



PLANT-NET CY

Δημιουργία Δικτύου Μικρο-Αποθεμάτων Φυτών στην Κύπρο  
για τη Διατήρηση Ειδών και Οικοτόπων Προτεραιότητας



LIFE08 NAT/CY/000453

**Δράση Γ.7:** Συλλογή και αποθήκευση σπερμάτων των υπό μελέτη ειδών στην τράπεζα σπερμάτων του Ινστιτούτου Γεωργικών Ερευνών για την εκτός-τόπου διατήρησή τους



**Παραδοτέο:** Πρωτόκολλα για την αποθήκευση των σπερμάτων, τη φύτευση, την ανάπτυξη-αύξηση και τη φύτευση των στοχευμένων ειδών

(Protocols on seed storage, germination, growth and outplanting of the targeted species)

PLANT-NET CY

Ιούνιος 2013

Το παρόν κείμενο εκπονήθηκε από το Τμήμα Βιολογίας του Πανεπιστημίου Αθηνών και τη Μονάδα Διατήρησης της Φύσης του Πανεπιστημίου Frederick στο πλαίσιο του Έργου LIFE+ 08NAT/CY/000453 με τίτλο «Δημιουργία Δικτύου Μικρο-Αποθεμάτων Φυτών στην Κύπρο για τη Διατήρηση Ειδών και Οικοτόπων Προτεραιότητας». Το Έργο συγχρηματοδοτείται από την Ευρωπαϊκή Επιτροπή στο πλαίσιο του προγράμματος LIFE+.

The present report has been prepared by the Faculty of Biology of the University of Athens and the Nature Conservation Unit of the Frederick University in the framework of the project LIFE+ 08NAT/CY/000453 entitled '*Establishment of a Plant Micro-Reserve Network in Cyprus for the Conservation of Priority Species and Habitats*'. The Project is co-funded by the European Commission in the framework of the project LIFE+.

Η πλήρης αναφορά στο παρόν κείμενο είναι:

Κουτσοβούλου Κ., Κωνσταντίνου Κ., Καλτσής Α., Καδής Κ., Θάνος Κ.Α. 2013. Πρωτόκολλα για την αποθήκευση των σπερμάτων, τη φύτευση, την ανάπτυξη-αύξηση και τη φύτευση των στοχευμένων ειδών. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών. Αθήνα.

This document may be cited as follows:

Koutsovoulou K., Constantinou C., Kaltsis A., Kadis K., Thanos C.A. 2013. Protocols on seed storage, germination, growth and outplanting of the targeted species. National and Kapodistrian University of Athens. Athens.

## **Protocols on seed storage, germination, growth and outplanting of the targeted species**

### **English Summary**

The elaboration of the Protocols on seed storage, germination, growth and outplanting of the targeted species is part of the Concrete Conservation Action C7 (Collection and storage of seeds of the targeted species at the seed bank of the Agricultural Research Institute to achieve the ex situ conservation of the targeted taxa), in the context of the LIFE+ Project 'Establishment of a Plant Micro-Reserve Network in Cyprus for the Conservation of Priority Species and Habitats' (LIFE08 NAT/CY/000453).

This Report presents data from germination experiments held at the University of Athens and the Frederick University as well as from outplanting seedlings in the field. In total, 32 seed collections were carried out for the targeted taxa, 22 of which are stored in the Seed Banks of the Frederick University and the Agricultural Research Institute.

#### **Arabis kennedyae**

Mature seeds are collected in June and July. Final germination percentages are higher at 15 or 20/10 °C (depending on the seedlot), with daily illuminations of 12h per day or a single pulse of red light. The best period for outplanting is at the end of autumn until the beginning of winter (November – December).

#### **Astragalus macrocarpus subsp. lefkarensis**

Fruits mature by the end of May till beginning of June. However, the vast majority of seeds are infected by the insect *Bruchidius plagiatus*. Seeds have a water impermeable seed coat and germination occurs at 15 °C in darkness, after mechanical scarification. The best period for outplanting is at the end of winter (February).

#### **Cedrus brevifolia**

The most suitable period for cone collection is at the end of September until the beginning of October, but cone production varies quantitatively from year to year (masting). Seeds can be extracted after cone imbibition in water for 24 h. Seed germination is favoured in light, at low temperatures (5 and 10 °C) but with a low germination rate or at 15, 20 or 20/10 °C, after 4 weeks of cold stratification, with a high germination rate.

#### **Centaurea akamantis**

Seed maturation and dispersal begins in July and lasts until September, so collection must be performed carefully in order to gather only mature infructescences. Seeds germinate equally well in 10, 15 and 20/10 °C both in light and in darkness. Removal of the pappus can help avoid infections inside the petri dishes. The best period for outplanting is before winter (November-December) and plants should be watered twice a week during the first summer.

### **Ophrys kotschy**

The best period for collection of mature and immature capsules is in May and April, respectively. The seeds germinate in darkness at 20 and 20/10 °C, in coconut water-enriched (50 ml/l) Malmgren medium, after sterilization with domestic bleach. Following germination, germinated seeds are transferred to glass or plastic containers with coconut water-enriched (100 ml/l) Malmgren medium. After the emergence and growth of leaves, plants are transferred to the light.

### **Quercus alnifolia**

The most suitable period for acorn collection is November-December, but fruit production varies quantitatively from year to year (masting). Moreover, a high number of fruits are infected by insects. The acorns germinate even without water due to their high water content, which is why they cannot be stored at -20 °C in a Seed Bank. High germination percentages are observed in the light at 10, 15, 20, 25 °C and 20/10 °C but the germination rate is higher in higher temperatures.

## Περιεχόμενα

1. Εισαγωγή.....	5
2. Μεθοδολογία.....	6
2.1 Συλλογές Φυτικού Υλικού.....	6
2.2 Έλεγχος της φύτευσης στο εργαστήριο .....	7
2.3 Ανάπτυξη αρτιβλάστων στο φυτώριο .....	7
3. <i>Arabis kennedyae</i> .....	7
4. <i>Astragalus macrocarpus</i> subsp. <i>lefkarensis</i> .....	9
5. <i>Cedrus brevifolia</i> .....	10
6. <i>Centaurea akamantis</i> .....	13
7. <i>Ophrys kotschyi</i> .....	14
8. <i>Quercus alnifolia</i> .....	17
9. Βιβλιογραφία .....	19
Παράρτημα .....	20

## 1. Εισαγωγή

Η συγγραφή των Πρωτοκόλλων για την αποθήκευση των σπερμάτων, τη φύτευση, την ανάπτυξη-αύξηση και τη φύτευση των στοχευμένων ειδών αποτελεί μέρος της Δράσης Διατήρησης Γ7 (Συλλογή και αποθήκευση σπερμάτων των υπό μελέτη ειδών στην Τράπεζα Σπερμάτων του Ινστιτούτου Γεωργικών Ερευνών για την εκτός-τόπου διατήρησή τους) του Έργου LIFE+ «Δημιουργία Δικτύου Μικρο-Αποθεμάτων Φυτών στην Κύπρο για τη Διατήρηση Ειδών και Οικοτόπων Προτεραιότητας». Πρωταρχικός στόχος της δράσης αυτής είναι η συνεισφορά στην μακροπρόθεσμη επιβίωση των ειδών-στόχων με την αποθήκευση και διατήρηση ενός αντιπροσωπευτικού τμήματος της γενετικής τους ποικιλότητας σε Τράπεζες Σπερμάτων.

Η σημασία της εκτός τόπου (*ex situ*) διατήρησης, ως συμπληρωματικού μέσου και τρόπου διατήρησης μαζί με την επί τόπου (*in situ*) διατήρηση, επισημαίνεται τόσο από τη Διεθνή Σύμβαση για τη Βιολογική Ποικιλότητα (Convention on Biological Diversity, CBD) όσο και από την Οργάνωση Τροφίμων και Γεωργίας του ΟΗΕ (Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO) (Μαριά και συν. 2012). Ο μεγαλύτερος αριθμός αυτοφυών ειδών, που είτε είναι ενδημικά είτε αντιμετωπίζουν κίνδυνο εξαφάνισης είτε απαντούν σε γεωγραφικές περιοχές που υποβαθμίζονται, μπορούν να διατηρηθούν έξω από το βιότοπό τους με τη μορφή των σπερμάτων, μια μέθοδος θεμελιώδης για τη διατήρηση του γενετικού υλικού και κατ' επέκταση των φυτών.

Η αποθήκευση των σπερμάτων σε Τράπεζες Σπερμάτων αποτελεί την επικρατούσα μέθοδο εκτός τόπου διατήρησης, αφού διασφαλίζει την διατήρηση μεγάλου εύρους γενετικής ποικιλότητας σε μικρό χώρο. Ωστόσο εξίσου σημαντική είναι η γνώση των κατάλληλων συνθηκών φύτευσης των σπερμάτων και ανάπτυξης των αρτιβλάστων, καθώς και των κατάλληλων μεθόδων για την επιτυχή εγκατάσταση των αρτιβλάστων στο πεδίο. Η Τράπεζα Σπερμάτων οφείλει να παράσχει το υλικό καθώς και τις βασικές πληροφορίες για πιθανή επανεισαγωγή του είδους στο φυσικό του βιότοπο, σε περίπτωση καταστροφικών γεγονότων, ή την ενίσχυση προϋπαρχόντων υποπληθυσμών.

Στα πλαίσια του Προγράμματος PLANT-NET CY, πραγματοποιήθηκαν συλλογές σπερμάτων μέσα στα όρια των Μικρο-Αποθεμάτων Φυτών (ΜΑΦ), σε όλη τη διάρκεια του προγράμματος για τη συλλογή όσο το δυνατόν περισσότερων σπορομερίδων. Επίσης πραγματοποιήθηκαν και συλλογές από υποπληθυσμούς των ειδών-στόχων εκτός των ορίων των ΜΑΦ, για τη διασφάλιση της εκτός τόπου διατήρησης του μεγαλύτερου δυνατού τμήματος της γενετικής ποικιλότητας των ειδών, όπου κατέστη δυνατό. Ορισμένες από τις συλλογές χρησιμοποιήθηκαν για την πραγματοποίηση πειραμάτων φύτευσης και την παραγωγή νέων φυτών και ορισμένες αποθηκεύτηκαν στις Τράπεζες Σπερμάτων του Ινστιτούτου Γεωργικών Ερευνών και του Πανεπιστημίου Frederick (Πίνακας 1).

