

Γ Ε Ω Ρ Γ Ι Κ Ο Π Α Ν Ε Π Ι Σ Τ Η Μ Ι Ο Α Θ Η Ν Ω Ν

Τ Ο Μ Ε Α Σ Φ Υ Τ Ι Κ Η Σ Π Α Ρ Α Γ Ω Γ Η Σ

Ε Ρ Γ Α Σ Τ Η Ρ Ι Ο Δ Ε Ν Δ Ρ Ο Κ Ο Μ Ι Α Σ

Π Ο Λ Λ Α Π Λ Α Σ Ι Α Σ Μ Ο Σ Τ Η Σ Ε Λ Ι Α Σ Π Ο Ι Κ Ι Δ Ι Α Σ "Κ Α Λ Α Μ Ω Ν" I N V I T R O

Υ Π Ο

P E T R I T R A M A

Δ Ι Δ Α Κ Τ Ο Ρ Ι Κ Η Δ Ι Α Τ Ρ Ι Β Η

Υ Π Ο Β Λ Η Θ Ε Ι Σ Α Σ Τ Ο Γ Ε Ω Ρ Γ Ι Κ Ο Π Α Ν Ε Π Ι Σ Τ Η Μ Ι Ο Α Θ Η Ν Ω Ν

Α Θ Η Ν Α 1 9 8 9

Αφιερώνεται
στην κόρη μου Καίτη

Π Ρ Ο Λ Ο Γ Ο Σ

Η οικονομική υποστήριξη που μου δόθηκε επί τέσσερα χρόνια από το Υπουργείο Εθνικής Παιδείας και Θρησκευμάτων ως υποτροφία για την εκπόνηση διδακτορικής διατριβής υπήρξε καθοριστική για την πραγματοποίηση και ολοκλήρωση της παρούσης εργασίας. Για το λόγο αυτό εκφράζω τη βαθειά μου ευγνωμοσύνη και τις ευχαριστίες μου.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα Καθηγητή κ. Παντούση Καλτσίκη για τις παρασχεθείσες χρήσιμες συμβουλές του, τη βοήθεια κατά τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, ως και για τις υποδείξεις, τις παρατηρήσεις και της ευγενούς καλωσύνης να είναι ο επιβλέπων Καθηγητής μου.

Επίσης, αισθάνομαι την ανάγκη να ευχαριστήσω όλως ιδιαίτερω τον Επίκουρο Καθηγητή του Εργαστηρίου Δενδροκομίας κ. Κώστα Ποντίκη για τις παρασχεθείσες πολύτιμες συμβουλές του κατά την εκτέλεση της πειραματικής εργασίας μου, ως και κατά τη συγγραφή της παρούσης εργασίας.

Στον Αναπληρωτή Καθηγητή κ. Χαρίλαο Παπαϊωάννου, στον Επίκουρο Καθηγητή κ. Μόσχο Πολυσίου ως και στη Διοίκηση της Εταιρείας Βιορύλ εκφράζω τις θερμές μου ευχαριστίες για τη βοήθειά τους στον προσδιορισμό χημικών ουσιών του εκχυλίσματος από ιστούς ελιάς, ως και για τις παρασχεθείσες χρήσιμες συμβουλές τους.

Τέλος, θεωρώ καθήκον μου να ευχαριστήσω το προσωπικό του Εργαστηρίου Δενδροκομίας ως και όλους εκείνους που βοήθησαν στην ολοκλήρωση της παρούσης εργασίας. =

Αθήναι

Ιούνιος 1989

Π Ε Ρ Ι Ε Χ Ο Μ Ε Ν Α

	Σελ.	
1	Εισαγωγή	1
2	Ανασκόπηση της βιβλιογραφίας	3
2.1	Παράγοντες που επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των φυτών <u>in vitro</u>	3
2.1.1	Μητρικό φυτό	3
2.1.2	Έμφυτο	4
2.1.3	Περιβαλλοντικές συνθήκες ιστοκαλλιιεργειών	4
2.1.4	Υποστρώματα ανάπτυξης και ριζοβολίας	6
2.1.5	Θρεπτικά υλικά	8
2.1.5.1	Ανόργανα άλατα	8
2.1.5.2	Πηγή άνθρακα και ενέργειας	8
2.1.5.3	Βιταμίνες	9
2.1.5.4	Φυτορμόνες	9
2.1.5.5	Οργανικό άζωτο	11
2.1.5.6	Οργανικά οξέα	11
2.1.5.7	Σύνθετες ουσίες	11
2.1.5.8	Άγαρ	12
2.1.6	Φάσεις πολλαπλασιασμού φυτών <u>in vitro</u>	12
2.2	Παράγοντες που επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό της ελιάς <u>in vitro</u>	13
3	Υλικά και Μέθοδοι	18
3.1	Υλικά	18
3.2	Μέθοδοι	20
3.2.1	Επιλογή μεριστώματος	20

3.2.1.1	Επιλογή μεριστώματος σε σχέση με το είδος του βλαστού	20
3.2.1.2	Παραλαβή βλαστών	21
3.2.1.3	Παραλαβή και προετοιμασία μεριστωμάτων	21
3.2.1.4	Εποχή παραλαβής μεριστωμάτων	21
3.2.2	Απολύμανση μεριστωμάτων	22
3.2.3	Σύνθεση υποστρώματος ανάπτυξης	22
3.2.4	Σύνθεση υποστρώματος ριζοβολίας	24
3.2.5	Παραλαβή εκχυλίσματος ιστών ελιάς	24
3.2.6	Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων ανάπτυξης και ριζοβολίας	25
3.2.7	Εκφύτευση εκφύτων	26
3.2.8	Συνθήκες θαλάμου ανάπτυξης των φυτών	27
3.2.9	Προσδιορισμός ουσιών του εκχυλίσματος που επηρεάζουν την ανάπτυξη και ριζοβολία των εκφύτων	28
3.2.9.1	Ποιοτικός προσδιορισμός με χρωματογραφία λεπτής στιβάδος (TLC)	28
3.2.9.2	Ποιοτικός προσδιορισμός με αέρια-υγρή χρωματογραφία	29
3.2.10	Αξιολόγηση του ακατέργαστου εκχυλίσματος με βιοδοκιμές	31
3.2.11	Σχέδιο πειραμάτων και στατιστική επεξεργασία	32
3.2.12	Περιγραφή πειραμάτων	32
3.2.12.1	Επιλογή μεριστώματος σε σχέση με το είδος του βλαστού	32
3.2.12.2	Επίδραση του υποχλωριώδους νατρίου επί της επιβίωσης απαλλαγμένων από τη μόλυνση μεριστωμάτων ληφθέντων από βλαστούς γόγγρων και βλαστούς που εκφύονταν από τον κορμό ή βραχίονα του ελαιοδένδρου	33

3.2.12.3	Επίδραση των υποστρωμάτων MS, MS ₁ , MS ₂ , OM και ΥΕ (υπόστρωμα ελιάς) επί της ανάπτυξης των εκφύτων ελιάς "Καλαμών"	34
3.2.12.4	Επίδραση της ζεατίνης επί της αναπαραγωγής βλαστών από μεριστώματα εκφύτων ελιάς	35
3.2.12.5	Επίδραση της βενζυλαδενίνης επί της αναπαραγωγής βλαστών από μεριστώματα εκφύτων ελιάς	36
3.2.12.6	Επίδραση της ζεατίνης σε συνδυασμό με εκχύλισμα ιστών ελιάς στην αναπαραγωγή βλαστών από μεριστώματα εκφύτων ελιάς	36
3.2.12.7	Επίδραση της βενζυλαδενίνης σε συνδυασμό με εκχύλισμα ιστών ελιάς στην αναπαραγωγή βλαστών από μεριστώματα εκφύτων ελιάς	37
3.2.12.8	Επίδραση της ζεατίνης, της βενζυλαδενίνης και του Zip (2-ισο-πεντενελεαδίνης) ως και του συνδυασμού αυτών με εκχύλισμα ιστών ελιάς στην αναπαραγωγή βλαστών από μεριστώματα εκφύτων ελιάς	37
3.2.12.9	Επίδραση του ακατέργαστου εκχυλίσματος ιστών ελιάς επί της ριζοβολίας μοσχευμάτων φασιόλου	38
3.2.12.10	Επίδραση του ακατέργαστου εκχυλίσματος ιστών ελιάς σε συνδυασμό με την ορμόνη ριζοβολίας IBA στη ριζοβολία των μοσχευμάτων φασιόλου	38
3.2.12.11	Επίδραση των ανιχνευθμένων ουσιών στο χρωματογράφημα στη ριζοβολία μοσχευμάτων φασιόλου	39
3.2.12.12	Επίδραση του α-NAA, IBA και του συνδυασμού αυτών με εκχύλισμα ιστών ελιάς στη ριζοβολία βλαστών μεριστωματικών καλλιεργειών ελιάς	39

4	Αποτελέσματα	41
4.1	Επιλογή μεριστώματος σε σχέση με το είδος του βλαστού	41
4.2	Επίδραση του υποχλωριώδους νατρίου επί της επιβίωσης αμόλυντων μεριστωμάτων ληφθέντων από βλαστούς γόγγρων και βλαστούς που εκφύονταν από τον κορμό ή βραχίονα του ελαιόδένδρου	43
4.3	Επίδραση των υποστρωμάτων MS, MS ₁ , MS ₂ , OM και YE επί της αναπτύξεως των εκφύτων της ελιάς "Καλαμών"	45
4.4	Επίδραση της ζεατίνης επί της αναπαραγωγής βλαστών από μεριστώματα εκφύτων ελιάς	47
4.5	Επίδραση της βενζυλαδενίνης επί της αναπαραγωγής βλαστών από μεριστώματα εκφύτων ελιάς	49
4.6	Επίδραση της ζεατίνης σε συνδυασμό με εκχύλισμα ιστών ελιάς στην αναπαραγωγή βλαστών από μεριστώματα εκφύτων ελιάς	51
4.7	Επίδραση της βενζυλαδενίνης σε συνδυασμό με εκχύλισμα ιστών ελιάς στην αναπαραγωγή βλαστών από μεριστώματα εκφύτων ελιάς	53
4.8	Επίδραση της ζεατίνης, της βενζυλαδενίνης και του Zip, ως και του συνδυασμού αυτών με εκχύλισμα ιστών ελιάς στην αναπαραγωγή βλαστών από μεριστώματα εκφύτων ελιάς	56
4.9	Επίδραση του ακατέργαστου εκχυλίσματος ιστών ελιάς επί της ριζοβολίας μοσχευμάτων φασιόλου (<u>Phaseolus aureus</u>)	59
4.10	Επίδραση του ακατέργαστου εκχυλίσματος ιστών ελιάς σε συνδυασμό με την ορμόνη ριζοβολίας IBA στη ριζοβολία μοσχευμάτων φασιόλου	61

4.11	Επίδραση των ανιχνευομένων ουσιών στο χρωματογράφημα στη ριζοβολία μοσχευμάτων φασιόλου	63
4.12	Επίδραση του α-NAA, IBA και του συνδυασμού αυτών με εκχύλισμα ιστών ελιάς στη ριζοβολία βλαστών μεριστωματικών καλλιεργειών ελιάς	69
5	Συζήτηση	73
6	Συμπεράσματα	83
7	Περίληψη	86
8	Βιβλιογραφία	89
9	Παράρτημα εικόνων	95

Κατάλογος Πινάκων

Πίνακας	σελ .
1. Ποσοστό επιβίωσης μεριστωμάτων ληφθέντων από βλαστούς γόγγρων και βλαστούς που εκφύονταν από τον κορμό ή το βραχίονα του ελαιόδένδρου	41
2. Ποσοστό % επιβιωσάντων αμόλυντων μεριστωμάτων προερχομένων από βλαστούς γόγγρων	43
3. Ποσοστό % επιβιωσάντων αμόλυντων μεριστωμάτων προερχομένων από βλαστούς, που εκφύονταν από τον κορμό ή τον βραχίονα του ελαιόδένδρου	44
4. Επίδραση των υποστρωμάτων MS ₁ , MS ₂ , OM και YE επί του αριθμού βλαστών για κάθε έκφυτο	45
5. Επίδραση των υποστρωμάτων MS ₁ , MS ₂ , OM και YE επί του αριθμού βλαστών για κάθε έκφυτο σε σχέση με τη συγκέντρωση της ζεαΐνης	46
6. Επίδραση της ζεαΐνης επί του αριθμού των βλαστών ανά έκφυτο και του μήκους αυτών	47
7. Επίδραση της βενζυλαδεΐνης επί του αριθμού των βλαστών ανά έκφυτο και του μήκους αυτών	49
8. Επίδραση της ζεαΐνης ως και του εκχυλίσματος ιστών ελιάς επί του αριθμού των βλαστών για κάθε έκφυτο και του μήκους αυτών	51
9. Επίδραση της βενζυλαδεΐνης ως και του εκχυλίσματος ιστών ελιάς επί του αριθμού των βλαστών ανά έκφυτο και του μήκους αυτών	54
10. Επίδραση της ζεαΐνης, της βενζυλαδεΐνης και του Zip ως και του συνδυασμού αυτών με εκχύλισμα ιστών ελιάς στην αναπαραγωγή βλαστών από μεριστώματα εκφύτων ελιάς	57

	Σελ.
11. Επίδραση του ακατέργαστου εκχυλίσματος ιστών ελιάς στη ριζοβολία μοσχευμάτων φασιόλου	60
12. Επίδραση του IBA και του συνδυασμού IBA και εκχυλίσματος ιστών ελιάς στη ριζοβολία μοσχευμάτων φασιόλου	62
13. Επίδραση του ακατέργαστου εκχυλίσματος ιστών ελιάς 30ppm διάφορης εποχής λήψης σε συνδυασμό με IBA (1ppm) στη ριζοβολία μοσχευμάτων φασιόλου	63
14. Επίδραση των ανιχνευομένων ουσιών στη ριζοβολία μοσχευμάτων φασιόλου	64
15. Επίδραση του α-NAA, IBA και του συνδυασμού αυτών με εκχύλισμα ιστών ελιάς στη ριζοβολία βλαστών μεριστωμάτικων καλλιεργειών ελιάς	70
16. Επίδραση του α-NAA, IBA και του συνδυασμού αυτών με εκχυλίσματα ιστών ελιάς στο μέσο αριθμό ριζών ανά βλαστό ως και στο μήκος αυτών	71

Κατάλογος Σχημάτων

Σχήμα		Σελίδα
1.	Ποσοστό επιβίωσης μεριστωμάτων ληφθέντων από βλαστούς γόγγρων και βλαστούς που εκφύονταν από τον κορμό ή τον βραχίονα ελαιοδένδρου	42
2.	Ποσοστό % επιβιωσάντων αμόλυντων μεριστωμάτων προερχομένων από βλαστούς γόγγρων και από βλαστούς που εκφύονταν από τον κορμό ή τον βραχίονα του ελαιοδένδρου	44
3.	Επίδραση των υποστρωμάτων MS ₁ , MS ₂ , OM και ΥΕ επί του αριθμού βλαστών για κάθε έκφυτο σε σχέση με τη συγκέντρωση ζεατίνης	46
4.	Επίδραση της ζεατίνης επί του αριθμού των βλαστών ανά έκφυτο	48
5.	Επίδραση της ζεατίνης επί του μήκους των βλαστών	48
6.	Επίδραση της βενζυλαδεκίνης επί του αριθμού των βλαστών ανά έκφυτο	50
7.	Επίδραση της βενζυλαδεκίνης επί του μήκους των βλαστών	50
8.	Επίδραση της ζεατίνης ως και του εκχυλίσματος ιστών ελιάς επί του αριθμού των βλαστών ανά έκφυτο	52
9.	Επίδραση της ζεατίνης ως και του εκχυλίσματος ιστών ελιάς επί του μήκους των βλαστών	53
10.	Επίδραση της βενζυλαδεκίνης ως και του εκχυλίσματος ιστών ελιάς επί του αριθμού των βλαστών ανά έκφυτο	55
11.	Επίδραση της βενζυλαδεκίνης ως και του εκχυλίσματος ιστών ελιάς επί του μήκους των βλαστών	56

12. Επίδραση της ζεατίνης, της βενζυλαδενίνης, και του 2ip ως και του συνδυασμού αυτών με εκχύλισμα ιστών ελιάς στην αναπαραγωγή βλαστών από μερίστωμα εκφύτων ελιάς 58
13. Επίδραση της ζεατίνης, της βενζυλαδενίνης και του 2ip ως και του συνδυασμού αυτών με εκχύλισμα ιστών ελιάς στο μήκος των βλαστών.. 58
14. Επίδραση του ακατέργαστου εκχυλίσματος ιστών ελιάς στη ριζοβολία μοσχευμάτων 61
15. Επίδραση των ανιχνευομένων ουσιών στη ριζοβολία μοσχευμάτων φασιόλου με τους διαλύτες: χλωροφόρμιο: αιθυλικό οξύ: φορμικό οξύ:5:4:1 (v:v:v) 65
16. Επίδραση των ανιχνευομένων ουσιών στη ριζοβολία μοσχευμάτων φασιόλου, με τους διαλύτες: βουτανόλη: οξικό οξύ: νερό 12:3:5 (v:v:v) 65
17. Επίδραση των ανιχνευομένων ουσιών στη ριζοβολία μοσχευμάτων φασιόλου, με τους διαλύτες: ισοπροπανόλη: αμμωνία: νερό 8:1:1 (v:v:v) 66
- 17α. Εκλεκτικό χρωματογράφημα της μάζας 130 του ινδολοξικού οξέος (μάρτυρα) 67
- 17β. Εκλεκτικό χρωματογράφημα της μάζας 130 του μεθυλεστέρα του ινδολοξικού οξέος (μάρτυρα) 67
- 17γ. Εκλεκτικό χρωματογράφημα της μάζας 130 του εκχυλίσματος ιστών ελιάς..... 68
18. Επίδραση του α-NAA, IBA και του συνδυασμού αυτών με εκχύλισμα ιστών ελιάς στη ριζοβολία βλαστών μεριστωματικών καλλιεργειών ελιάς.. 72

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

IAA	-	Indole - 3 - acetic acid
IBA	-	Indole - 3 - butyric acid
NAA	-	α -Naphthaleneacetic acid
2.4D	-	2.4 Dichlorophenoxyacetic acid
Zeatine	-	(6-[4-Hydroxy-3methylbut-2-enylamino]-purine)
BAP	-	6-Benzyladenine
2ip	-	N ⁶ -[2-isopentenyl]adenine
GA ₃	-	gibberellic acid
EDTA	-	Ethylenediaminetetraacetic acid
TLC	-	Thin layer chromatography
Rf	-	Mobility relative to front
U.V.	-	Ultra violet
OM	-	Olive medium (υπόστρωμα ελιάς)
M.S.	-	Murashige and Skoog (υπόστρωμα)
YE	-	Υπόστρωμα ελιάς
ppm	-	parts per million (μέρη στο εκατομμύριο)

I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ελαιοκαλλιέργεια παίζει πρωτεύοντα ρόλο στην οικονομία των μεσογειακών κυρίως χωρών, όπου έχει εξαπλωθεί, γιατί αξιοποιεί εδάφη που δεν είναι τόσο κατάλληλα για άλλες καλλιέργειες και εξασφαλίζει στους μικροκαλλιεργητές εποχιακή εργασία και ικανοποιητικό εισόδημα.

Στην Ελλάδα η ελαιοκαλλιέργεια κατέχει εξέχουσα θέση στην εθνική οικονομία, με ποσοστό συμβολής 1,6% και 10,3% στο Εθνικό και Γεωργικό Εισόδημα αντίστοιχα και αποτελεί την κυριότερη γεωργική εκμετάλλευση σε πολλά διαμερίσματα.

Η εντατικοποίηση της ελαιοκαλλιέργειας, που αποσκοπεί στην αύξηση της ποσοτικής και ποιοτικής παραγωγής των ελαιοπροϊόντων, προϋποθέσει την ύπαρξη επαρκούς αυθεντικού και υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού.

Η ελιά πολλαπλασιάζεται εγγενώς και αγενώς. Τα παραγόμενα με εγγενή πολλαπλασιασμό φυτά είναι γενετικά ανόμοια, όχι μόνο προς τους γονείς, αλλά και μεταξύ τους. Γι' αυτό οι ποικιλίες της ελιάς πολλαπλασιάζονται αγενώς, α) με εμβολιασμό πάνω σε κλωνικά υποκείμενα ή σπορόφυτα

υποκείμενα, β) με μοσχεύματα (φυλλοφόρα ή άφυλλα), γ) με σφαιροβλάστες ή γόγγρους και δ) με παραφυάδες.

Οι τεχνικές όμως αυτές δεν εξασφαλίζουν μαζική και ταχεία αναπαραγωγή υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού πράγμα που μπορεί να επιτευχθεί με την τεχνική του μικροπολλαπλασιασμού.

Είναι γνωστό ότι η τεχνική αυτή έχει ιδιαίτερη σημασία στα είδη εκείνα που πολλαπλασιάζονται δύσκολα αγενώς. Στην ελιά υπάρχουν ποικιλίες, που πολλαπλασιάζονται αρικετά δύσκολα, όπως είναι η επιτραπέζια ποικιλία "Καλαμών", μεγάλης εμπορικής σημασίας (Ποντίκης 1981, Avidam and Lavee 1978).

Η παρούσα εργασία διερευνά τη δυνατότητα αναπαραγωγής της ποικιλίας "Καλαμών" in vitro. Συγκεκριμένα διερευνά από φυσιολογικής πλευράς, το είδος των βλαστών και του μεριστώματος, που προσφέρονται για καλλιέργεια in vitro, τη σύνθεση των υποστρωμάτων ανάπτυξης και ριζοβολίας των εκφύτων και την επίδραση εξωγενών και ενδογενών ορμονικών παραγόντων στην ανάπτυξη και ριζοβολία των εκφύτων.

2. ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

Η τεχνική in vitro, που επιτρέπει την ταχεία και μαζική παραγωγή ενός φυτού ακόμα και από περιορισμένο φυτικό υλικό, είναι σχετικά νέα. Οι πρώτοι φυτικοί ιστοί καλλιεργήθηκαν από τον Gautheret (1939).

Στην ανάπτυξη και εφαρμογή της τεχνικής του μεριστωματικού πολλαπλασιασμού των οπωροφόρων δένδρων συνέβαλαν σημαντικά οι εργασίες -του Jones και των συνεργατών του, που αναφέρονται στον μικροπολλαπλασιασμό υποκλειμένων και ποικιλιών στα γένη Malus και Prunus (1976, 1977, 1979).

2.1. Παράγοντες που επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των φυτών in vitro

2.1.1. Μητρικό φυτό

Η φυσιολογική κατάσταση του μητρικού φυτού έχει σημαντική επίδραση στη συμπεριφορά του μεριστωματικού εκφύτου. Έκφυτα από δένδρα, που βρίσκονται στην ενήλικη

φάση, συνήθως χρειάζονται διαφορετική προετοιμασία από τα έκφυτα, που λαμβάνονται από δέντρα στη φάση της νεανικότητας. Οι επάκριες κορυφές του είδους Tectonia grandis Linn., όταν βρίσκεται στην ενήλικη φάση, απαιτούν διαφορετικές συγκεντρώσεις ρυθμιστών αύξησης από εκείνες που προέρχονται από νεαρά δέντρα (Gupta et al, 1980). Η θέση των οφθαλμών είναι επίσης σημαντική. Οι επάκριοι οφθαλμοί του είδους Ribes sp., είναι οι μόνοι που έχουν καλλιεργηθεί με επιτυχία. (Jones and Vine, 1968). Στην τριανταφυλλιά, οι πλάγιοι οφθαλμοί από το μεσαίο τμήμα του βλαστού αναπτύσσονται ταχύτερα από τους οφθαλμούς είτε της κορυφής είτε της βάσης του βλαστού (Bressan et al, 1982).

2.1.2. Έκφυτο.

Τα έκφυτα προέρχονται από κορυφές βλαστών, αλλά διαφέρουν σε μέγεθος και αριθμό εμβρυωδών φύλλων.

Τα επάκρια μεριστώματα χωρίς εμβρυώδη φύλλα είναι αυτά, που συγκεντρώνουν τις περισσότερες πιθανότητες να δώσουν φυτά απαλλαγμένα ιώσεων, ενώ τα μεριστώματα με ένα ή περισσότερα εμβρυώδη φύλλα χαρακτηρίζονται από υψηλό βαθμό επιβίωσης κατά την καλλιέργεια, με ελάχιστες όμως πιθανότητες παραγωγής φυτών απαλλαγμένων ιώσεων.

2.1.3. Περιβαλλοντικές συνθήκες ιστοκαλλιεργείων.

Οι περιβαλλοντικές συνθήκες των ιστοκαλλιεργείων

περιλαμβάνουν όλους τους περιβαλλοντικούς παράγοντες πλην των υποστρωμάτων. Οι πιο σημαντικοί από τους παράγοντες αυτούς, είναι η θερμοκρασία και το φως. Για τα περισσότερα είδη, οι συνηθισμένες θερμοκρασίες κυμαίνονται μεταξύ 24°C και 26°C. Σπάνια χρησιμοποιούνται χαμηλότερες θερμοκρασίες, όπως 17°C για το είδος Asparagus plumosus Baker (Fonnesbech et al. 1977). Υψηλότερες θερμοκρασίες χρησιμοποιούνται, όταν επιδιώκεται παράλληλα και η παραγωγή φυτών απαλλαγμένων ιώσεων με τη μέθοδο της θερμοθεραπείας. Ημερήσιες μεταβολές της θερμοκρασίας συνήθως δεν είναι αναγκαίες, αν και έχουν γίνει σε ορισμένα είδη, όπως π.χ. το Vitis sp. (Chee and Pool, 1982).

Τα χαρακτηριστικά του φωτός, που μπορούν να επηρεάσουν τις ιστοκαλλιέργειες είναι η φωτοπερίοδος, η ένταση και το φάσμα. Η φωτοπερίοδος ποικίλλει από 0 έως 24 ώρες. Η πιο συνηθισμένη είναι 14 έως 18 ώρες.

Ευσκότιση χρησιμοποιείται κατά το στάδιο ριζοβολίας φυτών της οικογένειας Rosaceae (Hammerschla, 1982, Norton and Roe, 1982).

Μια ευρεία κλίμακα εντάσεων φωτός χρησιμοποιείται στις ιστοκαλλιέργειες. Εντάσεις φωτός κάτω από 1 klx (kilolux) χρησιμοποιούνται μόνο περιστασιακά, ενώ συνηθισμένες είναι οι εντάσεις μεταξύ 1 και 4 klx. Είναι όμως γνωστό ότι οι υψηλές εντάσεις φωτός συνήθως εμποδίζουν την ανάπτυξη των ριζών (Khosh-Khui and Simu, 1982).

Οι πιο πολλές καλλιέργειες αναπτύσσονται σε φωτισμό, που παρέχεται μόνον από λάμπες ψυχρού λευκού φθορισμού είτε από συνδυασμό φωτισμού, που παρέχεται από λάμπες

φθορισμού με νήμα πυρακτώσεως και από εμπλουτισμένες με ερυθρό φάσμα (Grow lux).

Η σχετική υγρασία επηρεάζει μόνον την επιβίωση των φυτών κατά τη φύτευσή των από τους σωλήνες καλλιέργειας των, όπου είναι σταθερά υψηλή (Murashige, 1974). Τα φυτά γενικά καλύπτονται ή διατηρούνται κάτω από διακεκομμένη διαβροχή (υδρονέφωση) με νερό αμέσως μετά τη μεταφύτευση, για να διατηρηθεί η σχετική υγρασία σε υψηλά επίπεδα.

