

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ
Ι Δ Ρ Υ Μ Α



ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ

ΣΧΟΛΗ: ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΤΜΗΜΑ: ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΩΝ

Πτυχιακή Μελέτη με Θέμα: Μικροπολλαπλασιασμός του φυτικού
είδους *Origanum majorana* (Μαντζουράνα)

Όνομα: Μαρκοζάνη Μαρία Ειρήνη

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ
ΣΧΟΛΗ: ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ

ΤΜΗΜΑ: ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΩΝ

Πτυχιακή Μελέτη με Θέμα: Μικροπολλαπλασιασμός του φυτικού
είδους *Origanum majorana* (Μαντζουράνα)



Επιβλέπων καθηγητής: Κάρτσωνας Επαμεινώνδας

Όνομα: Μαρκοζάνη Μαρία Ειρήνη

A.M: 2013120

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ τον κ. Κάρτσωνα Επαμεινώνδα, καθηγητή και επιβλέποντα στην πτυχιακή μου εργασία για τις χρήσιμες συμβουλές, την βοήθεια και την καθοδήγηση που μου έδωσε κατά τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας.

Περιεχόμενα

Ευχαριστίες.....	3
Σκοπός της εργασίας.....	7
Περίληψη.....	8
Εισαγωγή.....	9
1. Αρωματικά Φυτά.....	9-10
1.2 Οικονομική Σημασία και Εμπορία των Αρωματικών Φυτών..	10-11
1.3	
Μαντζουράνα.....	11
1.4 Καταγωγή, Ιστορία.....	12
1.5 Βοτανική Ταξινόμηση και Περιγραφή.....	12-13
1.6 Προσαρμοστικότητα.....	13
1.7 Καλλιεργητικές Φροντίδες – Συγκομιδή και Αποδόσεις.....	13
1.8 Χρήσεις.....	14-15
1.9 Πολλαπλασιασμός.....	15
1.9.1 Πολλαπλασιασμός με σπόρο.....	15
1.9.2 Πολλαπλασιασμός με παραφυάδες.....	15
1.10 Μικροπολλαπλασιασμός.....	16-17
1.10.1 Τύποι Καλλιέργειας.....	17
1.10.2 Στάδια ιστοκαλλιέργειας.....	17-18
1.10.3 Πλεονεκτήματα – Μειονεκτήματα	19
1.10.4 Προβλήματα ιστοκαλλιέργειας	20-22
1.11 Μικροπολλαπλασιασμός στο είδος <i>Origanum majorana</i>	22-23
2. Υλικά και Μέθοδοι.....	24
2.1 Υλικά.....	24
2.1.1 Φυτικό Υλικό.....	24
2.1.2 Υλικά Θρεπτικού Υποστρώματος Καλλιέργειας <i>in vitro</i>	24
2.1.3 Δοχεία <i>in vitro</i> Καλλιέργειας.....	24
2.1.4 Υπόστρωμα <i>in vitro</i> Καλλιέργειας.....	25
2.2 Μέθοδοι.....	26
2.2.1 Μέθοδος παρασκευής θρεπτικών υποστρωμάτων.....	26
2.2.2 Αποστείρωση Υλικών	29

2.2.3 Υποκαλλιέργεια <i>Origanum majorana</i>	30
2.2.4 Εκτίμηση αποτελεσμάτων.....	30-31
3. Αποτελέσματα	32-35
3.4 Συμπεράσματα.....	36
4.Βιβλιογραφία.....	27

Υπεύθυνη Δήλωση : Εγώ, η Μαρκοζάνη Μαρία Ειρήνη βεβαιώνω ότι είμαι η συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας με τίτλο
«ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΟΥ ΦΥΤΙΚΟΥ ΕΙΔΟΥΣ *Origanum majorana* (Μαντζουράνα)»

Στο τέλος της εργασίας αναφέρονται λεπτομερώς οι πηγές οι οποίες χρησιμοποιήθηκαν για την άντληση πληροφοριών, δεδομένων, πινάκων καθώς και εικόνων.

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της παρούσης πειραματικής εργασίας ήταν η εξεύρεση μιας αποδοτικής μεθόδου πολλαπλασιασμού του είδους *Origanum majorana*,. Έχει επιτευχθεί ως τώρα η εφαρμογή των μεθόδων απολύμανσης και εγκατάστασης των εκφύτων του είδους *in vitro*, οπότε στόχος της παρούσας μελέτης ήταν να διερευνηθεί η δυνατότητα ανα-πολλαπλασιασμού των βλαστών που έχουν εγκατασταθεί *in vitro*. Παράλληλα διερευνήθηκε η επίδραση του ατμοσφαιρικού περιβάλλοντος μέσα στο οποίο αναπτύχθηκαν τα έκφυτα στην αντίδρασή τους. Διερευνήθηκε επίσης η δυνατότητα παραγωγής φυταρίων με ικανοποιητικούς ρυθμούς σε φτωχότερα υποστρώματα, αλλά και με κάλυψη των δοχείων καλλιέργειας με ημιπερατές μεμβράνες. Τα παραπάνω υλικά κάλυψης μπορούν να διευκολύνουν την ανταλλαγή αερίων εντός και εκτός των δοχείων καλλιέργειας. Διερευνήθηκε επίσης εάν η ανάπτυξη εκφύτων σε φτωχά (ως προς την περιεκτικότητά τους σε θρεπτικό υπόστρωμα MS) σε συνδυασμό με τον αυξημένο αερισμό εντός των δοχείων καλλιέργειας, μπορούν να ωθήσουν τα αναπτυσσόμενα φυτάρια στο να σχηματίσουν λειτουργικά στόματα στα φύλλα τους και να αναπτύξουν πλήρως λειτουργικό μηχανισμό φωτοσύνθεσης ώστε να είναι φωτοαυτότροφα. Συνέπεια αυτού είναι, το στάδιο του εγκλιματισμού να είναι ευκολότερο για τα εν λόγω φυτάρια με τελικό αποτέλεσμα το υψηλότερο ποσοστό επιτυχώς εγκλιματισμένων φυταρίων. Με τη χρήση τέτοιων ημιπερατών υλικών κάλυψης το πρώτο ζητούμενο είναι η μη μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού οπότε με δεδομένη την δημιουργία φυτών με φυσιολογικά ανατομικά χαρακτηριστικά είναι βέβαιη η αυξημένη επιτυχία του μικροπολλαπλασιασμού του είδους.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στο είδος *Origanum majorana* εξετάστηκε η δυνατότητα πολλαπλασιασμού, ήδη εγκατεστημένων *in vitro* βλαστών του. Διερευνήθηκε η δυνατότητα παραγωγής φυταρίων με ικανοποιητικούς ρυθμούς σε φτωχότερα υποστρώματα, αλλά και με κάλυψη των δοχείων καλλιέργειας με ημιπερατή μεμβράνη. Τα έκφυτα καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα μισής δύναμης MS με 1,5 % σακχαρόζη και 100 mg Μυοινοζιτόλη. Εγκαταστάθηκαν σε τρυβλία Petri τα οποία καλύφθηκαν Παραφίλμ: ή ημιπερατή διάφανη μεμβράνη με πόρους που δεν επιτρέπουν τη μετακίνηση μικροοργανισμών, επιτρέπουν όμως την ανταλλαγή των αερίων με το εξωτερικό περιβάλλον. Η κάλυψη των δοχείων με την ημιπερατή μεμβράνη δεν μείωσε την αντίδραση των εκφύτων (ποσοστό αντίδρασης, αριθμός βλαστών, αριθμός κόμβων και μήκος βλαστών), αλλά αντίθετα αύξησε την ριζοβολία των σχηματισθέντων βλαστών, οπότε η χρήση της ενδείκνυται στον πολλαπλασιασμό των *in vitro* εγκατεστημένων καλλιεργειών του είδους *Origanum majorana*.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1. Εισαγωγή

1. Αρωματικά φυτά

Η μαντζουράνα στη περίπτωση μας, είναι ένα από τα μέλη του φυτικού βασιλείου που έχουν την δυνατότητα να αποθηκεύουν αρωματικά συστατικά σε ένα ή περισσότερα τμήματα τους. Στα συγκεκριμένα φυτά το στοιχείο αυτό, τους δίνει τη δυνατότητα να προσελκύουν ωφέλιμα για αυτά έντομα για τη διαδικασία της επικονίασης. Ακόμα τα ευώδη πτητικά συστατικά τραβούν κοντά στα φυτά κι άλλα ζώα ή πτηνά που είναι απαραίτητα για τη διάδοση των σπόρων.

