

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗΣ ΤΟΠΙΟΥ

**Πολλαπλασιασμός και Φυτωριακή Καλλιέργεια Αυτοφύων
Ειδών της Μεσογειακής Χλωρίδας, για την Αξιοποίηση ως
Καλλωπιστικών, Ιδιαίτερα σε Αρχαιολογικούς Χώρους, Καθώς
και στη Δημιουργία Νέων Πρόσθετων Τροφίμων, Καλλυντικών
και Υγειοπροστατευτικών Συμπληρωμάτων**



Διδακτορική Διατριβή
Γεωργίας Π. Βλάχου, Γεωπόνου MSc.

Επιβλέπουσα: Καθηγήτρια Μ. Παπαφωτίου

ΑΘΗΝΑ 2020

ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗΣ ΤΟΠΙΟΥ

Πολλαπλασιασμός και Φυτωριακή Καλλιέργεια Αυτοφύων Ειδών της Μεσογειακής Χλωρίδας, για την Αξιοποίηση ως Καλλωπιστικών, Ιδιαίτερα σε Αρχαιολογικούς Χώρους, Καθώς και στη Δημιουργία Νέων Πρόσθετων Τροφίμων, Καλλυντικών και Υγειοπροστατευτικών Συμπληρωμάτων

Propagation and Cultivation Protocols of Native Species of the Mediterranean Flora, for use as Ornamental, Especially in Archaeological Sites, as Well as in the Creation of New Food Additives, Cosmetics and Health Protection Supplements

Διδακτορική Διατριβή
Γεωργίας Π. Βλάχου, Γεωπόνου MSc.

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

ΑΘΗΝΑ 2020

Διδακτορική Διατριβή

«Πολλαπλασιασμός και Φυτωριακή Καλλιέργεια Αυτοφυών Ειδών της Μεσογειακής Χλωρίδας, για την Αξιοποίηση ως Καλλωπιστικών, Ιδιαίτερα σε Αρχαιολογικούς Χώρους, Καθώς και στη Δημιουργία Νέων Πρόσθετων Τροφίμων, Καλλυντικών και Υγειοπροστατευτικών Συμπληρωμάτων»

Γεωργία Π. Βλάχου, Γεωπόνου MSc.

Επιβλέπουσα

Παπαφωτίου Μαρία, Καθηγήτρια Γ.Π.Α.

Τριμελής Συμβουλευτική Επιτροπή

Παπαφωτίου Μαρία, Καθηγήτρια Γ.Π.Α.

Ακουμιανάκη – Ιωαννίδου Αναστασία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γ.Π.Α

Παρασκευοπούλου Αγγελική, Επίκουρη Καθηγήτρια Γ.Π.Α.

Επταμελής Εξεταστική Επιτροπή

Παπαφωτίου Μαρία, Καθηγήτρια Γ.Π.Α.

Ακουμιανάκη – Ιωαννίδου Αναστασία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γ.Π.Α

Παρασκευοπούλου Αγγελική, Επίκουρη Καθηγήτρια Γ.Π.Α.

Ταραντίλης Πέτρος, Καθηγητής Γ.Π.Α.

Τρίγκας Παναγιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.

Οικονόμου Γαρυφαλλιά, Καθηγήτρια Γ.Π.Α.

Χατζηδημητρίου Μαριάννα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γ.Π.Α

Η παρούσα Διατριβή έχει χρηματοδοτηθεί από την Ευρωπαϊκή Ένωση (Ευρωπαϊκό Κοινωνικό Ταμείο – ΕΚΤ) και από Εθνικούς πόρους, μέσω του επιχειρησιακού προγράμματος «Εκπαίδευση και Δια βίου Μάθηση», του Εθνικού Στρατηγικού Πλαισίου Αναφοράς (ΕΣΠΑ), στα πλαίσια του ερευνητικού προγράμματος ΘΑΛΗΣ – Ενίσχυση της διεπιστημονικής και διδρυματικής έρευνας και καινοτομίας με τη δυνατότητα προσέλκυσης ερευνητών υψηλού επιπέδου από το εξωτερικό, μέσω της διενέργειας βασικής και εφαρμοσμένης έρευνας αριστείας.



*στους γονείς μου, Βασιλική και Παναγιώτη
και στην αδερφή μου Ηλιάννα*

“Ἐν πάσι γὰρ τοῖς φυσικοῖς ἐνεστὶ τι θαυμαστόν”

Μετάφραση: “Σε όλα τα πράγματα στη φύση υπάρχει κάτι ἄξιο θαυμασμού”

Ἀριστοτέλης

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Πρωτίστως, θα ήθελα να ευχαριστήσω την επιβλέπουσα μου, κ. Μ. Παπαφωτίου, Καθηγήτρια και Διευθύντρια του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου, για την εμπιστοσύνη που μου έδειξε από την πρώτη στιγμή, τη συνεχή καθοδήγησή της, την επιστημονική, πνευματική και ηθική υποστήριξη που μου παρείχε καθ' όλη τη διάρκεια της ερευνητικής μου προσπάθειας, τη δημιουργική κριτική της, καθώς και για την αστείρευτη υπομονή της κατά το στάδιο της συγγραφής.

Αισθάνομαι, επίσης, την ανάγκη να απευθύνω ένα μεγάλο ευχαριστώ προς τα άλλα δύο μέλη της τριμελούς συμβουλευτικής μου επιτροπής, την κ. Α. Ακουμιανάκη-Ιωαννίδου, Αναπλ. Καθηγήτρια και την κ. Α. Παρασκευοπούλου, Επίκ. Καθηγήτρια, για τις πολύτιμες συμβουλές τους στην εκπόνηση της διατριβής μου και την άμεση ανταπόκριση κάθε φορά που χρειαζόμουν τη βοήθειά τους.

Ακόμα, θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κ. Π. Ταραντίλη, Καθηγητή, για τη φιλοξενία του στο Εργαστήριο Χημείας, καθώς και για τις συμβουλές του σε θέματα αναλυτικής χημείας.

Πολύτιμη ήταν η βοήθεια του κ. Π. Τρίγκα, Επίκ. Καθηγητή, για την αναγνώριση του φυτικού υλικού, καθώς και για την εύρεσή του. Τον ευχαριστώ, λοιπόν, θερμά για την προθυμία του και τη διάθεσή του να με βοηθήσει. Την κ. Γ. Οικονόμου, Καθηγήτρια και την κ. Μ. Χατζηδημητρίου, Αναπλ. Καθηγήτρια για την τιμή που μου έκαναν να συμμετάσχουν ως μέλη στην Επταμελή Εξεταστική Επιτροπή και πάνω από όλα, για τον πολύτιμο χρόνο που διέθεσαν για την εξέταση της διατριβής μου.

Δύσκολα θα βρω κατάλληλα λόγια για να ευχαριστήσω επαρκώς τον Κ. Μπερτσουιλή, του οποίου η ενεργός συνεισφορά του και οι επιστημονικές συμβουλές του, υπήρξαν πολύτιμες σε όλη τη διάρκεια της διατριβής μου. Η συνεισφορά του όμως δεν εξαντλήθηκε στο στάδιο της τυπικής τελείωσης, αλλά επεκτάθηκε μέχρι και το στάδιο της ολοκλήρωσης της συγγραφικής μελέτης.

Συνεχίζοντας, οφείλω ένα μεγάλο ευχαριστώ στην Κ. Μαρίνη, για τη θετική της αύρα, το ενδιαφέρον και τις συμβουλές της, αλλά και για την αμέριστη ηθική τόνωση όλα αυτά τα χρόνια.

Δεν θα πρέπει όμως να παραλείψω να ευχαριστήσω τους συναδέλφους, Η. Κανέλλου και Ν. Ντούλα, για τη βοήθεια κατά την εγκατάσταση και παρακολούθηση των πειραμάτων και τη Μ. Τρίγκα για τη βοήθεια της και την άψογη συνεργασία που είχαμε.

Ακόμα θα ήθελα να ευχαριστήσω τη Δρ. Δ. Δαφερέρα, για το χρόνο που αφιέρωσε για την επεξεργασία και ερμηνεία των ποσοτικών και ποιοτικών αποτελεσμάτων των αιθέριων ελαίων.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω την κ. Χ. Φουρναράκη και το Μεσογειακό Αγρονομικό Ινστιτούτο Χανίων, καθώς και τη Φιλοδασική Ένωση Αθηνών για την ευγενική χορηγία πολλαπλασιαστικού υλικού, που χρησιμοποιήθηκε στην εκπόνηση της διατριβής μου.

Ευχαριστώ, ιδιαίτερα, τη φίλη μου Γ. Ντάτση (Επίκ. Καθηγήτρια στο Εργαστήριο Κηπευτικών Καλλιιεργειών) για την ηθική της συμπαράσταση και την ψυχολογική της στήριξη σε όλη τη διάρκεια της εκπόνησης της διατριβής μου.

Ολοκληρώνοντας, το πιο μεγάλο ευχαριστώ ανήκει στους δικούς μου ανθρώπους, τους γονείς μου, Βασιλική και Παναγιώτη, και την πολυαγαπημένη μου αδερφή Ηλιάνα για τις θυσίες που έχουν κάνει όλα αυτά τα χρόνια, στηρίζοντάς με και υπομένοντας αδιαμαρτύρητα την κούραση και το άγχος μου. Δίχως την αγάπη και τη συμπαράστασή τους, η εκπόνηση και η ολοκλήρωση της διατριβής μου δε θα ήταν ποτέ εφικτή.

ΓΕΝΙΚΗ ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Στην παρούσα Διατριβή μελετήθηκαν αυτοφυή και μεσογειακά είδη, ήτοι *Anthyllis barba-jovis*, *Ballota acetabulosa*, *Clinopodium creticum*, *Clinopodium nepeta* και *Scabiosa hymettia*, με στόχο την αξιοποίησή τους ως καλλωπιστικών και για αποκατάσταση τοπίου με έμφαση στο τοπίο αρχαιολογικών χώρων. Αναπτύχθηκαν πρωτόκολλα πολλαπλασιασμού με σπόρο, μικροπολλαπλασιασμό, και μοσχεύματα βλαστού και πρωτόκολλα φυτωριακής καλλιέργειας, και διερευνήθηκε η ικανότητα επιβίωσης των ειδών αυτών *in situ* σε αρχαιολογικούς χώρους. Στα *C. creticum* και *C. nepeta* προσδιορίστηκε συγκριτικά η απόδοση και χημική σύσταση του αιθερίου ελαίου σε φυτά υπαίθριας, θερμοκηπιακής και *in vitro* καλλιέργειας.

Όσον αφορά τον πολλαπλασιασμό με σπόρο, μόνο στο είδος *A. barba-jovis* διαπιστώθηκε φυσικός λήθαργος, ο οποίος αντιμετωπίστηκε με μηχανικό σκαριφισμό (1 min με σμυριδόχαρτο). Το εύρος των θερμοκρασιών για τη βλάστηση των σπόρων των ειδών *A. barba-jovis*, *B. acetabulosa*, *C. creticum* και *C. nepeta* κυμάνθηκε από 10 έως 30 °C, με άριστες θερμοκρασίες 15 - 20 °C, όπου η βλαστικότητα ήταν πολύ υψηλή. Η αποθήκευση των σπόρων σε θερμοκρασία δωματίου για 1 - 2 έτη δεν επέδρασε στη βλαστικότητα, ενώ αποθήκευση πέραν των τριών ετών μείωσε τη βλαστικότητα των *A. barba-jovis* και *B. acetabulosa*. Οι σπόροι του *S. hymettia* εμφάνισαν πολύ χαμηλή ικανότητα βλάστησης σε *ex vitro* συνθήκες, ενώ σε *in vitro* συνθήκες η βλάστηση του σπόρου ήταν αδύνατη.

Στον *in vitro* πολλαπλασιασμό η εγκατάσταση καλλιέργειας του *A. barba-jovis*, *B. acetabulosa* και *S. hymettia* με έκφυτα προερχόμενα από ενήλικα αυτοφυή ή καλλιεργούμενα φυτά, παρουσίασε πολλές έως αξεπέραστες δυσκολίες, λόγω του υψηλού ποσοστού μολύνσεων. Εξ' αυτών μόνο το είδος *S. hymettia* εγκαταστάθηκε *in vitro* από ενήλικα αυτοφυή φυτά, με χρήση εκφύτων κορυφής βλαστού και υποστρώματος Murashige & Skoog (MS) είτε χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες (PGRs) ή με 1,0 mg L⁻¹ 6-βενζυλαδενίνη (BA), ενώ το *A. barba-jovis* εγκαταστάθηκε από νεαρά φυτά (2 ετών) που αναπτύσσονταν σε θερμοκήπιο, επίσης σε υπόστρωμα MS με 1,0 - 1,5 mg L⁻¹ BA. Για την εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας από ενήλικα φυτά του *C. creticum* ενδείκνυται η χρήση εκφύτων κορυφής και κόμβου και υποστρώματος MS εμπλουτισμένου με 1,0 mg L⁻¹ ζεατίνη (ZEAT), ενώ για το συγγενικό είδος *C. nepeta* προτείνεται το υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με 1,0 mg L⁻¹ BA.

Η εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας *A. barba-jovis*, *B. acetabulosa*, *C. creticum* και *C. nepeta* από *in vitro* καλλιεργούμενα σπορόφυτα, έγινε σε υψηλότατο ποσοστό, με έκφυτα κορυφής και κόμβου, σε υπόστρωμα MS είτε χωρίς PGRs ή με 0,5 - 1,0 mg L⁻¹ BA ή ZEAT.

Κατά το στάδιο πολλαπλασιασμού των *in vitro* καλλιεργειών, τόσο της καλλιέργειας από σπορόφυτα, όσο και αυτής από ενήλικα ή νεαρά φυτά θερμοκηπίου των ειδών *A. barba-jovis*, *B. acetabulosa*, *C. creticum* και *C. nepeta* παρατηρήθηκε υψηλό ποσοστό αντίδρασης των εκφύτων. Η προσθήκη κυτοκίνινης στο υπόστρωμα (από 0,5 - 8,0 mg L⁻¹), ειδικά των BA και ZEAT και λιγότερο των κινετίνη (KIN) και το 6-γ-γ-(διμεθυλαλληλάμινο)-πουρίνη (2iP), είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των βλαστών ανά έκφυτο, αναλογικά με τη συγκέντρωση αυτών, αλλά συγχρόνως επέφερε και αύξηση της υπερενυδάτωση. Στο υπόστρωμα MS με 4,0 ή 8,0 mg L⁻¹ BA η προσθήκη της αυξίνης 1-ναφθαλινοξικό οξύ (NAA) σε συγκέντρωση 0,1 ή 0,5 mg L⁻¹, ή η αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ από 8 g L⁻¹ σε 12 g L⁻¹ εξάλειψε την υπερενυδάτωση με ταυτόχρονη αύξηση του αριθμού των βλαστών σε πολύ υψηλό επίπεδο και ως εκ τούτου τα υποστρώματα αυτά ενδείκνυνται για χρήση σε επιχειρηματική κλίμακα.

Για τον πολλαπλασιασμό του *S. hymettia* προτείνεται το υπόστρωμα MS πλήρους ή μισής δύναμης εμπλουτισμένο με 1,0 mg L⁻¹ BA με ή χωρίς 0,1 mg L⁻¹ NAA, το οποίο όμως δεν ενδείκνυται για πολλαπλασιασμό του είδους σε επιχειρηματική κλίμακα λόγω του χαμηλού δυναμικού του.

Η ριζοβολία των μικρομοσχευμάτων των προαναφερθέντων ειδών που προήλθαν από την καλλιέργεια που εγκαταστάθηκε τόσο από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα όσο και από νεαρά φυτά παρουσίασαν παρόμοια συμπεριφορά και ήταν επιτυχής σε υπόστρωμα μισής δύναμης MS χωρίς ή με 0,5 - 4,0 mg L⁻¹ σε ινδολ-3-βουτυρικό οξύ (IBA) σε συνεχή εφαρμογή για έξι εβδομάδες. Παράλληλα με τη ριζοβολία παρατηρήθηκε και έκπτυξη πλάγιων βλαστών, με αποτέλεσμα τη δημιουργία πολύκλαδων φυταρίων έτοιμων για εγκλιματισμό, με το πλεονέκτημα της αποφυγής πιθανού κορυφολογήματος για απόκτηση συμπαγούς φυτού. Για τα είδη *A. barba-jovis* και *B. acetabulosa* διερευνήθηκε και ο τύπος του μικρομοσχεύματος, ήτοι μόσχευμα κορυφής μικροβλαστού ή μέσης, όπου δεν παρατηρήθηκαν διαφορές στη ριζοβολία τους. Επιπρόσθετα διερευνήθηκε η *in vitro* ριζοβολία συστάδων μικροβλαστών του *B. acetabulosa*, *C. creticum* και *C. nepeta*, η οποία ήταν επιτυχής σε υπόστρωμα μισής δύναμης MS χωρίς IBA. Τέλος για το είδος *S. hymettia* για την *in vitro* ριζοβολία των μικρομοσχευμάτων προτείνεται υπόστρωμα μισής δύναμης MS με 1,0 mg L⁻¹ IBA σε συνεχή εφαρμογή για έξι εβδομάδες.

Ο εγκλιματισμός των φυταρίων όλων των ειδών σε *ex vitro* συνθήκες έγινε με πολύ υψηλά ποσοστά επιτυχίας (80 - 100%) σε μίγμα τύρφης – περλίτη (1:1, v/v).

Σε ότι αφορά στη ριζοβολία μοσχευμάτων βλαστού, δοκιμάστηκε λήψη μοσχευμάτων στις τέσσερις εποχές του έτους και μεταχειρίσεις με αυξίνη είτε σε μορφή σκόνης για ποώδη/ημι-ξυλώδη ή ξυλώδη μοσχεύματα ή σε αλκοολούχο υδατικό διάλυμα (0 - 3000 mg L⁻¹ IBA για 1 ή 5 min.). Ο πολλαπλασιασμός του *A. barba-jonis* με μοσχεύματα βλαστού ήταν ανεπιτυχής, σε όλες τις εποχές και σε όλες τις μεταχειρίσεις που δοκιμάστηκαν, αντίθετα η ριζοβολία των μοσχευμάτων της *C. creticum* και *C. nepeta* έγινε με απόλυτη σχεδόν επιτυχία σε όλες τις μεταχειρίσεις και σε όλες τις εποχές. Στο ποσοστό ριζοβολίας μοσχευμάτων των ειδών *B. acetabulosa* και *S. hymettia* παρατηρήθηκε εποχική διακύμανση. Πιο συγκεκριμένα, υψηλότερα ποσοστά ριζοβολίας παρατηρήθηκαν στα μοσχεύματα *B. acetabulosa* που συλλέχθηκαν την άνοιξη και το φθινόπωρο, για το είδος *S. hymettia* το φθινόπωρο και το χειμώνα, ενώ αντίθετως το καλοκαίρι ήταν η πλέον ακατάλληλη εποχή για τη ριζοβολία των μοσχευμάτων και των δύο ειδών. Όσον αφορά τη συγκέντρωση του IBA, για το είδος *B. acetabulosa*, την άνοιξη προτείνεται συγκέντρωση 2000 mg L⁻¹, για 1 min, ενώ το φθινόπωρο για 5 min. Για το είδος *S. hymettia* τόσο το φθινόπωρο όσο και το χειμώνα προτείνεται συγκέντρωση 1000 mg L⁻¹ για 1 min ή εφαρμογή σκόνη ριζοβολίας για ξυλώδη μοσχεύματα.

Για την περαιτέρω ανάπτυξη των φυταρίων όλων των ειδών προτείνεται η χρήση υποστρώματος τύρφης: περλίτη (2:1, v/v) και η λίπανση με χαμηλή συγκέντρωση (2 g L⁻¹) ισορροπημένου λιπάσματος (20:20:20) ανά μήνα. Επιπλέον για τα είδη *B. acetabulosa*, *C. creticum* και *C. nepeta* για την παραγωγή διακλαδισμένων φυταρίων, τα οποία θα είναι πιο ελκυστικά στους καταναλωτές ενδείκνυται η εφαρμογή κορυφολογήματος.

Όσον αφορά την εγκατάσταση των ειδών στους αρχαιολογικούς χώρους, το είδος *B. acetabulosa* έδειξε τη μεγαλύτερη προσαρμοστικότητα σε όλη την Ελλάδα, ενώ το *S. hymettia* εγκαταστάθηκε επιτυχώς στις μη παράκτιες περιοχές. Το *C. nepeta* εγκαταστάθηκε καλύτερα στη Β. Ελλάδα, ενώ το *C. creticum* στη Νότια Ελλάδα. Επιπρόσθετα παρατηρήθηκε ότι η χρήση γεωφάσματος για τον έλεγχο των ζιζανίων και η εφαρμογή αραιών αρδεύσεων κατά τη διάρκεια της θερμής και ξηρής περιόδου του καλοκαιριού συνέβαλαν στην αποτελεσματικότερη εγκατάσταση όλων των φυτικών ειδών.

Η απόδοση αιθερίου ελαίου ήταν υψηλότερη στα φυτά *C. creticum* και *C. nepeta* που καλλιεργήθηκαν υπαίθρια σε σύγκριση με τα θερμοκηπιακά. Η υψηλότερη απόδοση αιθερίου ελαίου και για τα δύο είδη ανεξαρτήτως θέσης καλλιέργειας καταγράφηκε τον Αύγουστο (περίοδος ανθοφορίας), ενώ η χαμηλότερη το Φεβρουάριο (βλαστική περίοδος).

Τα *in vitro* φυτάρια και των δύο ειδών (σε βλαστική κατάσταση) έδωσαν υψηλότερη απόδοση αιθερίου ελαίου σε σχέση με τα *ex vitro* φυτά, υπαίθρια ή θερμοκηπιακά του Φεβρουαρίου. Αναφορικά με την ποιοτική σύσταση του αιθερίου ελαίου, η κύρια χημική ομάδα που ανιχνεύτηκε στο αιθέριο έλαιο και των δύο ειδών ήταν τα οξυγονωμένα μονοτερπένια, ακολουθούμενη από τους μονοτερπενικούς υδρογονάνθρακες και τα σεσκιτερπένια. Στους κύριους εκπροσώπους των χημικών ομάδων παρατηρήθηκε επίσης εποχική διακύμανση και στις δύο θέσεις *ex vitro* καλλιέργειας (αγρός, θερμοκήπιο) και για τα δύο υπό μελέτη είδη. Η συγκριτική μελέτη της σύστασης των αιθερίων ελαίων από *in vitro* αναπτυγμένους μικροβλαστούς και από *ex vitro* καλλιεργούμενα φυτά, έδειξε μεγάλη ομοιότητα μεταξύ των δύο χημικών προφίλ τόσο για το είδος *C. creticum* όσο και για το είδος *C. nepeta*.

Συνοψίζοντας, η παρούσα Διατριβή ανέδειξε πέντε είδη αυτοφυών φυτών της Μεσογείου, με πρωτόκολλα πολλαπλασιασμού και φυτωριακής καλλιέργειας, έτοιμα για εισαγωγή στην επιχειρηματική ανθοκομία και στην Αρχιτεκτονική του Τοπίου, στα πλαίσια της γενικά αποδεκτής πλέων τάσης των τελευταίων ετών, χρήσης αυτοφυών φυτών σε κηποτεχνικές διαμορφώσεις και αναπλάσεις τοπίου, με στόχο τη βιοποικιλότητα, την ανθεκτικότητα και τη διατήρηση του χαρακτήρα του τοπίου.

Επιστημονικό πεδίο: Γεωργικές Επιστήμες

Λέξεις κλειδιά: *Anthyllis barba-jovis*, *Ballota acetabulosa*, *Clinopodium creticum*, *Clinopodium nepeta*, *Scabiosa hymettia*, Ανθυλλίδα, Μπαλλότα, Καλαμίνθα, Σκαμπιόσα, αυτοφυή φυτά της Ελληνικής και Μεσογειακής χλωρίδας, αρωματικά και φαρμακευτικά φυτά, οικοφυσιολογία σπόρου, πολλαπλασιασμός, *in vitro* πολλαπλασιασμός, μικροπολλαπλασιασμός, υπερενυδάτωση, *in vitro* ριζοβολία, εγκλιματισμός *ex vitro*, μοσχεύματα βλαστού, εποχική διακύμανση της ριζοβολίας, φυτωριακή καλλιέργεια, λίπανση, υπόστρωμα καλλιέργειας, εγκατάσταση αυτοφυών σε αρχαιολογικούς χώρους, ποσοτικός και ποιοτικός προσδιορισμός αιθερίων ελαίων

GENERAL ABSTRACT

In the present Thesis Mediterranean and native species were studied, i.e, *Anthyllis barba-jovis*, *Ballota acetabulosa*, *Clinopodium creticum*, *Clinopodium nepeta* and *Scabiosa hymettia*, aiming to their introduction as ornamentals plants and in landscape restoration with emphasis on the landscape of archeological sites. Propagation protocols were developed with seed, micropropagation and stem cuttings, and protocols for nursery cultivation; the survival of these species was investigated *in situ* in archeological sites. The yield and chemical composition of the essential oil of *C. creticum* and *C. nepeta* were also studied in plants grown in the field, greenhouse and *in vitro*.

As regards seed propagation, *A. barba-jovis* out of all species was found to have physical dormancy (coat-imposed dormancy) that was overcome by mechanical scarification (with sandpaper for 1 min). Cardinal germination temperatures of *A. barba-jovis*, *B. acetabulosa*, *C. creticum* and *C. nepeta* ranged from 10 to 30 °C; optimum temperatures ranged from 15 - 20 °C, with high germination percentages. Storage of seeds at room temperature for 1 - 2 years did not affect the germination, while storage over 3 years reduced the germination of *A. barba-jovis* and *B. acetabulosa*. Seeds *S. hymettia* showed very low germination ability in *ex vitro* conditions, while *in vitro* seeds failed to germinate.

In vitro propagation of *A. barba-jovis*, *B. acetabulosa* and *S. hymettia* took place starting either from adult or from cultivated plants, facing major difficulties due to high percentages of contamination. Only in *S. hymettia* was possible to establish *in vitro* cultures from adult wild plants, using shoot tip explants, on Murashige & Skoog (MS) medium, either without plant growth regulator(s) (PGRs) or with 1.0 mg L⁻¹ 6-benzyladenine (BA). *A. barba-jovis* *in vitro* cultures were established starting from young plants (2 years old), growing in a greenhouse, also on an MS medium supplemented with 1.0 - 1.5 mg L⁻¹ BA. For *in vitro* culture starting from adult *C. creticum* plants the use of shoot tip or nodal explants and MS medium enriched with 1.0 mg L⁻¹ zeatin (ZEAT) is recommended. For the related species *C. nepeta* the use of MS medium enriched with 1.0 mg L⁻¹ BA is suggested.

The establishment of *in vitro* cultures of *A. barba-jovis*, *B. acetabulosa*, *C. creticum* and *C. nepeta* from *in vitro* grown seedlings was performed at highest percentages, with shoot tip and nodal explants, on MS medium either without PGRs or with 0.5 - 1.0 mg L⁻¹ BA or ZEAT.

During the multiplication phase of *A. barba-jovis*, *B. acetabulosa*, *C. creticum* and *C. nepeta*, *in vitro* cultures of seedling, adult or young-greenhouse plant origin had high

explant-response percentage. The addition of cytokinin to the medium (from 0.5 - 8.0 mg L⁻¹), especially of BA and ZEAT and less of kinetin (KIN) and 6- γ - γ - (dimethylallamino)-purine (2iP), resulted to the increase of shoot number per explant, analogous to their concentration, but simultaneously led to an increase in hyperhydration. In the MS medium with 4.0 or 8.0 mg L⁻¹ BA the addition of auxin 1-Naphtheleneacetic acid (NAA) at a concentration of 0.1 or 0.5 mg L⁻¹ or an increase in the concentration of agar from 8 g L⁻¹ to 12 g L⁻¹ eliminated hyperhydration and simultaneously increased the shoot number to a very high level. Therefore, these media are appropriate for use on a business scale.

For the multiplication of *S. hymettia* the use of MS medium, full or half strength, enriched with 1.0 mg L⁻¹ BA with or without 0.1 mg L⁻¹ NAA, is recommended, but it is not appropriate for multiplication of the species on a business scale due to of its low multiplication index.

Rooting of all species micro-cuttings, derived from *in vitro* cultures established from seedlings and young plants, exhibited similar behavior and rooting was successful on half-strength MS medium without or with 0.5 - 4.0 mg L⁻¹ indole-3-butyric acid (IBA) in continuous application for six weeks. Along with rooting, the development of lateral shoots, resulting in the formation of a multi-branched plantlet for acclimatization, with the advantage of avoiding possible pruning for the acquisition of a compact plant. In *A. barba-jovis* and *B. acetabulosa* the type of micro-cutting depending on its position on the micro-shoot was also investigated as for its rooting capacity; shoot tip or below tip cuttings did not differ in their rooting. In addition, the *in vitro* rooting of microshoot clusters of *B. acetabulosa*, *C. creticum* and *C. nepeta* was investigated, which was successful on half-MS medium without IBA. Finally, *in vitro* rooting of *S. hymettia* micro-cuttings was successful on half-strength MS medium with 1.0 mg L⁻¹ IBA in continuous application for six weeks.

The acclimatization of plantlets of all the species in *ex vitro* conditions was highly successful (80 - 100%) in a mixture of peat - perlite (1: 1, v / v).

As regards rooting of stem cuttings, the effect of four seasons was tested in conjunction with auxin either in powder form for herbaceous/softwood or for hardwood cuttings or in an ethanol-water solution (0 - 3000 mg L⁻¹ IBA for 1 or 5 min). The propagation of *A. barba-jovis* with stem cuttings was unsuccessful, in all seasons and in all treatments. On the contrary the rooting of *C. creticum* and *C. nepeta* cuttings occurred with complete success, in all treatments and seasons. Seasonal variability was observed in the rooting percentage of *B. acetabulosa* and *S. hymettia*. More specifically, higher rooting percentages were observed in *B. acetabulosa* cuttings collected in spring and autumn, for *S. hymettia* in autumn and

winter, while summer was the most unsuitable season for rooting cuttings of both species. Concerning the IBA concentration, for *B. acetabulosa* 2000 mg L⁻¹ is suggested applied for 1 min in spring and 5 min in autumn, while for *S. hymettia*, both in autumn and winter a concentration of 1000 mg L⁻¹ for 1 min or application of rooting powder for hardwood cuttings is recommended.

For further growth of rooted cuttings of all species, is recommended to use a mixture of peat: perlite (2:1, v / v) and low concentration (2 g L⁻¹) of a water-soluble fertilizer (Nutrileaf 60, 20:20:20) per month. In addition, the application of pruning is recommended for *B. acetabulosa*, *C. creticum* and *C. nepeta* for the production of branched plants, which will be more attractive to consumers.

Regarding the installation of the species in the archeological sites, *B. acetabulosa* showed the greatest adaptability, while *S. hymettia* was successfully established in the non-coastal areas. *C. nepeta* was established better in northern Greece, while *C. creticum* in southern Greece. In addition, it was observed that the use of geotextile for weed control and the application of sparse irrigation during the hot and dry period of summer contributed to the more efficient establishment of all plant species.

Essential oil yield was highest in *C. creticum* and *C. nepeta* plants grown in the field compared to those in the greenhouses. The highest yield of essential oil for both species regardless their cultivation position was recorded in August (flowering period), while the lowest in February (vegetative period). The *in vitro* plantlets of both species (in vegetative condition) gave higher yield of essential oil than the *ex vitro*, field or greenhouse plants, in February. Regarding the qualitative composition of the essential oil, the main chemical group detected in the essential oil of both species was oxygenated monoterpenes, followed by monoterpene hydrocarbons and sesquiterpenes. The main representatives of chemical groups presented seasonal variation in both *ex vitro* culture sites (field and greenhouse) for both species under study. The comparative study of the composition of essential oils from *in vitro* developed microshoots and *ex vitro* cultivated plants showed a great similarity between their chemical profiles for both *C. creticum* and *C. nepeta*.

To summarize, this Thesis highlighted five species of native plants of the Mediterranean, with propagation and nursery protocols, ready for introduction to horticultural practice and landscape architecture, in the context of generally accepted trend in recent years that is the use of native plants in gardening and landscaping, aiming at biodiversity, resilience and maintaining the character of the landscape.

"Propagation and cultivation protocols of native species of the Mediterranean flora, for use as ornamental, especially in archaeological sites, as well as in the creation of new food additives, cosmetics and health protection supplements"

Scientific discipline: Agricultural sciences

Keywords: *Anthyllis barba-jovis*, *Ballota acetabulosa*, *Clinopodium creticum*, *Clinopodium nepeta*, *Scabiosa hymettia*, native Greece and Mediterranean plants, aromatic and pharmaceutical herbs, seed ecophysiology, *in vitro* propagation, micropropagation, tissue culture, hyperhydration, stem cuttings, seasonal variability of cuttings rooting, cultivation protocols, fertilization, growth substrate mixture, restoration of archeological sites with native plants, qualitative and quantitative determination of essential oils.

ΓΕΝΙΚΟΣ ΣΚΟΠΟΣ

Τα αυτοφυή είδη, τα τελευταία χρόνια έχουν εισαχθεί για χρήση στην Ανθοκομία και στην Αρχιτεκτονική Τοπίου, ενώ παράλληλα η μελέτη τους στη φαρμακευτική επιστήμη ολοένα και εντείνεται. Είναι πλέον κυρίαρχη η τάση των τελευταίων ετών, της χρήσης αυτοφυών φυτών σε κηποτεχνικές διαμορφώσεις και αναπλάσεις τοπίου, με στόχο τη βιοποικιλότητα, την ανθεκτικότητα και τη διατήρηση του χαρακτήρα του τοπίου. Τα είδη της παρούσας Διατριβής, *Anthyllis barba-jovis*, *Ballota acetabulosa*, *Clinopodium creticum* (*Calamintha cretica*), *Clinopodium nepeta* (*Calamintha nepeta*) και *Scabiosa hymettia* (*Lomelosia hymettia*) αποτελούν βασικά μέλη της ελληνικής χλωρίδας, με ιδιαίτερα καλλωπιστικά χαρακτηριστικά που τα καθιστούν πολύ ενδιαφέροντα για χρήση ως καλλωπιστικών σε χώρους με ιδιαίτερες απαιτήσεις ειδικά σε αρχαιολογικούς χώρους.

Με σκοπό λοιπόν την εισαγωγή των ειδών αυτών στην ανθοκομική πράξη και την Αρχιτεκτονική Τοπίου, διερευνήθηκε ο μικροπολλαπλασιασμός τους, η οικοφυσιολογία των σπόρων τους, ο πολλαπλασιασμός με μοσχεύματα βλαστού, η δυνατότητα για φυτωριακή καλλιέργεια, η εγκατάσταση σε αρχαιολογικούς χώρους, καθώς και σε δύο από αυτά (*Clinopodium creticum*, *Clinopodium nepeta*) η δυνατότητα για απόδοση αιθερίων ελαίων.

Στόχος ήταν: (α) η συγκριτική μελέτη της αποτελεσματικότητας θρεπτικών υποστρωμάτων και φυτορυθμιστικών ουσιών, καθώς και της ηλικίας του μητρικού υλικού, στο μικροπολλαπλασιασμό των ειδών, (β) η μελέτη της βλαστικότητας του σπόρου σε σχέση με τις συνθήκες περιβάλλοντος και την πιθανότητα ύπαρξης ληθάργου, (γ) η διερεύνηση της ριζοβολίας των μοσχευμάτων σε σχέση με την επίδραση της εποχής συλλογής και της συγκέντρωσης και του χρόνου εφαρμογής της ορμόνης ριζοβολίας, (δ) η ανάπτυξη πρωτοκόλλων φυτωριακής καλλιέργειας των ειδών, (ε) η αξιολόγηση της δυνατότητας εγκατάστασης των ειδών σε τρεις διαφορετικούς αρχαιολογικούς χώρους καθώς και στο Γ.Π.Α., ώστε σε συνδυασμό με τα αποτελέσματα του πολλαπλασιασμού να διευκολυνθεί η προσπάθεια εισαγωγής κατάλληλων φυτικών ειδών, στη φυτωριακή πρακτική, ως καλλωπιστικών φυτών, φυτών για αποκατάσταση προβληματικών περιοχών, αλλά και φυτών αποδοτικών σε αιθέρια έλαια για τη δημιουργία νέων πρόσθετων τροφίμων, καλλυντικών και υγειοπροστατευτικών συμπληρωμάτων.

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

BA	6-βενζυλαδενίνη, 6-benzyladenine
GA3	γιββεριλλικό οξύ, gibberellic acid
GC-MS	αέρια χρωματογραφία – φασματοσκοπία μάζας
IAA	ινδολ-3-οξικό οξύ, indole-3-acetic acid
IBA	ινδολ-3-βουτυρικό οξύ, indole-3-butyric acid
KIN	κινετίνη, 6-φουρφυουρλαμινοπουρίνη, kinetin, 6-furfurylamino-purine
MS	Murashige and Skoog Including Vitamins
NAA	1-ναφθαλινοξικό οξύ, 1-Naphtheleneacetic acid
PGRs	Φυτορυθμιστικές ουσίες
SH	Schenk and Hildebrandt Basal Salt Mixture
TDZ	Θειντιαζουρόν, thidiazuron
TZ-solution	2,3,5-τριφαίνυλο χλωριούχο τετραζόλιο
WPM	McCown's Woody Plant Vitamin Mixture
ZEAT	ζεατίνη, zeatin
2,4-D	2,4-διχλωροφαινοξικό οξύ, 2,4-dichlorophenoxyacetic acid
2iP	6-γ-γ-(διμεθυλαλληλάμινο)-πουρίνη, 6-γ-γ-(dimethylallylamino)-purine

ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

	Σελίδα
ΕΝΟΤΗΤΑ Ι – ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ	11
I. ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ	13
I.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	13
I.1.1 Η λεκάνη της Μεσογείου	13
I.1.2 Μεσογειακό κλίμα	13
I.1.3 Μεσογειακή βλάστηση	15
I.1.4 Δομές Μεσογειακής βλάστησης	16
I.1.5 Προσαρμοστικοί μηχανισμοί στο κλίμα	17
I.1.6 Βιοποικιλότητα της Ελλάδας	19
I.1.7 Αξιοποίηση αυτοφυών ειδών	20
I.1.8 Πολλαπλασιασμός αυτοφυών ειδών	21
I.2 ΕΠΙΛΟΓΗ ΦΥΤΙΚΩΝ ΕΙΔΩΝ ΓΙΑ ΧΡΗΣΗ ΣΤΟΥΣ ΑΡΧΑΙΟΛΟΓΙΚΟΥΣ ΧΩΡΟΥΣ	23
I.2.1 Βοτανική ταξινόμηση - Γεωγραφική κατανομή των ειδών που διερευνήθηκαν	25
I.2.1.1 <i>Anthyllis barba-jovis</i> L.	25
I.2.1.2 <i>Ballota acetabulosa</i> (L.) Benth.	32
I.2.1.3 <i>Clinopodium creticum</i> L. Kuntze και <i>Clinopodium nepeta</i> L. Kuntze	41
I.2.1.4 <i>Scabiosa hymettia</i> Boiss. & Spruner	49
I.3 ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	58
ΕΝΟΤΗΤΑ ΙΙ – ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΑΥΤΟΦΥΩΝ ΕΙΔΩΝ	69
ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι – ΟΙΚΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΣΠΟΡΟΥ	71
II.I ΠΕΡΙΛΗΨΗ	71
II.I ΣΚΟΠΟΣ	72
II.I.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	73
II.I.1.1 Οικοφυσιολογία των σπόρων	73
II.I.1.1.1 Η σημασία της ικανότητας επιβίωσης των σπόρων	73
II.I.1.1.2 Παράγοντες που συμβάλλουν στην ικανότητα επιβίωσης	75
II.I.1.1.3 Οικοφυσιολογία των σπόρων της Μεσογειακής βλάστησης	91
II.I.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ <i>IN VITRO</i> ΚΑΙ <i>EX VITRO</i> ΒΛΑΣΤΗΣΗΣ ΣΠΟΡΩΝ	94
II.I.2.1 ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	94
II.I.2.1.1 Υποστρώματα <i>in vitro</i> στρωμάτωσης - υλικά	94

Π.Ι.2.1.2	Τρυβλία και γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες για την <i>in vitro</i> βλάστηση και περαιτέρω ανάπτυξη των σπόρων	95
Π.Ι.2.1.3	Αποστείρωση εργαλείων και υλικών καλλιέργειας	95
Π.Ι.2.1.4	Συλλογή Σπόρων	96
Π.Ι.2.1.5	Μετασυλλεκτικοί χειρισμοί σπόρων	96
Π.Ι.2.1.5.1	Καθαρισμός - Αποθήκευση σπόρων	96
Π.Ι.2.1.5.2	Προμεταχείριση σπόρων	97
Π.Ι.2.1.6	Τέστ Τετραζολίου (Test tetrazolίου)	97
Π.Ι.2.1.7	<i>Ex vitro</i> βλάστηση	97
Π.Ι.2.1.8	<i>In vitro</i> βλάστηση και περαιτέρω ανάπτυξη των	98
Π.Ι.2.1.9	Στατιστική ανάλυση	98
Π.Ι.2.2	ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	99
Π.Ι.2.2.1	<i>Anthyllis barba-jovis</i>	99
Π.Ι.2.2.1.1	Συλλογή - Αποθήκευση σπόρου	99
Π.Ι.2.2.1.2	Τέστ Τετραζολίου	99
Π.Ι.2.2.1.3	Μικροσκοπική παρατήρηση σπόρων	99
Π.Ι.2.2.1.4	<i>In vitro</i> βλάστηση	100
Π.Ι.2.2.1.5	<i>Ex vitro</i> βλάστηση	100
Π.Ι.2.2.2	<i>Ballota acetabulosa</i>	100
Π.Ι.2.2.2.1	Συλλογή - Αποθήκευση σπόρου	100
Π.Ι.2.2.2.2	Τέστ Τετραζολίου	101
Π.Ι.2.2.2.3	<i>In vitro</i> βλάστηση	101
Π.Ι.2.2.2.4	<i>Ex vitro</i> βλάστηση	101
Π.Ι.2.2.3	<i>Clinopodium creticum</i> - <i>Clinopodium nepeta</i>	101
Π.Ι.2.2.3.1	Συλλογή - Αποθήκευση σπόρου	101
Π.Ι.2.2.3.2	Τέστ Τετραζολίου	102
Π.Ι.2.2.3.3	<i>In vitro</i> βλάστηση	102
Π.Ι.2.2.3.4	<i>Ex vitro</i> βλάστηση	102
Π.Ι.2.2.4	<i>Scabiosa hymettia</i>	102
Π.Ι.2.2.4.1	Συλλογή - Αποθήκευση σπόρου	102
Π.Ι.2.2.4.2	Τέστ Τετραζολίου	102
Π.Ι.2.2.4.3	<i>In vitro</i> βλάστηση	103
Π.Ι.2.2.4.4	<i>Ex vitro</i> βλάστηση	104
Π.Ι.3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	106
Π.Ι.3.1	<i>Anthyllis barba-jovis</i>	106
Π.Ι.3.1.1	Τέστ Τετραζολίου	106
Π.Ι.3.1.2	Μικροσκοπική παρατήρηση σπόρων	107
Π.Ι.3.1.3	<i>In vitro</i> βλάστηση	107
Π.Ι.3.1.4	<i>Ex vitro</i> βλάστηση	116
Π.Ι.3.2	<i>Ballota acetabulosa</i>	118

II.I.3.2.1	Τέστ Τετραζολίου	118
II.I.3.2.2	<i>In vitro</i> βλάστηση	118
II.I.3.2.3	<i>Ex vitro</i> βλάστηση	120
II.I.3.3	<i>Clinopodium creticum</i> - <i>Clinopodium nepeta</i>	121
II.I.3.3.1	Τέστ Τετραζολίου	121
II.I.3.3.2	<i>In vitro</i> βλάστηση	121
II.I.3.3.3	<i>Ex vitro</i> βλάστηση	124
II.I.3.4	<i>Scabiosa hymettia</i>	125
II.I.3.4.1	Τέστ Τετραζολίου	125
II.I.3.4.2	<i>In vitro</i> βλάστηση	125
II.I.3.4.3	<i>Ex vitro</i> βλάστηση	128
II.I.4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	130
II.I.5	ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ	136
II.I.6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	138
ΚΕΦΑΛΑΙΟ II – <i>IN VITRO</i> ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ		149
II.II.	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	149
II.II.	ΣΚΟΠΟΣ	153
II.II.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	154
II.II.1.1	<i>In vitro</i> καλλιέργειες	154
II.II.1.2	Παράγοντες που επηρεάζουν τον <i>in vitro</i> πολλαπλασιασμό	155
II.II.1.3	Υπερενυδάτωση	160
II.II.1.4	Η Ιστοκαλλιέργεια στο είδος <i>Anthyllis</i> και στο γένος <i>Anthyllis</i> (οικ. Fabaceae)	165
II.II.1.5	Η Ιστοκαλλιέργεια στα είδη <i>Ballota acetabulosa</i> , <i>Clinopodium creticum</i> , <i>Clinopodium nepeta</i> και στα γένη <i>Ballota</i> , <i>Clinopodium</i> (οικ. Lamiaceae)	167
II.II.1.6	Η Ιστοκαλλιέργεια στο είδος <i>Scabiosa hymettia</i> και στο γένος <i>Scabiosa</i> (οικ. Dipsacoideae)	168
II.II.2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ <i>IN VITRO</i> ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ	170
II.II.2.1	ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	170
II.II.2.1.1	Υποστρώματα <i>in vitro</i> καλλιέργειας	170
II.II.2.1.2	Δοχεία και υλικά κάλυψης <i>in vitro</i> καλλιέργειας	173
II.II.2.1.3	Δοχεία εγκλιματισμού φυταρίων	174
II.II.2.1.4	Αποστείρωση εργαλείων και υλικών καλλιέργειας	174
II.II.2.1.5	Μέθοδοι απολύμανσης και εγκατάστασης φυτικού υλικού	175
II.II.2.1.6	Έκφυτα - Μικρομοσχεύματα ριζοβολίας και οι χειρισμοί	175
II.II.2.1.7	Εγκλιματισμός ριζοβολημένων μικροβλαστών	176
II.II.2.1.8	Συνθήκες καλλιέργειας	177
II.II.2.1.9	Στατιστική ανάλυση	178

II.II.2.1.10	Πειραματικά σχέδια - Εκτίμηση αποτελεσμάτων	179
II.II.2.2	ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	180
II.II.2.2.1	<i>Anthyllis barba-jovis</i>	180
II.II.2.2.1.1	Αρχική εγκατάσταση <i>in vitro</i> καλλιέργειας	180
II.II.2.2.1.2	Πολλαπλασιασμός βλαστών σε <i>in vitro</i> καλλιέργεια	183
II.II.2.2.1.3	<i>In vitro</i> ριζοβολία μικρομοσχευμάτων	185
II.II.2.2.1.4	Εγκλιματισμός φυταρίων <i>ex vitro</i>	187
II.II.2.2.2	<i>Ballota acetabulosa</i>	188
II.II.2.2.2.1	Αρχική εγκατάσταση <i>in vitro</i> καλλιέργειας	188
II.II.2.2.2.2	Πολλαπλασιασμός βλαστών σε <i>in vitro</i> καλλιέργεια	190
II.II.2.2.2.3	<i>In vitro</i> ριζοβολία μικρομοσχευμάτων	191
II.II.2.2.2.4	Εγκλιματισμός φυταρίων <i>ex vitro</i>	192
II.II.2.2.3	<i>Clinopodium creticum</i>	192
II.II.2.2.3.1	Αρχική εγκατάσταση <i>in vitro</i> καλλιέργειας	192
II.II.2.2.3.2	Πολλαπλασιασμός βλαστών σε <i>in vitro</i> καλλιέργεια	194
II.II.2.2.3.3	<i>In vitro</i> ριζοβολία μικρομοσχευμάτων	195
II.II.2.2.3.4	Εγκλιματισμός φυταρίων <i>ex vitro</i>	195
II.II.2.2.4	<i>Clinopodium nepeta</i>	196
II.II.2.2.4.1	Αρχική εγκατάσταση <i>in vitro</i> καλλιέργειας	196
II.II.2.2.4.2	Πολλαπλασιασμός βλαστών σε <i>in vitro</i> καλλιέργεια	198
II.II.2.2.4.3	<i>In vitro</i> ριζοβολία μικρομοσχευμάτων	199
II.II.2.2.4.4	Εγκλιματισμός φυταρίων <i>ex vitro</i>	199
II.II.2.2.5	<i>Scabiosa hymettia</i>	200
II.II.2.2.5.1	Αρχική εγκατάσταση <i>in vitro</i> καλλιέργειας	200
II.II.2.2.5.2	Πολλαπλασιασμός βλαστών σε <i>in vitro</i> καλλιέργεια	204
II.II.2.2.5.3	<i>In vitro</i> ριζοβολία μικρομοσχευμάτων	204
II.II.2.2.5.4	Εγκλιματισμός φυταρίων <i>ex vitro</i>	204
II.II.3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	205
II.II.3.1	<i>Anthyllis barba-jovis</i>	205
II.II.3.1.1	Αρχική εγκατάσταση <i>in vitro</i> καλλιέργειας	205
II.II.3.1.2	Πολλαπλασιασμός βλαστών σε <i>in vitro</i> καλλιέργεια	211
II.II.3.1.3	<i>In vitro</i> ριζοβολία μικρομοσχευμάτων	236
II.II.3.1.4	Εγκλιματισμός φυταρίων <i>ex vitro</i>	245
II.II.3.2	<i>Ballota acetabulosa</i>	246
II.II.3.2.1	Αρχική εγκατάσταση <i>in vitro</i> καλλιέργειας	246
II.II.3.2.2	Πολλαπλασιασμός βλαστών σε <i>in vitro</i> καλλιέργεια	250
II.II.3.2.3	<i>In vitro</i> ριζοβολία μικρομοσχευμάτων	263
II.II.3.2.4	Εγκλιματισμός φυταρίων <i>ex vitro</i>	266
II.II.3.3	<i>Clinopodium creticum</i>	267
II.II.3.3.1	Αρχική εγκατάσταση <i>in vitro</i> καλλιέργειας	267

II.II.3.3.2	Πολλαπλασιασμός βλαστών σε <i>in vitro</i> καλλιέργεια	273
II.II.3.3.3	<i>In vitro</i> ριζοβολία μικρομοσχευμάτων	287
II.II.3.3.4	Εγκλιματισμός φυταρίων <i>ex vitro</i>	292
II.II.3.4	<i>Clinopodium nepeta</i>	293
II.II.3.4.1	Αρχική εγκατάσταση <i>in vitro</i> καλλιέργειας	293
II.II.3.4.2	Πολλαπλασιασμός βλαστών σε <i>in vitro</i> καλλιέργεια	298
II.II.3.4.3	<i>In vitro</i> ριζοβολία μικρομοσχευμάτων	316
II.II.3.4.4	Εγκλιματισμός φυταρίων <i>ex vitro</i>	321
II.II.3.5	<i>Scabiosa hymettia</i>	322
II.II.3.5.1	Αρχική εγκατάσταση <i>in vitro</i> καλλιέργειας	322
II.II.3.5.2	Πολλαπλασιασμός βλαστών σε <i>in vitro</i> καλλιέργεια	325
II.II.3.5.3	<i>In vitro</i> ριζοβολία μικρομοσχευμάτων	327
II.II.3.5.4	Εγκλιματισμός φυταρίων <i>ex vitro</i>	327
II.II.4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	329
II.II.5	ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ	341
II.II.6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	344
ΚΕΦΑΛΑΙΟ III – ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΑ ΒΛΑΣΤΟΥ - ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΥΤΑΡΙΩΝ		351
II.III.	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	351
II.III.	ΣΚΟΠΟΣ	353
II.III.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	354
II.III.1.1	Μοσχεύματα	354
II.III.1.2	Παράγοντες που επηρεάζουν τη ριζοβολία των μοσχευμάτων	355
II.III.1.3	Ο αγενής πολλαπλασιασμός με μοσχεύματα ειδών της οικογένειας Fabaceae	360
II.III.1.4	Ο αγενής πολλαπλασιασμός με μοσχεύματα ειδών της οικογένειας Lamiaceae	361
II.III.1.5	Ο αγενής πολλαπλασιασμός με μοσχεύματα ειδών της οικογένειας Carifoliaceae	362
II.III.2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ	363
II.III.2.1	ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	363
II.III.2.1.1	Περίοδος συλλογής μοσχευμάτων	363
II.III.2.1.2	Εγκατάσταση μοσχευμάτων προς ριζοβολία	363
II.III.2.1.3	Ανάπτυξη ριζοβολημένων μοσχευμάτων	364
II.III.2.1.4	Υλικά υποστρωμάτων ανάπτυξης ριζοβολημένων	364
II.III.2.1.5	Συνθήκες ριζοβολίας και ανάπτυξης των μοσχευμάτων	364
II.III.2.1.6	Πειραματικά σχέδια - Εκτίμηση αποτελεσμάτων	365
II.III.2.1.7	Στατιστική ανάλυση	366

II.III.2.2	ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ	366
II.III.2.2.1	<i>Anthyllis barba-jovis</i>	366
II.III.2.2.1.1	Μοσχεύματα Βλαστού	366
II.III.2.2.1.2	Ανάπτυξη φυταρίων	367
II.III.2.2.2	<i>Ballota acetabulosa</i>	367
II.III.2.2.2.1	Μοσχεύματα Βλαστού	367
II.III.2.2.2.2	Ανάπτυξη φυταρίων	368
II.III.2.2.3	<i>Clinopodium creticum</i> - <i>Clinopodium nepeta</i>	369
II.III.2.2.3.1	Μοσχεύματα Βλαστού	369
II.III.2.2.3.2	Ανάπτυξη φυταρίων	369
II.III.2.2.3.3	Καταστροφικό Πείραμα	370
II.III.2.2.4	<i>Scabiosa hymettia</i>	370
II.III.2.2.4.1	Μοσχεύματα Βλαστού	370
II.III.2.2.4.2	Ανάπτυξη φυταρίων	372
II.III.2.2.4.3	Καταστροφικό Πείραμα	373
II.III.3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	374
II.III.3.1	<i>Anthyllis barba-jovis</i>	374
II.III.3.1.1	Μοσχεύματα Βλαστού	374
II.III.3.1.2	Ανάπτυξη φυταρίων	374
II.III.3.2	<i>Ballota acetabulosa</i>	376
II.III.3.2.1	Μοσχεύματα Βλαστού	376
II.III.3.2.2	Ανάπτυξη φυταρίων	378
II.III.3.3	<i>Clinopodium creticum</i> <i>Clinopodium nepeta</i>	383
II.III.3.3.1	Μοσχεύματα Βλαστού	383
II.III.3.3.2	Ανάπτυξη φυταρίων	384
II.III.3.3.3	Καταστροφικό Πείραμα	388
II.III.3.4	<i>Scabiosa hymettia</i>	390
II.III.3.4.1	Μοσχεύματα Βλαστού	390
II.III.3.4.2	Ανάπτυξη φυταρίων	392
II.III.3.4.3	Καταστροφικό Πείραμα	403
II.III.4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	404
II.III.5	ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ	409
II.III.6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	411
ΕΝΟΤΗΤΑ III – ΑΝΑΔΕΙΞΗ ΑΡΧΑΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΧΩΡΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΑΥΤΟΦΥΩΝ ΦΥΤΙΚΩΝ ΕΙΔΩΝ		417
III.	ΠΕΡΙΛΗΨΗ	419
III.	ΣΚΟΠΟΣ	420
III.1	ΕΙΣΑΓΩΓΗ	421

III.1.1	Ιστορική αναδρομή της συνύπαρξη της αυτοφυούς βλάστησης και των αρχαιολογικών χώρων	421
III.1.2	Αναγκαιότητα βλάστησης στους αρχαιολογικούς χώρους - Θετικές επιδράσεις της βλάστησης στους αρχαιολογικούς χώρους	423
III.1.3	Αρνητικές επιδράσεις της βλάστησης στους αρχαιολογικούς χώρους	426
III.1.4	Σχεδιασμός φυτεύσεων στους αρχαιολογικούς χώρους	428
III.1.5	Η επιλογή των φυτικών ειδών για τη φύτευση ενός οργανωμένου αρχαιολογικού χώρου	429
III.1.6	Επιδράσεις ζιζανίων στην ανάπτυξη των φυτικών ειδών	430
III.1.7	Καλλιεργητικές φροντίδες	434
III.2	ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΦΥΤΕΥΣΕΩΝ	435
III.2.1	Οι χώροι εγκατάστασης	435
III.2.1.1	Αρχαιολογικός χώρος Κολώνας	436
III.2.1.2	Αρχαία Μεσσήνη	436
III.2.1.3	Χριστιανική (Παλαιοχριστιανική) Αμφίπολη Σερρών	436
III.2.2	Το κλίμα των περιοχών πειραμάτων	436
III.2.3	Φυτικό υλικό και εγκατάσταση πειραμάτων	442
III.3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	449
III.3.1	Επιβίωση των φυτικών ειδών	449
III.3.1.1	Αρχαιολογικός χώρος «Κολώνα»	449
III.3.1.2	Αρχαιολογικός χώρος της «Αρχαίας Μεσσήνης»	451
III.3.1.3	Αρχαιολογικός χώρος «Παλαιοχριστιανική Αμφίπολη» Σερρών	452
III.3.1.4	Βοτανικός Κήπος του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γ.Π.Α.	454
III.3.2	Ανάπτυξη των φυτικών ειδών	455
III.3.2.1	Αρχαιολογικός χώρος «Κολώνα»	455
III.3.2.2	Αρχαιολογικός χώρος της «Αρχαίας Μεσσήνης» Μεσσηνίας	457
III.3.2.3	Αρχαιολογικός χώρος «Παλαιοχριστιανική Αμφίπολη» Σερρών	458
III.3.2.4	Βοτανικός Κήπος του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γ.Π.Α.	460
III.4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	461
III.5	ΓΕΝΙΚΟ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ	462
III.6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	463

ΕΝΟΤΗΤΑ IV – ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ	469
ΤΩΝ ΕΙΔΩΝ <i>Clinopodium creticum</i> και <i>Clinopodium nepeta</i>	
IV. ΠΕΡΙΛΗΨΗ	471
IV. ΣΚΟΠΟΣ	473
IV.1 ΕΙΣΑΓΩΓΗ	474
IV.1.1 Τα αρωματικά/φαρμακευτικά φυτά και τα αιθέρια έλαιά τους κατά το παρελθόν, στη νεότερη και σύγχρονη εποχή	474
IV.1.2 Αρωματικά - Φαρμακευτικά φυτά	477
IV.1.3 Τα ελληνικά αρωματικά-φαρμακευτικά φυτά	478
IV.1.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή και τη σύσταση των αιθερίων ελαίων στα φυτά	480
IV.1.5 Ο ρόλος των αιθερίων ελαίων	481
IV.1.6 Μέθοδοι παραλαβής αιθερίων ελαίων	481
IV.1.6.1 Υδροαπόσταξη	481
IV.1.7 Ποιοτικός – Ποσοτικός προσδιορισμός συστατικών αιθερίων ελαίων	482
IV.1.7.1 Αέρια χρωματογραφία – φασματοσκοπία μάζας (GC-MS)	482
IV.1.8 Χημική σύσταση του αιθερίου ελαίου του <i>Clinopodium</i>	482
IV.1.9 Χημική σύσταση του αιθερίου ελαίου του <i>Clinopodium nepeta</i>	484
IV.1.10 Πουλεγόνη-Η κύρια χημική ένωση αιθερίου ελαίου της <i>C. nepeta</i>	486
IV.1.11 Εποξειδίο της πιπεριτόνης – Η κύρια χημική ένωση αιθερίου ελαίου της <i>C. creticum</i>	488
IV.1.12 Εποξειδίο της πιπεριτενόνης – Μία από τις κύριες χημικές ενώσεις των αιθερίων ελαίων του <i>C. nepeta</i> και <i>C. creticum</i>	489
IV.1.13 Χημικό προφίλ αιθερίου ελαίου από <i>in vitro</i> καλλιέργεια – Σύγκριση με τα καλλιεργούμενα φυτά	492
IV.2 ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΑΡΑΛΑΒΗΣ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ	493
IV.2.1 Φυτικό υλικό	493
IV.2.2 Συλλογή και Αποθήκευση φυτικών δειγμάτων	494
IV.2.3 Διαδικασία ξήρανσης - Προετοιμασία δειγμάτων	494
IV.2.4 Παραλαβή αιθερίου ελαίου με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης Clevenger	494
IV.2.5 Ανάλυση με αέρια χρωματογραφία – φασματογράφο μάζας (GC-MS)	495
IV.2.6 Συνθήκες θερμοκρασίας στο μη θερμαινόμενο υαλόφρακτο θερμοκήπιο και στον υπαίθριο χώρο του Ανθοκομείου	496
IV.2.7 Στατιστική ανάλυση	497

IV.3	ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ	498
IV.3.1	Χημική σύσταση και εποχική διακύμανση του αιθερίου ελαίου του <i>C. creticum</i>	498
IV.3.2	Χημική σύσταση και εποχική διακύμανση του αιθερίου ελαίου του <i>C. nepeta</i>	511
IV.3.3	Χημική σύσταση του αιθερίου ελαίου του <i>C. creticum</i> και <i>C. nepeta</i> από <i>in vitro</i> αναπτυγμένους μικροβλαστούς	523
IV.3.4	Συγκριτική μελέτη των αιθερίων ελαίων από <i>in vitro</i> αναπτυγμένους μικροβλαστούς και καλλιεργούμενα φυτά	526
IV.4	ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	529
IV.5	ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	536
IV.6	ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ	538
ΕΝΟΤΗΤΑ V – ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ		545
ΕΝΟΤΗΤΑ VI – ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ		555
ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ – ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ		561

ΕΝΟΤΗΤΑ Ι – ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

I. ΓΕΝΙΚΗ ΕΙΣΑΓΩΓΗ

I.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

I.1.1 Η λεκάνη της Μεσογείου

Η λεκάνη της Μεσογείου εκτείνεται σε απόσταση περίπου 3.800 Km από τα δυτικά προς τα ανατολικά, από το άκρο της Πορτογαλίας έως τις ακτές του Λιβάνου και σε απόσταση περίπου 1.000 Km από τα Βόρεια προς τα Νότια, από την Ιταλία έως το Μαρόκο και τη Λιβύη (Blondel and Aronson, 1995). Στην Ευρωπαϊκή Ένωση, η περιοχή της Μεσογείου περιλαμβάνει επτά κράτη μέλη, είτε μερικώς (Γαλλία, Ισπανία) είτε πλήρως (Ελλάδα, Ιταλία, Κροατία, Κύπρος, Μάλτα) (Εικ. I.1).

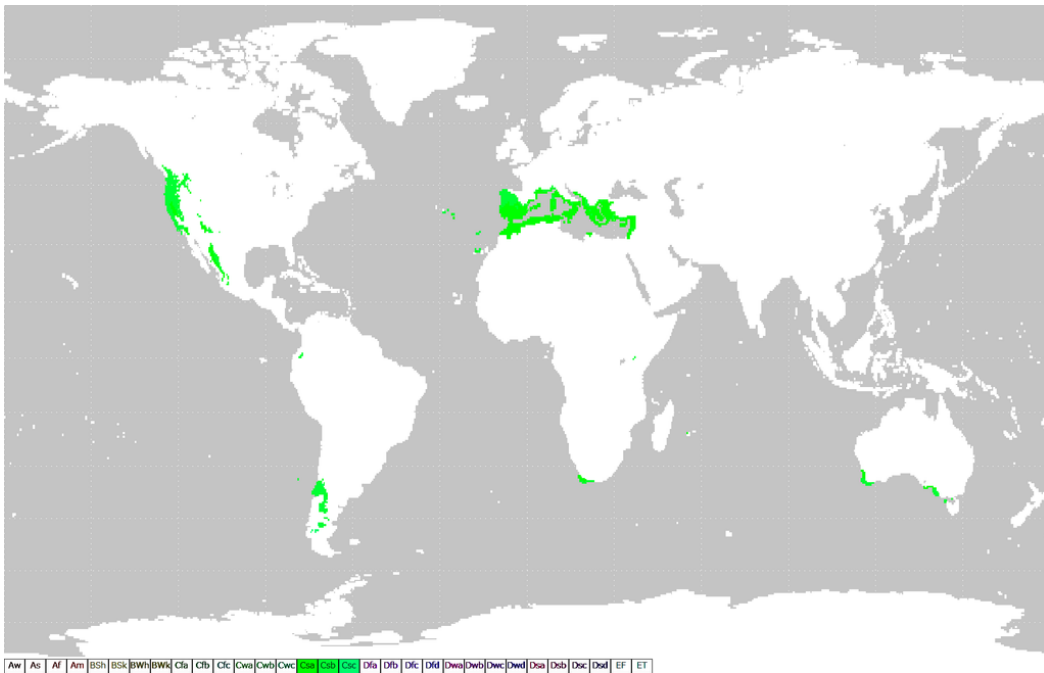


Εικόνα I.1. Τα όρια της Λεκάνης της Μεσογείου. Πηγή: <https://bit.ly/2MWLrLX>

I.1.2 Μεσογειακό κλίμα

Το μεσογειακό κλίμα χαρακτηρίζεται από ζεστά, ξηρά καλοκαίρια και υγρούς, ήπιους χειμώνες, αλλά φημίζεται επίσης για τις ξαφνικές αλλαγές του από τις καταρρακτώδεις βροχές ή τους πολύ ισχυρούς ανέμους που εκδηλώνονται σε διάφορες εποχές του χρόνου (Di Castri, 1981, Orshan, 1983). Αυτές οι κλιματικές συνθήκες ασκούν βαθιά επίδραση στη βλάστηση. Ανάλογη είναι και η επίδραση της πολύμορφης και γεμάτης αντιθέσεις τοπογραφίας. Κατά συνέπεια η περιοχή της Μεσογείου προσφέρει ένα τοπίο με συνεχείς εναλλαγές, όπως με ψηλά όρη, βραχώδεις ακτές, αδιαπέραστες λόχμες, ημιάγονες στέπες, αλλά και παράκτιους υγρότοπους, αμμώδεις παραλίες και μυριάδες νησιά, διάσπαρτα στη γαλάζια θάλασσα (Blondel and Aronson, 1995).

Αυτός ο τύπος κλίματος εμφανίζεται στη λεκάνη της Μεσογείου, από όπου πήρε και το όνομά του, αλλά και σε τέσσερις ακόμα περιοχές του πλανήτη, ήτοι στο μεγαλύτερο μέρος της Καλιφόρνιας, στην κεντρική Χιλή, σε τμήμα της Δυτικής και Νότιο - Δυτικής Αυστραλίας και στη νοτιοδυτική Νότιο Αφρική (Walter, 1979, Di Castri, 1981, Barbour and Billings, 1988, Rundel, 2007) (Εικ. Ι.2). Η Λεκάνη της Μεσογείου αποτελεί το 60% όλων των περιοχών με μεσογειακό κλίμα παγκοσμίως (Myers *et al.*, 2000). Επιπλέον παρατηρείται ότι σε όλες τις περιοχές, το μεσογειακό κλίμα εμφανίζεται στο δυτικό μέρος των Ηπείρων, σε γεωγραφικό πλάτος 30° με 40° μοίρες, και στα δύο ημισφαίρια αλλά και σε περιοχές κοντά σε μεγάλους όγκους νερού.



Εικόνα Ι.2. Παγκόσμιος χάρτης με τις περιοχές που έχουν μεσογειακό κλίμα (πράσινο χρώμα). Πηγή: <https://bit.ly/2SOIGBL>

Γενικά, στις περιοχές αυτές που χαρακτηρίζονται από μεσογειακού τύπου κλίμα, υπάρχουν έντονες εποχικές διακυμάνσεις. Το νερό είναι άφθονο κατά τη διάρκεια του χειμώνα, αλλά κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού μετατρέπεται σε περιοριστικό παράγοντα για τους περισσότερους οργανισμούς. Προκύπτει με σαφήνεια επομένως ότι λόγω της παρατεταμένης καλοκαιρινής ξηρασίας οι πυρκαγιές είναι χαρακτηριστικό φαινόμενο του μεσογειακού κλίματος. Ένα άλλο ιδιαίτερο χαρακτηριστικό πολλών περιοχών της Μεσογείου είναι η ύπαρξη ισχυρών ανέμων, για παράδειγμα το καλοκαίρι ισχυροί άνεμοι πνέουν από τα Βόρεια, οι οποίοι μπορεί να διαρκέσουν για πολλές μέρες, όπως ο άνεμος μαϊστράλι, ο ψυχρός άνεμος μπόρα και το μελτέμι.

Ταυτόχρονα παρατηρείται στη χώρα μας η βροχόπτωση να κυμαίνεται από 400 mm ή και λιγότερο έως 3.000 mm ετησίως. Αντίθετα το ετήσιο ύψος της βροχής αυξάνεται από το νότο προς το βορρά, από ανατολικά προς τα δυτικά, καθώς και με το υψόμετρο (Ντάφης, 1986).

I.1.3 Μεσογειακή βλάστηση

Η Μεσόγειος δεν διαθέτει μόνον πολύ πλούσια βιοποικιλότητα, αλλά και μεγάλο αριθμό ειδών τα οποία υπάρχουν μόνο στη συγκεκριμένη γεωγραφική περιοχή και πουθενά αλλού στον κόσμο. Άλλωστε ο βαθμός ενδημικότητας, λόγω του τεμαχισμού της γης σε νησιά και χερσονήσους που δυσχεραίνει τον πολλαπλασιασμό και την ανταλλαγή είναι εξαιρετικά υψηλός. Σύμφωνα με το Le Houerou (1981), η χλωρίδα της Μεσογείου περιλαμβάνει 15.000 είδη και είναι η πλουσιότερη από τις πέντε περιοχές παγκοσμίως με το ίδιο κλίμα. Σύμφωνα λοιπόν με νεότερα στοιχεία κατά μήκος της Μεσογειακής Λεκάνης απαντώνται περίπου 25.000 είδη, ενώ περισσότερα από τα μισά μεσογειακά είδη είναι ενδημικά (Cowling *et al.*, 1996, Thompson, 2005, Rundel, 2007).

Ένα ακόμη χαρακτηριστικό της περιοχής είναι η εξαιρετικά μακροχρόνια σχέση της με τον άνθρωπο, η οποία άφησε τα σημάδια της σε μεγάλο μέρος του τοπίου. Η πανταχού παρούσα λόχμη της Μεσογείου, με την αφθονία λουλουδιών και αρωματικών φυτών, για παράδειγμα, είναι άμεσο αποτέλεσμα αιώνων, ανθρωπογενών διεργασιών, όπως είναι οι δασικές πυρκαγιές, η αποψίλωση, η εξάπλωση των πόλεων, η βόσκηση ζώων και οι καλλιέργειες. Όλες αυτές οι διεργασίες έχουν οδηγήσει όχι μόνο σε σοβαρή υποβάθμιση των εδαφών, αλλά και σε ερημοποίηση μεγάλων εκτάσεων (Walter, 1973, Naveh, 1975, Papanastasis, 1977, Naveh, 1988, Keeley, 1991, Margaris and Koutsidou, 1998, Terradas, 2001). Επιπλέον τα φυτά απειλούνται από ένα συνδυασμό παραγόντων, όπως η υπερσυλλογή, οι ακατάλληλες πρακτικές γεωργίας, η αστικοποίηση, η ρύπανση, η καταστροφή, ο κατακερματισμός, η υποβάθμιση του ενδιαίτηματος, η διασπορά επιθετικών ξενικών ειδών και η κλιματική αλλαγή (Papanastasis, 2004).

Αναλυτικότερα επειδή η ανθρώπινη παρέμβαση έχει πολύ τοπικό χαρακτήρα, η λόχμη της Μεσογείου εξελίχθηκε σε ένα πολύπλοκο και δαιδαλώδες κινητό σύμπλεγμα ενδιαιτημάτων, το οποίο διαγράφει έναν τακτικό κύκλο εκφυλισμού και ανάπλασης. Ως επακόλουθο η πολυπλοκότητα αυτής της δομής της βλάστησης εξηγεί γιατί οι περιοχές αυτές διαθέτουν τόσο πλούσια άγρια ζωή και ιδίως φυτά και έντομα. Παρότι βέβαια η λεκάνη της Μεσογείου είναι συνώνυμη της περιοχής, δεν είναι σε καμία περίπτωση το μόνο εν προκειμένω πλούσιο σε είδη ενδιαίτημα. Σε πολλές περιοχές κυριαρχούν ακόμη μεγάλες

εκτάσεις φυσικών, ουσιαστικά παρθένων δασών, τα οποία παραμένουν σχεδόν ανέπαφα από τον άνθρωπο. Σε αντίθεση με τα περισσότερα δάση της Κεντρικής και της Βόρειας Ευρώπης, στα οποία κυριαρχούν περίπου 12 είδη δένδρων, τα δάση της Μεσογείου εμφανίζουν πολύ μεγαλύτερη ποικιλότητα και φιλοξενούν έως 100 διαφορετικά είδη δένδρων (<https://bit.ly/2lZb9FT>).

1.1.4 Δομές Μεσογειακής βλάστησης

Τα μεσογειακά οικοσυστήματα περιλαμβάνουν διάφορες δομές βλάστησης, όπως: δάση, θαμνώδεις εκτάσεις, περιοχές με μικρότερους θάμνους και πόες.

Το χαρακτηριστικότερο είδος βλάστησης των μεσογειακών οικοσυστημάτων είναι οι θαμνώδεις εκτάσεις. Σ' αυτές κυριαρχούν ξυλώδεις, αειθαλείς, σκληρόφυλλοι θάμνοι ή μικρά (χαμηλόσωμα) δέντρα, που έχουν αναπτύξει διάφορες στρατηγικές ανάπτυξης και χρησιμοποίησης των διαθέσιμων υδάτων κατά τη θερινή, ξηρή περίοδο. Αυτή η δομή βλάστησης έχει διάφορα ονόματα από περιοχή σε περιοχή. Στη Μεσόγειο λέγεται «μακκία» (*maquis*, *macchia*), στη Χιλή και στην Ισπανία «*matorral*», στην Καλιφόρνια «*chaparral*», στην Αυστραλία «*mallee*, *kwongan*» και «*renosterved*, *fynbos*» στη Νότιο Αφρική (Di Castri, 1981). Η μακκία βλάστηση αναπτύσσεται προς τις ακτές και εισχωρεί στην ενδοχώρα ακολουθώντας τις λεκάνες των ποταμών (Dallman, 1998). Ωφέλιμο είναι να επισημανθεί ότι η μείωση των βροχοπτώσεων επιφέρει την αύξηση της απόστασης μεταξύ των θάμνων. Αυτό έχει σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση μεγαλύτερων πληθυσμών φυλλοβόλων - ξηροφύτων. Αυτή λοιπόν η ομάδα φυτών απαντά με διαφορετικά ονόματα σε κάθε περιοχή ανά τον κόσμο· πρόκειται για τα επονομαζόμενα φρύγανα (Di Castri, 1981).

Κατά τον Papanastasis (2004), τα σημαντικότερα οικοσυστήματα της Μεσογειακής βλάστησης είναι τα εξής:

α. Φρυγανικά οικοσυστήματα ("garrigues"): Κυριαρχούν χαμηλόσωμα (<1 m ύψος) θαμνώδη είδη, συχνά αρωματικά ή με αγκαθωτά φύλλα (Margaris, 1981). Ενδεικτικά αναφέρονται: το φυτιλάκι (*Ballota acetabulosa*), η λαδανιά (*Cistus creticus*, *Cistus salvifolius*), το θυμάρι (*Coridothymus capitatus*, *Thymus* spp.), το ρείκι (*Erica arborea* και *Erica manipuliflora*), η γκλομπουλάρια (*Globularia alypum*), η ασφάκα (*Phlomis fruticosa*), το φασκόμηλο (*Salvia fruticosa*), η αστοιβίδα (*Sarcopoterium spinosum*).

β. Θαμνώδη οικοσυστήματα (μακκία): Κυριαρχούν ξυλώδεις, αειθαλείς, σκληρόφυλλοι θάμνοι, πλατύφυλλα είδη ή μικρά δέντρα, γνωστά ως «*matorral*» (Tomaselli, 1977), που έχουν αναπτύξει διάφορες στρατηγικές ανάπτυξης και χρησιμοποίησης των διαθέσιμων υδάτων κατά τη θερινή, ξηρή περίοδο (Margaris, 1981). Η μακκία βλάστηση

είναι πιο πυκνή, με υψηλότερους θάμνους (Le Houerou, 1992). Κυρίαρχα είδη: η αγριελιά (*Olea europaea*), η κουμαριά (*Arbutus unedo*), η χαρουπιά (*Ceratonia siliqua*), η δάφνη (*Laurus nobilis*), ο σχίνος (*Pistacia lentiscus*), οι άρκευθοι (*Juniperus* spp.), τα φιλλύκια (*Phyllirea latifolia*), η αγριοτσικουδιά (*Pistacia terebinthus*), το πουρνάρι (*Quercus coccifera*).

γ. Δασικά οικοσυστήματα: Σε μεγαλύτερα υψόμετρα κυριαρχούν τα ψυχρόβια κωνοφόρα (*Abies* spp., *Pinus* spp., *Juniperus* spp.) και τα φυλλοβόλα πλατύφυλλα (*Quercus* spp., *Acer* spp., *Castanea sativa*, κ.ά.). Στα χαμηλά υψόμετρα αναπτύσσονται δάση θερμόβιων κωνοφόρων (*Pinus* spp., *Juniperus* spp.) και αειθαλών πλατύφυλλων (*Quercus* spp., *Ceratonia siliqua*, *Phillyrea latifolia*, *Rhamnus* spp., κ.ά.).

1.1.5 Προσαρμοστικοί μηχανισμοί στο κλίμα

Τα φυτά που κυριαρχούν στο μεσογειακό τύπο κλίματος έχουν αναπτύξει ορισμένους ξηροφυτικούς χαρακτήρες για την αντιμετώπιση των αδυσώπητων καυτών καλοκαιριών και των μακρόχρονων περιόδων ξηρασίας. Οι κυριότεροι προσαρμοστικοί μηχανισμοί των ειδών της Μεσογειακής βλάστησης είναι η αειφυλλία και η σκληροφυλλία. Τα είδη αυτά χαρακτηρίζονται από μικρά, παχιά, στενά και δερματώδη φύλλα, συχνά με ανατομικές τροποποιήσεις, όπως καλά ανεπτυγμένο πασσαλώδες παρέγχυμα, ενώ καλύπτονται από πυκνά τριχίδια ή κηρώδεις ουσίες για τη μείωση της διαπνοής (Shields, 1950, Parkhurst and Loucks, 1972, Margaris, 1977, Turner, 1994, Salleo and Nardini, 2000, Read and Sanson, 2003, Paula and Pausas, 2006).

Αναλυτικότερα η σκληροφυλλία γίνεται εντονότερη σε περιπτώσεις καταπόνησης λόγω έντονης ακτινοβολίας, ξηρασίας ή μικρής γονιμότητας του εδάφους (Poole and Miller, 1975, Specht and Runderl, 1990, Gutschick, 1999). Γενικά στα αείφυλλα είδη τα φύλλα έχουν σχετικά χαμηλή φωτοσυνθετική ικανότητα, υψηλή περιεκτικότητα σε άνθρακα και μια σχετικά υψηλή μάζα ανά μονάδα επιφάνειας. Επιπρόσθετα παρουσιάζουν υψηλή πυκνότητα του φυλλικού ιστού, μικρή φυλλική επιφάνεια, σκληρά κυτταρικά τοιχώματα και σκληρή άκαμπτη εφυμενίδα. Αυτές οι ιδιότητες είναι σημαντικές καθώς εξασφαλίζουν ανθεκτικότητα στην ξηρασία, εξοικονόμηση του νερού και προστατεύουν το φυτό από τους θηρευτές (Abril and Hanano, 1998, Castro-Diez *et al.*, 1998, Gratani and Bombelli, 1999, Werner *et al.*, 1999). Τα φύλλα τους παράλληλα διαθέτουν αγγεία ανθεκτικά στις αρνητικές πιέσεις που επικρατούν σε συνθήκες έλλειψης νερού (Cunningham *et al.*, 1999, Niinemets, 2001, Lamont *et al.*, 2002).

Εκτός βέβαια από τις ανατομικές προσαρμογές, που αναφέρθηκαν ανωτέρω, στα φύλλα που ελέγχουν την εξατμισοδιαπνοή, υπάρχουν και προσαρμογές στη φυσιολογία τους. Έτσι σύμφωνα με τους Poole and Miller (1975) και τους Hetherington and Woodward (2003) σε περιόδους ξηρασίας, τα αείφυλλα είδη έχουν την ιδιότητα να κλείνουν τα στόματα των φύλλων τους, σταματώντας τη διαδικασία της διαπνοής και αναστέλλοντας τη βιολογική τους δραστηριότητα.

Συμπληρωματικά τα είδη της μακκίας βλάστησης χαρακτηρίζονται από βαθύ, καλά ανεπτυγμένο ριζικό σύστημα, για να απορροφούν το νερό από τα βαθύτερα στρώματα του εδάφους, ενώ τα μικρά και δερματώδη φύλλα τους περιορίζουν τη διαπνοή (απώλεια νερού μέσω των στομάτων των φύλλων) (Margaris, 1977). Κάποια είδη, επιπλέον, για να αξιοποιήσουν τα υδατικά αποθέματα του εδάφους καλύτερα, διαχέουν στο έδαφος ανασταλτικές ουσίες για τη βλάστηση σπόρων και την ανάπτυξη των νεαρών φυτών, ενώ άλλα διασκορπίζουν τους σπόρους τους το καλοκαίρι, ώστε με την έναρξη της βλάστησής τους το φθινόπωρο, μετά τις πρώτες βροχές να υπάρχει διαθέσιμο το νερό που χρειάζονται (Margaris, 1977, Margaris and Vokou, 1981, Baskin and Baskin, 2001).

Τα φρύγανα, από την άλλη πλευρά, έχουν ως βασικό χαρακτηριστικό τον εποχικό διμορφισμό, εμφανίζουν δηλαδή διαφορετική μορφή το χειμώνα απ' ότι το καλοκαίρι, προκειμένου να αντιμετωπίσουν την ξηρασία. Το χειμώνα δηλαδή έχουν μεγάλα φύλλα με μικρές ποσότητες δευτερογενών μεταβολιτών, ενώ το καλοκαίρι εμφανίζουν μικρότερα φύλλα με μεγάλες ποσότητες δευτερογενών μεταβολιτών. Με αυτό τον τρόπο περιορίζουν τη διαπνοή και εξοικονομούν νερό. Ο εποχικός διμορφισμός που συναντάται, κυρίως, στις μεσογειακές περιοχές έχει γίνει εδώ και καιρό αντικείμενο πολλών ερευνών (Margaris and Papadopoulou, 1975, Arianoustou-Faraggitaki and Margarris, 1981, Psaras, 1986, Christodoulakis, 1986, Psaras and Christodoulakis, 1987, Christodoulakis, 1989, Christodoulakis and Fasseas, 1991). Αυτές οι εποχικές διαφορές ανάμεσα στη δομή των φύλλων θεωρούνται φυσιολογικές, εφόσον το φυτό πρέπει να ξεπεράσει τις αντίξοες συνθήκες του καλοκαιριού (ζεστό και ξηρό καλοκαίρι) (Christodoulakis, 1989). Για παράδειγμα έρευνα που έγινε σε φύλλα της *Ballota acetabulosa* κατέληξε στο συμπέρασμα ότι τα χειμερινά φύλλα είναι λιγότερο ξηρομορφικά σε σύγκριση με τα θερινά και ότι λεπτότερα χειμερινά φύλλα περιέχουν πολυάριθμους, ανεπτυγμένους χλωροπλάστες, ενώ δεν παρατηρήθηκαν καθόλου φαινολικά. Σε αντίθεση με τα χειμερινά, τα συμπαγή θερινά φύλλα είναι περισσότερο τριχωτά και παρατηρείται αύξηση στις στρώσεις του σπογγώδους παρεγχύματος και μείωση στις στρώσεις του πασσαλώδους παρεγχύματος (Christodoulakis and Bazos, 1990).

Άλλα είδη φρύγανων έχουν φύλλα γκρι ή πολύ ανοιχτόχρωμα (π.χ. *Eremophila* spp.), που αντανακλούν το φως και ελαχιστοποιούν την εξάτμιση του νερού ή ρίχνουν τα φύλλα τους την ξηρή περίοδο προκειμένου να κερδίσουν υγρασία (π.χ. κάποια *Quercus* spp.), ενώ κάποια (π.χ. *Cistus* spp., *Quercus* spp., *Ceanothus* spp.) αλλάζουν προσανατολισμό στα φύλλα σε περιόδους ξηρασίας, προκειμένου να μειώσουν τα επίπεδα ηλιακού φωτός που προσλαμβάνουν.

1.1.6 Βιοποικιλότητα της Ελλάδας

Η Ελλάδα διαθέτει υψηλή βιοποικιλότητα ειδών, όχι μόνο φυτών και ζώων, αλλά και οικοτόπων – τοπίων. Επιπλέον αποτελεί ένα από τα σημαντικότερα κέντρα βιοποικιλότητας στην Ευρώπη και το σημαντικότερο κέντρο ενδημισμού στην Ευρώπη και τη Μεσόγειο. Εξαιτίας της γεωγραφικής της θέσης και της συνύπαρξης χλωριδικών περιοχών όπως είναι η μεσογειακή, η ευρωπαϊκή και η ιρανοκασπική, η χλωρίδα της Ελλάδας είναι από τις πλουσιότερες της Ευρώπης.

Σύμφωνα με τους Strid and Tan (1992) η ελληνική χλωρίδα περιλάμβανε 6.308 taxa, ενώ ο αριθμός των ειδών υπολογιζόταν στα 4.900 - 5.500. Με νεότερα στοιχεία η χλωρίδα της Ελλάδας περιλαμβάνει 6.620 taxa που αντιστοιχεί στο 26% της μεσογειακής χλωρίδας και ποσοστό ενδημισμού περίπου 20% (Dimopoulos *et al.*, 2013). Πιο συγκεκριμένα η ελληνική χλωρίδα περιλαμβάνει 5758 είδη και 1970 υποείδη που αντιπροσωπεύουν 6620 taxa· αυτά ανήκουν σε 1073 γένη και 185 οικογένειες (Dimopoulos *et al.*, 2013).

Κατά τη σύγκριση των διαφόρων περιοχών της Ελλάδας διαπιστώθηκε ότι η πλουσιότερη σε είδη και taxa περιοχή είναι η Βορειοανατολική (3264 είδη, 3531 taxa), ακολουθούμενη από τη Βόρεια - Κεντρική, τη Στερεά Ελλάδα και την Πελοπόννησο (1661 είδη, 1750 taxa). Γενικά παρατηρήθηκε ότι οι ηπειρωτικές περιοχές της Ελλάδας είναι πιο πλούσιες σε είδη και taxa σε σύγκριση με τις νησιωτικές περιοχές μια τάση που μπορεί να αντικατοπτρίζει τη διαφορετική έκταση της επιφάνειας της κάθε περιοχής (Dimopoulos *et al.*, 2013).

Η ελληνική χλωρίδα περιλαμβάνει 1459 ενδημικά είδη που αντιστοιχούν σε 1274 ενδημικά είδη (22,1% του συνολικού αριθμού των ελληνικών ειδών) και 450 ενδημικά υποείδη (22,8% του συνολικού αριθμού των ελληνικών υποείδων). Ο ενδημικός πλούτος σε απόλυτους αριθμούς και το ποσοστό του ενδημισμού δεν είναι ομοίμορφα κατανομημένο σε ολόκληρη την Ελλάδα. Ο υψηλότερος αριθμός ενδημικών ειδών παρατηρείται στην Πελοπόννησο (464 taxa), ενώ ο δεύτερος και ο τρίτος υψηλότερος αριθμός βρίσκονται στις περιοχές Κρήτη και Κάρπαθο (392 taxa) και Στερεά Ελλάδα (368 taxa). Οι χαμηλότεροι αριθμοί παρουσιάζονται στα νησιά του Βόρειου Αιγαίου (57 taxa), του Ιονίου (91 taxa) και

στην Ανατολική – Κεντρική Ελλάδα (96 taxa) (Dimopoulos *et al.*, 2013). Επομένως, δικαίως η Μεσόγειος (και η Ελλάδα) θεωρείται ένα από τα πιο ενδιαφέροντα σημεία στον κόσμο από πλευράς βιοποικιλότητας.

Ως συμπέρασμα προκύπτει ότι αυτή την πλούσια βιοποικιλότητα της χώρας μας θα πρέπει να την προστατεύσουμε με κάθε τρόπο, όχι μόνο για την προσωπική επιβίωση μας, αλλά και για την επιβίωση του ίδιου του πολιτισμού μας. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί με μια πιο ορθολογική και αειφορική διαχείριση των φυσικών πόρων.

I.1.7 Αξιοποίηση αυτοφυών ειδών

Τα αυτοφυή φυτά, στενά συνδεδεμένα με τα βιοτικά εξελικτικά χαρακτηριστικά ενός οικοτόπου, εξελίσσονται σε γεωλογικό χρόνο αλληλεπιδρώντας με τα είδη της τοπικής φυτοκοινωνίας. Με αυτόν τον τρόπο αναπτύσσουν προσαρμοστικούς μηχανισμούς στις κλιματικές συνθήκες, ιδιαίτερα πολύτιμους σε προγράμματα διάσωσης και διατήρησης αλλά και σε προγράμματα αρχιτεκτονικής τοπίου, ως εναλλακτικής και οικολογικής προσέγγισης και λύσης, ξεπερνώντας κάποιες φορές τόσο σε ομορφιά όσο και σε ανθεκτικότητα ως προς την ξηρασία, τους εχθρούς και τις ασθένειες τα καλλωπιστικά μη-αυτοφυή είδη.

Διαπιστώνεται λοιπόν ότι η χρήση των αυτοφυών φυτών ως καλλωπιστικά μπορεί να επιφέρει πολλά πλεονεκτήματα. Αρχικά μπορεί να αποτρέψει την εξάπλωση ξενικών ειδών που ήδη βρίσκονται σε μια περιοχή και να βοηθήσει στο να αποτραπούν μελλοντικές εισοδοί. Επιπλέον τα αυτοφυή είδη σπάνια γίνονται επιθετικά σε σύγκριση με τα ξενικά. Ακόμη πολλά αυτοφυή είδη συντελούν στο να διατηρηθεί ή και να βελτιωθεί η γονιμότητα του εδάφους. Επίσης μειώνουν τη διάβρωση και συχνά έχουν λιγότερες απαιτήσεις συντήρησης (π.χ. άρδευση, λίπανση, ζιζανιοκτονία) γεγονός που οδηγεί οικονομικό όφελος και είναι μια συμφωνία με την τάση στη σύγχρονη αρχιτεκτονική τοπίου και κηποτεχνία για εφαρμογή λύσεων με στόχο την ελαχιστοποίηση των αναγκών συντήρησης.

Ταυτόχρονα η χρήση αυτοφυών ειδών μπορεί να παρέχει βασικό καταφύγιο και πηγή τροφής σε διάφορα είδη του ζωικού βασιλείου (π.χ. πουλιά, έντομα, ερπετά). Ένα άλλο χαρακτηριστικό της αυτοφυούς χλωρίδας είναι η ανθεκτικότητά της και η επιβίωσή της στις αντίξοες καιρικές συνθήκες του περιβάλλοντος προσφέροντας μια μεγάλη ποικιλία σε ενδιαφέροντα άνθη, φυλλώματα, χρώματα, ύψη, σχήματα και υφές. Επιπλέον τα αυτοφυή φυτά συχνά χρησιμοποιούνται είτε ως εδώδιμα είδη (π.χ. τσουκνίδα (*Urtica dioica*), *Crithmum maritimum*, *Capparis spinosa*) ή αρωματικά – αρτυματικά (*Thymus capitatus*, *Origanum* spp. κ.ά.) ή αφεψήματα (*Salvia* spp., *Sideritis* spp.) ή φαρμακευτικά (π.χ.

Hypericum perforatum) ή προσφέρουν άλλη χρήση στην παραγωγή χημικών προϊόντων στον τομέα τροφίμων, καλλυντικών κ.α. Δεν υπάρχει αμφιβολία λοιπόν ότι η αυξανόμενη ζήτηση αυτοφυών ειδών έχει οδηγήσει στην αξιοποίηση τους κυρίως ως καλλωπιστικά και στη σύγχρονη επιχειρηματική ανθοκομία (Diekelmann and Schuster, 2002, Parafotiou *et al.*, 2017a, b).

Βασική παράμετρο αποτελεί η έρευνα των Helfand *et al.* (2006) η οποία έδειξε, ότι οι άνθρωποι ήταν πρόθυμοι να διαθέσουν μεγαλύτερα οικονομικά ποσά για έναν καλά-σχεδιασμένο κήπο που να περιλαμβάνει αυτοφυή φυτά παρά για χλοοτάπητες. Επίσης μια άλλη έρευνα ανέδειξε το ότι οι αρχιτέκτονες τοπίου στις Ν.Α. Η.Π.Α. χρησιμοποιούν σημαντικό ποσοστό αυτοφυών φυτικών ειδών της περιοχής στα σχέδιά τους, γιατί έχουν κατασταλάξει στο συμπέρασμα ότι τα τοπικά είδη είναι καλύτερα προσαρμοσμένα στις δύσκολες και μοναδικές συνθήκες μιας περιοχής (Brzuszek *et al.*, 2007).

Ωφέλιμο είναι τέλος να επισημανθεί ότι η χρήση των αυτοφυών ειδών είναι διαδεδομένη σε αρκετές εφαρμογές, όπως στα έργα οδοποιίας τόσο για φυτεύσεις σε πρανή όσο και για έλεγχο της διάβρωσης με σκοπό τον εμπλουτισμό και την αύξηση της βιοποικιλότητας (Harper-Lore, 1996, Harper-Lore and Wilson, 2000, Tinsley *et al.*, 2006, Burghardt *et al.*, 2008).

1.1.8 Πολλαπλασιασμός αυτοφυών ειδών

Στη φύση η κύρια μέθοδος αναπαραγωγής των φυτών είναι ο πολλαπλασιασμός με σπόρο (εγγενής πολλαπλασιασμός). Ο εγγενής πολλαπλασιασμός είναι ο πιο αποτελεσματικός και ευρέως διαδεδομένος τρόπος πολλαπλασιασμού φυτών. Είναι μια φτηνή και μαζική μέθοδος η οποία δίνει τη γρήγορη ανάπτυξη των σποροφύτων στα πρώτα στάδια της ζωής τους (Macdonald, 2006). Όμως δεν εξασφαλίζει γενετική ομοιομορφία και σταθερότητα, έτσι ώστε τα χαρακτηριστικά ενός γονότυπου μπορεί να εξαφανιστούν. Αυτά τα προβλήματα μπορούν να ξεπεραστούν είτε με τις παραδοσιακές τεχνικές του αγενούς πολλαπλασιασμού (δηλαδή με μοσχεύματα) είτε με το μικροπολλαπλασιασμό (*in vitro*) (Hartman *et al.*, 1997). Το χαρακτηριστικό γνώρισμα του αγενούς πολλαπλασιασμού είναι συνεπώς η γενετική σταθερότητα. Ωστόσο η μέθοδος παρουσιάζει και μειονεκτήματα καθώς το περιορισμένο αρχικό υλικό και το σχετικά μεγάλο κόστος διατήρησης μητρικών φυτειών αυξάνει το κόστος παραγωγής του πολλαπλασιαστικού υλικού. Θα πρέπει ακόμη να αναφερθεί η αυξημένη πιθανότητα μετάδοσης ασθενειών στις μητρικές φυτείες. Η εγκατάσταση *in vitro* φυτικών συλλογών επιτρέπει τη δημιουργία εκτεταμένων συλλογών σε ελάχιστο χώρο, μειώνει την πίεση συλλογής από τους άγριους πληθυσμούς και παρέχει πολύτιμο υλικό για

την αποκατάσταση των άγριων πληθυσμών, για μοριακές έρευνες, οικολογικές μελέτες και οικονομικές χρήσεις (Paunescu, 2009).

Στην Ελλάδα υπάρχει μεγάλο ενδιαφέρον για την εξερεύνηση όχι μόνο αποδοτικών τρόπων πολλαπλασιασμού αυτοφύων ειδών, αλλά και αποτελεσματικών μεθόδων για τη διατήρησή τους και την αξιοποίησή τους ως καλλωπιστικά φυτά.

Την τελευταία εικοσοπενταετία στο Εργαστήριο Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών έχει μελετηθεί ο πολλαπλασιασμός ενός μεγάλου αριθμού αυτοφύων ειδών της Ελληνικής Χλωρίδας, με διάφορες μεθόδους (εγγενώς, αγενώς, *in vitro*), με στόχο την εισαγωγή τους στην επιχειρηματική ανθοκομία κυρίως ως καλλωπιστικά φυτά, για χρήση στην κηποτεχνία και την Αρχιτεκτονική Τοπίου σε διάφορες εφαρμογές με έμφαση την ξηρική κηποτεχνία και το αστικό πράσινο, κυρίως φυτοδώματα εκτατικού τύπου (Akoumianaki-Ioannidou *et al.*, 2017, Kokkinou *et al.*, 2016, Kotsiris *et al.*, 2012, Martini *et al.*, 2017a, b, c, Nektarios and Ntoulas, 2017, Nektarios *et al.*, 2011, 2015, 2016, Papafotiou and Papanagiotou, 2013, Papafotiou *et al.*, 2012a, 2013b, 2015, 2016b, 2017c, 2018, Paraskevopoulou *et al.*, 2015, Tassoula *et al.*, 2015, 2017a, b).

Ειδικότερα έχουν μελέτη τα είδη: *Anthyllis barba-jovis* L. (Vlachou *et al.*, 2016a, Trigka and Papafotiou, 2017), *Arbutus andrachne*, *Arbutus unedo*, το φυσικό τους υβρίδιο *Arbutus x andrachnoides* (Bertsouklis and Papafotiou, 2009, 2010a, 2011, 2013, 2017, Papafotiou *et al.*, 2012, 2013, Papafotiou *et al.*, 2012b, 2013a), *Atriplex halimus* L. (Papafotiou *et al.*, 2016a), *Ballota acetabulosa* (Vlachou *et al.*, 2016b), *Calamintha cretica* (Vlachou *et al.*, 2017), *Calamintha nepeta* (Vlachou *et al.*, 2016c), *Dianthus fruticosus* (Papafotiou and Stragas, 2009), *Euphorbia characias* (Garavelos *et al.*, 1999), *Globularia alypum* (Bertsouklis *et al.*, 2003, Bertsouklis and Papafotiou, 2010b), *Limonium monoptalum* L. (Akoumianaki-Ioannidou *et al.*, 2016, Martini and Papafotiou, 2016), *Lithodora zahnii* (Papafotiou and Kalantzis, 2009a), *Quercus euboica* (Kartsonas and Papafotiou, 2007, 2009), *Sideritis athoa* (Papafotiou and Kalantzis, 2009b), *Scabiosa hymettia* (Papafotiou *et al.*, 2016c), *Teucrium capitatum* (Martini *et al.*, 2016, Papafotiou and Martini, 2016, Martini *et al.*, 2017a), *Thymelaea tartoraira* spp. *tartoraira* (Papafotiou and Martini, 2016), *xMalosorbus florentina* (Papafotiou and Martini, 2009 a, b, Martini and Papafotiou, 2009), και πολλά άλλα.

Ανάλογη έρευνα διεξάγεται και από το Εθνικό Ίδρυμα Γεωργικών Ερευνών και το Βαλκανικό Βοτανικό Κήπο Κρουσσίων (Maloupa *et al.*, 2005, Maloupa *et al.*, 2008), καθώς και άλλα εκπαιδευτικά ερευνητικά ιδρύματα της χώρας, όπου έχει μελετηθεί ο πολλαπλασιασμός των ειδών *Sternbergia sicula* και *Stachelina petiolata* (Antonidaki-

Giatromanolaki *et al.*, 2006, 2008), η οικοφυσιολογία του φυτρώματος των σπόρων τεσσάρων ενδημικών αρωματικών φυτών της Κρήτης (*Origanum dictamnus*, *Sideritis syriaca* ssp. *syriaca*, *Salvia pomifera* ssp. *pomifera* και *Salvia fruticosa*) (Thanos and Doussi, 1995), αλλά και άλλων ευρέως διαδεδομένων ενδημικών αρωματικών φυτών της Μεσογείου (*Coridothymus capitatus*, *Satureja thymbra*, *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*) (Thanos *et al.*, 1995).

1.2. ΕΠΙΛΟΓΗ ΦΥΤΙΚΩΝ ΕΙΔΩΝ ΓΙΑ ΧΡΗΣΗ ΣΤΟΥΣ ΑΡΧΑΙΟΛΟΓΙΚΟΥΣ ΧΩΡΟΥΣ

Στα πλαίσια του προγράμματος ARCHAEOSCAPE (2012 - 2015) – ΘΑΛΗΣ: «Ολοκληρωμένη διαχείριση της βλάστησης αρχαιολογικών χώρων για την προστασία των μνημείων και την ανάδειξη του ιστορικού τοπίου» του εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής τοπίου επιλέχθηκαν και αξιολογήθηκαν 14 είδη θαμνωδών αυτοφυών φυτών κατάλληλα για χρήση σε αρχαιολογικούς χώρους. Η επιλογή τους έγινε μεταξύ των αυτοφυών ειδών που καταγράφηκαν να αναπτύσσονται στους επτά αρχαιολογικούς χώρους, που διερευνήθηκαν στα πλαίσια του προγράμματος ή στη γύρω περιοχή, και τα οποία είναι οικολογικά και αισθητικά προσαρμοσμένα στο ιστορικό περιβάλλον. Αξίζει να σημειωθεί ότι ιδιαίτερη έμφαση δόθηκε στην επιλογή ειδών συμβατών με την προστασία των μνημείων, αλλά και ειδών που με βάση τα ιστορικά στοιχεία σχετίζονται ή μπορεί να έχουν συμβολική σημασία για τον αρχαιολογικό χώρο. Συνεπώς, δεν επιλέχθηκαν είδη με επιθετικό ριζικό σύστημα ή είδη που εύκολα εγκαθίστανται σε τοίχους, μέσα σε χαλάσματα ή κατηγορίες αυτών που εξαπλώνονται ανεξέλεγκτα.

Άλλα κριτήρια για την επιλογή φυτών ήταν ο τύπος ανάπτυξής τους, οι διαστάσεις τους (για παράδειγμα να είναι μικρού ύψους ώστε να μην παρεμποδίζεται η θέαση των μνημείων), η καλλωπιστική τους αξία, η διαθεσιμότητα του πολλαπλασιαστικού υλικού, αλλά και οι μειωμένες απαιτήσεις τους σε νερό και καλλιεργητικές επεμβάσεις. Δεν αποτελεί λοιπόν τυχαίο γεγονός ότι φυτικά είδη που καλλιεργούνται σε εμπορική κλίμακα δεν επιλέχθηκαν, καθώς αυτή η ιδιότητα τους πλήττει την επιστημονική αρτιότητα του εγχειρήματος, όπως επίσης και την πειραματική διαδικασία. Τα ακριβή κριτήρια βάσει των οποίων επιλέχθηκε κάθε είδος, αναφέρονται αναλυτικά κατά την περιγραφή των ιδιοτήτων και χρήσεων κάθε είδους. Συνεπώς με βάση τα ανωτέρω κριτήρια επιλέχθηκαν τα ακόλουθα θαμνώδη είδη: *Anthyllis barba-jovis* L., *Anthyllis hermanniae* L., *Atriplex halimus* L., *Asphodelus fistulosus* L., *Ballota acetabulosa* (L.) Benth., *Clinopodium creticum* (L.) Kuntze (*Calamintha cretica* (L.) Lam.), *Clinopodium nepeta* (L.) Kuntze (*Calamintha*

nepeta (L.) Savi), *Linoniastrum monopetalum* (L.) Boiss., *Origanum scabrum* Boiss. & Heldr., *Scabiosa hymettia* Boiss. & Spruner (*Lomelosia hymettia* (Boiss. & Spruner) Greuter & Burdet), *Teucrium capitatum* L., *Thymelaea hirsute* (L.) Endl., *Thymelaea tartonraira* (L.) All.

Όλα τα επιλεγέντα είδη απαντούν ως αυτοφυή εντός ή στη γύρω περιοχή των αρχαιολογικών χώρων, όπου διεξήχθη το πρόγραμμα, με εξαίρεση το είδος *C. creticum*, το οποίο προήλθε από την Κρήτη.

Κατά τη διάρκεια του προγράμματος μελετήθηκαν τρεις μέθοδοι πολλαπλασιασμού: με σπόρο, μοσχεύματα και μικροπολλαπλασιασμό. Κατά συνέπεια καθορίστηκε η πιο αποτελεσματική μέθοδος πολλαπλασιασμού για κάθε είδος και αναπτύχθηκε ένα ολοκληρωμένο πρωτόκολλο παραγωγής πολλαπλασιαστικού υλικού. Επιπλέον έγινε εγκατάσταση των ειδών αυτών σε τρεις αρχαιολογικούς χώρους, που επιλέχθηκαν για τις πιλοτικές εφαρμογές και τα *in situ* πειράματα του προγράμματος, ήτοι στην «Κολώνα» στη Νήσο Αίγινα, ΝΑ Ελλάδα, στην «Παλαιοχριστιανική Αμφίπολη» στο Νομό Σερρών, Β. Ελλάδα και στην «Αρχαία Μεσσήνη» στο Νομό Μεσσηνίας, ΝΔ Ελλάδα.

Για τις ανάγκες του προγράμματος, στους αρχαιολογικούς χώρους φυτεύτηκαν τα είδη: *Anthyllis barba-jovis*, *Anthyllis hermanniae*, *Atriplex halimus*, *Asphodelus fistulosus*, *Ballota acetabulosa*, *Clinopodium creticum*, *Clinopodium nepeta*, *Linoniastrum monopetalum*, *Scabiosa hymettia* και *Teucrium capitatum*.

Στην παρούσα Διατριβή, μελετήθηκε και αξιολογήθηκε συγκριτικά ο αγενής πολλαπλασιασμός με μοσχεύματα, ο εγγενής, αλλά και η δυνατότητα *in vitro* πολλαπλασιασμού τόσο από ενήλικο όσο και από νεανικό φυτικό υλικό των παρακάτω ειδών: *Anthyllis barba-jovis*, *Ballota acetabulosa*, *Clinopodium creticum*, *Clinopodium nepeta* και *Scabiosa hymettia*.

Παράλληλα αξιολογήθηκε η δυνατότητα των ειδών αυτών για εγκατάσταση και χρήση στους τρεις επιλεγέντες χώρους. Τέλος διερευνήθηκε και αξιολογήθηκε συγκριτικά η παραγωγή αιθερίων ελαίων των *Clinopodium creticum* και *Clinopodium nepeta* σε *ex vitro* καλλιέργεια με ή χωρίς κάλυψη, αλλά και σε *in vitro* καλλιέργειες.

I.2.1 Βοτανική ταξινόμηση και γεωγραφική κατανομή των ειδών που διερευνήθηκαν

I.2.1.1 *Anthyllis barba-jovis* L.

Βοτανική ταξινόμηση και γεωγραφική κατανομή του *A. barba-jovis*

Σύμφωνα με το Inventaire National du Patrimoine Naturel (INPN), το είδος *A. barba-jovis* L. κατατάσσεται επιστημονικά ως εξής:

Βασίλειο: Plantae Haeckel, 1866

Υποβασίλειο: Viridaeplantae

Φύλο: Streptophyta John, Williamson & Guiry, 2011

Κλάση: Equisetopsida C.Agardh, 1825

Υποκλάση: Magnoliidae Novák ex Takht., 1967

Υπερ-τάξη: Rosanae Takht., 1967

Τάξη: Fabales - Bromhead, 1838

Οικογένεια: Fabaceae - Lindl., 1836

Υπο-οικογένεια: Papilionoideae DC., 1825 - Faboideae

Υπερ-τριτύς: Robinioideae

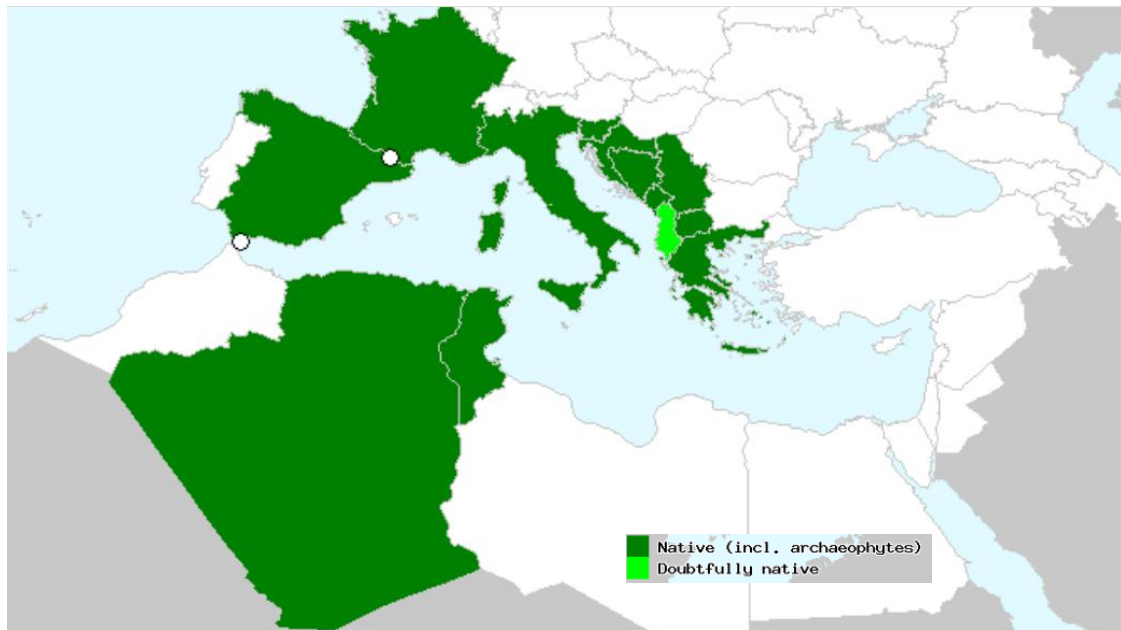
Τριτύς: Loteae

Γένος: *Anthyllis*

Είδος: *Anthyllis barba jovis* L., 1753

Πηγή: https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/82965/tab/taxo

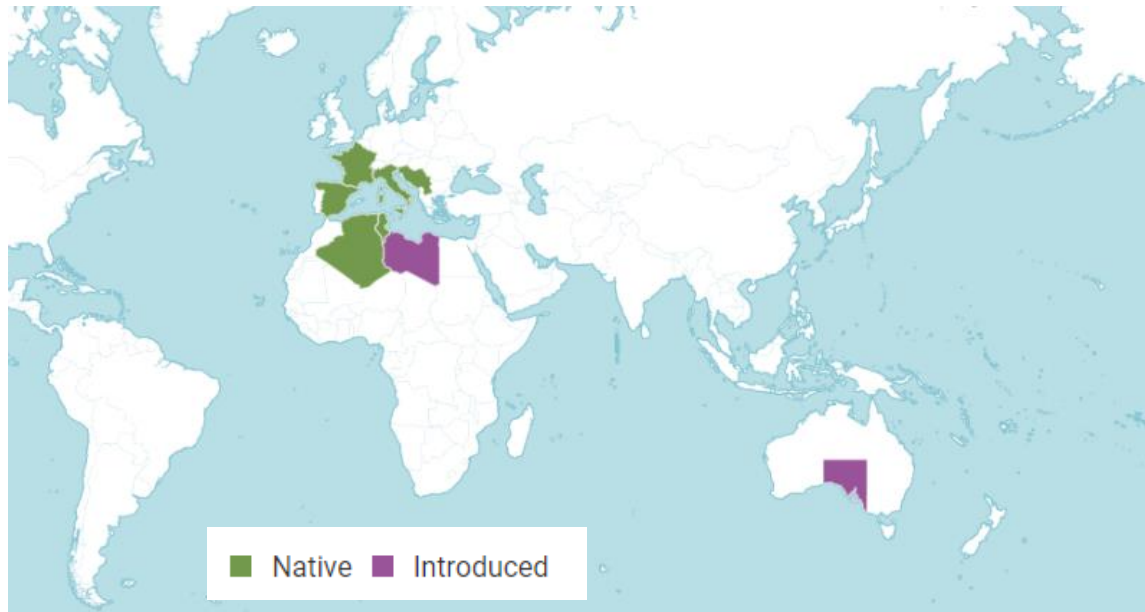
Το *A. barba-jovis* (κοιν. Ανθυλλίς ή Γενειάδα του Δία), είναι ένας πολυετής, αειθαλής θάμνος της οικογένειας Fabaceae, που απαντάται ως αυτοφυές φυτό σε διάφορα ενδιαιτήματα κατά μήκος απόκρημων βραχωδών περιοχών, σε παραθαλάσσιες Μεσογειακές - Παραμεσόγειες περιοχές. Σύμφωνα με τους Morbidoni *et al.* (2008), με το σύστημα ILDIS (International Legume Database and Information Service-2010-<https://bit.ly/2nTf4Fi>) και το ITIS (The Integrated Taxonomic Information System-2014-<https://bit.ly/2lkLR58>) το *A. barba-jovis* απαντάται ως φυσικός πληθυσμός στην Ισπανία, Γαλλία (Κορσική), Ιταλία (Λιγκούρια, Τυρηνική ακτή, Σαρδηνία, Σικελία, Αδριατική ακτή Gargano, νησιά Tremiti), Ελλάδα (Κρήτη, Κάσο και Κάρπαθο), Αλβανία, Κροατία, καθώς και στη Βόρειο Αφρική (Τυνησία, Αλγερία, Λιβύη) (<https://bit.ly/2lkLR58>, Εικ. I.3).



Εικόνα I.3. Γεωγραφική εξάπλωση του είδους *A. barba-jovis* με πράσινο σκούρο χρώμα, με ανοικτό πράσινο οι γεωγραφικές περιοχές που υπάρχει αμφιβολία εξάπλωσης και με άσπρο χρώμα οι γεωγραφικές περιοχές που δεν αυτοφύεται. Πηγή: <https://bit.ly/30WIT9o>

Οι Dimopoulos *et al.* (2013) αναφέρουν ότι η αναφορά του είδους *A. barba-jovis* από την Ελλάδα είναι λανθασμένη και οι ελληνικοί πληθυσμοί ανήκουν στο είδος *A. splendens*, το οποίο αναφέρουν ότι απαντάται στις Κυκλάδες, στην Κρήτη, στην Κάρπαθο και στην Κάσο. Επιπρόσθετα σύμφωνα με τη διαδικτυακή βάση δεδομένων "The Plants of the World Online, POWO" που δημοσιεύεται από το "Royal Botanic Gardens, Kew", το *A. barba-jovis* απαντάται ως φυσικός πληθυσμός στην Αλγερία, Κορσική, Γαλλία, Ιταλία, Σαρδηνία, Σικελία, Ισπανία, Τυνησία και Γιουγκοσλαβία. Έχει εισαχθεί στη Λιβύη και Νότια Αυστραλία, ενώ στην Αλβανία καταγράφηκε κατά λάθος (<https://bit.ly/37FTk2m>, Εικ. I.4).

Το είδος *A. barba-jovis* κατατάσσεται στη βλάστηση των βραχώδων ακτών της Μεσογείου, λόγω της ανθεκτικότητας του στην αλατότητα και της βλάστησής του σε βραχώδεις και πετρώδεις περιοχές (Biondi, 2007) (Εικ. I.5). Πιο συγκεκριμένα, στη Γαλλία το *A. barba-jovis* αν και είναι προστατευόμενο είδος σε εθνικό επίπεδο, δεν συμπεριλαμβάνεται στη Διεθνή Ένωση για τη διατήρηση της φύσης (IUCN - <https://www.iucn.org/>) (Danton and Baffray, 1995). Στην Κροατία αντίθετα (Trinajstic, 1994) περιλαμβάνεται σε κατάλογο με 44 προστατευόμενα είδη, γεγονός που καθιστά ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα τη μελέτη του *in vitro* πολλαπλασιασμού του (Šatović, 2002), ενώ στην Ιταλία αν και δεν περιλαμβάνεται στην προστατευόμενη χλωρίδα, θεωρείται ότι είναι στην κατηγορία κινδύνου σε επτά από τις εννέα περιοχές όπου φύεται (Conti *et al.*, 1997).



Εικόνα I.4. Γεωγραφική εξάπλωση του είδους *A. barba-jovis*, με πράσινο χρώμα, με μωβ χρώμα οι γεωγραφικές περιοχές που έχει εισαχθεί και με άσπρο χρώμα οι γεωγραφικές περιοχές που δεν αυτοφύεται. Πηγή: <https://bit.ly/2Naeahc>



Εικόνα I.5. Καλλιεργούμενα άτομα *A. barba-jovis* στο Βοτανικό Κήπο της Φιλοδασικής Ένωσης Αθηνών (Δάσος Καισαριανής Βύρωνα) κατά το μήνα Οκτώβριο (α) και κατά το μήνα Μάιο (β) (προσωπικό αρχείο), σε βραχώδη (<https://bit.ly/2SJ7omH>) και (δ) σε παραθαλάσσια περιοχή (<https://bit.ly/2RTcCbe>).

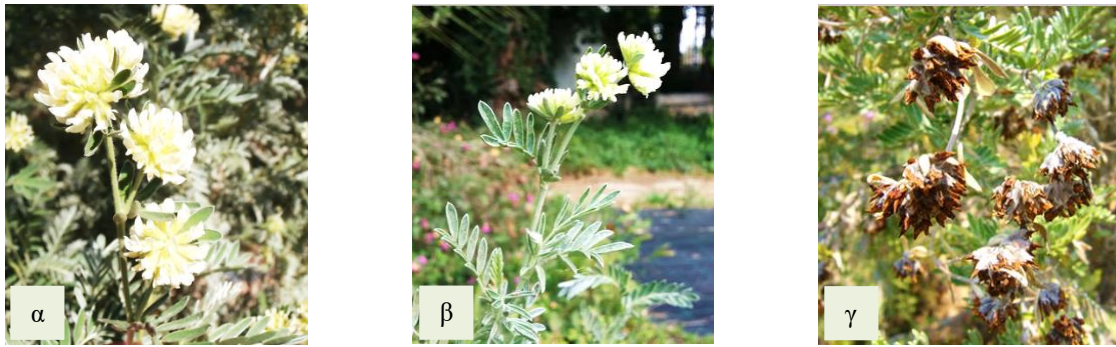
Βοτανική περιγραφή του *A. barba-jovis*

Το είδος *A. barba-jovis* έχει συμπαγή ορθόκλαδη ανάπτυξη που συνήθως φτάνει το 0,5 - 1,5 m (Bärtels, 2011) (Εικ. I.6α, β). Τα φύλλα είναι σύνθετα χνοώδη κατ' εναλλαγή, πτερωτά, περιττόληκτα, με 9 - 19 φυλλάρια, στενά ελλειπτικά έως στενά αντωνοειδή, μικρού μεγέθους (3 - 5 cm). Η άνω επιφάνεια φέρει αραιού μεταξοειδούς πράσινου χρώματος χνούδι, ενώ η κάτω επιφάνεια πυκνού μεταξοειδούς αργυρού χρώματος χνούδι (Bärtels, 2011) (Εικ. I.6γ). Οι ταξιανθίες είναι μακρόμισχες, πολυάριθμες επάκριες ή μασχαλιαίες (κεφάλια), μήκους 9 - 11 mm, αποτελούμενες από 10 τουλάχιστον ωχροκίτρινα άνθη (Εικ. I.7α, β). Η ταξιανθία φέρεται από βράκτιο διαμερισμένο σε δακτυλόμορφα τμήματα. Ο κάλυκας είναι σωληνοειδής-κωδωνοειδής, μήκους 4 - 6 mm, με 5 μακριά τριγωνικά δόντια, βραχύτερα από το σωλήνα, με λευκωπό χνούδι. Στο τέλος της ανθοφορίας το χρώμα των ανθέων από ωχροκίτρινο γίνεται σκούρο καφέ (Εικ. I.7γ).

Η ανθοφορία κλιμακώνεται ανάλογα με το υψόμετρο από το Μάιο έως και τον Ιούνιο (Καββάδας, 1956α, Pistelli *et al.*, 2007), από τον Απρίλιο έως τον Ιούνιο (Bärtels, 2011) και από το Μάρτιο έως το Μάιο (Benelli *et al.*, 2017). Τέλος, το κάθε κεφάλιο περιλαμβάνει περίπου 10 καρπούς, με ένα σπέρμα σε κάθε περικάρπιο, ενώ ο σπόρος, διαμέτρου 2 mm, είναι λείος με ωοειδές σχήμα και χρώμα που κυμαίνεται από ανοιχτό έως σκούρο κίτρινο (Εικ. I.8).



Εικόνα I.6. Ορθόκλαδη ανάπτυξη *A. barba-jovis* (α, β) με σύνθετα χνοώδη φύλλα (γ).



Εικόνα I.7. Ωχροκίτρινα άνθη *Anthyllis barba-jovis* από νεαρά άτομα τριών ετών (1^η άνθιση του φυτού, τέλη Μαρτίου) στο Βοτανικό Κήπο του εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γ.Π.Α (α, β) και άνθη από ανήλικα φυτά *A. barba-jovis* στον Υμηττό Αττικής στο τέλος της ανθοφορίας τους (γ).



Εικόνα I.8. Συλλεγμένοι σπόροι με το περικάρπιο τους και με τα υπολείμματα ανθέων (α) με το περικάρπιο τους (β) και καθαρισμένοι σπόροι χωρίς περικάρπιο (γ).

Βοτανική περιγραφή του γένους *Anthyllis*

Το αρχαίο ελληνικό όνομα «ανθυλλίς» χρησιμοποιήθηκε για πρώτη φορά από το Διοσκουρίδη για ένα είδος *Cressa* (Convolvulaceae) και από τον Πλίνιο για ένα είδος *Ajuga* (Lamiaceae) (Tan and Strid, 2009).

Το γένος *Anthyllis* ανήκει στην οικογένεια Fabaceae, η οποία θεωρείται ως η τρίτη μεγαλύτερη οικογένεια φυτών στον κόσμο και είναι η συνηθέστερη που βρίσκεται στα τροπικά δάση καθώς και στα ξηρά δάση της Αμερικής και της Αφρικής (Bumham and Johnson, 2004). Η οικογένεια Fabaceae περιλαμβάνει 751 γένη και 19.000 είδη φυτών, όπως δενδρώδη, θαμνώδη, ποώδη πολυετή ή ετήσια είδη φυτών (Cronquist, 1981, Magallon and Sanderson, 2001, Judd *et al.*, 2002).

Το γένος *Anthyllis* περιλαμβάνει 20 περίπου είδη (ο αριθμός των ειδών ποικίλει ανάλογα με το συγγραφέα) που απαντώνται σε Ευρώπη, Μέση Ανατολή και Βόρεια Αφρική. Τα φυτά είναι ετήσια ποώδη ή πολυετή ξυλώδη (θαμνώδη είδη) που ευδοκιμούν με μεγάλη επιτυχία σε φτωχά, αμμώδη και βραχώδη εδάφη (Καββάδας, 1956a, Strid, 1980).

Το 2012 στην έρευνα των Degtjareva *et al.*, μετά από τη φυλογενετική ανάλυση του γένους *Anthyllis* γίνεται διαχωρισμός των ειδών σε 6 κλάδους (clade), όπου στο καθένα συμπεριλαμβάνονται 2 - 5 είδη. Τα είδη που κατατάσσονται στους ίδιους κλάδους παρουσιάζουν τα ίδια χαρακτηριστικά και είναι οι εξής: Ο *Vulneraria* κλάδος (*A. lemmaniana* και *A. vulneraria*), το *Barba-Jovis* (*A. aurea*, *A. barba-jovis*, *A. hermanniae*, *A. hystrix* και *A. splendens*), το *Cornicina* (*A. circinnata*, *A. cornicina*, *A. hamosa* και *A. lotoides*), το *Dorycnioides* (*A. onobrychoides*, *A. polycephala*, *A. ramburii*, *A. rupestris*, *A. tejedensis* και *A. warnieri*), το *Oreanthyllis* (*A. lagascana* και *A. montana*) και το *Terniflora* (*A. cytisoides* και *A. terniflora*).

Στη χώρα μας κατά τον Καββάδας (1956α) απαντούν 6 είδη του γένους, τα *A. vulneraria* (ανθυλλίς η τραυματική), *A. hermanniae* (ανθυλλίς η ερμάνειος), *A. cytisoides* (ανθυλλίς η κυτισοειδής), *A. barba-jovis* (ανθυλλίς ο πάγων του Διός), *A. aurea* (ανθυλλίς η χρυσή) και *A. montana* (ανθυλλίς η ορεινή), ενώ από τους Dimopoulos *et al.* (2013) προτάθηκε τα είδη *A. barba-jovis* και *A. cytisoides* να αντικαταστήθηκαν με το είδος *A. splendens*.

Ειδικότερα το είδος *A. montana* έχει καταγραφεί στην Ανατολική-Κεντρική, Βόρεια Κεντρική και Βόρεια Ανατολική Ελλάδα, το *A. aurea* στη Βόρεια Πίνδο, Βόρεια Κεντρική και Βόρεια Ανατολική Ελλάδα, ενώ το *A. hermanniae* και το *A. vulneraria* απαντούνται κυρίως σε φρυγανικά οικοσυστήματα σε όλη την Ελλάδα (Dimopoulos *et al.*, 2013).

Φαρμακευτικές Ιδιότητες - Χρήσεις του *A. barba-jovis*

Το είδος *A. barba-jovis* κατά την αρχαιότητα είχε σημαντική παρουσία λόγω της χρήσης του ως φαρμακευτικό φυτό (Font Quer, 1982). Σήμερα το *A. barba-jovis* λόγω των αντιοξειδωτικών, αντιφλεγμονωδών και αντιδιαβητικών ιδιοτήτων του, καθώς και των αιθερίων ελαίων που βρίσκονται στα άνθη και στους σπόρους του μπορεί να χρησιμοποιηθεί στη φαρμακοβιομηχανία (Pistelli *et al.*, 2007).

Το κύριο χαρακτηριστικό του φυτού είναι η μορφολογία του, καθώς και η υψηλή ανθεκτικότητα του υπέργειου μέρους του στην αλατότητα, στις δυσμενείς καιρικές συνθήκες και στους δυνατούς θαλάσσιους αλμυρούς ανέμους. Γι' αυτό και ενδείκνυται για την κάλυψη παραθαλάσσιων πρανών και γενικά για αποκαταστάσεις προβληματικών περιοχών, όπως σ' αυτές με ξηροθερμικές συνθήκες που κινδυνεύουν από διάβρωση του εδάφους (Tutin *et al.*, 1972, Motta, 1992, Biondi, 2007).

Σε μια πρόσφατη έρευνα που εκπονήθηκε στην παράκτια περιοχή της Τοσκάνης, αναφέρετε ότι το *A. barba-jovis* χρησιμοποιείται ως τροφή για τις μέλισσες και τους βομβίνους σε περιόδους έλλειψης φαγητού των επικονιαστών των μεσογειακών ακτών

Benelli *et al.*, (2017). Πιο συγκεκριμένα σε φυτά *A. barba-jovis* στην περίοδο ανθοφορίας (Μάρτιος - Μάιος), κατέγραψαν έξι είδη της οικογένειας Apidae (με κυρίαρχο είδος το *Apis mellifera* και ακολούθησαν τα είδη *Bombus pascuorum* και *Bombus terrestris*, *Anthophora crinipes* Smith, *Anthophora plumipes* Pallas, *Oxythyrea funesta* και *Xylocopa violacea*) και ένα είδος της οικογένειας Scarabaeidae. Με βάση την πιο πάνω έρευνα, το είδος θα μπορούσε να χαρακτηριστεί και ως μελισσοκομικό φυτό, όπως θεωρείται και το είδος *A. cytisoides* (Gavidia *et al.*, 1997).

Φαρμακευτικές Ιδιότητες - Χρήσεις άλλων ειδών του γένους *Anthyllis*

Μερικά είδη του γένους *Anthyllis* κατά την αρχαιότητα χρησιμοποιούνταν για την κατασκευή σαρώθρων και ως φυσική, κίτρινη βαφή για τα υφάσματα (λόγω του κίτρινου άνθους τους) (Font Quer, 1982, Le Rudulier *et al.*, 1982).

Σήμερα κάποια είδη του γένους *Anthyllis* λόγω της οικολογικής τους αξίας έχουν εισαχθεί στην κοσμετολογία υπό τη μορφή καλλυντικών, σαμπουάν, αντηλιακών, ενυδατικών και αντιγηραντικών κρεμών. Πιο συγκεκριμένα το είδος *A. vulneraria* L. εμφανίζει όχι μόνο αντιεμετικές, αντιβηχικές, στυπτικές δράσεις αλλά διαθέτει και καθαρτικές, επουλωτικές και τονωτικές ιδιότητες. Το αφέψημα (τσάι) των αποξηραμένων ανθέων χρησιμοποιείται κατά του βήχα και υπό τη μορφή επιθέματος ως επουλωτικό και αναπλαστικό προϊόν σε ανοιχτές πληγές. Επίσης το έγχυμα του φυτού χορηγείται για την πρόληψη της τριχόπτωσης και την αντιμετώπιση της δυσκοιλιότητας. Παράλληλα από την αρχαιότητα το χρησιμοποιούσαν εξωτερικά στο δέρμα κατά των δερματικών εξανθημάτων και την επούλωση των τραυμάτων (<https://bit.ly/2RTpdv6> και <https://bit.ly/2I6x3Sd>).

Εκτός της οικολογικής τους αξίας έχουν και καλλωπιστικές δυνατότητες. Τα περισσότερα είδη του γένους χρησιμοποιούνται στην κηποτεχνία λόγω των εντυπωσιακών κίτρινων ανθέων τους, αλλά και εξαιτίας της ανθεκτικότητάς τους στις δυσμενείς καιρικές συνθήκες (Bärtels, 2011).

Ένα άλλο είδος, το *A. hermanniae* κατά την περίοδο της ανθοφορίας προσεγγίζει πλήθος μελισσών, λόγω του πολύ ελκυστικού νέκταρ. Επομένως η ιδιαίτερη μορφολογία της γύρης θεωρείται ότι είναι ένα από τα χαρακτηριστικά που κάνουν το νέκταρ του *A. hermanniae* τόσο ελκυστικό (Battesti, 1990, Tsigouri *et al.*, 2004).

Επιπλέον τα είδη του γένους *Anthyllis* χρησιμοποιούνται ως τροφή από τις προνύμφες μερικών ειδών Lepidoptera, συγκεκριμένα του γένους *Coleophora* που τρέφονται αποκλειστικά από κάποια είδη: *C. acanthyllidis*, *C. protecta* (*A. tragacanthoides*), *C.*

hermanniella (*A. hermanniae*), *C. vestalella* (*A. cytisoides*) και *C. vulnerariae* (*A. vulneraria*) (Thomas *et al.*, 2002, Koptur, 2005).

Τέλος επισημαίνεται ότι πολλά φυτά του γένους *Anthyllis* (μεγάλων καλλιεργειών και διακοσμητικά είδη) π.χ. το *A. vulneraria* L., έχουν ριζικά φυμάτια με βακτήρια, τα οποία έχουν την ικανότητα να δεσμεύουν το ελεύθερο άζωτο της ατμόσφαιρας και να το μετατρέπουν σε τέτοια μορφή (οργανική) που μπορεί να χρησιμοποιηθεί από το φυτό για την ανάπτυξή του (Strid, 1980). Ως συμπέρασμα λοιπόν προκύπτει ότι ένα μέρος από αυτό το άζωτο χρησιμοποιείται από το ίδιο το φυτό για να εξελιχθεί και το άλλο μέρος από άλλα φυτά που αναπτύσσονται κοντά του (Le Rudulier *et al.*, 1982, Koptur, 2005).

1.2.1.2 *Ballota acetabulosa* (L.) Benth.

Βοτανική ταξινόμηση και γεωγραφική κατανομή του *B. acetabulosa*

Σύμφωνα με το Inventaire National du Patrimoine Naturel (INPN), το είδος *B. acetabulosa* κατατάσσεται επιστημονικά ως εξής:

Βασίλειο: Plantae-Haeckel, 1866-Plants

Υποβασίλειο: Viridaeplantae- Cavalier- Smith, 1981

Φύλο: Tracheophyta- Sinnott, 1935 Ex Cavalier- Smith, 1988 – Vascular Plants

Υποφύλο: Euphylllophytina- (Auct.) Cavalier- Smith, 1988

Κλάση: Spermatopsida- Brongniart, 1843

Υποκλάση: Asteridae- Tkhtajan, 1967

Υπερτάξη: Lamianae- Tkhtajan, 1967

Τάξη: Lamiales- Bromhead, 1838

Υποτάξη: Lamianae- Tkhtajan, 1967

Οικογένεια: Lamiaceae (Labiatae)- A.L. de Jussiey, 1789, nom.
cons., nom. alt.

Υπο-οικογένεια: Lamioideae

Τριττός: Lamieae

Γένος: *Ballota*- Linnaeus, 1753

Πηγή: https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/611777/tab/taxo

Το *B. acetabulosa* (οικ. Lamiaceae), συν., *Beringeria acetabulosa* (L.) Neck. ex Link, *Marrubium acetabulosum* L., *Pseudodictamnus acetanulosus* (L.) Salmaki & Siadati, είναι συμπαγής, αειθαλής, πολυετής πόα με ξυλώδη βάση που απαντάται ως αυτοφυές φυτό σε περιοχές της Νότιας και Βόρειας Ελλάδας εκτός από την περιοχή της Βόρειας Πίνδου και της Δυτικής Τουρκίας (Καββάδας, 1956b, Heywood and Richardson, 1990, Sahrpaz *et al.*, 2002, Dimopoulos *et al.*, 2013, <https://bit.ly/2lNoXU7>) (Εικ. I.9). Προτιμάει τα φτωχά εδάφη, τις ξηρές εκτάσεις και τις βραχώδεις θέσεις (Shields, 1950, Parkhurst and Loucks, 1972, Psaras and Rhizoroulou, 1995, Sahrpaz *et al.*, 2002). Αυτοφύεται καλύτερα σε αλκαλικά εδάφη, αλλά αναπτύσσεται εξίσου καλά σε ελαφριά (αμμώδη), μεσαία (αργιλώδη) και βαριά (άργιλος) εδάφη.

Από τις πηγές προκύπτει ότι το φυτό *B. acetabulosa*, ο Διοσκουρίδης (77μ.Χ.), ο οποίος θεωρείται ο πιο λαμπρός φαρμακολόγος του αρχαίου κόσμου, στο σύγγραμμά του «Περί Ὑλης Ιατρικῆς», όπου πραγματεύεται "περί ριζῶν καὶ χυλισμάτων καὶ βοτάνων καὶ σπερμάτων συμφύλων τε καὶ φαρμακῶδῶν ἐπελευσόμεθα" το περιγράφει ως Ψευδοδίκτημο. Πιο συγκεκριμένα αναφέρει: {τὸ δὲ ψευδοδίκτημιον καλούμενον φύεται <μὲν> ἐν πολλοῖς τόποις, ἐμπερὲς δὲ τῷ πρὸ αὐτοῦ, ἔλαττον δὲ καὶ ἤττον δριμύ. ποιεῖ δὲ τὰ αὐτὰ τῷ δικτάμνῳ, οὐχ ὁμοίως ἐνεργοῦν. Διοσκουρίδης Βιβλίο 3.32.2α}

Το *B. acetabulosa* (βαλλωτή) ονομάστηκε έτσι από τους αρχαίους Έλληνες. Ίσως προέρχεται από τη λέξη βάλλω (ρίχνω, απορρίπτω), επειδή οι αγελάδες και άλλα εκτρεφόμενα ζώα από ένστικτο την απέρριπταν. Το κοινό του όνομα βρωμόχορτο, οφείλεται στη δυσάρεστη μυρωδιά του. Το χαρακτηριστικό επίθετο του γένους *acetabulosa*, προέρχεται από το λατινικό *acetabulum* = κυλίκιο, κάλυκας των ανθέων εξ ου και η ορθή μετάφραση καλυκοφόρος ή καλυκοειδής. Η εμφάνιση του φυτού λοιπόν χαρακτηρίζεται από την παρουσία των πολλών πυκνών καλύκων που συχνά μοιάζουν σαν να είναι αυτοί τα άνθη του φυτού, ενώ στην πραγματικότητα είναι τα μικροσκοπικά λουλουδάκια που αναπτύσσονται στο κέντρο τους.

Οι Ρωμαίοι την ονομάζουν "arnium", άλλοι "meditam" κάποιοι "ulceraria" και μερικοί "marrubium cantherenum". Οι Αιγύπτιοι χρησιμοποιούν τον όρο "ασφό", ενώ οι προφήτες την αποκαλούσαν "αίμα του Ισίουνα".

Το *B. acetabulosa* ήταν βότανο γνωστό από την αρχαιότητα και πιο συγκεκριμένα ο Διοσκουρίδης το αποκαλούσε «Γνωτέρα». Τόσο ο ίδιος όσο και άλλοι γιατροί συνιστούσαν τα φύλλα του φυτού κοπανισμένα με αλάτι, σε μορφή καταπλάσματος, ως αντίδοτο σε δαγκώματα σκύλων, αλλά ενδείκνυτο και για την αντιμετώπιση των κονδυλωμάτων και των ελκών κάθε είδους.

Στο μεσαίωνα το θεωρούσαν ακόμα ως ένα από τα καλύτερα φάρμακα για την επούλωση των πληγών. Στα μέσα της Βυζαντινής Αυτοκρατορίας το χρησιμοποιούσαν στην εμπειρική ιατρική. Ο διάσημος Γάλλος φυσιολόγος και φυτοθεραπευτής Ζωρζ Λουί Λεκλέρκ (Buffon) (1707 - 1788), χρησιμοποιούσε με επιτυχία το φυτό κατά των νευρώσεων, των νευρασθενειών και των ψυχώσεων (απαθικών καταστάσεων κ.ά.). Ο Ρώσος βοτανολόγος Peter Kropotkin (1842 - 1921) αποκαλούσε το φυτό «foetidum», δηλαδή δύσοσμο λόγω της εξαιρετικά δυσάρεστης οσμής του.

Σήμερα φέρει διάφορες ονομασίες ανάλογα με τη περιοχή. Οι πιο γνωστές είναι οι εξής: Αλουμινάκι, Φυτιλάκι, Λυχνάρακι, Αποπουλιά, Καντηλαναύτρα, Φουφλιά, Καπτουριά, Ανεμεφωλιά, Βρομόχορτο, Κρατηροειδής, Φουρφουλιά (Τήνος), Μπαμπακούλια (Κύθηρα), Φάσσα (Αίγινα), Νεροβαμβακιά (Πελοπόννησος), Μαυρομάργο (Αττική), Μαυρομάρκος (Κύθνος).



