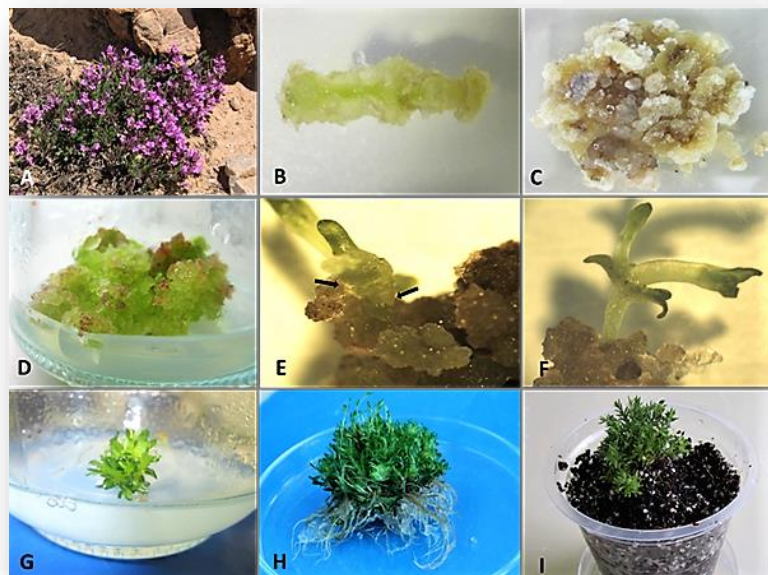


ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ (Τ.Ε.Ι.) ΠΕΛΛΟΠΟΝΗΣΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΚΑΙ
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΩΝ (ΠΡΩΗΝ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ)

ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ *Thymus capitatus*

Πτυχιακή εργασία

της σπουδάστριας Μαρίας Πανοσκάλτη



ΚΑΛΑΜΑΤΑ
ΙΟΥΝΙΟΣ 2017

ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ (Τ.Ε.Ι.) ΠΕΛΛΟΠΟΝΗΣΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΚΑΙ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ
ΚΑΙ
ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΩΝ (ΠΡΩΗΝ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ)
ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ *Thymus capitatus*

Πτυχιακή εργασία

της σπουδαστριας Μαρίας Πανοσκάλτσι

Επιβλέπων Καθηγητής: Επαμεινώνδας Κάρτσωνας

Καλαμάτα, Ιούνιος 2017

Ευχαριστίες

Τελειώνοντας την πτυχιακή μου τελειώνει και η φοίτηση μου στο Τ.Ε.Ι. Πελοποννήσου. Θα ήθελα να ευχαριστήσω όλο το προσωπικό του ιδρύματος που με βοήθησε να φτάσω ως εδώ και περισσότερο τον επιβλέποντα καθηγητή αυτής της πτυχιακής Ε. Κάρτσωνα. Σας ευχαριστώ όλους για την στήριξη και την μετάδοση γνώσεων.

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	5
ABSTRACT	6
1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ(ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ)	7
1.1. Ιστορικά στοιχεία.....	8
1.2. Μορφολογία-Ανατομία.....	8
1.3. Ποικιλίες.....	9
1.4. Πολλαπλασιασμός	12
1.4.1. Εγγενής πολλαπλασιασμός	12
1.4.2. Αγενής πολλαπλασιασμός.....	13
1.5. Προετοιμασία εδάφους	15
1.6. Κλιματικές απαιτήσεις- Θερμοκρασία.....	16
1.7. Βροχόπτωση	16
1.8. Εδαφικές απαιτήσεις	16
1.9. Αποστάσεις πυκνότητα φύτευσης.....	16
1.10. Λίπανση.....	17
1.11. Άρδευση	17
1.12. Έλεγχος ζιζανίων	17
1.13. Εχθροί.....	17
1.14. Ασθένειες	18
1.15. Συγκομιδή.....	18
1.16. Χειρισμός μετά την συγκομιδή.....	18
1.17. Συσκευασία – Αποθήκευση.....	19
1.18. Αγορές.....	20
1.19. Χώρες παραγωγής - Αποδόσεις.....	20
1.20. Φαρμακευτική χρήση.....	20
2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	22
2.1. Υλικά	22
2.1.1 Υλικά απολύμανσης σπόρων και ιστών	22
2.1.2. Υλικά θρεπτικού υποστρώματος in vitro καλλιέργειας	22
2.1.3. Δοχεία in vitro καλλιιεργειών.....	22
2.1.4. Υπόστρωμα in vitro καλλιέργειας.....	22
2.2. Μέθοδοι.....	24
2.2.1 Μέθοδοι απολύμανσης, αποστείρωσης και εγκατάστασης φυτικού υλικού.....	24
2.2.2. Μέθοδος παρασκευής θρεπτικών υποστρωμάτων.....	25

2.2.3.	Περιγραφή ειδικών εγκαταστάσεων	26
2.2.4.	Μέθοδος μέτρησης έκπτυξης και αντίδρασης των εκφύτων.....	26
2.3.	Εγκατάσταση αρχικών καλλιεργειών.....	26
3.	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	28
4.	ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	30
	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	32

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

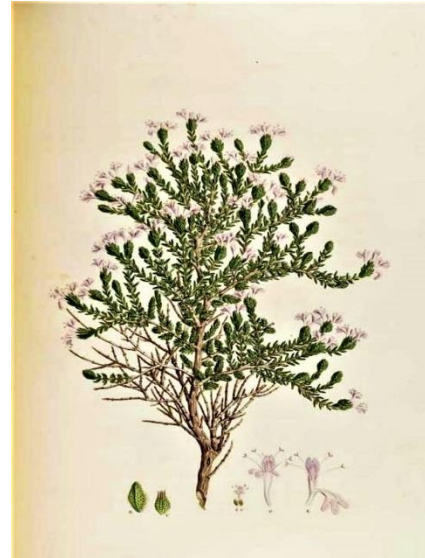
Η πτυχιακή αυτή εργασία που πραγματοποιήθηκε στο χώρο του ΤΕΙ Πελοποννήσου, εξετάζει τον τρόπο μικροπολλαπλασιασμού (micropropagation) του είδους *Thymus capitatus*, ενδημικού φυτού στην περιοχή του Ταΰγétου στην Πελοπόννησο, από τον μήνα Μάιο μέχρι τον Οκτώβριο, σε θρεπτικό υπόστρωμα Murashige και Skoog medium (MS) MS₂. Για την καλλιέργεια του *Thymus capitatus* χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα βλαστών μήκους 5 mm αφού πρώτα είχαν περάσει από το στάδιο της απολύμανσης. Βυθίζονταν για 10 λεπτά σε διάλυμα χλωρίνης 15% και ακολουθούσαν 3 ξεπλύματα με αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερο. Στο υπόστρωμα MS $\frac{1}{2}$ που χρησιμοποιήθηκε περιέχονταν 2% σακχαρόζη και 6% άγαρ. Αναφέρονται οι συνθήκες που πρέπει να υπάρχουν για την επιτυχία μιας ιστοκαλλιέργειας, ποια είναι τα βασικά συστατικά που απαρτίζουν ένα θρεπτικό υπόστρωμα αλλά και τον τρόπο παρασκευής του. Αναφέρεται επίσης ο χώρος που παρασκευάζεται ένα θρεπτικό υπόστρωμα MS, που και πως αποστειρώνονται τα αντικείμενα για να επιτευχθεί η λεγόμενη «ασηψία» σε μια ιστοκαλλιέργεια και παρουσιάζονται τρόποι για την απολύμανση των εκφύτων πριν την εγκατάσταση ή την επέμβαση στα έκφυτα. Παρακάτω αναφέρονται τα πλεονεκτήματα και τα μειονεκτήματα της ιστοκαλλιέργειας αλλά και οι παράγοντες που την επηρεάζουν. Τέλος θα αναλυθεί λεπτομερώς η πειραματική διαδικασία στους φυτικούς ιστούς, τα αποτελέσματα και τα συμπεράσματα όπως ποια είναι η καλύτερη περίοδος για την εγκατάσταση μιας καλλιέργειας *in vitro* στο φυτό *Thymus capitatus*. Τα έκφυτα εγκαταστάθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα μισής δύναμης MS και 1,5% σουκρόζη, αλλά δεν κατάφεραν να φτάσουν στην διαδικασία *ex vitro* λόγω των συνεχών μολύνσεων που υπήρχαν.

