



ΕΘΝΙΚΟ ΚΑΙ ΚΑΠΟΔΙΣΤΡΙΑΚΟ
ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ

ΤΟΜΕΑΣ ΒΟΤΑΝΙΚΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΒΙΟΛΟΓΙΑΣ



ΣΠΥΡΙΔΩΝ ΟΙΚΟΝΟΜΙΔΗΣ

A.M: 1113201400075

**ΟΡΧΙΔΕΕΣ ΤΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ: ΕΝΤΟΠΙΣΜΟΣ ΘΕΣΕΩΝ, ΣΥΛΛΟΓΗ,
ΑΠΟΘΗΚΕΥΣΗ, ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΚΑΙ ΟΙΚΟΛΟΓΙΑ ΣΠΕΡΜΑΤΩΝ**



ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ: ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΚΩΣΤΑΣ Α. ΘΑΝΟΣ

ΑΘΗΝΑ 2019

Πίνακας περιεχομένων

1. Περίληψη	1
2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ	2
2.1 Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ORCHIDACEAE.....	3
2.1.1 Γενικά Στοιχεία - Εμφάνιση της οικογένειας στον εξελικτικό χρόνο	3
2.1.2 Ορχιδέες και επικονίαση.....	3
2.1.3 Ορχιδέες και συμβιωτικές σχέσεις	5
2.1.4 Ορχιδέες και διατήρηση.....	7
2.1.5 Ορχιδέες της Ελλάδος	16
2.1.6 Το άνθος των ορχιδειών.....	16
2.1.7 Η φύτευση στην Οικογένεια Orchidaceae.....	18
2.1.8 Φυλογενετικές σχέσεις μέσα στην Orchidinae.....	20
2.2 ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ	21
3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	22
3.1 ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	23
3.1.1 Περιοχές και χρόνος δειγματοληψιών.....	23
3.1.2 Περιγραφή των ειδών από τα οποία συλλέχθηκαν κάψες.....	26
3.2 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ	39
3.2.1 Θρεπτικά υποστρώματα	39
3.2.2 Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων	40
3.3 Χειρισμός των σπερμάτων και διάβρεξη	41
3.3.1 Κατασκευή φακέλων με σπέρματα και μεταχείριση τους.....	41
3.3.2 Πειράματα φύτευσης.....	44
3.4 Όργανα και θάλαμοι	46
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	48
5. Συζήτηση - Συμπεράσματα	70
6. Ευχαριστίες	77
7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	78

1. Περίληψη

Στη παρούσα διπλωματική εργασία αρχικά έγινε εντοπισμός θέσεων μελών της οικογένειας Orchidaceae στα όρη: 1) Υμηττός, 2) Ποικίλο, 3) Πάρνηθα, 4) Κιθαιρώνας, 5) Φαλακρό καθώς επίσης και στη περιοχή των Σπάτων. Συνολικά εντοπίστηκαν 20 είδη, για τα οποία δεν είχαν πραγματοποιηθεί συλλογές από την ερευνητική ομάδα του εργαστηρίου. Έγιναν συλλογές για 14 από τα 20 είδη (*Anacamptis collina*, *Cephalanthera damasonium*, *Dactylorhiza sambucina*, *Eripactis helleborine*, *Eripactis microphylla*, *Gymnadenia conopsea*, *Neotinea maculata*, *Neotinea lactea*, *Neotinea tridentata*, *Ophrys helenae*, *Ophrys mammosa*, *Ophrys mycenensis*, *Serapias bergonii*, *Spiranthes spiralis*) ενώ για 11 από αυτά έγινε μελέτη της ασυμβιωτικής φύτερωσής τους *ex – situ*, με εξαίρεση τα είδη στα γένη *Cephalanthera* και *Eripactis* λόγω περιορισμένου μεγέθους των συλλογών. Οι συλλογές για κάθε είδος έγιναν από έναν πληθυσμό, με εξαίρεση το είδος *Ophrys mammosa* για το οποίο πραγματοποιήθηκε συλλογή σε δύο θέσεις (Ποικίλο Όρος, Σπάτα). Για τα είδη *A. collina*, *N. lactea*, *N. tridentata*, *O. helenae*, *O. mycenensis*, *S. bergonii* έγινε για πρώτη φορά μελέτη της ασυμβιωτικής φύτερωσής τους. Η φύτερωση όλων των ειδών μελετήθηκε στο σκοτάδι, στους 20 °C, σε 6 διαφορετικά θρεπτικά υποστρώματα (Malmgrem, Murashige & Skoog, Knudson, Orchimax, Malmgrem modified, Murashige & Skoog modified) και με προεμβάπτιση είτε σε χλωρίνη είτε σε υποχλωριώδες ασβέστιο, σε διαφορετικές συγκεντρώσεις και διάρκειες κατεργασίας. Για τα είδη *D. sambucina* και *N. maculata* έγινε επιπρόσθετα έλεγχος της φύτερωσης των σπερμάτων στο νερό σε διαφορετικές θερμοκρασίες και καθεστώτα φωτισμού. Από τα 6 θρεπτικά που χρησιμοποιήθηκαν τα μεγαλύτερα ποσοστά φύτερωσης παρατηρήθηκαν στα Malmgrem (4 είδη), Murashige & Skoog (3 είδη), Knudson (1 είδος), Orchimax (3 είδη). Τα είδη *N. maculata* και *D. sambucina* φύτερωσαν άριστα στο θρεπτικό Malmgrem (ποσοστό φύτερωσης > 80%), ενώ στο ίδιο θρεπτικό το είδος *O. mammosa* φύτερωσε ικανοποιητικά (ποσοστό φύτερωσης > 60%). Τα είδη *O. mycenensis*, *O. helenae* και *S. bergonii* φύτερωσαν μέτρια (>20%) στο θρεπτικό Orchimax ενώ μέτρια φύτερωση παρουσιάζεται και στο είδος *S. spiralis* (>20%) στο θρεπτικό Murashige & Skoog. Μικρή φύτερωση παρατηρήθηκε για τα είδη *N. lactea* (θρεπτικό Malmgrem), *A. collina* και *N. tridentata* (θρεπτικό Murashige & Skoog) καθώς και για το είδος *Gymnadenia conopsea* (θρεπτικό Knudson). Στο τελευταίο είδος, πιθανώς η βιωσιμότητα των σπερμάτων είχε επηρεαστεί από προσβολή ζυγομύκητα πριν την αποξήρανσή τους. Φαίνεται πως για τα είδη *N. maculata* και *D. Sambucina*, η έκθεση σε εναλλασσόμενες συνθήκες σκοταδιού / φωτός (12/12 h) αναστέλλει τη δυνατότητα φύτερωσης των σπερμάτων. Η βέλτιστη θερμοκρασία φύτερωσης για τα δύο παραπάνω είδη είναι οι 20 °C. Η διάρκεια κατεργασίας φαίνεται πως παίζει σημαντικό ρόλο στη φύτερωση των ειδών *N. tridentata* και *N. lactea*, όπου η ελάχιστη διάρκεια κατεργασίας για την εκδήλωση φύτερωσης είναι 30 min.

2. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

2.1 Η ΟΙΚΟΓΕΝΕΙΑ ORCHIDACEAE

2.1.1 Γενικά Στοιχεία - Εμφάνιση της οικογένειας στον εξελικτικό χρόνο

Η οικογένεια Orchidaceae μαζί με την οικογένεια Asteraceae αποτελούν τις δυο μεγαλύτερες οικογένειες ανθοφύτων. Η οικογένεια των ορχεοειδών περιλαμβάνει 27.801 είδη (Willis, 2017). Εκπρόσωποι αυτής της ομάδας εντοπίζονται σχεδόν σε όλες τις περιοχές του κόσμου με εξαίρεση τις ερήμους καθώς και τις συνεχώς παγωμένες περιοχές. Τα περισσότερα taxa εντοπίζονται στις τροπικές περιοχές και αναπτύσσονται ως επίφυτα, μεγάλη όμως είναι και η εκπροσώπηση στις επίγειες ορχιδέες, αποτελώντας περίπου το 1/3 του συνόλου των ειδών ενώ κανένα είδος δεν είναι αληθώς ξυλώδες. Οι ορχιδέες είναι φυτά τα οποία είναι στενά συνδεδεμένα με τον τόπο που φυτρώνουν εξαιτίας των σχέσεων που αναπτύσσουν με μύκητες (Αλκιμος, 1988) καθώς και με βακτήρια (Wilkinson et al., 1994) που υποστηρίζουν τη φύτρωση, τα πρώτα στάδια ανάπτυξης καθώς και σε πολλές περιπτώσεις και ολόκληρη τη ζωή του φυτού, φαινόμενο πολύ συχνό στις παρασιτικές ορχιδέες. Οι ιδιαίτερες σχέσεις που αναπτύσσονται με τους επικονιαστές καθιστούν δύσκολη τη συστηματική τους κατάταξη λόγω των υψηλών επιπέδων υβριδισμού μεταξύ ειδών και γενών.

Η οικογένεια Orchidaceae αρχικά πιστευόταν ότι εξελίχθηκε πρόσφατα. Η δυσκολία που παρουσιάζεται στην απολίθωσή τους είχε ως αποτέλεσμα πριν μερικά χρόνια τα μόνα γνωστά απολιθώματα μελών της οικογένειας να έχουν ηλικία μόλις 2-3 εκατομμύρια χρόνια. Τα τελευταία χρόνια ωστόσο έχουν βρεθεί απολιθώματα ηλικίας μεγαλύτερης των 20 εκατομμυρίων ετών με το αρχαιότερο που εντοπίστηκε να φτάνει στα 40-45 εκατομμύρια χρόνια (Poinar & Rasmussen, 2017) σε κεχρμπάρι. Η οικογένεια φαίνεται ότι διαφοροποιήθηκε και εξαπλώθηκε γρήγορα κοντά στο τέλος του Κρητιδικού ενώ είχε εμφανιστεί όπως φαίνεται από φυλογενετικά στοιχεία ήδη πριν από 110-120 εκατομμύρια χρόνια (Givnish et al., 2015), γεγονός που την τοποθετεί μεταξύ των πρώτων ομάδων μονοκοτυλήδων φυτών που εμφανίστηκαν και μεταξύ των 15 αρχαιότερων οικογενειών αγγειοσπέρμων (Christenhusz et al., 2017). Η πρώτη εμφάνιση των ορχιδεών στον εξελικτικό χρόνο έγινε στην Αυστραλία και μέσω της Ανταρκτικής εξαπλώθηκαν στις Νεοτροπικές περιοχές. Η πρώτη μορφή ορχιδέας ήταν επίγεια και στη συνέχεια εμφανίστηκαν οι επιφυτικές (Givnish et al., 2016).

2.1.2 Ορχιδέες και επικονίαση

Στην οικογένεια των ορχεοειδών παρατηρείται ασυνήθιστα μεγάλος αριθμός μη-ανταποδοτικών ειδών (non-rewarding species) σε σχέση με άλλες οικογένειες, ειδών δηλαδή που δεν παράγουν νέκταρ. Οι ορχιδέες συχνά αξιοποιούν τις σχέσεις του φυτού-επικονιαστή ή τα συστήματα σύζευξης των εντόμων για την αναπαραγωγή τους. Περίπου το 1/3 των ειδών της οικογένειας χρησιμοποιεί κάποια μέθοδο εξαπάτησης (Jersáková et al., 2006) του επικονιαστή για να εξασφαλίσει τη μεταφορά της γύρης και κατ' επέκταση την επικονίαση. Η επικονίαση μέσω εξαπάτησης εμφανίζει πολλές μορφές στις ορχιδέες με τις σημαντικότερες να είναι:

1. Γενικευμένη τροφική απάτη (generalized food deception): Στην προσπάθειά τους

να προσελκύσουν τους επικονιαστές, τα μέλη της οικογένειας εκμεταλλεύονται γενικά ανθικά σήματα που είναι χαρακτηριστικά των ανταποδοτικών (rewarding) φυτών (όπως το χρώμα του άνθους, η μορφή της ταξιανθίας, η οσμή, οδηγίο νέκταρ κ.ά.), όπως για παράδειγμα είδη του γένους *Anacamptis*. Οι ορχιδέες που εκμεταλλεύονται την εν λόγω στρατηγική συχνά ανθίζουν μαζικά χωρίς την άνοιξη εκμεταλλεζόμενες τις νέο-εμφανιζόμενες μέλισσες ενώ συχνή είναι και η παρουσία τους σε περιοχές που φέρουν ανταποδοτικά φυτά εκμεταλλεζόμενα έτσι τους πληθυσμούς μελισσών-εντόμων της περιοχής.

2. Μίμηση θέσεων ωοτοκίας (brood site imitation): Άλλα είδη τείνουν να μιμούνται θέσεις ωοτοκίας, έτσι έντομα τα οποία αναζητούν κατάλληλη θέση για εναπόθεση των αυγών τους μοιραία μεταφέρουν μαζί τους από το ένα άνθος στο άλλο τα γυρεομάγματα συμβάλλοντας στην επικονίαση. Σε αυτή την περίπτωση η επικονίαση γίνεται κυρίως από Coleoptera ή Diptera όπου η μίμηση στοιχείων όπως οσμή ψοφιοιού, κοπριάς κτλ. οδηγεί στην προσέλκυση των αντίστοιχων ομάδων εντόμων. Στην ίδια μορφή εξαπάτησης εμπίπτει η εξαπάτηση από φυτά, όπως αυτά του γένους *Epipactis*, που φέρουν φερομόνες όμοιες με των εντόμων στα οποία παρασιτεί ο επικονιαστής (Stokl et al., 2011).
3. Μίμηση καταφυγίου (shelter imitation): Σε πολλές περιπτώσεις τα άνθη των ορχεοειδών παρέχουν έναν σωλήνα-θάλαμο για την ανάπαυση του επικονιαστή, οπότε σε περίπτωση δύσκολων καιρικών συνθηκών ή αδυναμίας του εντόμου να επιστρέψει στη φωλιά του, υποστηρίζουν την θερμορύθμιση των επικονιαστών καθώς αυτή η θέση του άνθους μπορεί να έχει υψηλότερη θερμοκρασία από ότι το περιβάλλον, έως και 3 °C. Χαρακτηριστικό παράδειγμα αποτελεί το γένος *Serapias*, εκπρόσωποι του οποίου υπάρχουν και στην Ελλάδα, των οποίων τα σκούρα-κόκκινα άνθη σε μορφή σωλήνα φαίνεται να μιμούνται την είσοδο φωλιάς μέλισσας. Στην εν λόγω περίπτωση παρέχεται όντως καταφύγιο στο έντομο και άρα δεν έχουμε εξαπάτηση, ωστόσο στη περίπτωση του είδους *Ophrys helenae* όπου φαίνεται να αξιοποιεί, εν μέρει τουλάχιστον, τον ίδιο τρόπο προσέλκυσης επικονιαστών τα έντομα που είναι συνήθως μέλη του γένους *Eucera* (*E. vulpes*, *E. longicornis*) βρίσκονται εκτεθειμένα (Paulus, 2006).
4. Ψευδοανταγωνισμός (pseudoantagonism): Σε αυτή την περίπτωση η ορχιδέα εκμεταλλεύεται τη χωροκρατική συμπεριφορά κάποιων ειδών (πχ *Centris* spp.). Έτσι όταν το έντομο επιτίθεται στο άνθος καθώς αυτό κινείται με τον άνεμο, εκείνη την στιγμή συμβαίνει και η προσκόλληση των γυρεομαγμάτων στο έντομο.
5. Σεξουαλική εξαπάτηση (sexual deception): Σε αυτή την περίπτωση το φυτό μιμείται σήματα σύζευξης του θηλυκού εντόμου και κυρίως τις φερομόνες. Το αρσενικό άτομο προσελκύεται και στην προσπάθειά του να αναπαραχθεί κατά τη διάρκεια μιας διαδικασίας που αναφέρεται ως ψευδοσυνουσία (Pseudocopulation), μεταφέρει τα γυρεομάγματα. Το γένος *Ophrys*, εκπρόσωποι του οποίου αποτελούν την πλειονότητα των ορχεοειδών της Ελλάδας, αποτελεί ένα χαρακτηριστικό παράδειγμα ομάδας φυτών που αξιοποιεί τον εν λόγω τρόπο για να διασφαλίσει την αναπαραγωγική του επιτυχία. Όσον αφορά την επιτυχία προσέλκυσης των θηλυκών εντόμων, έρευνες (Ayasse et al., 2003) φανερώνουν ότι το μείγμα πολυσακχαριτών / φερομονών που αξιοποιεί το φυτό είναι διαφορετικό από αυτό του θηλυκού εντόμου αλλά έχει μεγαλύτερη επιτυχία στην προσέλκυση του αρσενικού από τα αντίστοιχα σήματα που χρησιμοποιεί ένα θηλυκό. Μεγάλο ενδιαφέρον φαίνεται να έχουν τα γένη *Serapias* και *Ophrys*

που φαίνεται ότι εμφανίζουν χαρακτηριστικά σε κάποια μέλη τους τόσο της σεξουαλικής εξαπάτησης όσο και της εξαπάτησης καταφυγίου (Schiestl & Cozzolino, 2008).

Η επικονίαση με την αξιοποίηση μιας μεθόδου εξαπάτησης του εντόμου / επικονιαστή περιορίζει την αυτεπικονίαση καθώς το έντομο που εξαπατάται συνήθως φεύγει μακριά από την περιοχή όπου βρίσκεται το φυτό του οποίου τα γυρεομάγματα μεταφέρει. Τα ορχεοειδή που αξιοποιούν μια μορφή εξαπάτησης για την επικονιάσή τους φαίνεται ότι αυξάνουν το ποσοστό επικονίασης με το να φύονται κοντά σε ανταποδοτικά (rewarding) είδη όπου υπάρχει και αφθονία πιθανών επικονιαστών (Johnson et al., 2003).

Εκτός από την απατηλή επικονίαση (deceptive pollination) γίνεται και η επικονίαση μετ' ανταμοιβής. Στην επικονίαση των μελών της οικογένειας Orchidaceae συμμετέχουν, εκτός από έντομα και πτηνά (Micheneau et al., 2006) αλλά έχει παρατηρηθεί ότι συμβαίνει και με το νερό της βροχής (Fan et al., 2012).

2.1.3 Ορχιδέες και συμβιωτικές σχέσεις

Τα σπέρματα των ορχεοειδών είναι πολύ μικρά σε μέγεθος, στερούνται ενδοσπερμίου ή της ικανότητας να αξιοποιούν τις αποθηκευμένες ενώσεις αυτού ενώ, ταυτόχρονα, το έμβρυο δεν είναι πλήρως ανεπτυγμένο. Όταν ανοίγει η ώριμη κάψα τα σπέρματα διασπείρονται κυρίως με τη βοήθεια του ανέμου. Το περίβλημα που καλύπτει το έμβρυο περιέχει σχετικά μεγάλο όγκο αέρα και επιτρέπει στο μεταφερόμενο σπέρμα να αιωρείται για μεγάλες αποστάσεις, έως και κάποιες εκατοντάδες χιλιόμετρα, όπως για παράδειγμα στο σύμπλεγμα των τριών ειδών του γένους *Platanthera* των Αζόρων όπου προήλθαν πιθανώς από ένα μόνο γεγονός μετανάστευσης από πληθυσμούς των ηπειρωτικών περιοχών (Bateman et al., 2014). Σε μια κάψα περιέχονται πολυάριθμα σπέρματα αρκετές χιλιάδες έως και δεκάδες χιλιάδες μερικές φορές. Καθώς τα σπέρματα των μελών της οικογένειας δεν διαθέτουν ενδοσπέρμιο, είναι ιδιαίτερα ευάλωτα κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξής τους, ιδιαίτερα μέχρι την εμφάνιση του πρώτου υπέργειου τμήματός τους που μπορεί να συμβεί μετά από αρκετά χρόνια.

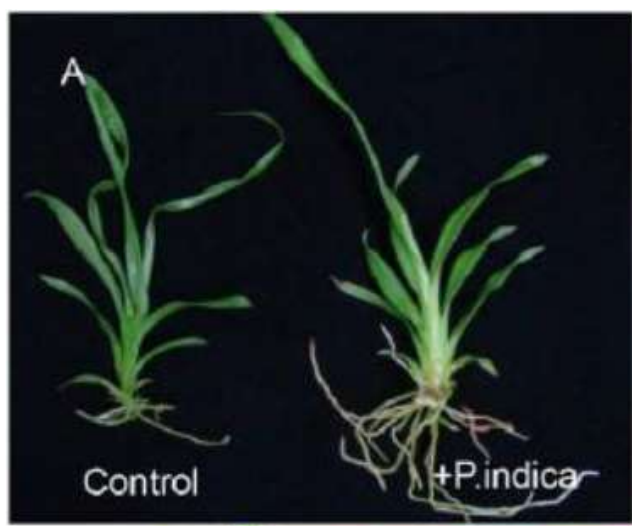
Η βλάστηση και ανάπτυξη των ορχεοειδών εξαρτάται από την προσβολή των σπερμάτων από μύκητες, κυρίως βασιδιομύκητες και πιο σπάνια από ασκομύκητες, αν και έχουν γίνει αναφορές και από άλλες ομάδες μυκήτων καθώς και βακτηρίων. Οι μύκητες θα διαπεράσουν τα κύτταρα του σπέρματος και αργότερα του φυτού παρέχοντάς του νερό και ανόργανα στοιχεία κατά τα πρώτα στάδια ανάπτυξης. Η συμβίωση είναι σημείο κλειδί για την ανάπτυξη, ωστόσο δεν έχουν ανάγκη σε ίδιο βαθμό όλες οι ορχιδέες τον συμβιώτη τους σε όλα τα στάδια της ζωής τους. Μεταξύ των χιλιάδων ειδών που ανήκουν στην οικογένεια υπάρχουν φυτά τα οποία αξιοποιούν τη φωτοσύνθεση ως βασική πηγή θρεπτικών, άλλα που στηρίζονται τόσο στη διεργασία αυτή όσο και στην πρόσληψη ουσιών από τον μύκητα ενώ παράλληλα υπάρχουν φυτά τα οποία έχουν απολέσει πλήρως την φωτοσυνθετική διαδικασία.

Η μυκορριζική συμβίωση θεωρείται γενικά μη ειδική, ωστόσο η ειδικότητα στη συμβίωση αυξάνεται σε μεγάλο βαθμό σε καταστάσεις όπως σε υποχρεωτικά μυκοετερότροφα φυτά,

όπως για παράδειγμα μέλη της φυλής Neottieae (Girlanda et al., 2011). Σε περίπτωση ειδών που έχουν προσαρμοστεί σε σκιερά δάση έχουμε μεγαλύτερη εξάρτηση από τον μυκοβιώτη ενώ παράλληλα διατηρείται η διεργασία της φωτοσύνθεσης. Σε αυτή την κατάσταση που αναφέρεται ως μερική μυκοετεροτροφία παρουσιάζεται μια ευρύτερη ομάδα πιθανών συμβιωτικών μυκήτων. Γενετική ανάλυση στα είδη *Ophrys fuciflora*, *Anacamptis laxiflora*, *Orchis purpurea* και *Serapias vomeraceae* έδειξαν εμφανή ποικιλότητα μεταξύ των μυκήτων της πολυφυλετικής ομάδας Rhizoctonia (Girlanda et al., 2011). Είναι πολύ ενδιαφέρον το γεγονός ότι σε πολλές περιπτώσεις παρατηρείται η συμβίωση με είδη που εκφράζουν παθογονικότητα όταν συμβιώνουν με είδη εκτός της οικογένειας Orchidaceae όπως στη περίπτωση του *Spiranthes spiralis* (Tondello et al., 2012).

Ένα ενδιαφέρον σημείο στη σχέση μεταξύ φυτού και μύκητα είναι η διακύμανση που παρατηρείται στο μυκητιακό φορτίο κατά την διάρκεια του έτους αναλόγως το αναπτυξιακό στάδιο του φυτού. Μελέτες που έγιναν σε ρίζες φυτών του είδους *Cephalanthera damasonium* για την εξακρίβωση του μυκητιακού φορτίου κατά την διάρκεια του έτους φανερώνουν ότι κατά την μετάβαση από τον Ιανουάριο (περίοδος που εμφανίζονται οι ρόδακες) έως και τον Ιούλιο (περίοδος που πλησιάζει το τέλος της ανθοφορίας) παρατηρείται μείωση του μυκητιακού φορτίου (Roy et al., 2013) και στις δύο πιθανές περιπτώσεις φαινοτύπου (αλμπίνο: πλήρης μυκοετεροτροφία, πράσινα φυτά: φωτοσυνθετικά ενεργά), με τα αλμπίνο φυτά να είναι πιο ευάλωτα σε σχέση με τα πράσινα φυτά (μολύνσεις, προσέλκυση φυτοφάγων κ.ά.). Αυτό αποτελεί ένα καλό παράδειγμα για να γίνει αντιληπτή η διαφορετική εξάρτηση του φυτού από τον συμβιώτη του αναλόγως και το στάδιο κύκλου ζωής του φυτού. Την περίοδο που το φυτό βρίσκεται στη μορφή κονδύλου έως και την έκπτυξη των φύλλων, είναι βασική η ύπαρξη του μύκητα για οποιαδήποτε τροφική υποστήριξη χρειαστεί το φυτό καθώς και για την ορμονική ρύθμιση που όπως έχει παρατηρηθεί σε μεγάλο βαθμό ρυθμίζεται από τους οργανισμούς με τους οποίους συμβιώνει η ορχιδέα, ενώ από την έκπτυξη των φύλλων έως και την καρποφορία τουλάχιστον στα είδη που δεν έχουν εγκαταλείψει πλήρως την φωτοσύνθεση η ύπαρξη του μύκητα που δεν είναι πλέον άμεσα απαραίτητη περιορίζεται, αλλά δεν εξαφανίζεται.

Η παρουσία του μύκητα εκτός από την παροχή θρεπτικών στην ορχιδέα συμβάλει ενεργά σε πολλές περιπτώσεις στη φύτευση του φυτού. Το περιβλήμα που περιβάλλει το έμβρυο φέρει, πολλές φορές, μια λιπιδική στρώση η οποία εμποδίζει την είσοδο του νερού ή εάν η είσοδος του νερού είναι εφικτή πολλές φορές εμποδίζει τη σχάση του περιβλήματος για να εξέλθουν τα ριζοειδή. Ο μύκητας διαπερνά το περιβλήμα και καθιστά εφικτή τη φύτευση (Rasmussen, 1995). Συγχρόνως υπάρχει σημαντική συμβολή τόσο των μυκήτων όσο και των βακτηρίων που συμβιώνουν με τις ορχιδέες στην ανάπτυξη του φυτού, ρυθμίζοντας γενετικά μονοπάτια ή προσφέροντας ορμόνες που δεν μπορεί να συνθέσει το φυτό (Tsavkelova et al., 2006).



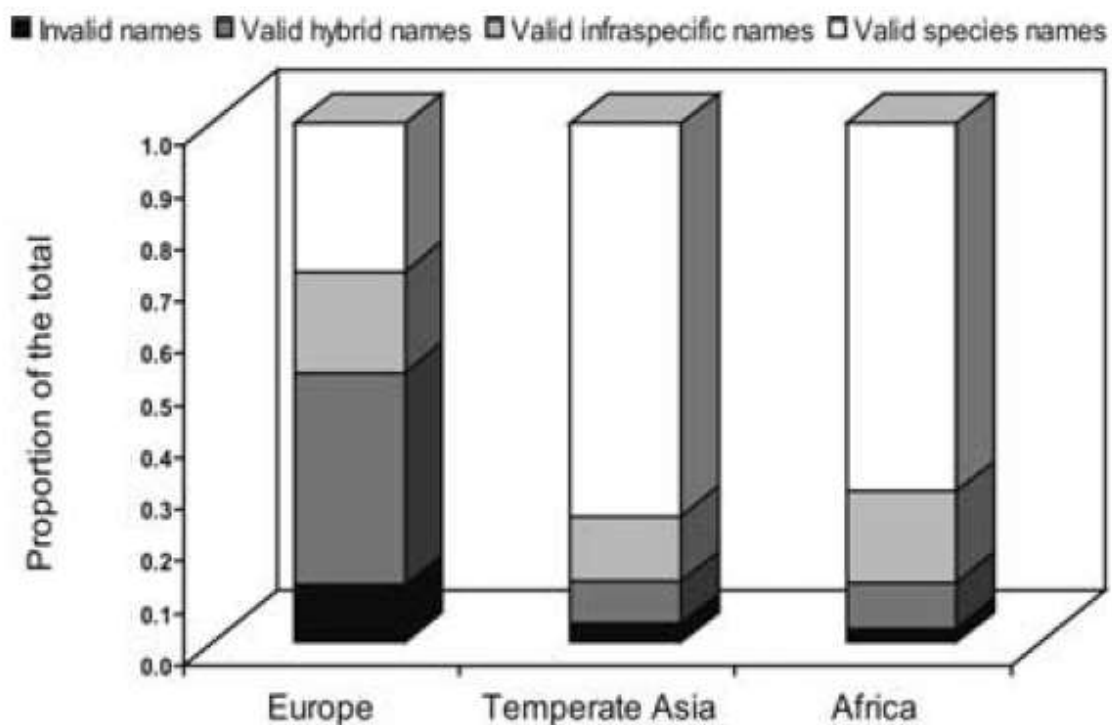
Εικόνα 1. Σύγκριση της ανάπτυξης του γένους *Oncidium* απουσία (αριστερά) και παρουσία (δεξιά) του συμβιώτη μύκητα *Piriformospora indica*, όπου είναι φανερή η ενισχυτική συμβολή του μύκητα στην ανάπτυξη του ριζώματος του φυτού (Ye et al., 2014).

Οι ορχιδέες αν και πολυετή φυτά δεν αναπτύσσουν φύλλωμα και ανθικά στελέχη κάθε χρόνο. Πολλές φορές αυτή η βλαστική αδράνεια σχετίζεται με τις αντίξοες συνθήκες στις οποίες μπορεί να αναπτύσσεται το φυτό (Shefferson et al., 2012) και στοιχεία όπως η διάρκεια της μπορεί να επηρεάσει το φυτό σε αρκετά στοιχεία του κύκλου του και την επιβίωσή του (Gremer et al., 2010, 2012). Όπως έγινε φανερό από πρόσφατες μελέτες, η βλαστική αδράνεια έχει άμεση σχέση με την αφθονία των συμβιωτών μυκήτων στο έδαφος και με μειούμενη τη αφθονία των μυκήτων ο αριθμός των φυτών που θα βρεθούν σε βλαστική αδράνεια αυξάνεται (Blake et al., 2017).