Για όλα τα είδη-στόχους ήταν δυνατή η αποθήκευση των σπερμάτων σε Τράπεζες Σπερμάτων εκτός από την *Quercus alnifolia*, είδος το οποίο παράγει ανορθόδοξα σπέρματα, τα οποία με την

αφυδάτωση χάνουν τη βιωσιμότητά τους και συνεπώς δεν μπορούν να αποθηκευτούν στους – 20 °C.

**Πίνακας 1.** Συλλογές σπερμάτων στα πλαίσια του Προγράμματος PLANT-NET CY.

Taxon	Ημερομηνία Συλλογής	Περιοχή Συλλογής	Φύλαξη στην Τράπεζα Σπερμάτων <sup>1</sup>
<i>Arabis kennedyae</i>	11/05/2010	Τρίφυλος	-
	05/2011	Φυτά καλλιέργειας από σπέρματα Τριτύλου του 2010	2000 (IGE) + 80000 (Frederick)
	09+15/06/2011	Τρίφυλος	-
	25/05/2012	Τρίφυλος	720 (Frederick)
	30/04/2012	Φυτά καλλιέργειας από σπέρματα καλλιέργειας του 2011 (2ης γενιάς)	-
	30/04/2012	Φυτά καλλιέργειας από σπέρματα Τριτύλου του 2010	1300 (IGE)
	17/05/2013	Τρίφυλος	800(IGE) + 853 (Frederick)
	27/05/2013	Χιονίστρα	3200 (Frederick)
	27/05/2013	Κρύος Ποταμός	64 (Frederick)
<i>Astragalus macrocarpus</i> subsp. <i>lefkarensis</i>	27/05/2010	Ασγάτα	-
	10/05/2011, 16/06/2011, 12/07/2011	Ασγάτα	-
	12/06/2012	Ασγάτα	150 (IGE) + 150 (Frederick)
	24/05/2013	Αθαλάσσα	540 (IGE) + 540 (Frederick)
	28/05/2013	Ασγάτα	104 (IGE) + 104 (Frederick)
	30/05/2013	Κελοκέδαρα	81 (IGE)
<i>Cedrus brevifolia</i>	12+13+14/09/2011	Τρίφυλος	5200 (IGE) + 5800 (Frederick)
	27/09/2011	Μαύροι Γκρεμοί – Κονίζι	760 (IGE) + 760 (Frederick)
	27/09/2011	Έξω Μύλος	700 (IGE) + 700 (Frederick)
	13/10/2011	Θρονί	900 (IGE) + 900 (Frederick)
	13/10/2011	Σελλάδι της Ελιάς	430 (IGE) + 430 (Frederick)
<i>Centaurea akamantis</i>	17/11/2010	Φαράγγι του Άβακα	230 (IGE) + 370 (Frederick)
	14+25/07/2011	Φαράγγι του Άβακα	400 (IGE) + 227 (Frederick)
	24/07/2012, 01+09/08/2012	Φαράγγι του Άβακα	300 (IGE) + 335 (Frederick)
	05/10/2012	Φαράγγι του Άβακα	-
<i>Ophrys kotschy</i>	29/04/2010	Μιτσερό	5200 (IGE) + 5800 (Frederick)
	29/04/2011, 13/05/2011	Μιτσερό	-
	25/04/2012, 04/05/2012	Μιτσερό	-
	19/04/2013	Μιτσερό	350000 (Frederick)
	29/04/2013	Αλάμπρα	156000 (Frederick)
	30/04/2013	Μάμμαρη	50000 (Frederick)
<i>Quercus alnifolia</i>	24/10/2011	Μαδαρή	-
	11/2013	Τρίφυλος	-

<sup>1</sup> Οι αριθμοί αντιστοιχούν στον αριθμό των σπερμάτων που είναι αποθηκευμένοι στην Τράπεζα Σπερμάτων του Ινστιτούτου Γεωργικών Ερευνών (IGE) και του Πανεπιστημίου Frederick (Frederick).

## 2. Μεθοδολογία

### 2.1 Συλλογές Φυτικού Υλικού

Οι συλλογές έγιναν σύμφωνα με το Seed Collecting Manual for Wild Species που ετοιμάστηκε από το Ευρωπαϊκό Δίκτυο Διατήρησης Σπερμάτων Αυτοφυών Φυτών - ENSCONET (European Native Seed Conservation Network) ώστε να διασφαλιστεί η επιβίωση των φυσικών υποπληθυσμών των ειδών-στόχων. Μετά τη συλλογή, πραγματοποιήθηκε καθαρισμός των σπερμάτων και φύλαξη στο εργαστήριο σε θερμοκρασία δωματίου ή στο ξηραντήριο (θερμοκρασία c. 20 °C και σχετική υγρασία 15%). Στη συνέχεια ορισμένες συλλογές τοποθετήθηκαν στις Τράπεζες Σπερμάτων και ορισμένες χρησιμοποιήθηκαν για τον εργαστηριακό έλεγχο της φύτρωσης και την ανάπτυξη αρτιβλάστων.

Ωστόσο σε κάποιες συλλογές υπάρχουν κάποιες ιδιαιτερότητες. Λόγω της χαμηλής αναπαραγωγικής επιτυχίας στο είδος *Ophrys kotschyi*, πραγματοποιήθηκε τεχνητή επικονίαση (αυτεπικονίαση, σταυρωτή επικονίαση) και συνεπώς σε ορισμένες συλλογές τα σπέρματα προέρχονται από κάψες που προέκυψαν μετά από αυτή τη μέθοδο. Ορισμένες συλλογές της *Arabis kennedyae* ανανεώθηκαν από την καλλιέργεια των φυτών στο φυτώριο της Αθαλάσσας, λόγω του μικρού αριθμού σπερμάτων που ήταν δυνατόν να συλλεχθούν από τον φυσικό υποπληθυσμό του είδους.

## **2.2 Έλεγχος της φύτευσης στο εργαστήριο**

Πειράματα φύτευσης πραγματοποιήθηκαν στα εργαστήρια των Πανεπιστημίων Αθηνών και Frederick. Τα πειράματα για τα είδη *Arabis kennedyae*, *Astragalus macrocarpus* subsp. *lefkarensis*, *Cedrus brevifolia* και *Centaurea akamantis* πραγματοποιήθηκαν σε τρυβλία Petri με διηθητικό χαρτί και απεσταγμένο νερό. Για το είδος *Quercus alnifolia* χρησιμοποιήθηκαν πλαστικά κουτιά με βαμβάκι, διηθητικό χαρτί και απεσταγμένο νερό. Τέλος τα πειράματα της *Ophrys kotschyi* έγιναν με ειδική διαδικασία, όπως περιγράφεται στο Παράρτημα.

Ανάλογα με την διαθεσιμότητα των σπερμάτων η φύτευση ελέγχθηκε σε διάφορες θερμοκρασίες – σταθερές και εναλλασσόμενες - και διερευνήθηκε η επίδραση του φωτεινού καθεστώτος στη φύτευση (πειράματα σε λευκό φως και σκοτάδι).

## **2.3 Ανάπτυξη αρτιβλάστων στο φυτώριο**

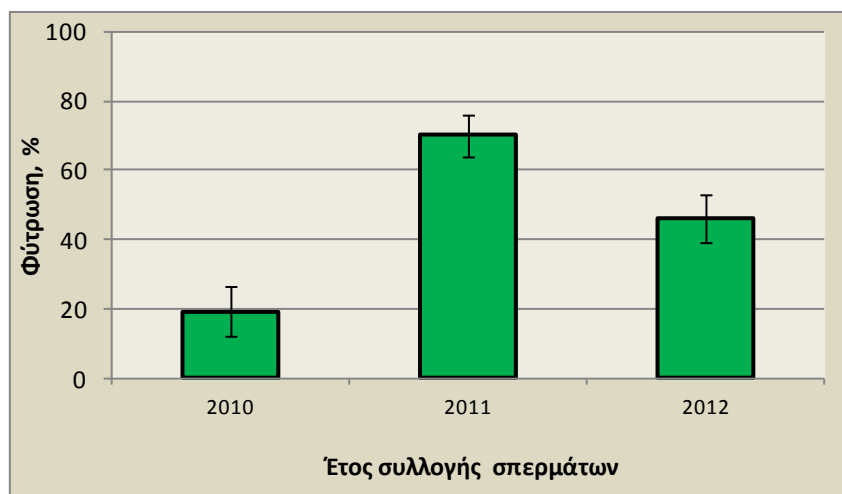
Η ανάπτυξη των αρτιβλάστων, μετά τη φύτευση των σπερμάτων και πριν τη φύτευση σε επιλεγμένες θέσεις εντός των ΜΑΦ, πραγματοποιήθηκε στο φυτώριο της Αθαλάσσας. Τα αρτίβλαστα παρέμειναν στο φυτώριο για διάφορα χρονικά διαστήματα. Το χώμα που χρησιμοποιήθηκε, ήταν ένα μείγμα από χώμα της περιοχής ή παραπλήσιο της περιοχής όπου συναντάται ο φυσικός πληθυσμός κάθε είδους και φυτόχωμα εμπλουτισμένο με θρεπτικές ουσίες (peat moss). Οι συνθήκες που επικρατούσαν στο θερμοκήπιο ήταν περίπου 60% σχετική υγρασία και 26 °C (σύστημα κλιματισμού κυψελίδων). Δεν προστέθηκαν χημικές ουσίες ή ορμόνες.

