



Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών

Σχολή Αγροτικής Παραγωγής Υποδομών & Περιβάλλοντος

Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής

Εργαστήριο Ανθοκομίας & Αρχιτεκτονικής Τοπίου

Π. Μ. Σ. Επιστήμες & Συστήματα Φυτικής Παραγωγής

«Κηπευτικές Καλλιέργειες & Ανθοκομία»

Μεταπτυχιακή Μελέτη

Διερεύνηση της οικοφυσιολογίας του σπόρου της

Anthyllis barba-jovis L. και του *in vitro*

πολλαπλασιασμού του είδους

Μαρίνα Δ. Τρίγκα

Επιβλέπουσα: Καθηγήτρια Μαρία Παπαφωτίου

ΑΘΗΝΑ 2017



Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών
Σχολή Αγροτικής Παραγωγής Υποδομών & Περιβάλλοντος
Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής
Εργαστήριο Ανθοκομίας & Αρχιτεκτονικής Τοπίου

Π. Μ. Σ. Επιστήμες & Συστήματα Φυτικής Παραγωγής
«Κηπευτικές Καλλιέργειες & Ανθοκομία»

Μεταπτυχιακή Μελέτη

Διερεύνηση της οικοφυσιολογίας του σπόρου της
Anthyllis barba-jovis L. και του *in vitro*
πολλαπλασιασμού του είδους

Μαρίνα Δ. Τρίγκα

Επιβλέπουσα: Καθηγήτρια Μαρία Παπαφωτίου

Εξεταστική Επιτροπή

Παπαφωτίου Μαρία - Καθηγήτρια

Νεκτάριος Παναγιώτης - Καθηγητής

Ακουμιανάκη - Ιωαννίδου Αναστασία - Αν. Καθηγήτρια

ΑΘΗΝΑ 2017

Στις αδερφές μου...

Κωνσταντίνα - Μίλτια & Χριστίνα

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους όσους με βοήθησαν για την ολοκλήρωση της παρούσας μεταπτυχιακής μελέτης.

Κατ' αρχήν, θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου για την διεξαγωγή της μεταπτυχιακής μου μελέτης Δρ. Μαρία Παπαφωτίου, Καθηγήτρια, Διευθύντρια του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γ.Π.Α., για την ανάθεση του θέματος, τη συνεχή επιστημονική καθοδήγηση και τις πολύτιμες υποδείξεις που μου παρείχε, καθ' όλη τη διάρκεια του πειραματικού σταδίου, της συγγραφής και της διόρθωσης της μεταπτυχιακής μου μελέτης.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες μου στα μέλη της τριμελούς επιτροπής, στον Δρ. Παναγιώτη Νεκτάριο, Καθηγητή και την Δρ. Αναστασία Ακουμιανάκη-Ιωαννίδου, Αν. Καθηγήτρια, του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου, για τον χρόνο που διέθεσαν για την εξέταση της μεταπτυχιακής μου μελέτης.

Τέλος, ευχαριστώ θερμά τον Δρ. Κωνσταντίνο Μπερτσουκλή και την Δρ. Κατερίνα Μαρτίνη, για τις συμβουλές που μου προσέφεραν κατά την διάρκεια του πειραματικού μέρους, καθώς επίσης και τις συναδέλφους Γεωργία Βλάχου και Ηρώ Παπαγιάννη και τις φοιτήτριες Μαρία Μανιάτη και Δήμητρα Τσιάμα, για τη βοήθειά τους.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Συντομογραφίες.....	11
Περίληψη.....	13
Abstract.....	15
Σκοπός Μελέτης.....	17
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	21
1.1 Μεσογειακή βλάστηση.....	21
1.2 Οικοφυσιολογία σπόρων της Μεσογειακής βλάστησης.....	26
1.3 Πολλαπλασιασμός αυτοφυών της Μεσογειακής βλάστησης.....	28
1.4 Το γένος <i>Anthyllis</i>.....	30
1.4.1 Βοτανική ταξινόμηση.....	30
1.4.2 Βοτανική περιγραφή.....	30
1.4.3 Πολλαπλασιασμός του γένους <i>Anthyllis</i>	33
1.4.4 <i>Anthyllis barba – jovis</i> L.	35
1.4.4.1 Πολλαπλασιασμός της <i>Anthyllis barba – jovis</i> L.	36
1.4.4.2 Χρήσεις της <i>Anthyllis barba – jovis</i> L.	40
2. ΟΙΚΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΣΠΟΡΟΥ <i>Anthyllis barba-jovis</i> L.	45
2.1 Εισαγωγή - Οικοφυσιολογία του σπόρου- Λήθαργος.....	45
2.2 Υλικά και Μέθοδοι.....	46
2.2.1 Φυτικό υλικό.....	46
2.2.2 Συλλογή, καθαρισμός και αποθήκευση σπόρων.....	46
2.2.3 Μηχανικός σκαριφισμός σπόρων.....	47
2.2.4 Έλεγχος βλαστικότητας σπόρων.....	47
2.2.5 Μικροσκοπική παρατήρηση σπόρων.....	47
2.2.6 Μέθοδος παρασκευής και αποστείρωσης του θρεπτικού υποστρώματος.....	48
2.2.7 Δοχεία <i>in vitro</i> και <i>ex vitro</i> καλλιέργειας.....	48
2.2.8 Επιφανειακή απολύμανση σπόρων.....	48
2.2.9 Εγκατάσταση σπόρων και Συνθήκες επώασης.....	49
2.2.10 Στατιστική ανάλυση – Εκτίμηση αποτελεσμάτων.....	49
2.3 Αποτελέσματα.....	50
2.3.1 Βλαστικότητα σπόρων <i>in vitro</i>	50
2.3.1.1 Έλεγχος βλαστικότητας σπόρων.....	50
2.3.1.2 Μικροσκοπική παρατήρηση σπόρων.....	50
2.3.1.3 Σπόροι <i>Anthyllis barba-jovis</i> L. ηλικίας 0 μηνών.....	51

2.3.1.4 Σπόροι <i>Anthyllis barba-jovis</i> L. ηλικίας 12 μηνών	56
2.3.1.5 Σπόροι <i>Anthyllis barba-jovis</i> L. ηλικίας 24 μηνών	61
2.3.2 Βλαστικότητα σπόρων <i>ex vitro</i>	67
2.3.2.1 Σπόροι <i>Anthyllis barba-jovis</i> L. ηλικίας 0, 12 και 24 μηνών.....	67
2.4 Συζήτηση - Συμπεράσματα.....	69
3. ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ <i>Anthyllis barba - jovis</i> L.....	71
3.1 Εισαγωγή.....	71
3.2 <i>In vitro</i> πολλαπλασιασμός από σπορόφυτα <i>A. barba - jovis</i> L.....	71
3.2.1 Υλικά και Μέθοδοι.....	71
3.2.1.1 Φυτικό υλικό	71
3.2.1.2 Υποστρώματα <i>in vitro</i> καλλιέργειας	72
3.2.1.2.1 Υλικά των θρεπτικών υποστρωμάτων <i>in vitro</i> καλλιέργειας	72
3.2.1.2.2 Μέθοδος παρασκευής «stock» διαλυμάτων φυτορυθμιστικών ουσιών	72
3.2.1.2.3 Μέθοδος παρασκευής θρεπτικού υποστρώματος.....	74
3.2.1.3 Δοχεία και υλικά κάλυψης	74
3.2.1.3.1 Δοχεία <i>in vitro</i> καλλιέργειας και υλικά κάλυψης	74
3.2.1.3.2 Δοχεία εγκλιματισμού φυταρίων	75
3.2.1.4 Αποστείρωση εργαλείων και υλικών καλλιέργειας.....	75
3.2.1.5 Εγκατάσταση φυτικού υλικού	76
3.2.1.5.1 Εγκατάσταση εκφύτων αρχικής καλλιέργειας	76
3.2.1.5.2 Εγκατάσταση εκφύτων καλλιεργειών πολλαπλασιασμού.....	76
3.2.1.5.3 Εγκατάσταση μικροβλαστών προς ριζοβολία	76
3.2.1.5.4 Εγκατάσταση ριζοβολημένων μικροβλαστών.....	76
3.2.1.6 Συνθήκες καλλιέργειας.....	77
3.2.1.6.1 Συνθήκες <i>in vitro</i> καλλιέργειας	77
3.2.1.6.2 Συνθήκες <i>ex vitro</i> καλλιέργειας	77
3.2.1.7 Στατιστική ανάλυση – Εκτίμηση αποτελεσμάτων	78
3.2.2 Αποτελέσματα.....	79
3.2.2.1 Αρχική καλλιέργεια <i>in vitro</i>	79
3.2.2.2 Στάδιο υποκαλλιέργειας	81
3.2.2.3 Ριζοβολία μικροβλαστών	83
3.2.2.4 Εγκλιματισμός φυταρίων	85
3.3 <i>In vitro</i> πολλαπλασιασμός από νεαρά φυτά <i>A. barba-jovis</i> L.....	89
3.3.1 Υλικά και Μέθοδοι.....	89
3.3.1.1 Φυτικό υλικό	89
3.3.1.2 Υποστρώματα <i>in vitro</i> καλλιέργειας	90

3.3.1.2.1 Υλικά των θρεπτικών υποστρωμάτων <i>in vitro</i> καλλιέργειας	90
3.3.1.2.2 Μέθοδος παρασκευής «stock» διαλυμάτων φυτορρυθμιστικών ουσιών	90
3.3.1.2.3 Μέθοδος παρασκευής θρεπτικού υποστρώματος	91
3.3.1.3 Δοχεία και υλικά κάλυψης	91
3.3.1.3.1 Δοχεία <i>in vitro</i> καλλιέργειας και υλικά κάλυψης αυτών	91
3.3.1.3.2 Δοχεία εγκλιματισμού φυταρίων	92
3.3.1.4 Μέθοδοι αποστείρωσης και απολύμανσης	92
3.3.1.4.1 Αποστείρωση εργαλείων και υλικών καλλιέργειας	92
3.3.1.4.2 Επιφανειακή απολύμανση εκφύτων	93
3.3.1.5 Εγκατάσταση φυτικού υλικού	93
3.3.1.5.1 Εγκατάσταση εκφύτων αρχικής καλλιέργειας	93
3.3.1.5.2 Εγκατάσταση εκφύτων καλλιεργειών πολλαπλασιασμού	94
3.3.1.5.3 Εγκατάσταση μικροβλαστών προς ριζοβολία	94
3.3.1.5.4 Εγκατάσταση ριζοβολημένων μικροβλαστών	94
3.3.1.6 Συνθήκες καλλιέργειας	95
3.3.1.6.1 Συνθήκες <i>in vitro</i> καλλιέργειας	95
3.3.1.6.2 Συνθήκες <i>ex vitro</i> καλλιέργειας	95
3.3.1.7 Στατιστική ανάλυση – Εκτίμηση αποτελεσμάτων	96
3.3.2 Αποτελέσματα	97
3.3.2.1 Αρχική καλλιέργεια <i>in vitro</i>	97
3.3.2.2 Πρώτη υποκαλλιέργεια	98
3.3.2.3 Δεύτερη υποκαλλιέργεια	99
3.3.2.4 Ριζοβολία μικροβλαστών	103
3.3.2.5 Εγκλιματισμός φυταρίων	104
3.4 Συζήτηση – Συμπεράσματα	107
3.4.1 <i>In vitro</i> πολλαπλασιασμός από σπορόφυτα <i>A. barba-jovis</i> L.	107
3.4.2 <i>In vitro</i> πολλαπλασιασμός από νεαρά φυτά <i>A. barba-jovis</i> L.	108
4. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	111
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	117
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι	129
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ	130
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ	140
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙV	149

Συντομογραφίες

- BA** 6-βενζυλαδερίνη, 6-benzyladenine
IBA ινδολο-3-οξικό οξύ, indole-3-butyric acid
2iP 6-γ-γ-(διμεθυλαλληλάμινο)-πουρίνη, 6-γ-γ-(dimethylallylamino)-purine
KIN κινετίνη, 6-φουρφοουρυλαμινοπουρίνη, kinetin, 6-furfurylamino-purine
MS Murashige and Skoog Medium
NAA 1-ναφθαλινοξικό οξύ, 1-naphthelene acetic acid
SH Schenk and Hildebrandt Medium
WPM McCown's Woody Plant Medium
ZEA τρανς-ζεατίνη, trans-zeatin
ΗΜΣ Ηλεκτρονικό Μικροσκόπιο Σάρωσης

Περίληψη

Η *Anthyllis barba-jovis* L. (Ανθυλλίς, Γενειάδα του Δία), είναι ένας πολυετής, αειθαλής, θάμνος της οικογένειας Fabaceae που αυτοφύεται σε απόκρημνες βραχώδεις πλαγιές της κεντροδυτικής λεκάνης της Μεσογείου. Παρουσιάζει ενδιαφέρον για τη φαρμακοβιομηχανία λόγω των αντιοξειδωτικών, αντιφλεγμονωδών και αντιδιαβητικών ιδιοτήτων του, καθώς και των αιθέριων ελαίων που βρίσκονται στα άνθη και στους σπόρους του. Η μορφολογία και η υψηλή του ανθεκτικότητα στην αλατότητα των εδαφών και στις δυσμενείς καιρικές συνθήκες, το κάνουν επίσης ενδιαφέρον είδος για χρήση ως καλλωπιστικό σε παραθαλάσσιες περιοχές και αποκαταστάσεις προβληματικών περιοχών. Με στόχο τη διάδοση του είδους ως καλλωπιστικό σε αστικές και περιαστικές περιοχές, στην παρούσα εργασία μελετήθηκε αρχικά ο προσδιορισμός των κατάλληλων συνθηκών για μέγιστη βλαστικότητα των σπόρων. Η συλλογή των σπόρων έγινε από αυτοφυή φυτά, και διατηρήθηκαν σε σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου για 0, 12 και 24 μήνες. Μετά την απομάκρυνση του περικαρπίου και το μηχανικό σκαριφισμό, έγινε απολύμανση των σπόρων και τοποθετήθηκαν για βλάστηση *in vitro*, σε τρυβλία Petri, με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα ½ MS, σε θερμοκρασίες 5, 10, 15, 20, 25, 30 ή 35 °C σε συνεχές σκότος και σε φωτοπερίοδο 16 h ($37.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$), από φως που προερχόταν από λαμπτήρες φθορισμού. Οι σπόροι, όλων των ηλικιών, βλάστησαν σε όλες τις επεμβάσεις, ενώ η φωτοπερίοδος δεν είχε σημαντική επίδραση στη βλαστικότητα. Οι σπόροι στους 5 και 35 °C σημείωσαν το χαμηλότερο ποσοστό βλαστικότητας (με σκαριφισμό 20-58% και 10-20%, ενώ χωρίς σκαριφισμό 4-20% και 16-30%, αντίστοιχα). Στους 10 έως 30 °C το ποσοστό βλαστικότητας κυμάνθηκε από 56-98% σε σκαριφισμένους σπόρους και 20-65% σε μη σκαριφισμένους. Ο σκαριφισμός είχε ευνοϊκή επίδραση στη βλαστικότητα, για όλες τις ηλικίες. Σκαριφισμένοι σπόροι εμφάνισαν την υψηλότερη βλαστικότητα (83-98%) στους 15 και 20°C, ενώ οι μη σκαριφισμένοι βλάστησαν σε υψηλότερα ποσοστά στους 20 °C για σπόρους 0 και 12 μηνών (59-65%) και στους 20 και 25 °C για σπόρους 24 μηνών (28-38%). Η διερεύνηση της βλαστικότητας των σπόρων έγινε και σε *ex vitro* συνθήκες, σε εδαφικό υπόστρωμα 1 τύρφη:1 περλίτη (v/v), με ή χωρίς προμεταχείριση μηχανικού σκαριφισμού ή με το περικάρπιό τους, σε θάλαμο σταθερών συνθηκών, στους 20 °C. Οι σπόροι που αποθηκεύτηκαν για 12 ή 24 μήνες έδωσαν χαμηλότερα αποτελέσματα από τους σπόρους πρόσφατης συλλογής.

Διερευνήθηκε ακόμη, ο *in vitro* πολλαπλασιασμός του είδους από σπορόφυτα και νεαρά φυτά και έγινε εκτενής διερεύνηση ως προς την αποτελεσματικότητα διαφόρων φυτορυθμιστικών ουσιών στη μεγιστοποίηση της βλαστογένεσης από έκφυτα ενός κόμβου. Ως βασικό υπόστρωμα όλων των *in vitro* καλλιεργειών χρησιμοποιήθηκε το MS. Πιο συγκεκριμένα,

μελετήθηκε η επίδραση των BA και NAA, στη βλαστογένεση από έκφυτα κοτυληδικού κόμβου νεαρών σποροφύτων. Στο στάδιο της αρχικής εγκατάστασης όλα τα υποστρώματα σημείωσαν υψηλό ποσοστό βλαστογένεσης (81-91%), ενώ υψηλότερη παραγωγή βλαστών (1,9 βλαστοί/έκφυτο) παρατηρήθηκε στα υποστρώματα με 1,0 mg l⁻¹ BA με ή χωρίς 0,1 mg l⁻¹ NAA, χωρίς διαφορά από τα υποστρώματα με 0,5/0,1 mg l⁻¹ BA/NAA. Ακολούθησε υποκαλλιέργεια σε υπόστρωμα MS με 0,5 ή 1,0 mg l⁻¹ BA σε συνδυασμό με 0,1 mg l⁻¹ NAA, καθώς και σε υπόστρωμα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες. Σημειώθηκε υψηλό ποσοστό βλαστογένεσης (86-91%) σε όλα τα υποστρώματα. Μεγαλύτερος αριθμός βλαστών σημειώθηκε στο υπόστρωμα με 1,0/0,1 mg l⁻¹ BA/NAA (8,1 βλαστοί/έκφυτο), ενώ το μήκος των βλαστών ήταν παρόμοιο σε όλα τα υποστρώματα (1,2-1,3 cm). Υψηλό ποσοστό υπερενυδάτωσης παρατηρήθηκε στα υποστρώματα που περιείχαν φυτορρυθμιστικές ουσίες (55-65%), αλλά οι βλαστοί στο υπόστρωμα με 0,5/0,1 mg l⁻¹ BA/NAA είχαν πιο ικανοποιητική εμφάνιση και ήταν καλοσχηματισμένοι. Μικροβλαστοί τοποθετήθηκαν για ριζοβολία σε υποστρώματα ½ MS ή ½ WPM ή ½ SH χωρίς IBA ή εμπλουτισμένα με 0,5 ή 2,0 mg l⁻¹ IBA. Το ποσοστό ριζοβολίας ήταν υψηλό (80-100%) σε όλα τα υποστρώματα, ενώ εκείνα με 0,5 mg l⁻¹ IBA έδωσαν αυξημένο μήκος ριζών (11,2-17,5 cm) σε σύγκριση με εκείνα που περιείχαν 2,0 mg l⁻¹ IBA (5,6-8,1 cm). Τα φυτάρια εγκλιματίστηκαν με 97% επιτυχία σε *ex vitro* συνθήκες.

Ο *in vitro* πολλαπλασιασμός του είδους από νεαρά φυτά αφορούσε στη μελέτη της επίδρασης των BA, ZEAT, KIN, και 2iP, σε συγκεντρώσεις 0,0 ή 0,5 ή 1,0 ή 1,5 mg l⁻¹, στη βλαστογένεση. Κατά την αρχική εγκατάσταση υψηλότερη παραγωγή βλαστών (3,5 βλαστοί/έκφυτο) παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα με 1,0 mg l⁻¹ BA, όπου σημειώθηκε και η μεγαλύτερη επιμήκυνση των παραχθέντων μικροβλαστών (0,9 cm). Ακολούθησε υποκαλλιέργεια με στόχο την παραγωγή περισσότερων βλαστών. Στη δεύτερη υποκαλλιέργεια σημειώθηκε υψηλό ποσοστό βλαστογένεσης σε όλα τα υποστρώματα (88-100%), ενώ υπό την παρουσία BA αυξήθηκε πολύ ο αριθμός των παραγόμενων βλαστών (4,2-11,0 βλαστοί/έκφυτο). Τα υποστρώματα με 2iP και KIN έδωσαν μεγαλύτερο μήκος βλαστών (2,1-3,6 cm και 1,2-2,0 cm, αντίστοιχα) απ' ότι τα υποστρώματα που περιείχαν BA και ZEA (0,9-1,3 cm και 1,4-1,6 cm, αντίστοιχα). Υπό την παρουσία BA αυξήθηκε πολύ ο αριθμός των υπερενυδατωμένων βλαστών (4,7-5,8 υπερενυδ. βλαστοί/έκφυτο). Η ριζοβολία έγινε σε υποστρώματα MS ή ½ MS χωρίς IBA, ή σε ½ MS εμπλουτισμένα με 1,0 ή 2,0 mg l⁻¹ IBA. Το ποσοστό ριζοβολίας στο MS ήταν χαμηλότερο (60%) απ' ότι στο ½ MS, με ή χωρίς την παρουσία IBA (98% και 84%, αντίστοιχα), ενώ τον μεγαλύτερο αριθμό ριζών σημείωσε το υπόστρωμα με 2,0 mg l⁻¹ IBA (3,9 ρίζες/μικροβλαστό). Τα φυτάρια εγκλιματίστηκαν με 92% επιτυχία σε *ex vitro* συνθήκες.

Abstract

Anthyllis barba-jovis L. ("Jupiter's Beard") is a native, silvery evergreen shrub of family Fabaceae, found in rocky cliffs of Mediterranean region. The species is used in the pharmaceutical industry due to its antioxidants, anti-inflammatory and anti-diabetic properties, as well as for the essential oils found in flowers and seeds. The morphology of the plant and its high tolerance to high salinity, wind and drought provides the potential to be introduced as an ornamental landscape plant for coastal Mediterranean areas. Purpose of this study was to enable its conservation and facilitate its use as an ornamental and landscape plant, as well as a plant suitable for landscape restorations and sustainable reclamation of special landscapes. For this purpose was investigated and determined the seed germination. Seeds were collected from selected wild plants and stored in darkness at room temperature for 0, 12 and 24 months. After the separation from the fruit flesh and the mechanical scarification methods, the seeds were placed on Petri dishes and germinated on half-strength MS medium, at 5, 10, 15, 20, 25, 30 or 35°C under 16 h photoperiod and 37.5 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fluorescent light or continuous darkness. Seeds, stored 0, 12 or 24 months, germinated in all treatments, while the photoperiod had no significant effect on germination ability. Seeds showed very low levels of germination at 5 and 35°C (scarification 20-58% and 10-20%, without scarification 4-20% and 16-30%, respectively). At 10 and 30°C the germination was 56-98% with scarification method and 20-65% without scarification. The scarification method was more effective in all seeds. Scarified seeds showed high germination levels at 15 and 20°C (83-98%), while non-scarified seeds, stored 0 and 12 months, germinated better at 20 °C (59-65%) and at 20 and 25 °C for non-scarified seeds that stored 24 months (28-38%). The germination capacity of seeds was examined also in a soil substrate, consisting of a mix of 1 peat: 1 perlite (v/v), with or without scarification treatment or keeping the fruit flesh, at 20 °C. Seeds stored for 12 or 24 months showed lower germination levels than those who were not stored at all.

Furthermore, was investigated the *in vitro* propagation of the species from young plants and young seedlings and also the effectiveness of various plant growth regulators on shoot proliferation from single-node explants. The main medium for all *in vitro* cultures was MS medium. Specifically, examined the effectiveness of BA and NAA on shoot proliferation from cotyledonary nodes excised from young seedlings. In culture establishment, all treatments produced shoots at high percentages (81-91%), while the presence of 1.0 mg l⁻¹ BA, with or without 0.1 mg l⁻¹ NAA induced the shoot proliferation (1.9 shoots per explant). A subculture took place on MS medium supplemented with BA (0.5 or 1.0 mg l⁻¹) combined with 0.1 mg l⁻¹

NAA or hormone-free. Shooting reached 86-91% in all treatments. Higher shoot production was promoted by 1.0/0.1 mg l⁻¹ BA/NAA (8.1 shoots per explant), while shoot length was similar in all media (1.2-1.3 cm). Shoots reported above, bear hyperhydric shoots at high percentages (55-65%), while at media with 0.5/0.1 mg l⁻¹ BA/NAA the shoots were more well formed. Microshoots rooted at ½ MS ñ ½ WPM ñ ½ SH media with 0.5 and 2.0 mg l⁻¹ IBA or without IBA. Rooting percentage was high in all treatments (80-100%), while media supplemented with 0.5 mg l⁻¹ IBA gave longer roots (11.2-17.5 cm), than those supplemented with 2.0 mg l⁻¹ IBA (5.6-8.1 cm). *Ex vitro* acclimatization was highly successful (97%) on a mix of 1 peat: 1 perlite (v/v).

The effectiveness of various cytokinin types as BA, ZEA, 2iP and KIN, (0.0 or 0.5 or 1.0 or 1.5 or 2.0 mg l⁻¹) was also tested on shoot proliferation from single-node explants excised from young plants. In culture establishment, media supplemented with 1.0 mg l⁻¹ BA, not only produced more shoots (3.5 shoots per explant), but also gave longer shoots (0.9 cm). A first subculture took place, with the aim of producing adequate number of microshoots for further experimentation. In the following subculture, explants in all treatments produced shoots at high percentage (88-100%), while the presence of BA formed many more shoots (4.2-11.0 shoots per explant). The use of 2iP and KIN formed longer shoots (2.1-3.6 cm and 1.2-2.0 cm, respectively), than ZEA and BA (0.9-1.3 cm and 1.4-1.6 cm, respectively). Shoots reported above, bear many hyperhydric shoots at media with BA (4.7-5.8 hyperhydric shoots per explant). Root induction examined also after the subcultures stages at media with MS or ½ MS medium supplemented with or without 1.0 or 2.0 mg l⁻¹ IBA. Microshoots at MS media rooted in low percentages (60%), than at ½ MS media, supplemented with or without IBA (98% and 84%, respectively). Media with 2.0 mg l⁻¹ IBA formed more roots (3.9 roots per microshoot). *Ex vitro* acclimatization of plantlets was very high, with well-formed plants (92%), on a mix of 1 peat: 1 perlite (v/v).

Σκοπός Μελέτης

Η *Anthyllis barba-jovis* L. είναι ένας πολυετής, αειθαλής, θάμνος της οικογένειας Fabaceae που αυτοφύεται σε διάφορα ενδιαιτήματα κατά μήκος απόκρημνων βραχωδών περιοχών της κεντροδυτικής λεκάνης της Μεσογείου και της Βορείου Αφρικής. Παρ' όλο που δεν συμπεριλαμβάνεται στην Διεθνή Ένωση για τη διατήρηση της φύσης (IUCN) Κόκκινη λίστα, σε ορισμένες χώρες όπως η Γαλλία και η Κροατία θεωρείται προστατευόμενο είδος σε εθνικό επίπεδο, ενώ στην Ιταλία θεωρείται ότι είναι στην κατηγορία κινδύνου σε επτά από τις εννέα περιοχές όπου απαντάται, γεγονός που καθιστά ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα τη μελέτη του *in vitro* πολλαπλασιασμού του.

Η συμπαγής ορθόκλαδη ανάπτυξη, τα χνοώδη φύλλα (αραιού πράσινου χρώματος στην άνω επιφάνεια και γκρίζου χρώματος στην κάτω με πυκνό αργυρόχρωμο μεταξοειδές χνούδι) και τα εντυπωσιακά ωχροκίτρινου χρώματος άνθη, που φέρονται σε πολυάριθμες ταξιανθίες (κεφάλια), δίνουν στην *Anthyllis barba-jovis* ιδιαίτερη καλλωπιστική αξία και το καθιστούν κατάλληλο για χρήση ως καλλωπιστικό φυτό. Επιπλέον, η μορφολογία του, καθώς και η υψηλή του ανθεκτικότητα στην αλατότητα των εδαφών και στις δυσμενείς καιρικές συνθήκες, το κάνουν επίσης ενδιαφέρον είδος για χρήση ως καλλωπιστικό φυτό σε παραθαλάσσιες περιοχές και σε αποκαταστάσεις προβληματικών περιοχών, όπως περιοχές με ξηροθερμικές συνθήκες που κινδυνεύουν από διάβρωση του εδάφους και χώρους με υποβαθμισμένο εδαφικό περιβάλλον, όπως οι αρχαιολογικοί χώροι.

Με στόχο τη διάδοση του είδους ως καλλωπιστικό σε αστικές και περιαστικές περιοχές, καθώς και χώρους με υποβαθμισμένο εδαφικό περιβάλλον, όπως οι αρχαιολογικοί χώροι, στην παρούσα εργασία μελετήθηκε αρχικά ο προσδιορισμός των πιο κατάλληλων συνθηκών για μέγιστη βλαστικότητα των σπόρων, ως πρώτη προσέγγιση ανάπτυξης μεθόδου εγγενούς πολλαπλασιασμού του είδους. Ακόμη, διερευνήθηκε ο *in vitro* πολλαπλασιασμός του είδους από σπορόφυτα ανεπτυγμένα *in vitro* και από νεαρά φυτά, ηλικίας δυο ετών, που προήλθαν από ανεπτυγμένα *in vitro* σπορόφυτα και έγινε εκτενής διερεύνηση ως προς την αποτελεσματικότητα διαφόρων φυτορυθμιστικών ουσιών στη μεγιστοποίηση της βλαστογένεσης από έκφυτα κόμβου βλαστού.



BARBA IOVIS

RECENTIORVM

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Μεσογειακή βλάστηση

Η περιοχή της Μεσογείου είναι μια ιδιαίτερα φιλόξενη περιοχή για τα φυτά. Η ιδιαιτερότητα του κλίματος, η διαμόρφωση του εδάφους και η γεωγραφική της θέση, ευνόησαν εξαιρετικά τη βιοποικιλότητα της Μεσογειακής περιοχής. Από τα 20.000 περίπου γνωστά ως σήμερα φυτά της Μεσογείου, τα 6.000 περίπου φυτρώνουν στην Ελλάδα και από αυτά τα 600 περίπου είναι ενδημικά. Η Μεσογειακή βλάστηση περιορίζεται κατά κανόνα στις περιοχές των ακτών, επειδή μόνο σε αυτές εμφανίζονται οι τυπικές για την περιοχή, γνήσιες διαπλάσεις αειθαλών σκληρόφυλλων και τα στάδια της υποβάθμισής τους. Κατά κανόνα όμως, στη Μεσογειακή περιοχή λαμβάνονται και υπομεσογειακές περιοχές με υψηλό ποσοστό στοιχείων της Μεσογειακής χλωρίδας, δηλαδή τα βουνά με τις διάφορες ζώνες βλάστησης (Bärtels, 2011).

Το κλίμα του Μεσογειακού χώρου χαρακτηρίζεται κυρίως από ξηρά και θερμά καλοκαίρια και υγρούς, ήπιους χειμώνες, αλλά φημίζεται επίσης για τις ξαφνικές αλλαγές της θερμοκρασίας, τις καταρρακτώδεις βροχές ή τους πολύ ισχυρούς ανέμους που εκδηλώνονται σε διάφορες εποχές του χρόνου (Di Castri, 1981). Αυτές οι κλιματικές συνθήκες ασκούν βαθιά επίδραση στη βλάστηση και στην άγρια ζωή στην περιοχή. Ανάλογη είναι και η επίδραση της πολύμορφης και γεμάτης αντιθέσεις τοπογραφίας. Η περιοχή της Μεσογείου προσφέρει ένα τοπίο με συνεχείς εναλλαγές, με ψηλά όρη, βραχώδεις ακτές, αδιαπέρατες λόγχμες, ημιάγονες στέπες, παράκτιους υγρότοπους, αμμώδεις παραλίες και μυριάδες νησιά, με διάφορα σχήματα και μεγέθη, διάσπαρτα στη διαυγή γαλάζια θάλασσα. Σε αντίθεση προς τις συνήθεις εικόνες «ήλιου, θάλασσας και άμμου» που περιέχονται στα περισσότερα τουριστικά φυλλάδια, η Μεσόγειος είναι στην πραγματικότητα λοφώδης. Τα βουνά είναι πάντοτε παρόντα, ακόμη και στα νησιά. Έχοντας αποφύγει τις συνέπειες της τελευταίας εποχής των παγετώνων, όλες αυτές οι περιοχές φιλοξενούν τα δικά τους ιδιαίτερα είδη άγριας ζωής και ενδιαιτήματα.

Ως εκ τούτου, η Μεσόγειος δεν διαθέτει μόνο πολύ πλούσια βιοποικιλότητα, αλλά και μεγάλο αριθμό ειδών τα οποία υπάρχουν μόνο εδώ και πουθενά αλλού στον κόσμο. Τα Μεσογειακά οικοσυστήματα σε παγκόσμιο επίπεδο αν και καταλαμβάνουν λιγότερο από το 2 % της επιφάνειας της γης, φιλοξενούν 45.000 είδη αγγειόσπερμων, τα οποία αποτελούν το 18 % των ειδών (250.000 είδη) που αναφέρονται παγκοσμίως (Rundel, 2007). Μεσογειακές εκτάσεις εκτός από τη λεκάνη της Μεσογείου απαντούν σε διάφορες άλλες περιοχές του

κόσμου (Β. Αμερική, Ν. Αμερική, Μεσόγειο, Ν. Αφρική και Νοτιοδυτική Αυστραλία) (Walter, 1979, Di Castri, 1981, Barbour and Billings, 1988, Rundel, 2007) (Εικ. 1).

Η Λεκάνη της Μεσογείου αποτελεί το 60% όλων των περιοχών με μεσογειακό κλίμα παγκοσμίως και εκτείνεται σε απόσταση περίπου 3.800 χλμ. από τα δυτικά προς τα ανατολικά, από το άκρο της Πορτογαλίας έως τις ακτές του Λιβάνου, και σε απόσταση περίπου 1.000 χλμ. από τα βόρεια προς τα νότια, από την Ιταλία έως το Μαρόκο και τη Λιβύη. Ακόμη, περιλαμβάνει περίπου 5.000 νησιά της Μεσογείου Θάλασσας (Myers *et al.*, 2000). Η τοποθεσία της Λεκάνης ανάμεσα σε Ευρασία και Αφρική έχει συμβάλει στη μεγάλη πολυμορφία της χλωρίδας της και του περιβάλλοντος γενικότερα. Στη λεκάνη βρίσκονται βουνά με υψόμετρο έως 4.500 μέτρα, χερσόνησοι και ένα από τα μεγαλύτερα αρχιπελάγη του κόσμου. Σύμφωνα με τον Le Houerou (1981), η χλωρίδα της Μεσογείου περιλαμβάνει 15.000 είδη, και είναι η πλουσιότερη από τις πέντε περιοχές παγκοσμίως με το ίδιο κλίμα, όμως μια νεότερη μελέτη προσδιορίζει σε 25.000 τον αριθμό των φυτικών ειδών (Cowling *et al.*, 1996). Το ποσοστό ενδημικότητας δείχνει να είναι εξαιρετικά υψηλό, τόσο στην ξηρά όσο και στη θάλασσα. Από τα 25.000 καλλωπιστικά φυτά που έχουν εντοπισθεί έως τώρα, τα οποία αντιπροσωπεύουν περίπου το 10 % όλων των γνωστών φυτών του πλανήτη, περισσότερα από τα μισά είναι ενδημικά της περιοχής και έτσι η Μεσόγειος θεωρείται ένα από τα πιο ενδιαφέροντα σημεία στον κόσμο από πλευράς βιοποικιλότητας.

Ένα ακόμη χαρακτηριστικό της περιοχής είναι η εξαιρετικά μακροχρόνια σχέση της με τον άνθρωπο, η οποία άφησε τα σημάδια της σε μεγάλο μέρος του τοπίου. Η πανταχού παρούσα λόχμη της Μεσογείου, με την αφθονία λουλουδιών και αρωματικών φυτών, για παράδειγμα, είναι άμεσο αποτέλεσμα αιώνων ανθρωπογενών διεργασιών όπως είναι οι δασικές πυρκαγιές, η αποψίλωση, η εξάπλωση των πόλεων, η βόσκηση ζώων και οι καλλιέργειες. Επειδή η ανθρώπινη παρέμβαση έχει πολύ τοπικό χαρακτήρα, η λόχμη της Μεσογείου εξελίχθηκε σε ένα πολύπλοκο και δαιδαλώδες κινητό σύμπλεγμα ενδιαιτημάτων, το οποίο διαγράφει έναν τακτικό κύκλο εκφυλισμού και ανάπλασης. Η πολυπλοκότητα αυτής της δομής της βλάστησης εξηγεί επίσης γιατί οι περιοχές αυτές διαθέτουν τόσο πλούσια άγρια ζωή, και ιδίως φυτά και έντομα. Παρότι η λόχμη της Μεσογείου είναι συνώνυμη της περιοχής, δεν είναι σε καμία περίπτωση το μόνο εν προκειμένω πλούσιο σε είδη ενδιαίτημα. Σε πολλές περιοχές κυριαρχούν ακόμη μεγάλες εκτάσεις φυσικών, ουσιαστικά παρθένων δασών, τα οποία παραμένουν σχεδόν ανέπαφα από τον άνθρωπο. Σε αντίθεση με τα περισσότερα δάση της Κεντρικής και της Βόρειας Ευρώπης, στα οποία κυριαρχούν περίπου 12 είδη δένδρων, τα δάση της Μεσογείου εμφανίζουν πολύ μεγαλύτερη ποικιλότητα και φιλοξενούν έως 100 διαφορετικά είδη δένδρων.

Άλλες περιοχές της Μεσογείου είναι υπερβολικά ξηρές για την ανάπτυξη δένδρων ή πυκνής βλάστησης και καλύπτονται, αντίθετα, από εκτενείς λειμώνες. Εκ πρώτης όψεως, αυτές οι ημιάγονες στεπικές περιοχές μπορεί να φαίνονται έρημες και χωρίς ζωή, αλλά η προσεκτικότερη παρατήρηση αναδεικνύει μια εξίσου πλούσια άγρια ζωή. Εδώ υπάρχουν περισσότερα είδη φυτών από ό,τι σε όλες τις άλλες βιογεωγραφικές περιοχές της Ευρώπης μαζί. Η διαφοροποίηση του τοπίου είχε ως αποτέλεσμα την ανάπτυξη εξαιρετικά υψηλού αριθμού ενδημικών ειδών, ορισμένα εκ των οποίων περιορίζονται σε λίγες μόνον τοποθεσίες, όπως η σερατούλα των βράχων *Cheirolophus crassifolius* της Μάλτας, η οποία απαντά μόνον στις ανεμοδαρμένες απόκρημνες βραχώδεις ακτές της Μάλτας, ή ο πανέμορφος ελλέβορος *Helleborus cyclophyllus*, ο οποίος περιορίζεται στα όρη της Ροδόπης, στα σύνορα Ελλάδας–Βουλγαρίας. Όπως και άλλα είδη στη λεκάνη της Μεσογείου, τα φυτά ανέπτυξαν πολλούς τρόπους για την αντιμετώπιση των αδυσώπητων καυτών καλοκαιριών και των μακρόχρονων περιόδων ξηρασίας. Πολλά ανθίζουν πολύ νωρίς στην αρχή της περιόδου, ώστε να προλάβουν να δώσουν σπόρο προτού ο ήλιος γίνει υπερβολικά ζεστός. Άλλα αναπτύσσουν δερματώδη, αρωματικά φύλλα, τα οποία συμβάλλουν στη μείωση της απώλειας νερού. Με τόσο πολλά φυτά στην περιοχή, είναι αναμενόμενο να υπάρχει επίσης μεγάλη ποικιλία εντόμων και άλλων ασπόνδυλων. Πολλά έχουν αναπτύξει στενή σχέση με συγκεκριμένα φυτά και εξαρτώνται πλέον πλήρως από την παρουσία των εν λόγω φυτών για την επιβίωσή τους.

Η Μεσογειακή βλάστηση καλύπτει το 15% των χωρών της Λεκάνης της Μεσογείου (Le Houerou, 1981). Τα μεσογειακά οικοσυστήματα έχουν ιδιαίτερη σημασία για τη χώρα μας, γιατί καταλαμβάνουν το 40% της έκτασής της. Η Ελληνική βιοποικιλότητα είναι από τις μεγαλύτερες της Ευρώπης και της Μεσογείου. Η Ελληνική χλωρίδα περιλαμβάνει 6.300 taxa με 4.900 έως 5.500 είδη (Strid and Tan, 1992). Όταν η φύση αφηθεί ανενόχλητη διαμορφώνεται ένα τοπίο με πυκνότερη και ψηλότερη βλάστηση, πλησιέστερο σε αυτό που δημιουργεί αρχικά. Η προστασία και διατήρηση των τοπίων εξαρτάται από την προστασία και διατήρηση της βιοποικιλότητας των οικοσυστημάτων που τα συνθέτουν. Η σταθερότητα των οικοσυστημάτων εξαρτάται από την προστασία και διατήρηση των ειδών που συμμετέχουν στη δομή τους δηλαδή από την προστασία και διατήρηση της βιοποικιλότητας των ειδών και η προστασία και επιβίωση των ειδών, εξαρτάται από τη διατήρηση και προστασία της γενετικής βιοποικιλότητάς τους, δηλαδή τη διατήρηση των κληρονομικών μεταβολών τους σε όλο το εύρος τους (Dafis *et al.*, 1997).

Η Ελλάδα χαρακτηρίζεται επίσης και από τη μεγάλη της βιοποικιλότητα σε επίπεδο γενετικό, τοπίων και φυτοκοινωνιών-οικοσυστημάτων. Η βιοποικιλότητα, παρά τη διάκρισή της σε επίπεδα, πρέπει να αντιμετωπίζεται ως κάτι ενιαίο. Η προστασία κάθε επιπέδου

εξαρτάται από την προστασία του προηγούμενου ή επόμενου επιπέδου. Ο πλούτος της ελληνικής χλωρίδας οφείλεται στον συνδυασμό διαφόρων παραγόντων, όπως γεωϊστορικών, οικολογικών κ. ά. με αποτέλεσμα τον εμπλουτισμό της χλωρίδας με είδη, τα οποία μετανάστευσαν στον ελλαδικό χώρο από την κεντρική Ευρώπη, αλλά και από την Ανατολία και την Ποντιακή χλωριδική περιοχή, τον εμπλουτισμό της χλωρίδας από τον ανθρωπογενή παράγοντα και την δυνατότητα προσαρμογής ειδών με ιδιαίτερες οικολογικές απαιτήσεις στο πλήθος των διαφορετικών βιοτόπων, λόγω της τοπογραφικής ετερογένειας του ελλαδικού χώρου, αλλά και την δημιουργία νέων ταξινομικών μορφών, κατά τη διάρκεια των γεωλογικών αιώνων (Φοίτος *et al.*, 2009).

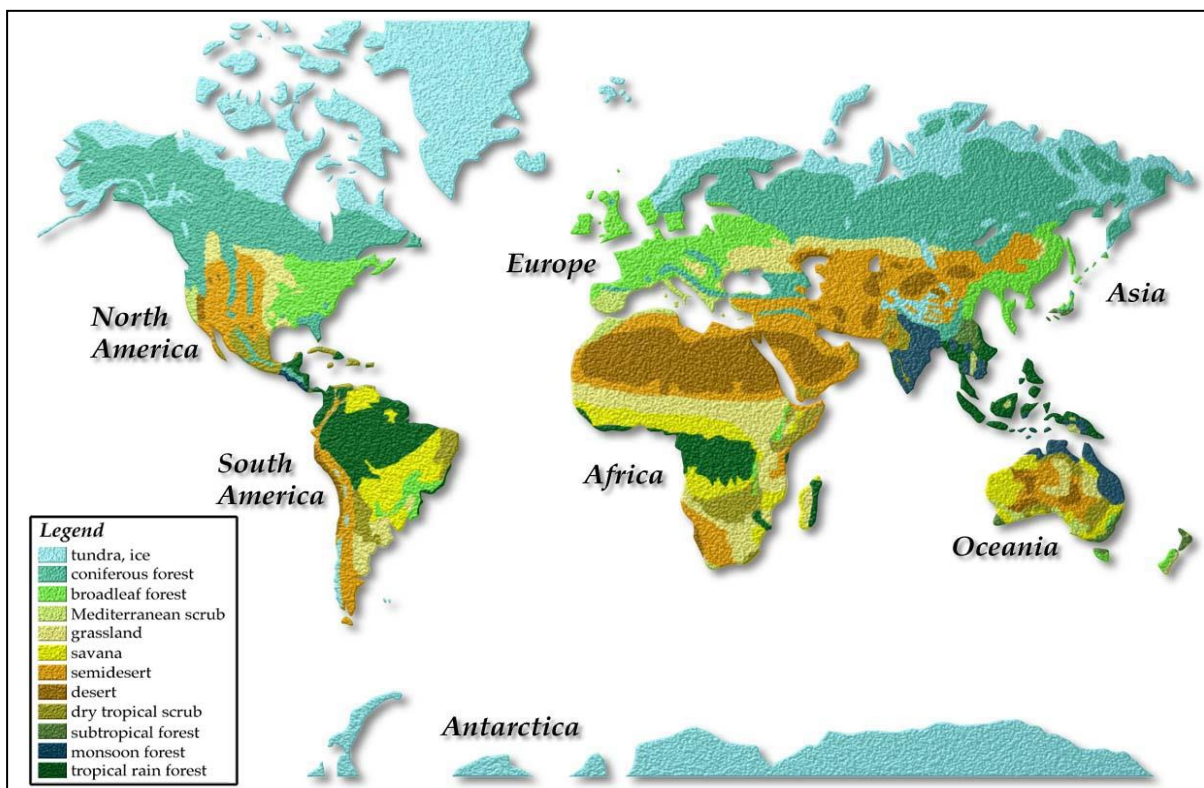
Κατά τον Polunin (1980) υπάρχουν τρεις βασικοί τύποι βλάστησης στη χερσόνησο των Βαλκανίων. Οι φυτοκοινωνίες αυτές της Μεσογείου ανήκουν στις εξής ζώνες βλάστησης: πεδινές και ημιορεινές ζώνες (0-700m περίπου), ορεινά δάση (700-1700m περίπου) και αλπικές-υποαλπικές ζώνες (1700-3000m περίπου). Στις πεδινές-ημιορεινές ζώνες ανήκουν τα αειθαλή δάση, η μακκία βλάστηση (*macchie*), τα φρύγανα (*garrigue*), τα φυλλοβόλα δάση, η ποώδης βλάστηση των πετρώδων εδαφών (*pseudo-steppe*), τα χασμόφυτα (*chasmophytes*) και η παράκτια βλάστηση. Στα ορεινά ανήκουν τα δάση των κωνοφόρων, ενώ στις αλπικές-ημιαλπικές ζώνες ανήκουν τα χαμόδεντρα (*scrub*), τα αλπικά λιβάδια-λειμώνες, οι πετρώδεις πλαγιές-πρανή και η βραχώδης βλάστηση. Στην Ελλάδα τα φρύγανα είναι ευρέως διαδεδομένα σε περιοχές όπως η Κρήτη (*A. hermanniae*), τα νησιά του Αιγαίου και του Ιονίου, η Πελοπόννησος (*A. tetraphylla*), η Στερεά Ελλάδα (*A. montana*), η Θεσσαλία (*A. aurea*, *A. vulneraria* subsp. *pulchella*), η Μακεδονία και η Θράκη (Polunin, 1980).

Έκφραση του κλίματος της μεσογειακής περιοχής (ελληνική χλωρίδα) αποτελούσε, άλλοτε, το αειθαλές σκληρόφυλλο δάσος *Quercus* (Δρυς), ύψους μέχρι και τα 18 m, το οποίο κάλυπτε τις πεδινές και ημιορεινές ζώνες της εν λόγω περιοχής. Τα άλλοτε κυρίαρχα δάση *Quercus* υπέστησαν, από την έντονη επίδραση του ανθρώπου (υλοτομίες, πυρκαγιές κ.λ.π.) και με τη σύγχρονη απόπλυση του εδάφους, σημαντική υποφάθμιση. Σήμερα η χαρακτηριστική βλάστηση της μεσογειακής περιοχής είναι οι διάφορες μορφές θαμνώδους βλαστήσεως. Η εν λόγω βλάστηση συνίσταται από μια διάπλαση αειφύλλων-σκληροφύλλων θάμνων με χαρακτηριστικό γνώρισμα τα σχετικά μικρά, δερματώδη φύλλα, επικαλυμμένα με κηρώσεις ουσίες και, γενικώς, με δομή που μειώνει την μεγάλη απώλεια ύδατος κατά τις ξηρές περιόδους (Φοίτος *et al.*, 2009).

Εκεί, όπου η θαμνώδης βλάστηση έχει υποστεί περαιτέρω υποβάθμιση, συναντώνται όλα τα στάδια διαδοχής της, δηλαδή οι σχηματισμοί *garrigue* ή φρυγάνων μέχρι και το γυμνό έδαφος. Ο όρος *garrigue* χρησιμοποιείται για τους χαμηλούς, θαμνώδεις σχηματισμούς της δυτικής

Μεσογείου, ιδιαιτέρως στην Ισπανία, στους οποίους κυριαρχεί η υποβαθμισμένη μορφή της *Quercus coccifera* κυρίως εξαιτίας της βοσκήσεως. Κυριαρχούν χαμηλόσωμα (<1 m ύψος) θαμνώδη είδη με εποχικό διμορφισμό, συχνά αρωματικά ή με βελονοειδή φύλλα (Margaris, 1981). Ενδεικτικά αναφέρονται τα: *Sarcopoterium spinosum*, L. Spach, *Phlomis fruticosa* L., *Cistus* sp., *Euphorbia acanthothamnus* Heldr & Sart. Ex Boiss., *Corydanthus capitatus* L., *Globularia alypum* L. Εντυπωσιακοί είναι οι μηχανισμοί προσαρμογής που έχουν αναπτύξει τα φρυγανικά είδη που τα καθιστούν ικανά να επιβιώσουν σε ένα ακραίο ξηροθερμικό μεσογειακό περιβάλλον (Margaris, 1981). Η ικανότητά τους να ευδοκιμούν και να αναπαράγονται σε δυσμενή περιβάλλοντα κάνει τα είδη αυτά κατάλληλα για φυτεύσεις σε περιοχές της Μεσογειακής ζώνης που κινδυνεύουν από ερημοποίηση (Φοίτος *et al.*, 2009).

Η υποβάθμιση μπορεί να φθάνει, ενίοτε, μέχρι το στάδιο του γυμνού εδάφους. Για το στάδιο αυτό χρησιμοποιείται ο όρος ερημοποίηση, με τον οποίον εννοείται η διαδικασία υποβαθμίσεως της γης σε ξηρές, ημίξηρες ή ύφυγρες περιοχές, που δημιουργούνται κυρίως από την άμεση ή έμμεση επέμβαση του ανθρώπου. Ο όρος αυτός παραπέμπει στις γνωστές συνθήκες των ερήμων και για αυτό γενικά δεν είναι αποδεκτός.



Εικ. 1. Παγκόσμιος χάρτης με την κατανομή των ζωνών βλάστησης. Το μεσογειακό κλίμα (πράσινο ανοιχτό χρώμα) συναντάται από 30° έως 45° γεωγραφικό πλάτος.

Πηγή: http://vasilikoulamarkou3.blogspot.gr/2013/03/blog-post_5.html

1.2 Οικοφυσιολογία σπόρων της Μεσογειακής βλάστησης

Υπάρχουν πολλά φυτικά είδη, που βλαστάνουν, αυξάνονται και αναπτύσσονται σε περιοχές με έντονες εποχιακές διακυμάνσεις. Συνήθως τέτοιες κατηγορίες φυτών έχουν αναπτύξει μηχανισμούς, που θα τους εξασφαλίσουν τη διατήρησή τους στη ζωή κατά τη διάρκεια των μη ευνοϊκών περιόδων. Έτσι, η αδυναμία των σπερμάτων να βλαστήσουν κάτω από αντίξοες συνθήκες, όπως έλλειψη νερού ή οξυγόνου, υψηλές ή χαμηλές θερμοκρασίες, αίρεται μόλις οι περιβαλλοντικές συνθήκες πλησιάσουν τις πιο ευνοϊκές τιμές. Η κατανόηση της οικοφυσιολογίας του σπόρου είναι θεμελιώδους σημασίας για τον πολλαπλασιασμό, διάδοση και διάσωση των ειδών, αλλά για να γίνει εφικτή πρέπει να συνεκτιμηθούν παράγοντες όπως η ύπαρξη ή όχι ληθάργου, οι κατάλληλες συνθήκες για βλάστηση συμπεριλαμβανομένων και οι κλιματολογικές συνθήκες στο φυσικό περιβάλλον που αναπτύσσεται ο σπόρος στο διάστημα από την ωρίμανσή του έως τη βλάστηση.

Σε πολλά είδη η φύτευση των σπόρων επιτυγχάνεται χωρίς καμία προεργασία ή ειδική μεταχείριση, αρκεί να βρεθούν οι σπόροι κάτω από ιδανικές συνθήκες υγρασίας, θερμοκρασίας και σύνθεσης αερίων (Taiz and Zeiger, 2006). Σε άλλα είδη, όμως, απαιτείται ειδικός χειρισμός, χωρίς τον οποίο δε φυτρώνουν οι σπόροι. Όταν ένας ή περισσότεροι από τους παραπάνω παράγοντες δε βρίσκεται στα ευνοϊκά όρια που επιτρέπουν τη φύτευση, τότε ο σπόρος βρίσκεται σε κατάσταση νάρκης, δηλαδή σε ένα είδος ληθάργου που ονομάζεται επιβεβλημένος (endoredced). Ο λήθαργος είναι ένα πολύπλοκο φαινόμενο και ο βαθμός του ποικίλει ακόμα και μεταξύ διαφορετικών ατόμων του ίδιου είδους, μεταβάλλεται από περιοχή σε περιοχή αλλά και από χρονιά σε χρονιά (Poulsen, 1996, Wolf and Kamondo, 1993). Οι κυριότεροι λόγοι που οδηγούν στην αναστολή της φύτευσης (ληθάργου) είναι το σκληρό περίβλημα, η μη καλή ανάπτυξη του εμβρύου και οι ανασταλτικές ουσίες. Το σκληρό περίβλημα είναι μια από τις πιο συνηθισμένες αιτίες ληθάργου των σπόρων. Σπόροι με σκληρό περίβλημα θεωρούνται αυτοί οι οποίοι μετά από εμβάπτιση σε νερό για 10 ημέρες συνεχίζουν να είναι σκληροί (Rohmeder, 1972, Krüssmann, 1981). Το σκληρό περίβλημα μπορεί να προκαλέσει λήθαργο με τρεις τρόπους, όπως να είναι αδιαπέραστο στο νερό, σε αέρια και να περιορίζει ή να παρεμποδίζει μηχανικά την ανάπτυξη-αύξηση του εμβρύου. Η Nicolaeva (1969) ταξινόμησε πρώτη το λήθαργο των σπόρων σε έξι κατηγορίες. Ο λήθαργος διακόπτεται με την έκθεση σε χαμηλή θερμοκρασία Nicolaeva (1969), ενώ αναφέρεται ότι η διατήρηση των σπόρων, ξηρών, σε θερμοκρασία δωματίου, μπορεί να απομακρύνει τον λήθαργο του σπόρου (Toole and Toole, 1941).

Ένας ασφαλής, γενικός κανόνας είναι να συλλέγουμε τους σπόρους όταν ξεκινά ή διασπορά τους στη φύση (Baskin and Baskin, 2001). Οι σπόροι πρέπει να συλλέγονται στο στάδιο πλήρους ωρίμανσης αν και υπάρχουν σπόροι που μπορούν να βλαστήσουν ανώριμοι, αν τοποθετηθούν αμέσως μετά τη συλλογή τους για βλάστηση (Hume, 1984). Το φως μπορεί να επιδράσει στη βλαστικότητα των σπόρων και σε είδη με λήθαργο μπορεί να υποκατασταθεί από το ψύχος όπως στο *Picea mariana* (Farmer *et al.*, 1984). Σε άλλα είδη αντίθετα η υψηλή θερμοκρασία υποκατέστησε την ανάγκη σε φως για βλάστηση των σπόρων του *Hygrophila auriculata* (Amritphale *et al.*, 1989). Η ανάγκη σε φως μπορεί να ποικίλει ανάλογα με τη θερμοκρασία (Baskin and Baskin, 2001). Ο Haywood (1994) μελέτησε την βλάστηση των σπόρων του είδους *Quercus falcata*. Τα βαλανίδια βλάσταναν μόνο τον πρώτο χρόνο από την συγκομιδή τους και καθόλου τα επόμενα έτη.

Σε πολλά ξηροφυτικά μεσογειακά είδη έχειδειχθείό,τι καταλληλότερες θερμοκρασίες για βλάστηση των σπόρων είναι 15-20 °C (Papafotiou and Stragas, 2009, Bertsouklis and Papafotiou, 2013, Papafotiou and Martini, 2016).

1.3 Πολλαπλασιασμός αυτοφυών της Μεσογειακής βλάστησης

Στην Ελλάδα υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για την εξερεύνηση όχι μόνο αποτελεσματικών μεθόδων πολλαπλασιασμού αυτοφυών ειδών, αλλά και αποτελεσματικών μεθόδων για τη διατήρησή τους και την αξιοποίησή τους ως καλλωπιστικά φυτά (Thanos and Doussi, 1995, Thanos *et al.*, 1995, Takos and Efthimiou, 2003, Maloupa *et al.*, 2005, 2008, Kartsonas and Papafotiou, 2007, Papafotiou and Stragas, 2009, Bertsouklis and Papafotiou, 2009, 2010, 2013, Martini and Papafotiou, 2013, Akoumianaki-Ioannidou *et al.*, 2015). Την τελευταία εικοσαετία στο εργαστήριο Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, έχει μελετηθεί αρκετά ο μικροπολλαπλασιασμός ενός μεγάλου αριθμού αυτοφυών ειδών, για την εισαγωγή τους σε εμπορική χρήση ως καλλωπιστικά φυτά, παράδειγμα τέτοιων ειδών είναι το *Arbutus andrachne*, το *Arbutus unedo*, το φυσικό τους υβρίδιο *Arbutus x andrachnoides*, το *Dianthus fruticosus*, το *Euphorbia characias*, το *Globularia alypum*, το *Lithodora zahnii*, το *xMalosorbus florentina*, το *Quercus euboica*, το *Sideritis athoa*, το *Thymelea hirsute* και πολλά άλλα είδη αυτοφυών.

Η ζήτηση αυτοφυών ειδών αυξάνεται όλο και περισσότερο, καθώς συνέχεια πολλοί ανακαλύπτουν τα πολλά πλεονεκτήματά τους και έχει οδηγήσει στην αξιοποίηση πολλών αυτοφυών ειδών ως καλλωπιστικά. Επίσης η κατασκευή και βελτίωση των πρανών των δρόμων θεωρείται βασικό συστατικό της αποκατάστασης της βλάστησης (Tinsley *et al.*, 2006). Κατά τους Diekelmann και Schuster (2002) η αρχιτεκτονική τοπίου προσεγγίζεται ως εγκατάσταση φυσικών τοπίων. Υπάρχουν αναφορές για τον τρόπο πολλαπλασιασμού και καλλιέργειας αυτοφυών ειδών σε διάφορες περιοχές, όπως του Ειρηνικού ωκεανού (Rose *et al.*, 1998), της Νέας Ζηλανδίας (Cooper and Cambie, 1991, Metcalf, 2007) και της Αυστραλίας (Elliot *et al.*, 1980, 1997). Η επιβίωση των απειλούμενων ειδών και η διάσωσή τους μπορεί να εξασφαλιστεί με τον *in vitro* πολλαπλασιασμό. Εκεί όπου η διάσωση των απειλούμενων ειδών στο φυσικό τους περιβάλλον είναι ανεπαρκής, καθώς οι κίνδυνοι που απειλούν τα φυτά δεν μπορούν να αποφευχθούν ολοκληρωτικά (Broussalis, 1977). Σπάνια και απειλούμενα είδη φυτών ανά τον κόσμο έχουν πολλαπλασιαστεί με τη χρήση μεθόδων *in vitro* πολλαπλασιασμού. Το εργαστήριο Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου, δραστηριοποιήθηκε το 2012-2015 στην αξιολόγηση θαμνωδών και ποωδών αυτοφυών φυτών με στόχο τη χρήση τους σε αρχαιολογικούς χώρους για διαχείριση της βλάστησης και ανάδειξη του χώρου στα πλαίσια του προγράμματος ARCHAEOSCAPE (2012 - 2015). Επιλέχθηκαν τα ακόλουθα αυτοφυή θαμνώδη είδη: *Anthyllis hermanniae*, *Anthyllis barba-jovis*, *Ashodelus fistulosus*, *Atriplex halimus*, *Ballota acetabulosa*, *Calamintha nepeta*, *Calamintha cretica*, *Limoniastrum*

monopetalum, *Lomelosia hymettia*, *Teucrium capitatum*, *Thymelaea hirsuta*, *Thymelaea tartonraira*. Μελετήθηκαν τρεις μέθοδοι πολλαπλασιασμού, με σπόρο, μοσχεύματα και μικροπολλαπλασιασμό, και καθορίστηκε η πιο αποτελεσματική μέθοδος πολλαπλασιασμού για κάθε είδος και αναπτύχθηκε ένα ολοκληρωμένο πρωτόκολλο παραγωγής πολλαπλασιαστικού υλικού (Martini and Papafotiou, 2013, Akoumianaki-Ioannidou *et al.*, 2015, Papafotiou *et al.*, 2016, Vlachou *et al.*, 2016, Martini and Papafotiou, 2016, Martini *et al.*, 2016, Papafotiou and Martini, 2016, Martini *et al.*, 2017, Vlachou *et al.*, 2017).

Στη φύση τα φυτά πολλαπλασιάζονται με σπόρο. Ο πολλαπλασιασμός επιλεγμένων ατόμων είναι μεγάλης σημασίας. Ο εγγενής πολλαπλασιασμός δεν εξασφαλίζει γενετική ομοιομορφία και σταθερότητα και τα χαρακτηριστικά ενός γονότυπου μπορεί να εξαφανιστούν. Αυτά τα προβλήματα μπορούν να ξεπεραστούν με τις παραδοσιακές τεχνικές του αγενούς πολλαπλασιασμού, δηλαδή με μοσχεύματα ή με μικροπολλαπλασιασμό (Hartman *et al.*, 1997), παρ' ότι ο εγγενής πολλαπλασιασμός είναι ο πιο οικονομικός τρόπος για μαζική παραγωγή φυτών σε ένα φυτώριο (Macdonald, 2006).

