

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΔΕΝΔΡΟΚΟΜΙΑΣ

Άμεση Οργανογένεση Νερατζιάς *in vitro* από Έκφυτα Επικοτυλίου

Τριμελής επιτροπή

Επιβλέπων: Ρούσσος Πέτρος (Λέκτορας)

Μέλη: Βέμμος Σταύρος (Αναπληρωτής Καθηγητής)

Τσαντίλη Ελένη (Αναπληρώτρια Καθηγήτρια)

ΓΕΩΡΓΙΑ ΔΗΜΗΤΡΙΟΥ

ΑΘΗΝΑ 2009

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Ευχαριστώ θερμά τον Λέκτορα του Εργαστηρίου Δενδροκομίας κύριο Πέτρο Ρούσσο για την ανάθεση της πτυχιακής μελέτης και τη συνεχή επιστημονική καθοδήγηση και επίβλεψη κατά την εκπόνηση και συγγραφή αυτής.

Επίσης, ευχαριστώ πολύ το προσωπικό του εργαστηρίου, για την παραχώρηση του εργαστηριακού εξοπλισμού και την γενικότερη συνεργασία.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	σελίδα
1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	3
1.1 ΠΡΟΛΟΓΟΣ	3
1.1.1 Η σημασία των εσπεριδοειδών	3
1.1.2 Βοτανική ταξινόμηση των εσπεριδοειδών	3
1.2 ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΕΣΠΕΡΙΔΟΕΙΔΩΝ	4
1.2.1 Γενικά	4
1.2.2 Υποκείμενα εσπεριδοειδών	5
1.3 ΝΕΡΑΤΖΙΑ	6
1.3.1 Γενικά	6
1.4 ΤΡΟΠΟΙ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΝΕΡΑΤΖΙΑΣ	7
1.4.1 Γενικά	7
1.4.2 Εγγενής πολλαπλασιασμός	7
1.4.3 Αγενής πολλαπλασιασμός	8
1.5 ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ <i>IN VITRO</i>	8
1.5.1 Γενικά	8
1.5.2 Πλεονεκτήματα <i>in vitro</i> πολλαπλασιασμού	9
1.5.3 Παράγοντες που επηρεάζουν τον <i>in vitro</i> πολλαπλασιασμό	10
1.6 ΟΡΓΑΝΟΓΕΝΕΣΗ	12
1.7 ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΤΗΣ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ	13
1.8 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΚΟΠΟΣ	19
2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	20
2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	20
2.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ MURASHIGE AND TUCKER	20
2.3 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΦΥΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ	22
2.3.1 Παραλαβή και φύτευση σπόρων νερατζιάς	22
2.3.2 Ανάπτυξη σποροφύτων και παραλαβή εκφύτων	22
2.4 ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ	23
2.5 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ	24
3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	26
4 ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	38

5	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	43
----------	---------------------	-----------

	ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΙΚΟΝΩΝ	48
--	--------------------------	-----------

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΠΡΟΛΟΓΟΣ

1.1.1 Η ΣΗΜΑΣΙΑ ΤΩΝ ΕΣΠΕΡΙΔΟΕΙΔΩΝ

Η σημασία των εσπεριδοειδών στη γεωργία και στην παγκόσμια οικονομία συνάγεται από την ευρεία τους εξάπλωση και τη μεγάλη παραγωγή. Τα εσπεριδοειδή καλλιεργούνται σε χώρες που έχουν τροπικό και υποτροπικό κλίμα, κατάλληλο έδαφος, επαρκή υγρασία και είναι απαλλαγμένες από παγετούς. Οι καλλιεργούμενες περιοχές συνιστούν μια ζώνη που εκτείνεται, κατά προσέγγιση, 35° Βόρεια και Νότια του Ισημερινού.

Οι κυρίως καλλιεργούμενες εκτάσεις βρίσκονται σε υποτροπικές περιοχές με γεωγραφικό πλάτος μεγαλύτερο των 20° Βόρεια ή Νότια του Ισημερινού. Η καλλιεργούμενη έκταση σε παγκόσμια κλίμακα υπολογίζεται σε 24 εκατομμύρια στρέμματα, της οποίας το 80% ανήκει στις παραμεσόγειες χώρες και στη Βόρεια και Κεντρική Αμερική. Το υπόλοιπο 20% κατανέμεται στην Άπω Ανατολή (10%), Νότιο Αμερική (6%) και σε άλλες χώρες του Νότιου ημισφαιρίου (4%), συμπεριλαμβανομένων της Νοτίου Αφρικής και της Αυστραλίας. Η παραγωγή σε παγκόσμια κλίμακα υπολογίζεται σε 67.398.000 μετρικούς τόνους. Για κάθε είδος αντιστοιχούν κατά προσέγγιση τα εξής ποσοστά: πορτοκάλια 65%, λεμόνια 10%, γκρέιπ φρουτ 10%, μανταρίνια 12%, λοιπά είδη 3%.

Οι παραμεσόγειες χώρες διαθέτουν το 80% της εξαγόμενης παραγωγής σε φρέσκο καρπό και το 20% σε επεξεργασμένη μορφή, ενώ η Βόρεια και Κεντρική Αμερική διαθέτουν μόνο το 20% της παραγωγής σε φρέσκο καρπό και το 80% σε επεξεργασμένη μορφή (Ποντίκης, 2003).

1.1.2 ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ ΤΩΝ ΕΣΠΕΡΙΔΟΕΙΔΩΝ

Τα εσπεριδοειδή, γενικά, ανήκουν στην οικογένεια *Rutaceae* η οποία ανήκει στη διαίρεση *Embryophyta Siphonogana* ή *Spermatophyta*, στην υποδιαίρεση *Angiosperme*, στην κλάση *Dicotyledoneae*, στην υπόκλαση *Archichlamydeae* (*Choropitalae* και *Apetalae*), στην τάξη *Geraniales*, στην υπόταξη *Geraniineae*, μαζί με άλλες 11 οικογένειες φυτών.

Ο Swingle με τον όρο αληθινά εσπεριδοειδή ονομάζει τα έξι γένη της υποφυλής *Citrinae*: *Citrus*, *Eremocitrus*, *Microcitrus*, *Clymenia*, *Poncirus* και *Fortunella*. Από αυτά, οικονομικής σημασίας είναι τα γένη: *Citrus*, *Poncirus* και *Fortunella*. Το πιο ενδιαφέρον, όμως, από αυτά είναι το γένος *Citrus*.

Σήμερα, υπάρχουν δύο κύρια συστήματα ταξινομήσεως του γένους αυτού: το σύστημα κατά W.T. Swingle (1943) και το σύστημα κατά T. Tanaka. Κατά το πρώτο, το οποίο και θα ακολουθήσουμε, το γένος *Citrus* ταξινομείται σε δύο υπογένη: *Citrus* ή *Eucitrus* και *Papeda*.

CITRUS: περιλαμβάνει όλα τα εμπορικά καλλιεργούμενα είδη, τα οποία χαρακτηρίζονται από καρπούς με νόστιμο και αρωματικό χυμό, υπόξινο ή γλυκό και είναι απαλλαγμένα μερικώς ή εξ ολοκλήρου ελαιοσταγονιδίων με πικρή γεύση. Αποτελεί το επίτευγμα μιας μεγάλης περιόδου, προοδευτικής εξελίξεως, που άρχισε πριν από 20 εκατομμύρια χρόνια περίπου και προέρχεται από την περιοχή της Νέας Γουϊνέας και της Μελανησίας. Η εξέλιξή του, όμως, σε διάφορα είδη, έγινε στη Ν.Α. Ασία. Από τα εδώδιμα είδη του υπογένους αυτού, τα πιο σημαντικά είναι τα ακόλουθα: *Citrus sinensis* (πορτοκαλιά), *C. limon* (λεμονιά), *C. reticulata* (μανταρινιά), *C. paradisi* (γκρέιπ φρουτ), *C. medica* (κιτριά), *C. grandis* (φράπα), *C. aurantifolia* (λιμεττία) και *C. aurantium* (νερατζιά).

PAPEDA: περιλαμβάνει είδη μη φαγώσιμα. Κανένα είδος του υπογένους αυτού δεν παράγει καρπούς φαγώσιμους, γιατί οι καρποί αυτών περιέχουν πυκνές συγκεντρώσεις ελαιοσταγονιδίων με πικρή γεύση. Επί προσθέτως, χαρακτηρίζονται από μικρά άνθη και από πολύ μικρούς καρπούς. Τα είδη αυτά έχουν αναπτυχθεί στο Ανατολικό Ινδικό Αρχιπέλαγος, τις Φιλιππίνες, τη Νέα Γουϊνέα και τη Μελανησία. Αναμφίβολα, από τα είδη αυτά προήλθαν τα νόστιμα είδη του υπογένους *Citrus*, όταν μερικά από αυτά έφτασαν στην Ασιατική ήπειρο (Ποντίκης, 2003).

1.2 ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΕΣΠΕΡΙΔΟΕΙΔΩΝ

1.2.1 ΓΕΝΙΚΑ

Τα εσπεριδοειδή πολλαπλασιάζονται, συνήθως, δια εμβολιασμού, με ενοφθαλμισμό ή μικροεκκεντρισμό της επιθυμητής ποικιλίας σε σπορόφυτα

υποκείμενα. Η μέθοδος του εμβολιασμού με εκκεντρισμό χρησιμοποιείται συνήθως σε περιπτώσεις αλλαγής ποικιλίας σε παλιά εσπεριδοφυτεία.

Πολλά, όμως, είδη πολλαπλασιάζονται και με φυλλοφόρα μοσχεύματα.

Η παραγωγή των εσπεριδοδενδρυλλίων γίνεται σε υπαίθρια φυτώρια ή σε δοχεία (πλαστικά, σακούλες κτλ), με την τελευταία μέθοδο να κερδίζει συνεχώς έδαφος τα τελευταία χρόνια.

Για την παραγωγή υποκειμένων χρησιμοποιείται σπόρος. Η καλύτερη εποχή σποράς είναι η άνοιξη, όταν το έδαφος έχει κάπως ζεσταθεί. Όταν τα σπορόφυτα αποκτήσουν ύψος 20-30 εκ. μεταφυτεύονται στο φυτώριο (εφόσον πρόκειται για υπαίθριο πολλαπλασιασμό εσπεριδοειδών), ή σε ατομικό δοχείο ή σακούλα. Η καλύτερη εποχή μεταφύτευσης είναι η άνοιξη, όταν έχουν παρέλθει οι παγετοί, ενώ ο εμβολιασμός τους γίνεται συνήθως το φθινόπωρο. Στις μέρες μας, η δυνατότητα παραγωγής και διάθεσης πιστοποιημένου φυτωριακού υλικού, απαλλαγμένου από ιώσεις, επέτρεψε την ευρεία χρησιμοποίηση των διαφόρων υποκειμένων, πράγμα που δεν μπορούσε να γίνει παλαιότερα εξαιτίας της μόλυνσης αυτών με ένα ή περισσότερους ιούς (Ποντίκης, 2003).

1.2.2 ΥΠΟΚΕΙΜΕΝΑ ΕΣΠΕΡΙΔΟΕΙΔΩΝ

Τα υποκείμενα των εσπεριδοειδών επηρεάζουν θετικά τις εμβολιαζόμενες σε αυτά ποικιλίες ως εξής:

Α) επιταχύνουν την είσοδο των δένδρων σε καρποφορία και εξαλείφουν τα προβλήματα που δημιουργεί η νεανικότητα,

Β) παρέχουν ομοιόμορφο μέγεθος στα δένδρα,

Γ) αυξάνουν την παραγωγή και βελτιώνουν την ποιότητα των καρπών,

Δ) είναι ανθεκτικά σε δυσμενείς παράγοντες του εδάφους (άλατα, υψηλό pH, υψηλή περιεκτικότητα σε ανθρακικό ασβέστιο και κακή αποστράγγιση) και

Ε) είναι ανθεκτικά σε ιώσεις, νηματώδεις και μυκητολογικές παθήσεις.

Τα κυριότερα υποκείμενα εσπεριδοειδών που χρησιμοποιούνται σήμερα, είναι: νερατζιά, τραχύκαρπος λεμονιά, τρίφυλλος πορτοκαλιά, Troyer citrange, Carrizo, ράνγκπουρ, λεμονιά Αλέμο, Κλεοπάτρα μανταρινιά.

Στην παρούσα εργασία εμείς θα εστιάσουμε στην αξία της νερατζιάς ως υποκείμενο, καθώς και στη αναγκαιότητα χρησιμοποίησής της για την εγκατάσταση παραγωγικής εσπεριδοφυτείας.

1.3 ΝΕΡΑΤΖΙΑ

1.3.1 ΓΕΝΙΚΑ

Από τις τρεις αναγνωρισμένες ομάδες νερατζιών, τις οξύχυμες κοινές, τις γλυκόξινες και τις διάφορες οξύχυμες νερατζιές, μόνο οι κοινές ενδείκνυνται ως υποκείμενα.

Η ευρεία χρήση της νερατζιάς ως υποκείμενο οφείλεται, κυρίως, στην ανθεκτικότητά της στο ψύχος και σε αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες εν γένει. Θεωρείται πολύ καλό υποκείμενο για τα πιο πολλά είδη εσπεριδοειδών (κυρίως πορτοκαλιάς, γκρέιπ φρουτ, μανταρινιάς), λόγω της ζωηρότητάς της, της αντοχής της στον παγετό, του βαθιού ριζικού της συστήματος (ανθεκτική στην ξηρασία), της ανθεκτικότητάς της στη φυτόφθορα (Webber, 1948), παρόλο που υπάρχουν και αναφορές για ευαισθησία αυτής στη φυτόφθορα (Hutchison et al., 1972; Hutchison and Grimm, 1973) και της ανθεκτικότητάς της στην υπερβολική υγρασία. Είναι, τέλος, γεγονός ότι δίνει υψηλό ποσοστό (75-80%) νουκελλικών ή απογαμικών σποροφύτων.

Από την άλλη, δεν είναι απολύτως ανθεκτική στις ιώσεις exocortis και xylorosis, των οποίων είναι φορέας χωρίς συμπτώματα. Επίσης, είναι ευαίσθητη στους νηματώδεις (*Tylenchulus semipenetrans*, *Radopholus similis* κ.ά.). Ακόμα, οι ποικιλίες πάνω σε αυτήν είναι ευπαθείς στην κορυφοξήρα (*Deuterophoma tracheiphila*).

Το μεγαλύτερο, όμως, μειονέκτημά της είναι η ευπάθειά της στην ίωση tristeza. Μόνο ίσως η λεμονιά μπορεί να επιβιώσει πάνω σε υποκείμενο νερατζιάς, σε περιοχές που υπάρχει η ίωση, με την προϋπόθεση, βέβαια, ότι θα καταστρέφονται οι εκφυόμενοι λαίμαργοι του υποκειμένου. Σε πολλές παραγωγικές περιοχές, εσπεριδοφυτείες που είχαν ως υποκείμενο τη νερατζιά αντικαταστάθηκαν με φυτείες που φέρουν υποκείμενα ανθεκτικά στην εν λόγω ίωση. Στην Ισπανία η χρήση της έχει απαγορευτεί. Όπως όλα δείχνουν, είναι επιτακτική η ανάγκη δημιουργίας διαγονιδιακών φυτών ή/και υβριδίων νερατζιάς που θα παρουσιάζουν ανθεκτικότητα στην tristeza. Το *C. taiwanica*, είναι πιθανώς ένα τέτοιο υβρίδιο νερατζιάς, που βρίσκεται υπό δοκιμή. Δυστυχώς, δοκιμασμένο με διάφορες ποικιλίες εσπεριδοειδών έδωσε φτωχή παραγωγή και ποιότητα καρπών.

Συνθήκες ανάπτυξης νερατζιάς: αναπτύσσεται καλύτερα σε υγρά, ελαφρώς βαριά εδάφη και ανέχεται σε μεγάλο βαθμό τα ασβεστώδη. Είναι μετρίως ανεκτική στα άλατα, ανεκτική στο υψηλό pH του εδάφους και στη γνωστή ως Blight πάθηση.

Παραγωγική ικανότητα: οι εσπεριδοφυτείες στις οποίες χρησιμοποιείται ως υποκείμενο δίνουν πολύ καλή παραγωγή. Οι εμβολιαζόμενες σε αυτήν ποικιλίες δίνουν δένδρα μέσου (κανονικού) μεγέθους. Οι δε καρποί των ποικιλιών αυτών είναι μέσου έως μεγάλου μεγέθους, λεπτόφλοιοι, λείοι, χυμώδεις, εξαιρετικής ποιότητας και μεγαλύτερης περιεκτικότητας σε ασκορβικό οξύ, συγκριτικά με εκείνους που παράγονται επί οποιουδήποτε άλλου υποκειμένου.

1.4 ΤΡΟΠΟΙ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΝΕΡΑΤΖΙΑΣ

1.4.1 ΓΕΝΙΚΑ

Ο πολλαπλασιασμός της νερατζιάς, όπως και των λοιπών υποκειμένων, γίνεται με τους εξής τρόπους:

1. Εγγενώς (με σπόρο)
2. Αγενώς (με μοσχεύματα, με *in vitro* πολλαπλασιασμό κτλ.)

