

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

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ



ΘΕΜΑ

«ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ *Hypericum taygeteum*»

ΚΟΛΛΙΟΠΟΥΛΟΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ

Καλαμάτα 2019

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

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΘΕΜΑ

«ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ *Hypericum taygeteum*»

ΚΟΛΛΙΟΠΟΥΛΟΣ ΑΛΕΞΑΝΔΡΟΣ

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΚΑΡΤΣΩΝΑΣ ΕΠΑΜΕΙΝΩΝΔΑΣ

Καλαμάτα 2019

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ	7
ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	8
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1 ^ο	9
1.1.ΚΑΤΑΓΩΓΗ, ΕΞΑΠΛΩΣΗ, ΙΣΤΟΡΙΚΟ	9
1.2.ΒΟΤΑΝΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ, ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ - ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΚΑΙ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΑ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ.....	9
1.3.ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ - ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΣΕ ΚΛΙΜΑ, ΕΔΑΦΟΣ ΚΑΙ ΝΕΡΟ.....	10
1.3.1.ΓΕΝΙΚΑ	10
1.4.ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ.....	10
1.4.1.ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ.....	10
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2 ^ο	11
2.ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ.....	11
2.1.ΒΑΣΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ	11
2.2.Η ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΩΣ ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΣΠΑΝΙΩΝ ΦΥΤΩΝ..	12
2.3.Ο ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΣΤΟ ΕΙΔΟΣ.....	14
2.4.ΤΥΠΟΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ.....	14
2.5.ΣΤΑΔΙΑ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	15
2.6. ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ – ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ.....	16
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ^ο	18
3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	18
3.1.ΥΛΙΚΑ.....	18
3.1.1ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	18
3.1.2ΥΛΙΚΑ ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗΣ ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΩΝ.....	18
3.1.3ΥΛΙΚΑ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ IN VITRO.....	18
3.1.4ΔΟΧΕΙΑ IN VITRO ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	19
3.1.5ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ IN VITRO ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ.....	19
3.2ΜΕΘΟΔΟΙ.....	20
3.2.1ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ	20
3.2.2ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ ΥΛΙΚΩΝ	21
3.2.3ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗ – ΕΠΩΑΣΗ – ΑΝΑΠΤΥΞΗ IN VITRO ΕΚΦΥΤΩΝ ΤΟΥ	21
3.3ΕΚΦΥΤΑ-ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ ΕΚΦΥΤΩΝ.....	22
3.3.1'ΕΚΦΥΤΑ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΑΡΧΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ	22
3.3.2 ΣΥΝΘΗΚΕΣ IN VITRO ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	22

3.3.3ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ.....	23
3.3.3.1ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΑ ΣΧΕΔΙΑ – ΣΤΑΤΙΣΤΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	23
3.3.3.2 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΤΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ.....	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ^ο	25
4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	25
4.1ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΤΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ.....	25
4.1.1ΠΡΩΤΗ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ	25
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5 ^ο	31
5.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	31
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	31

Υπεύθυνη Δήλωση : Εγώ, ο Κολλιόπουλος Αλέξανδρος βεβαιώνω ότι είμαι ο συγγραφέας αυτής της πτυχιακής εργασίας με τίτλο «**ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ *Hypericum taygeteum***»

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 μικρο πολλαπλασιασμού του είδους *Hypericum taygeteum*. Το ανωτέρω είδος είναι ένα σπάνιο ενδημικό είδος της Νότιας Πελοποννήσου που απειλείται με εξαφάνιση. Η εξεύρεση μιας επιτυχούς μεθόδου μικρο πολλαπλασιασμού του είναι αναγκαία, τόσο για την διάσωσή του, όσο και για την παραγωγή μεγάλου αριθμού φυτών (χωρίς να διαταραχθεί ο ευάλωτος πληθυσμός του), ώστε να εξεταστεί η δυνατότητα χρήσης του ως καλλωπιστικό ή φαρμακευτικό. Εξετάστηκε η επίδραση του υποστρώματος καλλιέργειας καθώς και η θέση του εκφύτου πάνω στον μητρικό βλαστό στην αντίδραση των εκφύτων στην καλλιέργεια. Χρησιμοποιήθηκαν φτωχά ή πλούσια σε θρεπτικά στοιχεία υποστρώματα καλλιέργειας καθώς και έκφυτα από την κορυφή, την μέση και την βάση του μητρικού βλαστού.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η παρούσα πτυχιακή εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο ιστοκαλλιέργειας του Τ.Ε.Ι Πελοποννήσου. Σκοπός της ήταν η εξεύρεση μιας επιτυχούς μεθόδου μικρο πολλαπλασιασμού του ενδημικού και υπο εξαφάνιση είδους της Νοτίας Πελοποννήσου *Hypericum taygeteum*. Επιτεύχθηκε επιτυχής απολύμανση και εγκατάσταση φυταρίων in vitro. Η χρήση εκφύτων από την κορυφή του μητρικού βλαστού και η καλλιέργεια τους σε φτωχά θρεπτικά υποστρώματα (μισής δύναμης MS και 1.5 σακχαρόζη) αύξησε σημαντικά την αντίδραση των εκφύτων του είδους στην καλλιέργεια,

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Το υπέρικο (*Hypericum* sp.) ανήκει στην οικογένεια *Hypericaceae* ή *Clusiaceae* ή *Guttiferae*. Το υπέρικο αποτελεί φυτό γνωστό από την αρχαιότητα με παγκόσμια εξάπλωση και με πολλές ονομασίες.

Σύμφωνα με τον Μιτάκη (2002), η πρώτη ονομασία που επικράτησε κατά τους αρχαίους χρόνους ήταν η «υπερεικόν» η οποία προέρχεται από τα δύο συνθετικά «υπέρ» + «εικών» που σημαίνει ότι «το φυτό είναι υπεράνω της εικόνας» η οποία με τη σειρά της παραλήφθηκε από τους Λατίνους ως *Hypericum*. Η ονομασία αυτή έχει θρησκευτική προέλευση διότι οι αρχαίοι Έλληνες διακοσμούσαν με αυτό τα θρησκευτικά τους είδωλα. Με τον τρόπο αυτό πίστευαν ότι θα προστατευτούν από τα δαιμονικά πνεύματα διότι ήταν πολύ μισητό από αυτά. Η δεύτερη ονομασία προέρχεται από τα δύο συνθετικά «υπό» + «ερείκη» που σημαίνει ότι «το φυτό συνέβαινε να φύεται κάτω από τα φυτά του γένους *Erica*».