Η υγρασία μειώνεται σιγά-σιγά για να σκληραγωγηθούν τα φυτά και να αναπτυχθούν κάτω από κανονικές συνθήκες.

2.1.4. Υποστρώματα ανάπτυξης και ριζοβολίας.

Τα διάφορα υποστρώματα, που χρησιμοποιούνται στην ιστοκαλλιέργεια, έχουν αρκετά κοινά βασικά συστατικά.

Κατά κανόνα όλα τα υποστρώματα περιέχουν σακχαρόζη ως πηγή άνθρακα, συνήθως σε συγκέντρωση 1 έως 3%. Η γλυκόζη έχει χρησιμοποιηθεί για την αναπαραγωγή φυτών φράουλας (Boxus, 1974). Το pH των υποστρωμάτων κυμαίνεται μεταξύ 5.5 και 6.0. Το σύνολο των υποστρωμάτων περιέχει ανόργανα άλατα.

Το πιο συνηθισμένο υπόστρωμα είναι του M S που χρησιμοποιείται εκτεταμένα στην καλλιέργεια επάκριων κορυφών (Murashige and Skoog, 1962). Υποστρώματα με μικρότερες συγκεντρώσεις αλάτων από τις συνηθισμένες χρησιμοποιούνται συχνά για την προτροπή σχηματισμού ριζών.

Τα πιο συνηθισμένα οργανικά συστατικά των υποστρωμάτων είναι οι βιταμίνες, θειαμίνη, νικοτινικό οξύ και

πυριδοξίνη, το αμυνοξύ γλυσίνη και το M-inositol.

Η ριβοφλαβίνη αναφέρεται ότι εμποδίζει το σχηματισμό ριζών σε μερικά είδη όπως στον ευκάλυπτο (Gorst and De Fossard, 1980) και το υποκείμενο ροδακινιάς Nemaquard (Miller et al., 1982). Επίσης σύνθετες οργανικές ουσίες όπως το γάλα της ινδικής καρύδας κ.λ.π. έχουν χρησιμοποιηθεί σε διάφορα υποστρώματα. Ακόμα ο ενεργός ζωικός άνθρακας αναφέρεται ότι επιταχύνει το σχηματισμό ριζών σε βλαστούς μηλιάς (Snir and Erez, 1980) και εμποδίζει τη ριζοβολία βλαστών της Ιαπωνικής δαμασκηνιάς (Rosati et al., 1980).

Η ισορροπία των ενδογενών και εξωγενών ρυθμιστών αύξησης ελέγχει την προτροπή σχηματισμού και την ανάπτυξη βλαστών και ριζών, αν και αυτό ελέγχεται και από παρεμποδιστικά επίπεδα παραγόντων όπως είναι το φως και η θερμοκρασία. Η παραγωγή πολλαπλών βλαστών γενικά ευνοείται, όταν οι συγκεντρώσεις των κυτοκινινών είναι υψηλότερες των αυξινών. Υψηλότερες συγκεντρώσεις αυξινών συνήθως απαιτούνται για την προτροπή σχηματισμού ριζών, αλλά η αύξηση των ριζών ευνοείται από χαμηλές συγκεντρώσεις αυξινών.

Το νερό που χρησιμοποιείται στα θρεπτικά υποστρώματα πρέπει να είναι απεσταγμένο ή απιονισμένο (Dods, H.J. and Roberts, W.L., 1985).

Ο Bonga (1982) συνιστά το απεσταγμένο νερό, που συγκεντρώνεται κατά την απόσταξη τα πρώτα 10-15 λεπτά, πρέπει να μη χρησιμοποιείται για να αποφευχθεί η επίδραση πτητικών οργανικών μορίων που αποστάζονται με το νερό. Το νερό θα πρέπει να προέρχεται από πρόσφατη απόσταξη.

2.1.5. Θρεπτικά υλικά

2.1.5.1. Ανόργανα άλατα.

Οι φυτικές καλλιέργειες χρειάζονται συνεχή παροχή με διάφορα ανόργανα στοιχεία. Εκτός από τον άνθρακα, το υδρογόνο και το οξυγόνο, απαραίτητα σε σχετικά μεγάλες συγκεντρώσεις είναι τα μακροστοιχεία, άζωτο, φώσφορος, κάλιο, ασβέστιο, μαγνήσιο και θείο. Το άζωτο, που προστίθεται στη μεγαλύτερη συγκέντρωση, βρίσκεται ή ως νιτρικό, ή ως αμμωνιακό ιόν, ή σε συνδυασμό των ιόντων αυτών.

Το θειϊκό μαγνήσιο ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$) ικανοποιεί αμφότερες τις απαιτήσεις των ιστοκαλλιιεργειών σε μαγνήσιο και θείο. Ο φωσφόρος προστίθεται υπό μορφή είτε $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$ είτε KH_2PO_4 . Το κάλιο, το κατιόν, που απαντά σε μεγαλύτερη συγκέντρωση, δίδεται υπό μορφή είτε KCl , KNO_3 ή KH_2PO_4 , ενώ το ασβέστιο είτε υπό μορφή $CaCl_2 \cdot 2H_2O$ και $Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ είτε υπό άνυδρο μορφή των αλάτων αυτών.

Εκτός των μακροστοιχείων οι φυτικές ιστοκαλλιέργειες χρειάζονται για τις ανάγκες τους και μικροποσότητες ιχνοστοιχείων. Τα απαραίτητα μικροστοιχεία είναι ο σίδηρος, το μαγγάνιο, ο ψευδάργυρος, το βόριο, ο χαλκός, το μολυβδένιο, το χλώριο και σε ορισμένες περιπτώσεις το νάτριο, το κοβάλτιο και το ιώδιο.

2.1.5.2. Πηγή άνθρακα και ενέργειας.

Ως πηγή άνθρακα χρησιμοποιείται αποκλειστικά η σακχαρόζη ή η γλυκόζη. Η φρουκτόζη μπορεί να χρησιμοποιηθεί, αλλά θεωρείται ως λιγότερο κατάλληλη. Οι υδατάνθρακες λα-

κτόζη, μαλτόζη, γαλακτόζη και το άμυλο θεωρούνται πολύ κατώτερη πηγή άνθρακα απ'ότι η σακχαρόζη ή η γλυκόζη. Η προσθήκη στα υποστρώματα του M-inositol, αν και δεν θεωρείται αναγκαία σε συγκέντρωση 100mg ανά λίτρο, βελτιώνει την κυτταρική αύξηση.

2.1.5.3. Βιταμίνες,

Τα φυτά συνθέτουν τις βιταμίνες που χρειάζονται για αύξηση και ανάπτυξη. Όταν τα φυτά όμως καλλιεργούνται σε τεχνητά υποστρώματα, ενδέχεται να υπάρξει έλλειψη ορισμένων βιταμινών. Η θειαμίνη είναι αναγκαία (Ohira, Ikeda and Ojima, 1976). Η βιοχημική βάση, για την απαίτηση αυτή δεν έχει ακόμα προσδιοριστεί. Η αύξηση βελτιώνεται επίσης με την προσθήκη νικοτινικού οξέος και πυριδοξίνης. Μερικά υποστρώματα περιέχουν παντοθενικό οξύ και βιοτίνη, αλλά αυτές ως και άλλες βιταμίνες γενικά δε θεωρούνται να αποτελούν περιοριστικούς παράγοντες αύξησης.

2.1.5.4. Φυτορμόνες,

Οι κυτοκινίνες και οι αυξίνες είναι δύο κατηγορίες χημικών ουσιών, που θεωρούνται απολύτως αναγκαίες στις ιστοκαλλιέργειες. Μερικές απ' αυτές απαντούν φυσικά στα φυτά, όπως είναι το IAA και η ζεατίνη, ενώ άλλες είναι συνθετικές, όπως το 2,4D, η BA (Βενζυλαδενίνη), το NAA και το IBA.

Οι κυτοκινίνες είναι παράγωγα της αδενίνης. Αρκετές

κυτοκινίνες, που απαντούν στα κύτταρα πολλών οργανισμών, στερούνται της ορμονικής επίδρασης, που παρατηρείται μόνο στις φυτικές. Συνήθως χρησιμοποιούνται η κινετίνη, η βενζυλαδεκίνη, το 2ip (N_6 [2-ισοπεντενυλ]αδεκίνη) και η ζεατίνη. Το γιββερελλικό οξύ GA_3 είναι απαραίτητο μόνο για την αύξηση σε ορισμένα μόνο είδη.

Οι αυξίνες χαρακτηρίζονται από την ιδιότητά τους να προκαλούν τάνυση (αύξηση του όγκου) των φυτικών κυττάρων. Σε ορισμένες μικρές συγκεντρώσεις είναι δυνατόν να προωθήσουν την αύξηση ενός οργάνου, ενώ σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις ν'αναστείλουν αυτή. Ο μηχανισμός δράσης των αυξινών έγκειται στην ικανότητα της αυξίνης να αυξάνει την πλαστικότητα (μη αντιστρεπτή διάταση) του κυτταρικού τοιχώματος. Ακόμα ευνοούν τη ριζοβολία των μοσχευμάτων.

Οι γιββερελλίνες αποτελούν μια ομάδα αυξητικών ουσιών, που ανακαλύφθηκαν στην Ιαπωνία, και είναι ενώσεις κυκλο-διτερπενοειδείς. Παράγονται από το μύκητα *Gibberella fujikuroi*, αλλά και από άλλους μύκητες καθώς και από άλλους φυτικούς οργανισμούς. Χαρακτηρίζονται κυρίως από την ιδιότητα να αυξάνουν το μήκος των βλαστών. Η επίδρασή τους επί της αυξήσεως των βλαστών σε ορισμένες περιπτώσεις είναι έμμεσος και συνδέεται με την αύξηση της περιεκτικότητας των ιστών σε αυξίνη, που προκαλεί την αύξηση των βλαστών.

Οι κυτοκινίνες αποτελούν μια ομάδα αυξητικών ουσιών, που χαρακτηρίζονται κυρίως από την ιδιότητά τους να προκαλούν κυτταροδιαίρεση παρουσία αυξίνης και το σχηματισμό

επίκτητων βλαστοφόρων οφθαλμών.

2.1.5.5. Οργανικό άζωτο.

Συνήθης πηγή οργανικού αζώτου των θρεπτικών υποστρωμάτων είναι τα αμινοξέα, γλουταμίνη, ασπαραγίνη και αδενίνη. Η επίδρασή των στην αύξηση των ιστοκαλλιιεργειών χαρακτηρίζεται ως αμφίβολη.

2.1.5.6. Οργανικά οξέα.

Σχετικά με την αναγκαιότητα ορισμένων οργανικών οξέων στην αύξηση των ιστοκαλλιιεργειών, όπως του κιτρικού οξέος, δεν υπάρχουν ερευνητικά δεδομένα που να τεκμηριώνουν ότι αποτελούν περιοριστικούς παράγοντες αύξησης.

2.1.5.7. Σύνθετες ουσίες.

Έχουν δοκιμαστεί πολλά εκχυλίσματα φυτών ως το γάλα της ινδικής καρύδας, χυμός πορτοκαλιού κ.λ.π. με περιορισμένη όμως επίδραση στην αύξηση των ιστοκαλλιιεργειών. Από τους Leclerk και Chong (1983) διαπιστώθηκε ότι το ακατέργαστο υδατικό εκχύλισμα, που παραλήφθηκε από ιστούς κισσού (Salix alba var. tristis, L.) και λεύκας (Populus nigra italica, L.) σε συνδυασμός με αυξίνη (IBA), παρεμπόδιζε το σχηματισμό ριζών σε μοσχεύματα κυδωνιάστρου (Cotoneaster acutifolius Turcs.), ενώ ευνοούσε το σχηματισμό ριζών σε μοσχεύματα φιλάδελφου (Philadelphus coronarius L.) "Acrcus" και βατόμουρου Ribes alpinum L.

Η ύπαρξη ριζογόνων ουσιών σε εκχύλισμα ιστών φύλλο - φόρων μοσχευμάτων κισσού (Salix alba L.) διαπιστώθηκε και από το Kawase (1964,1970).

Οι δε Diagneault και Chong (1985) αναφέρουν ότι τα υδατοδιαλυτά φαινολικά και τύπου Indolyl συστατικά, που απαντούν σε εκχυλίσματα ιστών κισσού είναι υπεύθυνα για την προαγωγική επίδραση σχηματισμού ριζών σε μοσχεύματα φασολιού. Η επίδραση των κατεργασμένων εκχυλισμάτων ήταν μεγαλύτερη από εκείνη των ακατέργαστων εκχυλισμάτων. Πιο θετικά αποτελέσματα έδωσαν τα εκχυλίσματα, που προέρχονταν από ιστούς βλαστών που παραλήφθηκαν στους χειμερινούς παρά στους θερινούς μήνες.

2.1.5.8. Άγαρ.

Το άγαρ χρησιμοποιείται αποκλειστικά για την στερεοποίηση των υποστρωμάτων, αλλά πιστεύεται ότι αποτελεί πηγή και ανόργανων στοιχείων. Συνήθως χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 0,6 - 0,7%.

2.1.6. Φάσεις πολλαπλασιασμού φυτών in vitro.

Το έμφυτο απολυμαίνεται επιφανειακά συνήθως σε διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου όπου κατά κανόνα προστίθεται και κάποια προσκολλητική ουσία. Έπειτα τα μεριστώματα ξεπλένονται αρκετές φορές με αποστειρωμένο νερό, μεταφέρονται σε αποστειρωμένο θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης για αναπαραγωγή βλαστών, και ακολούθως κάθε βλαστός εμφυτεύεται σε θρεπτικό υπόστρωμα ριζοβολίας.

Τα έρριζα φυτά μεταφυτεύονται σε γλαστράκια με υπόστρωμα , που έχει προηγουμένως απολυμανθεί με κατάλληλες απολυμαντικές χημικές ουσίες NaOCl κ.λ.π., σκληραγωγούνται σε θερμοκήπια με ρυθμιζόμενες συνθήκες κυρίως θερμοκρασίας και υγρασίας και αναπτύσσονται μετά το σύντομο αυτό στάδιο της σκληραγωγήσεως σε φυσικές συνθήκες.

2.2. Παράγοντες που επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό της ελιάς in vitro

Η βιβλιογραφία, που αναφέρεται στον πολλαπλασιασμό της ελιάς in vitro είναι πολύ περιορισμένη.

Οι Hackett και Anderson (1966) διαπίστωσαν σε μεριστώματα ελιάς, που αποτελούνταν από μικρό τμήμα εκφύτου, με ένα ή δύο οφθαλμούς, καλλιεργηθέντα στο υπόστρωμα του White (1963), μικρή ανάπτυξη του άξονα του οφθαλμού και το σχηματισμό μικρού βλαστού σε μορφή ροσέττας. Από τις ρυθμιστικές ουσίες αύξησης που δοκίμαστηκαν μόνον ο συνδυασμός γιββερελλικού οξέος (0.1ppm) και τριϊωδοβενζοϊκού οξέος (10^{-5} M) είχαν ελαχίστην επίδραση στην επιμήκυνση των βλαστών.

Οι Ιταλοί Rugini, Fontanazza και Bongì (1979) χρησιμοποιώντας ως μεριστώματα μικρά τμήματα βλαστών με έναν ή δύο οφθαλμούς, που προήλθαν από καλλιέργεια εμβρύων ελιάς, που καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS (1962) , επέτυχαν την έκπτυξη βλαστών (μέσος όρος αριθμού βλαστών 1.7 ανά έκφυτο σε χρονικό διάστημα περίπου 4 εβδομάδων)

και ριζοβολία αυτών σε υπόστρωμα, που περιείχε τα μακρο - στοιχεία του Knop (1865), τα μικροστοιχεία του Heller (1953) και την ορμόνη ριζοβολίας IBA σε συγκέντρωση 1ppm (ποσοστό ριζοβολίας 72-80%).

Οι Rugini και Fontanazza (1981) πέτυχαν να πολλαπλασιάσουν in vitro την ποικιλία ελιάς "Dolce Agogia". Χρησιμοποιήθηκαν ως μεριστώματα μικρά τμήματα εκφύτων, που περιελάμβαναν ένα μόνο γόνατο. Και τα έκφυτα αυτά προήλθαν από την καλλιέργεια μικρών τμημάτων βλαστών, που περιελάμβαναν ένα μόνο γόνατο, από παραφυάδες του ελαιοδένδρου σε υπόστρωμα, που αποτελείτο από μακροστοιχεία του Knop (1865) και μικροστοιχεία του Heller (1953), μειωμένων των συγκεντρώσεων αυτών κατά το ήμισυ και με την προσθήκη σακχαρόζης και IBA σε συγκεντρώσεις 30gr και 2mg ανά λίτρο, αντίστοιχα. Η απολύμανση των μεριστωμάτων με 7% υποχλωριώδες ασβέστιο δεν έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα λόγω καταστροφής των οφθαλμών.

Αναπαραγωγή βλαστών από μεριστώματα εκφύτου του ενός γόνατος επιτεύχθηκε σε υπόστρωμα Murashige και Skoog (1962), όπου οι συγκεντρώσεις των μακροστοιχείων και μικροστοιχείων μειώθηκαν κατά το ήμισυ, που εμπλουτίστηκε με ριβοζίδιο ζεαΐνης (10mg ανά λίτρο), IBA (0.5mg ανά λίτρο). Ο ρυθμός πολλαπλασιασμού (αριθμός γονάτων που σχηματίστηκαν ανά έκφυτο) ήταν περίπου 6x σε χρονικό διάστημα πέντε εβδομάδων. Ριζοβολία εκφύτων επιτεύχθηκε σε υπόστρωμα, που αποτελούνταν από μακροστοιχεία του Knop και μικροστοιχεία του Heller (1953) στο ήμισυ των αρχικών συγκεντρώσεών των.

Ως ορμόνη ριζοβολίας χρησιμοποιήθηκε το NAA σε συγκεντρώσεις 2mg και 4mg ανά λίτρο. Η συγκέντρωση των 4mg έδωσε ποσοστό ριζοβολίας 80% σε χρονικό διάστημα ενός μηνός. Η ανάπτυξη των μεριστωματικών καλλιεργειών έγινε κάτω από τις ακόλουθες συνθήκες: ένταση φωτισμού 3.5klx, φωτοπερίοδος 16 ώρες, θερμοκρασία 25°C κατά τη διάρκεια του φωτισμού και 22°C κατά τη διάρκεια του σκότους. Το ποσοστό επιβίωσης έφθασε το 60%.

Ο Rugini (1981) αξιολόγησε την επίδραση ορισμένων κυτοκινινών στην αναπαραγωγή βλαστών. Διαπίστωσε ότι ο μέσος όρος αριθμού βλαστών ανά έκφυτο, μετά από χρονικό διάστημα 5 εβδομάδων, ήταν 2.2 (μέσο μήκος βλαστών 10mm), 1.5 (μέσο μήκος βλαστών 13mm), 2.6 (μέσο μήκος βλαστών 6mm) για optimum τιμές του ριβοζίδιου ζεατίνης (8ppm), του 2ip (4ppm) και BAP (8ppm).

Αργότερα ο Rugini (1984) πέτυχε να πολλαπλασιάσει in vitro τις ποικιλίες ελιάς Frantoio, Dolce Agogia και Moraiolo, που χαρακτηρίζονταν από διάφορη ικανότητα ριζοβολίας. Τα μεριστώματα αποτελούνταν από μικρό τμήμα εκφύτου με ένα γόνατο, που λήφθηκαν από βλαστούς, που διέφεραν φυσιολογικά ως προς την ικανότητα ριζοβολίας (παραφυάδες, λαίμαργοι, καρποφόροι βλαστοί).

Η αναπαραγωγή βλαστών επιτεύχθηκε σε υπόστρωμα, που αποτελείτο από μακροστοιχεία και μικροστοιχεία του Murashige και Skoog (1962) με αυξημένη τη συγκέντρωση των ανοργάνων στοιχείων Ca, Mg, S, Cu και Zn. Ο ρυθμός πολλαπλασιασμού (αριθμός γονάτων που σχηματίστηκαν κατά φυτό)

ήταν περίπου 9χ σε χρονικό διάστημα 6 εβδομάδων.

Ριζοβολία εκφύτων επιτεύχθηκε στο υπόστρωμα του Marashige και Skoog (1962), όπου οι συγκεντρώσεις των μακροστοιχείων και μικροστοιχείων μειώθηκαν κατά το ήμισυ, στο υπόστρωμα των Bourgin και Nitsch (1967) και σε υπόστρωμα που αποτελείτο από μακροστοιχεία του Knop και μικροστοιχεία του Heller σε συγκεντρώσεις που είχαν μειωθεί στο ήμισυ. Ως ορμόνη ριζοβολίας χρησιμοποιήθηκε το NAA με πολύ ικανοποιητικά αποτελέσματα σε συγκέντρωση 1mg ανά λίτρο (ποσοστό ριζοβολίας 80%). Ο βαθμός νεανικότητας των αρχικών εκφύτων δεν επηρέασε το ποσοστό ριζοβολίας.

Οι Fiorino και Leva (1985) πέτυχαν να πολλαπλασιάσουν in vitro σπορόφυτα της ποικιλίας "Maurino". Αναπαραγωγή βλαστών επιτεύχθηκε στα υποστρώματα MS₁ και MS₂, μετά από χρονικό διάστημα 4 εβδομάδων, με ριβοζίδιο ζεατίνης σε συγκέντρωση 10mg ανά λίτρο απ'όπου διαπιστώθηκε ότι σημαντικό ρόλο παίζει η σχέση των στοιχείων Ca/N, που ήταν 1:9.4 στο MS₁ και 1:7.6 στο MS₂. Ο μέσος όρος αριθμού βλαστών ανά έκφυτο στα υποστρώματα MS₁ και MS₂ ήταν 3.4 (μήκος βλαστών 8.47mm) και 2.5 (μήκος βλαστών 9.16mm), αντίστοιχα. Όπως αναφέρεται οι αριθμοί αυτοί δε διέφεραν μεταξύ τους σημαντικά.

Ριζοβολία εκφύτων επιτεύχθηκε στα υποστρώματα MS₁ και MS₂ με την προσθήκη IBA σε συγκέντρωση 3mg ανά λίτρο. Τα ποσοστά ριζοβολίας στα υποστρώματα MS₁ και MS₂ ήταν 38.7% και 29.3%, αντίστοιχα.

Τέλος, οι Cana, carramolino και Vicente (1987) πέ-

τυχαν να πολλαπλασιάσουν in vitro επτά ποικιλίες ελιάς, χρησιμοποιώντας ως μεριστώματα τμήματα σποροφύτων με ένα γόνατο (κόμβο), που προήλθαν από καλλιέργεια εμβρύων των ποικιλιών αυτών. Αναπαραγωγή βλαστών επιτεύχθηκε στο υπόστρωμα OM (Rugini, 1984) με την προσθήκη ζεατίνης ή 2ip ή BAP σε συγκέντρωση 4ppm, 4ppm, 2ppm αντίστοιχα μετά από χρονικό διάστημα 3 μηνών.

Ριζοβολία εκφύτων κατέστη δυνατή σε υπόστρωμα OM με την προσθήκη IBA σε συγκέντρωση 1ppm σε σκοτάδι.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1. Υλικά

Χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα υλικά:

- (1) Ηλεκτρονικός ζυγός, τύπου Sauter, για το ζύγισμα των θρεπτικών συστατικών των υποστρωμάτων ανάπτυξης και ριζοβολίας.
- (2) Πιπέτες και μικροπιπέτες για την προσθήκη ορισμένων συστατικών υπό μορφή διαλύματος στις περιπτώσεις εκείνες που χρησιμοποιούνται μικροποσότητες και η ζύγισή των σε στερεά μορφή δε θα είναι ακριβής.
- (3) Δοκιμαστικοί σωλήνες (25 X 2,5 εκ) και κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 250ml για την ανάπτυξη και ριζοβολία των φυτών.
- (4) Ογκομετρικοί σωλήνες και ογκομετρικές φιάλες για τη μέτρηση διαλυμάτων και παρασκευής των υποστρωμάτων ανάπτυξης και ριζοβολίας αντίστοιχα.

- (5) Ηλεκτρικό μαγνητικό μάτι ως πηγή θερμότητας για την παρασκευή των θρεπτικών υποστρωμάτων.
- (6) Πώματα από αλουμινόχαρτο για τους δοκιμαστικούς σωλήνες και από βαμβάκι καλυμμένα με αλουμινόχαρτο για τις κωνικές φιάλες Erlenmeyer.
- (7) Θήκες μεταλλικές ή από φεΐζόλ για την τοποθέτηση των δοκιμαστικών σωλήνων.
- (8) Κλίβανος αποστείρωσης των θρεπτικών υποστρωμάτων (Autoclave).
- (9) Πεχάμετρο τύπου Perkin-Elmer (Coleman 80) για τη ρύθμιση του pH των θρεπτικών υποστρωμάτων.
- (10) Θάλαμος (Microflow) της M.D.H., (Αγγλία) όπου γίνονται οι διεργασίες φύτευσης του φυτικού υλικού , προς αποφυγή μολύνσεων.
- (11) Θάλαμος ρυθμιζομένων συνθηκών (φωτισμού, θερμοκρασίας, υγρασίας) για την ανάπτυξη των ιστοκαλλιεργείων.
- (12) Διάφορα μικροεργαλεία (λαβίδες, ανατομικές λεπίδες και ψαλίδια, καμινέτο κ.λ.π.), που χρησιμοποιούνται κατά την παραλαβή και τη φύτευση των εκφύτων.
- (13) Θρεπτικά συστατικά, ως ανόργανα μακροστοιχεία και μικροστοιχεία, βιταμίνες κ.λ.π., για τη σύνθεση των θρεπτικών υποστρωμάτων.
- (14) Υποχλωριώδες νάτριο για την απολύμανση του φυτικού υλικού και καθαρό οινόπνευμα για την απολύμανση των μικροεργαλείων κατά την εμφύτευση.

(15) Ως φυτικό υλικό χρησιμοποιήθηκαν επάκριες κορυφές βλαστών ή τμήματα βλαστού με ένα ή δύο οφθαλμούς (0.4 - 0.7 εκ.) από σφαιροβλάστες ή γόγγρους ελιάς και από βλαστούς του κορμού ή των βραχιόνων του ελαιοδένδρου.

3.2. Μέθοδοι

3.2.1. Επιλογή μεριστώματος

Είναι γνωστό ότι η ανάπτυξη του μεριστώματος in vitro επηρεάζεται από τη φυσιολογική κατάσταση του βλαστού, απ'όπου αυτό παραλαμβάνεται. Παρατηρήθη δηλ. πως, καλύτερα αναπτύσσονται τα μεριστώματα που λαμβάνονται από βλαστούς, που βρίσκονται στη φάση της νεανικότητάς τους. Μερικές φορές όμως η ανάπτυξη των μεριστωματικών καλλιεργειών επηρεάζεται και από την εποχή που λαμβάνεται το μερίστωμα.

Γι'αυτό στην παρούσα εργασία διερευνάται από φυσιολογική άποψη αφ'ενός μεν το είδος του βλαστού, απ'όπου θα παραληφθεί το μερίστωμα, αφ'ετέρου δε η εποχή λήψης του.

3.2.1.1. Επιλογή μεριστώματος σε σχέση με το είδος του βλαστού.

Χρησιμοποιήθηκαν μεριστώματα από βλαστούς, που εκφύονταν από τον κορμό ή τους βραχίονες του δένδρου και από βλαστούς, που προήλθαν από την καλλιέργεια σφαιροβλαστών ή γόγγρων (φυσιολογικές υπερπλασίες του δένδρου

της ελιάς, που συνήθως σχηματίζονται στον κορμό του ελαιόδενδρου και μάλιστα στο τμήμα εκείνο που βρίσκεται πλησίον του εδάφους, πλούσιες σε θρεπτικά στοιχεία και φυτορμόνες).

