



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ & ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗΣ ΤΟΠΙΟΥ

ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΩΝ ΣΠΟΥΔΩΝ
ΤΟΜΕΙΣ ΑΙΧΜΗΣ & ΚΑΙΝΟΤΟΜΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ ΣΤΗΝ ΠΑΡΑΓΩΓΗ &
ΣΥΝΤΗΡΗΣΗ ΟΠΩΡΟΚΗΠΕΥΤΙΚΩΝ & ΑΝΘΟΚΟΜΙΚΩΝ ΕΙΔΩΝ

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Διερεύνηση της οικοφυσιολογίας του σπόρου και
του μικροπολλαπλασιασμού του *Dianthus cruentus*

Απόστολος-Εμμανουήλ Σ. Μπαζάνης



Επιβλέπουσα καθηγήτρια:
Μαρία Παπαφωτίου, Καθηγήτρια ΓΠΑ

ΑΘΗΝΑ
2022

**ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ & ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗΣ ΤΟΠΙΟΥ**

Μεταπτυχιακή Διπλωματική Εργασία

Διερεύνηση της οικοφυσιολογίας του σπόρου και
του μικροπολλαπλασιασμού του *Dianthus cruentus*

“Studies on seed ecophysiology and micropropagation of *Dianthus cruentus*”

Απόστολος-Εμμανουήλ Μπαζάνης

Εξεταστική Επιτροπή:

Μαρία Παπαφωτίου, Καθηγήτρια ΓΠΑ (επιβλέπουσα)

Αγγελική Παρασκευοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια ΓΠΑ

Πέτρος Ρούσσος, Καθηγητής ΓΠΑ

Περίληψη

Ο *Dianthus cruentus* Griseb. (οικ. Caryophyllaceae) αποτελεί ένα ποώδες πολυετές είδος, αυτοφυές της Ελληνικής χλωρίδας και εξαπλωνόμενο στη Βαλκανική χερσόνησο και τη δυτική Ασία. Πρόκειται για είδος με έντονο καλλωπιστικό ενδιαφέρον λόγω των αρχιτεκτονικών ταξιανθιών του και του συμπαγούς γλαυκοπράσινου φυλλώματός του, ιδιαίτερα ανθεκτικό σε ξηρά και φτωχά εδάφη, το οποίο προσελκύει επικονιαστές, όπως πεταλούδες και μέλισσες. Επιπρόσθετα, παρουσιάζει ενδιαφέρον και για τη φαρμακευτική χρήση του λόγω της ισχυρής αντιοξειδωτικής δράσης του.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε αρχικά ο προσδιορισμός των κατάλληλων συνθηκών για τη μεγιστοποίηση της βλαστικότητας των σπόρων του τόσο σε *in vitro* όσο και σε *in vivo* συνθήκες. Χρησιμοποιήθηκαν δύο σπορομερίδες συλλεχθείσες από αυτοφυή πληθυσμό του είδους στο όρος Καλλίδρομο Φθιώτιδας, ηλικίας 0 και 12 μηνών, χωρίς κάποια προμεταχείριση.

Για τη βλάστηση *in vitro* οι σπόροι απολυμάνθηκαν επιφανειακά με διάλυμα χλωρίνης 20% για 10 λεπτά και αφού ξεπλύθηκαν με απεσταγμένο νερό τοποθετήθηκαν σε τρυβλία Petri με θρεπτικό υπόστρωμα ½ MS, σε συνθήκες φωτοπεριόδου 16 h, με ένταση φωτός $37,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ προερχόμενη από λαμπτήρες φθορισμού, σε θερμοκρασίες 5, 10, 15, 20 ή 25 °C. Η θερμοκρασία των 15 °C έδωσε τα υψηλότερα ποσοστά βλαστικότητας τόσο στους σπόρους πρόσφατης συλλογής (98%) όσο και στους σπόρους ηλικίας 12 μηνών (100%). Τα χαμηλότερα ποσοστά βλαστικότητας σημειώθηκαν στις δύο ακραίες θερμοκρασίες των 5 °C και 25 °C (18% και 15% αντίστοιχα), με ιδιαίτερα χαμηλές τιμές για τους σπόρους πρόσφατης συλλογής. Σε όλες τις θερμοκρασίες πλην των 5 °C οι σπόροι βλάστησαν ταχύτατα ($T_{50} = 2-6 \text{ d}$). Η ηλικία των σπόρων επηρέασε σημαντικά τη βλάστησή τους, αυξάνοντας σημαντικά το ποσοστό βλαστικότητας στις δύο ακραίες θερμοκρασίες, καταδεικνύοντας τη θετική επίδραση της ξηρής μεθωρίμανσης των σπόρων.

Για τη βλάστηση *ex vitro*, οι σπόροι τοποθετήθηκαν σε φυτοδοχεία με εδαφικό υπόστρωμα τύρφης-περλίτη (1:1, v/v) σε θάλαμο σταθερών συνθηκών με θερμοκρασία 15, 20 ή 25 °C. Η υψηλότερη βλαστικότητα σημειώθηκε στους 15 °C και για τις δύο ηλικίες σπόρων (97-99%), ενώ η χαμηλότερη στους 25 °C (62% και 4% για τους σπόρους 12 και 0 μηνών, αντίστοιχα). Τα ποσοστά βλαστικότητας ήταν ελαφρώς χαμηλότερα σε σχέση με τη βλάστηση *in vitro*, ιδίως στους 25 °C.

Διερευνήθηκε επίσης ο μικροπολλαπλασιασμός του είδους, με την εγκατάσταση εκφύτων από σπορόφυτα κόμβου και κορυφής και τη διενέργεια τεσσάρων υποκαλλιιεργειών σε στερεά υποστρώματα. Σε όλα σχεδόν τα στάδια του πολλαπλασιασμού έγινε χρήση υποστρωμάτων που περιείχαν θρεπτικό μέσο MS και 8 g L^{-1} άγαρ, καθώς και τις κυτοκινίνες BA, 2iP και ZEA, χωρίς ή με τη παρουσία της αυξίνης NAA, με τη χρήση εκφύτων από φυσιολογικούς ή υπερενυδατωμένους βλαστούς. Στα υποστρώματα εγκατάστασης με $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ BA ή $0,1$ ή $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP καταγράφηκαν υψηλά ποσοστά αντίδρασης (72-87%), όμως πολλοί από τους βλαστούς ήταν υπερενυδατωμένοι, με παραμορφωμένη, υαλώδη εμφάνιση. Ο αριθμός των υπερενυδατωμένων βλαστών και ο αριθμός των κόμβων φάνηκε να είναι μεγαλύτερος στα υποστρώματα με 2iP, με το μεγαλύτερο αριθμό φυσιολογικών βλαστών (2,3) να εκπτύσσονται στο υπόστρωμα με $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ BA.

Στο στάδιο της 1^{ης} υποκαλλιέργειας, παρατηρήθηκε αυξημένη παρουσία υπερενυδατωμένων βλαστών στο υπόστρωμα που περιείχε 2iP, ενώ καταγράφηκε αυξημένο ποσοστό βλαστογένεσης και υπερενυδατωμένων βλαστών σε υπερενυδατωμένα έκφυτα που καλλιιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS χωρίς φυτορμόνες. Στο στάδιο της 2^{ης} υποκαλλιέργειας, η παρουσία $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ BA έδωσε το μεγαλύτερο αριθμό βλαστών ανεξαρτήτως της φυσιολογίας των εκφύτων, ενώ η προσθήκη $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ NAA οδήγησε σε σημαντική αύξηση των φυσιολογικών βλαστών και μείωση της υπερενυδάτωσης όταν έγινε χρήση υπερενυδατωμένων εκφύτων. Στην 3^η υποκαλλιέργεια, στα έκφυτα προερχόμενα από φυσιολογικούς βλαστούς το μεγαλύτερο δυναμικό πολλαπλασιασμού (4,5) και ο μέγιστος αριθμός φυσιολογικών βλαστών (3,6) καταγράφηκε σε υπόστρωμα MS με 2 mg L^{-1} BA, ενώ στα έκφυτα υπερενυδατωμένης φυσιολογίας η αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ σε 12 g L^{-1} έδωσε το μεγαλύτερο αριθμό φυσιολογικών βλαστών (2,4). Τα υψηλότερα ποσοστά υπερενυδάτωσης και στις δύο περιπτώσεις καταγράφηκαν σε υπόστρωμα MS με $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ZEA. Αντίθετα, στη 4^η υποκαλλιέργεια, η χρήση του υποστρώματος αυτού έδωσε το μεγαλύτερο δυναμικό πολλαπλασιασμού στο στάδιο αυτό (4,8).

Συνολικά, η χρήση υποστρώματος MS με $0,1$ BA και $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ NAA έδωσε το μεγαλύτερο δυναμικό πολλαπλασιασμού (5,1) ανεξαρτήτως της φυσιολογίας εκφύτου, με τη μέγιστη τιμή του (5,2) να καταγράφεται κατά την καλλιέργεια υπερενυδατωμένων εκφύτων σε υπόστρωμα MS με 12 g L^{-1} άγαρ. Η παρουσία

φυτορμονών αύξησε την καλογένεση στη βάση των εκφύτων, ενώ οι υψηλές συγκεντρώσεις κυτοκινινών μείωσαν τη ριζογένεση.

Η ριζοβολία του *D. cruentus* πραγματοποιήθηκε σε υποστρώματα MS ή ½ MS παρουσία ή απουσία IBA. Η χρήση υποστρώματος MS έδωσε χαμηλότερα ποσοστά ριζοβολίας (55-70%) για τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις IBA (0 ή 0,1 mg L⁻¹). Η βέλτιστη συγκέντρωση του IBA ήταν 0,5 mg L⁻¹ ανεξαρτήτως του υποστρώματος προέλευσης των μικροβλαστών και του θρεπτικού μέσου, με ποσοστά ριζοβολίας 83-100%, ενώ σε ορισμένες περιπτώσεις παρουσιάστηκε επίδραση του περιεχομένου σε κυτοκινίνες των υποστρωμάτων πολλαπλασιασμού στον αριθμό και το μέσο μήκος των ριζών.

Ο *ex vitro* εγκλιματισμός των έρριζων μικροβλαστών ολοκληρώθηκε με ποσοστό επιτυχίας 91% σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (1:1, v/v). Παρατηρήθηκαν σημαντικές μορφολογικές διαφορές μεταξύ των εγκλιματισμένων φυταρίων όπως διαφορές στο μήκος και τον αριθμό βλαστών και κόμβων, οι οποίες οφείλονταν στα διαφορετικά υποστρώματα πολλαπλασιασμού, ενώ η παρουσία IBA στο υπόστρωμα ριζοβολίας φάνηκε να έχει ευνοϊκή επίδραση στην επιβίωσή τους.

Τέλος, η χρήση ενιαίου σταδίου πολλαπλασιασμού-ριζοβολίας διάρκειας 60 ημερών σε υποστρώματα MS χωρίς φυτορμόνες ή με BA ή 2iP και NAA έδωσε φυτάρια με το μεγαλύτερο αριθμό βλαστών και κόμβων και υψηλό ποσοστό ριζοβολίας (88%), τα οποία εγκλιματίστηκαν επιτυχώς σε ποσοστό 86%.

Επιστημονικό πεδίο: Γεωργικές Επιστήμες

Λέξεις-κλειδιά: *Dianthus cruentus*, αυτοφυές καλλωπιστικό φυτό, οικοφυσιολογία βλάστησης, βλάστηση σπόρου *in vitro*, θερμοκρασία βλάστησης σπόρου, ηλικία σπόρου, ξηρή μεθωρίμανση, πολλαπλασιασμός *in vitro*, στερεή καλλιέργεια, έκφυτα από σπορόφυτα, υπερενυδάτωση, υπερενυδατωμένα έκφυτα, καλογένεση, *in vitro* ριζοβολία, *ex vitro* εγκλιματισμός, κυτοκινίνες, IBA, επίδραση carry over, μορφολογία εγκλιματισμένων φυταρίων.

Abstract

Dianthus cruentus Griseb. (Caryophyllaceae) is a herbaceous perennial species native to the Balkan Peninsula, including Greece, and western Asia. It is a species of great ornamental interest due to its architectural inflorescences and its compact blue-green foliage, particularly resistant to dry and poor soils and attractive to pollinators such as butterflies and bees. In addition, it is a species of medical potential due to its strong antioxidant action.

In the present study, the determination of the appropriate conditions for maximizing the germination of its seeds in both *in vitro* and *in vivo* conditions was initially investigated. Two seed lots collected from a native population of the species on Mount Kallidromo, Fthiotida, dry-stored for 0 or 12 months, were used, without any pre-treatment.

Regarding *in vitro* germination, the seeds were surface sterilized with a 20% commercial bleach water solution for 10 minutes, were then rinsed with distilled water and afterwards were placed in Petri dishes containing ½ MS medium, under 16 h photoperiod from 37.5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fluorescent light, at temperatures of 5, 10, 15, 20 or 25 °C. The optimum temperature for seed germination was 15 °C, in which the highest germination ability in both recently collected (98%) and 12-month-old seeds (100 %) was observed. The lowest germination percentages were recorded at the two extreme temperatures of 5 °C and 25 °C, with particularly low values for recently collected seeds (18% and 15%). At all temperatures, minus that of 5 °C, the seeds germinated rapidly ($T_{50} = 2\text{-}6$ d). The duration of the seeds' dry storage significantly affected their germination, increasing the germination percentage at the 2 extreme temperatures and demonstrating the positive effect of dry afterripening.

As for *ex vitro* germination, the seeds were placed in pots with a mixture of peat-perlite (1: 1, v/v) and were incubated in growing chambers at temperatures of 15, 20 or 25 °C. The highest germination percentage was observed at 15 °C for both seed lots (97-99%), while the lowest at the temperature of 25 °C (62% and 4% for the 0- and 12-months-old seeds respectively). Germination ability was slightly lower in *ex vitro* germination, especially at 25 °C.

Furthermore, the micropropagation of the species from explants excised from 2-month-old seedlings was investigated on solid substrates. Substrates containing MS medium and 8 g L⁻¹ agar were used in almost all substages of the proliferation stage,

and the effects of cytokinins BA, 2iP and ZEA, with the absence or the presence of auxin NAA, were investigated, using explants derived from non-hyperhydric or hyperhydric shoots. In the initial culture substrates containing 0.1 mg L⁻¹ BA or 0.1 or 0.5 mg L⁻¹ 2iP the explants produced shoots at a high percentage (72-87%), but many of these were shown to be hyperhydric, with abnormal morphology and vitreous appearance. The number of hyperhydric shoots and the number of nodes seemed to be higher on substrates containing 2iP, with the largest number of normal shoots (2.3) appearing in the substrate containing 0.1 mg L⁻¹ BA.

During the 1st subculture stage, hyperhydric shoots were observed in bigger numbers in the substrate containing 2iP, while an increase in shoot proliferation and the number of hyperhydric shoots was correlated with the use of hyperhydric explants grown on hormone-free MS substrate. In the 2nd subculture stage, the presence of 0.1 mg L⁻¹ BA yielded the largest number of shoots regardless of the physiology of the explants, while the addition of 0.05 mg L⁻¹ resulted in a significant increase in the number of normal shoots and a reduction in hyperhydricity rates when hyperhydric explants were used. In the 3rd subculture, when explants derived from non-hyperhydric shoots were used the highest value of the multiplication index (4.5) and the maximum number of shoots (3.6) was recorded in MS substrate containing 2 mg L⁻¹ BA. Increasing the concentration of agar to 12 g L⁻¹ produced the largest number of shoots (2.4) when hyperhydric explants were used. In both cases, the highest percentages of hyperhydricity were recorded on MS substrate containing 0.1 mg L⁻¹ ZEA. In contrast, during the 4th subculture, the use of this substrate resulted in the greatest multiplication index value at this stage (4.8).

Overall, the use of MS substrate with 0.1 mg L⁻¹ BA and 0.05 mg L⁻¹ NAA resulted in the highest values of the proliferation index (5.1) regardless of the physiology of the explants used, with its maximum value (5.2) recorded from the culture of hyperhydric explants on MS substrate containing 0.1 mg L⁻¹ BA and 12 g L⁻¹ agar. The presence of phytohormones in the substrates increased the production of callus around the base of the explants, while high concentrations of cytokinins lessened the occurrence of roots.

D. cruentus microshoots were rooted in MS or ½ MS substrates in the presence or absence of IBA. The use of MS substrate resulted in lower rooting rates (55-70%) when lower concentrations of IBA were used (0 or 0.1 mg L⁻¹). The optimal concentration of IBA was found to be 0.5 mg L⁻¹ regardless of the multiplication

substrate where the microshoots originated or the nutrient medium used in the rooting substrate, with rooting rates of 83-100%, while in some instances a carry-over effect, caused by the cytokinin content of the shoot proliferation substrates, was observed on the roots' number and median length.

The *ex vitro* acclimatization of the rooted microshoots was completed with a success rate of 91% using a peat:perlite substrate (1:1, v/v). Significant morphological differences were observed between acclimatized plantlets, including differences in stem length and total number of shoots and nodes, which were correlated with the influence of different shoot proliferation and/or rooting substrates, while the presence of IBA during rooting seemed to have an amendable effect on their survival.

Finally, the use of an integrated, 60-days-long propagation protocol with shoot proliferation and rooting occurring concurrently in one stage on MS substrates free of PGRs or containing BA or 2iP and NAA produced rooted young plants at a high percentage (88%), which had the maximum observed total number of shoots and nodes and were then successfully acclimatized, surviving at a percentage of 86%.

Scientific area: Horticulture

Keywords: *Dianthus cruentus*, native ornamental plant, germination ecophysiology, seed germination *in vitro*, seed germination temperature, seed lot age, dry afterripening, *in vitro* propagation, solid culture, seedling explant, hyperhydricity, hyperhydric explant, callus induction, *in vitro* rooting, *ex vitro* acclimatization, cytokinins, IBA, carry over effect, acclimatized plantlets' morphology.

Σκοπός μελέτης

Ο *Dianthus cruentus* Griseb. είναι ένα αυτοφυές καλλωπιστικό είδος που ξεχωρίζει για τις θεαματικές ταξιανθίες του, την ανθεκτικότητά του σε ξηρά, φτωχά εδάφη και την οικολογική του αξία για έντομα-επικονιαστές όπως ημερόβια λεπιδόπτερα. Παρά το ιδιαίτερο ενδιαφέρον που υπάρχει για την αξιοποίησή του στην κηποτεχνία και την αρχιτεκτονική τοπίου, δεν αναφέρεται κανένα πρωτόκολλο αγενούς πολλαπλασιασμού του, πιθανώς λόγω της ιδιαίτερης βλαστητικής μορφολογίας του (ολιγάριθμοι, βραχυγονάτιοι βλαστοί με ξυλώδη βάση), η οποία δυσχεραίνει τη χρήση διαδεδομένων τεχνικών όπως η χρήση μοσχευμάτων. Την ίδια στιγμή, υπάρχει μία μόνο ερευνητική αναφορά για τον εγγενή πολλαπλασιασμό του. Ως εκ τούτου, ο πρωταρχικός σκοπός της παρούσας μελέτης ήταν η διερεύνηση της οικοφυσιολογίας του σπόρου και του *in vitro* πολλαπλασιασμού του είδους, με φυτικό υλικό συλλεχθέν από φυσικό πληθυσμό, με σκοπό τη διάδοση της καλλιέργειας και της αξιοποίησής του ως αυτοφυές καλλωπιστικό τόσο στην Ελλάδα όσο και διεθνώς σε περιοχές με ανάλογα κλίματα.

Πρώτος στόχος αποτέλεσε η διερεύνηση της επίδρασης της θερμοκρασίας επώασης και της ηλικίας της σπορομερίδας στη βλαστικότητα των σπόρων, με σκοπό τον προσδιορισμό της βέλτιστης θερμοκρασίας για τη βλάστηση των σπόρων και την εξέταση τυχόν αρνητικής ή θετικής επίδρασης της ξηρής αποθήκευσης αυτών.

Δεύτερος στόχος αποτέλεσε αρχικά η διερεύνηση της επίδρασης του είδους και της συγκέντρωσης των κυτοκινινών BA και 2iP, σε συνδυασμό ή χωρίς τη συνεργεία NAA, στον μικροπολλαπλασιασμό σποροφύτων *D. cruentus* σε στερεά υποστρώματα καλλιέργειας MS, και στη συνέχεια η τροποποίησή τους (αύξηση συγκέντρωσης άγαρ, αλλαγή MS με WPM, χρήση ZEA) με σκοπό το περιορισμό της υπερενυδάτωσης και την αύξηση του δυναμικού πολλαπλασιασμού.

Τρίτος στόχος αποτέλεσε η διερεύνηση της δυνατότητας αξιοποίησης των υπερενυδατωμένων βλαστών ως πηγή εκφύτων, με σκοπό τη μεγιστοποίηση της παραγωγικότητας του πρωτοκόλλου *in vitro* πολλαπλασιασμού.

Τέταρτος στόχος αποτέλεσε η μελέτη της *in vitro* ριζοβολίας και του *ex vitro* εγκλιματισμού του είδους, με σκοπό την επιτυχή μετατροπή των παραχθέντων μικροβλαστών σε έρριζα, σκληραγωγημένα, υγιή φυτάρια, με ομοιόμορφη εμφάνιση τυπική για το είδος και χαρακτηριστική των φυτών του φυσικού πληθυσμού.

Στους γονείς μου,
Αντιγόνη και Σεραφείμ



DIANTHUS CRUENTUS Hortul.

L. Sprengel ad nat. viv. del. & sc.

GH. lith. & pfer. in Horto Van Houtteano.

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά την Καθηγήτρια Δρ. Μαρία Παπαφωτίου, Διευθύντρια του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, για την ανάθεση του θέματος και επίβλεψη της Διατριβής, για την πολύτιμη αρωγή και παρακολούθηση του σχεδιασμού και της υλοποίησης της πειραματικής διαδικασίας, καθώς και για τη διόρθωση και επιμέλεια της παρούσας διπλωματικής μελέτης.

Θα ήθελα επίσης να εκφράσω τις ευχαριστίες μου προς τα μέλη της τριμελούς εξεταστικής επιτροπής της παρούσας μελέτης, την Δρ. Αγγελική Παρασκευοπούλου, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, και τον Δρ. Πέτρο Ρούσσο, Καθηγητή του Εργαστηρίου Δενδροκομίας του ιδίου Πανεπιστημίου, για το χρόνο που αφιέρωσαν για τη βελτίωση και εξέταση της μεταπτυχιακής μου μελέτης.

Ευχαριστώ επίσης τον Δρ. Κωνσταντίνο Μπερτσουκλή, ΕΔΙΠ του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών, και την κα. Μαρίνα Τρίγκα, υποψήφια Διδάκτορα, για την υποστήριξη και τις συμβουλές που μου παρείχαν κατά τη διάρκεια της εκτέλεσης των πειραμάτων και τη συγγραφή της μελέτης αυτής.

Τέλος, θέλω να ευχαριστήσω την κα. Ελένη Κασκαρίκα για τη γραφιστική επιμέλεια του εξωφύλλου και των πειραματικών εικόνων, και τους γονείς μου, Αντιγόνη και Σεραφείμ, για τη δική τους βοήθεια και υποστήριξη καθ' όλα τα στάδια εκπόνησης της Διατριβής αυτής.

Με την άδειά μου, η παρούσα εργασία ελέγχθηκε από την Εξεταστική Επιτροπή μέσα από λογισμικό ανίχνευσης λογοκλοπής που διαθέτει το ΓΠΑ και διασταυρώθηκε η εγκυρότητα και η πρωτοτυπία της.

Περιεχόμενα

Περίληψη	3
Abstract.....	6
Σκοπός μελέτης.....	9
Ευχαριστίες.....	11
Περιεχόμενα.....	13
Συντομογραφίες	17
1. Εισαγωγή	19
1.1 Η οικογένεια Caryophyllaceae	19
1.2 Το γένος <i>Dianthus</i> L.	22
1.2.1 Συστηματική ταξινόμηση	22
1.2.2 Βοτανική περιγραφή	23
1.2.3 Χρήσεις του γένους <i>Dianthus</i>	28
1.2.3.1 Παραγωγή δρεπτών ανθέων	28
1.2.3.2 Αξιοποίηση στον κήπο και το τοπίο	32
1.2.3.3 Φαρμακευτικές χρήσεις	36
1.2.4 Πολλαπλασιασμός του γένους <i>Dianthus</i>	39
1.2.4.1 Εγγενής πολλαπλασιασμός – Οικοφυσιολογία βλάστησης	39
1.2.4.2 Αγενής πολλαπλασιασμός.....	43
1.2.5 <i>In vitro</i> πολλαπλασιασμός στο γένος <i>Dianthus</i>	46
1.2.5.1 Μικροπολλαπλασιασμός του <i>D. caryophyllus</i>	46
1.2.5.2 Μικροπολλαπλασιασμός άλλων ειδών του γένους <i>Dianthus</i> .53	
1.2.5.3 Άλλες μέθοδοι <i>in vitro</i> πολλαπλασιασμού στο γένος <i>Dianthus</i>	
.....	57
1.2.5.5 Υπερενυδάτωση στο γένος <i>Dianthus</i>	61
1.3 <i>Dianthus cruentus</i> Griseb.....	65
1.3.1 Βοτανική περιγραφή	65

1.3.2 Χρήσεις του <i>Dianthus cruentus</i> Griseb.....	70
1.3.3 Πολλαπλασιασμός του <i>Dianthus cruentus</i> Griseb.....	73
2. Οικοφυσιολογία του σπόρου <i>D. cruentus</i>	76
2.1 Εισαγωγή - Οικοφυσιολογία του σπόρου	76
2.2 Υλικά και μέθοδοι	77
2.2.1 Προέλευση φυτικού υλικού.....	77
2.2.2 Συλλογή, καθαρισμός και αποθήκευση σπόρων	78
2.2.3 Μέθοδος παρασκευής και αποστείρωσης του θρεπτικού υποστρώματος	79
2.2.4 Επιφανειακή απολύμανση σπόρων	79
2.2.5 Εγκατάσταση σπόρων και συνθήκες επώασης.....	80
2.2.6 Στατιστική ανάλυση - Εκτίμηση αποτελεσμάτων	80
2.3 Αποτελέσματα	81
2.3.1 Βλαστικότητα σπόρων <i>in vitro</i>	81
2.3.2 Βλαστικότητα σπόρων <i>ex vitro</i>	85
2.4 Συζήτηση - Συμπεράσματα	87
3. Μικροπολλαπλασιασμός του <i>D. cruentus</i>	89
3.1 Εισαγωγή.....	89
3.2 Υλικά και μέθοδοι	90
3.2.1 Φυτικό υλικό.....	90
3.2.2 Υποστρώματα <i>in vitro</i> καλλιιεργειών	91
3.2.2.1 Υλικά των θρεπτικών υποστρωμάτων	91
3.2.2.2 Μέθοδος παρασκευής μητρικών διαλυμάτων φυτορυθμιστικών ουσιών.....	92
3.2.2.2 Μέθοδος παρασκευής θρεπτικού υποστρώματος.....	94
3.2.2.3 Δοχεία και υλικά κάλυψης	94
3.2.2.4 Αποστείρωση εργαλείων και υλικών καλλιέργειας.....	95
3.2.5 Εγκατάσταση φυτικού υλικού	96

3.2.5.1 Εγκατάσταση εκφύτων αρχικής καλλιέργειας	96
3.2.5.2 Εγκατάσταση εκφύτων καλλιεργειών πολλαπλασιασμού	96
3.2.5.3 Εγκατάσταση μικροβλαστών προς ριζοβολία.....	96
3.2.5.4 Εγκλιματισμός ριζοβολημένων μικροβλαστών	97
3.2.6 Συνθήκες καλλιέργειας.....	98
3.2.6.1 Συνθήκες <i>in vitro</i> καλλιέργειας	98
3.2.6.2 Συνθήκες <i>ex vitro</i> καλλιέργειας.....	98
3.2.7 Στατιστική ανάλυση - Εκτίμηση και παρουσίαση αποτελεσμάτων ..	99
3.3 Αποτελέσματα	102
3.3.1 Αρχική εγκατάσταση.....	102
3.3.2 Στάδιο πολλαπλασιασμού	104
3.3.2.1 Πρώτη υποκαλλιέργεια	104
3.3.2.2 Δεύτερη υποκαλλιέργεια.....	107
3.3.2.3 Τρίτη υποκαλλιέργεια	111
3.3.2.4 Τέταρτη υποκαλλιέργεια.....	115
3.3.2.5 Σύγκριση υποκαλλιεργειών.....	116
3.3.2.6 Επίδραση προέλευσης εκφύτου.....	120
3.3.3 Ριζοβολία και εγκλιματισμός.....	123
3.3.3.1 Πρώτη ριζοβολία και εγκλιματισμός.....	123
3.3.3.2 Δεύτερη ριζοβολία και εγκλιματισμός.....	128
3.3.3.3 Τρίτη ριζοβολία και εγκλιματισμός.....	133
3.3.3.4 Εγκλιματισμός δίχως στάδιο ριζοβολίας	138
3.4 Συμπεράσματα - Συζήτηση	143
4. Γενικά συμπεράσματα	152
Βιβλιογραφία	156
Διαδικτυακές πηγές	177
Πηγές εικόνων.....	178

Συντομογραφίες

BA	6-βενζυλαδενίνη, 6-benzyladenine
2iP	6-γ-γ-(διμεθυλαλληλάμινο)-πουρίνη, 6-γ-γ-(dimethylallylamino)-purine
ZEA	τρανς-ζεατίνη, trans-zeatin
NAA	1-ναφθαλινοξικό οξύ, 1-naphthelene acetic acid
IBA	ινδολο-3-οξικό οξύ, indole-3-butyric acid
MS	Murashige and Skoog Medium
WPM	McCown's Woody Plant Medium
PGRs	φυτορρυθμιστικές ουσίες, plant growth regulators
GA₃	γιββεριλικό οξύ, gibberelic acid
TDZ	θειντιαζουρόν, thidiazuron
KIN	κινετίνη, 6-φουρφουρλαμινοπουρίνη, kinetin, 6-furfurylaminopurine



DIANTHUS CRUENTUS Hortul.

L. Strobant ad nat. viv. del. & Sc.

Off. lith. & pict. in Horto Van Houtteano.

1. Εισαγωγή

1.1 Η οικογένεια *Caryophyllaceae*

Η τάξη *Caryophyllales*, σύγχρονη ταξινομική ομάδα ανάλογης των παραδοσιακών *Centrospermae* και *Caryophyllideae* (Cronquist, 1981), περιλαμβάνει πάνω από 12.500 είδη φυτών που κατανέμονται σε 38 έως 41 οικογένειες, μεταξύ των οποίων και η οικογένεια των Καρυοφυλλιδών (*Caryophyllaceae*) (APG IV, 2016; Walker *et al.*, 2018). Πρόκειται για μία μεγάλη και ποικιλόμορφη τάξη, ταξινομικά εγγύτερη στους Αστερίδες παρά στους Ροζίδες, η οποία περιλαμβάνει ένα ιδιαίτερα εκτεταμένο εύρος εξειδικευμένων φυτικών ειδών όπως σαρκοφάγα, παχύφυτα, αλόφυτα, μαγκρόβια και φυτά με C₄ φωτοσύνθεση. Οι κυριότερες μορφοανατομικές απομορφίες που μοιράζονται τα περισσότερα μέλη της τάξης αποτελούν η παρουσία κρυσταλλικών εγκλειστών περιβαλλόμενων από πρωτεϊνικά νημάτια στα πλαστίδια των ηθμαγγειώδων δεσμίδων, καμπυλότροπες σπερματικές βλάστες και σπέρματα που φέρουν περισπέρμιο, καθώς και η παρουσία βεταλαϊνών, έγχρωμων ενώσεων-παραγώγων της τυροσίνης που αντικαθιστούν λειτουργικά τις ανθοκυανίνες (Simpson, 2019).

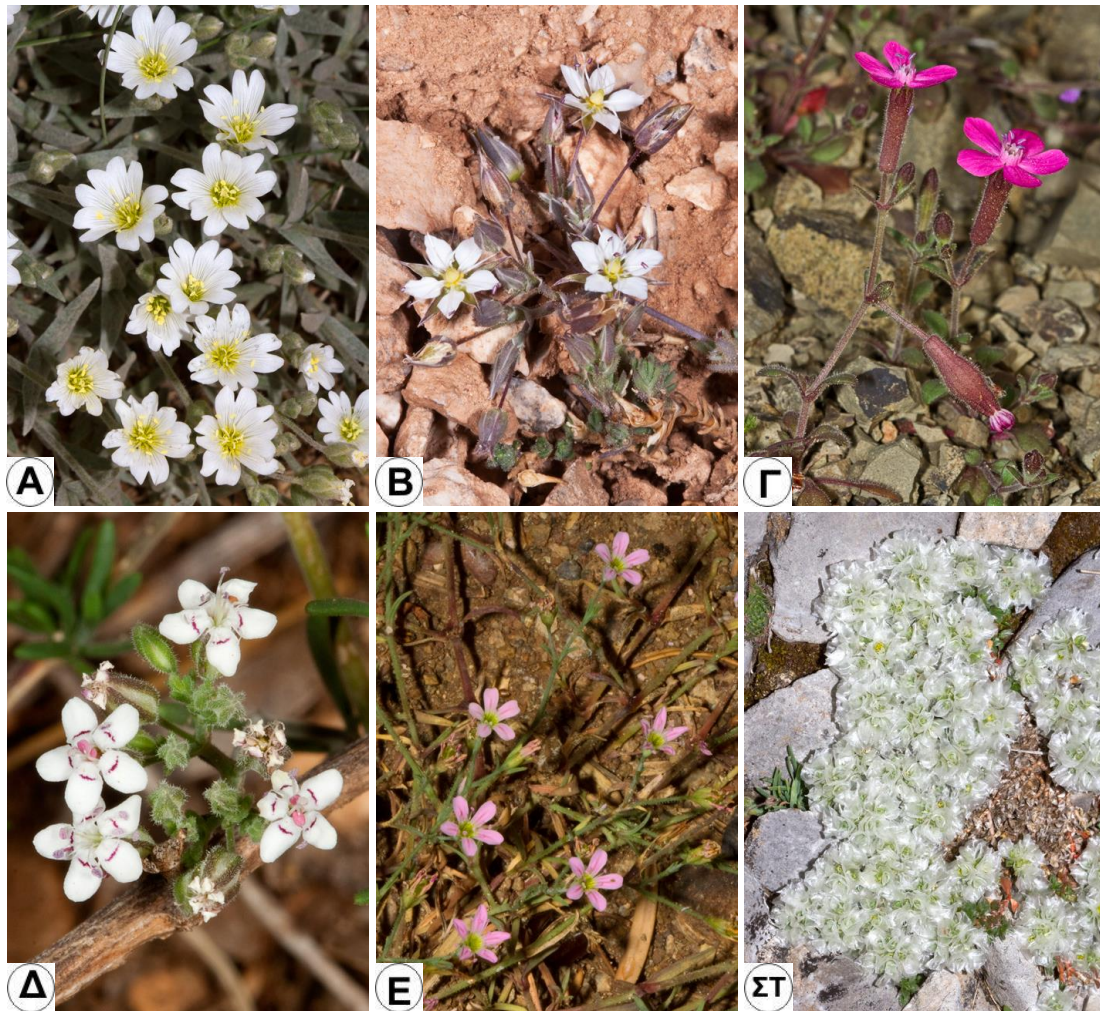
Η οικογένεια *Caryophyllaceae* περιλαμβάνει 91 έως 101 γένη και 2.200 έως πάνω από 2.600 είδη, με το όνομά της να προέρχεται από το πλέον μη αναγνωριζόμενο, συνώνυμο του *Dianthus*, γένος *Caryophyllus*. Αποτελείται από ετήσιες ή πολυετείς πόες, σπανιότερα θάμνους, λιάνες ή δένδρα. Τα στελέχη φέρουν συχνά χαρακτηριστικά διογκωμένους κόμβους, ενώ τα φύλλα φέρονται αντίθετα και είναι απλά, χωρίς παράφυλλα. Τα άνθη είναι διγενή, σπανιότερα μονογενή, ακτινόμορφα, υπόγυνα, σπανίως περίγυνα, φερόμενα σε διχάσια κύματα ή μονήρως. Το περιάνθιο είναι δίσειρο και διχλαμυδικό, χωρίς υπάνθιο, και αποτελείται από κάλυκα σχεδόν πάντα συσσέπαλο με 5 σέπαλα και στεφάνη αποπέταλη, συχνά ονυχοφόρος, με 5 πέταλα. Οι στήμονες είναι 5 έως 10, αποστημονικοί, ενίοτε προσαρτώμενοι στη βάση των πετάλων, σχηματίζοντας σωλήνα, φέροντας ανθήρες με κατά μήκος διάνοιξη. Το γυναικείο είναι σύγκαρπο, με μία επιφυή ωοθήκη, 2 έως 5 καρπόφυλλα και 1 χώρο, συχνά με διαφράγματα στη βάση της. Ο στύλος ή οι στύλοι είναι κορυφαίοι, ενιαίοι στο κάτω τμήμα τους, συχνά διακλαδισμένοι προς τα

πάνω. Οι σπερματικές βλάστες είναι καμπυλότροπες έως ημίτροπες, με δύο χιτώνες και ελευθέρη-κεντρική πλακουντοποίηση. Ο καρπός είναι αχάινιο ή κάψα, με βαλβίδες ή δόντια ίσα ή διπλάσια με τον αριθμό των καρπόφυλλων. Τα σπέρματα φέρον περισπέρμιο, συχνά με ανάγλυφο περίβλημα. Σε αντίθεση με τη συντριπτική πλειοψηφία των οικογενειών της τάξης, οι βεταλαΐνες απουσιάζουν, ενώ παρούσες στη θέση τους είναι οι ανθοκυανίνες (Simpson, 2019).

Η πρωιμότερη αναφορά της οικογένειας προέρχεται από απολιθωμένη γύρη ηλικίας 73 εκατ. ετών (Υστερο Κρητιδικό), ενώ τα αρχαιότερα μακροαπολιθώματα βρέθηκαν σε εναποθέσεις του Ηώκενου στη Τασμανία (*Caryophylliflora*) (Christenhusz *et al.*, 2017). Οι τρεις παραδοσιακές υποοικογένειες Silenoideae, Alsinoideae και Paronychioideae (Pax, 1899; Bittrich, 1993) δεν φαίνεται να επιβεβαιώνονται από τα ευρήματα της μοριακής φυλογενετικής, επομένως έχουν εγκαταληφθεί στις πιο πρόσφατες θεωρήσεις της οικογένειας, αντικαθιστώμενες από 11 φυλές (tribes) συγγενικών γενών (Harbaugh *et al.*, 2010; Greenberg & Donoghue, 2011). Αντιστοίχως, σε επίπεδο γενών αναμένονται αρκετές ανακατάταξεις τα επόμενα χρόνια χάρη στην ευρύτερη και πιο ευχερή χρήση των μοριακών δεικτών, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τη διάσπαση του πολυφυλετικού γένους *Minuartia* σε 11 γένη (Dillenberger & Kadereit, 2014).

Πρόκειται για μία κοσμοπολίτικη οικογένεια με εξαιρετικά ευρεία εξάπλωση, απουσιάζοντας μόνο από τους παγετώνες της Ανταρκτικής και της Γροιλανδίας, η οποία ωστόσο παρουσιάζει το μεγαλύτερο πλούτο ειδών σε περιοχές με εύκρατο κλίμα, όπου συναντώνται γένη με μεγάλο αριθμό ειδών όπως τα *Silene* (700 είδη), *Dianthus* (320 είδη) και *Arenaria* (300 είδη). Χαρακτηριστικότερη είναι η προσαρμογή ειδών της σε ακραία περιβάλλοντα. Η *Arenaria bryophylla* αποτελεί ένα από τα πιο ανθεκτικά αλπικά φυτά, επιβιώνοντας σε υψόμετρο 6180 m στις ανώτερες πλαγιές του όρους Έβερεστ. Το είδος *Colobanthus quitensis* είναι ένα από τα μόνο δύο αγγειόσπερμα που αυτοφύονται σε περιοχές νότια του Ανταρκτικού κύκλου, ενώ γένη όπως το *Acanthophyllum* κατάφεραν να προσαρμοστούν και να εξαπλωθούν σε ερημικές περιοχές. Άξιο μνείας είναι και το παλαιαρκτικό είδος *Silene stenopetala*, άωροι καρποί του οποίου με ηλικία άνω των 31000 ετών χρησιμοποιήθηκαν για την επιτυχή *in vitro* καλλιέργεια και ανασύσταση ενός εξαφανισμένου χρονότυπου του είδους (Christenhusz *et al.*, 2017).

Στην Ελλάδα απαντώνται 34 γένη της οικογένειας, στα οποία ανήκουν 351 είδη και 447 taxa (είδη και υποείδη), πολλά εξ αυτών ενδημικά ή/και περιορισμένης εξάπλωσης (FoGW, 2022). Το πλουσιότερο γένος είναι το *Silene*, με 109 είδη και 137 taxa στον ελλαδικό χώρο, ενώ τα αμέσως μεγαλύτερα είναι τα γένη *Dianthus*, με 46 είδη και 74 taxa, και *Cerastium*, με 35 είδη και 44 taxa. 20 taxa της οικογένειας καταγράφονται ως απειλούμενα με εξαφάνιση στη τελευταία έκδοση του Βιβλίου Ερυθρών Δεδομένων των Σπανίων και Απειλούμενων Φυτών της Ελλάδας (Φοίτος *et al.*, 2009), ενώ σε πρόσφατη αξιολόγηση, 148 από τα 154 ενδημικά taxa της οικογένειας έλαβαν το χαρακτηριστικό «τρωτό», «κινδυνεύον» ή «κρίσιμως κινδυνεύον» βάσει των κριτηρίων Α και Β του IUCN (Kougioumtzis *et al.*, 2021).



Εικόνα 1. Ελληνικά ενδημικά taxa της οικογένειας Caryophyllaceae: *Cerastium candidissimum* (Α), *Minuartia attica* subsp. *idaea* (Β), *Silene salamandra* (Γ), *Bolanthus laconicus* (Δ), *Petrorrhagia phthiotica* (ε), *Paronychia albanica* subsp. *graeca* (στ).

1.2 Το γένος *Dianthus* L.

1.2.1 Συστηματική ταξινόμηση

Σύμφωνα με τη πιο πρόσφατη εκδοχή του ταξινομικού συστήματος APG (Angiosperm Phylogeny Group IV) (APG, 2016), το γένος *Dianthus* L. κατατάσσεται ταξινομικά ως εξής:

Kingdom	Plantae
Clade	Tracheophytes
Clade	Angiosperms
Clade	Eudicots
Order	Caryophyllales
Family	Caryophyllaceae
Genus	<i>Dianthus</i> L.

Σύμφωνα με το σύστημα κατάταξης κατά Cronquist (1981), το γένος *Dianthus* L. κατατάσσεται ταξινομικά ως εξής:

Kingdom	Plantae
Subkingdom	Tracheobionta
Superdivision	Spermatophyta
Phylum	Magnoliophyta (Angiosperms)
Class	Magnoliopsida (Dicotyledons)
Subclass	Caryophyllidae
Order	Caryophyllales
Family	Caryophyllaceae
Subfamily	Silenoideae
Genus	<i>Dianthus</i> L.

1.2.2 Βοτανική περιγραφή

Το γένος *Dianthus* L. περιλαμβάνει ετήσιους ή πολυετείς πόες, σπανιότερα χαμηλούς θάμνους, με φύλλα απλά, συχνά αγρωστιδόμορφα (επιμήκη λογχοειδή), και βλαστούς περισσότερο ή λιγότερο διογκωμένους στους κόμβους. Τα άνθη είναι τέλεια (διγενή), πολύ σπάνια μονογενή, και φέρονται μεμονωμένα ή σε κεφαλοειδή επάκρια κύματα, συχνά περιβαλλόμενα από βράκτια, στη βάση των οποίων εμφανίζεται επικάλυκας αποτελούμενος από 2 έως πολυάριθμα λέπια. Ο κάλυκας είναι συσέπαλος και σωληνοειδής, σχηματιζόμενος από 5 πράσινα σέπαλα με πολλά παράλληλα νεύρα, ενώ φέρει 5 όδοντες στη περιφέρειά του. Η στεφάνη, η οποία ενίοτε θεωρείται τμήμα του ανδρείου αποτελούμενο από μεταμορφωμένα στημονώδη, αποτελείται από 5 πέταλα που έχουν λευκές, κόκκινες ή ρόδινες αποχρώσεις, σπανιότερα κίτρινες, και φέρουν αδιαίρετα, οδοντωτά ή κροσσωτά περιθώρια και μακρύ όνυχα στη βάση τους. Το ανδρείο αποτελείται από 10 στήμονες, ενώ το γυναικείο από 2 στύλους και 1 καρπόφυλλο με πολυάριθμες σπερματικές βλάστες που φέρεται σε γυνοφόρο. Ο καρπός είναι κάψα κυλινδρικού έως αντωειδούς σχήματος, η οποία διαρρηγνύεται με τη βοήθεια 4 οδόντων ή βαλβίδων. Περιέχει πολυάριθμους μαύρους σπόρους, ραχιοκοιλία συμπιεσμένους, με δισκοειδές, ασπιδοειδές ή κυκλικό σχήμα, επίπεδοι ή κυρτοί, με μετωπιαίο ομφαλό.

Ανθικός τύπος: *K(5) A(5°+5+5) \underline{G} (2) ή *K(5) C5 A(5+5) \underline{G} (2)

Καρυολογικός τύπος: $2n = 30, 60, 90$, με γνωστές περιπτώσεις αυτοπολυπλοειδίας και ετεροπολυπλοειδίας.

Βασιζόμενοι σε ιστορικές αναφορές, συγγραφείς όπως ο Montagu (1955) και ο Ingwersen (1949) αναφέρουν ότι το γένος ήταν γνωστό ήδη από την εποχή του Θεόφραστου, ο οποίος και ήταν ο πρώτος που χρησιμοποίησε την ονομασία «διάνθος» (Δίας + άνθος) για να περιγράψει τη χρήση ανθέων κάπου είδους του γένους, πιθανώς του *D. sylvestris*, για τη κατασκευή στεφανιών που απονέμονταν στους αθλητές. Αργότερα, ο διάνθος αναφέρεται στιςπραμάτειες φαρμακογνωσιακού περιεχομένου του Νικάνδρου του Κολοφώνα και του Πλινίου του Πρεσβύτερου ("Iovis flos"). Κατά τη πρώτη συστηματική περιγραφή του είδους, ο Σουηδός βοτανικός Κάρολος Λιναίος συμπεριέλαβε 15 είδη που του ήταν γνωστά από συλλογές, τα οποία διέκρινε σε 5 ενότητες βάσει των χαρακτηριστικών της ταξιανθίας, της μορφής του φυτού και του σχήματος του κάλυκα (Linnaeus, 1753).

Αργότερα, ο Βρετανός J. E. Smith εμπλούτισε και διόρθωσε τις αρχικές περιγραφές του Λιναίου, καταλήγοντας με 23 είδη στο γένος (Smith, 1793). Σταθμός θεωρείται η έκδοση του πρώτου τόμου του «*Prodromus systematis naturalis regni vegetabilis*», στο οποίο τα πλέον 113 είδη του γένους διακρίνονται σε 2 ενότητες (*Armeriastrum*, *Caryophyllum*), καταγράφοντας την εκρηκτική ανάπτυξη της σύγχρονης βοτανικής επιστήμης με τη συντεταγμένη συλλογή, περιγραφή και ταξινόμηση φυτικών ειδών σε ένα μεγάλο γεωγραφικό εύρος (de Candolle, 1824). Με αυτό τον τρόπο, οι Bentham & Hooker φτάνουν να καταγράφουν 200 είδη το 1862 (Bentham & Hooker, 1862), ενώ αργότερα ο Pax διαχωρίζει τα πλέον 230 γνωστά είδη σε 2 υπογένη (*Carthusianastrum*, *Caryophyllastrum*), με το πρώτο να περιέχει 3 ενότητες (*Armerium*, *Suffruticosi*, *Carthusianum*) και το δεύτερο 5 (*Fimbriatum*, *Barbullatum*, *Caryophyllum*, *Imparjugum*, *Tetralepides*) (Pax, 1899; Komarov, 1970). Πιο πρόσφατα, η υποειδική θεώρηση του είδους σταδιακά εγκαταλήφθηκε, με τον Bittrich να καταγράφει 300 είδη το 1993 (Bittrich, 1993), ενώ σήμερα ο αριθμός των ειδών παραμένει δυναμικός και σταθερά αυξανόμενος, με τις πιο πρόσφατες εκτιμήσεις των ειδών του γένους να κυμαίνονται από 320 (Christenhunz *et al.*, 2017) έως 343 είδη (PoWO, 2022).

Όπως και στα υπόλοιπα γένη της οικογένειας, η αποσαφήνιση των φυλογενετικών σχέσεων εντός και εκτός του γένους *Dianthus* φαίνεται να είναι ιδιαίτερα δύσκολη, γεγονός που οφείλεται σε πολυάριθμους παράγοντες. Σύμφωνα με τους Valente *et al.* (2010), ο σημαντικότερος εξ αυτών φαίνεται να είναι η πρόσφατη και ιδιαίτερα ταχύρυθμη ειδογένεση των περισσότερων εκπροσώπων του γένους, η οποία συσχετίζεται με την αύξηση των ξηρών κλιματικών συνθηκών κατά το Πλειστόκενο, 2,58 έως 0,11 εκατομύρια χρόνια πριν. Ιδιαίτερα στη Μεσογειακή λεκάνη, γύρω από την οποία συναντάται και ο μεγαλύτερος αριθμός ειδών του γένους, ο αυξημένος αριθμός κλιματικών ή/και ενδαιτηματικών καταφυγίων και η πολυπλοκότητα του ανάγλυφου και της τοπογραφίας οδήγησαν στην εμφάνιση μεγάλου αριθμού αλλοπατρικών νεοενδημικών ειδών με περιορισμένη εξάπλωση, με αποτέλεσμα την αδυναμία αποσαφήνισης των μεταξύ τους σχέσεων μέσω της μοριακής φυλογενετικής. Ταυτόχρονα, η μεγάλη ενδοειδική ποικιλομορφία, τα ασαφή όρια μεταξύ των taxa αλλά και τα συχνά γεγονότα υβριδισμού και πολυπλοειδίας περιπλέκουν και δυσχεραίνουν σε μεγάλο βαθμό τη ταξινόμηση βάσει μορφολογικών και γονιδιακών δεικτών, εξηγώντας την απουσία οποιασδήποτε σύγχρονης μονογραφικής θεώρησης του γένους για περισσότερα από 80 έτη (Balao *et*

al., 2010). Σύμφωνα με τις πιο πρόσφατες μοριακές μελέτες με εκτεταμένη δειγματοληψία συγγενικών γενών, το γένος *Dianthus* είναι παραφυλετικό και επομένως θα πρέπει να διευρυνθεί περαιτέρω, απορροφώντας το μικρό γένος *Velezia* και πιθανώς κάποια είδη *Petrorhagia* (Madhani et al., 2018).

Η συντριπτική πλειοψηφία των ειδών του γένους κατανέμεται σε περιοχές του Ολαρκτικού χλωριδικού βασιλείου, και πιο συγκεκριμένα στην Ευρώπη, την Ασία και τη βόρεια Αφρική. Ελάχιστα είδη απαντώνται νοτιότερα, στους ορεινούς όγκους της ανατολικής Αφρικής, ενώ τουλάχιστον άλλα 10 είδη ενδημούν στη Νότια Αφρική (Bittrich, 1993). Οι πιο πλούσιες σε είδη περιοχές φαίνεται να είναι αυτές της νότιας Ευρώπης και της δυτικής Ασίας, με τους ορεινούς όγκους που περιβάλλουν τη Μεσόγειο λεκάνη να συγκεντρώνουν το μεγαλύτερο αριθμό ειδών, με χαρακτηριστικό παράδειγμα τη Τουρκία, από την οποία έχουν περιγραφεί 11 νέα είδη του γένους τη τελευταία δεκαετία (Hamzaoglu et al., 2021).

Όπως και σε άλλα μέλη της οικογένειας, το γένος είναι σχετικά εξειδικευμένο ως προς τις οικολογικές απαιτήσεις του, καθώς πολλά από τα είδη προτιμούν απόκρημνες, βραχώδεις τοποθεσίες με μικρό ανταγωνισμό και φτωχά, επικλινή, ξηρά εδάφη, στα οποία αναπτύσσονται ως λιθόφυτα ή χασμόφυτα. Σύμφωνα με τα πρότυπα ανάπτυξης κατά Raunkier (1934), τα περισσότερα είδη είναι πολυετή και χαρακτηρίζονται ως χαμαίφυτα (chamaephytes, Ch) ή ημικρυπτόφυτα (hemicryptophytes, Hc), ενώ ελάχιστα είναι ετήσια θερόφυτα (therophytes, Th). Πολλά από αυτά εξειδικεύονται σε συγκεκριμένες συνθήκες γεωλογικής σύστασης, αναγλύφου, προσανατολισμού και υψομέτρου, με τα είδη που ενδημούν σε ορεινές ή αλπικές περιοχές με ακραίες συνθήκες συχνά να παρουσιάζουν χαρακτηριστική ταπητοειδή ή προσκεφαλόμορφη ανάπτυξη (Körner, 2021).

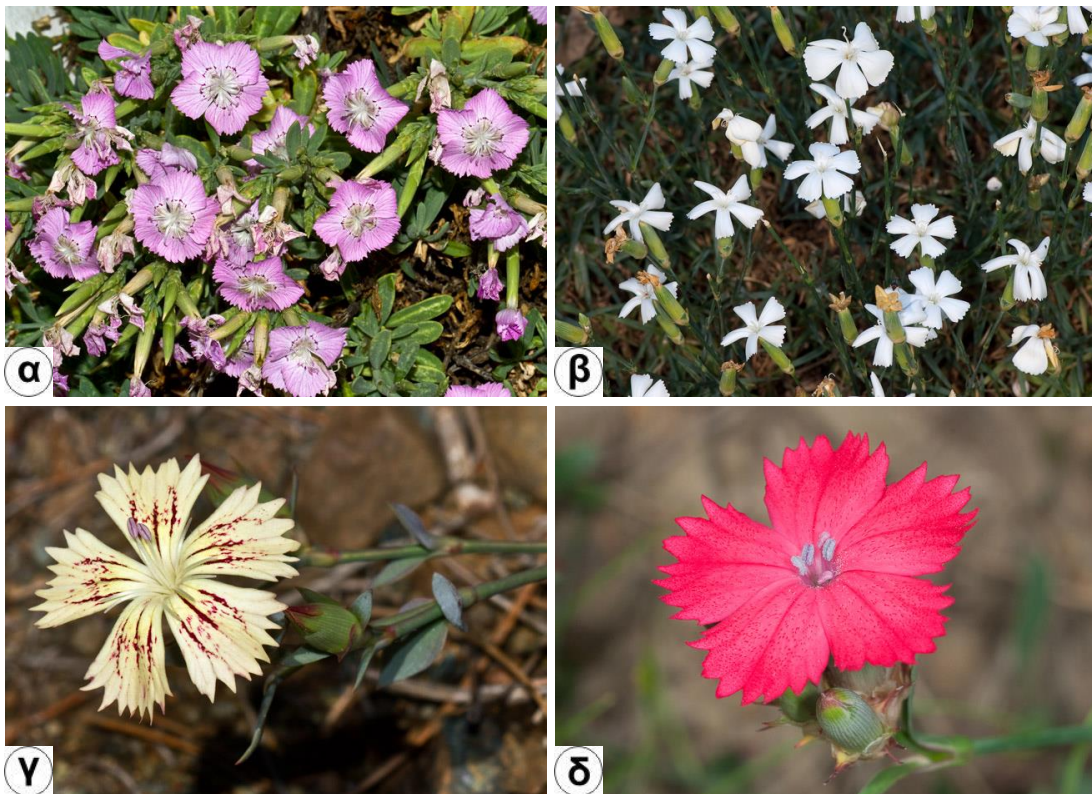


Εικόνα 2. *Dianthus juniperinus* subsp. *juniperinus* (α) και *Dianthus juniperinus* subsp. *pulvinoformis*, παράδειγμα σχιζοενδημικών χασμοφυτικών taxa του γένους από τη Κρήτη με χαρακτηριστική θαμνώδη (α) ή προσκεφαλόμορφη (β) ανάπτυξη.

Όπως και σε όλα τα γένη της οικογένειας Caryophyllaceae, η άνθιση όλων των ειδών του γένους *Dianthus* χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη πρωτανδρικής διχογαμίας, με την αποκάλυψη των στημόνων να προηγείται από αυτή των υπέρων (Simpson, 2019). Η κύρια μορφή αναπαραγωγικού μηχανισμού είναι η εντομοφιλία, με πολύ μικρό αριθμό ειδών, κυρίως ετησίων ή προερχόμενων από οικότοπους με ανεπαρκή αριθμό επικονιαστών, να είναι αυτογόνιμα. Κύριοι επικονιαστές αποτελούν πρωτευόντως διάφορα λεπιδόπτερα, και δευτερευόντως υμενόπτερα όπως μέλισσες και βομβίνοι, ενώ άλλοι ανθικοί επισκέπτες όπως δίπτερα και κολεόπτερα δεν φαίνεται να είναι ιδιαίτερα σημαντικοί για την επικονίαση. Αναλύτικότερα, τα εντομόφιλα είδη του γένους μπορούν να διακριθούν σε αυτά των οποίων η επικονίαση επιτελείται κατά τη διάρκεια της ημέρας και σε αυτά στα οποία αυτή πραγματοποιείται τη νύχτα. Τα άνθη των πρώτων χαρακτηρίζονται συνήθως από έντονα χρωματιστά πέταλα και απουσία ή ύπαρξη ελαφριάς οσμής, γονομοποιούμενα από ημερόβια λεπιδόπτερα και διάφορα υμενόπτερα, ενώ τα δεύτερα από λευκά ή ανοιχτού χρωματισμού πέταλα και ύπαρξη έντονης οσμής, γονιμοποιούμενα από νυχτόβια λεπιδόπτερα. Και για τις δύο ομάδες ειδών η σακχαρόζη αποτελεί το κύριο σάκχαρο που περιέχεται στο παραγόμενο νέκταρ (Witt *et al.*, 2013).

Σύμφωνα με τις τελευταίες ενημερώσεις και καταγραφές της ελληνικής χλωρίδας (Dimopoulos *et al.*, 2013; Dimopoulos *et al.*, 2016; FoGW, 2022), στην Ελλάδα αυτοφύονται 46 είδη και 74 taxa (είδη και υποείδη) του γένους *Dianthus*, εκ των οποίων τα 14 είδη και τα 35 taxa είναι ενδημικά της χώρας, ενώ από τα μη ενδημικά τα 14 είδη και τα 20 taxa είναι φυτά με περιορισμένη εξάπλωση. Ανάμεσα στα ενδημικά είδη, ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζουν τα θαμνώδη είδη *D. fruticosus* και *D. juniperinus*, τα οποία φαίνεται να αποτελούν υπολείμματα της χλωρίδας του Τριτογενούς και συνίστανται από πολυάριθμα σχιζοενδημικά taxa που καταγράφουν τη γεωλογική ιστορία της Αιγαίδας (Φοίτος, 2009). Η ιδιαίτερα πλούσια εκπροσώπηση του γένους στον ελλαδικό χώρο σχετίζεται τόσο με την ποικιλότητα του ανάγλυφου όσο και με την ιδιαίτερη βιογεωγραφική θέση της χώρας, ενώ πρέπει να σημειωθεί ότι για πολλά από τα είδη ευρύτερης εξάπλωσης, η Ελλάδα αποτελεί το δυτικότερο ή το νοτιότερο σημείο εξάπλωσης (Strid, 2016). Χαρακτηριστική έκφραση του χλωριδικού πλούτου αυτού αποτελεί η πρόσφατη δημοσίευση αναφορών εύρεσης στον ελλαδικό χώρο των ειδών *Dianthus aridus* και *Dianthus muglensis*, οι οποίοι μέχρι πρότινος είχαν θεωρηθεί ενδημικοί της Βουλγαρίας και της Τουρκίας αντίστοιχα (FoGW, 2022).

Στη πιο πρόσφατη έκδοση του Ερυθρού Βιβλίου Δεδομένων (Φοίτος *et al.*, 2009) 5 taxa του γένους καταγράφονται ως άμεσα κινδυνεύοντα με εξαφάνιση, εκ των οποίων τα 3 ενδημικά (*Dianthus juniperinus* subsp. *kanusikus*, *Dianthus haematocalyx* subsp. *phitosianus* και *Dianthus xylorrhizus*) και τα 2 περιορισμένης εξάπλωσης (*Dianthus arpadianus* και *Dianthus ingoldbyi*). Ο μεγαλύτερος κίνδυνος για τα taxa αυτά φαίνεται να είναι το πολύ μικρό μέγεθος των πληθυσμών τους, ενώ άλλες απειλές αποτελούν η καταστροφή του ενδιαιτήματός τους από ανθρωπογενείς παρεμβάσεις και η βόσκηση (Φοίτος *et al.*, 2009). Σε μία πρόσφατη αξιολόγηση του κινδύνου εξαφάνισης των ελληνικών ενδημικών taxa αγγειόσπερμων φυτών βάσει της μείωσης εξάπλωσης των πληθυσμών και της σπανιότητάς τους, διαπιστώθηκε πως από τα 35 ενδημικά taxa του γένους *Dianthus*, τα 33 χαρακτηρίζονται τουλάχιστον τρωτά (VU) βάσει των κριτηρίων του IUCN, με 11 να αξιολογούνται ως κρίσιμως κινδυνεύοντα (CR) με άμεση εξαφάνιση (Kougioumtzis *et al.*, 2021).



Εικόνα 3. Ελληνικά ενδημικά taxa του γένους *Dianthus*: *Dianthus fruticosus* subsp. *fruticosus* (α), *Dianthus xylorrhizus* (β), *Dianthus haematocalyx* subsp. *phitosianus* (γ), *Dianthus biflorus* (δ).

1.2.3 Χρήσεις του γένους *Dianthus*

1.2.3.1 Παραγωγή δρεπτών ανθέων

Η πιο οικονομική σημαντική χρήση των ειδών του γένους *Dianthus* αποτελεί η εμπορική καλλιέργειά σε μεγάλη κλίμακα για ανθοκομική χρήση, με σαφώς σημαντικότερη τη χρήση ποικιλιών του *Dianthus caryophyllus* ως δρεπτά άνθη. Λόγω της μακρόχρονης καλλιέργειας και βελτίωσής του για τη χρήση του αυτή, η ακριβής γεωγραφική προέλευση και οι μορφολογικοί χαρακτήρες της αρχικής, άγριας μορφής του είδους δεν είναι γνωστές. Οι πρώτες σαφείς αναφορές για τη χρήση του είδους ως καλλωπιστικό προέρχονται από τη μεσαιωνική Ευρώπη (Αγγλία, Γαλλία), με τα αρχικά φυτά πιθανώς να μεταφέρονται από την Ισπανία, τη βόρεια Αφρική και τη Μέση Ανατολή. Ήδη το 1442, ο δούκας της Λωρραίνης René d'Anjou φέρεται να αποτελεί από τους πρώτους βελτιωτές του είδους, με τις ποικιλίες του να διαδίδονται στην αναγεννησιακή Ευρώπη μέσω των βασιλικών κήπων. Στην Αγγλία, η καλλιέργεια του είδους από τη βασιλική αυλή ανάγεται στα μέσα του 14^{ου} αιώνα, με πλήθος διαφορετικών μορφών, χρωμάτων και σχημάτων ανθέων να καταγράφονται σε βιβλία κηπουρικής της Ελισαβετιανής περιόδου. Αργότερα, με την έλευση της μαζικής δημοτικότητας των δρεπτών γαρύφαλλων κατά τα μέσα του 18^{ου} αιώνα, όλο και περισσότεροι βελτιωτές σε όλη την Ευρώπη σταδιακά παράγουν φυτά με βελτιωμένα χαρακτηριστικά όπως μεγαλύτερα άνθη και πολλαπλές ανθοφορίες, εκτοπίζοντας πολλές από τις παλαιότερες ποικιλίες (Ingwersen, 1949; Montagu, 1955).

Τον επόμενο αιώνα, το γαρύφαλλο αποτελεί πλέον περιζήτητο δρεπτό άνθος, οδηγώντας στις πρώτες εντατικού τύπου θερμοκηπιακές καλλιέργειές του για να καλύψουν την ολοένα και αυξανόμενη ζήτηση, με πολυάριθμα κέντρα παραγωγής να εμφανίζονται στην Ευρώπη και την Αμερική. Το 1938, η παρουσίαση της βελτιωμένης ποικιλίας standard «Sim» από τον Αμερικανό υβριδιστή William Sim θα φέρει επανάσταση στο χώρο των επαγγελματιών ανθοπαραγωγών, καθώς η υψηλή ποιότητα των ανθέων και η ευκολία της καλλιέργειάς της θα τη καταστήσει τη πιο δημοφιλή ποικιλία γαρύφαλλου για 50 έτη και μητρικό υλικό για πολυάριθμες νέες ποικιλίες (Way, 2016). Τις επόμενες δεκαετίες, πολυάριθμοι βελτιωτές, σε συνεργασία με μεγάλες θερμοκηπιακές καλλιέργειες του είδους στη δυτική Μεσόγειο (Γαλλία, Ιταλία, Ισπανία) παρουσίασαν ένα νέο τύπο standard ποικιλιών, τις

επονομαζόμενες «Μεσογειακές», με αυξημένη ανθεκτικότητα στη φουζαρίωση και μειωμένη τάση για διαχωρισμό του κάλυκα. Από τη δεκαετία του '70 και έπειτα αρχίζουν να εμφανίζονται νέοι τύποι ποικιλιών με πολυάριθμα άνθη σε κάθε στέλεχος, οι οποίες σήμερα κατηγοριοποιούνται σε τρεις κύριες ομάδες ποικιλιών, τις «spray», «mignon» και «dianthini», με τη πρώτη να παραμένει η σημαντικότερη από τις 3 στη διεθνή παραγωγή δρεπτού γαρύφαλλου. Παράλληλα εμφανίζονται και οι πρώτες εμπορικές καλλιέργειες άλλων ειδών του γένους με σκοπό παραγωγής δρεπτών ανθέων, με σημαντικότερα είδη τα *Dianthus barbatus* και *Dianthus chinensis* (Faust & Dole, 2021).

Σήμερα, ο *Dianthus caryophyllus* παραμένει εδώ και δεκαετίες η δεύτερη πιο εκτεταμένη ανθοκομική καλλιέργεια για τη παραγωγή δρεπτών ανθέων, με τα κύρια κέντρα της παραγωγής να έχουν μεταφερθεί εκτός Ευρώπης και Βόρειας Αμερικής, με τα σημαντικότερα από αυτά να εντοπίζονται στην Ινδία, τη Κένυα, τον Ισημερινό και τη Κολομβία, ενώ σημαντική είναι και η παραγωγή στη Τουρκία και στο Μεξικό. Στην Ευρώπη, οι κύριες παραγωγικές χώρες είναι η Ιταλία, η Γαλλία, η Ισπανία και η Ολλανδία, χωρίς ωστόσο να καλύπτουν τη ζήτηση, με τα δρεπτά γαρύφαλλα να αποτελούν το 20% επί του συνόλου των εισαγόμενων δρεπτών ανθέων, ποσοστό μικρότερο μόνο από αυτό των τριανταφύλλων (EUROSTAT, 2020). Στην Ελλάδα η εντατική καλλιέργειά του γαρύφαλλου για τη παραγωγή δρεπτών ανθέων αρχίζει κατά τα τέλη της δεκαετίας του '50. Σήμερα αποτελούν τη σημαντικότερη ανθοκομική καλλιέργεια της χώρας, καλύπτοντας συνολική επιφάνεια μεγαλύτερη των 150 εκταρίων. Το 60% των καλλιεργούμενων εκτάσεων αφορά θερμοκηπιακές καλλιέργειες, ενώ το μεγαλύτερο ύψος της παραγωγής προέρχεται από τη Κρήτη. Στις θερμότερες περιοχές της χώρας τα θερμοκήπια συνήθως είναι μη θερμαινόμενα, ενώ στις βορειότερες χρησιμοποιούνται θερμαινόμενα υαλόφρακτα θερμοκήπια. Σε ορισμένες περιοχές η καλλιέργεια πραγματοποιείται σε συνθήκες υπαίθρου, στις οποίες απαραίτητη είναι η προστασία από τον άνεμο και η σκίαση από τον ισχυρό καλοκαιρινό ήλιο (Abeliotis *et al.*, 2016).

