



ΔΙΕΘΝΕΣ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ
ΤΗΣ ΕΛΛΑΔΟΣ

**ΔΙΕΘΝΕΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΤΗΣ ΕΛΛΑΔΟΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ**

**ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ, ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ
ΤΟΠΙΚΩΝ ΕΝΔΗΜΙΚΩΝ ΦΥΤΩΝ ΤΗΣ ΚΡΗΤΗΣ
ΜΕ ΠΟΛΛΑΠΛΟ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΕΥΑΓΓΕΛΙΑΣ Α. ΠΑΔΕΝΟΓΛΟΥ**



ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2020

**ΔΙΕΘΝΕΣ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΤΗΣ ΕΛΛΑΔΟΣ
ΣΧΟΛΗ ΓΕΩΤΕΧΝΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

**ΔΙΑΤΗΡΗΣΗ, ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΚΑΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ
ΤΟΠΙΚΩΝ ΕΝΔΗΜΙΚΩΝ ΦΥΤΩΝ ΤΗΣ ΚΡΗΤΗΣ
ΜΕ ΠΟΛΛΑΠΛΟ ΕΝΔΙΑΦΕΡΟΝ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ
ΕΥΑΓΓΕΛΙΑΣ ΠΑΔΕΝΟΓΛΟΥ**

**ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ:
Δρ. Α. ΓΙΑΝΝΑΚΟΥΛΑ
Επίκουρη Καθηγήτρια**

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ 2020

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ολοκληρώνοντας τη πτυχιακή μου εργασία στο ινστιτούτο Αρωματικών φυτών του ΕΛΓΟ-ΔΗΜΗΤΡΑ (πρώην ΕΘΙΑΓΠΕ) και στο εργαστήριο Βοτανικής του ΔΙ.ΠΑ.Ε. θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές μου ευχαριστίες στη καθηγήτρια κα. Γιαννακούλα Αναστασία για τη δυνατότητα που μου έδωσε να εκπονήσω υπό τη συνεχή καθοδήγηση και συμπαράσταση της τη πτυχιακή μου εργασία.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω ιδιαίτερος τη διευθύντρια του ινστιτούτου κα. Ε. Μαλούπα καθώς και τους διδάκτορες κα. Κ. Γρηγοριάδου και κ. Ν. Κρίγκα για τις χρήσιμες συμβουλές και τη πολύτιμη βοήθεια τους κατά τη διεξαγωγή των πειραμάτων. Ευχαριστώ, επίσης, το τεχνικό προσωπικό του ινστιτούτου για τη βοήθεια τους όποτε αυτή χρειάστηκε.

Τέλος θα ήθελα να πω ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου για την αμέριστη συμπαράσταση τους.

Θεσσαλονίκη, Σεπτέμβριος 2020

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

1.	ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....σελ.	2
1.1	Αναπαραγωγή των φυτών και πολλαπλασιασμός.....	6
1.2	Εγγενής πολλαπλασιασμός.....	6
1.2.1	Πολλαπλασιασμός με σπόρο.....	7
1.3	Αγενής πολλαπλασιασμός.....	7
1.3.1	Πολλαπλασιασμός με μοσχεύματα.....	7
1.3.2	Πλεονεκτήματα – μειονεκτήματα πολλαπλασιασμού με μοσχεύματα.....	8
1.3.3	Παράγοντες που επιδρούν στη ριζοβολία των μοσχευμάτων πριν από την κοπή τους από το μητρικό φυτό.....	9
1.3.4	Παράγοντες που επιδρούν στη ριζοβολία κατά τη κοπή των μοσχευμάτων.....	15
1.3.5	Παράγοντες που επιδρούν στη ριζοβολία μετά τη κοπή των μοσχευμάτων.....	17
1.4	Ιστοκαλλιέργεια.....	19
1.4.1	Καλλιέργειες οργανωμένων δομών.....	19
1.4.2	Καλλιέργειες αδιαφοροποίητων κυττάρων.....	20
1.4.3	Καλλιέργειες που προέρχονται από μεμονωμένα κύτταρα.....	20
1.4.4	Μικροπολλαπλασιασμός – πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα.....	21
1.5	Σκοπός.....	23
2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	24
2.1	Αναπαραγωγή και πολλαπλασιασμός με τη μέθοδο των μοσχευμάτων.....	25
2.2	Αναπαραγωγή και πολλαπλασιασμός με τη μέθοδο της ιστοκαλλιέργειας (Φάση 1^η).....	25
2.2.1	Φυτικό υλικό.....	25
2.2.2	Υπόστρωμα <i>in vitro</i> καλλιέργειας.....	26
2.2.3	Μέθοδοι απολύμανσης, αποστείρωσης και εγκατάστασης φυτικού υλικού.....	29
2.2.4	Χειρισμός σπόρων-εκφύτων.....	31
2.2.5	Συνθήκες καλλιέργειας.....	32
2.3	Αναπαραγωγή και πολλαπλασιασμός με τη μέθοδο της ιστοκαλλιέργειας (Φάση 2^η).....	32

2.3.1	Φυτικό υλικό.....	32
2.3.2	Υπόστρωμα <i>in vitro</i> καλλιέργειας.....	33
2.3.3	Έκφυτα καλλιεργειών πολλαπλασιασμού – χειρισμός.....	33
2.4	Στατιστική ανάλυση.....	34
3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	35
3.1	Αγενής πολλαπλασιασμός.....	35
3.2	Εγγενής πολλαπλασιασμός.....	38
4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	41
5	Παράρτημα εικόνων.....	44
6	Βιβλιογραφία.....	48

ΕΥΡΕΤΗΡΙΟ ΠΙΝΑΚΩΝ

- Πίνακας 1** Είδη φυτών και μήκος των μοσχευμάτων που χρησιμοποιήθηκαν
- Πίνακας 2** Συστατικά (μακροστοιχεία-ιχνοστοιχεία-βιταμίνες) υποστρώματος MS (Murashige and Skoog, 1962)
- Πίνακας 3** Επίδραση του φυτικού ρυθμιστή IBA στη ριζοβολία μοσχευμάτων *Carlina diae* στο σύστημα της υδρονέφωσης
- Πίνακας 4** Επίδραση του φυτικού ρυθμιστή IBA στη ριζοβολία μοσχευμάτων *Lomelosia minoana* subsp. *minoana* στο σύστημα της υδρονέφωσης.
- Πίνακας 5** Επίδραση της απολύμανσης στην αντίδραση σπερμάτων *Carlina diae*, που διατηρήθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών, σε διαφορετικά υποστρώματα
- Πίνακας 6** Επίδραση του θρεπτικού υποστρώματος καλλιέργειας στη δημιουργία νέων μικροβλαστών *Carlina diae*
- Πίνακας 7** Επίδραση του θρεπτικού υποστρώματος καλλιέργειας στη δημιουργία νέων μικροβλαστών *Acantholimon androsaceum*
- Πίνακας 8** Επίδραση προηγούμενου θρεπτικού υποστρώματος (MS-20-6) στο πολλαπλασιασμό βλαστών *Carlina diae*
- Πίνακας 9** Επίδραση προηγούμενου θρεπτικού υποστρώματος (MS-20-6+250GA₃) στο πολλαπλασιασμό βλαστών *Carlina diae*

Πίνακας Συντμήσεων

Εικ.	= Εικόνα
Μ.Ο	= Μέσος όρος
Πιν.	= Πίνακας
BA	= Βενζυλαδενίνη (6- benzyladenine)
GA ₃	= Γιββερελλίνη (gibberellic acid)
IBA	= Ινδολυλοβουτυρικό οξύ (indole-3-butyric acid)
MS	= Θρεπτικό υπόστρωμα Murashige και Skoog (1962)
NAA	= Ναφθαλινοξικό οξύ (α-Naphthaleneacetic acid)

Περίληψη

Στην εργασία που παρατίθεται παρακάτω έγινε μελέτη των ενδημικών φυτών της Κρήτης *Acantholimon androsaceum*, *Carlina diae* και *Lomelosia minoana subsp. minoana* τα οποία έχουν ιδιαίτερη καλλωπιστική, αρωματική και φαρμακευτική αξία. Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν η δημιουργία ενός κατάλληλου πρωτοκόλλου πολλαπλασιασμού *in vitro*, που θα βοηθήσει στην αναπαραγωγή των παραπάνω ειδών σε εμπορική κλίμακα με στόχο την αξιοποίησή τους. Ακόμη, μελετήθηκε τόσο η δράση όσο και η μεταβολή της ποσότητας του ινδολο-3-βουτυρικού οξέος (IBA) στη ριζοβολία των φυτών με μοσχεύματα.

Όσον αφορά το πείραμα πολλαπλασιασμού με μοσχεύματα μελετήσαμε στα φυτά: *Acantholimon androsaceum*, *Carlina diae* και *Lomelosia minoana subsp. minoana* την επίδραση του ινδολο-3-βουτυρικού οξέος (IBA) στη ριζοβολία τους στην υδρονέφωση. Διαπιστώθηκε ότι στο *Acantholimon androsaceum* η καλύτερη αντίδραση των μοσχευμάτων πραγματοποιείται στη μεταχείριση με τα 4000 ppm IBA, στη *Carlina diae* στη μεταχείριση με τα 2000 ppm IBA ενώ στη *Lomelosia minoana subsp. minoana* στα 2000 ppm IBA, λαμβάνοντας υπόψιν όλα τα επιμέρους χαρακτηριστικά ριζοβολίας.

Στην ιστοκαλλιέργεια έγιναν μετρήσεις που αφορούσαν τον αριθμό των βλαστών και το ύψος τους, τον αριθμό των γονάτων καθώς και τον αριθμό ριζών και το μήκος τους. Στο *Acantholimon androsaceum* η προσθήκη 0,5mg BA, 0,05mg IBA και 0,1mg GA₃ είχαν ευνοϊκά αποτελέσματα στον αριθμό των βλαστών ενώ σε απλό υπόστρωμα MS το ύψος των βλαστών ήταν μεγαλύτερο. Όσον αφορά τη ριζοβολία, τόσο το απλό υπόστρωμα MS όσο και το εμπλουτισμένο δεν είχαν κάποιο ικανοποιητικό αποτέλεσμα.

Στην αναπαραγωγή της *Carlina diae*, το απλό υπόστρωμα MS έδωσε αυξημένο ριζικό σύστημα και σε αριθμό ριζών αλλά και σε μήκος ενώ με τη προσθήκη 250mg GA₃ σημειώθηκε έντονη κορυφαία ανάπτυξη χωρίς όμως ύπαρξη ριζιδίου.

Σχετικά με το πολλαπλασιασμό των εκφύτων *Carlina diae*, οι καλύτερες αντιδράσεις εντοπίστηκαν στα υποστρώματα που προήλθαν από το MS-20-6+ 250 GA₃, είτε αυτά στη συνέχεια πολλαπλασιάστηκαν στα νέα υποστρώματα Ca1 και Ca2, λαμβάνοντας πάντα υπόψη όλα τα επιμέρους χαρακτηριστικά.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Η ελληνική χλωρίδα είναι από τις πλουσιότερες της Ευρώπης καταλαμβάνοντας το 30% της χλωρίδας της παραμεσογείου περιοχής. Σύμφωνα με τα πιο πρόσφατα δεδομένα, στη χλωρίδα της Ελλάδας υπάρχουν πάνω από 6.600 ταξινομικές μονάδες (taxa), στις οποίες περιλαμβάνονται 5.752 αυτοφυή ή επιγενή είδη (Dimopoulos et al., 2013). Οι αριθμοί αυτοί, σε συνδυασμό με το ποσοστό ενδημισμού που ανέρχεται σε 22% (1.462 taxa), είναι ιδιαίτερα υψηλοί για τη χλωρίδα μιας σχετικά μικρής σε έκταση χώρας της Ευρώπης και της Μεσογείου (Strid & Tan, 1997, 2002, Tan & Iatrou, 2001, Thompson, 2005, Georghiou & Delipetrou, 2010).

Η παρούσα διπλωματική εργασία αποτελεί μέρος του προγράμματος PRECISE-M. Το πρόγραμμα PRECISE-M [Διατήρηση και αιφορική αξιοποίηση σπάνιων-απειλούμενων φυτών της Κρήτης για ανάπτυξη νέων αγροδιατροφικών προϊόντων με καινοτόμο λίπανση] έχει ως σκοπό τη διατήρηση και αιφορική αξιοποίηση σπάνιων-απειλούμενων ενδημικών φυτών της Κρήτης προκειμένου να εισαχθούν νέα είδη καλλιεργούμενων φυτών σε εμπορική καλλιέργεια με καινοτόμους μεθόδους. Ο λόγος δημιουργίας ενός τέτοιου προγράμματος προκύπτει λόγω του πολύπλευρου και διεθνούς εμπορικού ενδιαφέροντος, που έχουν τα φυτά αυτά, και οφείλεται στη σπανιότητα-μοναδικότητα τους καθώς και στις ιδιότητες τους (αρωματικές-φαρμακευτικές, ανθοκομικές-καλλωπιστικές, εδώδιμες-αρτυματικές, αγροδιατροφικές). Για το πρόγραμμα θα χρησιμοποιηθούν τόσο βασικές όσο και προηγμένες μέθοδοι αναπαραγωγής φυτικού υλικού προκειμένου να δημιουργηθούν προϊόντα με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά και υψηλή προστιθέμενη αξία. Επιπλέον, το πρόγραμμα αποσκοπεί να συμβάλει τόσο στην ανάπτυξη εναλλακτικών καλλιεργειών μετριασμένου ρίσκου για έλληνες καλλιεργητές, το οποίο θα οδηγήσει στην ανάπτυξη της πρωτογενούς παραγωγής, όσο και στη διατήρηση-προστασία της ελληνικής βιοποικιλότητας.

Η εστίαση του προγράμματος στα φυτά της Κρήτης οφείλεται στη πλούσια και μοναδική βιοποικιλότητα της (Dimopoulos 2013). Η χλωρίδα της Κρήτης αριθμεί 1742 ιθαγενή είδη που αντιστοιχούν σε 623 γένη και 128 οικογένειες (Turland & Chilton, 2008). Αναλογικά δε με την έκταση της, η Κρήτη αποτελεί ένα από τα πλουσιότερα νησιά της Μεσογείου σε αριθμό ειδών χλωρίδας ειδικά αν ληφθεί υπ'όψη ότι σε μια έκταση 8306 τετραγωνικών χιλιομέτρων απαντά το 28% του συνόλου των γνωστών taxa της ελληνικής χλωρίδας. Η ιδιαίτερη βιοποικιλότητα της κρητικής

χλωρίδας αποδίδεται στη γεωγραφική της θέση, στη γεωλογική ιστορία της και στη ποικιλία των μικροκλιματικών συνθηκών (Κυπριωτάκης, 1998). Ωστόσο, η ενδημική χλωρίδα της αποτελείται κυρίως από παλαιοενδημικά είδη και φαίνεται ότι η γεωγραφική απομόνωση του νησιού, τελικά, να συνέβαλε περισσότερο στη διατήρηση και λιγότερο στην εξέλιξη των ενδημικών taxa (Cardona & Contandriopoulos 1977, Ιατρού 1986, Montmollin 1987). Επιπλέον, στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος “Natura 2000”, καταγράφηκαν μόνο στη Κρήτη 55 τύποι οικοτόπων σε ένα σύνολο 109 όλης της Ελλάδας. Ο μεγάλος αυτός αριθμός μπορεί να αποδοθεί στο πολύμορφο διαμελισμό της, που χαρακτηρίζεται από βουνά, φαράγγια, νησίδες κ.λ.π. και δημιουργεί βιότοπους με ιδιαίτερες κλιματικές συνθήκες. Τα φυτά που υπάγονται στο πρόγραμμα έχουν διεθνές εμπορικό ενδιαφέρον με υψηλές τιμές πώλησης και λόγω της μοναδικότητας τους ενδείκνυνται για τη βιομηχανία της ανθοκομίας-αρχιτεκτονικής τοπίου (Maloupa et al 2008). Όσον αφορά τον ελληνικό χώρο, πρόσφατες μελέτες έχουν δείξει ότι υπάρχει μεγάλη εμπορική ζήτηση για τα ενδημικά φυτά της Ελλάδας τα οποία διακινούνται διαδικτυακά. Τα φυτά αυτά δε καλλιεργούνται σε ελληνικά φυτώρια αλλά εμπορεύονται πρωτίστως από φυτώρια της Ευρώπης, Αμερικής και Αυστραλίας (Krigas et al. 2014a).

