

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

ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΩΝ



2

ΘΕΜΑ:

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ *Origanum majorana*

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΣΠΟΥΔΑΣΤΗ

ΒΑΣΙΛΕΙΟΥ ΓΥΦΤΕΑ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2017

Πτυχιακή Εργασία Βασίλειος Γυφτέας

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

ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΩΝ

ΘΕΜΑ

ΜΕΛΕΤΗ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥ *Origanum majorana*

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ ΤΟΥ ΣΠΟΥΔΑΣΤΗ
ΒΑΣΙΛΕΙΟΥ ΓΥΦΤΕΑ**

ΕΠΙΒΛΕΠΩΝ ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ: ΚΑΡΤΣΩΝΑΣ ΕΠΑΜΕΙΝΩΝΔΑΣ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2017

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

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

ΕΥΘΥΝΗ ΓΡΑΦΟΜΕΝΩΝ

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ.....	3
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ.....	4
ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....	6
1.1Αρωματικά Φυτά-Εξάπλωση.....	6
1.2 Μαντζουράνα (<i>Origanum majorana</i>).....	7
1.2.1 Καταγωγή, Εξάπλωση, Ιστορικό.....	7
1.2.2 Βοτανικά Χαρακτηριστικά.....	7
1.2.3 Βοτανική Ταξινόμηση- Περιγραφή.....	7
1.2.4 Απαιτήσεις σε κλίμα, έδαφος και νερό.....	8
1.2.5 Χρήσεις.....	8
1.2.6 Θεραπευτικές Ιδιότητες.....	9
1.2.7 Πολλαπλασιασμός.....	10
α)Πολλαπλασιασμός με σπόρο (ΕΓΓΕΝΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ).....	10
1.3Μικροπολλαπλασιασμός.....	11
1.3.1 Βασικές έννοιες.....	11
1.3.2 Τύποι Καλλιέργειας.....	12
1.3.3 Στάδια ιστοκαλλιέργειας.....	13
1.3.4 Πλεονεκτήματα – Μειονεκτήματα.....	14
1.3.5 Προβλήματα Ιστοκαλλιέργειας.....	15
2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	18
2.1ΥΛΙΚΑ.....	18
2.1.1Φυτικό Υλικό.....	18
2.1.2 Υλικά Απολύμανσης Μοσχευμάτων.....	18
2.2.3 Υλικά Θρεπτικού Υποστρώματος Καλλιέργειας <i>in vitro</i>	18
2.2.4 Δοχεία <i>in vitro</i> Καλλιέργειας.....	19
2.2.5 Υπόστρωμα <i>in vitro</i> Καλλιέργειας.....	19
2.2.ΜΕΘΟΔΟΙ.....	20
2.2.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ ΓΙΑ ΤΗΝ ΒΛΑΣΤΗΣΗ ΚΑΙ ΤΟΝ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ.....	20
2.2.2 ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ ΥΛΙΚΩΝ.....	21
2.2.3 ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗ-ΕΠΩΑΣΗ-ΑΝΑΠΤΥΞΗ <i>in vitro</i> ΕΚΦΥΤΩΝ ΤΟΥ <i>Origanum majorana</i>	22
3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	244
4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ.....	28
5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	30

Εικόνα:31

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η πτυχιακή αυτή εργασία πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο ιστοκαλλιέργειας του ΤΕΙ Πελοποννήσου, που είχε ως σκοπό να μελετήσει την δυνατότητα μικροπολλαπλασιασμού του είδους *Origanum magorana* L.. Το ανωτέρω είδος δεν είχε μέχρι τώρα μελετηθεί όσον αφορά τον πολλαπλασιασμό του με αυτή την μέθοδο. Εξετάστηκε η εύρεση επιτυχούς τρόπου απολύμανσης των εκφύτων και εγκατάστασης τους σε υποστρώματα, η κατάλληλη εποχή λήψης των εκφύτων και η επίδραση της θέσης του εκφύτου στον μητρικό βλαστό στη μετέπειτα βλάστησή τους. Οι καλλιέργειες εγκαταστάθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα πλήρους ή μισής δύναμης MS (Murashige και Skoog medium).

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1Αρωματικά Φυτά-Εξάπλωση

Από πάντα τα αρωματικά-φαρμακευτικά φυτά ήταν μια καλλιέργεια με σημαντική οικονομική σημασία. Το ενδιαφέρον προς αυτά έγινε ακόμα πιο έντονο όταν ξεκίνησε η παρασκευή των συνθετικών χημικών ουσιών. Τα τελευταία χρόνια μάλιστα, οι κοινωνίες παγκοσμίως έχουν ευαισθητοποιηθεί, με αποτέλεσμα να στρέφεται το ενδιαφέρον τους προς την ορθολογική εκμετάλλευση των φυσικών πόρων, την μείωση κατανάλωσης συνθετικών φαρμάκων και χημικών προσθέτων στα τρόφιμα, έτσι ώστε και οι βιομηχανίες διαφόρων προϊόντων να στρέφονται στη χρήση ουσιών φυτικής προέλευσης ώστε να παράγουν φυτικά προϊόντα. Έντονα θα λέγαμε ότι έχει παρατηρηθεί το φαινόμενο της χρήσης των βοτάνων σε διάφορες χώρες της Ευρώπης και στη Β.Αμερική ,λόγω της αλλαγής του τρόπου ζωής, δηλαδή πλέον δίνουν έμφαση στην υγιεινή διατροφή , στην αντιμετώπιση προβλημάτων υγείας μέσω φαρμάκων φυτικής προέλευσης ακόμα προτιμούν και τα καλλυντικά τους που χρησιμοποιούν ,να έχουν ως βάση ουσίες που προέρχονται από φυτά. Σημαντικό είναι να αναφερθεί ότι πλέον μέσω του ενδιαφέροντος και της συστηματικής μελέτης διαφόρων φυτών έχουν προκύψει πολλές νέες ουσίες ,οι οποίες φέρουν νέες χρήσεις.

