

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

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Θέμα

«Μελέτη της επίδρασης της εποχής συλλογής έκφυτων στο
μικροπολλασιασμό της λαγορίγανης (*Origanum scabrum* Boiss. & Heldr.)»

ΝΤΑΣΚΑΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ

Καλαμάτα 2015

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

ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΜΕΛΕΤΗ

Θέμα

«Μελέτη της επίδρασης της εποχής συλλογής έκφυτων στο
μικροπολλασιασμό της λαγορίγανης (*Origanum scabrum* Boiss. & Heldr.)»

ΝΤΑΣΚΑΣ ΕΥΑΓΓΕΛΟΣ

Επιβλέπων καθηγητής
ΑΛΕΞΟΠΟΥΛΟΣ ΑΛΕΞΙΟΣ

Καλαμάτα 2015

Πρόλογος

Στην επιλογή του θέματος της πτυχιακής μου μελέτης, προκειμένου να ολοκληρώσω τις σπουδές μου στο τμήμα Φυτικής Παραγωγής του ΤΕΙ Καλαμάτας, καθοριστικό ρόλο είχε ο επιβλέπων καθηγητής για την καλή και παραγωγική συνεργασία που θα μπορούσαμε να έχουμε, όπως επίσης και η πρωτοτυπία του θέματος, καθώς το συγκεκριμένο είδος ρίγανης (*Origanum scabrum* Boiss. & Heldr.) έχει ερευνηθεί σε πολύ μικρή κλίμακα σε παγκόσμιο επίπεδο.

Για την ολοκλήρωση αυτής της εργασίας καθώς και για την πραγματοποίηση των πειραμάτων στους εργαστηριακούς χώρους του ΤΕΙ Καλαμάτας, θέλω να ευχαριστήσω τον επιβλέποντα καθηγητή μου κ. Α. Αλεξόπουλο για την ανάθεση του θέματος και την καθοριστικής σημασίας βοήθειά του στην συγγραφή της εργασίας, όπως επίσης και τον συμφοιτητή μου Κ. Κούτρα για τη βοήθειά του κατά τη διάρκεια των μετρήσεων του πειράματος. Επίσης θα ήθελα να ευχαριστήσω τον καθηγητή μου κ. Ε. Κάρτσωνα και τον κ. Σ. Καρρά για την βοήθειά τους στην πραγματοποίηση του πειράματος.

Με πλήρη επίγνωση των συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων, δηλώνω ενυπογράφως ότι είμαι αποκλειστικός συγγραφέας της παρούσας Πτυχιακής Εργασίας, για την ολοκλήρωση της οποίας κάθε βοήθεια είναι πλήρως αναγνωρισμένη και αναφέρεται λεπτομερώς στην εργασία αυτή. Έχω αναφέρει λεπτομερώς όλες τις πηγές χρήσης δεδομένων, απόψεων, θέσεων και προτάσεων, ιδεών και λεκτικών αναφορών, είτε κατά κυριολεξία είτε βάσει επιστημονικής παράφρασης. Αναλαμβάνω την προσωπική και ατομική ευθύνη ότι σε περίπτωση αποτυχίας στην υλοποίηση των παραπάνω δηλωθέντων στοιχείων, είμαι υπόλογος έναντι λογοκλοπής, γεγονός που σημαίνει αποτυχία στην Πτυχιακή μου Εργασία και κατά συνέπεια αποτυχία απόκτησης Τίτλου Σπουδών, πέραν των λοιπών συνεπειών του νόμου περί πνευματικών δικαιωμάτων. Δηλώνω, συνεπώς, ότι αυτή η Πτυχιακή Εργασία προετοιμάστηκε και ολοκληρώθηκε από εμένα προσωπικά και αποκλειστικά και ότι, αναλαμβάνω πλήρως όλες τις συνέπειες του νόμου στην περίπτωση κατά την οποία αποδειχθεί, διαχρονικά, ότι η εργασία αυτή ή τμήμα της δεν μου ανήκει διότι είναι προϊόν λογοκλοπής άλλης πνευματικής ιδιοκτησίας.

Όνομα και Επώνυμο Συγγραφέα (με κεφαλαία γράμματα):

.....

Υπογραφή (ολογράφως, χωρίς μονογραφή):

.....

Ημερομηνία (ημέρα - μήνας - έτος):

.....

Περιεχόμενα

ΠΕΡΙΛΗΨΗ.....	6
1 ΛΑΓΟΡΙΓΑΝΗ.....	6
1.1 Βοτανική ταξινόμηση.....	8
1.2 Καταγωγή.....	11
1.3 Χρήσεις-διατροφική αξία.....	11
1.4 Μορφολογικά χαρακτηριστικά του φυτού.....	12
1.5 Εδαφοκλιματικές απαιτήσεις.....	14
1.6 Καλλιέργεια.....	15
2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ <i>IN VITRO</i>	16
2.1 Η τεχνική της <i>in vitro</i> καλλιέργειας εκφύτων.....	16
2.2 Πλεονεκτήματα του μικροπολλαπλασιασμού.....	17
2.3 Παράγοντες που επηρεάζουν τον μικροπολλαπλασιασμό.....	18
3 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ.....	22
4 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ.....	23
5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ.....	28
5.1 Ποσοστό εκφύτων που αναπτύχθηκαν.....	28
5.2 Αριθμός φύλλων ανά έκφυτο.....	34
5.3 Αριθμός βλαστών ανά έκφυτο.....	41
6 ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ.....	47
ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ.....	51

Περίληψη

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο Εργαστήριο Γεωργίας - Ιστοκαλλιέργειας του ΤΕΙ Πελοποννήσου το 2012. Σκοπός ήταν η μελέτη της επίδρασης της εποχής συλλογής έκφυτων λαγορίγανης (*Origanum scabrum*) καθώς και της θέσης του στο βλαστό του φυτού στον *in vitro* πολλαπλασιασμό του φυτού. Για το λόγο αυτό συλλέχθηκαν έκφυτα που προέρχονταν από την κορυφή του βλαστού καθώς και έκφυτα που προέρχονταν από το 1^ο, το 3^ο, το 5^ο και το 7^ο γόνατο – κόμβο κάτω από την κορυφή του φυτού. Η συλλογή των έκφυτων έγινε σε 4 εποχές: 20 Μαΐου, 19 Ιουνίου, 20 Ιουλίου και 7 Σεπτεμβρίου. Τα έκφυτα απολυμάνθηκαν επιφανειακά με εμβάπτιση σε διάλυμα χλωρίνης (10% ο/ο) και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες σε τριβλία petri με θρεπτικό υπόστρωμα MS στο οποίο προστέθηκαν άγαρ 4 g / L και σακχαρόζη 30 g / L. Μετρήθηκαν το ποσοστό των έκφυτων που αναπτύσσονται, ο αριθμός των φύλλων ανά έκφυτο και ο αριθμός των βλαστών ανά έκφυτο. Από τα αποτελέσματα της εργασίας εξάγεται το συμπέρασμα ότι η συλλογή έκφυτων από την κορυφή του βλαστού και από το 1^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού υπερτερούν ως προς το ποσοστό των έκφυτων που αναπτύσσονται. Αντίθετα, τα έκφυτα που λαμβάνονται από το 3^ο ή 5^ο και ιδιαίτερα από το 7^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού, εμφανίζουν μικρότερα ποσοστά ανάπτυξης. Σε ότι αφορά τον αριθμό των φύλλων ανά έκφυτο παρατηρήθηκε ότι ήταν μεγαλύτερος σε αυτά που προέρχονται από την κορυφή του βλαστού. Αντίθετα, τα έκφυτα που προέρχονται από τα γόνατα του βλαστού, ιδιαίτερα από το 3^ο, το 5^ο και το 7^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού, είχαν μικρότερο αριθμό φύλλων. Επιπρόσθετα, η συλλογή έκφυτων τον Σεπτέμβριο, ιδιαίτερα όταν πρόκειται για έκφυτα που προέρχονται από την κορυφή του βλαστού, δεν ευνόησε την εμφάνιση νέων φύλλων. Ο αριθμός των βλαστών ευνοήθηκε στην αρχή σε έκφυτα που προέρχονται από την κορυφή του βλαστού αλλά αργότερα δεν υπήρχαν διαφορές μεταξύ αυτών και των έκφυτων που προέρχονται από το 1^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού, για έκφυτα που

συλλέχθηκαν το Μάιο και τον Ιούνιο. Επιπρόσθετα, τα έκφυτα της κορυφής του βλαστού και αυτά που προέρχονται από το 1^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού και συλλέχθηκαν τον Μάιο και τον Ιούνιο είχαν μεγαλύτερο αριθμό βλαστών από αυτά που συλλέχθηκαν τον Ιούλιο και το Σεπτέμβριο.

1 ΛΑΓΟΡΙΓΑΝΗ

1.1 ΒΟΤΑΝΙΚΗ ΤΑΞΙΝΟΜΗΣΗ

Λαγορίγανη (*Origanum scabrum* Bois & Heldr) ονομάζεται στην περιοχή του Ταυγέτου ένα πολυετές φυτό της οικογένειας των χειλανθών (*Lamiaceae*) (Εικόνα 1.1). Στην οικογένεια *Lamiaceae* ανήκουν επίσης πολλά φυτά τα οποία περιέχουν αιθέρια έλαια και χρησιμοποιούνται ως αρτυματικά, αρωματικά ή/και φαρμακευτικά (Kokkini et al., 2000), όπως είναι για παράδειγμα ο βασιλικός, ο δυόσμος, το δεντρολίβανο, η ρίγανη, η μαντζουράνα, ο δίκταμος κ.ά. (Δόρδας, 2012).



Εικόνα 1.1. Φυτά λαγορίγανης που αναπτύσσονται στο φυσικό τους περιβάλλον.

Η οικογένεια *Lamiaceae* συμπεριλαμβάνει μεγάλο αριθμό φυτικών ειδών (περίπου 3.000) τα οποία απαντώνται σε πολλές περιοχές της γης (Καρούσου, 1995). Στην Ελλάδα, φυτικά είδη της οικογένειας *Lamiaceae* απαντώνται σε όλες

τις περιοχές, πολλά δε από αυτά είναι ενδημικά. Πιο συγκεκριμένα, τα είδη αυτά ανήκουν σε τουλάχιστον 35 διαφορετικά γένη, και παρουσιάζουν διαφορές μεταξύ τους κυρίως λόγω της προσαρμογής τους σε διαφορετικά περιβάλλοντα (Σκρουμπής, 1985). 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*).

Στην οικογένεια *Lamiaceae* κατατάσσονται πολλά φυτά τα οποία είτε καλλιεργούνται είτε συλλέγονται για να χρησιμοποιηθούν ως βότανα (Simopoulos, 2001) καθώς και ως πηγή για την παραλαβή αιθέριων ελαίων (Lewinsohn et al., 2000). Το αιθέριο έλαιο που παράγεται στα φύλλα, χρησιμεύει σε κάποια φυτά για την προστασία τους από άλλους ζωντανούς οργανισμούς (π.χ. έντομα, μύκητες, ζώα), ενώ αυτό που παράγεται στα άνθη χρησιμεύει και στην προσέλκυση επικονιαστών (Werker, 1993).

Τα αιθέρια έλαια έχουν σε πολλές περιπτώσεις αντιμικροβιακές ιδιότητες οι οποίες αποδίδονται σε διάφορα συστατικά του αιθέριου ελαίου, όπως είναι η καρβακόλη και η θυμόλη (Bouchra et al., 2003; Baydar et al., 2004; Bozin et al., 2006). Για τις ιδιότητες αυτές, τα αιθέρια έλαια πολλών φυτών της οικογένειας χρησιμοποιούνται στη βιομηχανία φαρμάκων, καλλυντικών κ.α. Επιπρόσθετα, ορισμένα από αυτά έχει αποδειχθεί ότι έχουν δράση κατά εντόμων ή/και μυκήτων. Λόγω και της μικρότερης τοξικότητάς τους στον άνθρωπο αλλά και της μικρότερης επιβάρυνσης του περιβάλλοντος υπάρχει σημαντικό ενδιαφέρον για τη χρήση τους στη γεωργία (Shaaya et al., 1997; Lamiri et al., 2001).

