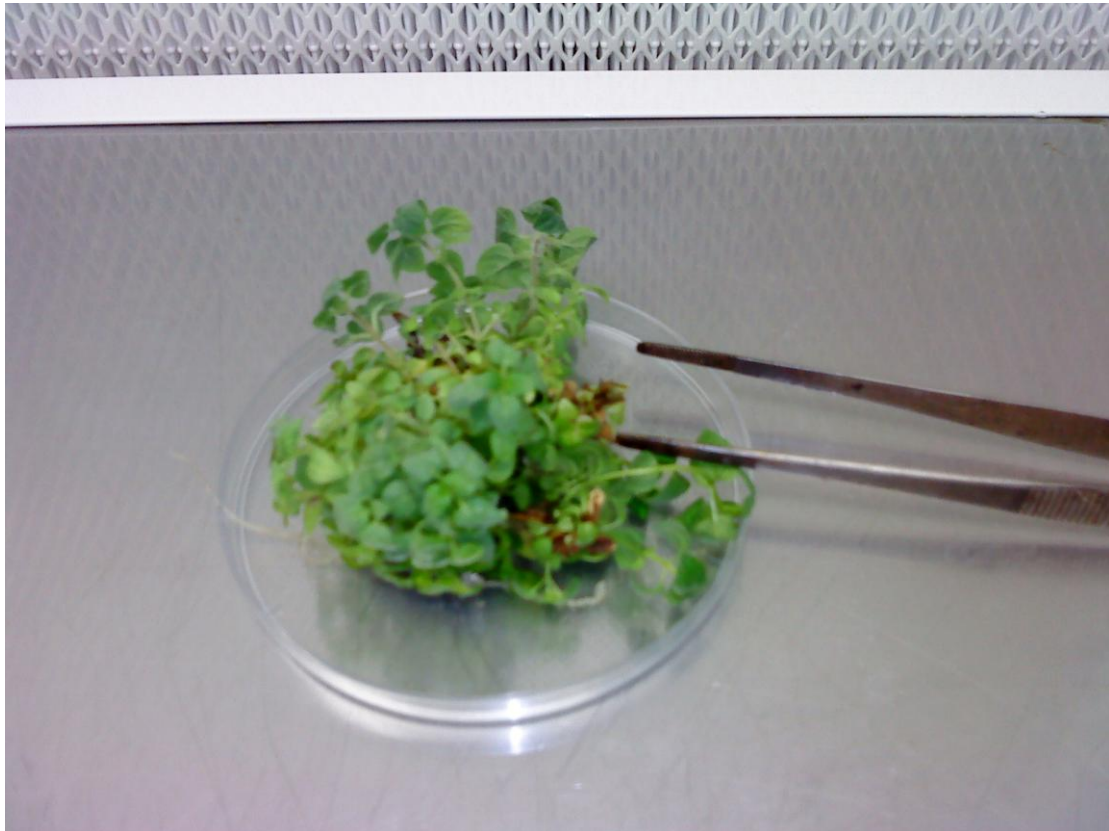


ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ
ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΚΑΙ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΩΝ

IN VITRO ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ *Origanum
vulgare*



Πτυχιακή εργασία
της σπουδάστριας **Παπακωστοπούλου Σοφίας**

Καλαμάτα, Δεκέμβριος 2014

ΑΝΩΤΑΤΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ ΙΔΡΥΜΑ
(ΑΤΕΙ) ΠΕΛΟΠΟΝΝΗΣΟΥ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ ΚΑΙ
ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΤΡΟΦΙΜΩΝ ΚΑΙ ΔΙΑΤΡΟΦΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΤΕΧΝΟΛΟΓΩΝ ΓΕΩΠΟΝΩΝ

IN VITRO ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ *Origanum
vulgare*

Πτυχιακή εργασία
της σπουδάστριας **Παπακωστοπούλου Σοφίας**

Επιβλέπων καθηγητής: Κάρτσωνας Επαμεινώνδας

Καλαμάτα, Δεκέμβριος 2014

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ	4
ΠΡΟΛΟΓΟΣ	5
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΡΩΤΟ ΕΙΣΑΓΩΓΗ	6
1.1 ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΟ ΚΛΙΜΑ	6
1.2 ΑΡΩΜΑΤΙΚΑ ΦΥΤΑ	7
1.3 ΡΙΓΑΝΗ	9
1.4 ΒΟΤΑΝΙΚΑ ΧΑΡΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ	10
1.5 ΧΡΗΣΕΙΣ ΡΙΓΑΝΗΣ	10
1.6 ΚΛΙΜΑΤΙΚΕΣ-ΕΔΑΦΙΚΕΣ ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ	11
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΔΕΥΤΕΡΟ Ο ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ	11
2.1 ΟΙ ΛΟΓΟΙ ΠΟΥ ΕΦΑΡΜΟΖΕΤΑΙ ΑΓΕΝΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ	12
2.2 ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ <i>in vitro</i>	13
2.3 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΟΝ <i>in vitro</i> ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ	14
2.4 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΤΟΥ <i>in vitro</i> ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ	15
2.5 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΟΝ <i>in vitro</i> ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ	16
2.6 ΦΑΣΕΙΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ <i>in vitro</i>	21
2.7 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ	23
2.8 ΤΥΠΟΙ ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	23
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	
3.1. ΥΛΙΚΑ	27
3.1.1. ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ	27
3.1.2. ΥΛΙΚΑ ΑΠΟΛΥΜΑΝΣΗΣ ΣΠΟΡΩΝ	27
3.1.3. ΥΛΙΚΑ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ IN VITRO ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	27
3.1.4. ΤΡΙΒΛΙΑ <i>in vitro</i> ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	27
3.1.5. ΥΠΟΣΤΡΩΜΑ <i>in vitro</i> ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ	28
3.2. ΜΕΘΟΔΟΙ	29
3.2.1 ΜΕΘΟΔΟΣ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ	29
3.2.2. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΕΔΙΚΩΝ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΕΩΝ	29
3.2.3. ΑΠΟΣΤΕΙΡΩΣΗ ΥΛΙΚΩΝ-ΚΟΠΗ ΕΚΦΥΤΩΝ-ΕΠΩΑΣΗ	29

3.2.4 ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΒΛΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΠΟΡΟΥ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ	
<i>Origanum vulgare</i>	30
3.2.5 ΕΚΤΙΜΗΣΗ ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΩΝ	31
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΕΤΑΡΤΟ	
4.1 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	32
4.2.ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	36
ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΠΤΟ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	38

ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Σκοπός της εργασίας αυτής ήτα να διερευνηθεί εάν οι σπόροι του είδους *Origanum vulgare* οι οποίοι προέρχονται από αυτοφυή φυτά που αναπτύσσονται στο όρος Ταΰγετος βλαστάνουν καλύτερα σε σκοτάδι ή σε φωτοπερίοδο 16hφως

ΠΡΟΛΟΓΟΣ

Τα αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά έχουν διαδραματίσει σπουδαίο ρόλο στην ζωή του ανθρώπου σε όλες τις χώρες του κόσμου από την αρχαιότητα. Στην αρχαία Ελλάδα παράδειγμα η θεά Δήμητρα ήταν η θεά της γονιμότητας και της φύσης, για χάρη της πραγματοποιούνταν μεγάλες γιορτές, τα ανθεστήρια. Από την ελληνορωμαϊκή εποχή η χρήση των αρωματικών φυτών ήταν ευρέως διαδεδομένη σε όλα τα κοινωνικά στρώματα. Τα αρωματικά φυτά εκτός από την μαγειρική χρησιμοποιούνταν στην παρασκευή αρωματικών κρασιών και διάφορων αρωμάτων. Ακόμη και σήμερα η θρησκεία μας είναι πολύ συνδεδεμένη με την παρουσία ανθέων στους χριστιανικούς ναούς.

Τις σπουδαίες ιδιότητες μερικών εκ των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών είχε περιγράψει ο Ιπποκράτης (πατέρας της Ιατρικής) ο οποίος ανέφερε ότι ο γλυκάνισος είχε την ιδιότητα να σταματά το πτάρνισμα, ο κορίανδρος βοηθούσε σε διάφορα στομαχικά προβλήματα, το θυμάρι ότι ήταν αποχρεμπτικό, ενώ η ματζουράνα και το θρούμπι περιόριζαν την έκκριση της χολής.

Εκτός από τον Ιπποκράτη με τις ευεργετικές ιδιότητες των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών ασχολήθηκαν ο Θεόφραστος (372 – 287 π.Χ) , Διοσκουρίδης ο Αναζαρβέας (1^{ος} μ.Χ αιώνας), ο οποίος μάλιστα έγραψε το γνωστό σύγγραμμα «περί ύλης ιατρικής» το οποίο περιγράφει τις φαρμακευτικές ιδιότητες εξακοσίων φυτών.

Ακόμη και τα χρόνια του Μεσαίωνα και της Τουρκοκρατίας οι θεραπευτικές ιδιότητες ορισμένων φυτών ήταν πολύ γνωστές όχι μόνο στην χώρα μας αλλά και σε πολλές ακόμη χώρες της Ευρώπης. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι Κομπογιαννίτες της εποχής προσπαθούσαν να θεραπεύσουν πολλές ασθένειες εκείνης της περιόδου με την βοήθεια διάφορων θεραπευτικών φυτών σε συνδιασμό πολλές φορές με μάγια ή προσευχές.

Εκτός από τους αρχαίους Έλληνες πολλοί ήταν οι λαοί που προσπάθησαν στην αρχαιότητα να χρησιμοποιήσουν τις θεραπευτικές ιδιότητες ορισμένων φυτών. Στην Ασία δημιουργήθηκε από τους Κινέζους, πριν 6000-7000 χρόνια, ένα μεγάλο εμπόριο αρτυμάτων που στην συνέχεια οι Άραβες το μετέφεραν στην Ευρώπη.

Οι Σουμέριοι, ένας λαός από τους αρχαιότερους του κόσμου όπως καταγράφεται από τις πηγές, καθώς επίσης και οι Ασσύριοι είχαν γνώση των θεραπευτικών ιδιοτήτων πολλών φυτών και τα χρησιμοποιούσαν οι γιατροί και οι μάγοι της εποχής.