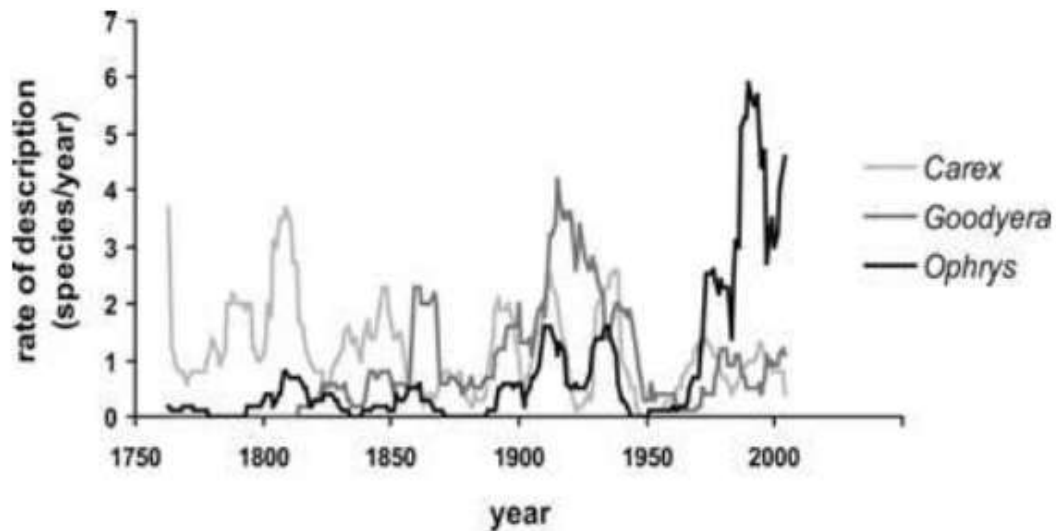
2.1.4 Ορχιδέες και διατήρηση

Για αιώνες τώρα οι ορχιδέες συναρπάζουν ερευνητές και συλλέκτες. Το μεγάλο ενδιαφέρον που εμφανίστηκε γι' αυτά τα φυτά εξαιτίας της ομορφιάς και της βιολογίας τους είχε ως αποτέλεσμα, μεταξύ άλλων παραγόντων, πολλά να βρεθούν στο χείλος της εξαφάνισης. Στην περίπτωση των επιφυτικών ορχεοειδών η καταστροφή εκτάσεων δασών για ξυλεία και γεωργία καταστρέφει τα πιθανά τους ενδιαιτήματα ενώ παράλληλα συχνό φαινόμενο ήταν η καταστροφή των ενδιαιτημάτων από συλλέκτες για την αποκλειστικότητα απόκτησης ενός σπάνιου είδους. Στην περίπτωση των ειδών που αναπτύσσονται στο έδαφος όπως αυτά της Ελλάδας (*Ophrys*, *Orchis* κτλ) βρίσκονται επίσης πολλά είδη σε κίνδυνο. Η χρήση των ορεινών εκτάσεων για βόσκηση, η κατάχρηση των χημικών λιπασμάτων, η καταστροφή δασικών εκτάσεων για οικοδόμηση αλλά και η συλλογή για σαλέπι έχουν καταστρέψει μεγάλους πληθυσμούς από τις επίγειες ορχιδέες. Ιδιαίτερα η συλλογή των φυτών για το σαλέπι τόσο στην Ελλάδα αλλά κυρίως στη μέση Ανατολή καταστρέφει ετησίως δισεκατομμύρια φυτά καθώς για ένα κιλό σαλέπι χρειάζονται περίπου τρεις χιλιάδες κόνδυλοι. Εξαιτίας τέτοιων περιπτώσεων που απειλούν τα μέλη της ομάδας γίνονται προσπάθειες για εξασφάλιση της διατήρησης των πληθυσμών τους με προτεραιότητα στα ιδιαίτερος κινδυνεύοντα είδη.

Ωστόσο η εκτεταμένη τάση για ορισμό νέων taxa που εμφανίζεται τα τελευταία χρόνια με επίκεντρο την Ευρώπη δημιουργεί πρόβλημα στη λήψη αποφάσεων και στις προσπάθειες αυτές καθώς είναι πιθανό 'σπάνια', κακώς ορισμένα, taxa να αποτελέσουν επίκεντρο των προσπαθειών ενώ άλλα λιγότερο σπάνια taxa τα οποία όμως είναι ορθώς ορισμένα να παραμεινθούν. Παρακάτω παρουσιάζεται σε διαγράμματα η αυξημένη τάση για ορισμό νέων ειδών (Pillon & Chase, 2007) στην Ευρώπη από ομάδες κάποιων ορχεοειδών καθώς και η αυξημένη ύπαρξη κακώς ορισμένων taxa στην Ευρώπη (περίπου 10% των ονομάτων) σε σχέση με την εύκρατη Ασία και την Αφρική. Σύμφωνα με την IUCN σχεδόν τα μισά είδη που έχουν εξαφανισθεί ανήκουν στις επίγειες ορχιδέες (Swarts & Dixon, 2009) όπως αυτές που εντοπίζονται στην Ελλάδα, αυτή όμως η κατηγορία αποτελεί μόλις το 1/3 του συνολικού πληθυσμού ορχεοειδών του πλανήτη. Όπως φαίνεται από τα διαγράμματα (Εικόνες 2, 3) της εργασίας των Pillon και Chase (2006) στην Ευρώπη υπάρχει η τάση ορισμού νέων ειδών με μεγάλο ρυθμό τα κριτήρια για τον ορισμό των οποίων, ωστόσο, δεν είναι αξιόπιστα γεγονότα που θα μπορούσε να αποτελέσει αποπροσανατολιστικό παράγοντα, όπως αναφέρθηκε, σε μια στοχευμένη προσπάθεια προστασίας ενός 'είδους'.

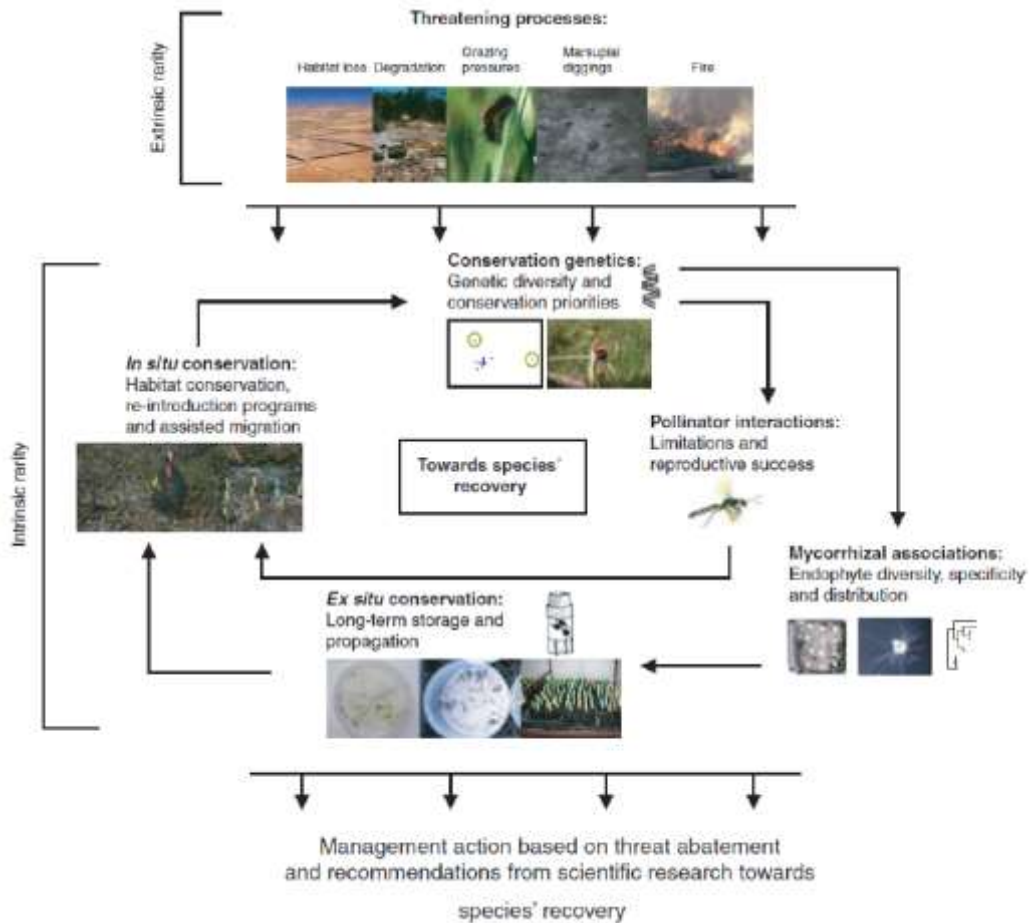


Εικόνα 2. Σύγκριση της ταξινομικής μεταχείρισης των Ορχεοειδών σε Ευρώπη (743 ονόματα), εύκρατη Ασία (645 ονόματα) και Αφρική (216 ονόματα) ως προς τον αριθμό των μη έγκυρων ονομάτων, των έγκυρων ονομάτων υβριδίων, των έγκυρων ονομάτων ομάδων κατώτερων του είδους και των ονομάτων ειδών (Pillon & Chase, 2006).



Εικόνα 3. Ρυθμός περιγραφής νέων taxa σε 3 γένη φυτών με παραπλήσιο μέγεθος (Ευρωπαϊκά *Carex*, *Ophrys* και *Goodyera* με ευρεία εξάπλωση) (Pillon & Chase, 2006).

Για την προστασία ενός είδους από την εξαφάνιση ακολουθείται μια πολύπλευρη προσέγγιση (Εικόνα 4). Η διαφύλαξη της γενετικής ποικιλότητας του είδους, του ενδιαιτήματός του, η αποθήκευση σπερμάτων σε τράπεζες γενετικού υλικού, η ανάπτυξη αρτιβλάστων *ex situ* και η επανένταξη πληθυσμών στη φύση, η μελέτη των συμβιωτικών σχέσεων με μικροοργανισμούς αλλά και των σχέσεων του φυτού με τους επικονιαστές και η αξιοποίησή τους αποτελούν βασικά στοιχεία για την επιβίωση μια ομάδας που αναπτύσσει ιδιαίτερες σχέσεις τόσο με το περιβάλλον της όσο και με τους οργανισμούς με τους οποίους συνυπάρχει, όπως οι ορχιδέες.



Εικόνα 4. Διάγραμμα μιας ολοκληρωμένης προσέγγισης για την διατήρηση του απειλούμενου είδους ορχιδέας *Caladenia huegelii* (Swarts & Dixon, 2009).

Όσον αφορά τις ορχιδέες της Ελλάδας η πρώτη προσπάθεια διατήρησης και προστασίας έγινε το 1981, με την έκδοση του Προεδρικού Διατάγματος 67/1981 «Περί προστασίας της αυτοφυούς χλωρίδος και άγριας πανίδος και καθορισμού διαδικασίας συντονισμού και ελέγχου της ερεύνης επ' αυτών» (ΦΕΚ 23 Α'), σύμφωνα με το οποίο, όλα τα γένη της οικογένειας Orchidaceae κηρύσσονται ως προστατευτέα. Όλα τα ορχεοειδή παγκοσμίως εντάσσονται στα Παραρτήματα I και II της Σύμβασης CITES, η οποία στην Ελλάδα κυρώθηκε με το Νόμο 2055/1992 «Κύρωση Σύμβασης διεθνούς εμπορίας ειδών της άγριας πανίδας και χλωρίδας που κινδυνεύουν να εξαφανισθούν με τα Παραρτήματα I και II αυτής» (ΦΕΚ 105/τ.Α'/30-06-1992). Είδη της οικογένειας περιλαμβάνονται και στα Παραρτήματα II και IV της Οδηγίας 92/43/ΕΟΚ «για τη διατήρηση των φυσικών οικοτόπων καθώς και της άγριας πανίδας και χλωρίδας» (L 206 της 22/07/1992 σ. 0007 – 0050), 5 από αυτά αφορούν την Ελλάδα τα *Ophrys argolica*, *Cephalanthera cucculata*, *Cypripedium calceolus*, *Dactylorhiza kalopissii* και το *Himantoglossum hircinum* subsp. *caprinum* (ύπαρξη μη επιβεβαιωμένης καταγραφής). Τέλος, 10 είδη και υποείδη της οικογένειας Orchidaceae περιλαμβάνονται στα Βιβλία Ερυθρών Δεδομένων των Σπάνιων και Απειλούμενων Φυτών της Ελλάδας (Φοίτος et al., 2009).

Πίνακας 1. Τα taxa ορχιδεών της Ελλάδος και η παρουσία τους στους ερυθρούς καταλόγους της IUCN, το βιβλίο ερυθρών δεδομένων των σπάνιων και απειλούμενων φυτών της Ελλάδας (Φοίτος et al., 2009) (για συντομία: ΒΕΔΕ) και την πρόσφατη αξιολόγηση βάσει κριτηρίων της IUCN (Tsiftsis S. & Tsiripidis I, 2016).

* Οι συντομογραφίες που χρησιμοποιούνται στο πίνακα αντιστοιχούν: 1) Not evaluated (NE), 2) Least concern (LC), 3) Near threatened (NT), 4) Vulnerable (VU), 5) Endangered (EN), 6) Critically endangered (CR), 7) Data deficient (DD).

<u>Taxon</u>	<u>κατηγορία κινδύνου IUCN</u>	<u>Κατηγορία κινδύνου ΒΕΔΕ</u>	<u>Τσιφτσή & Τσιριπίδης</u>
<i>Anacamptis</i>	-	-	-
<i>A. boryi</i>	VU	NE	NT
<i>A. collina</i>	NE	NE	LC
<i>A. coriophora</i>	NE	NE	LC
<i>A. coriophora subsp. fragrans</i>	NE	NE	LC
<i>A. coriophora subsp. coriophora</i>	NE	NE	LC
<i>A. laxiflora</i>	NE	NE	LC
<i>A. laxiflora subsp. laxiflora</i>	NE	NE	LC
<i>A. morio</i>	NE	NE	LC
<i>A. morio subsp. caucasica</i>	NE	NE	LC
<i>A. palustris</i>	LC	NE	NT
<i>A. palustris subsp. elegans</i>	LC	NE	NT
<i>A. palustris subsp. palustris</i>	LC	NE	NT
<i>A. papilionacea</i>	NE	NE	LC
<i>A. papilionacea subsp. aegaea</i>	NE	NE	LC
<i>A. papilionacea subsp. alibertis</i>	NE	NE	LC
<i>A. papilionacea subsp. papilionacea</i>	NE	NE	LC
<i>A. papilionacea subsp. thaliae</i>	NE	NE	LC
<i>A. pyramidalis</i>	NE	NE	LC
<i>A. sancta</i>	LC	NE	LC
<i>Cephalanthera</i>	-	-	-
<i>C. cucullata</i>	VU	EN	EN
<i>C. damasonium</i>	NE	NE	LC
<i>C. epipactoides</i>	NE	NE	NT
<i>C. longifolia</i>	NE	NE	LC
<i>C. rubra</i>	NE	NE	LC
<i>Coeloglossum</i>	-	-	-
<i>C. viride</i>	NE	NE	LC
<i>Corallorhiza</i>	-	-	-
<i>C. trifida</i>	NE	NE	LC
<i>Dactylorhiza</i>	-	-	-
<i>D. baumanniana</i>	NT	NE	LC

<i>D. baumanniana</i> subsp. <i>smolikana</i>	NT	NE	VU
<i>D. baumanniana</i> subsp. <i>baumanniana</i>	NT	NE	LC
<i>D. cordigera</i>	LC	NE	LC
<i>D. cordigera</i> subsp. <i>pindica</i>	LC	NE	LC
<i>D. cordigera</i> subsp. <i>cordigera</i>	LC	NE	LC
<i>D. iberica</i>	NE	NE	VU
<i>D. incarnata</i>	NE	VU	EN
<i>D. incarnata</i> subsp. <i>incarnata</i>	NE	VU	EN
<i>D. kalopissii</i>	EN	NE	EN
<i>D. kalopissii</i> subsp. <i>macedonica</i>	EN	VU	VU
<i>D. kalopissii</i> subsp. <i>pythagorae</i>	EN	CR	CR
<i>D. kalopissii</i> subsp. <i>kalopissii</i>	EN	NE	EN
<i>D. romana</i>	NE	NE	LC
<i>D. romana</i> subsp. <i>romana</i>	NE	NE	LC
<i>D. saccifera</i>	NE	NE	LC
<i>D. saccifera</i> subsp. <i>saccifera</i>	NE	NE	LC
<i>D. sambucina</i>	LC	NE	LC
<i>Epipactis</i>	-	-	-
<i>E. atrorubens</i>	NE	NE	LC
<i>E. atrorubens</i> subsp. <i>spiridonovii</i>	NE	EN	LC
<i>E. cretica</i>	EN	EN	EN
<i>E. degenii</i>	NE	NE	LC
<i>E. greuteri</i>	EN	NE	LC
<i>E. halacsyi</i>	NE	NE	NT
<i>E. helleborine</i>	NE	NE	LC
<i>E. helleborine</i> subsp. <i>helleborine</i>	NE	NE	LC
<i>E. leptochila</i>	LC	NE	LC
<i>E. leptochila</i> subsp. <i>naousaensis</i>	LC	EN	EN
<i>E. microphylla</i>	NE	NE	LC
<i>E. olympica</i>	EN	NE	EN
<i>E. palustris</i>	LC	NE	LC
<i>E. persica</i>	NE	NE	LC
<i>E. persica</i> subsp. <i>gracilis</i>	NE	NE	LC
<i>E. persica</i> subsp. <i>persica</i>	NE	NE	CR
<i>E. pinovica</i>	NE	NE	VU
<i>E. pontica</i>	NE	NE	NT
<i>E. purpurata</i>	NE	NE	EN
<i>E. subclausa</i>	NE	NT	LC
<i>E. turcica</i>	NE	NE	LC
<i>Epipogium</i>	-	-	-
<i>E. aphyllum</i>	NE	NE	LC
<i>Goodyera</i>	-	-	-

<i>G. repens</i>	NE	NE	LC
<i>Gymnadenia</i>	-	-	-
<i>G. conopsea</i>	DD	NE	LC
<i>G. frivaldii</i>	LC	NE	NT
<i>G. odoratissima</i>	LC	NE	CR
<i>G. rhellicani</i>	LC	VU	CR
<i>Himantoglossum</i>	-	-	-
<i>H. comperianum</i>	NE	NE	EN
<i>H. jankae</i>	NE	NE	LC
<i>H. robertianum</i>	NE	NE	LC
<i>H. samariense</i>	NE	NE	LC
<i>Limodorum</i>	-	-	-
<i>L. abortivum</i>	NE	NE	LC
<i>L. trabutianum</i>	NE	NE	VU
<i>L. trabutianum subsp. thracum</i>	NE	NE	VU
<i>Neotinea</i>	-	-	-
<i>N. lactea</i>	NE	NE	LC
<i>N. maculata</i>	NE	NE	LC
<i>N. tridentata</i>	NE	NE	LC
<i>N. tridentata subsp. tridentata</i>	NE	NE	LC
<i>N. ustulata</i>	NE	NE	LC
<i>Neottia</i>	-	-	-
<i>N. cordata</i>	LC	NE	VU
<i>N. nidus-avis</i>	LC	NE	LC
<i>N. ovata</i>	NE	NE	LC
<i>Ophrys</i>	-	-	-
<i>O. apifera</i>	NE	NE	LC
<i>O. argolica</i>	VU	NE	NT
<i>O. argolica subsp. aegaea</i>	VU	NE	VU
<i>O. argolica subsp. lesbis</i>	VU	NE	VU
<i>O. argolica subsp. lucis</i>	VU	NE	LC
<i>O. argolica subsp. argolica</i>	VU	NE	LC
<i>O. bertolonii</i>	LC	NE	CR
<i>O. bombyliflora</i>	NE	NE	LC
<i>O. cretica</i>	NE	NE	LC
<i>O. cretica subsp. karpathensis</i>	NE	NE	LC
<i>O. cretica subsp. cretica</i>	NE	NE	LC
<i>O. cythnia</i>	NE	NE	LC
<i>O. ferrum-equinum</i>	NE	NE	LC
<i>O. ferrum-equinum subsp. gottfriediana</i>	NE	NE	LC
<i>O. ferrum-equinum subsp. ferrum-equinum</i>	NE	NE	LC

<i>O. fusca</i>	NE	NE	LC
<i>O. fusca subsp. blithoperta</i>	NE	NE	LC
<i>O. fusca subsp. cinereophila</i>	NE	NE	LC
<i>O. fusca subsp. iricolor</i>	NE	NE	LC
<i>O. fusca subsp. fusca</i>	NE	NE	LC
<i>O. helenae</i>	NE	NE	LC
<i>O. holoserica</i>	NE	NE	LC
<i>O. holoserica subsp. andria</i>	NE	NE	LC
<i>O. holoserica subsp. candida</i>	NE	NE	LC
<i>O. holoserica subsp. holoserica</i>	NE	NE	LC
<i>O. insectifera</i>	LC	NE	EN
<i>O. insectifera subsp. insectifera</i>	LC	NE	EN
<i>O. lutea</i>	NE	NE	
<i>O. lutea subsp. galilaea</i>	NE	NE	LC
<i>O. lutea subsp. melena</i>	NE	NE	LC
<i>O. lutea subsp. lutea</i>	NE	NE	LC
<i>O. mavromata</i>	NE	NE	LC
<i>O. omegaifera</i>	NE	NE	LC
<i>O. omegaifera subsp. fleischmannii</i>	NE	NE	LC
<i>O. omegaifera subsp. israelitica</i>	NE	NE	LC
<i>O. omegaifera subsp. omegaifera</i>	NE	NE	LC
<i>O. reinholdii</i>	NE	NE	LC
<i>O. reinholdii subsp. reinholdii</i>	NE	NE	LC
<i>O. scolopax</i>	NE	NE	LC
<i>O. scolopax subsp. cornuta</i>	NE	NE	LC
<i>O. scolopax subsp. heldreichii</i>	NE	NE	LC
<i>O. scolopax subsp. rhodia</i>	NE	NE	NT
<i>O. speculum</i>	NE	NE	LC
<i>O. speculum subsp. regis-ferdinandii</i>	NE	NE	LC
<i>O. speculum subsp. speculum</i>	NE	NE	LC
<i>O. sphegodes</i>	NE	NE	LC
<i>O. sphegodes subsp. aesculapii</i>	NE	NE	LC
<i>O. sphegodes subsp. cretensis</i>	NE	NE	LC
<i>O. sphegodes subsp. epirotica</i>	NE	NE	LC
<i>O. sphegodes subsp. gortynia</i>	NE	NE	LC
<i>O. sphegodes subsp. mammosa</i>	NE	NE	LC
<i>O. sphegodes subsp. spruneri</i>	NE	NE	LC
<i>O. sphegodes subsp. sphegodes</i>	NE	NE	LC
<i>O. tenthredinifera</i>	NE	NE	LC
<i>O. umbilicata</i>	NE	NE	LC
<i>O. umbilicata subsp. bucephala</i>	NE	NE	LC
<i>O. umbilicata subsp. umbilicata</i>	NE	NE	LC

<i>Orchis</i>	-	-	-
<i>O. anatolica</i>	NE	NE	LC
<i>O. anthropophora</i>	NE	NE	LC
<i>O. italica</i>	NE	NE	LC
<i>O. mascula</i>	NE	NE	LC
<i>O. mascula subsp. mascula</i>	NE	NE	LC
<i>O. militaris</i>	NE	NE	VU
<i>O. militaris subsp. militaris</i>	NE	NE	VU
<i>O. pallens</i>	NE	NE	LC
<i>O. pauciflora</i>	LC	NE	LC
<i>O. provincialis</i>	NE	NE	LC
<i>O. punctulata</i>	NE	NE	CR
<i>O. purpurea</i>	NE	NE	LC
<i>O. purpurea subsp. purpurea</i>	NE	NE	LC
<i>O. quadripunctata</i>	LC	NE	LC
<i>O. simia</i>	NE	NE	LC
<i>O. simia subsp. simia</i>	NE	NE	LC
<i>O. sitiaca</i>	EN	NE	EN
<i>O. spitzelii</i>	NE	NE	LC
<i>O. spitzelii subsp. nitidifolia</i>	NE	NE	NT
<i>O. spitzelii subsp. spitzelii</i>	NE	NE	LC
<i>Platanthera</i>	-	-	-
<i>P. bifolia</i>	NE	NE	LC
<i>P. chlorantha</i>	NE	NE	LC
<i>P. chlorantha subsp. holmboei</i>	NE	NE	VU
<i>P. chlorantha subsp. chlorantha</i>	NE	NE	LC
<i>P. fornicata</i>	NE	NE	LC
<i>Pseudorchis</i>	-	-	-
<i>P. albida</i>	NE	NE	CR
<i>Serapias</i>	-	-	-
<i>S. bergonii</i>	NE	NE	LC
<i>S. cordigera</i>	NE	NE	LC
<i>S. cordigera subsp. cretica</i>	NE	NE	NT
<i>S. cordigera subsp. cordigera</i>	NE	NE	LC
<i>S. lingua</i>	NE	NE	LC
<i>S. lingua subsp. lingua</i>	NE	NE	LC
<i>S. neglecta</i>	NT	NE	VU
<i>S. neglecta subsp. ionica</i>	NT	NE	VU
<i>S. orientalis</i>	NE	NE	LC
<i>S. orientalis subsp. carica</i>	NE	NE	LC
<i>S. orientalis subsp. orientalis</i>	NE	NE	LC
<i>S. parviflora</i>	NE	NE	LC
<i>S. politisii</i>	NE	NE	LC

<i>S. vomeracea</i>	NE	NE	LC
<i>Spiranthes</i>	-	-	-
<i>S. spiralis</i>	NE	NE	LC

2.1.5 Ορχιδέες της Ελλάδος

Στην Ελλάδα τα περισσότερα είδη ορχεοειδών αναπτύσσονται σε ασβεστολιθικά εδάφη χωρίς αυτό να αποτελεί κανόνα. Ορχιδέες μπορεί κάποιος να εντοπίσει από τα ανοιχτά ψευδοαλπικά λιβάδια με τους πυκνούς πληθυσμούς όπως τη *Dactylorhiza sambucina* στα βόρεια της χώρας έως τα κλειστά δάση με το σπάνιο *Epirogium aphyllum* ή την *Neottia nidus-avis* που εντάσσονται στα ολοπαρασιτικά είδη. Όλα τα ορχεοειδή της χώρας μας είναι επίγεια (φύονται στο έδαφος). Εκπρόσωποι της οικογένειας καταγράφονται από τις ακτές έως και πάνω από 2.000 μέτρα υψόμετρο, και ανέρχονται περί τα 100 είδη σε 18 γένη με 3 από αυτά (*Epiractis*, *Dactylorhiza*, *Ophrys*) να είναι τα πολυπληθέστερα σε είδη (Vascular plants of Greece, 2013) και πολλά από τα οποία είναι ενδημικά. Υπάρχουν πολλές 'σχολές' στην συστηματική των ορχιδεών. Εξαιτίας αυτής της 'διαμάχης' ο σαφής αριθμός των ειδών βρίσκεται μεταξύ των 100 (ή λιγότερων που προτείνει το VPG) και σύμφωνα με κάποιους ερευνητές μπορεί να φτάνει στα 200-300 είδη, για την Ελλάδα. Το γένος με το μεγαλύτερο πρόβλημα στη συστηματική του είναι το γένος *Ophrys* που στο VPG αναγνωρίζονται 18 μόλις είδη ενώ σύμφωνα με άλλους μελετητές αυτά ανέρχονται σε έως και 100 είδη (Αντωνόπουλος, 2009).

Οι ορχιδέες ήταν γνωστές από την αρχαιότητα στον ελληνικό χώρο και είχαν τυλιχτεί όπως και πολλά φυτά με θρύλους για τις θαυμαστές ιδιότητές τους. Όπως αναφέρεται από τον Μπάουμαν (Μπάουμαν, 1993), η ιατρική της αρχαιότητας χάριζε στα ορχεοειδή αφροδισιακές ιδιότητες εξαιτίας της ομοιότητας που παρουσίαζαν οι βολβοί με τους όρχεις. Ο Διοσκουρίδης παρατηρώντας τη διαφορά στο μέγεθος των δυο βολβών κάθε φυτού πίστευε ότι όταν ο μεγαλύτερος τρωγόταν από άντρα οδηγούσε στη γέννηση αρσενικού παιδιού ενώ όταν ο μικρότερος τρωγόταν από γυναίκα οδηγούσε στη γέννηση θηλυκού παιδιού. Τα ορχεοειδή, επίσης, λόγω του σχήματος των βολβών ήταν αφιερωμένα στους Σάτυρους και στους Σίληνους που συνόδευαν τον θεό Διόνυσο. Πιθανώς επίσης οι αρχαίοι να τα ονόμαζαν και υάκινθους. Ο Θεόφραστος περιγράφει έναν υάκινθο ανοιξιάτικο, το άνθος του οποίου διαρκεί περισσότερο από τα άνθη των άλλων φυτών, χαρακτηριστικό των ανθών του γένους *Ophrys* των οποίων η διάρκεια άνθισης είναι εκτεταμένη, και λέει για το άνθος του ότι έχει χρώμα μαύρο πολύ συχνό στο γένος *Ophrys*.