Τα αιθέρια έλαια βρίσκονται σε ειδικές αδενώδεις τρίχες, κυρίως στις ταξιανθίες των φυτών αλλά και στα φύλλα. Ο μηχανισμός παραγωγής αιθέριου ελαίου είναι διαφορετικός σε διαφορετικά μέρη του φυτού και η σύσταση του αιθέριου ελαίου μπορεί να διαφέρει σημαντικά (Werker et al., 1985).

Όπως αναφέρθηκε παραπάνω, η λαγορίγανη ανήκει στο γένος *Origanum* στο οποίο κατατάσσονται πολλά γνωστά είδη με αρωματικές και φαρμακευτικές ιδιότητές τους, όπως είναι η κοινή ρίγανη (*Origanum vulgare*) (Kokkini et al., 1994) με την οποία η λαγορίγανη παρουσιάζει αρκετές μορφολογικές ομοιότητες.

Το γένος *Origanum* L. συμπεριλαμβάνει μικρά συνήθως σε ύψος φυτά με θαμνώδη ανάπτυξη. Τα φυτά αυτά μπορεί να είναι ετήσια, διετή ή πολυετή. Αναπτύσσονται κυρίως σε θερμές και ορεινές περιοχές, αλλά η μεγάλη ποικιλομορφία των ειδών έχει δημιουργήσει δυσκολίες στην βοτανική τους ταξινόμηση. Το γένος *Origanum* συμπεριλαμβάνει 42 είδη τα οποία απαντώνται σε εύκρατες περιοχές της Ασίας, της Αμερικής, της Αφρικής και σε Ευρωπαϊκές χώρες της Μεσογείου (Δόρδας, 2012). Στη χώρα μας υπάρχουν τρία υποείδη του είδους *Origanum vulgare* L.:

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

Άλλα υποείδη του *O. vulgare* που φύονται στην Ελλάδα είναι τα *O. vulgare* ssp. *virens*, *O. vulgare* ssp. *gracile*, *O. vulgare* ssp. *glandulosum*.

Το είδος *Origanum scabrum* έχει αναφερθεί στο παρελθόν ως υποείδος του *Origanum vulgare*. Αργότερα όμως έγινε ξεκάθαρο ότι πρόκειται για ένα διαφορετικό είδος στο γένος *Origanum*. Έτσι, βοτανικά ταξινομείται στο είδος *Origanum scabrum* Boiss. & Heldr., ενώ στο παρελθόν έχει αναφερθεί και ως *Amaracus scaber*, *Origanum pulchrum* και *Amaracus pulcher* (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*.

1.2 ΚΑΤΑΓΩΓΗ

Τα φυτά του γένους *Origanum* είναι αρκετά εξαπλωμένα σε χώρες της Μεσογειακής λεκάνης και αυτό συνδέεται με το θερμό καλοκαίρι. Ωστόσο, ευδοκιμούν σε πολλές ορεινές και ημιορεινές περιοχές της εύκρατης ζώνης στην Αμερική, την Αφρική και την Ασία. Στο γένος *Origanum* συμπεριλαμβάνονται τουλάχιστον 42 γνωστά φυτικά είδη (Δόρδας, 2012). Μερικά από αυτά είναι γνωστά για τη χρήση τους ως αρτυματικά ή/και φαρμακευτικά.

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 Ταΰγετου έχει βρεθεί και σε περιοχές με μικρότερο υψόμετρο (από 600-800 m). Στην περιοχή του Ταΰγετου είναι γνωστό με την ονομασία λαγορίγανη.

1.3 ΧΡΗΣΕΙΣ – ΔΙΑΤΡΟΦΙΚΗ ΑΞΙΑ

Σε ότι αφορά τις χρήσεις και τη διατροφική αξία της λαγορίγανης υπάρχουν λίγες αναφορές στις οποίες φαίνεται ότι το φυτό περιέχει αιθέρια έλαια (0,6%) με 28 συστατικά (98%) εκ των οποίων το σημαντικότερο είναι η καρβακρόλη η οποία αποτελεί το 74,86% (Aligiannis κ.ά., 2001) και έχει ισχυρή δράση κατά των *Staphylococcus aureus*, *S. epidermidis*, *Enterobacter cloacae*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Candida albicans*, *C. tropicalis*.

Ωστόσο, επειδή πολλά είδη του γένους *Origanum* χρησιμοποιούνται για τις αρωματικές και φαρμακευτικές τους ιδιότητες, δεν μπορεί να αποκλειστεί η πιθανότητα διάδοσης χρήσης της λαγορίγανης. Μάλιστα, πολλά είδη του γένους

Origanum, όπως και η λαγορίγανη, περιέχουν σε υψηλές ή χαμηλότερες συγκεντρώσεις καρβακρόλη, μία ουσία με σημαντική αντιοξειδωτική και αντικαρκινική δράση (http://greekoregano.blogspot.gr/p/blog-page_6.html).

Οι χρήσεις των φαρμακευτικών και αρωματικών φυτών είναι γνωστές και διαδεδομένες από την αρχαιότητα καθώς με τη βοήθειά τους οι άνθρωποι μπορούσαν να αντιμετωπίσουν αρκετά προβλήματα υγείας. Η ενασχόληση των ανθρώπων με τις φαρμακευτικές ιδιότητες ορισμένων φυτών στην αρχαία Ελλάδα είχε φτάσει σε τέτοιο σημείο ώστε να εκφράζεται και στην μυθολογία. Για παράδειγμα, η θεά Αφροδίτη χρησιμοποίησε το δίκταμο από την Κρήτη (*Origanum dictamnus* L.) για τη θεραπεία των πληγών του Αινεία στον Τρωικό πόλεμο. Αργότερα, ο Θεόφραστος ο Ερέσιος (327-287 π.Χ.), μαθητής του Αριστοτέλη, συνέγραψε 15 βιβλία στα οποία αναφέρονται τα φυτά με τις φαρμακευτικές τους ιδιότητες (Σφήκας, 1995). Ενδεικτικό γεγονός της μεγάλης φαρμακευτικής αξίας ορισμένων φυτών, είναι ότι σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας το 80% των φαρμάκων στην πρωτοβάθμια θεραπεία είναι φυτικής προέλευσης.

Εκτός όμως από τη χρήση τους στην παρασκευή φαρμακευτικών προϊόντων, τα φυτά της οικογένειας *Lamiaceae* χρησιμοποιούνται και στην αρωματοποιία καθώς και στη μαγειρική.

1.4 ΜΟΡΦΟΛΟΓΙΚΑ ΧΑΡΑΚΤΗΡΙΣΤΙΚΑ ΤΟΥ ΦΥΤΟΥ

Η λαγορίγανη (*Origanum scabrum*) είναι ποώδες, πολυετές φυτό με φύλλα που έχουν ωοειδές σχήμα, και εμφανίζονται στο βλαστό σε αντίθετη διάταξη. Τα άνθη είναι μικρά, στρογγυλά σε ταξιανθία στάχυ και σε πλήρη ανάπτυξη το χρώμα τους από πράσινο γίνεται μωβ. Το ύψος των βλαστών κυμαίνεται μεταξύ 20-40 cm, ενώ δεν αναπτύσσονται πλάγιοι βλαστοί. Οι σπόροι του φυτού είναι καφέ χρώματος και πολύ μικροί σε μέγεθος. Το αιθέριο έλαιο του φυτού παράγεται από

αδένες που βρίσκονται στα φύλλα του. Το ριζικό σύστημα είναι θυσσανώδες με τις ρίζες να φτάνουν μέχρι τα 40 cm βάθος (Heldreich et al., 1889).



Εικόνα 1.2. Ανθισμένο φυτό λαγορίγανης.

Στο φυσικό περιβάλλον που έχει παρατηρηθεί η λαγορίγανη, αρχίζει την ανάπτυξή της, τις πρώτες μέρες της άνοιξης εκπύσσοντας οφθαλμούς από ριζώματα (Εικόνα 1.3) που βρίσκονται μέσα στο έδαφος. Η άνθηση ξεκινά από τον Ιούνιο-Ιούλιο έως τον Αύγουστο και η συλλογή των φυτών γίνεται κατόπιν άδειας μέχρι περίπου το Σεπτέμβριο. Κατά τη διάρκεια του χειμώνα το φυτό βρίσκεται σε λήθαργο καθώς το υπέργειο μέρος ξεραίνεται και παραμένουν οι αποξηραμένοι βλαστοί καθώς και τα ριζώματα, από οφθαλμούς των οποίων αναπτύσσονται νέοι βλαστοί την επόμενη άνοιξη.



Εικόνα 1.3. Ριζώματα λαγορίγανης από οφθαλμούς των οποίων αναπτύσσονται νέα φυτά την άνοιξη.

1.5 ΕΛΔΟΚΛΙΜΑΤΙΚΕΣ ΑΠΑΙΤΗΣΕΙΣ

Η λαγορίγανη σύμφωνα με τα μέχρι τώρα στοιχεία, φύτεται σε υψόμετρο άνω των 1000 m καλύπτοντας πλαγιές στους ορεινούς όγκους που ευδοκιμεί. Καθώς μοιάζει πολύ με την κοινή ρίγανη θεωρείται ότι η άριστη θερμοκρασία ανάπτυξης κυμαίνεται μεταξύ των 18 και 22 °C (ΕΘΙΑΓΕ, 2008).

Τα σημεία στα οποία έχει εντοπιστεί η λαγορίγανη είναι ορεινές-ημιορεινές περιοχές και τα εδάφη κυρίως πετρώδη.

Αξιοσημείωτη παρατήρηση αποτελεί το γεγονός της ασυνέχειας στην εξάπλωση του φυτού, σε μέρη στα οποία η ανάπτυξή του έχει διακοπεί από εξωγενή παράγοντα (εργασίες κατασκευής δρόμου, πυρκαγιά).

1.6 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ

Η λαγορίγανη είναι είδος το οποίο δεν έχει ακόμη ενταχθεί σε συστήματα καλλιέργειας σε εμπορική κλίμακα. Για το λόγο αυτό δεν υπάρχουν στοιχεία για τις εδαφικές απαιτήσεις προκειμένου να υπάρξει κερδοφόρα παραγωγή. Καθώς ομοιάζει με την κοινή ρίγανη είναι πιθανό να μπορούν να εφαρμοστούν παρόμοιες καλλιεργητικές τεχνικές.

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.

Σε αντίθεση, η επιλογή του πολλαπλασιασμού του φυτού με μοσχεύματα από το ρίζωμα μπορεί να αποτελεί έναν πιο εύκολο και γρήγορο τρόπο, όπως έχει αναφερθεί τόσο για τη ρίγανη όσο και για το δίκταμο, καθώς τα μοσχεύματα των *Lamiaceae* ριζοβολούν σχετικά εύκολα (Kuris et al., 1980). Ωστόσο, στην περίπτωση της λαγορίγανης θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερη προσοχή και απαιτείται περαιτέρω έρευνα σχετικά με την ικανότητα των ριζωμάτων να χρησιμοποιηθούν για τον πολλαπλασιασμό του φυτού.

Επιπρόσθετα, ο αγενής πολλαπλασιασμός της λαγορίγανης, όπως συμβαίνει και με τη ρίγανη, δίνει τη δυνατότητα δημιουργίας κλώνων με βελτιωμένα χαρακτηριστικά, μετά από επιλογή. Δεν πρέπει τέλος να μας διαφεύγει ότι η ανάπτυξη μεθόδων πολλαπλασιασμού φυτών ενδημικών με περιορισμένη έκταση εξάπλωσης μπορεί να συμβάλει στη διατήρηση του γενετικού τους υλικού.