1.4.2 ΕΓΓΕΝΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ

Θα έπρεπε εξ αρχής να τονιστεί ότι με τον εγγενή πολλαπλασιασμό δεν αναπαράγεται πιστά η ποικιλία και τα σπορόφυτα που προκύπτουν πρέπει να εμβολιαστούν με την επιθυμητή ποικιλία. Ένα άλλο μειονέκτημα είναι ότι τα δενδρύλλια που παράγονται αργούν να μπουν σε καρποφορία (μετά τον τρίτο ή τέταρτο χρόνο απ' τον εμβολιασμό). Παρόλα αυτά, όμως, το μεγάλο ποσοστό νουκελλικών εμβρύων δίδει τη δυνατότητα πιστής αναπαραγωγής του επιθυμητού υποκειμένου, με παραγωγή σποροφύτων όμοιων τόσο με το μητρικό φυτό όσο και μεταξύ τους.

Τα φυτά που προέρχονται από σπόρο είναι ζωνηρά, εύρωστα, έχουν πλούσιο ριζικό σύστημα, πολύ καλή προσαρμογή στο περιβάλλον και αυξημένη αντοχή σε εχθρούς και ασθένειες.

1.4.3 ΑΓΕΝΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ

Ο αγενής πολλαπλασιασμός της νερατζιάς μπορεί να γίνει με φυλλοφόρα μοσχεύματα στην υδρονέφωση, αλλά δε συνίσταται για εμπορικούς, κυρίως, λόγους.

1.5 ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ *IN VITRO*

1.5.1 ΓΕΝΙΚΑ

Αν και ο πολλαπλασιασμός *in vitro* αποτελεί κομμάτι του αγενούς πολλαπλασιασμού, στην παρούσα μελέτη θα αναπτυχθεί ξεχωριστά, εφ'όσον αποτελεί και το θέμα αυτής.

Η τεχνική *in vitro* αφορά, γενικά, την καλλιέργεια ασηπτικά κυττάρων και οργάνων ζώντων οργανισμών, καθώς και την μεταχείριση των καλλιεργειών αυτών ανάλογα με τον επιδιωκόμενο τελικό σκοπό (έρευνα, βελτίωση, αναπαραγωγή, εξυγίανση).

Από τη στιγμή που αναγνωρίστηκε η μεγάλη οικονομική σημασία της καλλιέργειας της νερατζιάς ως υποκείμενο, επιστρατεύτηκε από πολλούς ερευνητές η τεχνική της *in vitro* καλλιέργειας διαφόρων οργάνων του φυτού με σκοπό να ικανοποιηθεί η αυξημένη ζήτηση μεγάλων ποσοτήτων πολλαπλασιαστικού υλικού σε μικρό χρονικό διάστημα. Το πολλαπλασιαστικό υλικό έπρεπε να είναι υγιές, απαλλαγμένο από ιώσεις και τα φυτά που θα προκύπτουν να φέρουν τα επιλεγμένα χαρακτηριστικά.

Όσον αφορά την εμπορική χρήση της ιστοκαλλιέργειας φυτών (ή αλλιώς μικροπολλαπλασιασμό), κυρίως, συνίσταται στην αναγέννηση ολόκληρων, υγιών και βιώσιμων φυτών από διάφορα έκφυτα σε σύντομο χρονικό διάστημα (Ποντίκης, 1994).

Η τεχνική αυτή παρουσιάζει πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους πολλαπλασιασμού, τα οποία αναφέρονται παρακάτω.

Σημείωση: από τώρα και στο εξής, με τον όρο έκφυτο θα εννοείται οποιοσδήποτε ιστός ή τμήμα ιστού του μητρικού φυτού το οποίο χρησιμοποιείται στον *in vitro* πολλαπλασιασμό και από το οποίο μπορεί να αναπαραχθεί το φυτό από το οποίο προήλθε.

1.5.2 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ *IN VITRO* ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ

1. Η κλωνική αναπαραγωγή των μητρικών φυτών, δηλαδή η παραγωγή γενετικά όμοιων φυτών-απογόνων με το μητρικό φυτό αλλά και μεταξύ τους, κυρίως, όταν χρησιμοποιούνται μεριστωματικά έκφυτα. Αντίθετα, με τις συμβατικές μεθόδους πολλαπλασιασμού και όταν χρησιμοποιούνται μη μεριστωματικά έκφυτα, μπορεί να παρατηρηθούν είτε διασχίσεις των γενετικών χαρακτηριστικών του μητρικού φυτού, είτε χημικά φαινόμενα (π.χ. με μοσχεύματα και καταβολάδες). Το πλεονέκτημα αυτό εξασφαλίζει την ομοιομορφία της φυτείας και κατ' επέκταση της παραγωγής.
2. Η αυξημένη παραγωγή φυτών σε σύντομο χρονικό διάστημα.
3. Η εξοικονόμηση αποθηκευτικών χώρων. Για παράδειγμα, ένας εργαστηριακός χώρος 100 m² είναι αρκετός για την παραγωγή ενός εκατομμυρίου φυτών ετησίως.
4. Η αποδέσμευση της παραγωγής από εξωτερικές περιβαλλοντικές συνθήκες και περιορισμούς, αφού η όλη διαδικασία της τεχνικής του μικροπολλαπλασιασμού πραγματοποιείται σε κλειστό εργαστηριακό χώρο κάτω από αυστηρά ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας, φωτοπεριόδου και υγρασίας.
5. Η παραγωγή άνοσου φυτικού υλικού, κυρίως, όσον αφορά τις ιώσεις. Αυτό προϋποθέτει: (α) Την καλλιέργεια μεριστωμάτων ή την παραγωγή σωματικών εμβρύων, τα οποία έχουν μειωμένη ή μηδενική αγγειακή σύνδεση με τους μητρικούς ιστούς και επομένως, είναι θεωρητικά τουλάχιστον, απαλλαγμένα από ιώσεις. (β) Την εφαρμογή θερμοθεραπείας ή και χημειοθεραπείας για την εξάλειψη των παθογόνων (κυρίως ιών και βακτηρίων).
6. Για ορισμένα φυτικά είδη (κυρίως γλαστρικά και κηποτεχνικά εξωτερικού χώρου), ο μικροπολλαπλασιασμός εξακολουθεί να είναι η μοναδική εμπορική μέθοδος πολλαπλασιασμού.
7. Η μακρά διατήρηση γενετικού υλικού, χωρίς αυτό να υφίσταται αλλοιώσεις.(Ποντίκης, 1994).

8. 1.5.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΟΝ *IN VITRO* ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ

Σε περιπτώσεις που χρησιμοποιείται η *in vitro* τεχνική για τον πολλαπλασιασμό της νερατζιάς, αλλά και των περισσότερων φυτών, είναι απαραίτητο να επισημαίνονται και να δίνεται ιδιαίτερη προσοχή στους παρακάτω παράγοντες, οι οποίοι διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη συγκεκριμένη τεχνική:

A) Το είδος του εκφύτου

Ανάλογα με το είδος του εκφύτου που χρησιμοποιείται μπορεί να έχουμε τις εξής περιπτώσεις:

1. Καλλιέργεια οργάνων, όπως έμβρυα, ανθήρες, τμήματα ριζών και βλαστών, κοτυληδόνες κ.ά., κάτω από ασηπτικές συνθήκες.
2. Ασηπτική καλλιέργεια μεριστωμάτων βλαστού ή άλλων ιστών του φυτού με στόχο τη μορφογένεση και την ανάπτυξη ολοκληρωμένων φυτών.
3. Καλλιέργεια κάλλου, δηλαδή καλλιέργεια μάζας αδιαφοροποίητων κυττάρων με στόχο την παραγωγή εμβρυοειδών ή την οργανογένεση.
4. Καλλιέργεια πρωτοπλάστων. Οι πρωτοπλάστες καλλιεργούνται σε ειδικό θρεπτικό μέσο όπου επιτυγχάνεται η σύντηξή τους και στη συνέχεια η παραγωγή εμβρυοειδών από αυτούς. (Ποντίκης, 1994).

B) Η σύνθεση του θρεπτικού υποστρώματος

Το έκφυτο, το οποίο έχουμε επιλέξει να καλλιεργήσουμε και στη συνέχεια να πολλαπλασιάσουμε, για να αναπτυχθεί ικανοποιητικά πρέπει να φυτευτεί σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα, το οποίο συνήθως περιλαμβάνει τις παρακάτω κατηγορίες θρεπτικών συστατικών:

1. **Μακροστοιχεία**
2. **Μικροστοιχεία**
3. **Βιταμίνες**
4. **Αμινοξέα και αμίδια**
5. **Ασυνήθη σάκχαρα και αλκοολοσάκχαρα ανοιχτής μακράς αλυσίδας (πολυόλες)**
6. **Οργανικά οξέα, άλατα οργανικών οξέων και ρυθμιστικά διαλύματα**

Πέρα από αυτές τις παραπάνω κατηγορίες συστατικών, τα υποστρώματα περιλαμβάνουν και τα παρακάτω συστατικά:

I. Σάκχαρο: συνήθως σακχαρόζη ή γλυκόζη,

II. Αυξητικές ρυθμιστικές ουσίες: οι αυξητικές ρυθμιστικές ουσίες είναι συστατικά, τα οποία σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις είναι ικανά να ρυθμίσουν την αύξηση και την ανάπτυξη του φυτού. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες είναι το γιββερελλικό οξύ (**GA₃**), το ινδολυλοξικό οξύ (**IAA**), το ινδολυλοβουτυρικό οξύ (**IBA**), η βενζυλαδενίνη (**BA** ή **BAP**), το 1-ναφθαλινοξικό οξύ (**1-NAA**) και το 2-ναφθαλινοξικό οξύ (**2-NAA**) και

III. Άγαρ: το οποίο είναι αδρανές συστατικό και χρησιμοποιείται για την στερεοποίηση των υποστρωμάτων, μόνο στις περιπτώσεις όπου απαιτείται στερεό υπόστρωμα.

Τα υποστρώματα καλλιέργειας των φυτών συντίθεται, κυρίως, από συστατικά καθαρής μορφής, αν και η προσθήκη ακατέργαστων συστατικών, όπως χυμού διαφόρων καρπών, εκχυλισμάτων φυτών και χυμού φυτών, συνηθίζεται κατά καιρούς από μερικούς ερευνητές. Τα συστατικά αυτά, όμως, δεν αποτελούν και τους καθοριστικούς παράγοντες σε ότι αφορά τη σύνθεση ενός υποστρώματος.

Η σύσταση του υποστρώματος καλλιέργειας εξαρτάται από την λειτουργία και την προέλευση κάθε ιστού ή κυττάρου που θα καλλιεργηθεί τη δεδομένη στιγμή. Η παρουσία ή μη κάποιου θρεπτικού συστατικού στο υπόστρωμα αποφασίζεται πειραματικά από τον ερευνητή.

Συνήθως, τα υποστρώματα χωρίζονται σε τρία είδη με βάση την υφή τους και διαλέγουμε αυτό που ταιριάζει με το είδος του φυτού και του μεριστώματος που θα χρησιμοποιηθεί. Τα είδη είναι τα εξής:

1. το **υγρό** θρεπτικό υπόστρωμα, που χρησιμοποιείται κυρίως στην καλλιέργεια ριζών και στην κυτταροκαλλιέργεια,
2. το **ημιστερεοποιημένο** και
3. το **στερεοποιημένο**, το οποίο είναι και το πιο σύννηθες (Ποντίκης, 1994).

Γ) Το είδος των ρυθμιστών ανάπτυξης

Οι ρυθμιστές ανάπτυξης προστίθενται στο υπόστρωμα καλλιέργειας και είναι αυτοί που καθορίζουν το είδος του οργάνου που θα σχηματιστεί.

Για τον ρόλο τους στην ανάπτυξη του φυτικού υλικού πρέπει να αναφερθούν οι παρακάτω:

- Οι **αυξίνες** προάγουν, κυρίως, την επιμήκυνση των κυττάρων και χρησιμοποιούνται στο στάδιο της ριζοβολίας,
- Οι **κυτοκινίνες** ευνοούν, κυρίως, την διαίρεση των κυττάρων και χρησιμοποιούνται στο στάδιο της βλαστογένεσης,
- Οι **γιββερελλίνες** προάγουν, κυρίως, την επιμήκυνση των κυττάρων και χρησιμοποιούνται, επίσης, στο στάδιο της βλαστογένεσης
- Το **αιθυλένιο** και το **αμπισιλικό οξύ** είναι και αυτά ρυθμιστές ανάπτυξης οι οποίοι προωθούν τη γήρανση. Δε χρησιμοποιούνται συχνά στην *in vitro* καλλιέργεια.

Για την αναγέννηση και την ανάπτυξη βλαστών χρησιμοποιούνται οι κυτοκινίνες και ελάχιστα οι αυξίνες NAA και 2,4-D. Από τις κυτοκινίνες οι πιο διαδεδομένες είναι η βενζυλαδενίνη και η ζεατίνη ενώ λιγότερο χρησιμοποιούνται η κινετίνη και η 2-ισοπεντενυλαδενίνη (2iP). Για την πρόκληση της ριζοβολίας χρησιμοποιούνται το ινδολυλοξικό οξύ (IAA), το ινδολυλοβουτυρικό οξύ (IBA) και το ναφθαλινοξικό οξύ (NAA).

Οι συγκεντρώσεις των ρυθμιστών αύξησης που χρησιμοποιούνται καθορίζονται πειραματικά από τον κάθε ερευνητή ανάλογα με το είδος του εκφύτου που χρησιμοποιεί.

1.6 ΟΡΓΑΝΟΓΕΝΕΣΗ

Με τον όρο οργανογένεση εννοούμε τη διαδικασία εκείνη που επισυμβαίνει κατά τον *in vitro* πολλαπλασιασμό των φυτών, όταν από ένα τεμάχιο φυτικού ιστού του μητρικού φυτού προκαλείται ανάπτυξη οργάνων (πχ. οφθαλμών, βλαστών, ριζών κτλ) (χωρίς να προϋπάρχουν οφθαλμοί στην περίπτωση παραγωγής βλαστών). Έχει καταγραφεί για πολλούς γονοτύπους εσπεριδοειδών, ο *in vitro* σχηματισμός τυχαίων οφθαλμών και βλαστών από επικοτύλια ή μεσογονάτια διαστήματα (Barlass and Skene, 1986; Gmitter et al., 1992). Από πειράματα που έχουν γίνει μέχρι τώρα, φαίνεται πως η διαδικασία ελέγχεται ορμονικά. Συγκεκριμένα, η προσθήκη της κυτοκινίνης BA θεωρείται ως απαραίτητη προϋπόθεση οργανογένεσης, αλλά η άριστη συγκέντρωση αυτής φαίνεται να εξαρτάται από τον γονότυπο (Barlass and Skene, 1986).

Ο σχηματισμός βλαστών μπορεί να πραγματοποιηθεί είτε μέσω άμεσης οργανογένεσης, χωρίς δηλαδή να μεσολαβεί η ενδιάμεση φάση της καλογένεσης

(Moore et al., 1992; Goh et al., 1995; Perez-Molphe-Balch and Ochoa-Alejo, 1997; Garcia-Luis et al., 1999), είτε μέσω έμμεσης οργανογένεσης, ακολουθώντας δηλαδή το σχηματισμό κάλου (Grinblat, 1972; Chatuverdi and Mitra, 1974; Barlass and Skene, 1982; Edriss and Burger, 1984; Moore, 1986; Garcia-Luis et al., 1999). Είναι γεγονός, όμως, πως η έμμεση οργανογένεση, εξαιτίας της παρεμβολής κάλλου, ενέχει τον κίνδυνο της σωμακλωνικής παραλλακτικότητας και άρα της δημιουργίας χημαιρικών φυτών, πράγμα ανεπιθύμητο. Αυτός είναι και ο λόγος που στο παρόν πείραμα εστιάσαμε στην μελέτη και βελτιστοποίηση της άμεσης οργανογένεσης.

Ποιο από τα δύο μορφογενετικά μονοπάτια (άμεσο ή έμμεσο) ακολουθείται κάθε φορά κατά την οργανογένεση, είναι αποτέλεσμα πολλών συνισταμένων που σχετίζονται κυρίως με τις συνθήκες της *in vitro* καλλιέργειας και το σκοπό του ερευνητή. Σε πείραμά τους οι Garcia-Luis et al. (1999), εξηγούν μερικώς το φαινόμενο και καταλήγουν πως η πιθανότητα άμεσης ή έμμεσης οργανογένεσης εξαρτάται ακόμα και από τη θέση του εκφύτου στο υπόστρωμα (κάθετα ή οριζόντια), και σε περίπτωση κάθετης τοποθέτησης και από τον προσανατολισμό του εκφύτου (κανονικά ή ανάποδα). Επίσης, συμπεραίνουν ότι κάποιο ρόλο παίζει και η ηλικία των εκφύτων, καθώς και η αρχική απόστασή τους από τις κοτυληδόνες (εφόσον πρόκειται για επικοτύλια). Τέλος, φαίνεται ότι τα δύο μονοπάτια διαφέρουν και ως προς τις ορμονικές απαιτήσεις τους (Grinblat, 1972; Barlass and Skene, 1982; Edriss and Burger, 1984; Moore, 1986), γεγονός που εν μέρει παρατηρήθηκε και στο παρόν πείραμα.

