} υποκαλλιέργειας. Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο LSD, $P \leq 0,05$.



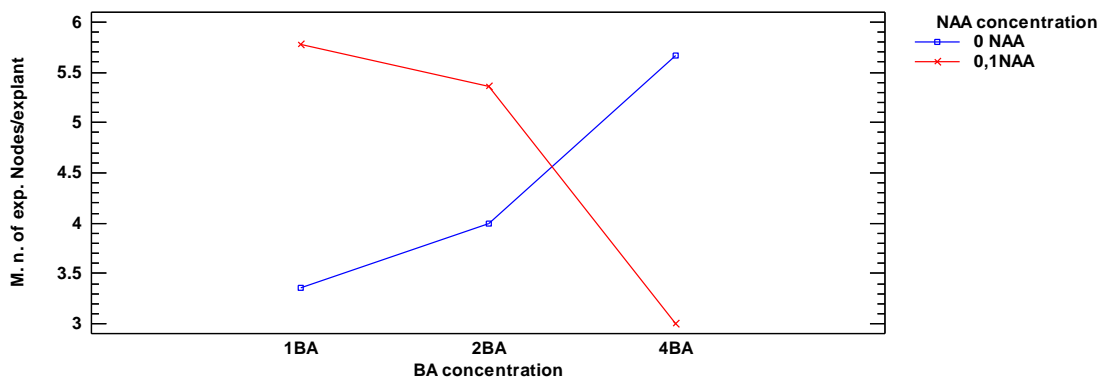
Σχήμα 3. Επίδραση της συγκέντρωσης BA στο μέσο μήκος των βλαστών 1^{ης} τάξης κατά την 1^η μέτρηση της 5^{ης} υποκαλλιέργειας. Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο LSD, $P \leq 0,05$.



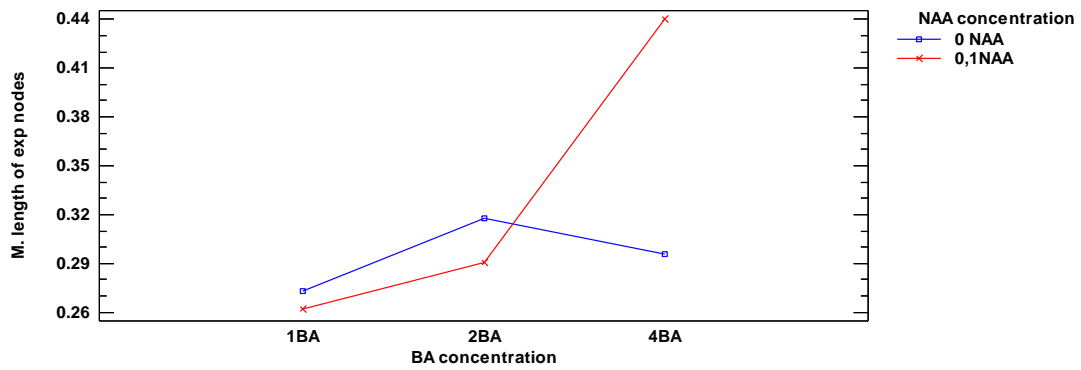
Σχήμα 4. Επίδραση της συγκέντρωσης BA στον μέσο αριθμο των κόμβων/βλαστό 1^{ης} τάξης κατά την 1^η μέτρηση της 5^{ης} υποκαλλιέργειας. Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο LSD, $P \leq 0,05$.



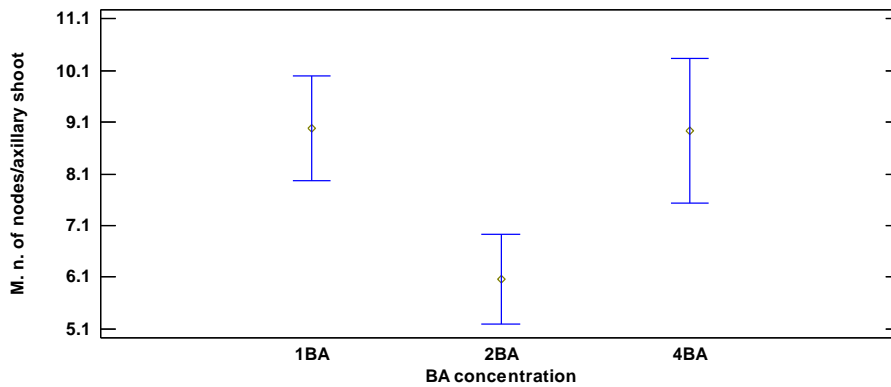
Σχήμα 5. Επίδραση της συγκέντρωσης NAA στον μέσο αριθμο των κόμβων/βλαστό 1^{ης} τάξης κατά την πρώτη μέτρηση της 5^{ης} υποκαλλιέργειας. Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο LSD, $P \leq 0,05$.