## **3. *Arabis kennedyae***

Η συλλογή των σπερμάτων πραγματοποιείται τους μήνες Ιούνιο και Ιούλιο. Σε πειράματα φύτευσης με σπέρματα από διαφορετικούς υποπληθυσμούς της *A. kennedyae* η φύτευση επιτυγχάνεται στους 15 °C είτε στο σκοτάδι (Καδής 1995) είτε μετά από ένα φωτισμό 5 min Ανοικτού Ερυθρού φωτός, μία ώρα μετά τη διάβρεξη των σπερμάτων (Ανδρέου 2010). Στα πλαίσια του Προγράμματος πραγματοποιήθηκαν πειράματα φύτευσης με τις συλλογές κάθε έτους (συλλογές 2010, 2011, 2012) στους 15 °C στο σκοτάδι, μετά από ένα φωτισμό 5 min Ανοικτού Ερυθρού φωτός, μία ώρα μετά τη διάβρεξη των σπερμάτων (Εικόνα 1). Το τελικό ποσοστό φύτευσης ωστόσο δεν ξεπέρασε το 80% στις συγκεκριμένες πειραματικές συνθήκες και επιπλέον κάποιες χρονιές ήταν πολύ χαμηλό. Η διαφορά στη φυτρωτική συμπεριφορά από χρονιά σε χρονιά

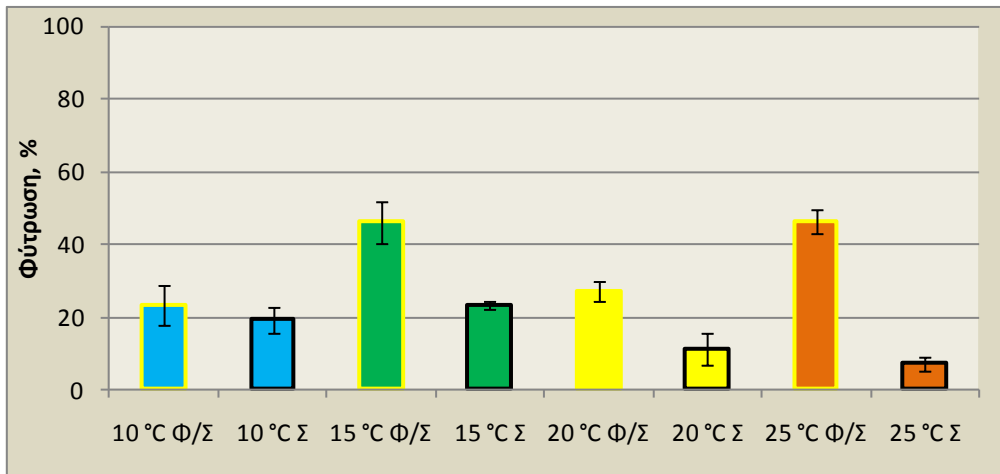


μπορεί να οφείλεται στις συνθήκες ωρίμανσης των σπερμάτων, την ημερομηνία ή την ποιότητα της συλλογής.

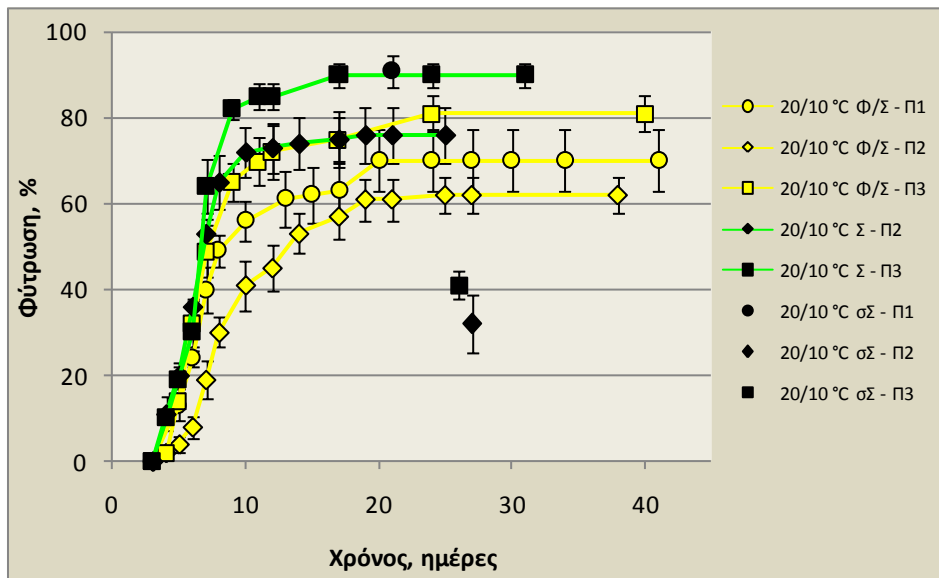


**Εικόνα 1.** Τελικά ποσοστά φύτρωσης σπερμάτων *Arabis kennedyae* στους 15 °C στο σκοτάδι, μετά από ένα φωτισμό 5 min Ανοικτού Ερυθρού φωτός, μία ώρα μετά τη διάβρεξη των σπερμάτων. Οι κατακόρυφες γραμμές αντιστοιχούν στο  $\pm$  τυπικό σφάλμα.

Τα αρτίβλαστα που προήλθαν από τα σπέρματα που συλλέχθηκαν το 2010 από τον υποπληθυσμό της *A. kennedyae* εντός του ΜΑΦ, μεταφέρθηκαν στο φυτώριο της Αθαλάσσης. Με τα σπέρματα που προέκυψαν από τα φυτά αυτά πραγματοποιήθηκαν πειράματα φύτρωσης στις σταθερές θερμοκρασίες 10, 15, 20 και 25 °C (Εικόνα 2) και στη εναλλασσόμενη 20/10 °C, σε εναλλασσόμενες συνθήκες φως/σκοτάδι και στο σκοτάδι (Εικόνα 3). Επίσης στους 20/10 °C τοποθετήθηκε και ένα πείραμα σε συνεχές Σκοτάδι για τη διερεύνηση της επίδρασης του πράσινου φωτός ασφαλείας (που χρησιμοποιείται για τις ενδιάμεσες μετρήσεις του πειράματος στο σκοτάδι) στη φύτρωση. Άριστη θερμοκρασία φύτρωσης είναι οι 20/10 °C και παρατηρείται προώθηση της φύτρωσης τόσο από το λευκό φως όσο και από το πράσινο φως ασφαλείας. Στις σταθερές θερμοκρασίες που μελετήθηκαν τα ποσοστά φύτρωσης ήταν χαμηλά (<50%). Η διαφορά στη φυτρωτική συμπεριφορά της συλλογής από το φυτώριο σε σύγκριση με τη συλλογή από τον φυσικό πληθυσμό οφείλεται πιθανόν στις διαφορετικές συνθήκες ωρίμανσης των σπερμάτων στο μητρικό φυτό.



**Εικόνα 2.** Τελικά ποσοστά φύτευσης σπερμάτων *Arabis kennedyae* (συλλογή 2011, φυτώριο Αθαλάσσιας) στους 10, 15, 20 και 25 °C, σε εναλλασσόμενες συνθήκες Φως/Σκοτάδι 12h/12h (Φ/Σ) και στο Σκοτάδι (Σ). Οι κατακόρυφες γραμμές αντιστοιχούν στο ± τυπικό σφάλμα.



**Εικόνα 3.** Χρονική πορεία της φύτευσης σπερμάτων *Arabis kennedyae* (συλλογή 2011, φυτώριο Αθαλάσσιας) και  $T_{50}$  στους 20/10 °C, σε εναλλασσόμενες συνθήκες Φως/Σκοτάδι 12h/12h (Φ/Σ) και στο Σκοτάδι (Σ) ή σε συνεχές Σκοτάδι (σΣ, χωρίς ενδιάμεσες μετρήσεις). Τα πειράματα (Π) επαναλήφθηκαν 2-3 φορές. Οι κατακόρυφες γραμμές αντιστοιχούν στο ± τυπικό σφάλμα.

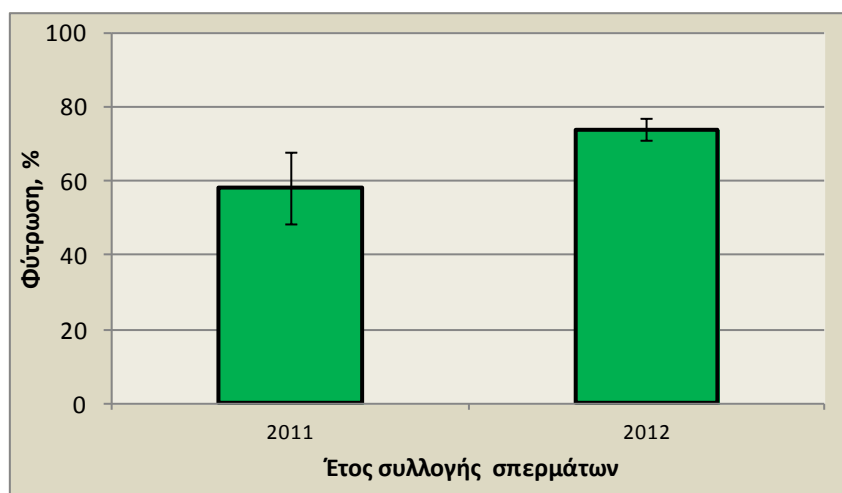
Η εμφάνιση των αρτιβλάστων παρατηρείται σε δύο περιόδους: το φθινόπωρο ή αρχές του χειμώνα (Νοέμβριο ή Δεκέμβριο) και την άνοιξη (αμέσως μετά το λιώσιμο των χιονιών), όταν οι μέγιστες ημερήσιες θερμοκρασίες ταυτίζονται με τις ευνοϊκές θερμοκρασίες φύτευσης (15-20 °C) (Ανδρέου 2010). Τα ποσοστά επιβίωσης ήταν καλύτερα όταν πραγματοποιήθηκε η φύτευση των αρτιβλάστων στο πεδίο τέλος φθινοπώρου με αρχές χειμώνα (Νοέμβριο-Δεκέμβριο) σε σύγκριση με την άνοιξη (Μάρτιο-Απρίλιο).