Η ονομασία «υπερεικόν», επηρέασε σε μεγάλο βαθμό τις ονομασίες του φυτού οι οποίες μπορούν να καταταχθούν σε 4 κατηγορίες:

1. Ονομασίες θρησκευτικής προέλευσης.
2. Ονομασίες που σχετίζονται με τη μαγεία.
3. Ονομασίες που σχετίζονται με θεραπευτικές ιδιότητες.
4. Ονομασίες που σχετίζονται με βοτανική περιγραφή.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο

1.1.ΚΑΤΑΓΩΓΗ, ΕΞΑΠΛΩΣΗ, ΙΣΤΟΡΙΚΟ

Στο βιβλίο Ερυθρών Δεδομένων των Σπάνιων και Απειλουμένων Ειδών της Ελληνικής Χλωρίδας αναφέρονται οι Καλπουτζάκης Ε., Κυριακόπουλος Χ. και Κωνσταντινίδης Θ. οι οποίοι μελέτησαν το συγκεκριμένο φυτό το οποίο αποτελεί σπάνιο ενδημικό φυτό της Νότιας Πελοποννήσου, γνωστό από τα όρη Ταΰγετος, Πάρνωνας καθώς και από τα μικρότερα όρη Χιονοβούνι και Κορακιά τα οποία ανήκουν στην οροσειρά του Ζάρακα. Συγκεκριμένα στον Ταΰγετο εμφανίζεται στα ανώτερα τμήματα της Λαγκάδας κυρίως σε βραχώδεις θέσεις. Στο Πάρνωνα συναντάμε πληθυσμούς σε σκιερούς βράχους, δυτικής-βορειοανατολικής πλευράς ,μέσα σε δάσος *Abies cephalonica*. Στα δύο μικρότερα όρη το συναντάμε σε ημισκιαζόμενους , κατακόρυφους, ασβεστολιθικοί κρημνούς με βόρεια ή βορειοανατολική έκθεση. Στη νότια πλευρά του όρους Χιονοβουνίου παρατηρείται το χαμηλότερο υψόμετρο ανάπτυξής του, 400m . Τέλος οι γνωστοί πληθυσμοί του *Hypericum taygeteum* αναπτύσσονται σε υψόμετρα από 400 έως 1.200m.

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

Στο πανεπιστήμιο της Πάτρας η Πυλαρά Α., η Καρατζά Ε. και ο Ιατρού Γ. μελέτησαν το γένος *Hypericum* L. στην Ελλάδα. Συγκεκριμένα το είδος *Hypericum taygeteum* Quèzel & Contandr ανήκει στην οικογένεια *Hypericaceae* η οποία περιλαμβάνει περίπου 300 είδη από τα οποία τα 200 είδη ανήκουν στο γένος *Hypericum*. Το συγκεκριμένο αποτελεί αυτοφυές είδος στη χώρα μας όπως και το *Hypericum perforatum* L., *H. crispum* L., *H. olympicum* L. κ.α. Το υπέρικο είναι πολυετές είδος, με μερικές φορές ξυλώδη στη βάση και αρκετά λεπτά, εύθραυστα στελέχη μήκους 3-10εκ., που συνήθως κρέμονται σε βράχους και σχηματίζουν μικρές συστάδες. Έχει βλαστό κυλινδρικό ή με δύο γραμμές ή πολύ σπάνια τετράγωνο. Επίσης έχει φύλλα αντίθετα, απλά ωοειδή έως ή ελλειπτικά. Μαύροι

αδένες είναι εμφανείς στα σέπαλα και στα περιθώρια των πετάλων, κάποιες φορές και στην κορυφή των φύλλων. Τα άνθη είναι σε κυματοειδείς ταξιανθίες ή ταξιανθίες φόβης. Πέταλα χωρίς όνυχα και διάφανοι αδένες επιμηκυσμένοι (σπάνια απουσιάζουν). Στήμονες σε δέσμες. Η περίοδος ανθοφορίας σύμφωνα με τους Καλπουτζάκης Ε., Κυριακόπουλος Χ. και Κωνσταντινίδης Θ. (2005) αρχίζει από τα μέσα Μαΐου μέχρι τα μέσα Ιουνίου. Οι ώριμοι καρποί οι οποίοι είναι κάψα με επιμήκεις νευρώσεις και σπέρματα ελαφρώς ρυτιδωμένα προς θηλώδη παρουσιάζονται τον Ιούλιο μέχρι τις αρχές Αυγούστου.

1.3.ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ - ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ ΣΕ ΚΛΙΜΑ, ΕΔΑΦΟΣ ΚΑΙ ΝΕΡΟ

1.3.1.ΓΕΝΙΚΑ

Ο Δόρδας Χ. αναφέρει στο βιβλίο του (2012) ότι το υπέρικο αυτοφύεται σε ασβεστολιθικούς βράχους και κρημνούς, σε υψόμετρα 400-1200μέτρα. Προσαρμόζεται σε ηλιόλουστες περιοχές και εδάφη που σχηματίστηκαν από ασβεστολιθικά πετρώματα με pH μέχρι 8. Δεν έχει ιδιαίτερες απαιτήσεις σε θρεπτικά στοιχεία και νερό και μπορεί να αναπτυχθεί σε εδάφη ξηρικά και πτωχά- μέτριας γονιμότητας. Στην αρχή της ανάπτυξης των φυτών απαιτούνται μερικά ποτίσματα για να έχουμε καλύτερη ανάπτυξη και εγκατάσταση της καλλιέργειας.

1.4.ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

1.4.1.ΦΥΣΙΚΟΧΗΜΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ

Σύμφωνα με τον Δόρδα Χ. (2012) το υπέρικο είναι φυτό φαρμακευτικό. Η δρόγη του που αποτελείται από τις αποξηραμένες ανθοφόρες κορυφές και τα φύλλα του φυτού, αποτελεί την πρώτη ύλη στις φαρμακοβιομηχανίες για την Παρασκευή διαφόρων σκευασμάτων για την αντιμετώπιση της ήπιας μορφής κατάθλιψης. Το υπέργειο τμήμα θεωρείται επουλωτικό, αντιπυρετικό, διεγερτικό, αντισηπτικό, εμμηναγωγό, παυσίπονο, ανθελμινθικό, αποχρεμπτικό, αντιφλογιστικό και στυπτικό.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο

2.ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ

2.1.ΒΑΣΙΚΕΣ ΕΝΝΟΙΕΣ

Ο Ξυνιάς Ι. (2003) του αναλύει την έννοια της ιστοκαλλιέργειας ή in-vitro καλλιέργεια φυτικών ιστών η οποία αποτελεί μια μέθοδο αγενούς πολλαπλασιασμού. Η τεχνική αυτή βασίζεται στην ολοδυναμικότητα του κυττάρου , την ικανότητα δηλαδή να αναγεννά το φυτό από το οποίο προήλθε. Η ιστοκαλλιέργεια είναι ουσιαστικά η καλλιέργεια οποιουδήποτε μέρους του φυτού το οποίο υπό κατάλληλους χειρισμούς και υπό κατάλληλες συνθήκες μπορεί να αναπαραγάγει το μητρικό φυτό. Η καλλιέργεια αυτή μπορεί να παραμείνει για ένα μεγάλο χρονικό διάστημα ως μια μάζα μη διαφοροποιημένων κυττάρων ή μπορεί να ακολουθήσει αναγέννηση ολόκληρων φυτών. Η καλλιέργεια των εκφύτων γίνεται στο εργαστήριο σε ειδικούς θαλάμους ελεγχόμενων συνθηκών (θερμοκρασία περί τους 22-25 0C ή και διαφορετική ανάλογα με το είδος, φωτοπερίοδος 8 ώρες σκοτάδι 16 ώρες φως) και για αυτό τον λόγο αναφέρεται η τεχνική και ως πολλαπλασιασμός in vitro. Για το λόγο αυτό μπορεί να πραγματοποιηθεί σε οποιαδήποτε περιοχή του κόσμου, οποιαδήποτε εποχή του χρόνου. Το τμήμα του φυτού που καλλιεργείται ονομάζεται έκφυτο (explant), και μπορεί να είναι οφθαλμός , φύλλο , κόμβος , επικοτύλιο , ρίζα , κύτταρο , πρωτοπλάστης , γυρεόκοκκος. Τα θρεπτικά υποστρώματα , είναι το μέσο εφοδιασμού του καλλιεργούμενου ιστού με τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία που συνήθως περιέχουν διάφορους ρυθμιστές ανάπτυξης. Οι ρυθμιστές ανάπτυξης (ορμόνες) έχουν ως ρόλο να βοηθήσουν τον πολλαπλασιασμό των κυττάρων αλλά και στις διαδικασίες ριζοβολίας και βλαστογένεσης.

2.2.Η ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΩΣ ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΣΠΑΝΙΩΝ ΦΥΤΩΝ

Οι Abrie και Staden (2001) πολλαπλασίασαν επιτυχώς το είδος *Aloe polyphylla*, ένα σπάνιο υπό εξαφάνιση είδος με μικροπολλαπλασιασμό. Χρησιμοποίησαν σπόρους του φυτού τους οποίους τους καλλιέργησαν *in vitro* σε υπόστρωμα MS medium με και χωρίς σουκρόζη. Τα φυτά που προέκυψαν καλλιεργήθηκαν σε όξινο περιβάλλον μόνο με βενζυλαδεκίνη ή και σε συνδυασμό με BA και NAA. Αρχικά αντιμετώπισαν κάποια προβλήματα ωστόσο τα έκφυτα γρήγορα κατάφεραν να σχηματίσουν μασχαλιαίους και τυχαίους οφθαλμούς. Ο συνδυασμός MS medium με 1.0 mg l⁻¹ BA έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα στον σχηματισμό βλαστών.

Οι Soniya and Das, (2002) πολλαπλασίασαν επιτυχώς το φαρμακευτικό είδος *Piper longum* (ενδημικό της Ινδίας) με μικροπολλαπλασιασμό, του οποίου εάν η συλλογή του εξακολουθήσει να γίνεται με τους ίδιους ρυθμούς θα απειληθεί με εξαφάνιση. Χρησιμοποίησαν ακραία τμήματα βλαστών τα οποία καλλιέργησαν σε MS με BA και κινετίνη. Ο συνδυασμός 8.9 μM BA και 4.6 μM κινετίνης, έδωσε τα καλύτερα αποτελέσματα στην αναγέννηση βλαστών. Ριζοβόλησαν βλαστούς μήκους 2-3cm σε MS με 2.46 μM IBA. Ριζοβολημένοι βλαστοί εγκλιματίστηκαν *ex vitro* με ποσοστό 90%.

Οι Mala and Bylinsky, (2004) μελέτησαν τον μικροπολλαπλασιασμό του είδους *Daphnec neorum*, ένα φυτικό είδος της Τσεχίας, που τα τελευταία χρόνια έχει υποστεί δραματική μείωση του πληθυσμού του. Ο πολλαπλασιασμός του με άλλους τρόπους όπως μοσχεύματα, είναι επιτυχής, αλλά η συλλογή των μοσχευμάτων θα μείωνε την βιωσιμότητα των υπαρχόντων φυτών τα οποία δεν αναγεννιούνται στη φύση λόγω της χαμηλής γονιμότητας και της μειωμένης βλάστησης των σπόρων. Για να πετύχουν μικροπολλαπλασιασμό του είδους οι ερευνητές χρησιμοποίησαν βλαστούς μήκους 3cm με έναν ακραίο οφθαλμό καθώς και σπορόφυτα που βλάστησαν *in vitro*. Πέτυχαν οργανογένεση και από τα δύο είδη εκφύτων σε WPM, με 6% άγαρ, 200mg glutamine, 200mg casein, 30g sucrose, 0.2 BAP και 0.1 IBA. Ριζοβολία των βλαστών επιτευχθεί σε 1/3 δύναμης WPM με 2.83mg IBA, τοποθετώντας τους βλαστούς στο σκοτάδι για 7 ημέρες και στη συνέχεια σε υπόστρωμα χωρίς IBA και φωτισμό. Η επίδραση της τοποθεσίας από την οποία προέρχονταν τα έκφυτα επέδρασε σημαντικά στην αντίδρασή τους. Οι καλλιέργειες

που προέρχονταν από ένα σπορόφυτο του είδους που εγκαταστάθηκε επιτυχώς έδειξαν πολύ χαμηλό ποσοστό ριζοβολίας 32%.

Οι Nand *et al.*, (2004) πολλαπλασίασαν επιτυχώς με μικροπολλαπλασιασμό τα *Davidsonia pruriens* και *Davidsonia jerseyana*, δύο είδη ενδημικά της Αυστραλίας. Χρησιμοποίησαν έκφυτα κόμβων από σπορόφυτα των δύο ειδών τα οποία βλάστησαν *in vitro*. Τα έκφυτα εγκαταστάθηκαν με τα καλύτερα αποτελέσματα σε MS με BA (για το *D. pruriens*). Υψηλότερα ποσοστά ριζοβολίας επιτεύχθηκαν μετά από καλλιέργεια βλαστών με μισής δύναμης MS με 32.2 μM IBA. Οι βλαστοί του *D. pruriens* παρέμεναν για διάστημα 3 με 5 ημερών και του *D. jerseyana* για διάστημα 2 με 3 ημερών στο υπόστρωμα ριζοβολίας και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε υπόστρωμα χωρίς αυξίνη. Το είδος *D. jerseyana* πολλαπλασιάστηκε με ψηλά ποσοστά όταν τα έκφυτα προέρχονταν από ενήλικα φυτά, ενώ το *D. pruriens* πολλαπλασιάστηκε με δυσκολία όταν τα έκφυτα προέρχονταν από ενήλικα φυτά