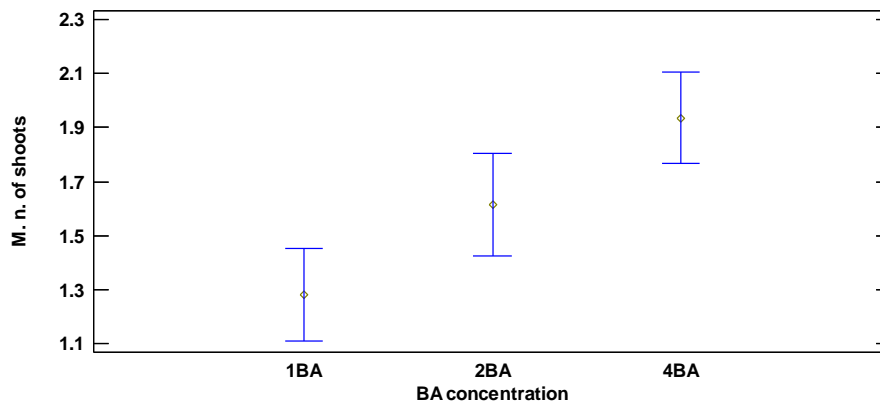
Σχήμα 6. Αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων στον αριθμό των εκπτυγμένων κόμβων επί των βλαστών 1^{ης} τάξης κατά την 1η μέτρηση της 5^{ης} υποκαλλιέργειας.



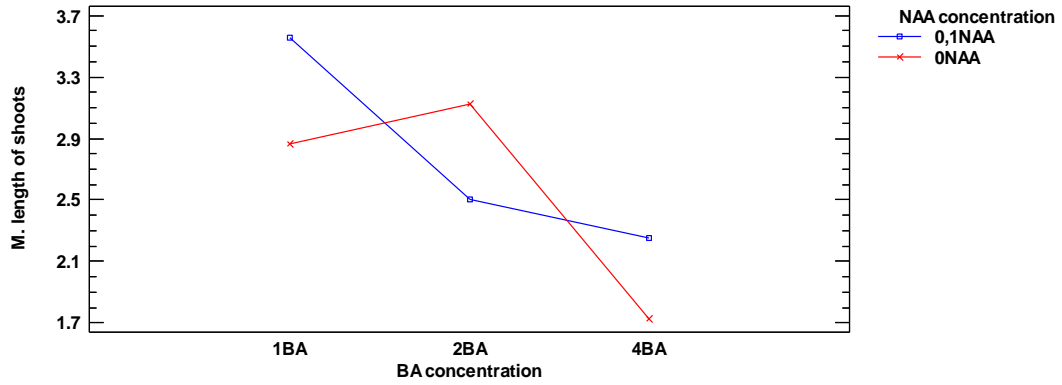
Σχήμα 7. Αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων στο μέσο μήκος των εκπτυγμένων κόμβων κατά την πρώτη μέτρηση της 5^{ης} υποκαλλιέργειας.



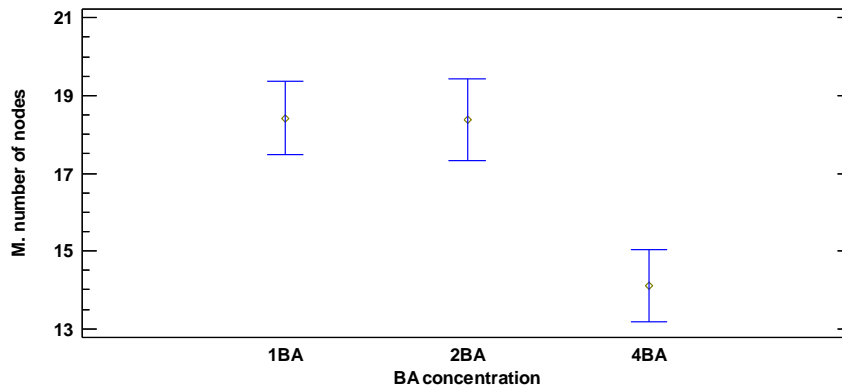
Σχήμα 8. Επίδραση συγκέντρωσης BA στον αριθμό των κόμβων των βλαστών 2^{ης} τάξης κατά την πρώτη μέτρηση της 5^{ης} υποκαλλιέργειας. Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο LSD, $P < 0,05$