Τα «Αρωματικά» φυτά, όπως ονομάζονται, γενικότερα περιλαμβάνουν ποώδη φυτά, βότανα, θάμνους και δένδρα διαφόρων μεγεθών τα οποία μπορεί να είναι ετήσια, διετή ή πολυετή. Τα τμήματα που αποθηκεύονται οι αρωματικές ουσίες μπορεί να είναι:

- I. Άνθη
- II. Φύλλα
- III. Βλαστοί
- IV. Καρποί
- V. Σπέρματα
- VI. Ρίζες

Δεν είναι απαραίτητο μόνο σε ένα όργανο από αυτά του φυτού, να σχηματίζεται το «αιθέριο έλαιο». Μπορεί και σε περισσότερα από ένα. Συγκεκριμένα το αιθέριο έλαιο βρίσκεται σε αυτά τα όργανα μέσα σε ειδικούς αδένες, αγωγούς, ιδιόβλαστα κύτταρα ή κοιλότητες.

Σημαντικό κεφάλαιο στα αρωματικά φυτά είναι και οι χρήσεις τους. Τα αρωματικά αλλά και φαρμακευτικά φυτά καλλιεργούνται σήμερα είτε για το αιθέριο έλαιο που παράγεται, είτε για τις ξηρές δρόγες τους δηλαδή αποξηραμένα τμήματα αυτών των φυτών όπως είναι οι ρίζες, οι καρποί, οι βλαστοί και οι σπόροι.

Μερικές από τις πιο κύριες χρήσεις των αρωματικών φυτών και των αιθέριων ελαίων ή άλλων βιοδραστικών συστατικών που παραλαμβάνονται από αυτά είναι:

- I. Χρήση στη μαγειρική ως φρέσκα ή αποξηραμένα αρτύματα, βότανα, καρυκεύματα ή μπαχαρικά*

- II. Στην αρωματοποίηση, σε προϊόντα προσωπικής υγιεινής ή σε προϊόντα καλλωπισμού
- III. Παραγωγή προϊόντων για τη φροντίδα του νοικοκυριού
- IV. Χρήση στη ζαχαροπλαστική, τη βιομηχανία τροφίμων αλλά και ποτών για περισσότερο άρωμα
- V. Σε διάφορα σκευάσμα/τα στην ιατρική και στην κτηνιατρική
- VI. Στη γεωργία σαν φυτοπροστατευτικά μέσα
- VII. Τέλος, χρησιμοποιείται στη φαρμακευτική σε διάφορα σκευάσματα, λόγω της βιολογικής τους δραστηριότητας, ή σαν βελτιωτικά οσμής και γεύσης (ΚΑΤΣΙΩΤΗΣ 2015)

1.2 Οικονομική Σημασία και Εμπορία των Αρωματικών Φυτών

Οι κυριότερες χώρες που παράγουν και εξάγουν αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά είναι η Κίνα, η Ινδία, η Βραζιλία, το Μαροκό, η Αίγυπτος, η Ινδονησία, η Τουρκία και αρκετές χώρες της Ευρώπης. Αντίθετα οι κυριότερες χώρες που εισάγουν αρωματικά φυτά είναι η Γερμανία με 42%, η Γαλλία, η Αγγλία, η Ιταλία, η Ισπανία και η Ελβετία.

Στην Ελλάδα η καλλιεργούμενη έκταση φτάνει τα 40 εκατομμύρια στρέμματα και συγκεκριμένα η καλλιεργούμενη έκταση των αρωματικών αποτελεί το 0,02%. Το ποσοστό των αρωματικών που εισάγονται στην Ελλάδα είναι σχεδόν το διπλάσιο από το ποσοστό που εξάγει σε άλλες χώρες. Εισάγονται 5,000 τόνοι αξίας 9 εκατομμυρίων ευρώ και εξάγονται 2,500 τόνοι με βασικότερα φυτικά είδη τη ρίγανη, το φασκόμηλο, το κρόκο και τη μαστίχα Χίου.

Μια καλλιέργεια αρωματικών φυτών μπορεί να συμβάλει :

- I. Στην αναδιάρθρωση των καλλιεργειών
- II. Στην εκμετάλλευση των φτωχών και εγκαταλελειμμένων χωραφιών
- III. Στην αύξηση του γεωργικού εισοδήματος
- IV. Στην δημιουργία μικρών βιομηχανικών μονάδων
- V. Στην αξιοποίηση περισσότερου προσωπικού (γυναίκες, παιδιά και άτομα μεγαλύτερης ηλικίας)

- VI. Στην ανάπτυξη μελισσοκομίας
- VII. Στη τουριστική αξιοποίηση διαφόρων περιοχών
- VIII. Στην εξοικονόμηση συναλλάγματος
- IX. Και στη προστασία της χλωρίδας (ΔΟΡΔΑΣ 2012)

1.3 Μαντζουράνα (*Origanum majorana*)

1.3.1. Καταγωγή, Ιστορία

Η μαντζουράνα, αλλιώς και ματζουράνα, είναι ένα είδος ρίγανης. Η καταγωγή του φυτού είναι από τις χώρες της Νότιας Ευρώπης αλλά και της Βόρειας Αφρικής. Δεν αυτοφύεται στην Ελλάδα παρά μόνο μπορούμε να το συναντήσουμε ως καλλωπιστικό σε κήπους των σπιτιών και σε γλάστρες. Η Μαντζουράνα από την αρχαιότητα είναι γνωστή ως «αείφυλλος αμάραγκος» του Θεόφραστου ή σάμψυχο του Διοσκουρίδη. Οι αρχαίοι Έλληνες πίστευαν ότι το άρωμα της μαντζουράνας ήταν το άρωμα της θεάς Αφροδίτης και για αυτό το λόγο στις γαμήλιες τελετές στεφάνωναν τα νεαρά ζευγάρια με το φυτό αυτό. Η γλυκιά και πικάντικη ευωδία της μαντζουράνας δημιουργήθηκε σύμφωνα με τη μυθολογία από τη θεά Αφροδίτη ως σύμβολο ευτυχίας. Εκτός από τις γαμήλιες τελετές λοιπόν, χρησιμοποιούσαν και ολόκληρο το φυτό στους τάφους προκειμένου να κατευοδώσουν ειρηνικά τους νεκρούς. Μια επιπλέον χρήση της μαντζουράνας ήταν και ως φάρμακο κατά των στομαχικών και εντερικών προβλημάτων. Εκτός του Ελλαδικού χώρου, στην Αίγυπτο και την Αραβία χρησιμοποιούσαν το αφέψημα του φυτού για τονωτικά μπάνια ενώ στη Συρία έφτιαχναν μεθυστικά αρώματα από τα άνθη και τα φύλλα της.(ΛΙΕΠΟΥΡΗ ΕΛΕΝΗ 2016)

Βοτανικά χαρακτηριστικά - Ταξινόμηση

Άθροισμα	Spermatophyta
Ύποάθροισμα	Magnoliophytina
Κλάση	Magnoliatae
Υπόκλαση	Asteridae
Τάξη	Lamiales
Οικογένεια	Lamiaceae (Labiatae)
Γένος	<i>Origanum</i> ή <i>Majorana</i>
Είδος	<i>majorana</i> L. ή <i>hortensis</i> Moench
Κοινό Όνομα	Ματζουράνα, Μαντζουράνα, Ορίγανο

(ΣΚΡΟΥΜΠΗΣ 1998)

1.4 Βοτανική Ταξινόμηση και Περιγραφή

Η μαντζουράνα είναι πολυετής πόα με τετραγωνικούς βλαστούς και ύψος 20-40cm. Τα άνθη είναι μικρά πρασινοάσπρα. Η μαντζουράνα μοιάζει με την ρίγανη αλλά έχει κάποιες μορφολογικές διαφορές. Οι πιο σημαντικές είναι:

I. Η μαντζουράνα είναι ορθόκλαδη και στην τελική της ανάπτυξη είναι θάμνος με μικρότερη ανάπτυξη από την ρίγανη

II. Οι βλαστοί και τα φύλλα της μαντζουράνας έχουν λιγότερο και κοντύτερο τρίχωμα και έτσι φαίνονται πιο λείοι με ελαφρά μωβ απόχρωση.

III. Τα φύλλα της μαντζουράνας έχουν συνήθως σταχτόχρομη απόχρωση, είναι κατά κανόνα μικρότερα της ρίγανης, πλέον επιμήκη, με βελούδινη υφή.

IV. Τα άνθη της είναι λευκά, πιο μεγάλα και πιο πυκνά διατεταγμένα στις ταξιανθίες.

V. Οι ταξιανθίες της έχουν την ίδια διάταξη με της ρίγανης. Τα σταχύδια όμως στα περισσότερα φυτά είναι πιο κοντά και μεγαλύτερα της ρίγανης.