3.2.1.2. Παραλαβή βλαστών.

Οι βλαστοί και στις δύο περιπτώσεις χαρακτηρίζονται από ζωηρότητα, από μικρά μεσογονάτια διαστήματα, από αιχμηρά φύλλα, από ανώμαλους δείκτες φυλλοταξίας και από λεπτό φλοιό. Προέρχονται από τυχαίους οφθαλμούς και αναπτύσσονται συνήθως μετά από αυστηρό κλάδεμα των δένδρων ή καλλιέργεια των σφαιροβλαστών σε τεχνητά υποστρώματα. Η παραλαβή τους γίνεται, όταν αποκτήσουν μήκος περίπου 5-8 εκατοστά.

3.2.1.3. Παραλαβή και προετοιμασία μεριστωμάτων.

Οι βλαστοί κόβονται σε μικρά τμήματα (μήκους 0.4-0.7 εκ.) κατά τρόπο, που το καθένα απ'αυτά να περιλαμβάνει ένα μεσογονάτιο διάστημα βλαστού με έναν ή δύο οφθαλμούς και χωρίς φύλλα. Κάθε τμήμα αποτελεί και ένα μερίστωμα.

3.2.1.4. Εποχή παραλαβής μεριστωμάτων.

Η αποκοπή των βλαστών και η παραλαβή των μεριστωμάτων εγένετο κάθε 3 μήνες κατά τη χρονική περίοδο από Φεβρουάριο μέχρι Νοέμβριο, ήτοι στις αρχές Φεβρουαρίου, Μαΐου, Αυγούστου και Νοεμβρίου.

3.2.2. Απολύμανση μεριστωμάτων.

Χρησιμοποιήθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις υποχλωριώδους νατρίου (NaOCl) σε διαφορετικά χρονικά διαστήματα παραμονής των μεριστωμάτων στο διάλυμα η καθεμιά. Πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκαν οι συγκεντρώσεις 6%, 10%, 14%, σε χρονικά διαστήματα των 4, 6, 8, 10, 12 και 14 λεπτών της ώρας η καθεμιά. Κάθε συνδυασμός περιελάμβανε 25 μεριστώματα φυτευμένα σε ισάριθμους δοκιμαστικούς σωλήνες, που περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα ανάπτυξης. Το τεστ έγινε και για τις δύο κατηγορίες μεριστωμάτων ανάλογα με το είδος των χρησιμοποιηθέντων βλαστών.

Τα μεριστώματα μετά την απολύμανση ξεπλένονταν 3 φορές με αποστειρωμένο νερό και ακολούθως φυτεύονταν στο υπόστρωμα ανάπτυξης. Το ποσοστό μόλυνσης καταμετρήθηκε μετά από 2 εβδομάδες χωριστά για κάθε κατηγορία μεριστωμάτων. Οι απολυμάνσεις διενεργούνταν εντός του θαλάμου "Microflow".

3.2.3. Σύνθεση υποστρώματος ανάπτυξης.

Αρχικά χρησιμοποιήθηκαν τα γνωστά υποστρώματα ανάπτυξης των Murashige και Skoog (1962), του Rugini (1984) και των Fiorino και Leva (1985). Στα υποστρώματα αυτά προστέθηκε ζεατίνη σε συγκεντρώσεις 2.5, 5, 7.5, 10 και 15 mg ανά λίτρο, γιατί δίνει τα πιο ικανοποιητικά αποτελέσματα σε ό,τι αφορά την παραγωγή νέων βλαστών (Rugini, 1981). Στην περίπτωση μας τα αποτελέσματα κρίθηκαν ως μη

ικανοποιητικά και γι' αυτό προχωρήσαμε στη σύνθεση νέου υποστρώματος.

Η σύνθεση του νέου υποστρώματος επιτεύχθηκε μετά από μετατροπές των συγκεντρώσεων ορισμένων μακροστοιχείων και μικροστοιχείων του υποστρώματος Rugini (1984), την προσθήκη ορισμένων αμινοξέων του υποστρώματος των Fiorino και Leva (1985), ως και ορισμένων αυξινών, κατά την κρίση μας. Το υπόστρωμα, που προέκυψε μετά από συνεχείς δοκιμές, σταθεροποιήθηκε στις συγκεντρώσεις που αναφέρονται σ' αυτό, με βάση πάντοτε την καλή ανάπτυξη των εκφύτων.

Το νέο αυτό υπόστρωμα, που χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη των εκφύτων, αποτελείται από τα ακόλουθα συστατικά σε mg ανά λίτρο: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 650, NH_4NO_3 250, KNO_3 1830, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 440, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1100, KH_2PO_4 280, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 27.8, Na_2EDTA 37.5, MnSO_4 16.9, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 14.3, H_3BO_3 6.2, KJ 0.83, Na_2MoO_4 0.25, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.25, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.025, myo-inositol 100, cystine 0.5, Pantothenic acid calcium 10, glutamine 610, glycine 2, folic acid 0.5, biotin 0.1, nicotinic acid 5, pyridoxine-HCl 0.5, thiamine-HCl 0.5, sucrose 30000, IAA 0.1, GA_3 0.5 και agar oxoid No.3 6000.

Στο υπόστρωμα ανάπτυξης των εκφύτων για την αναπαραγωγή νέων βλαστών προστέθηκε ζεατίνη ή βενζυλαδενίνη ή 2ip η καθεμιά στις ακόλουθες συγκεντρώσεις: 2.5ppm, 5ppm, 7.5ppm, 10 και 15ppm σε συνδυασμό ή μη με εκχύλισμα που παραλήφθηκε από ιστούς γόγγρων ή σφαιροβλαστών. Το pH του υποστρώματος ρυθμίστηκε στο 5.8.

3.2.4. Σύνθεση υποστρώματος ριζοβολίας.

Το υπόστρωμα ριζοβολίας των εκφύτων περιείχε τα συστατικά του υποστρώματος ανάπτυξης των εκφύτων, εκτός των κυτοκινινών, που αντικαταστάθηκαν από τις αυξίνες IBA και α-NAA, στις ακόλουθες η καθεμιά συγκεντρώσεις: 1ppm, 2ppm και 3ppm σε συνδυασμό ή μη με ακατέργαστο εκχύλισμα που παραλήφθηκε από ιστούς γόγγρων ή σφαιροβλαστών.

3.2.5. Παραλαβή εκχυλίσματος ιστών ελιάς.

Ως φυτικό υλικό χρησιμοποιήθηκαν οι γόγγροι ή σφαιροβλάστες της ελιάς. Χρησιμοποιήθηκε η μέθοδος του Harbone (1973) για την παραλαβή του ακατέργαστου εκχυλίσματος, με ορισμένες τροποποιήσεις σε ό,τι αφορά την αναλογία κατά βάρος ιστού προς μεθανόλη (McDougall και Hillman, 1978) λόγω της φύσης του φυτικού υλικού.

Οι γόγγροι τεμαχίστηκαν σε μικρά κομμάτια μεγέθους περίπου 5-6mm αμέσως μετά την αποκοπή τους από το ελαιόδενδρο και ακολούθως 3 γραμμάρια από το υλικό αυτό τοποθετήθηκε σε 50ml καθαρής μεθανόλης. Στη συνέχεια το υλικό αυτό τοποθετήθηκε σε ψυγείο με θερμοκρασία 4°C για 24 ώρες. Μετά την παρέλευση του πιο πάνω χρονικού διαστήματος το διάλυμα μαζί με τους φυτικούς ιστούς ανακατεύονταν επί 30 λεπτά της ώρας σε μαγνητικό αναδευτήρα και ακολούθως διηθούνταν με χαρτί διήθησης Whatman No 1. Ακολουθούσε απομάκρυνση της μεθανόλης με τη βοήθεια περιστρεφόμενου εξατμιστήρα (Rotavapor R 110 Buchi) σε θερμοκρασία

40°C μέχρι της παραλαβής μικρού όγκου. Το υλικό αυτό υπό μορφή σκόνης διατηρούνταν στο ψυγείο σε θερμοκρασία -15°C.

3.2.6. Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων - ανάπτυξης και ριζοβολίας.

Αρχικά ζυγίζονται τα συστατικά των υποστρωμάτων σε ζυγό ακριβείας σε ποσότητες, που αντιστοιχούν στην παρασκευή ενός λίτρου διαλύματος, τοποθετούνται σε ογκομετρική φιάλη του ενός λίτρου και προστίθεται απεσταγμένο νερό μέχρι τα 1000 ml. Τα συστατικά εκείνα που προστίθενται σε πολύ μικρές ποσότητες, για μεγαλύτερη δυνατή ακρίβεια, προτιμήθηκε η παρασκευή διαλυμάτων μεγαλύτερων συγκεντρώσεων και η προσθήκη τους υπό μορφή διαλύματος. Ως διαλύτης των συστατικών των υποστρωμάτων χρησιμοποιήθηκε απεσταγμένο νερό. Πρέπει να αναφερθεί ότι, οι αυξίνες IBA και α-NAA ως δυσδιάλυτες στο νερό, διαλύθηκαν αρχικά σε μικρές ποσότητες καθαρού οινοπνεύματος, οι δε κυτοκινίνες και η κυστίνη σε μικρές ποσότητες καυστικού νατρίου πυκνότητας 1N. Στον τελικό όγκο του θρεπτικού υποστρώματος συνυπολογίζονται και οι μικροποσότητες των συστατικών που προστέθηκαν υπό μορφή διαλύματος.

Ακολουθεί η ρύθμιση του pH του υποστρώματος στο 5.8 με τη βοήθεια δεκατοκανονικού διαλύματος (0,1N) καυστικού νατρίου ή υδροχλωρικού οξέος πριν από την προσθήκη του άγαρ και μετέπειτα βράζεται. Ο βρασμός γίνεται σε ηλεκτρικό μαγνητικό μάτι, όπου ανακατεύεται συνεχώς με τη

βοήθεια μαγνήτη. Το υπόστρωμα θεωρείται έτοιμο όταν το διάλυμα γίνει διαυγές.

Στη συνέχεια τοποθετείται όπως είναι ζεστό σε δοκιμαστικούς σωλήνες ή κωνικές φιάλες Erlenmeyer. Στους δοκιμαστικούς σωλήνες διαστάσεων 25 X 2,5 εκ. τοποθετούμε 10ml από το διάλυμα και στις κωνικές φιάλες Erlenmeyer των 250ml, 120ml διαλύματος με τη βοήθεια αυτόματης σύριγγας πλήρωσης και ογκομετρικού κυλίνδρου αντίστοιχα. Ακολουθεί η κάλυψη των σωλήνων με ειδικά πώματα από αλουμινόχαρτο και των κωνικών φιαλών με πώματα από μη υδρόφιλο βαμβάκι και αλουμινόχαρτο. Ακολούθως τα υποστρώματα τοποθετούνται σε κλέβανο αποστείρωσης (Autoclave). Η αποστείρωση γίνεται σε θερμοκρασία 121⁰C επί 15' λεπτά της ώρας και το υπόστρωμα αφήνεται να στερεοποιηθεί.

3.2.7. Φύτευση εκφύτων.

Τα έκφυτα μετά τη διαδικασία της απολύμανσης, που γίνεται πάντοτε εντός του θαλάμου προς αποφυγή μολύνσεων, φυτεύονται εντός του θρεπτικού υποστρώματος των δοκιμαστικών σωλήνων και τοποθετούνται στο θάλαμο ρυθμιζόμενων συνθηκών για ανάπτυξη. Στο υπόστρωμα αυτό παραμένουν περίπου 4 εβδομάδες για ενδυνάμωση των εκφύτων. Ακολούθως μεταφυτεύονται, πάντοτε εντός του θαλάμου και χωρίς νέα απολύμανση, στο υπόστρωμα ανάπτυξης των κωνικών φιαλών για περαιτέρω ανάπτυξη. Η διαδικασία αυτή είναι αναγκαία αφ' ενός μεν γιατί ανανεώνεται το υπόστρωμα ανάπτυξης που

με την πάροδο του χρόνου πιθανόν να υφίσταται κάποια αλλοίωση στη σύνθεση των συστατικών, αφ'ετέρου δε παρέχεται μεγαλύτερος χώρος για την ανάπτυξη των εκφύτων.

Στο τέλος κάθε φάσης ανάπτυξης των εκφύτων λαμβάνονταν παρατηρήσεις που αφορούσαν τον αριθμό των παραγομένων βλαστών ως και το μήκος αυτών,

Ακολούθως οι βλαστοί αποκόπτονταν από τη μητρική καλλιέργεια και φυτεύονταν στο υπόστρωμα ριζοβολίας, ένας σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα, που στη συνέχεια τοποθετούνταν στο θάλαμο ρυθμιζομένων συνθηκών προκειμένου να ριζοβολήσουν. Η διάρκεια της φάσης της ριζοβολίας των εκφύτων ήταν περίπου 4 εβδομάδες. Μετά το χρονικό διάστημα αυτό λαμβάνονταν παρατηρήσεις, που αφορούσαν τον αριθμό των βλαστών που ριζοβόλησαν, τον αριθμό των ριζών κατά έρριζο βλαστό και το μέσο μήκος των ριζών.

Στη συνέχεια τα έρριζα φυτά μεταφυτεύονταν σε μικρά γλαστράκια με υπόστρωμα τύρφης και περλίτη σε αναλογία κατά όγκο 1:1. Ακολούθως η φάση της σκληραγώγησης των φυτών, που συνίστατο σε βαθμιαία μείωση της θερμοκρασίας και υγρασίας, που επικρατούσαν στο θάλαμο ανάπτυξης και εξισσορρόπησης αυτών με εκείνες του θερμοκηπίου (θερμοκρασία 20°C και σχετική υγρασία 70%). Η φάση της σκληραγώγησης διαρκούσε περίπου δύο εβδομάδες και ακολούθως λαμβάνονταν παρατηρήσεις που αφορούσαν τον αριθμό των επιβιώσαντων φυτών.

3.2.8. Συνθήκες θαλάμου ανάπτυξης των φυτών.

Τα φυτά καθόλη τη διάρκεια των διαφόρων φάσεων α-

νάπτυξης και ριζοβολίας διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$, με φωτοπερίοδο 16 ώρες φωτός στο 24ωρο και έντασης 3500 Lux. Ως πηγή φωτός χρησιμοποιήθηκαν λάμπες φθορισμού ψυχρού φωτός (Cool-white). Η σχετική υγρασία του θαλάμου διατηρήθηκε στο 90%.

3.2.9. Προσδιορισμός ουσιών του εκχυλίσματος, που επηρεάζουν την ανάπτυξη και ριζοβολία των εκφύτων.

Ο ποιοτικός προσδιορισμός των ουσιών έγινε με χρωματογραφία (TLC) και με αέρια - υγρή χρωματογραφία (GLC).

3.2.9.1. Ποιοτικός προσδιορισμός με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας (TLC).

Για τον ποιοτικό προσδιορισμό των ουσιών ανάπτυξης ή ριζοβολίας ακολουθήθηκε η μέθοδος του Harbone (1973).

Εκχύλιση. Ποσότητα 100mg από το υλικό που παραλήφθηκε από την εκχύλιση ιστών ελιάς (σφαιροβλάστες) διαλύθηκε σε απόλυτη μεθανόλη 100ml και ακολούθησε χρωματογράφηση του πάνω σε πλάκα TLC.

Η ανάπτυξη του χρωματογραφήματος έγινε με τρεις διαφορετικούς διαλύτες, ήτοι μίγμα χλωροφορμίου: αιθυλικό οξύ: φορμικό οξύ, 5:4:1 (v:v:v), ισοπροπανόλης: αμμωνία:νερό, 8:1:1 (v:v:v), και βουτανόλης: οξικό οξύ: νερό, 12:3:5 (v:v:v), σε ύψος 10 εκ, σε θερμοκρασία δωματίου.

Ο προσδιορισμός της θέσης Rf των ουσιών στο αναπτυγμένο χρωματογράφημα γινόταν με τοποθέτηση ξεχωριστών

σταγόνων (20μλ) διαλυμάτων ινδολυλοξικού οξέος και τρυπταμίνης στο περιθώριο της ίδιας πλάκας TLC, για να χρησιμοποιούνται ως δείκτες. Η ακριβής θέση των ανιχνευομένων ουσιών ως και των ουσιών - δεικτών, μετά την ανάπτυξη του χρωματογραφήματος, γινόταν με τη βοήθεια υπεριώδους ακτινοβολίας (U.V.-Vis). Η ζώνη που περιελάμβανε 2mm επάνω και κάτω από τη θέση των κηλίδων απομακρυνόταν από την πλάκα TLC με απόξεση, με τη βοήθεια ξυριστικής λεπίδας και αξιολογήθηκαν ως προς την αυξητική ή ριζογόνο επίδρασή των με βιοδοκιμή, όπου χρησιμοποιήθηκαν μοσχεύματα φασολιού (*Phaseolus aureus* Roxb.) ηλικίας περίπου μιας εβδομάδας.

Με τη μέθοδο προσδιορίστηκε βασικά η τρυπταμίνη.

Η τρυπταμίνη με διαλύτη το μίγμα χλωροφορμίου: αιθυλικό οξύ: φορμικό οξύ προσδιορίστηκε σε R_f περίπου 0,13, με διαλύτη το μίγμα ισοπροπανόλης: αμμωνία: νερό σε R_f περίπου 0.68 και με διαλύτη το μίγμα βουτανόλης: οξικό οξύ: νερό σε R_f περίπου 0.56.

3.2.9.2. Ποιοτικός προσδιορισμός με αέρια - υγρή χρωματογραφία.

Το ξηρό υπόλειμμα, που παραλήφθηκε από 3gr ιστών σφαιροβλαστών νωπού βάρους, όπως αναφέρεται πιο πάνω, διαλύθηκε σε 50ml απεσταγμένο νερό. Μετά τη ρύθμιση του pH σε 3 με διάλυμα 1N υδροχλωρικού οξέος, το διάλυμα υποβλήθηκε σε διαχωρισμό με ίσο όγκο διαιθυλαιθέρα 3 φορές.

Μετά το διαχωρισμό λαμβανόταν η αιθερική φάση, που

περιείχε το ινδολυλοξικό οξύ (IAA) και η υδατική φάση απορριπτόταν. Η αιθερική φάση εξατμιζόταν με περιστρεφόμενο εξατμιστή (Rotavapor) σε θερμοκρασία 40°C μέχρι ξηρού υπολείμματος.

Στο ξηρό υπόλειμμα έγινε η μεθυλίωση του IAA με διαζομεθάνιο, αφού διαλύθηκε σε 3-5ml απόλυτη μεθανόλη και προστέθηκαν 2-3 σταγόνες αιθερικού διαλύματος διαζομεθανίου. Η αντίδραση αφήνόταν να εξελιχθεί σε θερμοκρασία 0°C μέχρι του τερματισμού της έκλυσης αερίου. Στο τέλος της αντίδρασης το διάλυμα αποκτούσε ανοικτοκίτρινο χρωματισμό.

Τα διάφορα κλάσματα διαχωρίζονται με TLC και το IAA ταυτοποιείται με το μάρτυρα. Η ανάπτυξη έγινε με το σύστημα των διαλυτών (Βουτανόλης: οξικό οξύ:, νερό, 12:3:5).

Τα αντίστοιχα Rf είναι για το δείγμα 0.9 και για το μάρτυρα 0.91. Πρέπει να σημειωθεί ότι και ο μάρτυρας έχει μεθυλιωθεί πριν τη χρωματογραφική ανάλυση ακολουθώντας την ίδια μέθοδο μεθυλίωσης.

Για επαλήθευση της ταυτοποίησης του μεθυλιωμένου IAA, που υπάρχει στο δείγμα, εφαρμόστηκε και αέρια-υγρή χρωματογραφία. Από το TLC απομονώθηκε η κηλίδα, που αντιστοιχεί στο μεθυλιωμένο IAA, εκχυλίστηκε με απόλυτη μεθανόλη, διηθήθηκε με χαρτί διήθησης Whatman No1 και συμπυκνώθηκε με τη βοήθεια περιστρεφόμενου εξατμιστή (Rotavapor). Η αεριοχρωματογραφική ανάλυση έγινε ισόθερμα σε στήλη OV-1 1.8 μέτρων σε θερμοκρασία 200°C με ροή αζώτου 30ml κάθε λεπτό της ώρας.

Στη συνέχεια ακολούθησε ο προσδιορισμός του μοριακού βάρους των ουσιών της ομάδας indolyl με φασματογραμμική ανάλυση στα Εργαστήρια της Εταιρείας Bioryl.

3.2.10. Αξιολόγηση του ακατέργαστου εκχυλίσματος με βιοδοκιμές.

Η επίδραση του ακατέργαστου εκχυλίσματος επί της ριζοβολίας των εκφύτων της ελιάς, διερευνήθηκε αρχικά σε μοσχεύματα φασολιού (*Phaseolus aureus* Roxb.).

Τα μοσχεύματα κατασκευάστηκαν από το υποκοτύλιο και επικοτύλιο φασολιών, μετά από αφαίρεση του ριζικού συστήματος και των κοτυληδόνων, που σπάρθηκαν σε βερμικουλίτη και αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία $25 \pm 2^\circ\text{C}$. Τα μοσχεύματα είχαν μήκος περίπου 8 εκ. και ηλικία περίπου μιας εβδομάδας.

Τα μοσχεύματα τοποθετήθηκαν σε διάλυμα εκχύλισμα - τος στις ακόλουθες συγκεντρώσεις: 10ppm, 20ppm, 30ppm, 40ppm, 50ppm, 60ppm και 70ppm. Ως μέσο τοποθέτησης των διαλυμάτων χρησιμοποιήθηκαν γυάλινοι σωλήνες μήκους 5 εκ. και διαμέτρου 1 εκ. Σε κάθε σωλήνα τοποθετήθηκαν τέσσερα μοσχεύματα. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε απεσταγμένο νερό. Επί πλέον το εκχύλισμα αξιολογήθηκε και σε συνδυασμό με ινδολυλοβουτυρικό οξύ (IBA) με τις ακόλουθες μεταχειρίσεις: IBA 1ppm, IBA 1ppm συν εκχύλισμα 10ppm, IBA 1ppm συν εκχύλισμα 30ppm και IBA 1ppm συν εκχύλισμα 50ppm. Χρησιμοποιήθηκε εκχύλισμα που παραλήφθηκε το Φεβρουάριο.

Διευρύνθηκε ακόμη η επίδραση εκχυλισμάτων 4 διαφορετικών εποχών Φεβρουαρίου, Μαΐου, Αυγούστου και Νοεμβρίου με συγκέντρωση 30ppm και συνδυασμό με IBA 1ppm.

Σκοπός των βιοδοκιμών αυτών ήταν η αξιολόγηση της επίδρασης του ακατέργαστου εκχυλίσματος επί της ριζοβολίας των μοσχευμάτων, η συνεπίδραση αυτού με την κύρια ορμόνη ριζοβολίας, που είναι το IBA και η εξεύρεση της πιο κατάλληλης εποχής παραλαβής του.

3.2.11. Σχέδιο πειραμάτων και στατιστική επεξεργασία.

Σε όλα τα πειράματα εφαρμόστηκε το σχέδιο των τυχαιοποιημένων ομάδων (Randomized blocks). Ο αριθμός των ομάδων (επαναλήψεων) ήταν 4-5 ανάλογα με το πείραμα. Κάθε επέμβαση περιελάμβανε 4 μοσχεύματα στις βιοδοκιμές και 10 έκφυτα in vitro για ανάπτυξη ή ριζοβολία.

Στο τέλος κάθε πειράματος γινόταν στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, που περιελάμβανε: ανάλυση παραλλακτικότητας και υπολογισμό του ελάχιστου σημαντικού εύρους με τη μέθοδο Duncan.

3.2.12. Περιγραφή πειραμάτων

3.2.12.1. Επιλογή μεριστώματος σε σχέση με το είδος του βλαστού.

Μεριστώματα μήκους 0.4 - 0.7 εκ., που αποτελούνταν από το μεσογονάτιο διάστημα του βλαστού με έναν ή δύο οφθαλμούς και χωρίς φύλλα φυτεύθηκαν μετά από απολύμανσή

τους στο υπόστρωμα ανάπτυξης, του οποίου η σύνθεση αναφέρεται στο ίδιο κεφάλαιο "υλικά και μέθοδοι". Τα μεριστώματα, που περιελάμβαναν την κορυφή των βλαστών εξαιρέθηκαν, γιατί η ανάπτυξή τους, όπως διαπιστώθηκε από προκαταρκτικά πειράματα και παρατηρήσεις δεν ήταν τόσο ικανοποιητική όσο των μεριστωμάτων από το υπόλοιπο τμήμα του βλαστού.

Το πείραμα αποτελείτο από 5 επαναλήψεις με 25 μεριστώματα για κάθε επανάληψη. Οι μεταχειρίσεις αφορούσαν το είδος του βλαστού ήτοι αν εκφύονταν από γόγγρο (σφαιροβλάστη) ή από τον κορμό ή βραχίονα του ελαιόδενδρου. Η διάρκεια του πειράματος ήταν 4 εβδομάδες. Στα τέλη της χρονικής αυτής περιόδου λαμβανόταν παρατηρήσεις που αφορούσαν το ποσοστό των επιβιωσάντων μεριστωμάτων.

3.2.12.2. Επίδραση του υποχλωριώδους νατρίου επί της επιβίωσης απαλλαγμένων απ'τη μόλυνση μεριστωμάτων που ελήφθησαν από βλαστούς γόγγρων και βλαστούς που εκφύονταν από τον κορμό ή βραχίονα του ελαιόδενδρου.

Μεριστώματα μήκους 4-7 mm που αποτελούνταν από το μεσογονάτιο διάστημα του βλαστού με έναν ή δύο οφθαλμούς και χωρίς φύλλα, εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου, όπως περιγράφεται στο ίδιο κεφάλαιο "υλικά και μέθοδοι".

3.2.12.3. Επίδραση των υποστρωμάτων MS, MS₁, MS₂, OM και YE (υπόστρωμα ελιάς) επί της ανάπτυξης των εκφύτων ελιάς "Καλαμών".

Μεριστώματα μήκους 4-7mm που αποτελούνταν από το μεσογονάτιο διάστημα του βλαστού με έναν ή δύο οφθαλμούς και χωρίς φύλλα, αφού απολυμάνθηκαν, φυτεύθηκαν στα υποστρώματα MS, MS₁, MS₂, MO και YE. Τα υποστρώματα αυτά αποτελούνταν από τα ακόλουθα συστατικά σε mg ανά λίτρο.

MS : NH₄NO₃ 1650, KNO₃ 1900, CaCl₂·2H₂O 440, MgSO₄·7H₂O 370, KH₂PO₄ 170, FeSO₄·7H₂O 27.8, Na₂EDTA 37.3, MnSO₄·4H₂O 22.3, ZnSO₄·7H₂O 8.6, H₃BO₃ 6.2, KJ 0.83, Na₂MoO₄·2H₂O 0.25, CoCl₂·6H₂O 0.025, CuSO₄·5H₂O 0.025, myo-inositol 100, thiamine - HCl 0.4, IBA 0.1, GA₃ 0.1, sucrose 30.000 και agar oxoid No3 7000 (pH 5.6).