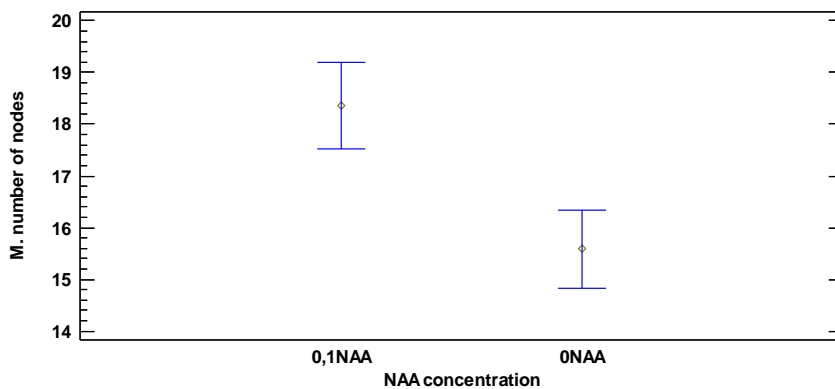
Σχήμα 9. Επίδραση συγκέντρωσης BA στον μέσο αριθμό των βλαστών 1^{ης} τάξης/έκφυτο κατά τη δεύτερη μέτρηση της 5^{ης} υποκαλλιέργειας. Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο LSD, $P < 0,05$.



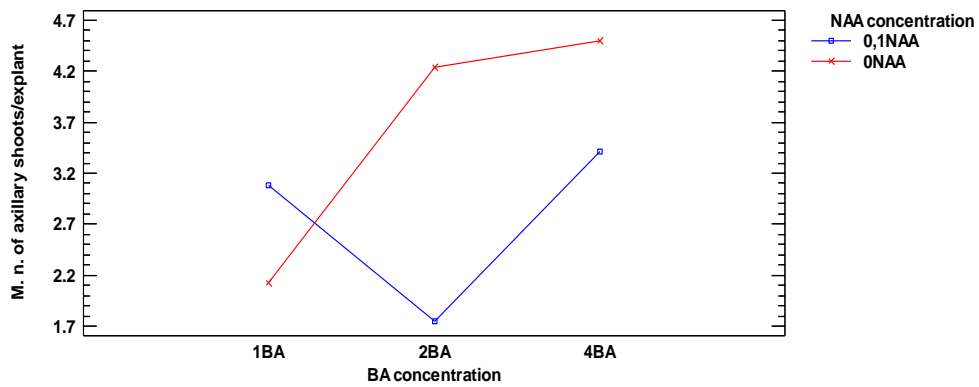
Σχήμα 10. Αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων στο μέσο μήκος των βλαστών 1^{ης} τάξης κατά τη δεύτερη μέτρηση της 5^{ης} υποκαλλιέργειας. Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο LSD, $P \leq 0,05$.



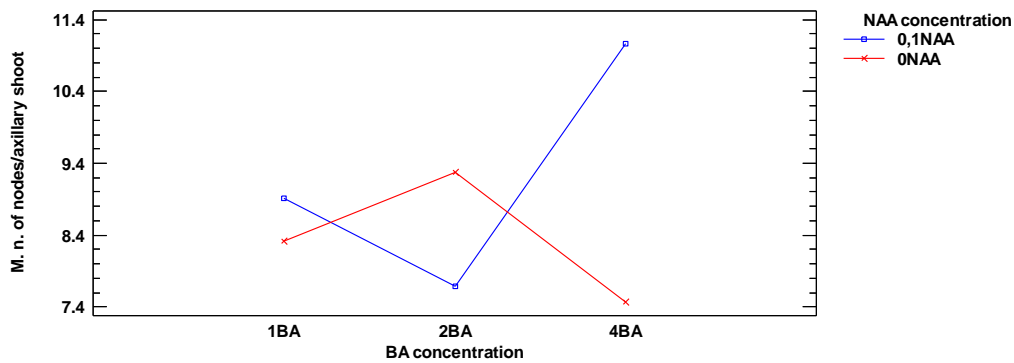
Σχήμα 11. Επίδραση της συγκέντρωσης BA στον μέσο αριθμό των κόμβων/βλαστό 1^{ης} τάξης κατά τη δεύτερη μέτρηση της 5^{ης} υποκαλλιέργειας. Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο LSD, $P \leq 0,05$.