Στη διπλωματική αυτή εργασία θα μελετηθούν κάποια από τα φυτά του προγράμματος τα οποία είναι τα εξής:

1. *Acantholimon androsaceum*
2. *Carlina diae* και
3. *Lomelosia minoana* subsp. *minoana*

Acantholimon androsaceum: Πρόκειται για έναν αγκαθωτό νάνο θάμνο των Κρητικών βουνών (ενδημικό στα Λευκά Όρη και στο Ψηλορείτη) που φύεται σε βραχώδεις ασβεστολιθικές περιοχές άνω των 1500 m και σχηματίζει ακανθώδη βλάστηση. Το ύψος του φυτού κυμαίνεται από 0,04-0,1cm. Τα φύλλα είναι πολύ πυκνά, γραμμικά και ημισφαιρικά στη βάση. Επιπλέον, είναι αρκετά λεπτά και η άκρη τους αρκετά μυτερή. Τα φύλλα της άνοιξης είναι γυμνά και έχουν μήκος 5 έως 10 χιλιοστά ενώ τα φύλλα του καλοκαιριού έχουν μήκος 7 έως 10,5 χιλιοστά και είναι είτε πυκνά και λαμπερά είτε πυκνά και τριχωτά. Το λουλούδι είναι ροζ, με πέντε πέταλα και ανθίζει από τον Ιούνιο μέχρι τον Αύγουστο, ενώ μπορεί να φτάσει και μέχρι το Σεπτέμβριο. Ο μίσχος του λουλουδιού είναι τριχωτός, μήκους 2-3 χιλιοστά και έχει ένα αυτί με μία έως τρεις αιχμές. Ο κάλλος είναι μεμβρανώδης, 8-10 χιλιοστά

και με πέντε πορφυρά νεύρα. Τα πέταλα είναι εξίσου κοκκινωπά. Όσον αφορά τη χρήση του, χρησιμοποιείται κυρίως ως καλλωπιστικός θάμνος σε βραχύτοπους.



Εικ.1 *Acantholimon androsaceum*

Carlina diae: Μικρό, λευκωπό θαμνώδες φυτό (χαμαίφυτο). Στη βάση του συνωστίζονται οι κοντοί μη-ανθοφόροι βλαστοί, με πολλά λευκοπράσινα φύλλα. Οι ανθοφόροι βλαστοί, με λίγα, μικρά φύλλα υψώνονται μέχρι τα 60 cm. Τα άνθη σχηματίζουν κίτρινα "κεφάλια", 1-4 σε κάθε βλαστό. Φυτρώνει σε υψόμετρο 0-150m ενώ ανθίζει τη περίοδο Ιουνίου-Ιουλίου (πρόγραμμα archi-med). Η Καρλίνα της Δίας έχει σχετικά περιορισμένη εξάπλωση και εξειδικευμένο αλλά γενικά δυσπρόσιτο ενδιαίτημα (παραθαλάσσιοι κρημνοί, ασβεστούχα πετρώματα). Η βόσκηση αποτελεί απειλή για το είδος στη νήσο Δία, όπου έχει προκαλέσει μεγάλη υποβάθμιση των πληθυσμών. Το συγκεκριμένο φυτό χρησιμοποιείται κυρίως για τη φαρμακευτική του δράση (διουρητικό, δερματικές παθήσεις) αλλά μπορεί να χρησιμοποιηθεί και καλλωπιστικό (Djordjevic, S., et al. 2005).



Εικ 2,3 : *Carlina diae*, Nicholas Turland

Lomelosia minoana subsp. minoana: Πρόκειται για ένα ενδημικό φυτό της Κρήτης το οποίο βρίσκεται στους ασβεστολιθικούς βράχους του όρους Δίκτη. Η Λομελόσια του Μίνωα πήρε το όνομα της από το Μίνωα, το μυθικό βασιλιά της Κνωσού, γιο του Δία και της Ευρώπης. Είναι ένας νάνος μαξιλαρόμορφος θάμνος, ύψους 10-13 cm και διάμετρο έως 40 cm. Τα φύλλα είναι αντίθετα με σχήμα ελλειψοειδές-ωοειδές και καλύπτονται από κοντό, μεταξένιο ασημί τρίχωμα. Η κεφαλή είναι σφαιρική, με διάμετρο 35-50(-55) mm ενώ το στέλεχος (μίσχος) είναι λευκό, καλυμμένο με τριχίδια, το οποίο ωστόσο μόλις που ξεπερνά τα φύλλα. Τα άνθη βγαίνουν σε κεφάλια με πολλά αγνά μπλε-ρόδινα ανθίδια τα οποία στη μέση του δίσκου είναι πιο κοντά και στη περιφέρεια μακρύτερα. Ανθοφορεί κατά κύριο λόγο Μάρτιο με Απρίλιο αλλά μπορεί να φτάσει μέχρι και το Μάιο . Ως προς τη χρήση του, αποτελεί καλλωπιστικό φυτό, κατάλληλο για αποκατάσταση διαταραγμένων βραχωδών περιοχών ενώ θεωρείται υπολειμματικό είδος με επιστημονική αξία.



Εικ 4,5: *Lomelosia minoana subsp. minoana*

1.1 ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ ΚΑΙ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ

Ο όρος αναπαραγωγή αναφέρεται στο τρόπο με τον οποίο τα φυτά δημιουργούν απογόνους και εξασφαλίζουν τη διαίωση του είδους στη φύση. Αντίθετα με τον όρο πολλαπλασιασμό εννοείται η αύξηση διαμέσου της αναπαραγωγικής διαδικασίας του αριθμού των ατόμων ενός φυτικού είδους με σκοπό τη καλλιέργεια αυτών. Η αναπαραγωγή των φυτών πραγματοποιείται με ποικίλους τρόπους καθώς τα φυτά που είναι αμετακίνητα στο φυσικό τους περιβάλλον εξαρτώνται από αυτή για την επιβίωση τους στο τόπο στον οποίο αυτοφύονται, τόσο για τον αποικισμό νέων περιοχών όσο και για την εξέλιξη και προσαρμογή τους στο περιβάλλον. Οι τρόποι αναπαραγωγής μπορούν να διακριθούν σε δύο τύπους που ο καθένας εξυπηρετεί με διαφορετικό τρόπο τις ανάγκες των φυτών:

- Την **εγγενή (φυλετική) αναπαραγωγή** που αφορά τη δημιουργία απογόνων μετά από ένωση (γονιμοποίηση) δύο γαμετών (ωάριο, γυρεόκοκκος) για τη δημιουργία ενός νέου κυττάρου, του ζυγωτού, από το οποίο προκύπτει το έμβρυο εντός του σπέρματος («σπόρος») και τελικά ο νέος οργανισμός. Οι απόγονοι που προκύπτουν είναι γενετικά διαφορετικοί τόσο σε σχέση με τους γονείς όσο και μεταξύ τους.
- Την **αγενή (μη φυλετική) αναπαραγωγή** που αφορά στη δημιουργία απογόνων χωρίς τη μεσολάβηση γαμετών, που βασίζεται στην ολοδυναμικότητα (αναγέννηση) και στην ικανότητα αποδιαφοροποίησης του φυτικού κυττάρου. Χαρακτηριστικό στοιχείο της αγενούς αναπαραγωγής είναι η γενετική σταθερότητα η οποία εξασφαλίζει απογόνους που είναι πιστά αντίγραφα των μητρικών φυτών.

1.2 ΕΓΓΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

Ο εγγενής (φυλετικός) πολλαπλασιασμός των ανώτερων φυτών πραγματοποιείται με τη παραγωγή σπερμάτων (σπόρων). Με τον όρο σπέρμα (σπόρος) εννοούμε τη φυλετική αναπαραγωγική μονάδα σε ένα φυτό. Βοτανικά, το σπέρμα είναι γονιμοποιημένη σπερμοβλάστη που περιέχει: α) ένα έμβρυο, συνήθως προϊόν γονιμοποίησης, β) αποθηκευτικό ιστό και γ) ένα εξωτερικό προστατευτικό περίβλημα.

1.2.1 Πολλαπλασιασμός με σπόρο

Ο πολλαπλασιασμός με σπέρματα («σπόρο») αποτελεί την κύρια μέθοδο με την οποία τα φυτά αναπαράγονται στη φύση αλλά και έναν από τους πιο αποτελεσματικούς και ευρέως διαδεδομένους τρόπους πολλαπλασιασμού φυτών.

Αποτελεί μία φθηνή και μαζική μέθοδος καθώς τα περισσότερα είδη παράγουν άφθονο σπόρο και αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη δυνατότητα παραγωγής σπόρων με το χαμηλότερο δυνατό κόστος. Επίσης, τα σπορόφυτα λόγω της ζωνρότητας/νεανικότητας τους και της μορφολογίας της ρίζα τους αναπτύσσονται πιο γρήγορα κατά τα πρώτα στάδια της ζωής τους. Ένα ακόμα πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι και οι λιγότερες πιθανότητες μετάδοσης ιώσεων μιας και οι περισσότερες ιώσεις δε μεταφέρονται με το σπόρο.

Η σύγχρονη γεωργία απαιτεί την καλλιέργεια απόλυτα όμοιων ατόμων και αυτό είναι το χαρακτηριστικό που αποτελεί το κύριο μειονέκτημα της μεθόδου καθώς αποτέλεσμα της είναι η αυξημένη γενετική παραλλακτικότητα. Ένα ακόμη πρόβλημα που μπορεί να δημιουργηθεί από τη χρήση σπερμάτων ή από την προμήθεια σπόρων από μη αξιόπιστες πηγές είναι η μειωμένη φυτρωτική ικανότητα λόγω πιθανής ύπαρξης ληθάργου σε κάποια είδη. Γενικά, τα σπέρματα μπορούν να διατηρήσουν τη φυτρωτική τους ικανότητα για μεγάλο χρονικό διάστημα. Όμως σε πολλά είδη δεν είναι κατάλληλα για βλάστηση αμέσως μετά το σχηματισμό τους.

1.3 ΑΓΕΝΗΣ ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ

1.3.1 Πολλαπλασιασμός με μοσχεύματα

Ο αγενής πολλαπλασιασμός είναι ο τρόπος με τον οποίο μπορούν να αναπαραχθούν φυτά που παρουσιάζουν επιθυμητά χαρακτηριστικά όπως για παράδειγμα όμορφο σχήμα και εντυπωσιακή ανθοφορία, αντοχή σε αντίξοες συνθήκες, περιεκτικότητα σε φαρμακευτικές ουσίες και πολλά ακόμη χαρακτηριστικά που θέλουμε να κρατήσουμε. Υπάρχουν διάφοροι τρόποι αγενούς πολλαπλασιασμού, από τους οποίους ο πιο εύκολος και οικονομικός είναι ο πολλαπλασιασμός με μοσχεύματα. Με τον όρο μόσχευμα εννοείται οποιοδήποτε τμήμα του φυτού, εκτός από αναπαραγωγικά όργανα, το οποίο τοποθετείται σε κατάλληλες συνθήκες για να σχηματίσει επίκτητες ρίζες ή και οφθαλμούς. Ο

επίκτητος αυτός σχηματισμός φυτικών οργάνων εξαρτάται από την ικανότητα των κυττάρων να επαναδιαφοροποιηθούν και να αναπτυχθούν σε ρίζες ή οφθαλμούς. Στη περίπτωση των μοσχευμάτων βλαστού, περιλαμβάνει τα εξής στάδια. Το πρώτο είναι η επαναδιαφοροποίηση ορισμένων κυττάρων ήδη διαφοροποιημένων (συνήθως παρεγχυματικών). Έπειτα, τα κύτταρα αυτά διαιρούνται και σχηματίζουν μάζες κυττάρων οι οποίες ονομάζονται 'root initials'. Τα τελευταία οργανώνονται με διαιρέσεις ως προς έναν άξονα και σχηματίζουν τις καταβολές των ριζών 'root primordia'. Στο τελευταίο στάδιο περιλαμβάνεται η σύνδεση των ριζικών καταβολών με το αγωγό σύστημα του φυτού και η επιμήκυνσή τους και τελικά έξοδό τους από τη ρίζα διαμέσου των ιστών (Hartmann 2002). Σε όλη αυτή τη διαδικασία επιδρούν πολλοί παράγοντες οι οποίοι μπορούν να χωριστούν σε τρεις κατηγορίες. Η πρώτη κατηγορία περιλαμβάνει παράγοντες που επιδρούν στη ριζοβολία των μοσχευμάτων πριν από της κοπή τους από το μητρικό φυτό. Η δεύτερη κατηγορία παραγόντων σχετίζεται με την ίδια την κοπή των μοσχευμάτων ενώ η τρίτη κατηγορία έχει σχέση με παράγοντες που επιδρούν μετά την κοπή των μοσχευμάτων από το μητρικό φυτό και αφορούν τις μεταχειρίσεις των μοσχευμάτων και το περιβάλλον ριζοβολίας. Όλοι αυτοί οι παράγοντες αναλύονται παρακάτω.

1.3.2 Πλεονεκτήματα – μειονεκτήματα πολλαπλασιασμού με μοσχεύματα

Τα πλεονεκτήματα του πολλαπλασιασμού με μοσχεύματα μπορούν να συνοψισθούν ως εξής:

1. *Δημιουργία ατόμων ακριβώς ομοίων με τα μητρικά φυτά.* Το μεγαλύτερο πλεονέκτημα της μεθόδου είναι η δημιουργία πιστών αντιγράφων του μητρικού φυτού το οποίο αποτελεί απαίτηση της σύγχρονης γεωργίας.
2. *Ομοιομορφία παραγόμενων φυτών.* Ο πολλαπλασιασμός με μοσχεύματα εξασφαλίζει την ομοιομορφία των τελικά παραγόμενων προϊόντων, εφόσον ακολουθούνται συγκεκριμένα πρωτόκολλα και τεχνικές στην ανάπτυξη της όλης καλλιέργειας.

Ωστόσο, η μέθοδος αυτή παρουσιάζει και μειονεκτήματα, κάποια από τα οποία είναι τα εξής:

1. *Περιορισμένο αρχικό υλικό-μεγάλο κόστος διατήρησης μητρικών φυτειών.* Για να υπάρξει αρκετό μητρικό υλικό, προκειμένου να γίνει μαζικός πολλαπλασιασμός με τη μέθοδο των μοσχευμάτων, είναι αναγκαία η δημιουργία και η διατήρηση μητρικών φυτειών. Για το λόγο αυτό απαιτούνται οι ανάλογες εκτάσεις χωραφιών, θερμοκηπίων αλλά και οι κατάλληλες καλλιεργητικές φροντίδες. Κατ'επέκταση το κόστος αυξάνεται.

2. *Υψηλό κόστος παραγωγής σε εξειδικευμένες εγκαταστάσεις.* Τα φυτά, κυρίως κατά τα πρώτα στάδια ζωής τους χρειάζονται εξειδικευμένες εγκαταστάσεις ή ειδικές τεχνικές που γίνονται τις περισσότερες φορές μέσα σε θερμοκήπια.

3. *Αυξημένες πιθανότητες μετάδοσης ασθενειών.* Η πιθανότητα εμφάνισης κάποιας ασθένειας είναι αυξημένη καθώς προσβολές μπορούν να συμβούν στις μητρικές φυτείες και να μη γίνουν άμεσα αντιληπτές. Επιπρόσθετα, η μετάδοση της ασθένειας μπορεί να γίνει και μέσω των εργαλείων που χρησιμοποιούνται. Για το λόγο αυτό, θα πρέπει να δίδεται ιδιαίτερη βαρύτητα στην υγιεινή κατάσταση των μητρικών φυτειών και στην όλη διαδικασία παραγωγής πολλαπλασιαστικού υλικού.

1.3.3 Παράγοντες που επιδρούν στη ριζοβολία των μοσχευμάτων πριν από την κοπή τους από το μητρικό φυτό

1) Γενότυπος

Υπάρχουν στοιχεία που αποδεικνύουν ότι η ριζοβολία των μοσχευμάτων υπόκειται σε έλεγχο γονιδίων (Haissig, 1986). Στη βιβλιογραφία υπάρχει πλήθος αναφορών για τη διαφορετική συμπεριφορά στη ριζοβολία των μοσχευμάτων τους μεταξύ των ειδών, μεταξύ κλώνων ενός είδους καθώς και μεταξύ των σπορόφυτων ενός συγκεκριμένου φυτού (Knox and Hamilton 1982, Constanzi k.a. 1988, Eccher 1988, Henry k.a. 1992, Carpenter and Cornell 1992, Schneck 1996). Κάποια είδη ριζοβολούν εύκολα ενώ δεν σχηματίζουν τέτοιες καταβολές. Υπάρχουν μεγάλες διαφορές μεταξύ των φυτών στην ικανότητα ριζοβολίας των μοσχευμάτων τους. Επιπλέον, είναι ευρέως γνωστό ότι κάποια φυτά πολλαπλασιάζονται εύκολα και κάποια δύσκολα. Οι βλαστοί για παράδειγμα του

τηλέγραφου (*Tradescandia sp*) εκπτύσσουν εύκολα ρίζες αν τοποθετηθούν σε ένα ποτήρι με νερό. Η ευκολία στον πολλαπλασιασμό αποτελεί ένα τρόπο επιλογής και επικράτησης ορισμένων ποικιλιών και αυτός είναι ένας βασικός λόγος που ορισμένα φυτά είναι διαδεδομένα σε μπαλκόνια και αυλές. Ποικιλίες που ριζοβολούν δύσκολα, παρόλο που παρουσιάζουν επιθυμητά χαρακτηριστικά, τείνουν να εκλείψουν. Φαίνεται ότι το χαρακτηριστικό της ικανότητας για ριζοβολία ελέγχεται από συγκεκριμένα γονίδια, τα οποία παρόλη τη πρόοδο που έχει επιτευχθεί παραμένουν άγνωστα.