#### 4. *Astragalus macrocarpus* subsp. *lefkarensis*

Οι χέδρωπες ωριμάζουν τέλος Μαΐου με αρχές Ιουνίου, οπότε είναι και η κατάλληλη περίοδος για τη συλλογή τους. Επειδή τα άνθη εμφανίζονται πρώτα στο κατώτερο τμήμα του φυτού και στη συνέχεια στην κορυφή, η ωρίμανση των χεδρώπων δεν είναι ταυτόχρονη οπότε πρέπει η

συλλογή να γίνεται με προσοχή. Η απελευθέρωση των σπερμάτων από τους χέδρωπες γίνεται σταδιακά με την αποσύνθεσή τους, ένα χρόνο περίπου μετά την ωρίμανσή τους (Καδής 1995). Οι καρποί του *A. macrocarpus* subsp. *lefkarensis* προσβάλλονται από το έντομο *Bruchidius plagiatus*, η προνύμφη του οποίου εκκολάπτεται μέσα στα σπέρματα και καταναλώνει τα θρεπτικά τους συστατικά, καταστρέφοντας το 50-75% των αναπτυσσόμενων σπερμάτων. Οι χέδρωπες οι οποίοι περιλαμβάνουν προσβεβλημένα σπέρματα έχουν συνήθως μια εμφανή οπή.

Τα σπέρματα του *A. macrocarpus* subsp. *lefkarensis* είναι ληθαργικά, γεγονός που οφείλεται στο σκληρό και αδιάβροχο περιβλήμα τους. Ο τραυματισμός του περιβλήματος των σπερμάτων έχει ως αποτέλεσμα τη διάβρεξή τους και την πλήρη φύτρωσή τους σε θερμοκρασίες 10-25 °C (Καδής 1995). Στα πλαίσια του Προγράμματος πραγματοποιήθηκαν πειράματα φύτευσης με τις συλλογές κάθε έτους (συλλογές 2011, 2012) μόνο στους 15 °C στο σκοτάδι, μετά από μηχανικό τραυματισμό του περιβλήματος και επίπαση των σπερμάτων με thiram (μυκητοκτόνο), λόγω της περιορισμένης διαθεσιμότητας υγιών σπερμάτων. Τα τελικά ποσοστά φύτευσης κυμαίνονται από 58 έως 74% (Εικόνα 4).

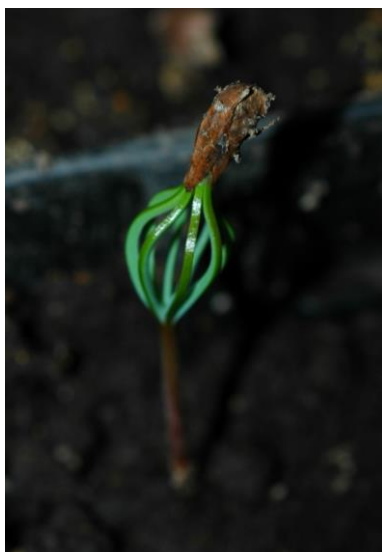


**Εικόνα 4.** Τελικά ποσοστά φύτευσης σπερμάτων *Astragalus macrocarpus* subsp. *lefkarensis* στους 15 °C στο σκοτάδι, μετά από μηχανικό τραυματισμό του περιβλήματος και επίπαση των σπερμάτων με thiram. Οι κατακόρυφες γραμμές αντιστοιχούν στο  $\pm$  τυπικό σφάλμα.

Η εμφάνιση των αρτιβλάστων στη φύση ξεκινά προς το τέλος του χειμώνα και μεγιστοποιείται μέσα στο Μάρτιο, ενώ η θνησιμότητά τους αυξάνεται με την έναρξη της θερμής και ξηρής θερινής περιόδου (Καδής 1995). Η καταλληλότερη περίοδος φύτευσης των νεαρών φυτών είναι προς το τέλος του χειμώνα (Φεβρουάριος) μετά από 2 μήνες στο φυτώριο, αφού η ανάπτυξή τους είναι καλύτερη από τη φύτευση τέλος φθινοπώρου με αρχές χειμώνα (Νοέμβριο-Δεκέμβριο). Αυτή η παρατήρηση έγινε και στο φυτώριο, όπου λόγω μιας βλάβης τα νεαρά φυτά έμειναν εκτός θερμοκηπίου κατά τους χειμερινούς μήνες και δεν επιβίωσαν.

##### **5. *Cedrus brevifolia***

Ωριμοι καρποί του *Cedrus brevifolia* παρατηρούνται Αύγουστο – Σεπτέμβριο, τον δεύτερο χρόνο από την άνθιση, οπότε η κατάλληλη περίοδος συλλογής κώνων είναι τέλος Σεπτεμβρίου με

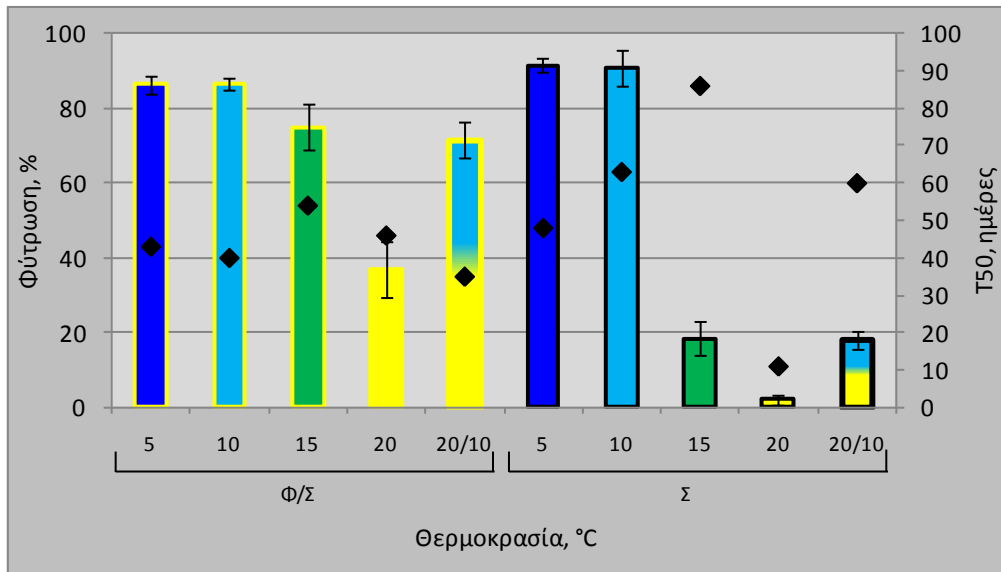


**Φωτογραφία 1.** Αρτίβλαστο *Cedrus brevifolia*.

αρχές Οκτωβρίου. Η παραγωγή κώνων παρουσιάζει ποσοτικές διακυμάνσεις ανάλογα με τη χρονιά. Μετά τη συλλογή των κώνων, η εξαγωγή των σπερμάτων πραγματοποιείται με διάβρεξη των κώνων για 24 h σε νερό. Το ποσοστό των κενών σπερμάτων προσδιορίστηκε με τομή και διαφέρει ανάλογα με την χρονιά και την περιοχή συλλογής. Τα ποσοστά των κενών σπερμάτων για τις συλλογές από Τρίπυλο, Έξω Μύλος, Μαύροι Γκρεμοί (Κονίζι), Σελλάδι της Ελιάς και Θρονί ήταν 12, 12, 20, 32 και 18% αντίστοιχα. Η μάζα σπέρματος των υγιών σπερμάτων είναι  $66,0 \text{ mg} \pm 1,0$ .

Η φύτευση των σπερμάτων του είδους *C. brevifolia*, ευνοείται στις χαμηλές θερμοκρασίες των 5 και 10 °C, όμως το τάχος φύτευσης είναι αρκετά μικρό και το τελικό ποσοστό φύτευσης ελαττώνεται σημαντικά όσο ανεβαίνει η θερμοκρασία (Georghίου *et al.* 1992). Η αύξηση του τάχους και του τελικού ποσοστού φύτευσης στους 20 °C επιτυγχάνεται με ψυχρή στρωμάτωση διάρκειας 6-8 εβδομάδων (Georghίου *et al.* 1992, Δασκαλάκου και συν. 1991).

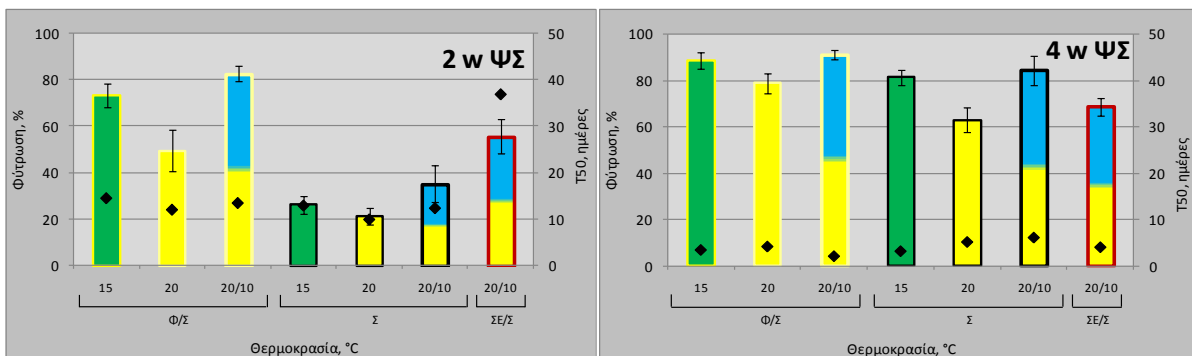
Με σπέρματα της συλλογής του 2011 από την Τρίπυλο πραγματοποιήθηκαν πειράματα φύτευσης στις σταθερές θερμοκρασίες 5, 10, 15 και 20 °C και στην εναλλασσόμενη 20/10 °C σε εναλλασσόμενες συνθήκες φως/σκοτάδι και στο σκοτάδι, χωρίς προμεταχειρίσεις (Εικόνα 5). Η φύτευση ευνοείται στις χαμηλές θερμοκρασίες (5 και 10 °C) με τελικά ποσοστά >80% και καθώς αυξάνεται η θερμοκρασία το ποσοστό φύτευσης μειώνεται. Ωστόσο το τάχος φύτευσης στις ευνοϊκές θερμοκρασίες είναι πολύ μικρό, με  $T_{50}$  πάνω από 40 ημέρες. Το λευκό φως επιδρά στη φύτευση είτε αυξάνοντας το τάχος φύτευσης στις χαμηλές θερμοκρασίες, είτε αυξάνοντας το τελικό ποσοστό φύτευσης στις υψηλές θερμοκρασίες.



