ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΗΝ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗ *IN VITRO* ΤΩΝ ΕΚΦΥΤΩΝ ΕΛΙΑΣ ΠΟΙΚΙΛΙΑΣ «ΚΟΡΩΝΕΙΚΗ»

Π. Ρούσσος και Κ. Ποντίκης
Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Τμήμα Φυτικής Παραγωγής, Εργαστήριο Δενδροκομίας, Ιερά Οδός 75, Αθήνα 118 55

Περίληψη

Έκφυτα ελιάς ποικιλίας Κορωνέϊκη συλλέχθηκαν κατά τη βλαστική περίοδο (Άνοιξη-Καλοκαίρι-Φθινόπωρο) από δένδρα που αναπτύσσονταν στο δενδροκομείο και από δενδρύλλια που αναπτύσσονταν εντός θερμοκηπίου. Τα έκφυτα χωρίστηκαν σε δύο κατηγορίες, κομβικά έκφυτα και έκφυτα προερχόμενα από τις κορυφές νεαρών βλαστών. Λόγω του έντονου φαινομένου καφετιάσματος που παρατηρείται κατά την εγκατάσταση *in vitro* εκφύτων ελιάς, μελετήθηκε η επίδραση στο φαινόμενο αυτό, των ενδογενών ολικών φαινολικών ενώσεων, των ολικών ο-διφαινολών και η ενεργότητα δύο οξειδωτικών ενζύμων, της πολυφαινολοξειδάσης και της υπεροξειδάσης, όπως επίσης και οι μεταβολές αυτών σε σχέση με το είδος του εκφύτου (κομβικά έκφυτα ή βλαστοκορυφές), την εποχή συλλογής των εκφύτων και την πηγή προέλευσης αυτών (δενδροκομείο ή θερμοκήπιο). Βρέθηκε ότι το είδος του εκφύτου και η πηγή συλλογής αυτού επηρέασαν σημαντικά το ποσοστό καφετιάσματος των εκφύτων ελιάς, αφού οι βλαστοκορυφές και τα έκφυτα από το δενδροκομείο παρουσίασαν υψηλότερο ποσοστό καφετιάσματος. Τα προαναφερθέντα έκφυτα παρουσίασαν επίσης στατιστικά σημαντικά υψηλότερες τιμές ολικών φαινολικών ουσιών και ο-διφαινολών, ουσίες που παρουσίασαν σημαντικό συντελεστή συσχέτισης με το καφέτιασμα των εκφύτων. Όσον αφορά τα οξειδωτικά ένζυμα μόνο η πολυφαινολοξειδάση παρουσίασε σημαντική συσχέτιση με το καφέτιασμα των εκφύτων, ενώ η υπεροξειδάση όχι. Η ενεργότητα και των δύο ενζύμων επηρεάστηκε σημαντικά τόσο από το είδος του εκφύτου όσο και από την εποχή συλλογής, με τις βλαστοκορυφές να εμφανίζουν υψηλότερη ενεργότητα πολυφαινολοξειδάσης και χαμηλότερη υπεροξειδάσης. Επιπλέον, το καλοκαίρι η ενεργότητα της πολυφαινολοξειδάσης παρουσίασε σημαντική αύξηση σε αντίθεση με αυτή της υπεροξειδάσης που παρουσίασε σημαντική μείωση.

Εισαγωγή

Κατά το στάδιο της εγκατάστασης *in vitro* εκφύτων πολλών φυτικών ειδών παρατηρείται ταχεία νέκρωση αυτών με το σχηματισμό καφετί χρωματισμού απόχρωσης (Bhatt and Dhar, 2000; Block and Lankes, 1996). Πολλοί ερευνητές συνδέουν το καφέτιασμα των εκφύτων με την οξείδωση ορισμένων ενδογενών χημικών ουσιών, τα προϊόντα της οποίας είναι χρώματος καφέ και ιδιαίτερα τοξικά για τα έκφυτα (Block and Lankes, 1996). Ένα από τα σημαντικότερα προβλήματα που έχει να αντιμετωπίσει κάποιος κατά τον *in vitro* πολλαπλασιασμό της ελιάς είναι ο ταχύς καφετί μεταχρωματισμός που υφίστανται τα έκφυτα με την επακόλουθη νέκρωση αυτών. Στην παρούσα εργασία μελετάται η επίδραση των ενδογενώς φαινολικών ουσιών και των οξειδωτικών ενζύμων πολυφαινολοξειδάση και υπεροξειδάση στο καφέτιασμα των εκφύτων ελιάς. Παράλληλα μελετώνται οι παράγοντες εκείνοι που

πιθανόν να επηρεάζουν τη συγκέντρωση των φαινολικών ουσιών και τη δράση των ενζύμων.