2) Νεανικότητα

Ο βιολογικός κύκλος του φυτού περιλαμβάνει κατά γενική ομολογία τέσσερα στάδια, τα οποία είναι: το στάδιο του εμβρύου, το στάδιο της νεανικότητας, το μεταβατικό στάδιο και το στάδιο της ωριμότητας ή αναπαραγωγικής ικανότητας. Η ικανότητα για ριζοβολία είναι ένα χαρακτηριστικό το οποίο μεταβάλλεται μεταξύ των σταδίων που αναφέρθηκαν προηγουμένως. Το στάδιο της νεανικότητας είναι το στάδιο στο οποίο η ικανότητα για ριζοβολία μεγιστοποιείται (μέσα στα όρια που καθορίζει ο γενότυπος). Μοσχεύματα νεανικών βλαστών ριζοβολούν γρηγορότερα και σε μεγαλύτερο ποσοστό από ότι μοσχεύματα ώριμων βλαστών. Στη πράξη προκειμένου να ξεπεραστεί το πρόβλημα, εφαρμόζεται η ανανέωση (rejuvenation) των φυτών ώστε από το στάδιο της ωριμότητας να επανέλθουν στο στάδιο της νεανικότητας ή στο μεταβατικό στάδιο με την αυξημένη ικανότητα ριζοβολίας ή ακόμη να κρατηθούν σε νεανικότητα. Χαρακτηριστικές τεχνικές που χρησιμοποιούνται για την ανανέωση των φυτών και την επάνοδο της ικανότητας ριζοβολίας είναι:

- το πολύ αυστηρό κλάδεμα των φυτών
- ο εμβολιασμός ώριμων εμβολίων σε νεανικά υποκείμενα,
- η προαγωγή σχηματισμού επίκτητων βλαστών που παρουσιάζουν νεανικά υποκείμενα
- ο ψεκασμός με φυτορρυθμιστικές ουσίες (γιβεριλλίνες, κυτοκινίνες, ethephon)
- ο πολλαπλασιασμός *in vitro* των επιθυμητών κλώνων
- διατήρηση των μητρικών φυτών σε συνθήκες μακριας ημέρας στο θερμοκήπιο με τεχνητό φωτισμό, όταν πρόκειται για φωτοπεριοδικα

φυτά τα οποία όταν υποβληθούν σε συνθήκες ημέρας διαφοροποιούν τα άνθη τους.

3) Θερμοκρασία

Η επίδραση της θερμοκρασίας στην οποία αναπτύσσονται τα μητρικά φυτά δεν έχει διερευνηθεί επαρκώς γεγονός που δημιουργεί αρκετά προβλήματα. Ένα από τα προβλήματα που προκύπτουν αφορά τη διαφορά μεταξύ της θερμοκρασίας των φύλλων και της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος. Όταν πραγματοποιείται ένα πείραμα στο οποίο μελετώνται διαφορετικά επίπεδα φωτός, τότε γίνεται προσπάθεια ώστε η θερμοκρασία του περιβάλλοντος να διατηρείται σταθερή. Η θερμοκρασία των φύλλων όμως που αναπτύσσονται στις υψηλότερες εντάσεις φωτός είναι πιθανό να ανέλθει αρκετούς βαθμούς πιο πάνω από τη θερμοκρασία των φύλλων που αναπτύσσονται στις χαμηλότερες εντάσεις φωτός. Έτσι η διαφορετική συμπεριφορά στη ριζοβολία δε μπορεί εύκολα να αποδοθεί στο διαφορετικό επίπεδο φωτός γιατί τα μητρικά φυτά αναπτύχθηκαν σε διαφορετικά επίπεδα θερμοκρασιών.

4) Νερό

Όσον αφορά το νερό, τόσο η έλλειψη νερού όσο και η περίσσεια έχει σημαντική επίδραση στη ριζοβολία. Το κομμάτι της έλλειψης μελετήθηκε από τον Andersen και της συνεργάτες του (Pajagopal and Andersen 1980a and b, Rasmussen and Andersen 1980). Οι ερευνητές αυτοί, χρησιμοποιώντας διαλύματα πολυαιθυλενογλυκόλης (PE 6000), εξέθεσαν το ριζικό σύστημα των μητρικών φυτών σε αυτά, σε διαφορετική χρονική διάρκεια προκειμένου να πετύχουν διαφορετικά επίπεδα υδατικής καταπόνησης. Από τα φυτά που μελετήθηκαν συνέλεξαν μοσχεύματα και μελέτησαν τη ριζοβολία της. Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από τη μελέτη αυτή έδειξαν ότι η μικρή καταπόνηση των φυτών είχε θετική επίδραση στον αριθμό των ριζών αλλά μόνο όταν τα φυτά αναπτύχθηκαν στην υψηλότερη ένταση φωτός. Από την άλλη η περίσσεια νερού αν και με τη μορφή της κατάκλυσης του εδάφους βοηθάει στο σχηματισμό επίκτητων ριζών (Kawase, 1965), δεν έχει μελετηθεί ακόμα η επίδραση της στο σχηματισμό μοσχευμάτων.

5) Επίδραση φωτός

Το φως επιδρά με τρεις τρόπους στα φυτά και αυτοί είναι η ένταση, η διάρκεια και το μήκος κύματος. Τα αποτελέσματα των πειραμάτων που σχετίζονται με τη διαφορετική ένταση του φωτός στο οποίο αναπτύσσονται τα μητρικά φυτά και τη μετέπειτα ριζοβολία των μοσχευμάτων της δεν είναι αρκετά ξεκάθαρα (Andersen,1986). Έχουν διεξαχθεί πειράματα στα οποία η φυσική ένταση του φωτός μειώνεται με σκίαση των μητρικών φυτών το καλοκαίρι, σε άλλα εφαρμόζεται συμπληρωματικός φωτισμός το χειμώνα, κάποια δημιουργούνται εντελώς τεχνητά σε θαλάμους ανάπτυξης ενώ υπάρχει και μια ομάδα πειραμάτων που τα φυτά αναπτύσσονται στο φως ή σε πλήρη απουσία αυτού (εκχλοίωση). Ωστόσο, ακραίες τιμές έντασης του φωτός, δηλαδή πολύ μικρές ή πολύ υψηλές, οδηγούν σε μειωμένη ριζοβολία. Αυτό σχετίζεται με το γεγονός τόσο της ικανοποίησης των ενεργειακών απαιτήσεων της ριζοβολίας όσο και με τη σύνθεση και τη φωτοδιάσπαση της αυξίνης. Πέρα από αυτές της παραμέτρους, πρέπει να ληφθεί υπόψη και η αλληλεπίδραση της έντασης του φωτός με της παράγοντες, της για παράδειγμα με τη θερμοκρασία των φύλλων ή το υδατικό δυναμικό του φυτού.

Σημαντικό ρόλο στη μετέπειτα ριζοβολία των μοσχευμάτων κατέχει και η φωτοπερίδος στην οποία αναπτύσσονται τα μητρικά φυτά. Είναι γνωστό ότι η φωτοπερίδος ρυθμίζει την ανθοφορία καθώς και την είσοδο των φυτών σε λήθαργο. Μικρή φωτοπερίδος η οποία έχει ως αποτέλεσμα την εισαγωγή ορισμένων ειδών σε λήθαργο φαίνεται να έχει αρνητική επίδραση στη ριζοβολία των μοσχευμάτων της (Anand and Heberlein 1975, Roberts and Fuchigami 1973). Αλλά και η μεγάλη διάρκεια ημέρας η οποία εισάγει σε άνθηση ορισμένα είδη φυτών βρέθηκε ότι περιορίζει τη ριζοβολία μοσχευμάτων των φυτών αυτών (Moe,1977). Ωστόσο, υπήρξε και το παράδειγμα της τριανταφυλλιάς, η οποία αν και δεν είναι φωτοπεριοδικό φυτό, η μεγάλη διάρκεια της ημέρας φάνηκε να προάγει τη ριζοβολία της λόγω της μεγαλύτερης φωτοσύνθεσης (ποσοτική επίδραση) (Moe,1973).

Το φως της επιδρά και μέσω του μήκους κύματος και γι'αυτό φαίνεται να ευθύνεται ο μηχανισμός του φυτοχρώματος. Ο Stoutmeyer (1947, αναφερόμενος από Moe and Andersen 1988) ανακάλυψε ότι το μπλε φως είχε τα καλύτερα

αποτελέσματα στη ριζοβολία μοσχευμάτων. Ακόμη, για τη καλύτερη ριζοβολία μοσχευμάτων που προέρχονται από το κατώτερο μέρος της κόμης των φυτών (στα περισσότερα τουλάχιστον είδη) φάνηκε να σχετίζεται η αναλογία R/FR (κόκκινο/βαθύ κόκκινο) καθώς το κόκκινο φως φιλτράρεται από τα φύλλα (Poulsen and Andersen 1980, Leaky 1983, Hansen 1986).

6) Θρεπτικά στοιχεία

Τα ανόργανα θρεπτικά στοιχεία παίζουν σημαντικό ρόλο στη ριζοβολία των μοσχευμάτων που λαμβάνονται από τα μητρικά φυτά. Από πειράματα που έχουν διεξαχθεί, τα οποία μελετούσαν την επίδραση των θρεπτικών στοιχείων στη ριζοβολία προκύπτει ότι το άζωτο έχει τη μεγαλύτερη επίδραση. Της είναι γνωστό, το άζωτο είναι απαραίτητο στοιχείο στη σύνθεση των νουκλεϊκών οξέων και των πρωτεϊνών. Η σημασία του προέκυψε τόσο από πειράματα θρέψης των μητρικών φυτών όσο και από πειράματα ανακατανομής των θρεπτικών στοιχείων στο μόσχευμα κατά τη διάρκεια της ριζοβολίας (Ρούσσο, 2008).

Εκτός από το άζωτο για το οποίο έγινε αναφορά παραπάνω, για τα υπόλοιπα μακροστοιχεία και ιχνοστοιχεία δεν είναι ξεκάθαρη η επίδραση της στο σχηματισμό ριζικών καταβολών.

7) Υδατάνθρακες

Οι υδατάνθρακες παίζουν σημαντικό ρόλο στο μεταβολισμό του φυτού γιατί είναι πηγή ενέργειας, αποτελούν δομικό στοιχείο των κυττάρων και συμμετέχουν στο σχηματισμό μεγάλων μακρομορίων (Haissig,1986). Τα αποτελέσματα των ερευνών που αφορούν τη σχέση της με τη ριζοβολία μοσχευμάτων. Κάποιους από τους ρόλους που συμβάλλουν στη μπερδεμένη κατάσταση είναι η μη ταυτόχρονη έρευνα επί των ανατομικών αλλαγών που συμβαίνουν στα μοσχεύματα κατά τη διάρκεια της ριζογένεσης. Της φορές δε λαμβάνεται υπόψη ότι ο ρόλος των υδατανθράκων μπορεί να είναι διαφορετικός κατά τη ριζοβολία φυλλοφόρων και άφυλλων μοσχευμάτων ακόμα και του ίδιου είδους (Ρούσσο,2008). Σε γενικά πλαίσια, βάση των πειραμάτων που έχουν διεξαχθεί, οι υδατάνθρακες παίζουν θετικό ρόλο στη ριζοβολία αλλά της ο ρόλος δεν είναι ρυθμιστικός (Henry ka 1992). Είναι αποδεκτό ότι το επίπεδο των υδατανθράκων του μοσχεύματος θα πρέπει να είναι υψηλό ώστε να υποστηρίξει ενεργειακά τη ριζοβολία του

μοσχεύματος κατά τη ριζογένεση και ιδιαίτερα όταν αυτή πραγματοποιείται υπό χαμηλή φωτοσυνθετική δραστηριότητα (Ρούσσοσ,2008).

Ακόμη, η αναλογία μεταξύ THΣ και (N) έχει καθοριστικό ρόλο στη ριζοβολία. Υψηλή αναλογία C/N στον ιστό των βλαστών δίνει υψηλότερα ποσοστά ριζοβολία αλλά αυτό δε μπορεί να θεωρηθεί αξιόπιστο κριτήριο. Ο Hambrick(1991) διαπίστωσε ότι μείωση της συγκέντρωσης του αζώτου αυξάνει το λόγο C/N που σημαίνει ότι μεγάλη συσχέτιση του λόγου αυτού με τη ριζοβολία οφείλεται στη συγκέντρωση του αζώτου.

8) Διοξειδίο του άνθρακα

Εμπλουτισμός της ατμόσφαιρας που περιβάλλει τα μητρικά φυτά με CO₂ συνήθως οδηγεί στο σχηματισμό περισσότερων βλαστών κατάλληλων να χρησιμοποιηθούν ως μοσχεύματα και μεγαλύτερο αριθμό ριζών. Ο εμπλουτισμός με CO₂ οδηγεί σε αυξημένους ρυθμούς φωτοσύνθεσης (Ehnlengine, 1979), αυξημένη βλαστική αύξηση και έκπτυξη πλάγιων οφθαλμών στα μητρικά φυτά. Μοσχεύματα από μητρικά φυτά που αναπτύχθηκαν σε εμπλουτισμένη με CO₂ ατμόσφαιρα έχουν αυξημένη συγκέντρωση υδατανθράκων και μεγαλύτερο ξηρό βάρος (Haaland 1976).

9) Δακτυλίωση

Η τεχνική αυτή συνίσταται στην αφαίρεση ενός δακτύλιου φλοιού από το βλαστό ο οποίος θα κοπεί αργότερα ως μόσχευμα. Η δακτυλίωση αυτή μπλοκάρει τη κίνηση προς τα κάτω ορμονικών ουσιών, υδατανθράκων και άλλων ουσιών που εμπλέκονται στη ριζοβολία με αποτέλεσμα να συγκεντρώνονται στη ζώνη ακριβώς πάνω από το σημείο αφαίρεσης του φλοιού. Με τη μέθοδο αυτή έχουν πολλαπλασιαστεί φυτά που ριζοβολούν δύσκολα. Αν και αποτελεί χρονοβόρα διαδικασία είναι χρήσιμη για το πολλαπλασιασμό άγριων κλώνων που παρουσιάζουν επιθυμητά χαρακτηριστικά (Dirr 1987).

1.3.4 Παράγοντες που επιδρούν στη ριζοβολία κατά τη κοπή των μοσχευμάτων

1.1 Τύπος μοσχεύματος

Σύμφωνα με το Hartmann 2002, τα μοσχεύματα ανάλογα με το τμήμα του φυτού από το οποίο προέρχονται χωρίζονται σε μοσχεύματα βλαστού, μοσχεύματα φύλλου, μοσχεύματα φύλλου-οφθαλμού και μοσχεύματα ριζών. Επιπλέον, τα μοσχεύματα βλαστού χωρίζονται και ανάλογα με τη κατάσταση των ιστών σε μοσχεύματα σκληρού ξύλου (στα οποία υπάγονται τα μοσχεύματα φυλλοβόλων φυτών, πλατύφυλλων αειθαλών, και μοσχεύματα κωνοφόρων), ημίσκληρου ξύλου, μαλακού ξύλου και ποώδη μοσχεύματα.

Ανεξάρτητα από τον τύπο, τα μοσχεύματα πρέπει να λαμβάνονται από μητρικά φυτά απαλλαγμένα από εχθρούς και ασθένειες, εξακριβωμένης ποικιλίας και δεν υποφέρουν από έλλειψη ή περίσσεια νερού και θρεπτικών στοιχείων. Επίσης η βλάστηση τους δεν πρέπει να είναι υπερβολικά ζωηρή (Dirr 1987).

