

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ
ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ
Ι Δ Ρ Υ Μ Α



ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ

ΑΤΕΙ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

**ΜΕΛΕΤΗ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΕ
ΦΥΤΑ ΛΑΓΟΡΙΓΑΝΗΣ**



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΚΑΛΟΜΟΙΡΑΣ ΜΠΑΚΑΝΔΡΙΤΣΟΥ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2017

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ ΚΑΛΑΜΑΤΑΣ

ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ

ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΩΝ

**ΜΕΛΕΤΗ ΕΝΔΟΚΥΤΤΑΡΙΚΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ ΣΕ
ΦΥΤΑ ΛΑΓΟΡΙΓΑΝΗΣ**

Πτυχιακή εργασία της σπουδάστριας: Μπακανδρίτσου Καλομοίρα

Αριθμός μητρώου: 2013023

Επιβλέπων Καθηγητής: Δελής Κωνσταντίνος

ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2017

Ευχαριστίες

Η παρούσα πτυχιακή εργασία εκπονήθηκε την χρονική περίοδο 2016-2017, στο Ανώτατο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Καλαμάτας, στο τμήμα Τεχνολογίας Γεωπονίας όπου φοίτησα αξιοπρεπώς. Θα ήθελα να εκφράσω τις θερμές ευχαριστίες μου στον Δρ. Δελλή Κωνσταντίνο, Καθηγητή, για την ανάθεση του θέματος, καθώς και για την καθοδήγηση των εργασιών για την επιτυχή τους διεκπεραίωση. Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Κ. Νηφάκο Καλλίμαχο, για την αμέριστη βοήθεια και παρουσία του στις επιτόπιες έρευνές μου στον Ταΰγετο για την συλλογή του φυτικού υλικού που μελετώ αλλά και για την συνεχή παρακολούθηση και βοήθεια στα πειράματα και της εργασίες που έκανα.

Περιεχόμενα

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	3
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1^ο ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1.1 Η ΙΣΤΟΡΙΑ ΤΗΣ ΡΙΓΑΝΗΣ	6
1.2 ΓΕΩΓΡΑΦΙΚΗ ΕΞΑΠΛΩΣΗ:.....	6
1.3 ΓΕΝΙΚΑ ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΓΝΩΡΙΣΜΑΤΑ:	7
1.4 ΚΛΙΜΑΤΙΚΕΣ ΚΑΙ ΕΔΑΦΙΚΕΣ ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ.....	9
1.5 ORIGANUM SCABRUM.....	10
1.6 ΕΝΔΟΦΥΤΙΚΑ ΒΑΚΤΥΡΙΑ ΚΑΙ ΜΥΚΗΤΕΣ	12
1.7 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2^ο ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	14
2.1 ΣΥΛΛΟΓΗ ΔΕΙΓΜΑΤΩΝ	14
2.2 ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ ΦΥΤΙΚΩΝ ΙΣΤΩΝ	15
2.3 ΛΕΙΟΤΡΙΒΗΣΗ ΦΥΤΙΚΩΝ ΙΣΤΩΝ ΚΑΙ ΣΤΡΩΣΗ ΣΕ ΤΡΥΒΛΙΑ ΓΙΑ ΤΗΝ ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΑΠΟΙΚΙΩΝ.	16
2.3.1 Η ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΤΗΣ ΣΤΡΩΣΗΣ	17
2.4 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ (NA, SA, PDA).....	18

2.4.1 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗΣ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΔΙΑΛΥΜΑΤΑΣ ΚΑΙ ΣΤΡΩΣΗ ΣΕ ΤΡΥΒΛΙΑ	19
2.5 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΥΓΡΩΝ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ	20
2.5.1 ΔΗΜΙΟΥΡΓΙΑ ΑΝΤΙΒΙΟΤΙΚΟΥ chloramphenicol :.....	22
2.6 STOCK GLYCEROL (ΣΤΟΚ ΓΛΥΚΕΡΟΛΗΣ)	23
2.7 ΧΡΩΣΗ GRAM ΣΥΜΦΩΝΑ ΜΕ ΤΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ ΤΟΥ CORNELL UNIVERSITY	24
.....	26
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3 ° ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΑΝΤΙΜΥΚΗΤΙΑΚΗΣ ΔΡΑΣΗΣ.....	27
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4 ° ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	29
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 5° ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ	32
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	33

Κεφάλαιο 1^ο Εισαγωγή

1.1 Η Ιστορία της Ρίγανης

Η ρίγανη ανήκει στην οικογένεια Lamiaceae, του γένους Origanum. Υπάρχουν τέσσερα διαφορετικά είδη ρίγανης. Η γλωσσολογική ρίζα του φυτού προέρχεται από το ελληνικό «Όρος» και το «Γκάνας» που σημαίνει φωτεινότητα «λαμπερό βουνό». (ΑΤΕΙ Καλαμάτας- Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας τμήμα φυτικής παραγωγής- Η Ιστοκαλλιέργεια στη Λαγορίγανη και στο θυμάρι. Πτυχιακή εργασία της σπουδάστριας Μαριέττα Θεανώ Κοκκα)

Η ρίγανη προέρχεται από τη περιοχή της Μεσογείου, αν και κάποιες ποικιλίες τις βρίσκουμε σε άγρια μορφή μέχρι και τη Σκανδιναβία, στην κεντρική και νότιο Αμερική σε ηλιόλουστα, ζεστά και ξηρά κλίματα. Έχει αναγνωριστεί για τις αρωματικές του ιδιότητες από την αρχαιότητα, ενώ για τους Έλληνες και τους Ρωμαίους η ρίγανη αποτελούσε σύμβολο της χαράς και της ευτυχίας. Επιπλέον, ήταν παράδοση στην αρχαία Ελλάδα και Ρώμη, οι γαμπροί και οι νύφες να στέφονται με δάφνη και ρίγανη. (Πτυχιακή εργασία της σπουδάστριας Μαριέττα Θεανώ Κοκκα)

Οι αρχαίοι Έλληνες ήξεραν εδώ και χιλιάδες χρόνια τη θεραπευτική αξία της ρίγανης και την χρησιμοποιούσαν εσωτερικά (πίνοντας το αφέψημά της) σε σπασμούς, δηλητηριάσεις, κολικούς και εξωτερικά για να ανακουφίζουν πρηξίματα που πονούσαν, φυσικά την χρησιμοποιούσαν και στη μαγειρική. (Πτυχιακή εργασία της σπουδάστριας Μαριέττα Θεανώ Κοκκα)

- **Τάξη** Lamiales
- **Οικογένεια** Lamiaceae (ή Labiatae): Χειλανθή
- **Αριθμός γενών:** περίπου 251 (στην Ευρώπη 41, στην Μεσογειακή περιοχή 45, στην Ελλάδα 34)
- **Αριθμός ειδών:** περίπου 6700 (στην Ευρώπη 452, στην Ελλάδα.197)

1.2 Γεωγραφική εξάπλωση:

Η οικογένεια περιλαμβάνει ποώδη ή ημί-θαμνώδη φυτά, που εξαπλώνονται σχεδόν σε όλο τον κόσμο, κυρίως σε ανοιχτές περιοχές. Μία από τις περιοχές με την μεγαλύτερη συγκέντρωση ειδών είναι η λεκάνη της Μεσογείου. Εδώ αντιπρόσωποι των γενών Micromeria, Phlomis, Rosmarinus, Sideritis Satureja και Thymus, είναι χαρακτηριστικά στοιχεία των φρύγανων αλλά συμμετέχουν και σαν συμπληρωματικά στοιχεία στη μακκία βλάστηση. (Πτυχιακή εργασία της σπουδάστριας Μαριέττα Θεανώ Κοκκα)

1.3 Γενικά μορφολογικά γνωρίσματα:

Τα φυτά είναι ποώδη ή ημί-θαμνώδη, ενώ οι δενδρώδεις μορφές είναι εξαιρετικά σπάνιες στην οικογένεια (εμφανίζονται μόνον στο Ν. Αμερικανικό γένος *Hyptis* αντιπρόσωποι του οποίου μπορούν να φθάσουν μέχρι τα 12 m ύψος). (Πτυχιακή εργασία της σπουδάστριας Μαριέττα Θεανώ Κοκκα)

Ο βλαστός συνήθως έχει χαρακτηριστική τετράγωνη διατομή. Τα φύλλα είναι κυρίως απλά, αντίθετα και σταυροειδώς διατεταγμένα στον βλαστό και χωρίς παράφυλλα. Τα φυτά καλύπτονται από αδένες ή αδενώδεις τρίχες και έχουν έντονη αρωματική οσμή που οφείλεται στην ύπαρξη αιθέριων ελαίων, και λόγω της παρουσίας αυτών των ουσιών, τα φυτά της οικογένειας έχουν πολύ μεγάλη εμπορική αξία, αφού χρησιμοποιούνται ως αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά. Τα άνθη είναι ισχυρά ζυγόμορφα, με δίχειλη στεφάνη, που φύονται πολλά μαζί στις μασχάλες των φύλλων κατά μονοχάσια ή διχάσια, που σχηματίζουν σπονδύλους ή σε ακραίους βότρες. (Πτυχιακή εργασία της σπουδάστριας Μαριέττα Θεανώ Κοκκα)

Τα άνθη των φυτών της οικογένειας είναι ουσιαστικά ερμαφρόδιτα, αλλά σε αρκετά είδη πχ., των γενών Μέντα (**Mentha**), Νεπέτα (**Nepeta**), θυμάρι (**Thymus**) μέχρι και 50 % των φυτών μπορεί να έχουν άνθη όπου τα αρσενικά μέρη (στήμονες) είναι υποπλασμένα και άγονα και τα άνθη λειτουργού. (Πτυχιακή εργασία της σπουδάστριας Μαριέττα Θεανώ Κοκκα)