Στην αρχαία Αίγυπτο από τις ανασκαφές που έγιναν στις πυραμίδες προκύπτει ότι τα αρωματικά φυτά χρησιμοποιούνταν εκτός από τις θρησκευτικές τελετές, την παρασκευή αρωμάτων, ως αρτύματα σε τρόφιμα στην μουμιοποίηση των νεκρών και στην θεραπεία διαφόρων παθήσεων. Τα κυριότερα φυτά που χρησιμοποιούσαν στην αρχαία Αίγυπτο ήτα η ματζουράνα, ο γλυκάνισος, η κανέλλα και το κύμινο.

Η χρήση των αρωματικών και των φαρμακευτικών φυτών συνεχίστηκε από την αρχαιότητα μέχρι σήμερα για την κάλυψη βασικών αναγκών του ανθρώπου σε όλες τις χώρες του κόσμου. Σήμερα η παγκόσμια βιομηχανία φαρμάκων και καλλυντικών προσπαθεί να εντοπίσει και άλλα φυτά με αρωματικές ή/και φαρμακευτικές ιδιότητες.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

1.1 ΜΕΣΟΓΕΙΑΚΟ ΚΛΙΜΑ

Η χώρα μας βρίσκεται στην εύκρατη ζώνη και σε γεωγραφικό πλάτος μεταξύ των παραλλήλων του 34^{ου} και 42^{ου}. Το κλίμα της χώρας μας χαρακτηρίζεται από μεσογειακό έως ηπειρωτικό, η ποικιλομορφία αυτή οφείλεται στην ιδιαίτερη τοπογραφία της Ελλάδας που περιλαμβάνει μεγάλες υψομετρικές διαφορές, ιδιαίτερα πετρώματα και ανάγλυφα εδάφους που έχουν σαν αποτελέσματα την ιδιαίτερη χλωρίδα και πανίδα της χώρας μας.

Το κλίμα της μεσογείου χαρακτηρίζεται από ήπιους και υγρούς χειμώνες, θερμά και ξηρά καλοκαίρια. Η ηλιοφάνεια είναι έντονη σχεδόν όλες τις ημέρες του έτους. Την καλοκαιρινή περίοδο οι βροχοπτώσεις είναι ελάχιστες.

Στις περιοχές με γεωγραφικό πλάτος 30-40 μοίρες και στα δύο ημισφαίρια του πλανήτη παρατηρείται μεσογειακό κλίμα και μεταξύ άλλων χαμηλή εδαφική διαθεσιμότητα σε άζωτο και φώσφορο με αποτέλεσμα η χλωρίδα και η πανίδα των περιοχών αυτών να μοιάζουν μεταξύ τους σε μικρό ή μεγάλο βαθμό.

Όταν δηλαδή τα είδη παρουσιάζουν μεταξύ τους εξαιτίας διάφορων κλιματικών παραγόντων και όχι εξαιτίας της φυλογενετικής συγγένειας ονομάζεται συγκλίνουσα εξέλιξη. Στην περίπτωση αυτή τα είδη ζουν σε τελείως διαφορετικές γεωγραφικές περιοχές.

Στην Ελλάδα τα φυτικά είδη αριθμούν περίπου 6.000 μέλη και μάλιστα το ένα δέκατο περίπου εξ αυτών απαντούν αποκλειστικά και μόνο στην χώρα μας. Η χώρα μας έχει μια από τις πλουσιότερες χλωρίδες σε παγκόσμιο επίπεδο, το γεγονός αυτό οφείλεται στις ιδιαίτερες εδαφικές και κλιματολογικές συνθήκες που επικρατούν. Τα αρωματικά και τα φαρμακευτικά φυτά που απαντούν στην χώρας μας είναι τις περισσότερες φορές και μελισσοτροφικά.

1.2 ΑΡΩΜΑΤΙΚΑ ΦΥΤΑ

Η χλωρίδα της χώρας μας είναι μια από τις πιο πλούσιες του κόσμου και περιλαμβάνει μεγάλο αριθμό αρωματικών φυτών. Με τον ορισμό αρωματικά φυτά εννοούμε τα φυτά που φέρουν ένα ιδιαίτερο άρωμα εξαιτίας των αιθέριων ελαίων που απαντούν στα φύλλα, τους καρπούς, τις ρίζες, τα άνθη ή άλλα φυτικά όργανα. (Βώκου 1983).

Τα πιο γνωστά αρωματικά φυτά που απαντούν στην χώρα μας είναι η ρίγανη, το χαμομήλι, το θυμάρι, η λεβάντα, η μέντα, ο βασιλικός, όλα τα είδη που ανήκουν στην οικογένεια των εσπεριδοειδών, ο γλυκάνισος, η δάφνη και πολλά ακόμη που χρησιμοποιούνται ευρέως από την αρχαιότητα. Πολλά από τα φυτά αυτά είναι αυτοφυή, κάποια άλλα καλλιεργούνται ως καλλωπιστικά για τα ιδιαίτερα αρώματά τους.

Οι θεραπευτικές ιδιότητες πολλών φυτών έχουν μελετηθεί και στο παρελθόν από επιστήμονες και τους λαούς πολλών χωρών παγκοσμίως και σήμερα χρησιμοποιούνται ευρέως από την βιομηχανία τροφίμων, καλλυντικών και φαρμάκων. Στην χώρα μας η καλλιέργεια των αρωματικών και των φαρμακευτικών φυτών δεν έχουν αναπτυχθεί παρά τις εντατικές προσπάθειες που έγιναν στο παρελθόν από το Υπουργείο Γεωργίας αλλά και από ιδιώτες.

Οι ιδιαίτερες εδαφοκλιματικές συνθήκες της χώρας μας που επιτρέπουν την ανάπτυξη πληθώρα αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών δυστυχώς δεν έχουν αξιοποιηθεί επαρκώς μέχρι σήμερα.

Πολλοί είναι δυστυχώς οι συλλογείς που κάθε χρόνο συγκομίζουν μικρές ή μεγάλες ποσότητες διάφορων αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών με στόχο να τα διοχετεύσουν στο εμπόριο. Η λανθασμένη συλλογή των φυτών αυτών πολλές φορές μειώνει δραστικά τον πληθυσμό τους με αποτέλεσμα να οδηγούμαστε ακόμη και στη εξαφάνιση μερικών εξ αυτών. Χαρακτηριστικό είναι το γεγονός ότι μέχρι σήμερα η λανθασμένη συλλογή έχει οδηγήσει στην εξαφάνιση τουλάχιστον πέντε φυτικών ειδών αλλά και στον κίνδυνο εξαφάνισης ακόμη 33 φυτικών ειδών, 25 εκ των οποίων είναι ενδημικά.

Για να αναπτυχθεί η καλλιέργεια των αρωματικών και των φαρμακευτικών φυτών αλλά χωρίς να δημιουργηθούν προβλήματα στην χλωρίδα θα πρέπει αυτοί που ασχολούνται ή που μπορεί να ασχοληθούν με αυτά να μπορούν να τα αναγνωρίσουν κι να ξέρουν αρκετά για την καλλιέργεια τους.

Το Υπουργείο Γεωργίας, για να μπορέσει να λάβει μέτρα για την προστασία των φυτών που κινδυνεύουν, συνέστησε επιτροπή από ειδικούς οι οποίοι κατέγραψαν ένα πολύ μεγάλο αριθμό από αυτά. Τα φυτικά αυτά είδη δημοσιεύθηκαν στο υπ. Αριθμό 67/81 φύλλο της Εφημερίδας της Κυβερνήσεως. Φυσικά ο αριθμός αυτός δεν ανταποκρίνεται στα φυτικά είδη που πράγματι άμεσα κινδυνεύουν, αλλά δείχνει το ενδιαφέρον τους για την προστασία της χλωρίδας.

Εκτός από το Υπουργείο Γεωργίας που με διάφορες Υπηρεσίες του βοηθάει την προστασία των φυτικών ειδών, μεγάλο ενδιαφέρον για το ίδιο θέμα δείχνουν και άλλοι μη κρατικοί φορείς. Ενδεικτικά αναφέρουμε την «Ελληνική Προστασία της Φύσης» και το «Μουσείο Φυσικής Ιστορίας Γουλανδρή» που αναπτύσσουν ιδιαίτερη δραστηριότητα για την προστασία της ελληνικής χλωρίδας.

Βασική προϋπόθεση για την προστασία της χλωρίδας του τόπου μα είναι η γνώση των φυτών και η πείρα προκειμένου να συγκομιστούν σωστά. Μερικά βασικά μέτρα που θα πρέπει να τηρούνται για την προστασία της βιοποικιλότητας είναι οι εξής:

- Θα πρέπει να περιοριστεί όσο το δυνατόν περισσότερο η βόσκηση κυρίως από γίδες σε περιοχές που φυτά κινδυνεύουν με εξαφάνιση
- Θα πρέπει να απαγορευτεί η συλλογή αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών από ανθρώπους που δεν φέρουν ειδική άδεια.
- Θα πρέπει το εκπαιδευτικό πρόγραμμα να συμπεριλάβει ειδικά σεμινάρια που σχετίζονται με την προστασία της ελληνικής χλωρίδας προκειμένου η κοινωνία να γνωρίσει, να αγαπήσει και εν τέλει να προστατεύσει τα φυτικά είδη που κινδυνεύουν με εξαφάνιση.
- Θα πρέπει επίσης να δημιουργηθούν εθνικά πάρκα τα οποία να προστατεύουν τα φυτικά είδη.
- Εκπαίδευση τα σχολεία και σε ειδικά σεμινάρια του ελληνικού κοινού ώστε να αποκτήσει συνείδηση του κινδύνου που απειλεί την χλωρίδα, να γνωρίσει τα φυτά, να τα αγαπήσει και να τα προστατεύσει.

1.3 ΡΙΓΑΝΗ

Η ρίγανη (*Origanum vulgare*,) ανήκει στην οικογένεια των χειλανθών (Lamiaceae) Η ονομασία ρίγανη δίνεται σε φυτά της οικογένειας Ορίγανον (*Origanum*) που περιλαμβάνει περίπου 30 φυτικά είδη, τα περισσότερα από τα οποία χρησιμοποιούνται ως αρωματικά. Είναι φυτό που αναπτύσσεται στην Κεντρική Ασία και σε μεσογειακές χώρες (Ελλάδα, Κύπρος, Ισραήλ, Τουρκία, Αλβανία, Μαρόκο) (Χατζόπουλος 2010). Στην χώρα μας η ρίγανη απαντά σε τοποθεσίες με υψόμετρο μέχρι 2000 μέτρα.

