

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ (ΤΕΙ)
ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΚΑΙ ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ
ΤΟΥ *Erica manipuliflora*

Πτυχιακή εργασία
της σπουδάστριας **Φωτεινής Παναγοπούλου**



Καλαμάτα, Νοέμβριος 2007

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ (ΤΕΙ)
ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΘΕΡΜΟΚΗΠΙΑΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ ΚΑΙ ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ
ΤΟΥ *Erica manipuliflora*

Πτυχιακή εργασία
της σπουδάστριας **Φωτεινής Παναγοπούλου**

Επιβλέπων Καθηγητής: Επαμεινώνδας Κάρτσωνας

Καλαμάτα, Νοέμβριος 2007

Ευχαριστίες

Τελειώνοντας ουσιαστικά με αυτή τη μελέτη τη φοίτηση μου στο Τμήμα Θερμοκηπιακών Καλλιεργειών και Ανθοκομίας του Τ.Ε.Ι. Καλαμάτας, θα ήταν παράλειψη να μην ευχαριστήσω ανθρώπους που με στήριξαν στις όποιες δυσκολίες και απογοητεύσεις πολλές φορές υπήρξαν.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω θερμά τον καθηγητή μου και επιβλέποντα στην παρούσα μελέτη Επαμεινώνδα Κάρτσωνα για την πολύτιμη βοήθεια, στήριξη και καθοδήγηση που μου προσέφερε κατά την εκπόνηση και συγγραφή αυτής της μελέτης. Επίσης να ευχαριστήσω το Γεώργιο Μπαλωτή, Γεωπόνο MSc, του Ινστιτούτου Γεωπονικών Επιστημών στο Κτήμα Συγγρού για την πολύτιμη βοήθεια του και καθοδήγηση στην εκπόνηση της μελέτης μου, όπως επίσης και για την παροχή του εργαστηριακού χώρου, όπου εντός αυτού πραγματοποιήθηκαν όλες οι εργασίες. Όπως επίσης και όλους τους καθηγητές που είχα αυτά τα τέσσερα χρόνια με των οποίων τη διδασκαλία, κατάφερα να διευρύνω σε σημαντικό βαθμό τις γνώσεις μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	1
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	2
ABSTRACT	3
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ (ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ)	4
1.1. Βοτανικά χαρακτηριστικά της οικογένειας Ericaceae.	4
1.1.1. Βοτανικά χαρακτηριστικά του γένους <i>Erica sp.</i> L.	5
1.1.2. Βοτανικά χαρακτηριστικά του <i>Erica manipuliflora</i>	6
1.2. Πολλαπλασιασμός	9
1.2.1. Εγγενής πολλαπλασιασμός του <i>Erica sp.</i>	9
1.2.2. Αγενής πολλαπλασιασμός του <i>Erica sp.</i>	9
1.2.2.1. Πολλαπλασιασμός με μοσχεύματα	9
1.2.2.2. Πολλαπλασιασμός με ιστοκαλλιέργεια	9
1.2.2.3. Πολλαπλασιασμός <i>in vitro</i> άλλων ειδών της οικογένειας Ericaceae	12
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	15
2.1. Υλικά	15
2.1.1. Υλικά απολύμανσης ιστών	15

2.1.2. Υλικά θρεπτικού υποστρώματος <i>in vitro</i> καλλιέργειας	15
2.1.3. Υλικά εδαφικού υποστρώματος	16
2.1.4. Δοχεία καλλιέργειας <i>in vitro</i>	16
2.1.5. Υπόστρωμα <i>in vitro</i> καλλιέργειας	16
2.2. Μέθοδοι	19
2.2.1. Παρασκευή stock διαλυμάτων φυτορυθμιστικών ουσιών και βιταμινών Mullin	19
2.2.2. Μέθοδος παρασκευής θρεπτικών υποστρωμάτων	20
2.2.3. Αποστείρωση υλικών	21
2.2.4. Απολύμανση- σπορά <i>in vitro</i> σπόρων του <i>Erica manipuliflora</i> τον Ιανουάριο	22
2.2.5. Απολύμανση και υποστρώματα εγκατάστασης εκφύτων	22
2.2.5.1. Απολύμανση 1 ^{ου} πειράματος τον Νοέμβριο στις 8/11/06	25
2.2.5.2. Απολύμανση 2 ^{ου} πειράματος τον Νοέμβριο στις 16/11/06	25
2.2.5.3. Απολύμανση 3 ^{ου} πειράματος τον Νοέμβριο στις 20/11/06	26
2.2.5.4. Απολύμανση 4 ^{ου} πειράματος το Δεκέμβριο στις 4/12/06	26
2.2.5.5. Απολύμανση 5 ^{ου} πειράματος το Δεκέμβριο στις 15/12/06	26
2.2.5.6. Απολύμανση 6 ^{ου} πειράματος τον Ιανουάριο στις 11/1/07	27

2.2.5.7. Απολύμανση 7 ^{ου} πειράματος το Φεβρουάριο στις 1/2/07	27
2.2.5.8. Απολύμανση 8 ^{ου} πειράματος το Φεβρουάριο στις 21/2/07	27
2.2.5.9. Απολύμανση 9 ^{ου} πειράματος το Φεβρουάριο στις 26/2/07	28
2.2.5.10. Απολύμανση 10 ^{ου} και 11 ^{ου} πειράματος το Μάιο στις 3/5/07 και στις 4/5/07	28
2.2.5.11. Απολύμανση 12 ^{ου} πειράματος τον Ιούλιο στις 3/7/07	28
2.2.5.12. Απολύμανση 13 ^{ου} πειράματος τον Αύγουστο στις 1/8/07	29
2.2.6. Εγκατάσταση και επώαση εκφύτων βλαστών του <i>Erica manipuliflora</i>	29
2.2.7. Υποκαλλιέργεια του <i>Erica manipuliflora</i>	29
2.3.1. Εγκατάσταση <i>ex vitro</i> φυταρίων του <i>Erica manipuliflora</i>	30
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	31
3.1. Πείραμα απολύμανσης ιστών του <i>Erica manipuliflora</i>	31
3.2.1. Καλλιέργεια του <i>Erica manipuliflora</i> τον Νοέμβριο 8/11/06	32
3.2.2. Καλλιέργεια του <i>Erica manipuliflora</i> τον Νοέμβριο 16/11/06	33
3.2.3. Καλλιέργεια του <i>Erica manipuliflora</i> τον Νοέμβριο 20/11/06	34
3.2.4. Καλλιέργεια του <i>Erica manipuliflora</i> τον Δεκέμβριο 4/12/06	36
3.2.5. Καλλιέργεια του <i>Erica manipuliflora</i> τον Δεκέμβριο 15/12/06	37
3.2.6. Καλλιέργεια του <i>Erica manipuliflora</i> τον Ιανουάριο 11/1/07	38

3.2.7. Καλλιέργεια του <i>Erica manipuliflora</i> το Φεβρουάριο 1/2/07	39
3.2.8. Καλλιέργεια του <i>Erica manipuliflora</i> το Φεβρουάριο 21/2/07	41
3.2.9. Καλλιέργεια του <i>Erica manipuliflora</i> το Φεβρουάριο 26/2/07	42
3.2.10. Καλλιέργεια του <i>Erica manipuliflora</i> το Μάιο 3/5/07	43
3.2.11. Καλλιέργεια του <i>Erica manipuliflora</i> το Μάιο 4/5/07	44
3.2.12. Υποκαλλιέργεια του <i>Erica manipuliflora</i> τον Ιούνιο 4/6/07	45
3.2.13. Καλλιέργεια του <i>Erica manipuliflora</i> τον Ιούλιο 3/7/07	47
3.2.14. Καλλιέργεια του <i>Erica manipuliflora</i> τον Αύγουστο 1/8/07	48
3.3. <i>In vitro</i> σπορά του <i>Erica manipuliflora</i> τον Ιανουάριο	49
3.4. Εγκλιματισμός του φυταρίου <i>Erica manipuliflora</i>	49
4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	50
4.1. Πειράματα απολύμανσης	50
4.2. Πειράματα <i>in vitro</i> καλλιέργειας	51
4.3. Υποκαλλιέργεια	51
4.4. Επίλογος	52
5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	53

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

MS: υπόστρωμα Murashige and Skoog (1962)

WPM: υπόστρωμα McCown and Lloyd (1981)

BA: N-6 Βενζυλαδερίνη

NAA: Ναφθυλ-οξικό οξύ

IAA: Indole-3-acetic acid

2iP: (6-(γ , γ - Dimethylallylamino)purine)

Φωτογραφίες εξωφύλλου: Έκφυτα του *Erica manipuliflora* από αρχική καλλιέργεια και υποκαλλιέργεια, άνθη του *Erica manipuliflora*, έριζο φυτάριο και εγκλιματισμός *ex vitro*.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Για την καλλιέργεια του *Erica manipuliflora* χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα βλαστών μήκους 4-5 mm, αφού προηγουμένως είχαν περάσει από διαδικασία απολύμανσης. Βυθίζονταν για 0, 30, ή 60 sec σε αιθανόλη 99%. Έπειτα σε διάλυμα χλωρίνης 10, 15, 20 ή 30% για 15 ή 20' και ακολουθούσαν 3 ξεπλύματα με απεσταγμένο αποστειρωμένο νερό. Στα δύο υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν MS και W.P.M. (με βιταμίνες Mullin) περιέχονταν 1,5 ή 2% σουκρόζη, 0.8% άγαρ και η φυτορρυθμιστική ουσία BA σε συγκέντρωση 0, 0.5 και 1 mg/l. Το θρεπτικό υπόστρωμα W.P.M., με 0 ή 1 mg/l BA, προκάλεσε αναγέννηση βλαστών σε αντίθεση με το MS όπου τα έκφυτα δεν αντέδρασαν. Τα έκφυτα που προέρχονταν από το W.P.M. υποκαλλιεργήθηκαν σε W.P.M. με 0 ή 1 mg/l BA. Σε αναγεννημένο βλαστό, μετά από 5 μήνες στο ίδιο υπόστρωμα καλλιέργειας, προκλήθηκε ριζογένεση. Το έρριζο φυτάριο εγκλιματίστηκε *ex vitro* με επιτυχία.

ABSTRACT

Microcuttings from shoot tips of *Erica manipuliflora* were used for *in vitro* micropropagation. Explants were surface disinfected by immersing them for 0, 30 or 60 sec in 99% ethanol, then for 15 or 20 min in 10, 15, 20 or 30 % calcium hypochlorite followed by 3 rinses with sterile distilled water. MS and WPM were used with 15 or 20 g/l sucrose, 0.8% agar and BA (at concentrations 0, 0.5 or 1 mg/l). Explants cultured at solid WPM with the BA 0 or 1 mg/l media induced shoot proliferation. Explants cultured at WPM, were subcultured at the same medium with 0 or 1 mg/l BA. In regenerated shoots, after five months culture in the same medium formed roots. The rooted plantlet acclimatized *ex vitro* successfully.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ (ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ)

1.1. Βοτανικά χαρακτηριστικά της οικογένειας Ericaceae.

Θάμνοι ή σπανιότερα μικρά δέντρα. Συνήθως αειθαλή. Φύλλα απλά, εναλλασσόμενα, σπανιότερα αντίθετα ή σε σπονδύλους, λειώχειλα ή οδοντωτά, χωρίς παράφυλλα. Άνθη διγενή, ακτινόμορφα, σε βότρες ή σκιάδια, μεμονωμένα ή σε δέσμες (οι ταξιανθίες πλευρικές ή επάκριες). Βράκτια και βρακτίδια υπαρκτά. Ο κάλυκας με 4-5 λοβούς, συχνά διαρκής. Στεφάνη κυλινδρική, σταμνόμορφη ή καμπανοειδής, με 3-7 λοβούς. Στήμονες διπλάσιοι των λοβών της στεφάνης, ελεύθεροι, εκφυόμενοι από το δίσκο ή την ανθοδόχη ή μερικές φορές από τη βάση του σωλήνα της στεφάνης. Οι ανθήρες συνήθως ανοίγουν με πόρους της κορυφής. Ωοθήκη επί- ή υποφυής, συνήθως 4-5χωρη, με πολυάριθμες σπερμοβλάστες. Στύλος απλός και στίγμα κεφαλόμορφο. Καρπός κάψα, ράγα ή δρύπη. Με 125 περίπου γένη και 1.300 είδη, κυρίως στις εύκρατες περιοχές. Σχεδόν όλα τα ευρωπαϊκά είδη δημιουργούν μυκόρριζα και τα περισσότερα είναι ασβεστόφοβα (Πιν. 1) (Αραμπατζής, 2001).

Πίνακας 1. Κλείδα ταξινόμησης της οικογένειας Ericaceae (Αραμπατζής, 2001).

1 Φύλλα αντίθετα ή σε σπονδύλους. Στεφάνη διαρκής. Καρπός κάψα.	
2 Κάλυκας πεταλοειδής, μακρύτερος της στεφάνης. Φύλλα αντίθετα, στενώς πιεσμένα, αλληλοεπικαλυπτόμενα.	3. <i>Calluna</i>
2 Κάλυκας βραχύτερος της στεφάνης. Φύλλα σε σπονδύλους, + - αποκλίνοντα.	
3 Σέπαλα συμφυή (σωλήνας του κάλυκα ισομήκης με τους λοβούς). Άνθη χωρίς βρακτίδια.	2. <i>Bruckenthalia</i>
3 Σέπαλα ελεύθερα. Άνθη με βράκτια.	1. <i>Erica</i>
1 Φύλλα εναλλασόμενα. Στεφάνη μη διαρκής. Καρπός ράγα, δρύπη ή κάψα.	
4 Ωοθήκη υποφυής.	7. <i>Vaccinium</i>
4 Ωοθήκη επιφυής.	
5 Καρπός ράγα, δρύπη ή κάψα περιβαλλόμενη από σαρκώδη κάλυκα. Στεφάνη σταμνόμορφη.	
6 Δέντρα ή όρθιοι θάμνοι.	5. <i>Arbutus</i>
6 Κατοκλινείς θάμνοι.	6. <i>Arctostaphylos</i>
5 Καρπός κάψα. Κάλυκας μη σαρκώδης. Στεφάνη διαφορετική, με πέταλα συμφυή στα βάση τους.	4. <i>Rhododendron</i>

1.1.1. Βοτανικά χαρακτηριστικά του γένους *Erica* sp. L.

Νανοφυείς μέχρι μέτριοι, αειθαλείς θάμνοι. Φύλλα σε σπονδύλους, μικρά, συχνά γραμμοειδή ή φαινομενικά γραμμοειδή (από τις περιελιγμένες παρυφές). Μίσχος βραχύς πιεσμένος (Αραμπατζής, 2001).

Άνθη διγενή, 4-5μερή, σε επάκρια σκιάδια ή βότρυς, σε μαχαλιαίες δέσμες ή σκιάδα (σχηματίζουν επάκριες ή πλευρικές φόβες). Ποδίσκος με 2 ή περισσότερα μικρά βράκτια. Κάλυκας με βαθείς λοβούς, πράσινος ή ροδόχρωμος, βραχύτερος της στεφάνης. Στεφάνη κυλινδρική, καμpanοειδής ή σταμνόμορφη, με λοβούς βραχύτερους ή ισομηκείς του σωλήνα (παραμένει στον καρπό). Στήμονες 8-10, εκφυόμενοι μεταξύ των λοβών ενός νεκταριοφόρου δίσκου. Στύλος νηματοειδής. Στίγμα κεφαλόμορφο ή δισκοειδές. Ωοθήκη επιφυής, 4-5χωρη (Αραμπατζής, 2001).

Καρπός κάψα με πολλά σπέρματα (περικλείεται από την παραμένουσα στεφάνη).

Μεγάλο γένος με 500 περίπου είδη, με κύριο χώρο εξάπλωσης τη Ν. Αφρική και με ένα μικρότερο δευτερεύον κέντρο στη ΝΔ Ευρώπη. Αρκετά από αυτά καλλιεργούνται ως καλλωπιστικά. Από τη ρίζα ορισμένων ειδών κατασκευάζονται πίπες καπνίσματος (Αραμπατζής, 2001).

Στη χώρα μας απαντώνται 3 αυτοφυή (Πιν. 2).

Πίνακας 2. Κλείδα ταξινόμησης του γένους *Erica sp.* L. (Αραμπατζής, 2001)

1 Ανθήρες έγκλειστοι (δεν προεξέχουν της στεφάνης).	1. <i>arborea</i>
1 Ανθήρες προεξέχοντες της στεφάνης.	
2 Ποδίσκος τουλάχιστον διπλάσιος του κάλυκα, γυμνός.	2. <i>manipuliflora</i>
2 Ποδίσκος ισομήκης του κάλυκα.	3. <i>herbacea</i>

1.1.2. Βοτανικά χαρακτηριστικά του *Erica manipuliflora*

Κοινό όνομα: Ερείκη η “σπονδυλωτή” κ. ρείκι, χαμορρείκι, ξούρα, πυρένι.

Όρθιος θάμνος με ύψος μέχρι 1 m (Εικ. 1). Στελέχη πολύκλαδα, με πτυχώσεις ή γωνιώδη, με μικρό χνούδι ή σχεδόν γυμνά στην αρχή, κυλινδρικά, γκριζοκάστανα, με λεπτώς σχισμένο φλοιό αργότερα.

Φύλλα συνήθως ανά 4, σε σπονδύλους, όρθια ή λίγο αποκλίνοντα, σε πυκνή διάταξη, 4-7Χ0,7 mm, γραμμοειδή, αμβλυκόρυφα, με βάση απότομα στενούμενη, με παρυφές ισχυρώς περιελιγμένες, σχεδόν γυμνά ή ± πυκνό χνούδι. Μίσχος όρθιος, c. 0,8 mm, συνήθως χνουδατός.