MS₁: NH₄NO₃ 1650, KNO₃ 1900, CaCl₂·2H₂O 950, MgSO₄·7H₂O 370, KH₂O 27.8, MnSO₄·2H₂O 22.3, ZnSO₄·7H₂O 8.6, H₃BO₃ 6.2, KJ 0.83, Na₂MoO₄·2H₂O 0.25, CuSO₄·5H₂O 0.025, CoCl₂·6H₂O 0.025, thiamine -HCl 10, nicotinic acid 10, pyridoxine 10, pantothenic acid calcium 10, cystine 10, myo-inositol 500, sucrose 30.000, και agar oxoid No 3 4000 (pH 5.5).

MS₂: Ca(NO₃)₂·4H₂O 250, KNO₃ 1900, CaCl₂·2H₂O 250, MgSO₄·7H₂O 370, KH₂PO₄ 170, Na₂EDTA 37.3, FeSO₄·7H₂O 22.3, ZnSO₄·7H₂O 8.6, H₃BO₃ 6.2, KJ 0.83, Na₂MoO₄·2H₂O 0.25, CuSO₄·5H₂O 0.025, CoCl₂·6H₂O 0.025, thiamine-HCl 10, nicotinic acid 10,, pyridoxine 10, pantothenic acid calcium 10, cy-

stine 10, myo-inositol 500, sucrose 30000 και agar oxoid No 3 4000 (pH 5.5).

OM : KNO_3 1100, NH_4NO_3 412, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 600, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 440, KCl 500, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1500, KH_2PO_4 340, $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 27.8, Na_2 EDTA 37.5, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 22.3, H_3BO_3 12.4, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 14.3, $\text{Na}_2\text{MoO}_5 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.25, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.25, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.025, KJ 0.83, myo-inositol 100, glycine 2, thiamine-HCl 0.5, pyridoxine-HCl 0.5, nicotinic acid 5, biotin 0.05, Folic acid 0.5, glutamine 2190, sucrose 30.000 και agar oxoid No3 6000 (pH 5.8).

YE : Η σύνθεση του υποστρώματος αυτού αναφέρεται στο ίδιο κεφάλαιο υλικά και μέθοδοι.

Στα πιο πάνω υποστρώματα προστέθηκε ζεατίνη σε συγκεντρώσεις 2.5ppm, 5ppm, 7.5ppm, 10ppm, 12.5ppm και 15ppm.

Το πείραμα αποτελείτο από πέντε επαναλήψεις με 10 μεριστώματα ανά επέμβαση. Η διάρκεια του πειράματος ήταν 6 εβδομάδες. Στα τέλη της χρονικής αυτής περιόδου λαμβάνονταν παρατηρήσεις, που αφορούσαν τον αριθμό των βλαστών ανά έμφυτο.

3.2.12.4. Επίδραση της ζεατίνης επί της αναπαραγωγής βλαστών από μεριστώματα εκφύτων ελιάς.

Μεριστώματα μήκους 4-7 mm που αποτελούνταν από το μεσογονάτιο διάστημα του βλαστού με έναν ή δύο οφθαλμούς και χωρίς φύλλα, αφού απολυμάνθηκαν, φυτεύθηκαν στο υπόστρωμα ανάπτυξης YE, που περιείχε τις ακόλουθες συγκεν -

τρώσεις ζεατίνης: 2.5ppm, 5ppm, 7.5ppm, 10ppm, 12.5ppm και 15ppm.

Τα μεριστώματα αρχικά φυτεύθηκαν στο υπόστρωμα ΥΕ σε δοκιμαστικούς σωλήνες και τοποθετήθηκαν στο θάλαμο ρυθμιζομένων συνθηκών για ανάπτυξη. Μετά από χρονικό διάστημα 4 εβδομάδων αφού καταγράφηκε ο αριθμός των παραγόμενων βλαστών ανά έκφυτο και το μήκος των βλαστών, οι καλλιέργειες μεταφυτεύθηκαν στο υπόστρωμα ΥΕ σε κωνικές φιάλες και επανατοποθετήθηκαν στο θάλαμο ρυθμιζομένων συνθηκών για περαιτέρω ανάπτυξη. Μετά από χρονικό διάστημα 8 εβδομάδων καταγράφηκε ο αριθμός των παραχθέντων βλαστών ανά έκφυτο ως και το μήκος των βλαστών αυτών.

Το πείραμα αποτελείτο από πέντε επαναλήψεις με 10 μεριστώματα ανά μεταχείριση. Οι μεταχειρίσεις αφορούσαν τις διάφορες συγκεντρώσεις της ζεατίνης.

3.2.12.5. Επίδραση της βενζυλαδενίνης επί της αναπαραγωγής βλαστών από μεριστώματα εκφύτων ελιάς.

Το πείραμα σχεδιάστηκε και εκτελέστηκε όπως το προηγούμενο με τη διαφορά ότι αντικαταστάθηκε η ζεατίνη από τη βενζυλαδενίνη και το πείραμα κράτησε (6) έξι εβδομάδες.

3.2.12.6. Επίδραση της ζεατίνης σε συνδυασμό με εκχύλισμα ιστών ελιάς στην αναπαραγωγή βλαστών από μεριστώματα εκφύτων ελιάς.

Το πείραμα σχεδιάστηκε και εκτελέστηκε όπως το πεί-

ραμα 3.2.12.4. Οι μεταχειρίσεις αφορούσαν τις ακόλουθες συγκεντρώσεις από ζεατίνη και εκχύλισμα ελιάς: ζεατίνη 10ppm, ζεατίνη 10ppm συν εκχύλισμα ιστών ελιάς 10ppm, ζεατίνη 10ppm συν εκχύλισμα ιστών ελιάς 20ppm και ζεατίνη 10ppm συν εκχύλισμα ιστών ελιάς 30ppm.

Στο τέλος κάθε πειράματος καταγράφηκε ο αριθμός των παραχθέντων βλαστών ανά έκφυτο ως και το μήκος των βλαστών αυτών.

3.2.12.7. Επίδραση της βενζυλαδενίνης σε συνδυασμό με εκχύλισμα ιστών ελιάς στην αναπαραγωγή βλαστών από μεριστώματα εκφύτων ελιάς.

Το πείραμα σχεδιάστηκε και εκτελέστηκε όπως το προηγούμενο (3.2.12.6). Οι μεταχειρίσεις αφορούσαν τις ακόλουθες συγκεντρώσεις βενζυλαδενίνης και εκχυλίσματος ιστών ελιάς: βενζυλαδενίνη 7.5ppm, βενζυλαδενίνη 7.5ppm συν εκχύλισμα ιστών ελιάς 10ppm, βενζυλαδενίνη 7.5 ppm συν εκχύλισμα ιστών ελιάς 20ppm, βενζυλαδενίνη 7.5ppm συν εκχύλισμα ιστών ελιάς 30ppm.

Στο τέλος κάθε πειράματος καταγράφηκε ο αριθμός των παραχθέντων βλαστών ανά έκφυτο ως και το μήκος των βλαστών αυτών.

3.2.12.8. Επίδραση της ζεατίνης, της βενζυλαδενίνης και 2ip (N6-2-ισοπεντενύλ αδενίνη) ως και του συνδυασμού αυτών με εκχύλισμα ιστών ελιάς στην αναπαραγωγή βλαστών από μεριστώματα εκφύτων ελιάς.

Το πείραμα σχεδιάστηκε και εκτελέστηκε όπως τα προηγούμενα. Οι μεταχειρίσεις αφορούσαν τις ακόλουθες συγκεντρώσεις ζεατίνης, βενζυλαδεκίνης, 2ip και εκχυλίσματος ιστών ελιάς: ζεατίνη 10ppm, ζεατίνη 10ppm συν εκχύλισμα ιστών ελιάς 20ppm, βενζυλαδεκίνη 7.5ppm, βενζυλαδεκίνη 7.5ppm συν εκχύλισμα ιστών ελιάς 20ppm, 2ip 10ppm, και 2ip 10ppm συν εκχύλισμα ιστών ελιάς 20ppm.

Στο τέλος κάθε πειράματος καταγράφηκε ο αριθμός των παραχθέντων βλαστών ανά έκφυτο ως και το μήκος των βλαστών αυτών.

3.2.12.9. Επίδραση του ακατέργαστου εκχυλίσματος ιστών ελιάς επί της ριζοβολίας μοσχευμάτων φασολιού.

Μοσχεύματα φασολιού μήκους 8 εκ. τοποθετήθηκαν σε διάλυμα εκχυλίσματος ιστών ελιάς στις ακόλουθες συγκεντρώσεις: 10ppm, 20ppm, 30ppm, 40ppm, 50ppm, 60ppm και 70ppm. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε απεσταγμένο νερό.

Το πείραμα αποτελείτο από πέντε επαναλήψεις με 4 μοσχεύματα η κάθε επέμβαση. Η διάρκεια του πειράματος ήταν περίπου μια εβδομάδα. Στο τέλος της πειραματικής περιόδου λαμβάνονταν παρατηρήσεις που αφορούσαν τον αριθμό των ριζών των μοσχευμάτων.

3.2.12.10. Επίδραση του ακατέργαστου εκχυλίσματος ιστών ελιάς σε συνδυασμό με την ορμόνη ριζοβολίας IBA στη ριζοβολία των μοσχευμάτων φασολιού.

Το πείραμα σχεδιάστηκε και εκτελέστηκε όπως το προ-

ηγούμενο (3.2.12.9). Οι μεταχειρίσεις αφορούσαν τις ακόλουθες συγκεντρώσεις IBA και ακατέργαστου εκχυλισματος ιστών ελιάς: IBA 1pp, IBA 1ppm συν εκχύλισμα 10ppm, IBA 1ppm συν εκχύλισμα 30 ppm και IBA 1ppm συν εκχύλισμα 50 ppm.

Στο τέλος της πειραματικής περιόδου (μιας εβδομάδας) λαμβανόταν παρατηρήσεις που αφορούσαν τον αριθμό των ριζών των μοσχευμάτων

3.2.12.11. Επίδραση των ανιχνευομένων ουσιών στο χρωματογράφημα στη ριζοβολία μοσχευμάτων φασιόλου.

Κάθε ανιχνευόμενη κηλίδα στο χρωματογράφημα (βλέπε υλικά και μέθοδοι - ποιοτικός προσδιορισμός με χρωματογραφία χάρτου) διαλυόταν σε 5ml απεσταγμένο νερό και το διάλυμα τοποθετόταν σε μικρούς γυάλινους σωλήνες (διαστάσεων 5 εκ. X 1 εκ.), όπου στη συνέχεια τοποθετώνταν τα μοσχεύματα φασιόλου για ριζοβολία.

Το πείραμα σχεδιάστηκε και εκτελέστηκε όπως στα προηγούμενα πειράματα βιοδοκιμών με μοσχεύματα φασιόλου.

3.2.12.12. Επίδραση του α-NAA, IBA και του συνδυασμού αυτών με εκχύλισμα ιστών ελιάς στη ριζοβολία βλαστών μεριστωματικών καλλιεργειών ελιάς.

Βλαστοί μήκους 3-5 εκ., που παραλήφθηκαν από μεριστωματικές καλλιέργειες ηλικίας περίπου 12 εβδομάδων, φυτεύθηκαν στο υπόστρωμα ριζοβολίας, του οποίου η σύνθεση

αναφέρεται στα υλικά και μέθοδοι. Οι μεταχειρίσεις αφορούσαν τις ακόλουθες συγκεντρώσεις α-NAA, IBA και συνδυασμού αυτών με αιατέργαστο εκχύλισμα ιστών ελιάς, ήτοι : α-NAA 1ppm, α-NAA 1ppm συν εκχύλισμα 50ppm, α-NAA 2ppm, α-NAA 2ppm συν εκχύλισμα 50ppm, α-NAA 3ppm, α-NAA 3 ppm συν εκχύλισμα 50ppm, IBA 1ppm, IBA 1ppm συν εκχύλισμα 50ppm, IBA 3ppm και IBA 3ppm συν εκχύλισμα 50ppm.

Το πείραμα αποτελείτο από τέσσερις επαναλήψεις με 10 βλαστούς σε κάθε επέμβαση. Η διάρκεια του πειράματος ήταν 6 εβδομάδες. Στα τέλη των περιόδων 3 εβδομάδων, 4 εβδομάδων και 6 εβδομάδων λαμβάνονταν παρατηρήσεις, που αφορούσαν το ποσοστό % ριζοβολίας των βλαστών, το μέσο αριθμό των ριζών ως και το μέσο μήκος αυτών μόνο κατά τα τέλη της περιόδου των έξι εβδομάδων.

4, ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1 Επιλογή μεριστώματος σε σχέση με το είδος του βλαστού.

Στον πίνακα 1 και στο σχήμα 1 φαίνεται το ποσοστό % των μεριστωμάτων που επιβίωσαν.

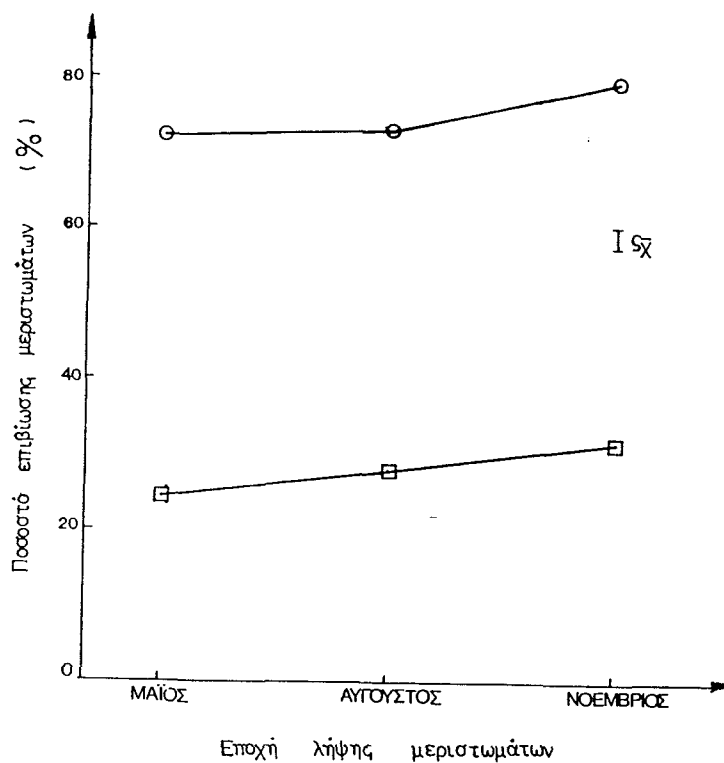
Πίνακας 1. Ποσοστό επιβίωσης μεριστωμάτων ληφθέντων από βλαστούς γόγγρων και βλαστούς που εκφύονταν από τον κορμό ή το βραχίονα του ελαιόδενδρου.

Μεταχειρίσεις	Ποσοστό επιβίωσης μεριστωμάτων (%)		
	ΜΑΪΟΣ	ΑΥΓΟΥΣΤΟΣ	ΝΟΕΜΒΡΙΟΣ
Βλαστοί από γόγγρους	72 ^{*α**}	72.8α	79.6α
Βλαστοί από τον κορμό	24.4β	28.4β	36.β

* Μέσος όρος πέντε επαναλήψεων

** Μέσοι όροι στηλών με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο P=0.05 (Δοκιμασία Duncan).

Παρατηρήθηκε ότι το ποσοστό επιβίωσης των μεριστωμάτων, που προέρχονταν από βλαστούς γόγγρων ή σφαιροβλαστών, ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερο ($P=0.05$) του αντίστοιχου ποσοστού επιβίωσης των μεριστωμάτων, που προέρχονταν από βλαστούς που εκφύονταν από τον κορμό ή το βραχίονα του ελαιόδενδρου.



Σχήμα 1. Ποσοστό επιβίωσης μεριστωμάτων ληφθέντων από βλαστούς γόγγρων και βλαστούς που εκφύονταν από τον κορμό ή το βραχίονα του ελαιόδενδρου.

- Μεριστώματα από βλαστούς γόγγρων ή σφαιροβλαστών
- Μεριστώματα από βλαστούς κορμού ή βραχιόνων

4,2. Επίδραση του υποχλωριώδους νατρίου επί της επιβίωσης απαλλαγμένων από τη μόλυνση μεριστωμάτων ληφοδέντων από βλαστούς που εκφύονταν από γόγγρους και από τον κορμό ή βραχίονα του ελαιοδένδρου.

Τα ποσοστά % των επιβιωσάντων και απαλλαγμένων μόλυνσης μεριστωμάτων εμφανίζονται στους πίνακες 2,3 και στο σχήμα 2.

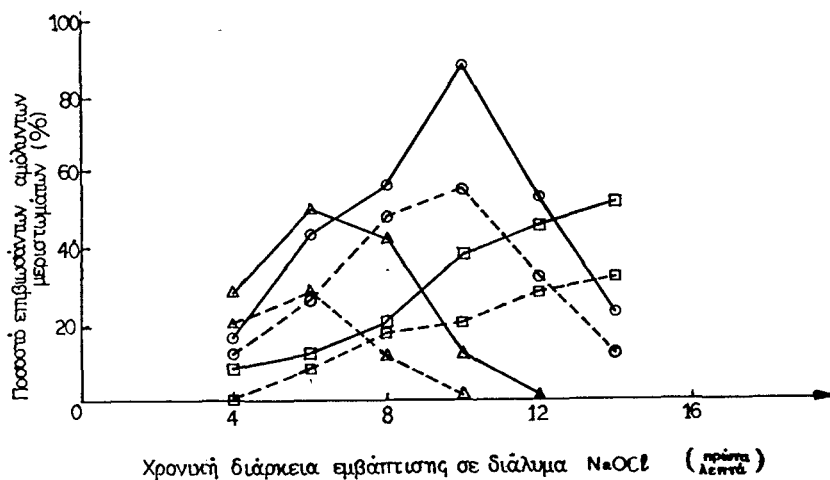
Διαπιστώθηκε ότι τα ποσοστά επιβίωσης των αμόλυντων μεριστωμάτων ήταν υψηλότερα στην περίπτωση των γόγγρων σε σχέση με τα αντίστοιχα των βλαστών που εκφύονταν από τον κορμό ή το βραχίονα του ελαιόδενδρου. Το υψηλότερο ποσοστό επιβίωσης των αμόλυντων μεριστωμάτων επιτεύχθηκε σε συγκέντρωση υποχλωριώδους νατρίου 10% και σε χρόνο εμβάπτισης 10' λεπτών της ώρας.

Πίνακας 2. Ποσοστό % επιβιωσάντων αμόλυντων μεριστωμάτων προερχομένων από βλαστούς γόγγρων.

Διάρκεια εμβάπτισης σε λεπτά της ώρας	Συγκέντρωση υποχλωριώδους νατρίου %		
	6	10	14
4	8	16	28
6	12	44	50
8	20	56	42
10	38	88	12
12	46	52	0
14	52	22	0

Πίνακας 3. Ποσοστό % επιβιωσάντων αμόλυντων μεριστωμάτων προερχομένων από βλαστούς, που εκφύονταν από τον κορμό ή τον βραχίονα του ελαιοδένδρου.

Διάρκεια εμφάνισης σε λεπτά της ώρας	Συγκέντρωση υποχλωριώδους νατρίου %		
	6	10	14
4	0	12	20
6	8	26	28
8	16	48	12
10	20	56	0
12	28	32	0
14	32	12	0



Σχήμα 2. Ποσοστό % επιβιωσάντων αμόλυντων μεριστωμάτων προερχομένων από βλαστούς γόγγρων και από βλαστούς που εκφύονταν από τον κορμό ή το βραχίονα του ελαιοδένδρου.

- Μεριστώματα από βλαστούς γόγγρων
- Μεριστώματα από βλαστούς που εκφύονταν από τον κορμό ή το βραχίονα.
- 6% υποχλωριώδες νάτριο
- 10% υποχλωριώδες νάτριο
- △-△- 14% υποχλωριώδες νάτριο.

4. 3 Επίδραση των υποστρωμάτων MS, MS₁, MS₂, OM και YE επί της αναπτύξεως των εκφύτων της ελιιάς "Καλαμών".

Η ανάπτυξη των εκφύτων στο υπόστρωμα MS δεν ήταν καθόλου ικανοποιητική, και γι' αυτό κρίθηκε σκόπιμο να εξαιρεθεί από τον πειραματισμό.

Στον πίνακα 4 και στο σχήμα 3 φαίνεται ο αριθμός των παραγομένων βλαστών ανά έκφυτο ανάλογα με το χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα.

Από τις συγκεντρώσεις ζεαΐνης που χρησιμοποιήθηκαν καλύτερα αποτελέσματα έδωσαν οι: 10ppm, 12.5ppm και 15ppm (πίνακας 5).

Πίνακας 4. Επίδραση των υποστρωμάτων MS₁, MS₂, OM και YE επί του αριθμού βλαστών ανά έκφυτο.

Υπόστρωμα	Μέσος όρος αριθμού βλαστών ανά έκφυτο
MS ₁	1.69* α **
MS ₂	1.52 α
OM	1.60 α
YE	2.00 β

* Μέσος όρος πέντε επαναλήψεων

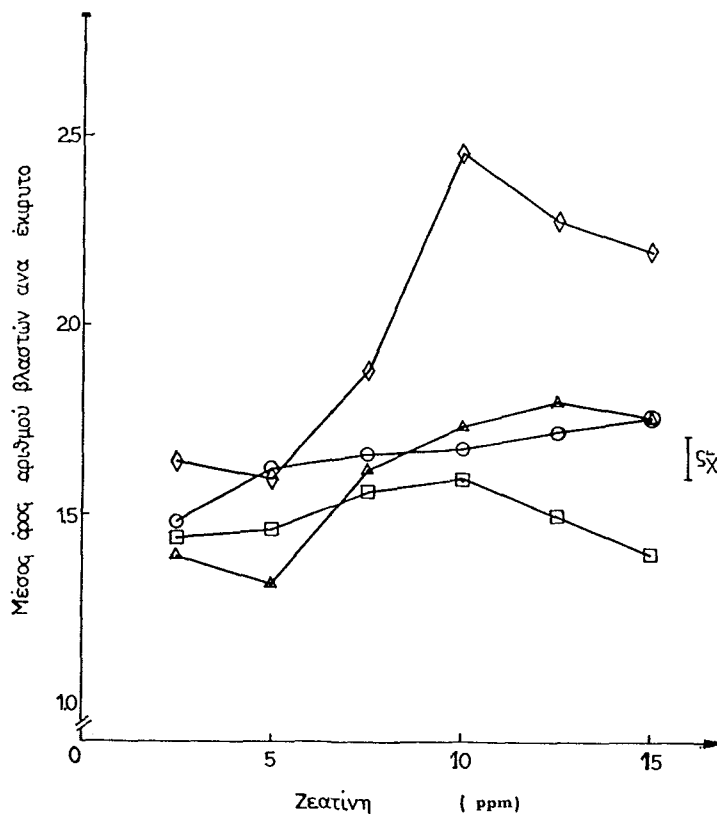
** Μέσοι όροι της στήλης με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο P=0.05 (δοκιμασία Duncan).

Πίνακας 5. Επίδραση των υποστρωμάτων MS₁, MS₂, OM και YE επί του αριθμού βλαστών ανά έκφυτο σε σχέση με τη συγκέντρωση της ζεατίνης.

Υπόστρωμα	Μέσος όρος αριθμού βλαστών ανά έκφυτο					
	ζεατίνη (ppm)					
	2.5	5	7.5	10	12.5	15
MS ₁	1.48 ^{**}	1.62 ^β	1.66 ^β	1.68 ^β	1.72 ^β	1.76 ^β
MS ₂	1.44 ^α	1.46 ^α	1.56 ^α	1.60 ^{αβ}	1.50 ^α	1.40 ^α
OM	1.39 ^α	1.32 ^α	1.62 ^β	1.74 ^β	1.8 ^γ	1.76 ^β
YE	1.64 ^β	1.62 ^β	1.88 ^γ	2.46 ^γ	2.26	2.2 ^γ

* Μέσος όρος πέντε επαναλήψεων

** Μέσοι όροι στηλών με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο P=0.05 (Δοκιμασία Duncan).



Σχήμα 3. Επίδραση των υποστρωμάτων MS₁, MS₂, OM και YE επί του αριθμού βλαστών ανά έκφυτο σε σχέση με τη συγκέντρωση ζεατίνης.

○-○ MS₁ □-□ MS₂ Δ-Δ OM ◇-◇ YE

4.4. Επίδραση της ζεατίνης επί της αναπαραγωγής βλαστών από μεριστώματα εκφύτων ελιάς.

Ο μέσος όρος αριθμού βλαστών ανά έκφυτο, ως και το μέσο μήκος των βλαστών εμφανίζονται στον πίνακα 6 και στα σχήματα 4 και 5.

Πίνακας 6. Επίδραση της ζεατίνης επί του αριθμού των βλαστών ανά έκφυτο και του μήκους αυτών.

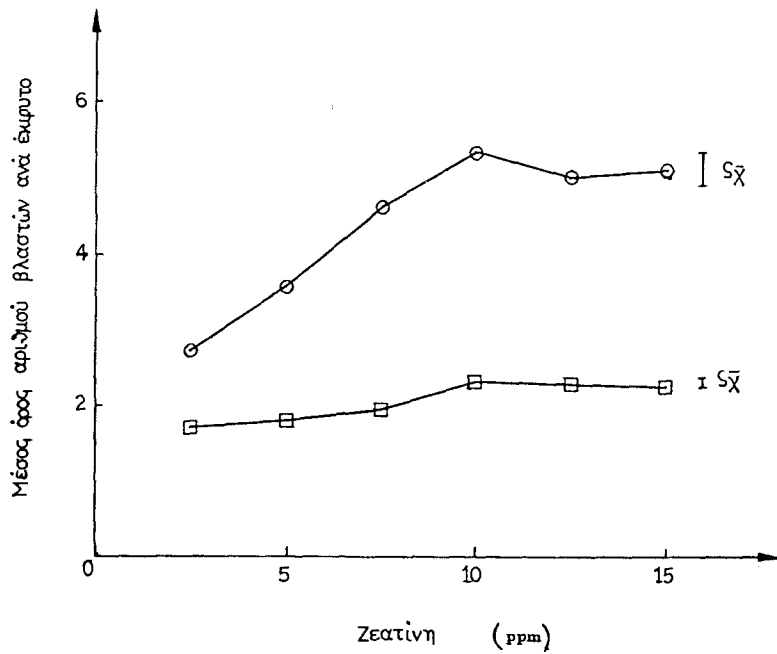
Συγκέντρωση ζεατίνης (ppm)	Περίοδος 4 εβδομάδων		Περίοδος 12 εβδομάδων	
	Αριθμός βλαστών ανά έκφυτο	Μήκος βλαστών (εκ.)	Αριθμός βλαστών ανά έκφυτο	Μήκος βλαστών (εκ.)
2.5	1.72 [*] α ^{**}	1.67α	2.72α	3.72α
5	1.80αβ	1.58α	3.58α	4.21α
7.5	1.94αβ	1.66α	4.58αβ	5.18β
10	2.38γ	2.08α	5.32β	5.40β
12.2	2.08β	2.05α	5.00β	5.14β
15	2.00β	1.76α	5.10β	4.42α

* Μέσος όρος 5 επαναλήψεων

** Μέσοι όροι στηλών με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο $P=0,05$ (δοκιμασία Duncan).

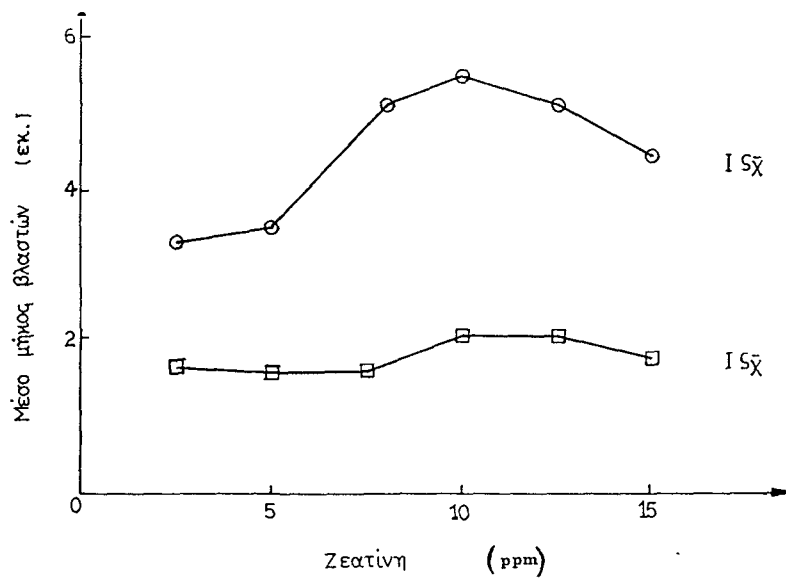
Παρατηρήθηκε ότι οι παράμετροι, όπως ο μέσος όρος αριθμού βλαστών ανά έκφυτο και το μέσο μήκος αυτών, ήταν μεγαλύτερες στη συγκέντρωση ζεατίνης 10ppm.