Χρονικά, τα μοσχεύματα σκληρού ξύλου αντιπροσωπεύουν τη χειμερινή περίοδο μετά την είσοδο των φυτών σε λήθαργο. Στα φυλλοβόλα φυτά έχουν πέσει τα φύλλα και οι βλαστοί έχουν σκληρύνει πολύ. Τα μοσχεύματα λαμβάνονται από τέτοιους ώριμους βλαστούς αποφεύγοντας συνήθως το κορυφαίο τμήμα, που πιθανόν να είναι ανώριμο και περιέχει λιγότερες αποθηκευμένες ουσίες. Ο τύπος αυτός του μοσχεύματος είναι η πιο οικονομική μέθοδος πολλαπλασιασμού. Δεν απαιτεί ιδιαίτερες εγκαταστάσεις και η ριζοβολία μπορεί να γίνει στο χωράφι. Υπάρχουν τέσσερις τρόποι χειρισμού των φυλλοβόλων μοσχευμάτων που χρησιμοποιούνται. Με τον πρώτο τρόπο γίνεται απευθείας η τοποθέτηση τους στο έδαφος το φθινόπωρο. Η μέθοδος αυτή χρησιμοποιείται σε περιοχές με ήπιους χειμώνες. Η ριζοβολία λαμβάνει χώρα κατά τη περίοδο του ληθάργου των οφθαλμών ή την άνοιξη ταυτόχρονα με την έκπτυξη των οφθαλμών. Στη δεύτερη μέθοδο η τοποθέτηση των μοσχευμάτων γίνεται σε υγρό και θερμό περιβάλλον πριν από τη φύτευση τους στο χωράφι. Ο τρόπος αυτός αποσκοπεί στο σχηματισμό ριζικών καταβολών και την επιτάχυνση της ριζοβολίας όταν τα μοσχεύματα φυτευτούν στο χωράφι. Μετά τη κοπή τους τα μοσχεύματα μεταχειρίζονται με διάλυμα αυξίνης και αποθηκεύονται σε υγρές συνθήκες στους 18-21°C για 3-5 εβδομάδες. Στη συνέχεια είτε φυτεύονται απευθείας στο χωράφι είτε αποθηκεύονται σε ψυγείο μέχρι την άνοιξη. Η Τρίτη

μέθοδος αφορά τη τοποθέτηση των μοσχευμάτων σε σύστημα 'υπεδάφιας θέρμανσης', στο οποίο οι βάσεις μοσχευμάτων θερμαίνονται στους 18-21°C είτε με ηλεκτρική αντίσταση είτε με κυκλοφορία ζεστού νερού. Οι κορυφές των μοσχευμάτων διατηρούνται σε χαμηλές θερμοκρασίες και έτσι δεν επιτρέπεται η έκπτυξη των οφθαλμών. Μόλις εμφανιστούν οι ρίζες, τα μοσχεύματα φυτεύονται στο χωράφι. Στη τελευταία μέθοδος χειρισμού των μοσχευμάτων σκληρού ξύλου φυλλοβόλων φυτών γίνεται η απευθείας φύτευση τους στο χωράφι την άνοιξη. Τα μοσχεύματα λαμβάνονται τη περίοδο του ληθάργου και αποθηκεύονται με το κατάλληλο τρόπο σε ψυγείο μέχρι την άνοιξη. Έπειτα κόβονται στο κατάλληλο μήκος και φυτεύονται.

Ωστόσο στη κατηγορία μοσχεύματος σκληρού ξύλου, υπάρχουν και αειθαλή πλατύφυλλα και κωνοφόρα. Και αυτές οι κατηγορίες μοσχευμάτων σχετίζονται με τη περίοδο το ληθάργου, με τη διαφορά ότι τα μοσχεύματα έχουν φύλλα και η μεταχείριση τους πρέπει να γίνει με τέτοιο τρόπο ώστε να μην αφυδατωθούν. Η ριζοβολία τους γίνεται συνήθως σε σύστημα υδρονέφωσης ή με κάλυψη με φύλλο πολυαιθυλενίου.

Τα μοσχεύματα ημίσκληρου ξύλου καλύπτουν τη περίοδο από τον Ιούλιο μέχρι τα μέσα του Σεπτεμβρίου. Η επιμήκυνση της βλάστησης σταματά, το ξύλο σκληραίνει και τα φύλλα έχουν σχεδόν όλα το ίδιο μέγεθος. Τα μοσχεύματα αυτά δεν είναι τόσο ευαίσθητα στην απώλεια υγρασίας καθώς οι ιστοί είναι σκληρότεροι και έτσι η μεταχείριση τους είναι ευκολότερη. Στη κατηγορία αυτή υπάγονται μοσχεύματα τόσο φυλλοβόλων όσο και αειθαλών φυτών.

Μοσχεύματα μαλακού ξύλου χαρακτηρίζονται μοσχεύματα που παίρνονται από βλαστούς την άνοιξη και νωρίς το καλοκαίρι όταν αυτοί αναπτύσσονται. Τα φύλλα δεν έχουν όλα το ίδιο μέγεθος και οι ίδιοι οι βλαστοί είναι εύθραυστοι στη προσπάθεια να τους λυγίσουμε. Έχουν τη τάση να μαραίνονται αμέσως μετά τη κοπή τους ενώ υπερβολικά τρυφεροί βλαστοί σαπίζουν στη βάση τους κατά τη ριζοβολία. Ένα μόσχευμα μαλακού ξύλου προκειμένου να ριζοβολήσει χρειάζεται από λίγες μέρες έως 4-5 εβδομάδες. Η χρονική διάρκεια που οι βλαστοί των φυτών βρίσκονται στη κατάσταση αυτή εξαρτάται από το είδος του φυτού και το περιβάλλον στο οποίο αναπτύσσεται.

Ως ποώδη μοσχεύματα χαρακτηρίζονται τα μοσχεύματα φυτών που λαμβάνονται από σαρκώδεις βλαστούς μη ξυλοποιημένων φυτών όπως το πελαργόνιο, το χρυσάνθεμο και η γαρυφαλλιά (Hartmann κ.α. 2002). Έχουν μήκος

8 ως 13 cm και ο χειρισμός τους είναι ανάλογος των μοσχευμάτων μαλακού ξύλου. Η μεταχείριση με φυτικό ρυθμιστή βοηθά στην ομοιόμορφη και πιο πλούσια ριζοβολία των μοσχευμάτων παρόλο που συχνά δεν είναι απαραίτητη. Επιπλέον θετική επίδραση έχει και η θέρμανση της βάσης τους. Ορισμένα φυτά όπως το πελαργόνιο και τα παχύφυτα, τα μοσχεύματα αφήνονται για μια εβδομάδα σε κλειστό χώρο για να σχηματίσουν προστατευτικό ιστό οι τομές και μετά τοποθετούνται στο υπόστρωμα ριζοβολίας (Hartmann k.a. 2002). Με τη τεχνική αυτή φαίνεται να μειώνονται οι προσβολές από μικροοργανισμούς.

Όσον αφορά τα μοσχεύματα φύλλου, το έλασμα του φύλλου ή το έλασμα και ο μίσκος είναι αυτά που χρησιμοποιούνται για τη παραγωγή νέων φυτών. Σε σχέση με τα μοσχεύματα των βλαστών, τα μοσχεύματα αυτά πρέπει να σχηματίσουν εκτός από ρίζες και επίκτητους βλαστούς και οφθαλμούς. Τα μοσχεύματα αυτά τοποθετούνται στην υδρονέφωση και συχνά εφαρμόζονται κυτοκινίνες προκειμένου να σχηματιστούν επίκτητοι βλαστοφόροι οφθαλμοί.

Τα μοσχεύματα φύλλου με οφθαλμό αποτελούνται από ένα φύλλο και τον οφθαλμό που υπάρχει στη βάση του μίσχου με το βλαστό. Τα μοσχεύματα αυτά δε χρησιμοποιούνται ευρέως, παρά μόνο για το πολλαπλασιασμό της κληματίδας, του *Acer rubrum* και λίγων ακόμη φυτών (Dirr 1987).

Με μοσχεύματα ριζών μπορούν μόνο να πολλαπλασιαστούν είδη που έχουν την ικανότητα σχηματισμού επίκτητων οφθαλμών και βλαστών, καθώς αυτός είναι ο περιοριστικός παράγοντας. Η δυσκολία αυτής της μεθόδου είναι στο να βρεθεί το υλικό για το πολλαπλασιασμό. Η συγκομιδή των ριζών για τη κοπή των μοσχευμάτων πρέπει να γίνεται τη περίοδο του ληθάργου ώστε να υπάρχουν αποθηκευμένες ουσίες στις ρίζες.

1.3.5 Παράγοντες που επιδρούν στη ριζοβολία μετά τη κοπή των μοσχευμάτων

1. Αποθήκευση μοσχευμάτων

Πολύ συχνό είναι το φαινόμενο της αποθήκευσης των μοσχευμάτων μέχρι τη τοποθέτησή τους για ριζοβολία. Οι λόγοι αυτοί αφορούν είτε την αδυναμία άμεσης προετοιμασίας των μοσχευμάτων και τοποθέτησή τους για ριζοβολία είτε γιατί αυτά θα πρέπει να μεταφερθούν μακριά είτε με προγραμματισμό των

εργασιών του φυτωρίου. Οι συνθήκες και η μέγιστη διάρκεια αποθήκευσης σχετίζονται με το είδος του φυτού αλλά και με το βαθμό ξυλοποίησης τους. Έμφαση θα πρέπει να δοθεί στη σχετική υγρασία του χώρου αποθήκευσης προκειμένου να μην αφυδατωθούν τα μοσχεύματα.

2. Επίδραση φυτικών ρυθμιστών

Οι φυτικοί ρυθμιστές ή φυτορρυθμιστικές ουσίες είναι οργανικές ουσίες χαμηλού μοριακού βάρους που σε μικρές συγκεντρώσεις ρυθμίζουν την αύξηση και ανάπτυξη των φυτών και είτε είναι φυσικές (ενδογενείς) είτε παράγονται τεχνητά (συνθετικές). Στους φυτικούς ρυθμιστές ανήκουν και οι ενδογενείς ορμόνες. Υπάρχουν πέντε κατηγορίες φυτικών ουσιών και αυτοί είναι οι αυξίνες, οι κυτοκινίνες, οι γιββεριλλίνες, το αμπισικό οξύ (ABA) και το αιθυλένιο.

3. Τραυματισμός

Αν και στα περισσότερα είδη ο επιπρόσθετος τραυματισμός της βάσης του μοσχεύματος, πέρα από την αποκοπή του από το μητρικό φυτό, δεν είναι απαραίτητος, σε ορισμένα είδη προάγει τη παραγωγή ριζών (Dirr and Heuser 1987). Ο τραυματισμός επιδρά στο μεταβολισμό του μοσχεύματος το οποίο προσπαθεί να κλείσει τη πληγή για να περιοριστούν οι υδατικές απώλειες και είσοδος μικροοργανισμών. Στο σημείο του τραυματισμού προκαλείται συγκέντρωση υδατανθράκων και αυξινών, λιπαρών οξέων και φαινολών (Wilson and Van Staden, 1990). Επιπλέον προκαλείται παραγωγή αιθυλενίου (Robbins, 1983). Η λύση της συνέχειας των κυτταρικών τοιχωμάτων και μεμβρανών κατά το τραυματισμό προάγει την αύξηση της συγκέντρωσης καταβολικών ενζύμων όπως υπεροξειδασών, φωσφολιπασών, λιποξυγενασών και γλυκανασών (De Klerk and 1999). Πιστεύεται ότι τα προϊόντα καταβολισμού των δομών των κυττάρων από τα παραπάνω ένζυμα προάγει το σχηματισμό ριζών.

4. Υπόστρωμα ριζοβολίας

Τα μοσχεύματα μετά τις διάφορες μεταχειρίσεις πρέπει να τοποθετηθούν σε κάποιο υπόστρωμα για να ριζοβολήσουν. Άρα η πρώτη λειτουργία που πρέπει να επιτελέσει ένα υπόστρωμα είναι η στήριξη και στη συνέχεια είναι η παροχή νερού και ο σωστός αερισμός.

5. Θερμοκρασία

Η διαδικασία της ριζοβολίας είναι μια μεταβολική διαδικασία και ως τέτοια επηρεάζεται από τη θερμοκρασία. Συνίσταται (Hartmann ka 2002) ως θερμοκρασία υποστρώματος αυτή των 18-25°C για φυτικά είδη από εύκρατες περιοχές, και θερμοκρασία ανώτερη κατά 7°C για είδη εύκρατων περιοχών. Ακόμη, η θερμοκρασία στην οποία αναπτύσσονται τα μητρικά φυτά φαίνεται να σχετίζεται με την άριστη θερμοκρασία για τη ριζοβολία των μοσχευμάτων (Andersen 1986).

1.4 ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Με τον όρο καλλιέργεια ιστών αναφέρεται συνήθως η *in vitro* ασυπτική καλλιέργεια κυττάρων, ιστών, οργάνων ή ολόκληρου του φυτού υπό ελεγχόμενες διατροφικές και περιβαλλοντικές συνθήκες, με σκοπό να παραχθούν κλώνοι πανομοιότυποι με τα μητρικά φυτά (Altaf H., I. A. Qarshi, Hummera N. and I. Ullah 2012). Ο όρος ιστοκαλλιέργεια χρησιμοποιείται συνήθως για να περιγράψει όλα τα είδη της *in vitro* φυτικής καλλιέργειας. Ωστόσο, τα είδη ιστοκαλλιέργειας που χρησιμοποιούνται περισσότερο είναι:

- I. Οι καλλιέργειες οργανωμένων δομών
- II. Οι καλλιέργειες αδιαφοροποίητων κυττάρων
- III. Οι καλλιέργειες που προέρχονται από μεμονωμένα κύτταρα

1.4.1 Καλλιέργειες οργανωμένων δομών

Η καλλιέργεια οργάνων (*organ culture*) χρησιμοποιείται ως ένας γενικός όρος για αυτούς τους τύπους καλλιέργειας στους οποίους μια οργανωμένη μορφή ανάπτυξης μπορεί να διατηρηθεί συνεχώς. Περιλαμβάνει την ασηπτική απομόνωση από ολόκληρα φυτά με συγκεκριμένες δομές όπως νεαρά φύλλα που

σχηματίστηκαν πρόσφατα, πρώιμα άνθη και φρούτα. Τα διαφοροποιημένα φυτικά όργανα μπορούν συνήθως να αναπτυχθούν σε καλλιέργεια χωρίς απώλεια ακεραιότητας. Μπορούν να είναι δύο τύπων:

- Αδιαφοροποίητα όργανα (indeterminate organs), που η ανάπτυξη τους είναι απεριόριστη και τα οποία διακρίνονται σε:

- Καλλιέργειες μεριστωμάτων και βλαστικών κορυφών (meristem and shoot tip culture), όπου σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα σχηματίζονται μικροί βλαστοί που είναι ικανοί να σχηματίσουν ρίζες.

- Καλλιέργειες εμβρύων (embryo culture), γονιμοποιημένα ή αγονιμοποιητά ζυγωτικά έμβρυα απομακρύνονται από τα σπέρματα και καλλιεργούνται in vitro μέχρι να εξελιχθούν σε σπορόφυτα.

- Καλλιέργειες ριζών (roots culture), μπορούν να εγκατασταθούν από ριζικά μεριστώματα που λαμβάνονται από πολλά φυτά.

- Διαφοροποιημένα όργανα (determinate organs), ένα όργανο προκύπτει από μια ομάδα μεριστωματικών κυττάρων. Η κατάσταση όμως διαφέρει για τα όργανα που βρίσκονται σε πρώιμο στάδιο ανάπτυξης καθώς το όργανο που δημιουργείται in vitro μπορεί να είναι μικρότερο από το μητρικό φυτό in vivo.

1.4.2 Καλλιέργειες αδιαφοροποίητων κυττάρων

- Καλλιέργεια κάλλων (callus culture). Ο κάλλος είναι ένας συμπαγής και άμορφος ιστός που σχηματίζεται όταν τα φυτικά κύτταρα πολλαπλασιάζονται με άτακτο τρόπο. Η εγκατάσταση καλλιέργειας κάλλου in vitro μπορεί να γίνει τοποθετώντας μικρά τμήματα από το φυτό σε ένα θρεπτικό υπόστρωμα κάτω από ασυπτικές συνθήκες.

- Καλλιέργειες αιωρημάτων κυττάρων (cell suspension culture). Τα αδιαφοροποίητα φυτικά κύτταρα που αναπτύσσονται σε μορφή κάλλου είναι δυνατόν να διαχωριστούν μεταξύ τους αν καλλιεργηθούν σε υγρό υπόστρωμα με συνεχή ανάδευση. Οι καλλιέργειες αιωρημάτων ξεκινούν

συνήθως τοποθετώντας τμήματα κάλλου σε υγρό υπόστρωμα όπου υπό συνεχή ανάδευση τα μεμονωμένα κύτταρα αποχωρίζονται και σχηματίζουν νέες κυτταρικές αλυσίδες ή μικρές ομάδες.

1.4.3 Καλλιέργειες που προέρχονται από μεμονωμένα κύτταρα

- Καλλιέργειες σειρών που προέρχονται από μεμονωμένα κύτταρα (single cell culture). Οι καλλιέργειες μπορούν να ξεκινήσουν από μεμονωμένα φυτικά κύτταρα με τη βοήθεια κατάλληλων τεχνικών. Συχνά αυτές περιλαμβάνουν τη διέλευση κυττάρων που καλλιεργούνται σε εναιώρημα, μέσω φίλτρου που αφαιρεί τα αδρανή συσσωματώματα κυττάρων και επιτρέπει τη διέλευση μόνο μεμονωμένων κυττάρων και πολύ μικρών ομάδων κυττάρων.