Άνθη ωχροροδόχρωμα (Εικ. 2), εύωσμα, συνήθως σε ζεύγη, μερικές φορές μεμονωμένα ή ανά 3, μασχαλιαία (κυρίως στα φύλλα της κορυφής), σχηματίζουν επιμηκυσιμένες, κυλινδρικές, σταχυόμορφες ή βοτρυόμορφες ταξιανθίες. Ποδίσκος 0,4-1,2 cm, νηματοειδής, γωνιώδης, γυμνός ή σχεδόν γυμνός. Βράκτια μικρά, δελτοειδή, σχεδόν γυμνά. Βρακτίδια λίγο μικρότερα, νηματοειδώς δελτοειδή, κοίλα. Κάλυκας 4-λοβος, με όρθιους, ωοειδείς, σχεδόν γυμνούς λοβούς. Στεφάνη 2,5Χ3mm,

καμpanοειδής, γυμνή, με 4 όρθιους, δελτοειδής λοβούς. Νήματα 2,5 mm, όρθια, γραμμοειδή. Ανθήρες προεξέχοντες της στεφάνης, σκουρερυθροϊώδεις. Ωοθήκη τετραγωνική, γυμνή, ερυθρή (σε 8-λοβο, ερυθροϊώδη δίσκο). Στύλος 4 mm, γυμνός. Στίγμα ακρότομο.



Εικόνα 1. Ανθισμένο φυτό του *Erica manipuliiflora* στο Κτήμα Συγγρού (Νοέμβριος 2006).



Εικόνα 2. Άνθη του *Erica manipuliflora*

Άνθηση Αύγουστο – Νοέμβριο.

Κάψα 2X1,6 mm, τετραγωνική, με πλατιά ωσειδή σπέρματα.

Σε ξηρές, πετρώδεις θέσεις, συνήθως σε ασβεστόλιθους, στην ευμεσογειακή και παραμεσογειακή ζώνη βλάστησης.

Στην Ηπειρωτική χώρα και νησιά.

Είδος των περιοχών της Α και Κ Μεσογείου (από την Ιταλία μέχρι το Λίβανο).

Με μελισσοτροφική αξία ιδιαίτερα το χρόνο άνθησής του (Αραμπατζής, 2001).

1.2. Πολλαπλασιασμός

1.2.1. Εγγενής πολλαπλασιασμός

Η σπορά πραγματοποιείται την Άνοιξη, περίπου στα μέσα Μαρτίου, σε αβαθή δοχεία μέσα σε θερμοκήπιο χωρίς να προηγηθεί χειρισμός. Ως υπόστρωμα χρησιμοποιείται ερεικόχωμα. Οι σπόροι σκεπάζονται με λεπτόκοκκο (κοσκινισμένο) ερεικόχωμα. Πάνω στο δοχείο τοποθετείται γυαλί. Τα δοχεία τοποθετούνται σε σκιασμένο-σκοτεινό μέρος. Το ερεικόχωμα διατηρείται συνεχώς υγρό (Τάκος & Μέρου ,1995).

Το φύτευμα των σπόρων επιτυγχάνεται μετά από 2-3 εβδομάδες. Μετά το φύτευμα απομακρύνεται το γυαλί από το φυτοδοχείο και τοποθετείται σε φωτεινό μέρος. Ακολουθεί μεταφύτευση πάλι σε φυτοδοχεία και από εκεί θα μεγαλώσουν τα σπορόφυτα, μεταφυτεύονται στην ύπαιθρο σε κιβώτια (Τάκος & Μέρου, 1995).

1.2.2. Αγενής πολλαπλασιασμός

1.2.2.1. Πολλαπλασιασμός με μοσχεύματα

Από έλεγχο τόσο της ξενόγλωσσης όσο και της ελληνικής βιβλιογραφίας δεν βρέθηκαν αναφορές για πολλαπλασιασμού του *Erica manipuliflora* με τη μέθοδο των μοσχευμάτων.

1.2.2.2. Πολλαπλασιασμός με ιστοκαλλιέργεια

Η *in vitro* μεθοδολογία αφορά γενικά την καλλιέργεια κυττάρων, ιστών και οργάνων ζώντων οργανισμών, καθώς και τη μεταχείριση των καλλιεργειών αυτών

ανάλογα με τον επιδιωκόμενο τελικό σκοπό (π.χ. έρευνα, βελτίωση, αναπαραγωγή, εξυγίανση) (Κίντζιος, 1994).

Όσον αφορά την εμπορική ιστοκαλλιέργεια φυτών (ή μικροπολλαπλασιασμό), αυτή κυρίως συνίσταται στην αναγέννηση ολόκληρων (πλήρων), βιώσιμων φυτών από διάφορα έκφυτα, συνηθέστερα των οποίων είναι:

1. Τα κορυφαία μεριστώματα.
2. Τα κορυφαία τμήματα βλαστών.
3. Οι οφθαλμοί.
4. Τα μεσογονάτια διαστήματα βλαστών.
5. Τα έμβρυα.
6. Τα φύλλα.

Σε περίπτωση κατά την οποία στην ιστοκαλλιέργεια δεν χρησιμοποιούνται μεριστωματικοί ιστοί (μεριστώματα, οφθαλμοί, έμβρυα), οι καλλιεργούμενοι ιστοί διέρχονται από μια φάση αποδιοργάνωσης της τυπικής δομής τους, παράγοντας μάζες διαφοροποιημένων κυττάρων, γνωστές ως κάλλος (κάλλος εμφανίζεται συχνά και κατά την καλλιέργεια μεριστωματικών ιστών, αλλά και σε μικρότερη έκταση) (Κίντζιος, 1994).

Με κατάλληλους χειρισμούς οι καλλιεργούμενοι μεριστωματικοί ιστοί ή ο κάλλος παρουσιάζουν μερική επαναδιαφοροποίηση, με τη δημιουργία καταβολών διαφόρων οργάνων ή ιστών, όπως βλαστών και/ή ριζών. Η διαδικασία αυτή χαρακτηρίζεται ως τυχαία οργανογένεση (εκτός από την αναγέννηση εμβρύων σε ολόκληρα φυτά). Συνήθως από ένα μόνο έκφυτο μπορούν να προέλθουν περισσότερες (π.χ. 5-10) καταβολές νέων οργάνων, οι οποίες επανακαλλιεργούμενες μπορούν να δώσουν με τη σειρά τους νέες καταβολές. Με περαιτέρω χειρισμούς οι καταβολές αυτές μπορούν να εξελιχθούν σε ολόκληρα φυτάρια (Κίντζιος, 1994).

Σε ορισμένες περιπτώσεις, αντί καταβολών οργάνων μπορούν να παραχθούν από σωματικούς (δηλ. μη γαμετικούς) ιστούς ολόκληρα έμβρυα, τα οποία περικλείουν σε μικρογραφία όλη την απαραίτητη δομή ενός φυτού. Τα έμβρυα αυτά ονομάζονται σωματικά, επειδή δεν προέρχονται από τη γονιμοποίηση γαμετικών κυττάρων, αλλά από σωματικά κύτταρα, ενώ όλη η διαδικασία ονομάζεται σωματική εμβρυογένεση (Κίντζιος, 1994).

Από πρακτική άποψη, στην εμπορική ιστοκαλλιέργεια χρησιμοποιούνται συνηθέστερα τα κορυφαία ή τα μεσογονάτια τμήματα βλαστών (μήκους 0.5-1 εκ.), λόγω της ευκολίας παραλαβής τους από το μητρικό φυτό (φυτό-δότη) και αντίδρασης

στην καλλιέργεια. Σχετικά εύκολη είναι και η καλλιέργεια των οφθαλμών, ενώ η απομόνωση μεριστωμάτων και εμβρύων απαιτεί σχετικά υψηλό βαθμό τεχνικής ικανότητας και εξειδίκευσης. Η σωματική εμβρυογένεση, μια σχετικά νέα μεθοδολογία, προϋποθέτει αυξημένο τεχνολογικό επίπεδο ενός εργαστηρίου και παρουσιάζει ακόμα πολλά πρακτικά προβλήματα στην εφαρμογή. Η καλλιέργεια, τέλος, των φύλλων χρησιμοποιείται μόνο σε ειδικές περιπτώσεις (π.χ. κλωνική αναπαραγωγή της *Saintpaulia*) (Κίντζιος, 1994).

Τα σημαντικότερα **πλεονεκτήματα** της ιστοκαλλιέργειας έναντι των συμβατικών μεθόδων πολλαπλασιασμού των φυτών είναι:

1. Η κλωνική αναπαραγωγή των μητρικών φυτών
2. Η αυξημένη παραγωγή φυτών σε σύντομο χρονικό διάστημα.
3. Η εξοικονόμηση χώρου.
4. Η αποδέσμευση της παραγωγής από εξωτερικές και περιβαλλοντικές συνθήκες και περιορισμούς.
5. Η παραγωγή άνοσου φυτικού υλικού.
6. Μοναδική μέθοδος πολλαπλασιασμού για ορισμένα φυτικά είδη.

Ωστόσο η καλλιέργεια παρουσιάζει και **μειονεκτήματα** σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους, σπουδαιότερα από τα οποία είναι τα εξής:

1. Απαιτεί υψηλό επενδυτικό κόστος.
2. Προϋποθέτει υψηλή επάρκεια σε τεχνογνωσία καθώς και αποτελεσματική επίβλεψη όλων των σταδίων παραγωγής.
3. Το κόστος της *in vitro* παραγωγής φυτών είναι, προς το παρόν τουλάχιστον, σημαντικά μεγαλύτερο από αυτό των συμβατικών μεθόδων.

Τα κυριότερα τεχνικά προβλήματα της ιστοκαλλιέργειας είναι:

1. Η εκτεταμένη μόλυνση των καλλιεργειών.
2. Η υαλοποίηση των *in vitro* αναγεννώμενων φυτών.
3. Η χαμηλή βιωσιμότητα των *in vitro* παραχθέντων φυτών.
4. Η κλωνική αναπαραγωγή του μητρικού υλικού.
5. Η μη επιτυχής αναγέννηση πλήρων φυτών.

Η *in vitro* παραγωγή φυτών μπορεί να διακριθεί σε πέντε στάδια:

Στάδιο 0: Προετοιμασία/επεξεργασία μητρικού φυτού.

Στάδιο 1: Απομόνωση έκφυτου-επαγωγή καλλιέργειας.

Στάδιο 2: Πολλαπλασιασμός κάλλου/ιστού.

Στάδιο 3: Αναγέννηση ολόκληρων φυτών (διακρίνονται πιθανά ενδιάμεσα στάδια βλαστογέννησης/ριζογέννησης).

Στάδιο 4: Εγκλιματισμός των φυτών πριν την υπαίθρια φύτευσή τους (Κίντζιος, 1994).

1.2.2.3. Πολλαπλασιασμός *in vitro* ειδών της οικογένειας Ericaceae

Λόγω της έλλειψης βιβλιογραφικών αναφορών στην ελληνική και την ξενόγλωσση βιβλιογραφία για μικροπολλαπλασιασμό ειδών του γένους *Erica*, αναζητήθηκαν πληροφορίες για μικροπολλαπλασιασμό άλλων ειδών της οικογένειας Ericaceae.

Οι Norton & Norton (1985) προσπάθησαν να πολλαπλασιάσουν *in vitro* αρκετά είδη της οικογένειας Ericaceae (Πίν. 3). Ο σκοπός της μελέτης τους ήταν να δουν την επίδραση της κυτοκινίνης BA σε σχέση με την 2iP και βρήκαν ότι η κατάλληλη κυτοκινίνη για τον πολλαπλασιασμό των ειδών είναι η δεύτερη.

Οι Gebhardt & Friedrich (1987) πολλαπλασίασαν το είδος *Calluna vulgaris* cv. "H.E. Beale". Ως έκφυτα χρησιμοποιήθηκαν τμήματα από κορυφαίο μερίστωμα το οποίο πάρθηκε από αναπτυσσόμενη κορυφή. Το θρεπτικό υπόστρωμα που χρησιμοποιήθηκε ήταν μισής δύναμης MS με 30 g/l σακχαρόζη και 0.9% άγαρ, διάφορους συνδυασμούς IAA και BA (0.5 και 1 mg/l). Επίσης παρατηρήθηκαν διαφορές στην αναγέννηση από έκφυτα που προέρχονταν από τη φύση σε σχέση με έκφυτα που προέρχονταν από αρχική καλλιέργεια *in vitro*.

Οι Kada et al., (1991) προσπάθησαν να πολλαπλασιάσουν *in vitro* το είδος *Arctostaphylos uva-ursi*, χρησιμοποιώντας ένα στερεό θρεπτικό υπόστρωμα το οποίο περιείχε τα μακροστοιχεία των Zimmerman & Broome (1980), τα μικροστοιχεία των Murashige & Skoog (1962), το μίγμα των βιταμινών των Morel & Wetmore (1951), σακχαρόζη 30 g/l και 0.55% άγαρ. Ως έκφυτα δοκιμάστηκαν μεσογονάτια ή κορυφαίο μερίστωμα. Ενώ η 2iP είναι η πιο συνήθης ορμόνη κυτοκινίνης για τον πολλαπλασιασμό των μελών της Ericaceae (Lloyd & McCown 1981, Fisher-Dazy et al. 1984), οι Kada et al., (1991) βρήκαν ότι η προσθήκη της ορμόνης BA στο θρεπτικό υπόστρωμα, μόνη της ή σε συνδυασμό με IAA αύξησε το ρυθμό πολλαπλασιασμού του είδους.

Πίνακας 3. Είδη της Οικ. Ericaceae που πολλαπλασιάστηκαν *in vitro*. Πηγή Norton & Norton (1985).

Arctostaphylos media Green
Arctostaphylos uva-ursi (L.) K. Spreng
Erica carnea L. 'Springwood White'
Gaultheria hispidula (L.) Muhlenb. Ex Bigel
Kalmia angustifolia L. (pink form)
Rhododendron arboreum Sm
Rhododendron chamae-thomsonii (Tag and Forr.) Cowan and Davidian
Rhododendron x 'Chikor'
Rhododendron x 'Chinsayii'
Rhododendron dauricum L.
Rhododendron fastigiatum Franch
Rhododendron forrestii Balf. F. ex Diels
Rhododendron keiskei Miq.
Rhododendron leucapsis Tagg
Rhododendron lutescens Franch
Rhododendron 'P.J.M. Victor'
Rhododendron racemosum Franch
Rhododendron 'Vuyk's Rosy Red'
Rhododendron Williamsianum Rehd. And Wils.
Vaccinium vitis-idaea Lodd. Var. *minus*

Σύμφωνα με τους Debnath & McRae (2001) επιτυχώς πολλαπλασίασαν *in vitro* το *Vaccinium macrocarpon* με κορυφαίους οφθαλμούς και βρήκαν ότι το BA δίνει μικρότερο αριθμό αναγεννημένων βλαστών σε σχέση με την κυτοκινίνη 2iP.

Ένα χρόνο μετά οι Mereti et al., (2002) κατάφεραν τον μικροπολλαπλασιασμό του *Arbutus unedo* αλλά παρατηρήθηκε αστάθεια όσον αφορά τη ριζοβολία αλλά και τον *ex vitro* εγκλιματισμό.

Σύμφωνα όμως με τους Μπερτσουκλή κ.α., (2007) επιτεύχθηκε ο *in vitro* πολλαπλασιασμός του *Arbutus andrachne* σε υπόστρωμα W.P.M. και σύγκριναν την επίδραση των κυτοκινινών BA, Zeatin, Kinetin και 2iP στη βλαστογένεση. Κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η Zeatin έδωσε συνολικά το μεγαλύτερο αριθμό βλαστών, μήκος βλαστών καθώς και διπλάσιο αριθμό κόμβων σε σύγκριση με το BA.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1. Υλικά

2.1.1. Υλικά απολύμανσης ιστών

Πριν την τοποθέτηση *in vitro* εκφύτων ή σπόρων προηγήθηκε απολύμανση με χρήση των εξής υλικών:

- α) Χλωρίνη εμπορίου η οποία περιείχε NaOCl₂ 4.5 % σε διαθέσιμο Cl.
- β) Προσκολλητική ουσία Tween-20 (Polyoxyethylenesorbitan Monolaurate) της εταιρείας MERCK.
- γ) Αιθανόλη (ethanol absolute 99%) της εταιρείας MERCK.

2.1.2. Υλικά θρεπτικού υποστρώματος *in vitro* καλλιέργειας

α) Υπόστρωμα πλήρους MS (Murashige and Skoog, 1962) σε μορφή σκόνης, MS basal mixture της εταιρείας SIGMA.

β) Υπόστρωμα αλάτων W.P.M. (Woody Plant Medium, McCown and Lloyd, 1981) σε μορφή σκόνης, W.P.M. basal salt mixture της εταιρείας SIGMA.

γ) Σακχαρόζη (του εμπορίου).

δ) Κυτοκινίνη :

Βενζυλαδεκίνη (BA,6-benzyladenine) MB = 225.2, της εταιρείας SIGMA.

ε) Βιταμίνες

Μυοϊνοζιτόλη (Myo-Inositol) MB = 180.16, της εταιρείας Merck.

Θειαμίνη (Thiamine hydrochloride) MB = 337.27, της εταιρείας SIGMA, διαλύτης το νερό.