Η ρίγανη είναι γνωστή στην χώρα μας από τα αρχαία χρόνια για την χρήση ως φάρμακο σε διάφορες παθήσεις. Το όνομα της προέρχεται από την αρχαία λέξη ορίγανον, η οποία προέρχεται από τις λέξεις «όρος» και «γανούσθαι» που σημαίνει αγαπώ, απολαμβάνω, λόγω του ότι η ρίγανη προτιμά τα μεγάλα υψόμετρα. Η ονομασία «oregano» είναι κοινή σε πολλές χώρες της Ευρώπης όπως η Γερμανία, η Ιταλία, η Ισπανία κ.α.

Οι πρώτες αναφορές γίνονται από τον Θεόφραστο και τον Διοσκουρίδη, ενώ την μεσαιωνική περίοδο η εξάπλωση της ως φαρμακευτικό φυτό ήταν ραγδαία. (Σκρουμπής 1988)

1.4

ΒΟΤΑΝΙΚΑ

ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ

Η ρίγανη είναι ένα φυτό πολυετές, ποώδες, με χνουδοτό βλαστό που φτάνει μέχρι και το 1 μέτρο, ξυλώδη και αρωματικό. Ο βλαστός είναι όρθιος, τετραγωνικός, πολύκλαδος και έχει ύψος 30-80 εκατοστά. Επίσης, οι βλαστοί φέρουν αδένες, πυκνούς βότρεις και τα κλαδιά επικαλύπτονται από βράκτια κάλυκες 5 οδόντων και δίχειλη στεφανή.

Τα φύλλα είναι αντίθετα, έμμισχα και πολύ πριονωτα, επίσης έχουν σχήμα ωοειδή ή ελλειψοειδή και φέρουν τριχοειδής αδένες. Ο αριθμός και το μέγεθος των αδενικών τριχωμάτων στα φύλλα, βράκτια και κάλυκες μειώνεται σημαντικά από τις νότιες προς τις βόρειες περιοχές της Ελλάδας. Τα άνθη έχουν άσπρο χρώμα και φύονται σε ακραίους συμπαγείς κορύμβους.

Τα φύλλα και τα άνθη της ρίγανης έχουν αρωματικό άρωμα και ελαφρώς πικρή γεύση. Τα αιθέρια έλαια της ρίγανης μεταξύ άλλων αποτελούνται από το οριγανέλαιο (θυμόλη και καρβοκρόλη), καφεϊκό οξύ, ροσμαρινικό οξύ κ.α.

1.5 ΧΡΗΣΕΙΣ ΡΙΓΑΝΗΣ

Η ρίγανη που χρησιμοποιείται ως φαρμακευτικό φυτό από την αρχαιότητα βρίσκει και σήμερα ευρεία εφαρμογή σε πολλούς τομείς της βιομηχανίας. Τα φυτικά τμήματα και τα αιθέρια έλαια του φυτού χρησιμοποιούνται σε παγκόσμιο επίπεδο ως αρτύματα, έτσι η ρίγανη αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα αρτύματα των μεσογειακών χωρών.

Η βιομηχανία τροφίμων χρησιμοποιεί κυρίως τα ξερά φύλλα ρίγανης για την παραγωγή ροφημάτων και κονσερβών. Επίσης, η ρίγανη αποτελεί πρώτη ύλη για την παραγωγή της πίτσας. Στην φαρμακοβιομηχανία το αιθέριο έλαιο του φυτού χρησιμοποιείται εξαιτίας των σπυδαίων αντιμικροβιακών και αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων του. Η αντιοξειδωτικές ιδιότητες της ρίγανης οφείλονται στην καρβακρόλη, την θυμόλη, των φλαβονοειδών καθώς επίσης και των φαινολικών οξέων.

Το αιθέριο έλαιο της ρίγανης χρησιμοποιείται επίσης για την παραγωγή φυτικών καλλυντικών υψηλής ποιότητας.

Στην γεωργία η ρίγανη χρησιμοποιείται στην φυτοπροστασία εξαιτίας της νηματωδοκτόνου και της εντομοαπωθητικής δράσης του αιθέριου ελαίου της.

Επίσης, σε πολλές περιπτώσεις σπέρνεται ρίγανη προκειμένου να προστατευτούν τα γυμνά και επικλινή εδάφη από διάβρωση. Η ρίγανη είναι γνωστό ότι δημιουργεί πληθώρα παραφυάδων με αποτέλεσμα να συγκρατεί επιτυχώς το επιφανειακό έδαφος.

1.6 ΚΛΙΜΑΤΙΚΕΣ-ΕΔΑΦΙΚΕΣ ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ

Η ρίγανη αυτοφύεται σε θαμνώδη και χερσαία εδάφη σε όλη την Ελλάδα και καλλιεργείται σε μικρή έκταση, αναπτύσσεται σε διάφορα υψόμετρα παραθαλάσσιες και ορεινές περιοχές ακόμη και σε άγονα εδάφη. Η ρίγανη στην χώρα μας ευδοκίμει ακόμη και σε ημιορεινές δροσερές περιοχές και σε χωράφια ασβεστόχα, βραχώδη μέρη, ξηρικά, φτωχής ή πλούσιας οργανικής ουσίας. Είναι φυτό που αναπτύσσεται σε ένα υψόμετρο ανάμεσα στο επίπεδο της θάλασσας και 500 μέτρα αφού να αντέξει ακόμη και στις χαμηλές θερμοκρασίες του χειμώνα

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ

Ο πολλαπλασιασμός των φυτών είναι μια πανάρχαια τέχνη που αποβλέπει στην αύξηση του αριθμού των φυτών. Οι αρχαίοι πρόγονοι μας, προκειμένου να δημιουργήσουν ένα σταθερό πολιτισμό, έπρεπε να αλλάξουν τον τρόπο ζωής τους από νομαδικό στο γεωργικό. Άρχισαν να μαζεύουν σπόρους για άμεση κατανάλωση, αλλά και για σπάρσιμο την επόμενη περίοδο. Οι πρώτοι παραγωγοί εγκαταστάθηκαν κατά μήκος των ποταμών, γιατί το νερό ήταν αναγκαίο, τόσο για την επιβίωση τους όσο και για το πότισμα των καλλιεργειών τους. Ακόμα και γιατί τα εδάφη αυτά ήταν γόνιμα. Μεταξύ των φυτών που μάζευαν, παρατήρησαν ότι μερικά απ' αυτά, παρήγαγαν μεγαλύτερους σπόρους, που βλάστειναν γρήγορα και νοστιμότερους καρπούς, απ' ότι άλλα.

Ο πολλαπλασιασμός των φυτών γίνεται είτε εγγενώς (με σπόρο), είτε αγενώς (με μοσχεύματα, με *in vitro* πολλαπλασιασμό). Στην πρώτη περίπτωση η ποικιλία δεν αναπαράγεται πιστά. Τα φυτά που προέρχονται από εγγενής

αναπαραγωγή εμφανίζουν μεγαλύτερη ζωηρότητα, πλούσιο ριζικό σύστημα, καλύτερη προσαρμοστικότητα στο περιβάλλον και καλύτερη αντοχή σε εχθρούς και ασθένειες.

Από την αρχαιότητα είναι γνωστό ότι μερικά φυτά πολλαπλασιαζόταν εύκολα με μοσχεύματα ή με καταβολάδες βλαστών, και ότι τα αναπαράγομενα φυτά, γενετικά, ήταν παρόμοια με το μητρικό φυτό. Η τεχνική αυτή, που εξασφαλίζει πιστή γενετικά αναπαραγωγή στα φυτά, ονομάστηκε αγενής, βλαστικός ή κλωνικός πολλαπλασιασμός. Για τον επιτυχή πολλαπλασιασμό των φυτών απαιτούνται γνώσεις σχετικές με την ανατομία, ανάπτυξη και αύξηση αυτών αι επαρκής τεχνική εμπειρία αναφορικά μ' αυτόν.

Σε μεγάλο ποσοστό η επιτυχία μιας καλλιέργειας εξαρτάται από την εφαρμογή ενδεδειγμένων μεθόδων πολλαπλασιασμού των φυτών. Το κέρδος των παραγωγών επηρεάζεται άμεσα από την ποιότητα των φυτών, που προμηθεύονται από μονάδες πολλαπλασιαστικού υλικού. Η χρησιμοποίηση σύγχρονων και ταχείας παραγωγής μεθόδων πολλαπλασιασμού των φυτών προϋποθέτει οι φυτωριούχοι να γνωρίζουν πολύ καλά την ανατομική και την αύξηση του φυτού καθώς επίσης και τις σύγχρονες τεχνικές.

Πολλά φυτά αναπαράγονται υπό φυσικές συνθήκες αγενώς. Αγενής ή βλαστικός πολλαπλασιασμός των φυτών είναι ο τρόπος εκείνος πολλαπλασιασμού των φυτών, κατά τον οποίο τα νέα παραγόμενα φυτά έχουν ακριβώς τα ίδια χαρακτηριστικά με εκείνα των μητρικών φυτών από τα οποία προέρχονται. Η ομοιομορφία πολλών οπωροκηπευτικών φυτών και η ομοιότητα ή ομοιομορφία της καλλιέργειας εξασφαλίζεται κυρίως με τον αγενή πολλαπλασιασμό. Για το λόγο αυτό πολλές από τις οπωροκηπευτικές ποικιλίες που παραλλάσσουν γενετικά, πολλαπλασιάζονται με βλαστικά μέρη.