2 ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑ *IN VITRO*

2.1 Η ΤΕΧΝΙΚΗ ΤΗΣ *IN VITRO* ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΑΣ ΕΚΦΥΤΩΝ

Η μεριστωματική καλλιέργεια είναι μια εργαστηριακών προδιαγραφών ασηπτική τεχνική, που απαιτεί ειδικές εγκαταστάσεις (θαλάμους νηματικής ροής, θαλάμους ελεγχόμενων συνθηκών) και εξοπλισμό (λαβίδες, νυστέρια, τριβλία κ.ά.) καθώς και εξειδικευμένο προσωπικό (Ποντίκης, 1994). Αυτές οι προϋποθέσεις αποτελούν τα σημαντικότερα μειονεκτήματα του μικροπολλαπλασιασμού των φυτών καθώς αυξάνουν σημαντικά το αρχικό κόστος εγκατάστασης μιας τέτοιας μονάδας παραγωγής πολλαπλασιαστικού υλικού. Ωστόσο, σε πολλές περιπτώσεις επιτυγχάνεται τελικά παραγωγή πολλαπλασιαστικού υλικού με μικρότερο κόστος, αν ληφθούν υπόψη και άλλοι παράγοντες (π.χ. δυνατότητα παραγωγής πολλαπλασιαστικού υλικού όλο το χρόνο) και με την προϋπόθεση ότι το φυτικό είδος δεν προσφέρει πιο εύκολο τρόπο για τον πολλαπλασιασμό του.

Οι φυτικοί ιστοί αναπτύσσονται κάτω από ελεγχόμενο περιβάλλον σε μικρά δοχεία που εφοδιάζονται με όλα τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία για την ανάπτυξή τους. Ειδικοί ρυθμιστές ανάπτυξης ελέγχουν τον ρυθμό ανάπτυξης των φυτών σε αυτό το περιβάλλον καθώς και την πορεία την οποία θα ακολουθήσουν (π.χ. σχηματισμός βλαστών ή ριζών).

Ο μικροπολλαπλασιασμός αποτελεί μια σύγχρονη τεχνική για την παραγωγή πολλαπλασιαστικού υλικού και εφαρμόζεται σε πάρα πολλά φυτικά είδη. Στηρίζεται στην ικανότητα μεμονωμένων ή μικρών ομάδων κυττάρων να αναπαράγουν πλήρως το φυτό από το οποίο προέρχονται (totipotency). Ο μικροπολλαπλασιασμός ανάλογα με το είδος του έκφυτου που χρησιμοποιείται και τον τρόπο αναγέννησης των φυτών περιλαμβάνει τις παρακάτω μεθόδους:

1. καλλιέργεια μεριστωμάτων
2. καλλιέργεια αρχέφυτρων βλαστού

3. καλλιέργεια κάλλου
4. καλλιέργεια αιωρημάτων κυττάρων
5. καλλιέργεια πρωτοπλαστών
6. καλλιέργεια ανθέρων, γυρεοκόκκων και ωοθήκης
7. καλλιέργεια εμβρύων και σπορίων

Τα σημαντικότερα χαρακτηριστικά της μεθόδου μικροπολλαπλασιασμού για την αναπαραγωγή των φυτών είναι:

- Μαζική παραγωγή ειδικών κλώνων.
- Παραγωγή φυτών απαλλαγμένων από ασθένειες.
- Κλωνική παραγωγή από γονείς που φυλάσσονται για υβριδική παραγωγή σπόρων.
- Παραγωγή σποροφύτων καθ' όλη τη διάρκεια του χρόνου.
- Διατήρηση γονότυπων.

2.2 ΠΛΕΟΝΕΚΤΗΜΑΤΑ ΤΟΥ ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΥ

Τα σημαντικότερα πλεονεκτήματα του μικροπολλαπλασιασμού είναι σύμφωνα με τους Ποντίκη (1994) και Τρυφονόπουλο (2014):

1. Η δυνατότητα πιστής αναπαραγωγής των μητρικών φυτών, δηλαδή η παραγωγή γενετικά όμοιων φυτών-απογόνων με το μητρικό φυτό αλλά και μεταξύ τους (κλωνικές ποικιλίες).
2. Η δυνατότητα παραγωγής μεγάλου αριθμού απογόνων σε σύντομο χρονικό διάστημα και σε μικρό χώρο (εξοικονόμηση χώρου).
3. Παραγωγή πολλαπλασιαστικού υλικού όλο το χρόνο γιατί η παραγωγή πολλαπλασιαστικού υλικού είναι ανεξάρτητη από τις εξωτερικές περιβαλλοντικές συνθήκες.

4. Παραγωγή 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. Διατήρηση γενετικού υλικού για μεγάλο χρονικό διάστημα, χωρίς αυτό να υφίσταται αλλοιώσεις (Ποντίκης, 1994).

2.3 ΠΑΡΑΓΟΝΤΕΣ ΠΟΥ ΕΠΗΡΕΑΖΟΥΝ ΤΟΝ ΜΙΚΡΟΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟ

Στα ερευνητικά εργαστήρια χρησιμοποιούνται διάφορα δοχεία και δοκιμαστικοί ή άλλοι σωλήνες, καθώς και τριβλία *Petri* για την τοποθέτηση του θρεπτικού υποστρώματος και των φυτικών ιστών. Όλα αυτά είναι από υλικά που αντέχουν σε ψηλές θερμοκρασίες καθώς θα πρέπει να αποστειρώνονται. Τα τριβλία *Petri* είναι γυάλινα ή πλαστικά επαναχρησιμοποιούμενα ή μιας χρήσης, αντίστοιχα.

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 (άζωτο, φώσφορος, κάλιο κ.ά.), μικροστοιχεία (σίδηρος, ψευδάργυρος κ.ά.), βιταμίνες, αμινοξέα, οργανικά οξέα, άλατα οργανικών οξέων και ρυθμιστικά διαλύματα, υδατάνθρακες (συνήθως σακχαρόζη και πιο σπάνια γλυκόζη). Επιπρόσθετα, μπορεί να περιλαμβάνονται φυτορρυθμιστικές ουσίες, όπως γιββερελλίνες: γιββερελλικό οξύ (GA_3), αυξίνες: ινδολυλοξικό οξύ (IAA), ινδολυλοβουτυρικό οξύ (IBA) και ναφθαλινοξικό οξύ (NAA), κυτοκινίνες: 6-βενζυλαδενίνη ή αμινοπουρίνη (6-BA ή BAP). Επιπρόσθετα, μπορεί να χρησιμοποιείται και 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 επιμήκυνση 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 γιββερελλίνες προάγουν κυρίως την επιμήκηση των κυττάρων και χρησιμοποιούνται επίσης στο στάδιο της βλαστογένεσης.

Το αιθυλένιο και το αμπισικό οξύ (ABA) είναι και αυτά ρυθμιστές ανάπτυξης οι οποίοι προωθούν τη γήρανση, αλλά δε χρησιμοποιούνται πολύ συχνά στην *in vitro* καλλιέργεια φυτικών ιστών που προορίζονται για την αναπαραγωγή φυτικών ειδών, εκτός και αν πρόκειται για φυτικά είδη με ιδιαίτερες απαιτήσεις.

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 ινδολυλολικό 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.

Σημαντικός παράγοντας για την επιτυχημένη εγκατάσταση μιας *in vitro* καλλιέργειας είναι επίσης είναι και τρόπος επιφανειακής απολύμανσης των φυτικών τμημάτων που θα χρησιμοποιηθούν (έκφυτα). Η απολύμανση των έκφυτων γίνεται συνήθως σε διάλυμα υποχλωριώδους νατρίου ή πιο σπάνια υποχλωριώδους ασβεστίου. Χρησιμοποιείται συνήθως χλωρίνη του εμπορίου (κατά προτίμηση μη παλαιωμένη).

Η συγκέντρωση της χλωρίνης που συνήθως χρησιμοποιείται για την απολύμανση των έκφυτων κυμαίνεται έως 20% (συνήθως μεγαλύτερη από 10%). Ωστόσο, η ακριβής συγκέντρωση χλωρίνης εξαρτάται σημαντικά από την εξωτερική επιφάνεια του φυτικού ιστού. Έτσι για παράδειγμα, για την απολύμανση νεφών βλαστών μπορεί να χρησιμοποιούνται χαμηλές

συγκεντρώσεις διαλυμάτων χλωρίνης (π.χ. 10%) και οι ιστοί να παραμένουν στο διάλυμα για σχετικά μικρό χρονικό διάστημα (π.χ. 8-10 min). Σε αντίθεση, ιστοί με σκληρή ή τραχιά επιφάνεια (π.χ. σπόροι) παραμένουν στο διάλυμα χλωρίνης για μεγαλύτερο χρονικό διάστημα (π.χ. 12 ή και 20 min) και σε διαλύματα υψηλότερης συγκέντρωσης σε χλωρίνη (π.χ. 15-20%).

Αν και η χρήση διαλυμάτων με υψηλή συγκέντρωση σε χλωρίνη ή/και η παρατεταμένη παραμονή των φυτικών ιστών στο διάλυμα χλωρίνης μπορούν να εξασφαλίσουν την απολύμανσή τους από μύκητες και βακτήρια, θα πρέπει για κάθε φυτικό ιστό να προσδιορίζονται ο ακριβής χρόνος παραμονής και η ακριβής συγκέντρωση του διαλύματος σε χλωρίνη, ώστε να αποφεύγεται η καταστροφή των κυττάρων που χρησιμεύουν για την αναπαραγωγή (π.χ. μεριστώματα, έμβρυα κ.ά.). Επιπρόσθετα, αυτή η επίδραση της χλωρίνης στους φυτικούς ιστούς θα πρέπει να λαμβάνεται υπόψη κατά τη στιγμή της λήψης των έκφυτων, π.χ. γονάτων με μεριστώματα από βλαστούς. Πιο συγκεκριμένα θα πρέπει να λαμβάνονται έκφυτα στα οποία αφήνονται και από τις δύο πλευρές του μεριστώματος τουλάχιστον 0,5 cm καθώς τα κύτταρα που μετά την τομή είναι εκτεθειμένα στο διάλυμα της χλωρίνης καταστρέφονται. Πάντως, σε κάποιες περιπτώσεις μπορεί να απαιτείται η εφαρμογή διπλής απολύμανσης των φυτικών ιστών.

Μετά την απολύμανση των φυτικών ιστών ακολουθεί πλύσιμο με αποστειρωμένο νερό (3 φορές εμβάπτιση σε αποστειρωμένο) με σκοπό την απομάκρυνση των υπολειμάτων χλωρίνης που είναι τοξική για τους φυτικούς ιστούς.

Μετά τη μεταφορά των έκφυτων υπό ασηπτικές συνθήκες (σε θάλαμο νηματικής ροής με τη χρήση αποστειρωμένων λαβίδων και νυστεριών) στο θρεπτικό υπόστρωμα, που έχει αποστειρωθεί σε κλίβανο, τα αποστειρωμένα δοχεία (διαφόρων τύπων) καλύπτονται από υλικά (συνήθως πολυαιθυλένιο) που επιτρέπουν την ανταλλαγή αερίων (οξυγόνο, διοξείδιο του άνθρακα, υδρατμοί) αλλά δεν επιτρέπουν την είσοδο παθογόνων μικροοργανισμών.