Πυριδοξίνη (Pyridoxine hydrochloride) MB = 205.64, της εταιρείας Merck, διαλύτης το νερό.

Νικοτινικό οξύ (Nicotinic acid) MB = 123.11, της εταιρείας Merck, διαλύτης το νερό.

ζ) Άγαρ (Προμηθευτής Ρουμπουλάκης Α.Ε. Χημικά).

2.1.3. Υλικά εδαφικού υποστρώματος

Για τη δημιουργία υποστρώματος χρησιμοποιήθηκαν:

-Τύρφη της εταιρείας Klashman τύπου MAX Multi purpose compost Klasmann-Deilmann GmbH-P.O., Germany) με χαρακτηριστικά (pH 5.5-6.5).

-Περλίτης της εταιρείας Perloflor με χαρακτηριστικά (pH 5.5-6.5).

2.1.4. Δοχεία καλλιέργειας *in vitro*

Στο στάδιο της εγκατάστασης των αρχικών καλλιεργειών *in vitro*, χρησιμοποιήθηκαν γυάλινα δοχεία καλλιέργειας τύπου magenta που είχαν όγκο 100 ml, της εταιρείας SIGMA και ως υλικό κάλυψης χρησιμοποιήθηκαν τα καπάκια των ανωτέρω δοχείων.

2.1.5. Υπόστρωμα *in vitro* καλλιέργειας

Για την *in vitro* καλλιέργεια σπόρων ή εκφύτων χρησιμοποιήθηκαν στερεά υποστρώματα με βάση το MS (Mourashige & Skoog, 1962) ή το Woody Plant Medium (McCown and Lloyd, 1981)

Στον Πίνακα 4 φαίνονται τα συστατικά των θρεπτικών υποστρωμάτων MS (Mourashige & Skoog, 1962) και του W.P.M. (McCown and Lloyd, 1981).

Πίνακας 4 : Συστατικά (μακροστοιχεία - ιχνοστοιχεία - βιταμινών) των υποστρωμάτων MS (Mourashige & Skoog, 1962) και WPM (McCown and Lloyd, 1981).

Συστατικά	MS (mg/l)	WPM (mg/l)
NH_4NO_3	1650	400
$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	332.2	96
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$		556
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370	370
KNO_3	1900	
K_2SO_4		990
KH_2PO_4	170	170
H_3BO_3	6.2	6.2
$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025	
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025	0.25
Na_2EDTA	37.3	37.3
$\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	27.8	27.8
$\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	16.9	22.3
KI	0.83	
$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.25	0.25
$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.6	8.6
Myo-inositol	100	100
Glycine	2.0	2.0
Nicotinic acid	0.5	0.5
Pyridoxine HCl	0.5	0.5
Thiamin HCl	0.1	1.0

Τα έκφυτα καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS ή W.P.M που περιείχαν τη φυτορρυθμιστική ουσία BA σε διάφορες αναλογίες.

Στον Πίνακα 5 φαίνονται οι συγκεντρώσεις της φυτορρυθμιστικής ουσίας ΒΑ που χρησιμοποιήθηκαν σε mg/l.

ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ ΣΥΓΚΕΝΤΡΩΣΗ ΒΑ	MS	WP
0	A	Δ
0,5	B	E
1	Γ	Z

Πιν. 5. Θρεπτικά υποστρώματα MS και W.P.M. με 0, 0.5 και 1 mg/l ΒΑ.

2.2. Μέθοδοι

2.2.1. Παρασκευή stock διαλυμάτων φυτορρυθμιστικών ουσιών και βιταμινών Mullin

Τα stock διαλύματα των φυτορρυθμιστικών ουσιών-βιταμινών περιείχαν την κάθε ουσία ή βιταμίνη σε ποσοστό 10% κ.β..

1. Παρασκευή "stock" διαλύματος BA. Σε δοχείο ζέσεως των 100 ml τοποθετούνταν 10 mg BA, τα οποία διαλύονταν με ανάδευση σε 2-3 σταγόνες 1N καυστικού νατρίου (NaOH). Στη συνέχεια προσθέτονταν 100 ml ζεστού (με βραστό νερό κρυστάλλωνε η ουσία) αποσταγμένου νερού.

2. Παρασκευή "stock" διαλύματος Thiamine. Σε δοχείο ζέσεως των 100 ml, τοποθετούνταν 10 mg Thiamine hydrochloride, τα οποία διαλύονταν απευθείας σε 100 ml αποσταγμένου νερού.

3. Παρασκευή "stock" διαλύματος Pyridoxine. Σε δοχείο ζέσεως των 100 ml, τοποθετούνταν 10 mg Pyridoxine hydrochloride, τα οποία διαλύονταν απευθείας σε 100 ml αποσταγμένου νερού.

4. Παρασκευή "stock" διαλύματος Nicotinic acid. Σε δοχείο ζέσεως των 100 ml, τοποθετούνταν 10 mg Nicotinic acid, τα οποία διαλύονταν απευθείας σε 100 ml αποσταγμένου νερού.

Όλα τα "stock" διαλύματα των ορμονών αποθηκεύονταν στους 4°C, για δύο εβδομάδες το πολύ.

2.2.2. Μέθοδος παρασκευής θρεπτικών υποστρωμάτων

Σε δοχείο ζέσεως με αποσταγμένο νερό (όγκου λιγότερο του τελικού) προσθέτονταν οι ακριβείς ποσότητες, αλάτων Woody Plant Medium (W.P.M.) 2.3 g/l με βιταμίνες Mullin, Μυοϊνοζιτόλη 100 mg/l, Θειαμίνη 1 mg/l, Πυριδοξίνη 0.5 mg/l και Νικοτινικό οξύ 0.5 mg/l (Mullin et al. 1974) ή πλήρους Murashige and Skoog (MS) 4.4 g/l, σακχαρόζης 2% ή 1.5%, και των επιθυμητών κάθε φορά φυτορρυθμιστικών ουσιών, από τα stock διαλύματα αυτών και αναδεύονταν σε μαγνητικό αναδευτήρα (Εικ. 3) μέχρι να διαλυθούν πλήρως. Στη συνέχεια γινόταν ογκομέτρηση και προσθήκη αποσταγμένου νερού, μέχρι τον επιθυμητό όγκο και ακολουθούσε ρύθμιση του pH στην τιμή 5.7 της κλίμακας με τη βοήθεια αραιών διαλυμάτων 1N NaOH και 1N HCl. Ακολούθως προσθέτονταν, για τη σταθεροποίηση των υποστρωμάτων, άγαρ στην απαιτούμενη ποσότητα (8g/l) και ακολουθούσε θέρμανση του διαλύματος, υπό συνεχή ανάδευση μέχρι να λιώσει το άγαρ. Στη συνέχεια το υπόστρωμα μοιραζόταν ανά 20 ml στα δοχεία καλλιέργειας όγκου 100 ml και σκεπάζονταν με το καπάκι των δοχείων. Τέλος τα δοχεία καλλιέργειας με τα υποστρώματα τοποθετούνταν σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης.



Εικόνα 3. Μαγνητικός αναδευτήρας

2.2.3. Αποστείρωση υλικών

Όλα τα βάζα με τα υποστρώματα, αλλά και όλα τα υλικά και τα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν στις εμφυτεύσεις ή απολυμάνσεις, όπως λαβίδες, νυστέρια, πλακάκια πάνω στα οποία γίνονταν οι κοπές, διηθητικά χαρτιά, φιάλες και δοχεία με νερό για την απολύμανση των εκφύτων, αποστειρώνονταν σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης (αυτόκλειστο) επί 20 min (Εικ.4,5), σε θερμοκρασία 121°C και σε πίεση 1.1 atm. Προσοχή δόθηκε στο ότι όλα τα καπάκια έπρεπε να είναι χαλαρά τοποθετημένα κατά την αποστείρωση. Μολυσμένα βάζα καλλιέργειας πριν ανοιχτούν και πλυθούν αποστειρώνονταν για 40 min, σε θερμοκρασία 121°C και σε πίεση 1.1 atm.



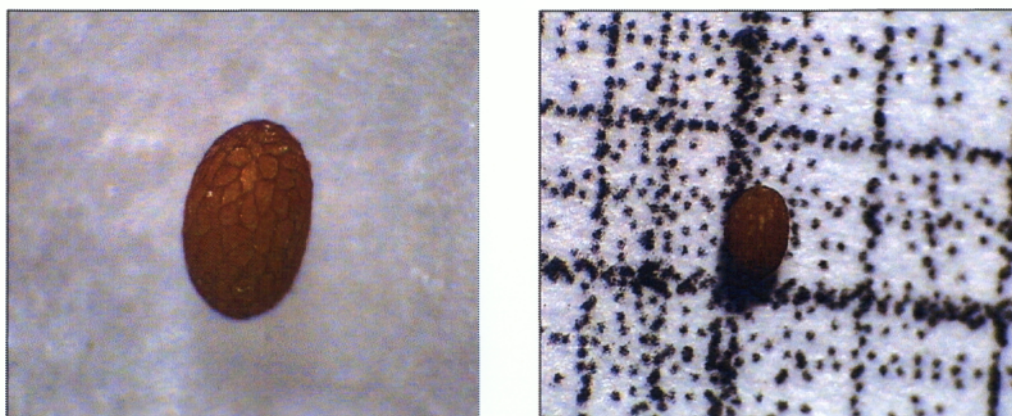
Εικόνα.4. Χύτρα υγρής αποστείρωσης σε λειτουργία



Εικόνα 5. Αποστειρωμένα εργαλεία τυλιγμένα σε αλουμινόχαρτο.

2.2.4. Απολύμανση-σπορά *in vitro* σπόρων του *Erica manipuliflora* τον Ιανουάριο

Σε υδατικό διάλυμα χλωρίνης (7,5%) τοποθετήθηκαν οι σπόροι του *Erica manipuliflora* (Εικ. 6) και απολυμάνθηκαν για 3 min. Στη συνέχεια οι σπόροι, ξεπλύθηκαν 3 φορές με αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό. Οι σπόροι τοποθετήθηκαν σε δοχεία καλλιέργειας που περιείχαν στερεό θρεπτικό υπόστρωμα 1/2 MS, χωρίς την παρουσία φυτορρυθμιστικής ουσίας. Το μέγεθος και το σχήμα των σπόρων φαίνεται στην εικόνα 6.



Εικόνα 6. Σπόρος του *E. manipuliflora* στο στερεοσκόπιο πάνω σε μελιμετρέ χαρτί.

2.2.5. Απολύμανση και υποστρώματα εγκατάστασης εκφύτων

Σαν εκφύτα χρησιμοποιήθηκαν τμήματα βλαστού τρέχουσας βλάστησης από ενήλικα αυτοφυή φυτά που αυτοφύονταν στο Κτήμα Συγγρού. Οι βλαστοί είχαν μήκος 5-6 cm, και το μέγεθός τους καθώς και το σημείο του φυτού από το οποίο κόπηκαν φαίνεται στις εικόνες 7 και 8.



Εικ. 7. Ακραία βλάστηση του *Erica manipuliflora* (Νοέμβριος 2006)



Εικ. 8. Έκφυτα του *Erica manipuliflora* λίγο πριν την απολύμανση

Πίνακας 6. Συγκεντρωτικός πίνακας πειραμάτων απολύμανσης των εκφύτων του *Erica manipuliflora*. Στον πίνακα αυτό αναφέρεται σε πόσες πειραματικές διαδικασίες χρησιμοποιήθηκε ο κάθε τρόπος απολύμανσης.

	Περιεκτικότητα σε χλωρίνη				Χρόνος ανακινήσεως
	10%	15%	20%	30%	
Αιθυλική αλκοόλη					
0 sec		2	7		15 min
30 sec	1	1		1	15 min
1 min				1	20 min

Αρχικά και λόγω των έντονων μολύνσεων που παρουσιάστηκαν κατά την αρχική εγκατάσταση των εκφύτων διερευνήθηκε η εξεύρεση ικανοποιητικής μεθόδου απολύμανσης (συγκέντρωση χλωρίνης και διάρκεια χρόνου απολύμανσης), η οποία και θα διασφάλιζε τόσο την αποφυγή των μολύνσεων, αλλά και υψηλό ποσοστό επιβίωσης των εκφύτων από αυτήν. Δοκιμάστηκαν οι μέθοδοι απολύμανσης που φαίνονται στον Πίνακα. 6.

Ο απαιτούμενος αριθμός βλαστών τοποθετούνταν σε αποστειρωμένο δοχείο που περιείχε αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό και την προβλεπόμενη συγκέντρωση χλωρίνης εμπορίου με 2-3 σταγόνες της προσκολλητικής ουσίας Tween-20. Αναδεύονταν για τον προβλεπόμενο χρόνο και μετά γίνονταν 3 ξεπλύματα των 3 min με αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό.

Πριν την απολύμανση σε όλα τα πειράματα προηγήθηκαν οι εξής εργασίες. Αρχικά τα κομμάτια βλαστού (μήκους 5-6 cm), πλένονταν με κοινό υγρό απορρυπαντικό και ξεπλένονταν καλά με νερό βρύσης, με σκοπό την απομάκρυνση όσο το δυνατόν περισσότερων ρύπων πάνω από τους βλαστούς. Στη συνέχεια οι υπόλοιπες εργασίες πραγματοποιούνταν εντός της τράπεζας νηματικής ροής (laminar flow cabinet), υπό ασηπτικές συνθήκες.

2.2.5.1. Απολύμανση 1^{ου} πειράματος τον Νοέμβριο στις 8/11/06

Στην πρώτη καλλιέργεια βλαστοί μήκους 5-6 cm εμβαπτίστηκαν σε καθαρή αιθυλική αλκοόλη για 30 sec. Στη συνέχεια οι βλαστοί τοποθετήθηκαν σε δοχείο 100 ml με αποστειρωμένο, απεσταγμένο νερό που περιείχε 10% χλωρίνη μαζί με 2-3 σταγόνες Tween-20. Οι βλαστοί παρέμειναν στο δοχείο για 15 min υπό συνεχή ανάδευση. Ακολούθησαν τρία ξεπλύματα με απεσταγμένο, αποστειρωμένο νερό (3 min ανακίνηση στο κάθε ξέπλυμα). Από τους βλαστούς κόπηκαν και χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα κορυφής και μέσης που τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα MS με 0, 0.5 και 1 mg/l BA (αποτέλεσμα §3.2.1.).

2.2.5.2. Απολύμανση 2^{ου} πειράματος τον Νοέμβριο στις 16/11/06

Στην δεύτερη καλλιέργεια επειδή οι μολύνσεις στην πρώτη άγγιξαν το 100% αυξήθηκε η συγκέντρωση της χλωρίνης στο 15%. Βλαστοί μήκους 5-6 cm εμβαπτίστηκαν σε καθαρή αιθυλική αλκοόλη για 30 sec. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε δοχείο 100 ml με αποστειρωμένο, απεσταγμένο νερό που περιείχε 15% χλωρίνη μαζί με 2-3 σταγόνες Tween-20, υπό συνεχή ανάδευση για 15 min. Ακολούθησαν τρία ξεπλύματα με απεσταγμένο, αποστειρωμένο νερό (3 min ανακίνηση στο κάθε ξέπλυμα). Από τους βλαστούς κόπηκαν και χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα κορυφής και μέσης που τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα MS με 0, 0.5 και 1 mg/l BA (Αποτέλεσμα § 3.2.2.).

2.2.5.3. Απολύμανση 3^{ου} πειράματος τον Νοέμβριο στις 20/11/06

Στη συνέχεια επειδή το ποσοστό των μολύνσεων παρέμενε αρκετά υψηλό, αυξήθηκαν, ο χρόνος παραμονής των βλαστών στην αιθυλική αλκοόλη, η συγκέντρωση χλωρίνης στο υδατικό διάλυμα και ο χρόνος παραμονής των βλαστών σε αυτό. Το χρονικό διάστημα της εμβάπτισης στην αιθυλική αλκοόλη αυξήθηκε στο 1 min. Η συγκέντρωση της χλωρίνης αυξήθηκε στο 30% και το χρονικό διάστημα παραμονής των βλαστών σε αυτό στα 20 min, (προσθέτονταν 2-3 σταγόνες Tween-20). Ακολούθησαν τρία ξεπλύματα με αποστειρωμένο, απεσταγμένο νερό (3 min ανακίνηση στο κάθε ξέπλυμα). Από τους βλαστούς κόπηκαν και χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα κορυφής και μέσης που τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα MS χωρίς BA (Αποτέλεσμα § 3.2.3.).

2.2.5.4. Απολύμανση 4^{ου} πειράματος το Δεκέμβριο στις 4/12/06

Στο πείραμα αυτό μειώθηκε το χρονικό διάστημα της εμβάπτισης στην αιθυλική αλκοόλη σε 30 sec. Η συγκέντρωση της χλωρίνης παρέμεινε στο 30%, ενώ το χρονικό διάστημα που παρέμειναν μέσα στο διάλυμα της χλωρίνης οι βλαστοί, μειώθηκε στα 15 min. Στη συνέχεια οι βλαστοί ξεπλύθηκαν 3 φορές με απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό. Από τους βλαστούς κόπηκαν και χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα κορυφής και μέσης που τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα MS με 0, 0.5 και 1 mg/l BA (Αποτέλεσμα § 3.2.4.). .