Η συνεχής ζήτηση για νέες ποικιλίες γαρύφαλλου με βελτιωμένα ή/και καινοτόμα μορφολογικά χαρακτηριστικά, αυξημένη απόδοση, ανθεκτικότητα σε ασθένειες και μεγαλύτερη διάρκεια ζωής στο βάζο έχουν οδηγήσει σε αναρίθμητα εγχειρήματα βελτίωσης με κλασικές και καινοτόμες μεθόδους. Από τις πρώτες, αναφέρονται η αξιοποίηση της σωματοκλωνικής παραλλακτικότητας με την επιλογή τυχαίων μεταλλαγμένων οφθαλμών (sports), καθώς και η ενδοειδική διασταύρωση

μεταξύ κλώνων με επιθυμητά χαρακτηριστικά, μέθοδοι με ευρεία χρήση για δεκαετίες. Από τη δεκαετία του '70 και ύστερα, νέες μέθοδοι όπως η χρήση μεταλλαξιγόνων ενώσεων και ακτινοβολιών οδήγησαν στην ανάπτυξη έντονου ερευνητικού ενδιαφέροντος γύρω από την επαγωγή τυχαίων μεταλλάξεων σε σπόρους ή βλαστικά όργανα. Πιο πρόσφατα, η απλοποίηση διεργασιών παραγωγής γενετικών τροποποιήσεων και γενετικής χαρτογράφησης οδήγησαν σε σημεία-ορόσημα όπως τα πρώτα γενετικά τροποποιημένα γαρύφαλλα με μπλε-μωβ χρώμα και το πλήρες γονιδίωμα του *Dianthus caryophyllus* (Way, 2016). Μερικοί από τους στόχους των σύγχρονων προγραμμάτων βελτίωσης του γένους αποτελούν η παραγωγή φυτών με ιδιαίτερα χαρακτηριστικά ανθέων όπως ασυνήθιστοι χρωματισμοί (μπλε, πράσινο, σκούρο ιώδες, μεταλλικές αποχρώσεις) και έντονο, πλούσιο άρωμα, η αύξηση της ανθεκτικότητας σε μυκητολογικές προσβολές και δυσμενείς περιβαλλοντικές συνθήκες, καθώς και η αύξηση του χρονικού διαστήματος όπου τα κομμένα άνθη διατηρούν αποδεκτή εμφάνιση (Ozanaki & Yagi, 2020).

Μετά τη συγκομιδή τους, τα κομμένα άνθη *Dianthus caryophyllus* αποθηκεύονται σε θαλάμους ψύξης αφού τυποποιηθούν και δεματοποιηθούν με διάτρητα λεπτά φύλλα πλαστικού (ξηρή αποθήκευση), διατηρούμενα για 20 έως 30 μέρες σε θερμοκρασίες 0 έως 5 °C (Salunkhe *et al.*, 1990). Τα άνθη των περισσότερων ποικιλιών είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στο αιθυλένιο, παρουσία του οποίου η γήρανσή τους επιταχύνεται σημαντικά, με αποτέλεσμα την ποιοτική υποβάθμιση του προϊόντος και την αύξηση των απωλειών. Πέρα από την επίδραση του γονοτύπου, η μετασυλλεκτική συμπεριφορά του γαρύφαλλου επηρεάζεται από καλλιεργητικές πρακτικές όπως η θρέψη και οι περιβαλλοντικές συνθήκες, καθώς και από τους χειρισμούς αμέσως μετά τη κοπή. Πολυάριθμες ενώσεις έχουν χρησιμοποιηθεί για την αύξηση της διάρκειας ζωής των ανθέων με την αποτελεσματική μείωση της βιοσύνθεσης ή/και της δράσης του αιθυλενίου, με σημαντικότερες τις ATA, 8-HQS, NBD, 1-MCP, αιθανόλη/μεθανόλη και σακχαρόζη σε υψηλή συγκέντρωση (Ebrahimzadeh *et al.*, 2008). Τέλος, αναφέρεται ότι τα τελευταία χρόνια αυξημένο ενδιαφέρον παρουσιάζεται για τη διερεύνηση και διάθεση μεταποιημένων και συντηρημένων ανθέων γαρύφαλλου.



Εικόνα 4: Θερμοκηπιακή καλλιέργεια *Dianthus caryophyllus* για τη παραγωγή δρεπτών ανθέων στην Κολομβία.

Πηγή: Revista Colombiana de Ciencias Horticolas



Εικόνα 5. Παραγωγή νέων ποικιλιών *Dianthus caryophyllus* διαφοροποιημένων ως προς το σχήμα ή το χρώμα με της χρήσης τεχνικής βελτίωσης μέσω μετάλλαξης (mutation breeding) με τη βοήθεια δέσμης ιόντων.

Πηγή: Onozaki *et al.* (2020)

1.2.3.2 Αξιοποίηση στον κήπο και το τοπίο

Το γένος *Dianthus* περιλαμβάνει πολυάριθμα είδη και ποικιλίες που αξιοποιούνται σε ένα μεγάλο εύρος καλλωπιστικών φυτεύσεων σε όλο τον κόσμο. Ορισμένα από αυτά, λόγω του μικρού τους μεγέθους και των ιδιαίτερα θεαματικών ανθέων τους, αποτελούν ιδιαίτερα δημοφιλή γλαστρικά φυτά, φυτευόμενα συχνά σε γλάστρες, ζαρντινιέρες, ή σε πυκνές ομαδικές φυτεύσεις σε παρτέρια ή πρασιές. Στην ομάδα αυτή περιλαμβάνονται τα ευρέως διαδεδομένα, βραχύβια είδη *Dianthus barbatus* (κοιν. «γαρύφαλλο των ποιητών») και *Dianthus chinensis* (κοιν. «κινέζικο γαρύφαλλο»), τα οποία διακρίνονται για την εξαιρετικά πλούσια ανθοφορία τους και τους αναρίθμητους χρωματικούς συνδυασμούς στους οποίους είναι πλέον διαθέσιμα (Armitage, 2003). Στη κατηγορία αυτή ανήκουν και οι πολυάριθμες ποικιλίες του *Dianthus plumarius*, γνωστές ως «γαρύφαλλα μινιαρντίζ», καθώς και ένα μεγάλο μέρος των σύγχρονων ποικιλιών *Dianthus caryophyllus*, ιδιαίτερα αυτές με πιο συμπαγή ανάπτυξη, πολυετή είδη με αρωματικά άνθη σε ένα μεγάλο εύρος χρωμάτων και σχημάτων (Clausen & Christopher, 2014). Το μεγαλύτερο μέρος των ειδών αξιοποιείται σε εξειδικευμένες θέσεις στο κήπο όπως οι βραχόκηποι και οι χαλκόκηποι, οι οποίες μιμούνται σε μεγάλο βαθμό τις συνθήκες στις οποίες αναπτύσσονται στο φυσικό τους περιβάλλον. Ανάμεσα σε ένα τεράστιο όγκο από διαθέσιμα είδη και ποικιλίες, ο οποίος συνεχώς εμπλουτίζεται, ανάμεσα στα πιο δημοφιλή είδη της κατηγορίας αυτής είναι οι *Dianthus deltoides*, *Dianthus gratianopolitanus* και *Dianthus superbis*, είδη με εντυπωσιακή και παρατεταμένη ανθοφορία και έντονα αρωματικά άνθη. Άλλα είδη είναι πλέον ιδιαίτερα δημοφιλή σε μεικτές πολυετείς φυτεύσεις όπως μπορντούρες, ξεχωρίζοντας για την αρχιτεκτονική δομή τους και την ικανότητά τους να αναπτύσσονται σε ξηρές θέσεις. Τέτοια είδη αποτελούν οι *Dianthus carthusianorum*, *Dianthus pinifolius* και *Dianthus giganteus*, των οποίων τα άνθη φέρονται σε πυκνές κεφαλοειδείς ταξιανθίες επάκρια όρθιων ανθικών στελεχών (Brickell, 2019).

Όσον αφορά τις καλλιεργητικές τους απαιτήσεις, τα περισσότερα μέλη του γένους αποτελούν ποώδη πολυετή φυτά που ευδοκιμούν σε ένα μεγάλο εύρος εδαφικών και κλιματικών συνθηκών. Τα περισσότερα από αυτά, ιδιαίτερα τα είδη που προέρχονται από αλπικές, μεσογειακές ή ημιάνυδρες περιοχές, προτιμούν πολύ καλά στραγγιζόμενα εδάφη και προσήλιες θέσεις, προσαρμοζόμενα εξαιρετικά σε φτωχά, ξηρά πετρώδη ή αμμώδη εδάφη, ενώ οι καλλιεργούμενες ποικιλίες των ευρέως

διαδεδομένων ειδών αναπτύσσονται καλύτερα σε πλούσια, καλά στραγγιζόμενα εδάφη με μέτριο περιεχόμενο υγρασίας. Πρόκειται συνήθως για φυτά ανθεκτικά σε ξηρασία και παγετό, ενώ τα περισσότερα είδη προτιμούν εδάφη με ουδέτερο ή αλκαλικό pH (Clausen & Christopher, 2014). Ορισμένα είδη και ποικιλίες είναι ευαίσθητα στη προσβολή από το μύκητα *Uromyces dianthi* (σκωρίαση), η οποία εκδηλώνεται με την εμφάνιση φλυκταίνων στο χρώμα της σκουριάς στο κάτω μέρος των φύλλων. Άλλες σημαντικές για το γένος ασθένειες προκαλούνται από τους μύκητες *Alternaria dianthi* (ετεροσπορίαση), *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*, *Fusarium gramineum* και *Fusarium avenaceum* (φουζαρίωση) και *Botrytis cinerea* (βοτρυτής), καθώς και από τα βακτήρια *Burkholderia caryophylli* (βακτηριακή μάρανση) και *Erwinia chrysanthemi* (βακτηριακή καθήλωση) (Horst, 2013). Σημαντικότεροι ζωικοί εχθροί αποτελούν οι αφίδες και οι θρίπες, μυζητικά ημίπτερα τα οποία προκαλούν κιτρινίσμα, κηλίδωση και παραμόρφωση των φύλλων και των ανθέων.

Ειδικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι αναφορές για χρήση ειδών του γένους σε φυτεμένα δώματα και πράσινες στέγες. Οι Krawczyk *et al.* (2017), οι οποίοι μελέτησαν την επίδραση του υποστρώματος στην ανάπτυξη και τη θρέψη 3 ξηροθερμικών ειδών σε εκτατικές πράσινες στέγες, έδειξαν ότι το είδος *Dianthus carthusianorum* είναι κατάλληλο για τη φύτευσή του σε αυτές. Η ανάπτυξη και η θρέψη του δεν επηρεάστηκε από το είδος του υποστρώματος, ενώ παρατηρήθηκε σημαντική βελτίωση της οπτικής αξιολόγησής του 1 έτος μετά την εγκατάστασή του. Οι Franzaring *et al.* (2016), οι οποίοι μελέτησαν την ανάπτυξη και τη βιοκλιματική επίδραση 5 ειδών κατά την ανάπτυξή τους σε εκτατική πράσινη στέγη, κατέγραψαν χαμηλά επίπεδα φυτοκάλυψης, καθώς και περιορισμένη κατακράτηση ύδατος και μείωση της θερμοκρασίας του υποστρώματος, όταν ο *Dianthus carthusianorum* φυτεύθηκε ως μονοκαλλιέργεια. Αντίθετα, η παραγωγικότητα και το περιεχόμενο νερό της φυτομάζας μεγιστοποιήθηκε κατά τη συγκαλλιέργειά του με τα *Phedimus floriferus* και *Lotus corniculatus*, ενώ παρατηρήθηκε σημαντική θετική ανταπόκριση μετά το κόψιμο και εξαιρετικά μεγάλος αριθμός σποροφύτων, υποδεικνύοντας την αξία του είδους ως μέρος μεικτών ξηροφυτικών φυτεύσεων. Τέλος, ένα εξαιρετικά ενδιαφέρον είδος για τις περιοχές με μεσογειακό κλίμα αποτελεί το ελληνικό ενδημικό *Dianthus fruticosus* subsp. *fruticosus*, το οποίο αναπτύσσεται με μεγάλη επιτυχία σε εκτατικά φυτοδώματα με υποστρώματα με ή χωρίς χόμα, ενώ αντέχει στις ξηροθερμικές συνθήκες του καλοκαιριού με χορήγηση άρδευσης ισοδύναμης του

15% της εξατμισοδιαπνοής. Ο σημαντικότερος παράγοντας που επηρεάζει την ανάπτυξή του είναι το βάθος του υποστρώματος, καθώς τα φυτά που φυτεύθηκαν σε βάθος 15 cm παρουσίασαν μεγαλύτερη ανάπτυξη και ξηρό βάρος φύλλων, ενώ η χρήση υποστρώματος με χώμα και η αυξημένη άρδευση είχαν θετική επίδραση κατά την εγκατάσταση και τη τελική περίοδο της θερμοξηρικής περιόδου αντίστοιχα (Nektarios *et al.*, 2011).

Χάρη στην υψηλή προσαρμοστικότητά τους και την ιδιαίτερη φυσιολογία τους, ορισμένα είδη μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τη φύτευση και αποκατάσταση υποβαθμισμένων περιοχών όπως πρώην λατομεία. Οι Zalecka & Wierzbicka (2002), συγκρίνοντας δύο οικότυπους του *Dianthus carthusianorum* που αναπτύσσονταν παρουσία ή απουσία βαρέων μετάλλων (ψευδάργυρος και μόλυβδος), έδειξαν ότι ο πρώτος οικότυπος παρουσίαζε σημαντικές μορφολογικές και φυσιολογικές διαφορές, οι οποίες ήταν κληρονομήσιμες στις επόμενες γενιές και συνδέονταν με τη προσαρμογή του στις πιο ξηροθερμικές συνθήκες και τις υψηλές συγκεντρώσεις βαρέων μετάλλων του ενδιαιτημάτος του. Σύμφωνα με τους Muszyńska & Hanus-Fajerska (2017), η χρήση τέτοιων μεταλλόφιλων οικότυπων είναι κατάλληλη για τη φυτοεξυγίανση υποβαθμισμένων εδαφών, δηλαδή την οικολογικά και οικονομικά αποδεκτή απομάκρυνση ή δέσμευση ρύπων όπως βαρέα μέταλλα με τη στρατηγική φύτευση κατάλληλων ειδών. Με τον τρόπο αυτή, η βιοδιαθεσιμότητά τους μειώνεται σημαντικά, ενώ περιορίζεται η περαιτέρω επιμόλυνση με τη μείωση φαινομένων υδατικής και αιολικής διάβρωσης. Οι Yang *et al.* (2017) ανέδειξαν τη δυνατότητα καλλιέργειας του *Dianthus superbis* σε επιβαρυμένα με μόλυβδο εδάφη, με μεγιστοποίηση της δέσμευσης του μολύβδου κατά τη προσθήκη χηλικών ενώσεων. Την ίδια στιγμή, ο εμβολιασμός των φυτών με μυκόρριζες περιόρισε σημαντικά το περιεχόμενο των φυτών σε μόλυβδο, καθιστώντας τα κατάλληλα για χρήση τους στην παραδοσιακή κινέζικη ιατρική, προσφέροντας δυνατότητα περαιτέρω αξιοποίησης της καλλιέργειας μετά το πέρας της φυτοεξυγίανσης. Τέλος, στενοενδημικά taxa προερχόμενα από οφιολιθικά εδάφη όπως οι *Dianthus haematocalyx* subsp. *phitosianus* (Ελλάδα) και *Dianthus marizii* (Πορτογαλία) χάρη στην ικανότητά τους να υπερσυσσωρεύουν μέταλλα όπως το νικέλιο πιθανώς μπορούν να χρησιμοποιηθούν για εγχειρήματα φυτοεξυγίανσης και φυτεξόρυξης (Konstantinidis, 1997; Majeti & Freitas, 1999).



Εικόνα 6. Παρτέρι με πολύχρωμες νάνες ποικιλίες του *Dianthus barbatus*, γνωστό και ως «γαρύφαλλο των ποιητών».

Πηγή: iStockPhoto



Εικόνα 7. Φυτεμένο δώμα με μεικτή φύτευση πολυετών ειδών, εντός της οποίας κυριαρχεί το *Dianthus carthusianorum*.

Πηγή: Green Roof Plants

1.2.3.3 Φαρμακευτικές χρήσεις

Στην Κίνα τα αυτοφυή *Dianthus chinensis* και *Dianthus superbis* αποτελούν είδη που συμπεριλαμβάνονται στη παραδοσιακή κινέζικη ιατρική και φαρμακοποιία, με τα επίγεια μέρη τους (herba dianthi) να χορηγούνται κυρίως σε παθήσεις του ουροποιητικού συστήματος (ολιγουρία, αιματουρία, ουρολειμώξεις) και του δέρματος (έκζεμα). Τα άνθη του *Dianthus caryophyllus* χρησιμοποιούνται σε διάφορες παρασκευές ως αντισκωλικό, αντισηπτικό, ηρεμιστικό και τονωτικό, ενώ αντίστοιχα ο *Dianthus barbatus* ως στυπτικό και αντιβακτηριακό. Στην Ινδία και τη Τουρκία, το εκχύλισμα των φύλλων του *Dianthus anatolicus* χρησιμοποιείται για διάφορες δερματικές παθήσεις, ενώ στη Νότια Αφρική, οι ρίζες του *Dianthus basuticus* αποτελεί μέρος της παραδοσιακής ιατρικής ιθαγενών πληθυσμών όπως οι Basotho, με αιμοπαραγωγική και αιμοκαθαρτική δράση (Quattrocchi, 2012).

Πολυάριθμες φυτοχημικές αναλύσεις έχουν πραγματοποιηθεί στα βλαστητικά και αναπαραγωγικά όργανα πολλών μελών του γένους *Dianthus* λόγω του μεγάλου πλήθους δευτερογενών μεταβολιτών με ενδιαφέρουσες φαρμακολογικές ιδιότητες. Ανάμεσα στις ενώσεις που απομονώθηκαν συγκαταλέγονται τριτερπένια, φλαβονοειδή, αλκαλοειδή, σαπωνίνες, κυανογλυκοζίτες, κουμαρίνες, διανθραμίδια, εκδυστεροειδή και κυκλικά πεπτίδια γνωστά ως διανθίνες (dianthins).

Ο *Dianthus superbis*, λόγω της εκτεταμένης χρήσης του από τη παραδοσιακή κινέζικη ιατρική (“qumai”), αποτελεί το πιο εκτενώς μελετημένο είδος για το φυτοχημικό περιεχόμενο και τις φαρμακευτικές ιδιότητές του. Ανάμεσα σε ένα μεγάλο εύρος άλλων ενώσεων, τα επίγεια μέρη του περιέχουν φλαβονοειδή, φαινολικά οξέα, κουμαρίνες, αλκαλοειδή, τριτερπενοειδείς σαπωνίνες, κυκλικά πεπτίδια και αμίδια, ενώ το αιθέριο έλαιο των ανθέων του αποτελείται κυρίως από μονοτερπένια και σεσκιτερπένια (Liu *et al.*, 2022). Βρέθηκε ότι τα μεθανολικά και αιθερικά εκχυλίσματα του φυτού παρουσιάζουν αντιοξειδωτική και αντικαρκινική δράση, οι οποίες αποδίδονται σε περιεχόμενες σε αυτά ενώσεις όπως οι τριτερπενικές σαπωνίνες, κυκλικά πεπτίδια και φλαβονοειδή (Yu *et al.*, 2007). Από το είδος αυτό έχουν απομονωθεί γλυκοζίτες φλαβονολών όπως οι Q3G και Q7G με εξειδικευμένη και ισχυρή αντική δράση στον ιό της ανθρώπινης γρίπης (Nile *et al.*, 2019). Αναφέρεται επίσης πως εκχυλίσματα του φυτού παρουσιάζουν αντιφλεγμονώδεις (Shin *et al.*, 2012) και διουρητικές (Xu *et al.*, 2015) ιδιότητες, ενώ η χορήγηση της ένωσης methyl 3,4-dihydroxybenzoate σε αρουραίους, η οποία απομονώθηκε από

καρπούς του φυτού, είχε εμμηνορυθμιστική δράση (Wang *et al.*, 2000). Το μεθανολικό εκχύλισμα ξηρών επίγειων μερών του φυτού βελτίωσε σημαντικά τη λειτουργία της μνήμης όταν χορηγήθηκε σε ποντίκια, ένδειξη ότι το φυτό θα μπορούσε να διερευνηθεί για την ύπαρξη ενώσεων κατάλληλων για την πρόληψη ή τη θεραπεία του Alzheimer (Weon *et al.*, 2016). Αιθανολικά και υδατικά εκχυλίσματα του φυτού έχουν αντιμικροβιακή δράση *in vitro* σε παθογόνα βακτήρια, ενώ χάρη στο περιεχόμενό τους σε φαινολικές ενώσεις όλα τα μέρη του φυτού εμφανίζουν έντονη αντιοξειδωτική δράση (Yun *et al.*, 2019). Η κατανάλωσή του θα πρέπει να αποφεύγεται από εγκύους, καθώς σε υψηλές δόσεις (> 15 g/Kg) έχει εκτροπική δράση, ενώ στις ίδιες δόσεις η κατανάλωσή του εμφανίζει πιθανή νεφροτοξικότητα (Liu *et al.*, 2022).

Ο *Dianthus caryophyllus* αποτελεί το πιο εκτενώς μελετημένο είδος για το φυτοχημικό περιεχόμενο και τις φαρμακευτικές ιδιότητές του. Έχει βρεθεί ότι περιέχει φλαβονοειδή και άλλες φαινολικές ενώσεις, αλκαλοειδή, σαπωνίνες, κυανογλυκοζίτες, διανθραμίδια και κυκλικά πεπτίδια, καθώς και άλλες βιοενεργές πρωτεΐνες (El-Snafi, 2017). Ιδιαίτερο ερευνητικό ενδιαφέρον παρουσιάζουν οι ενώσεις τριγλυκοζίτης της καεμπερόλης και των διανθινών, οι οποίες παρουσίασαν ισχυρή και εξειδικευμένη αντικαρκινική δράση όταν χορηγήθηκαν *in vitro* σε καλλιέργεια καρκινικών κύτταρων του ανθρώπινου εντέρου (Martineti *et al.*, 2010; Von Mallingrodt *et al.*, 2014 ; Fuchs, 2019). Τόσο το εκχύλισμα βλαστών και σπόρων του φυτού όσο και αρκετά ένζυμα (διανθίνες) που απομονώθηκαν από αυτά έχουν εκτεταμένη αντιική δράση, αναστέλλοντας την αναπαραγωγή και την εξάπλωση ιών όπως ο HSV-1 κατά τα πρώτα στάδια τους (Barakat *et al.*, 2010). Λόγω του υψηλού περιεχομένου σε φλαβονοειδή και άλλες φαινολικές ενώσεις, όλα τα μέρη του φυτού παρουσιάζουν αντιοξειδωτική και νεφροπροστατευτική δράση. Το αιθέριο έλαιο που απομονώθηκε από τα άνθη είχε έντονη αντιμικροβιακή και αντιμυκητιακή δράση για πλήθος παθογόνων μικροοργανισμών, κυρίως λόγω του περιεχομένου του σε ευγενόλη (El-Snafi, 2017).

Πολυάριθμα άλλα είδη του γένους έχουν διερευνηθεί για τις πιθανές φαρμακολογικές τους χρήσεις. Ο *Dianthus carmelitarum* περιέχει φαινολικές ενώσεις όπως συριγγαλδεΰδη και χλωρογενικό οξύ με αντιοξειδωτική και αντιμικροβιακή δράση (Aliyazicioglu *et al.*, 2017), ενώ η εκχύλιση των επίγειων μερών του με DMSO αποδίδει εκχύλισμα με εξειδικευμένη αντικαρκινική δράση *in vitro* (Turan *et al.*, 2019). Από το *Dianthus erinaceus* var. *erinaceus* απομονώθηκαν 8

τριτερπενοειδείς σαπωνίνες με αντιμικροβιακή δράση έναντι βακτηρίων και ζυμών (Mutlu *et al.*, 2016). Ο *Dianthus basuticus* βρέθηκε να περιέχει τριτερπενοειδείς σαπωνίνες, ταννίνες, αλκαλοειδή και γλυκοζίτες, ενώ τα μεθανολικά και αιθανολικά εκχυλίσματά του είχαν αντιμικροβιακή και αντικαρκινική δράση (Lamula *et al.*, 2014). Ο *Dianthus orientalis* περιέχει πολυάριθμες φαινολικές ενώσεις όπως βανιλλικό οξύ, κουμαρικό οξύ, γενιστεΐνη, ολευρωπαΐνη, οι οποίες εμφανίζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση (Atiyah & Kadmun, 2021). Από το *Dianthus elegans* var. *elegans* απομονώθηκαν σαπωνίνες (dianosides) με ανοσοτροποποιητική δράση (Mulu *et al.*, 2018), ενώ το *Dianthus helena* απέδωσε εκδυστεροειδή που εμφάνισαν νοοτροπική δράση, αυξάνοντας τη κινητική δραστηριότητα και την εξερευνητική συμπεριφορά των αρουραίων στους οποίους χορηγήθηκαν (Yusupova *et al.*, 2020).



Εικόνα 8. (α) Ξηρά επίγεια μέρη *Dianthus superbus* για φαρμακευτική χρήση, γνωστά ως “herba dianthi” ή “qumai” (瞿麦). (β) Η χημική δομή των ενώσεων dianthin C και dianthin E, κυκλικά πεπτιδία με ενδιαφέρουσα βιολογική δράση που απομονώθηκαν αρχικά από φυτά του γένους *Dianthus*

Πηγές: Sohu.com (α), PubChem (β)

1.2.4 Πολλαπλασιασμός του γένους *Dianthus*

1.2.4.1 Εγγενής πολλαπλασιασμός – Οικοφυσιολογία βλάστησης

Ο εγγενής πολλαπλασιασμός αποτελεί το κύριο μηχανισμό αναπαραγωγής όλων των ειδών του γένους *Dianthus*, με τα φυτά να αναπαράγονται στο φυσικό τους περιβάλλον με σπόρο. Είδη προερχόμενα από ορεινές και αλπικές περιοχές όπως οι *D. monspessulanus*, *D. seguierii* και *D. sylvestris*, αλλά και ψαμμοφυτικά είδη όπως ο *D. morrisianus* σχηματίζουν εφήμερες εδαφικές τράπεζες σπόρων (Cerabolini *et al.*, 2003, Cogoni *et al.*, 2012), με όλους τους σπόρους να βλαστάνουν εντός του πρώτου έτους από τη διασπορά τους, ενώ είδη από στεπικές περιοχές όπως ο *D. pontaderae* σχηματίζουν βραχυβίως παραμένουσες εδαφικές τράπεζες σπόρων, με τη βλάστησή τους έως και 4 χρόνια μετά τη διασπορά τους (Csontos *et al.*, 2016).

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία, τα περισσότερα είδη του γένους *Dianthus* χαρακτηρίζονται από την απουσία ληθάργου, καθώς καθίστανται ικανά να βλαστήσουν σε ένα εύρος θερμοκρασιών χωρίς κάποια προμεταχείριση. Ο Deno (1993), μελετώντας τη βλάστηση 20 ειδών του γένους σε θερμοκρασίες 5 και 20 °C, διαπίστωσε πως όλα τα είδη μπορούσαν να βλαστήσουν σε ποσοστά μεγαλύτερα του 70% και στις 2 θερμοκρασίες. Η χρήση τετράμηνης ψυχρής στρωμάτωσης ως προμεταχείριση κατά τη μελέτη της οικοφυσιολογίας βλάστησης των *D. gratianopolitanus*, *D. deltoides*, *D. carthusianorum*, *D. arenarius* δεν αύξησε τα τελικά ποσοστά βλαστικότητας και τη ταχύτητα βλάστησης σε κανένα από τα είδη αυτά (Kołodziejek *et al.*, 2018). Ελληνικά ενδημικά είδη όπως ο *Dianthus fruticosus*, *Dianthus xylorrhizus* και *Dianthus tymphresteus* επίσης χαρακτηρίζονται από απουσία πρωτογενούς φυσιολογικού ληθάργου (Stragas & Papafotiou, 2009; Φουρναράκη, 2010; Skourti *et al.*, 2019). Ορισμένα είδη όπως ο *Dianthus superbus*, κυρίως προερχόμενα από βόρειες εύκρατες, αλπικές και στεπικές περιοχές, χαρακτηρίζονται από τη παρουσία αβαθούς φυσιολογικού ληθάργου, ο οποίος αίρεται με ψυχρή στρωμάτωση (Nikolaeva, 1985).

Η επίδραση της θερμοκρασίας είναι ιδιαίτερα σημαντική για την οικοφυσιολογία της αναπαραγωγής των φυτών, καθώς μπορεί να αποτρέψει τη βλάστηση σε χωρικές ή/και χρονικές περιστάσεις με ακατάλληλες περιβαλλοντικές συνθήκες (π.χ. θερμοξηρικές συνθήκες του καλοκαιριού στα Μεσογειακά οικοσυστήματα) ή να την επιταχύνει όταν αυτές είναι βέλτιστες για την επιβίωση των νεαρών φυτών (Baskin & Baskin, 2014). Ο Deno (1993) αναφέρει ότι και στα 20 είδη του γένους *Dianthus* παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στη ταχύτητα βλάστησης μεταξύ των δύο διαφορετικών θερμοκρασιών, με τα περισσότερα είδη να χρειάζονται λιγότερο από 2 βδομάδες για να ολοκληρώσουν τη βλάστησή τους στους 20 °C και έως 5 βδομάδες στους 4 °C. Σε πειράματα όπου μελετήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας, της φωτοπερίοδου, της ξηρής αποθήκευσης και της ψυχρής στρωμάτωσης σε 4 είδη του γένους *Dianthus* (*D. gratianopolitanus*, *D. deltoides*, *D. carthusianorum*, *D. arenarius*), η θερμοκρασία ήταν ο σημαντικότερος παράγοντας που επηρέασε το ποσοστό της τελικής βλαστικότητας και τη ταχύτητα βλάστησης, με όλα τα είδη να βλαστάνουν σε υψηλότερα ποσοστά (76-98%) σε εναλλασσόμενη θερμοκρασία 25/15 °C (Kołodziejek *et al.*, 2018).

Από τις 3 θερμοκρασίες που εξετάστηκαν κατά την *in vitro* βλάστηση του ελληνικού ενδημικού *Dianthus fruticosus* subsp. *fruticosus*, το υψηλότερο ποσοστό βλαστικότητας παρατηρήθηκε στους 15 °C (96%), ενώ στις δύο υψηλότερες θερμοκρασίες των 20 και 25 °C τα ποσοστά ήταν σημαντικά χαμηλότερα (46% και 13% αντίστοιχα) (Stragas & Papafotiou, 2009). Αντίστοιχα, στο απειλούμενο, ενδημικό της Ιταλίας *Dianthus morrisianus* τα υψηλότερα ποσοστά βλάστησης σημειώθηκαν στους 15 °C (95-100%) ενώ τα χαμηλότερα στους 25 °C (27-49%), ενώ η μέγιστη ταχύτητα βλάστησης ($T_{50} = 4-5$ d) καταγράφηκε στους 15 °C (Cogoni *et al.*, 2012). Η βλάστηση των σπόρων του Κρητικού στενοενδημικού *Dianthus xylorrhizus* προωθείται από τις χαμηλές θερμοκρασίες και αναστέλλεται από τις υψηλές, με τη βέλτιστη βλαστικότητα (100%) και το μέγιστο τάχος βλάστησης ($T_{50} = 2,6$ d) να παρατηρείται στους 10 °C (Φουρναράκη, 2010). Αντίθετα, το μέγιστο ποσοστό βλαστικότητας (100%) και τάχος βλάστησης ($T_{50} = 1$ d) του ελληνικού ενδημικού *Dianthus tymphrysteus* σημειώθηκε στους 20 °C, με τις υψηλότερες θερμοκρασίες να προωθούν τη βλάστηση των σπόρων του είδους (Skourti *et al.*, 2019).

Σε ορισμένα είδη του γένους, η επίδραση της θερμοκρασίας είναι λιγότερο σημαντική. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί ο ενδημικός της κεντρικής Μεσογείου *Dianthus rupicola*, σπόροι από 5 πληθυσμούς και 3 υποείδη του οποίου βλάστησαν *in vitro* σε πολύ υψηλά ποσοστά (87-99%) και στις 4 θερμοκρασίες που εξετάστηκαν (10, 15, 20 και 25 °C), ενώ το τάχος βλάστησης ήταν χαμηλότερο στις δύο χαμηλότερες θερμοκρασίες (Lantieri *et al.*, 2012).

Όταν σπόροι του *Dianthus armeria* τοποθετήθηκαν προς βλάστηση σε θερμοκρασία 20 °C και φωτοπερίοδο 16/8 h, το 100% βλάστησε εντός 3 ημερών, με μόλις 1% να βλαστάνει στην ίδια θερμοκρασία υπό συνθήκες σκότους. Ίδια αποτελέσματα λήφθηκαν με τη χρήση φρέσκου και αποθηκευμένου στους 5 ή 20 °C για 6 μήνες σπόρου, ενώ η πρότερη έκθεση σε διαφορετικές θερμοκρασίες υπό συνθήκες σκότους δεν επηρέασε τη βλαστικότητα (Deno, 1993). Κατά τη βλάστηση των *D. gratianopolitanus*, *D. deltoides*, *D. carthusianorum* και *D. arenarius* παρατηρήθηκε σημαντική θετική επίδραση της παρουσίας φωτός σε αλληλεπίδραση με τη θερμοκρασία κατά τη βλάστηση και το είδος προέλευσης των σπόρων (Kołodziejek *et al.*, 2018). Στο *Dianthus xylorrhizus* το λευκό φως αναστέλλει σημαντικά τη βλάστηση των σπόρων σε όλες τις θερμοκρασίες πλην των 15 °C, όπου παρατηρείται μόνο καθυστέρηση της φύτευσης (Φουρναράκη, 2010). Αντίθετα, το λευκό φως προωθεί σημαντικά τη βλάστηση του *Dianthus tymphrysteus* σε όλες τις θερμοκρασίες, με τα ποσοστά τελικής βλαστικότητας σε συνθήκες σκότους να είναι υποδιπλάσια (Skourti *et al.*, 2019). Η βλάστηση του *Dianthus morrisianus* δεν επηρεάστηκε σημαντικά από την φωτοπερίοδο (Cogoni *et al.*, 2012).

Η ξηρή αποθήκευση σπόρων του *Dianthus morisianus* σε χαμηλές θερμοκρασίες για 1 ή 3 έτη οδήγησε σε αυξημένα ποσοστά βλαστικότητας σε όλες τις θερμοκρασίες βλάστησης που εξετάστηκαν σε σχέση με φρέσκους σπόρους του είδους, ιδίως στις ακραίες θερμοκρασίες των 5 και 25 °C (Cogoni *et al.*, 2012). Η χρήση εννιάμηνης ξηρής αποθήκευσης ως προμεταχείριση κατά τη μελέτη της οικοφυσιολογίας βλάστησης των *D. gratianopolitanus*, *D. deltoides*, *D. carthusianorum*, *D. arenarius* δεν αύξησε τα τελικά ποσοστά βλαστικότητας και τη ταχύτητα βλάστησης σε κανένα από τα είδη αυτά (Kołodziejek *et al.*, 2018). Στο *Dianthus rupicola* η ξηρά αποθήκευση για 4 μήνες δεν επηρέασε τα ποσοστά βλαστικότητας, ενώ μικρή μείωση παρατηρήθηκε στους 12 μήνες (Strumia *et al.*, 2020). Η ξηρή αποθήκευση των σπόρων του *Dianthus xylorrhizus* στους -20 °C για 3,5 μήνες δεν επηρέασε το τελικό ποσοστό βλάστησης και το τάχος βλάστησης,

επομένως χαρακτηρίζονται από ορθόδοξη συμπεριφορά αποθήκευσης (Φουρναράκη, 2010). Κατά τη ψυχρή αποθήκευση σπόρων του *Dianthus superbis* για διάστημα ενός έτους ($\theta = 3-4\text{ }^{\circ}\text{C}$), η βλαστικότητα των σπόρων που αποθηκεύτηκαν σε ξηρές συνθήκες (57%) ήταν σημαντικά χαμηλότερη από αυτή των σπόρων που αποθηκεύτηκαν σε υγρές συνθήκες (100%). Η ξηρή αποθήκευση του ίδιου είδους σε θερμοκρασία δωματίου ($20\text{ }^{\circ}\text{C}$) έδωσε ακόμα μικρότερο ποσοστό βλαστικότητας (44%) (Liu *et al.*, 2011).

Το pH επηρέασε σημαντικά τα τελικά ποσοστά βλαστικότητας των *D. deltoides*, *D. carthusianorum*, *D. gratianopolitanus* και *D. arenarius*. Για το πρώτο, η υψηλότερη βλαστικότητα καταγράφηκε σε pH 5, για το δεύτερο σε pH 6, ενώ για τα υπόλοιπα η βέλτιστη τιμή pH ήταν 7. Για όλα τα είδη τα χαμηλότερα ποσοστά βλαστικότητας καταγράφηκαν στις δύο ακραίες τιμές, pH 4 και pH 9 (Kołodziejek *et al.*, 2018).

Το βάθος φύτευσης ήταν ιδιαίτερα σημαντικό για τη βλάστηση και την επιβίωση των σποροφύτων του *Dianthus morisianus*, με το βέλτιστο εύρος να εντοπίζεται μεταξύ 1 και 2 cm. Όταν οι σπόροι φυτεύονταν σε μεγαλύτερο βάθος, ένα σημαντικό ποσοστό των βλαστάνοντων σπόρων δεν αναδυόταν στην επιφάνεια, ένα μικρότερο απονεκρωνόταν, ενώ ορισμένοι σπόροι παράμεναν σε ληθαργική κατάσταση (Cogoni *et al.*, 2012). Για τα *D. gratianopolitanus*, *D. deltoides*, *D. carthusianorum* και *D. arenarius*, το βάθος φύτευσης επηρέασε σημαντικά τα τελικά ποσοστά αναδυόμενων σποροφύτων, με τις μέγιστες τιμές να καταγράφονται σε βάθος 0 cm, ενώ κανένα σπορόφυτο δεν εμφανίστηκε σε βάθη μεγαλύτερα των 4 cm, χωρίς να παρατηρούνται διαφορές μεταξύ των ειδών (Kołodziejek *et al.*, 2018).

Η βλάστηση των *D. gratianopolitanus*, *D. deltoides*, *D. carthusianorum*, *D. arenarius* παρεμποδίστηκε σημαντικά σε ωσμωτικές πιέσεις μεγαλύτερες των $-0,2\text{ MPa}$, ενώ κανένα από τα 4 είδη δε μπόρεσε να βλαστήσει σε ωσμωτική πίεση ίση ή μεγαλύτερη του 1 MPa (Kołodziejek *et al.*, 2018). Η αύξηση της αλατότητας κατά τη βλάστηση των σπόρων του *Dianthus rupicola* σε διαλύματα θαλασσόνερου συνδέθηκε με τη μείωση των τελικών ποσοστών βλαστικότητας, με το είδος να επιδεικνύει υψηλά ποσοστά ανάκαμψης (65-80%) όταν οι σπόροι του μεταφέρθηκαν σε διάλυμα απεσταγμένου νερού (Strumia *et al.*, 2020).

1.2.4.2 Αγενής πολλαπλασιασμός

Ήδη από το 18^ο αιώνα, το αυξανόμενο ενδιαφέρον για το γένος *Dianthus* και η ανάγκη κλωνικής αναπαραγωγής επιλεγμένων ποικιλιών τα επιθυμητά χαρακτηριστικά των οποίων δε μπορούσαν να μεταφερθούν στις επόμενες γενιές ώθησε την ολοένα και πιο εντατική αναπαραγωγή τους με κάθε γνωστή κατάλληλη και αποτελεσματική μέθοδο αγενούς πολλαπλασιασμού. Ανάμεσα σε αυτές, η πιο διαδεδομένη είναι η λήψη μοσχευμάτων βλαστού με τρία έως τέσσερα ζεύγη φύλλων κατά την αρχή του καλοκαιριού, ιδιαίτερα για τα πιο συμπαγή είδη και ποικιλίες. Η επίταση με ορμόνη ριζοβολίας για ποώδη είδη είναι βοηθητική, με τα μοσχεύματα να ριζοβολούν σε δύο έως τέσσερις εβδομάδες στους 15 °C, δίνοντας νέα φυτά που θα ανθίσουν για την επόμενη χρονιά. Για τα είδη και τις ποικιλίες με επιμήκεις, ευλύγιστους βλαστούς λειτουργική είναι και η χρήση καταβολάδων, οι οποίες επιλέγονται από ισχυρούς, μη ανθοφόρους βλαστούς και προετοιμάζονται με απομάκρυνση των κατώτερων φύλλων, τραυματισμό του βλαστού και κάλυψή του με υπόστρωμα, ριζοβολώντας εντός 8 εβδομάδων. Ορισμένα αλπικά είδη με θυσανωτή, ταπητοειδή ανάπτυξη και ριζοβολούντες έρποντες βλαστούς μπορούν να διαιρεθούν μετά την άνθιση, με τα νέα φυτά να ανθίζουν τον επόμενο χρόνο. Οι παραδοσιακές μέθοδοι αγενούς πολλαπλασιασμού δεν είναι αποδοτικές για όλα τα είδη του γένους *Dianthus*, ιδιαίτερα για αυτά με ξυλώδη, βραχυγονάτια ανάπτυξη και όσα εκπτώσσουν περιορισμένο αριθμών βλαστών (Toogood, 2019; Hartmann *et al.*, 2014).

Δεδομένης της σύνθετης υβριδικής ή/και χιμαιρικής φύσης των περισσότερων καλλωπιστικών ποικιλιών του ευρέως διαδεδομένου και καλλιεργούμενου *Dianthus caryophyllus*, η βελτιστοποίηση και η εντατικοποίηση των μεθόδων αγενούς πολλαπλασιασμού με ικανότητα παραγωγής μεγάλου αριθμού ομοιόμορφων και υγιών φυτών καθίσταται απαραίτητο προαπαιτούμενο (Sheela, 2008). Στις σύγχρονες ανθοκομικές επιχειρήσεις, επιλεγμένες ποικιλίες *D. caryophyllus* πολλαπλασιάζονται με ποώδη μοσχεύματα κορυφής που φέρουν τέσσερα έως έξι ζεύγη πλήρως αναπτυγμένων φύλλων, συλλεγόμενα ανά τακτά χρονικά διαστήματα από επίλεκτα μητρικά φυτά διατηρούμενα στις βέλτιστες περιβαλλοντικές και καλλιεργητικές συνθήκες (Agulló-Antón *et al.*, 2014; Garrido *et al.*, 2002). Η εμφάνιση των πρώτων καταβολών ριζών αρχίζει τη πέμπτη ημέρα από τη τοποθέτησή τους στο ριζωτήριο, όμως η έκπτυξή τους χρειάζεται 2 έως 4 εβδομάδες, ανάλογα με τις περιβαλλοντικές συνθήκες (Hartmann *et al.*, 2014).

Η θρέψη των μητρικών φυτών είναι ιδιαίτερα σημαντική για το ύψος της παραγωγής και τη ποιότητα των μοσχευμάτων, με κάθε γονότυπο να έχει διαφορετικές απαιτήσεις σε N, P και K (Momin *et al.*, 2014). Η ταχεία έκπτυξη και ανάπτυξη των τυχαίων ριζών στα μοσχεύματα είναι ιδιαίτερα σημαντική, καθώς η μορφολογία του νέου ριζικού συστήματος επηρεάζει σημαντικά το υδατικό περιεχόμενο, την βλαστητική ανάπτυξη και την ανθεκτικότητα σε καταπονήσεις των προκύπτοντων φυτών (Justamente *et al.*, 2019). Η χρήση συμπληρωματικού φωτισμού, ιδιαίτερα όταν προέρχεται από λαμπτήρες αλογόνου, έχει θετική επίδραση στα μορφολογικά χαρακτηριστικά του νέου ριζικού συστήματος και των παραγόμενων βλαστών στα νέα φυτά, η οποία οφείλεται στη τροποποίηση της φωτοσυνθετικής λειτουργίας και φυσιολογίας των μοσχευμάτων (Wang *et al.*, 2020). Η χρήση υποστρωμάτων με διαφορετική φυσικοχημική σύσταση μπορεί να επηρεάσει σημαντικά το ποσοστό ριζοβολίας και τα χαρακτηριστικά του νέου ριζικού συστήματος. Για το *D. caryophyllus*, το υπόστρωμα με τη βέλτιστη αντίδραση ριζοβολίας αποτελείται από cocopeat και περλίτη σε αναλογία 1:1 (Zheng *et al.*, 2020).

Όπως και σε όλα τα καλλωπιστικά φυτά που αναπαράγονται με μοσχεύματα, ο σχηματισμός τυχαίων ριζών στη βάση των μοσχευμάτων επηρεάζεται από περίπλοκες αλληλεπιδράσεις μεταξύ των περιβαλλοντικών συνθηκών και ενδογενών παραγόντων (Garrido *et al.*, 2002; Guerrero *et al.*, 1999), με μεγάλο βαθμό της παρατηρούμενης παραλλακτικότητας ως προς την αντίδραση ριζοβολίας να οφείλεται στην επίδραση του γονότυπου (Birlanga *et al.*, 2015). Η παρουσία πλήρως ανεπτυγμένων φύλλων στα μοσχεύματα είναι απαραίτητη για την επιτυχή τους ριζοβολία, καθώς η απομάκρυνσή τους καθυστερεί σημαντικά την έκπτυξη τυχαίων ριζών στη βάση του βλαστού. Το φαινόμενο αυτό πιθανώς συνδέεται με τη σύνθεση ενδογενών αυξινών σε αυτά (Acosta *et al.*, 2009). Ιδιαίτερα σημαντικός παράγοντας ενδογενούς παραλλακτικότητας ως προς τη ριζοβολία των μοσχευμάτων αποτελεί η φυσιολογία και η ρύθμιση της μεταφοράς των ενδογενών αυξινών δια μέσω του βλαστού, με πλήθος ερευνών να επιχειρεί να χαρτογραφήσει τη γονιδιακή και μεταβολομική διάσταση του φαινομένου (Oliveros-Venezuela *et al.*, 2008; Cano *et al.*, 2018, Sanchez-Garcia *et al.*, 2018). Άλλος ένας σημαντικός παράγοντας που επηρεάζει τη συμπεριφορά των μοσχευμάτων αποτελεί η εποχικότητα, η οποία εκφράζεται ως η επίδραση της ενδογενούς ισορροπίας μεταξύ κυτοκινινών και αυξινών κατά το χρόνο συλλογής των μοσχευμάτων, καθώς και της κατάστασης της

φυσιολογίας των μητρικών φυτών κατά τη συλλογή και των μοσχευμάτων κατά τη ριζοβολία (Villanova *et al.*, 2016). Η θέση προέλευσης των μοσχευμάτων στο βλαστό του μητρικού φυτού επηρεάζει σημαντικά την αντίδραση ριζοβολίας και τα χαρακτηριστικά του εκπυσσόμενου ριζικού συστήματος, με τα μοσχεύματα κορυφής να ριζώνουν σε μεγαλύτερο ποσοστό και να εκπύσσουν περισσότερες ρίζες με μεγαλύτερο μήκος, νωπό και ξηρό βάρος σε σχέση με τα μοσχεύματα βάσης (Kumar *et al.*, 2014).

Η εξωγενής προσθήκη αυξινών όπως το IBA και το NAA σε χαμηλά επίπεδα προωθεί τη ριζοβολία των μοσχευμάτων του *Dianthus caryophyllus* (Garrido *et al.*, 1998). Το NAA φαίνεται να είναι πιο αποτελεσματικό στην προώθηση πρωιμότερης και εντονότερης ριζοβολίας, με τη βέλτιστη αντίδραση και τα καλύτερα ποιοτικά χαρακτηριστικά του νέου ριζικού συστήματος (αριθμός ριζών, μήκος ριζών, νωπό και ξηρό βάρος ριζών) να καταγράφονται με την εμβάπτιση των μοσχευμάτων σε 500 ppm NAA για 10 λεπτά (Kumar *et al.*, 2014). Όταν χρησιμοποιείται συνδυασμός IBA και NAA σε διάλυμα εμβάπτισης, τα καλύτερα αποτελέσματα καταγράφονται με τη χρήση 1000 mg L⁻¹ IBA και 100 mg L⁻¹ NAA (Zheng *et al.*, 2020).

Κατά τη συνήθη πρακτική των σύγχρονων φυτοπαραγωγικών επιχειρήσεων, τα μοσχεύματα συχνά θα πρέπει να αποθηκευτούν σε συνθήκες ψύχους για αρκετές εβδομάδες προκειμένου η παραγωγή να συγχρονιστεί με τη ζήτηση της αγοράς. Η διάρκεια αυτής της περιόδου αποθήκευσης επηρεάζει την αντίδραση ριζοβολίας ανεξαρτήτως του γονοτύπου, πιθανόν λόγω αλλαγών στα επίπεδα ή/και την ευαισθησία των ενδογενών αυξινών κατά τη ψυχρή αποθήκευση (Agulló-Antón *et al.*, 2011; Garrido *et al.*, 1996). Εξαιτίας της βασιπέταλης κυκλοφορίας των αυξινών, τα επίπεδα του ενδογενούς IAA αυξάνονται παροδικά στο βλαστό ύστερα από την αποκοπή των μοσχευμάτων από το μητρικό φυτό (Agulló-Antón *et al.*, 2014; Garrido *et al.*, 2002), ενώ τα επίπεδα της ενδογενούς *trans*-ζεατίνης είναι αρχικά χαμηλά στη βάση των μοσχευμάτων, αυξανόμενα σταθερά κατά τη διάρκεια της ψυχρής αποθήκευσης (Agulló-Antón *et al.*, 2014). Μετά από το στάδιο αυτό, τα επίπεδα των ενδογενών αυξινών σταδιακά μειώνονται λόγω αποικοδόμησης, με τις παρατεταμένες περιόδους αποθήκευσης των μοσχευμάτων να συνεπάγονται μειωμένους ρυθμούς παραγωγής και ανάπτυξης ριζών (Garrido *et al.*, 1996).

1.2.5 *In vitro* πολλαπλασιασμός στο γένος *Dianthus*

Λόγω της ιδιαίτερης μεγάλης σημασίας του *Dianthus caryophyllus* στη σύγχρονη ανθοκομία και των διαρκώς αυξανόμενων αναγκών ταχύρρυθμης και αξιόπιστης παραγωγής ομοιόμορφου και υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού, ήδη από τα τέλη της δεκαετίας του '70 άρχισε να εμφανίζεται μεγάλος αριθμός μελετών σχετικών με τον *in vitro* πολλαπλασιασμό ή άλλες βιοτεχνολογικές μεθόδους αναπαραγωγής του είδους (Nontaswatsri & Fukai, 2008). Αργότερα, ολοένα και μεγαλύτερο ενδιαφέρον απέκτησε η διερεύνηση του *in vitro* πολλαπλασιασμού και άλλων ειδών υψηλής καλλωπιστικής αξίας, όπως ο *Dianthus chinensis* (Sreelekshmi *et al.*, 2020), ενώ η διάδοσή τους σε συνδυασμό με την αυξανόμενη ζήτηση για νέα ανθοκομικά προϊόντα οδήγησε στη χρήση τους για τη δημιουργία νέων ποικιλιών (Onozaki & Yagi, 2020). Πρόσφατα οι τεχνικές *in vitro* πολλαπλασιασμού έχουν αξιοποιηθεί για τον πολλαπλασιασμό και διατήρηση ενός μεγάλου αριθμού σπάνιων, απειλούμενων ή περιορισμένης εξάπλωσης ειδών του γένους (Markovic *et al.*, 2013).

1.2.5.1 Μικροπολλαπλασιασμός του *D. caryophyllus*

Πολυάριθμες τεχνικές μικροπολλαπλασιασμού, όπως οργανογένεση, καλογένεση, σωματική εμβρυογένεση, κυτταροκαλλιέργεια και καλλιέργεια εκφύτων κόμβων και κορυφών έχουν διερευνηθεί για το *Dianthus caryophyllus*. Από αυτές, η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη είναι η *in vitro* άμεση (direct) οργανογένεση τυχαίων βλαστών από διαφόρων τύπων έκφυτα όπως φύλλα, τμήματα βλαστών και οφθαλμούς, η καλλιέργεια κόμβων ή κορυφών και η εμβρυογένεση, καθώς είναι δυνατή η παραλαβή μεγάλου αριθμού ομοιόμορφων φυταρίων από μικρή ποσότητα αρχικού πολλαπλασιαστικού υλικού (da Silva, 2014; Thu *et al.*, 2020). Άλλες μέθοδοι όπως η κυτταροκαλλιέργεια και η επαγωγή, καλλιέργεια και διαφοροποίηση κάλλου από διαφόρων τύπων έκφυτα συχνά οδηγούν σε φυτά με διαφορετική μορφολογία λόγω σωματοκλωνικής παραλλακτικότητας και επομένως αξιοποιούνται κυρίως σε προγράμματα βελτίωσης ή παραγωγής νέων ποικιλιών (Thakur & Kanwar, 2017).

Σημαντικές διαφορές στην επίδραση των φυτορμονών και των καλλιεργητικών συνθηκών καταγράφονται στην άμεση και έμμεση οργανογένεση *in vitro* μεταξύ των διαφορετικών τύπων εκφύτων και των διαφορετικών ποικιλιών του

D. caryophyllus, με το τελευταίο φαινόμενο να οφείλεται στη μεγάλη φαινοτυπική και γονοτυπική ποικιλότητα εντός του είδους. Οι Frey & Janick (1991), ερευνώντας τη *de novo* παραγωγή βλαστών από διάφορους τύπων εκφύτων (πέταλα, κάλυκες, κόμβους, μεσοκόμβιους βλαστούς, φύλλα) τριών ποικιλιών *D. caryophyllus*, διαπίστωσαν ότι η έκπτυξη βλαστών ήταν δυνατή και στις τρεις ποικιλίες μόνο όταν ως αρχικό υλικό χρησιμοποιούνταν πέταλα, κάλυκες ή κόμβοι. Τα καλύτερα αποτελέσματα έδωσε η εγκατάσταση πετάλων σε υπόστρωμα MS με 0,5 μM TDZ και 0,5 μM NAA, με τους βλαστούς να εκπτύσσονται από τη βάση των πετάλων, ενώ παρατηρήθηκε η εμφάνιση σωματοκλωνικών παραλλαγών με εμφανώς διαφοροποιημένη φαινολογία σε ποσοστό 3,3%.

Οι Nugent *et al.* (1991) διερεύνησαν επίσης την οργανογένεση από πέταλα και μεσοκόμβια τμήματα βλαστών διαφόρων ποικιλιών *Dianthus caryophyllus*, διαπιστώνοντας διαφορές ως προς την αντίδραση μεταξύ αυτών. Η χρήση πετάλων και 0,5 mg L^{-1} TDZ έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα, ενώ η επίδραση της προσθήκης NAA ήταν διαφορετική ανάλογα με το είδος και τη συγκέντρωση της κυτοκίνης. Κατά τη χρήση τμημάτων βλαστών, καλύτερα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν όταν χρησιμοποιήθηκαν νεαρότερα τμήματα και 2 mg L^{-1} BA.

Οι Miller *et al.* (1991a) εξέτασαν την επίδραση της συγκέντρωσης BA και NAA στην έκπτυξη τυχαίων βλαστών από πέταλα ή τεμαχισμένους ανθικούς οφθαλμούς δύο ποικιλιών *D. caryophyllus*. Διαπιστώθηκε ότι και εδώ η επίδραση της ποικιλίας ήταν ισχυρή, ενώ τα καλύτερα αποτελέσματα έδωσε το υπόστρωμα που περιείχε 8 μM BA και 4 μM NAA, όμως παρατηρήθηκαν προβλήματα υπερενυδάτωσης (40%) και παραγωγής παραμορφωμένων, πεταλοειδών φύλλων, ανθέων ή ενδιάμεσων μορφών. Σε μετέπειτα πειράματα με έκφυτα φύλλων, βλαστών ή πλάγιων οφθαλμών από διάφορες ποικιλίες του είδους, διαπίστωσαν ότι η χρήση ζεατίνης με υψηλές συγκεντρώσεις NAA μείωνε σημαντικά το πρόβλημα της γήρανσης και νέκρωσης των εκφύτων φύλλων και βλαστών. Την ίδια στιγμή, πολύ καλύτερα αποτελέσματα δόθηκαν με τη χρήση πλάγιων οφθαλμών, όπου η βέλτιστη συγκέντρωση BA και NAA υπολογίστηκε σε 15 και 0,5 μM αντίστοιχα. Παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στον αριθμό παραγόμενων βλαστών μεταξύ των ποικιλιών, ενώ οι μικρότεροι οφθαλμοί παρήγαγαν περισσότερους βλαστούς (Miller *et al.*, 1991b). Διαπιστώθηκε ότι η χρήση 0,8% άγαρ ως στερεοποιητικού παράγοντα μείωνε την έκπτυξη υπερενυδατωμένων βλαστών σε αποδεκτά επίπεδα

(20%), όμως ο μεγαλύτερος αριθμός τυχαίων βλαστών αναπτυσσόταν σε 0,25% gelrite.

Κατά τη διερεύνηση της δυνατότητας *in vitro* οργανογένεσης από φύλλα διαφόρων ποικιλιών *D. caryophyllus*, διαπιστώθηκε ότι η ποικιλία προέλευσης του εκφύτου, η ηλικία του φύλλου και του φυτού και η σειρά συλλογής επηρεάζαν το ποσοστό και τον αριθμό τυχαίων βλαστών, με τα καλύτερα αποτελέσματα να δίνονται σε νεαρά φύλλα από νεαρά φυτά που συλλέχθηκαν μετά την απομάκρυνση του πρώτου φύλλου του ζεύγους. Όταν χρησιμοποιήθηκαν πέταλα ως πηγή εκφύτων, ο αριθμός αντιδρώντων εκφύτων ήταν μεγαλύτερος, αλλά λιγότερες ποικιλίες αντέδρασαν. Οι βέλτιστες συγκεντρώσεις φυτορμονών ήταν 0,9 mg L⁻¹ BA και 0,3 mg L⁻¹ NAA (Van Altvorst *et al.*, 1992). Σε μετέπειτα έρευνα διαπιστώθηκε πως η χρήση φύλλων *ex vitro* προέλευσης κομμένων στη μέση οδηγούσε σε μεγαλύτερο ποσοστό αντίδρασης και αριθμό παραγόμενων βλαστών (Van Altvorst *et al.*, 1994).

Οι Varshney *et al.* (2013) διερεύνησαν τη συνεργιστική επίδραση του BA, της ζεατίνης και του NAA κατά την *in vitro* βλαστογένεση από φύλλα *D. caryophyllus*. Το υψηλότερο ποσοστό αντίδρασης και ο μεγαλύτερος αριθμός βλαστών παρατηρήθηκε όταν χρησιμοποιήθηκαν 2,5 μM BA και 0,5 μM NAA στο υπόστρωμα καλλιέργειας, ενώ η χρήση KIN έδωσε χειρότερα αποτελέσματα. Κατά την *ex vitro* ριζοβολία και εγκλιματισμό, τα καλύτερα αποτελέσματα έδωσε η εμβάπτιση του κάτω άκρου των μικροβλαστών με 100 μM IBA για 30 min. Με αυτή τη μέθοδο δεν παρατηρήθηκαν πολυμορφίες στους εξεταζόμενους γενετικούς δείκτες. Παρατηρήθηκαν διακυμάνσεις των τεσσάρων αντιοξειδωτικών ενζύμων καθ' όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

Σε αντίστοιχα πειράματα όπου έγινε χρήση TDZ και IBA κατά την *in vitro* βλαστογένεση από φύλλα *D. caryophyllus*, κάθε ποικιλία αντέδρασε διαφορετικά, με τις βέλτιστες συγκεντρώσεις TDZ και IBA να διαφέρουν για κάθε μία από αυτές, όπως και τα μέγιστα ποσοστά αντίδρασης και ο μέγιστος αριθμός βλαστών, ο οποίος ήταν σχετικά χαμηλός σε σχέση με άλλα πρωτόκολλα. Διαπιστώθηκε ότι κατά τη διάρκεια της διαδικασίας διατηρήθηκε η κλωνική πιστότητα των ποικιλιών βάσει δεικτών DNA (Thu *et al.*, 2020).

Πιο πρόσφατα, ο da Silva (2014) διερεύνησε το συνδυασμό διάφορων κυτοκινινών με NAA σε διαφορετικές συγκεντρώσεις κατά τη βλαστογένεση από έκφυτα φύλλων, κόμβων, μεσοκόμβιων βλαστών και λεπτών τομών μεσοκόμβιων βλαστών για 15 ποικιλίες *D. caryophyllus*. Σε όλες τις ποικιλίες που εξετάστηκαν η

καλύτερη αντίδραση παρατηρήθηκε για τους κόμβους και τους βλαστούς, ιδίως όταν χρησιμοποιήθηκε 1 και 2 mg L⁻¹ TDZ αντίστοιχα με 0,5 mg L⁻¹ NAA.

Η χρήση κορυφαίων και πλάγιων οφθαλμών είναι ιδιαίτερα διαδεδομένη κατά τη μελέτη και την εμπορική αξιοποίηση του *in vitro* πολλαπλασιασμού του είδους. Οι Brar *et al.* (1995) διερεύνησαν την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων BA και TDZ σε υποστρώματα B5 στην οργανογένεση από έκφυτα πλάγιων οφθαλμών από δύο ποικιλίες *D. caryophyllus*. Οι βέλτιστες συγκεντρώσεις των φυτορμονών και για τις δύο ποικιλίες ήταν 15-20 mg L⁻¹ BA και 1 mg L⁻¹ TDZ, ενώ παρατηρήθηκε αύξηση της έντασης της καλογένεσης και μείωση του μέσου μήκους των βλαστών με την αύξηση της συγκέντρωσης των κυτοκινινών. Οι δύο ποικιλίες αντέδρασαν διαφορετικά, με τη μία να παράγει σημαντικά μεγαλύτερο αριθμό βλαστών. Το ποσοστό υαλωμένων βλαστών ήταν αρκετά χαμηλό (7%).

Οι Ali *et al.* (2008) διερεύνησαν την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων BA και KIN στη βλαστογένεση εκφύτων πλάγιων και κορυφαίων οφθαλμών *D. caryophyllus*, καθώς και την επίδραση διαφορετικών τύπων και συγκεντρώσεων αυξινών στην *in vitro* ριζοβολία μικροβλαστών. Κατά τη βλαστογένεση, ο μεγαλύτερος αριθμός βλαστών παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα με 1 mg L⁻¹ BA, ενώ η προσθήκη KIN έδωσε καλύτερα αποτελέσματα μόνο στη χαμηλότερη συγκέντρωση BA (1 mg L⁻¹). Κατά τη ριζοβολία, καλύτερα αποτελέσματα καταγράφηκαν όταν χρησιμοποιήθηκε 1 mg L⁻¹ NAA, μόνο του ή σε συνδυασμό με 1 mg L⁻¹ IBA.

Οι Khadazzi *et al.* (2011) διερεύνησαν επίσης την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων BA και KIN, σε συνδυασμό με 0,2 mg L⁻¹ NAA, στη βλαστογένεση εκφύτων κορυφαίων οφθαλμών, καθώς και την επίδραση διαφορετικών τύπων και συγκεντρώσεων αυξινών στην *in vitro* ριζοβολία μικροβλαστών για δύο ποικιλίες *D. caryophyllus*. Και για τις δύο ποικιλίες θετικότερη αντίδραση βλαστογένεσης παρατηρήθηκε για τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις BA (1 και 2 mg L⁻¹). Τα ποσοστά των υπερενυδατωμένων εκφύτων αυξήθηκαν σημαντικά στις υψηλότερες συγκεντρώσεις κυτοκινινών και ιδιαίτερα στο BA. Οι 2 ποικιλίες διαφοροποιήθηκαν σημαντικά κατά το στάδιο τη ριζοβολίας, με τα καλύτερα αποτελέσματα να καταγράφονται σε υποστρώματα που περιείχε 0,5 mg L⁻¹ NAA ή 1,5 mg L⁻¹ BA αντίστοιχα.

Οι Maitra *et al.* (2011) εξέτασαν την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων KIN και NAA, στη βλαστογένεση εκφύτων κορυφαίων οφθαλμών *D. caryophyllus*, καθώς και την επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων IBA σε συνδυασμό με 1 mg

L⁻¹ NAA στην *in vitro* ριζοβολία μικροβλαστών. Το μεγαλύτερο ποσοστό αντιδρώντων εκφύτων και παραγόμενων βλαστών καταγράφηκε για την υψηλότερη συγκέντρωση KIN (3,5 mg L⁻¹), ενώ η καλύτερη αντίδραση ριζογένεσης για την υψηλότερη συγκέντρωση IBA (4 mg L⁻¹).

Πέρα από την επίδραση του περιεχόμενου των υποστρωμάτων σε φυτορμόνες, ο τύπος καλλιέργειας (στερεή, υγρή, σε σχέδια) ήταν ιδιαίτερα σημαντικός κατά την έκπτυξη τυχαίων βλαστών από έκφυτα μεσοκόμβιων βλαστών του *D. caryophyllus*. Στη στερεή καλλιέργεια, ο μέγιστος αριθμός βλαστών παρατηρήθηκε στην υψηλότερη συγκέντρωση TDZ (4 mg L⁻¹) παρουσία 1 mg L⁻¹ NAA, ενώ στην υγρή σε χαμηλότερη συγκέντρωση (1 mg L⁻¹), πιθανώς λόγω ανεπαρκούς αερισμού/υποξίας. Τα υψηλότερα ποσοστά αντίδρασης και ο μεγαλύτερος αριθμός βλαστών καταγράφηκαν σε καλλιέργεια σχεδίας με 0,25 mg L⁻¹ TDZ και 0,25 mg L⁻¹ NAA. Οι βλαστοί νεαρότερης ηλικίας αντέδρασαν καλύτερα σε όλους τους χειρισμούς (Watad *et al.*, 1996).