Η Ασία παραμένει ακόμα η κυρίαρχη ήπειρος στην παραγωγή αρωματικών-φαρμακευτικών φυτών .Ωστόσο ,παρατηρείται συνεχής αύξηση των εκτάσεων στη Δύση. Η Αμερική αποτελεί πλέον τον κύριο αγοραστή και ακολουθούν η Γερμανία, η Ιαπωνία και η Γαλλία, ενώ τα μεγαλύτερα κέντρα εμπορίου βρίσκονται στο Αμβούργο, στη Νέα Υόρκη και στο Τόκιο. (Μαλούπα, Γρηγοριάδου, & Λάζαρη, 2012)

1.2 Μαντζουράνα (*Origanum majorana*)

1.2.1 Καταγωγή , Εξάπλωση, Ιστορικό

3

Η μαντζουράνα (αγγλικά *majorana*) είναι ένα από τα πολλά είδη του γένους *Origanum*. Αυτοφύεται σε χώρες της Ν. Ευρώπης και της Β. Αφρικής αλλά όχι στην Ελλάδα. Στη χώρα μας συναντάται σε κήπους και σε γλάστρες ως καλλωπιστικό – αρωματικό φυτό ενώ σε άλλες χώρες καλλιεργείται συστηματικά. (Κουτσός, 2006) Είναι φυτό γνωστό από την αρχαιότητα, όπου τα νεαρά ζευγάρια στεφανώνονταν με αυτό στις γαμήλιες τελετές, γιατί πίστευαν ότι είχε το άρωμα της Αφροδίτης. (ΣΚΡΟΥΜΠΗΣ, 1998)

1.2.2 Βοτανικά Χαρακτηριστικά

Πίνακας 1. Πίνακας ταξινόμησης του είδους

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

(ΣΚΡΟΥΜΠΗΣ, 1998)

1.2.3 Βοτανική Ταξινόμηση- Περιγραφή

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

- Η μαντζουράνα είναι ορθόκλαδη και στην τελική της ανάπτυξη είναι θάμνος με μικρότερη ανάπτυξη από την ρίγανη
- Οι βλαστοί και τα φύλλα της μαντζουράνας έχουν λιγότερο και κοντότερο τρίχωμα και έτσι φαίνονται πιο λείοι με ελαφρά μωβ απόχρωση.
- Τα φύλλα της μαντζουράνας έχουν συνήθως σταχτόχρομη απόχρωση , είναι κατά κανόνα μικρότερα της ρίγανης, πλέον επιμήκη, με βελούδινη υφή.
- Τα άνθη της είναι λευκά, πιο μεγάλα και πιο πυκνά διατεταγμένα στις ταξιανθίες .
- Οι ταξιανθίες της έχουν την ίδια διάταξη με της ρίγανης. Τα σταχύδια όμως στα περισσότερα φυτά είναι πιο κοντά και μεγαλύτερα της ρίγανης.
- Ο σπόρος της μαντζουράνας είναι δυο με τρεις φορές μεγαλύτερος από τον σπόρο της ρίγανης . (Δόρδας, 2012)

1.2.4 Απαιτήσεις σε κλίμα, έδαφος και νερό

Η μαντζουράνα ευδοκίμει σε ημιορεινές , δροσερές περιοχές με ήπιο κλίμα και σε χωράφια πλούσια, ξηρικά ή ποτιστικά σταγгерά. Υπάρχουν κάποιες ποικιλίες που είναι πιο απαιτητικές σε θερμοκρασία από ότι είναι η ρίγανη. Χρειάζεται πιο γόνιμα εδάφη από τη ρίγανη και είναι πιο απαιτητική σε νερό. (Δόρδας, 2012)

1.2.5 Χρήσεις

Η μαντζουράνα αποτελεί ένα αρωματικό φυτό με πολλές χρήσεις. Συγκεκριμένα, η δρόγη του χρησιμοποιείται σαν άρτυμα (μπαχαρικό), το αιθέριο έλαιο της στη φαρμακευτική και σαν άρωμα στην αρωματοποιία. Επιπλέον, έχει αντισπασμωδικές, αντισηπτικές, αντί νευρολογικές και αντικεφαλαλγικές ιδιότητες (Δόρδας, 2012)

Ιδανικό για αρωματικό στο ξίδι ή το λάδι. Ακόμα, το εκχύλισμά της μπορεί να προστεθεί στο νερό του μπάνιου και να εξασφαλίσει χαλάρωση και καλή διάθεση. Όταν χρησιμοποιείται στη μαγειρική τα φύλλα κόβονται πριν το φυτό ανθίσει γιατί αλλιώς σε μεγαλύτερη δόση μπορεί να πικρίσει. Εκτός όμως από την αισθητική και τη γαστρονομία, τα πράσινα κλαδάκια με τα μικρά άσπρα άνθη της μαντζουράνας μπορούν να χρησιμοποιηθούν σαν διακοσμητικά σε αποξηραμένες και φρέσκες συνθέσεις. (Δασαρχείο, 2015)

1.2.6 Θεραπευτικές Ιδιότητες

Η μαντζουράνα είναι ένα ιδιαίτερα ευεργετικό βότανο, για την χαλάρωση και την τόνωση που προσφέρει τόσο σωματικά όσο και πνευματικά. Θεωρείται από την αρχαιότητα βότανο θεραπευτικό και καλλυντικό, με χρήση εκτεταμένη από τις γυναίκες για την προστασία και την θρέψη που προσέφερε στην επιδερμίδα.

Η χρήση του αιθέριου ελαίου, λειτουργεί χαλαρωτικά και αναλγητικά για πονεμένους μύες, πόνο στα οστά και στις αρθρώσεις. Ανακούφιση επίσης προσφέρει όταν υποφέρουμε από πονοκεφάλους, ημικρανίες και πόνους περιόδου. Η αναλγητική δράση της μαντζουράνας, βοηθά σε περιπτώσεις πόνων στα αυτιά, ωτίτιδες και πονόδοντος

Επίσης, χαρακτηρίζεται ως ευεργετική για αντιμετώπιση συναισθηματικής και πνευματικής κόπωσης και έντασης, καθώς επίσης αντιμετωπίζει αποτελεσματικά πληθώρα νευρικών και ψυχικών διαταραχών. Συνίσταται για αντιμετώπιση της αϋπνίας και της υπερκινητικότητας και της νευρικότητας, χαλαρώνει και μειώνει τις στιγμές οξυθυμίας ή επιθετικότητας. Γενικότερα τονώνει το νευρικό σύστημα και καταπολεμά ημικρανίες νευρικής φύσης και της συναισθηματική η ψυχική αστάθεια.