2.2.5.5. Απολύμανση 5^{ου} πειράματος το Δεκέμβριο στις 15/12/06

Στη συνέχεια των εγκαταστάσεων των καλλιεργειών δεν έγινε χρήση αιθυλικής αλκοόλης. Στην καλλιέργεια αυτή η συγκέντρωση της χλωρίνης μειώθηκε στο 15%, μαζί με 2-3 σταγόνες Tween-20. Οι νεαροί βλαστοί παρέμειναν στο διάλυμα για 15min, υπό συνεχή ανάδευση. Ακολούθησαν τρία ξεπλύματα με αποστειρωμένο, απεσταγμένο νερό (3 min ανακίνηση στο κάθε ξέπλυμα). Από τους

βλαστούς κόπηκαν και χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα κορυφής και μέσης που τοποθετήθηκαν σε MS με 0, 0.5 και 1 mg/l BA (Αποτέλεσμα § 3.2.5.).

2.2.5.6. Απολύμανση 6^{ου} πειράματος τον Ιανουάριο στις 11/1/07

Στο πείραμα αυτό χρησιμοποιήθηκε πάλι νεαρή βλάστηση από ενήλικα αυτοφυή φυτά, χωρίς να γίνει εμφύτευση των βλαστών σε αιθυλική αλκοόλη. Οι βλαστοί τοποθετήθηκαν σε υδατικό διάλυμα 20% χλωρίνης που περιείχε 2-3 σταγόνες Tween-20 υπό συνεχή ανάδευση για 15 min. Ακολούθησαν τρία ξεπλύματα με αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό (3 min ανακίνηση στο κάθε ξέπλυμα). Χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα κορυφής και μέσης όπου τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα MS χωρίς την παρουσία φυτορρυθμιστικής ουσίας (Αποτέλεσμα § 3.2.6.).

2.2.5.7. Απολύμανση 7^{ου} πειράματος το Φεβρουάριο στις 1/2/07

Για την επόμενη πειραματική δοκιμασία χρησιμοποιήθηκε το υπόστρωμα W.P.M., και πιο συγκεκριμένα με 0 και 1 mg/l BA. Δεν χρησιμοποιήθηκε αιθυλική αλκοόλη. Για την απολύμανση τοποθετήθηκαν 2-3 σταγόνες Tween20 και 20% χλωρίνη, υπό συνεχή ανάδευση για 15 min. Ακολούθησαν τρία ξεπλύματα με απεσταγμένο, αποστειρωμένο νερό (3 min ανακίνηση στο κάθε ξέπλυμα). Χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα κορυφής και μέσης, που τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα W.P.M με 0 και 1 mg/l BA (Αποτέλεσμα § 3.2.7.).

2.2.5.8. Απολύμανση 8^{ου} πειράματος το Φεβρουάριο στις 21/2/07

Στο πείραμα αυτό επαναλήφθηκε η διαδικασία απολύμανσης του προηγούμενου πειράματος. Αλλά τοποθετήθηκε σε κάθε βάζο από ένα έκφυτο (με σκοπό τη μείωση των μολύνσεων) και σε υποστρώμα W.P.M. χωρίς την παρουσία φυτορρυθμιστικής ουσίας. Χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα κορυφής (Αποτέλεσμα § 3.2.8.).

2.2.5.9. Απολύμανση 9^{ου} πειράματος το Φεβρουάριο στις 26/2/07

Στο πείραμα αυτό η διαδικασία απολύμανσης είχε ως εξής: Χρησιμοποιήθηκαν νεαροί βλαστοί όπου τοποθετήθηκαν σε 2 φιάλες με απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό, μέσα στις οποίες τοποθετήθηκαν 2-3 σταγόνες Tween και 20% χλωρίνη. Οι νεαροί βλαστοί έμειναν στο υδατικό διάλυμα χλωρίνης για 15 min. Ακολούθησαν τρία ξεπλύματα με απεσταγμένο, αποστειρωμένο νερό (3 min ανακίνηση στο κάθε ξέπλυμα). Χρησιμοποιήθηκαν μόνο έκφυτα κορυφής σε κάθε δοχείο καλλιέργειας, σε υπόστρωμα W.P.M. με 1 mg/l BA (Αποτέλεσμα § 3.2.9.).

2.2.5.10. Απολύμανση 10^{ου} και 11^{ου} πειράματος το Μάρτιο στις 3/5/07 και στις 4/5/07

Στα δύο αυτά πειράματα συγκρίθηκαν τα δύο (2) υποστρώματα που έχουν χρησιμοποιηθεί σε όλα τα προηγούμενα πειράματα. Το υπόστρωμα MS (με 0, 0.5 και 1 mg/l BA) και το υπόστρωμα W.P.M. (με 0 και 1 mg/l BA). Και στα δύο πειράματα η διαδικασία απολύμανσης ήταν απολύτως ίδια. Νεαροί βλαστοί πλύθηκαν με κοινό υγρό απορρυπαντικό, χωρίς να γίνει χρήση αιθυλικής αλκοόλης. Για την απολύμανση χρησιμοποιήθηκαν συνολικά 4 φιάλες με απεσταγμένο και αποστειρωμένο νερό, 2 φιάλες για το MS και 2 για το υπόστρωμα του W.P.M.. Μέσα σε αυτές τοποθετήθηκαν 2-3 σταγόνες Tween-20 και 20% χλωρίνη, υπό συνεχή ανάδευση για 15 min. Ακολούθησαν τρία ξεπλύματα με απεσταγμένο, αποστειρωμένο νερό (3 min ανακίνηση στο κάθε ξέπλυμα). Χρησιμοποιήθηκαν μόνο έκφυτα κορυφής (Αποτέλεσμα § 3.2.10. και 3.2.11.).

2.2.5.11. Απολύμανση 12^{ου} πειράματος τον Ιούλιο στις 3/7/07

Σε αυτή την αρχική καλλιέργεια νεαροί βλαστοί απολυμάνθηκαν σε φιάλες όπου περιείχαν 20% χλωρίνη εμπορίου και 2-3 σταγόνες Tween-20. Παρέμειναν σε αυτό για 15 min, έπειτα ακολούθησαν τρία ξεπλύματα των εκφύτων με αποστειρωμένο,

απεσταγμένο νερό. Κόπηκαν και χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα κορυφής και μέσης, όπου τοποθετήθηκαν σε υποστώματα, MS (με 0 και 1 mg/l BA) και W.P.M. (με 0 και 1 mg/l BA) (Αποτέλεσμα § 3.2.13.).

2.2.5.12. Απολύμανση 13^{ου} πειράματος τον Αύγουστο στις 1/8/07

Σε αυτή τη διαδικασία απολύμανσης χρησιμοποιήθηκαν βλαστοί όπου ήταν λίγο ξεροί, λόγω των υψηλών θερμοκρασιών του καλοκαιριού. Τοποθετήθηκαν σε υδατικό διάλυμα όπου περιείχε 20% χλωρίνη και 2-3 σταγόνες Tween-20. Παρέμειναν σε αυτό για 15 min και ακολούθησαν τρία ξεπλύματα. Χρησιμοποιήθηκαν μόνο έκφυτα κορυφής, που τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα W.P.M. με 0 και 1 mg/l BA (Αποτέλεσμα § 3.2.14.).

2.2.6. Εγκατάσταση και επώαση εκφύτων βλαστών του *Erica manipuliflora*

Μετά την απολύμανση των βλαστών μέσα σε τράπεζα νηματικής ροής (Laminar flow cabinet), πάνω σε αποστειρωμένο πλακάκι που τακτικά καθαρίζονταν με καθαρή αιθανόλη 99% και με αποστειρωμένο νυστέρι, οι βλαστοί τεμαχίστηκαν σε έκφυτα κορυφής και μέσης, μήκους 4-5 mm. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε δοχεία καλλιέργειας (3 έκφυτα ανά δοχείο). Έπειτα τα δοχεία καλλιέργειας με τα έκφυτα τοποθετήθηκαν για επώαση σε θάλαμο σταθερών συνθηκών $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ με 16h φωτοπερίοδο υπό $37,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ fluorescent συνεχές φως

2.2.7. Υποκαλλιέργεια του *Erica manipuliflora*

Βλαστοί που προέρχονταν από το πείραμα 4/5/2007, υποκαλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα W.P.M. με 1mg/l BA. Τα έκφυτα κόβονταν όπως και στα προηγούμενα πειράματα, τρία μαζί στο κάθε βάζο καλλιέργειας και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο σταθερών συνθηκών (Αποτέλεσμα § 3.2.12.).

2.3.1. Εγκατάσταση *ex vitro* φυταρίων του *Erica manipuliflora*

Έκφυτο που προερχόταν μετά από καλλιέργεια 5 μηνών περίπου, ριζοβόλησε στο αρχικό υπόστρωμα καλλιέργειας και έγινε η εγκατάστασή του *ex vitro*. Αρχικά αφότου βγήκε από το βάζο καλλιέργειας, πλύθηκε πολύ καλά με νερό βρύσης ούτως ώστε να απομακρυνθεί από τις ρίζες του εκφύτου κάθε ίχνος του θρεπτικού υποστρώματος που περιεχόταν. Έπειτα τοποθετήθηκε σε δοχείο με αναλογία υποστρώματος 1:2 τύρφη-περλίτη. Αφού ποτίστηκε καλά το δοχείο που περιείχε το φυτάριο του *Erica manipuliflora*, τοποθετήθηκε σε θάλαμο σταθερών συνθηκών $24^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ με 16h φωτοπερίοδο υπό $37,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fluorescent συνεχές φως για 15 ημέρες. Μετά το πέρας των 15 ημερών τοποθετήθηκε στο θερμοκήπιο.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

3.1. Πείραμα απολύμανσης ιστών του *Erica manipuliflora*

Για να αποφευχθεί η μόλυνση των εκφύτων που κόβονταν από τη φύση δοκιμάστηκε η επίδραση της αιθυλικής αλκοόλης σε συνδυασμό με το χρόνο παραμονής σε διαφορετικά επίπεδα χλωρίνης υπό συνεχή ανάδευση όπως φαίνονται στον Πιν. 7. Σε όλα τα πειράματα απολύμανσης προστέθηκε η προσκολλητική ουσία Tween-20.

Πίνακας 7: Ποσοστό μόλυνσης (κόκκινο) και καμένων εκφύτων (μπλέ) μετά την επίδραση διαφορετικού χρόνου παραμονής σε αιθυλική αλκοόλη καθώς και χρόνο ανακινήσεως σε διάφορα υδατικά διαλύματα χλωρίνης.

	Περιεκτικότητα σε χλωρίνη				
	10%	15%	20%	30%	
Αιθυλική Αλκοόλη					Χρόνος Ανακινήσεως
0 sec		51.66% 48.33%	34.6% 61.22%		15 min
30 sec	100% 0%	83.33% 16.66%		10% 90%	15 min
1 min				0% 100%	20 min

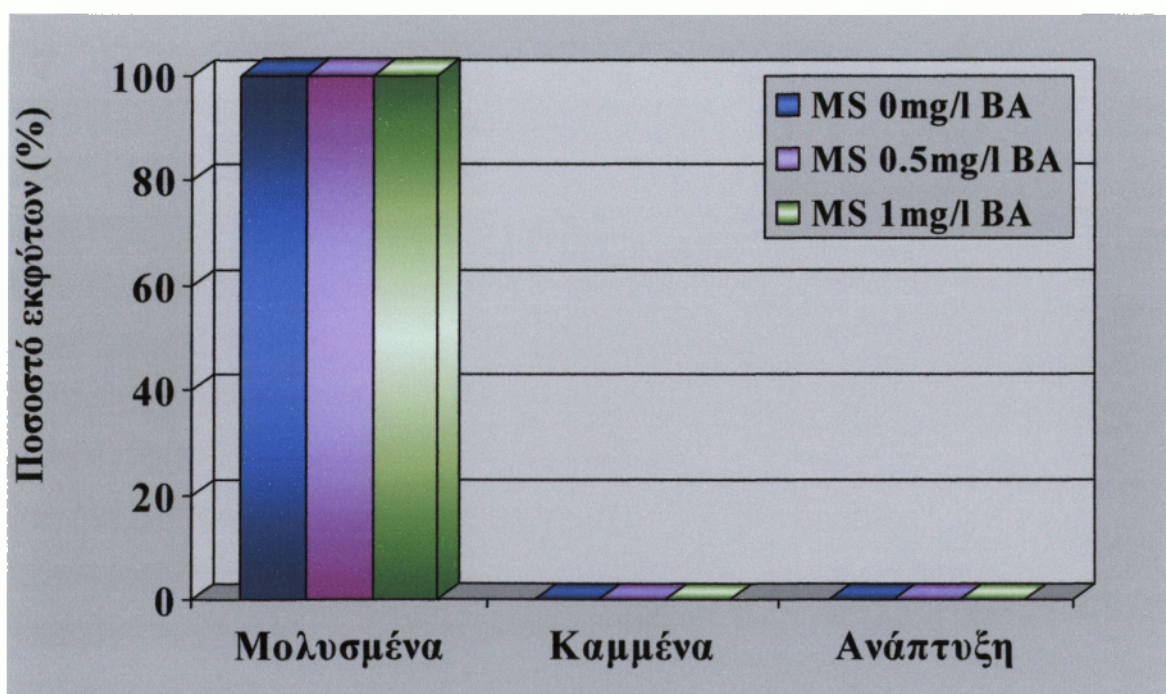
Όπως φαίνεται από τον Πίν. 7 παρατηρούμε ότι το ποσοστό μολύνσεων ήταν χαμηλό όσο αυξανόταν η συγκέντρωση της χλωρίνης. Μηδενίστηκε στην επέμβαση για 1 min στην αιθυλική αλκοόλη και ανακίνηση για 20 min σε 30% υδατικό διάλυμα χλωρίνης. Όμως, ενώ δεν παρουσιάστηκαν μολύνσεις όλα τα έκφυτα σε διάστημα 6-7 ημερών αρχικά καφέτιασαν και τελικά καταστράφηκαν.

Ο καλύτερος συνδυασμός εκφύτων που μολύνθηκαν (34.6%) και εκφύτων που κάηκαν (61.22%) φαίνεται ότι ήταν στην ανακίνηση για 15 min σε 20% υδατικό διάλυμα χλωρίνης, χωρίς τη χρήση αιθυλικής αλκοόλης.

3.2.1. Καλλιέργεια του *Erica manipuliflora* τον Νοέμβριο 8/11/06

Έκφυτα κορυφής και μέσης του *Erica manipuliflora* τοποθετήθηκαν *in vitro* σε θρεπτικό υπόστρωμα MS με 0, 0.5, και 1 mg/l BA. Μετά από καλλιέργεια 4 ημερών σε θάλαμο σταθερών συνθηκών παρατηρήθηκε μόλυνση όλων των εκφύτων (Σχήμα 1). Το ποσοστό της μόλυνσης συμπεραίνουμε ότι προήλθε από τη μικρή περιεκτικότητα χλωρίνης στο υδατικό διάλυμα της απολύμανσης (10%). (Μέθοδος § 2.2.5.1.).

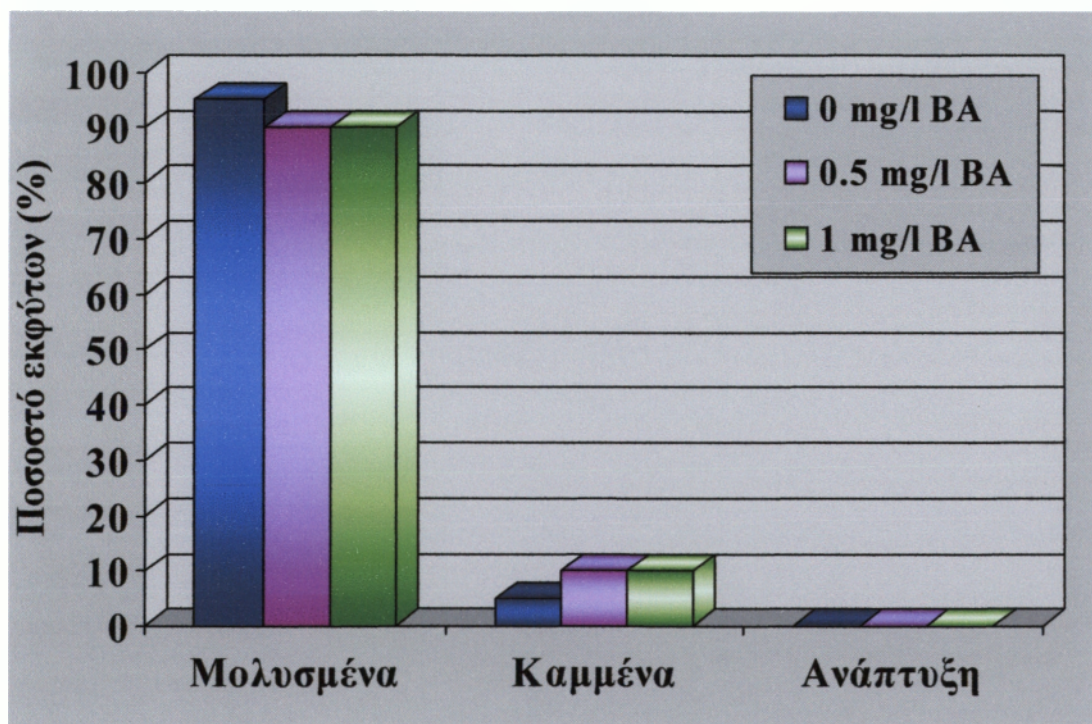
Σχήμα 1. : Ποσοστό μολύνσεων εκφύτων του *Erica manipuliflora* κατά την *in vitro* εγκατάσταση σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα MS με 0, 0.5, και 1 mg/l BA. n = 40.