Σε πολλές περιπτώσεις, η τροποποίηση του θρεπτικού μέσου, της πηγής άνθρακα ή η χρήση νέων φυτορμονών οδήγησε σε αύξηση της αντίδρασης και των παραγόμενων βλαστών. Οι Lukatkin *et al.* (2017) διερεύνησαν εναλλακτικές πηγές άνθρακα και φυτορμόνες σε διαφορετικές συγκεντρώσεις κατά τη βλαστογένεση από έκφυτα μεσοκόμβιων βλαστών *D. caryophyllus*. Διαπιστώθηκε πως τη θετικότερη αντίδραση έδινε η χρήση 3% φρουκτόζης, ενώ η χρήση εναλλακτικών φυτορμονών όπως το 24-epiBr (10⁻³ M) έδωσε αποτελέσματα αντίδρασης και βλαστογένεσης αντίστοιχα με αυτά συνδυασμού BA και IAA (8,9 και 2,9 μM) με σημαντικά μειωμένη υπερενυδάτωση. Η τροποποίηση της σύστασης του θρεπτικού μέσου (MS) κατά το μικροπολλαπλασιασμό κόμβων *D. caryophyllus* και *D. chinensis* οδήγησε σε αύξηση της αντίδρασης και του αριθμού των παραγόμενων βλαστών. 10πλάσια και πενταπλάσια συγκέντρωση CuSO₄ έδωσε το μέγιστο αριθμό βλαστών, αντίστοιχα, ενώ σημαντική αύξηση στην αντίδραση και τον αριθμό των βλαστών έδωσε η αύξηση της συγκέντρωσης του Co, του B, του Zn και του Mn (Kumawat *et al.*, 2013). Η ενσωμάτωση K₂SiO₃ ως πηγή πυριτίου στο υπόστρωμα καλλιέργειας σχετίζεται με την αύξηση της πυκνότητας των στοματίων, τη βελτιστοποίηση της φωτοσύνθεσης και την ενίσχυση των αντιοξειδωτικών ενζύμων, οδηγώντας σε αύξηση της αντίδρασης και της βλαστογένεσης (Mannivanan *et al.*, 2017).

Οι Jain *et al.* (2001) διερεύνησαν τη δυνατότητα *de novo* παραγωγής βλαστών από κάλο που προήλθε από έκφυτα φύλλων *D. caryophyllus*. Στο στάδιο της επαγωγής και καλλιέργειας κάλου, τα καλύτερα αποτελέσματα λήφθηκαν σε υπόστρωμα που περιείχε 1 mg L^{-1} BA και $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D. Στο στάδιο της διαφοροποίησης, τα καλύτερα αποτελέσματα λήφθηκαν όταν κάλος ηλικίας 8 ή 16 εβδομάδων μεταφέρθηκε σε MS άνευ φυτορμονών. Στο στάδιο του πολλαπλασιασμού, τα περισσότερα φυσιολογικά έκφυτα εκπύχθηκαν στα υποστρώματα που περιείχαν 1 mg L^{-1} GA₃ ή/και $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ bactoreptone, ενώ η παρουσία BA οδηγούσε στη παραγωγή υπερενυδατωμένων βλαστών.

Αντίστοιχα, οι Kanwar & Kumar (2009) εξέτασαν την επίδραση των φυτορμονών και του τύπου εκφύτου στη καλογένεση και οργανογένεση του *D. caryophyllus*. Στο στάδιο της επαγωγής και ανάπτυξης κάλου, τα καλύτερα αποτελέσματα λήφθηκαν σε υπόστρωμα που περιείχε 1 mg L^{-1} BA και 2 mg L^{-1} 2,4-D. Στο στάδιο διαφοροποίησης, τα καλύτερα αποτελέσματα λήφθηκαν σε υπόστρωμα με 2 mg L^{-1} TDZ και 1 mg L^{-1} IAA, ενώ διαφοροποίηση καταγράφηκε μόνο στους συνδυασμούς TDZ και ZEA με NAA και IAA. Σημαντικές διαφορές καταγράφηκαν μεταξύ των διαφορετικών τύπων εκφύτων, ιδίως στο στάδιο της επαγωγής κάλου, με τα φύλλα να αντιδρούν σε μεγαλύτερο ποσοστό.

Οι Qadri *et al.* (2018) διερεύνησαν την επίδραση των φυτορμονών, της ποικιλίας και του τύπου εκφύτου στη καλογένεση και οργανογένεση του *D. caryophyllus*. Στο στάδιο της επαγωγής και ανάπτυξης κάλου, τα καλύτερα αποτελέσματα λήφθηκαν σε υπόστρωμα που περιείχε 1 mg L^{-1} BA και 2 mg L^{-1} 2,4-D και στους δύο τύπους εκφύτων και από τις δύο ποικιλίες, με διαφορές στο μέσο χρόνο επαγωγής, το ποσοστό επαγωγής και το μέσο βάρος του κάλου. Σε αντίστοιχο πείραμα, οι Maurya *et al.* (2019) διαπίστωσαν ότι το στάδιο της επαγωγής και ανάπτυξης κάλου, τα καλύτερα αποτελέσματα λήφθηκαν σε υπόστρωμα που περιείχε $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ BA και $3,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D και στους δύο τύπους εκφύτων, με διαφορές στο μέσο χρόνο επαγωγής και το ποσοστό επαγωγής. Πιο πρόσφατα (Thakur & Kanwar, 2017), στο στάδιο της επαγωγής και ανάπτυξης κάλου, τα καλύτερα αποτελέσματα λήφθηκαν σε υπόστρωμα που περιείχε $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ NAA και 2 mg L^{-1} 2,4-D. Στο στάδιο διαφοροποίησης, τα καλύτερα αποτελέσματα λήφθηκαν σε υπόστρωμα με $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ TDZ, $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ NAA και $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ KIN. Κατά το στάδιο του πολλαπλασιασμού των μικροβλαστών ο μεγαλύτερος βαθμός πολλαπλασιασμού καταγράφηκε σε υπόστρωμα με 2 mg L^{-1} KIN και $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ NAA. Στο στάδιο της

ριζοβολίας, τα καλύτερα αποτελέσματα λήφθηκαν σε υπόστρωμα με $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ IBA και $0,02\%$ ενεργοποιημένο άνθρακα. Ο αριθμός και το μήκος των μικροβλαστών αυξήθηκε περαιτέρω με την υποκαλλιέργειά τους, με πτώση να παρατηρείται από τη πέμπτη υποκαλλιέργεια. Παρατηρήθηκαν γενετικές πολυμορφίες σε ποσοστό $12,8\%$ στα εγκλιματισμένα φυτά (ποσοστό εγκλιματισμού: 98%).

Οι Arif *et al.* (2014) μελέτησαν την επίδραση των φυτομονών, των περιβαλλοντικών συνθηκών και του τύπου εκφύτου στη καλογένεση και οργανογένεση του *D. caryophyllus*. Στο στάδιο της επαγωγής και ανάπτυξης κάλου, τα καλύτερα αποτελέσματα λήφθηκαν σε υπόστρωμα που περιείχε 3 mg L^{-1} 2,4-D. Στο στάδιο διαφοροποίησης, τα καλύτερα αποτελέσματα λήφθηκαν σε υπόστρωμα με 3 mg L^{-1} TDZ και 1 mg L^{-1} NAA. Το βέλτιστο διάστημα καλλιέργειας κάλου ήταν 8 εβδομάδες, ενώ η βέλτιστη θερμοκρασία καλλιέργειας ήταν 27°C . Η παρουσία φωτός ήταν απαραίτητη για την επαγωγή του κάλου. Σημαντικές διαφορές καταγράφηκαν μεταξύ των διαφορετικών τύπων εκφύτων, ιδίως κατά το στάδιο της διαφοροποίησης, με τον κάλλο φύλλων να εμφανίζει τα θετικότερα χαρακτηριστικά βλαστογένεσης.

Τέλος, οι Gutierrez-Micelli *et al.* (2010) διερεύνησαν τη βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης φυτομονών και AgNO_3 κατά τη *de novo* παραγωγή βλαστών από κάλο που προήλθε από μεριστώματα *D. caryophyllus*. Στο στάδιο της επαγωγής χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα που περιείχε $9 \mu\text{M}$ 2,4-D. Στο στάδιο της ανάπτυξης, το μέγιστο βάρος κάλου σημειώθηκε σε υπόστρωμα με $5 \mu\text{M}$ NAA. Στο στάδιο διαφοροποίησης, τα καλύτερα αποτελέσματα λήφθηκαν σε υπόστρωμα με $15,9 \mu\text{M}$ NAA, $47,08 \mu\text{M}$ AgNO_3 και $0,74 \mu\text{M}$ KIN. Τα χαμηλά ποσοστά υπερενυδατωμένων βλαστών που παρατηρήθηκαν συνδέθηκαν με τη χρήση AgNO_3 .

1.2.5.2 Μικροπολλαπλασιασμός άλλων ειδών του γένους *Dianthus*

Πέρα από το ευρέως μελετημένο *D. caryophyllus*, πολυάριθμα άλλα είδη του γένους έχουν διερευνηθεί για τη δυνατότητα ανάπτυξης αποδοτικών και αξιόπιστων πρωτοκόλλων *in vitro* πολλαπλασιασμού. Τα περισσότερα από αυτά είναι βαλκανικά ενδημικά, συχνά με ιδιαίτερα περιορισμένη εξάπλωση, τα οποία απειλούνται με τοπική ή ολική εξαφάνιση και ως εκ τούτου απαιτείται η ταχεία παραγωγή μεγάλου αριθμού φυτών με χαρακτηριστικά όμοια με τον αρχικό πληθυσμό. Στις περισσότερες περιπτώσεις, η πηγή εκφύτων είναι κόμβοι και κορυφές από βλαστούς σποροφύτων που αναπτύχθηκαν *in vitro*, ενώ οι μελέτες αφορούν κυρίως τη βελτιστοποίηση της σύνθεσης των υποστρωμάτων πολλαπλασιασμού και ριζοβολίας (Markovic *et al.*, 2013). Παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στην αντίδραση μεταξύ των διαφορετικών ειδών (Cristea *et al.*, 2006; Tiberia & Pamfil, 2011), ενώ σε πολλές περιπτώσεις καταγράφηκαν και ενδοπληθυσμιακές διαφορές όσον αφορά χαρακτηριστικά όπως η βλαστογένεση, η ριζοβολία και η μορφολογία των εγκλιματισμένων φυταρίων (Miclaus *et al.*, 2003; Jarda *et al.*, 2011; Cristea *et al.*, 2013).

Για το *Dianthus petraeus* subsp. *simonkainus*, το μέγιστο δυναμικό πολλαπλασιασμού (1,58-2,25) καταγράφηκε σε στερεό υπόστρωμα MS με 0,5 mg L⁻¹ BA και 0,05 mg L⁻¹ NAA. Η επίδραση του οικοτύπου ήταν σημαντική, καθώς διαφορετικοί πληθυσμοί είχαν μικρές διαφορές στην αντίδραση (Miclaus *et al.*, 2003).

Για το *Dianthus grationopolitanus*, ο μεγαλύτερος αριθμός βλαστών δόθηκε σε στερεό υπόστρωμα MS με 4,44 μM BA και 0,54 μM NAA, ενώ η καλύτερη ποιότητα βλαστών παρατηρήθηκε σε στερεό υπόστρωμα MS με 2,46 μM 2iP και 0,57 μM IAA. Αύξηση της συγκέντρωσης των κυτοκινινών οδήγησε στην αύξηση της υπερενυδάτωσης και την παραγωγή φυταρίων με αλλοιωμένα μορφολογικά χαρακτηριστικά. Ο μέγιστος αριθμός ριζών παρατηρήθηκε σε στερεό υπόστρωμα MS με 2,85 μM ή 5,7 μM IAA ή 2,46 μM IBA. Ανάμεσα στις 2 εξεταζόμενες ποικιλίες παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στη βλαστογένεση και τον αριθμό των βλαστών, καθώς και στο στάδιο της ριζοβολίας (Fraga & Alonso, 2004).

Για το *Dianthus pyrenaicus*, η χρήση BA και NAA σε συγκεντρώσεις 1 και 0,5 mg L⁻¹ αντίστοιχα κατά το στάδιο της βλαστογένεσης έδωσε μεγαλύτερο δυναμικό πολλαπλασιασμού από τη χρήση KIN και IAA. Στη ριζοβολία, ο μεγαλύτερος αριθμός ριζών καταγράφηκε σε υπόστρωμα MS με IAA ή με 0,1 mg L⁻¹ NAA (Marcu *et al.*, 2006).

Για το *Dianthus fruticosus*, οι μέγιστες τιμές ποσοστού βλαστογένεσης και αριθμού βλαστών στην εγκατάσταση εκφύτων κόμβου δόθηκαν με τη χρήση υποστρώματος MS που περιείχε 0,5 mg L⁻¹ 2iP και 0,1 mg L⁻¹ NAA, με αντίστοιχα υψηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού στα υποστρώματα με 0,1 ή 0,5 mg L⁻¹ BA και 0,1 mg L⁻¹ IBA, ενώ η χρήση του πρώτου υποστρώματος έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα και κατά την υποκαλλιέργεια. Βέλτιστο υπόστρωμα ριζοβολίας MS αποτέλεσε αυτό που περιείχε 2 mg L⁻¹ IBA (Stragas & Papafotiou, 2009).

Για το *Dianthus henteri*, η χρήση υποστρώματος MS με 1 mg L⁻¹ BA και 0,1 mg L⁻¹ NAA έδωσε το μεγαλύτερο δυναμικό πολλαπλασιασμού, ενώ ο μεγαλύτερος αριθμός ριζών καταγράφηκε σε υπόστρωμα MS που περιείχε 1 mg L⁻¹ NAA και 0,1 mg L⁻¹ BA (Cristea *et al.*, 2010).

Για το *Dianthus nardiformis*, η χρήση υποστρώματος MS παρουσία 1 mg L⁻¹ BA, 0,2 mg L⁻¹ NAA και 0,5 mg L⁻¹ GA₃ έδωσε το υψηλότερο ποσοστό βλαστογένεσης και το μεγαλύτερο αριθμό βλαστών, ενώ ο μεγαλύτερος αριθμός ριζών καταγράφηκε σε ½ MS με 0,01 mg L⁻¹ NAA (Holobiuc *et al.*, 2010).

Έκφυτα κόμβων του *Dianthus ciliatus* subsp. *dalmaticus* και *Dianthus giganteus* subsp. *croaticus* πολλαπλασιάστηκαν επιτυχώς σε MS με 1 mg L⁻¹ BA, 1 mg L⁻¹ NAA και 0,5 mg L⁻¹ IBA, με το πρώτο να αποδίδει πολύ μεγαλύτερο αριθμό βλαστών κατά τις επόμενες υποκαλλιέργειες, με αύξηση του δυναμικού πολλαπλασιασμού έως τη 4^η υποκαλλιέργεια. Διαφορές μεταξύ των δύο ειδών παρουσιάστηκαν και στη ριζοβολία, καθώς το δεύτερο έδωσε καλύτερα αποτελέσματα σε MS με 0,5 mg L⁻¹ IBA, ενώ το πρώτο σε MS χωρίς αυξίνη (Radojevic *et al.*, 2010).

Για το *Dianthus trifasciculatus* subsp. *parviflorus*, η καλύτερη αντίδραση ήταν σε MS με 1 mg L⁻¹ BA και 0,1 mg L⁻¹ NAA, ενώ η χρήση 2 mg L⁻¹ ZEA έδωσε να μεν μεγαλύτερο αριθμό βλαστών/έκφυτο, αλλά πολύ πιο έντονη υπερενυδάτωση. Το καλύτερο μέσο ριζοβολίας αποτέλεσε το υπόστρωμα MS υποδιπλασιασμένης δύναμης με 0,01 mg L⁻¹ IAA (Holobiuc *et al.*, 2013).

Για το *Dianthus petraeus* subsp. *orbelicus*, στερεά υποστρώματα MS που περιείχαν 0,5 έως 2 mg L⁻¹ TDZ σε συνδυασμό με 0,1 mg L⁻¹ NAA έδωσαν τα υψηλότερα ποσοστά αντίδρασης και το μεγαλύτερο αριθμό βλαστών. Διαφορετικοί πληθυσμοί είχαν διαφορές στην αντίδραση, με ισχυρή την επίδραση του οικότυπου. Η υπερενυδάτωση των βλαστών ξεπεράστηκε με μεταφορά τους σε στερεό υπόστρωμα MS δίχως φυτομόνες για χρονικό διάστημα 4 εβδομάδων (Tsoktouridis *et al.*, 2013).

Για το *Dianthus deltoides*, η καλύτερη αντίδραση ήταν σε MS με 0,1 mg L⁻¹ BA και 0,1 mg L⁻¹ NAA. Αύξηση του BA πάνω από 1 mg L⁻¹ αύξανε έντονα την υπερενυδάτωση και μείωνε τον αριθμό βλαστών/έκφυτο, καθώς και το μήκος τους. Διαφορές υπήρξαν και μεταξύ των εκφύτων κορυφής βλαστού και ενός κόμβου. Κατά τη ριζοβολία, υψηλός αριθμός ριζών καταγράφηκε σε όλες τις συγκεντρώσεις NAA και σε όλους τους τύπους των εκφύτων (Markovic *et al.*, 2013a).

Για το *Dianthus serotinus*, το είδος και το pH του υποστρώματος, το είδος του εκφύτου και το είδος και η συγκέντρωση της πηγής άνθρακα επηρέασαν σημαντικά το ποσοστό βλαστογένεσης, τον αριθμό βλαστών/έκφυτο και το μήκος. Τα καλύτερα αποτελέσματα καταγράφηκαν σε pH 5,8, MS και 3% σακχαρόζη, με τα έκφυτα κόμβου να τείνουν να αντιδρούν λιγότερο και να παράγουν λιγότερους βλαστούς. Η καλύτερη ριζοβολία παρατηρήθηκε σε υπόστρωμα MS υποδιπλασιασμένης δύναμης με 0,5 mg L⁻¹ NAA (Markovic *et al.*, 2013b).

Για το *Dianthus mainensis*, η καλύτερη αντίδραση βλαστογένεσης πραγματοποιήθηκε σε υπόστρωμα MS που περιείχε 3 μM BA, ενώ το μέγιστο ποσοστό ριζοβολίας (100%) σε υπόστρωμα MS υποδιπλασιασμένης δύναμης (Erst *et al.*, 2014).

Για το *Dianthus pinifolius*, το είδος του υποστρώματος, το είδος του εκφύτου και η συγκέντρωση BA και NAA επηρέασαν σημαντικά το ποσοστό βλαστογένεσης, τον αριθμό βλαστών/έκφυτο και το μήκος. Η καλύτερη αντίδραση βλαστογένεσης και το μεγαλύτερο μήκος βλαστών καταγράφηκαν σε MS με 0,1 mg L⁻¹ BA και 0,1 mg L⁻¹ NAA, ενώ ο μεγαλύτερος αριθμός βλαστών και κόμβων σε MS με 0,5 mg L⁻¹ BA και 0,1 mg L⁻¹ NAA, με τα έκφυτα κόμβου να τείνουν να παράγουν λιγότερους βλαστούς. Τα μεγαλύτερα ποσοστά ριζοβολίας καταγράφηκαν σε υπόστρωμα MS με 1 mg L⁻¹ NAA (Cristea *et al.*, 2016).

Για το *Dianthus carthusianorum*, το μεγαλύτερο δυναμικό πολλαπλασιασμού καταγράφηκε σε υπόστρωμα MS με 1 mg L^{-1} BA και $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ IAA, ενώ ο μεγαλύτερος ριζών σε υπόστρωμα WPM με $2,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP και $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ IAA. Συνολικά, τη καλύτερη ποιότητα έρριζων φυταρίων έδωσε η χρήση MS με 1 mg L^{-1} 2iP και $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ IAA. Ο μικροπολλαπλασιασμός επηρέασε σημαντικά τη μορφολογία και την άνθιση των εγκατεστημένων φυταρίων (Muszynska *et al.*, 2017).

Για το *Dianthus gigantiformis* subsp. *kladovianus*, το είδος του υποστρώματος, το είδος του εκφύτου και η συγκέντρωση BA και NAA επηρέασαν σημαντικά το ποσοστό βλαστογένεσης, τον αριθμό βλαστών ανά έκφυτο, τον αριθμό κόμβων και το μήκος. Η καλύτερη αντίδραση βλαστογένεσης, ο μεγαλύτερος αριθμός κόμβων και το μεγαλύτερο μήκος βλαστών καταγράφηκαν σε υπόστρωμα MS με $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ BA και $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA, ενώ ο μεγαλύτερος αριθμός βλαστών σε MS με $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ BA και $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA, με τα έκφυτα κόμβου να τείνουν να παράγουν λιγότερους βλαστούς. Τα υψηλότερα ποσοστά ριζοβολίας καταγράφηκαν σε υπόστρωμα υπόστρωμα MS υποδιπλασιασμένης δύναμης με $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ NAA (Markovic *et al.*, 2018).

1.2.5.3 Άλλες μέθοδοι *in vitro* πολλαπλασιασμού στο γένος *Dianthus*

Η σωματική εμβρυογένεση (somatic embryogenesis) είναι η διαδικασία εκείνη με την οποία σχηματίζονται εμβρυακές δομές πάνω στα καλλιεργούμενα έκφυτα χωρίς να έχει προηγηθεί καμία φάση γονιμοποίησης. Τα έμβρυα τα οποία δημιουργούνται ονομάζονται σωματικά ακριβώς επειδή προέρχονται από σωματικά κύτταρα (όπως π.χ. τα κύτταρα του φύλλου, του βλαστού ή της ρίζας) τα οποία δεν μπορούν να γονιμοποιηθούν (Κίντζιος, 2015). Λόγω της αξιοπιστίας και της υψηλής παραγωγικότητας της μεθόδου, έχει διερευνηθεί αρκετά για την αξιοποίησή της στον *in vitro* πολλαπλασιασμό καλλωπιστικών ειδών του γένους *Dianthus*, και ιδιαίτερα για τη διατήρηση της κλωνικής πιστότητας σε επιλεγμένους γονότυπους του *D. caryophyllus*. Οι Pareek & Kothari (2003) χρησιμοποίησαν υγρό MS με 1 mg L^{-1} 2,4-D για την άμεση εμβρυογένεση από έκφυτα φύλλων τριών ειδών *Dianthus*. Για την ανάπτυξη και ωρίμανσή τους τους χρησιμοποιήθηκε 2,5% PEG 6000 και 200 mg L^{-1} υδρόλυμα καζεΐνης, ενώ τα έμβρυα βλάστησαν σε στερεό MS με 1 mg L^{-1} GA₃.

Οι Karami *et al.* (2006) διερεύνησαν την επίδραση της συγκέντρωσης σακχαρόζης σε στερεό MS με $9 \text{ } \mu\text{M}$ 2,4-D και $0,8 \text{ } \mu\text{M}$ BA για την επαγωγή εμβρυογενετικού κάλου σε δύο ποικιλίες *D. caryophyllus*, καθώς και σε στερεό MS για την επαγωγή πρωτογενών εμβρύων (έμμεση εμβρυογένεση από έκφυτα πετάλων). Οι βέλτιστες συγκεντρώσεις και στα 2 στάδια ήταν 9-12%. Σε μετέπειτα έρευνα, χρησιμοποίησαν στερεό MS με $9 \text{ } \mu\text{M}$ 2,4-D και $0,8 \text{ } \mu\text{M}$ BA με 9% σακχαρόζη για την επαγωγή εμβρυογενετικού κάλου, και στερεό MS με picloram για την επαγωγή πρωτογενών και δευτερογενών εμβρύων (έμμεση εμβρυογένεση από έκφυτα πετάλων) (Karami *et al.*, 2007). Τέλος, σε παράλληλο πείραμα χρησιμοποίησαν στερεό MS με 2 mg L^{-1} 2,4-D και $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ BA με 9% σακχαρόζη για την επαγωγή εμβρυογενετικού κάλου, και στερεό MS με 2,4D, BA, σακχαρόζη, μαννιτόλη ή συνδυασμό αυτών για την επαγωγή πρωτογενών και δευτερογενών εμβρύων (έμμεση εμβρυογένεση από έκφυτα πετάλων). Τα καλύτερα αποτελέσματα δόθηκαν με τη χρήση 3% σακχαρόζης και 6% μαννιτόλης. Και στα 3 πειράματα η ανάπτυξη των εμβρύων πραγματοποιήθηκε σε στερεό υπόστρωμα υποδιπλασιασμένης δύναμης MS που περιείχε 3% σακχαρόζη.

Αντίστοιχα, οι Dejou *et al.* (2007) παρατήρησαν αύξηση του αριθμού των παραγόμενων σωματικών εμβρύων με την αύξηση της συγκέντρωσης σορβιτόλης σε σταθερή συγκέντρωση σακχαρόζης. Πιο πρόσφατα, οι Aalifar *et al.* (2019)

διαπίστωσαν ότι η άμεση εμβρυογένεση σε στέρεα υποστρώματα MS ήταν συντομότερης διάρκειας και λιγότερο επίπονη από την έμμεση, έδωσε όμως μικρότερο αριθμό εμβρύων (άμεση και έμμεση εμβρυογένεση από έκφυτα πετάλων). Στην πρώτη, τα καλύτερα αποτελέσματα καταγράφηκαν με τη χρήση picloram και 4-CCPU ή NOA, ενώ στη δεύτερη με 2,4-D και 4-CCPU. Το μπλε φως από LED λαμπτήρες βελτίωσε το ρυθμό παραγωγής και τα χαρακτηριστικά των εμβρύων σε σύγκριση με το μάρτυρα (λευκός LED φωτισμός). Τα παραγόμενα φυτά ήταν γενετικά και καρυολογικά όμοια με τα μητρικά.

Στο *Dianthus chinensis*, οι Fu *et al.* (2008) διαπίστωσαν την επίδραση διαφορετικών προμεταχειρίσεων και συνθηκών καλλιέργειας κατά την έμμεση εμβρυογένεση από έκφυτα ανθίρων προερχόμενων από πέντε ποικιλίες του είδους σε στερεά υποστρώματα MS. Η αντίδραση στις προμεταχειρίσεις ήταν διαφορετική σε κάθε γονότυπο, ενώ το καλύτερο υπόστρωμα περιείχε 3% σακχαρόζη, 2 mg L⁻¹ 2,4-D και 1 mg L⁻¹ BA. Παρατηρήθηκαν τετραπλοειδή φυτά σε αυτά που παράχθηκαν.

Η ανάπτυξη πρωτοκόλλων κυτταροκαλλιέργειας είναι μάλλον περιορισμένη στο γένος, γεγονός το οποίο οφείλεται στη παραγωγή φυταρίων με αυξημένη φαινοτυπική και γονοτυπική παραλλακτικότητα. Έχουν πραγματοποιηθεί πειράματα με τη λήψη και τη καλλιέργεια κυττάρων από είδη όπως ο *Dianthus caryophyllus* (Choodhary & Chin, 1995; Kumar *et al.*, 2016) και ο *Dianthus acicularis* (Shiba *et al.*, 2005). Απαραίτητη είναι η χρήση εύθρυπτου (friable) κάλου, καθώς και η χρήση υγρών υποστρωμάτων MS παρουσία της αυξίνης 2,4-D, συχνά σε συνδυασμό με NAA, με το υπόστρωμα να ανανεώνεται ανά μία βδομάδα. Η έλλειψη 2,4-D από το υπόστρωμα της κυτταροκαλλιέργειας προκαλεί το σχηματισμό εμβρυοειδών δομών και σταδιακά, εμβρύων, με την απώλεια του εμβρυογενετικού δυναμικού ύστερα από 5-6 υποκαλλιέργειες. Κατά τη μεταφορά κυττάρων *D. acicularis* από κυτταροκαλλιέργεια, το μεγαλύτερο ποσοστό βλαστογένεσης καταγράφηκε σε στέρεο υπόστρωμα MS με 0,5 mg L⁻¹ ZEA.

Αντίστοιχα, η διερεύνηση της χρήσης μεθόδων απομόνωσης και καλλιέργειας πρωτοπλαστών στο γένος παραμένει αποσπασματική. 17 ποικιλίες και είδη του γένους *Dianthus* έχουν διερευνηθεί για την απομόνωση πρωτοπλαστών και τη μετέπειτα καλλιέργειά τους με σκοπό τη βλαστογένεση. Ανάμεσα σε αυτά περιλαμβάνονται τα *D. caryophyllus*, *D. chinensis*, *D. barbatus*, *D. plumarius*, *D. superbis* και *D. japonicus*, καθώς και ορισμένα διαειδικά υβρίδιά τους. Η απομόνωση βιώσιμων πρωτοπλαστών ήταν εφικτή σε υψηλές αποδόσεις από όλα τα

είδη όταν χρησιμοποιήθηκαν φύλλα που προήλθαν από *in vitro* καλλιέργεια, ενώ αρκετοί από αυτούς μπόρεσαν να διαιρεθούν και να σχηματίσουν αποικίες όταν μεταφέρθηκαν σε καλλιέργεια. Ωστόσο παρατήρηθηκαν σημαντικές διαφορές μεταξύ των ειδών όσον αφορά το ποσοστό βλαστογένεσης των αποικιών, με υψηλά ποσοστά να καταγράφονται μόνο για το *D. chinensis* και τα διαειδικά υβρίδιά του (Sato *et al.*, 1992).

Η διερεύνηση και η διάδοση συστημάτων μαζικού και αυτοματοποιημένου *in vitro* πολλαπλασιασμού καλλωπιστικών ειδών παρουσιάζει ιδιαίτερο ενδιαφέρον, καθώς επιτρέπει σημαντική μείωση του κόστους παραγωγής και των επίπλων χειρισμών με παράλληλη αύξηση των αποδόσεων. Παρά τα προτερήματα αυτά, η χρήση βιοαντιδραστήρων δεν έχει διαδοθεί στο γένος *Dianthus*, καθώς η παραγωγικότητά τους μειώνεται σημαντικά λόγω της ευαισθησίας εμπορικά πολύτιμων ειδών του γένους όπως ο *D. caryophyllus* στην υπερενυδάτωση, η οποία αυξάνεται σημαντικά στα υγρά υποστρώματα καλλιέργειας. Σε έρευνα που συνέκρινε την επίδραση της παρεχόμενης ποσότητας υγρού διαλύματος στον *in vitro* πολλαπλασιασμό του *D. caryophyllus*, διαπιστώθηκε ότι τα φυτά που αναπτύχθηκαν στον αντιδραστήρα ψεκασμού με μεγαλύτερο χρόνο ψεκασμού παρήγαγαν μεγαλύτερη ξηρή μάζα από τον ίδιο αντιδραστήρα με μικρότερο χρόνο ψεκασμού. Ο έλεγχος της υπερενυδάτωσης απαιτούσε είτε τη μείωση της συνολικής ποσότητας χορηγούμενου υγρού θρεπτικού διαλύματος είτε τη τροποποίηση της παροχής του διαλύματος κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας. Στη πρώτη περίπτωση, επιτεύχθηκε σημαντική πτώση των υπερενυδατωμένων βλαστών, αλλά με παράλληλη σημαντική μείωση του δυναμικού πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών. Στη δεύτερη περίπτωση, η σταδιακή αύξηση της ποσότητας του χορηγούμενου διαλύματος οδήγησε σε αυξημένες αποδόσεις με σχετικά χαμηλά επίπεδα υπερενυδάτωσης (Correll *et al.*, 2000). Άλλες τεχνικές όπως οι βιοαντιδραστήρες παροδικής εμβάπτισης (temporary immersion bioreactors) μπορούν να δώσουν σημαντικά αυξημένες αποδόσεις σε σχέση με το συμβατικό μικροπολλαπλασιασμό σε στερεά υποστρώματος, με προϋπόθεση τη βελτιστοποίηση της σύστασης των υποστρωμάτων (Ahmadian *et al.*, 2017).

Μία μέθοδος για τη διατήρηση πολύτιμου πολλαπλασιαστικού υλικού αποτελεί η κρυοσυντήρηση, η οποία περιλαμβάνει την υπέρψυξη και τη διατήρηση φυτικών κυττάρων, ιστών και οργάνων στους $-196\text{ }^{\circ}\text{C}$, αποθηκευοντάς τους σε δοχεία με υγρό άζωτο. Κατά τη διάρκεια της αποθήκευσής τους παρατηρείται παύση

κάθε κυτταρικής λειτουργίας, καθώς όλα τα ενδοκυτταρικά διαλυτά μόρια και δομές περιέχονται σε αδρανή, υαλωμένη κατάσταση. Στο γένος *Dianthus*, η διάδοση της μεθόδου αυτής θα μειώσει σημαντικά το χρόνο και τις εργασίες που απαιτούνται για τη διατήρηση επιλεγμένων γονοτύπων, θα αυξήσει τη διαθεσιμότητα του αρχικού υλικού εκκίνησης καλλιέργειων και θα προσφέρει τη δυνατότητα φθηνής μακροχρόνιας διατήρησης γενετικού υλικού ειδών του γένους (da Silva, 2020). Για τους παραπάνω λόγους, η πρώτη δημοσίευση σχετική με τη κρυοσυντήρηση του *D. caryophyllus* εντοπίζεται ήδη από τα μέσα της δεκαετίας του '70. Αρχικά έγινε χρήση τεχνικών αργής ψύξης, οι οποίες περιλάμβαν τη σταδιακή σκληραγώγηση εκφύτων μέσω της έκθεσής τους σε χαμηλές θερμοκρασίες και την εμβάπτισή τους σε κρυοπροστατευτικά διαλύματα με σακχαρόζη και DMSO. Πιο πρόσφατα έχουν επικρατήσει ταχύτερες και λιγότερο καταπονητικές μέθοδοι όπως η υπερταχεία ψύξη, η ενθυλάκωση-υάλωση και η ενθυλάκωση-αφυδάτωση. Επιτυχή πρωτόκολλα κρυοσυντήρησης έχουν δημοσιευθεί για πολυάριθμες ποικιλίες του *D. caryophyllus* (da Silva, 2020), καθώς και για 8 απειλούμενα βαλκανικά ενδημικά taxa του γένους (Halmagyi *et al.*, 2020). Οι σημαντικότεροι παράγοντες που επηρεάζουν την επιτυχία της μεθόδου είναι το είδος της τεχνικής ψύξης των βλαστών, η σύσταση των κρυοπροστατευτικών διαλυμάτων, η φυσιολογική κατάσταση των μητρικών φυτών, το είδος των εκφύτων και η ευαισθησία του είδους ή του γονοτύπου (da Silva, 2020).

Μία ακόμα μέθοδος *in vitro* διατήρησης γενετικού υλικού που έχει διερευνηθεί για είδη του γένους αποτελεί η μακρόχρονη διαφύλαξη των καλλιιεργειών υπό συνθήκες αργής ανάπτυξης όπως χαμηλές θερμοκρασίες, ασθενή φωτισμό ή σκοτάδι, φτωχά υποστρώματα ή συνδυασμό αυτών. Στο απειλούμενο βαλκανικό ενδημικό *D. callizonus*, η χρήση υποστρώματος MS υποδεκαπλασιασμένης δύναμης που περιείχε 2% και παρέμεινε σε σταθερή θερμοκρασία 10 °C επέτρεψε τη διατήρηση βιώσιμων εκφύτων με μικρό ποσοστό υπερενυδάτωσης για χρονικό διάστημα έως και 12 μηνών σε ποσοστό 100%, ενώ η χρήση του ίδιου υποστρώματος σε θερμοκρασία 25% οδήγησε σε ποσοστό επιβίωσης 20% (Catana *et al.*, 2010). Στο κρισίμως κινδυνεύων, αυτοφυές είδος *D. ingoldbyi*, η χρήση υποστρώματος MS που περιείχε 0,5 mg L⁻¹ NAA σε συνδυασμό με αποθήκευση σε συνθήκες σκότους και θερμοκρασία 4 °C έδωσε ποσοστά επιβίωσης 100% για ένα μήνα αποθήκευσης, 83% για 3 μήνες αποθήκευσης και 58% για 6 μήνες αποθήκευσης. Μεγάλο ποσοστό των εκφύτων ριζοβόλησε επιτυχώς, όμως το ποσοστό *ex vitro* εγκλιματισμού για τα έκφυτα που αποθηκεύτηκαν για 6 μήνες ήταν χαμηλό (47%) (Arda *et al.*, 2016).

1.2.5.4 Υπερενυδάτωση στο γένος *Dianthus*

Το φαινόμενο της υπερενυδάτωσης ή υάλωσης αποτελεί ένα ιδιαίτερα σημαντικό πρόβλημα για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό πολλών φυτικών ειδών, μεταξύ των οποίων και για τα περισσότερα είδη του γένους *Dianthus*. Πρόκειται για ένα σύνολο φαινοτυπικών και φυσιολογικών δυσπλασιών που επηρεάζει δυσμενώς το πολλαπλασιασμό και την *ex vitro* επιβίωση των καλλιεργούμενων βλαστών. Στο *D. caryophyllus* εκδηλώνεται με μορφολογικές αλλαγές όπως μη ανεπτυγμένη εφυμενίδα, λεπτό κυτταρικό τοίχωμα, μεγάλους ενδοκυτταρικούς χώρους και μη πλήρως ανεπτυγμένο αγγειακό σύστημα, βιοχημικές ενδείξεις όπως υψηλούς δείκτες αυξημένη παραγωγή H_2O_2 και ελευθέρων ριζών, καθώς και επιγενετικές τροποποιήσεις σχετιζόμενες με τροποποιήσεις στη γενετική έκφραση γονιδίων της φωτοσύνθεσης, του μεταβολισμού, της μετάφρασης και της παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών (Piqueras *et al.*, 2002; Saher *et al.*, 2005). Πολυάριθμοι ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες συνδιαμορφώνουν και ρυθμίζουν την ένταση αυτού του περίπλοκου φαινομένου, με τους σημαντικότερους να αποτελούν η γονοτυπική ευαισθησία, η συγκέντρωση του αιθυλενίου, η σύσταση του υποστρώματος καλλιέργειας και οι συνθήκες ανταλλαγής αερίων στα δοχεία καλλιέργειας (Sreelekshmi & Siril, 2021a).

Η ένταση της υπερενυδάτωσης στο *D. caryophyllus* επηρεάζεται από το τύπο του εξαερισμού, τα μηχανικά χαρακτηριστικά του υποστρώματος, το τύπο της καλλιέργειας και τη ποικιλία. Αύξηση του εξαερισμού συνεπάγεται και μείωση της υπερενυδάτωσης, όμως συνεπάγεται μείωση του αριθμού των εκπυσσόμενων βλαστών. Σε σταθερό ρυθμό εξαερισμού παρατηρείται λιγότερη υπερενυδάτωση σε στερεές παρά σε υγρές καλλιέργειες. Με σωστές πρακτικές, η υπερενυδάτωση μπορεί να μειωθεί σημαντικά ακόμα και σε υγρές καλλιέργειες (Majada *et al.*, 1997). Η υπερενυδάτωση συσχετίζεται με τη συσσώρευση αιθυλενίου κατά τα πρώτα στάδια της καλλιέργειας. Αν αυτό παγιδευθεί με διάλυμα υπερχλωρικού υδραργύρου εντός των πρώτων δύο εβδομάδων, η υπερενυδάτωση μειώνεται σημαντικά (Fal *et al.*, 1999).

Οι Majada *et al.* (2001) έδειξαν ότι η αύξηση του ρυθμού ανταλλαγής αερίων εντός του περιέκτη καλλιέργειας συνδέεται με μορφολογικές αλλαγές όπως καλύτερα ανεπτυγμένη εφυμενίδα, παχύτερο κυτταρικό τοίχωμα, μικρότερους ενδοκυτταρικούς χώρους και καλύτερα ανεπτυγμένο αγγειακό σύστημα. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τη

παραγωγή βλαστών υψηλής ποιότητας, που ριζοβολούν και εγκλιματίζονται πιο εύκολα. Αντίστοιχα, οι Fal *et al.* (2002) αναφέρουν ότι κατά τη χρήση διαφορετικών περιεκτών καλλιέργειας σε κόμβους από τέσσερις ποικιλίες *D. caryophyllus* παρατηρήθηκαν διαφορές στο τύπο των εκπυσσόμενων βλαστών και στα χαρακτηριστικά τους, με το φαινόμενο της υπερενυδάτωσης να εξαρτάται από την αλληλεπίδραση των διαφορετικών συνθηκών ανταλλαγής υγραριών και εξάτμισης εντός των δοχείων με την ευαισθησία της κάθε ποικιλίας σε αυτές.

Η ψύξη του πυθμένα στα δοχεία καλλιέργειας και η αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ επηρέασαν το περιεχόμενο σε υγρασία, τα μορφολογικά και βιοχημικά χαρακτηριστικά και το ποσοστό υπερενυδάτωσης και ρυθμό πολλαπλασιασμού σε τρεις ποικιλίες *D. caryophyllus*, οι οποίες παρουσίασαν διαφορετικό βαθμό αντίδρασης λόγω διαφορετικής ευαισθησίας στο φαινόμενο. Το γεγονός αυτό αποδεικνύει την ικανότητα σημαντικού περιορισμού του φαινομένου της υπερενυδάτωσης και της οξειδωτικής καταπόνησης με βασιαία ψύξη και αύξηση του άγαρ (Saher *et al.*, 2005). Η χρήση φωτισμού LED σε κόκκινα ή μπλε φάσματα είναι ικανή να μειώσει σημαντικά το φαινόμενο της υπερενυδάτωσης στο είδος με τη προστασία της φωτοσύνθεσης και των μηχανισμών αντιοξειδωτικής δράσης, προστατεύοντας τα φυτά από τις ελεύθερες ρίζες οξυγόνου και την οξειδωτική καταπόνηση που προκαλούν. Διαφορές παρατηρήθηκαν μεταξύ των ποικιλιών, με το μπλε φως να είναι ελαφρώς πιο δραστικό (Muneeb *et al.*, 2017).

Πέρα από τη τροποποίηση των περιβαλλοντικών συνθηκών εντός και εκτός των περιεκτών καλλιέργειας, η τροποποίηση της σύστασης του υποστρώματος καλλιέργειας αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα μέτρα για τον έλεγχο και το περιορισμό της υπερενυδάτωσης στο γένος. Η υπερενυδάτωση στο *D. caryophyllus* μειώνεται σημαντικά ή και εξαφανίζεται με αύξηση της συγκέντρωσης του Fe, του Mg, ενίοτε και ανάλογα με τη ποικιλία αυξάνοντας και τον αριθμό των βλαστών. Δευτερευόντως το ίδιο συνέβη και με αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ, ωστόσο μειώνοντας τον αριθμό των βλαστών (Yadav *et al.*, 2003). Η μείωση του NH_4NO_3 στο $\frac{1}{4}$ της συγκέντρωσής του (MS) κατά την επαγωγή και την ανάπτυξη βλαστών από έκφυτα κόμβου *D. caryophyllus* οδηγεί σε σημαντική μείωση της υπερενυδάτωσης χωρίς συνεπακόλουθη μείωση στον αριθμό αντιδρώντων εκφύτων και παραγόμενων βλαστών (Tsay, 1998; Purohit & Agarwal, 2017). Η ενσωμάτωση 0,05 mM $\text{Ce}(\text{NO}_3)_3$ στο MS υπόστρωμα κατά τη καλλιέργεια κόμβων *D.*

caryophyllus οδήγησε σε σημαντική μείωση της υπερενυδάτωσης και της οξειδωτικής καταπόνησης (Liu *et al.*, 2018).

Μία ακόμα συχνά χρησιμοποιούμενη μέθοδος κατά το μικροπολλαπλασιασμό του γένους αφορά την ενσωμάτωση στο υπόστρωμα ουσιών με ευνοϊκή δράση στη μείωση του αριθμού των υπερενυδατωμένων βλαστών. Η παρουσία 30 μM AgNO_3 σε υπόστρωμα MS υποδιπλασιασμένης δύναμης κατά τη καλλιέργεια κόμβων *D. chinensis* οδήγησε σε σχεδόν πλήρη ύφεση της υπερενυδάτωσης, με έντονη μείωση του περιεχόμενου νερού και αιθυλενίου, του ρυθμού παραγωγής ROS (reactive oxygen species), ενώ αυξήθηκαν η αντιοξειδωτική δραστηριότητα, το άνοιγμα των στομάτων και η απώλεια νερού (Gao *et al.*, 2017a). Η παρουσία πολυαμινών οδηγούσε σε σημαντική μείωση της υπερενυδάτωσης και αύξηση των παραγόμενων βλαστών καλλιέργειας κόμβων *D. chinensis*, με τα καλύτερα αποτελέσματα να δίνονται με τη προσθήκη 5 μM σπερμίνης και σπερμιδίνης αντίστοιχα, καθώς είχαν αντιοξειδωτική δράση και μείωναν την παραγωγή αιθυλενίου. Επίσης διαπιστώθηκε η σημαντική αύξηση της υπερενυδάτωσης με την αυξανόμενη παρουσία αιθυλενίου στον περιέκτη καλλιέργειας (Sreelekshmi & Siril, 2020).

Σε πολλές περιπτώσεις ιδιαίτερα θετικά αποτελέσματα καταγράφηκαν όταν πολλαπλοί μέθοδοι περιορισμού της υπερενυδάτωσης συνδυάστηκαν κατά το μικροπολλαπλασιασμό ειδών του γένους *Dianthus*. Η αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ και η χρήση αεριζόμενων δοχείων κατά την οργανογένεση βλαστών από έκφυτα πετάλων *D. caryophyllus* οδήγησε σε μορφολογικές και βιοχημικές μεταβολές που προκάλεσαν ταυτόχρονη μείωση του ποσοστού υπερενυδάτωσης και του αριθμού παραγόμενων βλαστών. Αυξημένες ποσότητες άγαρ ή/και εξαερισμός πιο χρήσιμα σε μετέπειτα στάδια του πολλαπλασιασμού όπως πριν τη ριζοβολία (Casanova *et al.*, 2008). Η αύξηση του εξαερισμού και η αυξημένη παρουσία φωσφορικών ιόντων στο υπόστρωμα (MS) κατά τη καλλιέργεια κόμβων *D. chinensis* οδηγούσε σε μείωση της υπερενυδάτωσης και αύξηση των παραγόμενων βλαστών, ενώ η αύξηση της συγκέντρωσης της σακχαρόζης αύξανε τους παραγόμενους βλαστούς μόνο παρουσία αυξημένων φωσφορικών (Mohammed *et al.*, 2011).

Σε ορισμένες περιπτώσεις είναι εφικτό να επιτευχθεί μερική ή και πλήρη επαναφορά της κανονικής φυσιολογίας και μορφολογίας των υπερενυδατωμένων βλαστών υπό την επίδραση τροποποιήσεων στις συνθήκες της καλλιέργειας ή/και με τη χρήση ειδικών υποστρωμάτων καλλιέργειας. Στη πρώτη αναφορά χρήσης τέτοιων μεθόδων, η χρήση υποστρώματος υποδιπλασιασμένης δύναμης με 0,4% gelrite

υπόστρωμα ριζοβολίας, καθώς και η αντικατάσταση των πλαστικών πωμάτων Sun-caps μείωσε σημαντικά την υπερενυδάτωση μικροβλαστών του *D. caryophyllus* (Nugent *et al.*, 1991). Αργότερα, οι Sato *et al.* (1993) έδειξαν τη δυνατότητα επαναφοράς υπερενυδατωμένων βλαστών *D. caryophyllus* με τη μεταφορά τους σε υπόστρωμα MS που περιείχε βασικά πεπτίδια ζωικής προέλευσης χαμηλού μοριακού βάρους. Σημαντική επαναφορά των υπερενυδατωμένων βλαστών του είδους αυτού σε φυσιολογική κατάσταση επιτεύχθει με τη βασισαία ψύξη των περιεκτών καλλιέργειας, η οποία οδήγησε σε μείωση της εσωτερικής υγρασίας (Piquerias *et al.*, 2002). Άλλα μέτρα όπως η μεταφορά τους σε υπόστρωμα MS που περιείχε $0,5 \text{ mg L}^{-1} \text{ GA}_3$ (Jain *et al.*, 1997) ή σε υπόστρωμα MS χωρίς φυτομόνες και 1% άγαρ (Tsoktouridis *et al.*, 2013, Thu *et al.*, 2020) οδήγησαν επίσης στη παραλαβή βλαστών μη υπερενυδατωμένης μορφολογίας. Η ευνοϊκή δράση του AgNO_3 στη μείωση της υπερενυδάτωσης μπορεί να αξιοποιηθεί και για την επαναφορά υπερενυδατωμένων βλαστών *D. chinensis* που προήλθαν από πλήρες MS με χαμηλή συγκέντρωση άγαρ (Gao *et al.*, 2017b). Αντίστοιχα ευνοϊκή επίδραση ασκεί και η ενσωμάτωση μικροσφαιριδίων βιογενούς αργύρου στο υπόστρωμα καλλιέργειας (Sreelekshmi & Siril, 2021a). Τέλος, η χρήση υπερενυδατωμένων κόμβων *D. chinensis* ως έκφυτα, σε συνδυασμό με την ενσωμάτωση $10 \text{ }\mu\text{M AgNO}_3$ και $5 \text{ }\mu\text{M CoCl}_2$ στο υπόστρωμα καλλιέργειας, οδηγούσε σε σημαντική μείωση της υπερενυδάτωσης με παράλληλη αύξηση του αριθμού βλαστών σε σύγκριση με έκφυτα φυσιολογικών κόμβων (Sreelekshmi & Siril, 2021b).

1.3 *Dianthus cruentus* Griseb.

1.3.1 Βοτανική περιγραφή

Ο *Dianthus cruentus* Griseb., οικ. Caryophyllaceae (Διάνθος ο αιματόχρους, αγριογαρύφαλλο) είναι μία πολυετής, αειθαλής πόα με βλαστητικά μέρη με θυσανώδη ανάπτυξη και γλαυκή εμφάνιση, τα οποία εκφύονται από βραχεία, ελαφρώς ξυλοποιημένη βάση που καταλήγει σε εύρωστη πασσαλώδη ρίζα. Το ύψος του φυλλώματος φτάνει τα 10 έως 20 cm, σχηματίζοντας έναν συμπαγή θύσανο, ενώ κατά την ανθοφορία εμφανίζονται όρθια, αδιακλάδωτα ανθοφόρα στελέχη τετράγωνης διατομής στο άνω μέρος τους, με ύψος 30 έως 70 cm, σπανιότερα έως 100 cm. Τα γραμμικά, οξύληκτα, αρκετά άκαμπτα φύλλα έχουν τραχιά περιθώρια και σκούρο γλαυκοπράσινο χρώμα, φέρουν ευδιάκριτο μεσαίο νεύρο και ένα ή δύο ζεύγη περιφερειακών νεύρων. Είναι επίπεδα και περίβλαστα, φέροντας κολεούς με μήκος τουλάχιστον τριπλάσιο του πλάτους τους στη βάση τους. Στη βάση των φυτών έχουν διαστάσεις 100-180 x 1-3 mm και φέρονται ψευδοθυσανοτώς σε βραχείς βλαστούς με εξαιρετικά περιορισμένα μεσογονάτια, ενώ στους ανθοφόρους βλαστούς έχουν διαστάσεις 40-75 x 2-3 mm και φέρονται αντίθετα, με ευδιάκριτα μεσογονάτια. Επάκρια των ανθοφόρων βλαστών φέρονται οι ταξιανθίες, κεφαλοειδή διχάσια αποτελούμενα από συνήθως πολυάριθμα, πυκνά διατεταγμένα άνθη που εμφανίζονται από τις αρχές του Μάη έως τα τέλη του Ιουλίου. Στη βάση τους περιβάλλονται από αντωειδή, μακροαγανοειδή, ελαφρώς χνοώδη βράκτια με ανοιχτό έως κοκκινωπό καφέ χρώμα, καθώς και από λέπια επικάλυκα παρόμοιας μορφολογίας αλλά μικρότερου μεγέθους. Ο συστέπαλος, κυλινδρικός κάλυκας είναι στενότερος στο άνω ήμισυ του, έχει ερυθρό έως ιώδη χρωματισμό και διαστάσεις 13-20 x 3-4 mm. Η στεφάνη αποτελείται από πέντε πέταλα μήκους 3 έως 8 mm, με τριγωνικό σχήμα, οδοντωτά περιθώρια, περισσότερο ή λιγότερο πωγωνοφόρα, με ανοιχτό ροζ-κόκκινο έως έντονο ερυθρό-μωβ χρώμα. Ο καρπός είναι ακρορραγής κάψα με 5 οξύληκτους, μερικώς ανεστραμένους όδοντες, η οποία περιέχει πολυάριθμους ασπιδοειδείς σπόρους μαύρου ή σκούρου καστανέρυθρου χρώματος, διαστάσεων 8-12 x 5-7 mm και βάρος 1000 σπόρων ίσο με 0,8 g.

Ο *Dianthus cruentus* αποτελεί μέλος μίας ομάδας ειδών με εξάπλωση στη νοτιανατολική Ευρώπη και τη δυτική Ασία, η οποία φαίνεται να είναι στενά συνδεδεμένη με τη μεγάλη και έντονα πολυμορφική ομάδα ειδών γύρω από το *Dianthus carthusianorum*, τα είδη της οποίας εξαπλώνονται στην κεντρική και τη νότια Ευρώπη. Τα είδη της ομάδας παρουσιάζουν πολλές δυσχέρειες στη συστηματική τους ταξινόμηση, καθώς συχνότατα διαφέρουν μόνο σε ποσοτικούς χαρακτήρες, παρουσιάζουν έντονη φαινοτυπική πλαστικότητα και πλήθος οικοτύπων, ενώ είναι ικανά να παράγουν διαειδικά υβρίδια μεταξύ τους. Κοινά τους μορφολογικά γνωρίσματα η θυσανωτή, γλαυκή ανάπτυξη με ξυλώδη βάση, η ύπαρξη κολεών με μήκος τουλάχιστον τριπλάσιο από τη διάμετρο των βλαστών, η ύπαρξη μικρού αριθμού πυκνών κεφαλοειδών ταξιανθιών που φέρονται επάκρια όρθιων στελεχών και αποτελούνται από σχεδόν άμισχα άνθη με ρόδινα έως βαθυκόκκινα πέταλα, τα αγανοφόρα βράκτια και λείπια επικάλυκα και οι οξύληκτοι όδοντες του κάλυκα. Στην Ελλάδα συναντούμε πέντε εκπρόσωπους της ομάδας αυτής, οι οποίοι είναι οι *Dianthus stenopetalus*, *Dianthus strymonis*, *Dianthus giganteus*, *Dianthus leucophoeniceus* και *Dianthus cruentus* (Strid, 2001).

Η επίσημη περιγραφή του είδους έγινε από το Γερμανό βοτανικό August Grisebach (1814-1879) το 1843, βάσει φυτικού υλικού που συλλέχθηκε στο όρος Pelister (Περιστέρι) στη σημερινή Βόρεια Μακεδονία (Grisebach, 1843), ενώ δύο χρόνια νωρίτερα έχει αναφερθεί σύντομα στο είδος αυτό με την ονομασία *Dianthus atropurpureus*. Τα επόμενα χρόνια, πολυάριθμα νέα είδη θα περιγραφούν από την κεντρική και τη νότια Βαλκανική χερσόνησο, τα οποία προσομοιάζουν έντονα με το *Dianthus cruentus*, διαφέροντας συνήθως μόνο σε ποσοτικούς χαρακτήρες όπως ύψος στελεχών και αριθμό ανθέων στη ταξιανθία. Ανάμεσα σε αυτά, ο *Dianthus brachyzonus* αποτελεί μία συμπαγής μορφή του είδους με 2-6 άνθη ανά ταξιανθία, πιθανώς αποτέλεσμα υβριδισμού με το *D. biflorus*. Ο *Dianthus quadrangulus* φαίνεται να είναι μία λεπτοφυής ποικιλία του είδους από τη κεντρικά Βαλκάνια που πιθανόν θα πρέπει να χαρακτηριστεί ως υποείδος, ενώ ο *Dianthus lateritius* δεν είναι παρά μια μορφή του είδους με ανοιχτόχρωμα άνθη (Strid, 2001). Ιδιαίτερη σύγχυση φαίνεται να επικρατεί γύρω από την σχέση του *D. cruentus* με το *D. calcephalus*, ένα είδος με μικρές μορφολογικές διαφορές και ευρεία εξάπλωση στη δυτική Ασία (Τουρκία έως Ιράν), με ορισμένους συγγραφείς να διακρίνουν τα δύο είδη (Tutin *et al.*, 2001, Dimopoulos *et al.*, 2013), άλλους να τα ταυτίζουν (PoWO, 2022; Hamzaoglu *et al.*, 2017) και άλλους να διατηρούν επιφυλάξεις (Strid, 2001).

Σύμφωνα με τη «Flora Europaea», το είδος διακρίνεται σε δύο υποείδη, συχνά δυσδιάκριτα μεταξύ τους, το *D. cruentus* subsp. *cruentus* και το *D. cruentus* subsp. *turcicus*. Το πρώτο φέρει άγανα σημαντικά μεγαλύτερου μήκους από τα καστανέρυθρα λέπια του επικάλυκα και άτριχα πέταλα σκούρου πορφυρού-μωβ χρώματος, με εξάπλωση στη βορειοδυτική Βαλκανική χερσόνησο, ενώ το δεύτερο άγανα ίσου μήκους με τα ανοιχτόχρωμα λέπια του επικάλυκα και πωγωνοφόρα πέταλα ανοιχτού έως ζωηρού ρόδινο-μωβ χρώματος, με εξάπλωση στη νότια Βαλκανική χερσόνησο (Tutin *et al.*, 2001). Σύμφωνα με τη «Flora Hellenica» και τη «Vascular Flora of Greece», το δεύτερο υποείδος αποτελεί μέρος της ενδοειδικής ποικιλομορφίας του είδους, καθώς καταγράφονται πολυάριθμοι πληθυσμοί με χαρακτηριστικά ενδιάμεσα των δύο υποειδών (Strid, 2001; Dimopoulos *et al.*, 2013).

Ο *Dianthus cruentus* εξαπλώνεται σε ένα πλήθος ενδιαιτημάτων όπως ξηροί ορεινοί λειμώνες και βοσκότοποι, ανοίγματα και ξέφωτα δασών, άκρες δρόμων και άλλα, αναπτυσσόμενος σε ένα εύρος υποστρωμάτων σε υψόμετρα από 200 έως 2100 μέτρα από το επίπεδο της θάλασσας (Strid, 2001). Η περιοχή εξάπλωσής του περιλαμβάνει το μεγαλύτερο μέρος της Βαλκανικής χερσονήσου, απαντώμενο ως αυτοφυές στη Βοσνία και Ερζεγοβίνη, την Αλβανία, τη Σερβία, τη Βόρεια Μακεδονία, το Κόσοβο και το Μαυροβούνιο, την Ελλάδα και το ευρωπαϊκό τμήμα της Τουρκίας, ενώ αν το *D. calcephalus* αποτελεί συνώνυμο η εξάπλωση του είδους περιλαμβάνει την Ανατολία, το Καύκασο και τμήμα της κεντρικής Ασίας (PoWO, 2022). Στην Ελλάδα το είδος είναι αρκετά κοινό σε όλη την ηπειρωτική χώρα από τη βόρεια Πελοπόννησο και βορειότερα, αναφερόμενο από τις χλωριδικές περιοχές της Πελοποννήσου, της Στερεάς Ελλάδας, της βόρειας και ανατολικής Πίνδου, καθώς και της ανατολικής-κεντρικής, βόρειας-κεντρικής και βόρειας-ανατολικής Ελλάδας (Strid, 2001). Το είδος αυτό δεν συμπεριλαμβάνεται στην Κόκκινη λίστα της Διεθνούς Ένωσης για τη Διατήρηση της Φύσης (IUCN), ούτε σε κάποιο εθνικό ή τοπικό κατάλογο με προστατευόμενα είδη χλωρίδας, όμως αρκετοί από τους πληθυσμούς του πιθανόν να απειλούνται τοπικά λόγω ανθρωπογενών παρεμβάσεων όπως αλλαγές στη χρήση της γης και κατασκευή ή συντήρηση έργων υποδομής.



Εικόνα 9. Ταξιανθίες από άτομα *Dianthus cruentus* προερχόμενα από διαφορετικούς πληθυσμούς, χαρακτηριστικό δείγμα της ενδοειδικής παραλλακτικότητας του πολύμορφου αυτού είδους. Πηγές: Thanasis Papanikolaou, Zeynel Cebeci, Natura Graeca



Εικόνα 10. Ταξιανθίες *Dianthus cruentus* με επικονιαστές όπως ημερόβια λεπιδόπτερα (*Gonepteryx rhamni*, α) και νεκταροδίαιτα δίπτερα (*Syrphidae*, β)

Πηγές: Petr Beránek, Marie-Louise Agius



Εικόνα 11. Βοτανικές συλλογές *Dianthus cruentus* από το herbarium του Βοτανικού Κήπου του Βερολίνου, αρχειοθετημένα υπό τις ονομασίες *Dianthus cruentus* (α), *Dianthus cruentus* subsp. *turcicus* (β), *Dianthus quadrangulus* (γ), και *Dianthus calocephalus* (δ).

1.3.3 Χρήσεις του *Dianthus cruentus* Griseb.

Λόγω της ιδιαίτερης αισθητικής του αξίας, ο *Dianthus cruentus* αποτελεί είδος με έντονο καλλωπιστικό ενδιαφέρον, το οποίο μάλιστα τελευταία χρόνια έχει διαδοθεί αρκετά σε κήπους χωρών της δυτικής Ευρώπης. Μετά τη θεαματική ανάδειξη του είδους από τον αρχιτέκτονα τοπίου Cleve West στη βρετανική ανθοέκθεση «Chelsea Flower Show» του 2011, η έντονη ζήτηση από το κοινό οδήγησε στην άμεση διάθεσή του από πολυάριθμες σποροπαραγωγικές εταιρείες και φυτώρια στο Ηνωμένο Βασίλειο και στην ηπειρωτική Ευρώπη (Ryan, 2011). Το είδος αυτό ξεχωρίζει για τις πυκνές κεφαλοειδείς ταξιανθίες του σε τόνους του ροζ, του κόκκινου και του μωβ, οι οποίες δημιουργούν όμορφη χρωματική αντίθεση με το πλούσιο και αειθαλές γλαυκοπράσινο φύλλωμα του φυτού, η συμπαγής θυσανωτή ανάπτυξη του οποίου αναδεικνύει τα όρθια, γραμμικά στελέχη στα οποία φέρονται οι ταξιανθίες. Λόγω του συμπαγούς μεγέθους του, της εντυπωσιακής ανθοφορίας και της ικανότητας ανάπτυξης σε φτωχά εδάφη, πρόκειται για είδος ιδιαίτερα κατάλληλο για βραχόκηπους και χαλικόκηπους. Η αρχιτεκτονική δομή του, η προσαρμοστικότητά του σε εκτεθειμένες, ξηρές θέσεις και η παρουσία ενός πυκνού ριζικού συστήματος το καθιστά ιδιαίτερα κατάλληλο για χρήση του τόσο σε μεικτές πολυετείς φυτεύσεις όσο και σε πράσινες στέγες και φυτεμένα δώματα, ιδιαίτερα όταν συνδυάζεται με άλλα πολυετή είδη όπως αγρωστώδη σε φυτεύσεις λειμώνιου χαρακτήρα (BBC Gardener's World, 2018).

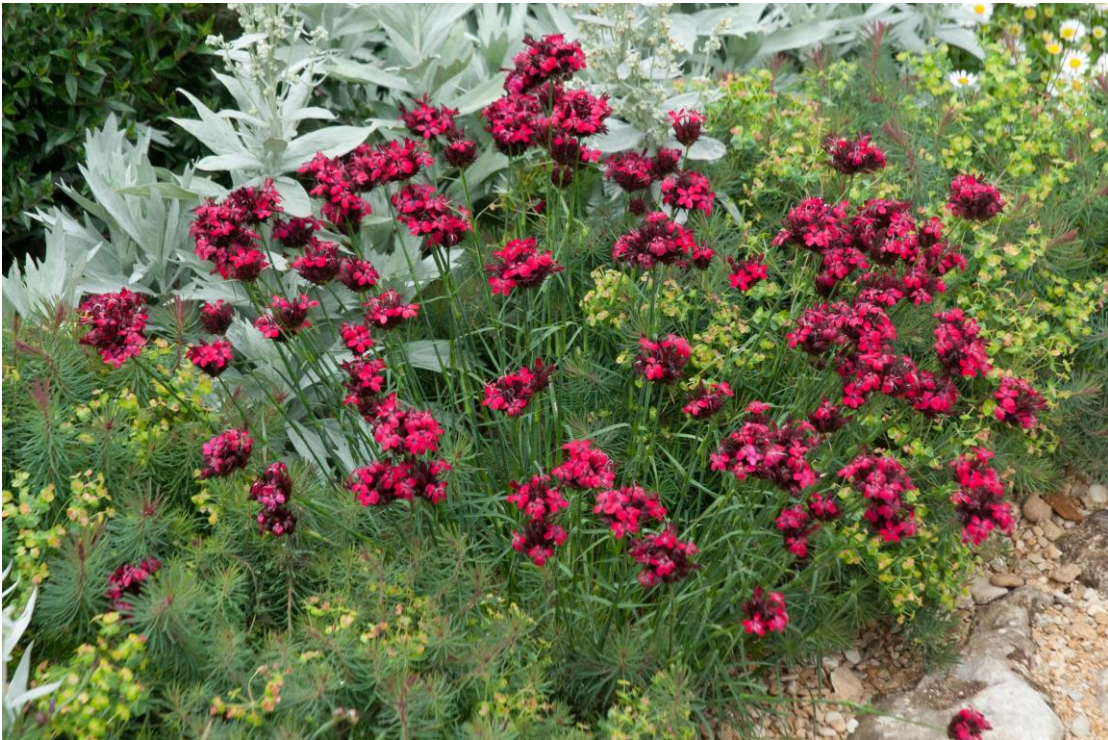
Πρόκειται για ένα συμπαγές, ποώδες είδος με μέτριο ρυθμό ανάπτυξης, ικανό να εγκατασταθεί σε ένα μεγάλο εύρος εδαφών με πολύ καλή αποστράγγιση όπως αμμώδη, αμμοπηλώδη, πηλώδη και χαλικώδη. Προτιμά προσήλιες ή ελαφρώς σκιαζόμενες θέσεις σε εδάφη με ουδέτερη ή αλκαλική αντίδραση, ενώ είναι ευαίσθητο σε πολύ υγρές θέσεις με κακό αερισμό, στις οποίες εμφανίζει κακή ανάπτυξη και συχνά αποτυγχάνει να εγκατασταθεί. Είναι αρκετά ανθεκτικό στη ξηρασία, ιδιαίτερα οι μορφές του είδους που προέρχονται από τα χαμηλότερα υψόμετρα της εξάπλωσής του, όμως αναπτύσσεται καλύτερα με τη χορήγηση αραιής άρδευσης του θερμούς μήνες του καλοκαιριού. Είναι πολύ ανθεκτικό στον παγετό, καθώς αναφέρεται ότι μπορεί να επιβιώσει στην έκθεση σε θερμοκρασίες έως -15°C , επομένως πρόκειται για είδος που κατατάσσεται στις ζώνες ανθεκτικότητας κατά

USDA 7-11 (Denver Botanical Gardens, 2017). Ως εκ τούτου, είναι κατάλληλο για καλλιέργεια σε όλες τις περιοχές της Ελλάδας.

Λόγω της συμπαγούς ανάπτυξης του φυλλώματος, θα πρέπει να αποφεύγεται η εγκατάστασή του κοντά σε είδη με επιθετική και ζωνρή ανάπτυξη, ενώ αναφέρεται ότι σε θέσεις με ευνοϊκές συνθήκες συχνά εμφανίζεται μεγάλος αριθμός σποροφύτων δίπλα στα μητρικά φυτά. Όταν αυτό δεν είναι επιθυμητό, μπορεί να αντιμετωπιστεί με αφαίρεση των ταξιανθιών μετά την ολοκλήρωση της άνθισης, ενέργεια η οποία αυξάνει την ευρωστία των φυτών. Όπως και στα περισσότερα είδη του γένους *Dianthus*, το ριζικό σύστημα είναι έντονα θυσανώδες και ιδιαίτερα πυκνό, βοηθώντας το φυτό να εγκατασταθεί ακόμα και σε σαθρά, επικλινή και υποβαθμισμένης μηχανικής σύστασης εδάφη. Όπως και άλλα είδη του γένους με έντονα χρωματισμένα πέταλα και επιμήκεις σωληνοειδείς κάλυκες, ο *Dianthus cruentus* έχει εξειδικευθεί στην επικονίαση από ημερόβια λεπιδόπτερα όπως το *Ochlodes venatus*, τα οποία προσελκύει σε μεγάλους αριθμούς λόγω του πλούσιου σε σακχαρόζη νέκταρ που παράγει στη βάση του κάλυκα (Kozahurova, 2000). Παράλληλα, σε μικρότερο βαθμό προσελκύει υμενόπτερα όπως μέλισσες και βομβίνους, ιδιαίτερα τα είδη που μπορούν να αποκτήσουν πρόσβαση στο νέκταρ που παράγουν τα άνθη, καθώς και ορισμένα γυρεοφάγα κολεόπτερα που καταναλώνουν τη μπλε γύρη.