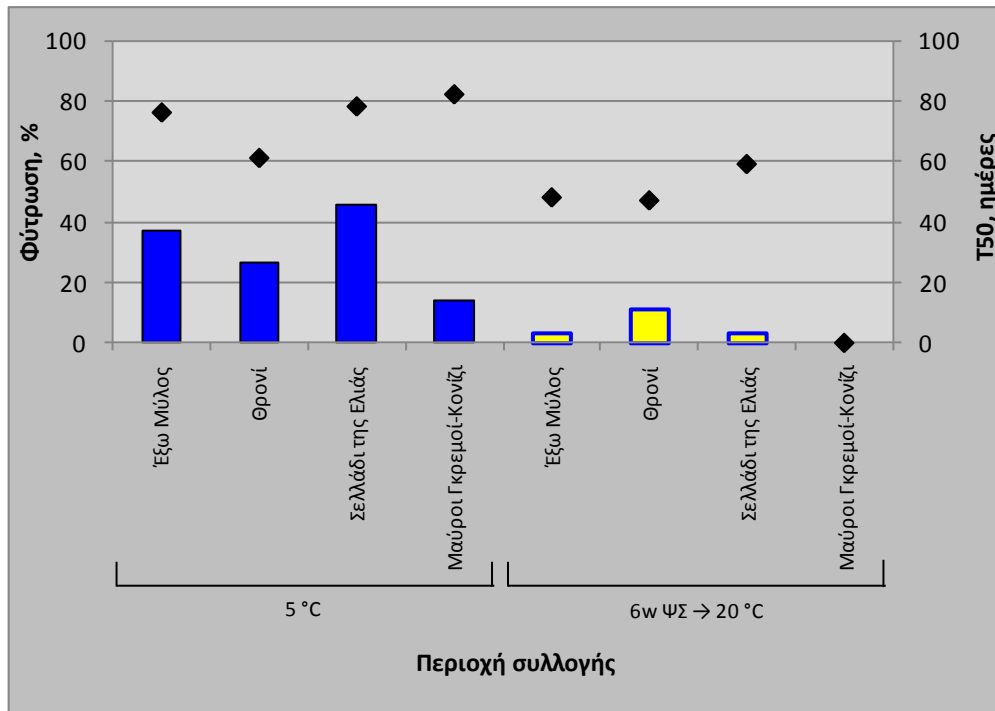
**Εικόνα 5.** Τελικά ποσοστά φύτρωσης σπερμάτων *Cedrus brevifolia* (συλλογή Τρίτυλος 2011) και T<sub>50</sub> στους 5, 10, 15, 20 και 20/10 °C, σε εναλλασσόμενες συνθήκες Φως/Σκοτάδι 12h/12h (Φ/Σ) και στο Σκοτάδι (Σ). Οι κατακόρυφες γραμμές αντιστοιχούν στο ± τυπικό σφάλμα.

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν πειράματα φύτρωσης στους 15, 20 και 20/10 °C μετά από ψυχρή στρωμάτωση 6 και 8 εβδομάδων αλλά τα περισσότερα σπέρματα φύτρωσαν κατά τη διάρκεια της προμεταχείρισης. Συνεπώς ελέγχθηκαν προμεταχειρίσεις μικρότερης διάρκειας, δηλαδή ψυχρή στρωμάτωση 2 και 4 εβδομάδων (Εικόνα 6). Αύξηση του τάχους φύτρωσης παρατηρείται από τις 2 εβδομάδες ψυχρής στρωμάτωσης. Ωστόσο τα καλύτερα τελικά ποσοστά καθώς και το μεγαλύτερο τάχος φύτρωσης επιτυγχάνονται μετά από 4 εβδομάδες ψυχρής στρωμάτωσης, παρουσία λευκού φωτός.

Εντούτοις, τα αποτελέσματα από τα πειράματα φύτρωσης με συλλογές σπερμάτων από περιοχές εκτός ΜΑΦ, την ίδια χρονιά, ήταν διαφορετικά. Δεν επιτεύχθηκαν καλά ποσοστά φύτρωσης ούτε στους 5 °C αλλά ούτε και στους 20 °C μετά από ψυχρή στρωμάτωση 6 εβδομάδων (Εικόνα 7).



**Εικόνα 6.** Τελικά ποσοστά φύτρωσης σπερμάτων *Cedrus brevifolia* (συλλογή Τρίτυλος 2011) και T<sub>50</sub> στους 5, 10, 15, 20 και 20/10 °C, σε εναλλασσόμενες συνθήκες Φως/Σκοτάδι (Φ/Σ) ή Σκοτεινό Ερυθρό/Σκοτάδι (ΣΕ/Σ) 12h/12h και στο Σκοτάδι (Σ) μετά από ψυχρή στρωμάτωση (ΨΣ) 2 ή 4 εβδομάδων. Οι κατακόρυφες γραμμές αντιστοιχούν στο ± τυπικό σφάλμα.



**Εικόνα 7.** Τελικά ποσοστά φύτρωσης σπερμάτων *Cedrus brevifolia* και T<sub>50</sub> στους 5 °C ή στους 20 °C μετά από ψυχρή στρωμάτωση (ΨΣ) 6 εβδομάδων, σε εναλλασσόμενες συνθήκες Φως/Σκοτάδι 12h/12h.

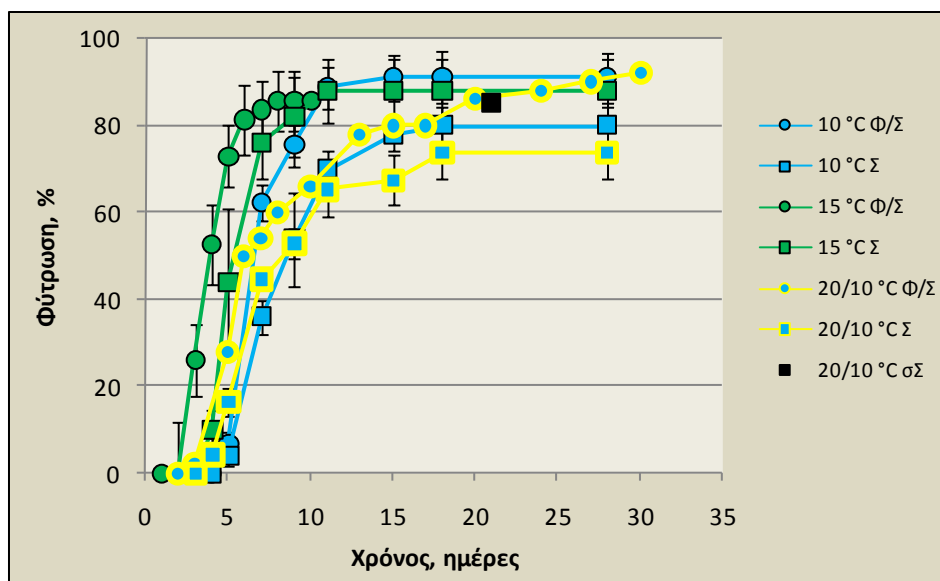
## 6. *Centaurea akamantis*

Η ωρίμανση και η διασπορά των σπερμάτων της *Centaurea akamantis* ξεκινάει από τον Ιούλιο και διαρκεί μέχρι τον Σεπτέμβριο, λόγω της παρατεταμένης περιόδου ανθοφορίας. Τα σπέρματα ωριμάζουν σταδιακά, τόσο στις ταξικαρπίες σε διαφορετικά μέρη του φυτού αλλά και μέσα στην ίδια ταξικαρπία. Η συλλογή θα πρέπει να γίνεται πολύ προσεκτικά και να συλλέγονται οι φαινομενικά ώριμες ταξικαρπίες. Πριν την έναρξη των πειραμάτων φύτρωσης ή την αφυδάτωση με σκοπό την αποθήκευση, θα πρέπει να παραμένουν σε συνθήκες δωματίου για κάποιο χρονικό διάστημα ώστε να ολοκληρωθεί η ωρίμανσή τους.

Η φύτρωση των σπερμάτων της *Centaurea akamantis* πραγματοποιείται στις θερμοκρασίες 5, 10, 15 και 20 °C στο σκοτάδι, με άριστη θερμοκρασία τους 10 °C και δεν επηρεάζεται από το φωτεινό καθεστώς (Καδής 1995). Στα πλαίσια του Προγράμματος πραγματοποιήθηκαν πειράματα φύτρωσης με τις συλλογές κάθε έτους (συλλογές 2010, 2011, 2012) στους 10 °C στο σκοτάδι, μετά από επίταση των σπερμάτων με thiram. Τα τελικά ποσοστά φύτρωσης κυμαίνονται από 57 έως 69%.