3.2.2. Καλλιέργεια του *Erica manipuliflora* τον Νοέμβριο 16/11/06

Αρχικά έκφυτα κορυφής και μέσης του *Erica manipuliflora* τοποθετήθηκαν *in vitro* σε θρεπτικό υπόστρωμα MS με 0, 0.5 και 1 mg/l BA. Μετά από καλλιέργεια 2-3 ημερών σε θάλαμο σταθερών συνθηκών, παρατηρήθηκε μόλυνση των εκφύτων 90%, 80% και 80% στα αντίστοιχα υποστρώματα. Τα έκφυτα που απέμειναν καφέτιασαν γρήγορα και έπειτα κάηκαν εντός 7 ημερών (Σχήμα 2.). Παρόλο που η περιεκτικότητα χλωρίνης στο υδατικό διάλυμα αυξήθηκε 5%, οι μολύνσεις των εκφύτων παρέμειναν σε υψηλά επίπεδα. (Μέθοδος § 2.2.5.2.).

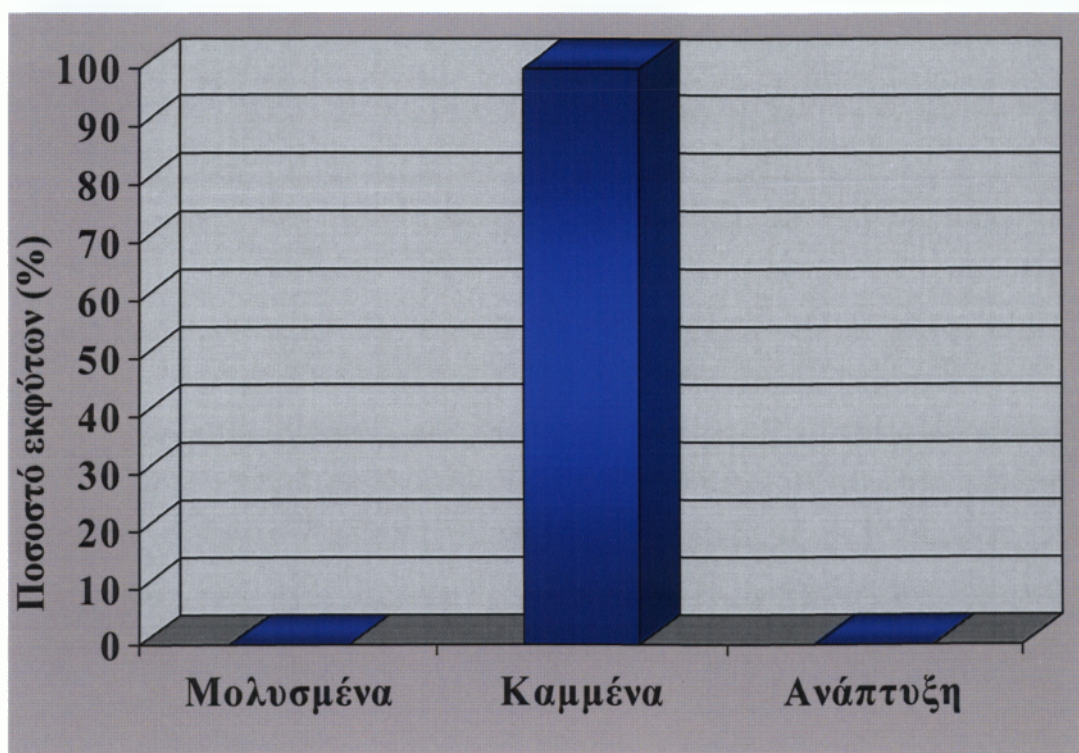
Σχήμα 2. : Ποσοστό εκφύτων του *Erica manipuliflora* που μολύνθηκαν, κάηκαν ή αναπτύχθηκαν κατά την *in vitro* καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα MS με 0, 0.5 και 1 mg/l BA. n = 40.

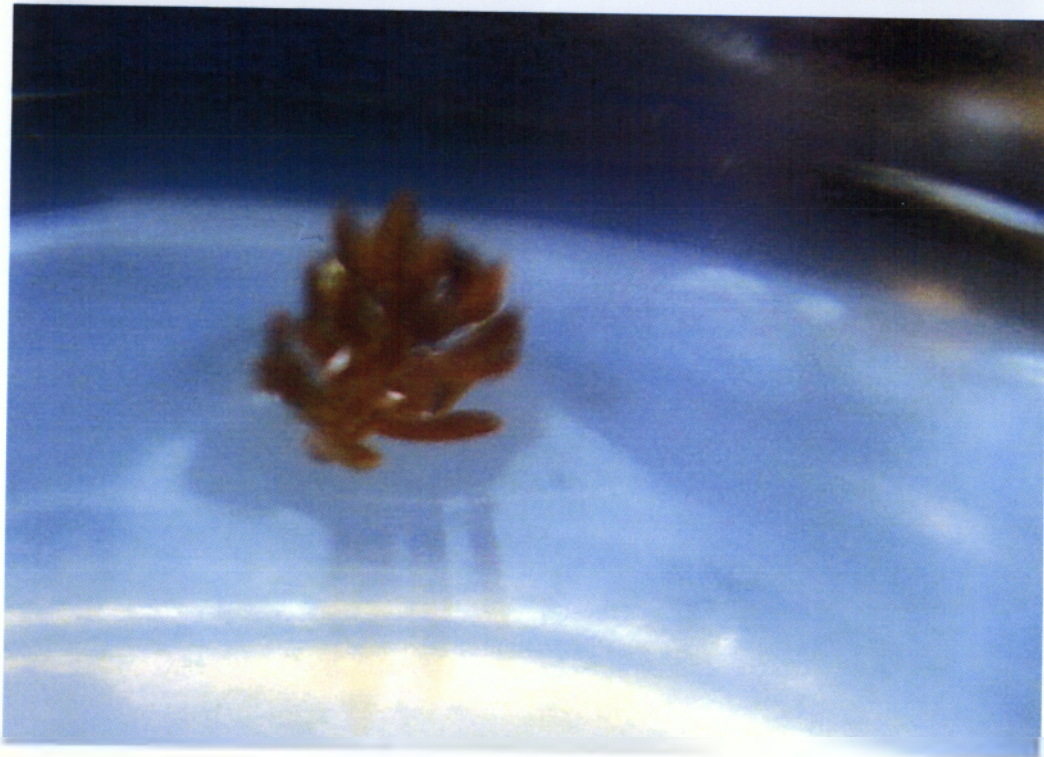
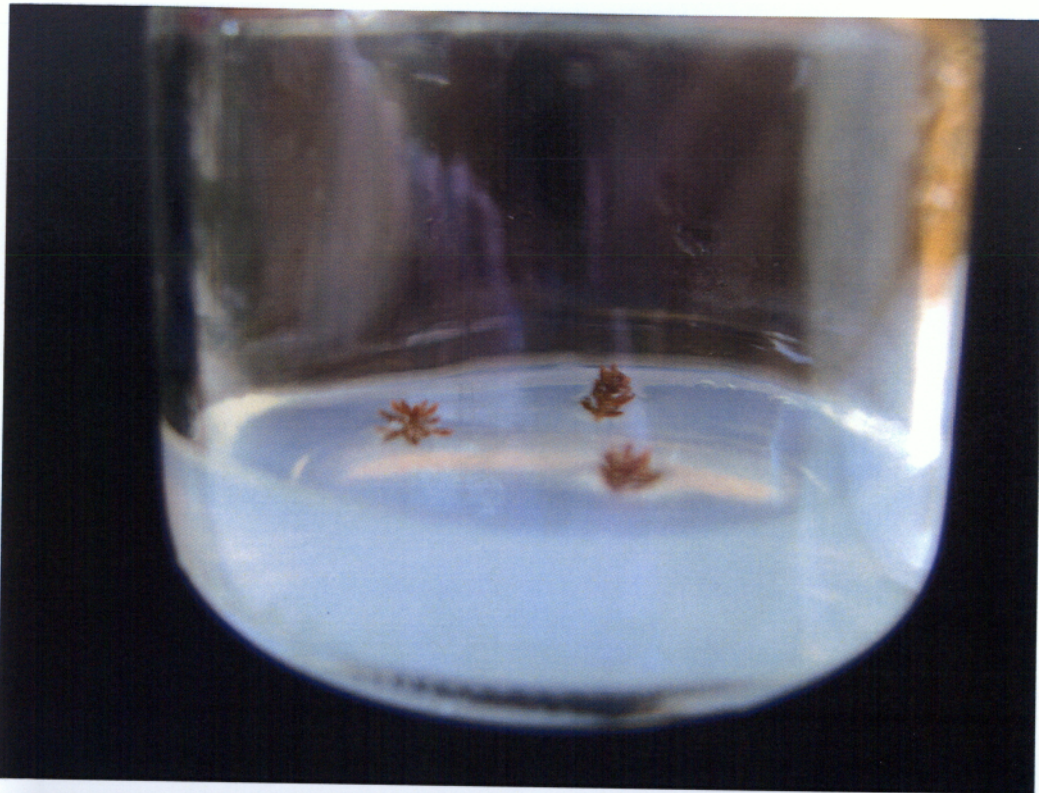


3.2.3. Καλλιέργεια του *Erica manipuliflora* τον Νοέμβριο 20/11/06

Εφόσον το ποσοστό μολύνσεων του προηγούμενου πειράματος ήταν τόσο μεγάλο, το επόμενο πείραμα πραγματοποιήθηκε 4 ημέρες αργότερα. Χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα κορυφής και μέσης του *Erica manipuliflora* που τοποθετήθηκαν *in vitro* σε θρεπτικό υπόστρωμα MS με 0 mg/l BA. Μετά από καλλιέργεια 7 ημερών σε θάλαμο σταθερών συνθηκών παρατηρήθηκε κάψιμο όλων των εκφύτων (Σχήμα 3., Εικ. 9,10). Πιθανή αιτία αυτού του αποτελέσματος ήταν η παραμονή των βλαστών για 1 min σε καθαρή αιθυλική αλκοόλη και η ανακίνησή τους για 20 min σε υδατικό διάλυμα που περιείχε 30% χλωρίνη. (Μέθοδος § 2.2.5.3.).

Σχήμα 3. : Ποσοστό εκφύτων του *Erica manipuliflora* που μολύνθηκαν, κάηκαν ή αναπτύχθηκαν κατά την *in vitro* καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα MS με 0 mg/l BA. n = 40.



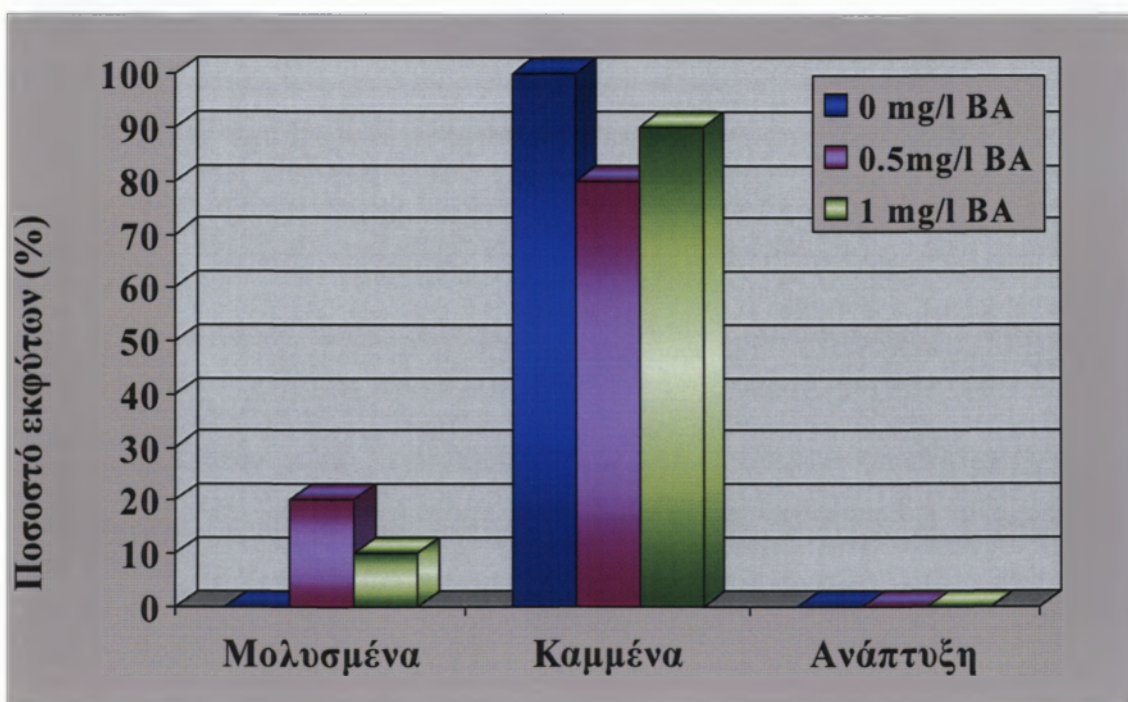


Εικ. 9 και 10: Καφετιασμένα έκφυτα του *E. manipuliflora*

3.2.4. Καλλιέργεια του *Erica manipuliflora* τον Δεκέμβριο 4/12/06

Ένα δεκαπενθήμερο μετά από την προηγούμενη καλλιέργεια τοποθετήθηκαν έκφυτα κορυφής και μέσης του *Erica manipuliflora in vitro* σε θρεπτικό υπόστρωμα MS με 0, 0.5 και 1 mg/l BA. Μετά από καλλιέργεια λίγων ημερών σε θάλαμο σταθερών συνθηκών, παρατηρήθηκε μόλυνση των εκφύτων κατά 0%, 20% και 10% στα αντίστοιχα υποστρώματα. Τα έκφυτα που απέμειναν σε χρονικό διάστημα 7 ημερών κάηκαν. Σε σύγκριση με την προηγούμενη καλλιέργεια η συγκέντρωση της χλωρίνης που περιέχονταν στο υδατικό διάλυμα παρέμεινε ίδια, μειώθηκε όμως η διάρκεια εμβάπτισης στην αλκοόλη των βλαστών στο μισό και επίσης μειώθηκε και ο χρόνος παραμονής τους στο υδατικό διάλυμα χλωρίνης κατά 5 min, (δηλαδή στα 15 min). Παρόλα αυτά όμως το αποτέλεσμα ήταν το άμεσο κάψιμο των εκφύτων (Σχήμα 4.). (Μέθοδος § 2.2.5.4.).

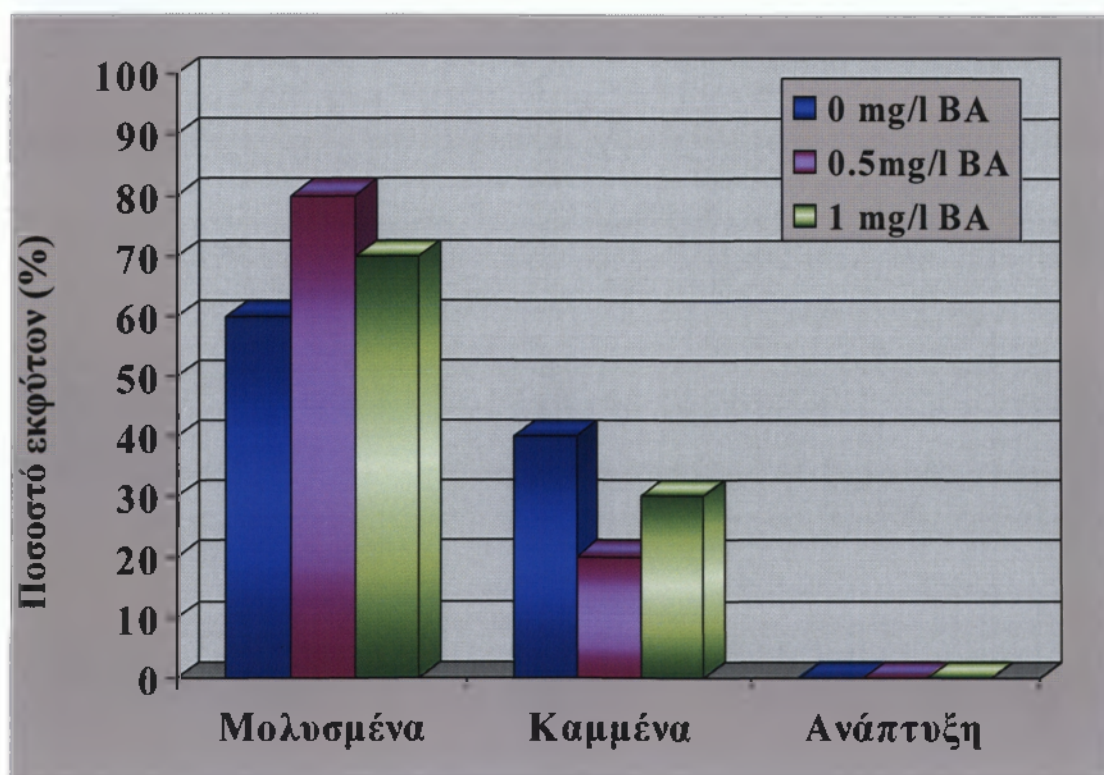
Σχήμα 4. : Ποσοστό εκφύτων του *Erica manipuliflora* που μολύνθηκαν, κάηκαν ή αναπτύχθηκαν κατά την *in vitro* καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα MS με 0, 0.5 και 1 mg/l BA. n = 30.