2.1 ΟΙ ΛΟΓΟΙ ΠΟΥ ΕΦΑΡΜΟΖΕΤΑΙ ΑΓΕΝΗΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ

Οι σημαντικότεροι λόγοι που εφαρμόζεται ο αγενής πολλαπλασιασμός είναι οι εξής:

Η ανικανότητα παραγωγής ζωτικών σπόρων. Τα φυτά αναπαράγονται αγενώς, γιατί είτε δεν είχαν είτε έχουν χάσει την ικανότητα να αναπαραχθούν εγγενώς με σπόρο. Πολλά από τα κατώτερα φυτά ή τα φυτά που δεν ανθίζουν

δεν είναι δυνατόν να παράγουν σπόρους, να και παράγουν σπόρια, τα οποία μπορεί να θεωρηθούν οι πρόδρομοι των σπόρων. Τα φυτά αυτά αναπαράγονται αγενώς με βλαστικά όργανα. Επίσης, πολλά από τα ανώτερα φυτά, που παράγουν άνθη, δεν παράγουν ζωτικούς σπόρους για τον λόγο αυτό θα πρέπει να αναπαραχθούν αγενώς, αν πρόκειται να διαιωνιστούν. Κατά την εξέλιξη του φυτικού βασιλείου, που έλαβε χώρα διά μέσου εκατομμυρίων ετών, είναι φανερό ότι κατά την ανάπτυξη από το απλούστερο στο πιο περίπλοκο, μερικά από τα ονομάζονται ανώτερα φυτά είτε δεν έχουν αναπτύξει λειτουργικά σεξουαλικά όργανα, είτε αν έχουν αναπτυχθεί έχουν γίνει μερικώς ή πλήρως εξαμβλωματικά.

Η ανικανότητα να αναπαραχθούν πιστά γενετικά, ως προς τον τύπο, από σπόρο. Πολλά φυτά παράγουν άνθη, τα οποία είναι επιδεκτικά στη σταυρογονιμοποίηση, και κατά συνέπεια παράγουν σπόρους, που παραλλάσουν γενετικά. Το φαινόμενο αυτό παρατηρείται σε δενδρώδεις καλλιέργειες, σε καλλωπιστικά δέντρα και σε θάμνους.

Η διαιώνιση ενός ιδιαίτερου χαρακτηριστικού του φυτού. Τα φυτά μπορεί να αναπαραχθούν αγενώς για να διαιωνίσουμε ένα ιδιαίτερο χαρακτηριστικό του φυτού. Ο χαρακτήρας νεανικότητας μιας ποικιλίας ενός φυτού διαφέρει από το χαρακτήρα ενηλικίωσης και είναι μερικές φορές επιθυμητό να διατηρήσουμε το χαρακτήρα νεανικότητας με τη μέθοδο του αγενούς πολλαπλασιασμού.

Η επιτάχυνση αύξησης του αριθμού των φυτών. Πολλά φυτά αναπαράγονται με βλαστικά όργανα λόγω της ταχύτητας και ευκολίας αύξησης του αριθμού των φυτών.

Η ανάπτυξη ανθεκτικότητας στα παθογόνα. Τα φυτά πολλαπλασιάζονται με βλαστικά όργανα για να αυξήσουν την ανθεκτικότητα των στα παθογόνα.

Η περιβαλλοντική προσαρμογή. Σε πολλές περιπτώσεις ο μόνος λόγος πολλαπλασιασμού των φυτών με βλαστικά όργανα είναι η αύξηση της προσαρμοστικότητας του φυτού σε μια συγκεκριμένη περιοχή.

Ο έλεγχος της ζωηρότητας της βλάστησης. Συχνά είναι επιθυμητός ο έλεγχος της βλάστησης του φυτού και αυτό επιτυγχάνεται με τον αγενή πολλαπλασιασμό. (βιβλίο)

2..2 ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ *in vitro*

Παρόλο που ο πολλαπλασιασμός *in vitro* αποτελεί κομμάτι του αγενούς πολλαπλασιασμού, στην παρούσα πτυχιακή διατριβή θα αναπτυχθεί ξεχωριστά μιας και αποτελεί το θέμα αυτής.

Η τεχνική *in vitro*, αφορά την καλλιέργεια ασηπτικά κυττάρων και οργάνων ζώντων οργανισμών, καθώς επίσης και με την μεταχείριση των καλλιεργειών αυτών που σχετίζεται με τον επιδιωκόμενο σκοπό (έρευνα, βελτίωση, αναπαραγωγή κλπ).

Τα τελευταία χρόνια η καλλιέργεια της ρίγανης αναπτύσσεται με ταχείς ρυθμούς για τον λόγο αυτό ο πολλαπλασιασμός *in vitro* έχει στόχο να καλύψει την αυξημένη ζήτηση μεγάλων ποσοτήτων πολλαπλασιαστικού υλικού σε μικρό χρονικό διάστημα.

2.3 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΟΝ IN VITRO ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ

Ο *in vitro* πολλαπλασιασμός στηρίζεται σε δύο σημαντικές ιδιότητες των φυτικών κυττάρων, στην ικανότητα τους να αναγεννήσουν ολόκληρο το φυτό από το οποίο προήλθαν και στην ικανότητα πλήρως διαφοροποιημένων και ώριμων φυτικών κυττάρων να αποκτήσουν εκ' νέου μεριστωματικές ιδιότητες. Η ικανότητα λοιπών των κυττάρων να αναγεννά ολόκληρο το φυτό από το οποίο προέρχονται οδήγησε τους επιστήμονες στην ανάπτυξη νέων τεχνικών καλλιέργειας των κυττάρων *in vitro* που στηρίζονται στην επιστήμη της Βιοτεχνολογίας. Οι επιστήμονες έχουν την δυνατότητα να απομονώσουν φυτικά κύτταρα από το μητρικό φυτό, να τα καλλιεργήσουν στο εργαστήριο και να επέμβουν στον γενετικό κώδικα τους.

Με τον όρο ιστοκαλλιέργεια ή καλλιέργεια *in vitro*, εννοούμε την τεχνική με την οποία απομονώνουμε μικρά τεμάχια φυτικού ιστού από το μητρικό φυτό σε ασηπτικές συνθήκες και τα καλλιεργούμε σε θρεπτικό υπόστρωμα σε ελεγχόμενες συνθήκες περιβάλλοντος. Ο φυτικός ιστός ή τμήμα ιστού του μητρικού φυτού που απομακρύνεται από το μητρικό φυτό προκειμένου να χρησιμοποιηθεί για *in vitro* πολλαπλασιασμό ονομάζεται έκφυτο. Τα έκφυτα προέρχονται από κορυφές βλαστών, αλλά διαφέρουν σε μέγεθος και αριθμό εμβρυωδών φύλλων. Τις περισσότερες πιθανότητες για επιτυχή πολλαπλασιασμό έχουν τα επάκρια μεριστώματα που δεν φέρουν εμβρυώδη

φύλλα και είναι απαλλαγμένα από ασθένειες. Ενώ τα μεριστώματα που φέρουν ένα ή και περισσότερα εμβρυώδη φύλλα εμφανίζουν υψηλό ποσοστό επιβίωσης στην καλλιέργεια αλλά είναι πολύ πιθανό να μεταφέρουν ιώσεις.

Ο *in vitro* πολλαπλασιασμός διακρίνεται σε δύο μεγάλες κατηγορίες. Στην πρώτη περίπτωση η απομόνωση και η καλλιέργεια αφορά φυτικά όργανα ή σπέρματα προκειμένου να παραχθεί ένα ολόκληρο φυτό. Για τον λόγο αυτό επιτρέπεται η ανάπτυξη και η διαφοροποίηση των φυτικών κυττάρων ή των ιστών από τα όργανα, τα οποία έχουν εμβολιαστεί σε θρεπτικό μέσο. Στην δεύτερη περίπτωση ο *in vitro* πολλαπλασιασμός επιτυγχάνεται η αποδιαφοροποίηση των κυττάρων για να δημιουργηθεί κάλλος που στην συνέχεια θα χρησιμοποιηθεί στην σωματική εμβρυογένεση ή την οργανογένεση με απώτερο στόχο την δημιουργία ενός αναγεννημένου φυτού. (Χατζόπουλος 2001).

2.4 ΙΣΤΟΡΙΚΗ ΑΝΑΔΡΟΜΗ ΤΟΥ IN VITRO ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ

Η τεχνική της ιστοκαλλιέργειας ξεκίνησε πολλούς αιώνες νωρίτερα όταν παρατηρήθηκε ο σχηματισμός του κάλλους και την έκπτυξη νέων οφθαλμών μετά από την αφαίρεση ενός μικρού δακτυλικού τμήματος από τον φλοιό. Στην ουσία όμως η ιστοκαλλιέργεια εφαρμόζεται από τον προηγούμενο αιώνα όταν ο βοτανολόγος Haberlandt έθεσε την βιολογική βάση να εδραιωθεί η τεχνική της ιστοκαλλιέργειας με την επιβεβαίωση των πειραμάτων του Roux. Το 1878 παρήγαγε κάλο από έκφυτα γογγυλιού δίνοντας ιδιαίτερη έμφαση στην πολικότητα που εμφανίζει το συγκεκριμένο φυτικό είδος. Ο ίδιος επιστήμονες αποπειράθηκε να εμβολιάσει διαφορετικά είδη μεταξύ τους και με τον τρόπο αυτό απέδειξε τους κληρονομικούς παράγοντες που δυσκολεύουν τέτοιες επαφές. Επιπλέον, τόνισε ότι το μέλλον της εφαρμογής της συγκεκριμένης τεχνικής κρύβεται στις συνθήκες που ευνοούν τα μεμονωμένα κύτταρα να διαιρεθούν. Μάλιστα, έκανε χρήση ενός θρεπτικού υποστρώματος το οποίο περιείχε γλυκόζη και πεπτόνη, ωστόσο το φυτικό είδος που επέλεξε δεν έφερε θετικά αποτελέσματα. Τα επόμενα χρόνια ο Reehinger ασχολήθηκε με το κατάλληλο μέγεθος που θα πρέπει να έχει το έκφυτο προκειμένου να προκαλέσει την κυτταρική διαίρεση. Αργότερα οι επιστήμονες Kotte και

Robbins καλλιέργησαν μεριστωματικά κύτταρα ριζιδίων φυτών μπιζελιού και καλαμποκιού με αποτέλεσμα την διαφοροποίηση των ιστών τους.

Προκειμένου αυτή η τεχνική πολλαπλασιασμού να έχει καλύτερα αποτελέσματα έγινε χρήση αυξινών σε υποστρώματα, έτσι άρχισαν να δημιουργούνται σύνθετα υποστρώματα.

2.5 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΟΝ *VITRO* ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ

Μερικούς από τους παράγοντες που επιδρούν στην επιτυχία του *in vitro* πολλαπλασιασμού είναι οι εξής:

❖ Το είδος του έκφυτου.

