

ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΗΣ ΞΥΛΟΚΕΡΑΤΙΑΣ (*Ceratonia siliqua* L.) IN VITRO

Β. Στουρνάρας, Κ. Ποντίκης και Π. Ρούσσοις
Εργαστήριο Δενδροκομίας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Ιερά Οδός 75, 11855, Αθήνα

Περίληψη

Στην παρούσα εργασία διερευνήθηκαν ορισμένοι παράγοντες που επηρεάζουν τον πολλαπλασιασμό της ξυλοκερατιάς μέσω της *in vitro* τεχνικής. Κομβικά έκφυτα και έκφυτα κορυφής τα οποία προέρχονταν από εγκατεστημένα έκφυτα ξυλοκερατιάς μεταφυτεύθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα Murashige και Skoog (MS) εφοδιασμένο με τις κυτοκινίνες, βενζυλαδενίνη (BA) και 2-ισοπεντυλαδενίνη (2iP) σε συγκεντρώσεις 0.5, 1, 2 και 4 mg l⁻¹ για την παραγωγή βλαστών. Μετά από παραμονή οκτώ εβδομάδων έκφυτα με τουλάχιστον 1 cm μήκος μεταφυτεύθηκαν για ριζοβολία στο ίδιο υπόστρωμα με την προσθήκη των αυξινών, ινδολυλοβουτυρικό (IBA) και β-ναφθαλινοξικό (β-NAA) οξύ σε συγκεντρώσεις 0.5, 1 και 2 mg l⁻¹. Τα έρριζα έκφυτα μεταφέρονταν στη συνέχεια σε σύστημα υδρονέφωσης για εγκλιματισμό και σκληραγώγηση.

Με βάση τα αποτελέσματα κατά το στάδιο της βλαστογένεσης η παρουσία BA στο υπόστρωμα έδωσε στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο αριθμό βλαστών ανά έκφυτο σε σύγκριση με την 2iP. Η BA στη συγκέντρωση των 4 mg l⁻¹ έδωσε το μεγαλύτερο αριθμό βλαστών (7,6), ενώ στη συγκέντρωση του 0,5 mg l⁻¹ έδωσε το μεγαλύτερο μέσο μήκος βλαστών (4 cm). Η προσθήκη 0,5 mg l⁻¹ 2iP στο υπόστρωμα έδωσε το μεγαλύτερο αριθμό κόμβων ανά βλαστό (5,6). Κατά το στάδιο της ριζοβολίας, μετά από παραμονή των εκφύτων για τέσσερις εβδομάδες, τα υψηλότερα ποσοστά ριζοβολίας (45%) επιτεύχθηκαν με την προσθήκη του IBA στη συγκέντρωση του 1 mg l⁻¹. Η προσθήκη του β-NAA έδωσε πολύ μικρά ποσοστά ριζοβολίας (<10 %). Τα έρριζα έκφυτα εγκλιματίστηκαν επιτυχώς στο σύστημα υδρονέφωσης επιτυγχάνοντας ποσοστά επιβίωσης περί το 80 %.

Εισαγωγή

Η ξυλοκερατιά ή αλλιώς χαρουπιά (*Ceratonia siliqua* L.) θεωρείται φυτό ανθεκτικό στη ξηρασία και την αλατότητα, παρουσιάζει καλή προσαρμογή σε άγονα εδάφη και έχει μικρές απαιτήσεις σε καλλιεργητικές φροντίδες (Battle and Tous, 1997). Επομένως, είναι δυνατό να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία σε προγράμματα αναδάσωσης, ιδιαίτερα σε περιοχές που χαρακτηρίζονται από φαινόμενα ερημοποίησης. Επίσης, το γεγονός ότι ανθίζει το φθινόπωρο και δίνει νέκταρ και γύρη υψηλής θρεπτικής αξίας καθιστούν την ύπαρξή της πολύτιμη στις μελισσοκομικές περιοχές.