Οι Almeida *et al.*, (2005) πολλαπλασίασαν επιτυχώς το είδος *Rhododendron ponticum* L. Subsp. *baeticum* (ένα σπάνιο υπό εξαφάνιση είδος της Ισπανίας και της Πορτογαλίας) με μικροπολλαπλασιασμό. Στις περιοχές όπου ενδημεί παρατηρούνται μόνο ενήλικα φυτά, ενώ από την μεγάλη φωτιά του 2003 ο πληθυσμός του είδους μειώθηκε σημαντικά. Εγκατέστησαν καλλιέργειες χρησιμοποιώντας έκφυτα κόμβων που καλλιεργούνταν σε υπόστρωμα Anderson (μακροστοιχεία και ιχνοστοιχεία) και βιταμίνες MS με 0.5mg l⁻¹ BA και 2% σακχαρόζη. Για τον πολλαπλασιασμό των βλαστών χρησιμοποιήθηκε το ίδιο υπόστρωμα με διάφορες συγκεντρώσεις των κυτοκινινών ζεατίνη, κινετίνη και BA, καθώς και διάφορες συγκεντρώσεις των κυτοκινινών με IAA. Ο αριθμός των βλαστών ανά έκφυτο επηρεάστηκε από τον τύπο της κυτοκινίνης και του εκφύτου, ενώ καλύτερα αποτελέσματα έδωσαν τα έκφυτα κόμβων, και ο συνδυασμός των ορμονών ζεατίνης και IAA. Για την ριζοβολία χρησιμοποιήθηκαν *ex vitro* και *in vitro* τεχνικές, αφού προηγουμένα οι βλαστοί από το υπόστρωμα πολλαπλασιασμού σκληραγωγήθηκαν για 2 εβδομάδες σε υπόστρωμα μισής δύναμης Anderson. Στην *in vitro* ριζοβολία είχαμε α) καλλιέργεια των βλαστών σε πλήρες ή μισής δύναμης Anderson με 1 ή 2mg l⁻¹ IBA ή NAA και στη συνέχεια καλλιέργεια σε ίδιο υπόστρωμα χωρίς αυξίνη και β) οι βλαστοί εμβαιπίστηκαν για 2min σε 1g l⁻¹ IBA ή NAA και στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν σε πλήρες ή μισής δύναμης Anderson χωρίς αυξίνη. Στην *ex vitro* ριζοβολία οι βλαστοί εμβαιπίστηκαν στα πυκνά διαλύματα των αυξινών και στη συνέχεια καλλιεργήθηκαν σε εδαφικό υπόστρωμα. Η παρουσία αυξίνης ήταν απαραίτητη για την επιτυχή

ριζοβολία των βλαστών. Καλύτερη ριζοβολία ως προς ποσοστό, αριθμό και μήκος ριζών είχαμε σε μισής δύναμης Anderson με IBA. Η εμφάνιση των βλαστών σε πυκνό διάλυμα αυξίνης αύξησε σημαντικά τη ριζοβολία φτάνοντας στο ποσοστό 100%.

Οι Saez *et al.*, (1994) πέτυχαν τον μικροπολλαπλασιασμό του είδους *Thymus piperella*, 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.

2.3.Ο ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΣΤΟ ΕΙΔΟΣ

Στο πείραμα αυτό μελετήθηκε το είδος *Hypericum taygeteum* το οποίο πολλαπλασιάστηκε με μικροπολλαπλασιασμό χρησιμοποιώντας έκφυτα κορυφής, μέσης και βάσης. Στο στάδιο του πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών χρησιμοποιήθηκαν δυο υποστρώματα MS διαφορετικής σύστασης MS 4/3 και MS/2. Υψηλότερα ποσοστά ριζοβολίας επιτεύχθηκαν μετά από καλλιέργεια εκφυτων κορυφής με μισής δύναμης MS.

2.4.ΤΥΠΟΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ

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 μικροπολλαπλασιασμού είναι οι εξής:

- 1.Μεριστωματική καλλιέργεια
- 2.Καλλιέργεια βλαστών

Τα έκφυτα σε αυτή την περίπτωση μπορεί να είναι:

Μασχαλιαίοι βλαστοί

Τμήμα βλαστού με ένα γόνατο

Τμήμα βλαστών

Μικροβολβοί-μικροκόνδυλοι

Μικροεμβολιασμοί

3.Εμβρυοκαλλιέργεια

4.Καλλιέργεια κάλλου

5.Κυτταροκαλλιέργεια

6.Καλλιέργεια πρωτοπλαστών

7.Καλλιέργεια Γύρης(Παπαχατζής Α.)

2.5.ΣΤΑΔΙΑ ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Για να είναι επιτυχής ο μικροπολλαπλασιασμός εξαρτάται από τον έλεγχο του περιβάλλοντος και την καθιέρωση σταδίων καλλιέργειας, όπου σε κάθε στάδιο χρησιμοποιείται διαφορετικό υπόστρωμα. Σύμφωνα με τον Κίντζιο (2015) η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει πέντε στάδια.

ΣΤΑΔΙΟ 0: Προετοιμασία φυτικού υλικού

Γίνεται προσεκτική επιλογή του μητρικού φυτικού υλικού που θα χρησιμοποιηθεί για τον μικροπολλαπλασιασμό. Θα πρέπει να φέρει κάποια χαρακτηριστικά να είναι υγιές και νεαρό σε ηλικία ώστε να πάρουμε τα καλύτερα δυνατά αποτελέσματα χωρίς καμία μόλυνση. Κατά κύριο λόγο η καλλιέργεια του γίνεται σε θερμοκήπια όπου είναι πιο εύκολο να γίνονται συχνή έλεγχοι για την κατάσταση και πορεία της καλλιέργειας.

ΣΤΑΔΙΟ1:Εγκατάσταση και σταθεροποίηση της καλλιέργειας εκφύτων

Το στάδιο αυτό αποσκοπεί στην επιτυχή τοποθέτηση ενός εκφύτου σε ασηπτικές συνθήκες αποφεύγοντας τις προσβολές από παθογόνα και στη συνέχεια την εφαρμογή ρυθμιζόμενου περιβάλλοντος που προωθεί την σταθερή παραγωγή βλαστών. Τα έκφυτα καλλιεργούνται σε ειδικά δοχεία τα οποία τοποθετούνται στον θάλαμο καλλιέργειας.