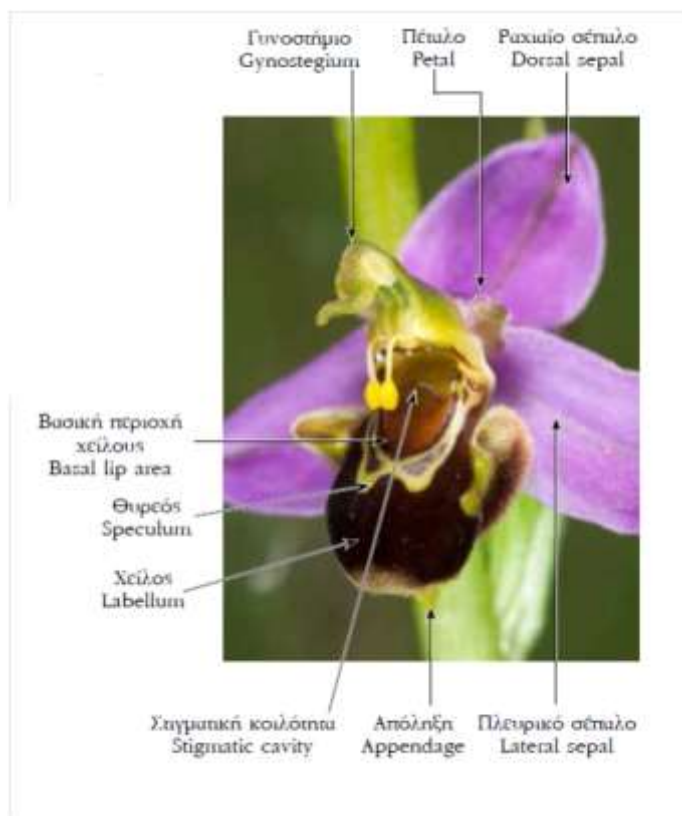
2.1.6 Το άνθος των ορχιδεών

Όσον αφορά το άνθος στα ορχεοειδή παρουσιάζει τα εξής γνωρίσματα (Καλοπίσης, 2001):

- Το περιάνθιο αποτελείται από 6 ανθόφυλλα και είναι στεφανοειδές περιγόνιο. Τα ανθόφυλλα είναι οργανωμένα σε δυο σπονδύλους και γενικά τα ανθόφυλλα του εξωτερικού σπονδύλου καλούνται σέπαλα ενώ του εσωτερικού πέταλα. Τα σέπαλα και τα πέταλα διαφέρουν στο μέγεθος και το μεσαίο πέταλο είναι έντονα ανεπτυγμένο και διαφοροποιημένο από τα υπόλοιπα και πολλές φορές φέρει διεύρυνση που ονομάζεται πλήκτρο και μπορεί να περιέχει νέκταρ, το πέταλο αυτό

ονομάζεται χείλος ή γλωσσάριο (labellum).

- Οι στήμονες από 6 προγονικούς έχουν αναχθεί σε ένα μόνο γόνιμο του εξωτερικού σπονδύλου ενώ δυο στήμονες εκατέρωθεν του γόνιμου δεν φέρουν γύρη και ονομάζονται στημονώδη.
- Στο άνθος παρουσιάζεται ένωση του στίγματος και του στύλου με το γόνιμο στήμονα σε ένα όργανο με τη μορφή μικρής στήλης (Columna) το οποίο λέγεται γυνοστήμιο και το οποίο βρίσκεται πάνω από την υποφυή ωοθήκη,
- Η γύρη που σχηματίζεται στον ανθήρα του γόνιμου στήμονα του γυνοστημίου αλλά δεν έχει την τυπική μορφή της γυρεόσκονης. Οι γυρεόκοκκοι έχουν συγκολληθεί σε κορνοειδής σχηματισμούς που λέγονται γυρεομάγματα ή πολλίνια, μέσω μια κολλώδους ουσίας. Τα γυρεομάγματα στη βάση τους έχουν ποδίσκους (Caudiculae) που στην βάση τους συνενώνονται με τους ιξωδούς αδένες του ρυγχίου. Έτσι το γυρεόμαγμα με τον ποδίσκο και τον ιξώδη αδένα σχηματίζουν το πολλινάριο.
- Το στίγμα των ορχεοειδών είναι τρίλοβο με δυο γόνιμους λοβούς που παρουσιάζονται ως ενιαία επιφάνεια που φέρει μια κολλητική ουσία στη βάση του γυνοστημίου (στιγματική κοιλότητα). Ο μεσαίος, άγονος, λοβός έχει μετατραπεί σε ειδική περιοχή του γυνοστημίου που βρίσκεται πάνω από το γόνιμο τμήμα του στίγματος και κάτω από τον γόνιμο ανθήρα σαν μικρή διαπλάτυνση και ονομάζεται ρυγχίο (rostellum) επειδή πολλές φορές προβάλλει από το χείλος της στιγματικής κοιλότητας σαν ρύγχος. Το ρυγχίο εμποδίζει με την θέση του την αυτεπικονίαση ενώ παράγει κολλώδη ουσία με την οποία προσκολλώνται τα γυρεομάγματα στους επικονιαστές.



Εικόνα 5. Ανατομία του άνθους του είδους *Ophrys apifera* (Ορχιδέες του εθνικού πάρκου βόρειας Πίνδου, 2015).

2.1.7 Η φύτρωση στην Οικογένεια Orchidaceae

Στα ορχεοειδή τα σπέρματα τα οποία ανήκουν στην κατηγορία των “dust seeds”, με μέγεθος περίπου 0,07-0,40 mm πλάτος και 0,11-0,197 mm σε μήκος (Rasmussen, 1995) σχηματίζονται κατά χιλιάδες μέσα στις κάψες. Ο αριθμός των σπερμάτων ανά κάψα εξαρτάται από το είδος και, μάλιστα, φαίνεται ότι μεγαλύτερο αριθμό σπερμάτων ανά κάψα σχηματίζουν τα είδη τα οποία αξιοποιούν κάποια μέθοδο εξαπάτησης για να προσελκύσουν τους επικονιαστές τους (Sonkoly et al., 2016). Το έμβρυο, που αναφέρεται και ως προ-έμβρυο, δεν είναι πλήρως σχηματισμένο αλλά αποτελεί μια σφαιρική συνήθως μάζα κυττάρων που μπορεί να είναι μεταξύ των 20 ή να ξεπερνούν τα 150 κύτταρα (Harvais, 1973).

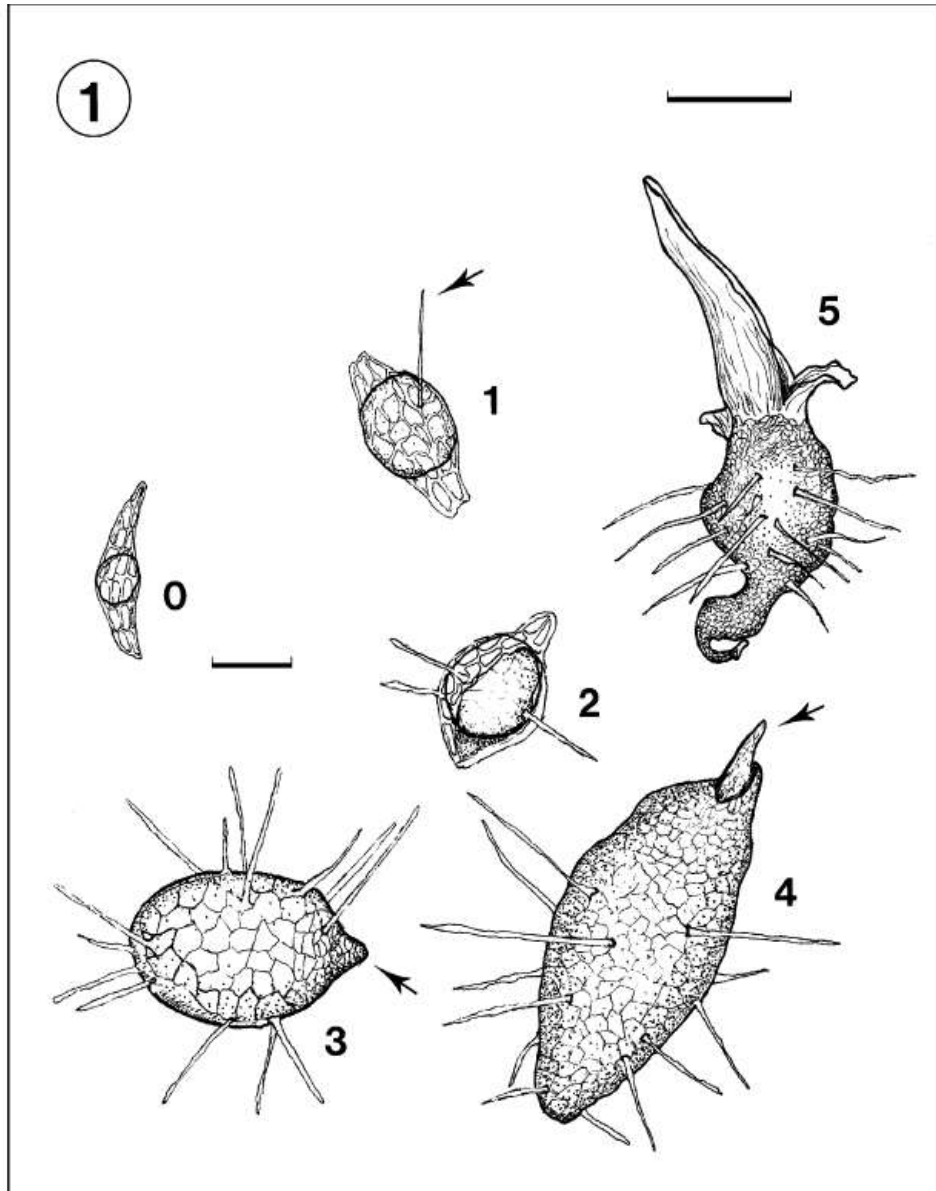
Η τυπική μορφή ενός σπέρματος στην οικογένεια Orchidaceae περιλαμβάνει: 1) το εξωτερικό περίβλημα που ονομάζεται “testa” μέσα στην οποία εντοπίζεται το προ-έμβρυο και η οποία είναι γεμάτη αέρα και διευκολύνει την μεταφορά των σπερμάτων μέσω του αέρα, 2) το μη διαφοροποιημένο έμβρυο με το απόν ή περιορισμένο ενδοσπέρμιο. Η συμμετοχή του ενδοσπερμίου στη θρέψη του αρτιβλάστου στα πρώτα στάδια ζωής του φυτού έχει αντικατασταθεί με την ανάπτυξη συμβιωτικών σχέσεων με μύκητες ή/και βακτήρια τα οποία παρέχουν θρεπτικά στο νεαρό φυτό μέχρι να είναι ικανό να φωτοσυνθέσει (σε πολλές περιπτώσεις και σε όλη την υπόλοιπη διάρκεια ζωής του φυτού).

Το μικροσκοπικό μέγεθος των σπερμάτων των ορχιδεών καθώς και οι πολύπλοκες σχέσεις

που αναπτύσσουν με μικροοργανισμούς, που σε πολλές περιπτώσεις ρυθμίζουν τη φύτευση και ανάπτυξη του φυτού, καθιστά ιδιαίτερα δύσκολη τη μελέτη της φύτευσής τους. Το μικρό μέγεθος αποτέλεσε ανασταλτικό παράγοντα της *in situ* μελέτης της φύτευσης και ανάπτυξης σχέσεων φυτού-μικροοργανισμού μέχρι που αναπτύχθηκε πλέον η μέθοδος του “δολώματος” σπερμάτων (seed baiting) που επιτρέπει τη μελέτη των αλληλεπιδράσεων, στο πεδίο, κατά τα πρώτα στάδια ζωής του φυτού (Rasmussen & Whigham, 1993). Το υπανάπτυκτο ενοδσπέρμιο και έμβρυο καθώς και η, πολλές φορές απαραίτητη συμβίωση με μικροοργανισμούς αποτελεί τροχοπέδη στην *ex situ* μελέτη της φύτευσης

Η μελέτη της φύτευσης στο εργαστήριο γίνεται με τη χρήση θρεπτικών υποστρωμάτων πάνω στα οποία γίνεται η διάβρεξη των σπερμάτων. Πριν τη διάβρεξη, τα σπέρματα υφίστανται μια προκατεργασία συνήθως με μέσα απολύμανσης, συνήθως, υποχλωριώδες ασβέστιο / νάτριο και πολλές φορές με κάποιο απορρυπαντικό (Tween 20 ή 80). Το $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ καθαρίζει το εξωτερικό περίβλημα του σπέρματος (Testa) και έτσι αποφεύγονται οι μολύνσεις του θρεπτικού με μύκητες και βακτήρια, ενώ ταυτόχρονα προκαλεί διάρρηξη του περιβλήματος επιτρέποντας το νερό να περάσει ευκολότερα. Το Tween 20 ή 80 από την άλλη επιτρέπει, στην περίπτωση ύπαρξης λιπόφιλων ενώσεων στο περίβλημα των σπερμάτων, την καλύτερη επαφή του νερού με το έμβρυο. Η διαδικασία της διάβρεξης γίνεται σε στείρες συνθήκες και τα τρυβλία στα οποία τα σπέρματα τοποθετούνται διατηρούνται ερμητικά κλειστά για να αποφευχθούν οι μολύνσεις αλλά και να διατηρηθεί η υγρασία στο εσωτερικό του τρυβλίου.

Όσον αφορά τη φύτευση επειδή στις ορχιδέες το έμβρυο, όπως προαναφέρθηκε, αποτελείται από μια μάζα κυττάρων και δεν διακρίνονται ούτε ριζίδιο ούτε κοτυληδόνες δεν μπορεί να ισχύει ο κλασικός ορισμός περί εμφάνισης / εξόδου του ριζιδίου από το σπερματικό περίβλημα. Στην περίπτωση των ορχιδεών έχει αναπτυχθεί ένα σύστημα 5 σταδίων μορφολογικής μεταβολής από το σπέρμα έως το σχηματισμό του πρωτοκόρμου προκειμένου να περιγραφεί η φύτευση του φυτού. Τα στάδια αυτά παρουσιάζονται στην εικόνα 6. Φυτρωμένο, στις περισσότερες μελέτες, θεωρείται το σπέρμα μετά τη διάρρηξη του εξωτερικού περιβλήματος και την εμφάνιση των ριζοειδών. Σημαντικό επίσης είναι να αναφερθεί ότι η διαδοχή των σταδίων δεν είναι πάντα γραμμική μπορεί πχ. πρώτα να προκληθεί η διάρρηξη του περιβλήματος και μετά η έξοδος των ριζοειδών ή το αντίστροφο.



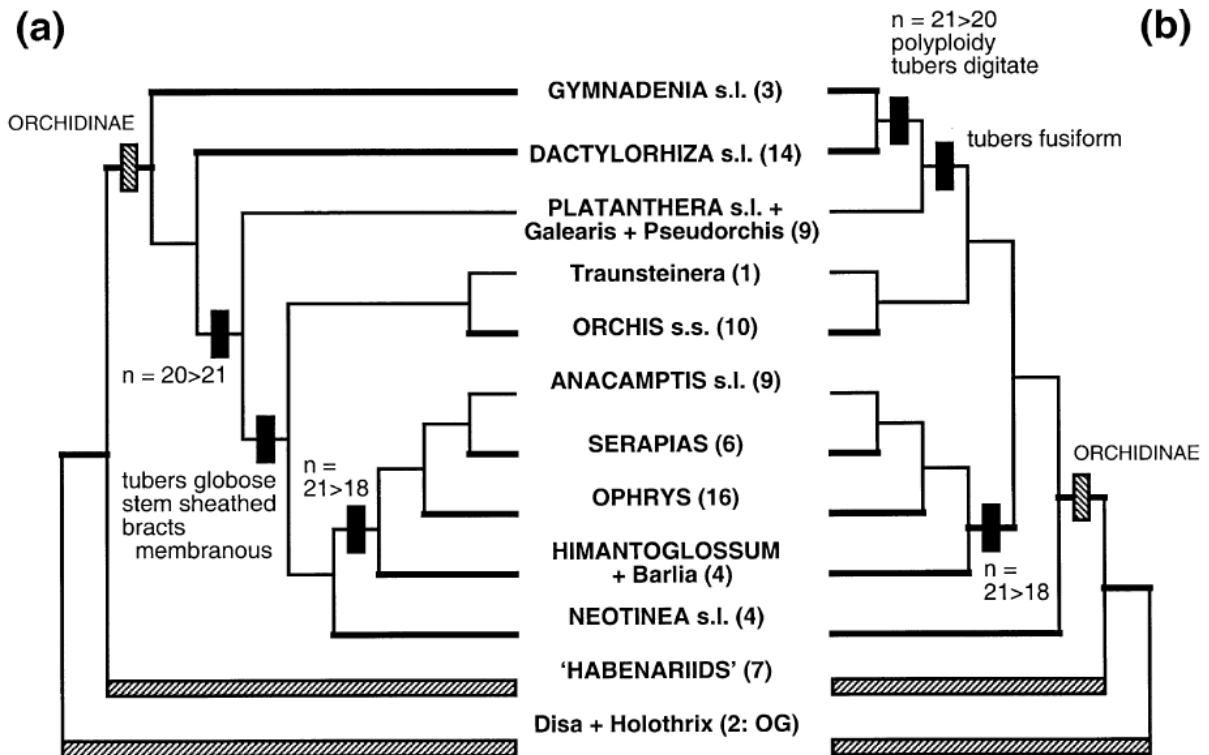
Εικόνα 6. Στάδια “φύτρωσης” σπέρματος ορχιδέας: 0) μη φυτρωμένο, 1) σχηματισμός ριζοειδών από το διογκωμένο έμβρυο, 2) διάρρηξη του εξωτερικού περιβλήματος από το διογκωμένο έμβρυο, 3) εμφάνιση του πρωτομεριστώματος του βλαστού, 4) ανάπτυξη του φύλλου από το βλαστό, 5) επιμήκυνση του φύλλου. (κλίμακα 1 mm). (Stewart & Zettler, 2002).

2.1.8 Φυλογενετικές σχέσεις μέσα στην Orchidinae

Η παρούσα διπλωματική εργασία ως προς το κομμάτι της φύτρωσης μελετάει κυρίως μέλη της υποφυλής (subtribe) Orchidinae με εξαίρεση το είδος *Spiranthes spiralis* που ανήκει στην Spiranthinae. Τα γένη στα οποία ανήκουν είδη για τα οποία μελετήθηκε η φύτρωση είναι: 1) *Anacamptis*, 2) *Dactylorhiza*, 3) *Gymnadenia*, 4) *Neotinea*, 5) *Ophrys*, 6) *Spiranthes*, 7) *Serapias*.

Παρατηρώντας το δέντρο της εικόνας 7 μπορούμε να παρατηρήσουμε τα εξής: τα γένη *Anacamptis* και *Serapias* είναι τα πιο συγγενικά μεταξύ τους και ο κλάδος τους συγγενεύει με

αυτών του γένους *Ophrys* ενώ πιο απομακρυσμένα είναι τα γένη *Neotinea*, *Dactylorhiza*, *Gymnadenia* με τα δυο τελευταία να είναι πιο κοντινά μεταξύ τους παρά με το κλάδο *Ophrys-Anacamptis-Serapias* και το γένος *Neotinea* να είναι εγγυτέρα του παραπάνω κλάδου.



Εικόνα 7. Περίληψη της φυλογένεσης βάση ITS στην Orchidinae όπως υπολογίστηκε a) με και b) χωρίς εισδοχές ή ελλείψεις βάσεων. Τα παχιά κλαδιά φανερώνουν >80% υποστήριξη bootstrap. Οι ομάδες που είναι σκιασμένες λοξά είναι παραφυλετικές. Στις παρενθέσεις αναφέρεται ο αριθμός των taxa που αναλύθηκαν για κάθε μεγάλο κλάδο. (Bateman et al., 2003).

2.2 ΣΤΟΧΟΣ ΤΗΣ ΔΙΠΛΩΜΑΤΙΚΗΣ

Στόχος της παρούσας διπλωματικής εργασίας ήταν, αρχικά, η καταγραφή πληθυσμών της οικογένειας Orchidaceae στα όρη Υμηττός, Ποικίλο, Πάρνηθα, Κιθαιρώνας, Φαλακρό καθώς και η μελέτη της *ex situ* ασυμβιωτικής φύτευσης των σπερμάτων και ανάπτυξης των πρωτοκόρμων (protocorms) σε διαφορετικά θρεπτικά και υπό διαφορετικές συνθήκες θερμοκρασίας, προ-κατεργασίας των σπερμάτων και φωτισμού. Η διπλωματική εργασία αποτελεί συνέχεια μιας σειράς διπλωματικών του εργαστηρίου που έχουν μελετήσει τη φυσιολογία φύτευσης 24 ειδών της οικογένειας Orchidaceae (Αγγελική Πέππα, 2011 & Άννα Βελιανίτη, 2011 & Κλειώ Αμπελακιώτου, 2015) και ακολουθώντας παρόμοια μεθοδολογία εργασίας προσθέτει 11 καινούργια είδη στη λίστα αυτή, 6 εκ των οποίων μελετώνται για πρώτη φορά ασυμβιωτικά.

3. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

3.1.1 Περιοχές και χρόνος δειγματοληψιών

Αρχικά έγινε εντοπισμός ειδών της οικογένειας Orchidaceae στις περιοχές: 1) Υμηττός, 2) Ποικίλο Όρος, 3) Πάρνηθα, 4) Σπάτα - Παιανία (δυτική Αττική), 5) Κιθαιρώνας και 6) Φαλακρό. Οι θέσεις στην Πάρνηθα, στον Υμηττό, στο Ποικίλο όρος και στα Σπάτα ως επί των πλείστων υποδείχθηκαν από μέλη του εργαστηρίου (Κατερίνα Κουτσοβούλου, Αποστόλης Καλτσής, Πηνελόπη Δελιπέτρου) που γνώριζαν που εντοπίζονται κάποια είδη ορχεοειδών, ενώ σε αυτές προστέθηκαν και καινούργιες θέσεις από προσωπικές καταγραφές. Στο όρος Φαλακρό, οδηγίες για τον εντοπισμό του είδους *Gymnadenia rhellicanii* δόθηκαν από τον Σπύρο Τσιφτσή ενώ στη Παιανία για τον εντοπισμό της *Ophrys helenae* συντεταγμένες δόθηκαν από τη Μάρθα Χαριτωνίδου. Έγινε καταγραφή της θέσης των ειδών με GPS, μέτρηση του πληθυσμού τους και φωτογράφιση αυτών και η αναγνώριση των ειδών έγινε στο πεδίο. Κάποια από τα άτομα σημάνθηκαν με πλαστικά ταμπελάκια προκειμένου να γίνει συλλογή σπερμάτων, πολλοί ωστόσο πληθυσμοί καταστράφηκαν πριν καρπίσουν ή πριν ωριμάσει ο καρπός με αποτέλεσμα να γίνει συλλογή από 14 είδη στο σύνολο των 20 ειδών που εντοπίστηκαν. Οι δειγματοληψίες έγιναν μεταξύ Μαρτίου και Ιουνίου του έτους 2017 για τα περισσότερα είδη, Εξαίρεση αποτέλεσαν τα είδη *Gymnadenia conopsea*, *Dactylorhiza sambucina*, *Platanthera chlorantha* για τα οποία η δειγματοληψία έγινε τον Αύγουστο καθώς και για το *Spiranthes spiralis* για το οποίο η δειγματοληψία πραγματοποιήθηκε στο τέλος του Οκτώβρη. Παρακάτω βρίσκεται ο πίνακας με τους πληθυσμούς που εντοπίστηκαν. Στην όλη προσπάθεια για την καταγραφή των ειδών εντοπίστηκαν και πολλά άλλα που ωστόσο δεν παρατίθενται παρακάτω επειδή είχαν χρησιμοποιηθεί σε παλαιότερες διπλωματικές είτε επειδή η πρόσβαση στους πληθυσμούς τους ήταν δύσκολη για συχνές επισκέψεις και δειγματοληψία.

Οι κάψες που συλλέχθηκαν μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο και μετά από περίπου ένα μήνα ξήρανσης για κάθε είδος τα σπέρματα αφαιρέθηκαν από τις κάψες και τοποθετήθηκαν σε γυάλινα αεροστεγή δοχεία και παρέμειναν σε θερμοκρασία δωματίου για περίπου ένα χρόνο (όσο διήρκησαν τα πειράματα). Στη συνέχεια οι συλλογές μεταφέρθηκαν στο ψυγείο σε γυάλινα βάζα με αφυδατικό μέσο (silica gel)

Πίνακας 2. Είδη της οικογένειας των ορχεοειδών, με τις συντεταγμένες των θέσεων που εντοπίστηκαν, την ημερομηνία εντοπισμού, την ευρύτερη περιοχή, καθώς και τον πληθυσμό τους.

Είδος	Περιοχή	Συντεταγμένες	Ημερομηνία	υποπληθυσμός (αριθμός ατόμων)
<i>Anacamptis collina</i>	Ποικίλο	38.0036 lat	18/3/2017	10
		23.6525 lon		
<i>Cephalanthera damasonium</i>	Πάρνηθα	38.1672 lat	21/5/2017	6
		23.7422 lon		
<i>Cephalanthera longifolia</i>	Κιθαιρώνας	38.1836 lat	30/4/2017	20
		23.3127 lon		
<i>Dactylorhiza sambucina</i>	Φαλακρό	41.3 lat	4/8/2017	100+
		24.0869 lon		
<i>Epipactis helleborine</i>	Πάρνηθα	38.1672 lat	18/7/2017	8

		23.7422 lon		
<i>Epipactis microphylla</i>	Πάρνηθα	38.1680 lat	20/6/2017	12
		23.7413 lon		
<i>Gymnadenia conopsea</i>	Φαλακρό	41.2997 lat	4/8/2017	100+
		24.0741 lon		
<i>Gymnadenia rhellicanii</i>	Φαλακρό	41.2936 lat	4/8/2017	7
		24.0897 lon		
<i>Neotinea lactea</i>	Υμηττός	37.9713 lat	14/3/2017	15+
		23.7902 lon		
<i>Neotinea maculata</i>	Υμηττός	37.9630 lat	26/3/2017	14
		23.7961 lon		
<i>Neotinea tridentata</i>	Πάρνηθα	38.1347 lat	26/4/2017	16
		23.7383 lon		
<i>Ophrys mammosa</i>	Σπάτα	37.9819 lat	25/3/2017	30+
		23.9180 lon		
<i>Ophrys mammosa</i>	Ποικίλο	38.0288 lat	22/3/2017	2
		23.6716 lon		
<i>Ophrys helenae</i>	Παιανία	37.9519 lat	15/5/2017	10
		23.8411 lon		
<i>Ophrys cinereophila</i>	Ποικίλο	38.0288 lat	22/3/2017	8
		23.6708 lon		
<i>Ophrys melena</i>	Ποικίλο	38.0286 lat	14/4/2017	3
		23.6711 lon		
	Υμηττός	37.9702 lat	28/4/2017	6
		23.8113 lon		
<i>Ophrys mycenensis</i>	Υμηττός	37.9711 lat	21/3/2017	5
		23.7886 lon		
<i>Orchis pauciflora</i>	Υμηττός	37.9708 lat	26/3/2017	4
		23.8038 lon		
<i>Platanthera chlorantha</i>	Φαλακρό	41.2986 lat	4/8/2017	1
		24.0763 lon		
<i>Spiranthes spiralis</i>	Υμηττός	37.9652 lat	24/10/2017	10
		23.7844 lon		
<i>Serapias bergonii</i>	Υμηττός	37.9658 lat	9/4/2017	10+
		23.7833 lon		



Εικόνα 8. Σήμανση κάποιων ορχιδεών για τη μετέπειτα συλλογή καψών. Τα είδη με τη σειρά από πάνω αριστερά είναι: 1) *Cephalanthera damasonium*, 2) *Ophrys forestieri*, 3) *Ophrys mycenensis*, 4) *Anacamptis collina*, 5) *Serapias bergonii*, 6) *Orchis anthropophora*, 7) *Ophrys cinereophila*.



Εικόνα 9. Συλλογές σπερμάτων από τις κάψες και αποθήκευση σε αεροστεγή γυάλινα δοχεία. 1) *Dactylorhiza sambucina* (πάνω αριστερά), 2) *Ophrys mammosa* (πάνω δεξιά), 3) *Epipactis helleborine* (κάτω αριστερά), 4) *Epipactis microphylla* (κάτω μέση), 5) *Neotinea maculate* (κάτω δεξιά).

3.1.2 Περιγραφή των ειδών από τα οποία συλλέχθηκαν κάψες

Η περιγραφή των ειδών στηρίχτηκε σε όσα αναφέρουν οι Άλκιμος (1988), Πέτρου (2009), Αντωνόπουλος (2009) και Delforge (2006).

Anacamptis collina (Banks & Sol. ex Russell) R.M. Bateman, Pridgeon & M.W.Chase



Είναι πολυετές φυτό με ύψος μεταξύ 10-40cm. Τα φύλλα είναι φαρδιά και λογχοειδή. Τα άνθη έχουν είτε άσπρο χείλος και πράσινα σέπαλα, πέταλα βράκτια και βλαστό είτε άνθη με ροζ χείλος και καφεκόκκινα σέπαλα, πέταλα, βράκτια και βλαστό. Τα βράκτια είναι φαρδιά, στο μέγεθος περίπου της ωοθήκης, η ταξιανθία κυλινδρική και φέρει 3-20 άνθη. Τα σέπαλα είναι ωοειδή με τα πλευρικά όρθια και το κεντρικό να σχηματίζει θόλο με τα πέταλα. Το πλήκτρο είναι άσπρο και παχύ με κλίση προς τα κάτω. Ανθίζει Ιανουάριο-Απρίλιο σε φρύγανα, λιβάδια, ανοιχτά δάση.

Cephalanthera damasonium (Mill.) Druce



Είναι φυτό εύρωστο με ύψος 15-60cm και φύλλα επιμήκη ωοειδή, 2-5 σε αριθμό, με χρώμα σκούρο πράσινο και δερματώδη υφή. Τα κατώτερα βράκτια είναι σχεδόν διπλάσια από τα άνθη ενώ τα ανώτερα μακρύτερα από την ωοθήκη. Η ταξιανθία είναι αραιή με 3-20 μεγάλα άνθη όρθια και μισάνοιχτα με χρώμα άσπρο ή κρεμ. Τα πέταλα και τα σέπαλα είναι ωοειδή μυτερά σχεδόν ίσα στο μέγεθος. Το χείλος είναι τρίλοβο εσωτερικά πορτοκαλί με ανάγλυφες κίτρινες ραβδώσεις και χωρίς πλήκτρο. Ανθίζει μεταξύ Μαΐου και Ιουλίου σε σκιερά δάση έως 1800 μέτρα σε μικρούς πληθυσμούς.