3.2.5. Καλλιέργεια του *Erica manipuliflora* τον Δεκέμβριο 15/12/06

Έκφυτα κορυφής και μέσης του *Erica manipuliflora* τοποθετήθηκαν *in vitro* σε θρεπτικό υπόστρωμα MS με 0, 0.5 και 1 mg/l BA, 10 ημέρες αργότερα από την προηγούμενη καλλιέργεια. Μετά από καλλιέργεια 4 ημερών σε θάλαμο σταθερών συνθηκών παρατηρήθηκε μόλυνση των εκφύτων κατά 60%, 80% και 70% αντίστοιχα. Το υπόλοιπο ποσοστό που απέμεινε μετά από καλλιέργεια 20 ημερών παρατηρήθηκε ότι είχε καεί (Σχήμα 5.). Η περιεκτικότητα του χλωρίου στο υδατικό διάλυμα της απολύμανσης ήταν 15% και δεν χρησιμοποιήθηκε αιθυλική αλκοόλη. Η μεν χαμηλή συγκέντρωση χλωρίου συντέλεσε στις αυξημένες μολύνσεις, αλλά και το γεγονός ότι δεν χρησιμοποιήθηκε αιθυλική αλκοόλη οδήγησε στη μη καταστροφή των φυτών και αυτό γιατί όλες τις προηγούμενες φορές που γινόταν χρήση αιθυλικής αλκοόλης τα έκφυτα καίγονταν εντός 7 ημερών. (Μέθοδος § 2.2.5.5.).

Σχήμα 5. : Ποσοστό εκφύτων του *Erica manipuliflora* που μολύνθηκαν, κήκαν ή αναπτύχθηκαν κατά την *in vitro* καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα MS με 0, 0.5 και 1 mg/l BA. n = 30.



3.2.6. Καλλιέργεια του *Erica manipuliflora* τον Ιανουάριο 11/1/07

Έκφυτα κορυφής και μέσης του *Erica manipuliflora* τοποθετήθηκαν *in vitro* σε θρεπτικό υπόστρωμα MS με 0 mg/l BA. Μετά από καλλιέργεια 4 ημερών σε θάλαμο σταθερών συνθηκών παρατηρήθηκε μόλυνση 33.33% των εκφύτων. Το υπόλοιπο ποσοστό που απέμεινε (66.66%) μετά από καλλιέργεια 20 ημερών παρατηρήθηκε ότι είχε καεί (Σχήμα 6.). Παρόλο που η διαδικασία απολύμανσης ήταν ακριβώς ίδια, ο λόγος που οι μολύνσεις σε σύγκριση με την προηγούμενη καλλιέργεια δεν ήταν τόσο υψηλές ίσως να οφείλεται στο γεγονός ότι στο υδατικό διάλυμα της απολύμανσης εμβαπτίστηκαν πολύ λιγότεροι βλαστοί. (Μέθοδος § 2.2.5.6.).

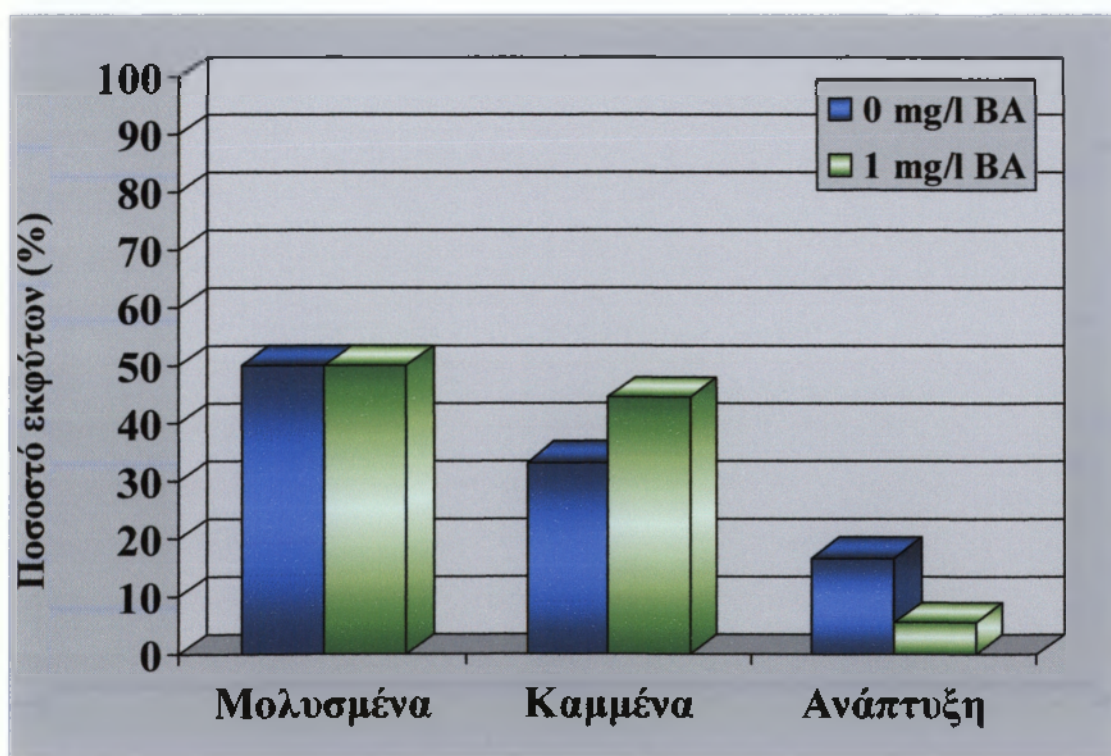
Σχήμα 6. : Ποσοστό εκφύτων του *Erica manipuliflora* που μολύνθηκαν, κάηκαν ή αναπτύχθηκαν κατά την *in vitro* καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα MS με 0 mg/l BA. n = 18.

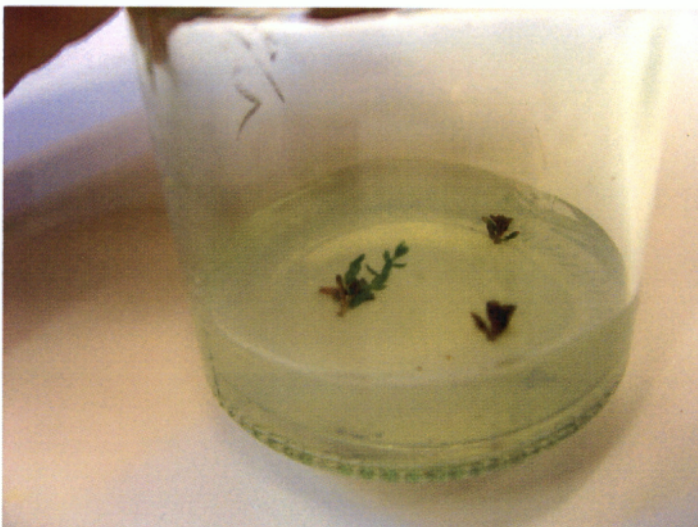


3.2.7. Καλλιέργεια του *Erica manipuliflora* το Φεβρουάριο 1/2/07

Μετά από 5 συνεχόμενες προσπάθειες καλλιέργειας με θρεπτικό υπόστρωμα MS χωρίς έκπτυξη βλαστών, από τους βλαστούς χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα κορυφής και μέσης του *Erica manipuliflora* που όμως τοποθετήθηκαν *in vitro* σε θρεπτικό υπόστρωμα W.P.M. με 0 και 1 mg/l BA. Μετά από καλλιέργεια 4 ημερών σε θάλαμο σταθερών συνθηκών παρατηρήθηκε μόλυνση 50% των εκφύτων και στα δύο υποστρώματα. Ποσοστό της τάξεως των 33.33% και 44.44% αντίστοιχα κάηκε και το υπόλοιπο 16.66% και 5.55% αντίστοιχα αναπτύχθηκε εντός 8 ημερών (Σχήμα 7., Εικ. 11,12,13). Μεγάλο ποσοστό εκφύτων ενώ αρχικά αναπτύχθηκαν μετά από διάστημα 3 περίπου εβδομάδων καφέτιασαν και σταμάτησαν την ανάπτυξή τους (Εικ. 14,15). (Μέθοδος § 2.2.5.7.).

Σχήμα 7. : Ποσοστό εκφύτων του *Erica manipuliflora* που μολύνθηκαν, κάηκαν ή αναπτύχθηκαν κατά την *in vitro* καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα W.P.M. με 0 και 1 mg/l BA. n = 10.





Εικόνα 11, 12 και 13: Έκφυτα που μετά από καλλιέργεια κάποιων ημερών παρουσίασαν ανάπτυξη.

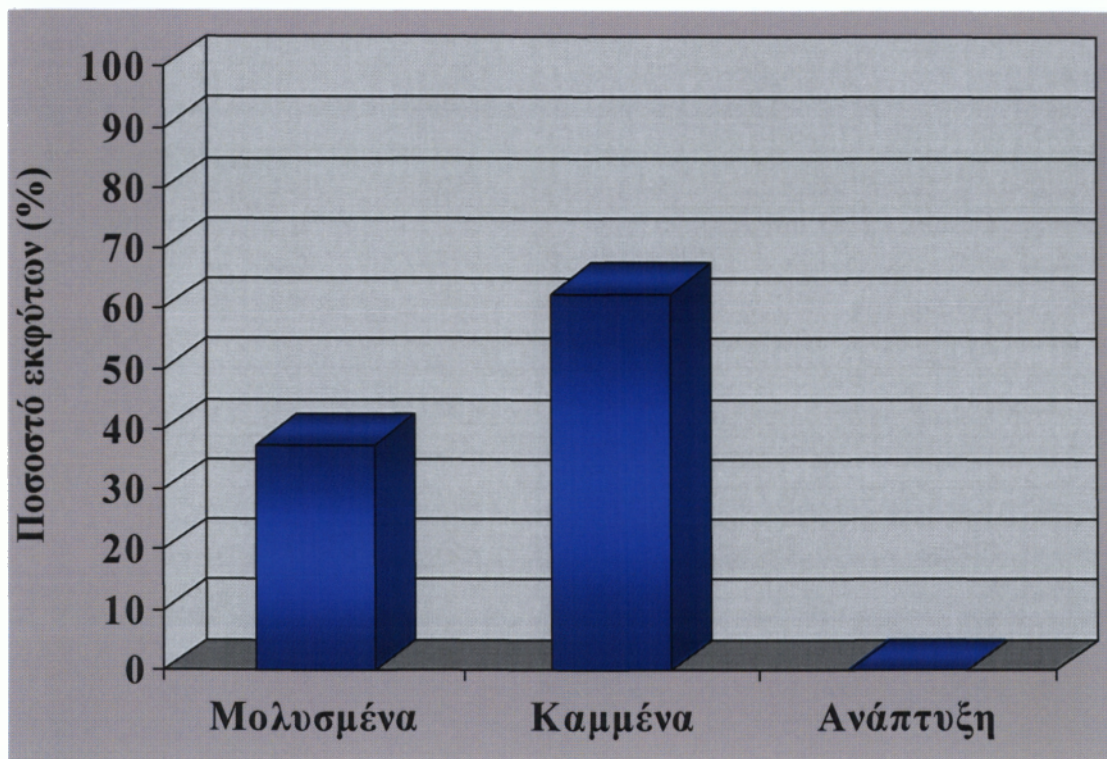


Εικόνα 14,15. Έκφυτα του *Erica manipuliiflora* που αναπτύχθηκαν και έπειτα αρχικά καφέτιασαν.

3.2.8. Καλλιέργεια του *Erica manipuliflora* το Φεβρουάριο 21/2/07

Έκφυτα κορυφής του *Erica manipuliflora* τοποθετήθηκαν *in vitro* σε θρεπτικό υπόστρωμα W.P.M. χωρίς τη χρήση φυτορρυθμιστικής ουσίας. Μετά από καλλιέργεια 4 ημερών σε θάλαμο σταθερών συνθηκών παρατηρήθηκε μόλυνση 37.5% των εκφύτων. Το υπόλοιπο ποσοστό (62.5%) των εκφύτων που απέμειναν, αν και είχε παρατηρηθεί μια μικρή ανάπτυξη των μεσογονατίων διαστημάτων, μετά από καλλιέργεια 20-25 ημερών εμφανίστηκαν καμμένα (Σχήμα 8.). (Μέθοδος § 2.2.5.8.).

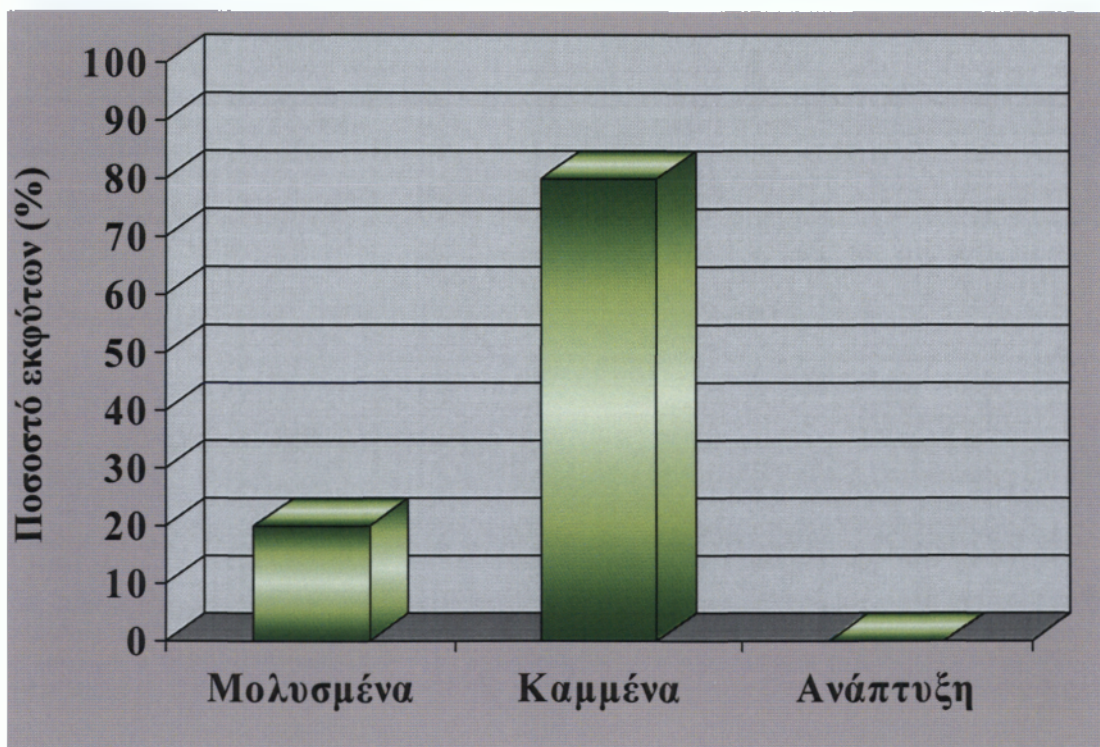
Σχήμα 8. : Ποσοστό εκφύτων του *Erica manipuliflora* που μολύνθηκαν, κάηκαν ή αναπτύχθηκαν κατά την *in vitro* καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα W.P.M. με 0 mg/l BA. n = 8.



3.2.9. Καλλιέργεια του *Erica manipuliflora* το Φεβρουάριο 26/2/07

Μετά την πάροδο 5 ημερών από την προηγούμενη καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα κορυφής και μέσης του *Erica manipuliflora* που τοποθετήθηκαν *in vitro* σε θρεπτικό υπόστρωμα W.P.M. 1 mg/l BA. Πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία απολύμανσης, που χρησιμοποιήθηκε και στην προηγούμενη πειραματική διαδικασία. Μετά από καλλιέργεια 4 ημερών σε θάλαμο σταθερών συνθηκών παρατηρήθηκε μόλυνση 20% των εκφύτων. Το υπόλοιπο ποσοστό (80%) των εκφύτων που απέμεινε μετά από καλλιέργεια 20 ημερών παρατηρήθηκε ότι είχε καεί, προηγουμένως όμως κάποια από τα έκφυτα αυτά, είχαν μικρή επιμήκυνση των μεσογονατίων διαστημάτων (Σχήμα 9.). (Μέθοδος § 2.2.5.9.).

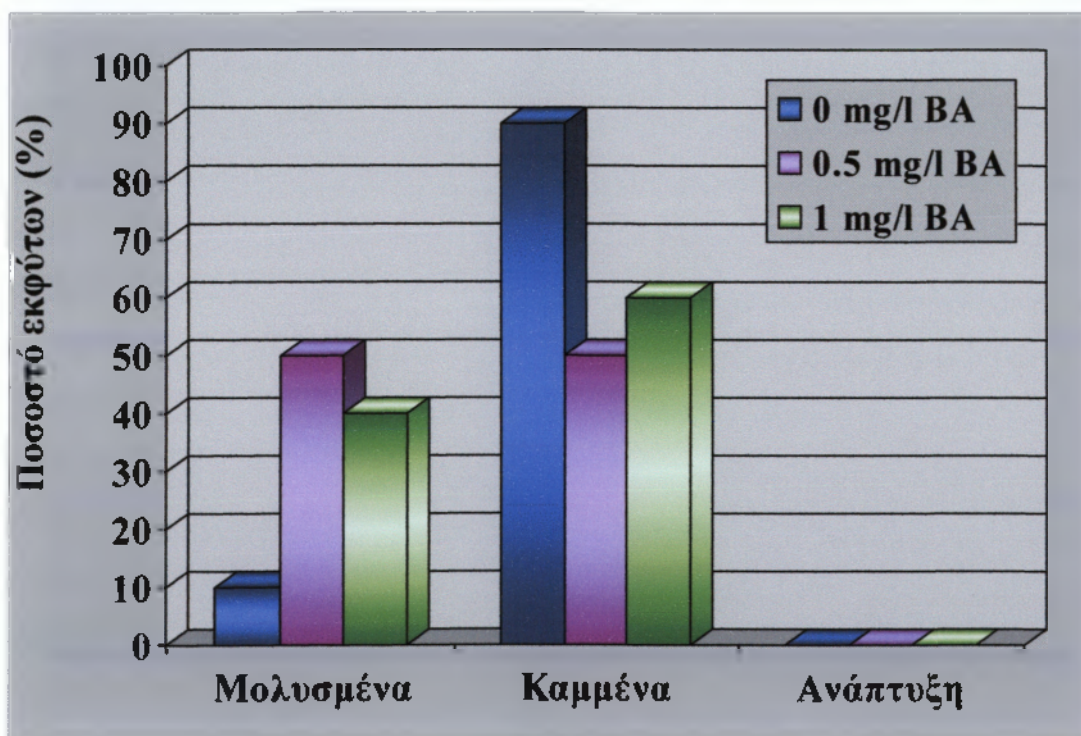
Σχήμα 9. : Ποσοστό εκφύτων του *Erica manipuliflora* που μολύνθηκαν, κάηκαν ή αναπτύχθηκαν κατά την *in vitro* καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα W.P.M. με 1 mg/l BA. n = 40.