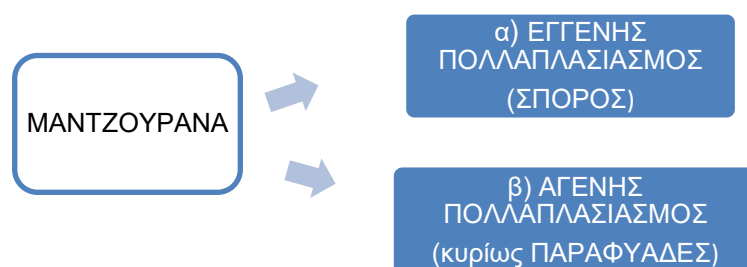
Οι αντισηπτικές, αντιμικροβιακές κάτι φλεγμονώδεις ιδιότητες του αιθέριο έλαιο της μαντζουράνας, προστατεύουν από μολύνσεις πληγών και λεκτόρων, καθώς επίσης βοηθά στην γρηγορότερη επούλωση τραυμάτων και ανάρρωση από μώλωπες, ιδρύματα και διαστρέμματα.

Αξίζει να σημειωθεί ότι χρησιμοποιείται και ως φυσικό αντιβιοτικό και μικροβιοκτόνο, βοηθάει στην αποτελεσματική αντιμετώπιση κρυολογημάτων και προστατεύει από λοίμωξη του οργανισμού. Θεωρείται βάλαμο για την προστασία

των πλαστικών συστήματος και θεραπεύει αποτελεσματικά παθήσεις και λοιμώξεις του ανωτέρω αναπνευστικού συστήματος και του λαιμού. Μαλακώνει τον ερεθισμένο λαιμό και τις αμυγδαλές και αντιμετωπίζει το ξερόβηχα Επίσης, συνίσταται σε περιπτώσεις ροχαλητού και αλλεργικού άσθματος. (ΒΟΤΑΝΑ, 2014)

Τέλος , πέρα από τις παραπάνω θεραπευτικές ιδιότητες της μαντζουράνας που αναφέρθηκαν υπάρχουν και άλλες πολλές ιδιότητες που απαρτίζουν το συγκεκριμένο φυτό και το κάνουν άξιο προς μελέτη και έρευνα .

1.2.7 Πολλαπλασιασμός



α) Πολλαπλασιασμός με σπόρο (ΕΓΓΕΝΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ)

Συγκεκριμένα, τα σπορεία μπορούν να γίνουν το καλοκαίρι(α .Αυγούστου) και η μεταφύτευση το Νοέμβριο, ή τα σπορεία να γίνουν το φθινόπωρο και η μεταφύτευση την άνοιξη(Μάρτιο- Απρίλιο) ή εναλλακτικά τα σπορεία να γίνουν την άνοιξη (Μάρτιο-Απρίλιο) και η μεταφύτευση τέλος της άνοιξης(Μάιο) ή το φθινόπωρο (Οκτώβριο- Νοέμβριο).

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

β)Πολλαπλασιασμός με παραφυάδες (ΑΓΕΝΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ)

Σε καλλιέργειες μαντζουράνας που είναι πολλών ετών αναπτύσσει πολλές παραφυάδες τις οποίες παίρνουμε το φθινόπωρο ή την άνοιξη και τις μεταφυτεύουμε στο χωράφι. Ο τρόπος αυτός είναι ο οικονομικότερος με την προϋπόθεση να υπάρχουν παλαιές καλλιέργειες. (Δόρδας, 2012)

1.3Μικροπολλαπλασιασμός

1.3.1 Βασικές έννοιες

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

Ο μικροπολλαπλασιασμός των φυτών αποτελεί την κυριότερη πρακτική και εμπορική εφαρμογή της ιστοκαλλιέργειας φυτών. Όπου μπορεί να εφαρμοστεί, ο μικροπολλαπλασιασμός υπερέχει στην απόδοση έως και χιλιάδες φορές σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους. Αν και θεωρείται εξαιρετικά προηγμένος, ο επιστημονικός κλάδος της ιστοκαλλιέργειας έχει ήδη προϋστορία περίπου δύο αιώνων. Αυτό αφορά ιδιαίτερα την καλλιέργεια των ζωικών κυττάρων, με σημαντικότερο ορόσημο τα επιτυχημένα πειράματα των Harrison, Burrows και Carrel κατά το διάστημα 1907-1909, τα οποία εστίαζονταν στην in vitro διατήρηση εμβρύων. Αντίθετα, ο κλάδος της ιστοκαλλιέργειας των φυτικών κυττάρων δεν αναπτύχθηκε ιδιαίτερα έως τα μέσα

περίπου του 20ού αιώνα. Κατά τρόπο ειρωνικό, όμως, η ιστοκαλλιέργεια των φυτών αναπτύχθηκε σε πολύ σύντομο χρονικό διάστημα και τελειοποιήθηκε σε μεγάλο βαθμό, ενσωματώνοντας τεχνολογίες και γνώσεις από πολλούς διαφορετικούς επιστημονικούς κλάδους και ξεπερνώντας κατά πολύ τις δυνατότητες και το εύρος των εφαρμογών της καλλιέργειας των ζωικών κυττάρων.

Η ιστοκαλλιέργεια είναι συνυφασμένη με μια σειρά από βασικές τεχνικές (όπως παρασκευή υποστρώματος, αποστείρωση και απολύμανση), οι οποίες απαιτούν ένα επαρκές επίπεδο εκπαίδευσης και εργαστηριακής υποδομής. Αν και για τις πλέον συνηθισμένες εργασίες οι απαιτήσεις δεν είναι ιδιαίτερα υψηλές, μπορούν να αυξηθούν στην περίπτωση ειδικών εφαρμογών. Ο μικροπολλαπλασιασμός των φυτών αποτελεί την κυριότερη πρακτική και εμπορική εφαρμογή της ιστοκαλλιέργειας φυτών. Όπου μπορεί να εφαρμοστεί (τυπικό παράδειγμα είναι τα ανθοκομικά φυτά), ο μικροπολλαπλασιασμός υπερέχει στην απόδοση έως και χιλιάδες φορές σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους. Σε μικρή κλίμακα παραγωγής και εφόσον υπάρχουν διαθέσιμα τα κατάλληλα πρωτόκολλα, χαρακτηρίζεται από μέτριο επίπεδο δυσκολίας. Αυτή αυξάνεται προκειμένου για είδη με χαμηλή απόκριση στην ιστοκαλλιέργεια και όταν επιθυμούμε παραγωγή σε μεγάλη κλίμακα (εκατοντάδες χιλιάδες ή και εκατομμύρια φυτά κάθε χρόνο). (KINTZIOS, 2015)