Dactylorhiza sambucina (L.) Soó



Πολυετές φυτό με ύψος 10-25 cm, φέρει 4-7 φαρδιά λογχοειδή φύλλα με μήκος έως 12 cm. Τα βράκτια είναι πορφυρά ή πράσινα συνήθως μεγαλύτερα από τα άνθη. Η ταξιανθία είναι σχεδόν κυλινδρική με αρκετά άνθη μετρίου μεγέθους σε χρώμα κίτρινο ή πορφυρό με το χείλος να έχει κίτρινη βάση. Τα πλευρικά σέπαλα είναι απλωτά ή όρθια ενώ το κεντρικό είναι συνήθως όρθιο και δεν ενώνεται με τα πέταλα. Το χείλος είναι φαρδύ, ελαφρά διπλωμένο, σχεδόν ακέραιο με στίγματα στη βάση. Το πλήκτρο είναι παχύ, καμπύλο προς τα κάτω στο μέγεθος της ωοθήκης. Η άνθιση του φυτού παρατηρείται μεταξύ Απριλίου και Ιουλίου σε υγρές πλαγιές, όχθες ρυακιών, αλπικά λιβάδια και ανοιχτά υγρά δάση σε υψόμετρο έως 2.200 μέτρα.

Epipactis helleborine (L.) Crantz



Φυτό με έρπον ρίζωμα με ύψος 20-100 cm, τα φύλλα είναι ωοειδή και σε σπειροειδή διάταξη στο βλαστό. Τα κατώτερα βράκτια είναι μακρύτερα από τα άνθη. Η ταξιανθία είναι αραιή ως πυκνή με 10-100 άνθη μετρίου μεγέθους. Τα σέπαλα και τα πέταλα είναι ωοειδή, μυτερά, με τα σέπαλα να έχουν χρώμα πράσινο, λαδί ή ροζ και τα πέταλα πιο σκούρα συχνά ροζ. Το υπογείλιο είναι πρασινωπό, εσωτερικά γυαλιστερό μαύρο ως σκούρο λαδί. Το επιγείλιο είναι ασπροπράσινο ως σκούρο ροζ, καρδιάσχημο με δύο έντονα σκουρότερα εξογκώματα στη βάση. Ανθίζει από Ιούνιο έως Αύγουστο σε πυκνά, σκιερά δάση και στα όριά τους έως 2.000 μέτρα υψόμετρο.

Epipactis microphylla (Ehrh.) Sw.



Φυτό με έρπον ρίζωμα που παράγει 1-2 πολύ χνουδωτούς βλαστούς. Φτάνει σε ύψος 15-55 cm. Τα φύλλα είναι γκριζοπράσινα ωσειδή ή λογχοειδή ως 5 cm. Τα κατώτερα βράκτια είναι ίσα ή μακρύτερα από τα άνθη. Η ταξιανθία είναι αραιή, σχεδόν μονόπλευρη με 4-30 μικρά άνθη. Τα σέπαλα και πέταλα είναι πράσινα συχνά με ροζ αποχρώσεις και χνουδωτά ωσειδή μυτερά. Το υποχείλιο είναι άσπρο και εσωτερικά πρασινωπό ενώ το επιχείλιο καρδιάσχημο, ασπροπράσινο με οδοντωτή άκρη και δυο πολύ οδοντωτά εξογκώματα στη βάση που ενώνονται με μια κεντρική λωρίδα. Ανθίζει από Μάιο έως Αύγουστο σε σκιερά δάση φυλλοβόλων και τα όριά τους έως 1.700 μέτρα υψόμετρο.

Gymnadenia conopsea (L.) R. Br. in W.T. Alton



Το φυτό έχει ύψος 20-60 cm με 3-12 λογχοειδή φύλλα έως 25 cm. Τα βράκτια είναι ίσα με τα άνθη. Η ταξιανθία παρουσιάζεται πυκνή και κυλινδρική με 20-80 άνθη με χρώμα μεταξύ άσπρου και σκούρου ροζ και ευχάριστο άρωμα. Το κεντρικό σέπαλο σχηματίζει θόλο με τα πέταλα ενώ τα πλευρικά σέπαλα είναι επιμήκη και οριζόντια. Το χείλος είναι τρίλοβο. Το πλήκτρο είναι καμπυλωτό προς τα κάτω και μακρύ (διπλάσιο από την ωοθήκη). Ανθίζει από τον Μάιο έως τον Αύγουστο σε χλοερά δάση, υγρολίβαδα, έλη, θαμνώνες ή βραχώδεις πλαγιές καθώς και στην υποαλπική και αλπική ζώνη από 1.200 έως 2.500 μέτρα.

Neotinea lactea (Poir.) R.M. Bateman, Pridgeon & M.W. Chase



Φυτό με ύψος μεταξύ 10-25 cm. Τα σέπαλα και πέταλα των ανθέων είναι μυτερά με πράσινες αποχρώσεις και τα άνθη σχηματίζουν ένα πυκνό στάχυ. Το χείλος είναι τρίλοβο, οδοντωτό, με χρώμα από άσπρο έως σκοτεινό ροζ, ενώ το μεσαίο λοβίο φέρει κόκκινα στίγματα και είναι μακρύτερο από τα πλευρικά. Η άνθιση παρατηρείται μεταξύ Φεβρουαρίου και Μαΐου σε φρύγανα, λιβάδια, θαμνώνες, ελαιώνες και ανοιχτά δάση έως 1.800 m υψόμετρο.

Neotinea maculata (Desf.) Stearn



Είναι φυτό με ύψος 10-30 cm με ωσειδή γαλαζοπράσινα φύλλα που τα ανώτερα τυλίγουν τον βλαστό. Τα άνθη παρουσιάζουν ποικιλομορφία στο χρώμα (άσπρα, κιτρινοπράσινα, ροζ, καφεκόκκινα). Η ταξιανθία είναι κυλινδρική πυκνή με πολλά μικροσκοπικά άνθη. Τα σέπαλα και τα πέταλα είναι λογχοειδή και σχηματίζουν θόλο. Το χείλος είναι τρίλοβο με το κεντρικό μεγαλύτερο και χωρισμένο σε δυο τμήματα. Το πλήκτρο είναι μικροσκοπικό παχύ με κλίση προς τα κάτω. Ανθίζει από Μάρτιο έως Μάιο σε φρύγανα, λιβάδια, θαμνώνες, δάση κωνοφόρων έως 2.000 μέτρα υψόμετρο.

Neotinea tridentata (Scop.) R.M. Bateman, Pridgeon & M.W. Chase



Είναι λεπτό φυτό με ύψος 15-45 cm που φέρει λογχοειδή έως ωοειδή άστικτα φύλλα από τα οποία τα ανώτερα τυλίγουν τον βλαστό. Η ταξιανθία είναι κοντή ωοειδής έως σφαιρική και πυκνή με 10-50 άνθη. Τα σέπαλα και τα πέταλα είναι λογχοειδή με ροζ έως βυσσινιές νευρώσεις και σχηματίζουν μακρύ θόλο. Το χείλος είναι τρίλοβο με άκρες στρογγυλεμένες ή ελαφρά οδοντωτές σε χρώμα ροζ ανοιχτό ή σκούρο με ροζ βυσσινί κηλίδες σε όλη την επιφάνεια. Ο τρίτος λοβός είναι μακρύτερος από τους πλευρικούς, στενός στη βάση και φαρδύτερος στην άκρη, ακέραιος ή ελαφρά διχαλωτός με μια μικρή προεξοχή στο κέντρο. Ανθίζει μεταξύ Μαρτίου και Ιουνίου σε φρύγανα, ακαλλιέργητα χωράφια, ορεινά λιβάδια και ανοιχτά δάση έως 1.600 μέτρα υψόμετρο.

Ophrys mammosa Desf.



Το όνομα προέρχεται από τις προεξοχές που μοιάζουν με μαστούς, στη βασική περιοχή του χείλους. Ποικιλόμορφο είδος με ευρεία κατανομή στην ανατολική Μεσόγειο. Το ύψος του είναι μεταξύ 15-60 cm και η ταξιανθία φέρει 2-15 άνθη. Το χείλος παρουσιάζεται αδιαίρετο, οι ψευδό-οφθαλμοί είναι σκουρόχρωμοι όπως και η στιγματική κοιλότητα. Το μήκος του χείλους είναι μεταξύ 12-17 mm. Ανθίζει σχετικά νωρίς (Απρίλιο με αρχές Μαΐου). Αποτελεί είδος που βρίσκεται κυρίως σε αλκαλικά εδάφη, ξηρά ή υγρά. Προτιμά τους ανοιχτούς χώρους (λιβάδια, ακαλλιέργητα χωράφια, φρύγανα και ανοιχτά δάση) ενώ εντοπίζεται έως 1.600 μέτρα υψόμετρο.

Ophrys mycenensis S. Hertel & Paulus



Είναι είδος που εντοπίζεται κυρίως στην ανατολική Πελοπόννησο, την Αττική και στα γύρω νησιά. Τα κύρια χαρακτηριστικά που το ξεχωρίζουν από τα υπόλοιπα είδη του συμπλέγματος των κερασφόρων ορχιδεών είναι: 1) Οι πλευρικοί λοβοί (κέρατα) είναι μικρού έως μεσαίου μεγέθους και έχουν μια κλίση προς τα έξω, μερικές φορές ιδιαίτερα έντονη, 2) ο χρωματισμός του χείλους είναι σκούρο καφέ που από απόσταση μπορεί να μοιάζει μαύρο, 3) ο θυρεός είναι αρκετά περιορισμένος πολλές φορές φαίνεται με δυσκολία, συνήθως αποτελείται από ένα σχηματισμό 'H' μεταλλικού μπλε χρώματος το οποίο περιβάλλεται από ένα κίτρινο αχνό περίγραμμα. Ανθίζει σχετικά νωρίς, από τα μέσα Μαρτίου έως και τέλη Απριλίου αναλόγως την περιοχή.

Ophrys helenae Renz.



Το ύψος του είναι μεταξύ 15-40 cm . Η ταξιανθία είναι συνήθως αραιή με 2-8 αρκετά μεγάλα άνθη και τα βράκτια είναι ίσα με τα άνθη. Τα σέπαλα είναι ανοιχτοπράσινα, συχνά με ρόδινες αποχρώσεις ενώ τα πλευρικά παρουσιάζουν κάποιες φορές διχρωμία. Τα πέταλα είναι επιμήκη με κυματιστές άκρες. Το χείλος είναι ακέραιο χωρίς εξογκώματα, πορτοκαλί (σπάνια), βελούδινο κόκκινο ή βυσσινί. Θυρεός απών ή σπανίως πολύ αχνός μπλε. Η στιγματική κοιλότητα εξωτερικά είναι άσπρη και βαθύ-κόκκινη με σχεδόν μαύρη βασική περιοχή και ψευδό-οφθαλμούς. Ανθίζει από Μάρτιο έως Ιούνιο σε λιβάδια, ακαλλιέργητα χωράφια, θαμνώνες και ανοιχτά δάση έως 1.000 μέτρα υψόμετρο.

Serapias bergonii E.G. Camus



Το ύψος είναι μεταξύ των 15-45 cm. Τα φύλλα είναι στενά λογχοειδή και όρθια έως 14 cm. Τα βράκτια είναι μακρύτερα από τα άνθη, κοκκινωπά ή μοβ με σκουρότερες νευρώσεις. Ταξιανθία σκούρη, αραιή με 3-12 άνθη μετρίου μεγέθους. Ο θόλος έχει κλίση προς τα πάνω και χρώμα ανοιχτό γκριζο-μοβ με σκουρότερες νευρώσεις. Τα σέπαλα είναι λογχοειδή ως 24 mm, τα πέταλα είναι λίγο μικρότερα. Το χείλος είναι μακρύτερο από τον θόλο ως 35 mm με δυο παράλληλες προεξοχές στη βάση ανοιχτόχρωμες ή σκούρες. Το υποχείλιο είναι ανοιχτόχρωμο στο κέντρο με κοντό τρίχωμα, οι λοβοί έχουν χρώμα σκούρο κόκκινο και εξέχουν λίγο ή αρκετά από τον θόλο. Το επιχείλιο είναι μυτερό κατακόρυφο ή διπλωμένο προς τα πίσω συνήθως κόκκινο ή στο χρώμα της ώχρας. Τα γυρεομάγματα έχουν χρώμα πράσινο. Ανθίζει Μάρτιο με Ιούνιο σε ακαλλιέργητα χωράφια, γλοερά λιβάδια, μακκία, φρύγανα, ελαιώνες και ανοιχτά δάση έως 1.500 μέτρα.

Spiranthes spiralis (L.) Chevall.



Είναι λεπτό φυτό με ύψος 6-30 cm. Ο βλαστός είναι χνουδωτός και περιβάλλεται από 3-7 βράκτια. Τα φύλλα έχουν μαραθεί την εποχή της άνθησης και δίπλα στο φυτό βρίσκεται ο ρόδακας των φύλλων της επόμενης χρονιάς. Η ταξιανθία είναι σπειροειδής και σχετικά πυκνή με 6-30 άνθη χρώματος άσπρου. Το κεντρικό σέπαλο σχηματίζει σωλήνα με τα πέταλα, ενώ τα πλευρικά σέπαλα είναι οριζόντια. Το χείλος είναι ωοειδές, δαντελωτό, με πράσινο-κίτρινο κέντρο και χωρίς πλήκτρο. Ανθίζει από Αύγουστο έως Οκτώβριο σε λιβάδια, θαμνώνες, ακαλλιέργητα χωράφια και ανοιχτά πευκοδάση έως τα 1.400 μέτρα.

3.2 ΘΡΕΠΤΙΚΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΑ

3.2.1 Θρεπτικά υποστρώματα

Στα περισσότερα από τα πειράματα που έγιναν στα πλαίσια της διπλωματικής αξιοποιήθηκαν σύνθετα χημικά υποστρώματα για τη φύτευση των σπερμάτων και σε λίγες μόνο περιπτώσεις η διάβρεξη έγινε σε απεσταγμένο νερό. Τα θρεπτικά υποστρώματα που αξιοποιήθηκαν ήταν τα Knudson, Orchimax, Murashige & Skoog αγορασμένα από την εταιρία Duchefa Biochemie ενώ χρησιμοποιήθηκε το Malmgrem medium που παρασκευάστηκε στο εργαστήριο καθώς επίσης και δυο τροποποιημένες μορφές των Malmgrem (Calevo et al., 2017) και Murashige & Skoog (Cevdet & Sebnem, 2012). Η επίστρωση των τρυβλίων (διάμετρος 60 mm) έγινε σε θάλαμο νηματικής ροής προκειμένου να αποφευχθούν πιθανές μολύνσεις.

3.2.2 Παρασκευή θρεπτικών υποστρωμάτων

Παρασκευή 1 L Malmgrem (MM)

Συστατικά: $(\text{Ca})_3\text{PO}_4$, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot (\text{H}_2\text{O})_7$, σακχαρόζη, νερό καρύδας, ξυλάνθρακας, άγαρ, απεσταγμένο νερό.

Ζυγίζονται 0,075 g από καθένα από τα τρία άλατα ($(\text{Ca})_3\text{PO}_4$, KH_2PO_4 , $\text{MgSO}_4 \cdot (\text{H}_2\text{O})_7$) και αναδεύονται για 15 min. Ακολούθως τοποθετούνται σε μια κωνική των 2000 mL και αναδεύονται. Βράζεται το νερό καρύδας για 10 min και ζυγίζονται 10 mg σακχαρόζης. Γεμίζεται η φιάλη με απεσταγμένο νερό (950 mL), τοποθετούνται 50 mL καρύδας και συμπληρώνεται νερό έως τη χαραγή των 1000 mL, στη συνέχεια προστίθενται 0,50 g ξυλάνθρακα και αναδεύονται για 20 min. Ρυθμίζεται το pH στο 5,6-5,8 και προστίθενται 6g άγαρ. Η κωνική τοποθετείται σε κατσαρόλα που βράζει και αναδεύεται μέχρι να διαλυθεί το άγαρ. Ακολούθως τοποθετείται σε αυτόκαυστο για 20 min αποστείρωση. Τέλος γίνεται η επίστρωση των τρυβλίων μέσα στο θάλαμο νηματικής ροής

Παρασκευή 1 L του τροποποιημένου κατά Calevo Malmgrem (MM+): Προσθήκη 100 mg NH_4NO_3 μαζί με τα άλλα 3 άλατα και 8 g αντί 6 g άγαρ καθώς επίσης 10 g σακχαρόζης αντί των 10 mg.



Εικόνα 10. Παρασκευή του θρεπτικού Malmgrem.

Παρασκευή 1 L Knudson C Orchid Medium (KC) Duchefa Biochemie

Συστατικά: $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, KCl , KH_2PO_4 , MgSO_4 , NH_4NO_3 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, άγαρ, απεσταγμένο νερό.

Ζυγίζονται 1,9 g από το θρεπτικό Knudson και 6 g άγαρ. Το θρεπτικό τοποθετείται σε

κωνική των 1000 mL και προστίθεται νερό έως τη χαραγή ενώ γίνεται ανάδευση για 15 min. Το pH ρυθμίζεται στο 5,6-5,8. Προστίθεται το άγαρ στη κωνική και γίνεται ανάδευση σε κατσαρόλα με νερό που βράζει μέχρι να διαλυθεί. Έπειτα γίνεται αποστείρωση του θρεπτικού στο αυτόκαυστο για 20 min. Τέλος γίνεται η επίστρωση του θρεπτικού σε τρυβλία μέσα στο θάλαμο νηματικής ροής.

Παρασκευή 1 L Orchimax medium (OR) Duchefa Biochemie

Συστατικά: $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, FeNaEDTA , H_3BO_3 , KI , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , KH_2PO_4 , KNO_3 , MgSO_4 , NH_4NO_3 , MES, myo-Inositol, Nicotinic acid, Pyridoxin HCl, Thiamine HCl, άγαρ, απεσταγμένο νερό.

Ζυγίζονται 27,3 g από το θρεπτικό Orchimax και 6 g άγαρ. Το θρεπτικό τοποθετείται σε κωνική των 1000 mL και προστίθεται νερό έως τη χαραγή, ενώ γίνεται ανάδευση για 15 min. Το pH ρυθμίζεται στο 5,6-5,8. Προστίθεται το άγαρ στη κωνική και γίνεται ανάδευση σε κατσαρόλα με νερό που βράζει μέχρι να διαλυθεί. Έπειτα γίνεται αποστείρωση του θρεπτικού στο αυτόκαυστο για 20 min. Τέλος γίνεται η επίστρωση του θρεπτικού σε τρυβλία μέσα στο θάλαμο νηματικής ροής.

Παρασκευή 1 L Murashige & Skoog medium (MS) Duchefa Biochemie

Συστατικά: $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, FeNaEDTA , H_3BO_3 , KI , $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, CaCl_2 , KH_2PO_4 , KNO_3 , MgSO_4 , NH_4NO_3 , Glycine, myo-Inositol, Nicotinic acid, Pyridoxine HCl, Thiamine HCl, άγαρ, απεσταγμένο νερό.

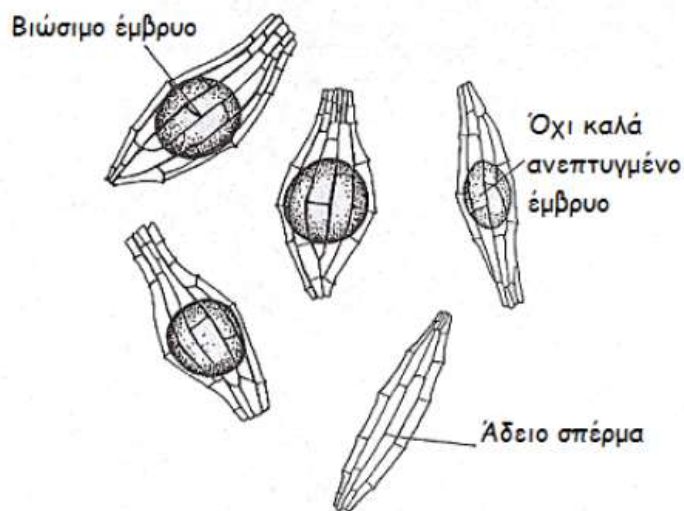
Ζυγίζονται 4,4 g από το θρεπτικό Murashige & Skoog και 6 g άγαρ. Το θρεπτικό τοποθετείται σε κωνική των 1000 mL και προστίθεται νερό έως τη χαραγή, ενώ γίνεται ανάδευση για 15 min. Το pH ρυθμίζεται στο 5,6-5,8. Προστίθεται το άγαρ στη κωνική και γίνεται ανάδευση σε κατσαρόλα με νερό που βράζει μέχρι να διαλυθεί. Έπειτα γίνεται αποστείρωση του θρεπτικού στο αυτόκαυστο για 20 min. Τέλος γίνεται η επίστρωση του θρεπτικού σε τρυβλία μέσα στο θάλαμο νηματικής ροής.

Παρασκευή 1 L του τροποποιημένου (κατά Cevdet) Murashige & Skoog (MS+): Προσθήκη 2,2 g Murashige & Skoog αντί 4,4 g και προσθήκη ή μη 0,1 g GA_3 .

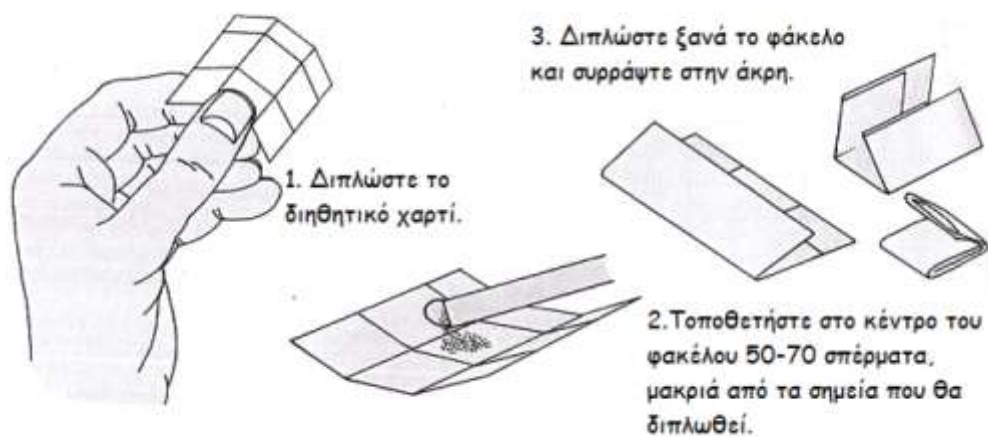
3.3 Χειρισμός των σπερμάτων και διάβρεξη

3.3.1 Κατασκευή φακέλων με σπέρματα και μεταχείριση τους

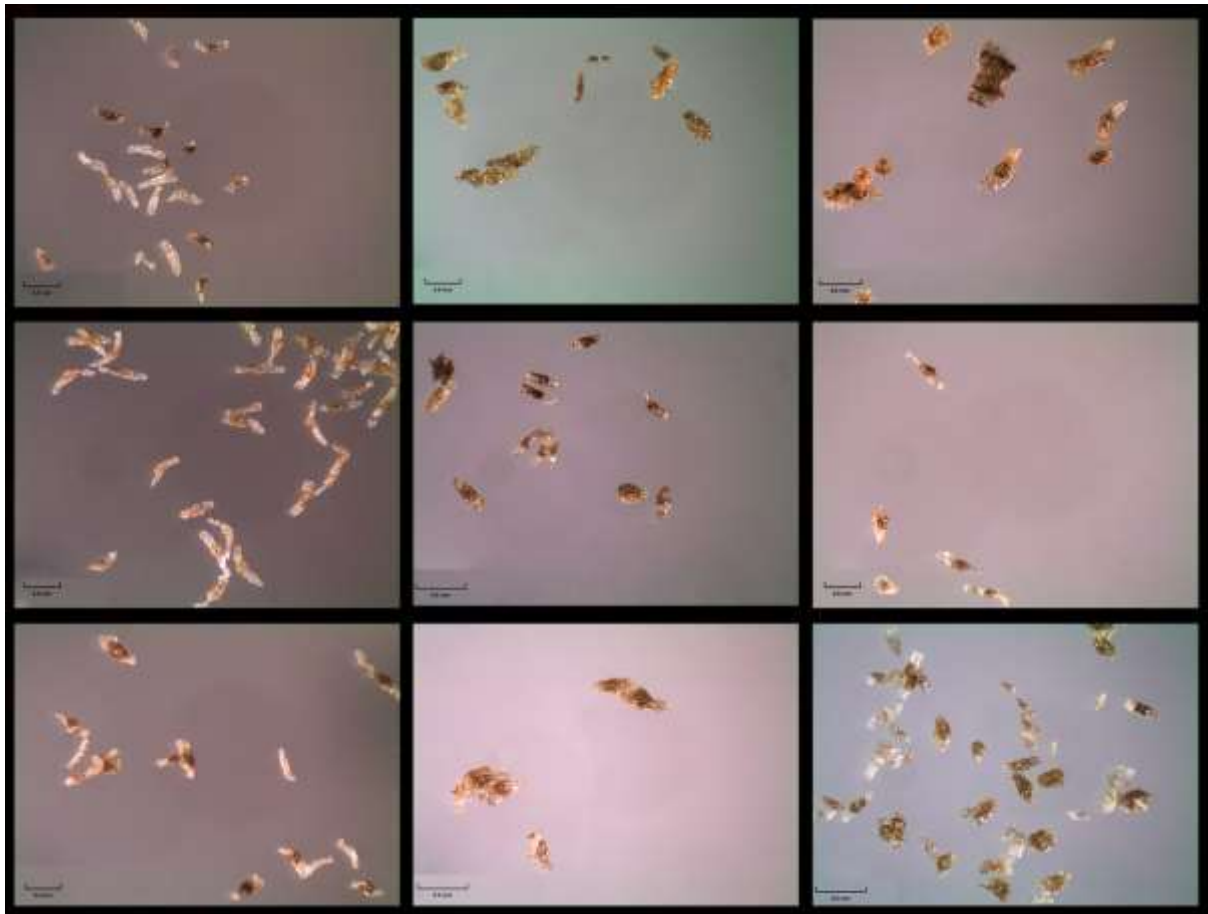
Εξαιτίας του μικρού μεγέθους που έχουν τα σπέρματα των ορχεοειδών κατασκευάσαμε φακέλους, από διηθητικό χαρτί, για να γίνει πιο εύκολα η μεταχείρισή τους πριν την διάβρεξη. Στο κέντρο των φακέλων (6x6 cm) τοποθετούνται 50-70 σπέρματα αφού γίνει επιλογή γεμάτων σπερμάτων (εικόνα 11). Ο φάκελος διπλώνεται, σφραγίζεται με συρραπτικό και στη συνέχεια στην άκρη σημειώνεται το όνομα του είδους (εικόνα 11).



Εικόνα 11. Αναπαράσταση των σπερμάτων με διαφορετικές καταστάσεις του εμβρύου.



Εικόνα 12. Μέθοδος πακεταρίσματος των σπερμάτων.



Εικόνα 13. Σπέρματα κάποιων από τα είδη που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα (από αριστερά προς τα δεξιά και από πάνω προς τα κάτω): 1) *Anacamptis collina*, 2) *Neotinea lactea*, 2) *Neotinea maculata*, 3) *Neotinea tridentata*, 4) *Ophrys mammosa*, 5) *Ophrys mycenensis*, 6) *Ophrys helenae*, 7) *Dactylorhiza sambucina*, 8) *Spiranthes spiralis*.

Πριν τον έλεγχο της φυτρωτικής ικανότητας των σπερμάτων χρησιμοποιήθηκαν διάφορες χημικές ουσίες για την απολύμανσή τους. Τα χημικά αυτά, που κατά κύριο λόγο είναι χλωρίνη και υποχλωριώδες ασβέστιο, εκτός της απολύμανση συμβάλουν και στην άρση του ληθάργου των σπερμάτων. Συνήθως εκτός από το απολυμαντικό μέσο χρησιμοποιούνται και απορρυπαντικά όπως το Tween 20 και Tween 80. Οι υδρόφιλες και λιπόφιλες ομάδες που περιέχουν αυτά βελτιώνουν την επαφή του νερού με το σπερματικό περίβλημα. Η φυτρωτικότητα επίσης βελτιώνεται και με διάφορες προ-μεταχειρίσεις όπως το να τοποθετηθούν τα σπέρματα για κάποιο χρονικό διάστημα στο νερό και σε χαμηλή θερμοκρασία (~5 °C). Τέλος όσον αφορά τα απολυμαντικά μέσα τόσο ο χρόνος απολύμανσης όσο και η συγκέντρωση του διαλύματος παίζουν σημαντικό ρόλο στην αύξηση της φυτρωτικότητας.



Εικόνα 14. Προτετομασία για μεταφορά στον θάλαμο νηματικής ροής.

3.3.2 Πειράματα φύτευσης

Το περιεχόμενο των φακέλων τοποθετήθηκε σε τρυβλία petri που περιείχαν θρεπτικό ή διαβρεγμένο με απεσταγμένο νερό διηθητικό χαρτί. Σε κάθε μεταχείριση χρησιμοποιήθηκαν 2 τρυβλία με εξαίρεση τα πειράματα στα οποία η διάβρεξη έγινε σε απεσταγμένο νερό (5 τρυβλία). Όλη η διαδικασία διάβρεξης πραγματοποιήθηκε σε θάλαμο νηματικής ροής (laminar), για να αποφευχθούν οι μολύνσεις. Τα τρυβλία, αφού σφραγίστηκαν με parafilm, τοποθετήθηκαν σε θαλάμους με τη σταθερή επιθυμητή θερμοκρασία. Τα τρυβλία παρέμειναν στους θαλάμους από 4 έως 7 μήνες και οι μετρήσεις συνεχίζονταν για όλο το διάστημα παραμονής τους στους θαλάμους. Τέλος, φυτρωμένο θεωρήθηκε ένα σπέρμα όταν είχε εμφανίσει ριζοειδή (στάδια 1-2) της ανάπτυξης.

Πίνακας 3. Παρουσίαση των ειδών και των κατεργασιών που υπέστησαν σε πειράματα που χρησιμοποιήθηκαν θρεπτικά υποστρώματα στο σκοτάδι.

*είδη που δέχθηκαν προκατεργασία 3 ημερών στους 5 °C σε νερό.