Αν παρόλα αυτά γίνουν αντιληπτές μολύνσεις θα πρέπει να απομακρύνονται οι φυτικοί ιστοί που δεν είναι μολυσμένοι να απομακρύνονται και να τοποθετούνται σε νέο θρεπτικό υπόστρωμα. Αν αυτό είναι αδύνατο, τότε το δοχείο απομακρύνεται από το θάλαμο ανάπτυξης μαζί με τους μολυσμένους φυτικούς ιστούς. Ωστόσο, κάποιες μολύνσεις που προέρχονται από βακτήρια (π.χ. *Bacillus*, *Erwinia*, *Pseudomonas*), παραμένουν πολλές φορές εντός του φυτικού υλικού χωρίς να εκδηλώνονται συμπτώματα για πολλούς μήνες.

Όταν τα μικρά φυτά ριζοβολήσουν, πρέπει να εγκλιματισθούν. Τα φυτά απομακρύνονται από τα δοχεία καλλιέργειας, ξεπλένεται το άγαρ και ακολουθεί η φύτευσή τους σε μικρά φυτοδοχεία τα οποία τοποθετούνται σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών ή σε συνθήκες θερμοκηπίου, αν δεν είναι διαθέσιμος τέτοιος θάλαμος.

3 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Ο σκοπός της εργασίας είναι η μελέτη της επίδρασης του χρόνου λήψης των έκφυτων και της θέσης τους στο βλαστό του φυτού στον *in vitro* πολλαπλασιασμό της λαγορίγανης. Θα πρέπει να σημειωθεί ότι κατά τη διάρκεια της πραγματοποίησης αυτής τη πειραματικής μελέτης δεν υπήρχαν στοιχεία για τον πολλαπλασιασμό του φυτού και ιδιαίτερα για την *in vitro* εγκατάστασή του, ούτε στη διεθνή ούτε στην ελληνική βιβλιογραφία.

4 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

Η εργασία αυτή πραγματοποιήθηκε στο εργαστήριο Γεωργίας του ΤΕΙ Πελοποννήσου από το Μάιο του 2012 έως το Νοέμβριο του ίδιου έτος. Χρησιμοποιήθηκαν στελέχη λαγορίγανης (Εικόνα 4.1) από τα οποία ελήφθησαν έκφυτα για την εγκατάστασή τους *in vitro*.



Εικόνα 4.1. Στέλεχος λαγορίγανης πριν τη χρήση του για τη λήψη έκφυτων.

Πιο συγκεκριμένα ελήφθησαν έκφυτα από φυτά σε 4 διαφορετικά στάδια της ανάπτυξής τους και πιο συγκεκριμένα:

- 22-5-2012
- 19-6-2012
- 20-7-2012
- 7-9-2012

Τα έκφυτα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν η κορυφή του φυτού (περιλαμβάνεται το κορυφαίο μερίστωμα) καθώς και γόνατα (περιλαμβάνουν δύο

μεριστώματα το καθένα καθώς σε κάθε γόνατο φύονται 2 φύλλα). Συγκεκριμένα τα έκφυτα που χρησιμοποιήθηκαν προέρχονταν από την κορυφή του βλαστού, το πρώτο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού, το τρίτο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού, το πέμπτο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού και το έβδομο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού.

Τα έκφυτα αρχικά πλύθηκαν με τρεχούμενο νερό και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε διηθητικό χαρτί μέχρι να στεγνώσουν. Στη συνέχεια με τη χρήση καθαρού ψαλιδιού αποκόπηκαν τμήματα είτε 0,5-1 cm ακριβώς κάτω από την κορυφή του βλαστού ή από γόνατα (0,5-1 cm επάνω και κάτω από το γόνατο).

Τα έκφυτα (γόνατα) τοποθετήθηκαν για επιφανειακή απολύμανση σε διάλυμα χλωρίνης 10% % για 10 min και υπό συνεχή ανάδευση και στη συνέχεια ξεπλύθηκαν τρεις φορές με αποστειρωμένο νερό (εμβάπτιση διαδοχικά σε τρία αποστειρωμένα δοχεία με αποστειρωμένο νερό). Τέλος, με χρήση αποστειρωμένης λαβίδας και υπό ασηπτικές συνθήκες, μεταφέρθηκαν σε τριβλία, με τα κατάλληλα για κάθε μεταχείριση ημιστερέα θρεπτικά υποστρώματα (Τρυφονόπουλος, 2014).

Σε όλα τα πειράματα χρησιμοποιήθηκε θρεπτικό υπόστρωμα *Murashige and Skoog* (MS) για την ανάπτυξη των έκφυτων, η σύνθεση του οποίου αναφέρεται στον πίνακα 4.1. Για την παρασκευή ενός λίτρου υποστρώματος ακολουθείται η παρακάτω διαδικασία. 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 g καθώς και σακχαρόζη σε ποσότητα 30 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 5,8. Προστέθηκε άγαρ σε ποσότητα 4 g ανά 1 L. Μετά την παρασκευή του τελικού διαλύματος, 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 (Τρυφονόπουλος, 2014).

Πίνακας 4.1. Σύσταση θρεπτικού υποστρώματος MS (Τρυφονόπουλος, 2014).

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

Μετά την τοποθέτηση στα τριβλία (Εικόνα 4.2), αυτά μεταφέρθηκαν σε θαλάμους ελεγχόμενων συνθηκών με θερμοκρασία 12° C τη νύχτα και 18° C την ημέρα με διάρκεια ημέρας 16 ώρες και διάρκεια νύχτας 8 ώρες.



Εικόνα 4.2. Νεαρά έκφυτα μετά την in vitro εγκατάστασή τους στο θρεπτικό υπόστρωμα.

Το πείραμα ήταν διπαραγοντικό (θέση έκφυτου στο βλαστό, χρόνος λήψης έκφυτων). Για κάθε επανάληψη κάθε μεταχείρισης χρησιμοποιήθηκαν 3 τριβλία των 5 έκφυτων το καθένα.

Κατά τη διάρκεια της ανάπτυξης των έκφυτων μετρήθηκαν:

1. Το ποσοστό των έκφυτων που αναπτύχθηκαν (αντίδραση έκφυτων) κάθε 15 ημέρες, ξεκινώντας από την 15^η ημέρα μετά την εγκατάσταση των έκφυτων
2. Ο αριθμός φύλλων ανά έκφυτο κάθε 15 ημέρες, ξεκινώντας από την 15^η ημέρα μετά την εγκατάσταση των έκφυτων

3. Ο αριθμός των βλαστών ανά έκφυτο κάθε 15 ημέρες, ξεκινώντας από την 15^η ημέρα μετά την εγκατάσταση των έκφυτων

Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έγινε με τη χρήση του στατιστικού προγράμματος Stat Graphics 10. Λόγω της στατιστικά σημαντικής αλληλεπίδρασης των δύο παραγόντων (χρόνος λήψης εκφυτων και θέση του έκφυτου στο βλαστό) έγινε ανάλυση της διασποράς (ANOVA) χωριστά για κάθε παράγοντα, έτσι ώστε να διαπιστωθεί η επίδραση κάθε παράγοντα, διατηρώντας το επίπεδο του άλλου παράγοντα σταθερό. Η σημαντικότητα των διαφορών των μέσων εκτιμήθηκε με το κριτήριο της Ελάχιστης Σημαντικής Διαφοράς σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

5 ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

5.1 ΠΟΣΟΣΤΟ ΕΚΦΥΤΩΝ ΠΟΥ ΑΝΑΠΤΥΘΗΚΑΝ

Πίνακας 5.1. Μέσο ποσοστό (%) έκφυτων που αναπτύχθηκαν 15 ημέρες μετά την εγκατάσταση *in vitro*.

Θέση έκφυτου στο βλαστό	Χρόνος λήψης έκφυτων			
	22-5-2012	19-6-2012	20-7-2012	7-9-2012
Κορυφή	90 a (a)	100 a (a)	80 a (a)	7 a (b)
1 ^ο γόνατο	100 a (a)	75 a (a)	25 b (b)	7 a (c)
3 ^ο γόνατο	10 b (a)	0 b (a)	10 bc (a)	7 a (a)
5 ^ο γόνατο	7 b (a)	7 b (a)	0 c (a)	0 a (a)
7 ^ο γόνατο	6 b (a)	0 b (a)	0 c (a)	0 a (a)

Τιμές στην ίδια στήλη που ακολουθούνται από το ίδιο λατινικό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

Τιμές στην ίδια γραμμή που ακολουθούνται από το ίδιο λατινικό γράμμα μέσα σε παρένθεση δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

Επίδραση της θέσης του έκφυτου. Η θέση του έκφυτου επηρεάζει στατιστικά σημαντικά το ποσοστό των έκφυτων που αναπτύσσονται 15 ημέρες μετά την εγκατάσταση (Πίνακας 5.1). Για τα έκφυτα που ελήφθησαν την 22-5-2012 και 19-6-2012, το ποσοστό έκφυτων που αναπτύχθηκαν ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερο όταν αυτά προέρχονται από την κορυφή του βλαστού και από το 1^ο

γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού, σε σύγκριση με αυτά που προέρχονται από το 3^ο, το 5^ο και το 7^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού.

Για τα έκφυτα που ελήφθησαν την 20-7-2012, το ποσοστό έκφυτων που αναπτύχθηκαν ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερο όταν αυτά προέρχονται από την κορυφή του βλαστού σε σύγκριση με αυτά που προέρχονται από το 1^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού. Αυτά που προέρχονται από το 1^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού αντέδρασαν σε στατιστικά σημαντικά υψηλότερο ποσοστό από αυτά που προέρχονται από το 5^ο και το 7^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού, αλλά δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά από αυτά που προέρχονταν από το 3^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού.

Για τα έκφυτα που ελήφθησαν την 7-9-2012, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική επίδραση της θέσης του έκφυτου στο ποσοστό των έκφυτων που αναπτύσσονται 15 ημέρες μετά την εγκατάσταση.

Επίδραση του χρόνου λήψης του έκφυτου. Ο χρόνος λήψης των έκφυτων επηρέασε στατιστικά σημαντικά το ποσοστό των έκφυτων που αναπτύχθηκαν 15 ημέρες μετά την εγκατάσταση (Πίνακας 5.1). Για τα έκφυτα που προέρχονται από την κορυφή του βλαστού, αυτά που ελήφθησαν την 22-5-2012, 19-6-2012 και 20-7-2012 είχαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα ποσοστά ανάπτυξης σε σύγκριση με αυτά που ελήφθησαν την 7-9-2012.

Για τα έκφυτα που προέρχονται από το 1^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού, αυτά που ελήφθησαν την 22-5-2012 και 19-6-2012 είχαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα ποσοστά ανάπτυξης σε σύγκριση με αυτά που ελήφθησαν την 20-7-2012, τα οποία με τη σειρά τους είχαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα ποσοστά ανάπτυξης σε σύγκριση με αυτά που ελήφθησαν την 7-9-2012.

Για τα έκφυτα που προέρχονται από το 3^ο, το 5^ο ή το 7^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού, ο χρόνος λήψης των έκφυτων δεν επηρέασε στατιστικά σημαντικά το ποσοστό αυτών που αναπτύχθηκαν 15 ημέρες μετά την εγκατάσταση.

Πίνακας 5.2. Μέσο ποσοστό (%) έκφυτων που αναπτύχθηκαν 30 ημέρες μετά την εγκατάσταση *in vitro*.