Σχήμα 12. Επίδραση της συγκέντρωσης NAA στον μέσο αριθμό των κόμβων/βλαστό 1^{ης} τάξης κατά τη 2^η μέτρηση της 5^{ης} υποκαλλιέργειας. Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο LSD, $P \leq 0,05$.

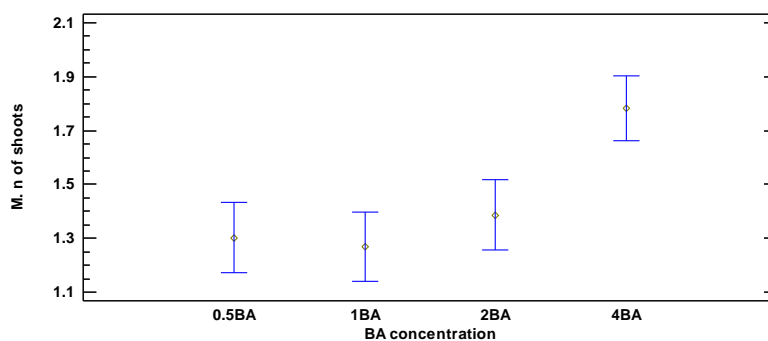


Σχήμα 13. Αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων στον μέσο αριθμό των βλαστών 2^{ης} τάξης κατά τη δεύτερη μέτρηση της 5^{ης} υποκαλλιέργειας.

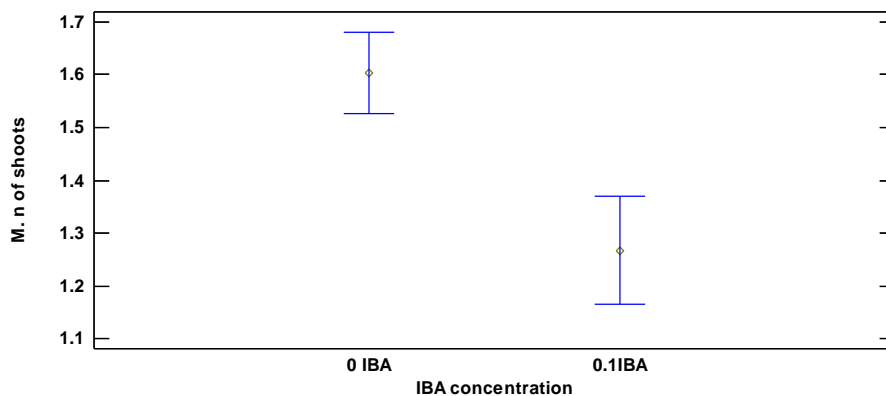


Σχήμα 14. Αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων στον αριθμό των κόμβων των βλαστών δεύτερης τάξης κατά τη δεύτερη μέτρηση της 5^{ης} υποκαλλιέργειας.