Επί πλέον εκτιμήθηκε ότι ο αριθμός των παραγομένων βλαστών από ένα και μόνο μερίστωμα σε χρονικό διάστημα περίπου 12 εβδομάδων περίπου πενταπλασιάστηκε. Συνεπώς ο ετήσιος ρυθμός αναπαραγωγής βλαστών από ένα και μόνο μερίστωμα ανέρχεται σε 5.32^4 , ήτοι 801 βλαστοί περίπου.



Σχήμα 4. Επίδραση της ζεατίνης επί του αριθμού των βλαστών ανά έκφυτο.

□-□ Μετά από 4 εβδομάδες
ο-ο Μετά από 12 εβδομάδες



Σχήμα 5. Επίδραση της ζεατίνης επί του μήκους των βλαστών

□-□ Μετά από 4 εβδομάδες
ο-ο Μετά από 12 εβδομάδες

4.5. Επίδραση της βενζυλαδενίνης επί της αναπαραγωγής βλαστών από μεριστώματα εκφύτων ελιάς.

Ο μέσος όρος αριθμού βλαστών ανά έκφυτο, ως και το μέσο μήκος των βλαστών εμφανίζονται στον πίνακα 7 και στα σχήματα 6 και 7.

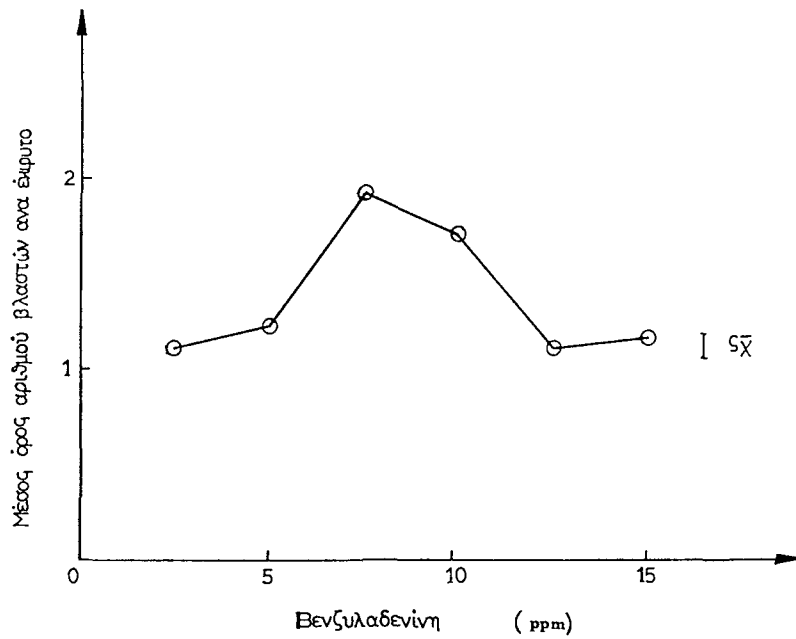
Πίνακας 7. Επίδραση της βενζυλαδενίνης επί του αριθμού των βλαστών ανά έκφυτο και του μήκους αυτών.

Συγκέντρωση βενζυλαδενίνης (ppm)	Περίοδος 6 εβδομάδων	
	Αριθμός βλαστών ανά έκφυτο	Μήκος βλαστών (εκ.)
2.5	1.16 ^{* **}	1.02α
5	1.24 ^α	1.02α
7.5	1.84 ^β	1.14α
10	1.72 ^β	0.95α
12.5	1.12 ^α	1.02α
15	1.18 ^α	0.72α

* Μέσος όρος πέντε επαναλήψεων

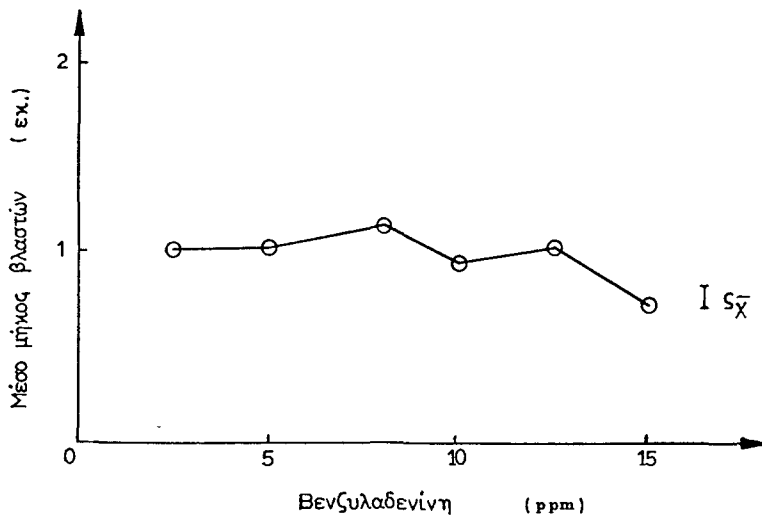
** Μέσοι όροι στηλών με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο $P=0.05$ (δοκιμασία Duncan),

Παρατηρήθηκε ότι ο μέσος όρος αριθμού βλαστών ανά έκφυτο ήταν σημαντικά μεγαλύτερος στις συγκεντρώσεις βενζυλαδενίνης 7.5ppm και 10ppm και το μέσο μήκος των βλαστών δε διέφερε σημαντικά μεταξύ των διαφόρων συγκεντρώσεων.



Σχήμα 6. Επίδραση της βενζυλαδεσνίνης επί του αριθμού των βλαστών ανά έμφυτο.

ο-ο Μετά από 4 εβδομάδες



Σχήμα 7. Επίδραση της βενζυλαδεσνίνης επί του μήκους των βλαστών

ο-ο Μετά από 4 εβδομάδες

4.6. Επίδραση της ζεατίνης σε συνδυασμό με εκχύλισμα ιστών ελιάς στην αναπαραγωγή βλαστών από μεριστώματα εκφύτων ελιάς.

Ο μέσος όρος αριθμού βλαστών ανά έκφυτο ως και το μέσο μήκος των βλαστών εμφανίζονται στον πίνακα 8 και στα σχήματα 8 και 9.

Πίνακας 8. Επίδραση της ζεατίνης ως και του εκχυλίσματος ιστών ελιάς επί του αριθμού των βλαστών ανά έκφυτο και του μήκους αυτών.

Μεταχειρίσεις	Περίοδος 4 εβδομάδων		Περίοδος 12 εβδομάδων	
	Αριθμός βλαστών ανά έκφυτο	Μήκος βλαστών (εκ.)	Αριθμός βλαστών ανά έκφυτο	Μήκος βλαστών (εκ.)
Ζεατίνη 10ppm	2.22 ^{α*} **	1.98 ^α	5.00 ^α	5.32 ^α
Ζεατίνη 10ppm συν εκχύλι- σμα 10ppm	2.17 ^α	1.94 ^α	5.07 ^α	5.42 ^α
Ζεατίνη 10ppm συν εκχύλι- σμα 20ppm	2.55 ^β	1.96 ^α	6.1 ^β	5.70 ^α
Ζεατίνη 10ppm συν εκχύλι- σμα 30ppm	2.12 ^α	1.55 ^β	4.8 ^α	4.46 ^β

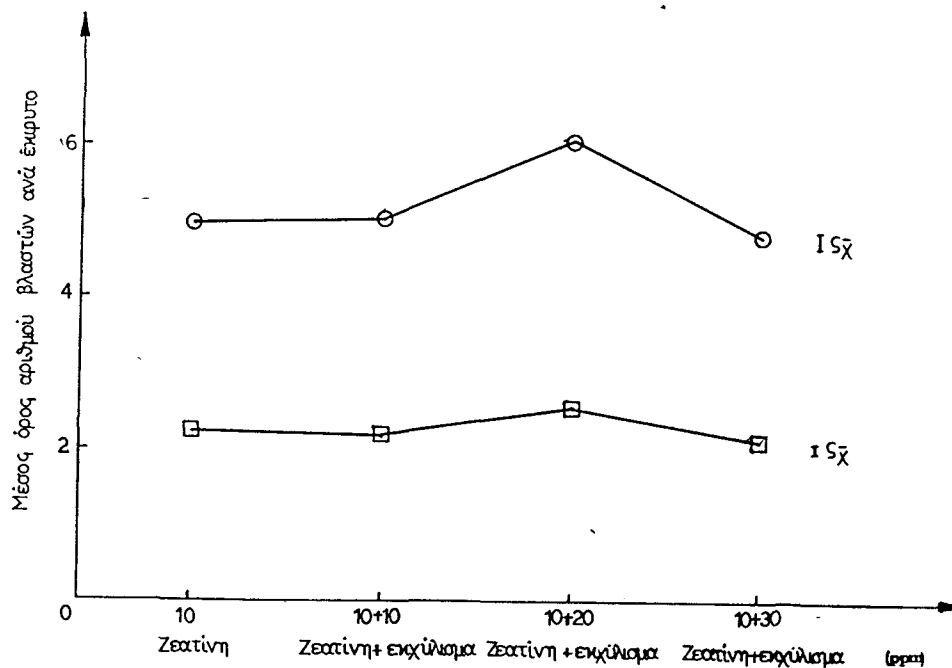
* Μέσος όρος πέντε επαναλήψεων

** Μέσοι όροι στηλών με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο $P=0.05$ (Δοκιμασία Duncan).

Παρατηρήθηκε ότι οι παράμετροι, όπως ο μέσος αριθμός βλαστών ανά έκφυτο και το μέσο μήκος αυτών, ήταν μεγαλύτερες στη μεταχείριση της ζεατίνης (10ppm) σε συνδυασμό με εκχύλισμα ιστών ελιάς συγκέντρωσης 20ppm.

Επιτιμήθηκε ότι ο αριθμός των παραγομένων βλαστών από ένα και μόνο μερίστωμα σε χρονικό διάστημα περίπου 12 εβδομάτων εξαπλασιάστηκε. Ο ετήσιος ρυθμός αναπαραγωγής βλαστών από ένα και μόνο μερίστωμα ανέρχεται σε 6.1^4 , ήτοι 1384.5 βλαστοί περίπου.

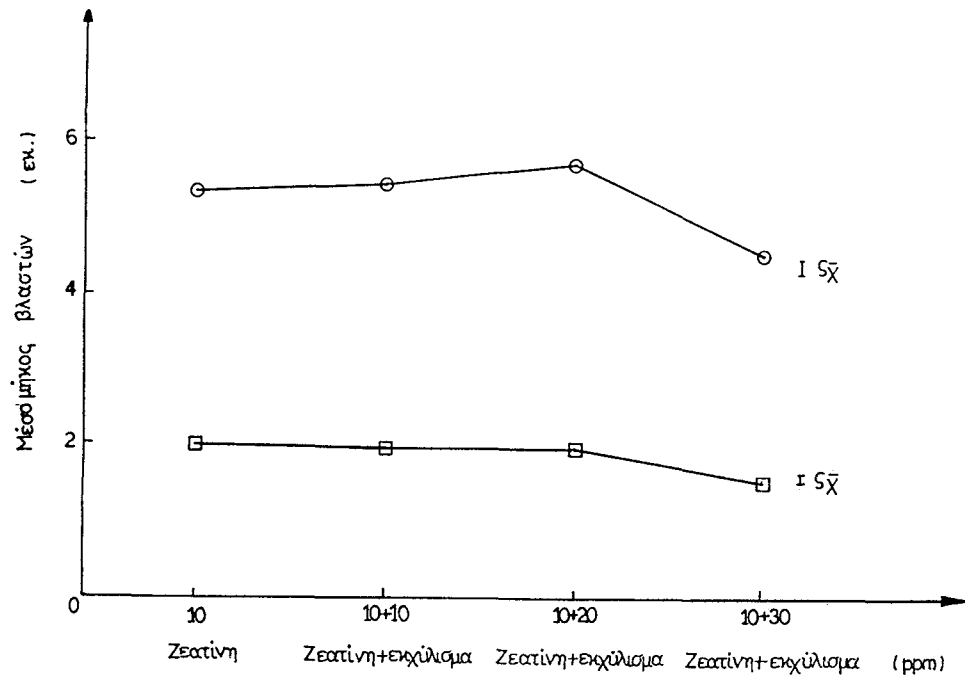
Τα αποτελέσματα αυτά δείχνουν ότι το εκχύλισμα ιστών ελιάς έχει θετική επίδραση στην αναπαραγωγή νέων βλαστών και συνεπώς η προσθήκη του στο υπόστρωμα ανάπτυξης σε συνδυασμό με τη ζεατίνη φαίνεται να είναι αναγκαία. Ο μέσος όρος αριθμού βλαστών ανά έκφυτο με το εκχύλισμα των ιστών ελιάς αυξήθηκε περίπου κατά 759.5 ($6.1^4 \approx 1384.5$, $5^5 \approx 625$).



Σχήμα 8. Επίδραση της ζεατίνης ως και του εκχυλίσματος ιστών ελιάς επί του αριθμού των βλαστών ανά έκφυτο.

-□-□- Μετά από 4 εβδομάδες

-ο-ο- Μετά από 12 εβδομάδες



Σχήμα 9. Επίδραση της ζεατίνης ως και του εκχυλίσματος ι-
στών ελιάς επί του μήκους των βλαστών.

- Μετά από 4 εβδομάδες
- Μετά από 12 εβδομάδες

4.7. Επίδραση της βενζυλαδενίνης σε συνδυασμό με εκχύλισμα ιστών ελιάς στην αναπαραγωγή βλαστών από μεριστώματα εκφύτων ελιάς.

Ο μέσος όρος αριθμού βλαστών ανά έκφυτο, ως και το μέσο μήκος των βλαστών εμφανίζονται στον πίνακα 9 και στα σχήματα 10 και 11.

Πίνακας 9. Επίδραση της βενζυλαδερίνης, ως και του εκχυλίσματος ιστών ελιάς επί του αριθμού των βλαστών ανά έκφυτο και του μήκους αυτών.

Μεταχειρίσεις	Περίοδος 4 εβδομάδων		Περίοδος 12 εβδομάδων	
	Αριθμός βλαστών ανά έκφυτο	Μήκος βλαστών (εκ.)	Αριθμός βλαστών ανά έκφυτο	Μήκος βλαστών (εκ.)
Βενζυλαδερίνη 7.5ppm	1.65 [*] **	1.00α	4.05α	2.1α
Βενζυλαδερίνη 7.5ppm συν εκχύλισμα 10ppm	1.90α	1.10α	4.20α	2.25α
Βενζυλαδερίνη 7.5ppm συν εκχύλισμα 20ppm	2.40α	1.50α	5.0β	2.55β
Βενζυλαδερίνη 7.5ppm συν εκχύλισμα 30ppm	2.02α	1.30α	3.85α	2.00α

* Μέσος όρος πέντε επαναλήψεων

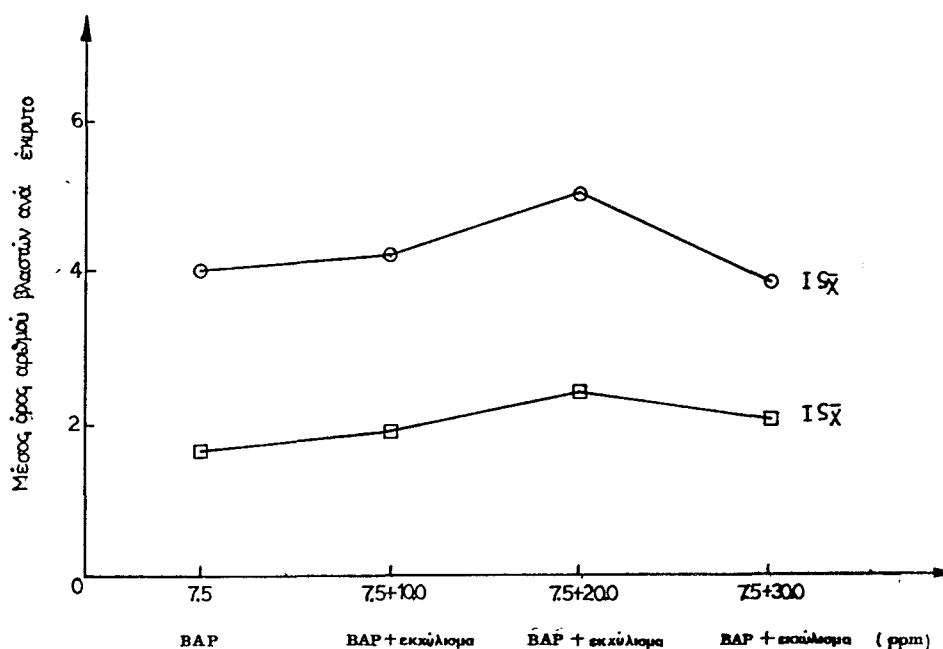
** Μέσοι όροι στηλών με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο P=0.05 (Δοκιμασία Duncan).

Παρατηρήθηκε ότι οι παράμετροι, όπως ο μέσος όρος αριθμού βλαστών ανά έκφυτο και το μέσο μήκος αυτών, ήταν μεγαλύτερες στη μεταχείριση της βενζυλαδερίνης (7.5ppm) σε συνδυασμό με εκχύλισμα ιστών ελιάς συγκέντρωσης 20ppm.

Εκτιμήθηκε ότι ο αριθμός των παραγομένων βλαστών από ένα και μόνο μερίστωμα σε χρονικό διάστημα περίπου 12 εβδομάδων πενταπλασιάστηκε. Ο ετήσιος ρυθμός αναπαρα-

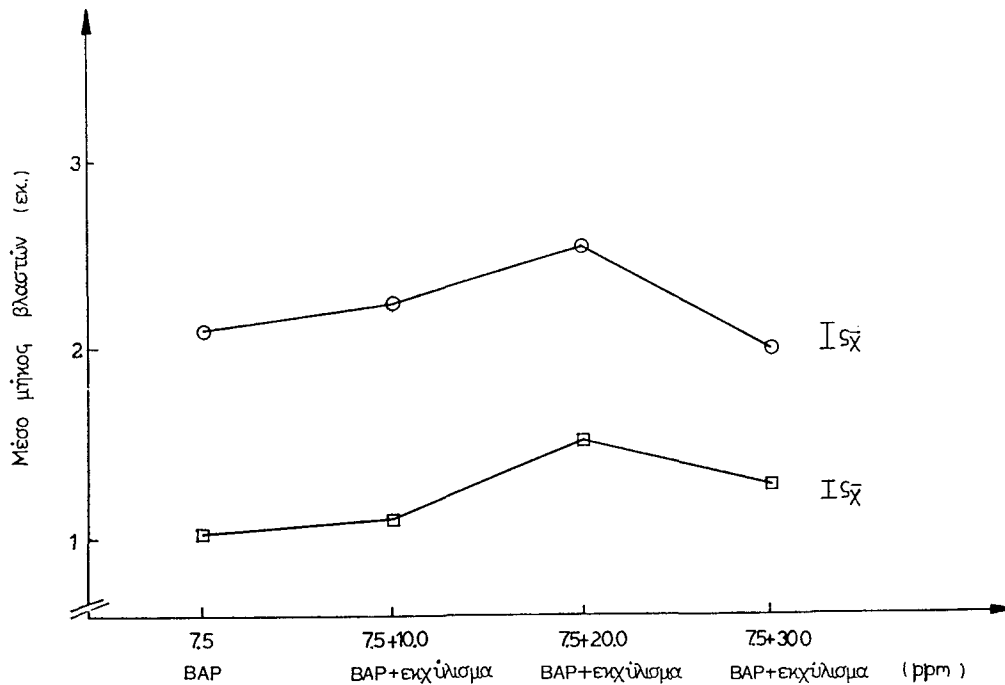
γωγής βλαστών, από ένα και μόνο μερίστωμα ανέρχεται σε 5^4 ήτοι 625 βλαστοί περίπου.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το εκχύλισμα ιστών ελιάς έχει θετική επίδραση στην αναπαραγωγή βλαστών και συνεπώς η προσθήκη του στο υπόστρωμα ανάπτυξης σε συνδυασμό με τη βενζυλαδεονίνη είναι αναγκαία. Ο μέσος αριθμός βλαστών ανά έκφυτο με το εκχύλισμα των ιστών ελιάς αυξήθηκε περίπου κατά 369 ($5^4 \approx 625, 4^4 \approx 256$).



Σχήμα 10. Επίδραση της βενζυλαδεονίνης ως και του εκχυλίσματος ιστών ελιάς επί του αριθμού των βλαστών ανά έκφυτο.

- Μετά από 4 εβδομάδες
- ο-ο Μετά από 12 εβδομάδες



Σχήμα 11. Επίδραση της βενζυλαδενίνης ως και του εκχυλί-
ματος ιστών ελιάς επί του μήκους των βλαστών.

- Μετά από 4 εβδομάδες
- Μετά από 12 εβδομάδες

4.8. Επίδραση της ζεατίνης, της βενζυλαδενίνης και του 2ip, ως και του συνδυασμού αυτών με εκχύλισμα ιστών ελιάς στην αναπαραγωγή βλαστών από μεριστώματα εκφύτων ελιάς.

Ο μέσος όρος αριθμού βλαστών ανά έκφυτο, ως και το μέσο μήκος των βλαστών εμφανίζονται στον πίνακα 10 και στα σχήματα 12 και 13.

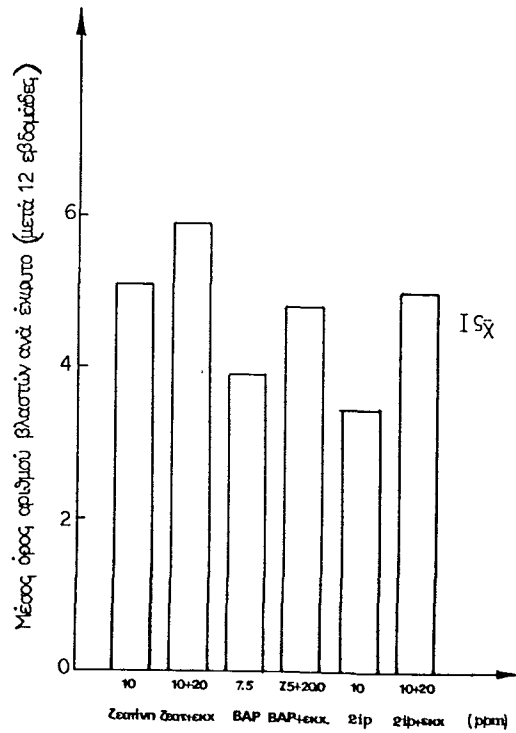
Πίνακας 10. Επίδραση της ζεατίνης, της βενζυλαδεονίνης και του 2ip ως και του συνδυασμού αυτών με εκχύλισμα ιστών ελιάς στην αναπαραγωγή βλαστών από μεριστώματα εκφύτων ελιάς.

Μεταχειρίσεις	Περίοδος 4 εβδομάδων		Περίοδος 12 εβδομάδων	
	Αριθμός βλαστών ανά έκφυτο	Μήκος βλαστών (εκ.)	Αριθμός βλαστών ανά έκφυτο	Μήκος βλαστών (εκ.)
Ζεατίνη 10ppm	2.2α* **	1.81αβ	5.12α	5.02α
Ζεατίνη 10ppm συν εκχύλισμα 20ppm	2.45αβ	1.97α	5.9β	5.20α
Βενζυλαδεονίνη 7.5ppm	1.75α	1.17γβ	3.9γ	2.27β
Βενζυλαδεονίνη 7.5ppm συν εκχύλισμα 20ppm	2.35β	1.49β	4.82α	2.17β
2ip 10ppm	1.60α	1.02γ	3.47γ	2.17β
2ip 10 ppm συν εκχύλισμα 20ppm	3.40β	0.80γ	5.07α	1.92β

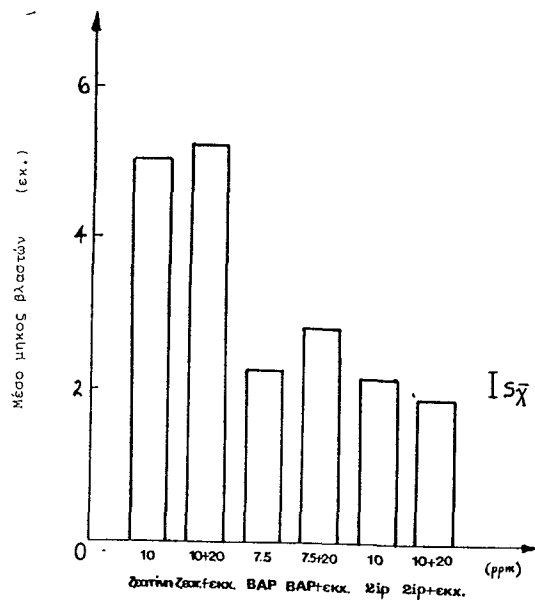
* Μέσος όρος πέντε επαναλήψεων

** Μέσοι όροι στηλών με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο P=0.05 (δοκιμασία Duncan),

Παρατηρήθηκε ότι οι παράμετροι, όπως ο μέσος αριθμός βλαστών ανά έκφυτο και το μέσο μήκος αυτών, ήταν μεγάλού -



Σχήμα 12. Επίδραση της ζεατίνης, της βενζυλαδεονίνης και του Zip ως και του συνδυασμού αυτών με εκχύλιση ιστών ελιάς στην αναπαραγωγή βλαστών από μεριστώματα εκφύτων ελιάς.



Σχήμα 13. Επίδραση της ζεατίνης, της βενζυλαδεονίνης και του Zip, ως και του συνδυασμού αυτών με εκχύλιση ιστών ελιάς στο μήκος των βλαστών.

τερες στις μεταχειρίσεις των συνδυασμών των κυτοκινινών με το εκχύλισμα των ιστών ελιάς. Καλύτερα αποτελέσματα έδωσε ο συνδυασμός ζεατίνη συν εκχύλισμα, μετά ο συνδυασμός 2ip συν εκχύλισμα και ακολούθησε ο συνδυασμός βενζυλαδενίνη συν εκχύλισμα. Ο μέσος όρος αριθμού βλαστών του συνδυασμού ζεατίνης συν εκχύλισμα ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερος εκείνου των δύο άλλων συνδυασμών ήτοι των 2ip συν εκχύλισμα και βενζυλαδενίνης συν εκχύλισμα. Ο μέσος όρος αριθμού βλαστών του συνδυασμού 2ip συν εκχύλισμα ήταν μεν μεγαλύτερος από το μέσο όρο αριθμού βλαστών του συνδυασμού βενζυλαδενίνη συν εκχύλισμα, αλλά η διαφορά δεν ήταν σημαντική.

