

**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΩΝ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΘΕΜΑ

«ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ *Lavandula stoechas*»

ΚΙΟΣΙΑ ΜΑΡΙΛΝΤΑ



Καλαμάτα 2019

**ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΩΝ**

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΘΕΜΑ

«ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ *Lavandula stoechas*»

ΚΙΟΣΙΑ ΜΑΡΙΛΝΤΑ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΚΑΡΤΣΩΝΑΣ ΕΠΑΜΕΙΝΩΝΔΑΣ

Καλαμάτα 2019

ΣΚΟΠΟΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	6
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	8
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	10
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο	13
1.1 LAVANDULA STOECHAS	13
1.2. ΚΑΤΑΓΩΓΗ , ΕΞΑΠΛΩΣΗ, ΙΣΤΟΡΙΚΟ	13
1.3. ΒΟΤΑΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ, ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ- ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ.....	15
1.4. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ - ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΣΕ ΚΛΙΜΑ, ΕΔΑΦΟΣ ΚΑΙ ΝΕΡΟ	18
1.4.1. ΓΕΝΙΚΑ	18
1.5. ΑΙΘΕΡΑΙΑ ΕΛΑΙΑ	19
1.6. ΑΛΛΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ.....	26
1.7. ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ	29
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο	32
2. ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ	32
2.1. ΒΑΣΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ.....	32
2.2. Η ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΩΣ ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ	21
2.3. ΤΥΠΟΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ	22
2.4. ΣΤΑΔΙΑ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.....	43
2.5. ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ – ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ	44
2.6. ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	45
2.7 Ο ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΣΤΟ ΕΙΔΟΣ LAVANDULA STOECHAS.. ...	34
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο	49
3.1 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	37
3.1.1 ΥΛΙΚΑ.....	37
3.1.1.1 ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ.....	37
3.1.1.2.ΥΛΙΚΑ ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗΣ ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΩΝ	37

3.1.1.3. ΥΛΙΚΑ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ IN VITRO	37
3.1.1.4. ΔΟΧΕΙΑ IN VITRO ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	39
3.1.2. ΜΕΘΟΔΟΙ	40
3.1.2.1. ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ	40
3.1.2.2 ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ ΥΛΙΚΩΝ	41
3.1.2.3 ΕΚΦΥΤΑ-ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ ΕΚΦΥΤΩΝ	41
3.1.2.4 ΣΥΝΘΗΚΕΣ IN VITRO ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	58
3.1.2.5 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	60
3.1.2.6 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΣΧΕΔΙΑ – ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	60
3.3 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	63
3.4 ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	65
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	66

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

- MS: θρεπτικό υπόστρωμα Murashige and Skoog
- MS/2: θρεπτικό υπόστρωμα με τη συγκέντρωση των ανόργανων στοιχείων μειωμένη στο 50%

Υπεύθυνη Δήλωση : Εγώ, η Κίτσια Μαρίλντα βεβαιώνω ότι είμαι η συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας με τίτλο **«ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ *Lavandula stoechas*»**

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 *Lavandula stoechas*. 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. 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 περιεκτικότητα 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 *Lavandula stoechas* εξετάστηκε η δυνατότητα πολλαπλασιασμού, 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 ταινία micropore της 3m 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 όχι απλώς δεν μείωσε αλλά αντίθετα αύξησε την αντίδραση των εκφύτων (ποσοστό αντίδρασης, αριθμός βλαστών, αριθμός κόμβων και μήκος βλαστών), οπότε η χρήση της ενδείκνυται στον πολλαπλασιασμό των *in vitro* εγκατεστημένων καλλιεργειών του είδους *Lavandula stoechas*.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1. *Lavandula stoechas*

Η Λαβαντούλα ή στοεχάς (*Lavandula stoechas*) ανήκει σε γένος φυτών της οικογενείας των Χειλανθών (Labiatae), περιλαμβάνει δε περί τα εικοσιπέντε (25) είδη, ιθαγενή των παραμεσογειών περιοχών των Καναρίων νήσων, της Ινδίας και διαφόρων άλλων χωρών της Ασίας.

Στην Ελλάδα απαντούν ως αυτοφυή δύο είδη:

α) Λαβαντούλα η στοεχάς (*Lavandula stoechas*)

β) Λαβαντούλα η στενόφυλλος (*Lavandula angustifolia*).

Από αυτά κοινότερη είναι η Λαβαντούλα η στοιχάς, γνωστή κοινώς με τα ονόματα: λεβάντα, αγριολεβάντα, λαβαντή, λαμπρή ή λαμπρά μυροφόρα, χαμολίβανο, καραμπάσι κλπ. (Βικιπαίδεια,)

Η Λαβαντούλα η στοεχάς είναι φυτό φρυγανώδες, πολυετές, πολύκλαδο, με βλαστούς όρθιους, οι οποίοι φύονται στη βάση (ύψους 50-70cm. περίπου). Τα φύλλα της είναι γκριζοπράσινα, αντίθετα, στενά, γραμμοειδή έως λογχοειδή, με άκρα, τα οποία γυρίζουν συνήθως προς τα κάτω. Οι ανθοφόροι βλαστοί καταλήγουν σε ταξιανθία τύπου στάχυ, που αποτελείται από χαλαρές ή συμπαγείς ομάδες, από κυανόχρωμα ή ανοιχτοϊώδη άνθη. Τα φύλλα και τα άνθη του φυτού καλύπτονται από άφθονες αδενώδεις τρίχες, που περιέχουν ένα αιθέριο έλαιο, στο οποίο οφείλεται το χαρακτηριστικό, ευχάριστο άρωμα του φυτού. Όταν φύλλα και άνθη της λεβάντας αποσταχθούν με υδρατμούς, λαμβάνεται το αιθέριο έλαιο (0,50%-3%), άχρωμο ή ελαφρώς κιτρινωπό. Κύριο συστατικό του είναι η χημική ένωση οξικό λιναύλιο (30-40%). Επίσης ενδιαφέρον έχει και η περιεκτικότητα σε ελεύθερες αλκοόλες (λιναλοόλη, γερανιόλη, βορνεόλη κ.α.). Εκτός από τα συστατικά αυτά, η λεβάντα περιέχει και διάφορες άλλες οργανικές χημικές ενώσεις, στις οποίες οφείλεται η φυσιολογική της δράση. (Βικιπαίδεια,)

Η λεβάντα φύεται σε μέρη πετρώδη, ξηρά, πυριτικά, καλώς στραγγίζοντα εδάφη και ηλιόλουστα. Η λεβάντα καλλιεργείται επίσης, είτε ως καλλωπιστικό φυτό, είτε για την παραγωγή αιθέριου ελαίου και άλλων προϊόντων.

Διάφορα είδη λεβάντας καλλιεργούνται σήμερα σε πολλές χώρες, κείμενες παρά την Μεσόγειο θάλασσα, καθώς επίσης στην Αγγλία, την Ρωσία και την Αμερική.

Η κύρια και η παλαιότερη παραγωγός χώρα είναι η Γαλλία. Στην Ελλάδα καλλιέργειες λεβάντας υπάρχουν στα Επτάνησα (Κέρκυρα, Κεφαλληνία), στην Βόρεια Ελλάδα και αλλού.



Εικόνα 1. Λεπτομέρεια άνθους λεβάντας (www.herb.gr)

1.2. ΚΑΤΑΓΩΓΗ,ΕΞΑΠΛΩΣΗ,ΙΣΤΟΡΙΚΟ

Τα περισσότερα είδη λεβάντας κατάγονται από την λεκάνη της Μεσόγειου και απαντώνται σε βραχώδεις και ασβεστολιθικές περιοχές. Επίσης η λεβάντα εμφανίζεται πάνω από τη βόρεια Αφρική, τη Μεσόγειο της Ευρώπης και την Δυτική Ινδία.

Η λεβάντα καλλιεργήθηκε από τους αρχαίους Έλληνες ,τους Ρωμαίους ,καθώς και την εποχή της Ελισαβετιανής Αγγλίας. Το όνομα <<λεβάντα>> προέρχεται από το λατινικό lavare που σημαίνει πλένω ή κολυμπώ. Είδη όπως η *Lavandula latifolia* φύονται σε ένα μεγάλο μέρος της Μεσόγειου προτιμώντας πιο ζεστά κλίματα και χαμηλότερες σε υψόμετρο περιοχές.

Οι αποδόσεις της πραγματικής λεβάντας σε αιθέριο έλαιο κυμαίνονται από 0.8-3 κιλ/στρμ.

Ενώ οι αποδόσεις σε αποξηραμένα άνθη από 50-100 κιλ/στρμ.

Παγκοσμίως παράγονται 200 τόνοι υψηλής ποιότητας λαδιού λεβάντας. Η αναλογία παράγωγης λαδιού λεβάντας και λεβαντινης παγκοσμίως είναι 1:5.

Η τιμή του λαδιού της λεβαντινης είναι χαμηλότερη από αυτό της πραγματικής λεβάντας.



Εικόνα 2. Χάρτης με τις περιοχές στην Ευρώπη όπου καλλιεργείται η λεβάντα(πηγή: *Lavandula angustifolia* - English Lavender, Origin, Description and Usage)

Οι μεγαλύτερες παράγωγες χώρες σε αιθέριο λεβάντας είναι η Βουλγαρία, η Αγγλία, η Σερβία, η Αυστραλία, οι ΗΠΑ, ο Καναδάς, η Νότια Αφρική, η Τανζανία, η Ιταλία και η Ισπανία. Η πραγματική λεβάντα κυρίως για άρωμα καλλιεργείται στην Ευρώπη και ειδικότερα στη Γαλλία (εικόνα 2).

1.3 ΒΟΤΑΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ, ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ - ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ.

Η οικογένεια με τον μεγαλύτερο αριθμό φυτών στην Ελλάδα είναι η οικογένεια *Lamiaceae* (χειλανθη). Η οικογένεια *Lamiaceae* χαρακτηρίζεται από πολυάριθμα είδη των ξηρών και θερμών κλιματικών περιοχών, με πολλά χαρακτηριστικά γνωρίσματα όπως ο τετράγωνος βλαστός με τα αντιθέτως φυόμενα φύλλα, η διάταξη των ανθέων που σχηματίζουν μονοχασία ή διχασία, η συμπεταλή στεφάνη, ο συσσεπαλός κάλυκας που περικλείει τον σωλήνα της στεφάνης, οι 4 άνισοι στήμονες που σχηματίζουν 2 ζεύγη, η επίφυσης δικαρποφυλλική ωθήκη και τα αιθέρια έλαια που παράγουν σε ειδικούς αδένες του βλαστού, των φύλλων και των ανθέων. Στην Ελλάδα φύονται πολλά είδη της οικογένειας *Lamiaceae*, τα οποία δεν είναι χρήσιμα μόνο ως αρωματικά αλλά και ως φαρμακευτικά, αρτυματικά, καλλωπιστικά και μελισσοτροφικά. (<https://el.wikipedia.org/wiki/>)

Η λεβάντα είναι ένα γένος φυτών που ανήκει στην οικογένεια *Lamiaceae*.

Το γνωστότερο είδος είναι η λαβαντούλα που περιλαμβάνει γύρω στα 48 είδη λεβάντας.