ABSTRACT

This diploma thesis, which took place at the Technological Educational Institute of Peloponnese, examines the micropropagation of *Thymus capitatus*, an endemic plant in the area of Taygetos in the Peloponnese, from May to October, on Murashige and Skoog medium (MS) MS / 2. Cultures of *Thymus capitatus* used 5 mm long shoots of shoots after having passed the disinfection step. They were immersed for 10 minutes in 15% bleach solution followed by 3 rinses with distilled and sterile water. The substrate MS ½ used contained 2% sucrose and 6% agar. The conditions to be met for the success of a tissue culture, what are the basic ingredients that make up a nutrient substrate, and how it is prepared. It also mentions the area where a MS nutrient substrate is prepared, how and how to sterilize the objects to achieve so-called "aseptic" in a tissue culture, and ways to disinfect mosses prior to installing or intervening in the explants. Below are the advantages and disadvantages of tissue culture and the factors that affect it. Finally, the experimental process on plant tissues, results and conclusions will be analyzed in detail, such as what is the best time for installing an in vitro culture on *Thymus capitatus*. The explants reacted on the MS ½ medium that was used but did not manage to reach the ex vitro process due to the ongoing infections.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ(ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΚΗ ΑΝΑΣΚΟΠΗΣΗ)

Βασίλειο	Plantae
Συνομοταξία	Magnoliophyta
Ομοταξία	Magnoliopsida
Τάξη	Lamiales
Οικογένεια	Lamiaceae
Γένος	Thymus
Είδος	<i>T. capitatus</i>



Πίνακας 1. Συστηματική ταξινόμηση θυμαριού

Το θυμάρι είναι ένα πολυετές βότανο της οικογένειας Lamiaceae και μπορεί να φτάσει σε ύψος περίπου 30 cm. Υπάρχουν περισσότερες από 100 ποικιλίες του θύμου και διανέμονται σε όλη την Ευρώπη. Στον ελλαδικό χώρο υπάρχουν περίπου 31 αυτοφυή είδη του γένους *Thymus*, πέντε από τα οποία είναι ενδημικά. Προέρχεται από την ακτή της Μεσογείου και από την περιοχή της Μικράς Ασίας. Τώρα καλλιεργείται σε πολλές Ευρωπαϊκές χώρες, στη Ρωσία, στον Καναδά, στην Αμερική και ορισμένες από τις χώρες της Βόρειας Αφρικής. Έχει σκούρα πράσινα φύλλα και άνθη μωβ-ροζ στις αρχές του καλοκαιριού. Το θυμάρι είναι ένα καλό φυτό βραχύκηπο, καθώς εξαπλώνεται εύκολα. Το θυμάρι είναι ένα από τα μεγάλα γαστρονομικά και φαρμακευτικά φυτά, και είναι ένα κλασικό συστατικό σε ένα μπουκέτο μυρωδικών (Fleming 1990), αλλά λίγα είδη χρησιμοποιούνται στην κουζίνα, όπως κοινό θυμάρι (*T. vulgaris*) και λεμονοθύμαρο (*T. citriodorus*).

Το αιθέριο έλαιο (Marhuenda et al. 1988; Blazquez MA, Zafra-Polo MC 1989) του θυμαριού έχει επίσης αναφερθεί ότι είναι αποτελεσματικό ως συντηρητικό τροφίμων, αντιοξειδωτικό (Farag et al. 1990), αντιμικροβιακό (Morris et al. 1979), για δροσερή αναπνοή σε οδοντόκρεμες (Ishikawa και Shibuya 1989) ιατρικό απολυμαντικό, κλπ. Σε γενικές γραμμές, τα αποξηραμένα φύλλα περιέχουν 0.7-2.5% ξηρό βάρος του αιθέριου ελαίου. Τα κύρια συστατικά είναι θυμόλη (15-62%) καρβακρόλη (2-44%) π-κυμένιο, και γ-τερπινεόλη.

1.1. Ιστορικά στοιχεία

Το όνομα για πρώτη φορά δόθηκε από τους αρχαίους Έλληνες και προέρχεται από το αρχαίο ελληνικό ρήμα Θύω που σημαίνει θυσιάζω για αυτό άλλωστε και το χρησιμοποιούσαν ως θυμίαμα στους ναούς. Άλλη εκδοχή αναφέρει ότι προέρχεται από την λέξη Θύμων που σημαίνει θαρραλέος. Είναι γνωστό ότι οι Ρωμαίοι στρατιώτες το χρησιμοποιούσαν για να αποκτήσουν δύναμη και ενεργητικότητα. Άλλες πηγές αναφέρουν την χρήση του από τους Σουμέριους κατά το 3.500 π.χ. αλλά και από τους Αιγυπτίους που το ονόμαζαν Θαμ και το χρησιμοποιούσαν ως Βαλσαμωτικό και ως αρωματικό Το θυμάρι στις αρχαίες και μεσαιωνικές ημέρες θεωρούνταν μια μεγάλη πηγή αναζωογόνησης. Οι αντισηπτικές ιδιότητες του θυμαριού αναγνωρίζονται πλήρως στην κλασική εποχή, αναφέρονται στα Γεωργικά, (Βιβλίο του Βιργίλιου) με τη χρήση του ως απολυμαντικό δια καπνού, και ο Πλίνιος μας λέει ότι, όταν καίγεται, βάζει σε φυγή όλα δηλητηριώδη πλάσματα. Η Lady Northcote (στο The Herb Garden) αναφέρει ότι μεταξύ των Ελλήνων, το θυμάρι συμβολίζει την κομψότητα «να μυρίζουν θυμάρι» ήταν μια έκφραση επαίνου, που εφαρμοζόταν σε εκείνους των οποίων το ύφος ήταν αξιοθαύμαστο. Ήταν ένα έμβλημα δραστηριότητας, ανδρεία, ενέργειας, και στις ημέρες της ιπποσύνης ήταν το έθιμο για τις κυρίες να κεντούν μια μέλισσα πάνω από ένα κλαδάκι θυμάρι στα κασκόλ που παρουσίαζαν στους ιππότες τους. Στο νότο της Γαλλίας, το άγριο θυμάρι είναι ένα σύμβολο του ακραίου ρεπουμπλικανισμού, τούφες από αυτό αποστέλλονται με την κλήση σε μια Ρεπουμπλικανική συνάντηση.

1.2. Μορφολογία-Ανατομία

Το θυμάρι είναι ένας μικρός πολυετής θάμνος, που σπάνια αυξάνεται περισσότερο από 40 εκατοστά ύψος. Το θυμάρι είναι αειθαλές φυτό, βγάζει φύλλα από μέσα Ιανουάριου και ανθίζει από Μάιο έως τον Αύγουστο. Τα άνθη είναι ερμαφρόδιτα και γονιμοποιούνται με τις μέλισσες, μύγες και τα λεπιδόπτερα. Η ανάπτυξη του είναι όρθια όσο και έρπουσα.



Το φυτό έχει ξυλώδης, ινώδη ρίζα. Οι μίσχοι είναι πολλοί, στρογγυλοί, σκληροί, διακλαδισμένοι και το ύψος είναι συνήθως είναι από 10-32 εκατοστά. Τα φύλλα είναι μικρά, μήκους μόνο περίπου από 2,5-5 χιλιοστά και 15 χιλιοστά ευρεία, στενά και ελλειπτικά, πρασινωπό-γκρι χρώμα, κυρτά στο περιθώριο, και ανά ζεύγη κατά πολύ μικρά κοτσάνια. Τα λουλούδια καταλήγουν στην άκρη των κλαδιών σε σπείρες. Ο κάλυκας είναι σωληνοειδής, γραμμωτός, κλειστός στο στόμα με μικρές τρίχες και χωρίζεται σε δύο χείλη, το άνω χείλος είναι χωρισμένο σε τρία δόντια και το κάτω σε δύο. Η στεφάνη αποτελείται από ένα σωλήνα γύρω από το μήκος του κάλυκα, που εξαπλώνεται στη κορυφή των δύο χειλιών σε ένα απαλό μοβ χρώμα, το άνω χείλος αναγείρεται ή γυρίζει μέσα με εγκοπές στην άκρη, το κάτω χείλος πλέον πιο μακρύ χωρίζεται σε τρία τμήματα. Οι σπόροι είναι σφαιροειδείς και πολύ μικροί, περίπου 4819,4 γραμμάρια διατηρούν τη βλαστικότητα τους για τρία χρόνια. Το φυτό έχει μια ευχάριστη αρωματική οσμή και μια ζεστή, έντονη γεύση

1.3.Ποικιλίες

Το γένος *Thymus* περιλαμβάνει περίπου 215 είδη καθώς και πολλά υβρίδια. Διακρίνουμε τρεις κύριες ποικιλίες που καλλιεργούνται για χρήση, τις πλατύφυλλες, τις στενόφυλλες και τις *variegata*. Οι στενόφυλλες, έχουν μικρά γκριζοπράσινα φύλλα και είναι πιο αρωματικές από τις πλατύφυλλες, είναι γνωστές με το όνομα γερμανικό θυμάρι.

Στην Ελλάδα υπάρχουν 23 αυτοφυή είδη και τα πιο σημαντικά είναι:

- Άγριο θυμάρι: Θύμος ο κεφαλωτός/ *Thymus capitatus*



Εικόνα 1.Θυμάρι κεφαλωτό

Μικρός θάμνος με βλαστούς ξυλώδεις ξαπλωμένους. Βρίσκεται κυρίως σε πολλές βραχώδεις, ορεινές, ξηρές περιοχές της ηπειρωτικής Ελλάδας.

- Χαμοθρούμπι: Θύμος ο γραπτός/ *Thymus striatus*



Εικόνα 2. Θύμος γραπτός

Πολύ κοινό σε διάφορες πεδινές περιοχές και λιβάδια της Μακεδονίας και της Θράκης.

- Σμάρι: Θύμος η ζυγίς ή Θύμος ο αττικός/ *Thymus atticus*



Εικόνα 3. Θυμάρι αττικό

Βρίσκεται σε διάφορες βραώδεις περιοχές της Αττικής, της Αχαΐας, της Κορινθίας και του Ολύμπου.

- Λεμονοθύμαρο: *Thymus citriodorus*



Εικόνα 4. Λεμονοθύμαρο

Το λεμονοθύμαρο (*Thymus citriodorus*) έχει μεγαλύτερα φύλλα από το κοινό θυμάρι, δεν είναι κυρτά προς τα μέσα και αποτελεί ποικιλία του *T. serpyllum* (άγριο θυμάρι). Το λεμονοθύμαρο θεωρείται μια από τις πιο ανθεκτικές ποικιλίες με το πιο έντονο άρωμα. Μερικά από τα πιο καλλιεργούμενα είδη ή ποικιλίες για την παραγωγή νωπού ή αποξηραμένου προϊόντος αλλά και για την απόσταξη και παραγωγή αιθέριου ελαίου, αναφέρονται παρακάτω. Είναι γνωστό ότι το φυτό υβριδοποιείται εύκολα και έτσι είναι εύλογο να υπάρχουν και διαφορετικοί διαθέσιμοι τύποι.