1.4 Το γένος *Anthyllis*

1.4.1 Βοτανική ταξινόμηση

Σύμφωνα με το σύστημα κατάταξης κατά Cronquist (1981), το γένος *Anthyllis* κατατάσσεται επιστημονικά ως εξής:

Kingdom	Plantae
Subkingdom	Tracheobionta
Superdivision	Spermatophyta
Phylum	Magnoliophyta (Angiosperms)
Class	Magnoliopsida (Dicotyledons)
Subclass	Rosidae
Order	Fabales
Family	Fabaceae (Leguminosae or Papilionaceae)
Subfamily	Faboideae
Tribus	Loteae
Genus	<i>Anthyllis</i>

1.4.2 Βοτανική περιγραφή

Η οικογένεια Fabaceae (Leguminosae) θεωρείται ως η τρίτη μεγαλύτερη οικογένεια φυτών στον κόσμο. Περιλαμβάνει 751 γένη και 19.000 είδη φυτών, όπως δενδρώδη, θαμνώδη, ποώδη πολυετή ή ετήσια είδη φυτών, εκ των οποίων περίπου το 7% αντιστοιχεί σε ανθόφυτα (Cronquist, 1981). Σύμφωνα με τα περισσότερα συστήματα ταξινόμησης των φυτών, συμπεριλαμβανομένου και του συστήματος APG II System (Angiosperm Phylogeny Group, 2009) η οικογένεια ανήκει στην τάξη Fabales και διαχωρίζεται σε τρεις υποοικογένειες: Mimosoideae (περιλαμβάνει 80 γένη και 3.200 είδη), Caesalpinioideae (περιλαμβάνει 170 γένη και 2.000 είδη) και Faboideae (περιλαμβάνει 470 γένη και 14.000 είδη) (Cronquist, 1981, Dahlgren, 1989).

Η υποοικογένεια Faboideae (Papilionoideae) είναι ευρέως διαδεδομένη και τα μέλη της είναι προσαρμοσμένα σε ποικίλα περιβάλλοντα και περιλαμβάνει δέντρα, θάμνους ή ποώδη φυτά. Τα πέντε μεγαλύτερα γένη θεωρούνται τα *Astragalus* (πάνω από 3.000

είδη), *Acacia* (πάνω από 1.000 είδη), *Indigofera* (περίπου 700 είδη), *Crotalaria* (περίπου 700 είδη) και *Mimosa* (περίπου 500 είδη), τα οποία αποτελούν το ένα τέταρτο της οικογένειας Fabaceae. Το γένος *Anthyllis* ανήκει στην οικογένεια Fabaceae (κυαμώδη) και περιλαμβάνει 20 περίπου είδη που απαντώνται σε Ευρώπη, Μέση Ανατολή και Βόρεια Αφρική. Τα φυτά είναι μονοετή ποώδη και θαμνώδη είδη ή πολυετή ξυλώδη, με φύλλα απλά, τρίφυλλα ή πτερωτά περιττόληκτα, με φυλλάρια ακέραια και άνευ παραφύλλων, μερικές φορές με έλικες. Ευδοκίμούν σε φτώχα αμμώδη και βραχώδη εδάφη, ενώ τα άνθη αναλόγως το είδος μπορεί να έχουν κίτρινο, ερυθρό ή λευκό χρώμα, σχεδόν επιφυή σε πυκνά «κεφάλια» υποβασταζόμενα με παλαμοειδώς περιβληματικά φύλλα, με τον καρπό να περικλείεται μέσα με 1-2 σπέρματα (Καββάδας, 1956, Strid, 1980). Πολλά φυτά μεγάλων καλλιεργειών και διακοσμητικά είδη έχουν ριζικά φυμάτια με βακτήρια, τα οποία έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν το ελεύθερο άζωτο της ατμόσφαιρας (Strid, 1980).

Ο αριθμός των ειδών βέβαια που περιλαμβάνει το γένος ποικίλει ανάλογα με το συγγραφέα. Αρχικά στο γένος *Anthyllis* αναγνωρίστηκαν 5 είδη: *A. tetraphylla*, *A. gerardii*, *A. cornicina*, *A. hamosa* και *A. lotoides* (Linnaeus, 1753, 1767, de Candolle, 1825). Ωστόσο, πολλοί συγγραφείς συνέχιζαν να θεωρούν αυτά τα 5 είδη ότι ανήκουν στο γένος *Anthyllis* (Bentham and Hooker, 1865, Taubert, 1894, Cullen, 1968, Polhill, 1981, Akulova, 1985, 1986), ενώ το 1982 ο Pignatti κάνει αναφορά για 6 είδη του γένους που απαντώνται στην Ιταλία, τα *A. hermanniae*, *A. barba-jovis*, *A. montana*, *A. gerardi*, *A. vulneraria* (με 13 υποείδη) και *A. tetraphylla*. Για 18 έως 20 περίπου είδη κάνουν λόγο οι, Καββάδας (1956), Lassen (1986), Greuter *et al.* (1989), Benedí (1998, 2000) και Nanni *et al.* (2004), ενώ ο Strid (1980) κάνει λόγο για 30 είδη κυρίως στην Παραμεσογειακή περιοχή και Δ. Ασία. Ο Sokoloff (2003a) αναγνώρισε 18 γένη της φυλής Loteae, εκ των οποίων τα μεγαλύτερα είναι: *Lotus* L. (130 είδη), *Hippocrepis* L. (34 είδη), *Coronilla* L. (22 είδη) και *Anthyllis* L. (22 είδη), ενώ σε μια πιο πρόσφατη έρευνα των Degtjareva *et al.* (2012), μετά από την φυλογενετική ανάλυση του γένους *Anthyllis* γίνεται διαχωρισμός των ειδών σε 6 κλάδους (clade), όπου στο καθένα συμπεριλαμβάνονται 2-5 είδη. Τα είδη που κατατάσσονται στα ίδια τμήματα παρουσιάζουν τα ίδια χαρακτηριστικά και είναι τα εξής: The *Vulneraria* clade (*A. lemanniana* και *A. vulneraria* (με 47 υποείδη)), The *Barba-Jovis* clade (*A. aurea*, *A. barba-jovis*, *A. hermanniae*, *A. hystrix* και *A. splendens*), The *Cornicina* clade (*A. circinnata*, *A. cornicina*, *A. hamosa* και *A. lotoides*), The *Dorycnioides* clade (*A. onobrychoides*, *A. polycephala*, *A. ramburii*, *A. rupestris*, *A. tejedensis* (με 2 υποείδη) και *A. warnieri*), The *Oreanthyllis* clade (*A. lagascana* και *A. montana* (με 4 υποείδη)) και The *Terniflora* clade (*A. cytisoides* και *A. terniflora*). Ο κλάδος

Barba-Jovis είναι ο μόνος ποικιλόμορφος κλάδος του γένους *Anthyllis*, ο οποίος απαντάται στις περιοχές της κεντρικής και ανατολικής Μεσογείου.

Η φυλογενετική ανάλυση των ειδών από τους Degtjareva *et al.* (2012) δημιουργεί ένα πάζλ μεταξύ των ειδών του ίδιου κλάδου. Το είδος *A. hystrix* είναι μορφολογικά πιο κοντά στο είδος *A. hermanniae*, αλλά ομαδοποιείται περισσότερο με το *A. barba-jovis*, όμως από τα δεδομένα ITS (nuclear ribosomal internal transcribed spacer regions) το *A. hystrix* θεωρείται πως είναι υβρίδιο, βασιζόμενο στο γεγονός ότι είναι οκταπλοειδές με $2n=84$ (Cardona *et al.*, 1986), ενώ τα υπόλοιπα είδη του γένους, συμπεριλαμβανομένου των *A. hermanniae* και *A. barba-jovis*, είναι διπλοειδή. Οπότε το *A. hystrix* δεν έχει ενδιάμεσα μορφολογικά χαρακτηριστικά με τα *A. hermanniae* και *A. barba-jovis* και πιθανολογείται πως είναι ένα αρχαίο υβρίδιο, του οποίου οι γονείς, ή τουλάχιστον ο ένας, να έχει πλέον εξαφανιστεί (Degtjareva *et al.*, 2012). Ωστόσο, οι Kropf *et al.* (2002) θεωρούν ότι το *A. montana* παρουσιάζει ομοιότητες με τα είδη *A. barba-jovis* και *A. aurea*. Στην βόρεια Ευρασία έχουν καταμετρηθεί 15 είδη του γένους *Anthyllis* και 2 υβρίδια. Το *A. baltica* είναι αποτέλεσμα διασταύρωσης των ειδών *A. maritima* x *A. vulneraria* και το *A. polyphyloides* που είναι διασταύρωση μεταξύ των *A. arenaria* x *A. macrocephala*. Τα υβρίδια αυτά απαντώνται στην βορεια-ανατολική Ευρώπη, δηλαδή Λευκορωσία, Λιθουανία, Εσθονία, Λετονία και Ρωσία (Yakovlev *et al.*, 1996). Το 2016 οι Ferrer-Gallego *et al.*, κάνουν λόγο για 5 υβρίδια του γένους, τα *A. x baltica*, *A. x cazulensis*, *A. x currasii*, *A. x fortuita*, *A. x polyphyloides*.

Στην χώρα μας κατά τον Καββάδα (1956) απαντούν 6 είδη του γένους, τα *A. vulneraria* (ανθυλλίς η τραυματική), *A. hermanniae* (ανθυλλίς η ερμάνειος), *A. cytisoides* (ανθυλλίς η κυτισοειδής), *A. barba-jovis* (ανθυλλίς ο πάγων του Διός), *A. aurea* (ανθυλλίς η χρυσή) και *A. montana* (ανθυλλίς η ορεινή). Το αρχαίο ελληνικό όνομα «ανθυλλίς» χρησιμοποιήθηκε από το Διοσκουρίδη για ένα είδος *Cressa* (Convolvulaceae) και από τον Πλίνιο για ένα είδος *Ajuga* (Lamiaceae) (Tan and Strid, 2009). Το πιο διαδεδομένο, πολύμορφο και γνωστό είδος του γένους είναι η *A. vulneraria*, το οποίο εκτός από τη Μεσόγειο και τα περισσότερα μέρη της Ευρώπης απαντάται στην δυτική Ασία (Καύκασο), στη βόρεια Αφρική και φθάνει προς τα νότια μέχρι τη Σαχάρα και την Αιθιοπία (Αβυσσηνία) και στα Ιμαλάια, (Strid, 1980, 2006, Bärtels, 2011). Στις αλπικές ζώνες και πιο συγκεκριμένα στα όρη της Βαλκανικής χερσονήσου έχουν καταγραφεί τα είδη *A. aurea* και *A. vulneraria* (Strid, 1980), ενώ στην Ελλάδα στη χερσόνησο της Χαλκιδικής στο όρος Άθως έχει καταγραφεί το *A. montana* και στο όρος Όλυμπος το *A. aurea* (Σφήκας, 1974, Tan and Strid, 2009). Η *A. hermanniae* είναι είδος των περιοχών της ανατολικής Μεσογείου (Boratynski *et al.*, 1992), ενώ στην Ελλάδα εξαπλώνεται στην ευμεσογειακή ζώνη βλάστησης (*Quercetalia ilicis*) (Αθανασιάδης, 1986) και απαντάται

κυρίως σε φρυγανικά οικοσυστήματα ή σε ανοίγματα των πευκοσυστάδων. Ως πρόσκοπο είδος μπορεί και αναπτύσσεται σε υποβαθμισμένα εδάφη (Boratynski *et al.* 1992).

Η *A. barba-jovis* αυτοφύεται σε διάφορα ενδιαιτήματα κατά μήκος απόκρημνων βραχωδών περιοχών της κεντροδυτικής λεκάνης της Μεσογείου (από την ανατολική Ισπανία μέχρι την βόρεια Γιουγκοσλαβία, την Ελλάδα έως την Κρήτη) και της Βορείου Αφρικής (Pignatti, 1982, Southon, 1994, Biondi *et al.*, 2000, Blamey *et al.*, 1993). Το 2007 ο Biondi κατατάσσει το είδος *A. barba-jovis* στην βλάστηση των βραχώδων ακτών της Μεσογείου, λόγω της ανθεκτικότητας του είδους στην αλατότητα και της βλάστησής του σε βραχώδεις και πετρώδεις περιοχές. Κατά τον Sokoloff (2003a) τα είδη *A. aurea* και *A. splendens* χαρακτηρίζονται ως υποείδη του είδους *A. barba-jovis*, ενώ οι Dimopoulos *et al.* (2013) αντικαθιστούν κάποια από τα είδη της ελληνικής χλωρίδας με άλλα, γεγονός που προκύπτει από μια καταγραφή που έγινε σε 13 χλωριδικές περιοχές της Ελλάδας. Γίνεται αναφορά για 5 είδη του γένους, όπως τα *A. vulneraria* (με 7 υποείδη), *A. hermanniae* (με 1 υποείδος), *A. montana* (με 1 υποείδος), *A. aurea* και *A. splendens*. Τα είδη *A. barba-jovis* και *A. cytisoides* αντικαταστάθηκαν με το είδος *A. splendens*, το οποίο θεωρείται ενδημικό είδος της ελληνικής χλωρίδας και παράλληλα περιορισμένου εύρους είδος. Θεωρείται ως χαμόφυτο (chamaephytes) και ημικρυπτόφυτο (hemicyptophytes), δηλαδή φύεται σε βραχώδεις και πετρώδεις περιοχές, τοίχους και χαράδρες, σε αλπικές και υποαλπικές ζώνες (Dimopoulos *et al.*, 2013).

Τα είδη του γένους χρησιμοποιούνται ως τροφή από τις λάρβες μερικών ειδών Lepidoptera, συγκεκριμένα του γένους *Coleophora* που τρέφονται αποκλειστικά από κάποια είδη: *C. acanthyllidis*, *C. protecta* (*A. tragacanthoides*), *C. hermanniella* (*A. hermanniae*), *C. vestalella* (*A. cytisoides*) και *C. vulnerariae* (*A. vulneraria*).

1.4.3 Πολλαπλασιασμός του γένους *Anthyllis*

Για πολλά είδη, κυρίως τα δασικά, αυτός ο τρόπος πολλαπλασιασμού παρουσιάζει δυσκολία λόγω του λήθαργου που έχουν οι σπόροι. Για παράδειγμα, σπόροι από πολλά ξυλώδη είδη, κυρίως της οικογένειας Fabaceae (Baskin and Baskin, 1998, Baskin, 2003), στην οποία ανήκει το γένος *Anthyllis*, παρουσιάζουν λήθαργο που οφείλεται στο σκληρό και αδιαπέραστο περίβλημα. Το πρόβλημα φυτρωτικότητας των σπόρων πολλών Fabaceae, λόγω της ύπαρξης φυσιολογικού ληθάργου και του αδιαπέραστου περιβλήματος των σπόρων, επιβεβαιώνεται ξανά και από άλλους ερευνητές (White, 1908, Hyde, 1954, Côme, 1970, Taylorson and Hendricks, 1977).

Οι σπόροι των ειδών *A. cytisoides*, *A. lagascana* και *A. barba-jovis* παρουσιάζουν δυσκολία στη φύτευση, η οποία οφείλεται στο περίβλημα (Ibanez and Passera, 1997, Prieto *et al.*, 2004, Morbidoni *et al.*, 2008). Επομένως, πριν τη σπορά απαιτείται μία προμεταχείριση των σπόρων αυτών των ειδών που θα «μαλακώσει» το σκληρό περίβλημα για μια γρήγορη, ομοιόμορφη και υψηλή φυτρωτικότητα. Το «μαλάκωμα» του περιβλήματος μπορεί να επιτευχθεί με μηχανική απόξεση (σκαριφισμός) των σπόρων (Ibanez and Passera 1997, Baes *et al.* 2002), με εμβάπτιση των σπόρων σε πυκνό θειικό οξύ (Liu *et al.* 1981, Demel, 1996, Fu *et al.*, 1996, Sacheti and Al-Rawahy, 1998, Pandita *et al.*, 1999, Πιπινής *et al.*, 2003), με τοποθέτηση των σπόρων σε ζεστό νερό (Lopez and Aviles, 1988) και με έκθεση των σπόρων σε υψηλές θερμοκρασίες (Martin *et al.*, 1975, Bonner *et al.*, 1994). Οι Πιπινής *et al.* (2003, 2009), μελέτησαν την επίδραση διαφόρων χειρισμών, που εφαρμόζονται για τη διακοπή του ληθάργου του περιβλήματος, με σκοπό την επίτευξη μίας υψηλής φυτρωτικής ικανότητας των σπόρων των ειδών *A. hermanniae*.

Ορισμένα είδη φρυγάνων έχουν αναπτύξει μηχανισμούς που τους εξασφαλίζει την επιβίωσή τους από τη φωτιά (Arianoutsou-Faraggitaki and Margaritis, 1982, Arianoutsou and Thanos, 1996). Οι σπόροι των ειδών της οικογένειας Cistaceae έχουν σκληρό περίβλημα και η φύτευσή τους ευνοείται από τις υψηλές θερμοκρασίες (Thanos *et al.*, 1992). Η επίδραση των υψηλών θερμοκρασιών των μεσογειακών κλιμάτων στην βλαστικότητα σπόρων της οικογένειας Fabaceae, έδειξαν ισχυρές ενδοπαραλλαγές (Herranz *et al.*, 1997).

Οι Μαρτίνη και Παπαφωτίου (2016), μελέτησαν την επίδραση της φυσιολογίας του εκφύτου και των φυτορρυθμιστικών ουσιών του υποστρώματος στα διάφορα στάδια του *in vitro* πολλαπλασιασμού της *Anthyllis hermanniae* και κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι τα έκφυτα από σπορόφυτα εγκαταστάθηκαν σε υψηλότερα ποσοστά και σχημάτισαν περισσότερους βλαστούς συγκριτικά με τα έκφυτα από ενήλικα αυτοφυή φυτά, τα οποία αντέδρασαν σε λίγο υψηλότερα ποσοστά, ενώ τόσο στα ενήλικα όσο και στα νεανικά έκφυτα, οι υψηλότερες τιμές καταγράφηκαν σε υπόστρωμα με 1,0 mg l⁻¹ BA και οι μικρότερες στο υπόστρωμα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, ενώ σε υπόστρωμα που περιείχε BA σχηματίστηκαν οι περισσότεροι βλαστοί και σε αυτό με ZEA οι πιο μακριοί βλαστοί.

Οι Gavidia *et al.* (1997), μελέτησαν επίσης την επίδραση της φυσιολογίας του εκφύτου και των φυτορρυθμιστικών ουσιών του υποστρώματος στην *Anthyllis cytisoides*, και βρήκαν ότι επίσης, απαιτήθηκε η προσθήκη BA στο υπόστρωμα, για την ανάπτυξη πλευρικών βλαστών και το σχηματισμό πολλαπλών βλαστών, ιδιαίτερα στις καλλιέργειες από ενήλικα φυτά, απ' ότι από σπορόφυτα.

Οι Romano *et al.* (2002), ανέπτυξαν μια επιτυχή μέθοδο μικροπολλαπλασιασμού του είδους *Ceratonia siliqua*, χρησιμοποιώντας έκφυτα κόμβων που είχαν έναν τουλάχιστον οφθαλμό.

Οι Μαρτίνη και Παπαφωτίου (2016), στο στάδιο ριζοβολίας της *Anthyllis hermanniae*, χρησιμοποίησαν υπόστρωμα MS μισής δύναμης, με ή χωρίς την προσθήκη IBA και αναφέρουν ότι η φυσιολογική κατάσταση των μικροβλαστών μπορεί να μην επηρέασε το ποσοστό ριζοβολίας τους, επέδρασε όμως στα χαρακτηριστικά των σχηματιζόμενων ριζών, ενώ μικροβλαστοί από ενήλικα και νεαρά φυτά ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό στο υπόστρωμα που περιείχε 4,0 mg l⁻¹ IBA.

Οι Gavidia *et al.* (1997), αναφέρουν ότι για το στάδιο της ριζοβολίας της *Anthyllis cytisoides*, ενδείκνυται η χρήση υποστρώματος SH μισής δύναμης, εμπλουτισμένο με IBA ή NAA, καθώς στο υπόστρωμα MS πήραν πολύ χαμηλά ποσοστά ριζοβολίας.

1.4.4 *Anthyllis barba – jovis* L.

Η *Anthyllis barba-jovis* L., οικ. Fabaceae (κοιν. Ανθυλλίς ή Γενειάδα του Δία) είναι ένας πολυετής, αειθαλής θάμνος, αραιά διακλαδισμένος με αργυρόχρωμη εμφάνιση και σύνηθες ύψος που φθάνει το 0,5-1,5 m (Bärtels, 2011). Αυτοφύεται σε διάφορα ενδιαιτήματα κατά μήκος απόκρημνων βραχωδών περιοχών της κεντροδυτικής λεκάνης της Μεσογείου και της Βορείου Αφρικής (Καββάδας, 1956, Pignatti, 1982, Southon, 1994, Paradis, 1997, Biondi *et al.*, 2000, Blamey *et al.*, 1993) (Εικ. 2). Η *A. barba-jovis* δεν συμπεριλαμβάνεται στην Διεθνή Ένωση για τη διατήρηση της φύσης (IUCN) Κόκκινη λίστα, αν και είναι προστατευόμενο είδος σε εθνικό επίπεδο στη Γαλλία (Danton and Baffray, 1995). Στην Κροατία το είδος περιλαμβάνεται σε κατάλογο με 44 προστατευόμενα είδη, γεγονός που καθιστά ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα τη μελέτη του *in vitro* πολλαπλασιασμού του (Trinajstic, 1994, Šatović, 2002), ενώ στην Ιταλία θεωρείται ότι είναι στην κατηγορία κινδύνου σε διάφορες περιοχές (Conti *et al.*, 1997).

Έχει συμπαγή ορθόκλαδη ανάπτυξη (Εικ. 3) και σύνθετα χνοώδη φύλλα κατ' εναλλαγή, πτερωτά, περιττόληκτα, με 13-19 φυλλάρια (τουλάχιστον 9), στενά ελλειπτικά έως στενά αντωναειδή, μικρού μεγέθους (3-5 cm), αραιού πράσινου μεταξοειδούς χρώματος στην άνω επιφάνεια και γκριζου χρώματος (πυκνό αργυρόχρωμο μεταξοειδές χνούδι) στην κάτω (Bärtels, 2011) (Εικ. 3). Τα ωχροκίτρινα άνθη, μήκους 9-11 mm, φέρονται σε μακρόμισχες, πολυάριθμες επάκριες ή μασχαλιαίες ταξιανθίες (κεφάλια), αποτελούμενα από 10 τουλάχιστον άνθη. Η ταξιανθία φέρεται από βράκτιο διαμερισμένο σε δακτυλόμορφα τμήματα. Ο κάλυκας, μήκους 4-6 mm, είναι σωληνοειδής-κωδωνοειδής με 5 μακριά τριγωνικά δόντια, βραχύτερα από το

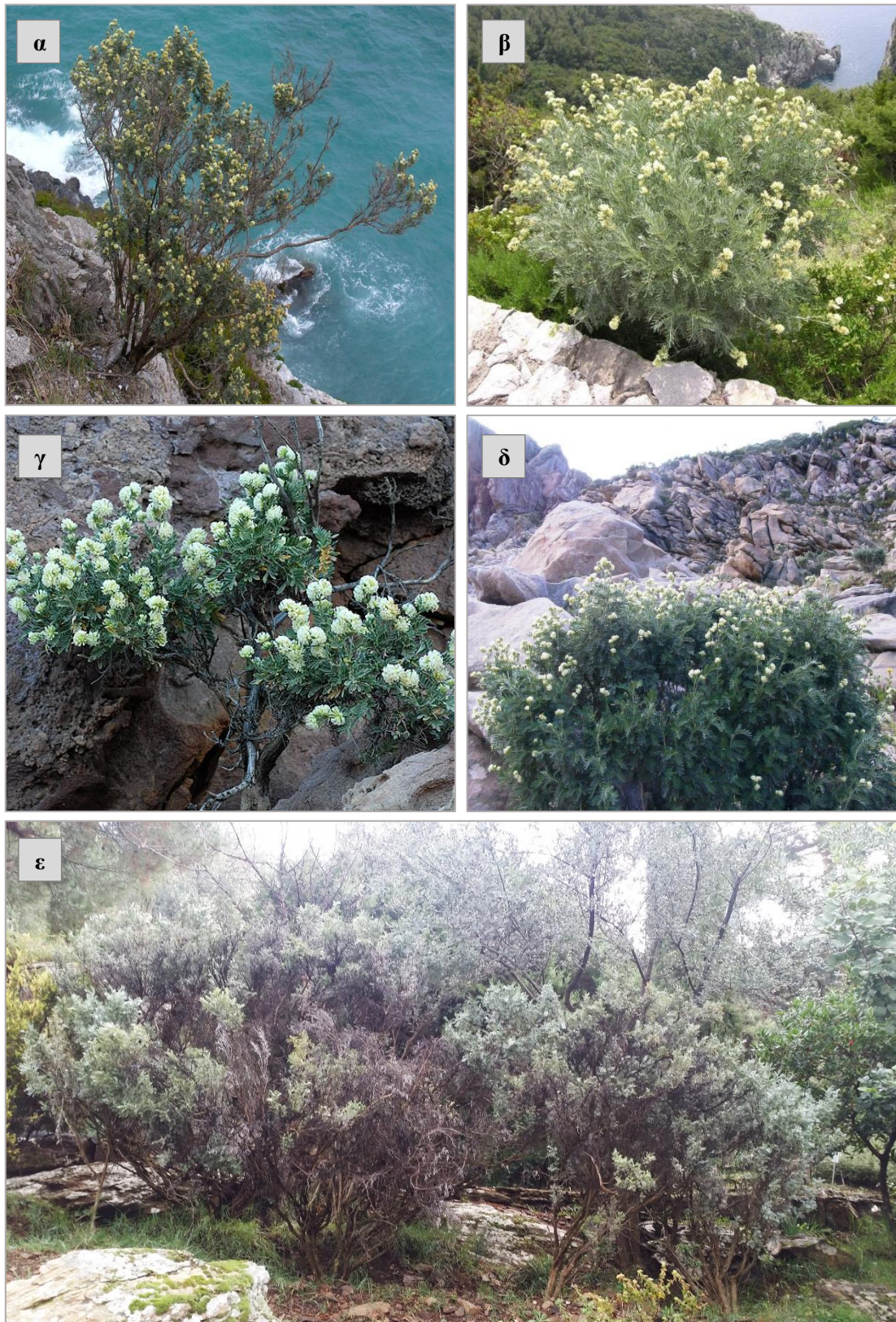
σωλήνα, με λευκωπό χνούδι. Για μερικούς ερευνητές η ανθοφορία κλιμακώνεται, ανάλογα με το υψόμετρο, από τον Μάιο έως και τον Ιούνιο (Καββάδας, 1956, Pistelli *et al.*, 2007), από τον Απρίλιο έως τον Ιούνιο (Bärtels, 2011) και από τον Μάρτιο έως τον Μάιο (Benelli *et al.*, 2017) (Εικ. 4). Το κάθε κεφάλιο περιλαμβάνει περίπου 10 καρπούς, με ένα σπέρμα σε κάθε περικάρπιο. Ο σπόρος, διαμέτρου 2 mm, είναι λείος με ωοειδές σχήμα και χρώμα που κυμαίνεται από ανοιχτό έως σκούρο κίτρινο.

1.4.4.1 Πολλαπλασιασμός της *Anthyllis barba-jovis* L.

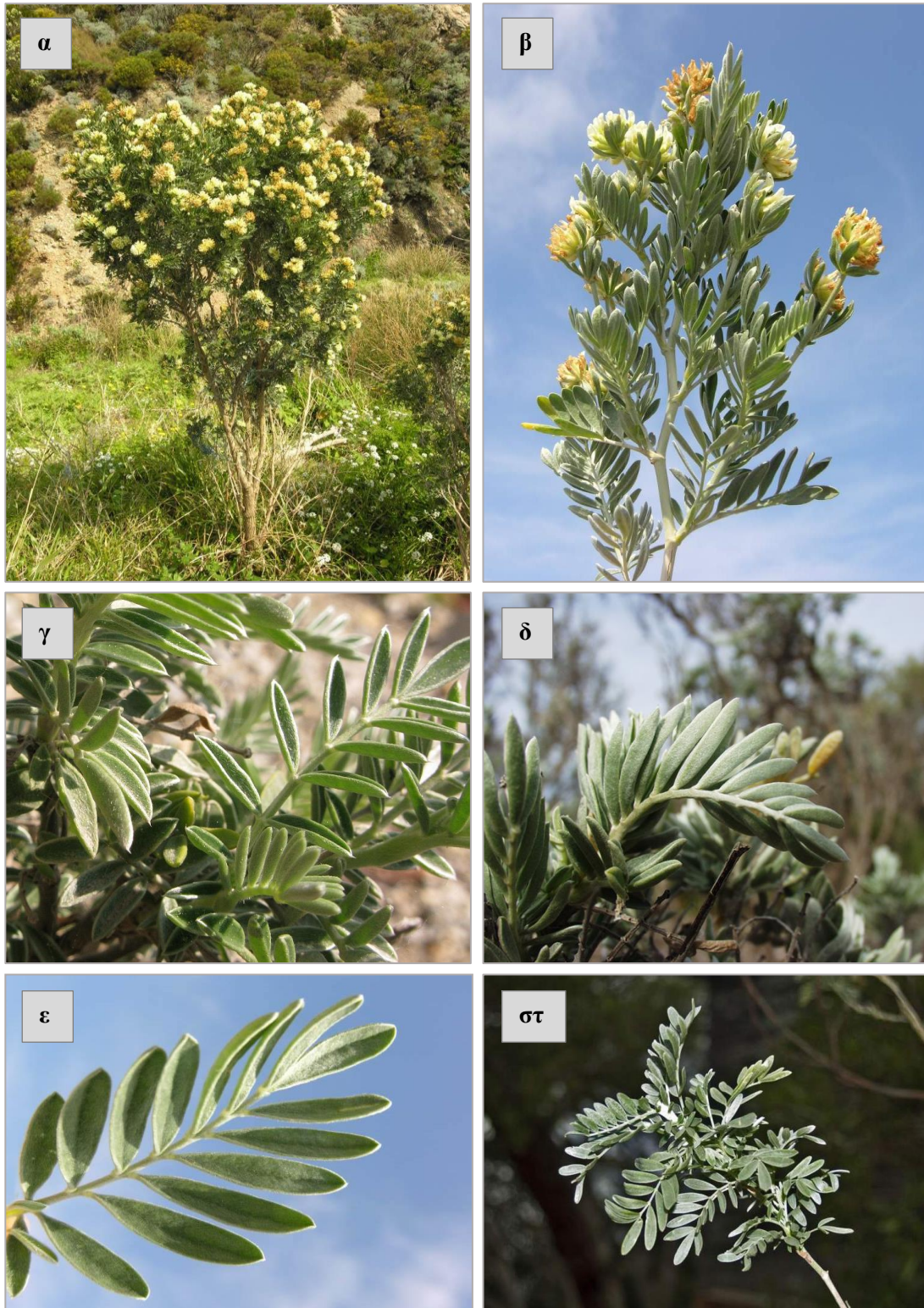
Στη φύση το φυτό πολλαπλασιάζεται με σπόρο. Ωστόσο, οι σπόροι του φυτού εμφανίζουν φυσικό λήθαργο (Morbidoni *et al.*, 2008), λόγω της αδιάβροχης εφυμενίδας τους, η οποία είναι παρόμοια σε όλα τα είδη της οικογένειας Fabaceae (Baskin and Baskin, 1989). Οι Morbidoni *et al.* (2008), μελέτησαν την έκθεση σπόρων *A. barba-jovis* σε υψηλές θερμοκρασίες, και βρήκαν ότι παρουσιάζουν μια ενδιάμεση συμπεριφορά σε σχέση με τα υπόλοιπα Fabaceae, το οποίο δείχνει εμφανή θετική επίδραση όταν εκτείθεται σε υψηλές θερμοκρασίες. Αυτές οι επιδράσεις μπορούν να παρουσιάσουν ποσοστά βλαστικότητας έως 75% με αρκετά παρατεταμένη έκθεση στους 120 °C για διάστημα 10 min, όπως έγινε και για τα είδη *Cytisus scoparius*, *Psoralea bituminosa* και *Ulex europaeus*, ενώ για το *Scorpiurus muricatus* η έκθεση αυτή δεν είχε κανένα όφελος (Herranz *et al.*, 1997). Στην ίδια μελέτη οι Morbidoni *et al.* (2008), διερεύνησαν και την επίδραση της αλατότητας σε σπόρους *A. barba-jovis*, οι οποίοι έδειξαν μεγάλη ανθεκτικότητα και μπορούν να βλαστάνουν εύκολα σε υφάλμυρα εδάφη, και μπορούν να ανταγωνιστούν τα αλόφυτα, τα οποία έχουν άμεση έκθεση στη θάλασσα.

Ο *in vitro* πολλαπλασιασμός του είδους *Anthyllis barba-jovis* δεν έχει μελετηθεί ιδιαίτερα. Οι βιβλιογραφικές αναφορές αφορούν κυρίως στα υπόλοιπα είδη του γένους *Anthyllis*. Οι Vlachou *et al.* (2016), διερεύνησαν τη δυνατότητα μικροπολλαπλασιασμού της *Anthyllis barba-jovis*, με έκφυτα κορυφής που ελήφθησαν από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα, καθώς και την επίδραση των κυτοκινινών ZEA και BA στον *in vitro* πολλαπλασιασμό του είδους. Συμπέραναν ότι για τον μικροπολλαπλασιασμό του είδους ενδείκνυται η χρήση BA σε συγκέντρωση 1,0 mg l⁻¹, καθώς εξασφαλίζει υψηλή δυναμικότητα για συνέχιση της καλλιέργειας και παραγωγή πολλαπλασιαστικού υλικού.

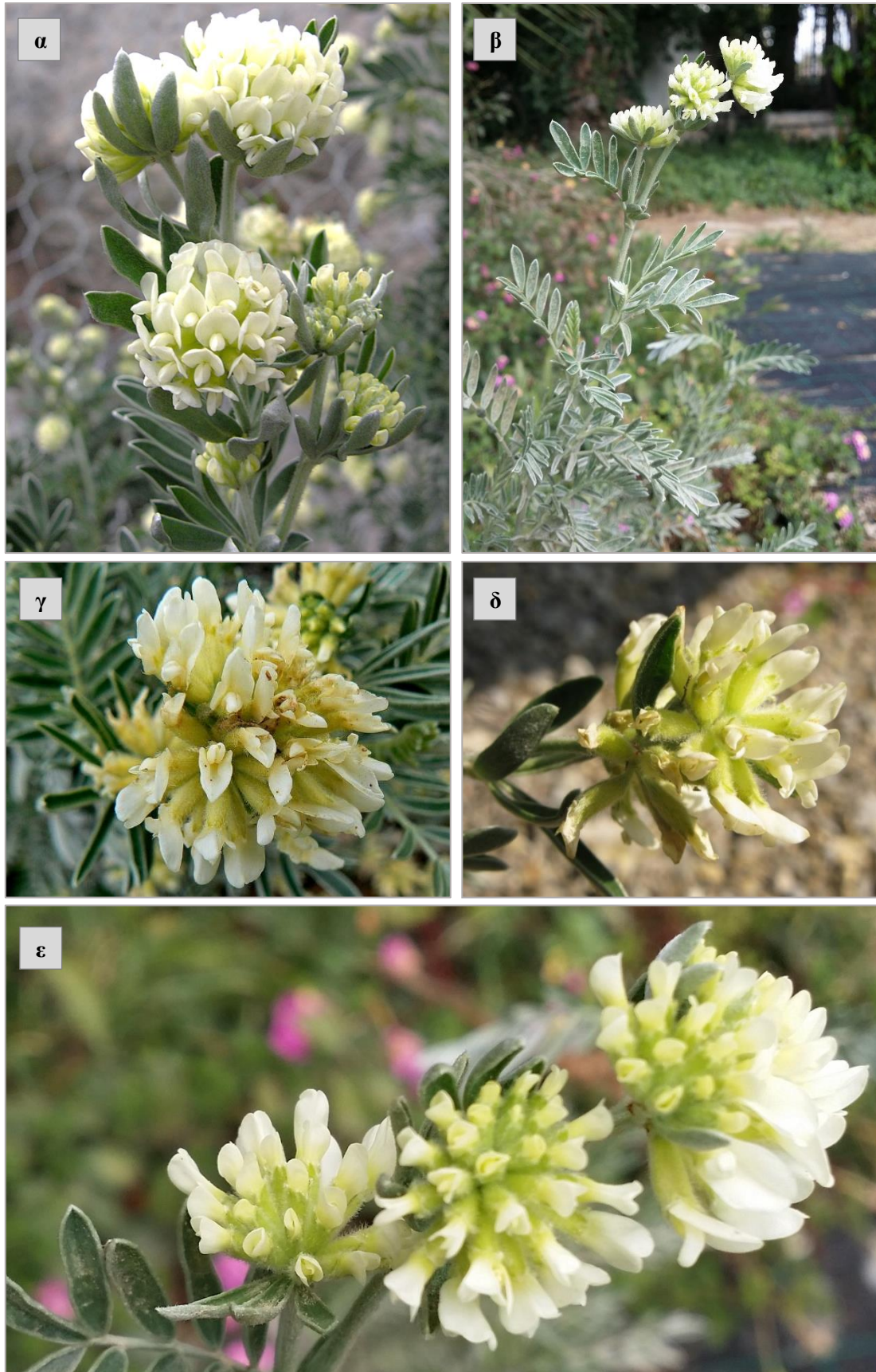
Οι Vlachou *et al.* (2016), αναφέρουν ότι για τη ριζοβολία των μικροβλαστών της *Anthyllis barba-jovis*, οι οποίοι προήλθαν από σπορόφυτα, ενδείκνυται η χρήση υποστρώματος MS μισής δύναμης, χωρίς την προσθήκη αυξίνης.



Εικ. 2. Αυτοφυή άτομα *Anthyllis barba-jovis* σε παραθαλάσσιες (α, β) και βραχώδεις (γ, δ) περιοχές της νοτιοδυτικής Ιταλίας (νησί Capri) και στον Υμηττό Αττικής (ε).



Εικ. 3. Ορθόκλαδη ανάπτυξη *Anthyllis barba-jovis* (α, β) με σύνθετα χνοώδη φύλλα κατ' εναλλαγή, πτερωτά, περιπτώληκτα, ανοικτού πράσινου χρώματος στην άνω επιφάνεια (γ, ε) και γκρίζου χρώματος στην κάτω (πυκνό αργυρόχρωμο μεταξοειδές χνούδι) (δ, στ).



Εικ. 4. Ωχροκίτρινα άνθη *Anthyllis barba-jovis*, φέρονται σε μακρόμισχες, πολυάριθμες επάκριες ή μασχαλιαίες ταξιανθίες (κεφάλια) από διάφορες περιοχές της Ιταλίας (α, γ, δ) και από νεαρά άτομα τριών ετών (1^η άνθιση του φυτού, τέλη Μαρτίου) στον χώρο του θερμοκηπίου του εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχ. Τοπίου του Γ.Π.Α. (β, ε).

1.4.4.2 Χρήσεις της *Anthyllis barba –jovis* L.

Κατά την αρχαιότητα η *A. barba-jovis* είχε σημαντική παρουσία λόγω της χρήσης της ως φαρμακευτικό φυτό, καθώς και για την κατασκευή σαρώθρων (Pistelli *et al.*, 2007), ως εκ τούτου η χρήση της σε αναπλάσεις αρχαιολογικών χώρων θεωρείται ενδιαφέρουσα. Στα πλαίσια του προγράμματος ARCHAEOSCPE (2012-2015), του εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής τοπίου έγινε αξιολόγηση διαφόρων θαμνωδών και ποωδών αυτοφυών φυτών, συμπεριλαμβανομένου και του είδους *A. barba-jovis*, με στόχο τη χρήση τους σε αρχαιολογικούς χώρους για διαχείριση της βλάστησης και ανάδειξη του χώρου. Μεγάλη έμφαση δόθηκε στην επιλογή ειδών που είναι συμβατά με την προστασία του μνημείου, αλλά και ειδών που με βάση ιστορικά στοιχεία σχετίζονται ή μπορεί να έχουν συμβολική σημασία για τον αρχαιολογικό χώρο. Συνεπώς, δεν επιλέχθηκαν είδη με επιθετικό ριζικό σύστημα ή είδη που εύκολα εγκαθίστανται σε τοίχους, μέσα σε χαλάσματα ή εξαπλώνονται ανεξέλεγκτα. Άλλα κριτήρια για την επιλογή φυτών ήταν ο τύπος ανάπτυξής τους, οι διαστάσεις τους (μικρού ύψους ώστε να μην παρεμποδίζεται η θέαση των μνημείων), η καλλωπιστική τους αξία, η διαθεσιμότητα του πολλαπλασιαστικού υλικού, αλλά και οι μειωμένες απαιτήσεις τους σε νερό και καλλιεργητικές επεμβάσεις.

Το κύριο χαρακτηριστικό του φυτού είναι η μορφολογία του, καθώς και η υψηλή ανθεκτικότητα του υπέργειου μέρους του στην αλατότητα, στις δυσμενείς καιρικές συνθήκες και στους δυνατούς θαλάσσιους αλμυρούς ανέμους, γι' αυτό και ενδείκνυται για την κάλυψη παραθαλάσσιων πρανών και γενικά για αποκαταστάσεις προβληματικών περιοχών, όπως περιοχές με ξηροθερμικές συνθήκες που κινδυνεύουν από διάβρωση του εδάφους (Tutin *et al.*, 1972, Motta, 1992, Biondi, 2007).

Το φυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην φαρμακοβιομηχανία λόγω των αντιοξειδωτικών, αντιφλεγμονωδών και αντιδιαβητικών ιδιοτήτων του, καθώς και των αιθέριων ελαίων που βρίσκονται στα άνθη και στους σπόρους του (Pistelli *et al.*, 2007). Ορισμένα είδη του γένους *Anthyllis* λόγω της οικολογικής τους αξίας έχουν εισαχθεί στην κοσμετολογία, υπο την μορφή καλλυντικών, σαμπουάν, αντηλιακών, ενυδατικών και αντιγηραντικών κρεμών.

Εκτός της οικολογικής τους αξίας παρουσιάζουν και καλλωπιστική αξία. Τα περισσότερα είδη του γένους που χρησιμοποιούνται στην κηποτεχνία οφείλουν την καλλωπιστική τους αξία στο χρώμα των ανθέων και στη διάρκεια της ανθοφορίας τους. Η *A. barba-jovis* συχνά καλλιεργείται ως διακοσμητικός θάμνος (Bärtels, 2011).

Μια πιο πρόσφατη έρευνα των Benelli *et al.*, (2017) στην παράκτια περιοχή της Τοσκάνης, αναφέρει ότι το φυτό χρησιμοποιείται ως τροφή για τις μέλισσες και τους βομβίνους. Σε περιόδους έλλειψης φαγίτου των επικονιαστών των μεσογειακών ακτών, η παραγωγή γύρης

και νέκταρ της *A. barba-jovis* είναι ιδιαίτερης σημασίας. Στην έρευνα αυτή, καταγράφηκαν 6 είδη της οικογένειας Apidae και 1 είδος της οικογένειας Scarabaeidae, σε φυτά *A. barba-jovis* στην περίοδο ανθοφορίας (Μάρτιος-Μάιος). Κυρίαρχο ήταν το είδος *Apis mellifera*, το οποίο την περίοδο του Απριλίου ήταν σε αφθονία (Εικ. 5), ακολούθησαν τα είδη *Bombus pascuorum* και *Bombus terrestris*, ενώ σε μικρότερο βαθμό ήταν τα είδη *Anthophora crinipes* Smith, *Anthophora plumipes* Pallas, *Oxythyrea funesta* και *Xylocopa violacea*. Επομένως, το είδος θα μπορούσε να χαρακτηριστεί και ως μελισσοκομικό φυτό, όπως θεωρείται και το είδος *A. cytisoides* (Gavidia *et al.*, 1997).



Εικ. 5. Μέλισσα, *A. mellifera*, πάνω σε λουλούδια *A. barba-jovis*, σε αναζήτηση τροφής την περίοδο του Απριλίου στις παράκτιες περιοχές της Τοσκάνης (Benelli *et al.*, 2017).



2. ΟΙΚΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΣΠΟΡΟΥ *Anthyllis barba-jovis* L.

2.1 Εισαγωγή - Οικοφυσιολογία του σπόρου- Λήθαργος

Σπόροι από πολλά είδη, κυρίως της οικογένειας Fabaceae (Baskin and Baskin, 1998, Baskin, 2003), στην οποία ανήκει το γένος *Anthyllis*, παρουσιάζουν λήθαργο που οφείλεται στο σκληρό και αδιαπέραστο περίβλημα. Το πρόβλημα φυτρωτικότητας των σπόρων πολλών Fabaceae, λόγω της ύπαρξης φυσιολογικού ληθάργου και του αδιαπέραστου περιβλήματος των σπόρων, επιβεβαιώνεται ξανά και από άλλους ερευνητές (White, 1908, Hyde, 1954, Côme, 1970, Taylorson and Hendricks, 1977).

Στη φύση η *A. barba-jovis* πολλαπλασιάζεται με σπόρο. Ωστόσο, οι σπόροι του φυτού εμφανίζουν φυσικό λήθαργο (Morbidoni *et al.*, 2008), λόγω της αδιάβροχης εφυμενίδας τους, η οποία είναι παρόμοια σε όλα τα είδη της οικογένειας Fabaceae (Baskin and Baskin, 1989). Επίσης, παρουσιάζουν υψηλή βιωσιμότητα με την πάροδο του χρόνου, αντοχή στην αλατότητα των εδαφών, καθώς και αντοχή στις υψηλές θερμοκρασίες (Morbidoni *et al.*, 2008). Οι σπόροι των ειδών *A. cytisoides*, *A. lagascana* και *A. barba-jovis* παρουσιάζουν δυσκολία στη φύτευση, η οποία οφείλεται στο περίβλημα (Ibanez and Passera, 1997, Prieto *et al.*, 2004, Morbidoni *et al.*, 2008). Επομένως, πριν τη σπορά απαιτείται μία προμεταχείριση των σπόρων αυτών των ειδών που θα «μαλακώσει» το σκληρό περίβλημα για μια γρήγορη, ομοιόμορφη και υψηλή φυτρωτικότητα. Το «μαλάκωμα» του περιβλήματος μπορεί να επιτευχθεί με μηχανική απόξεση (σκαριφισμός) των σπόρων (Ibanez and Passera 1997, Baes *et al.* 2002), με εμβάπτιση των σπόρων σε πυκνό θειικό οξύ (Liu *et al.* 1981, Demel, 1996, Fu *et al.*, 1996, Sacheti and Al-Rawahy, 1998, Pandita *et al.*, 1999, Πιπινής *et al.*, 2000), με τοποθέτηση των σπόρων σε ζεστό νερό (Lopez and Aviles, 1988) και με έκθεση των σπόρων σε υψηλές θερμοκρασίες (Martin *et al.*, 1975, Bonner *et al.*, 1994). Ορισμένα είδη φρυγάνων έχουν αναπτύξει μηχανισμούς που τους εξασφαλίζει την επιβίωσή τους από τη φωτιά (Argianoutsou-Faraggitaki and Margaritis, 1982). Η επίδραση των υψηλών θερμοκρασιών των μεσογειακών κλιμάτων στην βλαστικότητα σπόρων της οικογένειας Fabaceae, έδειξαν ισχυρές ενδοπαραλλαγές (Herranz *et al.*, 1997).

2.2 Υλικά και Μέθοδοι

2.2.1 Φυτικό υλικό

Για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό της *A. barba-jovis*, ως φυτικό υλικό χρησιμοποιήθηκαν σπόροι από επιλεγμένα αυτοφυή φυτά στον Υμηττό Αττικής (38°8'19 N, 23°47'44 E). Οι σπόροι ξηράνθηκαν και αποθηκεύτηκαν στο σκοτάδι σε θερμοκρασία δωματίου, στο χώρο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, για όσο χρονικό διάστημα χρειαζόταν πριν τη χρήση τους.

2.2.2 Συλλογή, καθαρισμός και αποθήκευση σπόρων

Για τη λήψη των σπόρων, συλλέγονταν τα άνθη (κεφάλια) από αυτοφυή φυτά *A. barba-jovis*, τέλη Νοεμβρίου έως αρχές Δεκεμβρίου (Εικ. 6α). Κριτήριο επιλογής ήταν η πλήρης ξήρανση του άνθους πάνω στον βλαστό. Λόγω των έντονων βροχοπτώσεων την περίοδο αυτή, η συλλογή αποτρεπόταν να γίνει έπειτα από κάποια βροχόπτωση για αποφυγή προσβολών από μικροοργανισμούς. Μετά τη συλλογή οι σπόροι αφέθηκαν σε ανοικτές συσκευασίες σε θερμοκρασία δωματίου για 24 h, με σκοπό τη μείωση της υγρασίας τους. Στη συνέχεια έγινε απομάκρυνση των υπολειμμάτων του άνθους (χωρίς την αφαίρεση του περικαρπίου τους) και αποθηκεύτηκαν σε γυάλινα βάζα, τα οποία τοποθετήθηκαν μέσα σε κουτί από φελιζόλ (σκοτάδι), σε θερμοκρασία δωματίου ($T=21\text{ }^{\circ}\text{C}$) και διατηρήθηκαν για 0, 12 και 24 μήνες, ενώ πριν τη χρήση τους έγινε απομάκρυνση του περικαρπίου (Εικ. 6γ). Συλλέχθηκαν σπόροι το 2012 (αποθήκευση για 24 μήνες), το 2013 (αποθήκευση για 12 μήνες) και το 2014 (πρόσφατης συλλογής).



Εικ. 6. Άνθη από αυτοφυή φυτά *A. barba-jovis* στον Υμηττό Αττικής στο τέλος της ανθοφορίας τους (α), συλλεγμένοι σπόροι με το περικάρπιο τους (β) και καθαρισμένοι σπόροι χωρίς περικάρπιο (γ).

2.2.3 Μηχανικός σκαριφισμός σπόρων

Λόγω της αδιάβροχης εφουμενίδας τους (Baskin & Baskin, 1989), οι σπόροι του φυτού εμφανίζουν φυσικό λήθαργο (Morbidoni *et al.*, 2008), γι' αυτό ελέγχθηκαν σπόροι με ή χωρίς προμεταχείριση μηχανικού σκαριφισμού, που είχαν αποθηκευτεί για διάστημα 0, 12 και 24 μηνών. Για τη διακοπή του ληθάργου των σπόρων πραγματοποιήθηκε η μέθοδος του μηχανικού σκαριφισμού, ο οποίος έγινε με γυαλόχαρτο (No 100), για διάστημα 1 min σε κάθε σπόρο.

2.2.4 Έλεγχος βλαστικότητας σπόρων

Η φύτρωση ενσωματώνει όλα εκείνα τα γεγονότα που αρχίζουν με την πρόσληψη νερού από τον ξηρό σπόρο και συνεχίζει με την επιμήκυνση του εμβρυϊκού άξονα και τη ρήξη του περιβλήματος με αποτέλεσμα την εμφάνιση του ριζιδίου, το οποίο και θεωρείται ως η ολοκλήρωση της φύτρωσης του σπόρου. Βιωσιμότητα ενός σπόρου είναι η ικανότητα του σπόρου να φυτρώσει και να αναπτυχθεί σε ένα νέο φυτό. Η εκτίμηση της βιωσιμότητας του σπόρου της *A. barba-jovis*, έγινε με την χρησιμοποίηση Tetrazolium Chloride. Είναι ένας χημικός έλεγχος για τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας των σπόρων και τα αποτελέσματα είναι διαθέσιμα μέσα σε 24 h. Δίνει μια έγκαιρη και γρήγορη εικόνα για την βιωσιμότητα των σπόρων, αλλά δεν μπορεί να αντικαταστήσει τον πιο ολοκληρωμένο έλεγχο της φύτρωσης των σπόρων (Lakon, 1949).

Χρησιμοποιήθηκε 1% διάλυμα τετραζολίου (TZ-solution), το οποίο παρασκευάστηκε διαλύοντας 1 g τριφενυλο-χλωρίδιο του τετραζολίου σε 100 ml αποσταγμένο νερό (Bonner and Karrfalt, 2008), σε σύνολο 100 σπόρων από κάθε μεταχείριση (με ή χωρίς μηχανικό σκαριφισμό) και από κάθε χρονική περίοδο (0, 12 και 24 μήνες αποθήκευσης).

2.2.5 Μικροσκοπική παρατήρηση σπόρων

Μετά την απομάκρυνση του περικαρπίου και την επέμβαση με μηχανικό σκαριφισμό με γυαλόχαρτο παρατηρήθηκε σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (ΗΜΣ) η ποιότητα της εξωτερικής εφουμενίδας του σπόρου και οι αλλαγές πριν και μετά τον σκαριφισμό. Αρχικά έγινε επικόλληση των σπόρων σε υποδοχείς με αυτοκόλλητους δίσκους άνθρακα διπλής όψης (Agar Scientific Ltd.) και στη συνέχεια έγινε επικάλυψη αυτών με καθαρό χρυσό, με εκκένωση αίγλης σε ατμόσφαιρα αργού (Ar). Η διαδικασία έγινε σε εξαχωτή Denton-Vacuum DV-502 εφοδιασμένο με τα κατάλληλα εξαρτήματα και τέλος τοποθετήθηκαν για παρατήρηση στο ΗΜΣ.

2.2.6 Μέθοδος παρασκευής και αποστείρωσης του θρεπτικού υποστρώματος

Για την παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος της καλλιέργειας των σπόρων έγινε προσθήκη, σε δοχείο ζέσεως, αποσταγμένου νερού με λιγότερο όγκο από του τελικού, ποσότητα μισής δύναμης Murashige and Skoog ($2,2 \text{ g l}^{-1} \text{ MS}$) και 20 g l^{-1} σακχαρόζης. Τέθηκαν υπό συνεχή ανάδευση με τη βοήθεια ενός μαγνητικού αναδευτήρα μέχρι το στάδιο της πλήρους διάλυσής των και στη συνέχεια έγινε η ογκομέτρηση του διαλύματος. Έγινε συμπλήρωση του διαλύματος με αποσταγμένο νερό μέχρι τον επιθυμητό όγκο και ακολούθησε μέτρηση και έπειτα ρύθμιση του pH στην τιμή 5,7-5,8 της κλίμακας με τη βοήθεια διαλυμάτων 0,1 ή 1 N NaOH και 0,1 ή 1 N HCl. Η διαδικασία ολοκληρώθηκε με την προσθήκη ακριβούς ποσότητας άγαρ (8 g l^{-1}) και ακολούθησε θέρμανση του διαλύματος, υπό συνεχή ανάδευση μέχρι να διαλυθεί πλήρως και ομοιόμορφα το άγαρ (διαυγές διάλυμα). Το έτοιμο υπόστρωμα τοποθετούνταν προς αποστείρωση σε χύτρα υγρής αποστείρωσης για χρονικό διάστημα 15 min, σε θερμοκρασία $125 \text{ }^{\circ}\text{C}$ και πίεση 1.1 atm.

2.2.7 Δοχεία *in vitro* και *ex vitro* καλλιέργειας

Μετά την αποστείρωση του υποστρώματος στη χύτρα, σε γυάλινες φιάλες όγκου 500 ή 1000 ml, η έκχυση γινόταν σε πλαστικά τρυβλία Petri (διαμέτρου 9 cm), με 20 ml υποστρώματος ανά τρυβλίο, μέσα στην Τράπεζα Νηματικής Ροής (Laminar Flow Cabinet) του Εργαστηρίου. Για την βλάστηση των σπόρων *ex vitro* χρησιμοποιήθηκαν πλαστικά φυτοδοχεία όγκου 2 L με εδαφικό υπόστρωμα τύρφης-περλίτη.

2.2.8 Επιφανειακή απολύμανση σπόρων

Πριν την τοποθέτηση των σπόρων στο υπόστρωμα καλλιέργειας έγινε επιφανειακή απολύμανση σε 20% υδατικό διάλυμα χλωρίνης εμπορίου (4,5% υποχλωριώδες νάτριο) με αποσταγμένο, αποστειρωμένο νερό και 0,1% Tween 20 (προσκολλητική ουσία, Polyoxyethylene (20) sorbitan Monolaurate, MERCK). Οι σπόροι εμβαπτίστηκαν στο διάλυμα αυτό και ακολούθησε συνεχής ανάδευση για χρονικό διάστημα 10 min. Μετά το πέρας των 10 min εφαρμόστηκαν τέσσερα τρίλεπτα ξεπλύματα με αποσταγμένο, αποστειρωμένο νερό υπό συνεχή ανάδευση και έπειτα τοποθετήθηκαν για βλάστηση *in vitro*.

2.2.9 Εγκατάσταση σπόρων και Συνθήκες επώασης

In vitro: Μετά τη διαδικασία απολύμανσης των σπόρων, σκαριφισμένων ή μη, έγινε τοποθέτηση αυτών σε πλαστικά τρυβλία Petri, για βλάστηση *in vitro*, με στερεό υπόστρωμα MS μισής δύναμης, που περιείχε 8 g l⁻¹ agar και 20 g l⁻¹ σακχαρόζη. Οι σπόροι τοποθετήθηκαν σε επτά διαφορετικές θερμοκρασίες, 5, 10, 15, 20, 25, 30 ή 35 °C, σε συνθήκες συνεχούς σκότους ή σε φωτοπερίοδο 16 h πλήρους φωτός, έντασης 37.5 μmol m⁻² s⁻¹ (4.000 lx fluorescent light) που προέρχονταν από λευκούς λαμπτήρες φθορισμού, σε θαλάμους σταθερών συνθηκών.

Ex vitro: Σπόροι, με ή χωρίς περικάρπιο (σκαριφισμένοι σπόροι ή μη), τοποθετήθηκαν για φύτευμα σε πλαστικά φυτοδοχεία, τα οποία περιείχαν εδαφικό υπόστρωμα που αποτελείτο από 1 τύρφη: 1 περλίτη (v/v). Οι σπόροι καλύφθηκαν με υπόστρωμα (πάχους 0,5-1,0 cm) και τα φυτοδοχεία καλύφθηκαν με πλαστική μεμβράνη sanitas και τοποθετήθηκαν προς βλάστηση σε θάλαμο σταθερών συνθηκών ανάπτυξης υπό 16 h φωτοπερίοδο και 37.5 μmol m⁻² s⁻¹ fluorescent φωτισμό στους 20 °C. Η διαβροχή του υποστρώματος γινόταν σε τακτά χρονικά διαστήματα, για να διατηρηθεί η υγρασία του υποστρώματος, ενώ η πλαστική μεμβράνη αφαιρέθηκε μόλις φύτευσε τουλάχιστον ένας σπόρος.

Ο έλεγχος της βλαστικότητας έγινε 0, 12 και 24 μήνες μετά την συλλογή των σπόρων.

2.2.10 Στατιστική ανάλυση – Εκτίμηση αποτελεσμάτων

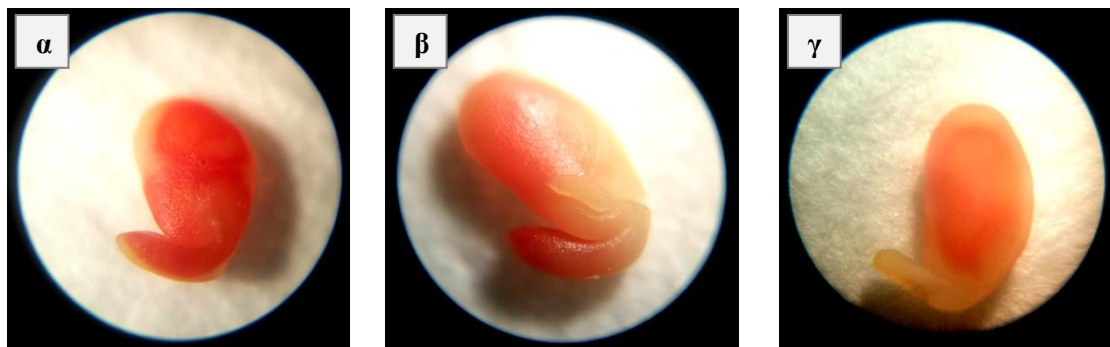
Σε κάθε επέμβαση χρησιμοποιήθηκαν 100 σπόροι (*in vitro*: 20 σπόροι ανά τρυβλίο, 5 τρυβλία ανά επέμβαση και *ex vitro*: 20 σπόροι ανά δοχείο, 5 δοχεία ανά επέμβαση). *In vitro* ως βλάστηση ορίστηκε η εμφάνιση ριζιδίου τουλάχιστον 1 mm μήκους, σύμφωνα με τον International Seed Testing Association (1999) και οι μετρήσεις λαμβάνονταν ανά δυο ημέρες. Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το εντελώς τυχαιοποιημένο σχέδιο, η σημαντικότητα των αποτελεσμάτων εξετάστηκε με τη δοκιμασία του *F* και η σύγκριση των μέσων των επεμβάσεων έγινε με Student's test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. Έγινε διπαραγοντική ανάλυση του πειράματος και μελετήθηκε η επίδραση της φωτοπεριόδου και της θερμοκρασίας στη βλαστικότητα των σπόρων.

2.3 Αποτελέσματα

2.3.1 Βλαστικότητα σπόρων *in vitro*

2.3.1.1 Έλεγχος βλαστικότητας σπόρων

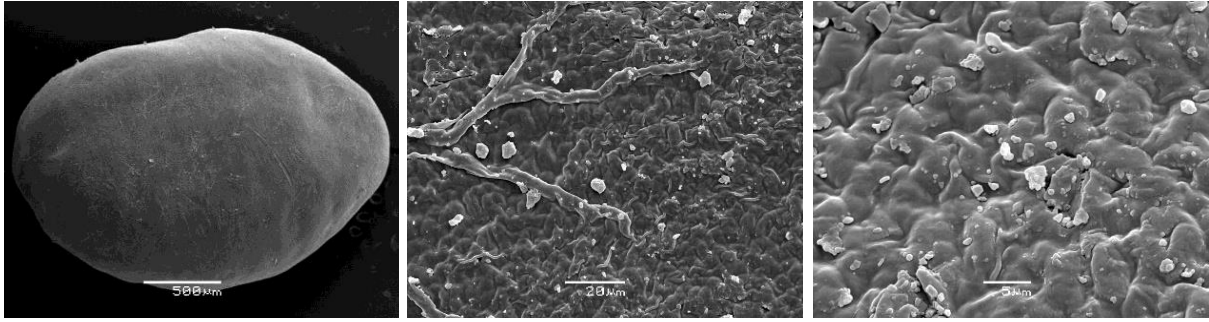
Μετά το πέρας των 24 h στους 20 °C τα έμβρυα που απέκτησαν ερυθρό χρώμα στο ριζίδιο και στις κοτυληδόνες θεωρήθηκαν βιώσιμα, ενώ εκείνα που παρέμειναν λευκά ή οι κοτυληδόνες χρωματίστηκαν στο ½ της επιφάνειάς τους ή το υποκοτύλιο δεν χρωματίστηκε, θεωρήθηκαν μη βιώσιμα (International Seed Testing Association, 1999, Bonner and Karrfalt, 2008) (Εικ. 7). Στους σκαριφισμένους σπόρους πρόσφατης συλλογής χρωματίστηκε πάνω από 97% των εμβρύων, ενώ στους σπόρους ηλικίας 12 και 24 μηνών χρωματίστηκε το 96% και 94% των εμβρύων. Χωρίς προμεταχείριση σκαριφισμού χρωματίστηκε σχεδόν το 62% των εμβρύων για σπόρους πρόσφατης συλλογής, 60% για σπόρους ηλικίας 12 μηνών και 58% για σπόρους ηλικίας 24 μηνών.