Είναι ιθαγενές των παραμεσόγειων περιοχών. Επίσης απαντάται στα Κανάρια Νησιά, στη Ινδία και σε άλλες ασιατικές χώρες.

Το αιθέριο έλαιο που περιέχουν τα φύλλα χρησιμοποιείται στην αρωματοποιία και για τη θεραπεία νευρασθενειών.

Πρόκειται για φυτό φρυγανώδες, πολύκλαδο, με όρθιους βλαστούς που φύονται από τη βάση. Είναι θάμνος, με ύψος 30 έως 80 cm. Έχει γκριζοπράσινα φύλλα, στενά ως λογχοειδή. Οι ανθοφόροι βλαστοί καταλήγουν σε ταξιανθία τύπου σταχέος.

Γνωστά είδη λεβάντας:

Λεβάντα η στενόφυλλος (*Lavandula angustifolia*)

Λεβάντα ή πλατύφυλλος (*Lavandula latifolia*)

Λεβάντα ή αεριώδης (*Lavandula lanata*)

Λεβάντα ή οδοντωτή (*Lavandula dentata*)

Λεβάντα ή πολυσχιδής (*Lavandula multifida*)

Λεβάντα ή στοεχάς (*Lavandula stoechas*)

Λεβάντα ή στρογγυλόφυλλος (*Lavandula rotundifolia*)

Λεβάντα ή θαλερή (*Lavandula viridis*)

Λεβάντα ή πτερωτή (*Lavandula pinnata*)

Λεβάντα ή κανάριος (*Lavandula canariensis*)

(<https://www.levantashop.gr/lavender/lavender-history/history-and-lavender>)

Υπάρχουν 3 κυρία ειδή που καλλιεργούνται για την παράγωγη του αιθέριου ελαίου:

L.angustifolia (γνησία λεβάντα, λαβαντουλα, λεβαντίνα, καλογεροχορτο). Είναι μικρός πολυετής αειθαλής θάμνος με βλαστό όρθιο, τετραγωνικό και ύψος 30-80 cm . Τα φύλλα είναι αντίθετα, προμήκη, γραμμοειδή, με λίγο χνούδι, τεφρά, τα άνθη είναι μπλε σε απλούς ανθοφόρους βλαστούς που σχηματίζουν κυλινδρικά στάχια. Ανθίζει από το τέλος Ιουνίου μέχρι τον Αύγουστο.

L.stoechas (αγριολεβαντα, μαυροκεφαλο , χαμολιβανο , λάμπρη , μυροφόρα).

Είναι πολυετής αειθαλής θάμνος με βλαστό όρθιο, τετραγωνικό χνουδωτό , γραμμοειδή , τα άνθη είναι ιώδη σε ακραία πυκνά αυγοειδή στάχια.

L. latifolia (πλατύφυλλη λεβάντα). Είναι μικρός αειθαλής θάμνος με βλαστό όρθιο , τετραγωνικό και ύψος 30-80 cm. Τα φύλλα είναι αντίθετα προμήκη, γραμμοειδή, με λίγο χνούδι, τεφρά, τα άνθη είναι ιώδες σε απλούς ανθοφόρους βλαστούς και σχηματίζουν κυλινδρικά στάχια. Ανθίζει από το τέλος Ιουνίου μέχρι τον Αύγουστο.

Γνήσιο αιθέριο έλαιο προέρχεται από την *L.angustifolia* ενώ το γαλλικό αιθέριο έλαιο παράγεται από την *L. denata*.

Το αιθέριο έλαιο της πλατύφυλλης λεβάντας προέρχεται από την *L. latifolia* ενώ το αιθέριο έλαιο ισπανικής λεβάντας από την *L. stoechas*. (<https://www.levantashop.gr/lavender/lavender-history/history-and-lavender>)

1.4 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ - ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΣΕ ΚΛΙΜΑ, ΕΔΑΦΟΣ ΚΑΙ ΝΕΡΟ

Η λεβάντα είναι μετρίως ανθεκτική στον παγετό και στην ξηρασία. Η πλατύφυλλη λεβάντα δεν είναι τόσο ανθεκτική στον παγετό όσο η λεβάντα η γνησία. Όλα τα είδη λεβάντας είναι ευαίσθητα στην υψηλή εδαφική υγρασία, ενώ οι υψηλές θερμοκρασίες του καλοκαιριού επηρεάζουν την ποιότητα του παραγόμενου αιθέριου ελαίου. Στο φυσικό της οικοσύστημα η γνησία λεβάντα μπορεί να ευδοκιμήσει σε υψόμετρα μέχρι 1700 m από το επίπεδο της θάλασσας, ενώ η πλατύφυλλη αναπτύσσεται σε υψόμετρα 200-700 m. Τα υβρίδια λεβάντας συνήθως αναπτύσσονται σε υψόμετρα 700-1000 m. (Δόρδας,2012)

Η παράγωγή ελαίου αυξάνεται καθώς αυξάνεται το υψόμετρο γιατί η άνθηση των φυτών σε ψυχρές περιοχές είναι αφθονότερη. Οι πολλοί και διαφορετικοί τύποι λεβάντας επιτρέπουν την καλλιέργεια της σε διαφορά μικροκλίματα, από κρύα μέχρι υποτροπικά. Σε κάθε ιδιαίτερο μικρόκλιμα πρέπει να δοκιμάζονται διαφορές ποικιλίες προκειμένου να διαπιστωθεί ποια από αυτές θα αναπτυχτεί καλύτερα. Σε περιοχές με ετήσιο ύψος βροχής 300-1400 m η λεβάντα αποδίδει καλά. Το έδαφος μεταξύ των αρδεύσεων θα πρέπει να διατηρείται χωρίς πολύ υγρασία, για αυτό θα πρέπει να αφήνεται να στραγγίζει καλά πριν την επανάληψη τους. Η λεβάντα χρειάζεται καλώς στραγγισμένα εδάφη ηλιαζόμενα, αμμώδη, αμμοπηλωδη, ή χαλικώδη εδάφη. Το pH του εδάφους πρέπει να κυμαίνεται από 5.8-8.3. Πολύ υγρά εδάφη η κακώς μεταγγιζόμενα, μπορούν να προκαλέσουν κακή ανάπτυξη, ασθένειες ή την νέκρωση των φυτών και θα πρέπει να αποφεύγονται. (Δόρδας, 2012).

Καλλιεργητικές φροντίδες

Προετοιμασία εδάφους

Η προετοιμασία του εδάφους για την εγκατάσταση της καλλιέργειας, περιλαμβάνει το όργωμα του εδάφους σε βάθος 30 cm και στην συνέχεια το δισκοσβαννισμό του ή και χρήση καλλιεργητή.

Αποστάσεις φύτευσης / Πυκνότητα Φύτευσης

Η λεβάντα *L. angustifolia* συνήθως φυτεύεται σε αποστάσεις μεταξύ των γραμμών 0.8 – 1m και 0.60-0.70 m μεταξύ των φυτών επί της γραμμής με πυκνότητα 1500-2000 φυτά ανά στρέμμα, ενώ για τα διαφορά υβρίδια (*Lavandula hybrid*) είναι 1.3-1.7 m μεταξύ των γραμμών και 0.8 -1 m πάνω στη γραμμή. Η πυκνότητα καθορίζεται ανάλογα με τη διαθέσιμη υγρασία, την ποικίλα, το μέγεθος της καλλιέργειας καθώς και με τις μηχανικές καλλιεργητικές εργασίες συγκομιδής. Υψηλές πυκνότητες σημαίνει και υψηλό ποσοστό εγκατάστασης αλλά όμως και μεγάλες αποδόσεις νωρίτερα. Επίσης τα φυτά γίνονται πιο δυνατά και έχουν μεγαλύτερη διάρκεια στο χρόνο. Μια καλά εγκατεστημένη δυναμική καλλιέργεια λεβάντας θα πρέπει να είναι δίνει καλή συγκομιδή το δεύτερο χρόνο της. Τα φυτά της λεβάντας αντέχουν για 10-15 έτη ή ακόμη περισσότερο εάν η διαχείριση της καλλιέργειας είναι σύμφωνη με τις ανάγκες.

Εποχή φύτευσης

Σε ήπια κλίματα καλύτερη εποχή φύτευσης είναι το φθινόπωρο ώστε να προλάβουν τα φυτά να εγκατασταθούν καλύτερα για να αντέξουν το χειμώνα και την άνοιξη να αναπτυχθούν γρηγορότερα. Σε περιοχές με ψυχρούς χειμώνες η φύτευση πρέπει να γίνεται την άνοιξη. Η φύτευση σε αυτές τις περιπτώσεις πρέπει να γίνεται αμέσως μετά το τελευταίο παγετό (Δόρδας, 2012).

Λίπανση

Η λεβάντα αποδίδει καλά σε εδάφη που για άλλες καλλιέργειες θεωρούνται θρεπτικά ανεπαρκή. Αυξημένες ποσότητες αζώτου (N) έχουν σαν αποτέλεσμα τη μείωση της ποσότητας αλλά και της ποιότητας του παραγόμενου αιθέριου ελαίου, τα φυτά γίνονται περισσότερο ευαίσθητα και αυξάνεται ο ανταγωνισμός με τα ζιζάνια. Η συνιστάμενη δόση αζώτου (N) ανά στρέμμα είναι 8-10 kg. Οι απαιτήσεις σε φωσφόρο και κάλιο είναι μικρές και εξαρτώνται από τον τύπο του εδάφους και τη θρεπτική του κατάσταση. Περιοδική προσθήκη ασβεστίου μπορεί να είναι αναγκαία ώστε να διατηρείται η τιμή του PH σε ικανοποιητικό επίπεδο. Μια πλήρης ανάλυση εδάφους πριν τη φύτευση είναι αναγκαία. (Δόρδας, 2012). Άρδευση

Η άρδευση είναι αναγκαία για τα πρώτα 2 χρονιά έως ότου η καλλιέργεια έχει εγκατασταθεί πλήρως. Σε ελαφριά εδάφη ή σε περιοχές με χαμηλές βροχοπτώσεις η άρδευση σε κρίσιμα στάδια εξακολουθεί να είναι αναγκαία.

Τα φυτά στο στάδιο της άνθησης δεν θα πρέπει να αφήνονται χωρίς νερό. Η άρδευση μπορεί να αυξήσει την παραγωγή στις ώριμες καλλιέργειες λεβάντας, αλλά η άκαιρη και υπερβολική άρδευση θα αυξήσει τα προβλήματα των ασθενειών, τα φυτά θα μεγαλώσουν σε ύψος, τα κλαδιά θα σπάσουν και η κόμη του φυτού θα ανοίξει στη μέση.

Σε κάθε περίπτωση η στάγδην άρδευση συνίσταται διότι πέρα από την ορθή εφαρμογή του νερού θα βοηθήσει στον έλεγχο των ζιζανίων. (Δόρδας, 2012).