VI. Ο σπόρος της μαντζουράνας είναι δυο με τρεις φορές μεγαλύτερος από τον σπόρο της ρίγανης .(ΔΟΡΔΑΣ 2012)

1.5 Προσαρμοστικότητα

Η μαντζουράνα προτιμά ημιορεινές, δροσερές περιοχές με ήπιο κλίμα και χωράφια πλούσια, ξηρικά ή ποτιστικά σταγερά. Μοιάζει πολύ στα χαρακτηριστικά της ρίγανης αλλά υπάρχουν ποικιλίες που είναι πιο απαιτητικές σε θερμοκρασία από τη ρίγανη. Επίσης σε σχέση με το φυτό της ρίγανης η μαντζουράνα χρειάζεται πιο γόνιμα εδάφη και είναι πιο απαιτητική σε νερό. (ΔΟΡΔΑΣ 2012)

1.6 Καλλιεργητικές Φροντίδες – Συγκομιδή και Αποδόσεις

Η μαντζουράνα είναι από τις απαιτητικές καλλιέργειες και θέλει ιδιαίτερη φροντίδα. Θα πρέπει να αντιμετωπίζονται τα ζιζάνια που μπορεί να δημιουργήσουν σημαντικό πρόβλημα και κυρίως τα πολυετή όπως είναι η αγριάδα και ο βέλιουρας. Η καταπολέμηση τους θα πρέπει να γίνεται με σκαλίσματα και εδαφοκάλυψη. Όσο αφορά την λίπανση θα πρέπει να προστίθονται 6-8 μονάδες Αζώτου (N) και 4-5 μονάδες Φωσφόρου (P).

Αργότερα, η συγκομιδή, γίνεται μια φορά στο στάδιο της άνθισης, με κοπή όλου του υπέργειου μέρους του φυτού σε ύψος 8-10 εκατοστά, όταν προορίζεται να χρησιμοποιηθεί για το αιθέριο έλαιο. Αντίθετα, όταν προορίζεται για ξηρή δρόγη, συγκομίζεται δύο φορές το χρόνο κάθε φορά πριν την έναρξη της άνθισης (Ιούνιος με Αύγουστο). Η διαδικασία της συγκομιδής γίνεται είτε με δρεπάνια ή με χορτοκοπτική μηχανή. (ΔΟΡΔΑΣ 2012)

1.8 Χρήσεις

Γενικότερα μπορεί να χρησιμοποιηθεί και ως καλλωπιστικό φυτό αλλά και σαν άρτυμα στο τομέα της μαγειρικής. Πιο συγκεκριμένα:

I. *Αρχιτεκτονική Τοπίου*: Κατάλληλο για κήπους και βραχόκηπους διότι είναι ένα ιδιαίτερο αρωματικό φυτό και μπορεί να χρησιμοποιηθεί μόνο του ή σε συνδυασμό με άλλα φυτικά είδη.

II. *Ανθοκομία*: Είναι γλαστρικό φυτό για εσωτερικούς και εξωτερικούς χώρους

III. *Θεραπευτικές Ιδιότητες*: Είναι αντισηπτικό, αντισπασμωδικό, αρωματικό, αναλγητικό, αποχρεμπτικό, τονωτικό, χωνευτικό και ηρεμιστικό.

Ως αντισηπτικό μπορεί να χρησιμοποιηθεί και για εσωτερική αλλά και για εξωτερική χρήση. Ενδείκνυται για τη θεραπεία ελαφρών παθήσεων του νευρικού συστήματος. Επιπλέον δρα ευεργετικά κατά των πονοκέφαλων, του άγχους και της αϋπνίας και έχει χρησιμοποιηθεί με επιτυχία στην αντιμετώπιση του ιλίγγου και της επιληψίας. Χρησιμοποιείται ενάντια στη δυσπεψία λόγω νευρικότητας, στους κολικούς και στα φουσκώματα. Ανοίγει την όρεξη, ανακουφίζει από τους τυμπανισμούς και τους στομαχικούς πόνους ενώ το όμορφο άρωμα απομακρύνει τη κατάθλιψη και το στρες. Χρησιμοποιείται ακόμα και ενάντια στις ημικρανίες και στα τικ του προσώπου. Η Μαντζουράνα δρα και κατά των αναπνευστικών παθήσεων, του κρυολογήματος, της δυσμηνόρροιας, της δυσκοιλιότητας και του στομαχικού έλκους και για τόνωση του δέρματος. Εκτός από το φυτό μπορούμε να λάβουμε και το αιθέριο έλαιο το οποίο προέρχεται συγκεκριμένα από τα φύλλα και είναι κατάλληλο για τη φαρμακοβιομηχανία και την αρωματοποιία. Το αιθέριο έλαιο μπορεί να εφαρμοστεί και για εξωτερική χρήση για να βελτιώσουμε μώλωπες και δύσκολες επουλώσιμες πληγές. Επίσης μπορούν να αντιμετωπιστούν οι πόνοι από ρευματισμούς και ισχιαλγίες. Χρησιμοποιείται ως απολυμαντικό για τα μαλλιά, την ακμή, τα τσιμπήματα και πολλές άλλες φαρμακευτικές χρήσεις.

IV. *Χρήση στη κουζίνα*: Οι νεαρές ανθισμένες κορυφές της μαντζουράνας χρησιμοποιείται ως άρτυμα στη μαγειρική. Αυτές έχουν ευχάριστο πιπεράτο άρωμα και η γεύση τους είναι πικάντικη, αλλά είναι περισσότερο γλυκιές από τη ρίγανη.

V. Άλλες χρήσεις: Οι σπόροι του φυτού μπορούν να χρησιμοποιηθούν ως μπαχαρικό στην αλλαντοποίηση, αρτοποιία και ποτοποιία. (ΛΙΕΠΟΥΡΗ ΕΛΕΝΗ 2016)

1.9 Πολλαπλασιασμός

Ο πολλαπλασιασμός μπορεί να γίνει με δύο τρόπους. Είτε αγενώς κυρίως με παραφυάδες, είτε εγγενώς δηλαδή με σπόρο.

1.9.1 Πολλαπλασιασμός με Σπόρο

Τα σπορεία μπορούν να γίνουν το καλοκαίρι δηλαδή αρχές Αυγούστου και η μεταφύτευση τον Νοέμβριο, είτε να γίνουν το φθινόπωρο δηλαδή Σεπτέμβρη με Οκτώβριο και η μεταφύτευση την άνοιξη. Εναλλακτικά τα σπορεία μπορούν να γίνουν την άνοιξη κατά το Μάρτιο και η μεταφύτευση τέλος άνοιξης το Μάιο ή το φθινόπωρο τον Οκτώβρη.

Η ποσότητα του σπόρου που χρησιμοποιείται είναι για κάθε τετραγωνικό μέτρο σπορείου 1-2g. Η πρώιμη φθινοπωρινή μεταφύτευση είναι καλύτερη από την ανοιξιάτικη και κυρίως από την πολύ όψιμη που γίνεται τέλος Απριλίου και Μάιο. Οι αποστάσεις φύτευσης είναι μεταξύ των γραμμών 40cm και πάνω στη γραμμή 15-20cm. (ΔΟΡΔΑΣ 2012)

1.9.2 Πολλαπλασιασμός με παραφυάδες

Ο τρόπος αυτός είναι από τους οικονομικότερους με τη προϋπόθεση να υπάρχουν παλαιές καλλιέργειες στο χωράφι. Η μαντζουράνα που είναι πολλών ετών αναπτύσσει πολλές παραφυάδες τις οποίες τις παίρνουμε το φθινόπωρο ή την άνοιξη και τις μεταφυτεύουμε στο χωράφι. (ΔΟΡΔΑΣ 2012)

1.10 Μικροπολλαπλασιασμός

Η κυτταροκαλλιέργεια (cell culture) και η ιστοκαλλιέργεια (tissue culture) είναι γενικότερα γνωστότερες με τους όρους «καλλιέργεια in vitro» ή «τεχνικές in vitro». Ο λατινικός όρος in vitro σημαίνει κυριολεκτικά «στο γυαλί» και προέρχεται από την εποχή που οι κυτταροκαλλιέργειες πραγματοποιούνταν μέσα σε γυάλινους σωλήνες (αυτοί χρησιμοποιούνται ακόμα σε αρκετές εφαρμογές). Στη συνέχεια θα χρησιμοποιήσουμε εναλλάξ τους όρους αυτούς εννοώντας βασικά το ίδιο πράγμα. Με τα σημερινά δεδομένα, ως τεχνική in vitro θα χαρακτηρίσουμε οποιαδήποτε μέθοδο ή διαδικασία αναφέρεται στην απομάκρυνση κυττάρων από έναν οργανισμό και, στη συνέχεια, τη διατήρησή του σε ένα τεχνητό περιβάλλον καλλιέργειας, όπου προσπαθούμε να ελέγξουμε τη φυσιολογική λειτουργία των κυττάρων αυτών. Ο έλεγχος επιτυγχάνεται με εφαρμογή διαφόρων φυσικών μεθόδων (π.χ. τροποποίηση θερμοκρασίας, φωτισμού, σύστασης ατμόσφαιρας) και/ή με προσθήκη χημικών ουσιών (π.χ. θρεπτικών μέσων, ρυθμιστών αύξησης κ.λπ.). Ο μικροπολλαπλασιασμός των φυτών αποτελεί την κυριότερη πρακτική και εμπορική εφαρμογή της ιστοκαλλιέργειας φυτών. Όπου μπορεί να εφαρμοστεί, ο μικροπολλαπλασιασμός υπερέχει στην απόδοση έως και χιλιάδες φορές σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους.