Με σπέρματα της συλλογής 2012 πραγματοποιήθηκαν πειράματα φύτρωσης στις σταθερές θερμοκρασίες 10 και 15 °C και στην εναλλασσόμενη 20/10 °C σε εναλλασσόμενες συνθήκες φως/σκοτάδι και στο σκοτάδι (Εικόνα 8). Επίσης στους 20/10 °C τοποθετήθηκε και ένα πείραμα σε συνεχές Σκοτάδι για τη διερεύνηση της επίδρασης του πράσινου φωτός ασφαλείας (που χρησιμοποιείται για τις ενδιάμεσες μετρήσεις του πειράματος στο σκοτάδι) στη φύτρωση, αλλά δεν

παρατηρήθηκαν διαφορές. Σε όλες τις πειραματικές συνθήκες είχε αφαιρεθεί ο πάππος από τα σπέρματα για την αποφυγή μολύνσεων και τα τελικά ποσοστά είναι πάνω από 70%.



**Εικόνα 8.** Χρονική πορεία της φύτευσης σπερμάτων *Centaurea akamantis* (συλλογή 2012) στους 10, 15 και 20/10 °C, σε εναλλασσόμενες συνθήκες Φως/Σκοτάδι 12h/12h (Φ/Σ) και στο Σκοτάδι (Σ) ή σε συνεχές Σκοτάδι (σΣ, χωρίς ενδιάμεσες μετρήσεις). Από τα σπέρματα είχε αφαιρεθεί ο πάππος. Οι κατακόρυφες γραμμές αντιστοιχούν στο  $\pm$  τυπικό σφάλμα.

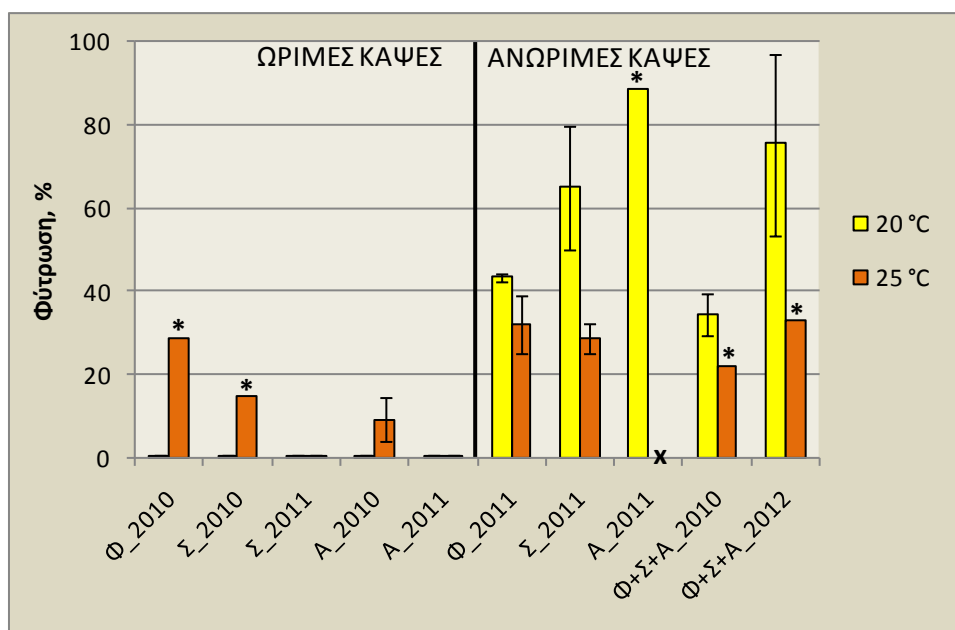
Στο πεδίο, αρτίβλαστα του είδους παρατηρούνται από το τέλος του καλοκαιριού, τόσο στις όχθες του ρυακιού που διασχίζει το φαράγγι του Άβακα όσο και στις σχισμές των κατακόρυφων κρημνών (Καδής 1995). Η φύτευση της *C. akamantis* είναι καλύτερα να πραγματοποιηθεί πριν το χειμώνα (Νοέμβριο-Δεκέμβριο) παρά την άνοιξη (λόγω των υψηλών θερμοκρασιών μέσα στο φαράγγι). Επίσης η επιτυχία εγκατάστασης είναι μεγαλύτερη όταν τα φυτά παραμείνουν στο φυτώριο για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο από 2 μήνες, αν και το πρόβλημα που προκύπτει είναι το μεγάλο μέγεθος των ριζών αφού δεν μπορούν να φυτευτούν σε σχισμές βράχων ή σε περιοχές με λίγο χώμα. Το πότισμα των νεαρών φυτών *C. akamantis* που φυτεύτηκαν στο φαράγγι του Άβακα γινόταν περίπου 2 φορές την εβδομάδα κατά τους καλοκαιρινούς μήνες, το πρώτο έτος της φύτευσης. Επίσης μπορούν να τοποθετηθούν σπέρματα σε σχισμές βράχων με λίγο χώμα, αλλά σε τοποθεσίες που δεν φτάνουν τα νερά του χειμάρρου το χειμώνα.

### 7. *Ophrys kotschyi*

Η καταλληλότερη εποχή για τη συλλογή ώριμων καψών της *Ophrys kotschyi* είναι στις αρχές με μέσα Μαΐου και για τις ανώριμες κάψες τον Απρίλιο. Ωστόσο το ποσοστό της Σχετικής Αναπαραγωγικής Επιτυχίας είναι πολύ μικρό λόγω της μειωμένης επισκεψιμότητας από έντομα-επικονιαστές και για αυτό το λόγο στη διάρκεια του Προγράμματος πραγματοποιήθηκε τεχνητή επικονίαση (αυτεπικονίαση και σταυρωτή επικονίαση).

Για τη διενέργεια των πειραμάτων φύτευσης, πραγματοποιήθηκε συλλογή καψών *O. kotschyi*, από άτομα, τα άνθη των οποίων επικονιάστηκαν από έντομα (φυσική επικονίαση) και από άτομα, τα άνθη των οποίων επικονιάστηκαν τεχνητά (τεχνητή επικονίαση), με αυτεπικονίαση και σταυρωτή επικονίαση. Συλλέχθηκαν ανώριμες (πράσινες) και ώριμες κάψες από όλες τις παραπάνω

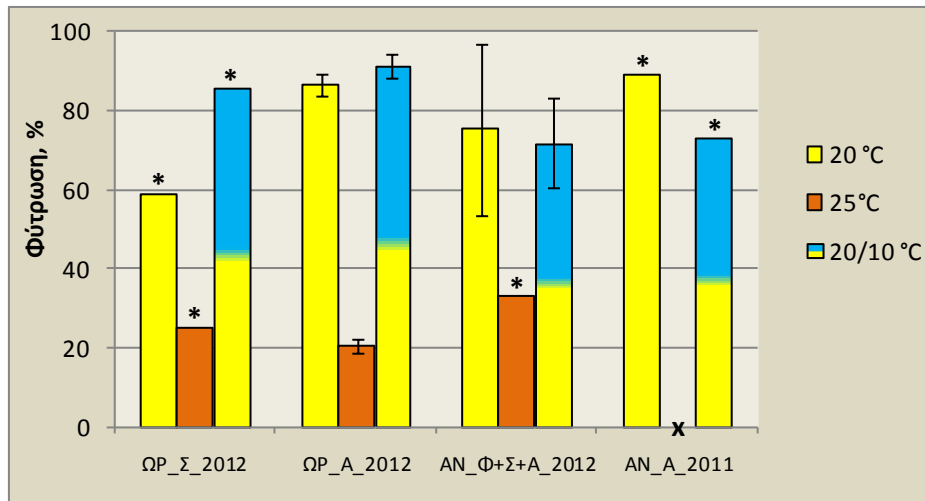
κατηγορίες κάθε έτος του Προγράμματος (2010, 2011, 2012). Η μεθοδολογία που ακολουθήθηκε για τη διενέργεια των πειραμάτων φύτευσης παρουσιάζεται στο Παράρτημα. Τα τελικά ποσοστά φύτευσης των ανώριμων σπερμάτων της *O. kotschy* ήταν μεγαλύτερα στους 20 °C στο σκοτάδι, σε σύγκριση με τους 25 °C, σε θρεπτικό υπόστρωμα Malmgren ενισχυμένο με καρύδα (MM) (Εικόνα 9). Ωστόσο η φύτευση δεν ξεπέρασε το 30% στα ώριμα σπέρματα και καλύτερη θερμοκρασία φαίνεται να είναι οι 25 °C. Αυτό ίσως οφείλεται στην διαφορετική προμεταχείριση (B, Παράρτημα) που υπέστησαν τα ώριμα σπέρματα σε αυτήν την ομάδα πειραμάτων. Στα πειράματα φύτευσης που πραγματοποιήθηκαν με το θρεπτικό Phytamax με προσθήκη IBA (PH) τα τελικά ποσοστά ήταν πολύ χαμηλά και για αυτό δεν παρουσιάζονται.