Υλικά και Μέθοδοι

Το πείραμα πραγματοποιήθηκε στο Δενδροκομείο του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Επιλέχθηκαν δένδρα ελιάς ποικιλίας Κορωνέικη που αναπτύσσονταν στο δενδροκομείο και δενδρύλλια της ίδιας ποικιλίας που αναπτύσσονταν σε γλάστρες εντός θερμοκηπίου. Το πείραμα έλαβε χώρα κατά τη βλαστική περίοδο Άνοιξη-Φθινόπωρο των ετών 1998 και 1999. Πέντε φορές ανά εποχή συλλέγονταν νεαροί βλαστοί και μεταφέρονταν στο εργαστήριο, όπου χωρίζονταν σε κομβικά έκφυτα και σε έκφυτα βλαστοκορυφών. Ορισμένα από τα έκφυτα αυτά φυτεύονταν υπό ασηπτικές συνθήκες σε υπόστρωμα σε κωνικές φιάλες και μετά από μία εβδομάδα μετριόταν ο αριθμός των εκφύτων με καφετί μεταχρωματισμό μεγαλύτερο από το 1/3 του μήκους των. Από τα υπόλοιπα έκφυτα κάποια χρησιμοποιούνταν για τις αναλύσεις των φαινολικών ουσιών σύμφωνα με τον Ρούσσο (2001), ενώ κάποια άλλα για μέτρηση της ενεργότητας της πολυφαινολοξειδάσης και υπεροξειδάσης κατά τους Flurkey and Jen (1978). Το πείραμα σχεδιάστηκε ως παραγοντικό πείραμα, με τρεις παράγοντες (είδος εκφύτου, προέλευση εκφύτου και εποχή συλλογής) σύμφωνα με το εντελώς τυχαιοποιημένο σχέδιο. Λόγω των παρόμοιων αποτελεσμάτων των δύο ετών στην παρούσα εργασία παρουσιάζονται τα αποτελέσματα μόνο του 1999.

Αποτελέσματα

Από το συνοπτικό πίνακα της ανάλυσης διασποράς του παραγοντικού πειράματος (Πίνακας 1) βλέπουμε ότι τόσο το είδος του εκφύτου όσο και η πηγή συλλογής αυτού επηρέασαν σημαντικά πολλές από τις μετρούμενες μεταβλητές, ενώ η εποχή συλλογής επηρέασε τη συγκέντρωση των ολικών ο-διφαινολών και την ενεργότητα των δύο ενζύμων. Επιπλέον παρατηρήθηκε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των διαφόρων πηγών παραλλακτικότητας όσον αφορά τη μεταβολή ορισμένων μεταβλητών.

Πίνακας 1. Ανάλυση διασποράς του παραγοντικού πειράματος που αφορά την επίδραση του είδους του εκφύτου, της πηγής προέλευσης αυτού και της εποχής συλλογής των εκφύτων στις διάφορες μετρούμενες μεταβλητές.