ΣΤΑΔΙΟ2: Πολλαπλασιασμός βλαστών

Ο σκοπός του σταδίου αυτού είναι να διατηρήσει την καλλιέργεια σε σταθερή κατάσταση και ο μικροπολλαπλασιασμός των μικροβλαστών στον επιθυμητό αριθμό. Αρκετές ανακαλλιέργειες πραγματοποιούνται σε αυτό το στάδιο για να ανανεωθεί το υπόστρωμα καθώς τα θρεπτικά του στοιχεία καταναλώνονται. Το θρεπτικό διάλυμα συνήθως είναι το ίδιο με αυτό του πρώτου σταδίου , αλλά συχνά η συγκέντρωση της κυτοκινίνης και των ανόργανων στοιχείων είναι αυξημένη. Στο στάδιο αυτό ανάλογα με το είδος , τα έκφυτα παραμένουν συνήθως από 4-8 εβδομάδες.

ΣΤΑΔΙΟ3: Αναγέννηση φυτού

Στο στάδιο αυτό πραγματοποιείται η ριζοβολία των βλαστών που παρήχθησαν κατά το προηγούμενο στάδιο. Έτσι τα φυτά τα οποία θεωρούνται κατάλληλα μεταφυτεύονται σε νέο υπόστρωμα ριζοβολίας. Στο στάδιο αυτό τα έκφυτα παραμένουν για περίπου 4-6 εβδομάδες , ανάλογα με το είδος και την ευκολία με την οποία ριζοβολεί.

ΣΤΑΔΙΟ4:Εγκλιματισμός και Σκληραγώγηση φυτών

Τέλος στο στάδιο αυτό μεταφέρονται τα έριζα έκφυτα σε συνθήκες *ex vitro*. Αυτό το στάδιο είναι καθοριστικό , αφού η επιτυχία της ιστοκαλλιέργειας ολοκληρώνεται με την επιτυχία αυτού του σταδίου. Ο εγκλιματισμός των εκφύτων γίνεται σταδιακά και συνήθως σε μονάδες υδρονέφωσης ώστε να έχουμε ομοιόμορφο εγκλιματισμό και ανάπτυξη φυτών. Το στάδιο της σκληραγώγησης διαρκεί 4-6 εβδομάδες. Τα φυτά που προκύπτουν είναι πλήρως αναγεννημένα και αν πραγματοποιηθούν όλα τα στάδια προσεκτικά κάτω από τις κατάλληλες συνθήκες μπορεί να επιτευχθεί και 100% επιτυχία.

2.6. ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ – ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ

Η ιστοκαλλιέργεια αποτελεί μια ιδιαίτερα χρήσιμη μέθοδος. Οι Sharma G. Jagetiya N. Dashora R.(2015) αναφέρουν τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα της ιστοκαλλιέργειας. Ένα βασικό της πλεονέκτημα είναι ότι έχει την δυνατότητα μαζικής και ταχείας παραγωγής κλωνικών φυτών λόγω των ελεγχόμενων συνθηκών. Σημαντικό πλεονέκτημα αποτελεί η παραγωγή φυτών τα οποία είναι απαλλαγμένα από παθογόνους μικροοργανισμούς λόγω των ασηπτικών συνθηκών. Η μέθοδος αυτή βρίσκει εφαρμογή σε φυτικά είδη τα οποία είναι δύσκολο να πολλαπλασιαστούν με τις κλασσικές μεθόδους. Επίσης δίνει τη δυνατότητα να διατηρηθεί γενετικό υλικό

σε περιορισμένο χώρο αλλά υπάρχει και μείωση του χώρου που απαιτείται για τη διατήρηση του πολλαπλασιαστικού υλικού. Τέλος αλλά εξίσου σημαντικό πλεονέκτημα αυτής της μεθόδου είναι η συνεχή παραγωγή πολλαπλασιαστικού υλικού κατά τη διάρκεια όλου του χρόνου.

Η ιστοκαλλιέργεια παρουσιάζει και ορισμένα μειονεκτήματα. Ένα από αυτά είναι το υψηλό κόστος παραγωγής. Επίσης απαιτείται εξειδικευμένος εργαστηριακός εξοπλισμός καθώς και ειδικευμένο προσωπικό το οποίο θα γνωρίζει την εφαρμογή των τεχνικών. Στα αρχικά στάδια της διαδικασίας μπορούν να εμφανιστούν μολύνσεις οι οποίες μπορούν να οδηγήσουν σε απώλεια σημαντικού αριθμού φυταρίων σε σύντομο χρονικό διάστημα. Τέλος υπάρχει αστάθεια στην παραγωγή ομοιόμορφων φυτών λόγω μεταλλάξεων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3^ο

3.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1.ΥΛΙΚΑ

3.1.1ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Ως φυτικό υλικό χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα του είδους *Hypericum taygeteum* που ήταν συλλογής του Απριλίου 2016. Τα έκφυτα επιλέχθηκαν από υγιή φυτά τα οποία αναπτύσσονταν στο όρος Ταΰγετος στην τοποθεσία χαράδρα της Λαγκάδας.

3.1.2ΥΛΙΚΑ 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.

3.1.3ΥΛΙΚΑ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ IN VITRO

Για την παρασκευή του υποστρώματος χρειάζεται να δοθεί μεγάλη προσοχή ως προς την καθαριότητα των σκευών , την καθαρότητα των χημικών ενώσεων και το σωστό ζύγισμα των υλικών. Ακολουθούν τα υλικά που χρειάζονται για να δημιουργηθεί το υπόστρωμα.

1. MS (Murashige και Skoog) σε σκόνη χωρίς IAA, Kinetin της εταιρίας ICN BIOMEDICALS, χρησιμοποιήθηκε πλήρους ή μισής δύναμης (μισής συγκέντρωσης) MS.
2. Σακχαρόζη σε συγκέντρωση 3 ή 1.5% που αποτελεί πηγή άνθρακα.
3. Βιταμίνη Μυοϊνοζιτόλη (Myo-inositol)
M.B.= 180,16(της εταιρείας Merck)
4. Στεροποιητικός παράγοντας Άγαρ της εταιρίας Ρουμπουλάκης Α.Ε.
5. Απιονισμένο νερό.

3.1.4 ΔΟΧΕΙΑ IN VITRO ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

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

3.1.5. ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ IN VITRO ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

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

Πίνακας 1. Θρεπτικά στοιχεία των πλήρους και μισής δύναμης MS

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

Συγκεκριμένα χρησιμοποιήθηκε μισής δύναμης MS και πλήρους 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.

Άλλες συσκευές και υλικά που χρησιμοποιήθηκαν ήταν :

- Συσκευή υγρής αποστείρωσης.
- Τράπεζα οριζόντιας νηματικής ροής.
- 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).