1.7 ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑΣ

Από την βιβλιογραφία που εξετάστηκε πιο αναλυτικά, οι Edriss and Burger (1984), ήταν από τους πρώτους που χρησιμοποίησαν ως έκφυτα επικοτύλια αλλά και τμήματα ριζών από Troyer citrange. Σπόροι τοποθετήθηκαν, αρχικά, σε βασικό υπόστρωμα Murashige and Skoog (MS) (Murashige and Skoog, 1962) για 2 εβδομάδες στο σκοτάδι. Στη συνέχεια, ελήφθησαν τα έκφυτα και παρέμειναν και αυτά σε MS για 3 εβδομάδες με BA (0, 0.1, 0.5, 1.0, 10.0 mg/l) και NAA (0, 0.1, 1.0, 10.0 mg/l). Όσον αφορά τα επικοτύλια, μόνο του το BA δεν έδωσε καθόλου βλαστούς σε καμία συγκέντρωση. Το μεγαλύτερο ποσοστό οργανογένεσης ουσιαστικά, έδωσε ο συνδυασμός BA 0.5ppm με NAA 0.1ppm (30%, με 10%

καλλογένεση) και ακολούθως με 1.0ppm (10%, με 48% καλλογένεση). Πολύ μικρές ή πολύ μεγάλες συγκεντρώσεις BA δεν έδωσαν βλαστούς αλλά ούτε και κάλλο.

Ακολούθησαν οι Maggon and Deo Singh (1995), οι οποίοι χρησιμοποίησαν ως έκφυτα επικοτύλια και υποκοτύλια από 2 εβδομάδων σπορόφυτα του *C. sinensis*, και τα τοποθέτησαν οριζόντια σε βασικό MS. Μόνο τα επικοτύλια έδωσαν βλαστούς στο βασικό υπόστρωμα (χωρίς την προσθήκη δηλαδή ορμονών). Επιπλέον και στα δύο είδη εκφύτων έγιναν επεμβάσεις με διάφορες ορμόνες (BA, ABA, GA₃). Στις 3 εβδομάδες έδωσαν κάλλο και μετά από αυτόν προέκυψαν βλαστοί σε 4 εβδομάδες. Για τα έκφυτα επικοτυλίου, τα μεγαλύτερα ποσοστά οργανογένεσης όπως και καλλογένεσης έδωσαν οι συγκεντρώσεις BA 2.0 και 4.0 mg/l (88% και 85%, αντίστοιχα). Προσθήκη ABA μέχρι την συγκέντρωση των 0.1 ή 0.2 mg/l στις παραπάνω συγκεντρώσεις BA, μείωσε το ποσό του σχηματιζόμενου κάλλου (οι βλαστοί προέκυψαν από άμεση οργανογένεση δηλαδή) χωρίς όμως να παρατηρηθεί ιδιαίτερη μεταβολή στο ποσοστό οργανογένεσης.

Δύο χρόνια αργότερα, οι Perez-Molphe-Balch and Ochoa-Alejo (1997), χρησιμοποίησαν *C. aurantifolia* και *C. reticulata* και οι σπόροι τους φυτεύτηκαν σε MS για 3 μήνες σε 16h φωτοπερίοδο. Από τα σπορόφυτα λήφθηκαν έκφυτα φύλλων, μεσογονατίων και ριζών. Δοκιμάστηκαν οι κυτοκινίνες BA, Kin (Κινετίνη), TDZ (θειδιαζουρόν) και η αυξίνη NAA σε διάφορους συνδυασμούς. Τα καλύτερα αποτελέσματα σε ποσοστό οργανογένεσης (75%) και αριθμό βλαστών ανά έκφυτο (3.38), έδωσε ο συνδυασμός BA 33.3μM (7.5 mg/l) και NAA 5.4μM (1.0 mg/l). Η TDZ δοκιμάστηκε σε συγκεντρώσεις 0.45μM (0.1 mg/l) και 0.90μM (0.2 mg/l) σε συνδυασμό με NAA 5.4μM (1.0 mg/l) και έδωσε περίπου 16-22% ποσοστό οργανογένεσης και για τα δύο είδη. Ενώ η Kin δοκιμάστηκε σε 46.5μM (10.0 mg/l) με NAA 5.4μM (1.0 mg/l) και έδωσε παρόμοια χαμηλά αποτελέσματα (20-22%).

Το 1999 οι Garcia Luis et al., δεν εξέτασαν τόσο τις ορμονικές απαιτήσεις της *in vitro* οργανογένεσης, αλλά διαφοροποιήθηκαν. Χρησιμοποίησαν ως έκφυτα επικοτύλια από σπορόφυτα Troyer citrange (περίοδος ανάπτυξης σποροφύτων 45-50 ημέρες). Τα έκφυτα παρέμειναν για 45 ημέρες σε βασικό MS και στη συνέχεια μετρήθηκε ο αριθμός βλαστών, ο αριθμός σχηματισμένων οφθαλμών που δεν εξελίχθηκαν περαιτέρω, καθώς και το μέγεθος του κάλλου. Ερεύνησαν τον ρόλο που διαδραματίζουν στην *in vitro* οργανογένεση η θέση του εκφύτου (κάθετα, οριζόντια) στο υπόστρωμα, καθώς και η απόστασή του από τις κοτυληδόνες. Πάνω σε αυτό, βρήκαν ότι στην κάθετη (κανονική) τοποθέτηση προκαλείται άμεση οργανογένεση,

ενώ στην οριζόντια έχουμε έμμεση. Βέβαια, αυτό ίσως δεν ισχύει για όλους τους γονοτύπους. Βρήκαν, ακόμη, ότι μάλλον περισσότερο επηρεάζει ο προσανατολισμός του εκφύτου παρά η επαφή των άκρων του (απ'όπου δηλαδή προκύπτουν οι βλαστοί) με το μέσο. Δηλαδή, η οργανογένεση (τόσο για την κορυφή όσο και για την βάση του επικοτυλίου) μειώνεται όσο η θέση του εκφύτου αποκλείει από την κάθετη κανονική. Επίσης, διαπίστωσαν ότι η έμμεση οργανογένεση γίνεται μόνο παρουσία BA ενώ η άμεση, απουσία της. Παρόλαυτα, η εν λόγω ορμόνη φαίνεται να προάγει την βλαστογένεση σημαντικά. Για την απόσταση από τις κοτυληδόνες, βρήκαν ότι στην άμεση οργανογένεση όσο πιο μακριά είναι το επικοτύλιο από αυτές, τόσο μειώνεται η βλαστογένεση, ενώ στην έμμεση δε φαίνεται να επηρεάζει. Οι ορμόνες που δοκιμάστηκαν ήταν BA (4.4μM ή 1 mg/l) μαζί με NAA (0.54μM ή 0.1 mg/l).

Την ίδια χρονιά, οι Bordon et al. (2000), μελέτησαν τόσο την επίδραση των ορμονών και του προσανατολισμού των εκφύτων επικοτυλίου όσο και της φωτοπεριόδου, επί της *in vitro* οργανογένεσης 4 ειδών και ενός υβριδίου του γένους *Citrus*, ανάμεσά τους και η νερατζιά (*C. aurantium*, *C. macrophylla*, *C. reshni*, *C. sinensis* και Troyer citrange). Από σπορόφυτα 40 ημερών λήφθηκαν επικοτύλια και τοποθετήθηκαν κάθετα ή οριζόντια σε MS με προσθήκη BA (0, 2.2, 4.4, 22 μM ή 0, 0.5, 1.0, 5 mg/l αντίστοιχα) και NAA (0, 0.54, 5.4, 54 μM ή 0, 0.1, 1.0, 10 mg/l αντίστοιχα) σε διάφορους συνδυασμούς. Μετά από 45 μέρες (σκότους ή φωτοπεριόδου 16h) μετρήθηκαν οι εκπυττώσιμοι βλαστοί. Το ποσοστό των εκφύτων (από αυτά που αναπτύχθηκαν σε φως) με οφθαλμούς, όσον αφορά τη νερατζιά, ήταν εξαιρετικά μικρό (18% στην κορυφή, 4% στη βάση του επικοτυλίου) στις συγκεντρώσεις BA 4.4μM και NAA 0.54μM, οι οποίες και εξετάστηκαν κατά κύριο λόγο. Πάντως, το γενικό τους συμπέρασμα ήταν ότι οι άριστες συνθήκες διαφέρουν οπωσδήποτε από γονότυπο σε γονότυπο.

Λίγο αργότερα, οι Moreira-Dias et al. (2001), χρησιμοποίησαν και πάλι σπόρους από Troyer citrange και από τα σπορόφυτα ηλικίας 49 ημερών (που αναπτύχθηκαν σε σκότος) έλαβαν έκφυτα επικοτυλίου. Στη συνέχεια, τα τοποθέτησαν κάθετα σε MS, είτε σε συνθήκες σκότους είτε σε φωτοπερίοδο των 8h ή 16h, όπου παρέμειναν για 45 μέρες. Δοκιμάστηκε η BA (2.2, 4.4, 22 μM ή 0.5, 1.0, 5.0 mg/l, αντίστοιχα) μόνη της ή σε συνδυασμό με NAA (0.0, 0.54 μM ή 0.0, 0.1 mg/l). Επίσης, πειραματίστηκαν ως προς τις πλέον κατάλληλες συνθήκες φωτισμού και βρήκαν τέλος, ότι οι άριστες συνθήκες ήταν 8h φωτοπερίοδος με BA 2.2μM (0.5 mg/l), ή 16h φωτοπερίοδος με BA 22μM (5.0 mg/l).

Με τη σειρά τους, οι Carlos Besspalhok Filho et al. (2001), χρησιμοποίησαν σπόρους από τρεις ποικιλίες του είδους *C. sinensis*, και από τα σπορόφυτά τους, ηλικίας 7 εβδομάδων (4 βδομάδες σκότος, 3 βδομάδες φως 16h), έλαβαν έκφυτα επικοτυλίου. Αρχικά, τα τοποθέτησαν κάθετα σε MS με προσθήκη BA (0, 0.5, 1.0, 2.0, 5.0 μM ή 0, 0.11, 0.23, 0.45, 1.13 mg/l αντίστοιχα) για 4 βδομάδες και μέτρησαν τον αριθμό των οφθαλμών. Στη συνέχεια τα μετέφεραν σε MS με BA 0.5 μM (0.11 mg/l), GA₃ 1 μM (0.34 mg/l) ή συνδυασμό τους για 4 εβδομάδες και μέτρησαν τον αριθμό των βλαστών μήκους $\geq 1\text{cm}$. Τα καλύτερα αποτελέσματα βλαστογένεσης για τους γονοτύπους που μελετήθηκαν έδωσε η προσθήκη BA 2-5 μM (0.45-1.13 mg/l) και η εν συνεχεία καλλιέργεια σε μέσο επιμήκυνσης εμπλουτισμένο με BA 0.5 μM (0.11 mg/l) ή BA 0.5 μM μαζί με GA₃ 1.0 μM .

Η πρώτη αναφορά για χρήση της κυτοκινίνης CPPU (N-(2-χλωρο-4-πυριδυλ)-N-φαινυλουρία) σε *in vitro* καλλιέργεια του γένους *Citrus* ήταν ίσως το 2002 από τους Fiore et al. (2002), οι οποίοι όμως, χρησιμοποίησαν έκφυτα από στύλους και στίγματα (για την ακρίβεια εγκάρσια λεπτά στρώματα κυττάρων, TCLs), των *C. sinensis* και *C. limon* με στόχο την δημιουργία κάλλου, την σωματική εμβρυογένεση και την αναγέννηση των φυτών. Τοποθέτησαν τα έκφυτα σε βασικό MT και πρόσθεσαν την 2,4-D και την CPPU (4 μM ή 1 mg/l), η οποία αύξησε στατιστικώς σημαντικά σε σχέση με την πρώτη, τα ποσοστά ανταποκρινόμενων εκφύτων.

Οι Almeida et al. (2002), χρησιμοποίησαν σπόρους από τρεις ποικιλίες του *C. sinensis* και μια του *C. limonia*. Στη συνέχεια, από σπορόφυτα ηλικίας 4 εβδομάδων (3 εβδομάδες σκότος, 1 εβδομάδα φως), παρέλαβαν επικοτύλια και τα τοποθέτησαν οριζόντια σε MT για 45 ημέρες, αφού πρόσθεσαν BA (0, 0.5 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0, 4.5 mg/l) χωρίς φάση σκότους. Στις μετρήσεις για ποσοστό οργανογένεσης και αριθμό βλαστών ανά έκφυτο, έλαβαν υπόψη τους μόνο βλαστούς μήκους $>1\text{cm}$. Το μεγαλύτερο ποσοστό (69,56%) έδωσε η BA 1.0 mg/l ανεξαρτήτως ποικιλίας. Και αυτοί, όπως και πολλοί άλλοι πριν από αυτούς (Maggon and Singh, 1995; Pérez-Molphe-Balch and Ochoa-Alejo, 1997; Ghorbel et al., 1998; Moreira-Dias et al., 2000), διαπιστώνουν ότι συγκεντρώσεις BA μεγαλύτερες από 1-1.5 mg/l, προκαλούν μείωση του αριθμού των εκπτυσσόμενων βλαστών.

Ένα χρόνο αργότερα, στην προσπάθειά τους να αξιολογήσουν τα επιμέρους τμήματα του επικοτυλίου, το ρόλο της ηλικίας τους ως έκφυτα καθώς και την σημαντική επίδραση του γονοτύπου, οι Costa et al. (2004), χρησιμοποίησαν σπόρους από *C. limonia*, *C. paradisi*, *C. sinensis*, και από σπορόφυτα 4 διαφορετικών ηλικιών

(21, 28, 35, 42 ημερών) έλαβαν έκφυτα από 5 διαφορετικές περιοχές του επικοτυλίου. Χρησιμοποίησαν MS στο οποίο πρόσθεσαν BA (0, 0.5, 1.0, 2.0, 3.0, 4.0 mg/l). Τα έκφυτα τοποθετήθηκαν οριζόντια και παρέμειναν στο υπόστρωμα για 45 ημέρες. Τα καλύτερα αποτελέσματα ποσοστού οργανογένεσης (60%-91,2%) και αριθμού βλαστών ανά έκφυτο (0.60-2.47) έδωσαν οι συγκεντρώσεις BA 0.0, 0.5, 1.0 mg/l, και για τα τρία είδη. Άμεση οργανογένεση είχαν με την προσθήκη 0.5 και 1.0 mg/l BA, ενώ στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις μειωνόταν πολύ το ποσοστό οργανογένεσης και αυξανόταν πολύ ο σχηματισμός κάλλου, γεγονός που όπως αναφέρουν χαρακτηριστικά, συμπίπτει και με προηγούμενους ερευνητές (Sim et al., 1989; Goh et al., 1995; Maggon and Singh, 1995). Από την άλλη, τα ποσοστά οργανογένεσης και ο αριθμός βλαστών αυξανόταν όσο η απόσταση του τμήματος του επικοτυλίου από τις κοτυληδόνες αυξανόταν. Αυτή η ανακάλυψη, όμως, ήρθε σε αντίθεση με προηγούμενες έρευνες (Burger and Hackett, 1986; Garcia-Luis et al., 1999; Moreira-Dias et al., 2001), οπότε οι συγγραφείς κατέληξαν στο ότι ο συγκεκριμένος παράγοντας επηρεάζεται από το αρχικό φυτικό υλικό, την σύνθεση του υποστρώματος, τις συνθήκες καλλιέργειας και μάλλον όχι από τον γονότυπο.

Λίγο αργότερα, οι Garcia-Luis et al. (2006) χρησιμοποίησαν και πάλι σπόρους από Troyer citrange και από σπορόφυτα 42 ημερών λήφθηκαν έκφυτα επικοτυλίου. Στο παρών πείραμα, μελετήθηκαν οι επιδράσεις του προσανατολισμού των εκφύτων και της επαφής με το μέσο (MS), και μετά από 41 ημέρες μετρήθηκε το ποσοστό βλαστογένεσης για τα δύο άκρα του επικοτυλίου ξεχωριστά. Οι ορμόνες που χρησιμοποιήθηκαν ήταν BA 4.4μM (1mg/l) μαζί με NAA 0.54μM (0.1 mg/l). Στις συγκεντρώσεις, λοιπόν, αυτές και κατά την οριζόντια (επί της επιφάνειας του υποστρώματος) τοποθέτηση των επικοτυλίων, ο αριθμός βλαστών ανά έκφυτο ήταν 5.6 και 3.5 στην κορυφή και στη βάση του επικοτυλίου, αντίστοιχα.

Στη συνέχεια, οι Duan et al. (2007), χρησιμοποίησαν σπόρους από το *C. sinensis* και τους τοποθέτησαν σε MT για 2 εβδομάδες. Έπειτα, από τα σπορόφυτα έλαβαν επικοτύλια τα οποία τοποθέτησαν οριζόντια επίσης σε MT για 45 ημέρες (15 ημέρες σκότος, 30 ημέρες φως). Πρόσθεσαν BA (1.0, 2.0, 3.0 mg/l) σε συνδυασμό με IAA (0.0, 0.2 mg/l). Τον μεγαλύτερο αριθμό βλαστών ανά έκφυτο (8.9) έδωσε ο συνδυασμός IAA 0.2 mg/l με BA 2.0 mg/l. Ενώ η BA 3.0 mg/l έδωσε λίγο μικρότερα αποτελέσματα. Πειραματίστηκαν, επίσης, στον τρόπο κοψίματος των επικοτυλίων και βρήκαν ότι η διαγώνια τομή έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα σε σχέση με την επιμήκη και την εγκάρσια.

