

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

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

«Εγκλιματισμός φυταρίων του είδους *Origanum scabrum*  
που παρήχθησαν *in vitro* »

**ΤΡΥΦΩΝΟΠΟΥΛΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ**

Καλαμάτα 2016

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

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ**

«Εγκλιματισμός φυταρίων του είδους *Origanum scabrum*  
που παρήχθησαν *in vitro* »

**ΤΡΥΦΩΝΟΠΟΥΛΟΣ ΚΩΝΣΤΑΝΤΙΝΟΣ**

Επιβλέπων καθηγητής  
**ΚΑΡΤΣΩΝΑΣ ΕΠΑΜΕΙΝΩΝΔΑΣ**

Καλαμάτα 2016

## Πρόλογος

Η παρούσα μελέτη πραγματοποιήθηκε στο ΤΕΙ Πελοποννήσου με σκοπό τη διερεύνηση του εγκλιματισμού φυταρίων που παρήχθησαν *in vitro* του είδους *Origanum scabrum*.

Με την ολοκλήρωση της εργασίας αυτής θέλω να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου κ. Ε. Κάρτσωνα για την ανάθεση του θέματος, την καθοδήγηση και τις χρήσιμες συμβουλές και υποδείξεις του καθ' όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της. Επίσης οφείλω ευχαριστίες στον κ. Σ. Καρρά για την πολύτιμη βοήθειά του, την οποία μου προσέφερε σε όλες τις εργαστηριακές εργασίες.

## Περιεχόμενα

Πρόλογος .....	3
Περίληψη .....	6
<b>ΕΙΣΑΓΩΓΗ.....</b>	<b>7</b>
1.1. Αρωματικά και Φαρμακευτικά Φυτά .....	8
1.1.1 Ιστορικά Στοιχεία.....	8
1.1.2 Ιδιότητες – Αιθέρια Έλαια .....	10
1.2. Αρωματικά Φυτά της Ελλάδας .....	11
1.3. Οικογένεια Lamiaceae .....	13
1.4. Το γένος <i>Origanum</i> .....	15
1.5. Το είδος <i>Origanum scabrum</i> .....	16
<b>2<sup>ο</sup> Κεφάλαιο .....</b>	<b>20</b>
<b>ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ(In Vitro).....</b>	<b>20</b>
2.1 Γενικά.....	21
2.2 Πλεονεκτήματα του μικροπολλαπλασιασμού .....	21
2.3 Παράγοντες που επηρεάζουν τον μικροπολλαπλασιασμό.....	22
<b>3<sup>ο</sup> Κεφάλαιο .....</b>	<b>24</b>
<b>ΕΓΚΛΙΜΑΤΙΣΜΟΣ.....</b>	<b>24</b>
3.1 Γενικά.....	25
3.2 Εισαγωγή.....	25
3.3 Εγκλιματισμός σε <i>ex vitro</i> συνθήκες .....	26
3.4 Αβιοτικές πιέσεις και εγκλιματισμός.....	27
3.4.1 Ελαφριά ένταση .....	27
3.4.2 Υγρασία .....	27
3.5 Βιοτικές καταπονήσεις και εγκλιματισμός .....	28
3.6 Σύναψη.....	28
<b>ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ .....</b>	<b>29</b>
<b>4<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ .....</b>	<b>30</b>
<b>ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ .....</b>	<b>30</b>
4.1 Σκοπός της εργασίας.....	31
4.2 Υλικά.....	31

4.2.1. Υλικά παρασκευής θρεπτικών υποστρωμάτων .....	31
4.2.2. Υλικά εδαφικού υποστρώματος.....	31
4.3. Μέθοδοι .....	32
4.3.1. Μέθοδοι παρασκευής θρεπτικών υποστρωμάτων .....	32
4.3.2. Μέθοδοι παρασκευής εδαφικού υποστρώματος, εγκατάστασης και ανάπτυξης των φυταρίων .....	33
4.3.3 Μέθοδοι εκτίμησης των αποτελεσμάτων .....	33
<b>5<sup>ο</sup> Κεφάλαιο</b> .....	<b>35</b>
<b>ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>35</b>
5.1 Μετρήσεις φυταρίων όπου αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα πλήρους δύναμης MS και 3% σουκρόζη. ....	36
5.2 Μετρήσεις φυταρίων όπου αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα μισής δύναμης MS και 1,5% σουκρόζη. ....	39
<b>6<sup>ο</sup> Κεφάλαιο</b> .....	<b>43</b>
<b>ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ</b> .....	<b>43</b>
<b>ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ</b> .....	<b>45</b>

## Περίληψη

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο ιστοκαλλιέργειας στο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Πελοποννήσου με σκοπό να μελετηθεί ο εγκλιματισμός των φυταρίων της λαγοριγανής που παρήχθησαν *in vitro*. Διερευνήθηκε η επίδραση του υποστρώματος που αναπτύχθηκαν και ριζοβόλησαν τα φυτά *in vitro* στο ποσοστό εγκλιματισμού τους *ex vitro*. Ως υποστρώματα ανάπτυξης και ριζοβόλησης των φυταρίων *in vitro*, χρησιμοποιήθηκαν το υπόστρωμα α που περιείχε μισής δύναμης MS και 1,5 % σουρκόζη, ή πλήρους δύναμης MS και 3 % σουρκόζη. Συγκρίθηκαν τέλος οι διαφορές στην ανάπτυξη και την επιβίωση των φυταρίων ανάλογα του υποστρώματος όπου είχαν αναπτυχθεί και ριζοβολήσει.

*1<sup>ο</sup> Κεφάλαιο*

## **ΕΙΣΑΓΩΓΗ**

## 1.1. Αρωματικά και Φαρμακευτικά Φυτά

### 1.1.1 Ιστορικά Στοιχεία

Ο άνθρωπος χρησιμοποιούσε από πολύ παλιά ορισμένα φυτικά είδη με σκοπό κυρίως την εκμετάλλευση των θεραπευτικών ιδιοτήτων τους. Έτσι, στο μακρινό παρελθόν οι άνθρωποι πίστευαν ότι οι ασθένειες, οφείλονταν στην παρουσία κακών πνευμάτων στο ανθρώπινο σώμα. Ωστόσο, θεωρούσαν ότι με τη χρήση κάποιων φυτικών ειδών θα μπορούσαν να αποφύγουν την παρουσία των κακών πνευμάτων. Έτσι, χρησιμοποιούσαν κάποια φυτικά είδη που περιείχαν ουσίες που δεν επέτρεπαν στα κακά πνεύματα να εγκατασταθούν στο ανθρώπινο σώμα. Οι ουσίες που περιέχονταν συνήθως μπορούσαν να επιδράσουν ως δηλητήρια ή να προκαλέσουν δυσανεξία (Βολιώτης, 1998).

Τα φυτά που χρησιμοποιούνταν για αυτό το λόγο χαρακτηρίζονταν ως «φάρμακο», μία λέξη που προήλθε από τη λέξη «φαρμακός». Σύμφωνα με τον Αριστοφάνη οι «φαρμακοί» ήταν άτομα τα οποία θυσιάζονταν κατά την εορτή των Θαργηλίων, που γινόταν στην Αθήνα και στα Ιόνια νησιά προς τιμήν της Αρτέμιδος και του Θαργηλίου (ηλίου Απόλλωνα). Ο Απόλλωνας θεωρείτο ότι ήταν ο θεός που έστελνε ή απομάκρυνε τις ασθένειες από τους ανθρώπους. Επιπρόσθετα, ο Απόλλωνας καθόριζε την ωρίμανση των καρπών καθώς και την ξήρανση των ανθέων. Οι «φαρμακοί», όπου ήταν συνήθως ένας άντρας και μία γυναίκα, θυσιάζονταν για την κάθαρση από τις ασθένειες.

Σε άλλες περιπτώσεις, πολλά φυτικά είδη χρησιμοποιήθηκαν στο παρελθόν με σκοπό την εκμετάλλευση του αρώματός τους, καθώς και με σκοπό τον καλλωπισμό του ανθρώπινου σώματος. Όπως αναφέρεται από τον Πολυσίου (2002), οι αρχαιότερες μαρτυρίες για τη χρήση αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών προέρχονται από έργα τέχνης και γραπτά των Ασσύριων και των Σουμέριων, ενώ και οι αρχαίοι Αιγύπτιοι χρησιμοποιούσαν φυτικά είδη με κατάλληλες ιδιότητες για τη μουμιοποίηση των νεκρών τους.

Οι αρχαίοι Έλληνες χρησιμοποιούσαν δάφνινα στεφάνια για την ανακήρυξη των νικητών των πρώτων Ολυμπιακών Αγώνων. Ο Ιπποκράτης (460 π.Χ.), ο



«πατέρας της Ιατρικής», κάνει αναφορά σε περίπου τα 400 φυτά, εκ των οποίων τα περισσότερα από αυτά είχαν φαρμακευτικές ή/και αρωματικές ιδιότητες. Αργότερα, ο Θεόφραστος (347 π.Χ.) περιέγραψε ένα μεγάλο αριθμό αυτοφυών φαρμακευτικών φυτών και ο Διοσκουρίδης (1<sup>ος</sup> αι. π.Χ.) στο έργο του «Περί ύλης ιατρικής» κάνει αναφορά σε 600 φυτικά είδη με φαρμακευτικές ιδιότητες.

Ορισμένα φυτά με αρωματικές και φαρμακευτικές ιδιότητες θεωρούνταν προϊόντα μεγάλης αξίας, όπως για παράδειγμα ήταν ο χρυσός και άλλοι πολύτιμοι λίθοι, όπως συμπεραίνεται από αναφορές που γίνονται σε αυτά τα φυτικά είδη σε κείμενα της Παλαιάς Διαθήκης. Οι Αρχαίοι Ρωμαίοι είχαν αναπτύξει εμπορική δραστηριότητα με την οποία διακινούσαν φυτικά είδη με αρωματικές ή/και φαρμακευτικές ιδιότητες στην Ινδία και την Αίγυπτο.

Αργότερα, στο Μεσαίωνα και ιδιαίτερα μετά την Αναγέννηση αναπτύχθηκε ακόμη περισσότερο η εμπορική διακίνηση φυτών με αρωματικές, φαρμακευτικές ή αρωματικές ιδιότητες, και ιδιαίτερα τα μπαχαρικά αποτέλεσαν σημαντικό παράγοντα στην ανάπτυξη του εμπορίου εκείνη την εποχή.

Μετά την ανακάλυψη της Αμερικής, η διακίνηση των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών επεκτάθηκε και στην αμερικανική ήπειρο. Από το 19<sup>ο</sup> αιώνα και μετά η καλλιέργεια αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών αναπτύχθηκε ακόμη περισσότερο με σκοπό να χρησιμοποιηθούν ως πρώτη ύλη στη βιομηχανία αρωμάτων και καλλυντικών, καθώς και στη βιομηχανίες τροφίμων και ποτών. Αργότερα όμως αναπτύχθηκε η βιομηχανία παρασκευής συνθετικών χημικών υλικών, τα οποία μπορούσαν να υποκαταστήσουν τα αιθέρια έλαια ή άλλες φαρμακευτικές ουσίες που παράγονται από τα φυτά με αποτέλεσμα να περιοριστεί σε κάποιο βαθμό το εμπορικό ενδιαφέρον για αυτά τα φυτά.