Ο ετήσιος ρυθμός αναπαραγωγής βλαστών από ένα και μόνο μερίστωμα ανέρχεται ανάλογα με το συνδυασμό ζεατίνη συν εκχύλισμα, 2ip συν εκχύλισμα και βενζυλαδενίνη συν εκχύλισμα σε $5,9^4$, $5,07^4$ και $4,82^4$ αντίστοιχα, ήτοι σε αριθμό βλαστών 1211,7, 660,7, 539,7 αντίστοιχα.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι ο συνδυασμός ζεατίνης και εκχυλίσματος ιστών ελιάς είχε τη μεγαλύτερη επίδραση τόσο στην αναπαραγωγή βλαστών όσο και στο μήκος των παραγομένων βλαστών.

4.9. Επίδραση του ακατέργαστου εκχυλίσματος ιστών ελιάς επί της ριζοβολίας μοσχευμάτων φασιόλου (Phaseolus aureus Roxb.).

Στον πίνακα 11 και στο σχήμα 14 φαίνεται ο μέσος αριθμός ριζών κατά συγκέντρωση ακατέργαστου εκχυλίσματος ιστών ελιάς.

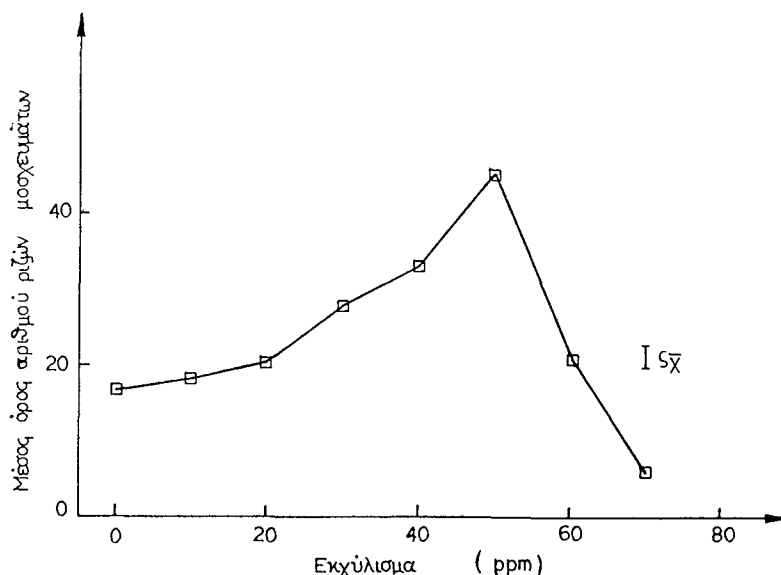
Πίνακα 11. Επίδραση του ακατέργαστου εκχυλίσματος ιστών ελιάς στη ριζοβολία μοσχευμάτων φασιόλου.

Συγκέντρωση ακατέργαστου εκχυλίσματος (ppm)	Μέσος όρος αριθμού ριζών μοσχευμάτων
10	17.8 [*] α ^{**}
20	20.2 α
30	27.8 β
40	33.0 γ
50	45.0 δ
60	20.8 α
70	6.0 ε
Νερό	14.6 α

* Μέσος όρος πέντε επαναλήψεων

** Μέσοι όροι στηλών με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο $P=0.05$ (δοκιμασία Duncan).

Παρατηρήθηκε ότι οι συγκεντρώσεις του ακατέργαστου εκχυλίσματος ιστών ελιάς 30ppm, 40ppm και 50ppm, με καλύτερη τη συγκέντρωση 50ppm, είχαν θετική επίδραση στη ριζοβολία των μοσχευμάτων. Ο μέσος όρος αριθμού ριζών των μοσχευμάτων ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερος έναντι των άλλων χρησιμοποιηθέντων συγκεντρώσεων του εκχυλίσματος και του μάρτυρα (πίνακας 11). Διαπιστώθηκε ακόμα ότι συγκεντρώσεις εκχυλίσματος πάνω από 60 ppm ασκούν αρνητική επίδραση στη ριζοβολία των μοσχευμάτων.



Σχήμα 14. Επίδραση του ακατέργαστου εκχυλίσματος ιστών ελιάς στη ριζοβολία μοσχευμάτων.

4.10. Επίδραση του ακατέργαστου εκχυλίσματος ιστών ελιάς σε συνδυασμό με την ορμόνη ριζοβολίας IBA στη ριζοβολία των μοσχευμάτων φασιόλου.

Στον πίνακα 12 και στο σχήμα 15 φαίνεται ο μέσος όρος αριθμού ριζών κατά συγκέντρωση IBA και IBA με εκχύλισμα ιστών ελιάς.

Παρατηρήθηκε ότι ο συνδυασμός IBA και εκχυλίσματος στις χρησιμοποιηθείσες συγκεντρώσεις έδωσε μεγαλύτερο αριθμό ριζών, με καλύτερη τη συγκέντρωση IBA 1ppm συν εκχύλισμα 30ppm. Διαπιστώθηκε και στην περίπτωση αυτή της βιοδοκιμής η θετική αλληλεπίδραση του εκχυλίσματος με το IBA στη ριζοβολία των μοσχευμάτων.

Πίνακας 12. Επίδραση του IBA και του συνδυασμού IBA και εκχυλίσματος ιστών ελιάς στη ριζοβολία μοσχευμάτων φασιόλου.

Μεταχείριση	Μέσος αριθμός ριζών μοσχευμάτων
IBA, 1ppm	36.75 ^{*α**}
IBA, 1ppm συν εκχύλι- σμα 10ppm	45.25 αβ
IBA, 1ppm συν εκχύλι- σμα 30ppm	56.8 β
IBA, 1ppm συν εκχύλι- σμα 50ppm	46.0 αβ

*Μέσος όρος πέντε επαναλήψεων

**Μέσοι όροι στηλών με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο $P=0.05$ (δοκιμασία Duncan).

Η επίδραση ακατέργαστου εκχυλίσματος ιστών ελιάς, που παραλήφθηκε σε διαφορετικές εποχές (Φεβρουάριο, Μάιο, Αύγουστο και Νοέμβριο), στη ριζοβολία των μοσχευμάτων φασιόλου, διερευνήθηκε όπως πιο πάνω, αλλά ο μέσος όρος αριθμού ριζών των μοσχευμάτων δε διέφερε σημαντικά (πίνακας 13).

Πίνακας 13. Επίδραση του ακατέργαστου εκχυλίσματος ιστών ελιάς 30ppm διάφορης εποχής λήψης σε συνδυασμό με IBA (1ppm) στη ριζοβολία μοσχευμάτων φασιόλου.

Εποχή παραλαβής εκχυλίσματος	Μέσος αριθμός ριζών μοσχευμάτων
Φεβρουάριος	54.5*α**
Μάϊος	58.75 α
Αύγουστος	58.0 α
Νοέμβριος	60.25 α

* Μέσος όρος πέντε επαναλήψεων

** Μέσοι όροι στηλών δε διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο $P=0.05$ (δοκιμασία Duncan),

4.11. Επίδραση των ανιχνευομένων ουσιών στο χρωματογράφημα στη ριζοβολία μοσχευμάτων φασιόλου.

Στον πίνακα 14 και στα σχήματα 16, 17 και 18 φαίνεται ο μέσος όρος αριθμού των ριζών των μοσχευμάτων κατά διαλύτη και ανιχνευόμενη ουσία στο χρωματογράφημα.

Παρατηρήθηκε ότι ο μέσος όρος αριθμού ριζών των μοσχευμάτων ήταν σημαντικά μεγαλύτερος στα διαλύματα "τριπταμίνη" και "IAA;". Φαίνεται ότι το ακατέργαστο εκχύλισμα ιστών ελιάς περιέχει IAA ή πρόδρομες αυτού ουσίες που ευνοούν τη ριζοβολία γενικά των μοσχευμάτων των φυτών.

Με αέρια - υγρή χρωματογραφία διαπιστώθηκε ότι το εκχύλισμα περιέχει κυρίως IAA το οποίο με τις συνθήκες

Πίνακας 14. Επίδραση των ανιχνευομένων ουσιών στη ριζοβολία μοσχευμάτων φασιόλου.

Διαλύτης	Rf ουσίας	Διάλυμα ριζοβολίας	Μέσος αριθμός ριζών
C.E.F.	0 -0.05	;	27 [*] α**
	0.1 -0.2	Τρυπαμίνη	39 β
	0.56-0.65	;	21.25 α
	0.7 -0.9	IAA;	42.5 β
	-	νερό	24.75 α
BAW	0.42-0.55	;	24 α
	0.55-0.64	Τρυπαμίνη	36.75 α
	0.67-0.75	;	23.75 α
	0.78-0.88	IAA;	37.5 β
	-	νερό	23.25 α
IAW	0.0 -0.2	;	23 α
	0.3 -0.5	;	25.5 α
	0.7 -0.8	Τρυπαμίνη	37.25 β
	0.85-0.9	IAA;	39.75 β
	-	νερό	26.75 α

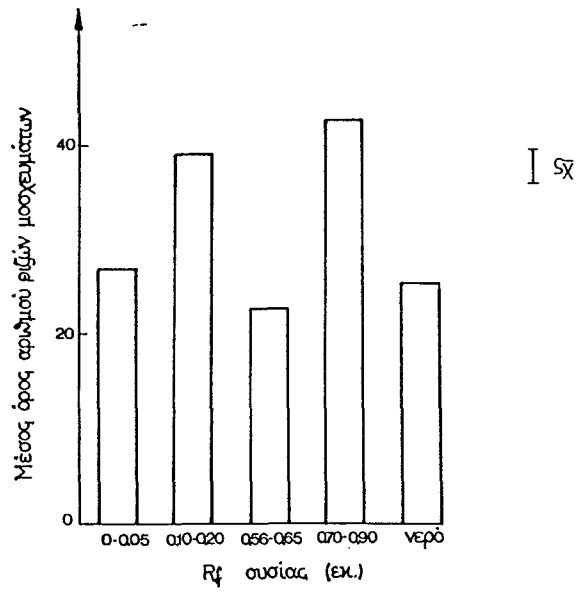
C.E.F. = κλωροφόρμιο: αιθυλικό οξύ: φορμικό οξύ 5:4:1 (v:v:v)

BAW = βουτανόλη: οξικό οξύ: νερό 12:3:5 (v:v:v)

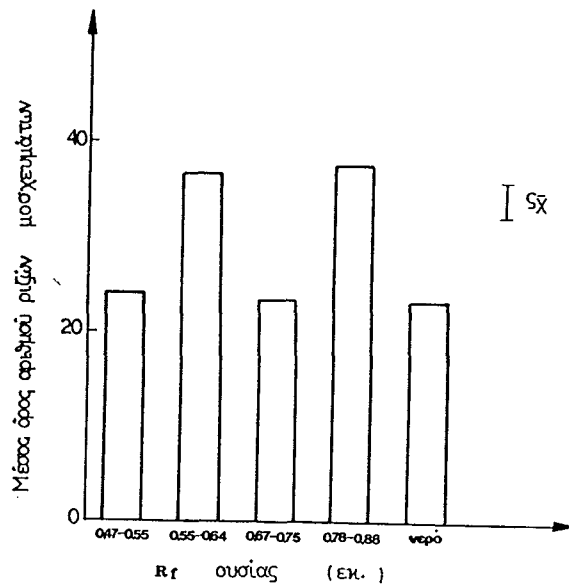
IAW = ισοπροπανόλη: αμμωνία: νερό 8:1:1 (v:v:v)

* Μέσος όρος τεσσάρων επαναλήψεων

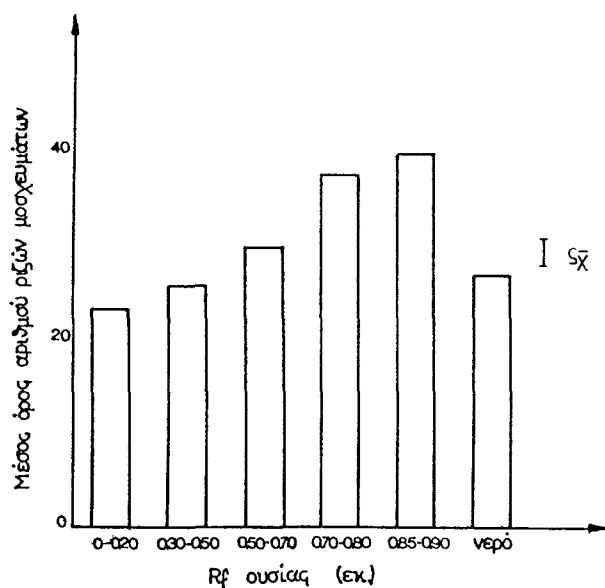
** Μέσοι όροι στηλών με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο P=0.05 (Δοκιμασία Duncan).



Σχήμα 15. Επίδραση των ανιχνευομένων ουσιών στην ριζοβολία μοσχευμάτων φασιόλου με τους διαλύτες: χλωροφόρμιο: αιθυλικό οξύ: φορμικό οξύ 5:4:1 (v:v:v)



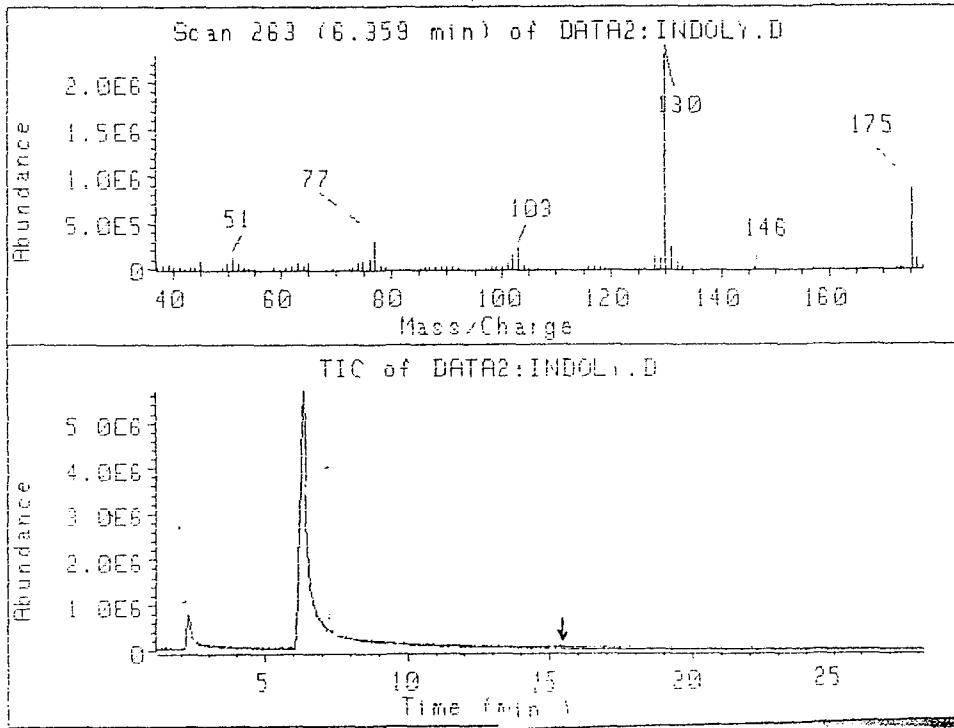
Σχήμα 16. Επίδραση των ανιχνευομένων ουσιών στη ριζοβολία μοσχευμάτων φασιόλου, με τους διαλύτες: βουτανόλης: οξικό οξύ: νερό 12:3:5 (v:v:v)



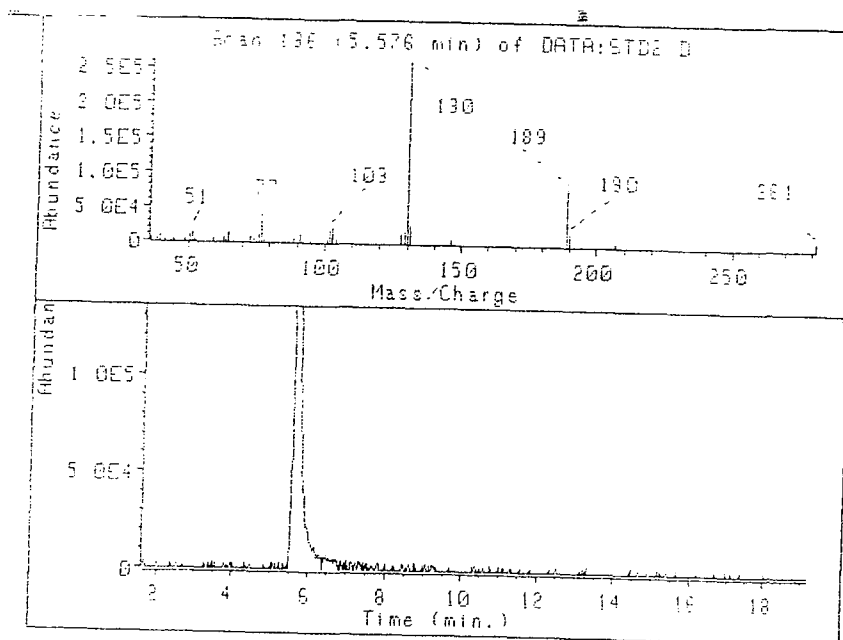
Σχήμα 17. Επίδραση των ανιχνευομένων ουσιών στη ριζοβολία μοσχευμάτων φασιόλου, με τους διαλύτες: ισοπροπανόλη: αμμωνία: νερό 8:1:1 (v:v:v).

που αναφέρονται στο αντίστοιχο κεφάλαιο "Υλικά και Μέθοδοι" εμφανίζεται με το χρόνο συγκράτησης 7.2 λεπτά της ώρας.

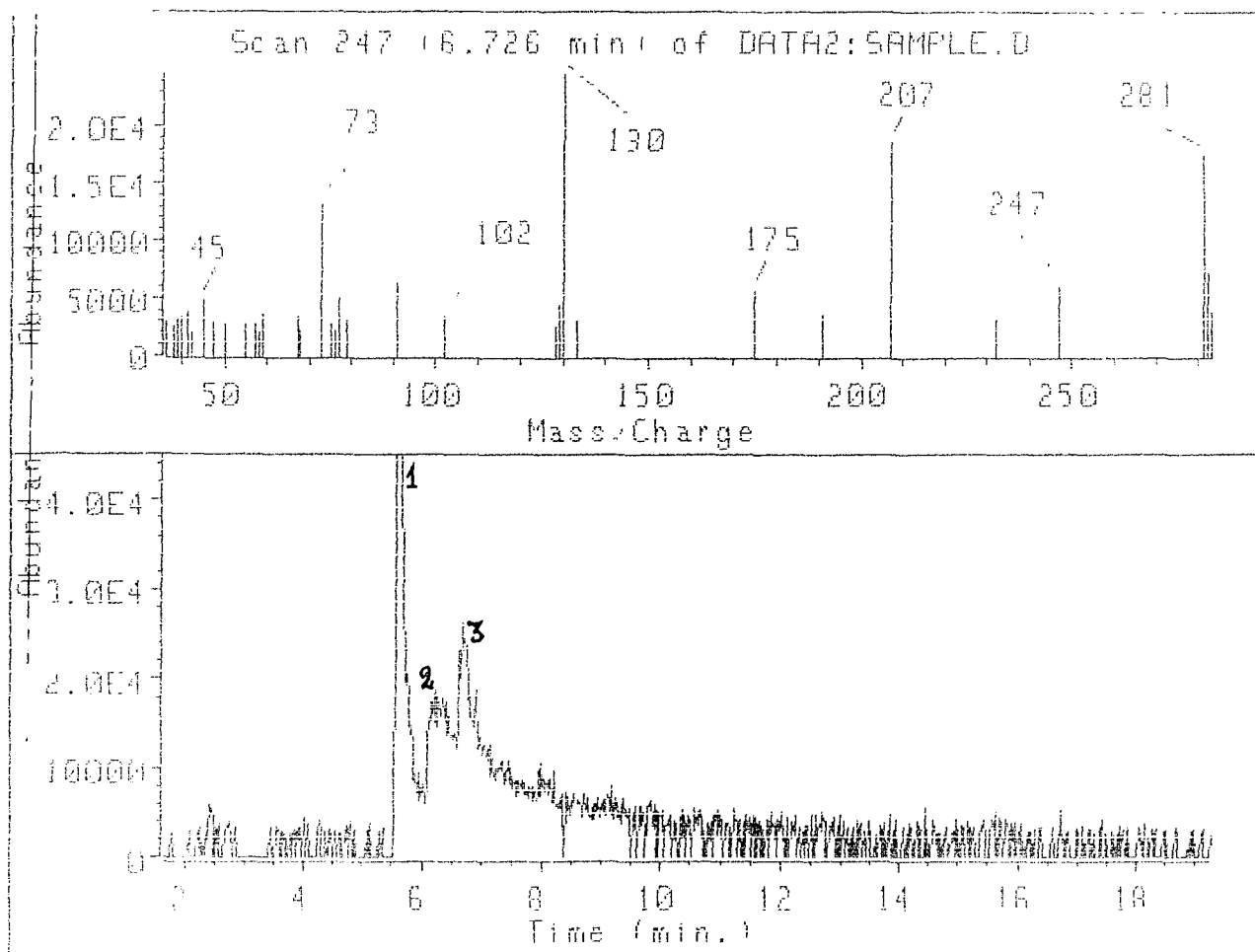
Από τη φασματογραφία μάζης βεβαιώθηκε ότι εκτός από το IAA το εκχύλισμα περιέχει και ίχνη μιας άγνωστης ουσίας της ίδιας όμως οικογένειας indolyl (ινδολύλ) που έχει το χαρακτηριστικό μοριακό βάρος 247, όπως φαίνεται στα σχήματα 17α, 17β και 17γ. Η παρουσία του ελεύθερου ινδολυλοξικού οξέος κορυφή αριθ.2, σχήμα (17γ) αποδίδεται στο ότι η αντίδραση της μεθυλίωσης δεν ολοκληρώθηκε.



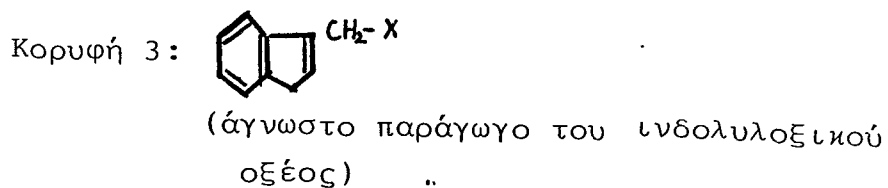
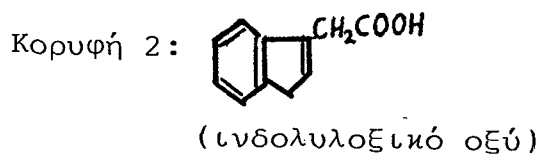
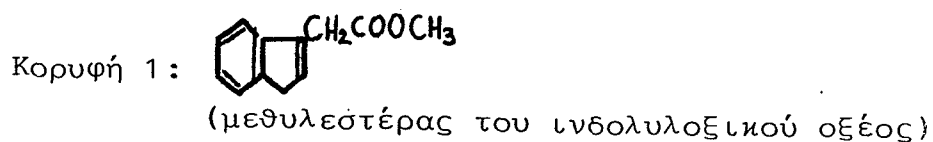
Σχήμα 17α. Επιλεκτικό χρωματογράφημα της μάζας 130 του ινδολυλοξικού οξέος (μάρτυρα).



Σχήμα 17β. Επιλεκτικό χρωματογράφημα της μάζας 130 του μεθυλεστέρα του ινδολυλοξικού οξέος (μάρτυρα).



Σχήμα 17γ. Εκλεκτικό χρωματογράφημα της μάζας 130 του εκχυλίσματος ιστών ελιάς.



4.12. Επίδραση του α-NAA, IBA και του συνδυασμού αυτών με εκχύλισμα ιστών ελιάς στη ριζοβολία βλαστών μερι - στωματικών καλλιεργειών ελιάς.

Στους πίνακες 15 και 16 και στο σχήμα 18 φαίνεται το ποσοστό % ριζοβολίας των βλαστών, ο μέσος όρος αριθμού ριζών ανά βλαστό και το μέσο μήκος αυτών.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η χρησιμοποίηση του α-NAA ως ορμόνης ριζοβολίας δίνει υψηλότερα ποσοστά ριζοβολίας έναντι του IBA και ότι η προσθήκη του εκχυλίσματος αυξάνει το ποσοστό ριζοβολίας των βλαστών. Υψηλότερο ποσοστό ριζοβολίας έδωσε ο συνδυασμός α-NAA σε συγκέντρωση 2ppm και εκχυλίσματος σε συγκέντρωση 50ppm. Τα ποσοστά ριζοβολίας που επιτεύχθηκαν με τις χρησιμοποιηθείσες συγκεντρώσεις α-NAA ήταν μικρότερα του συνδυασμού α-NAA και εκχυλίσματος και διέφεραν σημαντικά ($P = 0,05$), πλην του συνδυασμού της υψηλότερης συγκέντρωσης, που η διαφορά δεν ήταν σημαντική. Τα επιτευχθέντα ποσοστά ριζοβολίας με την ορμόνη ριζοβολίας IBA ή του συνδυασμού της με εκχύλισμα ιστών ελιάς είναι χαμηλά και κατά συνέπεια μη ικανοποιητικά. Τα ποσοστά ριζοβολίας διέφεραν στατιστικά μόνο στην περίπτωση της υψηλότερης συγκέντρωσης, ήτοι των 3ppm.

Πίνακας 15. Επίδραση του α-NAA, IBA και του συνδυασμού αυτών με εκχύλισμα ιστών ελιάς στη ριζοβολία βλαστών μεριστωματικών καλλιεργειών ελιάς.

