

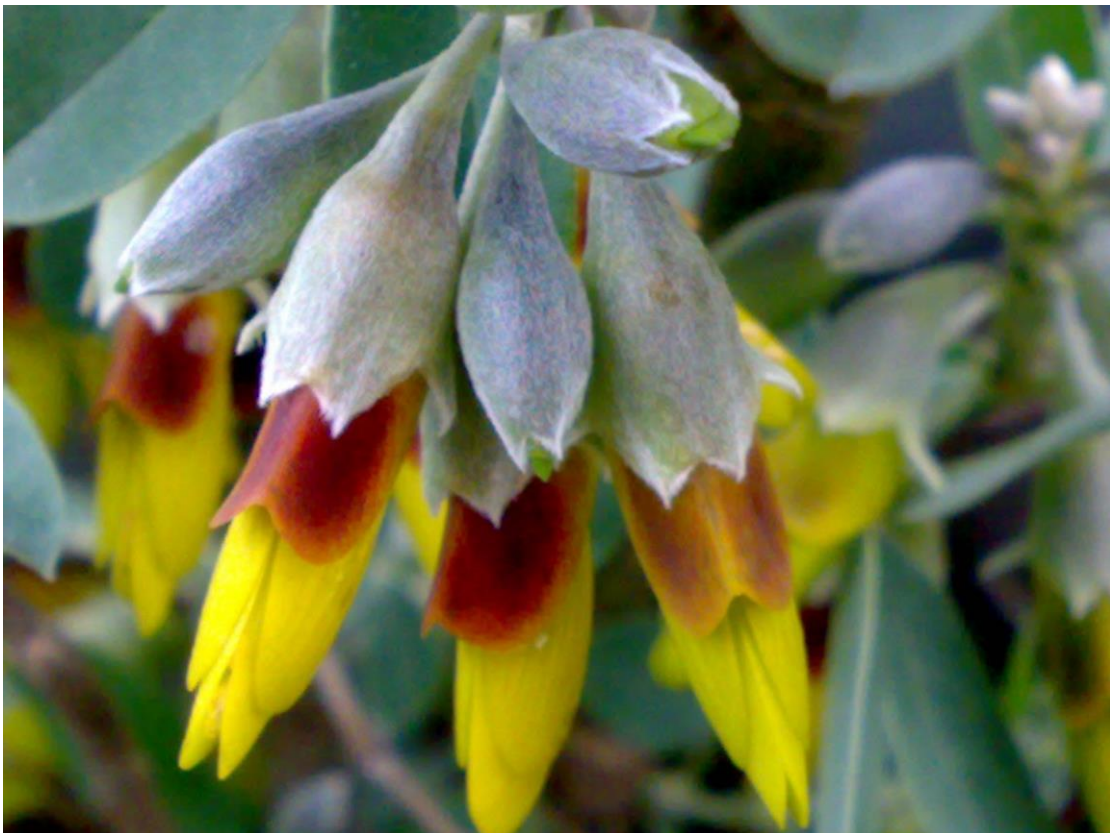


ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΥΠΟΔΟΜΩΝ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

Π.Μ.Σ. Επιστήμες και Συστήματα Φυτικής Παραγωγής

«Κηπευτικές Καλλιέργειες & Ανθοκομία»

«Μελέτη του πολλαπλασιασμού του *Anagyris foetida* L. in vitro»



Μεταπτυχιακή Διατριβή

Βενετία-Μαρία Α. Δελλή

Αθήνα 2017

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Δρ. Παπαφωτίου Μαρία



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΥΠΟΔΟΜΩΝ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

Π.Μ.Σ. Επιστήμες και Συστήματα Φυτικής Παραγωγής

«Κηπευτικές Καλλιέργειες & Ανθοκομία»

«Μελέτη του πολλαπλασιασμού του *Anagyris foetida* L. in vitro»



Μεταπτυχιακή Διατριβή

Βενετία-Μαρία Α. Δελλή

Αθήνα 2017

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Δρ. Παπαφωτίου Μαρία



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΑΓΡΟΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ ΥΠΟΔΟΜΩΝ & ΠΕΡΙΒΑΛΛΟΝΤΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ

Π.Μ.Σ. Επιστήμες και Συστήματα Φυτικής Παραγωγής

«Κηπευτικές Καλλιέργειες & Ανθοκομία»

«Μελέτη του πολλαπλασιασμού του *Anagyris foetida* L. in vitro»

Μεταπτυχιακή Διατριβή

Βενετία-Μαρία Α. Δελλή

Επιβλέπουσα Καθηγήτρια: Παπαφωτίου Μαρία, Καθηγήτρια Γ.Π.Α.

Τριμελής Εξεταστική Επιτροπή

1. Παπαφωτίου Μαρία, Καθηγήτρια Γ.Π.Α
2. Σάββας Δημήτριος, Καθηγητής Γ.Π.Α.
3. Ακουμιανάκη-Ιωαννίδου Αναστασία, Αν. Καθηγητής Γ.Π.Α.

ΑΘΗΝΑ 2017

Ευχαριστίες

Η παρούσα μεταπτυχιακή διατριβή εκπονήθηκε στο Εργαστήριο Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του ΓΠΑ. Στην σελίδα αυτή νοιώθω την ανάγκη να ευχαριστήσω όλους όσους με βοήθησαν για την ολοκλήρωση του παρόντος πονήματος.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω από καρδιάς την επιβλέπουσα καθηγήτριά μου Δρ. Μ. Παπαφωτίου για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε αναθέτοντάς μου την εκπόνηση αυτής της μεταπτυχιακής εργασίας. Η βοήθεια, το ενδιαφέρον και οι παρατηρήσεις της, τόσο κατά τη διάρκεια του πειραματικού μέρους όσο και κατά τη συγγραφή της εργασίας υπήρξαν για μένα πολύτιμα. Θα ήθελα επίσης να εκφράσω και να υπογραμμίσω την εκτίμηση και τις ευχαριστίες μου στον Δρ. Κ. Μπερτσουκλή, ΕΔΙΠ, για τις πολύτιμες υποδείξεις και τη στήριξή του στην εκπόνηση και συγγραφή της παρούσης διατριβής. Τέλος θα ήθελα να αναφερθώ στην πολύτιμη βοήθεια της κας Τζώρτζια Βλάχου MSc, υποψήφια διδάκτωρ, στην εκμάθηση των απαραίτητων εργαστηριακών τεχνικών αλλά και της Δρ. Κατερίνα Μαρτίνη, μεταδιδακτορική ερευνήτρια, για τις πολύτιμες συμβουλές της, τις οποίες ευχαριστώ θερμά.

Δελλή Βενετία-Μαρία

Αθήνα, 2017

		Σελίδα
ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ	Περίληψη	1
	Abstract	1
	Συντομογραφίες	2
	Σκοπός	3
ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ		
1	Εισαγωγή	
1.1	Μεσογειακή βλάστηση-Το γένος <i>Anagyris</i>	5
1.1.1	Βοτανική ταξινόμηση	6
1.1.2	Βοτανική περιγραφή	8
1.1.3	Χρήσεις	11
1.1.4	Εχθροί και ασθένειες	17
1.1.4.1	Έντομα	17
1.1.4.2	Μύκητες-Βακτήρια	23
1.2	Η Ιστοκαλλιέργεια	
1.2.1	Ιστορική αναδρομή και βασικές αρχές ιστοκαλλιέργειας	25
1.2.2	Βλαστικός πολλαπλασιασμός και μικροπολλαπλασιασμός	26
1.2.3	Στάδια του μικροπολλαπλασιασμού	27
1.2.4	Παράγοντες που επηρεάζουν το μικροπολλαπλασιασμό	28
1.2.5	Θρεπτικά μέσα	28
1.2.6	Πλεονεκτήματα του μικροπολλαπλασιασμού	30
1.2.7	Μειονεκτήματα του μικροπολλαπλασιασμού	30
2	Υλικά και μέθοδοι <i>in vitro</i> καλλιιεργειών	31
2.1	Φυτικό υλικό	31
2.2	Υποστρώματα <i>in vitro</i> καλλιέργειας	31
2.2.1	Υλικά	31
2.2.2	Μέθοδος παρασκευής υποστρωμάτων	32
2.2.3	Παρασκευή διαλυμάτων φυτορρυθμιστικών ουσιών και βιταμινών	32
2.3	Μέθοδοι αποστείρωσης, απολύμανσης και εγκατάστασης σπόρων και εκφύτων	34

2.3.1	Αποστείρωση εργαλείων και υλικών	34
2.3.2	Απολύμανση-εγκατάσταση-επώαση σπόρων	34
2.4	Έκφυτα-χειρισμοί εκφύτων	35
2.5	Ριζοβολία μικροβλαστών	35
2.6	Εγκλιματισμός φυταρίων	36
2.7	Πειραματικό Σχέδιο- Στατιστική Ανάλυση	36
2.8	Εκτίμηση Βλαστικότητας σπόρων	36
2.9	Εκτίμηση αποτελεσμάτων στο στάδιο in vitro καλλιεργειών	36
2.10	Εκτίμηση αποτελεσμάτων στο στάδιο της ριζοβολίας και του εγκλιματισμού των φυταρίων	37
3	Αποτελέσματα	38
3.1	Εισαγωγή	38
3.2	In vitro βλάστηση σπόρων	41
3.3	Πολλαπλασιασμός καλλιεργειών in vitro	43-50
3.4	Ριζοβολία μικροβλαστών	50-56
3.5	Εγκλιματισμός φυταρίων	57
4	Συζήτηση-Συμπεράσματα	58
4.1	In vitro καλλιέργεια του είδους <i>Anagyris foetida</i>	58
4.2	Ριζοβολία-Εγκλιματισμός του είδους <i>Anagyris foetida</i>	59

Βιβλιογραφία

Περίληψη

Το είδος *A. foetida* αυτοφύεται σε περιοχές της Μεσογείου, της Νοτιο Ανατολικής και Δυτικής Ευρώπης και της Μικράς Ασίας, συναντάται στα βορειοαφρικανικά παράλια και σε παραμεσόγειες περιοχές. Πρόκειται για ημιαειθαλή θάμνο που ανήκει στην οικογένεια Fabaceae που θα μπορούσε να αξιοποιηθεί ως καλλωπιστικό είδος, σε προγράμματα ανάπλασης υποβαθμισμένων και με διαβρωμένο έδαφος τοπίων αστικών και περιαστικών περιοχών. Χρησιμοποιείται για ερευνητικούς σκοπούς στον κλάδο της φαρμακοβιομηχανίας λόγω πολύτιμων ουσιών που περιέχονται στα φύλλα και στο φλοιό του.

Στην παρούσα εργασία εξετάστηκε η βλαστικότητα σπόρων του είδους *A. foetida* κατόπιν διαφόρων προμεταχειρήσεων, ήτοι με π. H_2SO_4 , σκαριφισμό, συνδιασμό των παραπάνω και παραμονή τους σε H_2O 40 °C για 24 h. Στη συνέχεια οι σπόροι απολυμάνθηκαν και τοποθετήθηκαν σε in vitro καλλιέργεια, σε γυάλινα δοχεία με στερεό θρεπτικό υπόστρωμα αλάτων MS στους 20 °C και 16 h φωτοπερίοδο, υπό 37,5 $\mu\text{mol m}^{-2}$ φωτισμό λαμπτήρων φθορίου.

Η βλαστικότητα των σπόρων κυμάνθηκε σε πολύ χαμηλά επίπεδα της τάξης του 28,57%.

Επίσης διερευνήθηκε σε in vitro καλλιέργεια η επίδραση των κυτοκινινών BA, ZEAT, 2-ip, και KIN στην in vitro βλαστογένεση του είδους *A. foetida*. Το ποσοστό βλαστογένεσης κυμάνθηκε από 55% έως 100%. Έκπτυξη μεγαλύτερου αριθμού βλαστών παρατηρήθηκε κατά την υποκαλλιέργεια εκφύτων σε υπόστρωμα MS με 1,0 ή 2,0 mg l^{-1} BA. Υποκαλλιέργειες εκφύτων *A. foetida* σε συγκεντρώσεις 0,5 ή 2,0 mg l^{-1} BA παρουσίασαν το μεγαλύτερο μήκος βλαστών. Υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού παρατηρήθηκε κατά την υποκαλλιέργεια εκφύτων σε υπόστρωμα MS με 0,5 ή 2,0 mg l^{-1} BA.

Μετά από υποκαλλιέργειες στα ανωτέρω υποστρώματα, αξιολογήθηκε η ριζοβολία των μικροβλαστών σε υπόστρωμα υποδιπλασιασμένης δύναμης MS παρουσία ή μη διαφορετικών συγκεντρώσεων IBA, NAA και IAA. Επίσης εξετάστηκε η επίδραση ενεργού άνθρακα (CA).

Η ριζοβολία ήταν ανεπιτυχής καθώς το μεγαλύτερο ποσοστό που επετεύχθη ήταν 19%.

Επίσης ανεπιτυχής ήταν ο εγκλιματισμός των ριζοβολημένων φυταρίων σε ex-vitro συνθήκες.

Abstract

Anagyris foetida (Bean trefoil) occurs naturally and has centres of diversification in areas of the Mediterranean, the South Eastern and Western Europe, Asia, in the North African coast and Mediterranean rim region.

It is a shrub species belonging to the Fabaceae family, that could be introduced as ornamental, in redevelopment projects of degraded and eroded urban and suburban landscapes and to the pharmaceutical industry due to various precious substances in their leaves and stem.

The present thesis investigated seed germination of the above species, following various handling techniques such as concentrated sulfuric acid or scarification or combining the above and then remaining of seeds in H_2O and at 40 °C for 24 h. The seeds were then disinfected and placed in glass containers with a solid MS nutrient substrate at 20 °C and a 16 hour photoperiod, under 37.5 $\mu\text{mol m}^{-2}$ of fluorescent lamp illumination. Seed germination ranged at very low level of 28,57%.

A thorough investigation of the effectiveness of cytokinin BA, ZEAT, 2-ip, and KIN on vitro shoot production of *Anagyris foetida* was undertaken. Blastogenesis rates ranged between 55% and 100%. Most shoots per explant were observed in the subculture of explants on an MS substrate with 1.0 and 2.0 mg l^{-1} BA. Subculture of *A. foetida* explants in concentrations of 0.5 and 2.0 mg l^{-1} BA showed the longer shoots length, while a higher proliferation potential was observed in the subculturing of explants on an MS substrate with 0.5 and 2.0 mg l^{-1} BA. Following subculturing on the above substrates, explant rooting was evaluated on a submultipulated MS force substrate with or without different concentrations of IBA, NAA and IAA. Also, the effect of activated carbon (CA) was examined. The rooting of microshoots reached very low levels ranging from from 0% to 19%. Rooted microshoots ex vitro acclimatization was unsuccessful.

Συντομογραφίες

AC	Activated charcoal
BA	6-benzyladenine
IBA	Indole-3-butyric acid
IAA	Indole-3-acetic acid
KIN	Kinetin, 6-furfurylaminopurine
NAA	1-Naphtheleneacetic acid
MS	Murashige and Skoog Basal Medium
ZEAT	trans-zeatin
2iP	6-γ-γ-(Dimethylallylamino)-purine



Σκοπός της Έρευνας

Το είδος *Anagyris foetida* συναντάται σε μικρούς πληθυσμούς στην χερσαία και νησιωτική Ελλάδα.

Πρόκειται για είδος ανθεκτικό που παρουσιάζει εντυπωσιακή κίτρινη ανθοφορία κατά τους χειμερινούς μήνες και θα μπορούσε να αξιοποιηθεί στην Αρχιτεκτονική τοπίου κυρίως για την ανάπλαση υποβαθμισμένων και διαβρωμένων εδαφών, λόγω της αζωτοδεσμευτικής του ικανότητας. Το *A. foetida* χρησιμοποιείται στη μελισσοτροφία και για την παραγωγή αιθερίων ελαίων. Σημαντικές είναι και οι φαρμακευτικές της ιδιότητες.

Το είδος *Anagyris foetida* εμπίπτει στην κατηγορία: Σποραδικοί Φυσικοί πληθυσμοί ενδημικών ειδών με περιορισμένη εξάπλωση. Φυσικοί πληθυσμοί ενδημικών ειδών με περιορισμένη εξάπλωση χαρακτηρίζονται συχνά από πολύ χαμηλά επίπεδα γενετικής παραλλακτικότητας και από απουσία γενετικής διαφοροποίησης.

Η καρπόδεση του *Anagyris foetida* είναι πολύ χαμηλή κάτω από φυσικές συνθήκες (3,09%, διακύμανση μεταξύ: 0,96% –5,10%). Πρόκειται για κοινό φαινόμενο σε πολλές περιπτώσεις αγγειοσπέρμων, και ιδίως για θαμνώδη ψυχανθή στην περιοχή της Μεσογείου (Rodríguez-Riáño *et al.*, 1999, 2004) και αλλού (Bawa and Webb 1984, Bawa and Buckley 1989). Το ίδιο μπορεί να ειπωθεί για τη σποροπαραγωγή (35,5%, διακύμανση μεταξύ: 30,6% - 42%).

Το είδος *A. foetida* παρουσιάζει μειωμένη βλαστικότητα σπόρου λόγω της ύπαρξης φυσικού ληθάργου που οφείλεται στο αδιαπέραστο περίβλημα των σπόρων (Valtueña *et al.*, 2008b).

Ο *in vitro* πολλαπλασιασμός αποτελεί μία εναλλακτική τεχνική διατήρησης για απειλούμενα φυτικά είδη που καθιστούν δυνατή την επανεισαγωγή τους στο φυσικό περιβάλλον (Wochock 1981), μειώνοντας έτσι τον κίνδυνο εξαφάνισης (Nadeem *et al.*, 2000, Chandra *et al.*, 2006).

Επιτρέπει δε την μαζική αναπαραγωγή άνοσου φυτικού υλικού σε σύντομο χρονικό διάστημα, μεγάλου βαθμού ομοιομορφίας, μειωμένου κόστους, που παρέχει τη δυνατότητα να ξεπεραστούν πολύπλοκα προβλήματα ληθάργου, χαμηλής ζωτικότητας σπόρου και δυσκολιών στις διαδικασίες σποροπαραγωγής.

Σκοπός της παρούσας έρευνας ήταν η διερεύνηση του πολλαπλασιασμού του *A. foetida* με σπόρο και μικροπολλαπλασιασμό με στόχο την εισαγωγή του είδους στην Αρχιτεκτονική Τοπίου.

Αριστοτέλης Βαλαωρίτης (1824-1879): Άσμα Πρώτον
Ἡ παραμονή

Χαρούμενα τὰ λούλουδα φιλοῦν τὸ μέτωπό του
χάνει μὲ μιᾶς τὴν ἀσκημιὰ καὶ τὴν ταπεινοσύνη
ὁ ἔρμος ἀζώηρος.....

K R E T A ηῦ Κ A N D I A .



DAPPER, Olfert. *Naukeurige Beschryving der Eilanden in de Archipel der Middellantsche Zee, en ontrent dezelve, gelegen: Waer onder de voornaemste Cyprus, Rhodes, Kandien, Samos, Scio, Negroponte, Lemnos, Paros, Delos, Patmos, en andere, in groten getale...*, Amsterdam, Wolfgangh, Waesbergen, Boom, Someren, Goethals, 1688.

1.ΕΙΣΑΓΩΓΗ

1.1 Μεσογειακή βλάστηση – Το γένος *Anagyris*

Τα οικοσυστήματα της μεσογειακής βλάστησης καλύπτουν το 40% της Ελλάδας και αναπτύσσονται στην ηπειρωτική χώρα και τις νήσους, σε υψόμετρο συνήθως μέχρι 800 m (Arianoutsou, 2001). Αξιοσημείωτη είναι η βιοποικιλότητα των μεσογειακών οικοσυστημάτων. Αν και καταλαμβάνουν λιγότερο από το 2% της επιφάνειας της γης, φιλοξενούν 45.000 είδη αγγειόσπερμων, αριθμό που αποτελεί το 18% των ειδών που αναφέρονται παγκοσμίως (250.000 είδη) (Rundel, 2007).

Τα ψυχανθή (Fabaceae), αποτελούν μία από τις τρεις μεγαλύτερες οικογένειες των ανώτερων φυτών με 12.000 έως 17.000 είδη σε 590-690 γένη (Harborne et al., 1971; Harley and Reynolds, 1992, Herendeen and Dilcher, 1992).

Είναι αυτοφυή στην Κεντρική Βραζιλία, το Μεξικό, την Ανατολική Αφρική, τη Μαδαγασκάρη και την Ινδομαλαισία και έχουν σημαντική παρουσία στην περιοχή της Μεσογείου, της Νότιας Αφρικής και της Αυστραλίας (Polhill and Raven, 1981). Στην Ευρώπη αυτή η οικογένεια παρουσιάζει περίπου 980 είδη και υποείδη (Heywood and Ball, 1968) και περίπου 2000 στην περιοχή της Μεσογείου (Greuter, Burdet and Long, 1989).

Τα ψυχανθή έχουν μεγάλη οικονομική σημασία, αφού είναι αζωτοδεσμευτικά και χρησιμοποιούνται για τον εμπλουτισμό εδαφών, επίσης χρησιμοποιούνται για την παραγωγή ξυλείας, καυσίμων, φυτοφαρμάκων, ζωοτροφών, κόμμεων, χρωστικών ουσιών, υδατανθράκων, πρωτεϊνών και ελαίων (Polhill et al., 1981), ενώ υπάρχουν επίσης πολλά είδη με καλλωπιστική και ή μελισσοκομική σημασία.

Το γένος *Anagyris* περιλαμβάνει θαμνώδη φυτά της οικογένειας των ψυχανθών αυτοφυή στην Γαλλία, την Ιβηρική Χερσόνησο, τη χερσόνησο των Απεννίνων, την Τουρκία, την Ανατολική Μεσόγειο, τη Βορειοδυτική Αφρική και τη Λιβύη. Στην Ελλάδα φύεται στη Βόρεια Ανατολική Ελλάδα, Βόρεια Πίνδο, Νότια Πίνδο, Ανατολική Κεντρική Ελλάδα, Στερεά Ελλάδα, Πελοπόννησο, Νησιά Ιονίου, Κρήτη, Κυκλάδες, Ανατολικό Βόρειο και Δυτικό Αιγαίο (Σχ.1).



Σχ. 1. Γεωγραφική κατανομή των *Anagyris foetida* και *Anagyris latifolia* (Ortega-Olivencia and Catalán, 2009)

1.1.1 Βοτανική ταξινόμηση

Το είδος *Anagyris foetida* έχει ταξινομηθεί εντός Thermopsidae Yakovlev, μια μικρή φυλή των Fabaceae (Leguminosae) που οριοθετείται από έξι γένη (*Anagyris*, *Ammopiptanthus* S.H. Cheng, *Baptisia* Vent., *Pickeringia* Nutt., *Piptanthus* Sweet, και *Thermopsis* R. Br.) τα οποία αντιπροσωπεύουν περί τα 45 είδη που διανέμονται στις εύκρατες ζώνες του ολαρκτικού ημισφαιρίου (Turner, 1981).

Τα περισσότερα από αυτά τα γένη με εξαίρεση το *Thermopsis* που συναντάται στην Ασία-Β. Αμερική (23 spp.) και το *Baptisia* (ανατολική Β. Αμερική) (15-17 spp.), παρουσιάζουν μικρούς πληθυσμούς, όπως το *Ammopiptanthus* (Β.Α Ασία) (2 spp.), το *Piptanthus* των Ιμαλαΐων (2 spp.), το παν-μεσογειακό *Anagyris* (1-2 spp.), και το *Pickeringia* (νοτιοδυτική Β. Αμερική) (1 sp.) (Mabberley, 1997, Lock, 2005).

Συστηματική Ταξινόμηση	
Βασίλειο :	Plantae
Υποάθροισμα	Angiosperms
Κλάση	Rosids
Υποκλάση	Rosidae
Υπερτάξη	Fabanae
Τάξη:	Fabales
Οικογένεια:	Fabaceae
Γένος:	<i>Anagyris</i> L.
Είδος	<i>Anagyris foetida</i> <i>Anagyris latifolia</i>

Πίνακας 1. Συστηματική ταξινόμηση του είδους *A.foetida*

Το γένος *Anagyris* αποτελείται από δύο είδη, το *A. foetida* L. που έχει διανεμηθεί στην περιοχή της Μεσογείου και της Μέσης Ανατολής, και το *A. latifolia* Brouss. ex Willd., ενδημικό των Καναρίων Νήσων (Gran Canaria, La Gomera, Tenerife, La Palma, Mesa et al., 2003).

Το είδος *A. latifolia* (Εικ.5) είναι ένα ενδημικό και απειλούμενο με εξαφάνιση είδος από τις Καναρίους Νήσους, η διανομή του οποίου περιορίζεται σε τέσσερα νησιά, με λιγότερα από

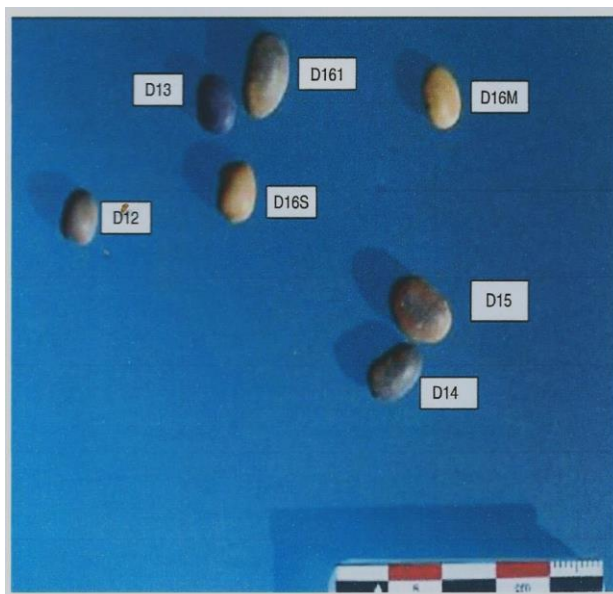
400 άτομα σε κατακερατισμένες και απομονωμένες περιοχές. Δείκτες RAPD ('Random Amplification of Polymorphic DNA') χρησιμοποιήθηκαν για την εκτίμηση της γενετικής ποικιλότητας και της γενετικής διαφοροποίησης των πληθυσμών του, προκειμένου να διαμορφωθούν κατάλληλες στρατηγικές γενετικής διαχείρισης και διατήρησης (González-Pérez and Batista, 2009).

Το *A. foetida* είναι υπολειμματικό είδος της Τριτογενούς Περιόδου (Ortega-Olivencia *et al.*, 2005, Valtuena *et al.*, 2008a).

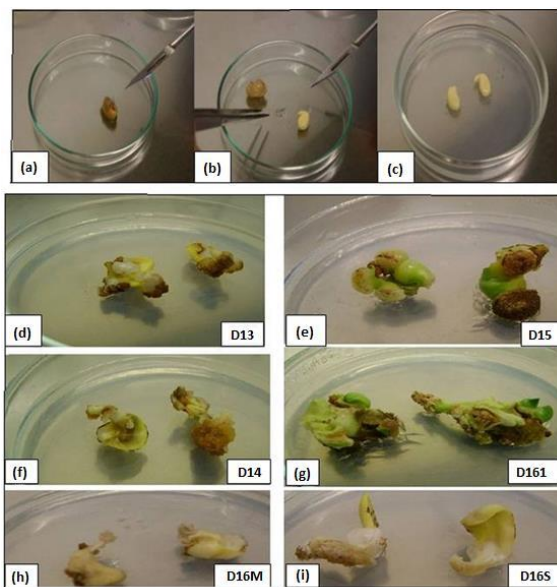
Ο Palamarev (1989) αναφέρει την παρουσία του *A. foetida* κατά το μέσο και ύστερο Μειόκαινο στις ανατολικοκεντρικές και βορειοκεντρικές ευρωπαϊκές περιοχές (Βουλγαρία, Πολωνία) όπου σήμερα έχουν εκλείψει.

Το είδος αυτό θα μπορούσε να είναι ένας εκπρόσωπος της Τριτογενούς υποεποχής τροπικού τύπου χλωρίδας που επέζησαν σε Μεσογειακά καταφύγια των Πλειστόκαινων παγετώνων (Ortega-Olivencia *et al.*, 2005).

Αρχαίοι σπόροι, περίπου 1.600 ετών, ήρθαν στο φως κατά τη διάρκεια μιας αρχαιολογικής ανασκαφής στο νησί Asar που βρίσκεται στη νότιο-δυτική Τουρκία. Αυτοί οι σπόροι υποβλήθηκαν σε βλάστηση με *in vitro* επαγωγή κάλου και πειράματα μοριακού χαρακτηρισμού (Εικ.1, 2). Τα αποτελέσματα έδειξαν σαφώς ότι τα είδη στα οποία ανήκαν οι εν λόγω βιώσιμοι αρχαίοι σπόροι ανήκαν στο είδος *A. foetida* (Özgen *et al.*, 2012)



Εικ.1



Εικ.2

- Εικ. 1 Οι επτά αρχαίοι σπόροι που βρέθηκαν σε ανασκαφές που πραγματοποιήθηκαν στον αρχαιολογικό χώρο της νήσου Asar (πόλη Αρχαίας Μύνδου) που βρίσκεται στη νότιο-δυτική Τουρκία.
- Εικ 2 (a – c) Απομάκρυνση περιβλήματος σπόρου από τους σπόρους που ανευρέθηκαν στις αρχαιολογικές ανασκαφές. (d – i) Επαγωγή κάλου από κοτυληδόνες των σπόρων των αρχαιολογικών ευρημάτων. Οι ετικέτες υποδεικνύουν τους κωδικούς που δόθηκαν στους έξι αρχαίους σπόρους.

(Özgen M, Özdilek A, Birsin MA, Önde S, Şahin D, Açıkgoz E, Kaya Z (2012). Analysis of ancient DNA from *in vitro* grown tissues of 1600-year-old seeds revealed the species as *Anagyris foetida*. *Seed Sci Res* 22: 279–286.)

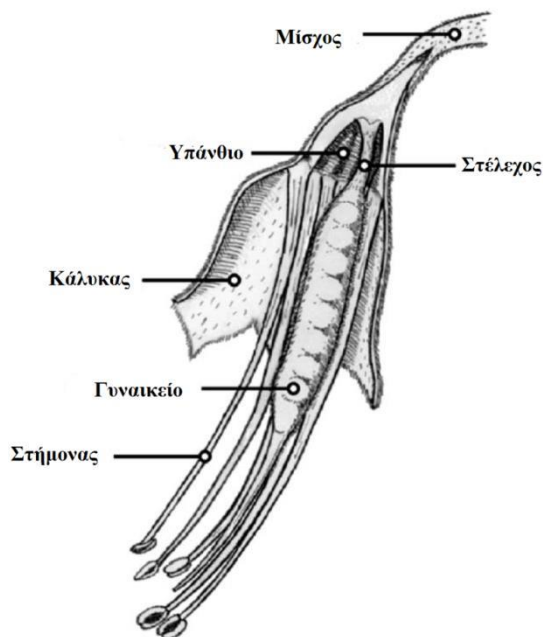
Οι Lavin *et al.*, 2005 προσδιορίζουν κατεκτίμηση την εμφάνιση των Thermopsidae περίπου 26,5 εκατομμύρια χρόνια πριν, ενώ η εμφάνιση του γένους *Anagyris* χρονολογείται στο τέλος της Μειόκαινου εποχής ($8,2 \pm 4,5$ Ma*). (Ortega-Olivencia and Catalán, 2009) (*Ma (megaannum):μονάδα χρόνου ίση με ένα εκατομμύριο (10^6)έτη).

1.1.2 Βοτανική περιγραφή

Το είδος *A. foetida* είναι ημιαειθαλής θάμνος, ύψους μέχρι 4 m, που συναντάται σε ημιορεινές και πεδινές περιοχές (Σφήκας 1987, Polunin and Huxley, 1990).