Η ιστοκαλλιέργεια είναι συνυφασμένη με μια σειρά από βασικές τεχνικές (όπως παρασκευή υποστρώματος, αποστείρωση και απολύμανση), οι οποίες απαιτούν ένα επαρκές επίπεδο εκπαίδευσης και εργαστηριακής υποδομής. Αν και για τις πλέον συνηθισμένες εργασίες οι απαιτήσεις δεν είναι ιδιαίτερα υψηλές, μπορούν να αυξηθούν στην περίπτωση ειδικών εφαρμογών. Ο μικροπολλαπλασιασμός των φυτών αποτελεί την κυριότερη πρακτική και εμπορική εφαρμογή της ιστοκαλλιέργειας φυτών. Όπου μπορεί να εφαρμοστεί (τυπικό παράδειγμα είναι τα ανθοκομικά φυτά), ο μικροπολλαπλασιασμός υπερέχει στην απόδοση έως και χιλιάδες φορές σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους. Σε μικρή κλίμακα παραγωγής και εφόσον υπάρχουν διαθέσιμα τα κατάλληλα πρωτόκολλα, χαρακτηρίζεται από μέτριο επίπεδο δυσκολίας. Αυτή αυξάνεται προκειμένου για είδη με χαμηλή απόκριση στην ιστοκαλλιέργεια και όταν επιθυμούμε παραγωγή σε μεγάλη κλίμακα (εκατοντάδες χιλιάδες ή και εκατομμύρια φυτά κάθε χρόνο). Η ιστοκαλλιέργεια είναι ο κατεξοχήν κλάδος της

βιοτεχνολογίας ο οποίος σχετίζεται με την βελτίωση των φυτών, δηλαδή την παραγωγή νέων ποικιλιών και υβριδίων. (ΚΙΝΤΖΙΟΣ 2015)

1.10.1 Τύποι Καλλιέργειας

Οι καλλιέργειες συνήθως ξεκινούν από αποστειρωμένα τμήματα ολόκληρων φυτών που ονομάζονται έκφυτα (explants) και είναι δυνατό να αποτελούνται από τμήματα οργάνων όπως τα φύλλα και οι ρίζες ή ακόμα να είναι ειδικοί τύποι κυττάρων όπως γύρη και ενδοσπέρμιο. Πολλά από τα γνωρίσματα του εκφύτου είναι δυνατό να επηρεάζουν την ικανότητα έναρξης της καλλιέργειας. Γενικά, οι νεαροί, πιο γρήγορα αναπτυσσόμενοι ιστοί (ή ιστοί που βρίσκονται σε αρχικό στάδιο ανάπτυξης) είναι οι καλύτερα ανταποκρινόμενοι. Οι πιο συνηθισμένοι τύποι ιστοκαλλιέργειας είναι οι εξής:

- Καλλιέργεια κάλων
- Καλλιέργεια αιωρημάτων κυττάρων
- Καλλιέργεια πρωτοπλαστών
- Καλλιέργεια ριζών
- Καλλιέργεια άκρων βλαστών και μεριστωμάτων
- Εμβρυοκαλλιέργεια
- Καλλιέργεια μικροσπορίων. (ΞΥΝΙΑΣ 2014)

1.10.2 Στάδια ιστοκαλλιέργειας

- Προετοιμασία Φυτικού Υλικού

Επιλογή του μητρικού φυτικού υλικού που θα χρησιμοποιηθεί για πολλαπλασιασμό. Τα μητρικά φυτά πρέπει να είναι υγιή, εύρωστα και σε νεαρή ηλικία. Έτσι αυξάνονται οι πιθανότητες θετικής απόκρισης και περιορίζεται σε κάποιο βαθμό η ενδεχόμενη διάδοση παθογόνων. Ως επί το πλείστον η καλλιέργεια του φυτικού υλικού γίνεται σε θερμοκήπια κάτω από ελεγχόμενες συνθήκες. Με τη μέθοδο αυτή γίνεται εφικτός ο διαρκής και άμεσος έλεγχος της υγιεινής και φαινοτυπικής κατάστασης των φυτών.

- Εγκατάσταση κύτταρο-/ιστοκαλλιέργειας

Στο στάδιο αυτό γίνεται η επιλογή, η παραλαβή και η απολύμανση των εκφύτων. Έπειτα πραγματοποιείται η εγκατάσταση της ιστοκαλλιέργειας με εμφύτευση του φυτικού υλικού σε κατάλληλα δοχεία και τοποθέτησή τους στον θάλαμο καλλιέργειας.

- Πολλαπλασιασμός

Στόχος του σταδίου αυτού είναι ο πολλαπλασιασμός του αρχικού φυτικού υλικού έτσι ώστε να αποκτηθεί ικανός αριθμός φυτών. Το στάδιο αυτό περιλαμβάνει αρκετές ανακαλλιέργειες για ανανέωση των θρεπτικών πόρων, καθώς τα θρεπτικά στοιχεία του υποστρώματος καταναλώνονται. Συνήθως ο πολλαπλασιασμός αφορά μόνο τους αναγεννημένους τυχαίους βλαστούς χωρίς επαγωγή ριζογένεσης.

- Αναγέννηση_φυτού

Αφού έχει αποκτηθεί ικανή ποσότητα φυτικού υλικού ακολουθεί η επιμήκυνση και παραγωγή ρίζας στα φυτά. Έτσι, τα φυτά που κρίνονται κατάλληλα μεταφυτεύονται στο υπόστρωμα ριζοβολίας. Η ορθή αναγέννηση του φυτού διαδραματίζει σημαντικό ρόλο στον μετέπειτα επιτυχή εγκλιματισμό του.

- Εγκλιματισμός φυτού

Συνήθως πραγματοποιείται σε συνθήκες θερμοκηπίου ή σε ειδικούς θαλάμους εγκλιματισμού. Τα φυτά, ανάλογα με τη φυσιολογική τους κατάσταση απαιτούν λιγότερο ή περισσότερο χρόνο για να αποκτήσουν τις φυσιολογικές τους λειτουργίες και την ικανότητα της φωτοσύνθεσης. Η χρήση θαλάμων εγκλιματισμού με αυστηρά καθορισμένες συνθήκες επιβάλλεται ώστε να έχουμε ομοιόμορφο εγκλιματισμό και ανάπτυξη των φυτών. Τα φυτά που παράγονται είναι πλήρως αναγεννημένα και, με κατάλληλους χειρισμούς, η επιτυχία μπορεί να φτάσει το 100%. (KINTZIOS 2015)

1.10.3 Πλεονεκτήματα – Μειονεκτήματα

Πλεονεκτήματα του μικροπολλαπλασιασμού

- Ταχεία παραγωγή κλωνικών υποκειμένων
- Παραγωγή φυτών απαλλαγμένων από παθογόνους μικροοργανισμούς
- Διατήρηση γενετικού υλικού σε περιορισμένο χώρο
- Μείωση του χώρου που απαιτείται για τη διατήρηση του πολλαπλασιαστικού υλικού
- Συνεχείς παραγωγή πολλαπλασιαστικού υλικού καθ' όλη τη διάρκεια του έτους.
- Δυνατότητα ελέγχου των χημικών και φυσικών παραγόντων του περιβάλλοντος
- Δίνεται η δυνατότητα πολλαπλασιασμού σε είδη, που με άλλους τρόπους ήταν δύσκολος, ακόμα και αδύνατος
- Απλοποίηση μετακίνησης και ανταλλαγής φυτικού υλικού μεταξύ ερευνητικών ιδρυμάτων διαφορετικών χωρών.

Μειονεκτήματα του μικροπολλαπλασιασμού

- Μεγάλες απαιτήσεις σε εργαστηριακό εξοπλισμό, ειδικευμένο προσωπικό και τεχνικές.
- Υψηλό κόστος παραγωγής
- Μεγάλες απώλειες σε σύντομο χρονικό διάστημα από μολύνσεις.
- Αστάθεια στην παραγωγή ομοιόμορφων φυτών λόγω μεταλλάξεων
- Τα φυτά που αναπτύσσονται σε συνθήκες ιστοκαλλιέργειας δεν είναι αυτότροφα, με αποτέλεσμα να απαιτείται εγκλιματισμός.

1.10.4 Προβλήματα ιστοκαλλιέργειας

Η ιστοκαλλιέργεια των φυτών, εξαρτάται από πληθώρα παραγόντων οι οποίοι σχετίζονται τόσο με το βιολογικό υλικό το οποίο πρόκειται να ιστοκαλλιεργηθεί όσο και με το περιβάλλον της καλλιέργειας. Ανεξάρτητα όμως από τον πραγματικά πολύ μεγάλο αριθμό τους, μπορούμε να ταξινομήσουμε αυτούς τους παράγοντες σε τρεις βασικές κατηγορίες.