1.3.2 Τύποι Καλλιέργειας

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

1. Καλλιέργεια κάλων (Callus culture) :
2. Καλλιέργεια αιωρημάτων κυττάρων (cell suspension cultures)
3. Καλλιέργεια πρωτοπλάστων (Protoplast culture)

4. Καλλιέργεια ριζών
5. Καλλιέργεια άκρων βλαστών και μεριστωμάτων
6. Εμβρυοκαλλιέργεια (Embryo culture)
7. Καλλιέργεια μικροσπορίων

(Ξυνιάς, 2014)

1.3.3 Στάδια ιστοκαλλιέργειας

Η διαδικασία του μικροπολλαπλασιασμού περιλαμβάνει μια σειρά από πέντε διεθνώς αναγνωρισμένα στάδια τα οποία συνοψίζονται στη συνέχεια:

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.

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%. (KINTZIOS, 2015)

1.3.4 Πλεονεκτήματα – Μειονεκτήματα

Πλεονεκτήματα του μικροπολλαπλασιασμού

- ✓ Ταχεία παραγωγή κλωνικών υποκειμένων
- ✓ Παραγωγή φυτών απαλλαγμένων από παθογόνους μικροοργανισμούς
- ✓ Διατήρηση γενετικού υλικού σε περιορισμένο χώρο
- ✓ Μείωση του χώρου που απαιτείται για τη διατήρηση του πολλαπλασιαστικού υλικού
- ✓ Συνεχείς παραγωγή πολλαπλασιαστικού υλικού καθ' όλη τη διάρκεια του έτους. (Παπαχατζής & Καλορίζου, 2008)
- ✓ Δυνατότητα ελέγχου των χημικών και φυσικών παραγόντων του περιβάλλοντος
- ✓ Δίνεται η δυνατότητα πολλαπλασιασμού σε είδη, που με άλλους τρόπους ήταν δύσκολος, ακόμα και αδύνατος.
- ✓ Απλοποίηση μετακίνησης και ανταλλαγής φυτικού υλικού μεταξύ ερευνητικών ιδρυμάτων διαφορετικών χωρών.

Μειονεκτήματα του μικροπολλαπλασιασμού

Ο μικροπολλαπλασιασμός δεν είναι πάντα ο ιδανικός τρόπος για την παραγωγή φυτών, υπάρχουν προϋποθέσεις που περιορίζουν τη χρήση του:

- Μεγάλες απαιτήσεις σε εργαστηριακό εξοπλισμό, ειδικευμένο προσωπικό και τεχνικές.
- Υψηλό κόστος παραγωγής
- Μεγάλες απώλειες σε σύντομο χρονικό διάστημα από μολύνσεις.
- Αστάθεια στην παραγωγή ομοιόμορφων φυτών λόγω μεταλλάξεων (Παπαχατζής & Καλορίζου, 2008)
- Τα φυτά που αναπτύσσονται σε συνθήκες ιστοκαλλιέργειας δεν είναι αυτότροφα, με αποτέλεσμα να απαιτείται εγκλιματισμός.

1.3.5 Προβλήματα Ιστοκαλλιέργειας

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

i. Στους παράγοντες που σχετίζονται με το μητρικό φυτό, όπως για παράδειγμα ο γονότυπος, το είδος, η οικογένεια και η ποικιλία.

Το μητρικό φυτό (φυτό δότης, donor plant) αποτελεί την πηγή των εκφύτων τα οποία θα χρησιμοποιηθούν στην ιστοκαλλιέργεια και έτσι οι ιδιότητές του, μεταφερόμενες στα έκφυτα, επηρεάζουν πολύ σημαντικά την απόκριση αυτών στους διάφορους χειρισμούς μας. Ο γονότυπος είναι ο καθοριστικότερος παράγοντας για την επιτυχία της ιστοκαλλιέργειας. Η σπουδαιότερη επίδραση του μητρικού φυτού προέρχεται από τον γονότυπο αυτού, δηλαδή το φυτικό είδος ή ακόμα και την ποικιλία (Kintzios et al. 1996a). Σε γενικές γραμμές μπορούμε να πούμε ότι υπάρχουν οικογένειες φυτών οι οποίες αντιδρούν πολύ καλύτερα στην ιστοκαλλιέργεια από άλλες. Σε ορισμένες περιπτώσεις η απόκριση στην ιστοκαλλιέργεια είναι τόσο άμεση, που δεν χρειάζεται παρά η τοποθέτηση ενός εκφύτου (π.χ. ενός τμήματος φύλλου) πάνω σε ένα απλό θρεπτικό υπόστρωμα ή ακόμα και νερό για να ξεκινήσει αμέσως η αναγέννηση φυτών από το έκφυτο. Παράδειγμα τέτοιου φυτού είναι η γαρδένια. Από την άλλη πλευρά υπάρχουν φυτικά

είδη τα οποία αποκρίνονται ελάχιστα στην ιστοκαλλιέργεια, με αποτέλεσμα, όταν προσπαθούμε να καλλιεργήσουμε έκφυτα προερχόμενα από διάφορους ιστούς αυτών των φυτών, συχνά να παρατηρούμε εκτεταμένη νέκρωση των εκφύτων χωρίς καμία απόκριση (π.χ. δημιουργία κάλου). Τα φυτικά αυτά είδη ονομάζονται δύστροπα (recalcitrant).

Οι συνθήκες ανάπτυξης του μητρικού φυτού μπορούν να επηρεάσουν άμεσα ή έμμεσα την επιτυχία της ιστοκαλλιέργειας. Σε ορισμένες περιπτώσεις, είναι απαραίτητο να έχουμε καλλιεργήσει τα φυτά κάτω από πολύ συγκεκριμένες συνθήκες φωτισμού (έντασης φωτισμού και/ή φωτοπεριόδου) και θερμοκρασίας προκειμένου να πετύχουμε τα επιθυμητά αποτελέσματα. Μία τέτοια περίπτωση είναι η καλλιέργεια φυτών προκειμένου να χρησιμοποιηθούν για παραλαβή πρωτοπλαστών. Επίσης η εποχή του χρόνου επηρεάζει σημαντικά το μικροβιακό φορτίο των φυτών, το οποίο είναι αυξημένο το καλοκαίρι (λόγω υψηλών θερμοκρασιών), με αποτέλεσμα να πρέπει να γίνεται ισχυρότερη επιφανειακή απολύμανση των εκφύτων πριν καλλιεργηθούν *in vitro*.