Το φυτό αυτό είναι γνωστό στην Ελλάδα με διάφορες κοινές ονομασίες, μεταξύ των οποίων βρομοκλάδι και βρομολυγαριά, εξαιτίας της δυσάρεστης οσμής που αναδύουν τα φύλλα του. Το όνομα του γένους καταγράφεται αρχικά στην Φυσική Ιστορία του Πλίνιου του Πρεσβύτερου και προέρχεται από το αρχαίο ελληνικό ανα+γύρος = από τον χαρακτηριστικό τρόπο που οι χέδρωπες καμπυλώνουν προς τα πάνω και το χαρακτηριστικό επίθετο από το λατινικό foetidus – a -um = δυσώδης.

Το είδος *A. foetida* παρουσιάζει χνουδωτό βλαστό και φύλλα δυσώδη αποτελούμενα από τρία φυλλάρια, ελλειπτικά, λεία στην άνω επιφάνεια και χνουδωτά στην κάτω. Τα άνθη (Σχ.2), που σχηματίζουν μασχαλιαίες ταξιανθίες, είναι Ψυχόμορφα [papilionaceous: Πενταμερής στεφάνη, η οποία αποτελείται από ένα ανώτερο πέταλο (πέτασος - vexillum), δύο πλάγια-άνω πέταλα (πτέρυγες - alae) και δύο συμφυόμενα πλάγια-κάτω πέταλα (τρόπιδα - carina)]. Τα άνθη είναι 18/25 mm, κιτρινωπά με μαύρα στίγματα, πρασινώχρα, με πριονωτούς κάλυκες, κρεμαστά, άοσμα και ομαδοποιούνται σε μικρούς βότρους (Ραίνα 1999, Ortega-Olivencia *et al.*, 2005) που εκφύονται άμεσα από τους κορμούς (cauliflory) (Valtueña *et al.*, 2008a).



Σχ.2 Κατά μήκος τομή άνθους *Anagyris foetida* με τα πέταλα και τα πρόσθια τμήματα του κάλυκα να έχουν απομακρυνθεί (Ortega-Olivencia *et al.*, 2005)

Το άνθος παράγει μεγάλη ποσότητα γύρης (περίπου 280.000 κόκκους / άνθος, Rodríguez-Riaño *et al.*, 1999). Το ανδρείον αποτελείται από δέκα στήμονες με διμορφικούς ανθήρες και

ο ύπερος, με 7 – 11 σπερματοβλάστες, βρίσκεται σε ένα μίσχο στη βάση μικρού υπάνθιου όπου συσσωρεύεται το νέκταρ λουλουδιών. Το νέκταρ (23,7 mL/d), πολύ αραιό(14,4%), είναι πλούσιο σε εξώζες (Ortega-Olivencia *et al.*, 2005, Valtueña, Ortega-Olivencia and Rodríguez-Riaño, 2007) (Εικ.3).

Το είδος *Anagyris foetida* συγκαταλέγεται στα ψυχανθή που παράγουν ογκομετρικά από τις μεγαλύτερες ποσότητες νέκταρ στον ευρωπαϊκό χώρο (Rodríguez Riano *et al.*, 1999 a, 1999 b). Χαρακτηρίζεται ως ένα από τα πιο νεκταροφόρα (nectariferous) είδη που φύονται στους Μεσογειακούς οικότοπους, μαζί με κάποια είδη *Lonicera* (Herrera 1985, Jordano 1990), *Capparis* (Petanidou and Smets, 1995) και *Scrophularia* (Ortega-Olivencia and Devesa, 1993).



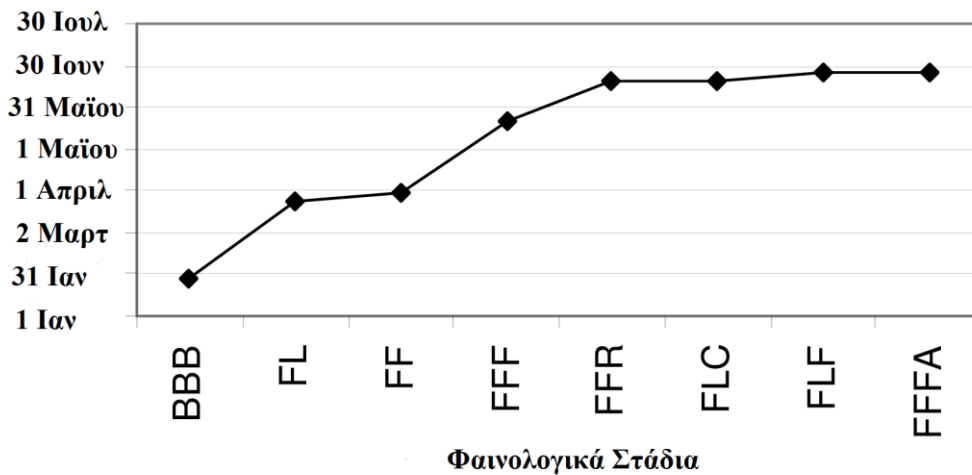
Εικ.3. Άνθη *Anagyris foetida* σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης. Στα αριστερά, άνθος με μια σταγόνα νέκταρ στο άνω τμήμα. (Ortega-Olivencia *et al.*, 2005)

Η απαρχή της ανθοφορίας σημειώνεται κατά τους μήνες Νοέμβριο – Δεκέμβριο και διαρκεί περίπου 3-3,7 μήνες μέχρι το Φεβρουάριο – Μάρτιο, ενώ η κορύφωση της ανθοφορίας αντιστοιχεί στους μήνες Ιανουάριο / Φεβρουάριο ποικίλωντας ανάλογα με τις συνθήκες, το κλίμα και την περιοχή (Ramos and Santos, 2005).

Αντιπροσωπεύει το μοναδικό πειραματικά επιβεβαιωμένο είδος ορνιθοφιλίας (επικονίασης από πουλιά – ornithophily) στην Ευρώπη, καθώς και τη κεντρική και δυτική Μεσόγειο. Επικονιάζεται κυρίως από τρία είδη που ανήκουν στην ομοταξία των πτηνών και ανήκουν στην τάξη: Στρουθιόμορφα (Passeriformes) (*Sylvia atricapilla* (μαυροσκούφης), *S. Melanocephala* (Μαυροτσιροβάκος) και *Phylloscopus collybita* (Δενδροφυλλοσκόπος) (Ortega-Olivencia *et al.*, 2005). Ο καρπός τους είναι χέδρωπας (45–190 × 12.5–24 mm) και τα σπέρματα {1–4(8)} έχουν ιώδες χρώμα και νεφροειδές σχήμα (9–16 × 6.5–9.5 mm) (Valtueña *et al.*, 2008a, Valtueña *et al.*, 2010).

Το είδος *A. foetida*, όπως και πολλές άλλοι σπόροι μεσογειακών ψυχανθών, διαθέτει εξαιρετικά σκληρό περίβλημα σπόρων και παρουσιάζει μεγάλες περιόδους ληθάργου (Taylor,

2005). Οι σπόροι του *A. foetida* απαιτούν μακροχρόνιες επεμβατικές εργασίες διαστρωμάτωσης και σκαριφισμού προκειμένου να βλαστήσουν (Valtueña et al., 2008b; Anşar, 2009). Αποτελεί δε μία σημαντική Τράπεζα Σπερμάτων αυτοφυούς φυτού (Valtueña et al., 2008b) που παρουσιάζει μεγάλη βιωσιμότητα μέσα στο χρόνο (Özgen et al., 2012).



- § Απαρχή έκπτυξης οφθαλμών (BBB) (Beginning of bud burst),
- § Πλήρης έκπτυξη φύλλων (FL) (Full leafing),
- § Πλήρης ανθοφορία (FF) (Full flowering),
- § Πλήρης σχηματισμός καρπών (FFF) (Full fruit formation),
- § Ωρίμανση καρπών (FFR) (Full fruit ripening),
- § Πλήρης χρωματισμός φυλλώματος (FLC) (Full leaf colouring),
- § Ολική φυλλόπτωση (FLF) (Full leaf fall),
- § Ολική καρπόπτωση (FFFA) (Full fruit fall)

Σχ.3 Γραφική απεικόνιση των κυρίων φαινολογικών μεταβολών του είδους *Anagyris foetida* (Anşar and Ok, 2010)

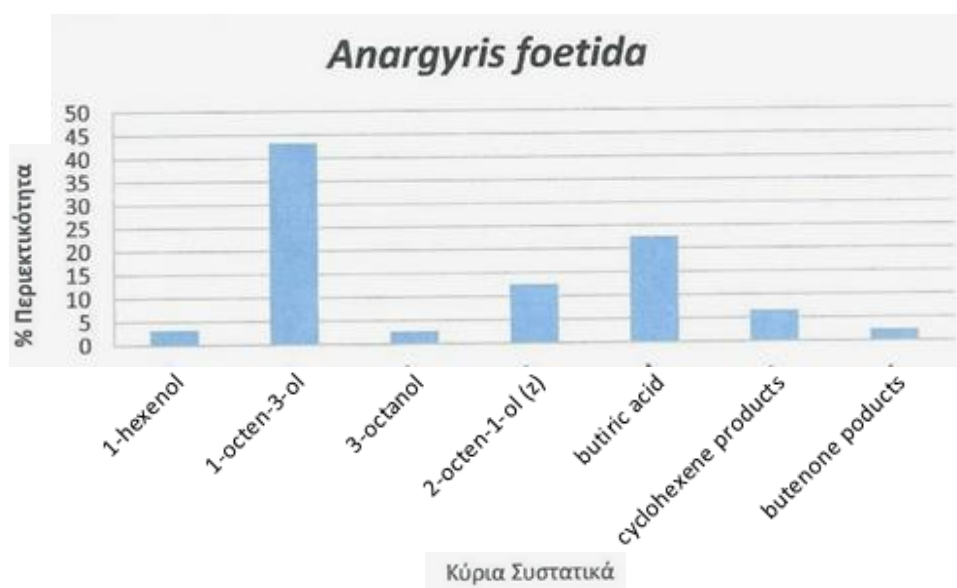


Εικ.4 Ανεπτυγμένο φυτό, άνθη, χέδρωπες, φύλλα και σπέρματα του είδους *Anagyris foetida*.

1.1.3 Χρήσεις

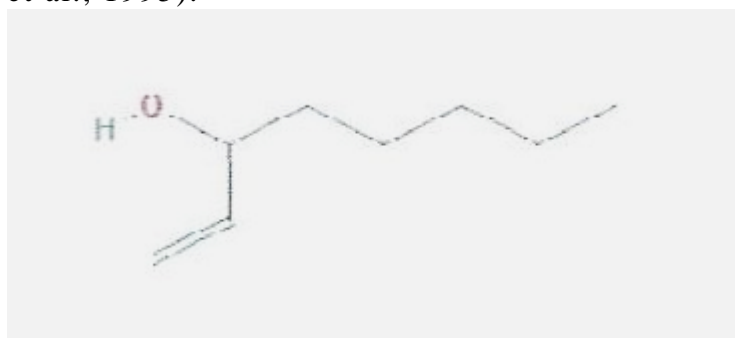
• Φασματογραφική Ανάλυση του είδους *A. foetida*

Βασικά συστατικά του είδους *Anargyris foetida*, είναι οκτανόλες ,που αποτελούν το 55,7% των συνολικών συστατικών - οκτεν-3-όλη με 43,25% και 2-οκτεν-1-όλη με 12,44 %, και το βουτυρικό οξύ με ποσοστό συμμετοχής 23%. Σε πολύ μικρότερα ποσοστά συμμετέχουν και άλλα συστατικά, κοινά λίγο έως πολύ σε πληθώρα αιθερίων ελαίων, όπως εξανόλη (3,2%), νονανόνη (0,5 %), νονανάλη (2,4%), κ υ κ λ ο ε ξ ε ν ό λ ε ς (6 %) β - μ υ ρ κ έ ν ι ο (0 , 5 %) (Καρούσου, 2014) (Σχ.4).



Σχ.4 Φασματογραφική Ανάλυση του είδους *Anargyris foetida* ως προς την περιεκτικότητα των φύλλων σε αιθέρια έλαια (Καρούσου, 2014)

Τα μόρια της οκτεν-3-όλης (Σχ.5) και 2-οκτεν-1-όλη παρουσιάζουν εντομοελκυστικές ιδιότητες (Takken et.al.,1989; Van Der Goes van Naters W.M. et al., 1995).



Σχ.5 Μόριο οκτεν-3-όλης

Οι Perez-Izquierdo and Ocete (1994), διεξήγαγαν δοκιμές εκχυλισμάτων αιθανόλης από αποξηραμένα φύλλα των ειδών *D.gnidium* και *Anargyris foetida* σχετικά με την πιθανή αντιδιατροφική δράση τους ενάντια στο 5^ο προνυμφικό στάδιο του *Spodoptera littoralis*. Βρήκαν ικανοποιητικές αντιδιατροφικές δραστηριότητες με δόσεις των 30 και 40 mg/cm² και

των δύο εκχυλισμάτων. Τα αιθέρια έλαια των *Thymus vulgaris*, *Santolina chamaecyparissus* και *Anagyris foetida* έχουν εντομοκτόνο δράση έναντι του *Callosobruchus chinensis* (chickpea weevil) (Righi Assia *et al.*, 2010).

Επίσης, οι Ocete and Pérez (1996) αξιολόγησαν την επίδραση των εκχυλισμάτων των *Daphne gnidium* και *Anagyris foetida* σε διάφορα βλαβερά έντομα. Εκχυλίσματα από *Daphne gnidium* L. (Thymelaeaceae) και *A. foetida* L. χρησιμοποιήθηκαν σε πειραματικές δοκιμές σε *Leptinotarsa decemlineata* Say (Coleoptera, Chrysomelidae) και *Aphis fabae* Scop. (Homoptera, Aphididae) σε πατάτες και σε ποικιλίες ζαχαρότευτλων, αντίστοιχα. Τα αποτελέσματα υποδεικνύουν ότι φυτά που υπέστησαν μεταχείριση παρουσίασαν χαμηλότερο επίπεδο μόλυνσης συγκριτικά με τους μάρτυρες. Αυτές οι διαφορές βρέθηκαν στατιστικά σημαντικές κατά τη διάρκεια των δύο πρώτων εβδομάδων. Από την άλλη πλευρά, οι βλαστοί του *Vitis vinifera silvestris* (Gmelin) Hegi που υποβλήθηκαν σε επεξεργασία με τα δύο εκχυλίσματα κατέγραψαν μικρότερο αριθμό από ερινώσεις, που προκλήθηκαν από τον *Colomerus vitis* (Pagst.) (Acari, Eriophyidae), από ό,τι ο μάρτυρας. Τέλος, και τα δύο εκχυλίσματα έδειξαν αντιμυκητιακή δραστηριότητα όσον αφορά το ωίδιο της αμπέλου *Uncinula necator* (Schw.) Burr, (Ocete and Pérez, 1996).

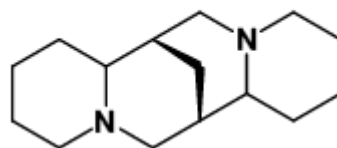
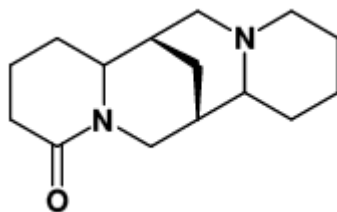
• Αλκαλοειδή

Το είδος *Anagyris foetida* L. μαζί με τα *Sophorae* και *Genistae* αντιπροσωπεύουν τους βασικούς δότες στην οικογένεια Fabaceae (Leguminosae) των αλκαλοειδών της κινολιζιδίνης (quinolizidine) QA (Mears και Mabry, 1971).

Αρκετά αλκαλοειδή έχουν ανιχνευθεί με TLC ή ηλεκτροφόρηση χάρτου (Ing, 1933) ή έχουν απομονωθεί από το *A. foetida* L. (Ing, 1935, Adzet *et al.*, 1970, Orjales Venero, 1971, Mears and Mabry, 1971, Viguera Lobo *et al.*, 1977). Αυτά περιλαμβάνουν την αναγυρίνη (anagyridine) και σπαρτεΐνη (sparteine) (Ing, 1933 & 1935, Adzet *et al.*, 1970, Orjales Venero, 1971), N-methylcytisine (Ing, 1935, Oijales Venero, 1971), την cytisine (Ing, 1933; Adzet *et al.*, 1970, Orjales Venero, 1971, Mears and Mabry, 1971, Viguera Lobo *et al.*, 1977), retamine (Ing, 1933) και τη lupanine (Ing, 1935). Ο Ing (1935) ανέφερε επίσης την ύπαρξη hydroxyanagyridine, η οποία δεν είχε πλήρως ταυτοποιηθεί. Οι Al-Azizi M.M. *et al.*, 1994, ασχολήθηκαν με την απομόνωση και την ταυτοποίηση των αλκαλοειδών του *A. foetida* rhombifoline 1 και 5,6-dehydrolupanine 2. Λοιπές ενώσεις που έχουν απομονωθεί από το είδος *Anagyris foetida* είναι οι: scopoletin, isoscooletin, 5-hydroxy-7-methoxycoumarin (Innocenti *et al.*, 2006).

Βιοχημικές και φαρμακολογικές ιδιότητες QA έχουν μια ευρεία ποικιλία βιολογικών δραστηριοτήτων. Είναι τοξικά ή ανασταλτικά για τους περισσότερους οργανισμούς. Σχετικά καλά μελετημένες είναι οι δραστηριότητες των sparteine και lupanine στα σπονδυλωτά, ιδιαίτερα στον αρουραίο και τον άνθρωπο: απομονωμένα QA μπορεί να είναι αντιαρρυθμικά (sparteine, lupanine), υπογλυκαιμικά (lupanine), κυτταροτοξικά και αντιπυρετικά (matrine), παραισθησιογόνα (cytisine, A-methylcytisine), τερατογόνα (anagyridine). Χρησιμοποιούνται επίσης ως εντομοκτόνα ή εντομοαπωθητικά.

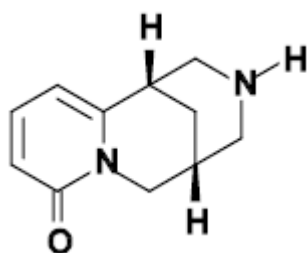
Σημαντική είναι η χρήση των αλκαλοειδών στην υγειονομική περίθαλψη. Λειτουργούν ως φάρμακα που σώζουν τη ζωή σε ορισμένες σοβαρές διαταραχές, όπως καρδιακή ανεπάρκεια, καρκίνο, αρτηριακή πίεση κλπ.



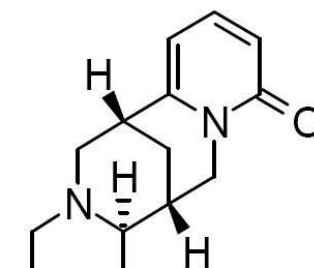
lupanine

sparteine

Η sparteine χρησιμοποιείται θεραπευτικά ως αντιαρρυθμικό φάρμακο και στη μαιευτική.



cytisine



anagyrene

Τα αλκαλοειδή όπως λ.χ η λουπινίνη, κυτισίνη, αναγυρίνη περιορίζουν την αποδοχή τροφής λόγω της πικρής τους γεύσης και τοξικότητας και προσφέρουν προστασία απέναντι στη βόσκηση από ζώα.

Σύμφωνα με τους Innocenti *et al.*, 2006, η περιεκτικότητα σπόρων στο τοξικό αλκαλοειδές αναγυρίνη, υπήρξε αιτία διατήρησης βιωσιμότητας των σπόρων που βρέθηκαν σε αρχαιολογικές ανασκαφές για περίπου 1600 έτη, η οποία συνέβαλε στο να αποτραπούν μυκητιακές και βακτηριακές λοιμώξεις.

• Συμπτώματα- Χρήσεις στην ιατρική

Σε γενικές γραμμές, έχει χορηγηθεί σε ζώα για την ανακούφιση τυμπανισμού και ως φυτικό φάρμακο για τον άνθρωπο (Baytop, 1999).

Ο κυαμισμός είναι μία κληρονομική ασθένεια του ανθρώπου που ακολουθεί φυλοσύνδετο υπολειπόμενο τύπο κληρονομικότητας. Στα άτομα που πάσχουν από την ασθένεια αυτή, παρατηρείται έλλειψη του ενζύμου αφυδρογονάση της 6-φωσφορικής γλυκόζης (G6PD ή G6PDH), το οποίο συμμετέχει στον κύκλο των φωσφορικών πεντοζών και είναι ιδιαίτερα σημαντικό για το μεταβολισμό των ερυθρών αιμοσφαιρίων. Τα άτομα που πάσχουν από την ασθένεια αυτή εμφανίζουν αιμολυτική αναιμία αν καταναλώσουν κουκιά (*Vicia faba*) ή αν έλθουν σ' επαφή με συγκεκριμένες χημικές ουσίες. Μεταξύ άλλων φυτών που λέγεται ότι προκαλούν ένα παρόμοιο σύνδρομο είναι διάφορα είδη του γένους *Sativum*, *Verbena*, το μύρτιλο και το είδος *Anagyris foetida* (Liener, 2012).

Το είδος *A.foetida* χρησιμοποιείται ως εμετικό, καθαρτικό και ανθελμινθικό (Phytochemical Database, USDA-ARS-NGRL). Λοιπές Φαρμακευτικές χρήσεις: Ενάντια στο έκζεμα και κατά της νεφρικής ανεπάρκειας. Παρουσιάζει ωστόσο τα κάτωθι τοξικολογικά συμπτώματα:

Ταχυκαρδία, υπέρταση, έμετο και διάρροια (Bnouham *et al.*, 2006). Στη Σαρδηνία το *A. foetida* έχει καταγραφεί ότι χρησιμοποιείται στη λαϊκή ιατρική (Ballero and Fresu, 1993, Loi *et al.*, 2002). Στην ομοιοπαθητική χρησιμοποιείται για την αντιμετώπιση του πονοκεφάλου και της αμηνόρροια. Τα φύλλα και ο φλοιός του φυτού χρησιμοποιείται στη λαϊκή ιατρική για τη θεραπεία του μετεωρισμού (τυμπανισμού), την κακή πέψη και τη δυσκοιλιότητα (Ageel *et al.*, 1987).

• Φαρμακευτική έρευνα

i) Αντικαρκινική δράση: Εκχυλίσματα του είδους *Anagyris foetida* διερευνήθηκαν σε προκαταρκτικά κυτταροτοξικά τεστ έναντι δύο καρκινικών κυτταρικών σειρών (Πιν.2). Χρωματογραφικοί διαχωρισμοί σε ενεργά εκχυλίσματα οδήγησαν στην απομόνωση δύο αλκαλοειδών, των anagyridine (1) και baptyfoline (2), καθώς και isorhamnetin (3) και syringin 4-O (3D-γλυκοκυρανοσίδη (4)). Η κυτταροτοξικότητα που παρατηρήθηκε για τα εκχυλίσματα *A. foetida* εν μέρει αποδίδονται στις ενώσεις (1)-(3). Οι anagyridine (1) και isorhamnetin (3) ήταν δραστικές και κατά και των δύο κυτταρικών γραμμών καρκίνου. Τα δεδομένα για την ένωση (3) ήταν σε συμφωνία με αυτά που είχαν δημοσιευτεί για την κυτταροτοξικότητα των φλαβονοειδών παραγώγων (Innocenti *et al.*, 2006).

Cytotoxicity of the *A. foetida* leaves extracts against HL-60 human (promyelocytic leukemia) and LoVo (human adenocarcinoma)

Extracts	Cytotoxicity IC ₅₀ (μg/ml)	
	HL-60	LoVo
Petroleum ether (PE)	5.13±0.73	16.1±0.3
Chloroform (CE)	14.9±3.6	16.4±0.4
Methanol (ME)	>50	>50
Doxorubicin ^a	5.7 · 10 ⁻³ ± 4 · 10 ⁻²	0.12±0.03

Πιν.2 Innocenti *et al.*, 2006

ii) Αντιμικροβιακή δράση: Πολυανθεκτικά στελέχη στα αντιβιοτικά του βακτήριου *Escherichia coli* αποτελούν σημαντική αιτία λοιμώξεων του ουροποιητικού συστήματος και μολύνσεων του αίματος. Αντικείμενο μελέτης υπήρξε η τροποποίηση της αντιβιοτικής δράσης αυτοφυών φυτών έναντι πολυανθεκτικών στελεχών του *E. Coli*. Συγκεκριμένα διερευνήθηκε η πιθανή δυνατότητα ταυτόχρονης χρήσης φυτικών εκχυλισμάτων και αντιβιοτικών για τη θεραπεία λοιμώξεων που προκαλούνται από το *E. coli* ή τουλάχιστον ότι η ταυτόχρονη χορήγηση δεν μπορεί να επηρεάσει την αντιμικροβιακή δράση των αντιβιοτικών αυτών. Μεθανολικά φυτικά εκχυλίσματα ενίσχυσαν τα ανασταλτικά αποτελέσματα των χλωραμφαινικόλης, νεομυκίνης, δοξυκυκλίνης, κεφαλεξίνης και ναλιδιξικού οξέως κατά του βασικού στελέχους και σε μικρότερο βαθμό του ανθεκτικού στελέχους του *E.coli*. Ενδιαφέρον παρουσιάζει το γεγονός ότι φυτικά εκχυλίσματα όπως του είδους *Anagyris foetida* (Fabaceae) και *Lepidium sativum* (Umbelliferae) μολονότι μείωσαν τη δραστηριότητα της αμοξικιλίνης κατά του βασικού στελέχους, ενίσχυσαν την δραστηριότητά της έναντι ανθεκτικών στελεχών .



Anagyris foetida

Chaumeton, F.P. et al., (1814-1818), *Flore Médicale* Vol. 1 Plate 22

Photograph Vilma Bharatan

© The Natural History Museum, London

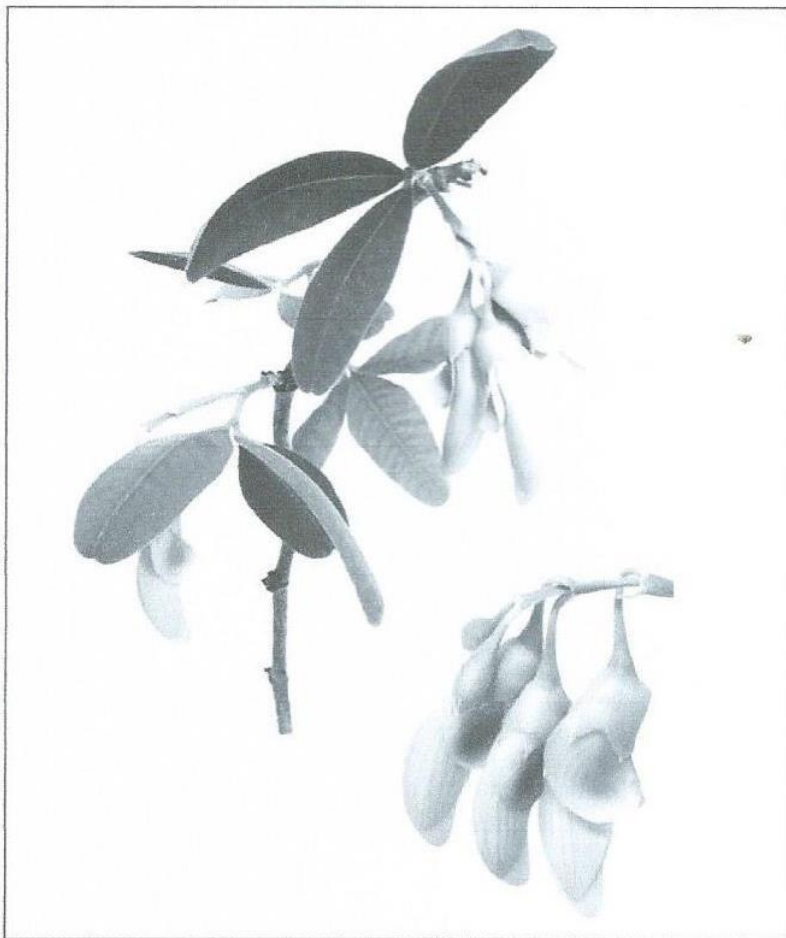
- **Λοιπές χρήσεις:**

Η ελκυστική κίτρινη ανθοφορία του είναι σημαντική για τη μελισσοκομία (Avsar and Ok, 2010). Οι κλάδοι του χρησιμοποιούνται στην καλαθοπλεκτική (Akan, 2013).

Πρόκειται για ανθεκτικό φυτό που μπορεί να αναπτυχθεί ακόμη και στα πιο φτωχά εδάφη βελτιώνοντας την περιεκτικότητά τους σε άζωτο, λειτουργώντας αζωτοδεσμευτικά (Yaltirik, 1972). Λόγω της δυσάρεστη οσμής και των τοξικών ιδιοτήτων του φυλλώματος και των σπερμάτων, πρόκειται για είδος δυσάρεστο για τα ζώα και επομένως, μπορεί να επιβιώσει σε περιοχές εντατικής βόσκησης όπου άλλα είδη θάμνων έχουν εξαλειφθεί (Browicz, 1983).

Τις τελευταίες δεκαετίες παρατηρείται μία αυξανόμενη τάση ερημοποίησης στις νότιες περιοχές της Μεσογείου (Diffenbaugh *et al.*, 2007), η οποία οφείλεται στη συρρόκνωση των υδατικών πόρων, την αύξηση της αλατότητας και τη διάβρωση του εδάφους. Άλλοι σημαντικοί παράγοντες είναι οι ανθρώπινες δραστηριότητες, όπως η εντατική εκμετάλλευση του εδάφους, η μη βιώσιμη αξιοποίηση αγρο-ποιμνικών πρακτικών, τα ορυχεία και ο πολλαπλασιασμός των δημοτικών χώρων υγειονομικής ταφής στο έδαφος.

Η βιοτεχνολογία του μικροσυμβιωτικού εμβολιασμού για τα άγρια ψυχανθή που εφαρμόστηκε για τις στρατηγικές αναβλάστησης των ερημοποιημένων οικοσυστημάτων στη νότια Ευρώπη (Requena *et al.*, 2001), ήταν επιτυχής και για ημι-άνυδρα εδάφη ανθρωπογενούς προέλευσης, όπως τεχνητά υποστρώματα αποτελούμενα κυρίως από αδρανή υλικά και ανθρώπινης προέλευσης τεχνήματα και φυτική γη υγειονομικής ταφής (Quatrini *et al.*, 2003).



Εικ.5 *Anagyris latifolia*, ένα απειλούμενο με εξαφάνιση είδος αυτοφυές των Κανάριων Νήσων (Φωτογραφία: Alex Bramwell, 2005)

1.1.4 Εχθροί και Ασθένειες

1.1.4.1 Έντομα

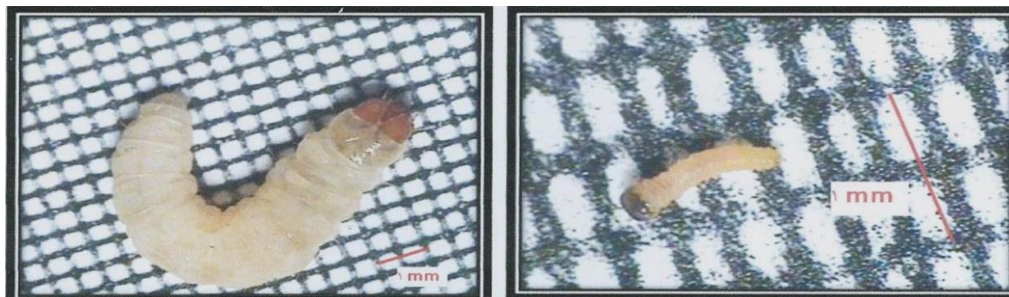
- *Cydia johanssoni*

Το είδος *Cydia johanssoni* αποτελεί τη σημαντικότερη εντομολογική προσβολή του είδους *Anagyris foetida*. Προνύμφες 1^{ου} σταδίου (παρουσιάζει 5 προνυμφικά στάδια) της *Cydia johanssoni* Aarvik and Karsholt (LEP.: Tortricidae) περί τα τέλη Απριλίου, διατρυπών τον χέδρωπα και κατευθύνονται στα σπέρματα με τα οποία και τρέφονται (Valiour et al. 2015).