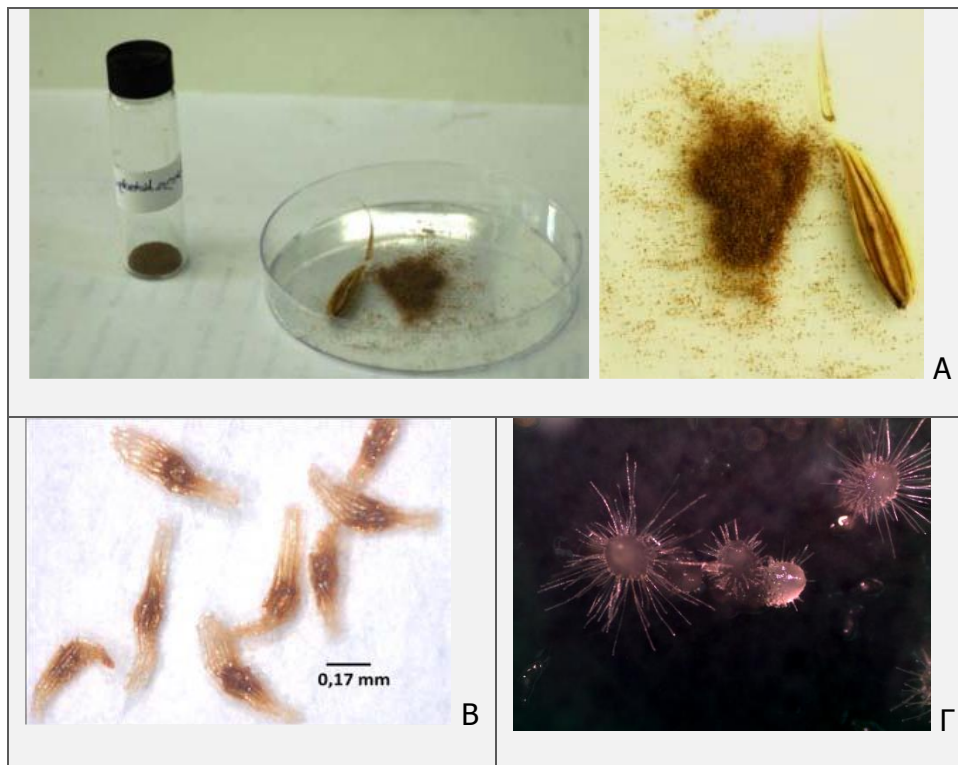
**Εικόνα 9.** Τελικά ποσοστά φύτευσης σπερμάτων *O. kotschy* σε θρεπτικό υπόστρωμα Malmgren ενισχυμένο με καρύδα (προμεταχείριση B για τις ώριμες κάψες). Φ: Φυσική Επικονίαση, Σ: Τεχνητή Σταυρωτή Επικονίαση, Α: Τεχνητή Αυτεπικονίαση. \*: ποσοστό φύτευσης από ένα τρυβλίο λόγω μόλυνσης, x: μολύνθηκαν και τα 2 τρυβλία. Οι κατακόρυφες γραμμές αντιστοιχούν στο  $\pm$  τυπικό σφάλμα.

Στη συνέχεια μελετήθηκε η φύτευση σε σπέρματα από ώριμες και ανώριμες κάψες με την ίδια προμεταχείριση (A, Παράρτημα) στους 20, 25 και 20/10 °C στο σκοτάδι (Εικόνα 10). Τα τελικά ποσοστά φύτευσης σε κάθε ομάδα ξεπερνούν το 70% και άριστες θερμοκρασίες είναι οι 20 και 20/10 °C. Φωτογραφίες της κάψας, των σπερμάτων και των φυτρωμένων σπερμάτων της *O. kotschy* παρουσιάζονται στην Φωτογραφία 2.





**Εικόνα 10.** Τελικά ποσοστά φύτρωσης σπερμάτων *O. kotschy* σε θρεπτικό υπόστρωμα Malmgren ενισχυμένο με καρύδα (προμεταχείριση Α για τις ώριμες κάψες). Φ: Φυσική Επικονίαση, Σ: Τεχνητή Σταυρωτή Επικονίαση, Α: Τεχνητή Αυτεπικονίαση. \*: ποσοστό φύτρωσης από ένα τρυβλίο λόγω μόλυνσης, x: μολύνθηκαν και τα 2 τρυβλία. Οι κατακόρυφες γραμμές αντιστοιχούν στο  $\pm$  τυπικό σφάλμα.



**Φωτογραφία 2.** Σπέρματα *Ophrys kotschy*. Α. Συλλογή σπερμάτων σε αεροστεγές γυάλινο μπουκαλάκι και ανώριμη κάψα, Β. Ανώριμα σπέρματα, Γ. Φυτρωμένα σπέρματα από τεχνητή σταυρωτή επικονίαση στους 25 °C σε θρεπτικό Malmgren.

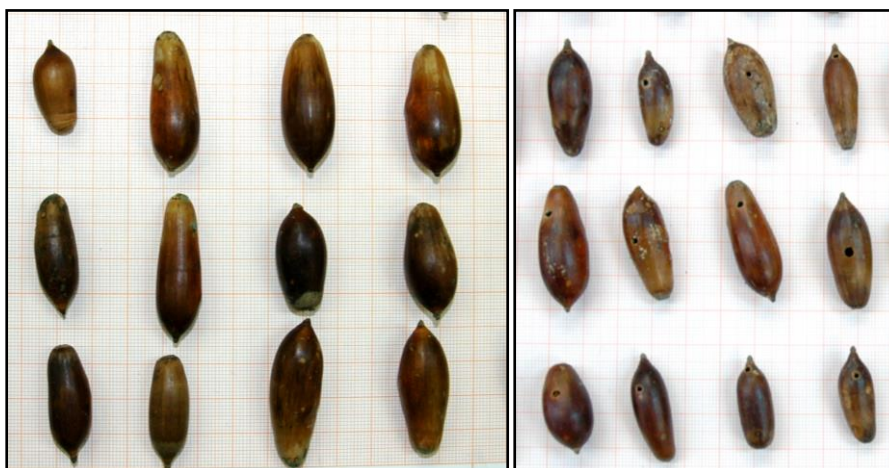
Μετά την εμφάνιση των ριζιδίων, τα φυτρωμένα σπέρματα μεταφέρθηκαν σε γυάλινα ή πλαστικά βάζα με θρεπτικό υπόστρωμα Malmgren ενισχυμένο με καρύδα (MM) και τοποθετήθηκαν στους 20 °C στο σκοτάδι. Στη συνέχεια μετά την εμφάνιση και αύξηση των πρώτων φύλλων μεταφέρθηκαν στους 20 °C στο φως (Φωτογραφία 3). Ωστόσο λόγω μολύνσεων δεν κατέστη δυνατή η μεταφορά τους σε χώμα και η ανάπτυξή τους στο φυτώριο.



**Φωτογραφία 3.** Ανάπτυξη νεαρών φυτών *Ophrys kotschy* στο εργαστήριο.

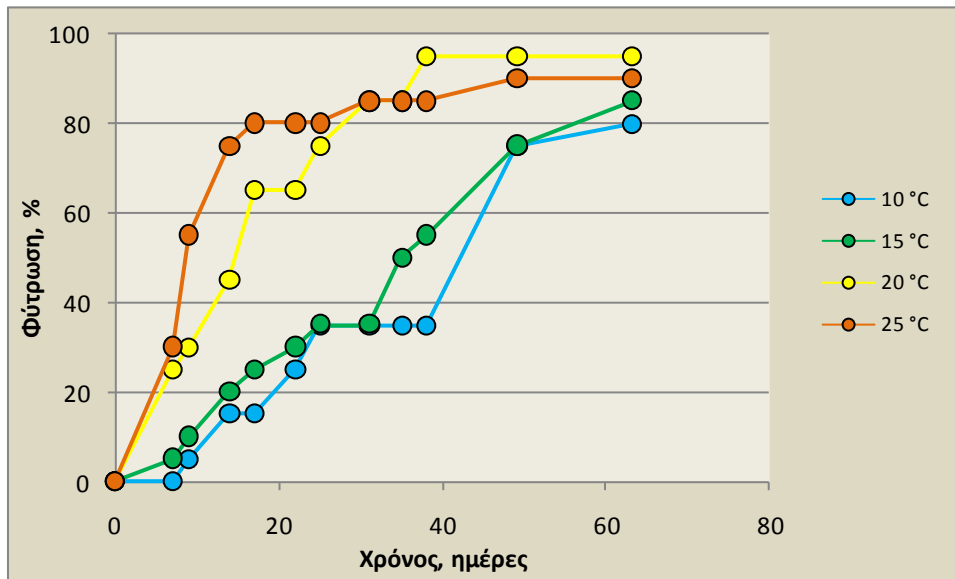
### 8. *Quercus alnifolia*

Οι καρποί της *Quercus alnifolia* ωριμάζουν τους μήνες Νοέμβριο-Δεκέμβριο, οπότε αυτή είναι η κατάλληλη περίοδος για την πραγματοποίηση της συλλογής. Ωστόσο στο είδος παρατηρείται το φαινόμενο της πληροκαρπίας, όπως είναι γνωστό και σε άλλα είδη του γένους *Quercus* (*Q. coccifera*, *Q. ilex* subsp. *ballota*, *Q. suber*, *Quercus faginea*, García-Fayos *et al.* 2001), οπότε δεν είναι δυνατή η συλλογή καρπών κάθε χρόνο. Επίσης μεγάλος αριθμός καρπών της *Q. alnifolia* είναι προσβεβλημένα από έντομο (Φωτογραφία 4) . Στη συλλογή από το ΜΑΦ, το ποσοστό των προσβεβλημένων καρπών ανήλθε στο 13,6%. Λόγω της αυξημένης υδατοπεριεκτικότητας, τα σπέρματα μπορούν να φυτρώνουν χωρίς να διαβραχούν, οπότε τα πειράματα φύτευσης θα πρέπει να πραγματοποιούνται αμέσως μετά τη συλλογή. Στη συλλογή από το ΜΑΦ, η υδατοπεριεκτικότητα των καρπών ήταν  $42,1\% \pm 1,42$  και σε λίγες ημέρες μετά τη συλλογή είχε φυτρώσει πάνω από το 15% των καρπών χωρίς διάβρεξη. Τα μορφομετρικά στοιχεία των καρπών της ίδιας συλλογής είναι: Μήκος  $36,2 \text{ mm} \pm 0,4$ , Πλάτος  $14,1 \text{ mm} \pm 1,3$  και Μάζα  $3,4 \text{ g} \pm 0,1$ .