- Καλλιέργειες πρωτοπλαστών (protoplast culture). Ο πρωτοπλάστης είναι το ζωντανό μέρος ενός φυτικού κυττάρου, το οποίο αποτελείται από το κυτταρόπλασμα, το πυρήνα, οργανίδια και δομές εκτός από το κυτταρικό τοίχωμα. Οι πρωτοπλάστες παράγονται κυρίως με ενζυμική απομάκρυνση του κυτταρικού τοιχώματος σε διάλυμα με κατάλληλη ωσμωτική πίεση και αν καλλιεργηθούν στο κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα μπορούν να ανασχηματίσουν το κυτταρικό τοίχωμα και να διαιρεθούν.

1.4.4. Μικροπολλαπλασιασμός – Πλεονεκτήματα και μειονεκτήματα

Οι μέθοδοι που διατίθενται για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό των φυτών, είναι σε μεγάλο βαθμό μια επέκταση εκείνων που έχουν ήδη αναπτυχθεί με το συμβατικό πολλαπλασιασμό. Κάποια από τα **πλεονεκτήματα** που έχουν οι *in vitro* τεχνικές σε σχέση με τις παραδοσιακές μεθόδους είναι:

- Οι αρχικές εγκαταστάσεις μπορούν να δημιουργηθούν με ένα πολύ μικρό αριθμό φυτικού υλικού (μόνο ένα υγιές φυτό), γεγονός που διευκολύνει τη διατήρηση των μητρικών φυτών καθώς απαιτείται πολύ λίγος χώρος και ενέργεια για τη συντήρησή τους.

- Η διαδικασία του μικροπολλαπλασιασμού πραγματοποιείται υπό ασηπτικές συνθήκες που εξασφαλίζουν τη παραγωγή υγιών φυτών καθώς η διαδικασία είναι τέτοια που αποκλείει τη προσβολή τόσο από μύκητες, βακτήρια όσο και από άλλους μικροοργανισμούς. Βασική προϋπόθεση, όπως αναφέρθηκε και παραπάνω, να είναι οι αρχικές εγκαταστάσεις καθαρές.
- Ο ρυθμός παραγωγής φυτών είναι μεγαλύτερος από κάθε άλλη μέθοδο αγενούς πολλαπλασιασμού. Πολύ μεγάλες ποσότητες μπορούν να παραχθούν σε πολύ μικρό χρονικό διάστημα. Σε αυτό συμβάλλει ιδιαίτερα η ευέλικτη προσαρμογή των παραγόντων που επηρεάζουν τον αγενή πολλαπλασιασμό όπως θρεπτικές ουσίες, ρυθμιστές ανάπτυξης, το φως και η θερμοκρασία.
- Δίνεται η δυνατότητα εύκολης αναπαραγωγής φυτών σε κάποια είδη που με άλλους τρόπους ήταν αργή, δύσκολη ή ακόμη και αδύνατη.
- Επιπλέον, υπάρχει η δυνατότητα διατήρησης του αναπαραγόμενου φυτικού υλικού, στο ψυγείο, για μεγάλο χρονικό διάστημα.
- Δίνεται η δυνατότητα γρήγορης αναπαραγωγής νέων ή βελτιωμένων ποικιλιών ή υβριδίων που προέρχονται από βελτιωτικά προγράμματα. Τα φυτά αυτά, μπορεί να αποκτήσουν νέα προσωρινά χαρακτηριστικά που θα τα κάνουν πιο επιθυμητά στον καλλιεργητή σε σχέση με τα συμβατικά.
- Η παραγωγή μπορεί να συνεχιστεί όλο το χρόνο, ανεξάρτητα από τις καιρικές συνθήκες. Ωστόσο η μέθοδος αυτή, κάτω από συγκεκριμένες συνθήκες, μπορεί να προμηθεύσει μεγάλο αριθμό από φυτά ελεύθερα ώσεων. (Edwin F. George, 2008)

Όσον αφορά τα μειονεκτήματα της μεθόδου, συνοψίζονται παρακάτω:

- Για την επιτυχή πραγματοποίηση της μεθόδου απαιτούνται εξειδικευμένες εγκαταστάσεις και προσωπικό. Ακόμη, για να ληφθούν τα βέλτιστα αποτελέσματα από κάθε είδος και ποικιλία θα χρειαστούν αρκετά ειδικές μέθοδοι. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, το κόστος παραγωγής να αυξάνεται αντίστοιχα.

- Πολλές από τις εργασίες δεν είναι ακόμη δυνατό να αυτοματοποιηθούν, γεγονός που σημαίνει ότι τα εργατικά αποτελούν το κύριο ποσοστό του κόστους παραγωγής. Αυτός είναι και ένας λόγος που η μέθοδος αυτή μπορεί να θεωρηθεί οικονομικά ασύμφορη, καθώς σε χώρες με υψηλό κόστος εργατικών αυτό αποτελεί το σημαντικότερο μειονέκτημα.
- Έχουν υπάρξει περιπτώσεις που κατά τη διάρκεια της ιστοκαλλιέργειας τα φυτά ανέπτυξαν ανεπιθύμητα χαρακτηριστικά.
- Προκειμένου τα φυτά να επιβιώσουν σε συνθήκες ιστοκαλλιέργειας, τα θρεπτικά υποστρώματα τους περιέχουν σακχαρόζη ή κάποια άλλη πηγή άνθρακα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα, τα φυτά να μην είναι εξαρχής σε θέση να παράγουν τη δική τους απαραίτητη οργανική ύλη από τη φωτοσύνθεση και γι' αυτό να πρέπει να υποβληθούν σε μια περίοδο εγκλιματισμού μέχρι να γίνουν ικανά για ανεξάρτητη ανάπτυξη.
- Οι πιθανότητες παραγωγής γενετικά ανώμαλων φυτών μπορεί να αυξηθούν. (Edwin F. George ,2008)

1.5 ΣΚΟΠΟΣ

Τα φυτά *Carlina diae*, *Acantholimon androsaceum* και *Lomelosia minoana subsp minoana* αποτελούν ενδημικά φυτά της Κρήτης τα οποία έχουν ιδιαίτερη καλλωπιστική, φαρμακευτική και αρωματική αξία. Οι πληθυσμοί των τριών φυτών είναι αρκετά περιορισμένοι γι' αυτό και στη χώρα μας δεν είναι ιδιαίτερα διαδεδομένα είδη. Έτσι, κρίνεται σκόπιμη η διερεύνηση μεθόδων που θα συμβάλλουν στη παραγωγή υγιούς και τυποποιημένου πολλαπλασιαστικού υλικού. Για το λόγο αυτό, στη παρούσα εργασία έγινε προσπάθεια για τη δημιουργία ενός κατάλληλου πρωτοκόλλου πολλαπλασιασμού *in vitro* αλλά και μοσχεύματος, που θα βοηθήσει στην αναπαραγωγή των φυτών σε εμπορική κλίμακα.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Αναπαραγωγή και πολλαπλασιασμός με τη μέθοδο των μοσχευμάτων

Το μήνα Μάιο συλλέχθηκαν μοσχεύματα κορυφής από τα είδη *Acantholimon androsaceum*, *Carlina diae* και *Lomelosia minoana subsp. minoana*, τα οποία προήλθαν από μητρικά φυτά που βρίσκονται στο Ινστιτούτο Γενετικής Βελτίωσης και Φυτογενετικών Πόρων. Στο πίνακα 1 αναφέρεται το μήκος των μοσχευμάτων από κάθε είδος.

Πίνακας 1 Είδη φυτών και μήκος των μοσχευμάτων που χρησιμοποιήθηκαν

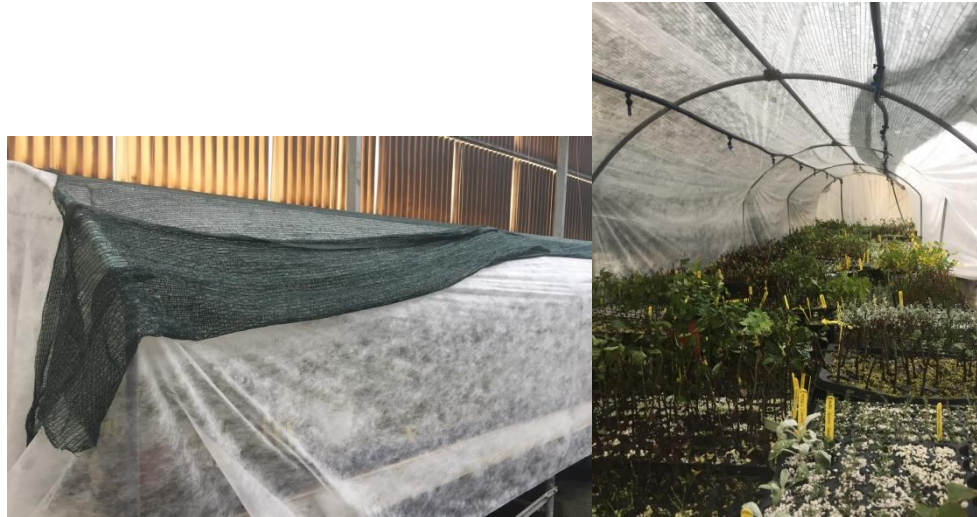
Είδος φυτού	Μήκος μοσχεύματος
<i>Acantholimon androsaceum</i>	1-1,5 cm
<i>Carlina diae</i>	3,5-4 cm
<i>Lomelosia minoana subsp. minoana</i>	3-4 cm

Αφού συλλέχθηκε ο απαραίτητος αριθμός μοσχευμάτων (21 ανά επέμβαση), εμβαπτίστηκαν σε υγρή ορμόνη ινδολοβουτυρικού οξέος (IBA) για 10 sec.

Έγιναν 4 διαφορετικές επεμβάσεις IBA(ινδολοβουτυρικού οξέος):

1. Μάρτυρας με 50% αλκοόλη
2. 1000 ppm IBA(50% αλκοόλη)
3. 2000 ppm IBA (50% αλκοόλη)
4. 4000 ppm IBA (50% αλκοόλη)

Στη συνέχεια τα μοσχεύματα φυτεύτηκαν σε δίσκους πολλαπλών θέσεων που περιείχαν μείγμα τύρφης (Terrahum):περλίτη 1:3 v/v. Οι δίσκοι τοποθετήθηκαν στο θερμοκήπιο, σε πάγκους υδρονέφωσης όπου παρέμειναν εκεί για διάστημα 40 ημερών.



Εικ. 6,7 : Πάγκος υδρονέφωσης εξωτερικά και εσωτερικά

Το σύστημα υδρονέφωσης που χρησιμοποιήθηκε για τις ανάγκες του πειράματος βρίσκεται στο ΙΓΒΦΠ .Οι πάγκοι έχουν πλάτος 1 m και μήκος 4 m. Στο πάνω μέρος, ο πάγκος υδρονέφωσης, καλύπτεται από ειδικό ύφασμα το οποίο στηρίζεται στα μεταλλικά τόξα. Επίσης, σε κάθε πάγκο είναι τοποθετημένη ηλεκτρική αντίσταση για την ομοιόμορφη εξάπλωση της θερμοκρασίας. Η ύπαρξη τόσο της ηλεκτρικής αντίστασης όσο και ενός θερμοστάτη εξασφαλίζει τη ρύθμιση της θερμοκρασίας στη βάση των μοσχευμάτων. Στην υδρονέφωση καταγράφηκε μία μέση θερμοκρασία 19-25°C. Ιδιαίτερα σημαντική είναι και η εξασφάλιση της υψηλής σχετικής υγρασίας (70-85%), για το λόγο αυτό όταν η υγρασία πέφτει κάτω από το 60% πραγματοποιείται ψεκασμός.

Μετά την εμφάνιση του ριζικού συστήματος ελήφθησαν οι μετρήσεις. Συγκεκριμένα αφορούσαν το ποσοστό ριζοβολίας, των αριθμό των ριζών καθώς και το μήκος τους. Στη συνέχεια, τα έριζα μοσχεύματα μεταφυτεύτηκαν σε φυτοδοχεία.

2.2 Αναπαραγωγή και πολλαπλασιασμός με τη μέθοδο της ιστοκαλλιέργειας (Φάση 1η)

2.2.1 Φυτικό Υλικό

Ως φυτικό υλικό χρησιμοποιήθηκαν σπόροι και έκφυτα από επιλεγμένα, αυτοφυή, ενήλικα φυτά τα οποία προσφέρθηκαν από το ΙΓΒΦΠ.

- *Carlina diae*: Για το πολλαπλασιασμό του συγκεκριμένου είδους χρησιμοποιήθηκαν 80 σπέρματα, το ξηρό βάρος των οποίων υπολογίστηκε ότι ήταν 0,454 g και τοποθετήθηκαν σε δοχείο με νερό όπου παρέμειναν ενυδατωμένα για 24 h.
- *Acantholimon androsaceum*: Η αναπαραγωγή και ο πολλαπλασιασμός του *Acantholimon androsaceum* έγινε με τη χρήση τρυφερών βλαστικών κορυφών τα οποία προήλθαν από μητρικά φυτά. Συνολικά χρησιμοποιήθηκαν 33 έκφυτα με μήκος 1 cm.

2.2.2 Υπόστρωμα in vitro καλλιέργειας

Υλικά

Τα διάφορα θρεπτικά υποστρώματα στα οποία τοποθετήθηκαν τόσο οι σπόροι όσο και τα έκφυτα περιείχαν τα ακόλουθα συστατικά:

α) Υπόστρωμα MS (Murashige and Skoog basal mixture της εταιρείας Sigma-Aldrich) σε μορφή σκόνης (Murashige and Skoog, 1962)

β) Σακχαρόζη (του εμπορίου)

γ) Αυξίνες:

- Ναφθυλ-οξικό οξύ (NAA, 1-Naphthaleneacetic acid)
- Ινδολυλ-3-βουτυρικό οξύ (IBA)
- 2,4-διχλωρο-φαινοξυ-οξικό οξύ (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid)

δ) Άγαρ (Plant Agar)

ε) Κυτοκινίνες: Βενζυλαδενίνη (BA, N⁶-benzyladenine)

στ) Γιβερελλίνες: Γιβερελλινικό οξύ (GA₃, Gibberellic acid)

Carlina diae

- Θρεπτικό υπόστρωμα 1: Σε δοχείο ζέσεως με αποσταγμένο νερό (όγκου λιγότερου του τελικού) , το οποίο τοποθετήθηκε στο μαγνητικό αναδευτήρα, προσθέτονταν οι ακριβείς ποσότητες αλάτων. Αρχικά ζυγίστηκαν και τοποθετήθηκαν στο δοχείο 4,4 g l⁻¹ σκόνη Murashige and Skoog (MS) (Πίνακας 2) και στη συνέχεια προστέθηκαν 20 g l⁻¹ σακχαρόζη μέχρι να διαλυθούν πλήρως. Έπειτα γινόταν ογκομέτρηση και προσθήκη αποσταγμένου νερού, μέχρι τον επιθυμητό όγκο και ακολουθούσε ρύθμιση του pH στο 5,8*. Ακολούθως προστίθεται το Plant Agar στην απαιτούμενη ποσότητα (6 g l⁻¹) και ακολούθησε θέρμανση του διαλύματος, υπό συνεχή ανάδευση μέχρι να διαλυθεί πλήρως και ομοιόμορφα το άγαρ.
- Θρεπτικό υπόστρωμα 2: Ομοίως, για το_θρεπτικό υπόστρωμα 2, ζυγίστηκαν και τοποθετήθηκαν στο δοχείο ζέσεως 4,4 g l⁻¹ MS, 20 g l⁻¹ σακχαρόζη και 250 mg l⁻¹ GA₃. Το pH ρυθμίστηκε στο 5,8 ενώ στη συνέχεια προστέθηκε και το Plant Agar (6 g l⁻¹) και ακολούθησε η θέρμανση του διαλύματος έως ότου το διάλυμα να γίνει διαυγές.

*Η ρύθμιση του pH έγινε με τη βοήθεια διαλυμάτων 0,5 ή 1 N NaOH και 0,5 ή 1 N HCL.

Acantholimon androsaceum

- Θρεπτικό υπόστρωμα 1: Η παρασκευή του υποστρώματος αυτού έγινε σε δοχείο ζέσεως στο οποίο τοποθετήθηκαν 4,4 g l⁻¹ MS και 20 g l⁻¹ σακχαρόζης μαζί με αποσταγμένο νερό. Ακολούθησε η ρύθμιση του pH στο 5,8, προστέθηκε το Plant Agar στην απαιτούμενη ποσότητα (6 g l⁻¹) και το διάλυμα ,υπό συνεχή ανάδευση στον ανακινητήρα, θερμάνθηκε έως το σημείο που έγινε διαυγές.