Ο κάλυκας είναι συστέπαλος, 5μερής, δίχειλος και περιβάλλει τον επιμήκη σωλήνα της δίχειλης, 5μερούς στεφάνης. Από τα 5 πέταλα της στεφάνης, συνήθως τα 3 σχηματίζουν το κάτω χείλος και τα 2 το πάνω. Σπανιότερα τα 4 σχηματίζουν το κάτω και το 1 το πάνω ή όλα μαζί το κάτω, ενώ το επάνω λείπει τελείως και τότε οι στήμονες είναι εντελώς ακάλυπτοι. (Πτυχιακή εργασία της σπουδάστριας Μαριέττα Θεανώ Κοκκα)

Οι Στήμονες είναι 4 (ο διάμεσος λείπει), είναι ανά ζεύγη ανισομήκεις και συμφύονται με τη στεφάνη (συμπέταλοι). Σε μερικά γένη υπάρχει μόνο το κατώτερο ζεύγος των κοντών στημόνων ή τουλάχιστον αυτό μόνο είναι γόνιμο. (Πτυχιακή εργασία της σπουδάστριας Μαριέττα Θεανώ Κοκκα)

Η ωοθήκη είναι επιφυής, και αποτελείται από 2 καρπόφυλλα, είναι όμως 4-χωρη. Χωρίζεται, από την άνθηση ακόμα, σε τέσσερις, βαθείς λοβούς με την βοήθεια ψεύδο-διαφράγματος. Τα τέσσερα αυτά τμήματα της ωοθήκης, που περιέχουν από μία σπερμοβλάστη, διογκώνονται σφαιρικά και μετατρέπονται σε σχιζοκάρπιο, που διασπάται σε τέσσερα καρπίδια, σπανιότατα σχηματίζουν μικρές δρύπες. (Πτυχιακή εργασία της σπουδάστριας Μαριέττα Θεανώ Κοκκα)



Εικόνα 1: Ρίγανη, *Origanum vulgare*, οικογένεια *Lamiaceae*

Ο **στύλος** βρίσκεται στη βάση των καρπόφυλλων και μεταξύ αυτών. Η **επικονίαση** των φυτών γίνεται με πολλούς τρόπους όπου μπορεί να συμμετέχουν διάφορα έντομα ή διάφορες μορφές λεπιδοπτερών (πεταλούδες), ή ακόμη και πουλιά. Ένας ιδιαίτερος μηχανισμός συναντάται στο γένος *Salvia*. Τα έντομα που επισκέπτονται τους αντιπρόσωπους του γένους προσγειώνονται στο κάτω χείλος της στεφάνης και με το κεφάλι τους προσκρούουν σε ένα αρθρωτό συνοχέα του νήματος του στήμονα, ο οποίος κλείνει την είσοδο για την κοιλότητα με το νέκταρ. Με αυτή την κίνηση το άλλο άκρο του βραχίονα του στήμονα κατεβαίνοντας φέρνει σε επαφή με την ράχη του εντόμου τον ανθήρα (και το περιεχόμενό του την γύρη). Αντιπρόσωποι της οικογένειας με πολύ μακρύ σωλήνα της στεφάνης επικονιάζονται με την βοήθεια πουλιών με αντίστοιχα μεγάλο ράμφος. Σε κάποιους αντιπρόσωπους των γενών *Hyptis* και *Aeollanthus* στην τροπική Αφρική τα κλειστά πέταλα κρατάνε την γύρη η οποία απελευθερώνεται βιαίως, με την επαφή ενός εντόμου επικονιαστού και η οποία τότε το περιβάλλει. (ΑΤΕΙ Καλαμάτας- Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας τμήμα φυτικής παραγωγής- Η ΙΣΤΟΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ ΣΤΗ ΛΑΓΟΡΙΓΑΝΗ ΚΑΙ ΣΤΟ ΘΥΜΑΡΙ πτυχιακή εργασία της σπουδάστριας Μαριέττα Θεανώ Κοκκα)

1.4 Κλιματικές και Εδαφικές απαιτήσεις

Για τα αυτοφυή είδη της ρίγανης υπάρχουν πολλές δυνατότητες ανάπτυξης τους. Αναπτύσσονται σε διάφορα υψόμετρα τόσο σε παραθαλάσσιες, όσο και σε ορεινές περιοχές, καθώς και σε εδάφη επικλινών, άγονων, μέτριας και μέσης γονιμότητας περιοχών. Πρόκειται για ιδιαίτερα ανθεκτικό φυτό, αφού αντέχει στις χαμηλές θερμοκρασίες, ευδοκμεί σε μέσης μέχρι μέτριας σύστασης ημιορεινά εδάφη και είναι λιτοδίαιτο στις κλιματικές συνθήκες (Γκόλιαρης, 1992, Κστουβουσιβί., 1999). Λαμβάνοντας υπόψη το γεγονός ότι η ρίγανη, όπως κάθε φυτό, δημιουργεί πολυάριθμες παραφυάδες με πολλές ρίζες, που με την πάροδο των ετών πλέκονται μεταξύ τους, επιτυγχάνει όχι μόνο να προστατεύει το έδαφος και ιδιαίτερα τα επικλινή εδάφη από διάβρωση, αλλά και να συγκρατεί το επιφανειακό τμήμα της Γης. Στα παραπάνω συντελεί και το ότι η καλλιέργεια της ρίγανης δύναται να είναι εκμεταλλεύσιμη περισσότερο από 10 χρόνια (Γκόλιαρης, 1992).

Χαρακτηριστικοί αντιπρόσωποι:

Salvia spp. Σάλβια, Φασκόμιλο

Thymus spp. Θυμάρια

Origanum spp. Ρίγανες

Sideritis spp. Τσάι του βουνού

Mentha spp. Μέντες

Lavandula spp. Λεβάντες

Stachys spp. Στάχεις

Ocimum spp. Βασιλικός

Rosmarinus spp. Δεντρολίβανο

Micromeria spp. Μικρομέριες

Nepeta spp. Νεπέτες

Teucrium spp. Τεούκρια

Scutellaria spp. Σκουτελάριας

Satureja spp. Θρούμπη, ρίγανη

Στην παρούσα εργασία θα ασχοληθούμε με μια από της ποικιλίες της ρίγανης την *Origanum scabrum* κοινός Λαγορίγανη.

1.5 *Origanum scabrum*

Πολυετής αρωματική πόα με λεπτό, ξυλώδες ρίζωμα ύψους μεγαλύτερο των 40εκ., που παράγει αναρριχώμενους βλαστούς που ανθίζουν, ύψους 10-45εκ. Έχει φύλλα άμισχα 14-25x10-18, γενικά ωοειδή ή σχεδόν σφαιροειδή, υποξεία έως και αμβλεία, σχεδόν σε σχήμα καρδιάς και κομμένο στην βάση του, με πυκνά αδενώδη-κηλιδώματα, καλυμμένα με κέρινο πράσινο στρώμα. Οι φλέβες που κυριαρχούν και στις δύο επιφάνειες του φύλλου σχηματίζουν καμπύλες. Τα άνθη είναι συνήθως μοναδικά μακρόστενα-ωοειδή έως και σχεδόν σφαιρικά με γυρτή μυτερή κορυφή. Οι μίσχοι έχουν μήκος έως και 1.5mm, με εκκριτικούς αδένες. Τα μικρά φύλλα (βράκτια) βρίσκονται ανά 3-12 σε ζεύγη σε κάθε κορυφή ξαπλωμένα το ένα πάνω στο άλλο που μοιάζουν με φύλλα αλλά είναι μεμβρανώδη και πιο μικρά, με δίκτυο φλεβών που συνήθως έχουν έλλειψη μόνιμων αδένων, σε χρώμα ροζ-μοβ. Ο κάλυκας έχει δύο στόμια, κυλινδρικά σε απαλό πράσινο χρώμα, με αραιούς εκκριτικούς αδένες, 10-13 φλεβών, με μαλακά τριχίδια στο λαιμό. Το πάνω στόμιο αποτελείται από 3 δόντια ενώ το κάτω είναι πιο στενό αποτελούμενο από 2.

Η στεφάνη φέρει δύο στόμια 7-14mm, ροζ-μοβ με εκκριτικούς αδένες κυλινδρικούς μήκους 5-7mm. Το πάνω στόμιο έχει εγκοπή στο άκρο με λοβούς 0,5-1,5mm ενώ το κάτω στόμιο αποτελείται από 3 λοβούς 2-3,5mm. Οι στήμονες εξέχουν και έχουν λεία νημάτια, μεγαλύτερα των 8-11mm σε μήκος, ενώ τα κύτταρα του ανθήρα αποκλίνουν, είναι ωοειδή λεία τριχίδια με διάμετρο 1mm. Οι καρποί είναι ωοειδείς σκούρου καφέ χρώματος.