IoI - NPi SPi Pe StE EC NC NE NAe WAe Kik KK EAe

Greece (East Aegean islands - present; East Central Greece - present; Ionian Islands - present; Kiklades - present; Kriti and Karpathos - present; North Aegean islands - present; North Central Greece - present; North Pindos - absent; North-East Greece - present; Peloponnisos - present; South Pindos - present; Sterea Ellas - present; West Aegean islands - present)

Εικόνα I.9. Γεωγραφική εξάπλωση του *B. acetabulosa* στην Ελλάδα με πράσινο χρώμα και με άσπρο χρώμα η μοναδική γεωγραφική περιοχή που δεν αυτοφύεται στην Ελλάδα.

Πηγή: <https://bit.ly/2INoXU7>

Βοτανική περιγραφή του *B. acetabulosa*

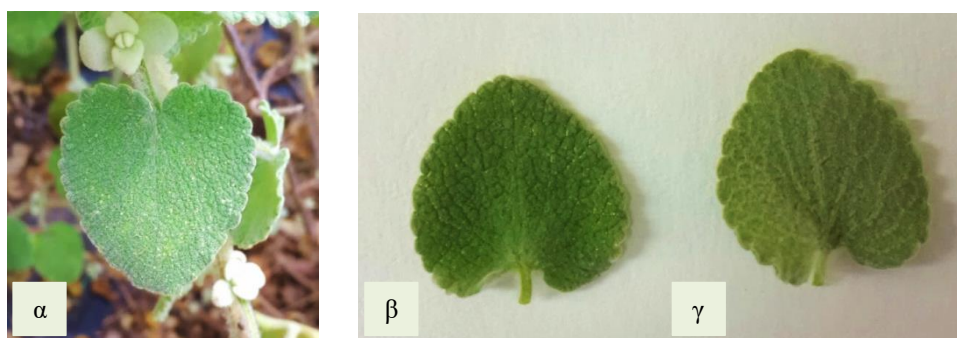
Ως προς τα χαρακτηριστικά του, έχει όρθια ανάπτυξη που μπορεί να φτάσει έως και 100-120 cm (Καββάδας, 1956b) (Εικ. I.10α, β, γ, δ). Τα φύλλα του είναι βραχύμισχα, ωοειδή σε σχήμα καρδιάς, απαλά, μήκους 6cm (Εικ. I.11α, β, γ). Το χρώμα των φύλλων είναι ασπροπράσινο στα μικρότερης ηλικίας φύλλα λόγω του πυκνού τους τριχώματος, σε αντίθεση με τα μεγαλύτερης ηλικίας που είναι πιο έντονα πράσινα. Το τρίχωμα που καλύπτει και τις δύο πλευρές των φύλλων αποτελείται από πολυάριθμα αδενώδη και μη αδενώδη τριχίδια. Αυτό το πλούσιο τρίχωμα δημιουργεί ενιαίο φράγμα προστασίας και αποτελεί την εξωτερική στρώση (Εικ. I.11α, β, γ).

Επιπρόσθετα η ανατομία των φύλλων του φυτού παρουσιάζει αρκετές εποχικές διαφορές, που πιθανόν αποτελούν ένα μέρος της αμυντικής αντίδρασης του φύλλου έναντι στις ξηροθερμικές συνθήκες της Μεσογείου. Ειδικότερα, τους ανοιξιότικους και καλοκαιρινούς μήνες ενισχύονται χαρακτηριστικά που περιορίζουν την απώλεια νερού (π.χ. αύξηση του πάχους του ελάσματος των φύλλων, αύξηση του πάχους των κυτταρικών τοιχωμάτων της εφυμενίδας, αύξηση των στρώσεων του σπογγώδους παρεγχύματος και μείωση των στρώσεων του πασσαλώδους παρεγχύματος). Οι εποχικές αυτές διαφορές συνοδεύονται και από αλλαγές τόσο στον αριθμό, όσο και στο μέγεθος και μήκος των τριχιδίων, εμποδίζοντας με αυτόν τον τρόπο την απώλεια νερού κατά τους ζεστούς και ξηρούς μήνες του θέρους. Παράλληλα τα κύτταρα του μεσοφύλλου φαίνεται να συσσωρεύουν ελαιοσταγονίδια των οποίων ο αριθμός αυξάνεται κατά τους θερινούς μήνες.

Τα άνθη του έχουν ροζ - μωβ χρωματισμό, είναι μικρά, ερμαφρόδιτα (έχει τόσο αρσενικά όσο και θηλυκά όργανα), όμοια με εκείνα των άλλων ειδών που ανήκουν στην ίδια οικογένεια και φέρονται σε μασχαλιαίους σπονδύλους σχηματίζοντας επιμήκη, διακοπτόμενο στάχυν. Ο κάλυκας μέσα στον οποίον βρίσκεται ο σπόρος, στην αρχή της ανθοφορίας είναι ανοικτού πρασίνου χρώματος, ενώ προς το τέλος της ανθοφορίας γίνεται μπεζ χρώματος (Εικ. I.12). Παρατηρείται ακόμα ότι η ανθοφορία διαρκεί από το Μάιο έως τον Ιούλιο. Επιπλέον ο σπόρος είναι κρυμμένος στη βάση ενός κάλυκα που μοιάζει με χωνί, είναι λείος, έχει σχήμα ωοειδές, διαμέτρου 2 - 3 mm και χρώματος σκούρο μαύρο (Καββάδας, 1956b) (Εικ. I.13).



Εικόνα I.10. Αυτοφυή άτομα *B. acetabulosa* στην περιοχή της Κορίνθου το Μάρτιο (α), Ιούνιο (β), στο Βοτανικό Κήπο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γ.Π.Α το Μάιο (γ) και ορθόκλαδη ανάπτυξη (δ).



Εικόνα I.11. Φύλλο *B. acetabulosa* ωοειδές σε σχήμα καρδιάς (α), άνω επιφάνεια (β) και κάτω επιφάνεια (γ).



Εικόνα I.12. Ανθισμένοι βλαστοί *B. acetabulosa* (α) αρχή και (β) τέλος ανθοφορίας.



Εικόνα I.13. Συλλεγμένοι σπόροι *B. acetabulosa* με τον κάλυκα (α), χωρίς τον κάλυκα (β), σπόρος σε μεγέθυνση: 50 μm (γ).

Ακόμα δεν πρέπει να παραληφθεί ότι το φυτό αναπτύσσεται καθ' όλη τη διάρκεια του έτους, βγάζοντας καινούρια φύλλα και εκπτύσσοντας νέους βλαστούς. Λεπτομερέστερα, νωρίς την άνοιξη (Μάρτιο) εκπτύσσονται οι νεαροί βλαστοί (ονομάζονται δολιχοβλάστες) και η περίοδος της επιμήκυνσης και της βλαστικής τους ανάπτυξης διαρκεί έως τα μέσα του καλοκαιριού. Τα ανοιξιάτικα φύλλα συνυπάρχουν μαζί με τα μικρότερα σε μέγεθος χειμωνιάτικα, τα οποία αρχίζουν σταδιακά να πέφτουν. Το καλοκαίρι (από αρχές Ιουνίου) οι πρώτοι βλαστοί (δολιχοβλάστες), που εκπτύχθηκαν νωρίς την άνοιξη, έχουν αποκτήσει το οριστικό τους μέγεθος και αρχίζουν να ξυλοποιούνται. Επιπλέον στις μασχάλες των ανοιξιάτικων φύλλων διακρίνουμε τους καλοκαιρινούς βλαστούς (ονομάζονται βραχυβλάστες - νεκρωτικοί βλαστοί), ενώ παράλληλα έχει αρχίσει η ανθοφορία η οποία διαρκεί μέχρι τέλος Ιουλίου και αρχές Αυγούστου. Αυτή την περίοδο το φυτό παρουσιάζει μία ξερή - χλωρωτική όψη. Στη διάρκεια της ανθοφορίας έχουμε τα ανοιξιάτικα φύλλα και από κάτω έτοιμα να εκπτυχθούν τα καλοκαιρινά. Τον Αύγουστο τα καλοκαιρινά φύλλα

έχουν αποκτήσει τη μέγιστη ανάπτυξή τους και διατηρούνται μέχρι αρχές φθινοπώρου, όπου αρχίζει η φυλλόπτωση τους, ενώ παράλληλα παρατηρείτε και η ανάπτυξη των φθινοπωρινών φύλλων. Στον αντίποδα βρίσκεται η περίοδος του χειμώνα κατά την οποία εκπτύσσονται οι χειμερινοί βλαστοί (βραχυβλάστες), που θα εξελιχθούν σε δολιχοβλάστες κατά τους ανοιξιάτικους μήνες, ενώ η πτώση των χειμωνιάτικων φύλλων ξεκινάει από τις αρχές Απριλίου (Ζαχάκη, 2012).

Τα ανοιξιάτικα φύλλα έχουν ένα πυκνό στρώμα τριχιδίων και στις δύο πλευρές και είναι τα μεγαλύτερα σε σύγκριση με εκείνα όλων των άλλων εποχών. Αρχικά συνυπάρχουν με τα χειμωνιάτικα τα οποία αρχίζουν να πέφτουν σταδιακά. Από τις αρχές του καλοκαιριού όμως τα ανοιξιάτικα φύλλα αρχίζουν να ξηραίνονται, ενώ παράλληλα αρχίζει και η έκπτυξη των καλοκαιρινών φύλλων, τα οποία είναι πιο παχιά λόγω του πυκνού στρώματος τριχιδίων και στις δύο πλευρές. Στην αρχή είναι μικρά, ενώ το οριστικό μέγεθος τους το αποκτούν τον Αύγουστο κατ' επέκταση στις αρχές του φθινοπώρου αρχίζει η πτώση των καλοκαιρινών φύλλων και η ανάπτυξη των φθινοπωρινών που είναι μεγαλύτερα από τα καλοκαιρινά και με λιγότερο αριθμό τριχιδίων. Στη συνέχεια τα χειμερινά φύλλα κάνουν την εμφάνισή τους στα μέσα του φθινοπώρου. Το μέγεθός τους είναι μεγαλύτερο σε σύγκριση με τα φθινοπωρινά φύλλα, ενώ εμφανή είναι και η παρουσία αραιών τριχιδίων και στις δύο πλευρές του φύλλου (Ζαχάκη, 2012).

Βοτανική περιγραφή του γένους *Ballota*

Το γένος *Ballota* ανήκει στην οικογένεια Lamiaceae και περιλαμβάνει 35 περίπου είδη ανθοφόρων φυτών, ιθαγενή στις εύκρατες περιοχές της Ευρώπης, τη Βόρειο Αφρική και τη Δυτική Ασία, με τη μεγαλύτερη ποικιλομορφία στην περιοχή της Μεσογείου.

Η οικογένεια Lamiaceae (Labiatae) είναι μια από τις πιο γνωστές οικογένειες φυτών (Βαρδαβάκης, 1993, Μπαμπαλώνας και Κοκκίνη, 2004), η οποία περιλαμβάνει από 233 έως 263 γένη και 6900 με 7200 είδη φυτών, εκ των οποίων τα 120 βρίσκονται στην Ευρώπη, τα 45 στη λεκάνη της Μεσογείου και 34 στην Ελλάδα (Σαρλής, 1999). Στην οικογένεια Lamiaceae ανήκουν φυτά μονοετή ή πολυετή, ποώδη ή ημί-θαμνώδη, ενώ οι δενδρώδεις μορφές είναι εξαιρετικά σπάνιες. Επίσης παρατηρείται ότι τα είδη της οικογένειας Lamiaceae είναι κατά κύριο λόγο αρωματικά (λεβάντα), περιλαμβάνοντας και ορισμένα ευρέως διαδεδομένα αρτυματικά φυτά (θυμάρι, ρίγανη). Τέλος εκτιμάται ότι η οικογένεια Lamiaceae είναι μια από τις ευρύτερα διαδεδομένες οικογένειες φυτών όσον αφορά την εθνοιατρική και τη φαρμακευτική της αξία, η οποία βασίζεται στη συγκέντρωση πτητικών αιθερίων ελαίων (Sarac and Ugur, 2007).

Στη χώρα μας κατά τον Καββάδα (1956b) απαντούν 4 είδη του γένους *Ballota*, τα *B. nigra* (μελανή), *B. acetabulosa* (κρατηροειδής), *B. pseudodictamnus* (ψευδοδίκτημνος), *B. hispanica* (μακεδονική). Σύμφωνα με νέες έρευνες υπάρχει και η *B. glandulosissima* (Dimopoulos *et al.*, 2013).

Το είδος *B. nigra* αυτοφύεται σε όλες τις περιοχές της Ελλάδας, το είδος *B. acetabulosa* σε όλη την Ελλάδα εκτός από την περιοχή της Πίνδου, το είδος *B. pseudodictamnus* στην Πελοπόννησο, στην Κρήτη και στην Κάρπαθο το *B. hispanica* στην περιοχή της Πίνδου και στη Βορριοκεντρική Ελλάδα, ενώ το είδος *B. glandulosissima* βρέθηκε μόνο στα ανατολικά νησιά του Αιγαίου (Καββάδας, 1956b, Dimopoulos *et al.*, 2013).

Φαρμακευτικές Ιδιότητες - Χρήσεις του *B. acetabulosa*

Το *B. acetabulosa* είναι φυτό φαρμακευτικό και μελισσοτροφικό. Στην παραδοσιακή, λαϊκή ιατρική το υπέργειο τμήμα (νεαροί βλαστοί που ονομάζονται «πανάκια») πολτοποιείται και τοποθετείται πάνω σε καψίματα και επιφανειακά τραύματα τα οποία επουλώνει. Η μελέτη των Meriçli *et al.* (1988) αναφέρει ότι το *B. acetabulosa* χρησιμοποιείται στη λαϊκή ιατρική για τη θεραπεία αιμορροϊδών.

Το είδος *B. acetabulosa* ακόμα και σήμερα χρησιμοποιείται για τη ναυτία, τον εμετό, τη δυσπεψία, καθώς επίσης για τις αντιβακτηριακές και ήπιες στυπτικές ιδιότητες του (Newall *et al.*, 1996, Citoglu *et al.*, 1998, Dulger and Sener, 2010). Επιπλέον τα εκχυλίσματα μεθανόλης του *B. acetabulosa* έχει αναφερθεί ότι διαθέτουν αντιοξειδωτική δράση (Couladis *et al.*, 2003). Τέλος, λειτουργεί και ως ηρεμιστικό (<https://bit.ly/2RT960B>).

Οι αντιμικροβιακές, αντιβακτηριακές ιδιότητες του φυτού έχουν μελετηθεί και τεκμηριωθεί από τα Πανεπιστήμια "Université du Droit et de la Santé Lille" στη Γαλλία, το "Catholic University of Louvain, Wallonia" στο Βέλγιο και το "Çanakkale" στην Τουρκία (<https://bit.ly/2TRvaKV>).

Παλαιότερα, τέλη Αυγούστου κάθε χρόνο συνέλεγαν «τα φυτιλάκια», δηλαδή τους ξηρούς κάλυκες του φυτού. Τα μικρά αυτά χωνάκια τοποθετούνταν ανεστραμμένα ανά δύο - αφού έβγαζαν το σπόρο από το ένα - στο λάδι του καντηλιού, που συνήθιζε να υπάρχει στο εικονοστάσι κάθε σπιτιού και τα άναβαν. Η φλογίτσα τους κρατούσε περίπου 10 ώρες αναμμένη χωρίς να δημιουργεί καπνιά. Γι' αυτό ονομάζεται και «Καντηλανάουτρα» στη Μάνη. Επιπλέον το φυτό αυτό μπορεί να καλλιεργηθεί για εδαφοκάλυψη, αφού μπορεί να εξαπλωθεί ως συστάδα.

Φαρμακευτικές Ιδιότητες - Χρήσεις άλλων ειδών του γένους *Ballota*

Βέβαια και άλλα είδη του γένους έχουν μελετηθεί αρκετά για τις αντιμικροβιακές και αντιβακτηριακές ιδιότητες τους, όπως το *B. nigra* (Daels-Rakotoarison *et al.*, 2000), *B. pseudodictamnus* (Couladis *et al.*, 2002), *B. antalyense*, *B. macrodonta*, *B. glandulosissima*, *B. larendana*, *B. pseudodictamnus*, *B. nigra subsp. anatolica*, *B. saxatilis subsp. saxatilis*, *B. rotundifolia*, και *B. saxatilis subsp. Brachyodonta* (Citoglu *et al.*, 2003a, b, Citoğlu *et al.*, 2004), *B. saxatilis* (Erdogan *et al.*, 2013) και *B. rotundifolia* (Gursoy and Tepe, 2009).

Επιπρόσθετα τα εναέρια μέρη κάποιων υποειδών του *B. nigra* χρησιμοποιούνται με τη μορφή αφεψήματος για τη θεραπεία της φλεγμονής, για την καταστολή του βήχα και για γαστρεντερικές διαταραχές (Yeşilada *et al.*, 1993, Yeşilada *et al.*, 1995, Tuzlacı and Tolon, 2000). Ακόμα έχει αναφερθεί ότι οι πολυφαινόλες (π.χ., verbascoside, forsythoside, arenarioside και ballotetroside) του είδους αναστέλλουν την υπεροξειδωση της LDL (Seidel *et al.*, 2000).

Το είδος *B. pseudodictamnus* έχει κερδίσει το βραβείο Award of Garden Merit (AGM) από τη British Royal Horticultural Society (RHS). Βασίζεται στην εκτίμηση της απόδοσης των φυτών στις βρετανικές συνθήκες καλλιέργειας. Το βραβείο Κηπουρικής Αξίας είναι ένα σήμα ποιότητας που απονέμεται από το Royal Horticultural Society (RHS), του Ηνωμένου Βασιλείου, από το 1922 σε φυτά κήπου (συμπεριλαμβανομένων οπωροφόρων δέντρων, λαχανικών και καλλωπιστικών φυτών). Για να βραβευτεί ένα φυτό πρέπει να είναι διαθέσιμο φυτοκοινωνικά, εξαιρετικής ποιότητας και δεν πρέπει να απαιτούνται εξειδικευμένες συνθήκες καλλιέργειας ή φροντίδας, ούτε να είναι ιδιαίτερα ευαίσθητο σε οποιοδήποτε παράσιτο ή ασθένεια.

Τέλος σύμφωνα με τους Scheen *et al.* (2010) ορισμένα είδη του γένους *Ballota* (π.χ. *Marrubium*) χρησιμοποιούνται και ως φυτά για τη θρέψη των προνυμφών ορισμένων λεπιδόπτερων, συμπεριλαμβανομένου του γένους *Coleophora* (όπως το *Coleophora ballotella*, *C. Lineolea* και *C. Ochripennella*).

1.2.1.3 *Clinopodium creticum* L. Kuntze και *Clinopodium nepeta* L. Kuntze

Βοτανική ταξινόμηση και γεωγραφική κατανομή του *C. creticum* και *C. nepeta*

Σύμφωνα με το Inventaire National du Patrimoine Naturel (INPN), τα είδη *C. creticum* και *C. nepeta* κατατάσσεται επιστημονικά ως εξής:

Βασίλειο: Plantae-Haeckel, 1866-Plants

Υποβασίλειο: Viridaeplantae- Cavalier- Smith, 1981

Φύλο: Streptophyta – John, Williamson & Guiry, 2011

Υποφύλο: Equisetopsida – C. Agardh, 1825

Κλάση: Tracheophyta Sinnott ex Cavalier-Smith, 1998

Υποκλάση: Magnoliidae Novák ex Takht., 1967

Υπερτάξη: Asteranae Takht., 1967

Τάξη: Lamiales- Bromhead, 1838

Υποτάξη: Lamianae- Tkhtajan, 1967

Οικογένεια: Lamiaceae Martinov, 1820

Υπο-οικογένεια: Nepetoideae (Dumort.) Luerss., 1882

Τριτύς: Mentheae

Γένος: *Clinopodium* L., 1753

Είδος: *Clinopodium creticum* (L.) Kuntze, 1981

Είδος: *Clinopodium nepeta* (L.) Kuntze, 1981

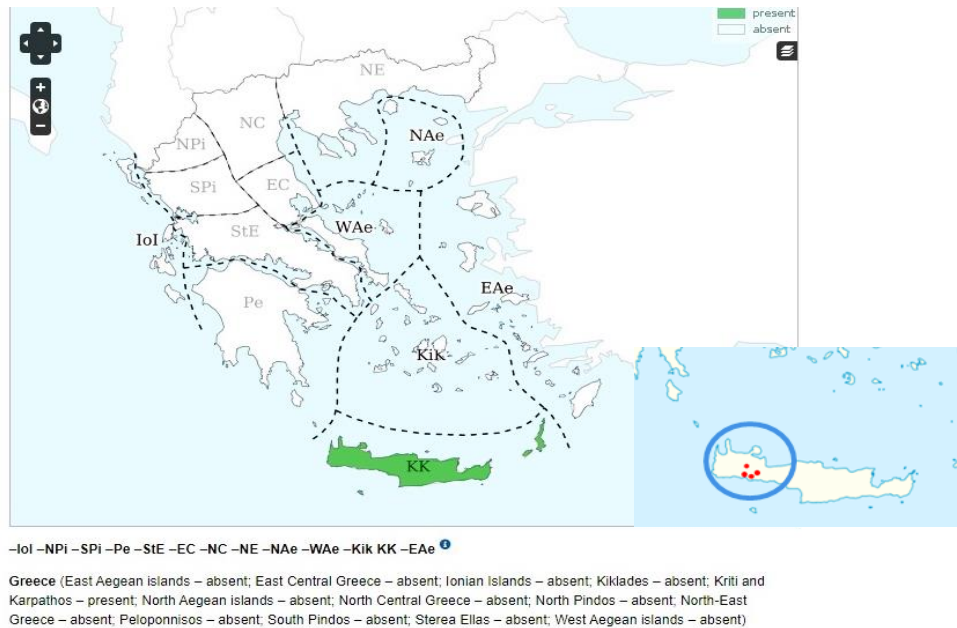
Πηγή: https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/91910/tab/taxo

Βοτανική ταξινόμηση και γεωγραφική κατανομή του *C. creticum* και *C. nepeta*

Το απειλούμενο είδος *C. creticum* (οικ. Lamiaceae), συν., *Calamintha cretica* (L.) Lam., *Melissa cretica* L., *Satureja cretica* (L.) Briq., χαρακτηρίζεται ως Τρωτό (VU) είδος στο «Red Data Book of rare and threatened plants of Greece» (Phitos *et al.*, 2009), λόγω της περιορισμένης περιοχής στην οποία εμφανίζεται. Σύμφωνα με τη κατηγοριοποίηση της IUCN (2001) είναι πιθανό - αν και δεν φαίνεται να αντιμετωπίζει άμεσα κίνδυνο εξαφάνισης - τυχαία γεγονότα, όπως οι πυρκαγιές ή η αυξανόμενη ανθρώπινη δραστηριότητα, να εξαφανίσουν κάποιους από τους απομονωμένους υποπληθυσμούς του.

Πρόκειται λοιπόν για ένα στενοενδημικό μεσογειακό είδος (Ball and Getliffe 1968, Greuter *et al.*, 1989) που απαντά στην Κρήτη, κυρίως στα Λευκά Όρη (Εικ. I.14), σε κρημνώδεις περιοχές με ασβεστούχα πετρώματα, σχισμές βράχων και άλλες βραχώδεις

θέσεις μαζί με αραιή φρυγανώδη βλάστηση, κυρίως σε υψόμετρο 100-1.800 m. (Rechinger 1943, Καββάδας, 1956c, Phitos *et al.*, 2009) (Εικ. I.15).



Εικόνα I.14. Γεωγραφική εξάπλωση του ενδημικού είδους *C. creticum* στην Ελλάδα με πράσινο χρώμα και με άσπρο χρώμα οι γεωγραφικές περιοχές που δεν αυτοφύεται στην Ελλάδα. Πηγή: <https://bit.ly/2kx7pLH>



Εικόνα I.15. Αυτοφυή άτομα *C. creticum* σε βραχώδεις θέσεις (α, β). Πηγή: <https://bit.ly/2HEQsYD>

Το είδος *C. nepeta* (οικ. Lamiaceae) συν.: *Calamintha nepeta* (L.) Savi, *Melissa nepeta* L., *Satureja nepeta* (L.) Scheele, είναι ένα έντονα αρωματικό, πολυετές βότανο, που αναπτύσσεται σε βραχώδεις περιοχές της Δυτικής και Νότιας Ευρώπης από 0 - 1.500 m υψόμετρο (Pignatti, 1982, Filibeck *et al.*, 2012) και στη Βόρειο - Ανατολική Αγγλία (Ball and Getliffe 1968, Šilic' *et al.*, 1979) (Εικ. I.16).



IoI NPi SPi Pe StE EC NC NE NAe WAe Kik KK EAe

Greece (East Aegean islands – present; East Central Greece – present; Ionian Islands – present; Kiklades – present; Kriti and Karpathos – present; North Aegean islands – present; North Central Greece – present; North Pindos – present; North-East Greece – present; Peloponnisos – present; South Pindos – present; Sterea Ellas – present; West Aegean islands – present)

Εικόνα I.16. Γεωγραφική εξάπλωση του ενδημικού είδους *C. nepeta* στην Ελλάδα με πράσινο χρώμα και με άσπρο χρώμα οι γεωγραφικές περιοχές που δεν αυτοφύεται στην Ελλάδα. Πηγή: <https://bit.ly/2kJrQVY>

Βοτανική περιγραφή του *C. creticum* και *C. nepeta*

Το *C. creticum*, γνωστό στην Κρήτη ως "λιβανόχορτο", είναι ένα πολυετές, αρωματικό βότανο, ύψους μέχρι 30 cm (Εικ. I.17), με μικρότερο μέγεθος φύλλων που φέρουν χαρακτηριστικές, πυκνές, μακριές, όρθιες τρίχες στους μίσχους και βλαστούς που το διακρίνουν από τα υπόλοιπα είδη του γένους του (Εικ. I.18α). Η ανθοφορία του διαρκεί από τον Ιούνιο έως τον Αύγουστο και σχηματίζει κυματοειδείς ταξιανθίες που φέρουν ένα έως τρία μικρά άνθη, λευκού χρωματισμού (Εικ. I.18β). Τέλος, ο σπόρος, διαμέτρου 1 mm, είναι λείος, σφαιρικός, βαθύ καφέ χρώματος (Εικ. I.19α, β). (Καββάδας, 1956c, Karousou *et al.*, 1996, Phitos *et al.*, 2009).

Το *C. nepeta* είναι ένα πολυετές βότανο ύψους μέχρι 80 cm (Εικ. I.20α, β, γ, δ). Στην Ελλάδα είναι γνωστό με διάφορες ονομασίες όπως: καλαμίδα, καλαμίθρα, αγριορίγανη, αγριομέντα, κοψόχορτο, φλεσκούνι, φλησκούνι (Καββάδας, 1956c). Τα φύλλα του είναι μικρά, χνουδωτά, ωοειδή και πολύ αρωματικά όταν συνθλίβονται. Η ανθοφορία του διαρκεί από τον Ιούνιο έως τον Αύγουστο και σχηματίζει δε κυματοειδείς ταξιανθίες που φέρουν πέντε (5) έως είκοσι (20) μικρά άνθη, λιλά, μωβ, κυανού ή λευκού χρωματισμού που στο τέλος της ανθοφορίας γίνεται ανοικτό μπεζ (Blamey and Gray-Wilson, 2000) (Εικ. I.21α, β,

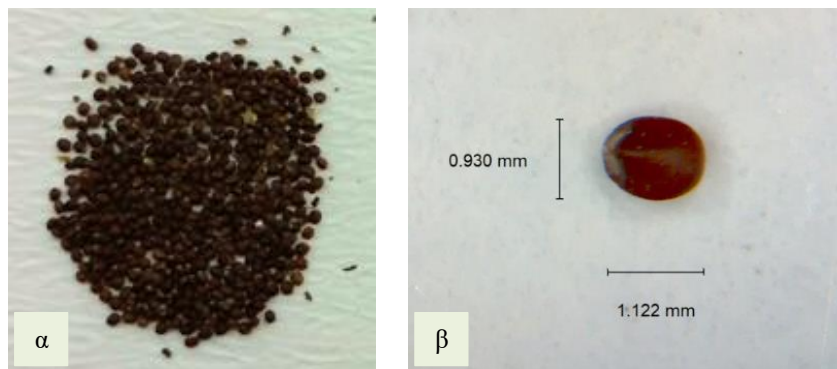
γ). Ο σπόρος, διαμέτρου 1 mm, είναι λείος, έχει σχήμα σφαιρικό και το χρώμα του είναι βαθύ καφέ (Εικ. I.22α, β).



Εικόνα I.17. Άτομα *C. creticum* στο Βοτανικό Κήπο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γ.Π.Α.



Εικόνα I.18. Χαρακτηριστικές, πυκνές μακριές, όρθιες τρίχες σε φύλλα και βλαστούς (α), κυματοειδείς ταξιανθίες που φέρουν ένα έως τρία μικρά άνθη, λευκού χρωματισμού (β).



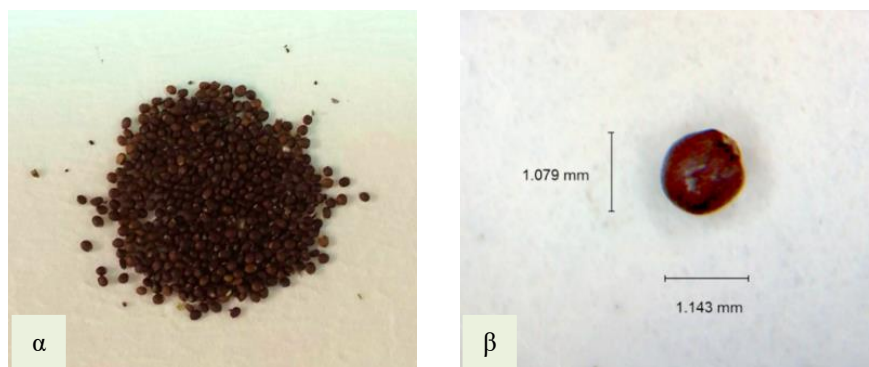
Εικόνα I.19. Σπόροι *C. creticum* (α) και σπόρος σε μεγέθυνση: 50 μm (β).



Εικόνα I.20. Άτομα *C. nepeta* στο Βοτανικό Κήπο (α) και στο θερμοκήπιο (β) του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γ.Π.Α., αυτοφυή άτομο στο χωριό Θέμελο του Νομού Πρεβέζης (γ) και στο χωριό Στρόπωνες του Νομού Ευβοίας (δ).



Εικόνα I.21. Άνθη *C. nepeta* στην αρχή (α) και στο τέλος (β) της ανθοφορίας.



Εικόνα I.22. Σπόροι *C. nepeta* (α) και σπόρος σε μεγέθυνση: 50 μm (β).

Βοτανική περιγραφή του γένους *Clinopodium*

Το όνομα του γένους "*Clinopodium*" προέρχεται από τη λατινική λέξη "*clinopodion*" ή την ελληνική "*klinopodion*". Το ελληνικό "*klino*" σημαίνει "κρεβάτι", ενώ το "*podion*" σημαίνει "μικρό πόδι" (Quattrocchi, 2000). Παλαιότερα το γένος "*Clinopodium*" ονομαζόταν "*Calamintha*", το οποίο προέρχεται από την ελληνική λέξη "*kalos*" που σημαίνει "όμορφη" και "*minthe*" που σημαίνει "μέντα" (Karousou *et al.*, 1996, Tenenbaum, 2003).

Το γένος *Clinopodium* (calamint in English) περιλαμβάνει αρωματικά – φαρμακευτικά φυτά που ανήκουν στην οικογένεια Lamiaceae. Τα είδη *Clinopodium* είναι μεσαίου έως μεγάλου μεγέθους, όρθια ποώδη, πολυετή φυτά· μερικές φορές ξυλώδη στη βάση (Demirci *et al.*, 2011) που απαντώνται στην Ευρώπη, την περιοχή της Ανατολικής Μεσογείου, την Κεντρική Ασία, τη Βόρεια Αφρική και την Αμερική (Alan and Ocak, 2009, Alan *et al.*, 2011). Τα φύλλα είναι μαλακά, τριχωτά, έμμισχα, ωσειδή ή στρογγυλά. Τα άνθη πορφυρά ή ιώδη, σπανίως λευκά και φέρονται σε επάκριους ή μασχαλιαίους κορυμβώδεις σπονδύλους (Καββάδας, 1956c).

Ο αριθμός των ειδών στο γένος *Clinopodium* που ήταν 30 φορές υψηλότερος εξαιτίας των ταξινομικών αναθεωρήσεων, αφού πολλά είδη μεταφέρθηκαν σε άλλα γένη της οικογένειας Lamiaceae όπως: *Acinos* Miller, *Micromeria* Benthham και *Satureja* L. Για το λόγο αυτό, η χρήση χημειοταξονομικών δεικτών είναι απαραίτητη για την καλύτερη διαφοροποίηση αυτών των γενών (Marin *et al.*, 2001).

Επίσης το γένος *Clinopodium* έχει οριστεί με ποικίλους τρόπους από διαφορετικούς συγγραφείς. Ορισμένοι αναφέρουν μόνο 13 είδη όλα στενά συνδεδεμένα με το είδος *Clinopodium vulgare*. Συγκεκριμένα, στην τελευταία αναθεώρηση των Lamiaceae, το γένος *Clinopodium* περιλάμβανε περίπου 100 είδη, συμπεριλαμβανομένων εκείνων που τοποθετούνται στα γένη *Acinos*, *Calamintha* και *Xenopoma* (Raymond, *et al.*, 2004).

Στη χώρα μας το γένος *Clinopodium* αντιπροσωπεύεται από 9 πολυμορφικά είδη τα: *C. creticum* (ενδημικό φυτό της Κρήτης), *C. grandiflora* (μεγανθές), *C. incana* (πολιά), *C. menthifolia*, *C. nepeta*, *C. vardarensis*, *C. dalmaricum*, *C. taygeteum* και *C. vulgare* (Dimopoulos *et al.*, 2013).

Το είδος *C. creticum* είναι ενδημικό είδος της Κρήτης, τα *C. nepeta* και *C. vulgare* αυτοφύονται σε όλη την Ελλάδα, το *C. taygeteum* μόνο στην Πελοπόννησο, το είδος *C. vardarensis* στη Πίνδο, τη Στερεά Ελλάδα και τη Βορειοκεντρική Ελλάδα. Επιπρόσθετα το είδος *C. grandiflora* σε όλο το τμήμα της Δυτικής Ελλάδας, το είδος *C. menthifolia* σε όλη την Ελλάδα εκτός από το Νοτιοανατολικό τμήμα της και το *C. incana* στο νότιο τμήμα της (Καββάδα, 1956c, Dimopoulos *et al.*, 2013).

Φαρμακευτικές Ιδιότητες - Χρήσεις του *C. creticum* και *C. nepeta*

Το είδος *C. creticum* στην Κρήτη χρησιμοποιείται από τους ντόπιους στη λαϊκή ιατρική και ως βότανο (Karousou *et al.*, 1996).

Το είδος *C. nepeta* είναι γνωστό για τις φαρμακευτικές του χρήσεις ως διεγερτικό, τονωτικό, αντισηπτικό, αντισπασμωδικό και διουρητικό (Ristorcelli, 1996, Sarer and Pançali, 1998, Baytop, 1999, Bown, 2001, Chevallier, 2001, Burzo *et al.*, 2006, Small, 2006, Reila *et al.*, 2008, Sarac and Ugur, 2009, Alan *et al.*, 2011, Demirci *et al.*, 2011, Mancini *et al.*, 2013), ενάντια στην ουρική αρθρίτιδα, το βήχα καθώς και για την εξωτερική εφαρμογή των φύλλων του φυτού σε πόνο του ισχίου (Adams *et al.*, 2009, Demirci *et al.*, 2011). Λόγω των αντιμικροβιακών του ιδιοτήτων σε διάφορα μέρη της Σικελίας χρησιμοποιείται για την απολύμανση και την επούλωση τραυμάτων (Flamini *et al.*, 1999), καθώς και σε τσιμπήματα εντόμων (Turolli, 1981, Monforte *et al.*, 2011).

Το αιθέριο έλαιο των υπέργειων μερών του φυτού *C. nepeta* έχει αντιοξειδωτικές (Demirci *et al.*, 2011, Amira *et al.*, 2012, Conforti *et al.*, 2012), αντιμικροβιακές (Panizzi *et al.*, 1993, Flamini *et al.*, 1999, Kitic *et al.*, 2002, Sarac and Ugur, 2009, Marongiu *et al.*, 2010, Demirci *et al.*, 2011, Miladinović *et al.*, 2012) και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Demirci *et al.*, 2011, Amira *et al.*, 2012). Επίσης χρησιμοποιείται ως αφέψημα, όπως και πολλά άλλα φυτά πλούσια σε πουλεγόνη (πολλά είδη της οικογένειας Lamiaceae) για πόνους στο στομάχι (Parmar and Ghosh, 1981, Özek, 1990), στο λαιμό και για νεφρικές διαταραχές (Viney, 1994, Alan and Ocak 2009, Alan *et al.*, 2011), για τη βοήθεια των αερίων και του κολικού του εντέρου (Chevallier, 2001), για τοπικές πλύσεις, για τη θεραπεία των ραγάδων και της μαστίτιδας των βοοειδών (Montesano *et al.*, 2012).

Το είδος *C. nepeta* παραδοσιακά συναντάται ως αρωματική ουσία (Pignatti, 1982). Τα φύλλα του περιέχουν μενθόνη, πουλεγόνη, πιπεριτόνη, λιμονένιο και μπορούν να εφαρμοστούν ως άρωμα για εντομοαπωθητικά προϊόντα (Drapeau *et al.*, 2009, Alan *et al.*, 2011, Božonić and Ragno, 2017).

Στην Αρχιτεκτονική Τοπίου το *C. nepeta* έχει προταθεί για εδαφοκάλυψη σε αστικά και περιαστικά πάρκα και δώματα και για συμμετοχή σε μίγματα για τεχνητούς φυσικούς λειμώνες (Baytop, 1999, Maurer *et al.*, 2000, Dunnett *et al.*, 2008, Caneva *et al.*, 2013, Casalini *et al.*, 2017), καθώς έχει δείξει καλή ανάπτυξη υποστρώματα χαμηλής γονιμότητας (Benvenuti and Bacci, 2010, Nagase *et al.*, 2013, Benvenuti, 2014, Casalini, *et al.*, 2017).

Στη Βασιλικάτα (Ιταλία) από το υπέργειο μέρος του *C. nepeta* κατασκεύαζαν έναν τύπο μικρής σκούπας που τη χρησιμοποιούσαν μετά το αλώνισμα για το διαχωρισμό του κόκκου του είδους *Triticum aestivum* από το πίτουρο (Salerno *et al.*, 2005).

Φαρμακευτικές Ιδιότητες - Χρήσεις άλλων ειδών του γένους *Clinopodium*

Στη λαϊκή ιατρική διαφόρων χωρών του κόσμου, το γένος *Clinopodium* έχει χρησιμοποιηθεί ευρέως κατά της αϋπνίας, της κατάθλιψης, των σπασμών και των πόνων από κράμπες (Reila *et al.*, 2008, Ceker *et al.*, 2013) αλλά και για τη θεραπεία των αναπνευστικών και γαστρεντερικών ασθενειών (Bandini and Pacchiani, 1981, Demirci *et al.*, 2011).

Από την αρχαιότητα έως σήμερα τα είδη *Clinopodium* έχουν χρησιμοποιηθεί με ποικίλους τρόπους (Jashemski, 1999, Alan *et al.*, 2011). Λόγω της ευχάριστης οσμής τους ανάμεσα σε ρίγανη και μέντα βρίσκουν εφαρμογή ως μπαχαρικό με την ονομασία "mentuccia" ή "nipitella" στην Ιταλία και στη Βόρεια Πορτογαλία (Pardo-de-Santayana *et al.*, 2007). Το αιθέριο έλαιο πολλών ειδών του γένους χρησιμοποιείται για βελτίωση της γεύσης και του αρώματος πολλών φαρμακευτικών προϊόντων (Kunkel, 1984, Monforte *et al.*, 2011).

Κατά την περίοδο της ανθοφορίας προσελκύουν πολλά είδη εντόμων. Επίσης, τα φύλλα τους χρησιμοποιούνται ως τροφή από τις προνύμφες ορισμένων ειδών λεπιδοπτέρων, συμπεριλαμβανομένης της *Coleophora albitarsella* (<https://bit.ly/2TgrAbM>).

I.2.1.4 *Scabiosa hymettia* Boiss. & Spruner

Βοτανική ταξινόμηση και γεωγραφική κατανομή του *S. hymettia*

Σύμφωνα με το σύστημα κατάταξης, το γένος *S. hymettia* κατατάσσεται επιστημονικά ως εξής:

Βασίλειο: Plantae Haeckel, 1866

Υποβασίλειο: Viridaeplantae

Φύλο: Streptophyta John, Williamson & Guiry, 2011

Κλάση: Equisetopsida C.Agardh, 1825

Υποκλάση: Magnoliidae Novák ex Takht., 1967

Υπερ-τάξη: Asteranae Takht., 1967

Τάξη: Dipsacales Juss. ex Bercht. & J. Presl, 1820

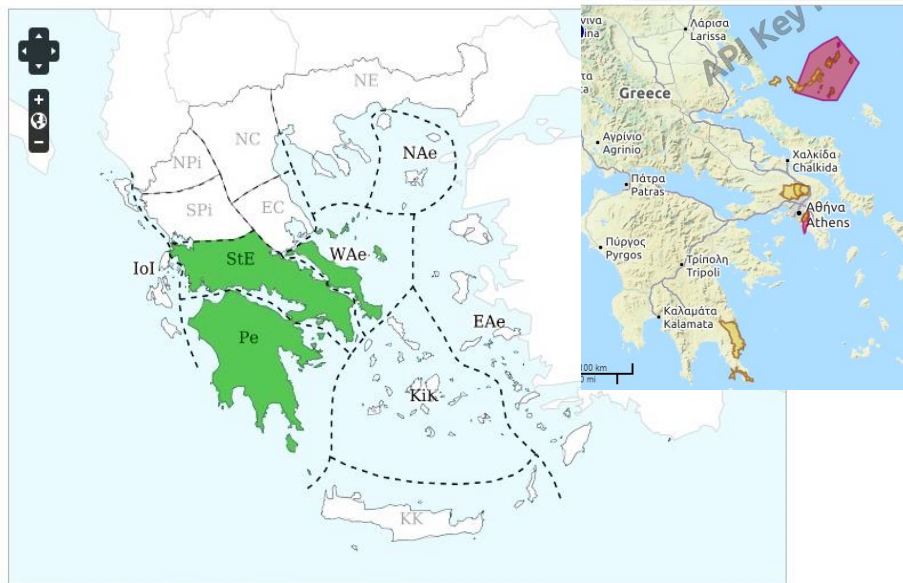
Οικογένεια: Caprifoliaceae Juss., 1789

Γένος: *Scabiosa* L., 1753

Είδος: *Scabiosa hymettia* Boiss. & Spruner, 1985

Πηγή: https://inpn.mnhn.fr/espece/cd_nom/121367/tab/taxo?lg=en

Το είδος *S. hymettia* (οικ. Caprifoliaceae) συν.: *Lomelosia hymettia* (Boiss. & Spruner) Greuter & Burdet και *Trochocephalus hymettius* (Boiss. & Spruner) Holub είναι ένα ενδημικό ξηρόφυτο της Κεντρικής και Νότιας Ελλάδας, καθώς και των Νησιών του Δυτικού Αιγαίου (<https://bit.ly/2tjaJe0> και <https://bit.ly/2mitZYX>). Στην Πάρνηθα θεωρείται σπάνιο και απειλούμενο είδος λόγω των μικρών πληθυσμών του (Απλαδά και Αμοργιανιώτης, 2005) (Εικ. I.23).



-Iol -NPI -SPI Pe StE -EC -NC -NE -NAe WAe -Kik -KK -E Ae

Greece (East Aegean islands – absent; East Central Greece – absent; Ionian Islands – absent; Kiklades – absent; Kriti and Karpathos – absent; North Aegean islands – absent; North Central Greece – absent; North Pindos – absent; North-East Greece – absent; Peloponnisos – present; South Pindos – absent; Sterea Ellas – present; West Aegean islands – present)

Εικόνα I.23. Γεωγραφική εξάπλωση του ενδημικού είδους *S. hymettia* στην Ελλάδα με πράσινο χρώμα και με άσπρο χρώμα οι γεωγραφικές περιοχές που δεν αυτοφύεται στην Ελλάδα. Πηγή: <https://bit.ly/2INrcyv>

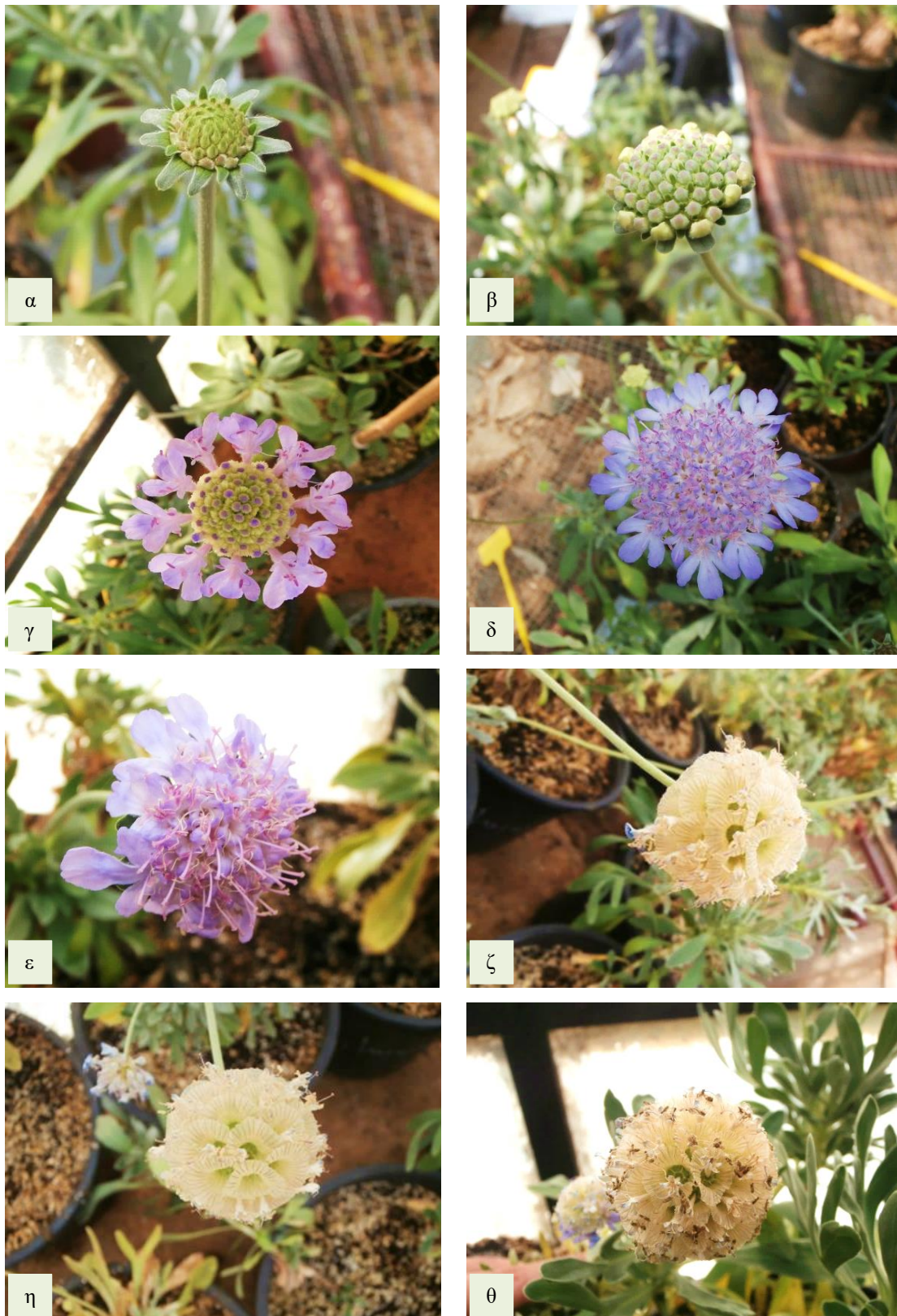
Βοτανική περιγραφή του *S. hymettia*

Το είδος *S. hymettia* είναι το πιο σημαντικό μέλος - από την άποψη της ταξινομικής πολυπλοκότητας - στην οικογένεια Dipsacaceae (Verlaque, 1983). Πρόκειται για ένα πολυετές, θυσανωτό βότανο, ξυλώδες στη βάση, με τριχωτό βλαστό ύψους 30 - 80 cm που φύεται σε πετρώδεις, απόκρημνες και ορεινές περιοχές (Jasiewicz 1976, Boratynski and Zielinski, 1989) (Εικ I.24α, β, γ, δ, ε, ζ).

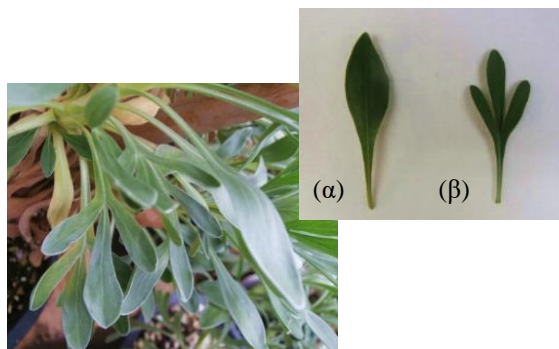


Εικόνα I.24. Αυτοφύες άτομο *S. hymettia* σε πετρώδη (α, β), ορεινή (γ) περιοχή της Πάρνηθας, πληθυσμός *S. hymettia* στην περιοχή της Πάρνηθας (δ), και αυτοφύες άτομο μικρής ηλικίας στην περιοχή της Πάρνηθας (ε, ζ)

Η ανθοφορία διαρκεί από τέλος Μαΐου μέχρι μέσα Ιουλίου με μπλε - μωβ άνθη σε κεφαλές διαμέτρου 25 - 35 mm (Εικ I.25α, β, γ, δ, ε, ζ, η, θ). Τα κατώτερα φύλλα του είναι ακέραια, λογχοειδή, ενώ τα υπόλοιπα είναι τρι-σχιδή σε λογχοειδή τμήματα και με πυκνές ασημίζουσες τρίχες (Εικ I.26α, β). Ο σπόρος έχει σχήμα ανάποδου κώνου και μέγεθος 3 - 5 mm, το χρώμα του είναι χρυσαφί και καλύπτεται από πυκνές τρίχες (Εικ I.27). Η συλλογή τους γίνεται μέχρι τα τέλη Σεπτεμβρίου (Καββάδας, 1956d, Απλαδά και Αμοργιανιώτης, 2005).



Εικόνα Ι.25. Διαδοχικά στάδια από την εμφάνιση της ταξιανθίας (α) έως την ωρίμανση των σπόρων (β, γ, δ, ε, ζ, η, θ), στο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γ.Π.Α.



Εικόνα I.26. Φύλλα *S. hymettia* ακέραια, λογχοειδή (α) και τρι-σχιδή (β).



Εικόνα I.27. Σπόροι *S. hymettia*.

Βοτανική περιγραφή του γένους *Scabiosa*

Το όνομα του γένους *Scabiosa* προέρχεται από τη λατινική λέξη "scabie" που σημαίνει έκζεμα - ψώρα (<https://bit.ly/2Swt2eK>).

Το γένος *Scabiosa* ανήκει στην οικογένεια *Caprifoliaceae*, απαντά συχνά και ως μέλος της οικογένειας *Dipsacaceae*, η οποία με βάση μορφολογικές και μοριακές φυλογενετικές αναλύσεις, δεν αναγνωρίζεται πλέον ως οικογένεια και τα είδη της τοποθετήθηκαν προς τον παρόν στην οικογένεια *Caprifoliaceae* (George and Ronald, 2013).

Η οικογένεια *Caprifoliaceae* αποτελείται από περίπου 860 είδη και 42 γένη με μία μεγάλη διασπορά σε όλον τον κόσμο. Τα κέντρα βιοποικιλότητας βρίσκονται στη Βορειοανατολική Αμερική και την ανατολική Ασία, ενώ απουσιάζει από την τροπική και Νότια Αφρική. Τα φυτά που ανήκουν σε αυτή την οικογένεια είναι ανθοφόρα, κυρίως σκληροί θάμνοι και αναρριχώμενα καθώς και σπάνια βότανα. Επίσης περιλαμβάνει και κάποιους καλλωπιστικούς θάμνους που καλλιεργούνται σε εύκρατες περιοχές.

Όπως και όλες οι μεγάλες οικογένειες της τάξης *Dipsacales*, έτσι και η οικογένεια *Caprifoliaceae* μπορεί να προέρχεται από την Ασία και στη συνέχεια τα είδη της να μετακινήθηκαν προς δυτικά κατά τη Μειόκαινο εποχή (23 εκατομμύρια μέχρι 5,332 εκατομμύρια χρόνια πριν) (Bell and Donoghue, 2005, Moore and Donoghue, 2007, Carlson *et al.*, 2009).

Το γένος *Scabiosa* περιλαμβάνει 618 επιστημονικά ονόματα ειδών, αν και μόνο τα 62 έχουν δεχθεί λατινικά διωνυμικά ονόματα, με τα υπόλοιπα να είναι συνώνυμα ή / και ανεπίλυτα ονόματα (The Plant List Database). Μερικοί συγγραφείς αναφέρουν ότι υπάρχουν 100 είδη *Scabiosa* (Lehbil *et al.*, 2018).

Η πλειοψηφία των ευρωπαϊκών ειδών *Scabiosa* εμφανίζεται κυρίως στη λεκάνη της Μεσογείου, την Ασία και τη Νότια Αφρική (Καββάδας, 1956d, Myers, 1990, Cowling *et al.*,

1996, Médail and Quezel, 1997). Και στις τρεις περιοχές, τα περισσότερα είδη απαντώνται σε ορεινούς οικότοπους ή στέπες, με αρκετά ευρωπαϊκά είδη να αυτοφύονται σε ξηρά, βραχώδη εδάφη στη λεκάνη της Μεσογείου. Η αξιοσημείωτη βιοποικιλότητα στην περιοχή, έχει πολλές φορές συνδεθεί με την αυξημένη διαφοροποίηση ως απόρροια της εξέλιξης της θερινής ξηρασίας κατά τη διάρκεια το Πλειόκενου που οδήγησε σε ένα εποχικό μεσογειακό κλίμα (Suc, 1984).

Τα είδη του γένους *Scabiosa* είναι ως επί το πλείστον πολυετή φυτά, με εξαίρεση δύο ετήσια είδη που απαντώνται στις πεδινές περιοχές της Μεσογείου (*S. tenuis* Spruner και *S. parviflora* Desf.). Τα φυτά είναι τριχωτά και ξυλοποιημένα· συνήθως στη βάση με φύλλα αντίθετα, ακέραια, οδοντωτά ή εσχισμένα με πυκνές ασημίζουσες τρίχες. Το χρώμα των ανθέων μπορεί να είναι άσπρο, μωβ, πορφυρό ή μπλε. Ο καρπός έχει σχήμα ανάποδου χωνιού, με χρώμα χρυσαφί και καλύπτεται από πυκνές τρίχες. Ευδοκίμούν με μεγάλη επιτυχία σε φτωχά, αμμώδη και βραχώδη εδάφη (Καββάδας, 1956d).

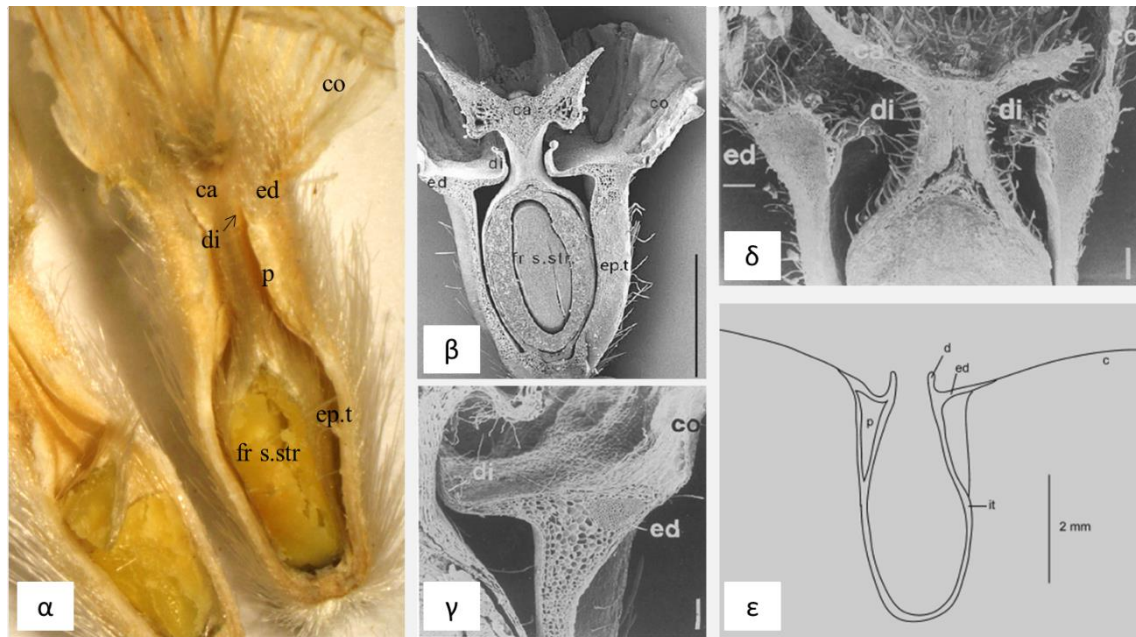
Πιο συγκεκριμένα, στη χώρα μας απαντούν 24 είδη του γένους, τα *S. albocincta*, *S. argentea*, *S. brachiate*, *S. crenata*, *S. divaricate*, *S. epirota*, *S. graminifolia*, *S. hispidula*, *S. hymettia*, *S. minoana*, *S. polykratis*, *S. prolifera*, *S. rhodopensis*, *S. ronata*, *S. sphaciotica*, *S. variifolia*, *S. atropurpurea*, *S. balcanica*, *S. columbaria*, *S. ochroleuca*, *S. taygetea*, *S. tenuis*, *S. triniifolia* και *S. webbiana* (Dimopoulos *et al.*, 2013).

Η φυλογενετική ανάλυση έδειξε ότι υπάρχουν δύο μεγάλες ομάδες (ομάδα 1 και ομάδα 2) στο γένος *Scabiosa*. Η ομάδα 1 περιλαμβάνει ευρωπαϊκά είδη που συνδέονται με τα ασιατικά και η ομάδα 2 περιλαμβάνει τα υπόλοιπα ευρωπαϊκά είδη που συνδέονται με τα αφρικανικά. Τα μέλη της ομάδας 1 χαρακτηρίζονται γενικά από παρόμοια μορφολογικά και ανατομικά χαρακτηριστικά (Verlaque, 1986, Mayer, 1995, Mayer and Ehrendorfer, 1999).

Απαραίτητη κρίνεται η αναφορά του πιο χαρακτηριστικού γνωρίσματος των ειδών της οικογένειας Dipsacaceae που είναι ο επικάλυκας, ο οποίος μαζί με τον κάλυκα σχηματίζουν από κοινού τη μονάδα προστασίας των ωοθηκών και επιπλέον βοηθούν τη διασπορά των σπόρων (Εικ. I.28) (Verlaque, 1984, Mayer, 1995, Donoghue *et al.*, 2004, Venable *et al.*, 2008, Carlson *et al.*, 2009).

Φαρμακευτικές Ιδιότητες - Χρήσεις του *S. hymettia*

Μια φυτοχημική διερεύνηση του *S. hymettia* οδήγησε στην απομόνωση και χαρακτηρισμό εννέα γνωστών ενώσεων (δύο φλαβονοειδή, τρεις κουμαρίνες, τρία ιριδοειδή και δύο φαινολικά συστατικά) και ένα νέο παράγωγο με μέτρια αντιμικροβιακή δράση έναντι τριών ανθρώπινων παθογόνων μυκήτων (Christoulou *et al.*, 2008).



Εικόνα I.28. Μορφολογική μεταβολή των δομικών στοιχείων της διασποράς στα διάφορα είδη *Scabiosa* ήτη *S. hymmetia* (α), *S. lunica* (β), *S. japonica* var. *alpine* (γ), *S. parviflora* (δ) και *S. solymica* (ε). [di=διάφραγμα, ed=επι-διάφραγμα, co=corona, fr s.str=περικάρπιο και σπόρος με έμβρυο, ca=κάλυκας, ep.t=επικάλυκας, p= κοιλότητα].

Φαρμακευτικές Ιδιότητες - Χρήσεις άλλων ειδών του γένους *Scabiosa*

Οι αντιφλεγμονώδεις και αντιπυρετικές ιδιότητές των ειδών τους γένους και το γεγονός ότι μπορούν να ενισχύσουν το καρδιαγγειακό και το ανοσοποιητικό σύστημα έχουν συχνά αναφέρθηκαν (Anonymous, 1977).

Ο Girre (1980) αναφέρουν ότι το είδος *S. succisa* έχει αποχρεμπτικές, καθαριστικές, εφιδρωτικές, στομαχικές και πεπτικές ιδιότητες και επιπλέον βοηθάει στην αύξηση της έκκρισης σιέλου·γι' αυτό χρησιμοποιείται στην παραδοσιακή ιατρική για τη θεραπεία πολλών ασθενειών. Εξωτερικά όμως συνιστάται για τη θεραπεία ορισμένων δερματικών παθήσεων όπως ο λειχήνας του έρπητα, η ψώρα και τα έλκη.

Το αφέψημα του *S. atropurpurea* από τα εναέρια τμήματά του χρησιμοποιείται ως διουρητικό (Bonet and Vallès, 2007) και ως υπογλυκαιμικό από τους λαούς της Ιβηρικής Χερσονήσου στην Ισπανία (Bonet *et al.*, 1999). Στο Περού το αιθανολικό εκχύλισμα του είδους χρησιμοποιείται ως αντιβακτηριακό φάρμακο λόγω της ικανότητάς του να αναστέλλεται το βακτήριο *Staphylococcus aureus* (Bussmann *et al.*, 2010), επίσης έχει αντιπεργλυκαιμικές, ηπατοπροστατευτικές και αντιοξειδωτικές ιδιότητες (Elhawary *et al.*, 2011). Τέλος στη Γαλλία το είδος *S. atropurpurea* είναι αναγνωρισμένο ως φαρμακευτικό φυτό (Gras *et al.*, 2017).

Ένα άλλο είδος με αρκετές βιβλιογραφικές αναφορές είναι το *S. columbaria*, το οποίο λόγω των αντιμικροβιακών, αντιοξειδωτικών ιδιοτήτων του (Vuuren and Naidoo, 2010), χρησιμοποιείται για τη θεραπεία της διφθερίτιδας (λοίμωξη που προκαλείται από βακτήριο *Corynebacterium diphtheriae*) και της λοίμωξης του αναπνευστικού συστήματος (Rigat *et al.*, 2007), της υψηλής αρτηριακής πίεσης καθώς και για τις διαταραχές της μήτρας (Kose *et al.*, 2015, Moteetee and Kose, 2016).

Και άλλα είδη *Scabiosa* έχουν διερευνηθεί για τις αντιμικροβιακές, αντιοξειδωτικές τους ιδιότητες και με βάση τις έρευνες αυτές επιβεβαιώνεται η χρήση τους στην παραδοσιακή ιατρική (π.χ. *S. comosa* και *S. tschilliensis* (Ma *et al.*, 2016, Wang, *et al.*, 2017), *S. prolifera* L. (Al-Qudah *et al.*, 2017), *S. arenaria* Forssk. (Hlila *et al.*, 2015, 2016)).

Τα είδη του γένους *Scabiosa* λοιπόν είναι πλούσια σε βιοδραστικούς, δευτερογενείς μεταβολίτες. Οι πιο αξιόλογοι απ' αυτούς είναι τα φλαβονοειδή και τα ιριδοειδή. Αυτοί οι μεταβολίτες μπορούν να επικυρώσουν και να διευρύνουν ορισμένες παραδοσιακές χρήσεις των ειδών *Scabiosa*, αλλά μπορούν επίσης να ενθαρρύνουν άλλες (την ανάπτυξη νέων φαρμάκων με θεραπευτικές ιδιότητες). Πρόσφατα από το είδος *S. stellata* απομονώθηκαν αρκετά φλαβονοειδή, που όχι μόνο βρέθηκαν για πρώτη φορά στο γένος, αλλά και επιβεβαιώνουν επίσης τον πλούτο του σε δευτερογενείς μεταβολίτες (Lehbili *et al.*, 2018, Rahmouni *et al.*, 2018).

Πολλές βιολογικές δραστηριότητες αποδίδονται επίσης σε ιριδοειδή (Tundis *et al.*, 2008) και αυτό το γεγονός βελτιώνει την αξία των ειδών *Scabiosa*, τα οποία αναγνωρίζονται ότι παράγουν πολλά παράγωγα ιριδοειδών. Οι έρευνες που ανέφεραν αυτούς τους δευτερογενείς μεταβολίτες είναι πρόσφατες και τα φυτά είναι αναγνωρισμένα επιτρέποντας τη σύστασή τους για περαιτέρω μελέτες, ειδικότερα τα είδη *S. hymettia* (Christopoulou *et al.*, 2008) και *S. variifolia* Boiss. (Papalexandrou *et al.*, 2003), τα οποία δεν αναφέρονται ως φαρμακευτικά φυτά, αλλά σίγουρα μπορούν να αποτελέσουν πηγή σημαντικών βιοδραστικών ενώσεων.

Άλλη μια μεγάλη κατηγορία δευτερογενών μεταβολιτών αποτελούν τα τερπενοειδή που παράγονται από φυτά, τα οποία βρέθηκαν σε αφθονία σε διάφορα είδη *Scabiosa*. Από βιολογική άποψη τα πεντακυκλικά τριτερπενοειδή μπορούν να επισημανθούν λόγω των αντι-φλεγμονωδών (Yadav *et al.*, 2010) και των αντικαρκινικών (Kamble *et al.*, 2014, Chudzik *et al.*, 2015) δραστηριοτήτων τους. Επίσης χρησιμοποιούνται και στη φαρμακευτική βιομηχανία (Singh and Sharma, 2015).

Τέλος οι σαπωνίνες είναι άφθονες στο γένος *Scabiosa* και αποτελούν σημαντικούς δευτερογενείς μεταβολίτες. Οι συγκεκριμένοι μπορούν να αξιολογηθούν από τη θεραπευτική

τους αξία και ίσως να προκαλέσουν τη χρήση ειδών *Scabiosa* σε παρασκευάσματα διατροφής.

Υπάρχουν πολυάριθμες αναφορές για τη δυνητική χρήση διαφόρων ειδών του γένους *Scabiosa* στη φαρμακοβιομηχανία, στη βιομηχανία τροφίμων και στην παρασκευή καλλυντικών λόγω των αντιοξειδωτικών χημικών τους ενώσεων (Girre, 1980, Marhuenda-Requena *et al.*, 1987, Bonet and Vallès, 2007, Bussmann *et al.*, 2010, Bussman and Glen, 2010).

Ορισμένα είδη του γένους *Scabiosa* χρησιμοποιούνται ευρέως για την παραγωγή δρεπτών ανθέων (Starman *et al.*, 1995), ως καλλωπιστικά σε κήπους και παρτέρια (Mallait, 1988, Nichols, 1992, Schulte-Scherlebeck, 1996), αλλά και ως αποξηραμένα άνθη για διακοσμητικούς λόγους (π.χ σύνθεση ανθοστολισμών).

1.3. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abril, M. and Hanano, R. (1998). Ecophysiological responses of three evergreen woody Mediterranean species to water stress. *Acta Oecol.* 19(4): 377-387.
- Adams, M., Berset, C., Kessler, M. and Hamburger, M. (2009). Medicinal herbs for the treatment of rheumatic disorders-A survey of European herbals from the 16th and 17th century. *J. Ethnopharmacol.* 121: 343-359.
- Akoumianaki-Ioannidou, A., Martini, A.N. and Papafotiou, M. (2016). Rooting and establishment of *Limoniastrum monopetalum* (L.) Boiss stem-tip cuttings. *Afr. J. Plant Sci.* 10(1): 23-31.
- Akoumianaki-Ioannidou, A., Podaropoulou, L. and Liakopoulos, G. (2017). Assessment of growth of *Mentha pulegium* in a green roof system through the study of PSII photochemical parameters. *Acta Hort.* 1189: 257-262.
- Alan, S., Kürkçüoğlu, M., Hüsnü, K. and Baser, K. (2011). Composition of essential oils of *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp. *nepeta* and *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp. *glandulosa* (Req.). *P.W. Ball. Asian J. Chem.* 23: 2357-2360.
- Alan, S. and Ocak, A. (2009). Taxonomical and morphological studies on the genus *Calamintha* Miller (Lamiaceae) in Turkey. *Biol. Divers. Conserv.* 2: 125-143.
- Al-Qudah, M.A., Ootom, N.K., Al-Jaber, H., Saleh, A.M., Zarga, M.H.A., Afifi, F.U. and Orabi, S.T.A. (2017). New flavonol glycoside from *Scabiosa prolifera* (L.) aerial parts with *in vitro* antioxidant and cytotoxic activities. *Nat. Prod. Res.* 31: 2865-2874.
- Amira, S., Dade, M., Schinella, G. and Ríos, J.L. (2012). Anti-inflammatory, anti-oxidant, and apoptotic activities of four plant species used in folk medicine in the Mediterranean basin. *Pak. J. Pharm. Sci.* 25: 65-72.
- Anonymous (1977). Chinese traditional medicine dictionary. Shanghai: People's Public Health Publishing House, Shanghai.
- Antonidaki-Giatromanolaki, A., Dragassaki, M., Vlahos, I. and Papadimigriou, M. (2006). Vegetative propagation *in vivo* and *in vitro* of *Stachelina petiolata* (L.) Hilliard et Burt. *Propag. Ornam. Plants.* 6: 187-193.
- Antonidaki-Giatromanolaki, A., Orchard, J.E., Dragassaki, M. and Vlahos, J.C. (2008). Propagation of *Sternbergia sicula*, by seed and tissue culture. *Acta Hort.* 766: 149-154.
- Arianoutsou-Faraggitaki, M. and Margaris, N.S. (1981). Producers and the fire cycle in a phryganic ecosystem. In components of productivity of Mediterranean-climate regions basic and applied aspects. 181-190.
- Ball, P.W. and Getliffe, F. (1968). *Calamintha* Miller-In Flora Europaea, Tutin, T., Heywood, V., Burges, N., Moore, D., Valentine, D., Walters, S., Webb, D., Eds., Cambr. Uni. Press, Cambridge, UK. 3: 166-167.
- Bandini, P. and Pacchiani, M. (1981). Constituents, properties and use of *Calamintha nepeta*. *Essenze Deriv. Agrum.* 51: 325-330.
- Barbour, M.G. and Billings, W.D. (1988). North American terrestrial vegetation. Camb. Univ. Press, Cambridge, UK.
- Bärtels, A. (2011). Pflanzen des mittelmerraumes. Eugen Ulmer verlag.
- Baskin, C.C. and Baskin, J.M. (2001). Seeds: ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination. Academic Press, London, UK.
- Battesti, M. J. (1990). Ph.D. Thesis, Aix-Marseille University (AUM).
- Baytop, T. (1999). Therapy with medicinal plants in Turkey (Past and Present), 2nd ed., Nobel Tıp Kitabevi: Istanbul, Turkey. 1-371.
- Bell, C.D. and Donoghue, M.J. (2005). Dating the Dipsacales: comparing models, genes, and evolutionary implications. *Am. J. Bot.* 92: 284-296.
- Benelli, G., Benvenuti, S., Scaramozzino, P.L. and Canale, A. (2017). Food for honeybees? Pollinators and seed set of *Anthyllis barba-jovis* (L.) (Fabaceae) in arid coastal areas of the Mediterranean basin. *Saudi J. Biol. Sci.* 863.
- Benvenuti, S. (2014). Wildflower green roofs for urban landscaping, ecological sustainability and biodiversity. *Landscape Urban Plan.* 124: 151-161.
- Benvenuti, S. and Bacci, D. (2010). Initial agronomic performances of Mediterranean xerophytes in simulated dry green roofs. *Urban Ecosyst.* 13: 349-363.
- Bertsouklis, K.F. and Papafotiou, M. (2009). *In vitro* propagation of *Arbutus andrachne* L. *Acta Hort.* 813: 477-480.
- Bertsouklis, K.F. and Papafotiou, M. (2010a). Effect of storage on *Arbutus andrachne* L. seed germination. *Acta Hort.* 885: 65-71.
- Bertsouklis, K.F. and Papafotiou, M. (2010b). Studies on propagation of *Globularia alypum*. L. *Acta Hort.* 885: 73-77.

- Bertsouklis, K.F. and Papafotiou, M. (2011). Effect of various cytokinins on micropropagation of *Arbutus* × *andrachnoides*. L. Acta Hort. 923: 213-218.
- Bertsouklis, K.F. and Papafotiou, M. (2013). Seed germination of *Arbutus unedo*, *A. andrachne* and their natural hybrid *A. andrachnoides* in relation to temperature and period of storage. HortScience, 48: 347-351.
- Bertsouklis, K.F. and Papafotiou, M. (2017). Comparative study on the effectiveness of cytokinin type and season on *in vitro* culture establishment of *Arbutus* species. Acta Hort. 1189: 435-438.
- Bertsouklis, K., Papafotiou, M. and Balotis, G. (2003). Effect of medium on *in vitro* growth and *ex vitro* establishment of *Globularia alypum*. L. Acta Hort. 616: 177-180.
- Biondi, E. (2007). Thoughts on the ecology and syntaxonomy of some vegetation typologies of the Mediterranean coast. Phytosociol. 44(1): 3-10.
- Blamey, M. and Grey-Wilson, C. (2000). Wild flowers of the Mediterranean: A complete guide to the flowers of Mediterranean coasts and islands, native and introduced over 2000 illustrated. A and C Black, London.
- Blamey, M. and Wilson, C.W. (1993). Mediterranean wild flowers. Pre-Press, London. 165-166.
- Blondel, J. and Aronson, J. (1995). Biodiversity and ecosystem function in the Mediterranean basin: Human and non-human determinants. In: Davis G.W. and Richardson, D.M., Mediterranean-type ecosystems: the function of biodiversity. Springer-Verlag, Berlin.
- Bonet, M. and Vallès, J. (2007). Ethnobotany of Montseny biosphere reserve (Catalonia, Iberian Peninsula): Plants used in veterinary medicine. J Ethnopharmacol. 110: 130-147.
- Bonet, M.A., Parada, M., Selga, A. and Vallès, J. (1999). Studies on pharmaceutical ethnobotany in the regions of L'Alt Empordà and Les Guilleries (Catalonia, Iberian Peninsula). J. Ethnopharmacol. 68: 145-168.
- Boratynski, A. and Zielinski, J. (1989). New data to the distribution of *Scabiosa hymettia*. Boiss and Spruner, Arboretum Kornickie. 34: 65.
- Bown, D. (2001). The herb society of America-New encyclopedia of herbs and their uses. Dorling Kindersley: New York, NY, USA. 1-448.
- Božović, M. and Ragno, R. (2017). *Calamintha nepeta* (L.) Savi and its main essential oil constituent pulegone: biological activities and chemistry. Molecules. 22(2): 290.
- Brzuszek, R.F., Harkess, R.L. and Mulley, S.J. (2007). Landscape architects' use of native plants in the southeastern United States. HortTechnology. 17: 78-81.
- Burghardt, K.T., Talamy, D.W. and Shriver, W.G. (2008). Impact of native plants on bird and butterfly biodiversity in suburban landscapes. Conservation Biology. 23: 219-224.
- Burnham, R. J. and Johnson, K. R. (2004). South American palaeobotany and the origins of neotropical rainforests. Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 359(1450): 1595-1610.
- Burzo, I., Mihaescu, D., Dobrescu, A., Ambarus, S., Falticeanu, M. and Badulescu, L. (2006). Contribution to the knowledge of the composition of the essential oils from five *Calamintha* species cultivated in Romania. Al. I. Cuza, Iasi. 52: 39-42.
- Bussman, R. and Glen, A.J. (2010). Ethnobiol. Ethnomed. 6: 30.
- Bussman, R.W., Malca-García, G., Glen, A.J., Sharon, D., Chait, G., Díaz, D., Pourmand, K., Jonat, B., Somogy, S., Guardado, G., Aguirre, C., Chan, R., Meyer, K., Kuhlman, A., Townesmith, A., Effio-Carbajal, J., Frias-Fernandez, F. and Benito, M. Ethnopharmacology. 132: 101-108.
- Caneva, G., Kumbaric, A., Savo, V. and Casalini R. (2013). Ecological approach in selecting extensive green roof plants: a data-set of Mediterranean plants. Plant Biosyst. 149(2): 374-383.
- Carlson, S.E., Mayer, V.M. and Donoghue, M.J. (2009). Phylogenetic relationships, taxonomy, and morphological evolution in Dipsacaceae (Dipsacales) inferred by DNA sequence data. Taxon. 58: 1075-1091.
- Casalini, R., Bartoli, F. and Caneva G. (2017). Investigation of seed germination of twelve Mediterranean wildflowers for evaluating their potential use on extensive green roofs. Acta Hort. 1189: 263-266.
- Castro-Diez, P., Puyravaud, J.P., Cornelissen, J.H.C. and Villar-Salvador, P. (1998). Stem anatomy and relative growth rate in seedlings of a wide range of woody plant species and types. Oecologia. 116(1-2): 57-66.
- Ceker, S., Agar, G., Alpsoy, L., Nardemir, G. and Kizil, H.E. (2013). Protective role of essential oils of *Calamintha nepeta* L. on oxidative and genotoxic damage caused by Alfatoxin B1 *in vitro*. Fresenius Environ. Bull. 22: 3258-3263.
- Chevallier, A. (2001). Encyclopedia of medicinal plants. Dorling Kindersley: London, UK. 211-212.
- Christodoulakis, N.S. (1986). Post-fire leaf structure of two seasonally dimorphic resprouters. Acta Oecol. 7(1): 97-102.
- Christodoulakis, N.S. (1989). An anatomical study of seasonal dimorphism in the leaves of *Phlomis fruticosa*. Annals of Botany. 63(3): 389-394.
- Christodoulakis, N.S. and Bazos, J. (1990). Leaf anatomy of three seasonally dimorphic shrubs. Acta Oecol. 11(2): 291-296.

- Christodoulakis, N.S. and Fasseas, C. (1991). Seasonal dimorphism of *Phlomis fruticosa* under controlled. *Acta Oecol.* 12(3): 323-330.
- Christopoulou, C., Graikou, K. and Chinou, I. (2008). Chemosystematic value of chemical constituents from *Scabiosa hymettia* (Dipsacaceae). *Chem. Biodivers.* 5: 318-323.
- Chudzik, M., Korzonek-Szlacheta, I. and Król, W. (2015). Triterpenes as potentially cytotoxic compounds. *Molecules.* 20: 1610-1625.
- Citoğlu, G.S., Coban, T., Sever, B. and Işcan, M. (2004). Antioxidant properties of *Ballota* species growing in Turkey. *J. Ethnopharmacol.* 92(2-3): 275-280.
- Citoglu, G., Tanker, M., Sever, B., Englert, J., Anton, R. and Altanlar, N. (1998). Antibacterial activities of diterpenoids isolated from *Ballota saxatilis* subsp. *saxatilis*. *Planta Med.* 64: 484-485.
- Citoglu, G.S., Sever, B., Antus, S., Baitz-Gacs, E. and Altanlar, N. (2003). Antifungal flavonoids from *Ballota glandulosissima*. *Pharm. Biol.* 41 (in press).
- Citoglu, G.S., Yılmaz, B.S. and Altanlar, N. (2003). Antimicrobial activity of *Ballota* species growing in Turkey. *Ankara Üniversitesi Eczacılık Fakültesi Dergisi (Journal of Faculty of Pharmacy of Ankara University).* 32(2): 93-97.
- Conforti, F., Marrelli, M., Statti, G., Menichini, F., Uzunov, D., Solimene, U. and Menichini, F. (2012). Comparative chemical composition and antioxidant activity of *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp. *glandulosa* (Req.) Nyman and *Calamintha grandiflora* (L.) Moench (Labiatae). *Nat. Prod. Res.* 25: 91-97.
- Conti, F., Manzi, A. and Pedrotti, F. (1997). Liste rosse regionali delle piante d'Italia. WWF - S.B.I. Università di Camerino.
- Couladis, M., Chinou, I.B., Tzakou, O. and Loukis, A. (2002). Composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Ballota pseudodictamnus* (L.) Benth. *Phytother. Res.* 16(8): 723-726.
- Couladis, M., Tzakou, O., Verykokidou, E. and Harvala, C. (2003). Screening of some Greek aromatic plants for antioxidant activity. *Phytother. Res.* 17: 194-195.
- Cowling, R.M., Rundel, P.W., Lamont, B.B., Arroyo, M.K. and Arianoutsou, M. (1996). Plant diversity in Mediterranean climate regions. *Trends Ecol. Evol.* 11: 362-366.
- Cronquist, A. (1981). An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, New York.
- Cunningham, S.A., Summerhayes, B. and Westoby, M. (1999). Evolutionary divergences in leaf structure and chemistry, comparing rainfall and soil nutrient gradients. *Ecol. Monogr.* 69(4): 569-588.
- Daels-Rakotoarison, D., Seidel, V., Gressier, B., Tillequin, F., Bailleul, F., Luyckx, M., Dine, T., Cazin, M. and Cazin, J.C. (2000). Neurosedative and antioxidant activities of phenyl propanoids from *Ballota nigra*. *Arzneimittelforschung.* 50: 16-23.
- Dallman, P.R. (1998). Plant life in the world's Mediterranean climates. University of California Press, Berkeley.
- Danton, Ph. and Baffray, M. (1995). Inventaire des plantes protegees en France. Nathan and A.F.C.E.V. Paris, Mulhouse.
- Degtjareva, G.V., Valiejo-Roman, C.M., Samigullin, T.H., Guara-Requena, M. and Sokoloff, D.D. (2012). Phylogenetics of *Anthyllis* (Leguminosae: Papilionoideae: Loteae): Partial incongruence between nuclear and plastid markers, a long branch problem and implications for morphological evolution. *Mol. Phylogenet. Evol.* 62: 693-707.
- Demirci, B., Temel, H.E., Portakal, T., Kırmızıbekmez, H., Demirci, F. and Baser, K.H.C. (2011). Inhibitory effect of *Calamintha nepeta* subsp. *glandulosa* essential oil on lipoxygenase. *Turk. J. Biochem.* 36: 290-295.
- Di Castri, F. (1981). Mediterranean-type shrublands of the world. *Ecosystems of the World.* 11: 1-52.
- Diekelmann, J. and Schuster, R.M. (2002). Natural landscaping. Designing with native plant communities. University of Wisconsin Press, Canada.
- Dimopoulos, P., Raus, T., Bergmeier, E., Constantinidis, T., Iatrou, G., Kokkini, S., Strid, A. and Tzanoudakis, D. (2013). Vascular plants of Greece: An annotated checklist. *Englera* 31. Botanic Garden and Botanical Museum Berlin-Dahlem, Berlin and Hellenic Botanical Society, Athens.
- Donoghue, M.J. and Smith, S.A. (2004). Patterns in the assembly of temperate forests around the Northern Hemisphere. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 359: 1633-1644.
- Drapeau, J., Fröhler C., Touraud, D., Kröckel, U., Geier, M., Rosea, A. and Kunzb, W. (2009). Repellent studies with *Aedes aegypti* mosquitoes and human olfactory tests on 19 essential oils from Corsica, France. *Flavour Fragr. J.* 24: 160-169.
- Dulger, B. and Sener, A. (2010). Evaluation of antimicrobial activity of *Ballota acetabulosa*. *African J. Microbiol. Res.* 4: 1235-1238.
- Dunnett, N., Nagase, A. and Hallam, A. (2008). The dynamics of planted and colonising species on a green roof over six growing seasons 2001-2006: influence of substrate depth. *Urban Ecosyst.* 11: 373-384.

- Elhawary, S.S., Eltantawy, M.E., Sleem, A.A., Abdallah, H.M. and Mohamed, N.M. (2011). Investigation of phenolic content and biological activities of *Scabiosa atropurpurea* (L.). *World Appl. Sci. J.* 15: 311-317.
- Erdogan, E.A., Everest, A. and Kaplan, E. (2013). Antimicrobial activities of aqueous extracts and essential oils of two endemic species from Turkey. *Indian. J. Tradit. Knowl.* 12(2): 221-224.
- Filibeck, G., Cornelini, P. and Petrella, P. (2012). Floristic analysis of a high-speed railway embankment in a Mediterranean landscape. *Acta Bot. Croat.* 71(2): 229-248.
- Flamini, G., Cioni, P.L., Puleio, R., Morelli, I. and Panizzi, L. (1999). Antimicrobial activity of the essential oil of *Calamintha nepeta* and its constituent pulegone against bacteria and fungi. *Phyther. Res.* 13: 349-351.
- Font Quer, P. (1982). *Plantas medicinales*. Labor (Edition), Barcellona.
- Garavelos, E., Antonopoulos, C., Chronopoulos, J. and Papafotiou, M. (1999). Studies on growth manipulation of *Euphorbia characias* (L.). IV International Symposium on New Floricultural Crops, ISHS. 541: 201-206.
- Gavidia, I., Zaragoza, C., Segura, J. and Perez-Bermudez, P. (1997). Plant regeneration from juvenile and adult *Anthyllis cytisoides*, a multipurpose leguminous. *Shrub. J. Plant Physiol.* 150: 714-718.
- George, E.B. and Ronald, J.T. (2013). *Toxic plants of North America*, John Wiley and Sons: Oxford, UK. 319-322.
- Girre, L. (1980). Connaitre et reconnaitre les plantes médicinales. (Know and recognize medicinal plants). *Ouest France GF.* 25: 332-334.
- Granati, L. and Bombelli, A. (1999). Leaf anatomy, inclination, and gas exchange relationships in evergreen sclerophyllous and drought semideciduous shrub species. *Photosynthetica.* 37: 573-585.
- Gras, A., Garnatje, T., Ibáñez, N., López-Pujol, J., Nualart, N. and Vallès, J. (2017). Medicinal plant uses and names from the herbarium of Francesc Bolòs (1773–1844). *J. Ethnopharmacol.* 204: 142-168.
- Greuter, W., Burdet, H.M. and Long, G. (1989). *Med-Checklist*. Vol. 4. Conserv. Jardin Bot. Ville de Genève.
- Gursoy, N. and Tepe, B. (2009). Determination of the antimicrobial and antioxidative properties and total phenolics of two “endemic” Lamiaceae species from Turkey: *Ballota rotundifolia* (L.) and *Teucrium chamaedrys* (C. Koch.). *Plant. Food. Hum. Nutr.* 64(2): 135-140.
- Gutschick, V.P. (1999). Biotic and abiotic consequences of differences in leaf structure. *New Phytol.* 144: 3-18.
- Harper-Lore, B.L. and Wilson, M. (2000). *Roadside use of native plants*. Island Press, Canada.
- Harper-Lore, B.L. (1996). Using native plants as problem-solvers. *Environ. Manage.* 20: 827-830.
- Hartmann, H.T., Rester, D., Davies, F.T.Jr. and Geneve, R.L. (1997). *Plant propagation: principles and practices*. Prentice. Hall. Int., Upper Saddle.
- Helfand, G.E., Park, J.S., Nassauer, J.I. and Kosek, S. (2006). The economics of native plants in residential landscape designs. *Landscape and Urban Plan.* 78: 229-240.
- Hetherington, A.M. and Woodward, F.I. (2003). The role of stomata in sensing and driving environmental change. *Nature.* 424(6951): 901.
- Heywood, V.H. and Richardson, I.B.K. (1990). *Ballota acetabulosa* Benth. In: Tunin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M., Webb, D.A., eds. *Flora Europaea*, Cambridge: Cambr. Uni. Press. 3: 150.
- Hlila, B.M., Mosbah, H., Majouli, K., Nejma, A.B., Jannet, H.B., Mastouri, M., Aouni, M. and Selmi, B. (2016). Antimicrobial activity of *Scabiosa arenaria* Forssk. extracts and pure compounds using bioguided fractionation. *Chem. Biodivers.* 13: 1262-1272.
- Hlila, B.M., Mosbah, H., Mssada, K., Jannet, H.B., Aouni, M. and Selmi, B. (2015). Acetylcholinesterase inhibitory and antioxidante properties of roots extracts from the Tunisian *Scabiosa arenaria* Forssk. *Ind. Crop. Prod.* 67: 62-69.
- Jashemski, W.F. (1999). *A Pompeian herbal: ancient and modern medicinal plants*. Austin, University of Texas Press.
- Jasievicz, A., Tutin, T.G., Heywood, V.H., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M. and Webb, D.A. (1976). *Flora Europaea*, eds. Cambr. Uni. Press, Cambridge. 4: 68.
- Judd, W.S., Campbell, C.S., Kellogg, E.A., Stevens, P.F. and Donoghue, M.J. (2002). *Plant systematics: a phylogenetic approach*. Sinauer. Axxoc. 287-292.
- Kamble, S.M., Goyal, S.N. and Patil, C.R. (2014). Multifunctional pentacyclic triterpenoids as adjuvants in cancer chemotherapy: A review. *RSC Adv.* 4: 33370-33382.
- Karousou, R., Kokkini, S., Bessiere, J.M. and Vokou, D. (1996). *Calamintha cretica* (Lamiaceae), a Cretan endemic: Distribution and essential oil composition. *Nord. J. Bot.* 16(3): 247-251.
- Kartsonas, E. and Papafotiou, M. (2007). Mother plant age and seasonal influence on *in vitro* propagation of *Quercus euboica* (Pap.), an endemic, rare and endangered oak species of Greece. *Plant Cell Tissue and Organ Cult.* 90: 111-116.

- Kartsonas, E. and Papafotiou, M. (2009). Micropropagation of *Quercus euboica* (Pap.), a rare endemic oak species in Greece. *Acta Hort.* 485-490.
- Keeley, J.E. (1991). Seed germination and life history syndromes in the California chaparral. *Bot. Rev.* 57(2): 81-116.
- Kitic, D., Jovanovic, T., Ristic, M., Palic, R. and Stojanovic, G. (2002). Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Calamintha nepeta* (L.) Savi ssp. *glandulosa* (Req.). P.W. Ball from Montenegro. *J. Essent. Oil Res.* 14: 150-152.
- Kokkinou, I., Ntoulas, N., Nektarios, P.A. and Varela, D. (2016). Response of native aromatic and medicinal plant species to water stress on adaptive green roof systems. *HortScience*, 51(5): 608-614.
- Koptur, S. (2005). Nectar as fuel for plant protectors. Plant-provided food for carnivorous insects: a protective mutualism and its applications. *Cambr. Uni. Press, Cambridge, UK.* 75-108.
- Kose, L.S., Moteetee, A. and Vuuren, S.V. (2015). Ethnobotanical survey of medicinal plants used in the Maseru district of Lesotho. *J. Ethnopharmacol.* 170: 184-200.
- Kotsiris, G., Nektarios, P.A. and Paraskevopoulou, A.T. (2012). *Lavandula angustifolia* growth and physiology is affected by substrate type and depth when grown under Mediterranean semi-intensive green roof conditions. *HortScience*, 47: 311-317.
- Kunkel, G. (1984). Plants for human consumption. Koeltz Scientific Books: Koenigstein, Germany. 234.
- Lamont, B.B., Groom, P.K. and Cowling, R.M. (2002). High leaf mass per area of related species assemblages may reflect low rainfall and carbon isotope discrimination rather than low phosphorus and nitrogen concentrations. *Funct. Ecol.* 16(3): 403-412.
- Le Houérou, H.N. (1992). An overview of vegetation and land degradation in world arid lands. *Degradation and restoration of arid lands.* 127-163.
- Le Rudulier, D., Goas, G. and Larher, F. (1982). Onium compounds, amides and amino acids levels in nodules and other organs of nitrogen fixing plants. *Z. Pflanzenphysiol.* 105(5): 417-426.
- Lehbili, M., Magid, A.A., Hubert, J., Kabouche, A., Voutquenne-Nazabadioko, L., Renault, J.-H., Nuzillard, J.-M., Morjani, H., Abedini, A. and Gangloff, S.C. (2018). Two new bis-iridoids isolated from *Scabiosa stellata* and their antibacterial, antioxidant, anti-tyrosinase and cytotoxic activities. *Fitoterapia.* 125: 41-48.
- Le-Houerou, H.N. (1981). Impact of man and his animals on Mediterranean vegetation. In: di Castri F, Goodall DW, Specht RL, eds. *Mediterranean-type Shrublands: Ecosystems of the World 11.* Elsevier Scientific Publ., Amsterdam. 479-521.
- Linnaeus, C. (1753). *Species Plantarum*. T. 2. Salvius. Holmiae.
- Ma, J.N., Bolraa, S., Ji, M., He, Q.Q. and Ma, C.M. (2016). Quantification and antioxidant and anti-HCV activities of the constituents from the inflorescences of *Scabiosa comosa* and *S. tschilliensis*. *Nat. Prod. Res.* 30: 590-594.
- Macdonald, B. (2006). *Practical woody plant propagation for nursery growers.* Timber Press Inc., Portland, Oregon, U.S.A. 669.
- Magallón, S.A. and Sanderson, M.J. (2001). Absolute diversification rates in angiosperm clades. *Evolution.* 55(9): 1762-1780.
- Mallat, M. (1988). Diversification des fleurs coupées par les plantes vivaces: La Scabieuse du Caucase; une espèce à promouvoir pour le plein champ. *P.H.M.-Revue Horticole.* 284: 51-53.
- Maloupa, E., Grigoriadou, K., Papanastassi, K. and Krigas, N. (2008). Conservation, propagation, development and utilization of xerophytic species of the native Greek flora towards commercial floriculture. *Acta Hort.* 766: 205-214.
- Maloupa, E., Grigoriadou, K., Zervaki, D. and Papanastassi, K. (2005). Management of the Balkan native flora for sustainable floricultural commercial use. *Acta Hort.* 683: 189-196.
- Mancini, E., De Laura, M., Malova, H. and De Vincenzo, F. (2013). Chemical composition and biological activities of the essential oil from *Calamintha nepeta* plants from the wild in southern Italy. *Nat. Prod. Commun.* 8: 139-142.
- Margaris, N.S. (1977). Adaptive strategies in plants dominating Mediterranean-type ecosystems.
- Margaris, N.S. and Koutsidou, E. (1998). Fires and overgrazing: the main driving forces of desertification in the Aegean islands. *Ecological basis for livestock grazing in Mediterranean ecosystems.* 1830: 167-170.
- Margaris, N.S. and Papadopoulou, E. (1975). Day length effect on leaf of *Phlomis fruticosa*. *Biol. Gallo-Hell.* 6:153-159.
- Margaris, N.S. and Vokou, D. (1981). Structural and physiological features of woody plants in phrygantic ecosystems related to adaptive mechanisms. *Ecol. Mediterr.*
- Margaris, N.S. (1981). Adaptive strategies in plants dominating Mediterranean-type ecosystems. In: di Castri F, Goodall DW, Specht RL, eds. *Mediterranean-type Shrublands: Ecosystems of the World 11.* Elsevier Scientific Publ., Amsterdam. 309-315
- Marhuenda-Requena, E., Saenz-Rodriguez, M.T. and Garcia-Gimenez, M.D. (1987). *Plantas medicinale et phytotherapie* 21. 47-55.

- Marin, P.D., Grayer, R.J., Veitch, N.C., Kite, G.C. and Harborne, J.B. (2001). Acacetin glycosides as taxonomic markers in *Calamintha* and *Micromeria*. *Phytochemistry*. 58: 943-947.
- Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S., Falconieri, D., Maxia, A., Gonçalves, M.J. Cavaleiroc, C. and Salgueiro, L. (2010). Chemical composition and biological assays of essential oils of *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp. *nepeta* (Lamiaceae). *Nat. Prod. Res.* 24(18): 1734-1742.
- Martini, A.N. and Papafotiou, M. (2009). *In vitro* rooting of *XMalosorbus florentina* Zucc. microshoots. *Acta Hort.* 813: 491-496.
- Martini, A.N. and Papafotiou, M. (2011). Effect of thidiazuron on blastogenesis and subsequent rhizogenesis of *XMalosorbus florentina* Zucc. *Acta Hort.* 923: 169-176.
- Martini, A.N. and Papafotiou, M. (2013). Micropropagation as means for the conservation of the rare and endangered *XMalosorbus florentina* Zucc. (Rosaceae). *Acta Hort.* 990: 409-414.
- Martini, A.N. and Papafotiou, M. (2013). Effects of plant growth regulators and environmental factors on *in vitro* propagation of *XMalosorbus florentina*. *Propag. Orn. Plants*. 13(3): 112-122.
- Martini, A.N. and Papafotiou, M. (2016). Micropropagation of *Limoniastrum monopetalum* (L.). *Acta Hort.* 1113: 195-200.
- Martini, A.N., Papafotiou, M. and Akoumianaki-Ioannidou, A. (2017a). Vegetative propagation by stem cuttings and plant establishment of the Mediterranean aromatic and medicinal species *Teucrium capitatum* (L.). *Acta Hort.* 1189: 455-459.
- Martini, A.N., Papafotiou, M. and Evangelopoulos, K. (2017). Effect of substrate type and depth on the establishment of the edible and medicinal native species *Crithmum maritimum* (L.) on an extensive urban Mediterranean green roof. *Acta Hort.* 1189: 451-454.
- Martini, A.N., Papafotiou, M. and Evangelopoulos, K. (2017). Establishment of the edible and medicinal native species *Origanum dictamnus* (L.) on an extensive urban Mediterranean green roof as affected by substrate type and depth. *Acta Hort.* 1189: 461-464.
- Martini, A.N., Papafotiou, M. and Majumber, D.A.N. (2016). Micropropagation of *Teucrium capitatum* (L.). *Acta Hort.* 1113: 183-188.
- Maurer, U., Peschel, T. and Schmitz, S. (2000). The flora of selected urban land-use types in Berlin and Potsdam with regard to nature conservation in cities. *Landsc. Urban Plan.* 46: 209-215.
- Mayer, V. and Ehrendorfer, F. (1999). Fruit differentiation, palynology, and systematics in the *Scabiosa* group of genera and *Pseudoscabiosa* (Dipsacales). *Plant Syst. Evol.* 216: 135-166.
- Mayer, V. (1995). The epicalyx in fruits of *Scabiosa* and *Tremastelma* (Dipsacaceae): anatomy and ecological significance. *Bot. Jahrb. Syst.* 117: 211-238.
- Médail, F. and Quezel, P. (1997). Hot-spots analysis for conservation of plant biodiversity in the Mediterranean basin. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 84: 112-127.
- Mericli, A.H., Mericli, F. and Tuzlaci, E. (1988). Flavonoids of *Ballota acetabulosa*. *Acta Pharm.* 30: 143-144.
- Miladinović, D.L., Ilić, B.S., Mihajilov-Krsteš, T.M., Nikolić, N.D., Miladinović, L.C. and Cvetković, O.G. (2012). Investigation of the chemical composition-antibacterial activity relationship of essential oils by chemometric methods. *Anal. Bioanal. Chem.* 403: 1007-1018.
- Monforte, M.T., Tzakou, O., Nostro, A., Zimbalatti, V. and Galati, E.M. (2011). Chemical composition and biological activities of *Calamintha officinalis* Moench essential oil. *J. Med. Food.* 14: 297-303.
- Montesano, V., Negro, D., Sarli, G., De Lisi, A., Laghetti, G. and Hammer, K. (2012). Notes about the uses of plants by one of the last healers in the Basilicata Region (South Italy). *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 8:15.
- Moore, B.R. and Donoghue, M.J. (2007). Correlates of diversification in the plant clade Dipsacales: geographic movement and evolutionary innovation. *Am. Nat.* 170: 28-55.
- Morbidoni, M., Estrelles, E., Soriano, P., Martinez-Solis, I. and Biondi, E. (2008). Effects of environmental factors on seed germination of *Anthyllis barba-jovis* (L.). *Plant Biosyst.* 142: 275-286.
- Moteete, A. and Kose, L.S. (2016). Medicinal plants used in Lesotho for treatment of reproductive and post reproductive problems. *J. Ethnopharmacol.* 194: 827-849.
- Motta, F. (1992). Nel mondo della natura, Enciclopedia di scienze naturali. Milano. 1.
- Myers, N. (1990). The biodiversity challenge: expanded hotspots analysis. *Environmentalist.* 10: 243-256.
- Myers, N., Mittermeier, R.A., Mittermeier, C.G., Da Fonseca, G.A.B. and Kent, J. (2000). Biodiversity hotspots for conservation priorities. *Nature.* 403: 853-858.
- Nagase, A., Dunnett, N. and Choi, M.S. (2013). Investigation of weed phenology in an establishing semi-extensive green roof. *Ecol. Eng.* 58: 156-164.
- Naveh, Z. (1975). The evolutionary significance of fire in the Mediterranean region. *Vegetatio.* 29(3): 199-208.
- Naveh, Z. (1988). Multifunctional reconstruction of semiarid Mediterranean landscapes for multipurpose land uses. In: Allen, E.B., ed. The reconstruction of disturbed Arid lands, an ecological approach. *Aaas Select.* 234-256.

- Nektarios, P.A., Ntoulas, N., Nydrioti, E., Kokkinou, I., Bali, E.M. and Amountzias, I. (2015). Drought stress response of *Sedum sediforme* grown in extensive green roof systems with different substrate types and depths. *Sci. Hortic.* 181: 52-61.
- Nektarios, P.A. and Ntoulas, N. (2017). Designing green roofs for arid and semi-arid climates. the route towards the adaptive approach. *Acta Hortic.* 1189: 197-202.
- Nektarios, P.A., Amountzias, I., Kokkinou, I. and Ntoulas, N. (2011). Green roof substrate type and depth affect the growth of the native species *Dianthus fruticosus* under reduced irrigation regimens. *HortScience*, 46: 1208-1216.
- Nektarios, P.A., Nydrioti, E., Kapsali, T. and Ntoulas, N. (2016). *Crithmum maritimum* growth in extensive green roof systems with different substrate type, depth and irrigation regime. *Acta Hortic.* 1108: 303-308.
- Newall, C.A., Anderson, L.A. and Philipson, J.D. (1996). Herbal medicines, a guide for health-care professionals. *Pharm. J. London.* 164.
- Nichols, D. (1992). *Scabiosa*, *Scabiosa columbaria*. *Plant Varieties J.* 4: 20-21.
- Niinemets, Ü. (2001). Global-scale climatic controls of leaf dry mass per area, density, and thickness in trees and shrubs. *Ecology.* 82(2): 453-469.
- Orshan, G. (1983). Approaches to the definition of Mediterranean growth forms, of: Kruger, F.J., Mitchell, D.T. and Jarvis, J.U.M. *Mediterranean-type ecosystems: the role of nutrients.* Springer-Verlag, Berlin.
- Özek, T. (1990). Composition of the essential oil of *Micromeria congesta*. Anadolu University, Eskisehir, Turkey.
- Panizzi, L., Flamini, G., Cioni, P.L. and Morelli, I. (1993). Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae. *J. Ethnopharmacol.* 39: 167-170.
- Papafotiou, M., Tassoula, L., Pergialioti, N., Papanastasatos, E., Fouskaki, M., Galanis, D., Kefalopoulou, R. and Liakopoulos, G. (2015). Effect of substrate type and irrigation frequency on performance of native xerophytes at extensive green roofs of Eastern Mediterranean. *Changing Cities II: Spatial, design, landscape and socio-economic dimensions.* Porto Heli, Peloponnese, Greece. 691-698.
- Papafotiou, M., Pergialioti, N., Papanastasatos, E.A. and Tassoula, L. (2012b). Aromatic plants in green roofs: studies on substrate type and depth and irrigation frequency (Effect of growth medium and irrigation on growth of aromatic Mediterranean species in green roofs). *EuroGard VI-Sixth European Botanic Garden Congress.* Chios Island, Greece. 83.
- Papafotiou, M. and Kalantzis, A. (2009a). Studies on *in vitro* propagation of *Lithodora zahni*. *Acta Hortic.* 813: 465-470.
- Papafotiou, M. and Kalantzis, A. (2009b). Seed germination and *in vitro* propagation of *Sideritis athena*. *Acta Hort* 813: 471-476.
- Papafotiou, M. and Martini, A.N. (2009a). Effect of growth medium on *in vitro* regeneration of *XMalosorbus florentina* Zucc. *Acta Hortic.* 813: 497-501.
- Papafotiou, M. and Martini, A.N. (2009b). Effect of season and sterilization method on response of *XMalosorbus florentina* Zucc (Rosaceae) buds to *in vitro* culture. *Acta Hortic.* 813: 503-508.
- Papafotiou, M. and Martini, A.N. (2016). *In vitro* seed and clonal propagation of the Mediterranean aromatic and medicinal plant *Teucrium capitatum*. *HortScience*, 51: 403-411.
- Papafotiou, M. and Stragas, J. (2009). Seed germination and *in vitro* propagation of *Dianthus fruticosus* (L.). *Acta Hort.* 813: 481-484.
- Papafotiou, M. and Kalantzis, A. (2009). Seed germination and *in vitro* propagation of *Sideritis athena*. *Acta Hortic.* 813: 471-476.
- Papafotiou, M. and Martini, A.N. (2016a). Effect of cytokinins on *in vitro* blastogenesis of *Thymelaea tartonraira* spp. *tartonraira* (L.). *Third International Symposium on Horticulture in Europe (ISHS).* Chania, Greece. 147.
- Papafotiou, M. and Papanagiotou, N. (2013). Comparative evaluation with biometric and physiological characteristics of ornamental shrubs as for their contribution to the environment under two irrigation frequencies. *Acta Hortic.* 990: 369-372.
- Papafotiou, M., Majumder, D.A.N., Martini, A.N. and Bertsouklis, K.F. (2016a). Micropropagation of *Atriplex halimus* (L.). *Acta Hortic.* 1113: 207-210.
- Papafotiou, M., Martini, A.N. and Vlachou, G. (2017a). *In vitro* propagation as a tool to enhance the use of native ornamentals in archaeological sites of Greece. *Acta Hortic.* 1155: 301-308.
- Papafotiou, M., Bertsouklis, K.F., Martini, A.N., Vlachou, G., Akoumianaki-Ioannidou, A., Kanellou, E. and Kartsonas, E.D. (2017b). Evaluation of the establishment of native Mediterranean plant species suggested for landscape enhancement in archaeological sites of Greece. *Acta Hortic.* 1189: 177-180.
- Papafotiou, M., Bertsouklis, K.F. and Trigka, M. (2013a). Micropropagation of *Arbutus unedo*, *A. andrachne*, and their natural hybrid, *A. x andrachnoides* from seedling explants. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 88(6): 768-775.

- Papafotiou, M., Pergialioti, N., Papanastassatos, E.A., Tassoula, L., Massas, I. and Kargas, G. (2012a). Effect of substrate type and depth and the irrigation frequency on growth of semiwoody mediterranean species in green roofs. *Acta Hort.* 990: 481-486.
- Papafotiou, M., Pergialioti, N., Tassoula, L., Massas, I. and Kargas, G. (2013b). Growth of native aromatic xerophytes in an extensive Mediterranean green roof as affected by substrate type and depth and irrigation frequency. *HortScience*, 48: 1327-1333.
- Papafotiou, M., Tassoula, L. and Kefalopoulou, R. (2017c). Effect of substrate type and irrigation frequency on growth of *Pallenis maritima* on an urban extensive green roof at the semi-arid Mediterranean region. *Acta Hort.* 1189: 275-278.
- Papafotiou, M., Tassoula, L., Liakopoulos, G. and Kargas, G. (2016b). Effect of substrate type and irrigation frequency on growth of Mediterranean xerophytes on green roofs. *Acta Hort.* 1108: 309-316.
- Papafotiou, M., Trigka, M. and Bertsouklis, K.F. (2012b). *In vitro* propagation of *Arbutus* × *andrachnoides* link. From seedling tissues. *Acta Hort.* 990: 405-408.
- Papafotiou, M., Vlachou, G., Akoumianaki-Ioannidou, A. and Bertsouklis, K.F. (2016c). Propagation of *Scabiosa hymettia* (Boiss & Spruner) by stem cuttings. *Acta Hort*1242: 763-766.
- Papafotiou, M., Tassoula, L. and Mellos, K. (2018). Construction and maintenance factors affecting most the growth of shrubby Mediterranean native plants on urban extensive green roofs. *Acta Hort.* 1215: 101-108.
- Papalexandrou, A., Magiatis, P., Perdetzoglou, D., Skaltsounis, A.L., Chinou, I.B. and Harvala, C. (2003). Iridoids from *Scabiosa variifolia* (Dipsacaceae) growing in Greece. *Biochem. Syst. Ecol.* 31: 91-93.
- Papanastasis, V.P. (1977). Fire ecology and management of phrygana communities in Greece. *In: Mooney, H.A. and Conrad C.E., coors. Proc. Symp. Environmental consequences of fire and fuel management in Mediterranean ecosystems. USDA Forest Service, General Technical Report WO. 3: 476-482.*
- Papanastasis, V.P. (2004). Traditional vs contemporary management of Mediterranean vegetation: the case of the island of Greece. *J. Biol. Res. Thessaloniki.* 1: 39-46.
- Paraskevopoulou, A., Mitsios, I., Fragakis, I., Nektarios, P.A., Ntoulas, N., Londra, P. and Papafotiou, M. (2015). The growth of *Arthrocnemum macrostachyum* and *Halimione portulacoides* in an extensive green roof system under two watering regimes. *Agriculture and Agricultural Science Procedia.* 4: 242-249.
- Pardo-de-Santayana, M., Tardío, J., Blanco, E., Carvalho, A., Lastra, J., San Miguel, E. and Morales, R. (2007). Traditional knowledge of wild edible plants used in the northwest of the Iberian Peninsula (Spain and Portugal): a comparative study. *J. Ethnobiol. Ethnomed.* 3(1): 27.
- Parkhurst, D.F. and Loucks, O.L. (1972). Optimal leaf size in relation to environment. *J. Ecol.* 60: 505-537.
- Parmar, N.S. and Ghosh, M.N. (1981). Gastric antiulcer activity of (+)cyanidanol-3, a histidine decarboxylase inhibitor. *Eur. J. Pharmacol.* 69: 25-32.
- Paula, S. and Pausas, J.G. (2006). Leaf traits and resprouting ability in the Mediterranean basin. *Funct. Ecol.* 20(6): 941-947.
- Paunescu, A. (2009). Biotechnology for endangered plant conservation: A critical review. *Rom. Biotech. Lett.* 14(1): 4095-4103.
- Phitos, D., Constantinidis, T. and Kamari, G. (2009). The red data book of rare and threatened plants of Greece, Vol. II (E-Z), Hellenic Botanical Society (HBS). Patra. 287-288.
- Pignatti, S. (1982). *Flora d'Italia. Micol. Ita.* Bologna.
- Pistelli, L., Noccioli, C., Bertoli, A., Scapecchi, G. and Potenza, D. (2007). Chemical composition and volatile constituents of *Anthyllis barba-jovis*. *Nat. Prod. Res.* 21(5): 418-425.
- Poole, D.K. and Miller, P.C. (1975). Water relations of selected species of chaparral and coastal sage communities. *Ecology.* 56: 1118-1128.
- Pсарas, G.K. (1986). Chloroplast arrangement along intercellular spaces in the leaves of a Mediterranean subshrub. *J. Plant Physiol.* 126(2-3): 189-193.
- Pсарas, G.K. and Christodoulakis, N.S. (1987). Air pollution effects on the ultrastructure of *Phlomis fruticosa* mesophyll cell. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 38(4): 610-617.
- Pсарas, G.K. and Rhizopoulou, S. (1995). Mesophyll structure during leaf development in *Ballota acetabulosa*. *New Phytol.* 131: 303-309.
- Quattrocchi, U. (2000). *CRC World Dictionary of plant names volume I.*, CRC Press: Boca Raton, New York, Washington, DC, USA. London, UK. 91.
- Rahmouni, N., Pinto, D.C.G.A., Beghidja, N., Benayache, S. and Silva, A.M.S. (2018). *Scabiosa stellata* (L.) phenolic content clarifies its antioxidant activity. *Molecules.* 23: 1285.
- Raymond M. Harley, Sandy Atkins, Andrey L. Budantsev, Philip D. Cantino, Barry J. Conn, Renée J. Grayer, Madeline M. Harley, Rogier P.J. de Kok, Tatyana V. Krestovskaja, Ramón Morales, Alan J. Paton and P. Olof Ryding. (2004). *Labiatae: The families and genera of vascular plants.* Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, Germany. 7: 167-275.

- Read, J. and Sanson, G.D. (2003). Characterizing sclerophylly: the mechanical properties of a diverse range of leaf types. *New Phytol.* *160*(1): 81-99.
- Rechinger, K.H. (1943). *Flora Aegaea*. Springer, Wien.
- Riela, S., Bruno, M., Formisano, C., Rigano, D., Rosselli, S., Saladino, M.L. and Senatore, F. (2008). Effects of solvent-free microwave extraction on the chemical composition of essential oil of *Calamintha nepeta* (L.) Savi compared with the conventional production method. *J. Sep. Sci.* *31*(6-7): 1110-1117.
- Rigat, M., Bonet, M.À., Garcia, S., Garnatje, T. and Vallès, J. (2007). Studies on pharmaceutical ethnobotany in the high river Ter valley (Pyrenees, Catalonia, Iberian Peninsula). *J. Ethnopharmacol.* *113*: 267-277.
- Ristorcelli, D., Tomi, F. and Casanova, J. (1996). Essential oils of *Calamintha nepeta* subsp. *nepeta* and subsp. *glandulosa* from Corsica, France. *J. Essent. Oil Res.* *8*: 363-366.
- Rundel, P.W. (2007). Mediterranean-climate ecosystems. *Encyclopedia of Biodiversity*, Elsevier.
- Sahpaz, S., Skaltsounis, A.L. and Bailleul, F. (2002). Polyphenols from *Ballota acetabulosa*. *Biochem. Syst. Ecol.* *30*: 601-604.
- Salerno, G., Guarrera, P.M. and Caneva, G. (2005). Agricultural, domestic and handicraft folk uses of plants in the Tyrrhenian sector of Basilicata (Italy). *J. Ethnobiol Ethnomed.* *1*: 2.
- Salleo, S. and Nardini, A. (2000). Sclerophylly: evolutionary advantage or mere epiphenomenon? *Plant Biosyst.* *134*(3): 247-259.
- Sarac, N. and Ugur, A. (2007). Antimicrobial activities and usage in folkloric medicine of some Lamiaceae species growing in Mugla, Turkey. *EurAsia J. BioSci.* *1*(4): 28-34.
- Sarac, M. and Ugur, A. (2009). The *in vitro* antimicrobial activities of the essential oils of some Lamiaceae species from Turkey. *J. Med. Food.* *12*: 902-907.
- Sarer, E. and Pançalı, S.S. (1998). Composition of the essential oil from *Calamintha nepeta* (L.) Savi ssp. *glandulosa* (Req.). *R.W. Ball. Flavour Fragr. J.* *13*: 31-32.
- Šatovič, Z. (2002). Legal protection, conservation and cultivation of medicinal and aromatic plants in Croatia. In: Report of working group on medicinal and aromatic plants. International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI). Rome, Italy. 34-38.
- Scheen, A.C., Bendiksbj, M., Ryding, O., Mathiesen, C., Albert, V.A. and Lindqvist, C. (2010). Molecular phylogenetics, character evolution, and suprageneric classification of Lamioideae (Lamiaceae). *Ann. Mo. Bot. Gard.* 191-217.
- Schulte-Scherlebeck, H. (1996). Kulturinformation zu *Scabiosa caucasica*. *Zierpflanzenbau.* *11*: 480.
- Seidel, V., Verholle, M., Malard, Y., Tillequin, T., Fruchard, J.C., Duriez, P., Bailleul, F. and Teissier, E. (2000). Phenylpropanoids from *Ballota nigra* (L.) inhibit *in vitro* LDL peroxidation. *Phytother. Res.* *14*: 93-98.
- Shields, L.M. (1950). Leaf xeromorphy as related to phy-biological and structural influences. *Botanical Re Tietvs.* *16*: 399-447.
- Šilić, C. (1979). Monograph of the genera *Rodova Satureja* L., *Calamintha* Miller, *Micromeria* Benth, *Acinos* Miller i *Clinopodium* L. u *Flori Jugoslavije*, *Zemaljski Muzej*: Sarajevo, Bosnia and Herzegovina. 1-440.
- Singh, B. and Sharma, R.A. (2015). Plant terpenes: Defense responses, phylogenetic analysis, regulation and clinical applications. *3 Biotech.* *5*: 129-151.
- Small, E. (2006). *Culinary Herbs*, NRC Research Press: Ottawa, ON, Canada. 1-236.
- Southon, I.W. (1994). *Phytochemical Dictionary of the Leguminosae*. Chapman and Hall, London. *1*.
- Specht, R.L. and Rundel, P.W. (1990). Sclerophylly and foliar nutrient status of Mediterranean-climate plant communities in southern Australia. *Aust. J. Bot.* *38*: 459-474.
- Starman, T.W., Cerny, T.A. and MacKenzie, A.J. (1995). Productivity and profitability of some field-grown specialty cut flowers. *HortScience*, *30*: 1217-1220.
- Strid, A. (1980). Φυτά του Ολύμπου. Μουσείο Γουλανδρή Φυσικής Ιστορίας, Κηφισιά, Αθήνα.
- Strid, A. and Tan, K. (1992). *Flora Hellenica and the threatened plants of Greece*. *Opera Bot.* *113*: 55-67.
- Suc, J.P. (1984). Origin and evolution of the Mediterranean vegetation and climate in Europe. *Nature.* *307*: 429-438.
- Tan, K. and Strid, A. (2009). Ελληνικά Αγριολούλουδα. Μουσείο Γουλανδρή Φυσικής Ιστορίας, Κηφισιά, Αθήνα.
- Tassoula, L., Papafotiou, M., Liakopoulos, G. and Kargas, G. (2015). Growth of the native xerophyte *Convolvulus cneorum* (L.) on an extensive Mediterranean green roof under different substrate types and irrigation regimens. *HortScience*, *50*(7): 1118-1124.
- Tassoula, L., Papafotiou, M. and Fouskaki, M. (2017). Growth of the halophyte *Atriplex halimus* (L.) on an extensive green roof at the semi-arid Mediterranean region as affected by substrate type and irrigation regime. *Acta Hort.* *1189*: 287-290.

- Tassoula, L., Papafotiou, M. and Galanis, D. (2017). Growth of the Mediterranean xerophyte *Scabiosa cretica* on an extensive green roof under different substrate types and irrigation regimes. *Acta Hort.* 1189: 283-286.
- Tenenbaum, F. (2003). Taylor's Encyclopedia of garden plants. Houghton Mifflin Harcourt (HMH), New York, USA.
- Terradas, J. (2001). *Ecología urbana*. Barcelona.
- Thanos, C.A. and Doussi, M.A. (1995). Ecophysiology of seed germination in endemic labiates of Crete. *Isr. J. Plant Sci.* 43: 227-237.
- Thanos, C.A., Kadis, C.C. and Skarou, F. (1995). Ecophysiology of germination in the aromatic plants thyme, savory and oregano (Labiatae). *Seed Sci. Res.* 5: 161-170.
- The Legume Phylogeny Working Group (LPWG). (2017). A new subfamily classification of the Leguminosae based on a taxonomically comprehensive phylogeny. *Taxon.* 66(1): 44-77.
- The plant list database. (2018). <http://www.theplantlist.org/tpl1.1/search?q=Scabiosa> (accessed on 10 September 2018).
- Thomas, J.A., Snazell, R.G. and Ward, L.K. (2002). Are roads harmful or potentially beneficial to butterflies and other insects? In: *Wildlife and roads: The ecological impact*. 203-222.
- Thompson, J.N. (2005). *The geographic mosaic of coevolution*. University of Chicago Press (UCP).
- Tinsley, M.J., Simmons, M.T. and Windhager, S. (2006). The establishment success of native versus non-native herbaceous seed mixes on a revegetated roadside in Central Texas. *Ecol. Eng.* 26: 231-240.
- Tomaselli, R. (1977). Degradation of the Mediterranean maquis. In: *Mediterranean forests and maquis: Ecology, conservation and management*. MAB Technical notes 2, UNESCO, Paris. 32-72.
- Trinajstić, L. (1994). *Anthyllis barba-jovis* (L.). In: *Crvena knjiga biljnih vrsta Republike Hrvatske*. Ministarstvo graditeljstva i zaštite okolisa, Zavod za zaštitu prirode, Zagreb. 21-23.
- Trigka, M. and Papafotiou, M. (2017). *In vitro* propagation of *Anthyllis barba-jovis* from seedling tissues. *Acta Hort.* 1189: 473-748.
- Tsigouri, A., Passaloglou-Katrali, M. and Sabatakou, O. (2004). *Grana.* 43: 122
- Tundis, R., Loizzo, M.R., Menichini, F., Statti, G.A. and Menichini, F. (2008). Biological and pharmacological activities of iridoids: Recent developments. *Mini-Rev. Med. Chem.* 8: 399-420.
- Turner, I.M. (1994). Sclerophylly: primarily protective? *Funct. Ecol.* 8: 669-675.
- Turolli, F. (1981). *Erbe vitali di casa nostra*. In *tecniche alimentari alternative di prevenzione e cura*. Mursia, Milan, Italy. 205-206.
- Tutin, G.T., Heywood, V., Burges, N.A., Moore, D.M., Valentine, D.H., Walters, S.M. and Webb, D.A. (1972). *Flora Europaea*. Cambr. Uni. Press. Cambridge, UK, 4.
- Tuzlacı, E. and Tolon, E. (2000). Turkish folk medicinal plants, part III: Sile (Istanbul). *Fitoterapia.* 71: 673-685.
- Umberto Quattrocchi. 2000. *CRC World Dictionary of Plant Names volume I*, page 91. CRC Press: Boca Raton, New York, Washington, D.C., USA. London, UK. ISBN 978-0-8493-2673-8 (set).
- Venable, D.L., Flores-Martinez, A., Muller-Landau, H.C., Barron-Gafford, G. and Becerra, J.X. (2008). Seed dispersal of desert annuals. *Ecology.* 89: 2218-2227.
- Verlaque, R. (1983). *Etude biosystématique et phylogénétique des Dipsacaceae*. Ph.D. Thesis, Université de Provence, Marseille.
- Verlaque, R. (1984). A biosystematic and phylogenetic study of the Dipsacaceae. *Plant biosystematics* (ed. by R. Grant). Academic Press, Toronto. 307-320
- Verlaque, R. (1986). *Etude biosystématique et phylogénétique des Dipsacaceae. IV. – Tribus des Scabioseae* (phylum #1, 2, 3). *Revue de cytologie et de biologie végétales le botaniste.* 9: 5-72.
- Viney, D.E. (1994). *An illustrated flora of North Cyprus*. Koeltz scientific books: Koenigstein, Germany, 514-515.
- Vlachou, G., Papafotiou, M. and Bertsouklis, K.F. (2016a). Studies on *in vitro* propagation of *Anthyllis barba-jovis* (L.). *Acta Hort.* 1155: 317-320.
- Vlachou, G., Papafotiou, M. and Bertsouklis, K.F. (2016b). *In vitro* propagation of *Ballota acetabulosa*. *Acta Hort.* 1113: 171-174.
- Vlachou, G., Papafotiou, M. and Bertsouklis, K.F. (2016c). *In vitro* propagation of *Calamintha nepeta*. *Acta Hort.* 1113: 189-194.
- Vlachou, G., Papafotiou, M. and Bertsouklis, K.F. (2017). The effect of cytokinin type and concentration on micropropagation of *Calamintha cretica* (L.). *Acta Hort.* 1189: 477-480.
- Vuuren, S.F.V. and Naidoo, D. (2010). An antimicrobial investigation of plants used traditionally in southern Africa to treat sexually transmitted infections. *J. Ethnopharmacol.* 130: 552-558.
- Walter, H. (1973). *Vegetation of the earth in relation to climate and the eco-physiological conditions*. English Universities Press.

- Walter, H. (1979). *Vegetation of the Earth and ecological systems of the geo-biosphere*. Springer-Verlag, Berlin.
- Wang, J., Liu, K., Li, X., Bi, K., Zhang, Y., Huang, J. and Zhang, R. (2017). Variation of active constituents and antioxidant activity in *Scabiosa tschiliensis* Gruning from different stages. *J. Food Sci. Technol.* 54: 2288-2295.
- Werner, C., Correia, O. and Beyschlag, W. (1999). Two different strategies of Mediterranean macchia plants to avoid photoinhibitory damage by excessive radiation levels during summer drought. *Acta Oecol.* 20: 15-23.
- Yadav, V.R., Prasad, S., Sung, B., Kannappan, R. and Aggarwal, B.B. (2010). Targeting inflammatory pathways by triterpenoids for prevention and treatment of cancer. *Toxins.* 2: 2428-2466.
- Yeşilada, E., Honda, G., Sezik, E., Tabata, M., Fujita, T., Tanaka, T., Takeda, Y. and Takaishi, Y. (1995). Traditional medicine in Turkey V. Folk medicine in the inner Taurus Mountains. *J. Ethnopharmacol.* 46: 133-152.
- Yeşilada, E., Honda, G., Sezik, E., Tabata, M., Goto, K. and Ikeshiro, Y. (1993). Traditional medicine in the Mediterranean subdivision. *J. Ethnopharmacol.* 39: 31-38.
- Zlatev, S., Donchev, T. and Iliev, L. (1990). Influence of some phenylurea-type cytokinins on productivity of peppermint. *Plant Physiol.* 16: 59-64.
- Απλαδά, Ε. και Αμοργιανιώτης, Γ. (2005). Σπάνια και ενδημικά φυτά Εθνικού Δρυμού Πάρνηθας. Δασαρχείο της Πάρνηθας, Αθήνα.
- Βαρδαβάκης, Μ. (1993). Συστηματική Βοτανική (Κρυπτόγαμα-Σπερματοφύτα). Τόμος Ι, Έκδοση 4^η. Εκδόσεις Σαλονικίδης, Θεσσαλονίκη.
- Καββάδας, Σ.Δ. (1956a). Εικονογραφημένον Βοτανικόν-Φυτολογικόν Λεξικόν. Τόμος Β, Αθήνα. 532-533.
- Καββάδας, Σ.Δ. (1956b). Εικονογραφημένον Βοτανικόν-Φυτολογικόν Λεξικόν. Τόμος Β, Αθήνα. 742-744.
- Καββάδας, Σ.Δ. (1956c). Εικονογραφημένον Βοτανικόν-Φυτολογικόν Λεξικόν. Τόμος Δ, Αθήνα. 1730-1733.
- Καββάδας, Σ.Δ. (1956d). Εικονογραφημένον Βοτανικόν-Φυτολογικόν Λεξικόν. Τόμος Η, Αθήνα. 3652-3656.
- Ντάφης, Σ. (1986). Δασική Οικολογία. Εκδόσεις Γιαχούδη-Γιαπούλη, Θεσσαλονίκη.
- Μαμπαλώνας, Δ. και Κοκκίνη, Σ. (2004). Συστηματική Βοτανική: Φυλογενετική-φαινετική προσέγγιση της ταξινόμησης των φυτικών οργανισμών. Εκδόσεις Αιβάζη, Θεσσαλονίκη.
- Σαρλής, Γ. (1999). Συστηματική Βοτανική: Εφαρμογές κορμοφύτων. Εκδόσεις Σταμούλη, Αθήνα.
- Ζαχάκη, Σ. (2012). Ανατομικές και ιστοχημικές διαφορές στα φύλλα του φυτού βαλλωτή (*Ballota acetabulosa*) κατά τη διάρκεια του έτους. Μεταπτυχιακή μελέτη.

ΕΝΟΤΗΤΑ ΙΙ – ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ ΑΥΤΟΦΥΩΝ ΕΙΔΩΝ

ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι - ΟΙΚΟΦΥΣΙΟΛΟΓΙΑ ΣΠΟΡΟΥ

Π.Ι. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Το συγκεκριμένο κεφάλαιο της παρούσας διατριβής αφορά στη διερεύνηση της οικοφυσιολογίας των σπόρων πέντε αυτοφυών ειδών της ελληνικής και μεσογειακής χλωρίδας (*Anthyllis barba-jovis*, *Ballota acetabulosa*, *Clinopodium creticum*, *Clinopodium nepeta* και *Scabiosa hymettia*). Στα πλαίσια της διατριβής διερευνήθηκαν για πρώτη φορά και προσδιορίστηκαν οι οριακές τιμές της θερμοκρασίας για τη βλάστηση σπόρου των πέντε ειδών. Οι σπόροι της *A. barba-jovis* εμφανίζουν φυσικό λήθαργο, και η προμεταχείριση μηχανικού σκαριφισμού των σπόρων για 1 min με σμυριδόχαρτο είχε ευνοϊκή επίδραση στη βλαστική τους ικανότητα. Η βέλτιστη θερμοκρασία για βλάστηση των σπόρων *A. barba-jovis* σκαριφισμένων ή μη ήταν 20 °C, αν και οι σπόροι βλάστησαν ικανοποιητικά σε εύρος θερμοκρασιών, από 10 έως 25 °C. Αποθήκευση έως και 3 έτη σε θερμοκρασία δωματίου δεν άλλαξε τις κατάλληλες θερμοκρασίες για βλάστηση. Χαμηλότερες ή υψηλότερες θερμοκρασίες από το προηγούμενο εύρος θερμοκρασιών μείωναν προοδευτικά τη βλαστικότητα. Οι σπόροι, βλάστησαν εξ' ίσου καλά σε φως ή σκοτάδι. Παρατηρήθηκε επίσης υψηλή βιωσιμότητα των σπόρων με την πάροδο του χρόνου, μέχρι και δύο χρόνια από τη συλλογή τους, ενώ περαιτέρω αποθήκευση μείωσε το ποσοστό βλάστησης. Οι σπόροι των ειδών *C. creticum* και *C. nepeta* σημείωσαν τα υψηλότερα ποσοστά βλάστησης στη θερμοκρασία των 15 ή 20 °C, αμέσως μετά τη συλλογή και έως 12 μήνες μετά, ενώ στους 5, 35 και 40 °C οι σπόροι δεν βλάστησαν. Χαμηλότερες ή υψηλότερες θερμοκρασίες από τη βέλτιστη θερμοκρασία, μείωναν προοδευτικά τη βλαστικότητα. Η βλαστικότητα των σπόρων και των δύο ειδών διατηρήθηκε σε υψηλά επίπεδα μετά από 12 μήνες αποθήκευση. Η βέλτιστη θερμοκρασία για βλάστηση των σπόρων *B. acetabulosa* ήταν η θερμοκρασία των 15 °C, μετά από δύο έως και 48 μήνες αποθήκευσης, αν και οι σπόροι βλάστησαν ικανοποιητικά σε ένα μεγαλύτερο εύρος θερμοκρασιών, από 10 έως 20 °C. Παρατηρήθηκε επίσης ότι η βλάστηση των σπόρων παρεμποδίστηκε όταν η θερμοκρασία ξεπέρασε τους 20 °C, ενώ στους 5 °C οι σπόροι δεν βλάστησαν. Η βλαστικότητα των σπόρων διατηρήθηκε σε υψηλά επίπεδα μετά από 24 μήνες αποθήκευση, ενώ η περαιτέρω αποθήκευση των σπόρων (36 και 48 μήνες) οδήγησε σε μείωση της βλαστικότητας σε όλες τις θερμοκρασίες. Η υψηλή βλαστικότητα αμέσως μετά τη συλλογή των σπόρων των ειδών *B. acetabulosa*, *C. creticum* και *C. nepeta* και έως και ένα - δύο χρόνια μετά τη συλλογή, χωρίς κάποια προμεταχείριση των σπόρων, υποδηλώνει την απουσία ληθάργου. Τέλος οι σπόροι του

είδους *S. hymettia* είχαν χαμηλή ικανότητα βλάστησης σε *ex vitro* συνθήκες, ενώ σε *in vitro* συνθήκες δεν επιτεύχθηκε. Για αυτό το λόγο η μέθοδος που προτείνεται είναι η *ex vitro* βλάστηση των σπόρων, την άνοιξη και το καλοκαίρι, σε μίγμα τύρφης: περλίτη (1:1, v/v) χωρίς προμεταχείριση.

II.I. ΣΚΟΠΟΣ

Με στόχο λοιπόν την αξιοποίησή των ειδών *Anthyllis barba-jovis*, *Ballota acetabulosa*, *Clinopodium creticum*, *Clinopodium nepeta* και *Scabiosa hymettia* ως καλλωπιστικά σε παρτέρια, βραχόκηπους, εκτατικά φυτοδάματα, καθώς και χώρους με υποβαθμισμένο εδαφικό περιβάλλον, όπως οι αρχαιολογικοί χώροι, στην παρούσα εργασία, μελετήθηκε η οικοφυσιολογία των σπόρων τους, για να αξιολογηθεί η σπορά ως μέθοδος πολλαπλασιασμού αυτών των ειδών.

Συγκεκριμένα διερευνήθηκε η ύπαρξη ή μη ληθάργου, ο καθορισμός των ορίων θερμοκρασίας για βλάστηση των σπόρων, καθώς και η επίδραση της φωτοπερίόδου. Μελετήθηκε επίσης η επίδραση του χρόνου διατήρησης - αποθήκευσης στη βλαστικότητα των σπόρων *in vitro* και *ex vitro*.

Π.Ι.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Π.Ι.1.1 Οικοφυσιολογία των σπόρων

Η οικοφυσιολογία των σπόρων συνδέεται με την ικανότητα επιβίωσης και φυτρωτικότητας των σπόρων μετά την ωρίμανσή τους στο μητρικό φυτό. Η ικανότητα επιβίωσης και φυτρωτικότητας των σπόρων είναι μια σύνθετη έκφραση των χαρακτηριστικών των σπόρων και ειδών που μεταβάλλονται από το περιβάλλον (Long *et al.*, 2015). Τα χαρακτηριστικά των σπόρων και των ειδών συμβάλλουν στην ικανότητα επιβίωσης του σπόρου, στη βλάστηση ή τη θνησιμότητα του, ενώ η έκθεση των σπόρων σε διάφορους εδαφοκλιματικούς παράγοντες καθορίζουν τελικά πότε και πώς βλαστάνουν (Long *et al.*, 2015). Ως εκ τούτου, η κατανόηση της οικοφυσιολογίας των σπόρων είναι θεμελιώδους σημασίας για τον πολλαπλασιασμό, τη διάδοση και τη διάσωση των ειδών.

Π.Ι.1.1.1 Η σημασία της ικανότητας επιβίωσης των σπόρων

Η ικανότητα επιβίωσης των σπόρων καθορίζει την ύπαρξή των ειδών εντός της φυτοκοινωνίας και γι' αυτό είναι σημαντικός παράγοντας για την οικολογία της φυτοκοινωνίας, τη διαχείρισή της και συνεπώς και των ζιζανίων αλλά και για προγράμματα αποκατάστασης της χλωρίδας (Long *et al.*, 2015). Και μπορεί να χαρακτηριστεί ως παροδική (σπόροι που επιβιώνουν <1 έτος), βραχύβια (σπόροι που επιβιώνουν >1 έτος) ή μακρόβια (μακράς διάρκειας ζωής πάνω 3 ή 5 χρόνια) (Thompson *et al.*, 1998, Long *et al.*, 2008).

Η ικανότητα επιβίωσης των σπόρων κάνει εφικτή τη διασπορά τους από φυτικά είδη στο χώρο αλλά και μέσα στο χρόνο, αυξάνοντας με αυτόν τον τρόπο την πιθανότητα οι σπόροι ενός φυτού να αντιμετωπίσουν ευνοϊκές συνθήκες βλάστησης και εγκατάστασης αλλά και την αποφυγή της βλάστησής τους σε αντίξοες συνθήκες (Cohen, 1966, Venable and Brown, 1988, Οοί, 2012). Οι Dalling *et al.* (2011) αναφέρουν ότι οι σπόροι για να διατηρηθούν μέχρις ότου οι συνθήκες είναι ευνοϊκές για την εγκατάστασή τους, τα μητρικά φυτά έχουν παράγει έναν κατάλληλο αριθμό σπόρων που θα αναπτύξουν συγκεκριμένες προσαρμογές στο λήθαργο, βλάστηση, μακροζωία και μορφολογικά χαρακτηριστικά πάντα σε σχέση με το περιβάλλον. Η ικανότητά επιβίωσης των σπόρων αναπτύσσει μηχανισμούς που κάνουν δυνατή τη βλάστηση ανταγωνιστικών ειδών σε διαφορετικές χρονικές στιγμές, με διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες, («φαινόμενο αποθήκευσης», Facelli *et al.*, 2005).

Όλες αυτές οι στρατηγικές ευνοούν την επιβίωση των ειδών στο περιβάλλον τους και ως εκ τούτου, ενισχύουν την ποικιλομορφία των φυτικών κοινοτήτων.

Αποτελεί ένα χρήσιμο εργαλείο για τα προγράμματα που στοχεύουν στην αποκατάσταση υποβαθμισμένων εδαφών (Long *et al.*, 2015). Σημαντική πηγή σπόρων για αποκατάσταση αποτελεί για παράδειγμα το έδαφος που αρχικά απομακρύνεται κατά τη διάρκεια εργασιών και στη συνέχεια επιστρέφει (Bossuyt and Honnay, 2008). Σε άλλες περιπτώσεις, οι σπόροι συλλέγονται και αποθηκεύονται *ex situ* για μελλοντική χρήση στην αποκατάσταση των υποβαθμισμένων εκτάσεων. Οι στρατηγικές ανάπλασης καθορίζονται φυσικά ανάλογα με το είδος των σπόρων (μακρόβιοι, παροδικοί ή βραχύβιοι σπόροι) (Long *et al.*, 2015). Για τη μεγιστοποίηση των αποτελεσμάτων της αποκατάστασης είναι σημαντική η μελέτη και κατανόηση των φυσιολογικών αλλαγών (π.χ. λήθαργος) που θα είχαν υποστεί οι σπόροι *in situ* (Merritt and Dixon, 2011).