Κλάδεμα

Η κοπή των ανθέων μαζί με μέρος βλαστών θα πρέπει να γίνεται τα 2 πρώτα χρονιά ώστε να βοηθήσουν τα φυτά να δυναμώσουν για να δημιουργήσουν ένα ανθεκτικό κορμό. Στα μετέπειτα χρονιά το κλάδεμα γίνεται σε διαφορετική περίοδο, μετά τη συγκομιδή, συνήθως το φθινόπωρο αφού η συγκομιδή των αφήνει τα περισσότερα στελέχη στα φυτά. Συνεπώς το κλάδεμα γίνεται αμέσως μετά και σε ύψος τέτοιο ώστε να δυναμώνουμε την καλλιέργεια. Το κλάδεμα μπορεί να γίνει είτε μηχανικά (παρελκόμενα τρίμμα σε ελκυστήρα) είτε με δρεπάνια. (Δόρδας, 2012).

ΣΥΓΚΟΜΙΔΗ

Η συγκομιδή της λεβάντας για παράγωγη αιθέριου ελαίου γίνεται όταν το ανθός έχει ωριμάσει και το κάτω μισό έχει ανοίξει. Η συγκομιδή πρέπει να γίνεται έγκαιρα γιατί υποβαθμίζεται η ποιότητα του. Συνεπώς η συγκομιδή στην σωστή εποχή έχει πολύ μεγάλη σημασία. Αυτό που πρέπει να έχουμε υπόψη κατά τη διάρκεια της συγκομιδής είναι ότι αυτή δεν θα πρέπει να πραγματοποιείται σε πολύ ζεστό καιρό ούτε και σε συνθήκες δυνατού άνεμου, διότι πολύ σημαντικές ποσότητες ελαίου χάνονται με εξάτμιση. Τα στελέχη των ανθέων κόβονται 15-20 cm κάτω από αυτά.

Η συγκομιδή γίνεται είτε με δρεπάνια είτε με ειδικά μηχανήματα. Η κοπή των ανθέων για τις αγορές νωπών και αποξηραμένων αρωματικών φυτών

συνήθως λαμβάνει χωρά μια εβδομάδα αργότερα από ότι για την παράγωγη ελαίου. (Δόρδας, 2012).

ΑΣΘΕΝΕΙΕΣ , ΕΧΘΡΟΙ ΚΑΙ ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ

Η λεβάντα είναι ανθεκτική σε εχθρούς και ασθένειες. Παρόλα αυτά έχουν αναφερθεί προσβολές από νηματώδεις και μύκητες του εδάφους που προσβάλουν το ριζικό σύστημα. (Δόρδας, 2012).

1.5. ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ

Όπως αναφέρθηκε η λεβάντα είναι πολυετής χαμηλός θάμνος με ύψος από 0.3 – 1.2 m. Τα αρωματικά αιθάλη φύλλα της είναι καταπράσινα, αντίθετα και μήκους 5 cm. Ανθίζει το καλοκαίρι. Τα άνθη της έχουν γλυκό άρωμα. Τα μέρη του φυτού που χρησιμοποιούνται για την απόσταξη είναι τα άνθη και σε μικρότερες ποσότητες τα φύλλα. Οι κορυφές των ανθέων παράγουν αιθέριο έλαιο πολύ ανώτερης ποιότητας από αυτό που περιέχεται στα φύλλα. Κατά τη συγκομιδή των ανθέων για αποξήρανση κόβουμε τα άνθη.

Ειδή όπως: *Lavandula dentate*, *L. stoechas*, *L. petrostoechas* , *L. chaetostachys*, υπάρχουν είτε ως υβρίδια, είτε ως υποείδη ενώ τα παραπάνω ειδή ως επί των πλείστων καλλιεργούνται σε εμπορική κλίμακα για την παράγωγη αιθέριων ελαίων.

Καλής ποιότητας αιθέριο έλαιο προέρχεται από το είδος *L.angustifolia*, το γαλλικό αιθέριο έλαιο παράγεται από την *L. denata*, ενώ το αιθέριο έλαιο ισπανικής λεβάντας από την *L. stoechas*.

Το καθένα από τα παραπάνω ειδή παράγει διαφορετικής σύστασης αιθέρια έλαια, καθένα για διαφορετική χρήση. Σε κάθε είδος υπάρχουν αρκετές ποικιλίες που καλλιεργούνται για την παράγωγη και εμπόρια αιθέριων ελαίων.

Παράγοντες που θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την επιλογή μιας ποικιλίας λεβάντας για την παράγωγη αιθέριου ελαίου είναι :

Τα υβρίδια παράγουν τις υψηλότερες αποδόσεις σε άνθη και τις υψηλότερες ποσότητες σε αιθέριο έλαιο ανά μονάδα επιφάνειας.

Οι ποικιλίες του είδους *L. angustifolia* παράγουν μικρότερα άνθη μπλε χρώματος και είναι καταλληλότερες για την παράγωγη αποξηραμένων ανθέων. (Δόρδας, 2012).

1.6 ΑΛΛΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Η λεβάντα καλλιεργείται κυρίως για το αιθέριο έλαιο και λιγότερο για τα αποξηραμένα άνθη και φύλλα, που χρησιμοποιούνται ως αρωματικά κλειστών χωρών και στη προστασία των μάλλινων ρούχων. Το αιθέριο έλαιο έχει εντομοαπωθητικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες και χρησιμοποιείται στη βιομηχανία αρωμάτων, σαπουνιών, καλλυντικών και στην αρωματοθεραπεία.

Η εμπορική του αξία εξαρτάται από τη σύνθεση και κυρίως από τα συστατικά οξικό λιναλυστέρα και λιναλοολη που πρέπει να κυμαίνονται σε ποσοστό 30 -43% και 36- 43% αντίστοιχα. Επίσης το αιθέριο έλαιο της λεβάντας περιέχει λιμονενιο , τερπιν-4-ολη, α-τερπινολη, 1.8 κινεολη, μυρκενιο και α-και β-πινενιο. Η λεβάντα είναι μελισσοτροφικό φυτό αλλά χρησιμοποιείται εκτεταμένα και στην αρχιτεκτονική τοπιοϋ σε πάρκα και κήπους.

1.7 ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ

Η λεβάντα πολλαπλασιάζεται με μοσχεύματα, με σπόρο και με παραφυάδες. Ο πολλαπλασιασμός με σπόρο είναι εφικτός αλλά δεν εξασφαλίζει ομοιόμορφα φυτά.

Τα μοσχεύματα ρέπει να λαμβάνονται από δυνατά και υγιήφυτά που καλλιεργούνται στο ύπαιθρο. Οι ορμόνες ριζοβολάς μπορούν α χρησιμοποιηθούν για την υποβοήθηση της ριζοβολάς αν και η λεβάντα έχει υψηλό ποσοστά επιτυχίας.

Τα μοσχεύματα μήκους 10 έως 15 cm προέρχονται από τους νέους βλαστούς από τους οποίους αφαιρούνται κατά τα 2/3 του μήκους τους τα φύλλα και στη συνέχεια τοποθετούνται σε δίσκους ριζοβολάς στο ριζωτήριο με

κατάλληλο υπόστρωμα. Μείγμα με 30 % οργανικού υποστρώματος και 70 % κατάλληλου εδάφους είναι αποτελεσματικό για την για την επιτυχή ριζοβολία των μοσχευμάτων. (Δόρδας, 2012).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2ο

2.1. ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ/ΒΑΣΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ

Με τον όρο μικροπολλαπλασιασμό περιγράφουμε την τεχνική της παραγωγής ολόκληρων φυτών από μικρά φυτικά μέρη τα οποία ονομάζονται έκφυτα. Τα έκφυτα μπορεί να είναι φυτικά κύτταρα, ιστοί, όργανα, σπόροι που για διάφορους λόγους αδυνατούν αν βλαστήσουν στην φύση ή άλλα φυτικά μέρη. Η εγκατάσταση των εκφύτων γίνεται υπό ασηπτικές συνθήκες και η ανάπτυξη τους σε ελεγχόμενο περιβάλλον.

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). (<https://repository.kallipos.gr>)

Θεωρητικά ένα φυτικό κύτταρο πολλαπλασιαζόμενο μπορεί να δώσει ένα ολόκληρο φυτό ανεξάρτητα αν το κύτταρο αυτό έχει προέλθει από το φύλλο, τον βλαστό, τη ρίζα, τον οφθαλμό, κ.λπ. Το φαινόμενο αυτό ονομάζεται ολοδυναμία (totipotency) και διατυπώθηκε για πρώτη φορά από τους Schwann και Schleiden το 1838. Ο μικροπολλαπλασιασμός (micropropagation) αποτελεί τη σπουδαιότερη εφαρμογή της ολοδυναμίας στη γεωπονική πράξη, καθώς επιτρέπει την αναπαραγωγή ενός ολόκληρου φυτού από δυνητικά κάθε κύτταρο κάθε φυτικού τμήματος, όσο μικρό και αν είναι αυτό. Θεωρητικά, λοιπόν, θα μπορούσαμε να παραλάβουμε δισεκατομμύρια φυτά με την ιστοκαλλιέργεια ενός και μόνο φυτού! Βέβαια, στην πράξη αυτό δεν είναι ακριβώς εφικτό: συνήθως ολόκληρα φυτά αναγεννούνται από ομάδες μερικών χιλιάδων κυττάρων που

όμως έχουν συνολικά πολύ μικρή επιφάνεια, όχι μεγαλύτερη από μερικά τετραγωνικά χιλιοστά έως εκατοστά. Η επιφάνεια αυτή είναι ένας ιστός, δηλαδή μια ομάδα κυττάρων με εξειδικευμένη λειτουργία, όπως φύλλο, ρίζα κ.λπ. Όταν εισάγεται στην ιστοκαλλιέργεια, ο ιστός αυτός ονομάζεται έκφυτο (explant). Ένα φυτό μπορεί να μας δώσει πολύ μεγάλο αριθμό εκφύτων. Για παράδειγμα, ένα φύλλο μεσαίων διαστάσεων μπορεί να δώσει περίπου δέκα φυλλικά έκφυτα διαστάσεων 0,5 x 0,5 cm². (<https://repository.kallipos.gr>)

2.2 Η ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΩΣ ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ

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 μεριστώματικοί 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 μεριστώματικών 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).

2.3. ΤΥΠΟΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ

Όπως έχει ήδη αναφερθεί, η ιστοκαλλιέργεια των φυτών έχει πάρα πολλές εφαρμογές. Ανάμεσα σε αυτές ξεχωρίζουν εκείνες που αφορούν την

αναπαραγωγή των φυτών είτε στην αυτούσια μορφή τους είτε σε συνδυασμό με προγράμματα γενετικής βελτίωσης. Μπορούμε να ταξινομήσουμε σε τρεις κατηγορίες τις εφαρμογές της ιστοκαλλιέργειας στον μικροπολλαπλασιασμό των φυτών. Οι δύο πρώτες κατηγορίες αφορούν την αναπαραγωγή των φυτών (δηλαδή τον μικροπολλαπλασιασμό) και διακρίνονται μεταξύ τους από το εάν τα έκφυτα σχηματίζουν κάλο (δηλαδή διαφοροποιούνται) πριν διαφοροποιηθούν σε όργανα (βλαστό, ρίζα, φύλλο) ή σε σωματικά έμβρυα.