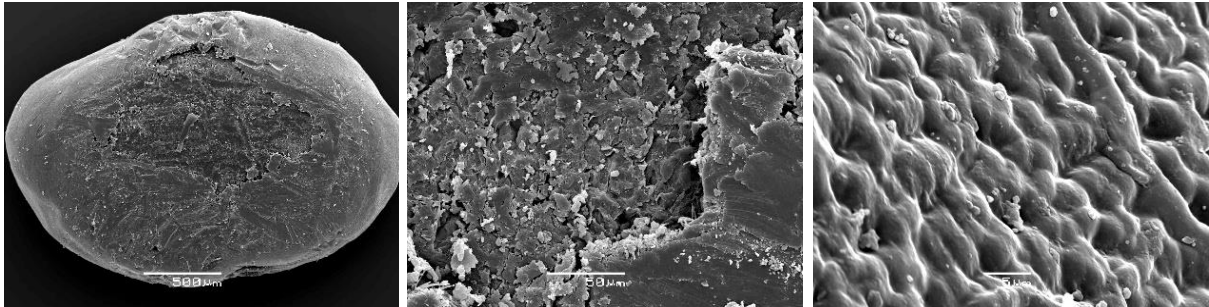
Εικ. 7. Έμβρυα *A. barba-jovis*, που απέκτησαν ερυθρό χρώμα στο ριζίδιο και στις κοτυληδόνες (βιώσιμα) (α, β) και έμβρυο που οι κοτυληδόνες χρωματίστηκαν στο ½ της επιφάνειάς τους και το υποκοτύλιο δεν χρωματίστηκε (μη βιώσιμα) (γ).

2.3.1.2 Μικροσκοπική παρατήρηση σπόρων

Στους μη σκαριφισμένους σπόρους φάνηκε καθαρά η λεία επιφάνειά τους με ορισμένα ρυτιδώματα και κοιλότητες (Εικ. 8), το οποίο έχει περιγραφεί και από τον Saint-Martin (1986) και θεωρείται πως είναι χαρακτηριστικό των ειδών της οικογένειας Fabaceae και ως εκ τούτου και του γένους *Anthyllis*, ενώ στους σκαριφισμένους σπόρους φάνηκε η μερική καταστροφή του περιβλήματος (Εικ. 9).



Εικ. 8. Μη σκαριφισμένος σπόρος σε μεγέθυνση 500 μm, 20 μm και 5 μm.



Εικ. 9. Σκαριφισμένος σπόρος σε μεγέθυνση 500 μm, 50 μm και 5 μm.

2.3.1.3 Σπόροι *Anthyllis barba-jovis* L. ηλικίας 0 μηνών

Η βλάστηση μη σκαριφισμένων σπόρων ξεκίνησε την 4^η ημέρα σε θερμοκρασίες 10 έως 20 °C, ενώ οι σκαριφισμένοι σπόροι στις ίδιες θερμοκρασίες ξεκίνησαν την 2^η ημέρα, ενώ στους 5 °C η βλάστηση ξεκίνησε την 26^η ημέρα. Σκαριφισμένοι σπόροι βλάστησαν σε υψηλότερα ποσοστά σε σύγκριση με τους σπόρους που δεν είχαν δεχθεί προμεταχείριση σκαριφισμού, είτε η καλλιέργεια έγινε σε 16 h φώς, είτε σε συνεχές σκοτάδι (Πίν. 1 και 2, Σχ. 1, 2, 3, 4 και 5). Η φωτοπερίοδος είχε σημαντική επίδραση στη βλαστικότητα των σπόρων. Το σκοτάδι ευνόησε ελάχιστα την βλαστικότητα. Οι σπόροι στους 5 και 35 °C σημείωσαν το χαμηλότερο ποσοστό βλαστικότητας, είτε σε φως είτε σε σκοτάδι (Πίν. 1 και 2, Σχ. 1, 2, 3, 4 και 5), ενώ οι σκαριφισμένοι σπόροι βλάστησαν γρηγορότερα από τους μη σκαριφισμένους σπόρους, όπως φανερώνουν οι τιμές T₅₀ (χρόνος για επίτευξη του 50% της βλαστικότητας) και οι καμπύλες βλαστικότητας (Πίν. 1 και 2, Σχ. 1, 2, 3 και 4). Η βλάστηση των σπόρων ολοκληρώθηκε ταχύτερα για τους σκαριφισμένους σπόρους στις θερμοκρασίες 15 και 20 °C, 6-10 ημέρες αργότερα σε 10, 25, 30 και 35 °C και περίπου 30 ημέρες αργότερα στους 5 °C (Πίν. 1 και 2). Οι τιμές του T₅₀ και ο χρόνος που απαιτήθηκε για την ολοκλήρωση της βλάστησης (Πίν. 1 και 2, Σχ. 5) επίσης φανερώνουν ταχύτερη βλάστηση καθώς η θερμοκρασία αυξάνει.

Πίνακας 1. *In vitro* βλαστικότητα σπόρων, 0 μήνες μετά τη συλλογή τους, στους 5, 10, 15, 20, 25, 30 ή 35 °C, σε συνθήκες συνεχούς σκότους ή σε φωτοπερίοδο 16 h πλήρους φωτός, χωρίς προμεταχείριση σκαριφισμού.

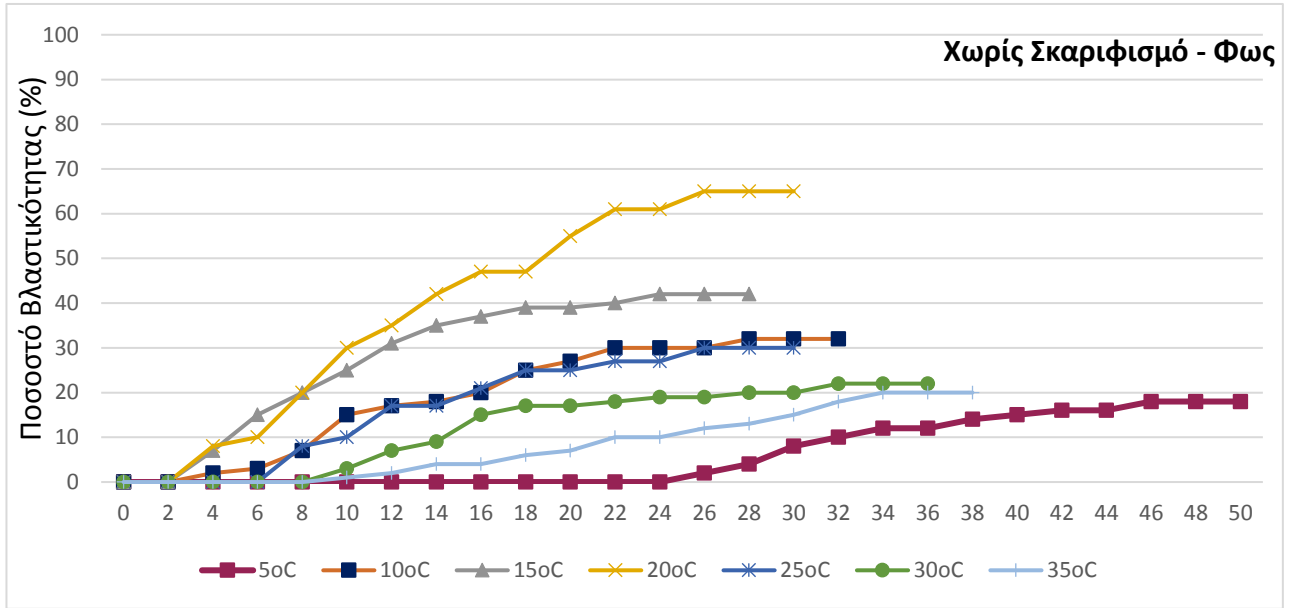
Φωτοπερίοδος/ Θερμοκρασία επώασης (°C)	Βλαστικότητα (%)	T₅₀	Περίοδος βλάστησης (ημέρες)
Μη Σκαριφισμένοι Σπόροι			
Φως / 5	18,0 e	38	46
Φως / 10	32,0 cd	10	28
Φως / 15	42,0 bc	8	24
Φως / 20	65,0 a	10	26
Φως / 25	30,0 cde	12	26
Φως / 30	22,0 de	14	32
Φως / 35	20,0 de	26	34
Σκοτάδι / 5	20,0 de	30	50
Σκοτάδι / 10	50,0 b	12	32
Σκοτάδι / 15	51,0 b	10	28
Σκοτάδι / 20	65,0 a	8	24
Σκοτάδι / 25	49,0 b	14	26
Σκοτάδι / 30	33,0 cd	18	28
Σκοτάδι / 35	30,0 cde	24	32
F_{Θερμοκρασίας}	***		
F_{Φωτοπεριόδου}	**		
F_{Θερμοκρασίας x Φωτοπεριόδου}	NS		
F_{one-way ANOVA}	***		

Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. Πέντε επαναλήψεις των 20 σπόρων χρησιμοποιήθηκαν ανά μεταχείριση.

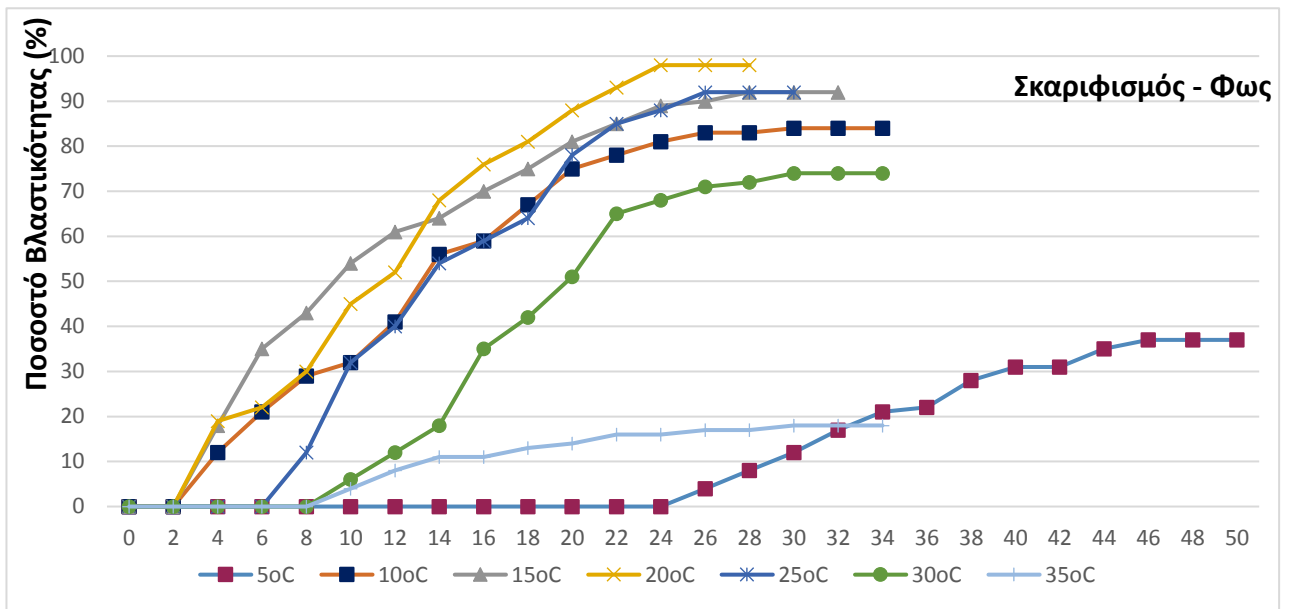
Πίνακας 2. *In vitro* βλαστικότητα σπόρων, 0 μήνες μετά τη συλλογή τους, στους 5, 10, 15, 20, 25, 30 ή 35 °C, σε συνθήκες συνεχούς σκότους ή σε φωτοπερίοδο 16 h πλήρους φωτός, με προμεταχείριση σκαριφισμού.

Φωτοπερίοδος/ Θερμοκρασία επώασης (°C)	Βλαστικότητα (%)	T ₅₀	Περίοδος βλάστησης (ημέρες)
Σκαριφισμένοι Σπόροι			
Φως / 5	37,0 e	26	46
Φως / 10	84,0 bc	12	30
Φως / 15	92,0 ab	6	28
Φως / 20	98,0 a	6	24
Φως / 25	92,0 ab	8	26
Φως / 30	74,0 c	12	30
Φως / 35	18,0 f	24	32
Σκοτάδι / 5	58,0 d	26	50
Σκοτάδι / 10	91,0 ab	6	22
Σκοτάδι / 15	97,0 a	6	18
Σκοτάδι / 20	98,0 a	6	16
Σκοτάδι / 25	85,0 bc	8	26
Σκοτάδι / 30	76,0 c	10	28
Σκοτάδι / 35	20,0 f	24	30
F_{Θερμοκρασίας}	-		
F_{Φωτοπεριόδου}	-		
F_{Θερμοκρασίας x Φωτοπεριόδου}	*		
F_{one-way ANOVA}	***		

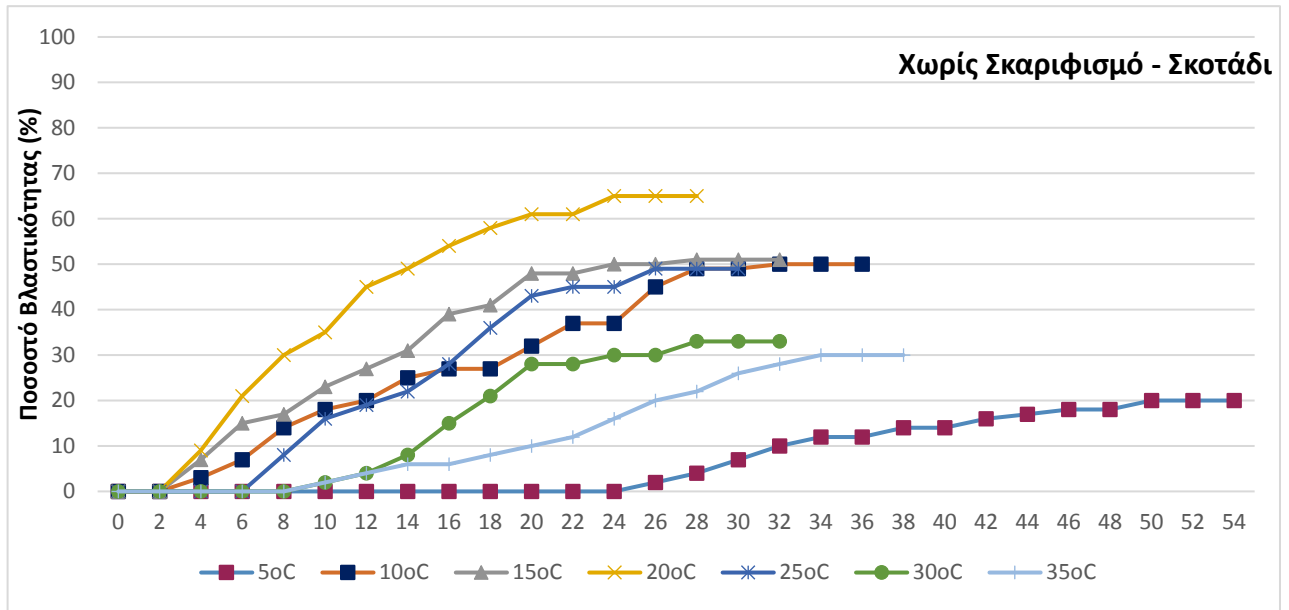
Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. Πέντε επαναλήψεις των 20 σπόρων χρησιμοποιήθηκαν ανά μεταχείριση.



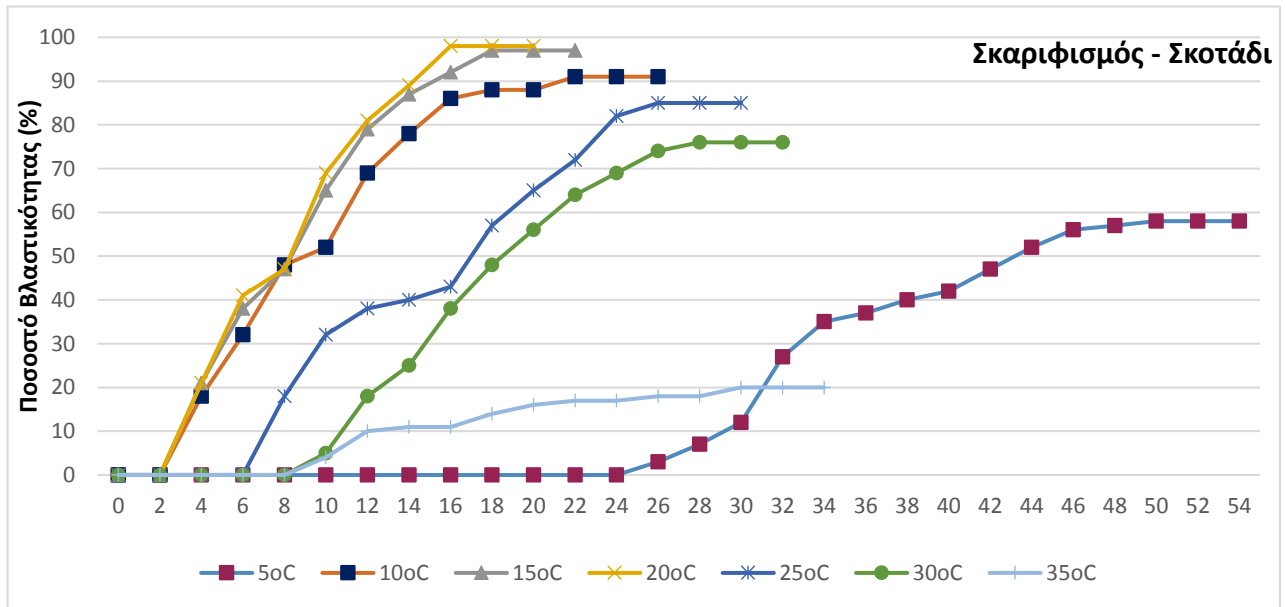
Σχ. 1. *In vitro* βλαστικότητα σπόρων, 0 μήνες μετά τη συλλογή τους, σε φως, στους 5, 10, 15, 20, 25, 30 ή 35 °C, χωρίς προμεταχείριση μηχανικού σκαριφισμού.



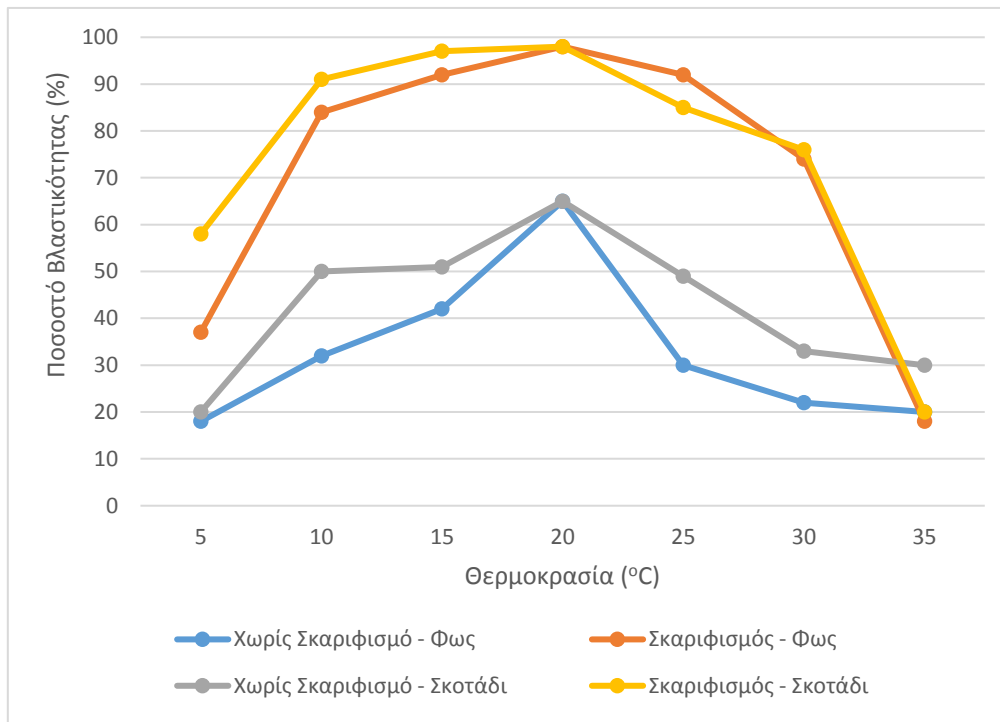
Σχ. 2. *In vitro* βλαστικότητα σπόρων, 0 μήνες μετά τη συλλογή τους, σε φως, στους 5, 10, 15, 20, 25, 30 ή 35 °C, με προμεταχείριση μηχανικού σκαριφισμού.



Σχ. 3. *In vitro* βλαστικότητα σπόρων, 0 μήνες μετά τη συλλογή τους, σε σκοτάδι, στους 5, 10, 15, 20, 25, 30 ή 35 °C, χωρίς προμεταχείριση μηχανικού σκαριφισμού.



Σχ. 4. *In vitro* βλαστικότητα σπόρων, 0 μήνες μετά τη συλλογή τους, σε σκοτάδι, στους 5, 10, 15, 20, 25, 30 ή 35 °C, με προμεταχείριση μηχανικού σκαριφισμού.



Σχ. 5. Σύγκριση *in vitro* βλαστικότητα σπόρων, 0 μήνες μετά τη συλλογή τους, σε φως και σκοτάδι, στους 5, 10, 15, 20, 25, 30 ή 35 °C, με ή χωρίς προμεταχείριση μηχανικού σκαριφισμού.

2.3.1.4 Σπόροι *Anthyllis barba-jovis* L. ηλικίας 12 μηνών

Η βλάστηση σκαριφισμένων και μη σκαριφισμένων σπόρων ξεκίνησε την 4^η ημέρα σε θερμοκρασίες 15 και 25 °C, την 6^η ημέρα στους 20 και 30 °C, την 8^η ημέρα στους 10 και 35 °C, ενώ στους 5 °C η βλάστηση ξεκίνησε την 41^η ημέρα. Σκαριφισμένοι σπόροι βλάστησαν σε υψηλότερα ποσοστά σε σύγκριση με τους σπόρους που δεν είχαν δεχθεί προμεταχείριση σκαριφισμού, είτε η καλλιέργεια έγινε σε 16 h φώς, είτε σε συνεχές σκοτάδι (Πίν. 3 και 4, Σχ. 6, 7, 8, 9 και 10). Η φωτοπερίοδος είχε επίδραση στη βλαστικότητα των σπόρων, ενώ το σκοτάδι ευνόησε ελάχιστα την βλαστικότητα. Το χαμηλότερο ποσοστό βλαστικότητας είτε σε φως είτε σε σκοτάδι σημείωσαν οι σπόροι στους 5 και 35 °C (Πίν. 3 και 4, Σχ. 6, 7, 8, 9 και 10). Σκαριφισμένοι σπόροι βλάστησαν γρηγορότερα από τους μη σκαριφισμένους σπόρους, όπως φανερώνουν οι τιμές T_{50} (χρόνος για επίτευξη του 50% της βλαστικότητας) και οι καμπύλες βλαστικότητας (Πίν. 3 και 4, Σχ. 6, 7, 8 και 9). Η βλάστηση των σπόρων ολοκληρώθηκε ταχύτερα για τους σκαριφισμένους σπόρους στις υψηλότερες θερμοκρασίες 15-35°C, 4-8 ημέρες αργότερα σε 10 °C και περίπου 20 ημέρες αργότερα στους 5 °C (Πίν. 3 και 4). Οι τιμές του T_{50} και ο χρόνος που απαιτήθηκε για την ολοκλήρωση της βλάστησης (Πίν. 3 και 4, Σχ. 10) επίσης φανερώνουν ταχύτερη βλάστηση καθώς η θερμοκρασία αυξάνει.

Πίνακας 3. *In vitro* βλαστικότητα σπόρων, 12 μήνες μετά τη συλλογή τους, στους 5, 10, 15, 20, 25, 30 ή 35 °C, σε συνθήκες συνεχούς σκότους ή σε φωτοπερίοδο 16 h πλήρους φωτός, χωρίς προμεταχείριση σκαριφισμού.

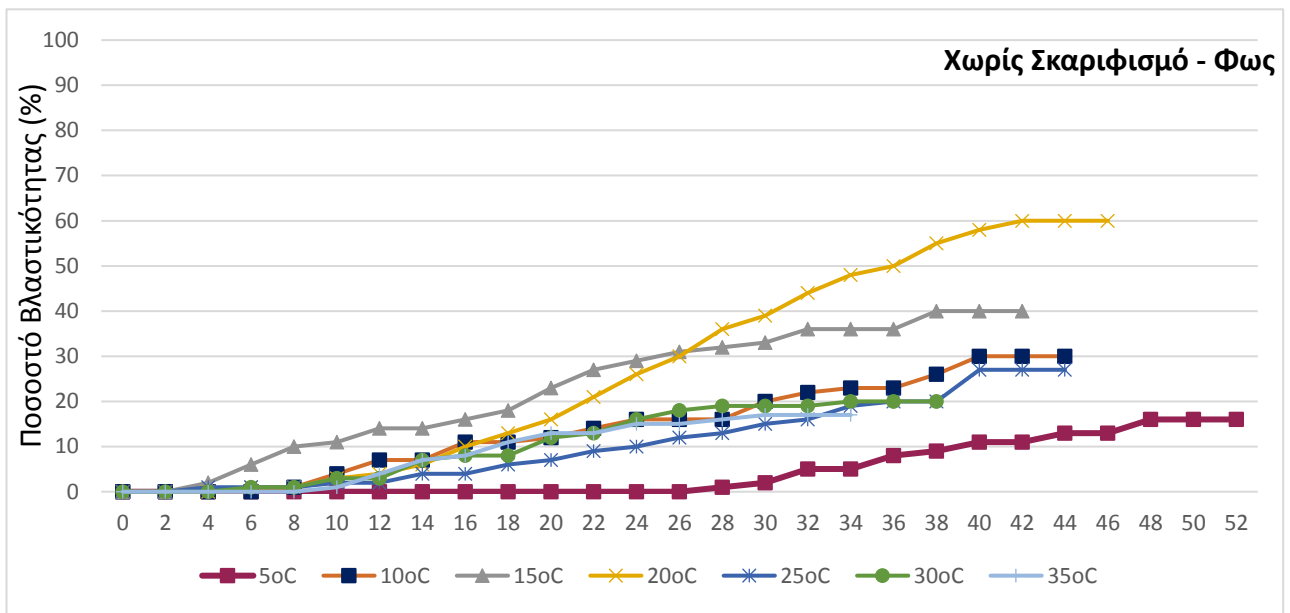
Φωτοπερίοδος/ Θερμοκρασία επώασης (°C)	Βλαστικότητα (%)	T ₅₀	Περίοδος βλάστησης (ημέρες)
Μη Σκαριφισμένοι Σπόροι			
Φως / 5	16,0 d	36	48
Φως / 10	30,0 cd	26	40
Φως / 15	40,0 bc	20	38
Φως / 20	60,0 a	26	42
Φως / 25	27,0 cd	30	40
Φως / 30	20,0 cd	20	34
Φως / 35	17,0 d	22	30
Σκοτάδι / 5	19,0 d	38	50
Σκοτάδι / 10	43,0 abc	22	40
Σκοτάδι / 15	45,0 abc	28	40
Σκοτάδι / 20	59,0 ab	20	36
Σκοτάδι / 25	45,0 abc	26	36
Σκοτάδι / 30	31,0 cd	20	30
Σκοτάδι / 35	28,0 cd	28	34
F_{Θερμοκρασίας}	***		
F_{Φωτοπεριόδου}	*		
F_{Θερμοκρασίας x Φωτοπεριόδου}	NS		
F_{one-way ANOVA}	***		

Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. Πέντε επαναλήψεις των 20 σπόρων χρησιμοποιήθηκαν ανά μεταχείριση.

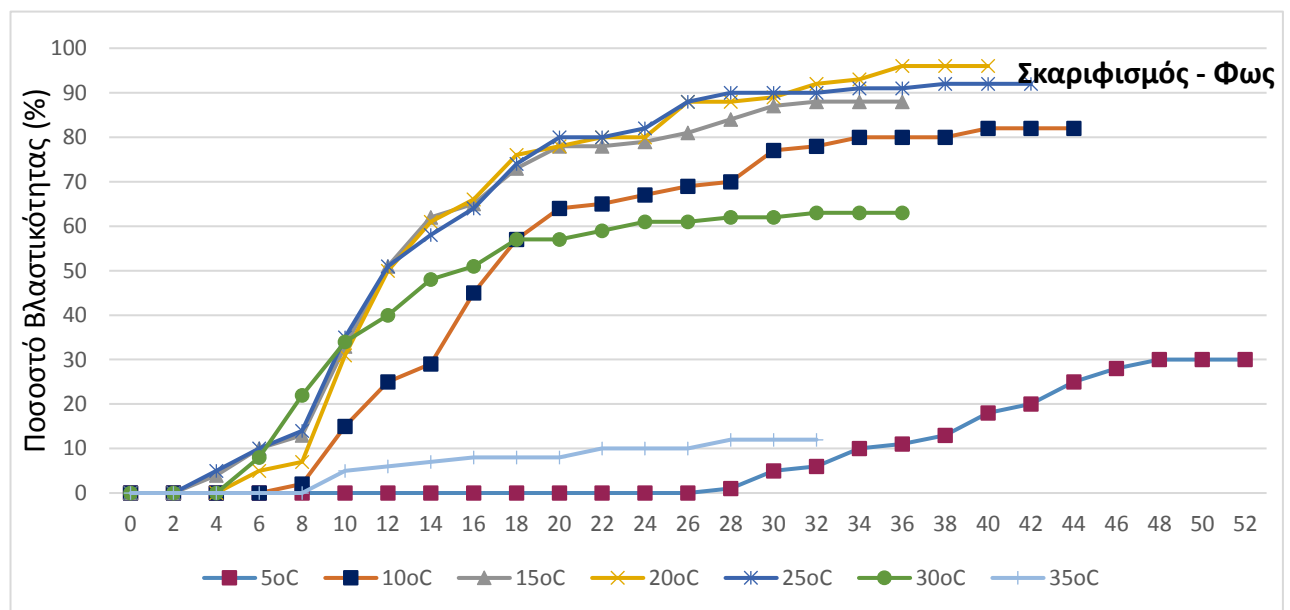
Πίνακας 4. *In vitro* βλαστικότητα σπόρων, 12 μήνες μετά τη συλλογή τους, στους 5, 10, 15, 20, 25, 30 ή 35 °C, σε συνθήκες συνεχούς σκότους ή σε φωτοπερίοδο 16 h πλήρους φωτός, με προμεταχείριση σκαριφισμού.

Φωτοπερίοδος/ Θερμοκρασία επώασης (°C)	Βλαστικότητα (%)	T ₅₀	Περίοδος βλάστησης (ημέρες)
Σκαριφισμένοι Σπόροι			
Φως / 5	30,0 e	26	48
Φως / 10	82,0 ab	16	40
Φως / 15	88,0 ab	12	32
Φως / 20	96,0 a	12	36
Φως / 25	92,0 a	12	38
Φως / 30	63,0 cd	10	32
Φως / 35	12,0 f	26	30
Σκοτάδι / 5	55,0 d	32	50
Σκοτάδι / 10	82,0 ab	16	40
Σκοτάδι / 15	84,0 ab	12	32
Σκοτάδι / 20	82,0 ab	12	32
Σκοτάδι / 25	83,0 ab	12	34
Σκοτάδι / 30	73,0 bc	10	30
Σκοτάδι / 35	17,0 ef	22	30
<i>F</i> Θερμοκρασίας	-		
<i>F</i> Φωτοπεριόδου	-		
<i>F</i> Θερμοκρασίας x Φωτοπεριόδου	*		
<i>F</i> one-way ANOVA	***		

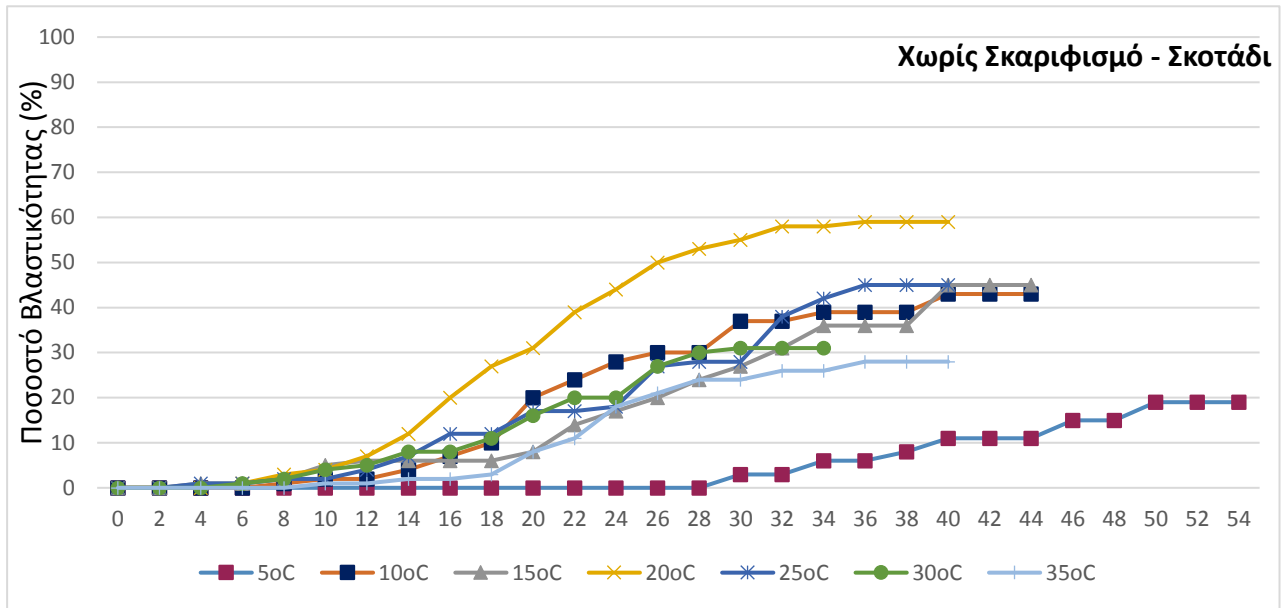
Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. Πέντε επαναλήψεις των 20 σπόρων χρησιμοποιήθηκαν ανά μεταχείριση.



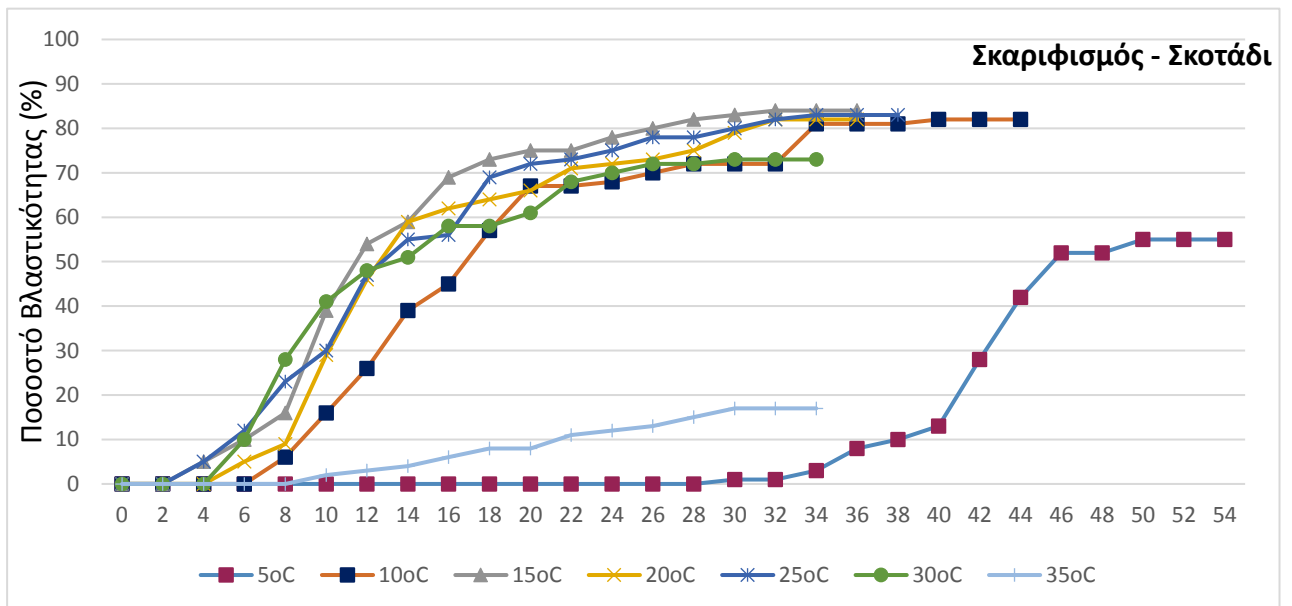
Σχ. 6. *In vitro* βλαστικότητα σπόρων, 12 μήνες μετά τη συλλογή τους, σε φως, στους 5, 10, 15, 20, 25, 30 ή 35 °C, χωρίς προμεταχείριση μηχανικού σκαριφισμού.



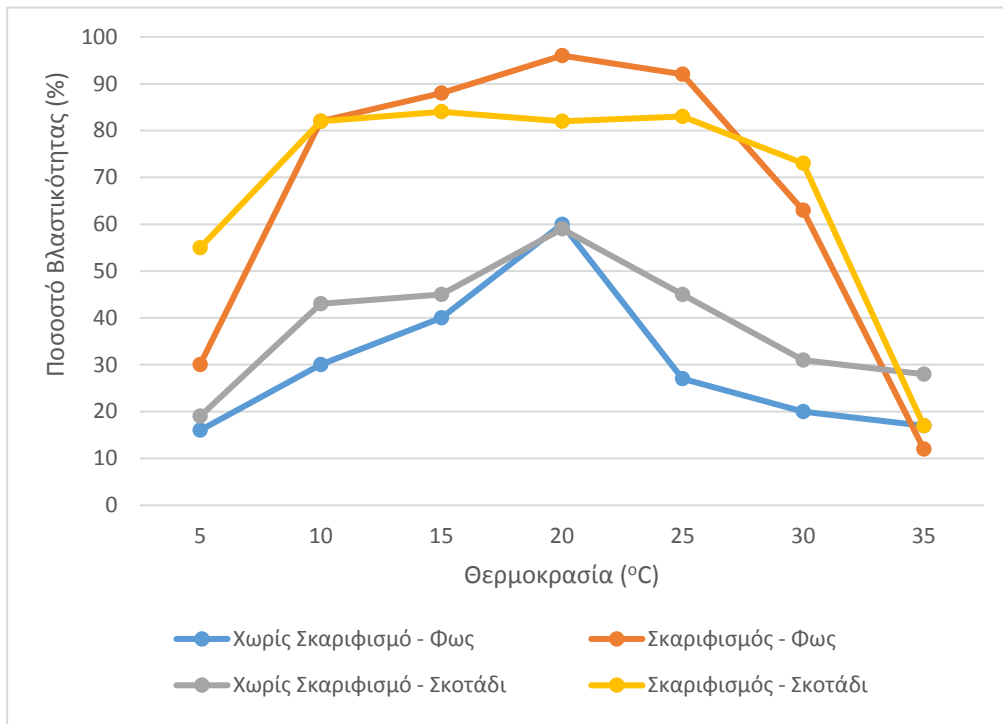
Σχ. 7. *In vitro* βλαστικότητα σπόρων, 12 μήνες μετά τη συλλογή τους, σε φως, στους 5, 10, 15, 20, 25, 30 ή 35 °C, με προμεταχείριση μηχανικού σκαριφισμού.



Σχ. 8. *In vitro* βλαστικότητα σπόρων, 12 μήνες μετά τη συλλογή τους, σε σκοτάδι, στους 5, 10, 15, 20, 25, 30 ή 35 °C, χωρίς προμεταχείριση μηχανικού σκαριφισμού.



Σχ. 9. *In vitro* βλαστικότητα σπόρων, 12 μήνες μετά τη συλλογή τους, σε σκοτάδι, στους 5, 10, 15, 20, 25, 30 ή 35 °C, με προμεταχείριση μηχανικού σκαριφισμού.



Σχ. 10. Σύγκριση *in vitro* βλαστικότητα σπόρων, 12 μήνες μετά τη συλλογή τους, σε φως και σκοτάδι, στους 5, 10, 15, 20, 25, 30 ή 35 °C, με ή χωρίς προμεταχείριση μηχανικού σκαριφισμού.

2.3.1.5 Σπόροι *Anthyllis barba-jovis* L. ηλικίας 24 μηνών

Η βλάστηση σκαριφισμένων και μη σκαριφισμένων σπόρων ξεκίνησε την 4^η ημέρα σε θερμοκρασίες 15 έως 25 °C, την 5^η ημέρα στους 30 και 35 °C, την 8^η ημέρα στους 10 °C, ενώ στους 5 °C η βλάστηση ξεκίνησε την 26^η ημέρα. Σκαριφισμένοι σπόροι βλάστησαν σε υψηλότερα ποσοστά σε σύγκριση με τους σπόρους που δεν είχαν δεχθεί προμεταχείριση σκαριφισμού, είτε η καλλιέργεια έγινε σε 16 h φώς, είτε σε συνεχές σκοτάδι. Η φωτοπερίοδος είχε επίδραση στη βλαστικότητα των σπόρων (Πίν. 5 και 6, Εικ. 10, Σχ. 11, 12, 13, 14 και 15). Το σκοτάδι ευνόησε ελάχιστα την βλαστικότητα. Οι σπόροι στους 5 και 35 °C σημείωσαν το χαμηλότερο ποσοστό βλαστικότητας είτε σε φως είτε σε σκοτάδι (Πίν. 5 και 6, Εικ. 10, Σχ. 11, 12, 13, 14 και 15). Σκαριφισμένοι σπόροι βλάστησαν γρηγορότερα από τους μη σκαριφισμένους σπόρους, όπως φανερώνουν οι τιμές T₅₀ (χρόνος για επίτευξη του 50% της βλαστικότητας) και οι καμπύλες βλαστικότητας (Πίν. 5 και 6, Σχ. 11, 12, 13 και 14). Η βλάστηση των σπόρων ολοκληρώθηκε ταχύτερα για τους σκαριφισμένους σπόρους στις υψηλότερες θερμοκρασίες, σχεδόν το ίδιο σε 25, 30 και 35 °C, 4-6 ημέρες αργότερα σε 10, 15 και 20 °C και περίπου 30 ημέρες αργότερα στους 5 °C (Πίν. 5 και 6). Οι τιμές του T₅₀ και ο χρόνος που απαιτήθηκε για την ολοκλήρωση της βλάστησης (Πίν. 5 και 6, Εικ. 10, Σχ. 15) επίσης φανερώνουν ταχύτερη βλάστηση καθώς η θερμοκρασία αυξάνει.

Πίνακας 5. *In vitro* βλαστικότητα σπόρων, 24 μήνες μετά τη συλλογή τους, στους 5, 10, 15, 20, 25, 30 ή 35 °C, σε συνθήκες συνεχούς σκότους ή σε φωτοπερίοδο 16 h πλήρους φωτός, χωρίς προμεταχείριση σκαριφισμού.

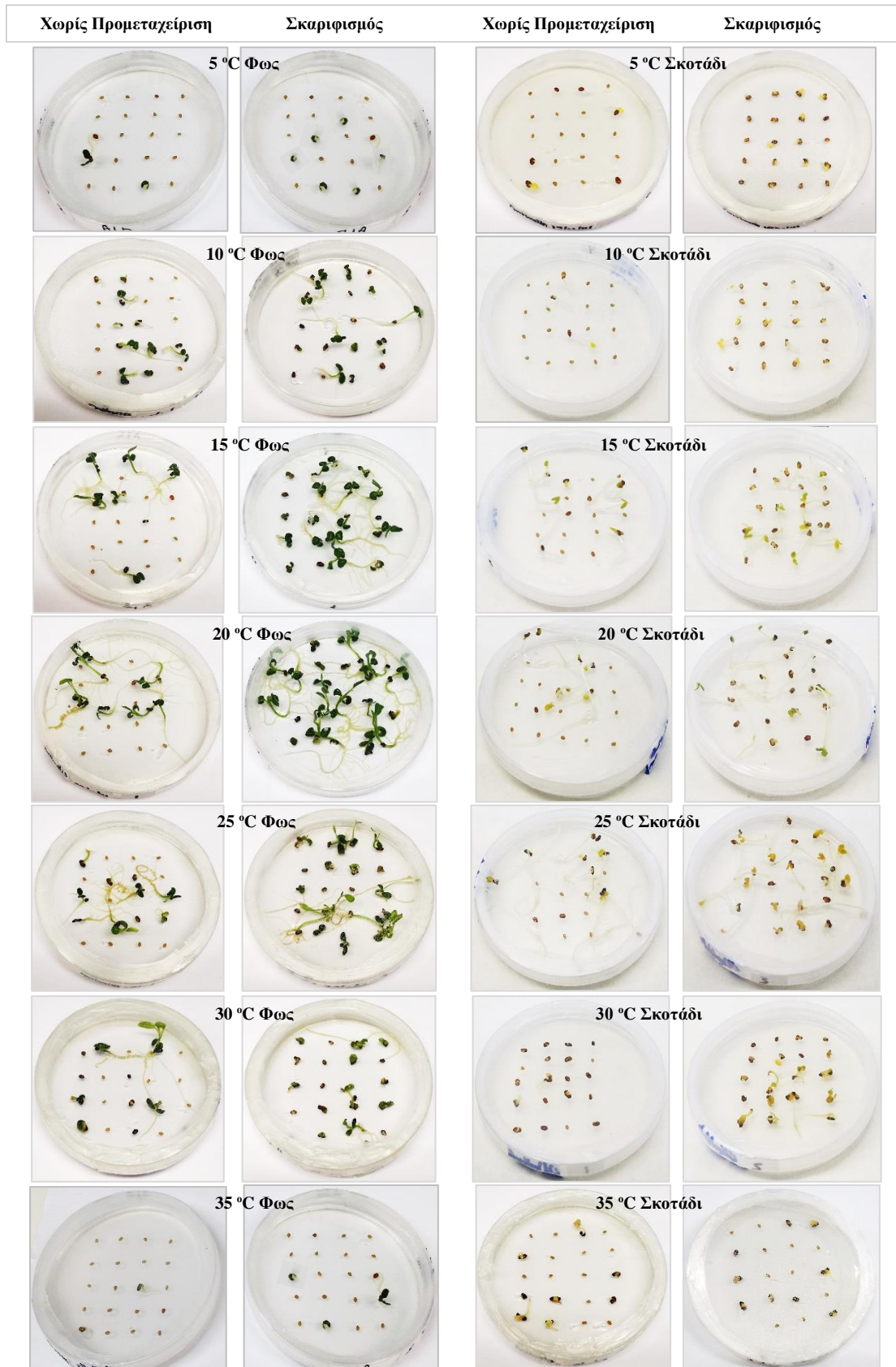
Φωτοπερίοδος/ Θερμοκρασία επώασης (°C)	Βλαστικότητα (%)	T₅₀	Περίοδος βλάστησης (ημέρες)
Μη Σκαριφισμένοι Σπόροι			
Φως / 5	4,0 e	32	42
Φως / 10	20,0 bcde	18	30
Φως / 15	22,0 abcd	18	36
Φως / 20	23,0 abcd	22	40
Φως / 25	28,0 abc	24	32
Φως / 30	20,0 bcde	14	32
Φως / 35	16,0 cde	20	28
Σκοτάδι / 5	7,0 de	32	44
Σκοτάδι / 10	25,0 ab	10	30
Σκοτάδι / 15	23,0 abcd	10	30
Σκοτάδι / 20	34,0 ab	15	30
Σκοτάδι / 25	38,0 a	16	32
Σκοτάδι / 30	30,0 abc	18	30
Σκοτάδι / 35	18,0 bcde	24	28
F_{Θερμοκρασίας}	**		
F_{Φωτοπεριόδου}	NS		
F_{Θερμοκρασίας x Φωτοπεριόδου}	NS		
F_{one-way ANOVA}	*		

Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. Πέντε επαναλήψεις των 20 σπόρων χρησιμοποιήθηκαν ανά μεταχείριση.

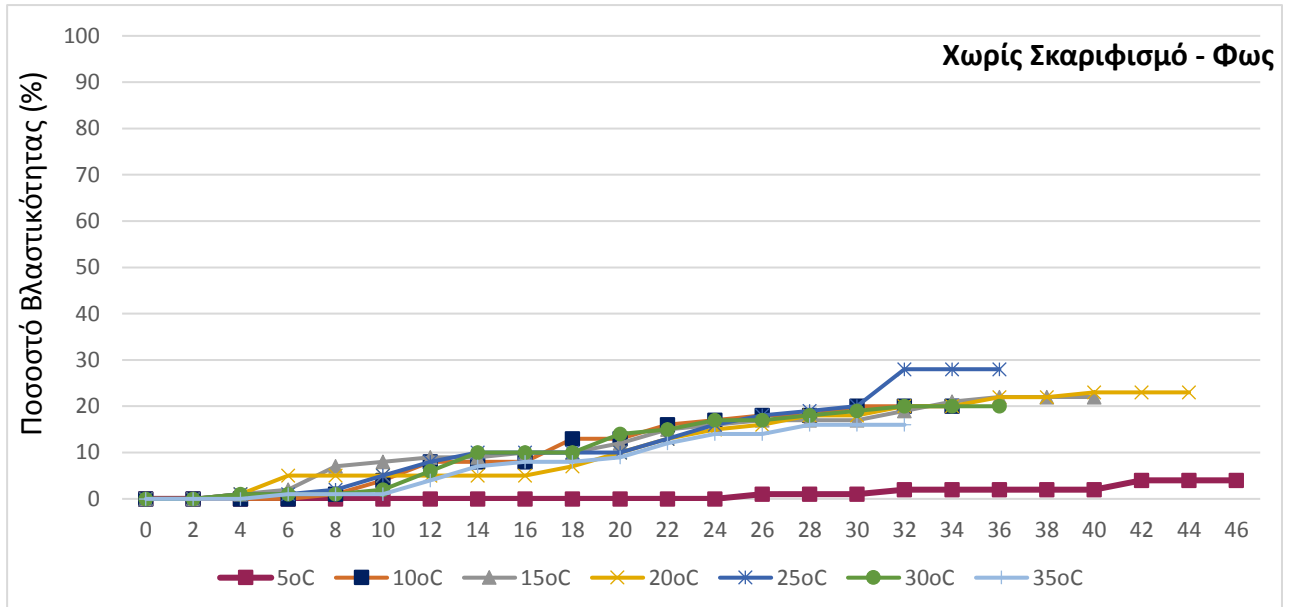
Πίνακας 6. *In vitro* βλαστικότητα σπόρων, 24 μήνες μετά τη συλλογή τους, στους 5, 10, 15, 20, 25, 30 ή 35 °C, σε συνθήκες συνεχούς σκότους ή σε φωτοπερίοδο 16 h πλήρους φωτός, με προμεταχείριση σκαριφισμού.

Φωτοπερίοδος/ Θερμοκρασία επώασης (°C)	Βλαστικότητα (%)	T ₅₀	Περίοδος βλάστησης (ημέρες)
Σκαριφισμένοι Σπόροι			
Φως / 5	20,0 h	28	50
Φως / 10	56,0 f	12	32
Φως / 15	89,0 ab	8	32
Φως / 20	97,0 a	8	26
Φως / 25	68,0 de	8	26
Φως / 30	60,0 ef	8	24
Φως / 35	10,0 h	18	22
Σκοτάδι / 5	34,0 g	40	52
Σκοτάδι / 10	70,0 de	12	30
Σκοτάδι / 15	83,0 bc	8	30
Σκοτάδι / 20	84,0 bc	6	30
Σκοτάδι / 25	82,0 bc	6	26
Σκοτάδι / 30	75,0 cd	8	28
Σκοτάδι / 35	12,0 h	10	20
F_{Θερμοκρασίας}	-		
F_{Φωτοπεριόδου}	-		
F_{Θερμοκρασίας x Φωτοπεριόδου}	**		
F_{one-way ANOVA}	***		

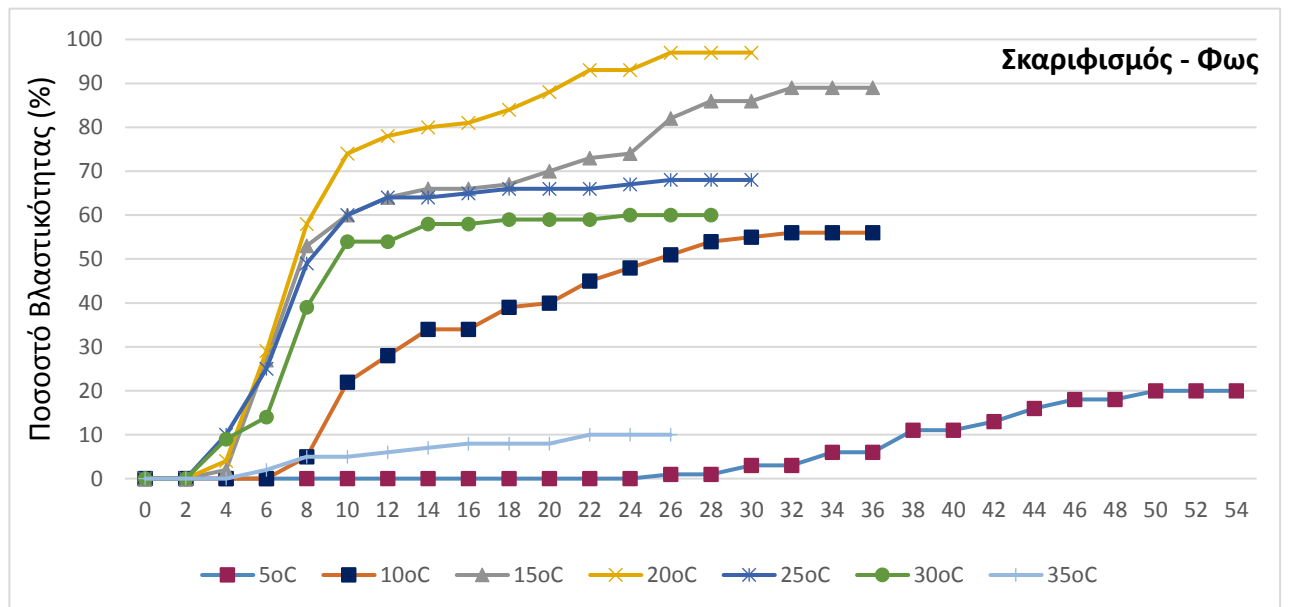
Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. Πέντε επαναλήψεις των 20 σπόρων χρησιμοποιήθηκαν ανά μεταχείριση.



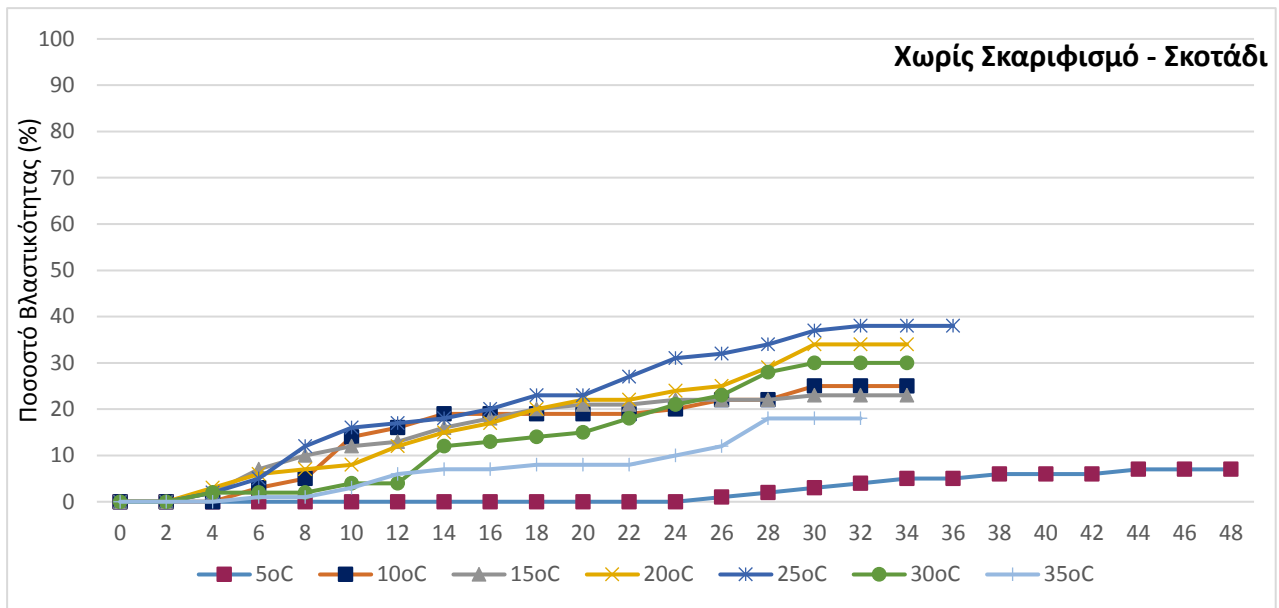
Εικ. 10. Βλάστηση *in vitro*, σπόρων, ηλικίας 24 μηνών, σε τρυβλία Petri, με στερεό υπόστρωμα MS μισής δύναμης, με ή χωρίς προμεταχείριση σκαριφισμού, σε φως ή σκοτάδι, σε θερμοκρασίες 5, 10, 15, 20, 25, 30 και 35 °C.



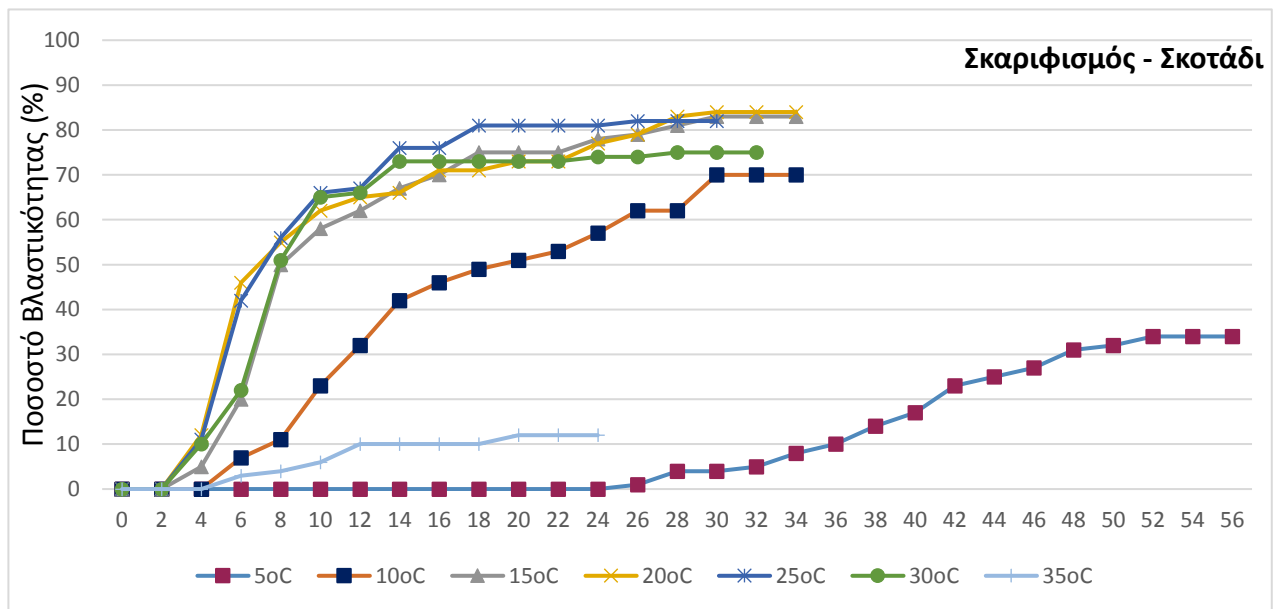
Σχ. 11. *In vitro* βλαστικότητα σπόρων, 24 μήνες μετά τη συλλογή τους, σε φως, στους 5, 10, 15, 20, 25, 30 ή 35 °C, χωρίς προμεταχείριση μηχανικού σκαριφισμού.



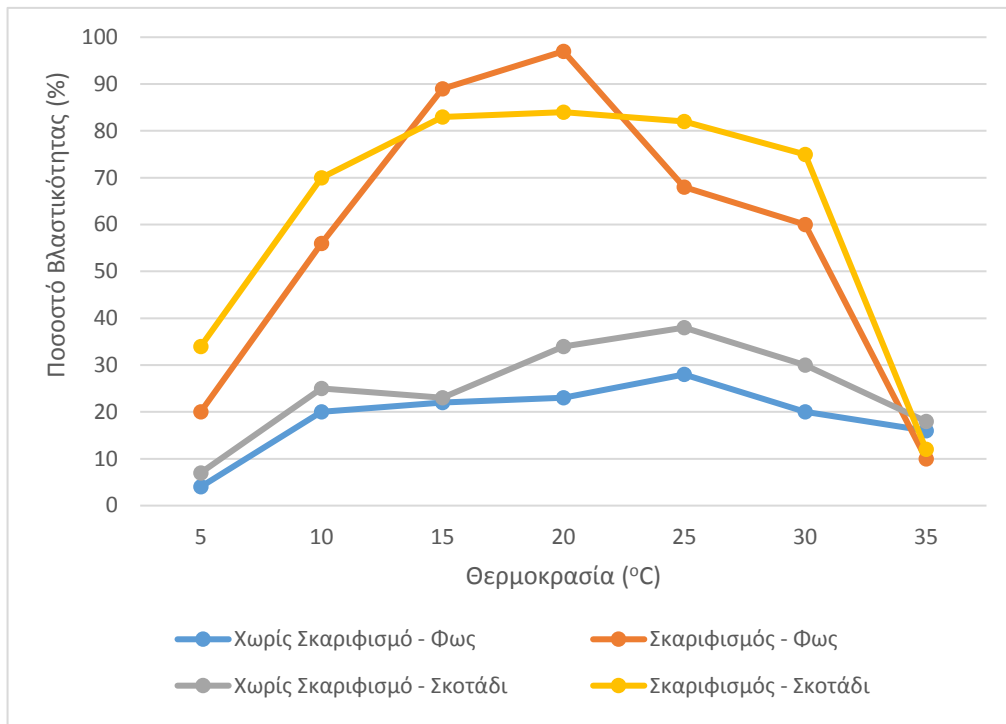
Σχ. 12. *In vitro* βλαστικότητα σπόρων, 24 μήνες μετά τη συλλογή τους, σε φως, στους 5, 10, 15, 20, 25, 30 ή 35 °C, χωρίς προμεταχείριση μηχανικού σκαριφισμού.