- Θρεπτικό υπόστρωμα 2: Για τη δημιουργία του υποστρώματος 2, ακολουθήθηκε η διαδικασία που περιγράφηκε παραπάνω στις εξής ποσότητες: 4,4 g l⁻¹ MS, 20 g l⁻¹ σακχαρόζης, 0,5 mg l⁻¹ BA, 0,05 mg l⁻¹ IBA, 0,1 mg l⁻¹ GA₃, pH = 5,8 και 6 g l⁻¹ Plant Agar.

Πίνακας 2 Συστατικά (μακροστοιχεία-ιχνοστοιχεία-βιταμίνες) υποστρώματος MS (Murashige and Skoog, 1962)

Θρεπτικό διάλυμα Murashige & Skoog (1962) (mg/l)		
Μακροστοιχεία	NH ₄ NO ₃	1650
	CaCl ₂ · 2H ₂ O	440
	MgSO ₄ · 7H ₂ O	370
	KH ₂ PO ₄	170
	KNO ₃	1900
Μικροάλατα	H ₃ BO ₃	6,2
	CoCl ₂ · 6H ₂ O	0,025
	MnSO ₄ · 4H ₂ O(II)	22,3
	KJ	0,83
	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	8,6
	CuSO ₄ · 5H ₂ O	0,025
	Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0,25
	FeSO ₄ 7H ₂ O	27,8
	Na ₂ EDTA2H ₂ O	37,3
Βιταμίνες	Μυο-ινοσιτόλη	100
	Θειαμίνη –HCL	0,1
	Νικοτινικό οξύ	0,5
	Πυριδοσίνη –HCL	0,5

Στο στάδιο εγκατάστασης των αρχικών καλλιεργειών χρησιμοποιήθηκαν ως δοχεία καλλιέργειας δοκιμαστικοί σωλήνες όγκου 50 ml, που περιείχαν περίπου 10 ml υπόστρωμα έκαστος. Έπειτα, ακολούθησε το κλείσιμο των σωλήνων με φύλλα αλουμινίου και η αποστείρωση των σωλήνων στο κλίβανο υγρής αποστείρωσης στους 120°C για 20 min. Συγκεκριμένα για το κάθε είδος χρησιμοποιήθηκαν:

- *Carlina diae*
- ❖ πενήντα σωλήνες με το θρεπτικό υπόστρωμα 1
- ❖ τριάντα σωλήνες με το θρεπτικό υπόστρωμα 2

- *Acantholimon androsaceum*
- ❖ επτά σωλήνες με το θρεπτικό υπόστρωμα 1
- ❖ είκοσι έξι σωλήνες με το θρεπτικό υπόστρωμα 2

Παρασκευή διαλυμάτων φυτορρυθμιστικών ουσιών και βιταμινών

Τα stock διαλύματα των φυτορρυθμιστικών ουσιών περιείχαν τη κάθε φυτορρυθμιστική ουσία σε ποσοστό 10% κ.β.

1. Παρασκευή “stock” διαλύματος NAA. Σε δοχείο ζέσεως των 100ml, τοποθετούνταν 10 mg NAA, τα οποία διαλύονταν με ανάδευση σε 2-3 σταγόνες καθαρής αιθανόλης. Στη συνέχεια προσθέτονταν 100ml αποσταγμένου νερού.
2. Παρασκευή “stock” διαλύματος IBA. Σε δοχείο ζέσεως των 100ml τοποθετούνταν 10 mg IBA, τα οποία διαλύονταν με ανάδευση σε 2-3 σταγόνες καθαρής αιθανόλης. Στη συνέχεια προσθέτονταν 100ml αποσταγμένου νερού.
3. Παρασκευή “stock” διαλύματος BA. Σε δοχείο ζέσεως των 100ml τοποθετούνταν 10 mg BA, τα οποία διαλύονταν με ανάδευση σε 2-3 σταγόνες 1N καυστικού νατρίου (NaOH). Στη συνέχεια προσθέτονταν 100ml θερμού (με βραστό νερό κρυστάλλωνε η ουσία) αποσταγμένου νερού.
4. Παρασκευή “stock” διαλύματος GA₃. Σε δοχείο ζέσεως των 100ml τοποθετούνταν 10 mg GA₃, τα οποία διαλύονταν με ανάδευση σε 2-3 σταγόνες καθαρής αιθανόλης. Στη συνέχεια προσθέτονταν 100ml βραστού αποσταγμένου νερού.

2.2.3 Μέθοδοι απολύμανσης, αποστείρωσης και εγκατάστασης φυτικού υλικού

Απολύμανση-εγκατάσταση σπόρων και εκφύτων

Πριν τη τοποθέτηση, τόσο των σπόρων του φυτού *Carlina diae* όσο και των εκφύτων του *Acantholimon androsaceum*, στους δοκιμαστικούς σωλήνες ακολουθήθηκε μια διαδικασία απολύμανσης προκειμένου να αποφευχθούν οι

μολύνσεις και να διασφαλιστεί ένα υψηλό ποσοστό επιβίωσης. Έγινε λοιπόν προσπάθεια για την εξεύρεση μιας αποτελεσματικής μεθόδου απολύμανσης και για το λόγο αυτό δοκιμάστηκαν το μυκητοκτόνο, η αιθυλική αλκοόλη και το διάλυμα χλωρίνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Τελικά, διαπιστώθηκε ότι οι απολυμάνσεις που θα παρουσιαστούν παρακάτω φέρουν τα αποτελέσματα που θα θέλαμε.

Carlina diae

Όσον αφορά τους σπόρους της *Carlina diae* απολυμάνθηκαν συνολικά 80 σπόροι. Η απολύμανση των σπόρων έχει ως εξής:

- Πρώτα αποστειρώθηκε ο θάλαμος νηματικής ροής, όπου εκτελέστηκαν οι μετέπειτα εργασίες, με διάλυμα αιθυλικής αλκοόλης 70%.
- Οι σπόροι εμβαπτίστηκαν σε απιονισμένο νερό το οποίο περιείχε μυκητοκτόνο Signum σε ποσότητα 0,1 g/100 ml για 30 min.
- Ακολούθησε εμβάπτιση των σπόρων σε αιθυλική αλκοόλη 70% για 1 min.
- Αμέσως μετά, οι σπόροι εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα χλωρίνης 5% για 15 min.

Για να αποφευχθούν καψίματα των σπόρων, πραγματοποιήθηκαν μεταξύ των εμβαπτίσεων τέσσερα διαδοχικά ξεπλύματα, σε αποστειρωμένο απιονισμένο νερό, χρονικής διάρκειας ενός λεπτού το καθένα.

Acantholimon androsaceum

Η διαδικασία της απολύμανσης που ακολουθήθηκε για τις τρυφερές βλαστικές κορυφές του *Acantholimon androsaceum* μοιάζει, ως προς την αποστείρωση του θαλάμου νηματικής ροής και των διαδοχικών ξεπλυμάτων

μεταξύ κάθε παρέμβασης, με αυτήν των σπόρων *Carlina diae*. Ωστόσο υπάρχουν διαφορές στις ποσότητες των ουσιών που χρησιμοποιήθηκαν καθώς και στο χρόνο εφαρμογής των επεμβάσεων. Συγκεκριμένα:

- Χρησιμοποιήθηκε μυκητοκτόνο Signum 0,200g σε 100ml απιονισμένου νερού για 30 min
- Έπειτα, οι βλαστικές κορυφές εμβαπτίστηκαν σε αιθυλική αλκοόλη 70% για 15 sec
- Ενώ στο τέλος, ακολούθησε η εμβάπτιση των κορυφών σε διάλυμα χλωρίνης, συγκέντρωσης 2%, για 30 min

Αποστείρωση εργαλείων και υλικών

Οι σωλήνες και τα δοχεία καλλιέργειας με τα υποστρώματα, αλλά και όλα τα υλικά και τα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν στις εμφυτεύσεις ή απολυμάνσεις, όπως λαβίδες, νυστέρια, πλακάκια πάνω στα οποία γίνονταν οι κοπές, φιάλες και δοχεία με νερό για την απολύμανση των σπόρων και των εκφύτων, αποστειρώνονταν τόσο σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης (αυτόκλειστο) για 20 min, σε θερμοκρασία 121°C, υπό πίεση 1,1 atm όσο και σε κλίβανο ξηρής αποστείρωσης για 2 h, σε θερμοκρασία 160-170°C.

2.2.4 Χειρισμός σπόρων-εκφύτων

Carlina diae

Μετά τη διαδικασία απολύμανσης των σπόρων μέσα σε τράπεζα νηματικής ροής, πάνω σε αποστειρωμένο πλακάκι, που τακτικά καθαρίζονταν με αιθυλική αλκοόλη 70%, οι σπόροι εμφυτεύτηκαν, με τη χρήση αποστειρωμένης λαβίδας, στους αποστειρωμένους σωλήνες με τα θρεπτικά υποστρώματα 1 και 2, εμφυτεύοντας ένα μόνο σπόρο ανά σωλήνα. Οι σωλήνες επισημάνθηκαν με το είδος του φυτού, το θρεπτικό υπόστρωμα και την ημερομηνία, τοποθετήθηκαν σε ειδικούς στατήρες και μεταφέρθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών, σε θερμοκρασία 25°C και 16 h φωτοπερίοδο.

Acantholimon androsaceum

Μετά τη διαδικασία της απολύμανσης των βλαστών μέσα στη τράπεζα νηματικής ροής, πάνω σε αποστειρωμένο πλακάκι, που τακτικά καθαριζόταν με υδατικό διάλυμα αιθυλικής αλκοόλης 70% και με χρήση αποστειρωμένης λαβίδας, αφαιρέθηκαν τυχόν υπολείμματα φύλλων. Στη συνέχεια οι βλαστικές κορυφές τοποθετήθηκαν στους δοκιμαστικούς σωλήνες, με το ανάλογο θρεπτικό υπόστρωμα. Ο κάθε σωλήνας περιείχε ένα έκφυτο, το οποίο με την αποστειρωμένη λαβίδα, τοποθετούνταν κατακόρυφα και πιέζονταν ελαφρά ώστε να βυθιστεί λίγα χιλιοστά μέσα στο υπόστρωμα. Τέλος, οι σωλήνες καλύπτονταν με ημίσκληρο διαφανές πλαστικό ή με μεμβράνη αλουμινίου. Οι σωλήνες μεταφέρθηκαν στο θάλαμο ανάπτυξης, όπου οι συνθήκες είναι ελεγχόμενες.

2.2.5 Συνθήκες καλλιέργειας

Συνθήκες in vitro καλλιέργειας

Οι δοκιμαστικοί σωλήνες με τους σπόρους και τις τρυφερές βλαστικές κορυφές επωάζονταν σε θάλαμο ελεγχόμενων σταθερών συνθηκών, σε θερμοκρασία $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ και σε φωτοπερίοδο 16 h πλήρους φωτός έντασης 1000-10.000 lux, που παρέχονταν από λευκές λάμπες φθορισμού που είναι τοποθετημένες πάνω στα ράφια.

2.3 Αναπαραγωγή και πολλαπλασιασμός με τη μέθοδο της ιστοκαλλιέργειας (Φάση 2η)

2.3.1 Φυτικό υλικό

Όσον αφορά τα έκφυτα *Carlina diae*, που είχαν δημιουργηθεί *in vitro*, χρησιμοποιήθηκαν προκειμένου να συνεχιστεί το πείραμα πολλαπλασιασμού και να προχωρήσει σε δεύτερη φάση.

2.3.2 Υπόστρωμα *in vitro* καλλιέργειας

Μετά την αρχική εγκατάσταση των σπόρων και την ανάπτυξη τους σε *in vitro* περιβάλλον, ελήφθησαν οι απαραίτητες παρατηρήσεις. Έτσι, με γνώμονα τις ανάγκες των εκφύτων για την επιβίωση τους αλλά και τον επιτυχή πολλαπλασιασμό τους, δημιουργήθηκαν τα θρεπτικά υποστρώματα για το πείραμα πολλαπλασιασμού. Η παρασκευή των υποστρωμάτων έγινε όπως περιγράφηκε στο κεφάλαιο 3.2.2, ωστόσο οι αναλογίες και κάποια συστατικά διαφέρουν.

Carlina diae

- **Θρεπτικό υπόστρωμα Ca1:** Σε δοχείο ζέσεως, το οποίο ήταν τοποθετημένο σε αναδευτήρα, ζυγίστηκαν και τοποθετήθηκαν 4,4 g l⁻¹ MS, 20 g l⁻¹ σακχαρόζη, 0,2 mg l⁻¹ BA, 1 mg l⁻¹ GA₃. Το pH ρυθμίστηκε στο 5,8 και προστέθηκε το Plant Agar (6 g l⁻¹).
- **Θρεπτικό υπόστρωμα Ca2:** Για το θρεπτικό υπόστρωμα αυτό ζυγίστηκαν και χρησιμοποιήθηκαν 4,4 g l⁻¹ MS, 20 g l⁻¹ σακχαρόζη, 1 mg l⁻¹ GA₃, pH=5,8 ενώ στο τέλος προστέθηκαν 6 g l⁻¹ Plant Agar.

Συνολικά παρασκευάστηκαν: • τριάντα βάζα Ca1
• είκοσι βάζα Ca2

2.3.3. Έκφυτα καλλιιεργειών πολλαπλασιασμού - χειρισμός

Σε τράπεζα νηματικής ροής, πάνω σε αποστειρωμένο πλακάκι, που τακτικά απολυμαίνονταν με διάλυμα αιθυλικής αλκοόλης 70%, και με τη χρήση αποστειρωμένου νυστεριού, βλαστοί που είχαν σχηματιστεί *in vitro* και είχαν μήκος μεγαλύτερο από 1 cm προωθούνταν για να ριζοβολήσουν. Αρχικά γινόταν αφαίρεση των ριζών, εφόσον υπήρχαν, και στη συνέχεια οι βλαστοί που είχαν σχηματιστεί τεμαχίζονταν σε έκφυτα κόμβων μήκους 5-6 mm, τα οποία περιλάμβαναν 1-2 οφθαλμούς. Επίσης αφαιρούνταν και τυχόν φύλλα που είχαν σχηματιστεί. Τα έκφυτα κόμβων τοποθετούνταν σε δοχεία καλλιέργειας, με το ανάλογο θρεπτικό υπόστρωμα

ριζοβολίας, πέντε έκφυτα ανά δοχείο καλλιέργειας, κατακόρυφα και πιέζονταν ελαφρά ώστε να βυθιστούν λίγα χιλιοστά μέσα σε αυτό. Οι καλλιέργειες τοποθετούνταν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών, σε θερμοκρασία $25\pm 2^{\circ}\text{C}$ και 16 h φωτοπερίοδο.

2.4 Στατιστική ανάλυση

Για τον αγγενή πολλαπλασιασμό, στα τρία πειράματα που πραγματοποιήθηκαν χρησιμοποιήθηκε ένας εντελώς τυχαιοποιημένος πειραματικός σχεδιασμός. Μετά από 40 μέρες από την τοποθέτηση των μοσχευμάτων στο σύστημα υδρονέφωσης έγινε η εξαγωγή τους και υπολογίστηκε το ποσοστό ριζοβολίας για το κάθε χειρισμό με τα διαλύματα K-IBA. Τα ποσοστά ριζοβολίας υπέστησαν γωνιακή μετατροπή, ελέγχθηκαν για τη κανονική κατανομή τους και την ομοιογένεια των διακυμάνσεων τους ενώ στη συνέχεια έγινε η ανάλυση της διακύμανσης (ANOVA). Η σύγκριση των μέσων όρων πραγματοποιήθηκε με τον έλεγχο του πολλαπλού εύρους του Duncan, χρησιμοποιώντας το πρόγραμμα SPSS 17.0. Το πειραματικό σφάλμα ορίστηκε στο επίπεδο 0,05 ($P \leq 0,05$).

Όσον αφορά τον εγγενή πολλαπλασιασμό, τα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν εφαρμόστηκαν σε πλήρως τυχαιοποιημένο σχέδιο. Σε κάθε πείραμα, για κάθε χειρισμό υπολογίστηκε ο αριθμός των βλαστών, γονάτων και ριζών, καθώς και το ύψος των βλαστών και το μήκος των ριζών ως ο μέσος όρος από τις τιμές που υπήρχαν στις μεταχειρίσεις. Το επίπεδο σημαντικότητας που χρησιμοποιήθηκε ήταν $\alpha = 0,05$.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Αγενής πολλαπλασιασμός

Όσον αφορά τον αγενή πολλαπλασιασμό των μοσχευμάτων των ειδών *Acantholimon androsaceum*, *Carlina diae* και *Lomelosia minoana* subsp. *minoana*, τα ποσοστά ριζοβολίας για τον κάθε χειρισμό με τα διαλύματα του φυτικού ρυθμιστή K-IBA δίνονται στους Πίνακες 2,3 και 4 αντίστοιχα.