1.5.1 Περιβάλλον και οικολογία

Η *Origanum scabrum* συνήθως βρίσκεται σε ρωγμές βράχων, σε γκρεμούς, ανάμεσα σε ογκόλιθους, σε ακινητοποιημένες σάρες και πετρώδη εδάφη, κυρίως στα ξέφωτα των δασών της Κεφαλληνιακής Ελάτης και της Μαύρης Πεύκης. Επίσης αναπτύσσεται πάνω από αναπτυσσόμενους θάμνους, όπως Λούτσια, Δάφνη, το κωνοφόρο δένδρο Άρκευθος και σε ασβεστόλιθους 1000-1800m. Ανθίζει από Ιούνιο έως Σεπτέμβριο. Είναι από τα σπάνια είδη φυτών ωστόσο είναι γνωστό σε τοπικό επίπεδο. Έχει καταγραφεί η ύπαρξη τους στα βουνά της Νότιας Πελοποννήσου (Ταΰγετος, Πάρνωνας) και της Εύβοιας (Δίρφυς, Καντίλιο όρος, συμπεριλαμβανομένου και του Ξεροβουνίου). Ξεχωρίζει ανάμεσα στα ελληνικά είδη του *Origanum*. Οι πιο κοντινοί συγγενείς είναι το *O. sipyleum* L., *O. Hypericifolium* Schwarz & P.H. Davis from W. και SW Turkey και *O. Libanoticum* Boiss από το όρος Lebanon. Παρά τα μεγάλα χρωματιστά του φύλλα, δεν σχετίζεται με τα είδη του *Amaractus* Bentham στην Ελλάδα



Εικόνα 2 :*Origanum scabrum*, κοινός Λαγορίγανη

1.6 Ενδοφυτικά βακτήρια και μύκητες

Στην παρούσα εργασία στοχεύσαμε στην εύρεση βακτηρίων ενδοφυτικά στο φυτό της λαγορίγανης, τα οποία μπορούν να παρεμποδίσουν ή να αναστείλουν κάποιο φυτοπαθογόνο. Στην προκειμένη περίπτωση κάνουμε λόγο για μύκητα. Αρχικά:

- Βακτήρια: Τα βακτήρια είναι προκαρυωτικοί οργανισμοί, δηλαδή δε διαθέτουν οργανωμένο πυρήνα. Συνήθως σχηματίζουν αθροίσματα, τις αποικίες. Το σχήμα τους μπορεί να είναι ελικοειδές (σπειρύλλια), σφαιρικό (κόκκοι) ή ραβδοειδές (βάκιλοι).
- Μύκητες: Οι μύκητες είναι ευκαρυωτικοί μονοκύτταροι ή κοινοκυτταρικοί οργανισμοί (διαθέτουν κυτταρόπλασμα με πολυάριθμους πυρήνες). Οι περισσότεροι μύκητες αποτελούνται από απλούστερες νηματοειδείς δομές, τις υφές.

Οι μύκητες παρασιτούν σε ζωντανούς οργανισμούς ή ζουν ελεύθεροι στο έδαφος, στο νερό, στον αέρα, στα τρόφιμα. Πολλοί από αυτούς πολλαπλασιάζονται μονογονικά με απλή διχοτόμηση, ενώ άλλοι πολλαπλασιάζονται με εκβλάστηση. Σ' αυτούς τους τελευταίους σχηματίζεται σε κάποιο σημείο του αρχικού κυττάρου ένα εξόγκωμα, το εκβλάστημα, το οποίο, όταν αναπτυχθεί αρκετά, είτε παραμένει ενωμένο με το γονικό οργανισμό είτε αποκόβεται από αυτόν και ζει πλέον ως αυτοτελής οργανισμός.

Τα βακτήρια αναπαράγονται κυρίως μονογονικά με απλή διχοτόμηση. Η αναπαραγωγή τους διαρκεί μικρό χρονικό διάστημα. Ορισμένα βακτήρια, σε ευνοϊκές γι' αυτά συνθήκες, διαιρούνται κάθε 20 λεπτά. Σε αντίξοες συνθήκες, όπως σε ακραίες θερμοκρασίες ή υπό τη δράση ακτινοβολιών, πολλά βακτήρια μετατρέπονται σε ανθεκτικές μορφές, τα ενδοσπόρια. Τα ενδοσπόρια είναι αφυδατωμένα κύτταρα με ανθεκτικά τοιχώματα και χαμηλούς μεταβολικούς ρυθμούς. Όταν οι συνθήκες του περιβάλλοντος ξαναγίνουν ευνοϊκές, τα ενδοσπόρια βλαστάνουν δίνοντας το καθένα ένα βακτήριο.

Ενδοφυτικά βακτήρια υπάρχουν σε πολλούς φυτικούς ιστούς πολυάριθμων φυτικών ειδών, χωρίς όμως να προκαλούν συμπτώματα ασθενειών, μάλιστα σε ορισμένες περιπτώσεις ασκούν ευεργετικά αποτελέσματα στους ξενιστές τους (Lodewyckx et al., 2002). Τα αδρανή ενδοφυτικά βακτήρια μπορούν να γίνουν παθογόνα κάτω από ορισμένες συνθήκες και εντός διαφορετικών γονοτύπων ξενιστών. Ως ενδόφυτα θεωρούνται όλα τα βακτήρια που απεικονίζουν το εσωτερικό των φυτών συμπεριλαμβανομένων των ενεργών και λανθάνων παθογόνων.

1.7 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της παρούσας πτυχιακής εργασίας είναι η εύρεση ενδοφυτικών βακτηρίων, στο φυτό Λαγορίγανη, τα οποία μπορούν να παρεμποδίσουν ή να αναστέλλουν κάποιο φυτοπαθογόνο, στην προκειμένη περίπτωση κάνουμε λόγο για μύκητα.

Κεφάλαιο 2° ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 Συλλογή δειγμάτων

Σύμφωνα με το πείραμά μας πραγματοποιήθηκε επίσκεψη στο όρος Ταϋγέτου στην περιοχή του χωριού Δυρράχιο όπου και συλλέχθηκαν φυτά Λαγορίγανης. Στο πείραμα συμπεριλήφθησαν και φυτά Λαγορίγανης από καλλιέργεια που πραγματοποιείται στο ΤΕΙ Πελοποννήσου.

Όργανα-Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν:

- Πλαστικές σακούλες
- Ψαλίδι
- Ψυγείο μεταφοράς δειγμάτων με πάγο

Πειραματική διαδικασία συλλογής δειγμάτων:

Η συλλογή πραγματοποιήθηκε σε τρία διαφορετικά σημεία του βουνού κοντά στο τμήμα του δρόμου και η διαδικασία συλλογής έγινε με τη χρήση ψαλιδιού, όπου επιλέχθηκαν υγιή τμήματα του φυτού και τοποθετήθηκαν σε ειδική πλαστική σακούλα. Η πλαστικές σακούλες τοποθετήθηκαν στην συνέχεια μέσα σε ψυγείο με πάγο ιδικά σχεδιασμένο, για τη διατήρηση του φυτικού ιστού κατά την μεταφορά τους στο εργαστήριο.



Εικόνα 3: Φυτό Λαγορίγανης στο όρος Ταϋγέτου κοντά στην περιοχή Δυρράχιο



Εικόνα 4: Φυτό Λαγορίγανης από υπαίθρια καλλιέργεια στο χώρο του ΤΕΙ Πελοποννήσου

2.2 Αποστείρωση φυτικών ιστών

Όργανα-Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν:

- Γάντια μιας χρήσεως
- 6 Falcon των 50ml
- Απιονισμένο νερό
- Αιθανόλη 70%
- Υποχλωριώδες νάτριο 1,3M
- Αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί
- Νυστέρι

Πειραματική Διαδικασία αποστείρωσης:

Στο χώρο του εργαστηρίου με γάντια μιας χρήσεως απομονώθηκαν κομμάτια φύλλων από τους βλαστούς και από αυτά χρησιμοποιήθηκαν δέκα με δεκαπέντε φύλλα. Ακολούθησε τεμαχισμός των φύλλων του φυτού σε λεπτές και μικρές λωρίδες με την βοήθεια νυστεριού και στην συνέχεια τοποθετήθηκαν, για την διευκόλυνση της αποστείρωσης σε Falcon των 50 ml. Έπειτα ακολούθησε πλύση δυο φορές με νερό βρύσης για καθαρισμό τυχών υπολειμμάτων (σκόνη, χώμα, έντομα), και στην συνέχεια τρεις φορές με απιονισμένο νερό. Η αποστείρωση των φυτικών ιστών συνεχίστηκε ως εξής:

- Αποστείρωση των ιστών με διήθηση σε αιθανόλη 70% για 1min
- Σε υποχλωριώδες νάτριο 1,3M για 3min
- Διήθηση σε αιθανόλη 70% για 30sec.

Οι φυτικοί ιστοί που αποστειρώθηκαν ξεπλύθηκαν στην συνέχεια τρεις φορές με υπερκάθαρο νερό, και τοποθετήθηκαν σε αποστειρωμένο διηθητικό χαρτί.



Εικόνα 3: Falcon των 50ml

2.3 Λειοτριβήση φυτικών ιστών και στρώση σε τρυβλία για την δημιουργία αποικιών.

Όργανα – Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν:

- Θάλαμος νηματικής ροής ακτινοβολίας UV
- 6 αποστειρωμένα πορσελάνινα ιγδία
- Τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient Agar (NA), Sucrose Agar (SA), Potato, Dextrose Agar (PDA)
- Φυτικό ιστό
- Πιπέτα 1000 μL , δηλαδή 1 ml
- Λύχνο Bunsen
- Ταινία parafilm
- Πιπέτες Pasteur γυάλινες (Pasteur pipettes)
- Κλίβανο επώασης 28 $^{\circ}\text{C}$

Πειραματική Διαδικασία λειοτριβήσης φυτικών ιστών:

Οι μικροοργανισμοί βρίσκονται παντού στο περιβάλλον και για αυτόν το λόγο θα πρέπει να λαμβάνονται όλα τα κατάλληλα μέτρα ώστε να αποφεύγονται μη επιθυμητές επιμολύνσεις. Ο λύχνος Bunsen θεωρείται ως ένα απαραίτητο εργαλείο για τη δημιουργία ενός στοιχειωδώς αποστειρωμένου περιβάλλοντος κατά τη διάρκεια εργασιών, μέσα στο θάλαμο νηματικής ροής.

Τα τρυβλία με τα στερεά θρεπτικά υποστρώματα απομακρύνθηκαν από το ψυγείο μια ώρα νωρίτερα επιτυγχάνοντας με αυτό τον τρόπο την ελαχιστοποίηση της υγρασίας τους, διότι η υπερβολική υγρασία μέσα στο τρυβλίο βοηθάει στον πολλαπλασιασμό των βακτηρίων μας.