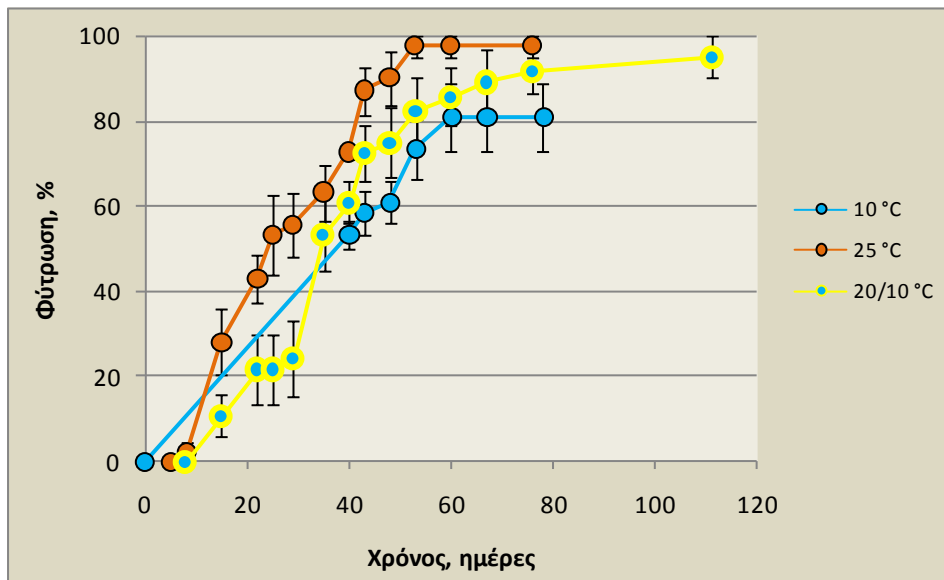


**Φωτογραφία 4.** Ακέραιοι (αριστερά) και προσβεβλημένοι (δεξιά) καρποί της *Quercus alnifolia*.

Σε εργαστηριακές συνθήκες, οι καρποί φυτρώνουν σε υψηλά ποσοστά (>80%) σε όλες τις θερμοκρασίες που μελετήθηκαν (10-25 °C και 20/10 °C) σε εναλλασσόμενες συνθήκες φως/σκοτάδι, αλλά το τάχος φύτευσης είναι μεγαλύτερο στις υψηλότερες θερμοκρασίες (Εικόνα 11, 12). Προκαταρκτικά πειράματα φύτευσης στο σκοτάδι είχαν ως αποτέλεσμα μηδενική φύτευση αλλά θα πρέπει να γίνει περαιτέρω διερεύνηση. Στα μεσογειακά είδη *Quercus* η φύτευση επιτυγχάνεται χωρίς προμεταχειρίσεις ενώ σε άλλα είδη έχει αναφερθεί η απαίτηση ψυχρής στρωμάτωσης (García-Fayos *et al.* 2001).



**Εικόνα 11.** Χρονική πορεία της φύτευσης καρπών *Quercus alnifolia* (συλλογή Μαδαρή 2012) σε εναλλασσόμενες συνθήκες Φως/Σκοτάδι 12h/12h.



**Εικόνα 12.** Χρονική πορεία της φύτευσης καρπών *Quercus alnifolia* (συλλογή Τρίφυλλος 2012) σε εναλλασσόμενες συνθήκες Φως/Σκοτάδι 12h/12h. Οι κατακόρυφες γραμμές αντιστοιχούν στο  $\pm$  τυπικό σφάλμα.

Λόγω της μικρής παραγωγής καρπών κατά τη διάρκεια του Προγράμματος δε κατέστη δυνατή η μελέτη της βιωσιμότητας των σπερμάτων κατά την αποθήκευση. Είναι γνωστό ότι οι

καρποί των ειδών του γένους *Quercus* έχουν ανορθόδοξη συμπεριφορά αποθήκευσης και το κρίσιμο επίπεδο της περιεχόμενης υγρασίας για την απώλεια βιωσιμότητας (μεταξύ 35 και 40% για τα μεσογειακά είδη *Quercus*) εξαρτάται από το είδος. Συνεπώς θα ήταν προτιμότερο να υπάρχουν φυτά στο φυτώριο και όχι διατήρηση των καρπών σε Τράπεζα Σπερμάτων. Τα αρτίβλαστα αναπτύσσονται καλύτερα σε ορεινό φυτώριο, σε απλό χώμα με περλίτη και δροσερές θερμοκρασίες.

## 9. Βιβλιογραφία

- García-Fayos P., Gulias J., Martínez J., Marzo A., Melero J.P., Traveset A., Veintimilla P., Verdú M., Cerdán V., Gasque M. & Medrano H. 2001. Bases ecológicas para la recolección, almacenamiento y germinación de semillas de especies de uso forestal de la Comunidad Valenciana. Banc de Llavors Forestals (Conselleria de Medi Ambient, Generalitat Valenciana).
- Georghiou K., Thanos C.A., Daskalaku E. 1992. Ecophysiology of seed germination in *Cedrus brevifolia* (Hook. f.) Henry. Proceedings of the 14th Panhellenic Biological Conference, pp. 43-44. Nicosia, Cyprus.
- Ανδρέου Μ. 2010. Βιολογία Διατήρησης Σπάνιων Φυτών της Κύπρου. Διδακτορική Διατριβή. Τμήμα Βιολογίας ΕΚΠΑ, Αθήνα.
- Δασκαλάκου Ε., Θάνος Κ.Α., Γεωργίου Κ. 1991. Η φυσιολογία της φύτρωσης των σπερμάτων του Κυπριακού κέδρου (*Cedrus brevifolia* (Hook. f.) Henry). Πρακτικά 13ου Συνεδρίου ΕΕΒΕ, Ηράκλειο.
- Καδής Κ. 1995. Η αναπαραγωγική Βιολογία των αυστηρώς Προστατευμένων Φυτών της Κυπριακής χλωρίδας. Διδακτορική Διατριβή. Τμήμα Βιολογίας ΕΚΠΑ, Αθήνα.
- Μαριά Ε.-Α., Φουρναράκη Χ., Θάνος Κ. 2012. Εκτός τόπου (*ex situ*) διατήρηση της φυτικής ποικιλότητας – σκέψεις και προτάσεις για ένα αποτελεσματικό σύστημα διοικητικής οργάνωσης των ελληνικών Τραπεζών Σπόρων (Seed Banks). Περιβάλλον & Δίκαιο, 4: 628-650.

## Παράρτημα

### Πειραματική διαδικασία για τη φύτευση των σπερμάτων *Ophrys kotschy*

Για την αποστείρωση των σπερμάτων και τη μετέπειτα τοποθέτησή τους σε τρυβλία κατασκευάζονται φάκελοι με διηθητικό χαρτί, στους οποίους τοποθετούνται 50–70 σπέρματα, μετά από παρατήρηση στο στερεοσκόπιο. Στη συνέχεια ο φάκελος διπλώνεται και σφραγίζεται με συρραπτικό. Το περιεχόμενο των φακέλων (50-70 σπέρματα), μετά τις προμεταχειρίσεις τοποθετείται σε τρυβλία petri που περιέχουν θρεπτικό. Σε κάθε μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν 2 τρυβλία.

Θρεπτικά που χρησιμοποιήθηκαν:

#### 1. Malmgren ενισχυμένο με καρύδα (MM)

Παρασκευάζεται στο εργαστήριο και περιέχει: 75 mg/l  $(Ca)_3PO_4$ , 75 mg/l  $KH_2PO_4$ , 75 mg/l  $MgSO_4$ , 7  $H_2O$ , 10 mg/l σακχαρόζη, 6 g/l άγαρ, 0,5 g/l άνθρακας και 50 ml/l νερό καρύδας.

#### 2. Phytamax με προσθήκη IBA (PH)

Το θρεπτικό είναι της εταιρείας SIGMA και περιέχει:  $(NH_4)_2SO_4$ ,  $H_3BO_3$ ,  $CaCl_2$ ,  $CoCl_2 \cdot 6H_2O$ ,  $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ ,  $Na_2-EDTA$ ,  $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ ,  $MgSO_4$ ,  $MgSO_4 \cdot H_2O$ ,  $MoO_3 \cdot 2H_2O$ ,  $KI$ ,  $KNO_3$ ,  $KH_2PO_4$ , 6-Benzylaminopurine (BA), MES (free acid),  $C_6H_{12}O_6$ ,  $C_{10}H_7CH_2CO_2H$  (NAA),  $C_6H_5NO_2$ , Peptone,  $C_8H_{11}NO_3 \cdot HCl$ , σακχαρόζη, θειαμίνη  $\cdot HCl$ , άγαρ, pH 5.6 – 5.8. Προστίθεται 1mg/l IBA (ινδολυλο-3-βουτυρικό οξύ), το οποίο αποστειρώθηκε με αιθανόλη 70%.

Προμεταχειρίσεις

A. Χλωρίνη 10% για 15 min (εφαρμόστηκε σε σπέρματα από ώριμες και ανώριμες κάψες)

B. 3 ημέρες σε  $H_2O$  στους 5 °C και στη συνέχεια 10%  $Ca(OCl)_2$  + 0,1% Tween20 για 15 min (εφαρμόστηκε σε σπέρματα από ώριμες κάψες)

### Πειραματική διαδικασία για την ανάπτυξη φυτών *Ophrys kotschy*

Κατά τη μεταφορά των φυτρωμένων σπερμάτων από τα τρυβλία σε γυάλινα ή πλαστικά δοχεία για την ανάπτυξη φυτών, θα πρέπει να λαμβάνεται και τμήμα του θρεπτικού ώστε να μην τραυματίζονται τα ριζίδια.

Θρεπτικό που χρησιμοποιήθηκε:

#### Malmgren ενισχυμένο με καρύδα (MM)

Παρασκευάζεται στο εργαστήριο και περιέχει: 75 mg/l  $(Ca)_3PO_4$ , 75 mg/l  $KH_2PO_4$ , 75 mg/l  $MgSO_4$ , 7  $H_2O$ , 10 mg/l σακχαρόζη, 6 g/l άγαρ, 0,5 g/l άνθρακας και 100 ml/l νερό καρύδας.