Θέση έκφυτου στο βλαστό	Χρόνος λήψης έκφυτων			
	22-5-2012	19-6-2012	20-7-2012	7-9-2012
Κορυφή	100 a (a)	100 a (a)	93 a (a)	13 a (b)
1 ^ο γόνατο	100 a (a)	90 a (a)	27 b (b)	7 ab (c)
3 ^ο γόνατο	20 b (a)	7 b (a)	13 bc (ab)	7 ab (b)
5 ^ο γόνατο	7 b (a)	7 b (a)	0 c (a)	0 b (a)
7 ^ο γόνατο	6 b (a)	0 b (a)	0 c (a)	0 b (a)

Τιμές στην ίδια στήλη που ακολουθούνται από το ίδιο λατινικό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

Τιμές στην ίδια γραμμή που ακολουθούνται από το ίδιο λατινικό γράμμα μέσα σε παρένθεση δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

Επίδραση της θέσης του έκφυτου. Η θέση του έκφυτου επηρεάζει στατιστικά σημαντικά το ποσοστό των έκφυτων που αναπτύσσονται 30 ημέρες μετά την εγκατάσταση (Πίνακας 5.2). Για τα έκφυτα που ελήφθησαν την 22-5-2012 και 19-6-2012, το ποσοστό έκφυτων που αναπτύχθηκαν ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερο όταν αυτά προέρχονται από την κορυφή του βλαστού και από το 1^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού, σε σύγκριση με αυτά που προέρχονται από το 3^ο, το 5^ο και το 7^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού.

Για τα έκφυτα που ελήφθησαν την 20-7-2012, το ποσοστό έκφυτων που αναπτύχθηκαν ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερο όταν αυτά προέρχονται από την κορυφή του βλαστού σε σύγκριση με αυτά που προέρχονται από το 1^ο γόνατο

κάτω από την κορυφή του βλαστού. Αυτά που προέρχονται από το 1^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού αντέδρασαν σε στατιστικά σημαντικά υψηλότερο ποσοστό από αυτά που προέρχονται από το 5^ο και το 7^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού, αλλά δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά από αυτά που προέρχονταν από το 3^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού.

Για τα έκφυτα που ελήφθησαν την 7-9-2012, αυτά που προέρχονται από την κορυφή του βλαστού είχαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερο ποσοστό ανάπτυξης σε σύγκριση με αυτά που προέρχονται από το 5^ο ή το 7^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού. Τα έκφυτα που προέρχονται από το 1^ο ή το 3^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε ότι αφορά το ποσοστό αυτών που αναπτύσσονται, τόσο σε σύγκριση με τα έκφυτα που προέρχονται από την κορυφή του βλαστού όσο και σε σύγκριση με τα έκφυτα που προέρχονται από το 5^ο και το 7^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού.

Επίδραση του χρόνου λήψης του έκφυτου. Ο χρόνος λήψης των έκφυτων επηρέασε στατιστικά σημαντικά το ποσοστό των έκφυτων που αναπτύχθηκαν 30 ημέρες μετά την εγκατάσταση (Πίνακας 5.2). Για τα έκφυτα που προέρχονται από την κορυφή του βλαστού, αυτά που ελήφθησαν την 22-5-2012, 19-6-2012 και 20-7-2012 είχαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα ποσοστά ανάπτυξης σε σύγκριση με αυτά που ελήφθησαν την 7-9-2012.

Για τα έκφυτα που προέρχονται από το 1^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού, αυτά που ελήφθησαν την 22-5-2012 και 19-6-2012 είχαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα ποσοστά ανάπτυξης σε σύγκριση με αυτά που ελήφθησαν την 20-7-2012, τα οποία με τη σειρά τους είχαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα ποσοστά ανάπτυξης σε σύγκριση με αυτά που ελήφθησαν την 7-9-2012.

Για τα έκφυτα που προέρχονται από το 3^ο, το 5^ο ή το 7^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού, ο χρόνος λήψης των έκφυτων δεν επηρέασε στατιστικά σημαντικά το ποσοστό αυτών που αναπτύχθηκαν 30 ημέρες μετά την εγκατάσταση.

Πίνακας 5.3. Μέσο ποσοστό (%) έκφυτων που αναπτύχθηκαν 45 ημέρες μετά την εγκατάσταση *in vitro*.

Θέση έκφυτου στο βλαστό	Χρόνος λήψης έκφυτων			
	22-5-2012	19-6-2012	20-7-2012	7-9-2012
Κορυφή	100 a (a)	100 a (a)	93 a (a)	13 a (b)
1 ^ο γόνατο	100 a (a)	100 a (a)	27 b (b)	7 ab (c)
3 ^ο γόνατο	20 b (a)	7 b (b)	13 bc (ab)	7 ab (b)
5 ^ο γόνατο	7 b (a)	7 b (a)	0 c (a)	0 a (a)
7 ^ο γόνατο	6 b (a)	0 b (a)	0 c (a)	0 a (a)

Τιμές στην ίδια στήλη που ακολουθούνται από το ίδιο λατινικό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

Τιμές στην ίδια γραμμή που ακολουθούνται από το ίδιο λατινικό γράμμα μέσα σε παρένθεση δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

Επίδραση της θέσης του έκφυτου. Η θέση του έκφυτου επηρεάζει στατιστικά σημαντικά το ποσοστό των έκφυτων που αναπτύσσονται 45 ημέρες μετά την εγκατάσταση (Πίνακας 5.3). Για τα έκφυτα που ελήφθησαν την 22-5-2012 και 19-6-2012, το ποσοστό έκφυτων που αναπτύχθηκαν ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερο όταν αυτά προέρχονται από την κορυφή του βλαστού και από το 1^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού, σε σύγκριση με αυτά που προέρχονται από το 3^ο, το 5^ο και το 7^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού.

Για τα έκφυτα που ελήφθησαν την 20-7-2012, το ποσοστό έκφυτων που αναπτύχθηκαν ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερο όταν αυτά προέρχονται από την κορυφή του βλαστού σε σύγκριση με αυτά που προέρχονται από το 1^ο γόνατο

κάτω από την κορυφή του βλαστού. Αυτά που προέρχονται από το 1^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού αντέδρασαν σε στατιστικά σημαντικά υψηλότερο ποσοστό από αυτά που προέρχονται από το 5^ο και το 7^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού, αλλά δεν διέφεραν στατιστικά σημαντικά από αυτά που προέρχονταν από το 3^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού.

Για τα έκφυτα που ελήφθησαν την 7-9-2012, αυτά που προέρχονται από την κορυφή του βλαστού είχαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερο ποσοστό ανάπτυξης σε σύγκριση με αυτά που προέρχονται από το 5^ο ή το 7^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού. Τα έκφυτα που προέρχονται από το 1^ο ή το 3^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε ότι αφορά το ποσοστό αυτών που αναπτύσσονται, τόσο σε σύγκριση με τα έκφυτα που προέρχονται από την κορυφή του βλαστού όσο και σε σύγκριση με τα έκφυτα που προέρχονται από το 5^ο και το 7^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού.

Επίδραση του χρόνου λήψης του έκφυτου. Ο χρόνος λήψης των έκφυτων επηρέασε στατιστικά σημαντικά το ποσοστό των έκφυτων που αναπτύχθηκαν 45 ημέρες μετά την εγκατάσταση (Πίνακας 5.3). Για τα έκφυτα που προέρχονται από την κορυφή του βλαστού, αυτά που ελήφθησαν την 22-5-2012, 19-6-2012 και 20-7-2012 είχαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα ποσοστά ανάπτυξης σε σύγκριση με αυτά που ελήφθησαν την 7-9-2012.

Για τα έκφυτα που προέρχονται από το 1^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού, αυτά που ελήφθησαν την 22-5-2012 και 19-6-2012 είχαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα ποσοστά ανάπτυξης σε σύγκριση με αυτά που ελήφθησαν την 20-7-2012, τα οποία με τη σειρά τους είχαν στατιστικά σημαντικά υψηλότερα ποσοστά ανάπτυξης σε σύγκριση με αυτά που ελήφθησαν την 7-9-2012.

Για τα έκφυτα που προέρχονται από το 3^ο, το 5^ο ή το 7^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού, ο χρόνος λήψης των έκφυτων δεν επηρέασε στατιστικά σημαντικά το ποσοστό αυτών που αναπτύχθηκαν 45 ημέρες μετά την εγκατάσταση.

5.2 ΑΡΙΘΜΟΣ ΦΥΛΛΩΝ ΑΝΑ ΕΚΦΥΤΟ

Πίνακας 5.4. Μέσος αριθμός φύλλων ανά έκφυτο 15 ημέρες μετά την εγκατάσταση *in vitro*.

Θέση έκφυτου στο βλαστό	Χρόνος λήψης έκφυτων			
	22-5-2012	19-6-2012	20-7-2012	7-9-2012
Κορυφή	2,1 a (a)	2,0 a (a)	1,4 a (b)	0,3 a (c)
1 ^ο γόνατο	2,4 a (a)	1,8 a (b)	0,6 b (c)	0,3 a (c)
3 ^ο γόνατο	0,4 b (a)	0,2 b (a)	0,1 c (a)	0,1 a (a)
5 ^ο γόνατο	0,2 b (a)	0,2 b (a)	0 c (a)	0 a (a)
7 ^ο γόνατο	0,1 b (a)	0 b (a)	0 c (a)	0 a (a)

Τιμές στην ίδια στήλη που ακολουθούνται από το ίδιο λατινικό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

Τιμές στην ίδια γραμμή που ακολουθούνται από το ίδιο λατινικό γράμμα μέσα σε παρένθεση δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

Επίδραση της θέσης του έκφυτου. Η θέση του έκφυτου επηρεάζει στατιστικά τον αριθμό των φύλλων που εκπτύσσονται ανά έκφυτο 15 ημέρες μετά την εγκατάσταση των έκφυτων (Πίνακας 5.4). Για τα έκφυτα που ελήφθησαν την 22-5-2012 και 19-6-2012, ο αριθμός των φύλλων ανά έκφυτο είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος σε αυτά που προέρχονται από την κορυφή του βλαστού και από το 1^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού σε σύγκριση με αυτά που προέρχονται από το 3^ο, το 5^ο ή το 7^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού.

Στα έκφυτα που ελήφθησαν την 20-7-2012, ο αριθμός των φύλλων ανά έκφυτο ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερος σε αυτά που προέρχονται από την κορυφή του βλαστού σε σύγκριση με αυτά που προέρχονται από το 1^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού. Επιπρόσθετα, τα έκφυτα που προέρχονται από το 3^ο, 5^ο ή 7^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού είχαν στατιστικά σημαντικά μικρότερο αριθμό φύλλων από αυτά που προέρχονται από το 1^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού.

Στα έκφυτα που ελήφθησαν την 7-9-2012, η θέση του έκφυτου στο βλαστό δεν επηρέασε στατιστικά σημαντικά τον αριθμό των φύλλων ανά έκφυτο.

Επίδραση του χρόνου λήψης του έκφυτου. Ο αριθμός των φύλλων ανά έκφυτο 15 ημέρες μετά την εγκατάστασή τους επηρεάζεται στατιστικά σημαντικά από το χρόνο λήψης του έκφυτου (Πίνακας 5.4). Για τα έκφυτα που προέρχονται από την κορυφή του βλαστού, ο αριθμός των φύλλων ανά έκφυτο είναι στατιστικά σημαντικά υψηλότερος σε αυτά που ελήφθησαν την 22-5-2012 και 19-6-2012 σε σύγκριση με αυτά που ελήφθησαν την 20-7-2012. Επιπρόσθετα, ο αριθμός των φύλλων ανά έκφυτο ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερος σε έκφυτα που ελήφθησαν την 20-7-2012 σε σύγκριση με έκφυτα που ελήφθησαν την 7-9-2012.

Για τα έκφυτα που προέρχονται από το 1^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού, ο αριθμός των φύλλων ανά έκφυτο είναι στατιστικά σημαντικά υψηλότερος σε αυτά που ελήφθησαν την 22-5-2012 και 19-6-2012 σε σύγκριση με αυτά που ελήφθησαν την 20-7-2012 και την 7-9-2012. Ωστόσο, ο αριθμός των φύλλων ανά έκφυτο δεν διέφερε στατιστικά σημαντικά μεταξύ των έκφυτων που ελήφθησαν την 20-7-2012 και την 7-9-2-2012, όπως παρατηρήθηκε για έκφυτα τα οποία προέρχονται την κορυφή του βλαστού.