Πίνακας 1. Εφαρμογές της ιστοκαλλιέργειας (Κίντζιος, Σ., 2015)

ΤΥΠΟΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	ΣΚΟΠΟΣ	ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ
ΜΕΡΙΣΤΩΜΑ	Καθαρισμός παθογόνων Γρήγορος πολλαπλασιασμός Γενετική σταθερότητα/ ιστότητα κλώνων Διατήρηση γενετικού υλικού	Δύσκολη μέθοδος Χαμηλή παραγωγικότητα
ΕΜΒΡΥΟ	Καθαρισμός παθογόνων Γρήγορος πολλαπλασιασμός Γενετική σταθερότητα/ πιστότητα κλώνων Υπέρβαση ασυμβατότητας ειδών Παραγωγή απλοειδών	Δύσκολη μέθοδος Χαμηλή παραγωγικότητα
ΟΦΘΑΛΜΟΣ	Γρήγορος πολλαπλασιασμός Γενετική σταθερότητα/ πιστότητα κλώνων	Μολύνσεις Χαμηλή παραγωγικότητα
ΒΛΑΣΤΟΣ, ΜΕΣΟΓΟΝΑΤΙΟ	Παραγωγή τυχαίων βλαστών	Πιθανόν χαμηλή παραγωγικότητα και/ή ριζοβολία
ΣΩΜΑΤΙΚΟ ΕΜΒΡΥΟ	Καθαρισμός παθογόνων Γενετική σταθερότητα/πιστότητα κλώνων Πολύ υψηλή παραγωγικότητα Παραγωγή συνθετικών σπόρων Δυνατότητα αυτοματοποίησης	Όχι πάντα επιτυχής
ΦΥΛΛΟ,ΒΛΑΣΤΟΣ, ΡΙΖΑ, ΑΛΛΟΙ ΙΣΤΟΙ	Δημιουργία κάλου Χειρισμός διαφοροποίησης Υψηλή παραγωγικότητα Δημιουργία νέων γονότυπων μέσω σωμακλωνικής παραλλακτικότητας Παραγωγή βιοδραστικών	Γενετική αστάθεια

	ουσιών	
--	--------	--

Επομένως οι δύο πρώτες κατηγορίες διαφέρουν μεταξύ τους ως προς το εάν αφορούν άμεση ή έμμεση οργανογένεση/σωματική εμβρυογένεση. Η τρίτη κατηγορία περιλαμβάνει ειδικές εφαρμογές της ιστοκαλλιέργειας στη γενετική βελτίωση των φυτών. Οι διαφορετικές εφαρμογές της ιστοκαλλιέργειας με σκοπό τον μικροπολλαπλασιασμό, ταξινομημένες σύμφωνα με όσα προαναφέρθηκαν, παρουσιάζονται συνοπτικά στον Πίνακα 1. (Κίντζιος, Σ., 2015)

A .ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΜΕΡΙΣΤΩΜΑΤΩΝ

Η απομόνωση και ανάπτυξη του βλαστικού μεριστώματος είναι σημαντική για την ανάκτηση φυτών απαλλαγμένων από παθογόνα. Όταν τα βλαστικώς πολλαπλασιασμένα φυτά μολυνθούν, το παθογόνο περνά από τη μια βλαστική γενεά στην επόμενη. Ολόκληρος ο πληθυσμός μιας ορισμένης κλωνοποιημένης ποικιλίας μπορεί να μολυνθεί από το ίδιο παθογόνο. Στα πρώτα πειράματα πολλαπλασιασμού φυτών ντομάτας *in vitro* βρέθηκε ότι οι ιώσεις δεν διατηρούνταν πάντοτε όταν υποκαλλιεργούνταν το ακρορρίζιο από μια προσβεβλημένη ρίζα. Αυτή ήταν και η πρώτη έρευνα που θεμελίωσε τη θεωρία της χρήσης καλλιέργειας μεριστωμάτων για την εξάλειψη παθογόνων ιών. Η καλλιέργεια μεριστωμάτων χρησιμοποιείται ακόμα για την παραγωγή φυτών κλωνικά πιστών προς το αρχικό φυτό-δότη, δηλαδή χωρίς παραλλαγές. Μετά από σχετικές μελέτες η μεριστωματική καλλιέργεια έχει χρησιμοποιηθεί εκτενώς για πλήθος φυτών και αποτελεί τη βάση της βιομηχανίας μικροπολλαπλασιασμού των κηπευτικών((Κίντζιος, Σ., 2015)

B.ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΟΦΘΑΛΜΩΝ

Οι οφθαλμοί περιέχουν μεριστωματικά κύτταρα και για αυτό ιστοκαλλιεργούνται για τον ίδιο πρακτικά σκοπό όπως και τα κορυφαία μεριστώματα. Η μέθοδος χρησιμοποιείται για τον μικροπολλαπλασιασμό φυτικών

ειδών όπως κουνουπίδι, ζέρμπερα, ροδόδενδρο, ευκάλυπτο και διοσκορέα. Ωστόσο η χρήση των οφθαλμών απαιτεί αυξημένη προσοχή καθώς:

- Τα λέπια των οφθαλμών αποτελούν σημαντικές εστίες μικροοργανισμών (κυρίως βακτηρίων) που μπορούν να μολύνουν την ιστοκαλλιέργεια. Για αυτό το λόγο πρέπει να εφαρμοστούν τα κατάλληλα πρωτόκολλα απολύμανσης.

- Οι πλευρικοί οφθαλμοί (δηλαδή αυτοί που εκφύονται στα πλάγια ενός βλαστού) συνήθως δεν αντιδρούν στην ιστοκαλλιέργεια. Αυτό συμβαίνει λόγω του φαινομένου της κυριαρχίας του κορυφαίου οφθαλμού, δηλαδή αυτού που βρίσκεται στην άκρη του βλαστού. Ο τελευταίος παρεμποδίζει τη βλάστηση των πλάγιων οφθαλμών μέσω της παραγωγής αυξίνης και άλλων παρεμποδιστών. Για να καταστεί δυνατή η χρησιμοποίηση των πλάγιων οφθαλμών στην ιστοκαλλιέργεια, πρέπει πρώτα να κοπεί ο κορυφαίος οφθαλμός από τον βλαστό στο μητρικό φυτό και μετά από μερικές ημέρες, αφού θα έχει εξουδετερωθεί η δράση της αυξίνης, να παραληφθούν οι πλάγιοι οφθαλμοί για ιστοκαλλιέργεια.

Η θέση του οφθαλμού στο μητρικό φυτό είναι καθοριστική για το είδος της οντογενετικής του εξέλιξης *in vitro*. Έχει παρατηρηθεί ανάπτυξη των εκφύτων σε μεγαλύτερο ποσοστό όταν προέρχονται από ακραία μπουμπούκια από ότι όταν προέρχονται από πλαϊνά. Σε ορισμένα φυτά ο ακραίος οφθαλμός διαφοροποιείται σε άνθος ενώ ο προσκείμενος μασχαλιαίος σε βλαστικό τμήμα. Η έκφραση ενός οφθαλμού ως «ανθοφόρου» ή «φυλλοφόρου» εξαρτάται σημαντικά και από περιβαλλοντικούς παράγοντες, όπως τη θερμοκρασία και τη φωτοπερίοδο. Για τον μικροπολλαπλασιασμό χρησιμοποιούνται αποκλειστικά βλαστοφόροι οφθαλμοί. (Κίντζιος, Σ., 2015)

Γ. ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΕΜΒΡΥΩΝ

Η *in vitro* καλλιέργεια ζυγωτών εμβρύων (δηλαδή εμβρύων τα οποία προέρχονται από κανονική γονιμοποίηση) αποσκοπεί στη διευκόλυνση της

βλάστησης του εμβρύου όταν αυτή δεν είναι εφικτή. Αυτό μπορεί να συμβεί σε ορισμένες περιπτώσεις, όπως:

- Ο σπόρος δεν έχει εκτεθεί για αρκετό χρονικό διάστημα σε χαμηλές θερμοκρασίες, δηλαδή δεν έχει ολοκληρωθεί η διαδικασία της εαρινοποίησης (vernalization). Η απαιτούμενη διάρκεια εαρινοποίησης διαφέρει ανάλογα με το φυτικό είδος και μερικές φορές με την ποικιλία, π.χ. για το κριθάρι απαιτείται γενικά αποθήκευση των σπόρων για δύο μήνες σε θερμοκρασία 4-8°C. Η ωρίμανση του σπόρου μπορεί να καθυστερεί και για άλλους φυσιολογικούς λόγους, με αποτέλεσμα να απαιτούνται έως και δεκαετίες για τη βλάστησή του (π.χ. σε πολλά κωνοφόρα). Το χαρακτηριστικό παράδειγμα της εφαρμογής της καλλιέργειας εμβρύων για την επιτάχυνση της βλάστησης είναι η δραστική συντόμευση (από έτη σε μήνες) του αναπαραγωγικού κύκλου του γένους *Iris* καθώς και διαφόρων ποικιλιών μηλιάς

- Για διαφόρους λόγους, το ενδοσπέρμιο περιέχει παρεμποδιστικούς παράγοντες για τη βλάστηση του εμβρύου. Ένας από αυτούς είναι και η διαφορετική ταξινομική προέλευση του εμβρύου από το μητρικό φυτό (από το οποίο προέρχεται το ενδοσπέρμιο). Στις περιπτώσεις αυτές λέμε ότι το έμβρυο προήλθε από μια απαγορευμένη διασταύρωση (illegal crossing). Για παράδειγμα, τα έμβρυα τα οποία προέρχονται από τη διασταύρωση *Triticum aestivum* και *Aegilops* spp. πεθαίνουν κατά την ανάπτυξή τους λόγω της ανάπτυξης απορριπτικών παραγόντων από το μητρικό ενδοσπέρμιο. Στο σημείο αυτό μπορούμε να επέμβουμε καλλιεργώντας τα υβριδικά έμβρυα σε τεχνητό υπόστρωμα το οποίο θα αναπληρώνει τις απαραίτητες θρεπτικές και ορμονικές ουσίες του ενδοσπερμίου, χωρίς να περιέχει τοξικούς παράγοντες. Με τον τρόπο αυτόν είναι δυνατή η αναγέννηση φυτών που θα φέρουν υβριδικά χαρακτηριστικά και των δύο διαφορετικών φυτικών ειδών. Η διαδικασία αυτή ονομάζεται διάσωση εμβρύου (embryo rescue).