Με βάση τη διεθνή βιβλιογραφία περιορισμένες εργασίες έχουν δημοσιευθεί πάνω στον *in vitro* πολλαπλασιασμό της ξυλοκερατιάς (Sebastian and McComb, 1986; Vinterhalter *et. al.*, 1992; Vinterhalter *et. al.*, 2001; Romano *et al.*, 2002; Custódio *et. al.*, 2004). Σκοπός της παρούσης εργασίας είναι η διερεύνηση της επίδρασης τόσο των κυτοκινινών BA και 2iP στο στάδιο της βλαστογένεσης όσο και των αυξινών IBA και β-NAA στο στάδιο της ριζοβολίας κατά τον πολλαπλασιασμό εκφύτων ξυλοκερατιάς μέσω της *in vitro* τεχνικής.

Υλικά και Μέθοδοι

Χρησιμοποιήθηκαν αρχικά ως έκφυτα βλαστοκορυφές από νεανικούς βλαστούς ξυλοκερατιάς, που προήλθαν από καρατομημένα ενήλικα δένδρα, αλλά δεν κατέστη εφικτός ο πολλαπλασιασμός τους, λόγω καφετιάσματος, υψηλού ποσοστού μολύνσεων και χαμηλού ποσοστού έκπτυξης των οφθαλμών τους. Γι' αυτό στη συνέχεια

χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα από σπορόφυτα ξυλοκερατιάς, επιλέχθηκε ένας κλώνος ο οποίος, έπειτα από συνεχείς επανακαλλιέργειες σε υπόστρωμα MS (Murashige and Skoog, 1962) εφοδιασμένο με 1 mg l^{-1} βενζυλαδεσίνη (BA), αποτέλεσε την πηγή του φυτικού υλικού. Κομβικά έκφυτα και έκφυτα κορυφής του παραπάνω κλώνου μεταφυτεύθηκαν αρχικά για τέσσερις εβδομάδες σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα MS εφοδιασμένο α) με βενζυλαδεσίνη (BA) σε συγκεντρώσεις 0.5, 1, 2 και 4 mg l^{-1} και β) με 2-ισοπεντυλαδεσίνη (2iP) σε συγκεντρώσεις 0.5, 1, 2 και 4 mg l^{-1} . Στη συνέχεια τα έκφυτα μεταφυτεύθηκαν σε κωνικές φιάλες, που περιείχαν το αντίστοιχο υπόστρωμα, για την παραγωγή βλαστών και έπειτα από παραμονή οκτώ εβδομάδων καταγράφηκε ο αριθμός βλαστών ανά έκφυτο, το μέσο μήκος βλαστών ανά έκφυτο και ο αριθμός κόμβων ανά έκφυτο. Έκφυτα με μήκος τουλάχιστον 1 cm μεταφυτεύθηκαν για ριζοβολία σε δοκιμαστικούς σωλήνες οι οποίοι περιείχαν το ίδιο υπόστρωμα (MS) εφοδιασμένο με τις αυξίνες, ινδολυλοβουτυρικό (IBA) και β-ναφθαλινοξικό (β-NAA) οξύ σε συγκεντρώσεις 0,5, 1 και 2 mg l^{-1} αντίστοιχα. Μετά από τέσσερις εβδομάδες καταγράφηκε το ποσοστό ριζοβολίας, ο αριθμός ριζών ανά έρριζο έκφυτο και το μέσο μήκος αυτών. Τα έρριζα έκφυτα μεταφέρονταν στη συνέχεια σε σύστημα υδρονέφωσης για εγκλιματισμό και σκληραγώγηση, όπου και παρέμειναν για τέσσερις εβδομάδες.

Το πείραμα σχεδιάστηκε και για τα δύο στάδια (βλαστογένεση, ριζοβολία) ως παραγοντικό με δύο παράγοντες (ορμόνη, συγκέντρωση) και ακολούθησε το εντελώς τυχαίοποιημένο σχέδιο. Κατά τη βλαστογένεση χρησιμοποιήθηκαν 20 επαναλήψεις και κατά τη ριζοβολία 4x10 επαναλήψεις. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη χρησιμοποίηση του στατιστικού πακέτου JMP IN (version 4.0.2). Η αξιολόγηση της σημαντικότητας των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε με τη δοκιμασία της Ελάχιστης Σημαντικής Διαφοράς για επίπεδο σημαντικότητας 5 % ($p \leq 0.05$).