Μια ακόμα αναφορά για χρήση της κυτοκινίνης CPPU ήταν από τους Siragusa et al. (2007), οι οποίοι, όμως, χρησιμοποίησαν το *Citrus madurensis* Lour. (calamondin). Όπως και προηγούμενοι επιστήμονες, παρέλαβαν έκφυτα στύλων και στίγματος και πρόσθεσαν ορμόνες σε βασικό MS με στόχο την αναγέννηση σωματικών εμβρύων. Ανάμεσα σε άλλες, χρησιμοποιήθηκαν και οι BA και CPPU σε συγκέντρωση 12μM (2.7 και 2.97 mg/l, αντίστοιχα για τις δύο ορμόνες). Αν και οι παράγωγες της διφαινυλουρίας κυτοκινίνες (όπως είναι η CPPU) έδωσαν μεγαλύτερα ποσοστά ανταποκρινόμενων εκφύτων, έλεγχος που έγινε στη συνέχεια για εύρεση πιθανής σωμακλωνικής παραλλακτικότητας έδειξε ότι οι κυτοκινίνες αυτές την προάγουν σε σχέση με την BA.

Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το πείραμα των Tavano et al. (2009), οι οποίοι χρησιμοποίησαν εκτός από σπόρους *C. volkameriana* και σπόρους *C. aurantium*. Έπειτα, από σπορόφυτα ηλικίας 30-40 ημερών (30 περίπου μέρες σκότος και 10 ημέρες φως 16h σε MS), παρέλαβαν έκφυτα επικοτυλίου και μεσογονατίων τμημάτων. Τα τοποθέτησαν σε υπόστρωμα κατά Grosser and Gmitter (EME, 1990) και πρόσθεσαν BA (0, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0 mg/l) και μετά από 45 ημέρες ελήφθησαν οι μετρήσεις. Τα καλύτερα ποσοστά οργανογένεσης στη νερατζιά με έκφυτα επικοτυλίου (59% και 51%) έδωσαν οι συγκεντρώσεις 0.5 και 1.0 mg/l, αντίστοιχα. Βρήκαν ότι με τα υποκοτύλια, τα ποσοστά ήταν μεγαλύτερα (75 και 67,5%), ανεξαρτήτως συγκέντρωσης BA, σε αντίθεση με τα μεσογονάτια τμήματα από τα οποία υπερτερούσαν τα επικοτύλια. Αναφέρουν στην ανασκόπηση βιβλιογραφίας ότι η νερατζιά έχει τα πλέον χαμηλά ποσοστά αναγέννησης, 4% (Bordon et al., 2000). Τέλος, επισημαίνουν και αυτοί την παρεμπόδιση που ασκεί η BA σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις στην αναγέννηση της νερατζιάς αλλά και άλλων γονοτύπων.

Μικρές διαφοροποιήσεις παρατηρούνται στο πείραμα των Sharma et al. (2009), που χρησιμοποίησαν τα υποκείμενα Rough lemon, Cleopatra mandarin, Pectinifera και Troyer citrange, από τα οποία πήραν κορυφές βλαστών και κομβικά τμήματα ως έκφυτα και όχι επικοτύλια. Τα τοποθέτησαν σε MS και πρόσθεσαν σε διάφορους συνδυασμούς και συγκεντρώσεις τις ορμόνες BA, Kin, NAA, 2,4-D. Σκοπός τους η δημιουργία κάλλου και από αυτόν η αναγέννηση του φυτού. Τα καλύτερα αποτελέσματα, λοιπόν, έμμεσης ουσιαστικά οργανογένεσης για τον αριθμό βλαστών ανά έκφυτο (2.17-2.72) έδωσε η BA 1 mg/l. Η αμέσως καλύτερη επέμβαση ήταν με Kin 0.5mg/l, με μεγάλη όμως διαφορά (1.67). Σε συνδυασμό της Κινετίνης (0.5 mg/l)

με NAA (1.0, 5.0 mg/l), η τελευταία φάνηκε να προάγει πολύ, αυξανόμενης της συγκέντρωσής της, τη δημιουργία κάλλου.

1.8 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟΣ ΣΚΟΠΟΣ

Από την ανασκόπηση της βιβλιογραφίας βλέπουμε ότι έχουν γίνει πολλά πειράματα *in vitro* οργανογένεσης στα εσπεριδοειδή. Οι παράγοντες που διαφοροποιούνται συνήθως, ανάλογα με το σκοπό του πειράματος, είναι τα διάφορα είδη γονοτύπων, οι χρησιμοποιούμενες ορμόνες, το είδος των εκφύτων αλλά και οι συνθήκες ανάπτυξής τους (φωτοπερίοδος, μέσο καλλιέργειας, χρονικό διάστημα ανάπτυξης).

Στην παρούσα μελέτη αξιοποιήθηκε συγκεκριμένα, η μέθοδος της καλλιέργειας τμημάτων επικοτυλίου νερατζιάς, με στόχο την άμεση οργανογένεση. Η σχεδίαση του πειράματος έγινε έτσι ώστε να μελετηθεί συγκριτικά η δραστηριότητα επί της οργανογένεσης, των πέντε κυτοκινινών που χρησιμοποιήθηκαν. Οι ορμόνες αυτές ήταν οι: BA, 2iP, TDZ (θειδιαζουρόν), CPPU (N-(2-χλωρο-4-πυριδύλ)-N-φαινυλουρία) και η Kin, σε διάφορες συγκεντρώσεις η καθεμία, προς εύρεση της αποτελεσματικότερης εξ αυτών. Θα πρέπει στο σημείο αυτό να τονιστεί ότι η CPPU χρησιμοποιείται για πρώτη φορά σε πειράματα άμεσης οργανογένεσης σε επικοτύλια εσπεριδοειδών, τουλάχιστον σύμφωνα με τη δική μας πληροφόρηση. Αποσκοπώντας, λοιπόν, στην αύξηση του ποσοστού οργανογένεσης σε συνθήκες *in vitro*, με την επέμβαση των καταλληλότερων ορμονών, τα αποτελέσματα του πειράματος έχουν προεκτάσεις στη σύγχρονη πραγματικότητα.

Στις μέρες μας γίνονται προσπάθειες δημιουργίας διαγονιδιακών (ή/και υβριδικών) φυτών νερατζιάς ώστε να αντιμετωπιστούν τα προβλήματα που προκύπτουν από την ευαισθησία της στην ίωση *tristeza*. Μια από τις τεχνικές που χρησιμοποιούνται είναι η μεταφορά γονιδίων ανθεκτικότητας σε έκφυτα νερατζιάς, με την βοήθεια του βακτηρίου *Agrobacterium tumefaciens*.

Όπως προκύπτει, συνεπώς, είναι επιτακτική η ανάγκη βελτιστοποίησης των *in vitro* συνθηκών πολλαπλασιασμού και ανάπτυξης της νερατζιάς, ώστε να ακολουθήσει η διαγονιδιακή μεταφορά. Εκεί έγκειται και η χρησιμότητα του εν λόγω πειράματος.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το πειραματικό μέρος της παρούσας πτυχιακής μελέτης πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Δενδροκομίας του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών την περίοδο καλοκαίρι 2007- φθινόπωρο 2008.

Στο πρώτο μέρος του πειράματος (Φθινόπωρο 2007), ερευνήθηκε η επίδραση των κυτοκινινών BA, 2iP, CPPU, TDZ στο μήκος και τον αριθμό των βλαστών καθώς και στο ποσοστό οργανογένεσης των επικοτυλίων νερατζιάς που χρησιμοποιήθηκαν ως έκφυτα. Στο δεύτερο μέρος του πειράματος (αρχές Άνοιξης 2008), στις παραπάνω ορμόνες προστέθηκε και η κυτοκινίνη Κινετίνη. Κάθε μία από τις ορμόνες χρησιμοποιήθηκε σε τρεις διαφορετικές συγκεντρώσεις. Οι τελικές μετρήσεις πραγματοποιήθηκαν μετά από 7 περίπου εβδομάδες ανάπτυξης των εκφύτων. Βέβαια, οι πρώτες ενδείξεις οργανογένεσης άρχισαν στις 30-45 ημέρες από την ημέρα φύτευσης των εκφύτων.

2.2 ΠΑΡΑΣΚΕΥΗ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ MURASHIGE AND TUCKER

Το υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε τόσο για την ανάπτυξη των σποροφύτων, όσο και για αυτήν των εκφύτων, ήταν το Murashige and Tucker (MT) (Murashige & Tucker, 1969), η ακριβής σύσταση του οποίου φαίνεται στον πίνακα 2.1. Τα στάδια που ακολουθήθηκαν είναι τα κάτωθι:

A. προσθήκη θρεπτικών στοιχείων, σε ποτήρι ζέσεως κατόπιν ζύγισής τους. Τελευταία προστίθεται η σακχαρόζη (30g/l).

B. ογκομέτρηση και pH-μέτρηση του υποστρώματος, το pH ρυθμίζεται στο 5,2.

Γ. προσθήκη άγαρ και φυτορρυθμιστικών ουσιών, προστίθεται το άγαρ (7-8 g/l) και το διάλυμα τίθεται υπό βρασμό και συνεχή ανάδευση έως ότου καταστεί διαυγές. Στη συνέχεια, αυτό μεταγγίζεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες των 10 ml.

Για τις ανάγκες του πειράματος, προστέθηκαν ορμόνες σε διάφορες συγκεντρώσεις η κάθε μία. Αυτό έγινε για τις περισσότερες πριν το στάδιο της αποστείρωσης του υποστρώματος, στην ποσότητα αυτού που προοριζόταν για τους

σωλήνες όπου θα μελετούνταν η συγκεκριμένη συγκέντρωση ορμόνης. Ωστόσο, υπήρξαν κάποιες (TDZ και CPPU) οι οποίες, λόγω της ευαισθησίας τους στην αποστείρωση στον κλίβανο, προστέθηκαν αφού πρώτα αποστειρώθηκαν μέσω φίλτρου (0.22μm διάμετρος πόρων). Η διαδικασία έλαβε χώρα στο θάλαμο νηματικής ροής.

Δ. αποστείρωση υποστρώματος, το υπόστρωμα οδηγείται στο κλίβανο αποστείρωσης (autoclave). Η αποστείρωση έγινε σε θερμοκρασία 121 °C και πίεση 1.2 atm και διήρκεσε 20 λεπτά. Μετά το πέρας της αποστείρωσης οι δοκιμαστικοί σωλήνες μεταφέρονται στο θάλαμο ανάπτυξης της καλλιέργειας.

Πίνακας 2.1: Σύσταση του υποστρώματος Murashige and Tucker

ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	MT (mg/l)
ΑΝΟΡΓΑΝΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ	
Μακροστοιχεία	
NH ₄ NO ₃	1650
KNO ₃	1900
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370
KH ₂ PO ₄	170
Μικροστοιχεία	
Na ₂ EDTA	37.25
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27.85
H ₃ BO ₃	6.2
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22.3
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025
KI	0.83
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6
ΟΡΓΑΝΙΚΟΙ ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ	
Βιταμίνες	
Νικοτινικό οξύ	5
Υδροχλωριούχος πυριδοξίνη	10
Υδροχλωριούχος θειαμίνη	10
Ινοσιτόλη	100
Γλυσίνη	2
ΔΙΑΦΟΡΑ	
Σακχαρόζη	30000
Άγαρ	7000-8000
pH	5.2

2.3 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΦΥΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ

2.3.1 ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΚΑΙ ΦΥΤΕΥΣΗ ΣΠΟΡΩΝ ΝΕΡΑΤΖΙΑΣ

Για την διεξαγωγή του πειράματος, ώριμοι καρποί νερατζιάς χωρίς εμφανή συμπτώματα ασθενειών συλλέχθηκαν και οδηγήθηκαν στο εργαστήριο. Οι καρποί πλύθηκαν εξωτερικά με τρεχούμενο νερό και στη συνέχεια με τη βοήθεια στίφτη εξήχθησαν οι σπόροι. Οι σπόροι πλύθηκαν με τρεχούμενο νερό και στη συνέχεια στέγνωσαν σε διηθητικό χαρτί. Προσεκτικά απομακρύνθηκαν τα περιβλήματα των σπόρων και τοποθετήθηκαν σε ποτήρι ζέσεως με νερό.

Οι σπόροι αυτοί απολυμάνθηκαν με 60% κ.ό. υποχλωριώδες νάτριο για δέκα λεπτά υπό συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια, οδηγήθηκαν στο θάλαμο νηματικής ροής όπου ξεπλύθηκαν τουλάχιστον τρεις φορές με απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό.

Ακολούθησε η φύτευσή τους, υπό ασηπτικές συνθήκες, στους δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν αποστειρωμένο και στερεοποιημένο βασικό υπόστρωμα ΜΤ.

2.3.2 ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΣΠΟΡΟΦΥΤΩΝ ΚΑΙ ΠΑΡΑΛΑΒΗ ΕΚΦΥΤΩΝ

Οι δοκιμαστικοί σωλήνες μεταφέρθηκαν άμεσα στο θάλαμο ανάπτυξης. Οι σπόροι παρέμειναν στο υπόστρωμα αυτό για 20 ή 30 ημέρες υπό συνεχές σκοτάδι (στο πρώτο και στο δεύτερο μέρος του πειράματος, αντίστοιχα) και στη συνέχεια για 20 ή 10 ημέρες με φωτοπερίοδο 16 ωρών φωτός / 8 ωρών σκότους (στο πρώτο και στο δεύτερο μέρος του πειράματος, αντίστοιχα), στους 25 °C.

Μετά το πέρας αυτής της περιόδου, τα σπορόφυτα είχαν αναπτυχθεί τόσο ώστε να δώσουν ικανοποιητικό αριθμό εκφύτων επικοτυλίου. Μεταφέρθηκαν, επομένως, στο θάλαμο ιστοκαλλιέργειας όπου και έγινε η παραλαβή των εκφύτων.

Τα επικοτύλια νερατζιάς, που χρησιμοποιήθηκαν ως έκφυτα, ήταν μήκους περίπου 1cm. Κόβονταν με ψαλίδι εντός των δοκιμαστικών σωλήνων που βρίσκονταν και μεταφέρονταν με λαβίδα σε νέους δοκιμαστικούς σωλήνες όπου τοποθετούνταν οριζόντια στο υπόστρωμα.

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, το υπόστρωμα για την ανάπτυξη των εκφύτων ήταν επίσης το βασικό ΜΤ εμπλουτισμένο, όμως, με τις κυτοκινίνες που αναφέρθηκαν και στην εισαγωγή του κεφαλαίου.

2.4 ΕΠΕΜΒΑΣΕΙΣ

Το βασικό ερευνητικό κομμάτι της παρούσας μελέτης ξεκινάει, επομένως, με τη φύτευση των εκφύτων.

A. Πρώτο Μέρος (Φθινόπωρο 2007)

ΣΗΜΕΙΩΣΗ: Στο σημείο αυτό θα πρέπει να αναφερθεί ότι οι σπόροι φυτεύθηκαν τόσο σε βασικό υπόστρωμα, όσο και σε υπόστρωμα εφοδιασμένο με την κυτοκίνη **BA** σε συγκέντρωση *1ppm*. Κατά την λήψη, λοιπόν, των επικοτυλίων υπήρξε διαχωρισμός ως προς το εάν αυτά προέρχονταν από σπόρους που αναπτύχθηκαν παρουσία της ορμόνης ή απουσία αυτής. Η επέμβαση αυτή δεν επαναλήφθηκε στο δεύτερο μέρος του πειράματος, καθώς εκ των αποτελεσμάτων δεν κρίθηκε σκόπιμη η περαιτέρω μελέτη της.

Όπως ήδη αναφέρθηκε, τα επικοτύλια τοποθετήθηκαν οριζόντια σε βασικό υπόστρωμα MT, το οποίο ήταν εμπλουτισμένο με κυτοκίνες στις ακόλουθες συγκεντρώσεις:

BA: 0.5, 1.0, 2.0 ppm (mg/l)

2iP: 0.5, 1.0, 2.0 ppm (mg/l)

CPPU: 0.05, 0.1, 0.2 ppm (mg/l)

TDZ: 0.05, 0.1, 0.2 ppm (mg/l)

Χρησιμοποιήθηκε ως μάρτυρας το βασικό υπόστρωμα MT. Για κάθε συγκέντρωση κάθε ορμόνης διατέθηκαν 20 δοκιμαστικοί σωλήνες, από τους οποίους οι 10 περιείχαν επικοτύλια που αναπτύχθηκαν παρουσία της ορμόνης BA στο αρχικό τους υπόστρωμα και οι υπόλοιποι 10 περιείχαν επικοτύλια που αναπτύχθηκαν απουσία αυτής. Το ίδιο ίσχυσε και για τον μάρτυρα.

Εξαίρεση αποτέλεσε η ορμόνη CPPU της οποίας όλοι οι δ.σ. περιείχαν έκφυτα που αναπτύχθηκαν χωρίς την ορμόνη BA.

Τα έκφυτα παρέμειναν στο υπόστρωμα αυτό για 45 ημέρες σε θάλαμο ανάπτυξης υπό συνθήκες 16 ώρες φως / 8 ώρες σκοτάδι και 25 °C. Μετά το πέρας της περιόδου αυτής ελήφθησαν οι τελικές μετρήσεις, από τις οποίες και προέκυψαν τα αποτελέσματα του πειράματος.