** είδη που ελέγχθηκαν με και χωρίς προκατεργασία 3 ημερών στους 5 °C.

Είδος	Κατεργασία	Διάρκεια κατεργασίας	Θρεπτικό	Θερμοκρασία
<i>Anacamptis collina</i>	5% Ca(OCl) ₂ & 1% Tween 80	30 min	MM, KN, MS	20 °C
		60 min	MS	
		120 min	MS	
<i>Dactylorhiza sambucina</i>	5% Ca(OCl) ₂ & 0.1% Tween 80	15 min	MM	

<i>Gymnadenia conopsea</i>	5% Ca(OCl) ₂ & 1% Tween 20	120 min	MM, KN, MS
<i>Neotinea tridentata</i>	10% χλωρίνη	15 min	MM, MS
	5% Ca(OCl) ₂ & 1% Tween 80		
	10% χλωρίνη & 0.1% Tween 20	30 min, 60 min	MM,MS
<i>Neotinea lactea</i>	10% χλωρίνη	15 min	MM, MS
	5% Ca(OCl) ₂ & 1% Tween 80		
	10% χλωρίνη & 0.1% Tween 20	30 min, 60 min	MM,MS (μόνο για 30 min)
<i>Neotinea maculata</i>	10% χλωρίνη	15 min	MM, MS
	5% Ca(OCl) ₂ & 1% Tween 80		
	10% χλωρίνη & 0.1% Tween 20	20 min	MM+
<i>Ophrys mammosa</i> **	10% Ca(OCl) ₂ & 1% Tween 20	15 min	MM
		20 min	MS
<i>Ophrys mycenensis</i> *		15 min	MM, OR, KN
		20 min	MS
<i>Ophrys helenae</i> *		15 min	MM, OR, KN
		20 min	MS
<i>Serapias bergonii</i>	10% χλωρίνη & 0.1% Tween 20	15 min	MS
	5% Ca(OCl) ₂ & 1% Tween 80		MS+, OR
<i>Spiranthes spiralis</i>	5% Ca(OCl) ₂ & 1% Tween 80	30 min	MS, MS+, OR, KN

Πίνακας 4. Παρουσίαση των ειδών και των κατεργασιών που υπέστησαν σε πειράματα που η διάβρεξη έγινε σε απεσταγμένο νερό στο σκοτάδι.

* στους 20 °C έγινε έλεγχος φύτρωσης τόσο στο σκοτάδι όσο και σε εναλλαγή φώς/σκοταδιού (12/12 h).

Είδος	Κατεργασία	Διάρκεια κατεργασίας	Θερμοκρασία
<i>Dactylorhiza sambucina</i>	5% Ca(OCl) ₂ & 0.1% Tween 80	15 min	10 °C, 15 °C, 20* °C, 25 °C, 30 °C
	-	-	20* °C

<i>Neotinea maculata</i>	10% χλωρίνη	15 min	10 °C, 15 °C, 20* °C, 25 °C, 30 °C
	-	-	10 °C, 15 °C, 20* °C, 25 °C, 30 °C

3.4 Όργανα και θάλαμοι

Για τη φύτευση των σπερμάτων χρησιμοποιήθηκαν οι θάλαμοι σταθερής θερμοκρασίας: 1) Sanyo Medicoool (για τη ψυχρή στρωμάτωση στους 5 °C), 2) VELP SCIENTIFICA FOC-215I (για τα πειράματα των 25 °C), 3) IRMECO laboratory thermostatic cabinet – ST 3 basic (για τα πειράματα σε 10 °C, 15 °C, 20 °C), 4) VELP SCIENTIFICA FOC-215I (για τα πειράματα σε 30 °C). Για τη χαρτογράφηση των θέσεων των πληθυσμών χρησιμοποιήθηκε η εφαρμογή ‘Map Marker’ στη κινητή συσκευή DOOGEE S60. Η διεξαγωγή των πειραμάτων έγινε σε θάλαμο νηματικής ροής (laminar) Holten laminar air HH 48. Ο χειρισμός των σπερμάτων, οι μετρήσεις καθώς και η μιας σειρά φωτογραφιών κατά τη διάρκεια της φύτευσης έγινε σε στερεοσκόπιο OLYMPUS SZ40 με τη χρήση της κάμερας INFINITY 1. Η λήψη των φωτογραφιών στο πεδίο έγινε με τη χρήση του μοντέλου Nikon d3300 καθώς και των φακών: 1) Tamron AF 70-300mm F4-5.6 Di LD Macro 1:2 (Nikon), 2) Nikon AF-S Micro Nikkor 105mm f/2.8G IF-ED VR.



Εικόνα 15. Αποθήκευση των τρυβλίων σε μεταλλικά δοχεία.



Εικόνα 16. Τοποθέτηση των τρυβλίων σε θαλάμους σταθερής θερμοκρασίας.

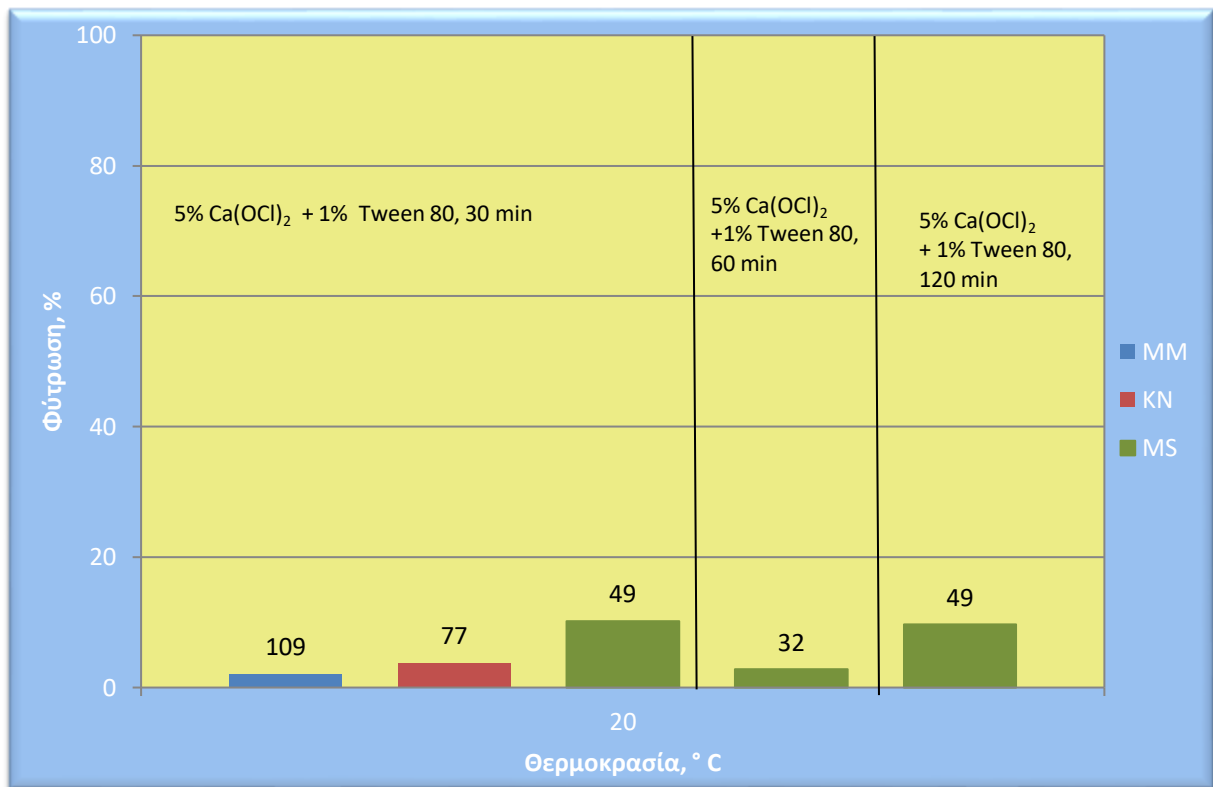
4. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Anacamptis collina

Η φύτευση του είδους μελετήθηκε στο σκοτάδι στους 20 °C και μετά από κατεργασία με 5% Ca(OCl)₂ + 1% Tween 80 σε 3 διαφορετικά θρεπτικά (MM, KN, MS) και σε 3 διαφορετικούς χρόνους κατεργασίας για το θρεπτικό MS (Πίνακας 5). Τα ποσοστά φύτευσης ήταν υψηλότερα στο MS αλλά δεν ξεπέρασαν το 10% σε καμιά σειρά πειραμάτων.

Πίνακας 5. Πειραματικά αποτελέσματα μελέτης της φύτευσης του είδους *Anacamptis collina* στους 20 °C, στο σκοτάδι, και με κατεργασία 5% Ca(OCl)₂ + 1% Tween 80.

Είδος	Διάρκεια Κατεργασίας	Θρεπτικό	Φύτευση, %	T ₅₀
<i>Anacamptis collina</i>	30 min	MM	2.1	15
		KN	3.8	40
		MS	10.2	26
	60 min	MS	2.8	14
	120 min		9.7	



Εικόνα 17. Τελικά ποσοστά φύτρωσης του είδους *Anacamptis collina*. Πάνω από κάθε στήλη υπάρχει ο συνολικός αριθμός σπερμάτων που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε πείραμα. Οι κάθετες γραμμές διαχωρίζουν τις διαφορετικές κατεργασίες.

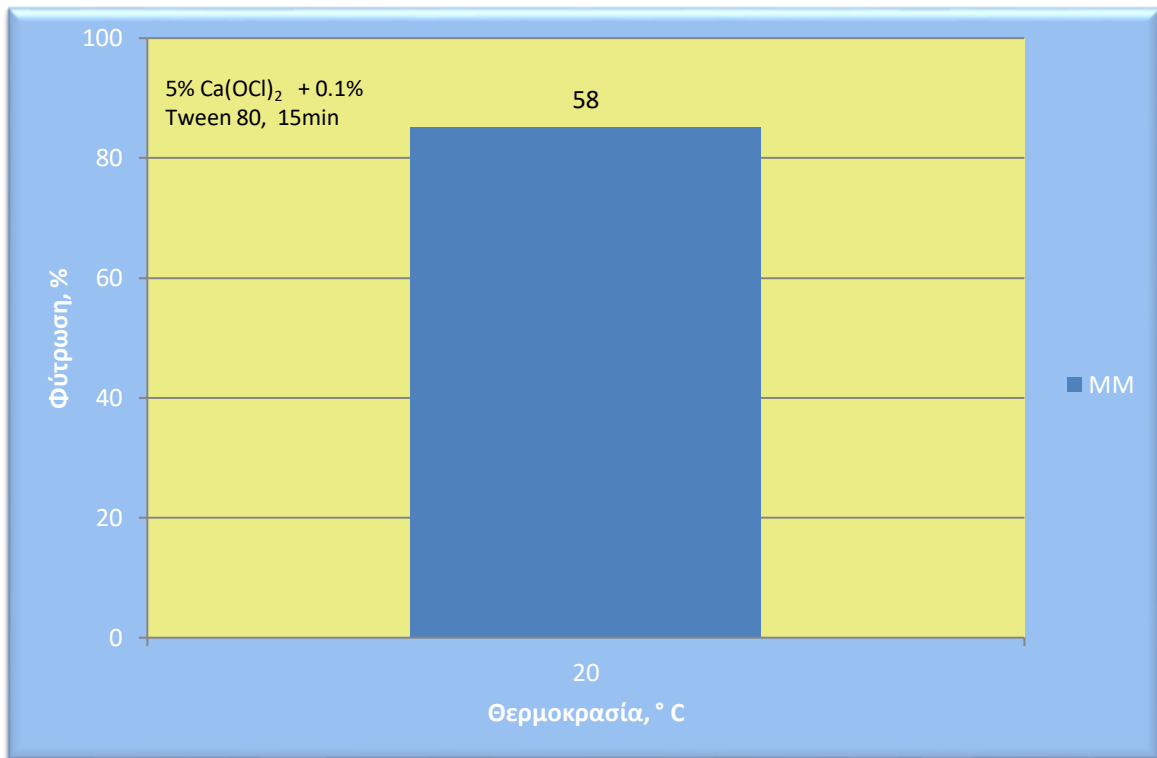
Dactylorhiza sambucina

Για αυτό το είδος χρησιμοποιήθηκε μόνο ένα θρεπτικό το MM ενώ έγινε επίσης μελέτη της φύτρωσης σε απεσταγμένο νερό. Ελέγχθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας στην φύτρωση σε 5 διαφορετικές θερμοκρασίες (10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C), σε διαφορετικά φωτεινά καθεστώτα (Σκοτάδι (Σ), (εναλλαγή Φώς/ Σκοτάδι) Φ/Σ) για τη θερμοκρασία 20 °C καθώς και με ή χωρίς κατεργασία με 5% Ca(OCl)₂ + 0.1% Tween 80 για 15 min. Το υψηλότερο ποσοστό φύτρωσης παρατηρήθηκε στο πείραμα όπου χρησιμοποιήθηκε το θρεπτικό MM (85.2 %, εικόνα 18). Η βέλτιστη θερμοκρασία για φύτρωση απουσία θρεπτικού είναι οι 20 °C (Φύτρωση = 45%, εικόνα 19), με υψηλότερες ή χαμηλότερες θερμοκρασίες να προκαλούν πτώση του τελικού ποσοστού φύτρωσης. Η έκθεση των σπερμάτων στο φως φαίνεται ότι αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα στη φύτρωση.

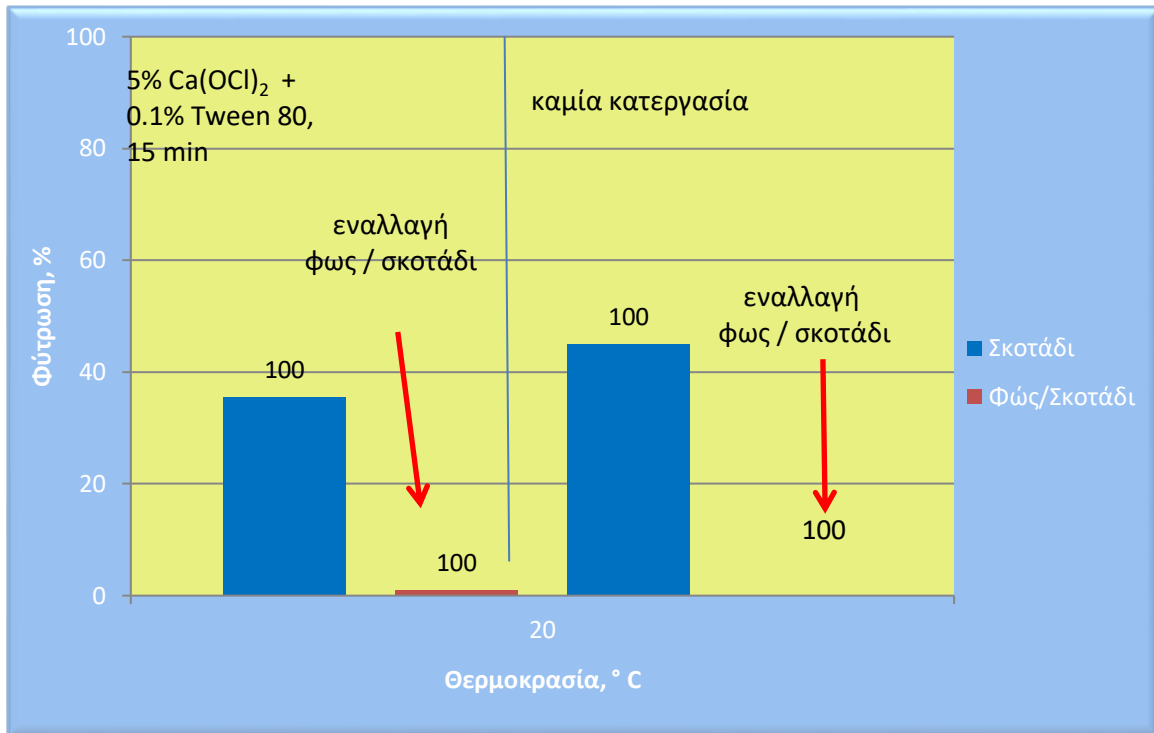
Πίνακας 6. Πειραματικά αποτελέσματα της μελέτης της φύτευσης του είδους *Dactylorhiza sambucina*.

*Σκοτάδι (Σ), εναλλαγή Φως-Σκοτάδι (Φ/Σ).

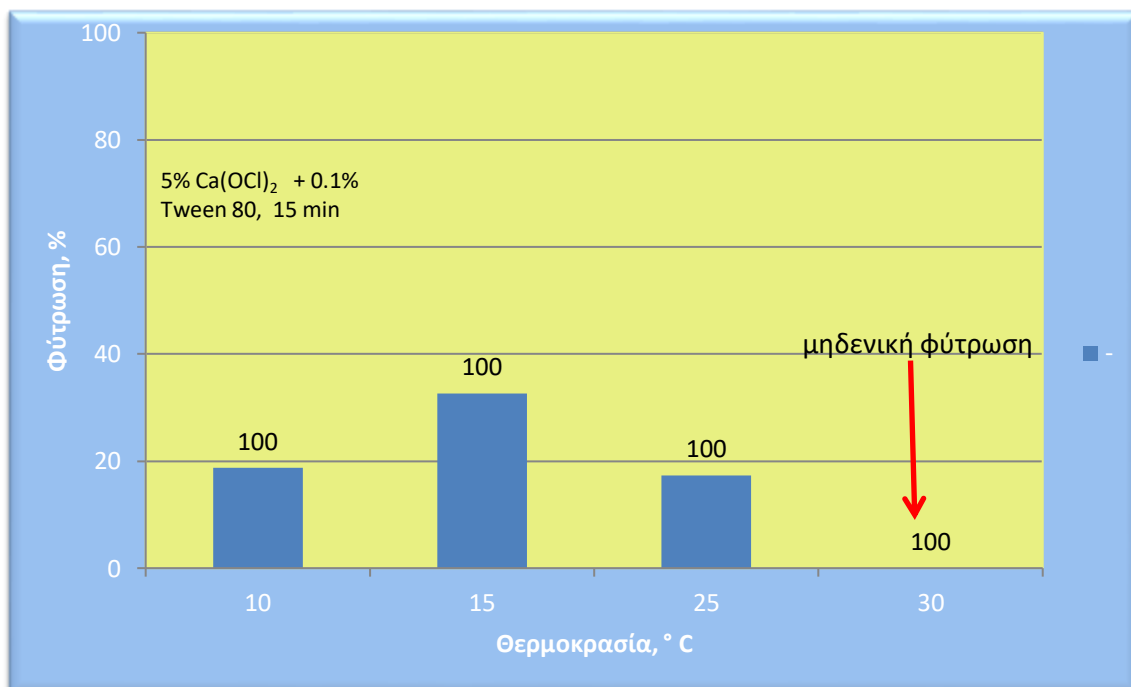
Είδος	Κατεργασία	Θρεπτικό	Θερμοκρασία, °C	Φωτεινό καθεστώς	Φύτευση, %	T ₅₀
<i>Dactylorhiza sambucina</i>	5% Ca(OCl) ₂ + 0.1% Tween 80, 15min	MM	20	Σ	85.2	16
				Φ/Σ	35.5	12
	Σ	1.0		60		
	Φ/Σ	45.0		19		
	-	-	10	Σ	18.7	50
			15	Σ	32.6	24
			25	Σ	17.3	19
			30	Σ	0	-



Εικόνα 18. Τελικό ποσοστό φύτευσης του είδους *Dactylorhiza sambucina* σε θρεπτικό. Πάνω από τη στήλη υπάρχει ο αριθμός σπερμάτων που χρησιμοποιήθηκαν.

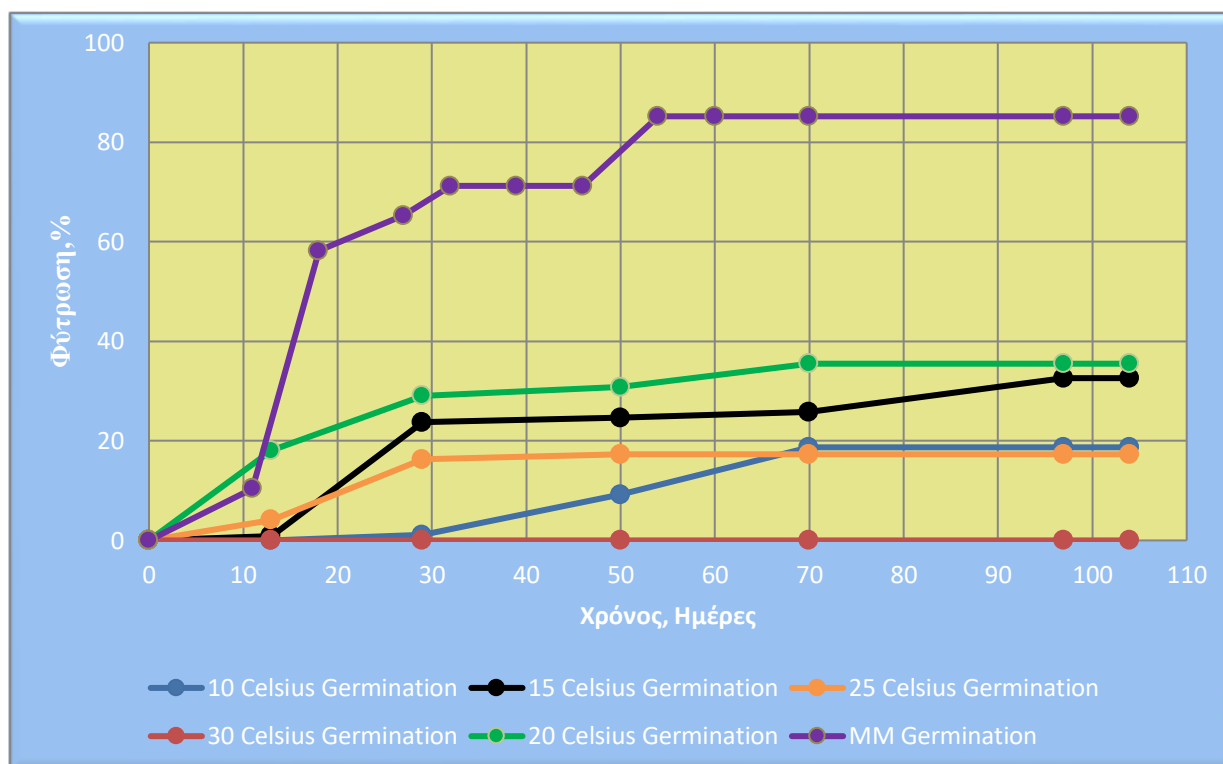


Εικόνα 19. Τελικό ποσοστό φύτρωσης του είδους *Dactylorhiza sambucina* σε απεσταγμένο νερό στους 20 °C σε διαφορετικές συνθήκες φωτισμού. Πάνω από κάθε στήλη υπάρχει ο αριθμός σπερμάτων που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε πείραμα. Η κάθετη γραμμή διαχωρίζει τις διαφορετικές κατεργασίες των σπερμάτων.



Εικόνα 20. Τελικό ποσοστό φύτρωσης του είδους *Dactylorhiza sambucina* σε απεσταγμένο νερό σε διαφορετικές θερμοκρασίες, στο σκοτάδι. Πάνω από κάθε στήλη υπάρχει ο αριθμός

σπερμάτων που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε πείραμα.



Εικόνα 21. Πορεία φύτευσης του είδους *Dactylorhiza sambucina* στο νερό σε διαφορετικές θερμοκρασίες. Παρουσιάζεται επίσης η πορεία φύτευσης στο θρεπτικό MM στους 20 °C.

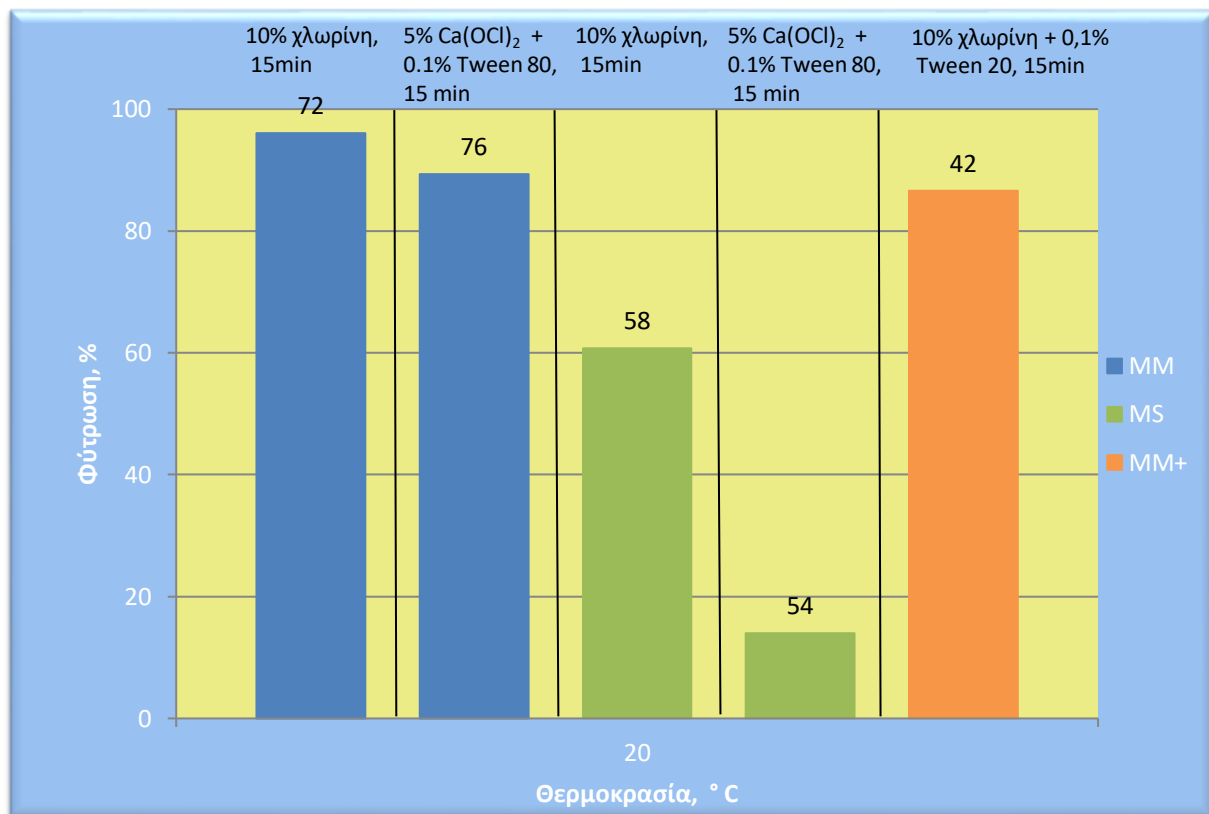
Neotinea maculata

Η φύτευση της *Neotinea maculata* ελέγχθηκε σε 3 διαφορετικά θρεπτικά (MM, MS, MM+) στο σκοτάδι και στους 20 °C με τρεις διαφορετικές κατεργασίες 1) 10% χλωρίνη, 15min, 2) 5% Ca(OCl)₂ +0.1% Tween 80, 15 min, 3) 10% χλωρίνη + 0.1% Tween 20, 15min. Υψηλότερο ποσοστό φύτευσης παρατηρήθηκε στο MM και με την κατεργασία 1 (φύτευση = 96.1%). Επίσης ελέγχθηκε, απουσία θρεπτικού, η φύτευση σε απεσταγμένο νερό στο Σκοτάδι και σε εναλλαγή Φως / Σκοτάδι σε 5 διαφορετικές θερμοκρασίες (10 °C, 15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C). Το υψηλότερο ποσοστό φύτευσης παρατηρήθηκε στους 20 °C (φύτευση = 84%), ενώ η πτώση ή αύξηση της θερμοκρασίας επώασης προκάλεσε πτώση του τελικού ποσοστού φύτευσης αλλά και του T₅₀.

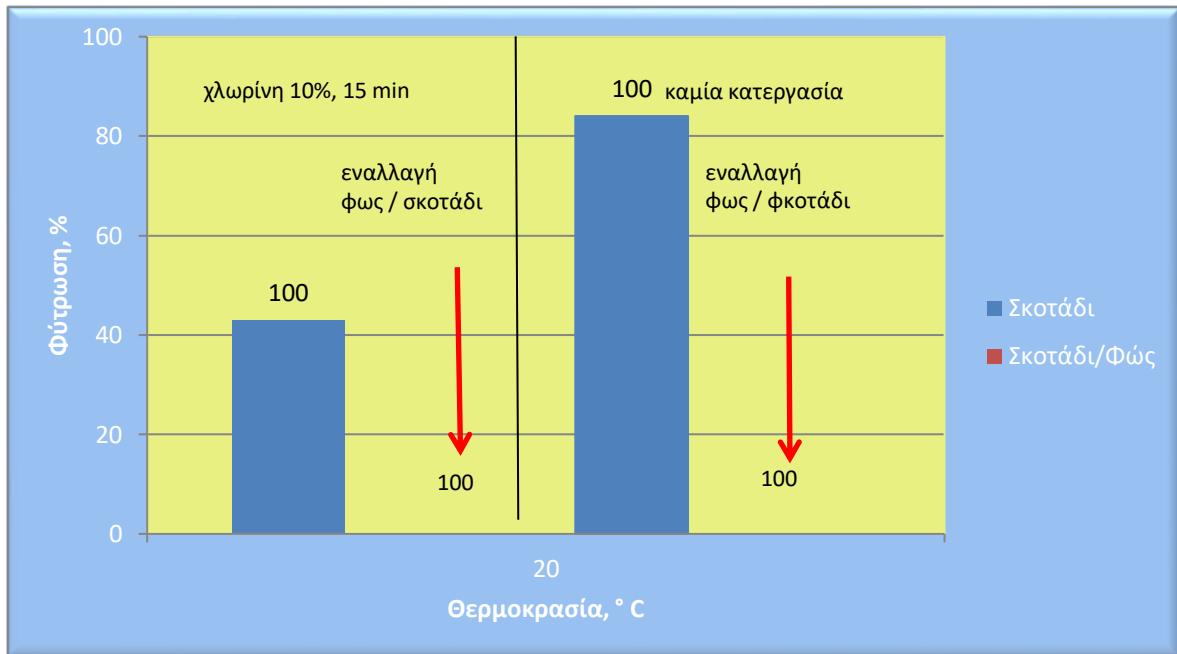
Πίνακας 7. Πειραματικά αποτελέσματα της μελέτης της φύτρωσης του είδους *Neotinea maculata*.

*Σκοτάδι (Σ), εναλλαγή φως-σκοτάδι (Φ/Σ).