Στον Πίνακα 2 φαίνονται διάφορες ποικιλίες θυμαριού σε όλο τον κόσμο και η αξιολόγησή του σε βρωσιμότητα και φαρμακευτικές ιδιότητες.

Λατινικό όνομα	Αξιολόγηση βρωσιμότητας	Φαρμακευτική αξιολόγηση
<i>Thymus caespititius</i>	2	2
<i>Thymus camphoratus</i>	0	2
<i>Thymus capitatus</i>	2	2
<i>Thymus cilicicus</i>	1	2
<i>Thymus herba-barona</i>	3	2

<i>Thymus hirtus</i>	2	2
<i>Thymus mastichina</i>	2	2
<i>Thymus pannonicus</i>	2	2
<i>Thymus praecox</i>	2	2
<i>Thymus praecox arcticus</i>	3	2
<i>Thymus pseudolanuginosus</i>	2	2
<i>Thymus pulegioides</i>	2	2
<i>Thymus quinquecostatus</i>	2	2
<i>Thymus serpyllum</i>	4	3
<i>Thymus citriodorus</i>	4	2
<i>Thymus zygis/Thymus</i>	2	2
<i>Thymus striatus</i>	1	2
<i>Thymus vulgaris</i>	3	2

1.4. Πολλαπλασιασμός

1.4.1. Εγγενής πολλαπλασιασμός

Η απευθείας σπορά στο χωράφι είναι δύσκολη επειδή ο σπόρος είναι πολύ μικρός (3.300-4000 σπόροι ανά γραμμάριο) Για το λόγο αυτό οι σπόροι σπέρνονται είτε σε σπορεία, είτε σε πολλαπλασιαστικούς δίσκους σε βάθος 6 mm ή λιγότερο. Η σπορά γίνεται γύρω στα μέσα Μαρτίου με αρχές Απριλίου. Η βλαστικότητα του σπόρου κυμαίνεται σε ποσοστό περίπου 72% (Kretschmer 1989). Για μεταφύτευση τον Οκτώβριο τα σπορεία ετοιμάζονται περί τα μέσα Αυγούστου ενώ για εαρινή μεταφύτευση τα σπορεία ετοιμάζονται πολύ νωρίς την άνοιξη ή και νωρίτερα, εντός θερμοκηπίων. Τα φυτά μετά από 6 – 8 εβδομάδες, και εφόσον δεν υπάρχει κίνδυνος παγετού (όταν η μεταφύτευση γίνεται την άνοιξη) τα φυτά μεταφυτεύονται. Επειδή το θυμάρι υβριδίζεται πολύ εύκολα η προέλευση των σπόρων πρέπει να είναι γνωστή, για το λόγο αυτό οι σπόροι πρέπει να είναι πιστοποιημένοι.

1.4.2. Αγενής πολλαπλασιασμός

1.4.2.1. Πολλαπλασιασμός με παραφυάδες

Είναι πλευρικοί βλαστοί που έχουν ρίζες. Οι παραφυάδες αφαιρούνται από το φυτό και φυτεύονται απευθείας στο χωράφι. Από κάθε φυτό μπορούμε να πάρουμε 10-20 παραφυάδες. Η συλλογή των παραφυάδων γίνεται νωρίς την άνοιξη.

1.4.2.2. Πολλαπλασιασμός με μοσχεύματα

Συνιστάται αγενής πολλαπλασιασμός με μοσχεύματα, καθώς υπάρχει μεγάλη ετερογένεια στους χημειότυπους των πληθυσμών που προέρχονται από σπόρο. Οι σπόροι έχουν λήθαργο. Γενικά ριζώνει χωρίς προβλήματα σε μίγμα τύρφης και περλίτη (1:3), με χρήση ορμόνης ριζοβολίας IBA συγκέντρωσης 1000 ppm, και περιορισμένη σχετική υγρασία

1.4.2.3. Πολλαπλασιασμός με ιστοκαλλιέργεια

Μια από τις πιο ενδιαφέρουσες περιοχές της βιοτεχνολογίας είναι η ιστοκαλλιέργεια, δηλαδή η ικανότητα εγκατάστασης και διατήρησης φυτικών οργάνων(έμβρυα, βλαστούς, ρίζες και άνθη) και φυτικών ιστών(κύτταρα, κάλλο, πρωτόπλασμα) σε ασηπτικές συνθήκες. Η ιστοκαλλιέργεια χρησιμοποιείται στον πολλαπλασιασμό και στη βελτίωση των φυτών, στη διατήρηση γενετικού υλικού, στη παραγωγή φυσικών και φαρμακευτικών ουσιών, στη φυτοπαθολογία και σε επιστημονικές έρευνες. Ο μικροπολλαπλασιασμός είναι μια μορφή της ιστοκαλλιέργειας που αφορά αποκλειστικά τον πολλαπλασιασμό των φυτών και έχει αποδειχθεί επιτυχής τεχνική για την μαζική παραγωγή φυτών. Επιπλέον, μείωσε τη διάρκεια της παραγωγικής διαδικασίας και έχει ευρύνει τον αριθμό των φυτικών γενοτύπων που μπορούν να πολλαπλασιαστούν αγενώς.

Όσον αφορά την εμπορική ιστοκαλλιέργεια φυτών (ή μικροπολλαπλασιασμό), αυτή κυρίως συνίσταται στην αναγέννηση ολόκληρων (πλήρων), βιώσιμων φυτών από διάφορα έκφυτα, συνηθέστερα των οποίων είναι:

- a) Τα κορυφαία μεριστώματα
- b) Τα κορυφαία τμήματα βλαστών
- c) Οι οφθαλμοί
- d) Τα μεσογονάτια διαστήματα βλαστών
- e) Τα έμβρυα
- f) Τα φύλλα.

Σε περίπτωση κατά την οποία στην ιστοκαλλιέργεια δεν χρησιμοποιούνται μεριστώματικοί ιστοί (μεριστώματα, οφθαλμοί, έμβρυα), οι καλλιεργούμενοι ιστοί διέρχονται από μια φάση αποδιοργάνωσης της τυπικής δομής τους, παράγοντας μάζες διαφοροποιημένων κυττάρων, γνωστές ως κάλλος (κάλλος εμφανίζεται συχνά και κατά την καλλιέργεια μεριστώματικών ιστών, αλλά και σε μικρότερη έκταση) (Κίντζιος, 1994).

Με κατάλληλους χειρισμούς οι καλλιεργούμενοι μεριστωματικοί ιστοί ή ο κάλλος παρουσιάζουν μερική επαναδιαφοροποίηση, με τη δημιουργία καταβολών διαφόρων οργάνων ή ιστών, όπως βλαστών και/ή ριζών. Η διαδικασία αυτή χαρακτηρίζεται ως τυχαία οργανογένεση (εκτός από την αναγέννηση εμβρύων σε ολόκληρα φυτά). Συνήθως από ένα μόνο έκφυτο μπορούν να προέλθουν περισσότερες (π.χ. 5-10) καταβολές νέων οργάνων, οι οποίες επανακαλλιεργούμενες μπορούν να δώσουν με τη σειρά τους νέες καταβολές. Με περαιτέρω χειρισμούς οι καταβολές αυτές μπορούν να εξελιχθούν σε ολόκληρα φυτάρια (Κίντζιος, 1994).

Σε ορισμένες περιπτώσεις, αντί καταβολών οργάνων μπορούν να παραχθούν από σωματικούς (δηλ. μη γαμετικούς) ιστούς ολόκληρα έμβρυα, τα οποία περικλείουν σε μικρογραφία όλη την απαραίτητη δομή ενός φυτού. Τα έμβρυα αυτά ονομάζονται σωματικά, επειδή δεν προέρχονται από τη γονιμοποίηση γαμετικών κυττάρων, αλλά από σωματικά κύτταρα, ενώ όλη η διαδικασία ονομάζεται σωματική εμβρυογένεση (Κίντζιος, 1994).

Από πρακτική άποψη, στην εμπορική ιστοκαλλιέργεια χρησιμοποιούνται συνηθέστερα τα κορυφαία ή τα μεσογονάτια τμήματα βλαστών (μήκους 0.5-1 εκ.), λόγω της ευκολίας παραλαβής τους από το μητρικό φυτό (φυτό-δότη) και αντίδρασης στην καλλιέργεια. Σχετικά εύκολη είναι και η καλλιέργεια των οφθαλμών, ενώ η απομόνωση μεριστωμάτων και εμβρύων απαιτεί σχετικά υψηλό βαθμό τεχνικής ικανότητας και εξειδίκευσης. Η σωματική εμβρυογένεση, μια σχετικά νέα μεθοδολογία, προϋποθέτει αυξημένο τεχνολογικό επίπεδο ενός εργαστηρίου και παρουσιάζει ακόμα πολλά πρακτικά προβλήματα στην εφαρμογή. Η καλλιέργεια, τέλος, των φύλλων χρησιμοποιείται μόνο σε ειδικές περιπτώσεις (π.χ. κλωνική αναπαραγωγή της Saintpaulia) (Κίντζιος, 1994).