B. Δεύτερο Μέρος (αρχές Άνοιξης 2008)

Στο δεύτερο μέρος οι επεμβάσεις και οι μέθοδοι που ακολουθήθηκαν ήταν ανάλογες του πρώτου, με κάποιες όμως τροποποιήσεις. Με βάση τα αποτελέσματα του πρώτου μέρους, κρίθηκε σκόπιμο να διαφοροποιηθούν οι συγκεντρώσεις των ορμονών BA και 2iP. Επίσης, προστέθηκε η κυτοκινίνη Κινετίνη. Το υπόστρωμα, επομένως, εμπλουτίστηκε με τις ακόλουθες ορμόνες:

BA: 0.25, 0.5, 1.0 ppm (mg/l)

2iP: 0.25, 0.5, 1.0 ppm (mg/l)

CPPU: 0.05, 0.1, 0.2 ppm (mg/l)

TDZ: 0.05, 0.1, 0.2 ppm (mg/l)

Kin: 0.25, 0.5, 1.0 ppm (mg/l)

Για κάθε συγκέντρωση κάθε ορμόνης χρησιμοποιήθηκαν 20 δοκιμαστικοί σωλήνες.

Όπως και προηγουμένως, τα έκφυτα παρέμειναν στο υπόστρωμα αυτό για 45 ημέρες σε θάλαμο ανάπτυξης υπό συνθήκες 16 ώρες φως / 8 ώρες σκοτάδι και 25 °C. Μετά το πέρας της περιόδου αυτής ελήφθησαν οι τελικές μετρήσεις, από τις οποίες και προέκυψαν τα αποτελέσματα του πειράματος.

Γ. Καλοκαίρι 2008

Την περίοδο αυτή, έγινε μια επιπλέον δοκιμή βελτιστοποίησης των αποτελεσμάτων. Στην καλύτερη συγκέντρωση ενός εκ των καλύτερων ορμονών **Kin** 0.25ppm, προστέθηκε η αυξίνη **α -NAA** στις συγκεντρώσεις: 0.01, 0.05, 0.1 ppm. Τα έκφυτα παρέμειναν σε συνθήκες όπως αυτές που περιγράφηκαν και παραπάνω για διάστημα 45 ημερών, οπότε και λήφθηκαν οι τελικές μετρήσεις. Τα αποτελέσματα αυτά συγκρίθηκαν και με την επέμβαση **Kin** 0.25ppm του δεύτερου μέρους του πειράματος, η οποία στην συγκεκριμένη σύγκριση χαρακτηρίστηκε ως μάρτυρας.

2.5 ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ

Το πείραμα σχεδιάστηκε και αναλύθηκε σύμφωνα με το Εντελώς Τυχαιοποιημένο Σχέδιο (Ε.Τ.Σ.). Ο αριθμός των επαναλήψεων ήταν n=3-4 (3-5 δ.σ. / επανάληψη). Η σημαντικότητα εκτιμήθηκε με βάση τις τιμές των πιθανοτήτων (*P*) των πινάκων της Ανάλυσης Διασποράς σε επίπεδο σημαντικότητας $\alpha=0.05$. Πραγματοποιήθηκε δι-παραγοντική ανάλυση (για το πρώτο και δεύτερο μέρος του πειράματος) με πρώτο

παράγοντα την ορμόνη και δεύτερο την συγκέντρωσή της και οι διαφορές προσδιορίστηκαν με τη βοήθεια του τυπικού σφάλματος της ανάλυσης διασποράς. Για τις επεμβάσεις που έγιναν το Καλοκαίρι 2008 έγινε μόνο-παραγοντική ανάλυση και οι διαφορές προσδιορίστηκαν με την δοκιμασία πολλαπλών μέσων του Tuckey HSD. Η στατιστική ανάλυση έγινε με το στατιστικό πακέτο Statgrafics plus 5.1.

3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Α. Αποτελέσματα Φθινόπωρο 2007 (χωρίς ΒΑ)

Σε αυτό το μέρος του πειράματος, το είδος της ορμόνης επηρέασε σημαντικά τόσο το ποσοστό οργανογένεσης όσο και τον αριθμό των εκπυσσόμενων βλαστών, όπως άλλωστε φαίνεται και στον Πίνακα 1. Αντίθετα, δεν υπήρξε επίδραση της συγκέντρωσης σε κανένα από τα μελετώμενα στοιχεία, ούτε και αλληλεπίδραση ορμόνης επί συγκέντρωση σε αυτά.

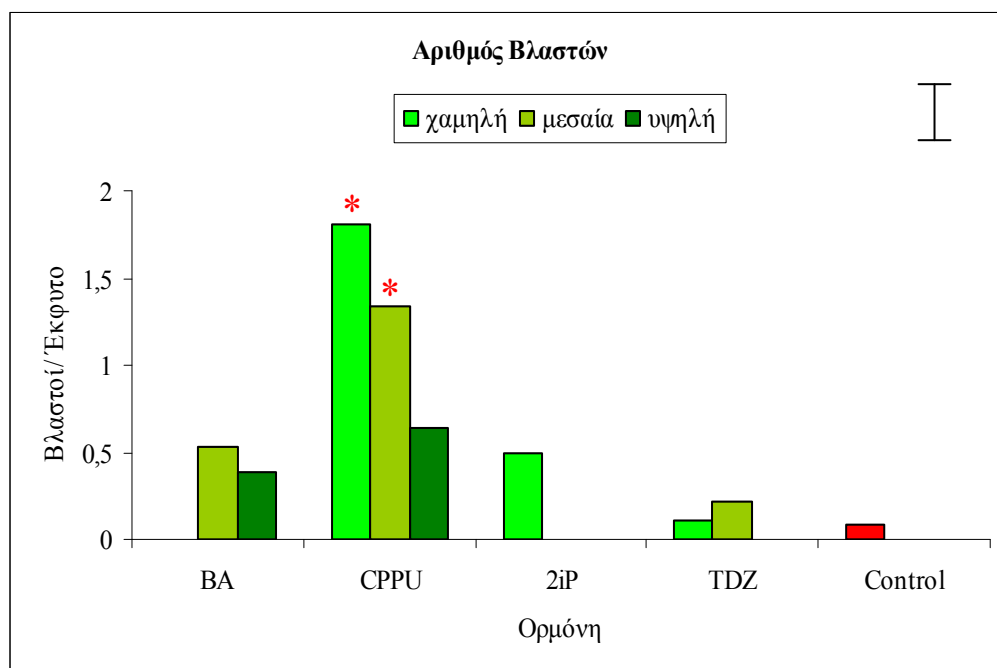
Πίνακας 3.1 Συγκεντρωτικός πίνακας των επιδράσεων της ορμόνης και της συγκέντρωσης επί των μετρούμενων μεταβλητών.

Μεταβλητές	Ορμόνη	Συγκέντρωση	Ορμόνη × Συγκέντρωση
Αριθμός Βλαστών	***	ns	ns
Μήκος Βλαστών	ns	ns	ns
Ποσοστό Οργανογένεσης	***	ns	ns

Σχόλιο: ns= non significant, *** δηλώνει $P < 0.001$, ** δηλώνει $P < 0.01$, * δηλώνει $P < 0.05$.

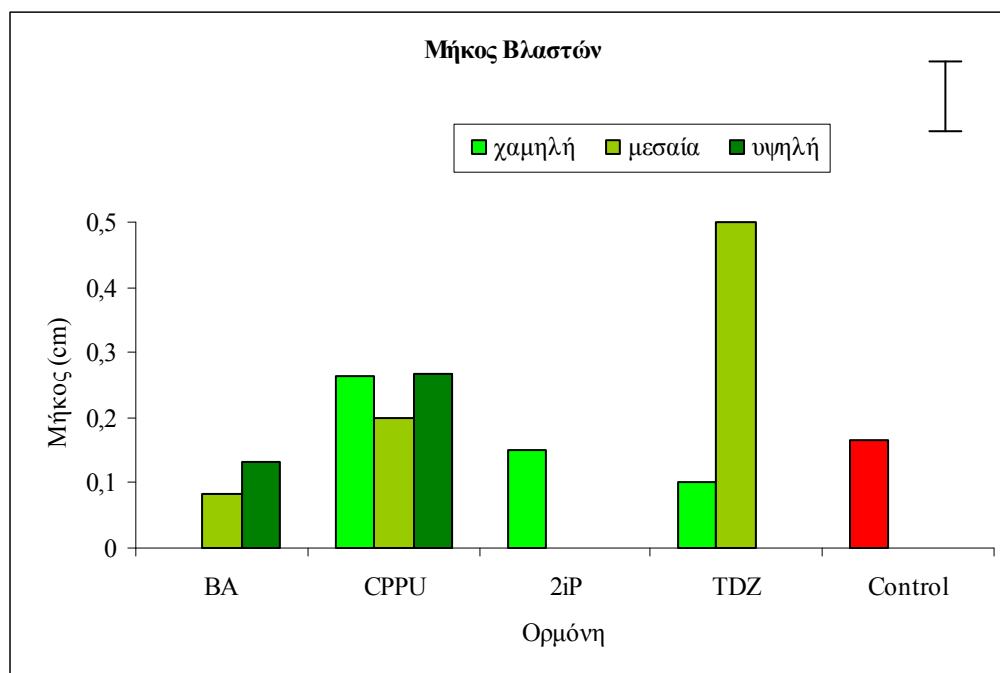
Στα σχεδιαγράμματα που ακολουθούν, φαίνονται πιο αναλυτικά οι επιδράσεις των κυτοκινινών και των συγκεντρώσεών τους σε καθεμιά από τις παραμέτρους που μελετήθηκαν. Επίσης, επισημαίνεται και η επίδραση του μάρτυρα.

Συγκεκριμένα, στο Σχεδιάγραμμα 1 φαίνεται πως τον μεγαλύτερο αριθμό εκπυσσόμενων βλαστών προκάλεσε η επέμβαση με την κυτοκινίνη **CPPU**. Οι επεμβάσεις με CPPU στην *χαμηλή* και *μεσαία* συγκέντρωσή της, ήταν και οι μόνες οι οποίες διέφεραν στατιστικώς σημαντικά από τον μάρτυρα.



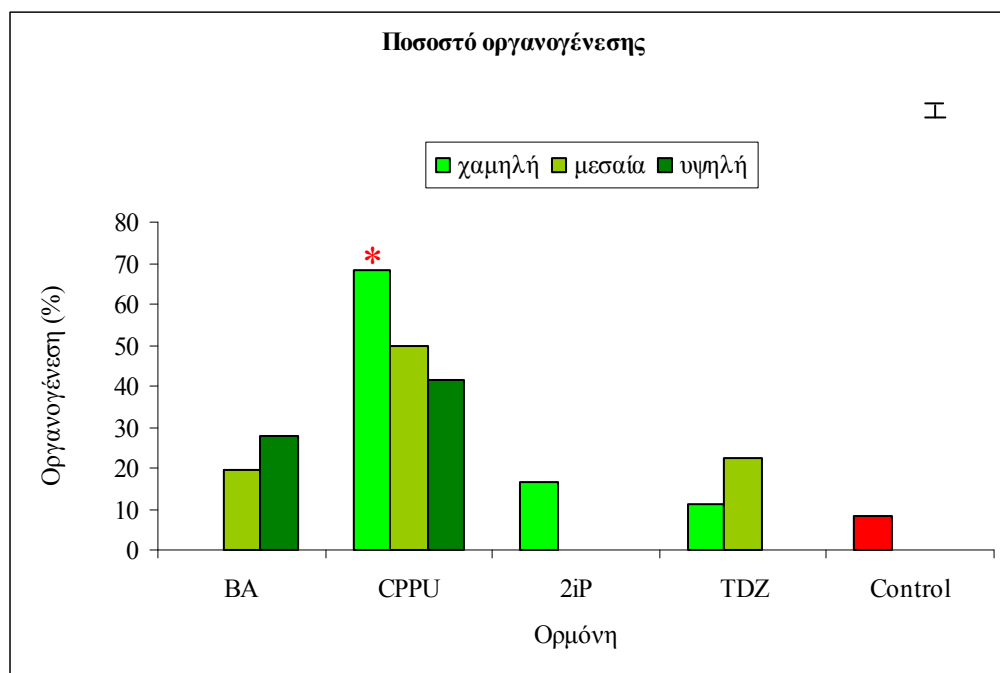
Σχεδιάγραμμα 1: Επίδραση των ορμονών και των συγκεντρώσεών τους στον αριθμό των εκπυσσόμενων βλαστών και σύγκρισή τους με τον μάρτυρα. Η κόκκινη στήλη αντιστοιχεί στην τιμή του μάρτυρα, ενώ με κόκκινο αστεράκι επισημαίνονται οι επεμβάσεις που διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά από αυτόν με βάση την ανάλυση Dunnett. Η μπάρα αντιστοιχεί στο Τυπικό Σφάλμα που προκύπτει από την ανάλυση παραγοντικού πειράματος.

Στο επόμενο σχεδιάγραμμα (Σχεδιάγραμμα 2) φαίνεται πως το μεγαλύτερο μήκος βλαστών προκάλεσε η επέμβαση με την κυτοκινίνη **TDZ**, χωρίς όμως να υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες επεμβάσεις. Επίσης, βλέπουμε πως καμία από τις επεμβάσεις δε διέφερε σημαντικά από τον μάρτυρα.



Σχεδιάγραμμα 2: Επίδραση των ορμονών και των συγκεντρώσεών τους στο μήκος των εκπυσόμενων βλαστών και σύγκρισή τους με τον μάρτυρα. Η κόκκινη στήλη αντιστοιχεί στην τιμή του μάρτυρα, ενώ με κόκκινο αστεράκι επισημαίνονται οι επεμβάσεις που διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά από αυτόν με βάση την ανάλυση Dunnett. Η μπάρα αντιστοιχεί στο Τυπικό Σφάλμα που προκύπτει από την ανάλυση παραγοντικού πειράματος.

Στο τελευταίο αυτό σχεδιάγραμμα (Σχεδιάγραμμα 3), φαίνεται πως η ορμόνη **CPPU** έδωσε τα μεγαλύτερα ποσοστά οργανογένεσης με στατιστικώς σημαντική διαφορά από όλες τις υπόλοιπες κυτοκινίνες. Όσον αφορά τον μάρτυρα, η επέμβαση της **CPPU** σε συγκέντρωση $0,05ppm$ ήταν η μόνη που διέφερε στατιστικώς σημαντικά από αυτόν.



Σχεδιάγραμμα 3: Επίδραση των ορμονών και των συγκεντρώσεών τους στο ποσοστό οργανογένεσης και σύγκρισή τους με τον μάρτυρα. Η κόκκινη στήλη αντιστοιχεί στην τιμή του μάρτυρα, ενώ με κόκκινο αστεράκι επισημαίνονται οι επεμβάσεις που διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά από αυτόν με βάση την ανάλυση Dunnett. Η μπάρα αντιστοιχεί στο Τυπικό Σφάλμα που προκύπτει από την ανάλυση παραγοντικού πειράματος.

Β. Αποτελέσματα Φθινόπωρο 2007 (με BA)

Τα αποτελέσματα σε αυτό το κομμάτι του πειράματος δεν έδειξαν κάποια στατιστικώς σημαντική επίδραση των παραγόντων επί των μελετώμενων παραμέτρων (Πίνακας 2).

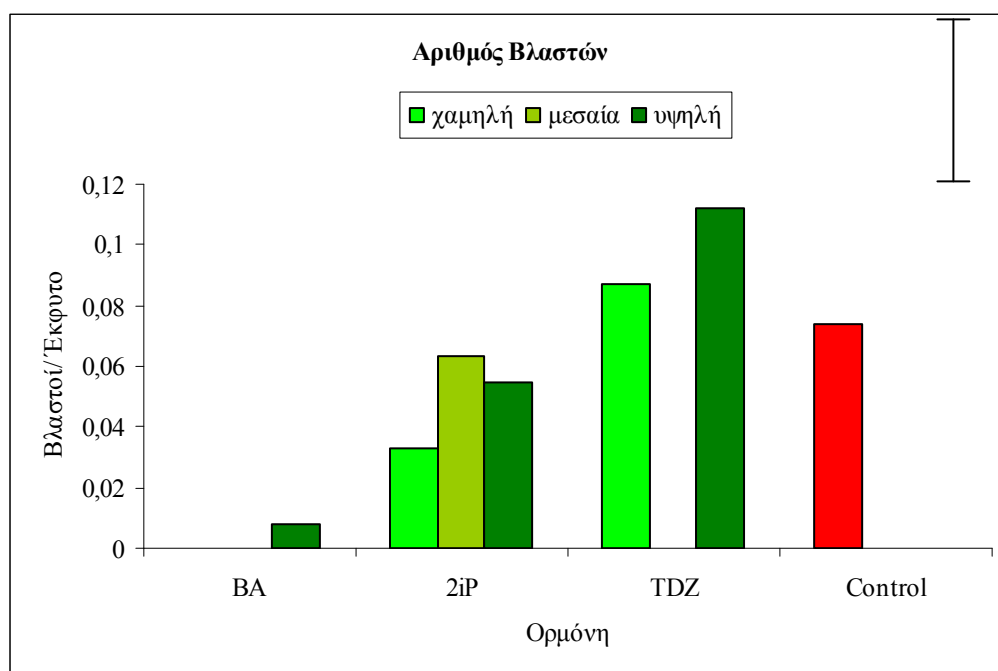
Πρέπει να σημειωθεί ότι τα επικοτύλια που χρησιμοποιήθηκαν ως έκφυτα είχαν ληφθεί από σπορόφυτα τα οποία αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα MT εμπλουτισμένο με την κυτοκίνη **BA** σε συγκέντρωση *1ppm*.

Πίνακας 3.2 Συγκεντρωτικός πίνακας των επιδράσεων της ορμόνης και της συγκέντρωσης επί των μετρούμενων μεταβλητών.

Μεταβλητές	Ορμόνη	Συγκέντρωση	Ορμόνη × Συγκέντρωση
Αριθμός Βλαστών	ns	ns	ns
Μήκος Βλαστών	ns	ns	ns
Ποσοστό Οργανογένεσης	ns	ns	ns

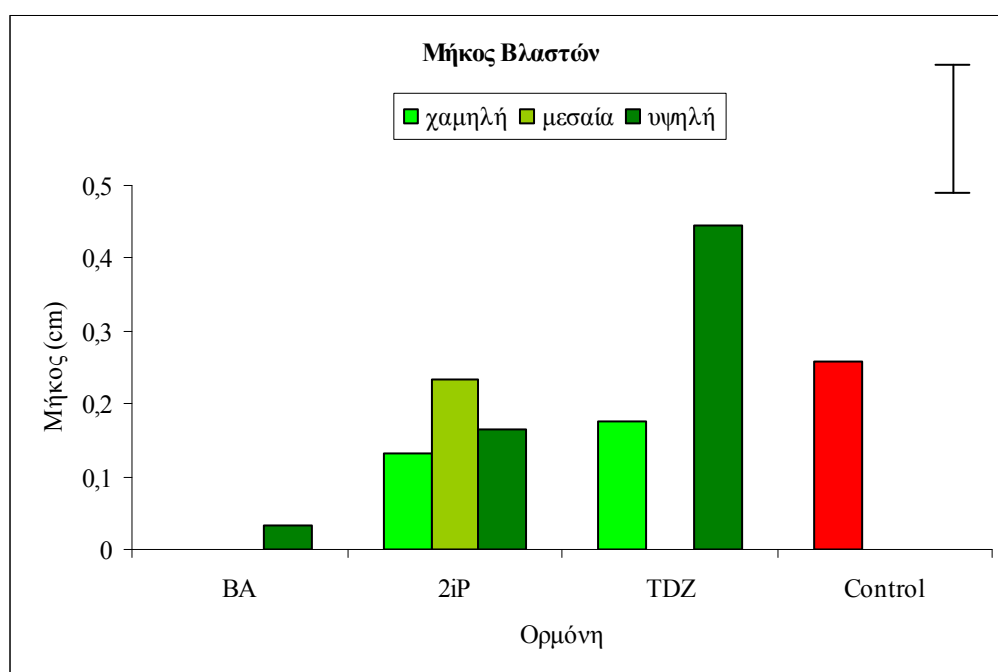
Σχόλιο: ns= non significant, *** δηλώνει $P < 0.001$, ** δηλώνει $P < 0.01$, * δηλώνει $P < 0.05$.

Αναλύοντας την επίδραση των ορμονών επί του αριθμού των εκπυτσόμενων βλαστών, βλέπουμε στο Σχεδιάγραμμα 4 πως τα καλύτερα αποτελέσματα έδωσαν οι επεμβάσεις με **TDZ** και ακολούθως οι επεμβάσεις της ορμόνης **2iP**, χωρίς όμως να πρόκειται για στατιστικώς σημαντικές επιδράσεις. Από την άλλη, ο μάρτυρας δε φαίνεται να διαφέρει στατιστικώς σημαντικά με καμιά επέμβαση.

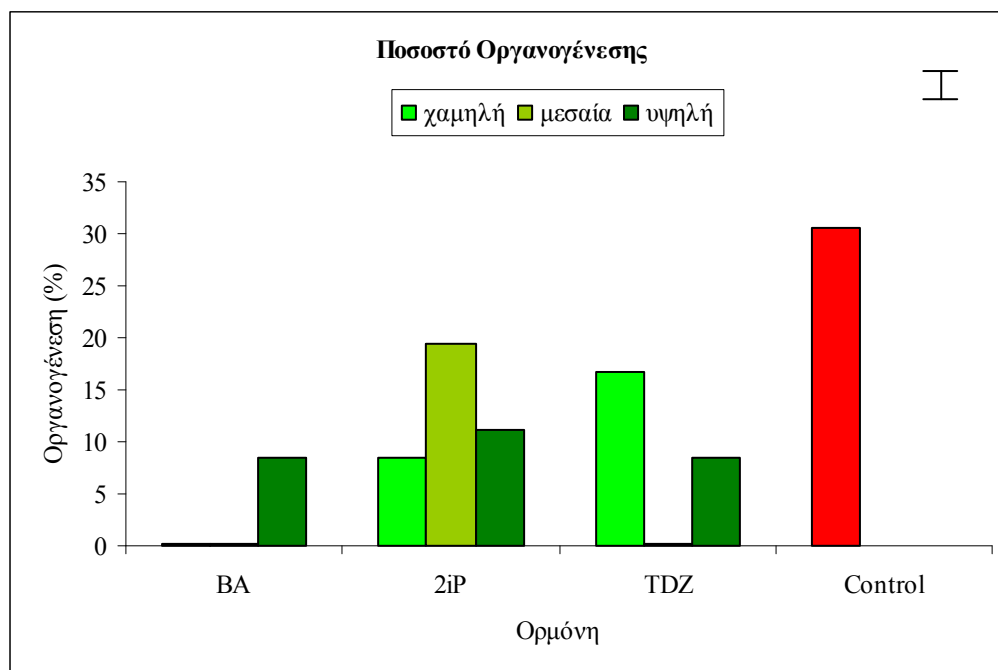


Σχεδιάγραμμα 4: Επίδραση των ορμονών και των συγκεντρώσεών τους στον αριθμό των εκπυτσόμενων βλαστών και σύγκρισή τους με τον μάρτυρα. Η κόκκινη στήλη αντιστοιχεί στην τιμή του μάρτυρα, ενώ με κόκκινο αστεράκι επισημαίνονται οι επεμβάσεις που διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά από αυτόν με βάση την ανάλυση Dunnett. Η μπάρα αντιστοιχεί στο Τυπικό Σφάλμα που προκύπτει από την ανάλυση παραγοντικού πειράματος.

Ανάλογα αποτελέσματα παρατηρούνται και στα Σχεδιαγράμματα 5 και 6, όπου επίσης δεν παρατηρούνται στατιστικώς σημαντικές διαφορές μεταξύ των ορμονών ή των συγκεντρώσεών τους, ούτε και σημαντικές διαφορές μεταξύ των επεμβάσεων και του μάρτυρα, όσον αφορά το μήκος βλαστών και το ποσοστό οργανογένεσης. Στο σημείο αυτό παρατηρείται ότι το ποσοστό οργανογένεσης που επετεύχθη ήταν ιδιαίτερα χαμηλό (για όλες τις επεμβάσεις, πλην της CPPU, η οποία δεν χρησιμοποιήθηκε σε αυτά τα έκφυτα) συγκρινόμενο με αυτό των εκφύτων τα οποία προήλθαν από σπορόφυτα που αναπτύχθηκαν χωρίς την προσθήκη BA στο υπόστρωμά τους.



Σχεδιάγραμμα 5: Επίδραση των ορμονών και των συγκεντρώσεών τους στο μήκος των εκπυττούμενων βλαστών και σύγκρισή τους με τον μάρτυρα. Η κόκκινη στήλη αντιστοιχεί στην τιμή του μάρτυρα, ενώ με κόκκινο αστεράκι επισημαίνονται οι επεμβάσεις που διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά από αυτόν με βάση την ανάλυση Dunnett. Η μπάρα αντιστοιχεί στο Τυπικό Σφάλμα που προκύπτει από την ανάλυση παραγοντικού πειράματος.



Σχεδιάγραμμα 6: Επίδραση των ορμονών και των συγκεντρώσεών τους στο ποσοστό οργανογένεσης και σύγκρισή τους με τον μάρτυρα. Η κόκκινη στήλη αντιστοιχεί στην τιμή του μάρτυρα, ενώ με κόκκινο αστεράκι επισημαίνονται οι επεμβάσεις που διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά από αυτόν με βάση την ανάλυση Dunnett. Η μπάρα αντιστοιχεί στο Τυπικό Σφάλμα που προκύπτει από την ανάλυση παραγοντικού πειράματος.

Γ. Αποτελέσματα Άνοιξη 2008

Στο δεύτερο αυτό μέρος του πειράματος, όπως αναφέρθηκε και στο Κεφάλαιο 2, προστέθηκε και η κυτοκίνη Κινετίνη και τροποποιήθηκαν λίγο οι μελετώμενες συγκεντρώσεις των ορμονών BA και 2iP.

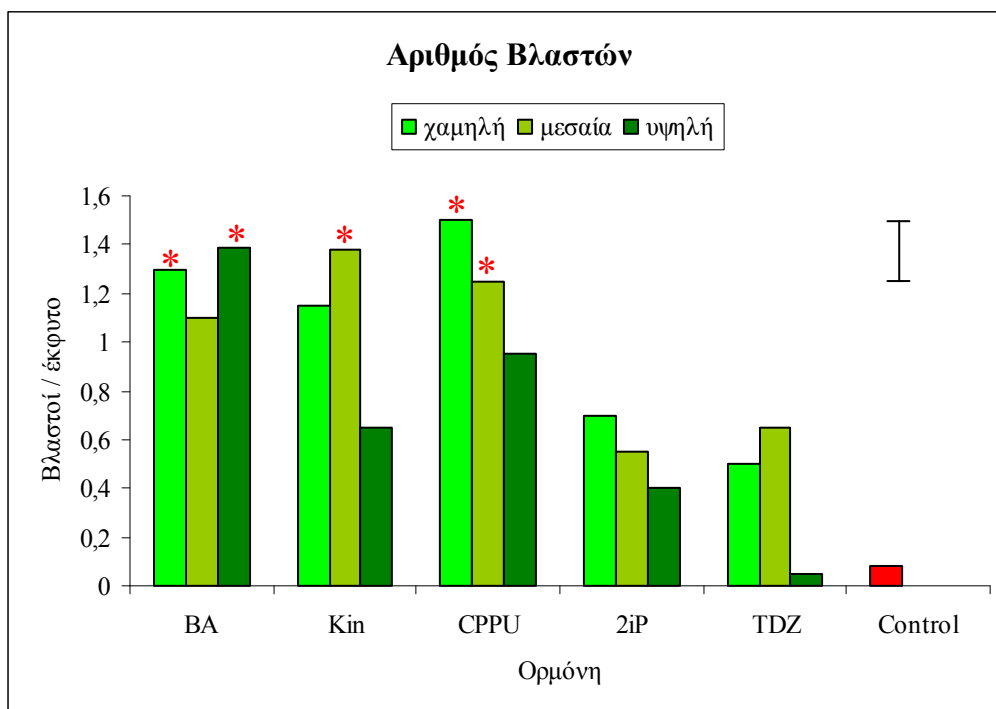
Όπως δείχνουν τα αποτελέσματα στον Πίνακα 3, το είδος της ορμόνης επηρέασε σημαντικά και τις τρεις μελετώμενες παραμέτρους (Αριθμό Βλαστών, Μήκος Βλαστών, Ποσοστό Οργανογένεσης). Ο παράγοντας συγκέντρωση, επίσης, επηρέασε στατιστικώς σημαντικά τόσο το ποσοστό οργανογένεσης όσο και το μήκος βλαστών. Αντίθετα, δεν υπήρξε αλληλεπίδραση ορμόνης επί συγκέντρωση.

Πίνακας 3.3 Συγκεντρωτικός πίνακας των επιδράσεων της ορμόνης και της συγκέντρωσης επί των μετρούμενων μεταβλητών.

<i>Μεταβλητές</i>	<i>Ορμόνη</i>	<i>Συγκέντρωση</i>	<i>Ορμόνη × Συγκέντρωση</i>
<i>Αριθμός Βλαστών</i>	***	ns	ns
<i>Μήκος Βλαστών</i>	**	*	ns
<i>Ποσοστό Οργανογένεσης</i>	***	**	ns

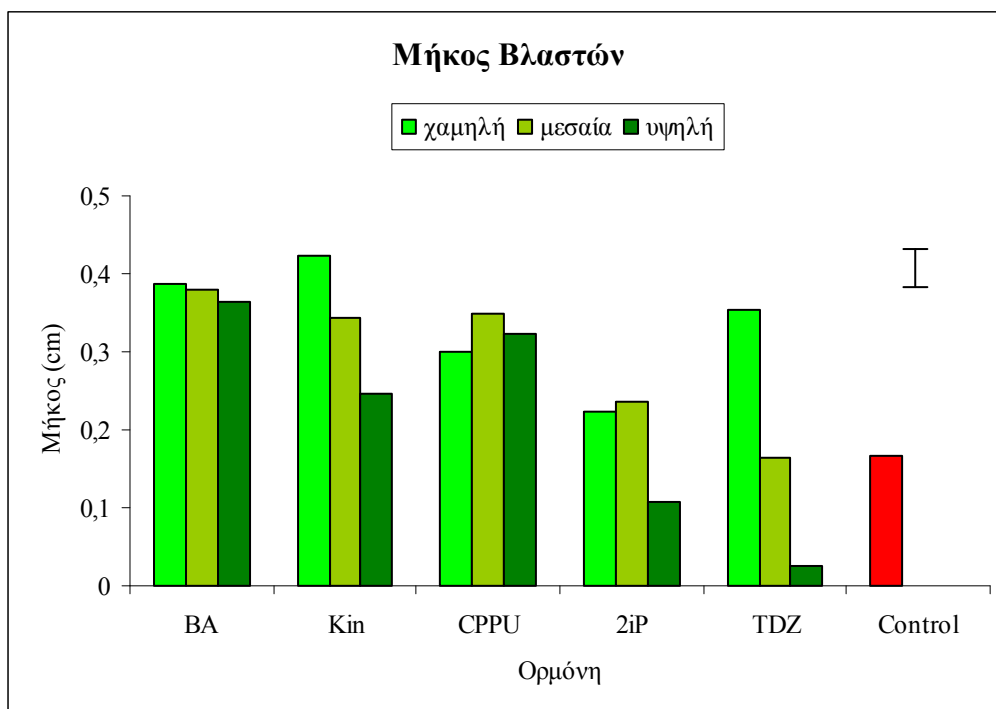
Σχόλιο: ns= non significant, *** δηλώνει $P < 0.001$, ** δηλώνει $P < 0.01$, * δηλώνει $P < 0.05$.

Από τον Πίνακα 3 και το Σχεδιάγραμμα 7, φαίνεται ότι τον μεγαλύτερο αριθμό βλαστών έδωσαν οι επεμβάσεις με τις ορμόνες **BA**, **Kin** και **CPPU**, χωρίς σημαντική επίδραση των συγκεντρώσεών τους. Από αυτές τα καλύτερα αποτελέσματα έδωσε η **CPPU** σε συγκέντρωση $0,05ppm$, χωρίς ωστόσο να διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από τις επεμβάσεις των υπόλοιπων δύο ορμονών. Και οι τρεις πάντως ορμόνες διαφέρουν σημαντικά από τις ορμόνες **TDZ** και **2iP**, μεταξύ βέβαια των οποίων δεν υπάρχει στατιστικώς σημαντική διαφορά. Ο μάρτυρας, όπως φαίνεται και από το Σχεδιάγραμμα 7, διαφέρει σημαντικά από τις επεμβάσεις **BA** (χαμηλή, υψηλή), **Kin** (μεσαία) και **CPPU** (χαμηλή, μεσαία).