Αποτελέσματα

Η ανάλυση της διασποράς του διπαραγοντικού πειράματος σχετικά με την επίδραση των κυτοκινινών και της συγκέντρωσής τους στον αριθμό βλαστών ανά έκφυτο, το μέσο μήκος βλαστών ανά έκφυτο και τον αριθμό κόμβων ανά έκφυτο στο στάδιο της βλαστογένεσης, κατά τον *in vitro* πολλαπλασιασμό της ξυλοκερατιάς, παρουσιάζεται στον Πίνακα 1. Με βάση την ανάλυση προκύπτει πως το είδος της κυτοκινίνης επηρεάζει στατιστικά σημαντικά τον αριθμό των βλαστών ανά έκφυτο (η BA δίνει μεγαλύτερο αριθμό βλαστών σε σύγκριση με το 2iP), ενώ δεν έχει καμία στατιστικά σημαντική επίδραση στο μέσο μήκος βλαστών ανά έκφυτο και τον αριθμό κόμβων ανά έκφυτο. Η συγκέντρωση της κυτοκινίνης επηρεάζει στατιστικά σημαντικά όλες τις μετρούμενες μεταβλητές. Ειδικότερα, αυξανόμενη της συγκέντρωσης αυξάνεται ο αριθμός των παραγόμενων βλαστών, ενώ μειώνεται το μέσο μήκος αυτών και ο αριθμός κόμβων ανά έκφυτο. Τέλος δεν υπάρχει στατιστικά σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ κυτοκινίνης και συγκέντρωσης σε όλες τις μετρούμενες μεταβλητές.

Η ανάλυση της διασποράς του διπαραγοντικού πειράματος σχετικά με την επίδραση των αυξινών και της συγκέντρωσής τους στο ποσοστό ριζοβολίας, τον αριθμό ριζών ανά έρριζο έκφυτο και το μέσο μήκος ριζών ανά έρριζο έκφυτο κατά το στάδιο της ριζοβολίας, στον *in vitro* πολλαπλασιασμό της ξυλοκερατιάς, παρουσιάζεται στον Πίνακα 2. Με βάση την ανάλυση προκύπτει πως το είδος της αυξίνης επηρεάζει στατιστικά σημαντικά όλες τις μετρούμενες μεταβλητές με το IBA να δίνει στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο ποσοστό ριζοβολίας, αριθμό ριζών ανά έρριζο έκφυτο και μέσο μήκος ριζών ανά έρριζο έκφυτο σε σύγκριση με το β-NAA. Η συγκέντρωση της αυξίνης επηρεάζει στατιστικά σημαντικά μόνο το ποσοστό ριζοβολίας. Η συγκέντρωση του 1 mg l^{-1} παρουσιάζει το υψηλότερο ποσοστό ριζοβολίας (45 %), ενώ εκείνη των 2

mg l⁻¹ δεν ευνοεί τη ριζοβολία των εκφύτων. Τα έρριζα έκφυτα εγκλιματίστηκαν επιτυχώς σε σύστημα υδρονέφωσης επιτυγχάνοντας ποσοστά επιβίωσης περί το 80 %.