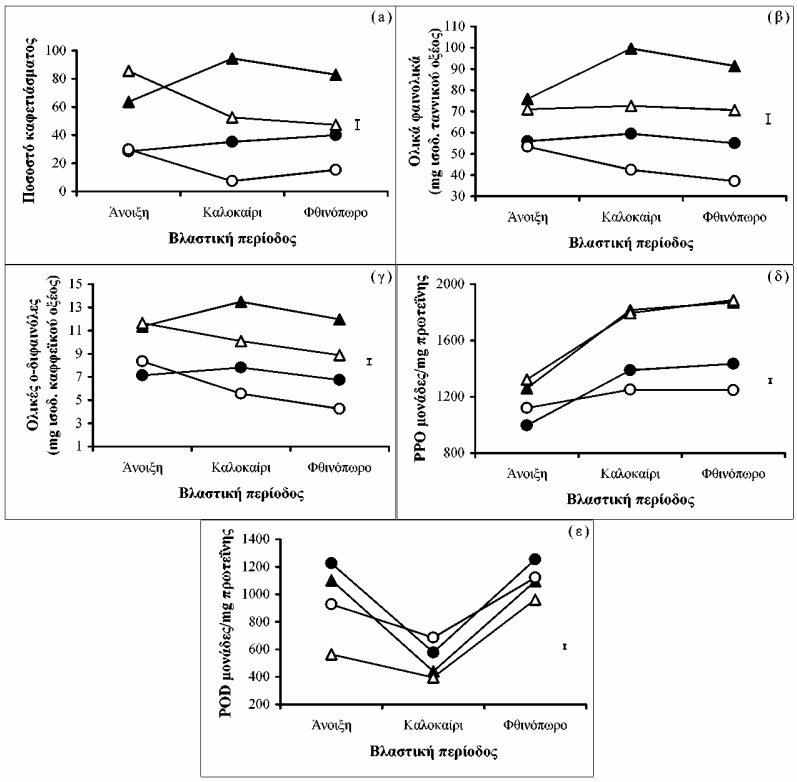
Μεταβλητές		Πηγή παραλλακτικότητας						
		ΕΕ	*ΠΕ*	*ΕΠ*	*ΕΕ*ΠΕ*	*ΕΕ*ΕΠ*	*ΠΕ*ΕΠ*	*ΕΕ*ΠΕ*ΕΠ*
Ποσοστό καφετιάσματος	P	<0,001	<0,001	>0,05	>0,05	>0,05	<0,001	<0,05
Ολικά φαινολικά	P	<0,001	<0,001	>0,05	>0,05	<0,05	<0,05	>0,05
ο- διφαινόλες	P	<0,001	<0,001	<0,01	<0,05	>0,05	<0,001	>0,05
PPO	P	<0,001	>0,05	<0,001	>0,05	<0,05	>0,05	>0,05
POD	P	<0,01	<0,05	<0,001	>0,05	>0,05	>0,05	>0,05

Συντομεύσεις: ΕΕ, Είδος Εκφύτου – ΠΕ, Πηγή Εκφύτου – ΕΠ, Εποχές - *, υποδηλώνει αλληλεπίδραση.

Από το Σχεδιάγραμμα 1 παρατηρείται ότι οι βλαστοκορυφές εμφανίζουν υψηλότερα ποσοστά καφετιάσματος, υψηλότερη συγκέντρωση φαινολικών ουσιών και ο-

διφαινολών όπως και υψηλότερη ενεργότητα πολυφαινολοξειδάσης από τα κομβικά έκφυτα, ενώ το αντίθετο συμβαίνει με την ενεργότητα της υπεροξειδάσης. Παρόμοια είναι και τα αποτελέσματα όσον αφορά τα έκφυτα από το δενδροκομείο σε σχέση με τα έκφυτα από το θερμοκήπιο. Όσον αφορά την επίδραση της εποχής συλλογής παρατηρούνται μεγάλες μεταβολές όσον αφορά κυρίως την ενεργότητα των ενζύμων και μικρότερες όσον αφορά τις φαινολικές ενώσεις.

Από τον Πίνακα 2 παρατηρείται ότι τόσο οι ολικές φαινολικές ενώσεις όσο και οι ο-διφαινόλες παρουσιάζουν στατιστικά σημαντικό υψηλό συντελεστή συσχέτισης με το επικείμενο καφέτιασμα των εκφύτων, ενώ η πολυφαινολοξειδάση παρουσιάζει στατιστικά σημαντική μετρίως ισχυρή συσχέτιση. Από την άλλη, η υπεροξειδάση δεν παρουσιάζει στατιστικά σημαντική συσχέτιση με το καφέτιασμα των εκφύτων.



Σχεδιάγραμμα 1. Μεταβολή του ποσοστού καφετιάσματος (α), των ολικών φαινολικών ουσιών (β), των ο-διφαινολών (γ), της ενεργότητας της πολυφαινολοξειδάσης (δ) και της υπεροξειδάσης (ε) σε έκφυτα ελιάς ποικιλίας Κορωνέϊκη κατά τη διάρκεια της βλαστικής περιόδου. —●— : κομβικά έκφυτα από το δενδροκομείο, —▲— : βλαστοκορυφές από το δενδροκομείο, —○— : κομβικά έκφυτα από το θερμοκήπιο, —△— : βλαστοκορυφές από το θερμοκήπιο. Η κάθετη μπάρα είναι το τυπικό σφάλμα.