Σχ. 13. *In vitro* βλαστικότητα σπόρων, 24 μήνες μετά τη συλλογή τους, σε σκοτάδι, στους 5, 10, 15, 20, 25, 30 ή 35 °C, χωρίς προμεταχείριση μηχανικού σκαριφισμού.



Σχ. 14. *In vitro* βλαστικότητα σπόρων, 24 μήνες μετά τη συλλογή τους, σε σκοτάδι, στους 5, 10, 15, 20, 25, 30 ή 35 °C, με προμεταχείριση μηχανικού σκαριφισμού.



Σχ. 15. Σύγκριση *in vitro* βλαστικότητα σπόρων, 24 μήνες μετά τη συλλογή τους, σε φως και σκοτάδι, στους 5, 10, 15, 20, 25, 30 ή 35 °C, με ή χωρίς προμεταχείριση μηχανικού σκαριφισμού.

2.3.2 Βλαστικότητα σπόρων *ex vitro*

2.3.2.1 Σπόροι *Anthyllis barba-jovis* L. ηλικίας 0, 12 και 24 μηνών

Η βλάστηση σκαριφισμένων και μη σκαριφισμένων σπόρων, όλων των ηλικιών, ξεκίνησε την 4^η ημέρα, ενώ οι σπόροι με περικάρπιο ηλικίας 0 και 12 μηνών την 20^η ημέρα και 24 μηνών την 40^η ημέρα. Η ύπαρξη περικαρπίων παρεμπόδισε τη βλάστηση των σπόρων, ενώ ο σκαριφισμός αύξησε τη βλαστικότητα των σπόρων (Πίν. 7). Σκαριφισμένοι σπόροι βλάστησαν σε υψηλότερα ποσοστά σε σύγκριση με τους σπόρους που δεν είχαν δεχθεί προμεταχείριση σκαριφισμού, ενώ πολύ χαμηλά ποσοστά βλαστικότητας σημείωσαν οι σπόροι με περικάρπιο σε όλες τις ηλικίες (Πίν. 7, Εικ. 11). Η αύξηση της διάρκειας αποθήκευσης μείωσε ελαφρά τη βλαστικότητα. Σπόροι 12 και 24 μηνών σημείωσαν χαμηλότερα ποσοστά βλαστικότητας. Σκαριφισμένοι σπόροι βλάστησαν γρηγορότερα από τους μη σκαριφισμένους σπόρους, όπως φανερώνουν οι τιμές T₅₀ (χρόνος για επίτευξη του 50% της βλαστικότητας), ενώ η βλάστηση των σπόρων ολοκληρώθηκε ταχύτερα για τους σκαριφισμένους σπόρους (Πίν. 7).

Πίνακας 7. *Ex vitro* βλαστικότητα σπόρων, 24, 12 και 0 μήνες μετά τη συλλογή στους 20 °C, με το περικάρυό τους, χωρίς προμεταχείριση ή με σκαριφισμό.

Ηλικία σπόρων / Χειρισμός στους 20 °C	Βλαστικότητα (%)	T ₅₀	Περίοδος βλάστησης (ημέρες)
0 μήνες			
Με Περικάπριο	5,0 e	32	48
Χωρίς Σκαριφισμό	61,0 bc	16	56
Με Σκαριφισμό	74,0 a	10	28
12 μήνες			
Με Περικάπριο	4,0 e	54	62
Χωρίς Σκαριφισμό	54,0 c	26	58
Με Σκαριφισμό	68,0 ab	8	32
24 μήνες			
Με Περικάπριο	2,0 e	50	50
Χωρίς Σκαριφισμό	44,0 d	18	62
Με Σκαριφισμό	64,0 b	6	26
<i>F</i> _{Ηλικίας}	***		
<i>F</i> _{Χειρισμού}	**		
<i>F</i> _{Ηλικίας x Χειρισμού}	NS		

Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. Πέντε επαναλήψεις των 20 σπόρων χρησιμοποιήθηκαν ανά μεταχείριση.



Εικ. 12. Σπορόφυτα ανεπτυγμένα *ex vitro* σε υπόστρωμα τύρφη: περλίτης (1:1 v/v), που προήλθαν από σπόρους που αποθηκεύτηκαν για διάστημα 0 μηνών, χωρίς προμεταχείριση μηχανικού σκαριφισμού.

2.4 Συζήτηση - Συμπεράσματα

Στο παρόν πείραμα, διερευνήθηκε η ύπαρξη ή μη ληθάργου σε σπόρους *A. barba-jovis*, ο καθορισμός των ορίων θερμοκρασίας για βλάστηση του σπόρου, καθώς και η επίδραση της φωτοπεριόδου. Μελετήθηκε επίσης η επίδραση του χρόνου διατήρησης-αποθήκευσης του σπόρου (0, 12 και 24 μήνες) στην βλαστικότητα, *in vitro* και *ex vitro*.

Οι σπόροι του φυτού εμφανίζουν φυσικό λήθαργο, λόγω της αδιάβροχης εφυμενίδας τους, και ως εκ τούτου η προμεταχείριση μηχανικού σκαριφισμού των σπόρων για 1 min με γυαλόχαρτο είχε ευνοϊκή επίδραση στη βλάστηση των σπόρων, επαληθεύοντας προηγούμενη σχετική αναφορά περί αυτού (Morbidoni *et al.*, 2008). Η φωτοπερίοδος είχε σημαντική επίδραση στη βλαστικότητα των σπόρων, ενώ το σκοτάδι ευνόησε ελάχιστα την βλαστικότητα. Οι σπόροι παρουσίασαν υψηλή βιωσιμότητα μέχρι και δύο χρόνια από τη συλλογή τους, ενώ αυτοί που αποθηκεύτηκαν για 24 μήνες βλάστησαν σε υψηλά ποσοστά, αλλά σχετικά χαμηλότερα από τους σπόρους πρόσφατης συλλογής (Σχ. 16). Οι τιμές του T₅₀ και ο χρόνος που απαιτήθηκε για την ολοκλήρωση της βλάστησης (Πίν. 1-6, Σχ. 5, 10, 15) επίσης φανερώνουν ταχύτερη βλάστηση καθώς η θερμοκρασία αυξάνει. Η βλάστηση ολοκληρώθηκε ταχύτερα σε θερμοκρασίες 10-25 °C και περίπου 10-20 ημέρες αργότερα στους 5°C. Η θερμοκρασία των 20 °C έδωσε υψηλότερα ποσοστά βλαστικότητας, σε σκαριφισμένους ή μη σπόρους, που ήταν αποθηκευμένοι για 0 και 12 μήνες, όπως και για σκαριφισμένους σπόρους που ήταν αποθηκευμένοι για 24 μήνες, ενώ μη σκαριφισμένοι σπόροι που ήταν αποθηκευμένοι για 24 μήνες έδωσαν καλύτερα ποσοστά βλαστικότητας στους 25 °C (Σχ. 1 - Παράρτημα I).

Στον έλεγχο βλαστικότητας των σπόρων *ex vitro*, παρατηρήθηκε ότι η αποθήκευση μέχρι 24 μήνες επηρέασε την βλαστικότητα των σπόρων (Πίν. 7). Οι σπόροι που αποθηκεύτηκαν για 12 και 24 μήνες έδωσαν χαμηλότερα αποτελέσματα από τους σπόρους πρόσφατης συλλογής, ενώ οι σπόροι με περικάρπιο έδωσαν τα χαμηλότερα ποσοστά βλαστικότητας σε όλες τις ηλικίες των σπόρων, το οποίο σε μεγάλο ποσοστό πιθανόν να οφείλεται σε κούφιους σπόρους, γεγονός που παρατηρήθηκε κατά την αφαίρεση του περικαρπίου των σπόρων πριν την εγκατάστασή τους για βλάστηση *in vitro*, όπου το 50% των σπόρων που καθαρίστηκαν ήταν κούφιοι.

3. ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ *Anthyllis barba - jovis* L.

3.1 Εισαγωγή

Το στάδιο του πολλαπλασιασμού των *in vitro* καλλιεργειών, είναι ιδιαίτερα σημαντικό κατά τη δημιουργία ενός πρωτοκόλλου μικροπολλαπλασιασμού. Η απόκτηση σε μικρό χρονικό διάστημα ενός μεγάλου αριθμού βλαστών, με μεγάλο μήκος και η ομοιότητα των παραγόμενων βλαστών με τα μητρικά φυτά απ' όπου προήλθαν είναι μεγάλης σημασίας. Σχετικά με τον *in vitro* πολλαπλασιασμό της *A. barba-jovis* δεν υπάρχουν πολλές βιβλιογραφικές αναφορές, όπως συμβαίνει με άλλα είδη του γένους.

3.2 *In vitro* πολλαπλασιασμός από σπορόφυτα *A. barba - jovis* L.

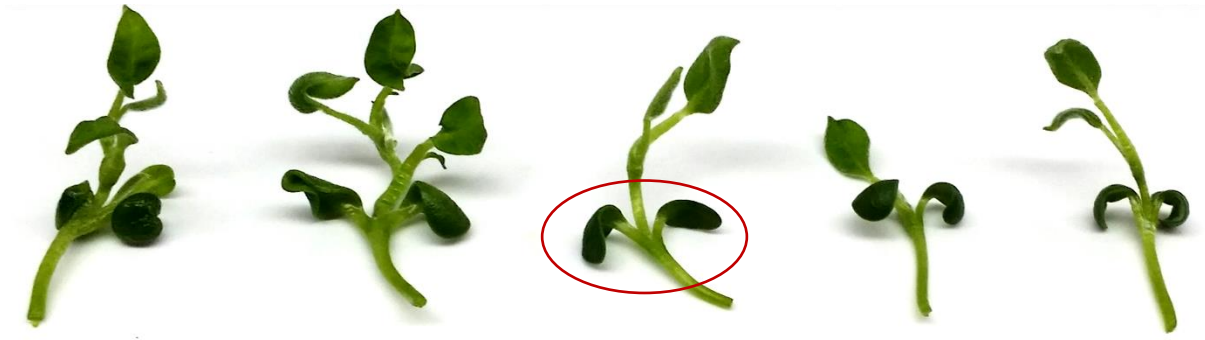
3.2.1 Υλικά και Μέθοδοι

3.2.1.1 Φυτικό υλικό

Σπόροι *Anthyllis barba-jovis* L. που είχαν συλλεχθεί από αυτοφυή φυτά στον Υμηττό Αττικής διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και έπειτα, απολυμάνθηκαν επιφανειακά και καλλιεργήθηκαν για βλάστηση *in vitro* σε τρυβλία Petri με στερεό (8 g l⁻¹ agar) θρεπτικό υπόστρωμα MS (Murashige and Skoog, 1962) μισής δύναμης, στους 15 °C, για ένα μήνα περίπου (Εικ. 12). Από τα σπορόφυτα ελήφθησαν έκφυτα κοτυληδικού κόμβου, τα οποία αποτέλεσαν το υλικό της αρχικής καλλιέργειας *in vitro* (Εικ. 13).



Εικ. 12. Σπόροι *A. barba-jovis* L. σε τρυβλία Petri με θρεπτικό υπόστρωμα ½ MS, στους 15 °C, 4 ημέρες (αριστερά) και 28 ημέρες μετά την εγκατάστασή τους (δεξιά).



Εικ. 13. Σπορόφυτα στο στάδιο λήψης κοτυληδικού κόμβου και μεταφορά αυτών σε θρεπτικό υπόστρωμα MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες ή εμπλουτισμένο με 0,5 ή 1,0 mg l⁻¹ BA ή 0,1 mg l⁻¹ NAA ή συνδυασμό αυτών.

3.2.1.2 Υποστρώματα *in vitro* καλλιέργειας

3.2.1.2.1 Υλικά των θρεπτικών υποστρωμάτων *in vitro* καλλιέργειας

Τα συστατικά που περιέχονταν στα διάφορα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πορεία του πειράματος είναι τα ακόλουθα:

- ✓ Υπόστρωμα MS (Murashige and Skoog Medium) της εταιρείας Duchefa Bio-chem σε μορφή σκόνης (Murashige and Skoog, 1962) (Πίν. 8).
- ✓ Υπόστρωμα WPM (McCown's Woody Plant Medium) σε μορφή σκόνης της εταιρείας Duchefa Bio-chem (McCown and Lloyd, 1981) (Πίν. 8).
- ✓ Υπόστρωμα SH (Schenk and Hildebrandt Medium) σε μορφή σκόνης της εταιρείας Duchefa Bio-chem (Schenk and Hildebrandt, 1972) (Πίν. 8).
- ✓ Σακχαρόζη εμπορίου (Sucrose).
- ✓ Αυξίνες: Ινδολο-3-βουτυρικό οξύ, IBA, (Indole-3-butyric acid, MB= 230,24) και Ναφθαλινοξικό οξύ, NAA, (1-Naphthaleneacetic acid, MB=186), της εταιρείας Sigma-Aldrich.
- ✓ Κυτοκινίνες: Βενζυλαδενίνη, BA, (N₆-benzyladenine, MB= 225,26), της εταιρείας Sigma-Aldrich.
- ✓ Άγαρ (Ρουμπουλάκης Α.Ε. Χημικά).

3.2.1.2.2 Μέθοδος παρασκευής «stock» διαλυμάτων φυτορρυθμιστικών ουσιών

Κατά την διαδικασία παρασκευής των θρεπτικών υποστρωμάτων καλλιέργειας, ήταν αναγκαία η παρασκευή «stock», αποθεματικών, διαλυμάτων των φυτορρυθμιστικών ουσιών που περιείχαν την κάθε φυτορρυθμιστική ουσία σε ποσοστό 10 % κ.β.

- ✓ Παρασκευή «stock» διαλύματος IBA. Σε δοχείο ζέσεως χωρητικότητας 100 ml τοποθετούνταν 10 mg IBA, τα οποία διαλύονταν με ανάδευση σε 2-3 σταγόνες καθαρής αιθανόλης (99,9 %). Στη συνέχεια προσθέτονταν 100 ml αποσταγμένου νερού.
- ✓ Παρασκευή «stock» διαλύματος NAA. Σε δοχείο ζέσεως χωρητικότητας 100 ml τοποθετούνταν 10 mg NAA, τα οποία διαλύονταν με ανάδευση σε 2-3 σταγόνες καθαρής αιθανόλης (99,9 %). Στη συνέχεια προσθέτονταν 100 ml αποσταγμένου νερού.
- ✓ Παρασκευή «stock» διαλύματος BA. Σε δοχείο ζέσεως χωρητικότητας 100 ml τοποθετούνταν 10 mg BA, τα οποία διαλύονταν με ανάδευση σε 2-3 σταγόνες 1N καυστικού νατρίου (NaOH). Στη συνέχεια προσθέτονταν 100 ml αποσταγμένου νερού.

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

Πίνακας 8. Συστατικά (μακροστοιχεία-ιχνοστοιχεία-βιταμίνες) των θρεπτικών υποστρωμάτων Murashige & Skoog (MS), Lloyd & McCown (WPM) και Schenk & Hildebrandt (SH).

Compounds	Murashige and Skoog	WPM	Schenk and Hildebrandt
Macronutrients in mg/l (mM)			
NH ₄ NO ₃	1650 (20.6)	400 (5.0)	—
NH ₄ H ₂ PO ₄	—	—	300 (2.6)
NH ₄ SO ₄	—	—	—
CaCl ₂ ·2H ₂ O	332.2 (2.3)	96 (0.7)	151 (1.0)
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	—	556 (2.4)	—
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370 (1.5)	370 (1.5)	400 (1.6)
KCl	—	—	—
KNO ₃	1900 (18.8)	—	2500 (24.8)
K ₂ SO ₄	—	990	—
KH ₂ PO ₄	170 (1.3)	170 (1.3)	—
NaH ₂ PO ₄	—	—	—
Na ₂ SO ₄	—	—	—
Micronutrients in mg/l (μM)			
H ₃ BO ₃	6.2 (100)	6.2 (100)	5 (80)
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025 (0.1)	—	0.1 (0.4)
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025 (0.1)	0.25 (1)	0.2 (0.08)
Na ₂ EDTA	37.3 (100)	37.3 (100)	20.1 (54)
Fe ₂ (SO ₄) ₃	—	—	—
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.8 (100)	27.8 (100)	15 (54)
MnSO ₄ ·H ₂ O	16.9 (100)	22.3 (132)	10.0 (59)
KI	0.83 (5)	—	0.1 (0.6)
NaMoO ₄	—	—	—
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25 (1)	0.25 (1)	0.1 (0.4)
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6 (30)	8.6 (30)	1 (3)
Organics in mg/l (μM)			
Myo-inositol	100 (550)	100 (550)	1000 (5500)
Glycine	2.0 (26.6)	2.0 (26.6)	—
Nicotinic Acid	0.5 (4.1)	0.5 (4.1)	5.0 (41)
Pyridoxine HCl	0.5 (2.4)	0.5 (2.4)	0.5 (2.4)
Thiamine HCl	0.1 (0.3)	1.0 (3.0)	5.0 (14.8)
Biotin	—	—	—

3.2.1.2.3 Μέθοδος παρασκευής θρεπτικού υποστρώματος

Για την παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος των καλλιεργειών έγινε προσθήκη, σε δοχείο ζέσεως, αποσταγμένου νερού με λιγότερο όγκο από του τελικού, καθώς και οι ακριβείς ποσότητες πλήρους Murashige and Skoog (MS) 4,4 g l⁻¹, σακχαρόζης 30 g l⁻¹ και των επιθυμητών κάθε φορά φυτορρυθμιστικών ουσιών, από τα stock διαλύματα αυτών. Στα υποστρώματα της αρχικής καλλιέργειας και της υποκαλλιέργειας προστέθηκαν συγκεντρώσεις κυτοκινίνης BA (0,0 ή 0,5 ή 1,0 mg l⁻¹), με ή χωρίς την παρουσία αυξίνης NAA, σε συγκέντρωση 0,1 mg l⁻¹. Στο στάδιο της ριζοβολίας μικροβλαστών χρησιμοποιήθηκαν υποστρώματα μισής δύναμης MS ή WPM ή SH χωρίς IBA ή εμπλουτισμένα με 0,5 ή 2,0 mg l⁻¹ IBA. Τα διαλύματα τέθηκαν υπό συνεχή ανάδευση με τη βοήθεια ενός μαγνητικού αναδευτήρα μέχρι το στάδιο της πλήρους διάλυσης των συστατικών και στη συνέχεια έγινε η ογκομέτρηση του διαλύματος. Έγινε συμπλήρωση του διαλύματος με αποσταγμένο νερό μέχρι τον επιθυμητό όγκο και ακολούθησε μέτρηση και έπειτα ρύθμιση του pH στην τιμή 5,7-5,8 της κλίμακας με τη βοήθεια διαλυμάτων 0,1 ή 1 N NaOH και 0,1 ή 1 N HCl. Η διαδικασία ολοκληρώθηκε με την προσθήκη ακριβούς ποσότητας άγαρ (8 g l⁻¹) και ακολούθησε θέρμανση του διαλύματος, υπό συνεχή ανάδευση μέχρι να διαλυθεί πλήρως το άγαρ (διαυγές διάλυμα). Το έτοιμο υπόστρωμα μοιραζόταν σε κάθε στάδιο καλλιέργειας σε αντίστοιχα δοχεία (δοκιμαστικοί σωλήνες ή γυάλινα βάζα καλλιέργειας) και τοποθετούνταν προς αποστείρωση σε χύτρα ή κλίβανο υγρής αποστείρωσης.

3.2.1.3 Δοχεία και υλικά κάλυψης

3.2.1.3.1 Δοχεία *in vitro* καλλιέργειας και υλικά κάλυψης

Στο στάδιο της εγκατάστασης *in vitro* των αρχικών καλλιεργειών από κοτυλιδικούς κόμβους χρησιμοποιήθηκαν ως δοχεία καλλιέργειας γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες όγκου 50 ml (25 x 100 mm), που περιείχαν 10 ml υπόστρωμα έκαστος. Μετά την τοποθέτηση του υποστρώματος οι σωλήνες καλύπτονταν με αλουμινόχαρτο για να αποστειρωθούν σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης, ενώ μετά την τοποθέτηση των εκφύτων στην Τράπεζα Νηματικής Ροής ως υλικό κάλυψής τους χρησιμοποιήθηκε μεμβράνη sanitas (πλαστική μεμβράνη περιτυλίγματος με το εμπορικό όνομα sanitas της εταιρείας Σαράντης Α.Ε., η οποία είχε τις εξής ιδιότητες: περατότητα σε οξυγόνο 8,5 cm³ m⁻² σε 24 h, περατότητα σε διοξείδιο του άνθρακα 55.000 cm³ m⁻² σε 24 h και περατότητα σε υδρατμούς 110 g m⁻² σε 24 h).

Στο στάδιο του πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών *in vitro* και των ριζοβολιών χρησιμοποιήθηκαν ως δοχεία καλλιέργειας γυάλινα βάζα όγκου 100 ml, τα οποία περιείχαν 25

ml υπόστρωμα το κάθε ένα. Η κάλυψη των βάζων πριν την αποστείρωσή τους σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης, καθώς και κατά την τοποθέτηση των εκφύτων στην Τράπεζα Νηματικής Ροής γινόταν με σκληρό πλαστικό καπάκι (Magenta B-caps, Sigma).

3.2.1.3.2 Δοχεία εγκλιματισμού φυταρίων

Στο στάδιο του εγκλιματισμού τα ριζοβολημένα φυτά μεταφυτεύθηκαν για περαιτέρω ανάπτυξη σε πλαστικά φυτοδοχεία όγκου 2.000 ml. Τα φυτοδοχεία περιείχαν υπόστρωμα που αποτελείτο από 1 τύρφη : 1 περλίτη (v/v), ενώ η κάλυψή τους έγινε με πλαστική μεμβράνη sanitas, κατά τις πρώτες 7 ημέρες καλλιέργειας, με σκοπό την μείωση των απωλειών υγρασίας στα πρώτα στάδια ανάπτυξης των φυταρίων, όπου παρέμειναν στον θάλαμο σταθερών συνθηκών (20°C) στο εργαστήριο και έπειτα μεταφέρθηκαν στην υδρονέφωση του θερμαινόμενου θερμοκηπίου του εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου.

3.2.1.4 Αποστείρωση εργαλείων και υλικών καλλιέργειας

Για την εκτέλεση όλων των πειραμάτων ιστοκαλλιέργειας απαιτείται η αποστείρωση και απολύμανση όλων των εργαλείων και υλικών καλλιέργειας. Η αποστείρωση των εργαλείων και υλικών γινόταν σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης (αυτόκλειστο) για χρονικό διάστημα 20 min, σε θερμοκρασία 121 °C και πίεση 1.1 atm ή σε χύτρα υγρής αποστείρωσης για χρονικό διάστημα 15 min, σε θερμοκρασία 125 °C και πίεση 1.1 atm. Τα γυάλινα βάζα που περιείχαν τα θρεπτικά υποστρώματα είχαν χαλαρά καλυμμένο το ελεύθερο στόμιό τους με τα πλαστικά καπάκια τους. Ακόμη, έγινε κάλυψη όλων των εργαλείων που θα χρησιμοποιούνταν στην διαδικασία εμφύτευσης των εκφύτων ή στις απολυμάνσεις με φύλλο αλουμινίου (κοινό αλουμινόχαρτο εμπορίου), όπως λαβίδες, νυστέρια, πλακάκια πάνω στα οποία θα λάμβανε χώρα η κοπή των εκφύτων προκειμένου να εμφυτευτούν στο υπόστρωμα καλλιέργειας, κωνικές φιάλες με καλυμμένο το στόμιό τους με φύλλο αλουμινίου και δοχεία με απεσταγμένο νερό για τις μεταχειρίσεις απολυμάνσεως έχοντας χαλαρά τοποθετημένα τα βιδωτά καπάκια τους. Τα γυάλινα βάζα και οι σωλήνες με μολυσμένες καλλιέργειες πριν ανοιχτούν και πλυθούν αποστειρώνονταν για 40 min, σε θερμοκρασία 121 °C και σε πίεση 1,1 atm στον κλίβανο υγρής αποστείρωσης.

3.2.1.5 Εγκατάσταση φυτικού υλικού

3.2.1.5.1 Εγκατάσταση εκφύτων αρχικής καλλιέργειας

Μετά το τέλος της περιόδου βλάστησης των σπόρων έγινε λήψη κοτυληδικού κόμβου σε τράπεζα νηματικής ροής, πάνω σε αποστειρωμένο πλακάκι, που τακτικά καθαριζόταν με αιθανόλη 80%, και με χρήση αποστειρωμένου νυστεριού. Έγινε αφαίρεση των δυο κοτυληδόνων και οι κοτυληδικοί κόμβοι που χρησιμοποιήθηκαν είχαν μήκος περίπου 6 mm. Τα έκφυτα τοποθετούνταν στους δοκιμαστικούς σωλήνες (ένα έκφυτο ανά σωλήνα) που περιείχαν το ανάλογο θρεπτικό υπόστρωμα κατακόρυφα σε αυτό και πιέζονταν ελαφρά ώστε να βυθιστούν λίγα χιλιοστά μέσα σε αυτό.

3.2.1.5.2 Εγκατάσταση εκφύτων καλλιιεργειών πολλαπλασιασμού

Βλαστοί που είχαν σχηματιστεί *in vitro* τεμαχίζονταν σε έκφυτα ενός κόμβου και κορυφής βλαστού (ελαφριά αποκοπή του κορυφαίου μεριστώματος) μήκους 6 mm (αφαιρούνταν επίσης τα φύλλα που είχαν σχηματιστεί), μέσα σε τράπεζα νηματικής ροής, πάνω σε αποστειρωμένο πλακάκι, που τακτικά απολυμαινόταν με υδατικό διάλυμα αιθανόλης 80%, και με τη χρήση αποστειρωμένου νυστεριού και λαβίδας. Τα έκφυτα κόμβου τοποθετούνταν σε δοχεία καλλιέργειας με το ανάλογο θρεπτικό υπόστρωμα, κατακόρυφα, τρία έκφυτα ανά δοχείο όγκου 100 ml και πιέζονταν ελαφρά ώστε να βυθιστούν λίγα χιλιοστά.

3.2.1.5.3 Εγκατάσταση μικροβλαστών προς ριζοβολία

Οι σχηματισμένοι *in vitro* βλαστοί με μήκος μεγαλύτερο από 1,5 cm, προωθούνταν για να ριζοβολήσουν. Σε τράπεζα νηματικής ροής, όπως και στις προηγούμενες υποκαλλιέργειες, πάνω σε αποστειρωμένο πλακάκι, που τακτικά απολυμαινόταν με υδατικό διάλυμα αιθανόλης 80% και με αποστειρωμένο νυστέρι και λαβίδα, οι βλαστοί αποκόπτονταν από την βάση τους (από το έκφυτο) και αφαιρούνταν τα κατώτερα φύλλα τους. Οι βλαστοί έπειτα τοποθετούνταν στα γυάλινα βάζα καλλιέργειας με το ανάλογο θρεπτικό υπόστρωμα ριζοβολίας, τρεις βλαστοί ανά δοχείο καλλιέργειας, κατακόρυφα, και πιέζονταν ελαφρά ώστε να βυθιστούν λίγα χιλιοστά μέσα σε αυτό.

3.2.1.5.4 Εγκατάσταση ριζοβολημένων μικροβλαστών

Σε διάστημα 40 ημερών μετά την εγκατάσταση στα υποστρώματα ριζοβολίας, ριζοβολημένοι μικροβλαστοί, με καλά αναπτυγμένο ριζικό σύστημα, τοποθετήθηκαν σε δοχεία

για εγκλιματισμό. Τα φυτάρια απομακρύνθηκαν από το υπόστρωμα και στη συνέχεια έγινε επιμελές πλύσιμο με τρεχούμενο νερό βρύσης, ώστε να απομακρυνθεί πλήρως το θρεπτικό στερεό υπόστρωμα από τις ρίζες τους. Έπειτα, έγινε μεταφύτευση των καλά ριζοβολημένων φυταρίων σε ορθογώνια, διάφανα, πλαστικά δοχεία όγκου 2 L (8 φυτάρια ανά πλαστικό δοχείο), τα οποία περιείχαν υπόστρωμα που αποτελείτο από 1 τύρφη : 1 περλίτη (v/v). Στη συνέχεια τα δοχεία καλύφθηκαν με πλαστική μεμβράνη sanitas, κατά τις πρώτες 7 ημέρες καλλιέργειας τους, με σκοπό την μείωση των απωλειών υγρασίας στα πρώτα στάδια εγκατάστασης των φυταρίων καθώς και την ομαλή μετάβαση των νεαρών φυταρίων από το περιβάλλον της 100% σχετικής υγρασίας στο περιβάλλον του θερμοκηπίου. Τοποθετούνταν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών στους 20 °C, με φωτοπερίοδο 16 h, και σε ένταση φωτισμού $37,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ από λαμπτήρες φθορισμού 30% υγρασία και ανά δύο ημέρες εφαρμοζόταν ελαφρύ πότισμα. Μετά το πέρας των επτά ημερών, η πλαστική μεμβράνη απομακρύνθηκε και τα φυτάρια μεταφέρθηκαν στην υδρονέφωση του θερμαινόμενου θερμοκηπίου του εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου για μία εβδομάδα. Μετά τη μεταφορά τους στο χώρο του θερμοκηπίου, τα πλαστικά δοχεία τοποθετήθηκαν σε σκιερό μέρος, όπου παρέμειναν συνολικά στον χώρο για διάστημα ενός μήνα. Εφαρμόστηκε περιοδική άρδευση, δύο φορές την εβδομάδα, και λίπανση με υδατοδιαλυτό πλήρες λίπασμα Nutrileaf 20:20:20 (Miller Chemical and Fertilizer Corp., Hanover, PA, USA), σε αναλογία 4 g l^{-1} .

3.2.1.6 Συνθήκες καλλιέργειας

3.2.1.6.1 Συνθήκες *in vitro* καλλιέργειας

Για την ανάπτυξη των εκφύτων, οι δοκιμαστικοί σωλήνες και τα γυάλινα βάζα καλλιέργειας, τοποθετούνταν σε θάλαμο ανάπτυξης ελεγχόμενων σταθερών συνθηκών, σε θερμοκρασία $25 \pm 2 \text{ }^\circ\text{C}$, με φωτοπερίοδο 16 h πλήρους φωτός έντασης $37,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (4.000 lx fluorescent light) που παρέχονταν από λευκούς λαμπτήρες φθορισμού, οι οποίοι βρίσκονταν στις πλευρές του θαλάμου. Η επώαση διαρκούσε 45 ημέρες, ενώ για τους βλαστούς που ήταν προς ριζοβολία η επώαση διαρκούσε 40 ημέρες.

3.2.1.6.2 Συνθήκες *ex vitro* καλλιέργειας

Τα ριζοβολημένα φυτάρια εγκλιματίζονταν αρχικά σε θάλαμο σταθερών συνθηκών του εργαστηρίου στους 20 °C, με φωτοπερίοδο 16 h πλήρους φωτός έντασης $37,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (4.000 lx fluorescent light) που παρέχονταν από λευκούς λαμπτήρες φθορισμού, για διάστημα

επτά ημερών και ακολούθως μεταφέρονταν σε γυάλινο θερμαινόμενο θερμοκήπιο του εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου για περαιτέρω ανάπτυξη. Αρχικά, τοποθετούνταν στην υδρονέφωση για επτά ημέρες και έπειτα στον πάγκο του θερμοκηπίου. Το θερμοκήπιο τους καλοκαιρινούς μήνες βαφόταν για μείωση της θερμοκρασίας, ενώ οι θερμοκρασίες που επικρατούσαν τον Ιούλιο, που τοποθετήθηκαν φυτά από *in vitro* για εγκλιματισμό, ήταν 25 °C min και 33°C max.

3.2.1.7 Στατιστική ανάλυση – Εκτίμηση αποτελεσμάτων

Χρησιμοποιήθηκε το Εντελώς Τυχαιοποιημένο Σχέδιο (ΕΤΣ) και εφαρμόστηκαν μονοπαραγοντικά και διπαραγοντικά σχέδια, ανάλογα με το κάθε επιμέρους πειραματικό στάδιο. Η σημαντικότητα των αποτελεσμάτων ελέγχθηκε με ανάλυση της διασποράς (Analysis of Variance, ANOVA). Το κριτήριο που χρησιμοποιούμε για τη στατιστική αυτή δοκιμασία είναι το κριτήριο του F. Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο Students σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων έγινε με το στατιστικό πρόγραμμα Jump 8.0 (SAS Institute Inc.). Στα αποτελέσματα οι μέσοι των επεμβάσεων που ακολουθούνται από διαφορετικά γράμματα της λατινικής αλφαβήτου διαφέρουν στατιστικά σημαντικά, ενώ το σύμβολο (*) δίπλα από κάθε τιμή του F, δηλώνει ότι οι τιμές αυτές του F ήταν σημαντικές σε επίπεδο σημαντικότητας 5%. Στο τέλος κάθε πίνακα αποτελεσμάτων αναγράφεται ο αριθμός των επαναλήψεων που χρησιμοποιήθηκαν ανά επέμβαση.

Σε διάστημα περίπου 30 ημερών μετά την εγκατάσταση των σπόρων για βλάστηση, έγινε λήψη κοτυλιδικών κόμβων των σποροφύτων (αρχική καλλιέργεια) και μετά από 45 ημέρες εκτιμήθηκε η αντίδραση των εκφύτων στο στάδιο του πολλαπλασιασμού. Καταγράφηκε το ποσοστό εκφύτων που αντέδρασαν ως προς την έκπτυξη βλαστών (βλαστογένεση, %), ο μέσος αριθμός των βλαστών που σχηματίστηκαν ανά έκφυτο που αντέδρασε, το μέσο μήκος των βλαστών που σχηματίστηκαν και ο μέσος αριθμός κόμβων ανά βλαστό. Ακόμη εκτιμήθηκε η ύπαρξη υπερενυδάτωσης των βλαστών. Υπολογίσθηκε επίσης το δυναμικό πολλαπλασιασμού ως το γινόμενο του ποσοστού βλαστογένεσης επί του μέσου αριθμού βλαστών που σχηματίστηκαν ανά έκφυτο που αντέδρασε και επί του μέσου μήκους των σχηματισθέντων βλαστών, και το γινόμενο αυτό διαιρέθηκε με 0,6 σαν μια εκτίμηση του μέσου αριθμού ληφθέντων εκφύτων (θεωρώντας ότι 0,6 cm είναι το αποδεκτό μήκος ενός εκφύτου κατά την υποκαλλιέργεια).

Κατά το στάδιο της ριζοβολίας η εκτίμηση των αποτελεσμάτων έγινε 40 ημέρες μετά από την μεταφορά των μικροβλαστών στα υποστρώματα ριζοβολίας και καταγράφηκε το ποσοστό των μικροβλαστών που σχημάτισαν ρίζες, ο μέσος αριθμός και το μέσο μήκος των ριζών που σχηματίστηκαν.

Στο στάδιο του εγκλιματισμού η *ex vitro* επιτυχία των φυταρίων σημειώθηκε ένα μήνα μετά τη μεταφύτευση των φυταρίων στα εδαφικά υποστρώματα ως το ποσοστό (%) επιβίωσης αυτών.

3.2.2 Αποτελέσματα

3.2.2.1 Αρχική καλλιέργεια *in vitro*

Σε όλα τα υποστρώματα σημειώθηκε υψηλό ποσοστό βλαστογένεσης (Πίν. 9). Η παρουσία κυτοκινίνης, με ή χωρίς την παρουσία αυξίνης, είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό υπερενυδατωμένων βλαστών. Έτσι, λόγω των υπερενυδατωμένων βλαστών υπολογίστηκαν δυο ποσοστά βλαστογένεσης. Το πρώτο αφορούσε σε έκφυτα που έφεραν μη υπερενυδατωμένους μαζί με υπερενυδατωμένους βλαστούς, ενώ το δεύτερο σε έκφυτα όπου έφεραν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς. Έτσι, το υψηλότερο ποσοστό βλαστογένεσης σημειώθηκε στα υπόστρωμα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες ή εμπλουτισμένο με $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ NAA (Πίν. 9). Η ύπαρξη $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ BA στο υπόστρωμα με ή χωρίς την ταυτόχρονη παρουσία $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ NAA προκάλεσε το σχηματισμό περισσότερων βλαστών χωρίς διαφορά όμως από το συνδυασμό $0,5/0,1 \text{ mg l}^{-1}$ BA/NAA, όπου σημειώθηκε και η μεγαλύτερη επιμήκυνση των παραχθέντων μικροβλαστών (Πίν. 9, Εικ. 14). Ο συνδυασμός των φυτορρυθμιστικών ουσιών BA και NAA σε συγκεντρώσεις $0,5$ ή $1,0/0,1 \text{ mg l}^{-1}$ BA/NAA προκάλεσε τον σχηματισμό μικρών μεσογονάτιων διαστημάτων δημιουργώντας περισσότερους κόμβους έναντι των υποστρωμάτων που περιείχαν είτε BA είτε NAA (Πίν. 9, Εικ. 14). Το ποσοστό υπερενυδάτωσης ήταν υψηλότερο στα υποστρώματα που περιείχαν τις συγκεντρώσεις BA, με ή χωρίς την προσθήκη NAA. Περισσότεροι υπερενυδατωμένοι βλαστοί σχηματίστηκαν στο υπόστρωμα με $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ BA, χωρίς μεγάλη διαφορά από το υπόστρωμα με $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ BA (Πίν. 9, Εικ. 15). Το μεγαλύτερο δυναμικό πολλαπλασιασμού στο στάδιο αυτό παρατηρήθηκε στα υποστρώματα με $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ BA με ή χωρίς την παρουσία NAA.

Πίνακας 9. Επίδραση των φυτορρυθμιστικών ουσιών του υποστρώματος, BA και NAA, σε έκφυτα κοτυληδικού κόμβου από σπορόφυτα, στο στάδιο της αρχικής εγκατάστασης της *in vitro* καλλιέργειας.

BA/NAA (mg l ⁻¹)	Ποσοστό Βλαστ/σης (%)		Μέσος Αριθμός Βλαστών ³	Μέσο Μήκος Βλαστών ³ (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ³	Ποσοστό Υπερενυδά- τωσης ⁴ (%)	Μέσος Αριθμός Υπερενυδα- τωμένων Βλαστών	Δυν. Πολλ/ μού
	Βλαστ/ση ¹	Βλαστ/ση ²						
0,0/0,0	91	5	1,1 c	1,2 b	1,6 b	7	0,1 c	2,7
0,0/0,1	91	5	1,1 c	1,2 b	1,8 b	5	0,1 c	3,0
0,5/0,0	83	9	1,3 bc	1,4 ab	2,0 b	16	0,4 ab	3,6
0,5/0,1	81	13	1,6 ab	1,7 a	2,9 a	20	0,3 b	6,3
1,0/0,0	87	11	1,9 a	1,2 b	1,9 b	18	0,6 a	7,4
1,0/0,1	85	8	1,9 a	1,5 ab	2,7 a	11	0,2 b	7,3
<i>F</i> one-way ANOVA			***	*	***	NS		

Διαχωρισμός των μέσων κατά στήλες με Student's *t* σε $P \leq 0,05$, $n=39-48$

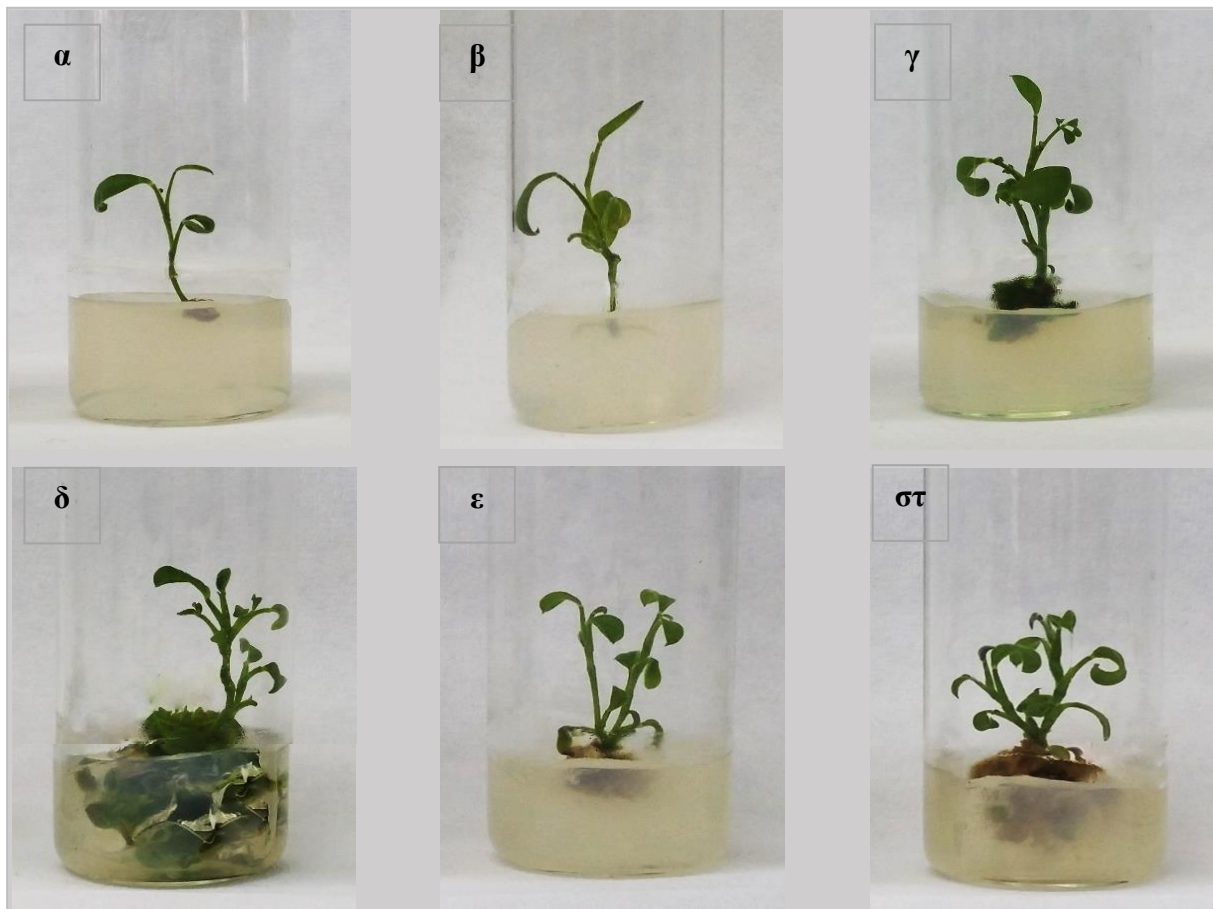
Δυναμικό πολλαπλασιασμού=Βλαστογένεση¹(%) x Μέσος αριθμός βλαστών³ x Μέσο αριθμός κόμβων³/0,6

1 Τα έκφυτα έφεραν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς

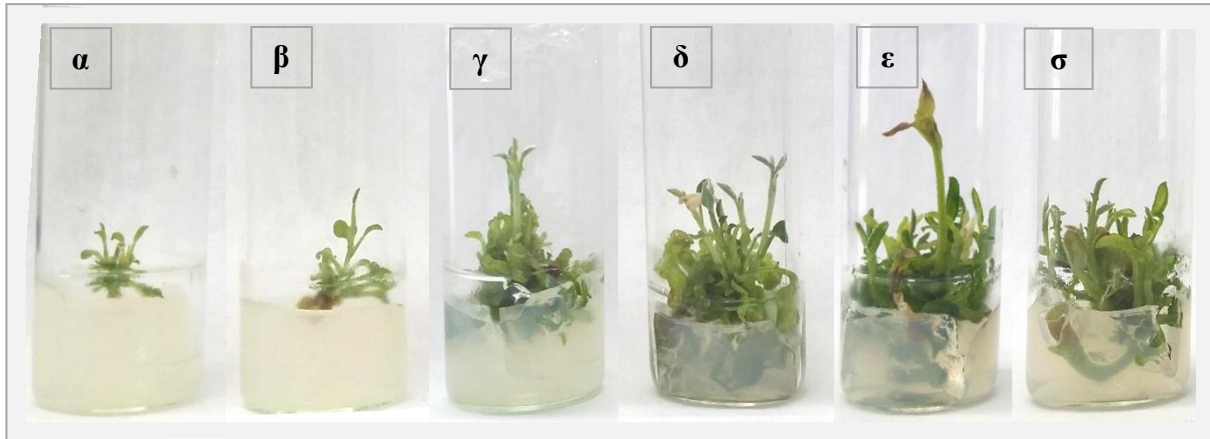
2 Τα έκφυτα έφεραν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς

3 Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί

4 Πλήρως υπερενυδατωμένα έκφυτα μαζί με μεικτά έκφυτα



Εικ. 14. Καλλιέργεια κοτυληδικών κόμβων σε υπόστρωμα MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες (α) ή εμπλουτισμένο με 0,1 mg l⁻¹ NAA (β) ή 0,5 (γ) ή 1,0 mg l⁻¹ BA (δ) ή συνδυασμό αυτών (ε, στ), αντίστοιχα.



Εικ. 15. Υπερενυδατωμένοι βλαστοί, σε καλλιέργεια κοτυληδικών κόμβων σε υπόστρωμα MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες (α) ή εμπλουτισμένο με 0,1 mg l⁻¹ NAA (β) ή 0,5 (γ) ή 1,0 mg l⁻¹ BA (δ) ή συνδυασμό αυτών (ε, στ), αντίστοιχα.

3.2.2.2 Στάδιο υποκαλλιέργειας

Στο στάδιο της υποκαλλιέργειας σημειώθηκε επίσης υψηλό ποσοστό βλαστογένεσης σε όλα τα υποστρώματα (Πίν. 10). Όπως και στην αρχική εγκατάσταση, έτσι και εδώ η παρουσία κυτοκινίνης σε συνδυασμό με την αυξίνη συνέχισε να προκαλεί το σχηματισμό υπερενυδατωμένων βλαστών. Έτσι, υπολογίστηκαν πάλι δυο ποσοστά βλαστογένεσης. Υπό την παρουσία BA αυξήθηκε πολύ ο αριθμός των παραγόμενων, ανά έκφυτο, βλαστών, ενώ μεγαλύτερος αριθμός βλαστών παράχθηκε στο υπόστρωμα με 1,0/0,1 mg l⁻¹ BA/NAA (Πίν. 10, Εικ. 16 και 18). Το μέσο μήκος των βλαστών ήταν παρόμοιο σε όλα τα υποστρώματα και μεγαλύτερο αριθμό κόμβων έδωσε το υπόστρωμα με 1,0/0,1 mg l⁻¹ BA/NAA (Πίν. 10, Εικ. 16 και 18). Ο σχηματισμός υπερενυδατωμένων βλαστών συνεχίστηκε σε μεγαλύτερο βαθμό στα υποστρώματα με τις φυτορρυθμιστικές ουσίες. Οι παραγόμενοι βλαστοί σε μερικά έκφυτα ήταν όλοι υπερενυδατωμένοι, ενώ σε μερικά άλλα ο αριθμός των υπερενυδατωμένων βλαστών ήταν μικρότερος ή ίσος με τους μη υπερενυδατωμένους βλαστούς πάνω στο έκφυτο. Το ποσοστό υπερενυδάτωσης ήταν πολύ υψηλό, ενώ περισσότεροι υπερενυδατωμένοι βλαστοί σχηματίστηκαν στο υπόστρωμα με 1,0/0,1 mg l⁻¹ BA/NAA (Πίν. 10, Εικ. 17). Στο υπόστρωμα με τη χαμηλότερη συγκέντρωση BA (0,5 mg l⁻¹) οι βλαστοί είχαν πιο ικανοποιητική εμφάνιση και ήταν καλοσχηματισμένοι (Εικ. 16β). Το υπόστρωμα με 1,0/0,1 mg l⁻¹ BA/NAA έδωσε το υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού (Πίν. 10).

Πίνακας 10. Επίδραση των BA και NAA, σε έκφυτα κόμβου στο στάδιο της υποκαλλιέργειας.

BA/NAA (mg l ⁻¹)	Ποσοστό Βλαστ/σης (%)		Μέσος Αριθμός Βλαστών ³	Μέσο Μήκος Βλαστών ³ (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ³	Ποσοστό Υπερενυδά- τωσης ⁴ (%)	Μέσος Αριθμός Υπερενυδα- τωμένων Βλαστών	Δυν. Πολλ/ μού
	Βλαστ/ση ¹	Βλαστ/ση ²						
0,0/0,0	86	8	1,2 c	1,1 b	1,7 b	18	0,3 b	2,9
0,5/0,1	86	5	6,8 b	1,3 a	1,9 ab	55	1,9 ab	18,5
1,0/0,1	91	7	8,1 a	1,2 ab	1,9 a	65	2,7 a	23,3
<i>F</i> _{one-way ANOVA}			***	*	***		***	

Διαχωρισμός των μέσων κατά στήλες με Student's *t* σε $P \leq 0,05$, $n=153-223$

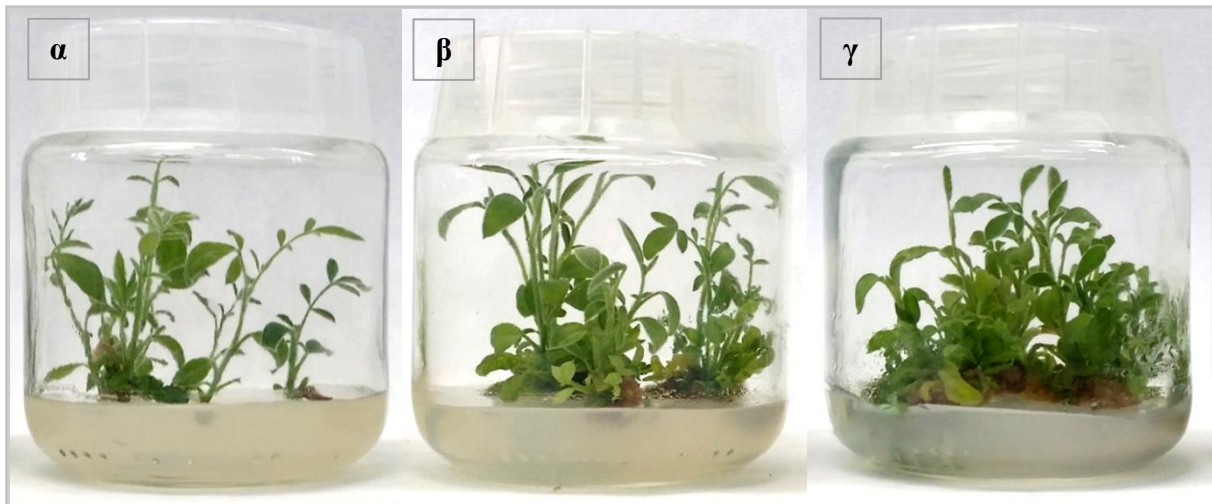
Δυναμικό πολλαπλασιασμού=Βλαστογένεση¹(%) x Μέσος αριθμός βλαστών³ x Μέσο αριθμός κόμβων³/0,6

1 Τα έκφυτα έφεραν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς

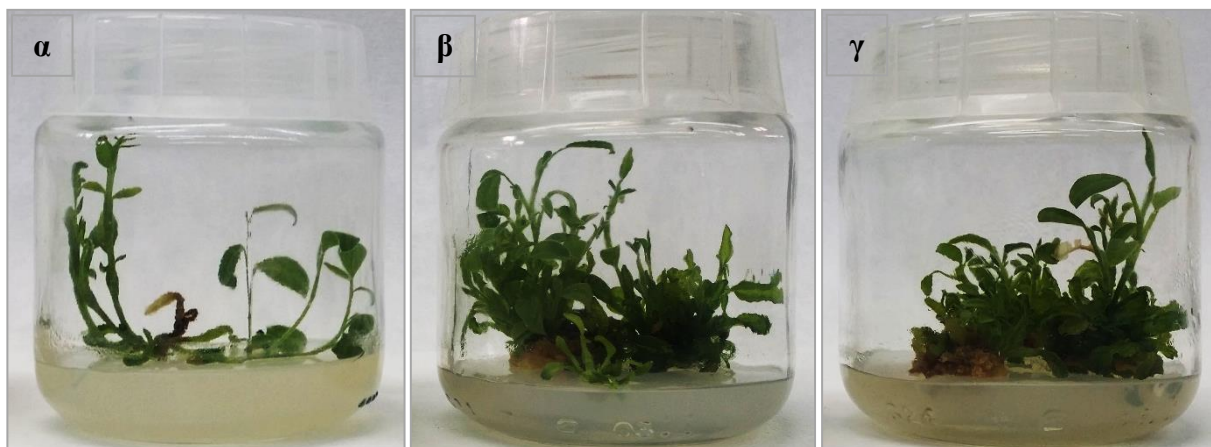
2 Τα έκφυτα έφεραν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς

3 Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί

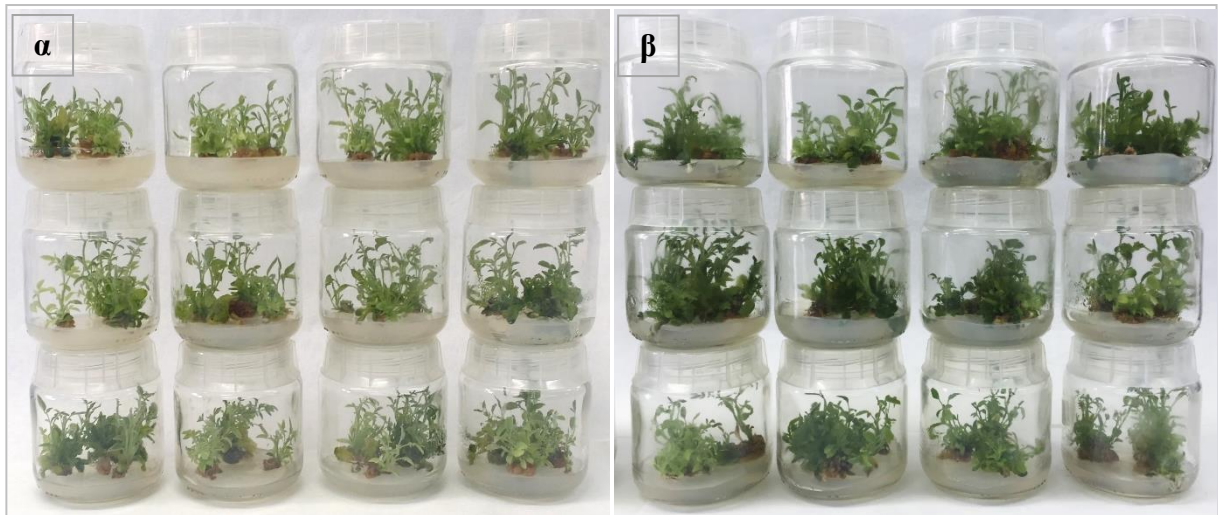
4 Πλήρως υπερενυδατωμένα έκφυτα μαζί με μεικτά έκφυτα



Εικ. 16. Υποκαλλιέργεια *A. barba-jovis* L., προέλευσης κοτυληδικού κόμβου, σε υπόστρωμα MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες (α) ή εμπλουτισμένο με 0,5 (β) ή 1,0 mg l⁻¹ BA (γ) σε συνδυασμό με 0,1 mg l⁻¹ NAA



Εικ. 17. Υπερενυδατωμένοι βλαστοί κατά την υποκαλλιέργεια *A. barba-jovis* L., προέλευσης κοτυληδικού κόμβου, σε υπόστρωμα MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες (α) ή εμπλουτισμένο με 0,5 (β) ή 1,0 mg l⁻¹ BA (γ) σε συνδυασμό με 0,1 mg l⁻¹ NAA.



Εικ. 18. Υποκαλλιέργεια *A. barba-jovis* L., προέλευσης κοτυληδικού κόμβου, σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με 0,5 (α) ή 1,0 mg l⁻¹ BA (β), σε συνδυασμό με 0,1 mg l⁻¹ NAA.

3.2.2.3 Ριζοβολία μικροβλαστών

Μη υπερενυδατωμένοι μικροβλαστοί, μήκους 1,5 cm, που προήλθαν από την υποκαλλιέργεια τοποθετήθηκαν για ριζοβολία σε υποστρώματα μισής δύναμης MS ή WPM ή SH χωρίς IBA ή εμπλουτισμένα με 0,5 ή 2,0 mg l⁻¹ IBA. Το ποσοστό της ριζοβολίας των μικροβλαστών ήταν υψηλό και στα τρία θρεπτικά υποστρώματα που δοκιμάστηκαν, με ή χωρίς την προσθήκη IBA (Πίν. 11). Όλα τα υποστρώματα που ήταν εμπλουτισμένα με συγκέντρωση 0,5 mg l⁻¹ IBA έδωσαν αυξημένο μήκος ριζών σε σύγκριση με εκείνα που περιείχαν 2,0 mg l⁻¹ IBA, τα οποία προώθησαν περισσότερο τον αριθμό των παραγόμενων ριζών (Πίν. 11, Εικ. 19, 20 και 21). Το WPM φάνηκε να ευνοεί την επιμήκυνση των ριζών, το MS τον αριθμό των ριζών, ενώ το SH έδωσε τα λιγότερα ικανοποιητικά αποτελέσματα σε σύγκριση με τα άλλα δυο υποστρώματα (Πίν. 11).

Πίνακας 11. Επίδραση των θρεπτικών υποστρωμάτων, ½ MS ή ½ WPM ή ½ SH, και των συγκεντρώσεων IBA στο ποσοστό ριζοβολίας, τον αριθμό και το μήκος των ριζών ανά ριζοβολημένο μικροβλαστό της *A. barba-jovis* L. προέλευσης κοτυληδικού κόμβου.

Θρεπτικά Υπόστρωματα	IBA (mg l ⁻¹)	Ριζοβολία (%)	Μέσος Αριθμός Ριζών	Μέσο Μήκος Ριζών (cm)
½ MS	0,0	90	2,0 c	8,1 de
	0,5	100	1,9 c	13,2 b
	2,0	98	4,3 a	5,6 f
½ WPM	0,0	95	1,8 c	10,0 cd
	0,5	97	1,7 cd	17,5 a
	2,0	100	2,4 b	7,8 e
½ SH	0,0	80	1,4 d	6,6 ef
	0,5	92	1,8 c	11,2 c
	2,0	97	1,9 c	8,1 de
<i>F</i> Υποστρώματος			-	-
<i>F</i> IBA			-	-
<i>F</i> Υποστρώματος x IBA			***	***
<i>F</i> one-way ANOVA			***	***

Διαχωρισμός των μέσων κατά στήλες με Student's *t* σε $P \leq 0,05$, n=100



Εικ. 19. Ριζοβολημένοι μικροβλαστοί, προέλευσης κοτυληδικού κόμβου, σε θρεπτικό υπόστρωμα ½ MS χωρίς την παρουσία αυξίνης (α) ή εμπλουτισμένο με IBA σε συγκεντρώσεις 0,5 (β) ή 2,0 mg l⁻¹ (γ).



Εικ. 20. Ριζοβολημένοι μικροβλαστοί, προέλευσης κοτυληδικού κόμβου, σε θρεπτικό υπόστρωμα ½ WPM χωρίς την παρουσία αυξίνης (α) ή εμπλουτισμένο με IBA σε συγκεντρώσεις 0,5 (β) ή 2,0 mg l⁻¹ (γ).



Εικ. 21. Ριζοβολημένοι μικροβλαστοί, προέλευσης κοτυληδικού κόμβου, σε θρεπτικό υπόστρωμα ½ SH χωρίς την παρουσία αυξίνης (α) ή εμπλουτισμένο με IBA σε συγκεντρώσεις 0,5 (β) ή 2,0 mg l⁻¹ (γ).

3.2.2.4 Εγκλιματισμός φυταρίων

Για εγκλιματισμό σε *ex vitro* συνθήκες τα ανεπτυγμένα έρριζα φυτάρια (Εικ. 22, 23 και 24) μεταφυτεύθηκαν σε 1 τύρφη : 1περλίτη, αρχικά σε θάλαμο σταθερών συνθηκών και στη συνέχεια στο θερμοκήπιο για περαιτέρω ανάπτυξη. Τα φυτάρια εγκλιματίστηκαν με 97% επιτυχία σε *ex vitro* συνθήκες (Εικ. 25). Μετά την ολοκλήρωση του εγκλιματισμού (1 μήνα), ακολούθησε μεταφύτευση σε γλάστρα 10cm σε υπόστρωμα τύρφη-περλίτης (1:1 v/v) και στα μισά εξ' αυτών έγινε κορυφολόγημα. Αυτά στη συνέχεια έδωσαν 2-3 βλαστούς ανά φυτό (Εικ. 26α). Η ανάπτυξη των φυτών ήταν επιτυχής κατά τους τρεις επόμενους μήνες από την μεταφύτευσή τους σε ατομική γλάστρα. Τα φυτά λιπαίνονταν με υδατοδιαλυτό πλήρες λίπασμα Nutrileaf 20:20:20 κάθε 20 ημέρες. Τέλη Μαρτίου 2017, τα φυτά ηλικίας 1,5 ετών, εμφάνισαν πλήρη ανθοφορία.



Εικ. 22. Μικροβλαστοί λίγο πριν το στάδιο του εγκλιματισμού, από θρεπτικό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS χωρίς την παρουσία αυξίνης (α) ή εμπλουτισμένο με IBA σε συγκεντρώσεις 0,5 (β) ή 2,0 mg l^{-1} (γ).



Εικ. 23. Μικροβλαστοί λίγο πριν το στάδιο του εγκλιματισμού, από θρεπτικό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ WPM χωρίς την παρουσία αυξίνης (α) ή εμπλουτισμένο με IBA σε συγκεντρώσεις 0,5 (β) ή 2,0 mg l^{-1} (γ).



Εικ. 24. Μικροβλαστοί λίγο πριν το στάδιο του εγκλιματισμού, από θρεπτικό υπόστρωμα ½ SH χωρίς την παρουσία αυξίνης (α) ή εμπλουτισμένο με IBA σε συγκεντρώσεις 0,5 (β) ή 2,0 mg l⁻¹ (γ).



Εικ. 25. Εγκλιματισμός μικροβλαστών, προέλευσης κοτυληδικού κόμβου, σε υπόστρωμα τύρφης-περλίτης (1:1 v/v), στον πάγκο του υαλόφρακτου θερμοκηπίου του εργαστηρίου Ανθοκομίας & Αρχιτεκτονικής Τοπίου.



Εικ. 26. Εγκλιματισμένα φυτάρια, προέλευσης κοτυληδικού κόμβου, ηλικίας περίπου 30 ημερών, από την μεταφύτευσή τους σε υπόστρωμα τύρφη-περλίτης (1:1 v/v), με (α) ή χωρίς κορυφολόγημα (β).



Εικ. 27. Φυτά *A. barba-jovis* L., προέλευσης κοτυληδικού κόμβου, ηλικίας περίπου 90 ημερών, από την μεταφύτευσή τους σε υπόστρωμα τύρφη-περλίτης (1:1 v/v), με (α) ή χωρίς κορυφολόγημα (β).

3.3 *In vitro* πολλαπλασιασμός από νεαρά φυτά *A. barba-jovis* L.

3.3.1 Υλικά και Μέθοδοι

3.3.1.1 Φυτικό υλικό

Νεαρά φυτά, ηλικίας δυο ετών, αποτέλεσαν το αρχικό υλικό για την εγκατάσταση της αρχικής καλλιέργειας. Τα μητρικά αυτά φυτά προήλθαν από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα, αναπτυσσόμενα στο χώρο του υαλόφρακτου θερμοκήπιο του εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου (Εικ. 28). Μετά την αποκοπή των βλαστών, οι αποκοπέντες βλαστοί μεταφέρονταν στο χώρο του εργαστηρίου μέσα σε μεγάλα πλαστικά δοχεία με νερό, για την αποφυγή της αφυδάτωσής τους. Χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα πρώτου, δεύτερου, τρίτου και τέταρτου ορατού κόμβου αποκλείοντας την κορυφή των βλαστών.



Εικ. 28. Νεαρά φυτά *A. barba-jovis* L., ηλικίας δυο ετών, που προήλθαν από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα, αναπτυσσόμενα στο χώρο του υαλόφρακτου θερμοκήπιο του εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου.

3.3.1.2 Υποστρώματα *in vitro* καλλιέργειας

3.3.1.2.1 Υλικά των θρεπτικών υποστρωμάτων *in vitro* καλλιέργειας

Τα συστατικά που περιέχονταν στα διάφορα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά την πορεία του πειράματος είναι τα ακόλουθα:

- ✓ Υπόστρωμα MS (Murashige and Skoog Medium) της εταιρείας Duchefa Bio-chem σε μορφή σκόνης (Murashige and Skoog, 1962).
- ✓ Σακχαρόζη εμπορίου (Sucrose).
- ✓ Αυξίνες: Ινδολο-3-βουτυρικό οξύ, IBA, (Indole-3-butyric acid, MB= 230,24), της εταιρείας Sigma-Aldrich.
- ✓ Κυτοκινίνες: Βενζυλαδενίνη, BA, (N₆-benzyladenine, MB= 225,26), 2iP (6-(γ,γ-Dimethylallylamino) purine, MB=203,24), Κινετίνη, KIN, (kinetin, MB= 215,21) και ZEA, Ζεατίνη, (trans-zeatin, MB= 219,24), της εταιρείας Sigma-Aldrich.
- ✓ Άγαρ (Ρουμπουλάκης Α.Ε. Χημικά).

3.3.1.2.2 Μέθοδος παρασκευής «stock» διαλυμάτων φυτορυθμιστικών ουσιών

Κατά την διαδικασία παρασκευής των θρεπτικών υποστρωμάτων καλλιέργειας, ήταν αναγκαία η παρασκευή «stock», αποθεματικών, διαλυμάτων των φυτορυθμιστικών ουσιών που περιείχαν την κάθε φυτορυθμιστική ουσία σε ποσοστό 10 % κ.β.

- ✓ Παρασκευή «stock» διαλύματος IBA. Σε δοχείο ζέσεως χωρητικότητας 100 ml τοποθετούνταν 10 mg IBA, τα οποία διαλύονταν με ανάδευση σε 2-3 σταγόνες καθαρής αιθανόλης (99,9 %). Στη συνέχεια προσθέτονταν 100 ml αποσταγμένου νερού.
- ✓ Παρασκευή «stock» διαλύματος ZEA. Σε δοχείο ζέσεως χωρητικότητας 100 ml τοποθετούνταν 10 mg ZEA, τα οποία διαλύονταν με ανάδευση σε 2-3 σταγόνες 1N 1N καυστικού νατρίου (NaOH). Στη συνέχεια προσθέτονταν 100 ml αποσταγμένου νερού.
- ✓ Παρασκευή «stock» διαλύματος BA. Σε δοχείο ζέσεως χωρητικότητας 100 ml τοποθετούνταν 10 mg BA, τα οποία διαλύονταν με ανάδευση σε 2-3 σταγόνες 1N καυστικού νατρίου (NaOH). Στη συνέχεια προσθέτονταν 100 ml αποσταγμένου νερού.
- ✓ Παρασκευή «stock» διαλύματος KIN. Σε δοχείο ζέσεως χωρητικότητας 100 ml τοποθετούνταν 10 mg KIN, τα οποία διαλύονταν με ανάδευση σε 2-3 σταγόνες 1N καυστικού νατρίου (NaOH). Στη συνέχεια προσθέτονταν 100 ml αποσταγμένου νερού.

- ✓ Παρασκευή «stock» διαλύματος 2iP. Σε δοχείο ζέσεως χωρητικότητας 100 ml τοποθετούνταν 10 mg 2iP, τα οποία διαλύονταν με ανάδευση σε 2-3 σταγόνες 1N καυστικού νατρίου (NaOH). Στη συνέχεια προσθέτονταν 100 ml αποσταγμένου νερού.

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

3.3.1.2.3 Μέθοδος παρασκευής θρεπτικού υποστρώματος

Για την παρασκευή θρεπτικού υποστρώματος των καλλιεργειών έγινε προσθήκη, σε δοχείο ζέσεως, αποσταγμένου νερού με λιγότερο όγκο από του τελικού, καθώς και οι ακριβείς ποσότητες πλήρους Murashige and Skoog (MS) 4,4 g l⁻¹, σακχαρόζης 30 g l⁻¹ και των επιθυμητών κάθε φορά φυτορρυθμιστικών ουσιών, από τα stock διαλύματα αυτών. Στα υποστρώματα της αρχικής καλλιέργειας προστέθηκαν συγκεντρώσεις κυτοκινίνης BA (0,0 ή 0,5 ή 1,0 ή 1,5 mg l⁻¹), χωρίς παρουσία αυξίνης, ενώ για τα υποστρώματα της δεύτερης υποκαλλιέργειας προστέθηκαν BA, ZEA, 2iP και KIN σε συγκεντρώσεις 0,5 ή 1,0 ή 1,5 ή 2,0 mg l⁻¹. Για ριζοβολία χρησιμοποιήθηκαν υποστρώματα πλήρους ή μισής δύναμης MS χωρίς IBA, ή σε υπόστρωμα MS μισής δύναμης εμπλουτισμένο με 1,0 ή 2,0 mg l⁻¹ IBA. Τα διαλύματα τέθηκαν υπό συνεχή ανάδευση με τη βοήθεια ενός μαγνητικού αναδευτήρα μέχρι το στάδιο της πλήρους διάλυσης των συστατικών και στη συνέχεια έγινε η ογκομέτρηση του διαλύματος. Έγινε συμπλήρωση του διαλύματος με αποσταγμένο νερό μέχρι τον επιθυμητό όγκο και ακολούθησε μέτρηση και έπειτα ρύθμιση του pH στην τιμή 5,7-5,8 της κλίμακας με τη βοήθεια διαλυμάτων 0,1 ή 1 N NaOH και 0,1 ή 1 N HCl. Η διαδικασία ολοκληρώθηκε με την προσθήκη ακριβούς ποσότητας άγαρ (8 g l⁻¹) και ακολούθησε θέρμανση του διαλύματος, υπό συνεχή ανάδευση μέχρι να διαλυθεί πλήρως το άγαρ (διαυγές διάλυμα). Το έτοιμο υπόστρωμα μοιραζόταν σε κάθε στάδιο καλλιέργειας σε αντίστοιχα δοχεία (δοκιμαστικοί σωλήνες ή γυάλινα βάζα καλλιέργειας) και τοποθετούνταν προς αποστείρωση σε χύτρα ή κλίβανο υγρής αποστείρωσης.

3.3.1.3 Δοχεία και υλικά κάλυψης

3.3.1.3.1 Δοχεία *in vitro* καλλιέργειας και υλικά κάλυψης αυτών

Στο στάδιο της εγκατάστασης *in vitro* των αρχικών καλλιεργειών από κόμβους στελέχους νεαρών φυτών χρησιμοποιήθηκαν ως δοχεία καλλιέργειας γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες όγκου 50 ml (25 x 100 mm), που περιείχαν 10 ml υπόστρωμα έκαστος. Μετά την τοποθέτηση

του υποστρώματος οι σωλήνες καλύπτονταν με αλουμινόχαρτο για να αποστειρωθούν σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης, ενώ μετά την τοποθέτηση των εκφύτων στην Τράπεζα Νηματικής Ροής ως υλικό κάλυψής τους χρησιμοποιήθηκε μεμβράνη sanitas (πλαστική μεμβράνη περιτυλίγματος με το εμπορικό όνομα sanitas της εταιρείας Σαράντης Α.Ε., η οποία είχε τις εξής ιδιότητες: περατότητα σε οξυγόνο $8,5 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2}$ σε 24 h, περατότητα σε διοξείδιο του άνθρακα $55.000 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2}$ σε 24 h και περατότητα σε υδρατμούς 110 g m^{-2} σε 24 h).

Στο στάδιο του πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών *in vitro* και των ριζοβολιών χρησιμοποιήθηκαν ως δοχεία καλλιέργειας γυάλινα βάζα όγκου 100 ml, τα οποία περιείχαν 25 ml υπόστρωμα το κάθε ένα. Η κάλυψη των βάζων πριν την αποστείρωσή τους σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης, καθώς και κατά την τοποθέτηση των εκφύτων στην Τράπεζα Νηματικής Ροής γινόταν με σκληρό πλαστικό καπάκι (Magenta B-caps, Sigma).

3.3.1.3.2 Δοχεία εγκλιματισμού φυταρίων

Στο στάδιο του εγκλιματισμού τα ριζοβολημένα φυτά μεταφυτεύθηκαν για περαιτέρω ανάπτυξη σε πλαστικά φυτοδοχεία όγκου 2.000 ml. Τα φυτοδοχεία περιείχαν υπόστρωμα που αποτελείτο από 1 τύρφη : 1 περλίτη (v/v), ενώ η κάλυψή τους έγινε με πλαστική μεμβράνη sanitas, κατά τις πρώτες 7 ημέρες καλλιέργειας, με σκοπό την μείωση των απωλειών υγρασίας στα πρώτα στάδια ανάπτυξης των φυταρίων, όπου παρέμειναν στον θάλαμο σταθερών συνθηκών (20°C) στο εργαστήριο και έπειτα μεταφέρθηκαν στην υδρονέφωση του θερμαινόμενου θερμοκηπίου του εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου.

3.3.1.4 Μέθοδοι αποστείρωσης και απολύμανσης

3.3.1.4.1 Αποστείρωση εργαλείων και υλικών καλλιέργειας

Για την εκτέλεση όλων των πειραμάτων ιστοκαλλιέργειας απαιτείται η αποστείρωση και απολύμανση όλων των εργαλείων και υλικών καλλιέργειας. Η αποστείρωση των εργαλείων και υλικών γινόταν σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης (αυτόκλειστο) για χρονικό διάστημα 20 min, σε θερμοκρασία 121 °C και πίεση 1.1 atm ή σε χύτρα υγρής αποστείρωσης για χρονικό διάστημα 15 min, σε θερμοκρασία 125 °C και πίεση 1.1 atm. Τα γυάλινα βάζα που περιείχαν τα θρεπτικά υποστρώματα είχαν χαλαρά καλυμμένο το ελεύθερο στόμιό τους με τα πλαστικά καπάκια τους. Ακόμη, έγινε κάλυψη όλων των εργαλείων που θα χρησιμοποιούνταν στην διαδικασία εμφύτευσης των εκφύτων ή στις απολυμάνσεις με φύλλο αλουμινίου (κοινό αλουμινόχαρτο εμπορίου), όπως λαβίδες, νυστέρια, πλακάκια πάνω στα οποία θα λάμβανε

χώρα η κοπή των εκφύτων προκειμένου να εμφυτευτούν στο υπόστρωμα καλλιέργειας, κωνικές φιάλες με καλυμμένο το στόμιό τους με φύλλο αλουμινίου και δοχεία με απεσταγμένο νερό για τις μεταχειρίσεις απολυμάνσεως έχοντας χαλαρά τοποθετημένα τα βιδωτά καπάκια τους. Τα γυάλινα βάζα και οι σωλήνες με μολυσμένες καλλιέργειες πριν ανοιχτούν και πλυθούν αποστειρώνονταν για 40 min, σε θερμοκρασία 121 °C και σε πίεση 1,1 atm στον κλίβανο υγρής αποστείρωσης.

3.3.1.4.2 Επιφανειακή απολύμανση εκφύτων

Πριν την τοποθέτηση των εκφύτων στους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχε το θρεπτικό υπόστρωμα, γινόταν επιφανειακή απολύμανσή τους. Μετά την αφαίρεση των φύλλων, τεμάχια βλαστών ξεπλένονταν πολύ καλά με άφθονο τρεχούμενο νερό βρύσης για 1 min περίπου και έπειτα τοποθετούνταν για 10 min σε σαπουνάδα από απορρυπαντικό πιάτων υπό συνεχή ανάδευση. Ακολουθούσε απολύμανση με διάλυμα αιθυλικής αλκοόλης 90% (Ethanol Absolute 99%, Scharlau) για 10 sec. Ακολούθως τοποθετούνταν σε κωνικές φιάλες που περιείχαν 30% διάλυμα χλωρίνης εμπορίου (4,5% υποχλωριώδες νάτριο) συνολικού όγκου 200 ml αποτελούμενο από αποσταγμένο-αποστειρωμένο νερό και 0.1% Tween-20 (προσκολλητική ουσία, Polyoxyethylene (20)sorbitan Monolaurate, MERCK) και ανακινούνταν για 10 min. Ακολουθούσαν τέσσερα τρίλεπτα ξεπλύματα των βλαστών με αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό υπό συνεχή ανάδευση.

3.3.1.5 Εγκατάσταση φυτικού υλικού

3.3.1.5.1 Εγκατάσταση εκφύτων αρχικής καλλιέργειας

Μετά τη διαδικασία απολύμανσης των βλαστών σε τράπεζα νηματικής ροής, πάνω σε αποστειρωμένο πλακάκι, που καθαριζόταν τακτικά με αιθανόλη 80%, και με χρήση αποστειρωμένου νυστεριού, οι βλαστοί τεμαχίζονταν σε έκφυτα ενός κόμβου, μήκους περίπου 6 mm. Αφαιρούνταν επίσης τυχόν υπολείμματα φύλλων καθώς και τα δύο ακραία τμήματα του βλαστού που είχαν καταστραφεί από την απολύμανση. Έκφυτα κορυφής δεν χρησιμοποιήθηκαν για αποφυγή πιθανών μολύνσεων, λόγω της μορφολογίας του κορυφαίου μεριστώματος, το οποίο θεωρείτο εστία συγκέντρωσης παθογόνων μικροοργανισμών. Στα πειράματα αυτά χρησιμοποιήθηκαν 4 τύποι εκφύτων, 1^{ος} - 4^{ος} κόμβος κάτω από την κορυφή. Τα έκφυτα τοποθετούνταν στους δοκιμαστικούς σωλήνες (ένα έκφυτο ανά σωλήνα) που

περιείχαν το ανάλογο θρεπτικό υπόστρωμα κατακόρυφα σε αυτό και πιέζονταν ελαφρά ώστε να βυθιστούν λίγα χιλιοστά μέσα σε αυτό.

3.3.1.5.2 Εγκατάσταση εκφύτων καλλιέργειών πολλαπλασιασμού

Βλαστοί που είχαν σχηματιστεί *in vitro* τεμαχίζονταν σε έκφυτα ενός κόμβου και κορυφής βλαστού (ελαφριά αποκοπή του κορυφαίου μεριστώματος) μήκους 6 mm (αφαιρούνταν επίσης τα φύλλα που είχαν σχηματιστεί), μέσα σε τράπεζα νηματικής ροής, πάνω σε αποστειρωμένο πλακάκι, που τακτικά απολυμαινόταν με υδατικό διάλυμα αιθανόλης 80%, και με τη χρήση αποστειρωμένου νυστεριού και λαβίδας. Τα έκφυτα κόμβου τοποθετούνταν σε δοχεία καλλιέργειας με το ανάλογο θρεπτικό υπόστρωμα, κατακόρυφα, τρία έκφυτα ανά δοχείο όγκου 100 ml και πιέζονταν ελαφρά ώστε να βυθιστούν λίγα χιλιοστά.

3.3.1.5.3 Εγκατάσταση μικροβλαστών προς ριζοβολία

Οι σχηματισμένοι *in vitro* βλαστοί με μήκος μεγαλύτερο από 1,5 cm, προωθούνταν για να ριζοβολήσουν. Σε τράπεζα νηματικής ροής, όπως και στις προηγούμενες υποκαλλιέργειες, πάνω σε αποστειρωμένο πλακάκι, που τακτικά απολυμαινόταν με υδατικό διάλυμα αιθανόλης 80% και με αποστειρωμένο νυστέρι και λαβίδα, οι βλαστοί αποκόπτονταν από την βάση τους (από το έκφυτο) και αφαιρούνταν τα κατώτερα φύλλα τους. Οι βλαστοί έπειτα τοποθετούνταν στα γυάλινα βάζα καλλιέργειας με το ανάλογο θρεπτικό υπόστρωμα ριζοβολίας, τρεις βλαστοί ανά δοχείο καλλιέργειας, κατακόρυφα, και πιέζονταν ελαφρά ώστε να βυθιστούν λίγα χιλιοστά μέσα σε αυτό.

3.3.1.5.4 Εγκατάσταση ριζοβολημένων μικροβλαστών

Σε διάστημα 40 ημερών μετά την εγκατάσταση στα υποστρώματα ριζοβολίας, ριζοβολημένοι μικροβλαστοί, με καλά αναπτυγμένο ριζικό σύστημα, τοποθετήθηκαν σε δοχεία για εγκλιματισμό. Τα φυτάρια απομακρύνθηκαν από το υπόστρωμα και στη συνέχεια έγινε επιμελές πλύσιμο με τρεχούμενο νερό βρύσης, ώστε να απομακρυνθεί πλήρως το θρεπτικό στερεό υπόστρωμα από τις ρίζες τους. Έπειτα, έγινε μεταφύτευση των καλά ριζοβολημένων φυταρίων σε ορθογώνια, διάφανα, πλαστικά δοχεία όγκου 2 L (8 φυτάρια ανά πλαστικό δοχείο), τα οποία περιείχαν υπόστρωμα που αποτελείτο από 1 τύρφη : 1 περλίτη (v/v). Στη συνέχεια τα δοχεία καλύφθηκαν με πλαστική μεμβράνη sanitas, κατά τις πρώτες 7 ημέρες καλλιέργειας τους, με σκοπό την μείωση των απωλειών υγρασίας στα πρώτα στάδια

εγκατάστασης των φυταρίων καθώς και την ομαλή μετάβαση των νεαρών φυταρίων από το περιβάλλον της 100% σχετικής υγρασίας στο περιβάλλον του θερμοκηπίου. Τοποθετούνταν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών στους 20 °C, με φωτοπερίοδο 16 h, και σε ένταση φωτισμού 37,5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ από λαμπτήρες φθορισμού 30% υγρασία και ανά δύο ημέρες εφαρμοζόταν ελαφρύ πότισμα. Μετά το πέρας των επτά ημερών, η πλαστική μεμβράνη απομακρύνθηκε και τα φυτά μεταφέρθηκαν στην υδρονέφωση του θερμαινόμενου θερμοκηπίου του εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου για μία εβδομάδα. Μετά τη μεταφορά τους στο χώρο του θερμοκηπίου, τα πλαστικά δοχεία τοποθετήθηκαν σε σκιερό μέρος, όπου παρέμειναν συνολικά στον χώρο για διάστημα ενός μήνα. Εφαρμόστηκε περιοδική άρδευση, δύο φορές την εβδομάδα, και λίπανση με υδατοδιαλυτό πλήρες λίπασμα Nutrileaf 20:20:20 (Miller Chemical and Fertilizer Corp., Hanover, PA, USA), σε αναλογία 4 g l⁻¹.

3.3.1.6 Συνθήκες καλλιέργειας

3.3.1.6.1 Συνθήκες *in vitro* καλλιέργειας

Για την ανάπτυξη των εκφύτων, οι δοκιμαστικοί σωλήνες και τα γυάλινα βάζα καλλιέργειας, τοποθετούνταν σε θάλαμο ανάπτυξης ελεγχόμενων σταθερών συνθηκών, σε θερμοκρασία 25±2 °C, με φωτοπερίοδο 16 h πλήρους φωτός έντασης 37,5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (4.000 lx fluorescent light) που παρέχονταν από λευκούς λαμπτήρες φθορισμού, οι οποίοι βρίσκονταν στις πλευρές του θαλάμου. Η επώαση διαρκούσε 45 ημέρες, ενώ για τους βλαστούς που ήταν προς ριζοβολία η επώαση διαρκούσε 40 ημέρες.

3.3.1.6.2 Συνθήκες *ex vitro* καλλιέργειας

Τα ριζοβολημένα φυτά εγκλιματίζονταν αρχικά σε θάλαμο σταθερών συνθηκών του εργαστηρίου στους 20 °C, με φωτοπερίοδο 16 h πλήρους φωτός έντασης 37,5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (4.000 lx fluorescent light) που παρέχονταν από λευκούς λαμπτήρες φθορισμού, για διάστημα επτά ημερών και ακολούθως μεταφέρονταν σε γυάλινο θερμαινόμενο θερμοκήπιο του εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου για περαιτέρω ανάπτυξη. Αρχικά, τοποθετούνταν στην υδρονέφωση για επτά ημέρες και έπειτα στον πάγκο του θερμοκηπίου. Το θερμοκήπιο τους καλοκαιρινούς μήνες βαφόταν για μείωση της θερμοκρασίας, ενώ οι θερμοκρασίες που επικρατούσαν το Νοέμβριο, ήταν 16 °C min και 21°C max.

3.3.1.7 Στατιστική ανάλυση – Εκτίμηση αποτελεσμάτων

Χρησιμοποιήθηκε το Εντελώς Τυχαιοποιημένο Σχέδιο (ΕΤΣ) και εφαρμόστηκαν μονοπαραγοντικά και διπαραγοντικά σχέδια, ανάλογα με το κάθε επιμέρους πειραματικό στάδιο. Η σημαντικότητα των αποτελεσμάτων ελέγχθηκε με ανάλυση της διασποράς (Analysis of Variance, ANOVA). Το κριτήριο που χρησιμοποιούμε για τη στατιστική αυτή δοκιμασία είναι το κριτήριο του F. Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο Students σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων έγινε με το στατιστικό πρόγραμμα Jump 8.0 (SAS Institute Inc.). Στα αποτελέσματα οι μέσοι των επεμβάσεων που ακολουθούνται από διαφορετικά γράμματα της λατινικής αλφαβήτου διαφέρουν στατιστικά σημαντικά, ενώ το σύμβολο (*) δίπλα από κάθε τιμή του F, δηλώνει ότι οι τιμές αυτές του F ήταν σημαντικές σε επίπεδο σημαντικότητας 5%. Στο τέλος κάθε πίνακα αποτελεσμάτων αναγράφεται ο αριθμός των επαναλήψεων που χρησιμοποιήθηκαν ανά επέμβαση.

Στο στάδιο εγκατάστασης των καλλιεργειών η μέθοδος απολύμανσης των εκφύτων για την αρχική εγκατάσταση αυτών, εκτιμήθηκε ως προς το ποσοστό εκφύτων που επέζησαν μετά την απολύμανση, καθώς και το ποσοστό των εκφύτων που δεν μολύνθηκαν. Η αρχική εγκατάσταση εκφύτων *in vitro* εκτιμήθηκε μετά 45 ημέρες από την εμφύτευση των εκφύτων στα υποστρώματα. Υπολογίσθηκαν το ποσοστό εκφύτων που αντέδρασαν ως προς την έκπτυξη βλαστών, ο αριθμός των βλαστών που σχηματίστηκε ανά έκφυτο που αντέδρασε, το μέσο μήκος των βλαστών που σχηματίστηκαν και εκτιμήθηκε η ύπαρξη υπερενυδάτωσης των βλαστών. Υπολογίσθηκε επίσης το δυναμικό πολλαπλασιασμού ως το γινόμενο του ποσοστού βλαστογένεσης επί του μέσου αριθμού βλαστών που σχηματίστηκαν ανά έκφυτο που αντέδρασε και επί του μέσου μήκους των σχηματισθέντων βλαστών, και το γινόμενο αυτό διαιρέθηκε με 0,6 σαν μια εκτίμηση του μέσου αριθμού ληφθέντων εκφύτων (θεωρώντας ότι 0,6 cm είναι το αποδεκτό μήκος ενός εκφύτου κατά την υποκαλλιέργεια).

Κατά το στάδιο της ριζοβολίας η εκτίμηση των αποτελεσμάτων έγινε 40 ημέρες μετά από την μεταφορά των μικροβλαστών στα υποστρώματα ριζοβολίας και καταγράφηκε το ποσοστό των μικροβλαστών που σχημάτισαν ρίζες, ο μέσος αριθμός και το μέσο μήκος των ριζών που σχηματίστηκαν.

Στο στάδιο του εγκλιματισμού η *ex vitro* επιτυχία των φυταρίων σημειώθηκε ένα μήνα μετά τη μεταφύτευση των φυταρίων στα εδαφικά υποστρώματα ως το ποσοστό (%) επιβίωσης αυτών.

3.3.2 Αποτελέσματα

3.3.2.1 Αρχική καλλιέργεια *in vitro*

Στο στάδιο της αρχικής εγκατάστασης οι μολύνσεις των εκφύτων ήταν σε μέτριο ποσοστό (Πίν. 12), ενώ το ποσοστό μη αντίδρασης των εκφύτων ήταν πολύ υψηλό έως 100% (Πίν. 13). Τα έκφυτα των υποστρωμάτων με 0,0 και 0,5 mg l⁻¹ BA δεν αντέδρασαν καθόλου, ενώ τα αντιδρώντα έκφυτα σε 1,0 mg l⁻¹ BA ήταν 5 (3 προήλθαν από έκφυτα πρώτου κόμβου και 2 από έκφυτα δεύτερου κόμβου) και σε 1,5 mg l⁻¹ BA ήταν 4 (3 προήλθαν από έκφυτα πρώτου κόμβου και 1 από έκφυτο δεύτερου κόμβου) (Πίν. 14). Έκφυτα τρίτου και τέταρτου κόμβου δεν αντέδρασαν καθόλου σε κανένα από αυτά τα υποστρώματα. Στο υπόστρωμα με 1,0 mg l⁻¹ BA σχηματίστηκαν περισσότεροι βλαστοί, ενώ το μήκος τους ήταν παρόμοιο με το υπόστρωμα που περιείχε 1,5 mg l⁻¹ BA (Πίν. 14). Ο σχηματισμός υπερενυδάτωσης εμφανίστηκε για άλλη μια φορά, σε μεγαλύτερο ποσοστό στο υπόστρωμα με 1,0 mg l⁻¹ BA. Υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα που περιείχε 1,0 mg l⁻¹ BA (Πίν. 14).

Πίνακας 12. Επίδραση της μεθόδου απολύμανσης, σε έκφυτα κόμβου φυτών θερμοκηπίου, στο στάδιο της πρώτης υποκαλλιέργειας.

BA (mg l ⁻¹)	Ποσοστό Μολύνσεων (%)
0,0 (n=96)	31
0,5 (n=96)	40
1,0 (n=96)	32
1,5 (n=96)	37

Πίνακας 13. Επίδραση της μεθόδου απολύμανσης και του BA, σε έκφυτα κόμβου φυτών θερμοκηπίου, στο στάδιο της πρώτης υποκαλλιέργειας.

BA (mg l ⁻¹)	Ποσοστό Μη Αντιδρόντων Εκφύτων (%)	Ποσοστό Αντιδρόντων Εκφύτων (%)
0,0 (n=66)	100	0
0,5 (n=58)	100	0
1,0 (n=65)	92	8
1,5 (n=61)	93	7

Πίνακας 14. Επίδραση του BA, σε έκφυτα κόμβου από φυτά θερμοκηπίου (πρώτου, δεύτερου, τρίτου και τέταρτου, συνολικά), στο στάδιο της αρχικής εγκατάστασης *in vitro* καλλιέργειας.

BA (mg l ⁻¹)	Ποσοστό Βλαστ/σις ¹ (%)	Μέσος Αριθμός Βλαστών ²	Μέσο Μήκος Βλαστών ² (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ²	Ποσοστό Υπερενυδάτωσης ³ (%)	Μέσος Αριθμός Υπερενυδατωμένων Βλαστών	Δυν. Πολλ/μού
0,0 (n=0)	0	0	0	0	0	0	0
0,5 (n=0)	0	0	0	0	0	0	0
1,0 (n=5)	40	3,5 a	0,9 a	1,3 a	60	1,2	3,0
1,5 (n=4)	75	1,0 b	0,7 a	1,0 a	25	0,5	1,3
<i>F</i> _{one-way ANOVA}		***	*	***			

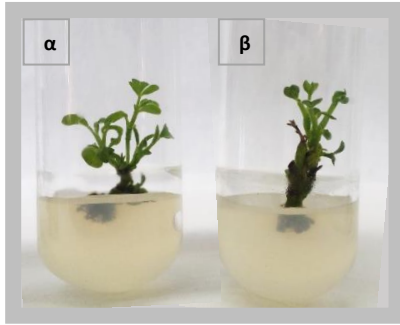
Διαχωρισμός των μέσων κατά στήλες με Student's *t* σε $P \leq 0,05$, $n=9$

Δυναμικό πολλαπλασιασμού=Βλαστογένεση¹(%)xΜέσος αριθμός βλαστών²xΜέσο αριθμός κόμβων/0,6

1 Τα έκφυτα έφεραν μόνο μη υπερενυδατωμένους βλαστούς

2 Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί

3 Πλήρως υπερενυδατωμένα έκφυτα



Εικ. 29. Καλλιέργεια κόμβων από φυτά θερμοκηπίου, σε υπόστρωμα MS με 1,0 (α) ή 1,5 mg l⁻¹ BA (β).

3.3.2.2 Πρώτη υποκαλλιέργεια

Στην αρχική καλλιέργεια των εκφύτων, λόγω μολύνσεων και μη αντίδρασης των περισσότερων εκφύτων, ο αριθμός των αντιδρόντων εκφύτων ήταν μικρός, με αποτέλεσμα η υποκαλλιέργεια των βλαστών που δημιουργήθηκαν, έγινε με μικρό αριθμό εκφύτων. Έτσι, στο στάδιο της πρώτης υποκαλλιέργειας, στόχος ήταν η παραγωγή περισσότερων βλαστών. Επιλέχθηκε το υπόστρωμα που απέδωσε καλύτερα κατά την αρχική εγκατάσταση της καλλιέργειας (Πίν. 14). Σημειώθηκε υψηλό ποσοστό βλαστογένεσης και στα δυο υποστρώματα, ενώ υπό την παρουσία του BA ήταν πολύ αυξημένος ο αριθμός των παραγόμενων, ανά έκφυτο, βλαστών (Πίν. 15).

Πίνακας 15. Επίδραση του BA, σε έκφυτα κόμβου *A. barba-jovis* L., θερμοκηπιακής προέλευσης στο στάδιο της πρώτης υποκαλλιέργειας.

BA (mg l ⁻¹)	Ποσοστό Βλαστ/σης (%)		Μέσος Αριθμός Βλαστών ³	Μέσο Μήκος Βλαστών ³ (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ³	Ποσοστό Υπερενυδά τωσης ⁴ (%)	Μέσος Αριθμός Υπερενυδα τωμένων Βλαστών ⁵	Δυν. Πολλ/μού
	Βλαστ/ση ¹	Βλαστ/ση ²						
0,0	100	0	1, b	0,9 b	1,0 b	0	0,0 b	1,5
1,0	100	0	6,1 a	1,5 a	1,8 ab	83	2,1 a	15,3
<i>F</i> _{one-way ANOVA}			***	*	***			

Διαχωρισμός των μέσων κατά στήλες με Student's *t* σε $P \leq 0,05$, $n=16$

Δυναμικό πολλαπλασιασμού=Βλαστογένεση¹(%)xΜέσος αριθμός βλαστών³xΜέσο αριθμός κόμβων/0,6

1 Τα έκφυτα έφεραν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς

2 Τα έκφυτα έφεραν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς

3 Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί

4 Πλήρως υπερενυδατωμένα έκφυτα μαζί με μεικτά έκφυτα



Εικ. 30. Πρώτη υποκαλλιέργεια της *A. barba-jovis* L. θερμοκηπιακής προέλευσης, σε υπόστρωμα MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες (α) ή εμπλουτισμένο με $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ BA (β).

3.3.2.3 Δεύτερη υποκαλλιέργεια

Στην δεύτερη υποκαλλιέργεια, στην οποία διερευνήθηκε η επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης κυτοκινίνης στον πολλαπλασιασμό των βλαστών, σημειώθηκε επίσης υψηλό ποσοστό βλαστογένεσης σε όλα τα υποστρώματα (Πίν. 16). Υπό την παρουσία BA αυξήθηκε πολύ ο αριθμός των παραγόμενων, ανά έκφυτο, βλαστών. Υψηλός αριθμός βλαστών παράχθηκε και στα υποστρώματα με ZEA, ενώ τα υποστρώματα που περιείχαν 2iP και KIN έδωσαν το χαμηλότερο αριθμό βλαστών, αλλά μεγαλύτερου μήκους σε σύγκριση με τα υποστρώματα που περιείχαν BA και ZEA (Πίν. 16, Εικ. 32, 33, 34 και 35). Τα υποστρώματα που περιείχαν 2iP προώθησαν τον σχηματισμό περισσότερων κόμβων, ενώ παρόμοια επίδραση μεταξύ τους είχαν τα υποστρώματα με ZEA και KIN (Πίν. 16, Εικ. 32, 33, 34 και 35). Χαμηλότερο αριθμό κόμβων έδωσαν τα υποστρώματα με BA ή χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες. Υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού έδωσαν οι συγκεντρώσεις $1,0$ και $2,0 \text{ mg l}^{-1}$ BA (27,5 και 27,6, αντίστοιχα) και 26,2 έδωσε η συγκέντρωση $1,5 \text{ mg l}^{-1}$ BA. Οι συγκεντρώσεις KIN έδωσαν το χαμηλότερο ποσοστό υπερενυδάτωσης, ενώ υπό την παρουσία BA αυξήθηκε πολύ ο αριθμός των υπερενυδατωμένων βλαστών (Πίν. 16, Εικ. 36, 37, 38 και 39). Υψηλός αριθμός υπερενυδατωμένων βλαστών παράχθηκε και στα υποστρώματα με ZEA και 2iP. Σε σύγκριση με τα υπόλοιπα υποστρώματα, εκείνα με την παρουσία BA προώθησαν σημαντικά το σχηματισμό υπερενυδατωμένων βλαστών, με υψηλότερο ποσοστό στη συγκέντρωση $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ BA (Πίν. 16, Εικ. 36, 37, 38 και 39).

Πίνακας 16. Επίδραση των φυτορρυθμιστικών ουσιών (PGRs) του υποστρώματος, BA, ZEA, 2iP και KIN, στο στάδιο της δεύτερης υποκαλλιέργειας, σε έκφυτα κόμβου *A. barba-jovis* L. θερμοκηπιακής προέλευσης.

PGRs (mg l ⁻¹)	Ποσοστό Βλαστ/σης (%)		Μέσος Αριθμός Βλαστών ³	Μέσο Μήκος Βλαστών ³ (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ³	Ποσοστό Υπερενδά- τωσης ⁴ (%)	Μέσος Αριθμός Υπερενδα- τομένων Βλαστών	Δυν. Πολλ/ μού
	Βλαστ/ση ¹	Βλαστ/ση ²						
0,0	100	0	1,0 h	1,0 hi	1,4 e	0	0,0 f	0,8
0,5 BA	88	12	4,2 cd	0,9 hi	1,5 e	38	1,9 ab	9,2
1,0 BA	100	0	7,5 b	1,3 fgh	2,2 d	63	2,7 a	27,5
1,5 BA	97	3	10,8 a	0,9 i	1,5 e	27	1,5 bc	26,2
2,0 BA	94	6	11,0 a	0,9 i	1,6 e	49	2,4 a	27,6
0,5 ZEA	91	9	2,3 efg	1,5 efg	2,2 d	41	1,5 bc	7,7
1,0 ZEA	94	6	2,7 ef	1,5 efg	2,2 d	34	1,1 cd	9,3
1,5 ZEA	88	12	4,2 c	1,6 def	2,8 bc	44	1,9 ab	17,2
2,0 ZEA	94	6	5,5 c	1,4 fg	2,4 cd	31	1,2 c	20,7
0,5 2iP	100	0	1,5 fgh	3,6 a	3,9 a	34	1,7 abc	9,8
1,0 2iP	97	3	1,8 efg	2,9 b	3,7 a	20	1,2 c	10,8
1,5 2iP	100	0	1,7 fgh	2,9 b	4,1 a	46	1,8 abc	11,6
2,0 2iP	97	3	3,0 de	2,1 c	3,2 b	34	1,1 cd	15,5
0,5 KIN	100	0	1,2 gh	1,2 ghi	2,3 cd	14	0,3 ef	4,6
1,0 KIN	97	3	1,2 gh	1,8 cde	2,7 bc	3	0,0 f	5,2
1,5 KIN	94	6	1,7 fgh	2,0 cd	3,0 b	17	0,5 e	8,0
2,0 KIN	100	0	1,3 gh	1,2 ghi	2,4 cd	9	0,3 ef	5,2
F Φυτορρυθμιστικών ουσιών			-	-	-		**	
F Συγκεντρώσεων			-	-	-		NS	
F Φυτορρυθμιστικών ουσιών X Συγκεντρώσεων			***	***	**		NS	
F one-way ANOVA			***	***	***		***	

Διαχωρισμός των μέσων κατά στήλες με Student's *t* σε $P \leq 0,05$, $n=34-35$

Δυναμικό πολλαπλασιασμού=Βλαστογένεση¹(%)xΜέσος αριθμός βλαστών³xΜέσο αριθμός κόμβων/0,6

1 Τα έκφυτα έφεραν υπερενδατομένους μαζί με μη υπερενδατομένους βλαστούς

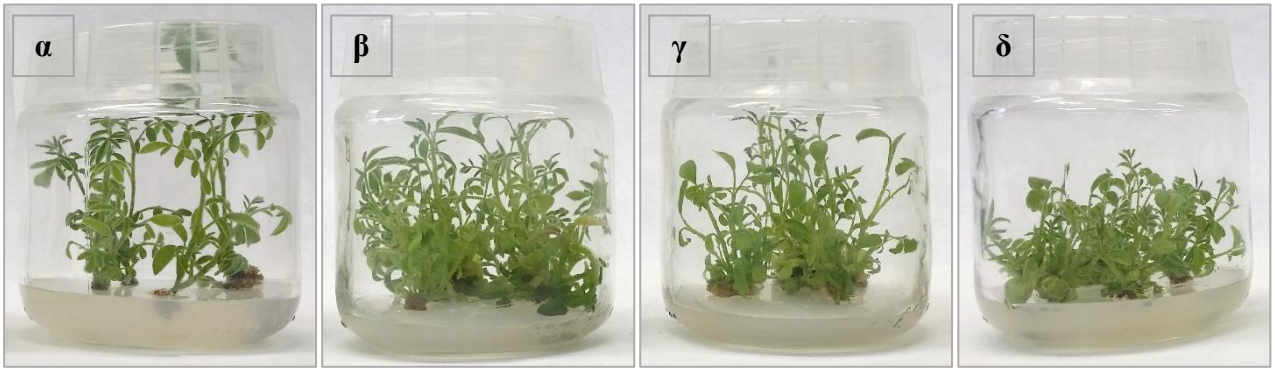
2 Τα έκφυτα έφεραν μόνο υπερενδατομένους βλαστούς

3 Μη υπερενδατομένοι βλαστοί

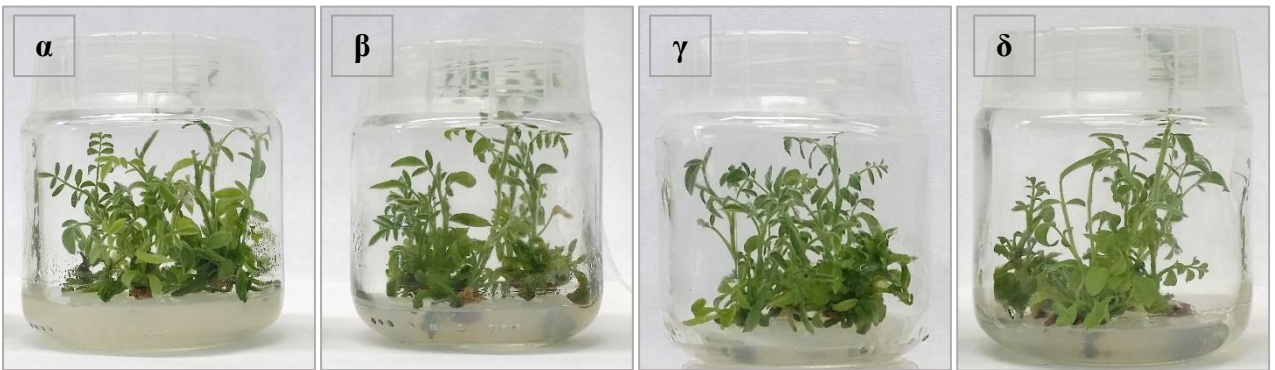
4 Πλήρως υπερενδατωμένα έκφυτα μαζί με μεικτά έκφυτα



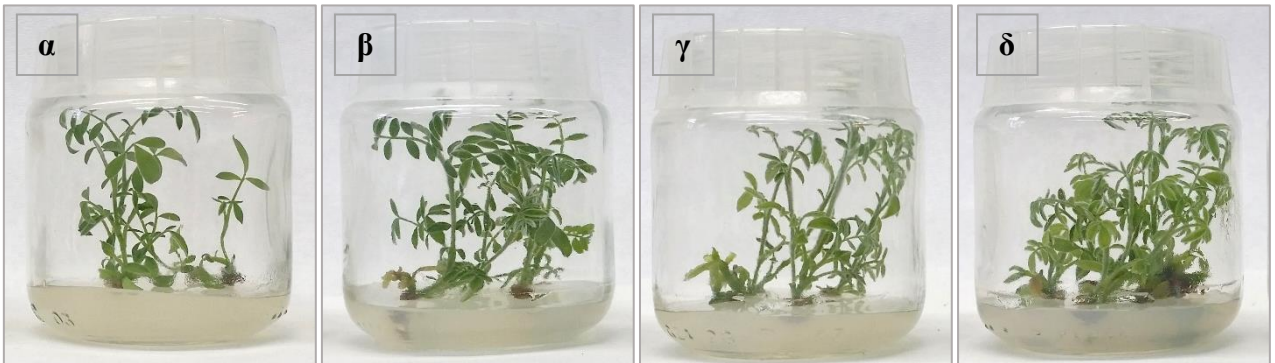
Εικ. 31. Δεύτερη υποκαλλιέργεια της *A. barba-jovis* L. θερμοκηπιακής προέλευσης, σε υπόστρωμα MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες.



Εικ. 32. Δεύτερη υποκαλλιέργεια, φυτών θερμοκηπίου, σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με BA σε συγκεντρώσεις $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ (α), $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ (β), $1,5 \text{ mg l}^{-1}$ (γ) και $2,0 \text{ mg l}^{-1}$ (δ).



Εικ. 33. Δεύτερη υποκαλλιέργεια, φυτών θερμοκηπίου, σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με ZEA σε συγκεντρώσεις $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ (α), $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ (β), $1,5 \text{ mg l}^{-1}$ (γ) και $2,0 \text{ mg l}^{-1}$ (δ).



Εικ. 34. Δεύτερη υποκαλλιέργεια, φυτών θερμοκηπίου, σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με 2iP σε συγκεντρώσεις $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ (α), $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ (β), $1,5 \text{ mg l}^{-1}$ (γ) και $2,0 \text{ mg l}^{-1}$ (δ).



Εικ. 35. Δεύτερη υποκαλλιέργεια, φυτών θερμοκηπίου, σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με KIN σε συγκεντρώσεις $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ (α), $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ (β), $1,5 \text{ mg l}^{-1}$ (γ) και $2,0 \text{ mg l}^{-1}$ (δ).



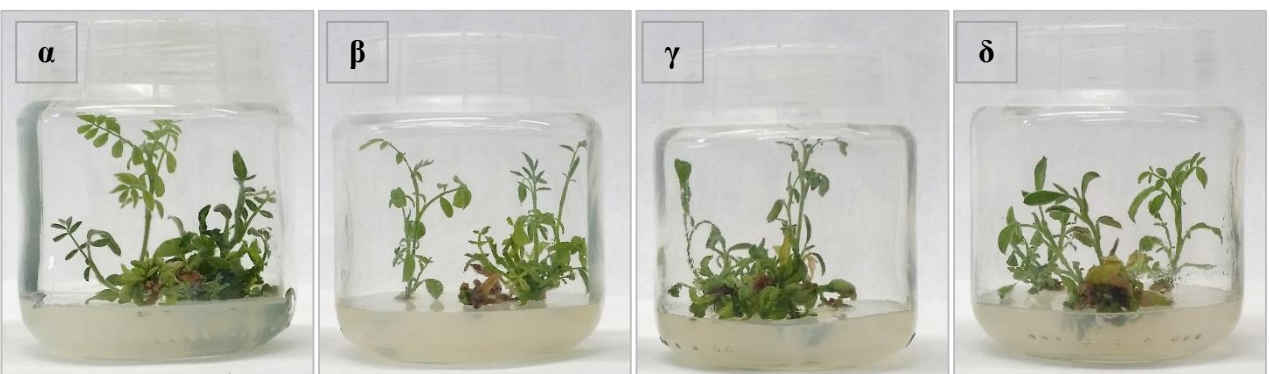
Εικ. 36. Υπερνευδατωμένοι βλαστοί, κατά την δεύτερη υποκαλλιέργεια, σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με ΒΑ σε συγκεντρώσεις $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ (α), $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ (β), $1,5 \text{ mg l}^{-1}$ (γ) και $2,0 \text{ mg l}^{-1}$ (δ).



Εικ. 37. Υπερνευδατωμένοι βλαστοί, κατά την δεύτερη υποκαλλιέργεια, σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με ΖΕΑ σε συγκεντρώσεις $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ (α), $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ (β), $1,5 \text{ mg l}^{-1}$ (γ) και $2,0 \text{ mg l}^{-1}$ (δ).



Εικ. 38. Υπερνευδατωμένοι βλαστοί, κατά την δεύτερη υποκαλλιέργεια, σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με 2iP σε συγκεντρώσεις $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ (α), $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ (β), $1,5 \text{ mg l}^{-1}$ (γ) και $2,0 \text{ mg l}^{-1}$ (δ).



Εικ. 39. Υπερνευδατωμένοι βλαστοί, κατά την δεύτερη υποκαλλιέργεια, σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με ΚΙΝ σε συγκεντρώσεις $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ (α), $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ (β), $1,5 \text{ mg l}^{-1}$ (γ) και $2,0 \text{ mg l}^{-1}$ (δ).

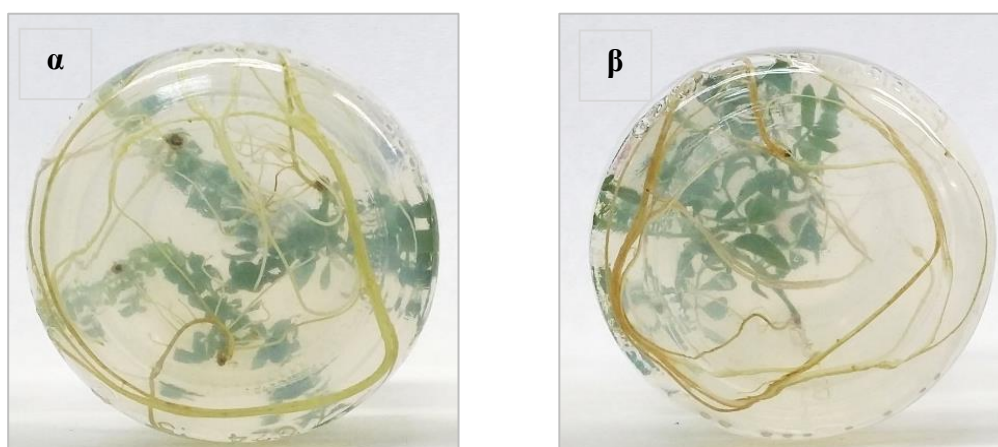
3.3.2.4 Ριζοβολία μικροβλαστών

Μη υπερενυδατωμένοι μικροβλαστοί, μήκους 1,5 cm, που προήλθαν από την δεύτερη υποκαλλιέργεια τοποθετήθηκαν για ριζοβολία σε υπόστρωμα πλήρους ή μισής δύναμης MS χωρίς IBA, ή σε υπόστρωμα MS μισής δύναμης εμπλουτισμένο με 1,0 ή 2,0 mg l⁻¹ IBA. Το ποσοστό ριζοβολίας στο υπόστρωμα MS ήταν χαμηλότερο απ' ότι στα υποστρώματα μισής δύναμης MS, με ή χωρίς την παρουσία IBA (Πίν. 17). Τον μεγαλύτερο αριθμό ριζών σημείωσε το υπόστρωμα με συγκέντρωση 2,0 mg l⁻¹ IBA, ενώ το μεγαλύτερο μήκος ριζών σημειώθηκε στα υποστρώματα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, με μεγαλύτερο μήκος εκείνο στο υπόστρωμα μισής δύναμης MS (Πίν. 17, Εικ. 40 και 41).

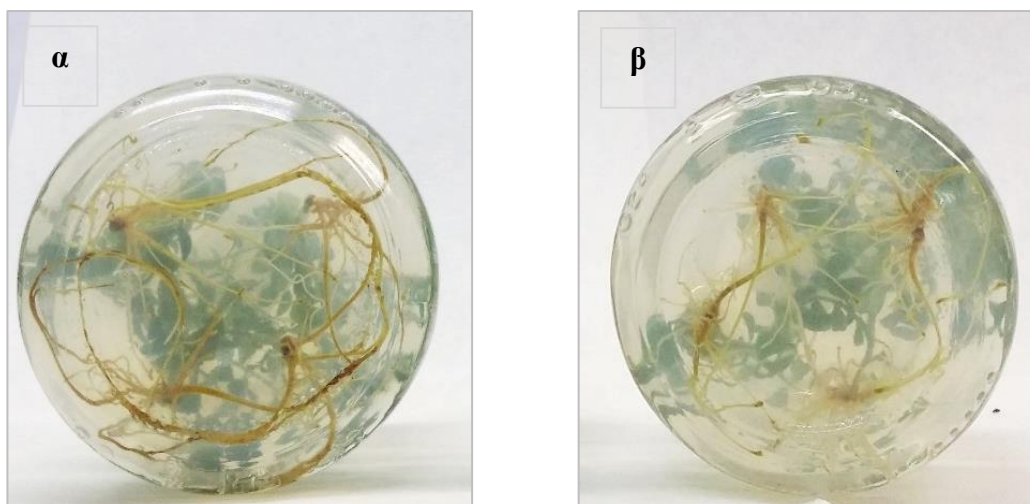
Πίνακας 17. Επίδραση του θρεπτικού υποστρώματος MS μισής ή πλήρους δύναμης, και των συγκεντρώσεων IBA στο ποσοστό ριζοβολίας (%), τον αριθμό και το μήκος των ριζών ανά ριζοβολημένο μικροβλαστό, θερμοκηπιακής προέλευσης.

PGRs (mg l ⁻¹)	Ριζοβολία (%)	Μέσος Αριθμός Ριζών	Μέσο Μήκος Ριζών (cm)
MS	60	1,5 c	12,5 b
½ MS	84	1,8 c	16,8 a
½ MS/ 1,0 IBA	98	2,8 b	8,2 c
½ MS/ 2,0 IBA	98	3,9 a	3,1 d
<i>F</i> _{one-way ANOVA}		***	***

Διαχωρισμός των μέσων κατά στήλες με Student's *t* σε $P \leq 0,05$, n=100



Εικ. 40. Ριζοβολημένοι μικροβλαστοί, θερμοκηπιακής προέλευσης, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS (α) ή ½ MS (β), χωρίς την παρουσία αυξίνης.



Εικ. 41. Ριζοβολημένοι μικροβλαστοί, θερμοκηπιακής προέλευσης, σε θρεπτικό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS εμπλουτισμένο με IBA σε συγκεντρώσεις 1,0 (α) ή 2,0 mg l^{-1} (β).

3.3.2.5 Εγκλιματισμός φυταρίων

Για εγκλιματισμό σε *ex vitro* συνθήκες τα ανεπτυγμένα έρριζα φυτάρια (Εικ. 42) μεταφυτεύθηκαν σε 1 τύρφη : 1περλίτη, αρχικά σε θάλαμο σταθερών συνθηκών και στη συνέχεια στο θερμοκήπιο για περαιτέρω ανάπτυξη. Τα φυτάρια εγκλιματίστηκαν με 92% επιτυχία σε *ex vitro* συνθήκες (Εικ. 43). Μετά την ολοκλήρωση του εγκλιματισμού (1 μήνα), ακολούθησε μεταφύτευση σε γλάστρα 10cm σε υπόστρωμα τύρφη-περλίτης (1:1 v/v) και στα μισά εξ' αυτών έγινε κορυφολόγηση. Αυτά στη συνέχεια έδωσαν 2-3 βλαστούς ανά φυτό (Εικ. 44α). Η ανάπτυξη των φυτών ήταν επιτυχής κατά τους τρεις επόμενους μήνες από την μεταφύτευσή τους σε ατομική γλάστρα. Τα φυτά λιπαίνονταν με υδατοδιαλυτό πλήρες λίπασμα Nutrileaf 20:20:20 κάθε 20 ημέρες. Στο ανθοκομείο του εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου, βρίσκονται τα φυτά που έχουν επιτυχώς εγκατασταθεί, ηλικίας 1 έτους.



Εικ. 42. Μικροβλαστοί, θερμοκηπιακής προέλευσης, λίγο πριν το στάδιο του εγκλιματισμού, από θρεπτικό υπόστρωμα MS (α) ή ½ MS χωρίς την παρουσία αυξίνης ή εμπλουτισμένο με IBA σε συγκεντρώσεις 1,0 ή 2,0 mg l⁻¹ (β, γ,δ), αντίστοιχα.



Εικ. 43. Εγκλιματισμός μικροβλαστών, θερμοκηπιακής προέλευσης, σε υπόστρωμα τύρφη-περλίτης (1:1 v/v), στον πάγκο του υαλόφρακτου θερμοκηπίου εργαστηρίου Ανθοκομίας & Αρχιτεκτονικής Τοπίου.



Εικ. 44. Εγκλιματισμένα φυτάρια, θερμοκηπιακής προέλευσης, ηλικίας περίπου 30 ημερών, από την μεταφύτευσή τους σε υπόστρωμα τύρφη-περλίτης (1:1 v/v), με (α) ή χωρίς κορυφολόγημα (β).



Εικ. 45. Φυτά *A. barba-jovis* L., θερμοκηπιακής προέλευσης, ηλικίας περίπου 90 ημερών, από την μεταφύτευσή τους σε υπόστρωμα τύρφη-περλίτης (1:1 v/v), με (α) ή χωρίς κορυφολόγημα (β).

3.4 Συζήτηση – Συμπεράσματα

3.4.1 *In vitro* πολλαπλασιασμός από σπορόφυτα *A. barba-jovis* L.

Το στάδιο του πολλαπλασιασμού των *in vitro* καλλιεργειών, είναι ιδιαίτερα σημαντικό κατά τη δημιουργία ενός πρωτοκόλλου μικροπολλαπλασιασμού. Η απόκτηση σε μικρό χρονικό διάστημα ενός μεγάλου αριθμού βλαστών, με μεγάλο μήκος και η ομοιότητα των παραγόμενων βλαστών με τα μητρικά φυτά απ' όπου προήλθαν είναι μεγάλης σημασίας. Σχετικά με τον *in vitro* πολλαπλασιασμό της *A. barba-jovis* δεν υπάρχουν πολλές βιβλιογραφικές αναφορές, όπως συμβαίνει με άλλα είδη του γένους. Η χρήση εκφύτων κορυφής βλαστού, που προήλθαν από *in vitro* αναπτυγμένα σπορόφυτα *A. barba-jovis* σε υποστρώματα που περιείχαν BA, επέφερε σχετικά χαμηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού (Vlachou *et al.*, 2016). Έτσι, στην παρούσα μελέτη χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα κοτυληδικού κόμβου σποροφύτων, τα οποία κατά τον μικροπολλαπλασιασμό έδωσαν υψηλά ποσοστά βλαστογένεσης (Πίν. 9, Σχ. 2 – Παράρτημα II). Η ύπαρξη BA στο υπόστρωμα με ή χωρίς NAA προκάλεσε το σχηματισμό περισσότερων βλαστών, ενώ ο συνδυασμός BA/NAA, σημείωσε τη μεγαλύτερη επιμήκυνση των παραχθέντων μικροβλαστών (Πίν. 9, Σχ. 3 και 4 – Παράρτημα II). Το ποσοστό αντίδρασης των εκφύτων ήταν πολύ υψηλό, αλλά ο αριθμός βλαστών ανά έκφυτο που αντέδρασε ήταν χαμηλός. Η ίδια συγκέντρωση BA ($1,0 \text{ mg l}^{-1}$) στο *A. cytisoides*, έδωσε υψηλότερο αριθμό βλαστών σε έκφυτα κοτυληδικού κόμβου και σε έκφυτα κορυφής (Gavidia *et al.*, 1997). Ο συνδυασμός των BA και NAA προκάλεσε τον σχηματισμό μικρών μεσογονάτιων διαστημάτων δημιουργώντας έτσι περισσότερους κόμβους, έναντι των υποστρωμάτων που περιείχαν είτε BA είτε NAA (Πίν. 9, Σχ. 5 – Παράρτημα II). Η παρουσία κυτοκίνης, με ή χωρίς την παρουσία αυξίνης, είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση υπερενυδάτωσης των βλαστών. Περισσότεροι υπερενυδατωμένοι βλαστοί σχηματίστηκαν στα υποστρώματα με BA, χωρίς την παρουσία NAA (Πίν. 9, Σχ. 6 και 7 – Παράρτημα II). Το μεγαλύτερο δυναμικό πολλαπλασιασμού στο στάδιο αυτό παρατηρήθηκε στα υποστρώματα με συγκεντρώσεις $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ BA χωρίς διαφορά από το $1,0/0,1 \text{ mg l}^{-1}$ BA/NAA (Πίν. 9, Σχ. 8 – Παράρτημα II).

Στο στάδιο της υποκαλλιέργειας η παρουσία BA αύξησε πολύ τον αριθμό των παραγόμενων βλαστών, ενώ το μήκος των βλαστών ήταν παρόμοιο σε όλα τα υποστρώματα (Πίν. 10, Σχ. 9, 10 και 11 – Παράρτημα II). Σε σύγκριση με τη χρήση εκφύτων κορυφής βλαστού των Vlachou *et al.* (2016), η χρήση εκφύτων κοτυληδικού κόμβου διπλασίασε την απόδοση της καλλιέργειας σε βλαστούς (Πίν. 10, Σχ. 12 – Παράρτημα II). Το υπόστρωμα με $1,0/0,1 \text{ mg l}^{-1}$ BA/NAA σχημάτισε περισσότερους υπερενυδατωμένους βλαστούς (Πίν. 10, Σχ. 13 και 14 – Παράρτημα II), ενώ υψηλά ποσοστά υπερενυδάτωσης έχουν παρατηρηθεί κατά το μικροπολλαπλασιασμό

και άλλων ξηροφυτικών ειδών της Μεσογείου, όπως η *Anthyllis cytisoides* (Gavidia *et al.*, 1997), *Globularia alypum* L. (Bertsouklis *et al.*, 2003) και *Lithodora zahnii* (Papafotiou and Kalantzis, 2009). Υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού έδωσε πάλι το υπόστρωμα με 1,0/0,1 mg l⁻¹ BA/NAA (Πίν. 10, Σχ. 15 – Παράρτημα II). Στο υπόστρωμα με τη χαμηλότερη συγκέντρωση BA οι βλαστοί είχαν πιο ικανοποιητική εμφάνιση και ήταν καλοσχηματισμένοι.