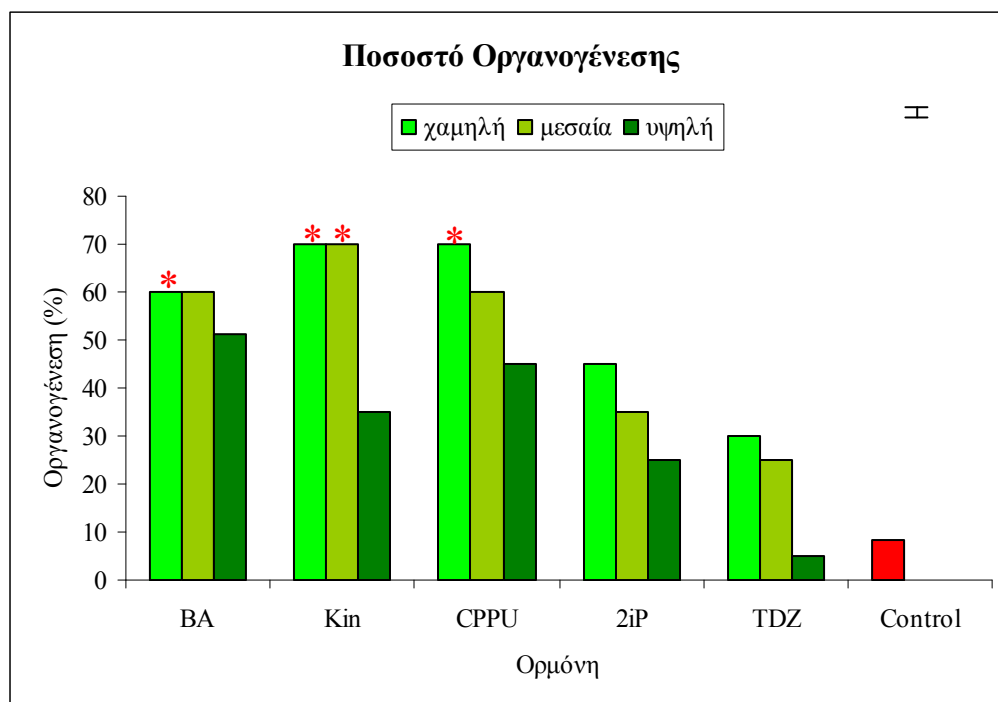
Σχεδιάγραμμα 7: Επίδραση των ορμονών και των συγκεντρώσεών τους στον αριθμό των εκπυσσόμενων βλαστών και σύγκρισή τους με τον μάρτυρα. Η κόκκινη στήλη αντιστοιχεί στην τιμή του μάρτυρα, ενώ με κόκκινο αστεράκι επισημαίνονται οι επεμβάσεις που διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά από αυτόν με βάση την ανάλυση Dunnett. Η μπάρα αντιστοιχεί στο Τυπικό Σφάλμα που προκύπτει από την ανάλυση παραγοντικού πειράματος.

Αναλύοντας τα αποτελέσματα που εξάγονται για το μήκος βλαστών από το Σχεδιάγραμμα 8, βλέπουμε ότι το μεγαλύτερο μήκος βλαστών με στατιστικώς σημαντική διαφορά από τις υπόλοιπες, έδωσαν οι ορμόνες **BA**, **CPPU** και **Kin**, χωρίς όμως σημαντικές στατιστικές διαφορές μεταξύ τους. Όσον αφορά τις συγκεντρώσεις των κυτοκινινών, στατιστικώς σημαντικά διέφεραν οι *χαμηλή* και *υψηλή*, με την πρώτη να δίνει καλύτερα αποτελέσματα. Ο μάρτυρας, από την άλλη, δε φαίνεται να διέφερε σημαντικά από καμία επέμβαση.



Σχεδιάγραμμα 8: Επίδραση των ορμονών και των συγκεντρώσεών τους στο μήκος των εκπυσσόμενων βλαστών και σύγκρισή τους με τον μάρτυρα. Η κόκκινη στήλη αντιστοιχεί στην τιμή του μάρτυρα, ενώ με κόκκινο αστεράκι επισημαίνονται οι επεμβάσεις που διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά από αυτόν με βάση την ανάλυση Dunnett. Η μπάρα αντιστοιχεί στο Τυπικό Σφάλμα που προκύπτει από την ανάλυση παραγοντικού πειράματος.

Στο ποσοστό οργανογένεσης, όπως δείχνει και ο Πίνακας 3, επιδρά σημαντικά τόσο ο τύπος της κυτοκίνης όσο και οι συγκεντρώσεις των επεμβάσεων. Συγκεκριμένα, από το Σχεδιάγραμμα 9 φαίνεται πως το μεγαλύτερο ποσοστό έδωσαν οι κυτοκίνες **CPPU** και **Kin**, χωρίς ωστόσο σημαντικές διαφορές από την ορμόνη **BA**. Επίσης, η συγκέντρωση *χαμηλή*, διέφερε στατιστικώς σημαντικά από τις υπόλοιπες δύο συγκεντρώσεις. Ο μάρτυρας, τέλος, φαίνεται να διαφέρει σημαντικά από τις επεμβάσεις **BA χαμηλή**, **Kin χαμηλή** και **μεσαία** και **CPPU χαμηλή**.



Σχεδιάγραμμα 9: Επίδραση των ορμονών και των συγκεντρώσεών τους στο ποσοστό οργανογένεσης και σύγκρισή τους με τον μάρτυρα. Η κόκκινη στήλη αντιστοιχεί στην τιμή του μάρτυρα, ενώ με κόκκινο αστεράκι επισημαίνονται οι επεμβάσεις που διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά από αυτόν με βάση την ανάλυση Dunnett. Η μπάρα αντιστοιχεί στο Τυπικό Σφάλμα που προκύπτει από την ανάλυση παραγοντικού πειράματος.

Δ. Αποτελέσματα Καλοκαίρι 2008

Όπως αναφέρθηκε και στο Κεφάλαιο 2, στο πειραματικό αυτό κομμάτι επιλέχθηκε η κυτοκίνη **Kin** $0.25ppm$, ως μία από τις καλύτερες που δοκιμάστηκαν στο παρόν πείραμα, για να συνδυαστεί περαιτέρω με την αυξίνη **α -NAA** σε διάφορες συγκεντρώσεις. Η ανάλυση που έγινε σε αυτό το κομμάτι του πειράματος ήταν μονο-παραγοντική. Αυτό που εξετάζεται, λοιπόν, είναι η στατιστικώς σημαντική διαφορά της επίδρασης των τεσσάρων επεμβάσεων, όπως φαίνεται και στον Πίνακα 4.

Πίνακας 3.4 Συγκριτικός πίνακας των συνδυαστικών επεμβάσεων Kin-NAA(ppm).

<i>Επεμβάσεις</i>	<i>Αριθμός Βλαστών</i>	<i>Μήκος Βλαστών</i>	<i>Ποσοστό Οργανογένεσης</i>
<i>Kin-NAA(0)</i>	1.15b	0.42c	56.49c
<i>Kin-NAA(0,01)</i>	0.80b	0.22b	33.51b
<i>Kin-NAA(0,05)</i>	0.0a	0.0a	11.21a
<i>Kin-NAA(0,1)</i>	0.17a	0.03a	1.81a

Σχόλιο: οι μέσες τιμές που ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν στατιστικώς σημαντικά, ενώ αυτές που ακολουθούνται από το διαφορετικό, διαφέρουν.

Όπως βλέπουμε από τον παραπάνω πίνακα, τα καλύτερα αποτελέσματα από τις επεμβάσεις έδωσαν αυτή χωρίς την προσθήκη της αυξίνης NAA και αυτή με την μικρότερη συγκέντρωση αυξίνης.

Όσον αφορά τον αριθμό βλαστών, οι δύο επεμβάσεις δε διέφεραν στατιστικώς σημαντικά.

Στο μήκος βλαστών οι δύο επεμβάσεις διαφέρουν σημαντικά, με αυτήν της πρώτης να υπερτερεί κατά πολύ.

Τελειώνοντας με την επίδραση των επεμβάσεων επί του ποσοστού οργανογένεσης, βλέπουμε πως και πάλι οι δύο παραπάνω επεμβάσεις διαφέρουν πολύ από τις άλλες δύο. Η επέμβαση χωρίς την προσθήκη αυξίνης διαφέρει στατιστικώς σημαντικά και από την επέμβαση με την προσθήκη της αυξίνης στη μικρότερη συγκέντρωσή της και βλέπουμε ότι δίνει το μεγαλύτερο ποσοστό οργανογένεσης με διαφορά.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

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

Οι ορμόνες που χρησιμοποιήθηκαν στο παρόν πείραμα ήταν κυτοκινίνες στην πλειοψηφία τους. Η κυτοκινίνη είναι φυτική ορμόνη που ελέγχει την ανάπτυξη των φυτών και αρχικά αναγνωρίστηκε ως παράγοντας που προάγει την κυτταρική διαίρεση παρουσία αυξίνης (Miller et al., 1955). Οι κυτοκινίνες διακρίνονται σε δύο ομάδες ενώσεων: τα παράγωγα αδενίνης με υποκαταστάτη (Shaw, 1994) και τα συνθετικά παράγωγα φαινυλουρίας (Shudo, 1994). Τη σύνθεση της διφαινυλουρίας (DPU) (Shantz and Steward, 1955) ακολούθησε η σύνθεση μιας τάξης νέων ανάλογων παραγώγων, όπως είναι το TDZ και το CPPU, με ακόμα μεγαλύτερη δραστηριότητα κυτοκινίνης από αυτήν του τύπου των παραγώγων αδενίνης (Mok et al., 1982, 1987). Τα παράγωγα αυτά χρησιμοποιούνται σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις όντας εξίσου αποτελεσματικά. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο ότι η φαινυλουρία παρουσιάζει σχετική ανεκτικότητα στις ενδογενείς οξειδάσες των κυτοκινινών (Arinaitwe et al., 2000), σε συνδυασμό, βέβαια, με την ικανότητά της να προωθεί την παραγωγή ενδογενών κυτοκινινών παρεμποδίζοντας την δράση των οξειδασών τους (Magioli et al., 1998).

Σχετικά πρόσφατα, διαπιστώθηκε η εμβρυογενετική και οργανογενετική ικανότητα της κυτοκινίνης CPPU (Nakano et al., 1997; Millan-Mendoza and Graham, 1999; Nakajima et al., 2000; Tsuru et al., 2000). Σύμφωνα, όμως, με τα όσα εμείς γνωρίζουμε, η CPPU δεν έχει χρησιμοποιηθεί μέχρι τώρα σε έκφυτα επικοτυλίου εσπεριδοειδών με στόχο την άμεση οργανογένεση. Οι πιο σχετικές, ίσως, αναφορές είναι από τους Fiore et al. (2002) και από τους Siragusa et al. (2007), οι οποίοι χρησιμοποίησαν, όμως, έκφυτα στύλων και στιγμάτων με στόχο την σωματική εμβρυογένεση ή/και την δημιουργία κάλλου.

Συγκεντρωτικά στο πείραμά μας, η συγκεκριμένη κυτοκινίνη έδωσε πολύ καλά αποτελέσματα, με τη χαμηλή της συγκέντρωση (0.05 mg/l) να διαφέρει στατιστικώς σημαντικά από τις άλλες δύο. Στη συγκέντρωσή της αυτή, επετεύχθει ποσοστό οργανογένεσης μέχρι και 70% και αριθμός βλαστών ανά έκφυτο 1.5. Στο μέρος αυτό

του πειράματος (Άνοιξη 2008), δε διέφερε στατιστικώς σημαντικά από τις BA 0.25 mg/l και Kin 0.25 mg/l οι οποίες έδωσαν ποσοστά οργανογένεσης 60% και 70% και αριθμό βλαστών ανά έκφυτο 1.3 και 1.15, αντίστοιχα. Ωστόσο, στο πρώτο μέρος του πειράματος (Φθινόπωρο 2007), όπου συγκρίθηκε με την BA βρέθηκε να υπερέχει αυτής στατιστικώς σημαντικά. Τα ποσοστά οργανογένεσης που έδωσαν στις καλύτερες συγκεντρώσεις τους οι BA (2 mg/l) και CPPU (0.05 mg/l) ήταν αντίστοιχα 27% και 68%. Συγχρόνως, η CPPU και στα δύο αυτά μέρη του πειράματος, βρέθηκε να διαφέρει σημαντικά από τον μάρτυρα ως προς το ποσοστό οργανογένεσης (CPPU 0.05 mg/l) και τον αριθμό βλαστών ανά έκφυτο (CPPU 0.05 και 0.1 mg/l). Συγκρινόμενη, βέβαια, με τις λοιπές κυτοκινίνες (TDZ, 2iP), η υπεροχή της ήταν προφανής.

Όσο για την TDZ, οι Perez-Molphe-Balch and Ochoa-Alejo (1997) ήταν αυτοί που τη χρησιμοποίησαν σε συγκεντρώσεις 0.1 mg/l και 0.2 mg/l σε συνδυασμό με NAA 1.0 mg/l και έδωσε περίπου 16-22% ποσοστό οργανογένεσης, γεγονός που συμπίπτει και με τα δικά μας αποτελέσματα περίπου. Μόνο που εμείς τη δοκιμάσαμε μόνη της και πετύχαμε και μεγαλύτερο ποσοστό οργανογένεσης όταν δοκιμάστηκε στην χαμηλή της συγκέντρωση (0.05 mg/l) που έφτασε το 30%. Άρα, μάλλον, η επίδραση της TDZ επηρεάζεται περισσότερο από τη συγκέντρωσή της, παρά από τις διαφορές των γονοτύπων ή του είδους των εκφύτων που υπήρχαν με το προαναφερθέν πείραμα.

Πάντως, η τόσο μεγάλη διαφορά στην αποτελεσματικότητα των δύο φαινυλουριών, πιθανόν να οφείλεται και σε διαφορετική ανταπόκριση του γονοτύπου της νερατζιάς ως προς τις δύο ορμόνες, όπως άλλωστε έχει διαπιστωθεί για τις κυτοκινίνες της ομάδας των αδενινών (Bordón *et al.*, 2000).

Στο εν λόγω πείραμα, εξαίρεση στη χρήση κυτοκινινών, αποτέλεσε η αυξίνη NAA που προστέθηκε συμπληρωματικά στο τελευταίο μέρος του πειράματος σε συνδυασμό με την καλύτερη συγκέντρωση της κυτοκινίνης Kin (0.25 mg/l). Είδαμε, λοιπόν, ότι η επέμβαση χωρίς την προσθήκη της παραπάνω αυξίνης έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα όσον αφορά το ποσοστό οργανογένεσης (69,44%) και το μήκος βλαστών (0.425cm) με σημαντική διαφορά από τις λοιπές επεμβάσεις (προσθήκη NAA: 0.01, 0.05, 0.1 mg/l) όσο αυξανόταν η συγκέντρωση της NAA. Οι Perez-Molphe-Balch and Ochoa-Alejo (1997), στο πείραμά τους χρησιμοποίησαν και αυτοί ένα συνδυασμό της Kin (10.0 mg/l) με NAA (1.0 mg/l) σε *C. aurantifolia* και *C. reticulata* που έδωσε, όμως, πολύ χαμηλό ποσοστό οργανογένεσης (20-22%). Βέβαια,

επρόκειτο για διαφορετικούς γονοτύπους, διαφορετικά είδη εκφύτων αλλά κυρίως, για πολύ υψηλή συγκέντρωση Κινετίνης.

Όπως παρατηρήσαμε και εμείς, η Κιν όταν χρησιμοποιήθηκε μόνη της στην υψηλή της συγκέντρωση (1 mg/l) έδωσε χαμηλότερα ποσοστά οργανογένεσης (35%) που διέφεραν σημαντικά από αυτά της μεσαίας (0.5 mg/l) και της χαμηλής (0.25 mg/l) της συγκέντρωσης (70% και για τις δύο αυτές). Πρόκειται, δηλαδή, για ανταπόκριση στη δόση κυτοκινίνης, που είναι άλλωστε σύνηθες για φυτορρυθμιστικές ουσίες. Όσον αφορά τον μάρτυρα, διέφερε από αυτόν σημαντικά ως προς το ποσοστό οργανογένεσης (Κιν: 0.25, 0.5 mg/l) και τον αριθμό βλαστών ανά έκφυτο (Κιν: 0.5 mg/l). Γενικά πρόκειται, επίσης, για μία ορμόνη που δεν έχει δοκιμαστεί διεξοδικά ως προς την αποτελεσματικότητά της στο συγκεκριμένο τομέα ερευνών και η οποία έδωσε εξίσου καλά αποτελέσματα με την γνωστή για τις ιδιότητές της BA.

Αναλύοντας τώρα την BA και τα αποτελέσματα που έδωσε στο πείραμά μας, διαπιστώσαμε ότι στο πρώτο μέρος αυτού, διέφεραν κατά πολύ τα ποσοστά οργανογένεσης των εκφύτων που προήλθαν από σπορόφυτα με BA στο υπόστρωμα ανάπτυξής τους από αυτά των εκφύτων που προήλθαν από σπορόφυτα που αναπτύχθηκαν χωρίς την προσθήκη BA σε αυτό. Τα πρώτα, στις τρεις συγκεντρώσεις BA που χρησιμοποιήθηκαν (0.5, 1.0, 2.0 mg/l) δεν έδωσαν σχεδόν καθόλου βλαστούς. Ανατρέχοντας άλλωστε στην βιβλιογραφία, είναι πολύ οι ερευνητές που παραδέχονται ότι η νερατζιά έχει από τα μικρότερα ποσοστά οργανογένεσης (4%) (Bordon et al., 2000). Τα δεύτερα στις ίδιες συγκεντρώσεις έδωσαν ποσοστό οργανογένεσης μέχρι και 28% στην μεγαλύτερη συγκέντρωση της BA και 19% σε BA 1 mg/l. Τα ποσοστά αυτά συμπίπτουν με τους παραπάνω ερευνητές (Bordon et al., 2000), οι οποίοι στη νερατζιά, με BA 1 mg/l είχαν ποσοστό 18% στην κορυφή του επικοτυλίου.