Όπως και αρκετά άλλα είδη του γένους *Dianthus*, τα τελευταία έτη ο *D. cruentus* έχει αποτελέσει αντικείμενο ερευνών της χημειοταξινομικής, της φυτοχημείας και της φαρμακολογίας. Κατά την ανάλυση των κηρών της εφουμενίδας προερχόμενων από τις ταξιανθίες του είδους με μεθόδους ατομικής φασματομετρίας και αέριας χρωματογραφίας, αναγνωρίστηκαν 151 διαφορετικές ενώσεις, εκ των οποίων οι 55 απομονοθήκες για πρώτη φορά από φυτικό οργανισμό και οι 10 νέες για την επιστήμη. Οι ασυνήθιστες ενώσεις αυτές δύναται να χρησιμοποιηθούν ως χημειοταξινομική δείκτες για το συγκεκριμένο είδος (Dekić *et al.*, 2019). Από την ανάλυση των πτητικών ενώσεων από τα άνθη του *D. cruentus* με αέρια χρωματογραφία καταγράφηκαν συνολικά 24 ενώσεις, με τις ευρισκόμενες σε υψηλότερες συγκεντρώσεις να είναι η επτανάλη, η βενζυλική αλκοόλη και το επτανοϊκό οξύ (Radulović *et al.*, 2018). Πτητικές ενώσεις απομονωθήκες με αέρια χρωματογραφία από τα επίγεια μέρη του μάλλον συνώνυμου *D. calcephalus* συμπεριλάμβαναν το 4,4-διμεθυλ-2-πεντένιο, τη φυτόλη και το πεντακοσάνιο, ενώ παρουσίαζαν ισχυρή αντιμικροβιακή δράση έναντι του παθογόνου μύκητα *Candida albicans* (Yucel & Yayli, 2018).

Η χρήση διαφορετικών διαλυτών (νερό, οξικό αιθύλιο, μεθανόλη) και τεχνικών εκχύλισης (πολτοποίηση, συσκευή Soxhlet, υπέρηχοι) χρησιμοποιήθηκε για τη παραλαβή εκχυλισμάτων, με τα μεθανολικά να παρουσιάζουν ισχυρή αντιοξειδωτική δράση που οφειλόταν κυρίως στη περιεχόμενη σε αυτά ρουτίνη. Παρατηρήθηκε επιπλέον έντονη ανασταλτική δράση των εκχυλισμάτων του φυτού σε νερό και οξικό αιθύλιο έναντι σημαντικών ενζύμων όπως η α-γλυκοζιδάση και οι ακετυλο- και βουτυρυλοχολιστερινάσες, με αποτέλεσμα το είδος να θεωρείται ενδιαφέρον για περαιτέρω διερεύνηση των δυνατοτήτων αξιοποίησης του φυτοχημικού του περιεχόμενου για τη θεραπεία νόσων όπως ο διαβήτης και το Alzheimer (Uysal *et al.*, 2018).



Εικόνα 12. Συστάδα ανθισμένων φυτών *Dianthus cruentus* στον κήπο-έκθεμα “The Daily Telegraph” από το Cleve West για το Chelsea Flower Show 2011.

Πηγή: Naomi Schillinger

1.3.4 Πολλαπλασιασμός του *Dianthus cruentus* Griseb.

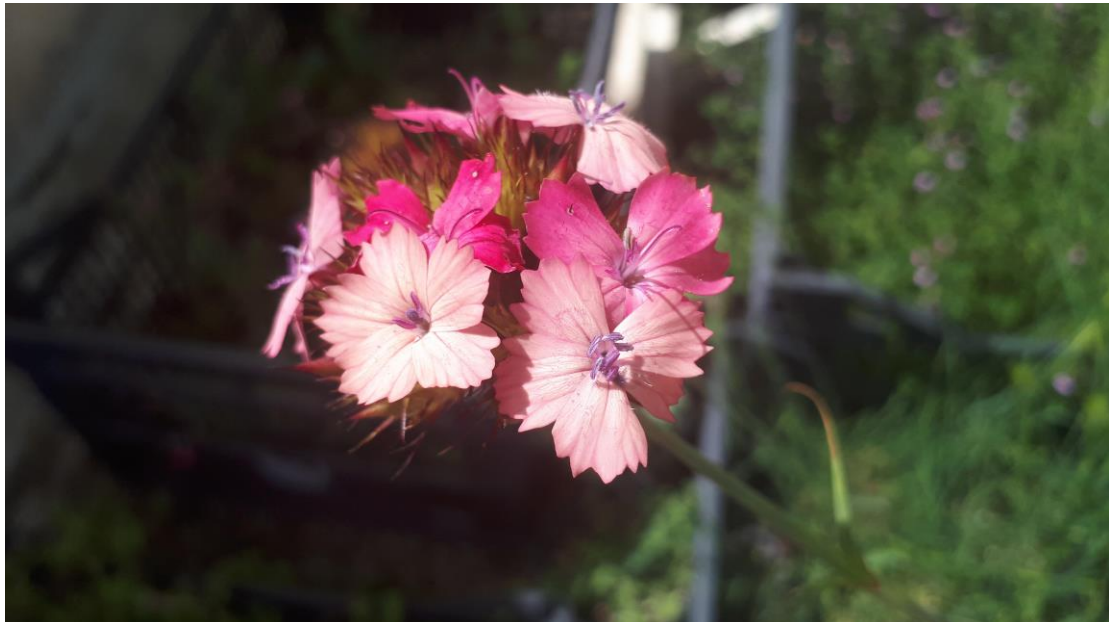
Η εγγενής αναπαραγωγή του *Dianthus cruentus* δεν έχει μελετηθεί εκτενώς έως τώρα. Σύμφωνα με μία από τις σποροπαραγωγικές εταιρείες που διαθέτει το εν λόγω είδος, η βλάστηση των σπόρων πραγματοποιείται ταχύτατα στους 20 °C. Οι σπόροι θα πρέπει να τοποθετούνται σε ελαφρώς υγρό υπόστρωμα και να καλύπτονται ελαφρώς, ενώ μετά τη βλάστησή τους να μεταφέρονται σε ψυχρότερες συνθήκες (Jelitto, 2022). Σπόροι του *D. calocephalus* ηλικίας 0 και 12 μηνών χρησιμοποιήθηκαν σε πειράματα βλαστικότητας σε *in vitro* και *ex vitro* συνθήκες. Στους θαλάμους σταθερών συνθηκών οι σπόροι βλάστησαν τόσο σε συνθήκες σκότους όσο και σε συνθήκες φωτοπεριόδου 16 ωρών, με το υψηλότερο ποσοστό βλαστικότητας (95%) να σημειώνεται στους 20 °C, ενώ στις δύο υψηλότερες θερμοκρασίες, 22 και 24 °C, καταγράφηκαν σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά βλαστικότητας. Και στις 3 θερμοκρασίες η βλάστηση ήταν ταχύτατη, καθώς η περίοδος βλάστησης ήταν 6 έως 7 ημέρες, ενώ το T₅₀ κυμάνθηκε μεταξύ 2 έως 3 ημερών. Στο θερμοκήπιο μεγαλύτερα ποσοστά βλαστικότητας έδωσε η χρήση σπόρων ηλικίας 12 μηνών σε υπόστρωμα τύρφης, όμως στα υποστρώματα τύρφης-περλίτη και περλίτη καταγράφηκαν υψηλότερα ποσοστά βλαστικότητας όταν χρησιμοποιήθηκε σπόροι ηλικίας 0 μηνών (Hazar & Baktir, 2012).

Μέχρι σήμερα δεν υπάρχει καμία αναφορά για τον αγενή πολλαπλασιασμό του *Dianthus cruentus*. Η χρήση παραδοσιακών μεθόδων πολλαπλασιασμού όπως μοσχεύματα, καταβολάδες και διαίρεση είναι ιδιαίτερα δυσχερές, ελάχιστα παραγωγική και ασύμφορη για το είδος αυτό εξαιτίας της ιδιαίτερης βλαστητικής μορφολογίας του, με την παρουσία ολιγάριθμων και εξαιρετικά βραχυγονάτιων βλαστών που προσαρτώνται σε ξυλώδη βάση. Ως εκ τούτου, η αξιοποίηση των σύγχρονων *in vitro* μεθόδων αγενούς αναπαραγωγής όπως ο μικροπολλαπλασιασμός είναι ιδιαίτερα σημαντική για τη μαζική παραγωγή ομοιόμορφων και ποιοτικών φυτών του είδους. Με βάσει πειράματα που πραγματοποιήθηκαν με τον *in vitro* πολλαπλασιασμό συγγενικών, μορφολογικά και οικολογικά παρόμοιων ειδών όπως οι *D. pinifolius* και *D. carthusianorum*, αναμένεται ότι για το είδος αυτό ενδείκνυται η χρήση υποστρωμάτων MS και BA ή 2iP σε συγκεντρώσεις έως 1 mg L⁻¹ κατά τα στάδια εγκατάστασης και πολλαπλασιασμού, καθώς και η χρήση υποστρωμάτων MS,

½ MS ή WPM παρουσία ή απουσία IBA κατά το στάδιο ριζοβολίας (Cristea *et al.*, 2016; Muszynska *et al.*, 2017).



Εικόνα 13. Ταξιανθίες ανθισμένου ατόμου *D. cruentus* στο φυσικό πληθυσμό του είδους πλησίον του οικισμού Σκαμνός, στις δυτικές υπώρειες του όρους Καλλίδρομο (Ν. Φθιώτιδος), Ιούλιος 2021.



Εικόνα 14. Ταξιανθίες ανθισμένων ατόμων *D. cruentus* προερχόμενων από σπόρους συλλεγμένους από το φυσικό πληθυσμό του είδους στο όρος Καλλίδρομο, οι οποίοι βλάστησαν και καλλιεργήθηκαν σε ταρατσόκηπο της Αθήνας, Μάιος 2021.

2. Οικοφυσιολογία του σπόρου *D. cruentus*

2.1 Εισαγωγή - Οικοφυσιολογία του σπόρου

Σπόροι πολυάριθμων ειδών προερχόμενων από περιοχές με Μεσογειακό κλίμα χαρακτηρίζονται από τη παρουσία πρωτογενούς φυσιολογικού ληθάργου, με το 60% περίπου των αυτοφυών σε αυτές ποώδων φυτών να εντάσσεται στη κατηγορία αυτή (Baskin & Baskin, 2014). Οι σπόροι τέτοιων ειδών είναι διαπερατοί στο νερό, όμως η παρουσία κάποιου παρεμποδιστικού φυσιολογικού μηχανισμού αποτρέπει την έκπτυξη του ριζιδίου ή/και του επικοτυλίου. Σε συνδυασμό με το χαμηλό δυναμικό βλάστησης του εμβρύου, η ύπαρξη δομών που το καλύπτουν όπως το ενδοσπέρμιο, οι σπερματικοί χιτώνες και αδιάρρηκτων καρπών ή υπολειμμάτων βρακτίων, καλύκων και άλλων οργάνων παρεμποδίζουν τη βλάστηση, ιδιαίτερα στους σπόρους που μόλις έχουν ωριμάσει. Πολυάριθμες μεταχειρίσεις μπορούν να άρουν το λήθαργο αυτό, με τις πιο ευρέως επιτυχείς από αυτές να είναι η ψυχρή στρωμάτωση και η εμβάπτιση των σπερμάτων σε διάλυμα που περιέχει γιββεριλίνες (Nikolaeva, 1977). Στα είδη που προέρχονται από περιοχές με βροχοπτώσεις κυρίως το χειμώνα, σε πολλές περιπτώσεις ο φυσιολογικός λήθαργος μπορεί να διασπαστεί με ξηρή αποθήκευση των σπόρων σε θερμοκρασίες μεγαλύτερες των 20 °C, ιδίως σε είδη με αβαθή φυσιολογικό λήθαργο όπως πολλά είδη της οικογένειας Poaceae. Πιθανώς ο μηχανισμός αυτός αποτελεί εξελικτική προσαρμογή της οικοφυσιολογίας βλάστησης των ειδών που εξέρχονται από το λήθαργο υπό τις ξηροθερμικές συνθήκες του καλοκαιριού, προκειμένου να βλαστήσουν με την έλευση των ψυχρών και υγρών συνθηκών του χειμώνα (Baskin & Baskin, 2014).

Το γένος *Dianthus* περιέχει κυρίως είδη που χαρακτηρίζονται από την απουσία ληθάργου στα σπέρματά τους, καθώς αυτά μπορούν να βλαστήσουν σε ένα μεγάλο εύρος συνθηκών χωρίς κάποια προμεταχείριση (Deno, 1993). Την ίδια στιγμή, πολυάριθμοι παράγοντες όπως η θερμοκρασία, η φωτοπερίοδος και η ηλικία των σπόρων επηρεάζουν σημαντικά τη βλαστικότητα τους, με αποτέλεσμα τη μείωση ή την αύξησή της (Kołodziejek *et al.*, 2018).

2.2 Υλικά και μέθοδοι

2.2.1 Προέλευση φυτικού υλικού

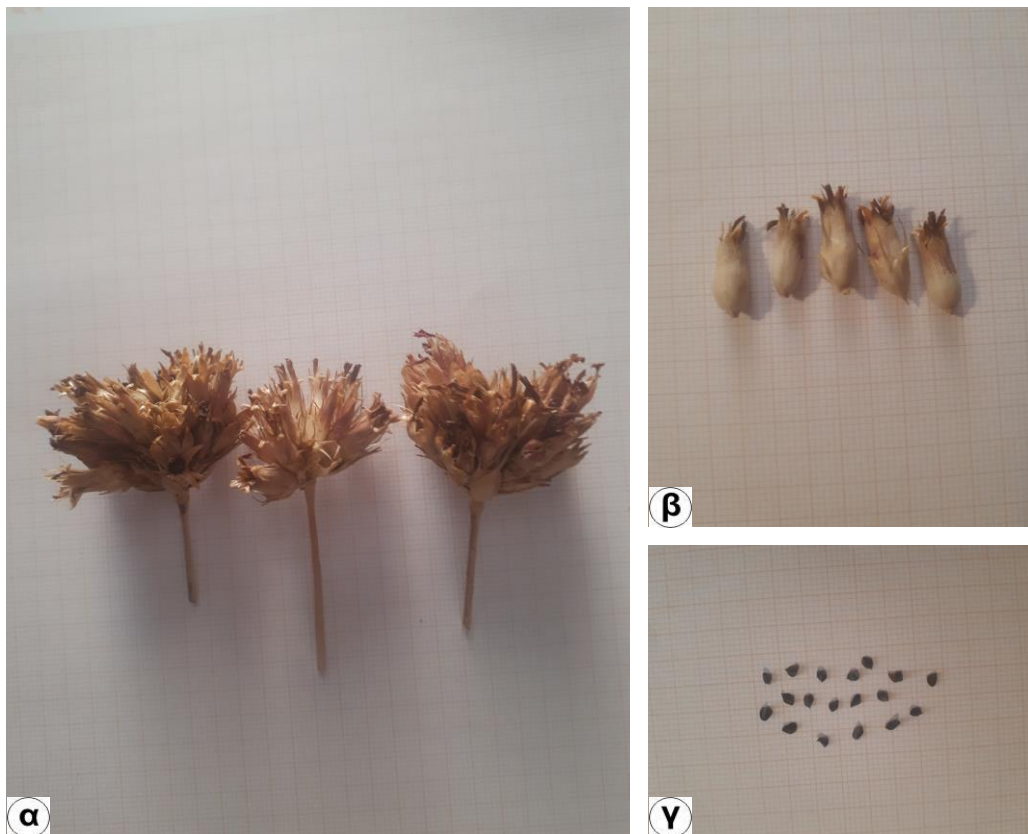
Για την εκτέλεση των πειραμάτων βλαστικότητας του *Dianthus cruentus*, ώριμες ταξικαρπίες που έφεραν μερικώς έως πλήρως αδιάρρηκτους καρπούς (κάψες) συλλέχθηκαν από επιλεγμένα άτομα φυσικού πληθυσμού του είδους στις δυτικές υπώρειες του όρους Καλλίδρομου Φθιώτιδας (38°44'34.6"N 22°26'43.4"E) τον Αύγουστο του 2020 και τον Αύγουστο του 2021. Πρόκειται για το μοναδικό ευρεθέντα πληθυσμό του είδους στην ευρύτερη περιοχή του όρους (πρώτη αναφορά για το Καλλίδρομο), ο οποίος αποτελείται από περίπου 15 ενήλικα άτομα που αναπτύσσονται σε επικλινή πρανή της παλιάς Εθνικής Οδού Αθηνών-Λαμίας, πλησίον του οικισμού Σκαμνός, σε υψόμετρο περίπου 570 μέτρα από την επιφάνεια της θάλασσας. Όλα τα φυτά αναπτύσσονται κοντά στη βάση των πρανών, σε μερικώς συγκρατημένους χαλικώνες με εναπόθεση πηλώδους εδάφους, σπανιότερα σε σχισμές ασβεστολιθικού πετρώματος. Η κυρίαρχη βλάστηση της περιοχής είναι πυκνή μακκία (πρινώνες), χαρακτηριστικό παράδειγμα της φυτοκοινότητας Phillyreo-Querquetum cocciferaea και σύσταση παρόμοια με αυτή των πρινώνων στις ανατολικές υπώρειες του όρους Οίτη (Καρέτσος, 2002). Κυρίαρχα είδη της βλάστησης αποτελούν σκληρόφυλλα φανερόφυτα όπως τα *Quercus coccifera* (πουρνάρι), *Phillyrea latifolia* (φιλλύκι) και *Cercis siliquastrum* (κουτσουπιά), ενώ κοντά στα κράσπεδα του δρόμου επικρατούν θαμνώδη και ποώδη είδη όπως τα *Cistus creticus* (λαδανιά), *Scaligeria nariformis* και *Micromeria juliana* (τραγορίγανη).



Εικόνα 15. Θέση συλλογής των σπόρων του *D. cruentus* στο όρος Καλλίδρομο.

2.2.2 Συλλογή, καθαρισμός και αποθήκευση σπόρων

Οι συλλεχθείσες ταξικαρπίες κόπηκαν από τη βάση τους με βοήθεια ψαλιδιού και αφού ελέγχθηκαν για τη παρουσία εντόμων, αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου για λίγες μέρες αναρτημένες εντός χάρτινων σάκων, έτσι ώστε να διαρραγούν φυσικώς οι καρποί και να παραληφθούν οι ώριμοι σπόροι του είδους. Στη συνέχεια, μετά τον καθαρισμό τους από προσμειξείς που οφείλονταν στη διαδικασία παραλαβής τους (υπολείμματα ανθέων, τοιχωμάτων κάψας, στοιχεία κάλυκα και επικάλυκα και άλλα τμήματα φυτικών οργάνων), απομακρύνθηκαν όλοι οι εμφανώς άωροι, κούφιοι ή/και προσβεβλημένοι σπόροι με βάση μορφολογικά κριτήρια (μέγεθος, χρώμα και πάχος). Τέλος, οι καθαρισμένοι σπόροι μεταφέρθηκαν σε κλειστούς πλαστικούς περιέκτες και αποθηκεύτηκαν σε συνθήκες σκότους και θερμοκρασία δωματίου μέχρι τη χρήση τους.



Εικόνα 16. (α) Ταξικαρπίες *D. cruentus* μετά από τη συλλογή και την αποθήκευσή τους. (β) Ωριμες, διαρρηγμένες κάψες του είδους. (γ) Ωριμα, υγιή σπέρματα του είδους. Κλίμακα: μιλλμετρέ χαρτί (πλέγμα 1 cm^2 με υποδιαίρεση 1 mm^2).

2.2.3 Μέθοδος παρασκευής και αποστείρωσης του θρεπτικού υποστρώματος

Η παρασκευή του θρεπτικού υποστρώματος που χρησιμοποιήθηκε για τη βλάστηση των σπόρων πραγματοποιήθηκε βάση της διαδικασίας που ακολουθήθηκε και σε άλλες μελέτες *in vitro* βλαστικότητας στο οικείο Εργαστήριο (Τρίγκα, 2017; Μπαρμπάνη, 2021). Αρχικά σε δοχείο ζέσεως έγινε προσθήκη αποσταγμένου νερού με λιγότερο όγκο από του τελικού, $2,2 \text{ g L}^{-1}$ θρεπτικού μέσου Murashige and Skoog και 20 g L^{-1} σακχαρόζης. Με τη βοήθεια ενός μαγνητικού αναδευτήρα το διάλυμα τέθηκε υπό συνεχή ανάδευση μέχρι τη πλήρη διάλυση των συστατικών. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε προσθήκη αποσταγμένου νερού μέχρι τον επιθυμητό όγκο, την οποία ακολούθησε ογκομέτρηση του διαλύματος και ρύθμιση του pH σε τιμή 5,7-5,8 της κλίμακας με τη χρήση διαλυμάτων $0,1 \text{ N NaOH}$ και $0,1 \text{ HCl}$. Η διαδικασία ολοκληρώθηκε με την προσθήκη του στερεοποιητικού παράγοντα (8 g L^{-1} άγαρ) και ακολούθησε θέρμανση του διαλύματος υπό συνεχή ανάδευση έως τη παραλαβή διαυγούς διαλύματος. Για την αποστείρωση του υποστρώματος χρησιμοποιήθηκε κλίβανος υγρής αποστείρωσης για χρονικό διάστημα 20 min , σε θερμοκρασία $121 \text{ }^{\circ}\text{C}$ και πίεση $1,2 \text{ atm}$.

Μετά την αποστείρωση του υποστρώματος σε γυάλινες φιάλες όγκου 500 ή 1000 mL , αυτό μεταφέρθηκε σε πλαστικά τρυβλία Petri (διαμέτρου 9 cm), με 20 mL υποστρώματος ανά τρυβλίο, μέσα στην Τράπεζα Νηματικής Ροής του Εργαστηρίου. Για την βλάστηση των σπόρων *ex vitro* χρησιμοποιήθηκαν πλαστικά φυτοδοχεία όγκου 2 L με εδαφικό υπόστρωμα τύρφης-περλίτη σε αναλογία $1:1 \text{ (v/v)}$.

2.2.4 Επιφανειακή απολύμανση σπόρων

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

2.2.5 Εγκατάσταση σπόρων και συνθήκες επώασης

In vitro: Μετά τη διαδικασία απολύμανσης των σπόρων αυτοί μεταφέρθηκαν σε πλαστικά τρυβλία Petri με στερεό υπόστρωμα MS υποδιπλασιασμένης δύναμης που περιείχε 8 g L⁻¹ άγαρ και 20 g L⁻¹ σακχαρόζη, για βλάστηση *in vitro*. Οι σπόροι τοποθετήθηκαν σε πέντε διαφορετικές θερμοκρασίες, 5, 10, 15, 20 ή 25 °C, σε φωτοπερίοδο 16 h πλήρους φωτός έντασης 37,5 μmol m⁻² s⁻¹ (4.000 lx fluorescent light) που προέρχονταν από λευκούς λαμπτήρες φθορισμού, σε θαλάμους σταθερών συνθηκών. *Ex vitro*: Σπόροι τοποθετήθηκαν για φύτρωμα σε πλαστικά φυτοδοχεία, τα οποία περιείχαν εδαφικό υπόστρωμα που αποτελείτο από τύρφη και περλίτη σε αναλογία 1:1 (v/v). Οι σπόροι καλύφθηκαν με υπόστρωμα (πάχους 0,5-1,0 cm) και τα φυτοδοχεία τυλίχθηκαν με πλαστική μεμβράνη sanitas και τοποθετήθηκαν προς βλάστηση σε θαλάμους σταθερών συνθηκών ανάπτυξης υπό 16 h φωτοπερίοδο και 37,5 μmol m⁻² s⁻¹ fluorescent φωτισμό στους 15, 20 ή 25 °C. Η διαβροχή του υποστρώματος γινόταν σε τακτά χρονικά διαστήματα με επιφανειακό ψεκασμό ώστε να διατηρηθεί η υγρασία του υποστρώματος. Ο έλεγχος της βλαστικότητας πραγματοποιήθηκε 0 και 12 μήνες μετά την συλλογή των σπόρων.

2.2.6 Στατιστική ανάλυση - Εκτίμηση αποτελεσμάτων

Σε κάθε επέμβαση χρησιμοποιήθηκαν 120 σπόροι (*in vitro*: 20 σπόροι ανά τρυβλίο, 6 τρυβλία ανά επέμβαση) ή 100 σπόροι (*ex vitro*: 25 σπόροι ανά δοχείο, 4 δοχεία ανά επέμβαση). *In vitro* ως βλάστηση ορίστηκε η εμφάνιση ριζιδίου τουλάχιστον 1 mm μήκους, σύμφωνα με τον International Seed Testing Association (1999), ενώ *ex vitro* ως βλάστηση ορίστηκε η εμφάνιση των εκπτυγμένων κοτυληδόνων. Και στις δύο περιπτώσεις οι μετρήσεις λαμβάνονταν κάθε δύο ημέρες, με την έναρξη των μετρήσεων κατά την εγκατάσταση των σπόρων. Για τη στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων χρησιμοποιήθηκε το Εντελώς Τυχαιοποιημένο Σχέδιο, η σημαντικότητα των αποτελεσμάτων εξετάστηκε με τη δοκιμασία του *F* (ANOVA) και η σύγκριση των μέσων των επεμβάσεων έγινε με τη διενέργεια Student's *t*-test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. Πραγματοποιήθηκε διπαραγοντική ανάλυση του πειράματος (MANOVA) και μελετήθηκε η επίδραση της ηλικίας και της θερμοκρασίας στη βλαστικότητα των σπόρων.

2.3 Αποτελέσματα

2.3.1 Βλαστικότητα σπόρων *in vitro*

Η βλάστηση των σπόρων ξεκίνησε την 2η ημέρα στις θερμοκρασίες 15 έως 25 °C και τη 4η ημέρα στους 10 °C και για τις δύο παρτίδες σπόρων, ηλικίας 0 και 12 μηνών, ενώ στους 5 °C η βλάστηση ξεκίνησε την 6η ημέρα για τους σπόρους ηλικίας 12 μηνών και τη 14η μέρα για τους σπόρους ηλικίας 0 μηνών (Πίν. 1, Σχ. 1, 2 και 3, Εικ. 17). Οι σπόροι ηλικίας 12 μηνών βλάστησαν σε υψηλότερα ποσοστά σε σύγκριση με τους σπόρους ηλικίας 0 μηνών, ιδιαίτερα στις δύο ακραίες θερμοκρασίες (5 και 25 °C) του πειράματος. Οι σπόροι στους 5 και στους 25 °C σημείωσαν το χαμηλότερο ποσοστό βλαστικότητας και στις δύο παρτίδες σπόρων, με τα ποσοστά να είναι ιδιαίτερα χαμηλότερα στους σπόρους ηλικίας 0 μηνών. Πέρα από τη θερμοκρασία των 5 °C, δεν σημειώθηκαν ουσιαστικές διαφορές στη ταχύτητα βλάστησης των σπόρων στις υπόλοιπες θερμοκρασίες (10 έως 25 °C) και για τις δύο παρτίδες σπόρων, έτσι όπως αυτή εκφράστηκε μέσω του υπολογισμού της τιμής T_{50} (χρόνος για την επίτευξη του 50% της τελικής βλαστικότητας). Αντίθετα, η βλάστηση των σπόρων ολοκληρώθηκε σημαντικά νωρίτερα για τους σπόρους ηλικίας 12 μηνών στις θερμοκρασίες 10, 20 και 25 °C (8, 14 και 22 μέρες αντίστοιχα), ενώ στους 5 °C και τους 15 °C η διαφορά ήταν πολύ μικρότερη (2 ημέρες) (Πίν. 1, Σχ. 1, 2 και 3, Εικ. 17).

Πίνακας 1. *In vitro* βλαστικότητα σπόρων *D. cruentus*, 0 ή 12 μήνες μετά τη συλλογή τους, στους 5, 10, 15, 20 ή 25 °C, σε συνθήκες φωτοπεριόδου 16 h.

Ηλικία (μην.) / Θερμοκρασία (C)	Βλαστικότητα (%)	T ₅₀	Περ. βλάστησης (d)
0 / 5	18 d	18	32
0 / 10	90 b	4	14
0 / 15	98 a	4	8
0 / 20	82 c	4	22
0 / 25	15 d	4	30
12 / 5	91 b	14	30
12 / 10	98 a	4	6
12 / 15	100 a	4	6
12 / 20	99 a	2	6
12 / 25	96 ab	2	8

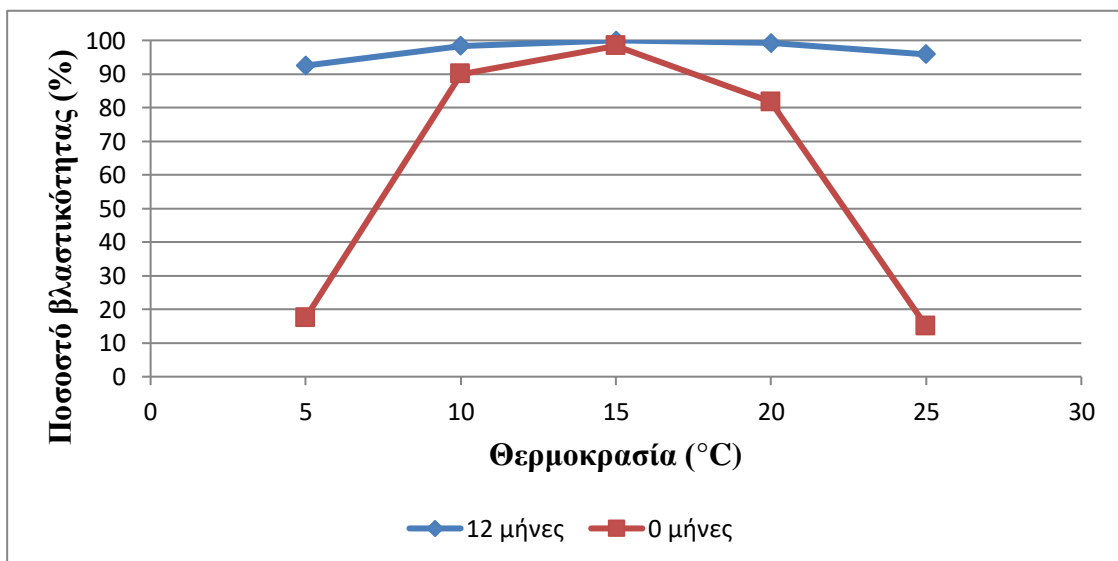
$F_{\text{Θερμοκρασίας}}$

$F_{\text{Ηλικίας}}$

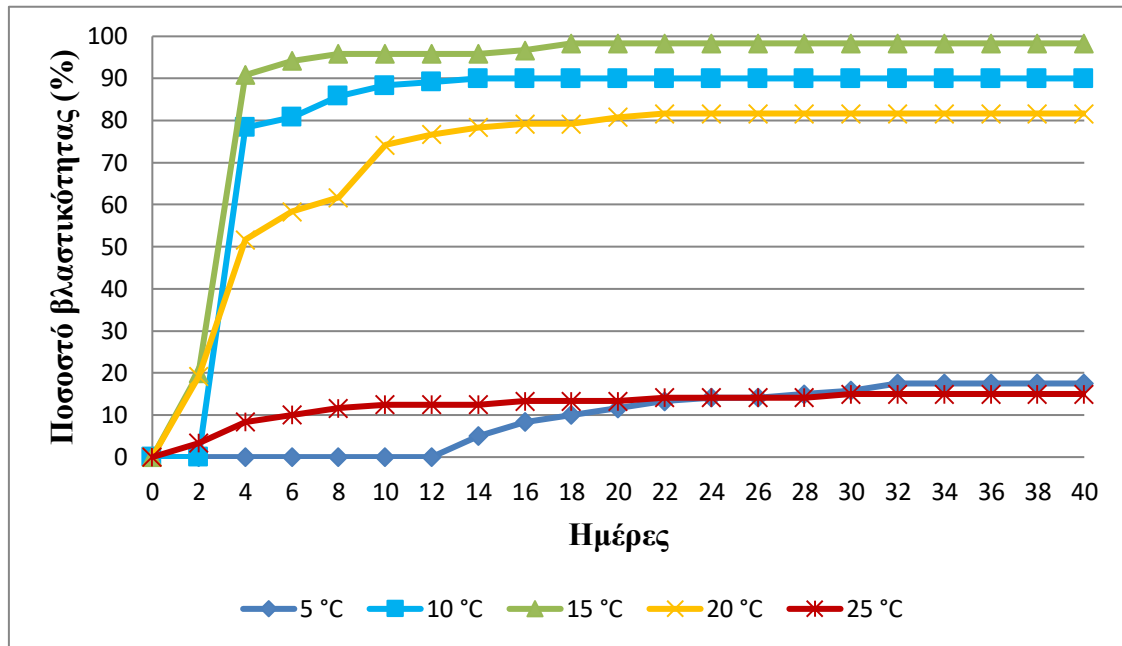
$F_{\text{Θερμοκρασίας x Ηλικίας}}$

$F_{\text{one-way ANOVA}}$

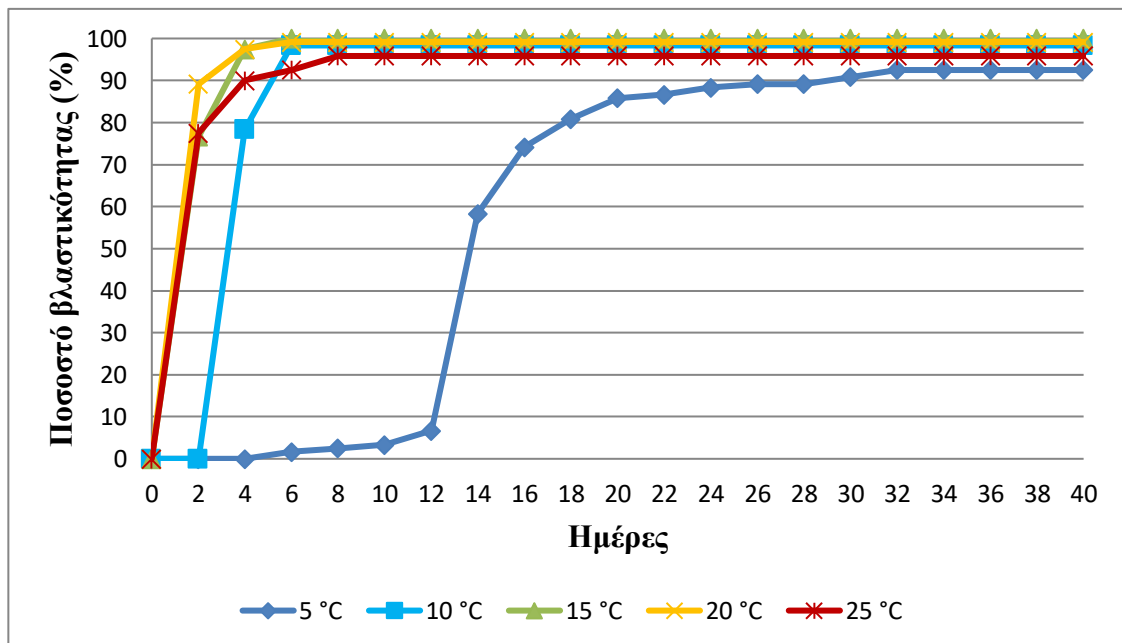
Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σύμφωνα με το Student's t test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. NS : μη σημαντικό, *, **, ***: σημαντικό σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$ και $P \leq 0,001$ αντίστοιχα. 6 επαναλήψεις των 20 σπόρων ($n = 120$) χρησιμοποιήθηκαν ανά μεταχείριση.



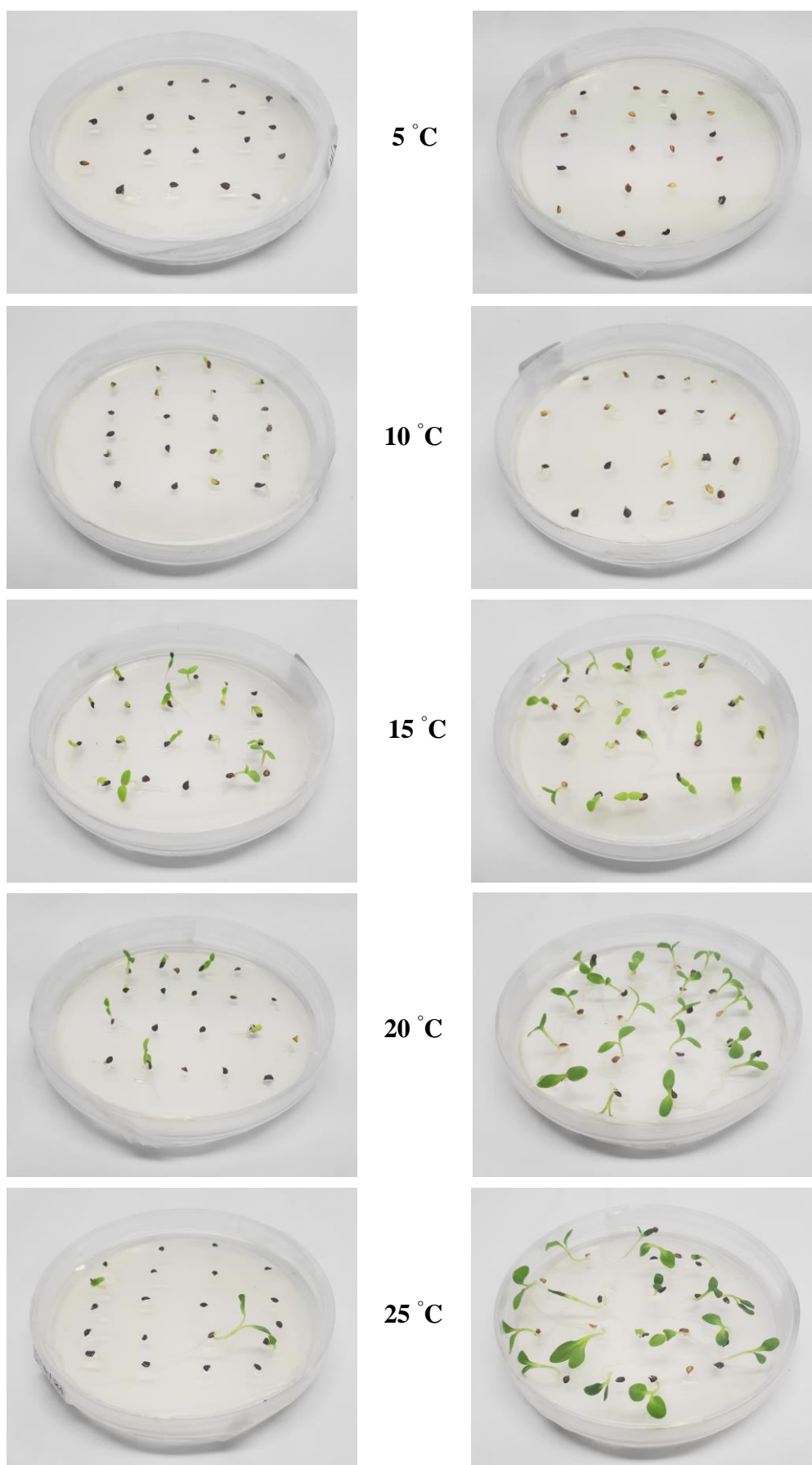
Σχήμα 1. Επίδραση της θερμοκρασίας και της ηλικίας (σπόροι ηλικίας 0 ή 12 μηνών) στην *in vitro* βλαστικότητα σπόρων *D. cruentus* σε συνθήκες φωτοπεριόδου 16 h πλήρους φωτός.



Σχήμα 2. Ρυθμός *in vitro* βλάστησης σπόρων *D. cruentus*, 0 μήνες μετά τη συλλογή τους, στους 5, 10, 15, 20 ή 25 °C, σε συνθήκες φωτοπεριόδου 16 h πλήρους φωτός.



Σχήμα 3. Ρυθμός *in vitro* βλάστησης σπόρων *D. cruentus*, 12 μήνες μετά τη συλλογή τους, στους 5, 10, 15, 20 ή 25 °C, σε συνθήκες φωτοπεριόδου 16 h πλήρους φωτός.



Εικόνα 17. Βλάστηση *in vitro* σπόρων *D. cruentus* 0 (αριστερά) ή 12 μήνες (δεξιά) μετά τη συλλογή τους, στους 5, 10, 15, 20 ή 25 °C, σε συνθήκες φωτοπερίοδου 16 h πλήρους φωτός, κατά την 6^η ημέρα.

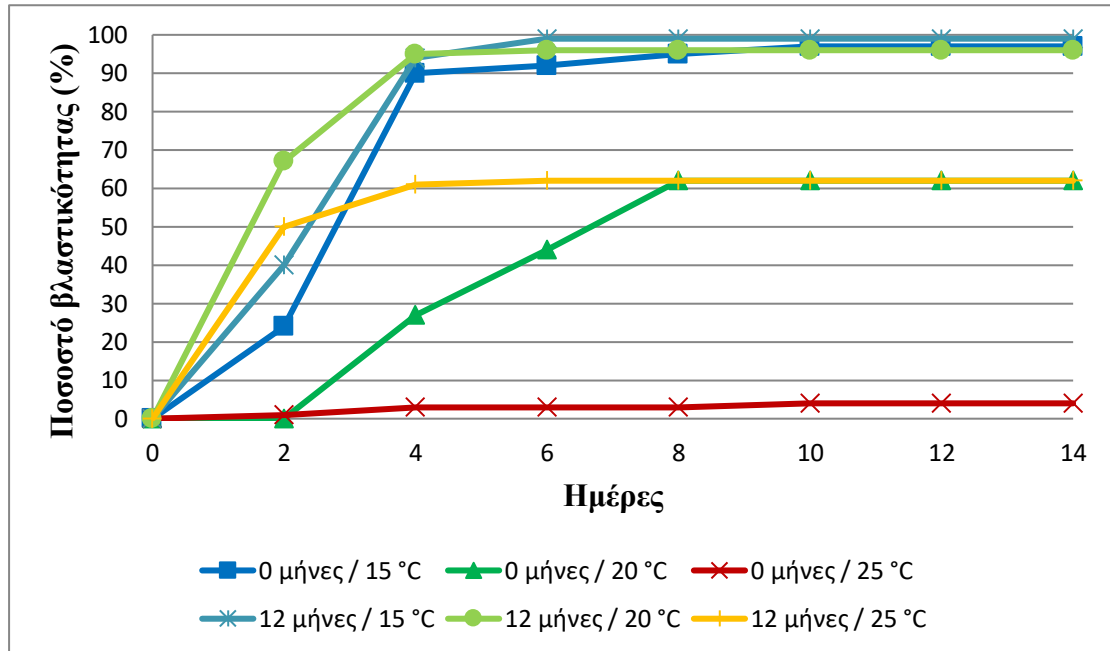
2.3.2 Βλαστικότητα σπόρων *ex vitro*

Η βλάστηση των σπόρων ξεκίνησε την 2η ημέρα σε όλες τις θερμοκρασίες και στις δύο παρτίδες σπόρων, ηλικίας 0 και 12 μηνών, με εξαίρεση τους 20 °C για τους σπόρους ηλικίας 0 μηνών (4 ημέρες) (Πίν. 3, Σχ. 4, Εικ. 18). Όπως και στο πείραμα βλαστικότητας *in vitro*, οι σπόροι ηλικίας 12 μηνών βλάστησαν σε υψηλότερα ποσοστά σε σύγκριση με τους σπόρους ηλικίας 0 μηνών, ιδιαίτερα στις δύο μεγαλύτερες θερμοκρασίες (20 και 25 °C) του πειράματος. Και για τις δύο ηλικίες συλλογών, οι σπόροι στους 25 °C σημείωσαν το χαμηλότερο ποσοστό βλαστικότητας, με το ποσοστό να είναι εξαιρετικά χαμηλό στους σπόρους ηλικίας 0 μηνών (4%). Παρουσιάστηκαν μικρές διαφορές στην ταχύτητα βλάστησης των σπόρων στις υψηλότερες θερμοκρασίες (20 και 25 °C) μεταξύ των δύο παρτίδων σπόρων, με τους σπόρους ηλικίας 12 μηνών να βλαστάνουν ελαφρώς ταχύτερα. Αντίστοιχες διαφορές παρατηρήθηκαν και στο διάστημα για την ολοκλήρωση της βλάστησης των σπόρων, με αυτό να μειώνεται 2 έως 4 ημέρες για τους σπόρους ηλικίας 12 μηνών (Πίν. 3, Σχ. 4, Εικ. 18).

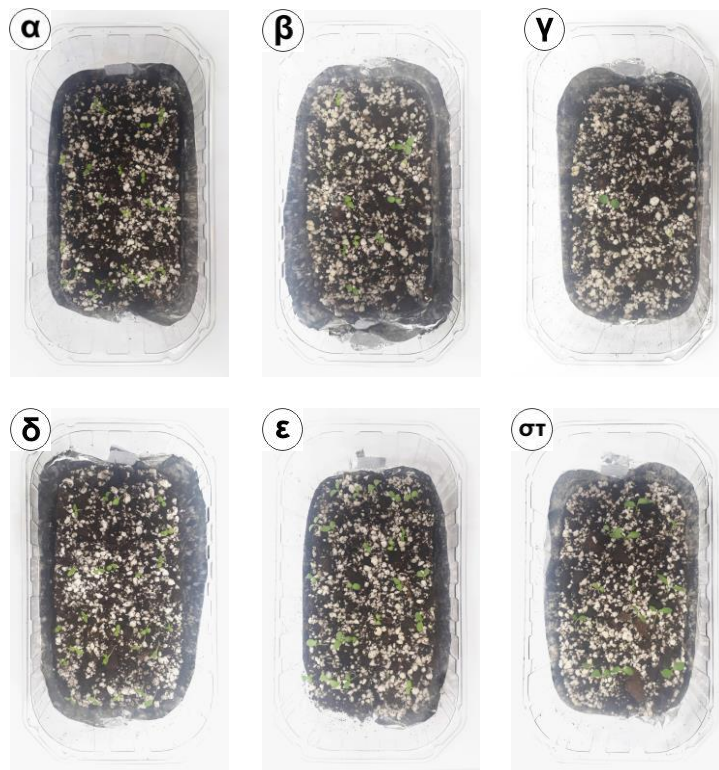
Πίνακας 2. *Ex vitro* βλαστικότητα σπόρων *D. cruentus*, 0 ή 12 μήνες μετά τη συλλογή τους, στους 15, 20 ή 25 °C, σε συνθήκες φωτοπεριόδου 16 h.

Ηλικία (μην.) / Θερμοκρασία (C)	Βλαστικότητα (%)	T ₅₀	Περ. βλάστησης (d)
0 / 15	97 a	4	10
0 / 20	62 b	6	8
0 / 25	4 c	4	10
12 / 15	99 a	4	6
12 / 20	96 a	2	6
12 / 25	62 b	2	6
<i>F</i> _{Θερμοκρασίας}	***		
<i>F</i> _{Ηλικίας}	***		
<i>F</i> _{Θερμοκρασίας x Ηλικίας}	***		
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***		

Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's t test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. NS : μη σημαντικό, *, **, ***: σημαντικό σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$ και $P \leq 0,001$ αντίστοιχα. 4 επαναλήψεις των 25 σπόρων (n = 100) χρησιμοποιήθηκαν ανά μεταχείριση.



Σχήμα 4. *Ex vitro* βλαστικότητα σπόρων *D. cruentus*, 0 ή 12 μήνες μετά τη συλλογή τους, στους 15, 20 ή 25 °C, σε συνθήκες φωτοπεριόδου 16 h πλήρους φωτός.



Εικόνα 18. Βλάστηση *ex vitro* σπόρων *D. cruentus* 0 (α, β, γ) ή 12 μήνες (δ, ε, στ) μετά τη συλλογή τους, στους 15 (α, δ), 20 (β, ε) ή 25 °C (γ, στ), σε συνθήκες φωτοπεριόδου 16 h πλήρους φωτός.

2.4 Συζήτηση - Συμπεράσματα

Σκοπός της πειραματικής διαδικασίας αποτέλεσε η διερεύνηση της ύπαρξης ή της απουσίας ληθάργου στους σπόρους του *Dianthus cruentus*, ο καθορισμός των θερμοκρασιακών ορίων για τη βλάστησή τους, καθώς και η επίδραση της ηλικίας της σπορομερίδας προέλευσης σε *in vitro* και *ex vitro* συνθήκες. Με βάση τις ληφθείσες μετρήσεις βλαστικότητας, οι σπόροι του *D. cruentus* χαρακτηρίζονται από την απουσία ληθάργου, καθώς καθίστανται ικανοί να βλαστήσουν σε ένα εύρος θερμοκρασιών χωρίς κάποια προμεταχείριση. Η απουσία ληθάργου αποτελεί κοινό χαρακτηριστικό των περισσότερων ειδών του γένους *Dianthus* (Deno, 1993), ενώ σε ορισμένα είδη παρατηρείται αβαθής φυσιολογικός λήθαργος, χαρακτηριστικά που μπορούν να συνδεθούν με την ανάγκη βλάστησης και επιβίωσης σε δυσχερείς, ευμετάβλητες συνθήκες (Baskin & Baskin, 2014).

Η ηλικία της σπορομερίδας προέλευσης είχε σημαντική επίδραση στη βλαστικότητα των σπόρων, με τους σπόρους που αποθηκεύτηκαν για 12 μήνες να βλαστάνουν σε σημαντικά υψηλότερα ποσοστά από αυτούς που υποβλήθηκαν σε δοκιμές βλάστησης αμέσως μετά τη συλλογή τους για τις περισσότερες θερμοκρασίες επώασης. Συνεπώς, το φαινόμενο της ξηρής μεθωρίμανσης (dry after-ripening) φαίνεται να έχει ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο στην οικοφυσιολογία βλάστησης του είδους, αυξάνοντας τόσο το θερμοκρασιακό εύρος βλάστησης όσο και το ποσοστό τελικής βλαστικότητας με τρόπο αντίστοιχο με αυτόν που έχει παρατηρηθεί για άλλα αυτοφυή μεσογειακά είδη όπως η *Satureja thymbra* (Thanos *et al.*, 1995). Αντίστοιχη θετική επίδραση της ξηρής μεθωρίμανσης αναφέρεται και για άλλα δύο είδη του γένους, με πιο χαρακτηριστικό το ψαμμόφιλο, ενδημικό της Σαρδηνίας *Dianthus morrisianus*, στο οποίο το φαινόμενο αποτελεί οικοφυσιολογική προσαρμογή για τη προστασία των σπερμάτων από πρόωρη βλάστηση στις αντίξοες θερμοξηρικές συνθήκες του καλοκαιριού (Cogoni *et al.*, 2012). Την ίδια στιγμή, αναφέρεται πως το φαινόμενο δε φαίνεται να είναι σημαντικό για άλλα είδη του γένους όπως οι *D. deltoides*, *D. arenarius* και *D. gratianopolitanus*, είδη προερχόμενα από περιοχές με εύκρατο κλίμα και συχνές θερινές βροχοπτώσεις (Kołodziejek *et al.*, 2018).

Όσον αφορά την επίδραση της θερμοκρασίας, σε όλα τα πειράματα οι υψηλότερες τιμές βλαστικότητας λήφθηκαν όταν οι σπόροι επώαστηκαν σε θερμοκρασία 15 °C, ενώ υψηλές τιμές σημειώθηκαν και για τους 10 °C, εύρος

χαρακτηριστικό για αυτοφυή είδη του γένους προερχόμενα από περιοχές με ξηροθερμικό Μεσογειακό κλίμα, με παραδείγματα όπως οι ενδημικοί *Dianthus fruticosus* subsp. *fruticosus* (Stragas & Papafotiou, 2009) και *Dianthus xylorrhizus* (Φουρναράκη, 2010). Αντίθετα, στις υπόλοιπες θερμοκρασίες παρουσιάστηκαν σημαντικές διαφορές, ιδιαίτερα στους σπόρους ηλικίας 0 μηνών, με τις μικρότερες τιμές βλαστικότητας να καταγράφονται για τις δύο ακραίες (5 °C και 25 °C).

Οι τιμές του T₅₀ ήταν ιδιαίτερα χαμηλές για όλες τις θερμοκρασίες βλάστησης που εξετάστηκαν (2 έως 6 d), με εξαίρεση τους 5 °C (14 έως 18 d), υποδεικνύοντας πολύ υψηλό ρυθμό βλάστησης, αντίστοιχο των περισσότερων ειδών του γένους (Stragas & Papafotiou, 2009; Φουρναράκη, 2010; Skourti *et al.*, 2019). Αντίθετα, στα πειράματα *in vitro* βλαστικότητας μεγάλες διαφορές εντοπίστηκαν στο συνολικό χρονικό διάστημα που απαιτήθηκε για την ολοκλήρωση της βλάστησης. Οι μικρότερες τιμές σημειώθηκαν και για τις δύο σπορομερίδες στους 15 °C, ενώ οι μεγαλύτερες στους 5 °C. Στις υπόλοιπες θερμοκρασίες, η χρονική περίοδος που απαιτήθηκε για την ολοκλήρωση της βλάστησης των σπόρων ηλικίας 0 μηνών ήταν 8 έως 16 ημέρες μακρότερη από την αντίστοιχη σε σπόρους ηλικίας 12 μηνών. Τα αποτελέσματα αυτά υποδεικνύουν τη καλή προσαρμογή του είδους για τη ταχεία εγκατάστασή του σε περιοχές επιρρεπείς σε περιοδικές φυσιολογικές καταπονήσεις, με παρόμοια συμπεριφορά με άλλα Μεσογειακά είδη που ζουν σε ξηρούς οικοτόπους με μεταβλητές, ιδιαίτερα απαιτητικές συνθήκες όπως ο *Centranthus ruber* (Mattana *et al.*, 2010).

Τέλος, διαφορές παρουσιάστηκαν μεταξύ των πειραμάτων σε *ex vitro* και *in vitro* συνθήκες, με τη διαδικασία σε *in vitro* συνθήκες να χαρακτηρίζεται από υψηλότερα ποσοστά βλαστικότητας για τις θερμοκρασίες των 20 και 25 °C, καθώς και μεγαλύτερη περίοδο για την ολοκλήρωση της βλάστησης για τους σπόρους ηλικίας 0 μηνών. Αντίστοιχα μειωμένη βλαστικότητα παρατηρήθηκε σε *ex vitro* συνθήκες στους 20 °C κατά τη βλάστηση σκαριφισμένων σπόρων της *Anthyllis barba-jonis* ηλικίας 0, 12 και 24 μηνών (Τρίγκα, 2017). Οι αιτίες για τις αποκλίσεις αυτές μπορούν να αναζητηθούν τόσο στις διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες (διαθέσιμη υγρασία, ένταση φωτός) όσο και στην πιθανή θετική επίδραση του σταδίου απολύμανσης στη κινητοποίηση των διεργασιών βλάστησης των σπόρων (Cristea *et al.*, 2013).

3. Μικροπολλαπλασιασμός του *D. cruentus*

3.1 Εισαγωγή

Σε πώδη πολυετή είδη για τα οποία η χρήση παραδοσιακών μεθόδων αγενούς πολλαπλασιασμού όπως μοσχεύματα δεν είναι εφικτή ή αποδοτική, ο *in vitro* πολλαπλασιασμός τους είναι συχνά προαπαιτούμενο για τη δημιουργία ενός αποτελεσματικού πρωτοκόλλου πολλαπλασιασμού. Η αυξημένη δυναμικότητα παραγωγής ενός μεγάλου αριθμού υγείων και όμοιων με το μητρικό πληθυσμό φυτών κρίνεται ως ιδιαίτερα μεγάλης σημασίας για την εμπορική διάθεση και αξιοποίηση νέων αυτοφυών καλλωπιστικών. Όσον αφορά το *D. cruentus*, παρά τη διάδοση του είδους στο εξωτερικό, δε βρέθηκε καμία βιβλιογραφική αναφορά σχετική με το μικροπολλαπλασιασμό του, ενώ έχουν δημοσιευθεί πολυάριθμες μελέτες για άλλα είδη του γένους *Dianthus*, και ιδίως για το ευρέως καλλιεργούμενο *D. caryophyllus*.

Σε όλη τη διάρκεια της *in vitro* καλλιέργειας του *D. cruentus* παρατηρήθηκε το φαινόμενο της υπερενυδάτωσης σε σημαντικό αριθμό των εκφύτων, καθώς πολλοί από τους βλαστούς που εκπτύσσονταν από αυτά είχαν μη τυπική για το είδος υαλώδη και παραμορφωμένη εμφάνιση, ενώ λόγω ιστοανατομικών και φυσιολογικών αλλοιώσεων καθίσταται αδύνατος ο *ex vitro* εγκλιματισμός τους. Πρόκειται για ένα συχνά απαντώμενο φαινόμενο κατά το μικροπολλαπλασιασμό πολυάριθμων ξυλωδών και ποωδών ειδών και αναφέρεται ως σημαντικό εμπόδιο για τον αποδοτικό μικροπολλαπλασιασμό άλλων ελληνικών αυτοφυών όπως η *Globularia alypum* και η *Lithodora zahnii* (Parafotiou, 2010). Ο ακριβής μηχανισμός για την εμφάνιση και την ένταση του φαινομένου δεν έχει αποσαφηνιστεί πλήρως, όμως φαίνεται ότι πρόκειται για μια σύνθετη διαδικασία με τη συμμετοχή πολυάριθμων αποκκρίσεων σε φυσιολογικές καταστάσεις όπως η σύνθεση και η συσσώρευση αιθυλενίου και η οξειδωτική καταπόνηση (Saher *et al.*, 2005). Παράγοντες με τους οποίους έχει συσχετιστεί η αυξημένη παρουσία υπερενυδατωμένων βλαστών είναι το είδος και η συγκέντρωση των κυτοκινινών, το είδος και η συγκέντρωση του θρεπτικού μέσου και του στερεοποιητικού παράγοντα, η ελλιπής ανταλλαγή αερίων του περιέκτη καλλιέργειας και η σχετική υγρασία στο εξωτερικό του, καθώς και η ευαισθησία του είδους ή της ποικιλίας στην υπερενυδάτωση (Sreelekshmi & Siril, 2021a).

3.2 Υλικά και μέθοδοι

3.2.1 Φυτικό υλικό

Σπόροι *Dianthus cruentus* Griseb. που είχαν συλλεχθεί από αυτοφυή πληθυσμό φυτών στις υπώρειες του όρους Καλλίδρομου Φθιώτιδας τον Ιούλιο του 2019 (βλ. ενότητα 2.2.1) διατηρήθηκαν σε θερμοκρασία δωματίου και υπό συνθήκες σκότους για διάστημα 12 μηνών και στη συνέχεια, αφού απολυμάνθηκαν επιφανειακά, καλλιεργήθηκαν για βλάστηση *in vitro* σε τρυβλία Petri με στερεό (8 g L^{-1} agar) θρεπτικό υπόστρωμα MS (Murashige and Skoog, 1962) μισής δύναμης ($2,2 \text{ g L}^{-1}$), στους $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ για διάστημα ενός μηνός από την εγκατάστασή τους (Εικ. 19). Έπειτα, τα αναπτυσσόμενα σπορόφυτα μεταφέρθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες στο στάδιο έκπτυξης του δεύτερου ζεύγους πραγματικών φύλλων σε γυάλινα βάζα όγκου 100 mL , το καθένα από τα οποία περιείχε 25 mL στερεό (8 g L^{-1} agar) θρεπτικό υπόστρωμα MS (Murashige and Skoog, 1962) πλήρους δύναμης ($4,4 \text{ g L}^{-1}$), προκειμένου να συνεχίσουν την ανάπτυξή τους για διάστημα ενός περίπου μήνα. Με την παρέλευση του χρονικού διαστήματος αυτού, κάθε σπορόφυτο χρησιμοποιήθηκε για την παραλαβή συνολικά δύο ή τριών εκφύτων κόμβου και κορυφής, τα οποία αποτέλεσαν το αρχικό υλικό για την *in vitro* εγκατάσταση του είδους χωρίς να διακριθούν βάσει της προέλευσής τους (Εικ. 19).



Εικόνα 19. Σπορόφυτα *D. cruentus* αναπτυσσόμενα *in vitro* ηλικίας 8 εβδομάδων λίγο πριν τη χρήση τους για τη παραλαβή εκφύτων κορυφής και κόμβου.

3.2.2 Υποστρώματα *in vitro* καλλιέργειών

3.2.2.1 Υλικά των θρεπτικών υποστρωμάτων

Για τη παρασκευή των διαφόρων θρεπτικών υποστρωμάτων καλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη πειραματική διαδικασία χρησιμοποιήθηκαν τα ακόλουθα συστατικά:

- Υπόστρωμα MS (Murashige and Skoog Medium) της εταιρείας Duchefa Bio-chem, σε μορφή σκόνης (Murashige & Skoog, 1962) (Πιν.)
- Υπόστρωμα WPM (McCown's Woody Plant Medium) της εταιρείας Duchefa Bio-chem, σε μορφή σκόνης (McCown & Lloyd, 1981) (Πιν.)
- Κρυσταλλική σακχαρόζη (sucrose) εμπορίου.
- Κυτοκινίνες: BA (N₆-benzyladenine, MB = 225,26), 2iP [6-(γ,γ-dimethylallylamino)purine, MB = 203,24] και ZEA, ζεατίνη (trans-zeatin, MB = 219,24), της εταιρείας Sigma-Aldrich.
- Αυξίνες: Ινδολο-3-βουτυρικό οξύ, IBA, (Indole-3-butyric acid, MB=230,24) και Ναφθαλινοξικό οξύ, NAA, (1-Naphthaleneacetic acid, MB=186), της εταιρείας Sigma-Aldrich.
- Άγαρ (Ρουμπουλάκης Α.Ε. Χημικά).
- Διπλά απεσταγμένο νερό.

Πίνακας 3. Συστατικά (μακροστοιχεία, ιχνοστοιχεία και βιταμίνες) των θρεπτικών υποστρωμάτων Murashige & Skoog (MS), Lloyd & McCown (WPM) και Schenk & Hildebrandt (SH). Πηγή: Τρίγκα, 2017

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

3.2.2.2 Μέθοδος παρασκευής μητρικών διαλυμάτων φυτορρυθμιστικών ουσιών

Προκειμένου να καταστεί εφικτή η παρασκευή των θρεπτικών υποστρωμάτων καλλιέργειας, απαραίτητο προαπαιτούμενο αποτέλεσε η παρασκευή μητρικών (stock) διαλυμάτων των χρησιμοποιούμενων φυτορρυθμιστικών ουσιών, καθένα από τα οποία περιείχε την εκάστοτε φυτορρυθμιστική ουσία σε συγκέντρωση 0,1 g/L. Ακολουθεί η αναλυτική περιγραφή της προετοιμασίας τους:

- Παρασκευή μητρικού διαλύματος BA. Σε δοχείο ζέσεως χωρητικότητας 100 mL τοποθετούνταν 10 mg BA ζυγισμένα με αναλυτικό ζυγό, τα οποία διαλύονταν με ανάδευση σε 2-3 σταγόνες 1 N καυστικού νατρίου (NaOH). Στη συνέχεια προσθέτονταν 100 mL αποσταγμένου νερού και το διάλυμα αναδεύονταν έως τη πλήρη διάλυση του BA.
- Παρασκευή μητρικού διαλύματος 2iP. Σε δοχείο ζέσεως χωρητικότητας 100 mL τοποθετούνταν 10 mg 2iP ζυγισμένα με αναλυτικό ζυγό, τα οποία διαλύονταν με ανάδευση σε 2-3 σταγόνες 1N καυστικού νατρίου (NaOH). Στη συνέχεια προσθέτονταν 100 mL αποσταγμένου νερού και το διάλυμα αναδεύονταν έως τη πλήρη διάλυση του 2iP.
- Παρασκευή μητρικού διαλύματος ζεαίνης. Σε δοχείο ζέσεως χωρητικότητας 100 mL τοποθετούνταν 10 mg ζεαίνης ζυγισμένα με αναλυτικό ζυγό, τα οποία διαλύονταν με ανάδευση σε 2-3 σταγόνες 1N καυστικού νατρίου (NaOH). Στη συνέχεια προσθέτονταν 100 mL αποσταγμένου νερού και το διάλυμα αναδεύονταν έως τη πλήρη διάλυση της ζεαίνης.
- Παρασκευή μητρικού διαλύματος IBA. Σε δοχείο ζέσεως χωρητικότητας 100 mL τοποθετούνταν 10 mg IBA ζυγισμένα με αναλυτικό ζυγό, τα οποία διαλύονταν με ανάδευση σε 2-3 σταγόνες καθαρής αιθανόλης (99,9 %). Στη συνέχεια προσθέτονταν 100 mL αποσταγμένου νερού και το διάλυμα αναδεύονταν έως τη πλήρη διάλυση του IBA.
- Παρασκευή μητρικού διαλύματος NAA. Σε δοχείο ζέσεως χωρητικότητας 100 mL τοποθετούνταν 10 mg NAA ζυγισμένα με αναλυτικό ζυγό, τα οποία διαλύονταν με ανάδευση σε 2-3 σταγόνες καθαρής αιθανόλης (99,9 %). Στη συνέχεια προσθέτονταν 100 mL αποσταγμένου νερού και το διάλυμα αναδεύονταν έως τη πλήρη διάλυση του IBA.

Μετά την παρασκευή τους όλα τα μητρικά διαλύματα των φυτορρυθμιστικών ουσιών αποθηκεύονταν σε οικιακό ψυγείο θερμοκρασίας 4-6 °C, για διάστημα 30 περίπου ημερών, ύστερα από την έλευση των οποίων ανανεώνονταν με την εκ νέου παρασκευή τους.

3.2.2.2 Μέθοδος παρασκευής θρεπτικού υποστρώματος

Για την παρασκευή των θρεπτικών υποστρώτων που χρησιμοποιήθηκαν σε όλα τα στάδια της πειραματικής πορείας ακολουθήθηκε η εξής διαδικασία: Αρχικά έγινε προσθήκη σε δοχείο ζέσεως χωρητικότητας 800 mL ή 1,5 L αποσταγμένου νερού όγκου μικρότερου του τελικού, καθώς και οι ακριβείς ποσότητες πλήρους υποστρώματος Murashige and Skoog (MS) 4,4 g L⁻¹, σακχαρόζης 20 g L⁻¹ και των επιθυμητών κάθε φορά φυτορρυθμιστικών ουσιών από τα μητρικά διαλύματα αυτών. Τα διαλύματα τέθηκαν υπό συνεχή ανάδευση με τη βοήθεια ενός μαγνητικού αναδευτήρα μέχρι το στάδιο της πλήρους διάλυσης των συστατικών και στη συνέχεια πραγματοποιήθηκε η ογκομέτρηση του διαλύματος. Έγινε συμπλήρωση του διαλύματος με αποσταγμένο νερό μέχρι τον επιθυμητό όγκο και ακολούθησε μέτρηση και έπειτα ρύθμιση του pH στην τιμή 5,7-5,8 της κλίμακας με τη βοήθεια διαλυμάτων 0,1 ή 1 N NaOH και 0,1 ή 1 N HCl. Η διαδικασία ολοκληρώθηκε με την προσθήκη της ακριβούς απαιτούμενης ποσότητας άγαρ (8 g L⁻¹) και ακολούθησε θέρμανση του διαλύματος υπό συνεχή ανάδευση μέχρι να διαλυθεί πλήρως (έως διαύγειας) το πηκτικό μέσο. Το έτοιμο υπόστρωμα μοιραζόταν σε κάθε στάδιο καλλιέργειας σε αντίστοιχα δοχεία (γυάλινα βάζα καλλιέργειας) και τοποθετούνταν προς αποστείρωση σε χύτρα ή κλίβανο υγρής αποστείρωσης (αυτόκλειστο).

3.2.2.3 Δοχεία και υλικά κάλυψης

Σε όλα τα *in vitro* στάδια της πειραματικής διαδικασίας, δηλαδή κατά την εγκατάσταση του είδους, τον πολλαπλασιασμό των εκφύτων και τη ριζοβολία των μικροβλαστών, χρησιμοποιήθηκαν ως δοχεία καλλιέργειας γυάλινα βάζα όγκου 100 mL, τα οποία είχαν πληρωθεί με 25 mL στερεού υποστρώματος. Η κάλυψη των βάζων πριν την αποστείρωσή τους σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης, καθώς και κατά την τοποθέτηση των εκφύτων στην Τράπεζα Νηματικής Ροής γινόταν με σκληρό πλαστικό καπάκι ειδικών τεχνικών προδιογραφών, κατάλληλο για ιστοκαλλιέργεια (Magenta B-caps, Sigma).

Στο στάδιο του εγκλιματισμού τα ριζοβολημένα φυτά μεταφυτεύθηκαν για περαιτέρω ανάπτυξη σε πλαστικά φυτοδοχεία όγκου 2 L. Τα φυτοδοχεία περιείχαν υπόστρωμα που αποτελείτο από τύρφη και περλίτη σε αναλογία 1:1 (v/v), ενώ η κάλυψή τους έγινε με πλαστική μεμβράνη Sanitas (Σαράντης Α.Ε), η οποία είχε τις εξής ιδιότητες: περατότητα σε οξυγόνο $8,5 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2}$ σε 24 h, περατότητα σε διοξείδιο του άνθρακα $55.000 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2}$ σε 24 h και περατότητα σε υδρατμούς 110 g m^{-2} σε 24 h), κατά τις πρώτες 7 ημέρες καλλιέργειας, με σκοπό την μείωση των απωλειών υγρασίας στα πρώτα στάδια ανάπτυξης των φυταρίων, όπου παρέμειναν στον θάλαμο σταθερών συνθηκών ($20 \text{ }^\circ\text{C}$) στο εργαστήριο και έπειτα μεταφέρθηκαν στην υδρονέφωση του θερμαινόμενου θερμοκηπίου του εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου έως τον πλήρη εγκλιματισμό τους 3 εβδομάδες αργότερα. Στην συνέχεια, τα πλέον εγκλιματισμένα φυτά μεταφυτεύθηκαν σε πλαστικά φυτοδοχεία όγκου 1 L που περιείχαν υπόστρωμα τύρφης - περλίτη 1:1.

3.2.2.4 Αποστείρωση εργαλείων και υλικών καλλιέργειας

Για την επιτυχή διατήρηση των ασηπτικών συνθηκών που απαιτούνται για την εκτέλεση όλων των *in vitro* σταδίων βασικό προαπαιτούμενο αποτελεί η αποστείρωση και απολύμανση όλων των εργαλείων και υλικών καλλιέργειας. Η αποστείρωση των εργαλείων και υλικών πραγματοποιήθηκε σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης (αυτόκλειστο) για χρονικό διάστημα 20 min, σε θερμοκρασία $121 \text{ }^\circ\text{C}$ και πίεση 1,2 atm ή σε χύτρα υγρής αποστείρωσης για χρονικό διάστημα 20 min, σε θερμοκρασία $121 \text{ }^\circ\text{C}$ και πίεση 1,2 atm. Κατά τη τοποθέτησή τους, τα γυάλινα βάζα που περιείχαν τα θρεπτικά υποστρώματα είχαν χαλαρά καλυμμένο το ελεύθερο στόμιό τους με τα πλαστικά καπάκια τους. Επιπλέον, όλα τα εργαλεία (λαβίδες, νυστέρια, πλακάκια) που θα χρησιμοποιούνταν στην διαδικασία εμφύτευσης των εκφύτων ή στις απολυμάνσεις καλύφθηκαν επιμελώς με φύλλο αλουμινίου (κοινό αλουμινοχαρτο εμπορίου), ενώ παρόμοια διαδικασία ακολουθήθηκε και για τους περιέκτες με ελεύθερα στόμια όπως κωνικές φιάλες. Τέλος, μετά την ολοκλήρωση του εκάστοτε πειράματος όλα τα χρησιμοποιούμενα σκεύη και εξοπλισμός πλενόταν άμεσα, ενώ όλα τα γυάλινα βάζα με μολυσμένες καλλιέργειες πριν ανοιχτούν και πλυθούν αποστειρώνονταν για 40 min, σε θερμοκρασία $121 \text{ }^\circ\text{C}$ και σε πίεση 1,2 atm στον κλίβανο υγρής αποστείρωσης.

3.2.5 Εγκατάσταση φυτικού υλικού

3.2.5.1 Εγκατάσταση εκφύτων αρχικής καλλιέργειας

Μετά το πέρας χρονικού διαστήματος ενός μηνός από τη μεταφορά των αναπτυσσόμενων σπορόφυτων σε γυάλινα βάζα όγκου 100 L, πραγματοποιήθηκε λήψη κόμβων σε τράπεζα νηματικής ροής, πάνω σε αποστειρωμένο κεραμικό πλακάκι, που τακτικά καθαριζόταν με διάλυμα αιθανόλης 80%, με τη χρήση αποστειρωμένου νυστεριού. Αφού αφαιρέθηκαν επιμελώς όλα τα παρόντα φύλλα από τη βάση τους, ο απομένων βλαστός αποκόπηκε προσεκτικά σε δύο ή τρία τμήματα τα οποία έφεραν ένα κόμβο ή αποτελούσαν τη κορυφή του σποροφύτου, το καθένα με μήκος περίπου 1,5 έως 5 mm. Τα έκφυτα τοποθετούνταν σταυροειδώς ανά πέντε και κατακόρυφα στα γυάλινα βάζα που περιείχαν το ανάλογο θρεπτικό υπόστρωμα, πιεζόμενα ελαφρά ώστε να βυθιστούν μέσα σε αυτό σε βάθος μικρότερο του 1/3 του μήκους τους.

3.2.5.2 Εγκατάσταση εκφύτων καλλιιεργειών πολλαπλασιασμού

Οι φυσιολογικής ανάπτυξης βλαστοί που είχαν σχηματιστεί *in vitro* τεμαχίζονταν σε έκφυτα ενός κόμβου και κορυφής βλαστού με μήκος περίπου 1,5 έως 5 mm μέσα σε τράπεζα νηματικής ροής, πάνω σε αποστειρωμένο κεραμικό πλακάκι, που τακτικά απολυμαινόταν με υδατικό διάλυμα αιθανόλης 80%, και με τη χρήση αποστειρωμένου νυστεριού και λαβίδας. Τα έκφυτα τοποθετούνταν σταυροειδώς ανά πέντε και κατακόρυφα στα γυάλινα βάζα που περιείχαν το ανάλογο θρεπτικό υπόστρωμα, πιεζόμενα ελαφρά ώστε να βυθιστούν μέσα σε αυτό σε βάθος μικρότερο του 1/3 του μήκους τους. Η ίδια διαδικασία ακολουθήθηκε και κατά τη προετοιμασία εκφύτων προερχόμενων από υπερενυδατωμένα έκφυτα.

3.2.5.3 Εγκατάσταση μικροβλαστών προς ριζοβολία

Οι σχηματισμένοι *in vitro* βλαστοί με τουλάχιστον τρεις κόμβους προωθούνταν για να ριζοβολήσουν αμέσως μετά τη λήψη μετρήσεων βλαστογένεσης για κάθε υποκαλλιέργεια (30 μέρες), με εξαίρεση αυτούς που χρησιμοποιήθηκαν για το τρίτο πείραμα ριζοβολίας, οι οποίοι παρέμειναν στο υπόστρωμα πολλαπλασιασμού

για 70 μέρες. Σε τράπεζα νηματικής ροής, όπως και στις προηγούμενες υποκαλλιέργειες, πάνω σε αποστειρωμένο πλακάκι, που τακτικά απολυμαινόταν με υδατικό διάλυμα αιθανόλης 80% και με αποστειρωμένο νυστέρι και λαβίδα, οι βλαστοί αποκόπτονταν από την βάση τους, διαχωρίζονταν από το έκφυτο και αφαιρείτο το κατώτερο ζεύγος φύλλων τους. Οι βλαστοί έπειτα τοποθετούνταν στα γυάλινα βάζα καλλιέργειας με το ανάλογο θρεπτικό υπόστρωμα ριζοβολίας κατακόρυφα και σταυροειδώς ανά πέντε, πιεζόμενοι ελαφρά ώστε να βυθιστούν λίγα χιλιοστά μέσα σε αυτό.

3.2.5.4 Εγκλιματισμός ριζοβολημένων μικροβλαστών

Σε διάστημα 20 ή 30 ημερών μετά την εγκατάσταση στα υποστρώματα ριζοβολίας, όλοι οι έρριζοι μικροβλαστοί μεταφέρθηκαν σε πλαστικά δοχεία για εγκλιματισμό. Οι βλαστοί αρχικά διαχωρίστηκαν από το υπόστρωμα και στη συνέχεια έγινε επιμελές πλύσιμο και προσεκτική μάλαξη με τρεχούμενο νερό βρύσης, ώστε να απομακρυνθεί πλήρως το θρεπτικό στερεό υπόστρωμα από τις ρίζες τους χωρίς αυτές να τραυματιστούν. Στη συνέχεια, όλα τα ριζοβολημένων φυτάρια μεταφέρθηκαν σε ορθογώνια, διάφανα, πλαστικά δοχεία όγκου 2 L (10 φυτάρια ανά πλαστικό δοχείο), τα οποία περιείχαν υπόστρωμα που αποτελείτο από 1 τύρφη : 1 περλίτη (v/v). Στη συνέχεια τα δοχεία καλύφθηκαν με πλαστική μεμβράνη sanitas, κατά τις πρώτες 7 ημέρες καλλιέργειας τους, με σκοπό την μείωση των απωλειών υγρασίας στα πρώτα στάδια εγκατάστασης των φυταρίων καθώς και την ομαλή μετάβαση των νεαρών φυταρίων από το περιβάλλον της 100% σχετικής υγρασίας στο περιβάλλον του θερμοκηπίου. Τοποθετούνταν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών στους 20 °C, με φωτοπερίοδο 16 h και ένταση φωτισμού 37,5 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ από λαμπτήρες φθορισμού, ενώ ανά τρεις ημέρες εφαρμοζόταν ελαφρύ ψέκασμα με νερό. Μετά το πέρας των επτά ημερών, η πλαστική μεμβράνη απομακρύνθηκε και τα φυτάρια μεταφέρθηκαν στην υδρονέφωση του θερμαινόμενου θερμοκηπίου του εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου για μία εβδομάδα. Μετά τη μεταφορά τους στο χώρο του θερμοκηπίου, τα πλαστικά δοχεία τοποθετήθηκαν σε σκιερό μέρος, όπου παρέμειναν συνολικά στον χώρο για διάστημα ενός μήνα. Εφαρμόστηκε περιοδική άρδευση, δύο φορές την εβδομάδα, και μηνιαία λίπανση με υδατοδιαλυτό πλήρες λίπασμα 20:20:20 (FAST-GROW 20-20-20, Humofert), σε αναλογία 4 g L⁻¹.

3.2.6 Συνθήκες καλλιέργειας

3.2.6.1 Συνθήκες *in vitro* καλλιέργειας

Για την ανάπτυξη των εκφύτων τα γυάλινα βάζα καλλιέργειας τοποθετούνταν σε θάλαμο ανάπτυξης ελεγχόμενων σταθερών συνθηκών, σε θερμοκρασία 25 ± 2 °C, με φωτοπερίοδο 16 h πλήρους φωτός έντασης $37,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (4.000 lx fluorescent light) που προερχόταν από λευκούς λαμπτήρες φθορισμού τοποθετημένους στις πλευρές του θαλάμου. Η επώαση των εκφύτων στα στάδια της εγκατάστασης και του πολλαπλασιασμού διαρκούσε 30 ημέρες, ενώ κατά τη ριζοβολία των μικροβλαστών αυτή διαρκούσε 20 ή 30 ημέρες. Για τις καλλιέργειες με ενιαίο στάδιο πολλαπλασιασμού και ριζοβολίας, η συνολική διάρκεια της επώασης ήταν 60 ημέρες.

3.2.6.2 Συνθήκες *ex vitro* καλλιέργειας

Τα ριζοβολημένα φυτάρια εγκλιματίζονταν αρχικά σε θάλαμο σταθερών συνθηκών του εργαστηρίου στους 20 °C, με φωτοπερίοδο 16 h πλήρους φωτός έντασης $37,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (4.000 lx fluorescent light) που παρέχονταν από λευκούς λαμπτήρες φθορισμού, για διάστημα επτά ημερών και ακολούθως μεταφέρονταν σε γυάλινο θερμαινόμενο θερμοκήπιο του εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου για περαιτέρω ανάπτυξη. Αρχικά, τοποθετούνταν στην υδρονέφωση για επτά ημέρες και έπειτα μεταφέρονταν στον πάγκο του θερμοκηπίου με βορεινό προσανατολισμό, αρδευόμενα τρεις φορές την εβδομάδα, προκειμένου να ολοκληρώσουν τον εγκλιματισμό τους. Τους καλοκαιρινούς μήνες οι υαλοπίνακες του θερμοκηπίου καλύπτονταν με επίχρισμα ασβέστη για μείωση της θερμοκρασίας, ενώ οι θερμοκρασίες που επικρατούσαν το Μάιο έως τον Ιούλιο, μήνες κατά τον οποίο πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα εγκλιματισμού, κυμάνθηκαν μεταξύ 20 °C και 35 °C.

3.2.7 Στατιστική ανάλυση - Εκτίμηση και παρουσίαση αποτελεσμάτων

Χρησιμοποιήθηκε το Εντελώς Τυχαιοποιημένο Σχέδιο (ΕΤΣ) και εφαρμόστηκαν μονοπαραγοντικά και διπαραγοντικά σχέδια, ανάλογα με το κάθε επιμέρους πειραματικό στάδιο. Η σημαντικότητα των αποτελεσμάτων ελέγχθηκε με ανάλυση της διασποράς (Analysis of Variance, ANOVA), με τη χρήση του κριτηρίου του F για τη στατιστική αυτή δοκιμασία. Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο Student's t-test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων έγινε με το στατιστικό πρόγραμμα Jump 8.0 (SAS Institute Inc.). Στα αποτελέσματα οι μέσοι των επεμβάσεων που ακολουθούνται από διαφορετικά γράμματα της λατινικής αλφαβήτου διαφέρουν στατιστικά σημαντικά, ενώ τα σύμβολα (*), (**) και (***) δίπλα από κάθε τιμή του F , δηλώνει ότι οι τιμές αυτές του F ήταν σημαντικές σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ($P \leq 0,05$), 1% ($P \leq 0,01$) και 0,1% ($P \leq 0,001$) αντίστοιχα. Στο τέλος κάθε πίνακα αποτελεσμάτων αναγράφεται ο αριθμός των επαναλήψεων (n) που χρησιμοποιήθηκαν ανά επέμβαση, ο οποίος ταυτίζεται με τον αριθμό των εκφύτων που εγκαταστήθηκαν, μεταφέρθηκαν, ριζοβόλησαν ή εγκλιματίστηκαν στο εκάστοτε υπόστρωμα.

Σε διάστημα περίπου 60 ημερών μετά την αρχική εγκατάσταση των σπόρων για βλάστηση, έγινε λήψη κόμβων και κορυφών των αναπτυσσόμενων σποροφύτων (αρχική καλλιέργεια) και μετά από 30 ημέρες εκτιμήθηκε η αντίδραση των εκφύτων στο στάδιο της εγκατάστασης. Αντίστοιχο διάστημα παραμονής των εκφύτων διήλθε και έως τη λήψη μετρήσεων για όλα τα ακόλουθα στάδια πολλαπλασιασμού (πρώτη έως τέταρτη υποκαλλιέργεια). Καταγράφηκε το ποσοστό εκφύτων που αντέδρασαν ως προς την έκπτυξη βλαστών (αντίδραση, %) και ο μέσος αριθμός των βλαστών που σχηματίστηκαν ανά έκφυτο που αντέδρασε. Επίσης, καταμετρήθηκαν τα πλήρως εκπτυχθέντα ζεύγη φύλλων όλων των βλαστών, τα οποία εκφράστηκαν ως ισοδύναμος αριθμός κόμβων, οδηγώντας στον υπολογισμό του μέσου αριθμού κόμβων ανά βλαστό. Λόγω του ιδιαίτερα μικρού μήκους των μεσογονατίων και την ύπαρξη αλληλοεπακαλυπτόμενων βάσεων φύλλων, η μέτρηση του μήκους των βλαστών δεν κατέστη πρακτικά εφικτή. Ακόμη εκτιμήθηκε η ύπαρξη υπερενυδάτωσης των βλαστών, καθώς σε όλα τα υποστρώματα παρατηρήθηκε η έκπτυξή τους. Ως εκ τούτου, κρίθηκε απαραίτητος ο υπολογισμός δύο διακριτών

ποσοστών βλαστογένεσης σε όλα τα στάδια εγκατάστασης και πολλαπλασιασμού της καλλιέργειας. Το πρώτο αφορούσε σε έκφυτα που έφεραν μη υπερενυδατωμένους μαζί με υπερενυδατωμένους βλαστούς (βλαστογένεση φυσιολογικών και μεικτών εκφύτων (1), %), ενώ το δεύτερο σε έκφυτα όπου έφεραν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς (βλαστογένεση υπερενυδατωμένων εκφύτων (2), %). Καταγράφηκε επίσης το ποσοστό υπερενυδάτωσης (%), εκφρασμένο ως ο λόγος των εκφύτων που περιείχαν υπερενυδατωμένους βλαστούς δια το συνολικό αριθμό αντιδρώντων εκφύτων, καθώς και ο μέσος αριθμός υπερενυδατωμένων βλαστών ανά έκφυτο. Υπολογίσθηκε επίσης το δυναμικό πολλαπλασιασμού ως το γινόμενο του ποσοστού βλαστογένεσης επί του μέσου αριθμού βλαστών που σχηματίστηκαν ανά έκφυτο που αντέδρασε και επί του μέσου αριθμού των σχηματισθέντων κόμβων. Τέλος, λόγω της έντασης των παρατηρούμενων φαινομένων ανάπτυξης κάλου στη βάση των εκφύτων και ριζοβολίας αυτών, καταγράφηκαν τα αντίστοιχα ποσοστά καλογένεσης και ριζογένεσης για κάθε στάδιο της εγκατάστασης και του πολλαπλασιασμού.

Κατά το στάδιο της ριζοβολίας η εκτίμηση των αποτελεσμάτων έγινε 20 ή 30 ημέρες μετά από την μεταφορά των μικροβλαστών στα υποστρώματα ριζοβολίας, όπου καταγράφηκε το ποσοστό των μικροβλαστών που σχημάτισαν ρίζες, ο μέσος αριθμός και το μέσο μήκος των ριζών που σχηματίστηκαν, ο μέσος αριθμός βλαστών και κόμβων των μικροβλαστών, καθώς και το ποσοστό καλογένεσης. Λόγω της συνεχούς και ανομοιόμορφης έκπτυξης ριζών καθόλη τη διάρκεια της ριζοβολίας, καταγράφηκε επίσης ως διακριτή παράμετρος το μέσο μήκος ριζών μήκους μεγαλύτερου του 1 cm, ενώ εξαιτίας της εξαιρετικά έντονης και πυκνής έκπτυξης ριζικών τριχιδίων και ριζών 2ης τάξης, καταγράφηκε αποκλειστικά ο αριθμός ριζών πρώτης τάξης.

Κατά τον εγκλιματισμό των προκύπτοντων έρριζων φυταρίων, αυτά αρχικά μεταφέρθηκαν σε κατάλληλα σεσημασμένα πλαστικά φυτοδοχεία όγκου 2 L που περιείχαν υπόστρωμα τύρφη περλίτης σε αναλογία 1:1 (v/v) και καλύφθηκαν με μεμβράνη sanitas, παραμένοντας σε θάλαμο σταθερών συνθηκών (20 °C) για διάστημα 7 ημερών. Στη συνέχεια, η μεμβράνη απομακρύνθηκε και μεταφέρθηκαν στην υδρονέφωση του θερμοκηπίου του Εργαστηρίου, όπου παρέμειναν σε σκιερό, προστατευμένο σημείο για διάστημα 3 εβδομάδων. Μετά το πέρας του εγκλιματισμού, καταγράφηκε ο συνολικός αριθμός των εγκλιματισμένων φυταρίων ως ποσοστό επιβίωσης αυτών (%), ο αριθμός των βλαστών τους, το μήκος (σε cm)

και ο αριθμός κόμβων των βλαστών, καθώς και το μέγιστο μήκος (σε cm) και πλάτος (σε mm) του νεότερου πλήρως εκπτυγμένου φύλλου.

Σε όλα τα στάδια του μικροπολλαπλασιασμού του είδους (εγκατάσταση, πολλαπλασιασμός, ριζοβολία, εγκλιματισμός) λήφθηκαν έγχρωμες φωτογραφίες των εκφύτων, των μικροβλαστών και των φυταρίων με τη βοήθεια ψηφιακής φωτογραφικής μηχανής κινητού τηλεφώνου (Samsung A5, 2017), οι οποίες στη συνέχεια επεξεργάστηκαν με τη χρήση λογισμικού επεξεργασίας εικόνων (Photoshop CS, Adobe).

3.3 Αποτελέσματα

3.3.1 Αρχική εγκατάσταση

Κατά την αρχική εγκατάσταση της καλλιέργειας από σπορόφυτα ηλικίας δύο μηνών χρησιμοποιήθηκαν τέσσερα υποστρώματα, τα οποία περιείχαν τις φυτορρυθμιστικές ουσίες BA ή 2iP (κυτοκινίνες) σε συγκεντρώσεις 0,1 ή 0,5 mg L⁻¹. Από αυτά, μόνο το υπόστρωμα που περιείχε 0,5 mg L⁻¹ BA έδωσε χαμηλό ποσοστό αντίδρασης (33%), ενώ τα υπόλοιπα είχαν αρκετά υψηλά ποσοστά, με το υψηλότερο να σημειώνεται στο υπόστρωμα 0,5 2iP mg L⁻¹ (87%) (Πίν. 4, Εικ. 20, 21). Αρκετά μεγάλες διαφορές εντοπίστηκαν στα ποσοστά βλαστογένεσης μεικτών και φυσιολογικών εκφύτων, με την υψηλότερη τιμή να εμφανίζεται στο υπόστρωμα που περιείχε 0,1 mg L⁻¹ BA (55%). Η ύπαρξη 0,1 mg L⁻¹ BA στο υπόστρωμα έδωσε το μεγαλύτερο αριθμό σχηματιζόμενων φυσιολογικών βλαστών (2,3), ενώ το μικρότερο έδωσε η συγκέντρωση 0,5 mg L⁻¹ 2iP (0,7). Την ίδια στιγμή, τα υποστρώματα που περιείχαν 2iP προκάλεσαν την έκπτυξη μεγαλύτερου αριθμού κόμβων σε σύγκριση με αυτά που περιείχαν BA. Σε όλα τα υποστρώματα παρατηρήθηκε η έκπτυξη βλαστών με παραμορφωμένα, υαλώδη φύλλα, οι οποίοι χαρακτηρίστηκαν ως υπερενυδατωμένοι, συχνά σχηματίζοντας θυσάνους στα υποστρώματα που περιείχαν 2iP. Τα ποσοστά υπερενυδάτωσης ήταν αρκετά έως πολύ υψηλά σε όλα τα υποστρώματα, με τη μικρότερη τιμή να λαμβάνεται από αυτό που περιείχε 0,1 mg L⁻¹ BA. Οι περισσότεροι υπερενυδατωμένοι βλαστοί σχηματίστηκαν στο υπόστρωμα με 0,1 mg L⁻¹ 2iP (4,1), χωρίς ωστόσο στατιστικά σημαντικές διαφορές μεταξύ των υποστρωμάτων. Το υψηλότερο ποσοστό καλογένεσης εμφανίστηκε στο υπόστρωμα 0,1 mg L⁻¹ 2iP, ενώ τα έκφυτα που εγκαταστήθηκαν σε υποστρώματα που περιείχαν BA παρουσίασαν αρκετά χαμηλότερα ποσοστά έκπτυξης κάλου στη βάση τους. Η εντονότερη ριζογένεση παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα με 0,1 mg L⁻¹ BA, χωρίς ωστόσο μεγάλες διαφορές σε σχέση με τα υπόλοιπα υποστρώματα εγκατάστασης. Τέλος, το μεγαλύτερο δυναμικό πολλαπλασιασμού στο στάδιο αυτό (2,76) παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα με 0,1 mg L⁻¹ BA, με τις τιμές της παραμέτρου αυτής στα υπόλοιπα υποστρώματα να λαμβάνουν αρκετά χαμηλότερες τιμές (Πίν. 4, Εικ. 20, 21).

Πίνακας 4. Αντίδραση εκφύτων κατά την αρχική καλλιέργεια του *D. cruentus* σε στερεά υποστρώματα MS.

PGRs (mg L ⁻¹)	Ποσοστό (%)			Αρ. Βλαστών ⁴	Μέσος Αρ. Κόμβων ⁴	Ποσοστό Υπερνε/σης ⁵ (%)	Μέσος Αρ. Υπερ. Βλαστών	Δυναμικό Πολλ/σμού	Ποσοστό Καλ/σης (%)	Ποσοστό Ριζ/σης (%)
	Αντίδραση ¹	Βλαστ/ση ²	Βλαστ/ση ³							
0,1 BA	76	55	22	2,3 a	2,2 b	48	2,7 a	2,76	52	12
0,5 BA	33	16	16	1,8 ab	2,1 b	67	2,4 a	0,62	33	0
0,1 2iP	72	34	39	1,1 bc	2,6 a	77	4,1 a	0,97	89	6
0,5 2iP	87	40	47	0,7 c	2,9 a	69	3,8 a	0,81	67	6
<i>F</i> _{one-way ANOVA}				***	***		NS			

Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικό, *, **, ***: σημαντικό σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$ και $P \leq 0,001$ αντίστοιχα, $n = 55-65$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση² (%) x Μέσος αριθμός βλαστών⁴ x Μέσος αριθμός κόμβων⁴.

¹ Συνολική αντίδραση.

² Τα έκφυτα έφεραν υπερνευδατωμένους μαζί με μη υπερνευδατωμένους βλαστούς.

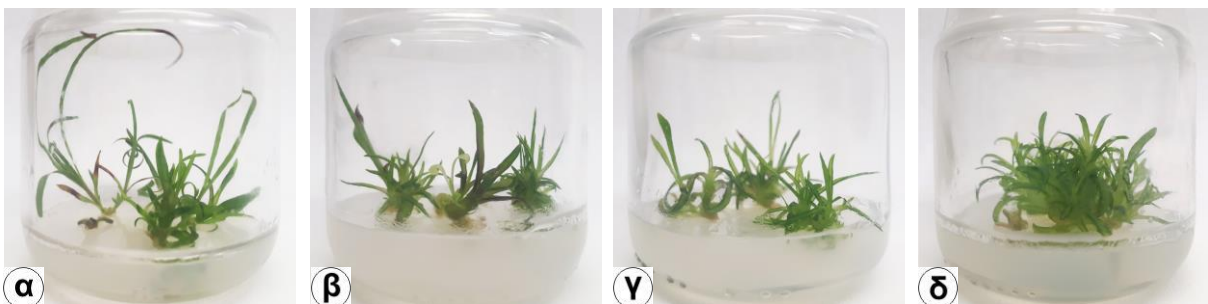
³ Τα έκφυτα έφεραν μόνο υπερνευδατωμένους βλαστούς.

⁴ Μη υπερνευδατωμένοι βλαστοί.

⁵ Πλήρως υπερνευδατωμένα έκφυτα μαζί με μεικτά έκφυτα.



Εικόνα 20. Φυσιολογικοί βλαστοί σε αρχική καλλιέργεια κόμβων και κορυφών *D. cruentus* σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με 0,1 (α) ή 0,5 mg L⁻¹ BA (β) ή 0,1 (γ) ή 0,5 mg L⁻¹ 2iP (δ).

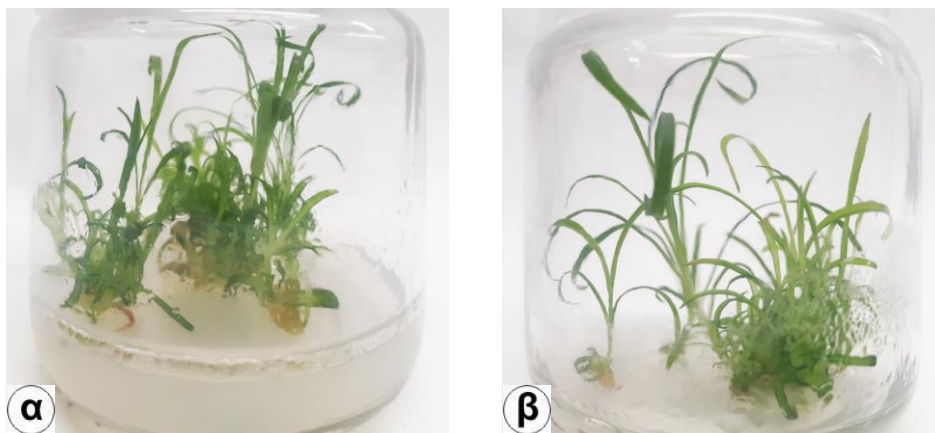


Εικόνα 21. Υπερνευδατωμένοι βλαστοί σε αρχική καλλιέργεια κόμβων και κορυφών *D. cruentus* σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με 0,1 (α) ή 0,5 mg L⁻¹ BA (β) ή 0,1 (γ) ή 0,5 mg L⁻¹ 2iP (δ).

3.3.2 Στάδιο πολλαπλασιασμού

3.3.2.1 Πρώτη υποκαλλιέργεια

Στο στάδιο της πρώτης υποκαλλιέργειας σημειώθηκε υψηλό ποσοστό αντίδρασης και στα δύο υποστρώματα, όμως το αντίστοιχο ποσοστό βλαστογένεσης φυσιολογικών και μεικτών εκφύτων ήταν σχετικά χαμηλό (44-55%) (Πιν. 5, Εικ. 22). Υπό την παρουσία BA ο αριθμός των παραγόμενων ανά έκφυτο βλαστών ήταν σημαντικά μεγαλύτερος (1,5), ενώ ο μεγαλύτερος αριθμός κόμβων παράχθηκε στο υπόστρωμα με $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP (2,9), χωρίς ωστόσο μεγάλη διαφορά από το υπόστρωμα με $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ BA (2,7). Ο σχηματισμός υπερενυδατωμένων βλαστών συνεχίστηκε με μεγαλύτερη ένταση και στα δύο υποστρώματα, με το αντίστοιχο ποσοστό βλαστογένεσης να κυμαίνεται σε πολύ υψηλά επίπεδα. Οι παραγόμενοι βλαστοί σε μερικά έκφυτα ήταν όλοι υπερενυδατωμένοι, ενώ σε μερικά άλλα ο αριθμός των υπερενυδατωμένων βλαστών ήταν μικρότερος ή ίσος με τους μη υπερενυδατωμένους βλαστούς πάνω στο έκφυτο. Το ποσοστό υπερενυδάτωσης ήταν πολύ υψηλό (74-75%), ενώ περισσότεροι υπερενυδατωμένοι βλαστοί σχηματίστηκαν στο υπόστρωμα με $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP (4,7). Πολύ υψηλό ήταν και το ποσοστό καλογένεσης και στα δύο υποστρώματα, ενώ σχετικά αυξημένο ήταν και το αντίστοιχο ποσοστό ριζογένεσης, με το 1/5 των εκφύτων να ριζοβολεί και στα δύο υποστρώματα. Στο υπόστρωμα με $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ BA οι βλαστοί είχαν πιο ικανοποιητική εμφάνιση και ήταν καλοσχηματισμένοι, ενώ το ίδιο υπόστρωμα έδωσε τον υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού (2,07) (Πιν. 5, Εικ. 22).



Εικόνα 22. 1^η υποκαλλιέργεια εκφύτων *D. cruentus* σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ BA (α) ή $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP (β).

Πίνακας 5. Αντίδραση εκφύτων κατά την πρώτη υποκαλλιέργεια του *D. cruentus* σε στερεά υποστρώματα MS.

PGRs (mg L ⁻¹)	Ποσοστό (%)			Αρ. Βλαστών ⁴	Μέσος Αρ. Κόμβων ⁴	Ποσοστό Υπερνε/σης ⁵ (%)	Μέσος Αρ. Υπερ. Βλαστών	Δυναμικό Πολλ./σμού	Ποσοστό Καλ./σης (%)	Ποσοστό Ριζ./σης (%)
	Αντίδραση ¹	Βλαστ/ση ²	Βλαστ/ση ³							
0,1 BA	87	51	36	1,5 a	2,7 a	74	4,1 a	2,07	82	19
0,1 2iP	79	44	35	1 b	2,9 a	75	4,7 a	1,27	94	22
<i>F</i> _{one-way ANOVA}				*	NS		NS			

Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικό, *, **, ***: σημαντικό σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$ και $P \leq 0,001$ αντίστοιχα, $n = 80-90$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση² (%) x Μέσος αριθμός βλαστών⁴ x Μέσος αριθμός κόμβων⁴.

¹ Συνολική αντίδραση.

² Τα έκφυτα έφεραν υπερνευδατωμένους μαζί με μη υπερνευδατωμένους βλαστούς.

³ Τα έκφυτα έφεραν μόνο υπερνευδατωμένους βλαστούς.

⁴ Μη υπερνευδατωμένοι βλαστοί.

⁵ Πλήρως υπερνευδατωμένα έκφυτα μαζί με μεικτά έκφυτα.

Σε παράλληλο πείραμα, έκφυτα που προήλθαν από φυσιολογικούς και υπερνευδατωμένους βλαστούς εκπτυχθέντες κατά την εγκατάσταση του είδους σε 0,5 mg L⁻¹ 2iP μεταφέρθηκαν σε υπόστρωμα πλήρους δύναμης MS απουσία φυτορρυθμιστικών ουσιών (Πίν. 6, Εικ. 23). Τόσο στα φυσιολογικής όσο και στα υπερνευδατωμένης προέλευσης έκφυτα παρουσιάστηκαν υψηλά ποσοστά αντίδρασης, ενώ τα ποσοστά βλαστογένεσης ήταν σχετικά χαμηλά και αντίστοιχα αυτών των υποστρωμάτων που περιείχαν κυτοκινίνες. Μεταξύ των δύο προελεύσεων εκφύτων δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στο μέσο αριθμό φυσιολογικών βλαστών και κόμβων, με τιμές παραπλήσιες αυτών που λήφθηκαν στο υπόστρωμα με 0,1 mg L⁻¹ 2iP. Το ποσοστό υπερνευδάτωσης κυμάνθηκε και εδώ σε πολύ υψηλά επίπεδα, με κάθε έκφυτο που προήλθε από υπερνευδατωμένους βλαστούς να φέρει τουλάχιστον έναν υπερνευδατωμένο βλαστό, σχηματίζοντας συχνά θυσάνους στη βάση τους. Την ίδια στιγμή, πολύ έντονη διαφορά παρατηρήθηκε στον αριθμό των υπερνευδατωμένων βλαστών που εκπτύχθηκαν, με τα έκφυτα υπερνευδατωμένης προέλευσης να έχουν κατά μέσο όρο υπερπενταπλάσιο αριθμό τέτοιων βλαστών. Αντίστοιχα έντονη διαφορά παρατηρήθηκε και στα ποσοστά καλογένεσης και ριζοβολίας, με τα υπερνευδατωμένα να παράγουν έντονα κάλλο και ρίζες στη βάση τους, ενώ ενδιαφέρον παρουσιάζει ότι κατά τη χρήση εκφύτων από υπερνευδατωμένους βλαστούς παρουσιάστηκε ελαφρώς αυξημένο δυναμικό πολλαπλασιασμού (Πίν. 6, Εικ. 23).

Πίνακας 6. Επίδραση της φυσιολογίας εκφύτων *D. cruentus* κατά την υποκαλλιέργειά τους σε στερεά υποστρώματα MS άνευ φυτορμονών.

PGRs (mg L ⁻¹)	Ποσοστό (%)			Αρ. Βλαστών ⁴	Μέσος Αρ. Κόμβων ⁴	Ποσοστό Υπερνε/ση ⁵ (%)	Μέσος Αρ. Υπερ. Βλαστών	Δυναμικό Πολλ/σμού	Ποσοστό Καύ/σης (%)	Ποσοστό Ριζ/σης (%)
	Αντίδραση ¹	Βλαστ/ση ²	Βλαστ/ση ³							
Hf ⁶	80	45	35	0,9 a	2,7 a	69	2,9 a	1,09	38	13
Hf ⁷	100	55	45	1,0 a	2,5 a	92	11,4 b	1,38	100	80
<i>F</i> one-way ANOVA				NS	NS		***			

Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικό, *, **, ***: σημαντικό σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$ και $P \leq 0,001$ αντίστοιχα, $n = 20$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση² (%) x Μέσος αριθμός βλαστών⁴ x Μέσος αριθμός κόμβων⁴.

¹ Συνολική αντίδραση.

² Τα έκφυτα έφεραν υπερνευδατωμένους μαζί με μη υπερνευδατωμένους βλαστούς.

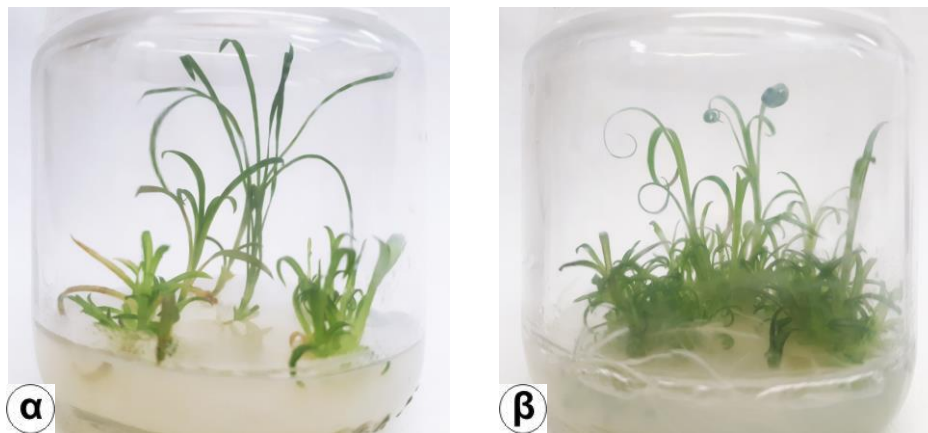
³ Τα έκφυτα έφεραν μόνο υπερνευδατωμένους βλαστούς.

⁴ Μη υπερνευδατωμένοι βλαστοί.

⁵ Πλήρως υπερνευδατωμένα έκφυτα μαζί με μεικτά έκφυτα.

⁶ Έκφυτα προερχόμενα από φυσιολογικούς βλαστούς.

⁷ Έκφυτα προερχόμενα από υπερνευδατωμένους βλαστούς.



Εικόνα 23. 1^η υποκαλλιέργεια εκφύτων *D. cruentus* προερχόμενων από (α) φυσιολογικούς ή (β) υπερνευδατωμένους βλαστούς σε υπόστρωμα MS χωρίς φυτορμόνες.

3.3.2.2 Δεύτερη υποκαλλιέργεια

Σκοπός του σταδίου της δεύτερης υποκαλλιέργειας αποτέλεσε η διερεύνηση της επίδρασης της αυξίνης NAA κατά τη προσθήκη της σε δύο διαφορετικές συγκεντρώσεις ($0,01$ και $0,05 \text{ mg L}^{-1}$) σε υποστρώματα που περιείχαν $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ BA ή $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP. Όπως και στην πρώτη υποκαλλιέργεια, το ποσοστό αντίδρασης σε όλα τα υποστρώματα ήταν υψηλό (72-85%), ενώ το ποσοστό βλαστογένεσης μεικτών και φυσιολογικών εκφύτων διαφοροποιήθηκε μεταξύ των υποστρωμάτων, με τη χαμηλότερη τιμή του να σημειώνεται στο υπόστρωμα με $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP και $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ NAA (54%) και την υψηλότερη στο υπόστρωμα με $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ BA και $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ NAA (82%) (Πιν. 7, Εικ. 24). Σε όλα τα υποστρώματα που περιείχαν BA ο αριθμός των παραγόμενων ανά έκφυτο βλαστών ήταν σημαντικά μεγαλύτερος (2 έως 2,6), ενώ ο αριθμός των κόμβων δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων. Ο σχηματισμός υπερενυδατωμένων βλαστών πιο περιορισμένος από τη προηγούμενη υποκαλλιέργεια, με το αντίστοιχο ποσοστό βλαστογένεσης να παρουσιάζεται ελαφρώς μειωμένο στα υποστρώματα που περιείχαν BA. Το ποσοστό υπερενυδάτωσης ήταν αρκετά υψηλό σε όλα τα υποστρώματα, με το μεγαλύτερο αριθμό υπερενυδατωμένων βλαστών να σχηματίζεται στο υπόστρωμα με $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP άνευ NAA (2,6). Το ποσοστό καλογένεσης ήταν πολύ υψηλό σε όλα τα υποστρώματα που περιείχαν φυτορμόνες (73-100%), ενώ το ποσοστό ριζογένεσης παρουσίασε αποκλίσεις μεταξύ των υποστρωμάτων, με τη μεγαλύτερη τιμή του να σημειώνεται για το υπόστρωμα άνευ φυτορμονών (47%). Συνολικά, οι υψηλότερες τιμές δυναμικού πολλαπλασιασμού σημειώθηκαν για τα υποστρώματα που περιείχαν BA (4,25-5,09), ενώ η χαμηλότερη για το υπόστρωμα που περιείχε $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP (2,23). Η εμφάνιση των εκφύτων παρουσίασε μικρές διαφορές μεταξύ των διαφορετικών υποστρωμάτων, με τα έκφυτα που εκπύχθηκαν σε υποστρώματα με BA να έχουν βραχύτερα μεσογονάτια και φύλλα (Πιν. 7, Εικ. 24).

Πίνακας 7. Αντίδραση εκφύτων κατά τη δεύτερη υποκαλλιέργεια του *D. cruentus* σε στερεά υποστρώματα MS.

PGRs (mg L ⁻¹)	Ποσοστό (%)			Αρ. Βλαστών ⁴	Μέσος Αρ. Κόμβων ⁴	Ποσοστό Υπερεν/σης ⁵ (%)	Μέσος Αρ. Υπερ. Βλαστών	Δυναμικό Πολλ./σμού	Ποσοστό Καλ/σης (%)	Ποσοστό Ριζ/σης (%)
	Αντίδραση ¹	Βλαστ/ση ²	Βλαστ/ση ³							
Hf	76	58	18	1,7 c	2,4 b	42	2,4 a	2,37	42	47
NAA	85	80	5	2,5 a	2,5 ab	37	2,0 a	5,00	73	16
0,1 BA/0,01 NAA	85	82	3	2 abc	2,6 ab	35	1,5 a	4,25	86	14
NAA	83	78	5	2,6 a	2,5 ab	34	1,8 a	5,09	90	38
0,1 2iP/0 NAA	80	62	18	1,5 c	2,4 ab	55	2,6 a	2,23	90	10
NAA	72	54	18	1,7 c	2,5 ab	44	2,2 a	2,30	100	28
0,1 2iP/0,05 NAA	76	70	6	1,8 bc	2,6 a	53	2,2 a	3,28	100	21
<i>F</i> one-way ANOVA				***	NS		NS			
<i>F</i> Κοτικονίνης				***	NS		NS			
<i>F</i> Συγγέντρησης NAA				NS	NS		NS			
<i>F</i> Κοτικονίνης x Συγγέντρησης NAA				NS	NS		NS			

Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικό, *, **, ***: σημαντικό σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$ και $P \leq 0,001$ αντίστοιχα, $n = 50-60$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση² (%) x Μέσος αριθμός βλαστών⁴ x Μέσος αριθμός κόμβων⁴.

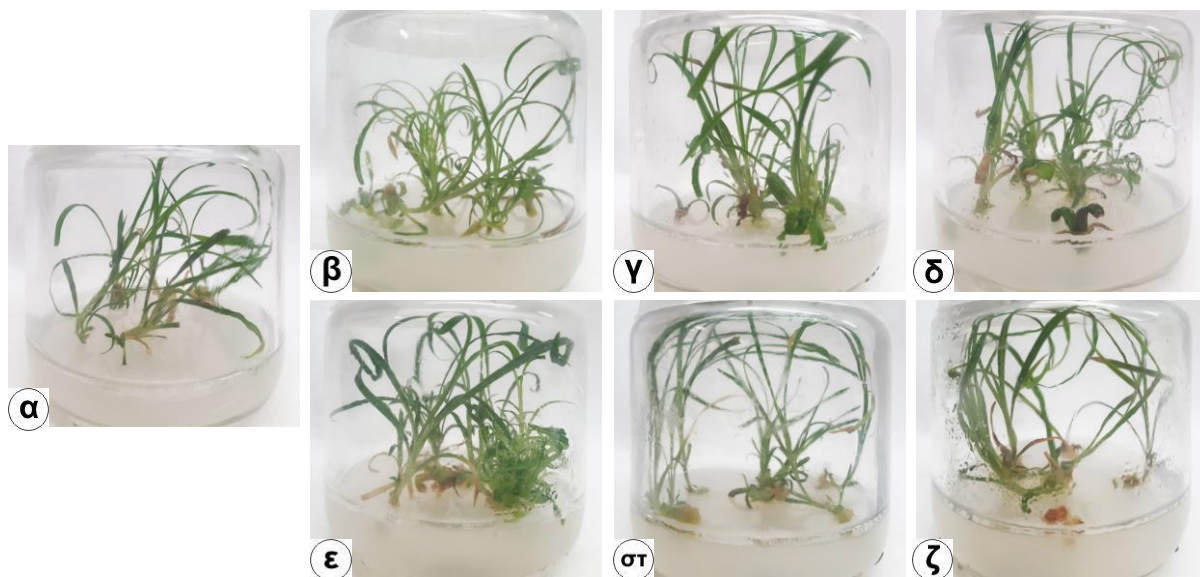
¹ Συνολική αντίδραση.

² Τα έκφυτα έφεραν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς.

³ Τα έκφυτα έφεραν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς.

⁴ Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί.

⁵ Πλήρως υπερενυδατωμένα έκφυτα μαζί με μεικτά έκφυτα.



Εικόνα 24. 2^η υποκαλλιέργεια εκφύτων *D. cruentus* προερχόμενων από φυσιολογικούς βλαστούς σε υπόστρωμα MS χωρίς φυτορμόνες (α) ή με 0,1 mg L⁻¹ BA χωρίς (β) ή με 0,01 (γ) ή 0,05 mg L⁻¹ NAA ή με 0,1 mg L⁻¹ 2iP χωρίς (δ) ή με 0,01 (ε) ή 0,05 mg L⁻¹ 2iP (στ, ζ).

Παράλληλα, διερευνήθηκε η αντίδραση εκφύτων προερχόμενων από υπερενυδατωμένους βλαστούς στα ίδια υποστρώματα. Το ποσοστό της αντίδρασης ήταν πολύ υψηλό, αγγίζοντας σχεδόν σε όλα το 100% (Πιν. 8, Εικ. 25). Αρκετά έντονες διαφορές διαπιστώθηκαν στο ποσοστό βλαστογένεσης μεικτών και φυσιολογικών εκφύτων, όπου η παρουσία BA και υψηλότερων συγκεντρώσεων NAA φάνηκε να προξενεί την αύξησή του. Παρατηρήθηκε επίσης ελαφρώς αυξημένος αριθμός παραγόμενων φυσιολογικών βλαστών στα υποστρώματα που περιείχαν BA, με το μέγιστο αριθμό τους (2,1) να σημειώνεται στο υπόστρωμα που περιείχε 0,1 mg L⁻¹ BA και 0,05 mg L⁻¹ NAA, ενώ το υπόστρωμα με 0,1 mg L⁻¹ 2iP άνευ NAA έδωσε το μικρότερο αριθμό αυτών (0,8). Έντονες ήταν οι διαφορές που παρατηρήθηκαν στο ποσοστό βλαστογένεσης υπερενυδατωμένων βλαστών και στον αριθμό τους, με τις μικρότερες τιμές να αναφέρονται στο υπόστρωμα που περιείχε 0,1 mg L⁻¹ BA και 0,05 mg L⁻¹ NAA και τις μεγαλύτερες στο υπόστρωμα με 0,1 mg L⁻¹ 2iP άνευ NAA. Σε όλα τα υποστρώματα που περιείχαν φυτορμόνες, όλα τα έκφυτα παρήγαγαν κάλο στη βάση τους, ενώ σχεδόν όλα τα έκφυτα στο υπόστρωμα άνευ φυτορμονών ριζοβόλησαν, με το μικρότερο ποσοστό ριζογένεσης να σημειώνεται στο υπόστρωμα περιείχε 0,1 mg L⁻¹ BA άνευ NAA. Τέλος, τα υποστρώματα που περιείχαν BA είχαν αρκετά μεγαλύτερο δυναμικό πολλαπλασιασμού από αυτά που περιείχαν 2iP, με τη μεγαλύτερη τιμή του να σημειώνεται για αυτό που περιείχε 0,1 mg L⁻¹ BA και 0,05 mg L⁻¹ NAA (5,10), ενώ η προσθήκη NAA φάνηκε να ασκεί θετική επίδραση. Διαφορές παρατηρήθηκαν και στην εμφάνιση των εκφύτων, καθώς η χρήση 2iP, ιδιαίτερα απουσία NAA, έδωσε βλαστούς με πιο ασθεντική εμφάνιση, μακρύτερα μεσογονάτια και ελαφρώς υπερενυδατωμένη μορφολογία (Πιν. 8, Εικ. 25).

Πίνακας 8. Αντίδραση εκφύτων προερχόμενων από υπερενυδατωμένους βλαστούς κατά τη δεύτερη υποκαλλιέργεια του *D. cruentus* σε στερεά υποστρώματα MS.

PGRs (mg L ⁻¹)	Ποσοστό (%)			Αρ. Βλαστών ⁴	Μέσος Αρ. Κόμβων ⁴	Ποσοστό Υπερνεση ⁵ (%)	Μέσος Αρ. Υπερ. Βλαστών	Δυναμικό Πολλ./σμού	Ποσοστό Καλ/σης (%)	Ποσοστό Ριζ/σης (%)
	Αντίδραση ¹	Βλαστ/ση ²	Βλαστ/ση ³							
Hf	91	69	22	1,4 ab	2,5 a	66	4,1 c	2,41	61	98
0,1 BA/0,00 NAA	100	67	33	1,4 ab	2,5 a	87	7,1 ab	2,33	100	7
0,1 BA/0,01 NAA	100	73	27	1,5 ab	2,6 a	100	6,1 abc	2,86	100	27
0,1 BA/0,05 NAA	100	87	13	2,1 a	2,8 a	80	5,6 abc	5,10	100	27
0,1 2iP/0 NAA	100	40	60	0,8 b	2,3 a	80	8,3 a	0,74	100	67
0,1 2iP/0,01 NAA	87	53	33	1,1 b	2,4 a	100	5,8 abc	1,41	100	23
0,1 2iP/0,05 NAA	100	60	40	1,2 ab	2,4 a	87	4,1 bc	1,73	100	33
<i>F</i> one-way ANOVA				NS	NS		*			
<i>F</i> Κοιτοκίνης				*	NS		NS			
<i>F</i> Συγκέντρωσης NAA				NS	NS		*			
<i>F</i> Κοιτοκίνης x Συγκέντρωσης NAA				NS	NS		NS			

Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούν από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικό, *, **, ***: σημαντικό σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$ και $P \leq 0,001$ αντίστοιχα, $n = 15-45$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση² (%) x Μέσος αριθμός βλαστών⁴ x Μέσος αριθμός κόμβων⁴.

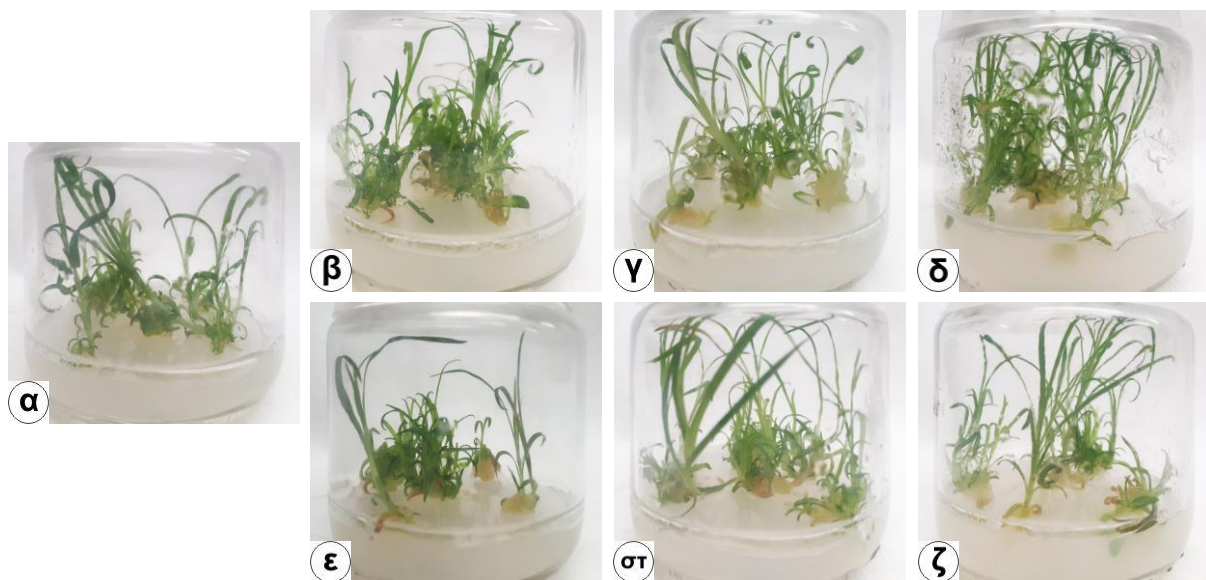
¹ Συνολική αντίδραση.

² Τα έκφυτα έφεραν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς.

³ Τα έκφυτα έφεραν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς.

⁴ Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί.

⁵ Πλήρως υπερενυδατωμένα έκφυτα μαζί με μεικτά έκφυτα.



Εικόνα 25. 2^η υποκαλλιέργεια εκφύτων *D. cruentus* προερχόμενων από υπερενυδατωμένους βλαστούς σε υπόστρωμα MS χωρίς φυτορμόνες (α) ή με 0,1 mg L⁻¹ BA χωρίς (β) ή με 0,01 (γ) ή 0,05 mg L⁻¹ NAA ή με 0,1 mg L⁻¹ 2iP χωρίς (δ) ή με 0,01 (ς) ή 0,05 mg L⁻¹ NAA.

3.3.2.3 Τρίτη υποκαλλιέργεια

Στο στάδιο της τρίτης υποκαλλιέργειας επιχειρήθηκε η μείωση της υπερενυδάτωσης και η αύξηση του δυναμικού πολλαπλασιασμού στο υπόστρωμα με $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ BA με τη τροποποίηση της συγκέντρωσης του πηκτικού μέσου ή την αλλαγή του θρεπτικού μέσου, ενώ διερευνήθηκε η επίδραση της χρήσης υψηλότερων τιμών BA ($0,5$, 1 και 2 mg L^{-1} BA), καθώς και υποστρώματος με $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ZEA, στην *in vitro* βλαστογένεση του *Dianthus cruentus*. Όπως και στα προηγούμενα πειράματα βλαστογένεσης, χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα αναπτυσσόμενα σε υποστρώματα με ίδιο περιεχόμενο φυτορμονών, ενώ τα έκφυτα που τοποθετήθηκαν στα υπόλοιπα υποστρώματα προήλθαν από βλαστούς εκφύτων αναπτυσσόμενων σε υπόστρωμα με $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP. Σε όλα τα υποστρώματα σημειώθηκαν υψηλά ποσοστά αντίδρασης (77-93%), με εξαίρεση αυτό με την υψηλότερη συγκέντρωση BA (60%). Όσον αφορά τη βλαστογένεση μεικτών και φυσιολογικών εκφύτων, οι υψηλότερες τιμές της παρατηρήθηκαν στα υποστρώματα που περιείχαν $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ BA. Ο μεγαλύτερος αριθμός παραγόμενων φυσιολογικών βλαστών σημειώθηκε στο υπόστρωμα που περιείχε 2 mg L^{-1} BA (3,6), ενώ ο μικρότερος στο υπόστρωμα άνευ φυτορμονών (1,0). Ο αριθμός των παραγόμενων κόμβων παρουσίασε μικρή, αλλά όχι στατιστικά σημαντική, πτώση με την αύξηση της συγκέντρωσης του BA στο υπόστρωμα. Το ποσοστό της υπερενυδάτωσης, όπως και ο αριθμός υπερενυδατωμένων βλαστών, παρουσίασαν έντονες διαφορές μεταξύ των υποστρωμάτων, με τις χαμηλότερες τιμές τους να καταγράφονται στα υποστρώματα με $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ BA και 12 g L^{-1} ή WPM ως θρεπτικό μέσο ($0,1$ και $0,2$ αντίστοιχα), καθώς και σε αυτό που περιείχε 2 mg L^{-1} BA ($0,2$). Αντίστοιχες διαφορές παρατηρήθηκαν και στα ποσοστά καλογένεσης, ενώ τα αντίστοιχα ποσοστά ριζογένεσης ήταν χαμηλά (0-11%), με εξαίρεση αυτό του υποστρώματος άνευ φυτορμονών (39%). Τέλος, διαφορές παρατηρήθηκαν και στο δυναμικό πολλαπλασιασμού, με τις μεγαλύτερες τιμές να καταγράφονται στα υποστρώματα με $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ BA και 12 g L^{-1} άγαρ και 2 mg L^{-1} BA (3,99 και 4,54), ενώ το μικρότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα άνευ φυτορμονών (1,67). Έντονες διαφορές παρατηρήθηκαν στην εμφάνιση των εκφύτων: η αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ και η αντικατάσταση του MS με WPM έδωσαν λεπτούς βλαστούς και φύλλα, η αυξημένη συγκέντρωση BA συνδέθηκε με βραχεία έκφυτα ενώ η χρήση ZEA προκάλεσε έντονη βιοσύνθεση ανθοκυανινών (Πιν. 9, Εικ. 26).

Πίνακας 9. Αντίδραση εκφύτων κατά τη τρίτη υποκαλλιέργεια του *D. cruentus* σε στερεά υποστρώματα MS ή WPM.

Υπόστρωμα/ Άγαρ/PGRs (mg/L ⁻¹)	Ποσοστό (%)			Αρ. Βλαστών ⁴	Μέσος Αρ. Κόμβων ⁴	Ποσοστό Υπερνε/σης ⁵ (%)	Μέσος Αρ. Υπερ. Βλαστών	Δυναμικό Πολλ/σμού	Ποσοστό Κάλ/σης (%)	Ποσοστό Ριζ/σης (%)
	Αντίδραση ¹	Βλαστ/ση ²	Βλαστ/ση ³							
MS/8/HF	87	67	20	1,0 c	2,5 a	42	1,8 bc	1,67	19	39
MS/8/0,1 BA	90	77	13	2,0 b	2,5 ab	41	1,4 bcd	3,84	66	11
MS/12/0,1 BA	87	87	0	2,0 b	2,3 abc	7	0,1 d	3,99	20	8
WPM/8/0,1 BA	93	87	7	1,6 bc	2,3 abc	8	0,2 cd	3,19	52	4
MS/8/0,5 BA	77	63	13	1,8 bc	2,2 bc	39	2,3 ab	2,51	83	9
MS/8/1 BA	80	53	27	1,9 bc	2,1 c	63	3,0 ab	2,13	78	0
MS/8/2 BA	60	60	0	3,6 a	2,1 c	6	0,2 cd	4,54	28	0
MS/8/0,1 ZEA	80	57	23	1,5 bc	2,4 abc	50	4,0 a	2,04	78	4
<i>F</i> _{one-way ANOVA}				***	NS		***			

Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούν από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικό, *, **, ***: σημαντικό σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$ και $P \leq 0,001$ αντίστοιχα, $n = 50-60$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση² (%) x Μέσος αριθμός βλαστών⁴ x Μέσος αριθμός κόμβων⁴.

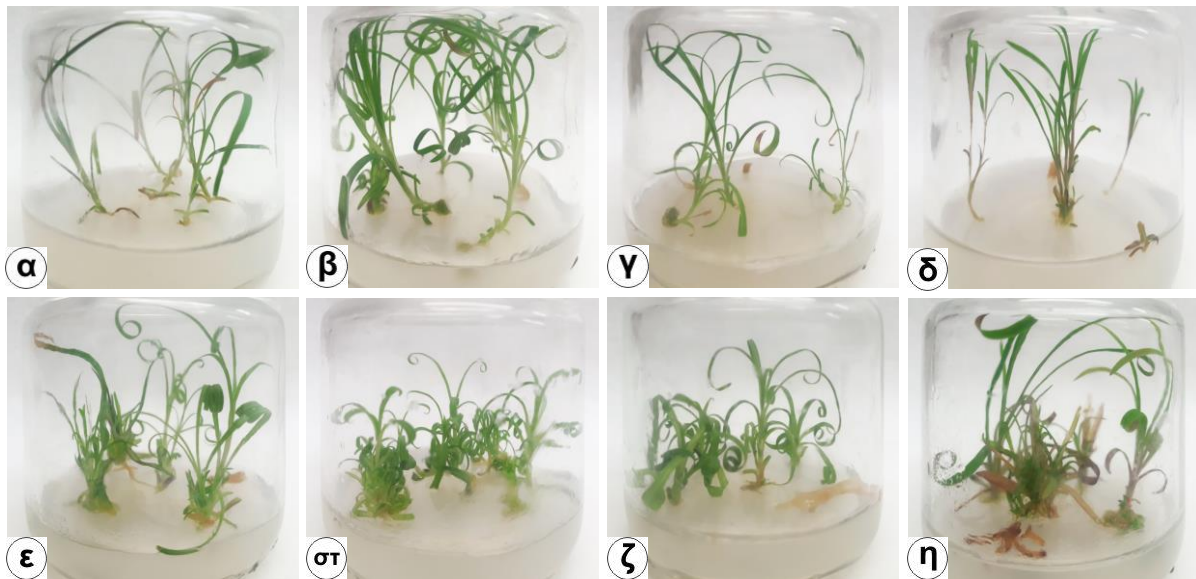
¹ Συνολική αντίδραση.

² Τα έκφυτα έφεραν υπερνευδατωμένους μαζί με μη υπερνευδατωμένους βλαστούς.

³ Τα έκφυτα έφεραν μόνο υπερνευδατωμένους βλαστούς.

⁴ Μη υπερνευδατωμένοι βλαστοί.

⁵ Πλήρως υπερνευδατωμένα έκφυτα μαζί με μεικτά έκφυτα.



Εικόνα 26. 3^η υποκαλλιέργεια εκφύτων *D. cruentus* προερχόμενων από φυσιολογικούς βλαστούς σε υπόστρωμα MS χωρίς φυτορμόνες (α) ή με 0,1 mg L⁻¹ BA (β) ή με 0,1 mg L⁻¹ BA και 12 g L⁻¹ άγαρ (γ) ή σε υπόστρωμα WPM με 0,1 mg L⁻¹ BA (δ) ή σε υπόστρωμα MS με 0,5 (ε) ή 1,0 (στ) ή 2,0 (η) mg L⁻¹ BA ή 0,1 mg L⁻¹ ZEA.

Εν συνεχεία του παράλληλου πειράματος της δεύτερης υποκαλλιέργειας, υπερενυδατωμένοι βλαστοί χρησιμοποιήθηκαν ως πηγή εκφύτων, τοποθετούμενοι προς βλαστογένεση στα υποστρώματα που περιείχαν $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ BA ή $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ZEA. Εδώ τα ποσοστά αντίδρασης ήταν πολύ υψηλά (90-100%), όμως τα αντίστοιχα ποσοστά βλαστογένεσης μεικτών και φυσιολογικών εκφύτων παρουσίασαν πολύ μεγάλες διαφορές μεταξύ των τεσσάρων υποστρωμάτων, με τη μεγαλύτερη τιμή τους να καταγράφεται στο υπόστρωμα που περιείχε $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ BA και 12 g L^{-1} άγαρ (83%) και τη μικρότερη σε αυτό που περιείχε $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ZEA (30%) (Πιν. 10, Εικ. 27). Αντίστοιχα, ο αριθμός των παραγόμενων φυσιολογικών βλαστών παρουσίασε μεγάλη διακύμανση, με το πλήθος αυτών που προέκυψαν στο υπόστρωμα WPM και στο υπόστρωμα MS που περιείχε $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ BA και 12 g L^{-1} άγαρ (2,0 και 2,4) να είναι πολλαπλάσιο από αυτό στο υπόστρωμα με $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ZEA (0,5). Τα ποσοστά υπερενυδάτωσης ήταν πολύ υψηλά (68-93%), ενώ στα υποστρώματα με τροποποιημένη σύσταση που περιείχαν BA τόσο η βλαστογένεση υπερενυδατωμένων εκφύτων όσο και ο αριθμός υπερενυδατωμένων βλαστών μειώθηκαν σημαντικά, ενώ οι μεγαλύτερες τιμές τους σημειώθηκαν στο υπόστρωμα με $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ZEA. Τα ποσοστά καλογένεσης ήταν πολύ υψηλά, ενώ τα ποσοστά ριζογένεσης σχετικά χαμηλά. Τέλος, το δυναμικό πολλαπλασιασμού παρουσίασε πολύ έντονες διαφορές μεταξύ των υποστρωμάτων, με τη μεγαλύτερη τιμή του να σημειώνεται στο υπόστρωμα $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ BA και 12 g L^{-1} άγαρ (5,20), ενώ τα υποστρώματα MS που περιείχαν $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ BA και 8 g L^{-1} άγαρ ή $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ZEA παρουσίασαν πολύ χαμηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού (0,79 και 0,39). Η χρήση διαφορετικών υποστρωμάτων συνδέθηκε με ακόμα εντονότερες διαφορές στην εμφάνιση των εκφύτων σε σύγκριση με τα μη υπερενυδατωμένα έκφυτα. Οι βλαστοί που εκπύχθηκαν από τα υποστρώματα MS με 8 g L^{-1} άγαρ και $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ BA ήταν βραχείς και με ελαφρώς υαλώδη εμφάνιση. Η χρήση ZEA οδήγησε σε εξαιρετικά παραμορφωμένους βλαστούς και εντονότατη καλογένεση, με αποτέλεσμα το σχηματισμό αδιαμόρφωτων, πλήρως υπερενυδατωμένων «μαζών». Αντίθετα, η χρήση WPM ή αυξημένης συγκέντρωσης άγαρ μαζί με $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ BA έδωσε βλαστούς φυσιολογικής εμφάνισης, οι οποίοι ωστόσο ήταν λεπτότεροι και ασθενέστεροι στο πρώτο (Πιν. 10, Εικ. 27).

Πίνακας 10. Αντίδραση εκφύτων προερχόμενων από υπερενδατωμένους βλαστούς κατά τη τρίτη υποκαλλιέργεια του *D. cruentus* σε στερεά υποστρώματα MS.

Υπόστρωμα/ Άγαρ/PGRs (mg/L ¹)	Ποσοστό (%)			Αρ. Βλαστών ⁴	Μέσος Αρ. Κόμβων ⁴	Ποσοστό Υπερνεσης ⁵ (%)	Μέσος Αρ. Υπερ. Βλαστών	Δυναμικό Πολλ/σμού	Ποσοστό Καλ/σης (%)	Ποσοστό Ριζ/σης (%)
	Αντίδραση ¹	Βλαστ/ση ²	Βλαστ/ση ³							
MS/8/0,1 BA	93	43	50	0,7 b	2,6 ab	93	5,3 b	0,79	90	10
MS/12/0,1 BA	93	83	10	2,4 a	2,6 a	68	2,5 c	5,20	89	25
WPM/8/0,1 BA	90	67	23	2,0 a	2,2 b	74	2,1 c	2,93	89	15
MS/8/0,1 ZEA	100	30	70	0,5 b	2,6 ab	87	12,3 a	0,39	93	0
<i>F</i> one-way ANOVA				***	NS		***			

Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικό, *, **, ***: σημαντικό σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$ και $P \leq 0,001$ αντίστοιχα, $n = 30$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση² (%) x Μέσος αριθμός βλαστών⁴ x Μέσος αριθμός κόμβων⁴.

¹ Συνολική αντίδραση.

² Τα έκφυτα έφεραν υπερενδατωμένους μαζί με μη υπερενδατωμένους βλαστούς.

³ Τα έκφυτα έφεραν μόνο υπερενδατωμένους βλαστούς.

⁴ Μη υπερενδατωμένοι βλαστοί.

⁵ Πλήρως υπερενδατωμένα έκφυτα μαζί με μεικτά έκφυτα.



Εικόνα 27. 3^η υποκαλλιέργεια εκφύτων *D. cruentus* προερχόμενων από υπερενδατωμένους βλαστούς σε υπόστρωμα MS με 0,1 mg L⁻¹ BA (α) ή με 0,1 mg L⁻¹ BA και 12 g L⁻¹ άγαρ (β) ή σε υπόστρωμα WPM με 0,1 mg L⁻¹ BA (γ) ή σε υπόστρωμα MS με 0,1 mg L⁻¹ ZEA (δ).

3.3.2.4 Τέταρτη υποκαλλιέργεια

Στο τελευταίο στάδιο της διαδικασίας του πολλαπλασιασμού, φυσιολογικοί βλαστοί προερχόμενοι από τα υποστρώματα με 0,1 mg L⁻¹ BA, 0,1 mg L⁻¹ ZEA ή χωρίς φυτορμόνες έδωσαν έκφυτα που μεταφέρθηκαν σε υποστρώματα ίδιας σύστασης με τη προέλευσή τους. Τόσο τα ποσοστά αντίδρασης όσο και τα ποσοστά βλαστογένεσης φυσιολογικών και μεικτών εκφύτων ήταν υψηλά και στα τρία υποστρώματα, με τις υψηλότερες τιμές να σημειώνονται σε αυτό που περιείχε 0,1 mg L⁻¹ BA (83% και 81%). Σημαντικές διαφορές παρουσιάστηκαν στον αριθμό φυσιολογικών βλαστών και κόμβων, με το υπόστρωμα που περιείχε 0,1 mg L⁻¹ ζεατίνη να δίνει πολυάριθμους βλαστούς με λιγότερους κόμβους και εντονότερη παρουσία ανθοκυανινών σε σχέση με τα άλλα δύο υποστρώματα. Η βλαστογένεση υπερενυδατωμένων εκφύτων ήταν πολύ χαμηλή σε όλα τα υποστρώματα, ενώ το ποσοστό υπερενυδάτωσης ήταν υψηλό μόνο για το υπόστρωμα με 0,1 mg L⁻¹ ZEA (63%). Την ίδια στιγμή, το υπόστρωμα αυτό παρουσίασε το υψηλότερο ποσοστό καλογένεσης (79%) και το χαμηλότερο ποσοστό ριζογένεσης (18%). Τέλος, στο ίδιο υπόστρωμα παρατηρήθηκε και το υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού (4,84), ενώ το χαμηλότερο κατάγραφε σε αυτό που δεν περιείχε κάποια φυτορμόνη (2,57). (Πιν. 11, Εικ. 27).

Πίνακας 11. Αντίδραση εκφύτων κατά τη τέταρτη υποκαλλιέργεια του *D. cruentus* σε στερεά υποστρώματα MS.

PGRs (mg/L-1)	Ποσοστό (%)			Αρ. Βλαστών ⁴	Μέσος Αρ. Κόμβων ⁴	Ποσοστό Υπερεν/σης (%) ⁵	Μέσος Αρ. Υπερ. Βλαστών	Δυναμικό Πολλ/σμού	Ποσοστό Καλ/σης (%)	Ποσοστό Ριζ/σης (%)
	Αντίδραση ¹	Βλαστ/ση ²	Βλαστ/ση ³							
Hf	78	66	12	1,5 b	2,6 a	28	1,4 ab	2,57	39	44
0,1 BA	83	81	2	1,8 b	2,5 a	13	0,3 b	3,65	28	39
0,1 ZEA	76	72	4	3,2 a	2,1 b	63	2,4 a	4,84	79	18

*F*_{0,05=99} ANOVA

NS

Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικό, *, **, ***: σημαντικό σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$ και $P \leq 0,001$ αντίστοιχα, $n = 47-50$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση² (%) x Μέσος αριθμός βλαστών⁴ x Μέσος αριθμός κόμβων⁴.

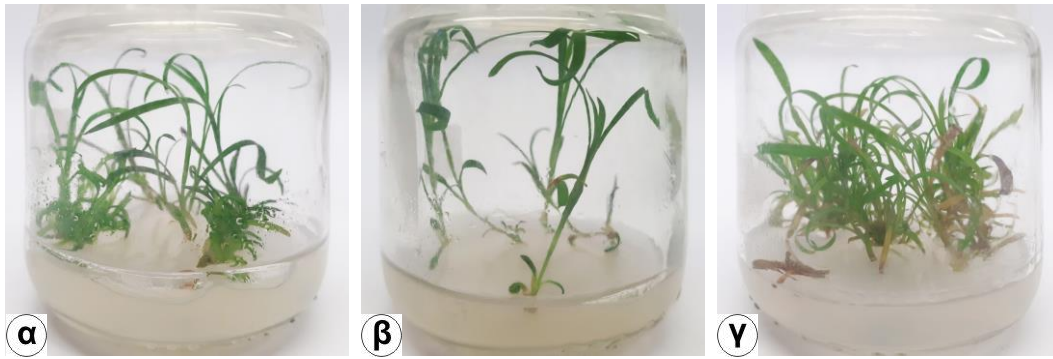
¹ Συνολική αντίδραση.

² Τα έκφυτα έφεραν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς.

³ Τα έκφυτα έφεραν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς.

⁴ Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί.

⁵ Πλήρως υπερενυδατωμένα έκφυτα μαζί με μεικτά έκφυτα.



Εικόνα 28. 4^η υποκαλλιέργεια εκφύτων *D. cruentus* προερχόμενων από φυσιολογικούς βλαστούς σε υπόστρωμα MS χωρίς φυτορμόνες (α) ή με 0,1 mg L⁻¹ BA (β) ή με 0,1 mg L⁻¹ ZEA (γ).

3.3.2.5 Σύγκριση υποκαλλιεργειών

Από την αρχική εγκατάσταση *in vitro* του είδους μέχρι και τη τέταρτη υποκαλλιέργεια έγινε χρήση υποστρώματος MS με 0,1 mg L⁻¹ BA, με τα έκφυτα που αναπτύσσονται σε αυτό να προέρχονται αποκλειστικά από βλαστούς που αναπτύχθηκαν στο ίδιο υπόστρωμα. Το ποσοστό αντίδρασης αυξήθηκε σημαντικά από τη πρώτη καλλιέργεια, παραμένοντας υψηλό μέχρι και το τέλος του σταδίου πολλαπλασιασμού. Το αρχικά χαμηλό ποσοστό βλαστογένεσης (55%) παρουσίασε θεαματική αύξηση από τη δεύτερη υποκαλλιέργεια, με τα υψηλά επίπεδα βλαστογένεσης να διατηρούνται μέχρι και τη τέταρτη υποκαλλιέργεια (77-81%). Μικρή αύξηση παρατηρήθηκε και στον αριθμό των κόμβων κατά την πρώτη υποκαλλιέργεια, με ελαφριά πτώση και σταθεροποίηση του αριθμού τους στη συνέχεια. Ο αριθμός βλαστών και το δυναμικό πολλαπλασιασμού παρουσίασαν μείωση στη πρώτη υποκαλλιέργεια, φτάνοντας στις μέγιστες τιμές τους (2,5 και 5,00) στη δεύτερη υποκαλλιέργεια, ακολουθώντας στη συνέχεια σταδιακή πτώση. Η βλαστογένεση υπερενυδατωμένων εκφύτων ήταν υψηλή έως και την πρώτη υποκαλλιέργεια, ενώ το ποσοστό υπερενυδάτωσης και ο αριθμός υπερενυδατωμένων βλαστών σημείωσαν έντονη πτώση από τη δεύτερη υποκαλλιέργεια. Η καλογένεση κορυφώθηκε κατά τη πρώτη υποκαλλιέργεια, με το ποσοστό της να κάμπτεται στη συνέχεια, ενώ η ριζογένεση ήταν χαμηλή μέχρι και τη τέταρτη υποκαλλιέργεια, όπου σχεδόν τετραπλασιάστηκε (Πιν. 12).

Πίνακας 12. Αντίδραση εκφύτων του *D. cruentus* σε διαδοχικές υποκαλλιέργειες σε στερεό υπόστρωμα MS που περιείχε 0,1 mg L⁻¹ BA.

Αριθμός Υποκαλλιέργειας ⁺	Ποσοστό (%)			Αρ. Βλαστών ⁴	Μέσος Αρ. Κόμβων ⁴	Ποσοστό Υπερεν/σης (%) ⁵	Μέσος Αρ. Υπερ. Βλαστών	Δυναμικό Πολλ/σμού	Ποσοστό Καλ/σης (%)	Ποσοστό Ριζ/σης (%)
	Αντίδραση ¹	Βλαστ/ση ²	Βλαστ/ση ³							
0	76	55	22	2,3 a	2,2 c	48	2,7 b	2,76	52	12
1	87	51	36	1,5 b	2,7 a	74	4,1 a	2,07	82	19
2	85	80	5	2,5 a	2,5 bc	37	2,0 b	5,00	73	16
3	90	77	13	2,0 ab	2,5 abc	41	1,4 bc	3,84	66	11
4	83	81	2	1,8 ab	2,5 ab	13	0,3 c	3,65	28	39

*F*_{one-way ANOVA}

NS

**

Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικό, *, **, ***: σημαντικό σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$ και $P \leq 0,001$ αντίστοιχα, $n = 30-90$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση² (%) x Μέσος αριθμός βλαστών⁴ x Μέσος αριθμός κόμβων⁴.

¹ Συνολική αντίδραση.

² Τα έκφυτα έφεραν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς.

³ Τα έκφυτα έφεραν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς.

⁴ Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί.

⁵ Πλήρως υπερενυδατωμένα έκφυτα μαζί με μεικτά έκφυτα.

*Ο αριθμός 0 υποδηλώνει την εγκατάσταση του είδους στο συγκεκριμένο υπόστρωμα.

Εξετάζοντας την αντίδραση των εκφύτων σε υπόστρωμα MS με 0,1 mg L⁻¹ 2iP για κάθε υποκαλλιέργεια που έγινε χρήση του, διαπιστώθηκε ότι το ποσοστό αντίδρασης κινήθηκε σε παρόμοια επίπεδα για όλες τις υποκαλλιέργειες (Πιν. 13). Το πολύ χαμηλό ποσοστό βλαστογένεσης κατά την εγκατάσταση (34%) αυξήθηκε μόνο κατά τη δεύτερη υποκαλλιέργεια (62%), ενώ μικρή αύξηση παρατηρήθηκε και στον αριθμό των κόμβων κατά την πρώτη υποκαλλιέργεια, με πτώση του αριθμού τους στη συνέχεια. Το δυναμικό πολλαπλασιασμού παρουσίασε αύξηση και στις δύο υποκαλλιέργειες, ενώ ο αριθμός των βλαστών μεγιστοποιήθηκε στη δεύτερη υποκαλλιέργεια (1,5). Η βλαστογένεση υπερενυδατωμένων εκφύτων ήταν υψηλή σε όλα τα στάδια, με υποδιπλασιασμό της στη δεύτερη υποκαλλιέργεια, ενώ ο αριθμός υπερενυδατωμένων βλαστών σημείωσε σημαντική πτώση κατά τη δεύτερη υποκαλλιέργεια. Η καλογένεση ήταν ιδιαίτερα έντονη σε όλα τα στάδια, ενώ η ριζογένεση κυμάνθηκε σε αρκετά χαμηλά επίπεδα (Πιν. 13).

Πίνακας 13. Αντίδραση εκφύτων του *D. cruentus* σε διαδοχικές υποκαλλιέργειες σε στερεό υπόστρωμα MS που περιείχε 0,1 mg L⁻¹ 2iP.

Αριθμός Υποκαλλιέργειας [†]	Ποσοστό (%)			Αρ. Βλαστών ⁴	Μέσος Αρ. Κόμβων ⁴	Ποσοστό Υπερεν/σης (%) ⁵	Μέσος Αρ. Υπερ. Βλαστών	Δυναμικό Πολλ./σμού	Ποσοστό Καλ/σης (%)	Ποσοστό Ριζ/σης (%)
	Αντίδραση ¹	Βλαστ/ση ²	Βλαστ/ση ³							
0	72	34	39	1,1 a	2,6 b	77	4,1 ab	0,97	89	6
1	79	44	35	1,0 a	2,9 a	75	4,7 a	1,27	94	22
2	80	62	18	1,5 a	2,4 b	55	2,6 b	2,23	90	10
<i>F</i> _{one-way ANOVA}				NS	**		*			

Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικό, *, **, ***: σημαντικό σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$ και $P \leq 0,001$ αντίστοιχα, $n = 50-80$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση² (%) x Μέσος αριθμός βλαστών⁴ x Μέσος αριθμός κόμβων⁴.

¹ Συνολική αντίδραση.

² Τα έκφυτα έφεραν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς.

³ Τα έκφυτα έφεραν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς.

⁴ Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί.

⁵ Πλήρως υπερενυδατωμένα έκφυτα μαζί με μεικτά έκφυτα.

*Ο αριθμός 0 υποδηλώνει την εγκατάσταση του είδους στο συγκεκριμένο υπόστρωμα.

Για τις δύο τελικές υποκαλλιέργειες όπου έγινε χρήση υποστρώματος MS με 0,1 mg L⁻¹ ZEA, καταγράφηκαν υψηλά ποσοστά αντίδρασης, ενώ το ποσοστό βλαστογένεσης αυξήθηκε κατά την υποκαλλιέργεια (72%). Και εδώ παρατηρήθηκε μικρή αύξηση στον αριθμό των κόμβων κατά την υποκαλλιέργεια, ενώ ταυτόχρονα ο αριθμός των βλαστών και το δυναμικό πολλαπλασιασμού υπερδιπλασιάστηκαν. Η βλαστογένεση υπερενυδατωμένων εκφύτων ήταν υψηλή σε όλα τα στάδια, με υποδιπλασιασμό της στην υποκαλλιέργεια, ενώ ο αριθμός υπερενυδατωμένων βλαστών σημείωσε πτώση κατά την υποκαλλιέργεια. Η καλογένεση ήταν έντονη σε όλα τα στάδια, ενώ η ριζογένεση κυμάνθηκε σε χαμηλά επίπεδα (Πιν. 14).

Πίνακας 14. Αντίδραση εκφύτων του *D. cruentus* σε διαδοχικές υποκαλλιέργειες σε στερεό υπόστρωμα MS που περιείχε 0,1 mg L⁻¹ Zeat.

Αριθμός Υποκαλλιέργειας [†]	Ποσοστό (%)			Αρ. Βλαστών ⁴	Μέσος Αρ. Κόμβων ⁴	Ποσοστό Υπερεν/σης (%) ⁵	Μέσος Αρ. Υπερ. Βλαστών	Δυναμικό Πολλ/σμού	Ποσοστό Καλ/σης (%)	Ποσοστό Ριζ/σης (%)
	Αντίδραση ¹	Βλαστ/ση ²	Βλαστ/ση ³							
0	80	57	23	1,5 b	2,4 a	50	4,0 a	2,04	78	4
1	76	72	4	3,2 a	2,1 b	63	2,4 a	4,84	79	18
<i>F</i> one-way ANOVA				**	*		NS			

Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούν από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικό, *, **, ***: σημαντικό σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$ και $P \leq 0,001$ αντίστοιχα, $n = 30-50$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση² (%) x Μέσος αριθμός βλαστών⁴ x Μέσος αριθμός κόμβων⁴.

¹ Συνολική αντίδραση.

² Τα έκφυτα έφεραν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς.

³ Τα έκφυτα έφεραν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς.

⁴ Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί.

⁵ Πλήρως υπερενυδατωμένα έκφυτα μαζί με μεικτά έκφυτα.

*Ο αριθμός 0 υποδηλώνει την εγκατάσταση του είδους στο συγκεκριμένο υπόστρωμα.

Όσον αφορά το υπόστρωμα MS χωρίς φυτορμόνες, παρατηρήθηκε ότι το ποσοστό αντίδρασης κινήθηκε σε υψηλά επίπεδα για όλες τις υποκαλλιέργειες. Το πολύ χαμηλό ποσοστό βλαστογένεσης κατά την εγκατάσταση αυξήθηκε μόνο κατά τη δεύτερη υποκαλλιέργεια, παραμένοντας σχετικά χαμηλό, ενώ ο αριθμός των κόμβων δε παρουσίασε αξιοσημείωτες διαφορές. Το δυναμικό πολλαπλασιασμού ήταν υψηλότερο στην πρώτη και τη Τρίτη υποκαλλιέργεια, όπως και ο αριθμός των βλαστών. Η βλαστογένεση υπερενυδατωμένων εκφύτων ήταν αρκετά χαμηλή σε όλα τα στάδια, παρουσιάζοντας σταδιακή πτώση, κάτι που ίσχυε και για τον αριθμό υπερενυδατωμένων βλαστών. Η καλογένεση ήταν ασθενής σε όλα τα στάδια, ενώ η ριζογένεση κυμάνθηκε σε υψηλά επίπεδα από την πρώτη υποκαλλιέργεια και ύστερα (Πιν. 15).

Πίνακας 15. Αντίδραση εκφύτων του *D. cruentus* σε διαδοχικές υποκαλλιέργειες σε στερεό υπόστρωμα MS άνευ φυτορμονών.

Αριθμός Υποκαλλιέργειας ⁺	Ποσοστό (%)			Αρ. Βλαστών ⁴	Μέσος Αρ. Κόμβων ⁴	Ποσοστό Υπερνεύσης (%) ⁵	Μέσος Αρ. Υπερ. Βλαστών	Δυναμικό Πολλ/σμού	Ποσοστό Καύσης (%)	Ποσοστό Ριζ/σης (%)
	Αντίδραση ¹	Βλαστ/ση ²	Βλαστ/ση ³							
0	80	45	35	0,9 a	2,7 a	69	2,9 a	1,09	38	13
1	76	58	18	1,7 a	2,4 a	42	2,4 a	2,37	42	47
2	87	67	20	1,0 a	2,5 a	42	1,8 a	1,67	19	39
3	78	66	12	1,5 a	2,6 a	28	1,4 a	2,57	39	44
<i>F</i> _{one-way ANOVA}				NS	NS		NS			

Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικό, *, **, ***: σημαντικό σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$ και $P \leq 0,001$ αντίστοιχα, $n = 20-50$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση² (%) x Μέσος αριθμός βλαστών⁴ x Μέσος αριθμός κόμβων⁴.

¹ Συνολική αντίδραση.

² Τα έκφυτα έφεραν υπερνευδατωμένους μαζί με μη υπερνευδατωμένους βλαστούς.

³ Τα έκφυτα έφεραν μόνο υπερνευδατωμένους βλαστούς.

⁴ Μη υπερνευδατωμένοι βλαστοί.

⁵ Πλήρως υπερνευδατωμένα έκφυτα μαζί με μεικτά έκφυτα.

*Ο αριθμός 0 υποδηλώνει την εγκατάσταση του είδους στο συγκεκριμένο υπόστρωμα.

3.3.2.6 Επίδραση προέλευσης εκφύτου

Η πρώτη ευρεία αξιολόγηση της χρήσης εκφύτων προερχόμενων από υπερνευδατωμένους βλαστούς πραγματοποιήθηκε κατά τη δεύτερη υποκαλλιέργεια, όπου υποστρώματα που περιείχαν BA ή 2iP σε συγκέντρωση 0,1 mg L⁻¹ μαζί με 0, 0,01 ή 0,01 mg L⁻¹ NAA. Τα ποσοστά αντίδρασης ήταν υψηλότερα στα έκφυτα υπερνευδατωμένης προέλευσης, όμως τα αντίστοιχα ποσοστά βλαστογένεσης ήταν χαμηλότερο στις περισσότερες περιπτώσεις, με τη χαμηλότερη τιμή του να σημειώνεται στο υπόστρωμα με 0,1 mg L⁻¹ 2iP και 0,01 mg L⁻¹ NAA και την υψηλότερη στο υπόστρωμα με 0,1 mg L⁻¹ BA και 0,05 mg L⁻¹ NAA. Σε όλα τα υποστρώματα που περιείχαν BA ο αριθμός των παραγόμενων ανά έκφυτο βλαστών ήταν σημαντικά μεγαλύτερος και στους δύο τύπους εκφύτων, ενώ ο αριθμός των κόμβων δεν παρουσίασε σημαντικές διαφορές. Ο σχηματισμός υπερνευδατωμένων βλαστών ήταν εξαιρετικά έντονος στα έκφυτα υπερνευδατωμένης προέλευσης, ενώ το ποσοστό υπερνευδατωμένης βλαστογένεσης κορυφώθηκε με τη χρήση υποστρώματος με 0,1 mg L⁻¹ 2iP άνευ NAA. Η χρήση υπερνευδατωμένων βλαστών ως έκφυτα συνδέθηκε με έντονη αύξηση των ήδη υψηλών ποσοστών

υπερενυδάτωσης και καλογένεσης, κάτι που ίσχυε στις περισσότερες περιπτώσεις και για το ποσοστό ριζογένεσης, με 98% των εκφύτων υπερενυδατωμένης πρόλευσης να ριζοβολεί στο υπόστρωμα χωρίς φυτορμόνες. Συνολικά, και στις δύο περιπτώσεις οι υψηλότερες τιμές δυναμικού πολλαπλασιασμού σημειώθηκαν για τα υποστρώματα που περιείχαν ΒΑ, ενώ η χαμηλότερη για το υπόστρωμα που περιείχε 0,1 mg L⁻¹ 2iP. Η προσθήκη ΝΑΑ ήταν σημαντική για τη μείωση των αριθμού των υπερενυδατωμένων βλαστών στα έκφυτα υπερενυδατωμένης προέλευσης, ενώ η παρουσία του σε συγκέντρωση 0,05 mg L⁻¹ μαζί με οδήγησε στη μοναδική περίπτωση όπου το δυναμικό πολλαπλασιασμού των υπερενυδατωμένης προέλευσης εκφύτων ήταν ίσο με αυτό των εκφύτων που προήλθαν από φυσιολογικούς βλαστούς (Πίν. 16).

Πίνακας 16. Επίδραση φυσιολογίας εκφύτου, είδους κυτοκινίνης και συγκέντρωσης ΝΑΑ κατά τη 2^η υποκαλλιέργεια του *D. cruentus*.

PGRs (mg L ⁻¹)	Ποσοστό (%)			Αρ. Βλαστών ⁴	Μέσος Αρ. Κόμβων ⁴	Ποσοστό Υπερεν/σης ⁵ (%)	Μέσος Αρ. Υπερ. Βλαστών	Δυναμικό Πολλ./σμού	Ποσοστό Καλ./σης (%)	Ποσοστό Ριζ./σης (%)
	Αντίδραση ¹	Βλαστ/ση ²	Βλαστ/ση ³							
Φυσιολογικά έκφυτα										
ΗΓ	76	58	18	1,7 cd	2,4 b	42	2,4 ef	2,37	42	47
0,1 ΒΑ/0,00 ΝΑΑ	85	80	5	2,5 ab	2,5 ab	37	2,0 f	5,00	73	16
0,1 ΒΑ/0,01 ΝΑΑ	85	82	3	2 abc	2,6 ab	35	1,5 f	4,25	86	14
0,1 ΒΑ/0,05 ΝΑΑ	83	78	5	2,6 a	2,5 ab	34	1,8 f	5,09	90	38
0,1 2iP/0 ΝΑΑ	80	62	18	1,5 cde	2,4 ab	55	2,6 def	2,23	90	10
0,1 2iP/0,01 ΝΑΑ	72	54	18	1,7 cd	2,5 ab	44	2,2 ef	2,30	100	28
0,1 2iP/0,05 ΝΑΑ	76	70	6	1,8 bcd	2,6 a	53	2,2 ef	3,28	100	21
Υπερενυδατωμένα έκφυτα										
ΗΓ	91	69	22	1,4 de	2,5 ab	66	4,1 cd	2,41	61	98
0,1 ΒΑ/0,00 ΝΑΑ	100	67	33	1,4 cde	2,5 ab	87	7,1 ab	2,33	100	7
0,1 ΒΑ/0,01 ΝΑΑ	100	73	27	1,5 cde	2,6 ab	100	6,1 abc	2,86	100	27
0,1 ΒΑ/0,05 ΝΑΑ	100	87	13	2,1 abcd	2,8 a	80	5,6 bc	5,10	100	27
0,1 2iP/0 ΝΑΑ	100	40	60	0,8 e	2,3 ab	80	8,3 a	0,74	100	67
0,1 2iP/0,01 ΝΑΑ	87	53	33	1,1 de	2,4 ab	100	5,8 abc	1,41	100	23
0,1 2iP/0,05 ΝΑΑ	100	60	40	1,2 cde	2,4 ab	87	4,1 cde	1,73	100	33
<i>F</i> Φυσιολογία εκφύτου (1)				***	NS		***			
<i>F</i> Είδος κυτοκινίνης (2)				***	NS		NS			
<i>F</i> Συγκέντρωση ΝΑΑ (3)				NS	NS		**			
<i>F</i> (1) x (3)				NS	NS		*			
<i>F</i> (1) x (2)				NS	NS		NS			
<i>F</i> (2) x (3)				NS	NS		NS			
<i>F</i> (1) x (2) x (3)				NS	NS		NS			
<i>F</i> one-way ANOVA				***	NS		***			

Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούν από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικό, *, **, ***: σημαντικό σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$ και $P \leq 0,001$ αντίστοιχα, $n = 15-60$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση² (%) x Μέσος αριθμός βλαστών⁴ x Μέσος αριθμός κόμβων⁴.

¹ Συνολική αντίδραση.

² Τα έκφυτα έφεραν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς.

³ Τα έκφυτα έφεραν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς.

⁴ Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί.

⁵ Πλήρως υπερενυδατωμένα έκφυτα μαζί με μεικτά έκφυτα.

Συγκρίνοντας την επανάληψη του ίδιου πειράματος με τέσσερα από τα υποστρώματα της τρίτης υποκαλλιέργειας, διαπιστώθηκε και πάλι ότι τα ποσοστά αντίδρασης των εκφύτων υπερενυδατωμένης προέλευσης ήταν υψηλότερα, όμως τα αντίστοιχα ποσοστά βλαστογένεσης παρουσίασαν πολύ μεγάλες διαφορές μεταξύ των τεσσάρων υποστρωμάτων και της φυσιολογίας των εκφύτων, με τη μεγαλύτερη τιμή τους να καταγράφεται στο υπόστρωμα που περιείχε 0,1 mg L⁻¹ BA και 1,2% άγαρ και για τους δύο τύπος εκφύτων. Αντίστοιχα, ο αριθμός των παραγόμενων φυσιολογικών βλαστών παρουσίασε μεγάλη διακύμανση, με τη μέγιστη να καταγράφεται στο ίδιο υπόστρωμα όταν χρησιμοποιήθηκαν υπερενυδατωμένα έκφυτα. Και εδώ τα ποσοστά υπερενυδάτωσης και ο αριθμός υπερενυδατωμένων βλαστών ήταν υψηλότερα για τα υπερενυδατωμένα έκφυτα, με ιδιαίτερα μεγαλύτερες τιμές τους για τα δύο υποστρώματα που περιείχαν κυτοκινίνες με 0,8% άγαρ και MS ως θρεπτικό μέσο. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον προκαλεί η παρατήρηση ότι οι τροποποιήσεις του υποστρώματος με 0,1 mg L⁻¹ BA δεν προκάλεσε σχεδόν καμία αλλαγή στο δυναμικό πολλαπλασιασμού όταν έγινε χρήση εκφύτων από φυσιολογικούς βλαστούς, ενώ κατά τη χρήση υπερενυδατωμένων εκφύτων οι ίδιες τροποποιήσεις έδωσαν πολλαπλάσια δυναμικά πολλαπλασιασμού (Πιν. 17).

Πίνακας 17. Επίδραση φυσιολογίας εκφύτου και είδους υποστρώματος κατά τη 3^η υποκαλλιέργεια του *D. cruentus*.

Υπόστρωμα/ Άγαρ/PGRs (mg/L ⁻¹)	Ποσοστό (%)			Αρ. Βλαστών ⁴	Μέσος Αρ. Κόμβων ⁴	Ποσοστό Υπερεν/ση ⁵ (%)	Μέσος Αρ. Υπερ. Βλαστών	Δυναμικό Πολλ/σμού	Ποσοστό Κάλλ/σης (%)	Ποσοστό Ριζ/σης (%)
	Αντίδραση ¹	Βλαστ/ση ²	Βλαστ/ση ³							
Φυσιολογικά έκφυτα										
MS/8/0,1 BA	90	77	13	2,0 ab	2,5 ab	41	1,4 de	3,84	66	11
MS/12/0,1 BA	87	87	0	2,0 ab	2,3 b	7	0,1 e	3,99	20	8
WPM/8/0,1 BA	93	87	7	1,6 b	2,3 b	8	0,2 e	3,19	52	4
MS/8/0,1 ZEA	80	57	23	1,5 b	2,4 ab	50	4,0 bc	2,04	78	4
Υπερενυδατωμένα έκφυτα										
MS/8/0,1 BA	93	43	50	0,7 c	2,6 ab	93	5,3 b	0,79	90	10
MS/12/0,1 BA	93	83	10	2,4 a	2,6 a	68	2,5 cd	5,20	89	25
WPM/8/0,1 BA	90	67	23	2,0 ab	2,2 b	74	2,1 cde	2,93	89	15
MS/8/0,1 ZEA	100	30	70	0,5 c	2,6 ab	87	12,3 a	0,39	93	0
<i>F</i> Φυσιολογία εκφύτου (1)				NS	NS		***			
<i>F</i> Υπόστρωμα (2)				***	NS		***			
<i>F</i> (1) x (2)				**	NS		***			
<i>F</i> one-way ANOVA				***	NS		***			

Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικό, *, **, ***: σημαντικό σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$ και $P \leq 0,001$ αντίστοιχα, $n = 15-60$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση² (%) x Μέσος αριθμός βλαστών⁴ x Μέσος αριθμός κόμβων⁴.

¹ Συνολική αντίδραση.

² Τα έκφυτα έφεραν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς.

³ Τα έκφυτα έφεραν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς.

⁴ Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί.

⁵ Πλήρως υπερενυδατωμένα έκφυτα μαζί με μεικτά έκφυτα.

3.3.3 Ριζοβολία και εγκλιματισμός

3.3.3.1 Πρώτη ριζοβολία και εγκλιματισμός

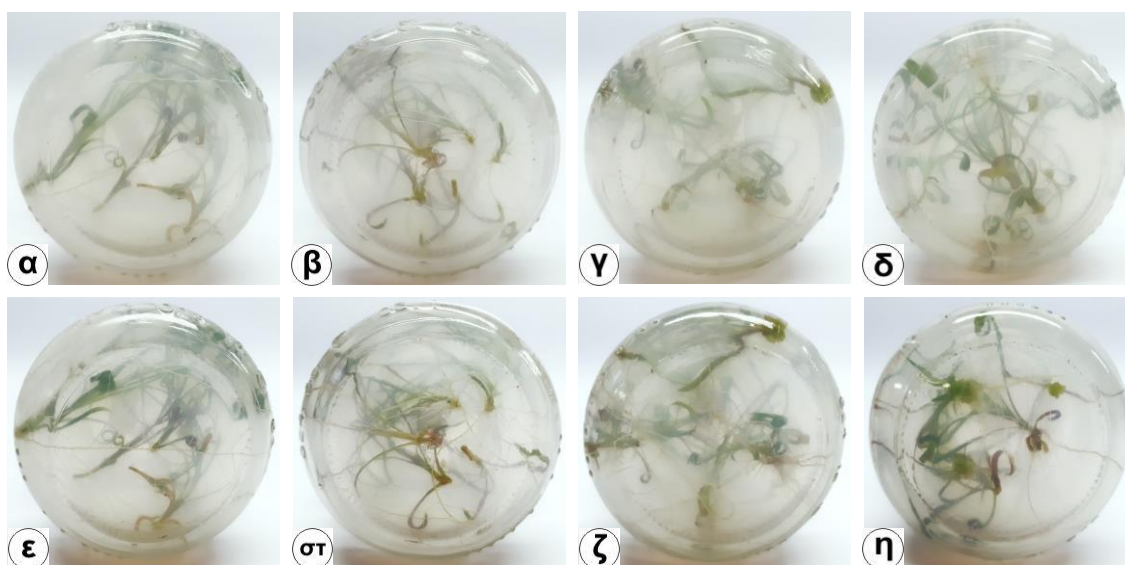
Κατά τη διενέργεια της πρώτης ριζοβολίας, άρριζοι μικροβλαστοί με τουλάχιστον 3 ζεύγη φύλλων προερχόμενοι από τα τρία υποστρώματα με $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ BA της τρίτης υποκαλλιέργειας τοποθετήθηκαν για ριζοβολία σε υποστρώματα πλήρους δύναμης χωρίς IBA ή εμπλουτισμένα με $0,1$ ή $0,5$ ή $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ IBA, στα οποία παρέμειναν για διάστημα 20 ή 30 ημερών. Το ποσοστό της ριζοβολίας των μικροβλαστών παρουσίασε διαφορές μεταξύ των υποστρωμάτων που χρησιμοποιήθηκαν και για τους δύο χρόνους παραμονής σε αυτά, με τις υψηλότερες τιμές να σημειώνονται κατά τη χρήση υποστρώματος με $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ IBA για 30 μέρες (95%) (Πίν. 18, Εικ. 29, 30). Ο μέσος αριθμός των ριζών δε φάνηκε να επηρεάζεται σημαντικά από το είδος του υποστρώματος ή από τη διάρκεια παραμονής των μικροβλαστών σε αυτό. Αντίθετα, σημαντική ήταν η αρνητική επίδραση των υψηλότερων συγκεντρώσεων IBA στο μήκος των ριζών τόσο στις 20 όσο και στις 30 μέρες, ιδιαίτερα όταν λήφθηκαν υπ' όψιν μόνο οι ρίζες με μήκος μεγαλύτερο του 1 cm. Τέλος, ο χρόνος παραμονής και η συγκέντρωση του IBA φάνηκε να αυξάνει το ποσοστό της καλογένεσης, με την ανάπτυξη κάλου διαμέτρου 3-10 mm στη βάση των μικροβλαστών, ενώ τα χαρακτηριστικά της ανάπτυξής τους (συνολικός αριθμός βλαστών και κόμβων ανά έκφυτο) δε παρουσίασαν αξιοσημείωτες διαφορές. Σε όλους τους χειρισμούς οι ρίζες ήταν λεπτές και παρουσίαζαν δευτερογενείς διακλαδώσεις, όμως στα υποστρώματα που περιείχαν $0,5$ ή $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ IBA είχαν πυκνότερη, θυσανώδη εμφάνιση, ιδιαίτερα όταν επώαστηκαν για 30 ημέρες στο υπόστρωμα ριζοβολίας (Πίν. 18, Εικ. 29, 30).

Πίνακας 18. Επίδραση της συγκέντρωσης IBA και της διάρκειας παραμονής σε υποστρώματα MS κατά τη ριζοβολία μικροβλαστών του *D. cruentus*.

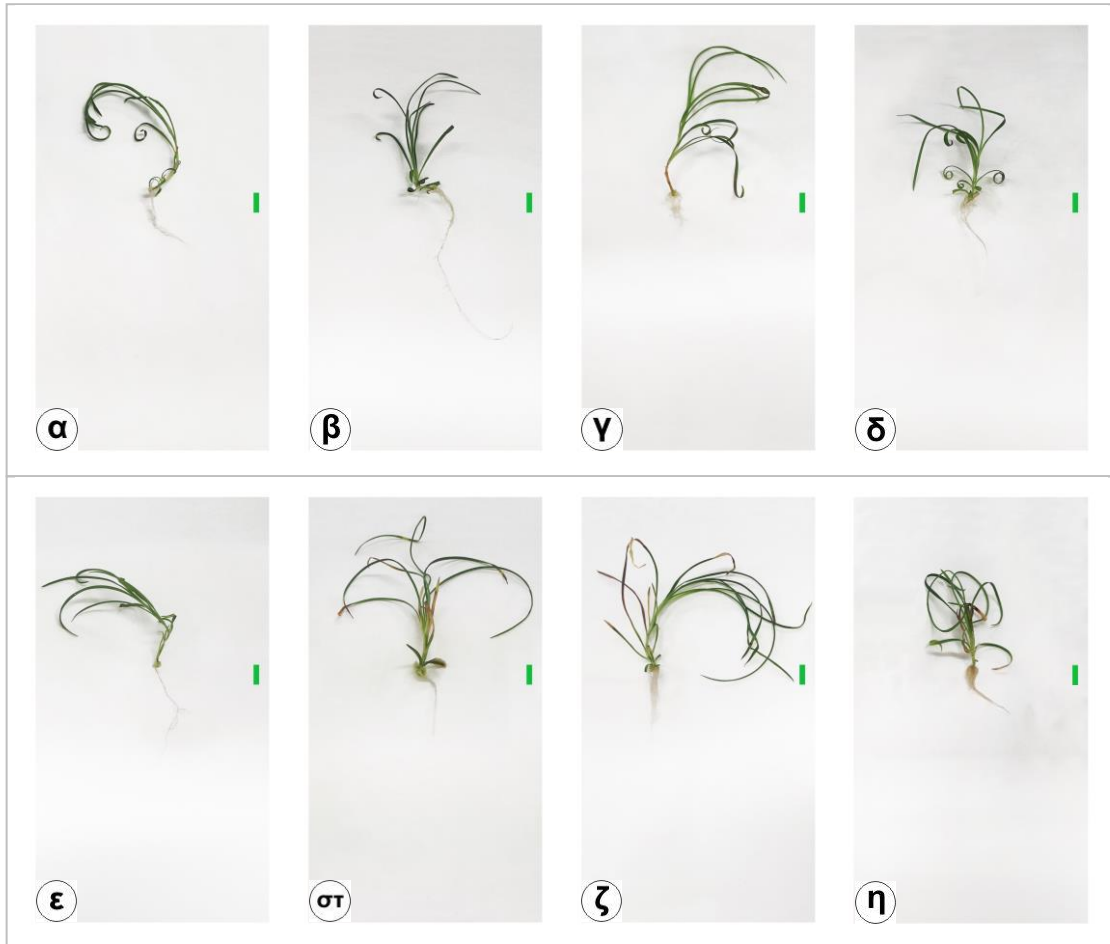
PGRs (mg L ⁻¹)	Ριζοβολία (%)	Μέσος αριθμός ριζών	Μέσο μήκος ριζών	Μέσο μήκος ριζών > 1 cm	Μέσος αριθμός βλαστών	Μέσος αριθμός κόμβων	Καλογένεση (%)
Hf (20d)	65	5,3 a	1,4 d	2 c	2,0 a	5,4 a	8
0,1 IBA (20d)	70	5,9 a	2 bcd	2,5 c	1,4 a	5,1 a	15
0,5 IBA (20d)	80	5,0 a	1,8 bcd	2,4 c	1,3 a	4,8 a	25
1 IBA (20d)	75	5,0 a	1,8 bcd	2 c	1,9 a	5,2 a	53
Hf (30d)	55	4,2 a	3,0 a	5,5 a	1,7 a	4,8 a	36
0,1 IBA (30d)	65	6,6 a	2,2 abc	3,6 b	1,6 a	5,2 a	31
0,5 IBA (30d)	95	6,3 a	2,3 ab	3,5 b	1,6 a	5,4 a	37
1 IBA (30d)	87	6,4 a	1,8 cd	2,6 c	1,6 a	5,1 a	70
<i>F</i> _{Ημέρες}		NS	***	***	NS	NS	
<i>F</i> _{PGRs}		NS	NS	***	NS	NS	
<i>F</i> _{Ημέρες x PGRs}		NS	**	***	NS	NS	
<i>F</i> _{one-wayANOVA}		NS	***	***	NS	NS	

Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικό, *, **, ***: σημαντικό σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$ και $P \leq 0,001$ αντίστοιχα, $n = 20-23$.



Εικόνα 29. Ριζοβολημένοι μικροβλαστοί *D. cruentus* κατά τη 1^η ριζοβολία μετά από 20 (α-δ) ή 30 (ε-η) μέρες επώασης σε θρεπτικό υπόστρωμα MS χωρίς τη παρουσία αυξίνης (α, ε) ή εμπλουτισμένο με IBA σε συγκεντρώσεις 0,1 (β, στ) ή 0,5 (γ, ζ) ή 1 mg L⁻¹ (δ, η).



Εικόνα 30. Μικροβλαστοί *D. cruentus* λίγο πριν το στάδιο του 1^{ου} εγκλιματισμού μετά από 20 (α-δ) ή 30 (ε-η) μέρες επώασης σε θρεπτικό υπόστρωμα MS χωρίς τη παρουσία αυξίνης (α, ε) ή εμπλουτισμένο με IBA σε συγκεντρώσεις 0,1 (β, στ) ή 0,5 (γ, ζ) ή 1 mg L⁻¹ (δ, η). Κλίμακα: 1 cm.

Μετά την ολοκλήρωση της πρώτης ριζοβολίας, τα έρριζα φυτάρια μεταφέρθηκαν προς εγκλιματισμό. 4 εβδομάδες αργότερα, λήφθηκαν μετρήσεις του συνολικού αριθμού εγκλιματισθέντων φυταρίων, καθώς και επιλεγμένων μορφολογικών χαρακτηριστικών τους, για κάθε διαφορετική επέμβαση ριζοβολίας (Πιν. 19, Εικ. 31, 32). Τα ποσοστά εγκλιματισμού ήταν πολύ υψηλά, κυμαινόμενα από 85% έως 100% (μέσο ποσοστό εγκλιματισμού: 94%). Ο μέσος αριθμός βλαστών παρουσίασε μικρές διαφορές, με τα φυτάρια που προήλθαν από το βραχύτερο χρονικό διάστημα ριζοβολίας (20d) να δίνουν ελαφρώς περισσότερους βλαστούς. Αντίστοιχα, διαπιστώθηκε ότι διαφορές σημειώθηκαν και στο μέσο μήκος των βλαστών, με το μικρότερο να σημειώνεται στο υπόστρωμα που περιείχε τη μεγαλύτερη συγκέντρωση IBA.

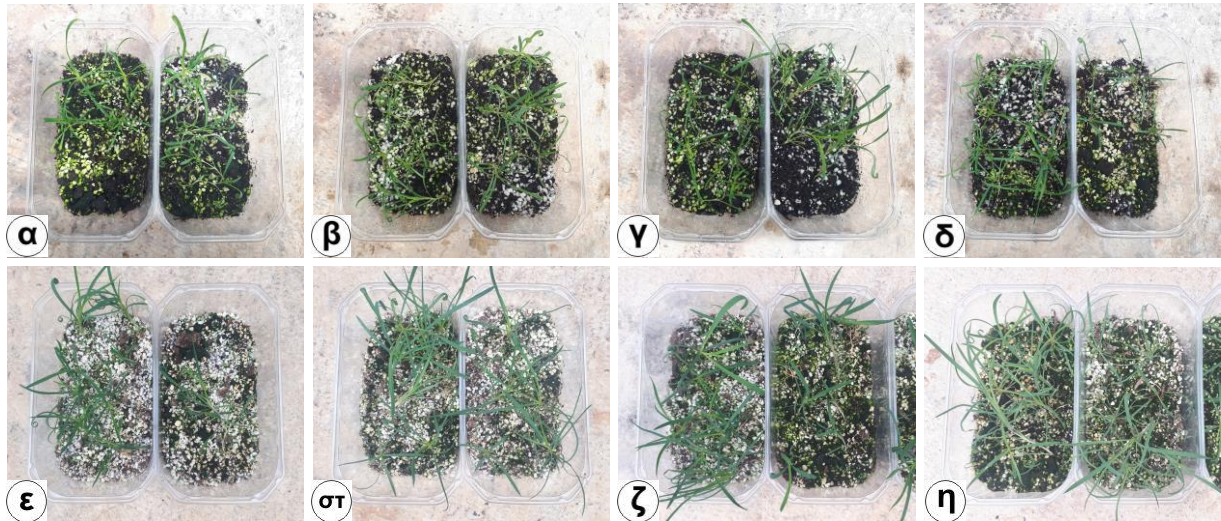
Την ίδια στιγμή, ο μεγαλύτερος χρόνος παραμονής στα υποστρώματα ριζοβολίας συνδέθηκε με σημαντικά αυξημένο συνολικό αριθμό κόμβων των φυταρίων. Τέλος, σημαντική ήταν η επίδραση της παραμέτρου αυτής και στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των φύλλων, με τις μεγαλύτερες τιμές μήκους και πλάτους αυτών να καταγράφονται σε φυτάρια που προήλθαν από τη παραμονή μικροβλαστών σε υποστρώματα ριζοβολίας για 30 μέρες, πιθανώς λόγω της μεγαλύτερης ηλικίας τους κατά τη λήψη των μετρήσεων (Πιν. 19, Εικ. 31, 32).

Πίνακας 19. Επίδραση της συγκέντρωσης IBA και της διάρκειας παραμονής σε υποστρώματα MS στα μορφολογικά χαρακτηριστικά εγκλιματισμένων φυταρίων του *D. cruentus*.

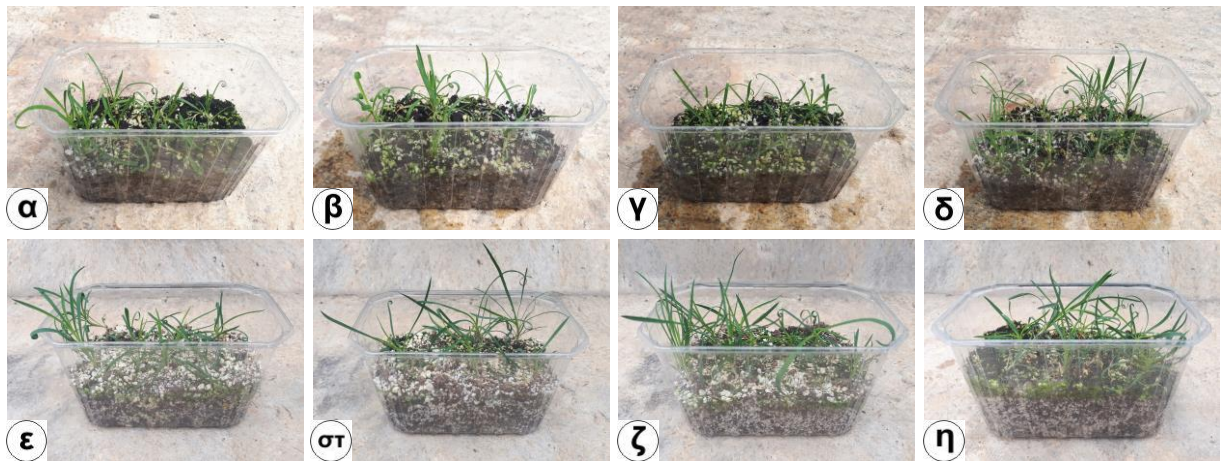
PGRs (mg L ⁻¹)	Εγκλιματισμός (%)	Μέσος αριθμός βλαστών	Μέσο μήκος βλαστών (cm)	Μέσος αριθμός κόμβων	Μέσο μέγιστο μήκος φύλλου	Μέσο μέγιστο πλάτος φύλλου (mm)
Hf (20d)	92	1,2 ab	2,7 ab	5,1 b	6,1 c	2,6 cd
0,1 IBA (20d)	100	1,2 ab	3,3 a	5,4 b	5,6 c	2,7 bcd
0,5 IBA (20d)	100	1,1 ab	2,5 abc	5,3 b	6,8 bc	2,5 d
1 IBA (20d)	100	1,4 a	1,9 c	4,7 b	5,8 c	2,4 d
Hf (30d)	90	1 b	2,7 abc	6,6 a	7,0 bc	2,4 d
0,1 IBA (30d)	92	1 b	2,3 bc	6,4 a	9,2 a	3,0 ab
0,5 IBA (30d)	90	1,1 ab	2,8 ab	6,3 a	7,6 b	3,1 a
1 IBA (30d)	85	1,1 ab	2 bc	6,3 a	7,7 ab	2,9 abc
<i>F</i> _{Ημέρες}		*	NS	***	***	***
<i>F</i> _{PGRs}		NS	**	NS	NS	*
<i>F</i> _{Ημέρες x PGRs}		NS	NS	NS	NS	**
<i>F</i> _{one-wayANOVA}		*	**	***	***	***

Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικό, *, **, ***: σημαντικό σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$ και $P \leq 0,001$ αντίστοιχα, $n = 11-20$.



Εικόνα 31. Κάτοψη εγκλιματισμένων φυταρίων *D. cruentus* προερχόμενων από 20 (α-δ) ή 30 (ε-η) μέρες επώασης σε θρεπτικό υπόστρωμα MS χωρίς τη παρουσία αυξίνης (α, ε) ή εμπλουτισμένο με IBA σε συγκεντρώσεις 0,1 (β, στ) ή 0,5 (γ, ζ) ή 1 mg L⁻¹ (δ, η).



Εικόνα 32. Άποψη εγκλιματισμένων φυταρίων *D. cruentus* προερχόμενων από 20 (α-δ) ή 30 (ε-η) μέρες επώασης σε θρεπτικό υπόστρωμα MS χωρίς τη παρουσία αυξίνης (α, ε) ή εμπλουτισμένο με IBA σε συγκεντρώσεις 0,1 (β, στ) ή 0,5 (γ, ζ) ή 1 mg L⁻¹ (δ, η).

3.3.3.2 Δεύτερη ριζοβολία και εγκλιματισμός

Το δεύτερο πείραμα ριζοβολίας πραγματοποιήθηκε με τη μεταφορά άρριζων μικροβλαστών με τουλάχιστον 3 ζεύγη φύλλων, οι οποίοι προήλθαν από τα υποστρώματα με 0,1 mg L⁻¹ BA, 0,1 mg L⁻¹ ZEA και άνευ κυτοκινινών (Hf) της τέταρτης υποκαλλιέργειας, σε υποστρώματα μισής δύναμης MS χωρίς IBA ή εμπλουτισμένα με 0,5 mg L⁻¹ IBA για 30 μέρες. Τα ποσοστά της ριζοβολίας των εκφύτων ήταν υψηλά, με την υψηλότερη τιμή (100%) να σημειώνεται κατά τη μεταφορά μικροβλαστών προερχόμενων από υπόστρωμα MS άνευ φυτομονών σε υπόστρωμα ½ MS με 0,5 mg L⁻¹ IBA (Πιν. 20, Εικ. 33, 34). Ο μέσος αριθμός των ριζών επηρεάστηκε θετικά από τη παρουσία IBA στο υπόστρωμα, με εξαίρεση τους μικροβλαστούς προερχόμενους από υπόστρωμα με 0,1 mg L⁻¹ BA, όπου δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των δύο υποστρωμάτων. Το μέσο μήκος των ριζών φάνηκε να μειώνεται σημαντικά στο υπόστρωμα που περιείχε IBA, με τη μικρότερη τιμή του να σημειώνεται για τους μικροβλαστούς προερχόμενους από υποστρώματα που περιείχαν κυτοκινίνη (2,1 cm). Στα υποστρώματα αυτά παρατηρήθηκαν διαφορές και ως προς τα βλαστογενετικά και καλογενετικά χαρακτηριστικά των εκφύτων προς ριζοβολία, καθώς αυτά παρουσίασαν ελαφρώς αυξημένο αριθμό βλαστών και κόμβων, καθώς και αύξηση στο ποσοστό καλογένεσης, η οποία ωστόσο ήταν εντονότερη όταν οι μικροβλαστοί προέρχονταν από υπόστρωμα χωρίς κυτοκινίνες. Η χρήση IBA επηρέασε τη μορφολογία των ριζών, με εντονότερη δευτερογενή διακλάδωσή τους και έντονα θυσανώδη εμφάνιση, ιδιαίτερα στους μικροβλαστούς που προήλθαν από υπόστρωμα χωρίς κυτοκινίνες (Πιν. 20, Εικ. 33, 34).

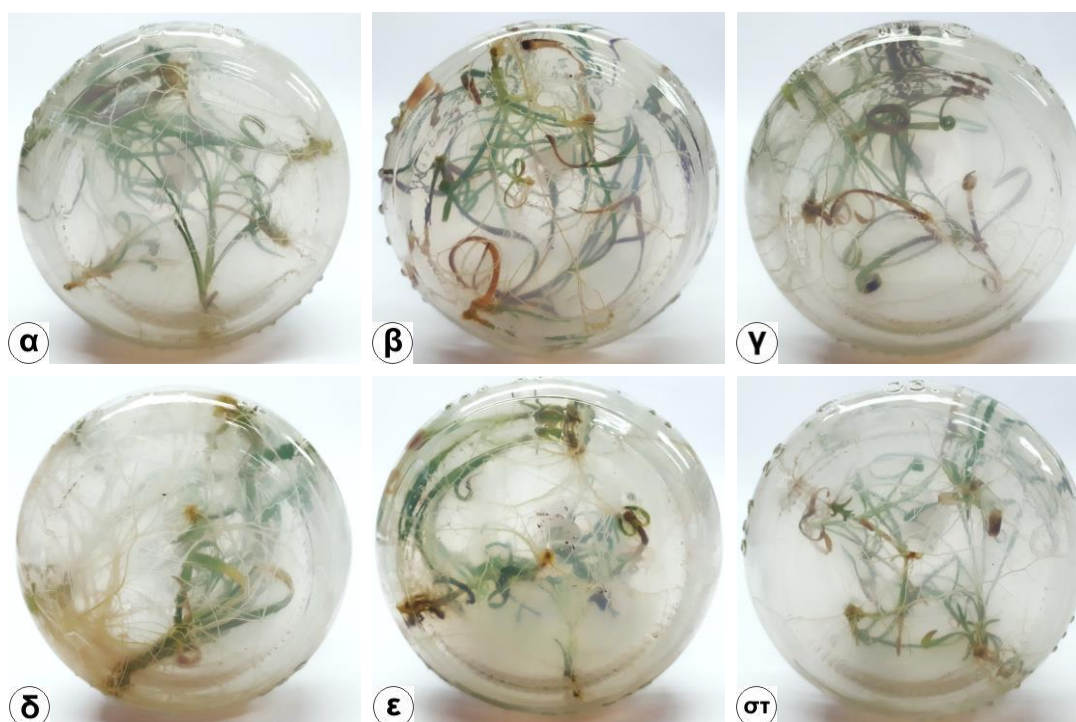
Πίνακας 20. Επίδραση της συγκέντρωσης IBA και της σύστασης του υποστρώματος προέλευσης των εκφύτων κατά τη ριζοβολία μικροβλαστών του *D. cruentus* σε υποστρώματα 1/2 MS.

PGRs (mg L ⁻¹)*	Ριζοβολία (%)	Μέσος αριθμός ριζών	Μέσο μήκος ριζών	Μέσο μήκος ριζών > 1 cm	Μέσος αριθμός βλαστών	Μέσος αριθμός κόμβων	Καλογένεση (%)
Hf (Hf)	90	5,7 bc	4,0 a	4,2 a	1,4 ab	4,5 ab	53
Hf (0,1 BA)	86	4,6 cd	3,0 b	3,4 bc	1,1 b	3,8 b	44
Hf (0,1 ZEA)	60	4 d	3,2 b	3,9 ab	1,7 ab	4,8 ab	33
0,5 IBA (Hf)	100	7,6 a	2,6 bc	3,1 c	1,4 ab	4,5 ab	83
0,5 IBA (0,1 BA)	89	4,6 cd	2,1 c	3,2 bc	1,7 ab	4,6 ab	52
0,5 IBA (0,1 ZEA)	83	6,1 b	2,1 c	3,4 bc	2,0 a	5,6 a	44
<i>F</i> _{PGRs}		**	***	**	NS	NS	
<i>F</i> _{Προέλευση}		***	**	NS	NS	NS	
<i>F</i> _{PGRs x Προέλευση}		NS	NS	NS	NS	NS	
<i>F</i> _{one-wayANOVA}		***	***	*	NS	NS	

Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικό, *, **, ***: σημαντικό σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$ και $P \leq 0,001$ αντίστοιχα, $n = 25-30$.

*Εντός παρανθέσεων καταγράφεται το περιεχόμενο σε φυτορμόνες (mg L⁻¹) του υποστρώματος μικροπολλαπλασιασμού από το οποίο προήλθαν οι μικροβλαστοί.



Εικόνα 33. Ριζοβολημένοι μικροβλαστοί *D. cruentus* κατά τη 2^η ριζοβολία σε θρεπτικό υπόστρωμα 1/2 MS χωρίς τη παρουσία αυξίνης (α, β, γ) ή εμπλουτισμένο με IBA σε συγκέντρωση 0,5 mg L⁻¹ (δ, ε, στ) προερχόμενοι από υπόστρωμα πολλαπλασιασμού χωρίς φυτορμόνες (α, δ) ή με 0,1 mg L⁻¹ BA (β, ε) ή με 0,1 mg L⁻¹ ZEA (γ, στ).



Εικόνα 34. Μικροβλαστοί *D. cruentus* λίγο πριν το στάδιο του 2^{ου} εγκλιματισμού, προερχόμενοι από υπόστρωμα ριζοβολίας ½ MS χωρίς τη παρουσία αυξίνης (α, β, γ) ή εμπλουτισμένο με IBA σε συγκέντρωση 0,5 mg L⁻¹ (δ, ε, στ) προερχόμενοι από υπόστρωμα πολλαπλασιασμού χωρίς φυτορμόνες (α, δ) ή με 0,1 mg L⁻¹ BA (β, ε) ή με 0,1 mg L⁻¹ ZEAT (γ, στ). Κλίμακα: 1 cm.

Μετά το πέρας της δεύτερης ριζοβολίας, τα έρριζα φυτάρια μεταφέρθηκαν προς εγκλιματισμό. Τέσσερις εβδομάδες αργότερα, λήφθηκαν μετρήσεις του συνολικού αριθμού εγκλιματισθέντων φυταρίων, καθώς και επιλεγμένων μορφολογικών χαρακτηριστικών τους, για κάθε διαφορετική επέμβαση ριζοβολίας. Τα ποσοστά εγκλιματισμού ήταν πολύ υψηλά (μέσο ποσοστό εγκλιματισμού: 89%), με εξαίρεση τους βλαστούς που προήλθαν από υπόστρωμα άνευ φυτορμονών, και ιδιαίτερα αυτούς που ριζοβόλησαν στο υπόστρωμα χωρίς IBA (65%). Ο μέσος αριθμός βλαστών παρουσίασε μικρές διαφορές, με τα φυτάρια που προήλθαν από το υπόστρωμα με 0,1 mg L⁻¹ ZEA να δίνουν ελαφρώς περισσότερους βλαστούς (1,5) όταν το υπόστρωμα ριζοβολίας δε περιείχε IBA. Σημαντικές διαφορές καταγράφηκαν στο μέσο μήκος των βλαστών, με το μικρότερο να σημειώνεται στα φυτάρια που προήλθαν από το υπόστρωμα που περιείχε ζεατίνη (1,2-1,5 cm). Μικρότερες διαφορές παρουσιάστηκαν στον μέσο αριθμό κόμβων, όπου και πάλι τα φυτάρια που προέρχονταν από μικροβλαστούς υποκαλλιεργούμενους σε 0,1 mg L⁻¹ ZEA και ριζοβολημένους σε υπόστρωμα χωρίς IBA βρέθηκαν τελευταία στη κατάταξη. Τέλος, τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των φύλλων διαφοροποιήθηκαν σημαντικά, ιδιαίτερα το μέσο μέγιστο μήκος, το οποίο εμφάνισε τη μεγαλύτερη τιμή του για τα φυτάρια που υποκαλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα δίχως κυτοκινίνες και ριζοβόλησαν σε υπόστρωμα με 0,5 mg L⁻¹ IBA (Πιν. 21, Εικ. 34, 35).

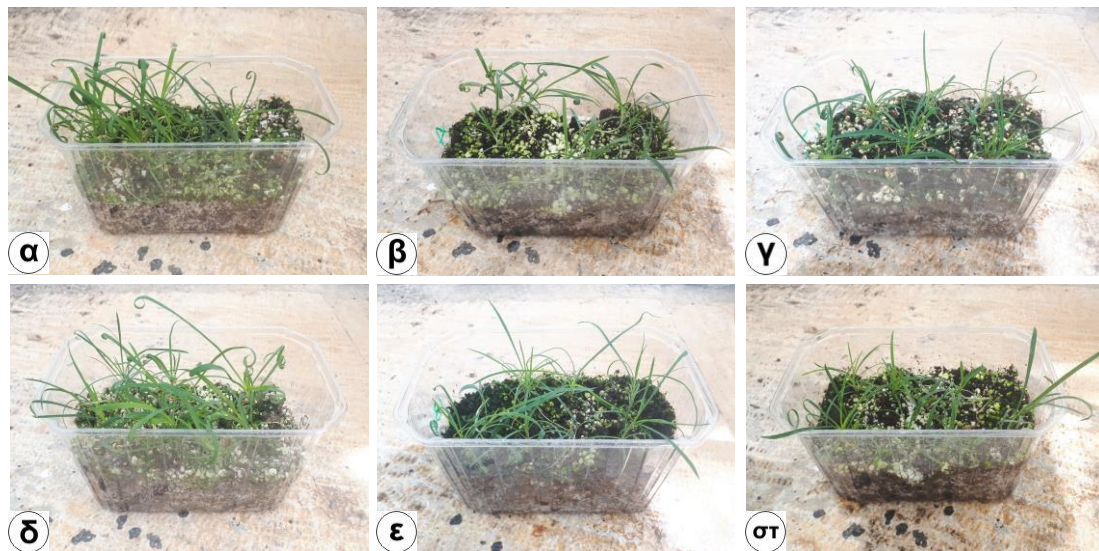
Πίνακας 21. Επίδραση της συγκέντρωσης IBA και της σύστασης του υποστρώματος προέλευσης των εκφύτων στα μορφολογικά χαρακτηριστικά εγκλιματισμένων φυταρίων του *D. cruentus*.

PGRs (mg L ⁻¹)*	Εγκλιματισμός (%)	Μέσος αριθμός βλαστών	Μέσο μήκος βλαστών (cm)	Μέσος αριθμός κόμβων	Μέσο μέγιστο μήκος φύλλου (cm)	Μέσο μέγιστο πλάτος φύλλου (mm)
Hf (Hf)	65	1,1 b	2,2 b	6,3 a	4,8 c	2,6 a
Hf (0,1 BA)	100	1,0 b	3,0 a	6,2 a	7,4 ab	2,6 a
Hf (0,1 ZEA)	92	1,5 a	1,2 c	5,2 b	6,4 b	2,3 b
0,5 IBA (Hf)	83	1,2 b	2,4 b	6,0 a	8,4 a	2,6 a
0,5 IBA (0,1 BA)	100	1,3 ab	2,3 b	5,8 a	6,2 bc	2,3 b
0,5 IBA (0,1 ZEA)	96	1,1 b	1,5 c	5,9 a	7,6 ab	2,6 a
<i>F</i> _{PGRs}		NS	NS	NS	***	NS
<i>F</i> _{Προέλευση}		NS	***	*	NS	*
<i>F</i> _{PGRs x Προέλευση}		*	**	***	***	***
<i>F</i> _{one-wayANOVA}		*	***	**	***	***

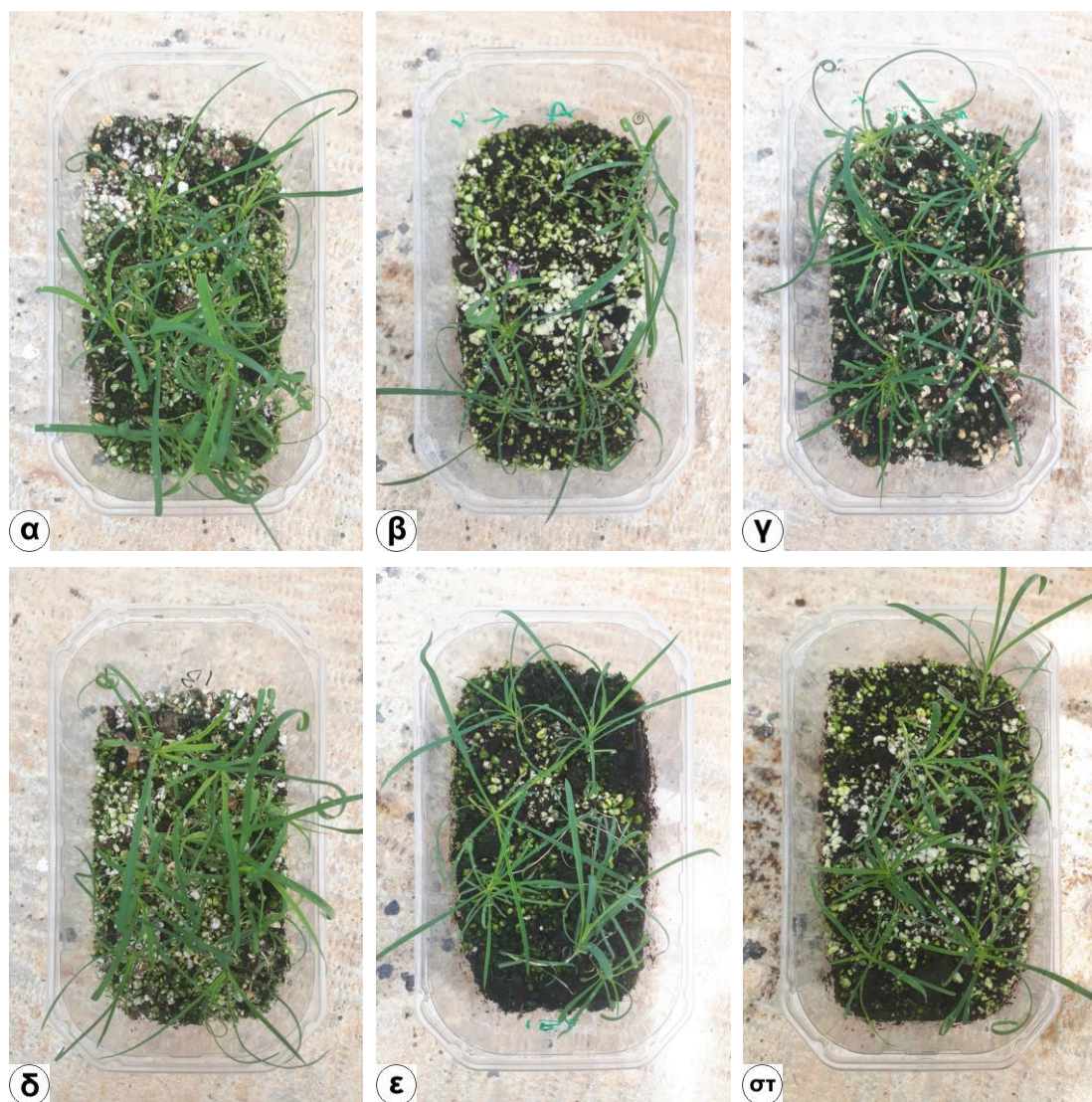
Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικό, *, **, ***: σημαντικό σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$ και $P \leq 0,001$ αντίστοιχα, $n = 24-26$.

*Εντός παραθέσεων καταγράφεται το περιεχόμενο σε φυτορμόνες (mg L⁻¹) του υποστρώματος μικροπολλαπλασιασμού από το οποίο προήλθαν οι μικροβλαστοί.



Εικόνα 35. Αποψη εγκλιματισμένων φυταρίων *D. cruentus* που ριζοβόλησαν σε θρεπτικό υπόστρωμα ½ MS χωρίς τη παρουσία αυξίνης (α, β, γ) ή εμπλουτισμένο με IBA σε συγκέντρωση 0,5 mg L⁻¹ (δ, ε, στ) προερχόμενοι από υπόστρωμα πολλαπλασιασμού χωρίς φυτορμόνες (α, δ) ή με 0,1 mg L⁻¹ BA (β, ε) ή με 0,1 mg L⁻¹ ZEA (γ, στ).



Εικόνα 36. Κάτοψη εγκλιματισμένων φυταρίων *D. cruentus* που ριζοβόλησαν σε θρεπτικό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS χωρίς τη παρουσία αυξίνης (α, β, γ) ή εμπλουτισμένο με IBA σε συγκέντρωση $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ (δ, ε, στ) προερχόμενοι από υπόστρωμα πολλαπλασιασμού χωρίς φυτορμόνες (α, δ) ή με $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ BA (β, ε) ή με $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ ZEA (γ, στ).

3.3.3.3 Τρίτη ριζοβολία και εγκλιματισμός

Για την εκτέλεση του τρίτου πείραματος ριζοβολίας χρησιμοποιήθηκαν άρριζοι μικροβλαστοί με τουλάχιστον 3 ζεύγη φύλλων προερχόμενοι από τα υποστρώματα με 0,5 ή 1 ή 2 mg L⁻¹ BA της τρίτης υποκαλλιέργειας, στα οποία παρέμειναν για 40 μέρες έπειτα από τη λήψη των μετρήσεων βλαστογένεσης (70 μέρες συνολικά), οι οποίοι τοποθετήθηκαν προς ριζοβολία σε υποστρώματα μισής δύναμης MS χωρίς IBA ή εμπλουτισμένα με 0,5 mg L⁻¹ IBA για 30 μέρες. Τα ποσοστά της ριζοβολίας των εκφύτων ήταν πολύ υψηλά (80-96%), με ελαφρώς υψηλότερες τιμές όταν οι μικροβλαστοί μεταφέρθηκαν σε υπόστρωμα ½ MS με 0,5 mg L⁻¹ IBA (Πιν. 22, Εικ. 37, 38). Ο μέσος αριθμός των ριζών επηρεάστηκε θετικά από τη παρουσία IBA στο υπόστρωμα ριζοβολίας αλλά και τη συγκέντρωση του BA στο υπόστρωμα πολλαπλασιασμού, με το μεγαλύτερο αριθμό τους να σημειώνεται όταν μικροβλαστοί προερχόμενοι από υπόστρωμα με 2 mg L⁻¹ BA μεταφέρθηκαν στο υπόστρωμα που περιείχε IBA. Το μέσο μήκος των ριζών φάνηκε να μειώνεται σημαντικά στο υπόστρωμα που περιείχε IBA, με τη μικρότερη τιμή του (1,9 cm) να σημειώνεται για τους μικροβλαστούς προερχόμενους από το υπόστρωμα με την υψηλότερη συγκέντρωση BA. Στο υπόστρωμα προέλευσης αυτό παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές και ως προς τα βλαστογενετικά και καλογενετικά χαρακτηριστικά των εκφύτων προς ριζοβολία, καθώς και στα δύο υποστρώματα ριζοβολίας εμφανίστηκε ιδιαίτερα αυξημένος αριθμός βλαστών και κόμβων, ενώ τα ποσοστά καλογένεσης ήταν υψηλότερα στο υπόστρωμα ριζοβολίας με 0,5 mg L⁻¹ IBA. Και εδώ Η χρήση IBA επηρέασε τη μορφολογία των ριζών, με εντονότερη διακλάδωσή τους και έντονα θυσανώδη εμφάνιση, ιδιαίτερα στους μικροβλαστούς που προήλθαν από τα υποστρώματα πολλαπλασιασμού με την υψηλότερη συγκέντρωση BA (Πιν. 22, Εικ. 37, 38).

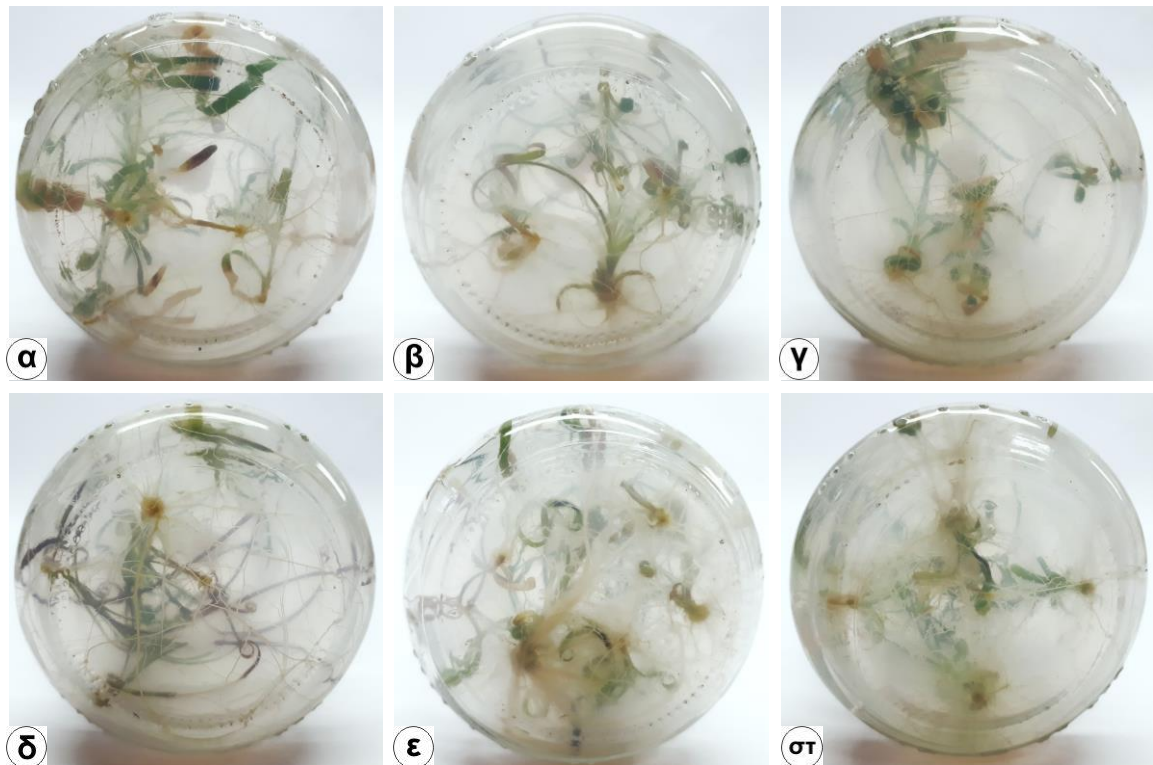
Πίνακας 22. Επίδραση της συγκέντρωσης IBA και της περιεχόμενου σε BA του υποστρώματος προέλευσης των εκφύτων κατά τη ριζοβολία μικροβλαστών του *D. cruentus* σε υποστρώματα MS/2.

PGRs (mg L ⁻¹)*	Ριζοβολία (%)	Μέσος αριθμός ριζών	Μέσο μήκος ριζών	Μέσο μήκος ριζών > 1 cm	Μέσος αριθμός βλαστών	Μέσος συν. αριθμός κόμβων	Καλογένεση (%)
Hf (0,5 BA)	88	3,2 d	3,0 a	3,6 a	1,4 b	4,5 b	41
Hf (1 BA)	92	4,5 cd	2,8 a	3,1 ab	2,0 b	5,7 b	65
Hf (2 BA)	80	4,4 cd	2,8 ab	3,1 ab	3,8 a	9,1 a	88
0,5 IBA (0,5 BA)	92	5,4 bc	2,2 c	3,0 ab	1,4 b	4,9 b	87
0,5 IBA (1 BA)	96	6,3 ab	2,2 bc	2,9 b	1,8 b	5,5 b	100
0,5 IBA (2 BA)	95	7,5 a	1,9 c	2,6 b	2,4 ab	6,7 ab	100
<i>F</i> _{PGRs}		***	***	*	NS	NS	
<i>F</i> _{Προέλευση}		**	NS	NS	**	**	
<i>F</i> _{PGRs x Προέλευση}		NS	NS	NS	NS	NS	
<i>F</i> _{one-wayANOVA}		***	***	NS	*	*	

Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικό, *, **, ***: σημαντικό σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$ και $P \leq 0,001$ αντίστοιχα, $n = 24-30$.

*Εντός παρανθέσεων καταγράφεται το περιεχόμενο σε φυτορμόνες (mg L⁻¹) του υποστρώματος μικροπολλαπλασιασμού από το οποίο προήλθαν οι μικροβλαστοί.



Εικόνα 37. Ριζοβολημένοι μικροβλαστοί *D. cruentus* κατά τη 3^η ριζοβολία σε θρεπτικό υπόστρωμα ½ MS χωρίς τη παρουσία αυξίνης (α, β, γ) ή εμπλουτισμένο με IBA σε συγκέντρωση 0,5 mg L⁻¹ (δ, ε, στ) προερχόμενοι από υπόστρωμα πολλαπλασιασμού με 0,5 (α, δ) ή 1,0 (β, ε) ή 2,0 (γ, στ) mg L⁻¹ BA.



Εικόνα 38. Μικροβλαστοί *D. cruentus* λίγο πριν το στάδιο του 3^{ου} εγκλιματισμού, προερχόμενοι από υπόστρωμα ριζοβολίας ½ MS χωρίς τη παρουσία αυξίνης (α, β, γ) ή εμπλουτισμένο με IBA σε συγκέντρωση 0,5 mg L⁻¹ (δ, ε, στ) προερχόμενοι από υπόστρωμα πολλαπλασιασμού με 0,5 (α, δ) ή 1,0 (β, ε) ή 2,0 (γ, στ) mg L⁻¹ BA. Κλίμακα: 1 cm.

Ύστερα από τη λήξη της τρίτης ριζοβολίας, τα έρριζα φυτάρια μεταφέρθηκαν προς εγκλιματισμό. Τέσσερις εβδομάδες αργότερα, λήφθηκαν μετρήσεις του συνολικού αριθμού εγκλιματισθέντων φυταρίων, καθώς και επιλεγμένων μορφολογικών χαρακτηριστικών τους, για κάθε διαφορετική επέμβαση ριζοβολίας. Τα ποσοστά εγκλιματισμού ήταν πολύ υψηλά, αγγίζοντας το 100% για τα φυτάρια που προήλθαν από την υποκαλλιέργεια που περιείχε 1 mg L⁻¹ BA (μέσο ποσοστό εγκλιματισμού: 90%) (Πιν. 23, Εικ. 39, 40). Ο μέσος αριθμός βλαστών διαφοροποιήθηκε σημαντικά ως προς την προέλευση των μικροβλαστών, με αυτούς που προέρχονταν από το υπόστρωμα πολλαπλασιασμού με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση BA να δίνει το μεγαλύτερο αριθμό βλαστών (1,7). Αντίστοιχα, αύξηση της συγκέντρωσης του BA φάνηκε να συνδέεται με τη μείωση του μέσου μήκους των βλαστών των φυταρίων, με το μικρότερο μήκος (2,0 cm) να σημειώνεται στα φυτάρια που προήλθαν από το υπόστρωμα που περιείχε 2 mg L⁻¹ BA. Έντονες διαφορές παρουσιάστηκαν στον μέσο αριθμό κόμβων, όπου τόσο η μειωμένη συγκέντρωση BA στο υπόστρωμα πολλαπλασιασμού όσο και η παρουσία IBA στο υπόστρωμα ριζοβολίας επηρέασε τον αριθμό τους. Τέλος, τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των φύλλων δε διαφοροποιήθηκαν σημαντικά, με το μέσο μέγιστο μήκος φύλλων να παρουσιάζει ελαφρώς χαμηλότερες τιμές για τα φυτάρια που προήλθαν από μικροβλαστούς υποκαλλιεργούμενους στο υπόστρωμα με τη μέγιστη συγκέντρωση BA (Πιν. 23, Εικ. 39, 40).

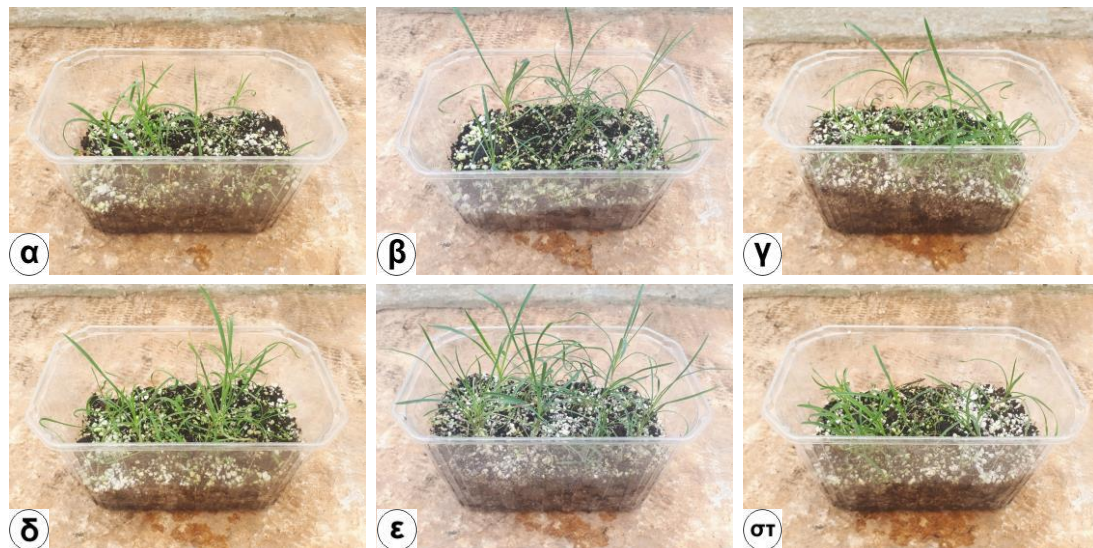
Πίνακας 23. Επίδραση της συγκέντρωσης IBA και της περιεχόμενου σε BA του υποστρώματος προέλευσης των εκφύτων στα μορφολογικά χαρακτηριστικά εγκλιματισμένων φυταρίων του *D. cruentus*.

PGRs (mg L ⁻¹)*	Εγκλιματισμός (%)	Μέσος αριθμός βλαστών	Μέσο μήκος βλαστών (cm)	Μέσος αριθμός κόμβων	Μέσο μέγιστο μήκος φύλλου (cm)	Μέσο μέγιστο πλάτος φύλλου (mm)
Hf (0,5 BA)	73	1,1 b	2,8 a	5,8 a	5,8 ab	2,6 a
Hf (1 BA)	100	1,2 b	2,6 a	4,9 b	6,5 ab	2,5 a
Hf (2 BA)	85	1,4 ab	2,5 ab	4,8 b	5,7 ab	2,6 a
0,5 IBA (0,5 BA)	91	1,1 b	2,7 a	5,9 a	6,7 a	2,6 a
0,5 IBA (1 BA)	100	1,4 ab	2,4 ab	5,9 a	6,3 ab	2,5 a
0,5 IBA (2 BA)	90	1,7 a	2,0 b	5,3 ab	5,3 b	2,6 a
<i>F</i> _{PGRs}		NS	NS	***	NS	NS
<i>F</i> _{Προέλευση}		*	NS	**	NS	NS
<i>F</i> _{PGRs x Προέλευση}		NS	NS	NS	NS	NS
<i>F</i> _{one-wayANOVA}		NS	NS	***	NS	NS

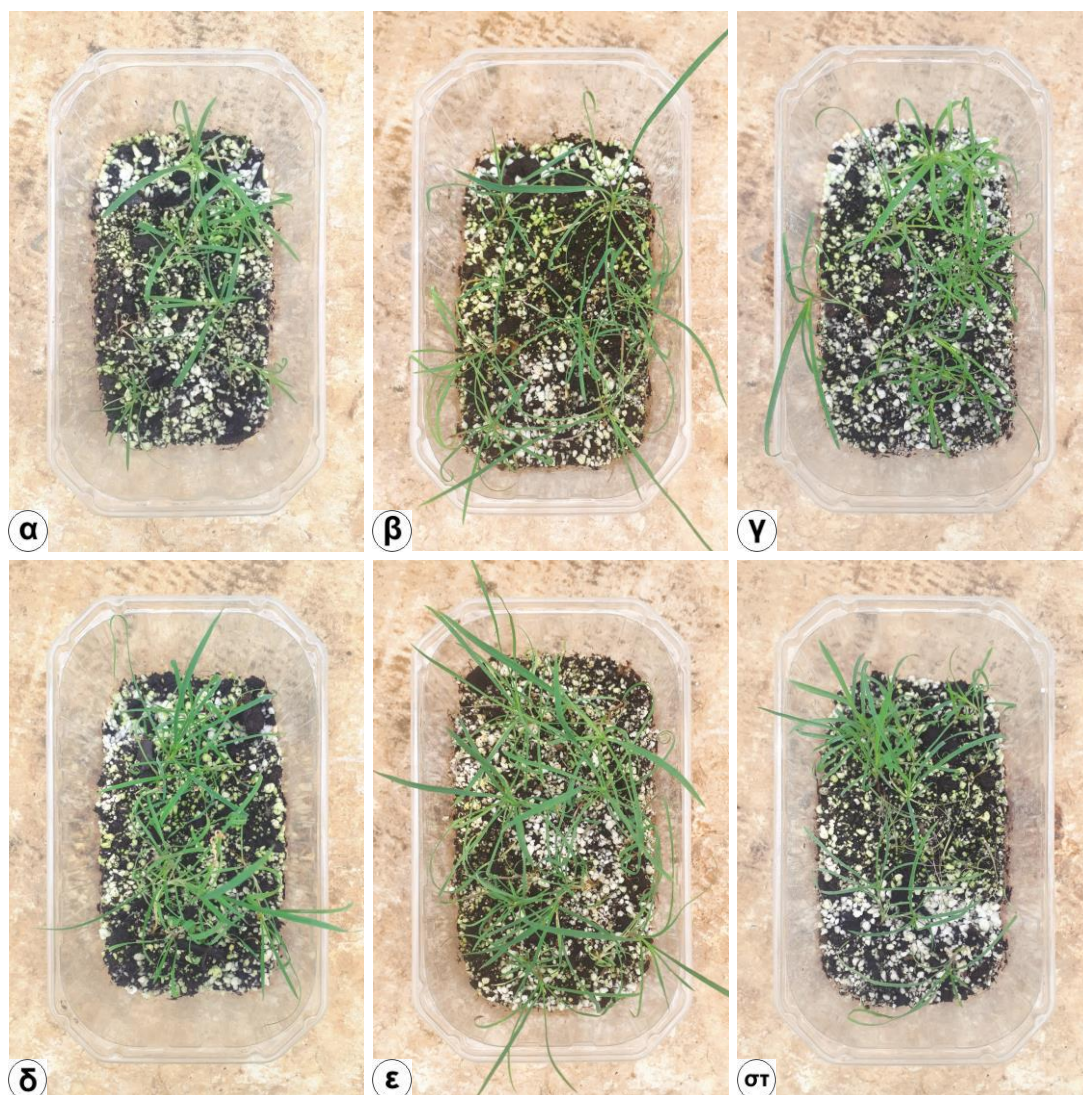
Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούν από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικό, *, **, ***: σημαντικό σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$ και $P \leq 0,001$ αντίστοιχα, $n = 19-23$.

*Εντός παραθέσεων καταγράφεται το περιεχόμενο σε φυτορμόνες (mg L⁻¹) του υποστρώματος μικροπολλαπλασιασμού από το οποίο προήλθαν οι μικροβλαστοί.



Εικόνα 39. Αποψη εγκλιματισμένων φυταρίων *D. cruentus* που ριζοβόλησαν σε θρεπτικό υπόστρωμα ½ MS χωρίς τη παρουσία αυξίνης (α, β, γ) ή εμπλουτισμένο με IBA σε συγκέντρωση 0,5 mg L⁻¹ (δ, ε, στ) προερχόμενοι από υπόστρωμα πολλαπλασιασμού με 0,5 (α, δ) ή 1,0 (β, ε) ή 2,0 (γ, στ) mg L⁻¹ BA.



Εικόνα 40. Κάτοψη εγκλιματισμένων φυταρίων *D. cruentus* που ριζοβόλησαν σε θρεπτικό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS χωρίς τη παρουσία αυξίνης (α, β, γ) ή εμπλουτισμένο με IBA σε συγκέντρωση $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ (δ, ε, στ) προερχόμενοι από υπόστρωμα πολλαπλασιασμού με $0,5$ (α, δ) ή $1,0$ (β, ε) ή $2,0$ (γ, στ) mg L^{-1} BA.

3.3.3.4 Εγκλιματισμός δίχως στάδιο ριζοβολίας

Συμπληρωματικά με τα κύρια πειράματα ριζοβολίας και με βάση την παρατηρούμενη, ενίοτε έντονη ριζογένεση στα υποστρώματα πολλαπλασιασμού, διερευνήθηκε η δυνατότητα απλοποίησης της διαδικασίας *in vitro* πολλαπλασιασμού του *Dianthus cruentus* σε ένα στάδιο με τη χρήση ενιαίου υποστρώματος πολλαπλασιασμού και ριζοβολίας. Αναλυτικότερα, μετά τη λήψη των μετρήσεων βλαστογένεσης της δεύτερης υποκαλλιέργειας, όλα τα έκφυτα που δε χρησιμοποιήθηκαν για τη διετέλεση της τρίτης υποκαλλιέργειας αφέθηκαν να συνεχίσουν την ανάπτυξή τους στα υποστρώματα πολλαπλασιασμού τους για διάστημα τεσσάρων εβδομάδων (συνολικός χρόνος υποκαλλιέργειας: 60 ημέρες). Στη συνέχεια, μετρήθηκε το ποσοστό ριζοβολίας των εκφύτων σε κάθε υπόστρωμα, και τα έρριζα έκφυτα μεταφέρθηκαν προς εγκλιματισμό.

Τα ποσοστά βλαστογένεσης ήταν αυξημένα συγκρινόμενα με αυτά που είχαν καταγραφεί τέσσερις εβδομάδες πριν, ενώ έντονη πτώση καταγράφηκε στον αριθμό των πλήρως υπερενυδατωμένων εκφύτων. Το υπόστρωμα χωρίς φυτορμόνες και αυτό με $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ BA και $0,01 \text{ mg L}^{-1}$ NAA έδωσαν τον υψηλότερο αριθμό βλαστών (3,1 και 3,3) και το μεγαλύτερο δυναμικό πολλαπλασιασμού (7,20 και 7,46), ενώ τα υποστρώματα με 2iP είχαν το μεγαλύτερο αριθμό υπερενυδατωμένων βλαστών. Τα υψηλότερα ποσοστά ριζογένεσης καταγράφηκαν στα υποστρώματα χωρίς φυτορμόνες ή με 2iP, ενώ το χαμηλότερο ποσοστό καλογένεσης στο υπόστρωμα χωρίς φυτορμόνες (Πιν. 24, Εικ. 41, 42)



Εικόνα 41. Φυτάρια *D. cruentus* λίγο πριν το στάδιο του εγκλιματισμού, προερχόμενα από έκφυτα που παρέμειναν για 60 ημέρες σε υπόστρωμα MS χωρίς φυτορμόνες (α) ή με $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ BA και $0,01$ (β) ή $0,05$ (γ) mg L^{-1} NAA ή $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP και $0,01$ (δ) ή $0,05$ (ε) mg L^{-1} NAA. Κλίμακα: 1 cm.

Πίνακας 24. Επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης φυτορμονών κατά την καλλιέργεια του *D. cruentus* σε στερεά υποστρώματα MS για 60 ημέρες.

PGRs (mg L ⁻¹)	Ποσοστό (%)			Αρ. Βλαστών ⁴	Μέσος Αρ. Κόμβων ⁴	Ποσοστό Υπερ/σης ⁵ (%)	Μέσος Αρ. Υπερ/ων Βλαστών	Δυναμικό Πολ/μού	Ποσοστό Καλ/σης (%)	Ποσοστό Ριζογένεσης (%)
	Αντίδραση ¹	Βλαστ/ση ²	Βλαστ/ση ³							
Hf	86	86	0	3,1 a	2,7 a	48	3,5 bc	7,2	57	93
0,1 BA/0,01 NAA	80	78	2	3,3 a	2,9 a	39	2,1 c	7,46	92	77
0,1 BA/0,05 NAA	87	82	5	2,9 a	2,8 a	46	2,5 bc	6,66	92	80
0,1 2iP/0,01 NAA	70	62	8	2,7 a	2,8 a	68	6,2 a	4,69	100	97
0,1 2iP/0,05 NAA	80	76	4	2,5 a	2,9 a	67	4,5 ab	5,51	100	93
<i>F</i> one-way ANOVA				NS	NS		**			

Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικό, *, **, ***: σημαντικό σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$ και $P \leq 0,001$ αντίστοιχα, $n = 35-60$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση² (%) x Μέσος αριθμός βλαστών⁴ x Μέσος αριθμός κόμβων⁴.

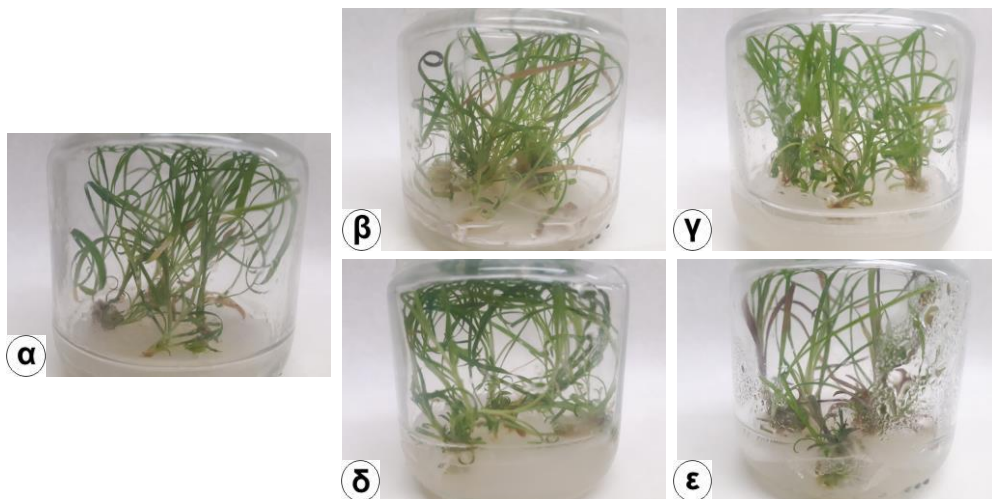
¹ Συνολική αντίδραση.

² Τα έκφυτα έφεραν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς.

³ Τα έκφυτα έφεραν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς.

⁴ Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί.

⁵ Πλήρως υπερενυδατωμένα έκφυτα μαζί με μεικτά έκφυτα.



Εικόνα 42. Έκφυτα *D. cruentus* που παρέμειναν για 60 ημέρες σε υπόστρωμα MS χωρίς φυτορμόνες (α) ή με 0,1 mg L⁻¹ BA και 0,01 (β) ή 0,05 (γ) mg L⁻¹ NAA ή 0,1 mg L⁻¹ 2iP και 0,01 (δ) ή 0,05 (ε) mg L⁻¹ NAA.

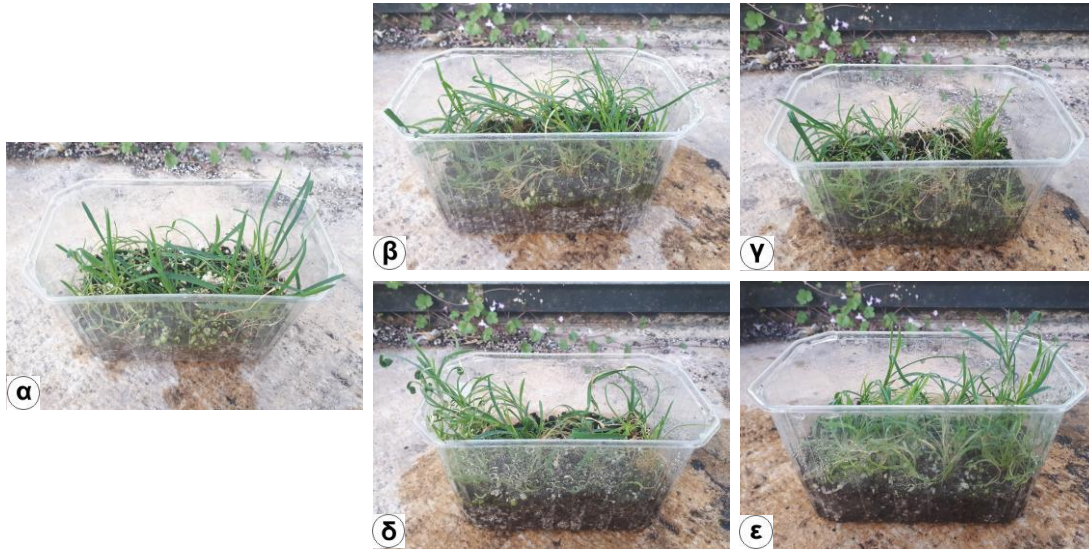
Με την ολοκλήρωση της διαδικασίας εγκλιματισμού τους, λήφθηκαν μετρήσεις του συνολικού αριθμού εγκλιματισθέντων φυταρίων, καθώς και επιλεγμένων μορφολογικών χαρακτηριστικών τους, για κάθε διαφορετικό υπόστρωμα προέλευσης ριζοβολημένων εκφύτων. Τα ποσοστά εγκλιματισμού ήταν αρκετά υψηλά, κυμαινόμενα από 76 % έως 92% (μέσο ποσοστό εγκλιματισμού: 86%), με τα έκφυτα που προήλθαν από υποστρώματα με 2iP να παρουσιάζουν ελαφρώς χαμηλότερα ποσοστά (Πιν. 25, Εικ. 43, 44). Ο μέσος αριθμός βλαστών παρουσίασε μικρές διαφορές, με τα φυτάρια που προήλθαν από υποστρώματα με 2iP να δίνουν λιγότερους βλαστούς. Επίσης διαπιστώθηκε ότι διαφορές σημειώθηκαν και στο μέσο μήκος των βλαστών, με το μικρότερο να σημειώνεται στα έκφυτα που προήλθαν από το υπόστρωμα που περιείχε 0,1 mg L⁻¹ BA και 0,05 mg L⁻¹ NAA, στα οποία σημειώθηκε επίσης και ο μικρότερος αριθμός κόμβων αλλά και το ελάχιστο μέσο μέγιστο πλάτος φύλλου (Πιν. 25, Εικ. 43, 44).

Πίνακας 25. Επίδραση των συγκεντρώσεων BA, 2iP και NAA στα μορφολογικά χαρακτηριστικά εγκλιματισμένων φυταρίων του *D. cruentus* που δε διήλθαν από στάδιο ριζοβολίας.

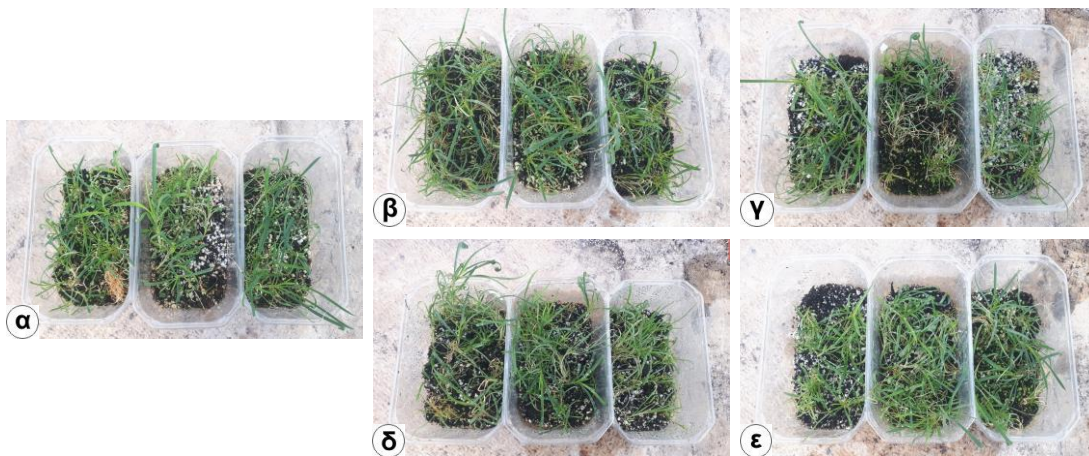
PGRs (mg L ⁻¹)	Εγκλιματισμός (%)	Μέσος αριθμός βλαστών	Μέσο μήκος βλαστών (cm)	Μέσος αριθμός κόμβων	Μέσο μέγιστο μήκος φύλλου (cm)	Μέσο μέγιστο πλάτος φύλλου (mm)
Hf	92	2,6 abc	2,6 b	4,8 bc	5,7 b	2,5 a
0,1 BA/0,01 NAA	89	3,0 a	2,2 b	5,2 ab	5,8 b	2,4 a
0,1 BA/0,05 NAA	90	2,7 ab	1,7 c	4,5 c	5,7 b	2,0 b
0,1 2iP/0,01 NAA	76	1,9 c	3,7 a	4,7 c	5,7 b	2,5 a
0,1 2iP/0,05 NAA	84	2,0 bc	3,6 a	5,4 a	6,8 a	2,4 a
<i>F</i> _{one-wayANOVA}		*	***	**	NS	***

Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικό, *, **, ***: σημαντικό σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$ και $P \leq 0,001$ αντίστοιχα, $n = 37-46$.



Εικόνα 43. Άποψη εγκλιματισμένων φυταρίων *D. cruentus* προερχόμενα από έκφυτα που παρέμειναν για 60 ημέρες σε υπόστρωμα MS χωρίς φυτορμόνες (α) ή με $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ BA και $0,01$ (β) ή $0,05$ (γ) mg L^{-1} NAA ή $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP και $0,01$ (δ) ή $0,05$ (ε) mg L^{-1} NAA.



Εικόνα 44. Κάτοψη εγκλιματισμένων φυταρίων *D. cruentus* προερχόμενα από έκφυτα που παρέμειναν για 60 ημέρες σε υπόστρωμα MS χωρίς φυτορμόνες (α) ή με $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ BA και $0,01$ (β) ή $0,05$ (γ) mg L^{-1} NAA ή $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP και $0,01$ (δ) ή $0,05$ (ε) mg L^{-1} NAA.



Εικόνα 45. (α) Εγκλιματισμένα φυτάρια *D. cruentus* στο ναλόφρακτο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου 3 μήνες μετά τη λήξη του εγκλιματισμού τους, Ιούλιος 2021. (β) Φυτό *D. cruentus* 2 μήνες μετά τη φύτευσή του στον κήπο του Ανθοκομείου, Φεβρουάριος 2022.

3.4 Συμπεράσματα - Συζήτηση

Κατά τη δημιουργία ενός πρωτόκολλου για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό ενός είδους, το στάδιο του πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών είναι ιδιαίτερα σημαντικό. Κύριοι στόχοι του αποτελούν η παραλαβή ενός μεγάλου αριθμού ομοιόμορφων βλαστών εντός συντόμου χρονικού διαστήματος, οι οποίοι είναι ικανοί να ριζοβολήσουν και να εγκλιματιστούν επιτυχώς σε *ex vitro* συνθήκες, παράγοντας φυτά φαινοτυπικά και γονοτυπικά όμοια με τα μητρικά (Parafotiu, 2010). Για το συγκεκριμένο είδος δεν υπάρχει καμία βιβλιογραφική αναφορά σχετική με το μικροπολλαπλασιασμό του, κάτι που δεν ισχύει για πολλά άλλα είδη του γένους *Dianthus*. Επομένως, η διερεύνηση του *in vitro* πολλαπλασιασμού του βασίστηκε σε αναφορές συγγενικών και μορφολογικά ή/και οικολογικά συναφών ειδών που έχουν ήδη διερευνηθεί, όπως τα ελληνικά αυτοφυή *D. pinifolius* και *D. fruticosus* (Cristea *et al.*, 2016; Parafotiu & Stragas, 2009).

Από την αρχική καλλιέργεια του *D. cruentus* παρατηρήθηκε ιδιαίτερα έντονα το πρόβλημα της υπερενυδάτωσης, με μεγάλο μέρος των βλαστών να εμφανίζουν ατυπική μορφολογία όπως ημιδιαφανή, παραμορφωμένα φύλλα, με αποτέλεσμα να είναι αδύνατον να εγκλιματιστούν επιτυχώς σε *ex vitro* συνθήκες. Το φαινόμενο της υπερενυδάτωσης έχει αναφερθεί πολυάριθμες φορές κατά τη διερεύνηση του μικροπολλαπλασιασμού ειδών του γένους *Dianthus*, και ιδιαιτέρως του *D. caryophyllus*, για το οποίο αποτελεί ιδιαίτερα μεγάλης σημασίας εμπόδιο (Saher *et al.*, 2005). Αποτελεί ένα σύνθετο φυσιολογικό φαινόμενο, το οποίο σχετίζεται με βιοχημικές, φυτορμονικές και επιγενετικές τροποποιήσεις της φυσιολογίας και της φαινολογίας των *in vitro* αναπτυσσόμενων φυταρίων (Muneer *et al.*, 2017). Κατά τα πρώτα στάδιά του, ιδιαίτερα σημαντικό ρόλο έχει η σύνθεση και η συσσώρευση του αιθυλενίου, ενώ σε επόμενα στάδια υπάρχει σημαντική συμμετοχή μηχανισμών ανθεκτικότητας στην οξειδωτική καταπόνηση (Sreelekshmi & Siril, 2021a).

Πολυάριθμοι ενδογενείς και εξωγενείς παράγοντες επηρεάζουν την εμφάνιση και την ένταση της υπερενυδάτωσης. Στο γένος *Dianthus*, οι σημαντικότεροι από αυτούς είναι τα μηχανικά και φυσικοχημικά χαρακτηριστικά του υποστρώματος καλλιέργειας, η ανταλλαγή αερίων και η σχετική υγρασία εντός του περιέκτη καλλιέργειας, καθώς και η ευαισθησία του είδους ή του γονοτύπου (Muneer *et al.*, 2017). Η αντιμετώπιση της υπερενυδάτωσης έχει επιτευχθεί με επεμβάσεις στο

υπόστρωμα καλλιέργειας όπως βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης των φυτορρυθμιστικών ουσιών, αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ, αλλαγή ή τροποποίηση του θρεπτικού μέσου και προσθήκη ενώσεων με ευεγερτική δράση όπως ο AgNO_3 (Sreelekshmi & Siril, 2021a), καθώς και με αλλαγή των συνθηκών καλλιέργειας όπως αύξηση της ανταλλαγής αερίων με αλλαγή καλύμματος, μείωση της σχετικής υγρασίας με ψύξη της βάσης του περιέκτη και χρήση ειδικού φωτισμού (Fal *et al.*, 2002; Saher *et al.*, 2005; Muneer *et al.*, 2017).

Ο τύπος της κυτοκινίνης και του εκφύτου που χρησιμοποιείται κατά την εγκατάσταση ενός είδους σε καλλιέργεια *in vitro* μπορεί είναι σημαντικός, καθώς επηρεάζει σημαντικά την αντίδραση και τη βλαστογένεση. Σε άλλα είδη του γένους όπως τα *D. pinifolius* και *D. gigantiformis* subsp. *kladovianus*, η χρήση εκφύτων κορυφής έδωσε μεγαλύτερο αριθμό βλαστών (Cristea *et al.*, 2016; Holobiuc *et al.*, 2018). Γενικά η χρήση εκφύτων προερχόμενων από σπορόφυτα ενδεικνύεται για την εγκατάσταση αυτοφυών Μεσογειακών φυτών, καθώς οι νεανικοί ιστοί παρουσιάζουν αυξημένα ποσοστά αντίδρασης (Papafotiou, 2010). Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκαν αρχικά 2 κυτοκινίνες, το BA και το 2iP, σε 2 συγκεντρώσεις, 0,1 και 0,5 mg L^{-1} , καθώς αυτές έδωσαν τα καλύτερα αποτελέσματα σε άλλα είδη του γένους όπως ο *D. fruticosus* (Papafotiou & Stragas, 2009). Λόγω πρακτικών δυσχερειών εξαιτίας των εξαιρετικά βραχέων μεσογονατίων διαστημάτων των βλαστών, χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα κορυφής και κόμβου σποροφύτων, τα οποία κατά την εγκατάστασή τους έδωσαν υψηλά ποσοστά αντίδρασης, με εξαίρεση το υπόστρωμα που περιείχε 0,5 mg L^{-1} BA. Ο αριθμός βλαστών ανά έκφυτο που αντέδρασε ήταν σχετικά χαμηλός, ιδιαίτερα στα υποστρώματα που περιείχαν 2iP.

Η ύπαρξη BA στο υπόστρωμα προκάλεσε το σχηματισμό περισσότερων φυσιολογικών βλαστών, με το μεγαλύτερο αριθμό να σημειώνεται στο υπόστρωμα που περιείχε 0,1 mg L^{-1} BA. Αρκετά αυτοφυή ξηροφυτικά είδη εγκαθίστανται καλύτερα σε υποστρώματα με χαμηλές συγκεντρώσεις BA (Vlachou *et al.*, 2016; Vlachou *et al.*, 2017). Η ίδια συγκέντρωση BA (0,1 mg L^{-1}), σε συνδυασμό με 0,1 mg L^{-1} NAA, στο *D. pinifolius* έδωσε το μεγαλύτερο ποσοστό βλαστογένεσης, ενώ το υπόστρωμα που περιείχε 0,5 mg L^{-1} BA και 0,1 mg L^{-1} NAA έδωσε το μεγαλύτερο αριθμό βλαστών και κόμβων (Cristea *et al.*, 2016). Η παρουσία 2iP προκάλεσε τον σχηματισμό περισσότερων κόμβων στους βλαστούς που εκπύχθηκαν σε σχέση με τα υποστρώματα που περιείχαν BA. Η αυξημένη συγκέντρωση των κυτοκινινών είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του ποσοστού της υπερενυδάτωσης και τη μείωση των

φυσιολογικών βλαστών. Κατά το μικροπολλαπλασιασμό του *Dianthus mainensis*, αύξηση της συγκέντρωσης του BA στο υπόστρωμα από 3 σε 5 μM οδήγησε σε αύξηση της υπερενυδάτωσης από 0% σε 72% (Erst, 2014). Ο μεγαλύτερος αριθμός υπερενυδατωμένων βλαστών καταγράφηκε στα υποστρώματα με 2iP, με το μεγαλύτερο αριθμό να σημειώνεται στο υπόστρωμα που περιείχε 0,5 mg L^{-1} 2iP. Το μεγαλύτερο δυναμικό πολλαπλασιασμού στο στάδιο αυτό παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα με συγκέντρωση 0,1 mg L^{-1} BA, με μεγάλη διαφορά από τα υπόλοιπα 3 υποστρώματα που εξετάστηκαν. Η ένταση της ριζογένεσης ήταν πολύ χαμηλή στο στάδιο αυτό, ενώ αυξημένη καλογένεση καταγράφηκε στα υποστρώματα που περιείχαν 2iP.

Με βάση τα αποτελέσματα της εγκατάστασης, κατά τη πρώτη υποκαλλιέργεια επιλέχθηκαν τα υποστρώματα με τη χαμηλότερη συγκέντρωση κυτοκινινών, καθώς έδωσαν τα υψηλότερα ποσοστά βλαστογένεσης και το μεγαλύτερο αριθμό φυσιολογικών βλαστών. Η χρήση BA έδωσε και πάλι μεγαλύτερο αριθμό σε σχέση με το 2iP, όμως ο αριθμός τους ανά έκφυτο που αντέδρασε ήταν αισθητά μειωμένος, με αντίστοιχη πτώση του δυναμικού πολλαπλασιασμού. Αντίθετα, η έκπτυξη υπερενυδατωμένων βλαστών ήταν ιδιαίτερα ενισχυμένη στο υπόστρωμα με 0,1 mg L^{-1} σε σχέση με την εγκατάσταση, ενώ αύξηση παρατηρήθηκε και στα ποσοστά αντίδρασης, καλογένεσης και ριζογένεσης. Αντίστοιχα φαινόμενα έχουν καταγραφεί και σε άλλα αυτοφυή φυτά όπως η *Ballota acetabulosa*, όπου το ποσοστό της υπερενυδάτωσης αυξήθηκε στη πρώτη υποκαλλιέργεια για να μειωθεί ξανά στις επόμενες (Τσιάμα, 2019).

Η υποκαλλιέργεια εκφύτων από φυσιολογικούς και υπερενυδατωμένους βλαστούς σε υπόστρωμα MS χωρίς φυτορμόνες έδωσε ενδείξεις για σημαντική διαφοροποίηση της αντίδρασης και της βλαστογένεσης των εκφύτων βάσει της φυσιολογίας τους. Η χρήση τέτοιων υποστρωμάτων σε άλλα είδη του γένους έχει αποδειχθεί ότι μπορεί να μειώσει σημαντικά την ένταση της υπερενυδάτωσης ή ακόμα να χρησιμοποιηθεί για την αντιστροφή του φαινομένου, με αποτέλεσμα τη παραγωγή φυσιολογικών βλαστών (Maloupa *et al.*, 2013; Thu *et al.*, 2020). Αναφέρεται ότι η χρήση υπερενυδατωμένων βλαστών ως πηγή εκφύτων κατά το μικροπολλαπλασιασμό του *Dianthus chinensis* σε τροποποιημένο υπόστρωμα MS προκάλεσε σημαντική αύξηση του αριθμού των φυσιολογικών βλαστών (Sreelekshmi & Siril, 2021b). Η χρήση υπερυαλωμένων βλαστών ως πηγή εκφύτων έχει μάλιστα χρησιμοποιηθεί και σε ορισμένα κωνοφόρα είδη όπως η *Picea abies*, δίνοντας

πολλαπλάσιο αριθμό βλαστών (Κίντζιος, 2015). Τα έκφυτα υπερενυδατωμένης προέλευσης είχαν ελαφρώς αυξημένα ποσοστά αντίδρασης και βλαστογένεσης, ενώ ανέπτυξαν κάλο και ριζοβόλησαν σε σημαντικά αυξημένα ποσοστά σε σχέση με τα έκφυτα φυσιολογικής προέλευσης. Το εξαιρετικά ενδιαφέρον αποτέλεσμα αυτό αναδεικνύει την αυξημένη δυναμικότητα αναπαραγωγής των υπερενυδατωμένων βλαστών και αποτέλεσε την αφορμή για περαιτέρω διερεύνηση της χρήσης τους για τον πολλαπλασιασμό του είδους.

Η προσθήκη της αυξίνης NAA σε διαφορετικές συγκεντρώσεις στα υποστρώματα πολλαπλασιασμού έχει διερευνηθεί σε πολλά είδη του γένους *Dianthus*, με θετικές επιδράσεις στην αύξηση της βλαστογένεσης και του αριθμού των βλαστών, καθώς και τη μείωση της υπερενυδάτωσης (Markovic *et al.*, 2013a). Στη δεύτερη υποκαλλιέργεια, η χρήση του NAA σε τρεις συγκεντρώσεις, σε συνδυασμό με τις περιεχόμενες στα προηγούμενα υποστρώματα κυτοκίνινες, έδωσε διαφορετικά αποτελέσματα στους δύο τύπους εκφύτων. Στα έκφυτα που προήλθαν από φυσιολογικούς βλαστούς, η προσθήκη NAA δε φάνηκε να επηρεάζει σημαντικά τη βλαστογένεση όταν ως κυτοκινίνη χρησιμοποιήθηκε το BA, ενώ καταγράφηκε μικρή αύξηση του δυναμικού πολλαπλασιασμού στην υψηλότερη συγκέντρωση NAA σε συνδυασμό με το 2iP. Και εδώ παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές ανάμεσα στις δύο κυτοκίνινες, καθώς η χρήση BA πάλι υπερείχε έναντι του 2iP, δίνοντας περισσότερους βλαστούς και υψηλότερα ποσοστά βλαστογένεσης. Όταν ως πηγή εκφύτων χρησιμοποιήθηκαν υπερενυδατωμένοι βλαστοί, η αύξηση της συγκέντρωσης του NAA είχε θετική επίδραση στη μείωση του αριθμού υπερενυδατωμένων βλαστών και στην αύξηση του δυναμικού πολλαπλασιασμού, ιδιαίτερα στα υποστρώματα που περιείχαν BA. Ο συνδυασμός $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ και $0,05 \text{ mg L}^{-1}$ NAA έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα και στους 2 τύπου εκφύτων. Ανεξαρτήτως φυσιολογίας εκφύτου, το υπόστρωμα χωρίς φυτορμόνες έδωσε το χαμηλότερο ποσοστό καλογένεσης και το υψηλότερο ποσοστό ριζογένεσης, με τη τελευταία παρατήρηση να καταγράφεται και σε άλλα αυτοφυή είδη όπως το *Limoniastrum monopetalum* (Martini *et al.*, 2020).

Πέρα από τη βελτιστοποίηση της συγκέντρωσης και του είδους των φυτορμονών στο υπόστρωμα καλλιέργειας, η τροποποίηση του είδους και της συγκέντρωσης του στερεοποιητικού παράγοντα και του μέσου καλλιέργειας μπορούν να συμβάλλουν στη μείωση της υπερενυδάτωσης και την αύξηση της βλαστογένεσης. Στα αυτοφυή ξηροφυτικά είδη *Globularia alypum* (Bertsouklis *et al.*, 2003), *Lithodora zahni* (Papafotiou & Kalantzis, 2009) και *Calamintha nepeta* (Vlachou *et*

al., 2019), αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ μείωσε σημαντικά το ποσοστό υπερενυδάτωσης και αύξησε τον αριθμό των φυσιολογικών βλαστών. Στη τρίτη υποκαλλιέργεια, η τροποποίηση της σύστασης του θρεπτικού υποστρώματος επηρέασε σημαντικά τη βλαστογένεση του είδους. Ανεξαρτήτως της φυσιολογίας των εκφύτων, όταν ως κυτοκινίνη χρησιμοποιήθηκε BA σε συγκέντρωση $0,1 \text{ mg L}^{-1}$, η αντικατάσταση του θρεπτικού μέσου MS με WPM ή η αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ σε 12 g L^{-1} μείωσε τον αριθμό υπερενυδατωμένων βλαστών. Για τα έκφυτα υπερενυδατωμένης προέλευσης, η μείωση αυτή συνοδεύθηκε με σημαντική αύξηση του αριθμού των φυσιολογικών βλαστών και του δυναμικού πολλαπλασιασμού, ιδιαίτερα στο υπόστρωμα με αυξημένη συγκέντρωση άγαρ.

Η ζεατίνη (ZEA) αποτελεί μία κυτοκινίνη με ιδιαίτερη ευνοϊκή βλαστογενετική δράση σε πολλά είδη που εμφανίζουν μειωμένη αντίδραση και βλαστογένεση στο στάδιο του πολλαπλασιασμού, ιδιαίτερα όταν αυτά εγκαθίστανται από έκφυτα προερχόμενα από ενήλικα φυτά (Bertsouklis *et al.*, 2003; Vlachou *et al.*, 2016b). Ωστόσο, σε πολλά αυτοφυή Μεσογειακά είδη η παρουσία της στο υπόστρωμα συνδέεται με την αυξημένη έκπτυξη υπερενυδατωμένων βλαστών, ιδιαίτερα σε υψηλές συγκεντρώσεις, ενώ το υψηλό κόστος της αποτελεί περαιτέρω εμπόδιο στην εκτεταμένη χρήση της (Vlachou *et al.*, 2019). Η χρήση υποστρώματος MS με ZEA έδωσε σχετικά έως εξαιρετικά χαμηλό αριθμό φυσιολογικό βλαστών και τον υψηλότερο αριθμό υπερενυδατωμένων βλαστών, ανάλογα με τη φυσιολογία των εκφύτων.

Για τα έκφυτα που προήλθαν από φυσιολογικούς βλαστούς, αύξηση της συγκέντρωσης του BA στα 2 mg L^{-1} οδήγησε σε μείωση την αντίδραση και της υπερενυδάτωσης με παράλληλη σημαντική αύξηση του αριθμού των βλαστών και του δυναμικού πολλαπλασιασμού, ενώ σε συγκεντρώσεις $0,5$ και 1 mg L^{-1} αύξησε ελαφρώς τους υπερενυδατωμένους βλαστούς. Πιθανώς η ευνοϊκή επίδραση της αυξημένης συγκέντρωσης του BA να οφείλεται και στην έντονη μείωση της υπερενυδάτωσης (Κίντζιος, 2015), κάτι που όμως δε παρατηρείται για άλλα αυτοφυή είδη, όπου αυξημένες συγκεντρώσεις BA προκαλούν την έκπτυξη παραμορφωμένων και υαλωμένων βλαστών (Vlachou *et al.*, 2019; Vlachou *et al.*, 2020).

Η τέταρτη υποκαλλιέργεια πραγματοποιήθηκε με χρήση υποστρωμάτων MS χωρίς φυτορμόνες ή με 1 mg L^{-1} BA ή ZEA. Τα ποσοστά υπερενυδάτωσης ήταν αρκετά χαμηλότερα από τις προηγούμενες υποκαλλιέργειες, ενώ ο μεγαλύτερος αριθμός βλαστών και δυναμικό πολλαπλασιασμού καταγράφηκαν στο υπόστρωμα με

ZEA, ιδιαίτερα αυξημένα από τη προηγούμενη καλλιέργεια. Το υψηλότερο ποσοστό βλαστογένεσης έδωσε η χρήση BA, όμως ο αριθμός βλαστών ήταν μειωμένος σε σχέση με τη προηγούμενη υποκαλλιέργεια. Όσον αφορά τη καλογένεση και τη ριζογένεση, σημαντικές ομοιότητες παρατηρήθηκαν μεταξύ των υποστρώματων χωρίς φυτορμόνες και με BA, όπου σε αντίθεση με το υπόστρωμα που περιείχε ZEA καταγράφηκε αρκετά έντονη ριζοβολία και ασθενής καλογένεση.

Για πολλά είδη, παρατηρείται αύξηση και στη συνέχεια πτώση του δυναμικού πολλαπλασιασμού μετά από κάποιο στάδιο υποκαλλιέργειας, με αποτέλεσμα να είναι αναγκαία η ανανέωση της καλλιέργειας με την εγκατάσταση νέου φυτικού υλικού. Για τα *Dianthus caryophyllus* και *Dianthus ciliatus* subsp. *dalmaticus* ο αριθμός των βλαστών και το δυναμικό πολλαπλασιασμού αυξάνεται μέχρι και τη τέταρτη υποκαλλιέργεια, σημειώνοντας σημαντική πτώση σε επόμενες υποκαλλιέργειες (Thakur & Kanwar, 2017; Radojevic *et al.*, 2010), ενώ για το αυτοφυές ξηροφυτικό είδος *Ballota acetabulosa* το δυναμικό πολλαπλασιασμού σε υποστρώματα MS χωρίς φυτορμόνες σημείωσε πτωτική πορεία από τη 2^η υποκαλλιέργεια (Τσιάμα, 2019). Αντίστοιχα, για το *Dianthus cruentus* σημειώθηκε πτώση του δυναμικού πολλαπλασιασμού κατά τη 1^η υποκαλλιέργεια, σημαντική αύξηση στη 2^η και σταδιακή πτώση από τη 3^η σε υποστρώματα MS με 0,1 mg L⁻¹ BA. Για τις άλλες δύο κυτοκινίνες, παρατηρήθηκε σταδιακή αύξηση του δυναμικού, ιδιαίτερα με τη χρήση ZEA, ενώ όταν το υπόστρωμα δε περιείχε φυτορμόνες δε καταγράφηκαν σταθερά πτωτική ή ανοδική τάση.

Η ριζοβολία των παραγόμενων σε *in vitro* συνθήκες βλαστών αποτελεί ένα κρίσιμο στάδιο για το μικροπολλαπλασιασμό των περισσότερων ειδών, με τη ταχεία έκπτυξη ενός ισχυρού και πλούσιου ριζικού συστήματος να αποτελεί κύριο στόχο του σταδίου. Προκειμένου αυτό να καταστεί δυνατό, οι μικροβλαστοί μεταφέρονται σε ειδικά υποστρώματα ριζοβολίας, τα οποία συνήθως περιέχουν κάποια αυξίνη (Parafotiou, 2010). Για τη βελτιστοποίηση της ριζογένεσης σε είδη του γένους *Dianthus* έχουν εξεταστεί διάφορα είδη και συγκεντρώσεις αυξινών, καθώς και διαφορετικά υποστρώματα, με σημαντικές διαφορές μεταξύ των ειδών και των ενδοειδικών γονοτύπων, με τα περισσότερα είδη να ριζοβολούν σε υψηλότερα ποσοστά και να παράγουν μεγαλύτερο αριθμό ριζών σε υποστρώματα ½ MS, παρουσία των αυξινών IBA ή NAA σε χαμηλές συγκεντρώσεις (Markovic *et al.*, 2013). Σε ορισμένες περιπτώσεις, το περιεχόμενο των υποστρώματων πολλαπλασιασμού μπορεί να επηρεάσει τη ριζοβολία των μικροβλαστών που

προήλθαν από τα πρώτα (carry-over effect) (Kereša *et al.*, 2019; Ozel *et al.*, 2015; Podwyszyńska *et al.*, 2012). Σε όλα τα πειράματα ριζοβολίας που πραγματοποιήθηκαν, η συγκέντρωση IBA στα υποστρώματα επηρέασε την ένταση και τη ποιότητα της ριζογένεσης, ενώ σημαντική επίδραση είχαν τόσο η διάρκεια παραμονής των βλαστών στο υπόστρωμα όσο και το υπόστρωμα πολλαπλασιασμού από το οποίο αυτοί προήλθαν. Η χρήση υποστρώματος ½ MS σε δύο από τα τρία πειράματα έδωσε πολύ υψηλά ριζοβολίας ακόμα και όταν το υπόστρωμα δε περιείχε IBA, ενώ η χρήση MS έδωσε υψηλά ποσοστά ριζοβολίας μόνο στα υποστρώματα που περιείχαν 0,5 ή 1 mg L⁻¹ IBA.

Στο πρώτο πείραμα ριζοβολίας, όπου χρησιμοποιήθηκαν υποστρώματα MS και 4 συγκεντρώσεις IBA, ανεξαρτήτως της διάρκειας παραμονής στο υπόστρωμα, η αύξηση της συγκέντρωσης του IBA συνδέθηκε με τη μείωση του μήκους των ριζών και την αύξηση της καλογένεσης στη βάση των βλαστών. Αύξηση της καλογένεσης με την αύξηση της συγκέντρωσης του IBA παρατηρήθηκε και κατά τη ριζοβολία του *Limoniastrum monopetalum* (Martini *et al.*, 2020). Όπως και στα αυτοφυή ξηροφυτικά είδη *Lithodora zahnii* (Papafotiou & Kalantzis, 2009) και *Ballota acetabulosa* (Vlachou *et al.*, 2016), τα υψηλότερα ποσοστά ριζοβολίας καταγράφηκαν όταν χρησιμοποιήθηκαν 0,5 mg L⁻¹ IBA, ενώ δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές στον αριθμό των ριζών και των βλαστών.

Στο δεύτερο πείραμα ριζοβολίας, όπου χρησιμοποιήθηκαν υποστρώματα ½ MS και 2 συγκεντρώσεις IBA (0 και 0,5 mg L⁻¹) και σε βλαστούς προερχόμενους από 3 διαφορετικά υποστρώματα πολλαπλασιασμού, η παρουσία IBA αύξησε τα ποσοστά ριζοβολίας και τον αριθμό ριζών, μειώνοντας παράλληλα το μέσο μήκος των ριζών. Η προέλευση των βλαστών επηρέασε επίσης τη ριζοβολία, καθώς αυτοί που προήλθαν από υπόστρωμα που περιείχε κυτοκινίνες παρήγαγαν λιγότερες και βραχύτερες ρίζες, ενώ ανέπτυξαν κάλο στη βάση τους σε μικρότερο ποσοστό. Το μικρότερο ποσοστό ριζοβολίας καταγράφηκε σε βλαστούς που προήλθαν από υπόστρωμα με ZEA και μεταφέρθηκαν σε υπόστρωμα χωρίς IBA.

Αντίστοιχα αποτελέσματα λήφθηκαν και στο τρίτο πείραμα ριζοβολίας, όπου και πάλι χρησιμοποιήθηκαν υποστρώματα ½ MS και οι 2 συγκεντρώσεις IBA σε βλαστούς προερχόμενους από 3 διαφορετικά υποστρώματα πολλαπλασιασμού, στα οποία τα έκφυτα είχαν αφεθεί να αναπτυχθούν για 10 βδομάδες. Σε αντίθεση με το προηγούμενο πείραμα, οι υψηλότερες συγκεντρώσεις BA στο υπόστρωμα πολλαπλασιασμού συνδέθηκαν με αυξημένο αριθμό ριζών, ενώ παρατηρήθηκε

σημαντική αύξηση του αριθμού βλαστών και κόμβων κατά τη διάρκεια της ριζοβολίας. Τα ποσοστά ριζοβολίας και καλογένεσης ήταν υψηλά έως πολύ υψηλά σε όλες τις περιπτώσεις.

Είναι σαφές ότι η αποτελεσματικότητα όλων των μεθόδων πολλαπλασιασμού στη πράξη αποτελεί έκφραση του αριθμού των φυτών που μπορούν να επιβιώσουν σε συνθήκες περιβάλλοντος μετά τον εγκλιματισμό τους σε *ex vitro* συνθήκες (Papafotiou, 2010). Την ίδια στιγμή, θα πρέπει να αξιολογείται η επίδραση της διαδικασίας του μικροπολλαπλασιασμού στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των παραγόμενων φυταρίων, με στόχο τη παραγωγή ομοιόμορφων και χαρακτηριστικών του είδους φυτών, όμοιων με τα μητρικά (Muszynska *et al.*, 2017). Παράγοντες που επηρεάζουν τον εγκλιματισμό αποτελούν πρωτεύοντως οι περιβαλλοντικές συνθήκες στο χώρο του εγκλιματισμού, το είδος του φυτού και τα μορφοφυσιολογικά χαρακτηριστικά των φυταρίων (Κίντζιος, 2015). Σε ορισμένες περιπτώσεις τα προηγούμενα στάδια του μικροπολλαπλασιασμού μπορούν να επηρεάσουν σημαντικά τα μορφολογικά χαρακτηριστικά των φυταρίων, φαινόμενο που οφείλεται κυρίως στην συνεχιζόμενη επίδραση των κυτοκινινών, με αναφορές τέτοιων παρατηρήσεων σε καλλιεργούμενα είδη όπως η *Fragaria x ananassa* (Jemmali *et al.*, 1995) και η *Zantedeschia aethiopica* (D'Arth *et al.*, 2002).

Σε όλα τα πειράματα, η χρήση υποστρώματος τύρφη-περλίτη 1:1 (v/v) έδωσε υψηλά ποσοστά εγκλιματισμού, ενώ παρατηρήθηκε σημαντική επίδραση των υποστρωμάτων καλλιέργειας και ριζοβολίας στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των εγκλιματισμένων φυταρίων. Στους βλαστούς που ριζοβόλησαν σε υποστρώματα MS, η αύξηση της παραμονής τους σε αυτά για 10 ημέρες οδήγησε σε μικρή μείωση του ποσοστού εγκλιματισμού και του αριθμού των βλαστών, καθώς και την αύξηση του μέσου αριθμού κόμβων, αλλά και του μέσου μήκους και πλάτους φύλλων. Η αύξηση της συγκέντρωσης του IBA οδήγησε στη μείωση του μέσου μήκους των βλαστών. Στους βλαστούς που ριζοβόλησαν σε υποστρώματα 1/2 MS, όταν αυτοί προέρχονταν από υποστρώματα πολλαπλασιασμού με διαφορετικό περιεχόμενο κυτοκινινών παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφορές στο μέσο μήκος των βλαστών τους και στο μέσο αριθμό των κόμβων τους, με μικρότερες διαφορές στα χαρακτηριστικά των φύλλων και ισχυρή αλληλεπίδραση μεταξύ των υποστρωμάτων πολλαπλασιασμού και ριζοβολίας. Η επίδραση του IBA ήταν γενικά περιορισμένη, καθώς η παρουσία του στα υποστρώματα ριζοβολίας προκάλεσε σημαντική αύξηση του αριθμού των κόμβων μόνο στους βλαστούς που προήλθαν από το τρίτο πείραμα ριζοβολίας.

Βάσει προηγούμενων αναφορών, κατά τον *in vitro* πολλαπλασιασμό ειδών του γένους *Dianthus* είναι δυνατή η παραγωγή έρριζων φυταρίων από ενιαίο στάδιο πολλαπλασιασμού και ριζοβολίας. Η χρήση αυτής της μεθόδου παρέχει ορισμένα σημαντικά πλεονεκτήματα, όπως η απλοποίηση της παραγωγικής διαδικασίας και η μείωση του κόστους (Muszynska *et al.*, 2017). Στα πλαίσια αυτά εξετάστηκαν 5 από τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν κατά τη 2^η υποκαλλιέργεια για την ικανότητα παραγωγής έρριζων φυταρίων αλλά και για τη διατήρηση μητρικού υλικού ικανοποιητικής ποιότητας κατά τη καλλιέργεια των εκφύτων σε αυτά για 8 εβδομάδες. Διαπιστώθηκε ότι μεγαλύτερος αριθμός φυσιολογικών βλαστών και δυναμικό πολλαπλασιασμού καταγράφηκε στα υποστρώματα χωρίς φυτορμόνες ή με BA, ενώ τα υψηλότερα ποσοστά ριζοβολίας στα υποστρώματα χωρίς φυτορμόνες ή με 2iP. Το χαμηλότερο ποσοστό καλογένεσης έδωσε το υπόστρωμα χωρίς φυτορμόνες, ενώ το μεγαλύτερο αριθμό υπερενυδατωμένων βλαστών το υπόστρωμα 2iP με τη μικρότερη συγκέντρωση NAA.

Ο εγκλιματισμός των έρριζων φυταρίων που προήλθαν από τη ενιαία διαδικασία πολλαπλασιασμού και ριζοβολίας εγκλιματίστηκαν επιτυχώς σε πολύ υψηλά ποσοστά (76-92%), τα οποία ήταν αντίστοιχα με αυτά άλλων ειδών του γένους για τα οποία εξετάστηκαν αντίστοιχα πρωτόκολλα *in vitro* πολλαπλασιασμού (Cristea *et al.*, 2013; Muszynska *et al.*, 2017). Η χρήση υποστρωμάτων με BA έδωσε φυτάρια με μεγάλο αριθμό βλαστών που είχαν μικρό μήκος, ενώ τα φυτάρια που προήλθαν από το υπόστρωμα με 0,1 mg L⁻¹ 2iP και 0,05 mg L⁻¹ NAA είχαν το μεγαλύτερο συνολικό αριθμό κόμβων και τις μεγαλύτερες διαστάσεις φύλλων. Ανεξαρτήτως υποστρώματος, όλα τα εγκλιματισμένα φυτάρια που προέκυψαν από τη μέθοδο αυτή είχαν περισσότερους βλαστούς και κόμβους σε σχέση με τα φυτάρια που προήλθαν από έρριζους μικροβλαστούς, ενώ η παρουσία 2iP στο υπόστρωμα παρήγαγε φυτάρια με μακρείς βλαστούς και επιμηκυσμένα μεσογονάτια διαστήματα, οι οποίοι θεωρούνται ατυπικοί για τη φυσιολογική ανάπτυξη του είδους, καθώς και τα χαμηλότερα ποσοστά εγκλιματισμού. Συνολικά τα υψηλότερα ποσοστά ριζοβολίας και εγκλιματισμού, καθώς και η πιο ομοιόμορφη και τυπική για το είδος εμφάνιση των εγκλιματισμένων φυταρίων καταγράφηκε κατά τη χρήση υποστρώματος MS χωρίς φυτορμόνες.

4. Γενικά συμπεράσματα

Κατά τη διερεύνηση της οικοφυσιολογίας βλάστησης των σπόρων αυτοφυών φυτικών ειδών όπως ο *Dianthus cruentus* πρέπει να λαμβάνονται υπ' όψιν οι περιβαλλοντικές συνθήκες που χαρακτηρίζουν τους οικότοπους από τους οποίους προέρχονται. Την ίδια στιγμή, είναι σαφές πως παράγοντες όπως το στάδιο συλλογής, το χρονικό διάστημα και οι συνθήκες αποθήκευσης, καθώς και μετασυλλεκτικές μεταχειρίσεις διαφόρων τύπων έχουν σημαντική επίδραση στη βλαστικότητα, και συνεπώς θα πρέπει να καταγράφονται αναλυτικά (Baskin and Baskin, 2014). Όπως και τα περισσότερα είδη του γένους *Dianthus*, οι σπόροι του είδους χαρακτηρίζονται από την απουσία ληθάργου, καθώς μπόρεσαν να βλαστήσουν σε 5 διαφορετικές θερμοκρασίες χωρίς την ανάγκη κάποιας προμεταχείρισης, επιβεβαιώνοντας τα αποτελέσματα της μοναδικής προηγούμενης αναφοράς για τη βλάστηση των σπόρων του είδους (Hazar & Baktir, 2012).

Η διάρκεια της ξηρής αποθήκευσης των σπόρων επηρέασε σημαντικά τη βλάστησή τους, αυξάνοντας σημαντικά το ποσοστό βλαστικότητας στις ακραίες θερμοκρασίες, καταδεικνύοντας τη θετική επίδραση της ξηρής μεθωρίμανσης των σπόρων, φαινόμενο που παρατηρείται και σε άλλα αυτοφυή είδη (Thanos *et al.*, 1995). Όπως και για το ενδημικό *D. fruticosus* (Stragas & Papafotiou, 2009), η θερμοκρασία των 15 °C έδωσε τα υψηλότερα ποσοστά βλαστικότητας τόσο στους σπόρους πρόσφατης συλλογής όσο και στους σπόρους ηλικίας 12 μηνών σπόρων σε *in vitro* και *ex vitro* συνθήκες, και επομένως προτείνεται ως η βέλτιστη για τη βλάστηση των σπόρων του είδους. Αντίστοιχα αποτελέσματα λήφθηκαν και κατά τη βλάστηση *ex vitro*, με μικρότερη βλαστικότητα στις 2 υψηλότερες θερμοκρασίες, πιθανόν λόγω των περιβαλλοντικών συνθηκών ή/και την έλλειψη απολύμανσης των σπόρων. Σε όλες τις θερμοκρασίες πλην των 5 °C, η βλάστηση του είδους ήταν ταχύτατη, με T₅₀ από 2 έως 6 ημέρες. Για τη πληρέστερη κατανόηση της οικοφυσιολογίας βλάστησης του είδους προτείνεται η μελέτη της επίδρασης μεγαλύτερων και μικρότερων χρονικών διαστημάτων ξηράς αποθήκευσης, καθώς και η διερεύνηση της επίδρασης της φωτοπερίόδου.

Παρά τη χρήση φυτορμονών σε χαμηλές συγκεντρώσεις, στα περισσότερα στάδια πολλαπλασιασμού του είδους παρατηρήθηκε ιδιαίτερα έντονο το πρόβλημα της υπερενυδάτωσης των βλαστών, με την έκπτυξη πολυάριθμων βλαστών με

αφύσικη μορφολογία και ανικανότητα *ex vitro* εγκλιματισμού. Ανεξαρτήτως του σταδίου της καλλιέργειας, η χρήση της κυτοκινίνης BA είχε ως αποτέλεσμα το μικρότερο αριθμό υπερενυδατωμένων βλαστών και χαμηλότερα ποσοστά υπερενυδατωμένης βλαστογένεσης, ενώ η προσθήκη NAA φάνηκε να ασκεί ευνοϊκή επίδραση μόνο στα έκφυτα που προήλθαν από υπερενυδατωμένους βλαστούς. Σε όσες υποκαλλιέργειες χρησιμοποιήθηκε, το 2iP φάνηκε να ευνοεί το σχηματισμό υπερενυδατωμένων βλαστών, ενώ και η ZEA προήγαγε την εμφάνισή τους. Η αντικατάσταση του MS με WPM αλλά και η αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ από 8 σε 12 g L⁻¹ μείωσαν σημαντικά την ένταση της υπερενυδάτωσης σε υποστρώματα που περιείχαν 0,1 mg L⁻¹ BA. Ιδιαίτερο ενδιαφέρον παρουσιάζει το εξαιρετικά χαμηλό ποσοστό υπερενυδατωμένων βλαστών σε υπόστρωμα που περιείχε 2 mg L⁻¹ BA, με την έκπτυξη πολυάριθμων, ελαφρώς χλωρωτικών και μικρόφυλλων αλλά κατά τα άλλα φυσιολογικών βλαστών, παρατήρηση που χρήζει περαιτέρω διερεύνησης. Σημαντική μείωση της υπερενυδάτωσης παρατηρήθηκε και κατά τις διαδοχικές υποκαλλιέργειες σε υποστρώματα που περιείχαν κυτοκινίνη, ιδιαίτερα όταν αυτή ήταν το BA. Συνολικά τα υποστρώματα που περιείχαν 0,1 mg L⁻¹ BA έδωσαν το μεγαλύτερο αριθμό φυσιολογικών βλαστών μέχρι και τη 2^η υποκαλλιέργεια, επομένως προτείνεται η χρήση του σε αυτά, ενώ στα επόμενα στάδια η χρήση 2 mg L⁻¹ BA ή 0,1 mg L⁻¹ Zeat συνδέθηκε με ελαφρώς υψηλότερα δυναμικά πολλαπλασιασμού. Η αυξημένη παρουσία φυτορμονών στο υπόστρωμα συνδέθηκε με εντονότερη καλογένεση και μικρότερη ριζογένεση, ενώ σε καμία υποκαλλιέργεια δε παρουσιάστηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στο μέσο αριθμό κόμβων.

Η μεγιστοποίηση των αποδόσεων κατά το μικροπολλαπλασιασμό ενός είδους ευαίσθητου στην υπερενυδάτωση μπορεί να επιτευχθεί τόσο με την αύξηση των παραγόμενων φυσιολογικών βλαστών όσο και με την επαναφορά ή τη χρήση των υπερενυδατωμένων βλαστών για τη παραγωγή φυσιολογικών βλαστών (Sreelekshmi & Siril, 2021b). Σε όλες τα πειράματα που εξετάστηκε η χρήση υπερενυδατωμένων βλαστών ως πηγή εκφύτων, διαπιστώθηκε η αυξημένη αντίδρασή τους, καθώς και η εντονότερη έκπτυξη υπερενυδατωμένων βλαστών. Ωστόσο, η ταυτόχρονη έκπτυξη βλαστών με φυσιολογική εμφάνιση, ιδιαίτερα στα υποστρώματα που περιείχαν BA, αποτέλεσε το έναυσμα για την αξιολόγηση της δράσης επεμβάσεων μείωσης της υπερενυδάτωσης. Από αυτές, η σημαντικότερη αύξηση του αριθμού των φυσιολογικών βλαστών καταγράφηκε με τη προσθήκη 0,05 mg L⁻¹ NAA ή την αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ στα 12 g L⁻¹ σε υπόστρωμα MS που περιείχε 0,1

mg L⁻¹ BA, καταγράφοντας μάλιστα ελαφρώς αυξημένο δυναμικό πολλαπλασιασμού σε σχέση με έκφυτα που προήλθαν από φυσιολογικούς βλαστούς. Συνεπώς είναι εφικτή η σημαντική αύξηση της αποτελεσματικότητας του πρωτοκόλλου πολλαπλασιασμού και η περαιτέρω μείωση των αρνητικών επιπτώσεων της υπερενυδάτωσης με τη χρήση των δύο αυτών υποστρωμάτων σε έκφυτα από υπερενυδατωμένους βλαστούς, ιδιαίτερα στις αρχικές υποκαλλιέργειες.

Με βάση τα παραπάνω, είναι σαφές ότι η συμπεριφορά του είδους στο στάδιο πολλαπλασιασμού επηρεάζεται από παράγοντες όπως η φυσιολογία του εκφύτου, ο τύπος και η συγκέντρωση της κυτοκινίνης, η συγκέντρωση της αυξίνης NAA, το είδος του θρεπτικού μέσου και η συγκέντρωση του άγαρ, καθώς και από τον αριθμό των υποκαλλιεργειών. Για τη περαιτέρω αύξηση του δυναμικού πολλαπλασιασμού, ιδιαίτερα κατά τη χρήση εκφύτων υπερενυδατωμένης φυσιολογίας, θα μπορούσε να εξεταστεί η χρήση θρεπτικών μέσων με τροποποιημένη σύσταση όπως μειωμένη συγκέντρωση αμμωνιακών ιόντων και αυξημένη συγκέντρωση φωσφορικών και μεταλλικών ιχνοστοιχείων όπως κοβάλτιο, τροποποιήσεις που σε άλλα είδη του γένους έχουν ιδιαίτερα ευνοϊκή επίδραση (Kumawat *et al.*, 2013). Άλλο ένα μέτρο για το περιορισμό της υπερενυδάτωσης θα μπορούσε να αποτελεί η χρήση μεμβράνης υψηλής διαπερατότητας στη κίνηση αερίων, τροποποίηση με ευνοϊκά αποτελέσματα στον *in vitro* πολλαπλασιασμό αυτοφυών ειδών (Μαρτίνη, 2013; Τρίγκα, 2017). Ενδιαφέρον θα είχε και η εκτενέστερη αξιολόγηση της χρήσης υψηλότερων συγκεντρώσεων BA στις υποκαλλιέργειες, σε συνδυασμό με τη προσθήκη NAA και υψηλές συγκεντρώσεις άγαρ, όπως έγινε κατά το μικροπολλαπλασιασμό της *Anthyllis barba-jovis* (Vlachou *et al.*, 2020). Άλλες αλλαγές που θα μπορούσαν να δοκιμαστούν η τροποποίηση της σχετικής υγρασίας εντός των περιεκτών με ψύξη του πυθμένα (Saher *et al.*, 2005) και η ενσωμάτωση ενώσεων ευνοϊκών για την έκπτυξη φυσιολογικών βλαστών όπως ο νιτρικός άργυρος και τα άλατα του πυριτίου (Sreelekshmi & Siril, 2021a; Mannivanan *et al.*, 2017).

Η ριζοβολία του *D. cruentus* πραγματοποιήθηκε χωρίς προβλήματα, καθώς ακόμα και κατά το στάδιο πολλαπλασιασμού σημαντικό μέρος των εκφύτων ριζοβολούσε στα υποστρώματα χωρίς κυτοκινίνες. Οι μικροβλαστοί του είδους ριζοβόλησαν επιτυχώς τόσο παρουσία ή απουσία IBA, σε υποστρώματα MS ή ½ MS, ωστόσο παράγοντας μεγαλύτερο αριθμό ριζών στα δεύτερα. Η χρήση υποστρώματος MS έδωσε χαμηλότερα ποσοστά ριζοβολίας, ιδιαίτερα για τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις IBA και το μικρότερο χρονικό διάστημα παραμονής στο υπόστρωμα.

Παρουσιάστηκε σημαντική επίδραση carry-over της ζεαΐνης και των υψηλότερων συγκεντρώσεων BA στα μορφολογικά χαρακτηριστικά των νέων ριζών, ιδιαίτερα κατά την απουσία αυξίνης στο υπόστρωμα, χωρίς ωστόσο η ριζοβολία να μειωθεί έντονα ακόμα και με τη χρήση μικροβλαστών που παρέμειναν σε υποστρώματα MS με έως και 2 mg L^{-1} BA για 10 εβδομάδες. Η βέλτιστη συγκέντρωση του IBA ήταν $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ανεξαρτήτως της προέλευσης των μικροβλαστών, επομένως ενδεικνύεται η χρήση του σε υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS. Ικανοποιητικά ποσοστά ριζοβολίας και βλαστογένεσης καταγράφηκαν και σε υποστρώματα MS χωρίς φυτορμόνες ή με συνδυασμό BA ή 2iP με NAA για χρόνο επώασης 8 εβδομάδων, υποδεικνύοντας τη δυνατότητα χρήσης ενιαίου σταδίου πολλαπλασιασμού-ριζοβολίας για το είδος αυτό, καθώς και τη καταλληλότητά τους για βραχείας διάρκειας διατήρηση μητρικού υλικού, με υπεροχή του υποστρώματος χωρίς φυτορμόνες. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά, θα είχε ενδιαφέρον να διερευνηθεί μελλοντικά η *ex vitro* ριζοβολία μικροβλαστών του είδους σε ενιαίο στάδιο ριζοβολίας-εγκλιματισμού όπως στο *Dianthus carthusianorum* (Muszynska *et al.*, 2017), καθώς και η περαιτέρω διερεύνηση της χρήσης ενιαίου σταδίου πολλαπλασιασμού-ριζοβολίας και της *in vitro* διατήρησης μητρικού υλικού του είδους.

Τέλος, ο *ex vitro* εγκλιματισμός των έρριζων μικροβλαστούς ολοκληρώθηκε με υψηλά ποσοστά επιτυχίας (73-100%) σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη 1:1 (v/v), με εξαίρεση τους μικροβλαστούς που προήλθαν από υπόστρωμα MS και ριζοβόλησαν σε υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS χωρίς φυτορμόνες (65%). Σημαντικές μορφολογικές διαφορές όπως διαφορές στο μήκος και τον αριθμό βλαστού και κόμβων παρατηρήθηκαν μεταξύ των εγκλιματισμένων φυταρίων που προήλθαν από διαφορετικά υποστρώματα πολλαπλασιασμού, ενώ η παρουσία IBA στο υπόστρωμα ριζοβολίας φάνηκε να έχει ευνοϊκή επίδραση στην επιβίωσή τους. Η χρήση ενιαίου σταδίου πολλαπλασιασμού-ριζοβολίας έδωσε φυτάρια με το μεγαλύτερο αριθμό βλαστών και κόμβων, τα οποία επιβίωσαν σε πολύ υψηλά ποσοστά (76-92%). Εν συνεχεία των μορφολογικών μετρήσεων αυτών, χρήσιμη θα ήταν η διερεύνηση της επίδρασης του μικροπολλαπλασιασμού στη μετέπειτα ανάπτυξη και ανθοφορία των φυταρίων, ιδιαίτερα κατά τη σύγκρισή τους με σπορόφυτα αντίστοιχης ηλικίας (Muszynska *et al.*, 2017).

Βιβλιογραφία

- Aalifar, M., Arab, M., Aliniaiefard, S., Dianati, S., Mehrjerdi, M.Z., Limpens, E. and Serek, M. (2019). Embryogenesis efficiency and genetic stability of *Dianthus caryophyllus* embryos in response to different light spectra and plant growth regulators. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 139, 479–492.
- Abeliotis, K., Barla, S.-A., Detsis, V. and Malindretos, G. (2016). Life cycle assessment of carnation production in Greece. *Journal of Cleaner Production*, 112, 32–38.
- Acosta, M., Oliveros-Valenzuela, M.R., Nicolás, C. and Sánchez-Bravo, J. (2009). Rooting of carnation cuttings. *Plant Signaling & Behavior*, 4(3), 234–236.
- Ahmadian, M., Babaei, A., Shokri, S. and Hessami, S. (2017). Micropropagation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) in liquid medium by temporary immersion bioreactor in comparison with solid culture. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology*, 15(2), 309–315.
- Al-Snafi, A. (2017). Chemical contents and medical importance of *Dianthus caryophyllus*-A review . *Article in IOSR Journal of Pharmacy*, 7(1), 61–71.
- Ali, A., Afrasiab, H. and Naz, S. (2008). An Efficient Protocol for In vitro Propagation of Carnation (*Dianthus caryophyllus*). *Pakistani Journal of Botany*, 40(1), 111–121.
- Aliyazicioglu, R., Demir, S., Badem, M. and Sener, S.O. (2017). Antioxidant, antigenotoxic, antimicrobial activities and phytochemical analysis of *Dianthus carmelitarum*. *Records of Natural Products*, 11(3), 270–284.
- Allwood, M.C. (1954). *Carnations, Pinks and All Dianthus*. London: Allwood Bros.
- Arda, H., Dayan, S., Kartal, Ç. and Güler, N. (2016). In vitro conservation of Critically Endangered *Dianthus ingoldbyi* Turrill under slow growth conditions. *Trakya University Journal of Natural Sciences*, 17(1), 47–54.
- Arif, M., Rauf, S., Din, A.U., Rauf, M. and Afrasiab, H. (2014). High Frequency Plant Regeneration from Leaf Derived Callus of *Dianthus caryophyllus* L. *American Journal of Plant Sciences*, 5(15), 2454–2463.

- Armitage, A.M. (2003). *Specialty cut flowers : the production of annuals, perennials, bulbs, and woody plants for fresh and dried cut flowers*. Portland, Oregon: Timber Press.
- Atiyah, K.H. and J Kadhum, E. (2021). Isolation and Identification of Phenolic Compounds from *Dianthus orientalis* Wildly Grown in Iraq. *Iraqi Journal of Pharmaceutical Sciences*, 30(2), 122–134.
- Balao, F., Valente, L.M., Vargas, P., Herrera, J. and Talavera, S. (2010). Radiative evolution of polyploid races of the Iberian carnation *Dianthus broteri* (Caryophyllaceae). *New Phytologist*, 187(2), 542–551.
- Baskin, C.C. and Baskin, J.M. (2014). *Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination*. Amsterdam, NL: Elsevier.
- Bentham, G. and Dalton, J. (1862). *Genera plantarum ad exemplaria imprimis in Herbariis Kewensibus servata definita*. London, UK: L. Reeve and Co.
- Bertsouklis, K., Papafotiou, M. and Balotis, G. (2003). Effect of medium on in vitro growth and ex vitro establishment of *Globularia alypum* L. *Acta Horticulturae*, 616, 177–180.
- Birlanga, V., Villanova, J., Cano, A., Cano, E.A., Acosta, M. and Pérez-Pérez, J.M. (2015). Quantitative Analysis of Adventitious Root Growth Phenotypes in Carnation Stem Cuttings. *PLOS ONE*, 10(7), e0133123.
- Bittrich, V. (1993). Caryophyllaceae. In: K. Kubitzki, ed., *The families and genera of vascular plants II: Flowering Plants· Dicotyledons Magnoliid, Hamamelid and Caryophyllid Families*. Berlin, DE: Springer Verlag.
- Brar, M., Al-Khayri, J. and Klingaman, G. (1995). Effect of Thidiazuron and Benzylaminopurine on In Vitro Shoot Proliferation of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Journal of the Arkansas Academy of Science*, 49, 30–33.
- Brickell, C. (2019). *Royal Horticultural Society encyclopedia of plants & flowers*. London: Dorling Kindersley.
- Cano, A., Sánchez-García, A.B., Albacete, A., González-Bayón, R., Justamante, M.S., Ibáñez, S., Acosta, M. and Pérez-Pérez, J.M. (2018). Enhanced Conjugation of Auxin by GH3 Enzymes Leads to Poor Adventitious Rooting in Carnation Stem Cuttings. *Frontiers in Plant Science*, 9.

- Casanova, E., Moysset, L. and Trillas, M.I. (2008). Effects of agar concentration and vessel closure on the organogenesis and hyperhydricity of adventitious carnation shoots. *Biologia Plantarum*, 52(1), 1–8.
- Cassells, A.C. and Walsh, C. (1994). The influence of gas permeability of the culture lid on calcium uptake and stomatal function in *Dianthus* microplants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 37(2), 171–178.
- Catană, R., Mitoi, M., Mitoi, E., Helepciuc, F. and Holobiuc, I. (2010). *In vitro* conservation under slow growth conditions of two rare plant species from Caryophyllaceae family. *Electronic Journal of Biology*, 6(4), 86–91.
- Cerabolini, B., Ceriani, R.M., Caccianiga, M., Andreis, R.D. and Raimondi, B. (2003). Seed size, shape and persistence in soil: a test on Italian flora from Alps to Mediterranean coasts. *Seed Science Research*, 13(1), 75–85.
- Choudhary, M. and Chin, C.-K. (1995). Somatic embryogenesis in cell suspension culture of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Plant Growth Regulation*, 16, 1–4.
- Christenhusz, M.J.M., Fay, M.F. and Chase, M.W. (2017). *Plants of the world : an illustrated encyclopedia of vascular plants*. Kew, UK: Kew Royal Botanic Gardens.
- Clausen, R.R. and Christopher, T. (2014). *Essential perennials : the complete reference to 2700 perennials for the home garden*. Portland, Oregon: Timber Press.
- Cogoni, D., Mattana, E., Fenu, G. and Bacchetta, G. (2012). From seed to seedling: A critical transitional stage for the Mediterranean psammophilous species *Dianthus morisianus* (Caryophyllaceae). *Plant Biosystems*, 146(4), 910–917.
- Constantinidis, T. (1999). *Dianthus haematocalyx* subsp. *phitosianus* (Caryophyllaceae), a New Serpentine Endemic from Greece. *Phyton*, 39(2), 277–291.
- Correll, M.J., Wu, Y. and Weathers, P.J. (2000). Controlling hyperhydration of carnations (*Dianthus caryophyllus* L.) grown in a mist reactor. *Biotechnology and Bioengineering*, 71(4), 307–314.

- Cristea, V., Brummer, A.-T., Jarda, L. and Miclăuș, M. (2010). *In vitro* culture initiation and phytohormonal influence on *Dianthus henteri* -a Romanian endemic species. *Romanian Biotechnological Letters*, 15(1), 25-33.
- Cristea, V., Jarda, L. and Keul, A. (2013). *Ex situ in vitro* conservation of *Dianthus spiculifolius*. *Studia UBB Biologia*, 58(1), 57–69.
- Cristea, V. and Pușcaș, M. (2006). Conservative Micropropagation of Some Endemic or Rare Species from the *Dianthus* Genus. *Acta Horticulturae*, 725, 357-364.
- Cronquist, A. (1981). *An integrated system of classification of flowering plants*. New York, USA: Columbia University Press.
- Csontos, P., Kalapos, T. and Tamás, J. (2016). Comparison of Seed Longevity for Thirty Forest, Grassland and Weed Species of the Central European Flora: Results of a Seed Burial Experiment. *Polish Journal of Ecology*, 64(3), 313–326.
- D'Arth, S.M., Simpson, S.I., Seelye, J.F. and Jameson, P.E. (2002). Bushiness and cytokinin sensitivity in micropropagated *Zantedeschia*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 70(1), 113–118.
- de Candolle, A.P. (1824). *Prodromus systemati naturalis regni vegetabilis sive enumeratio contracta ordinum, generum specierumque plantarum huc usque cognitarum, juxta methodi naturalis normas digesta*. Paris, FR: Sumptibus Sociorum Treuttel et Würtz.
- Dekić, B.R., Ristić, M.N., Mladenović, M.Z., Dekić, V.S., Ristić, N.R., Randelović, V. and Radulović, N.S. (2019). Diethyl-Ether Flower Washings of *Dianthus cruentus* Grise. (Caryophyllaceae): Derivatization Reactions Leading to the Identification of New Wax Constituents. *Chemistry & Biodiversity*, 16(7), e190015.
- Deljou, A., Karami, O. and OstadAhmadi, P. (2007). Effect of sucrose concentration on somatic embryogenesis in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Journal of Applied Horticulture*, 9(1), 77–80.
- Deno, N.C. (1993) *Seed Germination Theory and Practice*. Second Edition, State College, USA: Norman C. Deno.

- Dillenberger, M.S. and Kadereit, J.W. (2014). Maximum polyphyly: Multiple origins and delimitation with plesiomorphic characters require a new circumscription of *Minuartia* (Caryophyllaceae). *Taxon*, 63(1), 64–88.
- Dimopoulos, P., Raus, T., Bergmeier, E., Constantinidis, T., Iatrou, G., Kokkini, S., Strid, A. and Tzanoudakis, D. (2013). *Vascular plants of Greece: An annotated checklist*. *Willdenowia*, Oberreifenberg, DE: Koeltz Botanical Books.
- Dimopoulos, P., Raus, T., Bergmeier, E., Constantinidis, T., Iatrou, G., Kokkini, S., Strid, A. and Tzanoudakis, D. (2016). Vascular plants of Greece: An annotated checklist. Supplement. *Willdenowia*, 46(3), 301–347.
- Ebrahimzadeh, A., Jimenez, S., Texeira da Silva, J.A., Satoh, S. and Lao, M.T. (2008). Postharvest Physiology of Cut Carnation Flowers. *Fresh Produce*, 2(2), 57–71.
- Erst, A.A., Erst, A.A. and Shaulo, D.N. (2014). In vitro Propagation of *Dianthus mainensis*, an Endemic Plant from the West Sayan (North Asia). *Taiwania*, 59(2), 106–110.
- Fal, M., Majada, J., González, A. and Sánchez Tamés, R. (1999). Differences between *Dianthus caryophyllus* L. cultivar in in vitro growth and morphogenesis are related to their ethylene production. *Plant Growth Regulation*, 27, 131–136.
- Fal, M.A., Majada, J.P. and Sánchez Tamés, R. (2002). Physical environment in non-ventilated culture vessels affects *in vitro* growth and morphogenesis of several cultivars of *Dianthus caryophyllus* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 38(6), pp.589–594.
- Faust, J.E. and Dole, J.M. (2021). *Cut flowers and foliage*. Wallingford, UK: CABI.
- Fraga, M., Alonso, M., Ellul, P. and BorjaM. (2004). Micropropagation of *Dianthus gratianopolitanus*. *HortScience*, 39(5), 1083–1087.
- Franzaring, J., Steffan, L., Ansel, W., Walker, R. and Fangmeier, A. (2016). Water retention, wash-out, substrate and surface temperatures of extensive green roof mesocosms—Results from a two year study in SW-Germany. *Ecological Engineering*, 94, 503–515.

- Frey, L. and Janick, J. (1991). Organogenesis in Carnation. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 116(6), 1108–1112.
- Fu, X., Yang, S. and Bao, M. (2008). Factors affecting somatic embryogenesis in anther cultures of Chinese pink (*Dianthus chinensis* L.). *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 44(3), 194–202.
- Fuchs, H. (2019). Dianthin and Its Potential in Targeted Tumor Therapies. *Toxins*, 11(10), 592.
- Gao, H., Xia, X., An, L., Xin, X. and Liang, Y. (2017a). Reversion of hyperhydricity in pink (*Dianthus chinensis* L.) plantlets by AgNO₃ and its associated mechanism during in vitro culture. *Plant Science*, 254, 1–11.
- Gao, H., Xu, P., Li, J., Ji, H., An, L. and Xia, X. (2017b). AgNO₃ prevents the occurrence of hyperhydricity in *Dianthus chinensis* L. by enhancing water loss and antioxidant capacity. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 53(6), 561–570.
- Garrido, G., Cano, E.A., Amao, M.B., Acosta, M. and Sánchez-Bravo, J. (1996). Influence of cold storage period and auxin treatment on the subsequent rooting of carnation cuttings. *Scientia Horticulturae*, 65(1), 73–84.
- Garrido, G., Ramón Guerrero, J., Angel Cano, E., Acosta, M. and Sánchez-Bravo, J. (2002). Origin and basipetal transport of the IAA responsible for rooting of carnation cuttings. *Physiologia Plantarum*, 114(2), 303–312.
- Greenberg, A.K. and Donoghue, M.J. (2011). Molecular systematics and character evolution in Caryophyllaceae. *TAXON*, 60(6), 1637–1652.
- Grisebach, A.H.R. (1844). *Spicilegium florae rumelicae et bithynicae exhibens synopsis plantarum, Vol. 2*. Braunschweig, DE: Frederic Vieweg and Sons.
- Gutiérrez-Miceli, F.A., Arias, L., Juárez-Rodríguez, N., Abud-Archila, M., Amaro-Reyes, A. and Dendooven, L. (2009). Optimization of growth regulators and silver nitrate for micropropagation of *Dianthus caryophyllus* L. with the aid of a response surface experimental design. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 46(1), 57–63.

- Halmagyi, A., Coste, A., Jarda, L., Butiuc-Keul, A., Holobiuc, I. and Cristea, V. (2020). A safeguard measure of endemic and endangered plant species: cryostorage of *Dianthus* taxa. *Biodiversity and Conservation*, 29(11-12), 3445–3460.
- Hamzaoglu, E., Koç, M. and Büyük, İ. (2021). *Dianthus yilmazii* (Caryophyllaceae), a new species from central Turkey. *Kew Bulletin*, 76(3), 523–530.
- Harbaugh, Danica T., Nepokroeff, M., Rabeler, Richard K., McNeill, J., Zimmer, Elizabeth A. and Wagner, Warren L. (2010). A New Lineage-Based Tribal Classification of the Family Caryophyllaceae. *International Journal of Plant Sciences*, 171(2), 185–198.
- Hazar, D. and Baktir, I. (2012). Effects of temperatures, growing media and seed age on germination of *Dianthus calocephalus* Boiss. *Acta Horticulturae*, 937, 421–425.
- Holobiuc, I. and Cristea, V. (2010). Researches concerning *in vitro* cultures optimization of the vulnerable species *Dianthus nardiformis*. *Analele Universitatii din Oradea*, 28(1), 116-121.
- Holobiuc, I. and Maximilian, C. (2013). *In vitro* introduction of *Dianthus trifasciculatus* Kit ssp. *parviflorus* as *ex situ* preservation method. *Oltenia*, 29(1), 93–100.
- Ingwersen, W. (1949). *The Dianthus: A Flower Monograph*. London: Collins, p.128.
- Jain, A., Husain, S. and Kothari, S.L. (1997). Micropropagation of *Dianthus caryophyllus* L. — Control of Vitrification. *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*, 6(1), 35–37.
- Jain, A., Kantia, A. and Kothari, S.L. (2001). De novo differentiation of shoot buds from leaf-callus of *Dianthus caryophyllus* L. and control of hyperhydricity. *Scientia Horticulturae*, 87(4), 319–326.
- Jemmali, A. (1995). *Physiological and morphological study of the flowering in micropropagated strawberry (Fragaria x ananassa Duch) plantlets, cv. Gorella*. Thesis. pp. 171.

- Justamante, M.S., Acosta-Motos, J.R., Cano, A., Villanova, J., Birlanga, V., Albacete, A., Cano, E.Á., Acosta, M. and Pérez-Pérez, J.M. (2019). Integration of Phenotype and Hormone Data during Adventitious Rooting in Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) Stem Cuttings. *Plants*, 8(7), 226.
- Kantia, A. and Kothari, S.L. (2002). High efficiency adventitious shoot bud formation and plant regeneration from leaf explants of *Dianthus chinensis* L. *Scientia Horticulturae*, 96(1-4), 205–212.
- Kanwar, J.K. and Kumar, S. (2009). Influence of growth regulators and explants on shoot regeneration in carnation. *Horticultural Science*, 36(4), 140–146.
- Karami, O., Deljou, A., Esna-Ashari, M. and Ostad-Ahmadi, P. (2006). Effect of sucrose concentrations on somatic embryogenesis in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Scientia Horticulturae*, 110(4), 340–344.
- Karami, O., Deljou, A. and Kordestani, G.K. (2007). Secondary somatic embryogenesis of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 92(3), 273–280.
- Karami, O., Deljou, A. and Pour, A.M. (2006). Repetitive somatic embryogenesis in carnation on picloram supplemented media. *Plant Growth Regulation*, 51(1), 33–39.
- Kereša, S., Stanković, D., Batelja Lodeta, K., Habuš Jerčić, I., Bolarić, S., Barić, M. and Bošnjak Mihovilović, A. (2019). Efficient Protocol for the In Vitro Plantlet Production of Caper (*Capparis orientalis* Veill.) from the East Adriatic Coast. *Agronomy*, 9(6), 303.
- Kharrazi, M., Nemati, H., Tehranifar, A., Bagheri, A. and Sharifi, A. (2011). *In Vitro* Culture of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) Focusing on the Problem of Vitrification. *Journal of Biological and Environmental Sciences*, 5(13), 1–6.
- Kołodziejek, J., Patykowski, J. and Wala, M. (2018). An experimental comparison of germination ecology and its implication for conservation of selected rare and endangered species of *Dianthus* (Caryophyllaceae). *Botany*, 96(5), pp.319–328.
- Komarov, V.L., Shetler, S.G. and Fet, G.N. (1997). *Flora of the USSR. Flora of the USSR*. Washington, D.C.: Smithsonian Institution Libraries.

- Kozahurova, E. (2000). Entomophilous plant species inhabiting the southern limestone slopes of Mt. Vitosha (SW Bulgaria) and their pollinators. *Flora Mediterranea*, 10, 227–234.
- Körner, C. (2021). *Alpine plant life : functional plant ecology of high mountain ecosystems*. Cham, SU: Springer Nature.
- Kougioumoutzis, K., Kokkoris, I.P., Panitsa, M., Strid, A. and Dimopoulos, P. (2021). Extinction Risk Assessment of the Greek Endemic Flora. *Biology*, 10(3), 195.
- Krawczyk, A., Domagała-Świątkiewicz, I. and Lis-Krzyścin, A. (2017). The effect of substrate on growth and nutritional status of native xerothermic species grown in extensive green roof technology. *Ecological Engineering*, 108, 194–202.
- Kumar, S., Baheti, T., Thakur, M., Ghani, M. and Kumari, R. (2016). Plant regeneration from axillary bud, callus and somatic embryo in carnation (*Dianthus caryophyllus*) and assessment of genetic fidelity using RAPD-PCR analysis. *Indian Journal of Agricultural Sciences*, 86(11), 1482–1488.
- Kumar, S., Malik, A. and Yadav, R. (2019). Effect of the different Rooting Media and IBA Concentrations on Yield of Carnation (*Dianthus caryophyllus*) Cuttings cv. Gaudina. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8(10), 335–343.
- Kumawat, S., Kachhwaha, S. and Kothari, S.L. (2013). Micronutrient optimization in the basal medium improves in vitro plant regeneration in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) and Chinese pink (*Dianthus chinensis* L.). *Propagation of Ornamental Plants*, 13(1), 3–11.
- Lamula, S.Q.N. and Ashafa, A.O.T. (2014). Antimicrobial and cytotoxic potential of *Dianthus basuticus* used in Basotho traditional practice. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 9(1), 105-111.
- Lantieri, A., Salmeri, C., Guglielmo, A. and Pavone, P. (2012). Seed germination in the Sicilian subspecies of *Dianthus rupicola* Biv. (Caryophyllaceae). *Plant Biosystems*, 146(4), 906–909.
- Lee, J.W., Kim, J.G., Han, J.S., Cho, Y.B., Lee, Y.J., Lee, D., Shin, D.H., Hong, J.T., Lee, M.K. and Hwang, B.Y. (2021). Dianthiamides A–E, Proline-Containing Orbitides from *Dianthus chinensis*. *Molecules*, 26(23), 7275.

- Linnaeus, C. (1753). *Species plantarum*. 1st ed. Stockholm, SE: Laurentius Salvius.
- Liu, K., Baskin, J.M., Baskin, C.C., Bu, H., Liu, M., Liu, W. and Du, G. (2011). Effect of storage conditions on germination of seeds of 489 species from high elevation grasslands of the eastern Tibet Plateau and some implications for climate change. *American Journal of Botany*, 98(1), 12–9.
- Liu, Q., Zang, E.-H., Wang, C.-C., Liu, Y.-C., Niu, H., Gao, Y. and Li, M.-H. (2022). Dianthi herba: a comprehensive review of its botany, traditional use, phytochemistry, and pharmacology. *Chinese Medicine*, 17(15), 1-32.
- Lukatkin, A.S., Mokshin, E.V. and Teixeira da Silva, J.A. (2017). Use of alternative plant growth regulators and carbon sources to manipulate *Dianthus caryophyllus* L. shoot induction in vitro. *Rendiconti Lincei*, 28(3), 583–588.
- Madhani, H., Rabeler, R., Pirani, A., Oxelman, B., Heubl, G. and Zarre, S. (2018). Untangling phylogenetic patterns and taxonomic confusion in tribe Caryophylleae (Caryophyllaceae) with special focus on generic boundaries. *Taxon*, 67(1), 83–112.
- Majada, J., Tadeo, F., Fal, M. and Sánchez-Tamés, R. (2000). Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 63, 207–214.
- Majada, J.P., Fal, M.A. and Sánchez-Tamés, R. (1997). The effect of ventilation rate on proliferation and hyperhydricity of *Dianthus caryophyllus* L. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 33(1), 62–69.
- Majada, J.P., Fal, M.A., Tadeo, F. and Sánchez-Tamés, R. (2002). Effects of natural ventilation on leaf ultrastructure of *Dianthus caryophyllus* L. cultured in vitro. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 38(3), 272–278.
- Mallinckrodt, B. von, Thakur, M., Weng, A., Gilabert-Oriol, R., Dürkop, H., Brenner, W., Lukas, M., Beindorff, N., Melzig, M.F. and Fuchs, H. (2014). Dianthin-EGF is an effective tumor targeted toxin in combination with saponins in a xenograft model for colon carcinoma. *Future Oncology*, 10(14), 2161–2175.

- Manivannan, A., Soundararajan, P., Cho, Y.S., Park, J.E. and Jeong, B.R. (2017). Sources of silicon influence photosystem and redox homeostasis-related proteins during the axillary shoot multiplication of *Dianthus caryophyllus*. *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*, 152(4), 704–710.
- Markovic, M., Grbic, M. and Djukic, M. (2013). Micropropagation of the Endangered and Decorative Species *Dianthus serotinus* Waldst. et Kit. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 41(2), 370.
- Markovic, M., Grbic, M. and Djukic, M. (2013). The use of *in vitro* culture in dianthus propagation. *Bulletin of the Faculty of Forestry*, 107, 141–162.
- Markovic, M., Grbic, M. and Djukic, M. (2016). Micropropagation of Endangered and Decorative Species *Dianthus pinifolius* Sibth. et Sm. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 59, e16150320.
- Markovic, M., Grbic, M. and Djukic, M. (2018). An efficient *in vitro* propagation protocol of *Dianthus giganteiformis* Borbas subsp. *kladovanus* (Degen) Soo. *Bulletin of the Faculty of Forestry*, 118, 77–85.
- Markovic, M., Popovic, M. and Vilotic, D. (2013). Micropropagation of *Dianthus deltoides* L. through shoot tip and nodal cuttings culture. *Archives of Biological Sciences*, 65(1), 17–22.
- Martineti, V., Tognarini, I., Azzari, C., Sala, S.C., Clematis, F., Dolci, M., Lanzotti, V., Tonelli, F., Brandi, M.L. and Curir, P. (2010). Inhibition of *in vitro* growth and arrest in the G0/G1 phase of HCT8 line human colon cancer cells by kaempferide triglycoside from *Dianthus caryophyllus*. *Phytotherapy Research*, 24(9), 1302–1308.
- Martini, A.N. and Papafotiou, M. (2020). *In Vitro* Propagation and NaCl Tolerance of the Multipurpose Medicinal Halophyte *Limoniastrum monopetalum*. *HortScience*, 55(4), 436–443.
- Maurya, R.L., Kumar, M., Sirohi, U., Priya, Chaudhary, V., Sharma, V.R., Datta, S.K. and Yadav, M.K. (2021). An effective micropropagation protocol and determination of the clonal fidelity of *in vitro* developed microshoots of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) using SSR markers. *The Nucleus*.

- Miller, R.M., Kaul, V., Hutchinson, J.F., Maheswaran, G. and Richards, D. (1991a). Shoot Regeneration from Fragmented Flower Buds of Carnation (*Dianthus caryophyllus*). *Annals of Botany*, 68(6), 563–568.
- Miller, R.M., Kaul, V., Hutchinson, J.F. and Richards, D. (1991b). Adventitious Shoot Regeneration in Carnation (*Dianthus caryophyllus*) from Axillary Bud Explants. *Annals of Botany*, 67(1), 35–42.
- Mohamed, M. and Fang, W. (2011). A protocol for the mass- micropropagation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Journal of Horticultural Science & Biotechnology*, 86(2), 135–140.
- Muneer, S., Park, Y.G. and Jeong, B.R. (2017). Red and Blue Light Emitting Diodes (LEDs) Participate in Mitigation of Hyperhydricity in *in vitro*-grown Carnation Genotypes (*Dianthus caryophyllus*). *Journal of Plant Growth Regulation*, 37(2), 370–379.
- Muneer, S., Soundararajan, P. and Jeong, B.R. (2016). Proteomic and Antioxidant Analysis Elucidates the Underlying Mechanism of Tolerance to Hyperhydricity Stress in In Vitro Shoot Cultures of *Dianthus caryophyllus*. *Journal of Plant Growth Regulation*, 35(3), 667–679.
- Muszyńska, E. and Hanus-Fajerska, E. (2016). In vitro multiplication of *Dianthus carthusianorum* calamine ecotype with the aim to revegetate and stabilize polluted wastes. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 128(3), 631–640.
- Mutlu, K., Sarikahya, N.B., Nalbantsoy, A. and Kirmizigul, S. (2017). Chemical constituents and biological activities of *Dianthus elegans* var. *elegans*. *Natural Product Research*, 32(11), 1245–1253.
- Mutlu, K., Sarikahya, N.B., Yasa, I. and Kirmizigul, S. (2016). *Dianthus erinaceus* var. *erinaceus*: Extraction, isolation, characterization and antimicrobial activity investigation of novel saponins. *Phytochemistry Letters*, 16, 219–224.
- Nakano, M. and Mii, M. (1992). Protoplast culture and plant regeneration of several species in the genus *Dianthus*. *Plant Cell Reports*, 11(5), 225–228.

- Nektarios, P.A., Amountzias, I., Kokkinou, I. and Ntoulas, N. (2011). Green Roof Substrate Type and Depth Affect the Growth of the Native Species *Dianthus fruticosus* Under Reduced Irrigation Regimens. *HortScience*, 46(8), 1208–1216.
- Nikolaeva, M.G., Rasumova, M.V., Gladkova, V.N. (1985). In: Danilova, M.F. (Ed.), Reference Book on Dormant Seed Germination. Leningrad, SU: “Nauka” Publishers, Leningrad Branch.
- Nile, S.H., Kim, D.H., Nile, A., Park, G.S., Gansukh, E. and Kai, G. (2020). Probing the effect of quercetin 3-glucoside from *Dianthus superbus* L. against influenza virus infection- *In vitro* and *in silico* biochemical and toxicological screening. *Food and Chemical Toxicology*, 135, 110985.
- Nugent, G., Wardley-Richardson, T. and Lu, C.-Y. (1991). Plant regeneration from stem and petal of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Plant Cell Reports*, 10(9), 477–480.
- Oliveros-Valenzuela, M. del R., Reyes, D., Sánchez-Bravo, J., Acosta, M. and Nicolás, C. (2008). Isolation and characterization of a cDNA clone encoding an auxin influx carrier in carnation cuttings. Expression in different organs and cultivars and its relationship with cold storage. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(12), 1071–1076.
- Onozaki, T. and Yugi, M. eds., (2022). *Carnation Genome*. Singapore: Springer Verlag.
- Ozel, C.A., Khawar, K.M. and Unal, F. (2015). Factors affecting efficient *in vitro* micropropagation of *Muscari muscarimi* Medikus using twin bulb scale. *Saudi Journal of Biological Sciences*, 22(2), 132–138.
- Papafotiou, M. and Kalantzis, A. (2009). Studies on *in vitro* propagation of *Lithodora zahnii*. *Acta Horticulturae*, 813, 465-470.
- Papafotiou, M. and Stragas, J. (2009). Seed germination and *in vitro* propagation of *Dianthus fruticosus* L. *Acta Horticulturae*, 813, 481–484.
- Papafotiou, M. (2010). *In vitro* propagation of temperate zone woody plants with potential ornamental use. *Acta Horticulturae*, 885, 255-262.

- Pareek, A. and Kothari, S.L. (2003). Direct somatic embryogenesis and plant regeneration from leaf cultures of ornamental species of *Dianthus*. *Scientia Horticulturae*, 98(4), 449–459.
- Pax, F. (1934). Caryophyllaceae. In: A. Engler and K. Prantl, eds., *Die Natürlichen Pflanzen Familien*. Leipzig, DE: Engelmann, 275–364.
- Piqueras, A., Cortina, M., Serna, M.D. and Casas, J.L. (2002). Polyamines and hyperhydricity in micropropagated carnation plants. *Plant Science*, 162(5), 671–678.
- Pirani, A., Zarre, S., Pfeil, B.E., Bertrand, Y.J.K., Assadi, M. and Oxelman, B. (2014). Molecular phylogeny of *Acanthophyllum* (Caryophyllaceae: Caryophylleae), with emphasis on infrageneric classification. *Taxon*, 63(3), 592–607.
- Podwyszyńska, M., Węgrzynowicz-Lesiak, E., Doležal, K., Krekule, J., Strnad, M. and Saniewski, M. (2012). New cytokinin-meta-methoxytopolins in micropropagation of *Cotinus coggygia* Scop. Royal Purple. *Propagation of Ornamental Plants*, 12(4), 220–228.
- Pop, T.-I. and Pamfil, D. (2011). In vitro Preservation of Three Species of *Dianthus* from Romania. *Bulletin UASVM Horticulture*, 68(1), 414–422.
- Prasad, M.N. and de Oliveira Freitas, H.M. (1999). Feasible biotechnological and bioremediation strategies for serpentine soils and mine spoils. *Electronic Journal of Biotechnology*, 2(1), 20–34.
- Purohit, S. and Agarwal, M. (2017). Mineral manipulation and antioxidative studies in carnation - *Dianthus caryophyllus* L. *International Journal of Crop Science and Technology*, 3(2), 1–8.
- Qadri, Z., Neelofar, Masoodi, N., Din, A. and Wani, M. (2018). *In vitro* callusing of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) cv. Scania and Indios. *Current Journal of Applied Science and Technology*, 27(1), 1–10.
- Radojević, L., Čalić-Dragosavac, D., Špirić, J., Stevanović, B. and Stevanović, V. (2010). *In vitro* propagation of *Dianthus ciliatus* ssp. *dalmaticus* and *D. giganteus* ssp. *croaticus* (Caryophyllaceae) from stem segment cultures. *Botanica Serbica*, 34(2), 153–161.

- Raunkier, C. (1934). *The Life Forms of Plants and Statistical Plant Geography*. London, UK: Oxford University Press.
- Saher, S., Piqueras, A., Hellin, E. and Olmos, E. (2004). Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. *Physiologia Plantarum*, 120(1), 152–161.
- Saher, S., Piqueras, A., Hellin, E. and Olmos, E. (2005). Prevention of hyperhydricity in micropropagated carnation shoots by bottom cooling: implications of oxidative stress. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81(2), 149–158.
- Salunkhe, D.K., Bhat, N.R. and Desai, B.B. (1990). *Postharvest Biotechnology of Flowers and Ornamental Plants*. Heidelberg: Springer, 192.
- Sánchez-García, A.B., Ibáñez, S., Cano, A., Acosta, M. and Pérez-Pérez, J.M. (2018). A comprehensive phylogeny of auxin homeostasis genes involved in adventitious root formation in carnation stem cuttings. *PLOS ONE*, 13(4), e0196663.
- Sato, S., Hagimori, M. and Iwai, S. (1993). Recovering vitrified carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) shoots using Bacto-Peptone and its subfractions. *Plant Cell Reports*, 12(7), 370–374.
- Shiba, T. and Mii, M. (2005). Agrobacterium tumefaciens-mediated transformation of highly regenerable cell suspension cultures in *Dianthus acicularis*. *The Journal of Horticultural Science and Biotechnology*, 80(4), 393–398.
- Shin, I.-S., Lee, M.-Y., Ha, H., Jeon, W.-Y., Seo, C.-S. and Shin, H.-K. (2012). *Dianthus superbus* fructus suppresses airway inflammation by downregulating of inducible nitric oxide synthase in an ovalbumin-induced murine model of asthma. *Journal of Inflammation*, 9(1), 41.
- Simpson, M.G. (2019). *Plant systematics*. 3rd ed. Amsterdam: Academic Press.
- Singh, A. and Kumar, P. (2021). Response of cuttings of different carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) cultivars to rooting hormones. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 10(1), 933-936.

- Skourti E., Koutsovoulou K., Delipetrou P., Farmaki D., Koukoula I., Georghiou K. and Thanos C.A. (2019). Manual with protocols for seed collection, handling, storage and seed germination for the keystone species of all the target habitats. Deliverable C.7.1. for the project LIFE11 NAT/GR/2014 - ForOpenForests. National and Kapodistrian University of Athens - HSPN.
- Smith, J.E. (1794). Remarks on the Genus *Dianthus*. *Transactions of the Linnean Society*, 2, 292–304.
- Sreelekshmi, R. and Siril, E.A. (2020). Influence of polyamines on hyperhydricity reversion and its associated mechanism during micropropagation of China pink (*Dianthus chinensis* L.). *Physiology and Molecular Biology of Plants*, 26(10), 2035–2045.
- Sreelekshmi, R. and Siril, E.A. (2021). Effective reversal of hyperhydricity leading to efficient micropropagation of *Dianthus chinensis* L. *3 Biotech*, 11(95), 1–15.
- Sreelekshmi, R., Siril, E.A. and Muthukrishnan, S. (2021). Role of Biogenic Silver Nanoparticles on Hyperhydricity Reversion in *Dianthus chinensis* L. an In Vitro Model Culture. *Journal of Plant Growth Regulation*, 41(1), 23–39.
- Strid, A. (1997). *Flora Hellenica, Vol. 1*. Oberreifenberg, DE: Koenigstein Koeltz Scientific Books.
- Strid, A., Turland, N.J. and Rodewald, M. (2016). *Atlas of the Aegean flora*. Berlin, DE: Berlin Botanic Garden and Botanical Museum.
- Strumia, S., Santangelo, A. and Barone Lumaga, M.R. (2020). Seed germination and seedling roots traits of four species living on Mediterranean coastal cliffs. *Plant Biosystems*, 154(6), 990–999.
- Teixeira da Silva, J.A. (2014). Attempted genotype-independent induction of shoots in 15 carnation (*Dianthus caryophyllus*) cultivars from four explant types. *Environmental and Experimental Biology*, 12, 143–147.
- Teixeira da Silva, J.A., Wicaksono, A. and Engelmann, F. (2020). Cryopreservation of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) and other *Dianthus* species. *Planta*, 252(6), 1-9.

- Thakur, K. and Kanwar, K. (2017). In Vitro Plant Regeneration by Organogenesis from Leaf Callus of Carnation, *Dianthus caryophyllus* L. cv. “Master.” *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 88(3), 1147–1155.
- Thanos, C.A., Kadis, C.C. and Skarou, F. (1995). Ecophysiology of germination in the aromatic plants thyme, savory and oregano (Labiatae). *Seed Science Research*, 5(3), 161–170.
- The Angiosperm Phylogeny Group, Chase, M.W., Christenhusz, M.J.M., Fay, M.F., Byng, J.W., Judd, W.S., Soltis, D.E., Mabberley, D.J., Sennikov, A.N., Soltis, P.S. and Stevens, P.F. (2016). An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Botanical Journal of the Linnean Society*, 181(1), 1–20.
- Thu, H.T.M., Naing, A.H., Jeong, H.Y. and Kim, C.K. (2020). Regeneration of Genetically Stable Plants from *in vitro* Vitrified Leaves of Different Carnation Cultivars. *Plants*, 9(8), 950.
- Thuring, C.E., Berghage, R.D. and Beattie, D.J. (2010). Green Roof Plant Responses to Different Substrate Types and Depths under Various Drought Conditions. *HortTechnology*, 20(2), 395–401.
- Trigka, M. and Papafotiou, M. (2017). *In vitro* propagation of *Anthyllis barba-jovis* from seedling tissues. *Acta Horticulturae*, 1189, 473–748.
- Tsoktouridis, G., Grigoriadou, K., Doua, E., Nikolaidou, A., Menexes, G. and Maloupa, E. (2013). In vitro shoot proliferation, rooting, and acclimatization of four diverse *Dianthus petraeus* W. ET K. Genotypes using TDZ, NAA, and IBA. *Propagation of Ornamental Plants*, 13(4), 181–188.
- Turan, I., Demir, S., Aliyazicioglu, R., Kilinc, K., Ozer Yaman, S., Akbulut Cakiroglu, K., Kanbolat, S., Ayazoglu Demir, E., Mentese, A., Aliyazicioglu, Y. and Deger, O. (2019). Dimethyl Sulfoxide Extract of *Dianthus carmelitarum* Induces S Phase Arrest and Apoptosis in Human Colon Cancer Cells. *Nutrition and Cancer*, 71(7), 1181–1188.

- Tutin, T.G., Burges, N.A., Chater, A.O., Edmondson, J.R., Edmondson, V.H., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M. and Webb, D.A. eds., (1993). *Flora Europaea, Vol. 1: Psilotaceae to Platanaceae*. 2nd ed. Cambridge: Cambridge University Press.
- Twardowski, C.M., Crocker, J.L., Freeborn, J.R. and Scoggins, H.L. (2012). Quantity and Quality of Cuttings as Influenced by Stock Plant Nutrition of Herbaceous Perennials. *HortTechnology*, 22(1), 89–93.
- Umberto Quattrocchi (2012). *CRC world dictionary of medicinal and poisonous plants*. 1st ed. Boca Raton, FL: Taylor & Francis.
- Uysal, S., Aktumsek, A., Picot-Allain, C.M.N., Unuvar, H., Mollica, A., Georgiev, M.I., Zengin, G. and Mahomoodally, M.F. (2018). Biological, chemical and in silico fingerprints of *Dianthus calocephalus* Boiss.: A novel source for rutin. *Food and Chemical Toxicology*, 113, 179–186.
- Valente, L.M., Savolainen, V. and Vargas, P. (2010). Unparalleled rates of species diversification in Europe. *Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences*, 277(1687), 1489–1496.
- van Altvorst, A.C., Kochorst, H.J.J., Bruinsma, T. and Dons, J.J.M. (1994). Improvement of adventitious shoot formation from carnation leaf explants. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 37(1), 87–90.
- van Altvorst, A.C., Koehorst, H.J.J., Bruinsma, T., Jansen, J., Custers, J.B.M., de Jong, J. and Dons, J.J.M. (1992). Adventitious shoot formation from in vitro leaf explants of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.). *Scientia Horticulturae*, 51(3-4), 223–235.
- Varshney, A., Anis, M. and Aref, I.M. (2012). Potential role of cytokinin–auxin synergism, antioxidant enzymes activities and appraisal of genetic stability in *Dianthus caryophyllus* L.—an important cut flower crop. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 49(2), 166–174.
- Villanova, J., Cano, A., Albacete, A., López, A., Cano, E.Á., Acosta, M. and Pérez-Pérez, J.M. (2016). Multiple factors influence adventitious rooting in carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) stem cuttings. *Plant Growth Regulation*, 81(3), 511–521.

- Vlachou, G., Papafotiou, M. and Bertsouklis, K. (2020). Seed germination, micropropagation from adult and juvenile origin explants and address of hyperhydricity of the Cretan endemic herb *Calamintha cretica*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 48(3), 1504–1518.
- Vlachou, G., Papafotiou, M. and Bertsouklis, K.F. (2016). *In vitro* propagation of *Ballota acetabulosa*. *Acta Horticulturae*, 1113, 171–174.
- Vlachou, G., Papafotiou, M. and Bertsouklis, K.F. (2017a). Studies on *in vitro* propagation of *Anthyllis barba-jovis* L. *Acta Horticulturae*, 1155, 317–320.
- Vlachou, G., Papafotiou, M. and Bertsouklis, K.F. (2017b). The effect of cytokinin type and concentration on micropropagation of *Calamintha cretica*. *Acta Horticulturae*, 1189, 477–480.
- Vlachou, G., Papafotiou, M. and Bertsouklis, K.F. (2019). Studies on Seed Germination and Micropropagation of *Clinopodium nepeta*: A Medicinal and Aromatic Plant. *HortScience*, 54(9), 1558–1564.
- Walker, J.F., Yang, Y., Feng, T., Timoneda, A., Mikenas, J., Hutchison, V., Edwards, C., Wang, N., Ahluwalia, S., Olivieri, J., Walker-Hale, N., Majure, L.C., Puente, R., Kadereit, G., Lauterbach, M., Eggli, U., Flores-Olvera, H., Ochoterena, H., Brockington, S.F. and Moore, M.J. (2018). From cacti to carnivores: Improved phylotranscriptomic sampling and hierarchical homology inference provide further insight into the evolution of Caryophyllales. *American Journal of Botany*, 105(3), 446–462.
- Wang, M., Xiao, J., Wei, H. and Jeong, B.R. (2020). Supplementary Light Source Affects Growth and Development of Carnation “Dreambyul” Cuttings. *Agronomy*, 10(8), 1217.
- Watad, A., Ahroni, A., Zuker, A., Shejtman, H., Nissim, A. and Vainstein, A. (1996). Adventitious shoot formation from carnation stem segments: a comparison of different culture procedures. *Scientia Horticulturae*, 65, 313–320.
- Way, T. (2016). *Carnation*. London, UK: Reaktion Books.
- Weon, J.B., Jung, Y.S. and Ma, C.J. (2016). Cognitive-Enhancing Effect of *Dianthus superbus* var. *longicalycinus* on Scopolamine-Induced Memory Impairment in Mice. *Biomolecules & Therapeutics*, 24(3), 298–304.

- Westcott, C. and Horst, R.K. (2013). *Westcott's plant disease handbook*. Dordrecht: Springer Reference.
- Witt, T., Jürgens, A. and Gottsberger, G. (2013). Nectar sugar composition of European Caryophylloideae (Caryophyllaceae) in relation to flower length, pollination biology and phylogeny. *Journal of Evolutionary Biology*, 26(10), 2244–2259.
- Yadav, M., Gaur, A. and Garg, G. (2003). Development of suitable protocol to overcome hyperhydricity in carnation during micropropagation. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 72, 153–156.
- Yang, X., Ma, S. and Li, J. (2017). Effects of different soil remediation methods on inhibition of lead absorption and growth and quality of *Dianthus superbus* L. *Environmental Science and Pollution Research*, 24(36), 28190–28196.
- Yashwant, S., Parmar, Dhiman, S., Youdh, D., Gupta, C., Krishi, S. and Kendra, V. (2018). Nutrient management for cutting production in carnation (*Dianthus caryophyllus*). *The Indian Journal of Agricultural Sciences*, 85 (4), 143-156.
- Yoon, J., Park, J., Kim, H., Jin, H.-G., Kim, H., Ahn, Y., Kim, Y., Lee, H., Lee, Y. and Kang, D. (2019). *Dianthus superbus* Improves Glomerular Fibrosis and Renal Dysfunction in Diabetic Nephropathy Model. *Nutrients*, 11(3), 553.
- Yu, J.-Q., Yin, Y., Lei, J.-C., Zhang, X.-Q., Chen, W., Ding, C.-L., Wu, S., He, X.-Y., Liu, Y.-W. and Zou, G.-L. (2012). Activation of apoptosis by ethyl acetate fraction of ethanol extract of *Dianthus superbus* in HepG2 cell line. *Cancer Epidemiology*, 36(1), 40–45.
- Yücel, T.B. and Yaylı, N. (2018). Türkiye’de Yetişen *Dianthus carmelitarum* Reut. ex Boiss ve *Dianthus calocephalus* Boiss. Bitkilerinin Uçucu Bileşenlerinin GC/MS Analizleri ve Antimikrobiyal Aktiviteleri. *Ege Üniversitesi Ziraat Fakültesi Dergisi*, 55 (1), 89-94.
- Yusupova, U., Usmanov, D., Azamatov, A., Ramazonov, N. and Rejepov, J. (2020). Phytochemical constituents and biological activities of *Dianthus helenae* Vved., growing in Uzbekistan. *Natural Product Research*, 1–5.

- Załęcka, R. and Wierzbicka (2002). The adaptation of *Dianthus carthusianorum* L. (Caryophyllaceae) to growth on a zinc-lead heap in southern Poland. *Plant and Soil*, 246, 249–257.
- Zheng, L., Xiao, Z. and Song, W. (2020). Effects of Substrate and Exogenous Auxin on the Adventitious Rooting of *Dianthus caryophyllus* L. *HortScience*, 55(2), 170–173.
- Καρέτσος, Γ. (2002). Μελέτη της οικολογίας και της βλάστησης του όρους Οίτη. Διδακτορική διατριβή, 440 σελ. Διαθέσιμο στο: <https://www.didaktorika.gr/eadd/handle/10442/13143>
- Κίντζιος, Σ. (2015). *Εισαγωγή στο μικροπολλαπλασιασμό των φυτών*. Αθήνα: Εκδόσεις Ελληνικά Ακαδημαϊκά Συγγράματα και Βοηθήματα.
- Μπαρμπάνη, Χ. (2021). *Μελέτη της οικοφυσιολογίας του σπόρου και του μικροπολλαπλασιασμού του *Codariocalyx motorius**. Μεταπτυχιακή μελέτη, 140 pp. Διαθέσιμο στο: <http://dspace.aua.gr/xmlui/handle/10329/7283>
- Τρίγκα, Μ. (2017). *Διερεύνηση της οικοφυσιολογίας του σπόρου της *Anthyllis barbajonis* L. και του *in vitro* πολλαπλασιασμού του είδους*. Μεταπτυχιακή μελέτη, 166 σελ. Διαθέσιμο στο: <http://dspace.aua.gr/xmlui/handle/10329/6592>.
- Τσιάμα, Δ. (2019). *Διερεύνηση της *in vitro* καλλιέργειας σε υγρό υπόστρωμα και του προβλήματος της υπερενδάτωσης στο είδος *Ballota acetabulosa**. Μεταπτυχιακή μελέτη, 177 σελ. Διαθέσιμο στο: <http://dspace.aua.gr/xmlui/handle/10329/7024>
- Φουρναράκη, Χ. (2010). Διατήρηση των απειλούμενων φυτών της κρητικής χλωρίδας: οικοφυσιολογία σπερμάτων και λειτουργία τράπεζας γενετικού υλικού. Διδακτορική διατριβή, 468 σελ. Διαθέσιμο στο: <https://www.didaktorika.gr/eadd/handle/10442/27349>
- Φοίτος, Δ., Κωνσταντινίδης, Θ. και Καμάρη, Γ. (2009a). Βιβλίο ερυθρών δεδομένων των σπανίων και απειλούμενων φυτών της Ελλάδας. Πάτρα: Ελληνική Βοτανική Εταιρεία.
- Φοίτος, Δ. και Καμάρη, Γ. (2009b). Μαθήματα Γεωβοτανικής. Πάτρα: Εκδόσεις Πανεπιστημίου Πατρών.

Διαδικτυακές πηγές

- BBC Gardener's World Magazine. 2018. Dianthus cruentus. *BBC Gardeners World Magazine*. <https://www.gardenersworld.com/plants/dianthus-cruentus/> [accessed March 13, 2022].
- Denver Botanical Gardens. 2017. Dianthus cruentus. *navigate.botanicgardens.org*. http://navigate.botanicgardens.org/weboi/oecgi2.exe/inet_ecm_disppl?namenu m=3765&detail=1 [accessed March 13, 2022].
- Flora of Greece Web. 2020. Vascular Plants Checklist of Greece | Flora of Greece – An annotated checklist. *portal.cybertaxonomy.org*. <https://portal.cybertaxonomy.org/flora-greece/> [accessed March 13, 2022].
- Jelitto. 2022. Jelitto Perennial Seed | DIANTHUS cruentus Portion(s). *www.jelitto.com*. <https://www.jelitto.com/Seed/DIANTHUS+cruentus+Portion+s.html> [accessed March 13, 2022].
- Kew Gardens. 2021. Plants of the World Online | Kew Science. *Plants of the World Online*. <https://powo.science.kew.org/>.
- Ryan, C. 2011. BBC - Chelsea Flower Show 2011 - The Daily Telegraph Garden - Cleve West - Best in Show - Gold medal winner. *www.bbc.co.uk*. <https://www.bbc.co.uk/chelsea/show-gardens/2011/daily-telegraph-garden-cleve-west.shtml> [accessed March 13, 2022].

Πηγές εικόνων

Εσώφυλλο:

<https://www.flickr.com/photos/biodivlibrary/49492158453/in/album-72157712986730863/>

Εικ. 1:

<https://www.naturagraeca.com/ws/128,190,1,1,%CE%A6%CF%85%CF%84%CE%AC->

Εικ. 2:

<https://www.flickr.com/photos/nturland/>

Εικ. 3:

<https://www.naturagraeca.com/ws/226,291,1,%CE%91%CE%B3%CF%81%CE%B9%CE%BF%CE%B3%CE%B1%CF%81%CF%8D%CF%86%CE%B1%CE%BB%CE%BB%CE%B1>

Εικ. 4:

https://revistas.uptc.edu.co/index.php/ciencias_hortícolas/article/view/8068

Εικ. 5:

https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-981-15-8261-5_9

Εικ. 6:

<https://www.istockphoto.com/photo/flowerbed-of-dianthus-barbatus-in-garden-gm1138420052-303921210>

Εικ. 7:

<https://www.greenroofplants.com/plants/dianthus-carthusianorum/>

Εικ. 8:

https://www.sohu.com/a/488390097_169298 (α)

<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/> (β)

Εικ. 9:

<https://www.inaturalist.org/observations/103317471>

<https://www.naturagraeca.com/ws/226,291,1,%CE%91%CE%B3%CF%81%CE%B9%CE%BF%CE%B3%CE%B1%CF%81%CF%8D%CF%86%CE%B1%CE%BB%CE%BB%CE%B1>

https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Dianthus_calocephalus_-_G%C3%BCzel_karanfil_02.jpg

Εικ. 10:

<https://www.flickr.com/photos/26181971@No7/34943505374>

<https://www.allforgardening.com/6076/marielouiseagus-vibrant-iridescent-dianthus-cruentus-stunning-little-bright-blue-stame/>

Εικ. 11:

https://www.gbif.org/occurrence/gallery?taxon_key=8179294

Εικ. 12:

<https://outofmyshed.co.uk/2011/05/29/chelsea-flower-show-2011/>

Εικ. 15:

https://www.google.com/maps/@38.742902,22.4453449,3a,75y,136.6h,96.2t/data=!3m6!1e1!3m4!1sOhY_eLNW1A7i8za_4RXEUA!2e0!7i13312!8i6656

Όλες οι υπόλοιπες εικόνες λήφθηκαν και επεξεργάστηκαν από τον συγγραφέα.