Το γένος *Cydia* Hübner 1825 (LEP.: Tortricidae) περιλαμβάνει 231 είδη και υποείδη και βρίσκεται σε όλο τον κόσμο με εξαίρεση την Ανταρκτική. Προνύμφες πολλών ειδών *Cydia* τρέφονται εντός καρπών, σπόρων και ανθέων, ή κάτω από το φλοιό ή εντός σαρκωδών στελεχών τουλάχιστον από 65 είδη ξενιστών φυτών, συμπεριλαμβανομένων αγγειόσπερμων και κωνοφόρων (Oboyski, 2011). Πολλά είδη *Cydia* είναι οικονομικά επιζήμια για τα γεωργικά και τη δασοκομικά οικοσυστήματα. Για παράδειγμα, το *C. pomonella* L. αποτελεί ένα σημαντικό οικονομικό παράσιτο οπωρώνων μήλων, προκαλώντας συχνά απώλειες της τάξης του 25-50% (Beşleagă et al., 2013). Προνύμφες του *C. fagiglandana* τρέφονται εντός καρπών (κάρυο) και της οξιάς, *Fagus sylvatica* (Leguminosae).



Εικ. 6. Αβγά του εντόμου *C. johanssoni*, που μόλις έχουν αποτεθεί (αριστερά) και μετά από 2 ημέρες με σχηματισμένη περιμετρικά ερυθρά κηλίδα (δεξιά)



Εικ 7. Προνύμφη του εντόμου *C. johanssoni*



Εικ. 8. Νύμφη του εντόμου *C. johanssoni*



Εικ. 9. Ακμαία του εντόμου *C. Johanssoni* (Valipour et al., 2015)

Φυσικός εχθρός του *Cydia johanssoni* αναφέρεται στη βιβλιογραφία το είδος *Bracon variator* με 2 γενεές σε ένα χρόνο, προσβάλλει κυρίως τις προνύμφες *C. johanssoni* τέταρτου και πέμπτου σταδίου (Elzinga, 2005).

Αυτό το εκτοπαρασιτοειδές προσβάλλει προνύμφες τρίτου, τέταρτου και κυρίως πέμπτου σταδίου και σταματά την ανάπτυξή τους στον ξενιστή προκαλώντας παράλυση. Ο *Bracon variator* είναι ένα ευρέως διαδεδομένο είδος σε χώρες όπως η Κίνα, Μέση Ασία, Μογγολία, Σιβηρία, Ρωσία, Κριμαία, Ιράν, Ρουμανία, Ουγγαρία, Φινλανδία, Σουηδία, Ιταλία, Βέλγιο, Πολωνία, Αυστρία, Γερμανία, Γαλλία, Αγγλία, Τουρκία (Guler and Cagatay, 2001).



Εικ.10 Αβγά *B. variator* σε προνύμφες *Cydia johanssoni* (επάνω) και ακμαίο *B. variator* (κάτω)

- ***Aropestes spectrum***

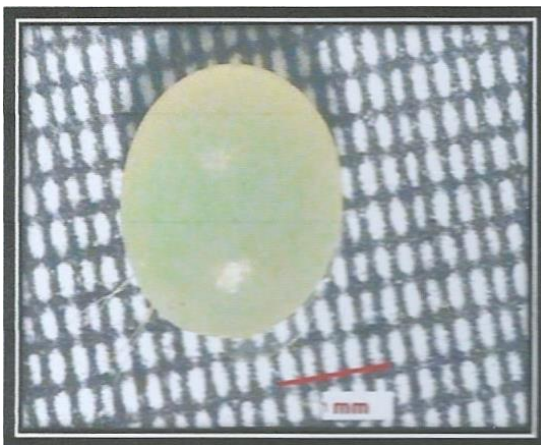
Οι Afrouzian *et al.*, 2007, ανέφεραν προσβολές οφειλόμενων στο *Aropestes spectrum* στο θάμνο *Ammodendron persicum* (Leguminosae) για πρώτη φορά στην επαρχία του Νοτίου Khorasan του Ιράν. Τα είδη *Genista pilosa*, *Cytisus scorpius* και *Spartium junceum* της οικογένειας Leguminosae έχουν αναφερθεί ως ξενιστές του επιζήμιου αυτού του εντόμου. Το εν λόγω έντομο συναντάται στην Ανατολική Ασία, την Ινδία, το Τουρκμενιστάν και το Τατζικιστάν (Afrouzian *et al.*, 2007).

Διατροφή και ζημιές-επιπτώσεις: Κατά την εκκόλαψη, οι προνύμφες κινούνται στα φύλλα του ξενιστή από τα οποία και εκτρέφονται. Οι προνύμφες τρέφονται πρώτα από την επιδερμίδα των φύλλων, αλλά από το δεύτερο στάδιο τρέφονται από ολόκληρο το φύλλο. Περισσότερο επιζήμιες ήταν οι προνύμφες του 4ου και 5ου σταδίου, λόγω του ότι διαθέτουν ισχυρότερους γνάθους. Οι προνύμφες των τελευταίων σταδίων τρέφονται από όλο το φύλλο συμπεριλαμβανομένων και των νευρώσεων.

Το είδος *A. spectrum* έχει μια γενιά το χρόνο. Η περίοδο πτήση του είναι οι μήνες Απρίλιος-Ιούνιος (Kravchenko *et al.*, 2004).

Ορισμένα είδη πουλιών είναι αρπακτικά των προνυμφών και διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στη μείωση του πληθυσμού του *Aropestes spectrum*.

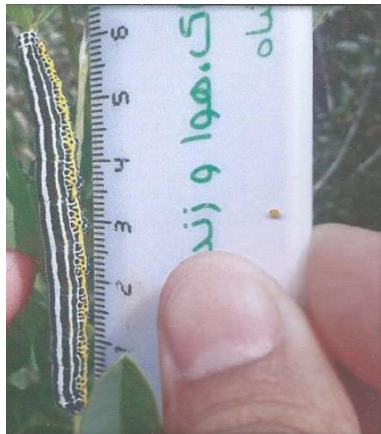
Για την παγίδευση του εντόμου πραγματοποιείται χρήση φωτεινών παγίδων (Kazemi, 2014).



Εικ.11 Αβγά του είδους *A. Spectrum*



Εικ.12. Πρώτο υποστάδιο του *A. Spectrum* με κέλυφος αβγού



Εικ.13. Τελευταίο υποστάδιο του *A. Spectrum*



Εικ.14 - Προνύμφη *A. Spectrum*



Εικόνα 15- Νύμφη (Pupa) (δεξιά) και βομβύκιο (νυμφική κυλινδρική θήκη) (αριστερά) του *A. Spectrum*.



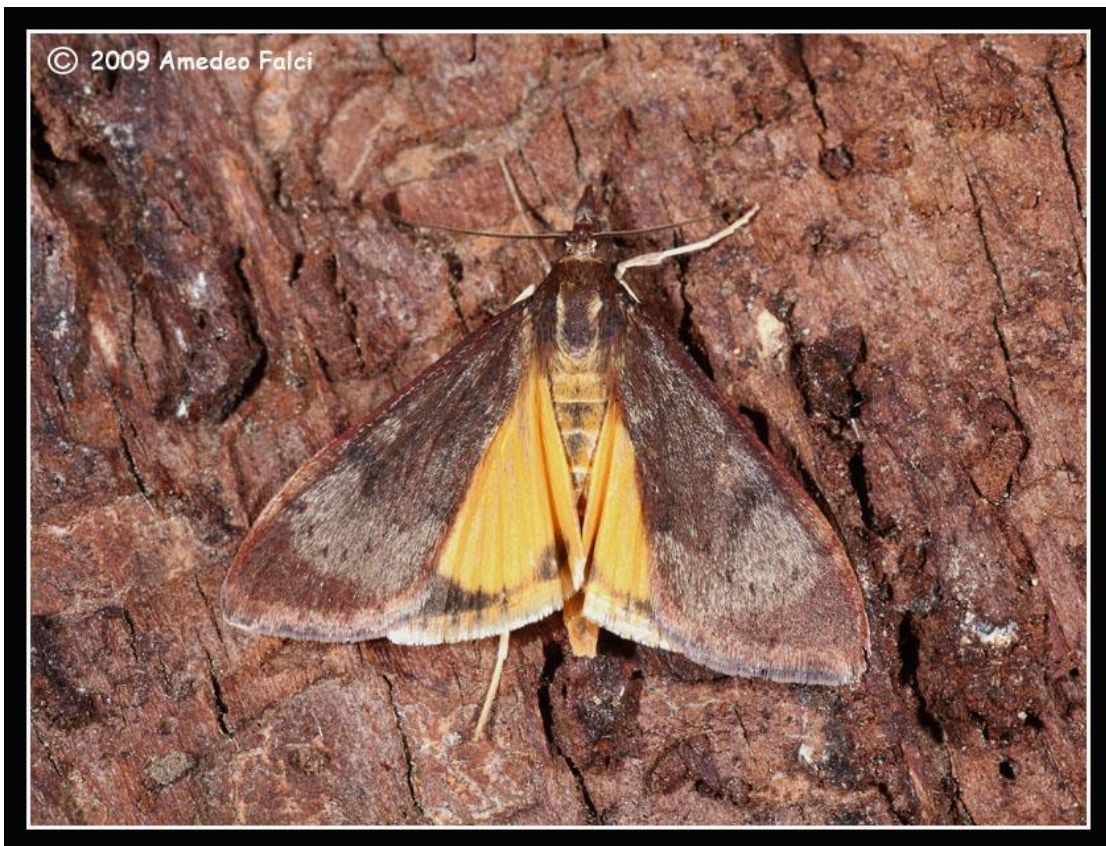
Εικ.16 Ακμαίο *A. Spectrum* (Egbert Friedrich, 1999) (http://www.lepiforum.de/lepiwiki_vgl.pl?Apopestes_Spectrum)

- ***Uresiphita limbalis***

Το είδος *Uresiphita limbalis* Denis & Schiffermüller (Lepidoptera: Pyralidae) προσβάλλει είδη της οικογένειας Leguminosae, το *Retama raetam*, το *Spartium junceum*, το *Cytisus canariensis* και το *Anagyris foetida*. Υπό βέλτιστες συνθήκες θερμοκρασίας (24-28 ° C) και τροφής, οι μέσες διάρκειες της επώασης των αυγών, του προνυμφικού σταδίου, προπλαγγών (prepupal) και νυμφικού σταδίου είναι 3,5, 18, 2 και 8 ημέρες αντίστοιχα (Halperin and Wysoki, 2013).



Εικ.17



Εικ.18

1.1.4.2 Μύκητες-Βακτήρια

Δεν βρέθηκαν λοιπές επιστημονικές αναφορές σχετικά με λοιπές μυκητολογικές ή βακτηριακές προσβολές του είδους *Anagyris foetida* με εξαίρεση τα κάτωθι στοιχεία:

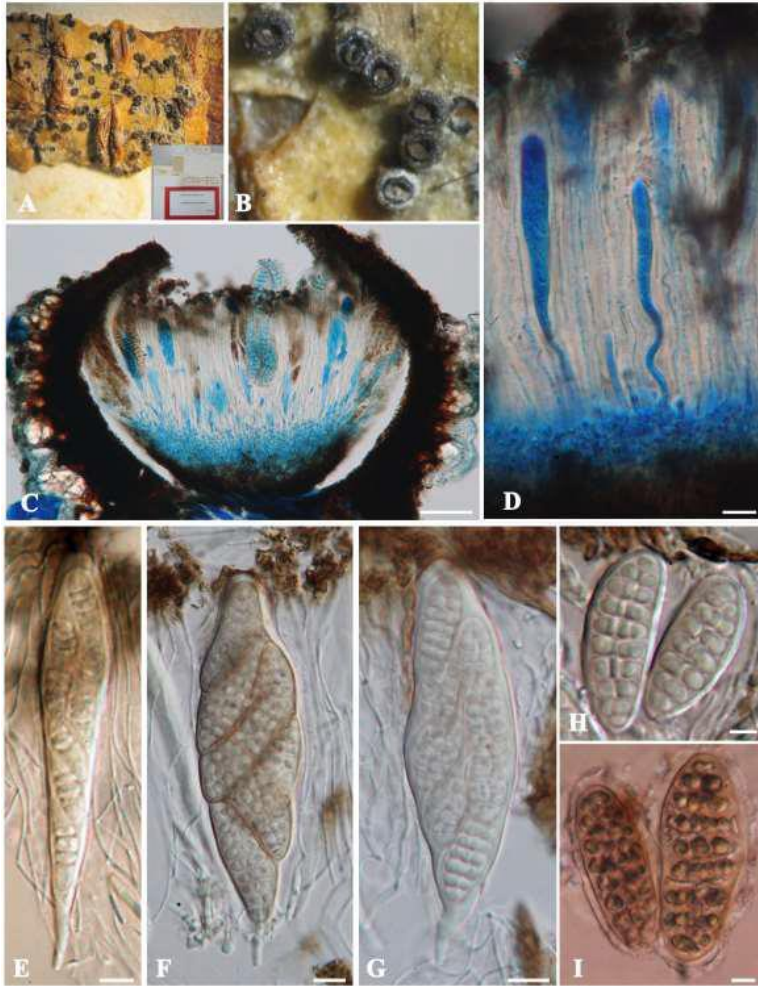
- ***Tryblidaria breutelii***

Ο μύκητας *Tryblidaria breutelii* προσβάλλει το είδος *Anagyris foetida* ως σαπρόβιο στο φλοιό του *A.foetida* L. σε χερσαία ενδιαιτήματα. (Yacharoen *et al.*, 2015).

Συστηματική Ταξινόμηση

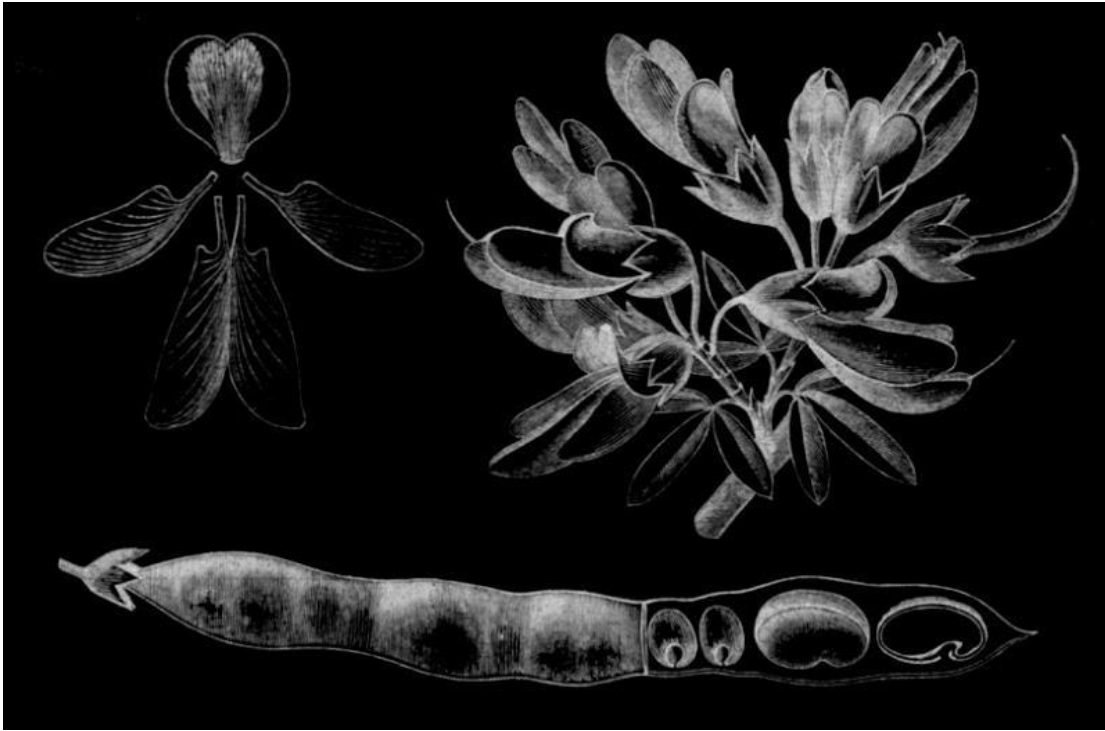
Βασίλειο:	<i>Fungi</i>
Συνομοταξία:	<i>Ascomycota</i>
Υποσυνομοταξία:	Pezizomycotina
Ομοταξία:	<i>Dothideomycetes</i>
Υποκλάση:	<i>Incertae sedis</i>
Κλάση:	<i>Patellariales</i> Hawksw and Erikss, 1986
Οικογένεια:	<i>Patellariaceae</i> Corda (1838) ^[2]
Γένος	<i>Tryblidaria</i>

Πίνακας 3. Crous *et al.*, 2014; Clements and Shear , 1931



Εικ. 19 - *Tryblidaria breutelii* (S: F61102, ολότυπος). (A) Φωτογραφία φυτικού δείγματος. (B) Μαύρο αποθήκιο στον ιστό του ξενιστή. (Γ) Κάθετη τομή αποθηκίου. (D) Pseudoparaphyses σε αντιδραστήριο Cotton blue. (E) Νέοι ασκοί. (F-G) Ωριμοί ασκοί με 8-σπόρια. (H) Muriform Ασκοσπόρια. (I) Ασκοσπόρια με θήκη σε βάμμα σινικής μελάνης. Γραφική κλίμακα: C = 50 μm, D-G = 10 μm, H-I = 5 μm.

(Το Cotton blue είναι μια σκούρα μπλε χρωστική ουσία σε μορφή σκόνης, αλλά στη μικροσκοπία χρησιμοποιείται διαλυμένη σε γαλακτικό οξύ (άρα σε υγρή μορφή) ή σε λακτοφαινόλη, για να χρωματίσει το περιεχόμενο ορισμένων τύπων υφών, για την παρατήρηση συγκεκριμένων τύπων κυστιδίων (γλοιοκυστιδίων), για να εμφανίσει τον σποριακό διάκοσμο ορισμένων γενών (*Ramaria pp.* (=pro parte =εν μέρει), *Laccaria*) και για τον καθορισμό της κυανοφιλίας των σπορίων και των υφών διαφόρων γενών. Διατηρείται περ. 2 χρόνια ή περισσότερο).



1.2 Η ιστοκαλλιέργεια

Η ιστοκαλλιέργεια (tissue culture) είναι ένα σύνολο τεχνικών με τις οποίες κύτταρα, μικρά τεμάχια ιστών ή όργανα, που έχουν αποσπαστεί από το μητρικό φυτό, καλλιεργούνται ασηπτικά σε θρεπτικό υπόστρωμα. Η καλλιέργεια που γίνεται σε δοκιμαστικούς σωλήνες, γυάλινα βάζα ή κωνικές φιάλες, είναι γνωστή και ως καλλιέργεια *in vitro*. Το προς καλλιέργεια *in vitro* φυτικό τμήμα, ανεξάρτητα από την προέλευση του, ονομάζεται έκφυτο (explant). Ως έκφυτα χρησιμοποιούνται οποιαδήποτε φυτικά τμήματα, που έχουν την δυνατότητα να αναπαράγουν το αρχικό φυτό. Αυτά μπορεί να είναι τα επάκρια μεριστώματα, τα πλευρικά μεριστώματα (βλαστών και ριζών), μασχαλιαίοι οφθαλμοί, οι κορυφές των βλαστών, το γόνατα των βλαστών, τα έμβρυα των σπερμάτων, καθώς και τμήματα νεαρών φύλλων, κοτυληδόνων, υποκοτύλιου και ριζών. Η ιστοκαλλιέργεια χρησιμοποιείται στη μαζική αναπαραγωγή επιλεγμένων ατόμων και στη γενετική βελτίωση των φυτών. Παρουσιάζει μεγάλες δυνατότητες για βλαστικό πολλαπλασιασμό γεωργικών και δασοπονικών φυτών με οικονομική σημασία, για δημιουργία νέων γενοτυπικών συνδυασμών μεταξύ διαφορετικών ειδών ή ακόμα και γενών, για διατήρηση γενετικού υλικού, για εξυγίανση προσβεβλημένων φυτών από ασθένειες και ιώσεις κ.λ.π. Έτσι, μπορεί να ειπωθεί ότι η ιστοκαλλιέργεια αποτελεί ένα σύστημα «μοντέλο» που επιτρέπει τη μελέτη θεμάτων φυσιολογίας, ανατομίας, βιοχημείας και γενετικής βελτίωσης φυτών (Σκαλτσογιάννης, 1990).

1.2.1 Ιστορική αναδρομή και βασικές αρχές ιστοκαλλιέργειας

Η πρώτη προσπάθεια καλλιέργειας φυτικών ιστών έγινε από τον Γερμανό φυσιολόγο Haberlandt, το 1902, ο οποίος δεν κατόρθωσε να καλλιεργήσει κύτταρα φύλλου γιατί αφενός δεν μπορούσαν να επιτευχθούν πλήρως ασηπτικές καλλιέργειες και αφετέρου γιατί οι ρυθμιστές ανάπτυξης που είναι υπεύθυνοι για τη διαίρεση, αύξηση και διαφοροποίηση των κυττάρων ήταν άγνωστοι εκείνη την εποχή. Η ανακάλυψη των αυξινών από τον Went, το 1926, καθώς και η επιλογή κατάλληλου φυτικού υλικού και θρεπτικού διαλύματος, οδήγησαν τον White, το 1934, στα πρώτα επιτυχή αποτελέσματα *in vitro* καλλιέργειας

ριζών τομάτας. Το 1939, ο Gautheret ήταν ο πρώτος που κατόρθωσε την έναρξη σχηματισμού κάλου με τη χρήση αυξινών. Η οργανογένεση επιτεύχθηκε πιο εύκολα με την ανακάλυψη των κυτοκινινών από τους Van Overbeek, Conklin και Blakeslee, το 1941. Ακολούθησε η ανακάλυψη από τους Skoog και Miller (1957) του ρόλου των αυξινών και κυτοκινινών στη βλαστογένεση και ριζογένεση, γεγονός που θεμελίωσε τις αρχές του μικροπολλαπλασιασμού (micropropagation). Έκτοτε, οι μέθοδοι ιστοκαλλιέργειας εξελίχθηκαν και βελτιώθηκαν ταχύτατα, και αναπτύχθηκαν εξειδικευμένες τεχνικές μεγάλης σπουδαιότητας, όπως η σωματική εμβρυογένεση, η σύντηξη πρωτοπλαστών, η δημιουργία απλοειδών φυτών από καλλιέργειες γυρεοκόκκων, κ.ά. Στη δεκαετία του 1980, έγινε για πρώτη φορά η επιτυχής εισαγωγή και έκφραση ξένων γονιδίων σε φυτά. Η ιστοκαλλιέργεια βασίζεται σε δύο βασικές αρχές, στην αρχή της ολοδυναμικότητας (totipotency) και στην αρχή της πλαστικότητας (plasticity) των κυττάρων. Η μοναδική ικανότητα του σωματικού φυτικού κυττάρου να αποδιαφοροποιηθεί, να επανεισαχθεί στον κυτταρικό κύκλο και τελικά από την ομάδα των νέων κυττάρων να αναγεννηθεί φυτό, όμοιο με το μητρικό φυτό-δότη, ανεξάρτητα από τον βαθμό διαφοροποίησης στον οποίο βρισκόταν (George, 1993). Αυτή η ικανότητα, συνιστά τη βασική αρχή της ολοδυναμικότητας των κυττάρων, δηλαδή τη δυνατότητα εξέλιξης από ένα κύτταρο σε έναν ολοκληρωμένο νέο οργανισμό. Πρόκειται, δηλαδή για την ικανότητα αναγέννησης ολόκληρου του φυτού, με μια διαδικασία εκτός της εγγενούς αναπαραγωγικής διαδικασίας. Οι χειρισμοί του εκφύτου, η σύνθεση του θρεπτικού υποστρώματος αλλά και οι παράμετροι του περιβάλλοντος καλλιέργειας, μπορούν να προκαλέσουν την αποδιαφοροποίηση και να προσανατολίσουν την συμπεριφορά του προς ποικίλους δρόμους διαφοροποίησης, ανάλογα με τον επιδιωκόμενο σκοπό. Η πλαστικότητα επιτρέπει στα φυτά να προσαρμόζουν τις μεταβολικές και αναπτυξιακές τους διαδικασίες σε σχέση με τις αλλαγές του περιβάλλοντος (stress). Η κυτταρική διαίρεση που μπορεί να προκληθεί σε οποιονδήποτε φυτικό ιστό με στόχο είτε να αναπαράγει τυχόν απώλειες σε ιστούς ή όργανα, είτε να οδηγήσει την ανάπτυξη του φυτού σε διαφορετικά κανάλια διαφοροποίησης σε σχέση πάντα με τα εξωτερικά ερεθίσματα, μπορεί να θεωρηθεί μία τρίτη αρχή, η οποία βασίζεται στον έλεγχο της αρμοδιότητας των κυττάρων (competency). Σύμφωνα με αυτήν τα αδιαφοροποίητα μεριστωματικά κύτταρα αποκτούν την αρμοδιότητα να διαφοροποιηθούν προς μια συγκεκριμένη μορφή (βλαστός, φύλλο, ρίζα, κ.λ.π.) με τη βοήθεια ενός συγκεκριμένου εσωτερικού μηχανισμού. Από τη στιγμή που θα καθοριστεί αυτή η κατεύθυνση διαφοροποίησης η πορεία ανάπτυξης είναι μη αναστρέψιμη (Hartmann et al., 2002).

1.2.2 Βλαστικός πολλαπλασιασμός και μικροπολλαπλασιασμός

Με τον όρο βλαστικό ή αγενή πολλαπλασιασμό εννοούμε την παραγωγή φυταρίων από βλαστικά τμήματα του μητρικού φυτού. Ο μικροπολλαπλασιασμός είναι μια από τις τεχνικές της ιστοκαλλιέργειας, κατά τον οποίο πραγματοποιείται αγενής πολλαπλασιασμός των φυτών, χρησιμοποιώντας μικρά φυτικά τμήματα. Η αξία του μικροπολλαπλασιασμού, έγκειται στην παραγωγή μεγάλου αριθμού φυτών, υγιών και γενετικά όμοιων με το μητρικό. Αποτελεί την πιο ευρεία εφαρμογή της ιστοκαλλιέργειας με πάνω από 500 εκατομμύρια φυτά να παράγονται ετησίως, εκ των οποίων το 90% είναι καλλωπιστικά. Η πιο σημαντική εμπορική τεχνική μικροπολλαπλασιασμού σε μαζική κλίμακα είναι η καλλιέργεια μασχαλαίων οφθαλμών (bud culture). Ως έκφυτα χρησιμοποιούνται

μασχαλιαίοι και επάκριοι οφθαλμοί. Υπάρχουν και άλλα είδη μικροπολλαπλασιασμού, όπως καλλιέργεια του ακραίου μεριστώματος των βλαστών (meristem tip culture), που εφαρμόζεται κυρίως στην εξυγίανση φυτών προσβεβλημένων από ιούς, η σωματική εμβρυογένεση (somatic embryogenesis) με την ανάπτυξη εμβρύων από σωματικά κύτταρα διαφόρων ιστών ή οργάνων του φυτού και η δημιουργία, επίκτητων βλαστών (adventitious shoot induction) είτε άμεσα στο έκφυτο είτε έμμεσα από τον κάλο που σχηματίστηκε από το έκφυτο (Σκαλτσογιάννης, 1990).

1.2.3 Στάδια του μικροπολλαπλασιασμού

Η διαδικασία παραγωγής νέων φυτών με τη μέθοδο του μικροπολλαπλασιασμού περιλαμβάνει διάφορα στάδια ανάλογα με τις επιμέρους διεργασίες. Οι απαιτούμενες συνθήκες θερμοκρασίας, φωτός αλλά και σύστασης θρεπτικού διαλύματος και υποστρώματος διαφοροποιούνται ανάλογα με το στάδιο.

1. Στάδιο εγκατάστασης: Τα έκφυτα μετά τη συλλογή τους απολυμαίνονται και μεταφέρονται σε θρεπτικό υπόστρωμα κάτω από ασηπτικές συνθήκες. Ο σκοπός της απολύμανσης είναι η καλλιέργεια των φυτικών ιστών σε ασηπτικές συνθήκες. Η κύρια πηγή μόλυνσεων στον μικροπολλαπλασιασμό είναι το φυτό-δότης και οι κυριότεροι μικροοργανισμοί που είναι παρόντες είναι μύκητες και βακτήρια. Σε αυτό το στάδιο τα έκφυτα εισέρχονται σε καλλιέργεια *in vitro* με σκοπό να σταθεροποιηθούν στο περιβάλλον αυτό και έπειτα να ξεκινήσει η έκπτυξη μασχαλιαίων οφθαλμών.

2. Στάδιο πολλαπλασιασμού και επιμήκυνσης: Στο στάδιο του πολλαπλασιασμού, εισάγονται στο θρεπτικό υπόστρωμα οι ρυθμιστές αύξησης (κυτοκίνη - αυξίνη), οι συγκεντρώσεις των οποίων καθορίζουν το ρυθμό παραγωγής νέων βλαστών. Οι παραγόμενοι νέοι βλαστοί προέρχονται είτε από την έκπτυξη μασχαλιαίων οφθαλμών ή από τυχαίους οφθαλμούς που εμφανίζονται στο σχηματιζόμενο κάλο στη βάση των εκφύτων. Οι μικροβλαστοί που αναπτύσσονται στις *in vitro* καλλιέργειες παρουσιάζουν έντονες διαφορές με τα φυτά που αναπτύσσονται στο εξωτερικό περιβάλλον. Μερικές από αυτές είναι :

- Οι βλαστοί που αναπτύσσονται σε *in vitro* συνθήκες δεν είναι αυτότροφοι οργανισμοί. Αυτό συμβαίνει διότι η φωτοσύνθεση δεν παρέχει την απαιτούμενη ενέργεια και τα έκφυτα αποκτούν την υπόλοιπη ενέργεια που χρειάζονται από τη σακχαρόζη που προστίθεται στο θρεπτικό υπόστρωμα.

- Τα φύλλα μπορεί να είναι πιο μικρά, πιο επιμηκυμένα στις άκρες τους και γενικά να διαφέρουν μορφολογικά από τα τυπικά του είδους. Η επιμήκυνση των μικροβλαστών επιδιώκεται είτε με την αλλαγή των αναλογιών των ρυθμιστών αύξησης είτε με την προσθήκη γιββεριλλίνης, που συμβάλει στην επιμήκυνση.

3. Στάδιο ριζοβολίας μικροβλαστών: Το στάδιο της ριζοβολίας περιλαμβάνει την πρόκληση της ανάπτυξης ριζών στη βάση των βλαστών και προετοιμάζει τα μικρομοσχεύματα για τη μεταφορά τους από το μη αυτότροφο περιβάλλον της *in vitro* καλλιέργειας στο εξωτερικό περιβάλλον. Η πρόκληση της έκπτυξης τυχαίων ριζών επιτυγχάνεται με διάφορες μεθόδους, όπως η αύξηση της συγκέντρωσης της αυξίνης στο υπόστρωμα, η μείωση της συγκέντρωσης μακροστοιχείων και της σακχαρόζης, η εμβάπτιση σε διαλύματα υψηλής συγκέντρωσης αυξίνης και η ακόλουθη μεταφορά των μικροβλαστών σε υπόστρωμα απαλλαγμένο από ρυθμιστές αύξησης, η παραμονή των καλλιεργειών στο σκοτάδι για λίγες ημέρες ή συνδυασμό των ανωτέρω.

4. Στάδιο εγκλιματισμού ή σκληραγώγησης: Προσαρμογή στις φυσικές συνθήκες του περιβάλλοντος. Τα φυτά που καλλιεργούνται *in vitro* είναι μη αυτότροφα και απαιτείται η παρουσία σακχαρόζης στο θρεπτικό διάλυμα. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη τροποποίηση των μορφολογικών, ανατομικών και μεταβολικών χαρακτηριστικών των φύλλων, βλαστών και ριζών που επηρεάζουν τις βασικές λειτουργικές διεργασίες του φυτού. Επίσης η

μεταφορά των φυταρίων από τις *in vitro* συνθήκες στο φυσικό περιβάλλον προκαλεί μια καταπόνηση που τα καθιστά ανίκανα να ανταπεξέλθουν στις νέες περιβαλλοντικές συνθήκες. Με αποτέλεσμα πολλά φυτά να νεκρώνονται. Προκειμένου να αποφευχθούν οι αρνητικές συνέπειες είναι απαραίτητο τα φυτά να περάσουν από ένα στάδιο προετοιμασίας με σκοπό τη σταδιακή προσαρμογή τους στις νέες συνθήκες περιβάλλοντος, την αύξηση της ανάπτυξης και τη συνακόλουθη μείωση των νεκρώσεων.

1.2.4 Παράγοντες που επηρεάζουν το μικροπολλαπλασιασμό

Οι βασικοί παράγοντες που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά τη συλλογή των εκφύτων είναι: το είδος του οργάνου και το μέρος του φυτού από όπου θα αποκοπεί, η ηλικία, η φυσιολογική κατάσταση και η ποιότητα του φυτού—δότη των εκφύτων και η κατάλληλη εποχή συλλογής τους.

- Η ηλικία του φυτού—δότη είναι σημαντική, διότι από τα νεότερα φυτά προκύπτουν τα πιο ρωμαλέα έκφυτα. Ανάλογα με την εποχή διακρίνεται στα φυτά ένα στάδιο έντονης δραστηριότητας και ένα στάδιο καμψής. Την άνοιξη στα φυτά παρατηρούνται ρυθμιστές αύξησης όπως η αυξίνη, οι κυτοκινίνες και οι γιββερελλίνες, το καλοκαίρι το ποσοστό των ουσιών αυτών μειώνεται και το φθινόπωρο εμφανίζονται αναστολείς αύξησης.

- Μολύνσεις: Εξωτερικά παθογόνα. Εξωτερικά παθογόνα θεωρούνται οι μύκητες, τα βακτήρια, οι ιοί και άλλοι παθογόνοι μικροοργανισμοί, οι σπόροι των οποίων μετακινούνται μέσω των ρευμάτων του αέρα με τη μορφή μικρών σωματιδίων σκόνης. Οι μολύνσεις αυτών είναι επιφανειακές και είναι απαραίτητη η απομάκρυνση τους πριν την εγκατάσταση στην *in vitro* καλλιέργεια. Τα μητρικά φυτά που βρίσκονται σε προστατευμένους χώρους, όπως θερμοκήπια είναι καθαρότερες πηγές εκφύτων από τα φυτά που αναπτύσσονται στο φυσικό περιβάλλον (Hartmann et al., 2002).

- Ενδογενείς μολύνσεις: Σε πολλές περιπτώσεις διάφοροι παθογόνοι μικροοργανισμοί βρίσκονται στο εσωτερικό των ιστών του εκφύτου πριν και κατά τη διάρκεια της καλλιέργειας. Στην αρχή της καλλιέργειας μπορεί να μην είναι ορατοί, με την πάροδο του χρόνου και μετά από διαδοχικές επανακαλλιέργειες, εκδηλώνονται μολύνσεις που οφείλονται συνήθως σε βακτήρια. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα τη σταδιακή αναστολή της αύξησης, τη μείωση της ικανότητας ριζοβολίας και κάποιες φορές επέρχεται νέκρωση των εκφύτων.

- Θρεπτικό υπόστρωμα και οι ρυθμιστές αύξησης: Τα θρεπτικά υποστρώματα, προμηθεύουν τους φυτικούς ιστούς με τα απαραίτητα θρεπτικά στοιχεία για την ανάπτυξή τους. Η επιλογή του κατάλληλου θρεπτικού υποστρώματος και η προσθήκη της ιδανικότερης αναλογίας ρυθμιστών αύξησης έχουν ως αποτέλεσμα την βελτιστοποίηση της καλλιέργειας.

- Περιβαλλοντικοί παράγοντες: Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες όπως η θερμοκρασία, το διοξείδιο του άνθρακα, η ποιότητα, η διάρκεια και η ένταση του φωτός επηρεάζουν τη μορφογένεση των φυτών. Τα φυτά, ανάλογα με το είδος και με το γενότυπο τους, αντιδρούν διαφορετικά στους παράγοντες. Ακόμα, η ανταλλαγή αερίων με το περιβάλλον, η οποία επιτυγχάνεται με τη χρήση ειδικών φίλτρων στα καπάκια των δοχείων, μπορεί να αυξήσει τη φωτοσυνθετική ικανότητα των εκφύτων.

1.2.5 Θρεπτικά μέσα

Το θρεπτικό υπόστρωμα, στο οποίο τοποθετούνται τα έκφυτα, αποτελεί την κυριότερη παράμετρο του μικροπολλαπλασιασμού. Τα θρεπτικά υποστρώματα, προμηθεύουν τους φυτικούς ιστούς με τα απαραίτητα στοιχεία για τη θρέψη και την ανάπτυξή τους. Τα στοιχεία αυτά μπορούν να κατηγοριοποιηθούν ως εξής:

- Τα βασικά συστατικά, τα οποία προσλαμβάνουν τα φυτά με τη μορφή μεταλλικών ιόντων από τα ανόργανα άλατα που προστίθενται στο θρεπτικό μέσο. Στην κατηγορία αυτή υπάγονται τα μακροστοιχεία, τα ιχνοστοιχεία και η πηγή σιδήρου (Fe) για το θρεπτικό υπόστρωμα.

- Τα οργανικά συστατικά, όπως οι βιταμίνες και τα αμινοξέα.

- Η σακχαρόζη, μια πηγή άνθρακα σε οργανική μορφή, απαραίτητη για τη λειτουργία της φωτοσύνθεσης.

α) Μακροστοιχεία και ιχνοστοιχεία: Ένα θρεπτικό υπόστρωμα αποτελείται από μακροστοιχεία, που χρησιμοποιούνται συνήθως σε μεγαλύτερες ποσότητες και είναι ο φώσφορος (P), το κάλιο (K), το ασβέστιο (Ca), το θείο (S), το άζωτο (N) και το μαγνήσιο (Mg). Τα μακροστοιχεία είναι απαραίτητα για το φυτικό κύτταρο και την ανάπτυξη του ιστού. Τα ιχνοστοιχεία, που χρησιμοποιούνται σε μικρότερες ποσότητες και είναι ο σίδηρος (Fe), το μαγγάνιο (Mn), ο ψευδάργυρος (Zn), το βόριο (B), ο χαλκός (Cu) και το μολυβδαίνιο (Mo). Τα ιχνοστοιχεία παρεμβαίνουν στις μεταβολικές διεργασίες των φυτών και είναι υπεύθυνα για βασικές λειτουργίες των φυτικών οργανισμών. Τα μακροστοιχεία και τα ιχνοστοιχεία προστίθενται στο θρεπτικό διάλυμα με τη μορφή ανόργανων αλάτων. Οι συγκεντρώσεις των θρεπτικών στοιχείων προσφέρονται στα υψηλά, δυνατά επίπεδα χωρίς να προκληθούν συμπτώματα τοξικότητας ή καταπόνηση αλατότητας. Η μείωση της συγκέντρωσης των ανόργανων αλάτων μπορεί να επιφέρει αύξηση του ποσοστού της ριζοβολίας και βελτίωση της ποιότητας του ριζικού συστήματος.

β) Βιταμίνες και αμινοξέα: Οι βιταμίνες, οι οποίες ασκούν ευεργετική επίδραση στην καλλιέργεια, βελτιώνοντας την ανάπτυξη και την επιβίωση των φυτικών ιστών και χρησιμοποιούνται από τα φυτικά κύτταρα ως βασικοί μεταβολικοί καταλύτες. Οι κυριότερες είναι η μυοϊνοσιτόλη (myo-inositol), η θειαμίνη (thiamine), το νικοτινικό οξύ (nicotinic acid), η πυριδοξίνη (pyridoxine-HCL) και η γλυκίνη (glycine).

γ) Ρυθμιστές αύξησης: Οι ρυθμιστές αύξησης, είναι οργανικές ενώσεις που ρυθμίζουν τις φυσιολογικές διεργασίες των φυτών, κατευθύνουν την ανάπτυξη των οργάνων και ελέγχουν την ανάπτυξη ολόκληρου του φυτού. Οι σπουδαιότερες ενώσεις είναι οι αυξίνες (IBA, IAA), διότι συμβάλλουν στην έναρξη της ριζοβολίας και στο σχηματισμό πλάγιων και επιγενών ριζών, ενώ σε υψηλές συγκεντρώσεις προωθούν τον σχηματισμό κάλλου. Οι κυτοκινίνες (BAP), που χρησιμοποιούνται για τη διέγερση πλάγιων οφθαλμών, τη διαίρεση των κυττάρων και την ανάπτυξη βλαστών και οι γιββεριλλίνες (GA3), που διεγείρουν την κανονική εξέλιξη των φυταρίων που προέρχονται από σωματικά έμβρυα παραγόμενα *in vitro*, προκαλούν την επιμήκυνση των μεσογονατίων διαστημάτων και την αύξηση των ακραίων οφθαλμών μετά την αποκοπή τους. Οι κυτοκινίνες χρησιμοποιούνται λόγω της δραστηριότητάς τους να προωθούν την έκπτυξη πολλαπλών βλαστών. Η αύξηση της συγκέντρωσής τους προκαλεί την διακοπή της κυριαρχίας της κορυφής και προάγει την εκβλάστηση πολλών πλευρικών οφθαλμών. Η αναλογία των ρυθμιστών αύξησης ελέγχει την έκφραση χαρακτήρων και χαρακτηρίζει κάθε φάση του μικροπολλαπλασιασμού. Κατά τον πολλαπλασιασμό, αύξηση των μικροβλαστών, η ποσότητα της κυτοκινίνης κυμαίνεται σε μεγαλύτερα επίπεδα της αυξίνης. Με την αλλαγή της αναλογίας, μεγάλη συγκέντρωση αυξίνης και μικρή έως μηδενική κυτοκινίνης επιτυγχάνεται η αναστολή βλαστογένεσης και η ενίσχυση της ριζογένεσης.

δ) Πηγή άνθρακα: Τα σάκχαρα, αποτελούν πηγή άνθρακα, ενέργειας και έμμεσα ρυθμίζουν την οσμωτική πίεση στο υπόστρωμα. Οι πράσινοι ιστοί φωτοσυνθέτουν πολύ λίγο εξαιτίας της μειωμένης διαθεσιμότητας CO₂ και συνεπώς δεν είναι σε θέση να

παράγουν υδατάνθρακες που είναι απαραίτητοι για την παραγωγή ενέργειας. Τα πιο διαδεδομένα σάκχαρα είναι η σακχαρόζη, η γλυκόζη, η μαλτόζη και η ραφινόζη.

ε) Στεροποιητικός παράγοντας: Το άγαρ είναι ένα αδρανές υλικό, προϊόν κυτταρικών τοιχωμάτων φυκιών, που στερεοποιείται στους 45°C. Προσοχή χρειάζεται στη χρήση του άγαρ, γιατί μπορεί να τροποποιήσει τη σύνθεση του θρεπτικού διαλύματος (Barbas et al., 1993). Το θρεπτικό υπόστρωμα μπορεί να είναι υγρό για καλλιέργειες αιωρημάτων κυττάρων ή στερεό για εγκατάσταση εκφύτων, για καλλιέργεια κάλων ή φυτικών οργάνων.

1.2.6 Πλεονεκτήματα του μικροπολλαπλασιασμού

Ο μικροπολλαπλασιασμός, σύμφωνα με τον Σκαλτσογιάννη (1990), παρουσιάζει πληθώρα πλεονεκτημάτων σε σχέση με τις κλασσικές μεθόδους πολλαπλασιασμού φυταρίων. Αναφέρονται παρακάτω :

- Παρέχει τη δυνατότητα ελέγχου των χημικών και φυσικών παραγόντων του περιβάλλοντος.
- Δίνεται η δυνατότητα πολλαπλασιασμού σε είδη, που με άλλους τρόπους ήταν δύσκολος, ακόμα και αδύνατος.
- Παρέχει τη δυνατότητα παραγωγής όλο το έτος.
- Προσφέρει μαζική παραγωγή φυτών απαλλαγμένα από παθογόνους μικροοργανισμούς και δυσμενείς επιγενετικές επιδράσεις (κυκλόφυση, τοπόφυση).
- Δημιουργία προϋποθέσεων ανανέωσης ώριμων ιστών.
- Δυνατότητα διατήρησης του αναπαραγόμενου φυτικού υλικού στο ψυγείο για αρκετό χρονικό διάστημα.
- Απλοποίηση μετακίνησης και ανταλλαγής φυτικού υλικού μεταξύ ερευνητικών ιδρυμάτων διαφορετικών χωρών.
- Δυνατότητα άμεσης και οικονομικής ίδρυσης φυτειών με βελτιωμένο υλικό σε φυτικά είδη που μπορούν να αναπαραχθούν κλωνικά σε μαζική ή σε περιορισμένη κλίμακα.
- Παραγωγή μεγάλου αριθμού φυτών σε ελάχιστο χώρο.
- Αποτελεί τεχνική υπερπήδησης του ασυμβίβαστου στις διασταυρώσεις μεταξύ των ειδών, με το σωματικό υβριδισμό.
- Δυνατότητα συγκέντρωσης γενετικού υλικού σ' ένα ορισμένο τόπο, για την εφαρμογή προγραμμάτων βελτίωσης για την ίδρυση σποροπαραγωγών κήπων, για τη δημιουργία τράπεζας γονιδίων ή κέντρων προστασίας των γενετικών πόρων ενός είδους.
- Δυνατότητα αξιολόγησης γενοτύπων και της αλληλεπίδρασης τους με το περιβάλλον.
- Δημιουργεί προϋποθέσεις υπολογισμού γενετικών παραμέτρων
- Εξασφάλιση της αναπαραγωγής φαινοτύπων προσαρμοσμένων σε ιδιαίτερα περιβάλλοντα, όπως αρκετά εξειδικευμένων κλώνων και κλώνων με ευρεία προσαρμοστικότητα.
- Εξασφάλιση ομοιομορφίας υλικού στον τομέα της βελτίωσης καλλωπιστικών δέντρων και θάμνων.
- Δυνατότητα βασικής έρευνας στη γενετική βιοχημεία, ανατομία, φυσιολογία και παθολογία με τον προσδιορισμό της σχέσης ανθεκτικότητα και περιβάλλον, ανθεκτικότητα και ταχύτητα αύξησης.

1.2.7 Μειονεκτήματα του μικροπολλαπλασιασμού

Ο μικροπολλαπλασιασμός δεν είναι πάντα το ιδανικότερο μέσο για την παραγωγή φυτών, υπάρχουν προϋποθέσεις που περιορίζουν τη χρήση του:

- Απαιτούνται εξειδικευμένες εγκαταστάσεις και προσωπικό για την επιτυχία της μεθόδου.
- Το κόστος παραγωγής είναι αρκετά υψηλό εξαιτίας του εξειδικευμένου εξοπλισμού.
- Τα φυτά που αναπτύσσονται σε συνθήκες ιστοκαλλιέργειας δεν είναι αυτότροφα, με αποτέλεσμα να απαιτείται εγκλιματισμός.
- Σε περίπτωση μόλυνσης μπορεί να προκληθούν τεράστιες απώλειες φυτικού υλικού.
- Μερικά φυτά είναι πολύ δύσκολο να απολυμανθούν πλήρως από τους μικροοργανισμούς χωρίς να προκληθεί η νέκρωση του φυτού.



2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ *IN VITRO* ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

2.1 Φυτικό υλικό

Ως φυτικό υλικό χρησιμοποιήθηκαν σπόροι (Εικ. 4) από επιλεγμένα ενήλικα, αυτοφυή φυτά και σπορόφυτα ανεπτυγμένα *in vitro*. Τα αυτοφυή φυτά, ήταν αντιπροσωπευτικά του είδους *A. foetida*, περίπου της ίδιας ανάπτυξης και ηλικίας, και φύοταν σε μικρούς πλυθυσμούς εντός του Καρέα, στο Όρος Υμηττού, Ν. Αττικής.

2.2 Υποστρώματα *in vitro* καλλιέργειας

2.2.1 Υλικά

Τα διάφορα θρεπτικά υποστρώματα στα οποία τοποθετήθηκαν τα έκφυτα περιείχαν τα ακόλουθα συστατικά:

α) Υπόστρωμα MS (Murashige and Skoog medium (Murashige and Skoog, 1962) της εταιρείας Duchefa-Biochem) σε μορφή σκόνης (Πίν. 4).

β) Σακχαρόζη (του εμπορίου-Sucrose).

γ) Αυξίνες:

- Ναφθυλ-οξικό οξύ (NAA, 1-Naphthaleneacetic acid), MB=186, της εταιρείας Sigma-Aldrich.
- Ινδολλ-3-βουτυρικό οξύ (IBA), MB= 230,24, της εταιρείας Sigma-Aldrich.
- Ινδολλο-3-οξικό οξύ (IAA, Indole-3-acetic acid), MB=175,18, της εταιρείας Sigma-Aldrich.

δ) Κυτοκινίνες:

- Βενζυλαδενίνη (BA, N6-benzyladenine), MB= 225,26, της εταιρείας Sigma-Aldrich.
- Ζεατίνη (ZEAT, trans-zeatin), MB= 219,24, της εταιρείας Sigma-Aldrich.
- Κινετίνη (KIN, kinetin), MB= 215,21, της εταιρείας Sigma-Aldrich.
- 2iP (6-(γ,γ-Dimethylallylamino)purine), MB=203,24, της εταιρείας Sigma-Aldrich.

ε) Άγαρ (Ρουμπουλάκης Α.Ε. Χημικά).

στ) Ενεργός Άνθρακας (activated charcoal, Sigma cell culture, SIGMA CHEMICAL CO)

2.2.2 Μέθοδος παρασκευής υποστρωμάτων

Σε δοχείο ζέσεως με αποσταγμένο νερό (όγκου λιγότερου του τελικού) πραγματοποιείται προσθήκη πλήρους θρεπτικού υποστρώματος Murashige and Skoog (MS) $4,4 \text{ g l}^{-1}$, καθώς και σακχαρόζης 30 g l^{-1} και των επιθυμητών κάθε φορά φυτορρυθμιστικών ουσιών, από τα stock διαλύματα αυτών και αναδεύονται σε μαγνητικό αναδευτήρα μέχρι να διαλυθούν πλήρως. Στη συνέχεια γινόταν ογκομέτρηση και προσθήκη αποσταγμένου νερού, μέχρι τον επιθυμητό όγκο και ακολουθούσε ρύθμιση του pH στην τιμή 5,6-5,7 της κλίμακας με τη βοήθεια διαλυμάτων 0,1 ή 1 N NaOH και 0,1 ή 1 N HCl. Ακολούθως προστίθετο άγαρ στην απαιτούμενη ποσότητα (8 g l^{-1}) και ακολουθούσε θέρμανση του διαλύματος, υπό συνεχή ανάδευση μέχρι να διαλυθεί πλήρως και ομοιόμορφα το άγαρ. Στην καλλιέργεια των σπόρων καθώς και στη παρασκευή υποστρωμάτων ριζοβολίας χρησιμοποιήθηκε υποδιπλασιασμένη δύναμη θρεπτικού υποστρώματος MS.

Πίν. 4. Συστατικά (μακροστοιχεία - ιχνοστοιχεία - βιταμίνες) των υποστρωμάτων MS (Murashige & Skoog, 1962).

Συστατικά MS	(mg/l)
NH ₄ NO ₃	1.650
CaCl ₂ 2 H ₂ O	332,2
MgSO ₄ 7H ₂ O	370
KNO ₃	1.900
KH ₂ PO ₄	170
H ₃ BO ₃	6.2
CoCl ₂ 6H ₂ O	0.025
CuSO ₄ 5H ₂ O	0.025
Na ₂ EDTA	37,3
FeSO ₄ 7H ₂ O	27,8
MnSO ₄ H ₂ O	1.69
KI	0.83
Na ₂ MoO ₄ 2H ₂ O	0.25
ZnSO ₄ 7H ₂ O	8,6
Myo-inositol	100
Glycine	2.0
Nicotinic acid	0.5
Pyridoxine HCl	0.5
Thiamine HCl	0.1

Η καλλιέργεια των σπόρων γινόταν σε γυάλινα δοχεία όγκου 100 ml με 25 ml υποστρώματος ανά δοχείο. Είχε προηγηθεί αποστείρωση μετά την τοποθέτηση του θρεπτικού υποστρώματος στα γυάλινα δοχεία και κάλυψή τους με φύλλο αλουμινίου σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης. Στο στάδιο των υποκαλλιιεργειών και των ριζοβολιών χρησιμοποιήθηκαν ως δοχεία καλλιέργειας γυάλινα δοχεία όγκου 100 ml και 180 ml, τα οποία περιείχαν 25 ml και 35 ml υπόστρωμα το κάθε ένα αντίστοιχα. Στη συνέχεια τα δοχεία καλύπτονταν με φύλλο αλουμινίου και τοποθετούνταν σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης.

2.2.3 Παρασκευή διαλυμάτων φυτορρυθμιστικών ουσιών

Τα stock διαλύματα των φυτορρυθμιστικών ουσιών περιείχαν την κάθε φυτορρυθμιστική ουσία σε ποσοστό 10 % κ.β.

1. Παρασκευή “stock” διαλύματος NAA. Σε δοχείο ζέσεως των 100 ml, τοποθετούνταν 10 mg NAA, τα οποία διαλύονταν με ανάδευση σε 2-3 σταγόνες καθαρής αιθανόλης (99,9 %). Στη συνέχεια προσθέτονταν 100 ml αποσταγμένου νερού.

2. Παρασκευή “stock” διαλύματος IBA. Σε δοχείο ζέσεως των 100 ml τοποθετούνταν 10 mg IBA, τα οποία διαλύονταν με ανάδευση σε 2-3 σταγόνες καθαρής αιθανόλης (99,9 %). Στη συνέχεια προστίθεντο 100 ml αποσταγμένου νερού.

3. Παρασκευή “stock” διαλύματος IAA. Σε δοχείο ζέσεως των 100 ml τοποθετούνταν 10 mg IAA, τα οποία διαλύονταν με ανάδευση σε 2-3 σταγόνες καθαρής αιθανόλης (99,9 %). Στη συνέχεια προστίθεντο 100 ml αποσταγμένου νερού.

4. Παρασκευή “stock” διαλύματος BA. Σε δοχείο ζέσεως των 100 ml τοποθετούνταν 10 mg BA, τα οποία διαλύονταν με ανάδευση σε 2-3 σταγόνες 1N καυστικού νατρίου (NaOH). Στη συνέχεια προσθέτονταν 100 ml θερμού (με βραστό νερό κρυστάλλωνε η ουσία) αποσταγμένου νερού.

5. Παρασκευή “stock” διαλύματος ZEAT. Σε δοχείο ζέσεως των 100 ml τοποθετούνταν 10 mg ZEAT, τα οποία διαλύονταν με ανάδευση σε 2-3 σταγόνες 1N καυστικού νατρίου (NaOH). Στη συνέχεια προσθέτονταν 100 ml αποσταγμένου νερού.

6. Παρασκευή “stock” διαλύματος KIN. Σε δοχείο ζέσεως των 100 ml τοποθετούνταν 10 mg KIN, τα οποία διαλύονταν με ανάδευση σε 2-3 σταγόνες 1N καυστικού νατρίου (NaOH). Στη συνέχεια προστίθεντο 100 ml ζεστού (με βραστό νερό κρυστάλλωνε) αποσταγμένου νερού.

7. Παρασκευή “stock” διαλύματος 2IP. Σε δοχείο ζέσεως των 100 ml τοποθετούνταν 10 mg 2IP, τα οποία διαλύονταν με ανάδευση σε 2-3 σταγόνες 1N καυστικού νατρίου (NaOH). Στη συνέχεια προστίθεντο 100 ml ζεστού (με βραστό νερό κρυστάλλωνε) αποσταγμένου νερού.

Όλα τα “stock” διαλύματα των ορμονών αποθηκεύονταν σε οικιακό ψυγείο, στους 4 °C, για 30-40 ημέρες.



2.3 Μέθοδοι αποστείρωσης, απολύμανσης και εγκατάστασης σπόρων και εκφύτων

2.3.1 Αποστείρωση εργαλείων και υλικών

Τα δοχεία καλλιέργειας με τα υποστρώματα, αλλά και όλα τα υλικά και τα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν, όπως λαβίδες, νυστέρια, πλακάκια πάνω στα οποία γίνονταν οι κοπές, φιάλες και δοχεία με νερό για την απολύμανση των σπόρων, αποστειρώνονταν σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης (αυτόκλειστο) επί 20 min, σε θερμοκρασία 121 °C, υπό πίεση 1,1 atm, ή σε χύτρα υγρής αποστείρωσης επί 15 min, σε θερμοκρασία 125 °C, υπό πίεση 1,1 atm. Μολυσμένα δοχεία καλλιέργειας πριν ανοιχτούν και πλυθούν αποστειρώνονταν για 40 min, σε θερμοκρασία 121 °C και σε πίεση 1,1 atm.

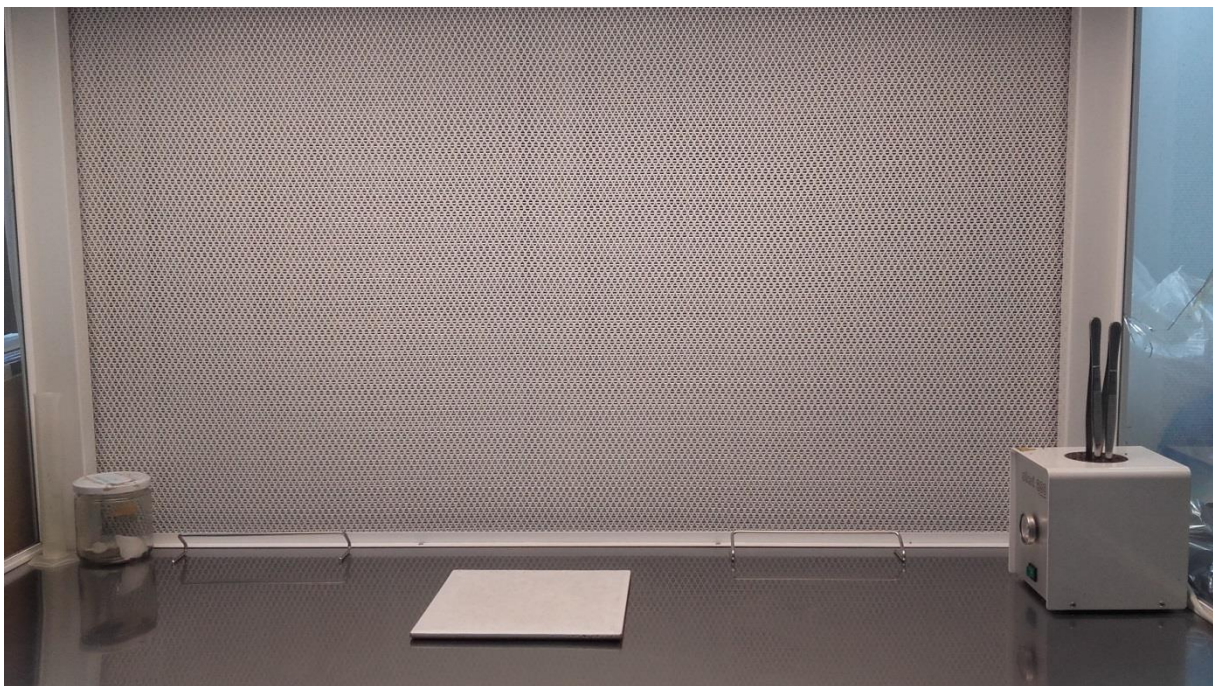
2.3.2 Απολύμανση - εγκατάσταση - επώαση σπόρων

Οι σπόροι του είδους *A. foetida* μετά το στάδιο της συλλογής και, αποθήκευσής τους σε χάρτινες σακούλες σε συνθήκες δωματίου (T=21 °C, σκοτάδι) του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής τοπίου, υπεβλήθησαν κατά ένα αριθμό σε σκαριφισμό ή εμβάπτιση σε π. H₂SO₄ ή και συνδιασμό των παραπάνω και στη συνέχεια πρωτού τοποθετηθούν στο υπόστρωμα καλλιέργειας δέχτηκαν απολύμανση. Η απολύμανση πραγματοποιήθηκε επιφανειακά με υδατικό διάλυμα 20% χλωρίνης εμπορίου (4,6% w/v NaClO) σε 3 κωνικές φιάλες των 250 ml έκαστη με αποσταγμένο, αποστειρωμένο νερό και 0,1% Tween-20 (προσκολλητική ουσία, Polyoxyethylene (20) sorbitan Monolaurate, MERCK). Ακολούθησε συνεχής ανάδευση για χρονικό διάστημα 10 min και μετά το πέρας των 10 min εφαρμόστηκαν τέσσερα τρίλεπτα ξεπλύματα με αποσταγμένο και αποστειρωμένο νερό υπό συνεχή ανάδευση. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν για βλάστηση σε γυάλινα δοχεία των 100 ml με θρεπτικό υπόστρωμα αλάτων MS (Murashige and Skoog, 1962) μισής δύναμης σε θερμοκρασία των 20 °C και 16 h φωτοπερίοδο υπό 37,5 μmol m⁻² fluorescent φως. Όλες οι παραπάνω μεταχειρίσεις πραγματοποιήθηκαν υπό ασηπτικές συνθήκες στην τράπεζα Νηματικής Ροής (Laminar flow cabinet) του Εργαστηρίου.



2.4 Έκφυτα- χειρισμοί εκφύτων

Σε τράπεζα νηματικής ροής (Laminar flow cabinet), πάνω σε αποστειρωμένο πλακάκι, που τακτικά απολυμαινόταν με υδατικό διάλυμα αιθανόλης 80%, και με τη χρήση αποστειρωμένου νυστεριού, βλαστοί που είχαν σχηματιστεί *in vitro* τεμαχίζονταν σε έκφυτα κόμβων μήκους 5-6 mm, τα οποία περιλάμβαναν 1-2 οφθαλμούς (αφαιρούνταν επίσης τα φύλλα που είχαν σχηματιστεί). Τα έκφυτα κόμβων τοποθετούνταν σε δοχεία καλλιέργειας με το ανάλογο θρεπτικό υπόστρωμα, κατακόρυφα, τρία έκφυτα ανά δοχείο όγκου 100 ml και πιέζονταν ελαφρά ώστε να βυθιστούν λίγα χιλιοστά. Τα δοχεία καλλιέργειας καλύπτονταν με μεμβράνη sanitas (πλαστική μεμβράνη περιτυλίγματος με το εμπορικό όνομα sanitas της εταιρείας Σαράντης Α.Ε., η οποία είχε τις εξής ιδιότητες: περατότητα σε διοξείδιο του άνθρακα $55.000 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2}$ σε 24 h, περατότητα σε υδρατμούς 110 g m^{-2} σε 24 h, περατότητα σε οξυγόνο $8,5 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2}$ σε 24 h) και τοποθετούνταν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών, σε θερμοκρασία $20 \text{ }^\circ\text{C}$ και 16 h φωτοπερίοδο υπό $37,5 \mu\text{mol m}^{-2}$ fluorescent φως.