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

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

Η δυνατότητα απόκρισης ενός εκφύτου στην ιστοκαλλιέργεια, εκτός από γενετικούς παράγοντες, καθορίζεται από τη σχετική αναλογία μεριστωματικών και μεσοφυλλικών κυττάρων (Mezghani et al.2007). Όσο περισσότερα είναι τα μεριστωματικά κύτταρα τόσο μεγαλύτερη είναι και η πιθανότητα να αντιδράσει το έκφυτο στους χειρισμούς. Επομένως, ιστοί με μεγαλύτερη συγκέντρωση μεριστωματικών κυττάρων, όπως τα κορυφαία μεριστώματα και οι οφθαλμοί, είναι δεκτικότεροι στην ιστοκαλλιέργεια από τα φύλλα

και τους βλαστούς, που περιέχουν κυρίως μεσοφυλλικά κύτταρα. Τη μικρότερη απόκριση συνήθως δείχνουν ιστοί με μικρή περιεκτικότητα τόσο σε μεριστωματικά όσο και σε μεσοφυλλικά κύτταρα, όπως οι ρίζες. Ενδιαφέρουσα περίπτωση αποτελούν οι σπόροι: αν και περιέχουν το έμβρυο (έναν καθαρά μεριστωματικό ιστό), πολλές φορές δεν μπορούν να αντιδράσουν στην ιστοκαλλιέργεια λόγω του φαινομένου του λήθαργου τα νεαρότερα έκφυτα αντιδρούν καλύτερα στην ιστοκαλλιέργεια από ό,τι τα γηραιότερα.

Τέλος, σημαντική επίδραση στην απόκριση του εκφύτου στην ιστοκαλλιέργεια ασκεί η σχετική θέση αυτού πάνω στο μητρικό φυτό. Αυτό εξηγείται κυρίως από το γεγονός ότι υφίσταται διαβάθμιση της συγκέντρωσης ορμονικών και θρεπτικών παραγόντων κατά μήκος του άξονα τροφοδοσίας των φυτών με νερό και θρεπτικά στοιχεία. Για παράδειγμα, οι αυξίνες συντίθενται κυρίως στην κορυφή κάθε βλαστού και η συγκέντρωσή τους ελαττώνεται όσο προχωρούμε προς τα κάτω, ενώ το αντίθετο ακριβώς συμβαίνει με τις κυτοκινίνες (οι οποίες συντίθενται βασικά στις ρίζες). Επομένως κάθε ιστός σε διαφορετικά σημείο του μητρικού φυτού περιέχει διαφορετικές συγκεντρώσεις αυτών των ορμονών με αποτέλεσμα να έχει και διαφορετική προδιάθεση στην ιστοκαλλιέργεια.

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

Είναι πολύ δύσκολο να αλλάξουμε τον γονότυπο ενός φυτού ώστε να αποκρίνεται καλύτερα στην ιστοκαλλιέργεια. Μπορούμε όμως να αλλάξουμε τις ίδιες τις συνθήκες της καλλιέργειας. Τα συστατικά του περιβάλλοντος της ιστοκαλλιέργειας μπορούν να ταξινομηθούν σε διάφορες κατηγορίες, σημαντικότερες από τις οποίες είναι οι εξής: Το θρεπτικό υπόστρωμα.

- Ο φωτισμός.
- Η θερμοκρασία
- Το ατμοσφαιρικό περιβάλλον.

(KINTZIOS, 2015)

2.ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΥΛΙΚΑ

2.1.1 Φυτικό Υλικό

Τα έκφυτα του είδους *Origanum majorana* που χρησιμοποιήθηκαν στα πειράματα *in vitro* συλλέχτηκαν από φυτά τα οποία αναπτύσσονταν στον υπαίθριο χώρο του ΤΕΙ Πελοποννήσου. Τα μητρικά φυτά ήταν ηλικίας τριών ετών και τον προηγούμενο χειμώνα είχαν κλαδευτεί αυστηρά. Αναπτύσσονταν σε χώρο με έντονη ηλιοφάνεια, ενώ μέχρι και την εποχή που κόπηκαν δεν είχαν αρδευτεί.

2.1.2 Υλικά Απολύμανσης Μοσχευμάτων

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

- * Χλωρίνη εμπορίου, που περιέχει 4,5 % NaOCL 12
- * Προσκολλητική ουσία Tween-20 (Polyxyethylenesorbitan Monolaurate) της εταιρίας MERCK.

2.2.3 Υλικά Θρεπτικού Υποστρώματος Καλλιέργειας *in vitro*

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

2.2.4 Δοχεία *in vitro* Καλλιέργειας

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

2.2.5 Υπόστρωμα *in vitro* Καλλιέργειας

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

Πίνακας 2:Συστατικά (μακροτοιχεία,ιχνοστοιχεία) των υποστρωμάτων.

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

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

Άλλες συσκευές (Εικόνα 1) 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 και
- θάλαμος ανάπτυξης φυτών
- παραφίλμ (ένα θερμοπλαστικό εύκαμπτο πλαστικό ανθεκτικό στην υγρασία που κρατάει έξω από το τρυβλίο τους διάφορους μικροοργανισμούς που μολύνουν τα έκφυτα).

2.2.ΜΕΘΟΔΟΙ

2.2.1 Μέθοδος παρασκευής θρεπτικών υποστρωμάτων

Σε δοχείο ζέσεως με αποσταγμένο νερό (όγκου λιγότερο του τελικού) προσθέτονταν οι ακριβείς ποσότητες, MS 4.4 ή 2.2 g/l ανάλογα αν το υπόστρωμα ήταν πλήρους ή μισής δύναμης, Σουκρόζης 3 ή 1.5%, Μυοινοζιτόλη 100mg/l. Χρησιμοποιήθηκαν δηλαδή δύο διαφορετικά υποστρώματα, το πρώτο περιείχε πλήρους δύναμης MS και 3 % σουκρόζη και το δεύτερο το πρώτο περιείχε μισής δύναμης MS και 1.5 % σουκρόζη. 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 (6 g/l) και ακολουθούσε θέρμανση του διαλύματος, υπό συνεχή ανάδευση μέχρι να λιώσει το άγαρ. Το υπόστρωμα αποστειρώνονταν σε δοχεία αποστείρωσης στον κλίβανο για 20 min και στη συνέχεια εντός του θαλάμου νηματικής ροής μοιράζονταν στα τρυβλία.