Η κατανόηση της ικανότητας επιβίωσης των σπόρων είναι ζωτικής σημασίας για τη στρατηγική διαχείριση των ζιζανίων στα φυσικά και αγροτικά συστήματα, διότι επηρεάζει τις αποφάσεις σχετικά με την ιεράρχηση των ειδών για έλεγχο και τη διάρκεια των προγραμμάτων διαχείρισης που απαιτούνται για την εξαφάνιση των σπόρων των ζιζανίων (Panetta, 2007, Gardarin *et al.*, 2010). Επιπρόσθετα οι στρατηγικές διαχείρισης και αντιμετώπισης των ζιζανίων προϋποθέτουν την κατανόηση της δυναμικής και της λειτουργίας της «μόνιμης τράπεζας» σπόρων στο έδαφος (Long *et al.*, 2011b), ώστε να εξασφαλιστεί η ομοιομορφία της καλλιέργειας και συνεπώς η αποτελεσματικότητα και η μεγιστοποίηση της συγκομιδής (Forcella *et al.*, 2000).

Επιτρέπει επίσης να αποθηκεύονται οι σπόροι *ex situ* και να χρησιμοποιούνται στην κοινωνία (Long *et al.*, 2015). Μετά την ωρίμανσή τους οι σπόροι μπορούν είτε να διασκορπιστούν στο έδαφος ή να παραμείνουν στην κόμη του φυτού ή να αποθηκευτούν *ex situ* μέχρι τη χρονική στιγμή που είτε θα βλαστήσουν είτε θα οδηγηθούν σε θνησιμότητα (Long *et al.*, 2015). Οι σπόροι μπορούν να παραμείνουν για πολύ μεγάλο χρονικό διάστημα σε αποθήκευση *ex situ* όπου οι συνθήκες είναι σχετικά σταθερές, π.χ. 30.000 χρόνια για τους σπόρους της *Silene Stenophylla* που ανακτήθηκαν από μια σπηλιά στη Σιβηρία όπου έβρισκαν καταφύγιο σκίουροι. Είναι η πρώτη φορά που επιστήμονες καταφέρνουν τόσο παλιοί σε ηλικία σπόροι να βλαστήσουν (Yashina *et al.*, 2012). Πράγματι, οι εξειδικευμένες τράπεζες σπόρων *ex situ*, όπως η Παγκόσμια τράπεζα σπόρων Σβάλμπαρντ στη Νορβηγία (Svalbard Global Seed Vault), αξιοποιούν την ικανότητα των σπόρων να επιβιώσουν για μακρές περιόδους υπό βέλτιστες συνθήκες αποθήκευσης (-18 °C, περίπου 15% σχετική υγρασία και περιορισμένη πρόσβαση στο οξυγόνο). Οι συνθήκες αυτές εξασφαλίζουν

χαμηλή μεταβολική δραστηριότητα και καθυστερήσουν τη γήρανση των σπόρων (Walters *et al.*, 2005c, Probert *et al.*, 2009). Αντιθέτως, οι σπόροι που διασκορπίζονται στο φυσικό περιβάλλον (έδαφος) αντιμετωπίζουν δυναμικές κλιματικές συνθήκες, συνθήκες εδάφους και τοποθεσίας, με αποτέλεσμα μεταβλητούς χρόνους επιβίωσης (Long *et al.*, 2015).

Π.Ι.1.1.2 Παράγοντες που συμβάλλουν στην ικανότητα επιβίωσης

Υπάρχουν πολύ παράγοντες που συμβάλλουν στην ικανότητα επιβίωσης των σπόρων όπως είναι οι γενετικοί, περιβαλλοντικοί (συμπεριλαμβανομένων των κλιματικών, εδαφικών και άλλων παραγόντων του τόπου), θήρευση από τα ζώα και η μικροβιακή αποσύνθεση κτλ. (Σχ. Π.Ι.1).



Σχήμα Π.Ι.1. Παράγοντες που επηρεάζουν την ικανότητα επιβίωσης των σπόρων.

α) Χαρακτηριστικά των σπόρων που επηρεάζουν την ικανότητα επιβίωσής τους

Τα χαρακτηριστικά των σπόρων που επηρεάζουν την ικανότητα επιβίωσής τους, μπορούν να ποικίλουν ανάλογα με το είδος και τον πληθυσμό των σπόρων και μεταβάλλονται με «έκθεση» σε αβιοτικούς και βιοτικούς παράγοντες, σε περιβάλλοντα πριν

και μετά τη διασπορά των σπόρων στο έδαφος (Long *et al.*, 2015). Παρόλ' αυτά, ορισμένα είδη ή πληθυσμοί επιβιώνουν περισσότερο από άλλα είδη κάτι το οποίο οφείλεται σε μια έμφυτη γενετική βάση στην ικανότητα επιβίωσης των σπόρων (Long *et al.*, 2015).

(i) Κατάλληλος χρόνος συλλογής των σπόρων

Ένας ασφαλής, γενικός κανόνας είναι να συλλέγονται οι σπόροι όταν ξεκινά η διασπορά τους στη φύση (Baskin and Baskin, 2001). Οι σπόροι πρέπει να συλλέγονται στο στάδιο πλήρους ωρίμανσης. Παρόλ' αυτά υπάρχουν σπόροι που μπορούν να βλαστήσουν ανώριμοι, με απαραίτητη προϋπόθεση να τοποθετηθούν για βλάστηση αμέσως μετά τη συλλογή τους (Hume, 1984).

(ii) Λήθαργος και βλάστηση των σπόρων

Η τάση των σπόρων να βλαστήσουν επηρεάζεται από το λήθαργο. Ο λήθαργος είναι ένα πολύπλοκο φαινόμενο και ο βαθμός του ποικίλει ακόμα και μεταξύ διαφορετικών ατόμων του ίδιου είδους, αφού μεταβάλλεται από περιοχή σε περιοχή, αλλά και από χρονιά σε χρονιά (Poulsen, 1996, Wolf and Kamondo, 1993). Με βάση την ταξινόμηση του ληθάργου από τους Baskin and Baskin (2004), η οποία αναθεωρείται διεξοδικά από τους Finch-Savage and Leubner-Metzger (2006), ο λήθαργος του σπόρου μπορεί να χωριστεί ευρέως στο (i) φυσικό [λήθαργος περιβλήματος (coat-imposed dormancy)], στον οποίο οι σπόροι διαθέτουν αδιαπέραστο περίβλημα με αποτέλεσμα το νερό να μην μπορεί να φθάσει στο έμβρυο. (ii) φυσιολογικό, στον οποίο η ισορροπία των ενδογενών ορμονών, του αμπισικικού οξέος (ABA) και του γιββερελλικού οξέος (GA₃), αποτρέπουν τη βλάστηση (iii) μορφολογικό, στην οποία το έμβρυο δεν έχει αναπτυχθεί πλήρως κατά τη στιγμή της διασποράς του σπόρου (iv) μορφοφυσιολογικό, στον οποίο το έμβρυο δεν αναπτύσσεται και μια ανισορροπία ορμονών αναστέλλει περαιτέρω τη βλάστηση του σπόρου και (v) συνδυαστικό, στον οποίο οι σπόροι διαθέτουν φυσικό φραγμό στην πρόσληψη νερού (αδιαπέραστο περίβλημα) καθώς και φυσιολογικό λήθαργο (Long *et al.*, 2015). Σύμφωνα με μερικούς ερευνητές, ο φυσιολογικός λήθαργος δεν συμβάλει στην ικανότητα επιβίωσης και δεν είναι απαραίτητος (Thompson *et al.*, 2003, Honda, 2008, Thompson and Ooi, 2010, Long *et al.*, 2015). Η άποψη αυτή στηρίζεται στο διαχωρισμό της διακοπής του ληθάργου και της διέγερσης της βλάστησης με τρόπο που οι σπόροι αναμένοντας τη διέγερση προς βλάστηση παραμένουν σε μη αδρανοποιημένη κατάσταση (Thompson *et al.*, 2003, Thompson and Ooi, 2010, Long *et al.*, 2015).

Είναι χαρακτηριστική η περίπτωση των 2 ειδών *Arbutus* (*A. Andrachne* και *A. unedo*) και του φυσικού τους υβριδίου *A. x andrachnoides*, που ενώ θεωρείτο ότι έχουν λήθαργου, διαπιστώθηκε ότι βλάστησαν σε πολύ υψηλό ποσοστό σε χαμηλές θερμοκρασίες 10 - 15 °C αμέσως μετά τη συλλογής τους και για ένα χρόνο αργότερα μετά από αποθήκευση σε θερμοκρασία δωματίου, ενώ στους 20°C βλάστησαν μόνο σπόροι πρόσφατης συλλογής (Bertsouklis and Papafotiou, 2013). Από αυτή την άποψη, εναλλαγές φωτός, καπνού, νιτρικών ή ημερήσιων θερμοκρασιών δεν σπάνε το λήθαργο, αλλά διεγείρουν τη βλάστηση. Η έρευνα των Finch-Savage and Footitt (2012) υποστηρίζει ότι η διακοπή του ληθάργου και η διέγερση της βλάστησης δεν είναι ξεχωριστά γεγονότα. Ένα ευρύ φάσμα περιβαλλοντικών σημάτων μπορεί να αλλάξει το λήθαργο, αλλά οι σπόροι πρέπει να εκτεθούν σε αυτά διαδοχικά για να διακοπή πλήρως ο λήθαργος και να προχωρήσει η βλάστηση. Αυτό οφείλεται στο γεγονός ότι οι σπόροι με λήθαργο συνήθως χρειάζονται περισσότερο χρόνο για να βλαστήσουν σε σύγκριση με τους σπόρους χωρίς λήθαργο (Honda, 2008, Saatkamp *et al.*, 2011b) και μπορεί να είναι πιο ανθεκτικοί στη γήρανση, επομένως μπορούν να επιβιώσουν περισσότερο στο έδαφος (Long *et al.*, 2015).

Ο φυσικός (περιβληματικός) λήθαργος προϋποθέτει τη διαμόρφωση ενός αδιαπέραστου και σκληρού περιβλήματος που ευνοεί την ικανότητα επιβίωσης, επιτρέποντας τη βλάστηση του σπόρου μόνο μετά τη διάρρηξή του όταν δηλαδή θα είναι δυνατή η είσοδος του και η προσέγγιση του εμβρύου (Baskin, 2003, Long *et al.*, 2015). Το σκληρό περίβλημα προστατεύει επίσης το σπόρο από τη γήρανση καθώς δεν επιτρέπει ανεπιθύμητες μεταβολές της περιεχόμενης υγρασίας (Long *et al.*, 2008). Σπόροι με βαθύτερο φυσιολογικό λήθαργο μπορεί να πλεονεκτούν σε σχέση με σπόρους που ληθαργούν ελαφρύτερα. Οι Turner *et al.* (2009) αναφέρουν σχετικά πως η μεθωρίμανση σε υψηλό ποσοστό υγρασίας οδηγεί μεν στη βλάστηση όλων των σπόρων, ανεξαρτήτως του βαθμού του ληθάργου, αλλά η βιωσιμότητα των σπόρων στη συνέχεια μειώνεται στα είδη με λήθαργο μικρότερης έντασης.

Κατά τους Rohmeder (1972) και Krüssmann (1981), σπόροι με σκληρό περίβλημα θεωρούνται αυτοί οι οποίοι μετά από εμβάπτιση σε νερό για 10 ημέρες συνεχίζουν να είναι σκληροί. Ο λήθαργος μπορεί να ανασταλεί με την έκθεση σε χαμηλή θερμοκρασία (Nikolaeva, 1969), ενώ αναφέρεται ότι η διατήρηση των σπόρων, σε θερμοκρασία δωματίου, μπορεί να απομακρύνει το λήθαργο του σπόρου (Toole and Toole, 1941). Οι συνθήκες του περιβάλλοντος που διακόπτουν το λήθαργο κι επηρεάζουν τη βλαστικότητα είναι ανάλογες με τον τύπο του ληθάργου (Long *et al.*, 2015). Οι ορμονικές μεταβολές εντός του σπόρου, καθοδηγούνται από αλλαγές στο φυσικό περιβάλλον του σπόρου (π.χ. υγρασία, θερμοκρασία, φως) και μειώνουν το φυσιολογικό λήθαργο εντός του σπόρου. Όσον αφορά

τους σπόρους με σκληρό περίβλημα αυτοί είναι δυνατόν να καταστούν κατάλληλοι για βλάστηση με αποξήρανση, αλλά και υγρή ή ξηρή θέρμανση στο έδαφος (Baskin and Baskin, 2001, van Klinken, *et al.*, 2006).

Οι φυσικές διεργασίες που μπορούν να συμβάλλουν στη μείωση του φυσιολογικού ληθάργου είναι: (i) οι παρατεταμένες ξηρές συνθήκες μετά την ωρίμανση των σπόρων, (ii) η ψυχρή και θερμή στρωμάτωση (υγρές συνθήκες κάτω ή πάνω από 10 °C αντίστοιχα), (iii) οι εναλλασσόμενες περίοδοι διαβροχής και ξήρανσης, (iv) οι εναλλασσόμενες θερμοκρασίες και το (v) το φως (Long *et al.*, 2015).

Ο φυσιολογικός λήθαργος μπορεί επίσης να μετριαστεί ή να παρακαμφθεί μέσω της δράσης εξωγενών ενώσεων που απαντώνται στο φυσικό περιβάλλον, συμπεριλαμβανομένων: (i) των καρρικινών (μια ομάδα ρυθμιστών ανάπτυξης φυτών που βρίσκονται στον καπνό του καύσιμου φυτικού υλικού) και του γλυκερονιτριλίου (προέρχεται από τον καπνό και την τέφρα), (ii) νιτρικών αλάτων (προέρχονται την αποσύνθεση βιολογικών υλικών και συνθετικών λιπασμάτων, (iii) του οξειδίου του αζώτου (προέρχεται από την *in vivo* μετατροπή οργανικών και ανόργανων νιτρικών αλάτων) και (iv) του αιθυλενίου (Long *et al.*, 2015).

Επιπρόσθετα, οι σπόροι με φυσιολογικό λήθαργο προσαρμόζουν την ένταση του λήθαργού τους ανάλογα με μια σειρά σημάτων (Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006, Long *et al.*, 2015), όπως για παράδειγμα τη θερμοκρασία του εδάφους και την εδαφική υγρασία που υποδηλώνουν την καταλληλότητα της εποχής και του κλίματος για τη βλάστηση των σπόρων και την ανάπτυξη των φυτών (Vleeshouwers *et al.*, 1995, Benech-Arnold *et al.*, 2000, Vleeshouwers and Bouwmeester, 2001, Footitt *et al.*, 2011, 2013). Τα σήματα αυτά μεταβάλλουν το βαθμό του ληθάργου διακόπτοντας τελικά το λήθαργο και οδηγώντας το σπόρο στη βλάστηση όπως για παράδειγμα συμβαίνει με το φως, τον καπνό, τα νιτρικά και τις εναλλασσόμενες θερμοκρασίες, (Long *et al.*, 2011b, c Footitt *et al.*, 2013 και Long *et al.*, 2015). Χωρίς τις κατάλληλες συνθήκες ο σπόρος δεν βλαστάνει για ένα έτος κι έτσι η τελικά η βλάστηση θα λάβει χώρα όταν οι συνθήκες θα είναι κατάλληλες για την εγκατάσταση των φυτών (Batlla and Benech-Arnold, 2010). Ο βαθμός ευαισθησίας των σπόρων με φυσιολογικό λήθαργο στα φυσικά και χημικά αυτά σήματα επηρεάζεται από το είδος και η ηλικία των σπόρων (Baker *et al.*, 2005, Long *et al.*, 2011b, c, Long *et al.*, 2015).

Ο λήθαργος δεν ενισχύει τους μηχανισμούς αύξησης της ικανότητας επιβίωσης των σπόρων εντός του εδάφους, αλλά εξασφαλίζει ότι η βλάστηση θα συμβεί την κατάλληλη χρονική στιγμή, όταν ο σπόρος θα συναντήσει τις κατάλληλες και ευνοϊκές συνθήκες για ανάπτυξη και η στρατηγική αυτή μπορεί να είναι διαφορετική και προσαρμοσμένη με τις

κλιματικές συνθήκες και τον οικότοπο (Gutterman, 2000, Long *et al.*, 2011b). Σπόροι με φυσιολογικό λήθαργο μπορούν να διατηρήσουν τους μηχανισμούς του ληθάργου ανεξάρτητα από το περιβάλλον τους και επιπλέον να επιβιώσουν για περισσότερο από μια δεκαετία τόσο στις ξηρές όσο και στις υγρές (Froud-Williams *et al.*, 1986, Gutterman, 2000, Hill and Kloet, 2005, Gutterman and Gendler, 2005).

Η αυξομείωση των ενδογενών φυτορυθμιστικών ουσιών εντός του σπόρου συσχετίζεται με τους μηχανισμούς του λήθαργου, για παράδειγμα η αυξημένη ποσότητα του αμπισικού οξέος συσχετίστηκε με το μεγαλύτερο βαθμό ληθάργου του *Arabidopsis thaliana* κατά το χειμώνα, ενώ η διακοπή του ληθάργου κατά την άνοιξη συνέπεσε με τη μείωση της συγκέντρωσης του αμπισικού οξέος και με την αύξηση της συγκέντρωσης του γιβερελλικού οξέος (Footitt *et al.*, 2011).

Είναι σημαντικό ότι μετά τη διακοπή του λήθαργου οι σπόροι δεν μπορούν να επανέλθουν στην προηγούμενη κατάσταση και δεν μπορεί να αντιστραφεί η αλλαγή που έχει γίνει στη διαπερατότητα του περιβλήματος των σπόρων (Jayasuriya *et al.*, 2009). Εφόσον βέβαια το περίβλημα δεν αλλοιωθεί στους φυσικά αδρανείς σπόρους η ευαισθησία στους παράγοντες διακοπής του λήθαργου (π.χ. θερμοκρασία) εξαρτάται από το είδος του φυτού, χαρακτηριστικά των πληθυσμών κ.ά. Πρόκειται για τον «κύκλο ευαισθησίας» που διακρίνεται από τον «κύκλο του ληθάργου», ο οποίος συνεπάγεται τη μείωση του βαθμού του ληθάργου και μετέπειτα την αύξησή του στους σπόρους με φυσιολογικό λήθαργο (Jayasuriya *et al.*, 2009).

iii) Συνθήκες βλάστησης

Οι σπόροι φυτρώνουν όταν οι περιβαλλοντικές συνθήκες (υγρασία, οξυγόνο, θερμοκρασία και φως) είναι ευνοϊκές για την εμφάνιση και την επιβίωσή τους. Αφενός ο λήθαργος μπορεί να εμποδίσει τους σπόρους να φυτρώσουν, ακόμη και εάν οι συνθήκες του περιβάλλοντος είναι ευνοϊκές, αφετέρου οι μη αδρανείς σπόροι μπορεί να μην φυτρώσουν εάν οι περιβαλλοντικές συνθήκες δεν ευνοούν τη βλάστηση (Ooi *et al.*, 2007). Ωστόσο για τη βλάστηση των σπόρων διαφορετικών ειδών απαιτούνται διαφορετικές θερμοκρασίες και ποσοστά υγρασίας (Gutterman, 1994, 2000, Rowse and Finch-Savage, 2003, Zhang *et al.*, 2010).

iv) Μακροζωία των σπόρων

Η μακροζωία των σπόρων είναι βασικός και καθοριστικός παράγοντας της ικανότητας επιβίωσής τους (Long *et al.*, 2008) και διαμορφώνεται ως αποτέλεσμα της έκφρασης των φυσιολογικών χαρακτηριστικών, όπως η κυτταρική κινητικότητα, οι ενδογενείς εσωτερικές προστατευτικές ουσίες και η ικανότητα των κυττάρων να αντιστέκονται και να αποκαθιστούν βλάβες.

Το νερό εντός των σπόρων και η θερμοκρασία είναι οι σημαντικότεροι παράγοντες που επηρεάζουν τις βιοχημικές αντιδράσεις «γήρανσης» των σπόρων (Ellis and Roberts, 1981, Walters *et al.*, 2005a). Με βάση αυτούς τους παράγοντες οι δοκιμές για την εκτίμηση της μακροζωίας περιλαμβάνουν την τοποθέτηση των σπόρων σε ελεγχόμενες συνθήκες θερμοκρασίας και υγρασίας. Με αυτόν τον τρόπο μπορεί να ελεγχθεί η φυσιολογική τους ικανότητα στην απώλεια βλαστικότητας και της βιωσιμότητας, χαρακτηριστικών που συνδέονται με τη γήρανση (Lehner *et al.*, 2008, Long *et al.*, 2009).

v) Αποξήρανση των σπόρων

Οι σπόροι μπορούν να επιβιώσουν από την αποξήρανση, λόγω των συστατικών (π.χ. μη αναγωγικών σακχάρων και της επαγωγής των πολυάριθμων πρωτεϊνών αργής εμβρυογένεσης) που συσσωρεύονται κατά τα τελευταία στάδια της ανάπτυξης των σπόρων, τα οποία μειώνουν τη μοριακή κινητικότητα και περιορίζουν τις χημικές αντιδράσεις (Colville and Kranner, 2010, Leprince and Buitink, 2010). Οι σπόροι μπορούν να παραμείνουν σε αυτή τη κατάσταση (χαμηλής μεταβολικής δραστηριότητας) για μεγάλα χρονικά διαστήματα (Sallon *et al.*, 2008), και έτσι διατηρούνται σε ξηρές συνθήκες *in situ* και *ex situ*. Βέβαια υπάρχουν και οι σπόροι που είναι ευαίσθητοι στην αποξήρανση και είναι συνηθέστεροι σε είδη που υπάρχουν στα τροπικά υγρά κλίματα και συχνά περιέχονται σε σαρκώδη φρούτα (Berjak and Pammenter, 2008).

vi) Σάκχαρα - Λιπίδια -Πρωτεΐνες των σπόρων

Η μακροζωία των σπόρων επηρεάζεται από τα σάκχαρα (π.χ. σακχαρόζη, ραφινόζη, σταχυόζη, βερμπισκόζη), διότι μπορούν να βοηθήσουν στην προστασία των πρωτεϊνών και των φωσφολιπιδίων από ζημιές που προκλήθηκαν από τη θερμότητα και την αποξήρανση (Bernal-Lugo and Leopold, 1995, 1998, Long *et al.*, 2015). Επιπρόσθετα επηρεάζεται από τη λιπιδική σύνθεση των κυτταρικών μεμβρανών τους (Golovina *et al.*, 2010) και από την περιεκτικότητα σε έλαιο του σπόρου (Walters *et al.*, 2005c, Probert *et al.*, 2009, Nagel and Börner, 2010, Gardarin *et al.*, 2010, Golovina *et al.*, 2010). Οι μακρόβιοι σπόροι τείνουν να

έχουν πιο σταθερές κυτταρικές μεμβράνες (Golovina *et al.*, 2010). Επιπλέον η γήρανση των σπόρων προκαλεί αλλαγές στην οργάνωση των αποθεμάτων λιπιδίων (Walters *et al.*, 2005b), απώλεια φωσφολιπιδίων μεμβράνης (Devaiah *et al.*, 2007) και υπεροξειδωση λιπιδίων (Murthy and Sun, 2000), με αποτέλεσμα τη μείωση της μακροζωίας των σπόρων. Τέλος η εφύγρανση του σπόρου αποκαθιστά τις βλάβες που υφίσταται ο σπόρος κατά τη διασπορά του από το μητρικό φυτό για να γίνει δυνατή η ανάδυση και βλάστηση των υγείων σπόρων και στη διαδικασία αυτή συμβάλλουν σημαντικοί παράγοντες βιωσιμότητας και μακροζωίας των σπόρων, όπως είναι αρκετές πρωτεΐνες (Hundertmark *et al.*, 2011).

vii) Επίδραση των αντιοξειδωτικών στη γήρανση των σπόρων

Η απώλεια της βιωσιμότητας των σπόρων κατά τη διάρκεια της διαδικασίας γήρανσης συνδέεται με τη συσσώρευση οξειδωτικής βλάβης και τις αλλαγές στην ικανότητα των σπόρων να εξουδετερώσουν και να επιδιορθώσουν αυτή τη ζημία (Goel *et al.*, 2003, Bailly, 2004, Munne-Bosch *et al.*, 2011). Η συμμετοχή των αντιοξειδωτικών στη μακροζωία των σπόρων έχει αποδειχθεί σε αρκετές μελέτες που χρησιμοποιούν μεταλλαγμένα φυτά με τροποποιημένα επίπεδα αντιοξειδωτικών μορίων ή ενζύμων (Clerkx *et al.*, 2004, Sattler *et al.*, 2004, Mène-Saffrané *et al.*, 2010). Στο έδαφος, οι σπόροι υφίστανται κύκλους αφυδάτωσης και επανυδάτωσης που μπορούν να επεκτείνουν την ικανότητα επιβίωσης των σπόρων επαναφέροντας την αντιοξειδωτική ικανότητα (Long *et al.*, 2011a) μέσω της επαγωγής αντιοξειδωτικών ενζύμων (π.χ. καταλάσης και δισμουτάσης υπεροξειδίου) και τη μείωση της δισουλφιδικής γλουταθειόνης μέσω της αυξημένης δραστηριότητας αναγωγάσης γλουταθειόνης (Long *et al.*, 2015).

β) Χαρακτηριστικά των σπόρων που σχετίζονται με τη διασπορά, την άμυνα και τη βλάστηση

Η τάση ενός σπόρου να παραμείνει ζωντανός στο έδαφος εξαρτάται από το περιβάλλον διασποράς του και την ικανότητα να αντιστέκεται στην καταστροφή από τα ζώα και τους μικροοργανισμούς, παράγοντες που επηρεάζονται από το μέγεθος, τα ειδικά χαρακτηριστικά των περιβλημάτων, τους μηχανισμούς διασποράς των σπόρων και την έκκριση χημικών ενώσεων από τους σπόρους (Long *et al.*, 2015).

i) Μέγεθος σπόρου

Το μέγεθος του σπόρου συνδέεται με τον κίνδυνο εντοπισμού από τους θηρευτές του. Μεγαλύτεροι σπόροι μπορεί να εντοπίζονται ευκολότερα, αλλά από την άλλη μεριά είναι πιο δύσκολοι στο χειρισμό τους από τους θηρευτές οπότε επέρχεται ισορροπία όσον αφορά

στον κίνδυνο καταστροφή τους (Bradford and Westcott, 2011, Tasker *et al.*, 2011). Υπάρχουν πολλές μελέτες, οι οποίες έχουν καταγράψει και συσχετίσει το μέγεθος και το σχήμα των σπόρων με την ικανότητα επιβίωσης (Thompson *et al.*, 2001, Bekker *et al.*, 2003, Honda, 2008, Zhao *et al.*, 2011b). Επίσης οι μεγαλύτεροι σπόροι τείνουν να είναι βραχύτεροι και δεν ενσωματώνονται εύκολα στο έδαφος όσο οι μικρότεροι, οι οποίοι πέφτουν εύκολα μέσω των ρωγμών (Bekker *et al.*, 1998a), επιπλέον μπορεί να είναι πιο ανθεκτικοί σε περιβάλλοντα όπου η συχνότητα μιας πυρκαγιάς είναι πολύ υψηλή (Gómez-González *et al.*, 2011). Ωστόσο, άλλες μελέτες έχουν αναφέρει ότι οι μεγαλύτεροι σπόροι είναι περισσότερο ανθεκτικοί ή ότι η ικανότητα επιβίωσης των σπόρων δεν σχετίζεται με το μέγεθος (Leishman and Westoby, 1998, Moles *et al.*, 2003, Hölzel and Otte, 2004).

ii) Χαρακτηριστικά των εξωτερικών ιστών και ενώσεων των σπόρων

Οι ιστοί που περιβάλλουν το έμβρυο και το ενδοσπέρμιο, προσφέρουν τόσο φυσική όσο και χημική προστασία έναντι της θήρευσης και της μικροβιακής αποσύνθεσης (Fuerst *et al.*, 2011 και Dalling *et al.*, 2011). Τέτοιοι ιστοί είναι όπως:

- 1) Το σκληρό περίβλημα των σπόρων: που προστατεύει τους σπόρους από τους μικροοργανισμούς και από την απορρόφηση νερού (Baskin and Baskin, 2001, 2006, Morbidoni *et al.*, 2008).
- 2) Τα παχύτερα στρώματα περιβλήματος των σπόρων που δίνουν στους σπόρους μεγαλύτερη ανθεκτικότητα στη θήρευση και καταστροφή (Gardarin *et al.*, 2010).
- 3) Η παρουσία βλενώδους υλικού: που καθιστά όλους τους σπόρους δυσκολότερους στην επεξεργασία από τα αρπακτικά και επομένως λιγότερο ελκυστικούς (Engelbrecht and Garcia-Fayos, 2012).
- 4) Το χρώμα των σπόρων: που μπορεί να επηρεάσει την ευαισθησία τους στη θήρευση (Lev-Yadun and Néeman, 2013) και μπορεί να είναι ένας δείκτης της περιεκτικότητας των αντιμικροβιακών ενώσεων στο στρώμα του σπόρου (Lepinić *et al.*, 2006).
- 5) Άλλα συστατικά της μονάδας διασποράς, όπως το ξυλώδες ενδοκάρπιο (π.χ. *Chrysanthemoides monilifera* - Schoeman *et al.*, 2010), που προσδίδει ακαμψία (*Raphanus raphanistrum* - Cousens *et al.*, 2010) και μπορεί να εμποδίσει τη βλάστηση των σπόρων (Long *et al.*, 2011b).
- 6) Οι φαινολικές ενώσεις, οι οποίες συμβάλλουν στη μακροζωία και την ικανότητα επιβίωσης των σπόρων, περιορίζοντας τη διαπερατότητα των σπόρων από το νερό και το οξυγόνο. (Davis *et al.*, 2008, Xiao *et al.*, 2008).

iii) Μηχανισμοί διασποράς των σπόρων

Ο Benvenuti (2007a, b) αναφέρει ότι υπάρχουν δομές προσαρμοσμένες απευθείας στους σπόρους ή στους καρπούς, οι οποίες μπορούν να διευκολύνουν τη διασπορά των σπόρων με αποτέλεσμα να επηρεάζουν την ικανότητα επιβίωσης σε φυσικά και γεωργικά περιβάλλοντα. Για παράδειγμα: α) οι σπόροι του *Taraxacum officinale* οι οποίοι σχηματίζουν θυσανώδη αχάινια που λειτουργούν ως "αλεξίπτωτα", β) οι πτερωτοί καρποί του *Acer saccharum* που χάρις στη μορφολογία τους, περιστρέφονται όπως η έλικα του ελικοπτερού, γ) οι καρποί ή σπόροι που έχουν την ικανότητα επίπλευσης και δ) οι καρποί φυτών που εκρήγνυται για να διασπείρουν τους σπόρους π.χ. του *Echium elaterium*. Επιπλέον η μετακίνηση των σπόρων κάτω από την επιφάνεια του εδάφους μπορεί να γίνει είτε μέσω των μυρμηγκιών (Lengyel *et al.*, 2010), είτε με τη μετακίνηση του νερού υπόγεια και μπορεί αφενός να τους προστατεύσει από τους θηρευτές και αφετέρου να προσφέρει ένα λιγότερο ευνοϊκό περιβάλλον για βλάστηση.

iv) Έκκριση ενώσεων

Η έκκριση ενώσεων από τους σπόρους μπορεί να επηρεάσει τη ικανότητα επιβίωσης γειτονικών σπόρων μέσω της ανάπτυξης κι εγκατάστασης μικροβιακής χλωρίδας στο άμεσο περιβάλλον τους (Long *et al.*, 2015). Οι ενώσεις αυτές μπορούν είτε να προωθήσουν τη βλάστηση των γειτονικών σπόρων, όπως το αιθυλένιο, ή να αναστείλουν αναστέλλουν τη βλάστηση των κοντινών σπόρων, ενθαρρύνοντας την ικανότητα επιβίωσης τους, όπως το βανιλικό οξύ (Kushima *et al.*, 1998, Linkies and Leubner-Metzger, 2012). Επιπλέον η έκκριση ενώσεων από τους σπόρους μπορεί να επηρεάζει τα παθογόνα μικρόβια, των οποίων η ανάπτυξη μπορεί είτε να ενθαρρυνθεί είτε να αποθαρρυνθεί από τις ενώσεις αυτές (Rose *et al.*, 2006, Roberts *et al.*, 2009, Fuerst *et al.*, 2011).

γ) Χαρακτηριστικά ειδών που σχετίζονται με την ανθεκτικότητα των σπόρων

Η ικανότητα επιβίωσης των σπόρων έχει γενετική βάση. Οι διαφορές μεταξύ των ειδών οφείλονται σε κρίσιμα γονίδια ή αλληλόμορφα βασικών γονιδίων που προσδίδουν πλεονέκτημα στην ικανότητα επιβίωσης. Τα γονίδια αυτά μπορεί να είναι κοινά μεταξύ συγγενικών ειδών ή μεταξύ ειδών με παρόμοια αναπαραγωγικά χαρακτηριστικά αλλά και μεταξύ αυτών που προέρχονται από την ίδια γηγενή περιοχή (Long *et al.*, 2015).

i) Φυλογενετικοί παράγοντες

Η ικανότητα επιβίωσης των σπόρων συσχετίζεται με τις ταξινομικές ομάδες, καθώς τα συγγενή είδη έχουν τη τάση να παρουσιάζουν παρόμοια μακροζωία, λήθαργο ή και αμυντικά χαρακτηριστικά. Άλλες οικογένειες είναι βραχύβιες (Campanulaceae, Ericaceae) και άλλες μακρόβιες (Caryophyllaceae, Malvaceae, Myrtaceae). Συχνά επίσης παρατηρείται η παρουσία ειδών σε κάποιες οικογένειες με μεγάλη μακροζωία (Lamiaceae, Fabaceae, Poaceae, Primulaceae) (Walters *et al.*, 2005c, Probert *et al.*, 2009) και παρόμοια οι τύποι ληθάργου εντός των γενεών και οικογενειών τείνουν να είναι ίδιοι (Baskin and Baskin, 2001).

ii) Αναπαραγωγή ειδών

Τα πολυετή είδη έχουν μεγαλύτερους και λιγότερο ανθεκτικούς σπόρους από ότι τα ετήσια και διετή φυτά (Chambers, 1995, Kalin Arroyo *et al.*, 1999, Honda, 2008). Οι Moles *et al.* (2004) αναφέρουν ότι τα φυτά που παράγουν μεγάλους αριθμούς σπόρων ετησίως τείνουν να είναι μικρού μεγέθους και μικρής διάρκειας (δηλαδή ετήσια). Η ικανότητα επιβίωσης των σπόρων των ειδών που έχουν υψηλότερη σποροπαραγωγή είναι μεγαλύτερη, καθώς παράγουν συνήθως σπόρους μικρότερου μεγέθους που εισέρχονται ευκολότερα στο έδαφος (Jakobsson *et al.*, 2006).

iii) Φαινοτυπική προσαρμοστικότητα

Με τον όρο φαινοτυπική προσαρμοστικότητα εννοούμε την ικανότητα των μεμονωμένων φυτών να τροποποιούν το σύνολο των εμφανών χαρακτηριστικών τους τα οποία και τα χαρακτηρίζουν, ως αντίδραση στις αλλαγές που πραγματοποιούνται στο περιβάλλον (Price *et al.*, 2003). Η φαινοτυπική προσαρμοστικότητα μπορεί να επηρεάσει και την ικανότητα επιβίωσης των σπόρων, επηρεάζοντας τα χαρακτηριστικά γνωρίσματα των σπόρων όπως ο λήθαργος, η μακροζωία και το μέγεθος των σπόρων (Hoyle *et al.*, 2008b, Kochanek *et al.*, 2010, Kochanek *et al.*, 2011). Τα επιπρόσθετα χαρακτηριστικά των φυτών που μπορεί να σχετίζονται με την ικανότητα επιβίωσης των σπόρων περιλαμβάνουν την περίοδο ανθοφορίας (Donohue *et al.*, 2007) και τη φαινολογία των φύλλων (π.χ. μεταχρωματισμός, πτώση, σκληροφυλλία των φύλλων κτλ.), τα οποία μπορούν να επηρεάσουν τη συσσώρευση και την παροχή των θρεπτικών στοιχείων στην ανάπτυξη των σπόρων (Nicotra *et al.*, 2010). Επομένως ένας οργανισμός με φαινοτυπική προσαρμοστικότητα εκφράζει διαφορετικούς φαινότυπους (φυσιολογικές και μορφολογικές διαφορές) ανάλογα με το βιοτικό και αβιοτικό περιβάλλον του (Price *et al.*, 2003).

iv) Γεωγραφική εξάπλωση

Τα προφίλ μακροζωίας και ικανότητας επιβίωσης των σπόρων μπορούν να συσχετιστούν με τη φυσική περιοχή των ειδών. Σε χώρες όπου το κλίμα είναι ζεστό και ξηρό, όπως η Αυστραλία, τα είδη που απαντούν εκεί τείνουν να έχουν μακρόβιους σπόρους σε σύγκριση με χώρες με δροσερά και υγρά περιβάλλοντα, όπως η Ευρώπη. (Walters *et al.*, 2005c, Probert *et al.*, 2009).

Οι Paulsen *et al.*, 2013 αναφέρουν ότι σπόροι με σκληρό περίβλημα (φυσικό λήθαργο) εντοπίζονται συχνότερα σε ζεστά περιβάλλοντα. Επιπλέον οι Dalling *et al.* (2011) αναφέρουν ότι οι σπόροι με φυσικό λήθαργο είναι προσαρμοσμένοι σε περιβάλλοντα όπου η μικροβιακή πίεση είναι υψηλή, ενώ αντίθετα οι σπόροι με φυσιολογικό λήθαργο μπορούν να επηρεαστούν από τη μικροβιακή πίεση του εδάφους.

δ) Περιβαλλοντικοί παράγοντες πριν τη διασπορά των ώριμων σπόρων

Το περιβάλλον επιδρά στα χαρακτηριστικά ανθεκτικότητας των σπόρων πριν ακόμα οι σπόροι διασκορπιστούν από το μητρικό τους φυτό (Finch-Savage and Leubner-Metzger 2006, Donohue, 2009, Kochanek *et al.*, 2011), επιδρώντας τελικά στο λήθαργο του σπόρου, στη βλάστηση, στο μέγεθος, στη διασπορά, καθώς και στις ιδιότητες του περιβλήματος του σπόρου, τη μακροζωία και τη γονιμότητα.

Οι αβιοτικοί παράγοντες που μπορούν να επηρεάσουν άμεσα ή έμμεσα την ικανότητα επιβίωσης των σπόρων είναι η φωτοπερίοδος, η ποιότητα του φωτός, το στρες από το νερό, η θερμοκρασία, η παροχή θρεπτικών συστατικών και CO₂ στο γονικό περιβάλλον (Gorecki *et al.*, 2012). Οι Gorecki *et al.* (2012) αναφέρουν ότι οι φυτικοί πληθυσμοί διαφέρουν ως προς την ευαισθησία τους στις περιβαλλοντικές διακυμάνσεις λόγω του διαφορετικού γενετικού υπόβαθρου.

Από τους παράγοντες του περιβάλλοντος η θερμοκρασία έχει την πιο σταθερή επίδραση στο λήθαργο και οι σπόροι από μητρικά φυτά που αναπτύχθηκαν σε υψηλές θερμοκρασίες είχαν μικρότερης έντασης λήθαργο (δηλ. αυξημένη βλαστικότητα) σε σύγκριση με εκείνους από φυτά που αναπτύχθηκαν σε χαμηλές θερμοκρασίες (Fenner, 1991, Baskin and Baskin, 2001, Steadman *et al.*, 2004). Οι επιδράσεις άλλων περιβαλλοντικών παραγόντων στο λήθαργο και τη βλάστηση τείνουν να είναι πιο μεταβλητές και εξαρτώνται από το είδος, την ένταση και το χρόνο του περιβαλλοντικού ερεθίσματος (Long *et al.*, 2015). Η μακροζωία μπορεί να μειωθεί και μπορεί επίσης να μεταβληθεί με τη φωτοπερίοδο και με την ποιότητα του φωτός (Contreras *et al.*, 2008, 2009, Gallagher and Fuerst, 2006). Οι συνθήκες του αβιοτικού γονικού περιβάλλοντος επηρεάζουν το μέγεθος του σπόρου και τις ιδιότητες του

περιβλήματος του σπόρου (Roach and Wulff, 1987, Baskin and Baskin, 2001, Donohue, 2009), ενώ η γονιμότητα των σπόρων τείνει να μειώνεται με την ξηρασία (Roach and Wulff, 1987).

Το βιοτικό στρες που μπορεί να υποστεί ο σπόρος κατά την ανάπτυξή του για παράδειγμα με την καταστροφή του περιβλήματος από έντομα, η γήρανση των φυτών, ο ανταγωνισμός των σπόρων εντός των καρπών ή μεταξύ των φυτών, μπορεί να επηρεάσει μια σειρά από χαρακτηριστικά συμπεριφοράς του σπόρου εντός της τράπεζας σπόρων. Σε έρευνα που πραγματοποιήθηκε από τους Baskin and Baskin (2001) σε 80 φυτικά είδη παρατηρήθηκε μεταβολή του μεγέθους των σπόρων, η οποία αποδόθηκε σε ορισμένους από τους προαναφερθέντες παράγοντες (π.χ. στην αποφύλλωση του μητρικού φυτού, η οποία προκάλεσε μείωση της μάζας σπόρου και πτώση των ανθέων, με αποτέλεσμα να αυξηθεί η μάζα στους υπόλοιπους σπόρους).

ε) Κλιματικοί παράγοντες που επηρεάζουν την ικανότητα επιβίωσης των σπόρων

Από τη στιγμή που οι σπόροι διασκορπίζονται, ο λήθαργός τους, η μακροζωία τους και η ευαισθησία τους στην καταστροφή και στην αποσύνθεση μεταβάλλονται με την πάροδο του χρόνου και την αλλαγή των περιβαλλοντικών παραγόντων (Finch-Savage and Leubner-Metzger, 2006). Οι περιβαλλοντικοί παράγοντες που επηρεάζουν την ικανότητα επιβίωσης των σπόρων μετά τη διασπορά περιλαμβάνουν το κλίμα, το έδαφος και άλλα χαρακτηριστικά της περιοχής στην οποία διασκορπίζονται οι σπόροι (π.χ. κλίση εδάφους, έκθεση κτλ.).

ι) Θερμοκρασία - Υγρασία

Η θερμοκρασία και η υγρασία του περιβάλλοντος επηρεάζουν τη γήρανση και τη βλάστηση των σπόρων και συνεπώς την ικανότητα επιβίωσης τους. Στο φυσικό περιβάλλον, οι σπόροι, ιδιαίτερα στα ανώτερα εκατοστά του εδάφους, βιώνουν καθημερινές και εποχιακές διακυμάνσεις της θερμοκρασίας και της υγρασίας, (Benvenuti *et al.*, 2001, Merritt *et al.*, 2007, Saatkamp *et al.*, 2011a). Οι υψηλότερες θερμοκρασίες μπορούν να επιταχύνουν τη γήρανση των σπόρων (Ellis and Roberts, 1981) και να διακόψουν το φυσικό και φυσιολογικό λήθαργο (Baskin, 2003, Iglesias-Fernandez *et al.*, 2011).

Περίοδοι μειωμένων βροχοπτώσεων με σταθερές θερμοκρασίες θα επαυξήσουν την ανθεκτικότητα των σπόρων που είναι ανθεκτικοί στην αφυδάτωση, ενώ αντίθετα η έκθεση σε ξηρό κλίμα μπορεί να προκαλέσει θανάτωση των ευαίσθητων στην αποξήρανση σπόρων (Burnside *et al.*, 1996, Tweddle *et al.*, 2003). Η εκτεταμένη έκθεση σε θερμές, υγρές

συνθήκες μπορεί να εξασθενήσει το περίβλημα με αποτέλεσμα ο σπόρος να καταστεί έτοιμος προς βλάστηση (van Klinken *et al.*, 2006, Turner *et al.*, 2009).

Η βλάστηση, ο λήθαργος, η μακροζωία των σπόρων και επομένως την ικανότητα επιβιώσής τους επηρεάζονται από τις εναλλαγές βροχοπτώσεων και ξηρών περιόδων (Brock, 2011). Η διακύμανση της υγρασίας στο έδαφος μπορεί να προάγει τη βλάστηση των σπόρων που δεν έχουν πρωτογενή λήθαργο απομακρύνοντας το φυσιολογικό λήθαργο μέσω μεταβολών στη συγκέντρωση ή την ευαισθησία των ορμονών που ελέγχουν το λήθαργο εντός του σπόρου (Gonzalez-Zertuche *et al.*, 2001, Hoyle *et al.*, 2008a, Long *et al.*, 2011b, Long *et al.*, 2010). Κυκλικές εναλλαγές υγρασίας και ξηρασίας μπορούν να παρατείνουν τη διατηρησιμότητα και τη μακροζωία του σπόρου μέσω της επαναφοράς της αντιοξειδωτικής του ικανότητας και συνεπώς της αντοχής στο στρες και της ικανότητας για «αυτό-επισκευή» (Long *et al.*, 2011a). Ακόμα και η ημερήσια μεταβολή της υγρασίας μπορεί να έχει ανάλογο αποτέλεσμα ειδικά σε σπόρους που φέρουν βλενώδη-κολλώδη ουσία (Huang *et al.*, 2008).

ii) Φως

Ο λήθαργος, η βλάστηση και η γήρανση του σπόρου μπορούν να επηρεαστούν από τη φωτοπερίοδο τη φωτοπερίοδο, την ποιότητα και την ένταση του φωτός που λαμβάνουν οι σπόροι μετά τη διασπορά τους (Long *et al.*, 2011b, Saatkamp *et al.*, 2011b, Corbineau, 2012, Huang *et al.*, 2008, Roqueiro *et al.*, 2010). Οι επιδράσεις των εναλλασσόμενων συνθηκών φωτός/σκότους στη διακοπή του λήθαργου και τη βλάστηση των σπόρων έχουν περιγραφεί σε πολλά διαφορετικά είδη (Saatkamp *et al.*, 2011b, Kanazashi *et al.*, 2015, Rodrigues-Junior, 2018, Vercellino *et al.*, 2019, Pinto *et al.*, 2020). Οι σπόροι που βρίσκονται πάνω ή πολύ κοντά στην επιφάνεια του εδάφους λαμβάνουν άμεσα το ηλιακό φως, επιπλέον η ένταση και η ποιότητα του ηλιακού φως που φθάνει στους σπόρους εξαρτάται από το τύπο του εδάφους, την κόμη του φυτού και τα σύννεφα, καθώς και από γεωγραφικούς παράγοντες όπως το γεωγραφικό πλάτος και το υψόμετρο (Mandoli *et al.*, 1990, Ciani, *et al.*, 2005). Οι σπόροι που βρίσκονται στην επιφάνεια του εδάφους λαμβάνουν φως εμπλουτισμένο σε πράσινα και κόκκινα μήκη κύματος, λόγω της διέλευσης και του φιλτραρίσματος του ηλιακού φωτός από την κόμη του φυτού (Batlla *et al.*, 2000). Παράλληλα, τόσο οι διάφορες ενώσεις εντός του σπόρου ή του ενδοσπερμίου, όσο και το περίβλημα του σπόρου μπορούν επίσης να επηρεάσουν την ποιότητα του φωτός που προσλαμβάνεται από το έμβρυο (Widell and Vogelmann, 1985, Goggin and Steadman, 2012).

iii) Μελλοντικές κλιματικές αλλαγές

Οι επιπτώσεις που θα έχουν οι μελλοντικές κλιματικές αλλαγές στην επιβίωση των σπόρων θα είναι συνάρτηση του τόπου και των ειδών (Walck *et al.*, 2011, Οοί, 2012). Αυτές οι αλλαγές πιθανό να περιλαμβάνουν θερμότερα κλίματα και τροποποιημένες βροχοπτώσεις (Solomon *et al.*, 2007) και ενδέχεται να μεταβάλλουν την ισορροπία των ειδών στα διάφορα οικοσυστήματα, επηρεάζοντας ιδιαίτερα τα ετήσια είδη (Kimball *et al.*, 2010). Οι θερμότερες και πιο ξηρές συνθήκες που προβλέπονται (Solomon *et al.*, 2007), είναι πιθανό να προωθήσουν την ταχύτερη διακοπή του ληθάργου στα ετήσια χειμερινά είδη, αλλά και να μην επιτρέψουν τη διακοπή του ληθάργου σε είδη που απαιτούν ψυχρή στρωμάτωση (Walck *et al.*, 2011). Τα διάφορα είδη μπορούν να προσαρμοστούν στις κλιματικές αλλαγές μέσω της επιλογής προσαρμοσμένων ατόμων, της φαινοτυπικής προσαρμοστικότητας, με την εξέλιξή τους και με την τροποποίηση του γενετικού τους υλικού (Parmesan, 2006, Richards *et al.*, 2010, Hoffmann and Sgro, 2011).

ζ) Παράγοντες εδάφους που επηρεάζουν τη διατήρηση των σπόρων

Οι φυσικές, χημικές και βιολογικές ιδιότητες των εδαφών συνδυάζονται με το κλίμα και με τα χαρακτηριστικά των σπόρων για να επηρεάσουν πότε και πώς ξεκινούν οι σπόροι στο έδαφος να φυτρώνουν (Davis, 2007, Dalling *et al.*, 2011, Pakeman *et al.*, 2012).

i) Φυσικές – Χημικές ιδιότητες

Οι φυσικές ιδιότητες του εδάφους, όπως η θερμοκρασία του εδάφους, το δυναμικό του νερού στο έδαφος και η διαπερατότητα του φωτός μπορούν να επηρεάσουν την ικανότητα επιβίωσης των σπόρων μέσω των επιδράσεών τους στη βλάστηση και τη γήρανση (Long *et al.*, 2015). Η θερμοκρασία του εδάφους επηρεάζεται από το χρώμα, την υφή (κοκκομετρία) του εδάφους και το κλίμα (Mandoli *et al.*, 1990, Brady and Weil, 1999, Long *et al.*, 2009). Για παράδειγμα σκουρόχρωμα εδάφη τείνουν να απορροφούν περισσότερη θερμότητα (Long *et al.*, 2009), ενώ η κοκκομετρική σύσταση των υλικών του εδάφους επηρεάζει το δυναμικό του νερού και τη διαπερατότητα του φωτός (Mandoli *et al.*, 1990, Brady and Weil, 1999). Η ικανότητα επιβίωσης των σπόρων που είναι ανθεκτικοί στην αφυδάτωση προάγεται όταν στο περιβάλλον επικρατούν χαμηλή θερμοκρασία εδάφους και μειωμένη διαθεσιμότητα ύδατος (Long *et al.*, 2009, Pakeman *et al.*, 2012). Οι συνθήκες αυτές ελαχιστοποιούν τη γήρανση των σπόρων και την απώλεια ληθάργου (Davis *et al.*, 2005).

Η ικανότητα επιβίωσης των σπόρων επηρεάζεται και από τις χημικές ιδιότητες των εδαφών, συμπεριλαμβανομένης της περιεκτικότητας σε θρεπτικά συστατικά, της οργανικής

ύλης και του pH (Long *et al.*, 2015). Εδάφη με χαμηλότερες αναλογίες άνθρακα: αζώτου (δηλ. με μικρότερο όγκο άνθρακα για να υποστηρίξουν την ανάπτυξη μικροβίων) μπορούν να ευνοήσουν την ικανότητα επιβίωσης σπόρων (Pakeman *et al.*, 2012), ενώ εδάφη με αυξημένη διαθεσιμότητα σε ανόργανες θρεπτικές ουσίες, μειώνουν τη μακροζωία των σπόρων στο έδαφος (Bekker *et al.*, 1998b). Τέλος και το pH των εδαφών μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα επιβίωσης των σπόρων, με τα αλκαλικά ή όξινα εδάφη να συσχετίζονται με τη βραχύτερη ικανότητα επιβίωσης των σπόρων (Long *et al.*, 2009, Pakeman *et al.*, 2012).

ii) Μικροβιακή δραστηριότητα

Η μικροβιακή δραστηριότητα του εδάφους διαφέρει από περιοχή σε περιοχή και αλληλοεπιδρά με διαφορετικό τρόπο στα διάφορα είδη σπόρων (Chee-Sanford *et al.*, 2006, Wagner and Mitschunas, 2008). Οι μικροοργανισμοί του εδάφους μπορεί να συνδέονται στενά με τη βλάστηση των σπόρων. Άλλοτε συμβάλλουν στη διάσπαση του περιβλήματος του σπόρου για να γίνει δυνατή η έξοδος του ριζικού συστήματος (van Leeuwen, 1981, Morpeth and Hall, 2000, Delgado-Sanchez *et al.*, 2011) ενώ σε άλλες περιπτώσεις οι αλλοχημικές ουσίες που εκκρίνουν στο έδαφος παρεμποδίζουν τη βλάστηση των σπόρων (Zhu *et al.*, 2011).

iii) Ατμοσφαιρικός αέρας

Ο ατμοσφαιρικός αέρας (το οξυγόνο, το διοξείδιο του άνθρακα και το αιθυλένιο) επηρεάζει τη βλάστηση και το λήθαργο των σπόρων. Η συγκέντρωση αυτών των αερίων μπορεί να διαφέρει μεταξύ τοπικών τοποθεσιών λόγω της αναπνοής από τους γειτονικούς οργανισμούς και της διαφορετικής μικροβιακής κατανομής της οργανικής ύλης (Sheppard and Lloyd, 2002, Nelson *et al.*, 2012). Το οξυγόνο είναι απαραίτητο για την εξέλιξη της βλάστησης, ενώ το αιθυλένιο διακόπτει το λήθαργο με αποτέλεσμα την προαγωγή της βλάστησης (Al-Ani *et al.*, 1985, Bradshaw *et al.*, 2011, Nelson *et al.*, 2012).

η) Άλλοι περιβαλλοντικοί παράγοντες σχετικοί με τον τόπο που επηρεάζουν την ικανότητα επιβίωσης των σπόρων

Η ικανότητα επιβίωσης των σπόρων σε ένα συγκεκριμένο έδαφος και κλίμα μπορεί να μεταβληθεί περαιτέρω από ειδικούς παράγοντες σχετικά με την τοποθεσία, όπως οι διαταραχές του εδάφους, η παρουσία των διασκορπιστών ζώων και των θηρευτών κτλ. (Long *et al.*, 2015).

i) Διαταραχές του εδάφους

Οι διαταραχές του εδάφους, είτε από τα φυσικά φαινόμενα ή από τις ανθρώπινες δραστηριότητες μπορούν να μεταβάλουν την ικανότητα επιβίωσης των σπόρων μέσω της μεταβολής των συνθηκών θερμοκρασίας, υγρασίας, αερίων και φωτός στις οποίες εκτίθενται (Bond and Grundy, 2001, Darabant *et al.*, 2007, Geissler and Gzik, 2008, García-Fayos *et al.*, 2010, Nelson *et al.*, 2012, Long *et al.*, 2015). Τα είδη που είναι προσαρμοσμένα σε διαταραγμένα περιβάλλοντα παρουσιάζουν τυπικά, περισσότερο ανθεκτικές τράπεζες σπόρων στο έδαφος από ό,τι τα είδη που προέρχονται από σταθερούς οικοτόπους (Thompson *et al.*, 1998, Hölzel and Otte, 2004).

ii) Βάθος ταφής των σπόρων στο έδαφος

Η μετακίνηση των σπόρων σε μέσα στο έδαφος μπορεί να γίνει μέσω της φυσικής μετακίνησης του εδάφους, της βροχής ή των καλλιεργητικών εργασιών, ενώ το βάθος στο οποίο παρασύρονται οι σπόροι εξαρτάται κατά κύριο λόγο από το μέγεθος του σπόρου. (Roger-Estrade *et al.*, 2001, Benvenuti, 2007a). Το βάθος στο οποίο παρασύρονται οι σπόροι μπορεί να επηρεάσει την ικανότητα επιβίωσης τους (Miller and Nalewaja, 1990). Η εισχώρηση σε μεγαλύτερο βάθος μπορεί να προστατεύσει τους σπόρους από την καταστροφή και την πυρκαγιά (Hulme, 1998, Hodgkinson and Oxley, 1990 Mandoli *et al.*, 1990, Saatkamp *et al.*, 2011a) αλλά από την άλλη μπορεί να βλαστήσουν σε μεγάλο βάθος με αποτέλεσμα ποτέ να μην εμφανιστούν στην επιφάνεια του εδάφους (Benvenuti *et al.*, 2001, Saatkamp *et al.*, 2011a).

iii) Τοξικά και χημικά που διακόπτουν το λήθαργο

Οι χημικές ουσίες στο περιβάλλον μπορούν να μεταβάλλουν την ικανότητα επιβίωσης του σπόρου με τη διακοπή του ληθάργου και την πρόκληση της βλάστησης μέσω άμεσων τοξικών επιδράσεων (Long *et al.*, 2015). Από τις ρίζες των ενήλικων φυτών στο έδαφος εκκρίνονται ορμόνες που μπορούν είτε να παρεμποδίσουν τη βλάστηση (αμπισσικό οξύ) ή να διακόψουν το λήθαργο (Zhao *et al.*, 2011a, Matusova *et al.*, 2005). Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι οι ουσίες που εκκρίνονται από τα φύλλα και τις ρίζες του μεσογειακού θάμνου *Cistus ladanifer*, οι οποίες μπορούν να διέλθουν στο έδαφος και να εμποδίσουν τη βλάστηση (Sosa *et al.*, 2010).

iv) Θήρευση μετά τη διασπορά των σπόρων

Οι σπόροι μετά την ωρίμανσή τους διασπείρονται στο έδαφος, όπου συναντούν την απειλή της θήρευσης από διάφορα ζώα συμπεριλαμβανομένων των πτηνών, των θηλαστικών, των εντόμων και των γαιοσκωλήκων (Regnier *et al.*, 2008, Forey *et al.*, 2011). Τα ποσοστά θήρευσης ποικίλλουν ανάλογα με τους διαφορετικούς οικοτόπους (Gonzalez-Varo *et al.*, 2012, Salazar *et al.*, 2012), με το χρόνο (Yokoo and Tokeshi, 2012), με το μέγεθος της καλλιέργειας ή την πυκνότητα του σπόρου στη θέση διασποράς (Bagchi *et al.*, 2011, Perez-Ramos and Maranon 2008, Fadini *et al.*, 2009, Lucas- Borja *et al.*, 2012), με τη σύνθεση της τοπικής κοινότητας θηρευτών και με τη σχετική ελκυστικότητα των σπόρων, αλλά και με τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυτών (Bonal and Munoz, 2007), από τις συνθήκες μικροστοιχείων που επηρεάζουν τη συμπεριφορά και την αφθονία των θηρευτών (Perez-Ramos and Maranon, 2008, Sanguinetti and Kitzberger, 2010) και από άλλους παράγοντες όπως η διαχείριση των οικοτόπων και η πυρκαγιά (Tasker *et al.*, 2011).

Π.1.1.3 Οικοφυσιολογία των σπόρων της Μεσογειακής βλάστησης

Πολλοί σπόροι της Μεσογειακής βλάστησης έχουν την ικανότητα να φυτρώνουν σε ένα μεγάλο εύρος θερμοκρασιών, αλλά συνήθως δεν αναπτύσσονται κάτω ή πάνω από συγκεκριμένες θερμοκρασίες που είναι χαρακτηριστικές για το φυτικό είδος. Οι ελάχιστες θερμοκρασίες λοιπόν για πολλά είδη είναι από 0 έως 4 °C· οι μέγιστες είναι από 45 έως 48 °C και οι άριστες γύρω στους 20 έως 30 °C (Thompson, 1970, Thompson, 1973 and Thanos *et al.*, 1991). Σε πολλά ξηροφυτικά μεσογειακά είδη έχει παρατηρηθεί ότι καταλληλότερες θερμοκρασίες για βλάστηση των σπόρων είναι 15 - 20 °C (Papafotiou and Stragas, 2009, Bertsouklis and Papafotiou, 2013, Papafotiou and Martini, 2016).

Σε πολλά είδη η βλάστηση των σπόρων επιτυγχάνεται χωρίς καμία προμεταχείριση, αρκεί να βρεθούν οι σπόροι κάτω από ιδανικές συνθήκες υγρασίας, θερμοκρασίας και σύνθεσης αερίων (Taiz and Zeiger, 2006), ενώ σε άλλα είδη, όπως σε πολλά της οικογένειας Fabaceae, απαιτείται ειδικός χειρισμός ως απαραίτητη προϋπόθεση για τη βλάστηση των σπόρων (Baskin, 2003).

Σπόροι από πολλά είδη, κυρίως της οικογένειας Fabaceae (Baskin and Baskin, 1998, Baskin, 2003), στην οποία ανήκει το γένος *Anthyllis*, παρουσιάζουν λήθαργο που οφείλεται στο σκληρό και αδιαπέραστο περίβλημα. Το πρόβλημα βλαστηκότητας των σπόρων πολλών Fabaceae, λόγω της ύπαρξης φυσιολογικού ληθάργου και του αδιαπέραστου περιβλήματος τους έχει επιβεβαιωθεί χρόνια πριν από πολλούς ερευνητές (White, 1908, Hyde, 1954, Côme, 1970, Taylorson and Hendricks, 1977).

Τα φυτά του γένους *Anthyllis* στο φυσικό τους περιβάλλον πολλαπλασιάζονται με σπόρο. Ωστόσο, οι σπόροι του φυτού εμφανίζουν φυσικό λήθαργο (Morbidoni *et al.*, 2008) λόγω της αδιάβροχης εφυμενίδας τους, η οποία είναι παρόμοια σε όλα τα είδη της οικογένειας Fabaceae (Baskin and Baskin, 1989). Επιπλέον, παρουσιάζουν υψηλή βιωσιμότητα με την πάροδο του χρόνου, αντοχή στην αλατότητα των εδαφών, καθώς και αντοχή στις υψηλές θερμοκρασίες (Morbidoni *et al.*, 2008). Οι σπόροι των ειδών *A. cytisoides*, *A. lagascana*, *A. barba-jovis* και *A. vulneraria* παρουσιάζουν δυσκολία στη φύτευση, η οποία οφείλεται στο σκληρό περίβλημα (Ibanez and Passera, 1997, Prieto *et al.*, 2004, Morbidoni *et al.*, 2008, Reyes and Trabaud, 2009). Επομένως, πριν τη σπορά απαιτείται μία προμεταχείριση των σπόρων αυτών των ειδών που θα «ενυδατωθεί» το σκληρό περίβλημα για μια γρήγορη, ομοιόμορφη και υψηλή φυτρωτικότητα. Η «ενυδάτωση» του περιβλήματος μπορεί να επιτευχθεί με μηχανικό σκαριφισμό (Ibanez and Passera 1997, Baes *et al.* 2002) ή με χημικό σκαριφισμό των σπόρων π.χ. εμβάπτιση των σπόρων σε πυκνό θειικό οξύ (Liu *et al.* 1981, Demel, 1996, Fu *et al.*, 1996, Sacheti and Al-Rawahy, 1998, Pandita *et al.*, 1999, Pipinis *et al.*, 2011). Επίσης ενδείκνυται η τοποθέτηση τους σε ζεστό νερό (Lopez and Aviles, 1988) και η έκθεση τους σε υψηλές θερμοκρασίες (Martin *et al.*, 1975, Bonner *et al.*, 2008).

Επισημαίνεται ότι οι Morbidoni *et al.* (2008) μελετώντας τη βλαστικότητα και την αντοχή στην αλατότητα των σπόρων του γένους *A. barba-jovis* διαπίστωσαν ότι η βέλτιστη θερμοκρασία για τη βλάστηση τους ήταν 20 °C, ενώ χαμηλότερες θερμοκρασίες μείωναν προοδευτικά τη βλαστικότητα. Οι σπόροι λοιπόν παρουσιάζουν δυσκολία στη φύτευση, η οποία οφείλεται στο σκληρό περίβλημά τους. Λόγω λοιπόν της χαμηλής βλαστικότητας των σπόρων που δεν είχαν υποστεί καμία προμεταχείριση, δοκίμασαν διάφορες προμεταχειρίσεις, συμπεριλαμβανόμενου του μηχανικού και χημικού σκαριφισμού. Το μεγαλύτερο ποσοστό βλαστικότητας (84%) παρατηρήθηκε λοιπόν στη προμεταχείριση με σκαριφισμό για 15 min με σφυριδόχαρτο.

Υπάρχουν πολλές αναφορές στη βιβλιογραφία για την *in vitro* βλαστικότητα άλλων ειδών της οικογένειας Fabaceae, που παρουσιάζουν λήθαργο περιβλήματος (coat-imposed dormancy) όπως το *Genista scorpius*, *Genista lydia*, *Spartium junceum*, *Cercis siliquastrum* και *Cytisus* spp. (Reyes and Trabaud, 2009, Zencirkiran *et al.*, 2010, Yücedağ and Cemal, 2011).

Για την *in vitro* βλαστικότητα σπόρου της *Scabiosa hymettia* δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές. Υπάρχουν έρευνες για άλλα είδη του γένους *Scabiosa* στις οποίες υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις. Οι Panayotova *et al.* (2008) αναφέρουν ότι η *in vitro* βλαστικότητα σπόρων *S. argentea* ήταν ανεπιτυχής και ως εκ τούτου οι ερευνητές προτείνουν

άλλες πηγές προέλευσης εκφύτων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για εγκατάσταση αρχικής καλλιέργειας. Αντιθέτως οι Luna *et al.* (2008) αναφέρουν ότι η βλαστικότητα του είδους *S. turolensis*, ενός ενδημικού είδους της Ιβηρικής χερσονήσου, ήταν 92%, χωρίς υγρή στρωμάτωση, στους 15° C.

Σύμφωνα με τους Ackerman and Hamernik (1994), οι περισσότερες ποικιλίες του γένους *Scabiosa*, είναι αρσενικές στερείρες ή δεν παράγουν αληθινούς σπόρους και η διάδοση των ποικιλιών αυτών γίνεται μόνο με μοσχεύματα βλαστών. Ενώ οι Carlson *et al.* (2009) αναφέρουν ότι πληθυσμοί του γένους *Scabiosa* συνήθως αυτοφύονται σε άγονες και ημι-άγονες περιοχές που χαρακτηρίζονται από μια σύντομη περίοδο βροχόπτωσης κάθε χρόνο. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα οι σπόροι τους να μην βλαστάνουν μέχρις ότου η διαθεσιμότητα σε νερό να επαρκεί για να τροφοδοτήσει το αναδυόμενο φυτάριο (δενδρύλλιο).

Όσον αφορά την οικογένεια *Lamiaceae* οι Baskin and Baskin, 1998 αναφέρουν ότι περιλαμβάνει είδη είτε με απουσία ληθάργου είτε με παρουσία φυσιολογικού ληθάργου. Είδη που ο σπόρος τους δεν εμφανίζει λήθαργο είναι για παράδειγμα το *Clinopodium sandalioticum* (Mattana *et al.*, 2016), το *Clinopodium vulgare* (Angelova *et al.*, 1994), η *Mentha aquatica* (Galmés *et al.*, 2006) και τα *Phlomis lychnitis*, *Sideritis tragoriganum*, *Thymus mastichina* (Luna *et al.*, 2008).

Τα περισσότερα μεσογειακά φυτά φυτρώνουν σε χαμηλές ή «δροσερές» θερμοκρασίες και οι πιο κατάλληλες θεωρούνται οι 15 - 20 °C, διότι λόγω της περιορισμένης διαθεσιμότητας του νερού στα Μεσογειακά οικοσυστήματα, η εγκατάσταση των σπόρων ευνοείται το φθινόπωρο, περίοδο με «δροσερές» θερμοκρασίες και περίσσεια νερού (Thanos *et al.*, 1991, Doussi and Thanos, 2002, Papafotiou and Kalantzis, 2009, Papafotiou and Stragas, 2009, Bertsoyklis and Papafotiou, 2010, 2013, Papafotiou and Martini, 2016). Αν και οι σπόροι φυτρώνουν ικανοποιητικά σε ένα μεγαλύτερο εύρος θερμοκρασιών, από 10 έως 30 °C, όπως τα είδη *Sideritis syriaca* L. ssp. *Syriaca*, *Origanum dictamnus*, *Salvia pomifera* L. ssp. *pomifera* και *S. fruticosa* (Thanos and Doussi 1995), *Coridothymus capitatus*, *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Satureja thymra* (Thanos *et al.*, 1995), *Phlomis brevibracteata* και *P. cypria* ssp. (Kadis and Georghiou 2010) και *Sideritis pungens* Benth και *S. chamaedryfolia* Cav. (Estrelles *et al.*, 2010).

Π.Ι.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ *IN VITRO* ΚΑΙ *EX VITRO* ΒΛΑΣΤΗΣΗΣ ΣΠΟΡΩΝ

Π.Ι.2.1 ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Π.Ι.2.1.1 Υποστρώματα *in vitro* στρωμάτωσης - υλικά

Χρησιμοποιήθηκε: Υπόστρωμα MS (Murashige and Skoog, 1962) της εταιρείας Duchefa Biochemie (Haarlem, Ολλανδία) σε μορφή σκόνης στη μισή του δύναμη ($1/2$ MS).

Το υπόστρωμα εμπλουτίστηκε με:

- α) Σακχαρόζη (Sucrose) εμπορίου
- β) Γιββερελλινικό οξύ (GA₃, gibberellic acid), MB=186, της εταιρείας Sigma-Aldrich (Darmstadt, Γερμανία) και
- γ) Στερεοποιήθηκε με άγαρ (Ρουμπουλάκης Α.Ε. Χημικά).

Τα διαλύματα έγιναν με νερό διπλής απόσταξης (αποστακτήρας τύπου Calypso Still της εταιρείας Fistreem International, Cambridge, Αγγλία).

Μέθοδος παρασκευής υποστρωμάτων

Σε δοχείο ζέσεως όγκου ανάλογου με τον όγκο του υπό παρασκευή υποστρώματος τοποθετούνταν αποσταγμένο νερό (όγκου λιγότερου του τελικού) και προσθέτονταν οι ακριβείς ποσότητες με βάση τον τελικό όγκο του θρεπτικού υποστρώματος μισής δύναμης Murashige και Skoog (MS) $2,2 \text{ g L}^{-1}$, σακχαρόζης (2%), υπό συνεχή ανάδευση με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα μέχρι να διαλυθούν πλήρως. Στη συνέχεια γινόταν ογκομέτρηση και προσθήκη αποσταγμένου νερού, μέχρι τον επιθυμητό όγκο και ακολουθούσε ρύθμιση του pH με τη χρήση αραιού HCl 1N και NaOH 1N για μείωση και αύξηση του pH, αντίστοιχα, στην τιμή 5.7 - 5.8 της κλίμακας. Η διαδικασία ολοκληρωνόταν με την προσθήκη 8 g L^{-1} άγαρ και ακολουθούσε θέρμανση του διαλύματος, υπό συνεχή ανάδευση μέχρι να διαλυθεί πλήρως και ομοιόμορφα το άγαρ (διαυγές διάλυμα). Το έτοιμο διάλυμα μοιραζόταν σε γυάλινα μπουκάλια και τοποθετούνταν προς αποστείρωση σε χύτρα ή κλίβανο υγρής αποστείρωσης. Οι ποσότητες του θρεπτικού υποστρώματος $1/2$ MS, σακχαρόζης και άγαρ ζυγίζοντουσαν σε ζυγό τύπου PJ3600 (Mettler –Toledo DeltaRnage).

Παρασκευή «stock» διαλυμάτων γιββερελλίνης (GA₃)

Σε δοχείο ζέσεως των 100 ml, τοποθετούνταν 10 mg GA₃, τα οποία διαλύονταν με ήπια ανάδευση σε 2 - 3 σταγόνες καθαρής αιθανόλης (99,8 %). Στη συνέχεια προστίθετο μικρή ποσότητα αποσταγμένου νερού και συνεχιζόταν η ανάδευση μέχρι να διαλυθεί καλά η GA₃. Στο τέλος προστίθετο αποσταγμένο νερό μέχρι τον τελικό όγκο (100 ml). Μετά την Παρασκευή το «stock» διάλυμα αποθηκεύονταν σε οικιακό ψυγείο, στους 4 °C, για διάστημα 30 περίπου ημερών. Οι ζυγίσεις του GA₃ γίνονταν σε ζυγό ακριβείας τύπου WA210 (aeAdam Equipment, U.S.A.).

Π.Ι.2.1.2 Τρυβλία και γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες για την *in vitro* βλάστηση και περαιτέρω ανάπτυξη των σπόρων

Η καλλιέργεια των σπόρων γινόταν σε πλαστικά τρυβλία της εταιρείας Greiner Bio-One διαμέτρου 9 cm, με 20 ml υποστρώματος ανά τρυβλίο. Η συμπλήρωση των τρυβλίων με υπόστρωμα, γινόταν στην Τράπεζα Νηματικής Ροής. Είχε προηγηθεί αποστείρωση του θρεπτικού υποστρώματος σε χύτρα ή σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης σε γυάλινες φιάλες όγκου 500 ή 1000 ml. Ενώ η περαιτέρω ανάπτυξη των *in vitro* σποροφύτων που προήλθαν από σπόρους που είχαν βλαστήσει σε τρυβλία, έγινε σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες όγκου 50 ml (25 x 100 mm), που περιείχαν 10 ml υπόστρωμα πλήρους δύναμης MS έκαστος. Μετά την τοποθέτηση του υποστρώματος οι σωλήνες καλύπτονταν με αλουμινόχαρτο για αποστείρωση σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης, ενώ μετά την τοποθέτηση των σποροφύτων στην Τράπεζα Νηματικής Ροής ως υλικό κάλυψής τους χρησιμοποιήθηκε πλαστική μεμβράνη (πλαστική μεμβράνη περιτυλίγματος με το εμπορικό όνομα sanitas της εταιρείας Σαράντης Α.Ε., Ελλάς, η οποία είχε τις εξής ιδιότητες: περατότητα σε οξυγόνο 8,5 cm³ m⁻² σε 24 h, περατότητα σε διοξείδιο του άνθρακα 55.000 cm³ m⁻² σε 24 h και περατότητα σε υδρατμούς 110 g m⁻² σε 24 h).

Π.Ι.2.1.3 Αποστείρωση εργαλείων και υλικών καλλιέργειας

Για την εκτέλεση όλων των πειραμάτων βλάστησης των σπόρων *in vitro* απαιτείται η αποστείρωση και απολύμανση όλων των εργαλείων και υλικών καλλιέργειας. Η αποστείρωση των εργαλείων και υλικών γινόταν σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης (αυτόκλειστο) για χρονικό διάστημα 20 min, σε θερμοκρασία 121 °C και πίεση 1.2 atm ή σε χύτρα υγρής αποστείρωσης για χρονικό διάστημα 15 min, σε θερμοκρασία 125 °C και πίεση 1.2 atm. Οι δοκιμαστικοί σωλήνες και τα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν στις εμφυτεύσεις ή απολυμάνσεις, όπως λαβίδες, φιάλες και δοχεία με αποσταγμένο νερό για την

απολύμανση των σπόρων, καλύπτονταν με φύλλο αλουμινίου (κοινό αλουμινόχαρτο εμπορίου) πριν την τοποθέτησή τους στον κλίβανο, ενώ τα γυάλινα μπουκάλια που περιείχαν θρεπτικό υπόστρωμα είχαν χαλαρά καλυμμένο το ελεύθερο στόμιό τους με τα πλαστικά καπάκια τους.

Π.Ι.2.1.4 Συλλογή Σπόρων

Σπόροι του *A. barba-jovis* συλλέχθηκαν το 2012, 2013, 2014 τέλη Νοεμβρίου - αρχές Δεκεμβρίου, από επιλεγμένα καλλιεργούμενα φυτά από το Βοτανικό Κήπο της Φιλοδοσικής Ένωσης Αθηνών (Δάσος Καισαριανής Βύρωνα) (37°57'37.0"N, 23°47'53.4"E), του *B. acetabulosa*, τον Αύγουστο 2012 από επιλεγμένα αυτοφυή φυτά του Νομού Κορινθίας (στην Αρχαία Κόρινθο, 37°53'58.5"N, 22°52'38.5"E), των ειδών *C. creticum* και *C. nepeta* τον Αύγουστο 2014, από μητρικά φυτά τα οποία είχαν αναπτυχθεί στο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου (37°58'57.8"N, 23°42'18.9"E), ενώ του *S. hymettia* τον Αύγουστο 2013, 2014, από επιλεγμένα αυτοφυή φυτά στο όρος Πάρνηθα (38°08'06.7"N, 23°44'32.8"E).

Π.Ι.2.1.5 Μετασυλλεκτικοί χειρισμοί σπόρων

Π.Ι.2.1.5.1 Καθαρισμός - Αποθήκευση σπόρων

Οι σπόροι αμέσως μετά τη συλλογή τοποθετούνταν σε καλά αεριζόμενες ανοιχτές συσκευασίες (δίσκοι αλουμινίου), σε θερμοκρασία δωματίου ($T=21\text{ }^{\circ}\text{C}$) για 2 - 14 ημέρες αναλόγως του φυτικού είδους, έτσι ώστε να μειωθεί η υγρασία τους (να στεγνώσουν). Σε κάποια φυτικά είδη χρειάστηκε καθαρισμός των σπόρων από τον καρπό ή αφαιρέθηκαν τα υπολείμματα του άνθους. Στη συνέχεια εγκλείονταν σε γυάλινα βάζα, που εναποθέτονταν σε κλειστό δοχείο διογκωμένης πολυστερίνης (expanded polystyrene), ώστε να εξασφαλίζονται συνθήκες σκότους και αποθηκεύονταν σε θερμοκρασία δωματίου ($T=21\pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$) για το χρονικό διάστημα που ακολούθησε μέχρι τις επεμβάσεις ελέγχου της βλαστικότητάς τους σε διαφορετικές τιμές θερμοκρασίας.

Π.Ι.2.1.5.2 Προμεταχείριση σπόρων

Στους σπόρους των *A. barba-jovis* και *S. hymettia* έγινε προμεταχείριση με διαφορετικούς χειρισμούς πριν την τοποθέτησή τους για *in vitro* και *ex vitro* βλάστηση (αναλυτική περιγραφή στο ειδικό μέρος για κάθε είδος).

Π.Ι.2.1.6 Τέστ Τετραζολίου (Tetrazolium test)

Η βιωσιμότητα των σπόρων εκτιμούνταν, πριν την έναρξη του κάθε πειράματος, με τη μέθοδο του τετραζολίου. Για την παρασκευή του διαλύματος διαλύονταν 1 g TZ-solution σε 100 ml αποσταγμένο νερό (Bonner and Karrfalt, 2008). Τυχαίο δείγμα 100 σπόρων τοποθετούταν σε διάλυμα τετραζολίου (TZ-solution) (1,0% 2,3,5-τριφαινόλο χλωριούχο τετραζόλιο) στους 20 °C για 24 h. Ακολούθως, έγινε επιμήκης τομή στους σπόρους, για την εκτίμηση της χρώσης του εμβρύου, με ψηφιακό μικροσκόπιο χειρός (Q-scope digital, model QS 20200-P, Euromex Microscopen bv, TheNetherlands].

Βιώσιμα θεωρούνταν τα σπέρματα των οποίων τα έμβρυα αποκτούσαν κόκκινο χρώμα μετά την εμβάπτιση τους στο διάλυμα τετραζολίου. Ως μη βιώσιμα θεωρούνταν τα έμβρυα που (α) η χρώση τους δεν ήταν κόκκινη, (β) η κόκκινη χρώση στις κοτυληδόνες ήταν μικρότερη από ½ της επιφάνειάς τους και (γ) το υποκοτύλιο δεν χρωματίστηκε (Moore, 1985).

Ο Lakon (1949) αναφέρει ότι η μέθοδος του τετραζολίου είναι ένας χημικός έλεγχος για τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας των σπόρων και τα αποτελέσματα είναι διαθέσιμα μέσα σε 24 h. Δίνει λοιπόν μια έγκυρη και γρήγορη εικόνα για τη βιωσιμότητα των σπόρων, που όμως δεν μπορεί να αντικαταστήσει τον πιο ολοκληρωμένο έλεγχο της βλάστησης των σπόρων.

Π.Ι.2.1.7 *Ex vitro* βλάστηση

Σπόροι τοποθετούνταν σε δοχεία (όγκου 500 ml) με μίγμα τύρφης: περλίτη (1:1, v/v). Οι σπόροι καλύπτονταν με υπόστρωμα (πάχους 0,5 - 1,0 cm) και τα δοχεία με πλαστική μεμβράνη (sanitas) και τοποθετούνταν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου σε θερμοκρασία (20±2 °C). Σε τακτά χρονικά διαστήματα, γινόταν διαβροχή του υποστρώματος, για να διατηρηθεί η υγρασία του, ενώ η πλαστική μεμβράνη αφαιρούνταν μόλις φύτρωνε τουλάχιστον ένας σπόρος. Η περίοδος παρατήρησης ήταν ανάλογη με το φυτικό είδος. Πέντε επαναλήψεις των 20 σπόρων χρησιμοποιούνταν και ένας σπόρος θεωρούνταν φυτρωμένος όταν οι κοτυληδόνες αναδύονταν από το μίγμα τύρφης: περλίτη.

Π.Ι.2.1.8 *In vitro* βλάστηση και περαιτέρω ανάπτυξη των σποροφύτων

Οι σπόροι πριν τη στρωμάτωσή τους *in vitro* σε στερεό (8 g L^{-1} άγαρ) υπόστρωμα MS μισής δύναμης με 20 g L^{-1} σακχαρόζη και pH 5.7 - 5.8, απολυμαίνονταν επιφανειακά με υδατικό διάλυμα χλωρίνης εμπορίου συγκέντρωσης 15 ή 20% (4.6% w/v υποχλωριώδες νάτριο NaClO), αναλόγως του φυτικού είδους, υπό ανάδευση για 10 min, το οποίο περιείχε 1 - 2 σταγόνες 0.1% Tween 20 (προσκολλητική ουσία, Polyoxyethylene(20)sorbitan Monolaurate, Merck). Την απολύμανση ακολουθούσαν τέσσερα τρίλεπτα ξεπλύματα με αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό, υπό ανάδευση.

Τα τρυβλία με τους σπόρους, τοποθετούνταν, σε θαλάμους ελεγχόμενων σταθερών συνθηκών, σε θερμοκρασία 5, 10, 15, 15, 20, 25, 30, 35 ± 2 °C και σε φωτοπερίοδο 16 h πλήρους φωτός έντασης 4.000 lx ($37,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) που παρέχονταν από λευκούς λαμπτήρες φθορισμού ή σε συνθήκες συνεχούς σκότους, καλύπτοντας τα τρυβλία με φύλλο αλουμινίου (κοινό αλουμινοχαρτο εμπορίου), για τη διεξαγωγή των πειραμάτων βλαστικότητας.

Κάθε 2 ημέρες γινόταν καταγραφή του αριθμού σπόρων που βλάστησαν ανά επέμβαση, μέχρι σταθεροποίησης της βλαστικότητας.

Ως βλάστηση ορίστηκε η εμφάνιση ριζιδίου τουλάχιστον 1 mm μήκους, σύμφωνα με τον International Seed Testing Association (1999). Το T_{50} ορίζεται ως ο χρόνος που χρειάζεται για να βλαστήσει το 50% των σπόρων.

Τα σπορόφυτα μετά την ολοκλήρωση του ελέγχου της βλαστικότητας μεταφέρονταν μεμονωμένα σε γυάλινους δοκιμαστικούς σωλήνες και τοποθετούνταν, για ένα μήνα, σε θάλαμο ελεγχόμενων σταθερών συνθηκών, σε θερμοκρασία 25 ± 2 °C και σε φωτοπερίοδο 16 h πλήρους φωτός έντασης 4.000 lx ($37,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$) που παρέχονταν από λευκούς λαμπτήρες φθορισμού, για περαιτέρω ανάπτυξη.

Π.Ι.2.1.9 Στατιστική ανάλυση

Στα πειράματα ακολουθήθηκε το Εντελώς Τυχαιοποιημένο Σχέδιο (ΕΤΣ) και εφαρμόστηκαν μονοπαραγοντικά, διπαραγοντικά και τριπαραγοντικά σχέδια, ανάλογα με το είδος του πειράματος. Η σημαντικότητα των αποτελεσμάτων ελέγχθηκε με ανάλυση της διασποράς (ANOVA). Το κριτήριο που χρησιμοποιείται για τη στατιστική αυτή δοκιμασία είναι το κριτήριο του F (F test) και η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο Students σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$ ή $P \leq 0,001$. 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 * ή ** ή *** δίπλα από κάθε τιμή του F , δηλώνει ότι οι τιμές αυτές του F ήταν σημαντικές σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ή 1% ή 0,1%, αντίστοιχα. Στο τέλος κάθε πίνακα αποτελεσμάτων αναγράφεται ο αριθμός των επαναλήψεων που χρησιμοποιήθηκαν ανά επέμβαση.

Π.Ι.2.2 ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

Π.Ι.2.2.1 *Anthyllis barba-jovis*

Π.Ι.2.2.1.1 Συλλογή – Αποθήκευση σπόρου

Με στόχο να εξετασθεί η βλαστικότητα σπόρων του *A. barba-jovis*, σπόροι συλλέχθηκαν το 2012, 2013, 2014 τέλη Νοεμβρίου έως αρχές Δεκεμβρίου, από επιλεγμένα καλλιεργούμενα φυτά από το Βοτανικό Κήπο της Φιλοδοσικής Ένωσης. Μετά τη συλλογή οι σπόροι τοποθετήθηκαν σε καλά αεριζόμενες ανοιχτές συσκευασίες σε θερμοκρασία δωματίου για 2 εβδομάδες και στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου ($T=21\pm 2$ °C) μέχρι την έναρξη των πειραμάτων βλαστικότητας τα οποία έγιναν 0, 12, 24 και 36 μήνες μετά τη συλλογή. Πριν τη χρήση τους έγινε απομάκρυνση του περικαρπίου.

Π.Ι.2.2.1.2 Τέστ Τετραζολίου

Εκατό (100) σπόροι από κάθε μεταχείριση (με ή χωρίς μηχανικό σκαριφισμό) και από κάθε χρονική περίοδο (0, 12, 24 και 36 μήνες αποθήκευσης) εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα τετραζολίου με σκοπό τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας των σπόρων.

Π.Ι.2.2.1.3 Μικροσκοπική παρατήρηση σπόρων

Μετά την απομάκρυνση του περικαρπίου παρατηρήθηκε σε ηλεκτρονικό μικροσκόπιο σάρωσης (Η.Μ.Σ.) [τύπου Jeol 6360 (Jeol, Japan)] του Εργαστηρίου Ηλεκτρονικής Μικροσκοπίας, η ποιότητα της εξωτερικής εφυμενίδας του σπόρου και οι αλλαγές πριν και μετά το σκαριφισμό. Αρχικά έγινε επικόλληση των σπόρων σε υποδοχείς με αυτοκόλλητους δίσκους άνθρακα διπλής όψης (Agar Scientific Ltd.) και στη συνέχεια έγινε επικάλυψη αυτών με καθαρό χρυσό, με εκκένωση αίγλης σε ατμόσφαιρα αργού (Ar). Η διαδικασία

έγινε σε εξαχνωτή Denton-Vacuum DV-502 εφοδιασμένο με τα κατάλληλα εξαρτήματα και τέλος τοποθετήθηκαν για παρατήρηση στο Η.Μ.Σ.

Π.Ι.2.2.1.4 *In vitro* βλάστηση

Οι σπόροι του φυτού έχει αναφερθεί ότι εμφανίζουν φυσικό λήθαργο (Morbidoni *et al.*, 2008). Ως εκ τούτο διερευνήθηκε η βλαστικότητα των σπόρων με χρήση προμεταχείρισης μηχανικού σκαριφισμού, ο οποίος έγινε με σφυριδόχαρτο N. 100 για διάστημα 1 min. Επίσης ελέγχθηκε η επίδραση της αποθήκευσης σε θερμοκρασία δωματίου στη βλαστικότητα των σπόρων. Έγιναν 4 πειράματα, με σπόρους με ή χωρίς μεταχείριση μηχανικού σκαριφισμού, που είχαν αποθηκευτεί για διάστημα 0 (σπόροι έτους 2014), 12 (σπόροι έτους 2013), 24 και 36 μηνών (σπόροι έτους 2012).

Σπόροι ηλικίας 0, 12, 24 και 36 μηνών, πριν τη στρωμάτωσή τους *in vitro* σε στερεό (8 g L⁻¹ άγαρ) υπόστρωμα MS μισής δύναμης με 20 g L⁻¹ σακχαρόζη, απολυμάνθηκαν επιφανειακά με υδατικό διάλυμα χλωρίνης εμπορίου 20% για 10 min. Οι σπόροι τοποθετήθηκαν για βλάστηση σε πέντε διαφορετικές θερμοκρασίες ήτοι 5, 10, 15, 20, 25, 30 ή 35 °C, είτε σε φωτοπερίοδο 16 h ή σε πλήρες σκοτάδι.. Η περίοδος παρατήρησης ήταν τρεις μήνες.

Π.Ι.2.2.1.5 *Ex vitro* βλάστηση

Σπόροι δίχως σκαριφισμό, με ή χωρίς περικάρπιο, καθώς και σπόροι χωρίς περικάρπιο με σκαριφισμό, τοποθετήθηκαν για βλάστηση σε τύρφη: περλίτη και τοποθετήθηκαν προς βλάστηση στους 20 °C. Ο έλεγχος της βλαστικότητας *ex vitro* έγινε 0, 12, 24 και 36 μήνες μετά τη συλλογή των σπόρων.

Π.Ι.2.2.2 *Ballota acetabulosa*

Π.Ι.2.2.2.1 Συλλογή – Αποθήκευση σπόρου

Με στόχο να εξετασθεί η βλαστικότητα σπόρων του *B. acetabulosa*, σπόροι συλλέχθηκαν τον Αύγουστο 2012 από επιλεγμένα αυτοφυή φυτά του Νομού Κορινθίας. Αμέσως μετά τη συλλογή και αφού διαχωρίστηκαν οι σπόροι από τους κάλυκες, τοποθετήθηκαν σε καλά αεριζόμενες ανοιχτές συσκευασίες, σε θερμοκρασία δωματίου για 1 εβδομάδα και στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (T=21±2 °C) μέχρι την έναρξη των

πειραμάτων βλαστικότητας τα οποία έγιναν 2, 7, 12, 15, 18, 22, 40 και 52 μήνες μετά τη συλλογή.

Π.Ι.2.2.2.2 Τέστ Τετραζολίου

Εκατό (100) σπόροι, χωρίς καμία προμεταχείριση, πριν από την έναρξη κάθε πειράματος (2, 7, 12, 24, 36 και 48 μήνες αποθήκευσης) εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα τετραζολίου με σκοπό τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας των σπόρων.

Π.Ι.2.2.2.3 *In vitro* βλάστηση

Σπόροι ηλικίας 2, 7, 12, 24, 36 και 48 μηνών, πριν στρωμάτωσή τους *in vitro* σε στερεό (8 g L⁻¹ άγαρ) υπόστρωμα MS μισής δύναμης με 20 g L⁻¹ σακχαρόζη, απολυμάνθηκαν επιφανειακά με υδατικό διάλυμα χλωρίνης εμπορίου 15% για 15 min. Οι σπόροι τοποθετήθηκαν για βλάστηση σε πέντε διαφορετικές θερμοκρασίες ήτοι 5, 10, 15, 20 και 25 °C σε φωτοπερίοδο 16 h. Η περίοδος παρατήρησης ήταν τρεις μήνες.

Π.Ι.2.2.2.4 *Ex vitro* βλάστηση

Σπόροι *B. acetabulosa* μετά από 2, 7, 12, 24, 36 και 48 μήνες αποθήκευσης μετά τη συλλογή τους, τοποθετήθηκαν χωρίς προμεταχείριση για βλάστηση σε τύρφη: περλίτη σε θάλαμο σταθερών συνθηκών στους 20 °C. Η περίοδος παρατήρησης ήταν ένας μήνας.

Π.Ι.2.2.3 *Clinopodium creticum* και *Clinopodium nepeta*

Π.Ι.2.2.3.1 Συλλογή – Αποθήκευση σπόρου

Με στόχο να εξετασθεί η βλαστικότητα σπόρων του *C. creticum* και του *C. nepeta*, σπόροι των δύο ειδών συλλέχθηκαν τον Αύγουστο 2014, από μητρικά φυτά τα οποία είχαν αναπτυχθεί στο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου. Αμέσως μετά τη συλλογή και αφού αφαιρέθηκαν τυχόν υπολείμματα ανθέων, τοποθετήθηκαν σε καλά αεριζόμενες ανοιχτές συσκευασίες σε θερμοκρασία δωματίου για 1 εβδομάδα και στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (T=21±2 °C) μέχρι την έναρξη των πειραμάτων βλαστικότητας τα οποία έγιναν 0, 6 και 12 μήνες μετά τη συλλογή.

Π.Ι.2.2.3.2 Τέστ Τετραζολίου

Εκατό (100) σπόροι, χωρίς καμία προμεταχείριση, και από τα δύο είδη, πριν από την έναρξη κάθε πειράματος πειράματος (δεκαπέντε ημερών, 6 και 12 μήνες αποθήκευσης) εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα τετραζολίου με σκοπό τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας των σπόρων.

Π.Ι.2.2.3.3 *In vitro* βλάστηση

Σπόροι και των δύο φυτικών ειδών ηλικίας 0, 6 και 12 μηνών, πριν τη στρωμάτωσή τους σε στερεό (8 g L⁻¹ άγαρ) υπόστρωμα MS μισής δύναμης με 20 g L⁻¹ σακχαρόζη, απολυμάνθηκαν επιφανειακά με υδατικό διάλυμα χλωρίνης εμπορίου 15% για 15 min. Οι σπόροι τοποθετήθηκαν για βλάστηση σε οκτώ διαφορετικές θερμοκρασίες ήτοι 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 και 40 °C σε φωτοπερίοδο 16 h.

Π.Ι.2.2.3.4 *Ex vitro* βλάστηση

Σπόροι *C. creticum* και *C. nepeta* 0, 6 και 12 μήνες μετά τη συλλογή τους, τοποθετήθηκαν χωρίς προμεταχείριση για βλάστηση σε τύρφη: περλίτη στους 20 °C. Η περίοδος παρατήρησης ήταν ένας μήνας.

Π.Ι.2.2.4 *Scabiosa hymettia*

Π.Ι.2.2.4.1 Συλλογή – Αποθήκευση σπόρου

Σπόροι *S. hymettia* συλλέχθηκαν τον Αύγουστο 2013 και 2014, από επιλεγμένα αυτοφυή φυτά στο όρος Πάρνηθα. Μετά τη συλλογή οι σπόροι τοποθετήθηκαν σε καλά αεριζόμενες ανοιχτές συσκευασίες σε θερμοκρασία δωματίου για 1 εβδομάδα και στη συνέχεια αποθηκεύτηκαν σε θερμοκρασία δωματίου (T=21±2 °C) μέχρι την έναρξη των πειραμάτων βλαστικότητας τα οποία έγιναν 0, 3, 4, 6 και 11 μήνες μετά τη συλλογή.

Π.Ι.2.2.4.2 Τέστ Τετραζολίου

Εκατό (100) σπόροι, χωρίς καμία προμεταχείριση, πριν από την έναρξη κάθε πειράματος εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα τετραζολίου με σκοπό τον προσδιορισμό της βιωσιμότητας των σπόρων.

Π.Ι.2.2.4.3 *In vitro* βλάστηση

Σπόροι ένα μήνα μετά τη συλλογή, απολυμάνθηκαν επιφανειακά με 15% διάλυμα χλωρίνης εμπορίου για 15 min και καλλιεργήθηκαν για βλάστηση σε στερεό υπόστρωμα (8 g L⁻¹ άγαρ) μισής δύναμης MS με 20 g L⁻¹ σακχαρόζη, στους 5, 10, 15, 20, 25 και 30 °C, υπό 16 h φως, είτε χωρίς προμεταχείριση ή μετά από σκαριφισμό με σμυριδόχαρτο για 1 min. Επειδή παρατηρήθηκε υψηλό ποσοστό μολύνσεων και δεν βλάστησε κανένας σπόρος μετά από 2 μήνες επώασης, δοκιμάστηκαν περισσότερες μεταχειρίσεις.

Τρεις μήνες μετά τη συλλογή, σπόροι απολυμάνθηκαν επιφανειακά με 20% διάλυμα χλωρίνης εμπορίου και τοποθετήθηκαν για βλάστηση σε στερεό υπόστρωμα μισής δύναμης MS με 20 g L⁻¹ σακχαρόζη, στους 5, 10, 15, 20, 25 και 30 °C είτε χωρίς προμεταχείριση, ή μετά από σκαριφισμό με σμυριδόχαρτο για 1 min. ή μετά από εμβάπτιση σε πυκνό H₂SO₄ για 5, 10, 15 min, ή μετά από εμβάπτιση σε H₂O σε θερμοκρασία 100 °C για 2 και 4 h χωρίς προμεταχείριση ή μετά από σκαριφισμό με σμυριδόχαρτο για 1 min. Επιπλέον δοκιμάστηκε στρωμάτωση των σπόρων στους 5 °C για 3 ή 4 μήνες πριν την τοποθέτησή τους στους 20 ή 25 °C για βλάστηση είτε χωρίς προμεταχείριση ή μετά από σκαριφισμό με σμυριδόχαρτο για 30 sec ή 1 min, ή στρωμάτωση των σπόρων στους 30 °C για 3 ή 4 μήνες πριν την τοποθέτησή τους στους 10 ή 15 ή 20 °C, υπό 16 h φως, για βλάστηση χωρίς προμεταχείριση ή μετά από σκαριφισμό με σμυριδόχαρτο για 30 sec ή 1 min. Στην προμεταχείριση με το πυκνό H₂SO₄, οι σπόροι κάηκαν, πιθανά λόγω μεγάλης διάρκειας παραμονής στο οξύ. Έτσι στα επόμενα πειράματα βλάστησης ο χρόνος εμβάπτισης στο πυκνό H₂SO₄ δεν ξεπερνούσε το 1 min.

Τέσσερις μήνες μετά τη συλλογή, σπόροι απολυμάνθηκαν επιφανειακά με 20% διάλυμα χλωρίνης εμπορίου για 20 min και τοποθετήθηκαν για βλάστηση σε υπόστρωμα μισής δύναμης MS με 20 g L⁻¹ σακχαρόζη, στους 5, 10, 15, 20, 25 και 30 °C, υπό 16 h φως, είτε χωρίς προμεταχείριση, ή μετά από σκαριφισμό με σμυριδόχαρτο για 30 sec ή 1 min (μετά το 1 min σκαριφισμού οι σπόροι έσπαγαν), είτε μετά από εμβάπτιση σε πυκνό H₂SO₄ για 15, 30 ή 45 sec, είτε μετά από εμβάπτιση σε GA₃ για 24 ή 48 h χωρίς προμεταχείριση ή μετά από σκαριφισμό με σμυριδόχαρτο για 30 sec, είτε μετά από εμβάπτιση σε H₂O σε θερμοκρασία 20 °C για 24 ή 48 h χωρίς προμεταχείριση ή μετά από σκαριφισμό με σμυριδόχαρτο για 30 sec.

Έξι μήνες μετά τη συλλογή, σπόροι απολυμάνθηκαν επιφανειακά με 20% διάλυμα χλωρίνης εμπορίου για 20 min. και τοποθετήθηκαν για βλάστηση σε υπόστρωμα μισής δύναμης MS με 20 g L⁻¹ σακχαρόζη, στους 5, 10, 15, 20, 25 και 30 °C, υπό 16 h φως, είτε χωρίς προμεταχείριση, ή μετά από σκαριφισμό με σμυριδόχαρτο για 30 sec ή 1 min, ή μετά

από συνδυασμό όλων των μεθόδων σκαριφισμού με σμυριδόχαρτο (30 sec ή 1 min) με εμφάπτιση σε πυκνό H₂SO₄ (15, 30 ή 45 sec).

Έντεκα μήνες μετά τη συλλογή, σπόροι απολυμάνθηκαν επιφανειακά με 20% διάλυμα χλωρίνης εμπορίου για 20 min και τοποθετήθηκαν για βλάστηση σε υπόστρωμα μισής δύναμης MS με 20 g L⁻¹ σακχαρόζη, στους 5, 10, 15, 20, 25 και 30 °C, υπό 16 h φως, είτε χωρίς προμεταχείριση, ή μετά από σκαριφισμό με σμυριδόχαρτο για 30 sec και 1 min.

Σπόροι επίσης συλλέχθηκαν τον Αύγουστο 2014 από τα ίδια ενήλικα αυτοφυή φυτά. Αμέσως μετά τη συλλογή, οι σπόροι απολυμάνθηκαν επιφανειακά με 20% διάλυμα χλωρίνης εμπορίου για 20 min και τοποθετήθηκαν για βλάστηση σε υπόστρωμα μισής δύναμης MS με 20 g L⁻¹ σακχαρόζη, στους 5, 10, 15, 20, 25 και 30 °C, υπό 16 h φως, είτε χωρίς προμεταχείριση, ή μετά από σκαριφισμό με σμυριδόχαρτο για 30 sec ή 1 min, ή μετά από εμφάπτιση σε πυκνό H₂SO₄ για 30 sec ή 1 min.

Π.Ι.2.2.4.4 Ex vitro βλάστηση

Βλαστικότητα σπόρων συλλογής 2013

Σπόροι ένα χρόνο μετά τη συλλογή τους τοποθετήθηκαν (τον Αύγουστο 2014) για βλάστηση σε πλαστικά κιβώτια σποράς, τα οποία περιείχαν υπόστρωμα 1 τύρφη: 1 περλίτη (v/v) στο υαλόφρακτο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου (μέση μηνιαία θερμοκρασία 30 °C) με τους εξής χειρισμούς: α) χωρίς να δεχθούν προμεταχείριση και β) μετά από σκαριφισμό με σμυριδόχαρτο για 1 min.

Σπόροι δεκαεννιά μήνες μετά τη συλλογή τους τοποθετήθηκαν (το Μάρτιο 2015) για βλάστηση είτε σε πλαστικά κιβώτια σποράς, τα οποία περιείχαν υπόστρωμα 1 τύρφη: 1 περλίτη (v/v) στο θερμοκήπιο (μέση μηνιαία θερμοκρασία 20 °C, είτε σε πλαστικά δοχεία (όγκου 500 ml) τα οποία καλύφθηκαν με διάφανη πλαστική μεμβράνη και τοποθετήθηκαν στο θάλαμο επώασης στους 20 °C και 16 h φως. Οι σπόροι τοποθετήθηκαν για βλάστηση είτε χωρίς προμεταχείριση ή μετά από σκαριφισμό με σμυριδόχαρτο για 1 min.

Βλαστικότητα σπόρων συλλογής 2014

Σπόροι επτά και δώδεκα μήνες μετά τη συλλογή τους τοποθετήθηκαν (το Μάρτιο και τον Αύγουστο του 2015, αντίστοιχα) για βλάστηση είτε σε πλαστικά κιβώτια σποράς, τα οποία περιείχαν υπόστρωμα 1 τύρφη: 1 περλίτη (v/v) στο υαλόφρακτο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου (μέση μηνιαία θερμοκρασία 17 °C το Μάρτιο και 33 °C τον Αύγουστο), είτε σε πλαστικά δοχεία (όγκου 500 ml) τα οποία

καλύφθηκαν με διαφανή πλαστική μεμβράνη και τοποθετήθηκαν στο θάλαμο επώασης στους 20 °C και 16 h φως. Οι σπόροι τοποθετήθηκαν για βλάστηση είτε χωρίς προμεταχείριση ή μετά από σκαριφισμό με σφυριδόχαρτο για 1 min.

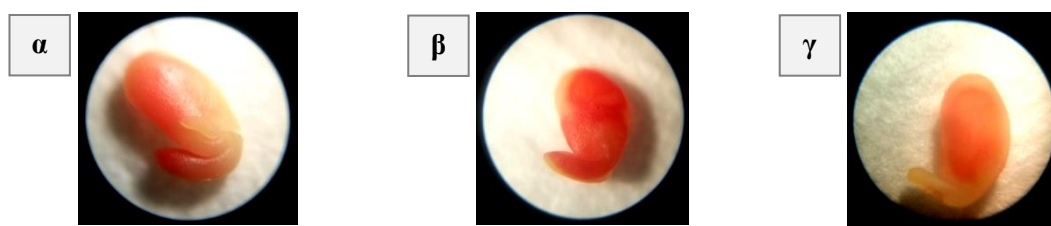
Σε κάθε κιβώτιο σποράς τοποθετήθηκαν 500 σπόροι, ενώ σε κάθε δοχείο (όγκου 500 ml) τοποθετήθηκαν 100 σπόροι και ένας σπόρος θεωρείτο φυτρωμένος όταν οι κοτυληδόνες αναδύονταν από το υπόστρωμα καλλιέργειας. Η βλαστικότητα των σπόρων καταγραφόταν εβδομαδιαία για 2 μήνες.

Π.Ι.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

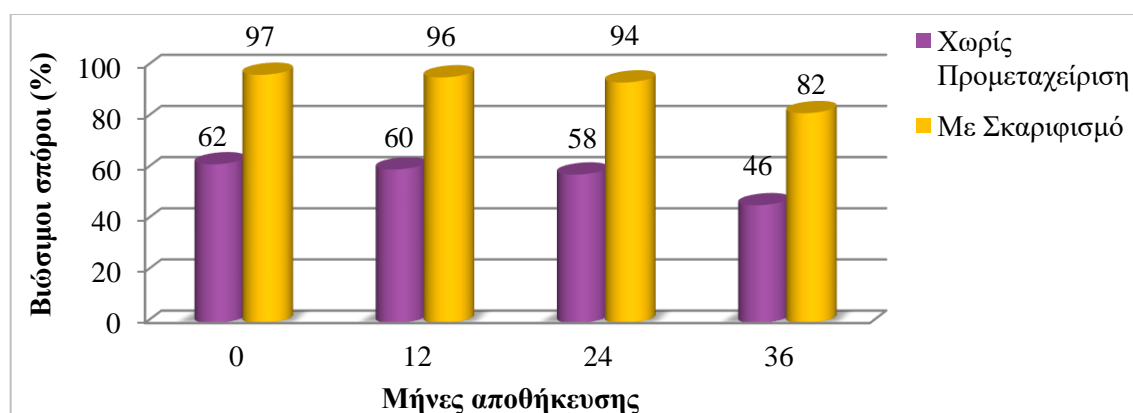
Π.Ι.3.1 *Anthyllis barba-jovis*

Π.Ι.3.1.1 Τέστ Τετραζολίου

Στο τεστ τετραζολίου σπόρων *A. barba-jovis* αμέσως μετά τη συλλογή και μετά από αποθήκευση 12, 24 και 36 μήνες σε θερμοκρασία δωματίου στους σκαριφισμένους σπόρους πρόσφατης συλλογής χρωματίστηκε το 97% των εμβρύων, ενώ στους σπόρους ηλικίας 12, 24 και 36 μηνών χρωματίστηκε το 96%, 94% και 82% αντίστοιχα των εμβρύων (Σχ. Π.Ι.2). Χωρίς προμεταχείριση χρωματίστηκε το 62% των εμβρύων στους σπόρους πρόσφατης συλλογής, 60% για σπόρους ηλικίας 12 μηνών, 58% για σπόρους ηλικίας 24 μηνών και 46% για τους σπόρους ηλικίας 36 μηνών (Σχ. Π.Ι.2, Εικ. Π.Ι.1α, β, γ). Ως εκ τούτου μετά την πάροδο 36 μηνών φαίνεται ότι το 20% περίπου των σπόρων *A. barba-jovis* χάνουν σταδιακά τη βλαστική τους ικανότητα.



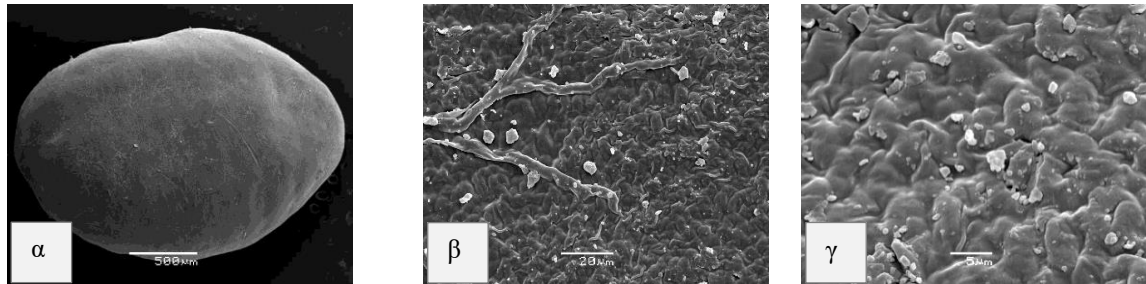
Εικόνα Π.Ι.1. Έμβρυα *A. barba-jovis*, που απέκτησαν ερυθρό χρώμα στο ριζίδιο και στις κοτυληδόνες (βιώσιμα) (α, β) και έμβρυο που οι κοτυληδόνες χρωματίστηκαν στο ½ της επιφάνειάς τους και το υποκοτύλιο δεν χρωματίστηκε (μη βιώσιμα) (γ).



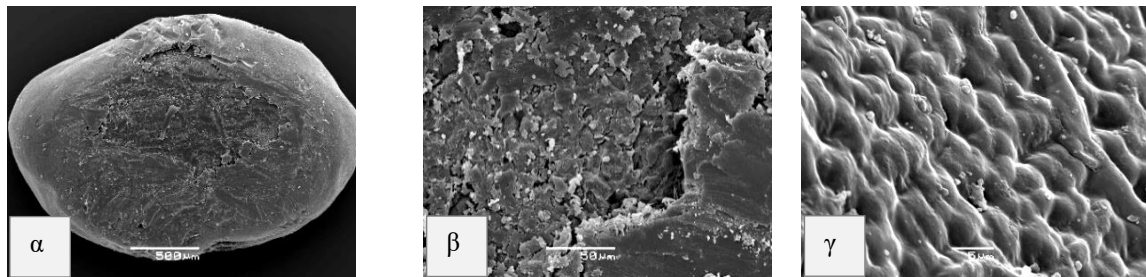
Σχήμα Π.Ι.2. Βιωσιμότητα σπόρων του είδους *A. barba-jovis*, 0, 12, 24 και 36 μήνες μετά τη συλλογή τους.

Π.Ι.3.1.2 Μικροσκοπική παρατήρηση σπόρων

Στην ιστολογική παρατήρηση της εξωτερικής επιφάνειας των σπόρων χωρίς περικάρπιο που δεν είχαν δεχθεί προμεταχείριση, φάνηκε καθαρά η λεία και άθικτη επιφάνειά τους με ορισμένα ρυτιδώματα και κοιλότητες (Εικ. Π.Ι.2α, β, γ), όπως έχει περιγραφεί και από το Saint-Martin (1986) και θεωρείται πως είναι χαρακτηριστικό των ειδών της οικογένειας Fabaceae. Στους σπόρους που εφαρμόστηκε μηχανικός σκαριφισμός βρέθηκαν εμφανή σημάδια μερικής καταστροφής του περιβλήματος (Εικ. Π.Ι.3α, β, γ).



Εικόνα Π.Ι.2. Μη σκαριφισμένος σπόρος *A. barba-jovis* σε μεγέθυνση 500 μm που δείχνει ολόκληρο το σπόρο (α), 20 μm και 5 μm που δείχνει τμήμα της επιφάνειας του σπόρου (β, γ).



Εικόνα Π.Ι.3. Σκαριφισμένος σπόρος *A. barba-jovis* σε μεγέθυνση 500 μm που δείχνει ολόκληρο το σπόρο (α), 20 μm και 5 μm που δείχνει τμήμα της επιφάνειας του σπόρου (β, γ).

Π.Ι.3.1.3 *In vitro* βλάστηση

Στους 0 και 36 μήνες αποθήκευσης η τριπαραγοντική ανάλυση ανέδειξε αλληλεπίδραση των τριών παραγόντων (θερμοκρασίας, σκαριφισμού και φωτοπεριόδου), ενώ στους 12 και 24 μήνες αποθήκευσης δεν υπήρχε αλληλεπίδραση. Η δεύτερου βαθμού αναλύσεις στους 12 και 24 μήνες αποθήκευσης ανέδειξαν αλληλεπίδραση μεταξύ της θερμοκρασίας και του σκαριφισμού.

Σπόροι αμέσως μετά τη συλλογή τους χωρίς προμεταχείριση, βλάστησαν σε υψηλότερο ποσοστό (65%) στους 20 °C, ενώ οι σκαριφισμένοι βλάστησαν σχεδόν όλοι (91 - 98%) στο εύρος θερμοκρασιών 15 - 25 °C (Πίν. Π.Ι.1, Σχ. Π.Ι.3). Στους 5 και 35 °C σημειώθηκε το

χαμηλότερο ποσοστό βλαστικότητας (Πίν. Π.Ι.1, Σχ. Π.Ι.3). Στους σκαριφισμένους σπόρους η βλάστηση ξεκίνησε ταχύτερα σε σύγκριση με τους μη σκαριφισμένους σπόρους, όπως φανερώνουν οι τιμές T_{50} , όμως η περίοδος για την ολοκλήρωση της βλάστησης ήταν παρόμοια τόσο για τους μη όσο και για τους σκαριφισμένους σπόρους (Πίν. Π.Ι.1). Η βλάστηση των σπόρων (σκαριφισμένων ή μη) ολοκληρώθηκε ταχύτερα στις θερμοκρασίες 10, 15, 20, 25 και 30 °C, ενώ στους 5 και 35°C καθυστέρησε μέχρι και 30 ημέρες (Πίν. Π.Ι.1).

Η αποθήκευση μέχρι και 12 μήνες σε θερμοκρασίες δωματίου δεν επέδρασε ιδιαίτερα στο ποσοστό βλαστικότητας των σπόρων, αλλά αύξησε την περίοδο βλάστησης (Πίν. Π.Ι.2, Σχ. Π.Ι.4). Αυξανόμενου του χρόνου αποθήκευσης μέχρι τους 24 και 36 μήνες, σταδιακά, μειώθηκε η βλαστικότητα, μέχρι και 50% στους μη σκαριφισμένους ή 30% στους σκαριφισμένους σπόρους στους 20 °C (Πίν. Π.Ι.3, Π.Ι.4 και Σχ. Π.Ι.5, Π.Ι.6). Το υψηλό ποσοστό βιωσιμότητας των σπόρων μέχρι και δύο χρόνια από τη συλλογή τους, επιβεβαιώνεται και από έλεγχο βλαστικότητας των σπόρων *ex vitro* (Πίν. Π.Ι.5). Ένα γενικό συμπέρασμα είναι ότι οι σπόροι που αποθηκεύτηκαν για 24 μήνες βλάστησαν σε υψηλά ποσοστά, αλλά σχετικά χαμηλότερα από τους σπόρους πρόσφατης συλλογής, ενώ οι σπόροι που αποθηκεύτηκαν για 36 μήνες βλάστησαν σε αισθητά χαμηλότερα ποσοστά από τους σπόρους πρόσφατης συλλογής.

Ο σκαριφισμός ευνόησε τη βλαστικότητα των σπόρων *A. barba-jovis*, ενώ το σκότος ελάχιστα αύξησε τα ποσοστά βλαστικότητας σε σχέση με τη φωτοπερίοδο 16 h κυρίως στις μη ευνοϊκές θερμοκρασίες. Στους 20 °C που είναι η καλύτερη θερμοκρασία βλάστησης παρατηρήθηκε ότι οι σκαριφισμένοι ή μη σπόροι στους 0 μήνες αποθήκευσης βλάστησαν στο ίδιο ποσοστό είτε σε φωτοπερίοδο είτε σε συνεχές σκοτάδι (Σχ. Π.Ι.7, Εικ. Π.Ι.4, Π.Ι.5). Το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε και στους μη σκαριφισμένους σπόρους στους 12 μήνες αποθήκευσης (Σχ. Π.Ι.7). Στους 12, 24 και 36 μήνες αποθήκευσης στους σκαριφισμένους σπόρους επέδρασε θετικά το φως σε σύγκριση με το συνεχές σκοτάδι, ενώ στους μη σκαριφισμένους στους 12 και 24 μήνες αποθήκευσης επέδρασε θετικά η παραμονή των σπόρων σε συνεχές σκοτάδι (Σχ. Π.Ι.7).

Τα σπορόφυτα που παρήχθησαν από σπόρους είτε σκαριφισμένους είτε μη στο συνεχές σκοτάδι, σε όλες τις θερμοκρασίες, είχαν φύλλα κίτρινου χρώματος και βλαστό λευκού χρώματος, λόγω έλλειψης φωτός και κατά επέκταση μειωμένης φωτοσύνθεσης (Εικ. Π.Ι.4, Π.Ι.5). Επιπλέον τα μεσογονάτια διαστήματα του βλαστού τους ήταν πιο επιμηκυσμένα σε σύγκριση με τα σπορόφυτα που παρήχθησαν σε φως 16 h (Εικ. Π.Ι.4, Π.Ι.5).

Οι τιμές του T₅₀ και ο χρόνος που απαιτήθηκε για την ολοκλήρωση της βλάστησης, φανερώνουν ταχύτερη βλάστηση, καθώς η θερμοκρασία αυξάνει μέχρι τους 30 °C, ενώ στους 5 °C σημειώθηκε καθυστέρηση περίπου 10 - 30 ημέρες. Γενικά η βλάστηση ολοκληρώθηκε ταχύτερα σε ένα εύρος θερμοκρασιών από 10 - 25 °C. Η θερμοκρασία των 20 °C έδωσε υψηλότερα ποσοστά βλάστησης, σε σκαριφισμένους ή μη σπόρους, όλων των ηλικιών, ενώ χαμηλότερες ή υψηλότερες θερμοκρασίες μείωναν προοδευτικά τη βλαστικότητα.

Πίνακας Π.Ι.1. *In vitro* βλαστικότητα σπόρων *A. barba-jovis*, αμέσως (0 μήνες) μετά τη συλλογή τους, στους 5, 10, 15, 20, 25, 30 ή 35 °C, σε συνθήκες συνεχούς σκότους (Σ) ή σε φωτοπερίοδο 16 h πλήρους φωτός (Φ), χωρίς προμεταχείριση σκαριφισμού.

Φωτοπερίοδος/ Θερμοκρασία επώασης (°C)	Βλαστικότητα (%)	T ₅₀	Περίοδος βλάστησης (ημέρες)	Βλαστικότητα (%)	T ₅₀	Περίοδος βλάστησης (ημέρες)
	Μη Σκαριφισμένοι Σπόροι			Σκαριφισμένοι Σπόροι		
Φ / 5	18,0 ± 2,0 e	38	46	37,0 ± 2,1 f	26	46
Φ / 10	32,0 ± 3,6 cd	10	28	84,0 ± 3,1 c	12	30
Φ / 15	42,0 ± 3,9 bc	8	24	92,0 ± 2,5 ab	6	28
Φ / 20	65,0 ± 2,7 a	10	26	98,0 ± 1,3 a	6	24
Φ / 25	30,0 ± 2,6 cd	12	26	92,0 ± 2,5 ab	8	26
Φ / 30	22,0 ± 2,0 de	14	32	74,0 ± 2,7 d	12	30
Φ / 35	20,0 ± 3,0 de	26	34	18,0 ± 2,9 g	24	32
Σ / 5	20,0 ± 3,0 de	30	50	58,0 ± 2,9 e	26	50
Σ / 10	50,0 ± 3,0 b	12	32	91,0 ± 2,8 abc	6	22
Σ / 15	51,0 ± 3,8 b	10	28	97,0 ± 1,5 a	6	18
Σ / 20	65,0 ± 3,7 a	8	24	98,0 ± 1,3 a	6	16
Σ / 25	49,0 ± 3,5 b	14	26	85,0 ± 3,1 bc	8	26
Σ / 30	33,0 ± 3,4 cd	18	28	76,0 ± 3,1 d	10	28
Σ / 35	30,0 ± 3,0 cd	24	32	20,0 ± 2,6 g	24	30
F _{Θερμοκρασίας}	***			-		
F _{Φωτοπεριόδου}	**			-		
F _{Θερμοκρασίας x Φωτοπεριόδου}	NS			*		
F _{one-way ANOVA}	***			***		
F _{Θερμοκρασίας}	-					
F _{Φωτοπεριόδου}	-					
F _{Σκαριφισμού}	-					
F _{Θερμοκρασίας x Φωτοπεριόδου}	-					
F _{Θερμοκρασίας x Σκαριφισμού}	-					
F _{Φωτοπεριόδου x Σκαριφισμού}	-					
F _{Θερμοκρασίας x Φωτοπεριόδου x Σκαριφισμού}	***					

Οι μέσοι ± τυπικό σφάλμα επί της στήλης ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. NS: μη σημαντικά ή *, **, ***: σημαντικά σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$, $P \leq 0,001$, αντίστοιχα. Πέντε επαναλήψεις των 20 σπόρων χρησιμοποιήθηκαν ανά μεταχείριση.

Πίνακας Π.Ι.2. *In vitro* βλαστικότητα σπόρων *A. barba-jovis*, 12 μήνες μετά τη συλλογή τους, στους 5, 10, 15, 20, 25, 30 ή 35 °C, σε συνθήκες συνεχούς σκότους (Σ) ή σε φωτοπερίοδο 16 h πλήρους φωτός (Φ), χωρίς προμεταχείριση σκαριφισμού.

Φωτοπερίοδος/ Θερμοκρασία επώασης (°C)	Βλαστικότητα (%)	T ₅₀	Περίοδος βλάστησης (ημέρες)	Βλαστικότητα (%)	T ₅₀	Περίοδος βλάστησης (ημέρες)
	Μη Σκαριφισμένοι Σπόροι			Σκαριφισμένοι Σπόροι		
Φ / 5	16,0 ± 1,9 d	36	48	30,0 ± 3,2 e	26	48
Φ / 10	30,0 ± 7,6 cd	26	40	82,0 ± 6,4 ab	16	40
Φ / 15	40,0 ± 8,7 bc	20	38	88,0 ± 2,0 ab	12	32
Φ / 20	60,0 ± 8,1 a	26	42	96,0 ± 1,9 a	12	36
Φ / 25	27,0 ± 7,0 cd	30	40	92,0 ± 3,0 a	12	38
Φ / 30	20,0 ± 3,5 cd	20	34	63,0 ± 7,7 cd	10	32
Φ / 35	17,0 ± 1,2 d	22	30	12,0 ± 1,2 f	26	30
Σ / 5	19,0 ± 2,9 d	38	50	55,0 ± 4,5 d	32	50
Σ / 10	43,0 ± 10,8 abc	22	40	82,0 ± 2,6 ab	16	40
Σ / 15	45,0 ± 6,3 abc	28	40	84,0 ± 8,0 ab	12	32
Σ / 20	59,0 ± 10,7 ab	20	36	82,0 ± 7,2 ab	12	32
Σ / 25	45,0 ± 4,5 abc	26	36	83,0 ± 9,6 ab	12	34
Σ / 30	31,0 ± 6,4 cd	20	30	73,0 ± 3,0 bc	10	30
Σ / 35	28,0 ± 6,6 cd	28	34	17,0 ± 5,6 ef	22	30
<i>F</i> _{Θερμοκρασίας}	***			-		
<i>F</i> _{Φωτοπεριόδου}	*			-		
<i>F</i> _{Θερμοκρασίας x Φωτοπεριόδου}	NS			*		
<i>F</i> _{One-way ANOVA}	***			***		
<i>F</i> _{Θερμοκρασίας}	***					
<i>F</i> _{Φωτοπεριόδου}	*					
<i>F</i> _{Σκαριφισμού}	***					
<i>F</i> _{Θερμοκρασίας x Φωτοπεριόδου}	NS					
<i>F</i> _{Θερμοκρασίας x Σκαριφισμού}	***					
<i>F</i> _{Φωτοπεριόδου x Σκαριφισμού}	NS					
<i>F</i> _{Θερμοκρασίας x Φωτοπεριόδου x Σκαριφισμού}	NS					

Οι μέσοι ± τυπικό σφάλμα επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. NS: μη σημαντικά ή *, ***: σημαντικά σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,001$, αντίστοιχα. Πέντε επαναλήψεις των 20 σπόρων χρησιμοποιήθηκαν ανά μεταχείριση.

Πίνακας Π.Ι. 3. *In vitro* βλαστικότητα σπόρων *A. barba-jovis*, 24 μήνες μετά τη συλλογή τους, στους 5, 10, 15, 20, 25, 30 ή 35 °C, σε συνθήκες συνεχούς σκότους (Σ) ή σε φωτοπερίοδο 16 h πλήρους φωτός (Φ), χωρίς προμεταχείριση σκαριφισμού.

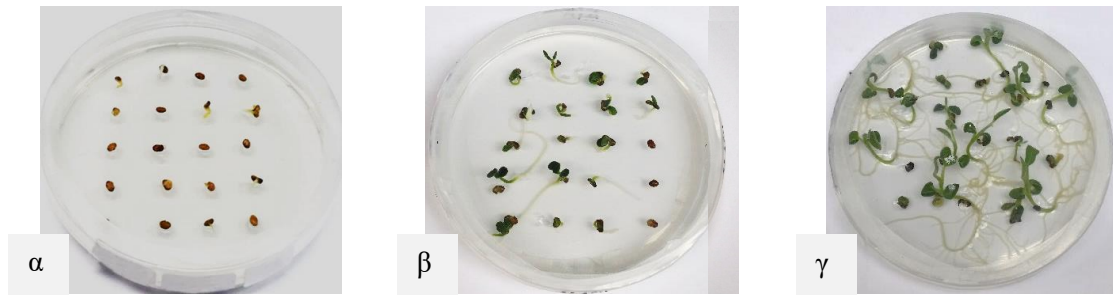
Φωτοπερίοδος/ Θερμοκρασία επώασης (°C)	Βλαστικότητα (%)	T ₅₀	Περίοδος βλάστησης (ημέρες)	Βλαστικότητα (%)	T ₅₀	Περίοδος βλάστησης (ημέρες)
	Μη Σκαριφισμένοι Σπόροι			Σκαριφισμένοι Σπόροι		
Φ / 5	4,0 ± 1,0 e	32	42	20,0 ± 4,5 h	28	50
Φ / 10	20,0 ± 8,2 bcde	18	30	56,0 ± 5,6 f	12	32
Φ / 15	22,0 ± 5,2 abcd	18	36	89,0 ± 1,9 ab	8	32
Φ / 20	23,0 ± 6,6 abcd	22	40	97,0 ± 3,0 a	8	26
Φ / 25	28,0 ± 6,8 abc	24	32	68,0 ± 4,4 de	8	26
Φ / 30	20,0 ± 5,0 bcde	14	32	60,0 ± 4,5 ef	8	24
Φ / 35	16,0 ± 4,3 cde	20	28	10,0 ± 1,6 h	18	22
Σ / 5	7,0 ± 2,0 de	32	44	34,0 ± 4,3 g	40	52
Σ / 10	25,0 ± 4,7 ab	10	30	70,0 ± 4,5 de	12	30
Σ / 15	23,0 ± 9,0 abcd	10	30	83,0 ± 3,7 bc	8	30
Σ / 20	34,0 ± 4,9 ab	15	30	84,0 ± 1,9 bc	6	30
Σ / 25	38,0 ± 11,5 a	16	32	82,0 ± 5,6 bc	6	26
Σ / 30	30,0 ± 7,9 abc	18	30	75,0 ± 2,7 cd	8	28
Σ / 35	18,0 ± 4,1 bcde	24	28	12,0 ± 3,4 h	10	20
F _{Θερμοκρασίας}	**			-		
F _{Φωτοπεριόδου}	NS			-		
F _{Θερμοκρασίας x Φωτοπεριόδου}	NS			**		
F _{one-way ANOVA}	*			***		
F _{Θερμοκρασίας}	***					
F _{Φωτοπεριόδου}	**					
F _{Σκαριφισμού}	***					
F _{Θερμοκρασίας x Φωτοπεριόδου}	NS					
F _{Θερμοκρασίας x Σκαριφισμού}	***					
F _{Φωτοπεριόδου x Σκαριφισμού}	NS					
F _{Θερμοκρασίας x Φωτοπεριόδου x Σκαριφισμού}	NS					

Οι μέσοι ± τυπικό σφάλμα επί της στήλης ακολουθούν από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. NS: μη σημαντικά ή *, **, ***: σημαντικά σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$, $P \leq 0,001$, αντίστοιχα. Πέντε επαναλήψεις των 20 σπόρων χρησιμοποιήθηκαν ανά μεταχείριση.

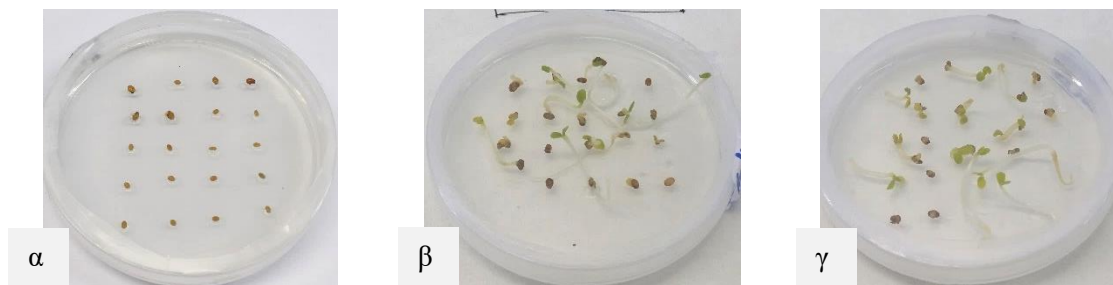
Πίνακας Π.Ι.4. *In vitro* βλαστικότητα σπόρων *A. barba-jovis*, 36 μήνες μετά τη συλλογή τους, στους 5, 10, 15, 20, 25, 30 ή 35 °C, σε συνθήκες συνεχούς σκότους (Σ) ή σε φωτοπερίοδο 16 h πλήρους φωτός (Φ), χωρίς προμεταχείριση σκαριφισμού.

Φωτοπερίοδος/ Θερμοκρασία επώασης (°C)	Βλαστικότητα (%)	T ₅₀	Περίοδος βλάστησης (ημέρες)	Βλαστικότητα (%)	T ₅₀	Περίοδος βλάστησης (ημέρες)
	Μη Σκαριφισμένοι Σπόροι			Σκαριφισμένοι Σπόροι		
Φ / 5	4,0 ± 1,6 e	32	44	10,0 ± 2,6 f	28	52
Φ / 10	10,0 ± 2,1 cde	22	36	41,0 ± 2,8 d	14	32
Φ / 15	12,0 ± 2,5 cd	22	36	67,0 ± 4,7 b	12	30
Φ / 20	10,0 ± 2,0 cde	22	36	77,0 ± 3,0 a	12	26
Φ / 25	10,0 ± 2,1 cde	26	40	53,0 ± 3,0 c	10	28
Φ / 30	8,0 ± 2,5 de	30	38	49,0 ± 3,5 cd	14	28
Φ / 35	8,0 ± 2,0 de	24	32	8,0 ± 2,5 f	16	30
Σ / 5	4,0 ± 1,6 e	34	50	23,0 ± 1,5 e	35	39
Σ / 10	16,0 ± 5,0 bc	14	36	47,0 ± 2,1 cd	14	30
Σ / 15	14,0 ± 2,7 cd	14	32	62,0 ± 4,2 b	8	30
Σ / 20	22,0 ± 2,5 ab	18	34	65,0 ± 5,4 b	14	30
Σ / 25	24,0 ± 2,4 a	22	32	52,0 ± 2,5 c	12	28
Σ / 30	22,0 ± 3,9 ab	30	36	52,0 ± 2,5 c	14	28
Σ / 35	10,0 ± 2,1 cde	30	36	10,0 ± 2,1 f	16	30
<i>F</i> Θερμοκρασίας	***			***		
<i>F</i> Φωτοπεριόδου	***			NS		
<i>F</i> Θερμοκρασίας x Φωτοπεριόδου	*			**		
<i>F</i> one-way ANOVA	***			***		
<i>F</i> Θερμοκρασίας	-					
<i>F</i> Φωτοπεριόδου	-					
<i>F</i> Σκαριφισμού	-					
<i>F</i> Θερμοκρασίας x Φωτοπεριόδου	-					
<i>F</i> Θερμοκρασίας x Σκαριφισμού	-					
<i>F</i> Φωτοπεριόδου x Σκαριφισμού	-					
<i>F</i> Θερμοκρασίας x Φωτοπεριόδου x Σκαριφισμού	**					

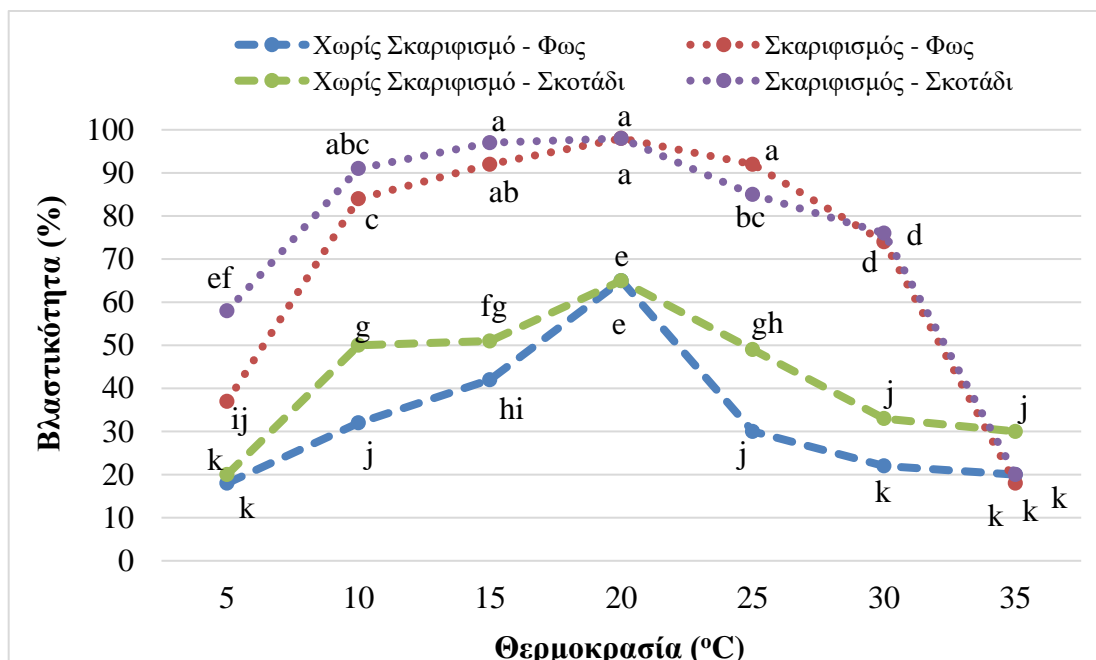
Οι μέσοι ± τυπικό σφάλμα επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. NS: μη σημαντικά ή *, **, ***: σημαντικά σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$, $P \leq 0,001$, αντίστοιχα. Πέντε επαναλήψεις των 20 σπόρων χρησιμοποιήθηκαν ανά μεταχείριση.



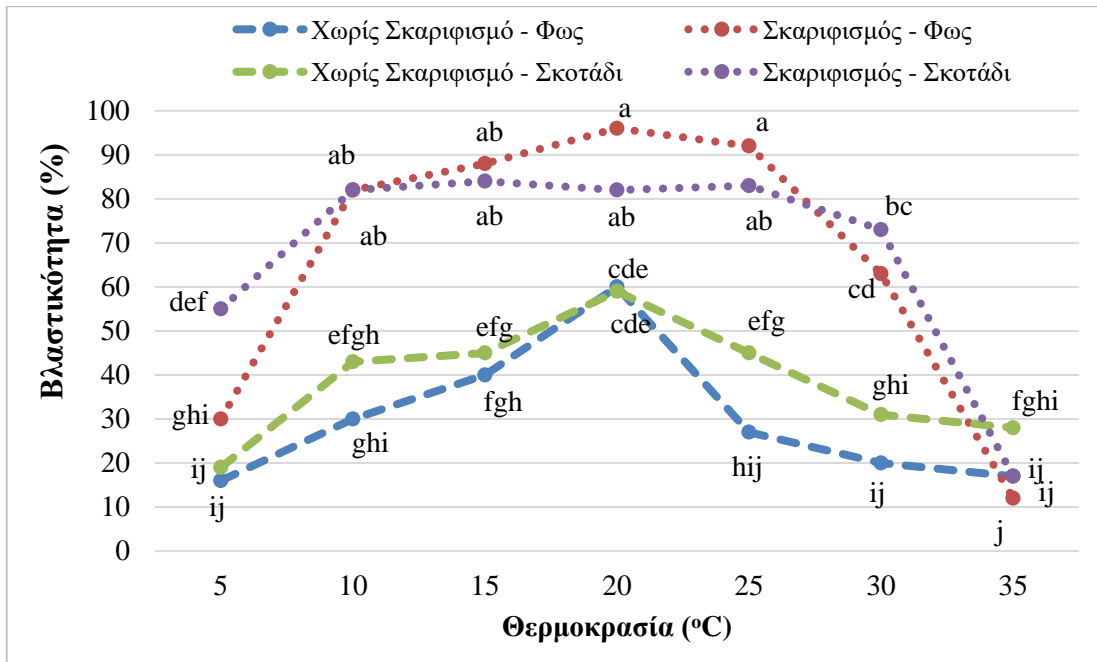
Εικόνα Π.Ι.4. Σκαριφισμένοι σπόροι *A. barba-jovis*, ηλικίας 12 μηνών, σε τρυβλία Petri με θρεπτικό υπόστρωμα ½ MS, στους 20 °C με φωτοπερίοδο 16 h, 4 (α), 18 (β) και 28 (γ) ημέρες μετά την εγκατάστασή τους.



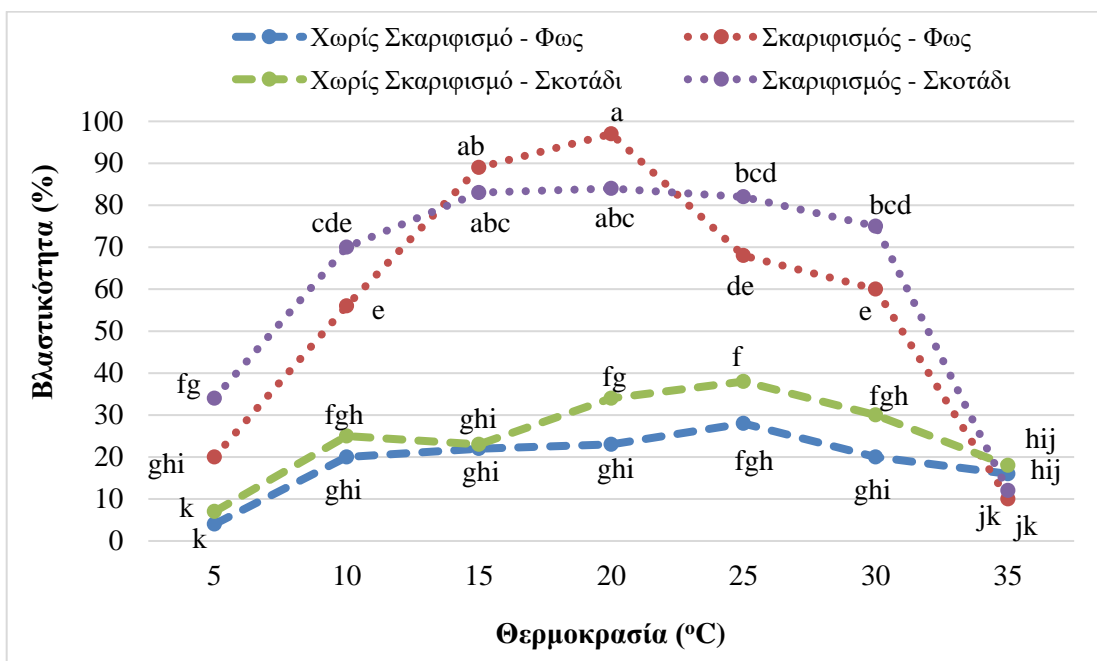
Εικόνα Π.Ι.5. Σκαριφισμένοι σπόροι *A. barba-jovis*, ηλικίας 12 μηνών, σε τρυβλία Petri με θρεπτικό υπόστρωμα ½ MS, στους 20 °C με συνεχές σκοτάδι, 4 (α), 18 (β) και 28 (γ) ημέρες μετά την εγκατάστασή τους.



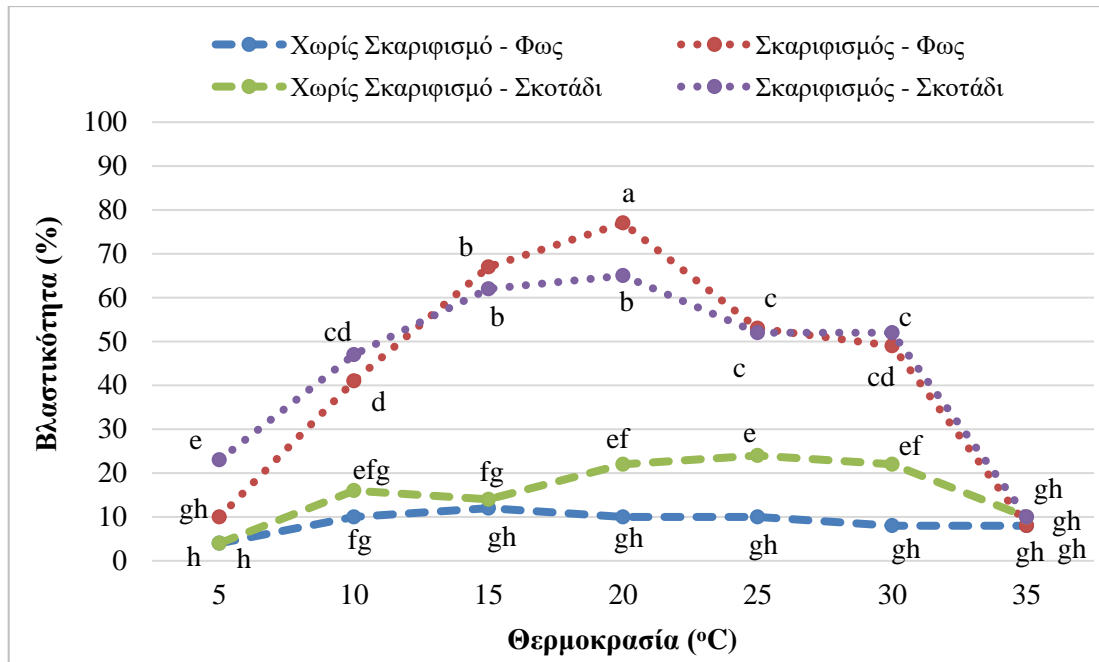
Σχήμα Π.Ι.3. Σύγκριση *in vitro* βλαστικότητα σπόρων *A. barba-jovis*, 0 μήνες μετά τη συλλογή τους, σε φως και σκοτάδι, στους 5, 10, 15, 20, 25, 30 ή 35 °C, με ή χωρίς προμεταχείριση μηχανικού σκαριφισμού.



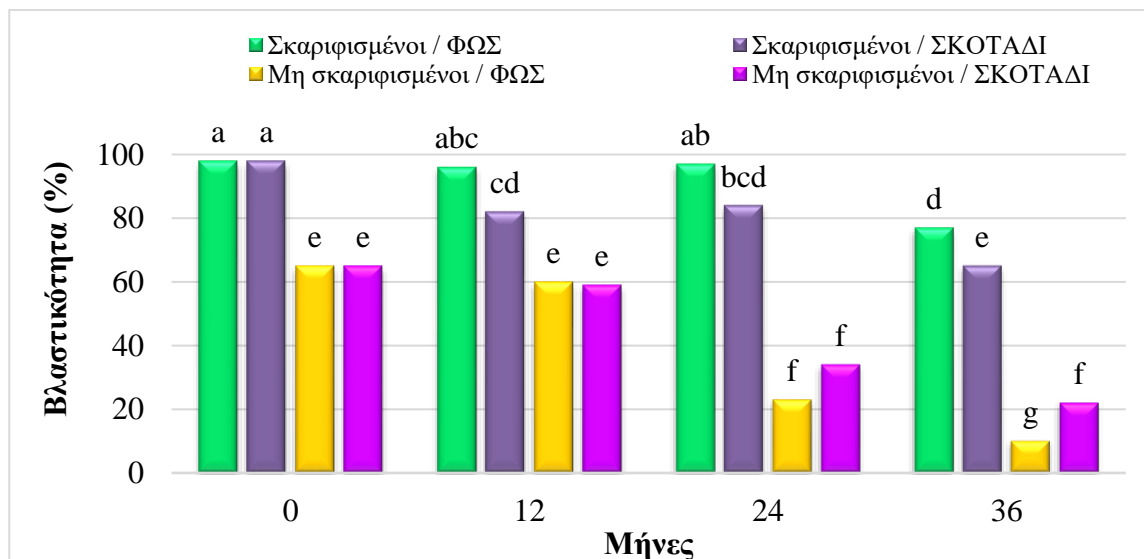
Σχήμα II.1.4. Σύγκριση *in vitro* βλαστικότητα σπόρων *A. barba-jovis*, 12 μήνες μετά τη συλλογή τους, σε φως και σκοτάδι, στους 5, 10, 15, 20, 25, 30 ή 35 °C, με ή χωρίς προμεταχείριση μηχανικού σκαριφισμού.



Σχήμα II.1.5. Σύγκριση *in vitro* βλαστικότητα σπόρων *A. barba-jovis*, 24 μήνες μετά τη συλλογή τους, σε φως και σκοτάδι, στους 5, 10, 15, 20, 25, 30 ή 35 °C, με ή χωρίς προμεταχείριση μηχανικού σκαριφισμού.



Σχήμα II.1.6. Σύγκριση *in vitro* βλαστικότητα σπόρων *A. barba-jovis*, 36 μήνες μετά τη συλλογή τους, σε φως και σκοτάδι, στους 5, 10, 15, 20, 25, 30 ή 35 °C, με ή χωρίς προμεταχείριση μηχανικού σκαριφισμού.



Σχήμα II.1.7. Σύγκριση *in vitro* βλαστικότητα σπόρων *A. barba-jovis*, 0, 12, 24 και 36 μήνες μετά τη συλλογή τους, σε φως και σκοτάδι, στους 20 °C, με ή χωρίς προμεταχείριση μηχανικού σκαριφισμού.

Π.Ι.3.1.4 *Ex vitro* βλάστηση

Σπόροι δίχως σκαριφισμό (με ή χωρίς περικάρπιο), καθώς και σπόροι χωρίς περικάρπιο με σκαριφισμό, τοποθετήθηκαν για βλάστηση σε τύρφη: περλίτη στους 20 °C.

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι η ύπαρξη περικαρπίου παρεμπόδιζε τη βλάστηση των σπόρων *A. barba-jonis*, ενώ ο σκαριφισμός των σπόρων χωρίς περικάρπιο αύξησε τη βλαστικότητα τους (Πίν. Π.Ι.5). Η διπαραγοντική ανάλυση ανέδειξε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ των μηνών αποθήκευσης και του χειρισμού που εφαρμόστηκε στους σπόρους (Πίν. Π.Ι.5). Οι σπόροι όλων των ηλικιών (0, 12, 24 και 36 μηνών) οι οποίοι είχαν δεχθεί σκαριφισμό βλάστησαν σε υψηλότερα ποσοστά σε σύγκριση με τους σπόρους που δεν είχαν δεχθεί προμεταχείριση σκαριφισμού, ενώ πολύ χαμηλά ποσοστά βλαστικότητας σημείωσαν οι σπόροι με περικάρπιο σε όλες τις ηλικίες (Πίν. Π.Ι.5). Επιπλέον οι σκαριφισμένοι σπόροι όλων των ηλικιών βλάστησαν ταχύτερα σε σύγκριση τόσο με τους σπόρους που δεν είχαν δεχθεί προμεταχείριση όσο και με τους σπόρους με το περικάρπιο, όπως φανερώνουν οι τιμές T_{50} και η περίοδος βλάστησης (Πίν. Π.Ι.5).

Η αύξηση της διάρκειας αποθήκευσης των σπόρων επηρέασε αρνητικά τη βλαστικότητα των σπόρων. Οι σπόροι που αποθηκεύτηκαν για 24 και 36 μήνες εμφάνισαν χαμηλότερη βλαστικότητα από τους σπόρους πρόσφατης συλλογής (Πίν. Π.Ι.5). Παρατηρείται η ύπαρξη μιας αρνητικής συσχέτισης μεταξύ του χρόνου αποθήκευσης και της βλαστικότητας των σπόρων.

Τέλος οι σπόροι με περικάρπιο εμφάνισαν τη χαμηλότερη βλαστικότητα σε όλες τις ηλικίες των σπόρων, το οποίο σε μεγάλο ποσοστό πιθανόν οφειλόταν σε «κούφιους» σπόρους, γεγονός που παρατηρήθηκε κατά την αφαίρεση του περικαρπίου των σπόρων πριν την εγκατάστασή τους για βλάστηση *in vitro*, όπου το 50% των σπόρων που καθαρίστηκαν ήταν κούφιοι.

Πίνακας Π.Ι.5. *Ex vitro* βλαστικότητα σπόρων *A. barba-jonis*, 0, 12, 24 και 36 μήνες μετά τη συλλογή στους 20 °C, με το περικάρπιό τους χωρίς προμεταχείριση και χωρίς το περικάρπιο με ή χωρίς σκαριφισμό.

Μήνες αποθήκευσης / Περικάρπιο / Σκαριφισμός	Βλαστικότητα (%)	T ₅₀	Περίοδος βλάστησης (ημέρες)
0 / Μ.Π. / Χ.Σ.	5,0 ± 0,0 g	32	48
0 / Χ.Π. / Χ.Σ.	61,0 ± 2,9 bcd	16	56
0 / Χ.Π. / Μ.Σ.	74,0 ± 3,7 a	10	28
12 / Μ.Π. / Χ.Σ.	4,0 ± 1,0 g	54	62
12 / Χ.Π. / Χ.Σ.	54,0 ± 4,3 d	26	58
12 / Χ.Π. / Μ.Σ.	68,0 ± 4,6 ab	8	32
24 / Μ.Π. / Χ.Σ.	2,0 ± 1,2 g	50	50
24 / Χ.Π. / Χ.Σ.	44,0 ± 4,9 e	18	62
24 / Χ.Π. / Μ.Σ.	64,0 ± 4,3 bc	6	26
36 / Μ.Π. / Χ.Σ.	0,0 ± 0,0 g	-	-
36 / Χ.Π. / Χ.Σ.	28,0 ± 3,7 f	22	64
36 / Χ.Π. / Μ.Σ.	58,0 ± 3,7 cd	14	34
F _{Μήνες αποθήκευσης}	-		
F _{Χειρισμός}	-		
F _{Μήνες αποθήκευσης x Χειρισμός}	**		
F _{one-way ANOVA}	***		

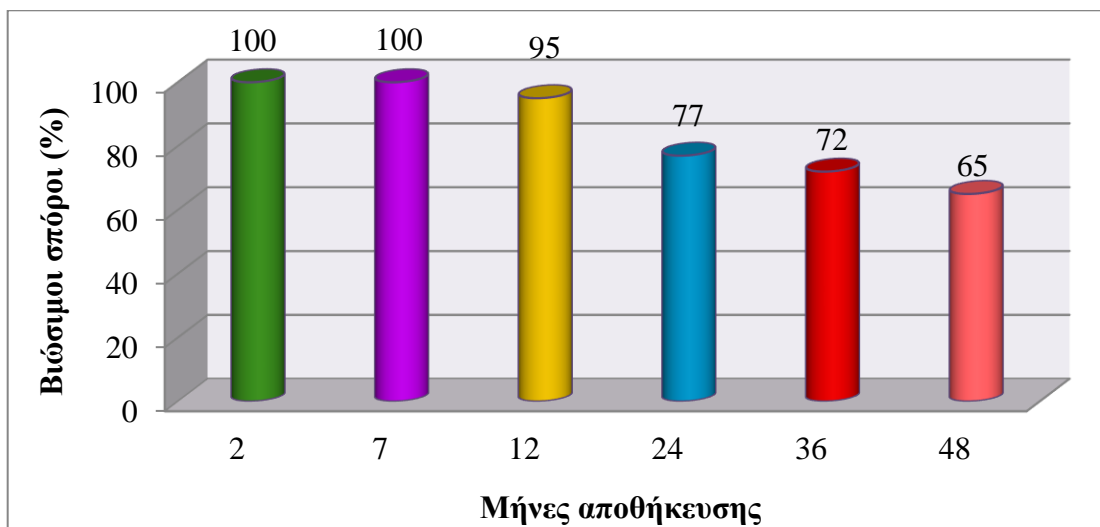
Οι μέσοι ± τυπικό σφάλμα επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. **, ***: σημαντικά σε $P \leq 0,01$, $P \leq 0,001$, αντίστοιχα. Πέντε επαναλήψεις των 20 σπόρων χρησιμοποιήθηκαν ανά μεταχείριση.

[(Μ.Π. = Με Περικάρπιο) / (Χ.Π. = Χωρίς Περικάρπιο) / (Χ.Σ. = Χωρίς Σκαριφισμό) / (Μ.Σ. = Με Σκαριφισμό)]

Π.Ι.3.2 *Ballota acetabulosa*

Π.Ι.3.2.1 Τέστ Τετραζολίου

Στο τεστ τετραζολίου σπόρων *B. acetabulosa* μετά από αποθήκευση 2, 7, 12, 24, 36 και 48 μήνες σε θερμοκρασία δωματίου στους σπόρους πρόσφατης συλλογής (2 και 7 μηνών) χρωματίστηκαν όλα τα έμβρυα (100%), ενώ στους σπόρους ηλικίας 12, 24, 36 και 48 μηνών χρωματίστηκε το 92%, 75%, 70% και 65% αντίστοιχα των εμβρύων (Σχ. Π.Ι.8). Ως εκ τούτου μετά την πάροδο 12 μηνών φαίνεται ότι 20% περίπου των σπόρων *B. acetabulosa* χάνουν σταδιακά τη βλαστική τους ικανότητα.



Σχήμα Π.Ι.8. Βιωσιμότητα σπόρων του είδους *B. acetabulosa*, 2, 7, 12, 24 36 και 48 μήνες μετά τη συλλογή τους.

Π.Ι.3.2.2 *In vitro* βλάστηση

Η βλαστικότητα στο είδος *B. acetabulosa*, μέχρι και δύο χρόνια δεν επηρεάστηκε από την αποθήκευση, κάτι το οποίο επιβεβαιώνεται και από έλεγχο βλαστικότητας των σπόρων *ex vitro* (Πίν. Π.Ι.6, Σχ. Π.Ι.9, Π.Ι.10). Η περαιτέρω αποθήκευση των σπόρων (36 και 48 μήνες) οδήγησε σε μείωση της βλαστικότητας σε όλες τις θερμοκρασίες (Πίν. Π.Ι.6).

Η θερμοκρασία των 15 °C έδωσε τα υψηλότερα ποσοστά βλάστησης, σε όλους τους μήνες αποθήκευσης (2, 7, 12, 24, 36 και 48 μήνες), αν και οι σπόροι φύτρωσαν ικανοποιητικά σε ένα μεγαλύτερο εύρος θερμοκρασιών, από 10 έως 20 °C, το οποίο θεωρείται ως το πιο κατάλληλο ανεξάρτητα από την περίοδο αποθήκευσης (Πίν. Π.Ι.6, Σχ. Π.Ι.9, Εικ. Π.Ι.6). Η βλάστηση των σπόρων παρεμποδίστηκε όταν η θερμοκρασία ξεπέρασε τους 20 °C, ενώ στους 5 °C οι σπόροι δεν βλάστησαν (Πίν. Π.Ι.6 και Σχ. Π.Ι.9).

Οι τιμές του T₅₀ και ο χρόνος που απαιτήθηκε για την ολοκλήρωση της βλάστησης, φανερώνουν ταχύτερη βλάστηση των σπόρων ηλικίας 2, 7 και 12 μηνών στους 10 ή 15 °C, ενώ για τους σπόρους μεγαλύτερης ηλικίας (24, 36 και 48 μηνών) ταχύτερη βλάστηση στους 15 ή 20 °C (Πίν. Π.Ι.6).

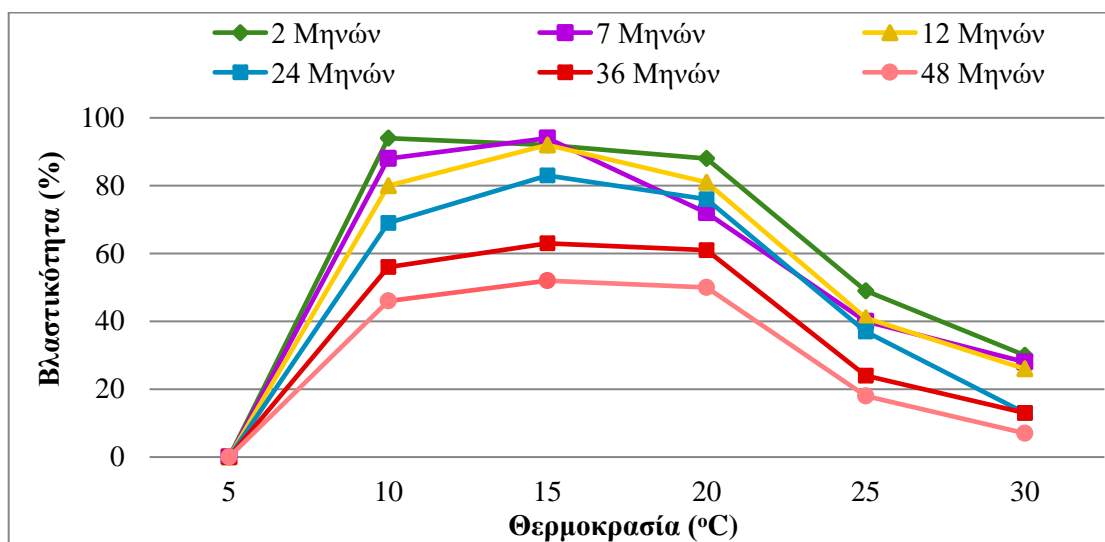
Πίνακας Π.Ι.6. *In vitro* βλαστικότητα σπόρων *B. acetabulosa* 2, 7, 12, 24, 36 και 48 μήνες μετά τη συλλογή στους 5, 10, 15, 20, 25 ή 30 °C, χωρίς προμεταχείριση.

Περίοδος αποθήκευσης (μήνες) / Θερμοκρασία επώασης (°C)	Βλαστικότητα (%)	T ₅₀	Περίοδος βλάστησης (ημέρες)	Περίοδος αποθήκευσης (μήνες) / Θερμοκρασία επώασης (°C)	Βλαστικότητα (%)	T ₅₀	Περίοδος βλάστησης (ημέρες)
2/5	0,0 ± 0,0 d	-	-	24/5	0,0 ± 0,0 e	-	-
2/10	94,0 ± 3,1 a	16	56	24/10	69,0 ± 2,8 b	20	48
2/15	92,0 ± 3,9 a	10	40	24/15	83,0 ± 2,8 a	10	30
2/20	88,0 ± 4,7 a	18	64	24/20	76,0 ± 3,7 a	16	32
2/25	49,0 ± 5,9 b	36	84	24/25	37,0 ± 2,1 c	36	40
2/30	30,0 ± 1,3 c	38	84	24/30	13,0 ± 3,0 d	38	58
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***			<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***		
7/5	0,0 ± 0,0 e	-	-	36/5	0,0 ± 0,0 d	-	-
7/10	88,0 ± 3,6 a	16	34	36/10	56,0 ± 3,1 a	22	44
7/15	94,0 ± 1,6 a	10	24	36/15	63,0 ± 3,7 a	14	34
7/20	72,0 ± 3,9 b	24	40	36/20	61,0 ± 3,8 a	14	30
7/25	40,0 ± 2,6 c	34	50	36/25	24,0 ± 2,2 b	32	38
7/30	28,0 ± 2,9 d	36	52	36/30	13,0 ± 3,0 c	38	60
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***			<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***		
12/5	0,0 ± 0,0 e	-	-	48/5	0,0 ± 0,0 e	-	-
12/10	80,0 ± 3,2 b	18	44	48/10	46,0 ± 2,2 b	20	42
12/15	92,0 ± 3,8 a	8	40	48/15	52,0 ± 2,0 a	14	36
12/20	81,0 ± 3,7 b	18	52	48/20	50,0 ± 2,6 ab	14	30
12/25	41,0 ± 4,5 c	36	62	48/25	18,0 ± 2,5 c	28	40
12/30	26,0 ± 2,2 d	36	56	48/30	7,0 ± 1,5 d	42	64
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***			<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***		
<i>F</i> _{Θερμοκρασίας}		***					
<i>F</i> _{Περίοδος Αποθήκευσης}			***				
<i>F</i> _{Θερμοκρασίας x Περίοδο Αποθήκευσης}			***				
<i>F</i> _{one-way ANOVA}			***				

Οι μέσοι ± τυπικό σφάλμα επί της στήλης σε κάθε περίοδο αποθήκευσης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. ***: σημαντικό σε $P \leq 0,001$. Πέντε επαναλήψεις των 20 σπόρων χρησιμοποιήθηκαν ανά μεταχείριση σε κάθε περίοδο αποθήκευσης.



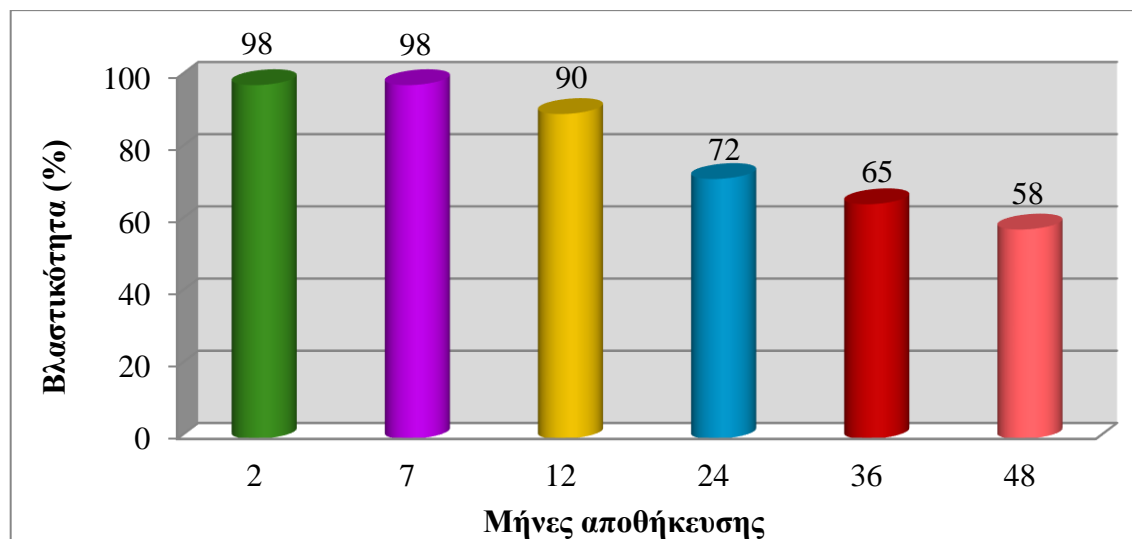
Εικόνα II.1.6. Σπόροι *B. acetabulosa*, αμέσως μετά τη συλλογή τους, σε τρυβλία Petri με θρεπτικό υπόστρωμα 1/2 MS, στους 15 °C με φωτοπερίοδο 16 h, 10 (α), 20 (β) και 30 (γ) ημέρες μετά την εγκατάστασή τους.



Σχήμα II.1.9. Σύγκριση *in vitro* βλαστικότητα σπόρων *B. acetabulosa*, διαφορετικών μηνών αποθήκευσης, σε 16 h φως, στους 5, 10, 15, 20, 25 ή 30 °C, χωρίς προμεταχείριση.

II.1.3.2.3 *Ex vitro* βλάστηση

Σπόροι 2, 7 και 12 μηνών, χωρίς προμεταχείριση βλάστησαν σε υψηλά ποσοστά (90 - 98%) μέσα σε 14 ημέρες, ενώ οι σπόροι 24 μηνών βλάστησαν σε ποσοστό 72% σε διάστημα 20 ημερών. Η περαιτέρω αποθήκευση επηρέασε αρνητικά το ποσοστό βλάστησης, στο οποίο παρατηρήθηκε μείωση 33% ή 40% για τους σπόρους 36 ή 48 μηνών αντίστοιχα (Σχ. II.1.10).



Σχήμα Π.Ι.10. *Ex vitro* βλαστικότητα σπόρων *B. acetabulosa*, 0, 7, 12, 24, 36 και 48 μήνες μετά τη συλλογή στους 20 °C, χωρίς προμεταχείριση.

Π.Ι.3.3 *Clinopodium creticum* και *Clinopodium nepeta*

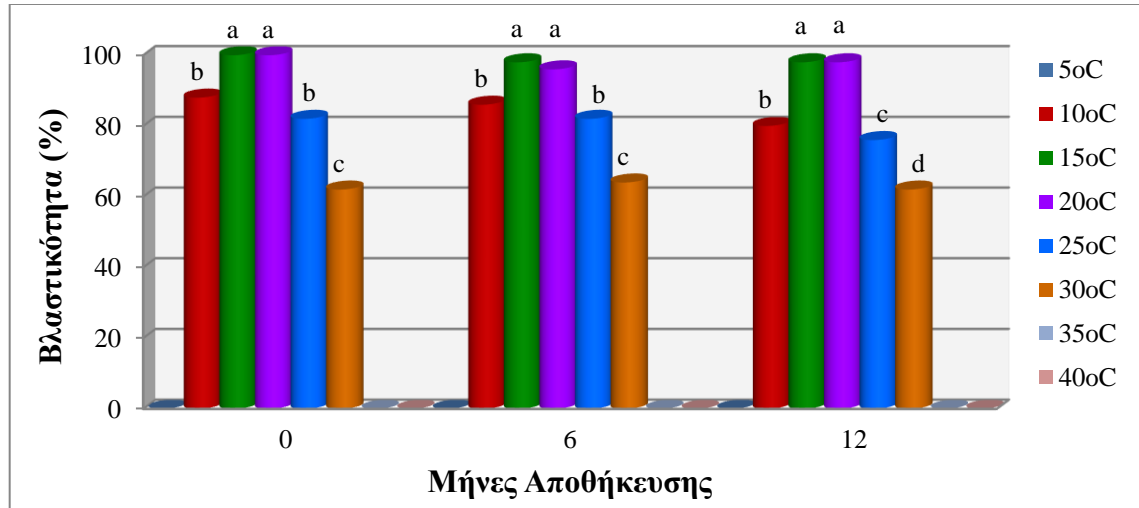
Π.Ι.3.3.1 Τέστ Τετραζολίου

Για το είδος *C. creticum* στους σπόρους πρόσφατης συλλογής (0 μηνών) χρωματίστηκε το 99% των εμβρύων, ενώ στους σπόρους ηλικίας 6 και 12 μηνών χρωματίστηκε το 98% και 97% αντίστοιχα των εμβρύων. Παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν για το είδος *C. nepeta*. Στους σπόρους πρόσφατης συλλογής (0 μηνών) χρωματίστηκαν όλα τα έμβρυα (100%), ενώ στους σπόρους ηλικίας 6 και 12 μηνών χρωματίστηκε το 98% και 97% αντίστοιχα των εμβρύων. Στους σπόρους όλων των ηλικιών και των δύο ειδών δεν είχε γίνει καμία προμεταχείριση.

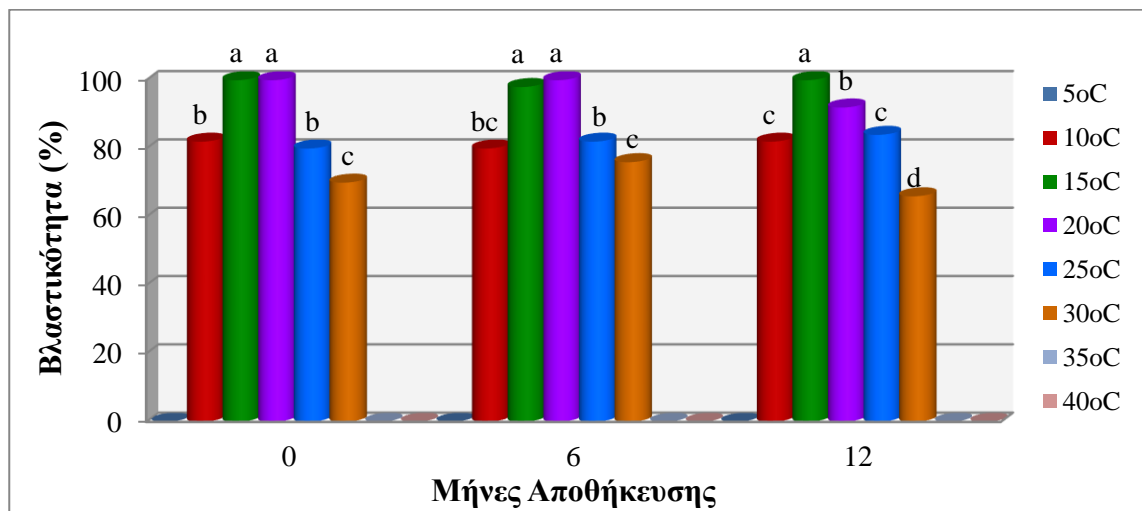
Π.Ι.3.3.3 *In vitro* βλάστηση

Σπόροι των ειδών *C. creticum* και *C. nepeta*, 0, 6 και 12 μήνες μετά τη συλλογή τους, χωρίς καμία προμεταχείριση, βλάστησαν σε υψηλό ποσοστό (92 - 100%), σε σύντομο χρονικό διάστημα (12 - 14 ημέρες), στους 15 ή 20 °C (Πίν. Π.Ι.7, Σχ. Π.Ι.11, Π.Ι.12 και Εικ. Π.Ι.7, Π.Ι.8). Χαμηλότερες ή υψηλότερες θερμοκρασίες από τους 15 ή 20 °C μείωσαν προοδευτικά τη βλαστικότητα των σπόρων, ενώ στους 5, 35 και 40 °C οι σπόροι δεν βλάστησαν (Πίν. Π.Ι.7, Σχ. Π.Ι.11, Π.Ι.12).

Διαπιστώνεται λοιπόν ότι η βλαστικότητα και των δύο υπό εξέταση ειδών δεν επηρεάζεται μέχρι και ένα χρόνο αποθήκευσης, κάτι το οποίο επιβεβαιώθηκε και από έλεγχο βλαστικότητας των σπόρων *ex vitro*.



Σχήμα Π.Ι.11. Βλαστικότητα σπόρων *C. creticum* σε διαφορετικές περιόδους αποθήκευσης (0, 6 και 12 μήνες) και θερμοκρασίες (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 και 40 °C).

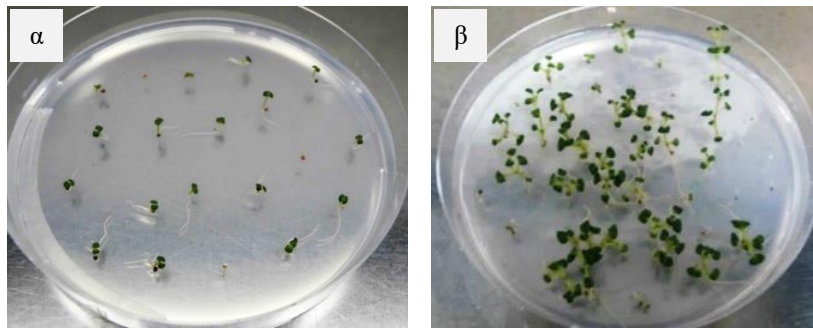


Σχήμα Π.Ι.12. Βλαστικότητα σπόρων *C. nepeta* σε διαφορετικές περιόδους αποθήκευσης (0, 6 και 12 μήνες) και θερμοκρασίες (5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 και 40 °C).

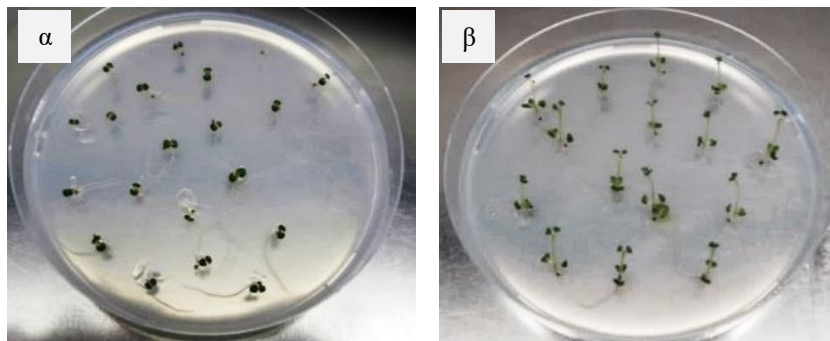
Πίνακας Π.Ι.7. *In vitro* βλαστικότητα σπόρων των ειδών *C. creticum* και *C. nepeta*, 0, 6 και 12 μήνες μετά τη συλλογή στους 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35 ή 40°C, χωρίς προμεταχείριση.

Περίοδος αποθήκευσης (μήνες)/ Θερμοκρασία επώασης (°C)	<i>C. creticum</i>			<i>C. nepeta</i>		
	Βλαστικότητα (%)	T ₅₀	Περίοδος βλάστησης (ημέρες)	Βλαστικότητα (%)	T ₅₀	Περίοδος βλάστησης (ημέρες)
0/5	0,0 ± 0,0 d	-	-	0,0 ± 0,0 d	-	-
0/10	88,0 ± 3,7 b	8	16	82,0 ± 3,7 b	8	16
0/15	100,0 ± 0,0 a	4	14	100,0 ± 0,0 a	4	12
0/20	100,0 ± 0,0 a	2	12	100,0 ± 0,0 a	4	12
0/25	82,0 ± 5,8 b	4	14	80,0 ± 3,0 b	4	14
0/30	62,0 ± 8,0 c	2	12	70,0 ± 5,3 c	2	10
0/35	0,0 ± 0,0 d	-	-	0,0 ± 0,0 d	-	-
0/40	0,0 ± 0,0 d	-	-	0,0 ± 0,0 d	-	-
6/5	0,0 ± 0,0 d	-	-	0,0 ± 0,0 d	-	-
6/10	86,0 ± 4,0 b	10	16	80,0 ± 3,2 bc	10	16
6/15	98,0 ± 2,0 a	4	16	98,0 ± 2,0 a	4	14
6/20	96,0 ± 4,0 a	2	16	100,0 ± 0,0 a	4	14
6/25	82,0 ± 3,7 b	4	14	82,0 ± 2,0 b	6	14
6/30	68,0 ± 3,7 c	0	16	76,0 ± 2,5 c	2	14
6/35	0,0 ± 0,0 d	-	-	0,0 ± 0,0 d	-	-
6/40	0,0 ± 0,0 d	-	-	0,0 ± 0,0 d	-	-
12/5	0,0 ± 0,0 e	-	-	0,0 ± 0,0 e	-	-
12/10	80,0 ± 3,0 b	8	16	82,0 ± 2,5 c	8	14
12/15	98,0 ± 1,3 a	6	16	100,0 ± 0,0a	4	10
12/20	98,0 ± 1,3 a	2	14	92,0 ± 2,5 b	4	14
12/25	76,0 ± 1,6 c	4	14	84,0 ± 1,6 c	6	16
12/30	62,0 ± 2,5 d	4	12	66,0 ± 2,7 d	4	10
12/35	0,0 ± 0,0 e	-	-	0,0 ± 0,0 e	-	-
12/40	0,0 ± 0,0e	-	-	0,0 ± 0,0e	-	-
<i>F</i> _{Θερμοκρασίας}	-			-		
<i>F</i> _{Περίοδος Αποθήκευσης}	-			-		
<i>F</i> _{Θερμοκρασίας x Περίοδο Αποθήκευσης}	*			*		
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***			***		

Οι μέσοι ± τυπικό σφάλμα επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. *, ***: σημαντικά σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,001$, αντίστοιχα. Πέντε επαναλήψεις των 20 σπόρων χρησιμοποιήθηκαν ανά μεταχείριση σε κάθε περίοδο αποθήκευσης.



Εικόνα II.1.7. Σπόροι *C. creticum*, αμέσως μετά τη συλλογή τους, σε τρυβλία Petri με θρεπτικό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS, στους 15 °C με φωτοπερίοδο 16 h, 10 (α) και 30 (β) ημέρες μετά την εγκατάστασή τους.



Εικόνα II.1.8. Σπόροι *C. nepeta*, αμέσως μετά τη συλλογή τους, σε τρυβλία Petri με θρεπτικό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS, στους 15 °C με φωτοπερίοδο 16 h, 10 (α) και 30 (β) ημέρες μετά την εγκατάστασή τους.

II.1.3.3.4 *Ex vitro* βλάστηση

Σπόροι 0, 6 και 12 μήνες μετά τη συλλογή τους χωρίς καμία προμεταχείριση βλάστησαν, στους 20 °C, σε υψηλό ποσοστό (94 - 98% για το είδος *C. creticum* και 96 - 100% για το είδος *C. nepeta*), μέσα σε 14 μέρες (*C. creticum*) και 8 - 10 μέρες (*C. nepeta*).

II.I.3.4 *Scabiosa hymettia*

II.I.3.4.1 Τέστ Τετραζολίου

Στους σπόρους πρόσφατης συλλογής (15 ημερών) χρωματίστηκε το 38% των σπόρων, ενώ στους σπόρους 6 και 12 μηνών χρωματίστηκε το 28 και 26% αντίστοιχα. Άρα οι σπόροι του *S. hymettia* φάνηκε να είχαν χαμηλή βιωσιμότητα.

II.I.3.4.2 *In vitro* βλάστηση

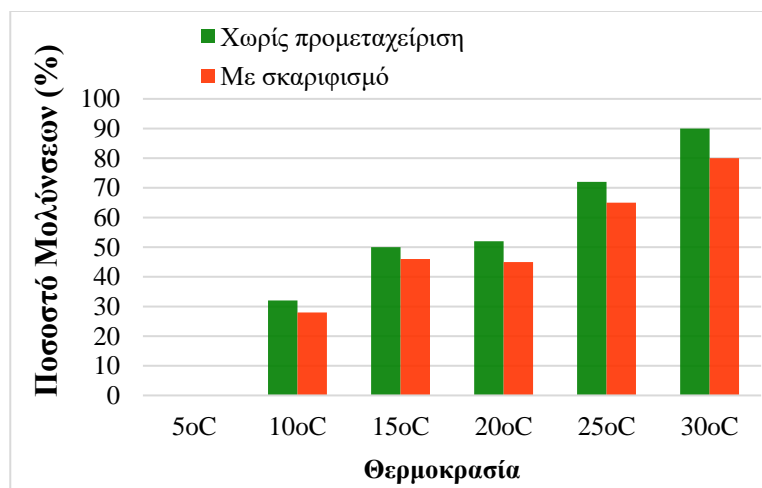
Στους σπόρους ένα μήνα μετά τη συλλογή τους, σημειώθηκε υψηλό ποσοστό μολύνσεων (65 - 90%) στις υψηλές θερμοκρασίες (25 και 30 °C), ενώ στους 5 °C δεν σημειώθηκε μόλυνση (Σχ. II.I.13). Σε όλες τις θερμοκρασίες, το ποσοστό μολύνσεων ήταν υψηλότερο στους σπόρους που δεν είχαν δεχθεί προμεταχείριση, πιθανόν λόγω της παρουσίας τριχιδίων σε πυκνή διάταξη που χαρακτηρίζει τους σπόρους του *S. hymettia* και έχει ως αποτέλεσμα τη συγκράτηση περισσότερων μολυσμάτων, ενώ ο σκαριφισμός με σφυριδόχαρτο για 1 min είχε σαν αποτέλεσμα την καταστροφή των τριχιδίων (Σχ. II.I.13). Λόγω του υψηλού ποσοστού μολύνσεων, και επειδή μετά από 2 μήνες επώασης δεν βλάστησε κανένας σπόρος, στο επόμενο πείραμα αυξήθηκε η συγκέντρωση της χλωρίνης από 15% στα 20% και επιπλέον δοκιμάστηκαν περισσότερες μεταχειρίσεις (Σχ. II.I.13).

Σπόροι ηλικίας τριών μηνών, χωρίς προμεταχείριση ή με σκαριφισμό, με σφυριδόχαρτο, για 1 min, σημείωσαν ανάλογα αποτελέσματα με σπόρους ηλικίας ενός μηνός. Οι σπόροι που δέχθηκαν προμεταχείριση με πυκνό H₂SO₄ για 5, 10 και 15 min «κάηκαν». Ως εκ τούτου ο χρόνος εμβάπτισης σε πυκνό H₂SO₄ σε επόμενα πειράματα, δεν ξεπέρασε το 1 min.

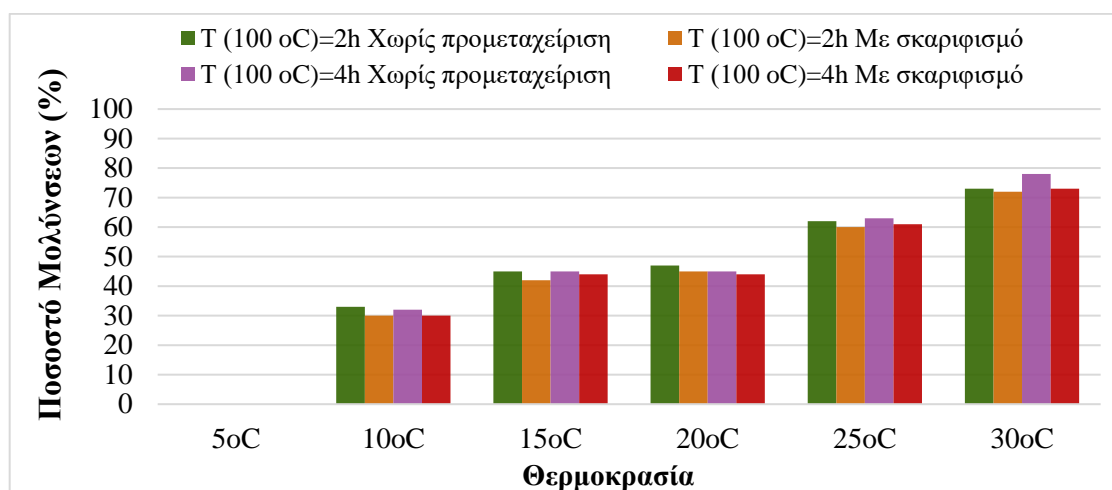
Η εμβάπτιση σπόρων, χωρίς προμεταχείριση ή μετά από σκαριφισμό, με σφυριδόχαρτο για 1 min, σε H₂O σε θερμοκρασία 100 °C για 2 και 4 h, δεν είχε θετική επίδραση στη βλάστησή τους (Σχ. II.I.14). Το ποσοστό μολύνσεων κυμάνθηκε και στις δύο αυτές μεταχειρίσεις σε υψηλό ποσοστό (62 - 78%) στους 25 και 30 °C, ενώ στους 5 °C δεν παρατηρήθηκε μόλυνση (Σχ. II.I.14). Τέλος στους 15 και 20 °C το ποσοστό μολύνσεων ήταν παρόμοιο ανεξάρτητα από τις μεταχειρίσεις που είχαν υποστεί οι σπόροι (Σχ. II.I.14).

Ταυτόχρονα σπόροι, χωρίς προμεταχείριση ή μετά από σκαριφισμό με σφυριδόχαρτο για 30 sec ή 1 min τοποθετήθηκαν στους 5 °C για 3 ή 4 μήνες πριν την τοποθέτησή τους στους 20 ή 25 °C και στους 30 °C για 3 ή 4 μήνες πριν την τοποθέτησή τους στους 10, 15 ή 20 °C. Η εμφάνιση των μολύνσεων σε σπόρους που αρχικά τοποθετήθηκαν για *in vitro* βλάστηση στους 5 °C για 3 ή 4 μήνες σημειώθηκε όταν οι σπόροι μεταφέρθηκαν σε θερμοκρασία 20 και 25 °C σε υψηλό ποσοστό (45 - 65%). Το ποσοστό μολύνσεων των σπόρων που αρχικά

τοποθετήθηκαν για *in vitro* βλάστηση στους 30 °C, παρατηρήθηκε από τις πρώτες ημέρες τις εγκατάστασης των σπόρων, και επίσης σε υψηλές τιμές (80 - 92%). Όσον αφορά τη βλάστηση των σπόρων κανένας σπόρος δεν βλάστησε σε καμία επέμβαση που δοκιμάστηκε.



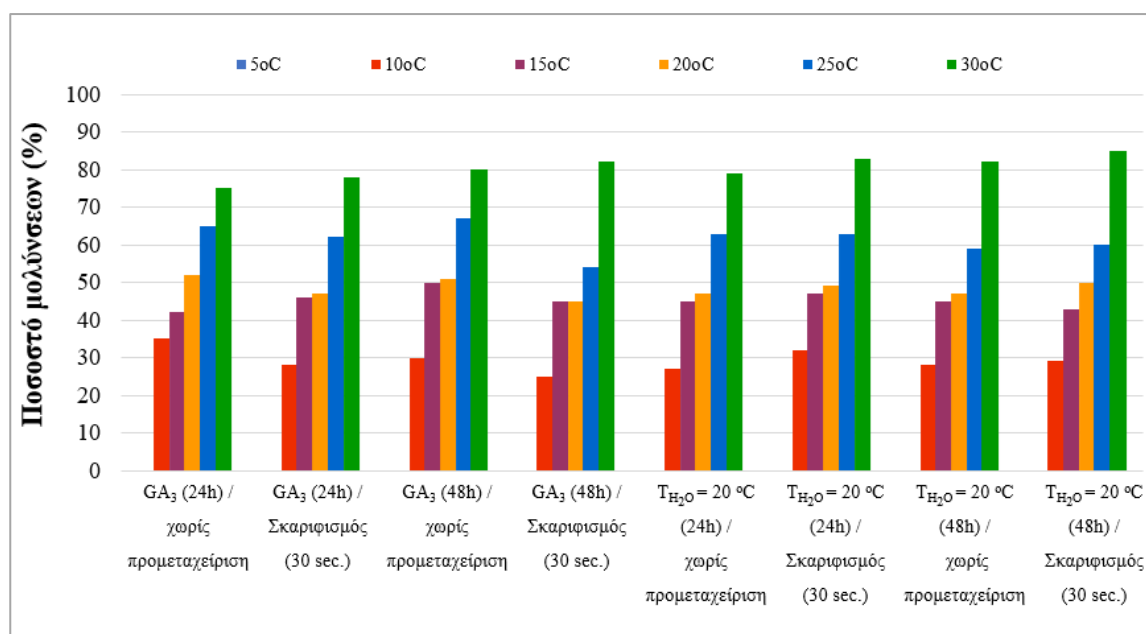
Σχήμα Π.Ι.13. Ποσοστό μολύνσεων των σπόρων του *S. hymettia*, ένα μήνα μετά τη συλλογή στους, 5, 10, 15, 20, 25 ή 30 °C, χωρίς προμεταχείριση ή μετά από σκαριφισμό για 1min.



Σχήμα Π.Ι.14. Ποσοστό μολύνσεων των σπόρων του *S. hymettia*, τρεις μήνες μετά τη συλλογή στους, 5, 10, 15, 20, 25 ή 30 °C.

Επειδή στο προηγούμενο πείραμα οι σπόροι που εμβάπτιστηκαν σε πυκνό H₂SO₄ για 5, 10 και 15 min, «κάηκαν», στους σπόρους ηλικίας τεσσάρων μηνών μειώθηκε ο χρόνος εμβάπτισης στα 15, 30 ή 45 sec. Επιπλέον, μαζί με τους μάρτυρες (χωρίς προμεταχείριση, ή μετά από σκαριφισμό με σμυριδόχαρτο για 30 sec ή 1 min), δοκιμάστηκαν και εμβάπτιση των σπόρων σε GA₃ για 24 ή 48 h χωρίς προμεταχείριση ή μετά από σκαριφισμό με σμυριδόχαρτο για 30 sec, είτε μετά από εμβάπτιση σε H₂O σε θερμοκρασία 20 °C για 24 ή 48 h χωρίς προμεταχείριση ή μετά από σκαριφισμό με σμυριδόχαρτο για 30 sec. Στους σπόρους που δεν εφαρμόστηκε προμεταχείριση ή που σκαριφίστηκαν με σμυριδόχαρτο για

30 sec ή 1 min, το ποσοστό μολύνσεων ήταν παρόμοιο με τα προηγούμενα πειράματα. Οι σπόροι που εμβάπτιστηκαν σε πυκνό H_2SO_4 για 15, 30 ή 45 sec, δεν «κάηκαν», αλλά το ποσοστό μολύνσεων παρέμεινε υψηλό και ιδιαίτερα στις υψηλές θερμοκρασίες (25 και 30 °C) αν και το πυκνό H_2SO_4 «έκαψε» τα τριχίδια των σπόρων. Όσον αφορά την εμβάπτιση των σπόρων (χωρίς προμεταχείριση ή μετά από σκαριφισμό με σμυριδόχαρτο για 30 sec) σε GA_3 για 24 ή 48 h ή σε H_2O σε θερμοκρασία 20 °C για 24 ή 48 h, δεν επέδρασε θετικά στη βλάστηση των σπόρων, ενώ και τα ποσοστά των μολύνσεων παρέμειναν υψηλά (Σχ. Π.Ι.15). Τέλος όσον αφορά τη βλάστηση των σπόρων, κανένας σπόρος δεν βλάστησε.



Σχήμα Π.Ι.15. Ποσοστό μολύνσεων των σπόρων του *S. hymettia*, τέσσερις μήνες μετά τη συλλογή στους 5, 10, 15, 20, 25 ή 30 °C στις επεμβάσεις με GA_3 .

Έξι μήνες μετά τη συλλογή, σπόροι τοποθετήθηκαν για *in vitro* βλάστηση στους 5, 10, 15, 20, 25 και 30 °C, είτε χωρίς προμεταχείριση, είτε μετά από σκαριφισμό με σμυριδόχαρτο για 30 sec ή 1 min ή μετά από συνδυασμό όλων των μεθόδων σκαριφισμού με σμυριδόχαρτο (30 sec ή 1 min) με εμβάπτιση σε πυκνό H_2SO_4 (15, 30 ή 45 sec). Το ποσοστό μολύνσεων παρέμεινε υψηλό σε όλες τις επεμβάσεις που δοκιμάστηκαν και ιδιαίτερα στις υψηλές θερμοκρασίες, όπως και στα προηγούμενα πειράματα, χωρίς να σημειωθεί βλάστηση.

Στους σπόρους ηλικίας 11 μηνών, το ποσοστό μολύνσεων παρέμεινε υψηλό σε όλες τις επεμβάσεις που δοκιμάστηκαν (χωρίς προμεταχείριση, ή μετά από σκαριφισμό με σμυριδόχαρτο για 30 sec και 1 min) και επιπλέον δεν παρατηρήθηκε βλάστηση.

Σπόροι συλλέχθηκαν και τον Αύγουστο 2014, από τα ίδια μητρικά, ενήλικα, αυτοφυή φυτά. Αμέσως μετά τη συλλογή, οι σπόροι τοποθετήθηκαν για *in vitro* βλάστηση στους 5, 10, 15, 20, 25 και 30 °C, χωρίς προμεταχείριση είτε μετά από σκαριφισμό για 30 sec ή 1 min ή μετά από εμβάπτιση σε πυκνό H₂SO₄ για 30 sec ή 1 min με αποτελέσματα παρόμοια με τους σπόρους που είχαν συλλεχθεί τον Αύγουστο 2013.

Διαπιστώνεται ότι η βλάστηση των σπόρων του *S. hymettia* 0, 1, 3, 4, 6 και 11 μήνες μετά τη συλλογή, ήταν αδύνατη σε όλες τις *in vitro* επεμβάσεις που δοκιμάστηκαν. Σε ένα βαθμό αυτό πιθανώς να οφείλεται στο μικρό ποσοστό βιώσιμων εμβρύων, κάτι που διαπιστώνεται και από το τεστ τετραζολίου, το οποίο έδειξε ότι μόνο το 38% των εμβρύων ήταν βιώσιμα σε συνδυασμό με τις μολύνσεις.

Π.Ι.3.4.3 *Ex vitro* βλάστηση

Στον έλεγχο βλαστικότητας των σπόρων *ex vitro*, παρατηρήθηκε ότι σπόροι *S. hymettia* έτους 2013, 12 μήνες μετά τη συλλογή τους, βλάστησαν στο θερμοκήπιο (Αύγουστο, 30 °C) σε εξαιρετικά χαμηλό (5 - 6%) ποσοστό ανεξάρτητα από το είδος της προμεταχείρισης που είχαν δεχθεί. Ενώ στους σπόρους ηλικίας 19 μηνών το ποσοστό βλάστησης αυξήθηκε σε 21 - 28% για τους σπόρους που καλλιεργήθηκαν στο θερμοκήπιο (Μάρτιο, 20 °C) και 24 - 26% στους σπόρους που τοποθετήθηκαν για βλάστηση σε θάλαμο επώασης, στους 20 °C, ανεξαρτήτως προμεταχείρισης (Πίν. Π.Ι.7). Παρόμοια αποτελέσματα σημειώθηκαν και σε σπόρους 7 και 12 μηνών *S. hymettia* έτους 2014 (Πίν. Π.Ι.8).

Πίνακας Π.Ι.7. *Ex vitro* βλαστικότητα σπόρων του *S. hymettia*, συλλεγμένων το 2013, 19 μήνες μετά τη συλλογή, σε τύρφη: περλίτη (1:1, v/v).

Μεταχείριση	Βλαστικότητα (%)	
	Χωρίς σκαριφισμό	Με σκαριφισμό
Στο θάλαμο επώασης στους 20 °C	26,0	23,6
Στο θερμοκήπιο (Μάρτιο 2014)	20,8	27,8

Πίνακας Π.Ι.8. *Ex vitro* βλαστικότητα σπόρων του *S. hymettia*, συλλεγμένων το 2014, επτά και 19 μήνες μετά τη συλλογή σε τύρφη: περλίτη (1:1, v/v).

Βλαστικότητα (%)				
Μήνες μετά τη συλλογή	Επτά μήνες (Μάρτιο 2015)		Δώδεκα μήνες (Αύγουστο 2015)	
	Χωρίς σκαριφισμό	Με σκαριφισμό	Χωρίς σκαριφισμό	Με σκαριφισμό
Στο θάλαμο επώασης στους 20 °C	26,7	29,2	20,8	27,0
Στο θερμοκήπιο	23,3	21,8	20,0	24,8

Π.Ι.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στο παρόν κεφάλαιο διερευνήθηκε η οικοφυσιολογία των σπόρων και η επίδραση του χρόνου αποθήκευσης στη βλαστικότητα των σπόρων (*in vitro* και *ex vitro*) των ειδών *A. barba-jovis*, *B. acetabulosa*, *C. creticum*, *C. nepeta* και *S. hymettia*.

Anthyllis barba-jovis

Όταν ξεκίνησε η παρούσα μελέτη, αλλά και μέχρι και σήμερα, στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχει μόνο μια αναφορά για την *in vitro* βλάστηση των σπόρων του *A. barba-jovis* (Morbidoni *et al.*, 2008).

Τα αποτελέσματα αρχικά επιβεβαίωσαν ότι οι σπόροι του φυτού *A. barba-jovis* εμφανίζουν φυσικό λήθαργο, λόγω της αδιάβροχης εφυμενίδας τους, όπως συνήθως συμβαίνει στα περισσότερα μέλη της οικ. Fabaceae (Baskin and Baskin 1989, Baskin, 2003, Yücedağ and Cemal, 2011), επαληθεύοντας προηγούμενη σχετική αναφορά των Morbidoni *et al.* (2008) σύμφωνα με την οποία οι σπόροι πρόσφατης συλλογής του ίδιου είδους, βλάστησαν σε υψηλό ποσοστό τόσο μετά από μεταχείριση με σκυριδόχαρτο όσο και κατόπιν εμφύπτισης των σπόρων σε θειικό οξύ για 15 min (78% και 84% αντίστοιχα), ενώ χωρίς καμία προμεταχείριση βλάστησε μόνο το 3%. Ο μηχανικός σκαριφισμός έχει αποδειχθεί ότι είναι μια εξ' ίσου ή και αποτελεσματικότερη μέθοδος από το χημικό σκαριφισμό με θειικό οξύ για την καταστροφή του περιβλήματος (Baskin *et al.*, 1998, Hermansen *et al.*, 2000, Gomes *et al.*, 2001), είναι όμως μια περισσότερο επίπονη και λιγότερο «ακριβής» μέθοδος, δεδομένου ότι εξαρτάται και από το χειριστή. Παρατηρήθηκε επίσης υψηλό επίπεδο φυσικού ληθάργου και στους σπόρους που είχαν αποθηκευτεί για μεγάλο χρονικό διάστημα (36 μήνες) οι οποίοι μόνο με προμεταχείριση με σκαριφισμό ήταν ικανοί να βλαστήσουν. Διαπιστώνεται ως εκ τούτου ότι ο λήθαργος δεν μειώνεται με την πάροδο του χρόνου (αποθήκευση του σπόρου), αποτέλεσμα που έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Morbidoni *et al.* (2008).

Δεν υπήρχαν σημαντικές διαφορές μεταξύ της βλαστικότητας σε συνθήκες φωτός και σκοτάδι στο *A. barba-jovis*, κάτι το οποίο συμφωνεί με μελέτες που έδειξαν ότι η αδιαφορία των σπόρων στο φως στα είδη της οικογένειας Fabaceae είναι ευρέως διαδεδομένη (Camargo-Ricalde and Grether 1998, Melo *et al.*, 1998, Baskin *et al.*, 1998, Hermansen *et al.*, 2000). Επιπροσθέτως τα αποτελέσματά μας έδειξαν ότι ούτε η θερμοκρασία ούτε ο σκαριφισμός ήταν ικανά να επηρεάσουν τη φωτοβλάστηση των σπόρων όπως φαίνεται να συμβαίνει σε άλλα είδη της οικ. Fabaceae (Melo *et al.*, 1998), κάτι που οδηγεί στο

συμπέρασμα ότι οι σπόροι του *A. barba-jovis* είναι σε θέση να βλαστήσουν ακόμη και καλυμμένοι στο έδαφος. Στη βιβλιογραφία υπάρχουν πολλά είδη της οικογένειας με παρόμοια συμπεριφορά όπως το *Mimosa foliolosa* (Silveira and Fernandes, 2006), *Acacia aroma*, *A. caven* και *A. furcatispina* (Funes and Venier, 2006), *Astragalus arpilobus* (Long *et al.*, 2012).

Παρατηρήθηκε επίσης υψηλό ποσοστό βιωσιμότητας των σπόρων με την πάροδο του χρόνου, μέχρι και δύο χρόνια από τη συλλογή τους, κάτι το οποίο επιβεβαιώνεται και από έλεγχο βλαστικότητας των σπόρων *ex vitro*. Οι σπόροι που αποθηκεύτηκαν για 24 μήνες βλάστησαν σε υψηλά ποσοστά, αλλά σχετικά χαμηλότερα από τους σπόρους πρόσφατης συλλογής, ενώ οι σπόροι που αποθηκεύτηκαν για 36 μήνες βλάστησαν σε αισθητά χαμηλότερα ποσοστά από τους σπόρους πρόσφατης συλλογής. Η υψηλή βιωσιμότητα των σπόρων του *A. barba-jovis* μέχρι και δύο χρόνια από τη συλλογή τους έχει αναφερθεί και από τους Morbidoni *et al.* (2008), ενώ και για άλλα είδη της οικογένειας Fabaceae έχει αναφερθεί υψηλή βιωσιμότητα των σπόρων τους, όπως για 11 είδη του γένους *Curmichuelia* (Grüner and Heenan, 2001).

Επιπλέον με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων, διαπιστώνεται ότι οι υψηλές ή οι χαμηλές θερμοκρασίες μπορούν να επηρεάσουν έντονα τη βλάστηση των σπόρων του *A. barba-jovis*, επαληθεύοντας προηγούμενη σχετική αναφορά περί αυτού (Morbidoni *et al.*, 2008). Η επίδραση των υψηλών θερμοκρασιών στη βλάστηση σπόρων της οικογένειας Fabaceae σε μεσογειακά κλίματα δείχνει ισχυρές διαφορές μεταξύ των ειδών (Herranz *et al.*, 1997, Hanley *et al.*, 2001).

Στον έλεγχο βλαστικότητας των σπόρων *ex vitro*, παρατηρήθηκε ότι η αποθήκευση επηρέασε τη βλαστικότητα των σπόρων. Οι σπόροι που αποθηκεύτηκαν για 24 και 36 μήνες έδωσαν χαμηλότερα αποτελέσματα από τους σπόρους πρόσφατης συλλογής, ενώ οι σπόροι με περικάρπιο έδωσαν τα χαμηλότερα ποσοστά βλαστικότητας σε όλες τις ηλικίες των σπόρων, το οποίο σε μεγάλο ποσοστό πιθανόν να οφείλεται σε «κούφιους» σπόρους, γεγονός που παρατηρήθηκε κατά την αφαίρεση του περικαρπίου των σπόρων πριν την εγκατάστασή τους για βλάστηση *in vitro*, όπου το 50% των σπόρων που καθαρίστηκαν ήταν κούφιοι.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι η βέλτιστη θερμοκρασία για βλάστηση των σπόρων *A. barba-jovis* ήταν οι 20 °C, αν και οι σπόροι φύτρωσαν ικανοποιητικά σε ένα μεγαλύτερο εύρος θερμοκρασιών, από 10 έως 25 °C, το οποίο θεωρείται ως το πιο κατάλληλο ανεξάρτητα από την περίοδο αποθήκευσης μέχρι τους 36 μήνες. Αυτό το εύρος θερμοκρασιών αναφέρεται ως κατάλληλο για τη βλάστηση και άλλων ειδών του γένους

Anthyllis όπως το *A. cytisoides* (Sabre *et al.*, 2017), αλλά και για άλλα είδη της Μεσογείου όπως το *Sideritis syriaca* L. ssp. *syriaca*, *Coridothymus capitatus*, *Origanum vulgare* subsp. *hirtum*, *Satureja thymra*, *Phlomis brevibracteata* και *P. cypria* ssp. (Thanos and Doussi 1995, Thanos *et al.*, 1995, Kadis and Georghiou, 2010).

Ballota acetabulosa

Στη Ελληνική και διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχουν αναφορές, μέχρι και σήμερα, σχετικά τόσο με τη βλάστηση των σπόρων του *B. acetabulosa*.

Διαπιστώθηκε ότι η βλαστικότητα στο είδος *B. acetabulosa*, δεν επηρεάστηκε από τη μέχρι και δύο χρόνια αποθήκευση, κάτι το οποίο επιβεβαιώθηκε και από έλεγχο βλαστικότητας των σπόρων *ex vitro*. Ενώ η περαιτέρω αποθήκευση των σπόρων (36 και 48 μήνες) οδήγησε σε μείωση της βλαστικότητας σε όλες τις θερμοκρασίες.

Η υψηλή βλαστικότητα αμέσως μετά τη συλλογή των σπόρων και έως και δύο χρόνια μετά τη συλλογή, χωρίς κάποια προμεταχείριση των σπόρων, υποδηλώνει την απουσία ληθαργου, κάτι που χαρακτηρίζει αρκετά είδη της οικογένειας Lamiaceae (Baskin and Baskin, 1998), όπως το *Clinopodium sandaliotica* (Mattana *et al.*, 2016), *Clinopodium vulgare* (Angelova *et al.*, 1994), *Mentha aquatica* (Galmés *et al.*, 2006), *Sideritis athoa* (Papafotiou and Stragas, 2009) και τα *Phlomis lychnitis*, *Sideritis tragoriganum*, *Thymus mastichina* (Luna *et al.*, 2008). Οι Baskin and Baskin, 1998 αναφέρουν ότι η οικογένεια Lamiaceae περιλαμβάνει είδη είτε με απουσία ληθάργου είτε με παρουσία φυσιολογικού ληθάργου.

Η θερμοκρασία των 15 °C έδωσε την υψηλότερη βλαστικότητα, σε όλους τους μήνες αποθήκευσης (2, 7, 12, 24, 36 και 48 μήνες), αν και οι σπόροι φύτρωσαν ικανοποιητικά σε ένα μεγαλύτερο εύρος θερμοκρασιών, από 10 έως 20 °C, το οποίο θεωρείται ως το πιο κατάλληλο ανεξάρτητα από την περίοδο αποθήκευσης. Αυτό το εύρος θερμοκρασιών αναφέρεται ως κατάλληλο και για τη βλάστηση σπόρων και άλλων μεσογειακών ειδών της οικογένειας Lamiaceae όπως π.χ. *Mentha aquatica* (Galmés *et al.*, 2006) και *Origanum cordifolium* (Kadis and Georghiou 2010).

Για τα τυπικά μεσογειακά είδη *Dianthus fruticosus*, *Globularia alypum*, *Phlomis lychnitis* *Sideritis tragoriganum* (Luna *et al.*, 2008, Papafotiou and Stragas, 2009, Bertsoouklis and Papafotiou, 2010), όπως και για όλα τα είδη *Arbutus* που απαντούν στη χλωρίδα της Ελλάδας (Bertsoouklis and Papafotiou, 2013), η θερμοκρασία των 15 °C διαπιστώθηκε ως η πλέον ευνοϊκή για τη βλάστηση, ενώ λίγο υψηλότερη (20 °C) προώθησε τη βλάστηση ειδών

του γένους *Sideritis* (*S. pungens* Benth, *S. chamaedryfolia* Cav. και *S. athoa*) (Estrelles *et al.*, 2010, Papafotiou and Kalantzis, 2009).

Επιπλέον η υψηλή βλαστική ικανότητα των σπόρων *B. acetabulosa* αμέσως μετά τη διασπορά τους στο έδαφος, το φθινόπωρο, ακόμα και σε σχετικά χαμηλή θερμοκρασία (10 °C), εποχή που τα μεσογειακά είδη μπορούν να βρουν ευνοϊκές συνθήκες υγρασίας αποφεύγοντάς έτσι τις υψηλές θερμοκρασίες του θέρους, είναι χαρακτηριστική προσαρμοστική στρατηγική που χαρακτηρίζει ιδιαίτερα τα είδη της οικ. Lamiaceae (Thanos *et al.*, 1991, Doussi and Thanos, 2002, Perez-Garcia *et al.*, 2003).

Clinopodium creticum* και *Clinopodium nepeta

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, διερευνήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας στη βλάστηση του σπόρου, καθώς και η επίδραση του χρόνου διατήρησης - αποθήκευσης (0, 6 και 12 μήνες) στη βλαστικότητα των σπόρων *C. creticum* και *C. nepeta*, *in vitro* και *ex vitro*.

Διαπιστώθηκε λοιπόν ότι η βλαστικότητα και των δύο υπό εξέταση ειδών δεν επηρεάστηκε από τους μήνες αποθήκευσης (έξι ή δώδεκα), κάτι το οποίο επιβεβαιώνεται και από έλεγχο βλαστικότητας των σπόρων *ex vitro*. Τα πολύ υψηλά (έως και 100%) ποσοστά βλαστικότητας στους 20°C έρχονται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα προηγούμενων ερευνών των Benvenuti and Bacci (2010) και Casalini *et al.* (2017), οι οποίοι ανέφεραν ποσοστά βλαστικότητας από 50% έως 60% στο είδος *C. nepeta*.

Η υψηλή βλαστικότητα αμέσως μετά τη συλλογή των σπόρων και έως ένα χρόνο μετά, χωρίς κάποια προμεταχείριση, υποδηλώνει την απουσία λήθαργου, κάτι που χαρακτηρίζει και άλλα συγγενή είδη, όπως το *C. sandaliotica* (Mattana *et al.*, 2016) και το *C. vulgare* (Angelova *et al.*, 1994), αλλά και άλλα είδη της οικογένειας Lamiaceae, όπως τα *Origanum dictamnus*, *Sideritis syriaca* ssp. *syriaca*, *Salvia pomifera* ssp. *pomifera* (Thanos and Doussi, 1995), και πολλά άλλα είδη της Μεσογείου, όπως το *Arbutus unedo*, *Arbutus andrachne*, *Arbutus andrachnoides* (Bertsuklis and Papafotiou, 2013), *Dianthus fruticosus* (Papafotiou and Stragas, 2009), *Sideritis athoa* (Papafotiou and Kalantzis, 2009).

Η βέλτιστη θερμοκρασία για βλάστηση των σπόρων του *C. creticum* και *C. nepeta* ήταν μεταξύ των 15 και 20 °C, αν και οι σπόροι φύτρωσαν ικανοποιητικά σε ένα μεγαλύτερο εύρος θερμοκρασιών, από 10 έως 30 °C, το οποίο θεωρείται ως το πιο κατάλληλο ανεξάρτητα από την περίοδο αποθήκευσης. Αυτό το εύρος θερμοκρασιών αναφέρεται ως κατάλληλο και για τη βλάστηση και άλλων μεσογειακών ειδών της οικογένειας Lamiaceae όπως τα *Sideritis syriaca* L. ssp. *syriaca* (Thanos and Doussi 1995), *Coridothymus capitatus*,

Origanum vulgare subsp. *hirtum*, *Satureja thymra* (Thanos *et al.*, 1995), *Phlomis brevibracteata* και *P. cypria* ssp. *occidentalis* (Kadis and Georghiou 2010), αλλά και για το *Anthyllis barba-jovis* (οικ. Fabaceae) (Morbidoni *et al.*, 2008). Άλλα είδη Lamiaceae όπως *Origanum dictamnus*, *Salvia pomifera* L. ssp. *pomifera* και *S. fruticosa* βλάστησαν επίσης σε υψηλά ποσοστά σε θερμοκρασίες που κυμαίνονται από 10 έως 25 °C (Thanos and Doussi, 1995).

Η θερμοκρασία των 20 °C προώθησε τη βλάστηση των σπόρων των ειδών *Sideritis pungens* Benth και *S. chamaedryfolia* Cav. (Estrelles *et al.*, 2010), ενώ για τη βλάστηση των μεσογειακών ειδών *Dianthus fruticosus* (Papafotiou and Stragas, 2009), *Globularia alypum* (Bertsouklis and Papafotiou, 2010) και όλων των ειδών *Arbutus* που βρέθηκαν στην Ελλάδα (Bertsouklis and Papafotiou, 2013) διαπιστώθηκε ότι η θερμοκρασία των 15 °C είναι η πλέον ευνοϊκή.

Η θερμοκρασία είναι ένας από τους σημαντικότερους περιβαλλοντικούς παράγοντες που ελέγχουν τη βλάστηση (Probert 2000), με τρόπο ώστε οι σπόροι να αποφεύγουν τις δυσμενείς συνθήκες περιβάλλοντος κατά την εγκατάσταση των νεαρών σποροφύτων. Είναι συνηθισμένο τα φυτά της Μεσογείου να βλαστάνουν σε σχετικά χαμηλές θερμοκρασίες, επειδή η χαμηλή διαθεσιμότητα νερού στα μεσογειακά οικοσυστήματα αναγκάζει τους σπόρους να βλαστήσουν κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου όταν ξεκινά η περίοδος των βροχών και οι θερμοκρασίες είναι δροσερές (Thanos *et al.*, 1991, Doussi and Thanos, 2002).

Επιπλέον με βάση τα αποτελέσματα των πειραμάτων, διαπιστώνεται ότι χαμηλότερες ή υψηλότερες θερμοκρασίες από τη βέλτιστη θερμοκρασία (15 ή 20 °C), μείωναν προοδευτικά τη βλαστικότητα και των δύο ειδών, επαληθεύοντας προηγούμενες σχετικές αναφορές περί αυτού (Neffati, 1994, Gorai *et al.*, 2006, Gorai and Neffati, 2007). Σύμφωνα δε με το Neffati (1994), η μεταβολή της βέλτιστης θερμοκρασίας εξαρτάται από τα εξεταζόμενα είδη και αποτελεί κάποια προσαρμοστική στρατηγική στις αντίξοες περιβαλλοντικές συνθήκες και η αύξηση της θερμοκρασίας πάνω από το οριακό βέλτιστο μπορεί να προκαλέσει την αναστολή της βλάστησης και μη αναστρέψιμη βλάβη (Gorai *et al.* 2006, Gorai and Neffati, 2007).

Scabiosa hymettia

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, διερευνήθηκε η επίδραση της θερμοκρασίας στη βλάστηση του σπόρου, καθώς και η επίδραση του χρόνου διατήρησης - αποθήκευσης (0, 1, 3, 4, 6 και 11 μήνες) στη βλαστικότητα των σπόρων *S. hymettia*, *in vitro* και (7 και 19 μήνες) *ex vitro*.

Στον έλεγχο βλαστικότητας των σπόρων *ex vitro*, παρατηρήθηκε ότι σπόροι *S. hymettia*, βλάστησαν σε εξαιρετικά χαμηλό ποσοστό (5 - 28%) ανεξάρτητα από το είδος της μεταχείρισης που είχαν δεχθεί και επιπλέον δεν επηρεάστηκε η βλαστικότητα από την τοποθέτηση της καλλιέργειας είτε σε θερμοκήπιο ή σε θάλαμο επώασης, ενώ σε *in vitro* συνθήκες η βλάστηση του σπόρου ήταν μη επιτυχής. Αυτό πιθανώς να οφείλεται στην εμφάνιση μολύνσεων σε συνδυασμό με το μικρό ποσοστό βιώσιμων εμβρύων, κάτι που διαπιστώθηκε και από το τεστ τετραζολίου, το οποίο έδειξε ότι μόνο το 38% των εμβρύων είναι βιώσιμα.

Σύμφωνα με τους Ackerman and Hamernik (1994), οι περισσότερες ποικιλίες *S. hymettia*, είναι αρσενικές στείρες ή δεν παράγουν αληθινούς σπόρους και η διάδοση των ποικιλιών αυτών γίνεται μόνο με μοσχεύματα βλαστών.

Οι Carlson *et al.* (2009) αναφέρουν ότι πληθυσμοί του γένους *Scabiosa* (*Lomelosia*) και *Rhynocomon* συνήθως αυτοφύονται σε άγονες και ημι-άγονες περιοχές, που χαρακτηρίζονται από μια σύντομη περίοδο βροχόπτωσης κάθε χρόνο, με αποτέλεσμα οι σπόροι τους να μην βλαστάνουν μέχρις ότου η διαθεσιμότητα σε νερό να επαρκεί για να τροφοδοτήσει το αναδυόμενο φυτάριο (σπορόφυτο), βέβαια αυτός ο λόγος δεν συνέτρεχε στα πειράματα της παρούσης Διατριβής.

Σε ένα άλλο είδος *Scabiosa*, το *Scabiosa argentea*, οι Panayotova *et al.* (2008) αναφέρουν ότι η *in vitro* βλάστηση του σπόρου ήταν αδύνατη, για αυτό το λόγο οι ερευνητές προτείνουν άλλες πηγές προέλευσης εκφύτων που θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν για την εγκατάσταση αρχικής *in vitro* καλλιέργειας, κατά προτίμηση από *in vivo* συλλογή.

Οι Wang *et al.* (2013) για την εγκατάσταση αρχικής *in vitro* καλλιέργειας του είδους *Scabiosa tschiliensis*, χρησιμοποίησαν σπόρο από το βουνό Lingshan, στην περιοχή του Πεκίνου της Κίνας, δίχως να αναφέρουν τον αρχικό αριθμό σπόρων που χρησιμοποίησαν για την *in vitro* βλάστηση, και αναφέρουν ότι πέντε έως επτά σπόροι βλάστησαν σε ημιστερέο υπόστρωμα MS συμπληρωμένο με διαφορετικές συγκεντρώσεις φυτορρυθμιστικών ουσιών.

Αντιθέτως, οι Luna *et al.* (2008) αναφέρουν ότι η βλαστικότητα του είδους *Scabiosa turolensis*, ενός ενδημικού είδους της Ιβηρικής χερσονήσου, ήταν 92% χωρίς υγρή στρωμάτωση, στους 15° C, ενώ με στρωμάτωση πρώτα σε ψυχρό θάλαμο στους 5 °C για 4 εβδομάδες και εν συνεχεία για τις επόμενες 6 εβδομάδες στους 15 °C για βλάστηση, η βλαστικότητα έπεσε στο 72%.

Π.Ι.5. ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

A. barba-jovis

Με βάση τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι οι σπόροι του *A. barba-jovis* εμφανίζουν φυσικό λήθαργο, και ως εκ τούτου η προμεταχείριση σκαριφισμού των σπόρων, όπως ο μηχανικός σκαριφισμός για 1 min με σμυριδόχαρτο είχε ευνοϊκή επίδραση στη βλαστική τους ικανότητα. Η φωτοπερίοδος (φως / σκοτάδι) δεν επέδρασε στη βλαστική ικανότητα των σπόρων πράγμα που σημαίνει ότι οι σπόροι της *A. barba-jovis* είναι σε θέση να βλαστήσουν ακόμη και όταν θάβονται. Παρατηρήθηκε επίσης υψηλή βιωσιμότητα των σπόρων με την πάροδο του χρόνου, μέχρι και δύο χρόνια από τη συλλογή τους, ενώ περαιτέρω αποθήκευση μείωσε το ποσοστό βλάστησης. Η βέλτιστη θερμοκρασία για βλάστηση των σπόρων σκαριφισμένων ή μη *A. barba-jovis* ήταν η θερμοκρασία των 20 °C, αν και οι σπόροι βλάστησαν ικανοποιητικά σε ένα μεγαλύτερο εύρος θερμοκρασιών, από 10 έως 25 °C, το οποίο θεωρείται ως το πιο κατάλληλο ανεξάρτητα από την περίοδο αποθήκευσης. Χαμηλότερες ή υψηλότερες θερμοκρασίες από το προηγούμενο εύρος θερμοκρασιών μείωναν προοδευτικά τη βλαστικότητα.

B. acetabulosa

Με βάση τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η βλαστική ικανότητα των σπόρων του *B. acetabulosa* ήταν πολύ υψηλή και διατηρήθηκε για δύο χρόνια τουλάχιστον σε υψηλά επίπεδα. Η βέλτιστη θερμοκρασία για τη βλάστηση των σπόρων ήταν 15 °C, αν και οι σπόροι βλάστησαν ικανοποιητικά σε ένα μεγαλύτερο εύρος θερμοκρασιών, από 10 °C έως 20 °C.

C. creticum και *C. nepeta*

Με βάση τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας μπορεί να εξαχθεί το συμπέρασμα ότι η βλαστική ικανότητα των σπόρων του *C. creticum* και *C. nepeta* ήταν πολύ υψηλή και διατηρήθηκε για έναν χρόνο τουλάχιστον σε υψηλά επίπεδα. Το εύρος των βέλτιστων θερμοκρασιών για τη βλάστηση των σπόρων κυμάνθηκε από 15 έως 20 °C, αν και οι σπόροι βλάστησαν ικανοποιητικά σε ένα μεγαλύτερο εύρος θερμοκρασιών, από 10 °C έως 30 °C.

S. hymettia

Με βάση τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας οι σπόροι του είδους *S. hymettia* είχαν πολύ χαμηλή ικανότητα βλάστησης σε *ex vitro* συνθήκες, ενώ σε *in vitro* συνθήκες η βλάστηση του σπόρου ήταν αδύνατη. Η μέθοδος που προτείνεται είναι η *ex vitro* βλάστηση των σπόρων σε μίγμα τύρφης: περλίτη (1:1, v/v) χωρίς κάποια προμεταχείριση.

Π.Ι.6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Ackerman, R. and Hamernik, H. (1994). Giberellic acid to extend shoots and bud break on *Heuchera* and *Scabiosa*. Combined Proceedings International Plant Propagators' Society (IPPS). 44: 545-546
- Al-Ani, A., Bruzau, F., Raymond, P., Saint-Ges, V., Leblanc, J.M. and Pradet, A. (1985). Germination, respiration, and adenylate energy charge of seeds at various oxygen partial pressures. *Plant Physiol.* 79: 885-890.
- Angelova, S., Varbanova, K., Peeva, I., Guteva, Y. and Dimitrova, D. (1994). Cultivation of medicinal plants from the wild flora in Bulgaria - Possibilities and prospects. *J. Herbs Spices Med. Plants* 2: 3-8.
- Baes, P.O., de Viana, M.L. and Suhring, S. (2002). Germination in *Prosopis ferox* seeds: effects of mechanical, chemical and biological scarificators. *J. Arid Envir.* 50: 185-189.
- Bagchi, R., Philipson, C.D., Slade, E.M., Hector, A., Phillips, S., Villanueva, J.F., Lewis, O. T., Lyal, C.H.C., Nilus, R., Madran, A., Scholes, J.D. and Press, M.C. (2011). Impacts of logging on density-dependent predation of dipterocarp seeds in a South East Asian rainforest. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London, Series B: Biological Sciences.* 366: 3246-3255.
- Bailly, C. (2004). Active oxygen species and antioxidants in seed biology. *Seed Sci. Res.* 14: 93-107.
- Baker, K.S., Steadman, K.J., Plummer, J.A., Merritt, D.J. and Dixon, K.W. (2005). The changing window of conditions that promotes germination of two fire ephemerals, *Actinotus leucocephalus* (Apiaceae) and *Tersonia cyathiflora* (Gyrostemonaceae). *Ann. Bot.* 96: 1225-1236.
- Baskin, C.C. (2003). Breaking physical dormancy in seeds - focusing on the lens. *New Phytol.* 158: 229-232.
- Baskin, C.C. and Baskin, J.M. (1998). *Seeds: Ecology, biogeography and evolution of dormancy and germination.* Academic Press, San Diego. 666.
- Baskin, C.C. and Baskin, J.M. (2001). *Seeds: Ecology, biogeography, and evolution of dormancy and germination.* Academic Press, San Diego.
- Baskin, C.C. and Baskin, J.M. (2006). The natural history of soil seed banks of arable land. *Weed Sci.* 54: 549-557.
- Baskin, J.M. and Baskin, C.C. (1989). Physiology of dormancy and germination in relation to seed bank ecology. In: Leck, M.A., Parker, V.T. and Simpson, R.L., editors. *Ecology of soil seed banks.* Academic Press, San Diego. 53-66.
- Baskin, J.M. and Baskin, C.C. (2004). A classification system for seed dormancy. *Seed Sci. Res.* 14: 1-16.
- Baskin, J.M., Nan, X.Y. and Baskin, C.C. (1998). A comparative study of seed dormancy and germination in an annual and a perennial species of *Senna* (Fabaceae). *Seed Sci. Res.* 8: 501-512.
- Batlla, D. and Benech-Arnold, R.L. (2010). Predicting changes in dormancy level in natural seed soil banks. *Plant Mol. Biol.* 73: 3-13.
- Batlla, D., Kruk, B.C. and Benech-Arnold, R.L. (2000). Very early detection of canopy presence by seeds through perception of subtle modifications in red: Far red signals. *Funct. Ecol.* 14: 195-202.
- Bekker, R.M., Bakker, J.P., Grandin, U., Kalamees, R., Milberg, P., Poschlod, P., Thompson, K. and Willems, J. (1998a). Seed size, shape and vertical distribution in the soil: indicators of seed longevity. *Funct. Ecol.* 12: 834-842.
- Bekker, R.M., Bakker, J.P., Ozinga, W.A. and Thompson, K. (2003). Seed traits: Essential for understanding seed longevity. *Asp. Appl. Biol.* 69: 1-9.
- Bekker, R.M., Knevel, I., Tallowin, J., Troost, E. and Bakker, J.P. (1998b). Soil nutrient input effects on seed longevity: A burial experiment with fen meadow species. *Funct. Ecol.* 12: 673-682.
- Benech-Arnold, R.L., Sanchez, R.A., Forcella, F., Kruk, B.C. and Ghera, C.M. (2000). Environmental control of dormancy in weed seed banks in soil. *Field Crops Res.* 67: 105-122.
- Benvenuti, S. (2007a). Natural weed seed burial: Effect of soil texture, rain and seed characteristics. *Seed Sci. Res.* 17: 211-219.
- Benvenuti, S. (2007b). Weed seed movement and dispersal strategies in the agricultural environment. *Weed Biol. Manag.* 7: 141-157.
- Benvenuti, S. and Bacci, D. (2010). Initial agronomic performances of Mediterranean xerophytes in stimulated dry green roofs. *Urban Ecosyst.* 13: 349-363.
- Benvenuti, S., MacChia, M. and Miele, S. (2001). Quantitative analysis of emergence of seedlings from buried weed seeds with increasing soil depth. *Weed Sci.* 49: 528-535.
- Berjak, P. and Pammenter, N.W. (2008). From *Avicennia* to *Zizania*: Seed recalcitrance in perspective. *Ann. Bot.* 101: 213-228.
- Bernal-Lugo, I. and Leopold, A.C. (1995). Seed stability during storage: Raffinose content and seed glassy state. *Seed Sci. Res.* 5: 75-80.
- Bernal-Lugo, I. and Leopold, A.C. (1998). The dynamics of seed mortality. *J. Exp. Bot.* 49: 1455-1461.

- Bertsouklis, K.F. and Papafotiou, M. (2010). Studies on propagation of *Globularia alypum* L. *Acta Hort.* 885: 73-77.
- Bertsouklis, K.F. and Papafotiou, M. (2013). Seed germination of *Arbutus unedo*, *A. andrachne* and their natural hybrid *A. x andrachnoides* in relation to temperature and period of storage. *HortScience*. 48: 347-351.
- Bonal, R. and Munoz, A. (2007). Multi-trophic effects of ungulate intraguild predation on acorn weevils. *Oecologia*. 152: 533-540.
- Bond, W. and Grundy, A.C. (2001). Non-chemical weed management in organic farming systems. *Weed Res.* 41: 383-405.
- Bonner, F.T. and Karrfalt, R.P. (2008). The woody plant seed manual. Agric. Handbook No. 727. Washington, DC. US Department of Agriculture, Forest Service. 1223.
- Bossuyt, B. and Honnay, O. (2008). Can the seed bank be used for ecological restoration? An overview of seed bank characteristics in European communities. *J. Veg. Sci.* 19: 875-884.
- Bradford, M.G. and Westcott, D.A. (2011). Predation of cassowary dispersed seeds: Is the cassowary an effective disperser? *Integr. Zool.* 6: 168-177.
- Bradshaw, S.D., Dixon, K.W., Hopper, S.D., Lambers, H. and Turner, S.R. (2011). Little evidence for fire-adapted plant traits in Mediterranean climate regions. *Trends Plant Sci.* 16: 69-76.
- Brady, N.C. and Weil, R.R. (1999). The nature and properties of soils. 12th Edition. Prentice-Hall Inc., Upper Saddle River.
- Brock, M.A. (2011). Persistence of seed banks in Australian temporary wetlands. *Freshw. Biol.* 56: 1312-1327.
- Burnside, O.C., Wilson, R.G., Weisbert, S. and Hubbard, K.G. (1996). Seed longevity of 41 weed species buried 17 years in eastern and western Nebraska. *Weed Sci.* 44: 74-86.
- Camargo-Ricalde, S.L. and Grether, R. (1998). Germinación, dispersión y establecimiento de plántulas de *Mimosa tenuiflora* (Leguminosae) en México. (Seed germination, dispersal and seedling establishment of *Mimosa tenuiflora* (Leguminosae) in México). *Rev. Biol. Trop.* 46: 543-554.
- Carlson, S.E., Mayer, V. and Donoghue, M.J. (2009). Phylogenetic relationships, taxonomy, and morphological evolution in Dipsacaceae (Dipsacales) inferred by DNA sequence data. *Taxon*. 58(4): 1075-1091.
- Casalini, R., Bartoli, F. and Caneva, G. (2017). Investigation of seed germination of twelve Mediterranean wildflowers for evaluating their potential use on extensive green roofs. *Acta Hort.* 1189: 263-266.
- Chambers, J.C. (1995). Disturbance, life history strategies, and seed fates in alpine herbfield communities. *Am. J. Bot.* 82: 421-433.
- Chee-Sanford, J.C., Williams, M.M., Davis, A.S. and Sims, G.K. (2006). Do microorganisms influence seed-bank dynamics? *Weed Sci.* 54: 575-587.
- Ciani, A., Goss, G.U. and Schwarzenbach, R.P. (2005). Light penetration in soil and particulate minerals. *Eur. J. Soil Sci.* 56: 561-574.
- Clerkx, E.J., Blankestijn-De Vries, H., Ruys, G.J., Groot, S.P.C. and Koornneef, M. (2004). Genetic differences in seed longevity of various *Arabidopsis* mutants. *Physiol. Plant.* 121: 448-461.
- Cohen, D. (1966). Optimising reproduction in a randomly varying environment. *J. Theor. Biol.* 12: 119-129.
- Colville, L. and Kranner, I. (2010). Desiccation tolerant plants as model systems to study redox regulation of protein thiols. *Plant Growth Regul.* 61: 241-255.
- Côme, D. (1970). Les obstacles a la germination. Paris: Masson et Cie. Editeurs. 162.
- Contreras, S., Bennett, M.A., Metzger, J.D. and Tay, D. (2008). Maternal light environment during seed development affects lettuce seed weight, germinability, and storability. *HortScience* 43: 845-852.
- Contreras, S., Bennett, M.A., Metzger, J.D., Tay, D. and Nerson, H. (2009). Red to far-red ratio during seed development affects lettuce seed germinability and longevity. *Hortscience* 44: 130-134.
- Corbineau, F. (2012). Markers of seed quality: From present to future. *Seed Sci. Res.* 22: 61-68.
- Cousens, R.D., Young, K.R. and Tadayyon, A. (2010). The role of the persistent fruit wall in seed water regulation in *Raphanus raphanistrum* (Brassicaceae). *Ann. Bot.* 105: 101-108.
- Dalling, J.W., Davis, A.S., Schutte, B.J. and Arnold, A.E. (2011). Seed survival in soil: Interacting effects of predation, dormancy and the soil microbial community. *J. Ecol.* 99: 89-95.
- Dalling, J.W., Davis, A.S., Schutte, B.J. and Arnold, A.E. (2011). Seed survival in soil: Interacting effects of predation, dormancy and the soil microbial community. *J. Ecol.* 99: 89-95.
- Darabant, A., Rai, P.B., Tenzin, K., Roder, W. and Gratzler, G. (2007). Cattle grazing facilitates tree regeneration in a conifer forest with palatable bamboo understory. *For. Ecol. Manag.* 252: 73-83.
- Davis, A.S. (2007). Nitrogen fertilizer and crop residue effects on seed mortality and germination of eight annual weed species. *Weed Sci.* 55: 123-128.
- Davis, A.S., Cardina, J., Forcella, F., Johnson, G.A., Kegode, G., Lindquist, J.L., Lusche, E.C., Renner, K.A., Sprague, C.L. and Williams, M.M. (2005). Environmental factors affecting seed persistence of annual weeds across the US Corn Belt. *Weed Sci.* 53: 860-868.

- Davis, A.S., Schutte, B.J., Iannuzzi, J. and Renner, K.A. (2008). Chemical and physical defense of weed seeds in relation to soil seed bank persistence. *Weed Sci.* 56: 676-684.
- Delgado-Sanchez, P., Ortega-Amaro, M.A., Jimenez-Bremont, J.F. and Flores, J. (2011). Are fungi important for breaking seed dormancy in desert species? Experimental evidence in *Opuntia streptacantha* (Cactaceae). *Plant Biol.* 13: 154-159.
- Demel, T. (1996). Germination ecology of twelve indigenous and eight exotic multipurpose leguminous species from Ethiopia. *For. Ecol. Manage.* 80: 209-223.
- Devaiah, S.P., Pan, X., Hong, Y., Roth, M., Welti, R. and Wang, X. (2007). Enhancing seed quality and viability by suppressing phospholipase D in *Arabidopsis*. *Plant J.* 50: 950-957.
- Donohue, K. (2009). Completing the cycle: Maternal effects as the missing link in plant life histories. *Philos. Trans. R. Soc. Lond., B, Biol. Sci.* 364: 1059-1074.
- Donohue, K., Heschel, M.S., Chiang, G.C.K., Butler, C.M. and Barua, D. (2007). Phytochrome mediates germination responses to multiple seasonal cues. *Plant Cell Environ.* 30: 202-212.
- Doussi, M.A. and Thanos, C.A. (2002). Ecophysiology of seed germination in Mediterranean geophytes. 1. *Muscari* spp. *Seed Sci. Res.* 12: 193-201.
- Ellis, R. and Roberts, E. (1981). The quantification of ageing and survival in orthodox seeds. *Seed Sci. Technol.* 9: 373-409.
- Engelbrecht, M. and Garcia-Fayos, P. (2012). Mucilage secretion by seeds doubles the chance to escape removal by ants. *Plant Ecol.* 213: 1167-1175.
- Estrelles, E., Güemes, J., Riera, J., Boscaiu, M., Ibars, A.M. and Costa, M. (2010). Seed germination behaviour in *Sideritis* from different Iberian habitats. *Not. Bot. Horti. Agrobot. Cluj Napoca.* 38: 9-13.
- Facelli, J.M., Chesson, P. and Barnes, N. (2005). Differences in seed biology of annual plants in arid lands: A key ingredient of the storage effect. *Ecology.* 86: 2998-3006.
- Fadini, R.F., Fleury, M., Donatti, C.I. and Galetti, M. (2009). Effects of frugivore impoverishment and seed predators on the recruitment of a keystone palm. *Acta Oecol.* 35: 188-196.
- Fenner, M. (1991). The effects of the parent environment on seed germinability. *Seed Sci. Res.* 1: 75-84.
- Finch-Savage, W.E. and Footitt, S. (2012). To germinate or not to germinate: A question of dormancy relief not germination stimulation. *Seed Sci. Res.* 22: 243-248.
- Finch-Savage, W.E. and Leubner-Metzger, G. (2006). Seed dormancy and the control of germination. *New Phytol.* 171: 501-523.
- Footitt, S., Douterelo-Soler, I., Clay, H. and Finch-Savage, W.E. (2011). Dormancy cycling in *Arabidopsis* seeds is controlled by seasonally distinct hormone-signaling pathways. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS).* 108: 20236-20241.
- Footitt, S., Huang, Z., Clay, H., Mead, A. and Finch-Savage, W. (2013). Temperature, light and nitrate sensing coordinate *Arabidopsis* seed dormancy cycling resulting in winter and summer annual phenotypes. *Plant J.* 74: 1003-1015.
- Forcella, F., Benech-Arnold, R.L., Sanchez, R.A. and Ghersa, C.M. (2000). Modeling seedling emergence. *Field Crops Res.* 67: 123-139.
- Forey, E., Barot, S., Decaens, T., Langlois, E., Laossi, K.R., Margerie, P., Scheud, S. and Eisenhauere, N. (2011). Importance of earthworm-seed interactions for the composition and structure of plant communities: A review. *Acta Oecol.* 37: 594-603.
- Froud-Williams, R.J., Hilton, J.R. and Dixon, J. (1986). Evidence for an endogenous cycle of dormancy in dry stored seeds of *Poa trivialis* L. *New Phytol.* 102: 123-131.
- Fu, S.M., Hampton, J.G., Hill, M.J. and Hill, K.A. (1996). Breaking hard seed of yellow and slender serradella (*Ornithopus compressus* and *O. pinnatus*) by sulphuric acid scarification. *Seed Sci. Technol.* 24: 1-6.
- Fuerst, E.P., Anderson, J.V., Kennedy, A.C. and Gallagher, R.S. (2011). Induction of polyphenol oxidase activity in dormant wild oat (*Avena fatua*) seeds and caryopses: A defense response to seed decay fungi. *Weed Sci.* 59: 137-144.
- Fuerst, E.P., Anderson, J.V., Kennedy, A.C. and Gallagher, R.S. (2011). Induction of polyphenol oxidase activity in dormant wild oat (*Avena fatua*) seeds and caryopses: A defense response to seed decay fungi. *Weed Sci.* 59: 137-144.
- Funes, G. and Venier, P. (2006). Dormancy and germination in three Acacia (Fabaceae) species from central Argentina. *Seed Sci. Res.* 16(1): 77-82.
- Gallagher, R. and Fuerst, E. (2006). The ecophysiological basis of weed seed longevity in the soil. *Seed Sci. Technol.* Food Products Press, New York. 521-557.
- Galmés, J., Medrano, H. and Flexas, J. (2006). Germination capacity and temperature dependence in Mediterranean species of the Balearic Islands. *Forest Syst.* 15(1): 88-95.
- García-Fayos, P., Bochet, E. and Cerda, A. (2010). Seed removal susceptibility through soil erosion shapes vegetation composition. *Plant Soil.* 334: 289-297.

- Gardarin, A., Durr, C., Mannino, M.R., Busset, H. and Colbach, N. (2010). Seed mortality in the soil is related to seed coat thickness. *Seed Sci. Res.* 20: 243-256.
- Geissler, K. and Gzik, A. (2008). The impact of flooding and drought on seeds of *Cnidium dubium*, *Gratiola officinalis*, and *Juncus atratus*, three endangered perennial river corridor plants of Central European lowlands. *Aquat. Bot.* 89: 283-291.
- Goel, A., Goel, A.K. and Sheoran, I.S. (2003). Changes in oxidative stress enzymes during artificial ageing in cotton (*Gossypium hirsutum* L.) seeds. *J. Plant Physiol.* 160: 1093-1100.
- Goggin, D.E. and Steadman, K.J. (2012). Blue and green are frequently seen: responses of seeds to short and mid-wave length light. *Seed Sci. Res.* 22: 27-35.
- Golovina, E.A., Van As, H. and Hoekstra, F.A. (2010). Membrane chemical stability and seed longevity. *Eur. Biophys. J. Biophys.* 39: 657-668.
- Gomes, V., Madeira, J.A., Fernandes, G.W. and Lemos Filho, J.P. (2001). Seed dormancy and germination of sympatric species of *Chamaecrista* (Leguminosae) in a rupestrian field. *J. Ecol. Environ. Sci.* 27: 191-197.
- Gómez-González, S., Torres-Díaz, C., Bustos-Schindler, C. and Gianoli, E. (2011). Anthropogenic fire drives the evolution of seed traits. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*. 108: 18743-18747.
- Gonzalez-Varo, J.P., Nora, S. and Aparicio, A. (2012). Bottlenecks for plant recruitment in woodland remnants: An ornithochorous shrub in a Mediterranean 'relictual' landscape. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* 14: 111-122.
- Gonzalez-Zertuche, L., Vazquez-Yanes, C., Gamboa, A., Sanchez-Coronado, M.E., Aguilera, P. and Orozco-Sergovia, A. (2001). Natural priming of *Wigandia urens* seeds during burial: Effects on germination, growth and protein expression. *Seed Sci. Res.* 11: 27-34.
- Gorai M., Vadel, M.A. and Neffati, M. (2006). Seed germination characteristics of *Phragmites communis*: Effects of temperature and salinity. *Belg. J. Bot.* 139: 78-86.
- Gorai, M., and Neffati, M. (2007). Germination responses of *Reaumuria vermiculata* to salinity and temperature. *Ann. Appl. Biol.* 151(1): 53-59.
- Gorecki, M.J., Long, R.L., Flematti, G.R. and Stevens, J.C. (2012). Parental environment changes the karrikinolide response of *Brassica tournefortii* seeds. *Ann. Bot.* 109: 1369-1378.
- Grüner, I. and Heenan, P.B. (2001). Viability and germination of seeds of *Carmichaelia* (Fabaceae) after prolonged storage. *N. Z. J. Bot.* 39(1): 125-131.
- Gutterman, Y. (1994). Strategies of seed dispersal and germination in plants inhabiting deserts. *Bot. Rev.* 60: 373-425.
- Gutterman, Y. (2000). Environmental factors and survival strategies of annual plant species in the Negev Desert, Israel. *Plant Spec. Biol.* 15: 113-125.
- Gutterman, Y. and Gendler, T. (2005). Annual rhythm of germination of seeds of *Mesembryanthemum nodiflorum* 32 years after collection. *Seed Sci. Res.* 15: 249-253.
- Hanley, M.E., Fenner, M. and Neeman, G. (2001). Pregermination heat shock and seedling growth of fire-following Fabaceae from four Mediterranean-climate regions. *Acta Oecol.* 22: 315-320.
- Hermansen, L.A., Duryea, M.L., West, S.H., White, T.L. and Malavasi, M.M. (2000). Pretreatments to overcome seed coat dormancy in *Dimorphandra mollis*. *Seed Sci. Technol.* 28: 581-595.
- Herranz, J.M., Ferrandis, P. and Martinez-Sanchez, J.J. (1997). Influence of heat on seed germination of seven Mediterranean Leguminosae species. *Plant Ecol.* 136: 95-103.
- Hill, N.M. and Kloet, S.P.V. (2005). Longevity of experimentally buried seed in *Vaccinium*: Relationship to climate, reproductive factors and natural seed banks. *J. Ecol.* 93: 1167-1176.
- Hodgkinson, K.C. and Oxley, R.E. (1990). Influence of fire and edaphic factors on germination of the arid zone shrubs *Acacia aneura*, *Cassia nemophila* and *Dodonaea viscosa*. *Aust. J. Bot.* 38: 269-279.
- Hoffmann, A.A. and Sgrò, C.M. (2011). Climate change and evolutionary adaptation. *Nature*. 470: 479-485.
- Hölzel, N. and Otte, A. (2004). Assessing soil seed bank persistence in flood-meadows: The search for reliable traits. *J. Veg. Sci.* 15: 93-100.
- Honda, Y. (2008). Ecological correlations between the persistence of the soil seed bank and several plant traits, including seed dormancy. *Plant Ecol.* 196: 301-309.
- Hoyle, G.L., Daws, M.I., Steadman, K.J. and Adkins, S.W. (2008a). Mimicking a semi-arid tropical environment achieves dormancy alleviation for seeds of Australian native Goodeniaceae and Asteraceae. *Ann. Bot.* 101: 701-708.
- Hoyle, G.L., Steadman, K.J., Daws, M.I. and Adkins, S.W. (2008b). Pre- and post-harvest influences on seed dormancy status of an Australian Goodeniaceae species, *Goodenia fascicularis*. *Ann. Bot.* 102: 93-101.
- Huang, Z.Y., Boubriak, I., Osborne, D.J., Dong, M. and Gutterman, Y. (2008). Possible role of pectin-containing mucilage and dew in repairing embryo DNA of seeds adapted to desert conditions. *Ann. Bot.* 101: 277-283.
- Hulme, P.E. (1998). Post-dispersal seed predation and seed bank persistence. *Seed Sci. Res.* 8: 513-519.

- Hume, L. (1984). The effect of seed maturity, storage on the soil surface, and burial on seeds of *Thlaspi arvense* (L.). *Can. J. Plant Sci.* 64: 961-969.
- Hundertmark, M., Buitink, J., Leprince, O. and Hinch, D.K. (2011). The reduction of seed-specific dehydrins reduces seed longevity in *Arabidopsis thaliana*. *Seed Sci. Res.* 21: 165-173.
- Hyde, E. (1954). The function of the hilum in some Papilionaceae in relation to the ripening of the seed and the permeability of the testa. *Ann. Bot. London.* 18: 241-256.
- Ibanez, A.N. and Passera, C.B. (1997). Factors affecting the germination of albaida (*Anthyllis cytisoides* L.), a forage legume of the Mediterranean coast. *J. Arid Envir.* 35: 225-231.
- Iglesias-Fernandez, R., Del Carmen Rodríguez-Gacio, M. and Matilla, A.J. (2011). Progress in research on dry after ripening. *Seed Sci. Res.* 21: 69-80.
- International Seed Testing Association. (1999). International rules for seed testing. *Seed Sci. Technol.* 27: 333.
- Jakobsson, A., Eriksson, O. and Bruun, H.H. (2006). Local seed rain and seed bank in a species-rich grass land: Effects of plant abundance and seed size. *Can. J. Bot.* 84: 1870-1881.
- Jayasuriya, K., Baskin, J.M. and Baskin, C.C. (2009). Sensitivity cycling and its ecological role in seeds with physical dormancy. *Seed Sci. Res.* 19: 3-13.
- Kadis, C. and Georghiou, K. (2010). Seed dispersal and germination behavior of three threatened endemic labiates of Cyprus. *Plant Spec. Biol.* 25: 77-84.
- Kalin Arroyo, M.T., Cavieres, L.A., Castor, C. and Humana, A.M. (1999). Persistent soil seed bank and standing vegetation at a high alpine site in the central Chilean Andes. *Oecologia.* 119: 126-132.
- Kanazashi, A., Nagamitsu, T. and Suzuki, W. (2015). Seed dormancy and germination characteristics in relation to the regeneration of *Acer pycnanthum*, a vulnerable tree species in Japan. *J. For. Res.* 20(1): 160-166.
- Kimball, S., Angert, A.L., Huxman, T.E. and Venable, D.L. (2010). Contemporary climate change in the Sonoran Desert favors cold-adapted species. *Glob. Change Biol.* 16: 1555-1565.
- Kochanek, J., Buckley, Y.M., Probert, R.J., Adkins, S.W. and Steadman, K.J. (2010). Pre-zygotic parental environment modulates seed longevity. *Austral Ecol.* 35: 837-848.
- Kochanek, J., Steadman, K.J., Probert, R.J. and Adkins, S.W. (2011). Parental effects modulate seed longevity: Exploring parental and offspring phenotypes to elucidate pre-zygotic environmental influences. *New Phytol.* 191: 223-233.
- Krüssmann, G. (1981). *Die Baumschule*. Paul Parey Verlag, 5. Auflage, Hamburg and Berlin.
- Kushima, M., Kakuta, H., Kosemura, S., Yamamura, S., Yamada, K., Yokotani Tomita, K. and Hasegawa, K. (1998). An allelopathic substance exuded from germinating watermelon seeds. *Plant Growth Regul.* 25: 1-4.
- Lakon, G. (1949). The topographical tetrazolium method for determining the germination capacity of seeds. *Plant Physiol.* 24(3): 389-394.
- Lehner, A., Mamadou, N., Poels, P., Come, D., Bailly, C. and Corbineau, F. (2008). Changes in soluble carbohydrates, lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities in the embryo during ageing in wheat grains. *J. Cereal Sci.* 47: 555-565.
- Leishman, M. and Westoby, M. (1998). Seed size and shape are not related to persistence in soil in Australia in the same way as in Britain. *Funct. Ecol.* 12: 480-485.
- Lengyel, S., Gove, A.D., Latimer, A.M., Majer, J.D. and Dunn, R.R. (2010). Convergent evolution of seed dispersal by ants, and phylogeny and biogeography in flowering plants: A global survey. *Perspect. Plant Ecol. Evol. Syst.* 12: 43-55.
- Lepiniec, L., Debeaujon, I., Routaboul, J.M., Baudry, A., Pourcel, L., Nesi, N. and Caboche, M. (2006). Genetics and biochemistry of seed flavonoids. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 405-430.
- Leprince, O. and Buitink, J. (2010). Desiccation tolerance: From genomics to the field. *Plant Sci.* 179: 554-564.
- Lev-Yadun, S. and Néeman, G. (2013). Bimodal colour pattern of individual *Pinus halepensis* Mill. seeds: A new type of crypsis. *Biol. J. Linn. Soc.* 109: 271-278.
- Linkies, A. and Leubner-Metzger, G. (2012). Beyond gibberellins and abscisic acid: How ethylene and jasmonates control seed germination. *Plant Cell Rep.* 31: 253-270.
- Liu, N.Y., Khatamian, H. and Fretz, T.A. (1981). Seed coat structure of three woody legume species after chemical and physical treatments to increase seed germination. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 106: 691-694.
- Long, R.L., Gorecki, M.J., Renton, M., Scott, J.K., Colville, L., Goggin, D.E., Commander, L.E., Westcott, D.A., Chery, H. and Finch-Savage, W.E. (2015). The ecophysiology of seed persistence: A mechanistic view of the journey to germination or demise. *Biol. Rev.* 90(1): 31-59.
- Long, R.L., Kranner, I., Panetta, F.D., Birtic, S., Adkins, S.W. and Steadman, K.J. (2011a). Wet-dry cycling extends seed persistence by re-instating antioxidant capacity. *Plant Soil.* 388: 511-519.
- Long, R.L., Panetta, F.D., Steadman, K.J., Probert, R.J., Bekker, R.M., Brooks, S. and Adkins, S.W. (2008). Seed persistence in the field may be predicted by laboratory-controlled aging. *Weed Sci.* 56: 523-528.

- Long, R.L., Steadman, K.J., Panetta, F.D. and Adkins, S.W. (2009). Soil type does not affect seed ageing when soil water potential and temperature are controlled. *Plant Soil*. 320: 131-140.
- Long, R.L., Stevens, J.C., Griffiths, E.M., Adamek, M., Gorecki, M.J., Powles, S.B. and Merritt, D.J. (2011b). Seeds of Brassicaceae weeds have an inherent or inducible response to the germination stimulant karrikinolide. *Ann. Bot.* 108: 933-944.
- Long, R.L., Stevens, J.C., Griffiths, E.M., Adamek, M., Powles, S.B. and Merritt, D.J. (2011c). Detecting karrikinolide-responses in seeds of the Poaceae. *Aust. J. Bot.* 59: 609-619.
- Long, R.L., Williams, K., Griffiths, E.M., Flematti, G.R., Merritt, D.J., Stevens, J.C., Turner, S.R., Powles, S.B. and Dixon, K.W. (2010). Prior hydration of *Brassica tournefortii* seeds reduces the stimulatory effect of karrikinolide on germination and increases seed sensitivity to abscisic acid. *Ann. Bot.* 105: 1063-1070.
- Long, Y., Tan, D.Y., Baskin, C.C. and Baskin, J.M. (2012). Seed dormancy and germination characteristics of *Astragalus arpilobus* (Fabaceae, subfamily Papilionoideae), a central Asian desert annual ephemeral. *S. Afr. J. Bot.* 83: 68-77.
- Lopez, J.H. and Aviles, R.B. (1988). The pre-treatment of seeds of four Chilean *Prosopis* to improve their germination response. *Seed Sci. Technol.* 16: 239-246.
- Lucas-Borja, M., Fonseca, T., Lousada, J., Silva-Santos, P., Garcia, E. and Abellan, M. (2012). Natural regeneration of Spanish black pine [*Pinus nigra* Arn. ssp. *salzmannii* (Dunal) Franco] at contrasting altitudes in a Mediterranean mountain area. *Ecol. Res.* 27: 913-921.
- Luna, B., Pérez, B., Céspedes, B. and Moreno, J.M. (2008). Effect of cold exposure on seed germination of 58 plant species comprising several functional groups from a mid-mountain Mediterranean area. *Ecoscience*. 15(4): 478-484.
- Mandoli, D.F., Ford, G.A., Waldron, L.J., Nemson, J.A. and Briggs, W.R. (1990). Some spectral properties of several soil types: Implications for photomorphogenesis. *Plant Cell Environ.* 13: 287-294.
- Mandoli, D.F., Ford, G.A., Waldron, L.J., Nemson, J.A. and Briggs, W.R. (1990). Some spectral properties of several soil types: Implications for photomorphogenesis. *Plant Cell Environ.* 13: 287-294.
- Martin, R.E., Miller, R.L. and Cushwa, C.T. (1975). Germination response of legume seeds subjected to moist and dry heat. *Ecology*. 56: 1441-1445.
- Mattana, E., Picciau, R., Puddu, S., Cuena Lombraña, A. and Bachetta, G. (2016). Effect of temperature and cold stratification on seed germination of the Mediterranean wild aromatic *Clinopodium sandalioticum* (Lamiaceae). *Plant Biosyst.* 150: 846-850.
- Matusova, R., Rani, K., Verstappen, F.W.A., Franssen, M.C.R., Beale, M.H. and Bouwmeester, H.J. (2005). The strigolactone germination stimulants of the plant-parasitic *Striga* and *Orobanche* spp. are derived from the carotenoid pathway. *Plant Physiol.* 139: 920-934.
- Melo, J.T., Silva, J.A., Torres, R.A.A., Silveira, C.E.S. and Caldas, L.S. (1998). Coleta, propagação e desenvolvimento inicial de espécies do cerrado. In *Cerrado: ambiente e flora*, (eds. S.M. Sano and S.P. Almeida). Embrapa, Planaltina. 195-246.
- Mène-Saffrané, L., Jones, A.D. and DellaPenna, D. (2010). Plastochromanol-8 and tocopherols are essential lipid-soluble antioxidants during seed desiccation and quiescence in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 107: 17815-17820.
- Merritt, D.J., Turner, S.R., Clarke, S. and Dixon, K.W. (2007). Seed dormancy and germination stimulation syndromes for Australian temperate species. *Aust. J. Bot.* 55: 336-344.
- Miller, S.D. and Nalewaja, J.D. (1990). Influence of burial depth on wild oats (*Avena fatua*) seed longevity. *Weed Technol.* 4: 514-517.
- Moles, A.T., Falster, D.S., Leishman, M.R. and Westoby, M. (2004). Small seeded species produce more seeds per square meter of canopy per year, but not per individual per lifetime. *J. Ecol.* 92: 384-396.
- Moles, A.T., Warton, D.I. and Westoby, M. (2003). Seed size and survival in the soil in arid Australia. *Austral Ecol.* 28: 575-585.
- Moore, R.P. (1985). *Handbook on tetrazolium Testing*. 1st ed. Switzerland, The International Seed Testing Association (ISTA). 99.
- Morbidoni, M., Estrelles, E., Soriano, P., Martínez-Solis, I. and Biondi, E. (2008). Effects of environmental factors on seed germination of *Anthyllis barba-jovis* L. *Plant Biosyst.* 142: 275-286.
- Morpeth, D.R. and Hall, A.M. (2000). Microbial enhancement of seed germination in *Rosa corymbifera* 'Laxa'. *Seed Sci. Res.* 10: 489-494.
- Munne-Bosch, S., Onate, M., Oliveira, P.G. and Garcia, Q.S. (2011). Changes in phytohormones and oxidative stress markers in buried seeds of *Vellozia alata*. *Flora*. 206: 704-711.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Murthy, U.M.N. and Sun, W.Q. (2000). Protein modification by Amadori and Maillard reactions during seed storage: Roles of sugar hydrolysis and lipid peroxidation. *J. of Exp. Bot.* 51: 1221-1228.

- Nagel, M. and Börner, A. (2010). The longevity of crop seeds stored under ambient conditions. *Seed Sci. Res.* 20: 1.
- Neffati, M. (1994). Caractérisation morphologique de certaines espèces végétales nord-africaines. Implications pour l'amélioration pastorale. Ph.D. Thesis. Gent University, Belgium. 264.
- Nelson, D.C., Flematti, G.R., Ghisalberti, E.L., Dixon, K.W. and Smith, S.M. (2012). Regulation of seed germination and seedling growth by chemical signals from burning vegetation. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63: 107-130.
- Nelson, E.B. (2004). Microbial dynamics and interactions in the spermosphere. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42: 271-309.
- Nicotra, A.B., Atkin, O.K., Bonser, S.P., Davidson, A.M., Finnegan, E.J., Mathesius, U., Poot, P., Purugganan, M.D., Richards, C.L., Valladares, F. and Van Kleunen, M. (2010). Plant phenotypic plasticity in a changing climate. *Trends Plant Sci.* 15: 684-692.
- Nikolaeva, M.G. (1969). Physiology of deep dormancy in seeds.
- Ooi, M.K.J. (2012). Seed bank persistence and climate change. *Seed Sci. Res.* 22: 53-60.
- Ooi, M.K.J., Auld, T.D. and Whelan, R.J. (2007). Distinguishing between persistence and dormancy in soil seed banks of three shrub species from fire-prone southeastern Australia. *J. Veg. Sci.* 18: 405-412.
- Pakeman, R.J., Small, J.L. and Torvell, L. (2012). Edaphic factors influence the longevity of seeds in the soil. *Plant Ecol.* 213: 57-65.
- Panayotova, L.G., Ivanova, T.A., Bogdanova, Y.Y., Gussey, C.V., Stanilova, M.I., Bosseva, Y.Z. and Stoeva, T.D. (2008). *In vitro* cultivation of plant species from sandy dunes along the Bulgarian Black Sea Coast. *Phytol. Balcan.* 14(1): 119-123.
- Pandita, V.K., Nagarajan, S. and Sharma, D. (1999). Reducing hard seedness in fenugreek by scarification technique. *Seed Sci. Technol.* 27: 627-631.
- Panetta, F.D. (2007). Evaluation of weed eradication programs: Containment and extirpation. *Divers. Distrib.* 13: 33-41.
- Papafotiou, M. and Kalantzis, A. (2009). Seed germination and *in vitro* propagation of *Sideritis athena*. *Acta Hort.* 813: 471-476.
- Papafotiou, M. and Martini, A.N. (2016). *In vitro* seed and clonal propagation of the Mediterranean aromatic and medicinal plant *Teucrium capitatum*. *HortScience.* 51: 403-411.
- Papafotiou, M. and Stragas, J. (2009). Seed germination and *in vitro* propagation of *Dianthus fruticosus* (L.). *Acta Hort.* 813: 481-484.
- Parmesan, C. (2006). Ecological and evolutionary responses to recent climate change. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 37: 637-669.
- Paulsen, T.R., Colville, L., Kranner, I., Daws, M.I., Hogstedt, G., Vandvik, V. and Thompson, K. (2013). Physical dormancy in seeds: A game of hide and seek? *New Phytol.* 198: 496-503.
- Pérez-García, F., Hornero, J. and González-Benito, M.E. (2003). Interpopulation variation in seed germination of five Mediterranean Labiatae shrubby species. *Israel J. Plant Sci.* 51: 117-124.
- Perez-Ramos, I.M. and Maranon, T. (2008). Factors affecting post-dispersal seed predation in two coexisting oak species: microhabitat, burial and exclusion of large herbivores. *For. Ecol. Manag.* 255: 3506-3514.
- Pinto, T. T., Geisler, G. E., Santos, M., & Paulilo, M. T. S. (2020). Germination of physically dormant seeds of *Colubrina glandulosa* Perkins (Rhamnaceae). *Brazilian Journal of Botany*, 1-7.
- Pipinis, E., Milios, E., Smiris, P. and Gioumousidis, C. (2011). Effect of acid scarification and cold moist stratification on the germination of *Cercis siliquastrum* L. seeds. *Turk J. Agric.* 35(3): 259-264.
- Poulsen, K. (1996). Case study: Neem (*Azadirachta indica* A. Juss.) seed research. In: Proceedings of an international workshop on improved methods for handling and storage of intermedia/recalcitrant tropical forest tree seeds (ed: A.S. Ouedraogos). Humlebak, Denmark. 14-22.
- Price, T.D., Qvarnström, A. and Irwin, D.E. (2003). The role of phenotypic plasticity in driving genetic evolution. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences.* 270(1523): 1433-1440.
- Prieto, J., Estrelles, E. and Ibars, A.M. (2004). *Anthyllis lagascana*: from seed to adult plant. *Ex situ* conservation and introduction experiences. Proceedings 4th European Conference on the Conservation of Wild Plants. Planta Europa.
- Probert, R.J. (2000). The role of temperature in the regulation of seed dormancy and germination. *Seeds: the ecology of regeneration in plant communities.* 2: 261-292.
- Probert, R.J., Daws, M.I. and Hay, F.R. (2009). Ecological correlates of *ex situ* seed longevity: A comparative study on 195 species. *Ann. Bot.* 104: 57-69.
- Regnier, E., Harrison, S.K., Liu, J., Schmoll, J.T., Edwards, C.A., Arancon, N. and Holloman, C. (2008). Impact of an exotic earthworm on seed dispersal of an indigenous US weed. *J. Appl. Ecol.* 45: 1621-1629.
- Reyes, O. and Traubaud, L. (2009). Germination behaviour of 14 Mediterranean species in relation to fire factors: smoke and heat. *Plant Ecol.* 202(1): 113.

- Richards, C.L., Bossdorf, O. and Pigliucci, M. (2010). What role does heritable epigenetic variation play in phenotypic evolution? *Bioscience*. *60*: 232-237.
- Roach, D.A. and Wulff, R.D. (1987). Maternal effects in plants. *Ann. Rev. Ecol. Syst.* *18*: 209-235.
- Roberts, D.P., Baker, C.J., McKenna, L., Liu, S., Buyer, J.S. and Kobayashi, D.Y. (2009). Influence of host seed on metabolic activity of *Enterobacter cloacae* in the spermosphere. *Soil Biol. Biochem.* *41*: 754-761.
- Rodrigues-Junior, A.G., Baskin, C.C., Baskin, J.M. and Garcia, Q.S. (2018). Sensitivity cycling in physically dormant seeds of the Neotropical tree *Senna multijuga* (Fabaceae). *Plant Biol.* *20*(4): 698-706.
- Roger-Estrade, J., Colbach, N., Leterme, P., Richard, G. and Caneill, J. (2001). Modelling vertical and lateral weed seed movements during mouldboard ploughing with a skim-coulter. *Soil Till. Res.* *63*: 35-49.
- Rohmeder, E. (1972). *Das Saatgut in der Forstwirtschaft*. Paul Parey Verlag, Hamburg and Berlin.
- Roqueiro, G., Facorro, G.B., Huarte, M.G., Rubin de Celis, E., Garcia, F., Maldonado, S. and Maroder, H. (2010). Effects of photooxidation on membrane integrity in *Salix nigra* seeds. *Ann. Bot.* *105*: 1027-1034.
- Rose, T.L., Conceicao, A.D.S., Xavier-Filho, J., Okorokov, L.A., Fernandes, K.V.S., Marty, F., Marty-Mazars, D., Carvalho, A.O. and Gomes, V.M. (2006). Defense proteins from *Vigna unguiculata* seed exudates: Characterization and inhibitory activity against *Fusarium oxysporum*. *Plant Soil.* *286*: 181-191.
- Rowse, H.R. and Finch-Savage, W.E. (2003). Hydrothermal threshold models can describe the germination response of carrot (*Daucus carota*) and onion (*Allium cepa*) seed populations across both sub- and supra-optimal temperatures. *New Phytol.* *158*: 101-108.
- Saatkamp, A., Affre, L., Baumberger, T., Dumas, P.J., Gasmi, A., Gachet, S. and Arene, F. (2011a). Soil depth detection by seeds and diurnally fluctuating temperatures: Different dynamics in 10 annual plants. *Plant Soil.* *349*: 331-340.
- Saatkamp, A., Affre, L., Dutoit, T. and Poschlod, P. (2011b). Germination traits explain soil seed persistence across species: The case of Mediterranean annual plants in cereal fields. *Ann. Bot.* *107*: 415-426.
- Sabre, I.A., Acherkouk, M., Aberkani, K., Maatougui, A., Melhaoui, M. and Haloui, B. (2017). Regeneration of *Anthyllis cytisoides* (L.) from cotyledonary nodes and effect of seeds morphology on the germination rate of spontaneous shrub in eastern region of Moroccan.
- Sacheti, U. and Al-Rawahy, S.H. (1998). The effects of various pretreatments on the germination of important leguminous shrub-tree species of the Sultanate of Oman. *Seed Sci. Technol.* *26*: 691-699.
- Salazar, A., Goldstein, G., Franco, A.C. and Miralles-Wilhelm, F. (2012). Seed limitation of woody plants in Neotropical savannas. *Plant Ecol.* *213*: 273-287.
- Sallon, S., Solowey, E., Cohen, Y., Korchinsky, R., Egli, M., Woodhatch, I., Simchoni, O. and Kislef, M. (2008). Germination, genetics, and growth of an ancient date seed. *Science.* *320*: 1464-1464.
- Sanguinetti, J. and Kitzberger, T. (2010). Factors controlling seed predation by rodents and non-native *Sus scrofa* in *Araucaria araucana* forests: Potential effects on seedling establishment. *Biol. Invasions.* *12*: 689-706.
- Sattler, S.E., Gilliland, L.U., Magallanes-Lundback, M., Pollard, M. and DellaPenna, D. (2004). Vitamine is essential for seed longevity and for preventing lipid peroxidation during germination. *Plant Cell.* *16*: 1419-1432.
- Schoeman, J., Buckley, Y.M., Cherry, H., Long, R.L. and Steadman, K.J. (2010). Inter-population variation in seed longevity for two invasive weeds: *Chrysanthemoides monilifera* ssp. *monilifera* (boneseed) and ssp. *rotundata* (bitou bush). *Weed Research* *50*: 67-75.
- Sheppard, S.K. and Lloyd, D. (2002). Direct mass spectrometric measurement of gases in soil monoliths. *J. Microbiol. Methods* *50*: 175-188.
- Silveira, F.A.O. and Fernandes, G.W. (2006). Effect of light, temperature and scarification on the germination of *Mimosa foliolosa* (Leguminosae) seeds. *Seed Sci. Technol.* *34*(3): 585-592.
- Solomon, S., Qin, D., Manning, M., Chen, Z., Marquis, M., Averyt, K.B., Tignor, M. and Miller, H.L. (2007). Contribution of working group I to the fourth assessment report of the intergovernmental panel on climate change. Cambri. Uni. Press, New York.
- Sosa, T., Valares, C., Alias, J.C. and Lobon, N.C. (2010). Persistence of flavonoids in *Cistus ladanifer* soils. *Plant Soil.* *337*: 51-63.
- Steadman, K.J., Ellery, A.J., Chapman, R., Moore, A. and Turner, N.C. (2004). Maturation temperature and rainfall influence seed dormancy characteristics of annual ryegrass (*Lolium rigidum*). *Aust. J. Agric. Res.* *55*: 1047-1057.
- Taiz, L. and Zeiger, E. (2006). *Plant physiology*. Fourth edition. Sinauer Associates, Inc., USA, 509-539.
- Tasker, E.M., Denham, A.J., Taylor, J.E. and Strevens, T.C. (2011). Post-fire seed predation: does distance to unburnt vegetation matter? *Austral Ecol.* *36*: 755-766.
- Taylorson, R.B. and Hendricks, S.B. (1977). Dormancy in seeds. *Annu. Rev. Plant Physiol.* *28*: 331-354.
- Thanos, C.A. and Doussi, M.A. (1995). Ecophysiology of seed germination in endemic labiates of Crete. *Israel J. Plant Sci.* *43*: 227-237.

- Thanos, C.A., Georghiou, K., Douma, D.J. and Marangaki, C.J. (1991). Photoinhibition of seed germination in Mediterranean maritime plants. *Ann. Bot.* 68(5): 469-475.
- Thanos, C.A., Kadis, C.C. and Skarou, F. (1995). Ecophysiology of germination in the aromatic plants thyme, savory and oregano. *Seed Sci. Res.* 5: 161-170.
- Thompson, K. and Ooi, M.J. (2010). To germinate or not to germinate: More than just a question of dormancy. *Seed Sci. Res.* 20: 209-211.
- Thompson, K., Bakker, J.P., Bekker, R.M. and Hodgson, J.G. (1998). Ecological correlates of seed persistence in soil in the north-west European flora. *J. Ecol.* 86: 163-169.
- Thompson, K., Ceriani, R.M., Bakker, J.P. and Bekker, R.M. (2003). Are seed dormancy and persistence in soil related? *Seed Sci. Res.* 13: 97-100.
- Thompson, K., Jalili, A., Hodgson, J.G., Hamzehee, B., Asri, Y., Shaw, S., Shirvany, A., Yazdani, S., Khoshnevis, M., Zarrinkamar, F., Ghahramani, M.A. and Safavi, R. (2001). Seed size, shape and persistence in the soil in an Iranian flora. *Seed Sci. Res.* 11: 345-355.
- Thompson, P.A. (1970). Characterization of the germination response to temperature of species and ecotypes. *Nature* 225: 827-831.
- Thompson, P.A. (1973). Geographical adaptation of seeds. In *Seed Ecology*, ed. W. Heydecker, pp. 31-58. Butterworths, London.
- Toole, E.H., and Toole, V.K. (1941). Progress of germination of seed of *Digitaria* as influenced by germination temperature and other factors. *J. Agric. Res.* 63: 65-90.
- Traveset, A. and Verdugo, D. (2002). A meta-analysis of the effect of gut treatment on seed germination. In: *Seed dispersal and frugivory: Ecology, evolution and conservation*. Levey, D.J., Silvan, W.R., Galetti, M. (eds). CABI Publishing, Wallingford. 339-350.
- Turner, S.R., Cook, A., Baskin, J.M., Baskin, C.C., Tuckett, R.E., Steadman, K.J. and Dixon, K.W. (2009). Identification and characterization of the water gap in the physically dormant seeds of *Dodonaea petiolaris*: A first report for Sapindaceae. *Ann. Bot.* 104: 833-844.
- Tweddle, J.C., Dickie, J.B., Baskin, C.C. and Baskin, J.M. (2003). Ecological aspects of seed desiccation sensitivity. *J. Ecol.* 91: 294-304.
- van Klinken, R.D., Flack, L.K. and Pettit, W. (2006). Wet-season dormancy release in seed banks of a tropical leguminous shrub is determined by wet heat. *Ann. Bot.* 98: 875-883.
- van Leeuwen, B.H. (1981). Influence of micro-organisms on the germination of the monocarpic *Cirsium vulgare* in relation to disturbance. *Oecologia*. 48: 112-115.
- Venable, D.L. and Brown, J.S. (1988). The selective interactions of dispersal, dormancy, and seed size as adaptations for reducing risk in variable environments. *Am. Nat.* 131: 360-384.
- Vercellino, R.B., Pandolfo, C.E., Cerrota, A., Cantamutto, M. and Presotto, A. (2019). The roles of light and pericarp on seed dormancy and germination in feral *Raphanus sativus* (Brassicaceae). *Weed Res.* 59(5): 396-406.
- Vleeshouwers, L., Bouwmeester, H. and Karssen, C. (1995). Redefining seed dormancy: An attempt to integrate physiology and ecology. *J. Ecol.* 83: 1031-1037.
- Vleeshouwers, L.M. and Bouwmeester, H.J. (2001). A simulation model for seasonal changes in dormancy and germination of weed seeds. *Seed Sci. Res.* 11: 77-92.
- Wagner, M. and Mitschunas, N. (2008). Fungal effects on seed bank persistence and potential applications in weed biocontrol: A review. *Basic Appl. Ecol.* 9: 191-203.
- Walck, J.L., Hidayati, S.N., Dixon, K.W., Thompson, K. and Poschod, P. (2011). Climate change and plant regeneration from seed. *Glob. Change Biol.* 17: 2145-2161.
- Walters, C., Hill, L.M. and Wheeler, L.J. (2005a). Dying while dry: Kinetics and mechanisms of deterioration in desiccated organisms. *Integr. Comp. Biol.* 45: 751-758.
- Walters, C., Landre, P., Hill, L., Corbineau, F. and Bailly, C. (2005b). Organization of lipid reserves in cotyledons of primed and aged sunflower seeds. *Planta*. 222: 397-407.
- Walters, C., Wheeler, L.M. and Grotenhuis, J.M. (2005c). Longevity of seeds stored in a genebank: Species characteristics. *Seed Sci. Res.* 15: 1-20.
- Wang, J., Liu, K., Xu, D., Wang, Q., Bi, K., Song, Y. and Zhang, L. (2013). Rapid micropropagation system in vitro and antioxidant activity of *Scabiosa tchiliensis* Grunning. *Plant Growth Regul.* 69(3): 305-310.
- Waterworth, W.M., Drury, G.E., Bray, C.M. and West, C.E. (2011). Repairing breaks in the plant genome: The importance of keeping it together. *New Phytol.* 192: 805-822.
- White, J. (1908). The occurrence of an impermeable cuticle on the exterior of certain seeds. *Proceedings of the Royal Society of Victoria (Canada)*. 21: 203-210.
- Widell, K.O. and Vogelmann, T.C. (1985). Optical properties of *Lactuca* and *Taraxacum* seed and fruit coats: Their role as light filters. *Physiol. Plant.* 64: 34-40.
- Wolf, H. and Kamondo, B. (1993). Seed presowing treatment. In: *Tree seeds handbook of Kenya* (ed.: J. Albrecht). Kenya Forestry Research Institute, Nairobi. 55-62.

- Yashina, S., Gubin, S., Maksimovich, S., Yashina, A., Gakhova, E. and Gilichinsky, D. (2012). Regeneration of whole fertile plants from 30,000-y-old fruit tissue buried in Siberian permafrost. *Proceedings of the National Academy of Sciences (PNAS)*. *109*(10): 4008-4013.
- Yoko-o, M. and Tokeshi, M. (2012). Assessing context-dependent survival of *Quercus glauca* seeds in a humid maritime woodland. *Plant Ecol.* *213*: 143-153.
- Yücedağ, C. and Cemal, G.H. (2011). The effect of sowing time on germination of twentytwo Leguminosae species. *Afr. J. Agric. Res.* *6*(16): 3809-3816.
- Zencirkiran, M., Tümsavas, Z. and Halil, Ü.N.A.L. (2010). The effects of different acid treatment and stratification duration on germination of *Cercis siliquastrum* (L.) seeds. *Not. Bot. Horti Agrobot. Cluj Napoca.* *38*(1): 159.
- Zhang, H.X., Irving, L.J., McGill, C., Matthew, C., Zhou, D.W. and Kemp, P. (2010). The effects of salinity and osmotic stress on barley germination rate: sodium as an osmotic regulator. *Ann. Bot.* *106*: 1027-1035.
- Zhao, H.B., Peng, S.L., Chen, Z.Q., Wu, Z.M., Zhou, G.Y., Wang, X. and Qiu, Z.J. (2011a). Abscisic acid in soil facilitates community succession in three forests in China. *J. Chem. Ecol.* *37*: 785-793.
- Zhao, L.P., Wu, G.L. and Cheng, J.M. (2011b). Seed mass and shape are related to persistence in a sandy soil in northern China. *Seed Sci. Res.* *21*: 47-53.
- Zhu, X., Zhang, J. and Ma, K. (2011). Soil biota reduce allelopathic effects of the invasive *Eupatorium adenophorum*. *PLoS One* *6*: 25393.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ II - *IN VITRO* ΠΟΛΛΑΠΛΑΣΙΑΣΜΟΣ

II. II. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα πέντε είδη *Anthyllis barba-jovis*, *Ballota acetabulosa*, *Clinopodium creticum*, *Clinopodium nepeta* και *Scabiosa hymettia* που μελετώνται στην παρούσα διατριβή, απαντώνται στη Μεσογειακή - Ελληνική χλωρίδα αποτελώντας βασικά είδη της μεσογειακής βλάστησης. Τα είδη αυτά παρουσιάζουν μια σειρά ιδιαίτερων χαρακτηριστικών που τα καθιστούν κατάλληλα και αξιόλογα για χρήση ως καλλωπιστικά σε παρτέρια, βραχόκηπους, εκτατικά φυτοδώματα, ως γλαστρικά φυτά ή φυτά κηποτεχνίας, αναλόγως της μορφολογίας τους, στη διαμόρφωση ή αποκατάσταση του τοπίου αστικών και περιαστικών περιοχών ή σε χώρους ιδιαίτερου ενδιαφέροντος, όπως οι αρχαιολογικοί χώροι. Ταυτόχρονα μπορούν να αξιοποιηθούν και στη φαρμακοβιομηχανία, λόγω της υψηλής περιεκτικότητας σε πολύτιμα συστατικά που περιέχονται στους βλαστούς, στα φύλλα και στα άνθη τους. Ειδικότερα το *A. barba-jovis* λόγω της ιδιαίτερης μορφολογίας του αλλά και λόγω της υψηλής ανθεκτικότητάς του στην αλατότητα, στις δυσμενείς καιρικές συνθήκες και στους δυνατούς θαλάσσιους αλμυρούς ανέμους, μπορεί να αποτελέσει ένα βασικό είδος για αξιοποίηση στην ξηρική κηποτεχνία, με χρήση στην κάλυψη παραθαλάσσιων πρανών, σε αποκαταστάσεις προβληματικών περιοχών, όπως περιοχές με ξηροθερμικές συνθήκες που κινδυνεύουν από διάβρωση του εδάφους και σε αναδασώσεις αφού οι σπόροι της παρουσιάζουν υψηλή βλαστικότητα μετά από πυρκαγιά.

Το συγκεκριμένο κεφάλαιο της παρούσας διατριβής αφορά στη διερεύνηση του *in vitro* πολλαπλασιασμού των ανωτέρω πέντε ειδών. Αναπτύχθηκε για πρώτη φορά μια πλήρης μέθοδος για το μικροπολλαπλασιασμό αυτών των ειδών ξεκινώντας από ενήλικα φυτά ή σπορόφυτα. Βασικά προβλήματα που έπρεπε να αντιμετωπιστούν κατά την *in vitro* καλλιέργεια ήταν οι μολύνσεις κατά την αρχική εγκατάσταση καλλιεργειών από ενήλικα φυτά και η υπερενυδάτωση των βλαστών κατά το στάδιο του πολλαπλασιασμού. Ενώ η ριζοβολία των μικρομοσχευμάτων και ο εγκλιματισμός των φυταρίων πραγματοποιήθηκαν χωρίς ιδιαίτερα προβλήματα.

Κατά το στάδιο εγκατάστασης αρχικής *in vitro* καλλιέργειας είτε από αυτοφυή φυτά ή από σπορόφυτα διερευνήθηκε η επίδραση του θρεπτικού υποστρώματος και το είδος και η συγκέντρωση φυτορρυθμιστικών ουσιών (PGRs) στην αντίδραση διαφορετικών τύπων εκφύτων. Επιπλέον για την εγκατάσταση αρχικής *in vitro* καλλιέργειας από αυτοφυή φυτά έγινε προσπάθεια εξεύρεσης μιας αποτελεσματικής μεθόδου απολύμανσης των εκφύτων, η

οποία θα διασφάλιζε τόσο την αποφυγή των μολύνσεων, όσο και το υψηλό ποσοστό επιβίωσης των εκφύτων. Για το λόγω αυτό δοκιμάσθηκαν διάφορες συγκεντρώσεις υδατικού διαλύματος χλωρίνης εμπορίου και διαφορετικός χρόνος εμβάπτισης των φυτικών ιστών σε αυτό.