2.5 Ριζοβολία μικροβλαστών

Βλαστοί που είχαν σχηματιστεί *in vitro* και είχαν μήκος 1,5-2,0 cm προωθούνταν για να ριζοβολήσουν. Μέσα σε τράπεζα νηματικής ροής, πάνω σε αποστειρωμένο πλακάκι, που τακτικά απολυμαινόταν με υδατικό διάλυμα αιθανόλης 80% και με αποστειρωμένο νυστέρι, οι βλαστοί αποκόπτονταν από την βάση τους (από το έκφυτο) και αφαιρούνταν τα κατώτερα φύλλα τους. Οι βλαστοί τοποθετούνταν στα δοχεία καλλιέργειας με το ανάλογο θρεπτικό υπόστρωμα ριζοβολίας, τρεις βλαστοί ανά δοχείο καλλιέργειας, κατακόρυφα, και πιέζονταν ελαφρά ώστε να βυθιστούν λίγα χιλιοστά μέσα σε αυτό. Τέλος τα δοχεία καλλιέργειας καλύπτονταν με μεμβράνη sanitas (πλαστική μεμβράνη περιτυλίγματος με το εμπορικό όνομα sanitas της εταιρείας Σαράντης Α.Ε., η οποία είχε τις εξής ιδιότητες : περατότητα σε διοξείδιο του άνθρακα $55.000 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2}$ σε 24 h, περατότητα σε υδρατμούς 110 g m^{-2} σε 24 h, περατότητα σε οξυγόνο $8,5 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2}$ σε 24 h) και τοποθετούνταν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών, σε θερμοκρασία $20 \text{ }^\circ\text{C}$ και 16 h φωτοπερίοδο υπό $37,5 \mu\text{mol m}^{-2}$ fluorescent φως.

2.6 Εγκλιματισμός φυταρίων

Ριζοβολημένοι μικροβλαστοί του είδους *A. foetida*, που είχαν καλά αναπτυγμένο ριζικό σύστημα τοποθετούνταν για εγκλιματισμό. Τα φυτάρια απομακρύνονταν από το υπόστρωμα και στη συνέχεια γινόταν επιμελές πλύσιμο με νερό βρύσης ώστε να απομακρυνθεί πλήρως το θρεπτικό στερεό υπόστρωμα από τις ρίζες τους. Στη συνέχεια φυτεύονταν σε ορθογώνια, διάφανα πλαστικά φυτοδοχεία όγκου 2.000 ml.

Τα φυτοδοχεία περιείχαν υπόστρωμα που αποτελείτο από 1 τύρφη : 1 περλίτη (v/v), Τύρφη: φυσική ξανθιά, διορθωμένο pH: 5.5, Klanmann-Deilmann, GmbH, Geeste, Germany, Περλίτης: Perlofor).

Τα δοχεία με τα ριζοβολημένα φυτά καλύπτονταν με πλαστική μεμβράνη sanitas, κατά τις πρώτες 7 ημέρες καλλιέργειας τους, με σκοπό την μείωση των απωλειών υγρασίας στα πρώτα στάδια εγκατάστασης των φυταρίων. Τοποθετούνταν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών στους 20°C, με φωτοπερίοδο 16 h, και σε ένταση φωτισμού $37,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ από λαμπτήρες φθορισμού και 30% \pm 5 υγρασία και ανα τρεις ημέρες εφαρμοζόταν ελαφρύ πότισμα. Μετά το πέρας των επτά ημερών, η πλαστική μεμβράνη απομακρυνόταν και τα φυτάρια μεταφέρονταν στην υδρονέφωση του θερμαινόμενου θερμοκηπίου του εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου για μία εβδομάδα. Μετά τη μεταφορά τους στο χώρο του θερμοκηπίου, τα πλαστικά δοχεία τοποθετούνταν σε σκιερό μέρος, όπου και παρέμεναν συνολικά για διάστημα ενός μήνα. Τα φυτάρια αρδεύονταν δύο φορές την εβδομάδα και λιπαίνονταν ανά δεκαήμερο με 2 g l^{-1} του υδατοδιαλυτού λιπάσματος (Nutrileaf 60, 20-20-20, Miller Chemical and Fertilizer Corp., Hanover, PA, USA).

2.7 Πειραματικό σχέδιο- Στατιστική ανάλυση

Χρησιμοποιήθηκε το Εντελώς Τυχαιοποιημένο Σχέδιο (ΕΤΣ) και εφαρμόστηκαν μονοπαραγοντικά σχέδια, ανάλογα με το κάθε επιμέρους πειραματικό στάδιο. Η σημαντικότητα των αποτελεσμάτων ελέγχθηκε με ανάλυση της διασποράς (Analysis of Variance, ANOVA). Το κριτήριο που χρησιμοποιούμε για τη στατιστική αυτή δοκιμασία είναι το κριτήριο του F. Η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο Students σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. Η στατιστική ανάλυση των αποτελεσμάτων των πειραμάτων έγινε με το στατιστικό πρόγραμμα Jump 8.0 (SAS Institute Inc.). Στα αποτελέσματα οι μέσοι των επεμβάσεων που ακολουθούνται από διαφορετικά γράμματα της λατινικής αλφαβήτου διαφέρουν στατιστικά σημαντικά, ενώ το σύμβολο (*) δίπλα από κάθε τιμή του F, δηλώνει ότι οι τιμές αυτές του F ήταν σημαντικές σε επίπεδο σημαντικότητας 5%. Στο τέλος κάθε πίνακα αποτελεσμάτων αναγράφεται ο αριθμός των επαναλήψεων που χρησιμοποιήθηκαν ανά επέμβαση.

2.8 Εκτίμηση βλαστικότητας σπόρων

Σε κάθε επέμβαση χρησιμοποιήθηκαν 60 σπόροι οι οποίοι διαχωρίστηκαν ανά 20 σε 3 ομάδες και υπεβλήθησαν σε διαφορετικούς χειρισμούς 'όπως περιγράφονται αναλυτικά στις παραγράφους 3.1.1 & 3.1.2. In vitro ως βλάστηση ορίστηκε η εμφάνιση ριζιδίου τουλάχιστον 2 mm μήκους, σύμφωνα με τον International Seed Testing Association (1999).

2.9. Εκτίμηση αποτελεσμάτων στο στάδιο in vitro καλλιέργειών

Η αντίδραση των εκφύτων στο στάδιο των in vitro καλλιέργειών εκτιμήθηκε μετά 30 ημέρες από την εμφύτευση των εκφύτων στα υποστρώματα. Υπολογίσθηκαν το ποσοστό αντίδρασης, ως προς την έκπτυξη βλαστών από τα έκφυτα, ο αριθμός των βλαστών που σχηματίστηκαν ανά έκφυτο που αντέδρασε, το μέσο μήκος των βλαστών που σχηματίστηκαν. Για την καλύτερη εκτίμηση της αντίδρασης των εκφύτων στις καλλιέργειες υπολογίσθηκαν ακόμα και

η δυναμικότητα πολλαπλασιασμού (στην επικείμενη υποκαλλιέργεια), ως τα γινόμενα A (ποσοστού αντίδρασης των εκφύτων επί τον αριθμό βλαστών που παρήχθησαν ανά έκφυτο που αντέδρασε) και B (γινόμενο του ποσοστού βλαστογένεσης επί του μέσου αριθμού βλαστών που σχηματίστηκαν ανά έκφυτο που αντέδρασε και επί του μέσου μήκους των σχηματισθέντων βλαστών, και το γινόμενο αυτό διαιρέθηκε με 0,6) σαν μια εκτίμηση του μέσου αριθμού ληφθέντων εκφύτων (θεωρώντας ότι 0,6 cm είναι το αποδεκτό μήκος ενός εκφύτου κατά την υποκαλλιέργεια).

2.10 Εκτίμηση αποτελεσμάτων στο στάδιο της ριζοβολίας και του εγκλιματισμού των φυταρίων

Η ριζοβολία των μικροβλαστών εκτιμήθηκε 40 ημέρες μετά από την εμφύτευση τους στα υποστρώματα ριζοβολίας. Υπολογίσθηκαν το ποσοστό των μικροβλαστών που σχημάτισαν ρίζες, ο αριθμός και το μέσο μήκος των ριζών που σχηματίστηκαν.

Η επιτυχία του *ex vitro* εγκλιματισμού των φυταρίων, καταγράφηκε 1 μήνα μετά τη μεταφύτευση των φυταρίων στα εδαφικά υποστρώματα ως το ποσοστό (%) επιβίωσης αυτών.

3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

Anagyris foetida

3.1 Εισαγωγή

Βλάστηση σπόρων - ανάπτυξη σποροφύτων

Το είδος *Anagyris foetida* χαρακτηρίζεται από κατακερματισμένους μικρούς πλυθυσμούς στα φυσικά ενδιαιτήματα στα οποία αυτοφύεται, όπου και αναπαράγεται με σπόρο. Για το λόγο αυτό η μελέτη της οικοφυσιολογίας του σπόρου είναι πρωταρχικής σημασίας για την προστασία από την απειλή εξαφάνισης και τη διατήρηση του είδους (Valtueña *et al.*, 2008b).

Η καρπόδεση της *Anagyris foetida* παρουσιάζει πολύ χαμηλό ποσοστό κάτω από φυσικές συνθήκες (3,09%). Πρόκειται για κοινό φαινόμενο σε πολλές περιπτώσεις αγγειοσπέρμων, και ιδίως για θαμνώδη ψυχανθή στην περιοχή της Μεσογείου (Rodríguez-Riáño *et al.*, 1999; 2004) και αλλού (Bawa and Webb 1984, Bawa and Buckley 1989). Το ίδιο μπορεί να ειπωθεί για τη σποροπαραγωγή (35,5%). Επίσης δεν έχει επιβεβαιωθεί κάποιος παράγοντας διασποράς, με αποτέλεσμα οι σπόροι του είδους *A. foetida* να πέφτουν λόγω βαρύτητας, σχηματίζοντας τράπεζα σπόρων κοντά στα μητρικά φυτά, γεγονός το οποίο αποτελεί περιοριστικό παράγοντα για την εξάπλωση του είδους.

Σε αντίθεση με άλλα είδη Fabaceae οι πολύ υψηλές θερμοκρασίες δεν ευνοούν ιδιαίτερα τη βλαστικότητα του σπόρου και για το λόγο αυτό δεν μπορεί να θεωρηθεί από τα καταλληλότερα είδη που χρησιμοποιούνται σε αντιπυρικές ζώνες, αλλά και δεν ευνοείται η αναβλάστηση του είδους μετά από καταστροφικές πυρκαγιές. (Valtueña F.J. *et al.*, 2008b).

Ένα από τα σημαντικότερα ζητήματα είναι το γεγονός ότι οι σπόροι της *A. foetida* παρουσιάζουν μεγάλες περιόδους ληθάργου.

Η αδιαπερατότητα του περιβλήματος του σπόρου προκαλεί φυσιολογικό λήθαργο σε μεγάλο αριθμό οικογενειών του φυτικού βασιλείου (Baskin and Baskin, 1998; Copeland and McDonald, 1995) προκαλώντας αργή και ανομοιογενή βλάστηση (Cruz *et al.*, 2001).

Το πρώτο σύστημα ταξινόμησης ληθάργου σπόρων αναπτύχθηκε από τη Nikolaeva M.G (1967, 2004), το οποίο αντικατοπτρίζει το γεγονός ότι ο λήθαργος καθορίζεται τόσο από τις μορφολογικές όσο και από τις φυσιολογικές ιδιότητες του σπόρου (Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006).

Με βάση αυτό το σύστημα, οι Baskin and Baskin (1998, 2004) πρότειναν ένα ολοκληρωμένο σύστημα ταξινόμησης το οποίο περιλαμβάνει πέντε κατηγορίες όσον αφορά το λήθαργο σπόρου: φυσιολογικός (physiological:PD), μορφολογικός (morphological :MD), μορφοφυσιολογικός (morphophysiological: MPD + PD), φυσικός (physical:PY) και συνδιαστικός (combinational: PY + PD). Το σύστημα, είναι ιεραρχικό, με αυτές τις πέντε κλάσεις να διαιρούνται περαιτέρω σε επίπεδα και τύπους.

Τα σπέρματα πολλών ειδών Ψυχανθών (Leguminosae) χαρακτηρίζονται από σκληρό αδιάβροχο σπερματικό περίβλημα (Van Staden *et al.*, 1989; Hauser 1994, Ortega-Olivencia and Devesa 1997, López *et al.*, 1999; Degreef *et al.*, 2002, Baskin, 2003, Van Assche *et al.*, 2003, Gresta *et al.*, 2007, Venier *et al.*, 2012, Gehan-Jayasuriya *et al.*, 2013). Στο είδος *Anagyris foetida* γίνεται επομένως κατανοητό πως το ίδιο το περισπέρμιο, ως ρυθμιστής της ενυδάτωσης του σπόρου, μπορεί να αποτελέσει σοβαρό εμπόδιο στη βλαστικότητα των σπόρων που παρουσιάζουν φυσικό λήθαργο (Valtueña *et al.*, 2008b, Avsar, 2009).

Το πρόβλημα φυτρωτικότητας, λόγω της ύπαρξης φυσικού (PY) ληθάργου και του αδιαπέρατου περιβλήματος μπορεί να αντιμετωπιστεί με μεθόδους όπως ο σκαριφισμός και ο

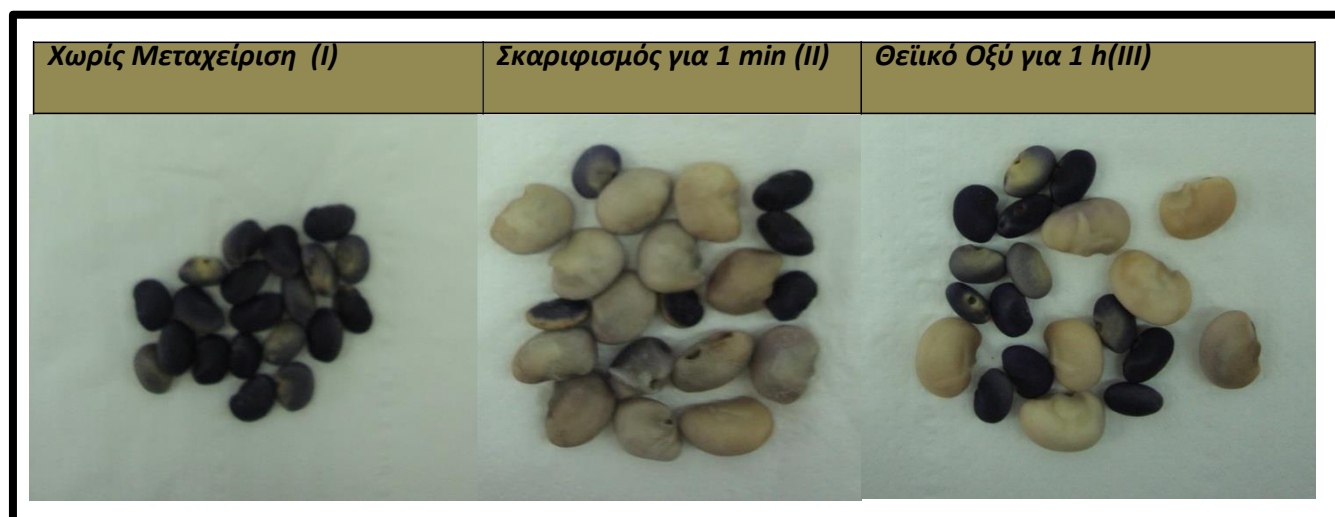
χειρισμός των σπόρων με διάλυμα πυκνού H₂SO₄ (Fowler and Bianchetti, 2000). Η αποτελεσματικότητα αυτής της θεραπείας ποικίλλει ανάλογα με τη συγκέντρωση του οξέος, των φυτικών ειδών και της διάρκειας της θεραπείας (Baskin and Baskin, 1998, Sacheti and Al-Rawahy, 1998).



Εικ.20 Σπόροι *A.foetida* : Αύξηση του ποσοστού βλαστικότητας στο 48% αποδίδεται σε πρόβατα που προκαλούν μέσω μασίματος μηχανικό σκαριφισμό των σπόρων (Valtueña, F. J. *et al.*, 2008b).

3.1.1 1^{ος} χειρισμός σπόρων

Εξήντα σπόροι του είδους *A. foetida* , οι οποίοι συλλέχθηκαν από ενήλικα θαμνώδη φυτά χωρίστηκαν σε τρεις ομάδες (I,II,III) από είκοσι σπόρους έκαστη. Οι σπόροι από την πρώτη ομάδα (I) τοποθετήθηκαν για εικοσιτέσσερις ώρες μέσα σε γυάλινο δοχείο με νερό στους 40°C, χωρίς κάποια μεταχείριση. Στη δεύτερη ομάδα σπόρων (II) πραγματοποιήθηκε σκαριφισμός των σπόρων με γυαλόχαρτο No 100 για σκληρές επιφάνειες και μετά τοποθετήθηκαν σε νερό και στους 40 °C για 24 h. Ενώ οι σπόροι της τρίτης ομάδας (III) μεταχειρίστηκαν με π. H₂SO₄ για 1 h και μετά τοποθετήθηκαν για 24 h στους 40 °C μέσα σε βάζο με νερό.



Εικ. 21 Σπόροι *Anagyris foetida* (ύστερα από τον 1^ο χειρισμό & μετά την εμβάπτιση στο νερό)

Χωρίς μεταχείριση (I): Αρ. σπόρων: 20 (24 h στους 40 °C μέσα σε βάζο με H₂O)

Σκαριφισμός για 1 min (II): Αρ. σπόρων: 20 (σκαριφισμός με γυαλόχαρτο No 100 για σκληρές επιφάνειες και μετά τοποθετήθηκαν σε H₂O και στους 40 °C για 24 h)

π.Θεϊκό Οξύ για 1 h (III): Αρ. σπόρων: 20 (εμβάπτιση σε π.H₂SO₄ για 1h και μετά για 24h στους 40 °C μέσα σε βάζο με H₂O)

Μετά το σκαριφισμό, ώστε να επιτραπεί η εισροή νερού και οξυγόνου που ενεργοποιεί τη βλάστηση, η απορρόφηση H₂O από τους σπόρους ολοκληρώθηκε, συμπίπτοντας με τον αποχρωματισμό του περιβλήματος του σπόρου (αλλαγή από βιολετί ή μπλε χρώμα σε μπεζ χρώμα). Το περίβλημα του σπόρου περιέχει ανθοκυάνες, οι οποίες είναι φλαβονοειδείς χρωστικές που είναι πολύ σημαντικές για τον χρωματισμό όχι μόνο των ανθέων, αλλά και πολλών καρπών (π.χ. Μύρτιλλο, *Vaccinium myrtillus* L.) και σπόρων. Αυτές οι χρωστικές είναι υδατοδιαλυτές με χρώματα που ποικίλλουν ανάλογα με το pH (ερυθρό σε όξινο pH έως γαλάζιο σε βασικό pH, Kuklinski 2000). Επίσης, έχουν συνήθως αντιβακτηριακές ιδιότητες, προστατεύοντας τους σπόρους αυτού του είδους από την επίθεση βακτηρίων στο έδαφος.

Από το σύνολο των ανωτέρω σπόρων παρατηρήθηκε διάρρηξη της επιφάνειας του σπόρου και διόγκωση λόγω προσρόφησης H₂O συνοδευόμενη από αποχρωματισμό ως εξής :

Στην **Ομάδα (I)**: 0/20 σπόροι

Στην **Ομάδα (II)**: 14/20 σπόροι

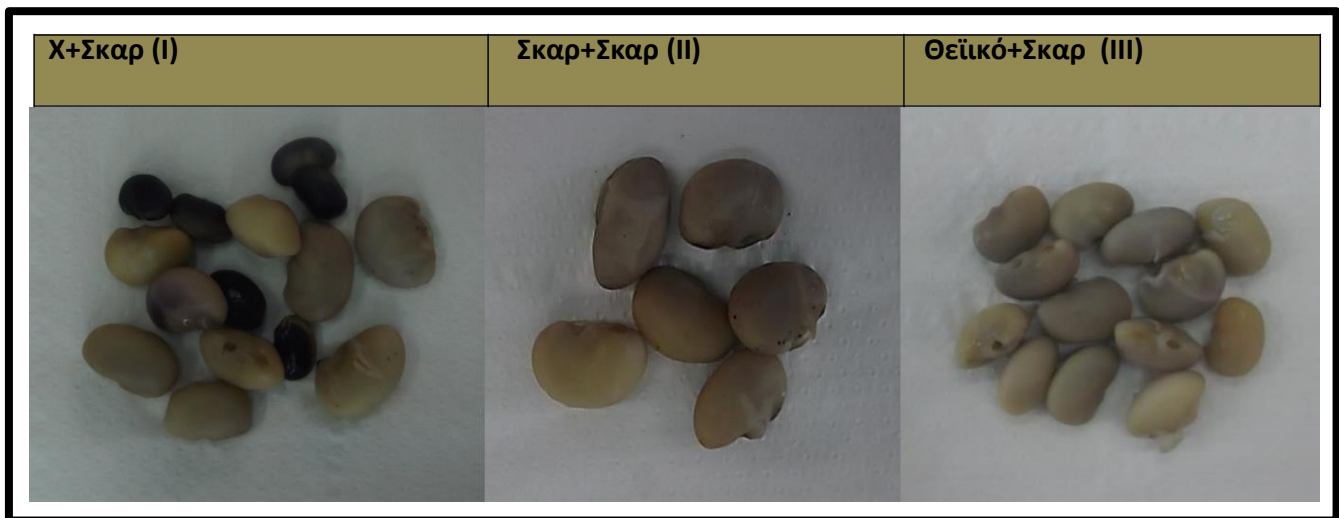
Στην **Ομάδα (III)**: 7/20 σπόροι

Οι παραπάνω σπόροι από κάθε ομάδα (II) & (III) καθώς και 5 σπόροι από την Ομάδα (I) στραγγίστηκαν, απολυμάνθηκαν και τοποθετήθηκαν για βλάστηση. Η απολύμανση πραγματοποιήθηκε επιφανειακά με υδατικό διάλυμα χλωρίνης εμπορίου 20% (4.6 % w/v) υπό ανάδευση για 10 min, το οποίο περιείχε 0.1% Tween 20 (προσκολλητική ουσία, Polyoxyethylene(20)sorbitan Monolaurate, Merck). Την απολύμανση ακολούθησαν τέσσερα τρίλεπτα ξεπλύματα με αποστειρωμένο, απεσταγμένο νερό υπό ανάδευση. Στη συνέχεια οι σπόροι στρωματώθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα αλάτων MS υποδιπλάσιας δύναμης με 20 g l⁻¹ σακχαρόζη και pH 5.6-5.7, σε γυάλινα δοχεία όγκου 100 ml με 25 ml υποστρώματος ανά δοχείο, θερμοκρασία 20°C και φωτοπεριοδισμό 16 h με ένταση φωτισμού 37,5 μmol m⁻² s⁻¹ προερχόμενη από λάμπα φθορισμού.

3.1.2 2^{ος} Χειρισμός σπόρων

Οι υπόλοιποι σπόροι, ήτοι: Ομάδα (I) : 15 σπόροι, Ομάδα (II): 6 και Ομάδα (III): 13 σπόροι, υπεβλήθησαν σε περαιτέρω χειρισμό, που ήταν **σκαριφισμός με γυαλόχαρτο Νο 100 για σκληρές επιφάνειες και τοποθέτηση σε H₂O και στους 40 °C για πλέον 24 h.**

Οι παραπάνω σπόροι από κάθε ομάδα (I) (II) & (III) μετά τη δεύτερη μεταχείριση με σκαριφισμό και επανεμβάπτιση σε H₂O για 24 h, στραγγίστηκαν και απολυμάνθηκαν. Η απολύμανση πραγματοποιήθηκε επιφανειακά με υδατικό διάλυμα χλωρίνης εμπορίου 20% (4.6 % w/v) υπό ανάδευση για 10 min, το οποίο περιείχε 0.1% Tween 20 (προσκολλητική ουσία, Polyoxyethylene(20)sorbitan Monolaurate, Merck). Την απολύμανση ακολούθησαν τέσσερα τρίλεπτα ξεπλύματα με αποστειρωμένο, απεσταγμένο νερό υπό ανάδευση. Στη συνέχεια οι σπόροι στρωματώθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα αλάτων MS υποδιπλάσιας δύναμης με 20 g l⁻¹ σακχαρόζη και pH 5.6-5.7, σε γυάλινα δοχεία όγκου 100 ml με 25 ml υποστρώματος ανά δοχείο, θερμοκρασία 20°C και φωτοπεριοδισμό 16 h με ένταση φωτισμού 37,5 μmol m⁻² s⁻¹ προερχόμενη από λάμπα φθορισμού.



Εικ. 22 Σπόροι *Anagyris foetida* (ύστερα από τον 2^ο χειρισμό & μετά την εμφάνισή τους στο νερό)

(I) Χωρίς μεταχείριση & κατόπιν Σκαριφισμός για 1 min: Αρ. σπόρων: 15 (σκαριφισμός με γυαλόχαρτο No 100 για σκληρές επιφάνειες και μετά τοποθέτηση σε H₂O και στους 40 °C για 24 h)

(II) Σκαριφισμός για 1 min & Σκαριφισμός για 1 min: Αρ. σπόρων: 6 (σκαριφισμός με γυαλόχαρτο No 100 για σκληρές επιφάνειες και μετά τοποθέτηση σε H₂O και στους 40 °C για 24 h)

(III) π.Θεϊκό Οξύ για 1 h & Σκαριφισμός για 1 min: Αρ. σπόρων: 13 (σκαριφισμός με γυαλόχαρτο No 100 για σκληρές επιφάνειες και μετά τοποθέτηση σε H₂O και στους 40 °C για 24 h)

3.2 *In vitro* βλάστηση σπόρων

Μετά τον 1^ο χειρισμό σπόροι που δεν είχαν δεχθεί προμεταχείριση μηχανικού ή χημικού σκαριφισμού δεν βλάστησαν. Σκαριφισμένοι σπόροι που δέχθηκαν δευτερογενώς μεταχείριση με γυαλόχαρτο No 100 για σκληρές επιφάνειες και μετά τοποθετήθηκαν σε H₂O και στους 40 °C για 24 h, παρουσίασαν μεγαλύτερη βλαστικότητα 7,14 %. Η μεγαλύτερη βλαστικότητα σημειώθηκε σε σπόρους που τοποθετήθηκαν σε π. H₂SO₄ για 1h και μετά τοποθετήθηκαν για 24 h στους 40 °C μέσα σε βάζο με H₂O όπου σημείωσε ποσοστό 28,57 %. Στις εικ. 23,24,25 γίνεται παρουσίαση των σπορόφυτων.

Σπόροι που υποβλήθηκαν στο 2^ο χειρισμό όπως περιγράφεται ανωτέρω δε βλάστησαν.



Εικ. 23 Σπορόφυτο από βλάστηση σπόρου που δέχθηκε μεταχείριση εμβαπτιζόμενο σε π.Η2SO4 για 1h και μετά για 24h και στους 40 °C μέσα σε βάζο με Η2O.



Εικ.24 Σπορόφυτο από βλάστηση σπόρου που δέχθηκε μεταχείριση εμβαπτιζόμενο σε π.Η2SO4 για 1h και μετά για 24h και στους 40 °C μέσα σε βάζο με Η2O.



Εικ.25 Σπορόφυτο από βλάστηση σπόρου που δέχθηκε σκαριφισμός με γυαλόχαρτο No 100 για σκληρές επιφάνειες και μετά τοποθετήθηκαν σε Η2O και στους 40 °C για 24 h.

Είδος Μεταχείρισης Σπόρων	Σπόροι που βλάστησαν/Σύνολο σπ	Ποσοστό Βλαστικότητας
1^η Μεταχείριση		
(I) X	0/5	0 %
(II) Σκαρ	1/14	7,14%
(III) π. Η2SO4	2/7	28,57%
2^η Μεταχείριση		
(I) X+Σκαρ	0/15	0 %
(II) Σκαρ+Σκαρ	0/6	0 %
(III) π. Η2SO4+Σκαρ	0/13	0 %

Πίν. 5. Επίδραση του είδους χειρισμού στην βλαστικότητα σπόρου του είδους *A. foetida*



3.3 Πολλαπλασιασμός καλλιέργειών in vitro

Έκφυτα κόμβων βλαστών καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικά υποστρώματα που περιείχαν διάφορα είδη και συγκεντρώσεις φυτορρυθμιστικών ουσιών, υπό συνθήκες και με χρήση τεχνικών που περιγράφονται στο κεφάλαιο 2.4.

Εξετάστηκε η επίδραση του είδους και των συγκεντρώσεων των φυτορρυθμιστικών ουσιών που συμπεριλήφθηκαν στα υποστρώματα καλλιέργειας, στο ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν βλαστούς, στον αριθμό βλαστών που σχηματίστηκε ανά έκφυτο που αντέδρασε, στο μέσο μήκος των βλαστών που σχηματίστηκαν, καθώς και στη δυναμικότητα του πολλαπλασιασμού, όπως εκφράστηκε από το γινόμενο Index A και γινόμενο Index B (Index A= ποσοστό βλαστογένεσης X μέσος αριθμός βλαστών/100, Index B=Index A X μέσο μήκος/0,6). Το Index B χρησιμοποιήθηκε για την αποτίμηση του αριθμού των εκφύτων που μπορούσαν να ληφθούν από κάθε έκφυτο όπου 0,6 cm είναι κατά προσέγγιση το ελάχιστο αποδεκτό μήκος εκφύτου για υποκαλλιέργεια.

3.3.1 Επίδραση του BA στην βλαστογένεση και επιμήκυνση της *A. foetida* στην αρχική καλλιέργεια

Έκφυτα κόμβων βλαστών καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικά υποστρώματα MS, που περιείχαν σακχαρόζη 3%, χωρίς ή με BA στη συγκέντρωση 0,05 mg/l.

Πίνακας 6. Επίδραση του BA στη βλαστογένεση εκφύτων από σπορόφυτα *A. foetida*, κατά την αρχική καλλιέργεια

PRGs (mg l ⁻¹)	Βλαστογένεση (%)	Μέσος αριθμός βλαστών / Έκφυτο	Μέσο μήκος βλαστών (cm)	Index A	Index B
Hf	82,1	1,0 a	0,9 a	0,82	1,23
0,05 BA	97,0	1,0 a	1,1 a	0,97	1,78
Fon e-way ANOVA		NS	*		
Οι μέσοι των επεμβάσεων διαχωρίζονται με το Student's t test σε P≤0,05.					
*: σημαντικά σε P≤0,05, NS: μη σημαντικά σε P≤0,05					
Hf : Υπόστρωμα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες					

Το ποσοστό βλαστογένεσης στο υπόστρωμα με 0,05 mg l⁻¹ BA κυμάνθηκε σε υψηλότερο ποσοστό έναντι του υποστρώματος, χωρίς φυτορρυθμιστική ουσία, MS. Το μέσο μήκος των βλαστών σε 0,05 mg l⁻¹ BA υπερέιχε, αλλά όχι σημαντικά συγκριτικά με το υπόστρωμα MS χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες, ενώ δεν παρατηρήθηκαν ουσιαστικές διαφορές στις υπόλοιπες παραμέτρους αξιολόγησης των αποτελεσμάτων (Πίν.6).