Θάλαμος νηματικής ροής



Γυάλινο δοχείο



Μαγνητικός αναδευτήρας

Εικόνα 1. Συσκευές απαραίτητες στον μικροπολλάπλασιασμό

2.2.2 Αποστείρωση υλικών

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

*Μολυσμένα βάζα καλλιέργειας πριν ανοιχτούν και πλυθούν αποστειρώνονταν για 40 min, σε θερμοκρασία 121°C και σε πίεση 1.1 atm.



Εικόνα 2 Κλίβανος αποστείρωσης

2.2.3 Απολύμανση – επώαση - ανάπτυξη *in vitro* εκφύτων του *Origanum majorana*

Βλαστοί του είδους αποκόπηκαν από μητρικά φυτά που αναπτύσσονταν στον εξωτερικό χώρο του ΤΕΙ Πελοποννήσου. Οι βλαστοί μεταφέρθηκαν στο εργαστήριο και ξεπλύθηκαν με άφθονο τρεχούμενο νερό βρύσης για μείωση του μικροβιακού φορτίου. Από τον κάθε βλαστό κόπηκαν πέντε διαφορετικά έκφυτα, η κορυφή, και οι 1^{ος} κόμβος, 3^{ος} κόμβος, 5^{ος} κόμβος και 7^{ος} κόμβος, χαμηλότερα από την κορυφή του βλαστού, με σκοπό την διερεύνηση της επίδρασης της θέσης των εκφύτων στον μητρικό βλαστό στην αναγέννησή τους *in vitro*. Στη συνέχεια απολυμάνθηκαν επιφανειακά σε υδατικό διάλυμα χλωρίνης εμπορίου (12%) για 10min, εντός του θαλάμου νηματικής ροής. Μετά την απολύμανση τους τα έκφυτα ξεπλύθηκαν 3 φορές με αποστειρωμένο- αποσταγμένο νερό και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στα τρυβλία PETRI που περιείχαν ένα από τα δύο θρεπτικά υποστρώματα Α) μισής δύναμης MS (2.2) gr/l , και σουκρόζη 1,5%, ή Β) πλήρους δύναμης MS και 3 g /l, με σκοπό την διερεύνηση της επίδρασης του υποστρώματος ανάπτυξης των εκφύτων στην αναγέννησή τους *in vitro* Σε κάθε τρυβλίο τοποθετήθηκαν 5 έκφυτα. Τα τρυβλία με τα έκφυτα τοποθετήθηκαν για επώαση σε θάλαμο σταθερών και πλήρως ελεγχόμενων συνθηκών (στους 20°C±1°C με 16h φωτοπερίοδο υπό 37,5 μmol m² s⁻¹

fluorescent συνεχές φως) και παρέμειναν σε αυτόν για 40 ημέρες. Η προαναφερόμενη εγκατάσταση των εκφύτων πραγματοποιήθηκε δύο φορές στις 23 Μαΐου του 2016 και στις 23 Σεπτεμβρίου του 2016, με σκοπό την διερεύνηση της επίδρασης της εποχής εγκατάστασης των εκφύτων στην αναγέννησή τους *in vitro*. Στην κάθε επέμβαση από όλες που αναφέρθηκαν τοποθετήθηκαν 10 έκφυτα (δύο τρυβλία).

Οι βλαστοί που ανεπτύχθησαν *in vitro* υποκαλλιεργήθηκαν και τα νέα έκφυτα τοποθετήθηκαν σε ίδια υποστρώματα με αυτά που εκπτύχθηκαν και επώαστηκαν πάλι 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.

2.2.4 Εκτίμηση των αποτελεσμάτων

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

3.ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Στην πρώτη εγκατάσταση των εκφύτων μετρήθηκε η αντίδρασή τους μετά από 40 ημέρες.

Αρχικά εκτιμήθηκε το ποσοστό των εκφύτων που δεν μολύνθηκαν μετά την εγκατάστασή τους στο υπόστρωμα. Τα έκφυτα που εγκαταστάθηκαν σε υπόστρωμα πλήρους δύναμης MS και με 3% σουκρόζη μολύνθηκαν σε σημαντικά υψηλότερο ποσοστό σε σχέση με αυτά που εγκαταστάθηκαν σε μισής δύναμης MS και με 1,5 % σουκρόζη (Πίν. 3). Φαίνεται ότι η απολύμανση των εκφύτων με 12% χλωρίνη εμπορίου για 10 min και στη συνέχεια η καλλιέργεια τους σε υπόστρωμα φτωχό τόσο σε MS όσο και σε σουκρόζη μείωσε σημαντικά το ποσοστό των μολύνσεων και δείχνει να αποτελεί μια μέθοδο με ικανοποιητικά αποτελέσματα.

Πίνακας 3. Επίδραση του υποστρώματος καλλιέργειας των εκφύτων, του είδους *Origanum majorana* στο ποσοστό των εκφύτων, που μολύνθηκαν n=50

Είδος υποστρώματος	Ποσοστό μόλυνσης (%)
πλήρους δύναμης MS και με 3% σουκρόζη	100 a
μισής δύναμης MS και με 1,5 % σουκρόζη	42 b
Σημαντικότητα	*

Στη συνέχεια εκτιμήθηκε η επίδραση που το υπόστρωμα που καλλιεργήθηκαν τα έκφυτα του είδους στο ποσοστό των εκφύτων που αντέδρασαν και σχημάτισαν βλαστούς. Έκφυτα που εγκαταστάθηκαν στα υποστρώματα που περιείχαν μισής δύναμης MS και χαμηλή συγκέντρωση σουκρόζης αντέδρασαν με ικανοποιητικά ποσοστά σε αντίθεση με αυτά που εγκαταστάθηκαν στο πλούσιο υπόστρωμα που δεν αντέδρασαν καθόλου (Πίν. 4).