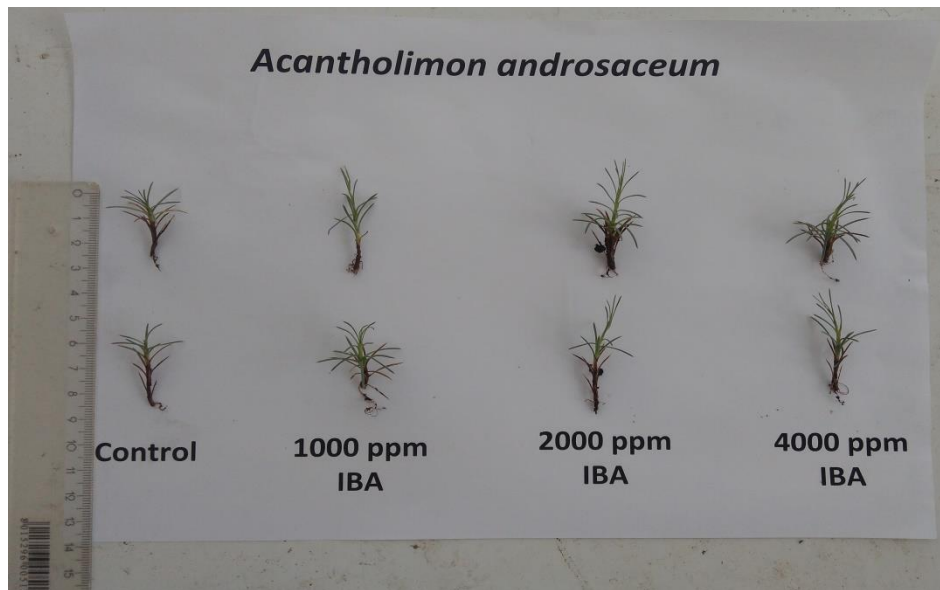
Πίνακας 2 Επίδραση του φυτικού ρυθμιστή IBA στη ριζοβολία μοσχευμάτων *Acantholimon androsaceum* στο σύστημα υδρονέφωσης

Μεταχειρίσεις	Ποσοστό ριζοβολίας (%)	Αριθμός ριζών / έριζο μόσχευμα	Μήκος ριζών (εκ.)
Μάρτυρας	9,53 c	1,50 ± 0,03 b	0,53 ± 0,00 a
1000 ppm IBA	38,10 b	3,13 ± 0,37 a	0,72 ± 0,11 a
2000 ppm IBA	71,43 a	2,00 ± 0,21 b	0,86 ± 0,20 a
4000 ppm IBA	71,43 a	3,13 ± 0,29 a	0,61 ± 0,06 a
P-values	0,001**	0,000***	0,224 ns

Οι αριθμοί σε κάθε στήλη που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σύμφωνα με το κριτήριο Duncan's multiple range test για επίπεδο σημαντικότητας 5% ($p \leq 0,05$). [SPSS 17.0, ANOVA]

** : στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο 1% ($p \leq 0,01$)

*** : στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο 0,1% ($p \leq 0,001$)



Εικ.8 Μικροβλαστοί του *Acantholimon androsaceum* που αναπτύχθηκαν στο σύστημα υδρονέφωσης με την εφαρμογή IBA σε διάφορες συγκεντρώσεις

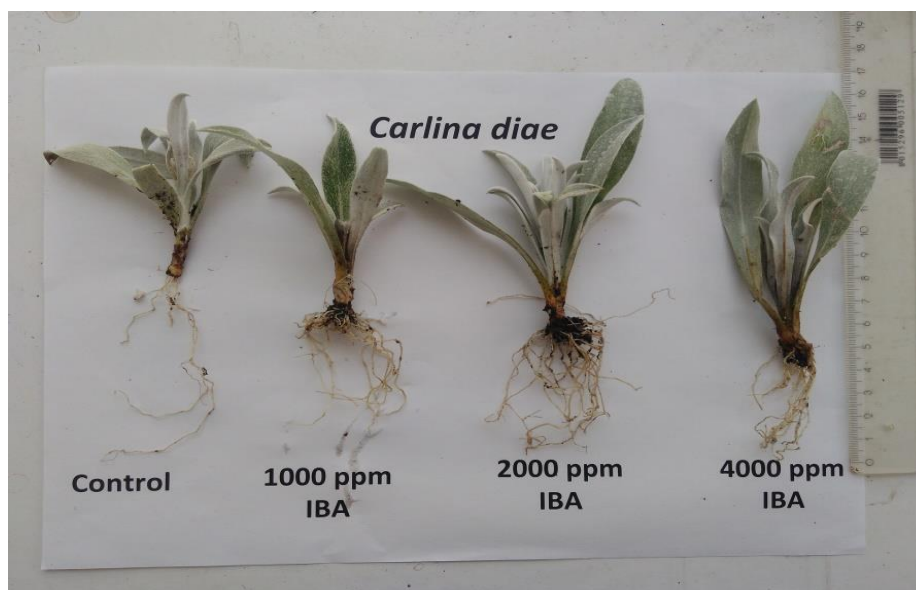
Πίνακας 3 Επίδραση του φυτικού ρυθμιστή IBA στη ριζοβολία μοσχευμάτων *Carlina diae* στο σύστημα της υδρονέφωσης

Μεταχειρίσεις	Ποσοστό ριζοβολίας (%)	Αριθμός ριζών / έριζο μόσχευμα	Μήκος ριζών (εκ.)	Ποσοστό νέκρωσης (%)
Μάρτυρας	71,43 b	5,00 ± 0,58 b	4,26 ± 0,43 a	0 b
1000 ppm IBA	100 a	11,43 ± 1,84 ab	2,97 ± 0,24 b	0 b
2000 ppm IBA	100 a	16,00 ± 3,45 a	2,08 ± 0,42 b	0 b
4000 ppm IBA	57,14 c	17,00 ± 2,04 a	2,88 ± 0,51 b	42,86 a
P-values	0,000***	0,003**	0,010**	0,000***

Οι αριθμοί σε κάθε στήλη που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σύμφωνα με το κριτήριο Duncan's multiple range test για επίπεδο σημαντικότητας 5% ($p \leq 0,05$). [SPSS 17.0, ANOVA]

** : στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο 1% ($p \leq 0,01$)

*** : στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο 0,1% ($p \leq 0,001$)



Εικ.9 Μικροβλαστοί του φυτού *Carlina diae* που αναπτύχθηκαν στο σύστημα υδρονέφωσης με την εφαρμογή IBA σε διάφορες συγκεντρώσεις

Πίνακας 4 Επίδραση του φυτικού ρυθμιστή IBA στη ριζοβολία μοσχευμάτων *Lomelosia minoana subsp. minoana* στο σύστημα της υδρονέφωσης

Μεταχειρίσεις	Ποσοστό ριζοβολίας (%)	Αριθμός ριζών / έριζο μόσχευμα	Μήκος ριζών (εκ.)
Μάρτυρας	42,86 b	5,33 ± 0,48 c	2,62 ± 0,43 b
1000 ppm IBA	71,43 a	14,30 ± 2,17 ab	4,42 ± 0,27 a
2000 ppm IBA	85,71 a	17,17 ± 2,20 a	3,61 ± 0,34 ab
4000 ppm IBA	85,71 a	10,83 ± 1,58 b	4,54 ± 0,35 a
P-values	0,019*	0,000***	0,001**

Οι αριθμοί σε κάθε στήλη που συνοδεύονται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά σύμφωνα με το κριτήριο Duncan's multiple range test για επίπεδο σημαντικότητας 5% ($p \leq 0,05$). [SPSS 17.0, ANOVA]

** : στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο 1% ($p \leq 0,01$)

*** : στατιστικώς σημαντική διαφορά σε επίπεδο 0,1% ($p \leq 0,001$)



Εικ. 10 Μικροβλαστοί *Lomelosia minoana subsp. minoana* με διαφορετικές συγκεντρώσεις IBA που αναπτύχθηκαν στο σύστημα υδρονέφωσης

3.2 Εγγενής πολλαπλασιασμός

Φάση 1^η

Carlina diae

Πίνακας 5 Επίδραση της απολύμανσης στην αντίδραση σπερμάτων *Carlina diae* , που διατηρήθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών, σε διαφορετικά υποστρώματα

Θρεπτικό υπόστρωμα	Μολυσμένα (%)	Χωρίς Μόλυνση (%)	
		Νεκρά	Υγιή
Θρεπτ.Υποστρ. 1 (MS-20-6)	2	16	82
Θρεπτ.Υποστρ. 2 (MS-20-6+250 GA ₃)	16,66	10	73,33

Πίνακας 6 Επίδραση του θρεπτικού υποστρώματος καλλιέργειας στη δημιουργία νέων μικροβλαστών *Carlina diae*

Θρεπτικό υπόστρωμα	A/A	ΑΡ. ΒΛΑΣΤΩΝ	ΥΨΟΣ (cm)	ΑΡ. ΡΙΖΩΝ	Μ.Ο ΜΗΚΟΥΣ ΡΙΖΩΝ
Θρεπτ. Υποστρ. 1 (MS-20-6)	1	1	1,5a	2b	7,5c
	2	1	1,2a	2b	7,5c
	3	1	1a	3b	3,17b
	4	1	3b	2b	6,75c
	5	1	1a	5c	4b
Θρεπτ. Υποστρ. 2 (MS-20-6+250 GA ₃)	6	1	4,5b	0	0
	7	1	5bc	1a	0,5a
	8	1	7,5c	0	0
	9	1	7c	0	0
	10	1	3,5b	1a	0,3a

Διαφορετικά γράμματα στην ίδια στήλη φανερώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο 0,05

Πίνακας 7 Επίδραση του θρεπτικού υποστρώματος καλλιέργειας στη δημιουργία νέων μικροβλαστών *Acantholimon androsaceum*

Θρεπτικό υπόστρωμα	A/A	ΑΡ. ΒΛΑΣΤΩΝ	ΥΨΟΣ (cm)	ΑΡ. ΡΙΖΩΝ	Μ.Ο ΜΗΚΟΥΣ ΡΙΖΩΝ
Θρεπτικό υπόστρωμα 1: (MS-20-6)	1	1a	5a	0	0
	2	1a	4,5a	0	0
	3	1a	4,5a	0	0
Θρεπτικό υπόστρωμα 2: (MS-20-6 +0,5 BA, 0,05 IBA, 0,1 GA ₃)	4	2b	1,75b	1	0,5
	5	3c	1,83b	0	0
	6	3c	3,17b	0	0

Διαφορετικά γράμματα στην ίδια στήλη φανερώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο 0,05

Φάση 2^η

Carlina diae

Πίνακας 8 Επίδραση προηγούμενου θρεπτικού υποστρώματος (MS-20-6) στο πολλαπλασιασμό βλαστών *Carlina diae*

Θρεπτικό υπόστρωμα	A/A	ΑΡ. ΒΛΑΣΤΩΝ	ΥΨΟΣ (cm)	ΑΡ. ΓΟΝΑΤΩΝ	ΑΡ. ΡΙΖΩΝ	Μ.Ο ΜΗΚΟΥΣ ΡΙΖΩΝ
Ca1	1	3b	0,83	4b	0	0
	2	1a	0,5	0	0	0
	3	3b	2,33	2a	0	0
Ca2	4	1a	2,3	3ab	0	0
	5	1a	1,7	5b	2	0,5a
	6	1a	3	5b	3	0,8a

Διαφορετικά γράμματα στην ίδια στήλη φανερώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο 0,05

Πίνακας 9 Επίδραση προηγούμενου θρεπτικού υποστρώματος (MS-20-6+250GA₃) στο πολλαπλασιασμό βλαστών *Carlina diae*

Θρεπτικό υπόστρωμα	A/A	ΑΡ. ΒΛΑΣΤΩΝ	ΥΨΟΣ (cm)	ΑΡ. ΓΟΝΑΤΩΝ	ΑΡ. ΡΙΖΩΝ	Μ.Ο ΜΗΚΟΥΣ ΡΙΖΩΝ
Ca1	1	1a	2,3	3ab	0	0
	2	1a	1,7	5b	2	0,5a
	3	1a	3	5b	3	0,8a
Ca2	4	1a	2,3	4b	4	2,4b
	5	1a	1,5	4b	3	1,4ab
	6	1a	2,5	3ab	2	1,65ab

Διαφορετικά γράμματα στην ίδια στήλη φανερώνουν στατιστικά σημαντικές διαφορές σε επίπεδο 0,05

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ - ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Πείραμα μοσχευμάτων

Σαράντα ημέρες μετά τη τοποθέτηση των μοσχευμάτων στο σύστημα υδρονέφωσης μετρήθηκαν το μήκος και ο αριθμός των διακλαδώσεων του ριζικού συστήματος, ανά μεταχείριση και εκτιμήθηκε το ποσοστό επιτυχίας της ριζοβολίας για τα φυτά μας: *Acantholimon androsaceum*, *Carlina diae* και *Lomelosia minoana subsp. minoana*.

Τα αποτελέσματα που προέκυψαν από την αξιολόγηση των μοσχευμάτων οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η αυξίνη IBA επηρεάζει θετικά τη ριζοβολία μοσχευμάτων των *Acantholimon androsaceum* και *Lomelosia minoana subsp. minoana* σε όλες τις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκε σε σχέση με το μάρτυρα. Μάλιστα φάνηκε ότι όσο αυξάνονταν η συγκέντρωση του IBA, τα αποτελέσματα ήταν καλύτερα. Όσον αφορά το φυτό *Carlina diae*, τα βέλτιστα αποτελέσματα φάνηκαν κυρίως στις μέσες συγκεντρώσεις του IBA αλλά και στο μάρτυρα, ενώ στη μεγάλη συγκέντρωση του υπήρξε το μικρότερο ποσοστό ριζοβολίας.

Αξιολογώντας τη ριζοβολία των μοσχευμάτων, μπορούμε να συμπεράνουμε ότι η αυξίνη IBA έχει θετικά αποτελέσματα στη ριζοβολία των φυτών που μελετήσαμε και πιο συγκεκριμένα: στο *Acantholimon androsaceum* η καλύτερη αντίδραση των μοσχευμάτων ήταν στα 4000 ppm IBA, ενώ στη *Carlina diae* και στη *Lomelosia minoana subsp. minoana* στα 2000 ppm IBA.

Ιστοκαλλιέργεια

Acantholimon androsaceum

Η εγκατάσταση *in vitro* ασηπτικών καλλιεργειών *Acantholimon androsaceum* είναι εφικτή με την εφαρμογή μυκητοκτόνου Signum 0,200g/100ml ddH₂O για 30min, 70% αλκοόλης για 15sec και 2% NaCl για 30min.

Όσον αφορά το σχηματισμό μικροβλαστών, στο απλό θρεπτικό υπόστρωμα MS-20-6 παρατηρήθηκε η δημιουργία ενός μόνο βλαστού με μεγάλο ύψος ενώ στο υπόστρωμα MS που περιείχε 0,5mg BA, 0,05mg IBA και 0,1mg GA₃ σχηματίστηκαν περισσότεροι βλαστοί με μικρότερο ύψος.

Στα δύο θρεπτικά υποστρώματα που εγκαταστάθηκε *in vitro* το *Acantholimon androsaceum* υπήρχε απουσία του ριζικού συστήματος

Carlina diae Φάση 1^η

Η εγκατάσταση *in vitro* ασηπτικών καλλιεργειών *Carlina diae* είναι εφικτή μετά την απολύμανση με μυκητοκτόνο Signum 0,100g/100ml ddH₂O για 30min, 70% αλκοόλης για 1min και 5% NaCl για 15min.

Ο αριθμός των μικροβλαστών που σχηματίστηκαν, τόσο στο θρεπτικό υπόστρωμα MS-20-6 όσο και στο υπόστρωμα που έγινε η προσθήκη 250mg GA₃, δεν διαφέρει. Ωστόσο παρατηρείται διαφορά στο ύψος του βλαστού, με αποτέλεσμα τα σπέρματα *Carlina diae* που αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα που υπήρχε GA₃ να παρουσιάσουν έντονη κορυφαία ανάπτυξη.

Η ριζοβολία *in vitro* των σπερμάτων *Carlina diae* είναι δυνατή και ικανοποιητική σε απλό υπόστρωμα MS-20-6 χωρίς τη προσθήκη GA₃.

Carlina diae Φάση 2^η

Ως δεύτερη φάση έγινε μια προσπάθεια πολλαπλασιασμού των εκφύτων *Carlina diae* που δημιουργήθηκαν με τη μέθοδο της ιστοκαλλιέργειας.