Συζήτηση

Από τα αποτελέσματα της παρούσης ερευνητικής εργασίας προκύπτει πως η ξυλοκερατιά ανταποκρίνεται καλύτερα κατά το στάδιο της βλαστογένεσης όταν το υπόστρωμα (MS) είναι εφοδιασμένο με βενζυλαδεσίνη (BA) και πιο συγκεκριμένα στη συγκέντρωση του 1 mg l⁻¹, καθώς τότε παράγει αρκετούς βλαστούς (6,3), οι οποίοι έχουν ικανοποιητικό μέσο μήκος βλαστών (3,5 cm) και αριθμό κόμβων (4,8). Η προσθήκη 0,5 mg l⁻¹ 2-ισοπεντυλαδεσίνης (2iP) στο υπόστρωμα δίνει το μεγαλύτερο αριθμό κόμβων ανά έκφυτο (5,6). Οι Romano *et al.* (2002) μελετώντας τον in vitro πολλαπλασιασμό σε 2 πορτογαλικές ποικιλίες ξυλοκερατιάς ('Galhosa' και 'Mulata') διαπίστωσαν πως την καλύτερη ανταπόκριση στο στάδιο της βλαστογένεσης είχε η εφαρμογή 1 mg l⁻¹ BA ή 1 mg l⁻¹ ζεατίνης σε υπόστρωμα MS.

Κατά το στάδιο της ριζοβολίας η προσθήκη IBA στη συγκέντρωση του 1 mg l⁻¹ δίνει ικανοποιητικό ποσοστό ριζοβολίας (45 %), αρκετό αριθμό παραγόμενων ριζών (7,6) και σχετικά μικρό μέσο μήκος ριζών (0,9 cm). Τα πολύ μικρά ποσοστά ριζοβολίας που δίνει η προσθήκη β-NAA στο υπόστρωμα έχουν αναφερθεί και από τους Romano *et al.* (2002). Μετά τη σκληραγώγηση και τον εγκλιματισμό τους τα παραγόμενα νέα έρριζα έκφυτα παρουσιάζουν υψηλό ποσοστό επιβίωσης (80%). Παρόμοια ποσοστά επιβίωσης έχουν καταγραφεί και από άλλους ερευνητές (Romano *et al.*, 2002; Custódio *et al.*, 2004).

Βιβλιογραφία

- Battle, I. and Tous J., 1997. Carob tree. *Ceratonia siliqua* L. Promoting the conservation and the use of underutilized and neglected crops.17. Institute of Plant Genetics and Crop Plant Research, Gatersleben/International Plant Genetic Resources Institute, Rome, Italy
- Custódio, L., Martins-Loução, M.A. and Romano, A., 2004. Influence of sugars on in vitro rooting and acclimatization of carob tree. *Biologia Plantarum* 48:469-472.
- Murashige, T. and Skoog, F., 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.
- 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.
- Sebastian, K.T. and McComb, J.A., 1986. A micropropagation system for carob (*Ceratonia siliqua* L.). *Scientia Horticulturae*, 28:127-131.
- Vinterhalter, D., Grubišić, D., Bojović-Cvetić, D. and Budimir, S., 1992. Lenticel hypertrophy in shoot cultures of *Ceratonia siliqua* L. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 31:111-114.
- Vinterhalter, B., Vinterhalter, D. and Nešković, M., 2001. Effect of irradiance, sugars and nitrogen on leaf size of in vitro grown *Ceratonia siliqua* L. *Biologia Plantarum* 44:185-188.

Ευχαριστίες

Η εκπόνηση της παρούσης εργασίας υποστηρίχθηκε οικονομικά από το Ίδρυμα Κρατικών Υποτροφιών (Ι.Κ.Υ.) μέσω υποτροφίας στον κ. Βασίλειο Στουρνάρα.

Πίνακας 1. Ανάλυση της διασποράς των επιδράσεων κυτοκινινών και της συγκέντρωσής τους στον αριθμό βλαστών ανά έκφυτο, το μέσο μήκος βλαστών ανά έκφυτο και τον αριθμό κόμβων ανά έκφυτο, σε έκφυτα ξυλοκερατιάς έπειτα από την παραμονή τους για 8 εβδομάδες σε θρεπτικό υπόστρωμα MS. Το * υποδηλώνει αλληλεπίδραση, το P την πιθανότητα και τα διαφορετικά γράμματα του λατινικού αλφαβήτου στατιστικώς σημαντικές διαφορές (δοκιμασία Ελάχιστης Σημαντικής Διαφοράς, Ε.Σ.Δ.) για επίπεδο σημαντικότητας p≤ 0.05.