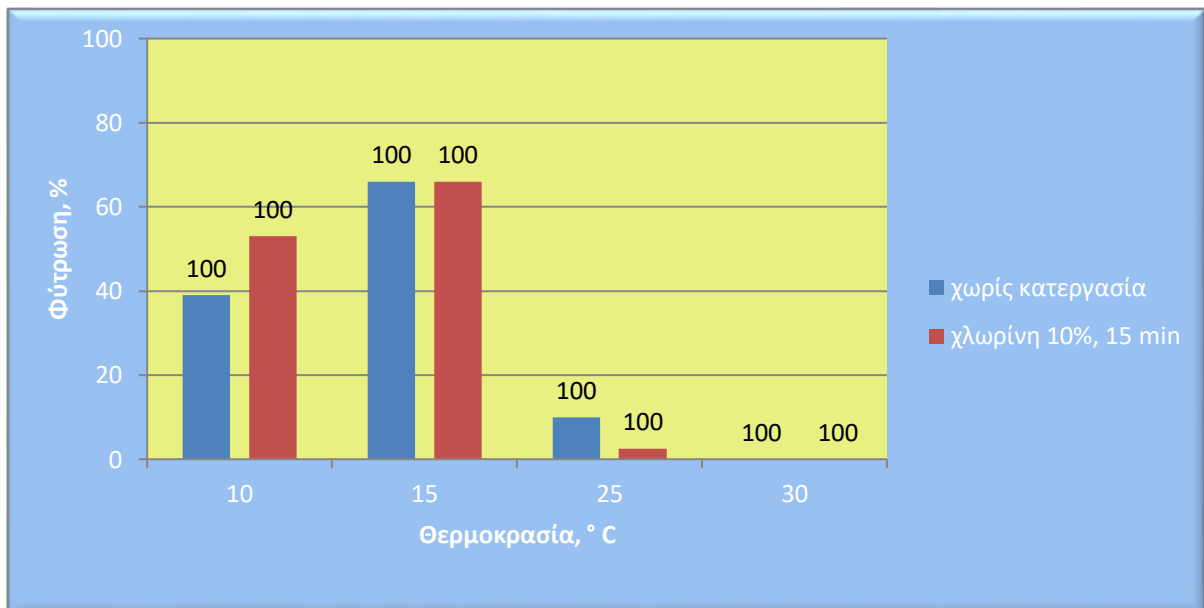
Είδος	Κατεργασία	Θρεπτικό	Θερμοκρασία, °C	Φωτεινό καθεστώς	Φύτρωση, %	T ₅₀	
<i>Neotinea maculata</i>	10% χλωρίνη, 15min	MM	20	Σ	96.1	16	
	5% Ca(OCl) ₂ +0.1% Tween 80, 15 min				89.3	18	
	10% χλωρίνη, 15min	MS			60.8	51	
	5% Ca(OCl) ₂ +0.1% Tween 80, 15 min				14.0	46	
	10% χλωρίνη + 0.1% Tween 20, 15min				86.6	14	
	10% χλωρίνη, 15min				43.0	10	
					Φ/Σ	0	-
					Σ	84.0	16
					Φ/Σ	0	-
					10	Σ	39.0
			15	66.0	22		
			25	10.0	40		
			30	0	-		
			10	53.0	38		
			15	66.0	19		
			25	2.5	40		
			30	0	-		
		10% χλωρίνη, 15min					



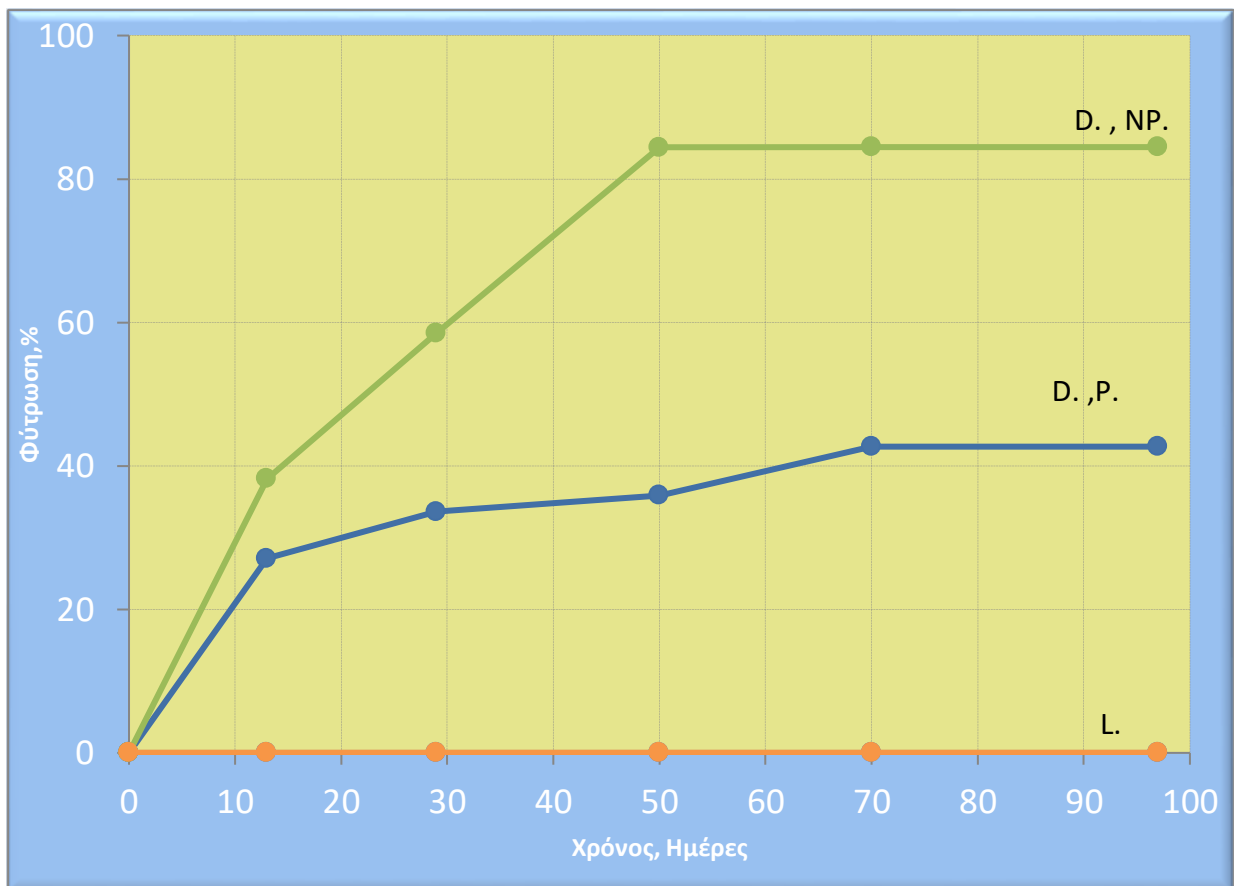
Εικόνα 22. Τελικό ποσοστό φύτρωσης του είδους *Neotinea maculata* σε θρεπτικά υποστρώματα. Πάνω από κάθε στήλη υπάρχει ο αριθμός σπερμάτων που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε πείραμα. Οι κάθετες γραμμές διαχωρίζουν τις διαφορετικές κατεργασίες.



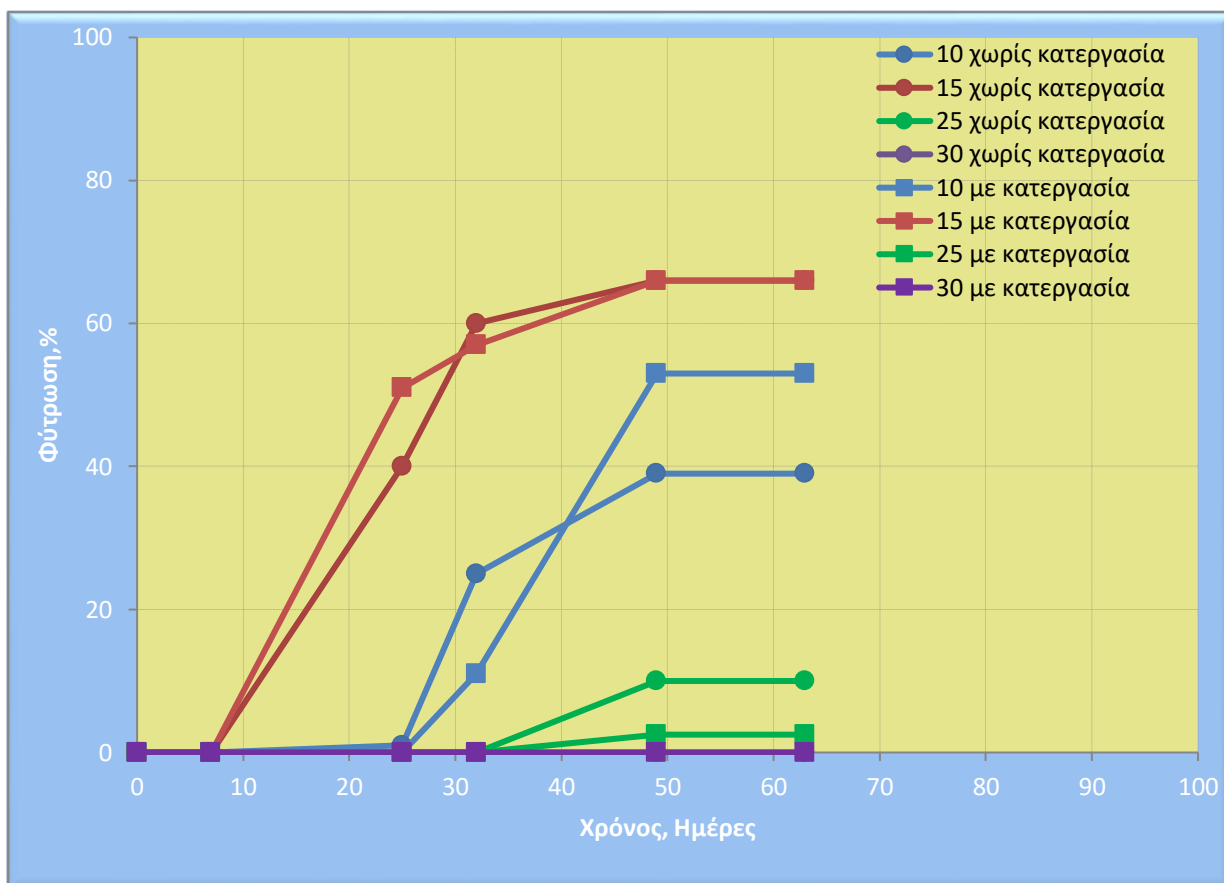
Εικόνα 23. Τελικό ποσοστό φύτρωσης του είδους *Neotinea maculata* σε απεσταγμένο νερό, στους 20 °C. Πάνω από κάθε στήλη υπάρχει ο αριθμός σπερμάτων που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε πείραμα. Οι κάθετες γραμμές διαχωρίζουν τις διαφορετικές κατεργασίες ανά θερμοκρασία.



Εικόνα 24. Τελικό ποσοστό φύτρωσης του είδους *Neotinea maculata* σε απεσταγμένο νερό, σε διαφορετικές θερμοκρασίες, στο σκοτάδι. Πάνω από κάθε στήλη υπάρχει ο αριθμός σπερμάτων που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε πείραμα.



Εικόνα 25. Πορεία φύτευσης του είδους *Neotinea maculata* στους 20 °C με κατεργασία ή χωρίς κατεργασία χλωρίνης 10 % για 15 min. * D., NP. : Σκοτάδι, χωρίς κατεργασία ** D., P. : Σκοτάδι, με κατεργασία χλωρίνης, *** L: εναλλαγή Σκοτάδι / φώς με και χωρίς κατεργασία.



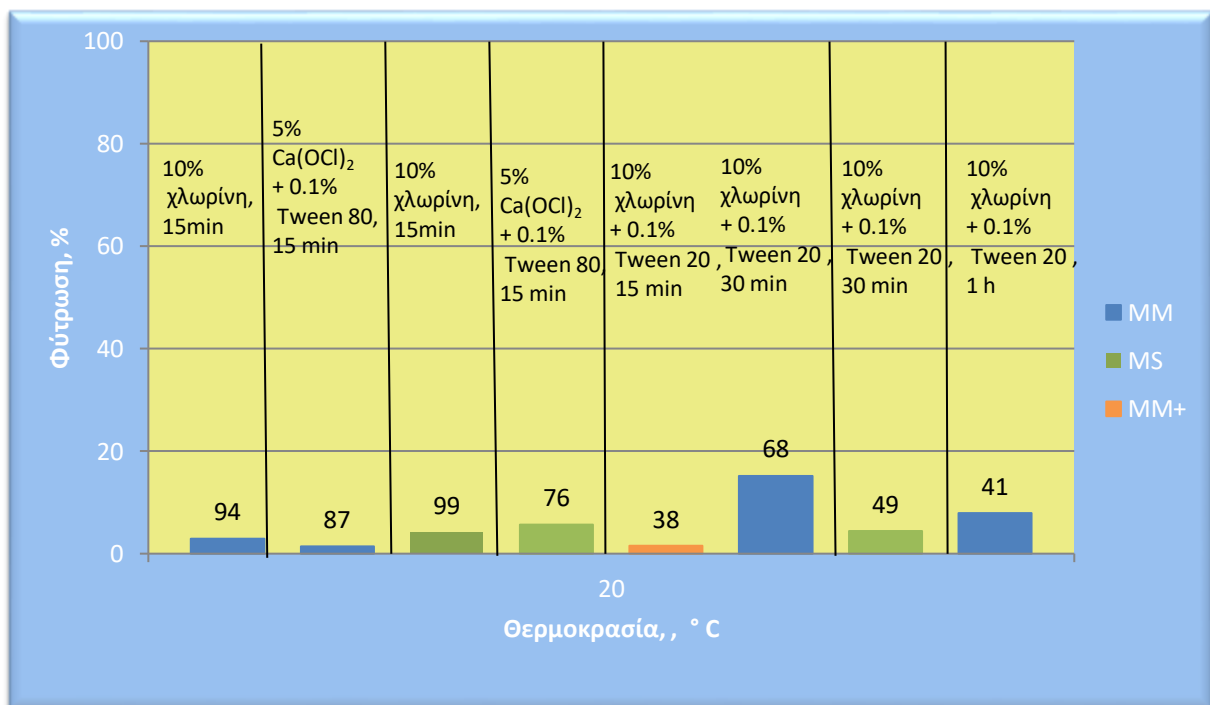
Εικόνα 26. Πορεία φύτρωσης του είδους *Neotinea maculata* στο νερό και σε διαφορετικές θερμοκρασίες με ή χωρίς κατεργασία: 10 % χλωρίνη για 15 min.

Neotinea lactea

Η μελέτη φύτρωσης του είδους *Neotinea lactea* πραγματοποιήθηκε στο σκοτάδι, στους 20 °C και σε τρία θρεπτικά (MM, MS, MM+) με τρεις κατεργασίες 1) 10% χλωρίνη, 15 min, 2) 5% $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ + 0.1% Tween 80, 30 min, 3) 10% χλωρίνη + 0.1 Tween 20, 30 min και 60 min. Το μεγαλύτερο ποσοστό φύτρωσης (φύτρωση = 15.2%) παρατηρήθηκε στο θρεπτικό MM και στην κατεργασία 3 για 30 min.

Πίνακας 8. Πειραματικά αποτελέσματα της μελέτης φύτευσης του είδους *Neotinea lactea* στους 20 °C, στο σκοτάδι.

Είδος	Κατεργασία	Διάρκεια κατεργασίας	Θρεπτικό	Φύτευση, %	T ₅₀
<i>Neotinea lactea</i>	10% χλωρίνη	15 min	MM	2.9	25
	5% Ca(OCl) ₂ + 0.1% Tween 80			1.4	23
	10% χλωρίνη		MS	4.2	41
	5% Ca(OCl) ₂ + 0.1% Tween 80			5.7	33
	10% χλωρίνη + 0.1% Tween 20	30 min	MM+	1.5	21
			MM	15.2	24
		MS	4.4		
		60 min	MM	7.9	



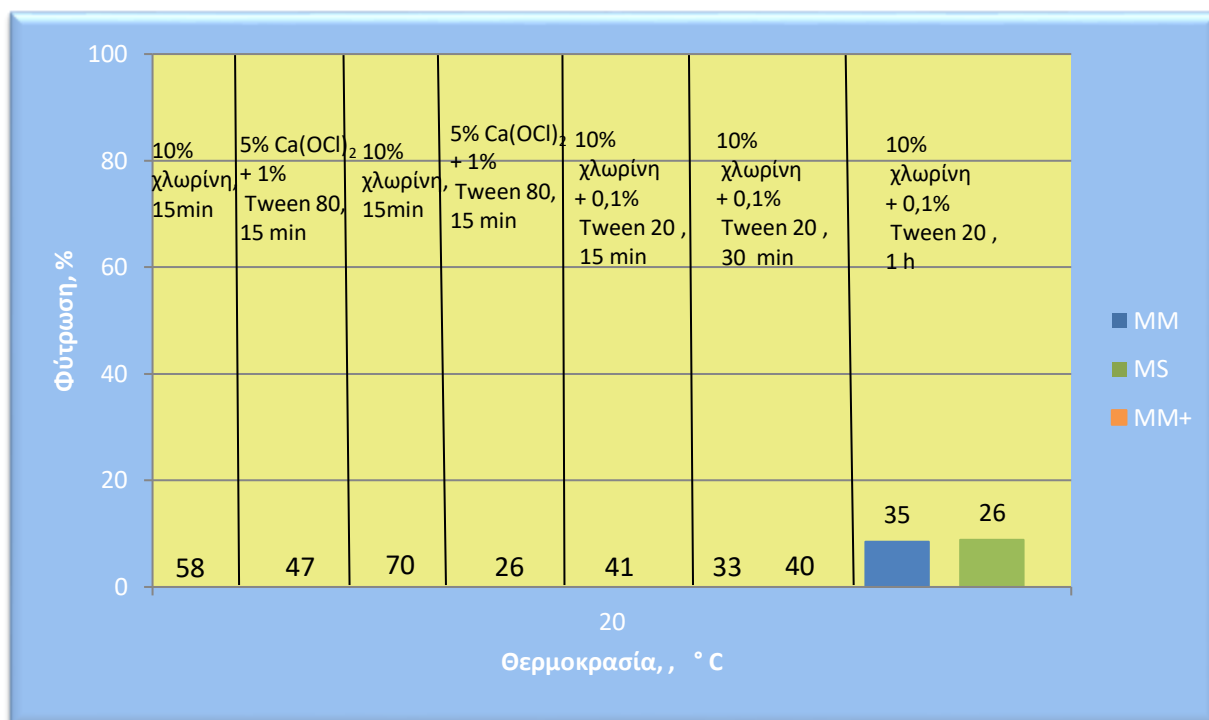
Εικόνα 27. Τελικό ποσοστό φύτευσης του είδους *Neotinea lactea*. Πάνω από κάθε στήλη υπάρχει ο αριθμός σπερμάτων που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε πείραμα. Οι κάθετες γραμμές διαχωρίζουν τις διαφορετικές κατεργασίες.

Neotinea tridentata

Για το είδος αυτό η φύτευση ελέγχθηκε στο σκοτάδι στους 20 °C και σε τρία θρεπτικά (MM, MS, MM+) με τρεις κατεργασίες 1) 10% χλωρίνη, 15 min, 2) 5% Ca(OCl)₂ + 0.1% Tween 80, 30 min, 3) 10% χλωρίνη + 0.1 Tween 20, 30 min και 60 min. Το μεγαλύτερο ποσοστό φύτευσης (φύτευση = 8.9 %) παρατηρήθηκε στο MS και για κατεργασία μιας ώρας.

Πίνακας 9. Πειραματικά αποτελέσματα της μελέτης φύτευσης του είδους *Neotinea tridentata* στους 20 °C, στο σκοτάδι.

Είδος	Κατεργασία	Διάρκεια κατεργασίας	Θρεπτικό	Φύτευση, %	T ₅₀	
<i>Neotinea tridentata</i>	10% χλωρίνη	15 min	MM	0	-	
	5% Ca(OCl) ₂ + 0.1% Tween 80					
	10% χλωρίνη					
	5% Ca(OCl) ₂ + 0.1% Tween 80		MS			
	10% χλωρίνη + 0.1% Tween 20					MM+
						MM
		MS				
	10% χλωρίνη + 0.1% Tween 20	30 min	MM	8.5	19	
		60 min	MS	8.9		



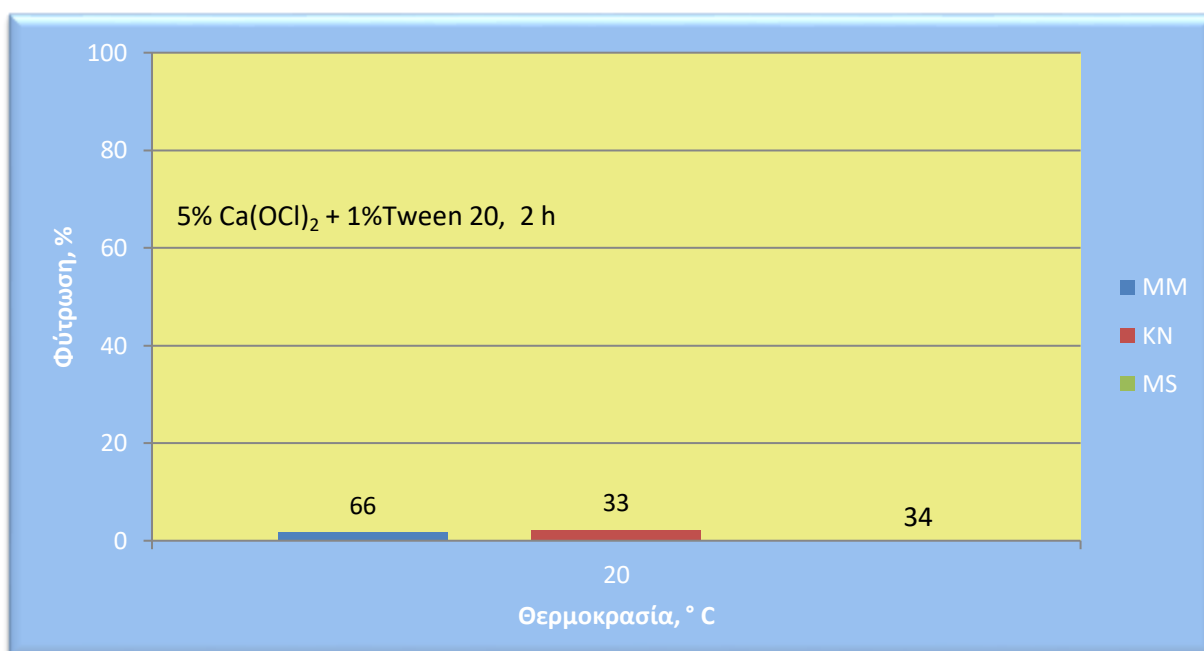
Εικόνα 28. Τελικό ποσοστό φύτρωσης του είδους *Neotinea tridentata*. Πάνω από κάθε στήλη υπάρχει ο αριθμός σπερμάτων που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε πείραμα. Οι κάθετες γραμμές διαχωρίζουν τις διαφορετικές κατεργασίες.

Gymnadenia conopsea

Η φύτρωση στο είδος *Gymnadenia conopsea* μελετήθηκε στο σκοτάδι στους 20 °C και με κατεργασία 5% Ca(OCl)₂ + 1% Tween 20 για 120 min σε τρία διαφορετικά θρεπτικά (MM, KN, MS). Τα ποσοστά φύτρωσης ήταν σχεδόν μηδενικά και στα τρία θρεπτικά.

Πίνακας 10. Πειραματικά αποτελέσματα της μελέτης φύτρωσης του είδους *Gymnadenia conopsea* στους 20 °C, στο σκοτάδι, και με κατεργασία 5% Ca(OCl)₂ + 1% Tween 20 για 120 min.

Είδος	Θρεπτικό	Φύτρωση, %	T ₅₀
<i>Gymnadenia conopsea</i>	MM	1.6	23
	KN	2.2	25
	MS	0	-



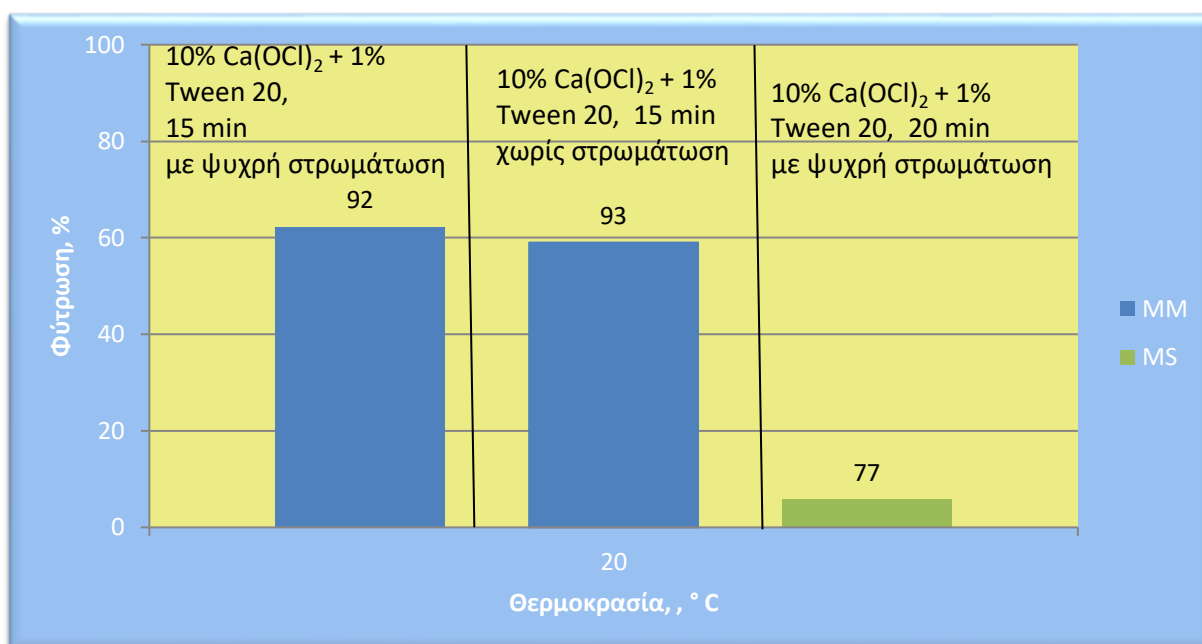
Εικόνα 29. Τελικό ποσοστό φύτρωσης του είδους *Gymnadenia conopsea*. Πάνω από κάθε στήλη υπάρχει ο αριθμός σπερμάτων που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε πείραμα. Αναγράφεται στο διάγραμμα η κατεργασία που χρησιμοποιήθηκε.

Ophrys mammosa

Η μελέτη της φύτρωσης του είδους *Ophrys mammosa* πραγματοποιήθηκε στο σκοτάδι στους 20 °C. Σε κάποια πειράματα τα σπέρματα πριν την τοποθέτηση στο θρεπτικό τοποθετήθηκαν για 3 μέρες στους 5 °C σε νερό. Η κατεργασία έγινε με 10% Ca(OCl)₂ + 1% Tween 20 για 15 min ή 20 min. Η φύτρωση ελέγχθηκε σε δύο θρεπτικά (MM, MS). Το υψηλότερο ποσοστό φύτρωσης παρατηρήθηκε στο MM (φύτρωση = 62.2 %). Η προκατεργασία για 3 μέρες σε χαμηλή θερμοκρασία φαίνεται ότι δεν επηρέασε την φύτρωση του είδους.

Πίνακας 11. Πειραματικά αποτελέσματα της μελέτης φύτρωσης του είδους *Ophrys mammosa* στους 20 °C, στο σκοτάδι.

Είδος	Προ-κατεργασία	Κατεργασία	Διάρκεια κατεργασίας	Θρεπτικό	Φύτρωση, %	T ₅₀
<i>Ophrys mammosa</i>	3 μέρες στους 5 °C	10% Ca(OCl) ₂ + 1% Tween 20	15 min	MM	62.2	19
			20 min	MS	5.8	25
	-		15 min	MM	59.0	24



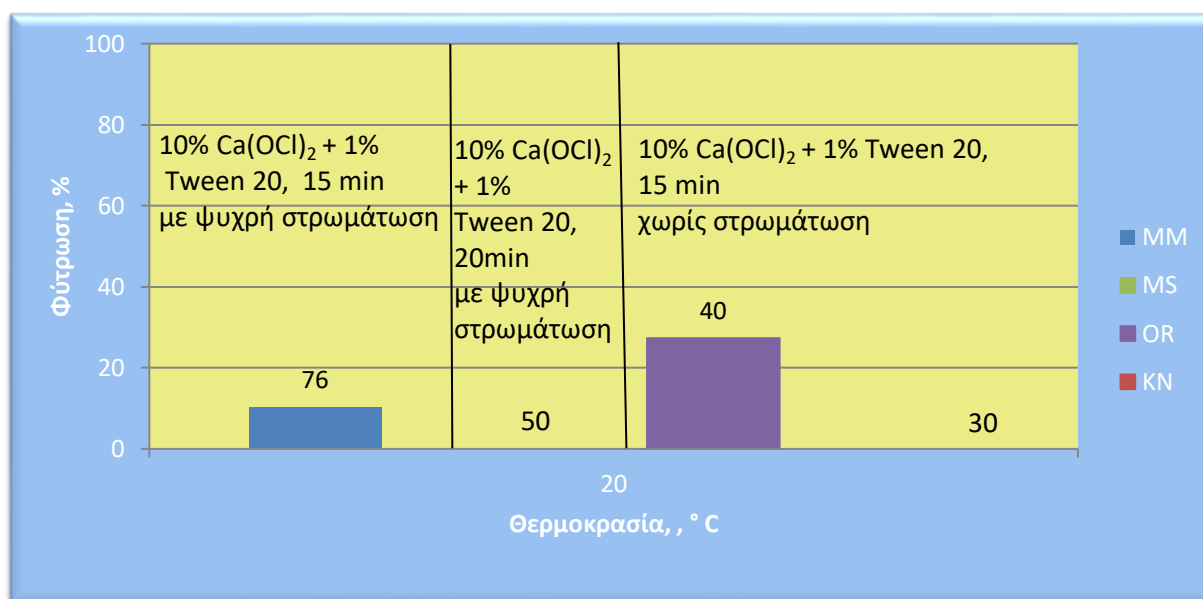
Εικόνα 30. Τελικό ποσοστό φύτευσης του είδους *Ophrys mammosa*. Πάνω από κάθε στήλη υπάρχει ο αριθμός σπερμάτων που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε πείραμα. Οι κάθετες γραμμές διαχωρίζουν τις διαφορετικές κατεργασίες που χρησιμοποιήθηκαν.