3.3.2 Επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης των φυτορρυθμιστικών ουσιών στη βλαστογένεση και επιμήκυνση της *A. foetida* στην 1η υποκαλλιέργεια

Έκφυτα κόμβων μικροβλαστών προερχόμενα από υποστρώματα MS και MS με 0,05 mg/l BA, καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικά υποστρώματα MS, που περιείχαν σακχαρόζη 3%, δίχως φυτορρυθμιστικές ουσίες ή με 0,5 mg l⁻¹ BA, 0,5 mg l⁻¹ BA+ 0,1 mg l⁻¹ NAA, 1 mg l⁻¹ ZEAT καθώς και 1 mg l⁻¹ ZEAT + 0,1 mg l⁻¹ NAA, και υπό συνθήκες και με χρήση τεχνικών που περιγράφονται στο κεφάλαιο 2.4.

Πίνακας 7. Επίδραση φυτορρυθμιστικών ουσιών στη βλαστογένεση εκφύτων κατά την 1^η υποκαλλιέργεια.

PRGs (mg l ⁻¹)	Βλαστογένεση (%)	Μέσος αριθμός βλαστών / Έκφυτο	Μέσο μήκος βλαστών (cm)	Index A	Index B
Hf	87,0	1,0 b	0,9 c	0,9	1,3
0,5 BA	91,3	1,2 ab	1,6 a	1,1	2,8
0,5 BA / 0,1 NAA	88,9	1,0 b	1,3 ab	0,9	1,9
1,0 ZEAT	86,4	1,1 ab	1,5 a	0,9	2,3
1,0 ZEAT / 0,1 NAA	86,4	1,3 a	1,0 bc	1,1	1,9
Fon e-way ANOVA		NS	*		
Οι μέσοι των επεμβάσεων διαχωρίζονται με το Student's t test σε P≤0,05.					
*: σημαντικά σε P≤0,05, NS: μη σημαντικά σε P≤0,05					
Hf : Υπόστρωμα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες					

Υπήρξε η ένδειξη ότι τα έκφυτα που υποκαλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS με 1 mg l⁻¹ ZEAT+0,1 mg l⁻¹ NAA σχημάτισαν περισσότερους βλαστούς από τα έκφυτα σε υπόστρωμα 0,5 BA ή 0,5 BA+0,1 NAA ή 1,0 ZEAT, αλλά τα αποτελέσματα δεν ήταν στατιστικά σημαντικά. Το υπόστρωμα 1 mg l⁻¹ ZEAT και 0,5 mg l⁻¹ BA παρουσίασαν το μεγαλύτερο μήκος βλαστών χωρίς όμως διαφορά από το υπόστρωμα 0,5 mg l⁻¹ BA+0,1 mg l⁻¹ NAA. Το υψηλότερο ποσοστό βλαστογένεσης καθώς και το υψηλότερο γινόμενο πολλαπλασιασμού σημειώθηκε σε έκφυτα που καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα με 0,5 mg l⁻¹ BA.

3.3.3 Επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης των φυτορρυθμιστικών ουσιών στη βλαστογένεση και επιμήκυνση της *A. foetida* στην 2η υποκαλλιέργεια

Έκφυτα κόμβων μικροβλαστών προερχόμενα από υποστρώματα MS και MS με 0,5 mg l⁻¹ BA, 0,5 mg l⁻¹ BA+ 0,1 mg l⁻¹ NAA, 1 mg l⁻¹ ZEAT καθώς και 1 mg l⁻¹ ZEAT + 0,1 mg l⁻¹ NAA, καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικά υποστρώματα MS, που περιείχαν σακχαρόζη 3%, χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες ή με: 0,5 mg l⁻¹ BA, 0,5 mg l⁻¹ BA+ 0,1 mg l⁻¹ NAA, 1 mg l⁻¹ ZEAT καθώς και 1 mg l⁻¹ ZEAT + 0,1 mg l⁻¹ NAA αντίστοιχα, και υπό συνθήκες και με χρήση τεχνικών που περιγράφονται στο κεφάλαιο 2.4.

Πίνακας 8. Επίδραση φυτορρυθμιστικών ουσιών στη βλαστογένεση εκφύτων κατά τη 2^η υποκαλλιέργεια.

PRGs (mg l ⁻¹)	Βλαστογένεση (%)	Μέσος αριθμός βλαστών / Έκφυτο	Μέσο μήκος βλαστών (cm)	Index A	Index B
Hf	84,0	1,0 c	0,9 b	0,8	1,3
0,5 BA	88,1	1,5 ab	1,4 a	1,3	2,9
0,5 BA / 0,1NAA	86,7	1,6 a	1,2 ab	1,4	2,7
ZEAT 1,0	85,2	1,2 bc	1,3 ab	1,0	2,2
1,0 ZEAT / 0,1 NAA	84,4	1,3 bc	1,2 ab	1,1	2,3
Fon e-way ANO VA		*	NS		
Οι μέσοι των επεμβάσεων διαχωρίζονται με το Student's t test σε P≤0,05.					
*: σημαντικά σε P≤0,05, NS: μη σημαντικά σε P≤0,05					
Hf : Υπόστρωμα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες					

Το ποσοστό βλαστογένεσης παρουσίασε μέγιστη τιμή στο υπόστρωμα υποκαλλιέργειας MS με κυτοκινίνη 0,5 mg l⁻¹ BA. Ο μέσος αριθμός βλαστών παρουσίασε σημαντική αύξηση σημειώνοντας μέγιστη τιμή στο υπόστρωμα 0,5 mg l⁻¹ BA+0,1 mg l⁻¹ NAA, ο οποίος ωστόσο στατιστικά δε διέφερε σημαντικά από το εμπλουτισμένο υπόστρωμα MS με 0,5 mg l⁻¹ BA. Υπήρχε η ένδειξη ότι το μέσο μήκος των βλαστών σε υπόστρωμα 0,5 mg l⁻¹ BA υπερέιχε, γεγονός το οποίο ωστόσο απεδείχθη στατιστικά μη σημαντικό. Το Γινόμενο A (Index A), ήταν μεγαλύτερο στο υπόστρωμα 0,5 mg l⁻¹ BA+0,1 mg l⁻¹ NAA, ενώ το γινόμενο B (Index B) παρουσίασε μέγιστη τιμή στο υπόστρωμα 0,5 mg l⁻¹ BA.

3.3.4 Επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης των φυτορρυθμιστικών ουσιών στη βλαστογένεση και επιμήκυνση της *A. foetida* στην 3η υποκαλλιέργεια

Έκφυτα κόμβων βλαστών προερχόμενα από θρεπτικά υποστρώματα MS υποστρώματα δίχως αλλά και με φυτορρυθμιστικές ουσίες: 0,5 mg l⁻¹ BA, 0,5 mg l⁻¹ BA+ 0,1 mg l⁻¹ NAA, 1 mg l⁻¹ ZEAT καθώς και 1 mg l⁻¹ ZEAT + 0,1 mg l⁻¹ NAA, καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικά υποστρώματα MS, που περιείχαν σακχαρόζη 3%, με φυτορρυθμιστικές ουσίες στις συγκεντρώσεις: 0,5 mg l⁻¹ BA, 1,0 mg l⁻¹ BA και 2,0 mg l⁻¹ BA, και υπό συνθήκες και με χρήση τεχνικών που περιγράφονται στο κεφάλαιο 2.4.

Πίνακας 9. Επίδραση φυτορρυθμιστικών ουσιών στη βλαστογένεση εκφύτων κατά την 3^η υποκαλλιέργεια.

PRGs (mg l ⁻¹)	Βλαστογένεση (%)	Μέσος αριθμός βλαστών / Έκφυτο	Μέσο μήκος βλαστών (cm)	Index A	Index B
BA 0,5 (*)	100,0	1,0 c	1,7 abcd	1,0	2,9
BA 0,5 (**)	91,4	1,6 abc	1,6 ab	1,5	4,0
BA 0,5 (***)	89,3	1,6 bc	1,9 a	1,4	4,5
BA 0,5 (****)	92,6	1,7 abc	1,2 cd	1,5	3,1
BA 0,5 (*****)	92,9	1,5 bc	1,0 d	1,4	2,4
BA 1,0 (**)	85,3	1,9 ab	1,2 cd	1,6	3,2
BA 1,0 (***)	91,4	2,0 a	1,2 cd	1,8	3,7
BA 1,0 (****)	84,2	1,7 abc	1,6 abc	1,4	3,7
BA 1,0 (*****)	87,5	1,6 abc	0,9 d	1,4	2,1
BA 2,0 (****)	90,0	2,0 ab	1,1 cd	1,8	3,4
BA 2,0 (*****)	80,0	1,5 abc	1,3 bcd	1,2	2,6
Fon e-way ANO VA		NS	*		
Οι μέσοι των επεμβάσεων διαχωρίζονται με το Student's t test σε P≤0,05.					
*: σημαντικά σε P≤0,05, NS: μη σημαντικά σε P≤0,05					
Hf : Υπόστρωμα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες					
Υπόστρωμα προέλευσης εκφύτων: (*)MS, (**)0,5 BA, (***)0,5 BA+0,1 NAA,(****)1,0 ZEAT,(*****),1,0 ZEAT+0,1 NAA					

Έκφυτα προερχόμενα από υπόστρωμα MS που υποκαλλιεργήθηκαν σε συγκέντρωση 0,5 mg l⁻¹ BA, επέδειξαν υψηλότερο ποσοστό βλαστογένεσης. Έκφυτα προερχόμενα από 0,5 mg l⁻¹ BA+0,1 mg l⁻¹ NAA που υποκαλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα 0,5 mg l⁻¹ BA σημείωσαν το μεγαλύτερο μήκος βλαστών. Μέγιστη τιμή Γινομένου A (Index A) αντιστοιχούσε σε έκφυτα προερχόμενα από υπόστρωμα 0,5 mg l⁻¹ BA+0,1 mg l⁻¹ NAA ή 1,0 mg l⁻¹ ZEAT που

υποκαλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα 1,0 mg l⁻¹ BA ή 2,0 mg l⁻¹ BA αντίστοιχα, ενώ το γινόμενο B (Index B) παρουσίασε μέγιστη τιμή σε υποκαλλιέργεια εκφύτων, προερχόμενων από 0,5 mg l⁻¹ BA+0,1 mg l⁻¹ NAA, σε υπόστρωμα 0,5 mg l⁻¹ BA.

3.3.5 Επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης των φυτορρυθμιστικών ουσιών στη βλαστογένεση και επιμήκυνση της *A. foetida* στην 4η υποκαλλιέργεια

Έκφυτα κόμβων βλαστών προερχόμενα από υποστρώματα προηγούμενων υποκαλλιεργειών, καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικά υποστρώματα MS, που περιείχαν σακχαρόζη 3%, και φυτορρυθμιστικές ουσίες στις συγκεντρώσεις: 0,5 mg l⁻¹ BA, και υπό συνθήκες και με χρήση τεχνικών που περιγράφονται στο κεφάλαιο 2.4.

Πίνακας 10. Επίδραση των φυτορρυθμιστικών ουσιών: 0,5 mg l⁻¹ BA, στη βλαστογένεση εκφύτων κατά την 4^η υποκαλλιέργεια.

PRGs (mg l ⁻¹)	Βλαστογένεση (%)	Μέσος αριθμός βλαστών / Έκφυτο	Μέσο μήκος βλαστών (cm)	Index A	Index B
0,5 BA	91,0	1,4	1,4	1,20	2,80

Εκτιμώντας την επίδραση των υποστρωμάτων 4^{ης} υποκαλλιέργειας, έκφυτα που υποκαλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα με 0,5 mg l⁻¹ BA παρουσίασαν ποσοστό βλαστογένεσης που κυμάνθηκε σε 91,0 %. Ο μέσος αριθμός βλαστών ήταν 1,4. Το μέσο μήκος των βλαστών σε 0,5 mg l⁻¹ BA ήταν 1,4. Τιμή Γινομένου A (Index A): 1,20 και τιμή Γινομένου B (Index B): 2,80.

3.3.6 Επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης των φυτορρυθμιστικών ουσιών στη βλαστογένεση και επιμήκυνση της *A. foetida* στην 5η υποκαλλιέργεια

Έκφυτα κόμβων βλαστών προερχόμενα από υποστρώματα 0,5 mg l⁻¹ BA, καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικά υποστρώματα MS, που περιείχαν σακχαρόζη 3% και φυτορρυθμιστικές ουσίες στις συγκεντρώσεις: 0,5 mg l⁻¹ BA, 2,0 mg l⁻¹ BA καθώς και 4,0 mg l⁻¹ BA και υπό συνθήκες και με χρήση τεχνικών που περιγράφονται στο κεφάλαιο 2.4.

Πίνακας 11. Επίδραση φυτορρυθμιστικών ουσιών στη βλαστογένεση εκφύτων κατά την 5η υποκαλλιέργεια.

PRGs (mg l ⁻¹)	Βλαστογένεση (%)	Μέσος αριθμός βλαστών / Έκφυτο	Μέσο μήκος βλαστών (cm)	Index A	Index B
BA 0,5	93,9	1,4 a	1,3 a	1,3	2,8
BA 2,0	93,7	1,4 a	1,3 a	1,3	2,9
BA 4,0	86,4	1,2 b	1,2 a	1,0	2,0
Fon e-way ANOVA		*	NS		
Οι μέσοι των επεμβάσεων διαχωρίζονται με το Student's t test σε P≤0,05.					
*: σημαντικά σε P≤0,05, NS: μη σημαντικά σε P≤0,05					
Hf : Υπόστρωμα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες					

Τα έκφυτα που υποκαλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα με 2 mg l⁻¹ BA σχημάτισαν περισσότερους βλαστούς συγκριτικά με έκφυτα σε υπόστρωμα 4,0 BA. Το υψηλότερο ποσοστό βλαστογένεσης σημειώθηκε σε έκφυτα που καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα 0,5 mg l⁻¹ BA. Το γινόμενο A (Index A) καθώς και το γινόμενο B (Index B) παρουσίασαν μέγιστη τιμή σε υποκαλλιέργεια εκφύτων, σε υπόστρωμα 2,0 mg l⁻¹ BA.

3.3.7 Επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης των φυτορρυθμιστικών ουσιών στην βλαστογένεση και επιμήκυνση της *A. foetida* στην 6η υποκαλλιέργεια

Έκφυτα κόμβων βλαστών προερχόμενα από υποστρώματα 0,5 mg l⁻¹ BA, 2,0 mg l⁻¹ BA καθώς και 4,0 mg l⁻¹ BA, καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικά υποστρώματα MS, που περιείχαν σακχαρόζη 3% και φυτορρυθμιστικές ουσίες στις συγκεντρώσεις: 0,5 mg l⁻¹ BA, 0,5 mg l⁻¹ 2-*ip*, 0,5 mg l⁻¹ KIN, 2,0 mg l⁻¹ BA, 2,0 mg l⁻¹ 2-*ip*, 2,0 mg l⁻¹ KIN καθώς και 5,0 mg l⁻¹ ZEAT και υπό συνθήκες και με χρήση τεχνικών που περιγράφονται στο κεφάλαιο 2.4.

Πίνακας 12. Επίδραση φυτορρυθμιστικών ουσιών βλαστογένεση εκφύτων κατά την 6^η υποκαλλιέργεια.

PRGs (mg l ⁻¹)	Βλαστογένεση (%)	Μέσος αριθμός βλαστών / Έκφυτο	Μέσο μήκος βλαστών (cm)	Index A	Index B
BA 0,5 (*)	98,4	1,1 bc	1,4 bc	1,1	2,5
2-ip 0,5 (*)	59,1	1,0 c	0,9 de	0,6	0,9
KIN 0,5 (*)	86,1	1,0 c	0,8 de	0,9	1,2
BA 2,0 (**)	94,7	1,2 b	1,5 b	1,2	2,9
KIN 2,0 (**)	85,7	1,1 bc	0,8 de	0,9	1,3
ZEAT 5,0 (***)	92,8	1,2 b	1,8 a	1,1	3,2
2-ip 2,0 (***)	55,0	1,0 c	1,1 cd	0,6	1,0
KIN 2,0 (***)	73,9	1,0 c	1,0 de	0,7	1,2
KIN 2,0 (*)	75,0	1,0 c	0,8 e	0,8	1,0
ZEAT 5,0 (*)	90,0	1,1 bc	1,8 a	1,0	3,0
BA 2,0 (*)	100,0	1,8 a	1,5 b	1,8	4,5
Fon e-way ANOVA		*	*		
Οι μέσοι των επεμβάσεων διαχωρίζονται με το Student's t test σε P≤0,05.					
*: σημαντικά σε P≤0,05, NS: μη σημαντικά σε P≤0,05					
Hf : Υπόστρωμα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες					
Υπόστρωμα προέλευσης εκφύτων: (*)0,5 BA, (**)2,0 BA, (***)4,0 BA					

Το υψηλότερο ποσοστό βλαστογένεσης σημειώθηκε σε έκφυτα προερχόμενα από υπόστρωμα 0,5 mg l⁻¹ BA που υποκαλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα 2,0 mg/l BA. Το ποσοστό έκπτυξης βλαστών ήταν υψηλότερο σε έκφυτα που υποκαλλιεργήθηκαν από 0,5 mg l⁻¹ BA σε υπόστρωμα 2,0 mg l⁻¹ BA. Έκφυτα από 0,5 mg l⁻¹ BA και 4,0 mg l⁻¹ BA που υποκαλλιεργήθηκαν σε συγκέντρωση, 5,0 mg l⁻¹ ZEAT επέδειξαν το υψηλότερο μ.ο μήκους βλαστών. Μέγιστη τιμή Γινομένου A (Index A) και Γινομένου B (Index B) αντιστοιχούσε σε έκφυτα προερχόμενα από υπόστρωμα 0,5 mg l⁻¹ BA που υποκαλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα 2,0 mg l⁻¹ BA.

3.3.8 Επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης των φυτορρυθμιστικών ουσιών στην βλαστογένεση και επιμήκυνση της *A. foetida* στην 7η υποκαλλιέργεια

Έκφυτα κόμβων βλαστών προερχόμενα από υποστρώματα 0,5 mg l⁻¹ BA, 0,5 mg l⁻¹ 2-ip, 0,5 mg l⁻¹ KIN, 2,0 mg l⁻¹ BA, 2,0 mg l⁻¹ 2-ip, 2,0 mg l⁻¹ KIN καθώς και 5,0 mg l⁻¹ ZEAT, καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικά υποστρώματα MS, που περιείχαν σακχαρόζη 3% και φυτορρυθμιστικές ουσίες στις συγκεντρώσεις: 0,5 mg l⁻¹ BA και 2,0 mg l⁻¹ BA, και υπό συνθήκες και με χρήση τεχνικών που περιγράφονται στο κεφάλαιο 2.4.

Πίνακας 13. Επίδραση φυτορρυθμιστικών ουσιών στη βλαστογένεση εκφύτων κατά την 7η υποκαλλιέργεια.

PRGs (mg l ⁻¹)	Βλαστογένεση (%)	Μέσος αριθμός βλαστών / Έκφυτο	Μέσο μήκος βλαστών (cm)	Index A	Index B
BA 0,5 (**)	94,1	1,4 a	1,7 b	1,3	3,7
BA 2,0 (*)	73,3	1,0 b	2,6 a	0,7	3,2
BA 0,5 (***)	78,9	1,1 b	2,0 ab	0,8	2,9
Fon e-way ANOVA		*	*		
Οι μέσοι των επεμβάσεων διαχωρίζονται με το Student's t test σε P≤0,05.					
*: σημαντικά σε P≤0,05, NS: μη σημαντικά σε P≤0,05					
Hf : Υπόστρωμα χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες					
Υπόστρωμα προέλευσης εκφύτων: (*)0,5 BA, (**)2,0 BA, (***)5,0 ZEAT					

Εκτιμώντας την επίδραση των υποστρωμάτων 7ης υποκαλλιέργειας, τα έκφυτα από 2,0 BA που υποκαλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα με 0,5 mg l⁻¹ BA σχημάτισαν τους περισσότερους βλαστούς. Το υψηλότερο ποσοστό βλαστογένεσης σημειώθηκε σε έκφυτα που υποκαλλιεργήθηκαν από 2,0 mg l⁻¹ BA σε υπόστρωμα 0,5 mg l⁻¹ BA. Έκφυτα που υποκαλλιεργήθηκαν από 0,5 mg l⁻¹ BA σε 2,0 mg l⁻¹ BA παρουσίασαν το μεγαλύτερο μήκος βλαστών, χωρίς όμως διαφορά από έκφυτα που υποκαλλιεργήθηκαν από 5,0 mg l⁻¹ ZEAT σε 0,5 mg l⁻¹ BA. Το γινόμενο A (Index A) καθώς και το γινόμενο B (Index B) παρουσίασαν μέγιστη τιμή σε υποκαλλιέργεια εκφύτων, προερχόμενων από 2,0 mg l⁻¹ BA, σε υπόστρωμα 0,5 mg l⁻¹ BA.

3.4 Πειράματα in vitro ριζοβολίας μικροβλαστών

1ο Πείραμα Ριζοβολίας

Μικροβλαστοί που προήλθαν από την 1^η κατά σειρά υποκαλλιέργεια του είδους *A. foetida*, τοποθετήθηκαν για ριζοβολία σε υπόστρωμα MS υποδιπλασιασμένης δύναμης με 1 ή 2 mg l⁻¹ IBA και υπό συνθήκες και με χρήση τεχνικών που περιγράφονται στο κεφάλαιο 2.5.

Η ριζοβολία ήταν πολύ χαμηλή και στα δύο υποστρώματα με μια μικρή υπεροχή στο υπόστρωμα MS υποδιπλασιασμένης δύναμης με 1 mg l⁻¹ IBA, ενώ δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις υπόλοιπες παραμέτρους αξιολόγησης των αποτελεσμάτων (Εικ. 26-28).

Πίνακας 14. Επίδραση συγκέντρωσης (1 ή 2 mg l⁻¹) IBA στο ποσοστό ριζοβολίας (%) και τον αριθμό των ριζών ανά ριζοβολημένο μικροβλαστό του *A.foetida*

Θρεπτικό Υπόστρωμα +Συγκέντρωση IBA (mg/L)	Ποσοστό ριζοβολίας(%)	Μέσος αριθμός ριζών	Μέσο μήκος ριζών (cm)
½ MS+1,0 IBA	18,2%	3,0 a	2,7 a
½ MS+2,0 IBA	10,0%	2,0 a	2,0 a
Fone-way ANOVA		NS	NS

Οι μέσοι των επεμβάσεων διαχωρίζονται με το Student's t test σε P≤0,05.
*: σημαντικά σε P≤0,05, NS: μη σημαντικά σε P≤0,05
(n ½ MS+1,0 IBA =11, n ½ MS+2,0 IBA = 20)



Εικ.26 ½ MS+1,0 IBA



Εικ.27 ½ MS+1,0 IBA



Εικ.28 ½ MS+2,0 IBA

2ο Πείραμα Ριζοβολίας

Μικροβλαστοί που προήλθαν από την 2^η κατά σειρά υποκαλλιέργεια του είδους *A. foetida*, τοποθετήθηκαν για ριζοβολία σε υπόστρωμα MS υποδιπλασιασμένης δύναμης με 0,5 mg l⁻¹ IBA, υπό συνθήκες και με χρήση τεχνικών που περιγράφονται στο κεφάλαιο 2.5.

Το ποσοστό ριζοβολίας στο υπόστρωμα MS/2 με συγκέντρωση 0,5 mg l⁻¹ IBA ήταν 18,8 % (Πίνακας 15). Ο μέσος αριθμός ριζών ήταν 2,7 (Εικ.29).

Πίνακας 15. Επίδραση της συγκέντρωσης (0,5 mg l⁻¹) IBA στο ποσοστό ριζοβολίας (%) και τον αριθμό των ριζών ανά ριζοβολημένο μικροβλαστό του *A.foetida*

Θρεπτικό Υπόστρωμα +Συγκέντρωση IBA (mg/L)	Ποσοστό ριζοβολίας(%)	Μέσος αριθμός ριζών	Μέσο μήκος ριζών (cm)
½ MS+0,5 IBA	18,8%	2,7	3,8
Fone-way ANOVA			

Οι μέσοι των επεμβάσεων διαχωρίζονται με το Student's t test σε P≤0,05.
*: σημαντικά σε P≤0,05, NS: μη σημαντικά σε P≤0,05

(n ½ MS+0,5 IBA =16)



Εικ.29 ½ MS+0,5 IBA

3ο Πείραμα Ριζοβολίας

Μικροβλαστοί που προήλθαν από την 3^η κατά σειρά υποκαλλιέργεια του είδους *A. foetida*, τοποθετήθηκαν για ριζοβολία, για διάστημα 10 ημερών σε υπόστρωμα MS υποδιπλασιασμένης δύναμης με 2 ή 4 mg l⁻¹ IBA και κατόπιν σε υπόστρωμα MS/2, υπό συνθήκες και με χρήση τεχνικών που περιγράφονται στο κεφάλαιο 2.5.

Το ποσοστό ριζοβολίας στο υπόστρωμα MS/2 με μικροβλαστούς που προήλθαν από 2 mg l⁻¹ υπερτερούσε σε μικρό βαθμό έναντι εκείνων που προήλθαν από υπόστρωμα MS/2 εμπλουτισμένο με 4 mg l⁻¹ IBA, παραμένοντας εντούτοις σε πολύ χαμηλά επίπεδα. Ο μέσος αριθμός ριζών διέφερε σε πολύ μικρό βαθμό μεταξύ των συγκεντρώσεων IBA του ίδιου υποστρώματος και ήταν μεγαλύτερος στο ½ MS+2,0 IBA χωρίς να πρόκειται για στατιστικά σημαντική διαφορά. (Πίνακας 16).

Πίνακας 16. Επίδραση συγκέντρωσης (2 ή 4 mg l⁻¹) IBA στο ποσοστό ριζοβολίας (%) και τον αριθμό των ριζών ανά ριζοβολημένο μικροβλαστό του *A.foetida*

Θρεπτικό Υπόστρωμα +Συγκέντρωση IBA (mg/L)	Ποσοστό ριζοβολίας(%)	Μέσος αριθμός ριζών	Μέσο μήκος ριζών (cm)
½ MS+2,0 IBA	7,4%	1,3 a	3,8 a
½ MS+4,0 IBA	5,9%	1,0 a	1,9 a
Fone-way ANOVA		NS	NS

Οι μέσοι των επεμβάσεων διαχωρίζονται με το Student's t test σε P≤0,05.

*: σημαντικά σε P≤0,05, NS: μη σημαντικά σε P≤0,05
(n 2,0 IBA/ ½ MS=54, n 4,0 IBA/ ½ MS =34)



Εικ.30

Από 2,0 BA σε 4,0 IBA
και από 4,0 IBA σε MS/2



Εικ.31

Από 2,0 BA σε 4,0 IBA
και από 4,0 IBA σε MS/2



Εικ.32

Από 2,0 BA σε 2,0 IBA
και από 2,0 IBA σε MS/2



Εικ.33

Από 2,0 BA σε 2,0 IBA
και από 2,0 IBA σε MS/2



Εικ.34

Από 0,5 BA σε 2,0 IBA
και από 2,0 IBA σε MS/2



Εικ.35

Από 2,0 BA σε 2,0 IBA
και από 2,0 IBA σε MS/2

4ο Πείραμα Ριζοβολίας

Μικροβλαστοί που προήλθαν από την 4^η κατά σειρά υποκαλλιέργεια του είδους *A. foetida*, τοποθετήθηκαν για ριζοβολία σε υπόστρωμα MS υποδιπλασιασμένης δύναμης με 0,2 mg l⁻¹ IBA, υπό συνθήκες και με χρήση τεχνικών που περιγράφονται στο κεφάλαιο 2.5.

Το ποσοστό ριζοβολίας στο υπόστρωμα MS με συγκέντρωση 0,2 mg l⁻¹ IBA ήταν 8,2 % (Πίνακας 17). Ο μέσος αριθμός ριζών ήταν 2,3 (Εικ.36-42).

Πίνακας 17. Επίδραση της συγκέντρωσης (0,2 mg l⁻¹) IBA στο ποσοστό ριζοβολίας (%) και τον αριθμό των ριζών ανά ριζοβολημένο μικροβλαστό του *A. foetida*

Θρεπτικό Υπόστρωμα +Συγκέντρωση IBA (mg/L)	Ποσοστό ριζοβολίας(%)	Μέσος αριθμός ριζών	Μέσο μήκος ριζών (cm)
½ MS+0,2 IBA	8,2%	2,3	2,3
F-one-way ANOVA			

Οι μέσοι των επεμβάσεων διαχωρίζονται με το Student's t test σε P≤0,05.

*: σημαντικά σε P≤0,05, NS: μη σημαντικά σε P≤0,05
(n ½ MS+0,2 IBA =110)



Εικ. 36 Από 0,5 BA σε 0,2 IBA



Εικ. 37 Από 0,5 BA σε 0,2 IBA



Εικ. 38 Από 0,5 BA σε 0,2 IBA



Εικ. 39 Από 0,5 BA σε 0,2 IBA



Εικ. 40 Από 0,5 BA σε 0,2 IBA



Εικ. 41 Από 0,5 BA σε 0,2 IBA



Εικ. 42 Από 0,5 BA σε 0,2 IBA

5ο Πείραμα Ριζοβολίας

Μικροβλαστοί που προήλθαν από την 5^η κατά σειρά υποκαλλιέργεια του είδους *A. foetida*, τοποθετήθηκαν για ριζοβολία σε υπόστρωμα MS υποδιπλασιασμένης δύναμης με 0,1 ή 5,0 ή 10,0 mg l⁻¹ IBA δίχως αλλά και με ενεργό άνθρακα, υπό συνθήκες και με χρήση τεχνικών που περιγράφονται στο κεφάλαιο 2.5.

Ριζοβολία μικροβλαστών παρατηρήθηκε μόνο στο υπόστρωμα MS/2 εμπλουτισμένο με 0,1 mg l⁻¹ IBA παρουσία ή μη ενεργού άνθρακα (CA). Αναφορικά με τα δύο παραπάνω δύο υποστρώματα, δεν παρατηρήθηκαν στατιστικά σημαντικές διαφορές στις υπόλοιπες παραμέτρους αξιολόγησης των αποτελεσμάτων (Πίνακας 18).

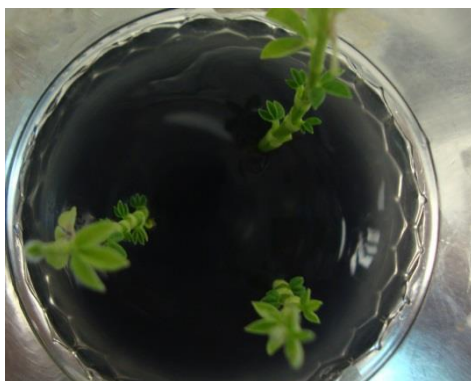
Πίνακας 18. Επίδραση της συγκέντρωσης (0,1 ή 5,0 ή 10,0 mg l⁻¹) IBA παρουσία ή μη ενεργού άνθρακα στο ποσοστό ριζοβολίας (%) και τον αριθμό των ριζών ανά ριζοβολημένο μικροβλαστό του *A. foetida*

Θρεπτικό Υπόστρωμα +Συγκέντρωση IBA (mg/L)	Ποσοστό ριζοβολίας(%)	Μέσος αριθμός ριζών	Μέσο μήκος ριζών (cm)
Χωρίς ενεργό C			
½ MS+0,1 IBA	6,7%	1 a	2,0 b
½ MS+5,0 IBA	0%	0	
½ MS+10,0 IBA	0%	0	
Με ενεργό C			
½ MS+0,1 IBA	6,7%	1 a	2,5 a
½ MS+5,0 IBA	0%	0	
½ MS+10,0 IBA	0%	0	
Fone-way ANOVA		NS	NS

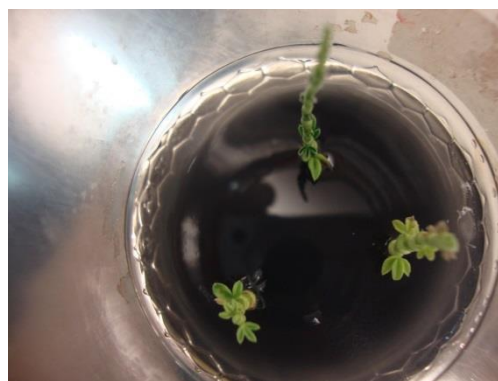
Οι μέσοι των επεμβάσεων διαχωρίζονται με το Student's t test σε P≤0,05.