Πίνακας 4. Επίδραση του υποστρώματος καλλιέργειας των εκφύτων, του είδους *Origanum majorana* στο ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν βλαστούς, n=50

Φυτορρυθμιστική ουσία	Ποσοστό αντίδρασης (%)
πλήρους δύναμης MS και με 3% σουκρόζη	0 a
μισής δύναμης MS και με 1,5 % σουκρόζη	40 b
Σημαντικότητα	*
Οι μέσοι των επεμβάσεων διαχωρίζονται με το Student's test, μέσοι με διαφορετικό λατινικό σύμβολο διαφέρουν στατιστικά σημαντικά.	

Παράλληλα με την επίδραση του υποστρώματος καλλιέργειας στο ποσοστό των εκφύτων που αντέδρασε, εξετάστηκε και η θέση που είχε το έκφυτο επάνω στον μητρικό βλαστό στο ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν βλαστούς. Έκφυτα που κόπηκαν από την κορυφή και τον 7^ο κόμβο του μητρικού βλαστού αντέδρασαν με σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά από αυτά που προέρχονταν από τους κόμβους 1, 2 και 5 κάτω από την κορυφή (Πίν. 5).

Πίνακας 5. Επίδραση της θέσης των εκφύτων στον μητρικό βλαστό, του είδους *Origanum majorana* στο ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν βλαστούς, n=10

Θέση εκφύτου στον μητρικό βλαστό	Ποσοστό αντίδρασης (%)
κορυφή	10 a
1 ^{ος} κόμβος	40 b
3 ^{ος} κόμβος	20 ab
5 ^{ος} κόμβος	40 b
7 ^{ος} κόμβος	10 a
Σημαντικότητα	*
Οι μέσοι των επεμβάσεων διαχωρίζονται με το Student's test, μέσοι με διαφορετικό λατινικό σύμβολο διαφέρουν στατιστικά σημαντικά.	

Η θέση που είχε το έκφυτο επάνω στον μητρικό βλαστό δεν επηρέασε σημαντικά τον αριθμό των βλαστών που σχηματίστηκαν ανά έκφυτο που αντέδρασε (Πίν. 6). Έκφυτα κορυφής σχημάτισαν ελαφρά χαμηλότερο αριθμό βλαστών, σε σύγκριση με έκφυτα που προήλθαν από τους επόμενους κόμβους.

Πίνακας 6. Επίδραση της θέσης των εκφύτων στον μητρικό βλαστό, του είδους *Origanum majorana* στον αριθμό των βλαστών που σχηματίστηκαν, n=10

Θέση εκφύτου στον μητρικό βλαστό	Αριθμός βλαστών
κορυφή	1
1 ^{ος} κόμβος	1,5
3 ^{ος} κόμβος	2
5 ^{ος} κόμβος	2
7 ^{ος} κόμβος	2
Σημαντικότητα	NS
Οι μέσοι των επεμβάσεων διαχωρίζονται με το Student's test, μέσοι με διαφορετικό λατινικό σύμβολο διαφέρουν στατιστικά σημαντικά.	

Πίνακας 7. Επίδραση της θέσης των εκφύτων στον μητρικό βλαστό, του είδους *Origanum majorana* στο αριθμό των κόμβων που σχηματίστηκαν στους βλαστούς που εκπτύχθηκαν, n=10

Θέση εκφύτου στον μητρικό βλαστό	Αριθμός κόμβων
κορυφή	1,0 a
1 ^{ος} κόμβος	2,7 b
3 ^{ος} κόμβος	2,0 ab
5 ^{ος} κόμβος	4,2 c
7 ^{ος} κόμβος	4,0 c
Σημαντικότητα	*
Οι μέσοι των επεμβάσεων διαχωρίζονται με το Student's test, μέσοι με διαφορετικό λατινικό σύμβολο διαφέρουν στατιστικά σημαντικά.	

Ένας σημαντικός παράγοντας ο οποίος αυξάνει τον ρυθμό πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών είναι και ο αριθμός των κόμβων που σχηματίζεται ανά βλαστό που εκπτύσσεται. Έκφυτα που κόπηκαν από τον 5^ο και 7^ο κόμβο από την κορυφή σχημάτισαν βλαστούς οι οποίοι είχαν περισσότερους κόμβους σε σύγκριση πάντα με αυτά που προήλθαν από την κορυφή τον 1^ο και 3^ο κόμβο (Πίν. 7).

Πίνακας 8. Επίδραση της θέσης των εκφύτων στον μητρικό βλαστό, του είδους *Origanum majorana* στο μέσο μήκος (cm) των βλαστών που σχηματίστηκαν, n=10

Θέση εκφύτου στον μητρικό βλαστό	Μέσο μήκος βλαστών (cm)
κορυφή	0,2 a
1 ^{ος} κόμβος	0,5 a
3 ^{ος} κόμβος	0,5 a
5 ^{ος} κόμβος	1 ab
7 ^{ος} κόμβος	1,5 b
Σημαντικότητα	*
Οι μέσοι των επεμβάσεων διαχωρίζονται με το Student's test, μέσοι με διαφορετικό λατινικό σύμβολο διαφέρουν στατιστικά σημαντικά.	

Εξετάστηκε τέλος η επίδραση της θέσης που κόπηκε το έκφυτο από τον μητρικό βλαστό, στο μέσο μήκος των βλαστών που σχηματίστηκαν. Έκφυτα που προήλθαν από τους χαμηλότερους κόμβους του μητρικού βλαστού σχημάτισαν βλαστούς με μεγαλύτερο μήκος.

Κατά την δεύτερη καλλιέργεια εγκατάστασης εκφύτων τον Σεπτέμβριο του 2016, τα έκφυτα μολύνθηκαν σε πολύ μεγάλο ποσοστό και δεν μπορούσαν να εξαχθούν ασφαλή συμπεράσματα.

4.ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Όπως αναφέρθηκε σκοπός της πειραματικής αυτής εργασίας ήταν η αρχική διερεύνηση της δυνατότητας πολλαπλασιασμού του είδους *Origanum majorana* με την μέθοδο του μικροπολλαπλασιασμού.

Για τον επιτυχή μικροπολλαπλασιασμό ενός είδους πρώτο στάδιο που πρέπει να επιτευχθεί είναι η αρχική εγκατάσταση εκφύτων από μητρικά φυτά που αναπτύσσονται *ex vitro* σε *in vitro* συνθήκες. Το μεγαλύτερο πρόβλημα που έχει να αντιμετωπιστεί είναι η εύρεση μιας επιτυχούς μεθόδου απολύμανσης η οποία θα εξασφαλίζει τον ελάχιστο αριθμό μολύνσεων των εκφύτων που εγκαθίστανται και ταυτόχρονα το υψηλότερο ποσοστό επιβίωσής τους από την μέθοδο απολύμανσης που ακολουθήθηκε.

