

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



ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΘΕΜΑ:

Μικροπολλαπλασιασμός του είδους *Clematis cirrhosa*

Σπουδάστρια: ΜΟΙΡΙΣΚΛΑΒΟΥ ΓΡΗΓΟΡΙΑ



Καλαμάτα 2016

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

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΕΡΓΑΣΙΑ

ΘΕΜΑ:

Μικροπολλαπλασιασμός του είδους *Clematis cirrhosa*

Εποπτεύων Καθηγητής : ΔΡ. ΚΑΡΤΣΩΝΑΣ ΕΠΑΜΕΙΝΩΝΤΑΣ

Σπουδάστρια: ΜΟΙΡΙΣΚΛΑΒΟΥ ΓΡΗΓΟΡΙΑ

ΚΑΛΑΜΑΤΑ 2016

*Στους γονείς μου,
Για την εμπιστοσύνη τους
την στήριξη τους και
την αγάπη τους.*

Ευχαριστίες

Ευχαριστώ θερμά τον Κύριο Επαμεινώνδα Κάρτσωνα για την καθοδήγηση και την πολύτιμη βοήθεια του καθ' όλη την διάρκεια των σπουδών μου και φυσικά στην δημιουργία της πτυχιακής μου.

Επίσης ένα μεγάλο ευχαριστώ στους γονείς μου Σπύρο και Χριστοφία για την εμπιστοσύνη τους και την στήριξη τους όλα αυτά τα χρόνια.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΓΕΝΙΚΑ	8
ΕΙΣΑΓΩΓΗ	8
Πλεονεκτήματα μικροπολλαπλασιασμού	10
Μειονεκτήματα μικροπολλαπλασιασμού	10
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι	11
ΚΛΗΜΑΤΙΔΕΣ	11
Ονομασία-Καταγωγή-Σημασία	11
Βοτανικά χαρακτηριστικά	11
Εδαφοκλιματικές Απαιτήσεις	12
Ειδικές φροντίδες	13
Εχθροί & ασθένειες	13
Πολλαπλασιασμός	13
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ	14
Κληματίδα η Κηρώδης- <i>Clematis cirrhosa</i>	14
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ	15
Υλικά και μέθοδοι	15
3.1 Υλικά	15
3.1.1. Φυτικό υλικό	15
3.1.2. Υλικά απολύμανσης σπόρων	15
3.1.3. Υλικά θρεπτικού υποστρώματος καλλιέργειας in vitro	15
3.1.4. Δοχεία in vitro καλλιέργειας	16
3.1.5. Υπόστρωμα in vitro καλλιέργειας	16
3.2 Μέθοδοι	17
3.2.1 Μέθοδος παρασκευής θρεπτικών υποστρωμάτων.....	17
3.2.2. Περιγραφή ειδικών εγκαταστάσεων.....	18
3.2.3. Αποστείρωση υλικών – Κοπή εκφύτων – Επώαση	19
3.2.4 Μέθοδος μέτρησης βλαστικότητας σπόρου του είδους <i>Clematis cirrhosa</i> και αντίδρασης των εκφύτων.....	22
3.2.5 Εκτίμηση αποτελεσμάτων.....	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙV.....	23
4.1. Αποτελέσματα.....	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ V.....	26

Βιβλιογραφία.....28

ΓΕΝΙΚΑ

ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Όπως κάθε άτομο είναι διαφορετικό και μοναδικό έτσι είναι και τα φυτά. Έχουν και αυτά τα δικά τους χαρακτηριστικά και γνωρίσματα και διαφοροποιούνται από το χρώμα τους , το άρωμα τους , την χρήση τους , τις ιδιότητες τους , την προσφορά τους στην φύση ή/και στον άνθρωπο κλπ . Για χρόνια οι ερευνητές προσπαθούσαν να βρουν τρόπους για να αναπαράγουν φυτά με τα ίδια χαρακτηριστικά.

Τα φυτά συνήθως αναπαράγονται με σπόρο δηλαδή με τον εγγενή τρόπο. Ο σπόρος περιέχει το γενετικό υλικό, το οποίο όμως και αυτό έχει προέλθει από τον συνδυασμό του γενετικού υλικού των μητρικών φυτών και δίνει φυτά με απροσδόκητα μοναδικά χαρακτηριστικά.

Όμως αυτή η έλλειψη προγνωσιμότητας της σταθερότητας των χαρακτηριστικών αυτών είναι και το μείζον πρόβλημα για τους καλλιεργητές και για την λύση του απαιτούνται χρόνια δουλειάς στο θερμοκήπιο ώστε να αναπαραχθεί ένα φυτό με συγκεκριμένα πλέον χαρακτηριστικά. Πολλοί πιστεύουμε ότι τα φυτά αναπαράγονται μόνο με σπόρο αλλά οι ερευνητές έχουν αναπτύξει καινούργιες μεθόδους ώστε να αναπαράγουν φυτά με τα ίδια χαρακτηριστικά και χωρίς σπόρο. Μια από αυτές τις μεθόδους είναι η Ιστοκαλλιέργεια.

Η ιστοκαλλιέργεια είναι εργαστηριακή μέθοδος ανάπτυξης φυτών μέσω της απομόνωσης φυτικών κυττάρων, ιστών και οργάνων του φυτού και θρέψης του με εξειδικευμένα θρεπτικά στοιχεία. Κάτω από ιδανικές συνθήκες μπορεί να αναπαραχθεί ένα ολοκληρωμένο φυτό από ένα μόνο φυτικό κύτταρο , ιστό ή όργανο .

Η ιστοκαλλιέργεια είναι μια μέθοδος που υπάρχει εδώ και περίπου τριάντα χρόνια και συνεχώς εξελίσσεται. Είναι μια εξαιρετική τεχνολογία που χρησιμοποιείται στις αναπτυγμένες χώρες για να αναπαράγουν φυτά απαλλαγμένα από ιούς, υψηλής ποιότητας πολλαπλασιαστικό υλικό και ταχεία παραγωγή ίδιων φυτών.

Ο μικροπολλαπλασιασμός είναι μια μορφή της ιστοκαλλιέργειας που αυξάνει το πολλαπλασιαστικό υλικό για την διευκόλυνση της παραγωγής και για την μεγάλη κλίμακα φύτευσης . Με αυτό τον τρόπο χιλιάδες «αντίγραφα» των φυτών μπορούν να αναπαραχθούν σε μικρό χρονικό διάστημα.