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

- I. Η κλωνική αναπαραγωγή των μητρικών φυτών
- II. Η αυξημένη παραγωγή φυτών σε σύντομο χρονικό διάστημα
- III. Η εξοικονόμηση χώρου
- IV. Η αποδέσμευση της παραγωγής από εξωτερικές και περιβαλλοντικές συνθήκες και περιορισμούς
- V. Η παραγωγή άνοσου φυτικού υλικού
- VI. Μοναδική μέθοδος πολλαπλασιασμού για ορισμένα φυτικά είδη

Ωστόσο η καλλιέργεια παρουσιάζει και μειονεκτήματα σε σχέση με τις συμβατικές μεθόδους, σπουδαιότερα από τα οποία είναι τα εξής:

- i. Απαιτεί υψηλό επενδυτικό κόστος
- ii. Προϋποθέτει υψηλή επάρκεια σε τεχνογνωσία καθώς και αποτελεσματική επίβλεψη όλων των σταδίων παραγωγής
- iii. Το κόστος της in vitro παραγωγής φυτών είναι, προς το παρόν τουλάχιστον, σημαντικά μεγαλύτερο από αυτό των συμβατικών μεθόδων

Τα κυριότερα τεχνικά προβλήματα της ιστοκαλλιέργειας είναι:

1. Η εκτεταμένη μόλυνση των καλλιεργειών
2. Η υαλοποίηση των in vitro αναγεννώμενων φυτών
3. Η χαμηλή βιωσιμότητα των in vitro παραχθέντων φυτών
4. Η κλωνική αναπαραγωγή του μητρικού υλικού
5. Η μη επιτυχής αναγέννηση πλήρων φυτών

Η in vitro παραγωγή φυτών μπορεί να διακριθεί σε πέντε στάδια:

- Στάδιο 1: Εγκατάσταση και σταθεροποίηση της καλλιέργειας
- Στάδιο 2: Πολλαπλασιασμός φυτών
- Στάδιο 3: Σχηματισμός επίκτητων ριζών
- Στάδιο 4: Εγκλιματισμός και σκληραγώγηση των φυτών πριν την υπαίθρια φύτευσή τους.

1.5. Προετοιμασία εδάφους

Καλλιεργείται σε εδάφη που άλλες καλλιέργειες δύσκολα θα μπορούσαν να αποδώσουν ακόμη και να επιβιώσουν. Όλες οι αρωματικές καλλιέργειες που καλλιεργούνται σε εδάφη που κατεργάζονται και βελτιώνονται με ορθές φυσικές

πρακτικές βελτίωσης αποδίδουν αιθέρια έλαια υψηλής ποιότητας και μεγάλης ζήτησης σε παγκόσμιο επίπεδο. Για την ισόρροπη διόρθωση της θρεπτικής κατάστασης της καλλιέργειας, την σωστή διόρθωση του pH, την άσκηση ορθών γεωργικών πρακτικών ώστε να διατηρείται η γονιμότητα του εδάφους και να εξασφαλίζεται η αειφορία του, αλλά και την διευκόλυνση της χρήσης των μηχανημάτων στην καλλιέργεια, η όλη προετοιμασία του εδάφους για την εγκατάσταση της καλλιέργειας θα πρέπει να γίνεται σύμφωνα με τις αρχές Γεωπονικής Επιστήμης και πάντα υπό την καθοδήγηση Γεωπόνου.

1.6.Κλιματικές απαιτήσεις- Θερμοκρασία

Αυξάνεται καλά σε εύκρατα κλίματα, σε ζεστές, ξηρές και ηλιόλουστες περιοχές. Είναι απαιτητικό σε φως γι' αυτό και θα πρέπει να αποφεύγεται η καλλιέργεια του σε σκιαζόμενες θέσεις, ώστε να αποδίδει τα μέγιστα.

1.7.Βροχόπτωση

Δεν προτιμά την υπερβολική υγρασία, λόγω της ευαισθησίας του στις ασθένειες που προκαλούν σηψιρριζίες. Οι βροχοπτώσεις στην περιοχή της Μεσογείου, όπου το θυμάρι καλλιεργείται περισσότερο, κυμαίνονται από 500 έως 1000 mm ετησίως, κυρίως το χειμώνα.

1.8.Εδαφικές απαιτήσεις

Προτιμά ελαφρά, καλά στραγγιζόμενα εδάφη με pH από 5,0 έως 8,0. Μπορεί να καλλιεργηθεί σε ποικιλία εδαφών, ειδικά σε ασβεστούχα ηλιαζόμενα και ξηρά εδάφη, ακόμη και σε βαριά υγρά, πλην όμως σε τέτοια εδάφη (βαριά και υγρά), η αρωματική του αξία μειώνεται.

1.9.Αποστάσεις πυκνότητα φύτευσης

Στις ΗΠΑ οι συνιστώμενες αποστάσεις φύτευσης είναι 30 εκ. επί των γραμμών και 60 μεταξύ των γραμμών ενώ στην Αυστραλία πυκνότητα φύτευσης 36 φυτά /m² έχει επιτυχή αποτελέσματα στην μείωση του ανταγωνισμού με τα ζιζάνια. Στην περίπτωση μηχανικής συγκομιδής οι συνιστώμενες αποστάσεις φύτευσης είναι 15 έως 30 cm επί των γραμμών και 60 cm μεταξύ των γραμμών. Οι μηχανές που θα επιλεγούν πρέπει να είναι τέτοιες που δεν θα προκαλούν την καταστροφή των φυτών. Σε κάθε περίπτωση η πυκνότητα της καλλιέργειας θα πρέπει να λαμβάνει την ποικιλία, τον τύπο του εδάφους και την διαθεσιμότητα σε νερό.

1.10. Λίπανση

Ετησίως και ανάλογα με τα αποτελέσματα της ανάλυσης του εδάφους αλλά και τις ιδιαίτερες συνθήκες ανάπτυξης της καλλιέργειας, βασική εφαρμογή λιπασμάτων που περιέχουν άζωτο, φώσφορο, κάλιο και θείο είναι αναγκαία. Μελέτες έχουν δείξει ότι το θυμάρι αντιδρά θετικά στο άζωτο (Shalaby and Razin 1992, Dambrauskiene et al. 2002) ειδικότερα μετά την συγκομιδή. Η υπερβολική όμως εφαρμογή αζώτου επηρεάζει την ανάπτυξη, αλλά και την ποιότητα του παραγόμενου αιθέριου ελαίου. Πρόσφατα αποδείχθηκε ότι νεαρά φυτά θυμαριού παρουσιάζουν αύξηση της φωτοσύνθεσης και της παραγωγής βιομάζας σε υψηλές συγκεντρώσεις διοξειδίου του άνθρακα (Tisserat et al., 2002). Στην περίπτωση που πρόκειται να ενσωματώσουμε στο έδαφος οργανικό λίπασμα (π.χ. κοπριά) καλό είναι να προηγείται ανάλυση. Το θυμάρι σε παγκόσμιο επίπεδο καλλιεργείται με βιολογικό τρόπο και το παραγόμενο αιθέριο έλαιο αγοράζεται σε πολύ καλές τιμές.

1.11. Άρδευση

Το θυμάρι αντέχει στην έλλειψη νερού αλλά όταν του παρέχεται το αξιοποιεί πλήρως. Συστηματική στάγδην άρδευση με την αναγκαία ποσότητα νερού, έχει ευεργετικά αποτελέσματα στην απόδοση της καλλιέργειας ειδικότερα όταν η διάθεση του τελικού προϊόντος αφορά την νωπή μορφή του.

1.12. Έλεγχος ζιζανίων

Ο Έλεγχος των ζιζανίων στο θυμάρι όπως και σε όλες τις ποώδεις καλλιέργειες δεν είναι εύκολος. Συνήθως η καταπολέμηση των ζιζανίων γίνεται με σκαλίσματα. Για τον καλύτερο έλεγχο των ζιζανίων πριν την εγκατάσταση της καλλιέργειας καλό είναι να έχει προηγηθεί αγρανάπαυση του χωραφιού. Επικάλυψη του εδάφους με οργανικά υλικά επικάλυψης έχει δώσει καλά αποτελέσματα στον έλεγχο των ζιζανίων. Στην περίπτωση αυτή η χρήση και η εφαρμογή αυτών των υλικών γίνεται με τρόπο ώστε να μην ευνοείται η ανάπτυξη ασθενειών εδάφους. Έχουν αναφερθεί περιπτώσεις που χρησιμοποιήθηκαν υλικά επικάλυψης για την προστασία των φυτών από το κρύο και ευνοήθηκαν διάφοροι μύκητες εδάφους.

1.13. Εχθροί

Το θυμάρι συνήθως δεν προσβάλλεται από έντομα καθότι το πτητικό έλαιο του λειτουργεί απωθητικά. Ωστόσο έχουν παρατηρηθεί προσβολές από αλευρώδεις και τετράνυχο. Οι υποψήφιοι παραγωγοί που θα ασχοληθούν με την συγκεκριμένη

καλλιέργεια και προκειμένου να παράγουν ποιοτικό προϊόν, για την αντιμετώπιση των εχθρών, θα πρέπει να επιλέγουν φυσικές μεθόδους καταπολέμησης των επιβλαβών εντόμων εφαρμόζοντας ορθές γεωργικές πρακτικές. Είναι απαραίτητο να τηρούν ένα πρόγραμμα διαχείρισης για την αντιμετώπιση τους, με τακτική ανίχνευση της καλλιέργειας τους και να υιοθετούν την χρήση βιολογικών μεθόδων και σκευασμάτων, με φερομόνες και εξαπόλυση φυσικών θηρευτών, εκχυλίσματα φυτών κ.α.