Υπάρχουν διαφορετικές περιπτώσεις έκφυτων ανάλογα με το είδος που χρησιμοποιούμε στον *in vitro* πολλαπλασιασμό, παρακάτω αναφέρονται οι σπουδαιότεροι:

- Καλλιέργεια φυτικών οργάνων (ριζών, βλαστών, ανθέρων κλπ),
- Καλλιέργεια του κάλλου με στόχο την παραγωγή εμβρυοειδών ή την οργανογένεση
- Ασηπτική καλλιέργεια μεριστωμάτων βλαστού ή άλλων φυτικών ιστών προκειμένου να αναπτυχθούν ολόκληρα φυτά.
- Καλλιέργεια πρωτοπλαστών με στόχο την παραγωγή εμβρυοειδών.

❖ Η σύνθεση του φυσικού υποστρώματος.

Η σύνθεση του φυσικού υποστρώματος αποτελεί τον σημαντικότερο παράγοντα που επηρεάζει την επιτυχία του *in vitro* πολλαπλασιασμού. Το κατάλληλο υπόστρωμα για κάθε καλλιέργεια μπορεί να διαφέρει μεταξύ των ειδών, μεταξύ των ποικιλιών του ίδιου φυτικού είδους και ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης στο οποίο βρίσκεται. Στο σημείο αυτό θα πρέπει να τονιστεί ότι η χρήση θρεπτικών υποστρωμάτων που δεν βρίσκονται σε άριστη σύνθεση ενδεχομένως να προκαλέσει ανωμαλίες στην ανάπτυξη των εκφύτων ή ακόμη και θάνατο των φυτικών ιστών. Επομένως η

σύσταση του υποστρώματος της καλλιέργειας εξαρτάται από την λειτουργία και την προέλευση του κάθε ιστού ή κυττάρου που θα χρησιμοποιηθεί κάθε φορά. Για τον λόγο αυτό η επιλογή των θρεπτικών συστατικών επιλέγεται πειραματικά από τον ερευνητή.

Τα θρεπτικά υποστρώματα έχουν τον ρόλο των προμηθευτών των φυτικών ιστών με απαραίτητες για την ανάπτυξη τους θρεπτικές ουσίες. Το έκφυτο για να πολλαπλασιαστεί επιτυχώς θα πρέπει αρχικά να έχει φυτευτεί σε κατάλληλο θρεπτικό υπόστρωμα που περιλαμβάνει κατηγορίες θρεπτικών συστατικών. Οι σημαντικότερες κατηγορίες που χρησιμοποιούνται για την παρασκευή ενός θρεπτικού υποστρώματος είναι οι εξής:

- **Μακροστοιχεία.** Οι φυτικές καλλιέργειες χρειάζονται συνεχή παροχή ανόργανων στοιχείων. Εκτός από τον άνθρακα, το υδρογόνο και το οξυγόνο θα πρέπει να παρέχονται και μια σειρά από θρεπτικές ουσίες σε μεγάλες ποσότητες (αντιστοιχούν τουλάχιστον στο 0,1% του ξηρού βάρους των φυτών), για τον λόγο αυτό ονομάζονται μακροστοιχεία. Τα μακροστοιχεία λοιπόν που θα πρέπει να περιέχει ένα θρεπτικό υπόστρωμα προκειμένου να εξασφαλίσουμε την επιτυχή ανάπτυξη των φυτικών ιστών είναι το άζωτο (N), ο φώσφορος (P), το κάλιο (K), το μαγνήσιο (Mg), το ασβέστιο (Ca) και το θείο (S). Το άζωτο που απαιτείται σε πολύ μεγάλη συγκέντρωση, βρίσκεται ως νιτρικό ή ως αμμωνιακό ιόν ή σε συνδυασμό των ιόντων αυτών. Το κάλιο προστίθεται με τη μορφή KCl, ή με την μορφή KNO₃.
- **Μικροστοιχεία.** τα στοιχεία αυτά αν και σε πολύ μικρές ποσότητες συνήθως είναι άκρως απαραίτητα για την σωστή ανάπτυξη του ιστού γιατί συμμετέχουν σε βασικές λειτουργίες των φυτικών οργανισμών. Τα πιο συνηθισμένα μακροστοιχεία είναι ο σίδηρος (Fe), το νάτριο (Na), το χλώριο (Cl), το μαγγάνιο (Mn), ο ψευδάργυρος (Zn) και το βόριο (B). και τα στοιχεία αυτά προστίθενται στο υπόστρωμα με την μορφή αλάτων.
- **Βιταμίνες.** Τα φυτά συνθέτουν τις βιταμίνες που είναι απαραίτητες για την αύξηση και την ανάπτυξη. Οι βιταμίνες

βελτιώνουν την ανάπτυξη και την επιβίωση των φυτικών ιστών, στον *in vitro* πολλαπλασιασμό ωστόσο ενδέχεται να υπάρξει έλλειψη ορισμένων βιταμινών. Για τον λόγο αυτό προστίθενται βιταμίνες που χρησιμοποιούνται ως βασικοί μεταβολικοί καταλύτες. Οι σημαντικότερες βιταμίνες που χρησιμοποιούνται είναι η θειαμίνη, το νικοτινικό οξύ, το ασκορβικό οξύ. Η θειαμίνη είναι μια βιταμίνη απαραίτητη για την ανάπτυξη και το νιτρικό οξύ με την πυριδοξίνη βελτιώνουν την ανάπτυξη των φυτών.

- **Αυξητικές ρυθμιστικές ουσίες.** Οι ουσίες αυτές σε μικρές συγκεντρώσεις ρυθμίζουν την αύξηση και την ανάπτυξη των φυτικών οργάνων αλλά και ολόκληρου του φυτού. Οι κυτοκίνινες και οι αυξίνες είναι απαραίτητες ουσίες για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό. Οι πιο συχνά χρησιμοποιούμενες είναι οι αυξίνες (IBA, NAA, IAA 2,4-D) που επηρεάζουν την διαφοροποίηση των επίκτητων ριζών προκειμένου να σχηματιστούν και στην συνέχεια να αναπτυχθεί ο κάλλος. Σε μικρές συγκεντρώσεις ευνοούν την ανάπτυξη ενός φυτικού οργάνου, σε μεγάλες δόσεις ωστόσο την αναστέλλουν. Οι κυτοκίνινες (BAP, ζεατίνη) είναι παράγωγα της αδεΐνης και χρησιμοποιούνται προκειμένου να σχηματιστούν πλάγιοι οφθαλμοί, να διαιρεθούν τα κύτταρα και να διαφοροποιηθούν οι επίκτητοι βλαστοί από κάλλους και βλαστούς. Μάλιστα, η αναλογία αυξίνης/κυτοκινίνης καθορίζει τη μορφογενετική έκφραση των *in vitro* συστημάτων. Σε περιπτώσεις όπου η αναλογία της αυξίνης και της κυτοκινίνης είναι υψηλή επιτυγχάνεται ριζοβολία, δημιουργία κάλλων και εμβρύων. Αντίθετα, για να επιτευχθεί επαγωγή βλαστογένεσης η αναλογία αυξίνης / κυτοκινίνης θα πρέπει να διατηρείται σε χαμηλά επίπεδα.

Το γιββερελλικό οξύ (GA3) ευνοεί την επιμήκυνση των μεσογονάτιων διαστημάτων και την αύξηση των ακραίων οφθαλμών μετά την αποκοπή τους και είναι απαραίτητο για την αύξηση σε ορισμένα μόνο είδη. Σε ορισμένες περιπτώσεις η επίδραση των γιββερελλινών η επίδραση τους στην αύξηση των

βλαστών οφείλεται στην αύξηση της περιεκτικότητας των ιστών σε αυξίνη, που προκαλεί την αύξηση των βλαστών.

- **Σάκχαρα.** Τα σάκχαρα παρέχουν στο φυτό άνθρακα, ενέργεια και ρυθμίζουν την οσμωτική πίεση των θρεπτικών στοιχείων στο υπόστρωμα. Εξαιτίας της μειωμένης φωτοσυνθετικής ικανότητας των ιστών αδυνατούν να παράγουν τους υδατάνθρακες που θα τους εξασφαλίσουν την απαιτούμενη ενέργεια προστίθενται σάκχαρα στο θρεπτικό υπόστρωμα. Τα πιο γνωστά σάκχαρα που χρησιμοποιούνται στον *in vitro* πολλαπλασιασμό είναι η σακχαρόζη, η γλυκόζη και η μαλτόζη. Η σακχαρόζη είναι η πλέον χρησιμοποιούμενη πηγή άνθρακα και ενέργειας στον *in vitro* πολλαπλασιασμό. Κατά την διάρκεια της αποστείρωσης του θρεπτικού μέσου, η σακχαρόζη υδρολύεται σε γλυκόζη και σε φρουκτόζη, έτσι τα φυτικά κύτταρα χρησιμοποιούν στην αρχή την γλυκόζη και αργότερα την φρουκτόζη. Η φρουκτόζη μπορεί να χρησιμοποιηθεί αλλά θεωρείται ως η λιγότερο κατάλληλη.
- **Στερεοποιητικοί παράγοντες.** Η πιο γνωστή ουσία που χρησιμοποιείται στην παρασκευή του υποστρώματος μόνο σε περιπτώσεις όπου απαιτείται στέρεο υπόστρωμα είναι το άγαρ γιατί στο υγρό μέσο ο ιστός θα βυθιστεί και θα πεθάνει εξαιτίας έλειψης οξυγόνου. Τα φυτικά κύτταρα καλλιεργούνται σε υγρό θρεπτικό μέσο με ήρεμη ανατάραξη ή διοχέτευση αποστειρωμένου αέρα. Το άγαρ είναι ένα αδρανές συστατικό, ωστόσο υπάρχουν ενδείξεις ότι αποτελεί πηγή ανόργανων στοιχείων. Το άγαρ προέρχεται από φύκη της θάλασσας, δεν αντιδρά με κανένα συστατικό του θρεπτικού διαλύματος και δεν μεταβάλλει την σύνθεση του. Έχει την ικανότητα να λιώνει στους 90-100° C και να στερεοποιείται περίπου στους 45° C. Συνήθως χρησιμοποιείται σε συγκέντρωση 0,6-0,7%. Άλλοι σταθεροποιητικοί παράγοντες που χρησιμοποιούνται στον *in vitro* πολλαπλασιασμό είναι το biogel, το phytagel και η καθαρή αγαρόζη.