Ophrys mycenensis

Η φύτευση του είδους *Ophrys mycenensis* μελετήθηκε στο σκοτάδι στους 20 °C. Τα σπέρματα τοποθετήθηκαν πριν την τοποθέτηση στο θρεπτικό προ-κατεργασία για 3 μέρες στους 5 °C. Η κατεργασία πριν την διάβρεξη έγινε με 10% Ca(OCl)₂ + 1% Tween 20 για 15 min ή 20 min. Η φύτευση ελέγχθηκε σε 4 θρεπτικά (MM, MS, OR, KN). Στα MS και KN δε παρατηρήθηκε φύτευση. Υψηλότερη φύτευση παρατηρήθηκε στο θρεπτικό OR (φύτευση = 27.3 %).

Πίνακας 12. Πειραματικά αποτελέσματα της μελέτης φύτευσης του είδους *Ophrys mycenensis* στους 20 °C, στο σκοτάδι.

Είδος	Προ-κατεργασία	Κατεργασία	Διάρκεια κατεργασίας	Θρεπτικό	Φύτευση,%	T ₅₀
<i>Ophrys mycenensis</i>	3 μέρες στους 5 °C	10% Ca(OCl) ₂ + 1% Tween 20	15 min	MM	10.3	23
			20 min	MS	0	-
	-		15 min	OR	27.3	14
				KN	0	-



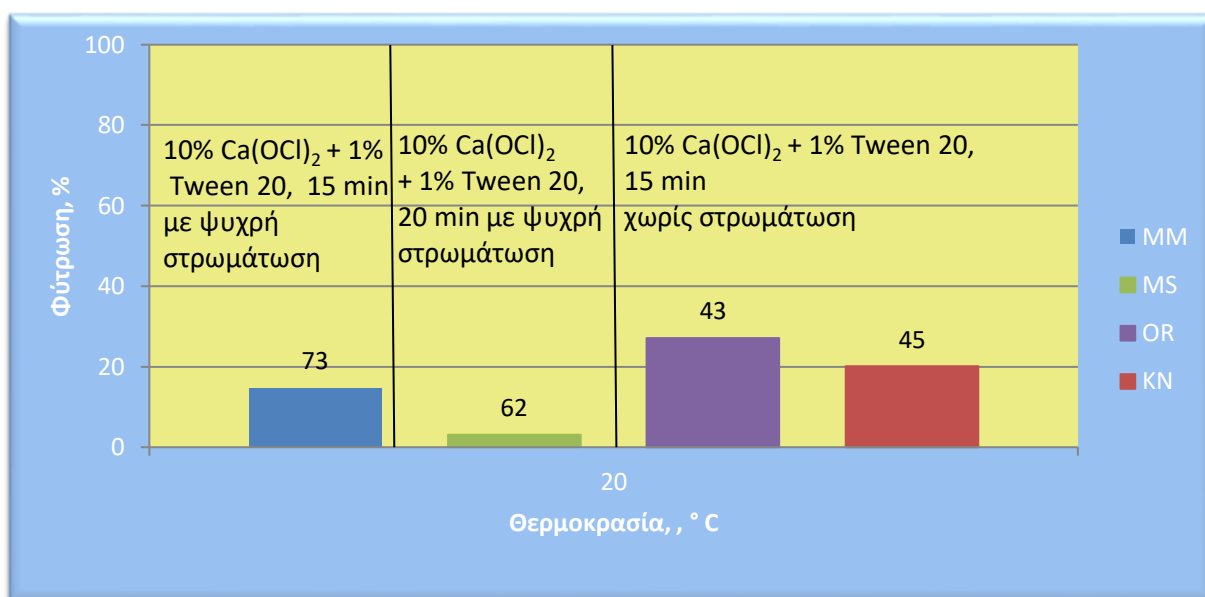
Εικόνα 31. Τελικό ποσοστό φύτρωσης του είδους *Ophrys mycenensis*. Πάνω από κάθε στήλη υπάρχει ο αριθμός σπερμάτων που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε πείραμα. Οι κάθετες γραμμές διαχωρίζουν τις διαφορετικές κατεργασίες που χρησιμοποιήθηκαν.

Ophrys helenae

Η φύτρωση για το είδος *Ophrys helenae* μελετήθηκε στο σκοτάδι, στους 20 °C. Τα σπέρματα πέρασαν πριν την τοποθέτηση στο θρεπτικό προ-κατεργασία για 3 μέρες στους 5 °C. Η κατεργασία πριν την διάβρεξη έγινε με 10% Ca(OCl)₂ + 1% Tween 20 για 15 min ή 20 min. Η φύτρωση ελέγχθηκε σε 4 θρεπτικά (MM, MS, OR, KN). Το υψηλότερο ποσοστό φύτρωσης παρατηρήθηκε στο θρεπτικό OR (φύτρωση = 27.1 %).

Πίνακας 13. Πειραματικά αποτελέσματα της μελέτης φύτρωσης του είδους *Ophrys helenae* στους 20 °C, στο σκοτάδι. .

Είδος	Προ-κατεργασία	Κατεργασία	Διάρκεια κατεργασίας	Θρεπτικό	Φύτρωση, %	T ₅₀
<i>Ophrys helenae</i>	3 μέρες στους 5 °C	10% Ca(OCl) ₂ + 1% Tween 20	15 min	MM	14.7	16
			20 min	MS	3.1	36
	-		15 min	OR	27.1	24
				KN	20.1	24



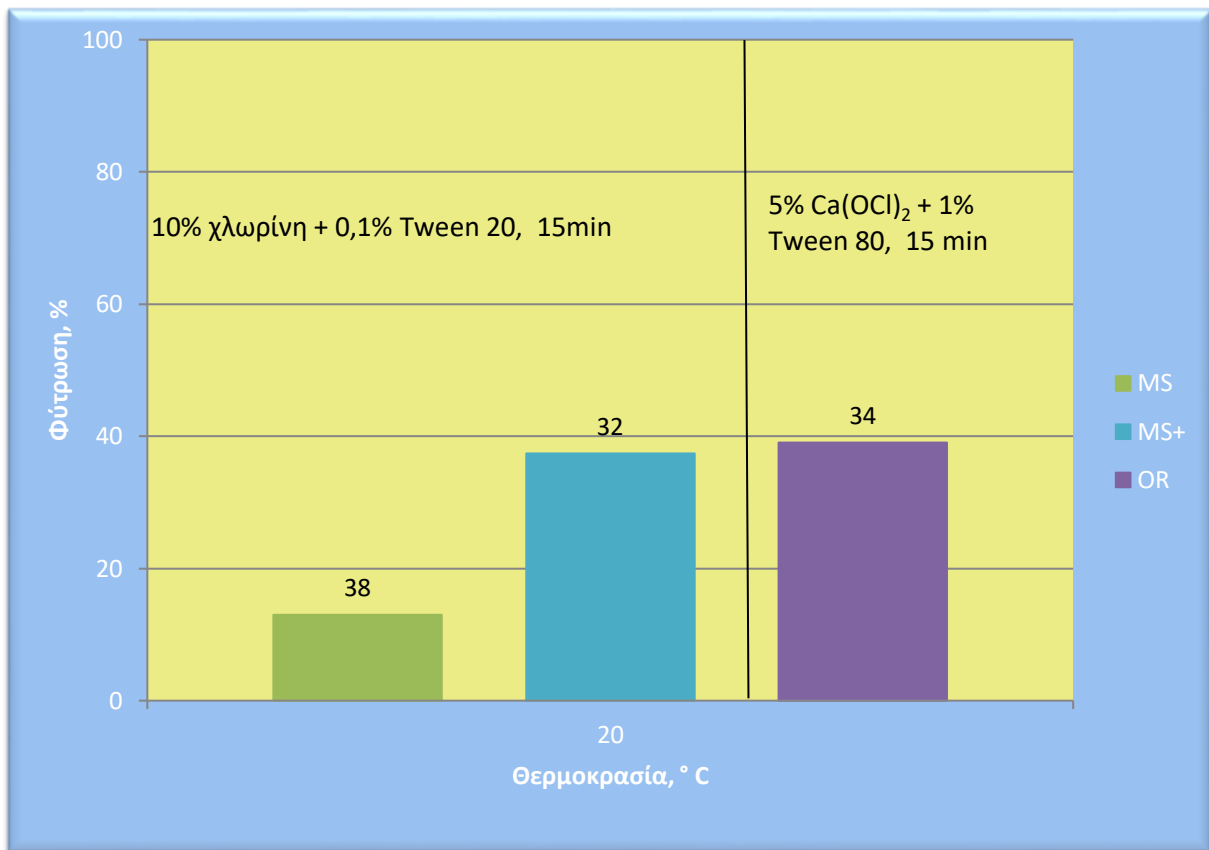
Εικόνα 32. Τελικό ποσοστό φύτρωσης του είδους *Ophrys helenae*. Πάνω από κάθε στήλη υπάρχει ο αριθμός σπερμάτων που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε πείραμα. Οι κάθετες γραμμές διαχωρίζουν τις διαφορετικές κατεργασίες που χρησιμοποιήθηκαν.

Serapias bergonii

Στο είδος *Serapias bergonii* η φύτρωση ελέγχθηκε στο σκοτάδι στους 20 °C με δύο διαφορετικές κατεργασίες 1) 10% χλωρίνη + 0,1% Tween 20, 15min, 2) 5% Ca(OCl)₂ + 1% Tween 80 για 15 min και σε τρία θρεπτικά (MS, MS+, OR). Το υψηλότερο ποσοστό φύτρωσης παρατηρήθηκε στο θρεπτικό OR (φύτρωση = 39%) με μικρή διαφορά σε σχέση με το θρεπτικό MS+ (φύτρωση = 37.4).

Πίνακας 14. Πειραματικά αποτελέσματα της μελέτης φύτρωσης του είδους *Gymnadenia conopsea* στους 20 °C, στο σκοτάδι.

Είδος	Κατεργασία	Θρεπτικό	Φύτρωση, %	T ₅₀
<i>Serapias bergonii</i>	10% χλωρίνη + 0,1% Tween 20, 15min	MS	13.0	39
		MS+	37.4	37
	5% Ca(OCl) ₂ + 1% Tween 80, 15 min	OR	39.0	26



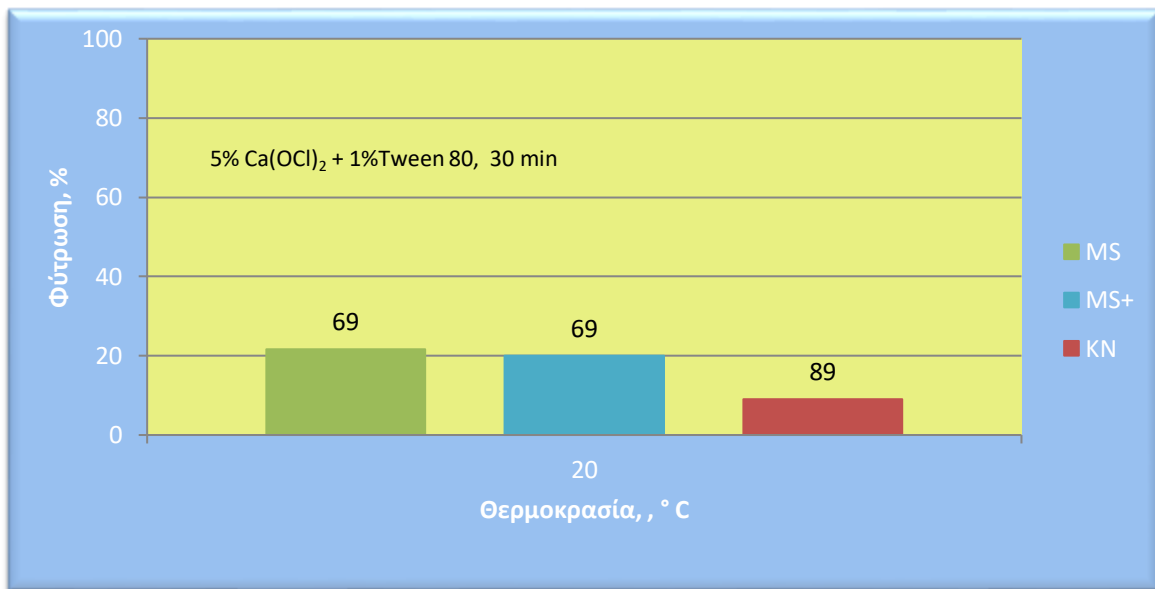
Εικόνα 33. Τελικό ποσοστό φύτευσης του είδους *Serapias bergonii*. Πάνω από κάθε στήλη υπάρχει ο αριθμός σπερμάτων που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε πείραμα. Η κάθετη γραμμή διαχωρίζει τις διαφορετικές κατεργασίες.

Spiranthes spiralis

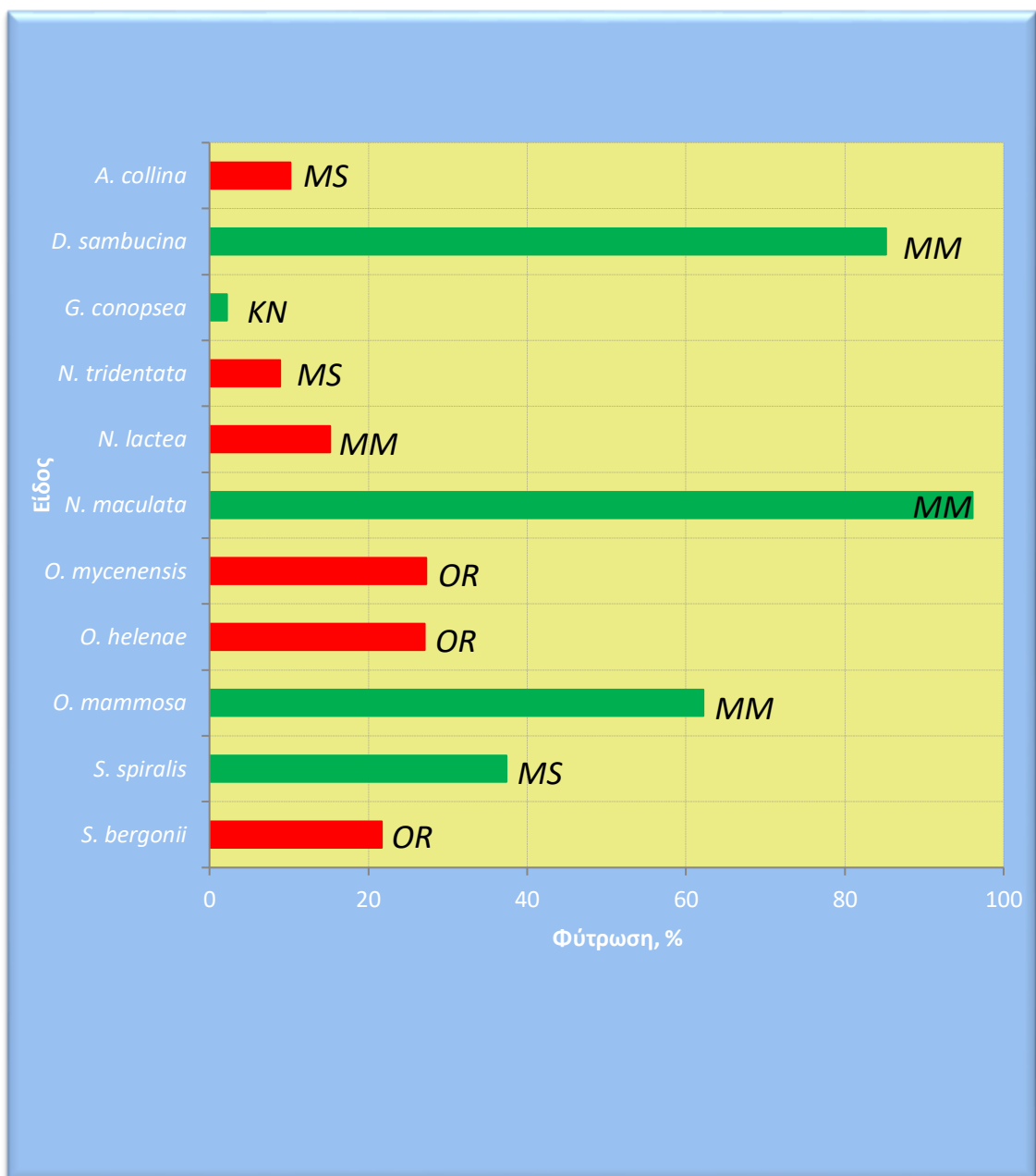
Η φύτευση του *Spiranthes spiralis* μελετήθηκε στο σκοτάδι, στους 20 °C και μετά από κατεργασία των σπερμάτων με 5% Ca(OCl)₂ + 1% Tween 80 για 30 min. Για τη μελέτη της φύτευσης χρησιμοποιήθηκαν τρία θρεπτικά υποστρώματα (MS, MS+, KN). Το υψηλότερο ποσοστό φύτευσης (φύτευση = 21.7 %) παρατηρήθηκε στο θρεπτικό MS.

Πίνακας 15. Πειραματικά αποτελέσματα της μελέτης φύτευσης του είδους *Spiranthes spiralis* στους 20 °C, στο σκοτάδι και με κατεργασία 5% Ca(OCl)₂ + 1% Tween 80, 30 min.

Είδος	Θρεπτικό	Φύτευση, %	T ₅₀
<i>Spiranthes spiralis</i>	MS	21.7	39
	MS+	20.1	34
	KN	9.1	28



Εικόνα 34. Τελικό ποσοστό φύτευσης του είδους *Spiranthes spiralis*. Πάνω από κάθε στήλη υπάρχει ο αριθμός σπερμάτων που χρησιμοποιήθηκαν σε κάθε πείραμα. Αναγράφεται στο διάγραμμα η κατεργασία που χρησιμοποιήθηκε.



Εικόνα 35. Στο διάγραμμα απεικονίζονται το υψηλότερο ποσοστό φύτρωσης για κάθε είδος καθώς και το θρεπτικό στο οποίο εμφανίστηκε. Με κόκκινο παρουσιάζονται τα είδη των οποίων η φύτρωση μελετάται για πρώτη φορά.



Εικόνα 36. Φωτογραφίες των φυτρωμένων ειδών. Από πάνω προς τα κάτω και από αριστερά προς τα δεξιά: 1) *Neotinea tridentata*, 2) *Neotinea lactea*, 3) *Gymnadenia conopsea*, 4) *Neotinea maculata*, 5) *Anacamptis collina*, 6) *Dactylorhiza sambucina*, 7) *Spiranthes spiralis*, 8) *Ophrys mycenensis*, 9) *Ophrys mammosa*, 10) *Ophrys helenae*.



Εικόνα 37. Φωτογραφία του είδους *Serapias bergonii* στο στάδιο του πρωτοκόρμου.

5. Συζήτηση - Συμπεράσματα

Προκειμένου να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με τη συμπεριφορά των 11 ειδών που μελετήθηκαν κατά τη διάρκεια της διπλωματικής, ως προς την φύτρωση θα ομαδοποιηθούν κατά γένος καθώς ακόμα και εντός ενός γένους υπήρχε μεγάλη διαφορά στα αποτελέσματα μεταξύ των διαφόρων κατεργασιών και συνθηκών στις οποίες ελέγχθηκε η φύτρωση.

Anacamptis

Το μόνο είδος στο γένος *Anacamptis* του οποίου η φύτρωση μελετήθηκε ήταν το *Anacamptis collina*. Η φύτρωση του είδους δεν είχε διερευνηθεί στο παρελθόν. Η κατεργασία των σπερμάτων έγινε με 5% $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ + 1% Tween 80 για τρεις διαφορετικούς χρόνους κατεργασίας (30 min, 60 min, 120 min) και η διάβρεξη έγινε σε τρία θρεπτικά υποστρώματα (MM, MS, KN). Μόνο στο θρεπτικό MS ελέγχθηκαν και οι τρεις χρόνοι καθώς στα 30 min είχε δώσει το μεγαλύτερο ποσοστό φύτρωσης (φύτρωση = 10 %). Η αύξηση της διάρκειας κατεργασίας φαίνεται πως δεν επηρέασε το τελικό ποσοστό φύτρωσης ωστόσο μείωσε στο μισό το T_{50} , στο θρεπτικό MS. Στην κατεργασία διάρκειας 60 min παρατηρήθηκε πτώση του τελικού ποσοστού φύτρωσης (φύτρωση = 2.8%). Σε όλα τα πειράματα τα αρτίβλαστα δεν πέρασαν το στάδιο 3, γρήγορα απέκτησαν καφέ χρώμα και η ανάπτυξη τους σταμάτησε.

Για πρώτη φορά έγινε έλεγχος της ασυμβιωτικής φύτρωσής του είδους *Anacamptis collina* και, όπως προαναφέρθηκε παρατηρήθηκαν, χαμηλά ποσοστά φύτρωσης. Συγκρίνοντας με τα δεδομένα προηγούμενων διπλωματικών (Βελιανίτη 2011, Πέππα 2011) φαίνεται ότι το είδος σε αντίθεση με όσα είχαν μελετηθεί (*Anacamptis coriophora*, *Anacamptis pyramidalis*, *Anacamptis morio*, *Anacamptis papilionacea*) παρουσιάζει καλύτερα ποσοστά φύτρωσης στο θρεπτικό MS αντί του MM. Αν και η παρούσα προσπάθεια είναι η πρώτη για ασυμβιωτική μελέτη της φύτρωσης του είδους έχει ήδη γίνει συμβιωτική μελέτη (Cig et al., 2018). Γενικά για το γένος *Anacamptis* φαίνεται ότι είναι αναγκαίες μεγάλες διάρκειες κατεργασίας (>2 h) για μέτρια φύτρωση (~20 – 30%) (Rasmussen, 1995).

Dactylorhiza

Στη περίπτωση του γένους *Dactylorhiza* η φύτρωση ενός μόνο είδους ελέγχθηκε. Για το είδος *D. sambucina* η φύτρωση ελέγχθηκε μόνο σε ένα θρεπτικό και μια κατεργασία (MM, 5 % $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ + 0.1% Tween 80, 15 min) όπου επιτεύχθηκε ικανοποιητική φύτρωση (φύτρωση = 85.2%). Ταυτόχρονα γνωρίζοντας ότι το είδος φυτρώνει και στο νερό (Rasmussen, 1995) εντοπίστηκε η βέλτιστη θερμοκρασία για την φύτρωσή του, σε απεσταγμένο νερό. Στους 20 °C δίνει το μεγαλύτερο ποσοστό φύτρωσης σε νερό (φύτρωση = 45%) ενώ σε μικρότερες ή υψηλότερες θερμοκρασίες το τελικό ποσοστό φύτρωσης μειώνεται (και μηδενίζεται στους 30 °C) ενώ αυξάνεται και το T_{50} . Συγχρόνως, το φως αποτελεί ανασταλτικό παράγοντα της φύτρωσης του είδους καθώς σε όσες διαδικασίες υπήρχε φωτεινό καθεστώς με εναλλαγή φώς/σκοτάδι η φύτρωση ήταν μηδενική. Στα πειράματα που χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό τα αρτίβλαστα έφταναν στο στάδιο του πρωτοκόρμου και στάδιο 5 (Stewart & Zettler, 2002) σε αντίθεση με τα πειράματα που έγιναν σε απεσταγμένο νερό όπου η ανάπτυξη σταματούσε στο στάδιο 2. Στα πειράματα που έγιναν σε απεσταγμένο νερό παρατηρήθηκε μεγάλη σε μήκος ανάπτυξη των ριζοειδών των αρτιβλάστων που πιθανώς να υποδεικνύει μια τάση αναζήτησης θρεπτικών από το φυτό. Τέλος, φαίνεται πως η κατεργασία των σπερμάτων μειώνει το τελικό ποσοστό της φύτρωσης (φύτρωση χωρίς κατεργασία στο νερό = 45%, φύτρωση με κατεργασία = 35.5%).

Φαίνεται, βάση και των αποτελεσμάτων προηγούμενων διπλωματικών για το είδος *Dactylorhiza romana*, ότι στο γένος *Dactylorhiza* υπάρχει προτίμηση για το θρεπτικό MM ενώ μικρές διάρκειες κατεργασίας (~15 min) είναι αρκετές για ικανοποιητικά ποσοστά φύτευσης. Η φύτευση του είδους *Dactylorhiza sambucina* έχει μελετηθεί και στο παρελθόν και είχε ήδη παρατηρηθεί ότι είναι εφικτή η φύτευση του στο νερό (Rasmussen, 1995). Στο θρεπτικό MM δε παρατηρήθηκε αισθητή διαφορά στο τελικό ποσοστό φύτευσης του είδους από αυτό που αναφέρουν οι Waes και Debergh με τη χρήση του θρεπτικού BM (Waes & Debergh, 1986).

Gymnadenia

Μόνο το είδος *Gymnadenia conopsea* χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα προκειμένου να διερευνηθούν οι απαιτήσεις του για φύτευση. Τα ποσοστά φύτευσης και στα τρία θρεπτικά (MM, KN, MS) που ελέγχθηκαν ήταν πολύ μικρά (<5%). Άλλοι ερευνητές έχουν παρατηρήσει αρκετά υψηλά ποσοστά φύτευσης (>45%) στο είδος αυτό (Rasmussen, 1995). Τα χαμηλά ποσοστά φύτευσης που παρατηρήσαμε οφείλονται είτε στη μη κατάλληλη διάρκεια κατεργασίας (χρησιμοποιήθηκε το κατώτερο προτεινόμενο όριο) που από τη βιβλιογραφία είναι μεταξύ 2 και 4 ωρών (Rasmussen, 1995) είτε στο γεγονός ότι πριν την αφαίρεση των σπερμάτων, από τις κάψες, αυτές είχαν προσβληθεί από κάποιο είδος ζυγομύκητα που πιθανώς να νέκρωσε μεγάλο αριθμό σπερμάτων.

Neotinea

Τρία είδη του γένους *Neotinea* μελετήθηκαν ως προς την απαιτήσεις τους για να επιτευχθεί η φύτευση. Για τα είδη *N. maculata*, *N. tridentata*, *N. lactea* χρησιμοποιήθηκαν τρία θρεπτικά υποστρώματα (MM, MS, MM+), τρεις διαφορετικές κατεργασίες: 1) 10% χλωρίνη, 15 min, 2) 5% Ca(OCl)₂ + 1% Tween 80, 15 min, 3) 10% χλωρίνη + 0.1% Tween 20 για τρεις χρόνους αναλόγως την σειρά πειραμάτων (15 min, 30 min, 60 min). Το είδος *N. maculata* παρουσίαζε την ικανότητα να φυτρώσει σε απεσταγμένο νερό και διερευνήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας στη φύτευση του είδους.

Όσον αφορά τη φύτευση σε θρεπτικά το είδος *N. maculata* φυτρώνει πλήρως στα θρεπτικά MM, MM+ (φύτευση = 96.1% και 86.6% αντίστοιχα) ενώ στο θρεπτικό MS η φύτευση μετά από κατεργασία με χλωρίνη φτάνει το 60.8%. Το θρεπτικό MS έδωσε τα χαμηλότερα ποσοστά φύτευσης από τα θρεπτικά που ελέγχθηκαν αλλά και από το απεσταγμένο νερό συνεπώς παρεμποδίζει σε κάποιο βαθμό την φύτευση των σπερμάτων. Σε κάθε θρεπτικό που ελέγχθηκε για το είδος φαίνεται ότι η κατεργασία με χλωρίνη πριν την διάβρεξη δίνει υψηλότερα τελικά ποσοστά φύτευσης από ότι η κατεργασία με υποχλωριώδες ασβέστιο με ακραία περίπτωση το θρεπτικό MS (φύτευση με κατεργασία χλωρίνης = 60.8% vs φύτευση με κατεργασία υποχλωριώδους ασβεστίου = 14%). Στα θρεπτικά MM, MM+ τα αρτίβλαστα έφταναν στο στάδιο 5 (Stewart & Zettler, 2002) ενώ στο MS έφτασαν μέχρι το στάδιο 2. Τα είδη *N. lactea* και *N. tridentata* παρουσιάζουν δυσκολία στη φύτευση και όταν αυτή επιτυγχάνεται τα ποσοστά είναι πολύ μικρά. Για το είδος *N. lactea* το θρεπτικό MM έδωσε το υψηλότερο ποσοστό φύτευσης (φύτευση = 15.2%) σε διάρκεια κατεργασίας 30 min σε 10% χλωρίνη. Για το είδος *N. tridentata* δεν εντοπίστηκε σημαντική διαφορά στη φύτευση μεταξύ των δυο θρεπτικών που ελέγχθηκαν, με διαφορετικές διάρκειες κατεργασίας των σπερμάτων πριν την διάβρεξη, (φύτευση με MM = 8.5%, φύτευση με MS = 8.9%) ωστόσο φαίνεται πως η

διάρκεια κατεργασίας παίζει σημαντικό ρόλο στη φύτευση για το είδος *N. tridentata* καθώς φύτευση παρατηρήθηκε μόνο στη κατεργασία διάρκειας 60 min. Όπως αναφέρθηκε παραπάνω το είδος *N. maculata* φυτρώνει χωρίς κατεργασία στο απεσταγμένο νερό. Μετά από έλεγχο της φύτευσης σε 5 διαφορετικές θερμοκρασίες παρατηρήθηκε ότι η θερμοκρασία $T = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ δίνει το υψηλότερο τελικό ποσοστό φύτευσης (φύτευση = 84%). Θερμοκρασίες εκατέρωθεν της βέλτιστης έχουν σαν αποτέλεσμα μικρότερα ποσοστά φύτευσης καθώς και αύξηση του T_{50} . Η έκθεση των σπερμάτων στο φως αναστέλλει τη φύτευσή τους. Η διάβρεξη χωρίς κατεργασία δίνει υψηλότερο τελικό ποσοστό φύτευσης (φύτευσης χωρίς κατεργασία = 84% vs φύτευση με κατεργασία = 43%). Όπως και στη περίπτωση της *D. sambucina* έτσι και στη *N. maculata* κατά τη φύτευση σε απεσταγμένο νερό η ανάπτυξη στα αρτίβλαστα σταματά στο στάδιο 2 ωστόσο παρατηρείται μεγάλη σε μήκος ανάπτυξη των ριζοειδών των αρτιβλάστων.