Τα καλλιεργούμενα έμβρυα μπορούν να χρησιμοποιηθούν και ως πηγή για την επαγωγή, δευτερογενώς, σωματικών εμβρύων, δηλαδή τα σωματικά έμβρυα να προέλθουν από ζυγωτά. Αυτό συνήθως επιτυγχάνεται με την εφαρμογή αυξίνης. Παραδείγματα τέτοιων εφαρμογών συναντώνται στα σιτηρά

και τα κωνοφόρα. Μια ειδική ερευνητική εφαρμογή αποτελεί η παραγωγή ινών από σπόρους βαμβακιού *in vitro*, έτσι ώστε να μελετηθεί η ινοποιητική ικανότητα διαφορετικών ποικιλιών σε πολύ πρώιμο στάδιο. Άλλες εφαρμογές περιλαμβάνουν τη βασική έρευνα σχετικά με την ανάπτυξη και τη φυσιολογία του εμβρύου, τη δοκιμή ζωτικότητας του σπόρου κ.ά

Από τεχνική άποψη, η καλλιέργεια των εμβρύων παρουσιάζει ορισμένες ιδιομορφίες, οι οποίες αναφέρονται περιληπτικά στη συνέχεια:

- Πολλές φορές απαιτείται η κατεργασία του περιβλήματος του σπόρου (ιδιαίτερα αν αυτό είναι σκληρό) πριν απομονωθεί το έμβρυο.
- Η απολύμανση γίνεται κυρίως σε επίπεδο σπόρου και όχι εμβρύου.
- Για την καλλιέργεια του εμβρύου αρχικά απαιτούνται υψηλές συγκεντρώσεις σακχαρόζης (8-12% β/ο), μέτριες συγκεντρώσεις αυξίνης και χαμηλές συγκεντρώσεις κυτοκινίνης. Μετά την ανάπτυξη του για χρονικό διάστημα 1-2 εβδομάδων, το καλλιεργούμενο έμβρυο πρέπει να μεταφερθεί σε άλλο υπόστρωμα το οποίο θα περιέχει σακχαρόζη σε φυσιολογική συγκέντρωση (2-3%), μειωμένη συγκέντρωση αυξίνης και μέτρια έως αυξημένη συγκέντρωση κυτοκινίνης. Ωστόσο οι συνθήκες αυτές μπορούν να διαφέρουν ανάλογα με την περίπτωση
- Συνιστάται η καλλιέργεια εμβρύων ανεπτυγμένων έως την αυτοτροφική φάση, δηλαδή εμβρύων που έχουν ήδη αρχίσει να παίρνουν το σχήμα τορπίλης (για περισσότερη επεξήγηση των σταδίων εξέλιξης ενός εμβρύου βλ. Κεφάλαιο 8: Σωματική Εμβρυογένεση), καθώς και η διατήρηση του ιμάντα που συνδέει το έμβρυο με το ενδοσπέρμιο.

Τέλος, έχει βρει σημαντική εφαρμογή η χρήση του τροφικού ενδοσπερμίου (*nurse endosperm*), η οποία συνιστάται στην τοποθέτηση του εμβρύου σε ένα φυσιολογικό, υγιές ενδοσπέρμιο και την από κοινού καλλιέργειά τους *in vitro*. Πλεονέκτημα αυτής της τεχνικής είναι η καλύτερη ανάπτυξη και γρηγορότερη διαφοροποίηση του εμβρύου χάρη στην απελευθέρωση διαφόρων συστατικών από το τροφικό ενδοσπέρμιο. (Κίντζιος, Σ., 2015)

Δ. Η ΤΥΧΑΙΑ ΟΡΓΑΝΟΓΕΝΕΣΗ

τυχαία ή επίκτητη οργανογένεση (adventitious organogenesis) χαρακτηρίζουμε τη διαδικασία εκείνη με την οποία σχηματίζονται βλαστοί, ρίζες ή άλλα είδη οργάνων πάνω σε ένα καλλιεργούμενο έκφυτο. Η οργανογένεση διακρίνεται σε άμεση ή έμμεση, ανάλογα με το εάν λαμβάνει χώρα σε διαφοροποιημένο ή αποδιαφοροποιημένο ιστό (κάλο) . Κατά την άμεση οργανογένεση ο σχηματισμός του νέου οργάνου αρχίζει από επιδερμικά ή υποδερμικά παρεγχυματικά κύτταρα από τα οποία προκύπτει το μεριστωματοειδές, δηλαδή μια ομάδα ταχέως διαιρούμενων κυττάρων που μοιάζουν με μεριστωματικά. Επίσης τα φυτά που αναγεννώνται μέσω οργανογένεσης αποτελούν μονοπολικές δομές, δηλαδή σχηματίζονται πρώτα οι βλαστοί και μετά οι ρίζες. Με τον τρόπο αυτό η τυχαία οργανογένεση διακρίνεται σαφώς από τη σωματική εμβρυογένεση, όπου η βλάστηση των εμβρύων δίνει ολοκληρωμένα φυτά διπολικής δομής με τον ταυτόχρονο σχηματισμό βλαστών και ριζών.

Σε γενικές γραμμές, η οργανογένεση βρίσκεται κάτω από τον άμεσο έλεγχο των φυτικών ρυθμιστών αύξησης, σύμφωνα με όσα αναλύθηκαν στο Κεφάλαιο 3. Από πρακτική άποψη, θα πρέπει να τονιστούν ορισμένα βασικά σημεία:

- Η ριζογένεση ακολουθεί πάντα τη βλαστογένεση. Είναι πολύ δύσκολο να σχηματιστούν βλαστοί πάνω σε αναγεννημένες ρίζες. Ωστόσο αυτό δεν σημαίνει ότι η ριζογένεση είναι απλή διαδικασία. Αντίθετα, αποτελεί το δυσκολότερο τμήμα της αναγέννησης φυτών μέσω τυχαίας οργανογένεσης και συχνά τον περιοριστικό παράγοντα αυτής.

- Η τυχαία οργανογένεση ονομάζεται έτσι επειδή μπορεί να προκληθεί (κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες, εννοείται) σε κάθε είδος φυτικού κυττάρου. Αντίθετα, η αναγέννηση οργάνων από ορισμένα έκφυτα μόνο τυχαία δεν είναι και για αυτό πολλές φορές δεν απαιτεί την υποκίνησή της με εφαρμογή ορμονών. Ένα τέτοιο παράδειγμα είναι η βλαστογένεση από τα κορυφαία μεριστώματα

- Εκτός από τους ρυθμιστές αύξησης, καθοριστικό ρόλο στην οργανογένεση έχει και η ποιότητα/ποσότητα του φωτισμού και η σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος.

Λόγω της εξαιρετικά μεγάλης σημασίας (από άποψη δυσκολίας!) που έχει η τυχαία ριζογένεση, η διαδικασία αυτή θα αναλυθεί λίγο περισσότερο. Σε πρώτη φάση, οι ξεχωριστές φάσεις που οδηγούν τελικά στον σχηματισμό μιας ρίζας πάνω σε ένα έκφυτο περιγράφονται συνοπτικά στον επόμενο Πίνακα (7.3). Από την περιγραφή γίνεται φανερό ότι ο σχηματισμός μιας ρίζας συνοδεύεται από έντονες βιοχημικές διεργασίες, με κύριο γνώρισμα την οξειδωση φαινολικών ουσιών και τη σύνθεση αυξίνης και αιθυλενίου μέσα στον ριζικό ιστό (Saiman et al. 2012, de la Cruz et al. 2015). Με βάση αυτά τα δεδομένα, ιδανικός ιστός προς επαγωγή ριζογένεσης θεωρείται αυτός που βρίσκεται στα στάδια 2-3, δηλαδή παρουσιάζει ήδη περικλινή διαίρεση του καμβίου. Θεωρητικά, ο ιστός αυτός μπορεί να μετασχηματιστεί για να δώσει ριζικές καταβολές εφόσον επωαστεί στο σκοτάδι, σε σχετικά υψηλή θερμοκρασία και εκτεθεί σε χαμηλές συγκεντρώσεις αυξίνης. Από πρακτική άποψη, η επαγωγή της ριζογένεσης στα καλλιεργούμενα έκφυτα μπορεί να διευκολυνθεί με τους εξής τρόπους:

- Με τη χρήση νεανικών ιστών.
- • Με τη χρήση υποστρωμάτων πλούσιας θρεπτικής σύστασης, ιδιαίτερα σε άλατα νιτρικών και αμμωνιακών ιόντων, καθώς και άλατα ιωδίου και καλίου. Ωστόσο σε πολλές περιπτώσεις η ριζογένεση ευνοείται από πτωχότερα διαλύματα.
- Με τη χρήση υποστρωμάτων με λόγο άνθρακα/αζώτου (C/N) 10-30
- Με την αποφυγή προσθήκης βιταμινών σε υψηλές συγκεντρώσεις
- Με την επώαση της περιοχής ριζοβολίας (δηλαδή της βάσης του δοχείου καλλιέργειας) σε υψηλή θερμοκρασία και σε συνθήκες σκότους για χρονικό διάστημα 3-10 ημερών.
- Με την έκθεση σε ερυθρό φως (Κίντζιος, Σ., 2015)

2.4. ΣΤΑΔΙΑ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Η διαδικασία του μικροπολλαπλασιασμού περιλαμβάνει μια σειρά από πέντε διακριτά στάδια τα οποία συνοψίζονται στη συνέχεια (Πίνακας 2):

1. 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.

2. Εγκατάσταση κυτταρο-/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.

3. 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.

Πίνακας 2 : Στάδια μικροπολλαπλασιασμού

ΚΩΔΙΚΟΣ	ΣΤΑΔΙΟ ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ/ ΑΝΑΠΤΥΞΗΣ ΦΥΤΩΝ	ΑΠΑΙΤΟΥΜΕΝΑ ΣΥΣΤΑΤΙΚΑ ΥΠΟΔΟΜΗΣ
1	Προετοιμασία μητρικού φυτού	Ενδεχομένως θερμοκήπιο ή ειδικός θάλαμος ανάπτυξης φυτών (φυτοτρόνιο)
2	Εγκατάσταση καλλιέργειας Εμφυτευμένα έκφυτα σε αρχική φάση διαφοροποίησης/αποδιαφοροποίησης	Γενικός χώρος Χώρος παρασκευής υποστρώματος Χώρος ασηπτικής μεταφοράς

		Χώρος ανάπτυξης καλλιεργειών
3	Πολλαπλασιασμός (κυρίως τυχαίων βλαστών)	Γενικός χώρος Χώρος παρασκευής υποστρώματος Χώρος ασηπτικής μεταφοράς Χώρος ανάπτυξης καλλιεργειών
4	Επιμήκυνση βλαστών Αναγέννηση φυτών Ριζοβολία	Γενικός χώρος Χώρος παρασκευής υποστρώματος Χώρος ασηπτικής μεταφοράς Χώρος ανάπτυξης καλλιεργειών
5	Εγκλιματισμός φυτών	Χώρος εγκλιματισμού/σκληραγώγησης

4. 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

5. 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%. (Κίντζιος, Σ., 2015)

2.5 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ – ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ

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

- Η κλωνική αναπαραγωγή των μητρικών φυτών
- Η αυξημένη παραγωγή φυτών σε σύντομο χρονικό διάστημα.