Για έκφυτα που προέρχονται από το 3^ο, το 5^ο ή το 7^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική επίδραση του χρόνου λήψης των έκφυτων στον αριθμό των φύλλων.

Πίνακας 5.5. Μέσος αριθμός φύλλων ανά έκφυτο 30 ημέρες μετά την εγκατάσταση *in vitro*.

Θέση έκφυτου στο βλαστό	Χρόνος λήψης έκφυτων			
	22-5-2012	19-6-2012	20-7-2012	7-9-2012
Κορυφή	4,6 a (a)	5,3 a (a)	3,1 a (b)	0,3 a (c)
1 ^ο γόνατο	5,1 a (a)	3,2 b (b)	1,5 b (c)	0,3 a (d)
3 ^ο γόνατο	1,1 b (a)	0,6 c (ab)	0,3 c (b)	0,1 a (b)
5 ^ο γόνατο	0,6 bc (a)	0,6 c (a)	0 c (b)	0 a (b)
7 ^ο γόνατο	0,3 c (a)	0 c (a)	0 c (a)	0 a (a)

Τιμές στην ίδια στήλη που ακολουθούνται από το ίδιο λατινικό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

Τιμές στην ίδια γραμμή που ακολουθούνται από το ίδιο λατινικό γράμμα μέσα σε παρένθεση δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

Επίδραση της θέσης του έκφυτου. Η θέση του έκφυτου επηρεάζει στατιστικά τον αριθμό των φύλλων που εκπτύσσονται ανά έκφυτο 30 ημέρες μετά την εγκατάσταση (Πίνακας 5.5). Για τα έκφυτα που ελήφθησαν την 22-5-2012, ο αριθμός των φύλλων ανά έκφυτο είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος σε αυτά που προέρχονται από την κορυφή του βλαστού και από το 1^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού σε σύγκριση με αυτά που προέρχονται από το 3^ο, το 5^ο ή το 7^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού. Επιπρόσθετα, ο αριθμός των φύλλων σε έκφυτα που προέρχονται από το 3^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος σε σύγκριση με τον αριθμό των

φύλλων σε έκφυτα που προέρχονται από το 7^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού.

Στα έκφυτα που ελήφθησαν την 19-6-2012 και την 20-7-2012, ο αριθμός των φύλλων ανά έκφυτο ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερος σε αυτά που προέρχονται από την κορυφή του βλαστού σε σύγκριση με αυτά που προέρχονται από το 1^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού. Επιπρόσθετα, τα έκφυτα που προέρχονται από το 3^ο, 5^ο ή 7^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού είχαν στατιστικά σημαντικά μικρότερο αριθμό φύλλων από αυτά που προέρχονται από το 1^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού.

Στα έκφυτα που ελήφθησαν την 7-9-2012, η θέση του έκφυτου στο βλαστό δεν επηρέασε στατιστικά σημαντικά τον αριθμό των φύλλων ανά έκφυτο.

Επίδραση του χρόνου λήψης του έκφυτου. Ο αριθμός των φύλλων ανά έκφυτο 30 ημέρες μετά την εγκατάσταση επηρεάζεται στατιστικά σημαντικά από το χρόνο λήψης του έκφυτου (Πίνακας 5.5). Για τα έκφυτα που προέρχονται από την κορυφή του βλαστού, ο αριθμός των φύλλων ανά έκφυτο είναι στατιστικά σημαντικά υψηλότερος σε αυτά που ελήφθησαν την 22-5-2012 και 19-6-2012 σε σύγκριση με αυτά που ελήφθησαν την 20-7-2012. Επιπρόσθετα, ο αριθμός των φύλλων ανά έκφυτο ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερος σε έκφυτα που ελήφθησαν την 20-7-2012 σε σύγκριση με έκφυτα που ελήφθησαν την 7-9-2012.

Για τα έκφυτα που προέρχονται από το 1^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού, ο αριθμός των φύλλων ανά έκφυτο είναι στατιστικά σημαντικά υψηλότερος σε αυτά που ελήφθησαν την 22-5-2012 και 19-6-2012 σε σύγκριση με αυτά που ελήφθησαν την 20-7-2012. Επιπρόσθετα, ο αριθμός των φύλλων ανά έκφυτο ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότερος σε έκφυτα που ελήφθησαν την 7-9-2012 σε σύγκριση με τα έκφυτα που ελήφθησαν την 20-7-2012.

Για έκφυτα που προέρχονται από το 3^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού, ο αριθμός των φύλλων ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος σε αυτά που ελήφθησαν την 22-5-2012 σε σύγκριση με αυτά που ελήφθησαν την 20-7-2012 και 7-9-2012.

Για τα έκφυτα που προέρχονται από το 5^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού, ο αριθμός των φύλλων ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος σε αυτά που ελήφθησαν την 22-5-2012 και την 19-6-2012 σε σύγκριση με αυτά που ελήφθησαν την 20-7-2012 και 7-9-2012.

Για τα έκφυτα που προέρχονται από το 7^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική επίδραση του χρόνου λήψης των έκφυτων στον αριθμό των φύλλων.

Πίνακας 5.6. Μέσος αριθμός φύλλων ανά έκφυτο 45 ημέρες μετά την εγκατάσταση *in vitro*.

Θέση έκφυτου στο βλαστό	Χρόνος λήψης έκφυτων			
	22-5-2012	19-6-2012	20-7-2012	7-9-2012
Κορυφή	5,8 a (a)	6,3 a (a)	5,1 a (b)	0,8 a (c)
1 ^ο γόνατο	6,4 a (a)	5,2 a (b)	2,5 b (c)	0,6 ab (d)
3 ^ο γόνατο	1,6 b (a)	0,8 b (ab)	0,5 c (b)	0,3 b (b)
5 ^ο γόνατο	0,8 bc (a)	0,9 b (a)	0 c (b)	0 b (b)
7 ^ο γόνατο	0,5 c (a)	0 c (a)	0 c (a)	0 b (a)

Τιμές στην ίδια στήλη που ακολουθούνται από το ίδιο λατινικό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

Τιμές στην ίδια γραμμή που ακολουθούνται από το ίδιο λατινικό γράμμα μέσα σε παρένθεση δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

Επίδραση της θέσης του έκφυτου. Η θέση του έκφυτου επηρεάζει στατιστικά τον αριθμό των φύλλων που εκπτύσσονται ανά έκφυτο 45 ημέρες μετά την

εγκατάσταση (Πίνακας 5.6). Για τα έκφυτα που ελήφθησαν την 22-5-2012, ο αριθμός των φύλλων ανά έκφυτο είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος σε αυτά που προέρχονται από την κορυφή του βλαστού και από το 1^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού σε σύγκριση με αυτά που προέρχονται από το 3^ο, το 5^ο ή το 7^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού. Επιπρόσθετα, ο αριθμός των φύλλων σε έκφυτα που προέρχονται από το 3^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού είναι στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος σε σύγκριση με τον αριθμό των φύλλων σε έκφυτα που προέρχονται από το 7^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού.

Στα έκφυτα που ελήφθησαν την 19-6-2012, ο αριθμός των φύλλων ανά έκφυτο ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερος σε αυτά που προέρχονται από την κορυφή του βλαστού σε σύγκριση με αυτά που προέρχονται από το 1^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού. Τα έκφυτα που προέρχονται από το 3^ο, 5^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού είχαν στατιστικά σημαντικά μικρότερο αριθμό φύλλων από αυτά που προέρχονται από το 1^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού. Επιπρόσθετα, έκφυτα που προέρχονται από το 7^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού είχαν στατιστικά σημαντικά μικρότερο αριθμό φύλλων από αυτά που προέρχονται από το 3^ο και το 5^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού.

Στα έκφυτα που ελήφθησαν την 20-7-2012, ο αριθμός των φύλλων ανά έκφυτο ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερος σε αυτά που προέρχονται από την κορυφή του βλαστού σε σύγκριση με αυτά που προέρχονται από το 1^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού. Τα έκφυτα που προέρχονται από το 3^ο, 5^ο και 7^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού είχαν στατιστικά σημαντικά μικρότερο αριθμό φύλλων από αυτά που προέρχονται από το 1^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού.

Στα έκφυτα που ελήφθησαν την 7-9-2012, ο αριθμός των φύλλων ανά έκφυτο ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος σε αυτά που προέρχονται από

την κορυφή του βλαστού σε σύγκριση με αυτά που προέρχονται από το 3^ο, 5^ο και 7^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού.

Επίδραση του χρόνου λήψης του έκφυτου. Ο αριθμός των φύλλων ανά έκφυτο 45 ημέρες μετά την εγκατάσταση επηρεάζεται στατιστικά σημαντικά από το χρόνο λήψης του έκφυτου (Πίνακας 5.6). Για τα έκφυτα που προέρχονται από την κορυφή του βλαστού, ο αριθμός των φύλλων ανά έκφυτο είναι στατιστικά σημαντικά υψηλότερος σε αυτά που ελήφθησαν την 22-5-2012 και 19-6-2012 σε σύγκριση με αυτά που ελήφθησαν την 20-7-2012. Επιπρόσθετα, ο αριθμός των φύλλων ανά έκφυτο ήταν στατιστικά σημαντικά υψηλότερος σε έκφυτα που ελήφθησαν την 20-7-2012 σε σύγκριση με έκφυτα που ελήφθησαν την 7-9-2012.

Για τα έκφυτα που προέρχονται από το 1^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού, ο αριθμός των φύλλων ανά έκφυτο είναι στατιστικά σημαντικά υψηλότερος σε αυτά που ελήφθησαν την 22-5-2012 και 19-6-2012 σε σύγκριση με αυτά που ελήφθησαν την 20-7-2012. Επιπρόσθετα, ο αριθμός των φύλλων ανά έκφυτο ήταν στατιστικά σημαντικά μικρότερος σε έκφυτα που ελήφθησαν την 7-9-2012 σε σύγκριση με τα έκφυτα που ελήφθησαν την 20-7-2012.

Για έκφυτα που προέρχονται από το 3^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού, ο αριθμός των φύλλων ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος σε αυτά που ελήφθησαν την 22-5-2012 σε σύγκριση με αυτά που ελήφθησαν την 20-7-2012 και 7-9-2012.

Για τα έκφυτα που προέρχονται από το 5^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού, ο αριθμός των φύλλων ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος σε αυτά που ελήφθησαν την 22-5-2012 και την 19-6-2012 σε σύγκριση με αυτά που ελήφθησαν την 20-7-2012 και 7-9-2012.

Για τα έκφυτα που προέρχονται από το 7^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική επίδραση του χρόνου λήψης των έκφυτων στον αριθμό των φύλλων.

5.3 ΑΡΙΘΜΟΣ ΒΛΑΣΤΩΝ ΑΝΑ ΕΚΦΥΤΟ

Πίνακας 5.7. Μέσος αριθμός βλαστών ανά έκφυτο 15 ημέρες μετά την εγκατάσταση *in vitro*.

