



**ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ
ΙΔΡΥΜΑ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΤΗΣ
ΛΙΑΣ ΠΟΝΤΜΠΕΛΤΣΕΒΑΣ**

ΤΙΤΛΟΣ:

**IN VITRO ΜΑΖΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΦΑΣΚΟΜΗΛΟΥ
(*Salvia fruticosa*)**

ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

ΠΑΛΑΤΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ

ΜΑΡΤΙΟΣ 2015



**ΑΛΕΞΑΝΔΡΕΙΟ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΚΟ ΕΚΠΑΙΔΕΥΤΙΚΟ
ΙΔΡΥΜΑ ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗΣ
ΣΧΟΛΗ ΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑΣ ΓΕΩΠΟΝΙΑΣ
ΤΜΗΜΑ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ**

**ΠΤΥΧΙΑΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ ΤΗΣ
ΛΙΑΣ ΠΟΝΤΜΠΕΛΤΣΕΒΑΣ**

ΤΙΤΛΟΣ:

**IN VITRO ΜΑΖΙΚΗ ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΦΑΣΚΟΜΗΛΟΥ
(*Salvia fruticosa*)**



ΥΠΕΥΘΥΝΟΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΔΙΑΤΡΙΒΗΣ

ΠΑΛΑΤΟΣ ΓΕΩΡΓΙΟΣ

ΚΑΘΗΓΗΤΗΣ ΕΦΑΡΜΟΓΩΝ

ΘΕΣΣΑΛΟΝΙΚΗ

ΜΑΡΤΙΟΣ 2015

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πρώτα από όλους θα ήθελα να ευχαριστήσω το Δρ. Γεώργιο Τσοκτουρίδη για τη βοήθεια και για την υποστήριξη και καθοδήγησή του καθ' όλη τη διάρκεια των πειραμάτων, καθώς και για τις γνώσεις του στην έκβαση των αποτελεσμάτων και την ολοκλήρωση της πτυχιακής μου.

Αφ' ετέρου θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Ελένη Μαλούπα, που μου έδωσε την ευκαιρία να παρευρεθώ στους χώρους του Εργαστηρίου Προστασίας και Αξιοποίησης Αυτοφύων και Ανθοκομικών Ειδών του ΕΛΓΟ-Δήμητρα στη Θέρμη Θεσσαλονίκης καθώς και όλο το προσωπικό του εργαστηρίου.

Στη συνέχεια θα ήθελα να ευχαριστήσω τον Καθηγητή Εφαρμογών Γεώργιο Παλάτο για την υποστήριξή του στην ολοκλήρωση αυτής της εργασίας και στη τελική της παρουσίαση.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω όλους τους καθηγητές του ΑΤΕΙ Θεσσαλονίκης του τμήματος Φυτικής Παραγωγής για τις γνώσεις που μου μετέδωσαν.

Εν κατακλείδι θα ήθελα να ευχαριστήσω τη μητέρα μου για τη βοήθεια, την υπομονή και τη συνεχή της υποστήριξη καθ' όλη τη διάρκεια των σπουδών μου.

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

Ευχαριστίες	i
Περιεχόμενα	ii
Περίληψη	iii
1 Εισαγωγή	1
1.1 Γενικά για το φασκόμηλο	1
1.2 Αναπαραγωγή του φασκόμηλου	2
1.2.1. Ιστοκαλλιέργεια	2
1.2.1.1 Θρεπτικό υπόστρωμα	3
1.2.1.1.1 Ανόργανα στοιχεία	3
1.2.1.1.2 Οργανικές ενώσεις	4
1.2.1.1.3. Σταθεροποιητές	4
1.2.1.2. Φυτοορμόνες	5
1.2.1.2.1 Αυξίνες	6
1.2.1.2.2 Κυτοκινίνες	7
1.3 Οικονομικά στοιχεία σχετικά με τα αρωματικά φαρμακευτικά φυτά στην Ευρωπαϊκή ένωση	9
1.4 Σκοπός της πτυχιακής εργασίας	11
2. Υλικά και μέθοδοι	12
2.1 Διαδικασία παρασκευής θρεπτικού υποστρώματος	12
2.2 Απολύμανση σπόρων	18
2.3 Προετοιμασία τράπεζας νηματικής ροής και διαδικασία Ιστοκαλλιέργειας	19
2.4 Χημικά αντιδραστήρια	20
2.5 Συσκευές	22
3. Αποτελέσματα/ Συζήτηση	23
4. Συμπεράσματα	25
5. Παραρτήματα	26
6. Βιβλιογραφία	38

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το φασκόμηλο είναι ένα αρωματικό και σημαντικό φαρμακευτικό φυτό, αρκετά εμπορικό και ευρέως γνωστό για τις ευεργετικές του ιδιότητες. Η εύρεση πρωτοκόλλου ιστοκαλλιέργειας για τη μαζική παραγωγή elite φυτών φασκόμηλου είναι ο στόχος των πειραμάτων της πτυχιακής εργασίας. Τέσσερις συνδυασμοί βασικών θρεπτικών υποστρωμάτων και πηκτικού μέσου (MS/Agar, MS/Phytigel, Mc'Cown/Agar και Mc'Cown/Phytigel) χρησιμοποιήθηκαν σε συνδυασμό με την αυξίνη NAA (0, 0.1, 0.3 ppm) και την κυτοκινίνη BAP (0, 0.5, 1, 2 ppm). Οι μετρήσεις λαμβάνονταν περιοδικά στις τέσσερις και έξι εβδομάδες με τα αποτελέσματα να κρίνονται ικανοποιητικά, έχοντας ως καλύτερο συνδυασμό το MS/Phytigel με NAA 0,1ppm και BAP 2ppm. Παρόλα αυτά παρατηρήθηκε ότι τα φυτά είχαν μεγάλα μεσογονάτια διαστήματα οπότε μετά από προσωπική συζήτηση με τον Δρ. Γεώργιο Τσοκτουρίδη αποφασίστηκε η δοκιμή του πέμπτου συνδυασμού υποστρώματος (Vit/Phytigel με NAA σε περιεκτικότητες 0, 0.1, 0.3 ppm και BAP 0, 0.5, 1, 2 ppm). Αυτός ο συνδυασμός ήταν καλύτερος και συγκεκριμένα η μεταχείριση NAA 0,1ppm και BAP 2ppm να αποδίδει το μεγαλύτερο ποιοτικό δείκτη με μεγάλο αριθμό πλάγιων βλαστών. Στην παρούσα φάση των πειραμάτων, έχει δημιουργηθεί ένα βασικό πρωτόκολλο μαζικής παραγωγής για το φασκόμηλο και μπορεί να χρησιμοποιηθεί άμεσα από εταιρείες και εργαστήρια ιστοκαλλιέργειας.

1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 ΓΕΝΙΚΑ ΓΙΑ ΤΟ ΦΑΣΚΟΜΗΛΟ

Βασίλειο	Plantae
Συνομοταξία	Magnoliophyta
Ομοταξία	Magnoliopsida
Τάξη	Lamiales
Οικογένεια	Lamiaceae
Γένος	Salvia
Είδος	<i>Salvia fruticosa</i>



Το φασκόμηλο είναι αυτοφυές των Μεσογειακών χωρών και απαντάται σχεδόν σε όλες τις βουνοπλαγιές και τις ακτές της νότιας Ευρώπης. Καλλιεργείται σε διάφορα μέρη της Ηπειρωτικής Ευρώπης και της Αμερικής. Είναι φυτό πολυετές, θαμνώδες, με πολυάριθμους βλαστούς, ύψους μέχρι μισό μέτρο και συναντάται σε όλες τις περιοχές της Ελλάδας, κυρίως σε ξηρές και πετρώδεις περιοχές. Τα φύλλα του είναι επιμήκη και παχιά, χρώματος λευκοπράσινου. Τα άνθη του φύονται κατά σπονδύλους, είναι χρώματος μοβ, ροζ, λευκού και ανθίζουν από το Μάιο ως τον Ιούνιο. Το φυτό έχει έντονη αρωματική οσμή και καλλιεργείται για τις φαρμακευτικές του ιδιότητες τόσο αφέψημα όσο και ως καρύκευμα. Τα φύλλα που είναι και τα κατεξοχήν χρησιμοποιούμενα μέρη του φυτού συλλέγονται λίγο πριν ή κατά την αρχή της ανθοφορίας, με ξηρό και ηλιόλουστο καιρό, το Μάιο ή τον Ιούνιο και ξηραίνονται στη σκιά. Περιέχει ως κύρια ουσία το αιθέριο έλαιο, φασκομηλόλαδο, άχρωμο ή ερυθροκίτρινο, σαπωνίνες, πικρές ουσίες, τερπένια, ρητίνες, πικρά διτερπένια, ταννίνες, τριτερπένια, φλαβονοειδή και θουγιόνη. Στην Ελλάδα φύονται περί τα είκοσι είδη φασκόμηλου. Από αυτά, εκτός από το *Salvia officinalis* που είναι γνωστό παγκοσμίως, ιδιαίτερο ενδιαφέρον έχει αρχίσει να παρουσιάζει και το *Salvia fruticosa* ή αλλιώς ελληνικό φασκόμηλο. Είναι εντονότερα πιο αρωματικό από το *S. officinalis* και γίνεται εξίσου αποδεκτό σε όλη την Ευρώπη σαν άρτυμα. Το αιθέριο έλαιό του από χημικής άποψης είναι πολύ πλούσιο σε 1,8

κινεόλη και περιέχει σε μικρές ποσότητες θουγιόνης (<5%) (Κατσιώτης, Χατζοπούλου,2010).

1.2 ΑΝΑΠΑΡΑΓΩΓΗ ΤΟΥ ΦΑΣΚΟΜΗΛΟΥ

Το φασκόμηλο αναλόγως και με το είδος του μπορεί να πολλαπλασιαστεί με σπόρο, παραφυάδες, μοσχεύματα ή ιστοκαλλιέργεια.

Σπόρος: Η σπορά γίνεται απευθείας στο χωράφι (40-50g/στρ), σε γλαστράκια η σε σπορείο. Συστήνεται ο σπόρος που θα χρησιμοποιηθεί να είναι ετήσιος για καλύτερη φυτρωτική ικανότητα.

Μοσχεύματα: Ο κύριος αγενής τρόπος αναπαραγωγής. Συλλέγονται μοσχεύματα (10-12cm) τον Ιούλιο και η μεταφύτευσή τους στο χωράφι γίνεται μέσα Οκτωβρίου. Τοποθετούνται σε μείγμα κοπριάς:άμμου 1:1 για 70-75 μέρες.

1.2.1 Ιστοκαλλιέργεια

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

Η καλλιέργεια των φυτικών ιστών βασίστηκε στη θεωρία της ολοδυναμίας του φυτικού κυττάρου που διατυπώθηκε το 1838 από τους Schleiden και Schwann. Από τότε πολλοί ερευνητές προσπάθησαν να καλλιεργήσουν φυτικά κύτταρα σε θρεπτικά

διαλύματα ωστόσο μόλις το 1954 ο Hildebrandt κατόρθωσε να παράγει φυτικό ιστό από ένα κύτταρο.

Αν και οι βάσεις για την αναπαραγωγή φυτών *in vitro* τέθηκαν στις αρχές του 20^{ου} αιώνα, σε εμπορική κλίμακα η εφαρμογή του μικροπολλαπλασιασμού πραγματοποιήθηκε στις αρχές της δεκαετίας του 70 με τη δημιουργία πολλών εργαστηριακών μονάδων παραγωγής φυτών σε Ευρώπη και Αμερική. Σήμερα, ο μικροπολλαπλασιασμός είναι ο συνήθης τρόπος παραγωγής φυτικού υλικού για είδη που πολλαπλασιάζονται δύσκολα με άλλες τεχνικές.

Η μέθοδος αυτή έχει πολλά πλεονεκτήματα όπως: α) ταχεία παραγωγή κλωνικών υποκειμένων β) παραγωγή φυτών απαλλαγμένων από παθογόνους μικροοργανισμούς γ) διατήρηση γενετικού υλικού σε περιορισμένο χώρο δ) μείωση του χώρου που απαιτείται για τη διατήρηση του πολλαπλασιαστικού υλικού ε) συνεχής παραγωγή πολλαπλασιαστικού υλικού καθ' όλη τη διάρκεια του έτους. Παρόλα αυτά υπάρχουν και μειονεκτήματα όπως α) μεγάλες απαιτήσεις σε εργαστηριακό εξοπλισμό, ειδικευμένο προσωπικό και τεχνικές β) υψηλό κόστος παραγωγής γ) μεγάλες απώλειες σε σύντομο χρονικό διάστημα από μολύνσεις και δ) αστάθεια στην παραγωγή ομοιόμορφων φυτών λόγω μεταλλάξεων (Χατζόπουλος, 2001).

1.2.1.1 Θρεπτικό υπόστρωμα

Ένα θρεπτικό υπόστρωμα αποτελείται από α) ανόργανα στοιχεία, β) οργανικές ενώσεις και γ) σταθεροποιητές. Οι συγκεντρώσεις των θρεπτικών στοιχείων που χρησιμοποιούνται για τη παρασκευή του υποστρώματος εξαρτώνται από το είδος του φυτού που θα καλλιεργηθεί καθώς και το στάδιο του πολλαπλασιασμού (Παπαχατζής, Καλορίζου, 2008).

1.2.1.1.1 Ανόργανα στοιχεία

Περιλαμβάνουν μακροστοιχεία (N, P, K, Ca, Mg) και μικροστοιχεία (B, Co, Cu, I, Fe, Zn). Με τα στοιχεία αυτά παρασκευάζονται τα πυκνά (stock) διαλύματα (100

φορές μεγαλύτερη συγκέντρωση από την απαιτούμενη του υποστρώματος καλλιέργειας), τα οποία μπορούν να διατηρηθούν για αρκετούς μήνες σε χαμηλή θερμοκρασία (4°C) και χρησιμοποιούνται για την παρασκευή του υποστρώματος καλλιέργειας. Κατά την παρασκευή των πυκνών διαλυμάτων τα στοιχεία ομαδοποιούνται και διατηρούνται σε διαφορετικές φιάλες έτσι ώστε να αποφευχθούν οι αντιδράσεις των στοιχείων μεταξύ τους και ο σχηματισμός ιζημάτων. Τα στοιχεία που μπορούν να αναμιχθούν χωρίς να σχηματίζουν ιζήματα είναι: α) τα νιτρικά, β) τα θειικά, γ) τα φωσφορικά, τα άλατα βορίου και μολυβδαινίου, δ) ενώσεις αλογόνων και ε) σίδηρος (Παπαχατζής, Καλορίζου, 2008).

1.2.1.1.2. Οργανικές ενώσεις

- Υδατάνθρακες: Στις περισσότερες καλλιέργειες χρησιμοποιείται η σουκρόζη σε συγκέντρωση 2-4%. Η απαιτούμενη συγκέντρωση των υδατανθράκων προστίθεται στο θρεπτικό υπόστρωμα κατά τη διάρκεια της παρασκευής του.
- Βιταμίνες: Η θειαμίνη είναι σχεδόν πάντα απαραίτητη σε κάθε υπόστρωμα. Επίσης χρησιμοποιείται η πυριδοξίνη, η ινοσιτόλη, το νικοτινικό οξύ και η βιοτίνη. Όλες οι βιταμίνες είναι διαλυτές στο νερό και πρέπει να παρασκευάζονται πυκνά διαλύματα από αυτές.
- Αυξητικές ρυθμιστικές ουσίες: Οι ρυθμιστικές ουσίες(φυτικές ορμόνες) είναι συστατικά τα οποία σε πολύ μικρές συγκεντρώσεις είναι ικανά να ρυθμίσουν την αύξηση και ανάπτυξη των φυτών. Οι ορμόνες που εφαρμόζονται για τον έλεγχο του σχηματισμού ιστών και οργάνων είναι η αυξίνη και η κυτοκίνη. Άλλες οργανικές ουσίες που μπορεί να προστεθούν στα υποστρώματα είναι το κιτρικό ή το ασκορβικό οξύ για να εμποδιστεί το μαύρισμα των έκφυτων, και αμινοξέα ή/και αμύδια ως εύκολη πηγή αζώτου. Η προσθήκη ακατέργαστων συστατικών, όπως το γάλα της ινδικής καρύδας, εκχυλίσματα φυτών και χυμός φρούτων συνηθίζεται από ορισμένους ερευνητές. Τα συστατικά αυτά αποτελούν τους καθοριστικούς παράγοντες σύνθεσης ενός υποστρώματος (Παπαχατζής, Καλορίζου, 2008).

1.2.1.1.3 Σταθεροποιητές

- Άγαρ: Προέρχεται από φυτά και είναι εμπορικά διαθέσιμο σε μορφή σκόνης. Η χρήση του βασίζεται στην ικανότητά του να λιώνει όταν θερμαίνεται, να μετατρέπεται σε ημίρρευστη κατάσταση σε θερμοκρασία δωματίου και η σχετική βιολογική του αδράνεια. Η μικρότερη συγκέντρωση άγαρ που μπορεί να χρησιμοποιηθεί είναι 0,5-0,6%. Η συγκέντρωση αυτή επιτρέπει την επαφή των έκφυτων με το θρεπτικό διάλυμα και τη μετακίνηση των θρεπτικών στοιχείων. Σε μερικές περιπτώσεις μπορούν να χρησιμοποιηθούν υγρά υποστρώματα. Στη περίπτωση αυτή τα έκφυτα στηρίζονται με διηθητικά χαρτιά, πλαστικά υλικά ή μεμβράνες. Επίσης ο αερισμός του διαλύματος είναι επιβεβλημένος. Η χρησιμοποίηση υγρού υποστρώματος επιτρέπει την απομάκρυνση των φαινολικών συστατικών που παράγονται από τους ιστούς μετά από τραυματισμό κατά τη διαδικασία της επιφανειακής απολύμανσής τους (Παπαχατζής, Καλορίζου, 2008).
- Phytigel: Είναι ένα υποκατάστατο του άγαρ που παράγεται από ένα βακτηριακό υπόστρωμα το οποίο αποτελείται από γλυκουρονικό οξύ, ραμνόζη και γλυκόζη. Παράγει ένα διαυγές, άχρωμο, gel υψηλής αντοχής. Το Phytigel αποτελεί μια οικονομική εναλλακτική λύση πηκτικού παράγοντα. Χρησιμοποιείται σε μία συγκέντρωση από 1,5 έως 3 g / L. Να αποτρέπεται η συσσώρευση, το Phytigel θα πρέπει να προστεθεί σε ταχέως αναδευόμενο μέσο καλλιέργειας το οποίο βρίσκεται σε θερμοκρασία δωματίου.

1.2.1.2 Φυτοορμόνες

Η μορφή και η λειτουργία ενός πολυκύτταρου οργανισμού εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από την αποτελεσματική επικοινωνία ανάμεσα στον τεράστιο αριθμό κυττάρων που το συγκροτούν. Στα ανώτερα φυτά, η ρύθμιση και ο συντονισμός του μεταβολισμού, της αυξήσεως και της μορφογενέσεως συχνά εξαρτώνται από χημικά σήματα από το ένα μέρος του φυτού στο άλλο (Sachs 1832-1897). Ο Sachs πρότεινε ότι χημικά μηνύματα είναι υπεύθυνα για το σχηματισμό και την αύξηση διάφορων οργάνων. Οι φυτοορμόνες συντελούν στην ανάπτυξη του ανώτερου φυτού ως ενεργές ουσίες, όπως και οι αυξητικοί παράγοντες με βιταμινικό χαρακτήρα. Αυτό εξηγεί και την ονομασία τους. Η λεπτομερειακή μελέτη αυτών των ουσιών έδειξε ότι και στο φυτικό οργανισμό, ανάλογα με τον ανθρώπινο και το ζωικό, υπάρχει σύμπλοκο ορμονικό σύστημα που τα συστατικά του λειτουργούν εν μέρει ανταγωνιστικά, εν

μέρει προαγωγικά. Οι φυτοορμόνες είναι δυνατό να επηρεάζουν τις επί μέρους φάσεις της ανάπτυξης του φυτού με διαφορετικό τρόπο και σε διαφορετικό βαθμό. Το αν μια ορισμένη διαδικασία προκαλείται, ενισχύεται ή όχι, εξαρτάται όχι μόνο από την απόλυτη συγκέντρωση των ορμονών στη συγκεκριμένη περιοχή του ιστού, αλλά και από τις αμοιβαίες ποσοτικές σχέσεις των διάφορων ορμονών. Γνωστές φυτοορμόνες είναι οι αυξίνες, οι γιββερελίνες, οι κυτοκινίνες, το αιθυλένιο και οι αναστολείς ανάπτυξης (Τσέκος, Ηλίας, 2006).

1.2.1.2.1 Αυξίνες

Κατά τον Thimann (1964) οι αυξίνες είναι φυσικές ή συνθετικές χημικές ενώσεις, οι οποίες σε διαφορετικές συγκεντρώσεις προάγουν την αύξηση τανύσεως των κυττάρων και κατά συνέπεια την επιμήκη αύξηση του βλαστού και της ρίζας, ωστόσο όμως σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις αναστέλλουν την αύξηση. Η κίνηση της αυξίνης στους βλαστούς και στις ρίζες είναι βραδεία, περίπου μόνο 1cm ανά ώρα. Επιπρόσθετα η μεταφορά της είναι πολική ή κατευθυνόμενη προς μία κατεύθυνση, πάντοτε προς την βάση στους κορμούς και στα φύλλα και προς την κορυφή στις ρίζες. Σε αντίθεση προς τη κίνηση των σακχάρων και άλλων διαλυμένων ουσιών, η πρωταρχική διαδρομή της μεταφοράς της αυξίνης δεν είναι διαμέσου των αγωγών σωλήνων του φλοιώματος και του ξυλώματος αλλά διαμέσου των παρεγχυματικών κυττάρων του φλοιώματος και των παρεγχυματικών κυττάρων που περιβάλλουν τις ηθμαγγειώδεις δεσμίδες. Αυτά τα παρεγχυματικά κύτταρα εμφανίζονται να έχουν εξειδικευμένους φορείς που μεταφέρουν τα μόρια αυξίνης έξω από το κύτταρο μόνο από τα άκρα της βάσεως τους. Επειδή η αυξίνη μπορεί να διαχέεται εντός των κυττάρων παθητικά, η δραστηριότητα αυτών των φορέων δημιουργεί μια καθαρή προς τα κάτω ροή διαμέσου του ιστού. Σε φυτικά τμήματα ικανά για δευτερογενή αύξηση, η μεταφορά της αυξίνης συμβαίνει επίσης διαμέσου κυττάρων στην περιοχή του δεσμικού καμβίου.

Η αυξίνη ρυθμίζει και την κανονική αύξηση του φυτού, προωθεί την αύξηση του βλαστού, των καρπών, όλων των φυτικών οργάνων και υπάρχει στενή σχέση μεταξύ περιεκτικότητας σε αυξίνη και ταχύτητας αύξησης. Η ποσότητα της αυξίνης μειώνεται από την κορυφή προς τη βάση και με την ηλικία. Η αυξίνη υπάρχει σε επάρκεια σε όλα τα φυτά και δεν αποτελεί περιοριστικό παράγοντα της αύξησης. Για

το λόγο αυτό η εξωγενής αυξίνη δεν προκαλεί αύξηση ολόκληρου φυτού. Υπερβολικές ποσότητες αυξίνης αντί να προωθούν την αύξηση, τη μειώνουν ή την αναστέλλουν, δρουν δηλαδή ως αντιαυξίνες. Η μελέτη της επίδρασης της αυξίνης επί της αύξησης διαφόρων οργάνων γίνεται σε τμήματα οργάνων που στερούνται ενδογενούς αυξίνης και τα οποία τοποθετούνται σε διαλύματα σακχάρου και αυξίνης σε διαφορετικές συγκεντρώσεις. Η αύξηση οργάνου προωθείται από ορισμένες συγκεντρώσεις αυξίνης. Διακρίνουμε πάντα την άριστη συγκέντρωση, πέρα της οποίας η αύξηση μειώνεται ή αναστέλλεται. Η ρίζα έχει τη μικρότερη άριστη συγκέντρωση, ακολουθούν οι οφθαλμοί και ο βλαστός που έχει τη μέγιστη. Η αυξίνη επιδρά ευνοϊκά στη ριζοβολία των μοσχευμάτων διότι αποτελεί βασικό παράγοντα δημιουργίας νέων ριζικών καταβολών. Με αυτό τον τρόπο πετυχαίνεται μεγαλύτερο ποσοστό ριζοβολίας, μεγαλύτερος αριθμός και ποιότητα ριζών. Τόσο στη ριζοβολία των μοσχευμάτων όσο και στην ιστοκαλλιέργεια χρησιμοποιούνται συνθετικές αυξίνες λόγω μεγαλύτερης σταθερότητας και αντοχής (Βογιατζής, Πετρίδου, 2009).

1.2.1.2.2 Κυτοκινίνες

Οι κυτοκινίνες είναι ουσίες, παράγωγα της αδερίνης, οι οποίες μπορούν να προκαλέσουν κυτταροδιαίρεση παρουσία αυξίνης. Οι κυτοκινίνες σχηματίζονται στις άκρες της ρίζας και σε αναπτυσσόμενα σπέρματα. Πολλές από αυτές δεν είναι ελεύθερες μέσα στο φυτό αλλά ενσωματωμένες με tRNA, υπό μορφή νουκλεοτιδίων. Οι ενσωματωμένες συνθέτονται πρώτες από αδερίνη και μία πηγή ισοπρενίου, όπως μεβαλονικό οξύ. Οι ελεύθερες προκύπτουν κυρίως από τις ενσωματωμένες. Οι κυτοκινίνες μέσα στο φυτό μπορούν να διασπαστούν, να οξειδωθούν, να αναχθούν και να σχηματίσουν σύμπλοκα. Το γεγονός ότι οι κυτοκινίνες βρίσκονται σε ιστούς που παρουσιάζουν κυτταροδιαίρεση, όπως στους καρπούς και σε κορυφές βλαστών, δείχνει ότι πρέπει να λαμβάνουν μέρος σ' αυτή. Καλλιέργεια τεμαχίων βλαστού καπνού έδειξε ότι ορισμένη αναλογία αυξίνης: κινητίνης (100:1) προκαλεί σχηματισμό αδιαφοροποίητων κυττάρων. Αν αυξηθεί η κινητίνη ώστε η αναλογία να είναι μικρότερη του 100 τότε παρατηρείται σχηματισμός επίκτητων φυλλοφόρων οφθαλμών. Αυξανόμενης της κινητίνης αυξάνεται ο αριθμός των οφθαλμών. Γενικώς τεμάχια φυτικών ιστών που έχουν την τάση να σχηματίζουν επίκτητους οφθαλμούς, αν δεχθούν την επίδραση κινητίνης σχηματίζουν πολλούς βλαστούς αλλά καθόλου ρίζες. Αντίθετα αν τοποθετηθούν σε νερό σχηματίζουν πρώτα ρίζες και στη συνέχεια βλαστούς. Εάν αυξηθεί η αυξίνη ώστε η αναλογία να είναι μεγαλύτερη του 100

παρατηρείται ανάπτυξη ριζών. Τα παραπάνω βρίσκουν πρακτική εφαρμογή στην ιστοκαλλιέργεια όπου από λίγα κύτταρα προκύπτει, με κατάλληλα θρεπτικά μέσα, ολόκληρο φυτό. Η κινητίνη διακόπτει τον λήθαργο των σπερμάτων του μαρουλιού και τον λήθαργο των οφθαλμών της μηλιάς, είναι από τους σπουδαιότερους παράγοντες κινητοποίησης θρεπτικών ουσιών μέσα στο φυτό. Η σημασία αυτής της ιδιότητας είναι μεγάλη όσον αφορά την προσέλκυση τροφών σε αυξανόμενα μέρη του φυτού καθώς και σε βολβούς και κονδύλους. Εκτός από την κινητίνη, η αυξίνη και η γιββερελλίνη προκαλούν κινητοποίηση θρεπτικών ουσιών και μάλιστα η δράση των τριών μαζί είναι συνεργιστική.

Κυτοκινίνες σχηματίζονται στις ρίζες, ανέρχονται στο φύλλο και παρατείνουν τη ζωή τους. Οι κυτοκινίνες μειώνουν την αναπνοή και καθυστερούν την απώλεια βάρους και την καταστροφή της χλωροφύλλης σε λαχανικά όπως το μαρούλι το σπαράγγι και τα λάχανα. Με αυτό τον τρόπο μπορούν να αποθηκευτούν για περισσότερο χρονικό διάστημα. Η καθυστέρηση του γήρατος επιτυγχάνεται με την κινητοποίηση θρεπτικών ουσιών και με επίδραση στο RNA, με συνέπεια την αύξηση της σύνθεσης ενζύμων. Η ιδιότητα αυτή των κυτοκινινών βρίσκει πρακτική εφαρμογή στη συντήρηση μαρουλιών, σπαραγγιών και λαχάνων. Μειώνεται η αναπνοή, καθυστερεί η απώλεια βάρους και η καταστροφή της χλωροφύλλης. Κατά το πρώτο στάδιο της ανάπτυξης του καρπού παρατηρείται έντονη κυτταροδιαίρεση ενώ στη συνέχεια τάνυση των κυττάρων. Την περίοδο της κυτταροδιαίρεσης υπάρχουν στον καρπό μεγάλες ποσότητες κυτοκινινών που αργότερα εξαφανίζονται. Αυτό το γεγονός δείχνει ότι πιθανόν οι κυτοκινίνες είναι υπεύθυνες για τη κυτταροδιαίρεση και επομένως για την αύξηση του καρπού στο πρώτο στάδιο. Επίσης όταν βρίσκονται υπό την κυριαρχία της κορυφής προκαλούν την έκπτυξή τους. Η ιδιότητα αυτή βρίσκει εφαρμογή στην ιστοκαλλιέργεια. Οι κυτοκινίνες προκαλούν αύξηση του RNA αλλά και του DNA και των πρωτεϊνών. Αυξάνουν επίσης τη ποσότητα των αυξινών, γιββερελλινών και αιθυλενίου. Στα φύλλα, εκτός των άλλων, επιδρούν σε όλες τις συνθετικές λειτουργίες. Η δράση τους αναστέλλεται από τους αναστολείς της σύνθεσης του RNA και των πρωτεϊνών (Βογιατζής, Πετρίδου, 2009).

1.3 ΟΙΚΟΝΟΜΙΚΑ ΣΤΟΙΧΕΙΑ ΣΧΕΤΙΚΑ ΜΕ ΤΑ ΑΡΩΜΑΤΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ ΦΥΤΑ ΣΤΗΝ ΕΥΡΩΠΑΙΚΗ ΕΝΩΣΗ

Η ευρέως διαδεδομένη χρήση των προϊόντων των αρωματικών φαρμακευτικών φυτών από τους καταναλωτές σε όλο τον κόσμο, καθώς και το αυξανόμενο διεθνές εμπόριο αυτών, συνοδεύονται από προσπάθειες αξιολόγησης νέων αυτοφυών ειδών πιθανού ενδιαφέροντος, ώστε να εισαχθούν ορισμένα στη καλλιέργεια, μερικές φορές μάλιστα σε πολύ μακρινές τοποθεσίες από τα μέρη προέλευσής τους. Μεταξύ των αρωματικών συστατικών φυσικής προέλευσης τα οποία χρησιμοποιούνται σήμερα στη φαρμακοβιομηχανία και τις αντίστοιχες βιομηχανίες καλλυντικών και τροφίμων, ορισμένα προέρχονται από φυτά που καλλιεργούνται επί χρόνια, ενώ πολλά ακόμη και σήμερα προέρχονται από συλλογές αυτοφυών.

Η Ευρώπη είναι η μεγαλύτερη αγορά η οποία αποτελεί και το 38% της παγκόσμιας αγοράς. Η κυρίαρχη χώρα είναι η Γερμανία η οποία αποτελεί πάνω από το 42% της Ευρωπαϊκής αγοράς και ακολουθεί η Γαλλία με 25%, η Ιταλία με 9% και η Αγγλία με 8%. Η Ελλάδα έχει μια ευκαιρία να μπει στο διεθνή ανταγωνισμό σε αυτή την ομάδα προϊόντων. Αυτά τα προϊόντα των αντίστοιχων καλλιεργειών θα ενισχύσουν την αγροτική οικονομική ανάπτυξη, ευνοώντας τις μικρές αγροτικές μονάδες αλλά κυρίως τη γεωργική διαφοροποίηση. Ο αριθμός των επιχειρήσεων μεταποίησης αρωματικών φυτών για την παραγωγή αιθέριων ελαίων με απλή, συμβατική, παραδοσιακή τεχνολογία στην Ευρώπη και τις Παραμεσόγειες Χώρες ήταν και είναι μεγάλος, με συνέπεια το μεγάλο ανταγωνισμό και τα περιορισμένα καθαρά έσοδα. Επιδιώκεται, ως εκ τούτου, η ίδρυση μονάδων σύγχρονης τεχνολογίας (περιορισμένου όμως κόστους εγκατάστασης-ανάλογου με τον επιδιωκόμενο όγκο απόσταξης φυτικού υλικού). Με την κατάλληλη τεχνογνωσία για παραγωγή αιθέριων ελαίων βέλτιστης ποιότητας, αλλά χαμηλού κόστους παραγωγής, αυτές οι παραγωγικές μονάδες μπορούν εύκολα να ενταχθούν στο λιγιστό αριθμό επιχειρήσεων, όπου ο ανταγωνισμός παραμένει περιορισμένος και με δυνατότητες αυξημένων κερδών.

Ο τομέας των αρωματικών φαρμακευτικών φυτών σαν πρόταση εναλλακτικής καλλιέργειας, η δυνατότητα ανάπτυξής του σε περιοχές ημιορεινές και σε εδάφη

χαμηλής γονιμότητας, οι μειωμένες απαιτήσεις σε εισροές και η αυξημένη πρόσοδος, που αποτελεί και το συγκριτικό πλεονέκτημα έναντι πολλών άλλων καλλιεργειών μπορεί και πρέπει να αποτελέσει σημαντικό μοχλό ανάπτυξης σε αρκετές περιοχές της Ελλάδας (Κατσιώτης, Χατζοπούλου,2010)

1.3 ΣΚΟΠΟΣ ΤΗΣ ΠΤΥΧΙΑΚΗΣ ΕΡΓΑΣΙΑΣ

Τα αρωματικά φαρμακευτικά φυτά σαν πρόταση εναλλακτικής καλλιέργειας, η δυνατότητα ανάπτυξής τους σε περιοχές ημιορεινές και σε εδάφη χαμηλής γονιμότητας, οι μειωμένες απαιτήσεις σε εισροές και η αυξημένη πρόσοδος, που αποτελεί και το συγκριτικό πλεονέκτημα έναντι πολλών άλλων καλλιεργειών μπορεί και πρέπει να αποτελέσει σημαντικό μοχλό ανάπτυξης σε αρκετές περιοχές της χώρας μας. Για να επιτευχθεί αυτό σε ανταγωνιστικό επίπεδο θα πρέπει να υποστηρίζεται και από τα κατάλληλα μέσα. Ένας από του τομείς αυτούς είναι και η προμήθεια πιστοποιημένου, επαρκούς και καλής ποιότητας πολλαπλασιαστικό υλικό.

Ο μικροπολλαπλασιασμός είναι μια μορφή της ιστοκαλλιέργειας που αφορά αποκλειστικά τον πολλαπλασιασμό των φυτών. Έχει αποδειχθεί επιτυχής τεχνική για τη μαζική παραγωγή φυτών μειώνοντας τη διάρκεια της παραγωγική διαδικασίας. Η έρευνα πάνω στο μικροπολλαπλασιασμό της *Salvia fruticosa* είναι ελλιπής. Επομένως σκοπός αυτής της εργασίας είναι η δημιουργία ενός πρωτοκόλλου μαζικής παραγωγής ελίτ φυτών το οποίο μπορεί δυνητικά να εφαρμοστεί και στη πράξη.

2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

2.1 ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΠΑΡΑΣΚΕΥΗΣ ΘΡΕΠΤΙΚΟΥ ΥΠΟΣΤΡΩΜΑΤΟΣ

Στο πείραμα αυτό θα εξεταστεί η έκπτυξη πλάγιων βλαστών του φυτού *Salvia fruticosa* σε 5 διαφορετικούς συνδυασμούς υποστρωμάτων. Οι συνδυασμοί αυτοί είναι

- 1) MS/Agar με NAA σε περιεκτικότητες 0, 0.1, 0.3 ppm και BAP 0, 0.5, 1, 2 ppm
- 2) MS/Phytigel με NAA σε περιεκτικότητες 0, 0.1, 0.3 ppm και BAP 0, 0.5, 1, 2 ppm
- 3) Mc'Cown/Agar με NAA σε περιεκτικότητες 0, 0.1, 0.3 ppm και BAP 0, 0.5, 1, 2 ppm
- 4) Mc'Cown/Phytigel με NAA σε περιεκτικότητες 0, 0.1, 0.3 ppm και BAP 0, 0.5, 1, 2 ppm
- 5) Vit/Phytigel με NAA σε περιεκτικότητες 0, 0.1, 0.3 ppm και BAP 0, 0.5, 1, 2 ppm (Παράρτημα 1)

Ο κάθε επιμέρους συνδυασμός αποτελείται από ποσότητα διαλύματος 150ml ο οποίος μοιράστηκε σε πέντε βαζάκια στα οποία τοποθετήθηκαν από τέσσερα φυτά στο καθένα. Για να υπολογιστούν οι συνολικές ποσότητες που απαιτούνται σχεδιάστηκαν οι παρακάτω Πίνακες. Το pH σε όλα τα διαλύματα ήταν 5,8. Όλα τα stock διαλύματα ορμονών είναι σε συγκέντρωση 10mg/100ml.

Περιεκτικότητα NAA (ppm)	0N				Σύνολο
Plain	150	131,25	112,5	75	468ml
BAP 4ppm (ml)	-	18,75	37,5	75	131,25ml
Περιεκτικότητα BAP (ppm)	0	0.5	1	2	

Περιεκτικότητα NAA (ppm)	0.1				Σύνολο
Plain	125	106,25	87,5	50	393,75 ml
NAA 0.6ppm (ml)	25	25	25	25	125 ml
BAP 4ppm (ml)	--	18,75	37,5	75	131,25 ml
Περιεκτικότητα BAP (ppm)	0	0.5	1	2	

Περιεκτικότητα NAA (ppm)	0.3				Σύνολο
Plain	75	56,25	37,5	-	243,75ml
NAA 0.6ppm (ml)	75	75	75	75	300ml
BAP 4ppm (ml)	-	18,75	37,5	75	131,25ml
Περιεκτικότητα BAP (ppm)	0	0.5	1	2	

Εφόσον έχουν υπολογιστεί οι συνολικές ποσότητες του θρεπτικού διαλύματος που απαιτείται μπορούν πλέον να υπολογιστούν οι ποσότητες των επιμέρους συστατικών του κάθε διαλύματος και να σχεδιαστούν οι παρακάτω Πίνακες

1. MS/Agar

	Plain 1200ml	NAA 450ml	BAP 450ml
Sucrose (2%)	24g	9g	9g
MS (4,4g/L)	5,28g	1,98g	1,98g
NAA (0,6ppm)	-	2,7ml από το Stock (10mg/100ml)	-
BAP (4ppm)	-	-	18ml από το Stock (10mg/100ml)
	ρύθμιση pH 5,8		
Agar(0,6%)	7,2g	2,7g	2,7g

2. Ms/Phytigel

	Stock Plain 1200ml	Stock NAA 450ml	Stock BAP 450ml
Sucrose (2%)	24g	9g	9g
MS (4,4g/L)	5,28g	1,98g	1,98g
NAA (0,6ppm)	-	2,7ml από το Stock (10mg/100ml)	-
BAP (4ppm)	-	-	18ml από το Stock (10mg/100ml)
	ρύθμιση pH 5,8		
Phytigel (3g/L)	3,6g	1,35g	1,35g

3. Mc'Cown/Agar

	Plain 1200ml	NAA 450ml	BAP 450ml
Sucrose (2%)	24g	9g	9g
Mc' Cown (2,3g/L)	2,76g	1,035g	1,035g
NAA (0,6ppm)	-	2,7ml από το Stock (10mg/100ml)	-
BAP (4ppm)	-	-	18ml από το Stock (10mg/100ml)
	ρύθμιση pH 5,8		
Agar (0,6%)	7,2g	2,7g	2,7g

4. Mc'Cown/Phytigel

	Plain 1200ml	NAA 450ml	BAP 450ml
Sucrose (2%)	24g	9g	9g
Mc' Cown (2,3g/L)	2,7g	1,035g	1,035g
NAA (0,6ppm)	-	2,7ml από το Stock (10mg/100ml)	-
BAP (4ppm)	-	-	18ml από το Stock (10mg/100ml)
	ρύθμιση pH 5,8		
Phytigel (3g/L)	3,6g	1,35g	1,35g

5. Vit/Phytigel (Παράρτημα 1)

	Plain 1200ml	NAA 450ml	BAP 450ml
VitA	120ml	45ml	45ml
VitB	120ml	45ml	45ml
VitC-dil	120ml	45ml	45ml
VitD	120ml	45ml	45ml
VitE-dil	120ml	45ml	45ml
Myo-Inositol	120mg	45mg	45mg
Ascorbic acid	90mg	33,75mg	33,75mg
Citric acid	60mg	22,5mg	22,5mg
Sucrose (2%)	24g	9	9
NAA (0,6ppm)	-	2,7ml από το Stock (10mg/100ml)	-
BAP (4ppm)	-	-	18ml από το Stock (10mg/100ml)
	ρύθμιση pH 5,8		
Phytigel (3g/L)	3,6g	1,35g	1,35g

Σε τρεις κωνικές φιάλες, μία των 2000ml για το διάλυμα χωρίς ορμόνες (Plain), μία των 1000ml για το διάλυμα με το NAA και μία τρίτη επίσης των 1000ml για το διάλυμα με το BAP, μεταφέρονται 300ml απιονισμένου νερού στη καθεμιά και τοποθετείται από ένας μαγνητικός αναδευτήρας. Στη συνέχεια τοποθετούνται οι φιάλες πάνω σε μαγνητικούς/ θερμικούς αναδευτήρες και θέτεται σε λειτουργία η ανάδευση. Σύμφωνα με τους παραπάνω Πίνακες ακολουθούνται οι εξής διαδικασίες. Ζυγίζονται οι ανάλογες ποσότητες από Sucrose και προστίθενται στις κωνικές φιάλες. Προτιμάται το Sucrose ως πρώτο υλικό διότι χρειάζεται περισσότερη ώρα από τα υπόλοιπα υλικά για να διαλυθεί. Έπειτα ζυγίζεται το MS, το Mc'Cown ή ογκομετρούνται τα διαλύματα Vit (A, B, C-dil, D, E-dil) αναλόγως το διάλυμα που παρασκευάζουμε στις ανάλογες ποσότητες και προσθέτονται στις φιάλες. Στη συνέχεια ογκομετρούνται 2,7ml NAA από το Stock (10mg/100ml) διάλυμα και 18ml BAP από το Stock (10mg/100ml) διάλυμα και τα προσθέτονται στις ανάλογες φιάλες. Εφόσον το μείγμα έχει ομογενοποιηθεί κλείνει η ανάδευση και συμπληρώνεται στις φιάλες απιονισμένο νερό μέχρι τον όγκο των 1200 και 900ml αντίστοιχα. Μετά από καλή ανάδευση ρυθμίζεται το pH στο 5,8 με τη χρήση διαφόρων συγκεντρώσεων KOH για αύξηση και HCl για μείωσή του. Έπειτα ζυγίζονται οι αντίστοιχες ποσότητες από τη πηκτική ουσία Agar ή Phytigel και προσθέτονται στο παραπάνω μείγμα. Αργότερα ακολουθεί θέρμανση για περίπου μισή ώρα μέχρι το διάλυμα να γίνει διαυγές. Στη συνέχεια μεταφέρονται περίπου 25-30ml του διαλύματος σε βαζάκια (διαστάσεων 6cm διάμετρο x 9,5cm ύψος). Πάνω στο κάθε βαζάκι σημειώνεται η ημερομηνία παρασκευής και το όνομα του υποστρώματος. Τα βαζάκια τέλος τυλίγονται με χαρτί που γράφεται επάνω η ημερομηνία παρασκευής και η σύσταση του θρεπτικού υποστρώματος. Έπειτα μπαίνουν στον κλίβανο υγρής αποστείρωσης. Η αποστείρωση γίνεται στους 121°C για 20 λεπτά της ώρας. Μόλις τελειώσει η διαδικασία της αποστείρωσης μεταφέρονται τα βαζάκια από τον κλίβανο και τοποθετούνται στον πάγκο του εργαστηρίου μέχρι να κρυώσουν και να πήξει το θρεπτικό υπόστρωμα. Στη συνέχεια τοποθετούνται στο ψυγείο μέχρι να χρησιμοποιηθούν.

2.2 Απολύμανση Σπόρων

Ερευνητές σε συνεργασία με το εργαστήριο Προστασίας και Αξιοποίησης Αυτοφυών και Ανθοκομικών ειδών του Ε.Λ.Γ.Ο. Δήμητρα στη Θέρμη Θεσσαλονίκη παρέλαβαν το Μάρτιο του 2004 δύο φυτά *Salvia fruticosa* (= *S. triloba*) με κωδικό: 04,2411 από τη περιοχή Αμάδες της Χίου. Τα φυτά βρίσκονταν σε υψόμετρο 273m σε βραχώδη περιοχή. Αναπαράχθηκαν με μοσχεύματα και εγκαταστάθηκαν στο έδαφος το 2008. Σπόροι ενός έτους από αυτά τα φυτά πάρθηκαν το 2013 για τις ανάγκες των πειραμάτων σ' αυτή τη πτυχιακή.

Οι σπόροι απολυμάνθηκαν σε διάλυμα 20% εργαστηριακής χλωρίνης, 80% απιονισμένου νερού και δύο σταγόνες Tween-20/100ml διαλύματος. Το Tween-20 είναι ένα είδος σαπουνιού που βοηθάει να προσκολληθούν τα ενεργά συστατικά της χλωρίνης πάνω στους σπόρους. Το νερό με το Tween-20 μεταφέρθηκαν σε βιδωτό μπουκάλι των 500ml και τοποθετήθηκαν σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης. Η διαδικασία της αποστείρωσης γίνεται στους 121°C για 20 λεπτά. Μετά το πέρας της αποστείρωσης το μπουκάλι τοποθετείται στη τράπεζα νηματικής ροής και εφόσον το διάλυμα αποκτήσει θερμοκρασία δωματίου προστίθεται η χλωρίνη με ένα ογκομετρικό κύλινδρο που έχει αποστειρωθεί νωρίτερα. Αργότερα εφόσον απομακρυνθούν τυχόν ξένες ύλες από τους σπόρους και ξεπλυθούν, τοποθετούνται στο διάλυμα χλωρίνης για να πραγματοποιηθεί η απολύμανση. Η διαδικασία της απολύμανσης με χλωρίνη διαρκεί 60 λεπτά συνεχούς ανάδευσης. Μετά την απολύμανση πρέπει να ξεπλυθεί η χλωρίνη από τους σπόρους. Αυτή η διαδικασία πραγματοποιείται στη τράπεζα νηματικής ροής. Προστίθεται νερό, στο μπουκάλι που βρίσκονται οι σπόροι, το οποίο είναι απιονισμένο και αποστειρωμένο, και ακολουθεί ανακίνηση για ένα λεπτό. Η διαδικασία αυτή πραγματοποιείται 3-4 φορές μέχρι να ξεπλυθούν οι σπόροι και να μη δημιουργούνται φυσαλίδες εξαιτίας του σαπουνιού. Μόλις ξεπλυθούν είναι έτοιμοι να τοποθετηθούν 20-30 σπόροι ανά βαζάκι σε υπόστρωμα MS (Murashige and Skoog 1962). Θα παραμείνουν εκεί 3-4 εβδομάδες στο θάλαμο ανάπτυξης μέχρις ότου αναπτυχθεί το κολεόπτυλο το οποίο θα μεταφερθεί αργότερα στα τελικά θρεπτικά υποστρώματα με φυτοορμόνες.

2.3 Προετοιμασία τράπεζας νηματικής ροής και διαδικασία ιστοκαλλιέργειας

Τίθεται σε λειτουργία η τράπεζα νηματικής ροής και ο επιτραπέζιος αποστειρωτής ξηρού τύπου όπου είναι έτοιμα για χρήση σε 15 περίπου λεπτά. Αρχικά παρασκευάζεται διάλυμα αιθανόλης 70% (70% αιθανόλη και 30% απιονισμένο νερό). Αυτό γίνεται διότι το καθαρό αποστειρωμένο περιβάλλον είναι η βάση και ο πιο σημαντικός παράγοντας επιτυχίας της ιστοκαλλιέργειας. Φροντίζεται από νωρίτερα να υπάρχουν αποστειρωμένα χαρτιά, πλάκα, βάση για τα εργαλεία και εργαλεία (νυστέρια, λαβίδες). Με χαρτί κουζίνας και το διάλυμα αιθανόλης που παρουσιάστηκε νωρίτερα καθαρίζονται όλες οι επιφάνειες εργασίας και τα εσωτερικά τοιχώματα της τράπεζας νηματικής ροής. Τα βαζάκια με το θρεπτικό υπόστρωμα που πρόκειται να χρησιμοποιηθεί μεταφέρονται και τοποθετούνται στη τράπεζα νηματικής ροής. Όλα τα εργαλεία και τα υλικά που πρόκειται να χρησιμοποιηθούν απομακρύνονται από τις συσκευασίες τους αυστηρά μέσα στη τράπεζα νηματικής ροής για να παραμένουν αποστειρωμένα. Στη συνέχεια τοποθετούνται τα εργαλεία στον επιτραπέζιο αποστειρωτή για μερικά λεπτά και αφήνονται πάνω στη βάση να κρυσώσουν. Καθ' όλη τη διάρκεια και σε τακτά χρονικά διαστήματα καθαρίζεται η επιφάνεια εργασίας με αιθανόλη. Όταν είναι να γίνει η τοποθέτηση των απολυμασμένων σπόρων στα θρεπτικά υποστρώματα, η διαδικασία είναι απλή και χρειάζονται μόνο οι σπόροι, το υπόστρωμα και οι λαβίδες. Αντιθέτως όταν είναι να παραληφθεί το κολεόπτυλο στο τελικό θρεπτικό υπόστρωμα με ορμόνες η διαδικασία είναι λίγο πιο περίπλοκη. Τοποθετείται πάνω στη πλάκα ένα κομμάτι χαρτί και λίγη αιθανόλη ώστε να μη μετακινείται το χαρτί λόγω της ροής αέρα μέσα στη τράπεζα. Πάνω στο χαρτί τοποθετείται το κολεόπτυλο του οποίου του αφαιρείται το ριζίδιο και μεταφέρεται μέσα στο θρεπτικό υπόστρωμα με ορμόνες. Σε κάθε βάζο τοποθετούνται 4 φυτά. Στο βαζάκι σημειώνεται ο κωδικός του φυτού, η ημερομηνία, το υπόστρωμα και το όνομα του υπεύθυνου που εργάστηκε με το πείραμα. Μετά από κάθε χρήση τα εργαλεία αποστειρώνονται. Τέλος τα καινούργια βαζάκια μεταφέρονται στο θάλαμο ανάπτυξης στους 22°C με 16 ώρες φως και 8 ώρες σκοτάδι.

2.4 Χημικά Αντιδραστήρια

Όνομα	Εταιρία	Συνθήκες αποθήκευσης
MS (Murashige and Skoog basal medium)	SIGMA	Θερμοκρασία 4°C
Sucrose, Grade I	SIGMA	Θερμοκρασία δωματίου
Phytigel, plant cell culture tested, powder	SIGMA	Θερμοκρασία δωματίου
Ethanol 99% denatured	J.T. Baker	Θερμοκρασία δωματίου
Potassium Nitrate	Panreac	Θερμοκρασία δωματίου
Amonium Nitrate	Panreac	Θερμοκρασία δωματίου
Calcium nitrate 4-Hydrate	Panreac	Θερμοκρασία δωματίου
Hydro Phosphate	Panreac	Θερμοκρασία δωματίου
Magnesium Sulphate 7-Hydrate	Panreac	Θερμοκρασία δωματίου
Boric Acid	Panreac	Θερμοκρασία δωματίου
Copper Sulfate 5-Hydrate	Riedel de Haen	Θερμοκρασία δωματίου
Manganese Sulfate 1-Hydrate	Riedel de Haen	Θερμοκρασία δωματίου
Sodium Molybdate 2-Hydrate	Panreac	Θερμοκρασία δωματίου
Zinc Sulfate 7-Hydrate	Riedel de Haen	Θερμοκρασία δωματίου
Cobalt Chloride 6-Hydrate	Panreac	Θερμοκρασία

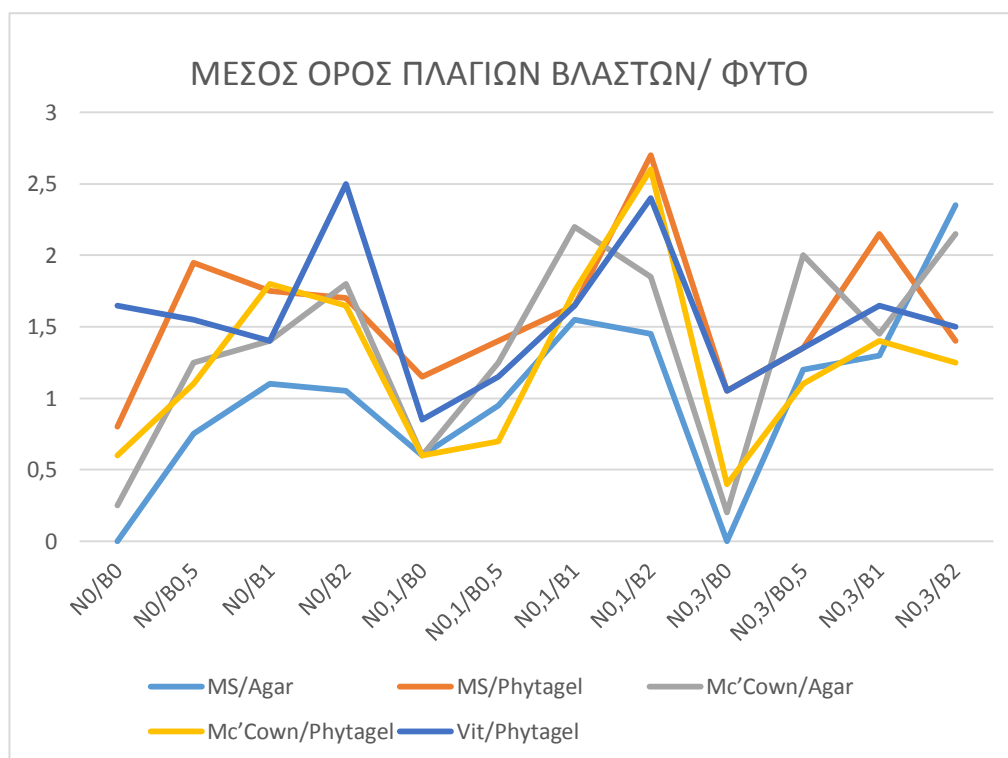
		δωματίου
Iron Sulfate 7-Hydrate	Riedel de Haen	Θερμοκρασία δωματίου
Idranal Signal	Riedel de Haen	Θερμοκρασία δωματίου
Thiamine Hydrochloride	Sigma	Θερμοκρασία δωματίου
Nicotinic Acid	Sigma	Θερμοκρασία δωματίου
Pyridoxine Hydrochloride	Sigma	Θερμοκρασία δωματίου
Glycine	Duchefa	Θερμοκρασία δωματίου
Biotin	Duchefa	Θερμοκρασία δωματίου
Folic Acid	Duchefa	Θερμοκρασία δωματίου
p-aminobenzoic	Duchefa	Θερμοκρασία δωματίου
Riboflavin	Duchefa	Θερμοκρασία δωματίου
Ca-pantothenate	Duchefa	Θερμοκρασία δωματίου
Agar	Sigma	Θερμοκρασία δωματίου
1-Naphthaleneacetic acid (NAA)	Duchefa	Θερμοκρασία δωματίου
6-Benzylaminopurine (BAP)	Duchefa	Θερμοκρασία δωματίου

2.5 Συσκευές

Όνομα	Εταιρία	Κωδικός
Ζυγαριά ακριβείας	Precisa 62A	#14879
Ζυγαριά αναλογική	Kern Kb	#031679
Drying oven	Trade Raypa	#DOD-150
Steam sterilizer	Trade Raypa	#AE-75 DRY
Θερμική Εστία / Μαγνητικός αναδευτήρας	Snijders Scientific	#34532
Επιτραπέζιος αποστειρωτής ξηρού τύπου (Steri-250)	Swiss	#250
Τράπεζα νηματικής ροής	ESCO	

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ-ΣΥΖΗΤΗΣΗ

Αυτό που παρατηρήθηκε σύμφωνα και με τον παρακάτω Πίνακα μέσω των όρων είναι ότι από τους τέσσερις πρώτους συνδυασμούς υποστρωμάτων που δοκιμάστηκαν μόνο το MS/Phytigel με NAA 0,1ppm και BAP 2ppm παρουσίασε δείκτη ποιότητας VG (όπως ορίζεται στον παρακάτω Πίνακα). Επιπροσθέτως σ' αυτή τη συγκέντρωση όλα τα φυτά είχαν τουλάχιστον δύο πλάγιους βλαστούς. Παρατηρήθηκε όμως ότι όλα τα φυτά ανεξαρτήτως υποστρώματος είχαν μεγάλα μεσογονάτια διαστήματα. Στον πέμπτο συνδυασμό, αυτό δεν ισχύει. Τα φυτά στις 6 εβδομάδες ήταν πιο συμπαγή και πιο ομοιόμορφα. Ο συνδυασμός Vit/Phytigel με NAA 0,1ppm και BAP 2ppm αποδείχθηκε και εδώ να έχει το μεγαλύτερο ποιοτικό δείκτη και πάλι όλα τα φυτά στο συνδυασμό αυτό είχαν τουλάχιστον δύο πλάγιους βλαστούς. Επίσης παρατηρείται ότι σε αντίθεση με τους Naser et al., 2004 στη *Salvia fruticosa*, Sahoo et al., 1997 στο *Ocimum basilicum*, Sanchez-Gras and Calvo, 1996 στο *Lavandula latifolia* και τους Komalavalli and Rao, 2000 στο *Gymnena sylvestre*, ο πέμπτος συνδυασμός Vit στο μάρτυρα χωρίς ορμόνες παρουσίασε ένα αξιοσημείωτο μέσο όρο 1,65 πλάγιων βλαστών ανά φυτό όπου επίσης μερικά φυτά καταγράφηκαν να έχουν μέχρι και 4-6 πλάγιους βλαστούς.



Συγκεντρώσεις	MS/Agar	MS/Phytigel	Mc' Cown/Agar	Mc' Cown/Phytigel	Vit/Phytigel
	Μέσος όρος πλάγιων βλαστών/φυτό ^{δείκτης ποιότητας}				
N0/B0	0	0,8 ^B	0,25 ^B	0,6 ^B	1,65 ^B
N0/B0,5	0,75 ^M	1,95 ^G	1,25 ^B	1,1 ^M	1,55 ^M
N0/B1	1,1 ^M	1,75 ^G	1,4 ^B	1,8 ^G	1,4 ^M
N0/B2	1,05 ^M	1,7 ^B	1,8 ^G	1,65 ^B	2,5 ^B
N0,1/B0	0,6 ^B	1,15 ^M	0,6 ^B	0,6 ^B	0,85 ^B
N0,1/B0,5	0,95 ^M	1,4 ^B	1,25 ^M	0,7 ^B	1,15 ^M
N0,1/B1	1,55 ^G	1,65 ^G	2,2 ^B	1,75 ^G	1,65 ^G
N0,1/B2	1,45 ^G	2,7 ^{VG}	1,85 ^G	2,6 ^G	2,4 ^{VG}
N0,3/B0	0	1,05 ^B	0,2 ^B	0,4 ^B	1,05 ^B
N0,3/B0,5	1,2 ^G	1,35 ^B	2 ^M	1,1 ^M	1,35 ^M
N0,3/B1	1,3 ^G	2,15 ^G	1,45 ^G	1,4 ^G	1,65 ^M
N0,3/B2	2,35 ^G	1,4 ^M	2,15 ^G	1,25 ^M	1,5 ^M

N= NAA (συγκέντρωση σε ppm) B= BAP (συγκέντρωση σε ppm)

ΔΕΙΚΤΗΣ ΠΟΙΟΤΗΤΑΣ	
Οι εκθετικοί δείκτες ^{G, VG, M και B} στις παραπάνω αριθμητικές τιμές, υποδεικνύουν τα ποσοτικά και ποιοτικά χαρακτηριστικών των βλαστών που εκπύχθηκαν	
VG	Όλα τα φυτά να έχουν πλάγιους βλαστούς, όχι υάλωση, μήκος έκφυτων > 0,5cm
G	Φυτά χωρίς πλάγιους βλαστούς ≤5, όχι υάλωση, μήκος έκφυτων > 0,5cm
M	Φυτά χωρίς πλάγιους βλαστούς ≤10, όχι υάλωση, μήκος έκφυτων > 0,5cm
B	Δεν ισχύει καμία από τις παραπάνω κατηγορίες

4. ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Η ιστοκαλλιέργεια είναι μια διαδικασία δύσκολη η οποία απαιτεί αρκετό χρόνο εξειδίκευσης. Ο υποψήφιος που ασχολείται σε αυτό το πεδίο έρευνας είναι απαραίτητο να μάθει να διαχειρίζεται σωστά όλες τις τεχνικές ιστοκαλλιέργειας. Επίσης τα δείγματα που διαχειρίζεται, και ειδικά όταν πρόκειται για αρκετά δύσκολα δείγματα όπως είναι το φασκόμηλο, που λόγω των τριχών και του τρόπου ανάπτυξής του δυσχεραίνουν την όλη διαδικασία. Για το λόγο αυτό προϋποτίθεται η εξάσκηση του υποψηφίου νωρίτερα σε φυτά με μικρότερο βαθμό δυσκολίας, όπως και έγινε σ' αυτήν την περίπτωση, χρησιμοποιώντας ως φυτό εξάσκησης το αγριογαρύφαλλο.

Αρκετά χρονοβόρα ήταν επίσης και η απολύμανση των σπόρων των οποίων θα χρησιμοποιούνταν αργότερα για τη παραλαβή των κολεόπτυλων ως έκφυτων. Χρειάστηκε πολύ χρόνο και χαμένο πολλαπλασιαστικό υλικό για την εύρεση του κατάλληλου πρωτοκόλλου απολύμανσης.

Η γνώση του τρόπου εργασίας κάτω από ασηπτικές συνθήκες και η αποφυγή των μολύνσεων είναι η βάση της ιστοκαλλιέργειας. Είναι μια διαδικασία η οποία απαιτεί αρκετό χρόνο, επιμονή και αφοσίωση.

Ακολουθώντας όλα τα παραπάνω σ' αυτή τη πτυχιακή εργασία επιτεύχθηκε η δημιουργία ενός πρωτοκόλλου ιστοκαλλιέργειας (Παράρτημα 1) για τη μαζική παραγωγή φυτών φασκόμηλου μέσω πλάγιων βλαστών.

5. ΠΑΡΑΡΤΗΜΑΤΑ

Παράρτημα 1:

Για την παρασκευή του θρεπτικού διαλύματος προετοιμάζονται τα παρακάτω Stock διαλύματα:

A. STOCK Διάλυμα ΜΑΚΡΟΣΤΟΙΧΕΙΩΝ (10 x)

Στοιχεία	(mg/L)	Για 10 Λίτρα
KNO ₃	1800	18 gr
NH ₄ NO ₃	400	4 gr
Ca(NO ₃)·4H ₂ O	1200	12 gr
KH ₂ PO ₄	270	2,7 gr

Τα παραπάνω στοιχεία διαλύονται σε 1 Λίτρο απιονισμένου νερού και διατηρούνται στους 4°C στο ψυγείο.

B. STOCK Διάλυμα ΜΑΓΝΗΣΙΟΥ (10 x)

Στοιχείο	(mg/L)	Για 10 Λίτρα
MgSO ₄ · 7H ₂ O	360	3,6 gr

Το παραπάνω στοιχείο διαλύεται σε 1 Λίτρο απιονισμένου νερού και διατηρείται στους 4°C στο ψυγείο.

C. STOCK ΠΥΚΝΟ Διάλυμα ΜΙΚΡΟΣΤΟΙΧΕΙΩΝ (100 x)

Στοιχεία	(mg/L)	Για 100 Λίτρα
H ₃ BO ₃	4,80	0,480 gr
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,25	0,025 gr
MnSO ₄ ·H ₂ O	33,50	3,350 gr
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,39	0,039 gr
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	17,00	1,700 gr
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	0,0025 gr

Τα παραπάνω στοιχεία διαλύονται σε 1 Λίτρο απιονισμένου νερού, αποτελούν το **ΠΥΚΝΟ** Stock διάλυμα μικροστοιχείων και διατηρούνται στους 4°C στο ψυγείο.

C-dil. STOCK Διάλυμα ΜΙΚΡΟΣΤΟΙΧΕΙΩΝ (10 x)

Διαλύονται 100ml από το πυκνό διάλυμα **C.** σε 1 Λίτρο απιονισμένου νερού και διατηρούνται στους 4°C στο ψυγείο.

D. STOCK Διάλυμα ΣΙΔΗΡΟΥ-EDTA (10 x)

Στοιχεία	(mg/L)	Για 10 Λίτρα
FeSO ₄ ·7H ₂ O	33,80	0,338 gr
Na-EDTA·2H ₂ O	45,40	0,454 gr

Τα παραπάνω στοιχεία διαλύονται σε 1 Λίτρο απιονισμένου νερού, και διατηρούνται στους 4°C στο ψυγείο.

E. STOCK ΠΥΚΝΟ Διάλυμα ΒΙΤΑΜΙΝΩΝ (100 x)

Στοιχεία	(mg/L)	Για 100 Λίτρα
Thiamine	2	0,200 gr
Nicotinic acid	1	0,100 gr
Glycine	2	0,200 gr
Pyridoxine HCl	0,5	0,050 gr
Biotin	0,1	0,010 gr
Folic acid	0,5	0,050 gr
p-aminobenzoic acid	1	0,100 gr
Riboflavin	0,1	0,010 gr
Ca-pantothenate	0,5	0,050 gr

Τα παραπάνω στοιχεία διαλύονται σε 1 Λίτρο απιονισμένου νερού, αποτελούν το **ΠΥΚΝΟ** Stock διάλυμα βιταμινών και διατηρούνται **στους -20°C στην κατάψυξη**. Για αποφυγή παγώματος και ξεπαγώματος του Stock, διαιρούμε την παραπάνω ποσότητα σε ποσότητες των 50ml ή 100ml.

E-dil. STOCK Διάλυμα ΒΙΤΑΜΙΝΩΝ (10 x)

Διαλύονται 100ml από το πυκνό διάλυμα **E.** σε 1 Λίτρο απιονισμένου νερού, και διατηρούνται στους 4°C στο ψυγείο.

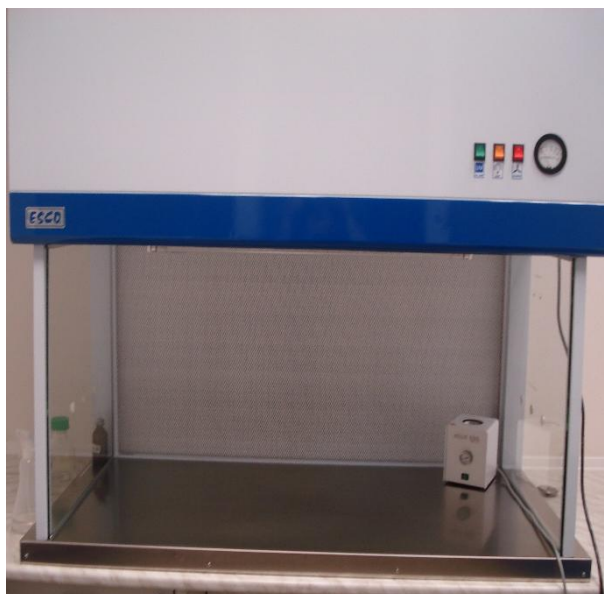
Διαδικασία παρασκευής 1 Λίτρου θρεπτικού διαλύματος.

- Βήμα 1.** Σε μια Κωνική φιάλη του 1L ή 2L, τοποθετείται μαγνητικός αναδευτήρας με 300 ml απιονισμένο νερό, πάνω σε μια εστία θέρμανσης/ανάδευσης.
- Βήμα 2.** Προσθέτονται 100ml από το κάθε Stock διάλυμα A, B, C-dil, D και E-dil.
- Βήμα 3.** Προσθέτονται 100mg Myo-inositol
- Βήμα 4.** Προσθέτονται 75mg Ascorbic acid
- Βήμα 5.** Προσθέτονται 50mg Citric acid
- Βήμα 6.** Προσθέτονται x mg/L BAP
- Βήμα 7.** Προσθέτονται x mg/L NAA
- Βήμα 8.** Προσθέτονται 30gr ζάχαρης
- Βήμα 9.** Προσθέτονται οι απαραίτητες ποσότητες απιονισμένου νερού μέχρι τελικού όγκου 1 Λίτρου.
- Βήμα 10.** Αφού διαλυθούν όλα τα στοιχεία, ρυθμίζεται το pH στο 5.7-5.8
- Βήμα 11.** Προσθέτονται 3 gr Phytigel
- Βήμα 12.** Το διάλυμα βράζει για να ομογενοποιηθεί, μέχρι να γίνει διαυγές.
- Βήμα 13.** Χρησιμοποιώντας ένα ογκομετρικό κύλινδρο ή αυτόματο μηχάνημα αν υπάρχει, διάφορες ποσότητες του παραπάνω διαλύματος μεταφέρονται σε βάζα.
- Βήμα 14.** Τα βάζα τοποθετούνται για αποστείρωση στον κλίβανο.
- Βήμα 16.** Μετά την αποστείρωση διατηρούνται σε καθαρό μέρος σε θερμοκρασία δωματίου (18-24°C).

Παράρτημα 2:



Εικόνα 5.1. Υγρός κλίβανος για την αποστείρωση του θρεπτικού υποστρώματος που είναι τοποθετημένο στα βαζάκια.



Εικόνα 5.2. Τράπεζα εργασίας που χρησιμοποιήθηκε για την ιστοκαλλιέργεια αγριογαρυφάλων.



Εικόνα 5.3. Επιτραπέζιος αποστειρωτής ξηρού τύπου που χρησιμοποιήθηκε για την αποστείρωση των εργαλείων κατά τη διαδικασία της ιστοκαλλιέργειας η οποία βρίσκεται μέσα στην τράπεζα εργασίας.



Εικόνα 5.4. Ξηρός κλίβανος που χρησιμοποιήθηκε για την αποστείρωση μικροεργαλείων, γυαλικών κ.ά. αντικειμένων που χρησιμοποιούνται στην ιστοκαλλιέργεια.



Εικόνα 5.5. pH-μετρο για τη μέτρηση της οξύτητας του θρεπτικού υποστρώματος.



Εικόνα 5.6. Θερμική εστία και Μαγνητικός αναδευτήρας για τη παρασκευή του θρεπτικού υποστρώματος.

Παράρτημα 3: Αναλυτικοί Πίνακες μετρήσεων πλάγιων βλαστών

Mc C / Agar	Week 4	Week 6	Σύνολο βλαστών	ποιότητα
1.N0 B0	0000	0000	5	B
2.	0000	0000		
3.	0000	4000		
4.	0000	0000		
5.	0001	0001		
1.N0/B0,5	1122	1122	25	B
2.	3222	2432		
3.	0120	2200		
4.	0110	0120		
5.	0001	0001		
1.N0/B1	2100	2100	28	B
2.	2223	2223		
3.	1022	2022		
4.	1001	2101		
5.	0222	0222		
1.N0/B2	2122	2122	36	G
2.	2230	2340		
3.	0230	0230		
4.	0132	1133		
5.	2222	1222		
1.N0,1/B0	0000	2100	12	B
2.	0020	0300		
3.	0100	0200		
4.	0001	0001		
5.	1010	2010		
1.N0,1/B0,5	2442	2452	25	M
2.	1210	2211		
3.	0000	0000		
4.	0001	0001		
5.	0120	0221		
1.N0,1/B1	4222	4222	44	B
2.	2221	2222		
3.	2323	3242		
4.	2221	2222		
5.	1200	2311		
1.N0,1/B2	3311	4321	37	G
2.	2223	2224		
3.	2110	2110		
4.	1110	2110		
5.	2310	2421		
1.N0,3/B0	0000	0000	4	B
2.	0001	0012		
3.	0000	0000		
4.	0000	0001		
5.	0000	0000		
1.N0,3/B0,5	0004	0014	20	M
2.	2011	2011		
3.	2200	2200		
4.	2100	2100		
5.	1110	2110		
1.N0,3/B1	2124	4122	29	G
2.	0000	0002		
3.	0002	0012		
4.	2210	3211		
5.	1121	2231		

1.N0,3/B2	0021	0021	43	G
2.	3211	4221		
3.	4220	6320		
4.	2324	3324		
5.	2221	3221		

MS / Agar	Week 4	Week 6	Σύνολο βλαστών	ποιότητα
1.N0/B0	0000	0000	0	
2.	0000	0000		
3.	0000	0000		
4.	0000	0000		
5.	0000	0000		
1.N0/B0,5	2320	2320	15	M
2.	0001	0002		
3.	1000	1000		
4.	0101	0201		
5.	0110	0110		
1.N0/B1	2012	3012	22	M
2.	0011	0021		
3.	2200	2210		
4.	1101	2101		
5.	0021	0022		
1.N0/B2	0002	0002	21	M
2.	0001	0011		
3.	2211	2221		
4.	1200	2210		
5.	1110	2210		
1.N0,1/B0	0000	0000	12	B
2.	0003	0006		
3.	0001	0001		
4.	0011	0012		
5.	0000	0002		
1.N0,1/B0,5	0002	0002	19	M
2.	0022	0022		
3.	1112	1222		
4.	0002	0002		
5.	0211	0211		
1.N0,1/B1	2220	2220	31	G
2.	0122	0122		
3.	2222	2222		
4.	2110	2211		
5.	0222	0222		
1.N0,1/B2	1222	1222	29	G
2.	0222	0222		
3.	1110	2111		
4.	3220	3220		
5.	3100	3100		
1.N0,3/B0	0000	0000	0	
2.	0000	0000		
3.	0000	0000		
4.	0000	0000		
5.	0000	0000		
1.N0,3/B0,5	2200	2200	24	G
2.	2220	2220		
3.	2111	2211		
4.	1100	2110		
5.	0001	0112		