- Η εξοικονόμηση χώρου.
- Η αποδέσμευση προς παραγωγή από εξωτερικές και περιβαλλοντικές συνθήκες και περιορισμούς.
 - Η παραγωγή άνοσου φυτικού υλικού.
Μοναδική μέθοδος πολλαπλασιασμού για ορισμένα φυτικά είδη
Όστούσο η καλλιέργεια παρουσιάζει και μειονεκτήματα σε σχέση με προς συμβατικές μεθόδους, σπουδαιότερα από τα οποία είναι τα εξής:
 - Απαιτεί υψηλό επενδυτικό κόστος.
 - Προϋποθέτει υψηλή επάρκεια σε τεχνογνωσία καθώς και αποτελεσματική επίβλεψη όλων των σταδίων παραγωγής.
 - Το κόστος προς in vitro παραγωγής φυτών είναι, προς το παρόν τουλάχιστον, σημαντικά μεγαλύτερο από αυτό των συμβατικών μεθόδων (Κίντζιος, Σ., 2015)

2.6. ΠΡΟΒΛΗΜΑΤΑ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Κατά την εκτέλεση των εργασιών των διαφόρων σταδίων του μικροπολλαπλασιασμού υπάρχει το ενδεχόμενο να σημειωθούν είτε απώλειες της παραγωγής είτε μείωση της ποιότητας των παραγόμενων φυτών, από διάφορες αιτίες τις οποίες θα αναλύσουμε στη συνέχεια. Πρέπει να σημειωθεί ότι στις αιτίες αυτές δεν συμπεριλαμβάνεται η πιθανή αδυναμία του φυτικού μας υλικού να αποκριθεί στο πρωτόκολλο μικροπολλαπλασιασμού το οποίο εφαρμόζουμε. Με άλλα λόγια, θα αναλύσουμε τις αιτίες που μας προκαλούν προβλήματα λόγω λανθασμένης εφαρμογής των τεχνικών και όχι λανθασμένου ή ανεπαρκούς σχεδιασμού του πρωτοκόλλου (για παράδειγμα, λανθασμένη επιλογή ρυθμιστών αύξησης, τύπου εκφύτων, ποικιλίας φυτού κ.λπ). (Κίντζιος, Σ., 2015)

ΠΡΟΒΛΗΜΑ ΠΡΩΤΟ: ΜΟΛΥΝΣΕΙΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

Η μόλυνση των καλλιεργειών από μικροοργανισμούς αποτελεί το σημαντικότερο πρόβλημα κάθε ιστοκαλλιεργητικής διαδικασίας και μπορεί να

οδηγήσει ακόμα και σε ολοκληρωτική απώλεια της παραγωγής (Cassells 1997). Αν και υπάρχουν πάρα πολλά είδη μικροοργανισμών που μπορούν να επιμολύνουν φυτικές in vitro καλλιέργειες, οι κυριότερες κατηγορίες αφορούν βακτήρια και μύκητες. Ένα επιπρόσθετο, δυσεπίλυτο πρόβλημα αποτελούν οι μολύνσεις που οφείλονται σε ενδοφυτικούς μικροοργανισμούς. (Κίντζιος, Σ., 2015)

ΠΡΟΒΛΗΜΑ ΔΕΥΤΕΡΟ: ΟΞΕΙΔΩΣΗ ΦΑΙΝΟΛΙΚΩΝ ΚΑΙ ΚΑΣΤΑΝΩΣΗ ΙΣΤΩΝ

Η διαδικασία της ιστοκαλλιέργειας προκαλεί σημαντική καταπόνηση στους καλλιεργούμενους in vitro φυτικούς ιστούς. Ανάλογα με το μέγεθος της καταπόνησης και ως ένα είδος αντίδρασης σε αυτήν οι φυτικοί ιστοί συσσωρεύουν οξειδωμένα συστατικά, κυρίως πολυφαινολικής προέλευσης, τα οποία σε υψηλή συγκέντρωση μπορούν να έχουν τοξική επίδραση στα φυτικά κύτταρα. Παράλληλα, μπορούν να δώσουν ένα σκούρο («καστανό») χρώμα τόσο στις κυτταρικές καλλιέργειες όσο και το θρεπτικό υπόστρωμα, χωρίς αυτό να συνδέεται απαραίτητα με τοξικές επιπτώσεις.

ΠΡΟΒΛΗΜΑ ΤΡΙΤΟ: ΥΑΛΟΠΟΙΗΣΗ

Η υαλοποίηση (vitrification) είναι ένα φαινόμενο κατά το οποίο τα αναγεννημένα in vitro φυτά εμφανίζουν ελλιπή διαμόρφωση της δομής τους, ιδιαίτερα όσον αφορά το κυτταρικό τοίχωμα και τα πλαστίδια. Σε ακραίο βαθμό η υαλοποίηση μπορεί να δώσει στους φυτικούς ιστούς σχεδόν διάφανη εμφάνιση (σαν να είναι από γυαλί, εξ ου και η ονομασία του φαινομένου). Η υαλοποίηση σχετίζεται άμεσα με προβλήματα στον εγκλιματισμό των φυτών, τα οποία θα εξεταστούν στην επόμενη ενότητα.

ΠΡΟΒΛΗΜΑ ΤΕΤΑΡΤΟ: ΑΤΕΛΗΣ ΕΓΚΛΙΜΑΤΙΣΜΟΣ

Ο εγκλιματισμός (acclimatization) ή σκληραγώγηση (weaning) αποτελεί το τελικό στάδιο πριν την οριστική έξοδο ενός αναγεννημένου φυτού από τη διαδικασία του μικροπολλαπλασιασμού. Με τον τρόπο αυτό τα φυτάρια μπορούν να προσαρμοστούν επιτυχώς στις συνθήκες του περιβάλλοντος έξω από το προστατευτικό πλαίσιο της ιστοκαλλιέργειας (Kozai et al. 2005). Ωστόσο, αν δεν

έχουν εγκλιματιστεί επαρκώς, θα υποστούν σημαντικές καταπονήσεις που θα οδηγήσουν σε μείωση της ποιότητάς τους, ακόμα και την νέκρωσή τους.

ΠΡΟΒΛΗΜΑ ΠΕΜΠΤΟ: ΣΩΜΑΚΛΩΝΙΚΗ ΠΑΡΑΛΛΑΚΤΙΚΟΤΗΤΑ

Η σωμακλωνική παραλλακτικότητα (somaclonal variation) είναι μια ενδογενής διαδικασία της *in vitro* καλλιέργειας φυτών, η οποία προκαλεί προσωρινές (transient) ή μόνιμες μεταβολές στο γονιδίωμα των μικροπολλαπλασιασμένων φυτών και μάλιστα με συχνότητα πολύ υψηλότερη από αυτήν της τυχαίας μετάλλαξης. Η σωμακλωνική παραλλακτικότητα αποτελεί πρόβλημα από την άποψη ότι μειώνει τον βαθμό ομοιομορφίας των αναγεννημένων φυτών καθώς και την πιστή αναπαραγωγή (true-to-type) του μητρικού φυτού. Ωστόσο μπορεί να αποτελέσει ένα χρήσιμο εργαλείο στη βελτίωση των φυτών για τη δημιουργία νέων γονοτύπων σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα.

2.7. ΜΙΚΡΟ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΣΤΟ ΓΕΝΟΣ *Lavandula*

Έχουν πραγματοποιηθεί έως σήμερα πολλές προσπάθειες για μικρο πολλαπλασιασμό τόσο του είδους *Lavandula stoechas* όσο και άλλων ειδών του γένους *Lavandula*.

Ο Nobre (1996) πέτυχε *in vitro* πολλαπλασιασμό του είδους *Lavandula stoechas* χρησιμοποιώντας έκφυτα από καλλιεργούμενα φυτά. Όπως αναφέρει ο πολλαπλασιασμός του είδους επιτυγχάνεται με μοσχεύματα, όμως βασικό πρόβλημα κατά τον πολλαπλασιασμό με μοσχεύματα, είναι η υπερβολική παραγωγή βλαστών από τα μοσχεύματα και η φτωχή ριζοβόλησή τους. Σύμφωνα πάντα με τον συγγραφέα, επιτυχής αναγέννηση φυτών με μικρο πολλαπλασιασμό επιτευχθεί όταν χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα ενός κόμβου (μήκους 10-12 mm) από ώριμα φυτά που αναπτύσσονταν στο ύπαιθρο. Τα έκφυτα καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα Margara, (1978), με NaFeEDTA (102,1 μM) και βιταμίνες του Murashige και του Skoog (1962). Στο υπόστρωμα προστέθηκαν 0.2, 0.5 ή 1.0 mg.l⁻¹, BA ο και 0,1 mg.l⁻¹ GA3. Οι βλαστοί που

σχηματίστηκαν ανακαλλιεργήθηκαν (πάλι χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα ενός κόμβου). Υψηλότερα ποσοστά σχηματισμού βλαστών παρατηρήθηκαν όταν στο υπόστρωμα προστίθετο $1.0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$, BA. Στη συνέχεια σχηματισμένοι βλαστοί με μήκος > 7-8 mm σε βασικό μέσο με 0.0, 0.25, 0.5 ή $1.0 \text{ mg} \cdot \text{l}^{-1}$ NAA.

Οι Andrade, et al 1999, πολλαπλασίασαν με επιτυχία το είδος *Lavandula vera*. Χρησιμοποίησαν έκφυτα κόμβων τα οποία τοποθέτησαν σε υπόστρωμα MS στο οποίο είχε προστεθεί 1.0 mg^{-1} του TDZ ή BA. Η ριζοβολία των σχηματισθέντων βλαστών επιτεύχθηκε εύκολα με υψηλότερα ποσοστά όμως όταν στο υπόστρωμα προστίθετο NAA. Ο εγκλιματισμός των φυταρίων ολοκληρώθηκε με επιτυχία και αναγεννημένα φυτά με φυσιολογική ανάπτυξη παρήχθησαν.

Το είδος *Lavandula dentata* πολλαπλασιάστηκε με επιτυχία με την μέθοδο του μικρο πολλαπλασιασμού (Echeverrigaray et al, 2005). Χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα κόμβων του είδους που αφού απολυμάνθηκαν τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα MS με BA και IBA. Υψηλότερη αναγέννηση βλαστών παρατηρήθηκε όταν στο υπόστρωμα προστέθηκε BA σε συγκέντρωση 0,5 ή 1 mg^{-1} . Καλύτερη ριζοβολία των βλαστών επιτεύχθηκε όταν στο υπόστρωμα προστέθηκε NAA.

Οι Dias et al, 2001, πολλαπλασίασαν με εξέταση την δυνατότητα πολλαπλασιασμού με μικρο πολλαπλασιασμό του είδους *Lavandula viridis*. Πέτυχαν επιτυχή μικρο πολλαπλασιασμό του είδους χρησιμοποιώντας έκφυτα κόμβων μήκους 10 -12 mm. Ο υψηλότερος ρυθμός πολλαπλασιασμού επιτεύχθηκε από τους συγγραφείς σε υπόστρωμα μισής δύναμης MS, στο οποίο είχε προστεθεί BA ($0,67 \mu\text{M}$). Στη συνέχεια οι βλαστοί ριζοβόλησαν με ευκολία σε υπόστρωμα Gresshoff και Doy. Το ποσοστό εγκλιματισμού των φυταρίων ήταν υψηλό (80%) και η ανάπτυξη των φυτών που εγκλιματίστηκαν ήταν φυσιολογική.

Σύμφωνα με τους Zuzarte et al, (2010) είναι δυνατός ο μικρο πολλαπλασιασμός του είδους *Lavandula pedunculata* χρησιμοποιώντας μασχαλαίους οφθαλμούς βλαστών. Εκτός από την επιτυχία του πολλαπλασιασμού με μικρο πολλαπλασιασμό του είδους οι ερευνητές διαπίστωσαν ότι τα φυτά που παρήχθησαν είχαν τα ίδια χαρακτηριστικά και τους ίδιους δευτερογενείς μεταβολίτες με τα φυτά που παρήχθησαν με κλασικούς

τρόπους πολλαπλασιασμού. Υψηλότερα ποσοστά πολλαπλασιασμού επιτεύχθηκαν όταν τα έκφυτα καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS με $0,25 \text{ mg}^{-1}$ BA. Ενώ η ριζοβολία επιτεύχθηκε σε υπόστρωμα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες και χωρίς τον σχηματισμό κάλου.