- **Οργανικό άζωτο.** Η βασική πηγή οργανικού αζώτου των θρεπτικών υποστρωμάτων είναι τα αμινοξέα, η γλουταμίνη, η ασπαραγίνη και η αδενίνη. Ωστόσο η χρήση του οργανικού αζώτου στον *in vitro* πολλαπλασιασμό δεν είναι βέβαιο ότι έχει θετικά αποτελέσματα.
- **Οργανικά οξέα.** Η χρήση οργανικών οξέων (π.χ. κιτρικού οξέος) στον *in vitro* πολλαπλασιασμό χαρακτηρίζεται ως αμφίβολη. Υπάρχουν ωστόσο ενδείξεις ότι οργανικά οξέα, κυρίως τα ενδιάμεσα του κύκλου του Krebs προστίθενται για να επιταχύνουν την ανάπτυξη.
- **pH.** Σε τιμές pH υψηλότερες από 7,0 αλλά και σε τιμές χαμηλότερες από 4,5 τα φυτικά κύτταρα παύουν να αναπτύσσονται. Ιδανικές τιμές pH για την ανάπτυξη των κυττάρων στον *in vitro* πολλαπλασιασμό θεωρούνται οι τιμές γύρω στο 5,5-6.
- **Άλλες ουσίες.** Μερικές άλλες ουσίες που χρησιμοποιούνται για διάφορους λόγους στον *in vitro* πολλαπλασιασμό είναι το γάλα καρύδας, η υδρολυμένη καζεΐνη, ο χυμός διάφορων καρπών (π.χ. τομάτας, εσπεριδοειδών) και το εκχύλισμα διάφορων καρπών (π.χ. σόγιας, βύνης, μαγιάς)

Η σύνθεση του υποστρώματος χωρίζεται σε τρεις κατηγορίες που εξαρτάται από την υφή του. Το πρώτο είδος υποστρώματος περιλαμβάνει το υγρό θρεπτικό υπόστρωμα που βρίσκει εφαρμογή κατά κύριο λόγο στην καλλιέργεια ριζών και στην κυτταροκαλλιέργεια, το δεύτερο είδος περιλαμβάνει το ημιστερεοποιημένο υπόστρωμα και η τρίτη κατηγορία περιλαμβάνει το στερεοποιημένο το οποίο μάλιστα χρησιμοποιείται τις περισσότερες φορές. (Ποντίκης, 1994, Auge et al., 1995, Nas and Read, 2004)

❖ Το είδος των ρυθμιστών ανάπτυξης

Στο θρεπτικό υπόστρωμα της καλλιέργειας για τον καθορισμό των φυτικών οργάνων που θα σχηματιστούν προσθέτουμε διάφορους ρυθμιστές αύξησης ανάλογα με την ανάπτυξη που θέλουμε να επιτύχουμε. Η

προσθήκη αυξινών για παράδειγμα προάγει την κυτταρική επιμήκυνση των κυττάρων, για τον λόγο αυτό χρησιμοποιείται κυρίως στο στάδιο της ριζοβολίας. Η προσθήκη κυτοκινίνων προάγει την κυτταρική διαίρεση, έτσι βρίσκει εφαρμογή στο στάδιο της βλαστογέννεσης. Οι γιββερελλίνες ευνοούν την κυτταρική επιμήκυνση και χρησιμοποιούνται και αυτές στο στάδιο της βλαστογέννεσης. Το αιθυλένιο και το αμπσιικό οξύ από την άλλη πλευρά επιταχύνουν την γήρανση, για τον λόγο αυτό σπάνια χρησιμοποιούνται στον πολλαπλασιασμό *in vitro*.

2.6 ΦΑΣΕΙΣ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ IN VITRO

Στον *in vitro* πολλαπλασιασμό ιδιαίτερα σημαντική διαδικασία είναι η τεχνική της αποστείρωσης του φυτικού υλικού και του θρεπτικού διαλύματος που θα χρησιμοποιηθούν καθώς επίσης και η διατήρηση των ασηπτικών συνθηκών μετά την εφαρμογή τους.

Τις περισσότερες φορές οι μολύνσεις προέρχονται από μύκητες και βακτήρια που μεταφέρονται με τον αέρα και όταν επικρατούν ευνοϊκές συνθήκες για να αναπτυχθούν και να πολλαπλασιαστούν μολύνουν την καλλιέργεια. Για την αποφυγή τέτοιων περιστατικών συνιστάται:

- ◆ **Η αποστείρωση του θρεπτικού διαλύματος.**

Το θρεπτικό διάλυμα μεταφέρεται σε γυάλινη φιάλη, κλεισμένη με βαμβάκι ή με πλαστικό πώμα και στην συνέχεια αποστειρώνεται είτε με κλιβανισμό είτε με φιλτράρισμα μέσω μεμβρανών υπό πίεση. Στην πρώτη περίπτωση η αποστείρωση περιλαμβάνει 20 λεπτά της ώρας στον κλίβανο σε θερμοκρασία 120° C για να σκοτωθούν οι επιβλαβείς μικροοργανισμοί. Στην δεύτερη περίπτωση χρησιμοποιείται ένα φίλτρο το οποίο αποτελείται δεν επιτρέπει την είσοδο βακτηρίων και άλλων μικροοργανισμών.

- ◆ **Η απολύμανση του φυτικού υλικού.**

Τα φυτικά μέρη που θα χρησιμοποιηθούν στον *in vitro* πολλαπλασιασμό δεν θα πρέπει να είναι προσβεβλημένα από εχθρούς ή ασθένειες για τον λόγο αυτό επιλέγεται η

απολύμανση του φυτικού υλικού. Σε πρώτη φάση επιλέγεται το μητρικό φυτό και το έκφυτο και με απολυμαντικές ουσίες απολυμαίνεται η επιφάνεια των φυτικών τμημάτων από παθογόνους μικροοργανισμούς αλλά όχι από ιούς και από διασυστηματικούς παθογόνους μικροοργανισμούς. Στην συνέχεια ψεκάζεται με μυκητοκτόνο ή με εντομοκτόνο το μητρικό φυτό που ακολουθείται από την κύρια απολύμανση, η οποία περιλαμβάνει το υποχλωριώδες νάτριο (NaOCl) ή το υποχλωριώδες ασβέστιο (Ca(ClO)₂). Για την ολοκλήρωση της απολύμανσης του φυτικού υλικού απαιτείται ξέπλυμα των φυτών με αποστειρωμένο νερό, διαίρεση του φυτικού υλικού και μεταφορά τους στο θρεπτικό διάλυμα.

- ♦ **Η αποστείρωση των εργαλείων** που χρησιμοποιούνται στην καλλιέργεια για να αποφευχθεί μετάδοση των μικροοργανισμών από φυτό σε φυτό.

Η αποστείρωση των εργαλείων είναι απαραίτητη και αποτελεί ένα προληπτικό μέτρο για την αποφυγή μόλυνσης της καλλιέργειας. Για τον λόγο αυτό συνιστάται πλύσιμο αποστείρωση των γυάλινων σκευών σε κλίβανο με θερμό αέρα στους 160-180° C για χρονικό διάστημα δύο έως τεσσάρων ωρών. Η αποστείρωση των μεταλλικών εργαλείων πραγματοποιείται με εμβάπτιση τους σε αιθανόλη συγκέντρωσης 75% που ακολουθείται από φλόγα.

- ♦ **Η αποστείρωση και η διατήρηση αμόλυντων συνθηκών στον θάλαμο εμβολιασμού.**

Ανάλογα με τον τύπο του θαλάμου εμβολιασμού χρησιμοποιούνται υπεριώδεις ακτίνες στην περίπτωση που ο θάλαμος είναι μεγάλος και αέρας για χρονικό διάστημα 15-20 λεπτών στην περίπτωση που ο θάλαμος διαθέτει ρεύμα αέρα οριζόντιας ροής. Στην συνέχεια πραγματοποιείται καθαρισμός των επιφανειών με αλκοόλη συγκέντρωσης 95%.

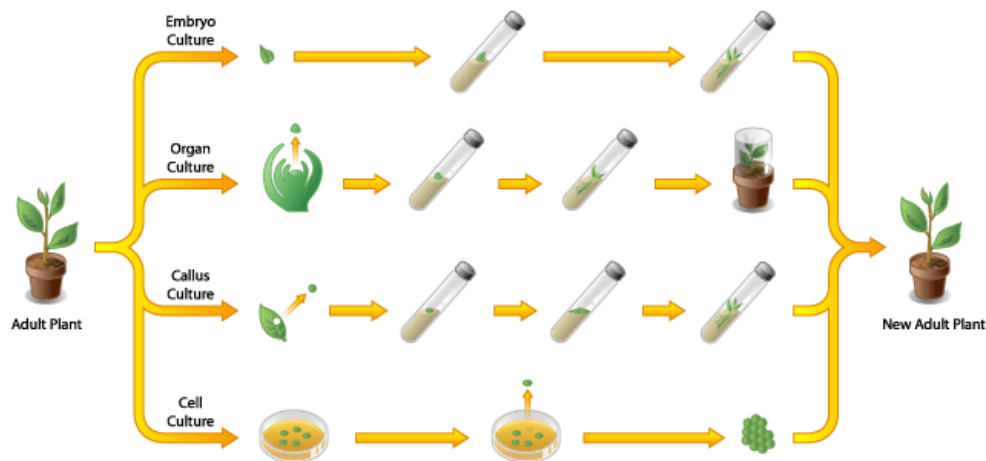
- ♦ **Η τοποθέτηση του φυτικού υλικού στο θρεπτικό διάλυμα**

Κατά την διάρκεια τοποθέτηση του φυτικού υλικού στο θρεπτικό διάλυμα είναι πολύ σημαντικό όλα τα εργαλεία (όλα τα σκεύη, τα νυστέρια και οι σπάτουλες) που θα χρησιμοποιηθούν να έχουν αποστειρωθεί πριν αλλά και κατά την διάρκεια της διαδικασίας. Τα εργαλεία μετά την χρήση θα πρέπει να εμβαπτίζονται σε διάλυμα αλκοόλης συγκέντρωσης 95% και στην συνέχεια να τοποθετούνται σε φλόγα προκειμένου να καταστραφούν όλοι οι επιβλαβής μικροοργανισμοί που πιθανώς φέρουν. Το προσωπικό που θα φέρει εις πέρας τον πολλαπλασιασμό οφείλει να τηρεί όλους τους κανόνες. (Δημάση – Θεριού, 1995)

2.7 ΠΡΟΕΤΟΙΜΑΣΙΑ ΘΡΕΠΤΙΚΩΝ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΩΝ

Για την προετοιμασία των θρεπτικών υποστρωμάτων απαιτείται η προετοιμασία πυκνών διαλυμάτων (10 x και 100x συγκέντρωσης) υψηλής καθαρότητας χημικών ουσιών σε απιονισμένο νερό. Μετά την παρασκευή τους τα διαλύματα αποστειρώνονται σε αυτόκαυστο στους 120° C, 15psi για 20 λεπτά και στην συνέχεια καταψύχονται μέχρι την χρήση τους. Διάφορες οργανικές ενώσεις που χρησιμοποιούνται (όπως είναι για παράδειγμα οι βιταμίνες, επειδή είναι πολύ ευαίσθητες στις υψηλές θερμοκρασίες αποστειρώνονται με την βοήθεια φίλτρου και στην συνέχεια προστίθενται στο αποστειρωμένο θρεπτικό μέσο. Τα περισσότερα θρεπτικά υποστρώματα που χρησιμοποιούνται σήμερα είναι εμπορικά σκευάσματα ξηρής σκόνης.