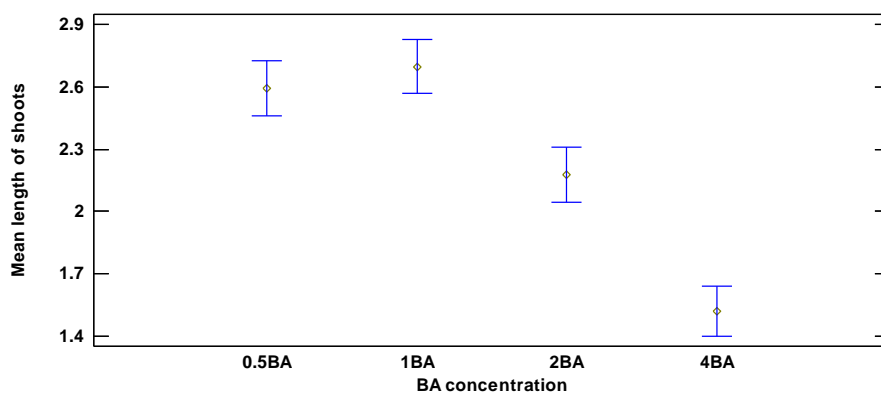
6^η Υποκαλλιέργεια



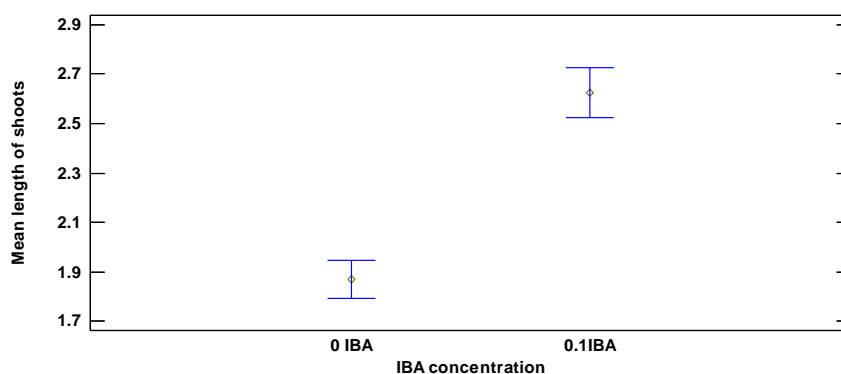
Σχήμα 1. Επίδραση συγκέντρωσης BA στον μέσο αριθμό βλαστών 1^{ης} τάξης κατά την 6^η υποκαλλιέργεια του είδους. Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο LSD, $P \leq 0,05$.



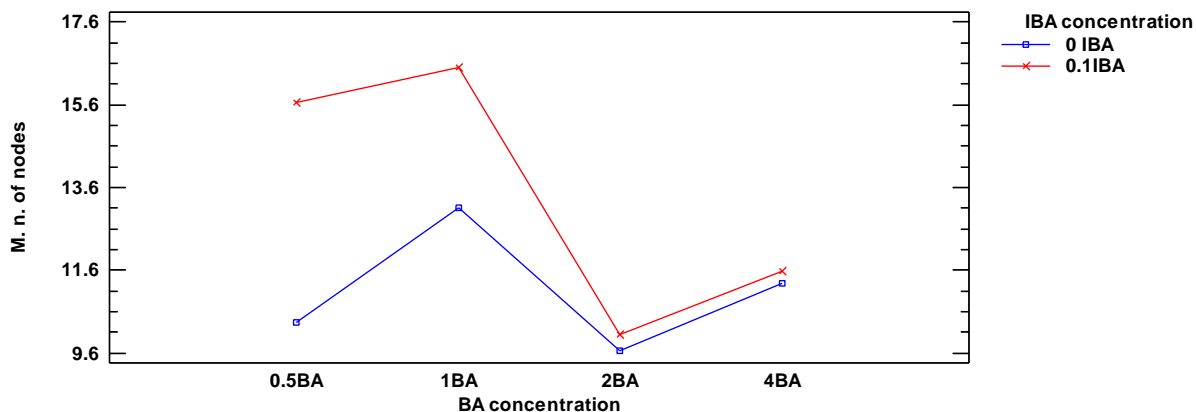
Σχήμα 2. Επίδραση συγκέντρωσης IBA στον μέσο αριθμό βλαστών 1^{ης} τάξης κατά την 6^η υποκαλλιέργεια του είδους. Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο LSD, $P \leq 0,05$.