Ωστόσο, τα τελευταία χρόνια, στο πλαίσιο της ευαισθητοποίησης της κοινής γνώμης για μια ορθολογικότερη εκμετάλλευση των φυσικών πόρων, έχουν γίνει προσπάθειες για τον περιορισμό της κατανάλωσης συνθετικών φαρμάκων και της χρήσης χημικών προσθέτων στα τρόφιμα. Αυτό έχει σαν συνέπεια να παρατηρείται και πάλι ενδιαφέρον για την καλλιέργεια και την εμπορική εκμετάλλευση αρωματικών, αρωματικών και φαρμακευτικών φυτά.

Σήμερα, αν και η καλλιέργεια των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών αυξάνεται συνεχώς σε χώρες της Δυτικής Ευρώπης και της Αμερικανικής ηπείρου, στην Ασία παράγονται οι μεγαλύτερες ποσότητες. Οι ΗΠΑ είναι σήμερα η χώρα με

τις μεγαλύτερες εισαγωγές σε προϊόντα αρωματικών, αρτυματικών και φαρμακευτικών φυτών και ακολουθούν η Γερμανία, η Ιαπωνία και η Γαλλία.

### 1.1.2 Ιδιότητες – Αιθέρια Έλαια

Ο αριθμός των φυτικών ειδών που είναι σήμερα γνωστά ξεπερνά τα 350.000. Μεταξύ αυτών, τα αρωματικά, αρτυματικά και φαρμακευτικά φυτά αποτελούν μια σχετικά μικρή σε αριθμό ομάδα φυτικών ειδών τα οποία όμως, σε ορισμένες περιπτώσεις, παρουσιάζουν σημαντικές ιδιαιτερότητες, κυρίως λόγω των ιδιοτήτων τους. Τις ιδιότητές τους τις οφείλουν στην παρουσία αιθερίων ελαίων ή άλλων χημικών ουσιών.

Το αιθέριο έλαιο είναι ένα μείγμα ουσιών που παράγονται στους ιστούς του φυτού και λαμβάνεται από αυτό σε πολύ συμπυκνωμένη μορφή. Παράγεται στις αδενώδεις τρίχες Παράγεται στις αδενώδεις τρίχες, οι οποίες ανάλογα με το σχήμα τους χαρακτηρίζονται ως δισκοειδείς ή λεπτοειδείς (Δεληβουλόπουλος, 1994). Κάθε αιθέριο έλαιο έχει χαρακτηριστική οσμή και ιδιαίτερες ιδιότητες οι οποίες καθορίζονται σε μεγάλο βαθμό από τα επιμέρους συστατικά του (Πολυσίου, 2002). Αυτά αποτελούν παράγωγα του δευτερογενούς μεταβολισμού και μέχρι τώρα δεν έχει διευκρινιστεί πλήρως ο ακριβής ρόλος της παρουσίας τους στο φυτό. Ωστόσο, λόγω του σημαντικού ενδιαφέροντός των ουσιών αυτών καθώς και της παρουσίας τους σε φυτικά είδη με ιδιαίτερες απαιτήσεις σε περιβαλλοντικές ή άλλες συνθήκες έχουν γίνει προσπάθειες να αποδοθούν σε αυτά κάποιοι ρόλοι σε σχέση με την ανάπτυξη και την διαίωση των διαφόρων φυτικών ειδών στα οποία είναι παρόντα. Πιο συγκεκριμένα, έχει αποδοθεί σε αυτά :

- Προστατευτικός ρόλος σε ότι αναφορά την προσαρμογή των φυτικών ειδών σε υψηλές ή χαμηλές θερμοκρασίες (Σκρουμπής, 1985)
- Προστατευτικός ρόλος σε ότι αναφορά την προσαρμογή των φυτικών ειδών σε συνθήκες ξηρασίας (Σκρουμπής, 1985)
- Ρυθμιστικός ρόλος στη μεταβολική δραστηριότητα των φυτών (Σκρουμπής, 1985)
- Προσέλκυση επικονιαστών (Σκρουμπής, 1985; Amiot et al., 2005)
- Προστασία έναντι εχθρών (έντομα, ζώα) ή μικροβίων (παθογόνοι μύκητες κ.ά.) (Σκρουμπής, 1985; Amiot et al., 2005)

- Επίδραση στη βλάστηση σπόρων και την ανάπτυξη άλλων φυτικών ειδών που βρίσκονται στον περιβάλλοντα χώρο των αρωματικών φυτών ( Σκρουμπής, 1985; Amiot et al., 2005)
- Αντίδραση των φυτών στην έκθεση στην ηλιακή ακτινοβολία (Kokkini et al., 1994; Close & Mc Arthur, 2002; Amiot et al., 2005)

Παρά το ότι σε διάφορα φυτικά είδη παρατηρείται μια ή και περισσότερες από τις παραπάνω αντιδράσεις σε βιοτικούς και αβιοτικούς παράγοντες, καμία από αυτές τις θεωρίες δεν μπορεί να δώσει μια ξεκάθαρη απάντηση τη σπουδαιότητα της παρουσίας των αιθέριων ελαίων σε ορισμένα φυτικά είδη (αρωματικά φυτά) και για τον ακριβή ρόλο που παίζουν αυτά στην ανάπτυξη και τη διαίωνιση αυτών των φυτικών ειδών. Έτσι, πολλοί επιστήμονες θεωρούν ότι ο ρόλος των αιθέριων ελαίων μπορεί να είναι συνδυασμός όλων ή μερικών από τους λόγους που αναφέρθηκαν παραπάνω (Σκρουμπής, 1985)

Σήμερα, λόγω των σημαντικών και πολύ ιδιαίτερων ιδιοτήτων που έχουν πολλά από τα αρωματικά φυτά, η εμπορική τους εκμετάλλευση έχει προσελκύσει το παγκόσμιο ενδιαφέρον τόσο από ερευνητικής πλευράς όσο και από την πλευρά της χρησιμοποίησής τους στην αρωματοποιία, τη σαπωνοποιία, τη ζαχαροπλαστική, τη βιομηχανία τροφίμων, τη φαρμακευτική κ.λπ. (Goliaris, 1997).

## 1.2. Αρωματικά Φυτά της Ελλάδας

Λόγω της μεγάλης ποικιλομορφίας στη μορφολογία του εδάφους και στις κλιματικές συνθήκες, η Ελλάδα συγκαταλέγεται μεταξύ των χωρών της Ευρώπης, σε αυτές με τη μεγαλύτερη ποικιλομορφία σε φυτικά είδη και τη μεγαλύτερη αφθονία σε ενδημικά είδη με αρωματικές και φαρμακευτικές ιδιότητες ειδών ενδημικών αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών (Goliaris, 1997).

Πολλές διαφορετικές εργασίες έχουν δείξει ότι η «μεσογειακή δίαιτα» συνδέεται με τη μείωση ασθενειών και θανάτων που οφείλονται σε καρδιακές παθήσεις και διάφορες μορφές καρκίνου. Στην πραγματικότητα θα ήταν πιο σωστό να γίνεται λόγος για «μεσογειακές δίαιτες» μιας και όλοι οι κάτοικοι των περιοχών γύρω από τη μεσόγειο δεν τρέφονται με τον ίδιο τρόπο (Rivera et al., 2005).

Το μικρότερο ποσοστό θανάτων από καρδιακές παθήσεις και καρκίνο εμφανίζεται στην Ελλάδα και συγκεκριμένα στην Κρήτη. Ένας από τους σοβαρότερους λόγους είναι ότι η διαίτα των Ελλήνων είναι πλούσια σε αντιοξειδωτικά τα οποία βρίσκονται μεταξύ των άλλων φυτικών ειδών και σε μεσογειακά αρωματικά ή άλλα φυτά που περιέχουν ουσίες με φαρμακευτικές ιδιότητες (Simopoulos, 2001; Rivera et al., 2005). Αποτελέσματα πειραμάτων έδειξαν ότι τα αποξηραμένα αρωματικά που χρησιμοποιούνται στη μαγειρική περιέχουν πολύ μεγαλύτερες ποσότητες αντιοξειδωτικών σε σχέση με τα φρούτα, τα λαχανικά, τα δημητριακά, τους ξηρούς καρπούς και τα όσπρια (Steinar et al., 2003).

Σήμερα τα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά παρουσιάζουν παγκόσμιο ενδιαφέρον και αναμένεται να παίξουν σημαντικό ρόλο στην ανάπτυξη της ελληνικής γεωργίας συμπληρώνοντας το εισόδημα των γεωργών, το οποίο φαίνεται να μειώνεται ως αποτέλεσμα της αναθεώρησης της κοινής αγροτικής της Ε.Ε. Εναλλακτικές λύσεις για τους Έλληνες παραγωγούς αποτελεί η αξιοποίηση ορεινών περιοχών, όπου τα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά έχουν τη δυνατότητα να αναπτυχθούν ικανοποιητικά καθώς έχουν μικρότερες απαιτήσεις σε εδαφοκλιματικές συνθήκες (Goliaris, 1997). Μάλιστα σε αρκετές περιοχές θα μπορούσαν να αποτελέσουν πολύ καλές εναλλακτικές καλλιέργειες για την αναδιάρθρωση των αροτραίων καλλιεργειών στη χώρα μας (Πετρόπουλος κ.ά., 1994).

Τα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά πέραν από την συνεχώς αυξανόμενη ζήτηση τόσο στο εξωτερικό όσο και στην εγχώρια αγορά, έχουν το πλεονέκτημα της επίτευξης ικανοποιητικών αποδόσεων και ποιότητας όταν καλλιεργούνται στη χώρα μας ενώ η καλλιέργειά τους διευκολύνεται από την ύπαρξη ορισμένων πλεονεκτημάτων, όπως η ευκολία καθετοποιημένης παραγωγικής διαδικασίας (πρωτογενής, δευτερογενής, τριτογενής τομέας παραγωγής) χωρίς μεγάλες επενδύσεις από μικρά εταιρικά σχήματα, συνεταιρισμούς ή ακόμη και οικογενειακές εκμεταλλεύσεις (Πολυσίου, 2002). Επιπρόσθετα, η καλλιέργεια αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών συμβάλλει στην ανάπτυξη της μελισσοκομίας, βελτιώνοντας την ποσότητα και την ποιότητα των παραγόμενων προϊόντων.

Πέραν των παραπάνω πλεονεκτημάτων η καλλιέργεια των αρωματικών και φαρμακευτικών ειδών παρουσιάζει σημαντικό ενδιαφέρον αν γίνει προσέγγιση και από την περιβαλλοντική πλευρά. Έτσι, η συστηματική και εμπορική καλλιέργεια αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών μπορεί να συμβάλει στην προστασία του περιβάλλοντος μέσω του περιορισμού της αλόγιστης συλλογή και εκμετάλλευσης

αυτοφυών αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών. Ο περιορισμός της αλόγιστης συλλογής αυτοφυών είναι σημαντικός καθώς η παρουσία των φυτών σε μη καλλιεργήσιμες περιοχές συμβάλει στην προστασία του εδάφους από τη διάβρωση. Επιπρόσθετα, σε καλλιέργειες αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών οι απαιτήσεις σε νερό είναι μικρότερες. Επίσης, οι ανάγκες τους σε φυτοφάρμακα και λιπάσματα είναι ελάχιστες ως μηδενικές. Τέλος, συμβάλλουν στην ανάπλαση και αποκατάσταση περιοχών, με ταυτόχρονη ή αυτόνομη ανάπτυξη του αγροτουρισμού, στα πλαίσια του οποίου οργανώνονται επισκέψεις σε περιοχές με μεγάλη παραγωγή αρωματικών φυτών και μονάδες επεξεργασίας τους (Πολυσίου, 2002).