- *Στους παράγοντες που σχετίζονται με το μητρικό φυτό, όπως για παράδειγμα ο γονότυπος, το είδος, η οικογένεια και η ποικιλία:*

Το μητρικό φυτό (φυτό δότης) αποτελεί την πηγή των εκφύτων τα οποία θα χρησιμοποιηθούν στην ιστοκαλλιέργεια και έτσι οι ιδιότητές του, μεταφερόμενες στα έκφυτα, επηρεάζουν πολύ σημαντικά την απόκριση αυτών στους διάφορους χειρισμούς μας. Ο γονότυπος είναι ο καθοριστικότερος παράγοντας για την επιτυχία της ιστοκαλλιέργειας. Η σπουδαιότερη επίδραση του μητρικού φυτού προέρχεται από τον γονότυπο αυτού, δηλαδή το φυτικό είδος ή ακόμα και την ποικιλία. Σε ορισμένες περιπτώσεις η απόκριση στην ιστοκαλλιέργεια είναι τόσο άμεση, που δεν χρειάζεται παρά η τοποθέτηση ενός εκφύτου (π.χ. ενός τμήματος φύλλου) πάνω σε ένα απλό θρεπτικό υπόστρωμα ή ακόμα και νερό για να ξεκινήσει αμέσως η αναγέννηση φυτών από το έκφυτο. Για παράδειγμα η γαρδένια. Από την άλλη πλευρά υπάρχουν φυτικά είδη τα οποία αποκρίνονται ελάχιστα στην ιστοκαλλιέργεια, με αποτέλεσμα, όταν προσπαθούμε να καλλιεργήσουμε έκφυτα προερχόμενα από διάφορους ιστούς αυτών των φυτών, συχνά να παρατηρούμε εκτεταμένη νέκρωση των εκφύτων χωρίς καμία απόκριση (π.χ. δημιουργία κάλου). Τα φυτικά αυτά είδη ονομάζονται δύστροπα. Οι συνθήκες ανάπτυξης του μητρικού φυτού μπορούν να επηρεάσουν άμεσα ή έμμεσα την επιτυχία της ιστοκαλλιέργειας. Σε ορισμένες περιπτώσεις, είναι απαραίτητο να έχουμε καλλιεργήσει τα φυτά κάτω από πολύ συγκεκριμένες συνθήκες φωτισμού (έντασης φωτισμού και/ή φωτοπερίόδου) και θερμοκρασίας προκειμένου να πετύχουμε τα επιθυμητά αποτελέσματα. Μία τέτοια περίπτωση είναι η καλλιέργεια φυτών προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για παραλαβή πρωτοπλαστών. Επίσης η εποχή του χρόνου επηρεάζει σημαντικά το μικροβιακό φορτίο των φυτών, το οποίο είναι αυξημένο το καλοκαίρι (λόγω υψηλών θερμοκρασιών), με αποτέλεσμα να πρέπει να γίνεται ισχυρότερη επιφανειακή απολύμανση των εκφύτων πριν

καλλιεργηθούν *in vitro*. Εξαιρετικά σημαντική είναι επίσης η φυσιολογική κατάσταση και υγεία του μητρικού φυτού. Φυτά τα οποία είναι ηλικιωμένα ή προσβεβλημένα από διάφορα φυτοπαθογόνα θα δώσουν έκφυτα με σημαντικά χαμηλότερη απόκριση στην ιστοκαλλιέργεια από ό,τι νέα και υγιή φυτά. Ο κανόνας αυτός ισχύει και για έκφυτα που λαμβάνονται από το ίδιο φυτό. Έτσι, τα παλαιότερα φύλλα (ειδικά αν έχουν αρχίσει να κιτρινίζουν ή να συστρέφονται) θα αντιδράσουν πολύ λιγότερο στην ιστοκαλλιέργεια από ό,τι τα νεαρά φύλλα που μόλις έχουν αρχίσει και εκπύσσονται.

- Στους παράγοντες που σχετίζονται με το έκφυτο, όπως για παράδειγμα το είδος του εκφύτου, η θέση του πάνω στο μητρικό φυτό και η ηλικία του.

Η δυνατότητα απόκρισης ενός εκφύτου στην ιστοκαλλιέργεια, εκτός από γενετικούς παράγοντες, καθορίζεται από τη σχετική αναλογία μεριστωματικών και μεσοφυλλικών κυττάρων. Όσο περισσότερα είναι τα μεριστωματικά κύτταρα τόσο μεγαλύτερη είναι και η πιθανότητα να αντιδράσει το έκφυτο στους χειρισμούς. Επομένως, ιστοί με μεγαλύτερη συγκέντρωση μεριστωματικών κυττάρων, όπως τα κορυφαία μεριστώματα και οι οφθαλμοί, είναι δεκτικότεροι στην ιστοκαλλιέργεια από τα φύλλα και τους βλαστούς, που περιέχουν κυρίως μεσοφυλλικά κύτταρα. Τη μικρότερη απόκριση συνήθως δείχνουν ιστοί με μικρή περιεκτικότητα τόσο σε μεριστωματικά όσο και σε μεσοφυλλικά κύτταρα, όπως οι ρίζες. Ενδιαφέρουσα περίπτωση αποτελούν οι σπόροι: αν και περιέχουν το έμβρυο (έναν καθαρά μεριστωματικό ιστό), πολλές φορές δεν μπορούν να αντιδράσουν στην ιστοκαλλιέργεια λόγω του φαινομένου του λήθαργου τα νεαρότερα έκφυτα αντιδρούν καλύτερα στην ιστοκαλλιέργεια από ό,τι τα γηραιότερα. Τέλος, σημαντική επίδραση στην απόκριση του εκφύτου στην ιστοκαλλιέργεια ασκεί η σχετική θέση αυτού πάνω στο μητρικό φυτό. Αυτό εξηγείται κυρίως από το γεγονός ότι υφίσταται διαβάθμιση της συγκέντρωσης ορμονικών και θρεπτικών παραγόντων κατά μήκος του άξονα τροφοδοσίας των φυτών με νερό και θρεπτικά στοιχεία. Για παράδειγμα, οι αυξίνες συντίθενται κυρίως στην κορυφή κάθε βλαστού και η συγκέντρωσή τους ελαττώνεται όσο προχωρούμε προς τα κάτω, ενώ το αντίθετο ακριβώς συμβαίνει με τις κυτοκινίνες (οι οποίες συντίθενται βασικά στις ρίζες). Επομένως κάθε ιστός σε διαφορετικά σημείο του μητρικού φυτού περιέχει διαφορετικές συγκεντρώσεις

αυτών των ορμονών με αποτέλεσμα να έχει και διαφορετική προδιάθεση στην ιστοκαλλιέργεια.

- Στους παράγοντες που σχετίζονται με τις συνθήκες της ιστοκαλλιέργειας, όπως για παράδειγμα το είδος του θρεπτικού υποστρώματος, οι ρυθμιστές αύξησης, το δοχείο καλλιέργειας και περιβαλλοντικές παράμετροι όπως το φως και η θερμοκρασία επώασης της καλλιέργειας.

Μπορούμε να αλλάξουμε τις ίδιες τις συνθήκες της καλλιέργειας. Τα συστατικά του περιβάλλοντος της ιστοκαλλιέργειας μπορούν να ταξινομηθούν σε διάφορες κατηγορίες, σημαντικότερες από τις οποίες είναι οι εξής:

- Το θρεπτικό υπόστρωμα
- Ο φωτισμός
- Η θερμοκρασία
- Το ατμοσφαιρικό περιβάλλον (ΚΙΝΤΖΙΟΣ 2015)

1.11 ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΣΤΟ ΕΙΔΟΣ *Origanum majorana* και στο γένος *Origanum*

Η ανασκόπηση της βιβλιογραφίας για μικρο- πολλαπλασιασμό του είδους έδειξε ότι δεν υπάρχουν σχετικές μελέτες, οπότε πραγματοποιήθηκε αναζήτηση για μελέτες μικρο- πολλαπλασιασμού άλλων ειδών του γένους *Origanum* και της οικογένειας *Lamiaceae*.

Οι Saez *et al.*, (1994) πέτυχαν τον μικροπολλαπλασιασμό του είδους *Thymus ripperella*, χρησιμοποιώντας έκφυτα ακραίων τμημάτων βλαστών με τρεις κόμβους, από σπορόφυτα που είχαν βλαστήσει *in vitro*. Χρησιμοποίησαν υπόστρωμα CMS (τροποποιημένο MS) και τις φυτορρυθμιστικές ουσίες BA, κινετίνη, NAA και IAA. Η χρήση του BA οδήγησε σε υψηλότερους ρυθμούς αναγέννησης βλαστών.