1.14. Ασθένειες

Γενικά το θυμάρι δεν παρουσιάζει προβλήματα ασθενειών. Ωστόσο σε περιοχές με υψηλό ποσοστό βροχοπτώσεων και σε εδάφη με κακή αποστράγγιση προσβάλλεται από ασθένειες της ρίζας, του λαιμού αλλά και του υπέργειου τμήματος. Οι μύκητες που έχουν εντοπισθεί στην καλλιέργεια ανήκουν στα γένη *Armillaria*, *Rhizoctonia* ακόμη και *Botrytis*. Η προμήθεια υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού, η εφαρμογή κατάλληλων γεωργικών πρακτικών, η έγκαιρη ανίχνευση της καλλιέργειας, η ορθή διάγνωση των ασθενειών σε συνδυασμό με την χρήση των κατάλληλων βιολογικών σκευασμάτων έχουν καλά αποτελέσματα στην πρόληψη των ασθενειών και την προστασία της καλλιέργειας.

1.15. Συγκομιδή

Η έναρξη της συγκομιδής γίνεται το δεύτερο έτος. Η γνώση του κατάλληλου χρόνου πραγματοποίησης της αποτελεί βασική προϋπόθεση για την παραγωγή τελικού προϊόντος με τα καλύτερα ποιοτικά χαρακτηριστικά. Για παραγωγή αιθέριου ελαίου και ξηρής δρόγης η συγκομιδή γίνεται στην έναρξη της ανθήσεως. Για διάθεση νωπού προϊόντος συλλέγουμε τις κορυφές των βλαστών (πριν την άνθηση) έτσι ώστε τα φυτά να προάγουν ισχυρή νέα βλάστηση. Συνήθως στο θυμάρι έχουμε μια συγκομιδή ανά έτος, αλλά είναι δυνατόν να έχουμε 2-3 εφόσον η καλλιέργεια αρδεύεται. Η διαχείριση της συγκομιδής είναι πολύ κρίσιμη για την καλλιέργεια για αυτό σε υγρές περιοχές πρέπει να είναι συχνή και το ύψος κοπής υψηλό. Τα εργαλεία κοπής πρέπει να είναι κατάλληλα ώστε η χρήση τους να μην καταστρέφει τους βλαστούς και το χρονικό διάστημα μεταξύ των συγκομιδών να μην είναι μεγάλο.

1.16. Χειρισμός μετά την συγκομιδή

Η θερμοκρασία είναι ο πιο σημαντικός παράγοντας για τη διατήρηση της ποιότητας νωπού προϊόντος μετά από τη συγκομιδή. Η βέλτιστη θερμοκρασία μετά

τη συγκομιδή για το νωπό θυμάρι είναι 0° C. Στη θερμοκρασία αυτή το νωπό προϊόν μπορεί να διατηρηθεί από τρεις έως τέσσερις εβδομάδες (Cantwell και Reid 1986). Για την ξήρανση του θυμαριού υπάρχουν διάφορες μέθοδοι όπως η φυσική ξήρανση, η ξήρανση με ρεύμα ξηρού αέρα και η ξήρανση με βαθιά κατάψυξη (λυοφυλοποίηση). Η φυσική ξήρανση είναι αναμφίβολα η πιο παλιά και η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη μέθοδος επεξεργασίας. Χρειάζεται όμως προσοχή καθότι το θυμάρι πρέπει να ξηραίνεται σε θερμοκρασίες χαμηλότερες των 40° C ώστε το τελικό προϊόν, να διατηρεί το άρωμα του και το χρώμα του και να μην εξατμίζεται το αιθέριο έλαιο του. Η ξήρανση με ρεύμα ξηρού αέρα εφαρμόζεται σήμερα σε πολλές χώρες. Μετά την ξήρανση, τα φύλλα διαχωρίζονται από τους μίσχους και ακολουθεί το κοσκίνισμα. Το διεθνές πρότυπο προδιαγράφει (ISO 6754:1996) τα ποιοτικά χαρακτηριστικά που πρέπει να πληρεί το αποξηραμένο προϊόν. Στο αιθέριο έλαιο του θυμαριού υπάρχει ένα ευρύ φάσμα χημειότυπων, ανάλογα με την διαφοροποίηση στην εκατοστιαία περιεκτικότητα των συστατικών του. Τα κύρια συστατικά του είναι η θυμόλη, η καρβακρόλη, η λιναλοόλη, η γερανιόλη η α-τερπινεόλη, και το π-κυμένιο. Έτσι μπορεί να έχουμε *T. vulgaris* ct thymol, χημειότυπο θυμόλης (κόκκινο θυμάρι) ή το *T. vulgaris* ct. geraniol χημειότυπο γερανιόλης κ.λ.π. Οι πιο συχνοί χημειότυποι αιθέριου ελαίου θυμαριού είναι της θυμόλης και της καρβακρόλης. Τέτοιοι χημειότυποι χαρακτηρίζουν το αιθέριο έλαιο φυτών θυμαριού που καλλιεργούνται ή φύονται σε χαμηλά υψόμετρα κοντά σε παραθαλάσσιες περιοχές ενώ φυτά που καλλιεργούνται ή φύονται σε μεγαλύτερα υψόμετρα παράγουν αιθέριο έλαιο με χημειότυπο λιναλοόλης.

1.17. Συσκευασία – Αποθήκευση

Το θυμάρι ως νωπό προϊόν συσκευάζεται είτε σε φακελάκια από σελοφάν, όταν διατίθεται άμεσα σε καταστήματα και σούπερ μάρκετ είτε σε κατάλληλα αεροστεγώς κλεισμένα χαρτοκιβώτια όταν διατίθεται χύμα και μεταφέρεται σε μεγάλες αποστάσεις. Ως αποξηραμένο προϊόν, συσκευάζεται σε σκουρόχρωμες γυάλινες συσκευασίες και αποθηκεύεται σε κατάλληλους χώρους όπου η θερμοκρασία παραμένει κάτω από 18° C. Το αιθέριο έλαιο του θυμαριού μέχρι την διάθεση του φυλάσσεται σε δροσερό, ξηρό μέρος. Τοποθετείται σε σκουρόχρωμα αεροστεγή γυάλινα μπουκάλια και φροντίζουμε να μην εκτίθεται σε θερμότητα και σε βαρέα μέταλλα.

1.18. Αγορές

Η μεγάλη αγορά στον κόσμο για τα αιθέρια έλαια είναι οι Ηνωμένες Πολιτείες, ακολουθούμενες από την Ιαπωνία και την Ευρώπη. Ωστόσο, η παραγωγή συνεχίζει να συγκεντρώνεται στην Ευρώπη, με επτά από τις μεγαλύτερες εταιρείες επεξεργασίας αιθέριου ελαίου στον κόσμο. Η Ιαπωνία αντιπροσωπεύει το 10% της παγκόσμιας ζήτησης. Η канаδική αγορά κυριαρχείται από την βιομηχανία αρωμάτων των Ηνωμένων πολιτειών. Η Γαλλία κυριαρχεί στην αγορά αρωμάτων ανά τον κόσμο και η Ελβετία είναι ένας από τους ηγέτες στον φαρμακευτικό κλάδο. Η Βρετανία και η Ινδία είναι γνωστό ότι κατέχουν σημαντική θέση στον τομέα των αρωματικών. Οι περισσότερες χώρες εισάγουν αποξηραμένο θυμάρι κυρίως από την Ισπανία και το Μαρόκο που είναι και οι μεγαλύτερες παραγωγές χώρες παγκοσμίως.

1.19. Χώρες παραγωγής - Αποδόσεις

Σε πολλές χώρες συμπεριλαμβανομένης και της Ελλάδας τα παραγόμενα προϊόντα της καλλιέργειας διατίθενται στην αγορά είτε ως νωπά είτε ως αποξηραμένα. Οι αποδόσεις σε νωπό προϊόν κυμαίνονται από 5 έως 6 τόνους/εκτάριο (1 εκτάριο=10 στρέμματα) ενώ σε ξηρή δρόγη φθάνουν και τους 2 τόνους/εκτάριο. Οι αποδόσεις σε αιθέριο έλαιο κυμαίνονται από 0,05–0,5% ανάλογα με την ποικιλία. Στην περίπτωση που η καλλιέργεια αρδεύεται οι αποδόσεις σε νωπό προϊόν μπορούν να φθάσουν και τους 15 τόνους/εκτάριο με απόδοση σε αιθέριο έλαιο 0,5 έως 1% ή 75 έως 150 kg / εκτάριο ετησίως. Στην Ελβετία επιλεγμένες ποικιλίες αποδίδουν 3% σε αιθέριο έλαιο και συνολική παραγωγή σε νωπό προϊόν 15 τόνους / εκτάριο. Σε ξηρικές καλλιέργειες οι αποδόσεις διαφέρουν σημαντικά. Χώρες που παράγουν θυμάρι είναι κυρίως η Ισπανία, η Γαλλία, η Ελβετία, η Ιταλία, η Βουλγαρία, η Πορτογαλία και η Ελλάδα Το 90% περίπου της παγκόσμιας ποσότητας σε αιθέριο έλαιο θυμαριού παράγεται στην Ισπανία.