### 1.3. Οικογένεια *Lamiaceae*

Σύμφωνα με την Καρούσου (1995), η οικογένεια *Lamiaceae* συμπεριλαμβάνει περίπου 3.000 φυτικά είδη, η παρουσία των οποίων είναι διαδεδομένη σε όλο τον κόσμο. Σε αυτά συμπεριλαμβάνονται ποώδη ή θαμνώδη φυτικά είδη, τα οποία παράγουν συνήθως αιθέρια έλαια και χαρακτηρίζονται από τετραγωνικής διατομής βλαστό. Πολλές φορές τα φύλλα τους φύονται αντίθετα, και το άνθος τους χαρακτηρίζεται από ακτινόμορφο ή δίχειλο κάλυκα με 4 ή 5 οδόντες και συμπέταλη, συνήθως δίχειλη στεφάνη.

Σύμφωνα με την Καρούσου (1995), η οικογένεια *Lamiaceae* είναι από τις πολυπληθέστερες οικογένειες φυτών στην Ελλάδα, τα μέλη της οποίας απαντώνται σε όλες τις περιοχές της Ελλάδας και θεωρείται ότι είναι η δεύτερη πολυπληθέστερη σε ενδημικά είδη οικογένεια μετά την οικογένεια *Compositae*.

Στην Ελλάδα συναντώνται τουλάχιστον 35 γένη που ανήκουν στην οικογένεια *Lamiaceae*. Η παρουσία των διαφορετικών ειδών των γενών της οικογένειας *Lamiaceae* στις διάφορες περιοχές της Ελλάδας επηρεάζεται σημαντικά από τις διαφορετικές κλιματικές συνθήκες κάθε περιοχής.

Πολλά μέλη της οικογένειας *Lamiaceae* καλλιεργούνται ή συλλέγονται για να χρησιμοποιηθούν ως βότανα και ως πηγή αιθέριων ελαίων. Τα περισσότερα αιθέρια έλαια αυτής της οικογένειας αποτελούνται από μονοτερπένια και σεσκιτερπένια (Lewinsohn et al., 2000). Σε πολλές περιπτώσεις τα αιθέρια έλαια αυτών των φυτικών ειδών έχουν αντιμικροβιακή και αντιμυκητιακή δράση η οποία θα μπορούσε να

αποδοθεί κυρίως στην περιεκτικότητά τους σε καρβακόλη και θυμόλη (Bouchra et al., 2003; Baydar et al., 2004; Bozin et al., 2006).

Επιπρόσθετα ορισμένα από αυτά μπορούν να περιορίσουν τη δραστηριότητα εντόμων που προσβάλλουν αποθηκευμένα προϊόντα και καταπολεμούνται δύσκολα. Η ανθεκτικότητα που αναπτύσσουν οι παθογόνοι οργανισμοί απέναντι στις χημικές ουσίες και η πιθανή τοξικότητα αυτών των ουσιών έχει αυξήσει το ενδιαφέρον για τη χρήση του ελαίου που περιέχεται σε ορισμένα είδη της οικογένειας Lamiaceae, το οποίο θα μπορούσε να χρησιμοποιηθεί με επιτυχία για τη συντήρηση αποθηκευμένων προϊόντων και παράλληλα να περιοριστεί ο κίνδυνος που συνδέεται με τη χρήση χημικών ουσιών που μπορεί να είναι τοξικές για τον άνθρωπο ή/και ρυπογόνες για το περιβάλλον (Shaaya et al., 1997; Lamiri et al., 2001).

Σύμφωνα με παρατηρήσεις η ποσότητα των αιθέριων ελαίων και η πυκνότητα των αδενωδών τριχών από τις οποίες παράγονται αυτά σε διάφορα φυτικά είδη της οικογένειας Lamiaceae, είναι πολύ μεγαλύτερες στις ταξιανθίες σε σύγκριση με τα φύλλα. Ωστόσο, ο μηχανισμός παραγωγής αιθέριου ελαίου μπορεί να διαφέρει μεταξύ των διαφορετικών τμημάτων ενός φυτού με αποτέλεσμα στα διαφορετικά φυτικά τμήματα να παράγεται διαφορετικής σύστασης αιθέριο έλαιο (Werker et al., 1985).

Το αιθέριο έλαιο που παράγεται στα φύλλα, χρησιμεύει σε πολλά φυτικά είδη για την προστασία του από φυτοφάγα ζώα ή την προσβολή τους από παθογόνα, ενώ αυτό που παράγεται στα άνθη χρησιμεύει τόσο για την προστασία των φυτών όσο και για την προσέλκυση επικονιαστών (Werker, 1993).

Στα αρωματικά φυτά της οικογένειας Lamiaceae μπορεί να υπάρχουν διαφορές μεταξύ δύο ειδών σε ότι αφορά τη δομή, τη λειτουργία και τον τρόπο ανάπτυξης των αδενωδών τριχών (Bosabadis & Tsekos, 1984; Werker, 1993). Εξάιρεση μπορεί να αποτελέσει μερικές φορές η παρουσία διαφορετικών τύπων κεφαλικών τριχωμάτων (Werker, 1993). Στα αδενώδη λέπια τα υλικά εκκρίνονται βαθμιαία στους νέους ιστούς, συγκεντρώνονται κάτω από έναν επιδερμικό σάκο και χρησιμοποιούνται από τα φυτά ως προστασία των ώριμων οργάνων. Οι αδένες αυτοί παράγουν και συσσωρεύουν τον κύριο όγκο των ελαίων που είναι χρήσιμα για τον άνθρωπο (Kokkini et al., 2000). Ορισμένα από τα σημαντικότερα φυτικά είδη της οικογένειας Lamiaceae είναι η ρίγανη (*Origanum vulgare*), η μέντα (*Mentha piperita*), ο δυόσμος (*Mentha spicata*), το δενδρολίβανο, ο βασιλικός (*Ocimum*

*basilicum*), η λεβάντα (*Lavandula vera*), το φασκόμηλο (*Salvia officinalis*) και η ματζουράνα (*Origanum majorana*).

#### 1.4. Το γένος *Origanum*

Το γένος *Origanum* L. περιλαμβάνει μικρούς θάμνους μονοετείς, διετείς ή πολυετείς οι οποίοι συναντώνται κυρίως σε θερμές και ορεινές περιοχές. Η μεγάλη ποικιλομορφία των ειδών που ανήκουν στο γένος αυτό, κάνει την βοτανική ταξινόμηση τους δύσκολη.

Όπως αναφέρεται από τους Spada & Perrino (1997), έχουν περιγραφεί 49 taxa τα οποία ανήκουν σε 10 διαφορετικές ομάδες και στην Ελλάδα η είναι το περισσότερο διαδεδομένο αρωματικό φυτό που αυτοφύεται σε πολλές τοποθεσίες με διαφορετικές εδαφοκλιματικές συνθήκες.

Σε γενικές γραμμές το γένος *Origanum* περιλαμβάνει 42 είδη τα οποία απαντώνται σε εύκρατες περιοχές της Ασίας, της Αμερικής, της Αφρικής και σε Ευρωπαϊκές χώρες της Μεσογείου (Δόρδας, 2012). Ωστόσο, στο γένος αυτό έχουν μέχρι σήμερα προσδιοριστεί 102 taxa. Ένα από τα πιο γνωστά είδη του γένους *Origanum* είναι η ρίγανη (*O. vulgare*), ενώ άλλα γνωστά είδη του γένους αυτού είναι το *O. onites*, γνωστό και ως νησιωτική ρίγανη ή τουρκική ρίγανη (διεθνώς) και ο δίκταμος (*O. dictamnus*) το οποίο αυτοφύεται και καλλιεργείται μόνο στην Κρήτη.

Στη χώρα μας υπάρχουν τρία υποείδη του είδους *Origanum vulgare* L. (Δόρδας, 2012):

- *O. vulgare* ssp. *vulgare*. Το είδος αυτό έχει πολύ μικρή περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο με ιδιαίτερη σύσταση και φέρει χαρακτηριστικά μωβ άνθη.
- *O. vulgare* ssp. *hirtum*. Το είδος αυτό είναι παγκοσμίως γνωστό ως «ελληνική ρίγανη».
- *O. vulgare* ssp. *viridulum*. Το είδος αυτό φέρει χαρακτηριστικά μεγάλα βράκτια φύλλα.

Άλλα είδη του γένους *Origanum* που συναντώνται στην Ελλάδα είναι και το είδος *vulgare*. Επιπρόσθετα, άλλα γνωστά είδη του γένους *O. vulgare* είναι τα:

- *O. vulgare* ssp. *virens*
- *O. vulgare* ssp. *gracile*

- *O. vulgare* ssp. *glandulosum*.

## 1.5. Το είδος *Origanum scabrum*

Το είδος *Origanum scabrum* ανήκει στην οικογένεια *Lamiaceae* (Aligiannis et al., 2001) και στο παρελθόν έχει αναφερθεί ως υποείδος του *Origanum vulgare*. Αργότερα όμως έγινε ξεκάθαρο ότι πρόκειται για ένα διαφορετικό είδος στο γένος *Origanum*. Έτσι, η βοτανική ταξινόμηση του είδους *Origanum scabrum* Boiss. & Heldr. αναφέρεται στη βιβλιογραφία, ενώ στο παρελθόν έχει αναφερθεί και ως *Amaracus scaber*, *Origanum pulchrum* και *Amaracus pulcher* ([www.filotis.itia.ntua.gr/species/d/3075](http://www.filotis.itia.ntua.gr/species/d/3075)). Σήμερα, υπάρχουν αναφορές σύμφωνα με τις οποίες στο είδος *Origanum scabrum* έχει δύο υποείδη, το υποείδος *Origanum scabrum* ssp. *scabrum* και το υποείδος *Origanum scabrum* ssp. *pulchrum*.

Το φυτό βρίσκεται στην Ν. Πελοπόννησο και συγκεκριμένα στα όρη Πάρνωνας και Ταΰγετος, ενώ έχει αναφερθεί η παρουσία του και στο όρος Δίρφυ στην Εύβοια. Το φυτό αυτό θεωρείται ενδημικό είδος των περιοχών αυτών (Aligiannis et al., 2001). Φυτρώνει σε σχισμές ασβεστολιθικών βράχων, σε υψόμετρο μεγαλύτερο των 1000 m (<http://www.mani.org.gr/hlorida/102origanum/orig.htm>), αλλά στην περιοχή του Ταΰγету έχει βρεθεί και σε περιοχές με μικρότερο υψόμετρο (από 600-800 m). Στην περιοχή του Ταΰγету είναι γνωστό με την ονομασία λαγορίγανη.



(α)



(β)

Εικόνα 1.1. Φυτά λαγορίγανης (*Origanum scabrum*): (α) αυτοφυή και (β) ανθισμένο φυτό λαγορίγανης.