Το είδος *Origanum vulgare* X *apalii* πολλαπλασιάστηκε με επιτυχία χρησιμοποιώντας έκφυτα κορυφών βλαστών από τους Coleniowski *et al.*, (2003). Στο στάδιο του πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών χρησιμοποίησαν διάφορους συνδυασμούς των φυτορρυθμιστικών ουσιών NAA και BA, χωρίς

όμως η χρήση τους να αυξήσει τον αριθμό των βλαστών και των κόμβων που σχηματίστηκαν.

Οι Oluik και Cakir, 2009, πολλαπλασίασαν επιτυχώς με μικρο - πολλαπλασιασμό, το είδος *Origanum spileum*, χρησιμοποιώντας έκφυτα κορυφής βλαστών από σπορόφυτα μικρής ηλικίας (17 ημερών). Οι παραγόμενοι βλαστοί στη συνέχεια υπο καλλιεργήθηκαν, ριζοβόλησαν και εγκλιματίστηκαν με επιτυχία.

Τα είδη *Lavandula latifolia* και *Lavandula stoechas*, πολλαπλασιάστηκαν επιτυχώς με μικρο πολλαπλασιασμό από τους Calvo και Segura (1988). Ευκολότερα σχηματίστηκαν βλαστοί στο είδος *Lavandula stoechas*. Χρησιμοποιήθηκαν ως έκφυτα κοτυληδόνες, υποκοτύλια και ρίζες από φυτά που αναπτύσσονταν υπό ασηπτικές συνθήκες και τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα MS.

Οι Soni *et al* (2013), ερεύνησαν τον μικρο πολλαπλασιασμό στο είδος *Lavandula aungustifolia*. Χρησιμοποίησαν έκφυτα κόμβων μήκους 5-10mm, που εμφυτεύθηκαν σε υπόστρωμα MS με συνδυασμού των BAP και IAA. Ο υψηλότερος αριθμός βλαστών επιτεύχθηκε σε υπόστρωμα με 0,5 mg⁻¹ IAA και 2 mg⁻¹ BAP.

2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Υλικά

2.1.1 Φυτικό Υλικό

Τα έκφυτα του είδους *Origanum majorana* που χρησιμοποιήθηκαν στις *in vitro* καλλιέργειες κόπηκαν από ήδη υπάρχοντα φυτάρια του είδους που αναπτύσσονταν *in vitro*.

2.1.2 Υλικά Θρεπτικού Υποστρώματος Καλλιέργειας *in vitro*

- Υπόστρωμα MS (Mourgashige and Skoog, 1962) σε σκόνη χωρίς IAA, Kinetin της εταιρίας ICN BIOMEDICALS.
- Σουκρόζη εμπορίου σε συγκέντρωση 1.5 ή 3 %
- Μυοινοζιτόλη (Myo-inositol) M.B.= 180,16(της εταιρείας Merck)
- Άγαρ της εταιρίας Ρουμπουλάκης Α.Ε.

2.1.3 Δοχεία *in vitro* Καλλιέργειας

Σε όλα τα στάδια της *in vitro* καλλιέργειας ως δοχεία χρησιμοποιήθηκαν τρυβλία Petri, διαμέτρου 9 cm.

Ως υλικά κάλυψής τους χρησιμοποιήθηκαν α. μεμβράνη sanitas (πλαστική μεμβράνη περιτυλίγματος με το εμπορικό όνομα sanitas της εταιρείας Σαράντης Α.Ε., η οποία είχε τις εξής ιδιότητες : περατότητα σε διοξειδίο του άνθρακα 55.000 cm³ m⁻² σε 24 h, περατότητα σε υδρατμούς 110 g m⁻² σε 24 h, περατότητα σε οξυγόνο 8.5 cm³ m⁻² σε 24 h) και β. Parafilm.

2.1.4 Υπόστρωμα *in vitro* Καλλιέργειας

Για την καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα με βάση το MS σε σκόνη χωρίς IAA, Kinetin της εταιρίας ICN BIOMEDICALS (Πίν. 1)

Πίνακας 1. Μακροστοιχεία και Ιχνοστοιχεία του Υποστρώματος MS :

Συστατικά	MS (mg/l)	Μισής δύναμης MS (mg/l)
NH ₄ NO ₃	1650	825
KNO ₃	1900	950
CaCl ₂ 2H ₂ O	440	220
MgSO ₄ 7H ₂ O	370	185
KH ₂ PO ₄	170	85
FeSO ₄ 7H ₂ O	27,8	13,9
Na ₂ EDTA	37,3	18,35
MnSO ₄ 4H ₂ O	22,3	11,15
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8,6	4,3
H ₃ BO ₃	6,2	3,1
KI	0,83	0,415
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0,25	0,125
CuSO ₄ 5H ₂ O	0,025	0,0125
CoCl ₂ 6H ₂ O	0,025	0,0125
Myo-inositol	100	50
Nicotinic acid	0,5	0,25
Pyrodoxine. HCL	0,5	0,25
Thiamine. HCL	0,1	0,05
Glycine	2	1

Χρησιμοποιήθηκε μισής δύναμης MS (Murashige & Skoog, 1962). Στον πίνακα 2 αναφέρονται τα συστατικά του θρεπτικού υποστρώματος :Όλα τα υποστρώματα σταθεροποιήθηκαν με 6 g l⁻¹ άγαρ. Το pH όλων των υποστρωμάτων ρυθμιζόταν με αραιό HCL ή αραιό NaOH 1N στην τιμή 5,7 πριν την τοποθέτηση του άγαρ και την αποστείρωση.

Συσκευές και άλλα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν

1. Συσκευή υγρής αποστείρωσης(Εικόνα 4)
2. Τράπεζα οριζόντιας νηματικής ροής (Εικόνα 1)
3. Ζυγός ακριβείας
4. Όργανο μέτρησης pH
5. Θερμαινόμενος μαγνητικός αναδευτήρας (Εικόνα 3)
6. Μεταλλικές λαβίδες
7. Νυστέρια
8. Πιπέτα ακριβείας
9. Ποτήρια ζέσεως 50 και 100 ml
10. Θάλαμος ανάπτυξης φυτών
11. Απλή μεμβράνη
12. Παραφίλμ: ένα θερμοπλαστικό εύκαμπτο πλαστικό ανθεκτικό στην υγρασία που κρατάει έξω από το τρυβλίο τους διάφορους μικροοργανισμούς που μολύνουν τα έκφυτα

2.2 Μέθοδοι

2.2.1 Μέθοδος παρασκευής θρεπτικών υποστρωμάτων

Σε δοχείο ζέσεως με αποσταγμένο νερό (όγκου λιγότερο του τελικού) προσθέτονταν οι ακριβείς ποσότητες, MS 4.4 ή 2.2 g/l ανάλογα αν το υπόστρωμα ήταν πλήρους ή μισής δύναμης, Σουκρόζης 3 ή 1.5%, Μυοινοζιτόλη 100mg/l. Στη συγκεκριμένη περίπτωση μισής δύναμης.

Αφού προστέθηκαν τα υλικά τα διαλύματα 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 NaOH και HCl. Στη συνέχεια, προστίθεται, για τη σταθεροποίηση των υποστρωμάτων, άγαρ στην απαιτούμενη ποσότητα (6 g/l) και ακολουθούσε θέρμανση του διαλύματος, υπό συνεχή ανάδευση μέχρι να λιώσει το άγαρ. Το υπόστρωμα αποστειρώνονταν σε δοχεία αποστείρωσης

στον κλίβανο για 20 min και στη συνέχεια εντός του θαλάμου νηματικής ροής μοιράζονταν στα τρυβλία.



Εικόνα 1. Θάλαμος Νηματικής Ροής που βρίσκεται στο εργαστήριο μικροπολλαπλασιασμού του ΤΕΙ Πελοποννήσου



Εικόνα 2. Γυάλινο Δοχείο που βρίσκεται στο εργαστήριο μικροπολλαπλασιασμού του ΤΕΙ Πελοποννήσου



Εικόνα 3. Μαγνητικός αναδευτήρας που βρίσκεται στο εργαστήριο μικροπολλαπλασιασμού του ΤΕΙ Πελοποννήσου

2.2.2 Αποστείρωση Υλικών

Όλα τα δοχεία (Εικ. 2) με τα υποστρώματα, αλλά και όλα τα υλικά και τα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν στις εμφυτεύσεις ή απολυμάνσεις, αποστειρώνονταν σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης (αυτόκλειστο) επί 20 min, σε θερμοκρασία 121°C και σε πίεση 1.1 atm (Εικ. 4). Προσοχή δόθηκε στο ότι όλα τα καπάκια έπρεπε να είναι χαλαρά τοποθετημένα κατά την αποστείρωση. Επιπλέον, αν υπάρχουν μολυσμένα βάζα καλλιέργειας, πριν ανοιχτούν και πλυθούν αποστειρώνονται για 40 λεπτά, σε θερμοκρασία 121°C και σε πίεση 1,1 atm.