Μεταχειρίσεις	Ποσοστό ριζοβολίας βλαστών (%)		
	Περίοδος 3 εβδομάδων	Περίοδος 4 εβδομάδων	Περίοδος 6 εβδομάδων
α-NAA, 1 ppm	20* α**	30 α	37.5 α
α-NAA, 1 ppm συν εκχύλισμα, 50 ppm	40 αβ	55 βγ	62.5 β
α-NAA, 2 ppm	35 α	60 βγ	65 β
α-NAA, 2 ppm συν εκχύλισμα, 50 ppm	60 β	70 γ	82.5 γ
α-NAA, 3 ppm	25 α	45 β	52.5 β
α-NAA, 3 ppm συν εκχύλισμα, 50 ppm	45 αβ	60 βγ	70 βγ
IBA, 1 ppm	0 γ	25 δ	7.5 δ
IBA, 1 ppm συν εκχύλισμα, 50	5 γ	10 δ	12.5 δ
IBA, 2 ppm	5 γ	5 δ	12.5 δ
IBA, 2 ppm συν εκχύλισμα, 50 ppm	5 γ	12.5 δ	17.5 δ
IBA, 3 ppm	5 γ	7.5 δ	15 δ
IBA, 3 ppm συν εκχύλισμα, 50 ppm	15 αγ	17.5 αδ	40 α

* Μέσος όρος τεσσάρων επαναλήψεων

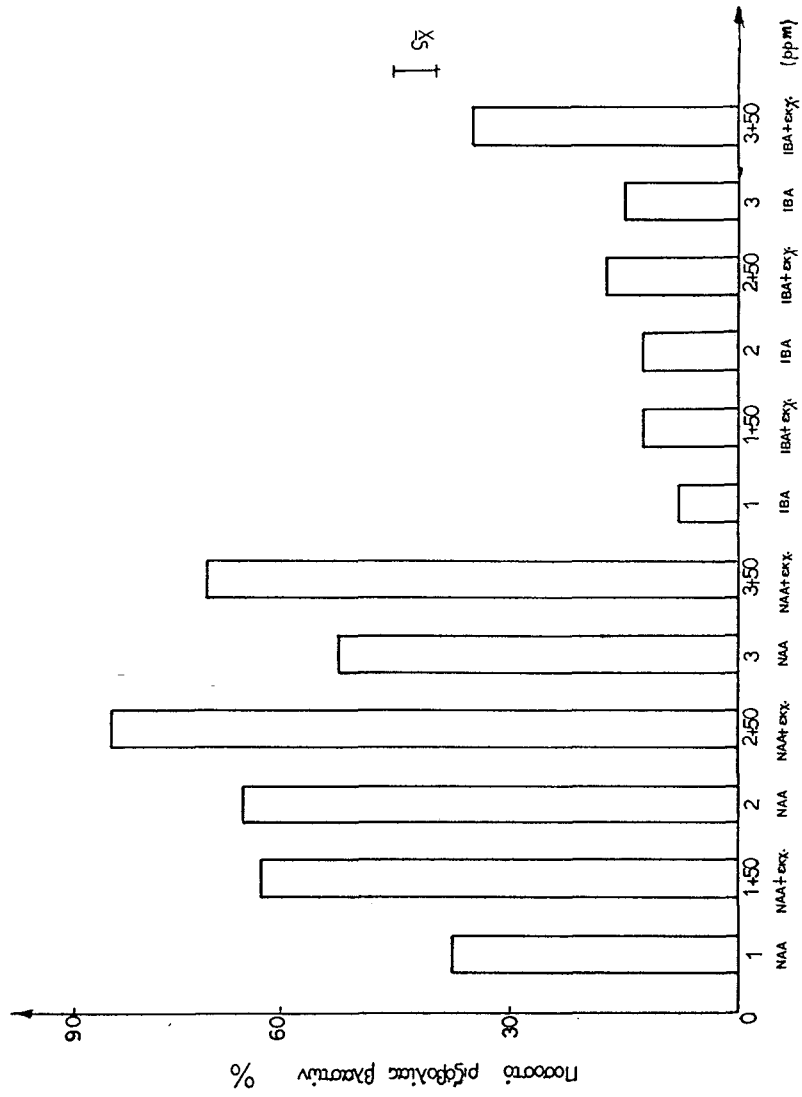
** Μέσοι όροι στηλών με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο P=0.05 (δοκιμάστια Duncan).

Πίνακας 16. Επίδραση του α-NAA, IBA και του συνδυασμού αυτών με εκχύλισμα ιστών ελιάς στο μέσο όρο αριθμού ριζών ανά βλαστό ως και στο μήκος αυτών.

Μεταχειρίσεις	Μέσος όρος αριθμού ριζών ανά βλαστό	Μέσο μήκος ριζών (εκ.)
α-NAA, 1ppm	3.5 [*] αβ ^{**}	0.41 [*] α ^{**}
α-NAA, 1ppm συν εκχύλισμα, 50ppm	4.15 α	0.66 α
α-NAA, 2ppm	3.0 αβ	1.48 βγ
α-NAA, 2ppm συν εκχύλισμα, 50ppm	3.65 αβ	1.69 βγ
α-NAA, 3ppm	3.45 αβ	0.77 β
α-NAA, 3ppm συν εκχύλισμα, 50ppm	3.85 αβ	0.93 αβγ
IBA, 1ppm	1.25 γ	0.52 α
IBA, 1ppm συν εκχύλισμα, 50ppm	1.3 γ	0.85 αβγ
IBA, 2ppm	1.3 γ	1.25 αβγ
IBA, 2ppm συν εκχύλισμα, 50ppm	2.87 γ	1.8 γ
IBA, 3ppm	2.15 γβ	1.7 βγ
IBA, 3ppm συν εκχύλισμα 50ppm	2.55 β	1.8 γ

*Μέσοι όροι τεσσάρων επαναλήψεων

**Μέσοι όροι στηλών με διαφορετικό γράμμα διαφέρουν σημαντικά σε επίπεδο P=0.05 (δοκιμασία Duncan),



Σχήμα 18. Επίδραση του α-NAA, IBA και του συνδυασμού αυτών με εκχύλισμα ιστών ελιάς στη ριζοβολία βλαστών μεριστωματικών καλλιιεργειών ελιάς.

5. ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Η φυσιολογική κατάσταση του μητρικού φυτού ασκεί σημαντική επίδραση στη συμπεριφορά του μεριστωματικού εκφύτου. Έκφυτα, που λαμβάνονται από δένδρα ή βλαστούς, που βρίσκονται στην ενήλικη φάση, συνήθως χρειάζονται διαφορετική συγκέντρωση ρυθμιστών αύξησης από εκείνα που λαμβάνονται από δένδρα ή βλαστούς, που βρίσκονται στη φάση της νεανικότητάς τους (Gupta et.al., 1980).. Και η θέση ακόμα των οφθαλμών επί του βλαστού έχει ιδιαίτερη σημασία. Σε ορισμένα μάλιστα είδη ενδείκνυται για καλύτερη λιάριεργεια μόνον οι επάκριοι οφθαλμοί (Jones and Vine 1968), ενώ σε άλλα αυτοί που βρίσκονται στο ενδιάμεσο τμήμα του βλαστού (Bressan, et al. 1982).

Στην ελιά μεριστώματα που περιελάμβαναν μικρό τμήμα βλαστού με έναν ή δύο οφθαλμούς προερχόμενα από σπορόφυτα ελιάς που βρίσκονται σε νεανική φάση αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα MS (Murashige and Skoog, 1962) και οι παραγόμενοι βλαστοί ριζοβόλησαν σε υπόστρωμα, που περιείχε μακροστοιχεία του υποστρώματος του Knorr (1865) και τα μικροστοιχεία του Heller (1953) με συγκέντρωση IBA 1ppm (Rugi-

ni, et al., 1979). Αργότερα ο Rugini με τους συνεργάτες (1981, 1984), οι Fiorino και Leva (1985) ως και οι Cana et al. (1987) πέτυχαν να πολλαπλασιάσουν τις ποικιλίες ελιάς Dolce Agogia, Frantoio, Agogia, Moraiolo, και σπορόφυτα της ποικιλίας Maurino, από μεριστώματα που περιείχαν μικρό τμήμα του βλαστού με έναν ή δύο οφθαλμούς και προέρχονταν από βλαστούς που βρίσκονταν στη φάση της νεανικότητας (λαίμαργοι, παραφυάδες, νεαρά σπορόφυτα). Το ποσοστό επιβίωσης των μεριστωμάτων με τη χρήση υποχλωριώδους ασβεστίου 7% ήταν ασήμαντο και αντιμετωπίστηκε ικανοποιητικά με διάλυμα $HgCl_2$ ($677mg\ l^{-1}$ επί 3 λεπτά της ώρας).

Στην περίπτωση μας μεριστώματα, που περιείχαν μικρό τμήμα του βλαστού με έναν ή δύο οφθαλμούς και προέρχονταν από βλαστούς σφαιροβλαστών ή γόγγρων σε σχέση με εκείνα που προέρχονταν από βλαστούς του κορμού ή των βραχιόνων του ελαιόδενδρου παρουσίασαν μεγαλύτερο ποσοστό επιβίωσης μετά από απολύμανση με υποχλωριώδες νάτριο και μάλιστα στατιστικώς σημαντικό σε επίπεδο $P=0.05$. Αν και οι δύο κατηγορίες βλαστών χαρακτηρίζονται από νεανικότητα, το υψηλότερο ποσοστό επιβίωσης των μεριστωμάτων, που προέρχονταν από βλαστούς σφαιροβλαστών ή γόγγρων πιθανόν να οφείλεται στον υψηλότερο βαθμό νεανικότητάς των ή και στην καλύτερη ορμονοθρεπτική τους κατάσταση.

Οι κανονικές (optimum) τιμές σε συγκέντρωση υποχλωριώδους νατρίου και χρόνο εμβάπτισης για τα μεριστώματα, που προέρχονταν από βλαστούς σφαιροβλαστών ή γόγγρων,

ή από βλαστούς του κορμού ή των βραχιόνων του ελαιόδενδρου ήταν 10% και 10 λεπτά της ώρας με ποσοστό επιβίωσης 88% και 56%, αντίστοιχα. Η εποχή παραλαβής των μεριστωμάτων δε φαίνεται να επηρεάζει σημαντικά το ποσοστό επιβίωσής των. Το υψηλό ποσοστό επιβίωσης των μεριστωμάτων σε σχέση με εκείνο που επιτεύχθηκε από το Rugini (1981) με τη χρησιμοποίηση παρόμοιων χημικών ουσιών οφείλεται πιθανόν στη φυσιολογική κατάσταση των μεριστωμάτων, που παραλήφθηκαν από βλαστούς σφαιροβλαστών ή γόγγρων. Κατά συνέπεια η απολύμανση των μεριστωμάτων μπορεί να αντιμετωπιστεί ικανοποιητικά με την επιλογή μεριστωμάτων από βλαστούς σφαιροβλαστών ή γόγγρων.

Η σύνθεση του υποστρώματος καλλιέργειας μεριστωμάτων ελιάς, επηρεάζει άμεσα την ανάπτυξη των. Αναπαραγωγή βλαστών από μεριστώματα εκφύτων διαφόρων ποικιλιών ελιάς ή σποροφύτων έχει επιτευχθεί σε διάφορα υποστρώματα, ήτοι: MS (Rugini, Fontanazza και Bongioanni, 1979., Rugini και Fontanazza 1981), OM (Rugini, 1984, Canevara και Carramolino και Vicente, 1987), MS₁ και MS₂ Fiorino και Levani, 1985).

Η ανάπτυξη των μεριστωμάτων της ποικιλίας Καλαμών δεν ήταν καθόλου ικανοποιητική στο υπόστρωμα MS (Murashige and Skoog, 1962). Η χρησιμοποίηση των υποστρωμάτων NS₁, MS₂ και OM συνέβαλε στην ανάπτυξη των μεριστωμάτων, αλλά η ανάπτυξή τους ήταν βραδεία και γενικά απρόθυμη, με έντονα συμπτώματα συστροφής των φύλλων. Ικανοποιητική ανάπτυξη

των μεριστωμάτων επιτεύχθηκε στο υπόστρωμα ΥΕ, που προήλθε από το ΟΜ μετά από τροποποίηση, όπως αναφέρεται στο σχετικό κεφάλαιο. Ο μέσος όρος αριθμού βλαστών ανά έκφυτο ήταν στατιστικά υψηλότερος ($P=0.05$) εκείνου των άλλων υποστρωμάτων, η δε ανάπτυξη των βλαστών ικανοποιητική και με φύλλα χωρίς έντονα συμπτώματα συστροφής. Φαίνεται ότι η ανάπτυξη των μεριστωμάτων επηρεάζεται αφ'ενός μεν από την ποικιλία, αφ'ετέρου δε από την ορμονοθρεπτική τους σύσταση.

Ο μέσος όρος αριθμού βλαστών ανά έκφυτο ήταν υψηλότερος σε συγκέντρωση ζεαΐνης 10ppm. Οι Rugini (1981) Rugini και Fontanazza, και Rugini (1984) πέτυχαν αναπαραγωγή βλαστών με ζεαΐνη σε συγκέντρωση 10ppm. Το μήκος των βλαστών των καλλιιεργειών μετά από χρονική περίοδο 12 εβδομάτων, αυξήθηκε αυξανόμενης της συγκέντρωσης της ζεαΐνης μέχρι 12.5ppm. Περαιτέρω αύξηση της ζεαΐνης (15ppm) όχι μόνο δεν επηρέασε σημαντικά το μέσο όρο αριθμού βλαστών ανά έκφυτο, αλλά συνετέλεσε και στη μείωση του μήκους των και μάλιστα στατιστικώς σημαντικά ($P=0.05$). Κατά την περίοδο των 12 εβδομάδων ο αριθμός των παραγομένων βλαστών πενταπλασιάστηκε, ο δε ετήσιος ρυθμός αναπαραγωγής βλαστών ανά έκφυτο ανήλθε σε 801 βλαστούς.

Η βενζυλαδενίνη έδωσε σημαντικά μικρότερο αριθμό βλαστών ανά έκφυτο συγκριτικά με τη ζεαΐνη στις συγκεντρώσεις 7.5 και 10ppm. Το μέσο μήκος των βλαστών δεν επηρεάστηκε στατιστικώς σημαντικά. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι η επίδραση της βενζυλαδενίνης στην αναπαραγωγή βλαστών είναι σημαντικά μικρότερη από εκείνη της ζεαΐνης. Πα-

ρόμοια αποτελέσματα επιτεύχθηκαν και από το Rugini (1981, 1984).

Η χρησιμοποίηση της ζεατίνης 10ppm σε συνδυασμό με εκχύλισμα ιστών από γόγγρο ελιάς σε συγκεντρώσεις 10ppm, 20ppm και 30ppm αύξησε σημαντικά τον αριθμό των βλαστών ανά έκφυτο. Ο μέσος όρος αριθμού βλαστών ανά έκφυτο αυξήθηκε στατιστικώς σημαντικά, ήτοι από 5 σε 6.1 βλαστοί ανά έκφυτο με την προσθήκη του εκχυλίσματος. Καλύτερα αποτελέσματα επιτεύχθηκαν σε συγκέντρωση εκχυλίσματος 20ppm. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος αρχίζει να επηρεάζει αρνητικά την αναπαραγωγή βλαστών. Το μέσο μήκος των βλαστών ήταν μικρότερο στη μεγαλύτερη συγκέντρωση του εκχυλίσματος (30 ppm) και μάλιστα διέφερε στατιστικώς σημαντικά σε επίπεδο $P=0.05$. Κατά την περίοδο των 12 εβδομάδων ο αριθμός των παραγομένων βλαστών εξαπλασιάστηκε, ο δε ετήσιος ρυθμός αναπαραγωγής βλαστών ανά έκφυτο ανήλθε σε 1384.5. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το εκχύλισμα επιδρά θετικά στην αναπαραγωγή βλαστών. Πιθανόν η επίδραση αυτή να οφείλεται στην ύπαρξη ορισμένων ουσιών (ΙΑΑ, φαινολικά κ.ά.) που ευνοούν το σχηματισμό επίκτητων οφθαλμών και κατ' επέκταση βλαστών, μετά από αλληλεπίδραση με τη ζεατίνη. Η επίδραση εκχυλισμάτων βλαστών στην ανάπτυξη βλαστών και ριζών έχει διαπιστωθεί και από άλλους ερευνητές σε οπωροφόρα (Jones, 1976) και καλλωπιστικά φυτά (Leclerk και Chong, 1983, Diagneault και Chong, 1985, Kawase, 1964, 1970).

Η βενζυλαδενίνη (7.5ppm) σε συνδυασμό με εκχύλισμα ιστών ελιάς σε συγκεντρώσεις 10ppm, 20ppm και 30ppm

αύξησε σημαντικά τον αριθμό των βλαστών ανά έκφυτο. Ο μέσος αριθμός βλαστών ανά έκφυτο αυξήθηκε στατιστικώς σημαντικά ($P=0.05$), ήτοι από 4.05 σε 5 ανά έκφυτο με την προσθήκη 20ppm εκχυλίσματος. Και στην περίπτωση αυτή, όπως και στη ζεατίνη, η περαιτέρω αύξηση της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος αρχίζει να επηρεάζει αρνητικά την αναπαραγωγή βλαστών. Το μέσο μήκος των βλαστών ήταν μεγαλύτερο στη συγκέντρωση του εκχυλίσματος 20ppm και μάλιστα διέφερε στατιστικώς σημαντικά σε επίπεδο $P=0.05$. Κατά την περίοδο των 12 εβδομάδων ο αριθμός των παραγομένων βλαστών πενταπλασιάστηκε ο δε ετήσιος ρυθμός αναπαραγωγής βλαστών ανά έκφυτο ανήλθε σε 625, έναντι 256 της βενζυλαδενίνης. Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το εκχύλισμα και στην περίπτωση της βενζυλαδενίνης αυξάνει τον ετήσιο ρυθμό αναπαραγωγής βλαστών, αλλά ο ρυθμός αυτός είναι πολύ μικρότερος εκείνου της ζεατίνης (1384.5).

Η θετική επίδραση του εκχυλίσματος ιστών από γόγγρους ελιάς διαπιστώθηκε και όταν χρησιμοποιήθηκαν οι κυτοκινίνες ζεατίνη, 2ip και βενζυλαδενίνη συνδυασμό με εκχύλισμα συγκέντρωσης 20ppm. Ο μέσος όρος αριθμού βλαστών ανά έκφυτο σε ετήσια βάση, με την επίδραση και του εκχυλίσματος, ανήλθε σε 1211.7, 660.7 και 539.7, αντίστοιχα, ενώ με την επίδραση μόνον των κυτοκινινών ζεατίνη βενζυλαδενίνη και 2ip ανήλθε σε 687.19, 231.34, 144.98, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα δείχνουν τη θετική επίδραση του εκχυλίσματος στην αναπαραγωγή βλαστών, που είναι ισχυρότερη, κατά φθί-

νουσα σειρά, όταν συνδυάζεται με ζεατίνη, 2ip και βενζυλαδενίνη. Το μέσο μήκος των βλαστών, αν και δε διέφερε σημαντικά κατά κυτοκινίνη με ή χωρίς εκχύλισμα, η ζεατίνη έδωσε βλαστούς μεγαλύτερου μήκους έναντι της βενζυλαδενίνης και 2ip και μάλιστα διαφορά στατιστικώς σημαντική σε επίπεδο $P=0.05$. Το μέσο μήκος των βλαστών μεταξύ των κυτοκινινών βενζυλαδενίνης και 2ip δε διέφερε σημαντικά σε επίπεδο $P=0.05$.

Η επίδραση του εκχυλίσματος στη ριζοβολία των μόσχευμάτων ελιάς διερευνήθηκε αρχικά με βιοδοκιμές σε μοσχεύματα φασιόλου. Διαπιστώθηκε ότι σε συγκεντρώσεις 30 ως 50ppm δίνει το μεγαλύτερο αριθμό ριζών ανά μόσχευμα. Αυξανόμενη όμως της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος πάνω από 60ppm επηρεάζει αρνητικά την ανάπτυξη ριζών, πιθανόν λόγω τοξικότητας. Παρόμοια επίδραση παρατηρείται και στις συνθετικές ριζογόνες ορμόνες (IBA, NAA κ.λ.π.), όταν χρησιμοποιούνται σε συγκεντρώσεις μεγαλύτερες των κανονικών (optimum).

Ο μέσος αριθμός ριζών ανά μόσχευμα, με τη χρησιμοποίηση συγκέντρωσης εκχυλίσματος 50ppm, ανήλθε σε 45 έναντι 14.6 του μάρτυρα (νερό). Η διαφορά αυτή είναι στατιστικά σημαντική σε επίπεδο $P=0.05$.

Η αξιολόγηση του εκχυλίσματος έγινε και σε συνδυασμό αυτού με IBA (ριζογόνος ορμόνη). Διαπιστώθηκε ότι ο συνδυασμός του IBA (1ppm) με εκχύλισμα (30ppm) έδωσε το μεγαλύτερο αριθμό ριζών ανά μόσχευμα. Οι συνδυασμοί IBA και εκχυλίσματος έδωσαν αριθμό ριζών ανά μόσχευμα

μεγαλύτερο εκείνου που έδωσε το IBA από μόνο του και μάλιστα ο αριθμός αυτός στη συγκέντρωση 30ppm ήταν στατιστικώς σημαντικά υψηλότερος σε επίπεδο $P=0.05$.

Τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών με μοσχεύματα φασιόλου έδειξαν ότι το εκχύλισμα έχει θετική επίδραση στη ριζοβολία των μοσχευμάτων. Θετική επίδραση εκχυλισμάτων βλαστών έχει διαπιστωθεί και σε καλλωπιστικά φυτά (Leclerk και Chong, 1983, Diagneault και Chong 1985, Kawase, 1964, 1970).

Μετά από βιοδοκιμές με μοσχεύματα φασιόλου διαπιστώθηκε ότι οι ανιχνευόμενες ουσίες στο χρωματογράφημα τρυπταμίνη και IAA είναι αυτές που ευνοούν τη ριζοβολία των μοσχευμάτων. Η θετική επίδραση των ουσιών αυτών στη ριζοβολία είναι δεδομένη, καθότι τα συστατικά που συνδέονται με την ομάδα των αυξινών ασκούν θετική επίδραση στη ριζοβολία μοσχευμάτων (Ποντίκης, 1988).

Ριζοβολία εκφύτων ελιάς επιτεύχθηκε στο υπόστρωμα ΥΕ με την προσθήκη α-NAA σε συγκέντρωση 1ppm, 2ppm και 3ppm ή IBA σε συγκέντρωση 1ppm, 2ppm και 3ppm. Το α-NAA σε συγκεντρώσεις 1ppm, 2ppm και 3ppm έδωσε κάπως ικανοποιητικά αποτελέσματα μετά από περίοδο 6 εβδομάδων ήτοι σε ποσοστό % 37.5 , 65 και 52.5 , αντίστοιχα. Το υψηλότερο ποσοστό επιτεύχθηκε σε συγκέντρωση α-NAA 2ppm. Τα ποσοστά % ριζοβολίας με τη χρησιμοποίηση του IBA δεν είναι καθόλου ικανοποιητικά, με υψηλότερο το 15% που επιτεύχθηκε με την υψηλότερη συγκέντρωση 3ppm.

Ο συνδυασμός των συγκεντρώσεων των αυξινών α-NAA

και IBA με εκχύλισμα ιστών ελιάς σε συγκέντρωση 50ppm αύξησε σημαντικά το ποσοστό ριζοβολίας των εκφύτων. Καλύτερα αποτελέσματα έδωσε ο συνδυασμός α-NAA 2ppm και εκχυλίσματος 50ppm. Το ποσοστό ριζοβολίας ανήλθε σε 82.5%, που διέφερε στατιστικώς σημαντικά σε επίπεδο $P=0.05$ έναντι των άλλων επεμβάσεων πλην του συνδυασμού α-NAA 3ppm και εκχυλίσματος 50ppm. Οι συνδυασμοί του IBA με εκχύλισμα αύξησαν μεν το ποσοστό ριζοβολίας στατιστικώς όχι σημαντικά, και σε ποσοστά μη ικανοποιητικά, με καλύτερη την επέμβαση συνδυασμού IBA 3ppm και εκχυλίσματος 50ppm, που έδωσε ποσοστό ριζοβολίας 40%.

Τα αποτελέσματα δείχνουν ότι το ποσοστό ριζοβολίας των εκφύτων ελιάς μπορεί να αυξηθεί σημαντικά με την προσθήκη του εκχυλίσματος στο υπόστρωμα ριζοβολίας. Η αύξηση σε ποσοστό % φθάνει το 25% με συγκέντρωση α-NAA 1ppm και το 17,5% με συγκεντρώσεις α-NAA 2ppm και 3ppm. Ο μέσος όρος αριθμού ριζών για κάθε έκφυτο δε διέφερε στατιστικώς σημαντικά μεταξύ των διαφόρων συγκεντρώσεων του α-NAA ή του συνδυασμού α-NAA και εκχυλίσματος. Το μέσο μήκος των ριζών ήταν μεγαλύτερο στο συνδυασμό α-NAA 2ppm και εκχυλίσματος 50ppm (1.69 εκ.). Το μήκος αυτό διέφερε στατιστικώς σημαντικά σε επίπεδο $P=0.05$ μόνο έναντι του μήκους, που επιτεύχθηκε με το συνδυασμό α-NAA 1ppm και εκχυλίσματος 50ppm.

Το ποσοστό ριζοβολίας 80%, που επιτεύχθηκε από το Rugini (1984) είναι μεν ικανοποιητικό, αλλά φαίνεται πως επιτεύχθηκε σε ποικιλίες με γενετική προδιάθεση

για ριζοβολία. Η ποικιλία Καλαμών που χαρακτηρίζεται από προδιάθεση δύσκολης ριζοβολίας (Ποντίκης 1981, Avidan and Lavee 1978) ριζοβόλησε σε ικανοποιητικό ποσοστό *in vitro* με την προσθήκη ακατέργαστου εκχυλίσματος από ιστούς γόγγρων ελιάς. Φαίνεται πως στο ακατέργαστο εκχύλισμα εμπεριέχονται ουσίες της ομάδας indolyl που ευνοούν τη ριζοβολία των εκφύτων, όταν αλληλεπιδράσουν με τη συνθετική ορμόνη ριζοβολίας α-NAA.

Η εποχή παραλαβής του εκχυλίσματος δεν επηρεάζει στατιστικώς σημαντικά τον αριθμό των ριζών των μοσχευμάτων του φασιόλου. Συνεπώς η εποχή παραλαβής του δεν έχει ιδιαίτερη σημασία.

Η σκληραγώγηση των έρριζων φυτών αποτελεί δύσκολη διαδικασία προσαρμογής των φυτών στις περιβαλλοντικές συνθήκες θερμοκηπίου. Το ποσοστό των μεταφυτευμένων φυτών, που επιβίωσαν, ήταν ελάχιστο και χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση. Φαίνεται ότι η ελιά είναι φυτό αρκετά ευαίσθητο τουλάχιστον στα πρώτα στάδια της ζωής των και στο μεριστωματικό πολλαπλασιασμό και χρειάζεται περιβαλλοντικές συνθήκες ανάπτυξης πλήρως ελεγχόμενες, εγκαταστάσεις όμως που διαθέτει μέχρι στιγμής το εργαστήριο και γενικότερα η Σχολή.

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

1. Απολυμασμένα μεριστώματα ελιάς που περιλάμβαναν μικρό τμήμα του βλαστού με έναν ή δύο οφθαλμούς και προέρχονταν από βλαστούς σφαιροβλαστών ή γόγγρων παρουσίασαν μεγαλύτερο ποσοστό επιβίωσης σε σχέση με εκείνα που προέρχονταν από βλαστούς του κορμού ή των βραχιόνων του ελαιόδένδρου.

2. Η απολύμανση των μεριστωμάτων είναι ικανοποιητική σε συγκέντρωση υποχλωριώδους νατρίου 10% επί 10' της ώρας.

3. Η εποχή παραλαβής των μεριστωμάτων δεν επηρεάζει σημαντικά το ποσοστό επιβίωσής των.

4. Η ικανοποιητική ανάπτυξη των μεριστωμάτων της ποικιλίας "Καλαμών" επιτεύχθηκε σε νέο υπόστρωμα ΥΕ (υπόστρωμα ελιάς), που προήλθε από το ΟΜ μετά από τροποποίηση. Τα υποστρώματα MS₁, MS₂ και ΟΜ δεν έδωσαν ικανοποιητική ανάπτυξη των μεριστωμάτων, ενώ το υπόστρωμα MS (1962) βρέθηκε ακατάλληλο για ανάπτυξη.

5. Ο μέσος όρος αριθμού βλαστών ανά έκφυτο ήταν ψηλότερος σε συγκέντρωση ζεατίνης 10ppm. Το μήκος των βλαστών μετά από χρονικό διάστημα 12 εβδομάδων αυξήθηκε

αυξανομένης της συγκέντρωσης της ζεατίνης μέχρι 12.5ppm. Η περαιτέρω αύξηση ζεατίνης (15ppm) όχι μόνο δεν επηρέασε σημαντικά το μέσο όρο αριθμού βλαστών, αλλά και συνέβαλε στη μείωση του μήκους των βλαστών.