Ο μικροπολλαπλασιασμός σαν τεχνική περιλαμβάνει την αποκοπή ενός μικρού τμήματος από το γονικό φυτό, την απαλλαγή του από μικροοργανισμούς (αποστείρωση) και την τοποθέτησή του σε θρεπτικό υλικό για καλλιέργεια. Αυτό το αρχικό φυτικό τμήμα που μπορεί να είναι ένα μόσχευμα ή μικρομόσχευμα ονομάζεται έκφυτο (explant) και αποτελεί τη βασική μονάδα για κάθε ιστοκαλλιέργεια και μικροπολλαπλασιασμό.

Τα φυτά που έχουν προέλθει από τον μικροπολλαπλασιασμό έχει παρατηρηθεί ότι αναπτύσσονται πιο γρήγορα, μεγαλώνουν και γίνονται πιο ζωντά, ψηλότερα, έχουν μικρότερο και πιο ομοιόμορφο κύκλο παραγωγής και παράγουν φυτά με υψηλότερες αποδόσεις σε αντίθεση με τους συμβατικούς τρόπους αναπαραγωγής.

Η ιστοκαλλιέργεια είναι μια απλή τεχνική και πολλές αναπτυγμένες χώρες την έχουν εξειδικεύσει. Η εφαρμογή απαιτεί ένα αποστειρωμένο θερμοκηπιακό περιβάλλον και εξειδικευμένο προσωπικό. Συγχρόνως όμως είναι και μια δαπανηρή μέθοδος που απαιτεί πολύ χρόνο και ανάλογη εργασία. Τα φυτά που είναι σημαντικά για τις αναπτυσσόμενες χώρες και αναπαράγονται με ιστοκαλλιέργεια είναι η τομάτα, η μελιτζάνα, ο ανανάς, η γλυκοπατάτα, η μπανάνα, κ.α. ([http://www.isaaa.org/Kc/inforesources/publications/biotechnagriculture/Tissue_Culture_and_Micropropagation .htm](http://www.isaaa.org/Kc/inforesources/publications/biotechnagriculture/Tissue_Culture_and_Micropropagation.htm))

Η Ιστοκαλλιέργεια μπορεί να εφαρμοστεί για:

➤ Πολλαπλασιασμό Φυτών

Η αναπαραγωγή φυτικού υλικού με την ιστοκαλλιέργεια και την μεριστωματική καλλιέργεια έχει αρκετά μεγάλη εφαρμογή σε ανθοκομικά φυτά που δεν αναπαράγονται με σπόρο, όπως είναι , η μπανάνα, η γλυκοπατάτα κ.α. με δυνατότητες γρήγορης και εύκολης παραγωγής πιστοποιημένων κλώνων ενός φυτού.

➤ Εξάλειψη ασθενειών

Καλλιεργώντας ακόμη και από προσβεβλημένα φυτά, το κορυφαίο μερίστωμα, το οποίο συνήθως δεν έχει ιούς, αποκτώνται υγιή φυτά.

➤ Βελτίωση Φυτών

Η δυνατότητα απόκτησης μεγάλου αριθμού φυτών σε συνδυασμό με τη γενετική αστάθεια που υπάρχει σε καλλιέργεια κάλλου ή αιωρήματος μας δίνει τη δυνατότητα να εφαρμόζονται σε προγράμματα βελτίωσης. Μεταλλαγές μπορούν να

προκληθούν τεχνητά με τη χρήση χημικών ουσιών ή με διάφορες ακτινοβολίες. Με τον τρόπο αυτό είναι δυνατόν να επιτευχθούν κλώνοι ανθεκτικοί σε κάποια ασθένεια ή ακόμη και πιο παραγωγικοί.

- Συντήρηση γενετικού υλικού

Είναι δυνατή η συντήρηση φυτικού υλικού σε περιορισμένο χώρο με μικρό κόστος. Η τράπεζα γενετικού υλικού που δημιουργείται με τον τρόπο αυτόν έχει μεγάλη σημασία για την εφαρμογή προγραμμάτων βελτίωσης γενετικού υλικού, εξάλειψη ασθενειών, πολλαπλασιασμού κτλ. (Κραβαδίτης 2002)

ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ

- Φυτά απαλλαγμένα από ιούς
- Μεγάλη παραγωγή φυτών
- Παράγεται σε μικρό χώρο

ΜΕΙΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ

- Υψηλό κόστος
- Εξειδικευμένο προσωπικό

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι

ΚΛΗΜΑΤΙΔΕΣ

Ονομασία-Καταγωγή-Σημασία

Η κληματίδα είναι ένα γένος με πάνω από 300 είδη στο πλαίσιο της οικογένειας Ranunculaceae.

Τα υβρίδια του αναρριχόμενου αυτού φυτού είναι πολύ διάσημα ανάμεσα στους επαγγελματίες κηπουρούς, αρχίζοντας με το είδος *clematis jackmanii* που έχει εντοπισθεί σε κήπους από το 1862.

Στις μέρες μας περισσότερες ποικιλίες υβριδίων παράγονται συνεχώς.

Οι κληματίδες είναι κυρίως Κινεζικής και Ιαπωνικής καταγωγής. Όσον αφορά την ονομασία των φυτών πέρα από την προσφώνηση Κληματίδα για κάποια είδη υπάρχει ακόμη ένα όνομα όπως για παράδειγμα για το είδος *clematis vitalba* ονομάζεται και αλλιώς «Η χαρά του ταξιδευτή» (traveller's joy) εφεύρεση του Βρετανού βοτανολόγου John Gerard.

Η ονομασία του γένους έχει Ελληνικές ρίζες *clematis* δηλαδή κληματίδα. Πάνω από 250 είδη που καλλιεργούνται παίρνουν την ονομασία τους από κάποιο χαρακτηριστικό ή ιδιότητα τους.

Βοτανικά χαρακτηριστικά

Όσον αφορά την μορφολογία τους είναι ποώδη πολυετή, ξυλώδη αρκετά εύθραυστα, αναρριχόμενα με την βοήθεια μίσχων.

Τα φύλλα είναι αντίθετα σύνθετα, πτερωτά, έλλογα, σπανίως ακέραια και έμμισχα.

Ευδοκιμούν σε εύκρατα και τροπικά κλίματα, τα χαμηλότερης θερμοκρασίας είδη είναι φυλλοβόλα ενώ των υψηλότερων θερμοκρασιών είναι αιθαλή.

Τα άνθη ποικίλουν ως προς το χρώμα μπορεί να είναι λευκά ρόδινα, μώβ κτλ. Άνθη μονήρη. Κάλυκας κανονικός ακτινωτός με 4-5 σέπαλα πεταλοειδή-έγχρωμα.