Τύποι ιστοκαλλιέργειας



Εικόνα: Μέθοδοι ιστοκαλλιέργειας. 1) Καλλιέργεια εμβρύων, 2) Καλλιέργεια οργάνων, 3) καλλιέργεια κάλλου, 4) Κυταροκαλλιέργεια.

❖ Καλλιέργεια οργάνων

Ο τύπος αυτός της ιστοκαλλιέργειας περιλαμβάνει την καλλιέργεια οργάνων, όπως είναι οι ρίζες, τα ενδοσπέρμια, οι ωθήκες και τα ωάρια.

❖ Καλλιέργεια έκφυτων

Η καλλιέργεια εκφύτων περιλαμβάνει την καλλιέργεια οποιουδήποτε ιστού ή οργάνου με στόχο την επαγωγή καλλογένεσης ή την αναγέννηση νέων φυτών.

❖ Καλλιέργεια κάλλου

Τα έκφυτα καλλιεργούνται σε κατάλληλο υπόστρωμα που περιέχει διάφορες αυξίνες και κυτοκινίνες προκειμένου να σχηματίζουν κάλλο. Οι φυτικοί ιστοί έχουν την ικανότητα να παράγουν μια ανοργάνωτη, αυξάνομενη και διαιρούμενη μάζα κυττάρων επ' άοριστον με την δυνατότητα ανάπτυξης κανονικών ριζών, βλαστών και εμβρυοειδών δημιουργώντας στην ουσία ένα φυτό. Οι κάλλοι σχηματίζονται στην φύση προκειμένου να επουλωθούν οι πληγές των φυτών που προέρχονται από μολύνσεις ή τραυματισμούς.

❖ Καλλιέργεια κυττάρων

Με την μεταφορά τμήματος του κάλλου σε ένα υγρό θρεπτικό υπόστρωμα και με την ελευθέρωση κυττάρων σε κατάλληλες συνθήκες περιβάλλοντος τα κύτταρα αναπτύσσονται και διαιρούνται. Η απομόνωση των φυτικών κυττάρων πραγματοποιείται με μηχανικές ή ενζυματικές μεθόδους. Η

πρώτη περίπτωση περιλαμβάνει λειοτριβήση του φυτικού ιστού, διήθηση και στην συνέχεια φυγοκέντρωση για την απομάκρυνση των φυτικών υπολειμμάτων. Στην δεύτερη περίπτωση χρησιμοποιούνται υδρολυτικά ένζυμα προκειμένου να λυθούν οι μεσοκυττάριοι σύνδεσμοι μεταξύ των κυττάρων.

Στην καλλιέργεια των κυττάρων γίνονται συνεχείς υποκαλλιέργειες σε φρέσκο θρεπτικό υπόστρωμα προκειμένου να αραιωθεί η καλλιέργεια και να ξεκινήσει μια νέα. Ο βαθμός της αραιώσης κάθε φορά καθορίζεται από τον ερευνητή. Σε περιπτώσεις υψηλής αραιώσης απαιτείται μεγάλο χρονικό διάστημα υστέρησης και σε ελάχιστες περιπτώσεις παρατηρείται ακόμη και θάνατος των κυττάρων. Στην περίπτωση της ιστοκαλλιέργειας μια καλλιέργεια μπορεί να περιλαμβάνει μεγάλες ποσότητες και η μεταφορά της καλλιέργειας γίνεται εύκολα με την βοήθεια μιας πιπέτας. Επίσης, η καλλιέργεια είναι λιγότερο ετερογενής και η διαφοροποίηση των κυττάρων πιο έντονη. Καλλιέργειες κυττάρων πραγματοποιούνται για επαγωγή σωματικών εμβρύων/βλαστών, *in vitro* μεταλλαξιγένεση και επιλογή μεταλλαγμάτων, παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών.

❖ **Καλλιέργεια πρωτοπλαστών**

Οι πρωτοπλάστες είναι φυτικά κύτταρα, τα οποία έχουν την δυνατότητα να αναγεννούν το κυτταρικό τους τοίχωμα, να αποδιαφοροποιηθούν, να διαιρεθούν μιτωτικά, στην συνέχεια να σχηματίζουν κλώνους και με την διαφοροποίηση τους σε ρίζες, μεριστώματα ή έμβρυα να αναγεννούν ένα ολόκληρο φυτό.

Με την βοήθεια της βιοτεχνολογίας αναπτύχθηκαν τεχνικές χρήσης των πρωτοπλαστών όπως είναι η μεταλλαξιγένεση των πρωτοπλαστών ή η δημιουργία σωματικών υβριδίων με την συνένωση πρωτοπλαστών προκειμένου να σε είδη που δεν μπορούσαν να υβριδιστούν με τον παραδοσιακό τρόπο. Μια άλλη τεχνική που αναπτύχθηκε είναι η μεταφορά οργανιδίων και η μεταφορά γονιδίων κυρίως από τους πρωτοπλάτες του μισιφύλλου, οι οποίοι προέρχονται από τον ίδιο ιστό και έχουν κοινή πορεία ανάπτυξης.

❖ **Καλλιέργεια ρίζας**

Η καλλιέργεια ρίζας αποτελεί ένας από τους πρώτους τύπους ιστοκαλλιέργειας που χρησιμοποιήθηκαν, αναπτύσσεται από έκφυτα από το ακρορίζιο, κύριες ή πλάγιες ρίζες.

❖ **Καλλιέργεια εμβρύων**

Τα έμβρυα χρησιμοποιούνται ως έκφυτα προκειμένου να παραχθεί κάλλος ή σωματικά έμβρυα. Η μέθοδος αυτή βρίσκει ευρεία εφαρμογή σε περιπτώσεις όπου το έμβρυο δεν μπορεί να αναπτυχθεί εξαιτίας της εκφύλισης των εμβρυακών ιστών.

❖ **Διάσωση εμβρύων**

Πολλές φορές παρόλο που η επικονίαση και η γονιμοποίηση έχουν γίνει με επιτυχία τα έμβρυα δεν αναπτύσσονται, το φαινόμενο αυτό οφείλεται στην ασυμβατότητα μεταξύ του εμβρύου και του ενδοσπερμίου. Τα έμβρυα αυτά καλλιεργούνται τεχνητά προκειμένου να αναπτυχθούν και στην συνέχεια να διαφοροποιηθούν σε βλαστό, ρίζα και φυτάρια.

❖ **Καλλιέργεια ανθήρων και γύρης**

Τα απλοειδή φυτά που έχουν η αριθμό χρωμοσωμάτων για τον λόγο αυτό έχουν την ικανότητα να αναπτύξουν ομοζύγωτες σειρές σε σύντομο χρονικό διάστημα, να παράγουν αντρικά φυτά με την τεχνική του διπλασιασμού των χρωματοσωμάτων, να προβάλλουν άμεσα μια υπολειπόμενη μετάλλαξη καθώς επίσης και να παράγουν φυτά με μεγάλη ανθεκτικότητα σε διάφορες ασθένειες.

❖ **Μονοπάτια αναγέννησης φυτών**

Τα φυτά έχουν την δυνατότητα να αναπαράγονται μέσω της οργανογέννεσης ή της σωματικής εμβρυογέννεσης. Στην οργανογέννεση σχηματίζονται τα φυτικά όργανα από την καλλιέργεια του έκφυτου ή του κάλλου, ενώ στη σωματική μεβρυογέννεση τα σωματικά κύτταρα μπορούν να παράξουν σωματικά έμβρυα που εξελίσσονται σε πλήρη φυτά.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΤΡΙΤΟ

ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

3.1 ΥΛΙΚΑ

3.1.1. ΦΥΤΙΚΟ ΥΛΙΚΟ

Ο σπόρος του είδους *Origanum vulgare* που χρησιμοποιήθηκε στα πειράματα *in vitro* ήταν συλλογής του Σεπτεμβρίου 2010. Οι κάψες επιλέχθηκαν από υγιή φυτά τα οποία αναπτύσσονταν στο όρος Ταΰγετος σε υψόμετρο 1100m. Αφού εγκαταστάθηκαν σπορόφυτα του είδους κα βλάστησαν *in vitro* στη συνέχεια, υποκαλλιεργούνται 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

A) δοχεία τύπου magenta όγκου 120 ml.

B) 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 φαίνονται τα συστατικά του θρεπτικού υποστρώματος.

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

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

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, 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.

3.2.2. ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΕΔΙΚΩΝ ΕΓΚΑΤΑΣΤΑΣΕΩΝ

A) 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 τριβλία 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, τριβλία και απιονισμένο νερό.

Η απολύμανση των σπόρων γινόταν μέσα σε τράπεζα νηματικής ροής. 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.

Μετά την εγκατάσταση των σπόρων στα δοχεία καλλιέργειας, τοποθετήθηκαν για επώαση σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών όπου επωάστηκαν στις εξής συνθήκες:

A) 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.

B) 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.

Σε κάθε δοχείο καλλιέργειας τοποθετήθηκαν 5 σπόροι του είδους.