6. Η θετική επίδραση της βενζυλαδενίνης ή του Zip στην αναπαραγωγή βλαστών είναι σημαντικά μικρότερη από εκείνη της ζεατίνης.

7. Χρησιμοποίηση της ζεατίνης (10ppm) και της βενζυλαδενίνης (7.5ppm) σε συνδυασμό με το εκχύλισμα ιστών ελιάς σε συγκέντρωση 20ppm αύξησε σημαντικά τον αριθμό των βλαστών συγκριτικά με την χρήση των κυτοκινινών από μόνες τους. Αυξανομένης της συγκέντρωσης του εκχυλίσματος (30 ppm) επηρεάζεται αρνητικά η αναπαραγωγή βλαστών και το μήκος τους. Η θετική επίδραση του εκχυλίσματος ιστών ελιάς (20 ppm) διαπιστώθηκε και σε συνδυασμό με Zip (10ppm).

8. Τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών με μοσχεύματα φασιόλου έδειξαν ότι τόσο το εκχύλισμα από μόνο του όσο και σε συνδυασμό με το IBA έχει θετική επίδραση στη ριζοβολία των μοσχευμάτων.

9. Ριζοβολία εκφύτων ελιάς επιτεύχθηκε στο υπόστρωμα ΥΕ μετά από αφαίρεση των κυτοκινινών και προσθήκη των αυξινών α-NAA και IBA σε συγκέντρωση 1 ppm, 2 ppm και 3ppm. Το α-NAA έδωσε ψηλότερο ποσοστό % ριζοβολίας συγκριτικά με το IBA. Ο συνδυασμός των αυξινών α-NAA και IBA με το εκχύλισμα ιστών ελιάς (50 ppm) αύξησε σημαντικά το ποσοστό ριζοβολίας των εκφύτων. Καλύτερα αποτελέσματα έδωσε το α-NAA (2ppm) σε συνδυασμό με 50ppm εκχυλίσματος.

10. Βιοδοκιμές με μοσχεύματα φασιόλου έδειξαν ότι οι ανιχνευόμενες ουσίες στο χρωματογράφημα τρυπταμίνη και ΙΑΑ είναι πιθανόν μεταξύ αυτών, που εμπεριέχονται στο ειχύλι - σμα και δεν είχαν όλες προσδιοριστεί, και ευνοούν τη ριζοβολία των μοσχευμάτων.

11. Η επιβίωση των έρριζων φυτών κατά τη σκληραγώγηση ήταν ελάχιστη. Φαίνεται ότι οι συνθήκες κατά τη σκληραγώγηση πρέπει να είναι απολύτως ελεγχόμενες.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η τεχνική του μικροπολλαπλασιασμού δοκιμάστηκε στην ποικιλία ελιάς " Καλαμών " που πολλαπλασιάζεται δύσκολα αγενώς με τις κλασικές μεθόδους αγενούς πολλαπλασιασμού.

Μελετήθηκε το ποσοστό επιβίωσης των μεριστωμάτων σε σχέση με το είδος του βλαστού καθώς και σε σχέση με το χρόνο εμφάνισης και τη συγκέντρωση του υποχλωριώδους νατρίου (NaOCl) κατά την απολύμανσή τους. Έμφυτα από βλαστούς σφαιροβλαστών έδωσαν καλύτερα αποτελέσματα σε ό,τι αφορά το ποσοστό επιβίωσης αμόλυντων μεριστωμάτων από εκείνους του κορμού ή των βραχιόνων. Η απολύμανση με NaOCl παρουσίασε ένα optimum σε συγκέντρωση 10% επί 10 λεπτά της ώρας. Ως φυτικό υλικό χρησιμοποιήθηκαν έμφυτα βλαστών από σφαιροβλάστες. Οι καλλιέργειες αναπτύχθηκαν σε θερμοκρασία $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ με φωτοπερίοδο 16 ωρών και φωτισμό (3.500 lux) που παρήχεται από λάμπες λευκού φθορισμού ψυχρού φωτός.

Πέντε υποστρώματα δοκιμάστηκαν για την αναπαραγωγή βλαστών (αριθμός βλαστών ανά έμφυτο - μήκος βλαστών).

Από αυτά, το MS (Murashige και Skoog) βρέθηκε ότι ήταν ακατάλληλο για την εν λόγω ποικιλία, τα MS₁ (Fiorine and Leva, 1985), MS₂ (Fiorine and Leva, 1985) και OM (Olive medium) έδωσαν καλύτερα μεν αποτελέσματα από το MS αλλά όχι ικανοποιητικά. Το υπόστρωμα ΥΕ (υπόστρωμα ελιάς) έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα.

Η επίδραση των κυτοκινινών στην αναπαραγωγή βλαστών από έκφυτα καλλιεργούμενα στο παραπάνω υπόστρωμα μελετήθηκε με την προσθήκη ζεατίνης και βενζυλαδενίνης σε διάφορες συγκεντρώσεις. Η ζεατίνη υπερτερεί της βενζυλαδενίνης και τα ορτίμα συγκεντρώσεών των είναι 10ppm και 7.5 ppm, αντίστοιχα. Η προσθήκη 20ppm ακατέργαστου εκχυλίσματος ελιάς στο υπόστρωμα και σε συνδυασμό με τη ζεατίνη, την 2ip ή την βενζυλαδενίνη στα ορτίμα των συγκεντρώσεων των έδωσε θετικότερα αποτελέσματα στην αναπαραγωγή βλαστών. Ο καλύτερος συνδυασμός βρέθηκε ότι είναι αυτός της ζεατίνης με το εκχύλισμα όσον αφορά τόσο στον αριθμό όσο και στο μήκος των νέων βλαστών.

Η μελέτη επίδρασης του ακατέργαστου εκχυλίσματος επεκτάθηκε και επί της ριζοβολίας των εκφύτων ελιάς. Η θετική του επίδραση στη ριζοβολία επιβεβαιώθηκε και με μοσχεύματα φασιόλου. Ο ρόλος του εκχυλίσματος στη ριζοβολία τουλάχιστον, πιθανόν να οφείλεται στην παρουσία αυξινών ή προδρόμων ουσιών αυτών. Η ερμηνεία αυτή συμφωνεί και με τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τον διαχωρισμό και προσδιορισμό ουσιών του εκχυλίσματος με χρωματογραφία λεπτής στιβάδας. Η δράση του εκχυλίσματος είναι ανεξάρτητη της εποχής λήψης του.

Ικανοποιητικό ποσοστό ριζοβολίας επιτεύχθηκε με την προσθήκη στο υπόστρωμα ριζοβολίας της συνθετικής ορμόνης α-NAA σε συγκέντρωση 2ppm. Η ριζογόνος ορμόνη IBA δεν έδωσε ικανοποιητικά αποτελέσματα. Ο συνδυασμός των συνθετικών αυξινών α-NAA και IBA με εκχύλισμα από ιστούς γόγγρων ελιάς συγκέντρωσης 50ppm αύξησε σημαντικά τα ποσοστά ριζοβολίας των εκφύτων ελιάς. Το α-NAA έδωσε θετικότερα αποτελέσματα του IBA.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Avidam, B. and S. Lavee, 1978. Physiological aspects of the rooting ability of olive cultivars. *Acta Horticulturae* 79:93-100.
- Bonga, J.M., 1982. Tissue culture techniques. In *Tissue Culture in Forestry*, J.M. Bonga and D.J. Duzzan (eds), pp. 4-35, The Hague, Martinus Nijhoff, junk.
- Bourgin, J.P. and J.P. Nitsh, 1967. Obtention de nicotina haploides a partir d' etamines cultivées in vitro. *Ann. Physiol. Veg.* 9:377-382.
- Boxus, P., 1974. The production of strawberry plants by in vitro micropropagation. *J. Hort. Sci.* 49:209-210.
- Bressan, P.H., Y.J. Kim, S.E. Hyndam, P.M. Hasegawa, and R.A. Bressan, 1982. Factors affecting in vitro, propagation of rose.
- Cana, A., L. Caramolino, and M. Vicente, 1987. Vegetative propagation of the olive tree from in vitro cultured embryos. *Plant. Sci.* 50: 85-90.
- Chee, R. and R.M. Pool, 1982. The effects of growth substances and photoperiod on the development of shoot

apices of vitis cultured in vitro. Scientia Hort. 16: 17-27.

Diagneault, L., and C. Chong, 1985. Characterization of the root promoting activity in willow extract. Combined proceeding. The IPPS. 35-509-518.

Dods, H.J. and W.L. Roberts, 1985. Experiment in Plant Tissue Culture. Second Edition, pp. 42. Cambridge University press, Cambridge.

Fiorino, P. and A.R. Leva, 1985. Investigations on the micropropagation of the olive (Olea europea). Influence of some mineral elements on the proliferation and rooting of explants. Olive 1985: 101-104.

Fonnesbech, M.A. and N. Brendose, 1977. Development of Asparagus plumosus, shoot tips grown in vitro Physiol. Plant. 40: 73-76.

Gorst, J.R. and R.A. Fossard, 1980. Riboflavin and root morphogenesis in Eucalyptus. In Plant Cell Cultures: Results and Perspectives, F.B. Sala, B. Parisi, R. Cella and O. Ciferri (eds), pp. 271-275, Elsevier, North Holland Biomedical Press, Amsterdam.

Guatheret, R.J., 1939. Sur la possibilité de realizer la culture indefinie des tissues de tubercule de carotte. C.r. Acad.Sci. (Paris) 208:118-120.

Gupta, P.K., A.L. Nadgrr, A.F. Mascarenhas and V. Jagannathan, 1980, Tissue culture of forest trees: Clonal multiplication of Tectona grandis L. (teak) by tissue

- culture. *Plant Sci. Lett.* 17:259-268.
- Hacket, W.P. and J.M. Anderson, 1966. Growth of axillary buds on explanted stem sections of Olea europea. *Am. J. Bot.* 53:608 (abstract).
- Hammerschlag, F., 1982. Factors influencing in vitro multiplication and rooting of the plum rootstock myrobalan (*Prunus cerasifera* Ehrh). *J. Amer. Soc. Hort. Sci.* 107:44-47.
- Harbone, J.B., 1973. *Phytochemical methods*, pp. 195-198. A Guide to Modern Techniques of Plant Analysis, London.
- Heller, R., 1953. Recherches sur la nutrition minerales des tissus vegetaux in vitro *Ann. Sci. Nat. Bot. Veg.* 14:1.
- Jones, O.P. and S.J. Vine, 1968. The culture of gooseberry shoot tips for eliminating virus. *J. Hort. Sci.* 43: 289.
- Jones, O.P., M.E. Hopgood, and C.A. Pontikis, 1979. Propagation in vitro of five apple Scion cultivars. *J. Hort. Sci.* 54:155-158.
- Jones, O.P. and S.G.S. Harfield, 1976. Root initiation in apple shoots cultured in vitro with auxins and phenolic compounds. *J. Hort. Sci.* 51:495-499.
- Jones, O.P., 1976. Effect of phloridrin and phloroglucinol on apple shoots. *Nature.* 262, No 5567:392-393.
- Jones, O.P., M.E. Hopgood and D.O. Farrel, 1977. Propaga-

- tion in vitro of M.26 apple rootstocks. 1. Hort. Sci. 52:235-238.
- Kawase, M., 1964. Centrifugation Rhizocaline and Rooting in Salix alba L. *Physiol. Plant.* 17: 855-865.
- Kawase, M., 1970. Root promoting substances in Salix alba. *Physiol. Plant.* 23: 159-170.
- Khosh-Khui, M. and K.C. Sink, 1982. Rooting enhancement of Rose hybrida for tissue culture propagation. *Scientia Hort.* 17: 371-376.
- Leclerc, R.C. and G. Chong, 1983. Influence of Willow and Poplar extracts on Rooting cuttings. Combined proceedings. The IPPS. Vol. 33:528-538.
- Murashige, T., 1974. Plant propagation through tissue culture. *Ann. Rev. Plant. Physiol.* 25:135-166.
- Murashige, T. and F. Skoog, 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Miller, G.A., D. C. Coston, E.G. Denny and M.E. Romeo, 1982. In vitro propagation of Nemaguard' peach. rootstock. *Hortscience* 17:194.
- McDougall, J. and J.R. Hillman, 1978. Analysis of indol -3 acetic acid using G.E. - M.S. technique: In Isolation of plant growth substances. Ed. by J.R. Hillman pp. 1-13.
- Norton, M.E. and A.A. Boe, 1982. In vitro propagation of

- ornamental roseaceous plants. Hortscience 17:190-191.
- Ohira, K., M. Ikeda, and K. Ojima, 1976. Thiamine requirements of various plant in suspension culture. Plant Cell Physiol. 17:583-590.
- Ποντίκης, Κ., 1981. Ελατοκομία. Αθήνα.
- Ποντίκης Κ., 1988. Σημειώσεις Γενικής Δενδροκομίας. Αθήνα.
- Rosati, P., G. Marino and C. Swierczewski (1980). In vitro propagation of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl. Cv Calita: 126-129.
- Rugini, E., G. Fontanazza, G. Bonga, 1979. Ricerche preliminari sulla coltura in vitro nella specie olea europea sativa L. Tecniche di colture in vitro per la propagazione su vasta scala delle specie ortoflorifrutticole. Pistoia 6 Ottobre: 193-202.
- Rugini, E., G. Fontanazza, 1981. In vitro propagation of "Dolce Agogia" olive. Hortscience 16 (4):492-493.
- Rugini, E., 1981. Propogazione in vitro di una cultivari di oliyo (*Olea europea* L.) Valutazione di varie citochinine ed auxine. Atti del Congresso su. "I Fitorregulatori in agricoltura. 26-27 Novembre 1981 pp.171-180.
- Rugini, E., 1984. In vitro propagation of some olive (*Olea europea sativa* L.) cultivars with different root-ability, and medium development using analytical data from developing shoots and embryos, Sci. Hortic. 24 : 123-134.

Snir, I. and A. Erez, 1980. In vitro propagation of Maling
Merton Apple rootstocks. Hort.science 15: 597-598.

White, P.R., 1963. The cultivation of animal and plant cells.
Ronald Press. New York p. 239.

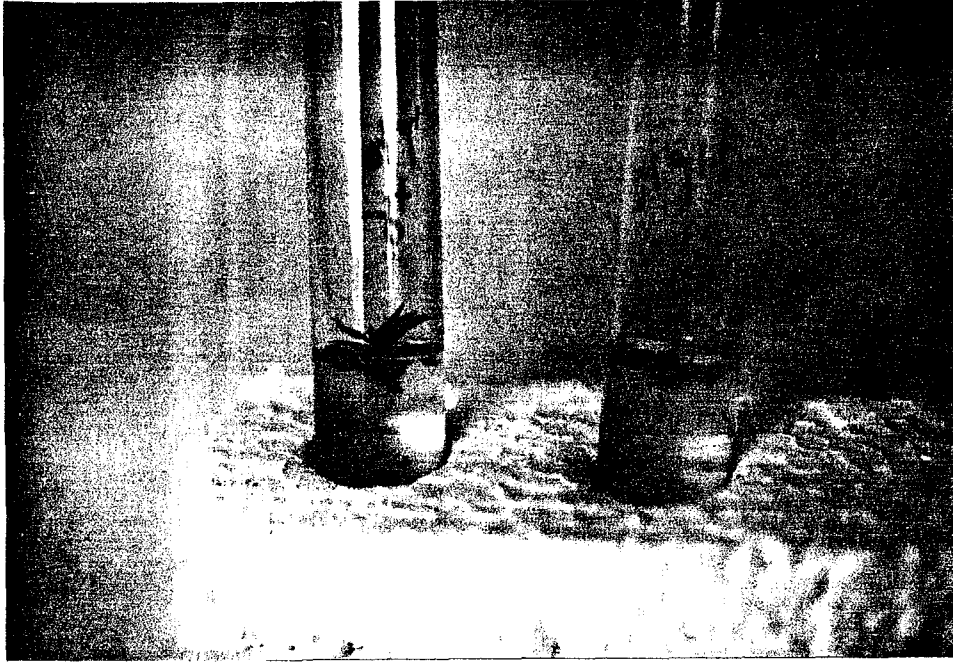
Π Α Ρ Α Ρ Τ Η Μ Α Ε Ι Κ Ο Ν Ω Ν



Εικ. 1. Σφαιροβλάστες ή γόγγροι ελιάς.



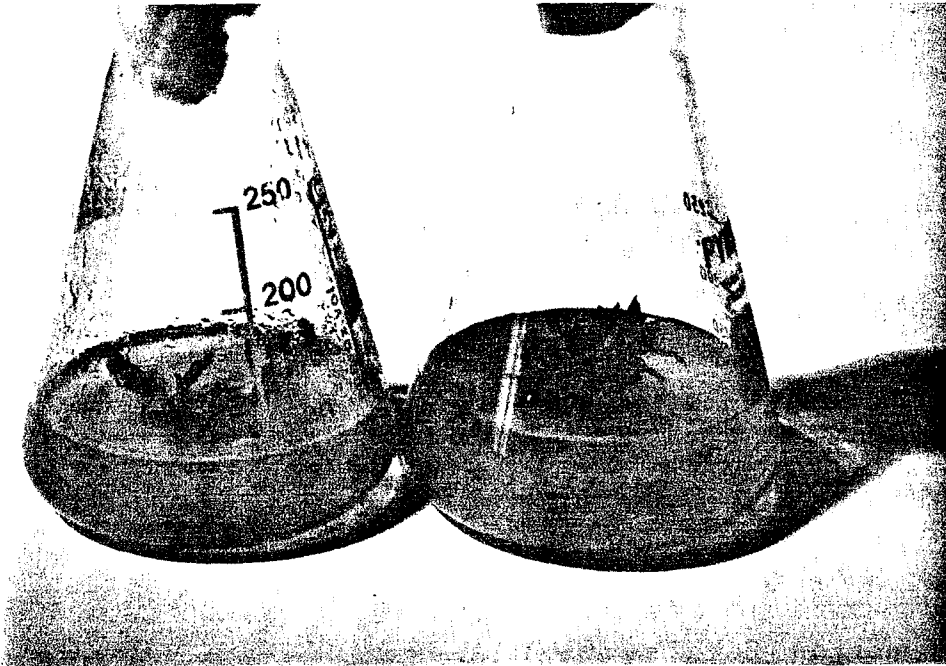
Εικ. 2. Ανάπτυξη μεριστωμάτων ελιάς σε χρονικό διάστημα 2 εβδομάδων. Αριστερά: Ζεατίνη συν εκχύλισμα ιστών σφαιροβλαστών ή γόγγρων ελιάς. Δεξιά: Ζεατίνη.



Εικ. 3. Ανάπτυξη μεριστωμάτων ελιάς σε χρονικό διάστημα 2 εβδομάδων. Αριστερά: Zīp συν εκχύλισμα ιστών σφαιροβλαστών ή γόγγρων ελιάς. Δεξιά: Zīp.



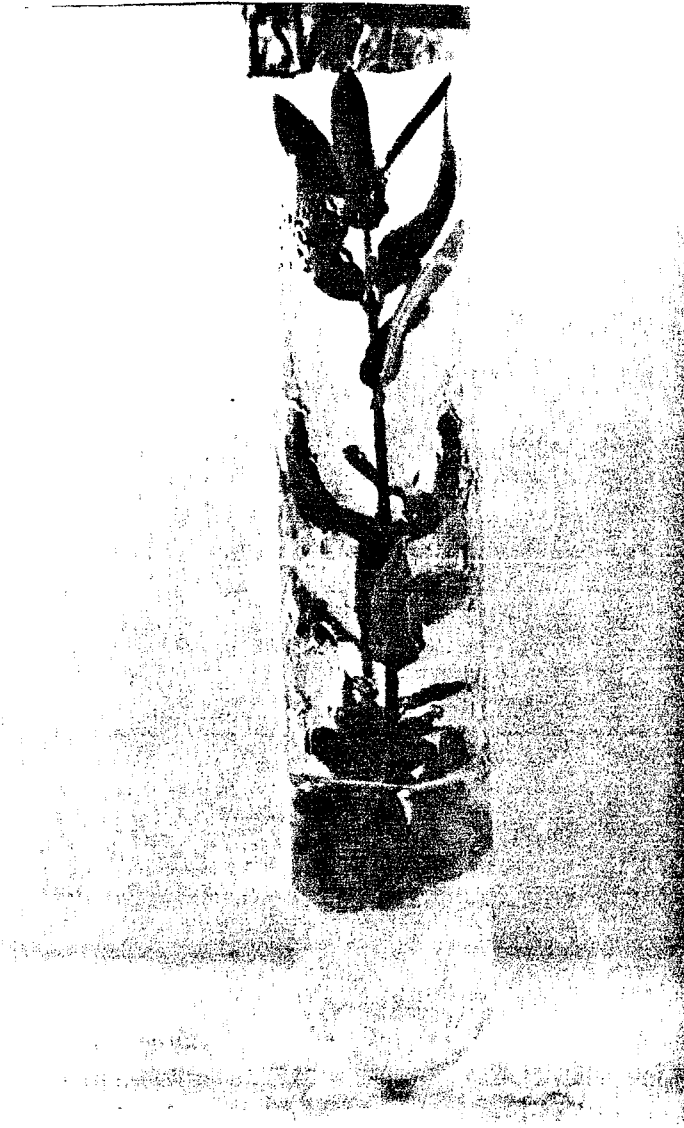
Εικ. 4. Ανάπτυξη μεριστωμάτων ελιάς σε χρονικό διάστημα 2 εβδομάδων. Αριστερά: Βενζυλαδεκίνη συν εκχύλισμα ιστών σφαιροβλαστών ή γόγγρων ελιάς. Δεξιά: Βενζυλαδεκίνη.



Εικ. 5. Ανάπτυξη μεριστωμάτων ελιάς σε χρονικό διάστημα 10 εβδομάδων. Αριστερά: Zip. Δεξιά: Zip συν εκχύλισμα ιστών σφαιροβλαστών ή γόγγρων ελιάς.



Εικ. 6. Ανάπτυξη μεριστωμάτων ελιάς σε χρονικό διάστημα 10 εβδομάδων. Αριστερά: Βενζυλαδενίνη. Δεξιά: Βενζυλαδενίνη συν εκχύλισμα ιστών σφαιροβλαστών ή γόγγρων ελιάς.



Εικ. 7. Ανάπτυξη μεριστωμάτων ελιάς σε υπόστρωμα με ζεατίνη και σε χρονικό διάστημα 10 εβδομάδων.



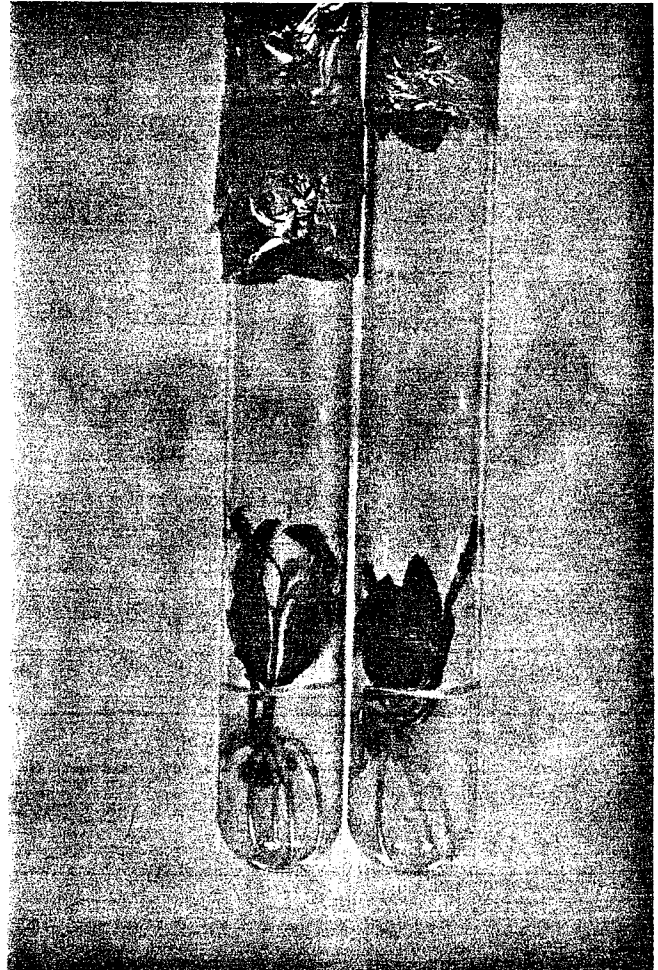
Εικ. 8. Ανάπτυξη μεριστωμάτων ελιάς σε υπόστρωμα με ζεατίνη και εκχυλίσματος ιστών σφαιροβλαστών ή γόγγρων ελιάς, σε χρονικό διάστημα 10 εβδομάδων.



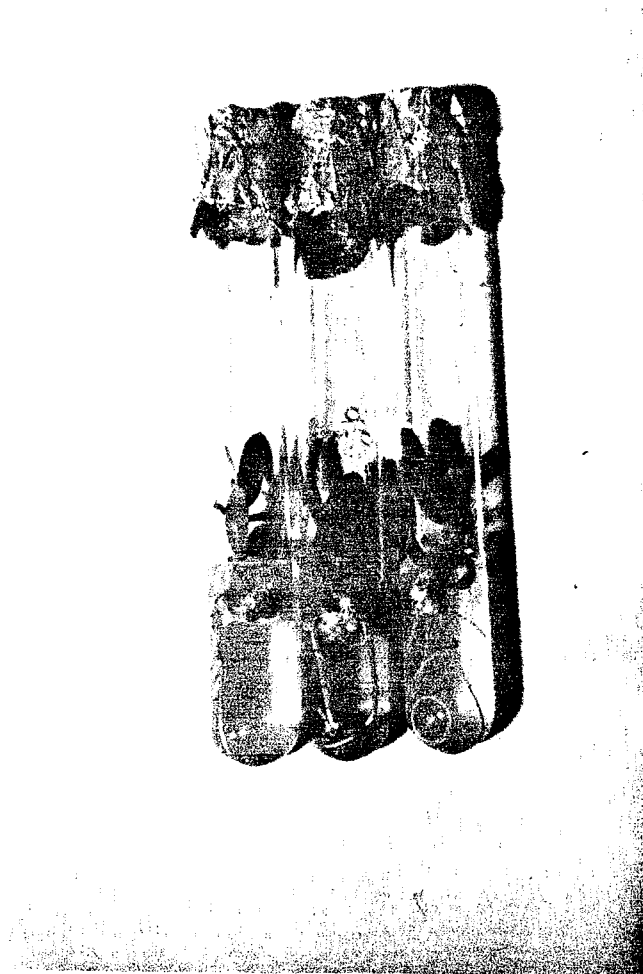
Εικ. 9. Ανάπτυξη μεριστωμάτων ελιάς σε υπόστρωμα με ζεατίνη και σε χρονικό διάστημα 12 εβδομάδων.



Εικ. 10. Ανάπτυξη μεριστωμάτων ελιάς σε υπόστρωμα με ζεατίνη και εκχυλίσματος ιστών σφαιροβλαστών ή γόγγρων ελιάς, σε χρονικό διάστημα 12 εβδομάδων.



Εικ. 11. Ριζοβολία εκφύτων ελιάς σε υπόστρωμα με α-NAA και σε χρονικό διάστημα 4 εβδομάδων.



Εικ. 12. Ριζοβολία εκφύτων ελιάς σε υπό-
στρωμα με IBA και σε χρονικό διάστημα
4 εβδομάδων.



Εικ. 13. Έρριζο φυτό ελιάς μεταφυτευμένο σε γλαστράκι με υπόστρωμα τύρφης και περλίτη σε αναλογία 1:1, σε χρονικό διάστημα 6 εβδομάδων.