- Ο φυτικός ιστός που για την διευκόλυνση της αποστείρωσης τοποθετήθηκε σε Falcon, μεταφέρθηκε σε αποστειρωμένα πορσελάνινα ιγδία. Χρησιμοποιήθηκαν τρία διαφορετικά πορσελάνινα ιγδία καθώς στο πείραμα πραγματοποιείτε λειοτριβήση φυτικού ιστού για ανάπτυξη σε τρία διαφορετικά στερεά υποστρώματα(NA, SA, PDA) και απαιτείται η ανάλογη ποσότητα για το καθένα.
- Στην συνέχεια προστέθηκε 300 μL υποχλωριόδες μαγνήσιο MgCl_2 μέσα σε κάθε γουδί για την διάσπαση του φυτικού ιστού.
- Τέλος όταν ο ιστός είχε πια διαλυθεί σε μεγάλο βαθμό, με την βοήθεια της πιπέτας συλλέχτηκε 300 μL από τον φυτικό ιστό για να πραγματοποιηθεί στρώση σε τρυβλία.



Εικόνα 4: Αποστειρωμένο ιγδίο πορσελάνης για την λειοτριβήση των φυτικών ιστών μέσα στο θάλαμο νηματικής ροής ακτινοβολίας UV

2.3.1 Η διαδικασία της στρώσης

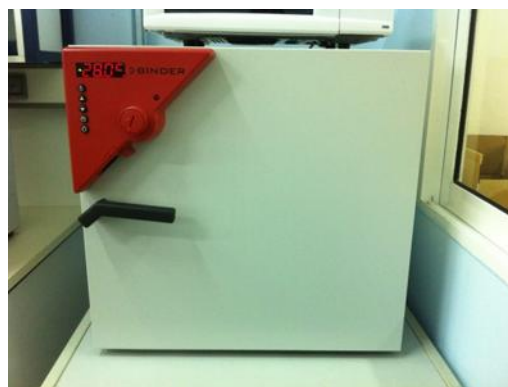
Στο θάλαμο νηματικής ροής ακτινοβολίας UV, αποσπάστηκε 300μL από το διαλυμένο φυτικό ιστό με την χρήση μίας πιπέτας (1000μL) και τοποθετήθηκε το δείγμα κάθε φορά σε διαφορετικό τρυβλίο. Η στρώση μέσα στο τρυβλίο πραγματοποιήθηκε με την βοήθεια ιδικών γυάλινων πιπέτων Pasteur οι οποίοι περάστηκαν πρώτα πάνω από την φλόγα του λύχνου. Στην συνέχεια ψύχθηκαν οι πιπέτες Pasteur για λίγα δευτερόλεπτα μέσα σε αποστειρωμένο νερό, κοντά όμως στη φλόγα, και γυρίζοντας παράλληλα με τα δάχτυλα μας το τρυβλίο κυκλικά, σπρώχνοντας τον φυτικό ιστό με τη βοήθεια της κολώνας επιδιώχθηκε η εξάπλωση παντού μέσα στο τρυβλίο του φυτικού ιστού. Τέλος σφραγίσθηκαν τα τρυβλία στα ανοίγματα τους με ιδική ταινία parafilm και τοποθετήθηκαν σε κλίβανο επώασης 28^ο για διάστημα 48h.

Σημείωση:

Και οι δύο διαδικασίες, της λειοτρίβησης και της στρώσης, πρέπει να γίνονται την ίδια ημέρα που έχουν συλλεχτεί οι φυτικοί ιστοί.



Εικόνα 7 : Τρυβλία με φυτικό ιστό Λαγορίγανης



Εικόνα 8 : Κλίβανο επώασης 28^ο

2.4 Δημιουργία υποστρωμάτων (NA, SA, PDA)

Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία υποστρώματος Nutrient agar :

- 5gr peptone
- 3gr Nutrient broth
- 15gr agar
- ή σε περίπτωση που υπάρχει έτοιμο σκεύασμα NA (Nutrient agar) χρησιμοποιείτε 23gr.

Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την δημιουργία υποστρώματος SA:

- 1gr yeast/lt νερού
- 10gr/lt sucrose δηλαδή συγκέντρωση 1%
- 15gr agar/lt
- 1ml/lt cyclohexamide

Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για τη δημιουργία υποστρώματος PDA:

- 42gr PDA (Potato dextrose agar έτοιμο σκεύασμα)
- 1ml/lt chloramphenicol

Βήματα για την Διαδικασία παρασκευής:

Χρησιμοποιήθηκαν τρεις ογκομετρικές φιάλες του 1lt, μια για το κάθε διάλυμα.

1. Στην πρώτη φιάλη χορηγήθηκε μέχρι το μέσο αυτής απιονισμένο νερό περίπου 800ml και προστέθηκε στην συνέχεια 5gr peptone, 3gr nutrient broth, 15gr agar ή σε περίπτωση που υπάρχει έτοιμο σκεύασμα NA χορηγούνται μόνο 23gr αυτού. Στην συνέχεια απογемίσθηκε η φιάλη με απιονισμένο νερό μέχρι την χαραγή. Για την διευκόλυνση της ομογενοποίησης των υλικών προστέθηκε στο εσωτερικό της φιάλης έναν μαγνήτη. Τέλος η φιάλη τοποθετήθηκε πάνω στον αναδευτήρα. Στα υποστρώματα του NA αναπτύσσονται αποικίες βακτηρίων αλλά και μυκήτων.
2. Έπειτα πραγματοποιήθηκε η ίδια διαδικασία με αυτής του NA και στις άλλες δύο φιάλες με τα υλικά του SA και του PDA αντίστοιχα. Στα υποστρώματα του SA αναπτύσσονται αποικίες βακτηρίων και τέλος στα υποστρώματα του PDA αποικίες μυκήτων.

Τα διαλύματα αφέθηκαν στους αναδευτήρες μέχρι να ομογενοποιηθούν πλήρως. Όταν και τα τρία διαλύματα ποια ήταν έτοιμα μεταφέρθηκαν για αποστείρωση. Μετά την αποστείρωση στο θάλαμο νηματικής ροής ακτινοβολίας UV στις φιάλες των υποστρωμάτων SA και PDA χορηγείτε αντιβιοτικό. Το αντιβιοτικό που χρησιμοποιήθηκε για το SA είναι 1ml/lt cyclohexamide, και για το PDA είναι 1ml/lt chloramphenicol.

2.4.1 Διαδικασία αποστείρωσης θρεπτικού διαλύματος και στρώση σε τρυβλία



Εικόνα 5: Κλίβανος υγρής αποστείρωσης στο χώρο του εργαστηρίου στο ΤΕΙ Πελοποννήσου

Η αποστείρωση πραγματοποιείται σε ιδικά σχεδιασμένους κλίβανους υγρής συνήθως αποστείρωσης. Οι κλίβανοι αποστείρωσης είναι συσκευές που χρησιμοποιούν συμπιεσμένο ατμό ο οποίος καταστρέφει όλους τους μικροοργανισμούς. Η θερμοκρασία που μπορεί να αναπτύξει ένας τέτοιος κλίβανος είναι 115-135^ο. (Εργαστηριακές ασκήσεις μικροβιολογίας Συγγραφή Εργαστηριακών Σημειώσεων ΚΩΣΤΑΣ ΜΠΟΥΡΤΖΗΣ)

Η διαδικασία της αποστείρωσης έγινε ως εξής:

Σφραγίστηκαν όλες οι βαλβίδες σταυρωτά αναμεταξύ τους όχι όμως πολύ σφιχτά. Ρυθμίστηκε ο διακόπτης στην ένδειξη 121^ο και ανοίχθηκε στο τέρμα αυτής η βαλβίδα εκτόνωσης, μέχρι έως ότου ξεκίνησε να βγάζει υδρατμούς, όταν έγινε αυτό σφραγίστηκε εντελώς. Έπειτα όταν ανέβηκε η πίεση στην ένδειξη 1,2atm ακούστηκε ο χαρακτηριστικός ήχος του κλιβάνου, ο οποίος προειδοποιεί ότι έχει ανέβει η πίεση της θερμοκρασίας μέσα στο χώρο του κλιβάνου. Μετά από αυτή την προειδοποίηση γυρίστηκε ο διακόπτης των λεπτών στα 20-25min. Μόλις πέρασαν τα λεπτά ακούστηκε ξανά ο χαρακτηριστικός ήχος και αυτή τη φορά προειδοποιεί ότι η αποστείρωση είναι έτοιμη. Έτσι έκλυσε ο διακόπτης της θερμοκρασίας των 121^ο και παρέμεινε ο θάλαμος κλειστός μέχρι η πίεση από 1,2atm να μηδενιστεί. Όταν πέρασε και αυτό το χρονικό διάστημα με μεγάλη προσοχή και με την χρήση γαντιών, για την αποφυγή εγκαυμάτων, ανοίχθηκαν σταυρωτά οι βαλβίδες και απομακρύνθηκαν τα πράγματα από την αποστείρωση.

Στην συνέχεια εφόσον οι φιάλες είχαν βγει από την αποστείρωση και είχαν κρυώσει (προσοχή! όχι πολύ γιατί το υγρό πήζει λόγο του agar και δεν θα πραγματοποιηθεί η δημιουργία υποστρωμάτων σε τρυβλία), μεταφέρθηκαν στο θάλαμο νηματικής ροής ακτινοβολίας UV και πραγματοποιήθηκε η στρώση σε τρυβλία.



Εικόνα 6 : Αποστειρωμένα τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα Nutrient agar, sucrose agar, και Potato dextrose agar

Η διαδικασία της στρώσης των υποστρωμάτων Nutrient agar, sucrose agar, και Potato dextrose agar είναι η εξής:

Στοιβάχθηκαν 10 αποστειρωμένα τρυβλία το ένα πάνω στο άλλο και σιγά σιγά ανοίχθηκαν τα καπάκια. Ξεκινώντας από την μέση χορηγήθηκε λίγο από το θρεπτικό διάλυμα. Όταν όλα τα τρυβλία ήταν έτοιμα μεταφέρθηκαν στο ψυγείο για την διατήρησή τους.