1.N0,3/B1	0021	0041	26	G
2.	2100	3100		
3.	2213	2324		
4.	1112	1122		
5.	0021	0121		
1N0,3/B2	4422	5442	47	G
2.	2200	2200		
3.	1223	2224		
4.	4320	4320		
5.	3222	3222		

McC/ Phyt	Week 4	Week 6	Σύνολο βλαστών	ποιότητα
1.N0/B0	1100	3300	12	B
2.	0000	0001		
3.	0011	0011		
4.	0000	0000		
5.	0011	0012		
1.N0/B0,5	0221	0322	22	M
2.	0011	0022		
3.	0021	0021		
4.	0011	0011		
5.	1112	1122		
1.N0/B1	0111	0221	36	G
2.	2221	4332		
3.	0422	0422		
4.	0221	0321		
5.	0002	0122		
1.N0/B2	3332	4332	33	B
2.	0221	0222		
3.	1223	2223		
4.	0001	0001		
5.	0221	2210		
1.N0,1/B0	0001	0001	12	B
2.	0002	0014		
3.	0000	0000		
4.	0011	0011		
5.	2100	3100		
1.N0,1/B0,5	0001	0001	14	B
2.	0011	0012		
3.	0000	0000		
4.	0111	0113		
5.	0012	0122		
1.N0,1/B1	2220	3321	35	G
2.	0022	0122		
3.	2222	2222		
4.	2111	2211		
5.	2221	2221		
1.N0,1/B2	1112	3222	52	G
2.	3221	4321		
3.	3220	4420		
4.	4110	4311		
5.	4422	5432		
1.N0,3/B0	0000	0221	8	B
2.	0000	0000		
3.	0000	0000		
4.	0001	0012		
5.	0000	0000		

1.N0,3/B0,5	0001	0001	22	M
2.	0022	0022		
3.	2211	2211		
4.	0022	0023		
5.	0111	0132		
1.N0,3/B1	2200	2200	28	G
2.	2220	2220		
3.	0003	1123		
4.	2111	2211		
5.	2210	2210		
1.N0,3/B2	0001	0112	25	M
2.	0000	0002		
3.	3200	3300		
4.	2210	2211		
5.	1113	1123		

MS / Phyt	Week 4	Week 6	Σύνολο βλαστών	ποιότητα
1.N0/B0	0001	0013	16	B
2.	0001	0001		
3.	0000	0000		
4.	0000	0000		
5.	0000	6410		
1.N0/B0,5	4221	4431	39	G
2.	2220	3220		
3.	2223	2224		
4.	1211	1221		
5.	2200	2200		
1.N0/B1	2221	2221	35	G
2.	2220	2220		
3.	3221	3221		
4.	2221	3221		
5.	2110	2211		
1.N0/B2	2211	2211	34	B
2.	4211	4221		
3.	2320	3320		
4.	1122	1123		
5.	0211	0211		
1.N0,1/B0	0000	4210	23	M
2.	0000	0210		
3.	0000	0001		
4.	2100	2210		
5.	6000	6100		
1.N0,1/B0,5	2110	2110	28	B
2.	2220	3220		
3.	3111	3211		
4.	2211	2211		
5.	1111	1111		
1.N0,1/B1	2110	2220	33	G
2.	2210	2210		
3.	1112	1112		
4.	0222	0223		
5.	2220	4420		
1.N0,1/B2	2200	4311	54	VG
2.	6222	6222		
3.	4322	4422		
4.	3222	5332		
5.	2221	2222		

1.N0,3/B0	5200	5300	21	B
2.	2000	3200		
3.	2000	3100		
4.	0001	00001		
5.	0002	0012		
1.N0,3/B0,5	0002	0002	27	B
2.	0022	0122		
3.	2110	2211		
4.	2111	2221		
5.	0222	0322		
1.N0,3/B1	4211	4211	43	G
2.	2211	2222		
3.	1222	4422		
4.	1133	1233		
5.	1103	1203		
1.N0,3/B2	2210	3221	28	M
2.	0000	0000		
3.	3221	3222		
4.	3330	3330		
5.	0002	0002		

Vit / Phyt	Week 4	Week 6	Σύνολο βλαστών	Ποιότητα
1.N0/B0	0000	0000	33	B
2.	0000	0001		
3.	0001	0002		
4.	0000	5420		
5.	0002	6454		
1.N0/B0,5	1153	2276	31	M
2.	0201	0201		
3.	2200	2200		
4.	2000	2000		
5.	0122	0122		
1.N0/B1	2202	2212	28	M
2.	0012	0234		
3.	1000	1000		
4.	1120	1120		
5.	3220	3220		
1.N0/B2	3222	4452	50	B
2.	2220	2222		
3.	4222	7422		
4.	2200	2200		
5.	2221	2222		
1.N0,1/B0	0000	0000	17	B
2.	0000	0000		
3.	0000	2200		
4.	0000	6300		
5.	0000	2200		
1.N0,1/B0,5	2200	2200	23	M
2.	0000	4200		
3.	4000	4000		
4.	2210	2210		
5.	2200	2200		
1.N0,1/B1	3333	3333	33	G
2.	2200	2200		
3.	2221	2221		
4.	2211	3221		
5.	2000	2000		

1.N0,1/B2	3221	3222	48	VG
2.	3221	3222		
3.	2211	2222		
4.	2211	2222		
5.	2221	8222		
1.N0,3/B0	2000	4200	21	B
2.	0000	2000		
3.	0000	0000		
4.	0000	3200		
5.	0000	5300		
1.N0,3/B0,5	2220	2220	27	M
2.	3200	3320		
3.	3100	3210		
4.	2200	3200		
5.	0000	2000		
1.N0,3/B1	4420	4430	33	M
2.	2211	2211		
3.	4200	4220		
4.	2100	2100		
5.	2200	3200		
1.N0,3/B2	1000	1000	30	M
2.	2110	4220		
3.	2222	2222		
4.	2220	3222		
5.	2200	2200		

6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- ΧΑΤΖΟΠΟΥΛΟΣ Π., (2001). ΒΙΟΤΕΧΝΟΛΟΓΙΑ ΦΥΤΩΝ, pp 191-223
- ΠΑΠΑΧΑΤΖΗΣ Α., ΚΑΛΟΡΙΖΟΥ., (2008). ΠΑΡΑΓΩΓΗ ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΤΙΚΟΥ ΥΛΙΚΟΥ, pp 99-123
- ΚΑΤΣΙΩΤΗΣ Σ., ΧΑΤΖΟΠΟΥΛΟΥ Π., (2010). ΑΡΩΜΑΤΙΚΑ ΦΑΡΜΑΚΕΥΤΙΚΑ ΦΥΤΑ ΚΑΙ ΑΙΘΕΡΙΑ ΕΛΑΙΑ, pp 43-78, 875-892
- ΒΟΓΙΑΤΖΗΣ Δ., ΠΕΤΡΙΔΟΥ-ΚΟΥΚΟΥΡΙΚΟΥ Μ., (2009). ΒΙΟΛΟΓΙΑ ΟΠΩΡΟΚΗΠΕΥΤΙΚΩΝ ΦΥΤΩΝ 1, pp 205-228, 239-245
- ΤΣΕΚΟΣ Ι., ΗΛΙΑΣ Η., (2006). ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΦΥΤΩΝ, pp 369-439
- NASER A., FAWZIAM., NABILAS., RIDA A., (2004). MICROPROPAGATION AND ACCUMULATION OF ESSENTIAL OILS IN WILD SAGE (*Salvia fruticosa* MILL.), SCIENTIA HORTICULTURA 100 pp193-202
- GUENCA S., AMO-MARCO J.B., (2000). IN VITRO PROPAGATION OF TWO SPANISH ENDEMIC SPECIES OF *Salvia* THROUGH BUD PROLIFERATION, IN VITRO CELL. DEV.BIOL.-PLANT 36 pp225-229
- KOMALAVALLI N., RAO M.V., (2000). IN VITRO MICROPROPAGATION OF *Gymnema sylvestre* A MULTIPURPOSE MEDICINAL PLANT, PLANT CELL TISSUE ORGAN CULTURE 61 pp97-105
- LIU W., CHILCOTT C.E., REICH R.C., HELLMANN G.M., (2000). REGENERATION OF *Salvia scalea* VIA ORGANOGENESIS, IN VITRO CELL. DEV.BIOL.-PLANT 36 pp201-206
- MURASHIGE T., SKOOG F., (1962). A REVISED MEDIUM FOR RAPID GROWTH AND BIOASSAYS WITH TOBACCO TISSUE CULTURES, PLANT PSYCHOLOGY 15 pp473-497
- SKALA E., WYSOKINSKA H., (2004). IN VITRO REGENERATION OF *Salvia nemorosa* L. FROM SHOOT TIPS AND LEAF EXPLANTS, IN VITRO CELL. DEV.BIOL.-PLANT 40 pp596-602
- MAKUNGA N.P., STADEN J., (2008). AN EFFICIENT SYSTEM FOR THE PRODUCTION OF CLONAL PLANTLETS OF THE MEDICINALLY IMPORTANT AROMATIC PLANT *Salvia Africana-lutea* L., PLANT CELL TISSUE ORGAN CULTURE 92 pp63-72
- JOHN F., (1987). INFLUENCE OF NUTRIENT SALTS, AUXINS AND CYTOKININS ON THE IN VITRO GROWTH OF *Salvia greggii*, PLANT CELL TISSUE ORGAN CULTURE 9 pp89-93

MISIC D., GRUBISIC D., KONJEVIC R., (2006). MICROPROPAGATION OF *Salvia brachyodon* THROUGH NODAL EXPLANTS, BIOLOGIA PLANTARUM 50 pp 473-476

SANTOS –GOMES P., SEABRA R., ANDRADE P., FERNANDES-FEREIRA M., (2002). PHENOLIC ANTIOXIDANT COMPOUNDS PRODUCED BY IN VITRO SHOOTS OF SAGE (*Salvia officinalis* L.), PLANT SCIENCE 162 pp981-987

SANTOS –GOMES P., FERNANDES-FEREIRA M.,(2003) ESSENTIAL OILS PRODUCED BY IN VITRO SHOOTS OF SAGE (*Salvia officinalis* L.),AGRICULTURAL AND FOOD CHEMISTRY 51 pp 2260-2266

AVATO P., FORTUNATO I., RUTA C., D'ELIA R., (2005). GLANDULAR HAIRS AND ESSENTIAL OILS IN MICROPROPAGATED PLANTS OF *Salvia officinalis* L., PLANT SCIENCE 169 pp 29-36