3.2.10. Καλλιέργεια του *Erica manipuliflora* το Μάιο 3/5/07

Έκφυτα κορυφής και μέσης του *Erica manipuliflora* τοποθετήθηκαν *in vitro* σε θρεπτικό υπόστρωμα MS με 0, 0.5 και 1 mg/l BA. Μετά από καλλιέργεια 4 ημερών σε θάλαμο σταθερών συνθηκών παρατηρήθηκε μόλυνση 10%, 50% και 40% των εκφύτων. Το υπόλοιπο ποσοστό των εκφύτων που απέμεινε (90%, 50% και 60%) μετά από καλλιέργεια 20 ημερών παρατηρήθηκε ότι είχαν καεί. Πρώτη φορά μετά τη χρησιμοποίηση αυτού του θρεπτικού υποστρώματος παρατηρήθηκε πολύ μικρή επιμήκυνση μεσογονατίων διαστημάτων των εκφύτων, έστω και αν μετά από κάποιες ημέρες παρατηρήθηκε το κάψιμο αυτών (Σχήμα 10.). (Μέθοδος § 2.2.5.10.).

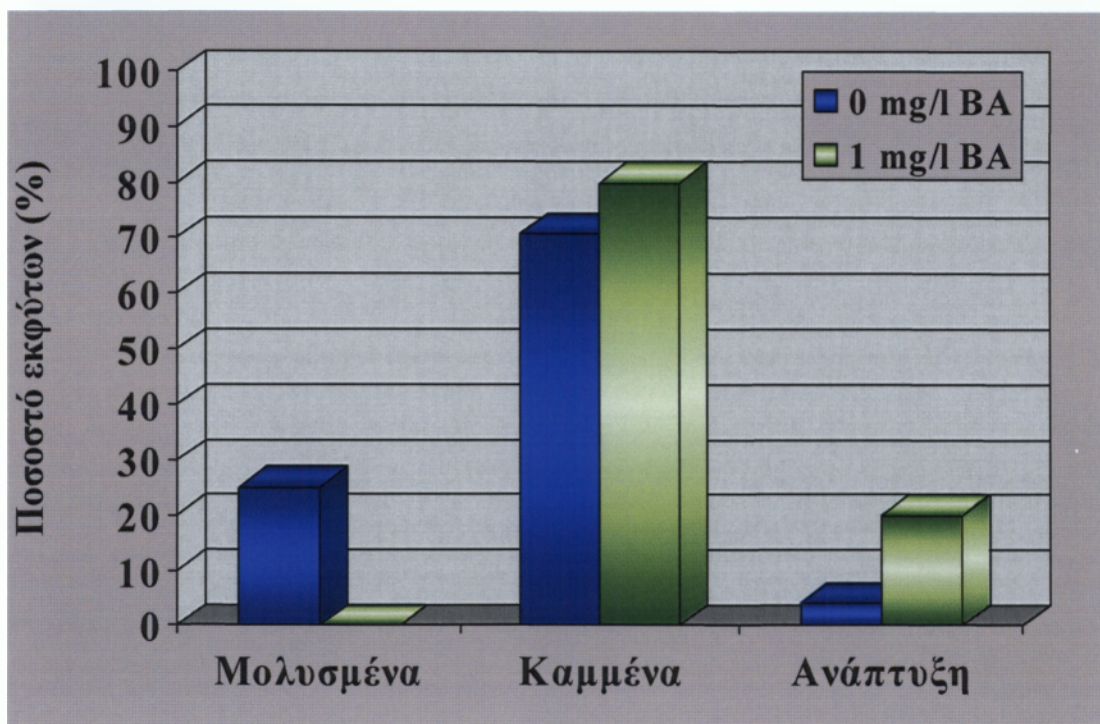
Σχήμα 10. : Ποσοστό εκφύτων του *Erica manipuliflora* που μολύνθηκαν, καήκαν ή αναπτύχθηκαν κατά την *in vitro* καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα MS με 0, 0.5 και 1 mg/l BA. n = 30.



3.2.11. Καλλιέργεια του *Erica manipuliflora* το Μάιο 4/5/07

Την επόμενη ημέρα χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα κορυφής και μέσης του *Erica manipuliflora* τοποθετήθηκαν *in vitro* με την ίδια διαδικασία απολύμανσης, σε θρεπτικό υπόστρωμα W.P.M. με 0 και 1 mg/l BA. Μετά από καλλιέργεια 4 ημερών σε θάλαμο σταθερών συνθηκών παρατηρήθηκε μόλυνση των εκφύτων 25% και 0% στα αντίστοιχα υποστρώματα. Ποσοστό της τάξεως των 70.83% και 80% αντίστοιχα κάηκε (ενώ κάποια από αυτά είχαν αναπτυχθεί) και το υπόλοιπο 4.16% και 20% αναπτύχθηκε αντίστοιχα (Σχήμα 11.). (Μέθοδος § 2.2.5.10.).

Σχήμα 11. : Ποσοστό εκφύτων του *Erica manipuliflora* που μολύνθηκαν, κάηκαν ή αναπτύχθηκαν κατά την *in vitro* καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα W.P.M. με 0 και 1 mg/l BA. n = 30.

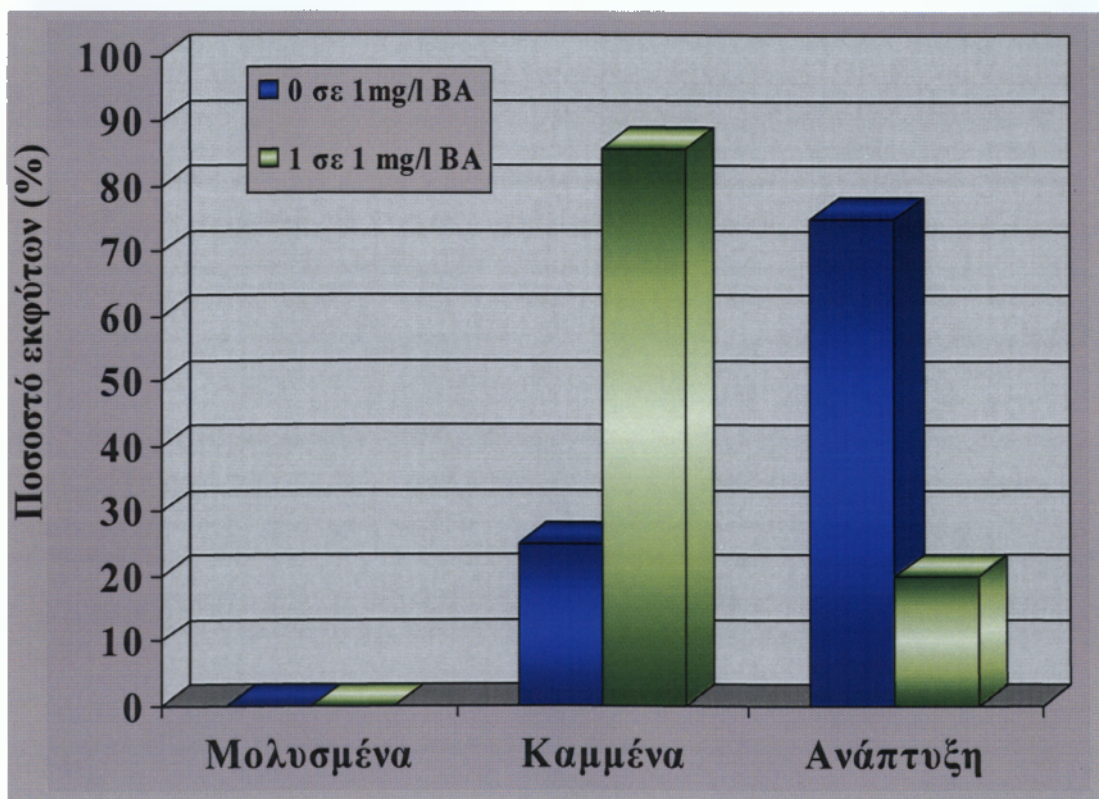


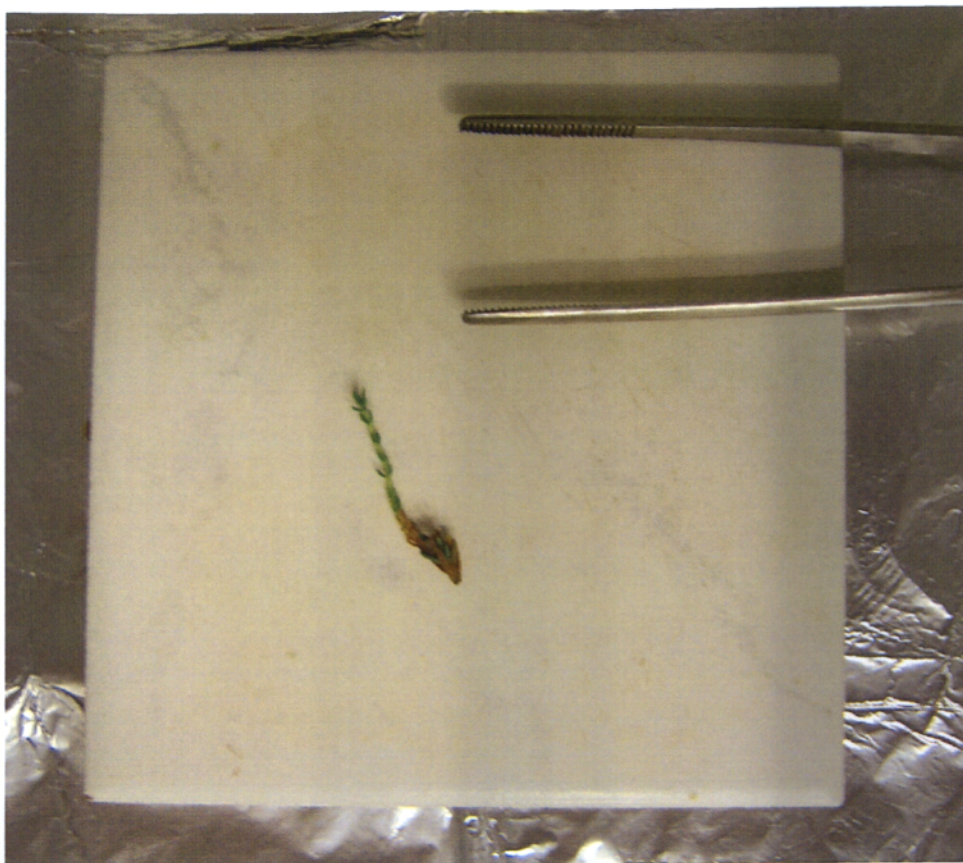
3.2.12. Υποκαλλιέργεια του *Erica manipuliiflora* τον Ιούλιο 2/7/07

Έκφυτα κορυφής και μέσης του *Erica manipuliiflora* που προέρχονται από θρεπτικό υπόστρωμα W.P.M. με 0 και 1 mg/l BA και τοποθετήθηκαν *in vitro* σε θρεπτικό υπόστρωμα W.P.M. 1 mg/l BA (Εικ. 16,17). Και στις δύο περιπτώσεις οι μολύνσεις ήταν μηδενικές (0%). Ποσοστό 25% και 85.71% των εκφύτων μετά από καλλιέργεια 20 ημερών παρατηρήθηκε ότι είχε καεί και το υπόλοιπο 75% και 14.28% σχηματίστηκαν βλαστοί. (Σχήμα 12.). (Μέθοδος § 2.2.7.).

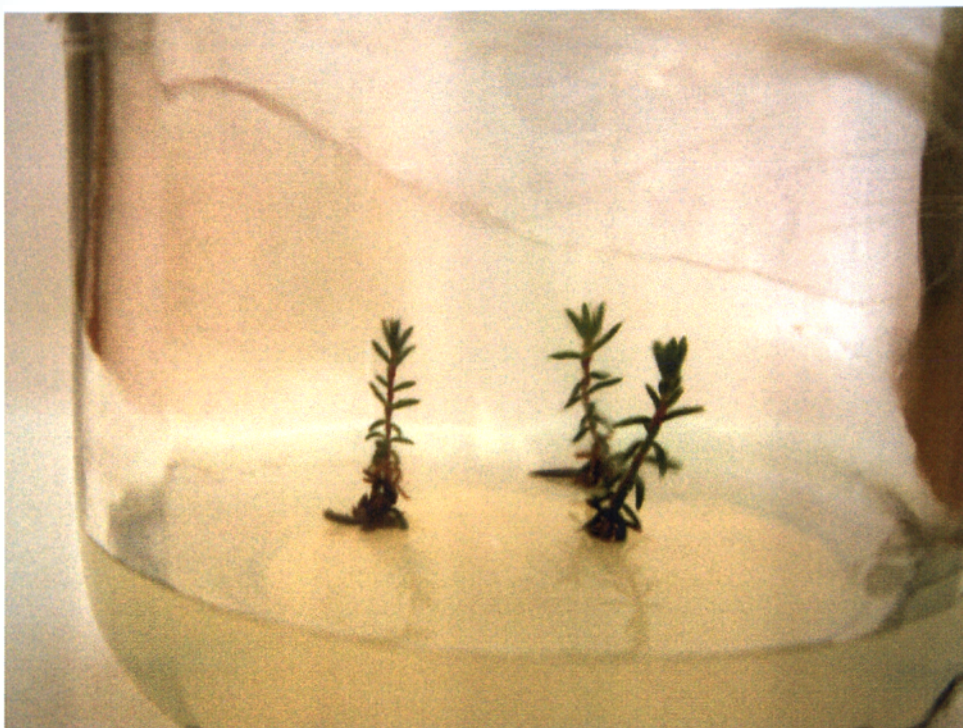
Σχήμα 12. : Ποσοστό εκφύτων του *Erica manipuliiflora* που μολύνθηκαν, κάηκαν ή αναπτύχθηκαν κατά την *in vitro* υποκαλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα W.P.M. 1 mg/l BA που προέρχονταν από υπόστρωμα W.P.M. με 0 και 1 mg/l BA.

Όπου για W.P.M. με 0 mg/l BA $n = 4$ και για 1 mg/l BA, $n = 7$.





Εικόνα 16: Αναγεννημένος βλαστός του *Erica manipuliflora* πριν την υποκαλλιέργεια.

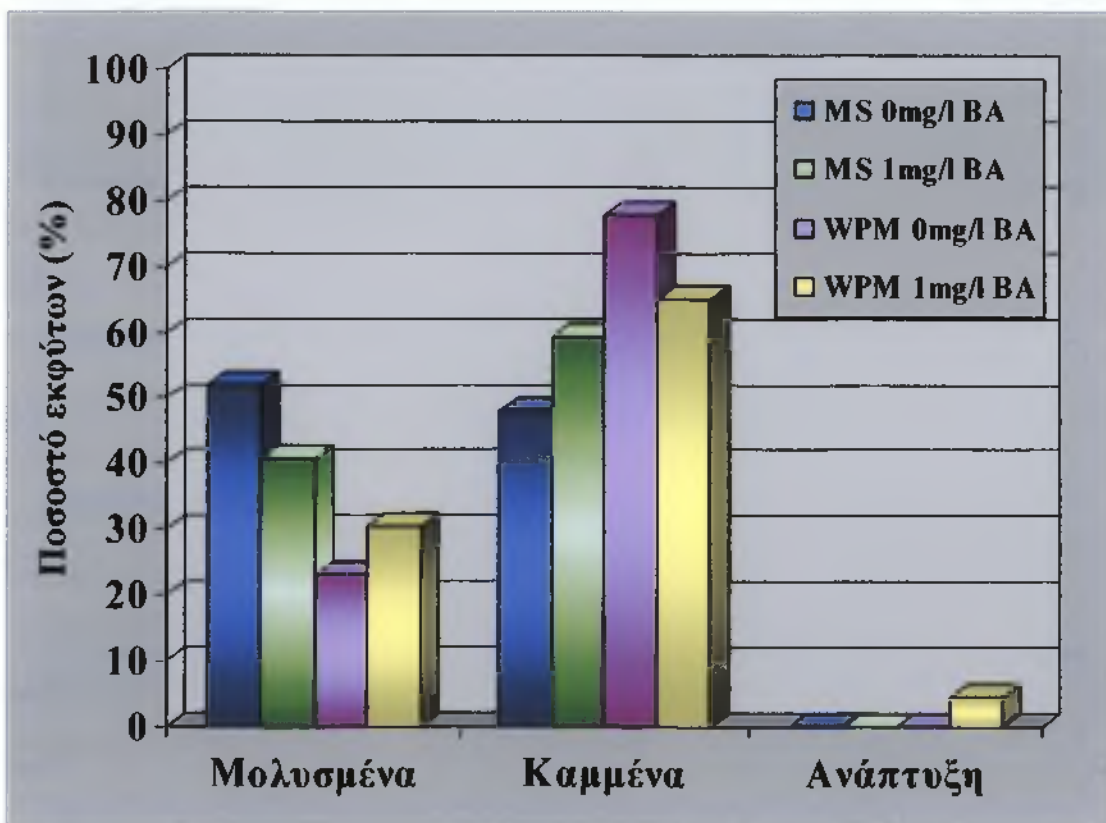


Εικόνα 17: Υποκαλλιεργούμενα έκφυτα του *Erica manipuliflora*.