1.20. Φαρμακευτική χρήση

Το θυμάρι έχει μια πολύ μακρά ιστορία στη λαϊκή χρήση για ένα ευρύ φάσμα παθήσεων. Είναι το καλύτερο αντισηπτικό και απολυμαντικό βότανο το οποίο έχουμε στην διάθεσή μας. Την ιδιότητά του αυτή την οφείλει στη μεγάλη περιεκτικότητά του σε θυμόλη (thymol) την οποία έχει το αιθέριο έλαιό του. Η θυμόλη είναι μια ουσία αντιμικροβιακή, μυκητοκτόνος και είναι αποτελεσματική κατά της σαλμονέλας και του σταφυλόκοκκου

Ειδικότερα, το θυμάρι αποτιμάται για τις αντισηπτικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητές του., είναι ένα εξαιρετικό τονωτικό και χρησιμοποιείται στη θεραπεία αναπνευστικών ασθενειών και μια ποικιλία άλλων ασθενειών. Το θυμάρι θεραπεύει βρογχίτιδες, δυναμώνει το ανοσοποιητικό σε κάθε γρίπη ή κρύωμα, χαλαρώνει το σπαστικό βήχα, είναι αποχρεμπτικό, εμμηναγωγό και τονώνει το στομάχι. Η εσωτερική του λήψη ως αφέψημα ή βάμμα θέλει προσοχή στη δοσολογία επειδή είναι ένα βότανο δυνατό το οποίο μπορεί να προκαλέσει διάρροιες ή πονοκεφάλους. Επίσης δεν συνίσταται η μακροχρόνια εσωτερική του λήψη χωρίς την παρακολούθηση ειδικού διότι επηρεάζει την λειτουργία του θυρεοειδούς αδένος. Με το έλαιο (λάδι) ή το βάμμα του θυμαριού γίνονται εντριβές σε κρύωμα, γρίπη, συναίσθημα κόπωσης, αλλά και σε πονεμένες αρθρώσεις από αρθρικά ή εξαρθρώσεις στραμπουλήγματα κ.ά).

Χρησιμοποιείται το αιθέριο έλαιο του θυμαριού σαν φυτοπροστατευτικό προϊόν, φιλικό προς το περιβάλλον και προς τον άνθρωπο, για την αντιμετώπιση διαφόρων ασθενειών των φυτών. Έχει γίνει μελέτη για την επίδραση του αιθερίου ελαίου στην επιβίωση και την συμπεριφορά της *Macrosiphoniella sanborni* με βιοδοκιμές δίσκων φύλλων, διπλής επιλογής και μη επιλογής. Τα αποτελέσματα των βιοδοκιμών έδειξαν ότι το αιθέριο έλαιο έχει κάποια αποτρεπτική και τοξική δράση ιδιαίτερα στην συγκέντρωση 0,3%.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1.Υλικά

2.1.1 Υλικά απολύμανσης σπόρων και ιστών

Πριν την τοποθέτηση *in vitro* των ιστών προηγείται απολύμανση όπου χρησιμοποιούνται τα εξής υλικά:

- Χλωρίνη εμπορίου, που περιέχει 4,5 % NaOCL
- Αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερο

2.1.2. Υλικά θρεπτικού υποστρώματος *in vitro* καλλιέργειας

- a) Υπόστρωμα πλήρους MS (Murashige and Skoog, 1962) σε μορφή σκόνης, MS basal mixture της εταιρείας SIGMA.
- b) Σακχαρόζη (του εμπορίου)
- c) Βιταμίνες: μωϊνοζιτόλη της εταιρείας Merck, θειαμίνη(0,1-0,5 mg/L), της εταιρείας SIGMA, διαλύτης το νερό, πυριδοξίνη(0,5 mg/L), της εταιρείας Merck, διαλύτης το νερό, νικοτινικό οξύ(0,5 mg/L), της εταιρείας Merck, διαλύτης το νερό
- d) Αγαρ (Προμηθευτής Ρουμπουλάκης Α.Ε. Χημικά)

2.1.3. Δοχεία *in vitro* καλλιεργείων

Σε όλα τα στάδια της *in vitro* καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκαν

- Δοχεία τύπου magenta όγκου 120 ml.
- Τρυβλία Petri

2.1.4. Υπόστρωμα *in vitro* καλλιέργειας

Για την *in vitro* καλλιέργεια εκφύτων χρησιμοποιήθηκαν στερεά υποστρώματα με βάση το MS (Mourashige & Skoog, 1962). Στον Πίνακα 3 φαίνονται τα συστατικά (μακροστοιχεία-ιχνοστοιχεία) των υποστρωμάτων MS και ½ MS.

Πίνακας 3. Θρεπτικά συστατικά που περιέχονται στα θρεπτικά υποστρώματα MS και μισής δύναμης MS

Συστατικά	MS (mg/l)	½MS (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

2.2. Μέθοδοι

2.2.1 Μέθοδοι απολύμανσης, αποστείρωσης και εγκατάστασης φυτικού υλικού

2.2.1.1. Απολύμανση-εγκατάσταση εκφύτων

Σαν έκφυτα χρησιμοποιήθηκαν τμήματα βλαστού τρέχουσας βλάστησης από ενήλικα αυτοφυή φυτά που αυτοφύονταν στον Ταΰγετο και στην Βέργα (Καλαμάτα). Οι βλαστοί είχαν μήκος 10-15 cm.

Οι βλαστοί κόβονταν, σε μικρά τεμάχια χωρισμένοι σε βάση, μέσης και κορυφής, και τοποθετούνταν ξεχωριστά σε κωνική φιάλη με 200 ml αποστειρωμένο, αποσταγμένο νερό που περιείχε 15% χλωρίνη, υπό συνεχή ανάδευση για 10 min, υπό ασηπτικές συνθήκες σε τράπεζα νηματικής ροής (laminar flow cabinet). Ακολουθούσε ξέπλυμα 3 φορές με 200 ml αποσταγμένο, αποστειρωμένο νερό. Κάθε ξέπλυμα διαρκούσε 3 min και γινόταν υπό συνεχή ανάδευση.

Μετα την απολύμανση των βλαστών του *T. capitatus* μέσα σε τράπεζα νηματικής ροής (Laminar flow cabinet), πάνω σε αποστειρωμένο πλακάκι που τακτικά καθαριζόταν με καθαρή αλκοόλη 99% και με αποστειρωμένο νυστέρι και λαβίδα οι βλαστοί τεμαχίστηκαν σε έκφυτα βάσης, μέσης και κορυφής μήκους 5 mm. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε τριβλία με θρεπτικό υπόστρωμα MS/2, 5 έκφυτα ανά τριβλίο. Έπειτα τα τριβλία με τα εκφυτα τοποθετήθηκαν για επώαση σε θάλαμο σταθερών συνθηκών στους $25 \pm 1^\circ\text{C}$ με 16h φωτοπερίοδο υπό $37,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fluorescent συνεχές φως. Πριν την τοποθέτηση των εκφύτων του *Thymus capitatus* στο θρεπτικό υπόστρωμα, γινόταν επιφανειακή απολύμανση των ιστών. Γενικά, διαλέγονταν ιστοί υγιείς και πριν την απολύμανση πλένονταν με άφθονο τρεχούμενο νερό.

2.2.1.2. Αποστείρωση εργαλείων και υλικών

Η αποστείρωση των υλικών, των υποστρωμάτων και των εργαλείων, γινόταν σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης (Εικόνα 5) για 20 min, σε θερμοκρασία 121°C και πίεση 1.1 atm.

Όλα τα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν στις εμφυτεύσεις ή απολυμάνσεις όπως λαβίδες, νυστέρια, πλακάκι πάνω στο οποίο γίνονταν οι κοπές των εκφύτων, κωνικές φιάλες και δοχεία με αποσταγμένο νερό καλύπτονταν με φύλλο αλουμινίου.

Βιδωτά καπάκια σε δοχεία τοποθετούνταν κατά την αποστείρωση χαλαρά κλεισμένα μέσα στον κλίβανο.



Εικόνα 5. Κλίβανος υγρής αποστείρωσης

Μετά την εγκατάσταση των εκφύτων του *T. capitatus*, στα δοχεία καλλιέργειας, τοποθετήθηκαν για επώαση σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών όπου επώαστηκαν στις εξής συνθήκες: στους $25 \pm 1^\circ\text{C}$ με 16h φωτοπερίοδο υπό $37,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fluorescent συνεχές φως.

2.2.2. Μέθοδος παρασκευής θρεπτικών υποστρωμάτων

Σε δοχείο ζέσεως με αποσταγμένο νερό(όγκου λιγότερου του τελικού) προθέτονταν οι ακριβείς ποσότητες Murashige and Skoog(MS) 2,2 gr/L, σακχαρόζη 2%, myoinositol 50 mg/L, 0,5 mg/L BA, 0,25 mg/L IAA και αναδεύονταν με τη βοήθεια μαγνητικού 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 1M NaOH και 1M HCl. Ακολούθως προθέτονταν το άγαρ για τη σταθεροποίηση των υποστρωμάτων στην απαιτούμενη ποσότητα(0,6gr/L) και ακολουθούσε θέρμανση του διαλύματος υπό συνεχή ανάδευση μέχρι να διαλυθεί το

άγαρ. Έπειτα μοιράζονταν το διάλυμα ανά 15-20 ml σε κάθε τριβλίο Petri και σκεπάζονταν με το καπάκι τους.

2.2.3. Περιγραφή ειδικών εγκαταστάσεων

Θάλαμος ανάπτυξης φυτών

Θάλαμος διαστάσεων 4x4x3.5 με ειδική θερμομονωτική κάλυψη, διατήρησης θερμοκρασίας και σχετικής υγρασίας σε σταθερά επίπεδα (10-25° C και 60% αντίστοιχα) με δυνατότητα αυξομείωσης των τιμών αυτών. Οι συνθήκες αυτές εξασφαλίζονται με χρήση κεντρικού κλιματιστικού συστήματος ολικής ισχύος 22 Kw, αυτόματα ελεγχόμενου.

Με κατάλληλα απόλυτα φίλτρα εξασφαλίζεται η καθαρότητα του ανακυκλούμενου αέρα σε ποσοστό 99,999% (clean-air system).