Εικόνα 4. Κλίβανος Αποστείρωσης που βρίσκεται στο εργαστήριο μικροπολλαπλασιασμού του ΤΕΙ Πελοποννήσου

2.2.3 Καλλιέργεια πολλαπλασιασμού (υπο- καλλιέργεια) του *Origanum majorana*

Φυτάρια του είδους που είχαν σχηματιστεί από αρχικές καλλιέργειες εγκατάστασης του είδους *in vitro* (τα έκφυτα προήλθαν από *ex vitro* αναπτυσσόμενα φυτά), αναπτύσσονταν και χρησιμοποιήθηκαν ως μητρικά φυτά στις καλλιέργειες πολλαπλασιασμού. Από καλά αναπτυσσόμενους βλαστούς *in vitro* του είδους κόπηκαν έκφυτα εντός του θαλάμου νηματικής ροής (Εικ. 1) και τοποθετήθηκαν σε τρυβλία PETRI με υπόστρωμα μισής δύναμης MS και 1,5% σουκρόζη. Τοποθετήθηκαν πέντε έκφυτα μήκους 6 -8 mm, ανά τρυβλίο. Τα μισά από τα τρυβλία στα οποία εγκαταστάθηκαν έκφυτα, σφραγίστηκαν με ημιπερατή μεμβράνη και τα άλλα μισά με parafilm (ώστε να μην έρχονται σε επαφή με το εξωτερικό περιβάλλον). Στη συνέχεια τα έκφυτα τοποθετήθηκαν για επώαση σε θάλαμο σταθερών και πλήρως ελεγχόμενων συνθηκών (στους $20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ με 16h φωτοπερίοδο υπό $37,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fluorescent συνεχές φως) και παρέμειναν σε αυτόν για 40 ημέρες. Μετά το πέρας των ημερών πραγματοποιήθηκε η πρώτη μέτρηση.

2.2.4 Εκτίμηση Αποτελεσμάτων

Τα αποτελέσματα στα πειράματα εγκατάστασης των εκφύτων του είδους λαμβάνονταν 40 ημέρες μετά την εγκατάστασή τους στο υπόστρωμα. Μετρήθηκαν όλα τα έκφυτα που βλάστησαν στο τρυβλίο καλλιέργειας, καθώς και ο αριθμός των εκφύτων που δεν μολύνθηκαν. Εκτιμήθηκαν το ποσοστό αντίδρασης, ο αριθμός των βλαστών, ο αριθμός των φύλλων, το μήκος του βλαστού και ο σχηματισμός ή όχι κάλλου.

Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων έγινε με το πρόγραμμα STATGRAPHIS CENTURION. Η σημαντικότητα των αποτελεσμάτων ελέγχθηκε με ανάλυση της διασποράς (ANALYSIS OF ANOVA).

Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο Students σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0.05$ (*) ή $P \leq 0.01$ (**). Ανάλογα με την κάθε επιμέρους πειραματική διαδικασία και τους παράγοντες που εξετάστηκαν σε αυτήν σχεδιάστηκαν, μονοπαραγοντικά και διπαραγοντικά πειράματα και εφαρμόστηκε το Εντελώς Τυχαιοποιημένο Σχέδιο. Στην παράθεση των αποτελεσμάτων οι μέσοι που ακολουθούνται από διαφορετικά γράμματα της λατινικής αλφαβήτου διαφέρουν στατιστικά σημαντικά. Ο αριθμός των επαναλήψεων που χρησιμοποιήθηκαν ανά πειραματική διαδικασία αναγράφεται σε κάθε πίνακα αποτελεσμάτων.

Κατά την στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων, ως επανάληψη θεωρήθηκε το κάθε έκφυτο που τοποθετήθηκε.

3. Αποτελέσματα

Κατά την φάση των καλλιεργειών πολλαπλασιασμού του είδους *Origanum majorana*, εξετάστηκε εάν η χρήση της διάφανου ημιπερατής μεμβράνης της εταιρίας sanitas, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υλικό κάλυψης των τρυβλίων Petri, όπου εγκαταστάθηκαν τα έκφυτα.

Η χρήση της ημιπερατής μεμβράνης δεν μείωσε το ποσοστό αντίδρασης των εκφύτων (Πίν. 2). Τα έκφυτα που εγκαταστάθηκαν σε τρυβλία με υπόστρωμα και σφραγίστηκαν με την ημιπερατή μεμβράνη, αντέδρασαν σε ποσοστό 95 %, μη στατιστικά σημαντικά χαμηλότερο από αυτό των εκφύτων που τοποθετήθηκαν σε τρυβλία που σφραγίστηκαν με Παραφίλμ (100%).

Πίνακας 2. Επίδραση του υλικού κάλυψης των τρυβλίων Petri (Παραφίλμ ή ημιπερατή μεμβράνη) στο ποσοστό των εκφύτων του είδους *Origanum majorana* που αντέδρασαν και σχημάτισαν βλαστούς. Εγκατάσταση των εκφύτων σε θερμοκρασία 20°C και σε φωτοπερίοδο 16h πλήρους φωτός, έντασης 4000 lux ($37.5 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$), n=5. Εκτίμηση του ποσοστού αντίδρασης των εκφύτων 30 ημέρες μετά την εγκατάστασή τους.

Πηγή παραλλακτικότητας	Ποσοστό βλάστησης (%)
Ημιπερατή μεμβράνη	95
Παραφίλμ	100
Υλικό κάλυψης	NS

Μέσοι με διαφορετικό λατινικό γράμμα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά
NS μη στατιστικά σημαντική διαφορά,
* στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%

Η χρήση της ημιπερατής μεμβράνης ως υλικό κάλυψης των τρυβλίων Petri που εγκαθίστανται τα έκφυτα, δεν επηρέασε στατιστικά σημαντικά τον αριθμό των βλαστών που σχηματίστηκαν ανά έκφυτο που αντέδρασε (Πίν. 3). Η μη μείωση του αριθμού των βλαστών που σχηματίστηκαν επιτρέπει την χρήση της ημιπερατής μεμβράνης χωρίς μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού.

Πίνακας 3. Επίδραση του υλικού κάλυψης των τρυβλίων Petri (Παραφίλμ ή ημιπερατή μεμβράνη) στον αριθμό των βλαστών που σχηματίστηκαν ανά εκφύτο που αντέδρασε του είδους *Origanum majorana*. Εγκατάσταση των εκφύτων σε θερμοκρασία 20°C και σε φωτοπερίοδο 16h πλήρους φωτός, έντασης 4000 lux ($37.5 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$), n=25. Εκτίμηση του αριθμού των βλαστών που σχηματίστηκαν 30 ημέρες μετά την εγκατάστασή των εκφύτων.

Πηγή παραλλακτικότητας	Αριθμός βλαστών που σχηματίστηκαν
Παραφίλμ	1,8
Ημιπερατή μεμβράνη	1,6
Υλικό κάλυψης	NS
Μέσοι με διαφορετικό λατινικό γράμμα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά NS μη στατιστικά σημαντική διαφορά, * στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%	

Πίνακας 4. Επίδραση του υλικού κάλυψης των τρυβλίων Petri (Παραφίλμ ή ημιπερατή μεμβράνη) στον αριθμό των κόμβων που σχηματίστηκαν ανά βλαστό που αντέδρασε του είδους *Origanum majorana*. Εγκατάσταση των εκφύτων σε θερμοκρασία 20°C και σε φωτοπερίοδο 16h πλήρους φωτός, έντασης 4000 lux ($37.5 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$), n=25. Εκτίμηση του αριθμού των κόμβων που σχηματίστηκαν 30 ημέρες μετά την εγκατάστασή των εκφύτων.

Πηγή παραλλακτικότητας	Αριθμός κόμβων που σχηματίστηκαν
Παραφίλμ	3.4
Ημιπερατή μεμβράνη	3.3
Υλικό κάλυψης	NS
Μέσοι με διαφορετικό λατινικό γράμμα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά NS μη στατιστικά σημαντική διαφορά, * στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%	

Ο αριθμός των κόμβων που σχηματίστηκαν δεν επηρεάστηκε από το υλικό κάλυψης των τρυβλίων Petri (Πίν. 4). Ο αριθμός των κόμβων που σχηματίστηκαν παρέμεινε σταθερός (3.3 ή 3.4) υπό κάλυψη των τρυβλίων Petri με οποιοδήποτε από τα δύο υλικά κάλυψης (Πίν. 4).

Πίνακας 5. Επίδραση του υλικού κάλυψης των τρυβλίων Petri (Παραφίλμ ή ημιπερατή μεμβράνη) στο ποσοστό των βλαστών του είδους *Origanum majorana* που σχημάτισαν ρίζες. Εγκατάσταση των εκφύτων σε θερμοκρασία 20°C και σε φωτοπερίοδο 16h πλήρους φωτός, έντασης 4000 lux (37.5 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$), n=25. Εκτίμηση του μέσου των βλαστών που σχηματίστηκαν 30 ημέρες μετά την εγκατάστασή των εκφύτων.