Κατά τη ριζοβολία των μικροβλαστών η προσθήκη IBA δεν επέδρασε στο ποσοστό ριζοβολίας, αλλά επέφερε αύξηση του μήκους των ριζών στη συγκέντρωση 0,5 mg l⁻¹ και αύξηση του αριθμού των παραγόμενων ριζών με μείωση του μήκους αυτών στη συγκέντρωση των 2,0 mg l⁻¹ (Πίν. 11, Σχ. 16, 17 και 18 – Παράρτημα II). Το WPM φάνηκε να ευνοεί την επιμήκυνση των ριζών, το MS τον αριθμό των ριζών, ενώ το SH έδωσε τα λιγότερα ικανοποιητικά αποτελέσματα σε σύγκριση με τα άλλα δυο υποστρώματα (Πίν. 11, Σχ. 16, 17 και 18 – Παράρτημα II). Η ποιότητα των ριζών, ανεξαρτήτως θρεπτικού υποστρώματος (MS, WPM, SH), διέφερε ανάλογα με τις συγκεντρώσεις του IBA. Τα υποστρώματα που δεν περιείχαν συγκέντρωση IBA, προκάλεσαν τον σχηματισμό πολύ λεπτών ριζών, ενώ εκείνα με 0,5 ή 2,0 mg l⁻¹ IBA, προκάλεσαν τον σχηματισμό ριζών με μεγαλύτερο πάχος (υπερενυδατωμένες), κάνοντας τις ρίζες πιο εύθραυστες. Οι Vlachou *et al.* (2016) για την ριζοβολία των μικροβλαστών, που προήλθαν από σπορόφυτα, χρησιμοποίησαν υποστρώματα MS πλήρους δύναμης. Σε σύγκριση με τα αποτελέσματά τους, η χρήση μισής δύναμης MS διπλασίασε την απόδοση των μικροβλαστών για ριζοβολία. Στο είδος *A. hermanniae*, όπου η ριζοβολία έγινε σε υποστρώματα μισής δύναμης MS, παρατηρήθηκαν χαμηλότερα ποσοστά ριζοβολίας, με ίδιο αριθμό ριζών, αλλά με μικρότερο μήκος ριζών (Μαρτίνη και Παπαφωτίου, 2016), ενώ στο είδος *A. cytisoides*, όπου η ριζοβολία έγινε σε υποστρώματα μισής δύναμης SH, παρατηρήθηκαν παρόμοια ποσοστά ριζοβολίας, αλλά υψηλότερος αριθμός ριζών (Gavidia *et al.*, 1997).

Η αποτελεσματικότητα μιας μεθόδου μικροπολλαπλασιασμού μπορεί να εκτιμηθεί από τον αριθμό των φυτών που είναι δυνατόν να επιζήσουν σε συνθήκες αγρού, μετά από το στάδιο του εγκλιματισμού και της σκληραγώγησης (Ziv, 1986). Στο στάδιο του εγκλιματισμού τα ανεπτυγμένα έρριζα φυτάρια εγκλιματίστηκαν με 97% επιτυχία σε *ex vitro* συνθήκες σε υπόστρωμα τύρφη-περλίτης (1:1 v/v).

3.4.2 *In vitro* πολλαπλασιασμός από νεαρά φυτά *A. barba-jovis* L.

Όπως ήδη αναφέρθηκε δεν βρέθηκαν αρκετές βιβλιογραφικές αναφορές για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό της *A. barba-jovis*. Για την εγκατάσταση της αρχικής καλλιέργειας εκφύτων

κόμβου από νεαρά φυτά έπρεπε να βρεθεί ένας συνδυασμός απολύμανσης των εκφύτων, που θα οδηγούσε σε βλαστογένεση, με αποφυγή μολύνσεων και μη αντίδρασης των εκφύτων. Το ποσοστό των μολύνσεων ήταν μέτριο, ενώ το ποσοστό μη αντίδρασης των εκφύτων ήταν υψηλότατο, πιθανόν λόγω καταστροφής τους από την υψηλή συγκέντρωση αιθανόλης ή χλωρίνης. Τα έκφυτα τρίτου και τέταρτου κόμβου δεν αντέδρασαν καθόλου σε κανένα από τα υποστρώματα, ενώ τα έκφυτα πρώτου και δεύτερου κόμβου αντέδρασαν σε πολύ μικρό αριθμό (Πίν. 14, Σχ. 19, 20, 21, 22 και 23 – Παράρτημα III). Στόχος της πρώτης υποκαλλιέργειας ήταν η παραγωγή περισσότερων βλαστών, γι' αυτό τον λόγο επιλέχθηκε το υπόστρωμα που απέδωσε καλύτερα κατά την αρχική εγκατάσταση της καλλιέργειας. Σημειώθηκε υψηλό ποσοστό βλαστογένεσης, ενώ υπό την παρουσία του BA αυξήθηκε πολύ ο αριθμός των παραγόμενων, βλαστών.

Κατά τη δεύτερη υποκαλλιέργεια διερευνήθηκε η επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης κυτοκινίνης στον πολλαπλασιασμό των βλαστών. Η βλαστογένεση παρέμεινε σε πολύ υψηλά ποσοστά (Πίν. 16, Σχ. 24 – Παράρτημα III). Υπό την παρουσία BA ο αριθμός των παραγόμενων βλαστών ήταν πολύ υψηλός, ενώ υψηλός αριθμός βλαστών παράχθηκε και στα υποστρώματα με ZEA (Πίν. 16, Σχ. 25 – Παράρτημα III). Τα υποστρώματα που περιείχαν 2iP και KIN έδωσαν το χαμηλότερο αριθμό παραγόμενων βλαστών, χωρίς σημαντικές διαφορές μεταξύ τους, αλλά μεγαλύτερου μήκους απ' ότι τα υποστρώματα που περιείχαν BA και ZEA (Πίν. 16, Σχ. 26 – Παράρτημα III). Τα ίδια αποτελέσματα είχε και η *A. hermanniae*, όπου ο αριθμός των σχηματιζόμενων βλαστών ήταν μεγαλύτερος στα έκφυτα που καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα που περιείχε 0,5- 4,0 mg l⁻¹ BA από ότι σε αυτά που περιείχαν ZEA, KIN, 2iP ή χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες (Μαρτίνη και Παπαφωτίου, 2016). Τα υποστρώματα που περιείχαν 2iP προώθησαν το σχηματισμό περισσότερων κόμβων, ενώ παρόμοια επίδραση μεταξύ τους είχαν τα υποστρώματα με ZEA και KIN (Πίν. 16, Σχ. 27 – Παράρτημα III). Η παρουσία κυτοκινίνης, είχε πάλι ως αποτέλεσμα το σχηματισμό υπερενυδατωμένων βλαστών. Υψηλότερα ποσοστά υπερενυδάτωσης έδωσαν οι συγκεντρώσεις BA, ZEA και 2iP, ενώ χαμηλότερα οι συγκεντρώσεις KIN (Πίν. 16, Σχ. 28 – Παράρτημα III). Σε σύγκριση με τα υπόλοιπα υποστρώματα, εκείνα με την παρουσία BA προώθησαν σημαντικά το σχηματισμό υπερενυδατωμένων βλαστών, με υψηλότερο ποσοστό στη συγκέντρωση 0,5 mg l⁻¹ (Πίν. 16, Σχ. 29 – Παράρτημα III). Υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού έδωσαν οι συγκεντρώσεις BA (Πίν. 16, Σχ. 30 – Παράρτημα III).

Στο στάδιο της ριζοβολίας των μικροβλαστών το ποσοστό ήταν αρκετά υψηλό στα υποστρώματα MS μισής δύναμης, ιδίως με την παρουσία IBA (Πίν. 17, Σχ. 31 – Παράρτημα III). Τον μεγαλύτερο αριθμό ριζών σημείωσε το υπόστρωμα με 2,0 mg l⁻¹ IBA, ενώ το

μεγαλύτερο μήκος ριζών σημειώθηκε στα υποστρώματα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, με μεγαλύτερο μήκος εκείνο στο υπόστρωμα μισής δύναμης MS (Πίν. 17, Σχ. 32 και 33 – Παράρτημα III). Στο είδος *A. hermanniae*, όπου η ριζοβολία έγινε σε υποστρώματα μισής δύναμης MS, παρατηρήθηκαν χαμηλότερα ποσοστά ριζοβολίας, με ίδιο αριθμό ριζών, αλλά το μήκος των ριζών ήταν πολύ χαμηλό, ειδικά στο υπόστρωμα μισής δύναμης MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες ήταν σχεδόν έξι φορές μικρότερο (Μαρτίνη και Παπαφωτίου, 2016).

Στο στάδιο του εγκλιματισμού τα ανεπτυγμένα έρριζα φυτάρια εγκλιματίστηκαν με 92% επιτυχία σε *ex vitro* συνθήκες σε υπόστρωμα τύρφη-περλίτης (1:1 v/v). Σε υψηλά ποσοστά έχει εγκλιματιστεί και το είδος *A. cytisoides*, αλλά σε υπόστρωμα τύρφη-περλίτης, 2:1 v/v (Gavidia *et al.*, 1997).

4. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Κατά τον προσδιορισμό των κατάλληλων συνθηκών βλάστησης των σπόρων και τη διερεύνηση της ύπαρξης ληθάργου, πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν οι συνθήκες που επικρατούν στο φυσικό περιβάλλον του σπόρου το χρονικό διάστημα μετά την ωρίμανσή του. Ιδιαίτερη σημασία έχει επίσης το στάδιο συλλογής των σπόρων και οι μετασυλλεκτικοί χειρισμοί στους σπόρους που θα πρέπει με ακρίβεια να αναφέρονται, γιατί είναι πιθανό να επηρεάσουν την βλαστική ικανότητα (Baskin and Baskin, 1998). Οι σπόροι του φυτού εμφανίζουν φυσικό λήθαργο, λόγω της αδιάβροχης εφουμενίδας τους, όπως σε όλα τα Fabaceae (Baskin and Baskin, 1998, Baskin, 2003), επομένως η προμεταχείριση μηχανικού σκαριφισμού των σπόρων για 1 min με γυαλόχαρτο είχε ευνοϊκή επίδραση στη βλάστηση των σπόρων, όπως αναφέρουν και οι Morbidoni *et al.* (2008), όπου στην έρευνά τους, η βλαστικότητα των σκαριφισμένων σπόρων ήταν κατά πολύ υψηλότερη σε σύγκριση με αυτή των σπόρων χωρίς προμεταχείριση, όπως και στην παρούσα εργασία. Η φωτοπερίοδος είχε επίδραση στη βλαστικότητα των σπόρων, ενώ παρουσίασαν υψηλή βιωσιμότητα με την πάροδο του χρόνου και αντοχή στις υψηλές θερμοκρασίες, γεγονός που επιβεβαιώνεται και από τους Morbidoni *et al.* (2008). Οι σπόροι που αποθηκεύτηκαν για 12 και 24 μήνες βλάστησαν σε υψηλά ποσοστά, αλλά σχετικά χαμηλότερα από τους σπόρους πρόσφατης συλλογής, επομένως το διάστημα αποθήκευσης μείωσε ελαφρώς την βλαστικότητα. Η θερμοκρασία των 20 °C έδωσε υψηλότερα ποσοστά βλαστικότητας, σε σπόρους πρόσφατης συλλογής και σπόρους ηλικίας 12 μηνών, ενώ σπόροι που ήταν αποθηκευμένοι για 24 μήνες έδωσαν καλύτερα ποσοστά βλαστικότητας στους 25 °C. Στον έλεγχο βλαστικότητας των σπόρων *ex vitro*, παρατηρήθηκε ξανά ότι η αποθήκευση μέχρι 24 μήνες επηρέασε την βλαστικότητα των σπόρων.

Όσον αφορά στην εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας *A. barba-jovis* με έκφυτα κόμβου προερχόμενα από νεαρά φυτά, ιδιαίτερη σημασία είχε η αποτελεσματικότητα της απολύμανσης των εκφύτων. Σε προηγούμενες προσπάθειες εγκατάστασης των εκφύτων από συναδέλφους, περιοριστικός παράγοντας για την επιτυχή εγκατάσταση ήταν οι μολύνσεις. Το επιμελές και σχολαστικό πλύσιμο των εκφύτων σε τρεχούμενο νερό βρύσης, ακολουθούμενο με βύθιση σε σαπουνάδα και έπειτα σε αιθανόλη 90% για 10 sec και ακολούθως ανάδευση σε υδατικό διάλυμα χλωρίνης εμπορίου 30% για 10 min, είχε ως αποτέλεσμα την σχετικά επιτυχή απολύμανση των εκφύτων, αλλά πιθανώς οδήγησε σε καταστροφή των ιστών τους δεδομένου ό,τι τα περισσότερα έκφυτα που δεν μολύνθηκαν δεν αντέδρασαν. Αντέδρασαν ελάχιστα

έκφυτα, τα οποία όμως κατά τις υποκαλλιέργειες επέδειξαν υψηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού κατάτι υψηλότερο από αυτό των καλλιεργειών που προήλθαν από σπορόφυτα.

Σε όλα τα στάδια των καλλιεργειών, είτε από σπορόφυτα είτε από νεαρά φυτά, παρουσιάστηκε έντονα η υπερενυδάτωση των βλαστών. Η παρουσία κυτοκινίνης, με ή χωρίς την παρουσία αυξίνης, είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό υπερενυδατωμένων βλαστών. Υψηλά ποσοστά υπερενυδάτωσης έχουν παρατηρηθεί κατά το μικροπολλαπλασιασμό και άλλων ξηροφυτικών ειδών της Μεσογείου, όπως η *Anthyllis cytisoides* (Gavidia *et al.*, 1997), *Globularia alypum* L. (Bertsouklis *et al.*, 2003) και *Lithodora zahnii* (Papafotiou and Kalantzis, 2009). Υπάρχουν πολλές αναφορές στο παρελθόν για σχηματισμό υπερενυδατωμένων βλαστών σε διάφορα είδη φυτών. Το 1988 οι Dillen και Buysens μελετώντας τον *in vitro* πολλαπλασιασμό της *Gypsophila paniculata* πρότειναν μια απλά αλλά αποτελεσματική μέθοδο για την καταπολέμηση της υπερενυδάτωσης. Σύμφωνα με τη μελέτη τους με την αλλαγή του τρόπου κάλυψης και με τη χρήση ειδικού καλύμματος με τρύπες για τον αερισμό των δοκιμαστικών σωλήνων το ποσοστό της υάλωσης μειώθηκε σημαντικά. Το υλικό κάλυψης και η επίδρασή του στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των *in vitro* καλλιεργούμενων εκφύτων μελετήθηκε και για τα είδη *Quercus euboica* (Kartsonas and Papafotiou, 2007), *Lithodora zahnii* (Καλαντζής, 2009) και *Malosorbus florentina* Zucc. (Μαρτίνη, 2013), όπου η υπερενυδάτωση των βλαστών περιορίστηκε όταν τα δοχεία καλλιέργειας καλύφθηκαν με μεμβράνη sanitas, ενώ το πλαστικό φιλμ και το πλαστικό καπάκι οδήγησαν σε υψηλά ποσοστά υπερενυδάτωσης. Υπάρχουν αναφορές σχετικά με τον περιορισμό μέσω της αύξησης της συγκέντρωσης του άγαρ. Οι Arnold και Eriksson (1984) μελετώντας τον *in vitro* πολλαπλασιασμό του *Picea abies*, συμπέραναν ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ από 5 g l⁻¹ σε 20 g l⁻¹ μείωσε σημαντικά το ποσοστό της υπερενυδάτωσης. Στο ίδιο συμπέρασμα κατέληξαν και οι Bertsouklis *et al.* (2003), μελετώντας τον *in vitro* πολλαπλασιασμό του *Globularia alypum*, ακόμη στην ίδια μελέτη δοκιμάστηκε και η αύξηση της συγκέντρωσης της σακχαρόζης για τη μείωση της υπερενυδάτωσης χωρίς όμως θετικά αποτελέσματα. Στις αρχικές εγκαταστάσεις των καλλιεργειών της *A. barba-jovis*, τα ποσοστά υπερενυδάτωσης κυμάνθηκαν σε χαμηλά επίπεδα, ενώ στα στάδια των υποκαλλιέργειών τα ποσοστά αυξήθηκαν σημαντικά. Ο συνδυασμός BA και NAA έδωσε τα υψηλότερα ποσοστά υπερενυδάτωσης, ενώ υπό την παρουσία BA η υπερενυδάτωση των βλαστών ήταν ναι μεν υψηλή, αλλά σε μικρότερο βαθμό. Οι συγκεντρώσεις KIN έδωσαν το χαμηλότερο ποσοστό υπερενυδατωμένων βλαστών, χωρίς όμως μεγάλη παραγωγή βλαστών και υψηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού. Αρκετά μεγάλος αριθμός υπερενυδατωμένων βλαστών σημειώθηκε και στα υποστρώματα με ZEA και 2iP. Η κάλυψη των σωλήνων καλλιέργειας με μεμβράνη sanitas, επιβεβαιώνει τις παραπάνω

αναφορές, καθώς στις αρχικές καλλιέργειες της *A. barba-jovis* είτε από σπορόφυτα είτε από νεαρά άτομα, όπου τα έκφυτα αναπτύχθηκαν σε σωλήνες καλυμμένοι με μεμβράνη, σημειώθηκαν χαμηλά ποσοστά υπερενυδατωμένων βλαστών, ενώ στα στάδια πολλαπλασιασμού όπου τα έκφυτα αναπτύχθηκαν σε βάζα καλλιέργειας με πλαστικό καπάκι magenta, η υπερενυδάτωση αυξήθηκε σημαντικά.

Ως εκ τούτου, για την αρχική εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας από νεαρά φυτά θερμοκηπίου συνιστάται χρήση υποστρώματος MS με $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ BA, ενώ από σπορόφυτα χρήση υποστρώματος MS με $0,5$ ή $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ BA, σε συνδυασμό με $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ NAA. Κατά το στάδιο του πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών από νεαρά φυτά θερμοκηπίου συνιστάται χρήση υποστρώματος MS με $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ BA, καθώς δίνει υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού, ενώ από σπορόφυτα χρήση υποστρώματος MS με $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ BA σε συνδυασμό με $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ NAA. Περαιτέρω έρευνα για αντιμετώπιση της υπερενυδάτωσης των βλαστών της *A. barba-jovis*, θα μπορούσε να αυξήσει ακόμη περισσότερο την απόδοση της καλλιέργειας.

Για την *in vitro* ριζοβολία της *A. barba-jovis*, είτε οι μικροβλαστοί προέρχονταν από σπορόφυτα είτε από νεαρά φυτά, ενδείκνυται η χρήση υποστρωμάτων MS μισής δύναμης, καθώς απεδείχθει ως το πλέον κατάλληλο υπόστρωμα ριζοβολίας σε σύγκριση με το WPM και το SH. Η παρουσία IBA στο υπόστρωμα αύξησε το ποσοστό ριζοβολίας, καθώς και τον αριθμό των ριζών, μειώνοντας το μήκος τους. Η χρήση $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ IBA ενδείκνυται για την *in vitro* ριζοβολία.

Ο εγκλιματισμός των φυταρίων σε *ex vitro* συνθήκες έγινε χωρίς προβλήματα σε υπόστρωμα τύρφη-περλίτη (1:1 v/v) και επιβίωσε πολύ υψηλό ποσοστό φυτών (92-97%) διατηρώντας τα χαρακτηριστικά των μητρικών φυτών.

...и в то время, когда он был еще совсем молодым, он уже был известен как талантливый писатель. Его произведения, полные глубокого анализа и тонкого юмора, завоевали широкую популярность. Он был одним из тех немногих, кто сумел соединить высокое искусство с доступностью для широкой аудитории. Его творчество оставило неизгладимый след в литературе того времени.

...и в то время, когда он был еще совсем молодым, он уже был известен как талантливый писатель. Его произведения, полные глубокого анализа и тонкого юмора, завоевали широкую популярность. Он был одним из тех немногих, кто сумел соединить высокое искусство с доступностью для широкой аудитории. Его творчество оставило неизгладимый след в литературе того времени.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Akoumianaki-Ioannidou, A., Martini, A.N. and Papafotiou, M. (2015). Rooting and establishment of *Limoniastrum monopetalum* (L.) Boiss stem-tip cuttings. *African Journal of Plant Science*, 10 (1): 23-31.
- Akulova, Z.V. (1985). To the question on ways of morphological evolution in the genus *Anthyllis* L. In: Anonymous (ed.), *Proceedings of 7 Conference of Young Scientists of V.L. Komarov Botanical Institute*: 29-36. VINITI. Moscow. (In Russian).
- Akulova, Z.V. (1986). The genus *Anthyllis* L. in the flora of USSR: systematics, morphology, and usage. PhD Thesis. Leningrad. (In Russian).
- Amritphale, D., Iyengar, S., and Sharma R.K. (1989). Effect of light and storage temperature on seed germination in *Hygrophila auriculata* (Schumach.) Haines. *Journal of Seed Technology*. 13: 39-43.
- Angiosperm Phylogeny Group (2009). "An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG III" (PDF). *Botanical Journal of the Linnean Society*. 161 (2): 105–121.
- Arianoutsou-Faraggitaki, M. and Margaris, N., (1981). Early stages of succession after fire in a phrygic (East Mediterranean) ecosystem. I. Regeneration by seed germination. *Biologie Ecologie Méditerranéenne*, 8 (3-4): 119-128.
- Arianoutsou, M. (2001). Landscape changes in Mediterranean ecosystems of Greece: implications for fire and biodiversity issues. *Journal of Mediterranean Ecology* 2: 165-178.
- Arianoutsou M. and Thanos CA. (1996). Legumes in the fire-prone Mediterranean regions: An example from Greece. *Int J Wild Fire* 6 (2):77–82.
- Baes, P.O., de Viana, M.L., Suhring, S. (2002). Germination in *Prosopis ferox* seeds: effects of mechanical, chemical and biological scarifiers. *Journal of Arid Environments* 50: 185–189.
- Barbour, M.G. and Billings, W.D. (eds). (1988). "North American Terrestrial Vegetation". Cambridge Univ. Press, Cambridge, UK.
- Bärtels, A. (2011). *Pflanzen des Mittelmeerraumes*. Eugen Ulmer verlag.
- Baskin, J.M. and Baskin, C.C. (1989). Physiology of dormancy and germination in relation to seed bank ecology. In: Leck MA, Parker VT, Simpson RL, editors. *Ecology of soil seed banks*. Academic Press, San Diego, pp 53–66.
- Baskin, C.C., Baskin, J.M. (1998). *Seeds: Ecology, Biogeography and Evolution of Dormancy and Germination*. Academic Press, San Diego. pp. 666.
- Baskin, C.C. and Baskin, J.M. (2001). *Seeds*. Academic Press, San Diego.

- Baskin, C.C. (2003). Breaking physical dormancy in seeds – focusing on the lens. *New Phytologist*. 158: 229–232.
- Benedí, C. (1998). Consideraciones sobre el género *Anthyllis* L. (Loteae-Leguminosae) y su tratamiento en Flora Iberica. *Anal Jard Bo. Madrid*. 56 (2):279–303.
- Benelli, G., Benvenuti, S., Scaramozzino, P.L. and Canale, A. (2017). Food for honeybees? Pollinators and seed set of *Anthyllis barba-jovis* L. (Fabaceae) in arid coastal areas of the Mediterranean basin. *Saudi Journal of Biological Sciences* 863.
- Bentham, G. & Hooker, J.D. (1865). *Genera Plantarum*. Vol. 1. Reeve. London.
- Bertsouklis, K. F. and Papafotiou, M. (2009). *In vitro* propagation of *Arbutus andrachne* L. *Acta Horticulturae*, 813: 477–480.
- Bertsouklis, K., and Papafotiou, M. (2010). Studies on propagation of *Globularia alypum* L., an outstanding xerophyte of Greece with potential ornamental use. *Acta Horticulturae*. 885: 73-77.
- Bertsouklis, K. F. and Papafotiou, M. (2013). Seed germination of *Arbutus unedo*, *A. andrachne* and their natural hybrid *A. x andrachnoides* in relation to temperature and period of storage. *HortScience*, 48: 347–351.
- Biondi E, Vagge I, Mossa L. (1997). On the phytosociological importance of *Anthyllis barba-jovis* L. *Colloq. Phytosociol.* XXVII: 95–104.
- Biondi, E., Vagge, I. and Mossa, L. (2000). On the phytosociological importance of *Anthyllis barba-jovis* L. *Colloq. Phytosociol.* XXVII: 95-104.
- Biondi, E. (2007). Thoughts on the ecology and syntaxonomy of some vegetation typologies of the Mediterranean coast. *Phytosociol.* 44 (1): 3-10.
- Blamey, M. and Wilson, C.W. (1993). *Mediterranean Wild Flowers*, p. 165-166. Pre-Press, London.
- Boratynski, A., Browicz, K., Zielinski J. (1992). *Chorology of trees and shrubs in Greece*. Polish Academy of Sciences, Institute of Dendrology, Sorus, Poznan / Kornik. pp. 286.
- Broussalis, P. (1977). The protection of the flora in Greece and its problems. *Ann. Mus. Goulandris*. 3: 23-30.
- de Candolle, A.P. (1825). *Prodromus Systematis Naturalis Regni Vegetabilis*. 2. Treufel et Würtz, Paris.
- Cardona, M.A., Contadriopoulos, J. and Sierra Ràfols, E. (1986). Étude biosystématique d' *Anthyllis hystrix* de Minorque et d' *A. hermanniae* de la Méditerranée orientale et central. *Orsis*2, 5-25.
- Côme, D. (1970). *Les Obstacles a la Germination*. Paris: Masson et Cie. Editeurs. pp. 162.
- Conti F, Manzi A, Pedrotti F. (1997). *Liste rosse regionali delle piante d'Italia*. WWF – S.B.I. Università di Camerino.
- Cooper, R.C. and Cambie, R.C. (1991). *New Zealand's economic native plants*. Oxford University Press.

- Cowling, R.M., Rundel, P.W., Lamont, B.B., Arroyo, M.K. and Arianoutsou, M. (1996). Plant diversity in Mediterranean climate regions, *Trends in ecology and evolution*, 11: 362-366.
- Cronquist, A. (1981). An intergrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York.
- Cullen J. (1968). Genus *Anthyllis*. In: Tutin et al., editors. *Flora europaea*. Cambridge: Cambridge University Press, vol. 2.
- Dafis, S., Papastergiadou, E., Georgiou, K., Mpampalonas, D., Georgiadis, T., Papageorgiou, M., Lazaridou, T. and Tsiaousi, V. (1997). Directive 92/43/EEC. The Greek "Habitat" Project Natura 2000: An Overview. Commission of the European 40. Communities DG XCI, The Goulandris Natural History Museum-Greek biotope/Wetland Centre.
- Dahlgren, G. (1989). "An updated angiosperm classification". *Botanical Journal of the Linnean Society*. 100 (3): 197–203.
- Danton Ph, Baffray M. (1995). *Inventaire des plantes prote'ge'es en France*. Nathan & A.F.C.E.V. Paris; Mulhouse.
- Demel, T. (1996). Germination ecology of twelve indigenous and eight exotic multipurpose leguminous species from Ethiopia. *Forest Ecology and Management* 80:209–223.
- Degtjareva GV, Valiejo-Roman CM, Samigullin TH, Guara-Requena M, Sokoloff DD. (2012). "Phylogenetics of *Anthyllis* (Leguminosae: Papilionoideae: Loteae): Partial incongruence between nuclear and plastid markers; A long branch problem and implications for morphological evolution". *Molecular Phylogenetics and Evolution*. 62: 693–707.
- Di Castri, F. (1981). Mediterranean-type shrublands of the world. In "Ecosystems of the World" (F. di Castri, DW Goodall, and RL Spech, eds), Vol. 11: 1-52. Elsevier, Amsterdam.
- Diekelmann, J. and Schuster, R.M. (2002). *Natural landscaping. Designing with native plant communities*. 2nd Edition. University of Wisconsin Press, Canada.
- Dimopoulos, P., Raus, T., Bergmeier, E., Constantinidis, T., Iatrou, G., Kokkini, S., Strid, A. and Tzanoudakis, D. (2013). *Vascular Plants of Greece, An annotated checklist*. Englera 31. Botanic Garden and Botanical Museum Berlin-Dahlem, Berlin and Hellenic Botanical Society, Athens.
- Dillen, W. and Buysens, S. (1988). A simple technique to overcome the vitrification in *Gypsophila paniculata* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 19: 181-188.
- Elliot, W.R., Jones, D.L. and Blake, T.L. (1980, 1997). *Encyclopedia of Australian plants suitable for cultivation*. Ten volumes. Lothian Publishing Co. Pty. Ltd., Melbourne.
- Farmer, R.E., Charrette, P., Searle, I.E., and Tarjan, D.P. (1984). Interaction of light, temperature, and chilling in the germination of black spruce. *Can. J. For. Res.* 14: 131-133.
- Fu, S.M., Hampton, J.G., Hill, M.J., Hill, K.A. (1996). Breaking hard seed of yellow and slender serradella (*Ornithopus compressus* and *O. pinnatus*) by sulphuric acid scarification. *Seed Science and Technology* 24: 1–6.

- Garzuglia, M. (2006). Threatened, Endangered and Vulnerable Tree Species: A Comparison between FRA 2005 and the IUCN Red List. Rome. Working Paper 108/E.
- Gavidia, I., Zaragoza, C., Segura, J. and Perez-Bermudez, P. (1997). Plant Regeneration from Juvenile and Adult *Anthyllis cytisoides*, a Multipurpose Leguminous Shrub. *J. Plant Physiol.* 150: 714-718.
- Greuter W, Burdet HM, Long G. (1989). Med-Checklist. Vol. 4. Conserv Jardin Bot Ville de Gene`ve.
- Hartmann, H.T., Rester, D., Davies, F.T.Jr. and Geneve, R.L. (1997). Plant propagation: principles and practices, 6th edn. Prentice Hall Int, Upper Saddle.
- Herranz JM, Ferrandis P, Martinez-Sanchez JJ. (1997). Influence of heat on seed germination of seven Mediterranean Leguminosae species. *Plant Ecol* 136: 95–103.
- Hume, L. (1984). The effect of seed maturity, storage on the soil surface, and burial on seeds of *Thlaspi arvense* L. *Can. J. Plant Sci.* 64: 961-969.
- Hyde, E. (1954). The function of the hilum in some Papilionaceae in relation to the ripening of the seed and the permeability of the testa. *Annals of Botany (London)*, 18: 241-256.
- Ibanez, A.N., Passera,. C.B. (1997). Factors affecting the germination of albaida (*Anthyllis cytisoides* L.), a forage legume of the Mediterranean coast. *Journal of Arid Environments* 35: 225–231.
- International Seed Testing Association (ISTA) (1999). International rules for seed testing. *Seed Sci. Technol.* 27 (suppl.): 333.
- Kartsonas, E. and Papafotiou, M. (2007). Mother plant age and seasonal influence on in vitro propagation of *Quercus euboica* Pap. , an endemic, rare and endangered oak species of Greece. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 90: 111–116.
- Kropf, M., Kadereit, J.W., Comes, H.P. (2002). Late Quaternary distributional stasis in the submediterranean mountain plant *Anthyllis montana* L. (Fabaceae) inferred from ITS sequences and amplified fragment length polymorphism markers. *Molecular Ecology* 11 (3): 447-463.
- Krüssmann, G. (1981). Die Baumschule. Paul Parey Verlag, 5. Auflage, Hamburg and Berlin.
- Lakon, G., (1949). The topographical tetrazolium method for determining the germination capacity of seeds. *Plant Physiol.* Jul; 24 (3): 389–394.
- Lassen, P. (1986). *Hymenocarpos cornicina*, *Hymenocarpos lotoides*, *Hymenocarpos hamosus*. In: Greuter, W. & Raus, Th. (eds.). Med-Checklist Notulae, 13. *Willdenowia* 16 (1): 112.
- Le-Houerou, H.N. (1981). Impact of man and his animals on Mediterranean vegetation. In: di Castri F, Goodall DW, Specht RL, eds. Mediterranean-type Shurblands. *Ecosystems of the World* 11, Elsevier Scientific. Publ., Amsterdam. 479-521.
- Linnaeus, C. (1753). *Species Plantarum*.T. 2. *Salvius, Holmiae*.
- Linnaeus, C. (1767). *Mantissa Plantarum*. *Salvius, Holmiae*.

- Liu, N.Y., Khatamian, H., Fretz, T.A. (1981). Seed coat structure of three woody legume species after chemical and physical treatments to increase seed germination. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 106: 691-694.
- Lopez, J.H., Aviles, R.B. (1988). The pre-treatment of seeds of four Chilean *Prosopis* to improve their germination response. *Seed Science and Technology* 16: 239-246.
- Macdonald, B. (2006). *Practical woody plant propagation for nursery growers*. Timber Press, Inc., Portland, Oregon, U.S.A.. pp. 669.
- Maloupa, E., Grigoriadou, K., Zervaki, D. and Papanastassi, K. (2005). Management of the Balkan native flora for sustainable floricultural commercial use. *Acta Horticulturae*, 683: 189-196.
- Maloupa, E., Grigoriadou, K., Zervaki, D. and Papanastassi, K. (2008). Conservation, propagation, development and utilization of xerophytic species of the native Greek flora towards commercial floriculture. *Acta Horticulturae*, 766: 205-214.
- Margaris, N.S. (1981). Adaptive strategies in plants dominating Mediterranean- type ecosystems. In: *Mediterranean type Shrublands* (di Castri, F., Goodal, D.W., Specht, R., Eds), Elsevier, the Netherlands pp.309-315.
- Martin, R.E., Miller, R.L., Cushwa, C.T. (1975). Germination response of legume seeds subjected to moist and dry heat. *Ecology* 56:1441-1445.
- Martini, A.N. and Papafotiou, M. (2013). Micropropagation as means for the conservation of the rare and endangered *Malosorbus florentina* Zucc. (Rosaceae). *Acta Horticulturae*, 990: 409-414.
- Martini, A. N. and Papafotiou, M. (2016). Micropropagation of *Limoniastrum monopetalum* L. *Acta Horticulturae*, 1113: 195-200.
- Martini, A. N., Papafotiou, M. and Majumder, D. A. N. (2016). Micropropagation of *Teucrium capitatum* L. *Acta Horticulturae*, 1113: 183-188. 1.
- Martini, A. N., Papafotiou, M. and Akoumianaki-Ioannidou, A. (2017). Vegetative propagation by stem cuttings and plant establishment of the Mediterranean aromatic and medicinal species *Teucrium capitatum* L. 6th International Conference on Landscape and Urban Horticulture, 20-25 June, 2016, Athens, Greece, abstract book p. 145, *Acta Horticulturae*, in press.
- McCown, B. H. and Lloyd, G. (1981). Woody plant medium (WPM) – a revised mineral formulation for micro-culture of woody plant species. *HortScience*, 16: 453.
- Metcalf, L. (2007). *The propagation of New Zealand native plants*. Revised edition. Godwit Publishing, New Zealand.
- Morbidoni, M., Estrelles, E., Soriano, P., Martinez-Solis, I. and Biondi, E. (2008). Effects of environmental factors on seed germination of *Anthyllis barba-jovis* L. *Plant Biosystem*, 142: 275-286.
- Motta, F. (1992). *Nel Mondo della Natura, Enciclopedia di Scienze Naturali*, vol. 1, F. Motta (Ed), Milano.

- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, 15: 473–497.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G. and Da Fonseca G.A.B. (2000). Kent J. Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature* 403: 853 – 858.
- Nanni L, Ferradini N, Taffetani F, Papa R. (2004). Molecular phylogeny of *Anthyllis* spp. *Plant Biology*, 6: 454–464.
- Nikolaeva, M.G. (1969). Physiology of deep dormancy in seeds. Izdatel'stvo "Nauka", Leningrad [Translated from Russian by Z. Shapiro, National Science Foundation, Washington, DC].
- Pandita, V.K., Nagarajan, S., Sharma, D. (1999). Reducing hard seededness in fenugreek by scarification technique. *Seed Science and Technology*, 27: 627–631.
- Papafotiou, M. and Stragas, J. (2009). Seed germination and *in vitro* propagation of *Dianthus fruticosus* L. *Acta Horticulturae*, 813: 481-484.
- Papafotiou, M. and A. Kalantzis, A., (2009). Studies on *in vitro* propagation of *Lithodora zahnii*. *Acta Horticulturae*, 813: 465-470.
- Papafotiou M. and Martini A.N. (2016). In Vitro Seed and Clonal Propagation of the Mediterranean Aromatic and Medicinal Plant *Teucrium capitatum*. *HortScience*, 51: 403-411.
- Papafotiou M., Martini A.N. and Vlachou G. (2016). In Vitro Propagation as a Means of Producing Native Plants for Use as Ornamentals in Archaeological Sites of Greece. 6th International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants, 19-24 April 2015, Sanremo, Italy, *Acta Horticulturae*, in press.
- Papafotiou, M., Majumder, D. A. N., Martini, A. N. and Bertsouklis, K. F. (2016). Micropropagation of *Atriplex halimus* L. *Acta Horticulturae*, 1113: 207-210.
- Paradis, G. (1997). Observations sur l'espèce rare et protégée *Anthyllis barba-jovis* L. (Fabaceae) en Corse: description de ses stations et phytosociologie. *Journal de Botanique Soc. Bot. France*, 4: 33-44
- Pignatti, S. (1982). *Flora d' Italia*. vol. 1. (Bologna, Italy: Edagricole-Edizioni Agricole de II Sole 24 ORE Edagricole S.r.l.), pp. 750.
- Pistelli, L., Noccioli, C., Bertoli, A., Scapecchi, G. and Potenza, D. (2007). Chemical composition and volatile constituents of *Anthyllis barba-jovis*. *Nat. Prod. Res.* 21 (5): 418-425.
- Prieto, J., Estrelles, E., Ibars, A.M. (2004). *Anthyllis lagascana*: from seed to adult plant. Ex situ conservation and introduction experiences. Proceedings 4th European Conference on the Conservation of Wild Plants, *Planta Europa* 2004.
- Polhill, R.M. (1981). Loteae, Coronilleae. In: Polhill, R.M., Raven, P.H. (Eds.), *Advances in Legume Systematics* 1. Royal Botanic Gardens, Kew, pp. 371-375.
- Polunin, O. (1980). *Flowers of Greece and the Balkans: a field guide*, p. 354-355. Oxford, Oxford University Press.

- Poulsen, K. (1996). Case study: Neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) seed research. In: Proceeding of an international workshop on improved methods for handling and storage of intermedia/recalcitrant tropical forest tree seeds (Ed.: A.S. Ouedraogos). June 8-10, Humlebak, Denmark, pp. 14-22.
- Rohmeder, E. (1972). Das Saatgut in der Forstwirtschaft. Paul Parey Verlag, Hamburg and Berlin.
- Romano, A., Barros, S. and Martins-Loução, M.A. (2002). Micropropagation of the Mediterranean tree *Ceratonia siliqua*. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 68, 35-41.
- Rose, R., Chachulski, C.E.C. and Haase, D.L. (1998). Propagation of Pacific Northwest native plants. Oregon State University Press, Oregon.
- Rundel, P.W. (2007). Mediterranean-Climate Ecosystems. Encyclopedia of Biodiversity. Elsevier.
- Sacheti, U., Al-Rawahy, S.H. (1998). The effects of various pretreatments on the germination of important leguminous shrub-tree species of the Sultanate of Oman. Seed Science and Technology, 26: 691–699.
- Saint-Martin M. (1986). Micromorphologie tegumentaire des graines de Papilionaceae. Bull Soc Bot Fr 133. Lettrs Bot., (2): 137–153.
- Šatovič, Z. (2004). Legal protection, conservation and cultivation of medicinal and aromatic plants in Croatia. In: Report of Working Group on Medicinal and Aromatic Plants. 1st Meeting. 12-14 September 2002. Gozd Martuljek, Slovenia. International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy, 34–38.
- Schenk, R.U. and Hildebrandt, A.C. (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Canadian Journal of Botany, 50: 199-204.
- Sokoloff, D.D. (2003a). On system and phylogeny of the tribe Loteae DC. (Leguminosae). Bulletin of Moscow Society of Naturalists, Biological Series 108 (3): 35-48. (In Russian).
- Southon, I.W. (1994). Phytochemical Dictionary of the Leguminosae, vol. 1. Chapman & Hall, London.
- Strid, A. (1980). Φυτά του Ολύμπου. Μουσείο Γουλανδρή Φυσικής Ιστορίας, Κηφισιά-Αθήνα.
- Strid, A. and Tan K. (1992). Flora Hellenica and the threatened plants of Greece. Opera Bot. 113: 55-67.
- Tan, K. and Strid, A. (2009). Ελληνικά Αγριολούλουδα. Μουσείο Γουλανδρή Φυσικής Ιστορίας, Κηφισιά-Αθήνα.
- Taiz, L. and Zeiger, E. (2006). Plant physiology. Fourth edition. Sinauer Associates, Inc., USA, 509-539.
- Takos, I.A. and Efthimiou, G.SP. (2003). Germination results on dormant seeds of fifteen tree species autumn sown in a northern Greek nursery, Silvae Genetica, 52: 67-70.

- Taubert, P. (1894). Leguminosea. In: Engler, A. Prantl, K. Die natürlichen Pflanzenfamilien 3: W. Engelmann, Leipzig, pp. 70-385.
- Taylorson, R.B. and Hendricks, S.B. (1977). Dormancy in seeds. Annual Review of Plant Physiology (USA), 28: 331-354.
- Tinsley, M.J., Simmons, M.T and Windhager, S. (2006). The establishment success of native versus non-native herbaceous seed mixes on a revegetated roadside in Central Texas. Ecological Engineering, 26: 231-240.
- Thanos, C.A., Georghiou, K., Kadis, C., Pantazi, C. (1992). Cistaceae: a plant family with hard seeds. Israel Journal of Botany 41: 251–263.
- Thanos, C.A. and Doussi, M.A. (1995). Ecophysiology of seed germination in endemic labiates of Crete. Israel Journal of Plant Sciences, 43: 227-237.
- Thanos, C.A, Kadis, C.C. and Skarou, F. (1995). Ecophysiology of germination in the aromatic plants thyme, savory and oregano (Labiatae). Seed Science Research, 5: 161-170.
- Toole, E.H., and Toole, V.K. (1941). Progress of germination of seed of *Digitaria* as influenced by germination temperature and other factors. J. Agric. Res. 63: 65-90.
- Trinajstic, L. (1994). *Anthyllis barba-jovis* L. In: Sugar I., editor. Crvena knjiga biljnih vrsta Republike Hrvatske, pp. 21-23. Ministarstvo graditeljstva i zaštite okoliša, Zavod za zaštitu prirode, Zagreb.
- Tutin, G.T., Heywood, V., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M., and Webb, D.A. (1972). Flora Europaea, vol. 4. (Cambridge, UK: Cambridge University Press).
- Vlachou, G., Papafotiou, M. and Bertsoyklis, K. F. (2016). Studies on in vitro propagation of *Anthyllis barba-jovis* L. 6th International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants, 19-24 April 2015, San Remo, Italy, Acta Horticulturae, in press.
- Vlachou, G., Papafotiou, M. and Bertsoyklis, K. F. (2017). The effect of cytokinin type and concentration on micropropagation of *Calamintha cretica* L. 6th International Conference on Landscape and Urban Horticulture, 20-25 June, 2016, Athens, Greece, abstract book p. 150, Acta Horticulturae, in press.
- Walter, H. (1979). Vegetation of the Earth and Ecological Systems of the Geo-biosphere, 2nd Ed. Translated from the third, revised German edition by Joy Wieser. Springer-Verlag, Berlin.
- White, J. (1908). The occurrence of an impermeable cuticle on the exterior of certain seeds. Proceedings of the Royal Society of Victoria (Canada), 21: 203-210.
- Wolf, H. and Kamondo, B. (1993). Seed presowing treatment. In: Tree seeds handbook of Kenya (Ed.: J. Albrecht), Kenya Forestry Research Institute, Nairobi, pp. 55-62.
- Yakovlev, G.P., Sytin, A.K. and Roskov, Yu.R. (1996). Legumes of Northern Eurasia, a checklist. The Trustees of The Royal Botanic Gardens, Kew.

- Ziv, M. 1986. In vitro hardening and acclimatization of tissue culture plants. In: Withers AW, Alderson PG (Eds) Plant Tissue Culture and Its Agricultural Applications Butterworth, London. pp. 187-196.
- Αθανασιάδης, Ν.Η. (1986). Δασική Φυτοκοινωνιολογία. Εκδ. Γιαχούδη- Γιαπούλη. Θεσσαλονίκη. σελ. 119.
- Καββάδας Σ. Δ. (1956). Εικονογραφημένον Βοτανικόν-Φυτολογικόν Λεξικόν. Αθήνα, τόμ. Β., σελ. 532-533.
- Μαρτίνη Α.Ν. και Παπαφωτίου Μ. (2016). Επίδραση της φυσιολογίας του εκφύτου και των φυτορρυθμιστικών ουσιών στον *in vitro* πολλαπλασιασμό της *Anthyllis hermanniae* L. Πρακτικά Ελληνικής Εταιρείας της Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών, 27^ο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο, 28 Σεπτ.-1 Οκτ. 2015, Βόλος, τόμος 17(β): 209-214.
- Πιπινής, Η., Ασλανίδου, Μ., Μήλιος, Η., Γκιουμουσίδης, Χ., Καρακωστα, Χ. (2000). Μελέτη της φυτρωτικότητας τριών ψυχανθών ειδών: *Calycotome villosa* (Poir.) Link., *Spartium junceum* L. και *Medicago arborea* L. Επ. Επ. Σχ. Δασολογίας και Φυσικού Περι/ντος Α.Π.Θ. Τόμος ΜΓ: 254-263.
- Πιπινής, Η., Μήλιος, Η. (2009). Επίδραση προμεταχειρίσεων στη φύτευση σπόρων των ειδών *Albizia julibrissin* Durazz. και *Robinia pseudoacacia* L.. Επ. Επ. Τμήμ. Δασολογίας και Διαχείρισης Περιβάλλοντος και Φυσικών Πόρων Δ.Π.Θ. Τόμος 2^ο: 69-82.
- Σφήκας, Γ. (1974). Αγριολούλουδα του Ολύμπου. Εκδόσεις Τολίδη. Αθήνα.
- Φοίτος, Δ., Κωνσταντινίδης, Θ. Και Καμάρη Γ. (2009). Βιβλίο Ερυθρών Δεδομένων των Σπάνιων και Απειλούμενων Φυτών της Ελλάδας. Τόμος Πρώτος, Α-Δ. Ελληνική Βοτανική Εταιρεία.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ I

Διαγραμματική απεικόνιση της *in vitro* βλαστικότητας των σπόρων της *A. barba - jovis* L., ηλικίας 0, 12 και 24 μηνών.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ II

Διαγραμματική απεικόνιση των αρχικών καλλιεργειών, των υποκαλλιεργειών και της ριζοβολίας της *A. barba - jovis* L., από σπορόφυτα.

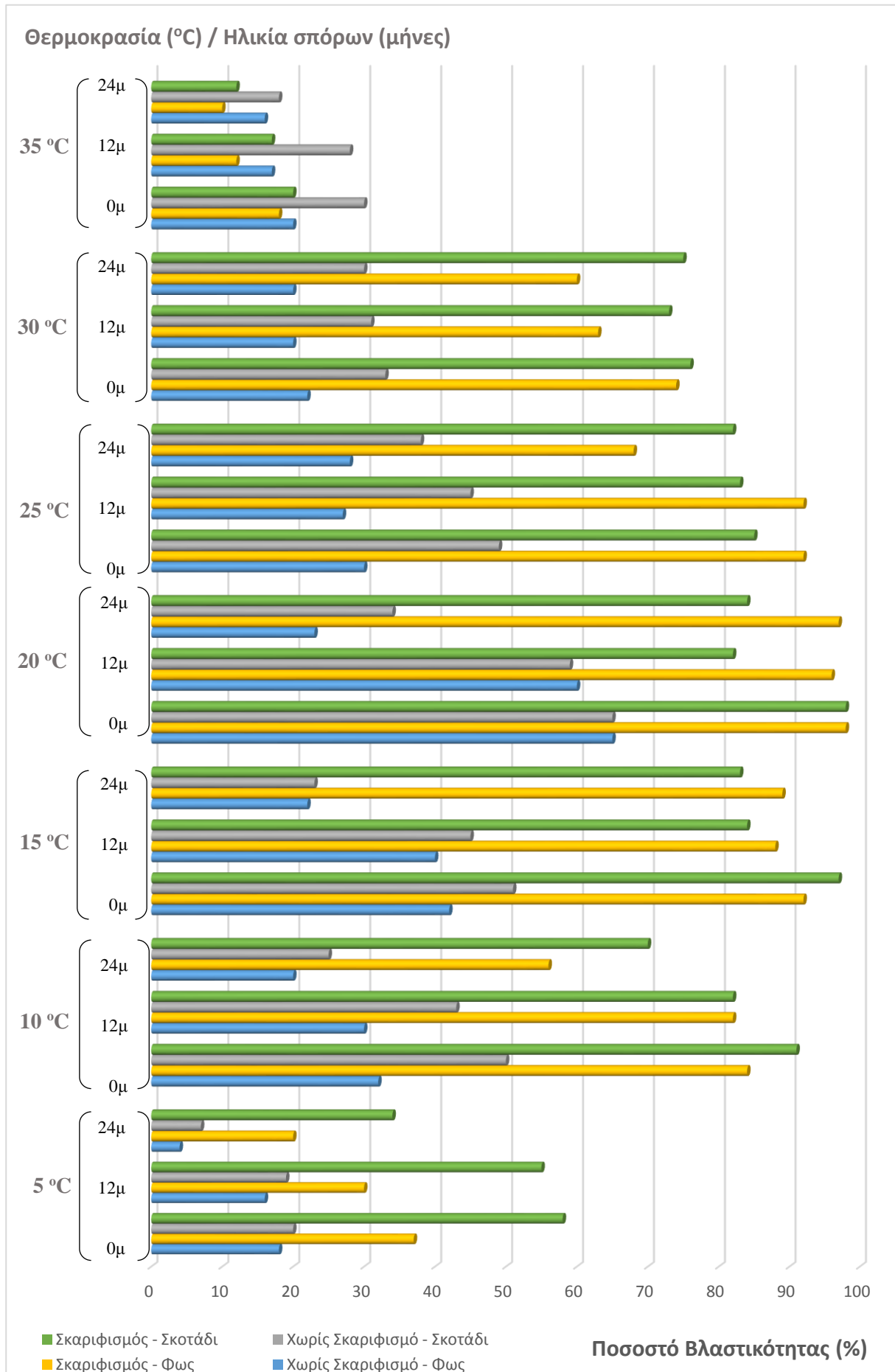
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ III

Διαγραμματική απεικόνιση των αρχικών καλλιεργειών, των υποκαλλιεργειών και της ριζοβολίας της *A. barba - jovis* L., από νεαρά φυτά, ηλικίας δυο ετών.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV

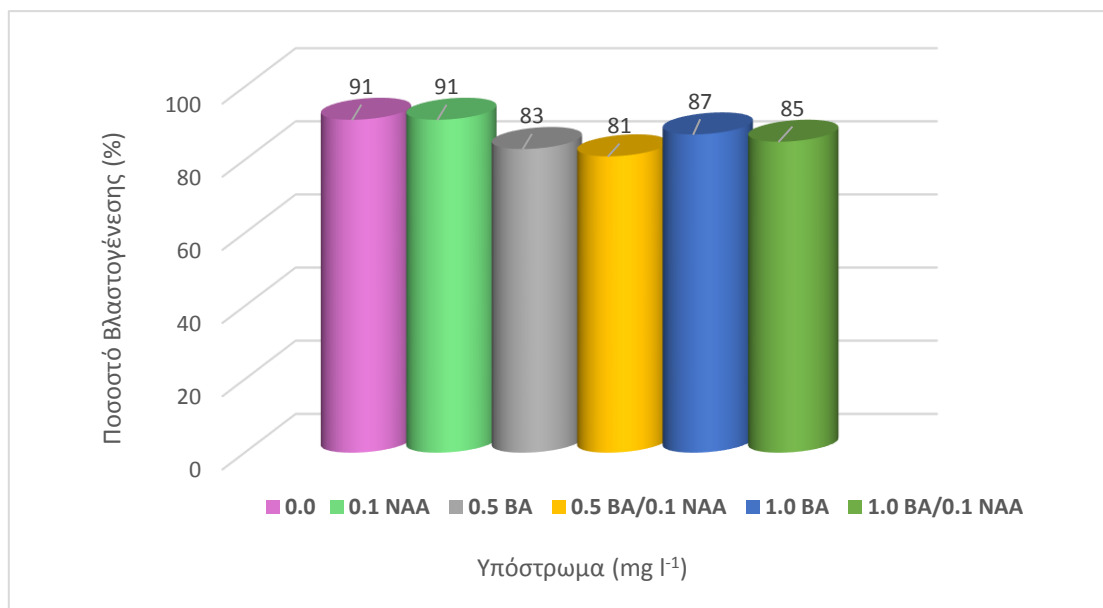
Δημοσιεύσεις που προήλθαν από την παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ Ι



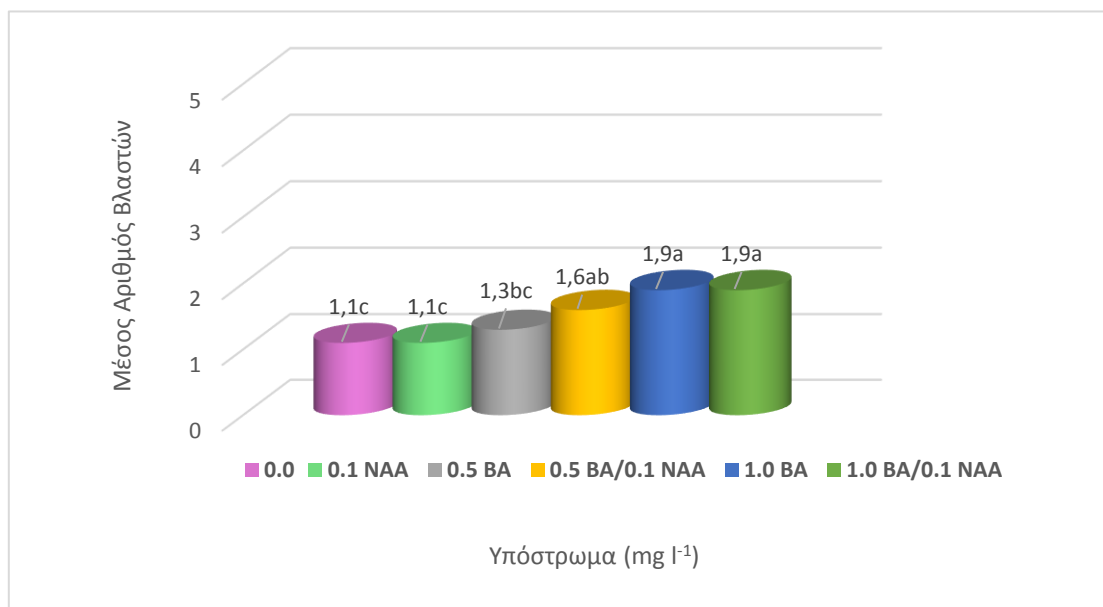
Σχ. 1. Σύγκριση *in vitro* βλαστικότητας σπόρων *A. barba-jovis*, 0, 12 και 24 μήνες μετά τη συλλογή τους, σε φως και σκοτάδι, στους 5, 10, 15, 20, 25, 30 ή 35 °C, με ή χωρίς προμεταχείριση μηχανικού σκαριφισμού.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙ



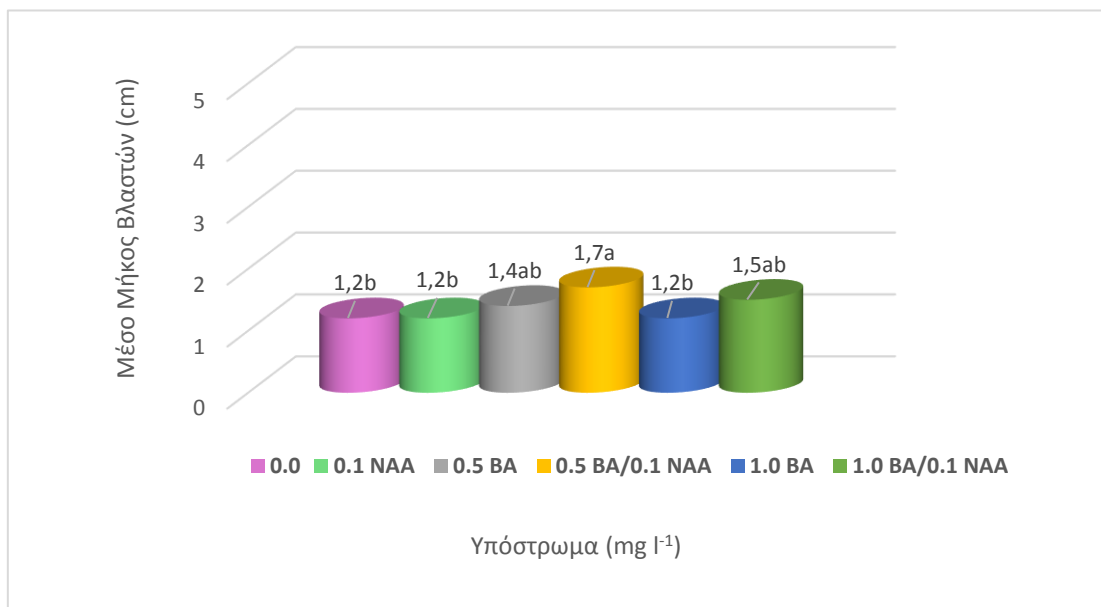
Σχ. 2. Βλαστογένεση (%) μη υπερενυδατωμένων βλαστών μαζί με υπερενυδατωμένους βλαστούς πάνω στο ίδιο έκφυτο, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS, εμπλουτισμένο με NAA (0,1 mg l⁻¹) ή BA (0,5 ή 1,0 mg l⁻¹) με ή χωρίς την προσθήκη NAA ή χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, από έκφυτα κοτυληδικού κόμβου από σπορόφυτα *A. barba-jovis* L., στο στάδιο της αρχικής εγκατάστασης *in vitro* καλλιέργειας.

Σύγκριση μέσων με Student's t σε $P \leq 0,05$, n=39-48.

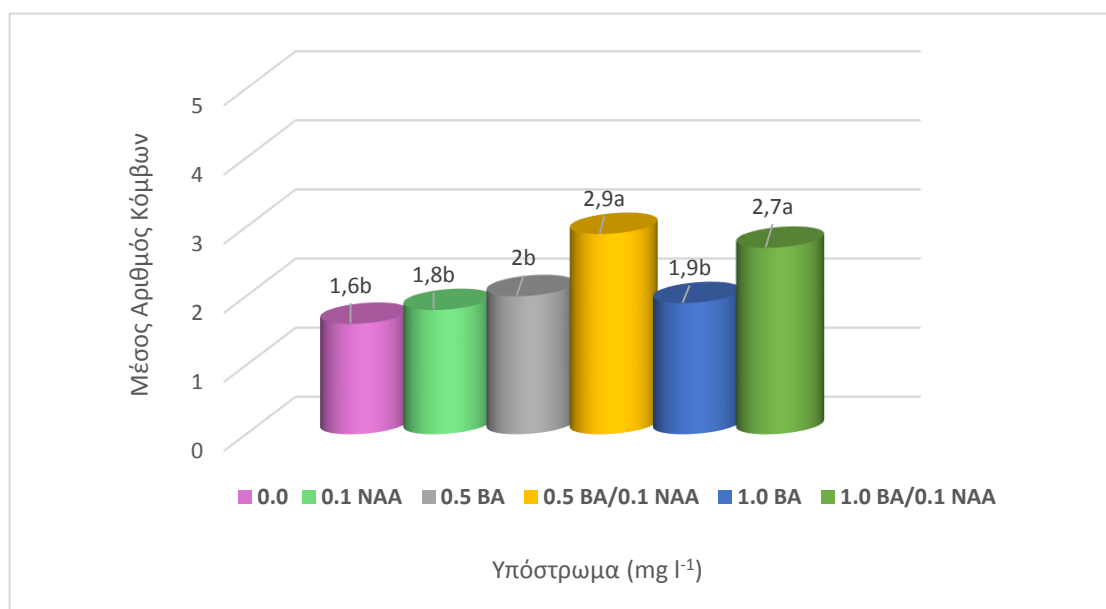


Σχ. 3. Μέσος αριθμός βλαστών, μη υπερενυδατωμένων, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS, εμπλουτισμένο με NAA (0,1 mg l⁻¹) ή BA (0,5 ή 1,0 mg l⁻¹) με ή χωρίς την προσθήκη NAA ή χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, από έκφυτα κοτυληδικού κόμβου από σπορόφυτα *A. barba-jovis* L., στο στάδιο της αρχικής εγκατάστασης *in vitro* καλλιέργειας.

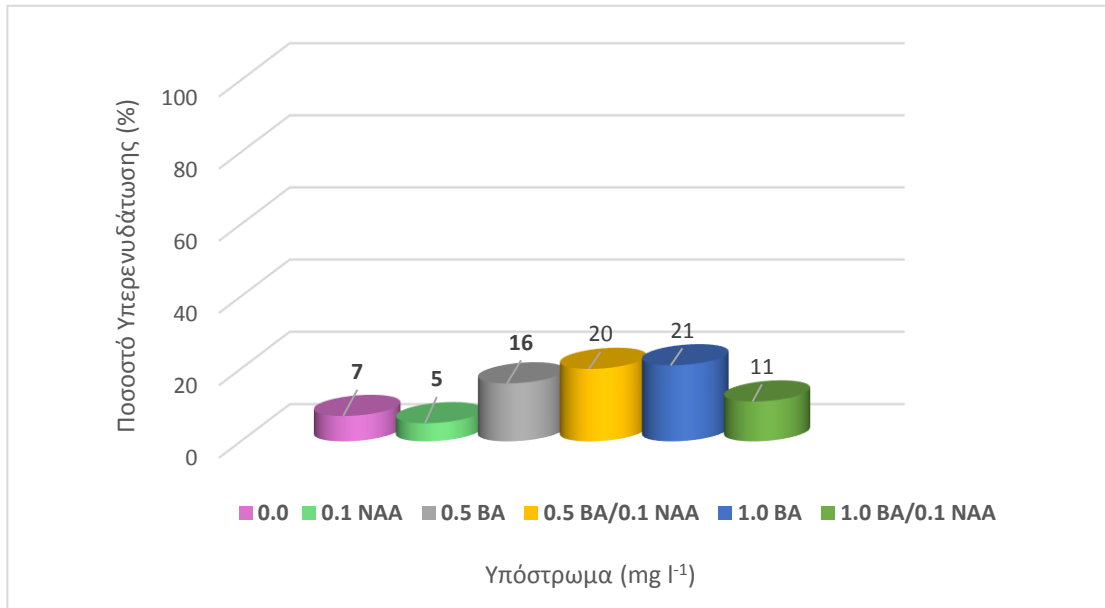
Σύγκριση μέσων με Student's t σε $P \leq 0,05$, n=39-48.



Σχ. 4. Μέσο μήκος βλαστών (cm), μη υπερενυδατωμένων, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS, εμπλουτισμένο με NAA (0,1 mg l⁻¹) ή BA (0,5 ή 1,0 mg l⁻¹) με ή χωρίς την προσθήκη NAA ή χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, από έκφυτα κοτυληδικού κόμβου από σπορόφυτα *A. barba-jovis* L., στο στάδιο της αρχικής εγκατάστασης *in vitro* καλλιέργειας. Σύγκριση μέσων με Student's t σε $P \leq 0,05$, n=39-48.