3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1. ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ

Σε δοχείο ζέσεως προσθέτουμε αποσταγμένο νερό (όγκου λιγότερο του τελικού). Καθ'όλη τη διάρκεια παρασκευής το υπόστρωμα θερμαίνεται και αναδεύεται ταυτόχρονα ώστε να επιτευχθεί η ομογενοποίηση του διαλύματος. Προσθέτουμε τις ακριβείς ποσότητες, $2,2\text{ g/l MS}$, σακχαρόζη 1.5%, μισοϊνοζιτόλη 100mg/l για το υπόστρωμα μισής δύναμης (υπόστρωμα 1) και $4,4\text{ g/l MS}$, σακχαρόζη 3%, και μισοϊνοζιτόλη 100mg/l για το πλήρους δύναμης (υπόστρωμα 2). Αφού προστέθηκαν τα υλικά, τα διαλύματα αναδεύονταν σε μαγνητικό αναδευτήρα μέχρι να διαλυθούν

πλήρως. Στη συνέχεια γίνεται 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.

3.2.2. ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ ΥΛΙΚΩΝ

Όλα τα δοχεία με τα υποστρώματα, αλλά και όλα τα υλικά και τα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν στις εμφυτεύσεις καλύπτονταν με φύλλο αλουμινίου, όπως λαβίδες, νυστέρια, 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. Τέλος όσον αναφορά τα τρυβλία είναι θερμοευαίσθητα επομένως δεν τοποθετούνται στο αυτόκαυστα αλλά είναι ήδη αποστειρωμένα από την εταιρία εφόσον δεν έχει ανοιχτεί το καπάκι τους.

3.2.3 ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗ – ΕΠΩΑΣΗ – ΑΝΑΠΤΥΞΗ IN VITRO ΕΚΦΥΤΩΝ ΤΟΥ

Η απολύμανση των εκφύτων πραγματοποιήθηκε μέσα σε τράπεζα νηματικής ροής καθώς και η κοπή τους απομακρύνοντας φύλλα που είναι εστία μικροβίων. Τα έκφυτα εμβαπτίστηκαν αρχικά σε αποστειρωμένα δοχεία ζέσεως που περιείχαν διάλυμα χαμηλής συγκέντρωσης υποχλωριώδους νατρίου (χλωρίνη εμπορίου) 12% με μια σταγόνα της προσκολλητικής ουσίας Tween-20 για 10-15min. Μετά ξεπλένονται 3-4 φορές για 3 min με αποστειρωμένο-απεσταγμένο νερό. Στην συνέχεια τα έκφυτα τοποθετήθηκαν σε τρυβλία Petri τα οποία περιείχαν το υπόστρωμα καλλιέργειας

. Μετά την απολύμανση και τοποθέτηση των εκφύτων στα τρυβλία καλλιέργειας τοποθετήθηκαν για επώαση σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών όπου επωάστηκαν 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.

Τα έκφυτα μας χωρίστηκαν σε κορυφής, μέσης και βάσης του μητρικού βλαστού από τον οποίο κόπηκαν. Σε κάθε τρυβλίο ή δοχείο καλλιέργειας τοποθετήθηκαν 3 με 5 έκφυτα του είδους.

3.3ΕΚΦΥΤΑ-ΧΕΙΡΙΣΜΟΙ ΕΚΦΥΤΩΝ

3.3.1ΈΚΦΥΤΑ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΑΡΧΙΚΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

Μετά την ολοκλήρωση της διαδικασίας απολύμανσης των βλαστών μέσα σε τράπεζα νηματικής ροής, πάνω σε αποστειρωμένη πλάκα η οποία καθαριζόταν συχνά με αιθανόλη 80%, και με χρήση αποστειρωμένου νυστεριού, οι βλαστοί τεμαχίζονταν σε έκφυτα από την κορυφή ,την μέση και την βάση τους. Έτσι στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα από τρεις διαφορετικές θέσεις επάνω στο μητρικό φυτό , από την κορυφή, το μέσο και την βάση του μητρικού φυτού, ώστε να διαπιστωθεί η επίδραση της θέσης του εκφύτου στον μητρικό βλαστό στην αντίδραση τους στον μικροπολλαπλασιασμό .Τέλος αφαιρούνταν τυχόν υπολείμματα φύλλων καθώς και τα δύο ακραία τμήματα του βλαστού που είχαν καταστραφεί από την απολύμανση.

3.3.2 ΣΥΝΘΗΚΕΣ IN VITRO ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Τα τρυβλία Petri με τα έκφυτα επωάζονταν σε θάλαμο ελεγχόμενων σταθερών συνθηκών, σε θερμοκρασία $20\pm 1^{\circ}\text{C}$ και σε φωτοπερίοδο 16 h πλήρους φωτός έντασης 4000 lx ($37,5 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$) που παρέχονταν από λευκούς λαμπτήρες φθορισμού οι οποίοι βρίσκονταν στις πλευρές του θαλάμου. Η επώαση διαρκούσε 40-45 ημέρες.

3.3.3ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΤΩΝ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

3.3.3.1. 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 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.

Στο στάδιο της εγκατάστασης των αρχικών καλλιεργειών, καθώς και στο στάδιο του πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών, ως επανάληψη θεωρήθηκε το κάθε έκφυτο κόμβου που τοποθετήθηκε.

3.3.3.2. ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ ΣΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΤΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

Εκτιμήθηκε η επίδραση του υποστρώματος καθώς και τη ζθέσγς του εκφύτου πάνω στον μητρικό βλαστό από τον οποίο κόπηκαν, στην αντίδρασή των εκφύτων. Οι μέθοδοι απολύμανσης εκφύτων για την αρχική εγκατάσταση αυτών, εκτιμήθηκαν ως προς το ποσοστό εκφύτων που επέζησαν μετά την κάθε απολύμανση, καθώς και το ποσοστό των εκφύτων που δεν μολύνθηκαν. Η αρχική εγκατάσταση εκφύτων in vitro εκτιμήθηκε μετά από 44 ημέρες από την εμφύτευση των εκφύτων στα υποστρώματα.

Υπολογίσθηκαν το ποσοστό εκφύτων που αντέδρασαν ως προς την έκπτυξη βλαστών, ο αριθμός των βλαστών που σχηματίστηκε ανά έκφυτο που αντέδρασε, το μέσο μήκος των βλαστών που σχηματίστηκαν και ο σχηματισμός ρίζας. Τέλος

υπολογίστηκε και σε ποιο από τα δυο υποστρώματα είχαμε μεγαλύτερο ποσοστό επιτυχίας.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4°

4.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

4.1.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ ΣΤΟ ΣΤΑΔΙΟ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ ΤΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

4.1.1.ΠΡΩΤΗ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

Κατά την φάση των αρχικών καλλιεργειών εγκατάστασης *in vitro* του είδους *Hypericum taygeteum*, εξετάστηκε η επίδραση του υποστρώματος εγκατάστασης καθώς και της θέσης των εκφύτων στον μητρικό βλαστό από τον οποίο κόπηκαν, στην αντίδρασή τους στην καλλιέργεια.