- Έκφυτα που προήλθαν από υπόστρωμα MS-20-6

Ο αριθμός των μικροβλαστών που σχηματίστηκαν ήταν μεγαλύτερος στα έκφυτα που είχαν προέλθει από το υπόστρωμα MS-20-6 και ο πολλαπλασιασμός τους έγινε στο υπόστρωμα Ca1, με τη προσθήκη 0,2mg BA και 1mg GA₃. Όσον αφορά τα έκφυτα που στο πείραμα πολλαπλασιασμού αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα Ca2 με τη παρουσία 1g GA₃, παρατηρήθηκε μεγαλύτερο ύψος βλαστού.

Σχετικά με τον αριθμό των γονάτων που σημειώθηκε, ικανοποιητικά ήταν τα αποτελέσματα στο υπόστρωμα Ca2 όπως επίσης και το ποσοστό ριζοβολίας, σε σχέση με τα έκφυτα που πολλαπλασιάστηκαν στο υπόστρωμα Ca1.

- Έκφυτα που προήλθαν από υπόστρωμα MS-20-6+250 GA₃

Τα έκφυτα που προήλθαν από το υπόστρωμα MS-20-6+250 GA₃ και πολλαπλασιάστηκαν είτε στο υπόστρωμα Ca1 είτε στο υπόστρωμα Ca2, δε παρουσίασαν στατιστικώς σημαντικές διαφορές όσον αφορά τον αριθμό των μικροβλαστών και το ύψος τους.

Η δημιουργία γονάτων και στις δύο περιπτώσεις (Ca1 και Ca2) είναι εφικτή από έκφυτα που κατά την *in vitro* καλλιέργεια τους προστέθηκε GA₃.

Η ριζοβολία *in vitro* για το πολλαπλασιασμό της *Carlina diae*, είναι ωστόσο δυνατή στο υπόστρωμα Ca2, τόσο από άποψη αριθμού ριζών όσο και του μήκους τους.

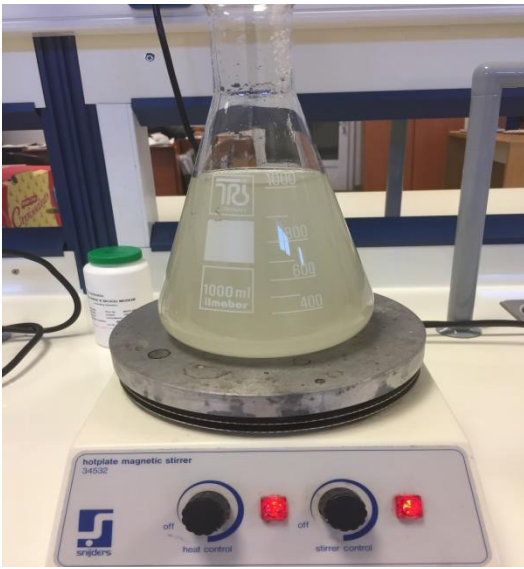
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΙΚΟΝΩΝ



Εικ.11 Δίσκος ριζοβολίας μοσχευμάτων πριν τοποθετηθεί στην υδρονέφωση



Εικ.12 Δίσκοι ριζοβολίας μοσχευμάτων στο πάγκο υδρονέφωσης



Εικ.13 Παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος στον αναδευτήρα



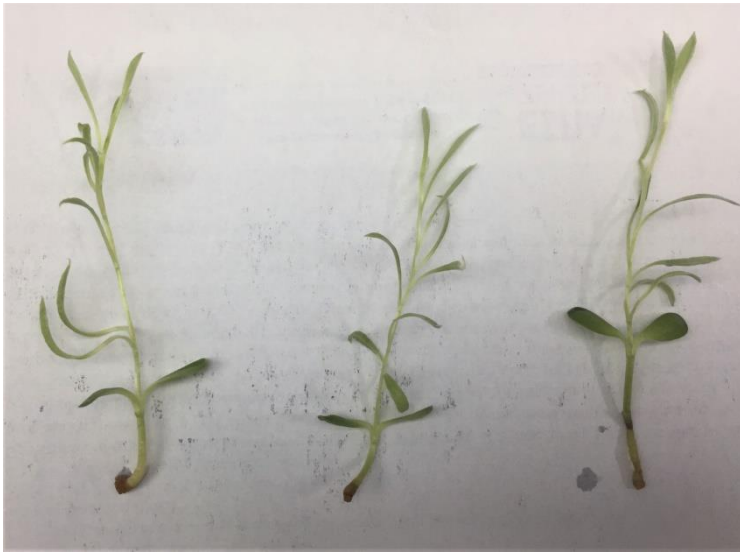
Εικ.14 Σπόροι *Carlina diae*



Εικ.15 Μικροβλαστοί *Carlina diae* που σχηματίστηκαν με τη προσθήκη 250mg GA₃ σε MS (Φάση 1^η)



Εικ.16 Μικροβλαστοί *Carlina diae* που σχηματίστηκαν σε υπόστρωμα MS (Φάση 1^η)



Εικ. 17,18 (Αριστερά) Κορυφαία ανάπτυξη μικροβλαστών *Carlina diae* στο θρεπτικό υπόστρωμα MS-20-6+250 GA₃, (Δεξιά) δημιουργία ριζών στους μικροβλαστούς *Carlina diae* στο θρεπτικό Υπόστρωμα MS-20-6 (Φάση 1^η)



Εικ.19 Βλαστοί *Acantholimon androsaceum* που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο Θρεπτικό υπόστρωμα 1 (MS-20-6)



Εικ.20 Βλαστοί *Acantholimon androsaceum* που αναπτύχθηκαν *in vitro* στο Θρεπτικό υπόστρωμα 2 (MS-20-6 +0,5 mg BA+0,05 mg IBA+ 0,1 mg GA3)

Φάση 2^η

Θρεπτικό υπόστρωμα Ca1



Εικ. 21,22 (Αριστερά) Μικροβλαστοί *Carlina diae*, που προήλθαν από Θρεπτικό υπόστρωμα (MS-20-6+250 GA₃) και αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα Ca1, **(Δεξιά)** Μικροβλαστοί *Carlina diae* που προήλθαν από Θρεπτικό υπόστρωμα (MS-20-6) και αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα Ca1

Θρεπτικό υπόστρωμα Ca2



Εικ. 21,22 (Αριστερά) Μικροβλαστοί *Carlina diae*, που προήλθαν από Θρεπτικό υπόστρωμα (MS-20-6+250 GA₃) και αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα Ca2, **(Δεξιά)** Μικροβλαστοί *Carlina diae* που προήλθαν από Θρεπτικό υπόστρωμα (MS-20-6) και αναπτύχθηκαν στο υπόστρωμα Ca2

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ξένη βιβλιογραφία

- Anand V.K. and G.T. Heberlein 1975, Seasonal changes in the effects of auxin on rooting in stem cuttings of *Ficus infectoria*, *Physiol. Plant*, 34:330-334
- Andersen A.S. 1986, Environmental influences on adventitious rooting in cuttings of non-woody species, In 'New root formation in plants and cuttings' M.B. Jackson ed. Martinus Nijhoff Pubs, Dordrecht, 223-253
- Altaf H., I. A. Qarshi, Hummera N. and I. Ullah 2012, Plant Tissue Culture: Current Status and Opportunities, DOI: 10.5772/50568
- Cardona M.A., Contandriopoulos J. 1977. L'endemisme dans les flores insulaires Méditerranéennes. Serie de estudios sobre biología terrestre Mediterránea 2, 49-77
- Carpenter W.J. and J.A. Cornell 1992, Auxin application duration and concentration govern rooting of hibiscus stem cuttings, *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 68-74
- Constanzi M., L. Mela and E.A. Garibaldi 1988, Preliminary results on multiplication by cuttings of *Genista monosperma*, *Acta Hort*, 226:327-331
- De Klerk G.J., W. Van de Krieken and J.C.de Jong 1999. The formation of adventitious roots: New concepts, new possibilities. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant*. 35:189-199
- Dimopoulos P., Raus Th., Bergmeier E., Constantinidis Th., Iatrou G., Kokkini S., Strid A. & Tzanoudakis D. 2013. Vascular plants of Greece: An annotated checklist. - Berlin: Botanischer Garten und Botanisches Museum Berlin-Dahlem; Athens: Hellenic Botanical Society. [Englera 31]
- Dirr M.A. and C.W. Heuser 1987. The reference manual of woody plant propagation. Univ.Press. Athens, Ga.
- Djordjevic, S., et al. (2005). Composition of *Carlina acanthifolia* root essential oil. *Chemistry of Natural Compounds* 41(4), 410-12
- Eccher T. 1988, Response of cuttings of 16 taxus cultivars to rooting treatments, *Acta Hort*, 227:251-253
- Ehleringer J.R.1979. Photosynthesis and photorespiration: Biochemistry, physiology, and ecological implications. *Hortscience* 14:217-222
- George, Edwin F., Hall, Michael A., De Klerk, Geert-Jan 2008, Plant Propagation by Tissue Culture, Volume 1. The Background, Springer Netherlands, 3th Edition

- Georghiou, K. & P. Delipetrou. 2010. Patterns and traits of the endemic plants of Greece. *Botanical Journal of the Linnean Society* 162:130-422
- Haaland E. 1976. The effect of light and CO₂ on the carbohydrates in stock plants and cuttings on *Campanula isophylla* Moretti. *Scientia Hort.* 5:353-361
- Haissig B.E. 1986, Metabolic processes in adventitious rooting in cuttings. In 'New root formation in plants and cuttings' M.B Jackson ed. Martinus Nijhoff Pubs, Dordrecht, 141-189
- Hambrick C.E., F.T. Davies Jr. and H.B. Pemberton 1991. Seasonal changes in carbohydrate/nitrogen levels during field rooting of *Rosa multiflora* 'Brooks 56' hardwood cuttings. *Scientia Hort.* 46:137-146
- Hansen J. 1986. Influence of cutting position and stem length on rooting of leaf-bud cuttings of *Schefflera arboricola*. *Scientia Hort.* 28:177-186
- Hartmann H., D. Kester, F.T. Davies Jr and R. Geneve F. 2002. *Plant propagation: principles and practices*, 7th ed. Prentice Hall, N. York, 646
- Henry P.H., F.A. Blazich and L.E. Hinesley 1992. Vegative propagation of eastern red cedar by stem cuttings. *HortScience.* 27:1272-1274
- Jon VanZile 2020, Wandering Jew (Spiderwort) Plant Profile, The spruce
- Kawase M. 1965, Etiolation and rooting in cuttings, *Physiol. Plant.*18, 1066-1076
- Knox G.W. and D.F. Hamilton 1982, Rooting of *Berberis* and *Ligustrum* cuttings from stock plants grown at selected light intensities, *Sci. Hort.* 16:85-90
- Krigas, N. & Maloupa, E. (2008). The Balkan Botanic Garden of Kroussia, Northern Greece: a garden dedicated to the conservation of native plants of Greece and the Balkans (invited botanic garden profile).
- Krigas N., Mendeli, V. & Vokou, D. (2014). The electronic trade in Greek endemic plants: biodiversity, commercial and legal aspects. – *Economic Botany* 68(1): 85–95.
- Leakey R.B. 1983. Stockplant factors affecting root initiation in cuttings of *Triplochiton scleroxylon* K. Schum., an indigenous hardwood of West Africa. *J. Hort. Sci.* 58:277-290
- Moe R. 1973, Propagation, growth and flowering of potted roses, *Acta Hort.* 31:35-40
- Moe R. 1977, Effect of light, temperature and CO₂ on the growth of *Campanula isophylla* stock plants and on the subsequent growth and development of their cuttings, *Scientia Hort.* 6:129-141

- Moe R. and A.S. Andersen 1988, Stock plant environment and subsequent adventitious rooting, In 'Adventitious root formation in cuttings' T.D. Davis, B.E. Haissig and N. Sankhla, eds. Dioscorides Press, Portland, Oreg ., 214-234
- Montmollin De P. 1987, Contribution à l'étude cytotaxonomique de la flore crétoise et en particulier de ses endémiques. Thèse présentée à la Faculté des Sciences de l'Université de Neuchatel, pp.194
- Pajagopal V. and A.S. Andersen 1980a, Water stress and root formation in pea cuttings I, Influence of the degree and duration of water stress on stock plants grown under two levels of irradiance, *Physiol. Plant*, 48:144-149
- Pajagopal V. and A.S. Andersen 1980b, Water stress and root formation in pea cuttings III, Changes in the endogenous level of abscisic acid and ethylene production in the stock plants under two levels of irradiance, *Physiol. Plant*, 48:155-160
- Poulsen A. and A.S. Andersen 1980, Propagation of *Hedera helix*: Influence of irradiance to stock plants, length of internode and topophysis of cuttings, *Physiol. Plant*, 49:359-365
- Rasmussen S. and A.S. Andersen 1980, Water stress and root formation in pea cuttings II, Effect of abscisic acid treatment of cuttings from stock plants grown under two levels of irradiance, *Physiol. Plant*. 150-154
- Roberts A. N. and L.H. Fuchigami 1973, Seasonal changes in auxin effect on rooting of Douglas fir stem cuttings as related to bud activity, *Physiol. Plant*, 28:215-221
- Schneck V. 1996, Studies on influence of clone on rooting ability and rooting quality in the propagation of cuttings from 40- to 350-year-old *Taxus baccata* L. ortets, *Silvae Genetica*, 45
- Stoutmeyer V.T. 1947, Changes of rooting response in cuttings following exposure of the stock plants to light of different qualities, *Proc. Amer. Soc. Hortic. Sci.*, 49:392-394
- Strid, A. & K. Tan. 1997. *Flora Hellenica 1*. Koeltz Scientific Books, Königstein, Germany
- Strid, A. & K. Tan. 2002. *Flora Hellenica 2*. A.R.G. Gantner Verlag, K.G. Ruggell, Liechtenstein.
- Turland N.J., Chilton L. 2008, *Flora of Crete: Supplement II, Additions 1997-2008*
- Wilson P.J. and J. Van Staden 1990. Rhizocaline, rooting co-factors, and the concept of promoters and inhibitors of adventitious rooting-a review. *Annals Bot.* 66:476-490

- Ελληνική βιβλιογραφία

- Ιατρού Γ. 1986, Συμβολή στη μελέτη του ενδημισμού της χλωρίδας της Πελοποννήσου.
 Διδακτορική διατριβή. Πανεπιστήμιο Πατρών, Πάτρα
- Κυπριωτάκης Ζ. 1998, Συμβολή στη μελέτη της χασμοφυτικής χλωρίδας της Κρήτης και της διαχείρισης της ως φυσικού πόρου, προς τη κατεύθυνση του φυσιολατρικού τουρισμού, της ανθοκομίας, της εθνοβοτανικής και της προστασίας των απειλούμενων φυτικών ειδών και βιοτόπων. Διδακτορική διατριβή, Πανεπιστήμιο Πατρών
- Μαλούπα Ε., Γρηγοριάδου Κ., Λάζαρη Δ., Κρίγκας Ν. 2013. Καλλιέργεια, Μεταποίηση και Διασφάλιση ποιότητας των Ελληνικών Αρωματικών-Φαρμακευτικών φυτών, Βασικές Αρχές Καθετοποιημένης Παραγωγής. , 29-32
- Μεταξάς Δ. 2004, Διερεύνηση των φυσιολογικών παραγόντων που επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό των αυτοφυών καλλωπιστικών φυτών τάξου (*Taxus baccata* L.) και κουμαριάς (*Arbutus unedo* L.), Διδακτορική Διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης
- Πρόγραμμα ARCHI-MED, Δράση 2.1 ΑΠΕΙΛΟΥΜΕΝΑ ΕΝΔΗΜΙΚΑ ΕΙΔΗ ΤΗΣ ΧΛΩΡΙΔΑΣ ΣΤΗ ΝΟΤΙΑ ΕΛΛΑΔΑ, Αθήνα 2000, 80, 112
- Ρούσσοις Π. 2008, Ανατομική, φυσιολογική και βιοχημική θεώρηση του αγενούς πολλαπλασιασμού των φυτών με μοσχεύματα, Σημειώσεις για το μεταπτυχιακό μάθημα «Πολλαπλασιασμός καρποφόρων δένδρων και θάμνων», Μέρος II, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, 59-69
- Ηλεκτρονική βιβλιογραφία
<https://images.app.goo.gl/fzPtGJzMVVfK6PBD7>
<https://images.app.goo.gl/t9DQN3obfAD7Jpud8>
http://www.cretanflora.com/acantholimon_androsaceum.html
http://www.cretanflora.com/lomelosia_minoana_minoana.html
<https://www.flickr.com/photos/nturland/3158300999/in/photostream/>
<https://www.flickr.com/photos/nturland/3159134730/in/photostream/>
<https://www.greekflora.gr/el/flowers/0805/Lomelosia-minoana>
https://www.west-crete.com/flowers/acantholimon_androsaceum.htm
https://www.west-crete.com/flowers/photos/acantholimon_androsaceum-3large.jpg