3.2.13. Καλλιέργεια του *Erica manipuliflora* τον Ιούλιο 3/7/07

Έκφυτα κορυφής και μέσης του *Erica manipuliflora* τοποθετήθηκαν *in vitro* σε θρεπτικό υπόστρωμα MS και WPM με 0 και 1 mg/l BA. Μετά από καλλιέργεια 4 ημερών σε θάλαμο σταθερών συνθηκών παρατηρήθηκε μόλυνση στο MS 52% και 40,74% των εκφύτων και στο WPM 23.07% και 30.42% αντίστοιχα. Το υπόλοιπο ποσοστό που απέμεινε στο MS (48% και 59.25%) και στο WPM (77.93% και 65.21%) μετά από καλλιέργεια 20 ημερών παρατηρήθηκε ότι είχαν καεί (Σχήμα 13.). (Μέθοδος § 2.2.5.11.).

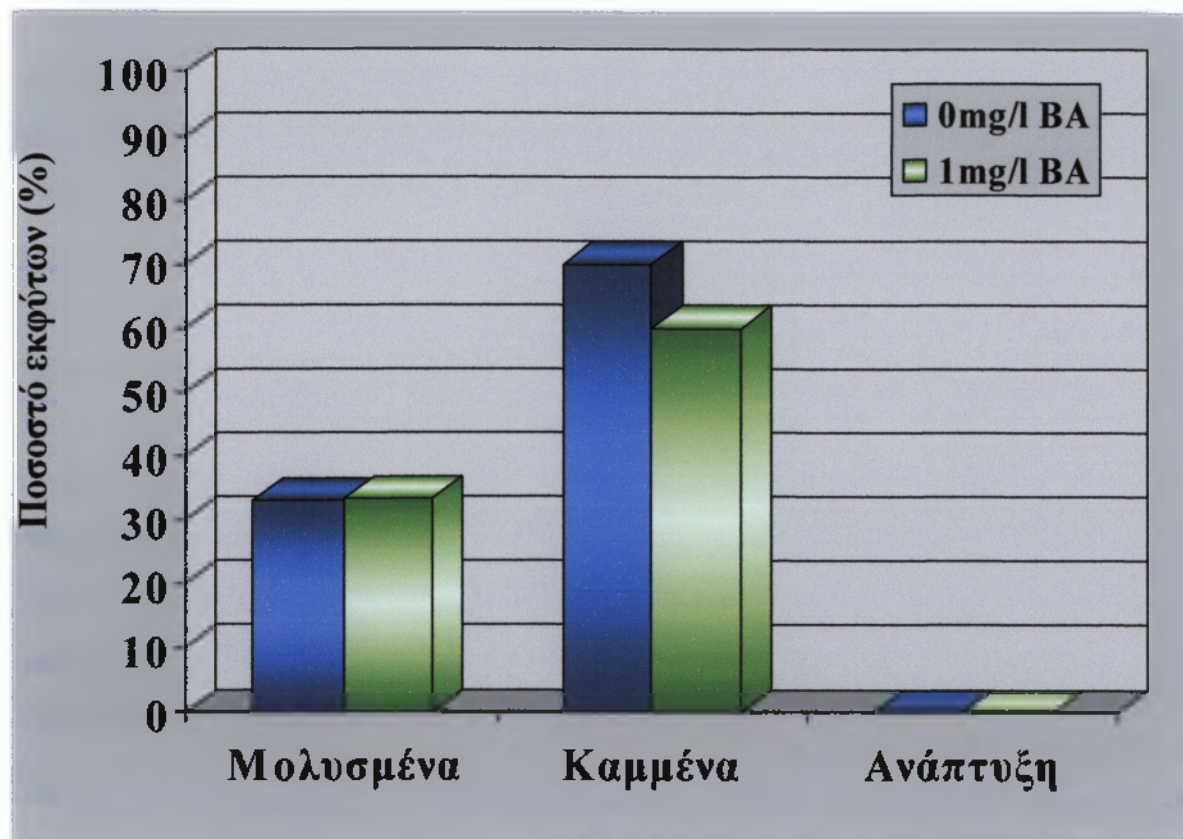
Σχήμα 13. : Ποσοστό εκφύτων του *Erica manipuliflora* που μολύνθηκαν ή κάηκαν ή αναπτύχθηκαν κατά την *in vitro* καλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα W.P.M. και MS με 0 και 1 mg/l BA και στα 2 υποστρώματα. n = 30.



3.2.14. Καλλιέργεια του *Erica manipuliflora* τον Αύγουστο 1/8/07

Έκφοντα κορυφής και μέσης του *Erica manipuliflora* τοποθετήθηκαν *in vitro* σε θρεπτικό υπόστρωμα W.P.M. με 0 και 1 mg/l BA. Μετά από καλλιέργεια 4 ημερών σε θάλαμο σταθερών συνθηκών παρατηρήθηκε μόλυνση των εκφύτων 33% και 33.33% στα αντίστοιχα υποστρώματα. Τα υπόλοιπα ποσοστά (67% και 66.66%) που απέμειναν μετά από καλλιέργεια 20 ημερών παρατηρήθηκε ότι είχαν καεί (Σχήμα 14). (Μέθοδος § 2.2.5.12.).

Σχήμα 14. : Ποσοστό εκφύτων του *Erica manipuliflora* που μολύνθηκαν, κήκων ή αναπτύχθηκαν κατά την *in vitro* υποκαλλιέργεια σε στερεό θρεπτικό υπόστρωμα W.P.M. 1 mg/l BA που προέρχονταν από υπόστρωμα W.P.M. με 0 και 1 mg/l BA.
n = 30.



3.3. *In vitro* σπορά του *Erica manipuliflora* τον Ιανουάριο

Σπόροι του *Erica manipuliflora* τοποθετήθηκαν *in vitro* σε θρεπτικό υπόστρωμα 1/2 MS, με σκοπό την παραγωγή σποροφύτων εγκατεστημένων *in vitro* που θα χρησιμοποιούνταν ως μητρικό φυτό. Μετά από 4 ημέρες σε καλλιέργεια, παρατηρήθηκε μόλυνση όλων των σπόρων.

3.4. Εγκλιματισμός του φυταρίου *Erica manipuliflora*

Έκφυτο που καλλιεργήθηκε *in vitro*, σχημάτισε στο αρχικό υπόστρωμα ρίζες. Παρατηρήθηκε επιμήκυνση των μεσογονατίων διαστημάτων με τη δημιουργία 5 κορυφαίων βλαστών και στην μετέπειτα πορεία καλλιέργειας του εκφύτου παρατηρήθηκε η δημιουργία ριζών (Εικ. 18). Είκοσι μέρες μετά ο εγκλιματισμός του φυταρίου ήταν επιτυχής(Εικ. 19).



Εικόνα 18. Έριζο φυτάριο του *Erica manipuliflora*.



Εικόνα 19. Φυτάριο του *Erica manipuliflora* για εγκατάσταση *ex vitro*.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1. Πειράματα απολύμανσης

Κατά τη διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών παρατηρήθηκαν έντονες μολύνσεις των εκφύτων. Πιθανά αίτια στα οποία οφείλονται οι εν λόγω μολύνσεις είναι:

1. Όπως έχει προαναφερθεί στα βοτανικά χαρακτηριστικά του μελετούμενου είδους (παρ. 1.1.2.), στα στελέχη του παρατηρούνται πτυχώσεις με μικρό χνούδι και λεπτώς σχισμένο φλοιό. Όπως επίσης και τα φύλλα χαρακτηρίζονται από την παρουσία ποσότητας χνούδιου. Ίσως αυτά τα ανατομικά χαρακτηριστικά να εμποδίζουν την καλή απολύμανση των βλαστών και ως συνέπεια την παρουσία μολύνσεων στα έκφυτα.
2. Μια δεύτερη αιτία που πιθανόν να προκάλεσε τις μολύνσεις, είναι το αυξημένο μικροβιακό φορτίο των μητρικών φυτών. Καθ' όλη τη διάρκεια των πειραματικών δοκιμασιών, πραγματοποιήθηκαν πολύ λίγες βροχοπτώσεις. Με αποτέλεσμα τη συσσώρευση ρύπων στο καλλιεργούμενο είδος, όπου το πλύσιμο με υγρό απορρυπαντικό και με άφθονο καθαρό νερό πριν την απολύμανση δε συντέλεσε στη μείωση των μολύνσεων.

Στην πρώτη πειραματική δοκιμασία οι μολύνσεις άγγιξαν το 100% και έπειτα από εκτεταμένες προσπάθειες για την εύρεση του καλύτερου τρόπου απολύμανσης επιτεύχθηκε ο μέσος όρος των μολυσμένων εκφύτων να μειωθεί στο 1/3 σε σύγκριση με τα αποτελέσματα που σημειώθηκαν από την πρώτη απολύμανση. Η καλύτερη μέθοδος απολύμανσης ήταν αυτή όπου στο υδατικό διάλυμα περιέχονταν 20% χλωρίνη μαζί με 2-3 σταγόνες Tween-20 και ο χρόνος παραμονής των βλαστών σε αυτό ήταν 15 min χωρίς τη χρήση αιθυλικής αλκοόλης. Η εμπάπτιση των βλαστών σε καθαρή αιθυλική αλκοόλη αποδείχθηκε ότι οδηγεί στο άμεσο και ολοκληρωτικό κάψιμο των εκφύτων. Στις μεθόδους απολύμανσης που

χρησιμοποιήθηκε αιθυλική αλκοόλη, έκφυτα που δεν είχαν μολυνθεί, καίγονταν εντός 6-7 ημερών. Αντίστοιχα σε μέθοδο απολύμανσης που δεν χρησιμοποιήθηκε αιθυλική αλκοόλη, έκφυτα που δεν μολύνθηκαν, καίγονταν εντός 20 ημερών, εάν και εφόσον δεν είχαν αναπτυχθεί.

4.2. Πειράματα *in vitro* καλλιέργειας

Χρησιμοποιήθηκαν δυο είδη υποστρωμάτων: το MS (Murashige and Skoog, 1962) και το W.P.M. (McCown and Lloyd, 1981), άλλοτε χωρίς τη χρήση φυτορρυθμιστικών ουσιών και άλλοτε με τη χρήση φυτορρυθμιστικών ουσιών. Και πιο συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε η κυτοκινίνη BA (0,5 και 1 mg/l BA), που όπως αναφέρεται και από τους Kada et al. (1991) η κυτοκινίνη BA ήταν κατάλληλη για το είδος *Arctostaphylos uva-ursi*. Η σύγκριση των δυο υποστρωμάτων οδηγεί στο συμπέρασμα ότι το W.P.M. είναι καταλληλότερο για την καλλιέργεια *in vitro* του *Erica manipuliflora*. Αποτέλεσμα που συμφωνεί με τους Kada et al., (1991) ότι ένα φτωχότερο υπόστρωμα απ' ότι το MS είναι κατάλληλο για την οικογένεια Ericaceae (Kada et al., 1991). Σε καλλιέργεια που γίνονταν σε W.P.M. εντός 8 ημερών είχαμε επιμήκυνση μεσογονατίων διαστημάτων σε αρκετά έκφυτα. Κάποια από αυτά συνέχιζαν τη ανάπτυξή τους, αλλά και πολλά από αυτά σε διάρκεια 20-25 ημερών καφέτιαζαν χωρίς να έχουν καμία περαιτέρω ανάπτυξη. Παρόμοια αντίδραση είχαν και τα κορυφαία έκφυτα του *Calluna vulgaris* (Gebhardt & Friedrich, 1987).

Παρατηρήθηκε επίσης σημαντική επίδραση της εποχής λήψης των εκφύτων στην αντίδραση τους σε καλλιέργεια. Κατάλληλη εποχή για λήψη εκφύτων φαίνεται να είναι η περίοδος Φεβρουάριο και Ιούλιο. Η λήψη εκφύτων στην υπόλοιπη περίοδο του έτους οδήγησε σε αποτυχία εγκατάστασης των καλλιεργειών.

4.3. Υποκαλλιέργεια

Βλαστοί που προέρχονταν από W.P.M. με 0 και 1 mg/l BA, έγινε προσπάθεια υποκαλλιέργειάς τους σε νέο υπόστρωμα W.P.M.. Τα έκφυτα αυτά αναπτύχθηκαν πολύ καλύτερα απ' ότι έκφυτα που πέρνονταν απ' έξω (παρ. 3.2.12. και 3.2.13.).

Αυτή η παρατήρηση συμφωνεί με το συμπέρασμα των Gebhardt & Friedrich (1987) στο φυτό *Calluna vulgaris*.

4.4. Επίλογος

Για το συγκεκριμένο είδος είναι η πρώτη φορά που γίνεται προσπάθεια *in vitro* πολλαπλασιασμού του. Με τη συγκεκριμένη μελέτη μπορούμε να δώσουμε ένα πρωτόκολλο απολύμανσης ιστών του για αρχική εγκατάσταση *in vitro* καλλιεργειών. Επίσης, φάνηκε ότι μόνο όταν χρησιμοποιήθηκε W.P.M. είχαμε αντίδραση των εκφύτων, αντίθετα η χρήση MS οδήγησε την καλλιέργεια σε αποτυχία. Πρέπει να πραγματοποιηθούν πειράματα για να βρούμε τον άριστο συνδυασμό φυτορρυθμιστικών ουσιών BA και πιθανόν NAA ή IAA για να αυξήσουμε τη διατηρησιμότητα των εκφύτων μετά την εγκατάστασή τους. Επίσης να γίνουν πειράματα ριζοβολίας ώστε ο εγκλιματισμός τους να ολοκληρώσει τα πειράματα μικροπολλαπλασιασμού του είδους.

Τέλος παρατηρήθηκε η κατάλληλη εποχή λήψης εκφύτων για επιτυχή εγκατάσταση καλλιεργειών. Αντίδραση των εκφύτων στην καλλιέργεια είχαμε όταν αυτά κόπηκαν την περίοδο Φεβρουάριο - Ιούλιο.

5. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Αραμπαντζής Θ., (2001). Θάμνοι και δέντρα στην Ελλάδα, Τόμος Π. Εκδόσεις Οικολογική κίνηση Δράμας-Τεχνολογικό Ίδρυμα Καβάλας.
- Debnath, S.C. and McRae, K.B. 2001. An efficient *in vitro* shoot propagation of cranberry (*Vaccinium macrocarpon* Ait) by axillary bud proliferation. *In vitro cellular & Development Biology – Plant* 37 (2): 243-249.
- Gebhardt K. & Friedrich M. (1987). Micropropagation of *Calluna vulgaris* cv ; 'H. E. Beale, *Plant Call Tissue and Organ Culture* vol 9. pp 137-145.
- Κίντζιος Σ. Ε. (1994). Επιχειρηματική ιστοκαλλιέργεια, Κατασκευή και διαχείριση επιχειρηματικών μονάδων παραγωγής ανθοκομικού πολλαπλασιαστικού υλικού με ιστοκαλλιέργεια. Εκδόσεις Α. Σταμούλης. Αθήνα-Πειραιάς.
- Kada J. M., Dorion N. & Bigot C. (1991). *In vitro* micropropagation of *Arctostaphylos uva-ursi* (L.) Sprengel.: Comparison between two methodologies. *Plant, Tissue and Organ Culture*. Vol 24: pp 217-222.
- Μπερτσουκλής Κ., Μαρία Παπαφωτίου και Ι. Χρονόπουλος.2007. Επίδραση κυτοκινινών στη βλαστογένεση του *Arbutus andrachne*. Πρακτικά ΕΕΕΟ τόμος 12 Α. Πάτρα, σελ. 153-156.
- McCown, B.H. and Lloyd, D.G., (1981). Woody Plant Medium (WPM). A mineral nutrient formulation for microculture of woody plant species. *HortScience*, 16: 453.
- Mereti M., Grigoriadon K and Nanos, G.D., 2002. Micropropagation of the strawberry tree, *Arbutus unedo* L. *Scientia Horticultural* 93:143-148.
- Murashige T. & Skoog F. (1962). I reviced medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant* vol 15: pp 473-497.
- Norton M.E. & Norton C.R., (1985). *In vitro* propagation of Ericaceae : A comparison of the cytokinins N⁶ Benzyladenine and N⁶ –isopentenyladenine in shoot proliferation. *Scientia Horticultural* vol 27: pp 335-340.
- Τάκος Ι. & Μέρου Θ. (1995). Τεχνολογία σπόρων ξυλωδών φυτών. Εκδόσεις Art of Text A.E., Θεσσαλονίκη σελ.62-63.
- Trigiano R. & Gray D. (2000) *Plant tissue culture concepts and Laboratory exercises*. CRC Press, London.