Στο στάδιο του πολλαπλασιασμού έγινε εκτενής διερεύνηση ως προς την αποτελεσματικότητα διαφόρων PGRs [6-βενζυλαδεσίνη (BA), ζεατίνη (ZEAT), κινετίνη (KIN), 6-γ-γ-(διμεθυλαλληλάμινο)-πουρίνη (2iP)] και συγκεντρώσεων (0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0 ή 8,0 mg L⁻¹) στην παραγωγή βλαστών. Η χρήση υψηλών συγκεντρώσεων των τεσσάρων τύπων κυτοκινίνης είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του ποσοστού υπερενυδάτωσης των ιστών. Για την αντιμετώπιση του φαινομένου της υπερενυδάτωσης των βλαστών δοκιμάστηκε ο εμπλουτισμός του υποστρώματος με αυξίνη [0,1 ή 0,5 mg L⁻¹ 1-ναφθαλινοξικό οξύ (NAA)] και η αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ από 8 σε 12 g L⁻¹.

Όσον αφορά τη ριζοβολία των μικρομοσχευμάτων εξετάστηκε η επίδραση της δύναμης του θρεπτικού υποστρώματος Murashige & Skoog (MS), ο τύπος του μικρομοσχεύματος (από το κορυφαίο τμήμα, μαζί με το επάκριο μερίστωμα και από το μεσαίο τμήμα του μικροβλαστού) και η συγκέντρωση και διάρκεια εφαρμογής του ινδολ-3-βουτυρικό οξύ (IBA). Για τον εγκλιματισμό των φυταρίων (ριζοβολημένων μικρομοσχευμάτων) σε *ex vitro* συνθήκες χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα τύρφης-περλίτη (1:1, v/v).

Η εγκατάσταση αρχικής *in vitro* καλλιέργειας του *A. barba-jovis* και *B. acetabulosa* από ενήλικα καλλιεργούμενα ή αυτοφυή φυτά, αντίστοιχα, δεν κατέστη δυνατή, εξ' αιτίας του υψηλού ποσοστού μολύνσεων (100%) με αποτέλεσμα την ολοκληρωτική απώλεια των καλλιεργειών και ως εκ τούτου χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα, από νεαρά φυτά που αναπτύσσονταν στο θερμοκήπιο.

Για την εγκατάσταση αρχικής *in vitro* καλλιέργειας του *A. barba-jovis* από νεαρά φυτά αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο μπορούν να χρησιμοποιηθούν έκφυτα πρώτου και δεύτερου ορατού κόμβου μετά την κορυφή του βλαστού σε θρεπτικό υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με 1,0 ή 1,5 mg L⁻¹ BA, ενώ για την εγκατάσταση από σπορόφυτα μπορούν να χρησιμοποιηθούν έκφυτα κορυφής ή πρώτου ή κοτυληδικού κόμβου αφού αντιδρούν με παρόμοιο τρόπο, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με 0,5 mg L⁻¹ BA, σε συνδυασμό με 0,1 mg L⁻¹ NAA.

Η εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας του *B. acetabulosa* από νεαρά φυτά αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο ήταν επιτυχής σε θρεπτικό υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με 1,0 mg L⁻¹ BA, ενώ για την εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας από σπορόφυτα προτείνεται το υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με 1,0 mg L⁻¹ BA ή 2,0 mg L⁻¹ KIN.

Για την *in vitro* αρχική καλλιέργεια των ειδών *C. creticum* και *C. nepeta* από ενήλικα φυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και οι δύο τύποι εκφύτων (κορυφής και κόμβου). Επιπλέον η καλλιέργεια του *C. creticum* ενδείκνυται να γίνεται σε θρεπτικό υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ZEAT και για τους δύο τύπους εκφύτων (κορυφής και κόμβου). Ενώ για το συγγενικό είδος *C. nepeta* προτείνεται το υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA.

Τέλος η εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας του *S. hymettia* τόσο από ενήλικα αυτοφυή φυτά όσο και από σπορόφυτα αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο ήταν εν μέρει επιτυχής, λόγω του υψηλού ποσοστού μολύνσεων. Ωστόσο προτείνεται η χρήση υποστρώματος MS είτε χωρίς PGRs είτε με $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA.

Στο στάδιο του πολλαπλασιασμού των *in vitro* καλλιεργειών, των υπό μελέτη ειδών, η χρήση υψηλών συγκεντρώσεων των τεσσάρων PGRs που δοκιμάστηκαν, ιδιαίτερα του BA και της ZEAT, επέφερε αύξηση του ποσοστού των εκφύτων που σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς και μείωση του ποσοστού των εκφύτων που σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς. Η αύξηση της συγκέντρωσης των PGRs στο υπόστρωμα οδήγησε σε αύξηση τόσο του αριθμού των κανονικών (φυσιολογικών) βλαστών όσο και του αριθμού των υπερενυδατωμένων βλαστών. Ο εμπλουτισμός του υποστρώματος με αυξίνη (NAA) ή η αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ παρεμπόδισε την υπερενυδάτωση. Κατά το στάδιο του πολλαπλασιασμού του *A. barba-jovis*, *C. creticum* και *C. nepeta* έκφυτα προερχόμενα από ενήλικα φυτά και από σπορόφυτα ανταποκρίθηκαν με παρόμοιο τρόπο στην *in vitro* καλλιέργεια. Για την απόκτηση περισσότερων φυσιολογικών βλαστών (μη υπερενυδατωμένων) με ελάχιστο αριθμό υπερενυδατωμένων, προτείνεται υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA σε συνδυασμό με $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA στερεοποιημένο με 12 g L^{-1} άγαρ για το είδος *A. barba-jovis*, για το *B. acetabulosa* προτείνεται η χρήση υποστρώματος MS εμπλουτισμένο με $0,5$ ή $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA στερεοποιημένο με 12 g L^{-1} άγαρ, ενώ για τα είδη *C. creticum* και *C. nepeta* υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με $8,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA και άγαρ 12 g L^{-1} ή με $8,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA και $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA. Δυσκολία παρουσιάστηκε κατά το στάδιο του πολλαπλασιασμού του *S. hymettia*, λόγω του χαμηλού δυναμικού πολλαπλασιασμού που παρατηρήθηκε. Τα έκφυτα κορυφής αντέδρασαν σε ποσοστό 50 - 100% στα διάφορα υποστρώματα, δίνοντας έναν βλαστό ανά έκφυτο, ενώ στα έκφυτα κόμβου παρουσιάστηκε αδυναμία βλαστογένεσης (δεν αντέδρασαν).

Η ριζοβολία και των δύο τύπων μικρομοσχευμάτων, από το κορυφαίο τμήμα, μαζί με το επάκριο μερίστωμα και από το μεσαίο τμήμα του μικροβλαστού, του *A. barba-jovis* έγινε

σε πολύ υψηλά ποσοστά σε μισής δύναμης MS χωρίς IBA ή με 0,5 - 4,0 mg L⁻¹ IBA σε συνεχή εφαρμογή για έξι εβδομάδες, ενώ για το *B. acetabulosa* σε υπόστρωμα πλήρους δύναμης MS με 0,5 - 1,0 mg L⁻¹ IBA σε συνεχή εφαρμογή για έξι εβδομάδες. Επιπλέον για την *in vitro* ριζοβολία των συστάδων μικροβλαστών του *B. acetabulosa* προτείνεται υπόστρωμα μισής δύναμης MS με 4,0 mg L⁻¹ IBA σε συνεχή εφαρμογή για έξι εβδομάδες. Όσον αφορά την *in vitro* ριζοβολία των μικρομοσχευμάτων, από το κορυφαίο τμήμα, μαζί με το επάκριο μερίστωμα, των μικροβλαστών και των συστάδων μικροβλαστών των ειδών *C. creticum* και *C. nepeta* προτείνεται υπόστρωμα μισής δύναμης MS χωρίς IBA ή με 0,5 - 4,0 mg L⁻¹ IBA σε συνεχή εφαρμογή για έξι εβδομάδες. Ενώ για την *in vitro* ριζοβολία των μικρομοσχευμάτων, από το κορυφαίο τμήμα, μαζί με το επάκριο μερίστωμα, των μικροβλαστών του *S. hymettia* προτείνεται υπόστρωμα μισής δύναμης MS με 1,0 mg L⁻¹ IBA σε συνεχή εφαρμογή για έξι εβδομάδες.

Ο εγκλιματισμός των φυταρίων και των πέντε ειδών και των συστάδων των ειδών *B. acetabulosa*, *C. creticum* και *C. nepeta*, σε *ex vitro* συνθήκες έγινε χωρίς ιδιαίτερα προβλήματα σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (1:1, v/v). και επιβίωσε πολύ υψηλό ποσοστό φυτών (80 - 100%).

Π.Π. ΣΚΟΠΟΣ

Με στόχο την εισαγωγή των αυτοφυών της ελληνικής και μεσογειακής χλωρίδας ειδών *Anthyllis barba-jovis*, *Ballota acetabulosa*, *Clinopodium creticum*, *Clinopodium nepeta* και *Scabiosa hymettia* στην επιχειρηματική ανθοκομία ως καλλωπιστικά για χρήση στο αστικό και περιαστικό πράσινο με έμφαση στην ξηρική κηποτεχνία, σε εκτατικά φυτοδώματα, καθώς και χώρους με υποβαθμισμένο εδαφικό περιβάλλον, όπως οι αρχαιολογικοί χώροι, στην παρούσα ενότητα, μελετήθηκε ο μικροπολλαπλασιασμός τους, ως πιθανή αποτελεσματική μέθοδος πολλαπλασιασμού των ειδών.

Συγκεκριμένα εξετάστηκε η επίδραση της προέλευσης του εκφύτου (ενήλικα φυτά ή σπορόφυτα), της θέσης του εκφύτου πάνω στο βλαστό του μητρικού φυτού (κορυφής, 1^ο, 2^ο, 3^ο κόμβου) και της θέσης του εκφύτου πάνω στο μικροβλαστό (κορυφής, κόμβου, κοτυληδικού κόμβου), του θρεπτικού υποστρώματος [MS, Schenk & Hildebrandt (SH), McCown's Woody Plant (WPM)], του τύπου και της συγκέντρωσης των PGRs (BA, ZEAT, KIN, 2iP, NAA), καθώς της συγκέντρωσης του σταθεροποιητικού παράγοντα (άγαρ), με σκοπό την αύξηση της απόδοσης της μεθόδου στη φάση του πολλαπλασιασμού των βλαστών, η αποτελεσματικότητα του IBA (διάρκεια εφαρμογής και συγκέντρωση) στη ριζοβολία των μικρομοσχευμάτων και ο εγκλιματισμός των ειδών στις *ex vitro* συνθήκες.

II. II. 1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

II. II. 1. 1 *In vitro* καλλιέργειες

Ο μικροπολλαπλασιασμός είναι μια ιδιαίτερα παραγωγική μέθοδος κλωνικού πολλαπλασιασμού, καθώς δίνει σε σχετικά σύντομο χρονικό διάστημα μεγάλες ποσότητες άνοσου και πιστού της ποικιλίας πολλαπλασιαστικού υλικού. Η διαδικασία του μικροπολλαπλασιασμού περιλαμβάνει μια σειρά από τέσσερα διακριτά στάδια: 1) εγκατάσταση κυτταρο-/ιστοκαλλιέργειας, 2) πολλαπλασιασμός, 3) ριζοβολία μικροβλαστών και 4) εγκλιματισμός φυταρίων (ριζοβολημένων μικροβλαστών). Η επιτυχία της μεθόδου επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες όπως ο γονότυπος, η ηλικία των μητρικών φυτών, το είδος του υποστρώματος, το είδος και η συγκέντρωση των ρυθμιστών ανάπτυξης, το είδος του εκφύτου και οι συνθήκες καλλιέργειας (Chalupa, 1988, Juncker and Favre, 1989, Manzanera and Pardos, 1990, Vieitez *et al.*, 1994, Bennett *et al.* 1994, Mylona and Dolan, 2002). Υπάρχουν αρκετές τεχνικές όπως η σωματική εμβρυογένεση, η οργανογένεση, ο πολλαπλασιασμός πλάγιων βλαστών (καλλιέργεια κόμβων βλαστού με πλάγιους οφθαλμούς), με την τελευταία να είναι η ευρέως χρησιμοποιούμενη στο μικροπολλαπλασιασμό.

Η έναρξη της καλλιέργειας είναι συχνά ένα κρίσιμο στάδιο του μικροπολλαπλασιασμού, ιδίως όταν ως μητρικά φυτά χρησιμοποιούνται ενήλικα φυτά από αυτοφυής πληθυσμούς (Marks and Myers, 1992a, 1992b). Επιπλέον καλλιέργειες βλαστών που προέρχονται από ίδιου τύπου έκφυτα μπορεί να επιδεικνύουν διαφορετικό βαθμό παραγωγής βλαστών και ικανότητα ριζοβολίας (Webster and Jones, 1989) γι' αυτό για τη συνέχιση της καλλιέργειας θα πρέπει να επιλέγονται μόνο τα καλύτερα (αποδοτικότερα) έκφυτα (Lane, 1992). Ταυτόχρονα και το στάδιο του πολλαπλασιασμού των *in vitro* καλλιεργειών είναι πολύ σημαντικό για τη δημιουργία ενός αποδοτικού πρωτοκόλλου πολλαπλασιασμού, διότι αφενός επιδιώκεται η γρήγορη απόκτηση μεγάλου αριθμού βλαστών και αφετέρου η ικανοποιητική επιμήκυνσή τους, με σκοπό να συνεχιστεί αφ' ενός η καλλιέργεια και αφ' ετέρου να προωθηθούν για ριζοβολία.

Η ριζογένεση και η επιμήκυνση των ριζών είναι μια σύνθετη διαδικασία, η οποία επηρεάζεται, όπως όλα τα προηγούμενα στάδια του μικροπολλαπλασιασμού, από πολλούς παράγοντες (Bennett *et al.* 1994, Mylona and Dolan, 2002). Ως εκ τούτου, οι συνθήκες για την επίτευξη ριζοβολίας ποικίλουν μεταξύ των διαφορετικών ειδών, ανάμεσα στα άτομα του ίδιου είδους, αλλά ακόμη και σε συνάρτηση των φυτών της ίδιας ποικιλίας.

Η επιτυχία κάθε μεθόδου *in vitro* πολλαπλασιασμού εξαρτάται και συνδέεται με το τελευταίο στάδιο, δηλαδή αυτό του επιτυχούς εγκλιματισμού. Μόνο τότε μπορεί να θεωρηθεί επιτυχής, όταν γίνει δηλαδή εφικτός ο εγκλιματισμός και η επιβίωση ενός ικανού αριθμού φυτών που θα έχουν πλέον μεταφερθεί, εγκλιματιστεί και επιβιώσει με επιτυχία σε φυσικές συνθήκες (Ziv, 1986).

II.Π.1.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τον *in vitro* πολλαπλασιασμό

Η βιβλιογραφική ανασκόπηση δείχνει ότι διάφοροι παράγοντες μπορούν να επηρεάσουν τον *in vitro* πολλαπλασιασμό. Μεταξύ αυτών ο γονότυπος των μητρικών φυτών, ο τύπος και οι συγκεντρώσεις των ρυθμιστών ανάπτυξης των φυτών (PGRs) και τα μέσα καλλιέργειας φαίνεται να είναι οι πιο σημαντικοί (George and Debergh, 2008, Machakova *et al.*, 2008, Chawla, 2009, Canhoto, 2010). Αρκετές θρεπτικές ουσίες / θρεπτικά συστατικά είναι απαραίτητα για την ανάπτυξη. Μερικά από αυτά είναι οι ανόργανες θρεπτικές ουσίες, οι PGRs και τα οργανικά θρεπτικά συστατικά (George and De Klerk, 2008, Canhoto, 2010).

(α) Ανόργανα θρεπτικά συστατικά

Τα ανόργανα θρεπτικά συστατικά προστίθενται στο υπόστρωμα ως άλατα, τα οποία διαχωρίζονται σε κατιόντα και ανιόντα και εν συνεχεία απορροφώνται από τους ιστούς των φυτών. Μέρος των θρεπτικών ουσιών, μπορεί επίσης να προστεθεί μέσω "ακαθαρσιών" που υπάρχουν σε άλλα συστατικά του υποστρώματος, όπως στην περίπτωση του άγαρ (George and De Klerk, 2008). Ο Canhoto (2010) αναφέρει ότι όταν γίνεται προσπάθεια ανεύρεσης κατάλληλων πρωτοκόλλων πολλαπλασιασμού των διαφόρων φυτών, πρέπει να λαμβάνονται υπόψη δύο σημαντικοί παράγοντες: α) η συνολική ποσότητα αζώτου στο υπόστρωμα και β) η αναλογία νιτρικών προς ιόντα αμμωνίου.

(β) Οργανικά θρεπτικά συστατικά

Οι υδατάνθρακες διαδραματίζουν σημαντικό ρόλο στον *in vitro* πολλαπλασιασμό, τόσο ως πηγή ενέργειας και άνθρακα όσο και ως οσμωτικός παράγοντας. Επιπλέον η σακχαρόζη (ζάχαρη εμπορίου) χρησιμοποιείται σχεδόν καθολικά στον *in vitro* πολλαπλασιασμό, καθώς μεταβολίζεται από τους ιστούς των φυτών τόσο *in vitro* όσο και σε φυσικές συνθήκες (George and De Klerk, 2008, Thorpe *et al.*, 2008). Αρκετοί συγγραφείς επεσήμαναν ότι τα σάκχαρα δεν είναι μόνο σημαντικά ως πηγές άνθρακα, αλλά μπορούν επίσης να επηρεάσουν διεργασίες μορφογένεσης (Machakova *et al.*, 2008). Επιπρόσθετα μικρές ποσότητες αρκετών οργανικών ενώσεων μπορούν να βελτιώσουν την ανάπτυξη και τη μορφογένεση

των φυτικών ιστών που καλλιεργούνται *in vitro*. Αυτές είναι κυρίως μερικές βιταμίνες και αμινοξέα. Η ποσότητα που χρησιμοποιείται από αυτές τις ενώσεις μεταβάλλεται ανάλογα με το σκοπό της *in vitro* καλλιεργητικής μεθόδου (Thorpe *et al.*, 2008).

(γ) Τύπος θρεπτικού υποστρώματος

Η επιτυχία της *in vitro* καλλιέργειας των φυτικών ιστών επηρεάζεται ισχυρότατα από τον τύπο του χρησιμοποιούμενου υποστρώματος καλλιέργειας (George and De Klerk, 2008, Chawla, 2009). Το ευρύτερα χρησιμοποιούμενο υπόστρωμα στο μικροπολλαπλασιασμό είναι αυτό των Murashige και Skoog (1962).

(δ) Φυτορυθμιστικές ουσίες (PGRs)

Οι PGRs είναι η σημαντικότερη κατηγορία ενώσεων που προστίθενται στο θρεπτικό διάλυμα και είναι αυτές που καθορίζουν την κατεύθυνση της καλλιέργειας, αφού διεγείρουν κάποιες λειτουργίες του φυτικού κυττάρου και αναστέλλουν κάποιες άλλες (George and Debergh, 2008, Machakova *et al.*, 2008, Chawla, 2009, Canhoto, 2010). Οι επιδράσεις των PGRs σπάνια είναι εξειδικευμένες στη βασική τους επίδραση ως προς την ανάπτυξη και εξέλιξη, με αποτέλεσμα οι αντιδράσεις των κυττάρων, των ιστών και των οργάνων *in vitro* να ποικίλουν ανάλογα με τις καλλιεργητικές συνθήκες, τον τύπο του εκφύτου και το γονότυπο (Gaspar *et al.*, 1996). Επιπλέον οι διαδικασίες ανάπτυξης και εξέλιξης *in vivo* και *ex vitro* είναι υπερβολικά πολύπλοκες και αποτελούνται από ανεξάρτητες φυσιολογικές φάσεις (προτροπή, προσδιορισμός, έναρξη, έκφραση) με επακόλουθο να έχουν διαφορετικές απαιτήσεις. Συνήθως απαιτείται ένας συνδυασμός δύο ή περισσότερων PGRs διαφορετικών κατηγοριών είτε ταυτόχρονα είτε διαδοχικά (Gaspar *et al.*, 1996). Οι PGRs ασκούν δραματικές επιδράσεις ακόμη και αν χρησιμοποιούνται σε χαμηλές συγκεντρώσεις στο υπόστρωμα (Trigiano and Gray, 2016). Συμμετέχουν στη ρύθμιση του κυτταρικού κύκλου, ενθαρρύνουν, ελέγχουν και διαμορφώνουν την άμεση έναρξη και την ανάπτυξη οργάνων, όπως βλαστών και ριζών σε έκφυτα διαφόρων τύπου και τη δημιουργία των εμβρύων (Van Staden *et al.*, 2008). Επιπλέον σε ορισμένες περιπτώσεις, οι κυτοκινίνες ενεργοποιούν τη σύνθεση RNA, διεγείρουν τη σύνθεση πρωτεϊνών και τις δράσεις ορισμένων ενζύμων (Kulaeva, 1980).

Παραδοσιακά οι PGRs έχουν ταξινομηθεί σε πέντε μεγάλες ομάδες: κυτοκινίνες, αυξίνες, αμπισικό οξύ, γιββερελλίνες και αιθυλένιο. Κάθε μια από αυτές τις ομάδες έχει μοναδικά αποτελέσματα και παρόλα αυτά είναι ικανές είτε να συνεργάζονται είτε να ανταγωνίζονται η μια την άλλη με σκοπό να ασκούν αντιδράσεις εντός του ιστού. Μερικές από τις νεότερες

PGRs που έχουν ανακαλυφθεί και ταξινομηθεί είναι οι πολυαμίνες, ιασμονάτες, ολιγοσακχαρίτες, το σαλικυλικό οξύ, τα μπρασσινοστεροειδή (BRs) και τα τριαζόλια (Millam,2011).

(i) Κυτοκινίνες

Για να προωθηθεί ο σχηματισμός βλαστών και να μειωθεί η κυριαρχία της κορυφής στον *in vitro* πολλαπλασιασμό, μία ή και περισσότερες κυτοκινίνες προστίθενται στο υπόστρωμα κατά τη διάρκεια της φάσης του πολλαπλασιασμού (Chawla, 2009, Canhoto, 2010). Οι κυτοκινίνες των οποίων η ονομασία προέρχεται από τις ελληνικές λέξεις κύτταρο και κίνηση, φαίνεται να είναι απαραίτητες για τη διαίρεση των φυτικών κυττάρων. Στις καλλιέργειες ιστών, οι κυτοκινίνες φαίνεται να είναι απαραίτητες για τη διαίρεση των φυτικών κυττάρων (Van Staden *et al.*, 2008). Με την απουσία τους, η μετάφαση, αλλά όχι η πρόφαση της μίτωσης, είναι αρκετά παρατεταμένη (Jouanneau, 1970, 1975), ενώ η παρουσία κυτοκινίνης σε ένα υπόστρωμα μπορεί να προκαλέσει την ταυτόχρονη διαίρεση των κυττάρων (Jouanneau, 1971).

Οι κυτοκινίνες μπορούν να χωριστούν σε δύο γενικούς τύπους: (1) τύπος αδερίνης και (2) τύπος φαινυλουρίας. Οι κυτοκινίνες τύπου αδερίνης περιλαμβάνουν την (ζεατίνη) ZEAT, (6-βενζυλαδερίνη) BA, (κινετίνη) KIN, (6-γ-γ-(διμεθυλαλληλάμινο)-πουρίνη) 2iP, meta-topolin (mT), ενώ οι κυτοκινίνες τύπου φαινυλουρίας περιλαμβάνουν τη διφαινυλουρία και το thidiazuron (TDZ) (Millam,2011). Οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες κυτοκινίνες στον *in vitro* πολλαπλασιασμό είναι η ZEAT, το 2iP, η KIN και το BA (Chawla, 2009). Πιο πρόσφατα, το TDZ, μια παρόμοια ένωση με την κυτοκινίνη, έχει δοκιμασθεί εντατικά και έχει χρησιμοποιηθεί για τον *in vitro* πολλαπλασιασμό ορισμένων ξυλωδών φυτών (Van Staden *et al.*, 2008, Martini and Papafotiou, 2011).

Ο τύπος και η συγκέντρωση της κυτοκινίνης που χρησιμοποιείται ποικίλλει σημαντικά μεταξύ των ειδών (των γονότυπων των φυτών) και του είδους της καλλιέργειας. Ωστόσο, γενικά η κυτοκινίνη που χρησιμοποιείται πιο συχνά για την παραγωγή υψηλού αριθμού βλαστών στον *in vitro* πολλαπλασιασμό είναι το BA. Τα περισσότερα είδη φυτών ανταποκρίνονται καλά στο BA και όταν η συγκέντρωση είναι η κατάλληλη, σχηματίζονται και επιμηκύνονται πολλοί πλάγιοι βλαστοί (Preece, 2008). Οι υψηλές συγκεντρώσεις κυτοκινινών προκαλούν τον τυχαίο σχηματισμό βλαστών (Chawla, 2009), με υψηλό αριθμό μικρών βλαστών που είναι δύσκολο να επιμηκυνθούν (Van Staden *et al.*, 2008). Συγχρόνως άλλες αρνητικές συνέπειες των υψηλών συγκεντρώσεων κυτοκινινών είναι ο σχηματισμός υπερενυδατωμένων βλαστών και η αναστολή του σχηματισμού ρίζας στη συνέχεια (Van

Staden *et al.*, 2008, Trigiano and Gray, 2016). Επιπλέον μπορεί να χρειαστούν περισσότερες από μία υποκαλλιέργειες σε ένα υπόστρωμα χωρίς κυτοκινίνη μέχρις ότου το επίπεδο της εντός των ιστών να έχει μειωθεί επαρκώς, ώστε να πραγματοποιηθεί μια αποτελεσματική ριζοβολία (Tornero *et al.*, 2009).

(ii) Αυξίνες

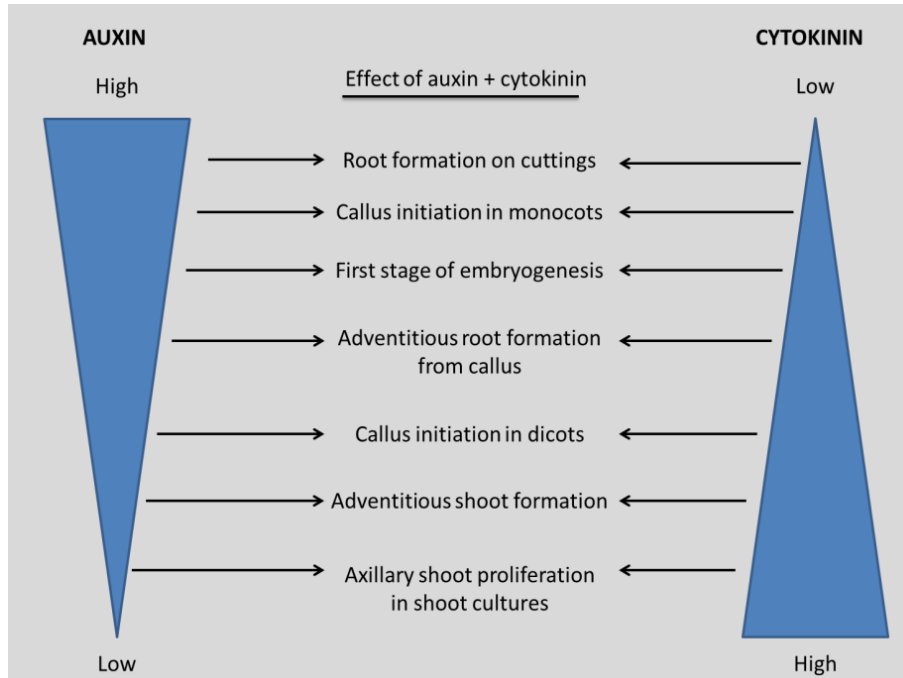
Οι αυξίνες ελέγχουν πολλές φυσιολογικές και αναπτυξιακές διεργασίες, συμπεριλαμβανόμενης της επιμήκυνσης των κυττάρων στους βλαστούς και στις ρίζες, της αύξησης του όγκου των κυττάρων, του τυχαίου σχηματισμού ρίζας και της σωματικής εμβρυογένεσης (Machakova *et al.*, 2008, Canhoto, 2010). Γενικά, όταν η συγκέντρωση της αυξίνης είναι χαμηλή, ευνοείται η έναρξη της ρίζας και, όταν είναι υψηλή, ευνοείται ο σχηματισμός κάλου (Machakova *et al.*, 2008, Farooq *et al.*, 2008, Chawla, 2009, Trigiano and Gray, 2016). Οι συνηθέστερες αυξίνες που χρησιμοποιούνται στην ιστοκαλλιέργεια είναι το α-ναφθαλινοξικό οξύ (NAA), το 2,4-διχλωροφαινοξικό οξύ (2,4-D), το ινδολ-3-οξικό οξύ (IAA) και το ινδολ-3-βουτανικό οξύ (IBA), με την τελευταία να είναι η πιο ευρέως χρησιμοποιούμενη αυξίνη στα υποστρώματα ριζοβολίας των διαφόρων ειδών, χωρίς φυτοτοξικότητα ακόμη και σε σχετικά υψηλές συγκεντρώσεις (George and De Klerk, 2008). Το ινδολοξικό οξύ (IAA) είναι η φυσική αυξάνει που απαντά συχνότερα από όλες τις φυσικές αυξίνες, αλλά η χρήση της στην καλλιέργεια ιστών περιορίζεται από την ευαισθησία της στο φως και την τάση της να οξειδώνεται στο υπόστρωμα, να μεταβολίζεται από τους ιστούς του φυτού ή να διασπάται από μικροοργανισμούς. (Millam, 2011). Το NAA και το (2,4-D) συνήθως χρησιμοποιούνται στο μικροπολλαπλασιασμό για την ανάπτυξη κάλου (Millam, 2011).

(iii) Αλληλεπιδράσεις μεταξύ αυξίνης / κυτοκινίνης

Σε ορισμένα είδη, η παρουσία μιας αυξίνης μαζί με την κυτοκινίνη προάγει το σχηματισμό τυχαίων βλαστών με τη διέγερση της κυτταρικής διαίρεσης, της εκκίνησης και της ανάπτυξης (Machakova *et al.*, 2008, Van Staden *et al.*, 2008, Chawla, 2009, Canhoto, 2010). Η αναλογία αυξίνης / κυτοκινίνης μέσα στο υπόστρωμα έχει σημαντικό ρόλο σε πολλές πτυχές της *in vitro* μορφογένεσης (Machakova *et al.*, 2008, Canhoto, 2010). Οι αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δύο PGR (αυξίνη / κυτοκινίνη) είναι συχνά πολύπλοκες και περισσότεροι από ένας συνδυασμοί PGR είναι πιθανόν να παράγουν βέλτιστα αποτελέσματα (Edwin *et al.*, 2007, Van Staden *et al.*, 2008). Κατά συνέπεια η ισορροπία μεταξύ των δυο PGR (αυξίνη / κυτοκινίνη) που συνήθως απαιτείται για να ξεκινήσει η

διαφοροποίηση και η αύξηση των ιστών σε καλλιέργεια περιγράφεται στο Σχ. II.Π.1. Βέβαια παρόλο που τόσο η αυξίνη όσο και η κυτοκίνη συχνά απαιτούνται για ανάπτυξη και μορφογένεση, η αυξίνη μπορεί να παρεμποδίσει τη συσσώρευση κυτοκίνης, ενώ οι κυτοκίνες μπορούν να παρεμποδίσουν τουλάχιστο μερικές από τις δράσεις της αυξίνης (Gaspar *et al.*, 1996). Ένα αρκετά γενικευμένο συμπέρασμα θα μπορούσε να είναι ότι η υψηλή συγκέντρωση κυτοκίνης και η χαμηλή συγκέντρωση αυξίνης προωθεί την ανάπτυξη των βλαστών, ενώ αντιθέτως η χαμηλή συγκέντρωση κυτοκίνης και η υψηλή συγκέντρωση αυξίνης οδηγεί στην ανάπτυξη των ριζών. Παράλληλα για το σχηματισμό επίκητων οφθαλμών ή ριζικών μεριστωμάτων απαιτείται μια ισορροπία μεταξύ της αυξίνης και κυτοκίνης.

Συμπερασματικά, κάθε πρωτόκολλο *in vitro* καλλιέργειας είναι μοναδικό και οι επιδράσεις των διαφορετικών συγκεντρώσεων PGRs πρέπει να εξετάζονται για κάθε περίπτωση ξεχωριστά και μόνο σε κάποιο βαθμό τα αποτελέσματα μπορούν να χρησιμοποιηθούν και σε άλλα πρωτόκολλα καλλιέργειας (Machakova *et al.*, 2008, Canhoto, 2010). Η απαιτούμενη συγκέντρωση κάθε τύπου PGR διαφέρει ανάλογα με το είδος του φυτού, τις συνθήκες καλλιέργειας και τις χρησιμοποιούμενες ενώσεις.



Σχήμα II.Π.1. Οι σχετικές συγκεντρώσεις αυξινών και κυτοκινινών που απαιτούνται για την αύξηση και τη μορφογένεση. Πηγή: Van Staden *et al.*, 2008.

II.II.1.3 Υπερενυδάτωση

Παλαιότερα ο όρος “υάλωση” χρησιμοποιούταν για να περιγράψει δύο διαφορετικές διεργασίες: 1) τα όργανα και τους ιστούς που έχουν ανώμαλη μορφολογική εμφάνιση και φυσιολογική λειτουργία και 2) τη μετατροπή από την υγρή στη στερεή κατάσταση, δηλαδή το σχηματισμό πάγου κατά τη διατήρηση σε χαμηλή θερμοκρασία *in vitro* καλλιιεργημένων κυττάρων, ιστών και οργάνων. Επειδή όμως η χρήση του ίδιου όρου για να προσδιορίσει δύο εντελώς διαφορετικές διεργασίες στην ίδια περιοχή έρευνας μπορούσε να οδηγήσει σε σύγχυση, ο όρος “υάλωση” αντικαταστάθηκε από τον όρο “υπερενυδάτωση” για να υποδείξει το φυτικό υλικό με ανώμαλη μορφολογία και φυσιολογία (Debergh *et al.*, 1992).

Η υπερενυδάτωση λοιπόν είναι μια μορφολογική και φυσιολογική διαταραχή των *in vitro* αναπτυσσόμενων φυτών (Hazarika, 2006), που έχει ως αποτέλεσμα την απώλεια της ικανότητά τους να αναπτύσσονται κανονικά, προκαλώντας ως εκ’ τούτου προβλήματα κατά τον *in situ* εγκλιματισμό (Pâques and Boxus, 1987a, b). Σύμφωνα με τους Casanova *et al.* (2008) η υπερενυδάτωση θεωρείται ένας ποιοτικός χαρακτήρας. Δεν υπάρχει αμφιβολία λοιπόν ότι η αντιμετώπιση του φαινομένου της υπερενυδάτωσης είναι αναπόσπαστο μέρος για την καθιέρωση μιας ικανοποιητικής μεθόδου μικροπολλαπλασιασμού.

Ορισμένοι συγγραφείς χαρακτηρίζουν τα φυτά ως υπερενυδατωμένα ή μη, μόνο με βάση την εμφάνιση των ιστών τους όπως π.χ. τα υπερενυδατωμένα φύλλα ή τους υπερενυδατωμένους βλαστούς (Dewir *et al.*, 2006, Gribble 1999).

Σε μια προσπάθεια λοιπόν να επιτευχθεί ποσοτική προσέγγιση του φαινομένου, οι ερευνητές βαθμολογούν το ποσοστό των υπερενυδατωμένων βλαστών. Όμως παρουσιάστηκαν δύο κυρίως προβλήματα: 1) η έκταση της υπερενυδάτωσης μπορεί να διαφέρει από βλαστό σε βλαστό π.χ. μπορεί να υπάρχουν βλαστοί που έχουν σοβαρά συμπτώματα υπερενυδάτωσης και άλλοι μόνο επουσιώδη και 2) η βαθμολόγηση εξαρτάται από το μάτι του παρατηρητή (ερευνητή) και ως εκ’ τούτου είναι υποκειμενική σε μεγάλο βαθμό (Lai *et al.*, 2005, Lee *et al.*, 2009, Saher *et al.*, 2004).

(α) Παράγοντες που επηρεάζουν την εμφάνιση της υπερενυδάτωσης

Η υπερενυδάτωση είναι αποτέλεσμα του στρες που προκαλούν οι συνθήκες ανάπτυξης και καλλιέργειας, όπως το πλήγωμα, η διείδυση του υγρού υποστρώματος καλλιέργειας και γενικά ο συνδυασμός ενός πλούσιου σε άζωτο και PGRs υπόστρωμα με μια υγρή και φτωχή σε αέρα ατμόσφαιρα (Kevers *et al.*, 2004). Επιπρόσθετα η εκδήλωση του φαινομένου εξαρτάται σε μεγάλο βαθμό από το γονότυπο, ενώ διαφοροποιήσεις παρατηρούνται ακόμα και ανάμεσα σε διαφορετικές ποικιλίες ή/και κλώνους του ίδιου είδους. Επιπλέον η

ευαισθησία στην υπερενυδάτωση ποικίλει με τον αριθμό των υποκαλλιεργειών, τον τρόπο κοπής των εκφύτων, την τοποθέτηση των εκφύτων στο υπόστρωμα και την απόσταση ενός οργάνου ή ιστού από την επιφάνεια του υποστρώματος (Debergh *et al.*, 1992).

Επιπρόσθετα πολλές έρευνες απέδειξαν ότι η υπερενυδάτωση εξαρτάται από τη διαθεσιμότητα νερού, την περιεκτικότητα σε μικροθρεπτικά συστατικά και την ορμονική ανισορροπία στα υποστρώματα (Doneso, 1987, Kataeva *et al.*, 1991). Ωστόσο, το μικροπεριβάλλον του δοχείου καλλιέργειας και η σύνθεση αιθυλενίου στο εσωτερικό του δοχείου καλλιέργειας βρέθηκε να έχει παρατεταμένη επίδραση στην υπερενυδάτωση. Η συνεκτικότητα του υποστρώματος, που καθορίζεται από τη συγκέντρωση και τον τύπο του πηκτικού υλικού, το είδος και η συγκέντρωση της κυτοκινίνης, η σύνθεση και η συγκέντρωση αλάτων, καθώς και η παρουσία ορισμένων ανόργανων στοιχείων σε αφθονία επηρεάζουν την υπερενυδάτωση (Debergh *et al.*, 1992). Η υπερενυδάτωση έχει δειχθεί να είναι αποτέλεσμα του ωσμωτικού δυναμικού του υποστρώματος, των ιόντων Cl^- , της επίδρασης των ιόντων NH_4^+ , της συγκέντρωσης Ca , της θερμοκρασία και της σχετικής υγρασίας της ατμόσφαιρας (Debergh *et al.*, 1992).

Η συγκέντρωση του άγαρ στο υπόστρωμα ρυθμίζει το υδατικό δυναμικό, τη διάχυση των μικροστοιχείων και την πρόσληψη των κυτοκινινών από τα φυτά (Pâques and Boxus, 1987b, Ziv 1991 a,b, Debergh *et al.*, 1992). Όσο υψηλότερη δηλαδή είναι η συγκέντρωση του άγαρ, τόσο χαμηλότερο είναι το δυναμικό του νερού κατά συνέπεια μειώνεται η διαθεσιμότητα τόσο του νερού όσο και των διαλυμένων ουσιών (Smith and Spomer 1995). Η υπερενυδάτωση (συχνότητα και ένταση) ήταν πιο σημαντική στα υγρά υποστρώματα (Al-Khateeb, 2008, Fki *et al.*, 2011). Αυτό μπορεί να αποδοθεί στην υπερβολική συσσώρευση νερού σε υγρές καλλιέργειες, γεγονός που οδηγεί σε οξειδωτικά στρες (Chakrabarty *et al.*, 2006). Ωστόσο, η συγκέντρωση άγαρ θα πρέπει να επιλέγεται με βάση το εάν ο σκοπός της καλλιέργειας είναι να ριζοβολήσουν και να εγκλιματιστούν περαιτέρω τα φυτάρια *ex vitro*, στην περίπτωση αυτή γενικώς θα ήταν βέλτιστο 8 g L^{-1} άγαρ, ή εάν είναι η μεγιστοποίηση του αριθμού των βλαστών, οπότε θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν λιγότερα από 8 g L^{-1} άγαρ, καθώς σε ένα δεύτερο κύκλο καλλιέργειας μπορεί να αυξηθεί το άγαρ ώστε να παραχθούν νέα υγιή φυτάρια, παρακάμπτοντας την υπερενυδάτωση (Jain *et al.*, 2001, Yadav *et al.*, 2003, Saher *et al.*, 2005a, b).

Καθώς είναι γνωστό ότι οι κυτοκινίνες εμπλέκονται στη ρύθμιση της ανάπτυξης, προάγοντας την κυτταρική διαίρεση και τον πολλαπλασιασμό των βλαστών (Van Staden *et al.*, 2008), είναι απαραίτητες στον *in vitro* πολλαπλασιασμό. Από την άλλη μεριά έχει αποδειχθεί ότι προκαλούν υπερενυδάτωση σε πολλά είδη, συνήθως με τρόπο εξαρτώμενο

από τον τύπο της κυτοκινίνης και τη συγκέντρωσή της (Ziv, 1991a, b, Debergh *et al.*, 1992, Sharma and Mohan, 2006, Kataeva *et al.*, 1991, Olmos *et al.*, 1997, Ochatt *et al.*, 2002, Ivanova and Van Staden 2008, Pavlovic *et al.*, 2012, Ravanfar *et al.*, 2014).

Άλλοι παράγοντες που θεωρούνται υπεύθυνοι για την υπερενυδάτωση είναι το υλικό από το οποίο είναι κατασκευασμένο το δοχείο και το κάλυμμά του, τα οποία δύνανται να επιδράσουν στην ανταλλαγή αερίων και έτσι να επηρεάσουν τις συγκεντρώσεις υδρατμών, διοξειδίου του άνθρακα και του αιθυλενίου στον άνω χώρο του δοχείου. Ακόμα ο όγκος του άνω χώρου σε σχέση με αυτόν του υποστρώματος και τον αριθμό των εκφύτων μπορεί επίσης να επηρεάσει τις συγκεντρώσεις αερίων και τη σύνθεση του άνω χώρου. Επιπλέον η θερμοκρασία, η ένταση και η ποιότητα φωτός, καθώς και η κίνηση του αέρα, η σχετική υγρασία στο χώρο που περιβάλλει το δοχείο και η θέση του στο ράφι μπορούν να επιδράσουν καταλυτικά ως προς την ανάπτυξη των φυτών στην καλλιέργεια (Debergh *et al.*, 1992).

(β) Συμπτώματα της υπερενυδάτωσης

Στα υπερενυδατωμένα φυτά, οι βλαστοί και τα φύλλα είναι συχνά διογκωμένα υδαρή στην επιφάνεια, λιγότερο πράσινα με όργανα ημιδιαφανή (σε κάποιες περιπτώσεις) και εύθραυστα (Kevers *et al.*, 2004). Επίσης χαρακτηρίζονται από μικρότερο ξηρό βάρος, υψηλότερη περιεκτικότητα σε νερό (Wang *et al.*, 2007, Wu *et al.*, 2009, Debergh *et al.*, 1992, Dewir *et al.*, 2006), μειωμένη περιεκτικότητα σε πρωτεΐνες και χλωροφύλλη (Phan and Letouze, 1983, Frank *et al.*, 2004, Debergh *et al.*, 1992, Kevers *et al.*, 2004), αυξημένη παραγωγή αιθυλενίου (Frank *et al.*, 2004) και χαμηλή συγκέντρωση φαινολικών (Perry *et al.*, 1999) σε σύγκριση με τα κανονικά (υγιή) φυτά.

Πιο συγκεκριμένα οι υπερενυδατωμένοι βλαστοί συχνά έχουν κοντύτερα μεσογονάτια και παρουσιάζουν υπερτροφία του παρεγχύματος. Ταυτόχρονα χαρακτηρίζονται από μεγάλους μεσοκυττάρους χώρους, υπολιγνιτοποίηση του αγγειακού συστήματος, καθώς και μειωμένο ή ανώμαλο αγγειακό σύστημα με διάμετρο μεγαλύτερη ή μικρότερη του κανονικού. Αντίθετα από τα κανονικά (υγιή) φύλλα, τα υπερενυδατωμένα σε πολλές περιπτώσεις, είναι παχιά, επιμηκυσμένα, ζαρωμένα ή κατσαρά· εύθραυστα, ημιδιαφανή, με μειωμένη ή υπερτροφική επιφάνεια, πιθανόν με χρώμα μη φυσιολογικό και με μειωμένο αριθμό στρωμάτων πασσαλωδών κυττάρων (ή και καθόλου). Συγχρόνως διαθέτουν μεγάλα μεσοκυττάρια διαστήματα στο στρώμα κυττάρων του μεσόφυλλου, με ελαττωματικό επιδερμικό ιστό, λεπτή επιδερμίδα, ανεπαρκώς διαμορφωμένα και με μικρότερο αριθμό

στοματίων γενικότερα με εσφαλμένη λειτουργία (Vieitez *et al.*, 1985, Majada *et al.*, 2001, Kevers *et al.*, 2004, Ainaa *et al.*, 2015).

Οι ιστοχημικές μελέτες των προστατευτικών κυττάρων από τα υπερενυδατωμένα φύλλα έδειξαν υψηλή δραστικότητα υπεροξειδάσης, χαμηλότερα επίπεδα λιγνινών, κυτταρίνης και πηκτίνης, υψηλή περιεκτικότητα σε malondialdehyde, καθώς και αποθέματα του πολυσακχαρίτη callose (Kevers and Gaspar, 1985, Marin *et al.*, 1988, Ziv and Ariel, 1988, Piquerias *et al.*, 2002, Ainaa *et al.*, 2015). Σε ανατομικό επίπεδο τα υπερενυδατωμένα φυτά εμφανίζουν ανώμαλη διαμόρφωση των ηθμαγγειωδών στοιχείων τους, η οποία δυσχεραίνει την πρόσληψη και εσωτερική διακίνηση νερού και θρεπτικών στοιχείων (Ainaa *et al.*, 2015). Για παράδειγμα, η μειωμένη έως ανύπαρκτη ύπαρξη πλαστιδίων, κυρίως χλωροπλαστών, καθιστά αδύνατη τη φωτοσυνθετική δραστηριότητα, επομένως και την επιβίωση των αναγεννημένων φυτών εκτός των *in vitro* συνθηκών (Ainaa *et al.*, 2015).

Τα δομικά ελαττώματα στα προστατευτικά κύτταρα συσχετίζονται με την ανάπτυξη των υπερενυδατωμένων φύλλων, τα οποία στερούνται ή έχουν χάσει τα συστατικά των κυτταρικών τους τοιχωμάτων (Gaspar *et al.*, 1987). Οι μικροσκοπικές μελέτες υποδεικνύουν ότι ο πόρος που περιβάλλεται από τα προστατευτικά κύτταρα στα υπερενυδατωμένα φύλλα είναι πιο στρογγυλεμένος σε αντίθεση με τον ελλειπτικό πόρο σε φυσιολογικά φύλλα (Ziv *et al.*, 1987). Αναλυτικότερα, οι Ziv *et al.* (1987) έδειξαν ότι στο γαρύφαλλο, παρόλο που τα στομάτια στα υπερενυδατωμένα φύλλα δεν κλείνουν στο σκοτάδι, στο ABA ή σε ένα υπερτονικό διάλυμα, οι πρωτοπλάστες στα προστατευτικά κύτταρα ανταποκρίθηκαν σε τέτοια σήματα. Κατέληξαν στο συμπέρασμα λοιπόν ότι το ελάττωμα βρίσκεται στα προστατευτικά τοιχώματα. Ενδεικτικό στοιχείο αποτελεί ότι εκτός από ένα μη φυσιολογικό σχήμα των στοματίων, τα κυτταρικά τοιχώματα που γειτνιάζουν με τα στομάτια είναι σχισμένα και κατεστραμμένα. Αυτό θα μπορούσε να προέλθει από την αποτυχία της διαδικασίας της κυτταρικής διαίρεσης κατά το σχηματισμό κυτταρικής πλάκας, καθώς και από την έλλειψη πηκτικών ουσιών και κυτταρίνης κατά το σχηματισμό του δευτερογενούς τοιχώματος (Ziv and Ariel, 1992).

Ως επακόλουθο τα συμπτώματα της υπερενυδάτωσης γίνονται ορατά μετά από κάποιο χρονικό διάστημα και υπό ορισμένες συνθήκες καλλιέργειας και εκφύτου. Τα συμπτώματα αυτά μπορούν να αποφευχθούν ελέγχοντας τη σύνθεση του υποστρώματος καλλιέργειας, τις περιβαλλοντικές συνθήκες στις οποίες διατηρούνται τα δοχεία καλλιέργειας και την ποιότητα των καλλιεργούμενων εκφύτων (Debergh *et al.*, 1992).

(γ) Αποτέλεσμα της υπερενυδάτωσης

Η διεργασία της υπερενυδάτωσης γενικά θεωρείται αντιστρεπτή, δηλαδή ότι οι νέοι βλαστοί ή φύλλα που σχηματίζονται από υπερενυδατωμένους βλαστούς μετά από μεταφορά σε υπόστρωμα που δεν προκαλεί υπερενυδάτωση ή στο θερμοκήπιο μπορεί να διαθέτουν μια μορφολογία ή ανατομία που να πλησιάζει εκείνες των κανονικών φυτών. Αντίθετα, η υποκαλλιέργεια των υπερενυδατωμένων βλαστών σε συνθήκες που προκαλούν υπερενυδάτωση μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρές βλάβες, συμπεριλαμβανομένου του θανάτου ολόκληρων βλαστών, μέσω της νέκρωσης των μεριστωμάτων (Kevers *et al.*, 2004).

Η υπερενυδάτωση πρακτικά μειώνει το δυναμικό πολλαπλασιασμού και επηρεάζει την ποιότητα των μικροπολλαπλασιασμένων φυταρίων. Οι υπερενυδατωμένοι βλαστοί επομένως δεν ριζοβολούν, ενώ έχει παρατηρηθεί και παλίνδρομη αποδιαφοροποίησή τους σε κάλους. Τέλος προκαλεί δυσκολίες στην προσαρμογή των φυταρίων στις *ex vitro* συνθήκες (Orlikowska, 1987, Ziv, 1991a, b). Συνιστά λοιπόν διαπίστωση γενικής αποδοχής ότι η κατανόηση των βαθύτερων μηχανισμών της υπερενυδάτωσης και ο έλεγχός τους *in vitro* μπορεί να συνεισφέρει σε έναν πιο αποτελεσματικό μικροπολλαπλασιασμό (Ziv, 1991a, b). Για παράδειγμα κατά τον *in vitro* πολλαπλασιασμό βλαστών γαρύφαλλου η χρήση KIN στο υπόστρωμα μείωσε το ρυθμό υπερενυδάτωσης, σε σχέση με τη 6-βενζυλαμινοπυρίνη (BAP) το οποίο όμως έδωσε περισσότερους βλαστούς. Μειώνοντας τη συγκέντρωση του BAP από 2,0 σε 0,0 mg L⁻¹ κατά τη διάρκεια των επόμενων υποκαλλιεργειών, ο ρυθμός υπερενυδάτωσης μειώθηκε σημαντικά (Kharrazi *et al.*, 2011).

(δ) Έλεγχος / Αντιμετώπιση της Υπερενυδάτωσης

Πολλές διαφορετικές τεχνικές συστήνονται για τον έλεγχο της υπερενυδάτωσης, οι οποίες σχετίζονται με τους παράγοντες που προωθούν αυτή την κατάσταση, για παράδειγμα μείωση της συγκέντρωσης κυτοκινίνης ή υποκατάσταση της μίας από άλλη (συνήθως αντικαθιστώντας το BA με άλλη κυτοκινίνη), αύξηση των ιόντων Ca²⁺, μείωση των ιόντων NH₄⁺ ή Cl⁻, χρήση υψηλής συγκέντρωσης στερεοποιητικού παράγοντα, χρήση επιβραδυντών ανάπτυξης, κάλυψης των δοχείων με αεριο-διαπερατή μεμβράνη ή ευλύγιστο πλαστικό, που επιτρέπει την ανταλλαγή αερίων και αποτρέπει τη συσσώρευση αιθυλενίου, στο άνω μέρος των δοχείων. Φυσικά η αντιμετώπιση της υπερενυδάτωσης όταν οφείλεται στην παρουσία κυτοκινινών είναι πιο δύσκολη, διότι η παρουσία των κυτοκινινών είναι απαραίτητη στα θρεπτικά υποστρώματα για το σχηματισμό βλαστών (Huang *et al.*, 1998, Picoli *et al.*, 2001, Kevers *et al.*, 2004).

Επιπλέον η ψύξη του ραφίου πάνω στο οποίο είναι τοποθετημένα τα δοχεία, δημιουργεί μια θερμοκρασιακή διαβάθμιση μειώνοντας τους υδρατμούς στον επάνω χώρο του δοχείου (Debergh *et al.*, 1992). Εκτός της μείωσης της σχετικής υγρασίας, που παρέχει καλή ανταλλαγή αερίων, ως διορθωτικά μέτρα έχουν προταθεί η χρήση ουσιών προσροφητικών του αιθυλενίου, όπως ο ενεργός άνθρακας (AC) ή το $KMnO_4$, καθώς και η χρήση μεγαλύτερων δοχείων καλλιέργειας αλλά και ο δυναμικός αερισμός (Park *et al.*, 2004).

Υψηλή αντίδραση εκφύτων και χαμηλό ποσοστό υπερενυδάτωσης έχει επιτευχθεί με τη χρήση mT (Bairu *et al.*, 2007), με χαμηλές συγκεντρώσεις κυτοκινινών και NH_4NO_3 (Ivanova και Van Staden 2008), καθώς και με τη χρήση νιτρικών ή γλουταμινών ως μοναδική πηγή αζώτου (Ivanova and Van Staden 2009), με σκοπό τη μείωση της αναλογίας $NH_4:NO_3$ στο υπόστρωμα (Ivanova and Van Staden 2009) και τη βελτίωση του φυσικού εξαερισμού των δοχείων καλλιέργειας (Ivanova and Van Staden 2010). Τέλος ένα πλεονέκτημα του εξαερισμού των βάζων είναι ότι τα φυτά γίνονται φωτοαυτότροφα, που οδηγεί σε μια βελτιωμένη ικανότητα επιβίωσης *ex vitro* (Kozai *et al.*, 1995, Serret *et al.*, 1997, Majada *et al.*, 2001, Lucchesini *et al.*, 2006).

II.II.1.4 Η Ιστοκαλλιέργεια στο είδος *Anthyllis babar-jovis* και στο γένος *Anthyllis* (οικ. Fabaceae)

Η μορφολογία του *A. babar-jovis*, καθώς και η υψηλή ανθεκτικότητά του στην αλατότητα, στις δυσμενείς καιρικές συνθήκες και στους δυνατούς θαλάσσιους αλμυρούς ανέμους, το αναδुकνύουν ενδιαφέρον είδος για την ξηρική κηποτεχνία, γεγονός που καθιστά ιδιαίτερα ενδιαφέρουσα τη μελέτη του *in vitro* πολλαπλασιασμού του.

Σχετικά με τον *in vitro* πολλαπλασιασμό του *A. barba-jovis* δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές, ενώ για το γένος *Anthyllis*, βρέθηκαν δύο βιβλιογραφικές αναφορές που αφορά τα είδη *A. cytisoides* (Gavidia *et al.*, 1997) και *A. hermanniae* L. (Μαρτίνη και Παπαφωτίου, 2016).

Οι Gavidia *et al.* (1997), μελέτησαν την επίδραση της φυσιολογίας του εκφύτου και του τύπου του θρεπτικού υποστρώματος σε έκφυτα προερχόμενα από σπορόφυτα, στο είδος *A. cytisoides*. Η συγκέντρωση του BA δεν επηρέασε την αντίδραση των εκφύτων κορυφής ή κοτυληδικού κόμβου από την καλλιέργεια σποροφύτων, η οποία κυμάνθηκε σε υψηλά ποσοστά (90-100%). Η προσθήκη BA στο υπόστρωμα είχε θετικά αποτελέσματα για την ανάπτυξη πλευρικών βλαστών και για το σχηματισμό πολλαπλών βλαστών, ιδιαίτερα στις καλλιέργειες προερχόμενες από σπορόφυτα, όμως οι υψηλές συγκεντρώσεις οδήγησαν σε υψηλό ποσοστό υπερενυδατωμένων βλαστών, κυρίως στα έκφυτα από σπορόφυτα και στα

υποστρώματα με Murashige and Skoog Basal Salt Mixture Medium (MS) ή McCown's Woody Plant Vitamin Mixture (WPM). Οι δύο τύποι εκφύτων από σπορόφυτα αντέδρασαν διαφορετικά στα διάφορα υποστρώματα, με τον υψηλότερο ρυθμό πολλαπλασιασμού να εμφανίζεται στο υπόστρωμα SH με $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ BA για τα έκφυτα κορυφής και στο υπόστρωμα WPM με $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA για τα έκφυτα κοτυληδικού κόμβου. Στα έκφυτα κόμβου από ενήλικα φυτά ο υψηλότερος ρυθμός πολλαπλασιασμού κατά την αρχική εγκατάσταση αλλά και κατά το στάδιο πολλαπλασιασμού παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα Schenk and Hildebrandt Basal Salt Mixture (SH) εμπλουτισμένο με $0,2$ ή $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ BA αντίστοιχα. Τα μικρομοσχεύματα από το κορυφαίο τμήμα, μαζί με το επάκριο μερίστωμα προερχόμενα είτε από σπορόφυτα είτε από ενήλικα φυτά ριζοβόλησαν με μεγάλη επιτυχία (90-100%) σε υπόστρωμα μισής δύναμης SH συμπληρωμένο με $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ IBA ή NAA. Ο εγκλιματισμός των φυταρίων έγινε με επιτυχία σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (2:1, v/v) στο θερμοκήπιο.

Οι Μαρτίνη και Παπαφωτίου (2016) μελέτησαν την επίδραση της φυσιολογίας του εκφύτου και των φυτορυθμιστικών ουσιών στα διάφορα στάδια του *in vitro* πολλαπλασιασμού του *A. hermanniae* L. Κατά την αρχική καλλιέργεια τα έκφυτα από σπορόφυτα εγκαταστάθηκαν σε υψηλότερα ποσοστά (79-100%) συγκριτικά με τα έκφυτα από αυτοφυή φυτά (0-50%), με τις υψηλότερες τιμές να καταγράφονται στο υπόστρωμα MS με BA και τις μικρότερες στο υπόστρωμα χωρίς PGRs. Επιπλέον στο υπόστρωμα που περιείχε BA σχηματίστηκαν οι περισσότεροι βλαστοί, ενώ στο υπόστρωμα με ZEAT οι πιο μακριοί βλαστοί, τόσο στα έκφυτα από ενήλικα φυτά όσο και από σπορόφυτα. Κατά το στάδιο πολλαπλασιασμού, στο υπόστρωμα με $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA τα έκφυτα νεανικής προέλευσης σχημάτισαν περισσότερους και πιο μακριούς βλαστούς από τα ενήλικα έκφυτα. Επιπρόσθετα έκφυτα από ενήλικα φυτά τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα MS που περιείχε BA ή ZEAT ή KIN ή 2iP, με το BA να είναι η πλέον κατάλληλη κυτοκινίνη για τον πολλαπλασιασμό του είδους σε σύγκριση με τη ZEAT ή KIN ή 2iP, δίνοντας τον υψηλότερο μέσο αριθμό βλαστών ανά έκφυτο ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση. Η ριζοβολία των μικρομοσχευμάτων τόσο από σπορόφυτα όσο από ενήλικα φυτά ήταν επιτυχής σε υπόστρωμα μισής δύναμης MS με $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ IBA, με τις περισσότερες και μακρύτερες ρίζες να σχηματίζονται στα μικρομοσχεύματα από ενήλικα φυτά συγκριτικά με τα μικρομοσχεύματα από ενήλικα φυτά. Τα φυτάρια εγκλιματίστηκαν *ex vitro* σε ποσοστό υψηλότερο του 97%, ανεξαρτήτως της προέλευσής τους σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (1:1, v/v).

II.II.1.5 Η Ιστοκαλλιέργεια στα είδη *Ballota acetabulosa*, *Clinopodium creticum*, *Clinopodium nepeta* και στα γένη *Ballota*, *Clinopodium* (οικ. **Lamiaceae**)

Το είδος *C. creticum*, λόγω της περιορισμένης περιοχής στην οποία εμφανίζεται, τυχαία γεγονότα, όπως οι πυρκαγιές ή η αυξανόμενη ανθρώπινη δραστηριότητα, μπορούν να εξαφανίσουν κάποιους από τους απομονωμένους υποπληθυσμούς του, γεγονός που καθιστά των *in vitro* πολλαπλασιασμού την καλύτερη μέθοδος για εξασφάλιση της επιβίωσης του είδους.

Επιπλέον το αιθέριο έλαιο των υπέργειων μερών των γενών *Ballota* και *Clinopodium* έχει αποδειχθεί ότι έχει αντιοξειδωτικές, αντιμικροβιακές και αντιφλεγμονώδεις ιδιότητες (Dulger and Sener, 2010, Conforti *et al.*, 2012). Σύμφωνα με την έρευνα των Pistelli *et al.* (2013) ο *in vitro* πολλαπλασιασμός μπορεί να αποτελέσει μια έγκυρη εναλλακτική λύση για να παραχθούν ταχέως μεγάλες ποσότητες φυτικού υλικού που έχουν ίδια χημική σύσταση με τα αυτοφυή φυτά. Υπό το πρίσμα μιας τέτοιας προσέγγισης ο *in vitro* πολλαπλασιασμός των αρωματικών φυτών είναι μεγάλης σημασίας.

Όσον αφορά το μικροπολλαπλασιασμό του *C. nepeta* υπάρχει μια μόνο αναφορά (Pistelli *et al.*, 2013), ενώ για το μικροπολλαπλασιασμό του *C. creticum* και του *B. acetabulosa* δεν βρέθηκε καμιά αναφορά. Επιπρόσθετα για το γένος *Clinopodium*, βρέθηκε μια βιβλιογραφική αναφορά που αφορά το είδος *C. odorum* (Diaz *et al.*, 2012).

Οι Pistelli *et al.* (2013), σε μια προσπάθεια αρχικής εγκατάστασης καλλιέργειας του *C. nepeta* από αυτοφυή φυτά τα οποία είχαν μεταφερθεί στο θερμοκήπιο του Πανεπιστημίου της Πίζας χρησιμοποίησαν έκφυτα με πλευρικούς οφθαλμούς, μήκους 10 mm. Τα έκφυτα εμβαπτίστηκαν σε 0,05% (v/v) Tween-20 για 20 min, ακολούθησε πλύσιμο των εκφύτων με αποστειρωμένο νερό για άλλα 5 min και στη συνέχεια απολυμάνθηκαν με 50% (v/v) διάλυμα χλωρίνης εμπορίου, για 10 min. Τα έκφυτα κατά την αρχική *in vitro* εγκατάσταση σε υπόστρωμα MS με 0,5 mg L⁻¹ BA, αντέδρασαν σε ποσοστό 50%, δίνοντας 4 βλαστούς ανά έκφυτο. Η ριζοβολία των μικροβλαστών ήταν πλήρως πετυχημένη (100%) σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με 2,0 mg L⁻¹ NAA.

Στο *C. odorum* οι Diaz *et al.* (2012) μελέτησαν την επίδραση του τύπου του θρεπτικού υποστρώματος και του συνδυασμού BA/NAA σε διάφορες συγκεντρώσεις σε έκφυτα από σπορόφυτα και διαπίστωσαν ότι η αντίδραση των εκφύτων παρουσίασε κάποιες διαφορές ανάλογα με τον τύπο του θρεπτικού υποστρώματος και το συνδυασμό BA/NNA. Ειδικότερα υψηλότερο ποσοστό αντίδρασης (100%) στην αρχική καλλιέργεια παρατήρησαν στο υπόστρωμα WPM χωρίς PGR, αλλά και στο υπόστρωμα WPM με προσθήκη 0,5 mg L⁻¹ BAP και 1,0 mg L⁻¹ NAA. Η προσθήκη BAP και NAA στο υπόστρωμα επέφερε μια

μεγαλύτερη επιμήκυνση των βλαστών, ενώ ο μεγαλύτερος αριθμός κόμβων ανά βλαστό παρατηρήθηκε σε έκφυτα που αναπτύχθηκαν σε $\frac{1}{2}$ MS με προσθήκη $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ BAP και $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ NAA. Το υψηλότερο ποσοστό ριζοβολίας των μικροβλαστών παρατηρήθηκε σε υπόστρωμα με ή χωρίς PGRs, ενώ τα *in vitro* ριζοβολημένα φυτάρια εγκλιματίστηκαν επιτυχώς (άνω του 85%) στο θερμοκήπιο σε μίγμα κηποχώματος: άμμου (2:1, v/v).

II.II.1.6 Η Ιστοκαλλιέργεια στο είδος *Scabiosa hymettia* και στο γένος *Scabiosa* (οικ. *Caprifoliaceae*)

Το είδος *S. hymettia* λόγω των πανέμορφων μπλε-μωβ ανθέων της μπορεί να χρησιμοποιηθεί ευρέως για την παραγωγή δρεπτών ανθέων (Starman *et al.*, 1995), ως καλλωπιστικό σε κήπους και παρτέρια (Mallait, 1988, Nichols, 1992, Schulte-Scherlebeck, 1996), αλλά και ως αποξηραμένο για διακοσμητικούς λόγους (π.χ σύνθεση ανθοστολισμών). Έτσι ο *in vitro* πολλαπλασιασμός θα μπορούσε να έχει πλεονεκτήματα για σκοπούς παραγωγής μεγάλων ποσοτήτων συγκεκριμένων κλώνων με τα επιθυμητά χαρακτηριστικά.

Όσον αφορά το μικροπολλαπλασιασμό της *Scabiosa hymettia* δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές. Υπάρχουν όμως αναφορές για τρία άλλα είδη *Scabiosa* ή τη *Scabiosa columbaria* (Romeijn and van Lammeren, 1999), *Scabiosa tschiliensis* (Wang *et al.*, 2013) και *Scabiosa caucasica* cv. *Caucasica Blue* (Hosoki and Nojima, 2004).

Οι Hosoki and Nojima (2004) διερεύνησαν την επίδραση της φυσιολογίας του εκφύτου και της συγκέντρωσης του BA στο θρεπτικό υπόστρωμα στην ιστοκαλλιέργεια του είδους *S. caucasica* cv. *Caucasica Blue*. Όλα τα έκφυτα (κόμβοι, μεσογονάτια, μίσχος) αντέδρασαν 100% σε υπόστρωμα MS ανεξάρτητα της συγκέντρωσης BA, εκτός από τα έκφυτα μίσχου φύλλου που αντέδρασαν σε ποσοστό 40 - 70%. Στο υπόστρωμα MS χωρίς προσθήκη BA δεν παρατήρησαν καμία αντίδραση σε κανένα τύπο εκφύτου. Ο υψηλότερος ρυθμός πολλαπλασιασμού παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα με $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA.

Οι Wang *et al.* (2013) για την εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας του είδους *S. tschiliensis* χρησιμοποίησαν σπόρο από το βουνό Lingshan στην περιοχή Πεκίνο της Κίνας. Η εγκατάσταση των σπόρων έγινε σε *in vitro* συνθήκες. Τεμάχια φύλλων και μίσχους από τα σπορόφυτα και τα τοποθέτησαν σε υπόστρωμα με 2,4-D ή TDZ ή και συνδυασμό αυτών για τη δημιουργία κάλου. Αποδοτικότερα αποτελέσματα παρουσίασε ο συνδυασμός $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D και $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ TDZ και για τους δυο τύπους εκφύτων. Επιπλέον μελέτησαν την επίδραση του τύπου της κυτοκινίνης (BA ή KIN). Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι το BA ήταν πιο αποτελεσματικό σε σύγκριση με την KIN και για τους δύο τύπους εκφύτων. Υψηλότερο

ποσοστό ριζοβολίας μικροβλαστών επιτεύχθηκε με $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ IBA. Ο εγκλιματισμός ήταν επιτυχής σε ποσοστό 70% σε μίγμα με τύρφης: βερμικουλίτη: άμμο (4:3:2).

Οι Romeijn and van Lammeren (1999), για την εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας απομόνωσαν ανθήρες και ωοθήκες από τα άνθη του είδους *Scabiosa columbaria*, τα οποία τοποθετήθηκαν σε τρυβλία Petri. Τα μητρικά φυτά προήλθαν από σπόρους που είχαν βλαστήσει σε θερμοκήπιο υπό ελεγχόμενες συνθήκες. Η καλύτερη αντίδραση παρατηρήθηκε σε υπόστρωμα MS με 2% σακχαρόζη και εμπλουτισμένο $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D σε συνδιασμό με $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ KIN. Στη συνέχεια μελέτησαν τη συχνότητα επαγωγής κάλου σε διάφορα υποστρώματα, χρησιμοποιώντας ως υλικό τους ανθήρες και τις ωοθήκες που αντέδρασαν. Η συχνότητα επαγωγής κάλου κυμαινόταν από 0 έως 87%, με μέσο όρο 26%. Τα καλύτερα αποτελέσματα ελήφθησαν σε υπόστρωμα MS με 2% σακχαρόζη και εμπλουτισμένο $0,2 \text{ mg L}^{-1}$ 2,4-D και $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ KIN με ποσοστό 87%. Τέλος η ανάλυση της διακύμανσης κατέστησε σαφές ότι η συχνότητα επαγωγής κάλου εξαρτιόταν από τον τύπο του εκφύτου, τη σύνθεση του υποστρώματος και τις αλληλεπιδράσεις τους.

II.II.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ *IN VITRO* ΚΑΛΛΙΕΡΓΕΙΩΝ

II.II.2.1 ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

II.II.2.1.1 Υποστρώματα *in vitro* καλλιέργειών

Υλικά θρεπτικών υποστρωμάτων in vitro καλλιέργειας

Χρησιμοποιήθηκαν τρία είδη υποστρώματος:

- α) Υπόστρωμα MS (Murashige and Skoog Medium Including Vitamins) της εταιρείας Duchefa Biochemie (Haarlem, Ολλανδία) σε μορφή σκόνης (Murashige and Skoog, 1962, Πίν. II.II.1).
- β) Υπόστρωμα WPM (McCown's Woody Plant Medium Vitamin Mixture) σε μορφή σκόνης της εταιρείας Duchefa Biochemie (Haarlem, Ολλανδία) (McCown and Lloyd, 1981, Πίν. II.II.1).
- γ) Υπόστρωμα SH (Schenk and Hildebrandt Medium Basal Salt Mixture) σε μορφή σκόνης της εταιρείας Duchefa Biochemie (Haarlem, Ολλανδία) (Schenk and Hildebrandt, 1972, Πίν. II.II.1).

Τα υποστρώματα εμπλουτίστηκαν με:

- α) Σακχαρόζη (Sucrose) εμπορίου.
- β) Φυτορυθμιστικές ουσίες (PGRs)

Αυξίνες:

- Ινδολυλ-3-βουτυρικό οξύ (IBA), MB= 230,24, της εταιρείας Sigma-Aldrich (Darmstadt, Γερμανία).
- Ναφθυλ-οξικό οξύ (NAA, 1-Naphthaleneacetic acid), MB=186, της εταιρείας Sigma-Aldrich (Darmstadt, Γερμανία).

Κυτοκινίνες:

- Βενζυλαδενίνη (BA, N⁶-benzyladenine), MB= 225,26, της εταιρείας Sigma-Aldrich (Darmstadt, Γερμανία).
- Ζεατίνη (ZEAT, trans-zeatin), MB= 219,24, της εταιρείας Duchefa Biochemie (Haarlem, Ολλανδία).

- Κινετίνη (KIN, kinetin), MB= 215,21, της εταιρείας Duchefa Biochemie (Haarlem, Ολλανδία).
- 2iP (6-(γ,γ -Dimethylallylamino)purine), MB=203,24, της εταιρείας Duchefa Biochemie (Haarlem, Ολλανδία).
- TDZ (thidiazuron), MB=220.3, της εταιρείας Sigma-Aldrich (Darmstadt, Γερμανία).

και στερεοποιήθηκαν με άγαρ (Ρουμπουλάκης Α.Ε. Χημικά).

Τα διαλύματα έγιναν με νερό διπλής απόσταξης (αποστακτήρας τύπου Calypso Still της εταιρείας Fistream International, Cambridge, Αγγλία).

Μέθοδος παρασκευής υποστρωμάτων

Σε δοχείο ζέσεως όγκου ανάλογου με τον όγκο του υπό παρασκευή υποστρώματος τοποθετείτο αποσταγμένο νερό (όγκου λιγότερου του τελικού) και προσθέτονταν οι ακριβείς ποσότητες με βάση τον τελικό όγκο του θρεπτικού υποστρώματος πλήρους ή μισής δύναμης (στα υποστρώματα ριζοβολίας) Murashige και Skoog (MS) $4,4 \text{ g L}^{-1}$ ή $2,5 \text{ g L}^{-1}$ WPM ή $3,2 \text{ g L}^{-1}$ SH, σακχαρόζης (3% στα υποστρώματα εγκατάστασης και πολλαπλασιασμού και 2% στα υποστρώματα ριζοβολίας) και των επιθυμητών κάθε φορά συγκεντρώσεων PGRs από τα stock διαλύματα αυτών, υπό συνεχή ανάδευση με τη βοήθεια μαγνητικού αναδευτήρα μέχρι να διαλυθούν πλήρως. Στη συνέχεια γινόταν ογκομέτρηση και προσθήκη αποσταγμένου νερού, μέχρι τον επιθυμητό όγκο και ακολουθούσε ρύθμιση του pH με τη χρήση αραιού HCl 1N και NaOH 1N για μείωση και αύξηση του pH, αντίστοιχα, στην τιμή 5.7 - 5.8 της κλίμακας. Η διαδικασία ολοκληρωνόταν με την προσθήκη άγαρ στην απαιτούμενη ποσότητα (8 g L^{-1}) συνήθως, πλην των πειραμάτων ελέγχου της υπερενυδάτωσης όπου χρησιμοποιήθηκαν 12 g L^{-1} και ακολουθούσε θέρμανση του διαλύματος, υπό συνεχή ανάδευση μέχρι να διαλυθεί πλήρως και ομοιόμορφα το άγαρ (διανγές διάλυμα). Το έτοιμο διάλυμα μοιραζόταν σε γυάλινους δοκιμαστικοί σωλήνες ή βάζα καλλιέργειας ανάλογα με το στάδιο της καλλιέργειας και τοποθετούνταν προς αποστείρωση σε χύτρα ή κλίβανο υγρής αποστείρωσης. Οι ποσότητες του θρεπτικού υποστρώματος, σακχαρόζης και άγαρ ζυγίζοντουσαν σε ζυγό ακριβείας δύο δεκαδικών ψηφίων τύπου PJ3600 (Mettler –Toledo DeltaRnage).

Πίνακας II.II.1. Συστατικά (μακροστοιχεία-ιχνοστοιχεία-βιταμίνες) των θρεπτικών υποστρωμάτων Murashige & Skoog Medium Including Vitamins (MS), McCown's Woody Plant Medium Vitamin Mixture (WPM) και Schenk & Hildebrandt Medium Basal Salt Mixture (SH).

Συστατικά	MS (mg L ⁻¹)	WPM (mg L ⁻¹)	SH (mg L ⁻¹)
Μακροστοιχεία			
NH ₄ NO ₃	1650.00	400.00	-
CaCl ₂	332.02	72.50	151.00
Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O	-	471.26	-
MgSO ₄	180.54	180.54	195.05
KNO ₃	1.900	-	2500.00
K ₂ SO ₄	-	990.00	-
KH ₂ PO ₄	170.00	170.00	-
(NH ₄) ₂ PO ₄	-	-	300.00
Μικροστοιχεία			
H ₃ BO ₃	6.2	6.2	5.00
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0.025	-	0.10
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.025	0.25	0.20
FeNaEDTA	36.7	36.7	19.80
MnSO ₄ ·H ₂ O	16.9	22.3	10.00
KI	0.83	-	1.00
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0.25	0.25	0.10
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8.6	8.6	1.00
Βιταμίνες			
myo-Inositol	100.00	100.00	-
Nicotinic acid	0.50	0.50	-
Pyridoxine HCl	0.50	0.50	-
Thiamine HCl	0.10	1.00	-
Glycine	2.00	2.00	-
Total(gms/litre)	4405.19	2462.6	3183.25

Πηγή: (<https://bit.ly/2kKPTUe>, <https://bit.ly/2lORKaK>, <https://bit.ly/2kf5tXS> and <https://bit.ly/2mhojyl>).

Παρασκευή «stock» διαλυμάτων φυτορυθμιστικών ουσιών (PGRs)

Κατά τη διαδικασία παρασκευής των θρεπτικών υποστρωμάτων καλλιέργειας, ήταν αναγκαία η παρασκευή «stock» (αποθεματικών) διαλυμάτων των PGRs που περιείχαν την κάθε PGR σε ποσοστό 10 % κ.β, για να προστίθεται η απαιτούμενη συγκέντρωση στο υπόστρωμα καλλιέργειας με μεγαλύτερη ακρίβεια

1. Παρασκευή «stock» διαλυμάτων κυτοκινινών (BA, ZEAT, KIN, 2iP, TDZ). Σε δοχείο ζέσεως χωρητικότητας 100 ml τοποθετούνταν 10 mg κυτοκινινών, τα οποία διαλύονταν με ήπια ανάδευση σε 4 - 5 σταγόνες 1N καυστικού νατρίου (NaOH). Στη συνέχεια προστίθετο μικρή ποσότητα αποσταγμένου νερού και συνεχιζόταν η ανάδευση μέχρι να διαλυθεί καλά η κυτοκινίνη. Στο τέλος προστίθετο αποσταγμένο νερό μέχρι τον τελικό όγκος (100 ml).
2. Παρασκευή «stock» διαλυμάτων αυξινών (NAA, IBA). Σε δοχείο ζέσεως των 100 ml, τοποθετούνταν 10 mg NAA, τα οποία διαλύονταν με ήπια ανάδευση σε 2 - 3 σταγόνες καθαρής αιθανόλης (99,8%) (PanReac, AppliChem). Στη συνέχεια προστίθετο μικρή ποσότητα αποσταγμένου νερού και συνεχιζόταν η ανάδευση μέχρι να διαλυθεί καλά η αυξίνη. Στο τέλος προστίθετο αποσταγμένο νερό μέχρι τον τελικό όγκος (100 ml).

Μετά την παρασκευή όλα τα «stock» διαλύματα των ορμονών αποθηκεύονταν σε οικιακό ψυγείο, στους 4 °C, για διάστημα 30 περίπου ημερών.

Οι ζυγίσεις των PGRs γίνονταν σε ζυγό ακριβείας τεσσάρων δεκαδικών ψηφίων τύπου WA210 (Adam Equipment, U.S.A.).

Π.Π.2.1.2 Δοχεία και υλικά κάλυψης *in vitro* καλλιιεργειών

Στο στάδιο της εγκατάστασης των αρχικών καλλιιεργειών χρησιμοποιήθηκαν ως δοχεία καλλιέργειας γυάλινοι δοκιμαστικοί σωλήνες όγκου 50 ml (25 x 100 mm), που περιείχαν 10 ml υπόστρωμα έκαστος. Μετά την τοποθέτηση του υποστρώματος οι σωλήνες καλύπτονταν με αλουμινόχαρτο για να αποστειρωθούν σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης, ενώ μετά την τοποθέτηση των εκφύτων στην Τράπεζα Νηματικής Ροής ως υλικό κάλυψής τους χρησιμοποιήθηκε μεμβράνη sanitas (πλαστική μεμβράνη περιτυλίγματος με το εμπορικό όνομα sanitas της εταιρείας Σαράντης Α.Ε., Ελλάς, η οποία είχε τις εξής ιδιότητες: περατότητα σε οξυγόνο $8,5 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2}$ σε 24 h, περατότητα σε διοξείδιο του άνθρακα $55.000 \text{ cm}^3 \text{ m}^{-2}$ σε 24 h και περατότητα σε υδρατμούς 110 g m^{-2} σε 24 h).

Στο στάδιο του πολλαπλασιασμού των *in vitro* καλλιιεργειών χρησιμοποιήθηκαν γυάλινα βάζα τύπου Magenta, όγκου 100 ml με πλαστικό καπάκι Magenta B-caps της εταιρείας

Sigma-Aldrich (Σέντ-Λούις, U.S.A.) τα οποία περιείχαν 25 ml υπόστρωμα το κάθε ένα. Τα ίδια βάζα χρησιμοποιήθηκαν και για την περαιτέρω ανάπτυξη των *in vitro* ριζοβολημένων σποροφύτων που προήλθαν από σπόρους που είχαν βλαστήσει σε τρυβλία. Η κάλυψη των βάζων μετά την τοποθέτηση των εκφύτων στην Τράπεζα Νηματικής Ροής γινόταν με το ίδιο σκληρό πλαστικό καπάκι (Magenta B-caps). Η ριζοβολία των μικρομοσχευμάτων έγινε επίσης στα ίδια βάζα που περιγράφηκαν ή σε γυάλινα βάζα των 212 ή 400 ml, τα οποία καλύπτονταν με αλουμινόχαρτο για να αποστειρωθούν σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης, ενώ μετά την τοποθέτηση των εκφύτων στην Τράπεζα Νηματικής Ροής ως υλικό κάλυψής τους χρησιμοποιήθηκε μεμβράνη sanitas

II.Π.2.1.3 Δοχεία εγκλιματισμού φυταρίων

Τα *in vitro* ριζοβολημένα φυτάρια μεταφυτεύονταν για εγκλιματισμό σε πλαστικά δοχεία όγκου 1.500 ml (17x10x9 cm). Τα δοχεία περιείχαν μίγμα τύρφης (τύρφη με διορθωμένο pH από 5.5 έως 6.5, Klasmann-Delmann GmbH, Geeste, Germany) και περλίτης (1 - 5 mm, Perloflor, ISOCON S.A., Athens, Greece) (1:1, v/v). Τα δοχεία καλύπτονταν με πλαστική μεμβράνη sanitas, κατά τις πρώτες 7 ημέρες καλλιέργειας, με σκοπό τη μείωση των απωλειών υγρασίας στα πρώτα στάδια ανάπτυξης των φυταρίων, όπου παρέμεναν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών ($T=20\pm 2$ °C) στο εργαστήριο και έπειτα μεταφέρονταν στην υδρονέφωση θερμαινόμενου υαλόφρακτου θερμοκηπίου του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου (37°58'53,94"N, 23°42'25,01"E, συνθήκες θερμοκρασίας (σχ. II.Π.2).

II.Π.2.1.4 Αποστείρωση εργαλείων και υλικών καλλιέργειας

Για την εκτέλεση όλων των πειραμάτων ιστοκαλλιέργειας απαιτείται η αποστείρωση και απολύμανση όλων των εργαλείων και υλικών καλλιέργειας. Η αποστείρωση των εργαλείων και υλικών γινόταν σε κλίβανο υγρής αποστείρωσης (αυτόκλειστο) για χρονικό διάστημα 20 min, σε θερμοκρασία 121 °C και πίεση 1.2 atm ή σε χύτρα υγρής αποστείρωσης για χρονικό διάστημα 15 min, σε θερμοκρασία 125 °C και πίεση 1.2 atm. Οι σωλήνες και τα εργαλεία που χρησιμοποιήθηκαν στις εμφυτεύσεις ή απολυμάνσεις, όπως λαβίδες, νυστέρια, πλακάκια πάνω στα οποία γίνονταν οι κοπές, φιάλες και δοχεία με αποσταγμένο νερό για την απολύμανση των εκφύτων, καλύπτονταν με φύλλο αλουμινίου (κοινό αλουμινόχαρτο εμπορίου) πριν την τοποθέτησή τους στον κλίβανο, ενώ τα γυάλινα βάζα που περιείχαν τα θρεπτικά υποστρώματα είχαν χαλαρά καλυμμένο το ελεύθερο στόμιό τους με τα πλαστικά καπάκια τους. Σωλήνες και γυάλινα βάζα με μολυσμένες καλλιέργειες πριν ανοιχτούν και

πλυθούν αποστειρώνονταν για διπλάσιο χρόνο (40 min), σε θερμοκρασία 121 °C και σε πίεση 1.2 atm.

Π.Π.2.1.5 Μέθοδοι απολύμανσης και *in vitro* εγκατάστασης φυτικού υλικού

Πριν την τοποθέτηση των εκφύτων από τα ενήλικα αυτοφυή φυτά, στους δοκιμαστικούς σωλήνες, που περιείχαν το θρεπτικό υπόστρωμα, γινόταν επιφανειακή απολύμανσή των βλαστών απ' όπου αποκόπτονταν τα έκφυτα με τα εξής υλικά:

- α) Χλωρίνη εμπορίου (4.6% περιεκτικότητα σε διαθέσιμο χλώριο NaOCl)
- β) Προσκολλητική ουσία 0,1 % Tween-20 (προσκολλητική ουσία, Polyoxyethylene (20)sorbitan Monolaurate, MERCK)
- γ) διάλυμα αιθανόλης 90% (ethanol absolute 99,8%) της εταιρείας PanReac AppliChem (μόνο για τα έκφυτα από τα ενήλικα αυτοφυή φυτά)
- δ) Αποστειρωμένες κωνικές φιάλες όγκου 250 ml με αποσταγμένο νερό σε ποσότητα που καθορίζεται από την επιθυμητή περιεκτικότητα σε χλωρίνη.
- ε) Αποστειρωμένα μπουκάλια με αποσταγμένο νερό για τα ξεπλύματα.

Οι βλαστοί τεμαχίζονταν σε μήκος περίπου 10cm, αφαιρούνταν τα φύλλα με νυστέρι και ακολούθως δέχονταν χειρισμούς επιφανειακής απολύμανσης που περιγράφονται αναλυτικά κατωτέρω για κάθε είδος φυτών. Ακολουθούσαν 4 τρίλεπτα ξεπλύματα των βλαστών ή των σπόρων με αποσταγμένο/αποστειρωμένο νερό υπό συνεχή ανάδευση.

Π.Π.2.1.6 Έκφυτα – Μικρομοσχεύματα ριζοβολίας και οι χειρισμοί τους

Έκφυτα εγκατάστασης αρχικών καλλιεργειών

Μετά τη διαδικασία απολύμανσης των εκφύτων μέσα σε Τράπεζα Νηματικής Ροής, πάνω σε αποστειρωμένο πλακάκι, που τακτικά καθαριζόταν με αιθανόλη 80%, οι βλαστοί τεμαχίζονταν με τη χρήση νυστεριού, σε έκφυτα κορυφής βλαστού και κόμβων μήκους περίπου 0,6 cm, επιπλέον αφαιρούνταν τυχόν υπολείμματα φύλλων. Τα έκφυτα, τοποθετούνταν μεμονωμένα σε δοκιμαστικούς σωλήνες όγκου 50 ml, που περιείχαν 10 ml θρεπτικού υποστρώματος, κατακόρυφα σε αυτό και πιέζοντας ελαφρά ώστε να βυθιστούν λίγα χιλιοστά μέσα σε αυτό χωρίς να βυθιστεί κόμβος στο υπόστρωμα. Τέλος, οι σωλήνες καλύπτονταν με μεμβράνη sanitas και τοποθετούνταν σε θάλαμο επώασης ελεγχόμενων συνθηκών.

Έκφυτα καλλιέργειών πολλαπλασιασμού

Σε Τράπεζα Νηματικής Ροής, πάνω σε αποστειρωμένο πλακάκι, που τακτικά απολυμαινόταν με υδατικό διάλυμα αιθανόλης 80%, και με τη χρήση αποστειρωμένης λαβίδας και νυστεριού, βλαστοί που είχαν σχηματιστεί *in vitro* τεμαχίζονταν σε έκφυτα κορυφής βλαστού και κόμβων μήκους 0.6 cm, τα οποία περιλάμβαναν 1 - 2 οφθαλμούς, επιπλέον αφαιρούνταν τα φύλλα που είχαν σχηματιστεί. Τα έκφυτα τοποθετούνταν σε γυάλινα βάζα καλλιέργειας με το ανάλογο θρεπτικό υπόστρωμα, κατακόρυφα, τρία έκφυτα ανά βάζο όγκου 100 ml και πιέζονταν ελαφρά ώστε να βυθιστούν λίγα χιλιοστά. Στη συνέχεια, τα βάζα καλύπτονταν με σκληρό πλαστικό καπάκι (Sigma, magenta-B caps) και τοποθετούνταν σε θάλαμο επώασης ελεγχόμενων συνθηκών.

Εγκατάσταση μικρομοσχευμάτων προς ριζοβολία

Για τα πειράματα ριζοβολίας επιλέγονταν εύρωστοι και μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί που είχαν σχηματιστεί *in vitro*, μήκους μεγαλύτερου από 2,5 cm. Σε Τράπεζα Νηματικής Ροής, πάνω σε αποστειρωμένο πλακάκι, που τακτικά απολυμαινόταν με υδατικό διάλυμα αιθανόλης 80% και με αποστειρωμένο νυστέρι και λαβίδα αρχικά οι μικροβλαστοί αποκόπτονταν από τη βάση τους (από το έκφυτο) και εν συνεχεία γινόταν η λήψη των μικρομοσχευμάτων είτε από το κορυφαίο τμήμα, μαζί με το επάκριο μερίστωμα ή από το μεσαίο τμήμα. Τα μικρομοσχεύματα τοποθετούνταν στα γυάλινα βάζα καλλιέργειας με το ανάλογο θρεπτικό υπόστρωμα ριζοβολίας, τρεις βλαστοί ανά βάζο καλλιέργειας, κατακόρυφα, και πιέζονταν ελαφρά ώστε να βυθιστούν λίγα χιλιοστά μέσα σε αυτό και τοποθετούνταν σε θάλαμο επώασης ελεγχόμενων συνθηκών.

II.II.2.1.7 Εγκλιματισμός ριζοβολημένων μικρομοσχευμάτων

Σε διάστημα 45 ημερών μετά την εγκατάσταση στα υποστρώματα ριζοβολίας, ριζοβολημένα μικρομοσχεύματα, είτε από το κορυφαίο τμήμα, μαζί με το επάκριο μερίστωμα ή από το μεσαίο τμήμα, με καλά αναπτυγμένο ριζικό σύστημα, τοποθετούνταν σε δοχεία για εγκλιματισμό. Από τα φυτάρια απομακρυνόταν το υπόστρωμα και στη συνέχεια γινόταν προσεκτικό πλύσιμο της ρίζας τους, με τρεχούμενο νερό βρύσης ώστε να απομακρυνθεί πλήρως το στερεό θρεπτικό υπόστρωμα. Στη συνέχεια τα φυτάρια, μεταφυτεύονταν σε ορθογώνια, πλαστικά δοχεία όγκου 500 ml (8 φυτάρια ανά πλαστικό δοχείο), τα οποία περιείχαν υπόστρωμα που αποτελείτο από τύρφη: περλίτη (1:1, v/v). Στη συνέχεια τα δοχεία καλύπτονταν με πλαστική μεμβράνη sanitas, κατά τις πρώτες 7 ημέρες καλλιέργειας τους, με σκοπό τη μείωση των απωλειών υγρασίας στα πρώτα στάδια

εγκατάστασης των φυταρίων και τοποθετούνταν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών στους 20 ± 2 °C, με φωτοπερίοδο 16 h, και σε ένταση φωτισμού $37,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ από λαμπτήρες φθορισμού και ανά δύο ημέρες εφαρμοζόταν ελαφρύ πότισμα (ψεκασμός) του υποστρώματος και των φυταρίων με νερό. Μετά το πέρας των 7 ημερών, η πλαστική μεμβράνη απομακρυνόταν και τα φυτά μεταφερόταν στην υδρονέφωση θερμαινόμενου υαλόφρακτου θερμοκηπίου του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου για 10 μέρες και στη συνέχεια μεταφέρονταν στο χώρο του θερμοκηπίου σε σκιερό μέρος, όπου παρέμειναν συνολικά στο χώρο για διάστημα 30 ημερών. Η καταγραφή του εγκλιματισμού λήφθηκε στο τέλος της περιόδου των 30 ημερών.

Μετά το πέρας των 30 ημερών, τα νεαρά φυτά μεταφυτεύονταν σε γλάστρες 10 cm σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (2:1, v/v) και λίπανση με 2 g L^{-1} υδατοδιαλυτό λίπασμα (Nutrileaf 60, 20-20-20, Miller Chemical and Fertilizer Corp., Hanover, PA, U.S.A.) μια φορά το μήνα, για περαιτέρω ανάπτυξη. Η καταγραφή των δεδομένων για την *ex vitro* εγκατάσταση γινόταν μετά από τρεις μήνες από τη μεταφορά στις γλάστρες. Ριζοβολημένα *in vitro* φυτά, τοποθετούνταν για εγκλιματισμό και περαιτέρω ανάπτυξη καθ' όλη τη διάρκεια του έτους.

II.II.2.1.8 Συνθήκες καλλιέργειας

Συνθήκες *in vitro* καλλιέργειας

Οι δοκιμαστικοί σωλήνες και τα γυάλινα βάζα καλλιέργειας με τα έκφυτα και τα μικρομοσχεύματα ή συστάδες μικροβλαστών αντίστοιχα, τοποθετούνταν σε θάλαμο ελεγχόμενων σταθερών συνθηκών, σε θερμοκρασία 25 ± 2 °C και σε φωτοπερίοδο 16 h πλήρους φωτός έντασης 4.000 lx ($37,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$) που παρέχονταν από λευκούς λαμπτήρες φθορισμού οι οποίοι βρίσκονταν στις πλευρές του θαλάμου.

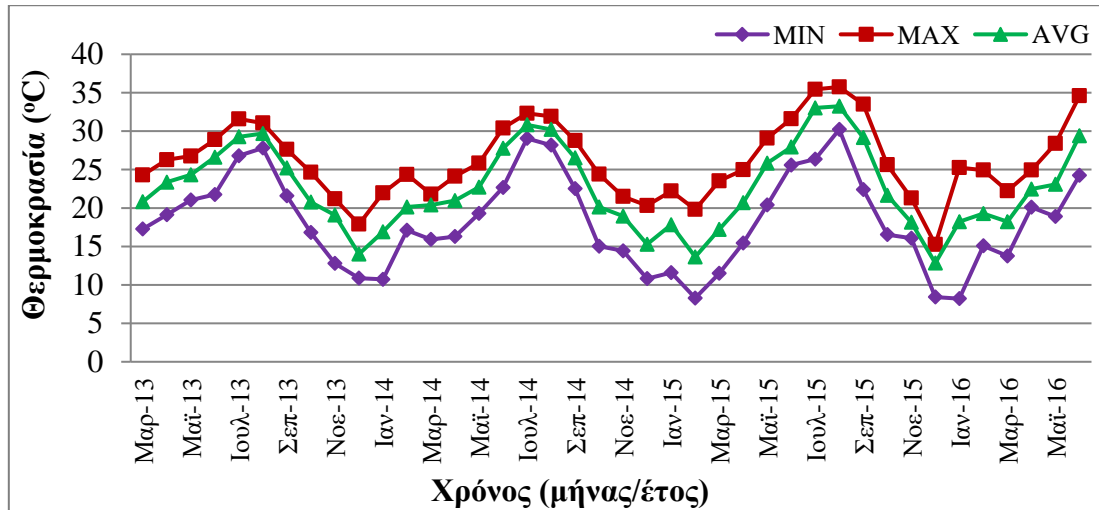
Συνθήκες *ex vitro* καλλιέργειας

1) Συνθήκες θαλάμου ελεγχόμενων συνθηκών:

Τα *in vitro* ριζοβολημένα φυτά εγκλιματίζονταν αρχικά σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών του εργαστηρίου στους 20 ± 2 °C, με φωτοπερίοδο 16 h πλήρους φωτός έντασης $37,5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ (4.000 lx fluorescent light) που παρέχονταν από λευκούς λαμπτήρες φθορισμού, για διάστημα 7 ημερών.

2) Συνθήκες θερμοκρασίας στο υαλόφρακτο θερμαινόμενο θερμοκήπιο

Στο Σχ. II.Π.2 παρουσιάζονται η μέγιστη, η ελάχιστη και η μέση θερμοκρασία στο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γ.Π.Α. Το θερμοκήπιο τους καλοκαιρινούς μήνες βαφόταν για μείωση της θερμοκρασίας.



Σχήμα II.Π.2. Μέγιστη, ελάχιστη και μέση θερμοκρασία στο υαλόφρακτο θερμαινόμενο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου, Γ.Π.Α. κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

3) Συνθήκες υδρονέφωσης

Η υδρονέφωση ήταν καλυμμένη με ημιδιαφανές λευκό πλαστικό στα 2 m από το επίπεδο του υποστρώματος. Η συχνότητα ψεκασμού από το Μάιο έως το Σεπτέμβριο ήταν 15 sec ανά 15 min, ενώ από τον Οκτώβριο έως τον Απρίλιο 15 sec ανά 30 min. Η θερμοκρασία του υποστρώματος διατηρούταν στους 22 °C, με καλώδιο ηλεκτρικής αντίστασης.

II.Π.2.1.9 Στατιστική ανάλυση

Στα πειράματα ακολουθήθηκε το Εντελώς Τυχαιοποιημένο Σχέδιο (ΕΤΣ) και εφαρμόστηκαν μονοπαραγοντικά, διπαραγοντικά και τριπαραγοντικά σχέδια, ανάλογα με το είδος του πειράματος. Η σημαντικότητα των αποτελεσμάτων ελέγχθηκε με ανάλυση της διασποράς (ANOVA). Το κριτήριο που χρησιμοποιούμε για τη στατιστική αυτή δοκιμασία είναι το κριτήριο του F (F test) και η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο Students σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$ ή $P \leq 0,001$. 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 τα σύμβολο (* ή ** ή ***) δίπλα από κάθε τιμή του F , δηλώνει ότι οι τιμές αυτές του F ήταν σημαντικές σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ή 1% ή 0,1%, αντίστοιχα. Στο τέλος κάθε πίνακα αποτελεσμάτων αναγράφεται ο αριθμός των επαναλήψεων που χρησιμοποιήθηκαν ανά επέμβαση με το γράμμα n .

II.Π.2.1.10 Πειραματικά σχέδια - Εκτίμηση αποτελεσμάτων

Εκτίμηση αποτελεσμάτων στο στάδιο εγκατάστασης και πολλαπλασιασμού των καλλιεργειών

Η αρχική εγκατάσταση εκφύτων *in vitro* εκτιμήθηκε μετά 42 ημέρες από την εμφύτευσή τους στα υποστρώματα και ως επανάληψη θεωρήθηκε το κάθε έκφυτο κόμβου που τοποθετήθηκε. Καταγράφηκε το ποσοστό μολύνσεων (%), το ποσοστό εκφύτων που αντέδρασαν δίνοντας βλαστό (βλαστογένεση, %), ο μέσος αριθμός των κανονικών (φυσιολογικών) βλαστών που σχηματίστηκαν ανά έκφυτο που αντέδρασε και το μέσο μήκος και ο μέσος αριθμός κόμβων ανά βλαστό των βλαστών αυτών, καθώς και ο μέσος αριθμός των υπερενυδατωμένων βλαστών που σχηματίστηκαν ανά έκφυτο που αντέδρασε. Το ποσοστό βλαστογένεσης (%) χωρίστηκε σε τρία μέρη, (α) ποσοστό βλαστογένεσης¹, όπου τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς, (β) ποσοστό βλαστογένεσης², όπου τα έκφυτα σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς και ποσοστό βλαστογένεσης³, όπου τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενυδατωμένη "μάζα βλαστών και φύλλων". Υπολογίσθηκε επίσης το δυναμικό πολλαπλασιασμού ως το γινόμενο του ποσοστού βλαστογένεσης¹ επί του μέσου αριθμού κανονικών βλαστών ανά έκφυτο που αντέδρασε και επί του μέσου αριθμού των κόμβων των κανονικών βλαστών, σαν μια εκτίμηση του μέσου αριθμού εκφύτων δυναμένων να ληφθούν σε επικείμενη υποκαλλιέργεια.

Εκτίμηση αποτελεσμάτων στο στάδιο της ριζοβολίας και του ex vitro εγκλιματισμού των φυταρίων

Κατά το στάδιο της ριζοβολίας η εκτίμηση των αποτελεσμάτων έγινε 42 ημέρες μετά από τη μεταφορά των μικρομοσχευμάτων στα υποστρώματα ριζοβολίας και ως επανάληψη θεωρήθηκε το κάθε μικρομόσχευμα. Καταγράφηκε το ποσοστό των μικρομοσχευμάτων που σχημάτισαν ρίζες, ο μέσος αριθμός και το μέσο μήκος των ριζών που σχηματίστηκαν.

Στο στάδιο του εγκλιματισμού, ως επανάληψη θεωρήθηκε το κάθε φυτάριο που προωθήθηκε προς εγκλιματισμό. Η *ex vitro* επιτυχής εγκατάσταση των φυταρίων καταγράφηκε 30 ημέρες από την εγκατάσταση των φυταρίων σε υπόστρωμα τύρφης : περλίτη και μετά από τρεις μήνες από τη μεταφορά στις γλάστρες καταγράφηκε το ποσοστό (%) επιβίωσης αυτών. Δεδομένου ότι πειράματα ριζοβολίας πραγματοποιούνταν όλο το χρόνο, τα ριζοβολημένα *in vitro* φυτάρια, που προέκυπταν τοποθετήθηκαν για εγκλιματισμό και εγκατάσταση και αυτά καθ' όλη τη διάρκεια του έτους.

Ο αριθμός των επαναλήψεων δεν ήταν σταθερός σε κάθε πείραμα (πολλαπλασιασμού, ριζοβολίας και εγκλιματισμού) γιατί ήταν εξαρτημένος κάθε φορά από τη διαθεσιμότητα του φυτικού υλικού σε κάθε στάδιο. Κατά την παρουσίαση των αποτελεσμάτων, ο αριθμός των επαναλήψεων (*n*) κάθε πειράματος αναγράφεται στους πίνακες.

II.II.2.2 ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

II.II.2.2.1 *Anthyllis barba-jovis*

II.II.2.2.1.1. Αρχική εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας

Από ενήλικα καλλιεργούμενα φυτά

Βλαστοί, μήκους 10,0 - 15,0 cm, συλλέχθηκαν από ενήλικα καλλιεργούμενα φυτά από το Βοτανικό κήπο της Φιλοδοσικής Ένωσης Αθηνών (Δάσος Καισαριανής Βύρωνα) (38°8'19"N, 23°47'44"E), το Σεπτέμβριο 2013, τον Οκτώβριο 2013 και το Μάιο 2014 (Εικ. II.II.1α). Οι βλαστοί τοποθετούνταν σε δοχεία που περιείχε νερό βρύσης, με τέτοιο τρόπο ώστε η βάση τους (2 cm) να εμβαπτίζεται στο νερό. Στη συνέχεια μεταφέρονταν στο Εργαστήριο Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου όπου ξεκινούσε η διαδικασία εγκατάστασης *in vitro* καλλιεργειών.

Αφού αφαιρέθηκαν τα φύλλα από όλο το μήκος του βλαστού, έγινε πολύ καλό ξέπλυμα των βλαστών με τρεχούμενο νερό βρύσης. Στη συνέχεια τα έκφυτα (κορυφής ή κόμβου) απολυμάνθηκαν επιφανειακά με αιθανόλη 90% για 1 min και με υδατικό διάλυμα 15, 20 ή 30% χλωρίνης εμπορίου (4.6% w/v NaClO) υπό ανάδευση, για 10 min (1^η καλλιέργεια), ή υδατικό διάλυμα 20% χλωρίνης εμπορίου για 10 min (2^η καλλιέργεια ή υδατικό διάλυμα 30% χλωρίνης εμπορίου για 15 min (3^η καλλιέργεια). Σε όλες τις απολυμάνσεις προστίθετο 0.1% Tween 20 (προσκολλητική ουσία, Polyoxyethylene(20)sorbitan Monolaurate) και

ακολουθούσαν τέσσερα τρίλεπτα ξεπλύματα, με αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό, υπό συνεχή ανάδευση. Η καλλιέργεια των εκφύτων έγινε σε στερεό (8 g L^{-1} άγαρ) υπόστρωμα MS με 30 g L^{-1} σακχαρόζη. Σε καμία από τις καλλιέργειες δεν κατέστη δυνατή η εγκατάσταση αρχικής καλλιέργειας λόγω της ολοκληρωτικής καταστροφής και απώλειας των εκφύτων από μολύνσεις και ως εκ τούτου χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα κορυφής και κόμβου, από νεαρά φυτά που αναπτύσσονταν στο θερμοκήπιο.

Από νεαρά φυτά αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο

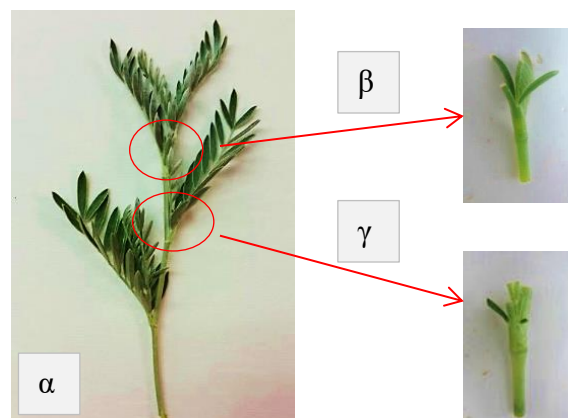
Το Φεβρουάριο 2014 συλλέχθηκαν βλαστοί, μήκους 10,0 - 15,0 cm, από νεαρά φυτά, ηλικίας δυο ετών, τα οποία προερχόμενα από καλλιέργεια *in vitro* σποροφύτων και τα οποία αναπτύσσονταν στο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γ.Π.Α ($37^{\circ}58'58.0''\text{N}$, $23^{\circ}42'19.2''\text{E}$). Αφού έγινε πολύ καλό ξέπλυμα των αποφυλλωμένων βλαστών με τρεχούμενο νερό βρύσης, τα έκφυτα (κορυφής ή κόμβου) απολύμανθηκαν επιφανειακά αρχικά με αιθανόλη 90% για 10 sec και εν συνεχεία με υδατικό διάλυμα 30% χλωρίνης εμπορίου (4.6% w/v NaClO), το οποίο περιείχε 0.1% Tween 20 (προσκολλητική ουσία, Polyoxyethylene(20)sorbitan Monolaurate), υπό ανάδευση, για 10 min. Την απολύμανση ακολούθησαν τέσσερα τρίλεπτα ξεπλύματα με αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό, υπό συνεχή ανάδευση. Τα έκφυτα καλλιεργήθηκαν σε στερεό (8 g L^{-1} άγαρ) υπόστρωμα MS με 30 g L^{-1} σακχαρόζη, χωρίς ή με $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA ή ZEAT.

Λόγω του μικρού ποσοστού αντίδρασης στο πρώτο πείραμα πραγματοποιήθηκε και δεύτερο πείραμα εγκατάστασης από νεαρά φυτά τον Ιούνιο 2014. Όπως και στο πρώτο πείραμα αφού έγινε πολύ καλό ξέπλυμα των βλαστών με τρεχούμενο νερό βρύσης, ακολούθησε η απολύμανση των εκφύτων (κορυφής και πρώτου κόμβου) με αιθανόλη 90% για 10 sec και εν συνεχεία με υδατικό διάλυμα 20% χλωρίνης εμπορίου (4.6% w/v NaClO), το οποίο περιείχε 0.1% Tween 20 (προσκολλητική ουσία, Polyoxyethylene(20)sorbitan Monolaurate) υπό ανάδευση, για 15 min. Την απολύμανση ακολούθησαν τέσσερα τρίλεπτα ξεπλύματα με αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό, υπό συνεχή ανάδευση. Η συγκέντρωση του υδατικού διαλύματος χλωρίνης μειώθηκε σε σύγκριση με την προηγούμενη προσπάθεια εγκατάστασης αρχικής καλλιέργειας το Φεβρουάριο 2014, γιατί οι βλαστοί και κατά επέκταση τα έκφυτα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν πολύ τρυφερά. Τα έκφυτα (κορυφής και πρώτου κόμβου, Εικ. II.Π.1β, γ) καλλιεργήθηκαν σε στερεό (8 g L^{-1} άγαρ) υπόστρωμα MS με 30 g L^{-1} σακχαρόζη, χωρίς ή με $0,5$ ή $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA ή ZEAT.

Ένα τρίτο πείραμα πραγματοποιήθηκε από νεαρά φυτά θερμοκηπίου το Φεβρουάριο 2015, στο οποίο χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα πρώτου, δεύτερου, τρίτου και τέταρτου κόμβου,

αποκλείοντας την κορυφή των βλαστών. Τα έκφυτα καλλιεργήθηκαν σε στερεό (8 g L^{-1} άγαρ) υπόστρωμα MS με 30 g L^{-1} σακχαρόζη, χωρίς ή με $0,5$ ή $1,0$ ή $1,5 \text{ mg L}^{-1}$ BA, αφού πρώτα είχαν απολυμανθεί επιφανειακά με αιθανόλη 90% για 10 sec και με διάλυμα χλωρίνης εμπορίου 30% για 10 min. Την απολύμανση ακολούθησαν τέσσερα τρίλεπτα ξεπλύματα με αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό, υπό συνεχή ανάδευση. Η συγκέντρωση του υδατικού διαλύματος που χρησιμοποιήθηκε ήταν η ίδια με το πρώτο πείραμα εγκατάστασης αρχικής *in vitro* καλλιέργειας (Φεβρουάριο 2014), αφού μετά τη συγκεκριμένη απολύμανση το ποσοστό μολύνσεων ήταν μηδενικό.

Τον Οκτώβριο 2015 πραγματοποιήθηκε και τέταρτο πείραμα από νεαρά φυτά θερμοκηπίου, στο οποίο χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα κορυφή, πρώτου και δεύτερου κόμβου. Τα έκφυτα καλλιεργήθηκαν σε στερεό (8 g L^{-1} άγαρ) υπόστρωμα MS με 30 g L^{-1} σακχαρόζη, με $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA ή ZEAT, αφού πρώτα είχαν απολυμανθεί επιφανειακά με αιθανόλη 90% για 10 sec και με διάλυμα χλωρίνης εμπορίου 20% για 10 min. Την απολύμανση ακολούθησαν τέσσερα τρίλεπτα ξεπλύματα με αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό, υπό συνεχή ανάδευση. Η συγκέντρωση του υδατικού διαλύματος χλωρίνης μειώθηκε σε σύγκριση με τις προηγούμενες προσπάθειες εγκατάστασης αρχικής καλλιέργειας, γιατί πιθανώς η συγκέντρωση 30% για 10 min, οδήγησε σε καταστροφή των ιστών των εκφύτων (κάψιμο) δεδομένου ότι τα περισσότερα έκφυτα που δεν μολύνθηκαν δεν αντέδρασαν.



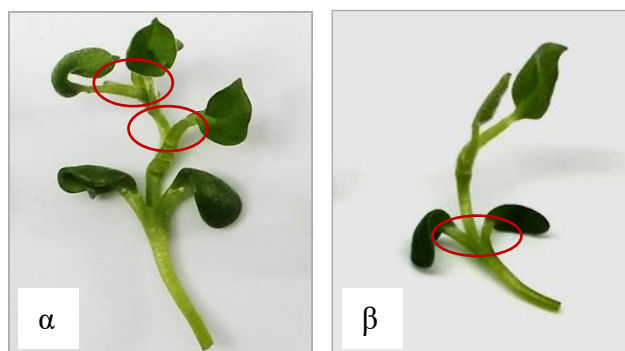
Εικόνα II.1.1. Συλλεγμένος νεαρός βλαστός τρέχουσας βλάστησης *A. barba-jonis* τον Ιούνιο 2014 πριν την έναρξη της εγκατάστασης *in vitro* αρχικής καλλιέργειας (α), έκφυτο κορυφής (β) και έκφυτο κόμβου (γ).

Από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα

Τον Απρίλιο 2013 έγινε αρχική εγκατάσταση *in vitro* καλλιεργειών από έκφυτα κορυφής και κόμβου που ελήφθησαν από δύο νεαρά *in vitro* αναπτυγμένα σπορόφυτα. Τα έκφυτα καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS με 30 g L⁻¹ σακχαρόζη και 1,0 mg L⁻¹ BA.

Τον Ιανουάριο 2015 για την αρχική εγκατάσταση *in vitro* καλλιεργειών χρησιμοποιήθηκαν έκφυτα κοτυληδικού κόμβου που ελήφθησαν από νεαρά *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα. Τα έκφυτα καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS με 30 g L⁻¹ σακχαρόζη χωρίς PGRs ή εμπλουτισμένο με 0,5 ή 1,0 mg L⁻¹ BA ή 0,1 mg L⁻¹ NAA ή συνδυασμό αυτών.

Το Μάιο 2015 έγινε αρχική εγκατάσταση *in vitro* καλλιεργειών από έκφυτα κορυφής ή πρώτου κόμβου ή κοτυληδικού κόμβου που ελήφθησαν από νεαρά *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα (Εικ. II.Π.2α, β). Τα έκφυτα καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS ή SH ή WPM με 30 g L⁻¹ σακχαρόζη χωρίς PGRs ή εμπλουτισμένο με 0,5 mg L⁻¹ BA σε συνδυασμό με 0,1 mg L⁻¹ NAA.



Εικόνα II.Π.2. Σπορόφυτα στο στάδιο λήψης κορυφής και πρώτου κόμβου (α) και κοτυληδικού κόμβου (β).

II.Π.2.2.1.2. Πολλαπλασιασμός βλαστών σε *in vitro* καλλιέργεια

Εγκατεστημένη από νεαρά φυτά αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο

Μετά την αρχική εγκατάσταση το Φεβρουάριο και τον Ιούνιο 2014 από νεαρά φυτά θερμοκηπίου ακολούθησε υποκαλλιέργεια σε υπόστρωμα MS που περιείχε 1,0 mg L⁻¹ BA και ZEAT αντίστοιχα. Τα έκφυτα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν έκφυτα κορυφής και κόμβου μαζί. Και στις δύο αυτές υποκαλλιέργειες δεν σημειώθηκε αντίδραση των εκφύτων.

Μετά την αρχική εγκατάσταση το Φεβρουάριο 2015 από νεαρά φυτά ακολούθησε υποκαλλιέργεια εκφύτων κορυφής και κόμβου, σε υπόστρωμα MS χωρίς ή με 1,0 mg L⁻¹

BA, για αύξηση του πολλαπλασιαστικού υλικού με σκοπό τη συνέχιση των πειραμάτων. Για να διερευνηθεί η επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης κυτοκινίνης στον πολλαπλασιασμό των βλαστών, ακολούθησε υποκαλλιέργεια εκφύτων κορυφής και κόμβου, σε υπόστρωμα MS είτε χωρίς PGR ή με BA ή ZEAT ή 2iP ή KIN σε συγκέντρωση 0,5 ή 1,0 ή 1,5 ή 2,0 ή 4,0 mg L⁻¹. Λόγω του υψηλού μέσου αριθμού βλαστών που παρατηρήθηκε στα υποστρώματα με 4,0 mg L⁻¹ BA, αλλά και λόγω του υψηλού αριθμού παραχθέντων υπερενυδατωμένων βλαστών, ακολούθησε υποκαλλιέργεια με στόχο την αντιμετώπιση της υπερενυδάτωσης με ταυτόχρονη αύξηση της παραγωγής κανονικών (φυσιολογικών) βλαστών. Χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα MS είτε χωρίς PGRs στερεοποιημένο με 8 g L⁻¹ άγαρ (μάρτυρας) είτε εμπλουτισμένο με 4,0 mg L⁻¹ BA σε συνδυασμό με 0,1 ή 0,5 mg L⁻¹ NAA με 8 ή 12 g L⁻¹ άγαρ.

Εγκατεστημένη από in vitro ανεπτυγμένα σπορόφυτα

Μετά την αρχική εγκατάσταση τον Απρίλιο 2013 από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα, ακολούθησε υποκαλλιέργεια εκφύτων κορυφής και κόμβου, σε υπόστρωμα MS με 1,0 mg L⁻¹ BA, για αύξηση του πολλαπλασιαστικού υλικού. Στη δεύτερη υποκαλλιέργεια ελέγχθηκε η επίδραση του είδους της κυτοκινίνης, BA ή ZEAT, σε συγκέντρωση 1,0 mg L⁻¹, καθώς και η απουσία PGR στην αντίδραση των εκφύτων, ενώ στην τρίτη και τέταρτη υποκαλλιέργεια έκφυτα κορυφής και κόμβου καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS με 1,0 mg L⁻¹ BA για αύξηση του πολλαπλασιαστικού υλικού. Στην επόμενη υποκαλλιέργεια (5^η) έκφυτα κορυφής και κόμβου τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα MS χωρίς PGRs ή με BA, ZEAT, 2iP, KIN σε συγκεντρώσεις 0,25 ή 0,5 ή 1,0 mg L⁻¹, έτσι ώστε να ελεγχθεί η επίδραση του τύπου και της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης στον πολλαπλασιασμό των βλαστών. Όλα τα έκφυτα προήλθαν από μικροβλαστούς αναπτυγμένους σε υπόστρωμα MS χωρίς PGRs. Πραγματοποιήθηκε μια ακόμη υποκαλλιέργεια (6^η), στην οποία έκφυτα κορυφής και κόμβου τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα MS χωρίς PGRs (χωρίς να ληφθούν μετρήσεις), για να ακολουθήσει υποκαλλιέργεια (7^η), όπου τα έκφυτα κορυφής και κόμβου τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα MS χωρίς ή με BA ή ZEAT ή 2iP ή KIN σε συγκεντρώσεις 0,25 ή 0,5 ή 1,0 mg L⁻¹. Στη συνέχεια (8^η υποκαλλιέργεια) τα έκφυτα κορυφής και κόμβου τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα MS είτε χωρίς PGRs, είτε με 1,0 mg L⁻¹ BA ή ZEAT ή 2iP ή KIN, θέλοντας να επαληθεύσουμε την υπεροχή της BA σε ότι αφορά τον πολλαπλασιασμό των βλαστών. Στην επόμενη υποκαλλιέργεια (9^η) έκφυτα κορυφής ή κόμβου τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα MS με BA σε συγκεντρώσεις 1,0 ή 2,0 mg L⁻¹. Στην

τελευταία υποκαλλιέργεια (10^η) τα έκφυτα κορυφής ή κόμβου τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα MS χωρίς PGRs για διατήρηση πολλαπλασιαστικού υλικού.

Μετά την αρχική εγκατάσταση τον Ιανουάριο 2015 από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα, ακολούθησε υποκαλλιέργεια (1^η) εκφύτων κόμβου, σε υπόστρωμα MS που περιείχε 0,5 ή 1,0 mg L⁻¹ BA σε συνδυασμό με 0,1 mg L⁻¹ NAA, καθώς και υπόστρωμα MS χωρίς PGRs. Στη δεύτερη υποκαλλιέργεια έκφυτα κόμβου τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα MS χωρίς PGRs ή με 0,5 mg L⁻¹ BA σε συνδυασμό με 0,1 mg L⁻¹ NAA. Η τρίτη υποκαλλιέργεια πραγματοποιήθηκε σε υπόστρωμα MS που περιείχε 0,5 ή 1,0 ή 2,0 mg L⁻¹ BA ή ZEAT σε συνδυασμό με 0,1 mg L⁻¹ NAA, καθώς και υπόστρωμα χωρίς PGRs ως μάρτυρας ή με 2,0 mg L⁻¹ BA ή ZEAT χωρίς NAA. Ακολούθησε υποκαλλιέργεια (4^η) εκφύτων κορυφής και κόμβου, σε υπόστρωμα MS είτε χωρίς PGR ή με BA ή ZEAT ή 2iP ή KIN σε συγκέντρωση 0,5 ή 1,0 ή 1,5 ή 2,0 ή 4,0 mg L⁻¹. Λόγω του υψηλού μέσου αριθμού βλαστών που παρατηρήθηκε στα υποστρώματα με 4,0 mg L⁻¹ BA ή ZEAT, αλλά και λόγω του υψηλού αριθμού παραχθέντων υπερενυδατωμένων βλαστών, ακολούθησε υποκαλλιέργεια (5^η) με στόχο την εξάλειψη της υπερενυδάτωσης. Επιπλέον λαμβάνοντας υπόψη μας το υψηλό κόστος της ZEAT στην επόμενη υποκαλλιέργεια, όπου ελέγχθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του άγαρ στην υπερενυδάτωση, χρησιμοποιήθηκε μόνο BA. Χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα MS στερεοποιημένο με 8 ή 12 g L⁻¹ άγαρ, εμπλουτισμένο με 4,0 mg L⁻¹ BA σε συνδυασμό με 0,1 ή 0,5 mg L⁻¹ NAA και υπόστρωμα MS με 8 g L⁻¹ άγαρ χωρίς PGRs. Ακολούθησαν τέσσερις υποκαλλιέργειες (6^η - 7^η - 8^η - 9^η) όπου τα έκφυτα κορυφής και κόμβου τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα MS είτε χωρίς είτε με 2,0 mg L⁻¹ BA σε συνδυασμό με 0,1 mg L⁻¹ NAA, για διατήρηση πολλαπλασιαστικού υλικού.

Μετά την αρχική εγκατάσταση το Μάιο 2015 από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα, ακολούθησε υποκαλλιέργεια εκφύτων κορυφής και κόμβου, σε υπόστρωμα MS ή SH ή WPM χωρίς PGRs ή με 0,5 ή 5,0 mg L⁻¹ BA σε συνδυασμό με 0,1 mg L⁻¹ NAA. Ακολούθησε υποκαλλιέργεια σε υπόστρωμα MS είτε χωρίς PGRs είτε με 5,0 mg L⁻¹ BA σε συνδυασμό με 0,1 ή 0,5 ή 1,0 mg L⁻¹ NAA.

II.Π.2.2.1.3. *In vitro* ριζοβολία μικρομοσχευμάτων

Κατά τη διερεύνηση της *in vitro* ριζοβολίας είτε από την καλλιέργεια που εγκαταστάθηκε από νεαρά φυτά αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο, είτε από την καλλιέργεια που εγκαταστάθηκε από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα, επιλέχθηκαν μη υπερενυδατωμένοι μικροβλαστοί, για τη λήψη μικρομοσχευμάτων, μήκους 1,5 - 2,0 cm.

I. Ριζοβολία μικρομοσχευμάτων από καλλιέργεια νεαρών φυτών αναπτυσσόμενων στο θερμοκήπιο

Στα μικρομοσχεύματα που ελήφθησαν από την καλλιέργεια που εγκαταστάθηκε το Φεβρουάριο 2015 από νεαρά φυτά αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο διερευνήθηκε:

- a. η επίδραση στη ριζοβολία του τύπου του μικρομοσχεύματος και της συγκέντρωσης της αυξίνης του υποστρώματος

Μικρομοσχεύματα από το κορυφαίο τμήμα, μαζί με το επάκριο μερίστωμα ή από το μεσαίο τμήμα των μικροβλαστών, καλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα ½ MS είτε χωρίς IBA είτε με 0,5 ή 1,0 ή 2,0 ή 4,0 mg L⁻¹ IBA για 6 συνεχείς εβδομάδες.

- b. η επίδραση της συγκέντρωσης της αυξίνης του υποστρώματος

Μικρομοσχεύματα από το κορυφαίο τμήμα, μαζί με το επάκριο μερίστωμα των μικροβλαστών, καλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα μισής δύναμης MS χωρίς IBA ή με 0,5 ή 1,0 ή 2,0 ή 4,0 mg L⁻¹ IBA, για 6 συνεχείς εβδομάδες.

II. Ριζοβολία μικρομοσχευμάτων από καλλιέργεια σποροφύτων

Στα μικρομοσχεύματα που ελήφθησαν από την καλλιέργεια που εγκαταστάθηκε τον Απρίλιο 2013 από *in vitro* σπορόφυτα διερευνήθηκε:

- Η επίδραση της συγκέντρωσης του MS και της αυξίνης και η επίδραση της συνεχούς ή για μία εβδομάδα παρουσίας IBA στο στερεό υπόστρωμα καλλιέργειας

Μικρομοσχεύματα από το κορυφαίο τμήμα, μαζί με το επάκριο μερίστωμα των μικροβλαστών, καλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα πλήρους ή μισής δύναμης MS χωρίς IBA, ή σε υπόστρωμα MS με 0,5 ή 1,0 ή 2,0 ή 4,0 mg L⁻¹ IBA. Σε μια άλλη μεταχείριση μικρομοσχεύματα καλλιεργήθηκαν επί 1 εβδομάδα σε υπόστρωμα MS χωρίς IBA ή με 0,5, 1,0, 2,0 ή 4,0 mg L⁻¹ IBA, και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε υπόστρωμα MS μισής δύναμης για 5 εβδομάδες.

Στα μικρομοσχεύματα που ελήφθησαν από την καλλιέργεια που εγκαταστάθηκε τον Ιανουάριο 2015 από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα διερευνήθηκε:

- a. Η επίδραση του τύπου του υποστρώματος και της συγκέντρωσης της αυξίνης του υποστρώματος

Μικρομοσχεύματα από το κορυφαίο τμήμα, μαζί με το επάκριο μερίστωμα των μικροβλαστών, καλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα μισής δύναμης MS ή SH ή WPM χωρίς IBA ή με 0,5 ή 2,0 mg L⁻¹ IBA, για 6 συνεχείς εβδομάδες.

b. *Η επίδραση της συγκέντρωσης της αυξίνης του υποστρώματος*

Μικρομοσχεύματα από το κορυφαίο τμήμα, μαζί με το επάκριο μερίστωμα των μικροβλαστών, σε στερεό υπόστρωμα μισής δύναμης MS χωρίς IBA ή με 0,5 ή 1,0 ή 2,0 ή 4,0 mg L⁻¹ IBA, για 6 συνεχείς εβδομάδες.

c. *Η επίδραση του τύπου του μικρομοσχεύματος και της συγκέντρωσης της αυξίνης του υποστρώματος*

Μικρομοσχεύματα από το κορυφαίο τμήμα, μαζί με το επάκριο μερίστωμα ή από το μεσαίο τμήμα των μικροβλαστών, καλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα ½ MS είτε χωρίς IBA είτε με 0,5 ή 1,0 ή 2,0 ή 4,0 mg L⁻¹ IBA για 6 συνεχείς εβδομάδες.

II.Π.2.2.1.4. Εγκλιματισμός φυταρίων *ex vitro*

Για εγκλιματισμό σε *ex vitro* συνθήκες τα ανεπτυγμένα έρριζα φυτάρια μεταφυτεύθηκαν σε δοχεία (οκτώ φυτάρια ανά δοχείο όγκου 500 ml) με μίγμα τύρφης: περλίτη (1:1, v/v) (Εικ. II.Π.3). Τα δοχεία καλύφθηκαν με πλαστική μεμβράνη και τοποθετήθηκαν αρχικά σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών για μία εβδομάδα και στη συνέχεια στο θερμοκήπιο για περαιτέρω ανάπτυξη.

Μετά την ολοκλήρωση του εγκλιματισμού (1 μήνα), ακολούθησε μεταφύτευση των εγκλιματισμένων φυταρίων σε γλάστρα 10 cm σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (2:1, v/v) και αφαίρεση της κορυφής στα μισά εξ' αυτών. Τα φυτά λιπαίνονταν με 2,0 g L⁻¹ υδατοδιαλυτό λίπασμα (Nutrileaf 60, 20-20-20) μια φορά το μήνα για περαιτέρω ανάπτυξη.



Εικόνα II.Π.3. Φυτάρια *A. barba-jovis*, τοποθετημένα στα δοχεία εγκλιματισμού, σε υπόστρωμα 1 τύρφη: 1 περλίτη (v/v).

II.II.2.2.2 *Ballota acetabulosa*

II.II.2.2.2.1 Αρχική εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας

Από ενήλικα αυτοφυή φυτά

Βλαστοί, μήκους 10,0 - 15,0 cm, συλλέχθηκαν από επιλεγμένα, ενήλικα, αυτοφυή φυτά από το Βοτανικό κήπο του Διομήδους (38°0'40"N, 23°38'35"E), το Νοέμβριο 2012 και από την Πάρνηθα (38°13'61.80"B, 23°74'06.98"E), το Μάρτιο 2013. Οι βλαστοί και στις δύο προσπάθειες εγκατάστασης αρχικής καλλιέργειας τοποθετούνταν σε δοχεία που περιείχε νερό βρύσης, με τέτοιο τρόπο ώστε η βάση τους (2 cm) να εμβαπτίζεται στο νερό. Στη συνέχεια μεταφέρονταν στο Εργαστήριο Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου όπου ξεκινούσε η διαδικασία εγκατάστασης *in vitro* καλλιέργειών.

Αφού αφαιρέθηκαν τα φύλλα από όλο το μήκος του βλαστού, έγινε πολύ καλό ξέπλυμα των βλαστών με τρεχούμενο νερό βρύσης. Στη συνέχεια τα έκφυτα (κορυφής ή κόμβου) απολυμάνθηκαν επιφανειακά με αιθανόλη 90% για 1 min και με υδατικό διάλυμα 30% χλωρίνης εμπορίου (4.6% w/v NaClO), το οποίο περιείχε 1 - 2 σταγόνες 0.1% Tween 20 (προσκολλητική ουσία, Polyoxyethylene(20)sorbitan Monolaurate) υπό ανάδευση, για 20 min. Την απολύμανση ακολούθησαν τέσσερα τρίλεπτα ξεπλύματα με αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό, υπό συνεχή ανάδευση. Η εγκατάσταση των εκφύτων έγινε σε στερεό (8 g L⁻¹ άγαρ) υπόστρωμα MS με 30 g L⁻¹ σακχαρόζη είτε χωρίς ή με 1,0 mg L⁻¹ BA ή ZEAT.

Η εγκατάσταση αρχικής καλλιέργειας και στις δύο προσπάθειες είχε πλήρη αποτυχία, εξ' αιτίας των μολύνσεων των εκφύτων (κορυφής ή κόμβου) με αποτέλεσμα την ολοκληρωτική απώλεια των καλλιέργειών. Για αυτό το λόγο έγινε προσπάθεια εγκατάστασης αρχικής καλλιέργειας, από νεαρά φυτά, από το Βοτανικό κήπο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου.

Από νεαρά φυτά εγκαταστημένα στο Βοτανικό Κήπο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου

Βλαστοί, μήκους 10,0 - 15,0 cm, συλλέχθηκαν το Μάιο 2015 από επιλεγμένα, νεαρά φυτά, ηλικίας περίπου 6 μηνών, προερχόμενα από ριζοβολημένα μοσχεύματα τα οποία είχαν εγκατασταθεί στο Βοτανικό Κήπο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γ.Π.Α.

Αφού αφαιρέθηκαν τα φύλλα από όλο το μήκος του βλαστού, έγινε πολύ καλό ξέπλυμα των βλαστών με τρεχούμενο νερό βρύσης και πριν την τεμάχισή τους και την απολύμανσή

τους, έγινε κάψιμο των τριχιδίων με αναπτήρα για δευτερόλεπτα. Ακολούθησε ο τεμαχισμός των βλαστών για παραλαβή εκφύτων (κορυφής ή κόμβου) και απολύμανσή τους με αιθανόλη 90% σε τρεις διαφορετικούς χρόνους (10 sec ή 30 sec ή 1 min) και με υδατικό διάλυμα 20% χλωρίνης εμπορίου (4.6% w/v NaClO), το οποίο περιείχε 1 - 2 σταγόνες 0.1% Tween 20 (προσκολλητική ουσία, Polyoxyethylene(20)sorbitan Monolaurate) υπό ανάδευση, για 20 min. Την απολύμανση ακολούθησαν τέσσερα τρίλεπτα ξεπλύματα με αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό, υπό συνεχή ανάδευση. Η εγκατάσταση των εκφύτων έγινε σε στερεό (8 g L⁻¹ άγαρ) υπόστρωμα MS με 30 g L⁻¹ σακχαρόζη είτε χωρίς ή με 1,0 mg L⁻¹ BA ή ZEAT. Και αυτή η μέθοδος είχε πλήρη αποτυχία εξ' αιτίας των μολύνσεων με αποτέλεσμα την ολοκληρωτική απώλεια των καλλιεργειών.

Από νεαρά φυτά αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο

Το Μάιο του 2013 έγινε προσπάθεια αρχικής εγκατάστασης *in vitro* καλλιέργειας από νεαρά φυτά, ηλικίας 4 μηνών, τα οποία είχαν προέλθει από καλλιέργεια *in vitro* σποροφύτων και τα οποία αναπτύσσονταν στο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου. Ως φυτικό υλικό χρησιμοποιήθηκαν μόνο έκφυτα κορυφής για να περιοριστούν οι μολύνσεις. Αφού έγινε πολύ καλό ξέπλυμα των βλαστών με τρεχούμενο νερό βρύσης, ακολούθησε η απολύμανση του φυτικού υλικού αρχικά με αιθανόλη 90% για 10 sec και εν συνεχεία με υδατικό διάλυμα 10% χλωρίνης εμπορίου (4.6% w/v NaClO), το οποίο περιείχε 0.1% Tween 20 (προσκολλητική ουσία, Polyoxyethylene(20)sorbitan Monolaurate) υπό ανάδευση, για 10 min. Την απολύμανση ακολούθησαν τέσσερα τρίλεπτα ξεπλύματα με αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό, υπό συνεχή ανάδευση. Ο χρόνος εμβάπτισης των εκφύτων στην αιθανόλη και στη χλωρίνη αλλά και η συγκέντρωση του υδατικού διαλύματος χλωρίνης μειώθηκαν σε σύγκριση με τις προηγούμενες προσπάθειες εγκατάστασης αρχικής καλλιέργειας, γιατί οι κορυφές ήταν πολύ τρυφερές. Η εγκατάσταση των εκφύτων κορυφής έγινε σε στερεό (8 g L⁻¹ άγαρ) υπόστρωμα MS με 30 g L⁻¹ σακχαρόζη είτε χωρίς ή με 1,0 mg L⁻¹ BA ή ZEAT.

Από in vitro ανεπτυγμένα σπορόφυτα

Σπορόφυτα φυτρωμένα *in vitro* κατά τη διάρκεια του πρώτου πειράματος βλαστικότητας μεταφέρθηκαν σε στερεό υπόστρωμα πλήρους δύναμης MS με 30 g L⁻¹ σακχαρόζη για 6 εβδομάδες, προκειμένου να αναπτυχθούν και να χρησιμοποιηθούν ως πηγή εκφύτων για την εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας. Μετά το πέρας των 6 εβδομάδων ελήφθησαν 2 - 3 έκφυτα (κορυφής και κόμβου) από κάθε σπορόφυτο και καλλιεργήθηκαν *in vitro* σε

υπόστρωμα MS με 30 g L⁻¹ σακχαρόζη είτε χωρίς ή με 0,5, 1,0 ή 2,0 mg L⁻¹ BA ή ZEAT ή 2iP ή KIN, έτσι ώστε να ελεγχθεί η επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης κυτοκινινών στην αντίδραση των εκφύτων.

II.II.2.2.2. Πολλαπλασιασμός βλαστών σε *in vitro* καλλιέργεια

Εγκατεστημένη από νεαρά φυτά αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο

Έκφυτα κορυφής και κόμβου που προήλθαν από την καλλιέργεια του εγκαταστάθηκε από νεαρά φυτά αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο το Μάιο 2013, υποκαλλιεργήθηκαν δύο φορές σε υπόστρωμα MS χωρίς PGRs.

Εγκατεστημένη από in vitro ανεπτυγμένα σπορόφυτα

Στην πρώτη υποκαλλιέργεια που εγκαταστάθηκε από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα, τα έκφυτα υποκαλλιεργήθηκαν στα ίδια υποστρώματα με την αρχική καλλιέργεια (υπόστρωμα MS με 30 g L⁻¹ σακχαρόζη, χωρίς ή με 0,5, 1,0 ή 2,0 mg L⁻¹ BA ή ZEAT ή 2iP ή KIN), με τη διαφορά ότι σε αυτή την υποκαλλιέργεια ελέγχθηκε και η επίδραση του τύπου του εκφύτου (κορυφής ή κόμβου). Τα έκφυτα τοποθετήθηκαν κάθε φορά στο υπόστρωμα από το οποίο προήλθαν. Στην επόμενη υποκαλλιέργεια (2^η) έκφυτα κορυφής ή κόμβου, που προήλθαν από το υπόστρωμα MS χωρίς PGRs, τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα MS με 30 g L⁻¹ σακχαρόζη και 1,0 mg L⁻¹ BA ή ZEAT ή 2iP ή KIN. Στις επόμενες δύο υποκαλλιέργειες (3^η και 4^η) τα έκφυτα κορυφής ή κόμβου τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα MS με 30 g L⁻¹ σακχαρόζη, χωρίς ή με 1,0 mg L⁻¹ BA ή ZEAT. Τα έκφυτα τοποθετήθηκαν κάθε φορά στο υπόστρωμα από το οποίο προήλθαν. Σε όλες τις υποκαλλιέργειες στις υψηλές συγκεντρώσεις κυτοκινινών (1,0 ή 2,0 mg L⁻¹) προέκυψε το πρόβλημα των υπερενυδατωμένων βλαστών. Για την αντιμετώπιση του φαινομένου της υπερενυδάτωσης των βλαστών δοκιμάστηκε η αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ. Πιο συγκεκριμένα στη πέμπτη υποκαλλιέργεια τα έκφυτα κορυφής και κόμβου τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα MS χωρίς PGRs και 8 g L⁻¹ άγαρ και σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με 0,5 ή 1,0 mg L⁻¹ BA και άγαρ σε συγκέντρωση 8 g L⁻¹ ή 12 g L⁻¹. Στις επόμενες 24 υποκαλλιέργειες τα έκφυτα κορυφής ή κόμβου τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα MS χωρίς PGRs, για διατήρηση πολλαπλασιαστικού υλικού.