Κληματίδα

Επιστημονική Ταξινόμηση

Άθροισμα: plantae

Υποάθροισμα: Eudicots

Κλάση: Ranunculales

Οικογένεια: Ranunculaceae

Γένος: Clematis

Είδος:-

Τα πέταλα είναι μικρά ή δεν υπάρχουν, οι στήμονες είναι πολυάριθμοι ύπερος είναι σύνθετος με πολλά χωρισμένα καρπόφυλλα εκ των οποίων το κάθε ένα από αυτά αποτελεί την ωθήκη, ο στύλος είναι επιμυκής μετά την άνθηση και καταλήγει σε πτερόμορφο μεταξοειδή αθέρα που μετατρέπεται μετά την ωρίμανση σε ένα ομοιόμορφο αχαίνιο.

Η ανθοφορία κατά την διάρκεια της άνοιξης πραγματοποιείται σε βλαστούς προηγούμενου έτους ενώ κατά την διάρκεια του καλοκαιριού ανθοφορούν μόνο οι άκρες των νεαρών μίσχων. (<https://en.wikipedia.org/wiki/Clematis>)

Εδαφοκλιματικές απαιτήσεις

Η κληματίδα είναι από τα πιο ενδιαφέροντα αναρριχώμενα φυτά. Μπορεί να μεγαλώσει σε γλάστρα ή στο έδαφος και να καλύψει τοίχους, πέργκολες & καφασωτά. Σε εξοχικούς κήπους μπορεί να αναπτυχθεί ελεύθερα πάνω σε θάμνους και δέντρα για ένα πιο φυσικό αποτέλεσμα.

Έδαφος

Η κληματίδα προτιμά το χώμα που έχει μεγάλη υδατοχωρητικότητα αλλά και καλή αποστράγγιση. Αναπτύσσονται καλά σε αμμοπηλώδη εδάφη πλούσια σε οργανική ουσία που αποστραγγίζουν καλά.

Κλίμα

Οι ποώδεις ποικιλίες προτιμούν τις ηλιόλουστες θέσεις που παρέχουν σκιά στη βάση του φυτού ενώ οι αναρριχώμενες ποικιλίες τις ηλιόλουστες ή ημισκιερές θέσεις . Για να εξασφαλιστεί η απαιτούμενη σκιά στη βάση του φυτού μπορούν να φυτευτούν θάμνοι μικρής ανάπτυξης στη βάση των κληματίδων.

Χρειάζονται προστασία από τον αέρα, για να κρατήσουν τα άνθη τους.

Είναι ανθεκτικά στις χαμηλές θερμοκρασίες αλλά υποφέρουν από ανοιξιάτικους παγετούς. Παγώνουν στους -15°C .

Λίπανση και πότισμα

Οι κληματίδες χρειάζονται λίπασμα πλούσιο σε κάλιο (εφαρμόζουμε τέλη του χειμώνα- αρχές άνοιξης). Χρειάζονται τακτική λίπανση ενώ κάθε άνοιξη πρέπει να εμπλουτίζεται το χώμα γύρω από τον κορμό με κοπριά ή κομπόστ

Απαιτείται τακτικό πότισμα κατά τις ξηρές περιόδους στα πρώτα χρόνια εγκατάστασης του φυτού..

Κλάδεμα

Οι περισσότερες κληματίδες ανθίζουν στους βλαστούς την νέας βλάστησης και κλαδεύονται χαμηλά στο τέλος του χειμώνα, όταν έχει περάσει ο κίνδυνος των παγετών. Έτσι δημιουργούν περισσότερους βλαστούς την επόμενη περίοδο και περισσότερα άνθη.

Τα είδη που ανθίζουν σε βλαστούς του προηγούμενου έτους, κλαδεύονται το φθινόπωρο μετά την άνθιση.

Ειδικές φροντίδες

Η βάση της κληματίδας και οι ρίζες πρέπει να διατηρούνται δροσερές. Αυτό επιτυγχάνεται είτε με τη φύτευση άλλων φυτών στην μπροστινή σειρά είτε καλύπτοντας το χώμα με χαλίκι ή κάποιο οργανικό υλικό εδαφοκάλυψης.

Εχθροί και Ασθένειες

Ο εχθρός της κληματίδας είναι ο μύκητας *Phoma clematidina* οποίος προκαλεί μάρανση στα περισσότερα είδη της κληματίδας . Τα συμπτώματα είναι σημάδια πάνω στα φύλλα, μάρανση των φύλλων, των μίσχων και τέλος όλου του φυτού του οποίου η προσβολή μπορεί να αρχίσει μαυρίζοντας αρχικά το φυτό εσωτερικά των μίσχων ακόμα και από το σημείο της επαφής με το χώμα. Συχνά προσβεβλημένα φυτά που αναπτύσσονται σε γλάστρες εμφανίζουν και σηψιρριζία..

(<http://www.gardenguide.gr/%CE%BA%CE%BB%CE%B7%CE%BC%CE%B1%CF%84%CE%AF%CE%B4%CE%B1-clematis-spp-ranunculaceae/>)

Πολλαπλασιασμός

Πολλαπλασιασμός / Μέθοδοι

Οι κληματίδες πολλαπλασιάζονται με τις ακόλουθες μεθόδους :

- Εύκολα με καταβολάδες την άνοιξη ή το φθινόπωρο.
- Με σπόρο που σπέρνεται αμέσως μετά τη συλλογή του, το φθινόπωρο.
- Με μοσχεύματα σκληρού ξύλου το φθινόπωρο ή μαλακού την άνοιξη.

Οι ποικιλίες προκύπτουν με εμβολιασμό στα αυτοφυή είδη *C. viticalla* και *C. flammula*.

➤ Με καλλιέργεια *in vitro*.

Η *in vitro* καλλιέργεια είναι ένας νέος τρόπος πολλαπλασιασμού για την καλλιέργεια της Κληματίδας . Τα πλεονεκτήματα αυτής της μεθόδου έναντι των ανωτέρων παραδοσιακών τεχνικών είναι ότι , δίνει υγιές υλικό πιστοποιημένο από πλευράς ποικιλίας και μεγάλο αριθμό φυτών σε σύντομο χρονικό διάστημα.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II

Κληματίδα η Κηρώδης – *Clematis cirrhosa*

Η κληματίδα η Κηρώδης είναι ένα αναρριχώμενο φυτό, που ο βλαστός του διακλαδίζεται και μπορεί να φθάσει από 6 έως 9 μέτρα.

Έχει φύλλα οδοντωτά, σε σχήμα φτερού, σύνθετα και άνθη που βγαίνουν πολλά μαζί με 5 σέπαλα, πολλούς στήμονες και σε χρώμα ασπροκίτρινο ή πρασινοκίτρινο που αναδύουν μια όμορφη ξεχωριστή οσμή.

Οι καρποί του είναι σύνθετοι με αχάινια (κάτι σαν τριχούλες) . Ανθίζει από το Μάιο μέχρι τον Αύγουστο. Προτιμάει εδάφη φτωχά σε ασβέστιο.

Η κληματίδα χρησιμοποιείται σαν φαρμακευτικό φυτό. Είναι επίσης και μελισσοκομικό φυτό.

Τα φύλλα της χρησιμοποιούνταν σαν επουλωτικό για τις πληγές των ζώων. Επίσης τα φύλλα και ο κορμός χρησιμοποιούνται με μορφή εγχύματος ή αλοιφής ως καθαρτικό, διουρητικό, αντισπαστικό και αναλγητικό για να καταπραΰνει πόνους και φαγούρες. Χρειάζεται όμως ιδιαίτερη προσοχή, διότι πολλά είδη κληματίδας είναι δηλητηριώδη.

Πολλά είδη κληματίδας καλλιεργούνται ως καλλωπιστικά φυτά για να ομορφαίνουν κήπους και πάρκα.

Στην Ελλάδα συναντούμε την Κηρώδη Κληματίδα κυρίως ως αυτοφυές, μπορούμε να συναντήσουμε το φυτό κυρίως στην Αμοργό και στην Αττική στην περιοχή του Υμηττού.

Σημείωση: Δυστυχώς δεν υπάρχει επαρκή βιβλιογραφία διότι δεν έχει μελετηθεί επαρκώς το συγκεκριμένο είδος Κληματίδας. Ευελπιστούμε στο μέλλον να υπάρξουν περαιτέρω μελέτες.(<http://oikokyr.blogspot.gr/2013/12/41.html>)

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΥΛΙΚΑ

3.1.1. ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Ο σπόρος του είδους *Clematis cirrhosa* που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα *in vitro* ήταν συλλογής του Σεπτεμβρίου 2013. Οι κάψες επιλέχθηκαν από υγιή φυτά τα οποία αναπτύσσονταν στο αγρόκτημα του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών. Αφού εγκαταστάθηκαν σπορόφυτα του είδους και βλάστησαν *in vitro*, στη συνέχεια υποκαλλιεργούνταν ανά 40 ημέρες για να επιτευχθεί πολλαπλασιασμός των καλλιεργειών.

3.1.2. ΥΛΙΚΑ ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗΣ ΣΠΟΡΩΝ

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

Χλωρίνη εμπορίου, που περιέχει 4,5 % NaOCL

Προσκολλητική ουσία Tween-20 (Polyxyethylenesorbitan Monolaurate) της εταιρίας MERCK.

3.1.3. ΥΛΙΚΑ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ *in vitro*

Υπόστρωμα MS (Mourashige and Skoog, 1962) σε σκόνη χωρίς IAA, Kinetin της εταιρίας ICN BIOMEDICALS.

Σουκρόζη εμπορίου

Μυοινοζιτόλη (Myo-inositol) M.B.= 180,16(της εταιρείας Merck)

Άγαρ της εταιρίας Ρουμπουλάκης Α.Ε.

3.1.4. ΔΟΧΕΙΑ *in vitro* ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Σε όλα τα στάδια της *in vitro* καλλιέργειας χρησιμοποιήθηκαν Τρυβλία Petri

3.1.5. ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ *in vitro* ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ

Για την *in vitro* βλάστηση σπόρων χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα με βάση το MS. Χρησιμοποιήθηκε μισής δύναμης MS (Mourashige & Skoog, 1962). Στον πίνακα 1 φαίνονται τα συστατικά του θρεπτικού υποστρώματος.

Πίνακας 1:Συστατικά (μακροστοιχεία-ιχνοστοιχεία) των υποστρωμάτων MS και ½ MS (Mourashige & Skoog, 1962).

<u>Συστατικά</u>	<u>MS (mg/l)</u>	<u>½MS (mg/l)</u>
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

Όλα τα υποστρώματα σταθεροποιήθηκαν με 8g l^{-1} άγαρ. Το pH όλων των υποστρωμάτων ρυθμιζόταν με αραιό HCL ή αραιό NaOH 1 N στην τιμή 5,7 πριν την τοποθέτηση του άγαρ και την αποστείρωση.

3.2 ΜΕΘΟΔΟΙ

3.2.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ

Σε αποσταγμένο νερό όγκου λιγότερου του τελικού προσθέτονταν οι ακριβείς ποσότητες (αναλόγως του όγκου του υπό Παρασκευή υποστρώματος) MS (Murashige και Skoog) Σουκρόζης και Μυοινοζιτόλης και αναδεύονταν με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα μέχρι να διαλυθούν. Ακολουθούσε η ογκομέτρηση (προσθήκη απεσταγμένου νερού ως τον επιθυμητό όγκο) και στη συνέχεια ρύθμιση του pH στην τιμή 5,6 της κλίμακας. Στη συνέχεια προσθέτονταν το άγαρ και ακολουθούσε θέρμανση υπό συνεχή ανάδευση μέχρι να διαλυθεί το άγαρ. Έπειτα μοιράζονταν το διάλυμα ανά 15 ml σε κάθε τριβλίο.

Για το φυτό *Clematis cirrhosa* χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υπόστρωμα Murashige και Skoog με PH 5,7.

Για την παρασκευή ενός (1) λίτρου θρεπτικού υλικού ακολουθήθηκε η παρακάτω διαδικασία:

Σε μικρή σχετικά ποσότητα νερού (300-500πl) διαλύθηκαν :

- 100 χιλιοστογραμμάρια μυο-ινοσιτόλης
- 30 γραμμάρια σακχαρόζης και μετά τη διάλυση αυτών

- Χρησιμοποιήθηκαν τρία διαλύματα Α(MS 4-3 κανονικό) Β(MS/2 μισο) Γ (MS/4 ένα τέταρτο θρεπτικού διαλύματος)

Μετά την ανάμειξη όλων των παραπάνω και τη προσθήκη 7-8 γραμμάρια αγαρόζης συμπληρώθηκε ο όγκος των 1000ml με σταδιακή προσθήκη διπλά αποσταγμένου νερού υπό συνεχή ανάδευση.

Στη συνέχεια το διάλυμα θερμαινόταν σε θερμαντικό σώμα εφοδιασμένο με μαγνητικό αναδευτήρα.

Το άγαρ προστίθενταν αφού η θερμοκρασία γινόταν αρκετά υψηλή (60-70° C). Πριν την πρόσθεση του άγαρ γίνονταν πεχαμέτρηση του διαλύματος. Το pH ρυθμιζόνταν στο 5,6-5,7.

Όταν με την θέρμανση και ανάδευση διαλυόταν το άγαρ και γινόταν πλήρης ομογενοποίηση, το διάλυμα απομακρυνόταν από το θερμαντικό σώμα και τοποθετούνταν σε τριβλία και βαζάκια τα οποία κλείνονταν και στην συνέχεια ακολούθησε η αποστείρωση αυτών και του υλικού. Αυτή γινόταν στον κλίβανο (autoclave), με υδρατμό 120°C που παράγονταν από το βρασμό νερού από πίεση 2 atm και διαρκούσε 15-20 λεπτά. Επιβάλλονταν η αποστείρωση να γίνεται σε όσο το δυνατόν συντομότερο χρονικό διάστημα μετά το γέμισμα των τριβλίων και των βαζακίων, για να μη δίνεται η ευκαιρία στους μικροοργανισμούς που ήδη υπήρχαν στο υπόστρωμα καλλιέργειας να αναπτυχθούν και να το αχρηστεύσουν. Συνήθως γινόταν την ίδια μέρα της παρασκευής του υποστρώματος ή το αργότερο την επομένη, γιατί παρατηρήθηκε ότι μετά το πέρασμα 24 ωρών χωρίς αποστείρωση, το υλικό παρουσίαζε ανάπτυξη μικροοργανισμών. Τέτοιες μολύνσεις του υλικού, ειδικά όταν ο καιρός ήταν ζεστός (καλοκαίρι) και η θερμοκρασία του περιβάλλοντος αρκετά υψηλή, ώστε να ευνοεί την ανάπτυξη των μικροοργανισμών, παρατηρήθηκαν και σε μικρότερο χρονικό διάστημα από 24 ώρες και μάλιστα μέσα σε 15-18 ώρες.

3.2.2. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΕΔΙΚΩΝ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΕΩΝ

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.

3.2.3. ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ ΥΛΙΚΩΝ –ΚΟΠΗ ΕΚΦΥΤΩΝ – ΕΠΩΑΣΗ

Η αποστείρωση γινόταν σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης για 20min σε θερμοκρασία 121°C και πίεση 1.1 Atm.

Όλα τα τρυβλία και τα δοχεία καλλιέργειας με τα υποστρώματα καλύπτονταν με φύλλο αλουμινίου καθώς και τα εργαλεία που χρησιμοποιούνταν στις εμφυτεύσεις ή απολυμάνσεις όπως λαβίδες, νυστέρια, πλακάκι πάνω στο οποίο γίνονταν οι κοπές εκφύτων, τρυβλία και απιονισμένο νερό.

Η απολύμανση των σπόρων γινόταν μέσα σε τράπεζα νηματικής ροής. Σαν μητρικό φυτό χρησιμοποιήθηκε το καλλωπιστικό φυτό *clematis cirrhosa*. Από το φυτό χρησιμοποιήθηκαν οι σπόροι. Οι σπόροι καθαρίστηκαν και απομακρύνθηκαν κάποια χνούδια που υπήρχαν στη συνέχεια απολυμάνθηκαν με διάλυμα χλωρίνης 10% για επτά (7) λεπτά και ξεπλύθηκαν με απιονισμένο νερό τρεις (3) φορές.(εικ.1)

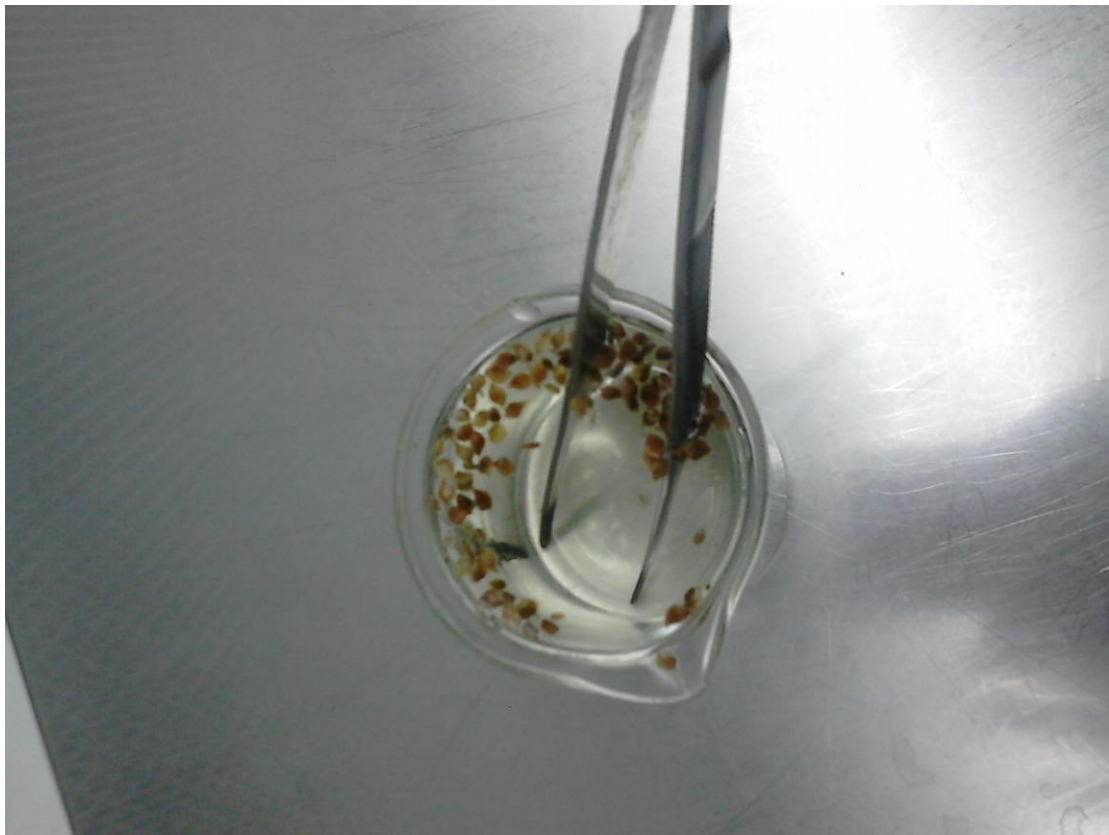
Στη συνέχεια τα χωρίσαμε σε επεμβάσεις A-B.

- Στην επέμβαση A αφήσαμε τους σπόρους σε απορροφητικό χαρτί ποτισμένο με νερό για δύο μέρες.
 - Μετά από δύο μέρες απολυμάνουμε ξανά σε διάλυμα χλωρίνης 5% για επτά (7) λεπτά.
- Στην επέμβαση B τους τοποθετήσαμε κατευθείαν σε θρεπτικό διάλυμα.
 - Η απαιτούμενη ποσότητα σπόρων τοποθετήθηκε σε αποστειρωμένα τριβλία που περιείχαν 4,5 ml αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό και

0,5 ml χλωρίνη εμπορίου με 1 σταγόνα της προσκολλητικής ουσίας Tween-20. Αναδεύονταν για 10 min και μετά γίνονταν 3 ξεπλύματα των 3 min με αποστειρωμένο απεσταγμένο νερό.

- Η κοπή των εκφύτων έγινε στην τράπεζα νηματικής ροής και τα έκφυτα τοποθετήθηκαν σε δοχεία καλλιέργειας.

Σε κάθε δοχείο καλλιέργειας τοποθετήθηκαν 5 σπόροι του είδους. Μετά την εγκατάσταση των σπόρων στα δοχεία καλλιέργειας, τοποθετήθηκαν για επώαση σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών όπου επωάστηκαν σε συνθήκες: $20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ με 16h φωτοπερίοδο υπό $37,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fluorescent συνεχές φως.(εικ.2)



Εικόνα 1

Οι σπόροι σε διάλυμα χλωρίνης 10%



Εικόνα 2

Οι 5 σπόροι που τοποθετήθηκαν στο τρυβλίο

Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν δύο υποκαλλιέργειες (καλλιέργειες πολλαπλασιασμού) ανά 40 ημέρες, τα έκφυτα τοποθετήθηκαν σε υποστρώματα μισής δύναμης MS και επώστηκαν 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.

Α ΕΠΕΜΒΑΣΗ

Σε φώς

Τοποθετήσαμε πέντε τριβλία με διάλυμα MS 4-3

Τοποθετήσαμε τέσσερα τριβλία με διάλυμα MS/2

Τοποθετήσαμε τρία τριβλία με διάλυμα MS/4

Τοποθετήσαμε ένα βαζάκι με διάλυμα MS 4-3

Τοποθετήσαμε ένα βαζάκι με διάλυμα MS/2

Σε σκοτάδι

Τοποθετήσαμε δυο τριβλία με διάλυμα MS 4-3

Τοποθετήσαμε δυο τριβλία με διάλυμα MS/2

Τοποθετήσαμε ένα τριβλία με διάλυμα MS/4

B ΕΠΕΜΒΑΣΗ

Σε φώς

Τοποθετήσαμε πέντε τριβλία με διάλυμα MS 4-3

Τοποθετήσαμε τέσσερα τριβλία με διάλυμα MS/2

Τοποθετήσαμε δυο τριβλία με διάλυμα MS/4

Σε σκοτάδι

Τοποθετήσαμε δυο τριβλία με διάλυμα MS 4-3

Τοποθετήσαμε δυο τριβλία με διάλυμα MS/2

Έπειτα τα τριβλία και τα βαζάκια μεταφέρονταν στον θάλαμο σταθερών συνθηκών για την ανάπτυξη των έκφυτων.

Στον θάλαμο αυτό οι συνθήκες που επικρατούσαν ήταν: σχετική υγρασία που κυμαίνονταν περίπου στο 60-70%, φωτισμός με λαμπτήρες φθορισμού εντάσεως 25000 lux. , με διάρκεια φωτός 16h και 8h σκότους και θερμοκρασία 22-26 °C.

Τα τριβλία με το φυτικό υλικό διατηρούνταν για 4 εβδομάδες στον θάλαμο σταθερών συνθηκών. Στο διάστημα αυτό το θρεπτικό διάλυμα έχει καταναλωθεί από τα έκφυτα και γι' αυτό απαιτείται μεταφύτευση του φυτικού υλικού σε νέο θρεπτικό υπόστρωμα, της ίδιας ή διαφορετικής χημικής σύστασης με το αρχικό (ανάλογα το αποτέλεσμα που επιδιώκουμε) και σε μεγαλύτερη φιάλη, ανάλογα με τον βαθμό ανάπτυξης των φυτών.

Για κάθε μεταφύτευση ετοιμάζονταν ο θάλαμο νηματικής ροής, απολυμαίνονταν και αποστειρώνονταν τα εργαλεία που θα χρησιμοποιούνται.

Επίσης, τα εξωτερικά τοιχώματα των σωληνών με το νέο θρεπτικό υπόστρωμα το απολυμαίνονταν με βαμβάκι εμποτισμένο σε καθαρό οινόπνευμα.

3.2.4 ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΒΛΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΠΟΡΟΥ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ *Clematis cirrhosa* ΚΑΙ ΑΝΤΙΔΡΑΣΗΣ ΤΩΝ ΕΚΦΥΤΩΝ

Οι παρατηρήσεις της βλάστησης πραγματοποιούνταν ανά δύο ημέρες με έναρξη τη ημέρα εγκατάστασής τους στο υπόστρωμα.

Ως έναρξη βλάστησης των σπόρων θεωρήθηκε η έκπτυξη του ριζιδίου.

3.2.5 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ

Τα αποτελέσματα στα πειράματα βλάστησης λαμβάνονταν μετά από 30 ημέρες μετά την εγκατάσταση των σπόρων στο υπόστρωμα.

Μετρήθηκαν όλοι οι σπόροι που βλάστησαν στο δοχείο καλλιέργειας, όσον αφορά την έκπτυξη και ανάπτυξη των εκφύτων στις καλλιέργειες πολλαπλασιασμού εκτιμήθηκαν το ποσοστό αντίδρασης, ο αριθμός των βλαστών, ο αριθμός των φύλλων, το μήκος του βλαστού και ο σχηματισμός ή όχι κάλλου.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV

4.1. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Όπως αναφέρθηκε η βλάστηση των σπόρων μετρήθηκε την 30 ημέρα μετά την εγκατάσταση των σπόρων στο υπόστρωμα.