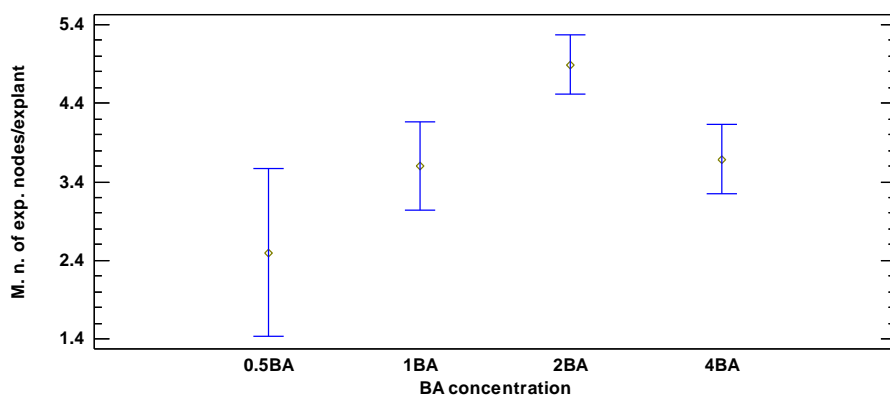
Σχήμα 3. Επίδραση συγκέντρωσης BA στον μέσο μήκος των βλαστών 1^{ης} τάξης κατά την 1^η μέτρηση της 6^{ης} υποκαλλιέργειας του είδους. Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο LSD, $P \leq 0,05$.



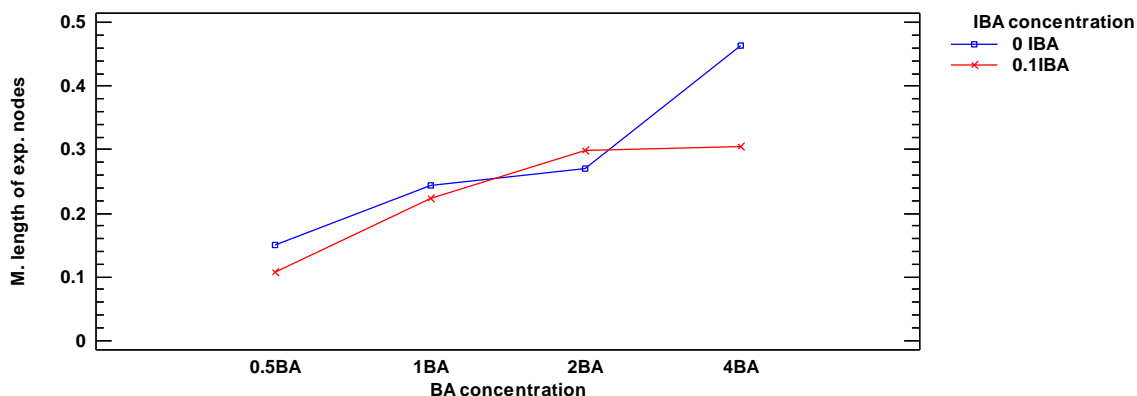
Σχήμα 4. Επίδραση συγκέντρωσης IBA στον μέσο μήκος των βλαστών 1^{ης} τάξης κατά την 1^η μέτρηση της 6^{ης} υποκαλλιέργειας του είδους. Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο LSD, $P \leq 0,05$.



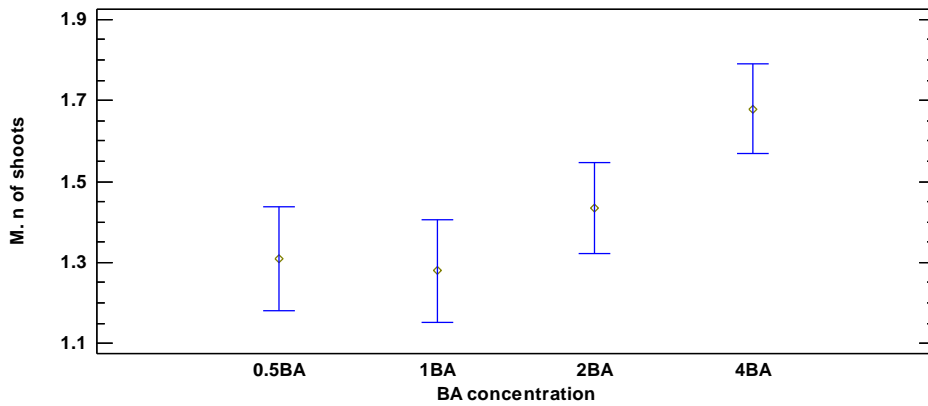
Σχήμα 5. Αλληλεπίδραση BA και IBA στον μέσο αριθμό των κόμβων/ βλαστό 1^{ης} τάξης κατά την 1η μέτρηση της 6ης υποκαλλιέργειας του είδους.