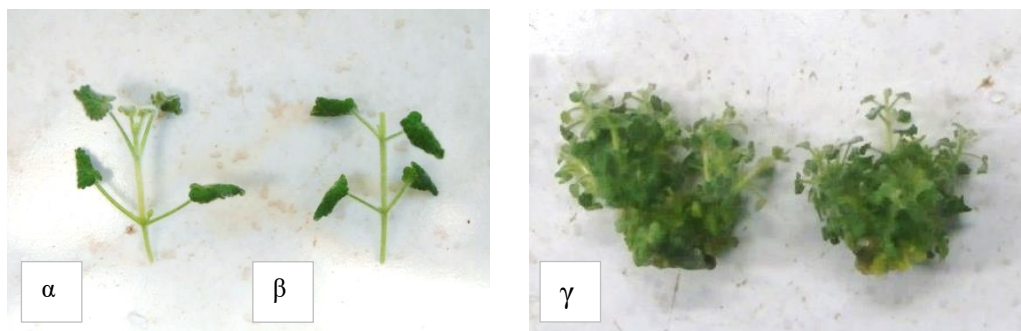
II.Π.2.2.2.3 *In vitro* ριζοβολία μικρομοσχευμάτων

Ριζοβολία μικρομοσχευμάτων από καλλιέργεια σποροφύτων

Στα πειράματα *in vitro* ριζοβολίας χρησιμοποιήθηκαν μικρομοσχεύματα, μήκους 2,0 - 2,5 cm, είτε από το κορυφαίο τμήμα, μαζί με το επάκριο μερίστωμα είτε από το μεσαίο τμήμα μικροβλαστών, από την καλλιέργεια που εγκαταστάθηκε από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα. Οι μικροβλαστοί από τους οποίους προήλθαν τα μικρομοσχεύματα είχαν μήκος 15 - 17 cm.

Κατά τη διερεύνηση της *in vitro* ριζοβολίας μικρομοσχευμάτων που προήλθαν από την καλλιέργεια που εγκαταστάθηκε από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα διερευνήθηκε η επίδραση του τύπου του μικρομοσχεύματος (από το κορυφαίο τμήμα, μαζί με το επάκριο μερίστωμα ή από το μεσαίο τμήμα μικροβλαστών) και της συγκέντρωσης αυξίνης στο υπόστρωμα πολλαπλασιασμού των βλαστών (Εικ. II.Π.4α, β). Μικρομοσχεύματα καλλιεργήθηκαν για *in vitro* ριζοβολία σε στερεό υπόστρωμα πλήρους δύναμης MS χωρίς IBA, ή σε υπόστρωμα MS με 0,5, 1,0, 2,0 ή 4,0 mg L⁻¹ IBA για 6 συνεχείς εβδομάδες. Το πείραμα επαναλήφθηκε 2 φορές.

Επίσης, συστάδες μικροβλαστών προερχόμενοι από καλλιέργεια ενήλικων σποροφύτων τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα MS μισής δύναμης με διάφορες συγκεντρώσεις IBA (0,0 ή 0,5 ή 1,0 ή 2,0 ή 4,0 mg L⁻¹) για ριζοβολία για 6 συνεχείς εβδομάδες (Εικ. II.Π.4γ).



Εικόνα II.Π.4. Μικρομοσχεύματα *B. acetabulosa* από το κορυφαίο τμήμα, μαζί με το επάκριο μερίστωμα (α), το μεσαίο τμήμα (β) του μικροβλαστού και συστάδες μικροβλαστών πριν την τοποθέτησή τους για *in vitro* ριζοβολία.

II.Π.2.2.2.4 Εγκλιματισμός φυταρίων *ex vitro*

Για εγκλιματισμό σε *ex vitro* συνθήκες τα ανεπτυγμένα έρριζα φυτάρια μεταφυτεύθηκαν σε δοχεία (οκτώ φυτάρια ανά δοχείο όγκου 500 ml) με μίγμα τύρφης: περλίτη (1:1, v/v) (Εικ. II.Π.5). Τα δοχεία καλύφθηκαν με πλαστική μεμβράνη και τοποθετήθηκαν αρχικά σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών για μία εβδομάδα και στη συνέχεια στο θερμοκήπιο για περαιτέρω ανάπτυξη.

Μετά την ολοκλήρωση του εγκλιματισμού (1 μήνα), ακολούθησε μεταφύτευση των εγκλιματισμένων φυταρίων σε γλάστρα 10 cm σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (2:1, v/v) και λίπανση με $2,0 \text{ g L}^{-1}$ υδατοδιαλυτό λίπασμα (Nutrileaf 60, 20-20-20) μια φορά το μήνα για περαιτέρω ανάπτυξη.



Εικόνα II.Π.5. Φυτάρια *B. acetabulosa*, τοποθετημένα στα δοχεία εγκλιματισμού, σε υπόστρωμα 1 τύρφη: 1 περλίτη (v/v).

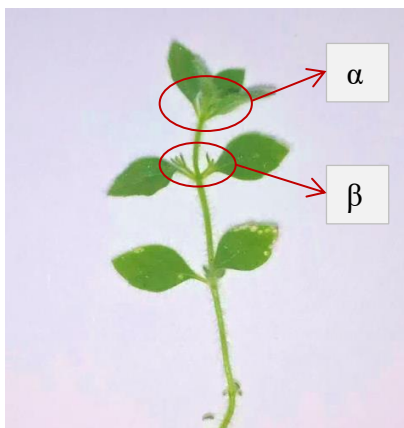
II.Π.2.2.3 *Clinopodium creticum*

II.Π.2.2.3.1. Αρχική εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας

Από ενήλικα φυτά αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο

Βλαστοί, μήκους περίπου 10 cm, συλλέχθηκαν από ενήλικα φυτά *C. creticum* (από τρία ριζοβολημένα μοσχεύματα που μας είχαν παραχωρήθηκαν από το Μεσογειακό Αγρονομικό Ινστιτούτο Χανίων τον Απρίλιο 2013) τα οποία αναπτύσσονταν στο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γ.Π.Α. (37°58'53,94"N, 23°42'25,01"E), τον Ιούλιο 2013 (Εικ. II.Π.6α, β). Αφού αφαιρέθηκαν τα φύλλα από όλο το μήκος του βλαστού, έγινε πολύ καλό ξέπλυμα των βλαστών με τρεχούμενο νερό βρύσης. Στη συνέχεια τα έκφυτα (κορυφής ή πρώτου κόμβου) απολυμάνθηκαν επιφανειακά με αιθανόλη 90% για 10 sec και με υδατικό διάλυμα 10% χλωρίνης εμπορίου (4.6% w/v

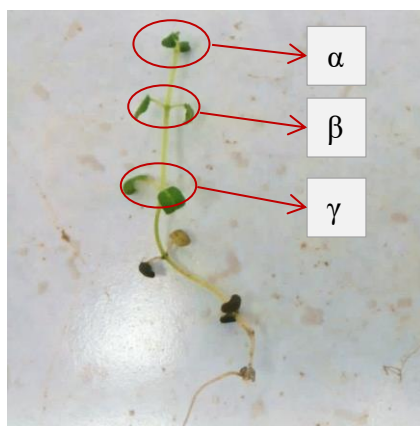
NaClO), το οποίο περιείχε 0.1% Tween 20 (προσκολλητική ουσία, Polyoxyethylene(20)sorbitan Monolaurate) υπό ανάδευση, για 15 min. Την απολύμανση ακολούθησαν τέσσερα τρίλεπτα ξεπλύματα με αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό, υπό συνεχή ανάδευση. Η εγκατάσταση των εκφύτων έγινε σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν στερεό (8 g L⁻¹ άγαρ) υπόστρωμα MS με 30 g L⁻¹ σακχαρόζη, είτε χωρίς ή με 1,0 mg L⁻¹ BA ή ZEAT.



Εικόνα II.Π.6. Βλαστός από ενήλικο φυτό *C. creticum* αναπτυσσόμενο στο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου κατά το στάδιο λήψης εκφύτων κορυφής (α) και πρώτου κόμβου (β).

Από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα

Μετά το τέλος της περιόδου βλάστησης των σπόρων, τα φυτρωμένα σπορόφυτα μεταφέρθηκαν σε στερεό υπόστρωμα πλήρους δύναμης MS με 30 g L⁻¹ σακχαρόζη για 6 εβδομάδες, προκειμένου να αναπτυχθούν και να χρησιμοποιηθούν ως πηγή εκφύτων για την εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας. Μετά το πέρας των 6 εβδομάδων ελήφθησαν 2-3 έκφυτα από κάθε σπορόφυτο και καλλιεργήθηκαν *in vitro* για να διερευνηθεί η επίδραση του τύπου (BA, ZEA, KIN 2iP) και συγκέντρωσης των κυτοκινινών (0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0, ή 8,0 mg L⁻¹) στην αντίδραση εκφύτων κορυφής ή κόμβου (Εικ. II.Π.7α, β, γ).



Εικόνα II.Π.7. Σπορόφυτα *C. creticum* στο στάδιο λήψης εκφύτων κορυφής (α), πρώτου κόμβου (β) και δεύτερου κόμβου (γ).

II.II.2.2.3.2. Πολλαπλασιασμός βλαστών σε *in vitro* καλλιέργεια

Εγκατεστημένη από ενήλικα φυτά αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο

Κατά την πρώτη υποκαλλιέργεια, και οι δύο τύποι εκφύτων (κορυφής ή κόμβου) καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS είτε χωρίς ή με $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA. Στην επόμενη υποκαλλιέργεια (2^η) εξετάστηκε η επίδραση του τύπου (BA, ZEA, KIN 2iP) και συγκέντρωσης των κυτοκινινών ($0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0$ ή $8,0 \text{ mg L}^{-1}$). Τα έκφυτα (κορυφής ή κόμβου) που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από υπόστρωμα MS χωρίς PGR. Ακολούθησε υποκαλλιέργεια (3^η υποκαλλιέργεια) όπου τα έκφυτα (κορυφής ή κόμβου) τοποθετήθηκαν στο ίδιο υπόστρωμα από το οποίο προήλθαν. Στις δύο προηγούμενες υποκαλλιέργειες στις υψηλές συγκεντρώσεις κυτοκινινών προέκυψε το πρόβλημα της υπερενυδάτωσης με αποτέλεσμα την απώλεια μεγάλου μέρους του πολλαπλασιαστικού υλικού. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν άλλες πέντε υποκαλλιέργειες (4^η - 5^η - 6^η - 7^η - 8^η) σε υπόστρωμα MS χωρίς PGRs για αύξηση του πολλαπλασιαστικού υλικού, με σκοπό τη συνέχιση των πειραμάτων.

Για την αντιμετώπιση του φαινομένου της υπερενυδάτωσης αρχικά δοκιμάστηκε ο εμπλουτισμός του υποστρώματος με αυξίνη (NAA) και σε επόμενο πείραμα η αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ. Όσον αφορά το πείραμα με την προσθήκη αυξίνης, χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα MS συμπληρωμένο με $0,5, 1,0, 2,0, 4,0$ ή $8,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA και $0,1$ ή $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ NAA, με όλους τους δυνατούς συνδυασμούς. Ενώ όσον αφορά το πείραμα με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις άγαρ, χρησιμοποιήθηκε: α) υπόστρωμα MS με άγαρ 8 g L^{-1} χωρίς PGRs ή εμπλουτισμένο με $8,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA και $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA και β) υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με $8,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA και άγαρ σε συγκέντρωση 8 ή 12 g L^{-1} .

*Εγκατεστημένη από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα*

Στην πρώτη υποκαλλιέργεια έκφυτα κορυφής ή κόμβου, τοποθετήθηκαν στο ίδιο υπόστρωμα από το οποίο προήλθαν από την αρχική καλλιέργεια. Στις υψηλές συγκεντρώσεις κυτοκινινών προέκυψε το πρόβλημα της υπερενυδάτωσης τόσο στην αρχική καλλιέργεια, όσο και στην πρώτη υποκαλλιέργεια, με αποτέλεσμα την απώλεια μεγάλου μέρους του πολλαπλασιαστικού υλικού. Για αύξηση του πολλαπλασιαστικού υλικού πραγματοποιήθηκαν άλλες τέσσερις υποκαλλιέργειες (2^η – 5^η) σε υπόστρωμα MS χωρίς PGRs, με σκοπό τη συνέχιση των πειραμάτων. Για την αντιμετώπιση του φαινομένου της υπερενυδάτωσης αρχικά δοκιμάστηκε ο εμπλουτισμός του υποστρώματος με αυξίνη (NAA)

και σε επόμενο πείραμα η αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ (χρησιμοποιήθηκαν τα ίδια υποστρώματα με την καλλιέργεια από ενήλικα φυτά).

Π.Π.2.2.3.3. *In vitro* ριζοβολία μικρομοσχευμάτων

Ριζοβολία μικρομοσχευμάτων από καλλιέργεια ενήλικων φυτών ή σποροφύτων

Κατά τη διερεύνηση της *in vitro* ριζοβολίας μικρομοσχεύματα από το κορυφαίο τμήμα, μαζί με το επάκριο μερίστωμα, των μικροβλαστών, που ελήφθησαν από καλλιέργεια ενήλικων φυτών ή σποροφύτων εξετάστηκε η επίδραση της συγκέντρωσης του θρεπτικού υποστρώματος MS, της συγκέντρωσης του IBA και της συνεχούς ή για μίας εβδομάδας παρουσίας του IBA σε στερεό υπόστρωμα καλλιέργειας. Πιο συγκεκριμένα μικρομοσχεύματα μήκους 2,0 - 2,5 cm, καλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα πλήρους ή μισής δύναμης MS με 20 g L⁻¹ σακχαρόζη και διάφορες συγκεντρώσεις IBA (0,0, 0,5, 1,0, 2,0 ή 4,0 mg L⁻¹). Σε μια άλλη μεταχείριση μικρομοσχεύματα καλλιεργήθηκαν επί 1 εβδομάδα σε υπόστρωμα MS χωρίς IBA ή με 0,5, 1,0, 2,0 ή 4,0 mg L⁻¹ IBA, και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε υπόστρωμα πλήρους ή μισής δύναμης MS για 5 εβδομάδες.

Επίσης, συστάδες μικροβλαστών προερχόμενοι από καλλιέργεια ενήλικων φυτών ή σποροφύτων τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα MS μισής δύναμης για ριζοβολία (Εικ. Π.Π.8).



Εικόνα Π.Π.8. Συστάδες μικροβλαστών *C. creticum* πριν την τοποθέτησή τους για *in vitro* ριζοβολία.

Π.Π.2.2.3.4. Εγκλιματισμός φυταρίων *ex vitro*

Για εγκλιματισμό σε *ex vitro* συνθήκες τα ανεπτυγμένα έρριζα φυτάρια μεταφυτεύθηκαν σε δοχεία (οκτώ φυτάρια ανά δοχείο όγκου 500 ml) με μίγμα τύρφης: περλίτη (1:1, v/v) (Εικ. Π.Π.9). Τα δοχεία καλύφθηκαν με πλαστική μεμβράνη και τοποθετήθηκαν αρχικά σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών για μία εβδομάδα και στη συνέχεια στο θερμοκήπιο για περαιτέρω ανάπτυξη.

Μετά την ολοκλήρωση του εγκλιματισμού (1 μήνα), ακολούθησε μεταφύτευση των εγκλιματισμένων φυταρίων σε γλάστρα 10 cm σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (2:1, v/v) και λίπανση με $2,0 \text{ g L}^{-1}$ υδατοδιαλυτό λίπασμα (Nutrileaf 60, 20-20-20) μια φορά το μήνα για περαιτέρω ανάπτυξη.



Εικόνα II.Π.9. Φυτάρια *C. creticum*, τοποθετημένα στα δοχεία εγκλιματισμού, σε υπόστρωμα 1 τύρφη: 1 περλίτη (v/v).

II.Π.2.2.4 *Clinopodium nepeta*

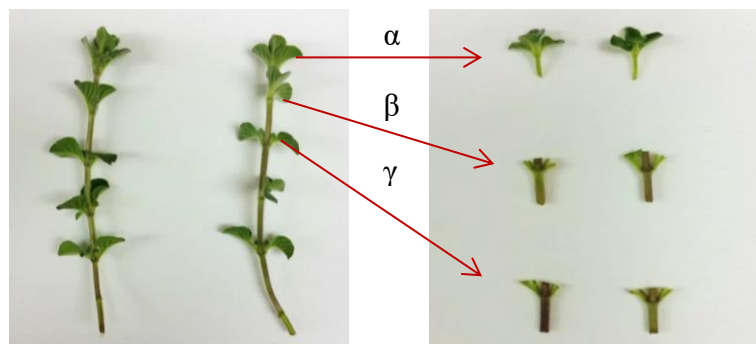
II.Π.2.2.4.1. Αρχική εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας

Από ενήλικα αυτοφυή φυτά

Βλαστοί, μήκους περίπου 10 cm, συλλέχθηκαν από επιλεγμένα, ενήλικα, αυτοφυή φυτά *C. nepeta*, που βρέθηκαν στον Αρχαιολογικό Χώρο Αμφιάρειο, Ωρωπός, Αττική (3817'28.4"N, 2350'46.7"E), τον Ιούλιο του 2012. Έγινε πολύ καλό ξέπλυμα των βλαστών με τρεχούμενο νερό βρύσης και τη συνέχεια έκφυτα κορυφής απολυμάνθηκαν επιφανειακά με αιθανόλη 90% για 10 sec και με υδατικό διάλυμα 10% χλωρίνης εμπορίου (4.6% w/v NaClO), το οποίο περιείχε 0.1% Tween 20 (προσκολλητική ουσία, Polyoxyethylene(20)sorbitan Monolaurate) υπό ανάδευση, για 15 min. Την απολύμανση ακολούθησαν τέσσερα τρίλεπτα ξεπλύματα με αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό, υπό συνεχή ανάδευση. Η εγκατάσταση των εκφύτων έγινε σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν στερεό (8 g L^{-1} άγαρ) υπόστρωμα MS με 30 g L^{-1} σακχαρόζη είτε χωρίς ή με $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA ή ZEAT.

Από ενήλικα φυτά αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο

Λόγω του υψηλού ποσοστού μολύνσεων στο πρώτο πείραμα πραγματοποιήθηκε και δεύτερη προσπάθεια εγκατάστασης αρχικής *in vitro* καλλιέργειας, τον Ιούλιο 2014, από έκφυτα κορυφής και κόμβου ενήλικων φυτών *C. nepeta* αναπτυσσόμενων στο θερμοκήπιο, με υψηλότερη συγκέντρωση υδατικού διαλύματος χλωρίνης (15%) (Εικ. II.Π.10α, β). Η εγκατάσταση των εκφύτων έγινε σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν στερεό (8 g L⁻¹ άγαρ) υπόστρωμα MS με 30 g L⁻¹ σακχαρόζη είτε χωρίς ή με 1,0 mg L⁻¹ BA ή ZEAT.



Εικόνα II.Π.10. Βλαστοί από ενήλικα αυτοφυή φυτά *C. nepeta* στο στάδιο λήψης εκφύτων κορυφής (α) και κόμβου (β).

Από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα

Μετά το τέλος της περιόδου βλάστησης των σπόρων, τα φυτωμένα σπορόφυτα μεταφέρθηκαν σε στερεό υπόστρωμα πλήρους δύναμης MS με 30 g L⁻¹ σακχαρόζη για 6 εβδομάδες, προκειμένου να αναπτυχθούν και να χρησιμοποιηθούν ως πηγή εκφύτων για την εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας. Η εγκατάσταση *in vitro* αρχικής καλλιέργειας από σπορόφυτα (Εικ. II.Π.11) πραγματοποιήθηκε στα ίδια υποστρώματα όπως περιγράφονται στο συγγενικό είδος *C. creticum* (αναλυτική περιγραφή στο Κεφάλαιο II.Π.2.2.3.1).



Εικόνα II.Π.11. Σπορόφυτα *C. nepeta* στο στάδιο λήψης εκφύτων κορυφής και κόμβου.

II.II.2.2.4.2. Πολλαπλασιασμός βλαστών σε *in vitro* καλλιέργεια

Εγκατεστημένη από ενήλικα αυτοφυή φυτά

Μετά από δύο υποκαλλιέργειες (1^η - 2^η) σε υπόστρωμα MS με 1,0 ή 2,0 mg L⁻¹ BA αντίστοιχα, για αύξηση του πολλαπλασιαστικού υλικού, διεξήχθη μια τρίτη υποκαλλιέργεια για να μελετηθεί η επίδραση του τύπου κυτοκινίνης (BA ή ZEA) και της συγκέντρωσης (0,5, 1,0, 2,0 mg L⁻¹) καθώς και του τύπου του εκφύτου (κορυφής ή κόμβου) στην παραγωγή βλαστών. Στην τέταρτη και πέμπτη υποκαλλιέργεια, χρησιμοποιήθηκαν δύο κυτοκινίνες, BA ή ZEAT, σε συγκέντρωση 1,0 mg L⁻¹ και δύο τύποι εκφύτου, κορυφής ή κόμβου, με στόχο να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα της τρίτης υποκαλλιέργειας στα συγκεκριμένα υποστρώματα, επιπλέον χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα χωρίς κυτοκινίνη (ως μάρτυρας).

Στην επόμενη υποκαλλιέργεια (6^η) εξετάστηκε η επίδραση του τύπου (BA, ZEAT, KIN 2iP) και συγκέντρωσης των κυτοκινινών (0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0 ή 8,0 mg L⁻¹). Τα έκφυτα (κορυφής ή κόμβου) που χρησιμοποιήθηκαν προήλθαν από υπόστρωμα MS χωρίς PGR. Ακολούθησε υποκαλλιέργεια (7^η) όπου τα έκφυτα (κορυφής ή κόμβου) τοποθετήθηκαν στο ίδιο υπόστρωμα από το οποίο προήλθαν. Στις δύο υποκαλλιέργειες 6^η και 7^η στις υψηλές συγκεντρώσεις κυτοκινινών προέκυψε το πρόβλημα της υπερενυδάτωσης με αποτέλεσμα την απώλεια μεγάλου μέρους του πολλαπλασιαστικού υλικού. Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν δύο υποκαλλιέργειες σε υπόστρωμα MS χωρίς PGRs για αύξηση του πολλαπλασιαστικού υλικού, με σκοπό τη συνέχιση των πειραμάτων (δεν ελήφθησαν μετρήσεις).

Για την αντιμετώπιση του φαινομένου της υπερενυδάτωσης αρχικά δοκιμάστηκε ο εμπλουτισμός του υποστρώματος με αυξίνη (NAA) (10^η υποκαλλιέργεια) και σε επόμενο πείραμα η αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ (11^η υποκαλλιέργεια). Όσον αφορά το πείραμα με την προσθήκη αυξίνης, χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα MS συμπληρωμένο με 0,5, 1,0, 2,0, 4,0 ή 8,0 mg L⁻¹ BA και 0,1 ή 0,5 mg L⁻¹ NAA, με όλους τους δυνατούς συνδυασμούς. Ενώ όσον αφορά το πείραμα με τις διαφορετικές συγκεντρώσεις άγαρ, χρησιμοποιήθηκε: α) υπόστρωμα MS με άγαρ 8 g L⁻¹ χωρίς PGRs ή εμπλουτισμένο με 8,0 mg L⁻¹ BA και 0,1 mg L⁻¹ NAA και β) υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με 8,0 mg L⁻¹ BA και άγαρ σε συγκέντρωση 8 ή 12 g L⁻¹.

Εγκατεστημένη από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα

Ο πολλαπλασιασμός των βλαστών σε *in vitro* καλλιέργεια εγκατεστημένη από ανεπτυγμένα σπορόφυτα πραγματοποιήθηκε στα ίδια υποστρώματα όπως περιγράφονται στο συγγενικό είδος *C. creticum* (αναλυτική περιγραφή στο Κεφάλαιο Π.Π.2.2.3.2).

Π.Π.2.2.4.3. *In vitro* ριζοβολία μικρομοσχευμάτων

Ριζοβολία μικρομοσχευμάτων από καλλιέργεια ενήλικων φυτών ή σποροφύτων

Η *in vitro* ριζοβολία των μικρομοσχευμάτων από το κορυφαίο τμήμα, μαζί με το επάκριο μερίστωμα, των μικροβλαστών και των συστάδων μικροβλαστών (Εικ. Π.Π.12) *C. nepeta*, από την καλλιέργεια των ενήλικων φυτών ή σποροφύτων πραγματοποιήθηκε στα ίδια υποστρώματα όπως περιγράφονται στο συγγενικό είδος *C. creticum* (αναλυτική περιγραφή στο Κεφάλαιο Π.Π.2.2.3.3).



Εικόνα Π.Π.12. Συστάδες μικροβλαστών *C. nepeta* πριν την τοποθέτησή τους για *in vitro* ριζοβολία.

Π.Π.2.2.4.4. Εγκλιματισμός φυταρίων *ex vitro*

Ο εγκλιματισμός των φυταρίων (Εικ. Π.Π.13) *ex vitro* πραγματοποιήθηκε στα ίδια υποστρώματα και στις ίδιες συνθήκες όπως περιγράφονται στο συγγενικό είδος *C. creticum* (αναλυτική περιγραφή στο Κεφάλαιο Π.Π.2.2.3.4).



Εικόνα Π.Π.13. Φυτάρια *C. nepeta*, τοποθετημένα στα δοχεία εγκλιματισμού, σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (1:1, v/v).

II.II.2.2.5 *Scabiosa hymettia*

II.II.2.2.5.1. Αρχική εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας

Από ενήλικα αυτοφυή φυτά

Βλαστοί, μήκους 10 cm, συλλέχθηκαν από επιλεγμένα, ενήλικα, αυτοφυή φυτά *S. hymettia* από την Πάρνηθα (38°13'51.91"N, 23°74'24.36"E), τον Απρίλιο 2013 (Εικ. II.II.14). Οι βλαστοί τοποθετούνταν σε δοχεία που περιείχε νερό βρύσης, με τέτοιο τρόπο ώστε η βάση τους (2 cm) να εμβαπτίζεται στο νερό. Στη συνέχεια μεταφέρονταν στο Εργαστήριο Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου όπου ξεκινούσε η διαδικασία εγκατάστασης *in vitro* καλλιεργειών. Αφού έγινε πολύ καλό ξέπλυμα των βλαστών με τρεχούμενο νερό βρύσης, τα έκφυτα (κορυφής - Εικ. II.II.14α) απολυμάνθηκαν επιφανειακά με αιθανόλη 90% για 15 sec και με υδατικό διάλυμα 20 ή 30% χλωρίνης εμπορίου (4.6% w/v NaClO), το οποίο περιείχε 0.1% Tween 20 (προσκολλητική ουσία, Polyoxyethylene(20)sorbitan Monolaurate) υπό ανάδευση, για 10 min. Την απολύμανση ακολούθησαν τέσσερα τρίλεπτα ξεπλύματα με αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό, υπό συνεχή ανάδευση. Η εγκατάσταση των εκφύτων έγινε σε δοκιμαστικούς σωλήνες που περιείχαν στερεό (8 g L⁻¹ άγαρ) υπόστρωμα MS με 30 g L⁻¹ σακχαρόζη και 1,0 mg L⁻¹ BA ή ZEAT.

Λόγω του υψηλού ποσοστού καψίματος των εκφύτων από τη χλωρίνη στο πρώτο πείραμα εγκατάστασης, πραγματοποιήθηκε και δεύτερο πείραμα εγκατάστασης εκφύτων κορυφής (Απρίλιο 2013) από ενήλικα αυτοφυή φυτά με χαμηλότερη συγκέντρωση υδατικού διαλύματος χλωρίνης (10 - 15%).

Τον Ιούλιο 2013 πραγματοποιήθηκε τρίτη συλλογή εκφύτων κορυφής από ενήλικα αυτοφυή φυτά, τα οποία καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS χωρίς PGRs ή εμπλουτισμένο με 1,0 mg L⁻¹ BA ή ZEAT. Η απολύμανση του φυτικού υλικού έγινε με εμβάπτιση των εκφύτων σε αιθανόλη 90% για 15 sec και με διάλυμα χλωρίνης εμπορίου 10 ή 15% (4.6% w/v NaClO) το οποίο περιείχε 0.1% Tween 20 (προσκολλητική ουσία, Polyoxyethylene(20)sorbitan Monolaurate, Merck), υπό συνεχή ανάδευση, για 10 min. Την απολύμανση ακολούθησαν τέσσερα τρίλεπτα ξεπλύματα με αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό, υπό συνεχή ανάδευση. Λόγω του υψηλού ποσοστού μολύνσεων στο τρίτο πείραμα εγκατάστασης στα επόμενα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν η συγκέντρωση του υδατικού διαλύματος χλωρίνης αυξήθηκε σε 20 - 30%.

Το Σεπτέμβριο και Οκτώβριο 2013 πραγματοποιήθηκαν συλλογές εκφύτων κορυφής, από ενήλικα αυτοφυή φυτά, τα οποία καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS χωρίς PGRs. Η απολύμανση που ακολουθήθηκε ήταν εμβάπτιση των εκφύτων σε αιθανόλη 90% για 15 sec και μετά σε διάλυμα χλωρίνης εμπορίου 20 ή 30% (4.6% w/v NaClO) το οποίο περιείχε 0.1% Tween 20 (προσκολλητική ουσία, Polyoxyethylene(20)sorbitan Monolaurate, Merck), υπό συνεχή ανάδευση, για 10 min. Την απολύμανση ακολούθησαν τέσσερα τρίλεπτα ξεπλύματα με αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό, υπό συνεχή ανάδευση. Όμως και με την αύξηση της συγκέντρωσης του υδατικού διαλύματος χλωρίνης, η μέθοδος είχε πλήρη αποτυχία εξ' αιτίας των μολύνσεων με αποτέλεσμα την ολοκληρωτική απώλεια των καλλιεργειών. Στην επόμενη προσπάθεια αρχικής *in vitro* εγκατάστασης αυξήθηκε ο χρόνος παραμονής των εκφύτων στο υδατικό διάλυμα χλωρίνης.

Τον Ιανουάριο 2014 πραγματοποιήθηκε συλλογή εκφύτων κορυφής, τα οποία καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS χωρίς PGRs. Η απολύμανση που ακολουθήθηκε ήταν εμβάπτιση των εκφύτων σε αιθανόλη 90% για 15 sec και μετά σε διάλυμα χλωρίνης εμπορίου 30% (4.6% w/v NaClO) το οποίο περιείχε 0.1% Tween 20 (προσκολλητική ουσία, Polyoxyethylene(20)sorbitan Monolaurate, Merck), υπό συνεχή ανάδευση, για 20 min. Την απολύμανση ακολούθησαν τέσσερα τρίλεπτα ξεπλύματα με αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό, υπό συνεχή ανάδευση. Λόγω του σχετικά υψηλού ποσοστού καψίματος των εκφύτων (50%) από το μεγάλο χρόνο παραμονής τους στο υδατικό διάλυμα χλωρίνης, στο επόμενο πείραμα μειώθηκε ο χρόνος απολύμανσης και αυξήθηκε ο χρόνος εμβάπτισης στην αιθανόλη.

Τον Απρίλιο 2014 πραγματοποιήθηκε συλλογή εκφύτων (κορυφής και πρώτου κόμβου), τα οποία καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS χωρίς PGRs. Γινόταν εμβάπτιση των εκφύτων σε αιθανόλη 90% για 1 min για τα έκφυτα κορυφής και για 5 min για τα έκφυτα πρώτου κόμβου. Ακολούθησε εμβάπτιση υπό συνεχή ανάδευση σε διάλυμα χλωρίνης εμπορίου 30% για 15 min για τα έκφυτα κορυφής και 20 min για τα έκφυτα 1ου κόμβου. Την απολύμανση ακολούθησαν τέσσερα τρίλεπτα ξεπλύματα με αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό, υπό συνεχή ανάδευση. Στα έκφυτα κορυφής έγινε πιο ήπια απολύμανση διότι ήταν πιο τρυφερά από τα έκφυτα του πρώτου κόμβου.

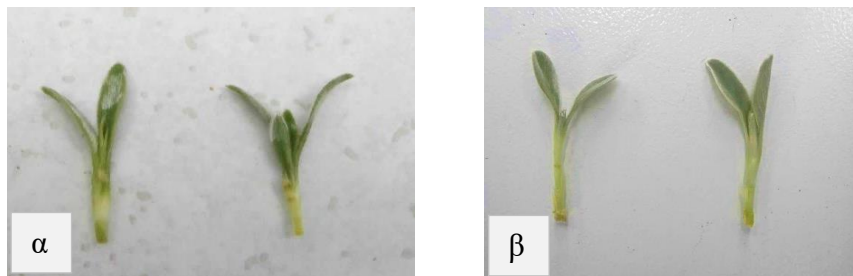
Το Μάιο 2014 πραγματοποιήθηκε ακόμα μία συλλογή εκφύτων (κορυφής), τα οποία καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS χωρίς PGRs. Λόγω του υψηλού ποσοστού μολύνσεων τον Απρίλιο 2014, αυξήθηκε ο χρόνος εμβάπτισης των εκφύτων κορυφής σε αιθανόλη από 1 min σε 5 min και ο χρόνος απολύμανσης σε διάλυμα χλωρίνης εμπορίου (4.6% w/v NaClO) 30% από 15 min στα 20 min. Το διάλυμα χλωρίνης περιείχε 0.1% Tween 20

(προσκολλητική ουσία, Polyoxyethylene(20)sorbitan Monolaurate, Merck), και εφαρμόστηκε υπό συνεχή ανάδευση.

Το Φεβρουάριο 2015 πραγματοποιήθηκε συλλογή εκφύτων (κορυφής), τα οποία καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS που περιείχε 0,5 ή 1,0 mg L⁻¹ BA. Η απολύμανση που ακολουθήθηκε ήταν εμβάπτιση των εκφύτων σε αιθανόλη 90% για 5 min και μετά σε διάλυμα χλωρίνης εμπορίου 30% (4.6% w/v NaClO) το οποίο περιείχε 0.1% Tween 20 (προσκολλητική ουσία, Polyoxyethylene(20)sorbitan Monolaurate, Merck) υπό συνεχή ανάδευση, για 20 min. Την απολύμανση ακολούθησαν τέσσερα τρίλεπτα ξεπλύματα με αποστειρωμένο αποσταγμένο νερό, υπό συνεχή ανάδευση. Όπως ήταν αναμενόμενο και αυτή η προσπάθεια για εγκατάστασης αρχικής καλλιέργειας είχε πλήρη αποτυχία λόγω του υψηλού ποσοστού μολύνσεων σε συνδυασμό με το υψηλό ποσοστό καψίματος των εκφύτων.

Από νεαρά φυτά αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο

Τον Οκτώβριο 2015 συλλέχθηκαν βλαστοί, μήκους 10 cm, από νεαρά φυτά (προερχόμενα από ριζοβολημένα μοσχεύματα, ηλικίας ενός έτους) που αναπτύσσονταν στο υαλόφρακτο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γ.Π.Α. (37°58'53,94"N, 23°42'25,01"E). Αφού έγινε πολύ καλό ξέπλυμα των βλαστών με τρεχούμενο νερό βρύσης, τα έκφυτα (κορυφής - Εικ. II.Π.14β) απολυμάνθηκαν με αιθανόλη 90% για 5 min και με υδατικό διάλυμα 30% χλωρίνης εμπορίου (4.6% w/v NaClO), το οποίο περιείχε 0.1% Tween 20 (προσκολλητική ουσία, Polyoxyethylene(20)sorbitan Monolaurate) υπό ανάδευση, για 10 min και τοποθετήθηκαν σε στερεό (8 g L⁻¹ άγαρ) υπόστρωμα MS με 30 g L⁻¹ σακχαρόζη και με 1,0 mg L⁻¹ BA.



Εικόνα II.Π.14. Έκφυτα κορυφής *S. hymettia* από ενήλικα, αυτοφυή φυτά (α) και από νεαρά φυτά αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου (β) μετά την απολύμανση και πριν την τοποθέτησή τους σε υπόστρωμα για εγκατάσταση αρχικής καλλιέργειας.

Λόγω του υψηλού ποσοστού καψίματος των εκφύτων από τη χλωρίνη στο πρώτο πείραμα εγκατάστασης από νεαρά φυτά, πραγματοποιήθηκε και δεύτερο πείραμα το Νοέμβριο 2015 με χαμηλότερη συγκέντρωση υδατικού διαλύματος χλωρίνης (20%) και μικρότερη παραμονή των εκφύτων στην αιθανόλη (1 min). Το πείραμα είχε πλήρη αποτυχία εξ' αιτίας των μολύνσεων με αποτέλεσμα την ολοκληρωτική απώλεια της καλλιέργειας.

Από ex vitro ανεπτυγμένα σπορόφυτα

Τον Αύγουστο 2015 πραγματοποιήθηκε συλλογή εκφύτων κορυφής από σπορόφυτα, τα οποία είχαν βλαστήσει σε *ex vitro* συνθήκες, σε πλαστικά κιβώτια σποράς με υπόστρωμα τύρφης: περλίτη στο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γ.Π.Α (37°58'58.0"N, 23°42'19.2"E). Αφού έγινε πολύ καλό ξέπλυμα του φυτικού υλικού με τρεχούμενο νερό βρύσης, τα έκφυτα απολυμάνθηκαν με αιθανόλη 90% για 1 min και με υδατικό διάλυμα χλωρίνης εμπορίου 20% για 20 min (4.6% w/v NaClO), το οποίο περιείχε 0.1% Tween 20 (προσκολλητική ουσία, Polyoxyethylene(20)sorbitan Monolaurate, Merck), υπό συνεχή ανάδευση. Την απολύμανση ακολούθησαν τέσσερα τρίλεπτα ξεπλύματα με αποστειρωμένο, αποσταγμένο νερό, υπό συνεχή ανάδευση. Η εγκατάσταση των εκφύτων έγινε σε στερεό (8 g L⁻¹ άγαρ) υπόστρωμα MS είτε χωρίς PGRs, είτε με 1,0 mg L⁻¹ BA ή ZEAT ή TDZ, είτε με 1,0 mg L⁻¹ BA ή ZEAT σε συνδυασμό με 0,1 mg L⁻¹ NAA.

Λόγω του υψηλού ποσοστού μολύνσεων των εκφύτων στο πρώτο πείραμα εγκατάστασης από *ex vitro* σπορόφυτα, πραγματοποιήθηκε και δεύτερο πείραμα το Νοέμβριο 2015 με υψηλότερη συγκέντρωση υδατικού διαλύματος χλωρίνης (30%) και μικρότερη παραμονή των εκφύτων στην αιθανόλη (30 sec). Και σε αυτό το πείραμα το ποσοστό μολύνσεων ήταν πολύ υψηλό (90 - 100%). Η εγκατάσταση των εκφύτων έγινε σε στερεό (8 g L⁻¹ άγαρ) υπόστρωμα MS είτε χωρίς ή με 1,0 mg L⁻¹ BA ή ZEAT.

Από in vitro ανεπτυγμένα σπορόφυτα

Λόγω αποτυχίας της βλάστησης των σπόρων *in vitro* δεν κατέστη δυνατή η εγκατάσταση *in vitro* αρχικής καλλιέργειας από σπορόφυτα.

II.Π.2.2.5.2. Πολλαπλασιασμός βλαστών σε *in vitro* καλλιέργεια

Εγκατεστημένη από ενήλικα αυτοφυή φυτά αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο

Μετά την εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας τον Ιανουάριο 2014 από ενήλικα αυτοφυή φυτά, ακολούθησε υποκαλλιέργεια εκφύτων κορυφής σε υπόστρωμα MS με 0,5 mg L⁻¹ ZEAT με στόχο τον πολλαπλασιασμό των βλαστών. Ακολούθησε δεύτερη υποκαλλιέργεια εκφύτων κορυφής σε υπόστρωμα με μισής δύναμης MS, και τρεις ακόμη υποκαλλιέργειες εκφύτων κορυφής και κόμβου σε υπόστρωμα MS. Στην επόμενη υποκαλλιέργεια τα έκφυτα κορυφής καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα με 1,0 mg L⁻¹ BA.

*Εγκατεστημένη από *ex vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα*

Μετά την εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας τον Αύγουστο 2015 από *ex vitro* σπορόφυτα, ακολούθησε υποκαλλιέργεια εκφύτων κορυφής και κόμβου σε υπόστρωμα με 1,0 mg L⁻¹ BA χωρίς ή με 0,1 mg L⁻¹ NAA, με στόχο την παραγωγή πολλαπλασιαστικού υλικού. Ακολούθησε δεύτερη υποκαλλιέργεια εκφύτων κορυφής σε υπόστρωμα με MS εμπλουτισμένο με 1,0 mg L⁻¹ BA.

II.Π.2.2.5.3. *In vitro* ριζοβολία μικρομοσχευμάτων

Μικρομοσχεύματα από το κορυφαίο τμήμα, μαζί με τον επάκριο μερίστωμα, των μικροβλαστών, μήκους 2,0 - 2,5 cm, ελήφθησαν από την *in vitro* καλλιέργεια που εγκαταστάθηκε από ενήλικα αυτοφυή φυτά και καλλιεργήθηκαν για *in vitro* ριζοβολία σε στερεό υπόστρωμα μισής δύναμης MS χωρίς IBA, ή σε υπόστρωμα MS με 0,5, 1,0, 2,0 ή 4,0 mg L⁻¹ IBA.

II.Π.2.2.5.4. Εγκλιματισμός φυταρίων *ex vitro*

Για εγκλιματισμό σε *ex vitro* συνθήκες τα ανεπτυγμένα έρριζα φυτάρια μεταφυτεύθηκαν σε δοχεία (οκτώ φυτάρια ανά δοχείο όγκου 500 ml) με μίγμα τύρφης: περλίτη (1:1, v/v). Τα δοχεία καλύφθηκαν με πλαστική μεμβράνη και τοποθετήθηκαν αρχικά σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών για μία εβδομάδα και στη συνέχεια στο θερμοκήπιο για περαιτέρω ανάπτυξη.

II.Π.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

II.Π.3.1 *Anthyllis barba-jovis*

II.Π.3.1.1 Αρχική εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας

Από ενήλικα καλλιεργούμενα φυτά

Όσον αφορά στην εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας *A. barba-jovis* με έκφυτα προερχόμενα από ενήλικα φυτά, παρουσιάστηκαν πολλές δυσκολίες, λόγω του υψηλού ποσοστού μολύνσεων. Πιο συγκεκριμένα έκφυτα που συλλέχθηκαν από ενήλικα καλλιεργούμενα φυτά είτε κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου είτε κατά τη διάρκεια της άνοιξης μολύνθηκαν όλα. (Πίν. II.Π.2).

Πίνακας II.Π.2. Αποτελεσματικότητα απολύμανσης σε πειράματα αρχικής εγκατάστασης εκφύτων *A. barba-jovis* από ενήλικα καλλιεργούμενα φυτά από το Βοτανικό Κήπο της Φιλοδασικής Ένωσης Αθηνών.

Προέλευση Εκφύτων	Έτος	Μήνας	Απολύμανση		Ποσοστό Μολύνσεων (%)
			Συγκέντρωση χλωρίνης εμπορίου (%)	Χρόνος Απολύμανσης (min)	
Έκφυτα ενήλικων φυτών	2013	Σεπ/ριος	15 ή 20 ή 30	10	100
	2013	Οκτ/ριος	20	10	100
	2014	Μάιος	30	15	100

Από νεαρά φυτά αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο

Το Φεβρουάριο 2014 πραγματοποιήθηκε εγκατάσταση αρχικής καλλιέργειας, με έκφυτα κορυφής που κόπηκαν από νεαρά φυτά αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο και καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS χωρίς ή με $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA ή ZEAT (Πίν. II.Π.3). Λόγω του μικρού ποσοστού αντίδρασης στο πρώτο πείραμα (Φεβρουάριος 2014), πραγματοποιήθηκαν άλλες τρεις προσπάθειες εγκατάστασης αρχικής καλλιέργειας, τον Ιούνιο 2014, με έκφυτα κορυφής και πρώτου κόμβου και το Φεβρουάριο 2015 και Οκτώβριο 2015 με έκφυτα πρώτου, δεύτερου, τρίτου και τέταρτου ορατού κόμβου.

Πίνακας Π.Π.3. Επίδραση του είδους των PGRs, στην αντίδραση εκφύτων κορυφής *A. barba-jovis* από νεαρά φυτά αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο το Φεβρουάριο 2014, κατά την αρχική εγκατάσταση.

PGRs (mg L ⁻¹)	Ποσοστό Βλαστ/σης ¹ (%)	Μέσος αριθμός βλαστών ²	Μέσο μήκος βλαστών ² (cm)	Μέσος αριθμός κόμβων ²	Δυν. Πολ/μού
0,0	0	0,0	0,0	0,0	0,0
1,0 BA (n=10)	30	2,7	1,2	1,0	0,8
1,0 ZEAT	0	0,0	0,0	0,0	0,0

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών² x Μέσος αριθμός κόμβων²

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενδατωμένους μαζί με μη υπερενδατωμένους βλαστούς

² Μη υπερενδατωμένοι βλαστοί

Η προσπάθεια για εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας από νεαρά φυτά που αναπτύσσονταν στο θερμοκήπιο ήταν επιτυχής με έκφυτα κορυφής, πρώτου και δεύτερου κόμβου, με μικρό όμως ποσοστό αντίδρασης (7 - 30%), σε υπόστρωμα με 0,5 - 1,5 mg L⁻¹ BA ή 0,5 - 1,0 mg L⁻¹ ZEAT (Πίν. Π.Π.3, Π.Π.4, Π.Π.5). Το επιμελές και σχολαστικό πλύσιμο των εκφύτων σε τρεχούμενο νερό βρύσης, ακολουθούμενο με εμβάπτισή τους σε αιθανόλη 90% για 10 sec και ακολούθως ανάδευση σε υδατικό διάλυμα χλωρίνης εμπορίου 30% για 10 min, είχε ως αποτέλεσμα τη σχετικά επιτυχή απολύμανση των εκφύτων, αλλά πιθανώς οδήγησε σε καταστροφή των ιστών τους (κάψιμο) δεδομένου ότι τα περισσότερα έκφυτα που δεν μολύνθηκαν δεν αντέδρασαν. Στην πρώτη και δεύτερη προσπάθεια εγκατάστασης το ποσοστό μολύνσεων ήταν μηδενικό, στην τρίτη ήταν σε μέτριο (31 - 40%), ενώ στην τέταρτη προσπάθεια έφτασε το 78 - 87% (δεν παρουσιάζονται δεδομένα). Χαμηλότερη συγκέντρωση χλωρίνης (20%) για 10 min, είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση υψηλού ποσοστού (78 - 87%) μολύνσεων των εκφύτων (Οκτώβριος 2015). Στο υπόστρωμα με 1,0 mg L⁻¹ BA κατά την εγκατάσταση αρχικής καλλιέργειας το Φεβρουάριο 2015, σχηματίστηκαν περισσότεροι βλαστοί ανά έκφυτο (3,5 βλαστοί/ έκφυτο) σε σύγκριση με τα άλλα υποστρώματα, ενώ το μήκος των παραχθέντων βλαστών ήταν παρόμοιο σε όλες τις αρχικές καλλιέργειες σε όλα τα υποστρώματα (Πίν. Π.Π.3, Π.Π.4, Π.Π.5, Εικ. Π.Π.15).

Πίνακας II.Π.4. Επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης των PGRs, στην αντίδραση εκφύτων κορυφής και πρώτου κόμβου του *A. barba-jonis* από νεαρά φυτά αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο τον Ιούνιο 2014, κατά την αρχική εγκατάσταση.

PGRs (mg L ⁻¹)	Ποσοστό Βλαστ/σης ¹ (%)	Μέσος αριθμός βλαστών ²	Μέσο μήκος βλαστών ² (cm)	Μέσος αριθμός κόμβων ²	Δυν. Πολ/μού
0,0	4 c	2,0 a	1,5 a	1,5 a	0,1 a
0,5 BA	8 b	2,0 a	1,4 a	1,5 a	0,2 a
1,0 BA	13 a	2,0 a	1,3 a	1,4 a	0,4 a
0,5 ZEAT	8 b	2,0 a	1,5 a	1,5a	0,2 a
1,0 ZEAT	14 a	2,3 a	1,6 a	1,5 a	0,5 a
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	*	NS	NS	NS	NS

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών² x Μέσος αριθμός κόμβων², n=24.

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς

² Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί

Πίνακας II.Π.5. Επίδραση του BA, σε έκφυτα κόμβου από φυτά θερμοκηπίου (1^{ου} έως 4^{ου}, συνολικά), στο στάδιο της αρχικής εγκατάστασης *in vitro* καλλιέργειας του *A. barba-jonis*, που προήλθαν από νεαρά φυτά αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο το Φεβρουάριο 2015.

BA (mg L ⁻¹)	Ποσοστό Βλαστ/σης ¹ (%)	Μέσος αριθμός βλαστών ²	Μέσο μήκος βλαστών ² (cm)	Μέσος αριθμός κόμβων ²	Μέσος Αριθμός Υπερενυδατωμ ένων Βλαστών ³	Δυν. Πολ/ σμού
0,0 (n=0)	0	0,0 c	0,0 b	0,0 b	0,0 c	0,0 c
0,5 (n=0)	0	0,0 c	0,0 b	0,0 b	0,0 c	0,0 c
1,0 (n=5)	8	3,5 a	0,9 a	1,3 a	1,2 a	0,4 a
1,5 (n=4)	7	1,0 b	0,7 a	1,0 a	0,5 b	0,1 b
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	-	***	*	***	***	*

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

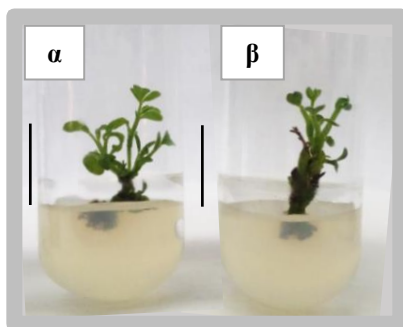
*, ***: σημαντικά σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,001$, αντίστοιχα.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών² x Μέσος αριθμός κόμβων²

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς

² Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί

³ Υπερενυδατωμένοι βλαστοί



Εικόνα II.Π.15. Καλλιέργεια κόμβων από φυτά θερμοκηπίου, σε στερεό υπόστρωμα MS με 1,0 (α) ή 1,5 (β) mg L⁻¹ BA. Η κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει μήκος 1 cm.

Από in vitro ανεπτυγμένα σπορόφυτα

Πραγματοποιήθηκαν τρεις εγκαταστάσεις αρχικής καλλιέργειας από *in vitro* αναπτυγμένα σπορόφυτα, ήτοι, τον Απρίλιο 2013, Ιανουάριο 2015 και Μάιο 2015. Τον Απρίλιο 2013 έκφυτα κορυφής και κόμβου που ελήφθησαν από δύο νεαρά *in vitro* αναπτυγμένα σπορόφυτα, καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS που περιείχε $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA. Στη δεύτερη εγκατάσταση που πραγματοποιήθηκε τον Ιανουάριο 2015, έκφυτα κοτυληδικού κόμβου καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS χωρίς PGRs ή με $0,5$ ή $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA ή $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA ή συνδυασμό αυτών (Εικ. II.Π.16). Το Μάιο 2015 έκφυτα κορυφής, πρώτου και κοτυληδικού κόμβου καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS ή SH ή WPM χωρίς PGRs ή με $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ BA. Η επιλογή των τριών θρεπτικών υποστρωμάτων που δοκιμάστηκαν (MS, WPM και SH) για την *in vitro* αρχική εγκατάσταση καλλιεργειών από σπορόφυτα, στηρίχθηκε σε μια υπάρχουσα βιβλιογραφική αναφορά για ένα άλλο είδος *Anthyllis*, το *A. cytisoides* (Gavidia *et al.*, 1997), ενώ ο εμπλουτισμός του υποστρώματος με $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ BA σε συνδυασμό με $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA, από τη προηγούμενη εγκατάσταση αρχικής καλλιέργειας το Ιανουάριο 2015, όπου έδωσε το υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού.

Η εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας *A. barba-jovis* με έκφυτα προερχόμενα από σπορόφυτα, δεν παρουσίασε καμία δυσκολία. Έκφυτα κορυφής ή πρώτου κόμβου ή κοτυληδικού κόμβου αντέδρασαν σε πολύ υψηλό ποσοστό (85 - 100%) σε όλα τα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν, ενώ το ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς ήταν σχετικά μικρό (5 - 11%) (Πίν. II.Π.6, II.Π.7, II.Π.8).

Όσον αφορά τον μέσο αριθμό των παραχθέντων βλαστών ήταν παρόμοιος σε όλα τα θρεπτικά υποστρώματα χωρίς την παρουσία PGRs, ανεξάρτητα από τον τύπο του εκφύτου (Πίν. II.Π.6, II.Π.7, II.Π.8). Στα υποστρώματα με BA/NAA η υψηλότερη παραγωγή βλαστών παρατηρήθηκε στα έκφυτα κορυφής στο θρεπτικό υπόστρωμα MS χωρίς διαφορά από τα έκφυτα πρώτου κόμβου στο θρεπτικό υπόστρωμα SH (Πίν. II.Π.8). Η παρουσία PGRs στα υποστρώματα είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό περισσότερων βλαστών (σχεδόν διπλάσιο αριθμό) σε σύγκριση με τα υποστρώματα χωρίς PGRs ανεξάρτητα του τύπου των εκφύτων ή του θρεπτικού υποστρώματος (Πίν. II.Π.6, II.Π.7, II.Π.8). Υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού παρατηρήθηκε στα υποστρώματα που περιείχαν BA/NAA ανεξαρτήτως του τύπου του εκφύτου σε σύγκριση με τα έκφυτα χωρίς την παρουσία PGRs, λόγω υψηλότερης παραγωγής βλαστών (Πίν. II.Π.6, II.Π.7, II.Π.8).

Επιπλέον στα υποστρώματα που δεν περιείχαν NAA παρατηρήθηκε υψηλό ποσοστό ριζοβολίας, ενώ τα υποστρώματα με παρουσία NAA επέφεραν υψηλό ποσοστό

καλογένεσης και στους τρεις τύπους εκφύτων. Πιο συγκεκριμένα το υψηλότερο ποσοστό ριζοβολίας παρατηρήθηκε στα έκφυτα κοτυληδικού κόμβου (64% ή 71% ή 90% στο υπόστρωμα SH ή MS ή WPM αντίστοιχα), ενώ το υψηλότερο ποσοστό καλογένεσης παρατηρήθηκε στα έκφυτα πρώτου κόμβου (74% ή 89% ή 100% στο υπόστρωμα 0,5/0,1 mg L⁻¹ BA/NAA SH ή MS ή WPM αντίστοιχα) (δεν παρουσιάζονται δεδομένα).

Πίνακας Π.Π.6. Αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου του *A. barba-jovis*, που προήλθαν από *in vitro* αναπτυγμένα σπορόφυτα τον Απρίλιο 2013, κατά την αρχική καλλιέργεια.

BA (mg L ⁻¹)	Ποσοστό (%)		Μέσος Αριθμός Βλαστών ³	Μέσο Μήκος Βλαστών ³ (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ³	Μέσος Αριθμός Υπερενδατωμέν ων Βλαστών ⁴	Δυν. Πολ/ σμού
	Βλαστ/ ση ¹	Βλαστ/ ση ²					
1,0	100	0	2,3	0,9	1,2	0,0	2,8

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών³ x Μέσος αριθμός κόμβων³, n=7.

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενδατωμένους μαζί με μη υπερενδατωμένους βλαστούς

² Τα έκφυτα σχημάτισαν μόνο υπερενδατωμένους βλαστούς

³ Μη υπερενδατωμένοι βλαστοί

⁴ Υπερενδατωμένοι βλαστοί

Πίνακας Π.Π.7. Αντίδραση εκφύτων κοτυληδικού κόμβου του *A. barba-jovis*, που προήλθαν από *in vitro* αναπτυγμένα σπορόφυτα τον Ιανουάριο 2015, κατά την αρχική καλλιέργεια στα αναγραφόμενα υποστρώματα.

BA / NAA (mg L ⁻¹) / (mg L ⁻¹)	Ποσοστό (%)		Μέσος Αριθμός Βλαστών ³	Μέσο Μήκος ³ (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ³	Μέσος Αριθμός Υπερενδατωμέν ων Βλαστών ⁴	Δυν. Πολ/ σμού
	Βλαστ/ ση ¹	Βλαστ/ ση ²					
0,0 / 0,0	96 a	0	1,1 c	1,2 b	1,6 b	0,2 c	1,6 d
0,0 / 0,1	91 b	5 c	1,1 c	1,2 b	1,8 b	0,2 c	1,8 d
0,5 / 0,0	83 d	9 b	1,3 bc	1,4 ab	2,0 b	0,4 b	2,2 c
0,5 / 0,1	87 c	7 c	1,6 ab	1,7 a	2,9 a	0,0 d	4,0 b
1,0 / 0,0	87 c	11 a	1,9 a	1,2 b	1,9 b	0,6 a	3,1 b
1,0 / 0,1	85 cd	7 c	1,9 a	1,5 ab	2,7 a	0,2 c	4,4 a
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***	***	***	***	***	***	***

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

***: σημαντικά σε $P \leq 0,001$, n=39-48.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών³ x Μέσος αριθμός κόμβων³

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενδατωμένους μαζί με μη υπερενδατωμένους βλαστούς

² Τα έκφυτα σχημάτισαν μόνο υπερενδατωμένους βλαστούς

³ Μη υπερενδατωμένοι βλαστοί

⁴ Υπερενδατωμένοι βλαστοί

Πίνακας II.Π.8. Επίδραση τύπου εκφύτου, θρεπτικού υποστρώματος και PGRs στην αντίδραση εκφύτων (κορυφής, πρώτου ή κοτυληδικού κόμβου) του *A. barba-jovis* που προήλθαν από *in vitro* αναπτυγμένα σπορόφυτα το Μάιο 2015, κατά την αρχική καλλιέργεια.

Θρεπτικό υπόστρωμα / BA (mg L ⁻¹) / NAA (mg L ⁻¹)	Ποσοστό (%)		Μέσος	Μέσο	Μέσος	Μέσος Αριθμός	Δυν.
	Βλαστ/ ση ¹	Βλαστ/ ση ²	Αριθμός Βλαστών ³	Μήκος Βλαστών ³ (cm)	Αριθμός Κόμβων ³	Υπερενυδατωμ ένων Βλαστών ⁴	Πολ/ σμού
Έκφυτα κορυφής							
MS / 0,0 / 0,0	100 a	0 c	1,0 h	0,9 f	1,6 e	0,0 d	1,6 f
MS / 0,5 / 0,1	100 a	0 c	2,5 a	2,6 a	3,4 b	0,5 b	8,5 a
SH / 0,0 / 0,0	100 a	0 c	1,1 gh	1,2 ef	1,8 de	0,0 d	1,9 f
SH / 0,5 / 0,1	90 c	10 a	1,9 bc	1,3 de	2,5 cd	1,3 a	4,3 cd
WPM / 0,0 / 0,0	100 a	0 c	1,0 h	1,5 cde	1,8 de	0,0 d	1,8 f
WPM / 0,5 / 0,1	100 a	0 c	1,7 cd	1,3 def	1,9 de	0,0 d	3,2 de
Έκφυτα πρώτου κόμβου							
MS / 0,0 / 0,0	100 a	0 c	1,1 gh	2,6 a	3,3 b	0,0 d	3,6 cd
MS / 0,5 / 0,1	95 b	5 b	1,8 cd	1,7 bc	4,4 a	0,1 c	7,5 b
SH / 0,0 / 0,0	100 a	0 c	1,1 gh	1,1 ef	1,5 e	0,0 d	1,7 f
SH / 0,5 / 0,1	95 b	5 b	2,2 ab	2,1 b	4,2 a	0,3 c	8,8 a
WPM / 0,0 / 0,0	100 a	0 c	1,2 fgh	1,2 ef	1,3 e	0,0 d	1,6 f
WPM / 0,5 / 0,1	100 a	0 c	1,4 efg	1,8 bc	2,9 bc	0,0 d	4,1 cd
Έκφυτα κοτυληδικού κόμβου							
MS / 0,0 / 0,0	85 d	0 c	1,2 fgh	0,9 f	1,5 e	0,0 d	1,5 f
MS / 0,5 / 0,1	95 b	5 b	1,6 cde	1,7 bcd	3,2 bc	0,6 b	4,4 c
SH / 0,0 / 0,0	95 b	0 c	1,2 fgh	2,0 b	2,7 bc	0,0 d	3,1 de
SH / 0,5 / 0,1	90 c	5 b	1,6 cde	1,4 cde	3,0 bc	0,3 c	4,3 cd
WPM / 0,0 / 0,0	100 a	0 c	1,2 fgh	1,2 ef	1,9 de	0,0 d	2,3 ef
WPM / 0,5 / 0,1	100 a	0 c	1,5 def	1,2 ef	1,8 de	0,0 d	2,7 ef
<i>F</i> _{Εκφύτου}	-	-	-	-	-	-	-
<i>F</i> _{Υποστρώματος}	-	-	*	-	-	-	-
<i>F</i> _{Συγκέντρωσης}	-	-	-	-	-	-	-
<i>F</i> _{Εκφύτου x Υπόστρωμα}	-	-	NS	-	-	-	-
<i>F</i> _{Υπόστρωμα x Συγκέντρωση}	-	-	NS	-	-	-	-
<i>F</i> _{Εκφύτου x Συγκέντρωση}	-	-	**	-	-	-	-
<i>F</i> _{Εκφύτου x Υπόστρωμα x Συγκέντρωση}	*	**	NS	***	***	**	***
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***	***	***	***	***	***	***

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικά ή *, **, ***: σημαντικά σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$, $P \leq 0,001$, αντίστοιχα, $n=20$.

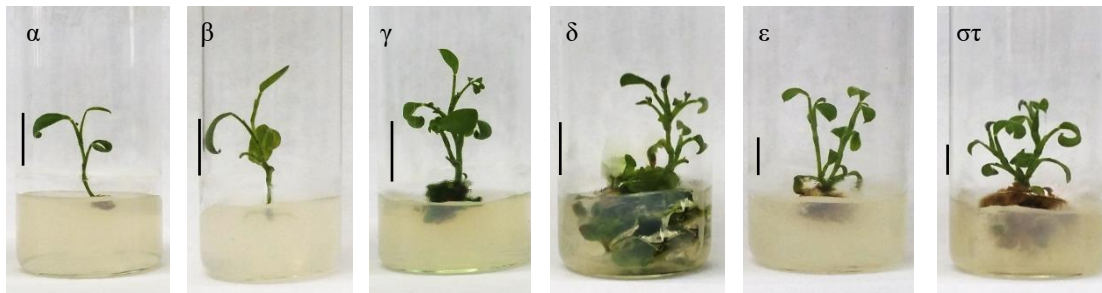
Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών³ x Μέσος αριθμός κόμβων³

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς

² Τα έκφυτα σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς

³ Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί

⁴ Υπερενυδατωμένοι βλαστοί



Εικόνα II.16. Καλλιέργεια κοτυληδικών κόμβων σε υπόστρωμα MS χωρίς PGRs (α) ή εμπλουτισμένο με $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA (β) ή $0,5$ (γ) ή $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA (δ) ή συνδυασμό αυτών (ε, στ), αντίστοιχα. Η κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει μήκος 1 cm.

II.3.1.2 Πολλαπλασιασμός βλαστών σε *in vitro* καλλιέργεια

Εγκατεστημένη από νεαρά φυτά αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο

Στις υποκαλλιέργειες που ακολούθησαν την πρώτη (Φεβρουάριος 2014) και τρίτη (Ιούνιος 2014) αρχική καλλιέργεια εκφύτων από νεαρά φυτά θερμοκηπίου δεν παρατηρήθηκε αντίδραση των εκφύτων.

Στην υποκαλλιέργεια που ακολούθησε την αρχική καλλιέργεια εκφύτων από νεαρά φυτά θερμοκηπίου, που εγκαταστάθηκε το Φεβρουάριο 2015, στόχος ήταν η αύξηση του πολλαπλασιαστικού υλικού με σκοπό τη συνέχιση των πειραμάτων. Για αυτό το λόγο επιλέχθηκε το υπόστρωμα που απέδωσε καλύτερα κατά την αρχική εγκατάσταση της καλλιέργειας (Πίν. II.9). Έτσι έκφυτα κορυφής και κόμβου καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS χωρίς (μάρτυρας) ή με $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA (καλύτερο υπόστρωμα). Το ποσοστό των εκφύτων που αντέδρασαν και σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς ήταν 100% και στα δύο υποστρώματα που δοκιμάστηκαν (Πίν. II.9), ενώ δεν παρατηρήθηκαν έκφυτα τα οποία να φέρουν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς. Η παρουσία του BA στο υπόστρωμα αύξησε τον αριθμό των παραγόμενων βλαστών ανά έκφυτο και το μήκος των αντίστοιχων βλαστών (Πίν. II.9, Εικ. II.17). Επιπλέον η παρουσία BA στο υπόστρωμα οδήγησε στην εμφάνιση υπερενυδατωμένων βλαστών σε ποσοστό 26%. Το δυναμικό πολλαπλασιασμού ήταν υψηλότερο στο υπόστρωμα με $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA, λόγω μεγαλύτερου αριθμού βλαστών ανά έκφυτο και μεγαλύτερου αριθμού κόμβων ανά βλαστό (Πίν. II.9).

Πίνακας Π.Π.9. Επίδραση του BA στην αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου, κατά την πρώτη υποκαλλιέργεια του *A. barba-jovis*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από νεαρά φυτά το Φεβρουάριο 2015.

BA (mg L ⁻¹)	Ποσοστό Βλαστ/σης ¹ (%)	Μέσος Αριθμός Βλαστών ²	Μέσο Μήκος Βλαστών ² (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ²	Μέσος Αριθμός Υπερενυδατωμ ένων Βλαστών ³	Δυν. Πολ/ σμού
0,0	100	1,0 b	0,9 b	1,3 b	0,0 b	1,6 b
1,0	100	6,1 a	1,5 a	1,8 a	2,1 a	10,1 a
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	-	***	*	***	***	**

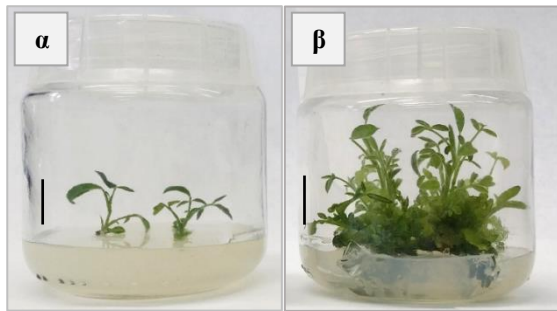
Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$, $n=16$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών² x Μέσος αριθμός κόμβων²

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς

² Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί

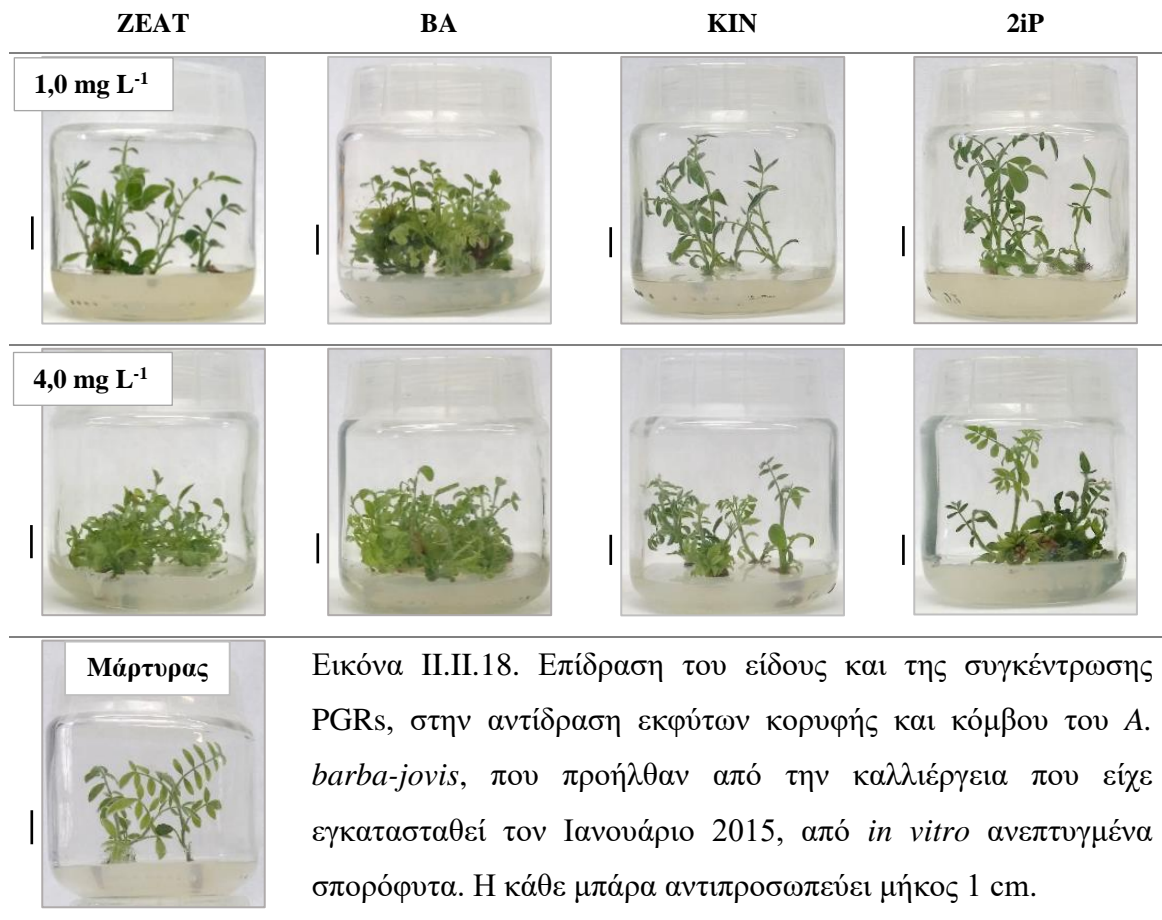
³ Υπερενυδατωμένοι βλαστοί



Εικόνα Π.Π.17. Πρώτη υποκαλλιέργεια του *A. barba-jovis* θερμοκηπιακής προέλευσης, σε υπόστρωμα MS χωρίς PGRs (α) ή εμπλουτισμένο με 1,0 mg L⁻¹ BA (β). Η κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει μήκος 1 cm.

Στη δεύτερη υποκαλλιέργεια, στην οποία διερευνήθηκε η επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης κυτοκινίνης στον πολλαπλασιασμό των βλαστών, σημειώθηκε επίσης υψηλό ποσοστό αντίδρασης (100%) σε όλα τα υποστρώματα. Στα υποστρώματα που περιείχαν 4,0 mg L⁻¹ ZEAT ή BA παρατηρήθηκε υψηλό ποσοστό εκφύτων που σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς (43 ή 55% αντίστοιχα) (Πίν. Π.Π.10). Η διπαραγοντική ανάλυση ανέδειξε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του είδους και της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης σε όλες τις παραμέτρους που μετρήθηκαν (Πίν. Π.Π.10). Η παρουσία του BA στο υπόστρωμα αύξησε τον αριθμό των παραγόμενων βλαστών ανά έκφυτο. Υψηλότερη παραγωγή κανονικών (φυσιολογικών) βλαστών (9,7 - 11,0 βλαστοί/έκφυτο) παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα με BA σε συγκέντρωση 0,5 ή 2,0 ή 4,0 mg L⁻¹, ενώ τα υποστρώματα που περιείχαν 2iP και KIN έδωσαν μικρότερη παραγωγή βλαστών (1,2 - 3,0 βλαστοί/έκφυτο), αλλά μεγαλύτερου μήκους βλαστούς σε σύγκριση με τα υποστρώματα που περιείχαν BA και ZEAT (Πίν. Π.Π.10, Εικ. Π.Π.18). Το υπόστρωμα χωρίς PGRs έδωσε το μικρότερο αριθμό και μήκος βλαστών (1,0 βλαστοί/έκφυτο, μήκους 1,0 cm). Τα υποστρώματα που περιείχαν 2iP σε συγκέντρωση 0,5 ή 1,0 ή 1,5 mg L⁻¹ προώθησαν το σχηματισμό

περισσότερων κόμβων (3,7 - 4,1 κόμβοι/βλαστό), ενώ παρόμοια επίδραση μεταξύ τους είχαν τα υποστρώματα με ZEAT και KIN (Πίν. II.Π.10, Εικ. II.Π.18). Τα υποστρώματα που περιείχαν κυτοκινίνη (BA ή ZEAT ή KIN ή 2iP) σε συγκέντρωση $4,0 \text{ mg L}^{-1}$, παρουσίασαν τη μικρότερη επιμήκυνση των βλαστών και κατ' επέκταση και το μικρότερο αριθμό κόμβων. Υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού έδωσαν τα υποστρώματα που περιείχαν BA σε συγκεντρώσεις $1,0$ ή $1,5$ ή $2,0 \text{ mg L}^{-1}$, λόγω του υψηλότερου μέσου αριθμού βλαστών (Πίν. II.Π.10). Η παρουσία κυτοκινίνης BA, ZEAT ή 2iP είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό υπερενυδατωμένων βλαστών σε υψηλό ποσοστό (20 - 63%), επιπλέον η αύξηση της συγκέντρωσης κυτοκινίνης στο υπόστρωμα οδήγησε σε αύξηση του αριθμού των υπερενυδατωμένων βλαστών ανά έκφυτο (Πίν. II.Π.10, Εικ. II.Π.18). Ο υψηλότερος μέσος αριθμός υπερενυδατωμένων βλαστών παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα που περιείχε $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA ή ZEAT ($5,7$ ή $6,4$ υπερενυδατωμένοι βλαστοί/ έκφυτο, αντίστοιχα) (Πίν. II.Π.10, Εικ. II.Π.18). Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του BA ή ZEAT είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση τόσο των υπερενυδατωμένων όσο και των μη υπερενυδατωμένων βλαστών.



Πίνακας Π.Π.10. Επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης PGRs στην αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου, κατά τη δεύτερη υποκαλλιέργεια του *A. barba-jovis*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από νεαρά φυτά, το Φεβρουάριο 2015.

PGRs (mg L ⁻¹)	Ποσοστό (%)		Μέσος Αριθμός Βλαστών ³	Μέσο Μήκος Βλαστών ³ (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ³	Μέσος Αριθμός Υπερενυδατωμ ένων Βλαστών ⁴	Δυν. Πολ/ σμού
	Βλαστ/ ση ¹	Βλαστ/ ση ²					
0,0 ±	100 a	0 g	1,0 i	1,0 ghi	1,4 fgh	0,0 j	1,4 i
0,5 ZEAT	91 d	9 d	2,3 fgh	1,5 def	2,2 e	1,5 fg	4,6 fg
1,0 ZEAT	94 c	6 e	2,7 fg	1,5 def	2,2 e	1,1 g	5,6 ef
1,5 ZEAT	88 e	2 f	4,2 cd	1,6 de	2,8 bcd	1,9 e	10,4 c
2,0 ZEAT	94 c	6 e	5,5 c	1,4 ef	2,4 de	1,2 g	12,4 b
4,0 ZEAT	57 f	43 b	6,9 bc	0,6 k	1,1 gh	6,7 a	4,3 fg
0,5 BA	88 e	12 c	4,2 de	0,9 hij	1,5 fgh	1,9 e	5,5 de
1,0 BA	100 a	0 g	7,5 bc	1,3 efg	2,2 e	2,7 cd	16,5 a
1,5 BA	97 b	3 f	10,8 a	0,9 ij	1,5 fgh	1,5 fg	15,7 a
2,0 BA	94 c	6 e	11,0 a	0,9 ij	1,6 fg	2,4 d	16,5 a
4,0 BA	45 g	55 a	9,7 b	0,5 k	1,0 h	5,4 b	4,4 efg
0,5 KIN	100 a	0 g	1,2 hi	1,2 fgh	2,3 de	0,3 hi	2,8 gh
1,0 KIN	97 b	3 f	1,2 hi	1,8 cd	2,7 cd	0,1 i	3,1 gh
1,5 KIN	94 c	6 e	1,7 ghi	2,0 c	3,0 bc	0,5 hi	4,8 fg
2,0 KIN	100 a	0 g	1,3 hi	1,2 fgh	2,4 de	0,3 hi	3,1 gh
4,0 KIN	94 c	6 e	1,8 ghi	0,9 hij	1,4 fgh	0,2 i	2,4 hi
0,5 2iP	100 a	0 g	1,5 ghi	3,6 a	3,9 a	1,7 e	5,9 de
1,0 2iP	97 b	3 f	1,8 fgh	2,9 b	3,7 a	1,2 g	6,5 de
1,5 2iP	100 a	0 g	1,7 ghi	2,9 b	4,1 a	1,8 e	7,0 cd
2,0 2iP	97 b	3 f	3,0 ef	2,1 c	3,2 b	1,1 g	9,3 c
4,0 2iP	95 bc	5 e	2,0 fgh	1,0 ghi	1,6 f	1,2 g	3,0 gh
<i>F</i> _{PGRs}	-	-	-	-	-	-	-
<i>F</i> _{Συγκέντρωση}	-	-	-	-	-	-	-
<i>F</i> _{PGRs x Συγκέντρωση}	***	***	***	***	***	***	***
<i>F</i> _{One-way ANOVA}	***	***	***	***	***	***	***

± Τα δεδομένα δεν συμμετέχουν στην 2-way ANOVA

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

***: σημαντικά σε $P \leq 0,001$, $n=40$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών³ x Μέσος αριθμός κόμβων³

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς

² Τα έκφυτα σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς

³ Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί

⁴ Υπερενυδατωμένοι βλαστοί

Δεδομένου ότι το υπόστρωμα με 4,0 ή 8,0 mg L⁻¹ BA έδωσε τον υψηλότερο αριθμό βλαστών σε σύνολο, κανονικών και υπερενυδατωμένων βλαστών στο προηγούμενο πείραμα, δοκιμάστηκε ο εμπλουτισμός του υποστρώματος αυτού με αυξίνη (NAA) με ταυτόχρονη αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ, με σκοπό την αντιμετώπιση της υπερενυδάτωσης των βλαστών και την αύξηση του μέσου αριθμού των κανονικών βλαστών ανά έκφυτο. Για το λόγο αυτό χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα MS στερεοποιημένο με 8 ή 12 g L⁻¹ άγαρ, εμπλουτισμένο με 4,0 mg L⁻¹ BA σε συνδυασμό με 0,1 ή 0,5 mg L⁻¹ NAA, και MS με 8 g L⁻¹ άγαρ χωρίς PGRs (μάρτυρας). Το ποσοστό των εκφύτων που αντέδρασαν διατηρήθηκε υψηλό (100%) σε όλα τα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν. Στο υπόστρωμα με 4,0 mg L⁻¹ BA χωρίς NAA στερεοποιημένο με 8 g L⁻¹ άγαρ παρατηρήθηκε υψηλό ποσοστό εκφύτων (40%) που σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς (Πίν. Π.Π.11). Το χαμηλότερο ποσοστό υπερενυδατωμένων βλαστών παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα με 12 g L⁻¹ άγαρ και συνδυασμό BA με 0,1 ή 0,5 mg L⁻¹ NAA (24% ή 23% αντίστοιχα). Ο μεγαλύτερος αριθμός κανονικών βλαστών, παρατηρήθηκε στα υποστρώματα με 12 g L⁻¹ άγαρ και συνδυασμό BA με 0,1 mg L⁻¹ NAA (7,6 βλαστοί/έκφυτο), ενώ ο μάρτυρας έδωσε το μικρότερο αριθμό (1,0 βλαστοί/έκφυτο) και μήκος (0,6 cm) βλαστών (Πίν. Π.Π.11, Εικ. Π.Π.19). Το υπόστρωμα που στερεοποιήθηκε με 8 g L⁻¹ άγαρ και περιείχε 4,0 mg L⁻¹ BA χωρίς NAA έδωσε το μεγαλύτερο αριθμό βλαστών ανά έκφυτο (12,5), όμως οι περισσότεροι (9,2) εξ' αυτών ήταν υπερενυδατωμένοι (Εικ. Π.Π.19). Οι κανονικοί βλαστοί ήταν και μεγαλύτερου μήκους (1,8 cm), σε σύγκριση με τους βλαστούς στις άλλες επεμβάσεις (Εικ. Π.Π.19). Στο μήκος των βλαστών παρατηρήθηκε μικρή επίδραση των διαφόρων συγκεντρώσεων άγαρ και NAA, το οποίο κυμάνθηκε από 1,0 - 1,8 cm στις διάφορες επεμβάσεις. Γενικά, διαπιστώθηκε ότι η προσθήκη της αυξίνης είχε θετική επίδραση στον έλεγχο της υπερενυδάτωσης των βλαστών. Ο συνδυασμός 4,0 mg L⁻¹ BA με 0,1 ή 0,5 mg L⁻¹ NAA και στερεοποίηση με 12 g L⁻¹ συνετέλεσε στη μείωση του αριθμού των υπερενυδατωμένων βλαστών και στην αύξηση του δυναμικού πολλαπλασιασμού (Πίν. Π.Π.11). Επιπλέον στα υποστρώματα που περιείχαν NAA παρατηρήθηκε καλογένεση σε ποσοστό από 70 - 100% (δεν παρουσιάζονται δεδομένα).

Πίνακας Π.Π.11. Επίδραση της συγκέντρωσης NAA και άγαρ, στην αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου *A. barba-jovis*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από νεαρά φυτά το Φεβρουάριο 2015.

BA / NAA / Άγαρ (mg L ⁻¹) / (mg L ⁻¹) / (g L ⁻¹)	Ποσοστό (%)		Μέσος Αριθμός Βλαστών ³	Μέσο Μήκος Βλαστών ³ (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ³	Μέσος Αριθμός Υπερενδατωμ ένων Βλαστών ⁴	Δυν. Πολ/ σμού
	Βλαστ/ ση ¹	Βλαστ/ ση ²					
0,0 / 0,0 / 0 [±]	100 a	0 d	1,0 f	0,6 e	1,0 e	0 e	1,0 f
4,0 / 0,0 / 8	60 d	40 a	3,3 e	1,8 a	2,0 a	9,2 a	4,0 e
4,0 / 0,0 / 12	100 a	0 d	5,5 c	1,2 b	1,4 c	6,0 b	7,7 c
4,0 / 0,1 / 8	87 c	13 b	4,2 d	1,1 c	1,3 cd	3,9 c	4,8 e
4,0 / 0,1 / 12	100 a	0 d	7,6 a	1,0 d	1,2 d	2,4 cd	9,1 ab
4,0 / 0,5 / 8	90 bc	10 c	5,1 cd	1,2 b	1,5 b	2,4 cd	6,9 cd
4,0 / 0,5 / 12	100 a	0 d	6,9 b	1,2 b	1,5 b	2,1 d	10,4 a
<i>F</i> _{NAA}	-	-	-	-	-	-	-
<i>F</i> _{Άγαρ}	-	-	-	-	-	-	-
<i>F</i> _{NAA x Άγαρ}	***	***	***	*	**	***	***
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***	***	***	***	***	***	***

[±]Τα δεδομένα δεν συμμετέχουν στην 2-way ANOVA

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

*, **, ***: σημαντικά σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$, $P \leq 0,001$, αντίστοιχα, $n=40$.

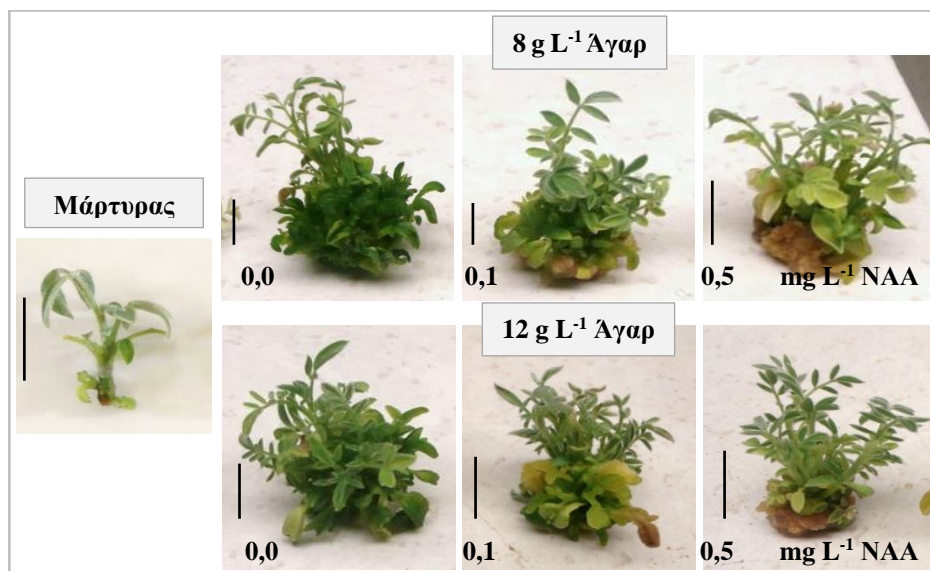
Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών³ x Μέσος αριθμός κόμβων³

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενδατωμένους μαζί με μη υπερενδατωμένους βλαστούς

² Τα έκφυτα σχημάτισαν μόνο υπερενδατωμένους βλαστούς

³ Μη υπερενδατωμένοι βλαστοί

⁴ Υπερενδατωμένοι βλαστοί



Εικόνα Π.Π.19. Επίδραση της συγκέντρωσης NAA και άγαρ σε συνδυασμό με 4,0 mg L⁻¹ BA, σε έκφυτα κορυφής και κόμβου *A. barba-jovis* από νεαρά φυτά. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε σκέτο MS στερεοποιημένο με 8 g L⁻¹ άγαρ. Η κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει μήκος 1 cm.

Εγκατεστημένη από in vitro ανεπτυγμένα σπορόφυτα

Στην πρώτη υποκαλλιέργεια που ακολούθησε την πρώτη εγκατάσταση από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα τον Απρίλιο 2013 το ποσοστό αντίδρασης των εκφύτων ήταν πολύ υψηλό (92%), δίνοντας στην πλειοψηφία τους (63%) κανονικούς μαζί με υπερενυδατωμένους βλαστούς, ενώ ένα σημαντικό ποσοστό (29%) έδωσε μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς. Η απόδοση σε βλαστούς ήταν ικανοποιητική (8,7 ανά έκφυτο), αλλά ένας μεγάλος αριθμός τους (3,4 ανά έκφυτο) ήταν υπερενυδατωμένοι (δεν παρουσιάζονται δεδομένα).

Στη δεύτερη υποκαλλιέργεια και στα τρία υποστρώματα που δοκιμάστηκαν αντέδρασαν όλα τα έκφυτα (100%) δίνοντας βλαστούς. Στα υποστρώματα που περιείχαν BA ή ZEAT ένα ποσοστό εκφύτων (25 ή 11%, αντίστοιχα) σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς (Πίν. II.Π.12). Υψηλότερη παραγωγή κανονικών βλαστών (3,3 - 3,9 βλαστοί ανά έκφυτο) και μέσο μήκος βλαστών (2,0 - 2,3 cm) παρατηρήθηκε στα υποστρώματα με κυτοκινίνη, ανεξαρτήτως του είδους της κυτοκινίνης, ενώ μεγαλύτερος αριθμός κόμβων παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα με ZEAT (1,8 κόμβοι ανά βλαστό) (Πίν. II.Π.12, Εικ. II.Π.20). Η παρουσία κυτοκινίνης είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό υπερενυδατωμένων βλαστών σε ποσοστό 25% ή 47% στο υπόστρωμα με BA ή ZEAT αντίστοιχα (Πίν. II.Π.12). Όπως ήταν αναμενόμενο το δυναμικό πολλαπλασιασμού ήταν υψηλότερο στο υπόστρωμα που περιείχαν ZEAT, λόγω του υψηλού ποσοστού εκφύτων που σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς, του μέσου αριθμού βλαστών και κόμβων ανά βλαστό (Πίν. II.Π.12). Επιπλέον στο υπόστρωμα MS χωρίς PGRs παρατηρήθηκε ριζοβολία σε ποσοστό 63% (δεν παρουσιάζονται δεδομένα).

Στις δύο επόμενες υποκαλλιέργειες (3^η και 4^η) έκφυτα κορυφής και κόμβου τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα MS με 1,0 mg L⁻¹ BA με στόχο την αύξηση του πολλαπλασιαστικού υλικού για να χρησιμοποιηθεί στα ακόλουθα πειράματα. Το ποσοστό αντίδρασης των εκφύτων και ο μέσος αριθμός των βλαστών ανά έκφυτο και στις δύο υποκαλλιέργειες διατηρήθηκε σε παρόμοια επίπεδα με το ποσοστό αντίδρασης των εκφύτων στη δεύτερη υποκαλλιέργεια στο ίδιο υπόστρωμα (δεν παρουσιάζονται δεδομένα).

Πίνακας Π.Π.12. Επίδραση του είδους της PGR, στην αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου του *A. barba-jovis*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί τον Απρίλιο 2013, από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα.

PGRs (mg L ⁻¹)	Ποσοστό (%)		Μέσος Αριθμός Βλαστών ³	Μέσο Μήκος Βλαστών ³ (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ³	Μέσος Αριθμός Υπερενδατωμ ένον Βλαστών ⁴	Δυν. Πολ/ σμού
	Βλαστ/ ση ¹	Βλαστ/ ση ²					
0,0	100 a	0 c	1,1 b	1,3 b	1,4 b	0,0 c	1,6 c
1,0 BA	75 c	25 a	3,9 a	2,0 a	1,3 b	1,3 b	3,8 b
1,0 ZEAT	89 b	11 b	3,3 a	2,3 a	1,8 a	3,0 a	5,3 a
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***	***	***	***	**	***	***

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

, *: σημαντικά σε $P \leq 0,01$, $P \leq 0,001$, αντίστοιχα, $n=27$.

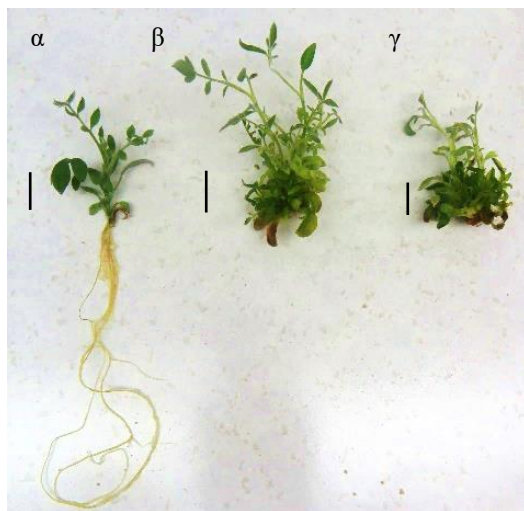
Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών³ x Μέσος αριθμός κόμβων³

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενδατωμένους μαζί με μη υπερενδατωμένους βλαστούς

² Τα έκφυτα σχημάτισαν μόνο υπερενδατωμένους βλαστούς

³ Μη υπερενδατωμένοι βλαστοί

⁴ Υπερενδατωμένοι βλαστοί



Εικόνα Π.Π.20. *In vitro* καλλιέργεια εκφύτων κορυφής και κόμβου *A. barba-jovis* σε στερεό υπόστρωμα MS, χωρίς PGRs (Μάρτυρας, α) ή με 1,0 mg L⁻¹ ZEAT (β) ή 1,0 mg L⁻¹ BA (γ). Η κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει μήκος 1 cm.

Στην επόμενη υποκαλλιέργεια (5^η) το ποσοστό των εκφύτων που αντέδρασαν ήταν υψηλό (92 - 100%) σε όλα τα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν (Πίν. Π.Π.13). Η διπαραγοντική ανάλυση δεν ανέδειξε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του είδους και της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης όσον αφορά το μέσο μήκος των βλαστών και μέσο αριθμό κόμβων (Πίν. Π.Π.13). Στο μέσο μήκος των βλαστών και στο μέσο αριθμό κόμβων επιδρά τόσο το είδος των κυτοκινινών όσο και η συγκέντρωσή τους. Υψηλότερη παραγωγή (2,6 - 3,4 βλαστοί/έκφυτο) και μεγαλύτερη επιμήκυνση βλαστών (1,7 - 2,0 cm) παρατηρήθηκε στα υποστρώματα που περιείχαν BA, ενώ το υπόστρωμα χωρίς PGRs έδωσε το μικρότερο αριθμό (1,1 βλαστοί/έκφυτο) και μήκος βλαστών (0,7 cm) (Πίν. Π.Π.13). Το δυναμικό πολλαπλασιασμού ήταν υψηλότερο (6,1) στο υπόστρωμα που περιείχε BA σε συγκέντρωση

0,25 mg L⁻¹, λόγω του υψηλότερου μέσου αριθμού βλαστών και του υψηλότερου μέσου αριθμού κόμβων (Πίν. II.Π.13). Τα υποστρώματα που περιείχαν ZEAT ή BA σε συγκέντρωση 0,5 mg L⁻¹ εμφάνισαν υψηλότερο αριθμό υπερενυδατωμένων βλαστών (1,1 ή 1,6 υπερενυδατωμένους βλαστούς ανά έκφυτο, αντίστοιχα) (Πίν. II.Π.13). Επιπλέον στο υπόστρωμα MS χωρίς PGRs ή με 2iP ή KIN παρατηρήθηκε ριζοβολία σε χαμηλό ποσοστό 14 - 28% (δεν παρουσιάζονται δεδομένα).

Πίνακας II.Π.13. Επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης κυτοκινίνης στην αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου του *A. barba-jovis*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί τον Απρίλιο 2013, από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα.

PGRs (mg L ⁻¹)	Ποσοστό Βλαστ/σης ¹ (%)	Μέσος Αριθμός Βλαστών ²	Μέσο Μήκος Βλαστών ² (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ²	Μέσος Αριθμός Υπερενυδατωμέν ων Βλαστών ³	Δυν. Πολ/ σμού
0,0 ±	100 a	1,1 g	0,7 f	1,0 f	0,0 e	1,1 h
0,25 ZEAT	92 b	1,6 def	1,4 d	1,5 bc	0,0 e	2,2 cde
0,5 ZEAT	100 a	1,6 def	1,1 e	1,3 bcd	1,1 b	1,2 gh
1,0 ZEAT	100 a	2,3 bc	1,1 e	1,2 de	0,1 d	1,7 def
0,25 BA	100 a	3,2 a	2,0 a	1,9 a	0,4 c	6,1 a
0,5 BA	100 a	2,6 b	1,7 abc	1,2 de	1,6 a	2,3 cde
1,0 BA	100 a	3,4 a	1,7 abc	1,3 bcd	0,4 c	3,0 b
0,25 KIN	100 a	1,2 fg	1,5 cd	1,5 bc	0,0 e	1,7 def
0,5 KIN	100 a	1,5 ef	1,0 ef	1,1 ef	0,0 e	1,6 ef
1,0 KIN	100 a	1,2 fg	1,0 ef	1,0 fg	0,0 e	1,3 gh
0,25 2iP	100 a	1,3 efg	1,9 ab	1,9 a	0,0 e	2,4 bc
0,5 2iP	100 a	1,7 de	1,5 cd	1,4 bcd	0,0 e	2,3 cd
1,0 2iP	100 a	1,9 cd	1,6 bcd	1,3 bcd	0,0 e	2,5 bc
<i>F</i> _{PGRs}	-	-	***	***	-	-
<i>F</i> _{Συγκέντρωσης}	-	-	***	***	-	-
<i>F</i> _{PGRs x Συγκέντρωση}	***	**	NS	NS	**	***
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***	***	***	***	***	***

± Τα δεδομένα δεν συμμετέχουν στην 2-way ANOVA

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικά ή **, ***: σημαντικά σε $P \leq 0,01$, $P \leq 0,001$, αντίστοιχα, $n=20$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών² x Μέσος αριθμός κόμβων²

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς

² Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί

³ Υπερενυδατωμένοι βλαστοί

Υστερα από μια υποκαλλιέργεια (6^η) στην οποία δεν ελήφθησαν μετρήσεις γιατί η συγκεκριμένη υποκαλλιέργεια είχε ως στόχο την αύξηση του πολλαπλασιαστικού υλικού, στην επόμενη (7^η) έκφυτα κορυφής και κόμβου τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα MS χωρίς ή με BA ή ZEAT ή 2iP ή KIN σε συγκεντρώσεις 0,25 ή 0,5 ή 1,0 mg L⁻¹. Το ποσοστό αντίδρασης των εκφύτων ήταν 100% σε όλα τα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν (Πίν. II.Π.14). Η διπαραγοντική ανάλυση ανέδειξε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του είδους και της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης στις τρεις παραμέτρους που μετρήθηκαν (μέσο αριθμό βλαστών, μέσο μήκος βλαστών και μέσο αριθμό κόμβων). Υψηλότερος αριθμός παραχθέντων βλαστών (9,2 βλαστοί/ έκφυτο) παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα με 1,0 mg L⁻¹ BA, εκ των οποίων οι (5,2) ήταν υπερενυδατωμένοι (Πίν. II.Π.14). Μεγαλύτερου μήκους βλαστοί και μεγαλύτερος αριθμός κόμβων παρατηρήθηκαν στο υπόστρωμα με 0,5 mg L⁻¹ BA (Πίν. II.Π.14). Το δυναμικό πολλαπλασιασμού ήταν υψηλότερο στα υποστρώματα με BA σε σχέση με τις άλλες PGRs που δοκιμάστηκαν, λόγω του μεγαλύτερου μέσου αριθμού βλαστών και κόμβων. Τέλος στο υπόστρωμα MS χωρίς PGRs ή με 2iP ή KIN παρατηρήθηκε ριζοβολία σε χαμηλό ποσοστό 5 - 20% (δεν παρουσιάζονται δεδομένα).

Θέλοντας να επαληθεύσουμε την υπεροχή της BA σε ότι αφορά τον πολλαπλασιασμό των βλαστών, έκφυτα κορυφής και κόμβου τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα MS είτε χωρίς PGRs, είτε με 1,0 mg L⁻¹ BA ή ZEAT ή 2iP ή KIN (8^η υποκαλλιέργεια). Το ποσοστό αντίδρασης των εκφύτων ήταν υψηλό σε όλα τα υποστρώματα και κυμαινόταν από 96 - 100% (Πίν. II.Π.15). Υψηλότερη παραγωγή κανονικών βλαστών (2,0 βλαστοί ανά έκφυτο) παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα με 1,0 mg L⁻¹ BA, ενώ στο μέσο μήκος βλαστών δεν παρατηρήθηκε καμία στατιστική διαφορά. Το υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα με 1,0 mg L⁻¹ BA, λόγω υψηλότερου μέσου αριθμού βλαστών (Πίν. II.Π.15). Τέλος στο υπόστρωμα MS χωρίς PGRs παρατηρήθηκε ριζοβολία σε ποσοστό 50%, ενώ στα υποστρώματα με PGRs το ποσοστό ριζοβολίας κυμάνθηκε από 5 - 25% (δεν παρουσιάζονται δεδομένα).

Πίνακας Π.Π.14. Επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης PGRs, στην αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου του *A. barba-jonis*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί τον Απρίλιο 2013, από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα.

PGRs (mg L ⁻¹)	Ποσοστό Βλαστ/σης ¹ (%)	Μέσος Αριθμός Βλαστών ²	Μέσο Μήκος Βλαστών ² (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ²	Μέσος Αριθμός Υπερενδατωμένων ων Βλαστών ³	Δυν. Πολ/ σμού
0,0 ±	100	1,0 g	1,4 f	1,8 e	0,0 c	1,8 g
0,25 ZEAT	100	1,1 efg	2,0 cde	2,8 b	0,0 c	3,1 de
0,5 ZET	100	1,2 efg	1,6 ef	2,2 cde	0,0 c	2,4 f
1,0 ZEAT	100	2,4 b	1,2 f	1,8 de	0,3 d	4,3 cd
0,25 BA	100	2,0 bc	2,9 a	3,5 a	0,0 c	7,0 b
0,5 BA	100	1,8 cd	2,6 ab	2,8 bc	0,0 c	5,0 c
1,0 BA	100	4,0 a	1,8 def	2,1 d	5,2 a	8,4 a
0,25 KIN	100	1,0 fg	2,6 abc	2,5 bcd	0,0 c	2,5 f
0,5 KIN	100	1,1 efg	2,2 bcde	2,2 cde	0,0 c	2,4 f
1,0 KIN	100	1,3 efg	1,6 ef	2,1 de	0,0 c	2,8 e
0,25 2iP	100	1,2 efg	2,1 bcde	2,0 de	0,0 c	2,4 f
0,5 2iP	100	1,4 def	2,3 bcd	2,3 bcd	0,0 c	3,2 de
1,0 2iP	100	1,5 d	2,6 abc	2,4 bcd	0,0 c	3,6 d
<i>F</i> _{PGRs}	-	-	-	-	-	-
<i>F</i> _{Συγκέντρωσης}	-	-	-	-	-	-
<i>F</i> _{PGRs x Συγκέντρωση}	-	***	*	**	***	*
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	-	***	***	***	***	***

± Τα δεδομένα δεν συμμετέχουν στην 2-way ANOVA

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικά ή *, **, ***: σημαντικά σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$, $P \leq 0,001$, αντίστοιχα, $n=20$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών² x Μέσος αριθμός κόμβων²

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενδατωμένους μαζί με μη υπερενδατωμένους βλαστούς

² Μη υπερενδατωμένοι βλαστοί

³ Υπερενδατωμένοι βλαστοί

Πίνακας II.II.15. Επίδραση του είδους της PGR, στην αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου του *A. barba-jovis*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί τον Απρίλιο 2013, από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα.

PGRs (mg L ⁻¹)	Ποσοστό Βλαστ/σης ¹ (%)	Μέσος Αριθμός Βλαστών ²	Μέσο Μήκος Βλαστών ² (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ²	Μέσος Αριθμός Υπερενυδατωμένων Βλαστών ³	Δυν. Πολ/ σμού
0,0	96 b	1,3 b	1,5 a	1,5 bc	0,0 b	1,9 c
1,0 ZEAT	97 b	1,3 b	1,6 a	1,5 c	0,0 b	1,9 c
1,0 BA	100 a	2,0 a	2,1 a	2,0 a	0,0 b	4,0 a
1,0 KIN	96 b	1,2 b	1,6 a	1,4 c	0,0 b	1,6 c
1,0 2iP	100 a	1,5 ab	2,0 a	1,9 ab	0,2 a	2,9 b
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***	*	NS	*	***	***

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικά ή *, ***: σημαντικά σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,001$, αντίστοιχα, $n=24$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹(%) x Μέσος αριθμός βλαστών² x Μέσος αριθμός κόμβων²

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς

² Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί

³ Υπερενυδατωμένοι βλαστοί

Με στόχο την αύξηση του αριθμού των βλαστών ανά έκφυτο, στην επόμενη υποκαλλιέργεια (9^η) αυξήθηκε η συγκέντρωση του BA στο υπόστρωμα. Έκφυτα κορυφής ή κόμβου τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα MS με 1,0 ή 2,0 mg L⁻¹ BA. Το ποσοστό των εκφύτων που αντέδρασε ήταν υψηλό (92 - 100%) και για τους δύο τύπους εκφύτων, όμως ένα σημαντικό ποσοστό (13 - 21%) των εκφύτων σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς (Πίν. II.II.16). Η διπαραγοντική ανάλυση δεν ανέδειξε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του τύπου του εκφύτου και της συγκέντρωσης του BA σε όλες τις παραμέτρους που μετρήθηκαν. Ο μέσος αριθμός βλαστών, το μέσο μήκος βλαστών και ο μέσος αριθμός κόμβων επηρεάστηκαν μόνο από τον τύπο του εκφύτου, ενώ το ποσοστό των εκφύτων που έδωσαν κανονικούς μαζί με υπερενυδατωμένους βλαστούς, το ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς και ο μέσος αριθμός υπερενυδατωμένων βλαστών επηρεάστηκαν τόσο από τον τύπο των εκφύτου όσο και από τη συγκέντρωση του BA. Υψηλότερη παραγωγή κανονικών βλαστών παρατηρήθηκε στα έκφυτα κορυφής ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση του BA, ενώ μεγαλύτερου μήκους βλαστοί παρατηρήθηκαν στα έκφυτα κόμβου (Πίν. II.II.16, Εικ. II.II.21). Στο υπόστρωμα με 2,0 mg L⁻¹ BA τόσο για τα έκφυτα κορυφής όσο και για τα έκφυτα κόμβου παρατηρήθηκε ο υψηλότερος αριθμός υπερενυδατωμένων βλαστών (1,0 ή 1,1 υπερενυδατωμένοι βλαστοί ανά έκφυτο αντίστοιχα) (Πίν. II.II.16, Εικ. II.II.21). Η αύξηση του BA αύξησε τον αριθμό των βλαστών ανά έκφυτο, αλλά ένα σημαντικό ποσοστό των βλαστών ήταν

υπερενυδατωμένοι. Τέλος σε όλα τα υποστρώματα και ανεξάρτητα του τύπου του εκφύτου παρατηρήθηκε ριζοβολία σε ποσοστό 10 - 15% (δεν παρουσιάζονται δεδομένα).

Πίνακας Π.Π.16. Επίδραση του τύπου του εκφύτου και της συγκέντρωσης BA στην αντίδραση εκφύτων του *A. barba-jovis*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί τον Απρίλιο 2013, από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα.

BA (mg L ⁻¹)	Ποσοστό (%)		Μέσος Αριθμός Βλαστών ³	Μέσο Μήκος Βλαστών ³ (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ³	Μέσος Αριθμός Υπερενυδατωμ ένων Βλαστών ⁴	Δυν. Πολ/ σμού
	Βλαστ/ ση ¹	Βλαστ/ ση ²					
Έκφυτα κορυφής							
1,0 BA	83 a	13 b	2,4 ab	1,2 b	1,6 b	0,4 b	3,2 a
2,0 BA	71 c	21 a	2,5 a	1,1 b	1,4 b	1,0 a	2,5 a
Έκφυτα κόμβου							
1,0 BA	85 a	15 b	1,6 c	1,6 a	2,1 a	0,4 b	2,9 a
2,0 BA	77 b	20 a	1,9 bc	1,6 a	2,1 a	1,1 a	3,1 a
<i>F</i> _{Εκφύτου}	*	*	***	***	***	***	NS
<i>F</i> _{Συγκέντρωσης}	***	***	NS	NS	NS	*	*
<i>F</i> _{Εκφύτου x Συγκέντρωση}	NS	NS	NS	NS	NS	NS	NS
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***	***	**	**	***	*	NS

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικά ή *, ***, σημαντικά σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,001$, αντίστοιχα, $n=80$ κορυφές και $n=40$ κόμβοι.

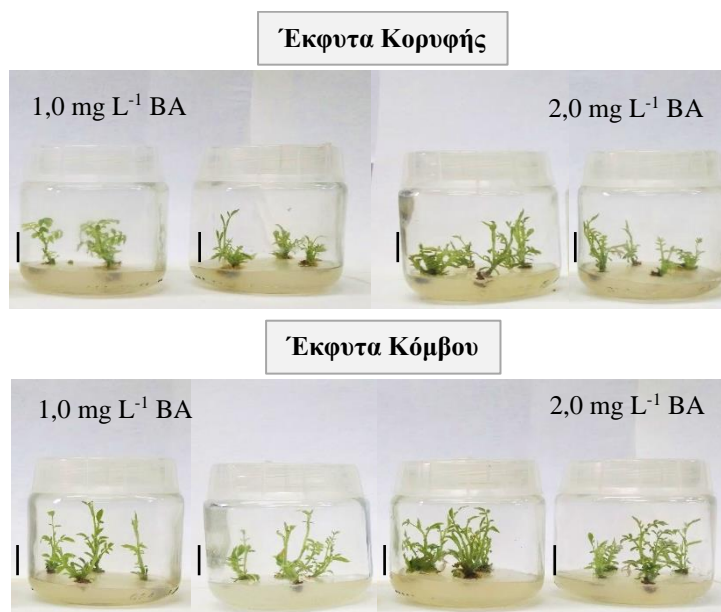
Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹(%) x Μέσος αριθμός βλαστών³ x Μέσος αριθμός κόμβων³

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερνυδατωμένους μαζί με μη υπερνυδατωμένους βλαστούς

² Τα έκφυτα σχημάτισαν μόνο υπερνυδατωμένους βλαστούς

³ Μη υπερνυδατωμένοι βλαστοί

⁴ Υπερνυδατωμένοι βλαστοί



Εικόνα Π.Π.21. *In vitro* καλλιέργεια εκφύτων κορυφής και κόμβου *A. barba-jovis* σε στερεό υπόστρωμα MS, με 1,0 ή 2,0 mg L⁻¹ BA. Η κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει μήκος 1 cm.

Στην τελευταία υποκαλλιέργεια (9^η) χωρίς PGRs παρατηρήθηκε μεγάλη πτώση του δυναμικού πολλαπλασιασμού. Τα έκφυτα κορυφής και κόμβου αντέδρασαν σε σχετικά χαμηλό ποσοστό (59 - 63%) (Πίν. II.Π.17), χωρίς διαφορές ως προς το μέσο αριθμό και το μήκος των βλαστών και το μέσο αριθμό κόμβων (Πίν. II.Π.17). Και στους δύο τύπους εκφύτων δεν παρουσιάστηκαν υπερενυδατωμένοι βλαστοί, λόγω απουσίας PGRs .

Πίνακας II.Π.17. Αντίδραση εκφύτων κορυφής ή κόμβου του *A. barba-jovis*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί τον Απρίλιο 2013, από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα, σε υπόστρωμα MS χωρίς PGRs..

Έκφυτα	Ποσοστό Βλαστ/σης ¹ (%)	Μέσος Αριθμός Βλαστών ²	Μέσο Μήκος Βλαστών ² (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ²	Δυν. Πολ/σμού
Κορυφής	59 a	1,0 a	0,9 a	1,2 a	0,7 a
Κόμβου	63 a	1,0 a	1,0 a	1,2 a	0,8 a
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	NS	NS	NS	NS	NS

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικά, $n=50$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών² x Μέσος αριθμός κόμβων²

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς

² Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί

Στην πρώτη υποκαλλιέργεια, που ακολούθησε την αρχική εγκατάσταση από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα που εγκαταστάθηκε τον Ιανουάριο 2015, διερευνήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης BA σε συνδυασμό με 0,1 mg L⁻¹ NAA στην αντίδραση εκφύτων κόμβου, με στόχο την αύξηση της απόδοσης των καλλιεργειών και της μείωσης της υπερενυδάτωσης. Το ποσοστό αντίδρασης των εκφύτων ήταν πολύ υψηλό (91 - 98%) και στα τρία υποστρώματα που δοκιμάστηκαν, ενώ το ποσοστό εκφύτων που έδωσε μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς ήταν πολύ χαμηλό (5 - 8%) (Πίν. II.Π.18). Η υψηλότερη παραγωγή βλαστών σημειώθηκε στο υπόστρωμα με 1,0/0,1 mg L⁻¹ BA/NAA (10,8 βλαστοί/έκφυτο), εκ των οποίων οι 2,7 ήταν υπερενυδατωμένοι (Πίν. II.Π.18, Εικ. II.Π.22). Το μήκος των βλαστών και ο μέσος αριθμός κόμβων ανά έκφυτο ήταν παρόμοια σε όλα τα υποστρώματα (Πίν. II.Π.18, Εικ. II.Π.22). Το υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού (14,0) παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα με 1,0/0,1 mg L⁻¹ BA/NAA λόγω του μεγαλύτερου αριθμού κανονικών βλαστών. Επιπλέον στο υπόστρωμα MS χωρίς PGRs παρατηρήθηκε ριζοβολία σε ποσοστό (25%), ενώ το ποσοστό καλογένεσης στη βάση του εκφύτου ήταν 96 - 100% στα υποστρώματα που περιείχαν NAA (δεν παρουσιάζονται δεδομένα).

Πίνακας II.Π.18. Επίδραση των BA και NAA στην αντίδραση εκφύτων κόμβου του *A. barba-jovis* που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί τον Ιανουάριο 2015, από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα.

BA / NAA (mg L ⁻¹) / (mg L ⁻¹)	Ποσοστό (%)		Μέσος Αριθμός Βλαστών ³	Μέσο Μήκος Βλαστών ³ (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ³	Μέσος Αριθμός Υπερενυδατωμέ νων Βλαστών ⁴	Δυν. Πολ/ σμού
	Βλαστ/ ση ¹	Βλαστ/ ση ²					
0,0 / 0,0	86 b	8 a	1,2 c	1,1 b	1,7 b	0,3 c	1,8 c
0,5 / 0,1	86 b	5 b	6,8 b	1,3 a	1,9 ab	1,9 b	11,1 b
1,0 / 0,1	91 a	7 a	8,1 a	1,2 ab	1,9 a	2,7 a	14,0 a
<i>F</i> One-way ANOVA	***	*	***	*	***	***	***

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

*, ***, σημαντικά σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,001$, αντίστοιχα, $n=153-223$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών³ x Μέσος αριθμός κόμβων³

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς

² Τα έκφυτα σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς

³ Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί

⁴ Υπερενυδατωμένοι βλαστοί



Εικόνα II.Π.22. Υπερενυδατωμένοι βλαστοί *A. barba-jovis* σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με 1,0 mg L⁻¹ BA σε συνδυασμό με 0,1 mg L⁻¹ NAA. Η κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει μήκος 1 cm.

Για επαλήθευση των αποτελεσμάτων της πρώτης υποκαλλιέργειας, στη δεύτερη υποκαλλιέργεια έκφυτα κορυφής και κόμβου εγκαταστάθηκαν σε υπόστρωμα MS χωρίς PGRs (μάρτυρας) και σε υπόστρωμα που περιείχε 0,5 mg L⁻¹ BA σε συνδυασμό με 0,1 mg L⁻¹ NAA. Το ποσοστό αντίδρασης ήταν 100% και στα δύο υποστρώματα. Αλλά ο αριθμός των βλαστών ανά έκφυτο ήταν μικρός (Πίν. II.Π.19). Στο υπόστρωμα με BA/NAA παρατηρήθηκε και ένα ποσοστό υπερενυδατωμένων βλαστών (20%). Στο υπόστρωμα MS χωρίς PGRs παρατηρήθηκε ριζοβολία, όπως και στα προηγούμενα πειράματα, σε ποσοστό 20%, ενώ το ποσοστό καλογένεσης ήταν υψηλό (97%) στο υπόστρωμα που περιείχε NAA (δεν παρουσιάζονται δεδομένα).

Πίνακας II.Π.19. Επίδραση των BA και NAA στην αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου του *A. barba-jovis*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί τον Ιανουάριο 2015, από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα.

BA / NAA (mg L ⁻¹) / (mg L ⁻¹)	Ποσοστό Βλαστ/σης ¹ (%)	Μέσος Αριθμός Βλαστών ²	Μέσο Μήκος Βλαστών ² (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ²	Μέσος Αριθμός Υπερενυδατωμέν ων Βλαστών	Δυν. Πολ/σμού
0,0 / 0,0	100	1,0 b	1,5 b	1,9 b	0,1 b	1,8 b
0,5 / 0,1	100	2,6 a	2,3 a	2,6 a	0,7 a	6,7 a
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	-	***	***	***	***	***

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

***: σημαντικά σε $P \leq 0,001$, $n=72-75$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών² x Μέσος αριθμός κόμβων²

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς

² Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί

³ Υπερενυδατωμένοι βλαστοί

Λόγω της χαμηλής απόδοσης της δεύτερης υποκαλλιέργειας στην επόμενη (τρίτη) δοκιμάστηκαν υψηλότερες συγκεντρώσεις και δύο είδη κυτοκινίνης. Έκφυτα κορυφής και κόμβου τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα MS που περιείχε 0,5 ή 1,0 ή 2,0 mg L⁻¹ BA ή ZEAT σε συνδυασμό με 0,1 mg L⁻¹ NAA, καθώς και υπόστρωμα χωρίς PGRs ως μάρτυρας ή με 2,0 mg L⁻¹ BA ή ZEAT χωρίς NAA. Το ποσοστό των εκφύτων που αντέδρασε και έδωσε κανονικούς μαζί με υπερενυδατωμένους βλαστούς ήταν από 69 έως 92% (Πίν. II.Π.20). Υψηλότερη παραγωγή κανονικών βλαστών (6,2 βλαστοί/έκφυτο) παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα με 2,0 mg L⁻¹ BA σε συνδυασμό με 0,1 mg L⁻¹ NAA, ενώ μεγαλύτερου μήκους βλαστοί στο υπόστρωμα με 2,0 mg L⁻¹ ZEAT χωρίς ή με 0,1 mg L⁻¹ NAA. Το δυναμικό πολλαπλασιασμού ήταν υψηλότερο στο υπόστρωμα με 2,0 mg L⁻¹ BA σε συνδυασμό με 0,1 mg L⁻¹ NAA, λόγω του υψηλού αριθμού παραχθέντων βλαστών (Πίν. II.Π.20). Η παρουσία BA ή ZEAT είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό υπερενυδατωμένων βλαστών κατά 18 - 47% (Πίν. II.Π.20). Ο υψηλότερος αριθμός υπερενυδατωμένων βλαστών παρατηρήθηκε στα υποστρώματα που περιείχαν BA ή ZEAT χωρίς NAA (2,4 ή 1,9 βλαστοί ανά έκφυτο, αντίστοιχα). Επιπλέον στο υπόστρωμα MS χωρίς PGRs παρατηρήθηκε ριζοβολία σε ποσοστό (65%), ενώ το ποσοστό καλογένεσης κυμαινόταν από 55 - 98% στο υποστρώματα που περιείχαν NAA (δεν παρουσιάζονται δεδομένα).

Πίνακας II.Π.20. Αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου του *A. barba-jovis*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί τον Ιανουάριο 2015, από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα, σε υπόστρωμα με BA ή ZEAT και NAA.

PGRs / NAA (mg L ⁻¹) / (mg L ⁻¹)	Ποσοστό (%)		Μέσος	Μέσο	Μέσος	Μέσος Αριθμός	Δυν.
	Βλαστ/ ση ¹	Βλαστ/ ση ²	Αριθμός Βλαστών ³	Μήκος Βλαστών ³ (cm)	Αριθμός Κόμβων ³	Υπερενυδατωμ ένων Βλαστών ⁴	Πολ/ σμού
0,0 BA / 0,0 NAA	83 bc	0 e	1,0 e	0,8 cde	1,1 d	0,0 g	0,9 e
0,5 BA / 0,1 NAA	81 c	9 d	2,3 cd	0,7 de	1,1 d	0,5 ef	2,1 d
1,0 BA / 0,1 NAA	92 a	8 d	1,9 d	0,8 cde	1,1 d	0,6 ef	1,9 d
2,0 BA / 0,1 NAA	83 bc	10 d	6,2 a	0,6 e	1,2 cd	1,5 c	6,2 a
2,0 BA / 0,0 NAA	75 d	25 a	2,7 c	1,1 b	1,4 bc	2,4 a	2,8 bc
0,5 ZEAT / 0,1 NAA	81 c	10 d	1,5 de	1,0 bc	1,4 bc	0,4 f	1,7 de
1,0 ZEAT / 0,1 NAA	85 b	15 c	2,0 cd	1,0 bcd	1,6 b	0,8 d	2,7 c
2,0 ZEAT / 0,1 NAA	81 c	19 b	3,7 b	1,5 a	1,6 b	1,6 c	4,8 bc
2,0 ZEAT / 0,0 NAA	69 e	19 b	2,3 cd	1,8 a	1,9 a	1,9 bc	3,0 b
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***	***	***	***	***	***	***

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

***: σημαντικά σε $P \leq 0,001$, $n=40$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών³ x Μέσος αριθμός κόμβων³

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς

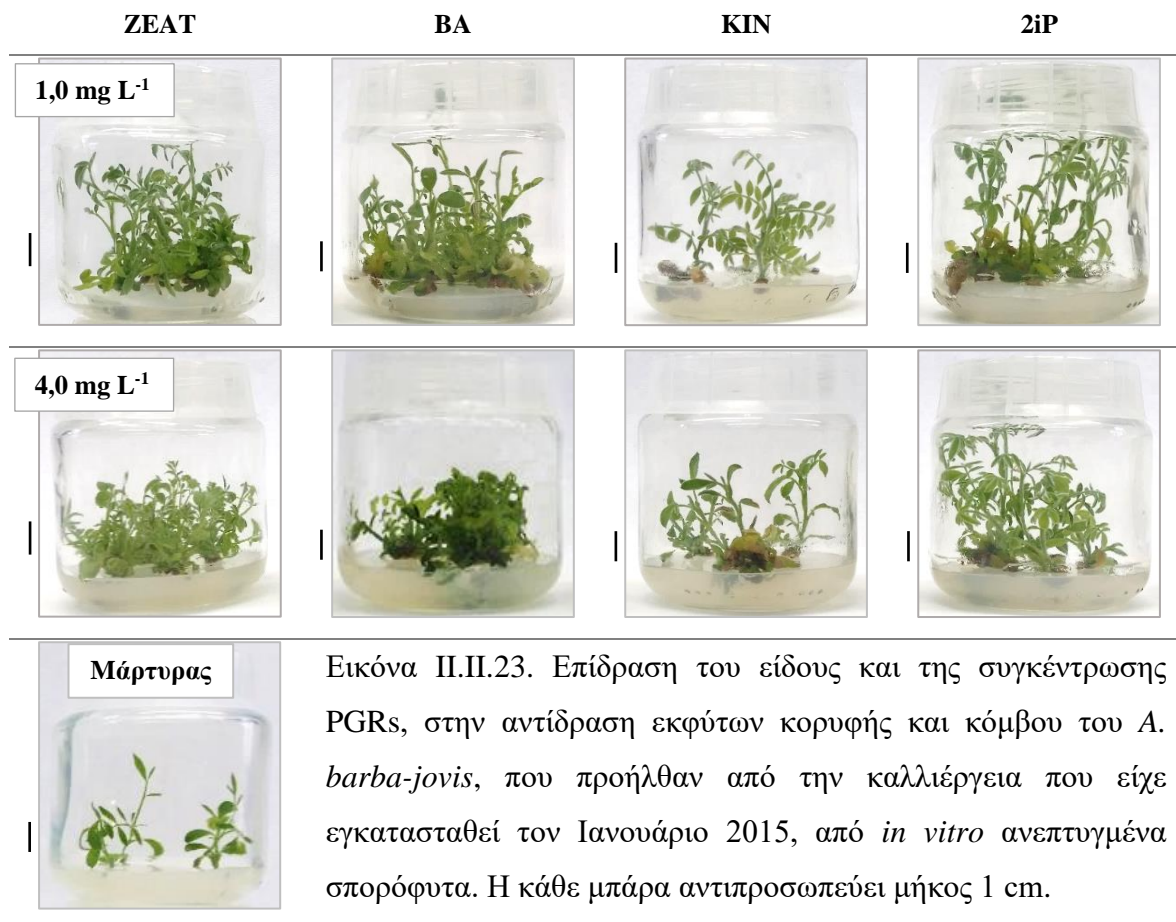
² Τα έκφυτα σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς

³ Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί

⁴ Υπερενυδατωμένοι βλαστοί

Στην τέταρτη υποκαλλιέργεια, αυξήθηκε περαιτέρω η συγκέντρωση κυτοκινίνης και δοκιμάστηκαν και άλλα είδη αυτής, με στόχο την αύξηση της παραγωγικότητας της καλλιέργειας. Σημειώθηκε υψηλό ποσοστό αντίδρασης (94 - 100%) σε όλα τα υποστρώματα (Πίν. II.Π.21). Στα υποστρώματα με 4,0 mg L⁻¹ BA ή ZEAT το ποσοστό αντίδρασης των εκφύτων ήταν 100%, όμως υψηλό ποσοστό των εκφύτων σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς (35% ή 40%, αντίστοιχα) (Πίν. II.Π.21). Υπό την παρουσία BA παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη παραγωγή κανονικών βλαστών (3,2 - 6,4 βλαστοί/έκφυτο). Ενώ τα υποστρώματα με 2iP έδωσαν μεγαλύτερο μήκος βλαστού (2,4 - 3,5 cm) με περισσότερους κόμβους (2,8 - 3,7 κόμβοι ανά βλαστό) σε σύγκριση με τα υποστρώματα που περιείχαν BA ή ZEA ή KIN (Πίν. II.Π.21, Εικ. II.Π.23). Τα υποστρώματα που περιείχαν BA ή ZEAT σε συγκέντρωση 4,0 mg L⁻¹, παρουσίασαν τη μικρότερη επιμήκυνση των βλαστών (0,6 ή 0,7cm, αντίστοιχα) και κατά επέκταση και το μικρότερο αριθμό κόμβων (1,2 ή 1,3 κόμβοι ανά βλαστό, αντίστοιχα). Υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού (14,9) έδωσε το υπόστρωμα που περιείχε 1,5 mg L⁻¹ BA, λόγω του υψηλότερου ποσοστού εκφύτων που

σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς σε συνδυασμό με το υψηλό μέσο αριθμό βλαστών (Πίν. II.Π.21). Η παρουσία και των τεσσάρων κυτοκινινών που δοκιμάστηκαν είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό υπερενυδατωμένων βλαστών, επιπλέον η αύξηση της συγκέντρωσης κυτοκινίνης στο υπόστρωμα οδήγησε σε αύξηση του αριθμού των υπερενυδατωμένων βλαστών ανά έκφυτο (Πίν. II.Π.21, Εικ. II.Π.24). Ο υψηλότερος μέσος αριθμός υπερενυδατωμένων βλαστών (4,8 και 5,1 υπερενυδατωμένοι βλαστοί/έκφυτο) παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα που περιείχε 4,0 mg L⁻¹ BA ή ZEAT, αντίστοιχα (Πίν. II.Π.21, Εικ. II.Π.23, II.Π.24). Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η αύξηση της συγκέντρωσης της BA ή ZEAT έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση των κανονικών αλλά και των υπερενυδατωμένων βλαστών. Στο υπόστρωμα MS χωρίς PGRs παρατηρήθηκε ριζοβολία σε ποσοστό (20%), ενώ στα υποστρώματα που περιείχαν PGRs το ποσοστό ριζοβολίας κυμάνθηκε από 0 έως 12% (δεν παρουσιάζονται δεδομένα).



Πίνακας II.Π.21. Επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης PGRs, στην αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου του *A. barba-jovis*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί τον Ιανουάριο 2015, από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα.

PGRs (mg L ⁻¹)	Ποσοστό (%)		Μέσος Αριθμός Βλαστών ³	Μέσο Μήκος Βλαστών ³ (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ³	Μέσος Αριθμός Υπερενδατωμ ένων Βλαστών	Δυν. Πολ/ σμού
	Βλαστ/ ση ¹	Βλαστ/ ση ²					
0,0 ±	98 ab	0 g	1,0 j	1,1 i	1,8 ghi	0,0 h	1,8 j
0,5 ZEAT	98 ab	0 g	1,6 ghi	1,0 ij	1,6 ij	0,0 h	2,5 j
1,0 ZEAT	98 ab	2 f	3,2 de	1,7 ef	1,9 fgh	0,8 e	6,0 ef
1,5 ZEAT	100 a	0 g	3,5 cd	1,9 e	2,4 de	1,3 d	8,4 b
2,0 ZEAT	88 d	12 d	3,2 de	1,8 ef	2,1 efg	2,2 c	5,9 ef
4,0 ZEAT	60 g	40 a	4,1 bc	0,7 jk	1,3 jk	5,1 a	3,2 i
0,5 BA	98 ab	2 f	3,2 de	1,9 e	2,5 cde	0,8 e	7,8 bc
1,0 BA	98 ab	2 f	5,0 b	1,3 hi	1,6 ij	2,9 b	7,8 bc
1,5 BA	100 a	0 g	6,2 a	1,6 efg	2,4 de	2,5 bc	14,9 a
2,0 BA	83 e	17 cd	6,4 a	1,0 ij	1,3 jk	3,9 ab	6,9 cd
4,0 BA	65 g	35 b	5,1 b	0,6 k	1,2 k	4,8 a	4,0 i
0,5 KIN	98 ab	0 g	1,1 hij	1,9 e	2,0 fgh	0,0 h	2,2 j
1,0 KIN	94 c	2 f	1,1 ij	1,9 e	2,2 ef	0,1 g	2,3 j
1,5 KIN	100 a	0 g	1,4 ij	1,3 hi	1,8 ghi	0,1 g	2,5 j
2,0 KIN	94 c	6 e	1,3 hij	1,5 fgh	2,0 fgh	0,5 f	2,4 j
4,0 KIN	92 c	8 e	1,7 hij	1,3 hi	1,8 ghi	0,4 f	2,8 ij
0,5 2iP	98 ab	2 f	1,4 hij	3,5 a	3,7 a	0,2 g	5,1 gh
1,0 2iP	100 a	0 g	1,6 ghi	3,1 b	3,1 b	0,5 f	5,0 gh
1,5 2iP	98 ab	2 f	1,9 gh	2,8 bc	3,1 b	1,1 d	5,8 ef
2,0 2iP	100 a	0 g	2,2 fg	2,6 cd	2,8 bc	1,2 d	6,2 de
4,0 2iP	98 ab	2 f	2,7 ef	2,4 d	2,8 bc	2,0 c	7,4 bcd
<i>F</i> _{PGRs}	-	-	-	-	-	-	-
<i>F</i> _{Συγκέντρωσης}	-	-	-	-	-	-	-
<i>F</i> _{PGRs x Συγκέντρωσης}	***	***	***	***	***	***	***
<i>F</i> _{One-way ANOVA}	***	***	***	***	***	***	***

± Τα δεδομένα δεν συμμετέχουν στην 2-way ANOVA

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

***: σημαντικά σε $P \leq 0,001$, $n=40$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών³ x Μέσος αριθμός κόμβων³

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενδατωμένους μαζί με μη υπερενδατωμένους βλαστούς

² Τα έκφυτα σχημάτισαν μόνο υπερενδατωμένους βλαστούς

³ Μη υπερενδατωμένοι βλαστοί

⁴ Υπερενδατωμένοι βλαστοί



Εικόνα II.Π.24. Έκφυτα που σχημάτισαν υπερενυδατωμένους βλαστούς (Y.B.) μαζί με μη υπερενυδατωμένους (κανονικούς) βλαστούς (K.B.) (α) και έκφυτα που σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς (β, γ, δ) σε υπόστρωμα $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA. Η κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει μήκος 1 cm.

Λόγω του υψηλού αριθμού τόσο των κανονικών όσο και των υπερενυδατωμένων βλαστών που παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα με $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA στο προηγούμενο πείραμα (4^η υποκαλλιέργεια), δοκιμάστηκε ο εμπλουτισμός του υποστρώματος με αυξίνη (NAA) με ταυτόχρονη αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ (5^η υποκαλλιέργεια), με σκοπό την αντιμετώπιση της υπερενυδάτωσης των βλαστών και την αύξηση του μέσου αριθμού των κανονικών βλαστών ανά έκφυτο. Για το λόγω αυτό χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα MS στερεοποιημένο με 8 ή 12 g L^{-1} άγαρ, εμπλουτισμένο με $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA σε συνδυασμό με $0,1$ ή $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ NAA, ή MS με 8 g L^{-1} άγαρ χωρίς PGRs. Το ποσοστό αντίδρασης διατηρήθηκε υψηλό (100%) σε όλα τα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν. Στο υπόστρωμα $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA χωρίς NAA στερεοποιημένο με 8 g L^{-1} άγαρ παρατηρήθηκε υψηλό ποσοστό εκφύτων (30%) που σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς (Πίν. II.Π.22). Το χαμηλότερο ποσοστό υπερενυδατωμένων βλαστών παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα με 12 g L^{-1} άγαρ και συνδυασμό BA με $0,1$ ή $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ NAA (11% ή 10%, αντίστοιχα). Ο μεγαλύτερος αριθμός κανονικών βλαστών, παρατηρήθηκε στα υποστρώματα με 12 g L^{-1} άγαρ και συνδυασμό BA με $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA (7,9 βλαστοί/έκφυτο), ενώ ο μάρτυρας έδωσε το μικρότερο αριθμό (1,0 βλαστοί/έκφυτο) και μήκος βλαστών (0,8 cm) (Πίν. II.Π.22, Εικ. II.Π.25). Το υπόστρωμα που στερεοποιήθηκε με 8 g L^{-1} άγαρ και περιείχε $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA χωρίς NAA έδωσε το μεγαλύτερο αριθμό βλαστών ανά έκφυτο (12,6), όμως οι περισσότεροι (9,5) εξ' αυτών ήταν υπερενυδατωμένοι (Πίν. II.Π.22, Εικ. II.Π.25). Οι κανονικοί βλαστοί ήταν και μεγαλύτερου μήκους (1,8 cm), σε σύγκριση με τους βλαστούς στις άλλες επεμβάσεις (Πίν. II.Π.22, Εικ. II.Π.25). Στο μήκος των βλαστών, το οποίο κυμάνθηκε από 1,1 - 1,8 cm στις διάφορες επεμβάσεις, παρατηρήθηκε μικρή επίδραση των διαφόρων συγκεντρώσεων άγαρ και NAA (Πίν. II.Π.22, Εικ. II.Π.25). Γενικά, διαπιστώθηκε ότι η προσθήκη της αυξίνης είχε θετική επίδραση στον έλεγχο της υπερενυδάτωσης των βλαστών.

Ο συνδυασμός 4,0 mg L⁻¹ BA με 0,1 ή 0,5 mg L⁻¹ NAA και στερεοποίηση με 12 g L⁻¹ συνετέλεσε στη μείωση του αριθμού των υπερενυδατωμένων βλαστών και σε υψηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού (Πίν. II.Π.22). Τέλος στο υπόστρωμα MS χωρίς PGRs παρατηρήθηκε ριζοβολία σε ποσοστό (17%), ενώ το ποσοστό καλογένεσης ήταν 67 - 97% στα υποστρώματα που περιείχαν NAA (δεν παρουσιάζονται δεδομένα).

Πίνακας II.Π.22. Επίδραση PGRs και συγκέντρωσης άγαρ, στην αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου του *A. barba-jonis*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί τον Ιανουάριο 2015, από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα.

BA / NAA / Άγαρ (mg L ⁻¹) / (mg L ⁻¹) / (g L ⁻¹)	Ποσοστό (%)		Μέσος	Μέσο	Μέσος	Μέσος Αριθμός	Δυν.
	Βλαστ/ ση ¹	Βλαστ/ ση ²	Αριθμός Βλαστών ³	Μήκος Βλαστών ³ (cm)	Αριθμός Κόμβων ³	Υπερενυδατωμέ νων Βλαστών ⁴	Πολ/ σμού
0,0 / 0,0 / 0 [±]	100 a	0 c	1,0 f	0,8 e	1,3 d	0 d	1,3 e
4,0 / 0,0 / 8	70 c	30 a	3,1 e	1,8 a	2,5 a	9,5 a	5,4 d
4,0 / 0,0 / 12	100 a	0 c	5,7 c	1,6 b	1,6 b	2,6 b	9,1 b
4,0 / 0,1 / 8	100 a	0 c	5,7 c	1,2 c	1,4 c	2,9 b	8,0 bc
4,0 / 0,1 / 12	100 a	0 c	7,9 a	1,2 c	1,4 c	1,0 c	11,1 a
4,0 / 0,5 / 8	97 b	3 b	5,2 d	1,2 c	1,5 bc	1,9 bc	7,6 bc
4,0 / 0,5 / 12	100 a	0 c	6,1 b	1,1 d	1,6 b	0,7 c	9,8 ab
<i>F</i> _{NAA}	-	-	-	-	-	-	-
<i>F</i> _{Άγαρ}	-	-	-	-	-	-	-
<i>F</i> _{NAA x Άγαρ}	***	***	***	**	***	***	***
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***	***	***	***	***	***	***

[±]Τα δεδομένα δεν συμμετέχουν στην 2-way ANOVA

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

***: σημαντικά σε $P \leq 0,001$, αντίστοιχα, $n=40$.

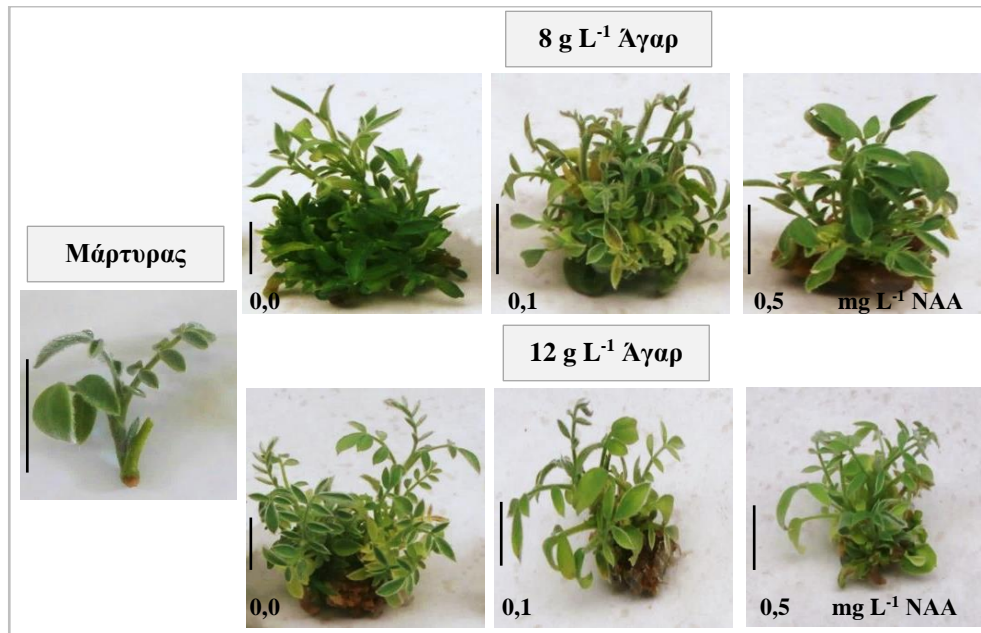
Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών³ x Μέσος αριθμός κόμβων³

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς

² Τα έκφυτα σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς

³ Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί

⁴ Υπερενυδατωμένοι βλαστοί



Εικόνα II.Π.25. Επίδραση της συγκέντρωσης NAA και άγαρ σε συνδυασμό με $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA, σε έκφυτα κορυφής και κόμβου *A. barba-jonis* από σπορόφυτα. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε σκέτο MS στερεοποιημένο με 8 g L^{-1} άγαρ. Η κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει μήκος 1 cm.