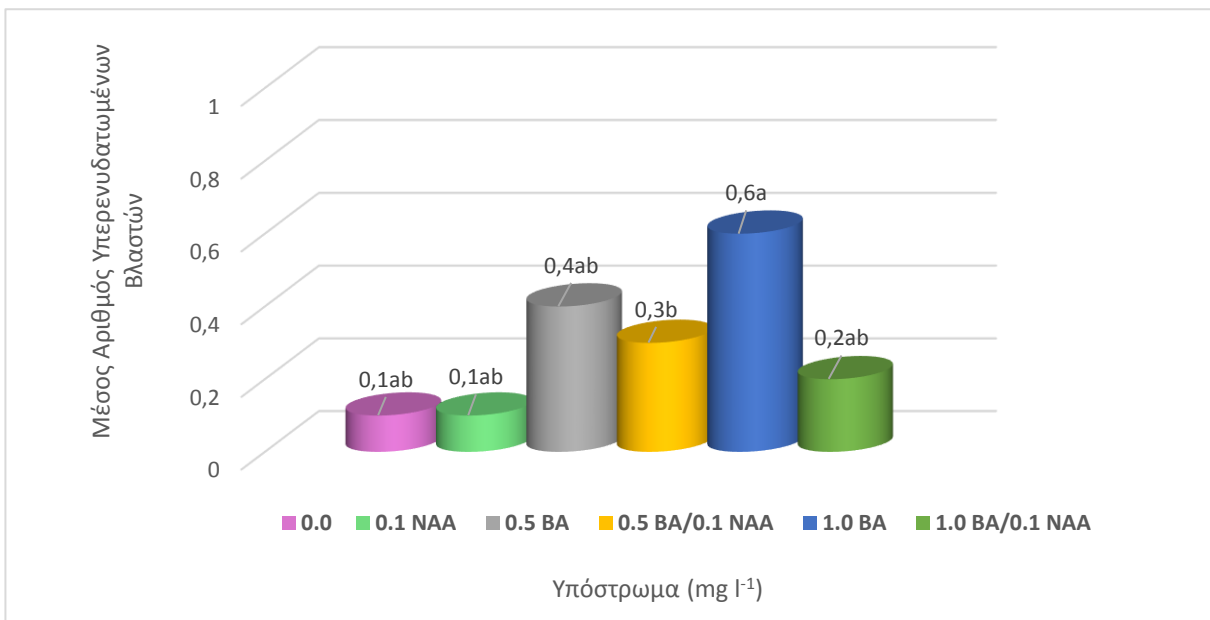


Σχ. 5. Μέσος αριθμός κόμβων, μη υπερενυδατωμένων, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS, εμπλουτισμένο με NAA (0,1 mg l⁻¹) ή BA (0,5 ή 1,0 mg l⁻¹) με ή χωρίς την προσθήκη NAA ή χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, από έκφυτα κοτυληδικού κόμβου από σπορόφυτα *A. barba-jovis* L., στο στάδιο της αρχικής εγκατάστασης *in vitro* καλλιέργειας. Σύγκριση μέσων με Student's t σε $P \leq 0,05$, n=39-48.



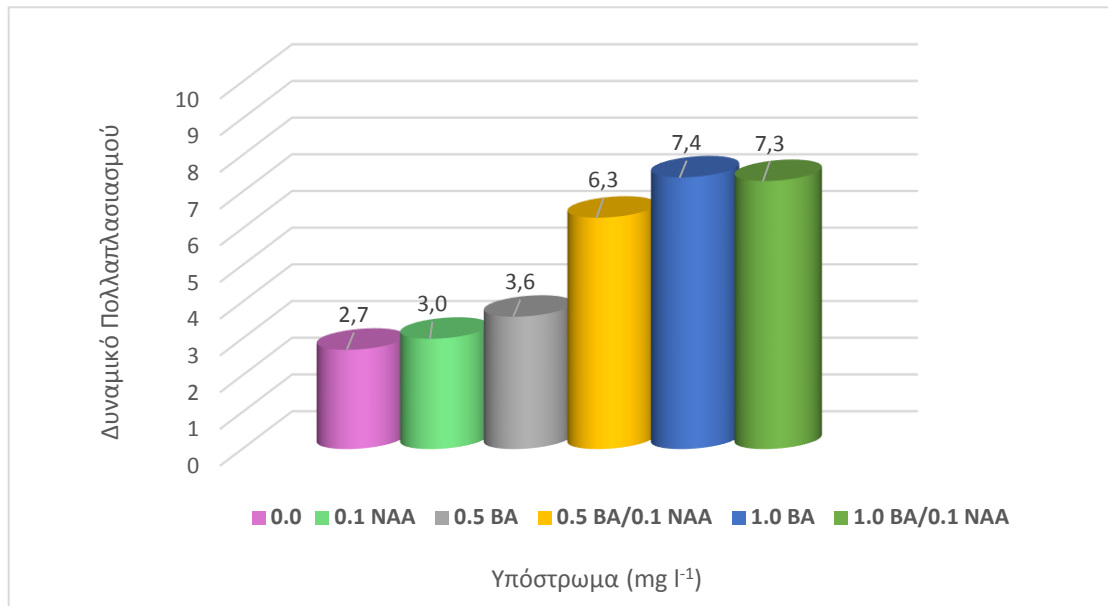
Σχ. 6. Υπερενυδάτωση (%), πλήρως υπερενυδατωμένων εκφύτων μαζί με μεικτά έκφυτα, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS, εμπλουτισμένο με NAA (0,1 mg l⁻¹) ή BA (0,5 ή 1,0 mg l⁻¹) με ή χωρίς την προσθήκη NAA ή χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, από έκφυτα κοτυληδικού κόμβου από σπορόφυτα *A. barba-jovis* L., στο στάδιο της αρχικής εγκατάστασης *in vitro* καλλιέργειας.

Σύγκριση μέσων με Student's t σε $P \leq 0,05$, n=39-48.



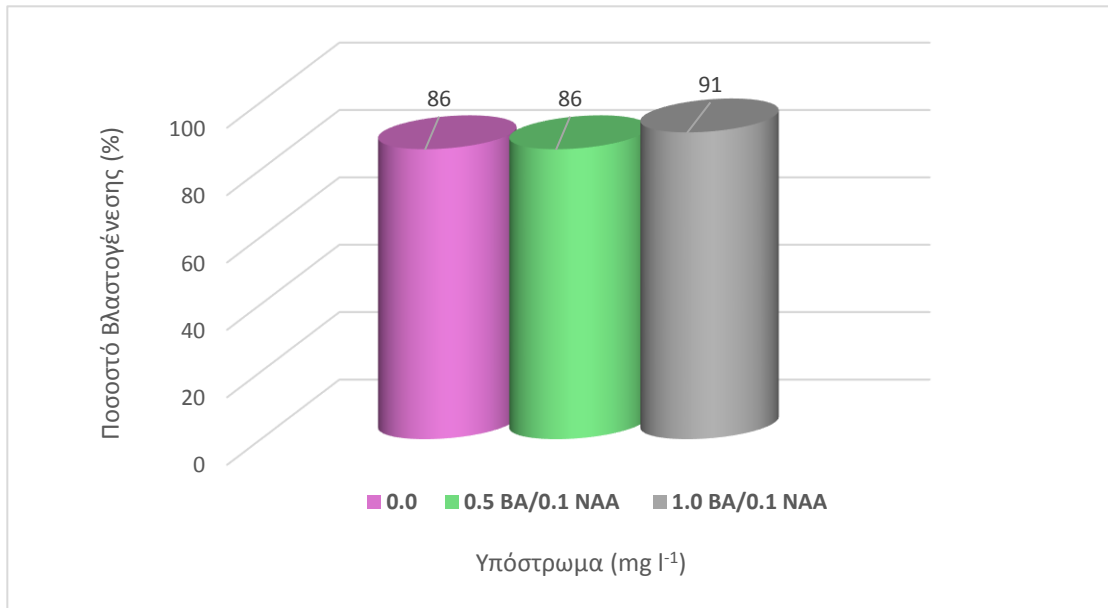
Σχ. 7. Μέσος αριθμός υπερενυδατωμένων βλαστών, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS, εμπλουτισμένο με NAA (0,1 mg l⁻¹) ή BA (0,5 ή 1,0 mg l⁻¹) με ή χωρίς την προσθήκη NAA ή χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, από έκφυτα κοτυληδικού κόμβου από σπορόφυτα *A. barba-jovis* L., στο στάδιο της αρχικής εγκατάστασης *in vitro* καλλιέργειας.

Σύγκριση μέσων με Student's t σε $P \leq 0,05$, n=39-48.

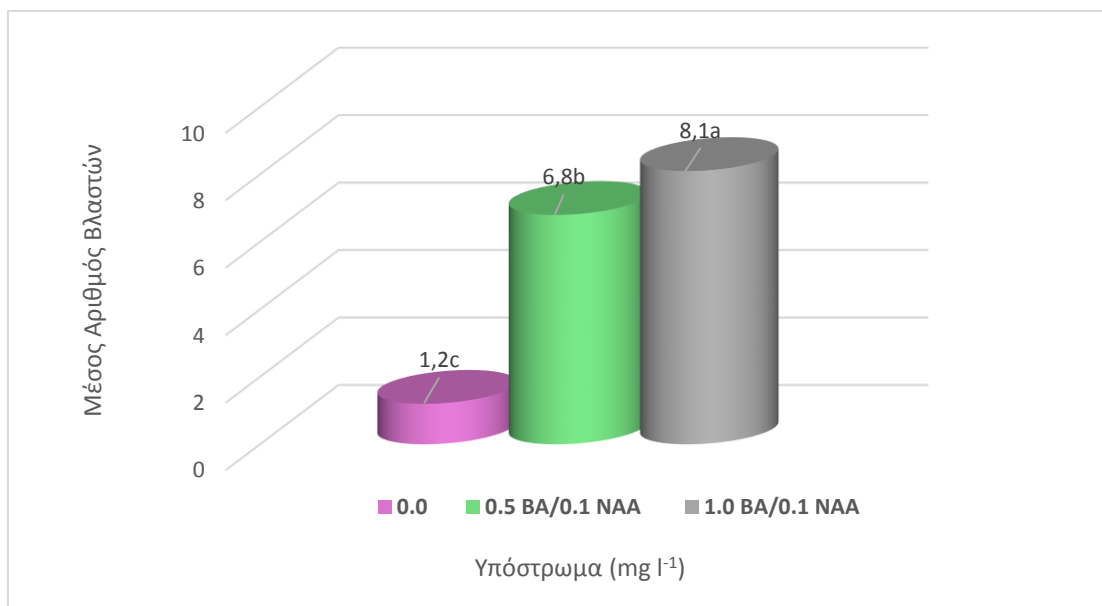


Σχ. 8. Δυναμικό πολλαπλασιασμού της *A. barba-jovis* L, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS, εμπλουτισμένο με NAA (0,1 mg l⁻¹) ή BA (0,5 ή 1,0 mg l⁻¹) με ή χωρίς την προσθήκη NAA ή χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, από έκφυτα κοτυληδικού κόμβου, στο στάδιο της αρχικής εγκατάστασης *in vitro* καλλιέργειας.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού=Βλαστογένεση(%) x Μέσος αριθμός βλαστών x Μέσο αριθμός κόμβων/0,6.

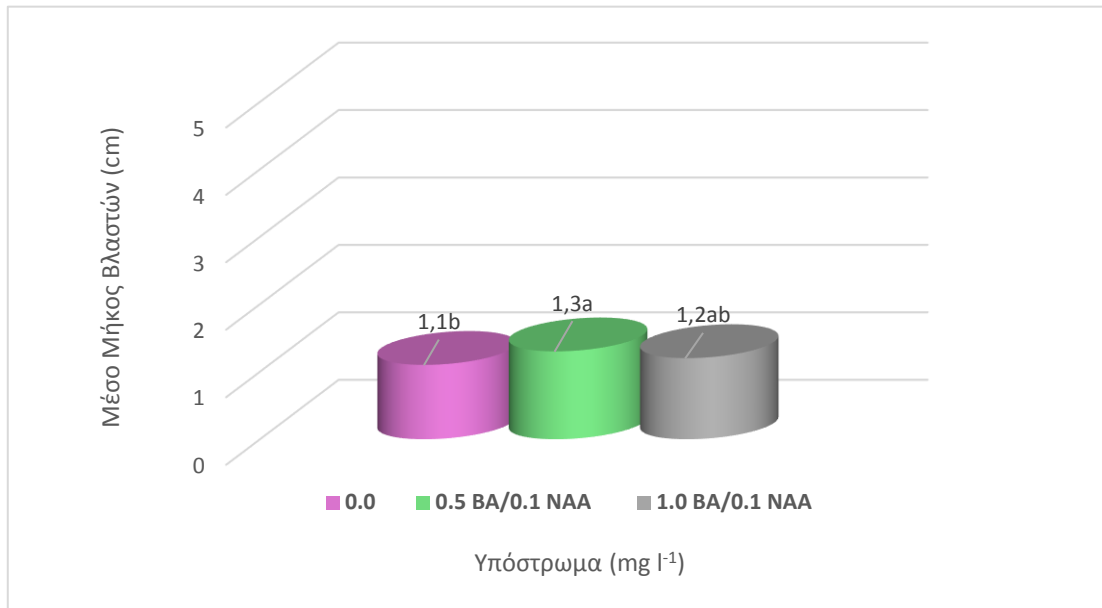


Σχ. 9. Βλαστογένεση (%) μη υπερενυδατωμένων βλαστών μαζί με υπερενυδατωμένους βλαστούς πάνω στο ίδιο έκφυτο, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS, εμπλουτισμένο με BA (0,5 ή 1,0 mg l⁻¹) σε συνδυασμό με NAA (0,1 mg l⁻¹) ή χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, από έκφυτα κοτυληδικού κόμβου από σπορόφυτα *A. barba-jovis* L., στο στάδιο της υποκαλλιέργειας. Σύγκριση μέσων με Student's t σε $P \leq 0,05$, n=153-223.



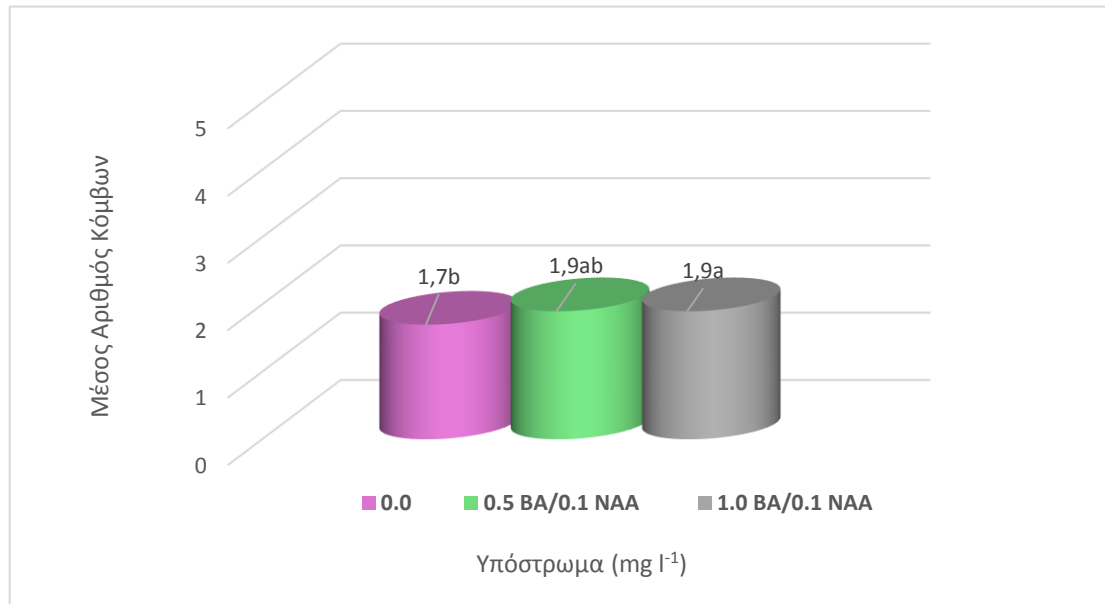
Σχ. 10. Μέσος αριθμός βλαστών, μη υπερενυδατωμένων, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS, εμπλουτισμένο με BA (0,5 ή 1,0 mg l⁻¹) σε συνδυασμό με NAA (0,1 mg l⁻¹) ή χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, από έκφυτα κοτυληδικού κόμβου από σπορόφυτα *A. barba-jovis* L., στο στάδιο της υποκαλλιέργειας.

Σύγκριση μέσων με Student's t σε $P \leq 0,05$, n=153-223.



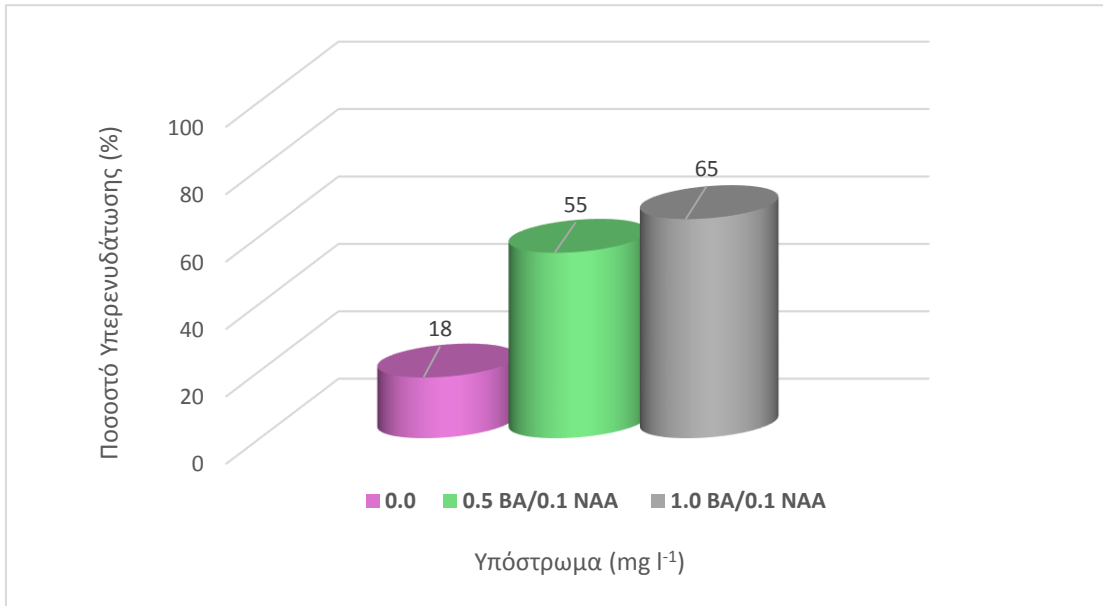
Σχ. 11. Μέσο μήκος βλαστών (cm), μη υπερενυδατωμένων, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS, εμπλουτισμένο με BA (0,5 ή 1,0 mg l⁻¹) σε συνδυασμό με NAA (0,1 mg l⁻¹) ή χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, από έκφυτα κοτυληδικού κόμβου από σπορόφυτα *A. barba-jovis* L., στο στάδιο της υποκαλλιέργειας.

Σύγκριση μέσων με Student's t σε $P \leq 0,05$, n=153-223.

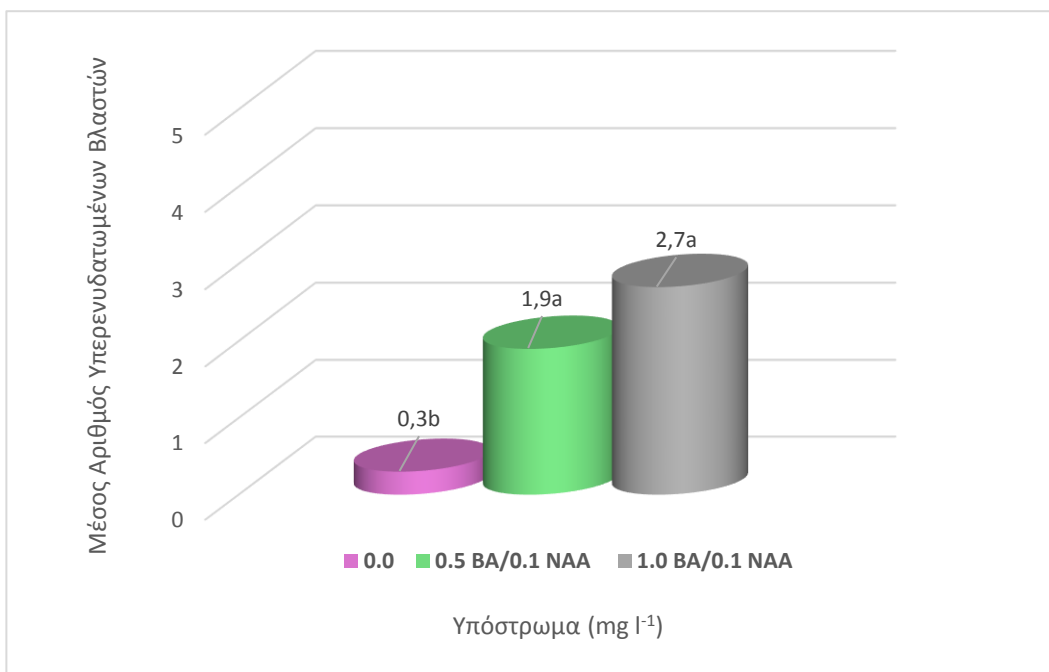


Σχ. 12. Μέσος αριθμός κόμβων, μη υπερενυδατωμένων, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS, εμπλουτισμένο με BA (0,5 ή 1,0 mg l⁻¹) σε συνδυασμό με NAA (0,1 mg l⁻¹) ή χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, από έκφυτα κοτυληδικού κόμβου από σπορόφυτα *A. barba-jovis* L., στο στάδιο της υποκαλλιέργειας.

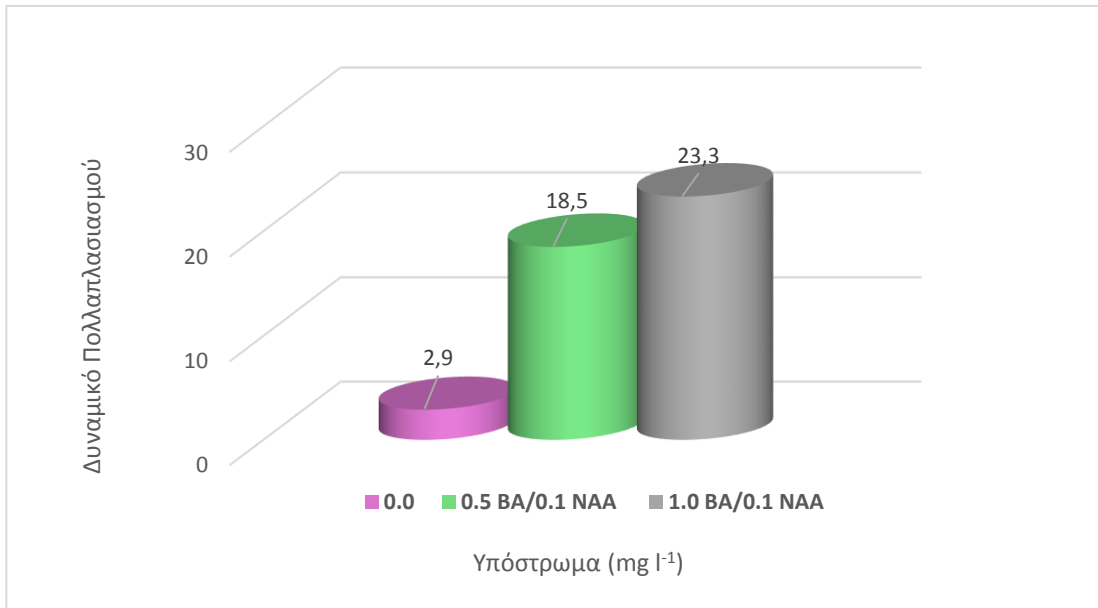
Σύγκριση μέσων με Student's t σε $P \leq 0,05$, n=153-223.



Σχ. 13. Υπερενυδάτωση (%), πλήρως υπερενυδατωμένων εκφύτων μαζί με μεικτά έκφυτα, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS, εμπλουτισμένο με BA (0,5 ή 1,0 mg l⁻¹) σε συνδυασμό με NAA (0,1 mg l⁻¹) ή χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, από έκφυτα κοτυληδικού κόμβου από σπορόφυτα *A. barba-jovis* L., στο στάδιο της υποκαλλιέργειας. Σύγκριση μέσων με Student's t σε $P \leq 0,05$, n=153-223.

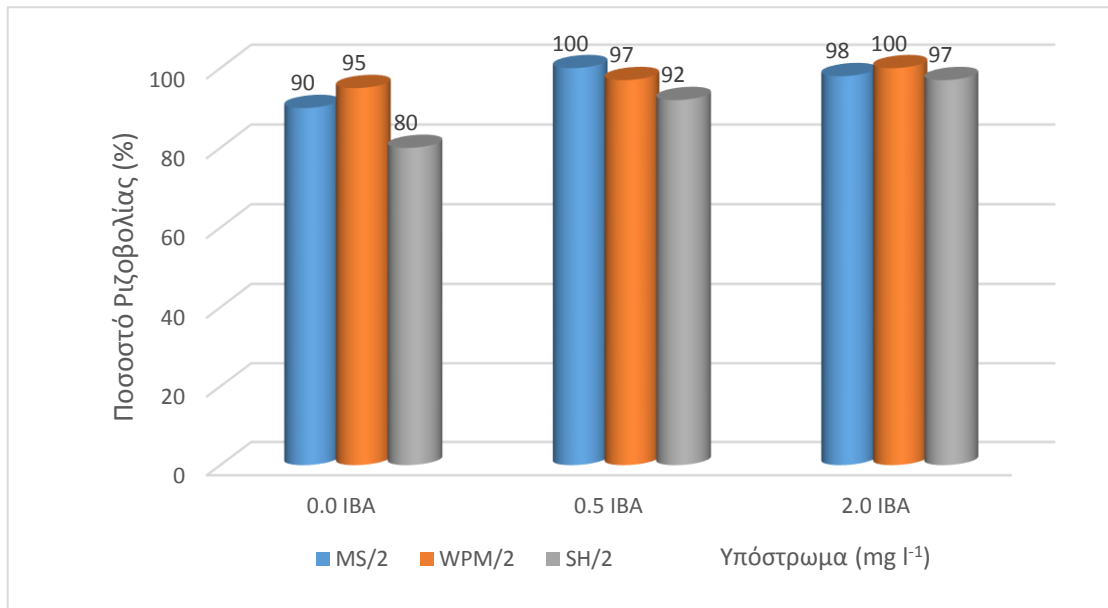


Σχ. 14. Μέσος αριθμός υπερενυδατωμένων βλαστών, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS, εμπλουτισμένο με BA (0,5 ή 1,0 mg l⁻¹) σε συνδυασμό με NAA (0,1 mg l⁻¹) ή χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, από έκφυτα κοτυληδικού κόμβου από σπορόφυτα *A. barba-jovis* L., στο στάδιο της υποκαλλιέργειας. Σύγκριση μέσων με Student's t σε $P \leq 0,05$, n=153-223.

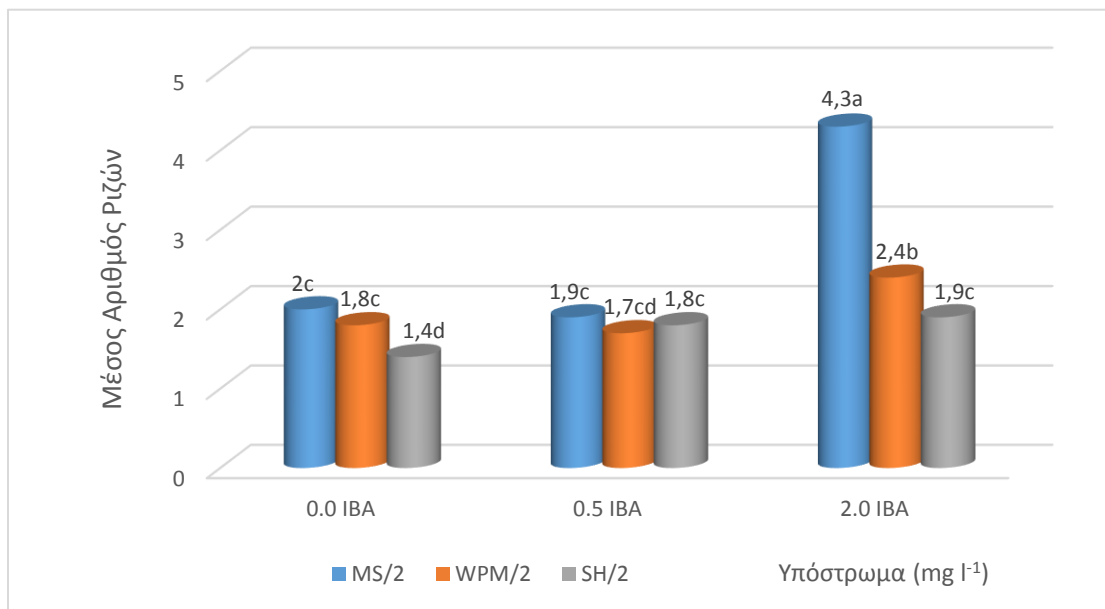


Σχ. 15. Δυναμικό πολλαπλασιασμού της *A. barba-jovis* L, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS, εμπλουτισμένο με BA (0,5 ή 1,0 mg l⁻¹) σε συνδυασμό με NAA (0,1 mg l⁻¹) ή χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, από έκφυτα κοτυληδικού κόμβου από σπορόφυτα *A. barba-jovis* L., στο στάδιο της υποκαλλιέργειας.

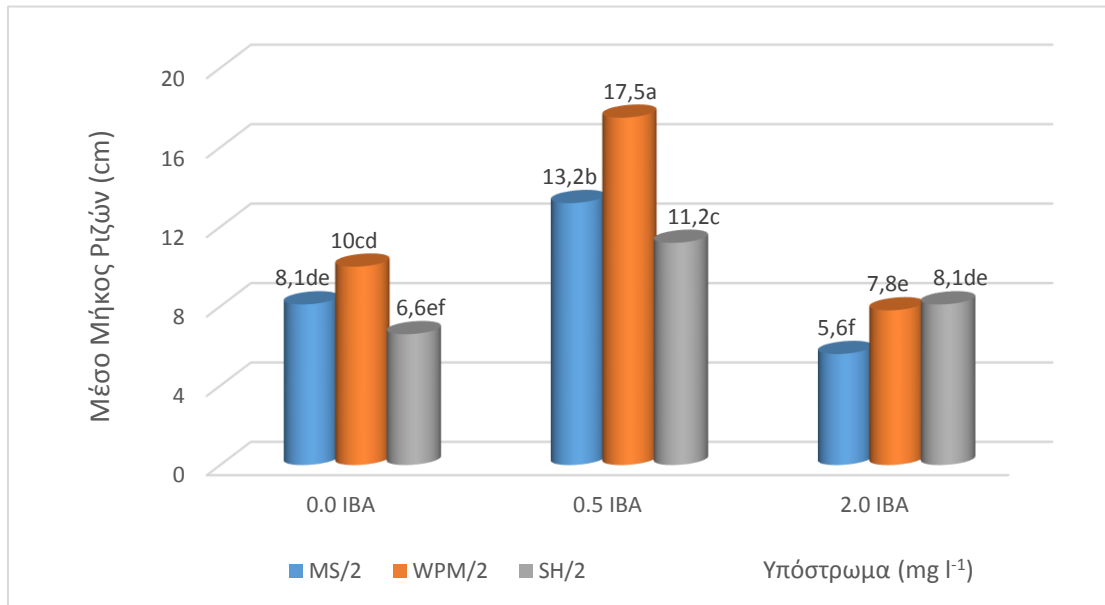
Δυναμικό πολλαπλασιασμού=Βλαστογένεση(%) x Μέσος αριθμός βλαστών x Μέσο αριθμός κόμβων/0,6.



Σχ. 16. Ριζοβολία (%) μικροβλαστών, σε θρεπτικά υποστρώματα ½ MS, ½ WPM και ½ SH, εμπλουτισμένα με IBA (0,5 ή 2,0 mg l⁻¹) ή χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, από έκφυτα κοτυληδικού κόμβου από σπορόφυτα *A. barba-jovis* L. Σύγκριση μέσων με Student's t σε $P \leq 0,05$, n=100.



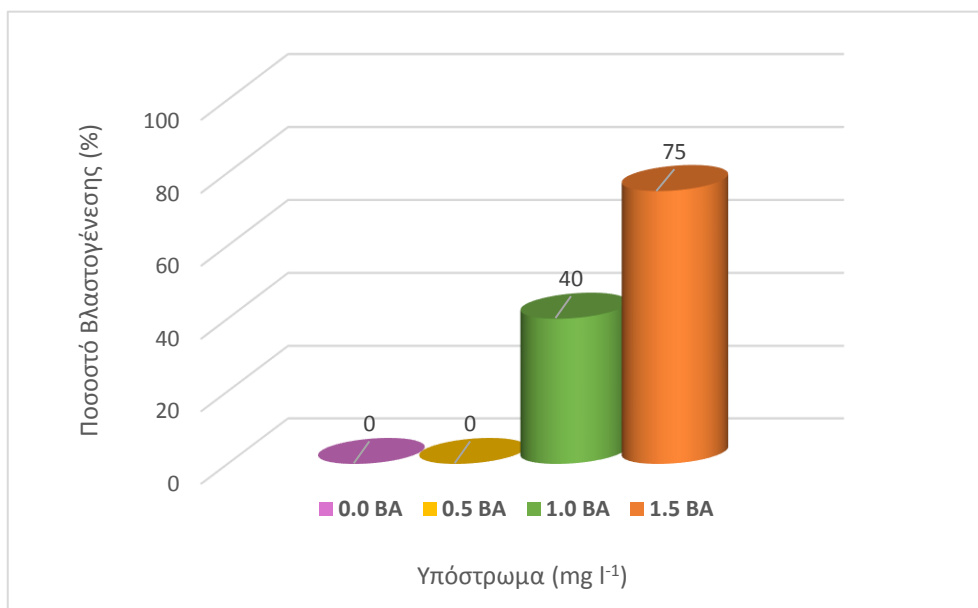
Σχ. 17. Μέσος αριθμός ριζών, μικροβλαστών σε θρεπτικά υποστρώματα ½ MS, ½ WPM και ½ SH, εμπλουτισμένα με IBA (0,5 ή 2,0 mg l⁻¹) ή χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, από έκφυτα κοτυληδικού κόμβου από σπορόφυτα *A. barba-jovis* L. Σύγκριση μέσων με Student's t σε $P \leq 0,05$, n=100.



Σχ. 18. Μέσο μήκος ριζών (cm), μικροβλαστών σε θρεπτικά υποστρώματα ½ MS, ½ WPM και ½ SH, εμπλουτισμένα με IBA (0,5 ή 2,0 mg l⁻¹) ή χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, από έκφυτα κοτυληδικού κόμβου από σπορόφυτα *A. barba-jovis* L.

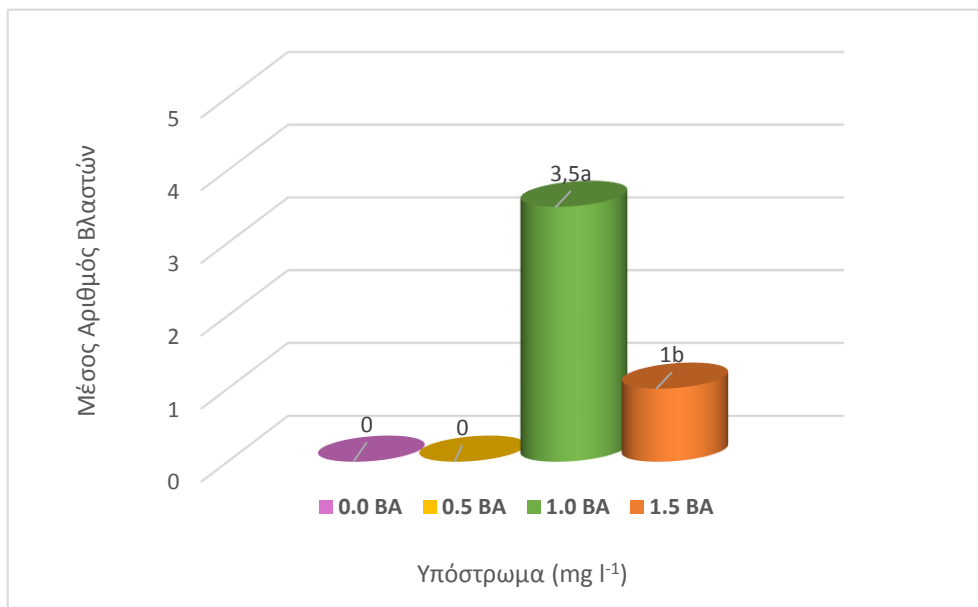
Σύγκριση μέσων με Student's t σε $P \leq 0,05$, n=100.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΙΙΙ



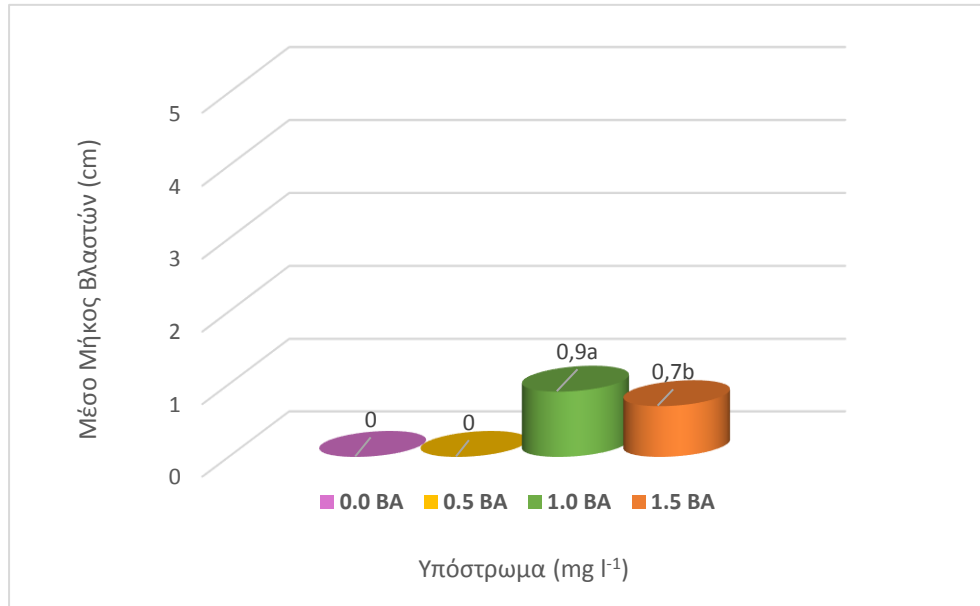
Σχ. 19. Βλαστογένεση (%) μη υπερενυδατωμένων βλαστών μαζί με υπερενυδατωμένους βλαστούς πάνω στο ίδιο έκφυτο, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS, εμπλουτισμένο με BA (0,5 ή 1,0 ή 1,5 mg l⁻¹) ή χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, από έκφυτα κόμβου από νεαρά φυτά *A. barba-jovis* L., στο στάδιο της αρχικής εγκατάστασης *in vitro* καλλιέργειας.

Σύγκριση μέσων με Student's t σε $P \leq 0,05$, n=9.

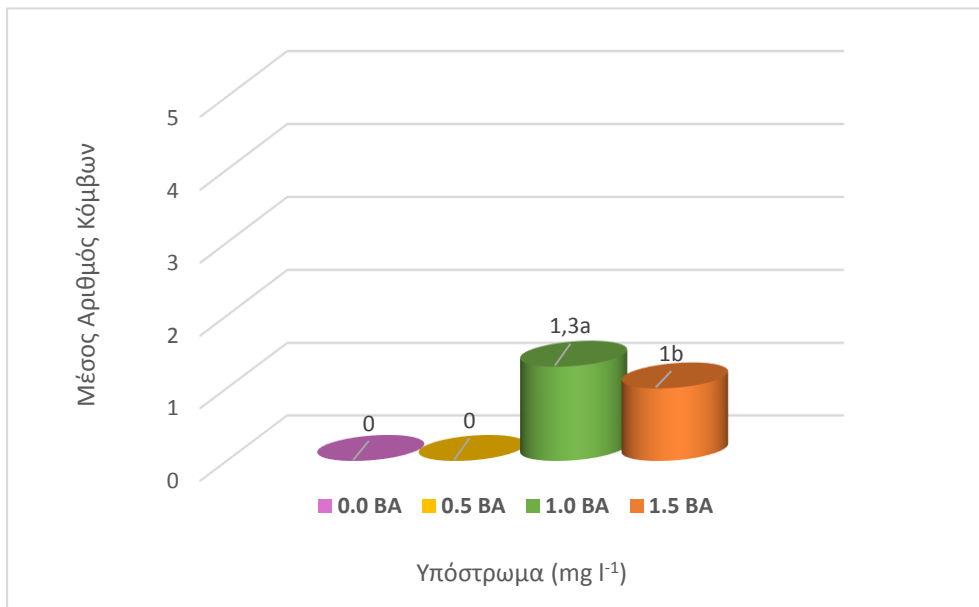


Σχ. 20. Μέσος αριθμός βλαστών, μη υπερενυδατωμένων, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS, εμπλουτισμένο με BA (0,5 ή 1,0 ή 1,5 mg l⁻¹) ή χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, από έκφυτα κόμβου από νεαρά φυτά *A. barba-jovis* L., στο στάδιο της αρχικής εγκατάστασης *in vitro* καλλιέργειας.

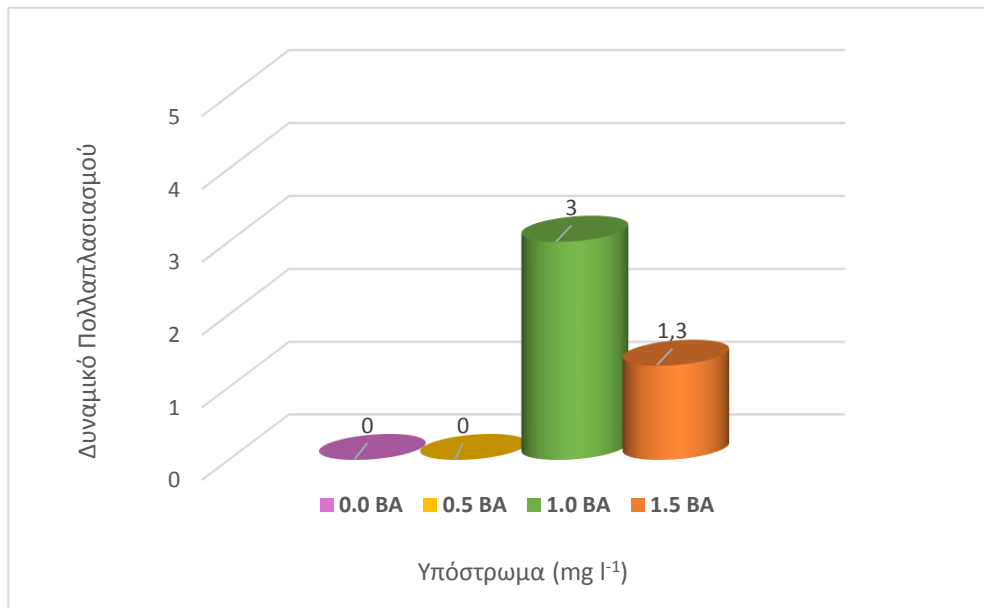
Σύγκριση μέσων με Student's t σε $P \leq 0,05$, n=9.



Σχ. 21. Μέσο μήκος βλαστών (cm), μη υπερενυδατωμένων, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS, εμπλουτισμένο με BA (0,5 ή 1,0 ή 1,5 mg l⁻¹) ή χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, από έκφυτα κόμβου από νεαρά φυτά *A. barba-jovis* L., στο στάδιο της αρχικής εγκατάστασης *in vitro* καλλιέργειας. Σύγκριση μέσων με Student's t σε $P \leq 0,05$, n=9.

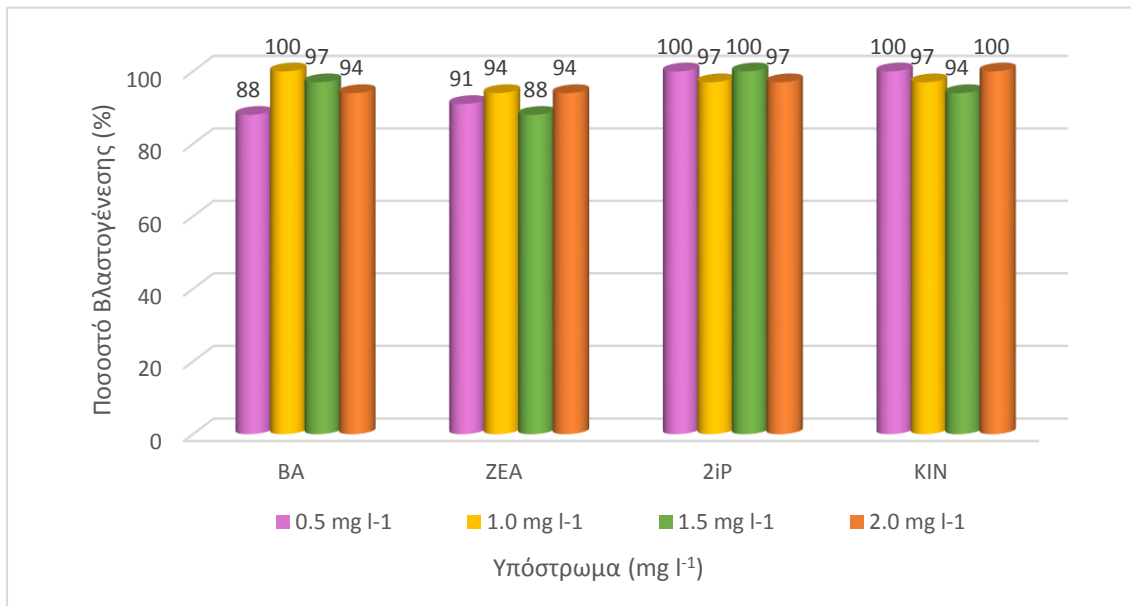


Σχ. 22. Μέσος αριθμός κόμβων, μη υπερενυδατωμένων, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS, εμπλουτισμένο με BA (0,5 ή 1,0 ή 1,5 mg l⁻¹) ή χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, από έκφυτα κόμβου από νεαρά φυτά *A. barba-jovis* L., στο στάδιο της αρχικής εγκατάστασης *in vitro* καλλιέργειας. Σύγκριση μέσων με Student's t σε $P \leq 0,05$, n=9.

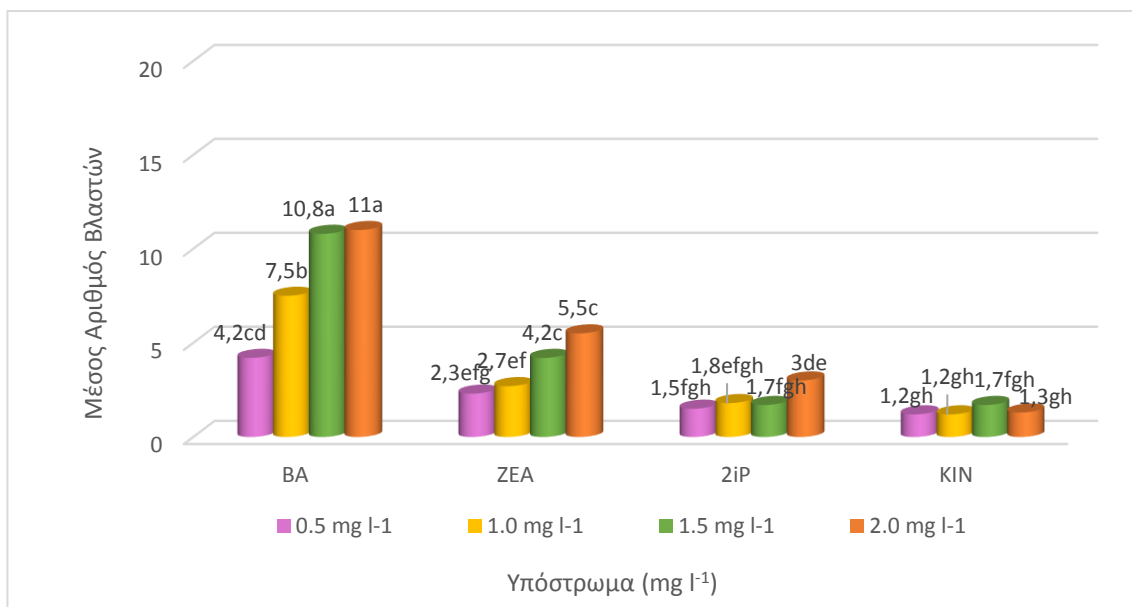


Σχ. 23. Δυναμικό πολλαπλασιασμού της *A. barba-jovis* L, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS, εμπλουτισμένο με BA (0,5 ή 1,0 ή 1,5 mg l⁻¹) ή χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, από έκφυτα κόμβου από νεαρά φυτά *A. barba-jovis* L., στο στάδιο της αρχικής εγκατάστασης *in vitro* καλλιέργειας.

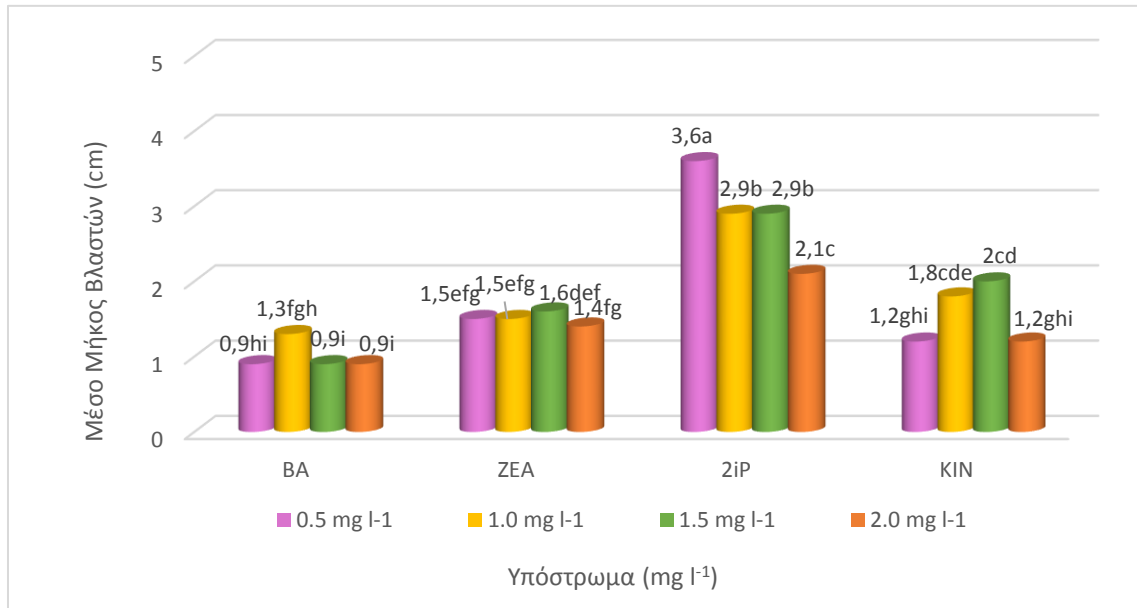
Δυναμικό πολλαπλασιασμού=Βλαστογένεση(%) x Μέσος αριθμός βλαστών x Μέσο αριθμός κόμβων/0,6.



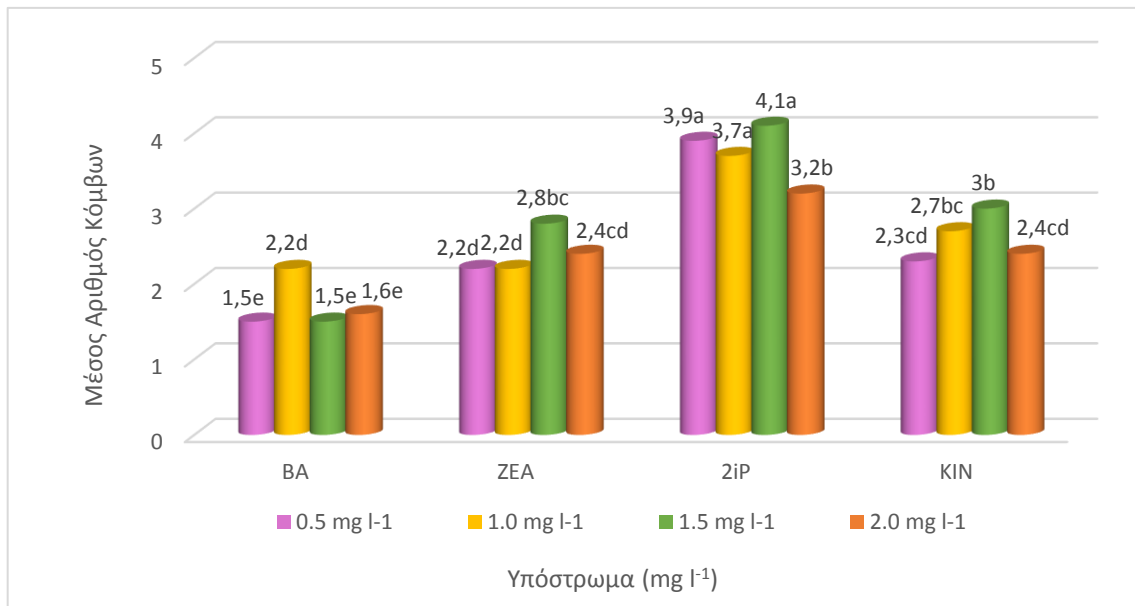
Σχ. 24. Βλαστογένεση (%) μη υπερενυδατωμένων βλαστών μαζί με υπερενυδατωμένους βλαστούς πάνω στο ίδιο έκφυτο, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS, εμπλουτισμένο με BA, ZEA, 2iP ή KIN σε συγκεντρώσεις 0,5 ή 1,0 ή 1,5 ή 2,0 mg l⁻¹ από έκφυτα κόμβου από νεαρά φυτά *A. barba-jovis* L., στο στάδιο της δεύτερης υποκαλλιέργειας. Σύγκριση μέσων με Student's t σε $P \leq 0,05$, n=34-35.



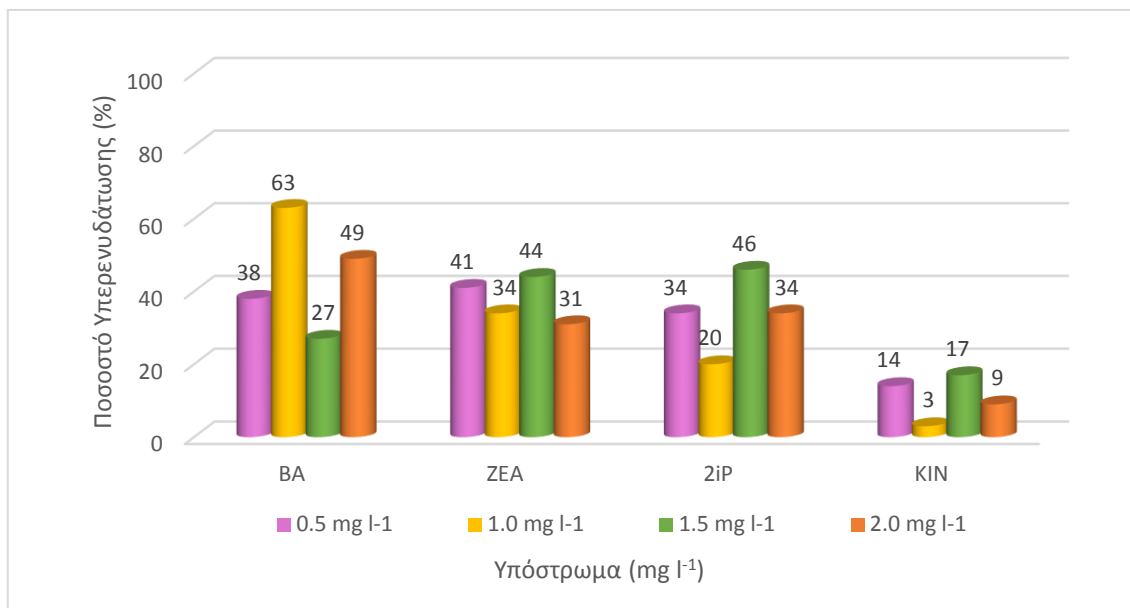
Σχ. 25. Μέσος αριθμός βλαστών, μη υπερενυδατωμένων, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS, εμπλουτισμένο με BA, ZEA, 2iP ή KIN σε συγκεντρώσεις 0,5 ή 1,0 ή 1,5 ή 2,0 mg l⁻¹ από έκφυτα κόμβου από νεαρά φυτά *A. barba-jovis* L., στο στάδιο της δεύτερης υποκαλλιέργειας. Σύγκριση μέσων με Student's t σε $P \leq 0,05$, n=34-35.



Σχ. 26. Μέσο μήκος βλαστών, μη υπερενυδατωμένων, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS, εμπλουτισμένο με BA, ZEA, 2iP ή KIN σε συγκεντρώσεις 0,5 ή 1,0 ή 1,5 ή 2,0 mg l⁻¹ από έκφυτα κόμβου από νεαρά φυτά *A. barba-jovis* L., στο στάδιο της δεύτερης υποκαλλιέργειας. Σύγκριση μέσων με Student's t σε $P \leq 0,05$, n=34-35.

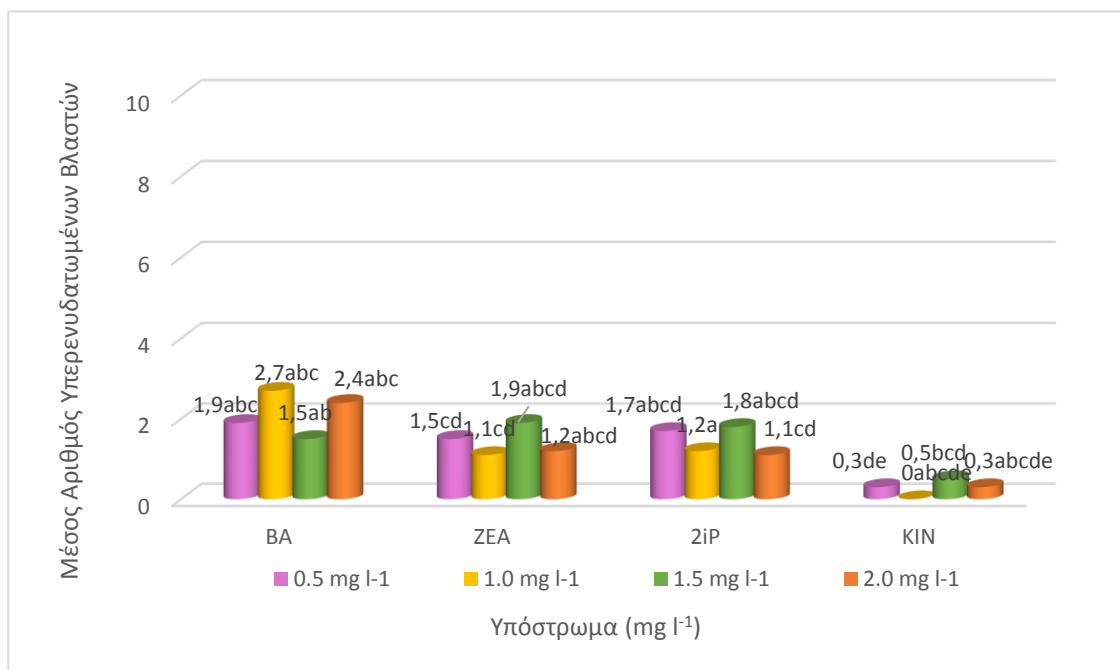


Σχ. 27. Μέσος αριθμός κόμβων, μη υπερενυδατωμένων, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS, εμπλουτισμένο με BA, ZEA, 2iP ή KIN σε συγκεντρώσεις 0,5 ή 1,0 ή 1,5 ή 2,0 mg l⁻¹ από έκφυτα κόμβου από νεαρά φυτά *A. barba-jovis* L., στο στάδιο της δεύτερης υποκαλλιέργειας. Σύγκριση μέσων με Student's t σε $P \leq 0,05$, n=34-35.

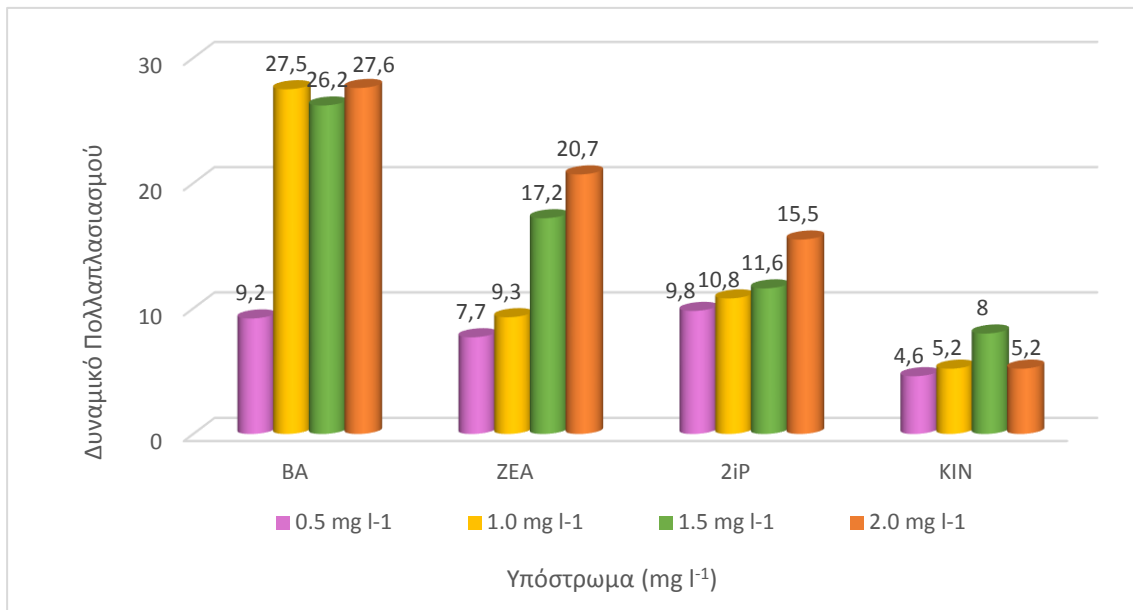


Σχ. 28. Υπερενυδάτωση (%), πλήρως υπερενυδατωμένων εκφύτων μαζί με μεικτά έκφυτα, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS, εμπλουτισμένο με BA, ZEA, 2iP ή KIN σε συγκεντρώσεις 0,5 ή 1,0 ή 1,5 ή 2,0 mg l⁻¹ από έκφυτα κόμβου από νεαρά φυτά *A. barba-jovis* L., στο στάδιο της δεύτερης υποκαλλιέργειας.