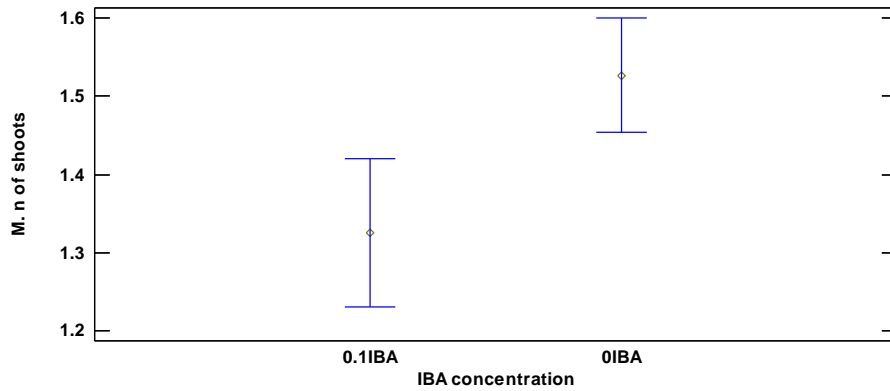
Σχήμα 6. Επίδραση συγκέντρωσης BA στον μέσο αριθμό των εκπτυγμένων κόμβων επί των βλαστών 1^{ης} τάξης κατά την 1^η μέτρηση της 6^{ης} υποκαλλιέργειας του είδους. Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο LSD, $P \leq 0,05$



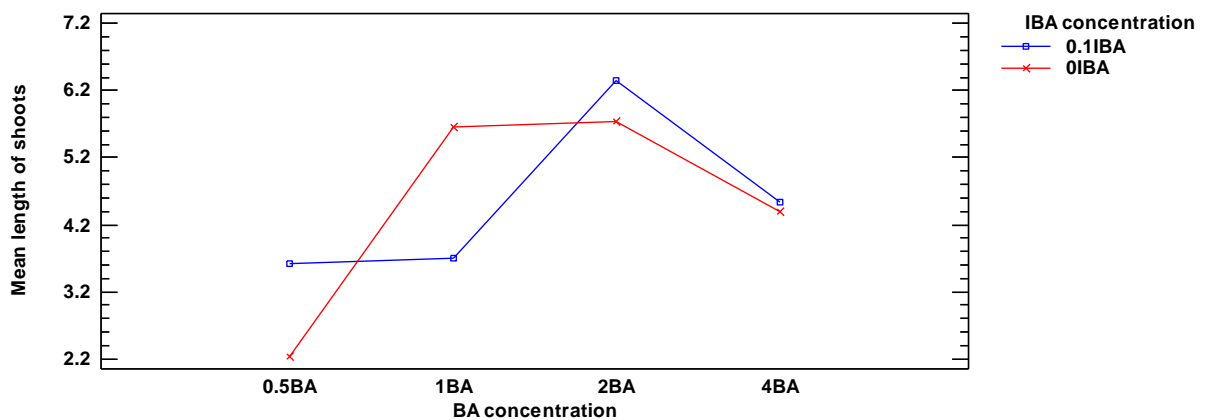
Σχήμα 7. Αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων στο μέσο μήκος των εκπτυγμένων κόμβων κατά την 1^η μέτρηση της 6^{ης} υποκαλλιέργειας του είδους.



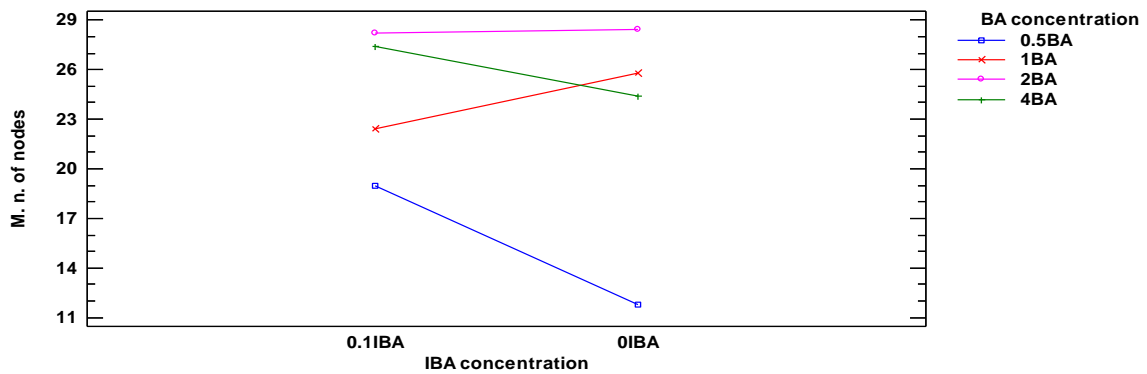
Σχήμα 8. Επίδραση της συγκέντρωσης BA Στον μέσο αριθμό των βλαστών 1^{ης} τάξης ανά έκφυτο κατά τη δεύτερη μέτρηση της 6^{ης} υποκαλλιέργειας. Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο LSD, $P \leq 0,05$.