Στις επόμενες τέσσερις υποκαλλιέργειες (6^η - 7^η - 8^η - 9^η) έκφυτα κορυφής και κόμβου τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα MS στερεοποιημένο με 8 g L^{-1} άγαρ, είτε χωρίς PGRs ή με $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA σε συνδυασμό με $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA, για διατήρηση πολλαπλασιαστικού υλικού (δεν παρουσιάζονται δεδομένα). Το ποσοστό των εκφύτων που αντέδρασαν διατηρήθηκε σε πολύ υψηλά επίπεδα (90 - 100%) σε όλες τις υποκαλλιέργειες και στα δύο υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν, ενώ έκφυτα που να φέρουν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς παρατηρήθηκαν σε μικρό ποσοστό (3 - 10%) στο υπόστρωμα που περιείχε $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA και $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA. Υψηλότερη παραγωγή κανονικών βλαστών (4,3 - 5,2 βλαστοί/έκφυτο) παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα που περιείχε $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA σε συνδυασμό με $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA, στο ίδιο υπόστρωμα παρατηρήθηκε και ο μεγαλύτερος αριθμός κόμβων (1,5 - 1,9 κόμβοι/βλαστό) και κατά επέκταση και το υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού. Υπερενυδατωμένοι βλαστοί παρατηρήθηκαν μόνο στο υπόστρωμα που περιείχε BA/NAA με το μέσο αριθμό υπερενυδατωμένων βλαστών ανά έκφυτο να κυμαίνεται από 1,1 έως 2,0 στις τέσσερις υποκαλλιέργειες. Τέλος στα υποστρώματα που περιείχαν NAA παρατηρήθηκε υψηλό ποσοστό καλογένεσης το οποίο κυμάνθηκε από 87 - 100% στις τέσσερις υποκαλλιέργειες, ενώ στο υπόστρωμα χωρίς PGRs παρατηρήθηκε ριζοβολία σε ποσοστό 39 - 50% (δεν παρουσιάζονται δεδομένα).

Στην πρώτη υποκαλλιέργεια, που ακολούθησε την αρχική εγκατάσταση από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα που εγκαταστάθηκε τον Μάιο 2015, διερευνήθηκε η επίδραση του θρεπτικού υποστρώματος και των PGRs στην αντίδραση των εκφύτων. Έκφυτα κορυφής και κόμβου, καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS ή SH ή WPM χωρίς PGRs ή με 0,5 ή 5,0 mg L⁻¹ BA σε συνδυασμό με 0,1 mg L⁻¹ NAA. Το ποσοστό αντίδρασης των εκφύτων ήταν πολύ υψηλό (81 - 100%) σε όλα τα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν (Πίν. II.Π.23). Η διπαραγοντική ανάλυση ανέδειξε αλληλεπίδραση μεταξύ του θρεπτικού υποστρώματος και των PGRs σε όλες τις παραμέτρους που μετρήθηκαν (Πίν. II.Π.23). Υψηλότερη παραγωγή κανονικών βλαστών (10,5 βλαστοί/έκφυτο) παρατηρήθηκε στο θρεπτικό υπόστρωμα MS που περιείχε 5,0/0,1 mg L⁻¹ BA/NAA, ενώ μεγαλύτερη επιμήκυνση βλαστών στο υπόστρωμα MS που περιείχε 0,5/0,1 mg L⁻¹ BA/NAA (Πίν. II.Π.23). Υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού (13,9) παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα MS που περιείχε 0,5/0,1 mg L⁻¹ BA/NAA, λόγω του υψηλότερου ποσοστού εκφύτων που σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς και μεγαλύτερου αριθμού κόμβων ανά βλαστό (Πίν. II.Π.23). Το υπόστρωμα SH που περιείχε είτε 0,5 mg L⁻¹ ή 5,0 mg L⁻¹ BA εμφάνισε το μεγαλύτερο αριθμό υπερενυδατωμένων βλαστών (4,3 ή 6,5 υπερενυδατωμένοι βλαστοί, αντίστοιχα, Πίν. II.Π.23). Από τα παραπάνω προκύπτει ότι το SH υπόστρωμα σε συνδυασμό με BA είχε σαν αποτέλεσμα την εμφάνιση περισσότερων υπερενυδατωμένων βλαστών σε σύγκριση με το MS ή το WPM. Επιπλέον στα υποστρώματα που δεν περιείχαν PGRs παρατηρήθηκε ριζοβολία σε ποσοστό 30 - 48%, ενώ στα υπόστρωμα με PGRs παρατηρήθηκε υψηλό ποσοστό καλογένεσης (95 - 100%) (δεν παρουσιάζονται δεδομένα).

Πίνακας II.Π.23. Επίδραση του θρεπτικού υποστρώματος και των PGRs, στην αντίδραση εκφύτων του *A. barba-jovis*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί το Μάιο 2015, από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα.

Θρεπτικό υπόστρωμα / BA (mg L ⁻¹) / NAA (mg L ⁻¹)	Ποσοστό (%)		Μέσος Αριθμός Βλαστών ³	Μέσο Μήκος Βλαστών ³ (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ³	Μέσος Αριθμός Υπερενδατωμ έων Βλαστών ⁴	Δυν. Πολ/ σμού
	Βλαστ/ ση ¹	Βλαστ/ ση ²					
MS / 0,0 / 0,0 [±]	94 bc	0	1,0 e	0,8 c	1,4 b	0,1 f	1,3 f
MS / 0,5 / 0,1	100 a	0	6,3 b	1,7 a	2,2 a	3,9 c	13,9 a
MS / 5,0 / 0,1	100 a	0	10,5 a	0,7 cd	1,2 b	3,5 d	12,6 b
SH / 0,0 / 0,0 [±]	84 c	0	1,0 e	0,8 bc	1,3 b	0,1 f	1,1 f
SH / 0,5 / 0,1	98 b	0	2,8 d	1,0 b	1,4 b	4,3 bc	3,8 de
SH / 5,0 / 0,1	100 a	0	6,5 b	0,6 d	1,2 b	6,5 a	7,8 c
WPM / 0,0 / 0,0 [±]	81 d	0	1,0 e	0,7 cd	1,4 b	0,0 g	1,1 f
WPM / 0,5 / 0,1	100 a	0	2,9 d	0,4 e	1,0 c	0,5 e	2,9 e
WPM / 5,0 / 0,1	100 a	0	4,3 c	0,3 e	1,0 c	0,0 g	4,3 d
<i>F</i> Υπόστρωμα	-	-	-	-	-	-	-
<i>F</i> Συγκέντρωσης BA	-	-	-	-	-	-	-
<i>F</i> Υπόστρωμα x Συγκέντρωσης BA	***		***	***	***	***	***
<i>F</i> one-way ANOVA	***		***	***	***	***	***

[±] Τα δεδομένα δεν συμμετέχουν στην 2-way ANOVA

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

***: σημαντικά σε $P \leq 0,001$, $n=68$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών³ x Μέσος αριθμός κόμβων³

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενδατωμένους μαζί με μη υπερενδατωμένους βλαστούς

² Τα έκφυτα σχημάτισαν μόνο υπερενδατωμένους βλαστούς

³ Μη υπερενδατωμένοι βλαστοί

⁴ Υπερενδατωμένοι βλαστοί

Στη δεύτερη υποκαλλιέργεια με στόχο την περαιτέρω αύξηση της απόδοσης του πολλαπλασιασμού, δοκιμάστηκε η επίδραση της αυξημένης συγκέντρωσης (5,0 mg L⁻¹) BA σε συνδυασμό με 0,1 ή 0,5 ή 1,0 mg L⁻¹ NAA για ταυτόχρονο αποτελεσματικότερο έλεγχο της υπερενδατώσεως. Το ποσοστό αντίδρασης των εκφύτων ήταν 100% σε όλα υποστρώματα. Στο υπόστρωμα με 5,0 mg L⁻¹ BA χωρίς NAA παρατηρήθηκε υψηλό ποσοστό εκφύτων (50%) που σχημάτισαν μόνο υπερενδατωμένους βλαστούς (Πίν. II.Π.24). Το υψηλότερο ποσοστό υπερενδατωμένων βλαστών (70%) παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα που περιείχε 5,0 mg L⁻¹ BA χωρίς NAA, ενώ το χαμηλότερο ποσοστό (17%) παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα που περιείχε 5,0 mg L⁻¹ BA σε συνδυασμό με 1,0 mg L⁻¹ NAA. Ο μεγαλύτερος αριθμός κανονικών βλαστών, παρατηρήθηκε στα υποστρώματα που

περιείχαν NAA (5,0 - 5,7 βλαστοί/έκφυτο), ενώ ο μάρτυρας έδωσε το μικρότερο αριθμό (1,1 βλαστοί/έκφυτο) (Πίν. II.Π.24, Εικ. II.Π.26). Το υπόστρωμα που περιείχε 5,0 mg L⁻¹ BA χωρίς NAA έδωσε το μεγαλύτερο αριθμό βλαστών ανά έκφυτο (14,0), όμως οι περισσότεροι (9,8) εξ' αυτών ήταν υπερενυδατωμένοι (Πίν. II.Π.24, Εικ. II.Π.26). Μεγαλύτερη επιμήκυνση βλαστών παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα που περιείχε NAA σε συγκέντρωση 1,0 mg L⁻¹ χωρίς διαφορά από το υπόστρωμα χωρίς PGRs (Πίν. II.Π.24, Εικ. II.Π.26). Γενικά, διαπιστώθηκε ότι η προσθήκη της αυξίνης είχε θετική επίδραση στον έλεγχο της υπερενυδάτωσης των βλαστών. Ο συνδυασμός 5,0 mg L⁻¹ BA με 0,1 ή 0,5 ή 1,0 mg L⁻¹ NAA συνετέλεσε στη μείωση του αριθμού των υπερενυδατωμένων βλαστών και σε υψηλό δυναμικό πολλαπλασιασμού (Πίν. II.Π.34). Στο υπόστρωμα με MS χωρίς PGRs παρατηρήθηκε ριζοβολία σε ποσοστό 35%, ενώ στα υπόστρωμα με NAA παρατηρήθηκε υψηλό ποσοστό καλογένεσης. (92 - 100%) (δεν παρουσιάζονται δεδομένα).

Πίνακας II.Π.24. Επίδραση των PGRs, στην αντίδραση εκφύτων του *A. barba-jovis*, που ελήφθησαν το Μάιο 2015, από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα.

BA / NAA (mg L ⁻¹)	Ποσοστό (%)		Μέσος Αριθμός Βλαστών ³	Μέσο Μήκος Βλαστών ³ (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ³	Μέσος Αριθμός Υπερενυδατωμένο v Βλαστών ⁴	Δυν. Πολ/ σμού
	Βλαστ/ ση ¹	Βλαστ/ ση ²					
0,0 / 0,0	100 a	0 b	1,1 c	1,1 ab	1,8 ab	0,0 e	2,0 d
5,0 / 0,0	50 b	50 a	4,2 b	0,9 c	1,4 c	9,8 a	2,9 d
5,0 / 0,1	100 a	0 b	5,7 a	0,7 d	1,4 c	2,3 b	10,3 a
5,0 / 0,5	100 a	0 b	5,3 a	0,9 bc	1,5 bc	1,9 c	8,0 ab
5,0 / 1,0	100 a	0 b	5,0 ab	1,2 a	1,8 a	1,0 d	9,0 a
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***	***	***	***	***	***	***

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

***: σημαντικά σε $P \leq 0,001$, $n=60$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών³ x Μέσος αριθμός κόμβων³

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς

² Τα έκφυτα σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς

³ Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί

⁴ Υπερενυδατωμένοι βλαστοί



Εικόνα II.Π.26. Επίδραση της συγκέντρωσης NAA σε συνδυασμό με $5,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA, σε έκφυτα κορυφής και κόμβου *A. barba-jovis* από σπορόφυτα. Ως μάρτυρας χρησιμοποιήθηκε υπόστρωμα MS χωρίς BA ή NAA. Η κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει μήκος 1 cm.

II.Π.3.1.3 *In vitro* ριζοβολία μικρομοσχευμάτων

Κατά τη διερεύνηση της *in vitro* ριζοβολίας είτε από την καλλιέργεια που εγκαταστάθηκε από νεαρά φυτά αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο, είτε από την καλλιέργεια που εγκαταστάθηκε από σπορόφυτα, επιλέχθηκαν μη υπερενυδατωμένοι μικροβλαστοί, για τη λήψη μικρομοσχευμάτων, μήκους 1,5 - 2,0 cm.

Ριζοβολία μικρομοσχευμάτων από καλλιέργεια νεαρών φυτών

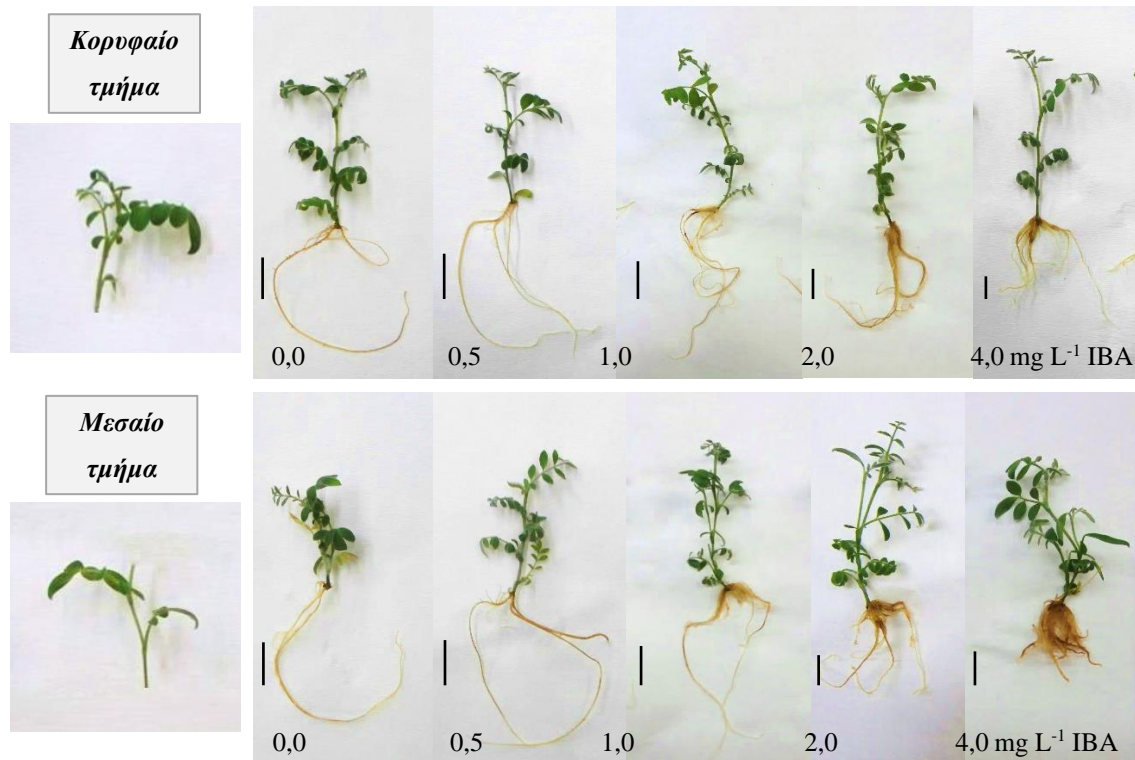
Στα μικρομοσχεύματα που ελήφθησαν από την καλλιέργεια που εγκαταστάθηκε το Φεβρουάριο 2015 από νεαρά φυτά αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο διερευνήθηκε η επίδραση στη ριζοβολία του τύπου του μικρομοσχεύματος και της συγκέντρωσης αυξίνης στο υπόστρωμα. Μικρομοσχεύματα, από το κορυφαίο τμήμα μαζί με το επάκριο μερίστωμα ή από το μεσαίο τμήμα του μικροβλαστού, καλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS είτε χωρίς IBA είτε με 0,5 ή 1,0 ή 2,0 ή 4,0 mg L^{-1} IBA για 6 συνεχείς εβδομάδες. Το ποσοστό ριζοβολίας ήταν υψηλό (90 - 100%) σε όλα τα υποστρώματα, με ή χωρίς την παρουσία IBA και για τους δυο τύπους μικρομοσχευμάτων (Πίν. II.Π.25). Η αύξηση της συγκέντρωσης του IBA στα υποστρώματα οδήγησε σε αύξηση του αριθμού των ριζών με ταυτόχρονη μείωση του μήκους τους. Υψηλότερος αριθμός ριζών και για τους δυο τύπους μικρομοσχευμάτων παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα με 4,0 mg L^{-1} IBA (4,3 - 5,8 ρίζες/μικρομόσχευμα), ενώ το υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS χωρίς IBA έδωσε το μεγαλύτερο μήκος ριζών (6,6 - 7,5 cm) (Πίν. II.Π.25, Εικ. II.Π.27). Κατά το στάδιο της ριζοβολίας, παράλληλα με τη ριζογένεση, παρατηρήθηκε επιμήκυνση των δύο τύπων μικρομοσχευμάτων και

έκπτυξη με ταυτόχρονη επιμήκυνση πλάγιων βλαστών (2 - 3 πλάγιοι βλαστοί/μικρομόσχευμα) στα μικρομοσχεύματα που προήλθαν από το μεσαίο τμήμα του μικροβλαστού (Εικ. Π.Π.27).

Πίνακας Π.Π.25. Επίδραση της συγκέντρωσης του IBA και του τύπου του μικρομοσχεύματος στη ριζοβολία των μικρομοσχευμάτων *A. barba-jovis*, από την καλλιέργεια που εγκαταστάθηκε από νεαρά φυτά αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο, σε θρεπτικό υπόστρωμα ½ MS.

IBA (mg L ⁻¹)	Ριζοβολία (%)	Μέσος αριθμός ριζών	Μέσο μήκος ριζών (cm)
Κορυφαίο τμήμα, μαζί με το επάκριο μερίστωμα			
0,0 IBA	100 a	2,8 e	7,5 a
0,5 IBA	90 b	3,4 cde	6,8 ab
1,0 IBA	100 a	3,8 bcd	6,8 ab
2,0 IBA	100 a	3,8 bcd	5,6 bcd
4,0 IBA	100 a	4,3 b	4,8 cde
Μεσαίο τμήμα			
0,0 IBA	92 b	2,7 e	6,6 abc
0,5 IBA	100 a	2,9 cde	5,7 abcd
1,0 IBA	92 b	4,4 b	4,2 de
2,0 IBA	100 a	4,0 bc	4,3 de
4,0 IBA	100 a	5,8 a	2,9 e
<i>F</i> _{Συγκέντρωσης IBA}	-	***	***
<i>F</i> _{Μικρομοσχεύματος}	-	NS	***
<i>F</i> _{Συγκέντρωσης IBA x Μικρομοσχεύματος}	***	NS	NS
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***	***	***

Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. NS: μη σημαντικά ή ***: σημαντικά σε $P \leq 0,001$, $n=60$.



Εικόνα II.Π.27. Επίδραση της συγκέντρωσης του IBA και του τύπου του μικρομοσχεύματος στη ριζοβολία των μικρομοσχευμάτων *A. barba-jonis*, από την καλλιέργεια που εγκαταστάθηκε από νεαρά φυτά, σε θρεπτικό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS. Η κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει μήκος 1 cm.

Σε επόμενο πείραμα, μικρομοσχεύματα από το κορυφαίο τμήμα, μαζί με το επάκριο μερίστωμα, των μικροβλαστών, καλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα πλήρους ή μισής δύναμης MS χωρίς IBA ή σε υπόστρωμα MS μισής δύναμης εμπλουτισμένο με 0,5 ή 1,0 ή 2,0 ή 4,0 mg L⁻¹ IBA. Το ποσοστό ριζοβολίας στο υπόστρωμα MS ήταν χαμηλότερο απ' ό τι στα υποστρώματα μισής δύναμης MS, ενώ η παρουσία IBA αύξησε περαιτέρω το ποσοστό ριζοβολίας (Πίν. II.Π.26). Το μεγαλύτερο αριθμό ριζών σημείωσε το υπόστρωμα με συγκέντρωση 4,0 mg L⁻¹ IBA, ενώ το μεγαλύτερο μήκος ριζών σημειώθηκε στα υποστρώματα χωρίς PGRs, με μεγαλύτερο μήκος στο υπόστρωμα μισής δύναμης MS (Πίν. II.Π.26, Εικ. II.Π.28). Επίσης, παράλληλα με τη ριζογένεση, παρατηρήθηκε επιμήκυνση των μικρομοσχευμάτων.

Πίνακας II.Π.26. Επίδραση της δύναμης του θρεπτικού υποστρώματος MS και του IBA στη ριζοβολία των μικρομοσχευμάτων από το κορυφαίο τμήμα, μαζί με το επάκριο μερίστωμα, των μικροβλαστών *A. barba-jonis*, από την καλλιέργεια που εγκαταστάθηκε από νεαρά φυτά αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο.

Υπόστρωμα+IBA (mg L ⁻¹)	Ριζοβολία (%)	Μέσος αριθμός ριζών	Μέσο μήκος ριζών (cm)
MS	60 c	1,5 d	12,5 b
½MS	84 b	1,8 d	16,8 a
½ MS+0,5 IBA	96 ab	1,9 d	8,1 c
½ MS+1,0 IBA	98 ab	2,8 c	8,2 c
½ MS+2,0 IBA	98 ab	3,9 b	3,1 d
½ MS+4,0 IBA	100 a	4,8 a	4,7 d
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***	***	***

Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. ***: σημαντικά σε $P \leq 0,001$, $n=100$.



Εικόνα II.Π.28. Ριζοβολημένα μικρομοσχεύματα, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS (α) ή ½ MS χωρίς την παρουσία αυξίνης (β), ή ½ MS εμπλουτισμένο με 1,0 (γ) ή 2,0 (δ), 4,0 (ε) mg L⁻¹ IBA. Η κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει μήκος 1 cm.

Ριζοβολία μικρομοσχευμάτων από καλλιέργεια σποροφύτων

Στα μικρομοσχεύματα από το κορυφαίο τμήμα, μαζί με το επάκριο μερίστωμα, των μικροβλαστών, που ελήφθησαν από την καλλιέργεια που εγκαταστάθηκε τον Απρίλιο 2013 από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα διερευνήθηκε η επίδραση στη ριζοβολία της συγκέντρωσης του MS και της αυξίνης και η επίδραση της συνεχούς ή για μία εβδομάδα παρουσίας IBA στο στερεό υπόστρωμα καλλιέργειας. Μικρομοσχεύματα, καλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα πλήρους ή μισής δύναμης MS χωρίς IBA, ή με 0,5 ή 1,0 ή 2,0 ή 4,0 mg L⁻¹ IBA. Επίσης, μικρομοσχεύματα καλλιεργήθηκαν επί 1 εβδομάδα σε υπόστρωμα MS χωρίς IBA ή με 0,5, 1,0, 2,0 ή 4,0 mg L⁻¹ IBA, και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε υπόστρωμα MS μισής δύναμης για 5 εβδομάδες. Όταν δεν χρησιμοποιήθηκε αυξίνη το υπόστρωμα με ½ MS έδωσε υψηλότερο ποσοστό ριζοβολίας από ότι το πλήρες MS. Στο πλήρες MS η υψηλή συγκέντρωση αυξίνης (2,0 ή 4,0 mg L⁻¹) παρεμπόδισε τη ριζοβολία,

ενώ στο υπόστρωμα με $\frac{1}{2}$ MS την ευνόησε. Η εφαρμογή αυξίνης για μία μόνο εβδομάδα έδωσε χαμηλά ποσοστά ριζοβολίας. Στο υπόστρωμα μισής δύναμης MS σε συνεχή καλλιέργεια για έξι εβδομάδες, καθώς η συγκέντρωση του IBA αυξανόταν, ο αριθμός των παραγόμενων ριζών αυξανόταν και το μήκος αυτών μειωνόταν (Πίν. II.Π.27). Κατά το στάδιο της ριζοβολίας, παράλληλα με τη ριζογένεση, παρατηρήθηκε επιμήκυνση των μικρομοσχευμάτων.

Πίνακας II.Π.27. Επίδραση της δύναμης του θρεπτικού υποστρώματος και του IBA (διάρκεια της εφαρμογής και της συγκέντρωσης) στη ριζοβολία μικρομοσχευμάτων από το κορυφαίο τμήμα, μαζί με το επάκριο μερίστωμα, μικροβλαστών *A. barba-jovis*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που εγκαταστάθηκε από σπορόφυτα.

Περίοδος καλλιέργειας/ υπόστρωμα+IBA (mg L ⁻¹)	Ριζοβολία (%)	Μέσος αριθμός ριζών	Μέσο μήκος ριζών (cm)
6 εβδομάδες / MS+0,0 IBA	40 f	1,1 e	3,3 cd
6 εβδομάδες / MS+0,5 IBA	100 a	1,1 e	5,8 b
6 εβδομάδες / MS+1,0 IBA	80 c	1,6 e	4,2 bc
6 εβδομάδες / MS+2,0 IBA	0 h	0,0 f	0,0 e
6 εβδομάδες / MS+4,0 IBA	0 h	0,0 f	0,0 e
6 εβδομάδες / $\frac{1}{2}$ MS+0,0 IBA	90 b	2,5 d	7,5 a
6 εβδομάδες / $\frac{1}{2}$ MS+0,5 IBA	85 c	4,9 c	8,6 a
6 εβδομάδες / $\frac{1}{2}$ MS+1,0 IBA	85 c	4,0 cd	4,7 bc
6 εβδομάδες / $\frac{1}{2}$ MS+2,0 IBA	100 a	8,8 a	3,2 cd
6 εβδομάδες / $\frac{1}{2}$ MS+4,0 IBA	100 a	6,3 b	1,5 de
1 εβδομάδα / MS+0,0 IBA + 5 εβδομάδες / $\frac{1}{2}$ MS	46 e	1,8 de	4,8 bc
1 εβδομάδα / MS+0,5 IBA + 5 εβδομάδες / $\frac{1}{2}$ MS	43 ef	1,8 de	2,3 cbe
1 εβδομάδα / MS+1,0 IBA + 5 εβδομάδες / $\frac{1}{2}$ MS	21 g	1,7 de	10,0 a
1 εβδομάδα / MS+2,0 IBA + 5 εβδομάδες / $\frac{1}{2}$ MS	36 f	1,6 de	2,8 cbe
1 εβδομάδα / MS+4,0 IBA + 5 εβδομάδες / $\frac{1}{2}$ MS	64 d	2,2 de	4,7 bc
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***	***	***

Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. ***: σημαντικά σε $P \leq 0,001$, $n=30$.

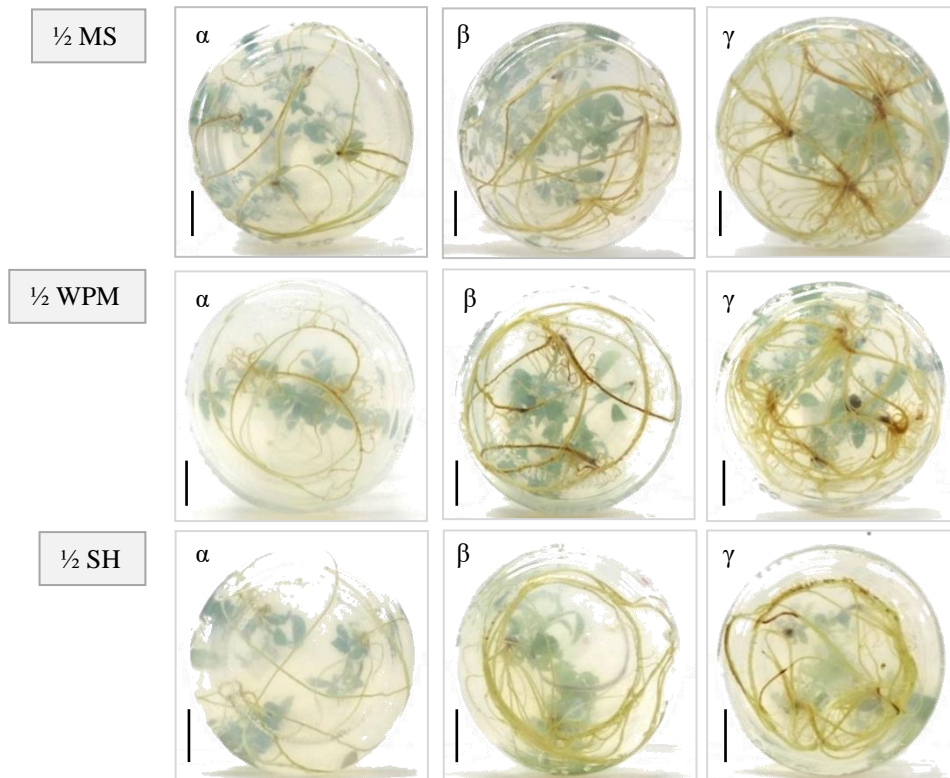
Στα μικρομοσχεύματα από το κορυφαίο τμήμα, μαζί με το επάκριο μερίστωμα, των μικροβλαστών, που ελήφθησαν από την καλλιέργεια που εγκαταστάθηκε τον Ιανουάριο 2015 από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα διερευνήθηκε η επίδραση στη ριζοβολία του τύπου του υποστρώματος και η επίδραση της συγκέντρωσης της αυξίνης του υποστρώματος. Αναλυτικότερα τα μικρομοσχεύματα καλλιεργήθηκαν, σε στερεό υπόστρωμα μισής δύναμης MS ή SH ή WPM χωρίς IBA ή με 0,5 ή 2,0 mg L⁻¹ IBA, για 6 συνεχείς εβδομάδες.

Το ποσοστό ριζοβολίας των μικρομοσχευμάτων ήταν υψηλό και στα τρία θρεπτικά υποστρώματα που δοκιμάστηκαν ($1/2$ MS ή $1/2$ SH ή $1/2$ WPM) και στις τρεις συγκεντρώσεις IBA ($0,0$ ή $0,5$ ή $2,0$ mg L⁻¹), ενώ μικρότερο ποσοστό ριζοβολίας επετεύχθη στο υπόστρωμα SH (Πίν. II.Π.28). Και στα τρία θρεπτικά υποστρώματα τα μικρομοσχεύματα αντέδρασαν παρόμοια στην αύξηση του IBA. Αύξηση από $0,0$ mg L⁻¹ σε $0,5$ mg L⁻¹ δεν επέδρασε στον αριθμό των παραγόμενων ριζών, αλλά οδήγησε σε αύξηση του μήκους των ριζών, ενώ η περαιτέρω αύξηση του IBA οδήγησε σε αύξηση των παραγόμενων ριζών και μείωση του μήκους αυτών (Πίν. II.Π.28, Εικ. II.Π.29). Το WPM φάνηκε να ευνοεί την επιμήκυνση των ριζών, το MS τον αριθμό των ριζών, ενώ το SH έδωσε τα λιγότερο ικανοποιητικά αποτελέσματα σε σύγκριση με τα άλλα δυο υποστρώματα (Πίν. II.Π.28). Παράλληλα με τη ριζογένεση, παρατηρήθηκε επιμήκυνση των μικρομοσχευμάτων.

Πίνακας II.Π.28. Επίδραση του τύπου υποστρώματος και της συγκέντρωσης του IBA στη ριζοβολία των μικρομοσχευμάτων από το κορυφαίο τμήμα, μαζί με το επάκριο μερίστωμα *A. barba-jovis*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που εγκαταστάθηκε από σπορόφυτα κοτυληδικού κόμβου τον Ιανουάριο 2015.

Υπόστρωμα	IBA (mg L ⁻¹)	Ριζοβολία (%)	Μέσος αριθμός ριζών	Μέσο μήκος ριζών (cm)
$1/2$ MS	0,0	90 e	1,6 c	8,1 de
	0,5	100 a	1,9 c	13,2 b
	2,0	98 b	4,3 a	5,6 f
$1/2$ SH	0,0	80 f	1,4 d	6,6 ef
	0,5	92 d	1,8 c	11,2 c
	2,0	97 b	1,9 c	8,1 de
$1/2$ WPM	0,0	95 c	1,8 c	10,0 cd
	0,5	97 b	1,7 cd	17,5 a
	2,0	100 a	2,4 b	7,8 e
$F_{\text{Υποστρώματος}}$		-	-	-
F_{IBA}		-	-	-
$F_{\text{Υποστρώματος} \times \text{IBA}}$		***	***	***
$F_{\text{one-way ANOVA}}$		***	***	***

Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. ***: σημαντικά σε $P \leq 0,001$, $n=100$.



Εικόνα II.Π.29. Ριζοβολημένα μικρομοσχεύματα, σε θρεπτικό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS ή $\frac{1}{2}$ WPM ή $\frac{1}{2}$ SH υπόστρωμα χωρίς την παρουσία αυξίνης (α) ή εμπλουτισμένο με IBA σε συγκεντρώσεις 0,5 (β) ή 2,0 mg L⁻¹ (γ). Η κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει μήκος 1 cm.

Σε επόμενο πείραμα, μικρομοσχεύματα από το κορυφαίο τμήμα, μαζί με το επάκριο μερίστωμα, των μικροβλαστών, καλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα πλήρους ή μισής δύναμης MS χωρίς IBA ή σε υπόστρωμα MS μισής δύναμης εμπλουτισμένο με 0,5 ή 1,0 ή 2,0 ή 4,0 mg L⁻¹ IBA. Το ποσοστό ριζοβολίας στο υπόστρωμα MS ήταν χαμηλότερο απ' ό τι στα υποστρώματα μισής δύναμης MS, με ή χωρίς την παρουσία IBA (Πίν. II.Π.29). Το μεγαλύτερο αριθμό ριζών σημείωσε το υπόστρωμα με συγκέντρωση 2,0 ή 4,0 mg L⁻¹ IBA, ενώ το μεγαλύτερο μήκος ριζών σημειώθηκε στα υποστρώματα χωρίς PGRs, επίσης παράλληλα με τη ριζογένεση, παρατηρήθηκε επιμήκυνση των μικρομοσχευμάτων (Πίν. II.Π.29, Εικ. II.Π.30).

Πίνακας II.Π.29. Επίδραση της δύναμης θρεπτικού υποστρώματος MS και του IBA στη ριζοβολία των μικρομοσχευμάτων από το κορυφαίο τμήμα, μαζί με το επάκριο μερίστωμα, μικροβλαστών *A. barba-jonis*, από την καλλιέργεια που εγκαταστάθηκε από σπορόφυτα.

Υπόστρωμα+IBA (mg L ⁻¹)	Ριζοβολία (%)	Μέσος αριθμός ριζών	Μέσο μήκος ριζών (cm)
MS	69 c	1,4 c	12,4 a
½MS	90 b	1,9 c	13,2 a
½ MS+0,5 IBA	100 a	1,9 c	9,1 b
½ MS+1,0 IBA	100 a	2,8 b	6,9 c
½ MS+2,0 IBA	98 ab	4,3 a	5,6 c
½ MS+4,0 IBA	92 b	4,2 a	4,0 d
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***	***	***

Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$, ***: σημαντικά σε $P \leq 0,001$, $n=80$.



Εικόνα II.Π.30. Ριζοβολημένα μικρομοσχεύματα, σε θρεπτικό υπόστρωμα πλήρους δύναμης MS (α) ή μισής δύναμης MS χωρίς την παρουσία αυξίνης (β), ή μισής δύναμης MS εμπλουτισμένο με 0,5 (γ) ή 1,0 (δ) ή 2,0 (ε) ή 4,0 (στ) mg L⁻¹ IBA. Η κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει μήκος 1 cm.

Πραγματοποιήθηκε και τρίτο πείραμα ριζοβολίας στο οποίο μικρομοσχεύματα από το κορυφαίο τμήμα μαζί με το επάκριο μερίστωμα ή από το μεσαίο τμήμα του μικροβλαστού, καλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα μισής δύναμης MS είτε χωρίς IBA είτε με 0,5 ή 1,0 ή 2,0 ή 4,0 mg L⁻¹ IBA για 6 συνεχείς εβδομάδες. Το ποσοστό ριζοβολίας ήταν υψηλό (90 - 100%) σε όλα τα υποστρώματα, με ή χωρίς την παρουσία IBA και για τους δυο τύπους μικρομοσχευμάτων (Πίν. II.Π.30). Το ποσοστό ριζοβολίας των μικρομοσχευμάτων από το

κορυφαίο τμήμα ήταν υψηλότερο σε όλα τα υπόστρωμα εκτός από το υπόστρωμα χωρίς IBA σε σύγκριση με τα μικρομοσχεύματα από μεσαίο τμήμα του μικροβλαστού. Η αύξηση της συγκέντρωσης του IBA στα υποστρώματα οδήγησε σε αύξηση του αριθμού των ριζών με ταυτόχρονη μείωση του μήκους τους. Υψηλότερος αριθμός ριζών και για τους δυο τύπους μικρομοσχευμάτων παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα με 4,0 mg L⁻¹ IBA (3,5 και 4,6 ρίζες/μικρομόσχευμα, αντίστοιχα), ενώ το υπόστρωμα ½ MS χωρίς IBA έδωσε το μεγαλύτερο μήκος ριζών (7,2 και 8,3 cm, αντίστοιχα) (Πίν. II.Π.30, Εικ. II.Π.31). Κατά το στάδιο της ριζοβολίας, παράλληλα με τη ριζογένεση, παρατηρήθηκε επιμήκυνση των δύο τύπων μικρομοσχευμάτων και έκπτυξη με ταυτόχρονη επιμήκυνση πλάγιων βλαστών (2 - 3 πλάγιοι βλαστοί/μικρομόσχευμα) στα μικρομοσχεύματα που προήλθαν από το μεσαίο τμήμα του μικροβλαστού (Εικ. II.Π.31).

Πίνακας II.Π.30. Επίδραση της συγκέντρωσης του IBA και του τύπου του μικρομοσχεύματος στη ριζοβολία των μικρομοσχευμάτων *A. barba-jovis*, από την καλλιέργεια που εγκαταστάθηκε από σπορόφυτα, σε θρεπτικό υπόστρωμα ½ MS.

Υπόστρωμα + IBA (mg L ⁻¹)	Ριζοβολία (%)	Μέσος αριθμός ριζών	Μέσο μήκος ριζών (cm)
Κορυφαίο τμήμα, μαζί με το επάκριο μερίστωμα			
0,0 IBA	93 b	2,0 d	7,2 a
0,5 IBA	100 a	2,0 d	6,9 a
1,0 IBA	100 a	2,1 d	4,4 b
2,0 IBA	100 a	3,2 bc	3,5 cd
4,0 IBA	100 a	3,5 b	3,5 cd
Μεσαίο τμήμα			
0,0 IBA	100 a	2,1 d	8,3 a
0,5 IBA	93 b	2,2 d	7,2 a
1,0 IBA	90 c	2,5 cd	6,9 a
2,0 IBA	93 b	2,8 bcd	3,4 cd
4,0 IBA	93 b	4,6 a	2,3 d
<i>F</i> _{Συγκέντρωσης IBA}	-	***	***
<i>F</i> _{Μικρομοσχεύματος}	-	NS	NS
<i>F</i> _{Συγκέντρωσης IBA x Μικρομοσχεύματος}	***	NS	NS
<i>F</i> _{One-way ANOVA}	***	***	***

Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. NS: μη σημαντικά ή ***: σημαντικά σε $P \leq 0,001$, $n=60$.



Εικόνα II.Π.31. Επίδραση της συγκέντρωσης του IBA και του τύπου του μικρομοσχεύματος στη ριζοβολία των μικρομοσχευμάτων *A. barba-jonis*, από την καλλιέργεια που εγκαταστάθηκε από σπορόφυτα, σε θρεπτικό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS. Η κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει μήκος 1 cm.

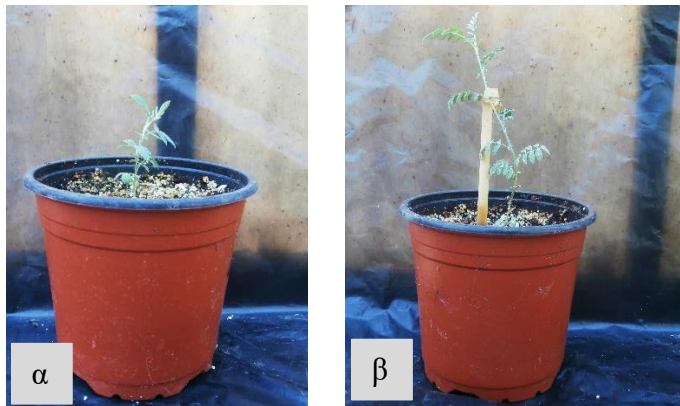
II.Π.3.1.4 Εγκλιματισμός φυταρίων *ex vitro*

Ριζοβολημένα μικρομοσχεύματα (φυτάρια), καθ' όλη τη διάρκεια του έτους, είτε από καλλιέργεια σποροφύτων, η καλλιέργεια νεαρών φυτών αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο, μεταφέρθηκαν *ex vitro* σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (1:1, v/v). Ο αριθμός των φυταρίων που μεταφέρθηκαν *ex vitro* είτε από την καλλιέργεια που εγκαταστάθηκε από σπορόφυτα ή από την καλλιέργεια που εγκαταστάθηκε από ενήλικα φυτά ήταν 120 (15 δοχεία, 8 φυτάρια ανά δοχείο) για κάθε τύπο ριζοβολημένου μικρομοσχεύματος.

Τα φυτάρια και των δύο τύπων μικρομοσχευμάτων είτε από καλλιέργεια σποροφύτων ή από καλλιέργεια ενήλικων νεαρών φυτών αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο, εγκλιματίστηκαν επιτυχώς σε υψηλό ποσοστό 92 - 98%, διατηρώντας τα χαρακτηριστικά των μητρικών φυτών.

Μετά την ολοκλήρωση του εγκλιματισμού (1 μήνα), ακολούθησε μεταφύτευση σε γλάστρα 10 cm σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (2:1, v/v) (Εικ. II.Π.32α). Τα φυτά λιπαίνονταν με υδατοδιαλυτό πλήρες λίπασμα Nutrileaf 20:20:20 σε συγκέντρωση 2,0 g

L⁻¹ μια φορά το μήνα. Η ανάπτυξη των φυτών ήταν 100% επιτυχής κατά τους τρεις επόμενους μήνες από τη μεταφύτευσή τους σε ατομική γλάστρα (Εικ. II.Π.32β).



Εικόνα II.Π.32. Μεταφτευμένο φυτάριο *A. barba-jovis* ένα μήνα μετά τον εγκλιματισμό (α), τρεις μήνες μετά τη μεταφύτευση (β).

II.Π.3.2 *Ballota acetabulosa*

II.Π.3.2.1 Αρχική εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας

Απολύμανση φυτικού υλικού

Το ποσοστό μολύνσεων στις και στις τρεις προσπάθειες, που έγιναν το Νοέμβριος 2012, Μάρτιο 2013 και Μάρτιο 2014, από ενήλικα, αυτοφυή φυτά και Μάιο 2015, από νεαρά φυτά ηλικίας 8 μηνών, εγκαταστημένα στο Βοτανικό Κήπο του του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γ.Π.Α, για εγκατάσταση αρχικής καλλιέργειας, ήταν 100% με αποτέλεσμα την ολοκληρωτική απώλεια των καλλιεργειών (Πίν. II.Π.31). Η αναποτελεσματικότητα της απολύμανσης, πιθανώς οφείλεται στα πυκνά τριχίδια κατά μήκος όλου του βλαστού που παρεμποδίζουν τη δράση του απολυμαντικού μέσου.

Το Μάιο 2013 πραγματοποιήθηκε εγκατάσταση αρχικής καλλιέργειας, με έκφυτα κορυφής, που κόπηκαν από νεαρά φυτά, ηλικίας 4 μηνών, τα οποία είχαν προέλθει από καλλιέργεια *in vitro* σποροφύτων και τα οποία αναπτύσσονταν στο θερμοκήπιο. Τα έκφυτα καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS χωρίς ή με 1,0 mg L⁻¹ BA ή ZEAT. Το ποσοστό μολύνσεων ήταν 50% στο υπόστρωμα MS χωρίς ή με 1,0 mg L⁻¹ BA και 58% στο υπόστρωμα MS με 1,0 mg L⁻¹ ZEAT (Πίν. II.Π.31). Το ποσοστό αντίδρασης των εκφύτων ήταν χαμηλό (29 - 41%) στα τρία υποστρώματα που δοκιμάστηκαν (Πίν. II.Π.32).

Πίνακας. Π.Π.31. Αποτελεσματικότητα απολύμανσης σε πειράματα αρχικής εγκατάστασης εκφύτων *B. acetabulosa* από ενήλικα, αυτοφυή φυτά στο Βοτανικό κήπο του Διομήδους, από την Πάρνηθα, από εγκατεστημένα φυτά στο Βοτανικό κήπο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γ.Π.Α και από νεαρά φυτά αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο.

Προέλευση Εκφύτων	Έτος	Μήνας	Απολύμανση		Ποσοστό Μολύνσεων (%)
			Συγκέντρωση	Χρόνος	
			Υδ. Διαλ. χλωρίνης εμπορίου (%)	Απολύμανσης (min)	
Έκφυτα ενήλικων αυτοφυών φυτών	2012	Νοέμβριος	30	20	100
	2013	Μάρτιος	30	20	100
	2014	Μάρτιος	30	20	100
Έκφυτα νεαρών φυτών εγκαταστημένων στο Γ.Π.Α.	2015	Μάιος	20	20	100
Έκφυτα νεαρών φυτών αναπτυσσόμενων στο θερμοκήπιο	2013	Μάιος	10	10	50-58

Το ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς ήταν 17% στο υπόστρωμα MS χωρίς PGRs και 25% στο υπόστρωμα που περιείχε 1,0 mg L⁻¹ BA (Πίν. Π.Π.32). Σε υπόστρωμα με 1,0 mg L⁻¹ ZEAT καταγράφηκε ένα ποσοστό εκφύτων (25%) που σχημάτισε υπερενυδατωμένη μάζα (βλαστοί και φύλλα). Στους υπερενυδατωμένους βλαστούς δεν ήταν δυνατόν να καταγραφεί ο αριθμός τους, αλλά ούτε και το μήκος ή ο αριθμός των κόμβων (Πίν. Π.Π.32). Ο μέσος αριθμός των παραγόμενων βλαστών και των κόμβων τους δεν διάφερε στα τρία υποστρώματα, ενώ το μέσο μήκος των βλαστών ήταν μεγαλύτερο στο υπόστρωμα MS χωρίς PGRs και στο υπόστρωμα με 1,0 mg L⁻¹ BA (Πίν. Π.Π.32). Στο υπόστρωμα MS χωρίς PGRs και στο υπόστρωμα με παρουσία BA ο αριθμός υπερενυδατωμένων βλαστών ανά έκφυτο ήταν 1,3 και 1,4 αντίστοιχα. Επιπλέον στο υπόστρωμα MS χωρίς PGRs παρατηρήθηκε ριζοβολία σε ποσοστό 48%.

Πίνακας Π.Π.32. Επίδραση του είδους της PGR, στην αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου του *B. acetabulosa*, που προήλθαν από νεαρά φυτά, ηλικίας 4 μηνών αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο, κατά την αρχική εγκατάσταση.

PGRs (mg L ⁻¹)	Ποσοστό (%)			Μέσος	Μέσο	Μέσος	Μέσος Αριθμός	Δυν. Πολ/ σμού
	Βλαστ/ ση ¹	Βλαστ/ ση ²	Βλαστ/ ση ³	Αριθμός Βλαστών ⁴	Μήκος Βλαστών ⁴ (cm)	Αριθμός Κόμβων ⁴	Μέσος Αριθμός Υπερενυδατωμ ένων Βλαστών ⁵	
0,0	8 a	17 b	4 b	1,5 a	4,1 a	4,0 a	1,3 a	0,5 a
1,0 ZEAT	4 b	0 c	25 a	1,0 a	2,5 b	3,8 a	0,0 b	0,2 a
1,0 BA	8 a	25 a	8 b	2,5 a	4,8 a	4,0 a	1,4 a	0,8 a
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***	***	***	NS	***	NS	***	NS

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικά, ***: σημαντικό σε $P \leq 0,001$, $n=24$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹(%) x Μέσος αριθμός βλαστών⁴ x Μέσος αριθμός κόμβων⁴

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς

² Τα έκφυτα σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς

³ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενυδατωμένη μάζα

⁴ Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί

⁵ Υπερενυδατωμένοι βλαστοί

Από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα

Τον Ιανουάριο 2013 πραγματοποιήθηκε εγκατάσταση αρχικής καλλιέργειας, με έκφυτα κορυφής και κόμβου που ελήφθησαν από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα, τα οποία καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS είτε χωρίς PGRs, είτε με 0,5, 1,0 ή 2,0 mg L⁻¹ BA ή ZEAT ή 2iP ή KIN, με σκοπό να ελεγχθεί η επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης κυτοκινινών στην αντίδραση των εκφύτων. Το ποσοστό αντίδρασης των εκφύτων ήταν υψηλό (83 - 100%) σε όλα τα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν. Στα υποστρώματα με 2,0 mg L⁻¹ BA ή 2iP το ποσοστό αντίδρασης ήταν 100% ή 92% αντίστοιχα, αλλά υψηλό ποσοστό των εκφύτων σχημάτισαν υπερενυδατωμένη μάζα (37% ή 21% αντίστοιχα) και ένα χαμηλότερο ποσοστό των εκφύτων (13% ή 8% αντίστοιχα) σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς (Πίν. Π.Π.33). Η διπαραγοντική ανάλυση έδειξε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του είδους και της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης όσον αφορά το ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς, το μέσο μήκος των βλαστών και το δυναμικό πολλαπλασιασμού (Πίν. Π.Π.33). Η παρουσία BA και ZEAT στο υπόστρωμα και στις τρεις συγκεντρώσεις που χρησιμοποιήθηκαν αύξησε τον αριθμό των παραγόμενων βλαστών ανά έκφυτο, όπως και το 2iP και KIN στην υψηλότερη συγκέντρωση που χρησιμοποιήθηκαν (2,0 mg L⁻¹) (Πίν. Π.Π.33). Υψηλότερη παραγωγή βλαστών (3,3 - 4,2 βλαστοί/ έκφυτο) παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα με BA και ZEAT και στις τρεις συγκεντρώσεις και στο υπόστρωμα με KIN σε συγκέντρωση 2,0 mg L⁻¹. Σε υπόστρωμα χωρίς PGRs σημειώθηκε η μεγαλύτερη

επιμήκυνση των βλαστών και καταγράφηκε ο μεγαλύτερος αριθμός κόμβων ανά έκφυτο (Πίν. II.Π.33, Εικ. II.Π.33). Υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού (11,6) σημειώθηκε στα υποστρώματα που περιείχαν 1,0 mg L⁻¹ ZEAT ή 2,0 mg L⁻¹ KIN, λόγω του μεγάλου αριθμού παραγόμενων βλαστών και του υψηλού αριθμού κόμβων (Πίν. II.Π.33). Η παρουσία κυτοκινινών στο υπόστρωμα ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό υπερενυδατωμένων βλαστών, επιπλέον η αύξηση της συγκέντρωσης κυτοκινίνης στο υπόστρωμα οδήγησε σε αύξηση του αριθμού των υπερενυδατωμένων βλαστών ανά έκφυτο (Πίν. II.Π.33, Εικ. II.Π.33). Τέλος στο υπόστρωμα MS χωρίς PGRs παρατηρήθηκε ριζοβολία σε ποσοστό 86%.

Πίνακας II.Π.33. Επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης PGRs, στην αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου του *B. acetabulosa*, που προήλθαν από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα, κατά την αρχική εγκατάσταση.

PGRs (mg L ⁻¹)	Ποσοστό (%)			Μέσος Αριθμός Βλαστών ⁴	Μέσο Μήκος Βλαστών ⁴ (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ⁴	Μέσος Αριθμός Υπερενυδατωμ ένων Βλαστών	Δυν. Πολ/ σμού
	Βλαστ /ση ¹	Βλαστ /ση ²	Βλαστ /ση ³					
0,0 ±	96 ab	0 e	0 e	1,3 e	4,6 a	4,4 a	0,2 c	5,5 de
0,5 ZEAT	83 d	0 e	0 e	3,9 ab	1,7 bc	3,4 bcd	0,0 d	11,0 bc
1,0 ZEAT	83 d	0 e	17 c	4,0 ab	1,8 b	3,5 bc	0,6 b	11,6 a
2,0 ZEAT	76 de	0 e	12 cd	4,2 a	1,3 bc	2,5 ef	0,7 b	8,0 bc
0,5 BA	83 d	4 c	0 e	3,3 abc	1,0 c	2,7 def	0,1 cd	7,4 cde
1,0 BA	92 bc	0 e	8 d	3,9 ab	1,2 bc	2,3 f	0,3 c	8,3 bc
2,0 BA	50 g	13 a	37 a	3,3 abc	1,0 bc	2,2 f	0,5 b	3,6 e
0,5 KIN	100 a	0 e	0 e	2,1 d	1,5 bc	3,7 ab	0,3 c	7,8 cd
1,0 KIN	83 d	4 c	8 d	2,9 cd	1,2 bc	3,0 bcd	0,6 b	7,2 cde
2,0 KIN	88 cd	4 c	8 d	4,1 ab	1,9 b	3,2 bcd	1,0 a	11,6 a
0,5 2iP	83 d	2 d	0 e	2,4 cd	1,9 b	3,7 ab	0,3 c	7,4 cde
1,0 2iP	71 e	4 c	17 c	2,7 cd	1,4 bc	3,4 bcd	0,5 b	6,5 cde
2,0 2iP	63 f	8 b	21 b	3,1 bcd	1,3 bc	2,7 def	0,5 b	5,3 de
<i>F</i> _{PGRs}	-	-	-	***	-	***	-	-
<i>F</i> _{Συγκέντρωσης}	-	-	-	*	-	**	-	-
<i>F</i> _{PGRs x Συγκέντρωση}	***	***	***	NS	**	NS	***	**
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***	***	***	***	***	***	***	***

± Τα δεδομένα δεν συμμετέχουν στην 2-way ANOVA

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικά ή *, **, ***: σημαντικά σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$, $P \leq 0,001$, αντίστοιχα, $n=24$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹(%) x Μέσος αριθμός βλαστών⁴ x Μέσος αριθμός κόμβων⁴

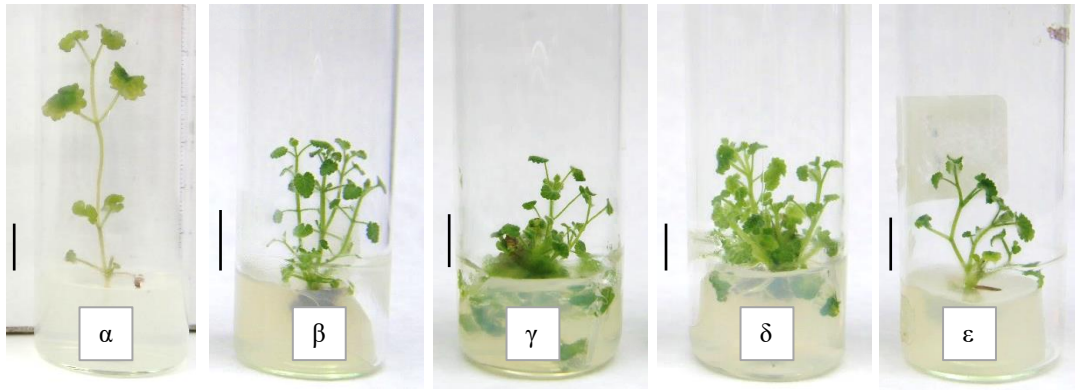
¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς

² Τα έκφυτα σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς

³ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενυδατωμένη μάζα

⁴ Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί

⁵ Υπερενυδατωμένοι βλαστοί



Εικόνα II.33. Αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου *B. acetabulosa*, σε υπόστρωμα MS χωρίς PGRs (α) ή εμπλουτισμένο με $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ZEAT (β), $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA (γ), $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ KIN (δ), και $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP (ε). Η κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει μήκος 1 cm.

II.3.2.2 Πολλαπλασιασμός βλαστών σε *in vitro* καλλιέργεια

Εγκατεστημένη από νεαρά φυτά αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο

Στις επόμενες δύο υποκαλλιέργειες (1^η και 2^η) που ακολούθησαν την αρχική καλλιέργεια από νεαρά φυτά, ηλικίας 4 μηνών, αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο που εγκαταστάθηκε το Μάιο 2013, έκφυτα κορυφής και κόμβου καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα χωρίς PGRs (Πίν. II.34). Το ποσοστό αντίδρασης των εκφύτων ήταν πολύ υψηλό (96 - 100%) στα έκφυτα κορυφής και κόμβου (Πίν. II.34). Και στις δύο υποκαλλιέργειες δεν παρουσιάστηκαν έκφυτα που να σχημάτιζαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς, ενώ μόνο τα έκφυτα κόμβου έδωσαν υπερενυδατωμένη μάζα (που δεν μπορούσε να καταγραφεί ο αριθμός των βλαστών και κατά επέκταση και το μήκος των βλαστών και ο αριθμός κόμβων) σε ποσοστό 25 - 27% (δεν παρουσιάζονται δεδομένα). Στην πρώτη υποκαλλιέργεια εκτός από το ποσοστό των εκφύτων που σχημάτιζαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς, όλες οι άλλες παράμετροι που καταγράφηκαν δεν διέφεραν στατιστικά (Πίν. II.34). Στη δεύτερη υποκαλλιέργεια τα έκφυτα κόμβου παρουσίασαν μεγαλύτερο αριθμό παραχθέντων βλαστών, ενώ τα έκφυτα κορυφής μεγαλύτερη επιμήκυνση των βλαστών και μεγαλύτερο αριθμό κόμβων ανά βλαστό (Πίν. II.34). Υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού στη δεύτερη υποκαλλιέργεια παρουσίασαν τα έκφυτα κορυφής, λόγω του υψηλότερου ποσοστού εκφύτων που σχημάτιζαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς και μεγαλύτερου αριθμού κόμβων. Επιπλέον και στις δύο υποκαλλιέργειες τα έκφυτα ανεξαρτήτως προέλευσης ριζοβόλησαν με ποσοστό 88 - 100% (έκφυτα κορυφής) και 70 - 88% (έκφυτα κόμβου) (δεν παρουσιάζονται δεδομένα).

Πίνακας II.Π.34. Αντίδραση εκφύτων κορυφής ή κόμβου του *B. acetabulosa*, που προήλθαν από νεαρά φυτά αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο, κατά την πρώτη (1^η) και δεύτερη (2^η) υποκαλλιέργεια.

Υποκαλλιέργεια	Είδος εκφύτων / PGRs (mg L ⁻¹)	Ποσοστό Βλαστ/σης ¹ (%)	Μέσος Αριθμός Βλαστών ²	Μέσο Μήκος Βλαστών ² (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ²	Μέσος Αριθμός Υπερενυδατωμένων Βλαστών ³	Δυν. Πολ/σμού
	1 ^η (n=10)	Έκφυτα κορυφής					
0,0		100 a	1,5 a	8,0	4,8 a	0,0 b	7,2 a
Έκφυτα κόμβου							
	0,0	73 b	1,9 a	6,3 a	4,8 a	0,2 a	6,7 a
	<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***	NS	NS	NS	***	NS
2 ^η (n=36)	Έκφυτα κορυφής						
	0,0	97 a	1,0 b	6,9 a	6,5 a	0,0 b	6,3 a
	Έκφυτα κόμβου						
	0,0	71 b	1,5 a	4,9 b	5,1 b	0,9 a	5,5 b
	<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***	***	***	**	***	***

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικά ή **, ***: σημαντικά σε $P \leq 0,01$, $P \leq 0,001$

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹(%) x Μέσος αριθμός βλαστών² x Μέσος αριθμός κόμβων²

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς

² Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί

³ Υπερενυδατωμένοι βλαστοί

Εγκατεστημένη από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα

Στην πρώτη υποκαλλιέργεια, που ακολούθησε την αρχική εγκατάσταση από *in vitro* αναπτυγμένα σπορόφυτα που εγκαταστάθηκε τον Ιανουάριο 2013, διερευνήθηκε η επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης κυτοκινίνης στον πολλαπλασιασμό των βλαστών, επιπλέον ελέγχθηκε και η επίδραση του τύπου του εκφύτου (κορυφής ή κόμβου). Έκφυτα κορυφής η κόμβου τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα MS, χωρίς ή με 0,5, 1,0 ή 2,0 mg L⁻¹ BA ή ZEAT ή 2iP ή KIN, σε υπόστρωμα ίδιο με αυτό από το οποίο προήλθαν. Το ποσοστό αντίδρασης των εκφύτων ήταν υψηλό (83 - 100%) σε όλα τα υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν και για τους δύο τύπους εκφύτων (Πίν. II.Π.35). Τα έκφυτα κορυφής εμφάνισαν υψηλότερο ποσοστό εκφύτων που σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς σε σύγκριση με τα έκφυτα κόμβου (Πίν. II.Π.35), ενώ στα έκφυτα κόμβου το ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς ήταν υψηλότερο σε σύγκριση με τα έκφυτα κορυφής (Πίν. II.Π.35). Και για τους δύο τύπους εκφύτων το υψηλότερο ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς ήταν 38% και καταγράφηκε στο υπόστρωμα με 0,5 mg L⁻¹ 2iP για τα έκφυτα κορυφής και στο υπόστρωμα με 1,0 mg L⁻¹ ZEAT για τα έκφυτα κόμβου. Επιπλέον στα υποστρώματα με κυτοκινίνη

παρατηρήθηκαν έκφυτα που σχημάτισαν υπερενυδατωμένη μάζα (που δεν μπορούσε να καταγραφεί ο αριθμός των βλαστών και κατά επέκταση και το μήκος των βλαστών και ο αριθμός κόμβων), το ποσοστό αυτό κυμαινόταν μεταξύ των κυτοκινινών αλλά και μεταξύ των συγκεντρώσεων, με το υψηλότερο ποσοστό να καταγράφεται στο υπόστρωμα με $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA (Πίν. II.Π.35). Το υψηλότερο ποσοστό εκφύτων που σχημάτισαν υπερενυδατωμένη μάζα εμφανίστηκε στα υποστρώματα που περιείχαν BA ή ZEAT ανεξαρτήτου της συγκέντρωσης αυτών και για τους δύο τύπους εκφύτων, επιπλέον για τα έκφυτα κορυφής στο υπόστρωμα με $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP και για έκφυτα κόμβου στα υποστρώματα που περιείχαν 2iP ανεξαρτήτου της συγκέντρωσης (Πίν. II.Π.35). Η τριπαραγοντική ανάλυση δεν ανέδειξε αλληλεπίδραση μεταξύ του τύπου των εκφύτων και του είδους και της συγκέντρωσης των κυτοκινινών στον αριθμό των παραχθέντων βλαστών, στο μήκος των βλαστών και στον αριθμό των κόμβων. Ο μέσος αριθμός των βλαστών επηρεάστηκε τόσο από το είδος όσο και από τη συγκέντρωση των κυτοκινινών, το μέσο μήκος βλαστών από τον τύπο του εκφύτου και από το είδος των κυτοκινινών, ενώ ο αριθμός των κόμβων και από τους τρεις παράγοντες (τύπο εκφύτου, είδος και συγκέντρωση κυτοκινινών) (Πίν. II.Π.35). Η υψηλότερη παραγωγή κανονικών (φυσιολογικών) βλαστών για τα έκφυτα κορυφής σημειώθηκε στο υπόστρωμα με $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA (6,3 βλαστοί/έκφυτο), ενώ για τα έκφυτα κόμβου στο υπόστρωμα με $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ZEAT (8,1 βλαστοί/έκφυτο) (Πίν. II.Π.35, Εικ. II.Π.34). Το μήκος των βλαστών και ο αριθμός των κόμβων ήταν υψηλότερα στο υπόστρωμα χωρίς PGRs και για τους δύο τύπους εκφύτων (Πίν. II.Π.35, Εικ. II.Π.34). Υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα MS με $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP ή KIN για τα έκφυτα κορυφής και με $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ KIN για τα έκφυτα κόμβου, λόγω υψηλού ποσοστού εκφύτων που σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς, του αυξημένου αριθμού παραχθέντων κανονικών βλαστών και του μεγαλύτερου μέσου αριθμού κόμβων (Πίν. II.Π.35). Στα έκφυτα κόμβου παρατηρήθηκε μεγαλύτερος αριθμός υπερενυδατωμένων βλαστών σε σύγκριση με τα έκφυτα κορυφής σε όλα τα υποστρώματα. Ο υψηλότερος αριθμός υπερενυδατωμένων βλαστών για τα έκφυτα κορυφής παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP (1,0 υπερενυδατωμένοι βλαστοί/έκφυτο), ενώ για τα έκφυτα κόμβου στο υπόστρωμα $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ZEAT (2,2 υπερενυδατωμένοι βλαστοί/έκφυτο) (Πίν. II.Π.35). Επιπλέον στο υπόστρωμα MS χωρίς PGRs παρατηρήθηκε ριζοβολία σε ποσοστό 96% για τα έκφυτα κορυφής και 62% για τα έκφυτα κόμβου (δεν παρουσιάζονται δεδομένα).

Πίνακας Π.Π.35. Επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης PGRs, στην αντίδραση εκφύτων κορυφής ή κόμβου της *B. acetabulosa*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από *in vitro* αναπτυγμένα σπορόφυτα, κατά την πρώτη υποκαλλιέργεια.

PGRs (mg L ⁻¹)	Ποσοστό (%)			Μέσος	Μέσο	Μέσος	Μέσος Αριθμός	Δυν. Πολ/ σμού
	Βλαστ /ση ¹	Βλαστ /ση ²	Βλαστ /ση ³	Αριθμός Βλαστών ⁴	Μήκος Βλαστών ⁴ (cm)	Αριθμός Κόμβων ⁴	Υπερευδατομ έων Βλαστών ⁵	
Έκφυτα κορυφής								
0,0 [±]	100 a	0 i	0 k	1,0 k	5,6 a	4,9 a	0,0 i	4,9 e
0,5 ZEAT	67 de	13 f	21 f	3,1 gh	2,5 efg	4,1 bc	0,6 ef	8,5 cd
1,0 ZEAT	58 fgh	8 g	33 c	5,6 bcd	2,7 def	3,4 cd	0,9 d	11,0 bc
2,0 ZEAT	57 b	4 h	30 d	5,1 cde	2,1 fgh	2,5 ghi	0,6 ef	7,3 cde
0,5 BA	46 i	29 c	25 e	3,2 fgh	1,8 ghi	2,4 ghi	0,6 ef	3,5 f
1,0 BA	71 d	4 h	25 e	6,3 b	1,6 hi	2,0 hi	0,4 g	9,0 cd
2,0 BA	63 efg	8 g	25 e	4,3 def	0,9 k	1,7 ij	0,2 h	4,6 ef
0,5 KIN	83 bc	13 f	0 k	2,9gh	2,4 efg	3,5 cd	0,6 ef	8,4 cd
1,0 KIN	88 b	13 f	0 k	2,0 ij	2,7 def	3,1 def	0,3 h	5,5 de
2,0 KIN	88 b	0 i	13 i	4,6 cd	2,6 def	3,1 def	0,0 i	12,6 ab
0,5 2iP	58 fgh	38 a	0 k	3,0 gh	2,4 efg	3,7 bcd	1,0 d	6,4 cde
1,0 2iP	63 efg	4 h	33 c	2,9 gh	3,1 cd	3,9 bcd	0,4 g	7,1cde
2,0 2iP	100 a	0 i	0 k	3,7 efg	3,5 bc	4,2 bc	0,0	15,5 a
Έκφυτα κόμβου								
0,0 [±]	79 c	21 d	0 k	1,5 j	4,2 b	5,2 a	0,5 g	6,2 cde
0,5 ZEAT	67 de	17 e	16 h	4,3 def	2,3 efg	2,9 efg	0,7 ef	8,4 cde
1,0 ZEAT	37 j	38 a	25 e	8,1 a	2,0 fgh	2,1 hi	2,2 a	6,3 cde
2,0 ZEAT	29 k	33 b	33 c	3,7 efg	1,8 ghi	2,0 hi	1,7 b	2,2 g
0,5 BA	58 fgh	13 f	29 d	5,7 bc	1,8 ghi	2,2 hi	0,9 d	7,3 cde
1,0 BA	53 gh	29 c	18 g	6,1 b	1,6 hi	2,1 hi	1,2 cd	6,8 cde
2,0 BA	17 l	17 e	54 a	5,3 bcd	1,0 jk	1,4 j	1,0 d	1,3 g
0,5 KIN	57 gh	22 d	4 j	2,2 i	3,0 cde	4,5 ab	0,6 ef	5,6 de
1,0 KIN	79 c	13 f	0 k	2,0 ij	2,9 cde	3,2 def	0,4 g	5,1 e
2,0 KIN	96 a	0 i	4 j	4,5 cde	2,6 def	3,0 def	0,2 h	13,0 ab
0,5 2iP	67 de	8 g	25 e	3,8 efg	2,4 efg	2,7 efg	0,3 h	6,9 cde
1,0 2iP	54 h	4 h	38 b	2,9 gh	2,2 efg	2,5 ghi	0,3 h	3,9 ef
2,0 2iP	71 d	4 h	25 e	3,1 gh	1,9 gh	2,7 efg	0,3 h	5,9 de

$F_{\text{Έκφύτου}}$	-	-	-	NS	-	-	-	***
F_{PGRs}	-	-	-	-	-	-	-	***
$F_{\text{Συγκέντρωσης}}$	-	-	-	-	NS	-	-	NS
$F_{\text{Έκφύτου x PGRs}}$	***	***	***	NS	**	***	***	*
$F_{\text{Έκφύτου x Συγκέντρωση}}$	***	***	***	NS	NS	NS	***	***
$F_{\text{PGRs x Συγκέντρωση}}$	***	***	***	***	NS	*	***	***
$F_{\text{Έκφύτου x PGRs x Συγκέντρωση}}$	***	***	***	NS	NS	NS	***	***
$F_{\text{one-way ANOVA}}$	***	***	***	***	***	***	***	***

[‡] Τα δεδομένα δεν συμμετέχουν στην 2-way ANOVA

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικά ή *, **, ***: σημαντικά σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$, $P \leq 0,001$, αντίστοιχα, $n=24$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹(%) x Μέσος αριθμός βλαστών⁴ x Μέσος αριθμός κόμβων⁵

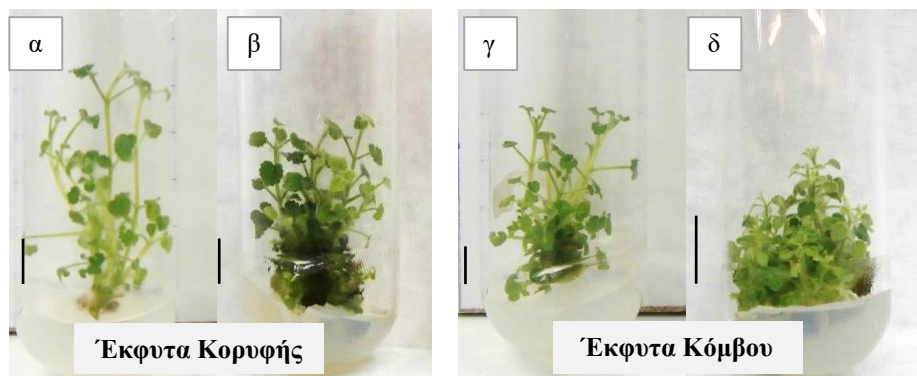
¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς

² Τα έκφυτα σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς

³ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενυδατωμένη μάζα

⁴ Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί

⁵ Υπερενυδατωμένοι βλαστοί



Εικόνα II.Π.34. Αντίδραση εκφύτων κορυφής σε υπόστρωμα MS με $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP (α) ή $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ BA (β) και κόμβου σε υπόστρωμα MS με $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ KIN (γ) ή $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA (δ) της *B. acetabulosa*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από *in vitro* αναπτυγμένα σπορόφυτα, κατά την πρώτη υποκαλλιέργεια. Η κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει μήκος 1 cm.

Στη δεύτερη υποκαλλιέργεια το ποσοστό αντίδρασης των εκφύτων παρέμεινε σε υψηλά επίπεδα (79 - 100%) και για τους δύο τύπους εκφύτων (κορυφής και κόμβου). Τα έκφυτα κορυφής παρουσίασαν ελαφρώς υψηλότερο ποσοστό εκφύτων που σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς σε σύγκριση με τα έκφυτα κόμβου (Πίν. II.Π.36). Στα υποστρώματα με κυτοκίνη παρουσιάστηκαν έκφυτα που σχημάτισαν υπερενυδατωμένη μάζα (που δεν μπορούσε να καταγραφεί ο αριθμός των βλαστών και κατά επέκταση και το μήκος των βλαστών και ο αριθμός κόμβων), το ποσοστό αυτό κυμαινόταν από 13 - 21% για τα έκφυτα κορυφής και από 17 - 33% για τα έκφυτα

κόμβου (Πίν. II.Π.36). Η διπαραγοντική ανάλυση ανέδειξε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του τύπου των εκφύτων και του είδους της κυτοκινίνης όσον αφορά στο ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς, στο ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς, στο ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν υπερενυδατωμένη μάζα, στον αριθμό των σχηματιζόμενων βλαστών, στο μήκος των βλαστών και τον αριθμό των κόμβων, ενώ αντίθετα δεν ανέδειξε αλληλεπίδραση όσον αφορά στο δυναμικό πολλαπλασιασμού, το οποίο επηρεάστηκε τόσο από το είδος όσο και από τη συγκέντρωση των κυτοκινινών (Πίν. II.Π.36). Το υψηλότερο ποσοστό εκφύτων που σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς και για τους δύο τύπους εκφύτων παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα MS χωρίς PGR. Τα έκφυτα κορυφής σχημάτισαν το μεγαλύτερο αριθμό βλαστών (6,4 βλαστοί/έκφυτο) στο υπόστρωμα 1,0 mg L⁻¹ BA, ενώ τα έκφυτα κόμβου στο υπόστρωμα 1,0 mg L⁻¹ ZEAT (6,0 βλαστοί/έκφυτο) (Πίν. II.Π.36, Εικ. II.Π.35, II.Π.36). Το μέσο μήκος των βλαστών και ο αριθμός κόμβων ήταν υψηλότερα στο υπόστρωμα MS χωρίς PGR και για τους δύο τύπους εκφύτων (Πίν. II.Π.36, Εικ. II.Π.35, II.Π.36). Το υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα MS χωρίς PGR για τα έκφυτα κορυφής και για τα έκφυτα κόμβου στο υπόστρωμα 1,0 mg L⁻¹ 2iP (Πίν. II.Π.36). Ο υψηλότερος αριθμός υπερενυδατωμένων βλαστών παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα που περιείχε BA ή ZEAT και για τους δύο τύπους εκφύτων (Πίν. II.Π.36). Τέλος στο υπόστρωμα MS χωρίς PGRs παρατηρήθηκε ριζοβολία σε ποσοστό 100% για τα έκφυτα κορυφής και 87% για τα έκφυτα κόμβου (δεν παρουσιάζονται δεδομένα).

Πίνακας Π.Π.36. Επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης PGRs, στην αντίδραση εκφύτων κορυφής ή κόμβου της *B. acetabulosa*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από *in vitro* αναπτυγμένα σπορόφυτα, κατά τη δεύτερη υποκαλλιέργεια.

PGRs (mg L ⁻¹)	Ποσοστό (%)			Μέσος	Μέσο	Μέσος	Μέσος Αριθμός	Δυν. Πολ/ σμού
	Βλαστ /ση ¹	Βλαστ /ση ²	Βλαστ /ση ³	Αριθμός Βλαστών ⁴	Μήκος Βλαστών ⁴ (cm)	Αριθμός Κόμβων ⁴	Υπερενδατωμ ένον Βλαστών ⁵	
Έκφυτα κορυφής								
0,0 ±	100 a	0 b	0 f	2,9 e	5,4 a	5,3 a	0,6 e	15,4 a
1,0 ZEAT	79 c	0 b	21 c	3,7 de	2,6 bc	3,9 b	1,0 c	11,4 b
1,0 BA	61 de	9 a	17 d	6,4 a	2,1 bc	2,0 d	1,1 c	7,8 de
1,0 2iP	87 b	0 b	13 e	4,4 cd	2,2 bc	2,6 cd	0,3 f	10,0 bc
Έκφυτα κόμβου								
0,0 ±	96 a	0 b	0 f	3,2 e	3,2 b	3,1 bc	0,9 de	9,5 cd
1,0 ZEAT	67 d	0 b	33 a	6,0 ab	2,1 c	2,8 cd	2,1 a	11,3 b
1,0 BA	54 e	0 b	25 b	4,8 bcd	2,4 bc	2,7 cd	1,4 bc	7,0 e
1,0 2iP	83 bc	0 b	17 d	5,0 bc	2,9 bc	2,8 cd	0,8 de	11,6 ab
<i>F</i> _{Εκφύτου}	-	-	-	-	-	-	-	***
<i>F</i> _{PGRs}	-	-	-	-	-	-	-	***
<i>F</i> _{Εκφύτου x PGRs}	**	***	***	***	***	***	***	NS
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***	***	***	***	***	***	***	**

± Τα δεδομένα δεν συμμετέχουν στην 2-way ANOVA

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικά ή **, ***: σημαντικά σε $P \leq 0,01$, $P \leq 0,001$, αντίστοιχα, $n=24$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹(%) x Μέσος αριθμός βλαστών⁴ x Μέσος αριθμός κόμβων⁴

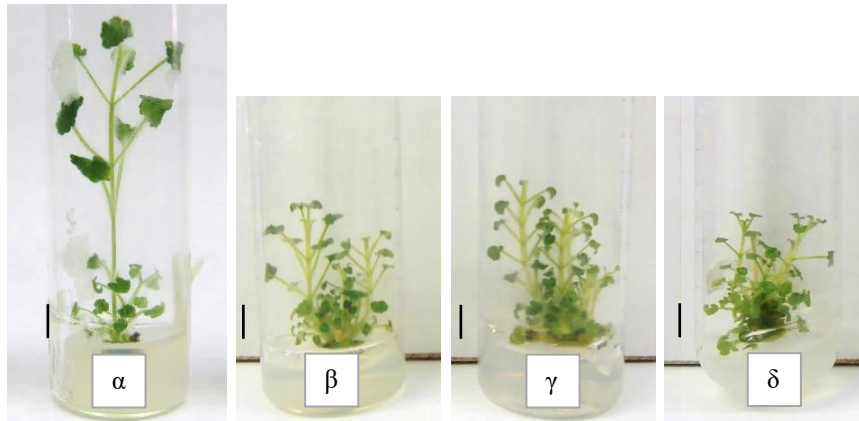
¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενδατωμένους μαζί με μη υπερενδατωμένους βλαστούς

² Τα έκφυτα σχημάτισαν μόνο υπερενδατωμένους βλαστούς

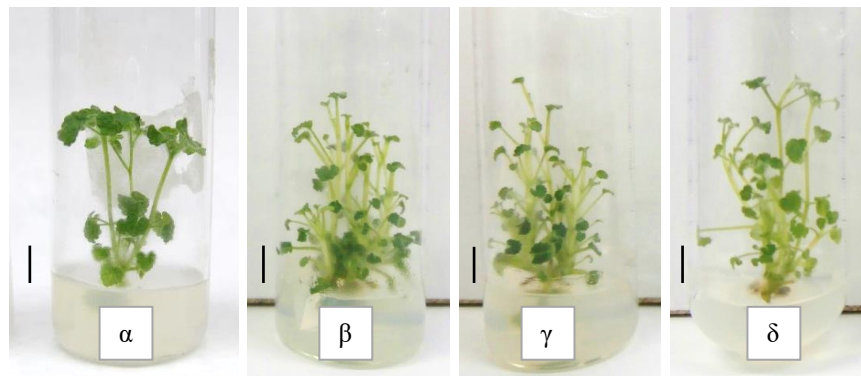
³ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενδατωμένη μάζα

⁴ Μη υπερενδατωμένοι βλαστοί

⁵ Υπερενδατωμένοι βλαστοί



Εικόνα II.II.35. Αντίδραση εκφύτων κορυφής *B. acetabulosa* σε υπόστρωμα MS χωρίς PGRs (α) ή εμπλουτισμένο με $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ZEAT (β) BA (γ) ή 2iP (δ) κατά τη δεύτερη υποκαλλιέργεια. Η κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει μήκος 1 cm.



Εικόνα II.II.36. Αντίδραση εκφύτων κόμβου *B. acetabulosa* σε υπόστρωμα MS χωρίς PGRs (α) ή εμπλουτισμένο με $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ZEAT (β), BA (γ) ή 2iP (δ) κατά τη δεύτερη υποκαλλιέργεια. Η κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει μήκος 1 cm.

Στην τρίτη και τέταρτη υποκαλλιέργεια προκειμένου να επιβεβαιώσουμε τα αποτελέσματα των υποστρωμάτων που περιείχαν BA και ZEAT της δεύτερης υποκαλλιέργειας, έκφυτα κορυφής ή κόμβου τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα MS χωρίς PGRs (ως μάρτυρας) ή με $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA ή ZEAT, κάθε έκφυτο στο υπόστρωμα από το οποίο προήλθε.

Στην τρίτη και τέταρτη υποκαλλιέργεια το ποσοστό αντίδρασης των εκφύτων παρέμεινε σε υψηλά επίπεδα σε όλα τα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν και για τους δύο τύπους εκφύτων (83 - 100% για τα έκφυτα κορυφής και 79 - 96% για τα έκφυτα κόμβου (Πίν. II.II.37, Πίν. II.II.38). Τα έκφυτα κορυφής παρουσίασαν υψηλότερο ποσοστό εκφύτων που σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς σε σύγκριση με τα έκφυτα κόμβου (Πίν. II.II.37, II.II.38). Και στα τρία υποστρώματα παρουσιάστηκαν

έκφυτα που σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς, με το μεγαλύτερο ποσοστό (50 - 58%) να εμφανίζεται στο υπόστρωμα με $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ZEAT ανεξάρτητα του τύπου των εκφύτων και σε αυτό το υπόστρωμα παρατηρήθηκε το υψηλότερο ποσοστό υπερενυδατωμένων βλαστών (34 - 34%) (Πίν. II.Π.37, II.Π.38). Τόσο στην τρίτη όσο και στην τέταρτη υποκαλλιέργεια η διπαραγοντική ανάλυση ανέδειξε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του τύπου των εκφύτων και του είδους της κυτοκινίνης, όσον αφορά στο ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς, στο ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς, στο μήκος των παραχθέντων βλαστών και το μέσο αριθμό κόμβων, επιπλέον στην τρίτη υποκαλλιέργεια στον αριθμό των σχηματιζόμενων βλαστών, ενώ στην τέταρτη υποκαλλιέργεια στο δυναμικό πολλαπλασιασμού. Αντίθετα η διπαραγοντική ανάλυση δεν ανέδειξε αλληλεπίδραση των παραγόντων όσον αφορά την τρίτη υποκαλλιέργεια στο δυναμικό πολλαπλασιασμού, το οποίο επηρεάστηκε μόνο από το είδος της κυτοκινίνης και στην τέταρτη υποκαλλιέργεια στον αριθμό παραχθέντων βλαστών, οποίος επηρεάστηκε μόνο από το είδος της κυτοκινίνης (Πίν. II.Π.37, II.Π.38). Τα έκφυτα κορυφής ή κόμβου σχημάτισαν το μεγαλύτερο αριθμό κανονικών βλαστών (9,9 - 10,3 ή 11,6 - 12,3 βλαστοί/έκφυτο αντίστοιχα) στο υπόστρωμα $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ZEAT, στο ίδιο υπόστρωμα παρατηρήθηκε και ο μεγαλύτερος αριθμός υπερενυδατωμένων βλαστών (5,1 - 5,2 ή 5,9 - 6,6 υπερενυδατωμένοι βλαστοί/έκφυτο αντίστοιχα) και στις δύο υποκαλλιέργειες (Πίν. II.Π.37, II.Π.38, Εικ. II.Π.37). Το μέσο μήκος των βλαστών και ο αριθμός κόμβων ήταν μεγαλύτερα στο υπόστρωμα MS χωρίς PGR και για τους δύο τύπους εκφύτων και στις δύο υποκαλλιέργειες (Πίν. II.Π.37, II.Π.38, Εικ. II.Π.37). Το υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού παρατηρήθηκε στα υποστρώματα που περιείχαν κυτοκινίνη (ZEAT ή BA) και για τους δύο τύπους εκφύτων, λόγω του μεγαλύτερου αριθμού παραχθέντων κανονικών βλαστών ανά έκφυτο (Πίν. II.Π.37, II.Π.38). Επιπλέον στο υπόστρωμα MS χωρίς PGRs παρατηρήθηκε ριζοβολία σε ποσοστό 100% για τα έκφυτα κορυφής και 80 - 84% για τα έκφυτα κόμβου (δεν παρουσιάζονται δεδομένα) τόσο στην τρίτη όσο και στην τέταρτη υποκαλλιέργεια.

Πίνακας II.Π.37. Επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης PGRs, στην αντίδραση εκφύτων κορυφής ή κόμβου της *B. acetabulosa*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα, κατά την τρίτη υποκαλλιέργεια.

PGRs (mg L ⁻¹)	Ποσοστό (%)		Μέσος Αριθμός Βλαστών ³	Μέσο Μήκος Βλαστών ³ (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ³	Μέσος Αριθμός Υπερενυδατωμ ένων Βλαστών ⁴	Δυν. Πολ/ σμού
	Βλαστ/ ση ¹	Βλαστ/ ση ²					
Έκφυτα κορυφής							
0,0 ±	88 a	12 e	1,3 d	6,2 a	7,2 a	0,4 f	8,2 c
1,0 ZEAT	46 de	54 a	9,9 ab	1,6 c	3,4 c	5,1 b	15,5 a
1,0 BA	63 bc	17 d	9,1 bc	1,4 c	2,7 c	1,6 de	15,5 a
Έκφυτα κόμβου							
0,0 ±	67 b	21 c	2,7 d	3,4 b	4,8 b	1,1 e	8,7 b
1,0 ZEAT	42 e	54 a	11,6 a	1,2 c	2,6 c	5,9 a	12,7 a
1,0 BA	54 cd	25 b	6,9 c	1,4 c	3,9 bc	3,2 c	14,5 a
$F_{\text{Εκφύτου}}$	-	-	-	-	-	-	NS
F_{PGRs}	-	-	-	-	-	-	***
$F_{\text{Εκφύτου} \times \text{PGRs}}$	*	***	*	***	***	***	NS
$F_{\text{one-way ANOVA}}$	***	***	***	***	***	***	***

± Τα δεδομένα δεν συμμετέχουν στην 2-way ANOVA

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικά ή *, **: σημαντικά σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,001$, αντίστοιχα, $n=24$.

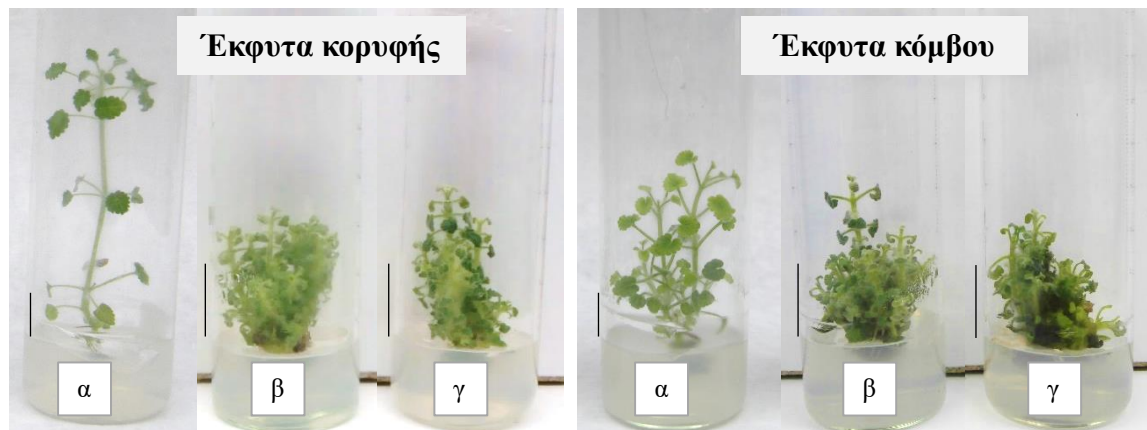
Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹(%) x Μέσος αριθμός βλαστών³ x Μέσος αριθμός κόμβων³

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερνυδατωμένους μαζί με μη υπερνυδατωμένους βλαστούς

² Τα έκφυτα σχημάτισαν μόνο υπερνυδατωμένους βλαστούς

³ Μη υπερνυδατωμένοι βλαστοί

⁴ Υπερνυδατωμένοι βλαστοί



Εικόνα II.Π.37. Αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου *B. acetabulosa* σε υπόστρωμα MS χωρίς PGRs (α) ή εμπλουτισμένο με 1,0 mg L⁻¹ ZEAT (β) ή BA (γ) κατά την τρίτη υποκαλλιέργεια. Η κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει μήκος 1 cm.

Πίνακας Π.Π.38. Επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης PGRs, στην αντίδραση εκφύτων κορυφής ή κόμβου της *B. acetabulosa*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα, κατά την τέταρτη υποκαλλιέργεια.

PGRs (mg L ⁻¹)	Ποσοστό (%)		Μέσος	Μέσο	Μέσος	Μέσος Αριθμός	Δυν.
	Βλαστ/ ση ¹	Βλαστ/ ση ²	Αριθμός Βλαστών ³	Μήκος Βλαστών ³ (cm)	Αριθμός Κόμβων ³	Υπερενυδατωμ ένων Βλαστών ⁴	Πολ/σμού
Έκφυτα κορυφής							
0,0 ±	83 a	12 e	1,0 c	5,7 a	7,1 a	0,3 e	5,9 c
1,0 ZEAT	42 d	58 a	10,3 ab	1,7 c	2,5 c	5,2 b	10,8 b
1,0 BA	54 bc	29 d	8,4 b	1,5 c	2,3 c	2,1 d	10,4 b
Έκφυτα κόμβου							
0,0 ±	54 bc	33 d	3,5 c	3,8 b	4,2 b	1,7 e	7,9 b
1,0 ZEAT	43 b	50 b	12,3 a	1,4 c	2,4 c	6,6 a	12,7 a
1,0 BA	50 cd	38 c	8,5 b	1,0 c	2,0 c	3,0 c	8,5 b
<i>F</i> _{Εκφύτου}	-	-	NS	-	-	-	-
<i>F</i> _{PGRs}	-	-	***	-	-	-	-
<i>F</i> _{Εκφύτου x PGRs}	***	***	NS	*	***	***	**
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***	***	***	***	***	***	***

± Τα δεδομένα δεν συμμετέχουν στην 2-way ANOVA

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικά ή *, **, ***: σημαντικά σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$, $P \leq 0,001$, αντίστοιχα, $n=24$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹(%) x Μέσος αριθμός βλαστών³ x Μέσος αριθμός κόμβων³

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς

² Τα έκφυτα σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς

³ Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί

⁴ Υπερενυδατωμένοι βλαστοί

Σε όλες τις υποκαλλιέργειες που πραγματοποιήθηκαν, στις υψηλές συγκεντρώσεις κυτοκινινών (1,0 ή 2,0 mg L⁻¹) και πιο συγκεκριμένα στη ZEAT και στο BA προέκυψε το πρόβλημα της εμφάνισης υπερενυδατωμένης μάζας και υπερενυδατωμένων βλαστών. Επιπλέον στις υψηλότερες συγκεντρώσεις κυτοκινινών παρατηρήθηκε αύξηση των παραθθέντων βλαστών, τόσο των κανονικών όσο και των υπερενυδατωμένων βλαστών, κυρίως όταν χρησιμοποιήθηκε ZEAT ή BA και στους δύο τύπους εκφύτων (κορυφής ή κόμβου).

Σε επόμενες υποκαλλιέργειες στόχος ήταν αντιμετώπιση του φαινομένου της υπερενυδάτωσης στα πλέον παραγωγικά πρωτόκολλα πολλαπλασιασμού. Ως τέτοια επιλέχθηκαν υποστρώματα με BA δεδομένου του υψηλού κόστους της ZEAT.

Ως εκ τούτου, στη πέμπτη υποκαλλιέργεια έκφυτα κορυφής και κόμβου τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα MS χωρίς PGRs και 8 g L⁻¹ άγαρ και σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με

0,5 ή 1,0 mg L⁻¹ BA και άγαρ σε συγκέντρωση 8 g L⁻¹ ή 12 g L⁻¹. Το ποσοστό αντίδρασης των εκφύτων ήταν υψηλό (95 - 100%) σε όλα τα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν (Πίν. Π.Π.39). Στα υποστρώματα που περιείχαν 0,5 ή 1,0 mg L⁻¹ BA και είχαν στερεοποιηθεί με 8 g L⁻¹ άγαρ εμφανίστηκαν έκφυτα που σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς (27% ή 22% αντίστοιχα). Υψηλότερη παραγωγή κανονικών βλαστών (10,2) παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα που περιείχε 1,0 mg L⁻¹ BA και άγαρ σε συγκέντρωση 12 g L⁻¹, ενώ μεγαλύτερος αριθμός κόμβων παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα χωρίς PGR (Πίν. Π.Π.39, Εικ. Π.Π.46). Το υψηλότερο ποσοστό υπερενυδατωμένων βλαστών (32 - 33%) παρατηρήθηκε στα υποστρώματα που περιείχαν 0,5 ή 1,0 mg L⁻¹ BA και άγαρ 8 g L⁻¹, με μέσο αριθμό υπερενυδατωμένων βλαστών 2,3 ή 3,4 αντίστοιχα. Το δυναμικό πολλαπλασιασμού ήταν υψηλότερο στα υποστρώματα που περιείχαν άγαρ 12 g L⁻¹, λόγω του υψηλότερου αριθμού παραχθέντων κανονικών βλαστών (Πίν. Π.Π.39, Εικ. Π.Π.46). Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ, από 8 g L⁻¹ σε 12 g L⁻¹, είχε ως αποτέλεσμα την μείωση των υπερενυδατωμένων βλαστών. Επιπλέον στο υπόστρωμα MS χωρίς PGRs παρατηρήθηκε ριζοβολία σε ποσοστό 100% (δεν παρουσιάζονται δεδομένα).

Στις επόμενες 22 υποκαλλιέργειες τα έκφυτα κορυφής ή κόμβου τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα MS χωρίς PGRs, για διατήρηση πολλαπλασιαστικού υλικού. Σε όλες τις υποκαλλιέργειες το ποσοστό αντίδρασης των εκφύτων διατηρήθηκε σε υψηλά επίπεδα (93-100%). Δεν παρουσιάστηκαν έκφυτα που να σχημάτισαν είτε μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς ή υπερενυδατωμένη μάζα (δεν παρουσιάζονται δεδομένα). Ο αριθμός των παραχθέντων βλαστών κυμάνθηκε στις υποκαλλιέργειες από 1,5 έως 2,5 βλαστοί ανά έκφυτο, με μέσο μήκος βλαστών από 4 έως 6 cm και μέσο αριθμό κόμβων από 4,7 έως 5,8 ανά βλαστό (δεν παρουσιάζονται δεδομένα).

Πίνακας Π.Π.39. Επίδραση του BA και του άγαρ, στην αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου της *B. acetabulosa*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα, κατά τη πέμπτη υποκαλλιέργεια.

BA / Άγαρ (mg L ⁻¹) / (g L ⁻¹)	Ποσοστό (%)		Μέσος Αριθμός Βλαστών ³	Μέσο Μήκος Βλαστών ³ (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ³	Μέσος Αριθμός Υπερενδατωμ ένων Βλαστών ⁴	Δυν. Πολ/ σμού
	Βλαστ/ ση ¹	Βλαστ/ ση ²					
0,0 / 8 ±	88 a	8 c	1,6 d	5,4 a	5,9 a	0,1 e	8,3 b
0,5 / 8	68 b	27 a	4,7 c	1,4 b	2,4 b	2,3 b	7,7 b
0,5 / 12	88 a	8 c	7,8 b	1,3 b	2,3 b	1,0 cd	15,8 a
1,0 / 8	70 b	22 b	7,4 b	1,1 bc	1,9 bc	3,4 a	9,8 b
1,0 / 12	92 a	8 c	10,2 a	0,8 c	1,8 c	0,8 d	16,9 a
F_{BA}	NS	-	***	***	**	***	NS
$F_{\text{Άγαρ}}$	***	-	***	**	NS	**	***
$F_{BA \times \text{Άγαρ}}$	NS	***	NS	NS	NS	NS	NS
$F_{\text{One-way ANOVA}}$	***	***	***	***	***	***	***

± Τα δεδομένα δεν συμμετέχουν στην 2-way ANOVA

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικά ή **, ***: σημαντικά σε $P \leq 0,01$, $P \leq 0,001$, αντίστοιχα, $n=24$.

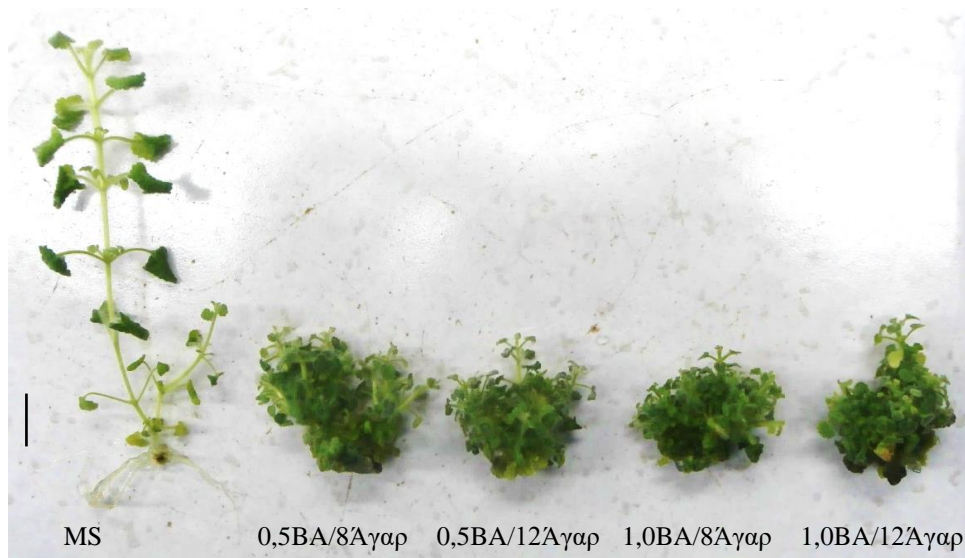
Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹(%) x Μέσος αριθμός βλαστών³ x Μέσος αριθμός κόμβων³

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενδατωμένους μαζί με μη υπερενδατωμένους βλαστούς

² Τα έκφυτα σχημάτισαν μόνο υπερενδατωμένους βλαστούς

³ Μη υπερενδατωμένοι βλαστοί

⁴ Υπερενδατωμένοι βλαστοί



Εικόνα Π.Π.38. Αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου *B. acetabulosa*, στα αναγραφόμενα υποστρώματα, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα, κατά τη πέμπτη υποκαλλιέργεια. Η μπάρα αντιπροσωπεύει μήκος 1 cm.

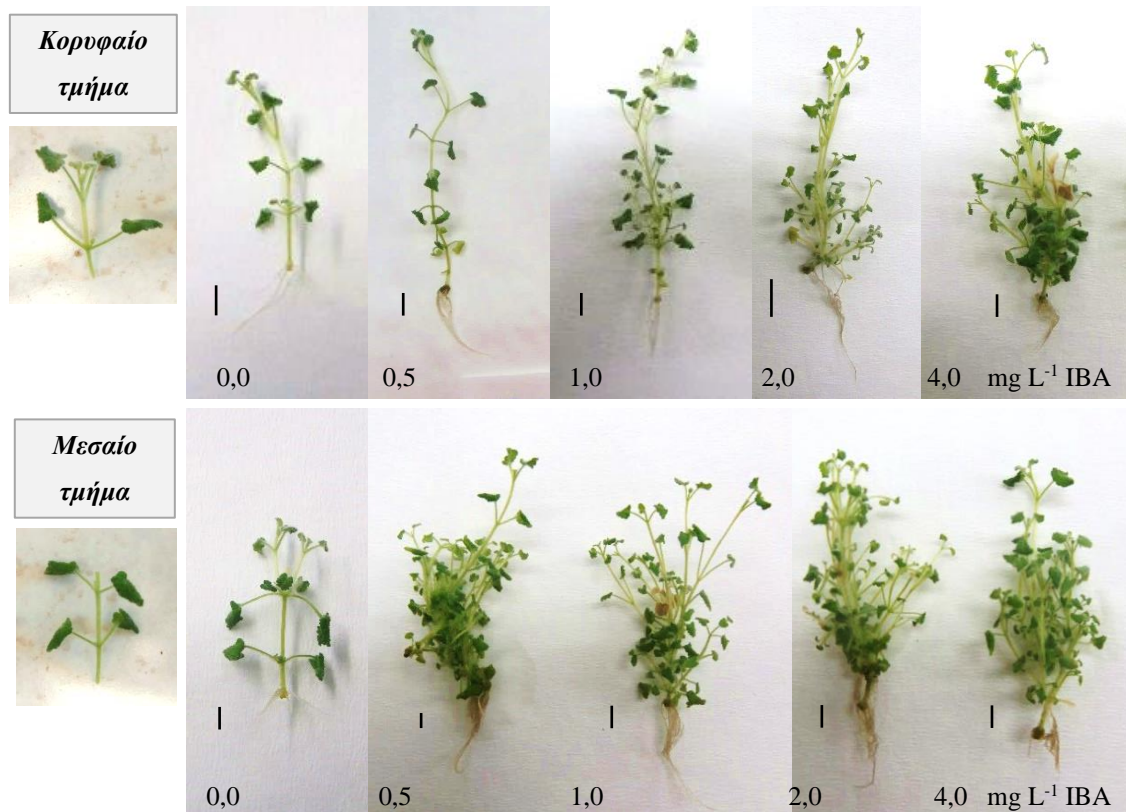
II.Π.3.2.3 *In vitro* ριζοβολία μικρομοσχευμάτων

Κατά τη διερεύνηση της *in vitro* ριζοβολίας από την καλλιέργεια που εγκαταστάθηκε από *in vitro* ανεπτυγμένα από σπορόφυτα, επιλέχθηκαν μη υπερενυδατωμένοι μικροβλαστοί, για τη λήψη μικρομοσχευμάτων, μήκους 1,5 - 2,0 cm. Στα μικρομοσχεύματα διερευνήθηκε η επίδραση στη ριζοβολία του τύπου του μικρομοσχεύματος και της συγκέντρωσης αυξίνης στο υπόστρωμα. Μικρομοσχεύματα, από το κορυφαίο τμήμα, μαζί με το επάκριο μερίστωμα ή από το μεσαίο τμήμα των μικροβλαστών, καλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα πλήρους δύναμης MS χωρίς IBA, είτε με 0,5 ή 1,0 ή 2,0 ή 4,0 mg L⁻¹ IBA για 6 συνεχείς εβδομάδες. Το ποσοστό ριζοβολίας ήταν 100% σε όλα τα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν και για τους δύο τύπους μικρομοσχευμάτων (Πίν. II.Π.40). Το μεγαλύτερο αριθμό ριζών σημείωσε το υπόστρωμα με συγκέντρωση 0,5 ή 1,0 mg L⁻¹ IBA και για τους δύο τύπους μικρομοσχευμάτων, ενώ το μεγαλύτερο μήκος ριζών σημειώθηκε στο υπόστρωμα με 0,5 mg L⁻¹ IBA για τα έκφυτα από το κορυφαίο τμήμα και στα υποστρώματα με 0,5 ή 1,0 ή 2,0 mg L⁻¹ IBA για τα μικρομοσχεύματα από μεσαίο τμήμα των μικροβλαστών (Πίν. II.Π.40, Εικ. II.Π.39). Επιπλέον και στους δύο τύπους μικρομοσχευμάτων παράλληλα με τη ριζογένεση, παρατηρήθηκε επιμήκυνση αυτών και έκπτυξη με ταυτόχρονη επιμήκυνση πλάγιων βλαστών. Πιο συγκεκριμένα στα μικρομοσχεύματα από το κορυφαίο τμήμα παρατηρήθηκε έκπτυξη πλάγιων βλαστών στο υπόστρωμα με 1,0, 2,0 και 4,0 mg L⁻¹ IBA (3 - 4, 4 - 6 και 6 - 8 βλαστοί/μικρομόσχευμα, αντίστοιχα), ενώ από το μεσαίο τμήμα των μικροβλαστών παρατηρήθηκε έκπτυξη πλάγιων βλαστών σε όλα τα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν (2 - 4 βλαστοί/μικρομόσχευμα στο υπόστρωμα με 0,0 mg L⁻¹ IBA και 8 - 12 βλαστοί/μικρομόσχευμα στο υπόστρωμα με 1,0 ή 2,0 ή 4,0 mg L⁻¹ IBA), με αποτέλεσμα τη δημιουργία πολύκλαδων φυταρίων προς εγκλιματισμό (Εικ. II.Π.39).

Πίνακας Π.Π.40. Επίδραση της συγκέντρωσης του IBA και του τύπου του μικρομοσχεύματος στη ριζοβολία των μικρομοσχευμάτων *B. acetabulosa*, σε θρεπτικό υπόστρωμα MS από την καλλιέργεια που εγκαταστάθηκε από σπορόφυτα.

IBA (mg L ⁻¹)	Ριζοβολία (%)	Μέσος αριθμός ριζών	Μέσο μήκος ριζών (cm)
Κορυφαίο τμήμα, μαζί με το επάκριο μερίστωμα			
0,0 IBA	100	4,8 bc	1,4 c
0,5 IBA	100	7,9 a	2,1 a
1,0 IBA	100	7,4 a	1,6 b
2,0 IBA	100	5,6 b	1,5 bc
4,0 IBA	100	4,8 bc	1,3 c
Μεσαίο τμήμα			
0,0 IBA	100	3,6 d	1,0 d
0,5 IBA	100	8,0 a	2,4 a
1,0 IBA	100	7,2 a	2,2 a
2,0 IBA	100	5,6 b	2,0 a
4,0 IBA	100	3,8 cd	1,4 bc
<i>F</i> _{Συγκέντρωσης IBA}	-	NS	-
<i>F</i> _{Μικρομοσχεύματος}	-	***	-
<i>F</i> _{Συγκέντρωσης IBA x Μικρομοσχεύματος}	-	NS	***
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	-	***	***

Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. NS: μη σημαντικά ή ***: σημαντικά σε $P \leq 0,001$, $n=60$.



Εικόνα II.Π.39. Επίδραση της συγκέντρωσης του IBA και του τύπου του μικρομοσχεύματος στη ριζοβολία των μικρομοσχευμάτων *B. acetabulosa*, από την καλλιέργεια που εγκαταστάθηκε από σπορόφυτα, σε θρεπτικό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS. Η κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει μήκος 1 cm.

Σε επόμενο πείραμα διερευνήθηκε η επίδραση της συγκέντρωσης της αυξίνης στο υπόστρωμα στη ριζοβολία συστάδων μικροβλαστών. Συστάδες μικροβλαστών τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα MS μισής δύναμης χωρίς IBA, είτε με 0,5 ή 1,0 ή 2,0 ή 4,0 mg L⁻¹ IBA για 6 συνεχείς εβδομάδες. Το ποσοστό ριζοβολίας ήταν 100% σε όλα τα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν. Ο μεγαλύτερος αριθμός ριζών παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα με 4,0 mg L⁻¹ IBA, ενώ το μεγαλύτερο μήκος ριζών σημειώθηκε στο υπόστρωμα με 0,5 mg L⁻¹ IBA (Πίν. II.Π.41, Εικ. II.Π.40) Παράλληλα σε όλα τα υποστρώματα παρατηρήθηκε επιμήκυνση των βλαστών, με τη μεγαλύτερη επιμήκυνση να εμφανίζεται στο υπόστρωμα MS χωρίς IBA (Εικ. II.Π.40).

Πίνακας Π.Π.41. Επίδραση της συγκέντρωσης του IBA στη ριζοβολία των συστάδων μικροβλαστών *B. acetabulosa*, σε θρεπτικό υπόστρωμα ½ MS, από την καλλιέργεια που εγκαταστάθηκε από σπορόφυτα.

IBA (mg L ⁻¹)	Ριζοβολία (%)	Μέσος αριθμός ριζών	Μέσο μήκος ριζών
0,0 IBA	100	6,4 d	1,5 b
0,5 IBA	100	7,9 c	1,6 a
1,0 IBA	100	8,5 bc	1,4 b
2,0 IBA	100	9,9 b	1,3 c
4,0 IBA	100	11,5 a	1,3 c
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	-	***	***

Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. ***: σημαντικά σε $P \leq 0,001$, $n=40$.



Εικόνα Π.Π.40. Επίδραση της συγκέντρωσης του IBA στη ριζοβολία συστάδων μικροβλαστών *B. acetabulosa*, από την καλλιέργεια που εγκαταστάθηκε από σπορόφυτα, σε θρεπτικό υπόστρωμα ½ MS. Η κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει μήκος 1 cm.

Π.Π.3.2.4 Εγκλιματισμός φυταρίων *ex vitro*

Τα ριζοβολημένα μικρομοσχεύματα (φυτάρια), καθώς και οι ριζοβολημένες συστάδες μικροβλαστών από καλλιέργεια σποροφύτων, μεταφέρθηκαν *ex vitro* σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (1:1, v/v). Ο αριθμός των φυταρίων που μεταφέρθηκαν *ex vitro* τόσο από τα ριζοβολημένα μικρομοσχεύματα (είτε από το κορυφαίο τμήμα ή από το μεσαίο τμήμα των μικρομοσχευμάτων) όσο και από τις ριζοβολημένες συστάδες μικροβλαστών ήταν 120 (15 δοχεία, 8 φυτάρια ανά δοχείο). Τα φυτάρια και οι συστάδες μικροβλαστών από καλλιέργεια σποροφύτων εγκλιματίστηκαν 100%.

Μετά την ολοκλήρωση του εγκλιματισμού (1 μήνα), ακολούθησε μεταφύτευση σε γλάστρα 1,3 l σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (2:1, v/v). Τα φυτά λιπαίνονταν με υδατοδιαλυτό πλήρες λίπασμα Nutrileaf 20:20:20 σε συγκέντρωση 2,0 g L⁻¹ μια φορά το μήνα. Η ανάπτυξη των φυταρίων και των συστάδων μικροβλαστών ήταν 100% επιτυχής κατά τους τρεις επόμενους μήνες από τη μεταφύτευσή τους σε ατομική γλάστρα (Εικ. Π.Π.41α, β).



Εικόνα Π.Π.41. Ριζοβολημένη συστάδα μικροβλαστών *B. acetabulosa* τοποθετημένη σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (1:1) για εγκλιματισμό (α) και �ιζοβολημένες συστάδες μικροβλαστών τρεις μήνες μετά τη μεταφύτευσή τους (β).

Π.Π.3.3 *Clinopodium creticum*

Π.Π.3.3.1 Αρχική εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας

Από ενήλικα φυτά αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο

Τον Ιούλιο 2013 πραγματοποιήθηκε εγκατάσταση αρχικής καλλιέργειας, με έκφυτα κορυφής ή πρώτου κόμβου που προήλθαν από ενήλικα φυτά *C. creticum* που αναπτύσσονταν στο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου. Τα έκφυτα τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα MS χωρίς PGRs ή με 1,0 mg L⁻¹ BA ή ZEAT. Το ποσοστό των μολύνσεων ήταν χαμηλό (15 - 38%) (δεν παρουσιάζονται δεδομένα). Το ποσοστό των εκφύτων που αντέδρασαν ήταν παρόμοιο και για τους δύο τύπους εκφύτων (κορυφής και κόμβου) και κυμαινόταν (35 - 69%) (Πίν. Π.Π.42). Στο υπόστρωμα με 1,0 mg L⁻¹ ZEAT αντέδρασε ένα σχετικά μικρό ποσοστό εκφύτων που σχημάτισε μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς (11% για τα έκφυτα κορυφής και 13% για τα έκφυτα κόμβου)

(Πίν. II.Π.42). Η υψηλότερη παραγωγή κανονικών (φυσιολογικών) βλαστών (3,4 - 4,7 βλαστοί/έκφυτο) παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα με 1,0 mg L⁻¹ ZEAT και για τους δύο τύπους εκφύτου, παράλληλα στο ίδιο υπόστρωμα παρατηρήθηκε και υψηλό ποσοστό υπερενυδατωμένων βλαστών (16 - 31%) (Πίν. II.Π.42, Εικ. II.Π.42). Το μέσο μήκος βλαστών και ο μέσος αριθμός κόμβων ανά βλαστό ήταν υψηλότερα στο υπόστρωμα χωρίς PGRs (Πίν. II.Π.42, Εικ. II.Π.42). Το δυναμικό πολλαπλασιασμού ήταν υψηλότερο στο υπόστρωμα 1,0 mg L⁻¹ ZEAT για τα έκφυτα κορυφής και για τα έκφυτα κόμβου στο υπόστρωμα χωρίς PGRs (Πίν. II.Π.42). Τέλος στο υπόστρωμα MS χωρίς PGRs ανεξάρτητα από το τύπο του εκφύτου παρατηρήθηκε ριζοβολία σε ποσοστό 47 - 55%.

Πίνακας II.Π.42. Επίδραση του είδους των PGRs, στην αντίδραση εκφύτων κορυφής ή κόμβου του *C. creticum*, που προήλθαν από ενήλικα φυτά τον Ιούλιο 2013, κατά την αρχική εγκατάσταση.

PGRs (mg L ⁻¹)	Ποσοστό (%)		Μέσος Αριθμός Βλαστών ³	Μέσο Μήκος Βλαστών ³ (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ³	Μέσος Αριθμός Υπερενυδατωμέ νων Βλαστών ⁴	Δυν. Πολ/ σμού
	Βλαστ/ ση ¹	Βλαστ/ ση ²					
Έκφυτα κορυφής							
0,0	59 ab	0 c	1,7 c	5,6 a	5,8 a	0,3 c	5,8 b
1,0 ZEAT	39 d	11 b	3,4 ab	3,7 ab	5,3 a	1,0 a	7,0 a
1,0 BA	62 a	0 c	2,1 bc	3,1 abc	3,5 ab	0,0 d	4,6 c
Έκφυτα κόμβου							
0,0	52 c	0 c	1,9 c	3,6 ab	5,4 a	0,0 d	5,3 b
1,0 ZEAT	56 bc	13 a	4,7 a	1,0 c	1,8 b	0,7 b	4,7 bc
1,0 BA	35 d	0 c	2,6 bc	1,3 bc	2,2 b	0,0 d	2,0 d
<i>F</i> _{PGRs}	-	-	***	*	**	-	-
<i>F</i> _{Εκφύτου}	-	-	NS	**	*	-	-
<i>F</i> _{PGRs x Εκφύτου}	***	***	NS	NS	NS	***	***
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***	***	***	**	**	***	***

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικά ή *, **, ***: σημαντικά σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$, $P \leq 0,001$, αντίστοιχα, $n=24$.

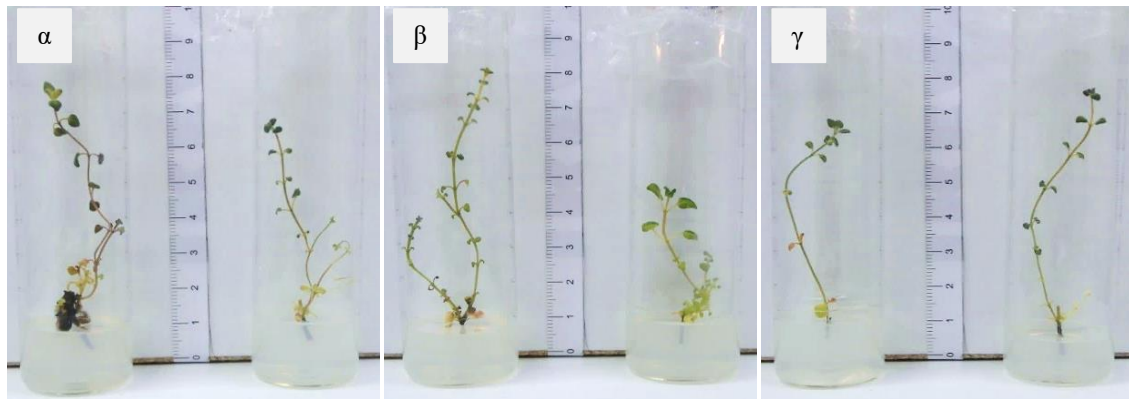
Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών³ x Μέσος αριθμός κόμβων³

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς

² Τα έκφυτα σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς

³ Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί

⁴ Υπερενυδατωμένοι βλαστοί



Εικόνα II.Π.42. Αντίδραση εκφύτων κορυφής (αριστερά) και κόμβου (δεξιά) *C. creticum* σε υπόστρωμα MS χωρίς PGRs (α) ή εμπλουτισμένο με $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ZEAT (β) ή BA (γ), από ενήλικα φυτά, κατά την αρχική εγκατάσταση.

Από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα

Το Νοέμβριο 2014 πραγματοποιήθηκε εγκατάσταση αρχικής καλλιέργειας, με έκφυτα κορυφής και κόμβου που ελήφθησαν από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα, τα οποία καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS είτε χωρίς PGRs, είτε με $0,25$, $0,5$, $1,0$, $2,0$, $4,0$ ή $8,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA ή ZEAT ή 2iP ή KIN, με σκοπό να διερευνηθεί η επίδραση του τύπου και της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης. Το ποσοστό των εκφύτων που αντέδρασαν ήταν από 65% έως 93% στα διάφορα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν (Πίν. II.Π.43). Η αύξηση της συγκέντρωσης των κυτοκινινών οδήγησε σε μείωση του ποσοστού των εκφύτων που αντέδρασαν η οποία έφτασε το 16 - 23% στη συγκέντρωση $8,0 \text{ mg L}^{-1}$. Η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων κυτοκινινών στο υπόστρωμα είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό υπερενυδατωμένων βλαστών (Πίν. II.Π.43, Εικ. II.Π.43). Πιο συγκεκριμένα στα υποστρώματα με $4,0$ ή $8,0 \text{ mg L}^{-1}$ κυτοκινίνη (ZEAT, BA, KIN, 2iP) παρατηρήθηκε αύξηση του ποσοστού των εκφύτων που σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς, ιδιαίτερα υψηλό ήταν στην ZEAT και στο BA στη συγκέντρωση $8,0 \text{ mg L}^{-1}$, όπου το ποσοστό έφτασε το 21% και για τις δύο κυτοκινίνες (Πίν. II.Π.43, Εικ. II.Π.43). Η διπαραγοντική ανάλυση έδειξε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του είδους και της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης όσον αφορά το ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς, το μέσο μήκος των βλαστών και το δυναμικό πολλαπλασιασμού (Πίν. II.Π.43). Η παρουσία BA ή ZEAT ή 2iP σε υψηλές συγκεντρώσεις στο υπόστρωμα αύξησε τον αριθμό των παραγόμενων βλαστών ανά έκφυτο. Υψηλότερη παραγωγή κανονικών βλαστών ($3,0 - 3,2$ βλαστοί/έκφυτο) παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα με $8,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA ή ZEAT ή 2iP, ενώ το υπόστρωμα που περιείχε είτε MS χωρίς κυτοκινίνη

ή με KIN σε συγκέντρωση 1,0 ή 4,0 mg L⁻¹ έδωσε τη μικρότερη παραγωγή βλαστών (1,4 βλαστοί/έκφυτο) (Πίν. II.Π.43, Εικ. II.Π.43). Μεγαλύτερου μήκους βλαστούς (4,1 - 4,2 cm) και υψηλότερος αριθμός κόμβων (4,0 - 4,8 κόμβοι/βλαστό) παρατηρήθηκε στα υποστρώματα που περιείχαν είτε 0,25 mg L⁻¹ 2iP ή KIN (Πίν. II.Π.43, Εικ. II.Π.43). Με βάση τα προηγούμενα, το δυναμικό πολλαπλασιασμού ήταν μεγαλύτερο (8,1) στο υπόστρωμα που περιείχε 0,25 mg L⁻¹ KIN, λόγω του υψηλού ποσοστού εκφύτων που σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς, του μεγάλου αριθμού παραγόμενων βλαστών και του υψηλού αριθμού κόμβων (Πίν. II.Π.43). Η παρουσία κυτοκινίνης σε υψηλές συγκεντρώσεις, ανεξάρτητα από το είδος της κυτοκινίνης, είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό υπερενυδατωμένων βλαστών σε υψηλό ποσοστό, το οποίο έφτασε και μέχρι το 39 - 40% στα υποστρώματα με 8,0 mg L⁻¹ BA ή ZEAT. Ο υψηλότερος αριθμός υπερενυδατωμένων βλαστών (1,1 ή 1,2 υπερενυδατωμένοι βλαστοί/έκφυτο) παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα που περιείχε 8,0 mg L⁻¹ ZEAT ή BA αντίστοιχα (Πίν. II.Π.43). Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η αύξηση της συγκέντρωσης και των τεσσάρων κυτοκινινών που δοκιμάστηκαν έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση τόσο των υπερενυδατωμένων όσο και των μη υπερενυδατωμένων βλαστών. Επιπλέον στο υπόστρωμα MS χωρίς PGRs παρατηρήθηκε ριζοβολία σε ποσοστό (95%), στα υποστρώματα που περιείχαν 0,5 mg L⁻¹ ZEAT ή BA σε ποσοστό 38% ή 47% αντίστοιχα, ενώ στα υποστρώματα με 0,5 - 2,0 mg L⁻¹ KIN ή 2iP σε ποσοστό από 27 - 39% (δεν παρουσιάζονται δεδομένα).

Πίνακας Π.Π.43. Επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης PGRs, στην αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου του *C. creticum*, που προήλθαν από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα.

PGRs (mg L ⁻¹)	Ποσοστό (%)		Μέσος Αριθμός Βλαστών ³	Μέσο Μήκος Βλαστών ³ (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ³	Μέσος Αριθμός Υπερενδοατομ ένων Βλαστών ⁴	Δυν. Πολλ/ σμού
	Βλαστ/ ση ¹	Βλαστ/ ση ²					
0,0 [‡]	93 a	0 j	1,4 g	2,3 d	2,8 d	0,0jk	3,7 def
0,25 ZEAT	89 ab	0 j	1,9 def	2,5 cd	3,3 bcd	0,0 jk	5,6 bc
0,5 ZEAT	88 ab	0 j	1,7 efg	1,9 de	2,7 de	0,0 jk	4,0 def
1,0 ZEAT	89 ab	0 j	2,0 def	2,6 cd	3,9 b	0,0 jk	6,9 ab
2,0 ZEAT	75 de	8 h	1,7 efg	1,3 efg	1,9 f	0,5 f	2,4 hij
4,0 ZEAT	56 hi	15 c	1,8 efg	0,8 hij	1,4 f	0,9 cd	1,4 j
8,0 ZEAT	47 jk	21 a	3,1 ab	0,6 ij	1,6 f	2,0 a	2,3 hij
0,25 BA	83 bc	0 j	2,1 cde	3,2 bc	3,9 b	0,0 jk	6,8 bc
0,5 BA	78 cde	0 j	2,2 cd	1,8 def	3,0 cd	0,1 ij	5,2 bcd
1,0 BA	67 fg	0 j	1,8 efg	2,0 de	3,3 bcd	0,3 gh	4,0 def
2,0 BA	60 gh	13 de	1,6 efg	1,4 efg	2,0 ef	0,8 d	2,0 j
4,0 BA	52 ij	17 b	2,6 bc	1,0 ghi	2,0 ef	1,2 b	2,7 ghi
8,0 BA	44 k	21 a	3,0 ab	0,5 j	1,5 f	2,0 a	2,0 j
0,25 KIN	94 a	0 j	1,8 efg	4,1 a	4,8 a	0,0 jk	8,1 a
0,5 KIN	83 bc	0 j	1,5 fg	3,9 ab	3,7 bc	0,0 jk	4,6 cde
1,0 KIN	78 cde	0 j	1,4 g	3,2 bc	3,8 bc	0,0 jk	4,2 cdef
2,0 KIN	79 cd	0 j	1,5 fg	1,5 efg	1,7 f	0,2 hi	2,0 ij
4,0 KIN	65 fg	10 g	1,4 g	1,3 efg	1,7 f	0,5 f	1,6 j
8,0 KIN	60 gh	12 ef	2,0 def	1,1 ghi	1,5 f	0,7 e	1,8 j
0,25 2iP	87 ab	0 j	1,5 fg	4,2 a	4,0 ab	0,0 jk	5,2 cde
0,5 2iP	83 bc	0 j	1,6 efg	3,8 ab	3,8 bc	0,0 jk	5,1 cde
1,0 2iP	83 bc	0 j	1,6 efg	3,5 ab	3,7 bc	0,0 jk	4,9 cde
2,0 2iP	73 ef	4 i	1,5 fg	1,2 efg	1,8 f	0,5 e	2,0 j
4,0 2iP	64 g	11 fg	1,6 efg	0,9 ghi	1,6 f	0,9 cd	1,6 j
8,0 2iP	57 hi	14 cd	3,2 a	0,8 hij	1,8 f	1,2 b	3,3 fgh
<i>F</i> _{PGRs}	-	-	-	-	*	-	-
<i>F</i> _{Συγκέντρωσης}	-	-	-	-	***	-	-
<i>F</i> _{PGRs x Συγκέντρωση}	***	***	*	***	NS	***	***
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***	***	***	***	***	***	***

[‡] Τα δεδομένα δεν συμμετέχουν στην 2-way ANOVA

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικά ή *, **, ***: σημαντικά σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$, $P \leq 0,001$, αντίστοιχα, $n=24$.

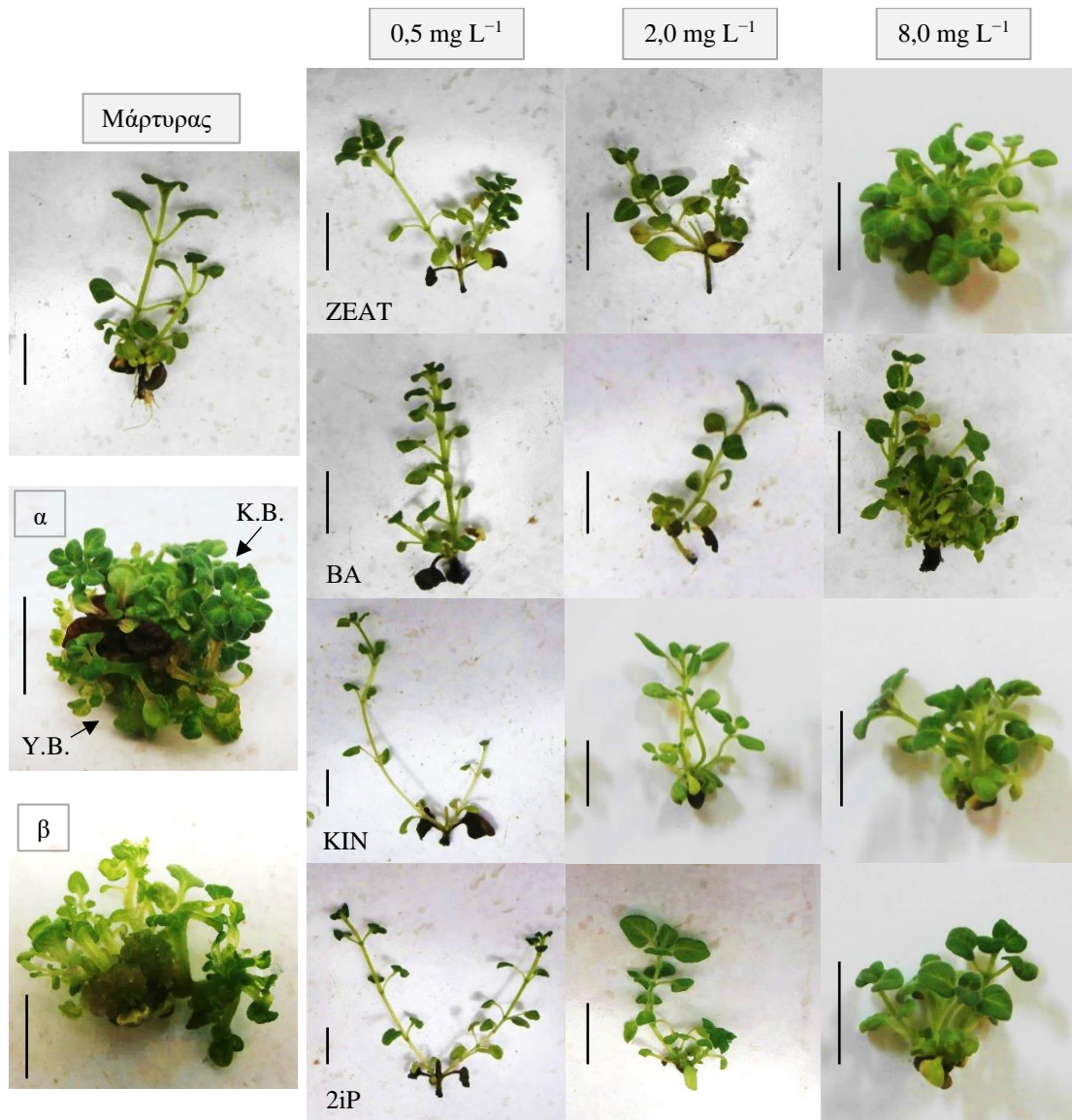
Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών³ x Μέσος αριθμός κόμβων³

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενδοατωμένους μαζί με μη υπερενδοατωμένους βλαστούς

² Τα έκφυτα σχημάτισαν μόνο υπερενδοατωμένους βλαστούς

³ Μη υπερενδοατωμένοι βλαστοί

⁴ Υπερενδοατωμένοι βλαστοί



Εικόνα II.Π.43. Αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου *C. creticum*, από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα, κατά την αρχική εγκατάσταση, σε στερεό υπόστρωμα MS χωρίς PGRs (Μάρτυρας), ή συμπληρωμένο με 0,5 ή 2,0 ή 8,0 mg L⁻¹ ZEAT ή BA ή KIN ή 2iP. Κανονικοί Βλαστοί (Κ.Β.) μαζί με Υπερενυδατωμένους Βλαστούς (Υ.Β.) (α) και Υπερενυδατωμένοι βλαστοί (β) σε υπόστρωμα MS συμπληρωμένο με 8,0 mg L⁻¹ BA. Η κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει μήκος 1 cm.

II.Π.3.2.2 Πολλαπλασιασμός βλαστών σε *in vitro* καλλιέργεια

Εγκατεστημένη από ενήλικα φυτά αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο

Στην πρώτη υποκαλλιέργεια, που ακολούθησε την αρχική εγκατάσταση που είχε εγκατασταθεί τον Ιούλιο 2013, το ποσοστό που αντέδρασαν ήταν υψηλότερο (75 - 80%) στα έκφυτα κορυφής σε σύγκριση με τα έκφυτα κόμβου (60 - 67%) και στα δύο υποστρώματα που χρησιμοποιήθηκαν (Πίν. II.Π.44). Ο υψηλότερος αριθμός κόμβων ανά βλαστό παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα χωρίς BA και για τους δύο τύπους εκφύτων (Πίν. II.Π.44). Υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα χωρίς BA και για τους δύο τύπους εκφύτου (3,2 - 4,0), λόγω μεγαλύτερης επιμήκυνσης των παραγόμενων βλαστών σε αυτό, η οποία συνοδευόταν και από περισσότερους κόμβους ανά έκφυτο (Πίν. II.Π.44). Τέλος στο υπόστρωμα MS χωρίς PGRs παρατηρήθηκε ριζοβολία σε ποσοστό 67% (δεν παρουσιάζονται δεδομένα).

Πίνακας II.Π.44. Επίδραση του BA, στην αντίδραση εκφύτων κορυφής ή κόμβου, κατά την πρώτη υποκαλλιέργεια του *C. creticum*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από ενήλικα φυτά, τον Ιούλιο 2013.

BA (mg L ⁻¹)	Ποσοστό Βλαστ/σης ¹ (%)	Μέσος Αριθμός Βλαστών ²	Μέσο Μήκος Βλαστών ² (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ²	Δυν. Πολ/σμού
Έκφυτα κορυφής					
0,0	75 ab	1,0 b	4,7 a	4,2 a	3,2 ab
1,0	80 a	1,3 ab	2,3 b	3,0 bc	3,1 b
Έκφυτα κόμβου					
0,0	67 bc	1,6 a	4,0 a	3,7 ab	4,0 a
1,0	60 c	1,5 a	1,8 b	2,7 c	2,5 b
<i>F</i> _{BA}	NS	NS	***	***	**
<i>F</i> _{Εκφύτου}	***	***	NS	NS	NS
<i>F</i> _{BA x Εκφύτου}	NS	NS	NS	NS	NS
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	**	**	***	***	**

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικά ή **, ***: σημαντικά σε $P \leq 0,01$, $P \leq 0,001$, αντίστοιχα, $n=20$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών² x Μέσος αριθμός κόμβων²

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς

² Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί

Στη δεύτερη και τρίτη υποκαλλιέργεια εξετάστηκε η επίδραση του τύπου (BA, ZEA, KIN 2iP) και συγκέντρωσης των κυτοκινινών (0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0 ή 8,0 mg L⁻¹). Τα έκφυτα κορυφής και κόμβου που χρησιμοποιήθηκαν στη δεύτερη υποκαλλιέργεια προήλθαν από υπόστρωμα MS χωρίς PGR, ενώ της τρίτης υποκαλλιέργειας από τα αντίστοιχα υποστρώματα της δεύτερης υποκαλλιέργειας.

Το ποσοστό των εκφύτων που αντέδρασαν ήταν 66 - 100% στα διάφορα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν για τις δύο υποκαλλιέργειες (Πίν. II.Π.45, II.Π.46). Η αύξηση της συγκέντρωσης των κυτοκινινών οδήγησε σε μείωση του ποσοστού των εκφύτων που αντέδρασαν, η οποία έφτασε το 9 - 33% στη συγκέντρωση $8,0 \text{ mg L}^{-1}$, ανεξαρτήτως του τύπου του εκφύτου. Η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων κυτοκινινών στο υπόστρωμα είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό υπερενυδατωμένων βλαστών (Πίν. II.Π.45, II.Π.46). Πιο συγκεκριμένα στα υποστρώματα με $4,0$ ή $8,0 \text{ mg L}^{-1}$ κυτοκινίνη (ZEAT, BA, KIN, 2iP) και στις δύο υποκαλλιέργειες παρατηρήθηκε αύξηση του ποσοστού των εκφύτων που σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς, ιδιαίτερα υψηλό ήταν στη ZEAT και στο BA στη συγκέντρωση $8,0 \text{ mg L}^{-1}$, όπου το ποσοστό έφτασε το 28 - 31% (Πίν. II.Π.45, II.Π.46, Εικ. II.Π.54). Η διπαραγοντική ανάλυση ανέδειξε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του είδους και της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης σε όλους τους παράγοντες που μετρήθηκαν και στις δύο υποκαλλιέργειες εκτός από το μέσο αριθμό των παραχθέντων βλαστών και μέσο αριθμό των κόμβων αυτών στην τρίτη υποκαλλιέργεια (Πίν. II.Π.45, II.Π.46). Η παρουσία κυτοκινινών σε υψηλές συγκεντρώσεις στο υπόστρωμα αύξησε τον αριθμό των παραγόμενων βλαστών ανά έκφυτο. Υψηλότερη παραγωγή κανονικών βλαστών ($2,0 - 2,8$ βλαστοί/έκφυτο) και στις δύο υποκαλλιέργειες παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα με $8,0 \text{ mg L}^{-1}$ ανεξαρτήτως της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης, ενώ το υπόστρωμα χωρίς κυτοκινίνη έδωσε μεγαλύτερου μήκους βλαστούς ($2,9 \text{ cm}$) και περισσότερους κόμβους ($3,2 - 3,4$ κόμβοι/βλαστό) (Πίν. II.Π.45, II.Π.46, Εικ. II.Π.44). Το δυναμικό πολλαπλασιασμού στη δεύτερη υποκαλλιέργεια ήταν υψηλότερο στο υπόστρωμα MS χωρίς PGRs, χωρίς στατιστική διαφορά από το υπόστρωμα $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ ZEAT και $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ KIN, ενώ στην τρίτη υποκαλλιέργεια στο υπόστρωμα που περιείχε $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ BA (Πίν. II.Π.45, II.Π.46). Η παρουσία κυτοκινίνης σε υψηλές συγκεντρώσεις, ανεξάρτητα από το είδος της κυτοκινίνης, είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό υπερενυδατωμένων βλαστών σε υψηλό ποσοστό, το οποίο έφτασε και μέχρι το 39 - 60% στα υποστρώματα με $8,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA ή ZEAT. Με βάση τα παραπάνω υψηλότερος αριθμός υπερενυδατωμένων βλαστών παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα που περιείχε $8,0 \text{ mg L}^{-1}$ ZEAT ή BA και στις δύο υποκαλλιέργειες ($1,8 - 2,8$ ή $2,1 - 3,5$ υπερενυδατωμένοι βλαστοί/έκφυτο, αντίστοιχα) (Πίν. II.Π.45, II.Π.46, Εικ. II.Π.44). Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η αύξηση της συγκέντρωσης και των τεσσάρων κυτοκινινών που δοκιμάστηκαν έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση τόσο των υπερενυδατωμένων όσο και των μη υπερενυδατωμένων βλαστών. Επιπλέον στο υπόστρωμα MS χωρίς PGRs παρατηρήθηκε ριζοβολία σε ποσοστό 60 - 70% (δεν παρουσιάζονται δεδομένα).

Πίνακας Π.Π.45. Επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης PGRs, στην αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου, κατά τη δεύτερη υποκαλλιέργεια του *C. creticum*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από ενήλικα φυτά, τον Ιούλιο 2013.