Θέση έκφυτου στο βλαστό	Χρόνος λήψης έκφυτων			
	22-5-2012	19-6-2012	20-7-2012	7-9-2012
Κορυφή	1,0 a (a)	1,0 a (a)	0,9 a (a)	0,1 a (b)
1 ^ο γόνατο	1,2 a (a)	1,0 a (a)	0,5 b (b)	0,1 a (c)
3 ^ο γόνατο	0,2 b (a)	0,1 b (a)	0,1 c (a)	0,1 a (a)
5 ^ο γόνατο	0,1 b (a)	0,1 b (a)	0,0 c (a)	0,0 a (a)
7 ^ο γόνατο	0,1 b (a)	0,0 b (a)	0,0 c (a)	0,0 a (a)

Τιμές στην ίδια στήλη που ακολουθούνται από το ίδιο λατινικό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

Τιμές στην ίδια γραμμή που ακολουθούνται από το ίδιο λατινικό γράμμα μέσα σε παρένθεση δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

Επίδραση της θέσης του έκφυτου. Η θέση του έκφυτου επηρεάζει στατιστικά τον αριθμό των βλαστών που εκπτύσσονται ανά έκφυτο 15 ημέρες μετά την εγκατάσταση (Πίνακας 5.7). Για τα έκφυτα που ελήφθησαν την 22-5-2012 και την 19-6-2012, ο αριθμός των βλαστών ανά έκφυτο ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος σε αυτά που προέρχονται από την κορυφή του βλαστού και από το 1^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού σε σύγκριση με αυτά που προέρχονται από το 3^ο, το 5^ο ή το 7^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού.

Για τα έκφυτα που ελήφθησαν την 20-7-2012, ο αριθμός των βλαστών ανά έκφυτο ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος σε αυτά που προέρχονται από την κορυφή του βλαστού σε σύγκριση με αυτά που προέρχονται από το 1^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού. Επιπρόσθετα, τα έκφυτα που προέρχονται από το 1^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού είχαν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο αριθμό βλαστών σε σύγκριση με αυτά που προέρχονται από το 3^ο, το 5^ο ή το 7^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού.

Για τα έκφυτα που ελήφθησαν την 7-9-2012, η θέση του έκφυτου στο μητρικό βλαστό δεν επηρέασε τον αριθμό των βλαστών που εκπτύχθηκαν ανά έκφυτο.

Επίδραση του χρόνου λήψης του έκφυτου. Ο αριθμός των βλαστών ανά έκφυτο 15 ημέρες μετά την εγκατάσταση επηρεάζεται στατιστικά σημαντικά από το χρόνο λήψης του έκφυτου (Πίνακας 5.7). Για τα έκφυτα που προέρχονται από την κορυφή του βλαστού, ο αριθμός των βλαστών ανά έκφυτο ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος σε αυτά που ελήφθησαν την 22-5-2012, την 19-6-2012 και την 20-7-2012 σε σύγκριση με αυτά που ελήφθησαν την 7-9-2012.

Για τα έκφυτα που προέρχονται από το 1^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού, ο αριθμός των βλαστών ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος σε αυτά που ελήφθησαν την 22-5-2012 και την 19-6-2012 σε σύγκριση με αυτά που ελήφθησαν την 20-7-2012. Επιπρόσθετα, ο αριθμός των βλαστών ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος σε αυτά που ελήφθησαν την 20-7-2012 σε σύγκριση με αυτά που ελήφθησαν την 7-9-2012.

Για τα έκφυτα που προέρχονται από το 3^ο, το 5^ο και το 7^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική επίδραση του χρόνου λήψης των έκφυτων στον αριθμό των βλαστών που εκπτύσσονται 15 ημέρες μετά την εγκατάσταση.

Πίνακας 5.8. Μέσος αριθμός βλαστών ανά έκφυτο 30 ημέρες μετά την εγκατάσταση *in vitro*.

Θέση έκφυτου στο βλαστό	Χρόνος λήψης έκφυτων			
	22-5-2012	19-6-2012	20-7-2012	7-9-2012
Κορυφή	1,0 b (a)	1,0 a (a)	0,9 a (a)	0,1 a (b)
1 ^ο γόνατο	1,5 a (a)	1,3 a (a)	0,5 b (b)	0,1 a (c)
3 ^ο γόνατο	0,3 c (a)	0,1 b (a)	0,1 c (a)	0,1 a (a)
5 ^ο γόνατο	0,1 c (a)	0,1 b (a)	0,0 c (a)	0,0 a (a)
7 ^ο γόνατο	0,1 c (a)	0,0 b (a)	0,0 c (a)	0,0 a (a)

Τιμές στην ίδια στήλη που ακολουθούνται από το ίδιο λατινικό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

Τιμές στην ίδια γραμμή που ακολουθούνται από το ίδιο λατινικό γράμμα μέσα σε παρένθεση δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

Επίδραση της θέσης του έκφυτου. Η θέση του έκφυτου επηρεάζει στατιστικά τον αριθμό των βλαστών που εκπύσσονται ανά έκφυτο 30 ημέρες μετά την εγκατάσταση (Πίνακας 5.7). Για τα έκφυτα που ελήφθησαν την 22-5-2012, ο αριθμός των βλαστών ανά έκφυτο ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος σε αυτά από το 1^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού σε σύγκριση με αυτά που προέρχονται από την κορυφή του βλαστού. Επιπρόσθετα, ο αριθμός των βλαστών ανά έκφυτο ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος σε αυτά που προέρχονται από την κορυφή του βλαστού σε σύγκριση με αυτά που προέρχονται από το 3^ο, το 5^ο ή το 7^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού.

Για τα έκφυτα που ελήφθησαν την 19-6-2012, ο αριθμός των βλαστών ανά έκφυτο ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος σε αυτά που προέρχονται από την κορυφή του βλαστού και από το 1^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού σε σύγκριση με αυτά που προέρχονται από το 3^ο, το 5^ο ή το 7^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού.

Για τα έκφυτα που ελήφθησαν την 20-7-2012, ο αριθμός των βλαστών ανά έκφυτο ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος σε αυτά που προέρχονται από την κορυφή του βλαστού σε σύγκριση με αυτά που προέρχονται από το 1^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού. Επιπρόσθετα, τα έκφυτα που προέρχονται από το 1^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού είχαν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο αριθμό βλαστών σε σύγκριση με αυτά που προέρχονται από το 3^ο, το 5^ο ή το 7^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού.

Για τα έκφυτα που ελήφθησαν την 7-9-2012, η θέση του έκφυτου στο μητρικό βλαστό δεν επηρέασε τον αριθμό των βλαστών που εκπτύχθηκαν ανά έκφυτο.

Επίδραση του χρόνου λήψης του έκφυτου. Ο αριθμός των βλαστών ανά έκφυτο 30 ημέρες μετά την εγκατάσταση επηρεάζεται στατιστικά σημαντικά από το χρόνο λήψης του έκφυτου (Πίνακας 5.7). Για τα έκφυτα που προέρχονται από την κορυφή του βλαστού, ο αριθμός των βλαστών ανά έκφυτο ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος σε αυτά που ελήφθησαν την 22-5-2012, την 19-6-2012 και την 20-7-2012 σε σύγκριση με αυτά που ελήφθησαν την 7-9-2012.

Για τα έκφυτα που προέρχονται από το 1^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού, ο αριθμός των βλαστών ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος σε αυτά που ελήφθησαν την 22-5-2012 και την 19-6-2012 σε σύγκριση με αυτά που ελήφθησαν την 20-7-2012. Επιπρόσθετα, ο αριθμός των βλαστών ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος σε αυτά που ελήφθησαν την 20-7-2012 σε σύγκριση με αυτά που ελήφθησαν την 7-9-2012.

Για τα έκφυτα που προέρχονται από το 3^ο, το 5^ο και το 7^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική επίδραση του

χρόνου λήψης των έκφυτων στον αριθμό των βλαστών που εκπτύσσονται 30 ημέρες μετά την εγκατάσταση.

Πίνακας 5.9. Μέσος αριθμός βλαστών ανά έκφυτο 45 ημέρες μετά την εγκατάσταση *in vitro*.

Θέση έκφυτου στο βλαστό	Χρόνος λήψης έκφυτων			
	22-5-2012	19-6-2012	20-7-2012	7-9-2012
Κορυφή	1,0 b (a)	1,0 b (a)	0,9 a (a)	0,1 a (b)
1 ^ο γόνατο	1,7 a (a)	1,6 a (a)	0,5 b (b)	0,1 a (c)
3 ^ο γόνατο	0,3 c (a)	0,1 c (a)	0,1 c (a)	0,1 a (a)
5 ^ο γόνατο	0,1 c (a)	0,1 c (a)	0,0 c (a)	0,0 a (a)
7 ^ο γόνατο	0,1 c (a)	0,0 c (a)	0,0 c (a)	0,0 a (a)

Τιμές στην ίδια στήλη που ακολουθούνται από το ίδιο λατινικό γράμμα δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

Τιμές στην ίδια γραμμή που ακολουθούνται από το ίδιο λατινικό γράμμα μέσα σε παρένθεση δε διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

Επίδραση της θέσης του έκφυτου. Η θέση του έκφυτου επηρεάζει στατιστικά τον αριθμό των βλαστών που εκπτύσσονται ανά έκφυτο 30 ημέρες μετά την εγκατάσταση (Πίνακας 5.7). Για τα έκφυτα που ελήφθησαν την 22-5-2012 και την 19-6-2012, ο αριθμός των βλαστών ανά έκφυτο ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος σε αυτά από το 1^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού σε σύγκριση με αυτά που προέρχονται από την κορυφή του βλαστού. Επιπρόσθετα, ο αριθμός των βλαστών ανά έκφυτο ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος σε

αυτά που προέρχονται από την κορυφή του βλαστού σε σύγκριση με αυτά που προέρχονται από το 3^ο, το 5^ο ή το 7^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού.

Για τα έκφυτα που ελήφθησαν την 20-7-2012, ο αριθμός των βλαστών ανά έκφυτο ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος σε αυτά που προέρχονται από την κορυφή του βλαστού σε σύγκριση με αυτά που προέρχονται από το 1^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού. Επιπρόσθετα, τα έκφυτα που προέρχονται από το 1^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού είχαν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερο αριθμό βλαστών σε σύγκριση με αυτά που προέρχονται από το 3^ο, το 5^ο ή το 7^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού.

Για τα έκφυτα που ελήφθησαν την 7-9-2012, η θέση του έκφυτου στο μητρικό βλαστό δεν επηρέασε τον αριθμό των βλαστών που εκπτύχθηκαν ανά έκφυτο.

Επίδραση του χρόνου λήψης του έκφυτου. Ο αριθμός των βλαστών ανά έκφυτο 30 ημέρες μετά την εγκατάσταση επηρεάζεται στατιστικά σημαντικά από το χρόνο λήψης του έκφυτου (Πίνακας 5.7). Για τα έκφυτα που προέρχονται από την κορυφή του βλαστού, ο αριθμός των βλαστών ανά έκφυτο ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος σε αυτά που ελήφθησαν την 22-5-2012, την 19-6-2012 και την 20-7-2012 σε σύγκριση με αυτά που ελήφθησαν την 7-9-2012.

Για τα έκφυτα που προέρχονται από το 1^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού, ο αριθμός των βλαστών ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος σε αυτά που ελήφθησαν την 22-5-2012 και την 19-6-2012 σε σύγκριση με αυτά που ελήφθησαν την 20-7-2012. Επιπρόσθετα, ο αριθμός των βλαστών ήταν στατιστικά σημαντικά μεγαλύτερος σε αυτά που ελήφθησαν την 20-7-2012 σε σύγκριση με αυτά που ελήφθησαν την 7-9-2012.

Για τα έκφυτα που προέρχονται από το 3^ο, το 5^ο και το 7^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού, δεν παρατηρήθηκε στατιστικά σημαντική επίδραση του χρόνου λήψης των έκφυτων στον αριθμό των βλαστών που εκπτύσσονται 30 ημέρες μετά την εγκατάσταση.

6. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η λαγορίγανη είναι ένα φυτό ενδημικό της Ελλάδας με σχετικά περιορισμένη εξάπλωση (Ταϋγγετος, Πάρνωνας, Δίρφυ) το οποίο, σύμφωνα με τους Aligiannis et al. (2001), παρουσιάζει ορισμένες φαρμακευτικές ιδιότητες. Επιπρόσθετα, χρησιμοποιείται σε κάποιες από τις περιοχές που αυτοφύεται για θεραπευτικές ιδιότητες (π.χ. κατά του στομαχόπονου), όπως κάποιοι κάτοικοι των περιοχών αυτών αναφέρουν.

Εκτός όμως από τις πιθανές φαρμακευτικές του ιδιότητες, που θα επέτρεπαν τη διάδοση της χρήσης του και συνεπώς την ανάγκη για την καλλιέργειά του σε ευρύτερη κλίμακα, θα πρέπει να δοθεί ιδιαίτερο βάρος στην διατήρηση του είδους. Επιπρόσθετα, οι απομακρυσμένες περιοχές στις οποίες μέχρι σήμερα είναι γνωστό ότι αυτοφύεται, ίσως απαιτούν τη διατήρηση γενετικού υλικού από περισσότερες από μια περιοχές, καθώς δεν είναι απίθανο να υπάρχουν διαφορές, πιθανόν ως αποτέλεσμα και των διαφορετικών εδαφοκλιματικών συνθηκών. Τέτοιες διαφορές έχουν αναφερθεί στο γένος *Origanum* γενικότερα, και ειδικότερα στο είδος *Origanum vulgare*, στο οποίο ακόμη και φυτά του ίδιου υποείδους εμφανίζουν διαφορές (π.χ. διαφορετικοί χημειότυποι).

Η διατήρηση γενετικού υλικού αυτοφυών φυτικών ειδών μπορεί να γίνει με διαφορετικούς τρόπους (π.χ. *ex vitro*, *in vitro*), αλλά ιδιαίτερα όταν πρόκειται να ενταχθεί ένα φυτικό είδος σε καλλιεργητικά συστήματα εμπορικής κλίμακας, η εξασφάλιση γενετικού υλικού αποτελεί βασική προϋπόθεση (Nikopoulos et al., 2008b). Ο *in vitro* πολλαπλασιασμός αυτοφυών φυτικών ειδών αποτελεί έναν εναλλακτικό τρόπο πολλαπλασιασμού των φυτών, ιδιαίτερα αυτών που δεν παράγουν μεγάλες ποσότητες σπόρων ή ο πολλαπλασιασμό τους με σπόρο έχει ορισμένα μειονεκτήματα (π.χ. πατάτα) (George, 1993b; Νικόπουλος, 2004).

Για την ανάπτυξη ενός πρωτόκολλου για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό των φυτών απαιτείται ερευνητική εργασία για τον προσδιορισμό των ιδιαίτερων απαιτήσεων κάθε φυτικού είδους (Nikopoulos and Alexopoulos, 2008a). Πολλά

είδη της οικογένειας Lamiaceae (π.χ. ρίγανη) έχουν αναπαραχθεί *in vitro* με επιτυχία (George, 1993a).

Από τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας είναι φανερό ότι ο *in vitro* πολλαπλασιασμός της λαγορίγανης μπορεί να γίνει με επιτυχία. Ωστόσο, η πρώτες προσπάθειες δείχνουν ότι η επιτυχία του μικροπολλαπλασιασμού του φυτού εξαρτάται σημαντικά από το χρόνο λήψης των έκφυτων καθώς και από τη θέση που έχουν αυτά στο βλαστό του φυτού.

Σύμφωνα, λοιπόν, με τα αποτελέσματα αυτής της εργασίας, ο πιο κατάλληλος χρόνος για την λήψη έκφυτων από φυτά που αναπτύσσονται στο φυσικό τους περιβάλλον είναι την άνοιξη έως και τον Ιούνιο. Ωστόσο, σε ότι αφορά το χρόνο λήψης των έκφυτων αυτός επηρεάζεται και από τη θέση του έκφυτου στο βλαστό.

Πιο συγκεκριμένα, σε ότι αφορά τον αριθμό των φύλλων ανά έκφυτο, κάτι το οποίο σχετίζεται αναλόγως με τον αριθμό των νέων γονάτων που σχηματίζονται ανά έκφυτο, τα έκφυτα της κορυφής του βλαστού καθώς και αυτά του 1^{ου} γόνατου κάτω από την κορυφή του βλαστού δίνουν τα καλύτερα αποτελέσματα. Αυτό είναι σημαντικό, καθώς ο μεγάλος αριθμός νέων γονάτων, σε καθένα από τα οποία υπάρχουν δύο μεριστώματα, επιτρέπει τον ταχύ πολλαπλασιασμό του φυτού με την εφαρμογή νέων υποκαλλιιεργειών.

Όταν η λήψη έκφυτων γίνεται πιο αργά μέσα στο καλοκαίρι (π.χ. 20-7-2012), η ικανότητα αντίδρασης των έκφυτων καθώς και της παραγωγής νέων φύλλων, βλαστών και γονάτων περιορίζονται σημαντικά. Αυτό είναι πιο έντονο όταν τα έκφυτα δεν προέρχονται από την κορυφή του βλαστού. Αργότερα (π.χ. την 7-9-2012), ακόμη και τα έκφυτα της κορυφής παρουσιάζουν δυσκολία στην ανάπτυξη νέων βλαστών και νέων γονάτων.

Αυτή η αντίδραση των έκφυτων που προέρχονται από φυτά που αναπτύσσονται στο φυσικό τους περιβάλλον υποδηλώνει αλλαγές στην ικανότητα

των μεριστωμάτων να αναπτυχθούν καθώς αυξάνεται η ηλικία τους. Αυτό ίσως συνδέεται με τη χρονολογική τους ηλικία, αλλά ίσως να επηρεάζεται σημαντικότερα από την φυσιολογική τους ηλικία. Αν και δεν έχουν πραγματοποιηθεί μελέτες σχετικά με τον τρόπο ανάπτυξης του φυτού και την επίδραση των περιβαλλοντικών συνθηκών, υπάρχουν ενδείξεις ότι οι αλλαγές στην ικανότητα των μεριστωμάτων να παράγουν νέους βλαστούς μπορεί να συνδέονται με τις αλλαγές που συμβαίνουν στο φυτό λόγω της επίδρασης των περιβαλλοντικών συνθηκών.

Έτσι, ενώ στο φυσικό τους περιβάλλον τα φυτά από τα οποία ελήφθησαν τα έκφυτα ξηραίνονται σταδιακά, όταν αυτά μεταφέρθηκαν σε φυτοδοχεία στο ΤΕΙ Πελοποννήσου παρατηρήθηκε ότι η βλαστική τους ανάπτυξη διατηρήθηκε τουλάχιστον μέχρι και το Δεκέμβριο (Τρυφωνόπουλος, 2014).

Επιπρόσθετα, τα έκφυτα που προέρχονται από κατώτερα γόνατα του βλαστού δεν είχαν ικανοποιητική αντίδραση, ακόμη και όταν η λήψη τους έγινε κατά τη βλαστική ανάπτυξη των φυτών. Αυτό υποδηλώνει ότι οι μεταβολές στα μεριστώματα αυτών των γονάτων έχουν ξεκινήσει πριν ακόμη την ορατή έναρξη της ξήρανσης των φυτών (Ιούνιος), πιθανόν λόγω της μείωσης της διαθέσιμης εδαφικής υγρασίας ή/και της υγρασίας της ατμόσφαιρας.

Τέλος θα πρέπει να αναφερθεί ότι, τα έκφυτα που προέρχονται από κατώτερα γόνατα του βλαστού (ιδιαίτερα από το 5^ο και το 7^ο) εμφάνισαν μεγαλύτερα ποσοστά μόλυνσεων. Αντίθετα, τα έκφυτα που προέρχονται από την κορυφή ή το 1^ο γόνατο κάτω από την κορυφή του βλαστού είχαν πολύ μικρά ποσοστά μόλυνσεων (μικρότερο από 10%), ιδιαίτερα όταν λαμβάνονταν κατά τη διάρκεια της βλαστικής ανάπτυξης (π.χ. Μάιος). Αυτό ίσως να συνδέεται με το ότι βρίσκονται πιο κοντά στην επιφάνεια του εδάφους και έχουν υψηλότερο μικροβιακό φορτίο. Για το λόγο αυτό απαιτείται περαιτέρω έρευνα σχετικά με τις απαιτήσεις των έκφυτων για επιφανειακή απολύμανση (συγκέντρωση υποχλωριώδους νατρίου, διάρκεια παραμονής στο διάλυμα απολύμανσης κ.ά.).

Επιπρόσθετα, θα πρέπει να αναφερθεί ότι απαιτείται περαιτέρω έρευνα σχετικά με τον *in vitro* πολλαπλασιασμό της λαγορίγανης, καθώς σε αυτή την εργασία χρησιμοποιήθηκαν συνθήκες ανάπτυξης (ιδιαίτερα σε ότι αφορά τη θερμοκρασία) που ομοιάζουν αρκετά με αυτές που επικρατούν κατά τη διάρκεια της έναρξης της ανάπτυξης των βλαστών του φυτού σε κάποιες από τις περιοχές που αυτοφύεται. Ωστόσο, σύμφωνα με τον Τρυφονόπουλο (2014), υψηλότερες θερμοκρασίες (π.χ. σταθερή ημέρα και νύχτα στους 25 °C) ευνοούν την *in vitro* ανάπτυξη των έκφυτων.

Συμπερασματικά, μπορεί να αναφερθεί ότι για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό της λαγορίγανης προτείνεται, όταν λαμβάνονται έκφυτα από αυτοφυή φυτά, αυτά να προέρχονται από γόνατα κοντά στην κορυφή του βλαστού και η λήψη τους να γίνεται όσο το δυνατό νωρίτερα κατά τη διάρκεια της βλαστικής περιόδου του φυτού.

BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aligiannis N., Kalpoutzakis E., Mitaku S. and Chinou I. B. (2001).** Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* spices. *J. Agric. Food Chem.* **49(9)**: 4168-4170.
- 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.
- 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.
- Δόρδας Χ. (2012).** *Αρωματικά και Φαρμακευτικά Φυτά*. Εκδόσεις Σύγχρονη Παιδεία, Θεσσαλονίκη.
- George E.F. (1993a).** Plant propagation by tissue culture. Part 1 – The technology. Edington: Exegetics Limited.
- George E.F. (1993b).** Plant propagation by tissue culture. Part 2 – In practise. Edington: Exegetics Limited.
- Heldreich, T.V. (1889).** Une Graminee de L'Atlas retrouve'e sur le mont Taygete en Grece. *Bull. Acadlnt Geogr. Bot.* **8**: 117-118.
- Καρούσου P.B. (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.
- 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.
- Νικόπουλος Δ. (2004).** Πατάτα - Ψυχανθή. Σημειώσεις, Εκδόσεις ΤΕΙ Καλαμάτας.
- Nikopoulos D. and Alexopoulos A.A. (2008).** *In vitro* propagation of an endangered medicinal plant: *Pancratium maritimum* L. *Journal of Food, Agriculture & Environment – JFAE* **6**: 393-298.
- Nikopoulos D., Nikopoulou D. and Alexopoulos A.A. (2008).** Methods for the preservation of genetic material of *Pancratium maritimum* (Amaryllidaceae). *J. Food Agric. Environ.* **6**: 538-546.
- Ποντίκης Κ.Α. (1994).** Πολλαπλασιασμός καρποφόρων δένδρων και θάμνων. Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα, σελ. 269.
- 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.
- Σφήκας Γ. (1995).** *Αρωματικά Φυτά της Ελλάδας*. Αθήνα.
- 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 από το διαδίκτυο

- www.filotis.itia.ntua.gr/species/d/3075
- <http://www.mani.org.gr/hlorida/102origanum/orig.htm>