Στους παρακάτω πίνακες παρατίθενται τα στοιχεία της συνολικής βλάστησης των σπόρων σε όλη τη διάρκεια της πειραματικής διαδικασίας στις δύο διαφορετικές θερμοκρασίες.

Στον πίνακα 2 παρατίθενται τα στοιχεία βλάστησης των σπόρων όταν αυτοί επώαστηκαν στους 20°C.

Πινάκας 2. Βλάστηση ανά δοχείο καλλιέργειας σπόρων του είδους *Clematis cirrhosa* που επώαστηκαν στους 20°C±1°C με 16h φωτοπερίοδο υπό 37,5 μmol m⁻² s⁻¹ fluorescent συνεχές φως.

<u>A/A δοχείου</u>	<u>Αριθμός σπόρων που βλάστησαν</u>	<u>Ποσοστό βλάστησης (%)</u>
1	4/5	80
2	2/5	40
3	1/5	20
4	4/5	80
5	5/5	100
6	μόλυνση	
7	μόλυνση	
8	μόλυνση	
9	μόλυνση	
10	μόλυνση	

Ο αριθμός των σπόρων που βλάστησαν όταν αυτοί επώαστηκαν 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, όπως φαίνεται και από τον πίνακα 2 ανήλθε στους 16 στους 25 σπόρους που εμφυτεύτηκαν (συνολικό ποσοστό 64%).

Στον πίνακα 3 παρατίθενται τα στοιχεία βλάστησης των σπόρων όταν αυτοί επώαστηκαν σε $10^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ με 16h φωτοπερίοδο υπό $37,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fluorescent συνεχές φως.

Ο αριθμός των σπόρων που βλάστησαν στις παραπάνω συνθήκες ήταν σημαντικά χαμηλότερος και ανήλθε στους 8 στους 55 (συνολικό ποσοστό 14%).

Πινάκας 3. Βλάστηση ανά δοχείο καλλιέργειας σπόρων του είδους *Clematis cirrhosa* που επώαστηκαν στους $10^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ με 16h φωτοπερίοδο υπό $37,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fluorescent συνεχές φως.

<u>A/A δοχείου</u>	<u>Αριθμός σπόρων που βλάστησαν</u>	<u>Ποσοστό βλάστησης (%)</u>
1	0/5	0
2	0/5	0

3	0/5	0
4	0/5	0
5	0/5	0
6	2/5	40
7	0/5	0
8	3/5	60
9	1/5	20
10	2/5	40
11	0/5	0
12	μόλυνση	

Από τους πίνακες 2 και 3 φαίνεται ότι η διπλή απολύμανση αύξησε το ποσοστό των σπόρων που δεν μολύνθηκαν μόνο όταν οι σπόροι καλλιεργήθηκαν σε συνεχές σκοτάδι, ενώ δεν επηρέασαν το ποσοστό επιβίωσης όταν οι σπόροι τοποθετήθηκαν σε 16 h φως

Στον πίνακα 3 παρατίθενται τα στοιχεία βλάστησης των σπόρων όταν αυτοί επωάστηκαν σε $20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ σε σκοτάδι.

Πινάκας 4. Βλάστηση ανά δοχείο καλλιέργειας σπόρων του είδους *Clematis cirrhosa* που επωάστηκαν στους $20^{\circ}\text{C}\pm 1^{\circ}\text{C}$ με 16h φωτοπερίοδο υπό $37,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ fluorescent.

A/A δοχείου	Αριθμός σπόρων που φύτρωσαν	Ποσοστό επιβίωσης (%)
B επέμβαση, φως	0	0
A επέμβαση, φως	3	51

Όσον αφορά την καλλιέργεια των σπόρων σε φως ή σε σκοτάδι, φαίνεται ότι σπόροι που επώαστηκαν σε σκοτάδι φύτρωσαν με υψηλότερα ποσοστά ενώ σπόροι που καλλιεργήθηκαν σε 16 h φως δεν βλάστησαν. Επίσης φαίνεται ότι η διπλή απολύμανση ήταν απαγορευτική στην βλάστηση των σπόρων.

Πινάκας 5. Βλάστηση ανά δοχείο καλλιέργειας σπόρων του είδους *Clematis cirrhosa* που επώαστηκαν 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.

A/A	Αριθμός σπόρων που φύτρωσαν	Ποσοστό επιβίωσης (%)
Πλήρους δύναμης MS, 3 % σουκρόζη	0	0
Μισής δύναμης MS, 1,5 % σουκρόζη	3	51

Όσον αφορά την επίδραση του υποστρώματος όπου καλλιεργήθηκαν οι σπόροι στο ποσοστό βλάστησής τους, φαίνεται η χρήση φτωχού θρεπτικού υποστρώματος να προκαλεί υψηλότερα ποσοστά επιβίωσης (Πίν. 5).

Σπορόφυτα του είδους που σχηματίστηκαν *in vitro* και υποκαλλιεργήθηκαν αντέδρασαν ικανοποιητικά σχημάτισαν νέα φυτάρια και ριζοβόλησαν.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ V