Μετρούμενες Μεταβλητές		Αριθμός βλαστών / έκφυτο			Μέσο μήκος βλαστών (cm) / έκφυτο			Αριθμός κόμβων / έκφυτο		
Πηγή Παρ/τας	Επίπεδα	P	Μέσος	Ε.Σ.Δ.	P	Μέσος	Ε.Σ.Δ.	P	Μέσος	Ε.Σ.Δ.
Κυτοκινίνη	BA 2iP	<0,0001	6 2,3	a b	0,4653	3,22 3,32	a a	0,1247	4,7 5	a a
Συγκέντρωση	0,5 mg l ⁻¹		2,5	b		3,9	a		5,4	a
	1 mg l ⁻¹		4,2	a		3,5	a b		5	a b
	2 mg l ⁻¹		4,8	a		3,2	b		4,7	b c
Κυτοκινίνη *συγκέντρωση	4 mg l ⁻¹	0,0924	5,3	a	0,1929	2,6	c	0,9347	4,4	c
	BA, 0,5 mg l ⁻¹		3,2	b		4	a		5,1	a b
	BA, 1 mg l ⁻¹		6,3	a		3,5	a b c		4,8	b c
	BA, 2 mg l ⁻¹		7	a		3,1	c d		4,6	b c
	BA, 4 mg l ⁻¹		7,6	a		2,3	e		4,3	c
	2iP, 0,5 mg l ⁻¹		1,7	b		3,7	a b		5,6	a
	2iP, 1 mg l ⁻¹		2,1	b		3,5	a b c		5,2	a b
	2iP, 2 mg l ⁻¹		2,5	b		3,2	b c d		4,8	b c
	2iP, 4 mg l ⁻¹		3	b		2,9	d e		4,5	b c

Πίνακας 2. Ανάλυση της διασποράς των επιδράσεων αυξινών και της συγκέντρωσής τους στο ποσοστό ριζοβολίας, τον αριθμό ριζών ανά έρριζο έκφυτο και το μέσο μήκος ριζών ανά έρριζο έκφυτο, σε έκφυτα ξυλοκερατιάς έπειτα από την παραμονή τους για 4 εβδομάδες σε θρεπτικό υπόστρωμα MS. Το * υποδηλώνει αλληλεπίδραση, το P την πιθανότητα και τα διαφορετικά γράμματα του λατινικού αλφαβήτου στατιστικώς σημαντικές διαφορές (δοκιμασία Ελάχιστης Σημαντικής Διαφοράς, Ε.Σ.Δ.) για επίπεδο σημαντικότητας p≤ 0.05.

Μετρούμενες Μεταβλητές		Ποσοστό ριζοβολίας (%)			Αριθμός ριζών/ έρριζο έκφυτο			Μέσο μήκος ριζών (cm) / έρριζο έκφυτο		
Πηγή Παρ/τας	Επίπεδα	P	Μέσος	Ε.Σ.Δ.	P	Μέσος	Ε.Σ.Δ.	P	Μέσος	Ε.Σ.Δ.
Αυξίνη	IBA β-NAA	<0,0001	28,3 2,50	a b	0,0147	6 1	a b	0,0403	1,3 0,5	a b
Συγκέντρωση	0,5 mg l ⁻¹		22,50	a		2,75	a		1,1	a
	1 mg l ⁻¹		23,75	a		4,25	a		0,7	a
	2 mg l ⁻¹		0	b						
Αυξίνη *συγκέντρωση	IBA, 0,5 mg l ⁻¹	<0,0001	40	a	0,3539	4,5	a b	0,2494	1,7	a
	IBA, 1 mg l ⁻¹		45	a		7,6	a		0,9	b
	IBA, 2 mg l ⁻¹		0	b						
	β-NAA 0,5 mg l ⁻¹		5	b		1	b		0,5	b
	β-NAA, 1 mg l ⁻¹		2,5	b		1	b		0,5	b
	β-NAA, 2 mg l ⁻¹		0	b						