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 $0,5 \text{ mg}^{-1}$ IAA και 2 mg^{-1} BAP.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

3.1. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1.1. ΥΛΙΚΑ

3.1.1.1 ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Ως φυτικό υλικό χρησιμοποιήθηκαν μητρικά φυτά ηλικίας άνω των τριών ετών μη κλαδεμένα (που αναπτύσσονταν στο αγρόκτημα του ΤΕΙ (τα φυτά προήλθαν από την ορεινή Κορινθία). Αναπτύσσονταν σε χώρο με έντονη ηλιοφάνεια, μέχρι και την εποχή που κόπηκαν. Τα μητρικά φυτά ήταν μεγέθους 10 μέχρι 15 cm περίπου και ήταν υγιή.

3.1.1.2. ΥΛΙΚΑ ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗΣ ΕΚΦΥΤΩΝ

Πριν την τοποθέτηση *in vitro* των εκφύτων προηγείται απολύμανση όπου χρησιμοποιήθηκαν τα εξής υλικά:

1. Χλωρίνη εμπορίου, που περιέχει 4,5 % NaOCL.
2. Προσκολλητική ουσία Tween-20 (Polyxyethylenesorbitan Monolaurate) της εταιρίας MERCK.

3.1.1.3. ΥΛΙΚΑ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ IN VITRO

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

Χρησιμοποιήθηκε μισής δύναμης MS. Στον πίνακα 1 αναφέρονται τα συστατικά του θρεπτικού υποστρώματος: Όλα τα υποστρώματα σταθεροποιήθηκαν με 4g^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.

Πίνακας 3. Συστατικά του υποστρώματος MS και του μισής δύναμης MS (μακροστοιχεία, ιχνοστοιχεία)

Συστατικά	MS (mg/l)	Μισής δύναμης MS
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.	0,5	0,25
Thiamine. HCL	0,1	0,05
Glycine	2	1

1. Υπόστρωμα μισής δύναμης MS σε σκόνη χωρίς IAA, Kinetin της εταιρίας ICN BIOMEDICALS (Πίνακας 3.)
2. Σακχαρόζη σε συγκέντρωση 1.5%.
3. Μυοϊνοζιτόλη (Myo-inositol) M.B.= 180,16(της εταιρείας Merck)
4. Άγαρ της εταιρίας Ρουμπουλάκης Α.Ε.

3.1.1.4. ΔΟΧΕΙΑ IN VITRO ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

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

Άλλες συσκευές (εικόνα 2) και υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν :

- Συσκευή υγρής αποστείρωσης.
- Τράπεζα οριζόντιας νηματικής ροής. (εικ. 2)
- Ζυγός ακριβείας(με τέσσερα δεκαδικά).
- Όργανο μέτρησης pH.
- Θερμαινόμενος μαγνητικός αναδευτήρας.
- Μεταλλικές λαβίδες
- Νυστέρια.
- Πιπέτα ακριβείας.
- Ποτήρια ζέσεως 50 και 100 ml.
- Θάλαμος ανάπτυξης φυτών.
- Παραφίλμ: ένα θερμοπλαστικό εύκαμπτο πλαστικό ανθεκτικό στην υγρασία που κρατάει έξω από το τρυβλίο τους διάφορους μικροοργανισμούς που μολύνουν τα έκφυτα (Εικόνα 3).
 - ημιπερατή ταινία micropore της 3M με πόρους που δεν επιτρέπουν τη μετακίνηση μικροοργανισμών, επιτρέπουν όμως την αναταλλαγή των αερίων με το εξωτερικό περιβάλλον, την μείωση της υγρασίας εντός του τρυβλίου Petri και την μη μείωση της συγκέντρωσης του CO₂ εντός του τρυβλίου (Εικόνα 3).



Εικόνα 3. : Τρυβλία Petri και υλικά κάλυψης (parafilm, μεμβράνη 3m micropore)

3.1.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1.2.1. ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ

Σε δοχείο ζέσεως με αποσταγμένο νερό (όγκου λιγότερο του τελικού) προσθέτονταν οι ακριβείς ποσότητες, MS 2.2g/l το υπόστρωμα ήταν μισής δύναμης, Σακχαρόζης 1.5%, Μυσινοζιτόλη 100mg/l. Αφού προστέθηκαν τα υλικά, τα διαλύματα αναδεύονταν σε μαγνητικό αναδευτήρα 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. Ακολούθως προσθέτονταν, για τη σταθεροποίηση των υποστρωμάτων, άγαρ στην απαιτούμενη ποσότητα (4g/l) και ακολουθούσε αποστείρωση του διαλύματος

στον κλίβανο αποστείρωσης για 55min, στην συνέχεια τοποθέτηση του διαλύματος στο υδατόλουτρο για ομαλή μείωση της θερμοκρασίας του και στη συνέχεια μοίρασμα στα τρυβλία Petri περίπου 25ml, στο καθένα εντός του θαλάμου νηματικής ροής τα τρυβλία αποθηκεύονται σε ψυγείο στους 5°C.

3.1.2.2. ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ ΥΛΙΚΩΝ

Όλα τα δοχεία 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 (αυτόκαυστο) επί 20min, σε θερμοκρασία 121°C και σε πίεση 1.1atm. Προσοχή δόθηκε στο ότι όλα τα καπάκια έπρεπε να είναι χαλαρά τοποθετημένα κατά την αποστείρωση.

Το **αυτόκαυστο (autoclave)**: Είναι ένας κλίβανος κατασκευασμένος έτσι ώστε να αναπτύσσει στο εσωτερικό του υψηλές θερμοκρασίες (121-135°C) και πιέσεις αέρα (συνήθως 1,2 Atm). Με τον τρόπο αυτόν επιτυγχάνεται σε εξαιρετικά μεγάλο βαθμό η θανάτωση των περισσότερων ειδών μικροοργανισμών και επομένως η αποστείρωση σκευών, διαλυμάτων και άλλων υλικών.

3.1.2.3. ΕΚΦΥΤΑ-ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ ΕΚΦΥΤΩΝ

Βλαστοί του είδους *Lavandula stoechas*, οι οποίοι είχαν σχηματιστεί σε *in vitro* συνθήκες, τεμαχίστηκαν υπό ασηπτικές σε νέα έκφυτα κόμβων. Σε τράπεζα νηματικής ροής, πάνω σε αποστειρωμένο πλακάκι, που τακτικά καθαριζόταν με αιθανόλη 90%, και με αποστειρωμένο νυστέρι, βλαστοί που είχαν σχηματιστεί *in vitro* τεμαχίζονταν σε έκφυτα κόμβων μήκους 4-7 mm, που περιλάμβαναν έναν οφθαλμό (αφαιρούνταν επίσης τα φύλλα που είχαν σχηματιστεί). Τα

λαμβανόμενα έκφυτα τοποθετούνταν σε τρυβλία καλλιέργειας κατακόρυφα στο υπόστρωμα και πιέζονταν ελαφρά ώστε να βυθιστούν λίγα χιλιοστά μέσα σε αυτό. Τοποθετήθηκαν σε τρυβλία Petri σε υπόστρωμα μισής δύναμης MS και 1.5% σακχαρόζη. Τα τρυβλία κλείστηκαν με ημιπερατή μεμβράνη της 3m micropore, η οποία επέτρεπε την ανταλλαγή αερίων μεταξύ του εσωτερικού περιβάλλοντος του τρυβλίου και του εξωτερικού περιβάλλοντος της ατμόσφαιρας, ή με parafilm το οποίο δεν επέτρεπε την ελεύθερη ανταλλαγή των αερίων. Από τον κάθε βλαστό ελήφθησαν τέσσερα διαφορετικά έκφυτα τα οποία περιείχαν έναν οφθαλμό το καθένα. Αυτά ήταν η κορυφή (1^{ος}) κόμβος, ο 2^{ος} κόμβος, ο 3^{ος} κόμβος και ο 4^{ος} κόμβος, με αρίθμηση που άρχιζε από την κορυφή του βλαστού.

Σε κάθε τρυβλίο εγκαταστάθηκαν 5 έκφυτα.

3.1.2.4 ΣΥΝΘΗΚΕΣ *IN VITRO* ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Τα τρυβλία με τα έκφυτα, τους σπόρους και τους αναγεννημένους βλαστούς επωάζονταν σε θάλαμο ελεγχόμενων σταθερών συνθηκών (Εικόνα 4), σε θερμοκρασία 20°C και σε φωτοπερίοδο 16h πλήρους φωτός, έντασης 4000 lux (37.5 $\mu\text{molm}^{-2}\text{s}^{-1}$). Το φως παρέχονταν από λευκούς λαμπτήρες φθορισμού οι οποίοι βρίσκονταν τοποθετημένοι κατακόρυφα στις πλευρές του θαλάμου ώστε τα φυτάρια να φωτίζονται από τα πλάγια. Η διάρκεια της επώασης για την αναγέννηση βλαστών ήταν 40 ημέρες.

3.1.2.5 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Η αντίδραση των εκφύτων στο στάδιο της υποκαλλιέργειας εκτιμήθηκε μετά από 40 ημέρες από την εμφύτευση των εκφύτων στα υποστρώματα. Μετρήθηκαν το ποσοστό των εκφύτων που αντέδρασαν στο σχηματισμό βλαστών, ο αριθμός των βλαστών που σχηματίστηκε ανά έκφυτο που

αντέδρασε, ο αριθμός κόμβων ανά έκφυτο και ο αριθμός των εκφύτων που σχημάτισε ρίζες.

Επίσης καταγράφηκε η επίδραση του υλικού κάλυψης στην επιτυχία του πολλαπλασιασμού.

3.1.2.6. ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΣΧΕΔΙΑ – ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

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 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.



Εικόνα 4: τρυβλία του είδους στο θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών

3.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Κατά την φάση των καλλιεργειών πολλαπλασιασμού του είδους *Lavandula stoechas*, εξετάστηκε εάν η χρήση της ημιπερατής μεμβράνης 3M, μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως υλικό κάλυψης των τρυβλίων Petri, όπου εγκαταστάθηκαν τα έκφυτα.

Η χρήση της ημιπερατής μεμβράνης 3M, όχι απλώς δεν μείωσε αλλά αντίθετα αύξησε το ποσοστό αντίδρασης των εκφύτων (Πίν. 4). Τα έκφυτα που εγκαταστάθηκαν σε τρυβλία με υπόστρωμα και σφραγίστηκαν με την ημιπερατή μεμβράνη 3M, αντέδρασαν σε ποσοστό 90 %, πολύ υψηλότερο από αυτό των εκφύτων που τοποθετήθηκαν σε τρυβλία που σφραγίστηκαν με Παραφίλμ (57%).

Πίνακας 4. Επίδραση του υλικού κάλυψης των τρυβλίων Petri (Παραφίλμ ή ημιπερατή μεμβράνη) στο ποσοστό των εκφύτων του είδους *Lavandula stoechas* 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=4. Εκτίμηση του ποσοστού αντίδρασης των εκφύτων 40 ημέρες μετά την εγκατάστασή τους.