*: σημαντικά σε P≤0,05, NS: μη σημαντικά σε P≤0,05

(Χωρίς ενεργό C: n ½ MS+0,1 IBA =30, n½ MS+5,0 IBA =27, n½ MS+10,0 IBA =30, Με ενεργό C: n½ MS+0,1 IBA =30, n½ MS+5,0 IBA =30 ,n½ MS+10,00 IBA =30)



Εικ. 43
5,00 IBA με ενεργό C



Εικ. 44
10,00 IBA με ενεργό C

6ο Πείραμα Ριζοβολίας

Μικροβλαστοί που προήλθαν από την 7^η κατά σειρά υποκαλλιέργεια του είδους *A. foetida*, τοποθετήθηκαν για ριζοβολία σε υπόστρωμα MS υποδιπλασιασμένης δύναμης δίχως αλλά και με φυτορρυθμιστικές ουσίες συγκέντρωσης 1 mg l⁻¹ NAA, 1 mg l⁻¹ IAA, 4 mg l⁻¹ IAA και 8 mg l⁻¹ IAA, υπό συνθήκες και με χρήση τεχνικών που περιγράφονται στο κεφάλαιο 2.5.

Το ποσοστό ριζοβολίας στο υπόστρωμα MS/2 με 4 mg l⁻¹ IAA υπερέφερε έναντι των αντιστοίχων που σημειώθηκε σε υπόστρωμα MS υποδιπλασιασμένης δύναμης δίχως φυτορρυθμιστικές ουσίες ή με συγκέντρωση 1 mg l⁻¹ NAA ή 1 mg l⁻¹ IAA, ή 8 mg l⁻¹ IAA. (Πίνακας 19). Μεγαλύτερος μέσος αριθμός ριζών σημειώθηκε στο υπόστρωμα MS/2 με συγκέντρωση 1,0 mg l⁻¹ NAA χωρίς όμως η διαφορά αυτή να είναι στατιστικά σημαντική (Εικ.45-46).

Πίνακας 19. Επίδραση μη προσθήκης φυτορρυθμιστικής ουσίας καθώς και της συγκέντρωσης 1,0 mg l⁻¹ IBA, 1,0 mg l⁻¹ NAA, 1,0 mg l⁻¹ IAA, 4,0 mg l⁻¹ IAA και 8,0 mg l⁻¹ IAA, στο ποσοστό ριζοβολίας (%) και τον αριθμό των ριζών ανά ριζοβολημένο μικροβλαστό του *A. foetida*

Θρεπτικό Υπόστρωμα +Συγκέντρωση IBA (mg/L)	Ποσοστό ριζοβολίας(%)	Μέσος αριθμός ριζών	Μέσο μήκος ριζών (cm)
½ MS	5%	1,0 a	2,1 a
½ MS+1.0 NAA	6,1%	2,5 a	0,85 ab
½ MS+1.0 IAA	0%		
½ MS+4.0 IAA	8,8%	1,7 a	0,68 ab
½ MS+8.0 IAA	0%		
Fone-way ANOVA		NS	NS

Οι μέσοι των επεμβάσεων διαχωρίζονται με το Student's t test σε P≤0,05.

*: σημαντικά σε P≤0,05, NS: μη σημαντικά σε P≤0,05

(n ½ MS = 40, n ½ MS+1.0 NAA =33, n ½ MS+1.0 IAA =36, n ½ MS+4.0 IAA =34, n ½ MS+8.0 IAA =46)



Εικ. 45
1.00 NAA



Εικ. 46
1.00 NAA



Εικ. 47
4.00 IAA



Εικ. 48
4.00 IAA



Εικ. 49
4.00 IAA

3.5 Εγκλιματισμός

Για εγκλιματισμό σε ex vitro συνθήκες τα ανεπτυγμένα έρριζα φυτάρια (Εικ. 26-42 & 45-51) μεταφυτεύθηκαν για περαιτέρω ανάπτυξη σε πλαστικά φυτοδοχεία με τύρφη-περλίτη (1:1 v/v). Τοποθετήθηκαν αρχικά σε θάλαμο σταθερών συνθηκών και στη συνέχεια στο θερμοκήπιο για περαιτέρω ανάπτυξη.

Έγιναν πειράματα εγκλιματισμού από το 1^ο, 2^ο, 3^ο, 4^ο, 5^ο & 6^ο πείραμα ριζοβολίας και δεν επετεύχθη εγκλιματισμός. Τα φυτάρια δύνευαν επιτυχώς, εμφανίζοντας σημάδια καταπόνησης, το στάδιο της πρώτης εβδομάδας στο θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών του εργαστηρίου. Χάνονταν σε ποσοστό 70 % στο στάδιο του πρώτου 7ήμερου στην υδρονέφωση και κατά ποσοστό 30 % μέχρι τη συμπλήρωση ενός μήνα κατά την παραπαμονή τους στο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας & Αρχιτεκτονικής Τοπίου.



Εικ. 50
1.00 IBA



Εικ. 51
1.00 NAA



Εικ. 52
4.00 IAA

4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ-ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

4.1 In vitro καλλιέργεια του είδους *Anagyris foetida*

Ο in vitro πολλαπλασιασμός αποτελεί μία εναλλακτική τεχνική διατήρησης για απειλούμενα φυτικά είδη που καθιστούν δυνατή την επανεισαγωγή τους στο φυσικό περιβάλλον (Wochock 1981), μειώνοντας έτσι τον κίνδυνο εξαφάνισης (Nadeem *et al.*, 2000, Chandra *et al.*, 2006). Στην παρούσα μελέτη σε συγκριτικά πειράματα ελέγχθηκε η δυνατότητα πολλαπλασιασμού in vitro του είδους *Anagyris foetida*, χρησιμοποιώντας θρεπτικό υπόστρωμα πλήρους δύναμης MS χωρίς αλλά και με φυτορρυθμιστικές ουσίες μονωμένα και συνδιαστικά. Χρησιμοποιήθηκαν Αυξίνες: NAA και κυτοκινίνες BA, ZEAT, KIN, 2IP σε διαφορετικές συγκεντρώσεις.

Στην αρχική καλλιέργεια χρησιμοποιήθηκε πολύ μικρή συγκέντρωση BA ($0,05 \text{ mg l}^{-1}$), η οποία δεν επέδρασε σημαντικά στον αριθμό και το μήκος των βλαστών του *A. foetida* συγκριτικά με υποκαλλιέργεια σε υπόστρωμα MS δίχως φυτορρυθμιστικές ουσίες. Αύξηση της συγκέντρωσης BA από $0,05 \text{ mg l}^{-1}$ σε $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ στην 1η υποκαλλιέργεια οδήγησε σε αύξηση του μέσου μήκους βλαστών.

Εξωγενείς εφαρμογές κυτοκινινών και αυξινών είναι γνωστό ότι είναι σημαντικές για επαγωγή και επιμήκυνση των βλαστών σε πολλά φυτικά είδη in vitro (George 1993). Διάφοροι επιτυχείς συνδιασμοί έχουν αναφερθεί, όπως το BA + NAA για τα *Syzygium alternifolium* (Sha Valli Khan *et al.*, 1997), *Acacia catechu* (Hossain *et al.*, 2001), *Zyziphus jujuba* (Hossain *et al.*, 2003), *Teucrium fruticans* (Frabetti *et al.*, 2009), *Celastrus paniculatus* (Martin *et al.*, 2006), και *Acacia auriculiformis* (Girijashankar, 2011).

Η προσθήκη σε υπόστρωμα MS με $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ BA, αυξίνης NAA σε συγκέντρωση $0,1 \text{ mg l}^{-1}$ εντούτοις δε βελτίωσε τα αποτελέσματα έχοντας αντίθετα ουσιαστικά μικρή αρνητική επίδραση. Συνέχιζε να παραμένει χαμηλός ο μέσος αριθμός βλαστών ανα έκφυτο. Με στόχο την αύξηση της παραγωγής βλαστών, διερευνήθηκε η υποκαλλιέργεια σε μεγαλύτερες συγκεντρώσεις BA. Μέγιστος αριθμός βλαστών παρατηρήθηκε σε έκφυτα που υποκαλλιέργηθηκαν σε συγκεντρώσεις $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ BA (προερχόμενα από υποκαλλιέργεια σε $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ BA+ $0,1 \text{ NAA}$), μη διαφέροντας στατιστικά σημαντικά από αντίστοιχες υποκαλλιέργειες σε $2,0 \text{ mg l}^{-1}$ BA (προερχόμενα από υποκαλλιέργεια σε $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ ZEAT) στην 3η υποκαλλιέργεια. BA σε $1,0 \text{ μM}$ οδήγησε σε έκπτυξη του μεγαλύτερου αριθμού βλαστών ανά έκφυτο στο είδος *Cassia siamea* (Fabaceae) συγκριτικά με KIN και TDZ (Parveen *et al.*, 2010).

Παρομοίως από τα ιθαγενή είδη της ελληνικής χλωρίδας (*Arbutus andrachne*, *Arbutus unedo*, *Dianthus fruticosus*, *Euphorbia characias*, *Globularia alypum*, *Lithodora zahni*, *Malosorbus florentina*, *Quercus euboica*, *Sideritis athoa* και *Thymelaea chirsute*) που μελετήθηκαν από την κα Παπαφωτίου (2010), το BA απεδείχθη ως η πιο αποτελεσματική κυτοκινίνη για τον in vitro πολλαπλασιασμό των περισσότερων από τα παραπάνω είδη, με εξαίρεση τα είδη *G. alypum*. (Bertsouklis *et al.*, 2003), *D. fruticosus* (Papafotiou and Stragas, 2009) και *Arbutus andrachne* (Bertsouklis and Papafotiou, 2009).

Στην παρούσα μελέτη, ZEAT σε συγκέντρωση $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ στην 1η υποκαλλιέργεια δεν παρουσίασε σημαντική διαφοροποίηση ως προς τον αριθμό και το μήκος των βλαστών συγκριτικά με υπόστρωμα $0,5 \text{ mg l}^{-1}$ BA. Παρομοίως η χρήση ZEAT σε $1,0 \text{ mg l}^{-1}$ στον in vitro πολλαπλασιασμό του είδους *Anthyllis barba-jovis* L. (οικογένεια Fabaceae) δεν αύξησε το δυναμικό πολλαπλασιασμού σε σύγκριση με το BA στην ίδια συγκέντρωση (Vlachou *et*

al., 2015).

ZEAT σε συγκέντρωση 5,0 mg l⁻¹ έδωσε συγκριτικά μεγάλο μήκος βλαστών. Το μεγαλύτερο μήκος βλαστών σημειώθηκε σε υποστρώματα με 0,5 mg l⁻¹ BA και 2,0 mg l⁻¹ BA.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία πέραν της χρήσης του BA σε καλλιέργειες ιστών, η KIN έχει επίσης βρεθεί ότι είναι πολύ αποτελεσματική στην καθιέρωση πρωτοκόλλου in vitro πολλαπλασιασμού για πολλά φαρμακευτικά είδη που συμπεριλαμβάνουν τα *Ricinus communis* (Chaudhary and Sood, 2008), *Rauwolfia tetraphylla* (Harisaranraj et al., 2009), *Thymus vulgaris* και *T. longicaulis* (Ozudogru et al., 2011).

Στην παρούσα μελέτη η KIN δεν επέδειξε αποτελεσματικότητα στις υποκαλλιέργειες.

Υποκαλλιέργειες εκφύτων *A. foetida* σε συγκεντρώσεις 0,5 mg l⁻¹ KIN και 2,0 mg l⁻¹ KIN έδωσαν το μικρότερο μήκος βλαστών και είχαν πολύ μικρή βλαστογένεση 86,1% και 73,9 % αντίστοιχα.

Δοκιμάστηκε επίσης η χρήση 2-ip. Όμως εκφύτα *A. foetida* που υποκαλλιεργήθηκαν σε 0,5 mg l⁻¹ 2-ip και 2,0 mg l⁻¹ 2-p, έδωσαν τη μικρότερη βλαστογένεση συγκριτικά με όλα τα άλλα υποστρώματα, μόλις 59,1% και 55,0% αντίστοιχα.

Αντιστοίχως στο πλαίσιο ενός ερευνητικού προγράμματος για την ολοκληρωμένη διαχείριση της βλάστησης σε αρχαιολογικούς χώρους της Ελλάδας για την προστασία των μνημείων και την ενίσχυση του ιστορικού τοπίου, εκτιμήθηκαν μικρά θαμνώδη είδη της ελληνικής βλάστησης (*macchia*) για πιθανή χρήση σε αρχαιολογικούς χώρους και μελετήθηκαν μέθοδοι για τη διάδοσή τους, συμπεριλαμβανομένου του μικροπολλαπλασιασμού. Τα επιλεγόμενα είδη ήταν τα *Anthyllis barba-jovis* (*A. Splendens*), *A. Hermanniae*, *Atriplex halimus*, *Ballota acetabulosa*, *Calamintha cretica*, *C. nepeta*, *Lomelosia cretica*, *L. hymettia*, *Limoniastrum monopetalum*, *Teucrium capitatum*, *Thymelaea hirsuta* και *T. Tartonraira*. Με την εξαίρεση του είδους *Teucrium capitatum*, το 2-ip ήταν το λιγότερο κατάλληλο για τον πολλαπλασιασμό των βλαστών από τις δοκιμαζόμενες κυτοκινίνες και η απόκριση των ειδών ήταν καλύτερη στα 1,0-2,0 mg l⁻¹ (Parafotiou et al., 2017).

Εν κατακλείδι, οι υποκαλλιέργειες διέφεραν μεταξύ τους ως προς το δυναμικό πολλαπλασιασμού. Η υποκαλλιέργεια εκφύτων *A. foetida* σε υποστρώματα με 0,5 mg l⁻¹ και 2,0 mg l⁻¹ BA επέδειξε το υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού.

Η υπεροχή του BA έναντι των άλλων κυτοκινινών έχει επίσης αναφερθεί στον μικροπολλαπλασιασμό αρκετών ειδών που ανήκουν στην οικογένεια Fabaceae (Rout, 2005 · Prakesh et al., 2006).

4.2 Ριζοβολία-Εγκλιματισμός του είδους *Anagyris foetida*

Διερευνήθηκε η επίδραση διαφορετικών συγκεντρώσεων αυξινών σχετικά με τη ριζοβολία του είδους *A. foetida*. Η ριζοβολία των μικροβλαστών είναι μία σύνθετη διαδικασία που επηρεάζεται από παράγοντες όπως ο γονότυπος, ο τύπος και η συγκέντρωση των φυτορρυθμιστικών ουσιών (Mylona and Dolan, 2002), κάτι που μπορεί να εξηγήσει τις διαφορές που παρατηρήθηκαν.

Οι Dhabhai et al., (2010), Girijashankar (2011), Khalisi and Al-Joboury (2012), Yadav et al., (2015) πέτυχαν καλύτερα αποτελέσματα αναφορικά με την επαγωγή ριζοβολίας σε θρεπτικό υπόστρωμα MS υποδιπλασιασμένης δύναμης. Η μείωση των επιπέδων αλάτων στην καλλιέργεια έχει αποδειχθεί χρήσιμη για την αύξηση της επαγωγής ριζοβολίας σε πολλά είδη που ανήκουν στην οικογένεια Fabaceae. Ενώ το υπόστρωμα MS πλήρους δύναμης έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως για την in vitro ριζοβολία σε πολλά είδη, τα υψηλά επίπεδα αλάτων μπορεί να παρεμποδίσουν την ριζογένεση (Parveen et al., 2010) και να προκαλέσουν νέκρωση των βλαστών (Agrawal και Sardar 2007). Η μείωση της δύναμης του θρεπτικού υποστρώματος MS κατά το ήμισυ (½ MS) παρήγαγε υψηλά ποσοστά επαγωγής των ριζών

στα είδη *Cassia angustifolia* (Agrawal and Sardar 2007), *Pongamia pinnata* (Sujatha et al., 2008), *Cassia sophera* (Parveen and Shahzad, 2010), *Cassia siamea* (Parveen et al., 2010) και *Albizia lebbek* (Perveen et al., 2011). Μείωση της συγκέντρωσης αλάτων οδηγεί σε αύξηση του αριθμού των ριζών καθώς και του ποσοστού ανάπτυξης και ριζοβολίας. Αύξηση της επαγωγής των ριζών παρατηρήθηκε επίσης στην *Clitoria ternatea* (Mukhtar et al., 2010) και στην *Leucaena leucocephala* (Shaik et al., 2009) όταν καλλιεργήθηκαν σε θρεπτικό υπόστρωμα MS/2 σε σύγκριση με μέσο MS πλήρους δύναμης.

Σύμφωνα με τη βιβλιογραφία η προσθήκη αυξινών μπορεί επίσης να βελτιώσει την ποιότητα των ριζών κατά τη ριζοβολία. Μικροβλαστοί του είδους *Cassia tora* (Quraishi et al., 2011) και *Caragana fruticosa* (Zhai et al., 2011) που καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα ½ MS χωρίς την παρουσία αυξινών σχημάτισαν λεπτές, αδύναμες ρίζες που στερούνται πλευρικής διακλάδωσης. Η προσθήκη αυξινών βελτίωσε το ποσοστό ριζοβολίας, την ανάπτυξη των ριζών και την πλευρική διακλάδωση. Το IBA είναι μια κοινή και ισχυρή αυξίνη που χρησιμοποιείται για την πρόκληση ριζοβολίας σε μικροβλαστούς ειδών που ανήκουν στην οικογένεια Fabaceae. Η αποτελεσματικότητα του IBA έναντι του ινδολο-3-οξικού οξέος (IAA) και του NAA για την ανάπτυξη ριζών σε μικροβλαστούς του είδους *Cassia angustifolia* έχει επίσης καταδειχθεί (Siddique et al., 2013). Το IBA έχει επίσης αποδειχθεί αποτελεσματικό για τη ριζοβολία ψυχανθών θάμνων, συμπεριλαμβανομένων των: *Casanius cajan* (Singh et al., 2003) και *Sutherlandia frutescens* (Dewir et al., 2010). Οι διεγερτικές επιδράσεις του IBA στο σχηματισμό ριζών έχουν επίσης καταδειχθεί σε διάφορα είδη ψυχανθών, όπως *Acacia tortilis* (Nandwani, 1994), *Albizia chinensis* (Sinha et al., 2000), *Dalbergia sissoo* (Pradhan et al., 1998, Singh et al., et al., 2002b) και *Pithecellobium dulce* (Goyal et al., 2012). Η συγκέντρωση της αυξίνης διαδραματίζει σημαντικό ρόλο τόσο στον αριθμό των ριζών όσο και στην ανάπτυξη των ριζών. Χαμηλές συγκεντρώσεις αυξινών ήταν βέλτιστες για την ριζοβολία πολλών ψυχανθών όπως τα είδη *Leucaena leucocephala* (Naik et al., 2000; Shaik et al., 2009) και *Cassia siamea* (Parveen et al., 2010). Η καλλιέργεια των παραπάνω ψυχανθών σε χαμηλές συγκεντρώσεις αυξίνης παρήγαγε σημαντικό πάχος και μήκους ρίζες με πλευρικές διακλαδώσεις. Οι υψηλές συγκεντρώσεις αυξίνης κατά τη διάρκεια της in vitro ριζοβολίας μπορεί να επιβραδύνουν την ριζοβολία με το σχηματισμό κάλου στη βάση του βλαστού. Η αύξηση των επιπέδων αυξίνης προκάλεσε τη δημιουργία κάλου σε βλαστούς του είδους *Caragana fruticosa* (Zhai et al., 2011) και δεν ήταν ευνοϊκή για την ριζοβολία.

Στην παρούσα μελέτη το ποσοστό ριζοβολίας του *A. foetida* σε υπόστρωμα ½ MS με 1,0 mg I⁻¹ IBA ήταν 18,2 %, ενώ διπλασιασμός της συγκέντρωσης της αυξίνης του υποστρώματος σε 2,0 mg I⁻¹ IBA οδήγησε σε μείωση του ποσοστού ριζοβολίας σε 10 %.

Εξαιτίας της φτωχής ριζοβολίας, το στάδιο της in vitro ριζοβολίας μελετήθηκε διεξοδικά με στόχο τη βελτίωση των ποσοστών ριζοβολίας και της ποιότητας των παραγόμενων φυταρίων. Κατά την προτροπή ριζοβολίας με καλλιέργεια σε ½ MS με 0,5 mg I⁻¹ IBA, οι μικροβλαστοί ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό, ήτοι 18,8 %.

Οι αυξίνες είναι απαραίτητες για το σχηματισμό ριζών σε ορισμένα είδη. Μικροβλαστοί του είδους *Pongamia pinnata* απέτυχαν να αναπτύξουν ρίζες μετά από καλλιέργεια, σε υπόστρωμα ½ MS απουσία αυξινών. Η προσθήκη ινδολο-3-βουτυρικού οξέος (IBA), σε συγκέντρωση 0,5 mg I⁻¹, οδήγησε σε ποσοστό ριζοβολίας 82,5% (Kesari et al., 2012).

Σε ορισμένα είδη ψυχανθών, η παρουσία της αυξίνης στο μέσο ριζοβολίας για μεγάλους χρόνους καλλιέργειας δεν προκάλεσε φυσιολογική ριζοβολία (Gulati and Jaiwal, 1994).

Στην παρούσα μελέτη η καλλιέργεια μικροβλαστών *A.foetida* για διάστημα 10 ημερών σε υπόστρωμα ½ MS με 2 mg I⁻¹ IBA (7,4 %) δεν βελτίωσε την ικανότητα ριζοβολίας των βλαστών, ενώ η υποκαλλιέργεια για διάστημα 10 ημερών σε υπόστρωμα ½ MS με 4 mg I⁻¹ IBA οδήγησε σε ακόμα χαμηλότερο ποσοστό ριζοβολίας μέχρι 5,9 %.

Υψηλότερα ποσοστά ριζοβολημένων βλαστών επιτεύχθηκαν μετά από καλλιέργεια σε ½ MS με 0,2 mg I⁻¹ IBA (8,2 %). Το ποσοστό ριζοβολίας στο υπόστρωμα ½ MS με συγκέντρωση 0,1 mg I⁻¹ IBA, ήταν 6,7 %, ενώ μικροβλαστοί που υποκαλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα ½ MS με συγκέντρωση 5,0 mg I⁻¹ και 10,0 mg I⁻¹ IBA δε ριζοβόλησαν.

Η θετική επίρρηση προσθήκης ενεργού άνθρακα (AC) σε θρεπτικό υπόστρωμα ριζοβολίας έχει αναφερθεί σε αρκετά είδη ψυχανθών όπως τα *Acacia leucophloea* και *Cassia angustifolia* (Sharma *et al.*, 2012, Siddique and Anis, 2007). Τα θετικά αποτελέσματα του AC σχετικά με την *in vitro* ριζοβολία μικροβλαστών μπορεί να αποδοθούν στην ικανότητα του AC αναφορικά με την απορρόφηση παρεμποδιστικών ουσιών στο μέσο καλλιέργειας και να μειώσει σημαντικά τους τοξικούς μεταβολίτες και τα επίπεδα φαινολικών (Thomas, 2008). Η προσθήκη ενεργού άνθρακα στο υπόστρωμα καλλιέργειας μπορεί να προωθήσει, είτε να παρεμποδίσει την *in vitro* ανάπτυξη και εξέλιξη, εξαρτώμενου του υποστρώματος, του χρησιμοποιούμενου ιστού και του στόχου του ερευνητή (Pan and van Staden, 1998).

Στην παρούσα μελέτη η καλλιέργεια μικροβλαστών *A. foetida* σε υπόστρωμα MS/2 με ενεργό άνθρακα δεν βελτίωσε την ικανότητα ριζοβολίας των βλαστών. Η υποκαλλιέργειά τους σε υπόστρωμα ½ MS (CA) με 0,1 mg I⁻¹ IBA οδήγησε σε ποσοστό ριζοβολίας 6,7%, ενώ μηδενικό ήταν το ποσοστό ριζοβολίας μικροβλαστών σε υποστρώματα ενεργού άνθρακα (CA) υποδιπλασιασμένης δύναμης MS με 5,0 mg I⁻¹ και 10,0 mg I⁻¹ IBA.

Ελαφρώς υψηλότερα ποσοστά ριζοβολημένων βλαστών επιτεύχθηκαν μετά από καλλιέργεια σε υπόστρωμα MS υποδιπλασιασμένης δύναμης και ήταν 5%.

Επίσης διερευνήθηκε η επίδραση υποστρώματος ½ MS με διάφορες συγκεντρώσεις IAA και NAA. Μικροβλαστοί που καλλιεργήθηκαν σε ½ MS με 1,0 mg I⁻¹ NAA παρουσίασαν ποσοστό ριζοβολίας 6,1%. Το ποσοστό ριζοβολίας στο υπόστρωμα ½ MS με συγκέντρωση 1,0 mg I⁻¹ IAA ήταν 0%. Οι μικροβλαστοί ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό μετά από καλλιέργεια σε 4,00 mg I⁻¹ IAA 8,8 %, ενώ η ριζοβολία σε υπόστρωμα ½ MS με συγκέντρωση 8,0 mg I⁻¹ IAA ήταν 0 %.

Στο μικροπολλαπλασιασμό του είδους *Colutea gifana*, το υψηλότερο ποσοστό ριζοβολίας (μέσος όρος 55%) παρατηρήθηκε σε θρεπτικό υπόστρωμα υποδιπλασιασμένης δύναμης MS εμπλουτισμένο με IBA σε σύγκριση με NAA (Kiani *et al.*, 2010).

Η υπεροχή του IBA σε σχέση με IAA και NAA παρατηρήθηκε ουσιαστικά από την πλειονότητα των ερευνητών και στη *in vitro* ριζοβολία ειδών του γένους *Acacia* (Fabaceae) (Vengadesan *et al.*, 2000; Khalafalla and Daffalla, 2008; Arumugam *et al.*, 2009; Dhabhai *et al.*, 2010; Shahinozzaman *et al.*, 2012; Javed *et al.*, 2013).

Εκτιμώντας συνολικά την επίδραση των υποστρωμάτων ανάπτυξης των ριζών στην παρούσα έρευνα για το είδος *A.foetida*, το υψηλότερο ποσοστό παρατηρήθηκε σε υπόστρωμα ½ MS με 0,5 mg I⁻¹ IBA, με ποσοστό ριζοβολίας :18,8%.

Χαμηλότερες ή υψηλότερες συγκεντρώσεις IBA στο υπόστρωμα ριζοβολίας, επηρέασαν αρνητικά τη ριζοβολία.

Λοιπά ιθαγενή είδη της ελληνικής χλωρίδας παρουσίασαν αντίστοιχη απροθυμία ριζοβολίας υπό *in vitro* συνθήκες. Το είδος *A. halimus* παρουσίασε εξαιρετικά χαμηλά ποσοστά ριζοβολίας, ενώ στα είδη *T. hirsute* and *T. tartonraira* η ριζοβολία δεν ήτο εφικτή (Papafotiou *et al.*, 2017).

Ο εγκλιματισμός και η επιβίωση ενός ικανού αριθμού φυτών *A.foetida* *ex-vitro*, ήταν ανεπιτυχής.

Σύμφωνα με τους Rohr *et al.*, (2003), η ενθάρρυνση των μικροπολλαπλασιασμένων φυταρίων να γίνουν αυτότροφα, μαζί με τη μείωση του υδατικού stress από την αλλαγή του περιβάλλοντος καλλιέργειας, αποτελούν δύο βασικές στρατηγικές για τον επιτυχή

εγκλιματισμό. Από την άλλη, η υδατική καταπόνηση και η φτωχή φωτοσυνθετική ικανότητα είναι οι δύο κύριοι παράγοντες, που ευθύνονται για τη φτωχή επιβίωση των φυταρίων (Preece and Sutter, 1991).

Τα *in vitro* παραγόμενα φυτά είναι ευαίσθητα στο μεταφυτευτικό σοκ με αποτέλεσμα να οδηγούνται σε υψηλή θνησιμότητα κατά τη διάρκεια του τελικού σταδίου του μικροπολλαπλασιασμού (Dhawan and Bhojwani, 1986). Αυτό συμβαίνει επειδή οι συνθήκες ανάπτυξης εντός των φιαλιδίων καλλιέργειας προκαλούν μη φυσιολογική ανάπτυξη και οδηγούν στη δημιουργία ανατομικών και μορφολογικών ανωμαλιών των φυταρίων (Kozai, 1991).

Πολλά είδη που ανήκουν στην οικογένεια fabaceae παρουσιάζουν όχι μόνο χαμηλό ποσοστό ριζοβολίας *in vitro* αλλά και χαμηλό ποσοστό επιβίωσης κατά την περίοδο εγκλιματισμού των φυταρίων (Dewir *et al.*, 2016).

Βιβλιογραφία

- Afrouzian, M., Tavakkoli H. & Zohairi R. (2007). Reporting damage of phyllophagous moth; *Apopestes spectrum* on *Ammodendron* shrub. *Journal of researches of conservation of forests and ranges in Iran*, 1 (9) : 104.
- Ageel, A. M., Mossa J. S., Al-Yahya M. A., Tariq M. and Al-Said M. S. (1987). *Plants Used in Saudi Folk Medicine*. King Saud University Press, Riyadh, Saudi Arabia.
- Agrawal, V., Sardar, P.R. (2007). *In vitro* regeneration through somatic embryogenesis and organogenesis using cotyledons of *Cassia angustifolia* Vahl. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant* .,43: 585-592
- Akan, H. (2013). An ethnobotanical investigation on the baskets of Mardin South East Anatolia. *Adıyaman Üniversitesi Tarımsal Araştırma ve Uygulama Merkezi Uluslararası Dergisi*, 1 (1): 21–30.
- Al-Azizi, M.M., Al-Said, M.S., El-Olemy MM., Abdel Sattar E., Khalifa A.S. (1994) Rhombifoline and 5,6-dehydrolupanine from *Anagyris foetida* L. *Arch. Pharm. Res.*, 17(6):393-7.
- Arianoutsou, M. (2001). Landscape changes in Mediterranean ecosystems of Greece: implications for fire and biodiversity issues. *Journal of Mediterranean Ecology*, 2: 165-178.
- Arumugam, S., Chu, F.H., Wang, S.Y., Chang, S.T., 2009. *In vitro* plant regeneration from immature leaflets derived callus of *Acacia confusa* Merr. via organogenesis. *J. Plant Biochem. Biotechnol.*, 18:197–201.
- Avsar, M. (2009). Effect of some pretreatments on seed germination of bean trefoil (*Anagyris foetida* L.), summer-deciduous shrub. *Fresen. Environ. Bull.*, 18(6):1014-1017.
- Avsar, M. & Ok, T. (2010). Full Length Research Paper Phenological observations on a bean trefoil (*Anagyris foetida* L.) population in the Kahramanmaraş region, Turkey. *Academic Journals. Scientific Research and Essays*, 5(22):3358-3362.