Πρόκειται για πολυετές, ποώδες φυτό που οι βλαστοί έχουν ύψος 20-40 cm. Τα φύλλα εμφανίζονται αντίθετα σε κάθε κόμβο και φέρουν μικροσκοπικούς αδένες που παράγουν αιθέριο έλαιο. Τα άνθη διατάσσονται σε ομάδες στις άκρες των βλαστών, οι οποίες γέρνουν προς τα κάτω. Τα βράκτια είναι μεγάλα και πορφυρά, όπως πορφυρού χρώματος είναι και η στεφάνη, η οποία είναι συμπέταλη και δίχειλη.

Καθώς αυξάνεται η ηλικία του φυτού, ο βλαστός γίνεται ξυλώδης με χαρακτηριστικό άρωμα. Ο βιολογικός κύκλος του φυτού στις περιοχές που αυτοφύεται ξεκινά με την έκπτυξη των υπέργειων βλαστών από οφθαλμούς που βρίσκονται σε υπόγειους βλαστούς (ριζώματα), προς το τέλος του χειμώνα με αρχές της άνοιξης. Η ανάπτυξη του υπέργειου μέρους του φυτού παρατηρείται κατά τη διάρκεια της άνοιξης και του καλοκαιριού. Η συλλογή των φυτών γίνεται συνήθως στο στάδιο της πλήρους άνθησης, μετά τον Ιούνιο και μέχρι το Σεπτέμβριο (Heldreich et al., 1889).

**Βλαστός.** Οι υπέργειοι βλαστοί του φυτού αναπτύσσονται συνήθως χωρίς την έκπτυξη πλάγιων βλαστών και καταλήγουν σε επάκρια ταξιανθία (Heldreich et al., 1889). Κάτω από την επιφάνεια του εδάφους υπάρχουν υπόγειοι βλαστοί που εκτείνονται σε μεγάλο μήκος.

**Ρίζες.** Το φυτό έχει επιγενείς ρίζες που αναπτύσσονται σε βάθος έως και 40 cm και σχηματίζουν ένα ριζικό σύστημα που αποτελείται από πολλά και λεπτά ριζικά τριχίδια (Heldreich et al., 1889).

**Φύλλα.** Τα φύλλα είναι χωρίς μίσχο (άμισχα). Συνήθως εμφανίζονται 14-26 ανά βλαστό. Έχουν σχήμα σχεδόν σφαιροειδές και χρώμα πράσινο, που αργότερα γίνεται φαιό (Heldreich et al., 1889).

**Άνθη.** Τα άνθη είναι χρώματος ροζ - μωβ με κάλυκα κυλινδρικό. Το άνω χείλος είναι μεγαλύτερο από το κάτω. Στο κάτω χείλος βρίσκονται οι στήμονες (νήματα λεία) και η αποκλίνουσα ωοθήκη (Heldreich et al., 1889).

**Καρπός και Σπόρος.** Όπως και στη ρίγανη, ο σπόρος είναι χρώματος καφέ και είναι πολύ μικρού μεγέθους (Heldreich et al., 1889). Ωστόσο, σε πολλές περιπτώσεις ο σπόρος έχει χαμηλή βλαστική ικανότητα.

Οι ιστοί του φυτού έχουν σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις σε φαινόλες. Η καρβακρόλη έχει υψηλά επίπεδα αντιμικροβιακής ιδιότητας (Aligiannis et al., 2001) και η λαγορίγανη είναι γνωστή, ιδιαίτερα στους πληθυσμούς των περιοχών στις

οποιές αυτοφύεται, ως άρτυμα στη μαγειρική, στη ζαχαροπλαστική, αλλά για τις φαρμακευτικές της ιδιότητες (χρησιμοποιείται ως αφέψημα κατά του στομαχόπουνου).

Το υπέργειο μέρος του φυτού συλλέγεται κατά το στάδιο της ανθοφορίας, συνήθως από τον Ιούνιο έως και τον Σεπτέμβριο στις περιοχές που αυτοφύεται.

Το αιθέριο έλαιο λαμβάνεται από τα υπέργεια μέρη του φυτού και η συγκέντρωσή του κυμαίνεται περίπου στο 0,6% (Aligiannis et al., 2001). Το αιθέριο έλαιο περιέχει 28 συστατικά εκ των οποίων τα σημαντικότερα είναι: carvacrol (74,86%), p-cymene (5,41%), γ-terpinene (4,66%), thymol (4,51%).

Το φυτό δεν καλλιεργείται σε εμπορική κλίμακα. Η συλλογή των φυτών γίνεται από περιοχές στις οποίες αυτοφύεται, μετά από σχετική άδεια από το Δασαρχείο. Η λαγορίγανη συναντάται στον Ταΰγετο, σε υψόμετρο των 1200 m αλλά και χαμηλότερα (600-800 m). Αυτοφύεται ανάμεσα σε ελατοδάση στη θέση Αγ. Βαρβάρα, σε σχισμές βράχων, σε ελατοδάση και δάση μαύρης Πεύκης, καθώς και ανάμεσα σε δάφνες και σε χλόη (Heldreich et al, 1889).

Η λαγορίγανη δεν καλλιεργείται σε εμπορική κλίμακα και η κατανάλωσή της γίνεται μόνο γύρω από τις περιοχές που αυτοφύεται καθώς μόνο οι κάτοικοι αυτών περιοχών καθώς και κάποιων αστικών κέντρων που βρίσκονται κοντά σε αυτές (π.χ. Καλαμάτα) γνωρίζουν την ύπαρξή της και τη χρησιμοποιούν για τις φαρμακευτικές της ιδιότητες.

Για το λόγο αυτό δεν είναι γνωστά τα στοιχεία που αφορούν την καλλιεργητική τεχνική που θα πρέπει να ακολουθηθεί. Ωστόσο, οι ομοιότητες με του φυτού με την κοινή ρίγανη επιτρέπουν ίσως την εφαρμογή της ίδιας καλλιεργητικής τεχνικής, με κάποιες ιδιαίτερες προσαρμογές. Ιδιαίτερη προσοχή θα πρέπει να δοθεί στην εγκατάσταση της καλλιέργειας, όπου είναι πιθανό να απαιτείται η επιλογή αγενούς πολλαπλασιαστικού υλικού που προέρχεται είτε από ριζώματα είτε από *in vitro* πολλαπλασιασμό του φυτού.

Όπως και στην περίπτωση της ρίγανης, ο σπόρος είναι πολύ μικρού μεγέθους και σε περίπτωση πολλαπλασιασμού θα πρέπει να αναμιγνύεται με άμμο. Πάντως αυτός ο τρόπος εγκατάστασης της καλλιέργειας μπορεί, ιδιαίτερα λόγω και του μικρού ποσοστού βλαστικής ικανότητας που έχει παρατηρηθεί, να οδηγήσει σε καθυστέρηση της εγκατάστασης της νέας καλλιέργειας, κάτι που έχει παρατηρηθεί σύμφωνα με τους Kuris et al. (1980) και στη ρίγανη.

Ο πολλαπλασιασμός με μοσχεύματα θα μπορούσε να είναι ένας εύκολος και γρήγορος τρόπος πολλαπλασιασμού, όπως έχει αναφερθεί τόσο για τη ρίγανη, όσο

και για το δίκταμο. Από τους Kuris et al. (1980) αναφέρεται ότι τα μοσχεύματα των Lamiaceae ριζοβολούν σχετικά εύκολα.

Από την άλλη μεριά ο αγενής πολλαπλασιασμός της λαγορίγανης, όπως και στην περίπτωση της ρίγανης, θα μπορούσε να δώσει τη δυνατότητα δημιουργίας κλώνων με βελτιωμένα χαρακτηριστικά. Επιπρόσθετα, θα μπορούσε να συνεισφέρει στη διατήρηση γενετικού υλικού, γεγονός πολύ σημαντικό αν λάβουμε υπ' όψη μας τη γρήγορη γενετική διάβρωση των ειδών, και την πίεση που μπορεί να δεχθεί, ιδιαίτερα το συγκεκριμένο είδος το οποίο ανήκει στα απειλούμενα και είναι ενδημικό της Ελλάδας, με πολύ περιορισμένη παρουσία.

*2<sup>ο</sup> Κεφάλαιο*

**ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ**  
***(In Vitro)***

## 2.1 Γενικά

Η τεχνική *in vitro* πολλαπλασιασμού (μικροπολλαπλασιασμός ή ιστοκαλλιέργεια) αφορά την ασηπτική καλλιέργεια κυττάρων και οργάνων ζώντων οργανισμών και στηρίζεται στην ικανότητα των κυττάρων να αναπαράγουν πλήρως έναν οργανισμό (ολοδυναμικότητα).

Σε ότι αφορά την εμπορική χρήση της ιστοκαλλιέργειας φυτών (ή αλλιώς μικροπολλαπλασιασμού), κυρίως, συνίσταται στην αναγέννηση ολόκληρων, υγιών και βιώσιμων φυτών από διάφορα έκφυτα, δηλ. ιστούς του μητρικού φυτού, σε σύντομο χρονικό διάστημα (Ποντίκης, 1994).

## 2.2 Πλεονεκτήματα του μικροπολλαπλασιασμού

Η τεχνική αυτή έχει ορισμένα σημαντικά πλεονεκτήματα σε σύγκριση με τις συμβατικές μεθόδους πολλαπλασιασμού των φυτών, όπως για παράδειγμα είναι:

1. Η δυνατότητα πιστής αναπαραγωγής των μητρικών φυτών, δηλαδή η παραγωγή γενετικά όμοιων φυτών-απογόνων με το μητρικό φυτό αλλά και μεταξύ τους. Έτσι, με αυτό τον τρόπο είναι δυνατή η δημιουργία κλωνικών ποικιλιών.
2. Η δυνατότητα παραγωγής μεγάλου αριθμού απογόνων σε σύντομο χρονικό διάστημα και σε μικρό χώρο (εξοικονόμηση χώρου). Ενδεικτικά αναφέρεται ότι για την παραγωγή ενός εκατομμυρίου φυτών ετησίως απαιτείται εργαστηριακός χώρος εμβαδού περίπου 100 m<sup>2</sup>.
3. Η ανεξαρτητοποίηση της παραγωγής πολλαπλασιαστικού υλικού από τις περιβαλλοντικές συνθήκες, αφού είναι δυνατός ο έλεγχος θερμοκρασίας, φωτισμού και υγρασίας, με αποτέλεσμα τη δυνατότητα παραγωγής πολλαπλασιαστικού υλικού όλο το χρόνο.
4. Η δυνατότητα παραγωγής υγιούς πολλαπλασιαστικού υλικού, κυρίως, σε ότι αφορά τις ιώσεις, είτε με την καλλιέργεια μεριστωμάτων ή την παραγωγή σωματικών εμβρύων, τα οποία έχουν μειωμένη ή μηδενική αγγειακή σύνδεση με τους μητρικούς ιστούς και επομένως είναι, θεωρητικά τουλάχιστον, απαλλαγμένα από ιώσεις, είτε με την εφαρμογή θερμοθεραπείας

ή και χημειοθεραπείας για την εξάλειψη των παθογόνων (κυρίως ιών και βακτηρίων).

5. Η δυνατότητα διατήρησης γενετικού υλικού για μεγάλο χρονικό διάστημα, χωρίς αυτό να υφίσταται αλλοιώσεις (Ποντίκης, 1994).