2.5 Δημιουργία υγρών καλλιιεργειών

Όργανα-Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν:

- Ογκομετρικές Φιάλες-φιαλίδια γυάλινα αποστειρωμένα
- Πιπέτα 5.000μL
- Δυο Φιάλες των 500ml
- Απιονισμένο νερό
- Μαγνητικός αναδευτήρας
- Δυο Μαγνήτες
- Ζυγός ακριβείας
- Αποστειρωμένες Οδοντογλυφίδες
- Τρυβλία με της αποικίες βακτηρίων
- Λύχνο Bunsen
- Κλίβανο αποστείρωσης
- Θάλαμος νηματικής ροής ακτινοβολίας UV
- Αναδευτήρας (ORBITAL SHAKER)

Υλικά για την δημιουργία υγρού υποστρώματος NA χωρίς agar :

- 1,25gr peptone
- 0,75gr Nutrient broth
- 250ml απιονισμένο νερό

Υλικά για την δημιουργία υγρού υποστρώματος SA χωρίς agar:

- 0,025gr yeast
- 2,5gr sucrose
- 250ml απιονισμένο νερό
- 5λ cyclohexamide (αντιβιοτικό το οποίο χορηγείται μετά την αποστείρωση)

Πειραματική διαδικασία:

1. Για την δημιουργία υγρού υποστρώματος NA χωρίς agar (Στις υγρές καλλιέργειες δεν χρησιμοποιείται agar γιατί επιδιώκετε το υπόστρωμα να βρίσκονται σε υγρή μορφή, καθώς το agar το σταθεροποιεί) χρησιμοποιήθηκε μια φιάλη των 500ml στην οποία αρχικά χορηγήθηκε 250ml απιονισμένο νερό, προστέθηκε στη συνέχεια 1,25gr peptone και τα 0,75gr Nutrient broth και απογεμίσθηκε η φιάλη μέχρι την χαραγή. Στην συνέχεια τοποθετήθηκε στο εσωτερικό της ένας μαγνήτης και τέλος παρέμειναν πάνω στον μαγνητικό αναδευτήρα έως ότου ομογενοποιηθεί πλήρως.
2. Για την δημιουργία υγρού υποστρώματος SA χωρίς agar εφαρμόστηκε η ίδια ακριβώς διαδικασία με αυτή του NA που αναφέρθηκε παραπάνω, με τα αντίστοιχα υλικά που απαιτούνται για το SA.

3. Με μία πιπέτα των 5.000μL στην συνέχεια λήφθηκαν 5ml από το υγρό διάλυμα που κατασκευάστηκε στις φιάλες, ξεχωριστά για το NA και για το SA και τα τοποθετήθηκαν μέσα σε ιδικά αποστειρωμένα μπουκαάλια. Για την διευκόλυνση της διαδικασίας σημειώθηκε πάνω στα καπάκια των μπουκαλιών ποία περιείχαν το υγρό υπόστρωμα του NA και ποια του SA αντίστοιχα. Έπειτα τοποθετήθηκαν τα μπουκαλάκια μέσα στους ιδικούς κάδους του κλιβάνου και βάλθηκαν για αποστείρωση (Η διαδικασία της αποστείρωσης αναλύεται στην ενότητα 2.5.1).
4. Στην συνέχεια μετά την ολοκλήρωση της αποστείρωσης και εφόσον είχαν κρυώσει τα μπουκαλάκια συνεχίστηκε το πείραμα στο θάλαμο νηματικής ροής. Αρχικά αφού ανοίχθηκαν τα δοχεία-μπουκαλάκια με το υγρό διάλυμα του SA, περάστηκε ο λαιμός της κάθε φιάλης στιγμιαία πάνω από τη φλόγα του λύχνου (με την τεχνική αυτή επιδιώκετε η αποφυγή καλλιέργειας μικροβίων), μετά προστέθηκε με την βοήθεια μιας πιπέτας (5.000μL) 5μL από το αντιβιοτικό cyclohexamide στο καθένα από αυτά.
5. Έπειτα μεταφέρθηκαν και τα τρυβλία με τις αποικίες, που ήταν αποθηκευμένα στο ψυγείο με σκοπό να χωριστούν σε οκταμελή τμήματα, σημειώνοντας με έναν μαρκαδόρο εξωτερικά στο καθένα. Αυτό έγινε καθώς μέσα σε κάθε τρυβλίο υπήρχε διαφορετικού χρώματος βακτήρια και επιδιώχθηκε η εξέτασή τους. Με την χρήση μιας οδοντογλυφίδας συλλέχτηκε μικρή ποσότητα από την αποικία του κάθε τρυβλίου και τοποθετήθηκε στα μπουκαλάκια των NA και SA αντίστοιχα. Για την διευκόλυνση της διαδικασίας πάνω στα μπουκαλάκια εκτός από την κατηγορία που ανήκουν με βάση το υγρό τους διάλυμα (π.χ.NA,SA) σημειώθηκε και ότι αναγραφόταν στο κάθε τρυβλίο ξεχωριστά. Αυτό έγινε για να γίνετε γνωστό από ποια καλλιέργεια έχει προέρθει η αποικία που εμπεριέχεται σε κάθε μπουκαλάκι αντίστοιχα.
6. Στο τέλος αυτής της διαδικασίας τα μπουκαλάκια τοποθετήθηκαν στον αναδευτήρα (ORBITAL SHAKER) και παρέμειναν εκεί μέχρι να δημιουργηθούν οι καλλιέργειες των βακτηρίων περίπου 48 ώρες. Η δημιουργία των αποικιών ξεχωρίζεται από ένα θόλωμα που αποκτά το υγρό υπόστρωμα. Όταν δημιουργήθηκαν όλες οι αποικίες βακτηρίων τοποθετήθηκαν τα μπουκαλάκια στο ψυγείο.



Εικόνα 7: Διαδικασία δημιουργίας υγρών καλλιιεργειών στο χώρο του εργαστηριού του ΤΕΙ Πελοποννήσου

2.5.1 Δημιουργία αντιβιοτικού chloramphenicol :

Όργανα-Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν:

- Chloramphenicol 0,5gr
- Falcon των 15ml
- Αιθανόλη 10ml συγκέντρωσης 70%
- Αναδευτήρα (voltex)
- Αποστειρωμένη Σύριγγα
- Φίλτρο για σύριγγα
- 6 erpendorf των 2ml
- Κατάψυξη -80°c
- Ειδική θήκη

Πειραματική διαδικασία:

Λήφθηκε 0,5gr chloramphenicol και τοποθετήθηκε σε falcon των 15ml. Προστέθηκε στην συνέχεια 10ml αιθανόλης συγκέντρωσης 70% και έγινε ανάδευση στον αναδευτήρα (voltex) έως ότου ομογενοποιηθεί πλήρως. Έπειτα με την χρήση μιας αποστειρωμένης σύριγγας λήφθηκαν 10ml διαλείμματος, απομακρύνθηκε η βελόνα και τοποθετήθηκε μπροστά φίλτρο. Τέλος τοποθετήθηκε το περιεχόμενο που απορροφήθηκε από την σύριγγα μέσω του φίλτρου, σε 6 erpendorf των 2ml, δηλαδή τοποθετήθηκε 1,7ml στο καθένα και φυλάχθηκαν στην κατάψυξη στους -80°c για την διατήρησή τους σε ειδική θήκη αποθήκευσης.

2.6 Stock glycerol (Στοκ Γλυκερόλης)

Η δημιουργία stock glycerol σε κολώνες, έγινε με σκοπό την αποθήκευση της καλλιέργειας για μακροχρόνια χρήση.

Όργανα-Υλικά που Χρησιμοποιήθηκαν:

- 300μL glycerol 80%
- 800μL από τις αποικίες βακτηρίων
- Φιαλίδια με τις αποικίες βακτηρίων
- Αναδευτήρα (Vortex)
- Απιονισμένο νερό
- Πιπέτα 1000μL
- Ογκομετρική φιάλη
- Κολώνες
- Κλίβανος υγρής αποστείρωσης
- Θάλαμος νηματικής ροής με ακτινοβολία UV
- Ειδική θήκη αποθήκευσης κολώνων

Τοποθετήθηκαν σε μία φιάλη 300μL glycerol 80%, απιονισμένο νερό 20% και μεταφέρθηκε για αποστείρωση. Στον θάλαμο νηματικής ροής έγινε αρίθμηση στα φιαλίδια και στις κολώνες αντίστοιχα. Με την πιπέτα (1000μL) λήφθηκαν 300μL glycerol και 800μL από τις αποικίες των βακτηρίων (Culture) και τοποθετήθηκαν σε κολώνες. Έγινε καλή ανάδευση στον αναδευτήρα (vortex) και τέλος όλες οι κολώνες μεταφέρθηκαν σε κατάψυξη στους -80°C μέσα σε ειδικά σχεδιασμένες θήκες.

Η τελική συγκέντρωση της καλλιέργειας που αποθηκεύτηκε ανέρχεται στις 20 με 25%.



Εικόνα11: Κολώνες Stock glycerol (Στοκ Γλυκερόλης)

2.7 Χρώση Gram σύμφωνα με το πρωτόκολλο του Cornell University

Η Χρώση κατά Gram είναι μία μέθοδος μέσω της οποίας διαχωρίζονται τα βακτήρια σε δύο μεγάλες ομάδες τα "θετικά κατά Gram " και τα "αρνητικά κατά Gram ". Ο χρωματισμός των βακτηρίων οφείλεται στην ύπαρξη ή μη της ουσίας πεπτιδογλυκάνης που εμπεριέχεται ή όχι στα κυτταρικά τους τοιχώματα.