Συζήτηση

Το καφέτιασμα των εκφύτων κατά το στάδιο της εγκατάστασης *in vitro* αποτελεί σοβαρό πρόβλημα στον *in vitro* πολλαπλασιασμό πολλών φυτικών ειδών. Από τα αποτελέσματα της παρούσης μελέτης συμπεραίνεται ότι οι φαινολικές ενώσεις και οι ο-διφαινόλες παίζουν σημαντικό ρόλο στην εκδήλωση αυτού του φαινομένου.

Πίνακας 2. Συντελεστές συσχέτισης των διαφόρων μεταβλητών με το ποσοστό καφετιάσματος εκφύτων.

Μεταβλητές	Ποσοστό καφετιάσματος
Ολικά φαινολικά	0,76***
Ολικές ο-διφαινόλες	0,79***
PPO	0,48**
POD	-

Η σημαντικότητα της συσχέτισης υποδηλώνεται με το *, όπου: *, P≤0,05 **, P≤0,01 και ***, P≤0,001 ενώ -, δεν υπήρξε σημαντική συσχέτιση.

Οι φαινολικές ενώσεις είναι οι κατεξοχήν υπεύθυνες ενώσεις για το καφέτιασμα που παρατηρείται σε πολλούς φυτικούς ιστούς κυρίως μετά από τραυματισμό (Amiot et al. 1995). Αυτό συμβαίνει κυρίως σε φρούτα και λαχανικά όπου ο ρόλος αυτών των ουσιών έχει μελετηθεί διεξοδικά. Όσον αφορά τα οξειδωτικά ένζυμα και αυτά έχει βρεθεί ότι παίζουν σημαντικό ρόλο στο καφέτιασμα φυτικών ιστών (Arogba, 2000). Από τα αποτελέσματα φαίνεται ότι μόνο η πολυφαινολοξειδάση παίζει κάποιο ρόλο στο καφέτιασμα των εκφύτων της ελιάς ενώ η υπεροξειδάση όχι. Επιπλέον συνάγεται το συμπέρασμα ότι οι βλαστοκορυφές είναι το είδος των εκφύτων με το μεγαλύτερο ποσοστό καφετιάσματος, ενώ τα έκφυτα από δενδρύλλια που μεγαλώνουν σε θερμοκήπιο έχουν μεγαλύτερα ποσοστά επιβίωσης από τα αντίστοιχα έκφυτα από δένδρα του αγρού. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν βρεθεί και για άλλα είδη φυτών (Yu and Meredith, 1986).

Βιβλιογραφία.

Amiot, M.J., Tacchini, M., Aubert, S.Y. and Oleszek, W., 1995. Influence of cultivar, maturity stage and storage conditions on phenolic composition and enzymatic browning of pear fruits. J. Agric. Food Chem. 43: 1132-1137.

Arogba, S.S., 2000. Mango (*Mangifera indica*) Kerbel: chromatographic analysis of the tannin and stability study of the associated polyphenol oxidase activity. J. Food Compos. Anal. 13: 149-156.

Bhatt, I.D. and Dhar, U., 2000. Micropropagation of Indian wild strawberry. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 60: 83-88.

Block, R. and Lankes, C., 1996. Measures to prevent tissue browning of explants of the apple rootstock M9 during *in vitro* establishment. Gartenbauwissenschaft 61: 11-17.

Flurkey, H.W. and Jen, J.J., 1978. Peroxidase and polyphenol oxidase activities in developing peaches. J. Food Sci. 43: 1826-1828.

Yu, D. and Meredith, C.P., 1986. The influence of explant origin on tissue browning and shoot production in shoot tip cultures of grapevine. J. Am. Soc. Hort. Sci. 111: 972-975.

Ρούσσος, Π., 2001. Παράγοντες που επηρεάζουν τον *in vitro* πολλαπλασιασμό της ελιάς ποικιλίας «Κορωνέϊκη». Διδακτορική Διατριβή υποβληθείσα στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών.