

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΨΥΧΟΥΣ ΣΤΟ ΜΕΓΕΘΟΣ ΤΩΝ ΑΡΤΙΒΛΑΣΤΩΝ
ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΩΝ ΟΡΧΕΟΕΙΔΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

IN VITRO

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

της

ΑΛΕΞΑΝΔΡΑΣ ΘΩΜΑ

Τμήμα Επιστήμης και Τεχνολογίας Τροφίμων

Σχολή Περιβάλλοντος

ΙΟΝΙΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ



Αργοστόλι Κεφαλληνίας

Αύγουστος 2022

Η ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΤΟΥ ΨΥΧΟΥΣ ΣΤΟ ΜΕΓΕΘΟΣ ΤΩΝ ΑΡΤΙΒΛΑΣΤΩΝ

ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΩΝ ΟΡΧΕΟΕΙΔΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

IN VITRO

Η πτυχιακή εργασία εγκρίθηκε από:

Αργύριος Γεράκης

Ιωάννης Σαμαράς

Ειρήνη Κατσαλήρου

Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον επιβλέποντα καθηγητή κ. Γεράκη Αργύριο για τις χρήσιμες συμβουλές και την επιστημονική του καθοδήγηση. Ήταν παρών κάθε στιγμή που προέκυπταν απορίες και ανάγκη για διευκρινίσεις. Επίσης, για την βοήθειά του και την καθοδήγηση για την συγγραφή και την τελική διαμόρφωση της εργασίας αλλά και για την διευκόλυνση χρήσης του προγράμματος JMP για τις στατιστικές αναλύσεις. Ακόμη, ευχαριστώ την κ. Κατσαλήρου Ειρήνη για την φιλοξενία στο Εργαστήριο Εδαφολογίας όπου πραγματοποιήθηκε το πείραμα και ήταν ανά πάσα στιγμή πρόθυμη στην όποια βοήθεια χρειαζόμουν.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα ορχεοειδή αποτελούν μία από τις μεγαλύτερες και πιο ποικιλόμορφες οικογένειες αγγειόσπερμων φυτών. Συγκεκριμένα, τα ορχεοειδή συμβάλλουν σημαντικά στο τομέα της διατροφής μέσω της παραγωγής της βανίλιας και του σαλεπιού. Λόγω των απειλών που δέχεται από το ανθρώπινο αποτύπωμα όσον αφορά την παράνομη συλλογή και την κλιματική αλλαγή κρίνεται χρήσιμη η διατήρησή τους και ο πολλαπλασιασμός τους. Η καλλιέργεια *in vitro* αποτελεί μια υποσχόμενη μέθοδο που θα συμβάλλει στη προσπάθεια αυτή η οποία περιλαμβάνει πολλές μεταβλητές που θα πρέπει να μελετηθούν ώστε να φέρει ευνοϊκό αποτέλεσμα. Μία από τις μεταβλητές με την οποία ασχολήθηκε η μελέτη αυτή, ήταν η επίδραση της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη των χερσαίων ορχεοειδών. Για να διαπιστωθεί αν η θερμοκρασία αποτελεί παράγοντα ο οποίος διαφοροποιεί την ανάπτυξη των σποροφύτων, σε προηγούμενη έρευνα τα δοχεία καλλιέργειας είχαν υποβληθεί σε διαφορετικές μεταχειρίσεις θερμοκρασίας επί οκτώ εβδομάδες: Ψυγείο, Εργαστήριο και έξι υπαίθριοι σταθμοί σε διαφορετικά υψόμετρα στο νησί της Κεφαλονιάς. Στην παρούσα έρευνα, ύστερα από τον θερινό λήθαργο έγινε καταμέτρηση κονδύλων, μήκος φύτρου τους και μάζας και οι μέσοι όροι των μεταχειρίσεων συγκρίθηκαν μεταξύ τους με μη παραμετρικές δοκιμές. Στο σταθμό Αίνος που είναι ο μεγαλύτερος σε υψόμετρο τα φυτά σημείωσαν το μακρύτερο φυτό. Αποδείχθηκε πως το μήκος φύτρου σχετίζεται με τη μάζα του αφού όσο μεγαλύτερο φυτό παρουσιάσει τόσο μικρότερη η μάζα του. Το μεγαλύτερο ποσοστό επιβίωσης παρουσίασε το γένος *Anacamptis* σε αντίθεση με το γένος *Himantoglossum*. Παρόλα αυτά η μεγαλύτερη μάζα κονδύλου σημειώθηκε στο γένος *Himantoglossum*. Τα αποτελέσματα έδειξαν

πως η επιβίωση των πρωτοκορμών εξαρτάται από το στάδιο ανάπτυξής τους για τα διαφορετικά είδη κατά την πρώτη φάση έναρξης του πειράματος, την προέλευση του σπόρου καθώς και τις συνθήκες ανάπτυξης. Οι ψυχρές μεταχειρίσεις που υπέστησαν τα γένη *Anacamptis* και *Himantoglossum* ευνόησαν την ανάπτυξή τους καθώς έτσι διαπιστώθηκε και ο ισχυρισμός της σχέσης του υψομέτρου με τη θερμοκρασία. Φαίνεται ότι όσο πιο μεγάλο είναι το υψόμετρο τόσο μειώνεται η θερμοκρασία. Η μείωση της θερμοκρασίας ωφελεί την ανάπτυξη του μήκους φύτρου των κονδύλων.

ABSTRACT

Orchids are one of the largest and most diverse families of angiosperms. Specifically, the orchid family contributes significantly to the food sector through the production of vanilla and salep. Due to the threats it receives from the human footprint due to illegal collection and climate changes, their preservation and multiplication is deemed necessary. *In vitro* culture is a promising method that will contribute to this effort with many variables that should be studied in order to work favorably. One of the parameters that this study was based on, was the effect of temperature on the growth of terrestrial orchids. To determine if temperature is a factor that differentiates seedling growth, the containers were subjected to different temperatures for eight weeks: Refrigerator, Laboratory and six outdoor stations on the island of Kefalonia. After counting shoot length and tuber mass, means of treatments were compared following non-parametrics tests. The results showed that the survival rate of protocorms depends on their development stage for the different species during the first phase of the experiment, the origin of the seed as well as the growth conditions. At the Ainos station, which is the highest in altitude, the plants had the longest shoot. It was shown that the length of the shoot is related to its mass, as the longest the shoot the smallest the mass. The highest percentage of survival was presented by the genus *Anacamptis* in contrast to the genus *Himantoglossum*. Nevertheless, the largest mass was noted in the genus *Himantoglossum*. The results showed that the survival of the protocorms depends on the stage of their development for the different species during

the first phase of the experiment, the origin of the seed as well as the growth conditions. The cold treatments endured by the genus *Anacamptis* and *Himantoglossum* favored their growth, and the claim of the relationship between altitude and temperature was thus established. It seems that the higher the altitude, the lower the temperature. The decrease in temperature benefits the development of tuber shoot length.

ΠΙΝΑΚΑΣ ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΩΝ

Κεφάλαιο	Σελίδα
I. ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	1-8
II. ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ	
2.1. Συλλογή σπόρων.....	9
2.2. Εργαστηριακή μέθοδος.....	9
2.2.1. Προετοιμασία.....	10-11
2.2.2. Προετοιμασία υλικών.....	12
2.2.3. Εμφύτευση.....	12
2.2.4. Μετεμφιάλωση.....	13
2.3. Πειραματική μεταχείριση.....	13-18
2.4. Δεύτερη φάση του πειράματος.....	19
2.5. Τρίτη φάση του πειράματος.....	19
2.6. Υλικά.....	19
2.7. Διαδικασία.....	20
2.8. Στατιστική.....	20-26
III. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	
3.1. Επιβίωση φυτού.....	27
3.2. Μήκος κονδύλου.....	27-28
3.3. Μάζα.....	28-32
IV. ΣΥΖΗΤΗΣΗ	
4.1. Επιβίωση φυτού.....	33-34
4.2. Μήκος φύτρου.....	35-37
4.3. Μάζα.....	37-38
4.4. Σχέση μάζας - Φύτρου.....	38
V. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	39-40

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	41-43
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ.....	44-51

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΕΙΚΟΝΩΝ

Εικόνα	Σελίδα
Εικόνα 1. Θέσεις σταθμών με υψομετρική διαφορά που υποβλήθηκαν τα δοχεία στο νησί της Κεφαλονιάς.....	16
Εικόνα 2. Ημερήσια μέση θερμοκρασία στο εσωτερικό των δοχείων καλλιέργειας κατά τη διάρκεια των οκτώ εβδομάδων ομαλής προσαρμογής μετά το τέλος των θερμοκρασιακών μεταχειρίσεων στη θέση Λακωμάτια (26 Μαρτίου - 19 Μαΐου 2021, Deconninck, 2021).....	18
Εικόνα 3. Τύπος box- cox για δοκιμή κανονικότητας στο <i>JMP</i>	24
Εικόνα 4. Γραφική παράσταση Q-Q Plot για το μήκος του φύτρου του είδους <i>Anacamptis laxiflora</i> σταθμού Αίνου. Σε αυτή τη περίπτωση η δοκιμή κανονικότητας αποτυγχάνει. Τα σημεία της μεταβλητής δεν συγκεντρώνονται όλα στη διαγώνιο.....	25
Εικόνα 5. Μέσος όρος επιβίωσης μετά από τη ψυχρή μεταχείριση οκτώ εβδομάδων των σποροφύτων για τα γένη <i>Anacamptis</i> και <i>Himantoglossum</i>	30
Εικόνα 6 . Πάνω <i>Anacamptis coriophora</i> , Κάτω <i>Anacamptis laxiflora</i> . Ίδιο γράμμα σηματοδοτεί μη στατιστικώς σημαντική διαφορά ενώ διαφορετικό σηματοδοτεί στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων των μεταχειρίσεων.....	31
Εικόνα 7. Ο μέσος όρος του μήκους φύτρου και της μάζας όπου χρησιμοποιήθηκαν ως εξαρτημένες μεταβλητές για να εξηγηθούν οι διαφορές ανάπτυξης μεταξύ των φυτών: Πάνω <i>Himantoglossum hircinum</i> και Κάτω <i>Himantoglossum robertianum</i>	32

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΙΝΑΚΩΝ

Πίνακας

Σελίδα

Πίνακας 1. Συνταγή για το τροποποιημένο οργανικό θρεπτικό μέσο (υπόστρωμα).....	11
Πίνακας 2 . Θέση και υψόμετρο πάνω από την επιφάνεια της θάλασσας των μεταχειρίσεων θερμοκρασίας (Deconninck, 2021).....	15
Πίνακας 3 . Ελάχιστη, μέγιστη, μέση $\pm$ τυπική απόκλιση (SD) της ωριαίας θερμοκρασίας ($^{\circ}\text{C}$) και μέση $\pm$ τυπική απόκλιση (SD) των ημερήσιων διακυμάνσεων της θερμοκρασίας ($^{\circ}\text{C}$) εντός των δοχείων κατά τη διάρκεια των οκτώ εβδομάδων ψυχρής μεταχείρισης από τις 25 Ιανουαρίου έως τις 23 Μαρτίου 2021 (Deconninck, 2021).....	17
Πίνακας 4 . Μη παραμετρικές δοκιμές για τη μεταχείριση <i>Anacamptis</i> <i>coriophora</i>	44-45
Πίνακας 5 . Μη παραμετρικές δοκιμές για μεταχείριση <i>Anacamptis</i> <i>laxiflora</i>	46-47

ΚΑΤΑΛΟΓΟΣ ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΩΝ

Παράρτημα	Σελίδα
Παράρτημα 1. Βήματα διαδικασίας πειράματος.....	48-51

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα ορχεοειδή αποτελούν μία από τις μεγαλύτερες και πιο ποικιλόμορφες οικογένειες αγγειόσπερμων φυτών. Μέχρι σήμερα, έχουν γίνει αποδεκτά πάνω από 25.000 είδη και 880 γένη (Ding et al., 2017). Οι ορχιδέες είναι φυτά που προτιμώνται παγκοσμίως για τα υπέροχα λουλούδια και είναι γνωστά για τις φαρμακευτικές, διατροφικές αλλά και για τις αρωματικές τους ιδιότητες (Zhang et al., 2018). Για παράδειγμα, η τροπική ορχιδέα βανίλια και ειδικά η *Vanilla planifolia* έχει μεγάλη εμπορική σημασία λόγω των αποξηραμένων λοβών που είναι σημαντικά αρωματικά συστατικά στη ζαχαροπλαστική καθώς και στην παραγωγή αρωμάτων (Zhang et al., 2018). Μία από τις πολλές ενώσεις που εντοπίζονται στα εκχυλίσματα βανίλιας είναι η ένωση βανιλίνη η οποία είναι υπεύθυνη για τη χαρακτηριστική γεύση και οσμή της. Σημαντική είναι η συμβολή της βανίλιας στη διατροφή καθώς περιέχει υψηλά επίπεδα αντιοξειδωτικών και έχει ηρεμιστικές ιδιότητες (Rastogi & Sugandha, 2019). Στην Ελλάδα όπως και σε πολλές χώρες των Βαλκανίων και της Μέσης Ανατολής, οι αυτοφυείς ορχιδέες χρησιμοποιούνται κυρίως για την παρασκευή ροφήματος γνωστό ως σαλέπι κατά τους χειμερινούς μήνες (Kreziou et al., 2016).

Το σαλέπι παρασκευάζεται από τους αποξηραμένους κονδύλους χειρσαίων ορχεοειδών και εκτιμάται ιδιαίτερα μεταξύ άλλων για τις φαρμακευτικές του ιδιότητες. Επίσης, χρησιμοποιείται στη ζαχαροπλαστική, όπως για την παρασκευή του παραδοσιακού παγωτού με γεύση «ντοντουρμά». Παρατηρείται υψηλή συγκομιδή σαλεπιού κυρίως στην Βόρεια Ελλάδα προερχόμενο από επτά είδη των τριών γενών *Anacamptis*, *Dactylorhiza* και *Orchis*. Στο στάδιο της συγκομιδής κάθε φυτό φέρει τον παλιό κόνδυλο ο οποίος παρέχει θρεπτικά συστατικά κατά την τρέχουσα

βλαστική περίοδο και ένα νέο κόνδυλο που θα χρησιμοποιηθεί κατά την επόμενη βλαστική περίοδο. Ο παλιός κόνδυλος είναι σαρκώδης και συρρικνωμένος ενώ ο νέος σαρκώδης και γεμάτος με αποταμιευτικές ουσίες. Οι συλλέκτες επιλέγουν να συλλέξουν τους κονδύλους μετά την ανθοφορία του φυτού και πριν τη σποροποίηση επιλέγοντας τον νεαρό κόνδυλο και απορρίπτοντας τον παλιό. Η ανάγκη των καταναλωτών για εύρεση παραδοσιακών, βιολογικών και εναλλακτικών τροφίμων είναι αυτή που δημιουργεί την υψηλή ζήτηση προϊόντων σαν το σαλέπι, αν και όπως θα αναφερθεί παρακάτω η συλλογή κονδύλων είναι παράνομη (Kreziou et al., 2016).

Επίσης, τα ορχεοειδή προσελκύουν το ενδιαφέρον πληθώρας φυσιολατρών όχι μόνο για τον αξιοσημείωτο αριθμό παραλλαγής μορφών που εμφανίζουν αλλά και για τους σύνθετους μηχανισμούς επικοινωνίας. Το γεγονός αυτό ωθεί τους μελετητές και λάτρεις των ορχεοειδών να ταξιδέψουν σε απόμακρα μέρη τόσο για να μελετήσουν όσο και για να φωτογραφίσουν άγριες ορχιδέες (Claessens & Kleynen, 2011).

Σημαντικό κίνητρο για τη μελέτη και έρευνα των αυτοφυών ορχιδεών είναι το γεγονός ότι περιλαμβάνουν υψηλό ποσοστό απειλούμενων ειδών, ακόμα και υπό εξαφάνιση. Αυτή η απειλή συνδέεται άμεσα με ενδογενείς παράγοντες της βιολογίας του φυτού αλλά και με εξωγενείς που αφορούν την ανθρώπινη παρέμβαση.

Αλληλεπιδράσεις μυκορριζών του εδάφους με επικοινωνιστές αποτελούν σημαντική παράμετρο στην ορθή λειτουργία του οικοσυστήματος με αποτέλεσμα να έχουν άμεση επίδραση στην προστασία του φυτού. Με την επικοινωνία, ένα είδος ορχιδέας μπορεί να συμμετάσχει σε οικολογική υποκατάσταση καθώς η ικανότητα ύπαρξης περισσότερων του ενός μυκητιακών συνεργατών ή πολλαπλών επικοινωνιστών σημαίνει γενική οικολογική ανοχή έναντι της απώλειας ενός από αυτούς τους παράγοντες. Λόγω των περιορισμένων αποθεμάτων τροφής, οι σπόροι ορχιδέας είναι

πλήρως εξαρτημένοι από τα θρεπτικά συστατικά που παρέχονται από μυκορριζικές ενώσεις (Swarts & Dixon, 2009).

Στο ανθρώπινο αποτύπωμα από την άλλη συμπεριλαμβάνεται η γεωργία, η υπερβόσκηση, η αστικοποίηση, ο τουρισμός, η παράνομη συλλογή καθώς και η κλιματική αλλαγή (Katsalirou et al., 2017). Οι ανθρώπινες συμπεριφορές επηρεάζουν αρνητικά τις συνθήκες περιβάλλοντος που είναι σημαντικές για την ανάπτυξη και την διατήρηση των ορχιδέων επιταχύνοντας την αλλοίωση των οικοτόπων μέσα από εξάπλωση ασθενειών και παρασίτων, πυρκαγιών και ερημοποίησης (Swarts & Dixon 2009). Έτσι, πολλά είδη ορχιδέων απειλούνται προς εξαφάνιση και γεννάται η ανάγκη για διατήρηση και πολλαπλασιασμό ορισμένων ειδών. Ο πολλαπλασιασμός *in vitro* είναι μια πολλά υποσχόμενη μέθοδος τόσο προστασίας όσο και διατήρησης των ορχεοειδών (Deconninck & Gerakis, 2021) που θα αποφέρει πολλά οφέλη μεταξύ των οποίων είναι η διατήρηση και η προστασία φυτογενετικών πόρων, η ανάπτυξη ενός καινοτόμου ανθοκομικού προϊόντος, η παρασκευή σαλεπιού καθώς και η αποκατάσταση διαταραγμένων οικοσυστημάτων (Katsalirou et al., 2017).

Η συλλογή κονδύλων αυτοφυών ορχεοειδών για παρασκευή σαλεπιού είναι παράνομη. Οι αυτοφυείς ορχιδέες προστατεύονται από την εθνική νομοθεσία (Π.Δ. 67 ΦΕΚ 23Α'/30-1-1981) ενώ το εμπόριο των αυτοφυών ορχεοειδών και των παραγώγων τους απαγορεύεται από τη διεθνή συνθήκη CITES¹. Το έντονο ενδιαφέρον για το σαλέπι, έχει οδηγήσει πολλούς συλλέκτες να συνειδητοποιήσουν ότι η υπερβολική συγκομιδή έχει αρνητικό αντίκτυπο στο πληθυσμό των φυτών. Έχει αναφερθεί ότι η κύρια περίοδος συγκομιδής ήταν συνήθως το φθινόπωρο. Οι συλλέκτες θεώρησαν απαραίτητο να αφήσουν μερικά μόνο μικρότερα φυτά όρθια καθώς υπήρχαν τρύπες στο έδαφος που υποδήλωναν την ήδη παρουσία άλλων

¹ (<https://cites.org/eng/app/appendices.php> (εξακριβώθηκε 2 Ιουνίου 2022).)

συλλεκτών. Πλέον, δεν καταγράφονται αυξημένες συγκομιδές καθώς οι ορχιδέες έχουν γίνει σπάνιες και οι πληθυσμοί που έχουν απομείνει έχουν χάσει την ικανότητα να αναπληρώνουν αυτόν τον ρυθμό συγκομιδής. Το γεγονός αυτό οδηγεί πολλούς εμπόρους να στρέφονται στη νοθεία και στην απόκρυψη προέλευσης του σαλεπιού. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι αυτό μιας εταιρείας που δραστηριοποιείται στην Ελλάδα η οποία πουλούσε αλεσμένο σαλέπι αναμεμειγμένο με άμυλο καλαμποκιού και κοινά μπαχαρικά, όπως κανέλα και μοσχοκάρυδο (Krezίου et al., 2016).

Οι ορχιδέες καταλαμβάνουν κάθε χερσαίο οικοσύστημα, είτε αυτό είναι τροπικό είτε εύκρατο. Στα τροπικά είδη ανήκουν κυρίως τα επίφυτα τα οποία έχουν την ικανότητα να στερεώνονται στην επιφάνεια ενός δέντρου και να προμηθεύονται υγρασία και θρεπτικά συστατικά από τον αέρα και τη βροχή. Αντίθετα, τα γεώφυτα είναι τα φυτά με υπόγεια όργανα (κονδύλους ή ριζώματα και οφθαλμούς) και έχουν την ικανότητα να αντιμετωπίσουν δύσκολες συνθήκες όπως μεγάλο κρύο ή υπερβολική ξηρότητα². Όλα τα Μεσογειακά ορχεοειδή είναι γεώφυτα. Ο ετήσιος κύκλος των εύκρατων ορχεοειδών εξαρτάται από τρεις βασικούς περιβαλλοντικούς παράγοντες: τη θερμοκρασία, το φως και τη βροχόπτωση (GIROS, 1994). Οι ευρωπαϊκές χερσαίες ορχιδέες υπόκεινται σε διάφορες θερμοκρασιακές διακυμάνσεις, οι οποίες ρυθμίζουν τα στάδια της ανάπτυξής τους (Deconnick, 2021). Αυτές θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την καλλιέργειά τους. Συγκεκριμένα, έχουν αναφερθεί δύο κύριες μεταχειρίσεις θερμοκρασίας, η ψυχρή στρωματοποίηση που αφορά κυρίως το φύτρωμα του σπόρου και η εαρινοποίηση που συμβάλλει στην πρόκληση της ανθοφορίας. Μέσω της ανάπτυξης των σπόρων με την υποβολή τους σε ψυχρές μεταχειρίσεις προωθείται η ανθοφορία καθώς δημιουργείται συνήθεια στο

² <https://eo.wikipedia.org/wiki/Kriptofito>(εξακριβώθηκε 25/11/2018)

κρύο και προσαρμόζονται τα φυτά που ανθίζουν την άνοιξη, ιδιότητα που οφείλεται στο μηχανισμό της εαρινοποίησης (Michaels & Amasino, 2000).

Παρά τις πολυάριθμες προσπάθειες καλλιέργειας σπόρων ορχιδέας, μέχρι σήμερα έχουν δημοσιευτεί ελάχιστες πληροφορίες σχετικά με την επίδραση της θερμοκρασίας. Ο βετεράνος εμπειροτέχνης Svante Malmgren έχει πολλαπλασιάσει επιτυχώς πάνω από 200 διαφορετικά είδη ορχιδέας και υβρίδια *in vitro* (Malmgren, 2004), υποστηρίζοντας ότι τα γένη *Ophrys*, *Anacamptis* και *Himantoglossum* επωφελούνται από τη ψυχρή μεταχείριση τουλάχιστον 10-12 εβδομάδων για τη μετέπειτα ανάπτυξη κονδύλων (Malmgren and Nystrom, 2021). Το *Ophrys* είναι ένα γένος που απαντάται στη Νότια και σε κάποιο βαθμό στην Κεντρική και Βόρεια Ευρώπη. Όλες οι *Ophrys*, αρκετές Μεσογειακές *Orchis*, *Serapias* και συγγενή είδη πολλαπλασιάζονται εύκολα με ασυμβιωτικό τρόπο, με την απουσία δηλαδή της συμβίωσης μυκήτων. Αντίθετα, ο συμβιωτικός πολλαπλασιασμός περιλαμβάνει την προσθήκη ενός συμβιωτικού μύκητα (μυκόρριζα) που προστίθεται στο θρεπτικό μέσο κατά τη σπορά. Τα παραπάνω γένη εμφανίζουν υψηλή βλαστικότητα των σπερμάτων και ταχεία ανάπτυξη τόσο στη φύση όσο και σε αποστειρωμένα θρεπτικά μέσα. Τα είδη *Ophrys* μπορούν εύκολα να πολλαπλασιαστούν από σπόρους και η μέθοδός τους μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υπόδειγμα τα οποία με μικρές μόνο αλλαγές μπορεί να τροποποιηθεί για τον πολλαπλασιασμό της *Orchis* /*Anacamptis* και συγγενών γενών.

Η χρονική περίοδος που χρειάζεται από την εμφύτευση μέχρι να αναπτυχθούν ώριμοι κόνδυλοι σε θρεπτικό μέσο διαφέρει από είδος σε είδος, όταν καλλιεργούνται ασυμβιωτικά. Ενώ σε ορισμένα είδη ο σπόρος θα βλαστήσει λίγες μέρες μετά την εμφύτευση, σε άλλα θα χρειαστεί δύο μήνες (Malmgren and Nystrom, 2021)..

Απομένει να γίνει ακόμα αρκετή έρευνα όσον αφορά τις απαιτήσεις της θερμοκρασίας για την ανάπτυξη των κονδύλων. Είναι τεκμηριωμένο ότι η απόκριση

σε καθεστώτα διαφορετικών θερμοκρασιών διαφέρει από είδος σε είδος και είναι ένας πολύ σημαντικός παράγοντας που είναι υπεύθυνος για την έναρξη και τη διακοπή του ληθάργου των σπόρων. Παρόλο που η επίδραση της θερμοκρασίας έχει μελετηθεί στους σπόρους των εύκρατων ορχεοειδών υπάρχει αβεβαιότητα αν τελικά παίζει καθοριστικό ρόλο στην ανάπτυξη τους και ειδικά μεταξύ αλλοπάτριων πληθυσμών του ίδιου είδους (Kauth et al.2011). Επομένως, σημαντικός κρίνεται ο καθορισμός των ιδανικών θερμοκρασιών πρωτίστως για τα βέλτιστα αποτελέσματα πολλαπλασιασμού *in vitro* καθώς και για την προσαρμογή ή μη του κάθε είδους στην κλιματική αλλαγή (Shefferson et al., 2017).

Η παρούσα μελέτη αποτελεί μέρος ενός μεγαλύτερου πειράματος που ξεκίνησε το 2020 (Deconninck, 2021). Στόχος της μελέτης ήταν να διερευνήσει την επίδραση της ψυχρής μεταχείρισης στην ανάπτυξη σποροφύτων ορχιδέας *in vitro* και να προσδιοριστεί εάν οι διάφορες μεταχειρίσεις θερμοκρασίας προάγουν την ανάπτυξη μετά το πέρας του χειμερινού ληθάργου, υπό συνθήκες ασυμβιωτικής καλλιέργειας. Συγκεκριμένα, πρωτοκορμοί χειρσαίων ορχιδεών *Anacamptis laxiflora*, *A.coriphora*, *Himantoglossum hircinum* και *H.robertianum* που αναπτύχθηκαν ασυμβιωτικά *in vitro* υποβλήθηκαν σε διάφορες θερμοκρασιακές μεταχειρίσεις κατά τη διάρκεια οκτώ εβδομάδων: θερμοκρασία περιβάλλοντος μέσα στο εργαστήριο (κατάσταση αναφοράς), ψυγείο σε μέση θερμοκρασία 6,5°C και σε έξι υπαίθριους σταθμούς της Κεφαλονιάς κατά μήκος μιας σημαντικής υψομετρικής βαθμίδας. Οι αρχικές υποθέσεις ήταν οι εξής: 1) η ψυχρή μεταχείριση καθυστερεί την ανάπτυξη των φυτών ως στρεσογόνος παράγοντας, 2) υπάρχει σχέση μεταξύ του τελικού μεγέθους των κονδύλων και της θερμοκρασίας και 3) υπάρχουν διαφορές στο μέγεθος των κονδύλων μεταξύ των διαφορετικών ειδών και κυρίως στα πιο ανθεκτικά στο ψύχος όπως το *H.hircinum* (Deconninck, 2021).

Κατά την πρώτη φάση του πειράματος από τη φοιτήτρια Gwenaëlle Deconinck έγινε η βλάστηση των σπόρων και η μετεμφιάλωση σε νέους περιέκτες. Κατόπιν, η υποβολή των πρωτοκορμών χερσαίων ορχιδεών στις οκτώ θερμοκρασιακές μεταχειρίσεις: θερμοκρασία περιβάλλοντος μέσα στο εργαστήριο, ψυγείο σε μέση θερμοκρασία 6,5°C και στους έξι υπαίθριους σταθμούς. Στη συνέχεια, μετρήθηκε το ποσοστό επιβίωσης και το μήκος του φύτρου στο τέλος της ψυχρής μεταχείρισης και καθ' όλη τη διάρκεια μίας περιόδου «δροσερής» προσαρμογής οκτώ επιπλέον εβδομάδων σε ανοιξιάτικες θερμοκρασίες. Τα αποτελέσματα της εργασίας αυτής, έδειξαν ότι στο εργαστήριο τα σπορόφυτα εμφανίζουν το υψηλότερο ποσοστό επιβίωσης και το μακρύτερο φυτό. Το συμπέρασμα που προέκυψε είναι ότι οι χαμηλές θερμοκρασίες καταπόνησαν τα σπορόφυτα που υποβλήθηκαν σε ψυχρή μεταχείριση και καθυστέρησαν την ανάπτυξή τους, αν και τελικά τα σπορόφυτα που υποβλήθηκαν σε ψυχρή μεταχείριση γεφύρωσαν τη διαφορά με αυτά που δεν υποβλήθηκαν. Μέχρι αυτό το στάδιο δεν έγινε εμφανής η επίδραση της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη των κονδύλων καθώς το μεταπτυχιακό πρόγραμμα της ερευνήτριας ολοκληρώθηκε τον Ιούνιο του 2021, πριν τα σπορόφυτα προλάβουν να εισέλθουν σε θερινό λήθαργο (Deconnick,2021).

Κατά τη δεύτερη φάση, το πείραμα συνεχίστηκε από τη φοιτήτρια Βικτωρία Χατζοπούλου με τη μέτρηση διαστάσεων φύτρου και των κονδύλων (μάζα, ύψος, πλάτος) αφού υπέστησαν αρκετές εβδομάδες υψηλών θερμοκρασιών οι οποίες οδήγησαν σταδιακά τα σπορόφυτα στον θερινό λήθαργο όπως αυτός έγινε αντιληπτός από τη μάρανση των φύτρων και τον μεταχρωματισμό των κονδύλων από λευκό σε κρεμώδες. Η δεύτερη φάση εκτελέστηκε τον Αύγουστο του 2021 ενώ τα αποτελέσματα είναι ακόμα υπό επεξεργασία. Αφού ολοκληρώθηκαν οι μετρήσεις, οι κόνδυλοι επανατοποθετήθηκαν στα δοχεία με ελάχιστο εδαφικό υπόστρωμα και

ελάχιστη υγρασία και αποθηκεύτηκαν σε ζεστό και σκοτεινό δωμάτιο ώστε να γίνει προσομοίωση των συνθηκών του θερινού ληθάργου στη φύση.

Η παρούσα εργασία αφορά την τρίτη φάση του πειράματος, κατά την οποία μετά την ολοκλήρωση του θερινού ληθάργου αφαιρέθηκαν οι κόνδυλοι από το εδαφικό υπόστρωμα και έγινε μέτρηση των διαστάσεων των κονδύλων (μάζα, ύψος) τον Νοέμβριο του 2021. Σκοπός της τρίτης φάσης είναι να διαπιστωθεί αν οι ψυχρές μεταχειρίσεις του προηγούμενου χειμώνα είχαν κάποια επίδραση στο μέγεθος των κονδύλων μετά τον θερινό λήθαργο καθώς και αν οι κόνδυλοι μπορούν στο τέλος να μεταφυτευτούν στο έδαφος για ανθοφορία.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II

ΜΕΘΟΔΟΛΟΓΙΑ

2.1.Συλλογή σπόρων

Είχαν ήδη συλλεχθεί ώριμοι σπόροι διάφορων αυτοφυών ορχεοειδών από την Κεφαλονιά κατά το διάστημα 2016–2020. Οι (θεωρητικά) ανθεκτικότεροι στο ψύχος σπόροι του *Himantoglossum hircinum* είχαν συλλεχθεί από το νησί Ré της Γαλλίας. Η συλλογή των σπερμάτων έγινε με κριτήριο την κατά τόπους αφθονία που εμφάνιζαν τα είδη ώστε να μην απειλείται η επιβίωση του πληθυσμού τους. Αφού απομακρύνθηκε με κοσκίνισμα κάθε ξένη ύλη από τους σπόρους, ακολούθησε η ξήρανσή τους σε ξηραντήρα με silica gel, η σφράγισή τους σε γυάλινα φιαλίδια και η αποθήκευσή τους στους -20 °C μέχρι την εμφύτευση (Deconninck, 2021).

2.2.Εργαστηριακή μέθοδος

Οι σπόροι των διαφόρων ειδών εμφυτεύτηκαν ασυμβιωτικά *in vitro* από τον Μάρτιο έως τον Νοέμβριο του 2020 (Deconninck, 2021). Υπό φυσικές συνθήκες, οι σπόροι των περισσότερων χειρσαίων ειδών ορχιδέας θα βλαστήσουν μόνο σε συνδυασμό με έναν συμβατό συμβιωτικό μύκητα γνωστό ως μυκόρριζα. Λόγω των περιορισμένων αποθεμάτων τροφής, οι σπόροι των ορχεοειδών είναι πλήρως εξαρτημένοι από τα θρεπτικά συστατικά που παρέχονται από τη μυκορριζική ένωση κατά τις πρώιμες φάσεις της βλάστησης (Swarts & Dixon, 2009). Έτσι, η τεχνική του

συμβιωτικού πολλαπλασιασμού περιλαμβάνει την προσθήκη ενός συμβιωτικού μύκητα (μυκόρριζα) στο θρεπτικό μέσο κατά την εμφύτευση. Αντίθετα, η ασυμβιωτική μέθοδος εμφύτευσης γίνεται απουσία μυκήτων. Αντί του μύκητα χρησιμοποιείται ένα υπόστρωμα που παρέχει όλα τα απαραίτητα θρεπτικά που χρειάζονται για την αρχική ανάπτυξη. Η ασυμβιωτική μέθοδος συχνά προτιμάται από τους ερευνητές και τους εμπειροτέχνες γιατί είναι απλούστερη και πιο επαναλήψιμη, καθώς ο χειριστής έχει να διαχειριστεί έναν ζωντανό οργανισμό αντί για δύο.

2.2.1. Προετοιμασία

Το υπόστρωμα της καλλιέργειας ήταν μια τροποποιημένη εκδοχή του “οργανικού” μέσου ανάπτυξης που προτείνει ο βετεράνος εμπειροτέχνης Svante Malmgren (Πίνακας 1). Ο όρος “οργανικό” αναφέρεται στην πηγή N, ένα μείγμα αμινοξέων γνωστό ως Vaminolac[®], σε αντιδιαστολή με ανόργανες μορφές N. Έπειτα, ακολούθησε ανάμειξη και εν συνεχεία ρύθμιση του pH σε 5,5-6,0 με μερικές σταγόνες διαλύματος H₂SO₄ συγκέντρωσης 3 M (Deconninck, 2021).

Πίνακας 1. Συνταγή για το τροποποιημένο οργανικό θρεπτικό μέσο (υπόστρωμα).

Υλικά	Ποσότητα
Μεταλλικό Νερό ¹	1L
Σακχαρόζη	12.5 g
KH ₂ PO ₄	75 mg
MgSO ₄ ·7H ₂ O	150 mg
CaHPO ₄	100 mg ²
H ₃ BO ₃	10 mg
Ενεργός άνθρακας	750 mg
Άγαρ Δανίας	10 g
Vaminolac® ³	4.6 mL
Χυμός ανανά	20 mL
3 M H ₂ SO ₄ για ρύθμιση του pH	~ 10 σταγόνες
Πατάτα	1 cm ³ για κάθε δοχείο καλλιέργειας

¹ Βίκος (Ιωάννινα, Ελλάδα)

² Ισοδυναμεί με 75 mg Ca₃(PO₄)₂ πρωτότυπης φόρμουλας

³ Fresenius Kabi, (Ουψάλα, Σουηδία)

2.2.2. Προετοιμασία υλικών

Οι εμφυτεύσεις εκτελέστηκαν μέσα σε θάλαμο διαστρωματικής ροής αφού είχε προηγηθεί απολύμανση επιφανειών και έκθεση των υλικών σε μικροβιοκτόνο λάμπα υπεριωδών ακτίνων UVC (Deconninck, 2021).

2.2.3. Εμφύτευση

Οι σπόροι απολυμάνθηκαν σε δοκιμαστικούς σωλήνες Sarstedt® των 15mL με βιδωτό πώμα. Σε κάθε δοκιμαστικό σωλήνα τοποθετήθηκαν 90 mg σπόρου από κάθε είδος. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες πληρώθηκαν με διάλυμα NaClO συγκέντρωσης 0,5%. Μετά από την πάροδο αρκετών λεπτών, τα εναιωρήματα μεταφέρθηκαν σε κωνικές φιάλες Erlenmeyer και με τη χρήση απολυμασμένου ηθμού ανακτήθηκαν οι σπόροι. Μετά τη διήθηση των εναιωρημάτων, ακολούθησε ξέπλυμα του διηθητικού χαρτιού που περιείχε τους σπόρους με αποστειρωμένο απιονισμένο νερό. Κάθε δοχείο καλλιέργειας είχε πληρωθεί με 16 mL στείρου θρεπτικού μέσου και έναν κύβο πατάτας. Σε κάθε δοχείο καλλιέργειας, τοποθετήθηκε ποσότητα σπόρου περίπου 4mg. Πριν και μετά τη μετάγγιση των σπόρων στα δοχεία αποστειρώνονταν οι άκρες των ατσάλινων εργαλείων με λύχνο αλκοόλης. Μετά την εμφύτευση, τα δοχεία επωάστηκαν σε σκοτεινό δωμάτιο σε θερμοκρασία περιβάλλοντος 22 °C. Σε τακτά χρονικά διαστήματα, όλα τα δοχεία εξετάζονταν οπτικά για τυχόν ανάπτυξη αποικιών μυκήτων και βακτηρίων (Deconninck, 2021).

2.2.4. Μετεμφιάλωση

Οι σπόροι που φύτεψαν και σχημάτισαν το αρχέγονο όργανο που ονομάζεται πρωτοκορμός, αραιώθηκαν και μετεμφιαλώθηκαν σε δοχεία με νέο θρεπτικό μέσο. Αρχικά, έγινε αποστείρωση υλικών και περιεκτών. Οι περιέκτες πληρώθηκαν εκ νέου με 30 mL αποστειρωμένου θρεπτικού μέσου και έναν κύβο πατάτας. Έπειτα από την στερεοποίηση του θρεπτικού μέσου, οι πρωτοκορμοί μεταφέρθηκαν από το παλιό στο νέο μέσο μέσω ατσάλινης λαβίδας η οποία αποστειρώθηκε στη φλόγα. Οι πρωτοκορμοί τυχαιοποιήθηκαν μεταξύ δοχείων λόγω της διαφοράς που παρουσίαζαν στον ρυθμό ανάπτυξης. Ο τελικός αριθμός των δοχείων για το πείραμα εξαρτήθηκε από τον αριθμό των αρχικά διαθέσιμων πρωτοκορμών για κάθε είδος και ήταν 1960 για *A. coriophora*, 1600 για *A. laxiflora* και *H. robertianum*, και 320 for *H. hircinum* με τελικό αποτέλεσμα 392, 320, 320 και 64 δοχεία καλλιέργειας αντίστοιχα για κάθε είδος (Deconninck, 2021).

2.3. Πειραματική μεταχείριση

Για να διαπιστωθεί αν η θερμοκρασία αποτελεί παράγοντα ο οποίος διαφοροποιεί την ανάπτυξη των σποροφύτων, τα δοχεία υποβλήθηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες επί οκτώ εβδομάδες:

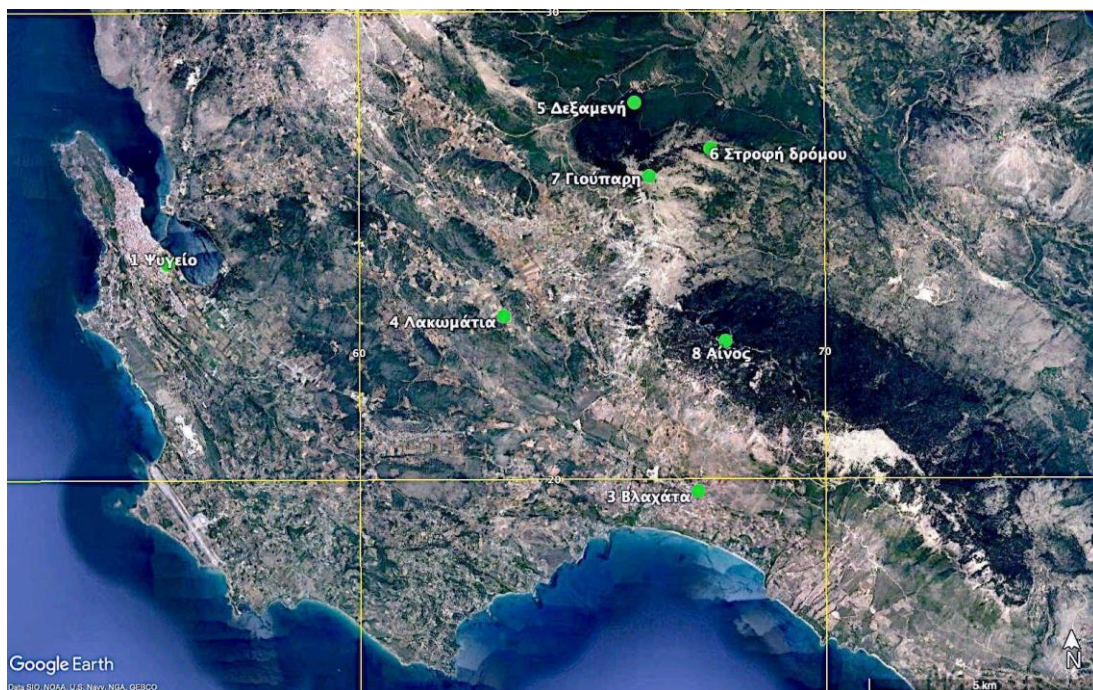
- 1) Θερμοκρασία δωματίου περίπου 20°C στο Εργαστήριο Εδαφολογίας
- 2) Ψύξη σε ψυγείο με διαφανή πόρτα περίπου στους 6,5°C

3) Διαφορετικές θερμοκρασίες περιβάλλοντος σε έξι υπαίθριους σταθμούς με σημαντική υψομετρική βαθμίδα από 238 έως 1291 m (Πίν. 2, Εικ. 1).

Τα δοχεία τυχαιοποιήθηκαν και διαμοιράστηκαν σε οκτώ τελάρα (ένα για κάθε μεταχείριση) καλυμμένα με λεπτό πλέγμα και ημιδιαφανείς πλαστικές σακούλες τόσο για την προστασία τους από βροχή και τα άγρια ζώα όσο και για να μπορούν να εκτίθενται σε ασθενή φωτισμό. Ο φωτισμός στη μεταχείριση Ψυγείο παρέχονταν από λαμπτήρες φθορισμού με ψυχρό λευκό φως προσαρμοσμένους έξω από τη διαφανή πόρτα με φωτοπερίοδο 12 ωρών. Στους υπαίθριους σταθμούς τα κιβώτια τοποθετήθηκαν σε σκιά για να εμποδιστεί η υπερβολική θέρμανση από το ηλιακό φως. Οι θερμοκρασίες καταγράφονταν ανά μία ώρα με καταγραφείς θερμοκρασίας που ήταν κλεισμένοι σε ένα δοχείο καλλιέργειας που είχε τοποθετηθεί στο κέντρο κάθε τελάρου (Πίνακας 3). Η διαδικασία της ψυχρής μεταχείρισης ξεκίνησε στις 25 Ιανουαρίου 2021 με διάρκεια 8 εβδομάδων έως τις 23 Μαρτίου 2021. Έπειτα, όλα τα τελάρα συγκεντρώθηκαν και τοποθετήθηκαν στα Λακωμάτια, τοποθεσία ενδιάμεσου υψομέτρου (492 m) με σκοπό τον σταδιακό εγκλιματισμό στις θερμοκρασίες της άνοιξης για οκτώ επιπλέον εβδομάδες (Εικ. 2). Το μήκος του φύτρου μετρήθηκε τρεις φορές κατά τη διάρκεια της περιόδου εγκλιματισμού. Για το τέλος του πειράματος είχε προγραμματιστεί η μέτρηση των τελικών διαστάσεων των κονδύλων και η ζύγιση της ξηρής μάζας τους, πλην όμως η διάρκεια του μεταπτυχιακού προγράμματος της ερευνήτριας είχε στο μεταξύ λήξει (Deconninck, 2021).

Πίνακας 2 . Θέση και υψόμετρο πάνω από την επιφάνεια της θάλασσας των μεταχειρίσεων θερμοκρασίας (Deconninck, 2021).

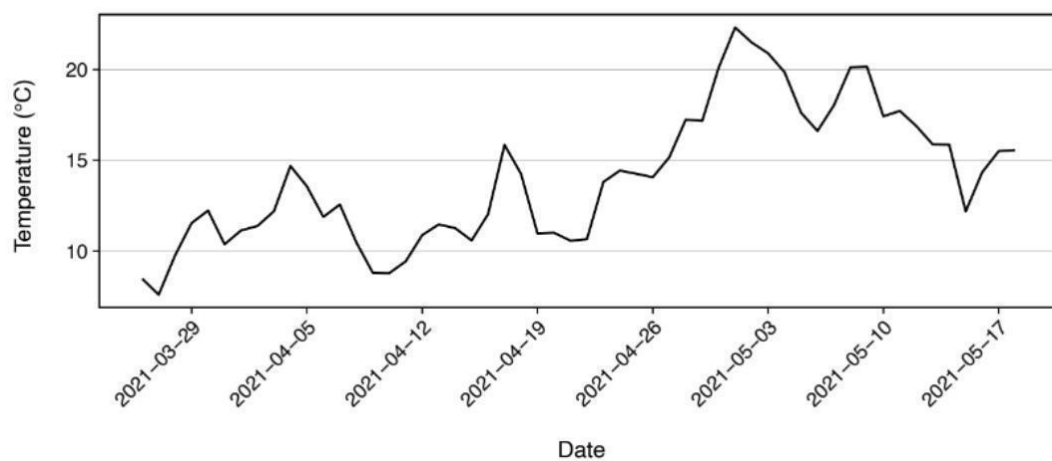
#	Τοποθεσία	Συντεταγμένες	Υψόμετρο (m)	Υψομετρική Διαφορά (m)
1	Ψυγείο	34SDH5587824633	6	-
2	Εργαστήριο	34SDH5587824633	6	-
3	Βλαχάτα	34SDH6726319739	238	232
4	Λακωμάτια	34SDH6310023485	492	254
5	Δεξαμενή	34SDH6591928049	707	215
6	Δρόμος	34SDH6754527061	916	209
7	Γιούπαρη	34SDH6622926477	1122	206
8	Αίνος	34SDH6785422948	1291	169



Εικόνα 1. Θέσεις σταθμών με υψομετρική διαφορά που υποβλήθηκαν τα δοχεία στο νησί της Κεφαλονιάς.

Πίνακας 3 . Ελάχιστη, μέγιστη, μέση $\pm$ τυπική απόκλιση (SD) της ωριαίας θερμοκρασίας ($^{\circ}\text{C}$) και μέση $\pm$ τυπική απόκλιση (SD) των ημερήσιων διακυμάνσεων της θερμοκρασίας ($^{\circ}\text{C}$) εντός των δοχείων κατά τη διάρκεια των οκτώ εβδομάδων ψυχρής μεταχείρισης από τις 25 Ιανουαρίου έως τις 23 Μαρτίου 2021 (Deconninck, 2021).

#	Τοποθεσία	Ελάχιστη	Μέγιστη	Μέση $\pm$ (SD)	Μέση $\pm$ διακυμάνσεων
1	Ψυγείο	4.5	11.0	6.9 ± 0.7^a	1.6 ± 0.9^a
2	Εργαστήριο	14.0	25.5	18.4 ± 1.6^b	3.7 ± 1.7^b
3	Βλαχάτα	3.1	19.9	11.9 ± 3.2^c	7.5 ± 1.9^c
4	Λακωμάτια	0	15.3	8.2 ± 3.1^d	6.5 ± 2.3^d
5	Δεξαμενή	-0.1	17.6	7.9 ± 2.7^e	6.0 ± 2.5^e
6	Δρόμος	-0.2	14.7	6.7 ± 2.6^a	4.4 ± 2.2^f
7	Γιούπαρη	-1.6	17.2	5.9 ± 3.0^g	6.2 ± 2.5^e
8	Αίνος	-0.1	14.9	5.9 ± 2.6^g	4.1 ± 2.6^g



Εικόνα 2. Ημερήσια μέση θερμοκρασία στο εσωτερικό των δοχείων καλλιέργειας κατά τη διάρκεια των οκτώ εβδομάδων ομαλής προσαρμογής μετά το τέλος των θερμοκρασιακών μεταχειρίσεων στη θέση Λακωμάτια (26 Μαρτίου - 19 Μαΐου 2021, Deconninck, 2021).

2.4 Δεύτερη φάση του πειράματος

Το πείραμα συνεχίστηκε από τη φοιτήτρια Βικτωρία Χατζοπούλου τον Αύγουστο του 2021 με τη μέτρηση διαστάσεων φύτρου και των κονδύλων (μάζα, ύψος, πλάτος) πριν από την είσοδό τους στον θερινό λήθαργο (αδημοσίευτα δεδομένα). Αφού ολοκληρώθηκε η διαδικασία αυτή, έγινε επανατοποθέτηση των κονδύλων στα δοχεία καλλιέργειας με ελάχιστο εδαφικό υπόστρωμα. Αφού προστέθηκε ελάχιστο νερό σε κάθε δοχείο, πωματίστηκαν χαλαρά και αποθηκεύτηκαν σε ζεστό και σκοτεινό δωμάτιο ώστε να γίνει προσομοίωση των συνθηκών του θερινού ληθάργου στη φύση.

2.5 Τρίτη φάση του πειράματος

Η τρίτη φάση του πειράματος η οποία αποτελεί αντικείμενο της παρούσας εργασίας ξεκίνησε στις 23 Νοεμβρίου 2021 με την μέτρηση του μήκους φύτρου και της ξηρής μάζας των κονδύλων μετά τη λήξη του θερινού ληθάργου και την επανέναρξη της βλάστησης.

2.6 Υλικά

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στη διαδικασία αυτή είναι τα εξής :

- I. Δύο λεκάνες οικιακής χρήσης
- II. Απιονισμένο νερό
- III. Κόσκινο μικρού μεγέθους
- IV. Ζυγός ακριβείας
- V. Χάρακας

2.7 Διαδικασία

Συγκεκριμένα, το κάθε τελάρο-μεταχείριση περιείχε δοχεία και από τα τέσσερα είδη, *Anacamptis laxiflora*, *A.coriophora*, *Himantoglossum hircinum* και *H.robertianum*. Αρχικά, έγινε εξαγωγή των κονδύλων από κάθε δοχείο. Η εργασία οργανώθηκε ανά τελάρο-μεταχείριση. Στην συνέχεια, οι κόνδυλοι τοποθετήθηκαν σε κόσκινο που ήταν τοποθετημένο μέσα στην λεκάνη και ξεπλύθηκαν με απιονισμένο νερό ώστε να απομακρυνθούν τα κατάλοιπα εδάφους. Αφού απορροφήθηκε το νερό με απορροφητικό χαρτί, ο κάθε κόνδυλος τοποθετήθηκε ξεχωριστά σε ζυγό ακριβείας. Καταγράφηκε η μάζα και τέλος μετρήθηκε το μήκος του φύτρου και του κονδύλου με το χάρακα. Για όσους κόνδυλους δεν είχαν παρουσιάσει ανάπτυξη φύτρου γινόταν η καταγραφή μόνο της μάζας. Στο τέλος, τοποθετήθηκαν προσεκτικά πάλι στο δοχείο καλλιέργειας, με το φυτό να προεξέχει από την επιφάνεια του εδαφικού μίγματος. Στις περιπτώσεις που κάποια δοχεία δεν είχαν κόνδυλους λόγω μη επιβίωσης, το εδαφικό μίγμα φυλάχτηκε σε μια λεκάνη για να επαναχρησιμοποιηθεί. Αυτή η διαδικασία επαναλήφθηκε για τις οκτώ μεταχειρίσεις: Εργαστήριο, Ψυγείο και για τους έξι υπαίθριους σταθμούς. Στο τέλος, όλα τα δοχεία τοποθετήθηκαν προσωρινά σε σκοτεινό δωμάτιο για σύντομο χρονικό διάστημα μέχρι να γίνει η μεταφύτευσή τους σε γλάστρες (Παράρτημα 1) .

2.8 Στατιστική Ανάλυση

Για κάθε μεταχείριση υπολογίστηκε ο μέσος όρος του μήκους του φύτρου (mm) και της μάζας (g) οι οποίες ορίστηκαν ως εξαρτημένες μεταβλητές προκειμένου να

περιγράφουν τις διαφορές ανάπτυξης μεταξύ των φυτών (Εικόνα ,). Τα αποτελέσματα των μεταχειρίσεων για τα είδη *Himantoglossum hircinum* και *H. robertianum* δεν ήταν επαρκή για στατιστική ανάλυση, καθότι κάποιες μεταχειρίσεις δεν είχαν καμία παρατήρηση, οπότε η ανάλυση περιορίστηκε στα είδη *Anacamptis laxiflora* και *A.coriorphora*. Τα βήματα ήταν τα εξής:

➤ Στο πρόγραμμα υπολογιστικών φύλλων:

1. Αναζήτηση τυχόν κενών γραμμών και αφαίρεση αυτών
2. Αναζήτηση για πρόδηλα σφάλματα στις αριθμητικές τιμές (π.χ., απουσία υποδιαστολής ή τελεία αντί για κόμμα)
3. Στα δοχεία με παραπάνω από έναν κόνδυλο, αντιγραφή και επικόλληση των πληροφοριών που λείπουν
4. Αναζήτηση για μη επιζώντες κονδύλους (διάμετρος κάτω από 1 mm) και διαγραφή αυτών
5. Δημιουργία γραφικών παραστάσεων
6. Αποθήκευση αρχείου δεδομένων ως csv
7. Μεταφορά δεδομένων από το υπολογιστικό φύλλο (στήλες γένους, είδους, μεταχείρισης, αριθμών μεταχείρισης, αριθμών δοχείων, αριθμών κονδύλων, μετρήσεις μήκους φύτρου και μάζας των κονδύλων) σε μορφή csv στο JMP.

Η μορφή csv (comma separated values) είναι ένα οριοθετημένο αρχείο κειμένου που χρησιμοποιεί κόμματα για να διαχωρίσει τιμές. Η χρήση του κόμματος ως διαχωριστικού πεδίου είναι η πηγή του ονόματος για αυτήν τη μορφή αρχείου. Κάθε γραμμή του αρχείου αποτελεί μια εγγραφή δεδομένων

για έναν κόνδυλο. Κάθε εγγραφή αποτελείται από ένα ή περισσότερα πεδία, διαχωρισμένα με κόμμα. Ένα αρχείο csv συνήθως αποθηκεύει δεδομένα πίνακα (αριθμούς και κείμενο) σε απλό κείμενο, οπότε κάθε γραμμή θα έχει τον ίδιο αριθμό πεδίων.

➤ Στο πρόγραμμα *JMP*:

1. Επιλογή των δύο εξαρτημένων μεταβλητών, μήκος φύτρου (mm) και μάζα (g) για τη δοκιμή ομοιομορφίας διασποράς.
2. Έλεγχος των κατανομών κάθε μεταβλητής και ειδικά των ακραίων τιμών για τυχόν σφάλματα.
3. Επίσης, αν ο αριθμός των παρατηρήσεων N συμφωνεί με το αρχείο του υπολογιστικού φύλλου. Αυτό αποτελεί μέσο επαλήθευσης τυχόν σφαλμάτων και δίνει τη δυνατότητα διόρθωσης.
4. Στη συνέχεια, επιλέγουμε τις μεταβλητές X , Y και τις εντολές Analyse -> Fit Y by X -> Unequal Variances.

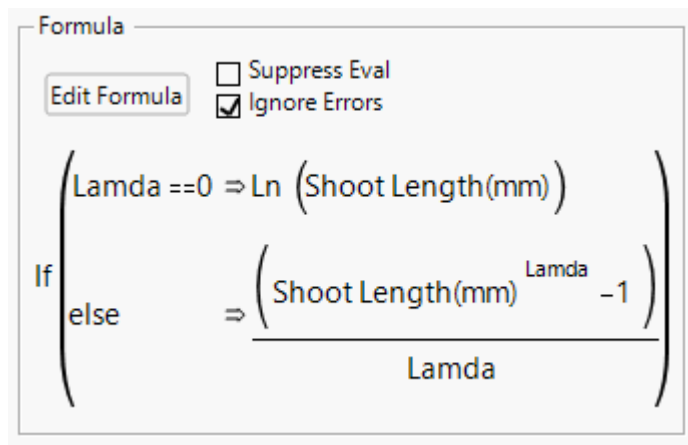
Σε αυτό το σημείο ελέγχουμε τη δοκιμή Levene και τη τιμή p της δοκιμής. Η δοκιμή Levene είναι μία στατιστική δοκιμή που χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση της ομοιογένειας των διασπορών για μια μεταβλητή που μετρήθηκε σε δύο ή περισσότερα δείγματα³. Αν $p < 0,05$ σημαίνει ότι η δοκιμή απέτυχε να επαληθεύσει την ομοιογένεια των διασπορών μεταξύ των μεταχειρίσεων, οπότε συμπληρώνουμε ένα αρνητικό σύμβολο (-) στον σχετικό πίνακα (Πίν. 2). Αν $p > 0,05$ η δοκιμή θεωρείται επιτυχής, οπότε σημειώνουμε στον πίνακα την ακριβή τιμή του p . Στη στατιστική, η τιμή p είναι η πιθανότητα να ληφθούν αποτελέσματα τουλάχιστον τόσο ακραία όσο τα παρατηρούμενα αποτελέσματα μιας δοκιμής στατιστικής υπόθεσης, με

³ https://en.wikipedia.org/wiki/Levene%27s_test (εξακριβώθηκε 8/05/2022)

την προϋπόθεση ότι η μηδενική υπόθεση είναι σωστή. Όσο χαμηλότερη είναι η τιμή p , τόσο μεγαλύτερη είναι η στατιστική σημασία της διαφοράς. Μια τιμή $p < 0,05$ ή χαμηλότερη θεωρείται, γενικά, στατιστικά σημαντική (<https://www.investopedia.com/terms/p/p-value.asp>).

Για όσες δοκιμές ομοιογένειας διασποράς βγήκαν θετικές με βάση τη δοκιμή Levene ακολούθησε έλεγχος με τη δοκιμή κανονικότητας των κατανομών των μεταχειρίσεων με τη δοκιμή κανονικότητας Shapiro -Wilk. Για όσες δοκιμές ομοιογένειας διασποράς βγήκαν αρνητικές, δοκιμάστηκαν διάφοροι μετασχηματισμοί των πρωτογενών μεταβλητών και επαναλήφθηκαν οι ίδιες δοκιμές στις μετασχηματισμένες μεταβλητές. Δύο συνηθισμένοι μετασχηματισμοί για διορθωθούν ατέλειες στην κανονικότητα των κατανομών είναι η τετραγωνική ρίζα και η οικογένεια μετασχηματισμών Box-Cox (Samuel Sanford Shapiro και Martin Wilk, 1965). Το Box-Cox είναι ένας μετασχηματισμός μη κανονικών εξαρτημένων μεταβλητών σε κανονική κατανομή, δεδομένου ότι η κανονικότητα είναι μια σημαντική προϋπόθεση για τις επόμενες στατιστικές δοκιμές. Σε αυτό το σημείο προσθέτουμε στο φύλλο δεδομένων του λογισμικού *JMP* πέντε επιπλέον στήλες, $\sqrt{\text{shoot length}}$, $\sqrt{\text{mass}}$, $\text{box-cox}(\text{shoot length})$, $\text{box-cox}(\text{mass})$ και την παράμετρο λ .

1. Η προσθήκη των στηλών αυτών γίνεται με Cols-> New columns-> Name->Lock-> Data type(Numeric)-> Modeling Type(Continues) -> Column Properties(Formula) -> Ok.
2. Στο πεδίο no formula προσθέτουμε τη μεταβλητή που θέλουμε X ή Y με τον αντίστοιχο τύπο μετασχηματισμού μέσω της τετραγωνικής ρίζας ή του μετασχηματισμού Box-Cox (Εικ. 3).

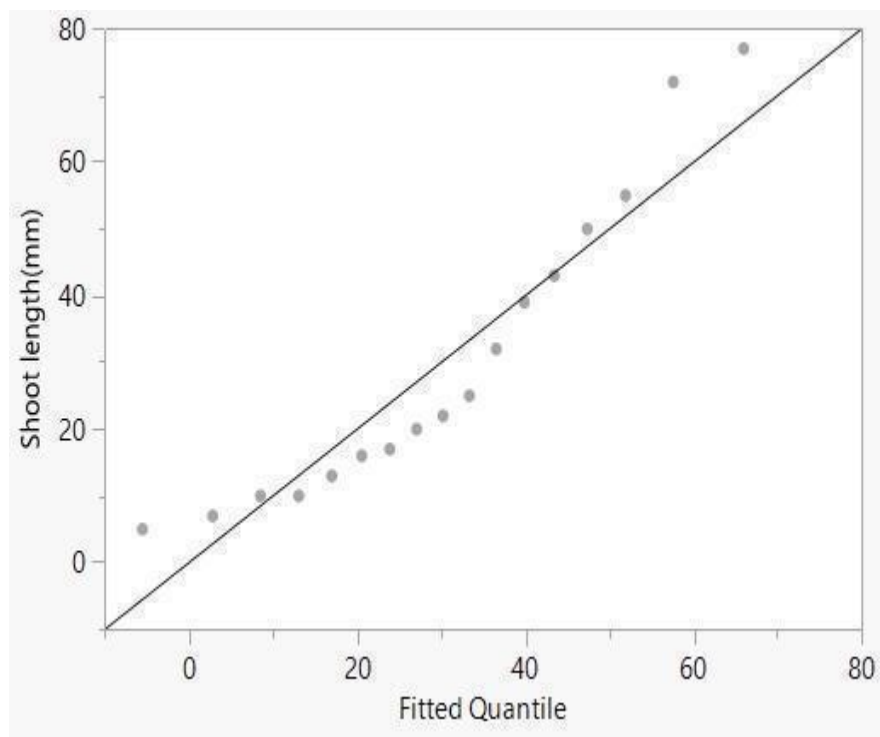


Εικόνα 3. Τύπος του μετασχηματισμού Box-Cox στο *JMP*.

3. Για τον μετασχηματισμό Box-Cox η διαδικασία επαναλαμβάνεται ώστε να δοκιμαστεί ικανό εύρος τιμών για την παράμετρο λ , συγκεκριμένα όλες οι ακέραιες τιμές από -5 έως +5. Παρατηρούμε και σημειώνουμε αν το p αν είναι μεγαλύτερο ή μικρότερο του 0,05.

Εκτός από τον στατιστικό έλεγχο για την κανονικότητα της κατανομής, πραγματοποιήθηκε και γραφικός έλεγχος με τα γραφήματα Normal Q-Q Plot. Το Q-Q Plot είναι μια γραφική αναπαράσταση ποσοστών μιας κατανομής (Εικ. 4). Πραγματοποιείται σύγκριση της αθροιστικής κατανομής της μεταβλητής με την αθροιστική κατανομή της κανονικής κατανομής. Σε περίπτωση που η μεταβλητή έχει κανονική κατανομή, τα σημεία αυτής συγκεντρώνονται στη διαγώνιο που πηγαίνει ανοδικά από αριστερά προς δεξιά (Q- Q Plot). Τα βήματα αυτής της διαδικασίας αυτής στο λογισμικό JMP ήταν τα εξής:

1. Analyze-> Distribution-> Y= Tuber Shoot length, Tuber mass και για By= Treatment ->Ok
2. Stack στα γραφήματα, για κάθε Y επιλογή Continuous Fit-> Normal, μετά Fitted Normal-> Diagnostic Plot->Q-Q plot.



Εικόνα 4. Γραφική παράσταση Q-Q Plot για το μήκος του φύτρου του είδους *Anacamptis laxiflora* σταθμού Αίνου. Σε αυτή τη περίπτωση η δοκιμή κανονικότητας αποτυγχάνει καθώς τα σημεία της μεταβλητής δεν συγκεντρώνονται όλα πάνω ή κοντά στη διαγώνιο.

Έπειτα, για όσες δοκιμές ομοιογένειας διασπορών και κανονικότητας κατανομών βγήκαν αρνητικές, ακολούθησαν μη παραμετρικές συγκρίσεις των μέσων όρων των οκτώ μεταχειρίσεων με τη δοκιμή Steel-Dwass⁴. Στην περίπτωση αυτή, πραγματοποιήθηκαν μη παραμετρικές δοκιμές καθώς οι δύο βασικές προϋποθέσεις

⁴ (<https://www.jmp.com/support/notes/35/406.html>)

για τις παραμετρικές δοκιμές (ομοιογένεια της διασποράς και κανονικότητα των κατανομών) δεν εκπληρώθηκαν (Πίν. 4 και 5).

Για τις μη παραμετρικές δοκιμές, η διαδικασία στο λογισμικό JMP έχει ως εξής:

Analyze, Fit X by Y, επιλογή NonParametric-> Nonparametric Multiple Comparisons -> Steel- Dwass All Pairs.

Όσες μεταχειρίσεις έχουν $p < 0,05$ εμφανίζονται στην οθόνη με χρωματιστές τιμές. Ακολουθεί η τοποθέτηση γραμμάτων πάνω από στις στήλες των μεταχειρίσεων. Ίδιο γράμμα σηματοδοτεί μη στατιστικώς σημαντική διαφορά ενώ διαφορετικό σηματοδοτεί στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων των μεταχειρίσεων (Εικ. 6).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ III

ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1 Επιβίωση φυτού

Μετά από την ψυχρή μεταχείριση των σποροφύτων ορχιδέας *in vitro* παρατηρήθηκε υψηλός αριθμός επιβίωσης των φυτών για το γένος *Anacamptis* αλλά όχι για το γένος *Himantoglossum* (Εικ. 5). Συγκεκριμένα, το είδος *Anacamptis laxiflora* παρουσιάζει υψηλό τελικό αριθμό κονδύλων στη θέση Στροφή Δρόμου (71), το *A.coriorphora* στο Εργαστήριο (111) ενώ τα *Himantoglossum robertianum* στο Εργαστήριο και στη θέση Αίνος (4) και το *H.hircinum* στη θέση Δεξαμενή (2). Το γένος *Himantoglossum* εμφάνισε χαμηλό αριθμό επιβίωσης με το είδος *H. hircinum* να παρουσιάζει το χαμηλότερο αριθμό επιβίωσης (Εικ. 7).

3.2 Μήκος κονδύλου

Οπτικά, παρατηρούνται σημαντικές διαφορές στο μέσο μήκος του κονδύλου ανάλογα με τη μεταχείριση. Αρχικά, τα φύτρα με το μέσο μεγαλύτερο μήκος σημειώθηκαν στη μεταχείριση Αίνος για τα *Anacamptis laxiflora* (30 mm) και για *A.coriorphora* (45 mm). Οι μικρότερες μέσες τιμές για το μήκος κονδύλου αντίθετα σημειώθηκαν για τα *Anacamptis laxiflora* στη μεταχείριση Εργαστήριο (3 mm) και για *A.coriorphora* στη μεταχείριση ψυγείο με (12 mm). Όσον αφορά το είδος *Himantoglossum robertianum*, σημειώθηκε μηδενικό μήκος φύτρου για όλες τις μεταχειρίσεις εκτός τον Αίνο (47 mm) και Στροφή Δρόμου με τιμή (25 mm) καθώς και για το είδος *H. hircinum* με εξαίρεση τη θέση Στροφή Δρόμου (6 mm) και τη θέση Δεξαμενή (3 mm).

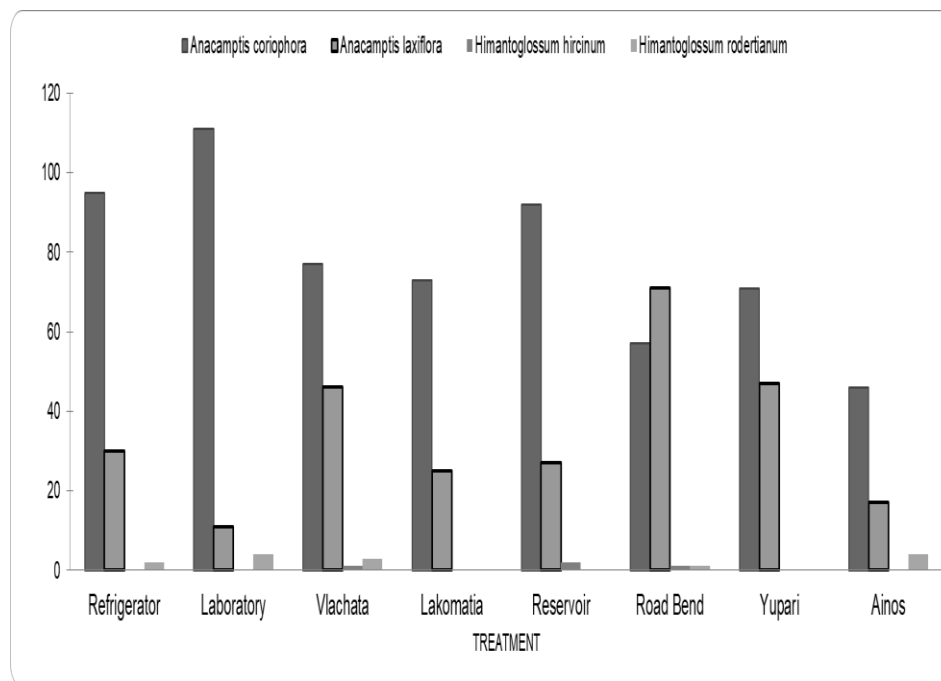
Στατιστικά, το μήκος φύτρου στο είδος *Anacamptis laxiflora* φαίνεται να μη διαφέρει σημαντικά μεταξύ κάποιων μεταχειρίσεων, δηλαδή να έχουν το ίδιο σύμβολο ενώ οπτικά να διαφέρουν. Μια τέτοια περίπτωση είναι οι μέσοι όροι μεταξύ των μεταχειρίσεων Λακωμάτια, Γιούπαρη, και Δεξαμενή, μεταξύ των μεταχειρίσεων Στροφή Δρόμου με Αίνος καθώς επίσης μεταξύ των μεταχειρίσεων Ψυγείο και Εργαστήριο και μεταξύ των μεταχειρίσεων Βλαχάτα με Λακωμάτια. Στο είδος *A.coriophora* παρατηρείται οπτική και στατιστική διαφορά μεταξύ των μεταχειρίσεων Δεξαμενή, Στροφή Δρόμου και Γιούπαρη καθώς και μεταξύ των μεταχειρίσεων Στροφή Δρόμου, Γιούπαρη και Αίνος. Ακόμα, διαφέρουν σημαντικά η μεταχείριση Βλαχάτα και Στροφή Δρόμου και οι μεταχειρίσεις Εργαστήριο, Βλαχάτα και Δεξαμενή (Εικ. 6).

3.3 Μάζα

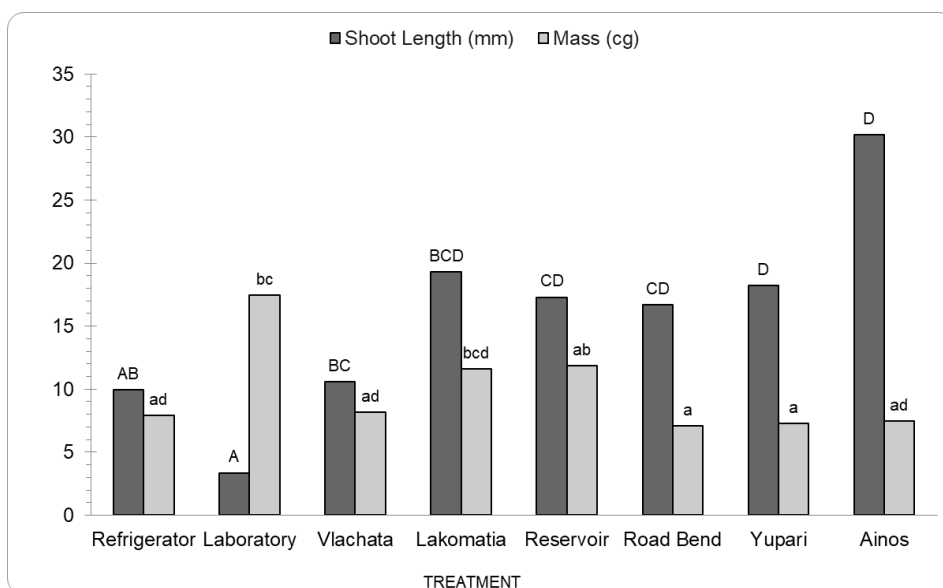
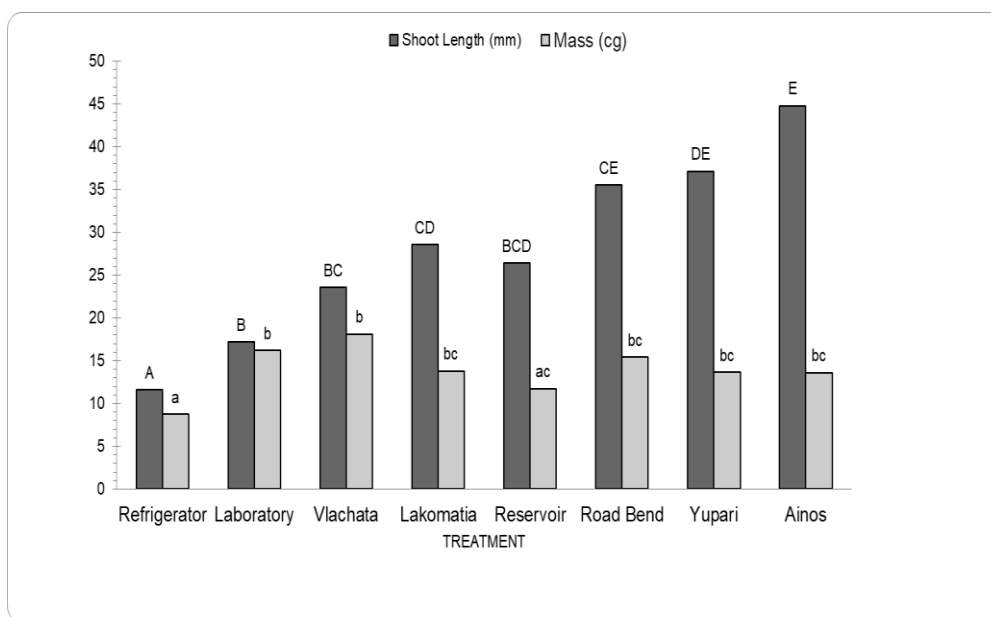
Ο μέσος όρος της μάζας ολόκληρου του σπορόφυτου φαίνεται να ποικίλει από μεταχείριση σε μεταχείριση. Συγκεκριμένα, το είδος *Anacamptis laxiflora* παρουσιάζει τη μεγαλύτερη τιμή μάζας στη μεταχείριση Εργαστήριο (17 cg) ενώ το *A.coriophora* στη μεταχείριση Βλαχάτα (18 cg). Στο είδος *Anacamptis laxiflora* η χαμηλότερη τιμή ήταν η (7 cg) για τις μεταχειρίσεις Δρόμος, Γιούπαρη και Αίνος ενώ στο *A.coriophora* (9 cg) για τη μεταχείριση Ψυγείο. Το είδος *Himantoglossum robertianum* παρουσίασε την υψηλότερη τιμή στο Ψυγείο (18 cg) και τις χαμηλότερες οι οποίες ήταν μηδενικές στις μεταχειρίσεις Γιούπαρη, Δεξαμενή και Λακωμάτια, ενώ το *H. hircinum* παρουσιάζει υψηλή τιμή (29 cg) στη Δεξαμενή και μηδενικές στις μεταχειρίσεις Ψυγείο, Εργαστήριο, Λακωμάτια, Γιούπαρη και Αίνος.

Στατιστικά, όσον αφορά τη μεταβλητή μάζα στο είδος *Anacamptis laxiflora* κάποιες από τις μεταχειρίσεις έχουν το ίδιο γράμμα παρά την προφανή διαφορά

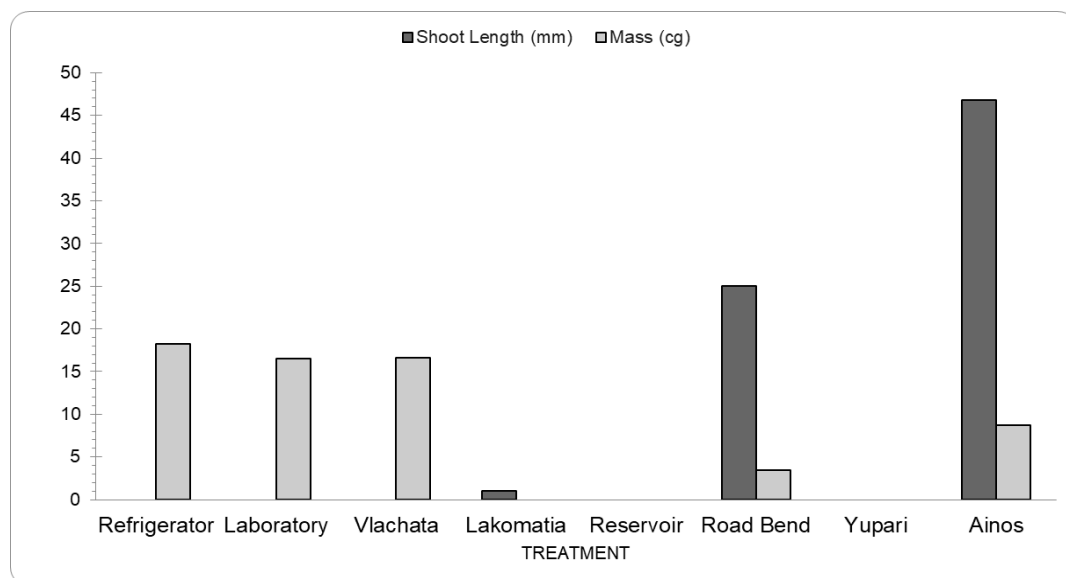
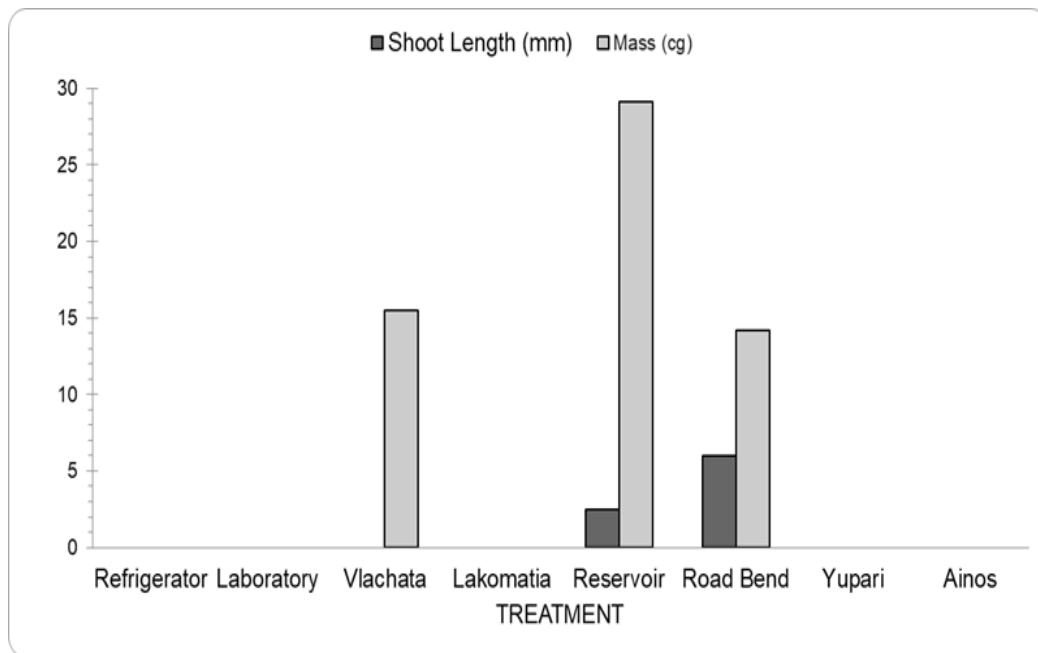
μεταξύ τους. Μια τέτοια περίπτωση είναι οι μεταχειρίσεις Εργαστήριο, Λακωμάτια και Δεξαμενή, καθώς επίσης οι μεταχειρίσεις Δεξαμενή, Ψυγείο, Βλαχάτα, Στροφή Δρόμου, Γιούπαρη και Αίνος. Στο είδος *A.coriophora* η μεταβλητή της μάζας δεν παρουσιάζει στατιστική διαφορά μεταξύ των μεταχειρίσεων.



Εικόνα 5. Μέσος όρος επιβίωσης μετά από τη ψυχρή μεταχείριση οκτώ εβδομάδων των σποροφύτων για τα γένη *Anacamptis* και *Himantoglossum*.



Εικόνα 6 . Επάνω *Anacamptis coriophora*, Κάτω *Anacamptis laxiflora*. Ίδιο γράμμα σηματοδοτεί μη στατιστικώς σημαντική διαφορά ενώ διαφορετικό σηματοδοτεί στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων των μεταχειρίσεων.



Εικόνα 7. Ο μέσος όρος του μήκους φύτρου και της μάζας όπου χρησιμοποιήθηκαν ως εξαρτημένες μεταβλητές για να εξηγηθούν οι διαφορές ανάπτυξης μεταξύ των φυτών: Επάνω *Himantoglossum hircinum* και Κάτω *Himantoglossum robertianum*.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV

ΣΥΖΗΤΗΣΗ

4.1 Επιβίωση φυτού

Οι διαφορές στην επιβίωση των πρωτοκορμών που παρατηρήθηκαν κατά την πρώτη φάση του πειράματος μπορούν να αποδοθούν στο στάδιο ανάπτυξής τους κατά την έναρξη του πειράματος. Τα διαφορετικά είδη δεν ξεκίνησαν ακριβώς από το ίδιο στάδιο ανάπτυξης διότι δεν ήταν δυνατόν να συγχρονιστούν απολύτως. Για αυτό και οι στατιστικές συγκρίσεις περιορίστηκαν στις μεταχειρίσεις της θερμοκρασίας μέσα στο ίδιο είδος και όχι μεταξύ των ειδών.

Επιπρόσθετα, τα χαμηλότερα ποσοστά βιωσιμότητας μπορεί να οφείλονται στις μη βέλτιστες θερμοκρασίες με σπόρους από βόρεια κλίματα που απαιτούν ψυχρότερες θερμοκρασίες *in vitro* ή στρωματοποίηση για να βλαστήσουν. Το περιβάλλον από το οποίο προέρχεται ο σπόρος μπορεί να επηρεάσει την ανταπόκριση του σποροφύτου στο κρύο. Έχει εξεταστεί η ανταπόκριση στην ψυχρή μεταχείριση σε διάφορους αυτοφυείς πληθυσμούς στις ΗΠΑ και διαπιστώθηκε ότι τα φυτά βόρειων περιοχών που υπόκεινται σε μεγαλύτερους χειμώνες μπορεί να χρειαστούν μεγαλύτερη περίοδο ψυχρής μεταχείρισης από τις οκτώ εβδομάδες για μέγιστη εμφάνιση φύτρων μετά το τέλος της περιόδου ψυχρής μεταχείρισης (Kauth et al., 2008). Ωστόσο, σε αυτή τη μελέτη οι σπόροι *Himantoglossum hircinum* που συγκομίστηκαν από πιο βόρειο γεωγραφικό πλάτος (Νήσος Ré της Γαλλίας) συγκριτικά με τα άλλα είδη, αν και θα μπορούσαν να έχουν επωφεληθεί από μια μακρύτερη ψυχρή μεταχείριση, φαίνεται ότι δεν άντεξαν στο κρύο, σημειώνοντας έτσι μικρό αριθμό κονδύλων. Ίσως αν η περίοδος ψυχρής μεταχείρισης ήταν

μακρύτερη ή το στάδιο ανάπτυξης των πρωτοκορμών πιο προχωρημένο να ήταν διαφορετικό το αποτέλεσμα (Εικ. 5).

Τα υπόλοιπα είδη, *Anacamptis laxiflora*, *A. coriophora* και *Himantoglossum robertianum* είχαν συγκομιστεί από σχετικά χαμηλά υψόμετρα 0-194 m στο νησί της Κεφαλονιάς. Η θερμοκρασία στο νησί κατά τους χειμερινούς μήνες κυμαίνεται από 11,4 έως 12,8 °C. Αν και η προέλευση υψομετρικά είναι παρόμοια και για τα τρία είδη, το *Himantoglossum robertianum* φαίνεται να επηρεάστηκε παρόμοια με το *H. hircinum* αφού οι περισσότεροι πρωτοκορμοί δεν επιβίωσαν. Στην πρώτη φάση του πειράματος, μετά τις οκτώ εβδομάδες ψυχρής μεταχείρισης τα είδη *Himantoglossum* είχαν ήδη παρουσιάσει μείωση ποσοστού επιβίωσης κατά την διάρκεια της περιόδου προσαρμογής (8-16 εβδομάδες). Φαίνεται πως ήδη από αυτό το στάδιο είχαν αρχίσει να μην ανταποκρίνονται στην ψυχρή μεταχείριση. Στις αρχές Μαΐου σημειώθηκε απότομη αύξηση θερμοκρασίας, μεγαλύτερη των 20 °C και ακολούθησε ύστερα πτώση (Εικόνα 2). Αυτή η περίοδος ίσως να επηρέασε όλα τα είδη. Ενεργοποιήθηκε ο μηχανισμός προσαρμογής των σποροφύτων στα δεδομένα της θερμοκρασίας και λόγω της απότομης μείωσης πολλούς από τους κόνδυλους να καταστράφηκαν. Μάλιστα, οι εμπειροτέχνες Malmgren & Nystrom (2022) συστήνουν πως μετά την έξοδο από το ψυγείο, τα φυτά πρέπει να διατηρούνται σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες και απλώς να αυξάνουν σταδιακά τη θερμοκρασία για 2-3 μήνες ακόμα. Αυτή είναι η περίοδος που τα φύλλα και οι ρίζες αναπτύσσονται γρήγορα. Οι κόνδυλοι ωριμάζουν λίγο αργότερα, σε λίγο υψηλότερη θερμοκρασία. Εάν δοθεί υψηλή θερμοκρασία πολύ νωρίς, συχνά μόνο πολύ μικροί κόνδυλοι αναπτύσσονται «βιαστικά», καθώς τα φυτά πιστεύουν πως πλησιάζει ένα μακρύ ζεστό και ξηρό καλοκαίρι (Malmgren and Nystrom, 2021).

4.2 Μήκος φύτρου

Για να διαπιστωθεί αν η θερμοκρασία αποτελεί παράγοντα ο οποίος διαφοροποιεί την ανάπτυξη των σποροφύτων, τα δοχεία υποβλήθηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες επί οκτώ εβδομάδες. Οι έξι υπαίθριοι σταθμοί στο νησί της Κεφαλονιάς επιλέχθηκαν ανάλογα με το υψόμετρο, με βάση την εύλογη υπόθεση ότι η θερμοκρασία μειώνεται με το υψόμετρο (Πίν. 2). Οι διαφορές στο τελικό μήκος του φύτρου των κονδύλων θα μπορούσαν να εξηγηθούν από διαειδικές μορφολογικές διαφορές μεταξύ των διαφόρων ειδών αλλά και από άλλες μεταβλητές όπως αυτή της θερμοκρασίας ως συνέπεια της βαθμίδας υψομέτρου. Στην έρευνα αυτή διαπιστώνεται ότι τα φύτρα με το μέσο μεγαλύτερο μήκος σημειώθηκαν στη μεταχείριση Αίνος για το είδος *Anacamptis laxiflora* (30 mm), για *A. coriophora* (45 mm) και για *Himantoglossum robertianum* (47 mm). Η θέση Αίνος βρίσκεται στο μεγαλύτερο υψόμετρο (1291 m) συγκριτικά με τις υπόλοιπες μεταχειρίσεις. Η υπόθεση ότι η θερμοκρασία γενικά εξαρτάται από το υψόμετρο, άρα και το μήκος του φύτρου, τεκμηριώνεται αλλά όχι απόλυτα, αφού ο Αίνος κατά τις οκτώ εβδομάδες ψυχρής μεταχείρισης σημείωσε θερμοκρασίες από -0.1 έως 14.9 °C ενώ η μεταχείριση στη χαμηλότερη θέση Γιούπαρη από -1.6 έως 17.2 °C, δηλαδή χαμηλότερη ελάχιστη θερμοκρασία, αν και ήρθε δεύτερη σε μήκος φύτρου (37 mm) για το είδος *A. coriophora* και τρίτη για το είδος *Anacamptis laxiflora* (18 mm). Η υπόθεση είναι ότι όσο πιο μεγάλο είναι το υψόμετρο τόσο μειώνεται η θερμοκρασία. Η μείωση της θερμοκρασίας επωφελεί την ανάπτυξη του μήκους φύτρου των κονδύλων. Βέβαια, αν και οι δύο αυτοί σταθμοί έχουν μόλις 169 m υψομετρική

διαφορά το αποτέλεσμα αυτό μπορεί να οφείλεται και στην έκθεση του σταθμού. Το τελάρο με τα δοχεία καλλιέργειας του σταθμού Γιούπαρη ήταν πολύ κοντά στην κορυφή του όρους Ρούδι, η οποία είναι πλήρως εκτεθειμένη στους ψυχρούς ΒΔ ανέμους, ενώ το τελάρο του σταθμού Αίνος αν και σε μεγαλύτερο υψόμετρο προφυλάσσονταν στην κόγχη ενός κτιρίου με ΝΑ προσανατολισμό. Ένας άλλος πιθανός λόγος είναι ότι το τοπίο γύρω από τον σταθμό Γιούπαρη είναι απογυμνωμένο ενώ η θέση Αίνος περιβάλλεται από ελατόδασος όπου η θερμοκρασία θα μπορούσε να μετριάζεται (Deconninck, 2021). Ακόμα, οι μεγαλύτερες θερμοκρασίες που σημειώθηκαν στο μεταχείριση του Εργαστηρίου Εδαφολογίας, 14.0 με 25.5 °C, φαίνεται να τεκμηριώνουν τη σχέση της θερμοκρασίας και την επίδρασή της στην ανάπτυξη σποροφύτων αφού στο είδος *Anacamptis coriophora* σημειώθηκε το μικρότερο μήκος φύτρου (12 mm) καθώς και η μικρότερη μάζα (9 cg) καθώς επίσης και στο είδος *Anacamptis laxiflora* η χαμηλότερη τιμή μήκους φύτρου (3 mm). Συγκριτικά με το πρώτο στάδιο του πειράματος, μετά το τέλος της ψυχρής μεταχείρισης, τα ψηλότερα φυτά είχαν μετρηθεί στο Εργαστήριο για όλα τα είδη, ενώ το μήκος του βλαστού έτεινε να μειώνεται με την ένταση του κρύου. Αντίθετα, στο τελευταίο στάδιο μετά τη λήξη του θερινού ληθάργου και την επανέναρξη της βλάστησης, που αφορά η παρούσα εργασία, παρατηρείται ότι στο Εργαστήριο σημειώνεται η μικρότερη μέτρηση μήκους φύτρου για το *Anacamptis laxiflora* ενώ για το *A. coriophora* στο Ψυγείο και έπειτα στο Εργαστήριο καθώς οι υψηλότερες μετρήσεις σημειώθηκαν στους κρύους σταθμούς (Αίνος, Γιούπαρη, Στροφή Δρόμου). Με άλλα λόγια, το τελευταίο στάδιο του πειράματος δίνει αποτελέσματα στην αντίθετη κατεύθυνση από το πρώτο: Οι πιο ψυχροί σταθμοί φαίνεται πως ευνόησαν την ανάπτυξη του μήκους φύτρου των κονδύλων ακόμη και στα είδη *Himantoglossum*, που παρόλο που εμφάνισαν χαμηλό αριθμό επιβίωσης κονδύλων,

στους σταθμούς αυτούς παρατηρήθηκαν ζωντανοί κόνδυλοι. Βέβαια, από το πρώτο στάδιο είχε φανεί πως τα *Anacamptis* ήταν πιο προχωρημένα σε ανάπτυξη από τα είδη *Himantoglossum* καθώς ακόμα διαπιστώνεται πως η ψυχρή μεταχείριση ενεργοποίησε τα φυτά να μεγαλώσουν πιο γρήγορα. Συμπερασματικά, η υψηλή ανάπτυξη κονδύλων στους ψυχρότερους σταθμούς μετά τον θερινό λήθαργο συμφωνεί με τις συστάσεις των Malmgren & Nystrom για μια απαραίτητη περίοδο ψυχρής μεταχείρισης των σποροφύτων (Malmgren and Nystrom, 2021).

4.3 Μάζα κονδύλων

Παρατηρείται ότι η μεγαλύτερη μέση τιμή σε μάζα κονδύλου σημειώθηκε στο είδος *H.hircinum* στη θέση Δεξαμενή (29 mm), με την επιφύλαξη ότι ο μικρός αριθμός παρατηρήσεων δεν επέτρεψε στατιστική ανάλυση. Αυτό ίσως οφείλεται στο γεγονός ότι ο σπόρος *H.hircinum* προήλθε από μεγαλύτερο γεωγραφικό πλάτος που αναμένει ταχύτερο ρυθμό ανάπτυξης με μεγαλύτερους κονδύλους σε σύγκριση με άλλα είδη παρόλο που τα σπορόφυτα δεν ήταν τόσο ανθεκτικά στο κρύο και τα περισσότερα απεβίωσαν. Να σημειωθεί ότι οι σπόροι του *Himantoglossum hircinum* είχαν συλλεχθεί από το νησί Ré της Γαλλίας συνεπώς υποθέτουμε προσαρμοσμένοι σε ψυχρότερο χειμώνα. Η δεύτερη μεγαλύτερη τιμή μάζας σημειώνεται στο Ψυγείο (18 cg) για το είδος *Himantoglossum robertianum* καθώς ίδια μάζα σημειώνεται και στο είδος *Anacamptis coriophora* στο σταθμό Βλαχάτα.

Όπως παρατηρήθηκε, πολλές από τις μεταχειρίσεις ενώ οπτικά φαίνονταν να έχουν διαφορά μεταξύ τους, στατιστικά έχουν το ίδιο γράμμα. Ίδιο γράμμα σηματοδοτεί μη στατιστικώς σημαντική διαφορά ενώ διαφορετικό σηματοδοτεί στατιστικώς σημαντική διαφορά μεταξύ των μέσων όρων των μεταχειρίσεων. Αυτό συμβαίνει γιατί μέσω της δοκιμής σύγκρισης μέσων όρων Steel-Dwass έχοντας ως

μηδενική υπόθεση ότι οι μέσοι όροι των μεταχειρίσεων δε διαφέρουν, η τιμή p προσδιορίζει αν τεκμηριώνεται η απόρριψη της μηδενικής υπόθεσης. Οι τιμές p υπολογίζονται με βάση την απόκλιση μεταξύ της παρατηρούμενης τιμής και μιας επιλεγμένης τιμής αναφοράς, δεδομένης της κατανομής πιθανοτήτων, με μεγαλύτερη διαφορά μεταξύ των δύο τιμών που αντιστοιχεί σε χαμηλότερη τιμή p . Ωστόσο, κάποιες φορές η διαφορά είναι πραγματική, αλλά δεν υπάρχουν αρκετές μετρήσεις για να την επιβεβαιώσουμε στατιστικά. Στην συγκεκριμένη έρευνα προσπαθήσαμε να βγάλουμε γενικά συμπεράσματα για τους πληθυσμούς των ορχεοειδών από τα πεπερασμένα σε μέγεθος δείγματα που μετρήσαμε εμείς. Ενδεχομένως να χρειάζεται μεγαλύτερος αριθμός παρατηρήσεων. Ένας άλλος λόγος που εξηγεί γιατί η τιμή p δεν επιβεβαιώνει την διαφορά είναι γιατί οι μη παραμετρικές δοκιμές γενικά δεν είναι τόσο «ισχυρές» όσο οι παραμετρικές, τις οποίες όμως δεν καταφέραμε να εφαρμόσουμε διότι δεν τηρούνταν οι προϋποθέσεις. Δηλαδή μπορεί να υπάρχουν πραγματικές διαφορές μεταξύ των μεταχειρίσεων αλλά να μην μπορούμε να τις επιβεβαιώσουμε στατιστικά.

4.4 Σχέση μάζας κονδύλου και μήκους φύτρου

Η σχέση μάζας με φύτρου κονδύλου φαίνεται πως είναι αντιστρόφως ανάλογη. Παρατηρείται πως όσο μικρότερη η μάζα τόσο μεγαλύτερο είναι το μήκος φύτρου. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελούν οι μεταχειρίσεις Εργαστήριο και Αίνος (Εικ. 5). Αυτό συμβαίνει γιατί όλες οι αποταμιευτικές ουσίες που υπάρχουν στον κόνδυλο κατά το φύτρωμά του καταναλώνονται με αποτέλεσμα να συρρικνώνεται και να χάνει βάρος.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ V

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η συγκεκριμένη μελέτη βασίστηκε στην επίδραση της θερμοκρασίας στην ανάπτυξη των χερσαίων ορχιδέων που καλλιεργήθηκαν *in vitro*. Για να διαπιστωθεί αν η θερμοκρασία αποτελεί παράγοντα ο οποίος διαφοροποιεί την ανάπτυξη των σποροφύτων, τα δοχεία υποβλήθηκαν σε διαφορετικές θερμοκρασίες επί οκτώ εβδομάδες. Τα αποτελέσματα έδειξαν πως η επιβίωση των πρωτοκορμών εξαρτάται από το στάδιο ανάπτυξής τους για τα διαφορετικά είδη κατά την πρώτη φάση έναρξης του πειράματος, την προέλευση του σπόρου καθώς και τις συνθήκες ανάπτυξης. Οι ψυχρές μεταχειρίσεις που υπέστησαν τα γένη *Anacamptis* και *Himantoglossum* φαίνεται πως ευνόησαν την ανάπτυξή τους και έτσι επιβεβαιώθηκε η σχέση της αύξησης του φύτρου με τη θερμοκρασία αφού οι ψυχρότεροι σταθμοί σημείωσαν το μεγαλύτερο ποσοστό επιβίωσης με το μεγαλύτερο μήκος φύτρου.

Συμπερασματικά, για την ανάπτυξη κονδύλων με μεγαλύτερο φυτό συνιστώνται οι μεταχειρίσεις με το μεγαλύτερο υψόμετρο και συνεπώς χαμηλότερη θερμοκρασία. Οι σταθμοί στην έρευνα αυτή με τα χαρακτηριστικά αυτά ήταν στη θέση Αίνος για τα είδη *Anacamptis laxiflora*, *A. coriophora* και *Himantoglossum robertianum* με μέση θερμοκρασία 5.9 ± 2.6 και ημερήσια διακύμανση 4.1 ± 2.6 κατά τη διάρκεια οκτώ εβδομάδων ψυχρής μεταχείρισης. Ο σταθμός Στροφή Δρόμου ήταν αυτός που λειτούργησε ευνοϊκά για το είδος *Himantoglossum hircinum* με μέση θερμοκρασία 6.7 ± 2.6 και διακύμανση 4.4 ± 2.2 κατά την ίδια περίοδο.

Επιπρόσθετα, βασιζόμενοι στο γεγονός ότι μια ψυχρή μεταχείριση στο βουνό δεν είναι πάντα εύκολη θα μπορούσε να πραγματοποιηθεί ψυχρή μεταχείριση σε ένα

κλειστό ρυθμιζόμενο χώρο με τις κατάλληλες θερμοκρασίες που απαιτούνται για την ανάπτυξη των φυτών. Με αυτό τον τρόπο θα υπάρχει μόνο ένας σταθμός πλήρης ελεγχόμενος.

Η μελέτη των ορχεοειδών εκτός από το ενδιαφέρον που παρουσιάζουν ως φυτά για τις ιδιότητές τους, έχουν και οικονομική σημασία. Αυτό αποτελεί ένα κίνητρο για περαιτέρω έρευνες διατήρησης και πολλαπλασιασμού τους. Κάποιες από τις προοπτικές που θα μπορούσαν να αποτελέσουν τη βάση για μελλοντικές μελέτες είναι οι εξής:

- I. Να υποβληθούν περισσότερα είδη στην διαδικασία της ψυχρής μεταχείρισης
- II. Να παραμείνουν διάφορα είδη στο ίδιο υψόμετρο για να διαπιστωθεί πως τα διάφορα είδη θα συμπεριφερθούν στις ίδιες συνθήκες και αν η σχέση υψόμετρου - θερμοκρασίας ισχύει στην περίπτωση αυτή.
- III. Να δοκιμαστούν διάφορα είδη με διαφορετική γεωγραφική προέλευση για να διαπιστωθεί πώς επιδρά η προέλευση των γονέων του φυτού.
- IV. Να ερευνηθεί πότε είναι η καλύτερη περίοδος και με ποιόν τρόπο τα φυτά θα μπορούν να μεταφερθούν από τις γλάστρες που έχουν μεταφυτευτεί μετά την ψυχρή μεταχείριση στο φυσικό περιβάλλον με υψηλό ποσοστό επιβίωσης.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

1. Claessens, J. & J. Kleynen, 2011. The lower of the European orchid. Form and function. [Διαδίκτυο]. Διεύθυνση πρόσβασης:
https://www.researchgate.net/publication/256842988_The_Flower_of_the_European_Orchid_Form_and_Function (εξακριβώθηκε Μάρτιο 2011).
2. Ding et al. , 2017 The Complete plastome sequences of four orchid species: Insights on the evolution of Orchidaceae and the utility of plastomic mutational spots. *Εμπρός. Plant Sci.* 2017 , 8 , 715. [Διαδίκτυο]. Διεύθυνση πρόσβασης: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fpls.2017.00715/full> (εξακριβώθηκε 03 Μαΐου 2017).
3. Ding Y., Shi Y., and Yang S. 2020. Molecular Regulation of Plant Responses to Environmental Temperatures. *Molecular Plant.* 13(4), 544–564
[Διαδίκτυο]. Διεύθυνση πρόσβασης:
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32068158> (εξακριβώθηκε 14 Φεβρουαρίου 2020).
4. Deconninck G. and Gerakis A. 2021. Influence of scarification method on seed germination of the terrestrial orchid *Anacamptis laxiflora* (Lam.). *The EuroBiotech Journal.* 5(1), 15–23.. [Διαδίκτυο]. Διεύθυνση πρόσβασης:
<https://sciendo.com/pdf/10.2478/ebtj-2021-0004> (εξακριβώθηκε 22 Ιανουαρίου 2021).
5. Galeazzo Sciarretta, presidente G.I.R.O.S (Ιταλική ομάδα για την έρευνα για τις άγριες ορχιδέες (GIROS), *Orchidee d'Italia. Guide to spontaneous orchids*, Cornaredo (MI), Il Castello, 2009

6. Kauth et al.2011, Kauth, PJ, Kane, ME & Vendrame, WA Συγκριτική *in vitro* οικολογία βλάστησης του *Calopogon tuberosus* var. *tuberosus* (Orchidaceae) σε όλη τη γεωγραφική του περιοχή. *In Vitro Cell.Dev.Biol.-Plant* 47, 148–156 (2011). [Διαδίκτυο]. Διεύθυνση πρόσβασης:
<https://doi.org/10.1007/s11627-010-9316-5> (εξακριβώθηκε 26 Οκτωβρίου 2010).
7. Kreziou A., De Boer H., and Gravendeel B. 2016. Harvesting of salep orchids in north-western Greece continues to threaten natural populations. *Oryx*. 50(3), 393–396 [Διαδίκτυο]. Διεύθυνση πρόσβασης:
<https://www.cambridge.org/core/journals/oryx/article/harvesting-of-salep-orchids-in-northwestern-greece-continues-to-threaten-natural-populations/B2843D8CF837F490F3114D17FED20F70> (εξακριβώθηκε 28 Απριλίου 2015).
8. Katsalirou E., Gerakis A., Haldas X., and Deconninck G. 2017. Optimal disinfection times for seeds of mediterranean orchids propagated on nutrient media. *European Journal of Environmental Sciences*. 7(2), [Διαδίκτυο]. Διεύθυνση πρόσβασης:
[119–124.https://www.researchgate.net/publication/321818237_Optimal_disinfection_times_for_seeds_of_Mediterranean_orchids_propagated_on_nutrient_media](https://www.researchgate.net/publication/321818237_Optimal_disinfection_times_for_seeds_of_Mediterranean_orchids_propagated_on_nutrient_media) (εξακριβώθηκε Δεκέμβριο 2017).
9. Michaels S.D. and Amasino R.M. 2000. Memories of winter: Vernalization and the competence to flower. *Plant, Cell and Environment*. 23(11), 1145–1153. [Διαδίκτυο]. Διεύθυνση πρόσβασης:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1046/j.1365-3040.2000.00643.x>

(εξακριβώθηκε 9 Οκτωβρίου 2008).

10. Malmgren S. and Nyström H. 2021. Orchid Propagation [Διαδίκτυο].

Διεύθυνση πρόσβασης:

<http://www.lidaforsgarden.com/orchids/engelsk.htm>

http://www.lidaforsgarden.com/orchids/orchis_eng.htm

11. Rastogi & Sugandha, 2019 [Διαδίκτυο]. Διεύθυνση πρόσβασης:

[https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-](https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/vanilla-planifolia)

[sciences/vanilla-planifolia](https://www.sciencedirect.com/topics/agricultural-and-biological-sciences/vanilla-planifolia) (εξακριβώθηκε 2019).

12. Swarts D.N. and Dixon W.D. 2009. Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. [Διαδίκτυο]. Διεύθυνση πρόσβασης:

<https://academic.oup.com/aob/article/104/3/543/227351> (εξακριβώθηκε 14

Φεβρουαρίου 2009).

13. Shefferson et al., 2017, Predicting evolution in response to climate change: the example of sprouting probability in three dormancy-prone orchid species [Διαδίκτυο]. Διεύθυνση πρόσβασης:

<https://royalsocietypublishing.org/doi/full/10.1098/rsos.160647>

[probability in three dormancy-prone orchid species](https://royalsocietypublishing.org/doi/full/10.1098/rsos.160647) (εξακριβώθηκε 01

Ιανουαρίου 2017).

14. Zhang S., Yang Y., Li J., Qin J., Zhang W., Huang W., and Hu H. 2018.

Physiological diversity of orchids. Plant Diversity. 40(4), 196–208.

[Διαδίκτυο]. Διεύθυνση πρόσβασης:

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2468265918300556>

(εξακριβώθηκε 4 Αυγούστου 2018).

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

Πίνακας 4 . Μη παραμετρικές δοκιμές για τη μεταχείριση *Anacamptis coriophora*

ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ	ΔΟΚΙΜΗ	ΜΕΤΑΒΛΗΤΗ	
		ΜΗΚΟΣ ΦΥΤΡΟΥ	ΜΑΖΑ
ΜΗ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ	LEVENE	-	-
	ΚΑΝΟΝΙΚΟΤΗΤΑ	ΑΙΝ	-
		LAB	-
		LAK	-
		REF	-
		RES	-
		ROA	-
		VLA	-
		YUP	-
ΤΕΤΡΑΓΩΝΙΚΗ ΠΙΖΑ	LEVENE	-	-
	ΚΑΝΟΝΙΚΟΤΗΤΑ	ΑΙΝ	-
		LAB	-
		LAK	-
		REF	-
		RES	-
		ROA	-
		VLA	-
		YUP	-
BOX-COX $\lambda = -5$	LEVENE	-	-
	ΚΑΝΟΝΙΚΟΤΗΤΑ	ΑΙΝ	-
		LAB	-
		LAK	-
		REF	-
		RES	-
		ROA	-
		VLA	-
		YUP	-
ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ	ΔΟΚΙΜΗ	ΜΕΤΑΒΛΗΤΗ	
		ΜΗΚΟΣ ΦΥΤΡΟΥ	ΜΑΖΑ
		LEVENE	-
		ΚΑΝΟΝΙΚΟΤΗΤΑ	ΑΙΝ
			LAB
			LAK
			REF
			RES
			ROA
			VLA
			YUP
BOX-COX $\lambda = -4$	ΔΟΚΙΜΗ	ΜΕΤΑΒΛΗΤΗ	
		ΜΗΚΟΣ ΦΥΤΡΟΥ	ΜΑΖΑ
		LEVENE	-
		ΚΑΝΟΝΙΚΟΤΗΤΑ	ΑΙΝ
			LAB
			LAK
			REF
			RES
			ROA
			VLA
			YUP
BOX-COX $\lambda = -3$	ΔΟΚΙΜΗ	ΜΕΤΑΒΛΗΤΗ	
		ΜΗΚΟΣ ΦΥΤΡΟΥ	ΜΑΖΑ
		LEVENE	-
		ΚΑΝΟΝΙΚΟΤΗΤΑ	ΑΙΝ
			LAB
			LAK
			REF
			RES
			ROA
			VLA
			YUP
BOX-COX $\lambda = -2$	ΔΟΚΙΜΗ	ΜΕΤΑΒΛΗΤΗ	
		ΜΗΚΟΣ ΦΥΤΡΟΥ	ΜΑΖΑ
		LEVENE	-
		ΚΑΝΟΝΙΚΟΤΗΤΑ	ΑΙΝ
			LAB
			LAK
			REF
			RES
			ROA
			VLA
			YUP

ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ	ΔΟΚΙΜΗ		ΜΕΤΑΒΛΗΤΗ	
			ΜΗΚΟΣ ΦΥΤΡΟΥ	ΜΑΖΑ
BOX-COX $\lambda = -1$	LEVENE		-	-
	ΚΑΝΟΝΙΚΟΤΗΤΑ	A1N	-	-
		LAB	-	-
		LAK	-	-
		REF	-	-
		RES	-	-
		ROA	-	-
		VLA	-	-
		YUP	-	-
BOX-COX $\lambda = 0$	LEVENE		-	-
	ΚΑΝΟΝΙΚΟΤΗΤΑ	A1N	-	-
		LAB	-	-
		LAK	-	-
		REF	-	-
		RES	-	-
		ROA	-	-
		VLA	-	-
		YUP	-	-
BOX-COX $\lambda = 1$	LEVENE		-	-
	ΚΑΝΟΝΙΚΟΤΗΤΑ	A1N	-	-
		LAB	-	-
		LAK	-	-
		REF	-	-
		RES	-	-
		ROA	-	-
		VLA	-	-
		YUP	-	-
BOX-COX $\lambda = 2$	LEVENE		-	-
	ΚΑΝΟΝΙΚΟΤΗΤΑ	A1N	-	-
		LAB	-	-
		LAK	-	-
		REF	-	-
		RES	-	-
		ROA	-	-
		VLA	-	-
		YUP	-	-
BOX-COX $\lambda = 3$	LEVENE		-	-
	ΚΑΝΟΝΙΚΟΤΗΤΑ	A1N	-	-
		LAB	-	-
		LAK	-	-
		REF	-	-
		RES	-	-
		ROA	-	-
		VLA	-	-
		YUP	-	-
BOX-COX $\lambda = 4$	LEVENE		-	-
	ΚΑΝΟΝΙΚΟΤΗΤΑ	A1N	-	-
		LAB	-	-
		LAK	-	-
		REF	-	-
		RES	-	-
		ROA	-	-
		VLA	-	-
		YUP	-	-

ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ	ΔΟΚΙΜΗ		ΜΕΤΑΒΛΗΤΗ	
			ΜΗΚΟΣ ΦΥΤΡΟΥ	ΜΑΖΑ
BOX-COX $\lambda = 5$	LEVENE		-	-
	ΚΑΝΟΝΙΚΟΤΗΤΑ	A1N	-	-
		LAB	-	-
		LAK	-	-
		REF	-	-
		RES	-	-
		ROA	-	-
		VLA	-	-
		YUP	-	-

Πίνακας 5 . Μη παραμετρικές δοκιμές για μεταχείριση *Anacamptis laxiflora*

ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ	ΔΟΚΙΜΗ		ΜΕΤΑΒΛΗΤΗ		ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ	ΔΟΚΙΜΗ		ΜΕΤΑΒΛΗΤΗ	
			ΜΗΚΟΣ ΦΥΤΡΟΥ	ΜΑΖΑ				ΜΗΚΟΣ ΦΥΤΡΟΥ	ΜΑΖΑ
ΜΗ ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ	LEVENE		-	-	BOX-COX $\lambda = -4$	LEVENE		-	-
	ΚΑΝΟΝΙΚΟΤΗΤΑ	AIN	-	-		ΚΑΝΟΝΙΚΟΤΗΤΑ	AIN	-	-
		LAB	-	-			LAB	-	-
		LAK	-	-			LAK	-	-
		REF	-	-			REF	-	-
		RES	-	-			RES	-	-
		ROA	-	-			ROA	-	-
		VLA	-	-			VLA	-	-
		YUP	-	-			YUP	-	-
ΤΕΤΡΑΓΩΝΙΚΗ ΡΙΖΑ	LEVENE		0,12	-	BOX-COX $\lambda = -3$	LEVENE		-	-
	ΚΑΝΟΝΙΚΟΤΗΤΑ	AIN	-	-		ΚΑΝΟΝΙΚΟΤΗΤΑ	AIN	-	-
		LAB	-	-			LAB	-	-
		LAK	-	-			LAK	-	-
		REF	-	-			REF	-	-
		RES	-	-			RES	-	-
		ROA	-	-			ROA	-	-
		VLA	-	-			VLA	-	-
		YUP	-	-			YUP	-	-
BOX-COX $\lambda = -5$	LEVENE		-	-	BOX-COX $\lambda = -2$	LEVENE		-	-
	ΚΑΝΟΝΙΚΟΤΗΤΑ	AIN	-	-		ΚΑΝΟΝΙΚΟΤΗΤΑ	AIN	-	-
		LAB	-	-			LAB	-	-
		LAK	-	-			LAK	-	-
		REF	-	-			REF	-	-
		RES	-	-			RES	-	-
		ROA	-	-			ROA	-	-
		VLA	-	-			VLA	-	-
		YUP	-	-			YUP	-	-

ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ	ΔΟΚΙΜΗ		ΜΕΤΑΒΛΗΤΗ	
			ΜΗΚΟΣ ΦΥΤΡΟΥ	ΜΑΖΑ
BOX-COX $\lambda = -1$	LEVENE		-	-
	ΚΑΝΟΝΙΚΟΤΗΤΑ	AIN	-	-
		LAB	-	-
		LAK	-	-
		REF	-	-
		RES	-	-
		ROA	-	-
		VLA	-	-
		YUP	-	-
BOX-COX $\lambda = 0$	LEVENE		-	-
	ΚΑΝΟΝΙΚΟΤΗΤΑ	AIN	-	-
		LAB	-	-
		LAK	-	-
		REF	-	-
		RES	-	-
		ROA	-	-
		VLA	-	-
		YUP	-	-
BOX-COX $\lambda = 1$	LEVENE		-	-
	ΚΑΝΟΝΙΚΟΤΗΤΑ	AIN	-	-
		LAB	-	-
		LAK	-	-
		REF	-	-
		RES	-	-
		ROA	-	-
		VLA	-	-
		YUP	-	-
BOX-COX $\lambda = 2$	LEVENE		-	-
	ΚΑΝΟΝΙΚΟΤΗΤΑ	AIN	-	-
		LAB	-	-
		LAK	-	-
		REF	-	-
		RES	-	-
		ROA	-	-
		VLA	-	-
		YUP	-	-
BOX-COX $\lambda = 3$	LEVENE		-	-
	ΚΑΝΟΝΙΚΟΤΗΤΑ	AIN	-	-
		LAB	-	-
		LAK	-	-
		REF	-	-
		RES	-	-
		ROA	-	-
		VLA	-	-
		YUP	-	-
BOX-COX $\lambda = 4$	LEVENE		-	-
	ΚΑΝΟΝΙΚΟΤΗΤΑ	AIN	-	-
		LAB	-	-
		LAK	-	-
		REF	-	-
		RES	-	-
		ROA	-	-
		VLA	-	-
		YUP	-	-

ΜΕΤΑΣΧΗΜΑΤΙΣΜΟΣ	ΔΟΚΙΜΗ		ΜΕΤΑΒΛΗΤΗ	
			ΜΗΚΟΣ ΦΥΤΡΟΥ	ΜΑΖΑ
BOX-COX $\lambda = 5$	LEVENE		-	-
	ΚΑΝΟΝΙΚΟΤΗΤΑ	AIN	-	-
		LAB	-	-
		LAK	-	-
		REF	-	-
		RES	-	-
		ROA	-	-
		VLA	-	-
		YUP	-	-



A

(A) Μεταχείριση-Τελάρο(Εργαστήριο)



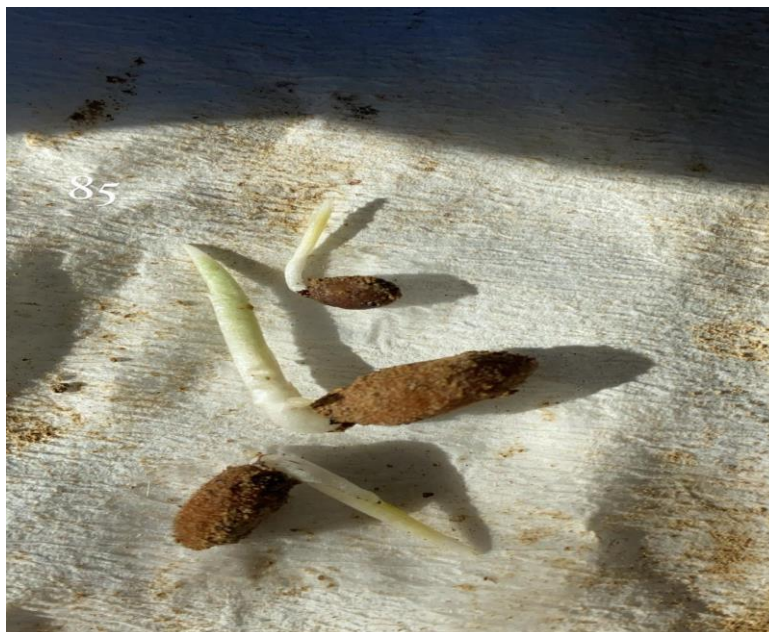
B

(B) Εξαγωγή κονδύλων από το δοχείο



C

(C) Τοποθέτηση στο κόσκινο και ξέπλυμα με απιονισμένο νερό



D

(D) Απορρόφηση νερού με απορροφητικό χαρτί



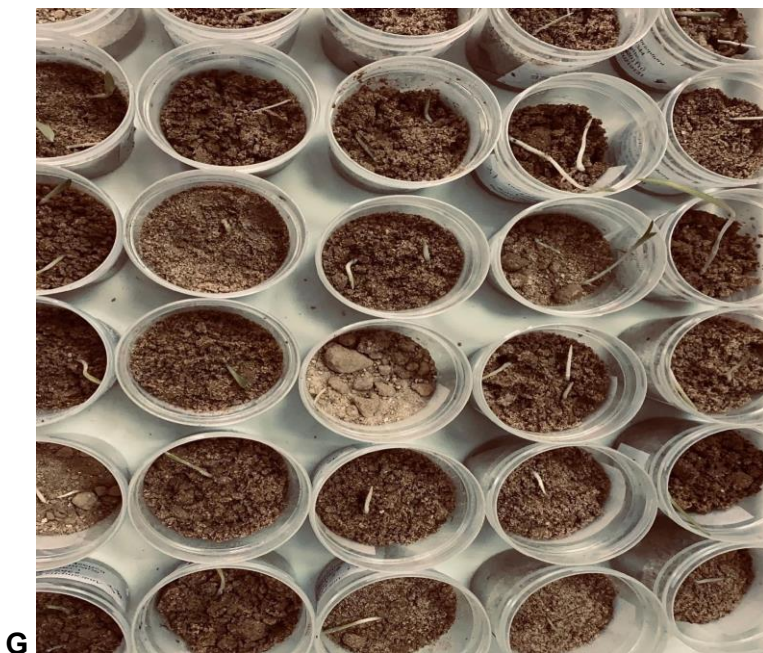
E

(Ε) Τοποθέτηση κονδύλου στο ζυγό-μέτρηση μάζας



F

(F) Τοποθέτηση μείγματος χώματος σε λεκάνη στη περίπτωση που δεν υπήρξε κανένας κόνδυλος στο δοχείο.



G

(G) Τοποθέτηση κονδύλων στα δοχεία μετά τη μέτρηση



H

(H) Τοποθέτηση δοχείων σε δωμάτιο και παραμονή τους σε αυτό μέχρι την μεταφύτευσή τους σε γλάστρες

Παράρτημα 1. Βήματα διαδικασίας πειράματος