- Ballero, M., Fresu, I. (1993). Le piante di uso officinale nella Barbagia di Seui (Sardegna Centrale). *Fitoterapia*, 64:141–150.
- Baskin, C.C., Baskin, J.J. (1998). Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. San Diego: Academic Press, 6: (101-132). Germination ecology of seeds with physical dormancy.
- Baskin, C.C. (2003). Breaking physical dormancy in seeds-focusing on the lens. *New Phytologist*, 158:229–232.
- Baskin, J.M. And Baskin, C.C. (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed Science Research*, 14: 1–16.
- Bawa, K.S. and Webb, C.J. (1984). Flower, fruit and seed abortion in tropical forest trees: implications for the evolution of paternal and maternal reproductive patterns. *Amer J Bot*, 71:736–751.
- Bawa, K.S. and Buckley, D.P. (1989). Seed: ovule ratios, selective seed abortion, and mating systems in Leguminosae. In Stirton CH, Zarucchi JL (eds) *Advances in legume biology. Monogr Syst Bot Missouri Bot Gard*, 29:243–262.
- Baytop, T. (1999). *Therapy with Medicinal Plants in Turkey (Past and Present)*, 2nd ed, Nobel Tıp Kitabevleri Ltd., İstanbul, 334-335.
- Bertsouklis K., M. Papafotiou and G. Balotis (2003). Effect of medium on in vitro growth and ex vitro establishment of *Globularia alypum*. *Acta Horticulturae*, 616:177- 180.
- Bertsouklis K.F. and M. Papafotiou (2009). In vitro propagation of *Arbutus andrachne* L. *Acta Horticulturae*, 813:477-480.
- Beșleagă, R., Tălmăciu, M., Diaconu, A., Tălmăciu, N., Cârdei, E., Corneanu, G. (2013). Control of the codling moth (*Cydia pomonella* L.) in accordance with the special evolution of biology of Iași county. *Journal of Food, Agriculture & Environment*, 11(1): 634-640.
- Bnouham, M., Merhfour F. Z ., Elachoui M., Legssyer A., Mekhfi H., Lamnaouer D., Ziyat A. (2006). Toxic effects of some medicinal plants used in Moroccan traditional medicine. *Moroccan J. Biol.*, 2(3):21-30.
- Browicz, K. (1983). *Chorology of trees and shrubs in south-west Asia and adjacent regions. Vol. 2*, Polish Academy of Sciences, Institute of Dendrology, Warszawa-Poznan.
- Chandra, B., Palni, L.M.S. & Nandi S.K. (2006). Propagation and conservation of *Picrorhiza kurrooa* Royle ex Benth.: an endangered Himalayan medicinal herb of high commercial value. *Biodivers. Conserv.*, 15: 2325–2338.
- Chaudhary, H., Sood, N. (2008). Purification and partial characterization of lectins from in vitro cultures of *Ricinus communis*. *Plant. Tiss. Cult .Biotechnol .*:89–102
- Clements, F.E. and Shear C.L.(1931). *The Genera of Fungi*. New York: H.W. Wilson.

- Copeland, L.O. and McDonald, M.B. (1995). Seed dormancy. In: Principles of seed science and technology. New York: Chapman & Hall, 127-152.
- Cruiz, E.D., Martins, F. de O., Carvalho, J.E.U. de. (2001). Biometria de frutos e sementes e germinação de jatobá-curuba (*Hymenaea intermedia* Ducke, Leguminosae-Caesalpinioideae). *Revista Brasileira de Botânica*, 24:161-165.
- Degreef, J., Rocha, O.J., Vanderborght, T., Baudoin J. (2002). Soil seed bank and seed dormancy in wild populations of lima bean (*Fabaceae*): considerations for in situ and ex situ conservation. *Am. J. Bot.*, 89(10): 1644-1650.
- Dewir, Yh., Sing, N., Shaik, S., Nicholas, A. (2010). Indirect regeneration of the Cancer bush (*Lessertia frutescens* L.) and detection of L-canavine in vitro plantlets using NMR. *In vitro Cell Dev Biol.- Plant.*, 46: 41-46.
- Dewir, Y.H, Murthy H.N., Ammar H. M. , Alghamdi S.S. , Al-Suhaibani A. N, Alsadon A.A. ,and Paek K.Y. (2016). In vitro Rooting of Leguminous Plants: Difficulties, Alternatives, and Strategies for Improvement. *Hortic. Environ. Biotechnol.*, 57(4):311-322. 2016.
- Dhabhai, K., Batra, A. (2010). Hormonal regulation impact on regeneration of *Acacia nilotica* L. a nitrogen fixing tree. *World Appl. Sci. J.*, 11:1148–1153.
- Dhabhai, K., Sharma, M.M., Batra, A. (2010). In vitro clonal propagation of *Acacia nilotica* (L.) – a nitrogen fixing tree. *Researcher*, 2:7–11.
- Dhawan, V. and Bhojwani, S.S. (1986). Micropropagation in crop plants. *Glimpses Plant Res.*, 7: 1-75.
- Diffenbaugh, N., Pal, J., Giorgi, F., & Gao, X. (2007). Heat stress intensification in the Mediterranean climate change hotspot. *Geophysical Research Letters*, 34(11).
- Elzinga, J.A. (2005). The effects of habitat fragmentation on a tri-trophic system: *Silene latifolia*, *Hadena bicurris* and its parasitoids. PhD thesis, Utrecht University, Netherlands.
- FAO (Food and Agriculture Organization of the United Nations), IUSS (International Union of Soil Sciences), ISRIC (International Soil Reference and Information Centre), (2006). World Reference Base for Soil Resources—A Framework for International Classification, Correlation and Communication. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.
- Finch-Savage, WE., Leubner-Metzger, G. (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol.*, 171(3): 501-23.
- Fowler, J.A.P., Bianchetti, A. (2000). Dormência em sementes florestais. Colombo: Embrapa Florestas.
- Frabetti, M., Gutierrez-Pesce, P., Mendoza-de Gyves, E., Rugini, E. (2009). Micropropagation of *Teucrium fruticans* L., an ornamental and medicinal plant. *In Vitro Cell Dev. Biol.- Plant.*, 45:129–134.

- Gautheret, R.J. (1939). Sur la possibilite de realiser a culture indefinite des tissues de tubercules de carotte. C R Hebd Seances Acad Sci., 208:118–120.
- Gehan-Jayasuriya, G.M., Wijetunga, A.S.T.B., Baskin, J.M., Baskin, C.C. (2013). Seed dormancy and storage behavior in tropical Fabaceae: a study of 100 species from Sri Lanka. Seed Science Research, 23:257-269.
- Girijashankar, V. (2011). Micropropagation of multipurpose medicinal tree, *Acacia auriculiformis*. J. Med. Plant. Res., 5:462–466.
- González-Pérez, M.A., Sosa, P.A. Batista, F.J. (2009). Genetic variation and conservation of the endangered endemic *Anagyris latifolia* Brouss. ex Willd. (Leguminosae) from the Canary Islands. Plant Syst Evol, 279: 59.
- Goyal, P., Kachhwaha, S., Kothari, S.L. (2012) Micropropagation of *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth-a multipurpose leguminous tree and assessment of genetic fidelity of micropropagated plants using molecular markers. Physiol. Mol. Biol. Plants, 18:169-176.
- Gresta, F., Avola G., Abbate, V. (2007). Germination ecology of *Scorpiurus subvillosus* L. seeds: the role of temperature and storage time. Plant Ecol., 190:123-130.
- Greuter, W., Burdet, H. M., Long, G. (1989). Med-checklist, 4. - Genève & Berlin.
- Gulati, A., Jaiwal, P.K. (1994). Plant regeneration from cotyledonary node explants of mungbean (*Vigna radiata* (L.) Wilczek). Plant Cell. Rep., 13:523-527.
- Guler, Y. and Cagatay, N. (2001). Systematical studies on the genus *Bracon* (*Glabrobracon*) (Hymenoptera, Braconidae: Braconinae) in Ankara province. Turkish Journal of Zoology, 25: 275-286.
- Haberlandt, G. (1902) Kulturversuche mit isolierten Pflanzenzellen. Sitzungsber K Preuss Akad Wiss Wien. Math Naturwiss, 111:69–92.
- Halperin, J. and Wysoki, M. (2013). On biology and ecology of *Uresiphita limbalis* (Lepidoptera: Pyralidae) in Israel. Zoology in the Middle East 2005, 35(1):87-92.
- Harborne, J.B., Boulter, D., and Turner, B.L. (1971). Chemotaxonomy of the Leguminosae. Academic press, London.
- Harisaranraj, R., Suresh, K., Saravanbabu, S. (2009). Rapid clonal propagation of *Rauvolfia tetraphylla* L. Acad. J. Plant. Sci., 2:195–198.
- Harley, R. M. & Reynolds, T. (1992). Advances in Labiatae Science. The Royal Botany Gardens Kew, Richmond.
- Hartmann, HT, Kester, DE, Davies, FT, Geneve, RL (2002). Plant Propagation Principles and Practices. 7 th Edition. Prentice Hall. New Jersey, 367-374.

- Hauser, T.P. (1994). Germination, predation and dispersal of *Acacia albida* seeds. *Oikos* 71: 421–426.
- Herendeen, P.S. and Dilcher, D.L. (1992). *Advances in Legume Systematics. The fossil record.* Royal Bot. Garden, London.
- Herrera, J. (1985). Nectar secretion patterns in southern Spanish Mediterranean scrublands. *Isr. J. Bot.*, 34:47–58.
- Heywood, V.H., Ball, P.W. (1968). Leguminosae. In: Tutin TG et al., eds. *Flora Europaea.* Cambridge: Cambridge University Press, 2: 80–191.
- Hossain, S.N., Rahman, S., Joydhar A., Islam, S., Hossain, M. (2001). In vitro propagation of *Acacia catechu* Willd. *Plant Tiss. Cult.*, 11:25–29.
- Hossain, S.N., Munshi, M.K., Islam, M.R., Hakim, L., Hossain, M. (2003). In vitro propagation of Plum (*Zyziphus jujuba* Lam.). *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 13:81–84.
- Innocenti, G., Dall'Acqua S., Viola, G., Loi, M.C. (2006). Cytotoxic Constituents From *Anagyris Foetida* Leaves. *Fitoterapia*, 77 (7-8):595-597.
- Javed, S.B., Anis, M., Khan, P.R., Aref, I.M., 2013. In vitro regeneration and multiplication for mass propagation of *Acacia ehrenbergiana* Hayne: a potential reclament of denude arid lands. *Agroforestry Syst.* 87:621–629.
- Jordano, P. (1990). *Biología de la reproducción de tres especies del género Lonicera* (Caprifoliaceae) en la Sierra de Cazorla. *An. Jard. Bot. Madrid*, 48:31–52.
- Kazemi, E. (2014). Biodiversity of the subfamily catocalinae boisduval, 1818. Lepidoptera noctuidae in Iran. *International journal of advanced biological and biomedical research*, 2(1): 25-33.
- Kesari V., Ramesh A.M., Latha R. (2012). High frequency direct organogenesis and evaluation of genetic stability for in vitro regenerated *Pongamia pinnata*, a valuable biodiesel plant. *Biomass Bioenerg.* 44:23-32.
- Khalisi, A.A., Al-Joboury, K.R. (2012). In vitro propagation of *Acacia farnesiana*. *Al-Mustansiriya J. Sci.*, 23:29–34.
- Khalafalla, M.M, Daffalla, H.M. (2008). In vitro micropropagation and micrografting of gum arabic tree [*Acacia Senegal* (L.) Wild]. *Int. J. Sustain Crop Prod.*, 3:19-27.
- Kiani, M., H. Zarghami, A., Tehranifar and Memariani, M. (2010). Conservation of *Colutea gifana*, a rare and potential ornamental species, using in vitro method. *J. Cell. Mol. Res.*, 2 (2): 81-85.
- Kozai T., Kubota, C. and Jeong, B.R. (1997). Enviromental control for the large-scale, production of plants through in vitro techniques. *Plant cell, Tissue and Organ culture*, 51 : 49-56.

- Kravchenko, V. D., Muller, G., Orlova O. B., Seplyarskaya V.N. (2004). The Catocalinae (Lepidoptera: Noctuidae) of Israel. *Russian Entomological journal*, 13(3): 175-186.
- Kuklinski, C. (2000). *Farmacognosia*. Omega, Barcelona.
- Lavin, M., Herendeen, P. S., Wojciechowski, M. F. (2005). Evolutionary rates analysis of leguminosae implicates a rapid diversification of lineages during the Tertiary. *Systematic Biology*, 54(4):575–594.
- Liener, I. (2012). *Toxic Constituents of Plant Foodstuffs*. Academic Press, Inc., New York, USA.
- Lock, J.M. (2005). Tribe Thermopsidae. In: Lewis, G., Schrire, B., Mackinder, B. & Lock, M. (eds.), *Legumes of the World*. Royal Botanic Gardens, Kew, 263-265.
- Loi, M.C., Frajus L., Maxia A. (2002). Le piante utilizzate nella medicina popolare nel territorio di Gesturi (Sardegna centro-meridionale. *Atti Soc. tosc. Sci. flat., Mem., Serie B*, 109, pagg. 167-176, figg. 3, tab. I
- López, J, Devesa JA, Ruiz T, Ortega-Olivencia A. (1999). Seed germination in Genisteae (Fabaceae) from south-west Spain. *Phyton.*, 39: 107–129
- Mabberley, D.J. (1997). *The Plant-book. A Portable Dictionary of the Vascular Plants*. Cambridge University Press, Cambridge.
- Martin G, Geetha S.P, Raja S.S., Raghu A.V., Balachandran I, Ravindran P.N. (2006) An efficient micropropagation system for *Celastrus paniculatus* Willd.: a vulnerable medicinal plant *J. Fores. Res.*, 11:461–46.
- Mesa, R., Marrero M., Carqué E., Oval J.P., Afonso L., Hernández A., Rodríguez B., Acevedo A., Naranjo, J. & Santana, J. (2003). *Anagyris latifolia* Brouss. ex Willd. Pp. 90–91 in: Bañares, Á., Blanca, G., Güemes, J., Moreno, J.C. & Ortiz, S. (eds.), *Atlas y Libro Rojo de la Flora Vas-cular Amenazada de España*. Dirección General de Conservación de la Naturaleza, Madrid.
- Mukhtar, S., Ahmad, N., Khan, M.I., Anis, M., Ibrahim, M.A. (2012). Influencing micropropagation in *Clitoria ternatea* L. through the manipulation of TDZ levels and use of different explant types. *Physiol. Mol. Bio.l Plants*, 18:381-386.
- Mylona, P., Dolan, L. (2002). The root meristem. In: Macmanus M.T.: Weit B.E. (eds) *Meristematic tissues in plant growth and development*. Sheffield Academic, Sheffield, 279-292.
- Nadeem, M., Palni, L.M.S., Purohit, A.N., Pandey, H. & Nandi, S.K. (2000). Propagation and conservation of *Podophyllum hexandrum* Royle: an important medicinal herb. *Biol. Conserv.*, 92: 121–129.
- Naik, S.K., Pattnaik, S., Chand, P.K (2000). In vitro propagation of pomegranate (*Punica granatum* L. cv. Ganesh) through axillary shoot proliferation from nodal segments of mature tree. *Sci. Hortic.*, 79:175-183.

- Nandwani, D. (1994). In vitro propagation of a tree legume adapted to arid lands *Acacia tortilis* subsp *raddiana*. *Ann. Sci. For.*, 52:183-189.
- Nikolaeva, MG. (1967). [Physiology of deep dormancy in seeds.] Leningrad, Russia: Izdatel'stvo 'Nauka' (in Russian). [Translated from Russian by Z. Shapiro (1969), National Science Foundation, Washington, DC, USA: 219.]
- Nikolaeva, MG. (2004). On criteria to use in studies of seed evolution. *Seed Science Research*, 14: 315–320.
- Oboyski, P.T. (2011): The Systematics, Evolution, and Ecology of Hawaiian *Cydia* (Lepidoptera: Tortricidae). PhD thesis, University of California, Berkeley.
- Ocete, R. and Pérez, M.A. (1996). Efectos de la aplicación de extractos de *Daphne gnidium* L. y *Anagyris foetida* L. sobre diversos grupos taxonómicos. *Bol. San. Veg. Plagas*, 22: 45-56.
- Ortega-Olivencia, A., Devesa, J.A. (1997). Seed set and germination in some wild species of *Vicia* from SW Europe (Spain). *Nordic Journal of Botany*, 17: 639–648.
- Ortega-Olivencia, A., Rodríguez-Riano, T., Valtuena, F.J., Lopez, J., Devesa, J.A. (2005). First confirmation of a native bird-pollinated plant in Europe. *Oikos*, 110: 578-590.
- Ortega-Olivencia, A., Catalán, P. (2009). Systematics and evolutionary history of the circum-Mediterranean genus *Anagyris* L. (Fabaceae) based on morphological and molecular data. *Taxon*, 58(4):1290–1306.
- Özgen, M., Özdilek, A., Birsin, MA., Önde, S., Şahin, D., Açıkgoz, E., Kaya, Z. (2012). Analysis of ancient DNA from in vitro grown tissues of 1600-year-old seeds revealed the species as *Anagyris foetida*. *Seed Sci. Res.*, 22: 279–286.
- Ozudogru EA, Kaya E, Kirdok E, Issever-Ozturk S (2011) In vitro propagation from young and mature explants of thyme (*Thymus vulgaris* and *T. longicaulis*) resulting in genetically stable shoots. *In Vitro Cell Dev. Biol-Plant*, 47:309–320.
- Paiva, J. (1999). Thermopsidae. In: Talavera S, Aedo C, Castroviejo S, Romero Zarco C, Sáez L, et al., editors. *Leguminosae (partim)*. *Flora Iberica VII(I)*. Madrid: Real Jardín Botánico de Madrid, CSIC, 37–39.
- Palamarev, E. (1989). Paleobotanical evidences of the Tertiary history and origin of the Mediterranean sclerophyll dendroflora, *Plant Syst. Evol.*, 162(1):93-107.
- Papafotiou M. and J. Stragas (2009). Seed germination and in vitro propagation of *Dianthus fruticosus* L. *Acta Horticulturae*, 813, 481-484.
- Papafotiou M. (2010). In vitro propagation of temperate zone woody plants with potential ornamental use. *Acta Horticulturae*, 885:255-262.
- Papafotiou, M., Martini, A.N., Vlachou, G. (2017). In vitro propagation as a tool to enhance the use of native ornamentals in archaeological sites of Greece. *Acta Hort.*, 1155:301-308.

- Parveen, S., Shahzad, A., Saema, S. (2010). In vitro plant regeneration system for *Cassia siamea* Lam., a leguminous tree of economic importance. *Agrofor. Syst.*, 80(1) :109-116.
- Parveen, S., Shahzad, A. (2010). TDZ-induced high frequency shoot regeneration in *Cassia sophera* Linn. via cotyledonary node explants. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 16:201-206.
- Perveen, S., Varshney, A., Anis, M., Aref, I.M. (2011). Influence of cytokinins, basal media and pH on adventitious shoot regeneration from excised root cultures of *Albizia lebbeck*. *J. Forest. Res.*, 22:47-52.
- Polhill, R.M. and Raven, P.H. (1981). *Advances in Legume Systematics*. Royal Bot. Garden, London.
- Perez-Izequierdo, M.A., Ocete, R. (1994). Antifeedant activity of extracts of *Daphne gnidium* L. and *Anagyris foetida* against *Spodoptera littoralis* (Boisd). (Lepidoptera: Noctuidae). *Boletín de Sanidad Vegetal, Plagas*, 20:623–629.
- Petanidou, T., Smets, E. (1995). The potential of marginal lands for bees and apiculture: nectar secretion in Mediterranean shrublands. *Apidologie*, 26:39–52.
- Phytochemical Database, USDA–ARS–NGRL, Beltsville Agricultural Research Center, Beltsville, Maryland. <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/duke/ethnobot.pl>.
- Polhill, R.M., Raven P.H., Stirton C.H. (1981). Evolution and systematics of the Leguminosae. In: Polhill R M. and Raven P.H. (eds). *Advances in Legume Systematics*, Royal Botanic Gardens, Kew, 1-26.
- Polhill, R.M. and Raven, P.H. (1981). *Advances in Legume Systematics*. Royal Bot. Garden, London.
- Polunin O. and Huxley, A. (1990). *Publs. Chatto & Windus London*, 662.
- Pradhan, C., Kar, S., Pattnaik, Chand, P.K. (1998). Propagation of *Dalbergia sissoo* Roxb. through in vitro shoot proliferation from cotyledonary nodes. *Plant Cell Rep* 18:122-126.
- Prakash, E., Sha Valli Khan, P.S., Sreenivasa Rao T.J.V., Meru E.S. (2006). Micropropagation of red sanders (*Pterocarpus santalinus* L.) using mature nodal explants. *Journal of Forest Research*, 11:329–335.
- Preece, J.E and Sutter E.G. (1991). Acclimatization of micropropagated plants to the greenhouse and field. In: Debergh P.C., Zimmerman R.H. (eds). *Micropropagation. Technology and Application*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 71-93.
- Quraishi A, Jadhav SK, Gupta S (2011). In vitro clonal propagation of *Cassia tora* L. (Coffee Pod): A medicinal plant. *Biotechnol.*, 10:546-550.
- Quatrini, P., Scaglione, G., Incannella, G., Badalucco, L., Puglia, A.M., La Mantia, T. (2003). Microbial inoculants on woody legumes to recover a municipal landfill site. *Water Air Soil Pollut.*, 189–199.

- Ramos, F.N., Santos, F.A.M. (2005). Phenology of *Psychotria tenuinervis* (Rubiaceae) in Atlantic forest fragments: fragment and habitat scales. *Canadian Journal of Botany*, 83:1305–1316.
- Requena, N., Perez-Solis, E., Azcón-Aguilar, C., Jeffries, P., Barea, J.M. (2001). Management of indigenous plant–microbe symbioses aids restoration of desertified ecosystems. *Appl. Environ. Microbiol.*, 67: 495–498.
- Righi-Assia, A. F., Khelil, M. A., Medjdoub-Bensaad, F. and Righi, K. (2010). Efficacy of oils and powders of some medicinal plants in biological control of the pea weevil *C. chinensis* L. *African Journal of Agricultural Research*, 5(12):1474-1481.
- Rodríguez-Riaño, T., Ortega-Olivencia, A., Devesa, J.A. (1999). The functionality of the type of androecium in Fabaceae. *Ann. Bot.* 83: 109-116.
- Rodríguez-Riaño, T., Ortega-Olivencia, A., Devesa, J.A. (2004). Reproductive biology in *Cytisus multiflorus* (Fabaceae). *Ann Bot Fenn* 41:179–188.
- Rohr R., Iliev, I., Scaltsoyiannes, A. and Tsoulpha, P.(2003). Acclimatization of micropropagated forest trees. *Acta Horticulturae*, 616, 59-69.
- Rout, G.R. (2005) Micropropagation of *Clitoria ternatea* Linn. (Fabaceae) an important medicinal plant. *In Vitro Cellular and Developmental Biology Plant* 41:516–519.
- Rundel, P.W.(2007). Mediterranean-Climate Ecosystems. *Encyclopedia of Biodiversity*. Elsevier.
- Sacheti, U., Al-Rawahy, S.H. (1998). The effects of various treatments on the germination of important leguminous shrub-tree species on the Sultanate of Oman. *Seed Science and Technology*, 26:691-699.
- Sha Valli Khan, P.S., Prakash, E., Rao K.R. (1997). In vitro propagation of an endemic fruit tree *Syzygium alternifolium* (Wight) Walp. *Plant Cell Rep.*, 16:325–328.
- Shahinozzaman, M., Azad, M.A.K., Amin, M.N., 2012. In Vitro clonal propagation of a fast growing legume tree-*Acacia mangium* Willd. employing cotyledonary node explants. *Not. Sci. Biol.* 4:79–85.
- Shaik, N.M., Arha, M., Nookaraju, A., Gupta, S.K., Shrivastava, S., Yadav, A.K., Kulkarni, P.S., Abhilash, O.U., Rishi, K. (2009). Improved method of in vitro regeneration in *Leucaena leucocephala*. *Physiol. Mol. Biol. Plants*, 15:311-318.
- Sharma, K.P., Trivedi, R., Purohit D.S.,(2012). Activated charcoal improves rooting in vitro-Derived *Acacia leucophloea* shoots. *International Journal of Plant Developmental Biology*, 6 (Special Issue 1):47-50.
- Pan MJ, Van staden J (1998) The use of charcoal in vitro, a review. *Plant Growth Regul* 26: 155-163.

- Siddique, I., Anis, M. (2007). In vitro shoot multiplication and plantlet regeneration from nodal explants of *Cassia angustifolia* (Vahl.): A medicinal plant. *Acta Physiol Plant* 29:233-238.
- Siddique, I., Javed, S.B., Al-Othman, M. R., Anis, M. (2013). Stimulation of in vitro organogenesis from epicotyl explants and successive micropropagation round in *Cassia angustifolia* Vahl.: an important source of sennosides. *Agrofor Syst* 87:583-590.
- Singh, AK, Chand, S., Pattnaik, S., Chand, P.K. (2002b). Adventitious shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of *Dalbergia sissoo* Roxb. a timber yielding tree legume. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*: 68:203-209.
- Singh, N.D., Sahoo, L., Sarin, N.B., Jaiwal, P.K (2003). The effect of TDZ on organogenesis and somatic embryogenesis in pigeonpea (*Cajanuscajan* L. Millsp) *Plant Sci.* 164: 341-347.
- Sinha, R.K., Majumdar, K., Sinha, S.(2000). In vitro differentiation and plant regeneration of *Albizia chinensis* (Osb.) Merr. *In Vitro Cell Dev Biol-Plant.*, 36:370-373.
- Skoog, F, Miller CO (1957) Chemical regulation of growth and organ formation in plant tissues cultured in vitro. *Symp. Soc Exp Biol* 11:118–131.
- Sujatha, K., Panda, B.M., Hazra, S.(2008). De novo organogenesis and plant regeneration in *Pongamia pinnata*, oil producing tree legume, 22:711-716.
- Takken, W. and Kline, D.L (1989). Carbon Dioxide and 1-octen-3-ol as mosquito attractants. *Journal of the American Mosquito control Association*, 5,(3):311-316.
- Thomas, T.D. (2008). The role of activated charcoal in plant tissue culture. *Biotechnol Adv.*, 26:618-631.
- Turner, B.L. (1981). *Thermopsidae* Yakovlev. In: Polhill, R.M. & Raven, P.H. (eds), *Advances in Legume Systematics*. Royal Botanic Gardens, Kew, 403–407.
- Valipour, J., Vahedi, H.A., Zamani A.A. (2015). Morphology and Biology of *Apopetes Spectrum Esper, 1787* (Lep: Noctuidae) on Stinking Bean Trefoil, *Anagyris Foetida* L. (Leguminosae) in Kermanshah Province . *J. Appl. Environ. Biol. Sci.*, 5(7):149-156.
- Van Assche, J.A., Debucquoy, K.L.A. and Rommens, W.A.F. (2003). Seasonal cycles in the germination capacity of buried seeds of some Leguminosae (Fabaceae). *New Phytologist* 158:315-323.
- Van der Goes van Naters, W. M., Bootsma, L., Den Otter, C. J., Belemtougri, R. G. (1995). Search for tsetse attractants: A structure-activity study on 1-octen-3-ol in *Glossina fuscipes fuscipes* (Diptera: Glossinidae). *Journal of chemical ecology*, 22(2):343-355.
- Van Overbeek, J., Conklin, M. E. and Blakeslee, A. F. (1941) Factors in coconut milk essential for growth and development of very young *Datura* embryos. *Science* 94: 350– 351.

- Van Staden J, Manning JC, Kelly, KM. (1989). Legume seeds—the structure: function equation. In: Stirton CH, Zarucchi JL, eds. *Advances in legume biology*. St Louis: Missouri Botanical Garden, 417–450.
- Valtueña, F.J., Ortega-Olivencia, A., Rodríguez-Riaño, T., Lopez, J. (2008a). Reproductive biology in *Anagyris foetida* L. (Leguminosae), an autumn-winter flowering and ornithophilous Mediterranean shrub. *Bot. J. Linn. Soc.*, 157: 519-532.
- Valtueña, F.J., Ortega-Olivencia, A., Rodríguez-Riaño, T., (2008b). Germination and seed bank biology in some Iberian populations of *Anagyris foetida* L. (Leguminosae). *Plant Syst. Evol.*, 275: 231-243.
- Valtueña, F.J., Ortega-Olivencia, A., Rodríguez-Riaño, T. (2010). Causes of low fruit- and seed-set in bird-pollinated *Anagyris foetida* L. (Leguminosae): pollen limitation and other extrinsic factors. *Folia Geobot* 45: 77–94.
- Vengadesan, G., Ganapathi, A., Anand, R.P., Anbazhagan, V.R. (2000). In vitro organogenesis and plant formation in *Acacia sinuata*. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.*, 61:23-28.
- Venier, P., Funes, G. and Carrizo-García, C. (2012). Physical dormancy and histological features of seeds of five *Acacia* species (Fabaceae) from xerophytic forests in central Argentina. *Flora-Morphology, Distribution, Functional Ecology of Plants* 207:39-46.
- Vlachou, G., Papafotiou, M., Bertouklis, K.F. (2015). Studies on in vitro propagation of *Anthyllis barba-jovis* L. 6th International Symposium on Production and Establishment of Micropropagated Plants, 19-24 April 2015, Sanremo, Italy, *Acta Horticulturae*, in press.
- Went, F.W. (1926) On growth accelerating substances in the coleoptile of *avena sativa*. *Proc Kon Ned Akad Wet* 30:10-19.
- White, P.R. (1934) Potentially unlimited growth of excised tomato root tips in a liquid medium. *Plant Physiol.* 9, 585–600.
- Yacharoen, S., Tian Q., Chomnunti, P., Boonmee, S., Chukeatirote, E., Bhat, J.D., Hyde, K.D., (2015) . *Patellariaceae* revisited. *Mycosphere* 6(3), 290–326.
- Yadav, R., Yadav, N., Kumar, S., (2015). An improved micropropagation and assessment of genetic fidelity in multipurpose medicinal tree *Acacia auriculiformis*. *Proc. Natl. Acad. of Sci., India Sect. B: Biol. Sci.*, 1–9.
- Yaltirik, F. (1972). A summer-deciduous woody plant in Turkey: bean trefoil (*Anagyris foetida* L.) and its importance in forestry practice. *J. Istanbul Univ. Faculty For. Series A*, 22(1): 295-301.
- Zargari, A. (1997). *Medicinal plants*, 4th ed. Tehran University, Iran.

- Zhai X., Yang L., Shen H. (2011). Shoot multiplication and plant regeneration in *Caragana fruticosa* (Pall.)Besser. *J.Forest. Res.*, 22:561-567.
- Καρούσου, Ε. (2014). Μελέτη των αιθερίων ελαίων των αυτοφυών ειδών της οικογένειας Fabaceae στην Ελλάδα. Μεταπτυχιακή μελέτη, Γ.Π.Α., Αθήνα.
- Σκαλτσογιάννης, Α., (1990). "Εφαρμογή της ιστοκαλλιέργειας στη βελτίωση δασοπονικών δέντρων". Επιστημονική επετηρίδα του Τμήματος Δασολογίας και Φυσικού Περιβάλλοντος. Τόμος - Αφιέρωμα προς τιμή του ομότιμου Καθηγητή Κ.Β. Μπασιώτη. 2 : 67-78.
- Σφήκας Γ., (1987). Αγριολούλουδα της Κρήτης. Εκδ. Efstathiadis Group, 310.