Προβλέπεται η διάταξη, εντός του θαλάμου, 60 μεταλλικών ραφιών (τύπου Dexion) εκάστου διαστάσεων 76x92 τ.μ. και εφοδιασμένου με σύστημα φωτισμού αποτελούμενο από 2 λαμπτήρες φθορισμού COOL-WHITE ολικής εντάσεως 6.000 Lux και ισχύος 72W. Η τροφοδοσία των λαμπτήρων ελέγχεται από χρονοδιακόπτη.

Μέθοδος μέτρησης βλαστικότητας και αντίδρασης των εκφύτων.

2.2.4. Μέθοδος μέτρησης έκπτυξης και αντίδρασης των εκφύτων

Οι παρατηρήσεις της έκπτυξης πραγματοποιούνταν ανά δύο ημέρες με έναρξη τη ημέρα εγκατάστασής τους στο υπόστρωμα. Μετρήθηκαν το ποσοστό των εκφύτων που αντέδρασαν, ο αριθμός των βλαστών που σχηματίστηκαν, το μέσο μήκος των βλαστών και ο σχηματισμός ή όχι ριζών στην βάση των βλαστών.

2.3. Εγκατάσταση αρχικών καλλιεργειών

Εγκατάσταση εκφύτων πραγματοποιήθηκε δυο φορές στο τέλος της άνοιξης και στην αρχή του φθινοπώρου. Στόχος των αρχικών καλλιεργειών εγκατάστασης των εκφύτων ήταν η εξεύρεση μιας μεθόδου απολύμανσης του, η οποία θα εξασφάλιζε μικρό αριθμό μολύνσεων και ταυτόχρονα υψηλό ποσοστό επιβίωσης των εκφύτων. Ως απολυμαντικό όπως αναφέρθηκε χρησιμοποιήθηκε υδατικό διάλυμα χλωρίνης εμπορίου. Η πρώτη εγκατάσταση των εκφύτων πραγματοποιήθηκε στις 31 Μάιου του 2016. Έκφυτα συλλέχτηκαν από την περιοχή Βέργα της Καλαμάτας σε ελεύθερη από καλλιέργειες ημιορεινή περιοχή του όρους Καλάθι (παρακλάδι του Ταυγέτου). Τα φυτά του είδους είχαν ανθίσει και επιλεχθείσαν βλαστοί μη ανθισμένοι. Βλαστοί

μήκους 5 mm τοποθετήθηκαν σε δοχείο 100 ml με αποσταγμένο, αποστειρωμένο νερό που περιείχε 15% χλωρίνη. Οι βλαστοί παρέμειναν στο δοχείο για 10 min υπό συνεχή ανάδευση. Ακολούθησαν 3 ξεπλύματα με αποσταγμένο, αποστειρωμένο νερό διάρκειας 3 min υπό συνεχή ανάδευση. Από τους βλαστούς κόπηκαν και χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα κορυφής, μέσης και βάσης που τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα μισής δύναμης MS). και 1.5% σακχαρόζη. Συνολικά εγκαταστάθηκαν έκφυτα σε 12 τριβλία (4 με έκφυτα βάσης, 4 με έκφυτα μέσης, 4 με έκφυτα κορυφής).

Η δεύτερη εγκατάσταση των εκφύτων πραγματοποιήθηκε στις 28 Σεπτεμβρίου του 2016. Έκφυτα συλλέχτηκαν από την περιοχή Βέργα της Καλαμάτας σε ελεύθερη από καλλιέργειες ημιορεινή περιοχή του όρους Καλάθι (παρακλάδι του Ταυγέτου). Επειδή οι μολύνσεις στην πρώτη εγκατάσταση έφτασαν το 100% έγινε προσπάθεια καθαρισμού των βλαστών σε τρεχούμενο νερό βρύσης πριν κοπούν τα έκφυτα και τοποθετηθούν στο υδατικό διάλυμα χλωρίνης. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν όπως και στην πρώτη στο ίδιο διάλυμα χλωρίνης 15%, αυξήθηκε όμως ο χρόνος παραμονής των εκφύτων στο απολυμαντικό στα 13 min για καλύτερη καταπολέμηση των ασθενειών που είχαν τα εκφυτα. Ακολούθησαν 3 ξεπλύματα με αποσταγμένο, αποστειρωμένο νερό διάρκειας 3 min υπό συνεχή ανάδευση. Από τους βλαστούς κόπηκαν και χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα κορυφής, μέσης και βάσης που τοποθετήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα μισής δύναμης MS). και 1.5% σουκρόζη Συνολικά υπήρχαν 12 τριβλία (4 με έκφυτα βάσης, 4 με έκφυτα μέσης, 4 με έκφυτα κορυφής).

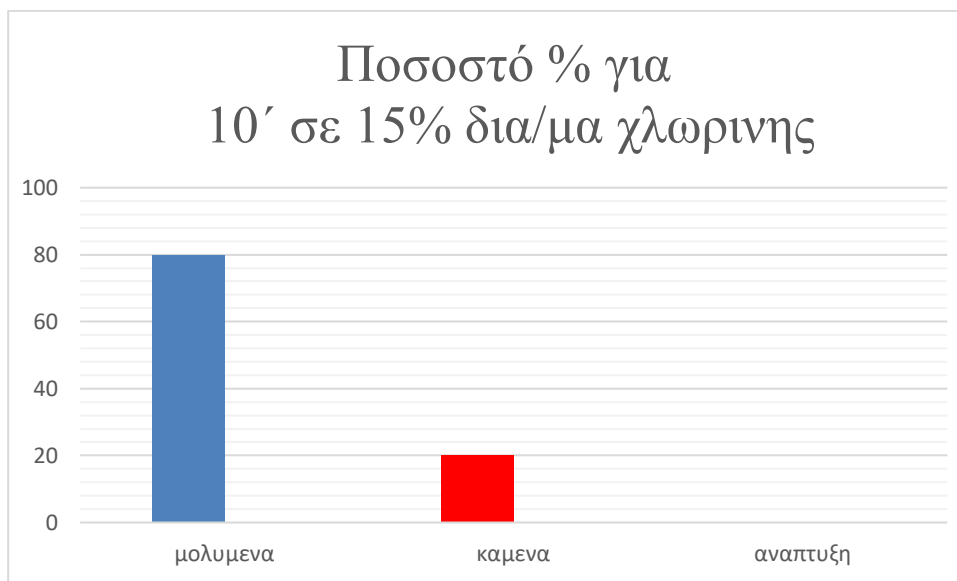
3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Τα έκφυτα που τοποθετήθηκαν κατά την πρώτη εγκατάσταση αρχικών καλλιεργειών μολύνθηκαν όλα, οι μολύνσεις εμφανίσθηκαν πολύ σύντομα (3 ημέρες μετά την τοποθέτησή τους στο υπόστρωμα). Παρόλο που μεταφέρθηκαν τα μη μολυσμένα σε καινούριο υπόστρωμα οι μολύνσεις συνεχίσθηκαν και τελικά όλα τα έκφυτα μολύνθηκαν. Φαίνεται ότι η περιεκτικότητα της χλωρίνης στο υδατικό διάλυμα απολύμανσης (15%) ήταν μικρή και επίσης ότι τα μητρικά αυτοφυή φυτά που τα οποία κόπηκαν τα έκφυτα έφεραν μεγάλο αριθμό μολύνσεων.

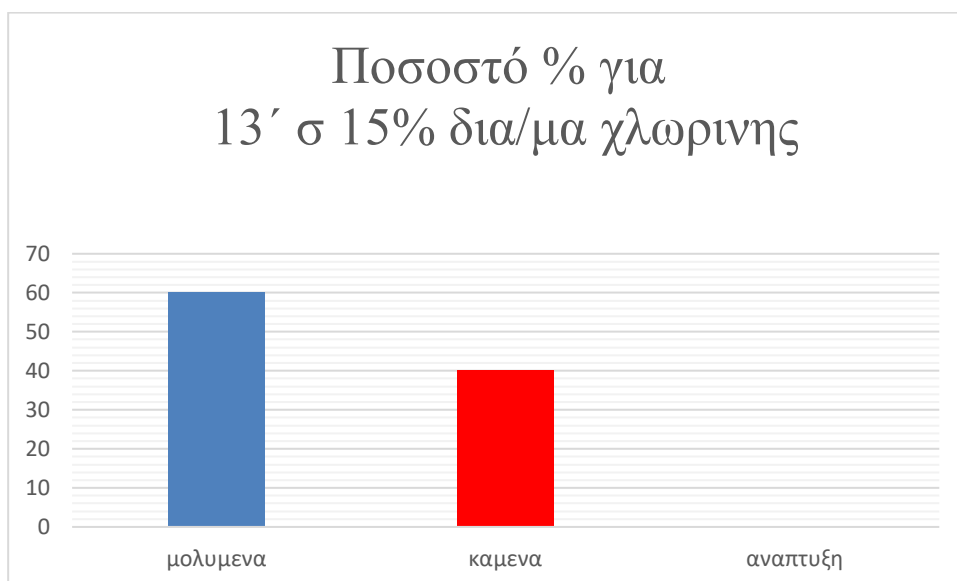
Στη δεύτερη εγκατάσταση αρχικών καλλιεργειών τα έκφυτα που τοποθετήθηκαν πριν την απολύμανσή τους ξεπλύθηκαν για αρκετή ώρα με καθαρό νερό βρύσης ώστε να μειωθεί το μικροβιακό φορτίο αυξήθηκε επίσης ο χρόνος παραμονής τους σε 15% διάλυμα χλωρίνης υπό συνεχή ανάδευση κατά 3 min (συνολικά δηλαδή παρέμειναν στο διάλυμα της χλωρίνης για 13 min). Επίσης πάλι μεταφέρθηκαν τα μη μολυσμένα σε καινούριο υπόστρωμα, οι μολύνσεις συνεχίσθηκαν και τελικά όλα τα έκφυτα μολύνθηκαν.