Πηγή παραλλακτικότητας	Ποσοστό βλάστησης (%)
Ημιπερατή μεμβράνη 3M	90 a
Παραφίλμ	57 b
Υλικό κάλυψης	*
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 3M ως υλικό κάλυψης των τρυβλίων Petri που εγκαθίστανται τα έκφυτα, δεν επηρέασε τον αριθμό των βλαστών που σχηματίστηκαν ανά έκφυτο που αντέδρασε (Πίν. 5). Η μη μείωση του αριθμού των βλαστών που σχηματίστηκαν επιτρέπει την χρήση της ημιπερατής μεμβράνης χωρίς μείωση του ρυθμού πολλαπλασιασμού.

Πίνακας 5. Επίδραση του υλικού κάλυψης των τρυβλίων Petri (Παραφίλμ ή ημιπερατή μεμβράνη) στον αριθμό των βλαστών που σχηματίστηκαν ανά έκφυτο που αντέδρασε του είδους *Lavandula stoechas*. 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=4. Εκτίμηση του αριθμού των βλαστών που σχηματίστηκαν 40 ημέρες μετά την εγκατάστασή των εκφύτων.

Πηγή παραλλακτικότητας	Αριθμός βλαστών που σχηματίστηκαν
Παραφίλμ	1,8
Ημιπερατή μεμβράνη 3M	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%	

Ο αριθμός των κόμβων που σχηματίστηκαν δεν επηρεάστηκε από το υλικό κάλυψης των τρυβλίων Petri (Πίν. 6). Ο αριθμός των κόμβων που σχηματίστηκαν παρέμεινε σταθερός (2,4-2,5) υπό κάλυψη των τρυβλίων Petri με οποιοδήποτε από τα δύο υλικά κάλυψης (Πίν. 6).

Πίνακας 6. Επίδραση του υλικού κάλυψης των τρυβλίων Petri (Παραφίλμ ή ημιπερατή μεμβράνη) στον αριθμό των κόμβων που σχηματίστηκαν ανά βλαστό που αντέδρασε του είδους *Lavandula stoechas*. 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=4. Εκτίμηση του αριθμού των κόμβων που σχηματίστηκαν 40 ημέρες μετά την εγκατάστασή των εκφύτων.

Πηγή παραλλακτικότητας	Αριθμός κόμβων που σχηματίστηκαν
Παραφίλμ	2.5
Ημιπερατή μεμβράνη 3M	2.4
Υλικό κάλυψης	NS
Μέσοι με διαφορετικό λατινικό γράμμα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά NS μη στατιστικά σημαντική διαφορά, * στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%	

Το μέσο μήκος των σχηματισθέντων βλαστών επίσης δεν επηρεάστηκε από την χρήση της ημιπερατής μεμβράνης 3M σε σύγκριση πάντα με το Παραφίλμ (Πίν7).

Η χρήση της ημιπερατής μεμβράνης 3M ως υλικό κάλυψης των τρυβλίων Petri που εγκαθίστανται τα έκφυτα, λοιπό αύξησε το ποσοστό αντίδρασης των εκφύτων και ταυτόχρονα δεν επηρέασε τον αριθμό των βλαστών που σχηματίστηκαν, τον αριθμό των κόμβων που σχηματίστηκαν, καθώς και το μέσο μήκος των βλαστών που σχηματίστηκαν.

Πίνακας 7. Επίδραση του υλικού κάλυψης των τρυβλίων Petri (Παραφίλμ ή ημιπερατή μεμβράνη) στον μέσο μήκος των βλαστών που σχηματίστηκαν ανά εκφύτο που αντέδρασε του είδους *Lavandula stoechas*. 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=4. Εκτίμηση του μέσου των βλαστών που σχηματίστηκαν 40 ημέρες μετά την εγκατάστασή των εκφύτων.

Πηγή παραλλακτικότητας	Μήκος βλαστών που σχηματίστηκαν
Παραφίλμ	0.6
Ημιπερατή μεμβράνη 3M	0.6
Υλικό κάλυψης	NS
<p>Μέσοι με διαφορετικό λατινικό γράμμα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά NS μη στατιστικά σημαντική διαφορά, * στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%</p>	

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 *Lavandula stoechas*.

Ως υλικά κάλυψης των τρυβλίων χρησιμοποιήθηκαν το Παραφιλμ και η ημιπερατή μεμβράνη 3M. 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 *Lavandula stoechas* η χρήση της ημιπερατής μεμβράνης 3M ως υλικό κάλυψης των τρυβλίων Petri που εγκαθίστανται τα έκφυτα, λοιπόν αύξησε το ποσοστό αντίδρασης των εκφύτων και ταυτόχρονα δεν επηρέασε τον αριθμό των βλαστών που σχηματίστηκαν, τον αριθμό των κόμβων που σχηματίστηκαν, καθώς και το μέσο μήκος των βλαστών 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 όχι απλώς δεν μειώθηκε αλλά αντίθετα αυξήθηκε με την χρήση της ημιπερατής μεμβράνης 3M.

Ως συνέχεια της μελέτης αυτής πρέπει να 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.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Andrade, L.B., Echeverrigaray, S., Fracaro, F., Pauletti G.F. and Rota L.. The effect of growth regulators on shoot propagation and rooting of common lavender (*Lavandula vera* DC) Plant Cell, Tissue and Organ Culture 56: 79–83, 1999.
- 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.
- Dias, M.C., Almeida, R. and Romano, A. Rapid clonal multiplication of *Lavandula viridis* L'H'er through *in vitro* axillary shoot proliferation. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 68: 99–102, 2002.
- Echeverrigaray, S., Basso R. and Andrade, L.B. Micropropagation of *Lavandula dentata* from axillary buds of field-grown adult plants. BIOLOGIA PLANTARUM 49 (3): 439-442, 2005.
- Nobre J. In vitro cloning and micropropagation of *Lavandula Stoechas* from field-grown plants Plant Cell, Tissue and Organ Culture 46: 151-155, 1996 (1996)
- Soni DR, Sodhi G Kaur, Sayyad FG,. Micropropagation studies in *Lavandula aungustifolia* Discovery Biotechnology, 4, Number 12, December 2013
- Zuzarte M. R., Dinis A. M., Cavaleiro, C., Salgueiro, L. R., and Canhoto, J. M.. Trichomes, essential oils and in vitro propagation of *Lavandula pedunculata* (Lamiaceae), Industrial Crops and Products, 32, 3, 580-587, 2010.

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ανάσης Εμμ., (1962) Τα φαρμακευτικά βότανα της Ελλάδας. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.

Βολιώτης Δ. και Αθανασιάδης Ν., (1990). Δένδρα και θάμνοι. Πανεπιστημιακό Σύγγραμμα, Αθήνα σελ. 171.

Γκόλιαρης Α & Β , Σκουμπρής, (1996). Νέοι κλώνοι ρίγανης. Πανελλήνιο Συνέδριο Γεωργικής Έρευνας (Πρακτικά). Τόμος Α. Θεσσαλονίκη. σ:201-203.

Δόρδας Χ., (2012). Αρωματικά και Φαρμακευτικά Φυτά, Τόμος ΙΙ. Γεωπονική Σχολή Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη.

Εθνικό Μετσόβιο Πολυτεχνείο. Βάση δεδομένων σχετικά με τους τοπικούς πολιτισμούς των ορεινών περιοχών της Ελλάδας την αλληλεπίδραση και την αλληλεξάρτησή τους με το φυσικό περιβάλλον- Δήμος Ξηροβουνίου Δ.Δ. Αμμοτόπου -66.

Ελληνικά Ακαδημαϊκά Ηλεκτρονικά Συγγράμματα και Βοηθήματα.

Επενδυτικές δυνατότητες Αρωματικών και Φαρμακευτικών Φυτών στην Ελλάδα, (2002).

Λέτσας Α., (1949). Μυθολογία της Γεωργίας. Τόμοι Ι – ΙΙΙ. Θεσσαλονίκη.

Μαρσέλλος Μ. και Μαρσέλλος Σ., (1981). Οδηγός των Φαρμακευτικών Φυτών. Εκδότης: Μόσχος Γκιούρδας, Αθήνα. 432 σελ.

Μπαζαΐος Κ., (1998). 100 βότανα, 1000 θεραπείες. Διατροφή και υγεία, Αθήνα, σελ. 155-157, 309.

Πολυσίου Μ., (2002). Επενδυτικές δυνατότητες στον τομέα των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών στην Ελλάδα. Υπουργείο Εθνικής Οικονομίας Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών -68.

Σκουμπρής Β., (1985). Αρωματικά Φυτά και Αιθέρια Έλαια. Θεσσαλονίκη, 256 σελ.

Σκρουμπής Β., (1998). “Αρωματικά, φαρμακευτικά και μελισσοτροφικά φυτά της Ελλάδας”, Εκδόσεις Αγρότυπος, Αθήνα.

<https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%9B%CE%B5%CE%B2%CE%AC%CE%BD%CF%84%CE%B1>

<https://repository.kallipos.gr/handle/11419/241>

Κίντζιος, Σ., 2015. *Εισαγωγή στον μικροπολλαπλασιασμό των φυτών*. [ηλεκτρ. βιβλ.] Αθήνα:Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών. Διαθέσιμο στο: <http://hdl.handle.net/11419/241>

ΑΝΑΣΤΑΣΙΟΣ ΔΑΡΡΑΣ, ΚΛΗΡΟΝΟΜΟΥ ΔΕΣΠΟΙΝΑ. ΑΝΘΟΚΟΜΙΑ – ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΑΚΕΣ ΑΣΚΗΣΕΙΣ,ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ,ΤΕΙ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ. ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΕΜΒΡΥΟ.

ΧΡΗΣΤΟΣ ΔΟΡΔΑΣ ,2012. ΑΡΩΜΑΤΙΚΑ ΚΑΙ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ ΦΥΤΑ. ΓΕΩΠΟΝΙΚΗ ΣΧΟΛΗ ΤΟΥ Α.Π.Θ. ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΠΑΙΔΕΙΑ.

https://www.google.gr/search?hl=el&q=plantas+emblematicas+del+peru&tbm=isch&tbs=simg:CAQSlwEJqNTG2xLiRglaiwELEKjU2AQaBAGVCACMCxCwjKclGmIKYAgDEiiQBN0WkQTIC4MMggz5FpcX5gveFsYoxSjVldQh3zfXN6kg1yHSIdMhGjCPao3e4ffLkzOAczAuEfWZUpG5OW4A3v9KNWlrf84AQ2x7zLtkP0xXr1HT6rqSh-IgBAwLEI6u_1ggaCgoICAESBP6d6HUM&sa=X&ved=0ahUKEwiyx9H15rjgAhXtwMQBHfqBAAAQwg4IKSgA&biw=1366&bih=657#imgrc=rXm_HH_RQoYuMM:

<https://www.google.gr/url?sa=i&source=images&cd=&cad=rja&uact=8&ved=0ahUKEwjy3-eo57jgAhUdwsQBHV1wAPcQMwgnKAAwAA&url=http%3A%2F%2Fwww.kalliergeia.com%2Fen%2Fflavandula-angustifolia-english-lavender-origin-description-and-usage%2F&psig=AOvVaw2vAffY7eqUfzw1yC6S56aw&ust=1550150651954727&ictx=3&uact=3>