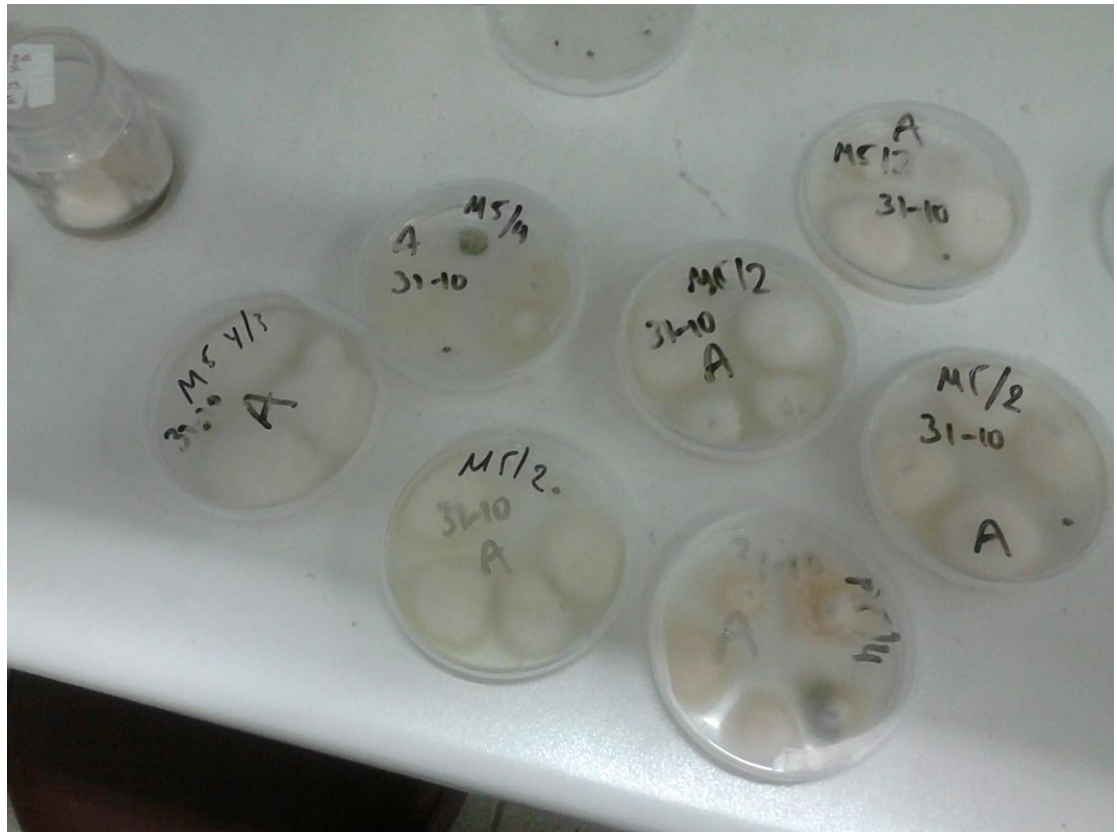
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η *in vitro* εγκατάσταση σπόρων του είδους σε θρεπτικά υποστρώματα με σκοπό την παραγωγή αποστειρωμένου πολλαπλασιαστικού υλικού ήταν χαμηλή. Διερευνήθηκε αρχικά η μέθοδος απολύμανσης. Η χρήση της μεθόδου της διπλής απολύμανσης μπορεί να μείωσε το ποσοστό μολύνσεων, αλλά ουσιαστικά μηδένισε την βλάστηση των σπόρων, οπότε δεν ενδείκνυται. (εικ.3)

Οι σπόροι του είδους φύτρωσαν μόνο στο σκοτάδι, η επώασή τους σε συνθήκες με 16h φως, μείωσε σημαντικά την φυτρωτικότητά τους.

Τέλος η καλλιέργεια των σπόρων σε φτωχά υποστρώματα αύξησε επίσης σημαντικά την βλάστησή τους.

Στην παρούσα μελέτη διερευνήθηκε η δυνατότητα βλάστηση των σπόρων του είδους *Clematis cirrhosa* για την εξαγωγή σαφών συμπερασμάτων χρειάζεται περαιτέρω διερεύνηση



Εικόνα 3

Τρυβλία με το φυτό *Clematis cirrhosa* τα οποία έχουν μολυνθεί

ΕΛΛΗΝΙΚΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Π.Γ. Γεννάδιος, Λεξικόν Φυτολογικόν, τόμ. Α'-Β', Β' έκδ., Αθήνα 1959, εκδοτικός οίκος Μόσχου Χρ. Γκιούρδα
- Ελευθερίου Π. Ελευθέριος. Τεχνολογία Φυτικού Πολλαπλασιαστικού Υλικού. Εκδόσεις Art of Text. Θεσσαλονίκη 1994
- Ζακυνθινός Γ. Απλές εφαρμογές Βιοτεχνολογίας στη Γεωργία. Α.Γ.Σ.Α. Νοέμβρης 1988
- Παπαϊωάννου Χ. Ι. Πρόχειρες σημειώσεις ιστοκαλλιέργειας. Γ.Π.Α. 1987
- Κραββαδίτης Κωσταντίνος Πτυχιακή εργασία Ιστοκαλλιέργειας Εδώδιμης Μουριάς 2002
- Νίκος Κύρου, Βότανα του Βερμίου, 5 δεκεμβρίου 2013, blog TA EN ΟΙΚΟ... <http://oikokyr.blogspot.gr/2013/12/41.html>
- Clematis cirrhosa . Διαθέσιμο στον δικτυακό τόπο: <http://www.greekflora.gr/el/flowers/0173/Clematis-cirrhosa>
- Κληματίδα – Clematis spp. Ranunculaceae, 25 νοεμβρίου 2014 Διαθέσιμο στον δικτυακό τόπο: <http://www.gardenguide.gr/%CE%BA%CE%BB%CE%B7%CE%BC%CE%B1%CF%84%CE%AF%CE%B4%CE%B1-clematis-spp-ranunculaceae/>
- Συμβουλές καλλιέργειας: Κληματίδα, 21 Ιανουαρίου 2011 Διαθέσιμο στον δικτυακό τόπο: <http://blog.livinggreen.gr/2011/01/21/%CF%83%CF%85%CE%BC%CE%B2%CE%BF%CF%85%CE%BB%CE%AD%CF%82-%CE%BA%CE%B1%CE%BB%CE%BB%CE%B9%CE%AD%CF%81%CE%B3%CE%B5%CE%B9%CE%B1%CF%82-%CE%BA%CE%BB%CE%B7%CE%BC%CE%B1%CF%84%CE%AF%CE%B4%CE%B1/>

ΞΕΝΗ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- George. Plant propagation by tissue culture - Part 1 - The technology. 2nd Ed., Exegetics Ltd. 1993
- Jain. A.K.. Dandin. S.B.. Sengupta. K.. 1990. In vitro propagation though axillary bud multiplication in different mulberry genotypes. Plant Cell Rep. 8. 737-740.
- Lindsey K. , Jones M.G.K. Plant Biotechnology in Agriculture. John Wiley & Sons Chichester. 1989
- Mantell S.H.,Mattheus J.A.,McKee R.A. Principles of Plant Biotechnology. An introduction to genetic engineering in plants. Blacwell Scientific Publications. 1985
- Murashige. T.. Skoog. F.. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15. 473-497.
- Ohyama. K.. Oka. S.. 1987. Mulberry. In: Bonga. J.M.. Durzan, D.J. (Eds.). Cell and Tissue Culture in Forestry. Vol. 3. Nijhoff/Junk Publishers. Dordrecht, pp. 272-284.
- Tissue culture and micropropagation-isaia
Διαθέσιμο στον διαδικτυακό τόπο:
<http://www.isaaa.org/Kc/inforesources/publications/biotechninagriculture/Tissue Culture and Micropropagation .htm>
- Clematis
Διαθέσιμο στον διαδικτυακό τόπο: <https://en.wikipedia.org/wiki/Clematis>