Όπως βλέπουμε στο Γράφημα 4 κατά την πρώτη καλλιέργεια εγκατάστασης, το ποσοστό των μολυσμένων εκφύτων μετά από απολύμανση των εκφύτων σε υδατικό διάλυμα χλωρίνης για 10 min έφτασε το 80%, ενώ το ποσοστό των καμένων ήταν στο 20%. Ενώ όπως φαίνεται στο Γράφημα 5, κατά την δεύτερη καλλιέργεια εγκατάστασης, το ποσοστό των μολυσμένων εκφύτων μετά από απολύμανση των εκφύτων σε υδατικό διάλυμα χλωρίνης για 13 min ήταν χαμηλότερο (60%), αυξήθηκε όμως το ποσοστό των καμένων εκφύτων (40%).

Γράφημα 4: Ποσοστό μολύνσεων (μπλε) και καμένων (κόκκινο) εκφύτων μετά την παραμονή τους για 10 min στο διάλυμα χλωρίνης.



Γράφημα 5: Ποσοστό μολύνσεων (μπλε) και καμένων (κόκκινο) εκφύτων μετά την παραμονή τους για 13 min στο διάλυμα χλωρίνης.



Παρατηρήθηκε ότι και στις δύο αρχικές καλλιέργειες εγκατάστασης εκφύτων, τα έκφυτα που κόπηκαν από τις κορυφές των βλαστών αντέδρασαν και σχηματίστηκαν βλαστοί ενώ αυτά της βάσης όχι.

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Κατά τη διάρκεια των πειραματικών διαδικασιών παρατηρήθηκαν έντονες μολύνσεις των εκφύτων. Πιθανά αίτια στα οποία οφείλονται οι εν λόγω μολύνσεις είναι:

1. Όπως έχει προαναφερθεί στα βοτανικά χαρακτηριστικά του μελετώμενου είδους στα στελέχη του παρατηρούνται πτυχώσεις με μικρό χνούδι και λεπτώς σχισμένο φλοιό. Όπως επίσης και τα φύλλα χαρακτηρίζονται από την παρουσία ποσότητας χνουδιού. Υπάρχει μεγάλη πιθανότητα τα ανατομικά χαρακτηριστικά να εμπόδιζαν την καλή απολύμανση των βλαστών και ως συνέπεια την παρουσία μολύνσεων στα έκφυτα.

2. Μια δεύτερη αιτία που πιθανόν να προκάλεσε τις μολύνσεις, είναι το αυξημένο μικροβιακό φορτίο των μητρικών φυτών αφού η συλλογή τους γινόταν απευθείας από τη φύση. Επίσης καθ' όλη τη διάρκεια των πειραματικών δοκιμασιών, δεν πραγματοποιήθηκαν πολλές βροχοπτώσεις. Με αποτέλεσμα τη συσσώρευση ρύπων στο καλλιεργούμενο είδος, όπου το πλύσιμο με υγρό απορρυπαντικό και με άφθονο καθαρό νερό πριν την απολύμανση δε συντέλεσε στη μείωση των μολύνσεων.

Στην πρώτη πειραματική δοκιμασία οι μολύνσεις έφτασαν το 80%, ενώ στην δεύτερη τα αποτελέσματα ήταν πάλι απογοητευτικά αφού ο περισσότερος χρόνος στο υδατικό διάλυμα χλωρίνης έκαψε τα περισσότερα έκφυτα. Η καλύτερη μέθοδος απολύμανσης ήταν αυτή όπου στο υδατικό διάλυμα περιέχονταν 15% χλωρίνη και ο χρόνος παραμονής των βλαστών σε αυτό ήταν 10 min.

Σε καλλιέργεια που πραγματοποιήθηκε τον Μάρτιο του 2017, το ποσοστό μολύνσεων ήταν πολύ χαμηλό και αντέδρασαν μόνο τα έκφυτα που προήλθαν από την κορυφή του φυτού.

Η κοπή των εκφύτων τέλος κατά τη χρονική περίοδο πριν την άνθηση των μητρικών φυτών, φαίνεται να έχει πολύ σημαντική επίδραση στην μετέπειτα αντίδρασή τους στην καλλιέργεια. Επίσης η κοπή τους από νεαρούς βλαστούς (πριν την άνθησή τους) που δεν έχουν αναπτύξει πλήρως το χνούδι γύρω από τα νεαρά σχηματισθέντα φύλλα, κάνει ευκολότερη την απολύμανσή τους και φυσικά περιέχεται σε αυτούς μικρότερο μικροβιακό φορτίο.

Κατάλληλη εποχή για λήψη εκφύτων θα φαίνεται να είναι η περίοδος πριν την άνθηση (το είδος στα χαμηλά υψόμετρα ανθίζει περί τα τέλη Μάιου), καθώς η λήψη εκφύτων μετά από την άνθηση οδήγησε σε αποτυχία εγκατάστασης των καλλιεργειών. Χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση της εποχής λήψης των εκφύτων καθώς και την εύρεση μεθόδου απολύμανσης που να ελαχιστοποιεί το ποσοστό των μολύνσεων και να μην προκαλεί νεκρώσεις στα έκφυτα.

ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Blazquez MA, Zafra-Polo MC (1989) Essential oil analysis of *Thymus godayanus*, an endemic species growing in northeastern Spain. *Pharmazie* 44: 651
- Farag RS, Ali MN, Taha SH (1990) Use of some essential oils as natural preservatives for butter. *J Am Oil Chem Soc* 67: 188–191
- Fleming S (ed) (1990) *Herbs*. Mitchell Beazley, New York
- Furmanowa M, Olszowska O (1992) Micropropagation of thyme (*Thymus vulgaris* L.). In: Bajaj YPS (ed) *Biotechnology in agriculture and forestry*, vol 19. High-Tech and Micropropagation III. Springer, Berlin Heidelberg New York, pp 230–243
- Ishikawa M, Shibuya K (1989) Breath-freshening dentifrices containing copper gluconate, a fluorine compound, and alkyl sulfates. *Eur Pat Appl* 16
- Kretchmer, M. (1989) Influence of different storage conditions on germination of spicesseeds. *Acta Horticulturae* 253: 99-103
- Marhuenda E, Menendez M, Lastra CA (1988) Constituents of essential oil of *Thymus carrtosus* Boiss. *J Chromatogr* 436: 103–106
- Morris JA, Khettry A, Seitz EW (1979) Antimicrobial activity of aroma chemicals and essential oils. *J Am Oil Chem Soc* 56: 595–603
- Tamura H., T. Takebayashi, H. Sugisawa(1993) *Thymus vulgaris* L. (Thyme): In *Vitro Culture and the Production of Secondary Metabolites V21*, pp 413-426
- Κίντζιος Σ. Ε. (1994). Επιχειρηματική ιστοκαλλιέργεια, Κατασκευή και διαχείριση επιχειρηματικών μονάδων παραγωγής ανθοκομικού πολλαπλασιαστικού υλικού με ιστοκαλλιέργεια. Εκδόσεις Α. Σταμούλης. Αθήνα-Πειραιάς.
- Παπαχατζής Α., Καλορίζου., (2008). Παραγωγή πολλαπλασιαστικού υλικού, pp 99-123
- <http://www.pfaf.org/user/plant.aspx?LatinName=Thymus+vulgaris>
- <http://www.botanical.com/botanical/mgmh/t/thygar16.html>
- <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4391421/>
- <http://www.missouribotanicalgarden.org/PlantFinder/PlantFinderDetails.aspx?kempercode=f970>
- <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1211/0022357022665/abstract>
- <http://www.mani.org.gr/hlorida/77thimari/th.htm>

<https://el.wikipedia.org/wiki/%CE%98%CF%85%CE%BC%CE%AC%CF%81%CE%B9>

[http://www.cell.com/immunology/pdf/0167-5699\(83\)90109-3.pdf](http://www.cell.com/immunology/pdf/0167-5699(83)90109-3.pdf)

<http://www.aaronsipphoto.com/galleries.php>

https://www.google.gr/imgres?imgurl=http%3A%2F%2Fwww.scielo.br%2Fimg%2Frevistas%2Frimtsp%2Fv54n5%2Fa08tab01.jpg&imgrefurl=http%3A%2F%2Fwww.scielo.br%2Fscielo.php%3Fscript%3Dsci_arttext%26pid%3DS0036-46652012000500008&docid=dKV01AuUmimQjM&tbnid=pc3g2CkkJfJIwM%3A&vet=10ahUKEwjAkMzGut3SAhVJUBQKHXPnAz8QMwghKAkwCQ..i&w=825&h=673&bih=628&biw=1422&q=thymus%20capitatus%20morphology&ved=0ahUKEwjAkMzGut3SAhVJUBQKHXPnAz8QMwghKAkwCQ&iact=mrc&uact=8#h=673&imgrc=pc3g2CkkJfJIwM:&vet=10ahUKEwjAkMzGut3SAhVJUBQKHXPnAz8QMwghKAkwCQ..i&w=825

<http://agrosimvoulos.gr/kalliergeia-thimari/>

http://www.gaiapedia.gr/gaiapedia/index.php/%CE%98%CF%85%CE%BC%CE%AC%CF%81%CE%B9_%CF%86%CF%85%CF%84%CF%8C