## 2.3 Παράγοντες που επηρεάζουν τον μικροπολλαπλασιασμό

Οι σημαντικότεροι παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν την επιτυχημένη εφαρμογή του μικροπολλαπλασιασμού για την παραγωγή πολλαπλασιαστικού υλικού των φυτικών ειδών είναι:

### 1. Το είδος του έκφυτου, που μπορεί να είναι:

α. έμβρυο, ανθήρες, τμήματα ριζών ή βλαστών, κοτυληδόνες κ.ά. ή μεριστώματα βλαστού ή άλλων ιστών του φυτού με στόχο τη μορφογένεση και την ανάπτυξη ολοκληρωμένων φυτών.

β. η καλλιέργεια κάλλου, δηλαδή καλλιέργεια μάζας αδιαφοροποίητων κυττάρων με στόχο την παραγωγή εμβρυοειδών ή την οργανογένεση.

γ. η καλλιέργεια πρωτοπλαστών που γίνεται σε ειδικό θρεπτικό μέσο όπου επιτυγχάνεται η σύντηξή τους και στη συνέχεια η παραγωγή εμβρυοειδών από αυτούς (Ποντίκης, 1994).

2. Η σύνθεση του θρεπτικού υποστρώματος, στο οποίο περιλαμβάνονται συνήθως μακροστοιχεία, μικροστοιχεία, βιταμίνες, αμινοξέα και, σάκχαρα (συνήθως σακχαρόζη ή γλυκόζη), οργανικά οξέα, άλατα οργανικών οξέων και ρυθμιστικά διαλύματα. Επιπρόσθετα, μπορεί να περιλαμβάνονται φυτορρυθμιστικές ουσίες (γιββερελλικό οξύ - GA<sub>3</sub>, ινδολυλοξικό οξύ - IAA, ινδολυλοβουτυρικό οξύ - IBA, βενζυλαδενίνη - BA ή BAP, ναφθαλινοξικό οξύ - NAA), άγαρ (αδρανές συστατικό που χρησιμοποιείται για την στερεοποίηση των υποστρωμάτων μόνο στις περιπτώσεις όπου απαιτείται στερεό ή ημιστερεό υπόστρωμα).

Το θρεπτικό υπόστρωμα καλλιέργειας των φυτών συντίθενται κυρίως από συστατικά καθαρής μορφής και η σύστασή του εξαρτάται από τη λειτουργία και την προέλευση κάθε ιστού ή κυττάρου που πρόκειται να καλλιεργηθεί.

Συνήθως τα υποστρώματα χωρίζονται σε τρία είδη με βάση την υφή τους και επιλέγεται αυτό που ταιριάζει με το είδος του φυτού και του μεριστώματος που θα χρησιμοποιείται σε κάθε περίπτωση. Έτσι τα είδη των θρεπτικών υποστρωμάτων

διακρίνονται σε υγρά (κυρίως για την καλλιέργεια ριζών και την καλλιέργεια κυττάρων), ημιστερεά (τα πιο συνήθη) και στερεά (Ποντίκης, 1994).

Ιδιαίτερης σημασίας είναι η χρήση φυτορρυθμιστικών ουσιών στα θρεπτικά υποστρώματα, καθώς ανάλογα με τη φυτορρυθμιστική ουσία που χρησιμοποιείται κάθε φορά μπορεί να επηρεαστεί σε σημαντικό βαθμό η κατεύθυνση της καλλιέργειας του έκφυτου. Πιο συγκεκριμένα:

Οι **αυξίνες** ευνοούν την επιμήκηση των κυττάρων και χρησιμοποιούνται στο στάδιο της ριζοβολίας των έκφυτων.

Οι **κυτοκινίνες** ευνοούν κυρίως τη διαίρεση των κυττάρων και χρησιμοποιούνται στο στάδιο της βλαστογένεσης.

Οι **γιββερελίνες** προάγουν κυρίως την επιμήκηση των κυττάρων και χρησιμοποιούνται επίσης στο στάδιο της βλαστογένεσης.

Το **αιθυλένιο** και το **αμπσιικό οξύ** είναι και αυτά ρυθμιστές ανάπτυξης οι οποίοι προωθούν τη γήρανση, αλλά δε χρησιμοποιούνται πολύ συχνά στην *in vitro* καλλιέργεια.

Για την αναγέννηση και την ανάπτυξη βλαστών χρησιμοποιούνται οι κυτοκινίνες και ελάχιστα οι αυξίνες, όπως είναι το NAA και το 2,4-D. Από τις κυτοκινίνες, οι πιο διαδεδομένες είναι η βενζυλαδενίνη και η ζεατίνη, ενώ λιγότερο χρησιμοποιούνται οι κινετίνη και η 2-ισοπεντενυλαδενίνη (2iP). Για την ανάπτυξη ριζών στα έκφυτα χρησιμοποιούνται το ινδολυλικό οξύ (IAA), το ινδολυλοβουτυρικό οξύ (IBA) και το ναφθαλινοξικό οξύ (NAA).

Οι συγκεντρώσεις των ρυθμιστών αύξησης θα πρέπει να καθορίζονται μετά από πειραματική έρευνα (προκαταρκτικά πειράματα) ανάλογα με το φυτικό είδος και το έκφυτο που χρησιμοποιείται κάθε φορά.

### *3<sup>ο</sup> Κεφάλαιο*

## **ΕΓΚΛΙΜΑΤΙΣΜΟΣ**



### 3.1 Γενικά

Η τελική επιτυχία του μικροπολλαπλασιασμού σε εμπορική κλίμακα εξαρτάται από την ικανότητα να μεταφέρει τα φυτά από καλλιέργεια σε μεγάλη κλίμακα, με χαμηλό κόστος και με υψηλά ποσοστά επιβίωσης. Κατά τη διάρκεια της μεταφοράς τους σε εξωτερικό χώρο, τα φυτάρια που έχουν αναπτυχθεί *in vitro*, δεν είναι σε θέση να ανταγωνιστούν τα μικρόβια του εδάφους ούτε να αντιμετωπίσουν τις περιβαλλοντικές συνθήκες. Οι συνθήκες καλλιέργειας *in vitro* έχουν ως αποτέλεσμα τα φυτάρια να έχουν αλλοιωμένη μορφολογία, ανατομία και φυσιολογία. Για την αύξηση της ανάπτυξης και μείωση της θνησιμότητας τους στο στάδιο του εγκλιματισμού, οι προσπάθειες επικεντρώνονται στον έλεγχο τόσο του φυσικού όσο και του χημικού περιβάλλοντος των μικροπολλαπλασιασμένων φυταρίων. Η ανασκόπηση αυτή περιγράφει τις βιοτικές και αβιοτικές καταπονήσεις και τις τρέχουσες αναπτυγμένες μεθόδους για τον εγκλιματισμό των φυταρίων.

### 3.2 Εισαγωγή

Η καλλιέργεια φυτικού ιστού αναφέρεται στην ανάπτυξη και τον πολλαπλασιασμό κυττάρων, ιστών και οργάνων των φυτών σε καθορισμένο στερεό ή υγρό περιβάλλον υπό ασηπτικές και ελεγχόμενες περιβαλλοντικές συνθήκες. Ο μικροπολλαπλασιασμός επιτρέπει την ταχεία παραγωγή υψηλής ποιότητας, απαλλαγμένη από ασθένειες και με ομοιόμορφο υλικό φύτευσης, ανεξάρτητα από την εποχή και τις καιρικές συνθήκες. Ωστόσο ένας σημαντικός περιορισμός στην εφαρμογή της τεχνολογίας αυτής είναι η υψηλή θνησιμότητα που βιώνουν τα μικροπολλαπλασιασμένα φυτά κατά τη διάρκεια ή μετά τη μεταφορά από το εργαστήριο στη γη. Οι μικροβλαστοί για να μεταφερθούν σε *ex vitro* συνθήκες εκτίθενται σε αβιοτικές (μεταβολή της θερμοκρασίας, ένταση φωτός και υγρασίας) και βιοτικές συνθήκες στρες, δηλαδή τη μικροχλωρίδα του εδάφους, έτσι πρέπει να εγκλιματιστούν για την επιτυχή δημιουργία και την επιβίωση των φυταρίων (*Deb and*

*Imchen 2010*). Για την αύξηση της ανάπτυξης και τη μείωση της θνησιμότητας των φυτάρων στο στάδιο εγκλιματισμού, η έρευνα έχει επικεντρωθεί στον έλεγχο των περιβαλλοντικών συνθηκών (φυσική και χημική) ώστε να εγκλιματιστούν τα φυτά και να ανταγωνιστούν τη μικροχλωρίδα του εδάφους (*Mathur et al. 2008*).

### 3.3 Εγκλιματισμός σε *ex vitro* συνθήκες

Που προκαλείται από αλλαγμένη μορφολογία και φυσιολογία

Φυτά που καλλιεργούνται *in vitro* είναι διαφορετικά από αυτά που καλλιεργούνται στον αγρό. Υψηλή θνησιμότητα παρατηρείται κατά τη μεταφορά των μικροβλαστών σε *ex vitro* συνθήκες, αφού τα καλλιεργούμενα φυτά έχουν μη λειτουργικά στόματα, αδύναμο ριζικό σύστημα και ανεπαρκώς ανεπτυγμένη επιδερμίδα (*Mathur et al. 2008*). Μικρά φυτά που τους παρέχουν περίσσεια φυτορμονών εμφανίζουν ανωμαλίες στην μορφολογία και την ανατομία και ονομάζονται υαλοποιημένα φυτά (*Hronkova et al. 2003*). Τα φυσιολογικά και ανατομικά χαρακτηριστικά των μικροπολλαπλασιασμένων φυταρίων καθιστούν αναγκαία την βαθμιαία εγκλιμάτιση τους στο περιβάλλον του θερμοκηπίου ή στον αγρό (*Hazarika 2003*). Σε πολλά είδη φυτών, τα φύλλα που σχηματίστηκαν *in vitro* δεν είναι σε θέση να αναπτυχθούν περαιτέρω σε *ex vitro* συνθήκες και γι' αυτό αντικαθίστανται από καινούργια φύλλα (*Preece and Sutter 1991/ Diettrich et al. 1992*). Τα φυτάρια που έχουν αναπτυχθεί *in vitro* έχουν μεγάλα στόματα με αλλαγμένο σχήμα και δομή. Τα καταφρακτικά κύτταρα έχουν λεπτότερα κυτταρικά τοιχώματα και περιέχουν περισσότερο άμυλο και χλωροπλάστες (*Marin et al. 1988*). Ο *Tichaet et al. (1999)* βρήκε ότι ο εγκλιματισμός των φυταρίων καπνού σε *ex vitro* συνθήκες μείωσε την πυκνότητα των στομάτων και στις δύο πλευρές των νεοσχηματισμένων φύλλων. Κατά τη διάρκεια του εγκλιματισμού σε *ex vitro* συνθήκες, το πάχος των φύλλων γενικά αυξάνεται, το μεσόφυλλο προχωράει σε διαφοροποίηση σε δρυφακτοειδές και σπογγώδες παρέγχυμα, η πυκνότητα των στομάτων μειώνεται και η μορφή των στομάτων αλλάζει από κυκλική σε ελλειπτική (*Pospi's' ilova' et al. 1999*).