- Τα κατά Gram θετικά βακτήρια έχουν παχύ κυτταρικό τοίχωμα, υψηλής περιεκτικότητας σε πεπτιδογλυκάνη και χαμηλότερης σε λιπίδια, το οποίο παγιδεύει τη χρωστική κρυσταλλικό ιώδες στο κυτταρόπλασμα. Η πλύση που πραγματοποιήθηκε με αιθυλική αλκοόλη δεν αφαιρεί τη χρωστική, η οποία δεν αφήνει να φανεί η χρώση της σαφρανίνης, η κόκκινη δηλαδή χρωστική που προστίθεται στη συνέχεια. Ο χρωματισμός των κυττάρων στο μικροσκόπιο φαίνεται με μπλε-ιώδες χρώμα.
- Η στιβάδα της πεπτιδογλυκάνης αντίθετα στα αρνητικά κατά Gram είναι πιο λεπτή και βρίσκεται ανάμεσα στην κυτταροπλασματική μεμβράνη και σε μία εξωτερική μεμβράνη. Ο διαλύτης απομακρύνει τη στιβάδα των λιπιδίων από τα κατά Gram αρνητικά βακτήρια πράγμα που διευκολύνει τη διάχυση της αρχικής χρώσης στο περιβάλλον. Η χρωστική κρυσταλλικό ιώδες ξεπλένεται εύκολα από το κυτταρόπλασμα, με αποτέλεσμα στο μικροσκόπιο το κύτταρο να φαίνεται ροζ ή κόκκινο.

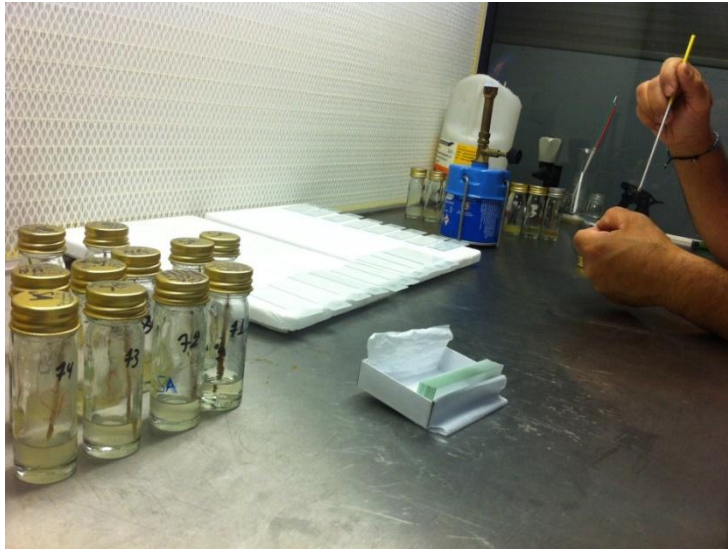
Σημαντικό σημείο στην επιτυχία της διαδικασίας είναι ο χρόνος που αφήνεται να επιδράσει ο διαλύτης: Αν είναι ιδιαίτερα παρατεταμένος, ο διαλύτης μπορεί να απομακρύνει τη χρωστική τόσο από τα κατά Gram αρνητικά όσο και από τα κατά Gram θετικά βακτήρια. Μερικά θετικά κατά Gram βακτήρια είναι πιθανό να χάσουν σχετικά εύκολα τη χρώση τους και στο παρασκεύασμα τελικά να εμφανίζεται μια μίξη θετικών και αρνητικών βακτηρίων. Αυτού του τύπου τα βακτήρια χαρακτηρίζονται ως κατά Gram μεταβλητά.

Όργανα-υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για την χρώση κατά Gram:

- Θάλαμος νηματικής ροής με ακτινοβολία UV
- Αντικειμενοφόροι πλάκες μικροσκοπίου
- Λύχνος Bunsen
- Βακτηριολογικός κύκλος
- Μικροσκόπιο με ελαιοκαταδυτικό φακό
- Απορροφητικό χαρτί
- Gram crystal violet (Κρυσταλλικό Ιώδες)
- Gram Iodine (Ιώδιο)
- Gram Decolorizer (Διαλύτης)
- Gram Safranin (Σαφρανίνη)

Πειραματική διαδικασία:

- a. Στον θάλαμο νηματικής ροής έγινε αρίθμηση των αποικιών στις υγρές καλλιέργειες και στην αντικειμενοφόρους πλάκες αντίστοιχα.
- b. Με την βοήθεια του βακτηριολογικού κρίκου συλλέχτηκε δείγμα υγρής καλλιέργειας και τοποθετήθηκε σε αντικειμενοφόρους πλάκες.
- c. Έπειτα αφέθηκαν οι αντικειμενοφόροι πλάκες με τα δείγματα να στεγνώσουν στο θάλαμο νηματικής ροής.
- d. Για την μονιμοποίηση του επίχρισματος, πέρασαν όλες οι αντικειμενοφόροι πλάκες ελαφρώς πάνω από την φλόγα του λύχνου.
- e. Οι χρώσεις έπειτα έγιναν διαδοχικά με διήθησης:
 - Πραγματοποιήθηκε διήθηση των αντικειμενοφόρων πλακών σε Gram Crystal Violet για ένα λεπτό.
 - Έπειτα διήθηση των αντικειμενοφόρων πλακών σε Gram Iodine Stabilized Gram Iodine για ένα λεπτό.
 - Διήθηση στην συνέχεια σε επί 30-60 δευτερόλεπτα σε Gram Decolorizer (διαλύτη) αιθανόλη 95% για τον αποχρωματισμό των χρώσεων.
 - Τέλος πραγματοποιήθηκε διήθηση των αντικειμενοφόρων πλακών σε Gram Safranin για 30-60 δευτερόλεπτα.
 - Μετά από κάθε χρώση αντίστοιχα ακολουθούσε καλό ξέπλυμα με νερό βρύσης.
 - Στο τέλος της χρώσης τοποθετήθηκαν οι αντικειμενοφόροι πλάκες σε ιδικά σχεδιασμένους φούρνους- εποαστήρια των 27°C έως ότου στεγνώσουν.
 - Όταν οι αντικειμενοφόροι στέγνωσαν πλήρως προστέθηκε παραφινέλαιο και εξετάστηκε το επίχρισμα σε μικροσκόπιο με ελαιοκαταδυτικό φακό.



Εικόνα 12: Πειραματική διαδικασία μεταφοράς, με βακτηριολογικό κρίκο, δειγμάτων υγρής καλλιέργειας και τοποθέτηση αυτών σε αντικειμενοφόρους πλάκες.



Εικόνα 13: Πειραματική διαδικασία μεταφοράς, με βακτηριολογικό κρίκο, δειγμάτων υγρής καλλιέργειας και τοποθέτηση αυτών σε αντικειμενοφόρους πλάκες.

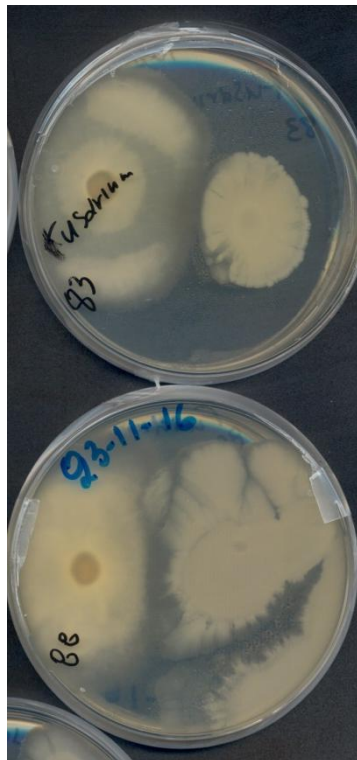
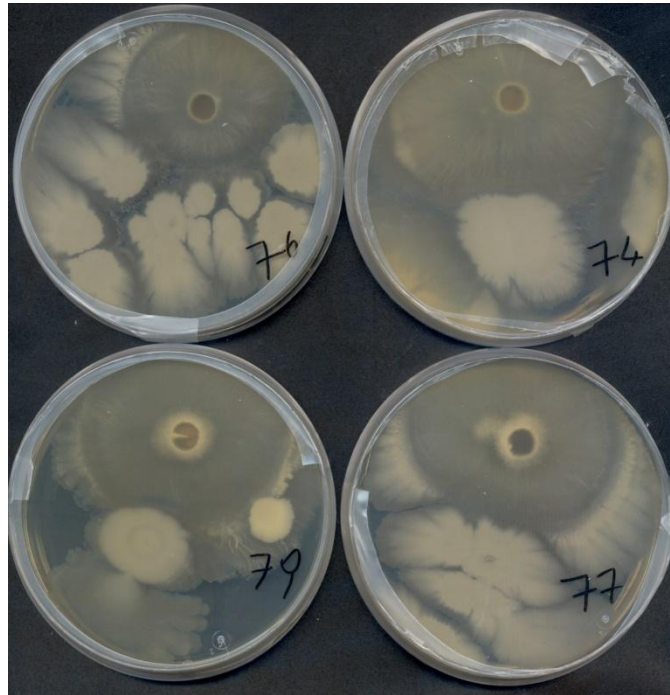
Κεφάλαιο 3 ° Διαδικασία αντιμυκητιακής δράσης

Όργανα-Υλικά που χρησιμοποιήθηκαν:

- Γρήγορα αναπτυσσόμενος μύκητας *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*
- Γρήγορα αναπτυσσόμενος μύκητας *Rhizoctonia solani*
- Τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα ΝΑ
- Υγρές καλλιέργειες με τις αποικίες
- Πιπετα 5.000μL
- Νυστέρι
- Αλκοόλη
- Λύχνο Bunsen
- Φελοτρυπητήρας
- Κλίβανο επώασης
- Ταινία parafilm
- Θάλαμος νηματικής ροής ακτινοβολίας UV

Πειραματική διαδικασία:

- Αρχικά πραγματοποιήθηκε βύθιση του φελοτρυπητήρα σε αλκοόλη και περάστηκε στιγμιαία πάνω από τη φλόγα του λύχνου Bunsen, με σκοπό την αποστείρωση του για αποφυγή τυχόν επιμολύνσεων.
- Στο πείραμα χρησιμοποιήθηκαν δυο διαφορετικοί μύκητες. Ο *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, και ο *Rhizoctonia solani*. Με την βοήθεια του φελοτρυπητήρα λήφθηκαν από τα τρυβλία των αναπτυγμένων μυκήτων, εμβόλια.
- Με τη χρήση του νυστεριού τοποθετήθηκε το κάθε εμβόλιο του μύκητα, ξεχωριστά στο κέντρο κάθε τρυβλίου με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα ΝΑ. Και για την διευκόλυνση μας σημειώθηκε το όνομα του μύκητα πάνω στα τρυβλία.
- Στην συνέχεια από της υγρές καλλιέργειες των βακτηρίων λήφθηκαν 5μL και τοποθετήθηκαν περιμετρικά του μύκητα σε σχήμα σταυρού. Σε κάθε τρυβλίο δηλαδή υπήρχαν μαζί με το μύκητα τέσσερις διαφορετικές καλλιέργειες βακτηρίων.
- Έπειτα σφραγίστηκαν, με ταινία parafilm, τα τρυβλία και τοποθετήθηκαν στους 28°C για διάστημα τουλάχιστον 48 ωρών.
- Τέλος έγινε ορατή μετά από συνεχή έλεγχο, η παρεμπόδιση των βακτηρίων απέναντι στην ανάπτυξη μυκήτων.



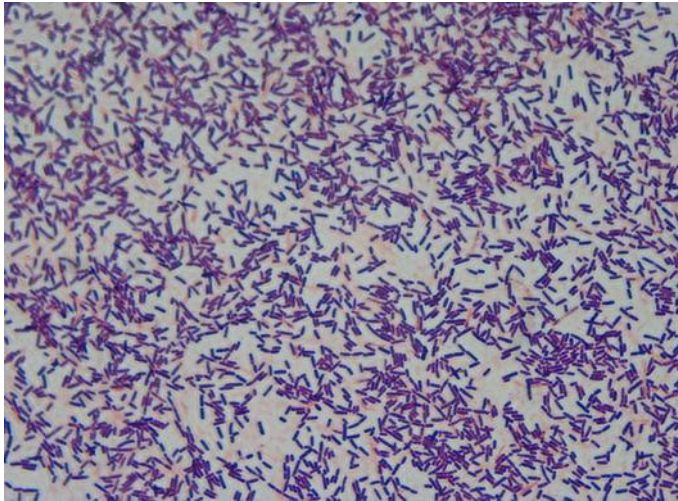
Εικόνα 14: Φωτογραφίες από σκάνερ που απεικονίζουν την παρεμπόδιση των βακτηρίων απέναντι στην ανάπτυξη των μυκήτων

Κεφάλαιο 4 ° Αποτελέσματα

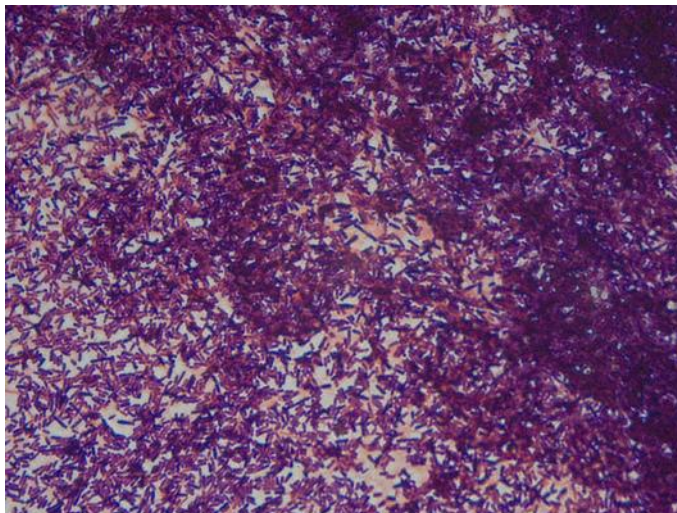
Η μελέτη των ενδοφυτικών μικροοργανισμών σε φυτά Λαγορίγανης , έχει ως αποτέλεσμα την εύρεση βακτηρίων ενδοφυτικά. Οι αποικίες βακτηρίων αναπτύχθηκαν σε τρυβλία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα αλλά και σε φιαλίδια με υγρό θρεπτικό υπόστρωμα. Η χρώση κατά Gram χρησιμοποιήθηκε κυρίως για το διαχωρισμό των επιμέρους ειδών των βακτηρίων σε δύο κατηγορίες (θετικά και αρνητικά). Οι δειγματοληψίες πραγματοποιήθηκαν από υπαίθρια καλλιέργεια του ΤΕΙ Πελοποννήσου αλλά και από την περιοχή κοντά στο χωρίο Δυρράχιο. Τα δείγματα ενδοφυτικών βακτηρίων που χρωματίστηκαν ήταν 27, από τα οποία Gram θετικά ήταν 7 και Gram αρνητικά 20. Τα ενδοφυτικά βακτήρια σε φυτά Λαγορίγανης σχετίζονται με την παρεμπόδιση φυτοπαθογόνων μυκήτων που πιθανός αναπτύσσονται στο φυτό.

ΑΡΙΘΜΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΕΙΔΟΣ ΔΕΙΓΜΑΤΟΣ	ΠΕΡΙΟΧΗ	ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ	GRAM
1	ΛΑΓΟΡΙΓΑΝΗ	ΔΥΡΡΑΧΙΟ	11/11/2015	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
2	ΛΑΓΟΡΙΓΑΝΗ	ΤΕΙ ΠΕΛΛΟΠΟΝΗΣΟΥ	11/11/2015	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
3	ΛΑΓΟΡΙΓΑΝΗ	ΤΕΙ ΠΕΛΛΟΠΟΝΗΣΟΥ	11/11/2015	ΘΕΤΙΚΟ
4	ΛΑΓΟΡΙΓΑΝΗ	ΔΥΡΡΑΧΙΟ	11/11/2015	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
5	ΛΑΓΟΡΙΓΑΝΗ	ΔΥΡΡΑΧΙΟ	11/11/2015	ΘΕΤΙΚΟ
6	ΛΑΓΟΡΙΓΑΝΗ	ΤΕΙ ΠΕΛΛΟΠΟΝΗΣΟΥ	11/11/2015	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
7	ΛΑΓΟΡΙΓΑΝΗ	ΔΥΡΡΑΧΙΟ	11/11/2015	ΘΕΤΙΚΟ
8	ΛΑΓΟΡΙΓΑΝΗ	ΔΥΡΡΑΧΙΟ	11/11/2015	ΘΕΤΙΚΟ
9	ΛΑΓΟΡΙΓΑΝΗ	ΤΕΙ ΠΕΛΛΟΠΟΝΗΣΟΥ	11/11/2015	ΘΕΤΙΚΟ
10	ΛΑΓΟΡΙΓΑΝΗ	ΤΕΙ ΠΕΛΛΟΠΟΝΗΣΟΥ	11/11/2015	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
11	ΛΑΓΟΡΙΓΑΝΗ	ΔΥΡΡΑΧΙΟ	11/11/2015	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
12	ΛΑΓΟΡΙΓΑΝΗ	ΤΕΙ ΠΕΛΛΟΠΟΝΗΣΟΥ	11/11/2015	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
13	ΛΑΓΟΡΙΓΑΝΗ	ΔΥΡΡΑΧΙΟ	11/11/2015	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
14	ΛΑΓΟΡΙΓΑΝΗ	ΤΕΙ ΠΕΛΛΟΠΟΝΗΣΟΥ	11/11/2015	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
15	ΛΑΓΟΡΙΓΑΝΗ	ΔΥΡΡΑΧΙΟ	11/11/2015	ΘΕΤΙΚΟ
16	ΛΑΓΟΡΙΓΑΝΗ	ΔΥΡΡΑΧΙΟ	11/11/2015	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
17	ΛΑΓΟΡΙΓΑΝΗ	ΤΕΙ ΠΕΛΛΟΠΟΝΗΣΟΥ	11/11/2015	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
18	ΛΑΓΟΡΙΓΑΝΗ	ΔΥΡΡΑΧΙΟ	12/9/2016	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
19	ΛΑΓΟΡΙΓΑΝΗ	ΤΕΙ ΠΕΛΛΟΠΟΝΗΣΟΥ	12/9/2016	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
20	ΛΑΓΟΡΙΓΑΝΗ	ΤΕΙ ΠΕΛΛΟΠΟΝΗΣΟΥ	12/9/2016	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
21	ΛΑΓΟΡΙΓΑΝΗ	ΔΥΡΡΑΧΙΟ	12/9/2016	ΘΕΤΙΚΟ
22	ΛΑΓΟΡΙΓΑΝΗ	ΤΕΙ ΠΕΛΛΟΠΟΝΗΣΟΥ	12/9/2016	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
23	ΛΑΓΟΡΙΓΑΝΗ	ΔΥΡΡΑΧΙΟ	12/9/2016	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
24	ΛΑΓΟΡΙΓΑΝΗ	ΤΕΙ ΠΕΛΛΟΠΟΝΗΣΟΥ	12/9/2016	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
25	ΛΑΓΟΡΙΓΑΝΗ	ΔΥΡΡΑΧΙΟ	12/9/2016	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
26	ΛΑΓΟΡΙΓΑΝΗ	ΤΕΙ ΠΕΛΛΟΠΟΝΗΣΟΥ	12/9/2016	ΑΡΝΗΤΙΚΟ
27	ΛΑΓΟΡΙΓΑΝΗ	ΤΕΙ ΠΕΛΛΟΠΟΝΗΣΟΥ	12/9/2016	ΑΡΝΗΤΙΚΟ