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

3.2.4 ΜΕΘΟΔΟΣ ΜΕΤΡΗΣΗΣ ΒΛΑΣΤΙΚΟΤΗΤΑΣ ΣΠΟΡΟΥ ΤΟΥ ΕΙΔΟΥΣ *Origanum vulgare* 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 ΤΕΤΑΡΤΟ

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 επωάστηκαν στους 20°C.

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

A/A δοχείου	Αριθμός σπόρων που βλάστησαν	Ποσοστό βλάστησης (%)
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 επωάστηκαν στους 20°C±1°C με 16h φωτοπερίοδο υπό 37,5 μmol m⁻² 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 επωάστηκαν 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.

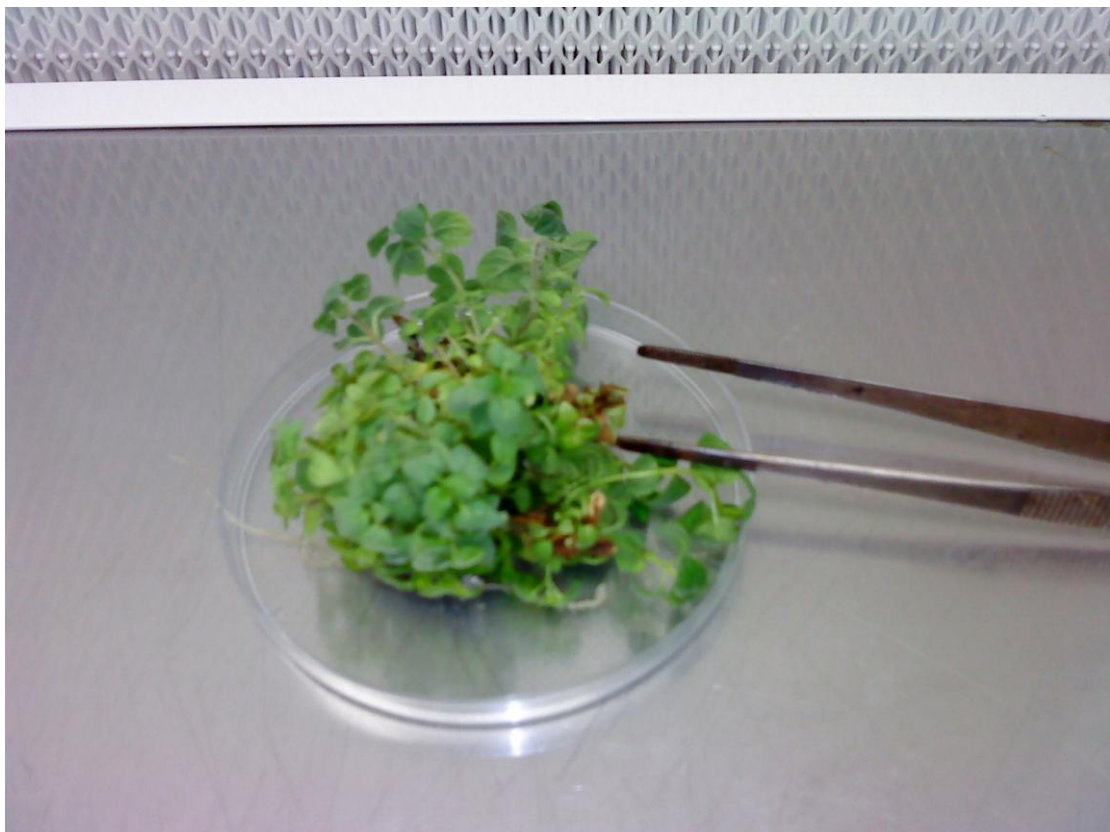
Ο αριθμός των σπόρων που βλάστησαν στις παραπάνω συνθήκες ήταν σημαντικά χαμηλότερος και ανήλθε στους 8 στους 55 (συνολικό ποσοστό 14%).

Πινάκας 3. Βλάστηση ανά δοχείο καλλιέργειας σπόρων του είδους *Origanum vulgare* που επωάστηκαν 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.

A/A δοχείου	Αριθμός σπόρων που βλάστησαν	Ποσοστό βλάστησης (%)
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	



Εικόνα 2. Ανεπτυγμένο φυτάριο του είδους *Origanum vulgare*.



Εικόνα 3. Ανεπτυγμένο φυτάριο του είδους *Origanum vulgare*.

Τα σπορόφυτα που βλάστησαν και στις δύο συνθήκες φωτισμού, αναπτύχθηκαν για δύο μήνες (Εικ. 2 και Εικ. 3), (έφτασαν σε μεγάλο μέγεθος) και στη συνέχεια υποκαλλιεργήθηκαν για πολλαπλασιασμό των καλλιεργειών

Πραγματοποιήθηκαν δύο καλλιέργειες πολλαπλασιασμού και μετρήθηκαν το ποσοστό αντίδρασης των εκφύτων, ο αριθμός των βλαστών που σχηματίστηκαν, το μήκος των βλαστών, ο αριθμός των ριζών που σχηματίστηκαν και το ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν κάλλο στη βάση των εκφύτων.

Όπως φαίνεται και στους πίνακες 4 (1η υποκαλλιέργεια) και 5 (2η υποκαλλιέργεια) στις δύο υποκαλλιέργειες παρατηρήθηκε υψηλή αντίδραση των εκφύτων και σχηματίστηκαν ρίζες σε υψηλό αριθμό και ποσοστό.

Πίνακας 4. 1η Υποκαλλιέργεια. Ποσοστό αντίδρασης, αριθμός και μήκος βλαστών, αριθμός ριζών και ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν κάλλο ανά δοχείο καλλιέργειας εκφύτων του είδους *Origanum vulgare* που επωάστηκαν στους 20°C±1°C με 16h φωτοπερίοδο υπό 37,5 μmol m⁻² s⁻¹ fluorescent συνεχές φως.

A/A δοχε ίου	Ποσοστό αντίδρασης (%)	Μέσος αριθμός Βλαστών	Μέσο μήκος βλαστών (cm)	Μέσος αριθμός ριζών	Ποσοστό σχηματ. κάλλου (%)
1	80	1,5	2	4	0
2	80	8	2	0,5	0
3	60	1	2,5	4	0
4	40	2,5	3,5	4	0
5	100	6	3	4	0
6	40	3	3	2	0
7	80	2	1	0	0
8	100	5	1,5	3	0
9	80	5	2	2	0
10	20	5	2,5	4	0
11	100	2,5	1	2	0
12	100	7	1,5	2	0

Πινάκας 5. 2η Υποκαλλιέργεια. Ποσοστό αντίδρασης, αριθμός και μήκος βλαστών, αριθμός ριζών και ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν κάλλο ανά δοχείο καλλιέργειας εκφύτων του είδους *Origanum vulgare* που επώαστηκαν στους 20°C±1°C με 16h φωτοπερίοδο υπό 37,5 μmol m⁻² s⁻¹ fluorescent συνεχές φως.

A/A δοχε ίου	Ποσοστό αντίδρασης (%)	Ποσοστό ριζοβολίας (%)	Ποσοστό σχηματ. κάλλου (%)
1	80	60	0
2	80	0	0
3	100	40	0
4	20	0	0
5	60	40	0
6	40	40	0
7	80	0	0
8	80	0	0
9	60	20	0
10	60	20	0
11	60	20	0
12	60	60	0

4.2. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η βλάστηση των σπόρων σε συνθήκες *in vitro* του είδους *Origanum vulgare* πραγματοποιήθηκε σε δύο διαφορετικές θερμοκρασίες (10 ή 25 °C). Σύμφωνα με τους πίνακες καταλήγουμε στο συμπέρασμα πως οι σπόροι του είδους *Origanum vulgare*, βλαστάνουν καλύτερα όταν η επώασή τους πραγματοποιηθεί στους 20 °C.

Όσον αφορά τις υποκαλλιέργειες και στις δύο, παρατηρήθηκαν υψηλά ποσοστά αντίδρασης των εκφύτων, ενώ παράλληλα σχηματίστηκαν υψηλός αριθμός βλαστών μεγάλου μήκους. Ενθαρρυντικό στοιχείο επίσης είναι και ο

σχηματισμός ριζών χωρίς μάλιστα την προσθήκη αυξίνης στο υπόστρωμα. Η απουσία κάλλου που παρατηρήθηκε και στις δύο υποκαλλιέργειες μηδενίζει το κίνδυνο εμφάνισης σωμακλωνικής παραλλακτικότητας. Τέλος η υψηλή αντίδραση που παρατηρήθηκε σε υποστρώματα με μισής δύναμης MS αναμένεται να ευνοήσει τον εγκλιματισμό των φυταρίων *ex vitro* και να οδηγήσει σε υψηλά ποσοστά επιβίωσης των φυταρίων.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΠΕΜΠΤΟ ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

Ελληνική βιβλιογραφία

- Αυγούλας Χ., Ποδηματάς Κ., Παπαστυλιανού Π., 2000. Φυτά μεγάλης καλλιέργειας, Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.
- Βώκου Δ., 1983. Τα αιθέρια έλαια και ο ρόλος τους στα φρυγανικά οικοσυστήματα. Διδακτορική διατριβή, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
- Γκιολάρης Α., 1992. Η καλλιέργεια της ρίγανης. Γεωργία και Ανάπτυξη Τεύχος 2, Αθήνα.
- Καταξάκη Δ., 2000 Διαδικασία απόσταξης αιθέριου ελαίου. Φρουτονέα, Τεύχος 17, Αθήνα.
- Κατσιώνης Σ., Χατζοπούλου Π., 2010. Αρωματικά φαρμακευτικά φυτά και αιθέρια έλαια, Αθήνα, Κυριακίδη.
- Ποντίκης Α., 2006. Πολλαπλασιασμός καρποφόρων δέντρων και θάμνων. Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα.
- Σαρλής Γ., 1994. Αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά. Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών, Αθήνα.
- Σκρούμπης Γ., 1988. Αρωματικά, φαρμακευτικά και μελισσοτροφικά φυτά της Ελλάδας. Εκδόσεις Αγρότυπος.
- Σκρούμπης Γ., 1988. Αρωματικά φυτά και αιθέρια έλαια. Β' Έκδοση. Εκδόσεις Γιαχούδη – Γιαπούλη, Θεσσαλονίκη.