## 3.4 Αβιοτικές πιέσεις και εγκλιματισμός

### 3.4.1 Ελαφριά ένταση

Τα φυτάρια που έχουν καλλιεργηθεί *in vitro* είναι υπό χαμηλή ένταση φωτός (1,200 – 3,000 lux) και θερμοκρασία ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ) και ως εκ τούτου, η άμεση μεταφορά στο ευρύ φως φάσματος (4.000 – 12.000 lux) και σε θερμοκρασία (26- 36 ° C) μπορεί να προκαλέσει απανθράκωση των φύλλων και μαρασμό των φυταρίων. Συνεπώς, είναι απαραίτητο να συνηθίσει το φυτό σε φυσικές συνθήκες με μία μέθοδο σκλήρυνσης ή εγκλιματισμού (*Lavanja et al. 2009*). Τα δοχεία καλλιέργειας θα μπορούσαν να διατηρούνται σε θερμοκήπιο με χαλαρά καπάκια. Τα μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια μπορεί να μείνουν στην σκιά για 3-6 ημέρες, υπό διάχυτο φυσικό φως για να τους κάνει να προσαρμοστούν στις συνθήκες του νέου περιβάλλοντος. Αυτό βοηθά στην ημι-σκλήρυνση των φυτών και οδηγεί στην επιμήκυνση του βλαστού. Η μεταφορά των μικροβλαστών από *in vitro* σε *ex vitro* συνθήκες υπό άμεσο ηλιακό φως μπορεί να προκαλέσει φωτοαναστολή και φωτολεύκανση της χλωροφύλλης (*Van Huylbroeck 1994/ VanHuylbroeck et al. 1995*).

### 3.4.2 Υγρασία

Η καθυστέρηση στην ανάπτυξη της επιδερμίδας κατά τη διάρκεια της *in vitro* καλλιέργειας, προκαλεί υψηλό ρυθμό στοματικής και δερματικής διαπνοής των φύλλων στα φυτάρια όταν λαμβάνονται από τα δοχεία καλλιέργειας. Για να αποφευχθεί αυτό, τα φυτάρια πρέπει να μεταφερθούν αργά από υψηλή υγρασία σε συνθήκες χαμηλής υγρασίας. Οι μικροβλαστοί πρέπει να διατηρούνται στη σκιά και μετά από μια εβδομάδα ή δύο, θα πρέπει να μεταφερθούν σε γλάστρες που περιέχουν αποστειρωμένο μίγμα από χώμα και άμμο όπου καλύπτονται με polybags. Σιγά-σιγά ο ρυθμός της στοματικής και δερματικής διαπνοής μειώνεται σταδιακά λόγω του ότι

η ρύθμιση της στοματικής απώλειας νερού γίνεται πιο αποτελεσματική ώστε να αναπτυχθεί η επιδερμίδα (*Pospi's ĭlova' et al. 1999*).

### **3.5 Βιοτικές καταπονήσεις και εγκλιματισμός**

Μια άλλη σημαντική αιτία της υψηλής θνησιμότητας των μικροβλαστών είναι η αιφνίδια έκθεση τους (ιδιαίτερα του ριζικού συστήματος ) στα μικρόβια που υπάρχουν στο έδαφος, καθώς δεν διαθέτουν επαρκή αντίσταση ενάντια στην μικροχλωρίδα του εδάφους. Τα τελευταία χρόνια, έχουν γίνει δοκιμές ώστε να εκθέσουν τα νεαρά φυτάρια που έχουν αναπτυχθεί *in vitro* σε χρήσιμους μικροοργανισμούς που προωθούν την ανάπτυξη και ενθαρρύνουν την αμοιβαία σύνδεση. Τα ενδόφυτα αναφέρονται στους μύκητες και τα βακτήρια που εισβάλλουν ή ζουν μέσα στους ιστούς των φυτών χωρίς να προκαλούν ασθένειες ή τον τραυματισμό τους. Μπορούν επίσης να προωθήσουν την ανάπτυξη του φυτού ξενιστή και τον σχηματισμό των δευτερογενών μεταβολιτών που σχετίζονται με την άμυνα των φυτών (*Hao et al. 2010*).

### **3.6 Σύναψη**

Τα μικροπολλαπλασιασμένα φυτάρια υποφέρουν από υψηλή θνησιμότητα όταν μεταφέρονται από *in vitro* σε *ex vitro* συνθήκες. Τα φυτάρια πρέπει να εγκλιματιστούν σιγά-σιγά σε *ex vitro* συνθήκες με υψηλή ένταση φωτός και συνθήκες χαμηλής υγρασίας. Τα φυτά *in vitro* είναι ανεπαρκή σε ABA αλλά το περιεχόμενο αυξάνεται σε συνθήκες στρες και βοηθά στον εγκλιματισμό. Η συγκέντρωση των υδατανθράκων παίζει σημαντικό ρόλο στον εγκλιματισμό καθώς τα φυτάρια μεταφέρονται από ετεροτροφικές συνθήκες σε αυτότροφες.

# **ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ**

## *4<sup>ο</sup> ΚΕΦΑΛΑΙΟ*

# **ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ**

## 4.1 Σκοπός της εργασίας

Σκοπός της πειραματικής αυτής εργασίας, ήταν να μελετηθεί ο εγκλιματισμός των φυταρίων της λαγορίγανης που παρήχθησαν *in vitro*. Διερευνήθηκε η επίδραση του υποστρώματος που αναπτύχθηκαν και ριζοβόλησαν τα φυτά *in vitro* στο ποσοστό εγκλιματισμού τους *ex vitro*. Ως υποστρώματα ανάπτυξης και ριζοβόλησης των φυταρίων *in vitro*, χρησιμοποιήθηκαν το υπόστρωμα α που περιείχε μισής δύναμης MS και 1.5 % σουκρόζη, ή πλήρους δύναμης MS και 3 % σουκρόζη) Το πειραματικό μέρος της εργασίας αυτής πραγματοποιήθηκε στο Τεχνολογικό Εκπαιδευτικό Ίδρυμα Πελοποννήσου στο εργαστήριο ιστοκαλλιέργειας.

## 4.2 Υλικά

### 4.2.1. Υλικά παρασκευής θρεπτικών υποστρωμάτων

Για την παρασκευή των θρεπτικών υποστρωμάτων χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα MS (πίνακας 3.1.) της εταιρίας Sigma σε ποσότητα 4.4 ή 2.2 g/l.

Χρησιμοποιήθηκε επίσης σουκρόζη εμπορίου σε ποσότητα 30 ή 15 g/l.

### 4.2.2. Υλικά εδαφικού υποστρώματος

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν για το εδαφικό υπόστρωμα ήταν:

α) Τύρφη

β) Περλίτης

Τα φυτά αναπτύχθηκαν σε φυτοδοχεία μαύρου χρώματος όγκου 2 lt (Εικ. 1). Τα φυτοδοχεία τοποθετήθηκαν σε θερμοκήπιο και αρδεύονταν ανά τρεις ημέρες. Μια φορά το μήνα λιπαίνονταν σύνθετο λίπασμα.



**Εικόνα 4.1.** Φυτάρια του είδους *Origanum scabrum* που εγκαταστάθηκαν *ex vitro* σε υπόστρωμα τύρφη και περλίτη

## 4.3. Μέθοδοι

### 4.3.1. Μέθοδοι παρασκευής θρεπτικών υποστρωμάτων

Όπως αναφέρθηκε χρησιμοποιήθηκαν φυτάρια τα οποία αναπτύχθηκαν σε πλήρους ή μισής δύναμης MS και 1.5% ή 3% σουκρόζη.

Η παρασκευή ενός lt υποστρώματος πραγματοποιείται ως εξής .:

Αρχικά προστέθηκαν σε ειδικό δοχείο 800 mL απιονισμένου νερού, και στη συνέχεια προστέθηκε MS (η σύστασή του αναφέρεται στον πίνακα 3.1) σε ποσότητα



4,4 g ή 2,2 g καθώς και σακχαρόζη σε ποσότητα 30 g ή 15 g. Στη συνέχεια συμπληρώθηκε απιονισμένο νερό μέχρι το διάλυμα να φτάσει στα 1000 mL.

Ακολούθησε διόρθωση του pH, με διαλύματα NaOH και HCl έτσι ώστε η τιμή του να είναι 5,7. Προστέθηκε άγαρ σε ποσότητα 6 g.

Μετά την παρασκευή του τελικού διαλύματος για κάθε μεταχείριση, τα αντίστοιχα ειδικά δοχεία τοποθετήθηκαν για αποστείρωση σε αυτόκαυστο - κλίβανο αποστείρωσης (autoclave) όπου παρέμειναν για 20 min σε θερμοκρασία 121°C. Μετά την αποστείρωση τα θρεπτικά υποστρώματα διανεμήθηκαν σε αποστειρωμένα τριβλία petri διαμέτρου 9 cm, περίπου 30 mL θρεπτικού υποστρώματος ανά τριβλίο.

#### **4.3.2. Μέθοδοι παρασκευής εδαφικού υποστρώματος, εγκατάστασης και ανάπτυξης των φυταρίων**

Για την παρασκευή του εδαφικού υποστρώματος που εγκαταστάθηκαν τα φυτάρια, αναμίχθηκαν ίση ποσότητα τύρφης και περλίτη σε αναλογία 1:1. Το υπόστρωμα τοποθετήθηκε σε φυτοδοχεία όγκου 2Lt και τη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε αυτά τα ριζοβολημένα φυτάρια. Τα φυτάρια εκριζώθηκαν από το υπόστρωμα όπου αναπτύσσονταν στα τρυβλία, ξεπλύθηκαν οι ρίζες τους πολύ καλά με τρεχούμενο νερό δικτύου, ώστε να απομακρυνθεί εντελώς το θρεπτικό υπόστρωμα από αυτές και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν στα φυτοδοχεία με τα υποστρώματα και αρδεύτηκαν μέχρι κορεσμού του εδαφικού υποστρώματος. Τα φυτάρια καλύφθηκαν με πλαστικά ποτήρια, ώστε η σχετική υγρασία στο χώρο των φύλλων να είναι πολύ υψηλή και να μειωθεί στο ελάχιστο η διαπνοή τους. Με τον τρόπο αυτό αναμένεται να αυξηθεί και η πιθανότητα επιβίωσής τους *ex vitro*. Τα φυτάρια αρδεύονταν ανά τρεις ημέρες και καταμετρούνταν τόσο η επιβίωσή τους όσο και ο ρυθμός ανάπτυξής τους.

#### **4.3.3 Μέθοδοι εκτίμησης των αποτελεσμάτων**

Ανά επτά ημέρες καταμετρούνταν όπως αναφέρθηκε η επιβίωση και ο ρυθμός ανάπτυξης των φυταρίων. Μετρήθηκαν το ποσοστό των φυταρίων που επιβίωσαν, ο

αριθμός των φύλλων, ο αριθμός των βλαστών και το ύψος των βλαστών αυτών. Συγκρίθηκαν τέλος οι διαφορές στην ανάπτυξη και την επιβίωση των φυταρίων ανάλογα του υποστρώματος όπου είχαν αναπτυχθεί και ριζοβολήσει.

Πίνακας 4.1. Σύσταση θρεπτικού υποστρώματος MS.