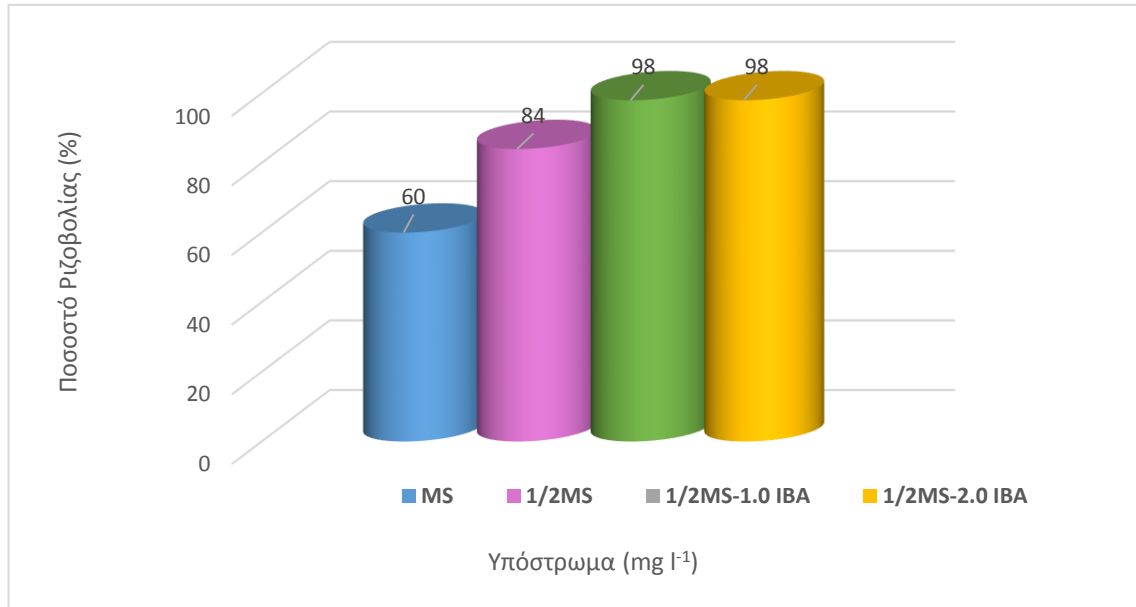
Σύγκριση μέσων με Student's t σε $P \leq 0,05$, n=34-35.



Σχ. 29. Μέσος αριθμός υπερενυδατωμένων βλαστών, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS, εμπλουτισμένο με BA, ZEA, 2iP ή KIN σε συγκεντρώσεις 0,5 ή 1,0 ή 1,5 ή 2,0 mg l⁻¹ από έκφυτα κόμβου από νεαρά φυτά *A. barba-jovis* L., στο στάδιο της δεύτερης υποκαλλιέργειας. Σύγκριση μέσων με Student's t σε $P \leq 0,05$, n=34-35.

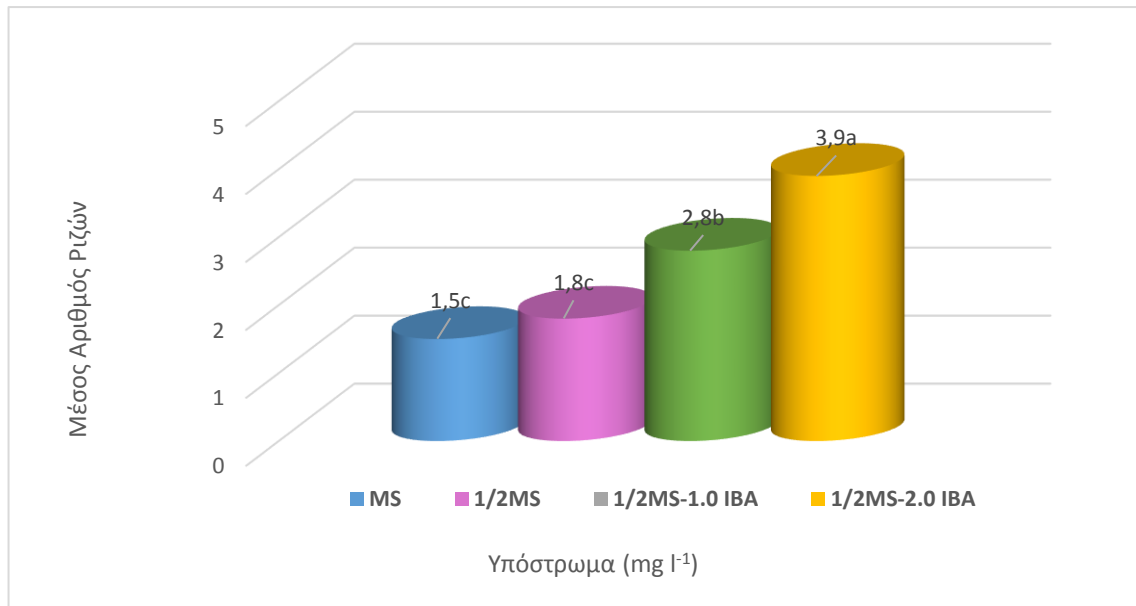


Σχ. 30. Δυναμικό πολλαπλασιασμού της *A. barba-jovis* L, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS, εμπλουτισμένο με BA, ZEA, 2iP ή KIN σε συγκεντρώσεις 0,5 ή 1,0 ή 1,5 ή 2,0 mg l⁻¹ από έκφυτα κόμβου από νεαρά φυτά *A. barba-jovis* L., στο στάδιο της δεύτερης υποκαλλιέργειας. Δυναμικό πολλαπλασιασμού=Βλαστογένεση(%) x Μέσος αριθμός βλαστών x Μέσο αριθμός κόμβων/0,6.



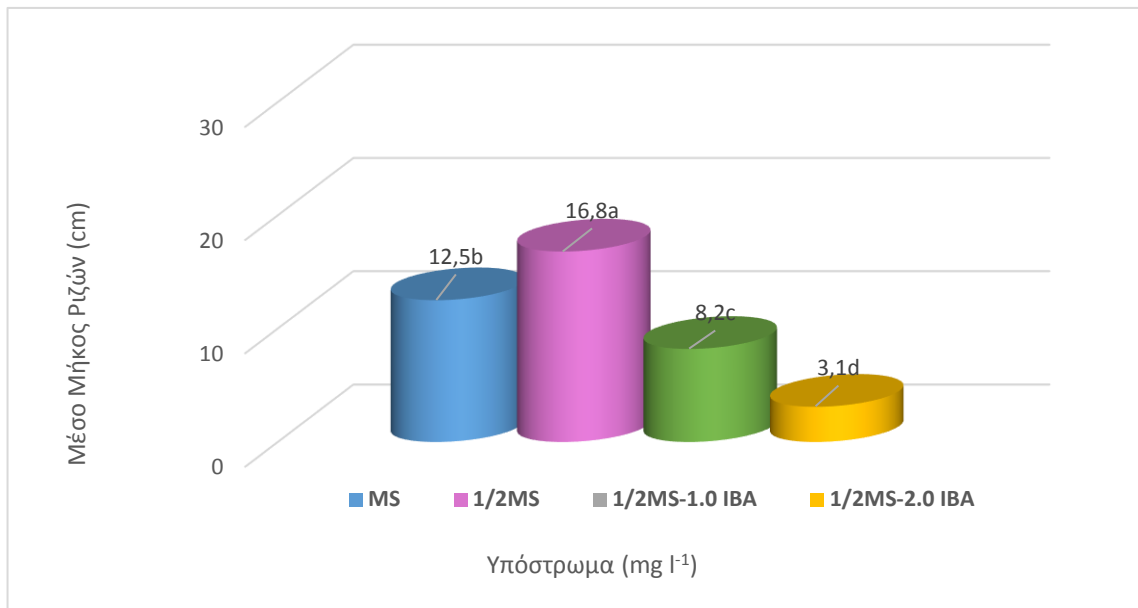
Σχ. 31. Ριζοβολία (%) μικροβλαστών σε θρεπτικά υποστρώματα MS ή ½ MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, ή ½ MS εμπλουτισμένο με IBA (1,0 ή 2,0 mg l⁻¹) από έκφυτα κόμβου από νεαρά φυτά *A. barba-jovis* L.

Σύγκριση μέσων με Student's t σε $P \leq 0,05$, n=100.



Σχ. 32. Μέσος αριθμός ριζών, μικροβλαστών σε θρεπτικά υποστρώματα MS ή ½ MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, ή ½ MS εμπλουτισμένο με IBA (1,0 ή 2,0 mg l⁻¹) από έκφυτα κόμβου από νεαρά φυτά *A. barba-jovis* L.

Σύγκριση μέσων με Student's t σε $P \leq 0,05$, n=100.



Σχ. 33. Μέσο μήκος ριζών (cm), μικροβλαστών σε θρεπτικά υποστρώματα MS ή ½ MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, ή ½ MS εμπλουτισμένο με IBA (1,0 ή 2,0 mg l⁻¹) από έκφυτα κόμβου από νεαρά φυτά *A. barba-jovis* L.

Σύγκριση μέσων με Student's t σε $P \leq 0,05$, n=100.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ IV

Επιστημονικές Δημοσιεύσεις

Από την παρούσα μεταπτυχιακή μελέτη έχουν δημοσιευτεί οι εξής εργασίες σε διεθνή επιστημονικά περιοδικά και πρακτικά διεθνών ή εθνικών συνεδρίων με κριτές:

1. **Trigka M. and Papafotiou M. (2016).** *In vitro* propagation of *Anthyllis barba-jovis* L. from Seedling Tissues. *Acta Horticulturae, (ISHS)*, (In press).
2. **Τρίγκα Μ. και Παπαφωτίου Μ. (2016).** Διερεύνηση του *in vitro* πολλαπλασιασμού της *Anthyllis barba-jovis* L. Πρακτικά Ελληνικής Εταιρείας της Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών, 27^ο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο, 28 Σεπτ.-1 Οκτ. 2015, Βόλος, τόμος 17(β), 215-219.
3. **Τρίγκα Μ., Παπαφωτίου Μ. και Βλάχου Γ. (2016).** Διερεύνηση της βλαστικότητας του σπόρου της *Anthyllis barba-jovis* L. Πρακτικά Ελληνικής Εταιρείας της Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών, 27^ο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο, 28 Σεπτ.-1 Οκτ. 2015, Βόλος, τόμος 17(β), 240-244.

In vitro propagation of *Anthyllis barba-jovis* from seedling tissues

(Accepted 2 Jan. 2017)

M. Trigka and M. Papafotiou^a

Laboratory of Floriculture and Landscape Architecture, Department of Crop Science, School of Agriculture, Engineering and Environmental Sciences, Agricultural University of Athens, Iera Odos 75, 118 55 Athens, Greece.

Abstract

Anthyllis barba-jovis L. (f. Fabaceae, "Jupiter's Beard") is a native, silvery evergreen shrub, bearing big inflorescences with pale yellow flowers from May to June, found in rocky cliffs of Mediterranean region. Being very tolerant to high salinity, wind and drought, it could be introduced as an ornamental landscape plant for coastal Mediterranean areas. Micropropagation of the species was studied using explants from young seedlings. Seeds germinated on half-strength Murashige and Skoog (MS) medium at 15°C. Cotyledonary nodes from 33-day-old seedlings were used as explants and cultured on hormone-free (Hf) MS medium or MS medium supplemented with either 0.5 or 1.0 mg L⁻¹ benzyladenine (BA) alone or in combination with 0.1 mg L⁻¹ naphthaleneacetic acid (NAA), or with 0.1 mg L⁻¹ NAA alone. In all treatments, almost all explants provided shoots (92-98%). Higher shoot production was promoted by 1.0 mg L⁻¹ BA with or without NAA (1.9 shoots per explant). A subculture took place on Hf-MS medium or MS medium supplemented with BA (0.5 or 1.0 mg L⁻¹) combined with 0.1 mg L⁻¹ NAA. Shooting reached 91-98% in all treatments. Higher shoot production was promoted by 1.0/0.1 mg L⁻¹ BA/NAA (8.1 shoots per explant), while shoot length was similar in all media (1.2-1.3 cm). At BA-media, particularly at the higher BA concentration, about half of the explants apart from the normal shoots reported above, bear hyperhydric shoots (about 4). Microshoots rooted at 90% on half-strength Hf MS medium and at 100% supplemented with 0.5 mg L⁻¹ indole-3-butyric acid (IBA), while 2 mg L⁻¹ IBA induced 98% rooting and the greatest number of roots (4.3). Ex vitro acclimatization was highly successful (97%) on a mix of 1 peat: 1 perlite (v/v).

Keywords: Jupiter's beard, native plant, micropropagation, cotyledonary node, hyperhydricity

INTRODUCTION

Anthyllis barba-jovis L. (f. Fabaceae, "Jupiter's Beard") is a native, silvery evergreen shrub, bearing big inflorescences with pale yellow flowers from May to June, found in rocky cliffs of Mediterranean region (Pignatti, 1982). In Croatia the species is included in a list of 44 protected plant species, a fact that makes the study of its in vitro propagation particularly interesting (Šatović, 2002). The plant has a compact-upright growth and bears odd-pinnate small leaves, with scattered hairs, silvery gray-green color on the top surface and silky silvery white-gray on the down surface. The species is used in the pharmaceutical industry due to its antioxidants, anti-inflammatory and anti-diabetic properties (Tutin et al., 1972), as well as for the essential oils found in flowers and seeds (Pistelli et al., 2007).

The morphology of the plant and its high tolerance to high salinity, wind and drought (Southon, 1994, Paradis, 1997) provides the potential to be introduced as an ornamental landscape plant for coastal Mediterranean areas, particularly for areas threatened by ground erosion (Biondi et al., 2000). In antiquity *A. barba-jovis* had a significant presence due to its use as a pharmaceutical plant and also for the construction of sweeping brushes (Pistelli et

^a E-mail: mpapaf@aua.gr

al., 2007), thus it could be used in restorations of archaeological site landscapes in Greece and eastern Mediterranean regions.

Previous studies (Morbidoni et al., 2008), concerning the native propagation of *A. barba-jovis*, shown the presence of physical dormancy in the seed coat. There is one report on in vitro propagation of the species starting from seedling stem tip explants (Vlachou et al., 2016).

The aim of this work was to improve the effectiveness of micropropagation of *A. barba-jovis*, using cotyledonary node explants as starting material, in order to enable its conservation and facilitate its use as an ornamental and landscape plant.

MATERIALS AND METHODS

In vitro cultures were established from cotyledonary nodes excised from young seedlings. *A. barba-jovis* seeds were collected from the wild in the area of Attica and stored for two years at room temperature. Seeds germinated on half-strength MS (Murashige and Skoog, 1962) medium at 15°C under 16 h photoperiod and 37.5 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fluorescent light. Cotyledonary nodes from 33-day-old seedlings were cultured on hormone-free (Hf) MS medium or MS medium supplemented with either 0.5 or 1.0 mg L⁻¹ benzyladenine (BA) alone or in combination with 0.1 mg L⁻¹ naphthaleneacetic acid (NAA), or with 0.1 mg L⁻¹ NAA alone. A subculture using single-node explants took place on Hf-MS medium or MS medium supplemented with BA (0.5 or 1.0 mg L⁻¹) combined with 0.1 mg L⁻¹ NAA. The produced microshoots (1.5 cm long) were cultured on half-strength MS medium, Hf or supplemented with 0.5 or 2.0 mg L⁻¹ indole-3-butyric acid (IBA), for rooting.

All in vitro cultures took place in 100 mL Sigma vessels covered by Magenta B-caps and were maintained in a standard growth chamber at 25°C under 16 h photoperiod and 37.5 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ fluorescent light. The pH of the media was adjusted to 5.7-5.8 before autoclaving at 121°C for 20 min. The assessment was performed 45 d after the establishment of the culture. The proliferation potential of a culture was calculated by multiplying the percentage of explants that produced shoots by the mean number of shoots per responding explant and the mean length of shoots divided by 0.6 that was the length of an explant used for subculture (multiplication index).

For ex vitro acclimatization, plantlets were transferred on a mix of 1 peat: 1 perlite (v/v) in 2 L plastic trays (8 plantlets per plastic tray), initially covered with transparent plastic film for 7 d in a standard growth chamber at 20°C and then transferred in a heated greenhouse under shade and natural photoperiod (end November-early December).

The completely randomized design was used. The significance of the results was tested by analysis of variance, ANOVA, and the means were compared by Student's t-test, at $p \leq 0.05$.

RESULTS AND DISCUSSION

In both culture establishment and subculture stage, explants in all treatments produced shoots at a percentage of 91-98%. Shoot number was increased by the presence of BA, while the combination of BA with NAA induced the highest multiplication index (Table 1). Similar was the response in the following subculture concerning the comparison of the Hf medium with those media supplemented with BA/NAA (Table 2). However, in the subculture, many more shoots per explant were formed in the media with BA/NAA compared to the establishment stage while the multiplication index was almost four times higher (Tables 1, 2). Shoot multiplication would have been much higher but hyperhydricity was very high particularly at the subculture (Table 2) and thus almost one third of the shoots produced were discarded. Hyperhydricity has been reported as a problem during micropropagation of other Mediterranean xerophytes too, such as *Anthyllis cytisoides* (Gavidia et al., 1997), *Globularia alypum* (Bertsouklis et al., 2003) and *Lithodora zahnii* (Papafotiou and Kalantzis, 2009). Comparing the present results with those of Vlachou et al. (2016) that evaluated the

micorpropagation of *A. barba-jovis* from seedling-stem tip explants, it was obvious that the use of cotyledonary explants as starting material and the addition of NAA apart of BA into the medium resulted to an increase of more than double shoot production per explant.

Almost all microshoots rooted even on the Hf medium while root number was increased analogously to the increase of NAA concentration (Table 3). Ex vitro acclimatization was highly successful reaching 97% on a mix of 1 peat: 1 perlite (v/v).

Table 1. Effect of plant growth regulators, benzyladenine (BA) and naphthaleneacetic acid (NAA), on cotelydonary node explants from *Anthyllis barba-jovis* seedlings, at the establishment stage of *in vitro* culture.

BA/NAA (mg L ⁻¹)	Shooting (%)	Shoot number per explant [†]	Mean shoot length (cm) [†]	Node number per explant [†]	Hyperhydricity rate (%)	Hyperhydric shoot number per explant	Multiplication index
0.0 / 0.0	96	1.1 c	1.2 b	1.6 b	7	1.3 ab	2.1
0.0 / 0.1	96	1.1 c	1.2 b	1.8 b	5	1.0 ab	2.1
0.5 / 0.0	92	1.3 bc	1.4 ab	2.0 b	16	2.4 ab	2.8
0.5 / 0.1	94	1.6 ab	1.7 a	2.9 a	20	1.6 b	4.4
1.0 / 0.0	98	1.9 a	1.2 b	1.9 b	20	3.0 a	3.8
1.0 / 0.1	92	1.9 a	1.5 ab	2.7 a	11	1.5 ab	4.4

[†] non hyperhydric shoots

Mean separation in columns by Student's *t*, $p \leq 0.05$, $n=39-48$

Multiplication index = Shooting (%) x Mean shoot number x Mean shoot length/0.6

Table 2. Effect of plant growth regulators, benzyladenine (BA) and naphthaleneacetic acid (NAA), on single node *Anthyllis barba-jovis* explants at the multiplication stage.

BA/NAA (mg L ⁻¹)	Shooting (%)	Shoot number per explant [†]	Mean shoot length (cm) [†]	Node number per explant [†]	Hyperhydricity rate (%)	Hyperhydric shoot number per explant	Multiplication index
0.0 / 0.0	94	1.2 c	1.1 b	1.7 b	18	1.7 b	2.1
0.5 / 0.1	91	6.8 b	1.3 a	1.9 ab	55	3.5 a	13.5
1.0 / 0.1	98	8.1 a	1.2 ab	1.9 a	65	4.1 a	16.3

[†] non hyperhydric shoots

Mean separation in columns by Student's *t*, $p \leq 0.05$, $n=153-223$

Multiplication index = Shooting (%) x Mean shoot number x Mean shoot length/0.6

Table 3. Effect of IBA on *Anthyllis barba-jovis* microshoot rooting on half-strength MS medium.

IBA (mg L ⁻¹)	Rooting (%)	Root number per explant	Mean root length (cm)
0.0	90	1.6 c	8.1 b
0.5	100	1.9 b	13.2 a
2.0	98	4.3 a	5.6 c

Mean separation in columns by Student's *t*, $p \leq 0.05$, $n=100$

CONCLUSIONS

For successful micropropagation of *A. barba-jovis* from cotyledonary node it is suggested to use MS medium supplemented with 0.5 or 1.0 mg L⁻¹ BA and 0.1 mg L⁻¹ NAA, for both culture establishment and shoot multiplication stage. For microshoot rooting, half-strength MS medium with IBA (0.5 or 2.0 mg L⁻¹) was the most effective treatment. Further study to overcome problems of hyperhydricity during the multiplication stage could enhance even more the efficiency of the method.

Literature Cited

- Bertsouklis, K., Papafotiou, M., and Balotis, G. (2003). Effect of medium on in vitro growth and ex vitro establishment of *Globularia alypum* L. *Acta Hortic.* 616, 177-180 http://www.actahort.org/members/showpdf?booknrnr=616_19.
- Biondi, E., Vagge, I., and Mossa, L. (2000). On the phytosociological importance of *Anthyllis barba-jovis* L. *Colloq. Phytosociol XXVII*, 95-104.
- Gavidia, I., Zaragoza, C., Segura, J., and Perez-Bermudez, P. (1997). Plant regeneration from juvenile and adult *Anthyllis cytisoides*, a multipurpose leguminous shrub. *J Plant Physiol* 150, 714-718 <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S017616179780288X>.
- Morbidoni, M., Estrelles, E., Soriano, P., Martinez-Solis, I., and Biondi, E. (2008). Effects of environmental factors on seed germination of *Anthyllis barba-jovis* L. *Plant Biosyst* 142, 275-286 <http://dx.doi.org/10.1080/11263500802150514>.
- Murashige, T., and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15, 473-497 <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x/full>.
- Paradis, G. (1997). Observations sur l' espèce rare et protégée *Anthyllis barba-jovis* L. (Fabaceae) en Corse: description de ses stations et phytosociologie. *J de Botanique Soc. Bot. France*, 4, 33-44.
- Papafotiou M., and Kalantzis A. (2009). Studies on in vitro propagation of *Lithodora zahnii*. *Acta Hortic* 813, 465-470 <http://www.actahort.org/books/813/>.
- Pignatti, S. (1982). *Flora d' Italia*. vol. 1. (Bologna, Italy: Edagricole), pp. 750.
- Pistelli, L., Noccioli, C., Bertoli, A., Scapecchi, G., and Potenza, D. (2007). Chemical composition and volatile constituents of *Anthyllis barba-jovis*. *Nat Prod Res* 21, 418-425 <http://dx.doi.org/10.1080/14786410600577524>.
- Šatović, Z. (2002). Legal protection, conservation and cultivation of medicinal and aromatic plants in Croatia. In: Report of Working Group on Medicinal and Aromatic Plants, 1st Meeting, 12-14 September 2002 (Gozd martuljek, Slovenia. http://www.biodiversityinternational.org/fileadmin/_migrated/uploads/tx_news/Report_of_a_Working_Group_on_Medicinal_and_Aromatic_Plants_984.pdf#page=39.
- Southon, I.W. (1994). *Phytochemical Dictionary of the Leguminosae*, vol. 1 (London, UK: Chapman & Hall).
- Tutin, G.T., Heywood, V., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M., and Webb, D.A. (1972). *Flora Europaea*, vol. 4. (Cambridge, UK: Cambridge University Press).
- Vlachou, G., Papafotiou, M. and Bertsouklis, K.F. (2016). Studies on in vitro propagation of *Anthyllis barba-jovis* L. 6th International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants, 19-24 April 2015, San Remo, Italy, *Acta Hortic* in press.

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΟΥ *IN VITRO* ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΤΗΣ *ANTHYLLIS BARBA-JOVIS* L.

Μ. Τρίγκα και Μ. Παπαφωτίου

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Σχολή Αγροτικής Παραγωγής Υποδομών και Περιβάλλοντος, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Εργαστήριο Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου, Ιερά Οδός 75, 11855 Αθήνα
Email: akgirt@gmail.com

Περίληψη

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε ο μικροπολλαπλασιασμός της *Anthyllis barba-jovis* L. με έκφυτα κοτυληδικού κόμβου που ελήφθησαν από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα. Η αρχική εγκατάσταση έγινε σε στερεό υπόστρωμα MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες ή εμπλουτισμένο με 0,5 ή 1,0 mg l⁻¹ βενζυλαδεκίνη (BA) ή 0,1 mg l⁻¹ ναφθαλινοξικό οξύ (NAA) ή με συνδυασμό αυτών. Σε όλα τα υποστρώματα σημειώθηκε υψηλό ποσοστό βλαστογένεσης (92-98%). Υψηλότερη παραγωγή βλαστών (1,9 βλαστοί/έκφυτο) παρατηρήθηκε στα υποστρώματα που περιείχαν 1,0 mg l⁻¹ BA με ή χωρίς την προσθήκη 0,1 mg l⁻¹ NAA χωρίς διαφορά από τα υποστρώματα που περιείχαν 0,5/0,1 mg l⁻¹ BA/NAA, στα οποία σημειώθηκε και η μεγαλύτερη επιμήκυνση των παραχθέντων μικροβλαστών (μέσο μήκος 1,7 cm). Ακολούθησε υποκαλλιέργεια σε υπόστρωμα MS που περιείχε 0,5 ή 1,0 mg l⁻¹ BA σε συνδυασμό με 0,1 mg l⁻¹ NAA, καθώς και υπόστρωμα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες ως μάρτυρας. Σημειώθηκε υψηλό ποσοστό βλαστογένεσης (91-98%) σε όλα τα υποστρώματα. Μεγαλύτερος αριθμός βλαστών σημειώθηκε στο υπόστρωμα με 1,0/0,1 mg l⁻¹ BA/NAA (8,1 βλαστοί/έκφυτο), ενώ το μήκος των βλαστών ήταν παρόμοιο σε όλα τα υποστρώματα (1,2-1,3 cm). Το ποσοστό υπερενδύατωσης ήταν υψηλό και στα δύο υποστρώματα που περιείχαν φυτορρυθμιστικές ουσίες (55-65%), αλλά οι βλαστοί στο υπόστρωμα με τη χαμηλότερη συγκέντρωση (0,5 mg l⁻¹) BA είχαν πιο ικανοποιητική εμφάνιση και ήταν καλοσηματισμένοι. Ως εκ τούτου για το στάδιο πολλαπλασιασμού ενδείκνυται το υπόστρωμα με 0,5/0,1 mg l⁻¹ BA/NAA.

Λέξεις κλειδιά: Μικροπολλαπλασιασμός, ανθυλλίς, σπορόφυτα, κοτυληδικός κόμβος, υπερενδύατωση βλαστών.

Εισαγωγή

Η *Anthyllis barba-jovis* L. (κοιν. Ανθυλλίς ή Γενειάδα του Δία), είναι ένας πολυετής, αειθαλής, θάμνος της οικογένειας Fabaceae που αυτοφύεται σε απόκρημνες βραχώδεις πλαγιές της κεντροδυτικής λεκάνης της Μεσογείου (Pignatti, 1982, Biondi κ.ά., 2000). Στην Κροατία το είδος περιλαμβάνεται σε κατάλογο με 44 προστατευόμενα είδη, γεγονός που καθιστά ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα τη μελέτη του *in vitro* πολλαπλασιασμού του (Šatović, 2002). Έχει συμπαγή, ορθόκλαδη ανάπτυξη και φέρει γκριζοπράσινα φύλλα και ωχροκίτρινα άνθη σε πολυανθείς, επάκριες ή μασχαλιαίες κεφαλές από Μάιο έως Ιούνιο ανάλογα με το υψόμετρο (Καββάδας, 1956). Το φυτό έχει ενδιαφέρον για τη φαρμακοβιομηχανία λόγω των αντιοξειδωτικών, αντιφλεγμονωδών

και αντιδιαβητικών ιδιοτήτων του, καθώς και των αιθέριων ελαίων που βρίσκονται στα άνθη και στους σπόρους του (Pistelli, 2007).

Κατά την αρχαιότητα η *A. barba-jovis* είχε σημαντική παρουσία λόγω της χρήσης της ως φαρμακευτικό φυτό, καθώς και για την κατασκευή σαρώθρων (Pistelli κ.ά., 2007), ως εκ τούτου η χρήση της σε αναπλάσεις αρχαιολογικών χώρων θεωρείται ενδιαφέρουσα. Η μορφολογία του, καθώς και η υψηλή του ανθεκτικότητα στην αλατότητα των εδαφών και στις δυσμενείς καιρικές συνθήκες, το κάνουν επίσης ενδιαφέρον είδος για χρήση ως καλλωπιστικό σε παραθαλάσσιες περιοχές και αποκαταστάσεις προβληματικών περιοχών (Biondi, 2007).

Υπάρχει εργασία που αφορά στον εγγενή πολλαπλασιασμό της *A. barba-jovis*, όπου αναφέρεται ύπαρξη ληθάργου περιβλημάτων του σπόρου (Morbidoni κ.ά., 2008), ενώ δεν βρέθηκαν αναφορές για αγενή πολλαπλασιασμό του είδους. Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκε η δυνατότητα *in vitro* πολλαπλασιασμού της *A. barba-jovis*, και συγκεκριμένα η επίδραση των φυτορρυθμιστικών ουσιών του υποστρώματος, BA και NAA, στη βλαστογένεση από έκφυτα κοτυληδικού κόμβου νεαρών σποροφύτων.

Υλικά και Μέθοδοι

Σπόροι *A. barba-jovis* που είχαν συλλεχθεί το Δεκέμβριο 2012 από αυτοφυή φυτά στον Υμηττό Αττικής και διατηρηθεί για δύο χρόνια σε θερμοκρασία δωματίου, απολυμάνθηκαν επιφανειακά με 20% διάλυμα χλωρίνης εμπορίου (4,5% υποχλωριώδες νάτριο) υπό ανάδευση για 10 min. Δέχτηκαν τέσσερα τρίλεπτα ξεπλύματα με απεσταγμένο, αποστειρωμένο νερό και καλλιεργήθηκαν για βλάστηση *in vitro* σε τρυβλία Petri με στερεό (8 g l⁻¹ agar) υπόστρωμα MS (Murashige and Skoog, 1962) μισής δύναμης, στους 15 °C, για 33 ημέρες.

Από τα σπορόφυτα ελήφθησαν έκφυτα κοτυληδικού κόμβου και τοποθετήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες ή εμπλουτισμένο με 0,5 ή 1,0 mg l⁻¹ BA ή 0,1 mg l⁻¹ NAA ή συνδυασμό αυτών. Μετά την πάροδο 45 ημερών ακολούθησε υποκαλλιέργεια σε υπόστρωμα MS που περιείχε 0,5 ή 1,0 mg l⁻¹ BA σε συνδυασμό με 0,1 mg l⁻¹ NAA, καθώς και υπόστρωμα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες ως μάρτυρας. Η επώαση των εκφύτων έγινε στους 25 °C με φωτοπερίοδο 16 h και ένταση φωτισμού 37.5 μmol m⁻² s⁻¹ fluorescent φωτός (λαμπτήρες φθορισμού). Το pH των υποστρωμάτων ρυθμίστηκε στο 5.7-5.8 πριν την αποστείρωση στους 121 °C για 20 min.

Η εκτίμηση των αποτελεσμάτων έγινε 45 ημέρες μετά την εγκατάσταση της καλλιέργειας. Το δυναμικό πολλαπλασιασμού της καλλιέργειας υπολογίστηκε ως το γινόμενο Βλαστογένεση x Αριθμός Βλαστών x Μήκος Βλαστού διαιρεμένο με 0,6 που ήταν το μήκος του εκφύτου κατά την υποκαλλιέργεια.

Χρησιμοποιήθηκε το εντελώς τυχαίοποιημένο σχέδιο, η σημαντικότητα των αποτελεσμάτων ελέγχθηκε με ανάλυση της διασποράς και η σύγκριση των μέσων των επεμβάσεων έγινε με Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

Αποτελέσματα και Συζήτηση

Στο στάδιο της αρχικής εγκατάστασης της καλλιέργειας σημειώθηκε υψηλό ποσοστό βλαστογένεσης σε όλα τα υποστρώματα, το οποίο κυμάνθηκε από 92 έως 98%. Η ύπαρξη 1,0 mg l⁻¹ BA στο υπόστρωμα με ή χωρίς την ταυτόχρονη παρουσία 0,1 mg l⁻¹

¹ NAA προκάλεσε το σχηματισμό περισσότερων βλαστών (1,9 βλαστοί/έκφυτο) χωρίς διαφορά από το συνδυασμό 0,5/0,1 mg l⁻¹ BA/NAA, όπου σημειώθηκε και η μεγαλύτερη επιμήκυνση των παραχθέντων μικροβλαστών, με μέσο μήκος 1,7 cm (Πίν. 1). Η παρουσία αντίδραση των εκφύτων κοτυληδικού κόμβου δεν διέφερε από την αντίδραση εκφύτων κορυφής βλαστού από *in vitro* αναπτυχθέντα σπορόφυτα (Vlachou κ.ά., 2015). Σε σύγκριση όμως με το είδος *A. cytisoides*, η συγκέντρωση 1,0 mg l⁻¹ BA έδωσε καλύτερα αποτελέσματα σε έκφυτα κοτυληδικού κόμβου (5,2 βλαστοί/έκφυτο), αλλά και σε έκφυτα κορυφής (3,8 βλαστοί/έκφυτο) (Gavidia κ.ά., 1997).

Στο στάδιο της υποκαλλιέργειας σημειώθηκε επίσης υψηλό ποσοστό βλαστογένεσης (91-98%) σε όλα τα υποστρώματα, ενώ με την παρουσία BA αυξήθηκε πολύ ο αριθμός των παραγόμενων βλαστών, ανά έκφυτο. Μεγαλύτερος αριθμός βλαστών παράχθηκε στο υπόστρωμα με 1,0/0,1 mg l⁻¹ BA/NAA (8,1 βλαστοί/έκφυτο), ενώ το μήκος των βλαστών ήταν παρόμοιο σε όλα τα υποστρώματα και κυμάνθηκε από 1,2 έως 1,3 cm (Πίν. 2). Σε σύγκριση με τη χρήση εκφύτων κορυφής βλαστού (Vlachou κ.ά., 2015), η χρήση εκφύτων κοτυληδικού κόμβου διπλασίασε την απόδοση της καλλιέργειας σε βλαστούς.

Η παρουσία κυτοκίνινης, με ή χωρίς την παρουσία αυξίνης, είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό υπερενυδατωμένων βλαστών, και στην αρχική εγκατάσταση, αλλά κυρίως στην υποκαλλιέργεια. Το ποσοστό των υπερενυδατωμένων βλαστών ήταν πολύ υψηλό (55-65%), ενώ περισσότεροι υπερενυδατωμένοι βλαστοί σχηματίστηκαν στο υπόστρωμα με 1,0/0,1 mg l⁻¹ BA/NAA (4,1 υπερενυδατωμένοι βλαστοί/έκφυτο) (Πίν. 2). Στο υπόστρωμα με τη χαμηλότερη συγκέντρωση (0,5 mg l⁻¹) BA οι βλαστοί είχαν πιο ικανοποιητική εμφάνιση και ήταν καλοσχηματισμένοι. Υψηλά ποσοστά υπερενυδάτωσης έχουν παρατηρηθεί κατά το μικροπολλαπλασιασμό και άλλων ξηροφυτικών ειδών της Μεσογείου, όπως η *Anthyllis cytisoides* (Gavidia κ.ά., 1997), *Globularia alypum* L. (Bertsouklis κ.ά., 2003) και *Lithodora zahnii* (Papafotiou και Kalantzis, 2009).

Συμπεράσματα

Για την εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας από σπορόφυτα *A. barba-jovis* με έκφυτα κοτυληδικού κόμβου προτείνεται η χρήση 0,5 ή 1,0 mg l⁻¹ BA σε συνδυασμό με 0,1 mg l⁻¹ NAA, ενώ για το στάδιο του πολλαπλασιασμού ενδείκνυται η χρήση υποστρωμάτων που περιέχουν BA σε συνδυασμό με NAA, σε συγκεντρώσεις 0,5 και 0,1 mg l⁻¹ αντίστοιχα. Περαιτέρω έρευνα για αντιμετώπιση της υπερενυδάτωσης θα μπορούσε να αυξήσει ακόμη περισσότερο την απόδοση της καλλιέργειας, παρότι η παραγωγικότητα της μεθόδου (8,1 βλαστοί ανά έκφυτο) είναι πολύ ικανοποιητική.

Πίνακας 1. Επίδραση των φυτορυθμιστικών ουσιών (PGRs) του υποστρώματος, BA και NAA, σε έκφυτα κοτυληδικού κόμβου από σπορόφυτα *A. barba-jovis*, στο στάδιο της αρχικής εγκατάστασης *in vitro* καλλιέργειας.

PGRs (mg l ⁻¹)	Βλαστογ ένεση (%)	Αριθμ. βλαστ. /έκφυτο	Μήκος βλαστ. (cm)	Αριθμ. Κόμβ. /βλαστ.	Ποσοστό υπερενουδάτωσης (%)	Αριθμός υπερενουδατ. βλαστών /έκφυτο	Δυναμικό πολ/μού
-	96	1,1 c	1,2 b	1,6 b	7	1,3 ab	2,1
0,1 NAA	96	1,1 c	1,2 b	1,8 b	5	1,0 ab	2,1
0,5 BA	92	1,3 bc	1,4 ab	2,0 b	16	2,4 ab	2,8
0,5 BA/ 0,1 NAA	94	1,6 ab	1,7 a	2,9 a	20	1,6 b	4,4
1,0 BA	98	1,9 a	1,2 b	1,9 b	20	3,0 a	3,8
1,0 BA/ 0,1 NAA	92	1,9 a	1,5 ab	2,7 a	11	1,5 ab	4,4

Διαχωρισμός των μέσων κατά στήλες με Student's *t* σε $P \leq 0,05$, $n=39-48$.

Η παράθεση ίδιων γραμμάτων σε κάθε στήλη του πίνακα υποδηλώνει μη στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Πίνακας 2. Επίδραση των φυτορυθμιστικών ουσιών (PGRs) του υποστρώματος, BA και NAA, σε έκφυτα κόμβου στο στάδιο πολλαπλασιασμού της καλλιέργειας.

PGRs (mg l ⁻¹)	Βλαστογ ένεση (%)	Αριθμ. βλαστ. /έκφυτο	Μήκος βλαστ. (cm)	Αριθμ. κόμβων /βλαστ.	Ποσοστό υπερενουδάτωσης (%)	Αριθμός βλαστών /έκφυτο	Δυναμικό πολλ/μού
-	94	1,2 c	1,1 b	1,7 b	18	1,7 b	2,1
0,5 BA/ 0,1 NAA	91	6,8 b	1,3 a	1,9 ab	55	3,5 a	13,5
1,0 BA/ 0,1 NAA	98	8,1 a	1,2 ab	1,9 a	65	4,1 a	16,3

Διαχωρισμός των μέσων κατά στήλες με Student's *t* σε $P \leq 0,05$, $n=153-223$.

Η παράθεση ίδιων γραμμάτων σε κάθε στήλη του πίνακα υποδηλώνει μη στατιστικά σημαντικές διαφορές.

Βιβλιογραφία

- Bertsouklis, K. F, Papafotiou, M. and Balotis, G. 2003. Effect of medium on *in vitro* growth and *ex vitro* establishment of *Globularia alypum* L. Acta Hort. 616:177-180.
- Biondi, E., Vagge, I. and Mossa, L. 2000. On the phytosociological importance of *Anthyllis barba-jovis* L. Colloq. Phytosociol. XXVII:95-104.

- Biondi, E. 2007. Thoughts on the ecology and syntaxonomy of some vegetation typologies of the Mediterranean coast. *Phytosociol.* 44(1):3-10.
- Gavidia, I., Zaragoza, C., Segura, J. and Perez-Bermudez, P. 1997. Plant regeneration from juvenile and adult *Anthyllis cytisoides*, a multipurpose Leguminous shrub. *J. Plant Physiol.* 150: 714-718.
- Καββάδας, Δ. 1956. Βοτανικό Φυτοπαθολογικό Λεξικό, τόμος Δ, Αθήνα. p. 478-481.
- Morbidoni, M., Estrelles, E., Soriano, P., Martinez-Solis, I. and Biondi, E. 2008. Effects of environmental factors on seed germination of *Anthyllis barba-jovis* L. *Plant Biosyst.* 142:275-286.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Papafotiou M. and Kalantzis A. 2009. Studies on *in vitro* propagation of *Lithodora zahni*. *Acta Hort.* 813:465-470.
- Pignatti, S. 1982. Flora d'Italia, vol 1. Edagricole, Bologna
- Pistelli, L., Noccioli, C., Bertoli, A., Scapecchi, G. and Potenza, D. 2007. Chemical composition and volatile constituents of *Anthyllis barba-jovis*. *Nat. Prod. Res.* 21(5):418-425.
- Šatović, Z. 2002. Legal protection, conservation and cultivation of medicinal and aromatic plants in Croatia. In: Report of Working Group on Medicinal and Aromatic Plants, 1st Meeting, 12-14 September 2002, Gozd Martuljek, Slovenia.
- Vlachou, G., Papafotiou, M. and Bertsouklis, K. F. 2015. Studies on *in vitro* propagation of *Anthyllis barba-jovis* L. 6th International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants, 19-24 April 2015, San Remo, Italy, *Acta Hort.*, in press.

ΔΙΕΡΕΥΝΗΣΗ ΤΗΣ ΒΛΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΤΟΥ ΣΠΟΡΟΥ ΤΗΣ ANTHYLLIS BARBA-JOVIS L.

Μ. Τρίγκα, Μ. Παπαφωτίου και Γ. Βλάχου

Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Σχολή Αγροτικής Παραγωγής Υποδομών και Περιβάλλοντος, Τμήμα Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής, Εργαστήριο Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου, Ιερά Οδός 75, 11855 Αθήνα

Email: akgirt@gmail.com

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκαν σπόροι της *Anthyllis barba-jovis* L., που συλλέχθηκαν από αυτοφυή φυτά και διατηρήθηκαν σε σκοτάδι, σε θερμοκρασία δωματίου, για 24 μήνες. Χρησιμοποιήθηκαν σπόροι χωρίς περικάρπιο, με ή χωρίς προμεταχείριση σκαριφισμού. Μετά την απομάκρυνση του περικαρπίου και το σκαριφισμό, έγινε επιφανειακή απολύμανση με 20% (v/v) υδατικό διάλυμα χλωρίνης εμπορίου, για 10 min. Οι σπόροι τοποθετήθηκαν για βλάστηση *in vitro*, σε τρυβλία Petri, με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα MS μισής δύναμης που περιείχε 8 g l⁻¹ agar και 20 g l⁻¹ σακχαρόζη, σε θερμοκρασίες 5, 10, 15, 20, 25, 30 ή 35 °C σε καθεστώς συνεχούς σκότους και σε φωτοπερίοδο 16 h (37,5 μmol m⁻² s⁻¹) από φως που προερχόταν από λαμπτήρες φθορισμού. Οι σπόροι βλάστησαν σε όλες τις επεμβάσεις. Η φωτοπερίοδος δεν είχε επίδραση στη βλαστικότητα των σπόρων. Οι σπόροι στους 5 και 35 °C είχαν το χαμηλότερο ποσοστό βλαστικότητας (χωρίς προμεταχείριση 7% και 18%, αντίστοιχα και με σκαριφισμό 34% και 12%, αντίστοιχα). Στις θερμοκρασίες 10 έως 30 °C το ποσοστό βλαστικότητας κυμάνθηκε από 56-97% σε σκαριφισμένους σπόρους και 19-38% σε μη σκαριφισμένους. Ο σκαριφισμός είχε ευνοϊκή επίδραση στη βλαστικότητα των σπόρων της *A. barba-jovis*, αφού σκαριφισμένοι σπόροι εμφάνισαν την υψηλότερη βλαστικότητα (88-97%) στους 15 και 20 °C, ενώ μη σκαριφισμένοι σπόροι βλάστησαν σε υψηλότερα ποσοστά (28-38%) στους 25 °C.

Λέξεις κλειδιά: Ανθυλλίς, βλάστηση *in vitro*, μηχανικός σκαριφισμός, θερμοκρασία βλάστησης, φωτοπερίοδος.

Εισαγωγή

Η *Anthyllis barba-jovis* L., οικ. Fabaceae (κοιν. Ανθυλλίς ή Γενειάδα του Δία) είναι ένας πολυετής, αειθαλής θάμνος που αυτοφύεται σε διάφορα ενδιαιτήματα κατά μήκος απόκρημνων βραχωδών περιοχών της κεντροδυτικής λεκάνης της Μεσογείου και της Βορείου Αφρικής (Pignatti, 1982, Southon, 1994, Biondi κ.ά., 2000). Έχει συμπαγή ορθόκλαδη ανάπτυξη και σύνθετα χνοώδη φύλλα, πράσινου χρώματος στην άνω επιφάνεια και γκριζου χρώματος στην κάτω. Τα ωχροκίτρινα άνθη φέρονται σε πολυάριθμες επάκριες ή μασχαλιαίες ταξιανθίες (κεφάλιο) και η ανθοφορία του κλιμακώνεται από το Μάιο έως και τον Ιούνιο ανάλογα με το υψόμετρο (Καββάδας, 1956). Το κάθε κεφάλιο περιλαμβάνει περίπου 30 καρπούς. Ο κάθε καρπός εσωκλείει

ένα σπόρο λείο με σχήμα ωοειδές διαμέτρου 2 mm και χρώμα που κυμαίνεται από ανοιχτό έως σκούρο κίτρινο.

Το φυτό μπορεί να χρησιμοποιηθεί στην φαρμακοβιομηχανία λόγω των αντιοξειδωτικών, αντιφλεγμονωδών και αντιδιαβητικών ιδιοτήτων του, καθώς και των αιθέριων ελαίων που βρίσκονται στα άνθη και στους σπόρους του (Pistelli, 2007), ενώ το κύριο χαρακτηριστικό του, είναι η ανθεκτικότητά του στην αλατότητα των εδαφών και στις δυσμενείς καιρικές συνθήκες. Ως εκ τούτου ενδείκνυται η χρήση του για την κάλυψη παραθαλάσσιων πρανών και γενικά για αποκαταστάσεις προβληματικών περιοχών, όπως περιοχές με ξηροθερμικές συνθήκες που κινδυνεύουν από διάβρωση του εδάφους (Tutin κ.ά., 1972, Motta, 1992).

Οι σπόροι του φυτού εμφανίζουν φυσικό λήθαργο (Morbidoni κ.ά., 2008), λόγω της αδιάβροχης εφυμενίδας τους, η οποία είναι παρόμοια σε όλα τα Fabaceae (Baskin & Baskin, 1989). Επίσης οι σπόροι εμφανίζουν υψηλή βιωσιμότητα με την πάροδο του χρόνου, αντοχή στην αλατότητα των εδαφών καθώς και στις υψηλές θερμοκρασίες (Morbidoni κ.ά., 2008).

Με στόχο τη διάδοση του είδους ως καλλωπιστικό σε αστικές και περιαστικές περιοχές, καθώς και χώρους με υποβαθμισμένο εδαφικό περιβάλλον, όπως οι αρχαιολογικοί χώροι, στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η βλαστικότητα των σπόρων του, ως πρώτη προσέγγιση ανάπτυξης μεθόδου πολλαπλασιασμού του είδους.

Υλικά και Μέθοδοι

Σπόροι συλλέχθηκαν το Δεκέμβριο 2012 από επιλεγμένα αυτοφυή φυτά *A. barbajonis* L., ξηράθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και αποθηκεύτηκαν στο σκοτάδι σε γυάλινα βάζα, σε θερμοκρασία δωματίου, για 24 μήνες. Πριν τη χρήση των σπόρων πραγματοποιήθηκε τεστ τετραζολίου για τον έλεγχο της βιωσιμότητάς τους. Ελέγχθηκαν σπόροι με ή χωρίς προμεταχείριση μηχανικού σκαριφισμού. Στους σπόρους χωρίς προμεταχείριση χρωματίστηκε το 50% των εμβρύων, ενώ στους σπόρους που έγινε σκαριφισμός χρωματίστηκε το 96% των εμβρύων.

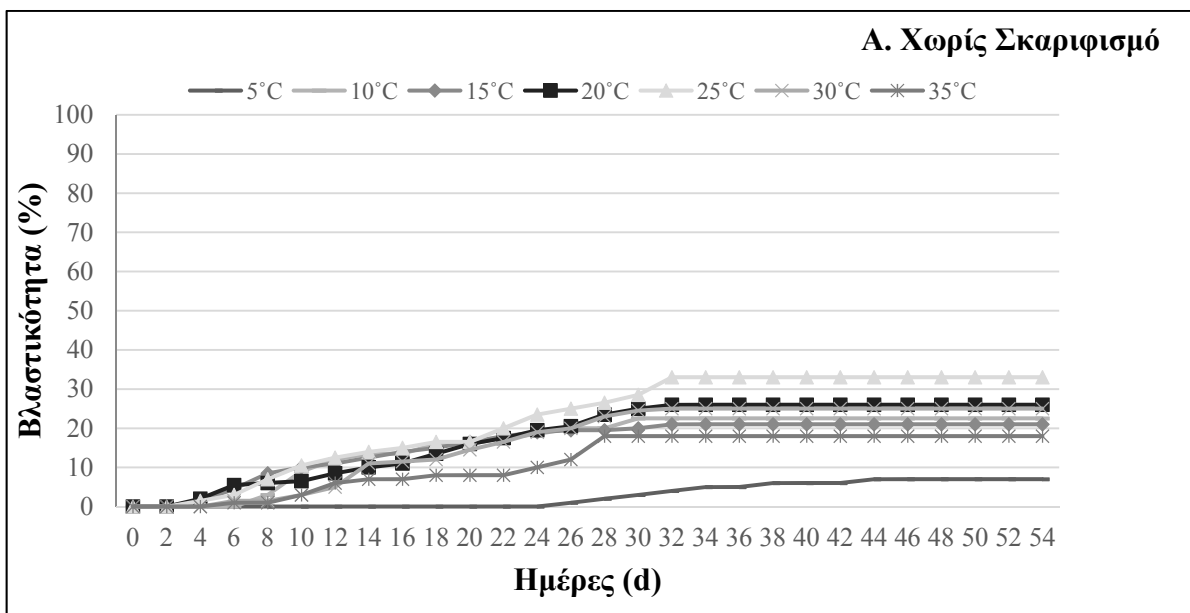
Χρησιμοποιήθηκαν σπόροι χωρίς περικάρπιο, με ή χωρίς προμεταχείριση μηχανικού σκαριφισμού. Μετά την απομάκρυνση του περικαρπίου και το σκαριφισμό, ο οποίος έγινε για 1 min με γυαλόχαρτο (No 100), έγινε επιφανειακή απολύμανση των σπόρων με 20% υδατικό διάλυμα χλωρίνης εμπορίου (4,5% υποχλωριώδες νάτριο) που περιείχε 0.1% Tween 20 (προσκολλητική ουσία), υπό ανάδευση για 10 min. Ακολούθησαν τέσσερα τρίλεπτα ξεπλύματα με απεσταγμένο, αποστειρωμένο νερό και καλλιεργήθηκαν για βλάστηση *in vitro*, σε τρυβλία Petri με στερεό υπόστρωμα MS (Murashige and Skoog, 1962) μισής δύναμης, που περιείχε 8 g l⁻¹ agar και 20 g l⁻¹ σακχαρόζη, σε θερμοκρασίες 5, 10, 15, 20, 25, 30 ή 35 °C, σε συνθήκες συνεχούς σκότους και σε φωτοπερίοδο 16 h φως (37,5 μmol m⁻² s⁻¹) που προέρχονταν από λαμπτήρες φθορισμού. Η περίοδος βλάστησης των σπόρων διήρκεσε 33 ημέρες για όλες τις θερμοκρασίες εκτός από τους 5 °C όπου διήρκεσε περίπου δύο μήνες. Σε κάθε επέμβαση χρησιμοποιήθηκαν 100 σπόροι (20 σπόροι ανά τρυβλίο, n=5). Ως βλάστηση ορίστηκε η εμφάνιση ριζιδίου τουλάχιστον 1 mm μήκους, σύμφωνα με τον International Seed Testing Association (1999).

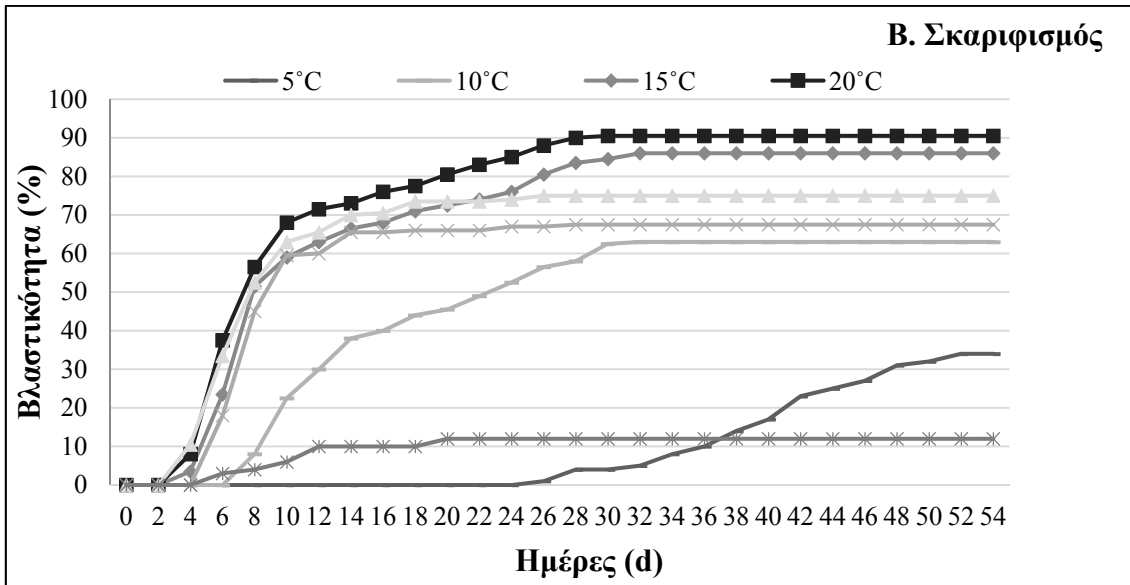
Χρησιμοποιήθηκε το εντελώς τυχαίοποιημένο σχέδιο, η σημαντικότητα των αποτελεσμάτων ελέγχθηκε με ανάλυση της διασποράς και η σύγκριση των μέσων των επεμβάσεων έγινε με Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

Αποτελέσματα και Συζήτηση

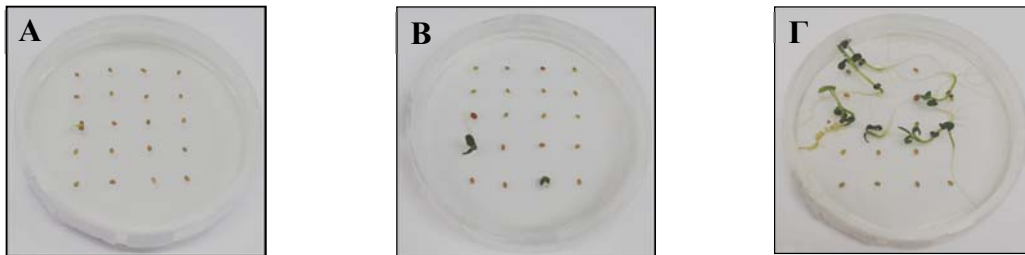
Οι σπόροι διατήρησαν τη βλαστικότητα τους, για περίοδο 24 μηνών μετά τη συλλογή τους, σε θερμοκρασία δωματίου και βλάστησαν σε όλες τις επεμβάσεις. Η βλάστηση σκαριφισμένων και μη σκαριφισμένων σπόρων ξεκίνησε την 4^η ημέρα σε θερμοκρασίες 15 έως 35 °C, την 8^η ημέρα στους 10 °C, ενώ στους 5 °C η βλάστηση ξεκίνησε σε ένα μήνα περίπου (Σχ. 1, Εικ. 1 και 2). Ο μηχανικός σκαριφισμός για 1 min με γυαλόχαρτο είχε ευνοϊκή επίδραση στη βλάστηση των σπόρων, όπως αναφέρουν και οι Morbidoni κ.ά. (2008). Σκαριφισμένοι σπόροι βλάστησαν σε υψηλότερα ποσοστά σε σύγκριση με τους σπόρους που δεν είχαν δεχθεί προμεταχείριση σκαριφισμού, είτε η καλλιέργεια έγινε σε 16 h φως είτε σε συνεχές σκοτάδι.

Η φωτοπερίοδος δεν είχε επίδραση στη βλαστικότητα των σπόρων. Οι σπόροι στους 5 και 35 °C σημείωσαν το χαμηλότερο ποσοστό βλαστικότητας (χωρίς προμεταχείριση 7% και 18%, αντίστοιχα και με σκαριφισμό 34% και 12%, αντίστοιχα). Στις θερμοκρασίες 10 έως 30 °C το ποσοστό βλαστικότητας κυμάνθηκε από 56-97% σε σκαριφισμένους σπόρους και 19-38% σε μη σκαριφισμένους. Σκαριφισμένοι σπόροι εμφάνισαν την υψηλότερη βλαστικότητα (88-97%) στους 15 και 20 °C (Σχ. 1, Εικ. 2), ενώ μη σκαριφισμένοι σπόροι βλάστησαν σε υψηλότερα ποσοστά (28-38 %) στους 25 °C (Σχ. 1, Εικ. 1). Τα αποτελέσματα συνάδουν με αυτά των Morbidoni κ.ά. (2008), όπου η βλαστικότητα των σκαριφισμένων σπόρων ήταν κατά πολύ υψηλότερη (78%) σε σύγκριση με αυτή σπόρων χωρίς προμεταχείριση (3%), αλλά στην παρούσα μελέτη η βλαστικότητα ήταν γενικώς υψηλότερη.

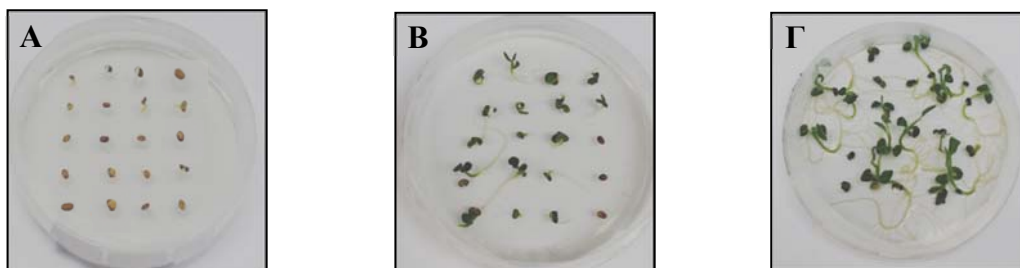




Σχήμα 1. Βλαστικότητα σπόρων *A. barba-jovis* 24 μήνες μετά τη συλλογή τους, στους 5, 10, 15, 20, 25, 30 ή 35 °C, χωρίς προμεταχείριση (A) και ύστερα από προμεταχείριση μηχανικού σκαριφισμού (B).



Εικόνα 1. Βλάστηση σπόρων *A. barba-jovis*, *in vitro*, σε τρυβλία Petri, με στερεό υπόστρωμα MS μισής δύναμης, χωρίς προμεταχείριση στους 25 °C: 4^η ημέρα (A), 14^η ημέρα (B), 28^η ημέρα (Γ).



Εικόνα 2. Βλάστηση σπόρων *A. barba-jovis*, *in vitro*, σε τρυβλία Petri, με στερεό υπόστρωμα MS μισής δύναμης, με προμεταχείριση μηχανικού σκαριφισμού στους 20 °C: 4^η ημέρα (A), 14^η ημέρα (B), 28^η ημέρα (Γ).

Βιβλιογραφία

- Baskin, J.M. and Baskin, C.C. 1989. Physiology of dormancy and germination in relation to seed bank ecology. In: Leck MA, Parker VT, Simpson RL, editors. Ecology of soil seed banks. Academic Press, San Diego, pp 53–66.
- Biondi, E., Vagge, I. and Mossa, L. 2000. On the phytosociological importance of *Anthyllis barba-jovis* L. Colloq. Phytosociol. XXVII:95-104.
- International Seed Testing Association. 1999. International rules for seed testing. Seed Sci. Technol. 27(suppl.):333.
- Καββάδας, Δ. 1956. Βοτανικό Φυτοπαθολογικό Λεξικό. Τόμος Δ, Αθήνα, pp. 478-481.
- Morbidoni, M., Estrelles, E., Soriano, P., Martinez-Solis, I. and Biondi, E. 2008. Effects of environmental factors on seed germination of *Anthyllis barba-jovis* L. Plant Biosyst. 142:275-286.
- Motta, F. 1992. Nel Mondo della Natura, Enciclopedia di Scienze Naturali, vol. 1, F. Motta (Ed), Milano.
- Murashige, T. and Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.
- Pignatti, S. 1982. Flora d'Italia. Edagricole, vol. 1, Bologna.
- Pistelli, L., Noccioli, C., Bertoli, A., Scapecchi, G. and Potenza, D. 2007. Chemical composition and volatile constituents of *Anthyllis barba-jovis*. Nat. Prod. Res. 21(5):418-425.
- Southon, I.W. 1994. Phytochemical Dictionary of the Leguminosae - vol. 1. Chapman & Hall, London.
- Tutin, G.T., Heywood, V., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M. and Webb, D.A. 1972. Flora Europaea, vol. 4, Cambridge Univ. Press, Cambridge.

ΕΣΠΑ 2007-2013, ΕΠΙΧΕΙΡΗΣΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ & ΔΙΑ ΒΙΟΥ ΜΑΘΗΣΗ – ΘΑΛΗΣ – ARCHAEOSCAPE