Η ασυμβιωτική φύτευση των ειδών *Neotinea lactea* και *Neotinea tridentata* μελετάται για πρώτη φορά ασυμβιωτικά. Ενώ το είδος *Neotinea maculata* φαίνεται ότι παρουσίασε μεγαλύτερα ποσοστά φύτευσης 96% vs 60% από αυτά που πρότειναν οι Calevo και οι συνεργάτες του (Calevo et al., 2017). Η υψηλότερη φύτευση παρατηρήθηκε στο θρεπτικό MM αλλά ταυτόχρονα και στο θρεπτικό MM+ που είχε χρησιμοποιηθεί στην παραπάνω εργασία παρατηρήθηκε άριστη φύτευση. Η διαφορά στο πρωτόκολλο που χρησιμοποιήθηκε ήταν η μικρότερη διάρκεια κατεργασίας (15 min vs 20 min) καθώς και το ότι η κατεργασία έγινε με χλωρίνη.

Ophrys

Τρία μέλη του γένους *Ophrys* μελετήθηκαν ως προς τη φυτρωτική τους συμπεριφορά. Δύο είδη στην ομάδα της *Ophrys sphegodes*, το είδος *Ophrys mammosa* και το είδος *Ophrys helenae*, καθώς και ένα είδος στην ομάδα της *Ophrys oestrifera*, το είδος *Ophrys mycenensis*. Ελέγχθηκε η φύτευση σε 2 θρεπτικά (MM, MS) για το είδος *O. mammosa* και σε 4 θρεπτικά (MM, MS, OR, KN) για τα είδη *O. helenae* και *O. mammosa*. Η κατεργασία ήταν ίδια και για τα 3 είδη με 10% $\text{Ca}(\text{OCl})_2$ + 1% Tween 20 για 15 ή 20 min ενώ είχε γίνει και προ-κατεργασία για 3 μέρες στους $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ σε απεσταγμένο νερό.

Από τα 3 είδη τα υψηλότερα ποσοστά φύτευσης παρουσίασε το είδος *O. mammosa* στο θρεπτικό MM (φύτευση = 62.2%) ενώ η φύτευση του είδους στο θρεπτικό MS δεν ξεπέρασε το 6%. Η απουσία προ-κατεργασίας για 3 μέρες στο $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ φαίνεται πώς δεν επηρέασε το τελικό ποσοστό φύτευσης αισθητά (φύτευση με προ-κατεργασία = 62.2% vs φύτευση χωρίς προ-κατεργασία = 59%). Το είδος *O. mycenensis* δεν φύτευσε καθόλου στα θρεπτικά MS και KN και φάνηκε πως από τα 2 θρεπτικά στα οποία παρατηρήθηκε φύτευση το θρεπτικό μέσο OR έδωσε τα καλύτερα ποσοστά φύτευσης (φύτευση = 27.3%), και το χαμηλότερο T_{50} . Το είδος *O. helenae* παρουσίασε φύτευση και στα 3 θρεπτικά, ενώ στα θρεπτικά OR, KN παρατηρήθηκαν τα υψηλότερα ποσοστά (φύτευση = 27.1%, 20.1% αντίστοιχα).

Η ασυμβιωτική φύτευση των ειδών *Ophrys mycenensis* και *Ophrys helenae* μελετάται για πρώτη φορά. Όπως και στις προηγούμενες διπλωματικές παρατηρείται ποικιλία στα ποσοστά φύτευσης ανάλογα το είδος με άλλα είδη να παρουσιάζουν μέτρια φύτευση (*Ophrys mycenensis*, *Ophrys helenae*, *Ophrys aesculapii*, *Ophrys fusca*) και άλλα ικανοποιητική (*Ophrys mammosa*, *Ophrys kotschyi*). Επίσης φαίνεται πώς υπάρχει μια προτίμηση αρκετών από τα είδη των γενών για το θρεπτικό OR / PH. Όσον αφορά τη διεθνή βιβλιογραφία τονίζεται από τον Rasmussen (Rasmussen, 1995) η ετερογένεια στα αποτελέσματα που παραθέτουν πολλοί ερευνητές τόσο ως προς το θρεπτικό αλλά και ως προς τις κατεργασίες των

σπερμάτων. Η Κιτσάκη και οι συνεργάτες της (Kitsaki et al., 2004) προτείνουν ψυχρή στρωμάτωση μικρής διάρκειας (3 μέρες) η οποία όμως φάνηκε ότι δεν επηρεάζει αισθητά τα τελικά ποσοστά φύτευσης. Τα ποσοστά της παρούσας διπλωματικής όσο και αυτά της παραπάνω εργασίας για το είδος *Ophrys mammosa* είναι παρόμοια.

Serapias

Το είδος *Serapias bergonii* ελέγχθηκε ως προς τη φυτρωτική του συμπεριφορά. Δύο κατεργασίες 1) 10% χλωρίνη + 0,1% Tween 20, 15 min, 2) 5% Ca(OCl)₂ + 1% Tween 80 χρησιμοποιήθηκαν και τρία θρεπτικά μέσα 1) MS 2) MS+ 3) OR. Τα υψηλότερα ποσοστά φύτευσης παρατηρήθηκαν στα θρεπτικά MS (φύτευση = 37.4%) και OR (φύτευση = 39%) ωστόσο στο δεύτερο θρεπτικό το T₅₀ ήταν μικρότερο (26 vs 37).

Η ασυμβιωτική φύτευσή του είδους *Serapias bergonii* μελετήθηκε για πρώτη φορά. Όσον αφορά το γένος *Serapias*, βάση των προηγούμενων διπλωματικών, φαίνεται πώς υπάρχει προτίμηση στο θρεπτικό OR / PH στο οποίο παρουσιάζονται τα υψηλότερα ποσοστά φύτευσης. Στα θρεπτικά MM, MM+ τα ποσοστά φύτευσης είναι χαμηλά. Τέλος στο θρεπτικό MS+ (Cevdet & Sebnem, 2012), το τελικό ποσοστό φύτευσης δε διαφέρει σημαντικά από αυτό που προκύπτει στο OR / PH.

Spiranthes

Το μοναδικό είδος που ανήκει στο γένος και εντοπίζεται στην Ελλάδα είναι το *Spiranthes spiralis*. Η φύτευση των σπερμάτων του είδους μελετήθηκε μετά από κατεργασία 5% Ca(OCl)₂ + 1% Tween 80 για 30 min σε τρία θρεπτικά μέσα (MS, MS+, KN). Από τα τρία θρεπτικά που χρησιμοποιήθηκαν το MS, MS+ έδωσαν τα καλύτερα ποσοστά φύτευσης (φύτευση = 21.7%, 20.1% αντίστοιχα).

Για το είδος *Spiranthes spiralis* οι Waes & Debergh (1986) με το θρεπτικό BM επιτυγχάνουν ένα άριστο ποσοστό φύτευσης (~90%) στην παρούσα διπλωματική δοκιμάστηκαν διαφορετικά θρεπτικά χωρίς όμως να παρουσιαστεί βελτίωση στα αποτελέσματα σε σχέση με το πρωτόκολλο της παραπάνω εργασίας.

Σκέψεις και προτάσεις για επακόλουθες ερευνητικές προσπάθειες

Από τα έντεκα είδη που μελετήθηκαν ως προς την φυτρωτική τους συμπεριφορά τα 7 έδωσαν φύτευση άνω του 20%. Από τα έξι θρεπτικά μέσα που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα το KN φάνηκε ότι είναι μη κατάλληλο για τη φύτευση των περισσότερων ειδών, με εξαίρεση την *G. conopsea* όπου όμως τα ποσοστά φύτευσης ήταν ελάχιστα για κάθε θρεπτικό που ελέγχθηκε. Τα θρεπτικά MM, OR, MS έδωσαν τα υψηλότερα ποσοστά φύτευσης για 3 είδη το καθένα. Μάλιστα το θρεπτικό OR φαίνεται να αποτελεί το πιο κατάλληλο, από αυτά που δοκιμάστηκαν, για τη φύτευση των ειδών *O. mycenensis*, *O. helenae*, *S. bergonii*. Το θρεπτικό MS έδωσε τα καλύτερα ποσοστά φύτευσης για τα *A. collina*, *N. tridentata*, *S. spiralis* ωστόσο μόνο στη περίπτωση του τρίτου το ποσοστό φύτευσης ξεπέρασε το 20%. Το θρεπτικό MM έδωσε τα υψηλότερα ποσοστά φύτευσης για τα είδη *D. sambucina*, *N. maculata*, *O. mammosa*. Τα τρία αυτά είδη παρουσίασαν και τα υψηλότερα ποσοστά φύτευσης σε σχέση με όλα τα υπόλοιπα.

Όσον αφορά την ασυμβιωτική *ex situ* μελέτη της φύτευσης των 11 ειδών της

διπλωματικής:

1. Για τα είδη *Gymnadenia conopsea*, *Neotinea lactea*, *Neotinea tridentata*, θα ήταν ενδιαφέρον να ελεγχθούν και μεγαλύτερες διάρκειες κατεργασίας καθώς τα δυο τελευταία φαίνεται ότι παρουσίασαν απόκριση και άρχισαν να φυτρώνουν μόνο μετά από την αύξηση της διάρκειας κατεργασίας ενώ το πρώτο παρουσίαζε σε ποικιλία θρεπτικών πολύ χαμηλά ποσοστά φύτευσης.
2. Για τα είδη *Spiranthes spiralis*, *Ophrys helenae*, *Ophrys mycenensis*, *Serapias bergonii* αξίζει να ελεγχθεί η επίδραση της διάρκειας κατεργασίας στο τελικό ποσοστό φύτευσης.
3. Καθώς φαίνεται πώς η διάρκεια κατεργασίας δεν ασκεί κάποια επίδραση στο είδος *Anacamptis collina*, θα ήταν ενδιαφέρον να ελεγχθεί η φύτευση του είδους σε άλλα θρεπτικά και σε άλλες θερμοκρασίες ακόμα και μετά από μια προ-κατεργασία ψυχρής στρωμάτωσης.

Οι ορχιδέες εξαιτίας των πολύπλοκων σχέσεων που αναπτύσσουν με άλλους οργανισμούς στο πεδίο (μύκητες, βακτήρια, επικονιαστές) παρουσιάζουν μεγάλες δυσκολίες στην φύτευσή τους. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα σε μεγάλο βαθμό η φύτευση να ελέγχεται, κυρίως, σε σύνθετα θρεπτικά μέσα και δεν υπάρχουν εκτενή δεδομένα επίδρασης μεμονωμένων παραγόντων στη φύτευση πολλών ειδών. Από τα 11 είδη που μελετήθηκαν στην παρούσα διπλωματική, σε προ-πειράματα, παρατηρήθηκε ότι 6 παρουσιάζουν απόκριση όταν διαβρέχονται σε απεσταγμένο νερό χωρίς κανένα θρεπτικό ή κατεργασία (2 από αυτά τα 6 παρουσιάζουν και φύτευση σε σχετικά υψηλά ποσοστά). Ο έλεγχος της φύτευσης των φυτών αυτών, καθώς και πολλών άλλων, τα σπέρματα των οποίων θα παρουσιάζουν απόκριση σε ένα υπόβαθρο σχετικά απλό, με διαδοχικές προσθήκες περισσότερων παραγόντων (νερό -> pH -> θερμοκρασία -> σάκχαρα κτλ.) θα συμβάλει στο να γίνει σε μεγαλύτερο βάθος κατανοητή η πολύπλοκη βιολογία αυτών των φυτών ενώ ταυτόχρονα απλοποιώντας την εξίσωση και συνθέτοντας την από την αρχή θα μπορούσαν να εμφανιστούν πιθανά μοτίβα στη συμπεριφορά φύτευσης μεταξύ των διάφορων ομάδων της οικογένειας.

Για ομάδες οι οποίες έχουν βρεθεί σε μεγάλη εξάρτηση από τους συμβιώτες τους για όλη τη διάρκεια της ζωής τους όπως τα γένη *Neottia*, *Cephalanthera*, *Epipactis* θα πρέπει να γίνει προσπάθεια κατανόησης και αξιοποίησης του μυκοβιώτη για τη φύτευση και ανάπτυξη των ειδών. Το γεγονός ότι αυτές οι ομάδες αναπτύσσουν κυρίως εκτομυκορρικές σχέσεις καθιστούν δύσκολη την καλλιέργεια του μύκητα και κατά συνέπεια την *ex situ* συγκαλλιέργεια της ορχιδέας με το μύκητα. Σε αυτήν την περίπτωση η *ex situ* ανάπτυξη τριπλών συμβιωτικών σχέσεων ορχιδέα – μύκητας – (φυτό που συνήθως συμβιώνει ο επιθυμητός μύκητας) θα είχε ενδιαφέρον να αξιοποιηθεί για πολλά τέτοια είδη (Yagame & Yamato, 2013).

Στην Ελλάδα απαντώνται άνω των 100 ειδών ορχιδεών. Μεγάλος αριθμός από αυτά είναι είτε ενδημικά είτε βρίσκονται στο όριο της εξάπλωσής τους. Θα ήταν σημαντικό γι' αυτά τα οποία εντάσσονται σε λίστες κινδύνου να γίνουν προσπάθειες για την προστασία των πληθυσμών τους (πίνακας 1). Τα είδη που εξελικτικά έχουν στραφεί προς την μυκοετεροτροφία φαίνεται πως είναι πιο ευαίσθητα σε μεταβολές του περιβάλλοντός τους. Γένη ορχιδεών που παρουσιάζουν είτε μεγάλο πλούτο είτε σημαντικά είδη για την ελληνική χλωρίδα (ενδημικά με πολύ περιορισμένους πληθυσμούς), όπως *Epipactis* και *Cephalanthera*, παρουσιάζουν μεγάλο ενδιαφέρον στη μελέτη τους από τη μια εξαιτίας του άμεσου κινδύνου στον οποίο βρίσκονται πολλά από τα μέλη τους και από την άλλη εξαιτίας της υψηλότερης

ειδίκευσης των σχέσεων που θα μπορούσαν να ρίξουν φως στην εξελικτική πορεία της οικογένειας καθώς και στις απαιτήσεις που φέρουν τα είδη αυτά καθώς και λιγότερα εξαρτημένα από τις συμβιωτικές σχέσεις για την φύτευση και την ανάπτυξή τους. Επίσης, καθώς, πολλά από αυτά τα είδη παρουσιάζουν δυνατότητα αποθήκευσης για πολύ σύντομα χρονικά διαστήματα (Rasmussen, 1995) στις τράπεζες σπερμάτων θα υπήρχε μεγάλο ενδιαφέρον: 1) για μελέτη της πορείας μείωσης της βιωσιμότητας των σπερμάτων σε υπάρχουσες συλλογές, 2) ανάπτυξη νέων πιο αποτελεσματικών μεθόδων αποθήκευσης για μελλοντικές χρήσεις όπως αυτές που εμπλέκουν αποθήκευση σε θερμοκρασίες πολύ χαμηλότερες του 0 °C (σε υγρό άζωτο) όπως προτείνουν τελευταίες μελέτες (Schofield et al., 2018).

Τέλος, καθώς τα σπέρματα των ορχιδεών συγκαταλέγονται στην ομάδα των ‘dust like seeds’ έχουν την δυνατότητα να ταξιδεύουν σε μεγάλες αποστάσεις. Αν και η δυνατότητα εγκατάστασης πληθυσμού δεν είναι εφικτή σε όλες τις περιπτώσεις για πολλά είδη ή γένη παρατηρείται μια εκτεταμένη παρουσία που μπορεί να υπερβαίνει τον χώρο δυο ή περισσότερων ηπείρων. Θα είχε ενδιαφέρον για τέτοιες ομάδες οργανισμών (όπως τα γένη: *Spiranthes*, *Platanthera*, *Dactylorhiza*, *Cephalanthera*) να διερευνηθεί το εάν μεταβάλλεται αλλά και ο πιθανός τρόπος μεταβολής της φυσιολογίας φύτευσης και ανάπτυξης καθώς και άλλων χαρακτηριστικών της βιολογίας τους.

6. Ευχαριστίες

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή Κώστα Α. Θάνο για το χρόνο που μου διέθεσε, την καθοδήγηση του κατά τη διάρκεια διεξαγωγής της διπλωματικής εργασίας καθώς και την εμπιστοσύνη που μου έδειξε. Σημαντικές ήταν οι υποδείξεις της δρ. Κατερίνας Κουτσοβούλου στη συγγραφή του κειμένου αλλά και στη διεξαγωγή των πειραμάτων.

Επίσης ευχαριστίες οφείλονται στην καθηγήτρια Σοφία Ριζοπούλου και την επίκουρη καθηγήτρια Σόνια Μελετίου για την παραχώρηση του εργαστηρίου τους για την διεξαγωγή ορισμένων πειραμάτων. Σημαντική ήταν η παροχή δεδομένων για τον εντοπισμό πληθυσμών ορχοειδών από την Πηνελόπη Δεληπέτρου (για την περιοχή της Αττικής), από τον Σπύρο Τσιφτσή (για τη περιοχή του Φαλακρού) και την υποψήφια διδάκτορα Μάρθα Χαριτωνίδου για το είδος *Ophrys helenae*. Επιπλέον, ευχαριστώ την υπ. δρ. Μ. Χαριτωνίδου για την παραχώρηση κάποιων συλλογών από τα είδη *Ophrys helenae* και *Ophrys insectifera*, από τα Ιωάννινα και από τα Τζουμέρκα. Θα ήθελα επίσης να ευχαριστήσω την Αναπληρώτρια Ερευνήτρια Ευαγγελία Δασκαλάκου του ΕΛΓΟ ‘ΔΗΜΗΤΡΑ’ – ΙΜΔΟ & ΤΠΔ για την παροχή θαλάμου φύτευσης για την διεξαγωγή μιας σειράς πειραμάτων. Τέλος θα ήθελα να ευχαριστήσω τους φίλους μου συμφοιτητές και μη που σε πολλές από τις δειγματοληψίες στο πεδίο αποτέλεσαν καλή παρέα και πολύτιμη βοήθεια.

7. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Αμπελακιώτου Κ.(2015). Μελέτη της φύτρωσης σπερμάτων σε είδη της οικογένειας Orchidaceae. Διπλωματική εργασία. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, τμήμα Βιολογίας, τομέας Βοτανικής.

Άλκιμος Α. (1988). Οι ορχιδέες της Ελλάδας. Εκδόσεις Ψυχαλού.

Αντωνόπουλος Ζ. (2009). Ορχιδέες της Ελλάδας, το γένος *Ophrys*. MEDITERRANEO EDITIONS.

Ayasse M., Schiestl F.P., Paulus H.P., Ibarra F., France W. (2003). Pollinator attraction in a sexually deceptive orchid by means of unconventional chemicals. Proceedings of the Royal Society B, 270, 517 – 522.

Βελιανίτη Α. (2011). Συμβολή στη διατήρηση της χλωρίδας του Υμηττού – Καταγραφή θέσεων και φύτρωση ειδών της οικογένειας Orchidaceae. Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, τμήμα Βιολογίας, τομέας Βοτανικής.

Bateman R.M., Rudall P.J., Bitartondo M.I., Cozzolino S., Lombardo-Tranchida V., Carine M.A., Moura M. (2014). Speciation via floral heterochrony and presumed mycorrhizal host switching of endemic butterfly orchids on the Azorean Archipelago. American Journal of Botany, 101, 979 – 1001.

Bateman R.M., Hollingsworth P.M., Preston J., Yi-Bo L., Pridgeon A.M., Chase M.W. (2003). Molecular phylogenetics and evolution of Orchidinae and selected Habenariinae (Orchidaceae). Botanical Journal of the Linnean Society, 142, 1 - 40.

Cevdet G., Sebnem E., (2012). Seed germination and development of *Serapias vomeracea* (Burm. fil.) Briq. ssp. Orientalis Greuter in Tissue culture. Research Journal of Biotechnology, 7, 4 – 8.

Cig A., Durak D.E., Isler S. (2018). In vitro germination potentials of some *Anacamptis*, *Dactylorhiza*, *Orchis* and *Ophrys* terrestrial orchid species. Applied Ecology and Environmental Research, 16, 5141 – 5155.

Calevo J., Giovaninni A., Cornara L., Peccenini S., (2017). Asymbiotic seed germination of hand-pollinated terrestrial orchids. Acta Horticulturae, 1155, 415 - 418.

Christenhusz M.J.M., Fay M.F., Chase M.W. (2017). Plants of the world an illustrated encyclopedia of vascular plants. Kew Publishing, Royal Botanic Gardens, Kew.

Dimopoulos P., Raus T., Bergmeier E., Constantinidis T., Iatrou G., Kokkini S., Strid A., Tzanoudakis D. (2013): Vascular plants of Greece: An annotated checklist. – Berlin: Botanic Garden and Botanical Museum Berlin-Dahlem; Athens: Hellenic Botanical Society. http://portal.cybertaxonomy.org/flora-greece/cdm_dataportal/taxon/9025aab2-ae8a-440a-ac16-

2c97ee776123.

Delforge P., 2006. Orchids of Europe, North Africa and the Middle East, 3rd edition. A & C Black, London.

Fan X.L., Baret S.C.H., Lin H., Chen L.L., Zhou X., Gao J.Y. (2012). Rain pollination provides reproductive assurance in a deceptive orchid. *Annals of Botany* 110, 953 – 958.

Φοίτος Δ., Κωνσταντινίδης Θ., Κάμαρη Γ. (2009). Βιβλίο ερυθρών δεδομένων των σπάνιων & απειλούμενων φυτών της Ελλάδας, τόμος πρώτος, Πάτρα, Ελληνική Βοτανική Εταιρεία.

Φοίτος Δ., Κωνσταντινίδης Θ., Κάμαρη Γ. (2009). Βιβλίο ερυθρών δεδομένων των σπάνιων & απειλούμενων φυτών της Ελλάδας, τόμος δεύτερος, Πάτρα, Ελληνική Βοτανική Εταιρεία.

Γιαννακούλιας Μ., Πέτρου Μ., Πέτρου Ν. (2009). Ορχιδέες της Ελλάδας. Ελληνική εταιρεία προστασίας της φύσης, οκτώ σύννεφα.

Givnish T.J., Spalink D., Ames M., Lyon S.P., Hunter S.J., Zuluaga A., Iies W.J.D., Clements M.A., Arroyo M.T.K., Leebens-Mack J., Endara L., Kriebel R., Neubig K.M., Whitten W.M., Williams N.H., Cameron K.M. (2015). Orchid phylogenomics and multiple drivers of their extraordinary diversification. *Proceedings of the Royal Society B*, 282, 1471 – 2954.

Givnish T.J., Spalink D., Ames M., Lyon S.P., Hunter S.J., Zuluaga A., Ducette A., Caro G.G., McDaniel J., Clements M.A., Arroyo M.T.K., Endara L., Kriebel R., Williams N.H., Cameron K.M. (2016). Orchid historical biogeography, diversification, Antarctica and the paradox of orchid dispersal. *Journal of Biogeography*, 43, 1905 – 1916.

Girlanda M., Segreto R., Cafasso D., Liebel H.T., Rodda M., Ercole E., Cozzolino S., Gebauer G., Perotto S. (2011). Photosynthetic Mediterranean meadow orchids feature partial mycoheterotrophy and specific mycorrhizal associations. *American Journal of Botany*, 98, 1148 – 1163.

Gremer J.R., Sala A., Crone E.E. (2010). Disappearing plants: why they hide and how they return. *Ecology*, 91, 3407 – 3413.

Gremer J.R., Crone E.E., Lesica P. (2012). Are dormant plants hedging their bets? demographic consequences of prolonged dormancy in variable environments. *The American Naturalist*, 179, 315 – 327.

Harvais G. (1973). Notes on the biology of some native orchids of Thunder Bay, their endophytes and symbionts. *Canadian Journal of Botany*, 52, 451 - 460.

Χέλμουτ Μ. (1993). Η ελληνική χλωρίδα στο μύθο, στη τέχνη και στη λογοτεχνία. Ελληνική εταιρεία προστασίας της φύσης.

Jersáková J., Johnson S. D., Kindlmann P. (2006). Mechanisms and evolution of deceptive pollination in orchids. *Biological Reviews*, 81, 219 – 235.

Johnson S.D., Peter C.I., Nilsson L.A., Agren J. (2003). Pollination success in a deceptive orchid is enhanced by co-occurring rewarding magnet plants. *Ecology*, 84, 2919 – 2927.

Καλοπίσης Θ.Ι. (2001). Επισκόπηση του ιδιόμορφου και θαυμαστού κόσμου των ορχεοειδών. Τριπτόλεμος, περιοδική έκδοση, τεύχος 13, Ιούνιος 2001.

Kitsaki C.K., Zygouraki S., Ziobora M., Kintzios S. (2004). In vitro germination, protocorm formation, and plantlet development of mature versus immature seeds from several *Ophrys* species (Orchidaceae). *Plant Cell Reports*, 23, 284 – 290.

Willis K.J. (2017). State of the world's plants. Kew Gardens, England.

Micheneau C., Fournel J. and Paillet T. (2006). Bird pollination in an angraecoid orchid on Reunion Island (Mascarene Archipelago, Indian Ocean). *Annals of Botany*, 97, 965 – 974.

Πέππα Α. (2011). Διατήρηση της βιοποικιλότητας Ex – situ – Ορχιδέες της Αττικής (τράπεζα σπερμάτων, συλλογή, αποθήκευση, φυσιολογία και οικολογία σπερμάτων). Εθνικό και Καποδιστριακό Πανεπιστήμιο Αθηνών, τμήμα Βιολογίας, τομέας Βοτανικής.

Pillon C., Chase M.W. (2006). Taxonomic exaggeration and its effects on orchid conservation. *Conservation Biology*, 21, 263 – 265.

Paulus H.F. (2006). Deceived males – pollination biology of the Mediterranean orchid genus *Ophrys* (Orchidaceae). *Journal Europaischer Orchideen*, 38, 303 – 353.

Rasmussen N.H., 1995. Terrestrial orchids from seeds to mycotrophic plant. Cambridge University Press.

Rasmussen N.H., Whigham D. (1993). Seed ecology of dust seeds in situ: a new study technique and its applications in terrestrial orchids. *American Journal of Botany*, 80, 1374 - 1378.

Rock-Blake R., McCormick M.K., Brooks H.E.A., Jones C.S., Whigham D.F. (2017). Symbiont abundance can affect host plant population dynamics. *American Journal of Botany*, 104, 1 – 11.

Roy M., Gonneau C., Rocheteau A., Berveiller D., Thomas J.C., Damesin C., Selosse M.A (2013). Why do mixotrophic plants stay green? A comparison between green and achlorophyllous orchid individuals in situ. *Ecological Monographs*, 83, 95 – 117.

Schofield E., Jones P.E., Sarasan V. (2018). Cryopreservation without vitrification suitable for large scale cryopreservation of orchid seeds. *Botanical Studies*, 59.

Schiestl F.P., Cozzolino S. (2008). Evolution of sexual mimicry in the orchid subtribe orchidinae: the role of preadaptations in the attraction of male bees as pollinators. *BMC Evolutionary Biology*, 8, 1471 - 2148.

Shefferson R.P., Kull T., Tali K., Kellet K.M. (2012). Linking vegetative dormancy to fitness in two long-lived herbaceous perennials. *Ecosphere*, 3, 1 - 19.

Sonkoly J., Vojtko A.E., Tokolyi J., Torok P., Sramko G., Illyes Z. Molnar A.V.(2016). Higher seed number compensates for lower fruit set in deceptive orchids. *Journal of Ecology*, 104, 343 - 351.

Stokl J., Brodmann J., Dafni A., Ayasse M., Hansson B. S. (2011). Smells like aphids:

orchid flowers mimic aphid alarm pheromones to attract hoverflies for pollination. *Proceedings of the Royal Society B*, 278, 1216 – 1222.

Stewart S.L., Zettler L.W., (2002). Symbiotic germination of three semi-aquatic rein orchids (*Habenaria repens*, *H. quinquiseta*, *H. macroceratitis*) from Florida. *Aquatic Botany*, 72, 25 – 35.

Swarts N.D., Dixon K.W. (2009). Terrestrial orchid conservation in the age of extinction. *Annals of Botany*, 104, 543 – 556.

Tondello A., Vendramin E., Villani M., Baldan B., Squartini A. (2012). Fungi associated with the southern Eurasian orchid *Spiranthes spiralis* (L.) Chevall. *Fungal Biology*, 116, 543 – 549.

Tsavkelova E.A., Cherdyntseva T.A., Botina S.G., Netrusov A.I. (2007). Bacteria associated with orchid roots and microbial production of auxin. *Microbial Research*, 162, 69 – 76.

Tsiftsis S., Tsiripidis I. (2016). Threat categories of the Greek orchids (Orchidaceae). *Botanika Chronika*, 21, 43 – 74.

Τσιφτσής Σ., Τσιριπίδης Ι. (2015). Ορχιδέες του εθνικού πάρκου βόρειας Πίνδου. Φορέας διαχείρισης εθνικών δρυμών Βίκου – Αώου και Πίνδου.

Wilkinson K.G., Sivasithamparam K., Dixon K.W., Fahy P.C., Bradley J.K. (1994). Identification and characterization of bacteria associated with western Australian orchids. *Soil Biology and Biochemistry*, 26, 137 – 142.

Waes J.M.V., Debergh P.C. (1986). In vitro germination of some Western European orchids. *Physiologia Plantarum*, 67, 253 – 261.

Ye W. , Shen C.H., Lin Y., Chen P.J., Xu X., Oelmuller R., Yeh K.W., Lai Z. (2014) . Growth promotion-related miRNAs in *Oncidium* orchid roots colonized by the endophytic fungus *Piriformospora indica*. *PLoS ONE*, 9

Yagame T., Yamato M. (2013). Mycoheterotrophic growth of *Cephalanthera falcata* (Orchidaceae) in tripartite symbioses with Thelephoraceae fungi and *Quercus serrata* (Fagaceae) in pot culture condition. *Journal of Plant Research*, 126, 215 – 222.