Συστατικό	Συγκέντρωση (mg l <sup>-1</sup> )
<b>NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub></b>	1650
<b>KNO<sub>3</sub></b>	1900
<b>CaCl<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O</b>	440
<b>MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	370
<b>KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub></b>	170
<b>KI</b>	830
<b>H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub></b>	6200
<b>MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O</b>	22300
<b>ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	8600
<b>Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O</b>	250
<b>CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O</b>	25
<b>CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O</b>	25
<b>FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O</b>	27850
<b>Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O</b>	37250
<b>Myo-inositol</b>	100
<b>Nicotinic acid</b>	500
<b>Pyridoxine-HCl</b>	500
<b>Thiamine-HCl</b>	100
<b>Glycine</b>	2

## *5<sup>ο</sup> Κεφάλαιο*

# **ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ**

Στους παρακάτω πίνακες 5.1, 5.2., 5.3., 5.4., 5.5., 5.6, 5.7., 5.8., 5.9., 5.10., 5.11. και 5.12., αναγράφονται ο αριθμός των φύλλων, ο αριθμός των βλαστών και το μήκος των βλαστών των φυταρίων όπου εγκλιματίστηκαν *ex vitro*.

## 5.1 Μετρήσεις φυταρίων όπου αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα πλήρους δύναμης MS και 3% σουκρόζη.

**Πίνακας 5.1:** Αριθμός φύλλων, αριθμός βλαστών και ύψος φυταρίων την 4<sup>η</sup> μέρα μετά την εγκατάσταση. (25/11/2014)

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ	ΕΠΙΒΙΩΣΗ	ΑΡ.ΦΥΛΛΩΝ	ΑΡ.ΒΛΑΣΤΩΝ	ΥΨΟΣ
21/11/2014	X	10	1	2 cm.
21/11/2014	ΞΕΡΟ	ΞΕΡΟ	ΞΕΡΟ	ΞΕΡΟ
21/11/2014	X	11	1	3 cm.
21/11/2014	X	22	2	4 cm.
21/11/2014	X	22	1	5 cm.
21/11/2014	X	14	1	5 cm.

**Πίνακας 5.2:** Αριθμός φύλλων, αριθμός βλαστών και ύψος φυταρίων την 6<sup>η</sup> μέρα μετά την εγκατάσταση. (27/11/2014)

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ	ΕΠΙΒΙΩΣΗ	ΑΡ.ΦΥΛΛΩΝ	ΑΡ.ΒΛΑΣΤΩΝ	ΥΨΟΣ
21/11/2014	X	10	1	2 cm.
21/11/2014	ΞΕΡΟ	ΞΕΡΟ	ΞΕΡΟ	ΞΕΡΟ
21/11/2014	X	15	2	5 cm.
21/11/2014	X	23	2	5 cm.
21/11/2014	X	25	3	7 cm.
21/11/2014	X	14	1	7 cm.

**Πίνακας 5.3:** Αριθμός φύλλων, αριθμός βλαστών και ύψος φυταρίων την 12<sup>η</sup> μέρα μετά την εγκατάσταση. (2/12/2014)

<b>ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ</b>	<b>ΕΠΙΒΙΩΣΗ</b>	<b>ΑΡ.ΦΥΛΛΩΝ</b>	<b>ΑΡ.ΒΛΑΣΤΩΝ</b>	<b>ΥΨΟΣ</b>
21/11/2014	X	12	1	3 cm.
21/11/2014	ΞΕΡΟ	ΞΕΡΟ	ΞΕΡΟ	ΞΕΡΟ
21/11/2014	X	20	2	5 cm.
21/11/2014	X	35	2	6 cm.
21/11/2014	X	33	3	8 cm.
21/11/2014	X	14	1	7 cm.

**Πίνακας 5.4:** Αριθμός φύλλων, αριθμός βλαστών και ύψος φυταρίων την 19<sup>η</sup> μέρα μετά την εγκατάσταση. (9/12/2014)

<b>ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ</b>	<b>ΕΠΙΒΙΩΣΗ</b>	<b>ΑΡ.ΦΥΛΛΩΝ</b>	<b>ΑΡ.ΒΛΑΣΤΩΝ</b>	<b>ΥΨΟΣ</b>
21/11/2014	X	18	1	4 cm.
21/11/2014	ΞΕΡΟ	ΞΕΡΟ	ΞΕΡΟ	ΞΕΡΟ
21/11/2014	ΞΕΡΟ	ΞΕΡΟ	ΞΕΡΟ	ΞΕΡΟ
21/11/2014	X	48	2	6 cm.
21/11/2014	X	34	3	8 cm.
21/11/2014	X	16	1	7 cm.

**Πίνακας 5.5:** Αριθμός φύλλων, αριθμός βλαστών και ύψος φυταρίων την 40<sup>η</sup> μέρα μετά την εγκατάσταση. (30/12/2014)

<b>ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ</b>	<b>ΕΠΙΒΙΩΣΗ</b>	<b>ΑΡ.ΦΥΛΛΩΝ</b>	<b>ΑΡ.ΒΛΑΣΤΩΝ</b>	<b>ΥΨΟΣ</b>
21/11/2014	X	30	1	5 cm.
21/11/2014	ΞΕΡΟ	ΞΕΡΟ	ΞΕΡΟ	ΞΕΡΟ
21/11/2014	ΞΕΡΟ	ΞΕΡΟ	ΞΕΡΟ	ΞΕΡΟ
21/11/2014	X	56	2	7 cm.
21/11/2014	X	48	3	9 cm.
21/11/2014	X	30	1	8 cm.

**Πίνακας 5.6:** Αριθμός φύλλων, αριθμός βλαστών και ύψος φυταρίων την 50<sup>η</sup> μέρα μετά την εγκατάσταση. (9/01/2015)

<b>ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ</b>	<b>ΕΠΙΒΙΩΣΗ</b>	<b>ΑΡ.ΦΥΛΛΩΝ</b>	<b>ΑΡ.ΒΛΑΣΤΩΝ</b>	<b>ΥΨΟΣ</b>
21/11/2014	X	30	1	7 cm.
21/11/2014	ΞΕΡΟ	ΞΕΡΟ	ΞΕΡΟ	ΞΕΡΟ
21/11/2014	ΞΕΡΟ	ΞΕΡΟ	ΞΕΡΟ	ΞΕΡΟ
21/11/2014	X	60	2	8 cm.
21/11/2014	X	62	3	10 cm.
21/11/2014	X	32	1	8 cm.

## 5.2 Μετρήσεις φυταρίων όπου αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα μισής δύναμης MS και 1,5% σουκρόζη.

*Πίνακας 5.7:* Αριθμός φύλλων, αριθμός βλαστών και ύψος φυταρίων την 4<sup>η</sup> μέρα μετά την εγκατάσταση. (25/11/2014)

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ	ΕΠΙΒΙΩΣΗ	ΑΡ.ΦΥΛΛΩΝ	ΑΡ.ΒΛΑΣΤΩΝ	ΥΨΟΣ
21/11/2014	X	18	3	5 cm.
21/11/2014	X	16	1	7 cm.
21/11/2014	X	12	1	3 cm.
21/11/2014	X	12	2	3 cm.
21/11/2014	X	10	1	4 cm.

*Πίνακας 5.8:* Αριθμός φύλλων, αριθμός βλαστών και ύψος φυταρίων την 6<sup>η</sup> μέρα μετά την εγκατάσταση. (27/11/2014)

ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ	ΕΠΙΒΙΩΣΗ	ΑΡ.ΦΥΛΛΩΝ	ΑΡ.ΒΛΑΣΤΩΝ	ΥΨΟΣ
21/11/2014	X	18	3	5 cm.
21/11/2014	X	16	1	8 cm.
21/11/2014	X	12	1	5 cm.
21/11/2014	X	12	2	4 cm.
21/11/2014	X	10	1	4 cm.

**Πίνακας 5.9:** Αριθμός φύλλων, αριθμός βλαστών και ύψος φυταρίων την 12<sup>η</sup> μέρα μετά την εγκατάσταση . (2/12/2014)

<b>ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ</b>	<b>ΕΠΙΒΙΩΣΗ</b>	<b>ΑΡ.ΦΥΛΛΩΝ</b>	<b>ΑΡ.ΒΛΑΣΤΩΝ</b>	<b>ΥΨΟΣ</b>
21/11/2014	X	24	3	6 cm.
21/11/2014	X	26	1	9 cm.
21/11/2014	X	12	1	5 cm.
21/11/2014	X	18	4	4 cm.
21/11/2014	X	15	1	5 cm.

**Πίνακας 5.10:** Αριθμός φύλλων, αριθμός βλαστών και ύψος φυταρίων την 19<sup>η</sup> μέρα μετά την εγκατάσταση. (9/12/2014)

<b>ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ</b>	<b>ΕΠΙΒΙΩΣΗ</b>	<b>ΑΡ.ΦΥΛΛΩΝ</b>	<b>ΑΡ.ΒΛΑΣΤΩΝ</b>	<b>ΥΨΟΣ</b>
21/11/2014	X	34	3	6 cm.
21/11/2014	X	33	1	9 cm.
21/11/2014	X	22	1	5 cm.
21/11/2014	X	24	4	5 cm.
21/11/2014	X	18	1	5 cm.



**Πίνακας 5.11:** Αριθμός φύλλων, αριθμός βλαστών και ύψος φυταρίων την 40<sup>η</sup> μέρα μετά την εγκατάσταση. (30/12/2014)

<b>ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ</b>	<b>ΕΠΙΒΙΩΣΗ</b>	<b>ΑΡ.ΦΥΛΛΩΝ</b>	<b>ΑΡ.ΒΛΑΣΤΩΝ</b>	<b>ΥΨΟΣ</b>
21/11/2014	X	40	3	8 cm.
21/11/2014	X	48	1	10 cm.
21/11/2014	X	22	1	5 cm.
21/11/2014	X	28	4	6 cm.
21/11/2014	X	28	1	5 cm.

**Πίνακας 5.12:** Αριθμός φύλλων, αριθμός βλαστών και ύψος φυταρίων την 50<sup>η</sup> μέρα μετά την εγκατάσταση. (9/01/2015)

<b>ΗΜΕΡΟΜΗΝΙΑ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΗΣ</b>	<b>ΕΠΙΒΙΩΣΗ</b>	<b>ΑΡ.ΦΥΛΛΩΝ</b>	<b>ΑΡ.ΒΛΑΣΤΩΝ</b>	<b>ΥΨΟΣ</b>
21/11/2014	X	46	3	8 cm.
21/11/2014	X	54	1	10 cm.
21/11/2014	X	22	1	5 cm.
21/11/2014	X	30	4	7 cm.
21/11/2014	X	28	1	6 cm.

Στη συνέχεια στον Πίνακα 5.13, παρουσιάζονται συγκεντρωτικά τα αποτελέσματα των υπολοίπων πινάκων και παρουσιάζονται και τα αποτελέσματα της στατιστικής ανάλυσης

Η ανάπτυξη των φυταρίων του είδους *Origanum scabrum* σε υπόστρωμα με χαμηλότερη συγκέντρωση MS και σουκρόζης αύξησε σημαντικά το ποσοστό των φυταρίων που επιβίωσαν ex vitro (Πίν. 5.13).

**Πίνακας 5.13:** Επίδραση του υποστρώματος ανάπτυξης των φυταρίων Πλήρους ή μισής δύναμης MS στο ποσοστό επιβίωσης και στην ανάπτυξη των φυταρίων.