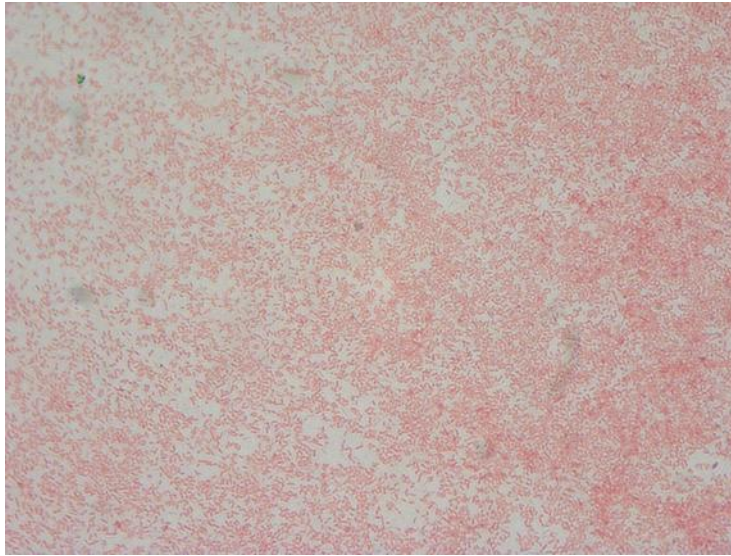
Εικόνα 15 : Στον παραπάνω πίνακα καταγράφηκαν τα αποτελέσματα της χρώσης σε Gram-θετικό και Gram-αρνητικό αντίστοιχα στο φυτό Λαγορίγανης.



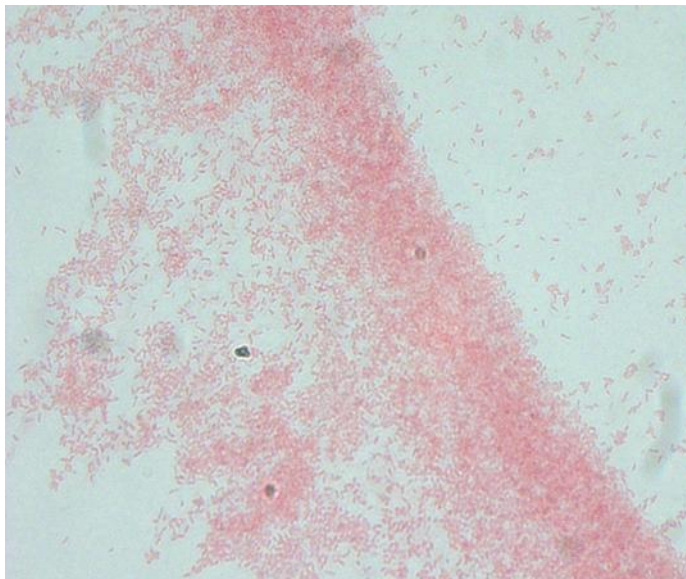
Εικόνα 16: Φωτογραφία από μικροσκόπιο με ελαιοκαταδυτικό φακό που απεικονίζει θετικά βακτήρια κατά Gram του δείγματος 8 της περιοχής Δυρράχιο που αναγράφετε στον παραπάνω πίνακα.



Εικόνα 17: Φωτογραφία από μικροσκόπιο με ελαιοκαταδυτικό φακό που απεικονίζει θετικά βακτήρια κατά Gram του δείγματος 9 του ΤΕΙ Πελοποννήσου που αναγράφετε στον παραπάνω πίνακα.



Εικόνα 18: Φωτογραφία από μικροσκόπιο με ελαιοκαταδυτικό φακό, που απεικονίζει αρνητικά βακτήρια κατά Gram του δείγματος 13 της περιοχής Δυρράχιο που αναγράφετε στον παραπάνω πίνακα.



Εικόνα 19: Φωτογραφία από μικροσκόπιο με ελαιοκαταδυτικό φακό, που απεικονίζει αρνητικά βακτήρια κατά Gram του δείγματος 1 της περιοχής Δυρράχιο που αναγράφετε στον παραπάνω πίνακα.

Κεφάλαιο 5° Συζήτηση-Συμπέρασμα

Στην παρούσα μελέτη εξετάστηκαν δείγματα από φύλλα *Origanum scabrum* κοινός Λαγορίανης τα οποία συλλέχθηκαν από το όρος Ταϋγέτου κοντά στο χωριό Δυρράχιο αλλά και από υπαίθρια καλλιέργεια του ΤΕΙ Πελοποννήσου. Στην συνέχεια αυτά τα δείγματα ακολούθησαν συγκεκριμένες πειραματικές διαδικασίες με κύριο σκοπό την εύρεση ενδοφυτικών μικροοργανισμών. Η αναλύσεις των πειραματικών διαδικασιών που πραγματοποιήθηκαν έδειξαν:

1. Αποικίες βακτηρίων σε τρυβλία με θρεπτικό υπόστρωμα NA,SA,PDA όπου αναπτύχθηκαν επιτυχώς σε διάστημα 48 ωρών.
2. Αποικίες βακτηρίων σε υγρές καλλιέργειες, από της οποίες απέτυχε μικρό ποσοστό αυτόν. Έτσι πραγματοποιήθηκε επανάληψη της παρούσας πειραματικής διαδικασίας σε όσα δεν είχαν επιτυχία, με σκοπό την σωστή ροη του πειράματος.
3. Βακτήρια τα οποία χρωματίστηκαν μέσω της διαδικασίας της χρώσης κατά Gram. Παρατηρήθηκαν σε μικροσκόπιο με ελαιοκαταδυτικό φακό και διακρίθηκαν σε Gram θετικό και Gram αρνητικό.
4. Από τα βακτήρια που εξετάστηκαν στην υπαίθρια καλλιέργεια του ΤΕΙ Πελοποννήσου, παρατηρήθηκαν δυο Gram θετικά και δώδεκα Gram αρνητικά. Από την υπαίθρια καλλιέργεια κοντά στο χωριό Δυρράχιο παρατηρήθηκαν 5 Gram θετικά και 8 Gram αρνητικά. Από τα παραπάνω συμπεραίνουμε ότι μεταξύ των δύο χρώσεων κατά Gram (θετικά και αρνητικά) υπερτερούν τα αρνητικά.
5. Τα βακτήρια Gram αρνητικά σημειώθηκαν περισσότερα στην καλλιέργεια υπαίθρου από το ΤΕΙ Πελοποννήσου λόγω του ότι ο φυτικός ιστός που συλλέχτηκε από την περιοχή κοντά στο χωριό Δυρράχιο είχε αρχίσει να καταστρέφεται λόγω των καιρικών συνθηκών.
6. Αντιμυκητιακή δράση βακτηρίων ενάντια των *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* και *Rhizoctonia solani*.

Συνοψίζοντας με την χρήση ενδοφυτικών μικροοργανισμών (βακτηρίων) παρεμποδίζονται οι φυτοπαθογόνοι μύκητες *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici* και *Rhizoctonia solani*, όπου όλα τα παραπάνω χρίζουν περεταιίρω έρευνας.

Βιβλιογραφία

1. Βιβλίο: Αναπτυξιακή Μοριακή Βιολογία φυτών Επιμέλεια: Κοσμάς Χαραλαμπίδης Εκδόσεις ΕΜΒΡΥΟ Έτος έκδοσης: 2009
2. Ιστοσελίδα Mydiatrofi Ρίγανη: θεραπευτικές ιδιότητες και θρεπτική αξία <http://www.mydiatrofi.gr/trofi/trofima/votana-baxarika/rigani-therapeftikes-idiotites-kai-threptiki-aksia>
3. Οικογένεια Lamiaceae
<https://eclass.upatras.gr/modules/document/file.php/BIO348/%CE%A4%CE%AC%CE%BE%CE%B7%20Lamiales%20LAMIACEAE.pdf>
4. Πρωτόκολλο Cornell University
5. ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΤΩΝ ΜΙΚΡΟΟΡΓΑΝΙΣΜΩΝ – ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΑΚΕΣ ΕΚΔΟΣΕΙΣ ΚΡΗΤΗΣ
6. ΚΥΡΙΟΤΕΡΑ ΑΡΩΜΑΤΙΚΑ ΦΥΤΑ ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ: Αναγνώριση φυτών-Τρόπος καλλιέργειας Εκπαιδευτής: Κωτσοβίνου Ευαγγελία.
7. Γιώτη Ε. 2016. Η συσσώρευση μεταγραφής γονιδίων και η ενζυμική δραστηριότητα των β-αμυλάσεων δείχνουν εμπλοκή στην εξάντληση του αμύλου κατά τη διάρκεια της ωρίμανσης του καρπού της τομάτας cherry. ΤΕΙ Πελοποννήσου. Σχολή Τεχνολογίας Γεωπονίας & Τεχνολογίας Τροφίμων και Διατροφής. Τμήμα Τεχνολόγων Γεωπόνων
8. Sturz AV, Christie BR & Nowak J (2000) Bacterial endophytes: potential role in developing sustainable systems of crop production. Crit Rev Plant Sci 19: 1–30.
9. Sturz AV & Nowak J (2000) Endophytic communities of rhizobacteria and the strategies required to create yield enhancing associations with crops. Appl Soil Ecol 15: 183–190.

10. Reinhold-Hurek B & Hurek T (2011) Living inside plants: bacterial endophytes. *Curr Opin Plant Biol* 14: 435–443
11. Hardoim PR, van Overbeek LS & Elsas JDV (2008) Properties of bacterial endophytes and their proposed role in plant growth. *Trends Microbiol* 16: 463–471.
12. Lodewyckx C, Vangronsveld J, Porteous F, Moore ERB, Taghavi S, Mezgeay M & der Lelie DV (2002) Endophytic bacteria and their potential applications. *Crit Rev Plant Sci* 21: 583–606.