Πίνακας 2. Επίδραση του υποστρώματος ανάπτυξης καθώς και της θέσης του εκφύτου στον μητρικό βλαστό στο ποσοστό των εκφύτων του είδους *Hypericum taygeteum* 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 (%)
Μισής δύναμης MS, Κορυφή βλαστού	100 a
Μισής δύναμης MS, Μέση βλαστού	0 d
Μισής δύναμης MS, Βάση βλαστού	0 d
Πλήρους δύναμης MS, Κορυφή βλαστού	37 bc
Πλήρους δύναμης MS, Μέση βλαστού	17 cd
Πλήρους δύναμης MS, Βάση βλαστού	50 b
Υπόστρωμα και θέση εκφύτου	*
Μέσοι με διαφορετικό λατινικό γράμμα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά NS μη στατιστικά σημαντική διαφορά, * στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%	

Το υψηλότερο ποσοστό αντίδρασης επιτεύχθηκε όταν χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα από την κορυφή του βλαστού και εγκαταστάθηκαν σε υπόστρωμα μισής δύναμης MS. Η εγκατάσταση όμως των εκφύτων από την βάση και την μέση του βλαστού δεν οδήγησε σε σχηματισμό βλαστών όταν αυτά τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα μισής δύναμης MS (Πίν. 2).

Πίνακας 3. Επίδραση του υποστρώματος ανάπτυξης καθώς και της θέσης του εκφύτου στον μητρικό βλαστό, στον αριθμό των βλαστών του είδους *Hypericum taygeteum* που σχηματίστηκαν. 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	Αριθμός βλαστών
Μισής δύναμης MS, Κορυφή βλαστού	7 a
Μισής δύναμης MS, Μέση βλαστού	0 c
Μισής δύναμης MS, Βάση βλαστού	0 c
Πλήρους δύναμης MS, Κορυφή βλαστού	1,5 bc
Πλήρους δύναμης MS, Μέση βλαστού	1 c
Πλήρους δύναμης MS, Βάση βλαστού	3 b
Υπόστρωμα και θέση εκφύτου	*
Μέσοι με διαφορετικό λατινικό γράμμα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά NS μη στατιστικά σημαντική διαφορά, * στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%	

Ο υψηλότερος αριθμός βλαστών που σχηματίστηκαν ανά έκφυτο που αντέδρασε παρατηρήθηκε όταν τα έκφυτα προήλθαν από την κορυφή του μητρικού βλαστού και τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα μισής δύναμης MS. Όταν τα έκφυτα τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα πλήρους δύναμης MS ο υψηλότερος αριθμός βλαστών παρατηρήθηκε όταν αυτά προήλθαν από την βάση του μητρικού βλαστού (Πίν. 3).

Πίνακας 4. Επίδραση του υποστρώματος ανάπτυξης καθώς και της θέσης του εκφύτου στον μητρικό βλαστό, στον μέσο μήκος των βλαστών του είδους *Hypericum tatygeteum* που σχηματίστηκαν.. 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 (%)
Μισής δύναμης MS, Κορυφή βλαστού	1 a
Μισής δύναμης MS, Μέση βλαστού	0 c
Μισής δύναμης MS, Βάση βλαστού	0 c
Πλήρους δύναμης MS, Κορυφή βλαστού	0,7 ab
Πλήρους δύναμης MS, Μέση βλαστού	0,5 b
Πλήρους δύναμης MS, Βάση βλαστού	0,2 bc
Υπόστρωμα και θέση εκφύτου	*
Μέσοι με διαφορετικό λατινικό γράμμα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά NS μη στατιστικά σημαντική διαφορά, * στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%	

Οι βλαστοί με το μεγαλύτερο μήκος σχηματίστηκαν όταν τα έκφυτα προήλθαν από την κορυφή του μητρικού βλαστού ανεξάρτητα του είδους του υποστρώματος που επωάστηκαν (Πίν. 4).

Στη συνέχεια και λόγω του μικρού τους μήκους, οι βλαστοί παρέμειναν για μεγαλύτερο διάστημα στο υπόστρωμα όπου είχαν εγκατασταθεί, ώστε να επιμηκυνθούν και να μπορέσουν να ανακαλλιεργηθούν. Μετά την παρέλευση 60 ημερών από την αρχική τους εγκατάσταση ξαναεκτιμήθηκε η αντίδρασή τους στην καλλιέργεια.

Πίνακας 5. Επίδραση του υποστρώματος ανάπτυξης καθώς και της θέσης του εκφύτου στον μητρικό βλαστό στο ποσοστό των εκφύτων του είδους *Hypericum taygeteum* 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 60 ημέρες μετά την εγκατάστασή τους.

Πηγή παραλλακτικότητας	Ποσοστό βλάστησης (%)
Μισής δύναμης MS, Κορυφή βλαστού	100 a
Μισής δύναμης MS, Μέση βλαστού	0 d
Μισής δύναμης MS, Βάση βλαστού	25 c
Πλήρους δύναμης MS, Κορυφή βλαστού	37 bc
Πλήρους δύναμης MS, Μέση βλαστού	17 cd
Πλήρους δύναμης MS, Βάση βλαστού	50 b
Υπόστρωμα και θέση εκφύτου	*
Μέσοι με διαφορετικό λατινικό γράμμα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά NS μη στατιστικά σημαντική διαφορά, * στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%	

Το υψηλότερο ποσοστό αντίδρασης επιτεύχθηκε όταν χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα από την κορυφή του βλαστού και εγκαταστάθηκαν σε υπόστρωμα μισής δύναμης MS. Η εγκατάσταση όμως των εκφύτων από την βάση και την μέση του βλαστού δεν οδήγησε σε σχηματισμό βλαστών όταν αυτά τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα μισής δύναμης MS (Πίν. 5). Τα ποσοστά αντίδρασης των εκφύτων παρέμειναν τα ίδια όπως και στην πρώτη εκτίμηση της αντίδρασης των εκφύτων (Πίν. 2 και 5).

Ο αριθμός των βλαστών που σχηματίστηκαν ανά έκφυτο που αντέδρασε αυξήθηκε θεαματικά όταν οι βλαστοί παρέμειναν για 60 ημέρες στο υπόστρωμα καλλιέργειας μισής δύναμης MS και προέρχονταν από την κορυφή του μητρικού φυτού (Πίν. 6).

Πίνακας 6. Επίδραση του υποστρώματος ανάπτυξης καθώς και της θέσης του εκφύτου στον μητρικό βλαστό, στον αριθμό των βλαστών του είδους *Hypericum taygeteum* που σχηματίστηκαν. 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 60 ημέρες μετά την εγκατάστασή τους.