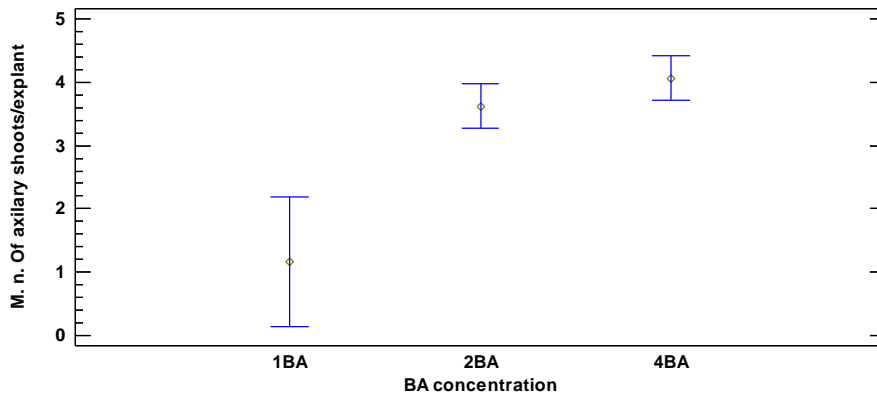
Σχήμα 9. Επίδραση της συγκέντρωσης IBA Στον μέσο αριθμό των βλαστών 1^{ης} τάξης ανά έκφυτο κατά τη δεύτερη μέτρηση της 6^{ης} υποκαλλιέργειας. Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο LSD, $P \leq 0,05$.



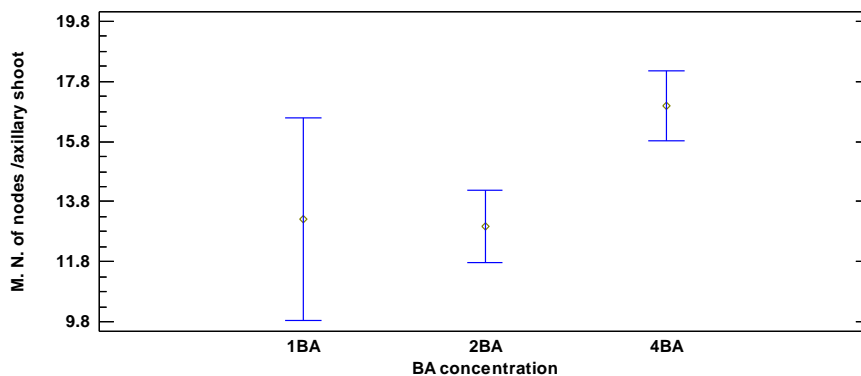
Σχήμα 10. Αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων στο μέσο μήκος των βλαστών 1^{ης} τάξης κατά τη δεύτερη μέτρηση της 6^{ης} υποκαλλιέργειας.



Σχήμα 11. Αλληλεπίδραση των δύο παραγόντων στον μέσο αριθμό των κόμβων ανά βλαστό 1^{ης} τάξης κατά τη δεύτερη μέτρηση της 6^{ης} υποκαλλιέργειας.



Σχήμα 12. Επίδραση της συγκέντρωσης BA στον μέσο αριθμό των βλαστών 2^{ης} τάξης κατά τη δεύτερη μέτρηση της 6^{ης} υποκαλλιέργειας. Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο LSD, $P \leq 0,05$.



Σχήμα 13. Επίδραση της συγκέντρωσης BA στον μέσο αριθμό των κόμβων των βλαστών 2^{ης} τάξης κατά τη δεύτερη μέτρηση της 6^{ης} υποκαλλιέργειας. Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο LSD, $P \leq 0,05$.