Πηγή παραλλακτικότητας	Ποσοστό βλαστών που σχημάτισαν ρίζες
Παραφίλμ	80 b
Ημιπερατή μεμβράνη	90 a
Υλικό κάλυψης	*
Μέσοι με διαφορετικό λατινικό γράμμα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά NS μη στατιστικά σημαντική διαφορά, * στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%	

Το ποσοστό των βλαστών του είδους *Origanum majorana* που σχημάτισαν ρίζες (σε υπόστρωμα χωρίς αυξίνη) ήταν στατιστικά υψηλότερο όταν τα τρυβλία Petri σφραγίστηκαν με ημιπερατή μεμβράνη σε σύγκριση με το Παραφίλμ (Πίν. 5). Οι βλαστοί που τοποθετήθηκαν σε τρυβλία που σφραγίστηκαν με ημιπερατή μεμβράνη μάλιστα ριζοβόλησαν σε σημαντικά υψηλό ποσοστό δεδομένου την μη παρουσία αυξίνης στο υπόστρωμα.

Ο αριθμός των ριζών που σχηματίστηκαν ανά βλαστό που ριζοβόλησε παρέμεινε σταθερός (αρκετά υψηλός) και δεν επηρεάστηκε από το υλικό κάλυψης των τρυβλίων (Πίν. 6).

Η χρήση της ημιπερατής μεμβράνης sanitas ως υλικό κάλυψης των τρυβλίων Petri που εγκαθίστανται τα έκφυτα, λοιπό αύξησε το ποσοστό των εκπτυχθέντων βλαστών που σχημάτισαν ρίζες και ταυτόχρονα δεν επηρέασε τον ρυθμό πολλαπλασιασμού στο στάδιο του πολλαπλασιασμού των

καλλιιεργειών. Ο ρυθμός πολλαπλασιασμού των καλλιιεργειών δίνεται ως το γινόμενο του ποσοστού αντίδρασης των εκφύτων επί του αριθμού των βλαστών που σχηματίστηκαν, επί του αριθμού των κόμβων που σχηματίστηκαν.

Πίνακας 6. Επίδραση του υλικού κάλυψης των τρυβλίων Petri (Παραφίλμ ή ημιπερατή μεμβράνη) στον αριθμό των ριζών που σχηματίστηκαν του είδους *Origanum majorana*. Εγκατάσταση των εκφύτων σε θερμοκρασία 20°C και σε φωτοπερίοδο 16h πλήρους φωτός, έντασης 4000 lux ($37.5 \mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$), n=25. Εκτίμηση του μέσου των βλαστών που σχηματίστηκαν 30 ημέρες μετά την εγκατάστασή των εκφύτων.

Πηγή παραλλακτικότητας	Αριθμός ριζών ανά βλαστό
Παραφίλμ	4,5
Ημιπερατή μεμβράνη	4,3
Υλικό κάλυψης	NS

Μέσοι με διαφορετικό λατινικό γράμμα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά
NS μη στατιστικά σημαντική διαφορά,
* στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%

3.4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκε η επίδραση του υλικού κάλυψης των τρυβλίων καλλιέργειας στα οποία εγκαταστάθηκαν έκφυτα στη φάση των καλλιέργειών πολλαπλασιασμού κατά τον μικρο πολλαπλασιασμό του είδους *Origanum majorana*.

Το ζητούμενο από μια επιτυχή μέθοδο μικρο- πολλαπλασιασμού είναι τα έκφυτα να αντιδράσουν σε υψηλό ποσοστό, να σχηματιστούν πολλοί βλαστοί οι οποίοι να έχουν πολλούς κόμβους και μεγάλο μήκος, ώστε ο ρυθμός πολλαπλασιασμού να είναι πολύ υψηλός.

Ως υλικά κάλυψης των τρυβλίων χρησιμοποιήθηκαν το Παραφιλμ και η διάφανη ημιπερατή μεμβράνη της εταιρίας sanitas. Το ζητούμενο από την χρήση ενός τέτοιου υλικού κάλυψης είναι η συμβολή του στον σχηματισμό φυταρίων με φυσιολογικά ανατομικά χαρακτηριστικά, χωρίς όμως την μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού.

Στο είδος *Origanum majorana* η χρήση της ημιπερατής μεμβράνης ως υλικό κάλυψης των τρυβλίων Petri που εγκαθίστανται τα έκφυτα, λοιπό αύξησε το ποσοστό των σχηματισθέντων βλαστών που σχημάτισε ρίζες και ταυτόχρονα δεν επηρέασε το ποσοστό αντίδραση των εκφύτων, τον αριθμό των βλαστών που σχηματίστηκαν, καθώς και τον αριθμό των κόμβων που σχηματίστηκαν. Ο ρυθμός λοιπόν πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών που υπολογίζεται ως το γινόμενο του ποσοστού των εκφύτων που αντέδρασαν στην καλλιέργεια επί του αριθμού των βλαστών που σχηματίστηκαν και του αριθμού των κόμβων που δημιουργήθηκαν δεν μειώθηκε με την χρήση της ημιπερατής μεμβράνης. Η χρήση επίσης της μεμβράνης αυτής αύξησε το ποσοστό σχηματισμού ριζών από τους εκπτυχθέντες βλαστούς.

Ως συνέχεια της μελέτης αυτής πρέπει αν ελεγχθεί η περαιτέρω χρήση της ημιπερατής μεμβράνης στην φάση της ριζοβολίας των σχηματισθέντων βλαστών και να καταμετρηθεί το τελικό ποσοστό εγκλιματισμού των φυταρίων που αναπτύχθηκαν υπό κάλυψη των τρυβλίων με την μεμβράνη αυτή.

4. Βιβλιογραφία

ΞΕΝΟΓΛΩΣΣΗ

- Calvo, M.C. and Segura, J.. In vitro morphogenesis from explants of *Lavandula latifolia* and *Lavandula stoechas* Seedlings, *Scientia Horticulturae*, 36, 1–2, 131-137, 1988.
- Coleniowski, M.E., Flamarique, C. and Bima, P., (2003). Micropropagation of Oregano (*Origanum vulgare X applii*) from Meristem Tips. *In Vitro Cell Development Biology*. Plant 39:125–128.
- Oluk E.A., Cakir A., (2009). Micropropagation of *Origanum sipyleum* L., an Endemic Medicinal Herb of Turkey. *African Journal of Biotechnology* 8: 5769-5772.
- Saez F., Sanchez. P., Piqueras A., (1994). Micropropagation of *Thymus piperella*. *Plant Cell Tissue Organ Culture*, 39: 269-272.
- Soni DR, Sodhi G Kaur, Sayyad FG,. Micropropagation studies in *Lavandula aungustifolia* *Discovery Biotechnology*, 4, Number 12, December 2013

ΕΛΛΗΝΙΚΗ

- Δόρδας Χρήστος : Αρωματικά Φαρμακευτικά Φυτά 2012
- Κατσιώτης Θ. Σταύρος, Πασχαλίνα Σ. Χατζοπούλου: « Αρωματικά Φαρμακευτικά Φυτά και αιθέρια Έλαια» Γ' Έκδοση
- Κιντζιος,Σ.(2015). Εισαγωγή στο μικροπολλαπλασιασμό των φυτών. Αθήνα: Ελληνικά Ακαδημαϊκά Ηλεκτρονικά Συγγράμματα και βοηθήματα.
- Λιεπουρή Ελένη. ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ: ΕΛΛΗΝΙΚΑ ΒΟΤΑΝΑ ΚΑΙ ΟΙ ΧΡΗΣΕΙΣ ΤΟΥΣ ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΑΛΛΕΣ ΧΡΗΣΕΙΣ ΠΙΘΑΝΕΣ ΧΡΗΣΕΙΣ ΣΤΗΝ ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗ ΤΟΠΙΟΥ ΚΑΙ ΣΤΗΝ ΑΝΘΟΚΟΜΙΑ.
- Ξυνιάς, Ι. Ν. (2014). ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΦΥΤΩΝ Θεωρία & ασκήσεις. Αιγάλεω: ΕΜΒΡΥΟ

Παπαχατζής, Α., & Καλορίζου, Ε. (2008). *ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ PLANT PROPAGATION MATERIAL*. ΛΑΡΙΣΑ: Γραμμικό.

ΣΚΡΟΥΜΠΗΣ, Β. (1998). *ΑΡΩΜΑΤΙΚΑ, ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ και ΜΕΛΙΣΣΟΤΡΟΦΙΚΑ ΦΥΤΑ ΤΗΣ ΕΛΛΑΔΑΣ*. Αθήνα: ΑγροΤύπος.