Στη συνέχεια του πειράματός μας, λόγω των πρώτων αποτελεσμάτων αλλά και λαμβάνοντας υπόψη τη βιβλιογραφία, κρίναμε σκόπιμο να αλλάξουμε τις συγκεντρώσεις της BA σε 0.25, 0.5, 1.0 mg/l. Είναι πολλοί οι ερευνητές που διαπίστωσαν ότι συγκεντρώσεις BA μεγαλύτερες από 1-1.5 mg/l, προκαλούν μείωση του αριθμού των εκπυσσόμενων βλαστών, στη νερατζιά αλλά και όχι μόνο (Maggon and Singh, 1995; Pérez-Molphe-Balch and Ochoa-Alejo, 1997; Ghorbel et al., 1998; Moreira-Dias et al., 2000; Almeida et al., 2002; Tavano et al., 2009). Επίσης, υπήρξαν ερευνητές που στις μεγαλύτερες συγκεντρώσεις BA διαπίστωσαν όχι μόνο μείωση

του ποσοστού οργανογένεσης αλλά και αύξηση του σχηματισμού κάλλου (Sim et al., 1989; Goh et al., 1995; Maggon and Singh, 1995; Costa et al., 2004).

Στα αποτελέσματα αυτού του δεύτερου μέρους του πειράματος (Άνοιξη 2008) βελτιώθηκε πολύ η επίδραση της BA. Τα ποσοστά οργανογένεσης για τις τρεις συγκεντρώσεις της BA ήταν 60%, 60% και 51% και συμφωνούν απόλυτα με τα αποτελέσματα που βρήκαν στο πείραμά τους οι Tavano et al. (2009). Οι συγκεκριμένοι ερευνητές στη νερατζιά και με συγκεντρώσεις BA 0.5 και 1.0 mg/l πέτυχαν ποσοστά οργανογένεσης 59% και 51%, αντίστοιχα. Η διαφορά με το πείραμα αυτό έγκειται στο υπόστρωμα καλλιέργειας (χρησιμοποίησαν EME), που όμως δε φάνηκε να διαφοροποιεί τα αποτελέσματα. Επίσης, κοντινά με τα αποτελέσματά μας ήταν και των Almeida et al. (2002). Χρησιμοποίησαν σαν κι εμάς υπόστρωμα MT (αν και οι περισσότεροι ερευνητές χρησιμοποιούν MS) για την ανάπτυξη των εκφύτων επικοτυλίου και με επέμβαση BA 1 mg/l πέτυχαν σε *C. sinensis* και *C. limonia*, ποσοστό οργανογένεσης 69.56%.

Γενικά, πάντως, υπήρξαν ερευνητές που πέτυχαν μεγαλύτερα ποσοστά οργανογένεσης σε αυτούς τους γονοτύπους (*C. sinensis* και *C. limonia*) (Maggon and Deo Singh, 1995; Costa et al., 2004), αλλά και σε άλλους (*C. aurantifolia*, *C. reticulata*, *C. paradisi*) (Perez-Molphe-Balch and Ochoa-Alejo, 1997; Costa et al., 2004), οι οποίοι κατά κανόνα παρουσιάζουν μεγαλύτερα ποσοστά αναγέννησης *in vitro* συγκρινόμενα με αυτά της νερατζιάς. Τα έκφυτα που χρησιμοποιήθηκαν στα περισσότερα από αυτά τα πειράματα ήταν επικοτυλίου, με εξαίρεση των Perez-Molphe-Balch and Ochoa-Alejo (1997), που χρησιμοποίησαν έκφυτα φύλλων, μεσογονατίων και ριζών από *C. aurantifolia*, *C. reticulata* και πέτυχαν οργανογένεση 75% με προσθήκη BA 7.5 mg/l και NAA 1 mg/l. Αν και πολύ μεγάλη η συγκέντρωση της BA κατάφερε υψηλά ποσοστά. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στην αντίδραση των γονοτύπων αλλά ίσως και στο είδος των εκφύτων. Οι Maggon and Deo Singh (1995), πέτυχαν πάντως, από τα μεγαλύτερα ποσοστά οργανογένεσης (88% και 85%) σε εσπεριδοειδή (*C. sinensis*) με την προσθήκη BA 2.0 και 4.0 mg/l, αντίστοιχα. Ο στόχος τους, όμως, ήταν η έμμεση οργανογένεση, γεγονός ανεπιθύμητο σε πειράματα δημιουργίας διαγονιδιακών φυτών, όπως αναφέρθηκε και στο Κεφάλαιο 1.6.

Όσον αφορά την μεγάλη απόκλιση επίδρασης της BA μεταξύ Φθινοπώρου 2007 και Άνοιξης 2008, μπορούμε ίσως να την αποδώσουμε σε διαφορές του αρχικού φυτικού υλικού, λόγω διαφορετικής εποχής συλλογής των νερατζιών. Επίσης, είναι πιθανό να οφείλεται στη διαφορά της διάρκειας σκότους κατά το στάδιο ανάπτυξης

των σποροφύτων. Όπως αναφέρθηκε και νωρίτερα, κατά το δεύτερο μέρος του πειράματος αυξήσαμε την διάρκεια της περιόδου αυτής σε ένα μήνα, γεγονός που αποδείχθηκε μάλλον ευεργετικό.

Στο σημείο αυτό, πρέπει ίσως να επισημάνουμε ότι όπως πολλοί ερευνητές έχουν δείξει, εκτός από τον τύπο και την συγκέντρωση των ορμονών που προστίθενται, υπάρχουν και άλλοι παράγοντες που επηρεάζουν τα ποσοστά οργανογένεσης. Οι Duan et al. (2007), σε *C. sinensis* βρήκαν ότι η διαγώνια τομή (μέθοδο που χρησιμοποιήσαμε και εμείς) έδωσε καλύτερα αποτελέσματα από τους άλλους τρόπους κοψίματος του επικοτυλίου (εγκάρσια, επιμήκη). Ακόμα, οι Tavano et al. (2009), σε *C. aurantium* διαπίστωσαν ότι ανεξαρτήτως συγκέντρωσης BA, τα έκφυτα υποκοτυλίου έδωσαν μεγαλύτερα ποσοστά οργανογένεσης (75 και 67,5%) από αυτά των επικοτυλίων (59% και 51%).

Συμπερασματικά, πάντως, η αποτελεσματικότητα των κυτοκινινών K_{in} καθώς και CPPU στην *in vitro* οργανογένεση της νερατζιάς, είναι εντυπωσιακή. Πιθανόν να οφείλεται σε θετική ανταπόκριση του γονοτύπου. Αλλά μιας και δεν έχουν γίνει ανάλογα πειράματα για την δράση της CPPU στο ίδιο ή σε κάποιο άλλο είδος του *Citrus* που να αντικρούουν τα αποτελέσματά μας υποθέτουμε ότι θα μπορούσε κάλλιστα να χρησιμοποιηθεί εναλλακτικά της BA σε πειράματα τέτοιου τύπου. Το ίδιο ισχύει και για την K_{in}, η οποία μπορεί μεν να έχει χρησιμοποιηθεί κατά το παρελθόν επιτυγχάνοντας χαμηλά ποσοστά οργανογένεσης, ωστόσο μπορεί αυτό να οφείλεται σε ακατάλληλες συγκεντρώσεις της ή ακόμα και σε αρνητική ανταπόκριση γονοτύπου και άρα να μη γενικεύεται στη δράση της Κινετίνης επί της οργανογένεσης *in vitro*.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ALMEIDA, W. A. B., ASSIS ALVES MOURÃO FILHO, F., MENDES, B. M. J. and RODRIGUEZ, A. P. M. (2002). In vitro organogenesis optimization and plantlet regeneration in *Citrus sinensis* and *Citrus limonia*. *Scientia Agricola*, **59**, 35-40.

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

BARLASS, M. and SKENE, K. G. M. (1982). In vitro plantlet formation from Citrus species and hybrids. *Scientia Horticulturae*, **17**, 333-341.

BARLASS, M. and SKENE, K. G. M. (1986). Citrus (Citrus species). In: *Biotechnology in agriculture and forestry*. (Bajaj, Y. P. S. Ed.). Volume 1. Trees, Springer-Verlag, Berlin, Germany pp 207-219.

BORDON, Y., GUARDIOLA, J. L. and GARCÍA-LUIS, A. (2000). Genotype Affects the Morphogenic Response in vitro of Epicotyl Segments of *Citrus* Rootstocks. *Annals of Botany*, **86**, 159-166.

CHATUVERDI, H. C. and MITRA, G. C. (1974). Clonal propagation of *Citrus* from somatic callus cultures. *HortScience*, **9**, 118-120.

COSTA, M. G. C., ALVES, V. S., LANI, E. R. G., MOSQUIMA, P. R., CARVALHO, C. R. and OTONI, W. C. (2004). Morphogenic gradients of adventitious bud and shoot regeneration in epicotyl explants of *Citrus*. *Scientia Horticulturae*, **100**, 63-74.

DUAN, Y.-X., LIU, X., FAN, J., LI, D.-L., WU, R.-C. and GUO, W.-W. (2007). Multiple shoot induction from seedling epicotyls and transgenic citrus plant regeneration containing the green fluorescent protein gene. *Botanical Studies*, **48**, 165-171.

EDRISS, M. H. and BURGER, D. W. (1984). In vitro propagation of Troyer citrange from epicotyl segments. *Scientia Horticulturae*, **23**, 159-162.

FILHO, J. C. B., KOBAYASHI, A. K., PEREIRA, L. F. P., HISSANO, Z. and VIEIRA, L. G. E. (2001). *In vitro* adventitious shoot regeneration from sweet orange using thin epicotyl sections. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*, **1**, 27-34.

IORE, S., PASQUALE, F., CARIMI, F. and SAJEVA, M. (2002). Effect of 2,4-DD and 4-CPPU on somatic embryogenesis from stigma and style transverse thin cell layers of *Citrus*. *Plant Cell*, **68**, 57-63.

GARCÍA-LUIS, A., BORDON, Y., MOREIRA-DIAS, J. M., MOLINA, R. V. and GUARDIOLA, J. L. (1999). Explant orientation and polarity determine the morphogenic response of epicotyl segments of Troyer citrange. *Annals of Botany*, **84**, 715-723.

GARCIA-LUIS, A., MOLINA, R. V., VARONA, V., CASTELLO, S. and GUARDIOLA, J. L. (2006). The influence of explant orientation and contact with the medium on the pathway of shoot regeneration in vitro in epicotyl cuttings of Troyer citrange. *Plant Cell*, **85**, 137-144.

GMITTER, F. C., GROSSER, J. W. and MOORE, G. A. (1992). Citrus. In: *Biotechnology of perennial fruit crops*. (Hammerschlag, F. A. and Litz, R. E., Eds.). CAB International, Wallingford, UK. 335-369.

GOH, C. J., SIM, G. E., MORALES, C. L. and LOH, C. S. (1995). Plantlet regeneration through different morphogenic pathways in pommelo tissue culture. *Plant Cell*, **43**, 301-303.

GRINBLAT, U. (1972). Differentiation of *Citrus* stem *in vitro*. *Journal of the American Society of Horticultural Science*, **97**, 599-603.

GROSSER, J. W. and GMITTER, F. G. (1990). Protoplast fusion and *Citrus* improvement. *Plant Breed*, **8**, 339-374.

HUTCHISON, D. J. and GRIMM, G. R. (1973). *Citrus* clones resistant to phytophthora parasitica. 1973 screening results. Proc. Fla. State Hort. Soc., **86**, 88-91.

MAGGON, R. and DEO SINGH, B. (1995). Promotion of adventitious bud regeneration by ABA in combination with BAP in epicotyl and hypocotyl explants of sweet orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). *Scientia Horticulturae*, **63**, 123-128.

MAGIOLI, C., ROCHA, A. P. M., DE OLIVEIRA, D. E. and MANSUR, E. (1998). Efficient shoot organogenesis of eggplant (*Solanum melongena* L.) induced by thidiazuron. *Plant Cell*, **17**, 661-663.

MILLAN-MENDOZA, B. and GRAHAM, J. (1999). Organogenesis and micropropagation in red raspberry using forchlorfenuron (CPPU). *Journal of Horticultural Science Biotechnology*, **74**, 219-223.

MILLER, C. O., SKOOG, F., VON SALTZA, H. M., OKUMURA, F. S. and STRONG, F. M. (1955). Kinetin: structure and synthesis of kinetin. *Journal of the American Chemistry Society*, **77**, 2662-2663.

MOK, M. C., MOK, D. W. S., DIXON, S. C., ARMSTRONG, D. J. and SHAW, G. (1982). Cytokinin structure-activity relationships and the metabolism of N⁶-(D²-isopentenyl)-adenosine-8-l⁴C in Phaseolus callus tissues. *Plant Physiology*, **70**, 173-178.

MOK, M. C., MOK, D. W. S., TURNER, J. E. and MU-JER, C. V. (1987). Biological and biochemical effects of cytokinin-active phenylurea derivative in tissue culture systems. *HortScience*, **22**, 1194-1197.

MOORE, G. A. (1986). In vitro propagation of *Citrus* rootstocks. *HortScience*, **21**, 300-301.

MOORE, G. A., JACONO, C. C., NEIDIGH, J. L., LAWRENCE, S. D. and KLINE, K. (1992). Agrobacterium-mediated transformation of *Citrus* stem segments and regeneration of transgenic plants. *Plant Cell*, **11**, 238-242.

MOREIRA-DIAS, J. M., MOLINA, R. V., GUARDIOLA, J. L. and GARCIA-LUIS, A. (2001). Daylength and photon flux density influence the growth regulator effects on morphogenesis in epicotyl segments of Troyer citrange. *Scientia Horticulturae*, **87**, 275-290.

MURASHIGE, T. and SKOOG, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum*, **15**, 473-497.

MURASHIGE, T. and TUCKER, D. P. H. (1969). Growth factor requirements of citrus tissue culture. *Proceedings 1st Citrus Symposium*, **3**, 1155-1161.

NAKAJIMA, I., KOBAYASHI, S. and NAKAMURA, Y. (2000). Embryogenic callus induction and plant regeneration from unfertilized ovule of 'Kyoho' grape. *Journal of the Japanese Society of Horticultural Science*, **69**, 186-188.

NAKANO, M., SAKAKIBARA, T., WATANABE, Y. and MII, M. (1997). Establishment of embryogenic cultures in several cultivars of *Vitis vinifera* and *V. x labruscana*. *Vitis*, **36**, 141-145.

PEREZ-MOLPHE-BALCH, E. and OCHOA-ALEJO, N. (1997). In vitro plant regeneration of Mexican lime and Mandarin by direct organogenesis. *HortScience*, **32**, 931-934.

ΠΟΝΤΙΚΗΣ, Κ. Α. (1994). Εσπεριδοειδή. Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα, σελ.328.

ΠΟΝΤΙΚΗΣ, Κ. Α. (1994). Πολλαπλασιασμός καρποφόρων δένδρων και θάμνων. Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα, σελ.269.

SHANTZ, E. M. and STEWARD, F. C. (1955). The identification of compound A from coconut milk as 1,3-diphenylurea. *Journal of the American Chemistry Society*, **74**, 6133.

SHAW, G. (1994). Chemistry of adenine cytokinins. In: *Cytokinins: chemistry, activity and function*. (Mok, D. W. S. and Mok, M. C. Eds.). CRC, Boca Raton, pp 15–34.

SHUDO, K. (1994). Chemistry of diphenylurea cytokinins. In: Mok, D. W. S. and Mok, M. C. Eds.). *Cytokinins: chemistry, activity and function*. CRC, Boca Raton, pp 35–42.

SIRAGUSA, M., CARRA, A., SALVIA, L., PUGLIA, A. M., PASQUALE, F. and CARIMI, F. (2007). Genetic instability in calamondin (*Citrus madurensis* Lour.) plants derived from somatic embryogenesis induced by diphenylurea derivatives. *Plant Cell*, **26**, 1289–1296.

SWINGLE, W. T. (1943). The botany of *Citrus* and its relatives of the orange subfamily. In: *The Citrus industry*. (Batchelor, L. D. and Webber, H. J. Eds.). University of California Press, Berkeley, pp 129-474.

TAVALO, E. C. R., STRIPP, L. C. L., MUNIZ, F. R., MOURAO FILHO, F. A. A. and MENDES, B. M. J. (2009). *In vitro* organogenesis of *Citrus volkameriana* and *Citrus aurantium*. *Biologia Plantarum*, **53**, 395-399.

TSURO, M., KODA, M. and INOUE, M. (2000). Efficient plant regeneration from multiple shoots formed in the leaf-derived callus of *Lavandula vera*, using the “open culture system”. *Scientia Horticulturae*, **86**, 81–88.

WEBBER, H. J. (1948). Rootstocks: their character and reactions. In: *The Citrus industry*. (Batchelor, L. D. and Webber, H. J. Eds.). University of California Press, Berkeley, USA. Volume 2. 1st. Edition. pp 69-168.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ ΕΙΚΟΝΩΝ



Εικόνα 1. Δημιουργία κάλλου σε έκφυτο επικοτυλίου νερατζιάς.



Εικόνα 2. Πρώιμο στάδιο άμεσης οργανογένεσης βλαστών σε έκφυτο επικοτυλίου νερατζιάς.



Εικόνα 3. Έκπτυξη τυχαίων οφθαλμών μέσω άμεσης οργανογένεσης, σε έκφυτο επικοτυλίου νερατζιάς.



Εικόνα 4. Ανάπτυξη βλαστών μέσω άμεσης οργανογένεσης, σε έκφυτο επικοτυλίου νερατζιάς.



Εικόνα 5. Ανάπτυξη βλαστών μέσω άμεσης οργανογένεσης, σε έκφυτο επικοτυλίου νερατζιάς.



Εικόνα 6. Ανάπτυξη βλαστών μέσω άμεσης οργανογένεσης, σε έκφυτο επικοτυλίου νερατζιάς.