Για το είδος *Origanum majorana*, φαίνεται ότι και σε πολλά άλλα είδη του γένους, επιτεύχθηκε να μην μολυνθεί μεγάλο ποσοστό εκφύτων χρησιμοποιώντας χαμηλή συγκέντρωση χλωρίνης, όταν η καλλιέργεια εγκατάστασης πραγματοποιήθηκε στην αρχή της βλαστικής περιόδου.

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

Το είδος *Origanum majorana*, φαίνεται να αντιδρά καλύτερα σε φτωχό υπόστρωμα καλλιέργειας τόσο ως προς την συγκέντρωση του MS όσο και ως προς αυτήν της σουκρόζης, αποτέλεσμα που έρχεται σε συμφωνία και με άλλα είδη του γένους.

Τέλος μελετήθηκε η επίδραση της θέσης που είχαν τα έκφυτα πάνω στον μητρικό βλαστό, στον μικροπολλαπλασιασμό του είδους.

Η θέση που είχε το έκφυτο επάνω στον μητρικό βλαστό δεν επηρέασε σημαντικά τον αριθμό των βλαστών που σχηματίστηκαν ανά έκφυτο που αντέδρασε, αλλά επηρέασε το ποσοστό αντίδρασης των εκφύτων, τον αριθμό των κόμβων που σχηματίστηκαν και το μέσο μήκος των βλαστών που σχηματίστηκαν. Έκφυτα που προήλθαν από χαμηλότερα σημεία του βλαστού, έδωσαν βλαστούς με υψηλότερο αριθμό κόμβων και μέσο μήκος, αλλά και χαμηλότερο ποσοστό αντίδρασης. Έκφυτα που κόπηκαν από τον 5^{ος} κόμβο του μητρικού βλαστού όπως φαίνεται και από τους πίνακες 5, 6, 7 και 8 έδωσαν τους υψηλότερους ρυθμούς πολλαπλασιασμού.

Στην συνέχεια τα έκφυτα υποκαλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα μισής δύναμης MS και 1.5% σουκρόζη,

Πολλά από τα έκφυτα που υποκαλλιεργήθηκαν σχημάτισαν βλαστούς οι οποίοι ριζοβόλησαν σε υπόστρωμα χωρίς αυξίνη.

Όπως αναφέρθηκε πάλι ήταν μια πρώτη επιτυχής προσπάθεια για τον μικροπολλαπλασιασμό του είδους, χρειάζεται φυσικά πολύ παραπάνω έρευνα στα εξής σημεία:.

Αρχικά πάνω στην μέθοδο απολύμανσης κατά την εγκατάσταση των αρχικών καλλιεργειών, τόσο με τον χρόνο της απολύμανσης όσο και με την εφαρμογή διαφορετικής μεθόδου ανάλογα με την εποχή εγκατάστασης.

Στην συνέχεια χρειάζεται παραπάνω έρευνα στην επίδραση της εποχής εγκατάστασης των εκφύτων, πρέπει να πραγματοποιηθούν αρχικές καλλιέργειες εγκατάστασης και σε άλλες εποχές στην διάρκεια της βλαστικής περιόδου και μελετηθεί ταυτόχρονα η επίδραση της εποχής και της θέσης του εκφύτου πάνω στον μητρικό βλαστό.

Τέλος χρειάζεται πολύ παραπάνω έρευνα στην αύξηση του ρυθμού πολλαπλασιασμού και στην ριζοβολία και εγκατάσταση *ex vitro* των εκπυσομένων βλαστών.

5.ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

ΒΟΤΑΝΑ. (2014, Μάρτιος 27). *Botanologio*. Ανάκτηση από ΘΕΡΑΠΕΥΤΙΚΕΣ ΙΔΙΟΤΗΤΕΣ: <https://botanologio.com/marjoram-origanum-majorana/>

Δασαρχείο. (2015, Μάιος 23). *Dasarxeio*. Ανάκτηση από Χλωρίδα: <https://dasarxeio.com/2015/05/23/303-7/>

Δόρδας, Χ. (2012). *Αρωματικά και Φαρμακευτικά Φυτά*. ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ: ΣΥΓΧΡΟΝΗ ΠΑΙΔΕΙΑ.

ΚΙΝΤΖΙΟΣ, Σ. (2015). *εισαγωγή στον μικροπολλαπλασιασμό των φυτών*. Αθήνα: Ελληνικά Ακαδημαϊκά Ηλεκτρονικά Συγγράμματα και Βοηθήματα.

Κουτσός, Θ. Β. (2006). *Αρωματικά και Φαρμακευτικά Φυτά*. Θεσσαλονίκη: ΖΗΤΗ.

Μαλούπα, Ε., Γρηγοριάδου, Κ., & Λάζαρη, Μ. (2012, Νοέμβριος 10-11). *Στοιχεία καλλιέργειας-αξιοποίησης ελληνικών αρωματικών/φαρμακευτικών ειδών*. Ανάκτηση Αύγουστος 2017, από <http://www.geotee-anmak.gr/img/ekdiloseis/filladio-aromatika.pdf>

Ξυνιάς, Ι. Ν. (2014). *ΒΕΛΤΙΩΣΗ ΦΥΤΩΝ Θεωρία & ασκήσεις*. Αιγάλεω: ΕΜΒΡΡΥΟ.

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

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

Διαδίκτυο:

1. <http://www.eclass.teipel.gr/eclass2/>
2. <http://votanaaristoteleio.weebly.com/mualphatauzetaomicronupsilonrho940nualpha.html>
3. http://monoprasino.blogspot.gr/2014/02/blog-post_17.html
4. http://www.insituconservation.com/products/plastic_labware/plastic_petri_dishes
5. <http://blog.labplanet.com/2011/07/18/laminar-flow-cabinet/>
6. <https://www.medicalhouse.gr/fiales-gyalines-me-bidoto-kapaki.el.aspx>
7. https://www.atas.gr/product.php?products_id=7650&sess=d7d1d3cbef9dace77cb2371c1905fdc6