Πηγή παραλλακτικότητας	Αριθμός βλαστών
Μισής δύναμης MS, Κορυφή βλαστού	17 a
Μισής δύναμης MS, Μέση βλαστού	0 c
Μισής δύναμης MS, Βάση βλαστού	1 c
Πλήρους δύναμης MS, Κορυφή βλαστού	1,5 bc
Πλήρους δύναμης MS, Μέση βλαστού	1 c
Πλήρους δύναμης MS, Βάση βλαστού	3 b
Υπόστρωμα και θέση εκφύτου	*
Μέσοι με διαφορετικό λατινικό γράμμα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά NS μη στατιστικά σημαντική διαφορά, * στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%	

Όταν τα έκφυτα τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα πλήρους δύναμης MS ο υψηλότερος αριθμός βλαστών παρατηρήθηκε όταν αυτά προήλθαν από την βάση του μητρικού βλαστού (Πίν. 6).

Οι βλαστοί με το μεγαλύτερο μήκος σχηματίστηκαν όταν τα έκφυτα προήλθαν από την κορυφή του μητρικού βλαστού ανεξάρτητα του είδους του υποστρώματος που επωάστηκαν (Πίν. 7).

Πίνακας 7. Επίδραση του υποστρώματος ανάπτυξης καθώς και της θέσης του εκφύτου στον μητρικό βλαστό, στον μέσο μήκος των βλαστών του είδους *Hypericum taygeteum* που σχηματίστηκαν.. 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 60 ημέρες μετά την εγκατάστασή τους.

Πηγή παραλλακτικότητας	Ποσοστό βλάστησης (%)
Μισής δύναμης MS, Κορυφή βλαστού	1.1 a
Μισής δύναμης MS, Μέση βλαστού	0 c
Μισής δύναμης MS, Βάση βλαστού	0,2 c
Πλήρους δύναμης MS, Κορυφή βλαστού	0,7 ab
Πλήρους δύναμης MS, Μέση βλαστού	0,5 b
Πλήρους δύναμης MS, Βάση βλαστού	0,2 bc
Υπόστρωμα και θέση εκφύτου	*
Μέσοι με διαφορετικό λατινικό γράμμα διαφέρουν στατιστικά σημαντικά NS μη στατιστικά σημαντική διαφορά, * στατιστικά σημαντική διαφορά σε επίπεδο σημαντικότητας 5%	

Τέλος όταν οι βλαστοί παρέμειναν για ακόμα 30 ημέρες στο υπόστρωμα ανάπτυξης (χωρίς φυτορυθμιστικές ουσίες) σχημάτισαν ρίζες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5^ο

5.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Όπως αναφέρθηκε και στην αρχή της παρούσης εργασίας, σκοπός της ήταν η εξεύρεση μιας αποδοτικής μεθόδου μικρο πολλαπλασιασμού του είδους *Hypericum taygeteum*. Το ανωτέρω είδος είναι ένα σπάνιο ενδημικό είδος της Νότιας Πελοποννήσου που απειλείται με εξαφάνιση. Αρχικά επιτεύχθηκε επιτυχής απολύμανση των εκφύτων του είδους με 12 % χλωρίνη για 19 min. Στην συνέχεια τα έκφυτα του είδους αντέδρασαν με υψηλότερα ποσοστά και με υψηλότερο ρυθμό πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών όταν καλλιεργήθηκαν σε φτωχά υποστρώματα (μισής δύναμης MS κι 1.5 σακχαρόζη) και χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα από την κορυφή του μητρικού βλαστού. Βλαστοί οι οποίοι παρέμειναν για μεγάλο διάστημα στα θρεπτικά υποστρώματα ριζοβόλησαν και στη συνέχεια εγκλιματίστηκαν με επιτυχία.

Τέλος περαιτέρω έρευνα χρειάζεται για την εξεύρεση μιας μεθόδους ριζοβολίας των παραγομένων μικροβλαστών που να δίνει σε σύντομο χρονικό διάστημα υψηλό αριθμό ριζών και υψηλά ποσοστά εγκλιματισμού των φυταρίων.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abrie A.L., Van Staden J., (2001). Micropropagation of the Endangered Aloe Polyphylla. *Plant Growth Regulators* 33:19–23.
- Almeida R., Gonçalves S., Romano A. (2005), *In vitro* micropropagation of endangered *Rhododendron ponticum* L. subsp. *baeticum* (Boissier & Reuter) Handel-Mazzetti Volume 14, Issue 5, pp 1059–1069
- Malá V. Bylinský, (2004).Micropropagation of Endangered Species *Daphnecneorum* Volume 48, Issue 4, pp 633–636
- Nand N., Roderick A., Ashmore S. (2004). Micropropagation of Two Australian Native Fruit Species, *Davidsonia pruriens* and *Davidsonia jerseyana* G. Harden & J.B. Williams Volume 77, Issue 2, pp 193–201
- Sáez F., Sánchez P., Piqueras A., (1994). Micropropagation of *Thymus piperella* Volume 39, Issue 3, pp 269–272
- Sharma G.K., Jagetina S., Dashora R., (2015).General Techniques of Plant Tissue Culture pp14-15
- Soniya E.V. , Das M.R., (2002). In vitro micropropagation of *Piper longum* – an important medicinal plant, Volume 70, Issue 3, pp 325–327

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Δόρδας Χ., (2012). Αρωματικά και Φαρμακευτικά Φυτά, Τόμος ΙΙ. Γεωπονική Σχολή Αριστοτελείου Πανεπιστημίου Θεσσαλονίκης. Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη.
- Κίντζιος Σπυρίδων ,(2015) . Εισαγωγή στον μικροπολλαπλασιασμό των φυτών
- Μιτάκης Μ., (2002). «Η εθνοφαρμακολογία του υπέρικου». Διαθέσιμο online http://www.iama.gr/ethno/Hypericum_files/2Hypericum_Mitakis%20Manolis.pdf
- Ξυνιάς Ι.,(2003). ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΦΥΤΩΝ θεωρία και ασκήσεις, Εκδόσεις : ΕΜΒΡΥΟ

Παπαχατζής Α., Καλορίζου Ε. ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ , Εκδόσεις
Γραμμικό

Πυλαρά Α. , Καρατζά Ε., Ιατρού Γ., Το γένος *Hypericum* L. στην Ελλάδα, Τμήμα Βιολογίας,
Τομέας Βιολογίας Φυτών, Πανεπιστήμιο Πατρών, 26500 Πάτρα

Φοίτος Δ., Κωνσταντινίδης Θ., Καμάρη Γ. ,(2009). Βιβλίο Ερυθρών Δεδομένων των
Σπάνιων και Απειλούμενων Ειδών της Ελληνικής Χλωρίδας, Τόμος 2 (Ε-Ζ), Ελληνική
Βοτανική Εταιρεία, Πάτρα.