<b>Υπόστρωμα ανάπτυξης</b>	<b>Ποσοστό επιβίωσης%</b>	<b>Μέσος Αριθμός φύλλων</b>	<b>Μέσος Αριθμός βλαστών</b>	<b>Μέσο Ύψος βλαστών (cm)</b>
<b>Πλήρους δύναμης MS, 3 % σουκρόζη</b>	60 a	45	1,8	8
<b>Μισής δύναμης MS, 1,5 % σουκρόζη</b>	100 b	37	2	8
<i>Ανάλυση της διασποράς</i>				
<b>Υπόστρωμα ανάπτυξης</b>	*	NS	NS	NS
Οι μέσοι των επεμβάσεων διαχωρίζονται με το Student's test σε $P=0.05$ .				
*, **: σημαντικά σε $P=0.05$ , $P=0.01$ , αντίστοιχα, NS: μη σημαντικά σε $P=0.05$ .				

## *6<sup>ο</sup> Κεφάλαιο*

# **ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ**

Όπως αναφέρθηκε σκοπός της πτυχιακής αυτής μελέτης, ήταν να διαπιστωθεί η επίδραση του υποστρώματος ανάπτυξης *in vitro* φυταρίων του είδους *Origanum scabrum*, κατά την επιβίωσή τους σε *ex vitro* συνθήκες.

Φαίνεται η ανάπτυξη των φυταρίων και η ριζοβόλησή τους σε υπόστρωμα φτωχότερο σε θρεπτικά στοιχεία και σουκρόζη (μισής δύναμης MS και 1.5% σουκρόζη) αύξησε σημαντικά το ποσοστό της επιβίωσής τους σε *ex vitro* συνθήκες. Πιθανόν στο φτωχότερο υπόστρωμα σχηματίστηκαν φυτάρια λιγότερο απαιτητικά σε θρεπτικά στοιχεία και έτοιμο σάκχαρο γεγονός που προκάλεσε το αυξημένο ποσοστό επιβίωσής τους στο εδαφικό υπόστρωμα.

Το αποτέλεσμα αυτό αποτελεί μια σαφή ένδειξη, του οφέλους που έχει η τελική ανάπτυξη και ριζοβολία φυταρίων σε φτωχότερο υπόστρωμα στον μετέπειτα εγκλιματισμό τους, αλλά απαιτεί περαιτέρω διερεύνηση.

## BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aligiannis N., Kalpoutzakis E., Mitaku S. and Chinou I. B. (2001).** Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem.* **49(9)**: 4168-4170.
- Amiot J., Salmon Y., Collin C. and Thompson J.D. (2005).** Differential resistance to freezing a spatial distribution in a chemically polymorphic plant *Thymus vulgaris*. *Ecology letters.* **8(4)**: 370-377.
- Baydar H., Sagdis O., Ozkan G. and Karadogan T. (2004).** Antibacterial activity and composition of essential oils from *Origanum*, *Thymbra* and *Satureja* species with commercial importance in Turkey. *Food Control.* **15(3)**: 169-172.
- Βολιώτης Δ. (1998).** *Οικονομική Βοτανική*. Δεύτερη έκδοση, Αθήνα, σελ. 266.
- Bosabadils A.M. and Tsekos I. (1984).** Glandular hair formation in *Origanum* species. *Ann. Bot.* **53**: 559-563.
- Bouchra C., Achouri M., Hassani L.M.I. and Hmamouchi M. (2003).** Chemical composition and antifungal activity of seven Moroccan Labiatae against *Botrytis cinerea*. *J. Ethnopharm* **89(1)**: 165-169.
- Bozin B., Dukic N.M., Simin N. and Anackov G. (2006).** Characterization of the volatile composition of essential oils of some Lamiaceae spice and the antimicrobial and antioxidant activities of the entire oils. *J. Agric. Food Chem.* **54**: 1822-1828.
- Close C.D. and Mc Arthur C. (2002).** Rethinking the role of many plant phenolics-protection from photodamage not herbivores? *Oikos.* **99(1)**: 166-172.
- Deb CR, Imchen T (2010),** An efficient in vitro hardening of tissue culture raised plants. *Biotechnology* **9**: 79–83
- Diettrich B, Mertinat H, Luckner M (1992),** Reduction of waterloss during ex vitro acclimatization of micropropagated *Digitalis lanata* clone plants. *Biochem Physiol Pflanz* **188**: 23–31
- Goliaris A. (1997).** Research and production of medicinal and aromatic plants in Greece. *Med. Plant Rep.* **4(4)**: 1-10.
- Δεληβουλόπουλος Γ.Σ. (1994).** *Μορφολογία και Ανατομία Φυτών*. Εκδόσεις : Α. Σιμώνη –Σ. Χατζηπάντου Ο.Ε, Θεσσαλονίκη, σελ. 335.

- Δόρδας Χ. (2012).** *Αρωματικά και Φαρμακευτικά Φυτά*. Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη.
- Hao G, Du X, Zhao F et al (2010),** Fungal endophytes-induced abscisic acid is required for flavonoid accumulation in suspension cells of *Ginkgo biloba*. *Biotechnol Lett* 32: 305- 314
- Hazarika BN (2003),** Acclimatization of tissue-cultured plants. *Curr Sci* **85**: 1704–1712
- Heldreich, T.V. (1889).** Une Graminee de L'Atlas retrouve'e sur le mont Taygete en Grece. *Bull. Acad Int Geogr. Bot.* **8**: 117-118.
- Hronkova M, Zahradnickova H, Simkova M et al (2003),** The role of abscisic acid in acclimation of plants cultivated in vitro to ex vitro conditions. *Biol Plant* **46**: 535–541
- Καρούσου Ρ.Β. (1995).** Ταξινομική προσέγγιση της οικογένειας Labiatae στην Κρήτη. Εξάπλωση μορφολογία και αιθέρια έλαια. *Διδακτορική Διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης*.
- Kokkini S., Hanlidou E. and Karousou R. (2000).** Smell and essential oil variation in Labiatae: does it deserve a taxonomist's appreciation? *Bot. Chron.* **13**: 187-199.
- Kokkini S., Karousou R. and Vokou D. (1994).** Pattern of geographic variation of *Origanum vulgare* trichomes and essential oil content in Greece. *Biochem. Syst. Ecol.* **22**: 517-528.
- Kuris A., Altman A. and Putievsky E. (1980).** Rooting and initial establishment of stem cuttings of oregano, peppermint and balm. *Hort. Sci.* **13**: 53-59.
- Lavanya M, Venkateshwarlu B, Devi BP (2009),** Acclimatization of neem microshoots adaptable to semi-sterile conditions. *Indian J Biotechnol* **8**: 218–222
- Lewinsohn E., Ziv-Raz I., Dudai N., Tadmor Y., Lastochkin E., Larkov O., Chainmovitsh D., Ravid U., Putievsky E., Pichersky E. and Shoham Y. (2000).** Biosynthesis of estragole and methyl –eugenol in sweet basil (*Ocimum basilicum* L.). Developmental and chemotypic association of allylphenol O-methyltransferase activities. *Plant Sci.* **160(1)**: 27-35.

- Lamiri A., Lhaloui S., Benjilali B., Berrada M. (2001).** Insecticidal effects of essential oils against Hessian fly, *Mayetiola destructor* (Say). *Field Crops Res.* **71(1)**: 9-15.
- Marin JA, Gella R, Herrero M (1988),** Stomatal structure and functioning as a response to environmental changes in acclimatized micropropagated *Prunus cerasus* L. *Ann Bot* **62**: 663–670
- Mathur A, Mathur AK, Verma P et al (2008),** Biological hardening and genetic fidelity testing of micro-cloned progeny of *Chlorophytum borivillanum*. *Afr J Biotechnol* **17**: 1046–1053
- Pospisilova J, Ticha I, Kadlec P et al (1999),** Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions. *Biol Plant* **42**: 481–497
- Preece JE, Sutter EG (1991),** Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: Debergh PC, Zimmerman RH (eds) *Micropropagation. Technology and application. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 71–93*
- Πετρόπουλος Γ., Ανδρεδάκος Ι. και Φωτόπουλος Χ. (1994).** Τα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά ως εναλλακτική προσπάθεια αναδιάρθρωσης των αροτραίων καλλιεργειών. *Πρακτικά 5<sup>ου</sup> Συνεδρίου «Βελτίωση Φυτών: Συμβολή στην αντιμετώπιση της υποβάθμισης του περιβάλλοντος και του άσματος της πείνας»*. σελ. 243-247.
- Πολυσίου Μ. (2002).** *Επενδυτικές δυνατότητες στον τομέα αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών στη Ελλάδα*. Υ.Ε.Ο., Γ.Π.Α., Αθήνα. σελ. 218.
- Ποντίκης Κ.Α. (1994).** *Πολλαπλασιασμός καρποφόρων δένδρων και θάμνων*. Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα, σελ. 269.
- Rivera D., Obon C., Inocencio C., Verde A., Fajardo J. and Llorach R. (2005).** The ethnobotanical study of local Mediterranean food plants as medicinal resources in southern Spain. *J. Physiol Pharmacol.* **56(1)**: 97-114.
- Shaaya E., Kostjukovski M., Eilberg J. and Sukprakarn C. (1997).** Plant oils as fumigants and contact insecticides for the control of stored-product insects. *J. Stored. Prod. Res.* **33(1)**: 7-15.
- Simopoulos P.A. (2001).** The Mediterranean diets: What is so special about the diet of Greece? The scientific evidence. *J. Nutr.* **131**: 3065-3073.
- Σκρουμπής Β.Γ. (1985).** *Αρωματικά Φυτά και Αιθέρια Έλαια*. Εκδόσεις: OFFSET. ΓΙΑΧΟΥΔΗ Ο.Ε., Θεσσαλονίκη, σελ. 204.

- Spada P. and Perrino P. (1997).** Conservation of oregano species in national and international collections: an assessment. *In: Proceedings of the IPGRI International Workshop on Oregano (8-12 May 1996, Valenzano, Bari)*, (ed: Padulosi S), pp: 14-23 IPGRI, Rome
- Steinar D., Senoo H., Wake K., Holte K. and Blomhoff R. (2003).** Several culinary herbs are important sources of dietary antioxidants. *J. Nutr.* **133**: 1281-1290.
- Ticha I, Radochova B, Kadlec P (1999),** Stomatal morphology during acclimatization of tobacco plantlets to ex vitro conditions. *Biol Plant* **42**: 469–474
- Tuteja N (2007),** Abscisic acid and abiotic stress signaling. *Plant Signal Behav* **2**: 135–138
- Van Huylenbroeck JM (1994),** Influence of light stress during the acclimation of in vitro plantlets. In: Struik PC, Vre-denbergh WJ, Renkema JA, Parlevliet JE (eds) Plant production on the threshold of a new century. *Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, NL*, pp 451–453
- Van Huylenbroeck JM, Huygens H, Debergh PC (1995),** Photoinhibition during acclimatization of micropropagated *Spathiphyllum* “Petite” plantlets. *In Vitro Cell Dev Bio* **131**: 160–164
- Werker E. (1993).** Function of essential oil secreting glandular hairs in aromatic plants of Lamiaceae – a review. *Flav. Frag. J.* **8**: 249-255.
- Werker E., Putievsky E. and Ravid U. (1985).** The essential oils and glandular hairs in different chemotypes of *Origanum vulgare* L. *Ann. Bot.* **55**: 793-801.

### Βιβλιογραφικές πηγές διαδικτύου

- <http://www.mani.org.gr/hlorida/102origanum/orig.htm>