PGRs (mg L ⁻¹)	Ποσοστό (%)		Μέσος Αριθμός Βλαστών ³	Μέσο Μήκος Βλαστών ³ (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ³	Μέσος Αριθμός Υπερενδατομ έων Βλαστών ⁴	Δυν. Πολ/ σμού
	Βλαστ/ ση ¹	Βλαστ/ ση ²					
0,0 [±]	80 c	0 h	1,3 gh	2,9 a	3,4 a	0,0 g	3,4 a
0,25 ZEAT	83 bc	0 h	1,5 def	2,1 bcd	2,7 bc	0,0 g	3,4 ab
0,5 ZEAT	81 c	0 h	1,4 efg	1,9 bcd	2,0 def	0,0 g	2,3 efg
1,0 ZEAT	81 c	0 h	1,5 def	1,6 cde	1,9 efg	0,0 g	2,3 efg
2,0 ZEAT	62 ef	12 de	1,6 def	1,4 def	2,9 abc	0,8 ef	2,9 def
4,0 ZEAT	54 gh	17 b	1,7 cde	0,8 fg	1,7 fgh	1,0 d	1,6 h
8,0 ZEAT	40 i	28 a	2,8 a	0,9 fg	1,4 h	1,8 b	1,6 h
0,25 BA	80 c	0 h	1,2 h	2,4 ab	3,1 ab	0,0 g	3,0 def
0,5 BA	83 bc	0 h	1,2 h	1,6 cde	2,1 def	0,0 g	2,1 efg
1,0 BA	83 bc	0 h	1,7 def	1,7 cde	1,9 efg	0,0 g	2,7 def
2,0 BA	66 ef	11 ef	2,2 bc	1,0 efg	2,0 def	0,8 ef	2,9 bcd
4,0 BA	61 ef	15 c	2,0 cd	1,3 def	2,0 def	1,2 cd	2,4 def
8,0 BA	42 i	29 a	2,5 ab	1,0 efg	1,8 fgh	2,1 a	1,9 fgh
0,25 KIN	98 a	0 h	1,3 gh	2,0 bcd	2,3 cde	0,0 g	2,9 cde
0,5 KIN	100 a	0 h	1,6 def	1,6 cde	2,1 def	0,0 g	3,4 ab
1,0 KIN	100 a	0 h	1,5 def	1,5 de	1,8 fgh	0,0 g	2,7 def
2,0 KIN	73 d	8 g	1,7 cde	1,0 efg	1,8 fgh	0,6 f	2,2 efg
4,0 KIN	63 ef	10 f	1,5 def	0,8 fg	1,9 efg	0,6 f	1,8 gh
8,0 KIN	54 gh	13 d	2,6 ab	1,0 efg	2,1 def	0,9 ef	3,0 cde
0,25 2iP	100 a	0 h	1,3 gh	1,9 bcd	2,5 cde	0,0 g	3,3 abc
0,5 2iP	87 b	0 h	1,5 def	1,8 cde	2,3 cde	0,0 g	3,0 cde
1,0 2iP	87 b	0 h	1,6 def	1,6 cde	2,3 cde	0,0 g	3,2 bcd
2,0 2iP	67 e	8 g	1,4 efg	1,5 de	2,2 cde	0,7 f	2,1 fgh
4,0 2iP	60 fg	12 de	1,5 def	1,2 ef	2,2 cde	0,9 ef	2,0 gh
8,0 2iP	52 h	16 bc	2,6 a	0,7 g	1,6 gh	1,1 d	2,2 efg
<i>F</i> _{PGRs}	-	-	-	-	-	-	-
<i>F</i> _{Συγκέντρωσης}	-	-	-	-	-	-	-
<i>F</i> _{PGRs x Συγκέντρωση}	***	***	**	*	*	*	*
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***	***	***	***	***	***	***

[±] Τα δεδομένα δεν συμμετέχουν στην 2-way ANOVA

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικά ή *, **, ***: σημαντικά σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$, $P \leq 0,001$, αντίστοιχα, $n=48$.

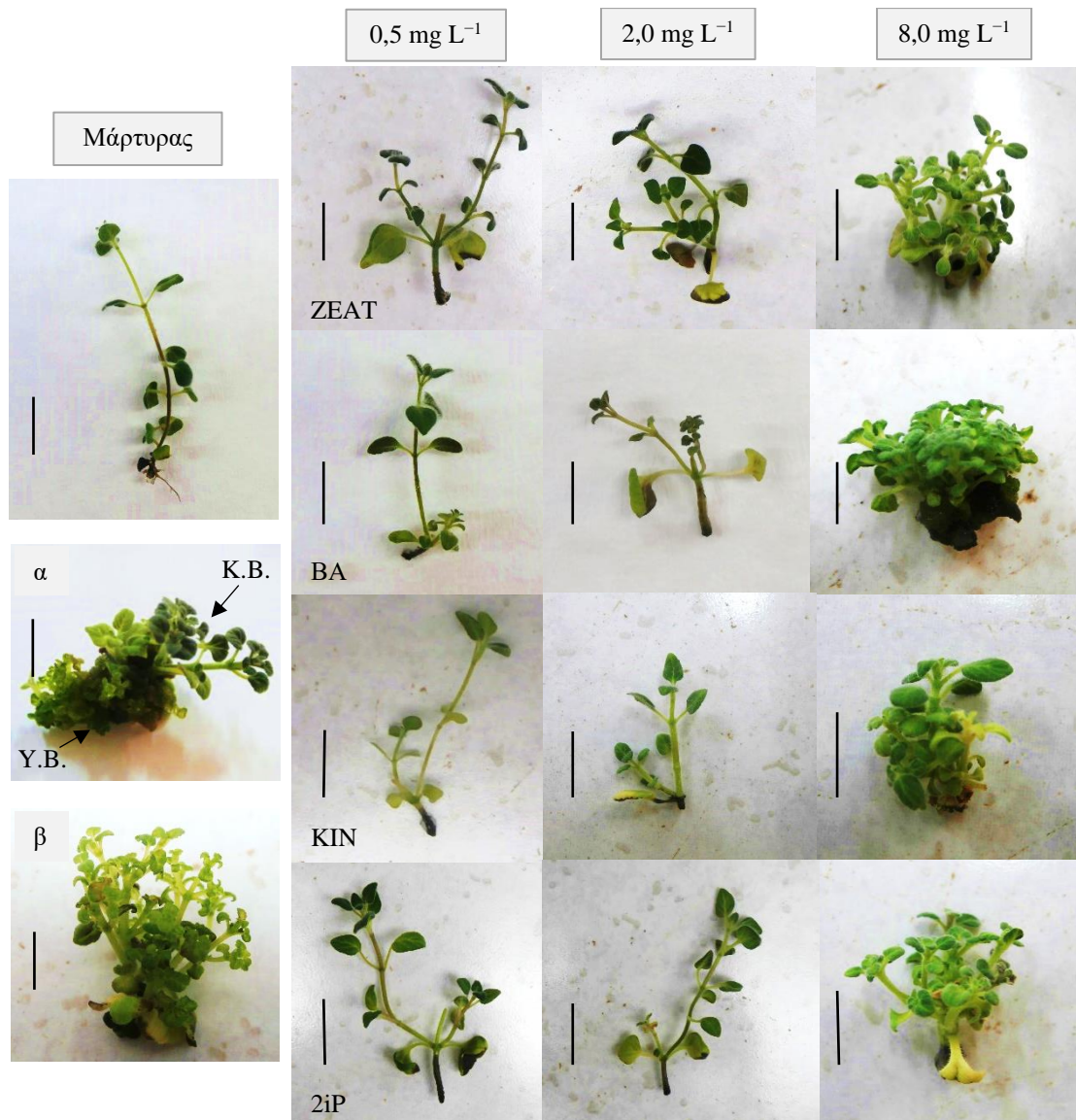
Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών² x Μέσος αριθμός κόμβων³

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενδατωμένους μαζί με μη υπερενδατωμένους βλαστούς

² Τα έκφυτα σχημάτισαν μόνο υπερενδατωμένους βλαστούς

³ Μη υπερενδατωμένοι βλαστοί

⁴ Υπερενδατωμένοι βλαστοί



Εικόνα II.44. Αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου *C. creticum*, από ενήλικα φυτά, κατά τη δεύτερη εγκατάσταση, σε στερεό υπόστρωμα MS χωρίς PGRs (Μάρτυρας), ή συμπληρωμένο με 0,5 ή 2,0 ή 8,0 mg L⁻¹ ZEAT ή BA ή KIN ή 2iP. Κανονικοί (Κ.Β.) μαζί με Υπερενυδατωμένους Βλαστούς (Υ.Β.) (α) και Υπερενυδατωμένοι Βλαστοί (β) σε υπόστρωμα MS συμπληρωμένο με 8,0 mg L⁻¹ BA. Η κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει μήκος 1 cm.

Πίνακας Π.Π.46. Επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης PGRs, στην αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου, κατά την τρίτη υποκαλλιέργεια του *C. creticum*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από ενήλικα φυτά, τον Ιούλιο 2013.

PGRs (mg L ⁻¹)	Ποσοστό (%)		Μέσος Αριθμός Βλαστών ³	Μέσο Μήκος Βλαστών ³ (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ³	Μέσος Αριθμός Υπερενδατωμένων Βλαστών ⁴	Δυν. Πολ/ σμού
	Βλαστ/ ση ¹	Βλαστ/ ση ²					
0,0 [±]	82 e	0 g	1,2 h	2,9 a	3,2 a	0,0 h	3,2 cde
0,25 ZEAT	86 d	0 g	1,6 efg	2,0 bc	2,5 bcd	0,0 h	3,4 abc
0,5 ZEAT	86 d	0 g	1,9 bcd	1,4 efg	2,1 def	0,0 h	3,4 abc
1,0 ZEAT	81 ef	0 g	2,0 abc	1,5 def	2,0 def	0,3 g	3,2 bc
2,0 ZEAT	68 g	8 e	2,0 abc	0,6 i	1,5 hi	1,0 e	2,0 efg
4,0 ZEAT	54 ij	21 b	2,0 abc	0,5 i	1,4 i	1,3 de	1,5 h
8,0 ZEAT	43 k	30 a	2,5 a	0,6 i	1,4 i	2,8 b	1,5 h
0,25 BA	100 a	0 g	1,5 fgh	2,6 ab	3,1 ab	0,0 h	4,7 a
0,5 BA	81 ef	0 g	1,7 efg	2,0 bc	2,6 bcd	0,0 h	3,6 abc
1,0 BA	81 ef	0 g	2,2 abc	1,9 cde	2,3 cde	0,8 f	4,1 ab
2,0 BA	68 g	8 d	1,8 cde	0,8 hi	1,8 fgh	1,2 de	2,2 efg
4,0 BA	55 i	19 b	2,0 abc	0,7 i	1,6 ghi	1,8 c	1,8 fgh
8,0 BA	41 k	31 a	2,3 ab	0,6 i	1,6 ghi	3,5 a	1,5 h
0,25 KIN	91 c	0 g	1,4 fgh	1,7 cde	2,4 cde	0,0 h	3,1 cde
0,5 KIN	91 c	0 g	1,3 gh	1,8 cde	2,4 cde	0,0 h	2,8 def
1,0 KIN	81 ef	0 g	1,5 fgh	2,0 bc	2,6 bcd	0,0 h	3,2 cde
2,0 KIN	70 g	5 f	1,5 fgh	0,8 hi	1,8 fgh	0,4 g	1,9 efg
4,0 KIN	60 h	10 cd	1,5 fgh	0,9 hi	1,8 fgh	0,7 f	1,6 fgh
8,0 KIN	52 ij	18 b	2,0 abc	1,0 fgh	2,0 def	1,1 e	2,1 efg
0,25 2iP	95 b	0 g	1,3 gh	1,9 cde	2,7 abc	0,0 h	3,3 cde
0,5 2iP	91 c	0 g	1,2 h	1,6 cde	2,6 bcd	0,0 h	2,8 cde
1,0 2iP	86 d	0 g	1,4 fgh	1,6 cde	2,5 bcd	0,0 h	3,0 cde
2,0 2iP	72 f	8 d	1,7 efg	1,4 efg	2,4 cde	0,5 g	2,9 cde
4,0 2iP	56 hi	10 cd	1,7 efg	1,1 fgh	2,5 bc	0,8 f	2,4 def
8,0 2iP	50 j	17 b	2,3 ab	0,6 i	1,5 hi	1,4 de	1,7 fgh
<i>F</i> _{PGRs}	-	-	***	-	***	-	*
<i>F</i> _{Συγκέντρωσης}	-	-	***	-	***	-	***
<i>F</i> _{PGRs x Συγκέντρωση}	***	***	NS	**	NS	**	NS
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***	***	***	***	***	***	***

[±] Τα δεδομένα δεν συμμετέχουν στην 2-way ANOVA

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικά ή *, **, ***: σημαντικά σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$, $P \leq 0,001$, αντίστοιχα, $n=48$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών³ x Μέσος αριθμός κόμβων³

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενδατωμένους μαζί με μη υπερενδατωμένους βλαστούς

² Τα έκφυτα σχημάτισαν μόνο υπερενδατωμένους βλαστούς

³ Μη υπερενδατωμένοι βλαστοί

⁴ Υπερενδατωμένοι βλαστοί

Στις επόμενες πέντε υποκαλλιέργειες (4^η - 8^η) τα έκφυτα κορυφής και κόμβου τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα MS χωρίς PGRs, για διατήρηση πολλαπλασιαστικού υλικού και συνέχιση των πειραμάτων. Σε όλες τις υποκαλλιέργειες το ποσοστό των εκφύτων που αντέδρασαν διατηρήθηκε σε υψηλά επίπεδα (90 - 100%) και δεν παρουσιάστηκαν έκφυτα που να σχημάτιζαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς. Ο αριθμός των παραχθέντων κανονικών βλαστών κυμάνθηκε από 1,3 έως 1,5 βλαστούς ανά έκφυτο, με μέσο μήκος βλαστών από 2,5 έως 3,3 cm και με μέσο αριθμό κόμβων από 3,2 έως 3,4 ανά βλαστό. Το δυναμικό πολλαπλασιασμού ήταν από 4,0 έως 5,1, επιπλέον παρατηρήθηκε ριζοβολία σε ποσοστό από 62 - 75% στις διάφορες υποκαλλιέργειες (δεν παρουσιάζονται δεδομένα).

Στο επόμενο πείραμα (9^η υποκαλλιέργεια) θέλοντας να μειώσουμε ή και να εξαλείψουμε το ποσοστό υπερενυδάτωσης εξετάσαμε τη χρήση NAA σε συνδυασμό με BA. Το ποσοστό των εκφύτων που αντέδρασαν ήταν υψηλό (70 - 93%) σε όλα τα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν (Πίν. II.Π.47). Στα υποστρώματα με 2,0 ή 4,0 ή 8,0 mg L⁻¹ BA σε συνδυασμό με 0,1 mg L⁻¹ NAA από τα έκφυτα που αντέδρασαν ένα μικρό ποσοστό (8 - 11%) σχημάτισε μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς (Πίν. II.Π.47). Η διπαραγοντική ανάλυση δεν έδειξε αλληλεπίδραση μεταξύ της συγκέντρωσης του BA και της συγκέντρωσης του NAA στον αριθμό των παραχθέντων κανονικών βλαστών, στο μήκος και στον αριθμό των κόμβων των βλαστών αυτών και στο δυναμικό πολλαπλασιασμού. Το μήκος των βλαστών επηρεάστηκε μόνο από τη συγκέντρωση του NAA, ενώ το δυναμικό πολλαπλασιασμού μόνο από τη συγκέντρωση του BA (Πίν. II.Π.47). Η υψηλότερη παραγωγή κανονικών βλαστών (3,8 βλαστοί/έκφυτο) παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα που περιείχε 8,0 mg L⁻¹ BA σε συνδυασμό με 0,1 mg L⁻¹ NAA (Πίν. II.Π.47), ενώ το υπόστρωμα χωρίς PGRs έδωσε μεγαλύτερου μήκους βλαστούς (2,3 cm) και περισσότερους κόμβους (3,5 κόμβοι/βλαστό) (Πίν. II.Π.47). Το υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού (8,2 και 8,6) παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα που περιείχε 8,0 mg L⁻¹ BA σε συνδυασμό με 0,1 ή 0,5 mg L⁻¹ NAA, λόγω περισσότερων κανονικών παραχθέντων βλαστών και περισσότερων κόμβων ανά βλαστό (Πίν. II.Π.47). Η προσθήκη 0,1 ή 0,5 mg L⁻¹ NAA στα υποστρώματα με χαμηλότερες συγκεντρώσεις BA (0,5 ή 1,0 mg L⁻¹) οδήγησε στην εξάλειψη των υπερενυδατωμένων βλαστών (Πίν. II.Π.47). Στα υποστρώματα που περιείχαν BA σε συγκέντρωση 2,0 ή 4,0 mg L⁻¹ η προσθήκη 0,1 mg L⁻¹ NAA μείωσε την εμφάνιση υπερενυδατωμένων βλαστών σε σύγκριση με τα υποστρώματα που περιείχαν μόνο BA χωρίς NAA (Πίν. II.Π.45, II.Π.46, II.Π.47), ενώ η προσθήκη 0,5 mg L⁻¹ NAA εξάλειψε την εμφάνιση υπερενυδατωμένων βλαστών (Πίν. II.Π.47). Στο υπόστρωμα που περιείχε 8,0 mg L⁻¹ BA η προσθήκη 0,5 mg L⁻¹ NAA δεν ήταν ικανή να εξαλείψει την εμφάνιση των υπερενυδατωμένων βλαστών (Πίν. II.Π.47). Επιπλέον στο

υπόστρωμα MS χωρίς PGRs παρατηρήθηκε ριζοβολία σε ποσοστό (82%), ενώ το ποσοστό καλογένεσης ήταν 54 - 90% στα υποστρώματα που περιείχαν NAA (δεν παρουσιάζονται δεδομένα).

Πίνακας Π.Π.47. Επίδραση της συγκέντρωσης BA και NAA, στην αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου, κατά την 9^η υποκαλλιέργεια του *C. creticum*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από ενήλικα φυτά, τον Ιούλιο 2013.

BA / NAA (mg L ⁻¹) / (mg L ⁻¹)	Ποσοστό (%)		Μέσος	Μέσο Μήκος	Μέσος	Μέσος Αριθμός	Δυν. Πολ/ σμού
	Βλαστ/ ση ¹	Βλαστ/ ση ²	Αριθμός Βλαστών ³	Βλαστών ³ (cm)	Αριθμός Κόμβων ³	Υπερενδοατομέν ων Βλαστών ⁴	
0,0 / 0,0 ±	93 a	0 c	1,4 e	2,3 a	3,5 a	0,0 c	4,6 d
0,5 / 0,1	83 bc	0 c	2,1 cd	1,1 bcd	2,8 abc	0,0 c	4,9 cd
0,5 / 0,5	83 bc	0 c	1,4 e	1,3 bc	3,0 abc	0,0 c	3,5 cd
1,0 / 0,1	80 bc	0 c	2,1 cd	1,0 cd	2,2 d	0,0 c	3,7 f
1,0 / 0,5	70 d	0 c	1,9 de	0,9 d	2,3 cd	0,0 c	3,7 f
2,0 / 0,1	83 bc	8 b	2,0 d	1,0 cd	2,5 cd	0,5 b	4,1 e
2,0 / 0,5	93 a	0 c	1,8 de	1,2 bc	2,9 abc	0,0 c	4,9 cd
4,0 / 0,1	93 a	8 b	2,0 d	1,0 cd	2,5 bcd	0,5 b	4,7 d
4,0 / 0,5	80 bc	0 c	2,6 bc	1,4 b	2,6 bcd	0,0 c	5,4 b
8,0 / 0,1	77 cd	11 a	3,8 a	1,1 bcd	2,8 abc	1,1 a	8,2 a
8,0 / 0,5	87 ab	0 c	3,1 b	1,3 bc	3,2 ab	0,6 b	8,6 a
<i>F</i> _{BA}	-	-	-	NS	NS	-	***
<i>F</i> _{NAA}	-	-	-	*	NS	-	NS
<i>F</i> _{BA x NAA}	***	***	**	NS	NS	***	NS
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***	***	***	***	*	***	***

± Τα δεδομένα δεν συμμετέχουν στην 2-way ANOVA

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικά ή *, **, ***: σημαντικά σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$, $P \leq 0,001$, αντίστοιχα, $n=48$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών³ x Μέσος αριθμός κόμβων³

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενδοατομένους μαζί με μη υπερενδοατομένους βλαστούς

² Τα έκφυτα σχημάτισαν μόνο υπερενδοατομένους βλαστούς

³ Μη υπερενδοατομένοι βλαστοί

⁴ Υπερενδοατομένοι βλαστοί

Επιπλέον για την αντιμετώπιση της υπερενδοάτωσης δοκιμάστηκε και η αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ από 8 g L⁻¹ σε 12 g L⁻¹ (10^η υποκαλλιέργεια). Έκφυτα κορυφής και κόμβου καλλιεργήθηκαν είτε σε υπόστρωμα MS με άγαρ 8 g L⁻¹ χωρίς PGRs ή εμπλουτισμένο με 8,0 mg L⁻¹ BA και 0,1 mg L⁻¹ NAA είτε σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με 8,0 mg L⁻¹ BA και άγαρ σε συγκέντρωση 8 ή 12 g L⁻¹. Το υψηλότερο ποσοστό εκφύτων που αντέδρασαν ήταν 100% και παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα MS με

άγαρ 8 g L⁻¹ χωρίς PGRs (Πίν. II.Π.48). Στο υπόστρωμα που περιείχε 8,0 mg L⁻¹ BA στερεοποιημένο με 8 g L⁻¹ άγαρ το ποσοστό των αντιδρώντων εκφύτων ήταν 88%, όμως ένα σχετικά υψηλό ποσοστό (25%) των εκφύτων σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς (Πίν. II.Π.48). Η υψηλότερη παραγωγή κανονικών βλαστών (11,2 βλαστοί/έκφυτο) παρατηρήθηκε, στο υπόστρωμα που περιείχε 8,0 mg L⁻¹ BA και 12 g L⁻¹ άγαρ, ενώ στο υπόστρωμα χωρίς PGRs παρατηρήθηκε ο υψηλότερος αριθμός κόμβων (2,1 κόμβου/βλαστό) (Πίν. II.Π.48, Εικ. II.Π.45). Το υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού (14,9) παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα που περιείχε 8,0 mg L⁻¹ BA και 12 g L⁻¹ άγαρ, λόγω περισσότερων παραχθέντων κανονικών βλαστών ανά έκφυτο (Πίν. II.Π.48). Ο υψηλότερος αριθμός υπερενυδατωμένων βλαστών (1,8 υπερενυδατωμένοι βλαστοί/έκφυτο) παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα που περιείχε 8,0 mg L⁻¹ BA στερεοποιημένο με 8 g L⁻¹ άγαρ (Πίν. II.Π.48). Η αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ από 8 g L⁻¹ σε 12 g L⁻¹, μείωσε το μέσο αριθμό υπερενυδατωμένων βλαστών, το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε και όταν στο υπόστρωμα 8,0 mg L⁻¹ BA και 8 g L⁻¹ άγαρ προστέθηκε 0,1 mg L⁻¹ NAA (Πίν. II.Π.48). Επιπλέον στο υπόστρωμα MS χωρίς PGRs παρατηρήθηκε ριζοβολία σε υψηλό ποσοστό 69%, ενώ στο υπόστρωμα με NAA παρατηρήθηκε καλογένεση σε ποσοστό 71% (δεν παρουσιάζονται δεδομένα).

Πίνακας II.Π.48. Επίδραση της συγκέντρωσης άγαρ (8 ή 12 g L⁻¹), με την παρουσία ή μη NAA, στην αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου, κατά τη 10^η υποκαλλιέργεια του *C. creticum*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από ενήλικα φυτά, τον Ιούλιο 2013.

BA / NAA / Άγαρ (mg L ⁻¹) / (mg L ⁻¹) / (g L ⁻¹)	Ποσοστό (%)		Μέσος Αριθμός Βλαστών ³	Μέσο Μήκος Βλαστών ³ (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ³	Μέσος Αριθμός Υπερενυδατωμ ένων Βλαστών ⁴	Δυν. Πολ/ σμού
	Βλαστ/ ση ¹	Βλαστ/ ση ²					
0,0 / 0,0 / 8	100 a	0 c	2,7 c	1,8 a	2,1 a	0,0 d	5,7 b
8,0 / 0,0 / 8	63 d	25 a	4,6 b	0,6 d	1,3 b	1,8 a	3,7 c
8,0 / 0,0 / 12	95 b	0 c	11,2 a	1,0 c	1,4 b	0,7 b	14,9 a
8,0 / 0,1 / 8	87 b	9 b	5,9 b	1,2 b	1,4 b	0,9 b	7,2 b
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***	***	***	***	***	***	***

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

***: σημαντικά σε $P \leq 0,001$, $n=30$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών³ x Μέσος αριθμός κόμβων³

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς

² Τα έκφυτα σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς

³ Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί

⁴ Υπερενυδατωμένοι βλαστοί



Εικόνα Π.Π.45. Αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου *C. creticum*, στα αναγραφόμενα υποστρώματα, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από ενήλικα φυτά, κατά τη δέκατη (10^{11}) υποκαλλιέργεια. Η μπάρα αντιπροσωπεύει μήκος 1 cm.

Εγκατεστημένη από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα

Στη πρώτη υποκαλλιέργεια που ακολούθησε την αρχική εγκατάσταση από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα έκφυτα κορυφής ή κόμβου, τοποθετήθηκαν στο ίδιο υπόστρωμα από το οποίο προήλθαν. Το ποσοστό των εκφύτων που αντέδρασαν στα διάφορα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν ήταν παρόμοιο με το αντίστοιχο της αρχικής καλλιέργειας (70 - 100%) (Πίν. Π.Π.43, Π.Π.49). Η αύξηση της συγκέντρωσης των κυτοκινινών οδήγησε σε μείωση του ποσοστού των εκφύτων που αντέδρασαν η οποία έφτασε το 7-24% στη συγκέντρωση $8,0 \text{ mg L}^{-1}$. Η παρουσία υψηλών συγκεντρώσεων κυτοκινινών στο υπόστρωμα είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό υπερενυδατωμένων βλαστών (Πίν. Π.Π.49). Πιο συγκεκριμένα στα υποστρώματα με $4,0$ ή $8,0 \text{ mg L}^{-1}$ κυτοκινίνη (ZEAT, BA, KIN, 2iP) παρατηρήθηκε αύξηση του ποσοστού των εκφύτων που σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς, ιδιαίτερα υψηλό ήταν στη ZEAT και στο BA στη συγκέντρωση $8,0 \text{ mg L}^{-1}$, όπου το ποσοστό έφτασε το 28 - 30% (Πίν. Π.Π.49). Η διπαραγοντική ανάλυση έδειξε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του είδους και της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης στο ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς, στο ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς, αλλά και στο μέσο μήκος των παραθθέντων κανονικών βλαστών (Πίν. Π.Π.49). Η παρουσία κυτοκινινών σε υψηλές συγκεντρώσεις στο υπόστρωμα αύξησε τον αριθμό των παραγόμενων βλαστών ανά έκφυτο. Υψηλότερη παραγωγή κανονικών βλαστών (3,5 βλαστοί/έκφυτο) παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα με $8,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA, ενώ το υπόστρωμα με $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ BA έδωσε τους περισσότερους κόμβους ανά έκφυτο (4,9 κόμβου/βλαστό) (Πίν. Π.Π.49). Το υπόστρωμα

χωρίς PGRs έδωσε μικρότερο αριθμό παραχθέντων βλαστών, όμως μεγαλύτερου μήκους. Το δυναμικό πολλαπλασιασμού ήταν μεγαλύτερο (7,6 και 8,1) στο υπόστρωμα που περιείχε 0,25 ή 0,5 mg L⁻¹ BA αντίστοιχα, χωρίς στατιστική διαφορά από τα υποστρώματα με 0,25 mg L⁻¹ ZEAT και 1,0 mg L⁻¹ BA (Πίν. II.Π.49). Η παρουσία κυτοκινίνης σε υψηλές συγκεντρώσεις, ανεξάρτητα από το είδος της κυτοκινίνης, είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό υπερενυδατωμένων βλαστών σε υψηλό ποσοστό, το οποίο έφτασε και μέχρι το 45 - 46% στα υποστρώματα με 8,0 mg L⁻¹ BA ή ZEAT. Ο υψηλότερος αριθμός υπερενυδατωμένων βλαστών (2,7 ή 3,1 υπερενυδατωμένοι βλαστοί/έκφυτο) παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα που περιείχε 8,0 mg L⁻¹ ZEAT ή BA αντίστοιχα (Πίν. II.Π.49). Επιπλέον στο υπόστρωμα MS χωρίς PGRs παρατηρήθηκε ριζοβολία σε ποσοστό (65%), στα υποστρώματα που περιείχαν ZEAT ή BA δεν παρουσιάστηκε ριζοβολία, ενώ στα υποστρώματα με 0,5 - 1,0 mg L⁻¹ KIN ή 2iP παρατηρήθηκε σε ποσοστό από 20-29%.

Στις επόμενες τέσσερις υποκαλλιέργειες (2^η - 5^η) τα έκφυτα κορυφής και κόμβου τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα MS χωρίς PGRs, για διατήρηση πολλαπλασιαστικού υλικού και συνέχιση των πειραμάτων. Σε όλες τις υποκαλλιέργειες το ποσοστό των εκφύτων που αντέδρασαν ήταν σε υψηλό επίπεδο (91 - 100%) και δεν παρουσιάστηκαν έκφυτα που να φέρουν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς. Ο αριθμός των παραχθέντων βλαστών κυμάνθηκε από 1,2 έως 2,4 βλαστοί ανά έκφυτο, με μέσο μήκος βλαστών από 1,4 έως 2,6 cm και με μέσο αριθμό κόμβων από 2,0 έως 3,3 ανά βλαστό. Το δυναμικό πολλαπλασιασμού κυμάνθηκε από 3,5 έως 7,2 επιπλέον παρατηρήθηκε ριζοβολία σε ποσοστό από 57 - 71% στις διάφορες υποκαλλιέργειες (δεν παρουσιάζονται δεδομένα).

Πίνακας Π.Π.49. Επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης PGRs, στην αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου, κατά την πρώτη υποκαλλιέργεια του *C. creticum*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα, το Νοέμβριο 2014.

PGRs (mg L ⁻¹)	Ποσοστό (%)		Μέσος Αριθμός Βλαστών ³	Μέσο Μήκος Βλαστών ³ (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ³	Μέσος Αριθμός Υπερενδατωμ ένων Βλαστών ⁴	Δυν. Πολ/ σμού
	Βλαστ/ ση ¹	Βλαστ/ ση ²					
0,0 [±]	93 ab	0 j	1,4 hi	3,3 abc	3,6 cde	0,0 i	4,7 de
0,25 ZEAT	91 abc	0 j	1,6 ghi	4,0 a	4,6 ab	0,0 i	7,0 ab
0,5 ZEAT	89 abc	0 j	1,5 ghi	3,4 abc	4,0 bcd	0,2 h	5,3 bc
1,0 ZEAT	90 abc	0 j	1,6 ghi	2,7 cde	3,0 efg	0,5 g	4,3 de
2,0 ZEAT	72 def	8 i	3,0 abc	1,6 ghi	2,9 efg	1,2 e	6,3 ab
4,0 ZEAT	54 hij	21 d	2,9 bcd	0,9 ijk	1,8 hi	1,8 c	2,8 hi
8,0 ZEAT	47 jk	28 b	3,3 ab	0,6 k	1,6 i	2,7 b	2,5 i
0,25 BA	83 bcd	0 j	2,0 efg	3,6 ab	4,9 a	0,0 i	8,1 a
0,5 BA	89 abc	0 j	2,3 def	1,8 fgh	3,7 cde	0,2 h	7,6 a
1,0 BA	78 cde	0 j	1,9 fgh	2,3 efg	4,5 abc	0,6 g	6,7 ab
2,0 BA	60 ghi	10 h	2,3 def	1,0 ijk	3,3 def	1,4 d	4,6 de
4,0 BA	50 ijk	23 c	2,9 bcd	0,8 jk	2,4 fgh	1,9 c	3,5 ghi
8,0 BA	40 k	30 a	3,5 a	0,6 k	1,9 ghi	3,1 a	2,7 hi
0,25 KIN	100 a	0 j	1,2 i	3,7 ab	4,7 ab	0,0 i	5,6 bc
0,5 KIN	83 bcd	0 j	1,4 hi	3,2 bcd	4,5 abc	0,0 i	5,2 cd
1,0 KIN	81 bcd	0 j	1,2 i	3,1 bcd	4,2 abc	0,0 i	4,1 efg
2,0 KIN	72 def	8 i	1,7 fgh	1,5 hij	3,1 efg	0,5 g	3,8 fgh
4,0 KIN	67 efg	11 h	2,0 efg	1,5 hij	2,6 efg	0,8 f	3,5 ghi
8,0 KIN	61 ghi	15 f	2,1 efg	1,5 hij	2,9 efg	1,2 e	3,7 fgh
0,25 2iP	83 bcd	0 j	1,4 hijk	3,1 bcd	4,3 abc	0,0 i	5,0 cd
0,5 2iP	89 abc	0 j	1,5 hijk	2,2 efg	3,7 cde	0,0 i	5,0 cd
1,0 2iP	89 abc	0 j	1,7 fgh	2,4 def	3,4 def	0,0 i	5,1 cd
2,0 2iP	75 def	8 i	2,0 efg	1,9 fgh	2,7 fgh	0,6 g	4,1 efg
4,0 2iP	65 fgh	13 g	2,2 efg	0,9 ijk	1,9 ghi	0,8 f	2,7 hi
8,0 2iP	59 ghi	17 e	2,4 cde	0,8 jk	1,6 i	1,4 d	2,3 i
<i>F</i> _{PGRs}	-	-	***	-	***	-	***
<i>F</i> _{Συγκέντρωσης}	-	-	***	-	***	-	***
<i>F</i> _{PGRs x Συγκέντρωση}	***	***	NS	**	NS	***	NS
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***	***	***	***	***	***	***

[±] Τα δεδομένα δεν συμμετέχουν στην 2-way ANOVA

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικά ή ***: σημαντικά σε $P \leq 0,001$, $n=48$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών³ x Μέσος αριθμός κόμβων³

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενδατωμένους μαζί με μη υπερενδατωμένους βλαστούς

² Τα έκφυτα σχημάτισαν μόνο υπερενδατωμένους βλαστούς

³ Μη υπερενδατωμένοι βλαστοί

⁴ Υπερενδατωμένοι βλαστοί

Στο επόμενο πείραμα (6^η υποκαλλιέργεια) θέλοντας να μειώσουμε ή και να εξαλείψουμε το ποσοστό υπερενυδάτωσης εξετάσαμε τη χρήση NAA σε συνδυασμό με BA. Το ποσοστό των εκφύτων που αντέδρασαν ήταν υψηλό (87 - 100%) σε όλα τα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν (Πίν. II.Π.50). Στο υπόστρωμα με 8,0 mg L⁻¹ BA σε συνδυασμό με 0,1 mg L⁻¹ NAA από τα έκφυτα που αντέδρασαν ένα μικρό ποσοστό (10%) σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς (Πίν. II.Π.50). Η διπαραγοντική ανάλυση δεν έδειξε αλληλεπίδραση μεταξύ της συγκέντρωσης του BA και της συγκέντρωσης του NAA στον αριθμό των παραχθέντων κανονικών βλαστών, στον αριθμό των κόμβων και στο δυναμικό πολλαπλασιασμού. Ο μέσος αριθμός των βλαστών επηρεάστηκε τόσο από τη συγκέντρωση του BA όσο και από τη συγκέντρωση του NAA, ο αριθμός κόμβων μόνο από τη συγκέντρωση του BA, ενώ το δυναμικό πολλαπλασιασμού μόνο από τη συγκέντρωση του BA, ενώ το δυναμικό πολλαπλασιασμού μόνο από τη συγκέντρωση του NAA (Πίν. II.Π.50). Η υψηλότερη παραγωγή κανονικών βλαστών (4,5 βλαστοί/έκφυτο) παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα περιείχε 8,0 mg L⁻¹ BA σε συνδυασμό με 0,1 mg L⁻¹ NAA (Πίν. II.Π.50), ενώ το υπόστρωμα χωρίς PGRs έδωσε μεγαλύτερου μήκους βλαστούς (2,5 cm) (Πίν. II.Π.50). Στον αριθμό των κόμβων δεν παρατηρήθηκαν στατιστικές διαφορές στα διάφορα υποστρώματα (Πίν. II.Π.50). Το υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού (9,3) παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα που περιείχε 8,0 mg L⁻¹ BA σε συνδυασμό με 0,5 mg L⁻¹ NAA, λόγω περισσότερων κανονικών παραχθέντων βλαστών ανά έκφυτο (Πίν. II.Π.50). Η προσθήκη 0,1 ή 0,5 mg L⁻¹ NAA στα υποστρώματα με χαμηλότερες συγκεντρώσεις BA (0,5 ή 1,0 mg L⁻¹) οδήγησε στην εξάλειψη των υπερενυδατωμένων βλαστών (Πίν. II.Π.50). Στα υποστρώματα που περιείχαν BA σε συγκέντρωση 2,0 ή 4,0 mg L⁻¹ η προσθήκη 0,1 mg L⁻¹ NAA μείωσε την εμφάνιση υπερενυδατωμένων βλαστών σε σύγκριση με τα υποστρώματα που περιείχαν μόνο BA χωρίς NAA (Πίν. II.Π.49, II.Π.50), ενώ η προσθήκη 0,5 mg L⁻¹ NAA εξάλειψε την εμφάνιση υπερενυδατωμένων βλαστών (Πίν. II.Π.50). Στο υπόστρωμα που περιείχαν 8,0 mg L⁻¹ BA η προσθήκη 0,5 mg L⁻¹ NAA δεν ήταν ικανή να εξαλείψει την εμφάνιση των υπερενυδατωμένων βλαστών (Πίν. II.Π.50). Επιπλέον στο υπόστρωμα MS χωρίς PGRs παρατηρήθηκε ριζοβολία σε ποσοστό (78%), ενώ το ποσοστό καλογένεσης ήταν 43 - 100% στα υποστρώματα που περιείχαν NAA (δεν παρουσιάζονται δεδομένα).

Πίνακας Π.Π.50. Επίδραση της συγκέντρωσης BA και NAA, στην αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου, κατά την έκτη (6^η) υποκαλλιέργεια του *C. creticum*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από σπορόφυτα, Νοέμβριο 2014.

BA / NAA (mg L ⁻¹) / (mg L ⁻¹)	Ποσοστό (%)		Μέσος	Μέσο Μήκος	Μέσος	Μέσος Αριθμός	Δυν.
	Βλαστ/ ση ¹	Βλαστ/ ση ²	Αριθμός Βλαστών ³	Βλαστών ³ (cm)	Αριθμός Κόμβων ³	Υπερενυδατωμέν ων Βλαστών ⁴	Πολ/ σμού
0,0 / 0,0 ±	100 a	0 b	1,4 e	2,5 a	3,2 a	0,0 d	4,5 f
0,5 / 0,1	100 a	0 b	2,3 bcd	1,8 bc	3,3 a	0,0 d	7,6 bc
0,5 / 0,5	92 b	0 b	1,8 de	2,6 a	3,0 a	0,0 d	5,0 def
1,0 / 0,1	100 a	0 b	2,8 b	1,7 bcd	3,1 a	0,0 d	8,7 b
1,0 / 0,5	88 bc	0 b	2,4 bcd	1,9 bc	3,4 a	0,0 d	7,2 bc
2,0 / 0,1	97 a	0 b	2,6 bc	1,2 def	2,7 a	0,4 c	6,8 cde
2,0 / 0,5	97 a	0 b	2,1 bcd	0,9 f	3,0 a	0,0 d	6,1 cde
4,0 / 0,1	100 a	0 b	2,6 bcd	1,0 cd	3,3 a	0,4 c	8,6 b
4,0 / 0,5	87 c	0 b	1,9 cde	0,9 f	2,9 a	0,0 d	4,8 def
8,0 / 0,1	90 bc	10 a	4,5 a	1,1 ef	2,3 a	1,0 a	9,3 a
8,0 / 0,5	97 c	0 b	2,7 b	0,9 f	2,4 a	0,5 b	5,6 de
<i>F</i> _{BA}	-	-	***	-	*	-	NS
<i>F</i> _{NAA}	-	-	***	-	NS	-	**
<i>F</i> _{BA x NAA}	***	***	NS	***	NS	***	NS
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***	***	***	***	NS	***	***

± Τα δεδομένα δεν συμμετέχουν στην 2-way ANOVA

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικά ή *, **, ***: σημαντικά σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$, $P \leq 0,001$, αντίστοιχα, $n=30$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών³ x Μέσος αριθμός κόμβων³

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς

² Τα έκφυτα σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς

³ Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί

⁴ Υπερενυδατωμένοι βλαστοί

Επιπλέον για την αντιμετώπιση της υπερενυδάτωσης δοκιμάστηκε και η αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ από 8 g L⁻¹ σε 12 g L⁻¹ (7^η υποκαλλιέργεια). Έτσι έκφυτα κορυφής και κόμβου καλλιεργήθηκαν είτε σε υπόστρωμα MS με άγαρ 8 g L⁻¹ χωρίς PGRs ή εμπλουτισμένο με 8,0 mg L⁻¹ BA και 0,1 mg L⁻¹ NAA είτε σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με 8,0 mg L⁻¹ BA και άγαρ σε συγκέντρωση 8 ή 12 g L⁻¹. Το υψηλότερο ποσοστό εκφύτων που αντέδρασαν ήταν 100% και παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα MS με άγαρ 8 g L⁻¹ χωρίς PGRs (Πίν. Π.Π.51). Στο υπόστρωμα που περιείχε 8,0 mg L⁻¹ BA στερεοποιημένο με 8 g L⁻¹ άγαρ το ποσοστό των αντιδρώντων εκφύτων ήταν 89%, όμως ένα σχετικά υψηλό ποσοστό (19%) των εκφύτων σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς (Πίν. Π.Π.51). Η υψηλότερη παραγωγή κανονικών βλαστών (12,3

βλαστοί/έκφυτο) παρατηρήθηκε, στο υπόστρωμα περιείχε 8,0 mg L⁻¹ BA και 12 g L⁻¹ άγαρ, ενώ στο υπόστρωμα χωρίς PGRs παρατηρήθηκε ο υψηλότερος αριθμός κόμβων (2,7 κόμβοι/βλαστό) (Πίν. II.Π.51, Εικ. II.Π.46). Το υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού (20,6) παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα που περιείχε 8,0 mg L⁻¹ BA και 12 g L⁻¹ άγαρ, λόγω περισσότερων παραχθέντων κανονικών βλαστών ανά έκφυτο (Πίν. II.Π.51). Ο υψηλότερος αριθμός υπερενυδατωμένων βλαστών (2,1 υπερενυδατωμένοι βλαστοί/έκφυτο) παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα που περιείχε 8,0 mg L⁻¹ BA στερεοποιημένο με 8 g L⁻¹ άγαρ (Πίν. II.Π.51). Η αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ από 8 g L⁻¹ σε 12 g L⁻¹, μείωση το μέσο αριθμό υπερενυδατωμένων βλαστών, το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε και όταν στο υπόστρωμα 8,0 mg L⁻¹ BA και 8 g L⁻¹ άγαρ προστέθηκε 0,1 mg L⁻¹ NAA (Πίν. II.Π.51). Επιπλέον στο υπόστρωμα MS χωρίς PGRs παρατηρήθηκε ριζοβολία σε υψηλό ποσοστό 75%, ενώ στο υπόστρωμα με NAA παρατηρήθηκε καλογένεση σε ποσοστό 76% (δεν παρουσιάζονται δεδομένα).

Πίνακας II.Π.51. Επίδραση της συγκέντρωσης άγαρ (8 ή 12 g L⁻¹), με την παρουσία ή μη NAA, στην αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου, κατά την εβδομη (7^η) υποκαλλιέργεια του *C. creticum*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα, το Νοέμβριο 2014.

BA / NAA / Άγαρ (mg L ⁻¹) / (mg L ⁻¹) / (g L ⁻¹)	Ποσοστό (%)		Μέσος Αριθμός Βλαστών ³	Μέσο Μήκος Βλαστών ³ (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ³	Μέσος Αριθμός Υπερενυδατωμ ένων Βλαστών	Δυν. Πολ/ σμού
	Βλαστ/ ση ¹	Βλαστ/ ση ²					
0,0 / 0,0 / 8	100 a	0 c	2,9 c	2,0 a	2,7 a	0,0 d	7,8 b
8,0 / 0,0 / 8	70 d	19 a	5,2 b	0,5 d	2,0 bc	2,1 a	7,3 c
8,0 / 0,0 / 12	93 b	0 c	12,3 a	0,8 c	1,8 cd	0,7 b	20,6 a
8,0 / 0,1 / 8	85 c	7b	5,7 b	1,2 b	1,5 d	1,1 b	7,3 c
<i>F</i> one-way ANOVA	***	***	***	***	***	***	***

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

***: σημαντικά σε $P \leq 0,001$, αντίστοιχα, $n=30$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών³ x Μέσος αριθμός κόμβων³

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς

² Τα έκφυτα σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς

³ Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί

⁴ Υπερενυδατωμένοι βλαστοί



Εικόνα II.11.46. Αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου *C. creticum*, στα αναγραφόμενα υποστρώματα, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα, κατά τη 7^η υποκαλλιέργεια. Η μπάρα αντιπροσωπεύει μήκος 1 cm.

II.11.3.2.3 *In vitro* ριζοβολία μικρομοσχευμάτων

Κατά τη διερεύνηση της *in vitro* ριζοβολίας είτε από την καλλιέργεια που εγκαταστάθηκε από ενήλικα φυτά, είτε από την καλλιέργεια που εγκαταστάθηκε από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα, επιλέχθηκαν μη υπερενυδατωμένοι μικροβλαστοί, για τη λήψη μικρομοσχευμάτων από το κορυφαίο τμήμα, μαζί με το επάκριο μερίστωμα, μήκους 1,5 - 2,0 cm, με σκοπό να εξεταστεί η επίδραση της συγκέντρωσης του θρεπτικού υποστρώματος MS, της συγκέντρωσης του IBA και της συνεχούς ή για μίας εβδομάδας παρουσίας του IBA σε στερεό υπόστρωμα καλλιέργειας. Συγκεκριμένα μικρομοσχεύματα καλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα πλήρους ή μισής δύναμης MS με 20 g L⁻¹ σακχαρόζη και διάφορες συγκεντρώσεις IBA (0,0, 0,5, 1,0, 2,0 ή 4,0 mg L⁻¹). Σε μια άλλη μεταχείριση μικρομοσχεύματα καλλιεργήθηκαν επί μία εβδομάδα σε υπόστρωμα MS χωρίς IBA ή με 0,5, 1,0, 2,0 ή 4,0 mg L⁻¹ IBA, και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε υπόστρωμα πλήρους ή μισής δύναμης MS για πέντε εβδομάδες.

Ριζοβολία μικρομοσχευμάτων από καλλιέργεια ενήλικων φυτών

Το ποσοστό ριζοβολίας των μικροβλαστών ήταν υψηλό (79 - 100%) σε όλα τα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν (Πίν. II.11.52). Το μεγαλύτερο αριθμό ριζών (4,9 και 5,2 ρίζες ανά μικρομόσχευμα), αλλά και το μεγαλύτερο μήκος ριζών (2,2 - 2,3 cm ανά μικρομόσχευμα), σημείωσε το υπόστρωμα μισής δύναμης MS με 2,0 ή 4,0 mg L⁻¹ IBA, σε συνεχή εφαρμογή για έξι εβδομάδες (Πίν. II.11.52, Εικ. II.11.47). Το πλήρους δύναμης MS ιδιαίτερα όταν συνδυάστηκε με IBA μείωσε το ποσοστό ριζοβολίας των μικρομοσχευμάτων,

καθώς και τον αριθμό και το μήκος των ριζών (Πίν. II.Π.52). Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η *in vitro* ριζοβολία των μικρομοσχευμάτων από το κορυφαίο τμήμα, μαζί με το επάκριο μερίστωμα, των μικροβλαστών, ήταν πετυχημένη σε υπόστρωμα μισής δύναμης MS χωρίς IBA ή με 0,5 - 4,0 mg L⁻¹ IBA σε συνεχή εφαρμογή για έξι εβδομάδες (Πίν. II.Π.52). Επιπλέον παράλληλα με τη ριζοβολία παρατηρήθηκε επιμήκυνση των μικρομοσχευμάτων σε όλα τα υποστρώματα και έκπτυξη με ταυτόχρονη επιμήκυνση πλάγιων βλαστών στα υποστρώματα που περιείχαν IBA. Πιο συγκεκριμένα στη συγκέντρωση 0,5 mg L⁻¹ IBA παρατηρήθηκε έκπτυξη 2 - 4 βλαστοί/μικρομόσχευμα, στο υπόστρωμα 1,0 mg L⁻¹ IBA 6 - 8 βλαστοί/μικρομόσχευμα, ενώ στα υποστρώματα 2,0 και 4,0 mg L⁻¹ IBA 8 - 12 βλαστοί/μικρομόσχευμα (Εικ. II.Π.47).

Πίνακας II.Π.52. Επίδραση του υποστρώματος και του IBA (διάρκεια της εφαρμογής και της συγκέντρωσης) στη ριζοβολία των μικρομοσχευμάτων *C. creticum*, που ελήφθησαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από ενήλικα φυτά.

Περίοδος καλλιέργειας / υπόστρωμα+IBA συγκέντρωση (mg L ⁻¹)	Ριζοβολία (%)	Μέσος αριθμός ριζών	Μέσο μήκος ριζών (cm)
6 εβδομάδες / ½ MS	91 bcd	4,6 abc	1,0 cdef
6 εβδομάδες / MS	91 bcd	4,3 bcd	1,0 def
6 εβδομάδες / MS+0,5 IBA	83 ef	3,7 efg	0,7 fgh
6 εβδομάδες / MS+1,0 IBA	88 de	2,9 hijk	0,8 efg
6 εβδομάδες / MS+2,0 IBA	83 ef	3,1 ghi	0,5 hi
6 εβδομάδες / MS+4,0 IBA	79 f	3,0 hij	0,6 ghi
6 εβδομάδες / ½ MS+0,5 IBA	95 ab	4,8 ab	1,4 b
6 εβδομάδες / ½ MS+1,0 IBA	98 a	4,5 bc	1,4 b
6 εβδομάδες / ½ MS+2,0 IBA	86 de	5,2 a	2,3 a
6 εβδομάδες / ½ MS+4,0 IBA	91 bcd	4,9 ab	2,2 a
1 εβδομάδα / MS + 5 εβδομάδες / ½ MS	95 ab	3,4 fgh	1,3 bc
1 εβδομάδα / MS+0,5 IBA + 5 εβδομάδες / ½ MS	88 de	3,9 def	1,0 cde
1 εβδομάδα / MS+1,0 IBA + 5 εβδομάδες / ½ MS	100 a	4,2 cde	1,0 cde
1 εβδομάδα / MS+2,0 IBA + 5 εβδομάδες / ½ MS	95 ab	4,4 bcd	1,4 b
1 εβδομάδα / MS+4,0 IBA + 5 εβδομάδες / ½ MS	95 ab	4,3 bcde	1,2 bcd
1 εβδομάδα / MS+0,5 IBA + 5 εβδομάδες / MS	90 bcd	2,7 ijk	0,4 i
1 εβδομάδα / MS+1,0 IBA + 5 εβδομάδες / MS	87 de	2,4 k	0,4 i
1 εβδομάδα / MS+2,0 IBA + 5 εβδομάδες / MS	87 de	2,5 ijk	0,4 i
1 εβδομάδα / MS+4,0 IBA + 5 εβδομάδες / MS	89 cd	2,4 jk	0,3 i
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***	***	***

Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. ***: σημαντικά σε $P \leq 0,001$, $n=30$.



Εικόνα II.Π.47. Ριζοβολία μικρομοσχευμάτων *C. creticum*, από το κορυφαίο τμήμα, μαζί με το επάκριο μερίστωμα σε υπόστρωμα μισής δύναμης MS χωρίς IBA ή με 0,5 - 4,0 mg L⁻¹ IBA σε συνεχή εφαρμογή για έξι εβδομάδες, που ελήφθησαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από ενήλικα φυτά. Η κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει μήκος 1 cm.

Ριζοβολία μικρομοσχευμάτων από καλλιέργεια σποροφύτων

Το ποσοστό ριζοβολίας των μικρομοσχευμάτων ήταν υψηλό (82 - 100%) σε όλα τα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν (Πίν. II.Π.53). Το μεγαλύτερο αριθμό ριζών (5,9 ρίζες/μικρομόσχευμα) σημείωσε το υπόστρωμα μισής δύναμης MS με 4,0 mg L⁻¹ IBA, σε συνεχή εφαρμογή για έξι εβδομάδες, ενώ το μεγαλύτερο μήκος ριζών (1,7cm) το υπόστρωμα μισής δύναμης MS χωρίς προσθήκη IBA, σε συνεχή εφαρμογή για έξι εβδομάδες (Πίν. II.Π.53, Εικ. II.Π.48). Το πλήρους δύναμης MS ιδιαίτερα όταν συνδυάστηκε με IBA μείωσε τον αριθμό και το μήκος των ριζών (Πίν. II.Π.53). Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η *in vitro* ριζοβολία των μικρομοσχευμάτων από το κορυφαίο τμήμα, μαζί με το επάκριο μερίστωμα, των μικροβλαστών, ήταν πετυχημένη σε υπόστρωμα μισής δύναμης MS χωρίς IBA ή με 0,5 - 4,0 mg L⁻¹ IBA σε συνεχή εφαρμογή για έξι εβδομάδες (Πίν. II.Π.53). Επιπλέον παράλληλα με τη ριζοβολία παρατηρήθηκε επιμήκυνση των μικρομοσχευμάτων σε όλα τα υποστρώματα και έκπτυξη με ταυτόχρονη επιμήκυνση πλάγιων βλαστών στα υποστρώματα που περιείχαν IBA. Πιο συγκεκριμένα στη συγκέντρωση 0,5 και 1,0 mg L⁻¹ IBA παρατηρήθηκε έκπτυξη 2 - 4 βλαστοί/μικρομόσχευμα, ενώ στα υποστρώματα 2,0 και 4,0 mg L⁻¹ IBA 6 - 10 βλαστοί/μικρομόσχευμα (Εικ. II.Π.48).

Πίνακας II.Π.53. Επίδραση του υποστρώματος και του IBA (διάρκεια της εφαρμογής και της συγκέντρωσης) στη ριζοβολία των μικρομοσχευμάτων *C. creticum*, που ελήφθησαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από σπορόφυτα.

Περίοδος καλλιέργειας / υποστρώμα+IBA συγκέντρωση (mg L ⁻¹)	Ριζοβολία (%)	Μέσος αριθμός ριζών	Μέσο μήκος ριζών (cm)
6 εβδομάδες / ½ MS	95 bc	5,3 abc	1,7 a
6 εβδομάδες / MS	93 c	4,7 c	1,4 cde
6 εβδομάδες / MS+0,5 IBA	98 ab	3,2 de	0,8 fgh
6 εβδομάδες / MS+1,0 IBA	98 ab	3,0 e	0,8 fgh
6 εβδομάδες / MS+2,0 IBA	93 c	2,9 e	0,6 hi
6 εβδομάδες / MS+4,0 IBA	91 cd	2,8 e	0,7 fgh
6 εβδομάδες / ½ MS+0,5 IBA	95 bc	5,3 abc	1,7 ab
6 εβδομάδες / ½ MS+1,0 IBA	88 d	5,7 ab	1,4 cd
6 εβδομάδες / ½ MS+2,0 IBA	95 bc	5,8 b	1,5 bc
6 εβδομάδες / ½ MS+4,0 IBA	95 bc	5,9 a	1,4 cde
1 εβδομάδα / MS + 5 εβδομάδες / ½ MS	98 ab	3,0 e	1,2 e
1 εβδομάδα / MS+0,5 IBA + 5 εβδομάδες / ½ MS	100 a	3,1 e	1,2 de
1 εβδομάδα / MS+1,0 IBA + 5 εβδομάδες / ½ MS	100 a	3,8 d	1,2 e
1 εβδομάδα / MS+2,0 IBA + 5 εβδομάδες / ½ MS	88 d	5,1 bc	0,9 f
1 εβδομάδα / MS+4,0 IBA + 5 εβδομάδες / ½ MS	82 f	5,2 abc	0,7 gh
1 εβδομάδα / MS+0,5 IBA + 5 εβδομάδες / MS	91 cd	3,1 e	0,9 fg
1 εβδομάδα / MS+1,0 IBA + 5 εβδομάδες / MS	93 c	2,7 e	0,8 fgh
1 εβδομάδα / MS+2,0 IBA + 5 εβδομάδες / MS	88 d	2,8 e	0,5 ij
1 εβδομάδα / MS+4,0 IBA + 5 εβδομάδες / MS	83 ef	2,6 e	0,4 j
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***	***	***

Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. ***: σημαντικά σε $P \leq 0,001$, $n=30$.



Εικόνα II.Π.48. Ριζοβολία μικρομοσχευμάτων *C. creticum*, από το κορυφαίο τμήμα, μαζί με το επάκριο μερίστωμα σε υπόστρωμα μισής δύναμης MS χωρίς IBA ή με 0,5 - 4,0 mg L⁻¹ IBA σε συνεχή εφαρμογή για έξι εβδομάδες, που ελήφθησαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα. Η κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει μήκος 1 cm.

Ριζοβολία συστάδων μικρομοσχευμάτων από καλλιέργεια ενήλικων φυτών ή σποροφύτων

Σε επόμενο πείραμα συστάδες μικροβλαστών προερχόμενοι είτε από καλλιέργεια ενήλικων φυτών είτε σποροφύτων τοποθετήθηκαν για ριζοβολία σε υπόστρωμα MS μισής δύναμης χωρίς IBA. Το ποσοστό ριζοβολίας ήταν πολύ υψηλό (96 - 98%) ανεξάρτητα από την προέλευση των συστάδων (δεδομένα από 46 συστάδες). Ο μέσος αριθμός ριζών που παράχθηκε ήταν 8,6 και 8,7 ρίζες ανά συστάδα μικροβλαστών (καλλιέργεια από ενήλικα φυτά ή από σπορόφυτα, αντίστοιχα) με μέσο μήκος 1,1 cm (δεν παρουσιάζονται δεδομένα, Εικ. II.Π.49). Παράλληλα με τη ριζογένεση παρατηρήθηκε και επιμήκυνση των επιμήκυνση των βλαστών (Εικ. II.Π.49).

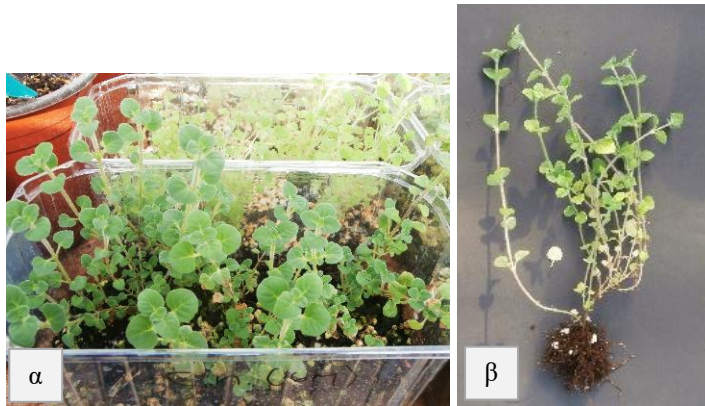


Εικόνα II.Π.49. Ριζοβολία συστάδων μικροβλαστών *C. creticum*, από την καλλιέργεια που εγκαταστάθηκε από ενήλικα φυτά και από σπορόφυτα, σε θρεπτικό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS. Η κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει μήκος 1 cm.

II.Π.3.2.4 Εγκλιματισμός φυταρίων *ex vitro*

Ριζοβολημένα μικρομοσχεύματα (φυτάρια), καθ' όλη τη διάρκεια του έτους, είτε από καλλιέργεια σποροφύτων, είτε από καλλιέργεια ενήλικων φυτών αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο, μεταφέρθηκαν *ex vitro* σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (1:1, v/v). Ο αριθμός των φυταρίων που μεταφέρονταν *ex vitro* κάθε φορά ήταν 120 (15 δοχεία, 8 φυτά ανά δοχείο). Οι ριζοβολημένες συστάδες είτε από καλλιέργεια ενήλικων φυτών είτε από καλλιέργεια σποροφύτων, μεταφέρθηκαν *ex vitro* σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (1:1, v/v) το Μάρτιο ($n=40$, 8 φυτά ανά δοχείο, 5 δοχεία). Τα φυτάρια τόσο από την καλλιέργεια σποροφύτων όσο και από καλλιέργεια ενήλικων φυτών εγκλιματίστηκαν επιτυχώς σε υψηλό ποσοστό 83 - 90%, ενώ οι συστάδες μικροβλαστών 100% (Εικ. II.Π.50α).

Μετά την ολοκλήρωση του εγκλιματισμού (1 μήνα), ακολούθησε μεταφύτευση σε γλάστρα 10 cm σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (2:1, v/v). Τα φυτά λιπαίνονταν με υδατοδιαλυτό πλήρες λίπασμα Nutrileaf 20:20:20 σε συγκέντρωση $2,0 \text{ g L}^{-1}$ μια φορά το μήνα. Η ανάπτυξη των φυτών ανεξάρτητα από την προέλευσή τους ήταν 100% επιτυχής κατά τους τρεις επόμενους μήνες από τ μεταφύτευσή τους σε ατομική γλάστρα (Εικ. II.Π.50β).



Εικόνα II.50. Φυτάρια *C. creticum* ένα μήνα μετά τον εγκλιματισμό (α) και ριζοβολημένες συστάδες μικροβλαστών από ενήλικα φυτά δύο-μηνες μετά τον εγκλιματισμό (β).

II.5.3.4 *Clinopodium nepeta*

II.5.3.4.1 Αρχική εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας

Από ενήλικα αυτοφυή φυτά

Τον Ιούλιο 2012 πραγματοποιήθηκε εγκατάσταση αρχικής καλλιέργειας, με έκφυτα κορυφής που ελήφθησαν από ενήλικα αυτοφυή φυτά *C. nepeta* που φύονταν στον Αρχαιολογικό Χώρο του Αμφιάρειου, στον Ωρωπό Αττικής. Τα έκφυτα τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα MS χωρίς PGRs ή με 1,0 mg L⁻¹ BA ή ZEAT. Το ποσοστό των μολύνσεων ήταν πολύ υψηλό (80 - 90%). Ο περαιτέρω πολλαπλασιασμός κατέστη δυνατός από τρία έκφυτα που δεν μολύνθηκαν και αντέδρασαν (2 έκφυτα από το υπόστρωμα με 1,0 mg L⁻¹ ZEAT και 1 έκφυτο από το υπόστρωμα με 1,0 mg L⁻¹ BA), σχηματίζοντας 1,5 - 3 βλαστούς ανά έκφυτο, μέσου μήκους 1,8 - 3 cm και με μέσο αριθμό κόμβων 1,8 - 5,0 (Πίν. II.54, Εικ. II.51).

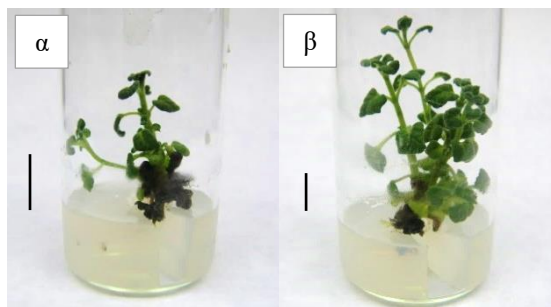
Πίνακας II.54. Επίδραση του είδους της PGR, στην αντίδραση εκφύτων κορυφής του *C. nepeta*, που προήλθαν από ενήλικα αυτοφυή φυτά, κατά την αρχική εγκατάσταση, τον Ιούλιο 2012.

PGRs (mg L ⁻¹)	Ποσοστό Βλαστ/σης ¹ (%)	Μέσος Αριθμός Βλαστών ²	Μέσο Μήκος Βλαστών ² (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ²	Δυν. Πολ/σμού
1,0 ZEAT (n=2)	100	1,5	1,8	1,8	2,2
1,0 BA (n=1)	100	3,0	3,0	5,0	13,5

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών² x Μέσος αριθμός κόμβων²

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς

² Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί



Εικόνα II.51. Αντίδραση εκφύτων κορυφής σε υπόστρωμα $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA (α) και $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ZEAT (β) κατά την αρχική εγκατάσταση. Η κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει μήκος 1 cm.

Από ενήλικα φυτά αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο

Τον Ιούλιο 2014 πραγματοποιήθηκε δεύτερη προσπάθεια εγκατάστασης αρχικής καλλιέργειας, με έκφυτα κορυφής και κόμβου που ελήφθησαν από ενήλικα φυτά *C. nepeta* που αναπτύσσονταν στο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου. Το ποσοστό μολύνσεων μειώθηκε σημαντικά, ενώ το ποσοστό βλαστογένεσης και για τα τρία υποστρώματα ήταν 56 - 67%. Ο μέσος αριθμός βλαστών και το μέσο μήκος βλαστών δεν διάφεραν στα τρία υποστρώματα. Στο υπόστρωμα με $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ZEAT παρατηρήθηκαν υπερενυδατωμένοι βλαστοί σε ποσοστό 20% (Πίν. II.55).

Πίνακας II.55. Επίδραση του είδους των κυτοκινινών, στην αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου του *C. nepeta*, που ελήφθησαν από ενήλικα φυτά αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο κατά την αρχική εγκατάσταση.

PGRs (mg L^{-1})	Ποσοστό Μολύνσεων (%)	Ποσοστό Βλαστ/σης ¹ (%)	Μέσος Αριθμός Βλαστών ²	Μέσο Μήκος Βλαστών ² (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ²	Δυν. Πολ/ σμού
0,0	17	60 a	1,5 a	2,1 a	2,1 a	1,9 a
1,0 ZEAT	25	67 a	2,0 a	1,5 a	1,5 a	2,0 a
1,0 BA	25	56 a	2,0 a	1,4 a	1,5 a	1,7 a
<i>F</i> _{one-way ANOVA}		NS	NS	NS	NS	NS

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών² x Μέσος αριθμός κόμβων², $n=12$

¹ Τα έκφυτα σημείωναν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς

² Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί

Από in vitro ανεπτυγμένα σπορόφυτα

Το Νοέμβριο 2014 πραγματοποιήθηκε εγκατάσταση αρχικής καλλιέργειας, με έκφυτα κορυφής και κόμβου που ελήφθησαν από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα, τα οποία καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS χωρίς PGRs ή με $0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0$ ή $8,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA ή ZEAT ή 2iP ή KIN, με σκοπό να διερευνηθεί η επίδραση του τύπου και της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης. Το ποσοστό των εκφύτων που αντέδρασαν ήταν πολύ υψηλό (83 - 100%) σε όλα τα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν (Πίν. II.56). Η παρουσία υψηλών

συγκεντρώσεων κυτοκινινών στο υπόστρωμα είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση εκφύτων που σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς, ιδιαίτερα ήταν στη ZEAT ή 2iP που στη συγκέντρωση $8,0 \text{ mg L}^{-1}$ έφτασε το 13% ή 10% αντίστοιχα (Πίν. II.Π.56). Η διπαραγοντική ανάλυση ανέδειξε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του είδους και της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης όσον αφορά το ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς, το ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς, τον αριθμό των παραχθέντων κανονικών (φυσιολογικών) βλαστών, το μέσο μήκος των βλαστών, το μέσο αριθμό κόμβων ανά βλαστό και το μέσο αριθμό υπερενυδατωμένων βλαστών, ενώ το δυναμικό πολλαπλασιασμού επηρεάστηκε μόνο από τη συγκέντρωση της κυτοκινίνης (Πίν. II.Π.56). Η παρουσία BA ή ZEAT σε υψηλές συγκεντρώσεις στο υπόστρωμα αύξησε τον αριθμό των παραχθέντων κανονικών βλαστών ανά έκφυτο. Υψηλότερη παραγωγή κανονικών βλαστών (5,3 βλαστοί/έκφυτο) παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα με $8,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA, αντίθετα το υπόστρωμα με $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ 2iP έδωσε τη μικρότερη παραγωγή βλαστών (1,3 βλαστοί/έκφυτο). Μεγαλύτερου μήκους βλαστούς (4,0 - 4,9 cm) και υψηλότερος αριθμός κόμβων (4,3 - 5,0 κόμβοι/βλαστό) παρατηρήθηκε στα υποστρώματα που περιείχαν είτε $0,25 \text{ mg L}^{-1}$ BA ή 2iP ή KIN, είτε $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ KIN (Πίν. II.Π.56, Εικ. II.Π.52). Το δυναμικό πολλαπλασιασμού ήταν μεγαλύτερο (9,2) στο υπόστρωμα που περιείχε $8,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA, λόγω του μεγάλου αριθμού παραγόμενων κανονικών βλαστών (Πίν. II.Π.56). Η παρουσία κυτοκινίνης σε υψηλές συγκεντρώσεις, ανεξάρτητα από το είδος της κυτοκινίνης, είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό υπερενυδατωμένων βλαστών σε υψηλό ποσοστό. Ο υψηλότερος μέσος αριθμός υπερενυδατωμένων βλαστών (1,3 ή 1,7 υπερενυδατωμένοι βλαστοί/έκφυτο) παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα που περιείχε $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA ή $8,0 \text{ mg L}^{-1}$ ZEAT αντίστοιχα (Πίν. II.Π.56, Εικ. II.Π.52). Επιπλέον παρατηρήθηκε ριζοβολία στο υπόστρωμα MS χωρίς PGRs σε ποσοστό 72% και στα υποστρώματα που περιείχαν $0,5 \text{ mg L}^{-1}$ ZEAT ή KIN ή 2iP σε ποσοστό 50% ή 17% ή 25% αντίστοιχα (δεν παρουσιάζονται δεδομένα).

Πίνακας II.II.56. Επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης PGRs, στην αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου του *C. nepeta*, που προήλθαν από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα, κατά την αρχική εγκατάσταση, το Νοέμβριο 2014.

PGRs (mg L ⁻¹)	Ποσοστό (%)		Μέσος Αριθμός Βλαστών ³	Μέσο Μήκος Βλαστών ³ (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ³	Μέσος Αριθμός Υπερενδοατωμέν ων Βλαστών ⁴	Δυν. Πολ/ σμού
	Βλαστ/ ση ¹	Βλαστ/ ση ²					
0,0 ±	92 bc	0 d	1,8 ghi	3,1 b	3,8 bc	0,0 g	6,3 bcd
0,25 ZEAT	100 a	0 d	2,6 efg	1,8 def	2,5 efg	0,0 g	6,5 abc
0,5 ZEAT	92 bc	0 d	2,6 efg	1,8 def	2,3 fgh	0,0 g	5,5 bcd
1,0 ZEAT	83 de	0 d	3,8 cd	1,7 def	2,3 fgh	0,0 g	7,3 abc
2,0 ZEAT	100 a	0 d	1,9 ghi	2,3 cde	3,0 def	0,2 ef	5,7 abc
4,0 ZEAT	81 ef	8 b	2,3 fgh	2,3 cde	3,0 def	0,6 d	5,6 bcd
8,0 ZEAT	79 f	13 a	4,1 bc	1,2 ghi	2,6 efg	1,7 a	8,4 ab
0,25 BA	92 bc	8 b	1,4 hi	4,0 a	4,5 ab	0,1 f	5,8 bcd
0,5 BA	92 bc	8 b	1,8 ghi	1,5 efg	2,8 efg	0,3 e	4,6 def
1,0 BA	90 cd	8 b	5,2 ab	1,1 hij	1,5 h	1,3 b	7,0 abc
2,0 BA	96 ab	4 c	2,3 fgh	1,7 def	2,9 def	0,3 e	6,4 bcd
4,0 BA	87 c	8 b	2,5 efg	1,4 fgh	2,2 fgh	0,5 d	4,8 cde
8,0 BA	83 de	8 b	5,3 a	1,0 ij	2,1 gh	0,8 cd	9,2 a
0,25 KIN	92 bc	0 d	1,6 ghi	4,9 a	5,0 a	0,0 g	7,4 abc
0,5 KIN	85 cde	0 d	1,6 ghi	4,1 a	4,9 a	0,0 g	6,7 abc
1,0 KIN	85 cde	0 d	3,6 cde	1,8 def	2,8 efg	0,0 g	8,6 ab
2,0 KIN	85 cde	4 c	1,4 hi	2,7 bcd	3,1 def	0,1 f	3,7 fg
4,0 KIN	82 ef	4 c	1,6 ghi	2,4 cde	3,4 cde	0,2 ef	4,5 def
8,0 KIN	82 ef	8 b	2,1 gh	1,6 efg	3,0 def	0,3 e	5,2 bcd
0,25 2iP	100 a	0 d	1,7 ghi	4,1 a	4,3 ab	0,0 g	7,3 abc
0,5 2iP	100 a	0 d	2,3 fgh	2,6 bcd	3,0 def	0,0 g	6,9 abc
1,0 2iP	93 bc	0 d	3,2 def	2,4 cde	3,1 def	0,0 g	9,2 a
2,0 2iP	83 de	4 c	1,3 i	2,5 cde	3,0 def	0,1 f	3,2 h
4,0 2iP	79 ef	8 b	1,6 ghi	1,8 def	2,6 efg	0,2 ef	3,3 gh
8,0 2iP	79 ef	10 a	3,0 def	0,8 j	2,2 fgh	0,4 e	5,2 bcd
<i>F</i> _{PGRs}	-	-	-	-	-	-	NS
<i>F</i> _{Συγκέντρωσης}	-	-	-	-	-	-	***
<i>F</i> _{PGRs x Συγκέντρωση}	***	***	***	***	***	***	NS
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***	***	***	***	***	***	***

± Τα δεδομένα δεν συμμετέχουν στην 2-way ANOVA

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικά ή ***: σημαντικά σε $P \leq 0,001$, $n=30$.

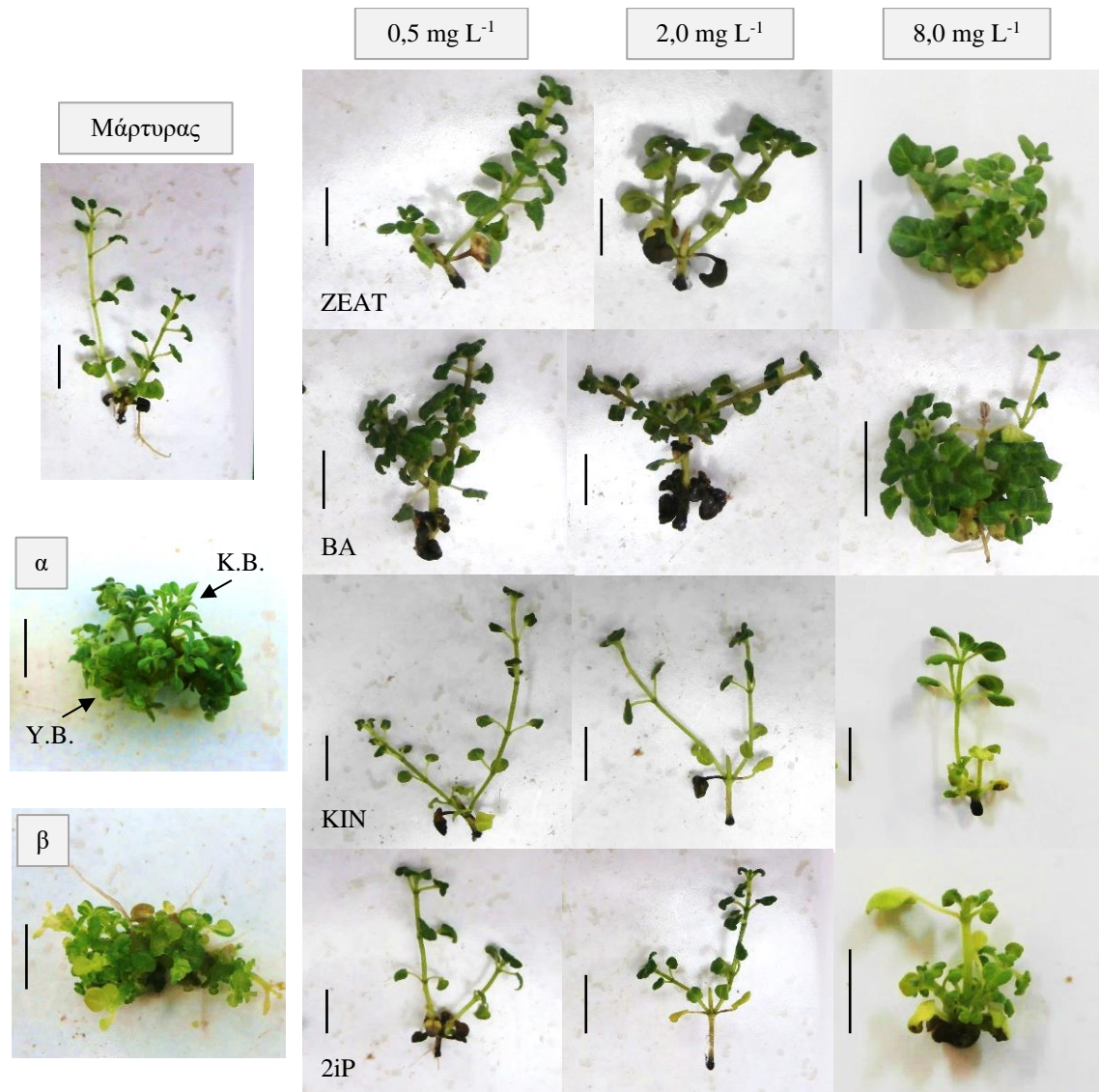
Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών³ x Μέσος αριθμός κόμβων³

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενδοατωμένους μαζί με μη υπερενδοατωμένους βλαστούς

² Τα έκφυτα σχημάτισαν μόνο υπερενδοατωμένους βλαστούς

³ Μη υπερενδοατωμένοι βλαστοί

⁴ Υπερενδοατωμένοι βλαστοί



Εικόνα II.52. Αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου *C. nepeta*, από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα, κατά την αρχική εγκατάσταση, σε στερεό υπόστρωμα MS χωρίς PGRs (Μάρτυρας), ή συμπληρωμένο με 0,5 ή 2,0 ή 8,0 mg L⁻¹ ZEAT ή BA ή KIN ή 2iP. Κανονικοί (Κ.Β.) μαζί με Υπερενυδατωμένους Βλαστούς (Υ.Β.) (α) και Υπερενυδατωμένοι Βλαστοί (β) σε υπόστρωμα MS συμπληρωμένο με 8,0 mg L⁻¹ BA. Η κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει μήκος 1 cm.

II.Π.3.4.2 Πολλαπλασιασμός βλαστών σε *in vitro* καλλιέργεια

Εγκατεστημένη από ενήλικα αυτοφυή φυτά

Μετά την αρχική εγκατάσταση που πραγματοποιήθηκε τον Ιούλιο 2012 από ενήλικα αυτοφυή φυτά, ακολούθησαν δύο υποκαλλιέργειες (1^η, 2^η) σε υπόστρωμα MS με 1,0 ή 2,0 mg L⁻¹ BA αντίστοιχα, για αύξηση του πολλαπλασιαστικού υλικού, με σκοπό τη συνέχιση των πειραμάτων.

Στην πρώτη και στη δεύτερη υποκαλλιέργεια, το ποσοστό των εκφύτων που αντέδρασαν ήταν (75% ή 70% αντίστοιχα) (Πίν. II.Π.57). Στις δύο συγκεντρώσεις BA που δοκιμάστηκαν δεν παρατηρήθηκε διαφορά όσον αφορά τον αριθμό παραχθέντων βλαστών, το μέσο μήκος των βλαστών και το μέσο αριθμό κόμβων (Πίν. II.Π.57, Εικ. II.Π.53).

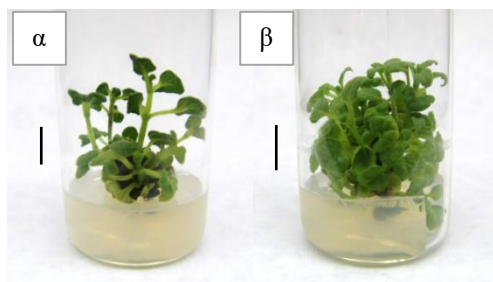
Πίνακας II.Π.57. Αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου, κατά την πρώτη και δεύτερη υποκαλλιέργεια του *C. nepeta*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από ενήλικα αυτοφυή φυτά, τον Ιούλιο 2012.

Υποκαλλιέργεια	BA (mg L ⁻¹)	Ποσοστό Βλαστ/σης ¹ (%)	Μέσος Αριθμός Βλαστών ²	Μέσο Μήκος Βλαστών ² (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ²	Δυν. Πολ/ σμού
1 ^η (n=8)	2,0	75	4,3	2,0	1,8	5,8
2 ^η (n=37)	1,0	70	4,8	2,0	2,2	7,4

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών² x Μέσος αριθμός κόμβων²

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς

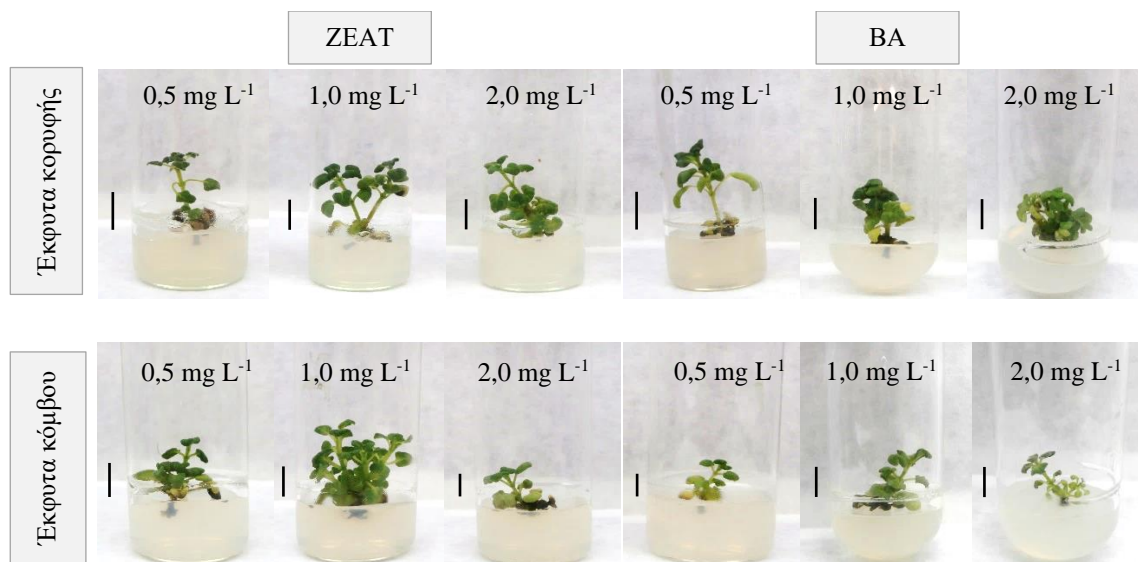
² Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί



Εικόνα II.Π.53. Αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου, κατά την πρώτη (α) και δεύτερη (β) υποκαλλιέργεια του *C. nepeta*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από ενήλικα αυτοφυή φυτά, τον Ιούλιο 2012. Η κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει μήκος 1 cm.

Στην τρίτη υποκαλλιέργεια μελετηθεί η επίδραση του τύπου κυτοκίνινης (BA ή ZEA) και της συγκέντρωσης (0,5, 1,0, 2,0 mg L⁻¹) καθώς και του τύπου του εκφύτου (κορυφής ή κόμβου) στην παραγωγή βλαστών. Το ποσοστό αντιδρώντων εκφύτων κορυφής ήταν υψηλότερο σε σύγκριση με εκείνο των εκφύτων κόμβου και στις δύο κυτοκινίνες που

χρησιμοποιήθηκαν, σε όλες τις συγκεντρώσεις (Πίν. II.Π.58), ενώ δεν παρατηρήθηκαν έκφυτα που να σχημάτιζαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς (Πίν. II.Π.58). Η τριπαραγοντική ανάλυση δεν ανέδειξε αλληλεπίδραση μεταξύ του τύπου των εκφύτων και του είδους και της συγκέντρωσης των κυτοκινινών στον αριθμό των παραχθέντων βλαστών, στο μήκος των βλαστών και στο δυναμικό πολλαπλασιασμού. Ο μέσος αριθμός των βλαστών επηρεάστηκε μόνο από τη συγκέντρωση των κυτοκινινών, το μέσο μήκος βλαστών από το είδος των κυτοκινινών και το δυναμικό πολλαπλασιασμού και από τους τρεις παράγοντες (τύπο εκφύτου, είδος και συγκέντρωση κυτοκινινών) (Πίν. II.Π.58). Τα έκφυτα κορυφής και κόμβου σχημάτιζαν το μεγαλύτερο αριθμό βλαστών (2,4 - 3,1) στο υπόστρωμα που περιείχε ZEAT σε συγκέντρωση 1,0 mg L⁻¹, επιπλέον για τα έκφυτα κορυφής στο υπόστρωμα 2,0 mg L⁻¹ BA (Πίν. II.Π.58, Εικ. II.Π.66). Όσον αφορά τον αριθμό των κόμβων για τα έκφυτα κορυφής, ο υψηλότερος αριθμός κόμβων σχηματίστηκε σε υποστρώματα που περιείχαν 1,0 ή 2,0 mg L⁻¹ ZEAT, ενώ για τα έκφυτα κόμβου σε υπόστρωμα που περιείχαν 1,0 mg L⁻¹ ZEAT (Πίν. II.Π.58, Εικ. II.Π.54). Το δυναμικό πολλαπλασιασμού ήταν μεγαλύτερο στο υπόστρωμα που περιείχε 1,0 mg L⁻¹ ZEAT και για τους δύο τύπους εκφύτων (12,9 για τα έκφυτα κορυφής και 6,5 για τα έκφυτα κόμβου) (Πίν. II.Π.58).



Εικόνα II.Π.54. *In vitro* καλλιέργεια εκφύτων κορυφής ή κόμβου *C. nepeta* σε στερεό υπόστρωμα MS με ZEAT ή BA σε συγκέντρωση 0,5, 1,0 ή 2,0 mg L⁻¹. Η κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει μήκος 1 cm.

Πίνακας II.Π.58. Επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης των PGRs, στην αντίδραση εκφύτων κορυφής ή κόμβου, κατά την τρίτη υποκαλλιέργεια του *C. nepeta*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από ενήλικα αυτοφυή φυτά, τον Ιούλιο 2012.

PGRs (mg L ⁻¹)	Ποσοστό (%)		Μέσος Αριθμός Βλαστών ³	Μέσο Μήκος Βλαστών ³ (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ³	Μέσος Αριθμός Υπερενδατωμένων ων Βλαστών ⁴	Δυν. Πολ/ σμού
	Βλαστ/ ση ¹	Βλαστ/ ση ²					
Έκφυτα κορυφής							
0,5 ZEAT	92 a	0	1,7 c	1,6 abc	3,0 cd	0,0	4,7 cd
1,0 ZEAT	83 b	0	3,7 ab	2,0 ab	4,2 a	0,0	12,9 a
2,0 ZEAT	92 a	0	2,0 c	2,0 ab	4,1 a	0,0	7,5 ab
0,5 BA	50 e	0	1,8 c	1,6 abc	3,3 abcd	0,0	3,0 de
1,0 BA	58 d	0	1,8 c	1,4 bcd	2,8 cd	0,0	2,9 e
2,0 BA	67 c	0	3,1 a	1,0 d	2,5 d	0,0	5,2 c
Έκφυτα κόμβου							
0,5 ZEAT	58 d	0	1,5 c	1,4 cb	3,0 cd	0,0	2,6 de
1,0 ZEAT	51 e	0	3,1 a	2,1 a	4,1 ab	0,0	6,5 bc
2,0 ZEAT	38 g	0	1,8 c	1,4 cd	3,2 abcd	0,0	2,2 e
0,5 BA	46 ef	0	2,0 bc	1,4 bcd	3,1 bcd	0,0	2,9 de
1,0 BA	37 g	0	1,8 bc	1,5 abcd	2,8 abcd	0,0	1,9 e
2,0 BA	41 fg	0	1,7 c	1,1 cb	3,9 abc	0,0	2,7 de
<i>F</i> _{Εκφύτου}	-		NS	NS	-		-
<i>F</i> _{PGRs}	-		-	**	-		-
<i>F</i> _{Συγκέντρωσης}	-		-	NS	-		-
<i>F</i> _{PGRs x Συγκέντρωση}	-		**	NS	-		***
<i>F</i> _{Εκφύτου x PGRs}	-		NS	NS	-		NS
<i>F</i> _{Εκφύτου x Συγκέντρωση}	-		NS	NS	-		**
<i>F</i> _{Εκφύτου x PGRs x Συγκέντρωση}	***		NS	NS	*		NS
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***		***	***	**		***

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικά ή *, **, ***: σημαντικά σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$, $P \leq 0,001$, αντίστοιχα, $n=24$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών³ x Μέσος αριθμός κόμβων³

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενδατωμένους μαζί με μη υπερενδατωμένους βλαστούς

² Τα έκφυτα σχημάτισαν μόνο υπερενδατωμένους βλαστούς

³ Μη υπερενδατωμένοι βλαστοί

⁴ Υπερενδατωμένοι βλαστοί

Στην τέταρτη και πέμπτη υποκαλλιέργεια, έκφυτα κορυφής ή κόμβου τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα χωρίς ή με 1,0 mg L⁻¹ BA ή ZEAT, με στόχο να επιβεβαιωθούν τα αποτελέσματα της τρίτης υποκαλλιέργειας.

Στην τέταρτη και πέμπτη υποκαλλιέργεια τα έκφυτα κορυφής και κόμβου εγκαταστάθηκαν σε υπόστρωμα είτε χωρίς PGRs είτε σε BA ή ZEAT, σε συγκέντρωση 1,0 mg L⁻¹. Το ποσοστό των εκφύτων που αντέδρασαν ήταν υψηλότερο στα έκφυτα κορυφής

(79 - 100%) σε σύγκριση από εκείνο των εκφύτων κόμβου (42 - 54%) και στα τρία υποστρώματα που δοκιμάστηκαν (Πίν. II.Π.59, II.Π.60). Η διπαραγοντική ανάλυση δεν έδειξε αλληλεπίδραση μεταξύ του τύπου των εκφύτων και του είδους των κυτοκινινών στον αριθμό των παραχθέντων κανονικών βλαστών, στο μήκος των βλαστών αυτών, στον αριθμό των κόμβων και στο δυναμικό πολλαπλασιασμού (Πίν. II.Π.59, II.Π.60). Ο αριθμός των παραχθέντων κανονικών βλαστών και το μήκος αυτών δεν διέφερε σημαντικά στα διάφορα υποστρώματα και στους δύο τύπους εκφύτου (Πίν. II.Π.59, II.Π.60, Εικ. II.Π.55). Το δυναμικό πολλαπλασιασμού στα έκφυτα κορυφής ήταν υψηλότερο (4,5 - 7,4) σε σύγκριση από εκείνο των εκφύτων κόμβου (2,1 - 3,0), λόγω υψηλότερου ποσοστού των εκφύτων που αντέδρασαν (Πίν. II.Π.59, II.Π.60). Επιπλέον στο υπόστρωμα MS χωρίς PGRs παρατηρήθηκε ριζοβολία σε ποσοστό 40% για τα έκφυτα κορυφής και 20% για τα έκφυτα κόμβου (δεν παρουσιάζονται δεδομένα).

Πίνακας II.Π.59. Επίδραση του είδους των PGRs, στην αντίδραση εκφύτων κορυφής ή κόμβου, κατά την τέταρτη υποκαλλιέργεια του *C. nepeta*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από ενήλικα αυτοφυή φυτά, τον Ιούλιο 2012.

PGRs (mg L ⁻¹)	Ποσοστό (%)		Μέσος Αριθμός Βλαστών ³	Μέσο Μήκος Βλαστών ³ (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ³	Μέσος Αριθμός Υπερενυδατωμ ένων Βλαστών ⁴	Δυν. Πολ/ σμού
	Βλαστ/ ση ¹	Βλαστ/ ση ²					
Έκφυτα κορυφής							
0,0	100 a	0 b	1,5 a	1,6 a	3,0 b	0,0 c	4,5 b
1,0 ZEAT	92 b	0 b	2,0 a	2,1 a	4,0 a	0,4 a	7,4 a
1,0 BA	83 c	0 b	2,6 a	1,7 a	3,3 ab	0,1 b	7,1 a
Έκφυτα κόμβου							
0,0	42 e	0 b	2,3 a	1,7 a	3,1 ab	0,0 c	3,0 bc
1,0 ZEAT	47 de	0 b	2,3 a	1,3 a	2,7 ab	0,0 c	2,9 bc
1,0 BA	54 d	4 a	2,1 a	1,1 a	2,2 b	0,1 b	2,5 c
<i>F</i> _{Εκφύτου}	-	-	NS	NS	NS	-	***
<i>F</i> _{PGRs}	-	-	NS	NS	NS	-	NS
<i>F</i> _{Εκφύτου x PGRs}	***	***	NS	NS	NS	***	NS
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***	***	NS	NS	*	***	***

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικά ή *, ***, σημαντικά σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,001$, αντίστοιχα, $n=24$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών³ x Μέσος αριθμός κόμβων³

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς

² Τα έκφυτα σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς

³ Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί

⁴ Υπερενυδατωμένοι βλαστοί

Πίνακας II.II.60. Επίδραση του είδους των PGRs, στην αντίδραση εκφύτων κορυφής ή κόμβου, κατά την τέταρτη υποκαλλιέργεια του *C. nepeta*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από ενήλικα αυτοφυή φυτά, τον Ιούλιο 2012.

PGRs (mg L ⁻¹)	Ποσοστό (%)		Μέσος Αριθμός Βλαστών ³	Μέσο Μήκος Βλαστών ³ (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ³	Μέσος Αριθμός Υπερενυδατωμ ένων Βλαστών ⁴	Δυν. Πολ/ σμού
	Βλαστ/ ση ¹	Βλαστ/ ση ²					
Έκφυτα κορυφής							
0,0	100 a	0 b	1,7 a	1,8 a	3,0 b	0,0 d	5,1 b
1,0 ZEAT	90 b	0 b	1,9 a	1,8 a	3,5 a	0,5 c	6,0 a
1,0 BA	79 c	0 b	2,2 a	1,9 a	3,4 ab	0,4 c	5,9 a
Έκφυτα κόμβου							
0,0	45 de	0 b	2,0 a	1,6 a	3,0 b	0,0 d	2,7 c
1,0 ZEAT	45 de	0 b	1,8 a	1,5 a	2,7 c	0,6 b	2,2 d
1,0 BA	42 e	6 a	2,0 a	1,4 a	2,5 c	0,8 a	2,1 d
<i>F</i> _{Εκφύτου}	-	-	NS	NS	NS	-	***
<i>F</i> _{PGRs}	-	-	NS	NS	NS	-	NS
<i>F</i> _{Εκφύτου x PGRs}	***	***	NS	NS	NS	***	NS
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***	***	NS	NS	*	***	***

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικά ή *, ***, σημαντικά σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,001$, αντίστοιχα, $n=24$.

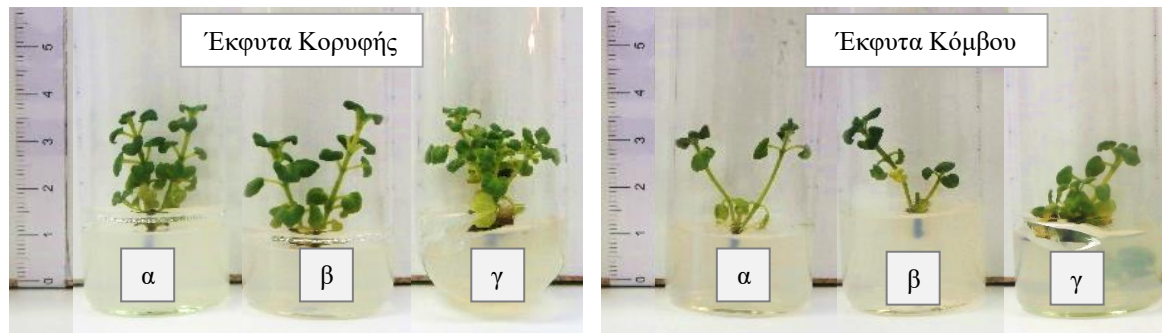
Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών³ x Μέσος αριθμός κόμβων³

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς

² Τα έκφυτα σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς

³ Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί

⁴ Υπερενυδατωμένοι βλαστοί



Εικόνα II.II.55. *In vitro* καλλιέργεια εκφύτων κορυφής ή κόμβου *C. nepeta* σε στερεό υπόστρωμα MS χωρίς PGRs (α) ή με 1,0 mg L⁻¹ ZEAT (β) ή BA (γ). Η κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει μήκος 1 cm.

Λόγω της παρόμοιας αντίδρασης των δύο τύπων εκφύτων (κορυφής και κόμβου) στα προηγούμενα πειράματα, στις επόμενες υποκαλλιέργειες, τα αποτελέσματα των εκφύτων κορυφής και κόμβου ενσωματώθηκαν μαζί σε κάθε μεταχείριση.

Στην 6^η και 7^η υποκαλλιέργεια εξετάστηκε η επίδραση του τύπου (BA, ZEA, KIN 2iP) και συγκέντρωσης των κυτοκινινών (0,25, 0,5, 1,0, 2,0, 4,0 ή 8,0 mg·L⁻¹). Τα έκφυτα

κορυφής και κόμβου που χρησιμοποιήθηκαν στην 6^η υποκαλλιέργεια προήλθαν από υπόστρωμα MS χωρίς PGR, ενώ στην 7^η από τα αντίστοιχα υποστρώματα της 6^{ης} υποκαλλιέργειας.

Το ποσοστό των εκφύτων που αντέδρασαν κυμάνθηκε 57 έως 97%, με το χαμηλότερο ποσοστό να παρατηρείται στο υπόστρωμα 8,0 mg L⁻¹ BA και για τις δύο υποκαλλιέργειες, ενώ το υψηλότερο για την 6^η υποκαλλιέργεια στο υπόστρωμα 0,25 mg L⁻¹ 2iP και για την 7^η υποκαλλιέργεια στο υπόστρωμα με 0,25 mg L⁻¹ KIN (Πίν. II.Π.61, II.Π.62). Η αύξηση της συγκέντρωσης των κυτοκινινών οδήγησε σε μείωση του ποσοστού των εκφύτων που αντέδρασαν η οποία έφτασε το 13 - 30% στη συγκέντρωση 8,0 mg L⁻¹ (Πίν. II.Π.61, II.Π.62). Η αύξηση της συγκέντρωσης των κυτοκινινών, ανεξάρτητα από το είδος της κυτοκινίνης, οδήγησε σε μείωση του ποσοστού των εκφύτων που σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς με ταυτόχρονη αύξηση του ποσοστού των εκφύτων που σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς (Πίν. II.Π.61, II.Π.62). Η διπαραγοντική ανάλυση και στις υποκαλλιέργειες ανέδειξε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του είδους και της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης σε όλους τους παράγοντες που μετρήθηκαν, εκτός από το μέσο αριθμό κόμβων, ο οποίος επηρεάστηκε τόσο από είδος όσο και από τη συγκέντρωση της κυτοκινίνης που δοκιμάστηκε (Πίν. II.Π.61, II.Π.62). Τόσο στην 6^η υποκαλλιέργεια όσο και στην 7^η η παρουσία κυτοκινινών σε υψηλές συγκεντρώσεις στο υπόστρωμα αύξησε τον αριθμό των παραχθέντων κανονικών βλαστών ανά έκφυτο, με την υψηλότερη παραγωγή (4,0 - 4,4 βλαστοί/έκφυτο) να παρατηρείται στο υπόστρωμα με 8,0 mg L⁻¹ BA ή ZEAT ή στο υπόστρωμα με 4,0 mg L⁻¹ ZEAT (Πίν. II.Π.61, II.Π.62, Εικ. II.Π.56). Στην 6^η υποκαλλιέργεια μεγαλύτερου μήκους βλαστούς (4,8 cm) και περισσότερους κόμβους (4,5 κόμβοι/βλαστό) έδωσε το υπόστρωμα με 0,25 mg L⁻¹ ZEAT, ενώ στην 7^η υποκαλλιέργεια το υπόστρωμα με 2,0 mg L⁻¹ ZEAT (Πίν. II.Π.61, II.Π.62, Εικ. II.Π.56). Σε όλες τις κυτοκινίνες (BA, ZEA, KIN 2iP) στις υψηλότερες συγκεντρώσεις (2,0 ή 4,0 η 8,0 mg L⁻¹) ο αριθμός των κόμβων ανά βλαστό ήταν μεγαλύτερος σε σύγκριση με τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις (0,25 ή 0,5 η 1,0 mg L⁻¹) (Πίν. II.Π.61, II.Π.62). Το δυναμικό πολλαπλασιασμού ήταν μεγαλύτερο στο υπόστρωμα που περιείχε 0,5 mg L⁻¹ BA στην 6^η υποκαλλιέργεια, ενώ στην 7^η στο υπόστρωμα που περιείχε 4,0 mg L⁻¹ ZEAT, λόγω του υψηλού αριθμού παραχθέντων κανονικών βλαστών και αριθμού κόμβων (Πίν. II.Π.61, II.Π.62). Η παρουσία κυτοκινίνης και ιδιαίτερα της ZEAT και του BA σε υψηλές συγκεντρώσεις, είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό υπερενυδατωμένων βλαστών σε υψηλό ποσοστό, το οποίο έφτασε και μέχρι το 43 - 52% στα υποστρώματα με 8,0 mg L⁻¹ BA. Με βάση τα παραπάνω υψηλότερος αριθμός υπερενυδατωμένων βλαστών παρατηρήθηκε στο

υπόστρωμα που περιείχε 8,0 mg L⁻¹ ZEAT ή BA και στις δύο υποκαλλιέργειες (3,0 - 5,5 ή 3,2 - 5,8 υπερενυδατωμένοι βλαστοί/ έκφυτο, αντίστοιχα) (Πίν. II.Π.61, II.Π.62). Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η αύξηση της συγκέντρωσης και των τεσσάρων κυτοκινινών που δοκιμάστηκαν έχει σαν αποτέλεσμα την αύξηση τόσο των υπερενυδατωμένων όσο και των μη υπερενυδατωμένων βλαστών. Τέλος στο υπόστρωμα MS χωρίς PGRs τόσο στην 6^η όσο και στην 7^η υποκαλλιέργεια παρατηρήθηκε ριζοβολία σε ποσοστό 35 - 42%.

Πίνακας II.Π.61. Επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης των PGRs, και της συγκέντρωσης κυτοκινινών, στην αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου, κατά την 6^η υποκαλλιέργεια του *C. pereta*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από ενήλικα αυτοφυή φυτά, τον Ιούλιο 2012.

PGRs (mg L ⁻¹)	Ποσοστό (%)		Μέσος Αριθμός Βλαστών ³	Μέσο Μήκος Βλαστών ³ (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ³	Μέσος Αριθμός Υπερενυδατωμ ένων Βλαστών ⁴	Δυν. Πολ/ σμού
	Βλαστ/ ση ¹	Βλαστ/ ση ²					
0,0 [±]	86 c	0 e	1,4 g	2,6 c	3,5 b	0,0 g	4,2 bcd
0,25 ZEAT	83 de	0 e	1,8 ef	4,8 a	4,5 a	0,0 g	6,7 ab
0,5 ZEAT	77 ef	0 e	1,5 g	3,4 b	3,7 ab	0,0 g	4,3 bcd
1,0 ZEAT	70 f	0 e	1,4 g	2,4 cd	2,6 def	0,0 g	2,6 de
2,0 ZEAT	60 gh	10 b	2,4 ef	1,7 def	3,2 bc	1,5 d	4,6 bcd
4,0 ZEAT	60 gh	10 b	4,0 ab	1,4 fgh	2,8 cde	2,6 bc	6,7 ab
8,0 ZEAT	57 gh	13 b	4,4 a	0,9 i	2,3 efg	3,0 a	5,8 bc
0,25 BA	87 c	0 e	1,5 g	2,2 cde	3,6 b	0,0 g	4,7 bcd
0,5 BA	80 ef	0 e	3,3 cd	1,9 def	2,9 cde	0,0 g	7,7 a
1,0 BA	77 ef	0 e	3,3 bcd	1,9 def	2,5 def	0,0 g	6,4 ab
2,0 BA	60gh	14 b	3,0 de	1,4 fgh	2,5 def	2,1 c	4,5 bcd
4,0 BA	56 h	17 ab	3,1 cde	1,0 hi	2,0 gh	2,4 bc	3,5 de
8,0 BA	38 i	19 a	4,1 abc	0,8 i	2,1 fgh	3,2 a	3,3 cde
0,25 KIN	90 b	0 e	2,0 efg	1,4 fgh	2,0 gh	0,0 g	3,6 cde
0,5 KIN	75 ef	0 e	1,1 g	1,9 def	2,7 def	0,0 g	2,2 e
1,0 KIN	77 ef	0 e	1,1 g	2,0 de	3,0 bcd	0,0 g	2,5 de
2,0 KIN	83 de	0 e	2,4 ef	1,4 fgh	2,1 fgh	0,2 f	4,2 bcd
4,0 KIN	75 ef	4 d	2,9 de	1,1 hi	1,8 h	0,8 e	3,9 cde
8,0 KIN	77 ef	8 c	3,5 bcd	1,2 gh	2,1 fgh	1,0 e	5,7 bc
0,25 2iP	97 a	0 e	1,3 g	2,1 de	3,0 bcd	0,0 g	3,8 cde
0,5 2iP	80 ef	0 e	1,8 ef	2,1 de	2,9 cde	0,0 g	4,2 bcd
1,0 2iP	80 ef	0 e	1,3 g	1,9 def	2,6 def	0,0 g	2,7 de
2,0 2iP	83 de	0 e	2,5 e	1,4 fgh	3,3 bc	0,1 f	6,9 ab
4,0 2iP	83 de	0 e	3,0 de	1,2 gh	2,4 defg	0,2 f	6,0 abc
8,0 2iP	77 ef	7 c	3,5 bcd	1,2 gh	2,0 gh	0,8 e	5,4 bc
<i>F</i> _{PGRs}	-	-	-	-	***	-	-
<i>F</i> _{Συγκέντρωσης}	-	-	-	-	***	-	-
<i>F</i> _{PGRs x Συγκέντρωση}	***	***	***	***	NS	***	***
<i>F</i> _{One-way ANOVA}	***	***	***	***	***	***	***

‡ Τα δεδομένα δεν συμμετέχουν στην 2-way ANOVA

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικά ή **: σημαντικά σε $P \leq 0,001$, $n=30$.

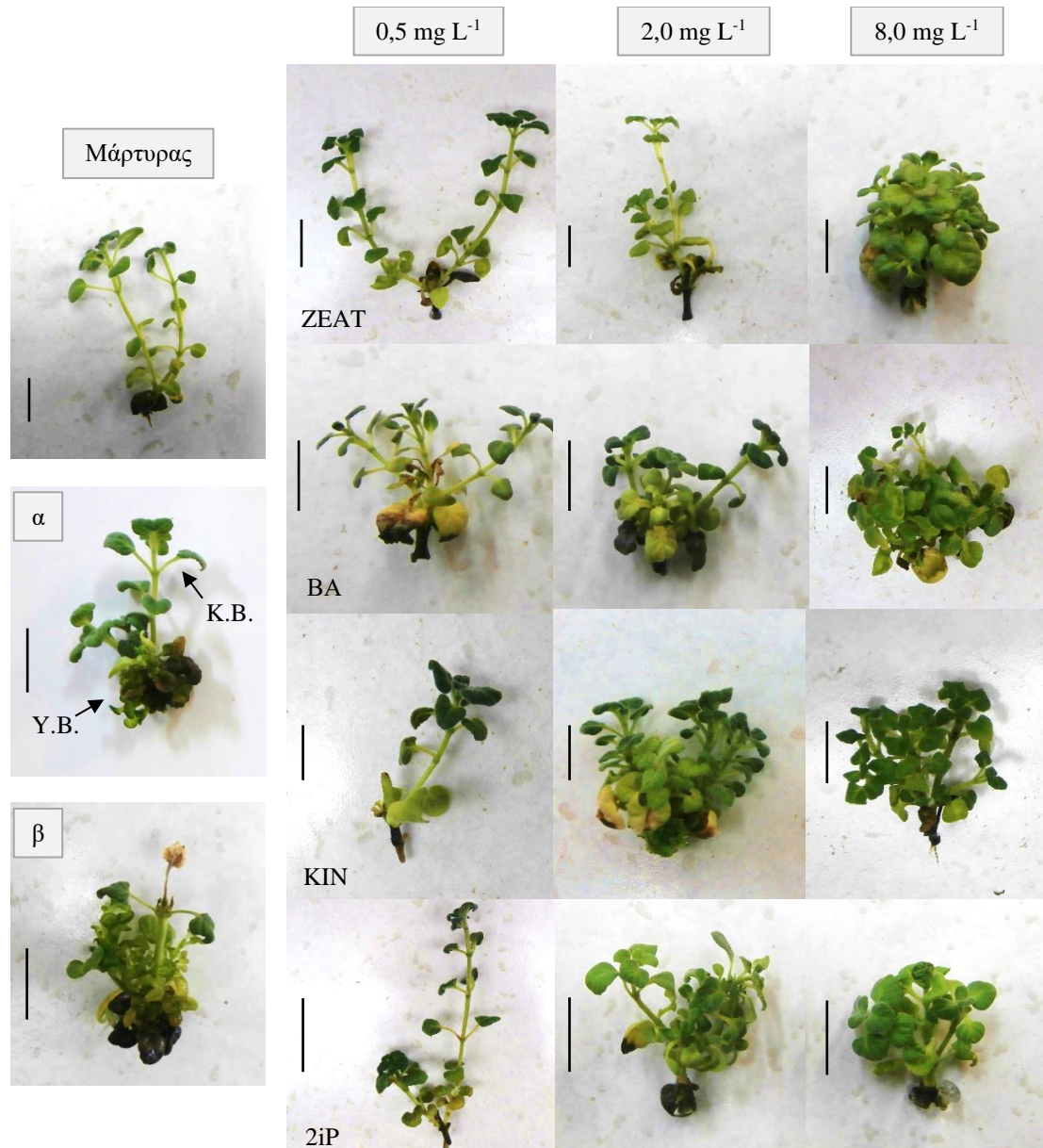
Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹(%) x Μέσος αριθμός βλαστών³ x Μέσος αριθμός κόμβων³

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς

² Τα έκφυτα σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς

³ Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί

⁴ Υπερενυδατωμένοι βλαστοί



Εικόνα II.56. Αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου *C. nepeta*, από ενήλικα φυτά, κατά την έκτη (6^η) εγκατάσταση, σε στερεό υπόστρωμα MS χωρίς PGRs (Μάρτυρας), ή συμπληρωμένο με 0,5 ή 2,0 ή 8,0 mg L⁻¹ ZEAT ή BA ή KIN ή 2iP. Κανονικοί (K.B.) μαζί με Υπερενυδατωμένους Βλαστούς (Y.B.) σε υπόστρωμα MS με 8,0 mg L⁻¹ BA (α) και Υπερενυδατωμένοι Βλαστοί σε υπόστρωμα MS με 2,0 mg L⁻¹ BA (β). Η κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει μήκος 1 cm.

Πίνακας II.Π.62. Επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης των PGRs, στην αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου, κατά την 7^η υποκαλλιέργεια του *C. nepeta*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από ενήλικα αυτοφυή φυτά, τον Ιούλιο 2012.

PGRs (mg L ⁻¹)	Ποσοστό (%)		Μέσος Αριθμός Βλαστών ³	Μέσο Μήκος Βλαστών ³ (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ³	Μέσος Αριθμός Υπερενδοατομ ένων Βλαστών ⁴	Δυν. Πολ/ σμού
	Βλαστ/ ση ¹	Βλαστ/ ση ²					
0,0 [±]	80 b	0 f	1,2ij	0,8 ghi	1,3 fg	0,0 k	1,3 hij
0,25 ZEAT	75 bcd	0 f	1,9 gh	0,8 ghi	1,2 fg	0,0 k	1,7 gh
0,5 ZEAT	70 def	0 f	1,6 ghi	0,8 ghi	1,3 fg	0,0k	1,5 hi
1,0 ZEAT	70 def	0 f	1,8 gh	0,8 ghi	1,1 gh	0,0 k	1,4 hi
2,0 ZEAT	60 fgh	10 d	2,2 fg	1,9 a	2,6 a	1,7 fg	3,4 e
4,0 ZEAT	57 ghi	10 d	4,1 ab	1,3 cd	2,5 ab	5,0 c	5,8 a
8,0 ZEAT	53 hij	13 cd	4,3 a	1,0 efg	2,4 abc	5,5 b	5,5 ab
0,25 BA	80 b	0 f	1,1 j	1,4 bc	1,7 de	0,0 k	1,5 hij
0,5 BA	75 bcd	0 f	1,6 ghi	0,7 hi	1,1 gh	0,0 k	1,3 hij
1,0 BA	75 dcd	0 f	1,7 ghi	1,1 cde	1,5 ef	0,0 k	1,9 fg
2,0 BA	63 efg	12 cd	3,0 de	1,1 cde	2,4 abc	3,2 e	4,5 cd
4,0 BA	43 jk	18 b	3,4 cd	1,1 cde	2,3 abc	4,8 d	3,4 e
8,0 BA	37 k	23 a	4,4 a	1,0 efg	2,2 bcd	5,8 a	3,6 e
0,25 KIN	85 a	0 f	1,7 ghi	0,8 ghi	1,0 gh	0,0 k	1,5 hi
0,5 KIN	75 bcd	0 f	1,2 ij	0,6 i	1,0 h	0,0 k	0,9 j
1,0 KIN	75 bcd	0 f	1,4 hij	0,6 i	1,0 h	0,0 k	1,1 ij
2,0 KIN	77 bc	0 f	2,7 ef	1,5 b	2,6 a	0,7 i	5,4 ab
4,0 KIN	72 cde	8 d	2,8 de	1,1 cde	2,1 cd	1,2 g	4,2 d
8,0 KIN	71 def	10 d	3,6 bc	0,9 fgh	1,9 cd	1,5 g	4,9 bc
0,25 2iP	80 b	0 f	1,1 j	1,1 cde	1,2 gh	0,0 k	1,1 ij
0,5 2iP	73 cde	0 f	1,6 ghi	0,7 hi	1,0 h	0,0 k	1,2 ij
1,0 2iP	75 bcd	0 f	1,6 ghi	0,7 hi	1,0 h	0,0 k	1,2 hij
2,0 2iP	77 bc	0 f	2,6 ef	1,2 cde	2,3 bc	0,4 j	4,6 cd
4,0 2iP	73 cde	4 e	2,8 de	1,0 efg	2,4 abc	0,7 i	4,9 bc
8,0 2iP	71 def	8 d	3,0 de	1,0 efg	2,2 bc	0,9 hi	4,7 cd
<i>F</i> _{PGRs}	-	-	-	-	*	-	-
<i>F</i> _{Συγκέντρωσης}	-	-	-	-	***	-	-
<i>F</i> _{PGRs x Συγκέντρωση}	***	***	***	***	NS	***	***
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***	***	***	***	***	***	***

[±] Τα δεδομένα δεν συμμετέχουν στην 2-way ANOVA

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικά ή *, ***: σημαντικά σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,001$, αντίστοιχα, $n=20$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών³ x Μέσος αριθμός κόμβων³

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενδοατωμένους μαζί με μη υπερενδοατωμένους βλαστούς

² Τα έκφυτα σχημάτισαν μόνο υπερενδοατωμένους βλαστούς

³ Μη υπερενδοατωμένοι βλαστοί

⁴ Υπερενδοατωμένοι βλαστοί

Στις δύο προηγούμενες υποκαλλιέργειες (6^η και 7^η) στις υψηλές συγκεντρώσεις κυτοκινινών προέκυψε το πρόβλημα της υπερενυδάτωσης με αποτέλεσμα την απώλεια μεγάλου μέρους του πολλαπλασιαστικού υλικού, για αυτό το λόγο στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν δύο υποκαλλιέργειες (8^η και 9^η) σε υπόστρωμα MS χωρίς PGRs για αύξηση του πολλαπλασιαστικού υλικού, με σκοπό τη συνέχιση των πειραμάτων (δεν ελήφθησαν μετρήσεις).

Στο επόμενο πείραμα (10^η υποκαλλιέργεια) θέλοντας να μειώσουμε ή και να εξαλείψουμε το ποσοστό υπερενυδάτωσης εξετάσαμε την πιθανή λύση της χρήσης NAA σε συνδυασμό με BA. Το ποσοστό των εκφύτων που αντέδρασαν ήταν πολύ υψηλό (85 - 95%) σε όλα τα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν, ενώ δεν παρατηρήθηκαν έκφυτα που σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς (Πίν. II.Π.63). Η διπαραγοντική ανάλυση δεν έδειξε αλληλεπίδραση μεταξύ της συγκέντρωσης του BA και της συγκέντρωσης του NAA στο μήκος των παραχθέντων κανονικών βλαστών, το οποίο επηρεάστηκε μόνο από τη συγκέντρωση του BA (Πίν. II.Π.63). Η υψηλότερη παραγωγή βλαστών ανά έκφυτο (7,5 βλαστοί/έκφυτο) παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα περιείχε 8,0 mg L⁻¹ BA σε συνδυασμό με 0,1 mg L⁻¹ NAA, ενώ το υπόστρωμα χωρίς PGRs έδωσε μεγαλύτερου μήκους βλαστούς (2,6 cm) και περισσότερους κόμβους (3,2 κόμβου/βλαστό) (Πίν. II.Π.63). Το υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού (14,5) παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα που περιείχε 8,0 mg L⁻¹ BA σε συνδυασμό με 0,1 mg L⁻¹ NAA, λόγω περισσότερων κανονικών παραχθέντων βλαστών (Πίν. II.Π.63). Η προσθήκη 0,1 ή 0,5 mg L⁻¹ NAA στα υποστρώματα με 0,5 ή 1,0 ή 2,0 ή 4,0 mg L⁻¹ BA οδήγησε στην εξάλειψη των υπερενυδατωμένων βλαστών (Πίν. II.Π.63), ενώ στα υποστρώματα με 8,0 mg L⁻¹ η προσθήκη NAA μείωσε κατά πολύ το μέσο αριθμό υπερενυδατωμένων σε σύγκριση με τα υποστρώματα που περιείχαν μόνο BA χωρίς NAA (Πίν. II.Π.61, II.Π.62, II.Π.63). Επιπλέον στο υπόστρωμα MS χωρίς PGRs παρατηρήθηκε ριζοβολία σε ποσοστό (81%), ενώ το ποσοστό καλογένεσης ήταν 67 - 81% στα υποστρώματα που περιείχαν NAA (δεν παρουσιάζονται δεδομένα).

Πίνακας Π.Π.63. Επίδραση της συγκέντρωσης BA και NAA, στην αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου του *C. nepeta*, κατά τη 10^η υποκαλλιέργεια, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από ενήλικα αυτοφυή φυτά, τον Ιούλιο 2012.

BA / NAA (mg L ⁻¹) / (mg L ⁻¹)	Ποσοστό (%)		Μέσος	Μέσο Μήκος	Μέσος	Μέσος Αριθμός	Δυν. Πολ/ σμού
	Βλαστ/ ση ¹	Βλαστ/ ση ²	Αριθμός Βλαστών ³	Βλαστών ³ (cm)	Αριθμός Κόμβων ³	Υπερενυδατωμέν ων Βλαστών	
0,0 / 0,0 ±	98 a	0	2,5 f	2,6 a	3,2 a	0,0 b	7,9 cd
0,5 / 0,1	98 a	0	1,7 g	1,6 b	2,2 bc	0,0 b	3,7 f
0,5 / 0,5	92 bc	0	2,0 fg	1,5 bc	2,1 cd	0,0 b	3,8 f
1,0 / 0,1	95 ab	0	3,0 e	1,7 b	2,2 bc	0,0 b	6,2 e
1,0 / 0,5	88 cd	0	2,4 f	1,7 b	2,2 cd	0,0 b	4,7 f
2,0 / 0,1	88 cd	0	4,0 cd	1,3 cd	2,0 d	0,0 b	7,0 de
2,0 / 0,5	95 ab	0	4,5 b	1,2 d	2,0 cd	0,0 b	8,5 c
4,0 / 0,1	85 d	0	4,1 bc	1,4 cd	2,1 cd	0,0 b	7,6 cd
4,0 / 0,5	85 cd	0	3,5 de	1,2 d	2,0 d	0,0 b	6,0 e
8,0 / 0,1	88 cd	0	7,5 a	1,2 d	2,2 cd	0,5 a	14,5 a
8,0 / 0,5	92 bc	0	4,6 b	1,4 cd	2,4 b	0,6 a	10,1 b
<i>F</i> _{BA}	-	-	-	***	-	-	-
<i>F</i> _{NAA}	-	-	-	NS	-	-	-
<i>F</i> _{BA x NAA}	***	-	***	NS	*	**	***
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***	-	***	***	***	*	***

± Τα δεδομένα δεν συμμετέχουν στην 2-way ANOVA

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικά ή *, ***: σημαντικά σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,001$, αντίστοιχα, $n=48$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹(%) x Μέσος αριθμός βλαστών³ x Μέσος αριθμός κόμβων³

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς

² Τα έκφυτα σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς

³ Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί

⁴ Υπερενυδατωμένοι βλαστοί

Επιπλέον για την εξάλειψη της υπερενυδάτωσης δοκιμάστηκε και η αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ από 8 g L⁻¹ σε 12 g L⁻¹ (11^η υποκαλλιέργεια). Έκφυτα κορυφής και κόμβου καλλιεργήθηκαν είτε σε υπόστρωμα MS με άγαρ 8 g L⁻¹ χωρίς PGRs ή εμπλουτισμένο με 8,0 mg L⁻¹ BA και 0,1 mg L⁻¹ NAA είτε σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με 8,0 mg L⁻¹ BA και άγαρ σε συγκέντρωση 8 ή 12 g L⁻¹. Το υψηλότερο ποσοστό εκφύτων που αντέδρασαν ήταν 100% και παρατηρήθηκε είτε στο υπόστρωμα MS με άγαρ 8 g L⁻¹ χωρίς PGRs είτε στο υπόστρωμα με 8,0 mg L⁻¹ BA στερεοποιημένο με 12 g L⁻¹ άγαρ (Πίν. Π.Π.64). Η υψηλότερη παραγωγή κανονικών βλαστών (9,9 βλαστοί/έκφυτο) παρατηρήθηκε, στο υπόστρωμα περιείχε 8,0 mg L⁻¹ BA και 12 g L⁻¹ άγαρ, ενώ το υπόστρωμα MS χωρίς PGRs έδωσε μεγαλύτερου μήκους βλαστούς (2,5 cm) οι οποίοι είχαν

και περισσότερους κόμβους (3,1 κόμβοι/βλαστό) (Πίν. II.Π.64, Εικ. II.Π57). Το υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού (7,7) παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα που περιείχε 8,0 mg L⁻¹ BA και 12 g L⁻¹ άγαρ, λόγω περισσότερων παραχθέντων κανονικών βλαστών ανά έκφυτο (Πίν. II.Π.64). Ο υψηλότερος αριθμός υπερενυδατωμένων βλαστών (3,5 υπερενυδατωμένοι βλαστοί/έκφυτο) παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα που περιείχε 8,0 mg L⁻¹ BA στερεοποιημένο με 8 g L⁻¹ άγαρ (Πίν. II.Π.64). Η αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ από 8 g L⁻¹ σε 12 g L⁻¹, μείωση το μέσο αριθμό υπερενυδατωμένων βλαστών, το ίδιο αποτέλεσμα παρατηρήθηκε και όταν στο υπόστρωμα 8,0 mg L⁻¹ BA και 8 g L⁻¹ άγαρ προστέθηκε 0,1 mg L⁻¹ NAA (Πίν. II.Π.64). Επιπλέον στο υπόστρωμα MS χωρίς PGRs παρατηρήθηκε ριζοβολία σε υψηλό ποσοστό 97,5%, ενώ στο υπόστρωμα με NAA παρατηρήθηκε καλογένεση σε ποσοστό (98%) (δεν παρουσιάζονται δεδομένα).

Πίνακας II.Π.64. Επίδραση της συγκέντρωσης άγαρ (8 ή 12 g L⁻¹), με την παρουσία ή μη NAA, στην αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου, κατά την 11^η υποκαλλιέργεια του *C. pereta*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από ενήλικα αυτοφυή φυτά, τον Ιούλιο 2012.

BA / NAA / Άγαρ (mg L ⁻¹) / (mg L ⁻¹) / (g L ⁻¹)	Ποσοστό (%)		Μέσος Αριθμός Βλαστών ³	Μέσο Μήκος Βλαστών ³ (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ³	Μέσος Αριθμός Υπερενυδατωμ ένων Βλαστών	Δυν. Πολ/ σμού
	Βλαστ/ ση ¹	Βλαστ/ ση ²					
0,0 / 0,0 / 8	100 a	0 b	3,0 d	2,5 a	3,1 a	0,0 c	5,3 b
8,0 / 0,0 / 8	68 c	13 a	5,0 c	0,8 b	1,4 b	3,5 a	2,7 c
8,0 / 0,0 / 12	100 a	0 b	9,9 a	0,8 b	1,3 b	0,8 b	7,7 a
8,0 / 0,1 / 8	85 b	0 b	7,1 b	0,8 b	1,3 b	0,9 b	4,7 b
<i>F</i> one-way ANOVA	***	***	***	***	***	***	***

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

***: σημαντικά σε $P \leq 0,001$, $n=30$.

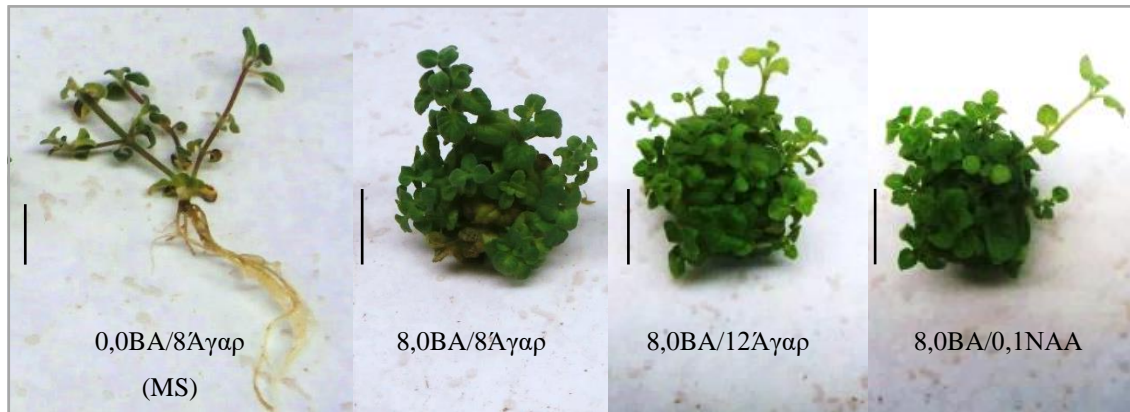
Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών³ x Μέσος αριθμός κόμβων³

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς

² Τα έκφυτα σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς

³ Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί

⁴ Υπερενυδατωμένοι βλαστοί



Εικόνα II.Π.57. Αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου *C. nepeta*, στα αναγραφόμενα υποστρώματα, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από ενήλικα φυτά, κατά την ενδέκατη (11^η) υποκαλλιέργεια. Η κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει μήκος 1 cm.

Εγκατεστημένη από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα

Στην πρώτη υποκαλλιέργεια που ακολούθησε την πρώτη εγκατάσταση από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα έκφυτα κορυφής ή κόμβου, τοποθετήθηκαν στο ίδιο υπόστρωμα από το οποίο προήλθαν από την αρχική καλλιέργεια. Το ποσοστό των εκφύτων που αντέδρασαν ήταν 71 - 100%, με το χαμηλότερο ποσοστό να παρατηρείται στο υπόστρωμα 2,0 mg L⁻¹ BA και το υψηλότερο στο υπόστρωμα 0,25 mg L⁻¹ ZEAT (Πίν. II.Π.65). Στα υποστρώματα που περιείχαν ZEAT παρατηρήθηκε σταδιακή μείωση του ποσοστού των εκφύτων που αντέδρασαν, η οποία έφτασε το 26% στη συγκέντρωση 8,0 mg L⁻¹ (Πίν. II.Π.65). Η αύξηση της συγκέντρωσης των κυτοκινινών και ιδιαίτερα της ZEAT και του BA οδήγησε σε μείωση του ποσοστού των εκφύτων που σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς με ταυτόχρονη αύξηση του ποσοστού των εκφύτων που σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς, με τη μεγαλύτερη αύξηση (45 - 46%) να παρατηρείται στα υποστρώματα με 4,0 ή 8,0 mg L⁻¹ ZEAT (Πίν. II.Π.65). Η διπαραγοντική ανάλυση δεν ανέδειξε σημαντική αλληλεπίδραση μεταξύ του είδους και της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης στον αριθμό των παραχθέντων κανονικών βλαστών και στον αριθμό των κόμβων (Πίν. II.Π.65). Ο αριθμός των παραχθέντων βλαστών επηρεάστηκε μόνο από τη συγκέντρωση των κυτοκινινών, ενώ ο αριθμός κόμβων τόσο από το είδος όσο και από τη συγκέντρωση των κυτοκινινών (Πίν. II.Π.65). Υψηλότερη παραγωγή βλαστών (3,3 ή 3,8 βλαστού/έκφυτο) παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα με 1,0 mg L⁻¹ ZEAT ή KIN αντίστοιχα. Σε όλες τις κυτοκινίνες (BA, ZEA, KIN 2iP) στις χαμηλότερες συγκεντρώσεις (0,25 ή 0,5 η 1,0 mg L⁻¹) ο αριθμός των κόμβων ανά βλαστό ήταν μεγαλύτερος σε σύγκριση με τις υψηλότερες συγκεντρώσεις (2,0 ή 4,0 η 8,0 mg L⁻¹) (Πίν. II.Π.65). Το υπόστρωμα

χωρίς PGRs έδωσε το μικρότερο αριθμό (1,5 βλαστοί/έκφυτο) παραχθέντων βλαστών, μεγαλύτερου μήκους (3,2 cm). Το δυναμικό πολλαπλασιασμού ήταν μεγαλύτερο (13,4) στο υπόστρωμα που περιείχε $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ZEAT, λόγω του υψηλού ποσοστού των εκφύτων που αντέδρασαν και του υψηλού αριθμού παραχθέντων κανονικών βλαστών και κόμβων (Πίν. II.Π.65). Η παρουσία κυτοκινίνης σε υψηλές συγκεντρώσεις, ανεξάρτητα από το είδος της κυτοκινίνης, είχε ως αποτέλεσμα το σχηματισμό υπερενυδατωμένων βλαστών σε υψηλό ποσοστό, ιδιαίτερα στη ZEAT το ποσοστό έφτασε το 67% στη συγκέντρωση $8,0 \text{ mg L}^{-1}$. Με βάση τα παραπάνω ο υψηλότερος μέσος αριθμός υπερενυδατωμένων βλαστών (4,2 υπερενυδατωμένοι βλαστοί/έκφυτο) παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα που περιείχε $8,0 \text{ mg L}^{-1}$ ZEAT (Πίν. II.Π.65). Τέλος στο υπόστρωμα MS χωρίς PGRs παρατηρήθηκε ριζοβολία σε ποσοστό 58%.

Στις επόμενες τέσσερις υποκαλλιέργειες ($2^{\text{η}}$ - $5^{\text{η}}$) τα έκφυτα κορυφής και κόμβου τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα MS χωρίς PGRs, για διατήρηση πολλαπλασιαστικού υλικού και συνέχιση των πειραμάτων. Σε όλες τις υποκαλλιέργειες το ποσοστό των εκφύτων που αντέδρασαν διατηρήθηκε σε υψηλά επίπεδα (86 - 100%) και δεν παρουσιάστηκαν έκφυτα που να φέρουν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς. Ο αριθμός των παραχθέντων κανονικών βλαστών κυμάνθηκε από 1,5 έως 2,2 βλαστοί ανά έκφυτο, με μέσο μήκος βλαστών από 1,7 έως 3,1 cm και με μέσο αριθμό κόμβων από 2,8 έως 3,8 ανά βλαστό. Το δυναμικό πολλαπλασιασμού κυμάνθηκε από 4,1 έως 7,0, επιπλέον παρατηρήθηκε ριζοβολία σε ποσοστό από 50 - 75 στις διάφορες υποκαλλιέργειες (δεν παρουσιάζονται δεδομένα).

Πίνακας II.Π.65. Επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης των PGRs, στην αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου, κατά την πρώτη υποκαλλιέργεια του *C. pereta*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα, το Νοέμβριο 2014.

PGRs (mg L ⁻¹)	Ποσοστό (%)		Μέσος	Μέσο Μήκος	Μέσος	Μέσος Αριθμός	Δυν.
	Βλαστ/ ση ¹	Βλαστ/ ση ²	Αριθμός Βλαστών ³	Βλαστών ³ (cm)	Αριθμός Κόμβων ³	Υπερενυδατωμ ένων Βλαστών	Πολ/σμού
0,0 [±]	92 c	0 d	1,5 f	3,2 a	4,5 ab	0,0 i	6,2 efg
0,25 ZEAT	100 a	0 d	2,5 bcd	1,9 def	4,9 ab	0,0 i	12,3 ab
0,5 ZEAT	92 c	0 d	2,6 bcd	2,3 bcd	5,2 a	0,0 i	12,4 ab
1,0 ZEAT	83 d	0 d	3,3 ab	1,6 efg	5,0 ab	0,0 i	13,4 a
2,0 ZEAT	46 gh	33 b	2,4 cde	2,3 bcd	2,7 def	2,9 cd	3,0 hi
4,0 ZEAT	38 i	46 a	2,6 bcd	1,2 fgh	1,8 f	3,5 b	1,8 ij
8,0 ZEAT	29 j	45 a	2,1 cde	0,8 hi	1,6 f	4,2 a	1,0 j
0,25 BA	92 c	0 d	2,3 cde	1,8 def	5,1 a	0,0 i	10,8 abc
0,5 BA	83 d	0 d	2,4 cde	1,2 fgh	2,6 def	0,0 i	5,2 efg
1,0 BA	92 c	8 c	2,6 bcd	1,2 fgh	2,3 ef	1,5 f	5,5 efg
2,0 BA	42 hi	29 b	2,2 cde	1,1 ghi	1,7 f	2,0 ef	1,6 ij
4,0 BA	50 g	26 b	3,0 abc	0,6 i	1,3 f	2,4 d	2,0 ij
8,0 BA	50 g	30 b	3,1 abc	0,8 hi	1,9 f	2,8 cd	3,0 hi
0,25 KIN	92 c	0 d	2,0 ef	3,7 a	5,0 ab	0,0 i	9,2 bcd
0,5 KIN	83 d	0 d	2,1 cde	2,1 cde	3,7 cde	0,0 i	6,5 def
1,0 KIN	72 f	0 d	3,8 a	2,2 bcd	4,0 bcd	0,0 i	10,9 abc
2,0 KIN	70 f	15 bc	2,3 cde	1,3 fgh	2,1 f	0,8 h	3,4 gh
4,0 KIN	72 f	10 c	2,1 def	1,1 ghi	2,1 f	0,8 h	3,2 gh
8,0 KIN	73 ef	11 c	2,6 bcd	0,9 hi	1,8 f	1,5 f	3,4 gh
0,25 2iP	93 bc	0 d	1,9 ef	2,2 bcd	4,4 b	0,0 i	7,8 cde
0,5 2iP	92 c	0 d	2,3 cde	2,8 ab	4,1 bc	0,0 i	8,7 cde
1,0 2iP	92 c	0d	2,6 bcd	1,7 efg	4,6 b	0,0 i	11,0 abc
2,0 2iP	79 de	8 c	2,3 cde	1,5 fgh	1,8 f	0,6 j	3,3 gh
4,0 2iP	71 f	8 c	3,1 abc	1,6 efg	2,0 f	1,0 gh	4,4 ef
8,0 2iP	83 d	10 c	2,6 bcd	0,9 hi	2,1 f	1,1 gh	4,5 ef
<i>F</i> _{PGRs}	-	-	NS	-	**	-	-
<i>F</i> _{Συγκέντρωσης}	-	-	*	-	***	-	-
<i>F</i> _{PGRs x Συγκέντρωση}	***	***	NS	***	NS	***	*
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***	***	**	***	***	***	***

[±] Τα δεδομένα δεν συμμετέχουν στην 2-way ANOVA

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικά ή *, **, ***: σημαντικά σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$, $P \leq 0,001$, αντίστοιχα, $n=30$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών³ x Μέσος αριθμός κόμβων³

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς

² Τα έκφυτα σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς

³ Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί

⁴ Υπερενυδατωμένοι βλαστοί

Στο επόμενο πείραμα (6^η υποκαλλιέργεια) θέλοντας να μειώσουμε ή και να εξαλείψουμε το ποσοστό υπερενυδάτωσης εξετάσαμε την πιθανή λύση της χρήσης NAA σε συνδυασμό με BA. Το ποσοστό των εκφύτων που αντέδρασαν ήταν υψηλό (73 - 97%) σε όλα τα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν (Πίν. II.Π.66). Στα υπόστρωμα με 2,0 ή 4,0 ή 8,0 mg L⁻¹ BA σε συνδυασμό με 0,1 mg L⁻¹ NAA από τα έκφυτα που αντέδρασαν ένα μικρό ποσοστό (7%) σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς (Πίν. II.Π.66). Η διπαραγοντική ανάλυση δεν ανέδειξε αλληλεπίδραση μεταξύ της συγκέντρωσης του BA και της συγκέντρωσης του NAA στο μήκος των παραχθέντων κανονικών βλαστών και στον αριθμό των κόμβων, τα οποία επηρεάστηκα μόνο από τη συγκέντρωση του BA (Πίν. II.Π.66). Η υψηλότερη παραγωγή κανονικών βλαστών (6,5 βλαστοί/έκφυτο) παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα περιείχε 8,0 mg L⁻¹ BA σε συνδυασμό με 0,1 mg L⁻¹ NAA, ενώ το υπόστρωμα χωρίς PGRs έδωσε μεγαλύτερου μήκους βλαστούς (2,0 cm), χωρίς στατιστική διαφορά από τα υποστρώματα με 0,5 ή 1,0 mg L⁻¹ BA σε συνδυασμό με 0,1 ή 0,5 mg L⁻¹ NAA (Πίν. II.Π.66). Υψηλότερος αριθμός κόμβων (4,3 κόμβοι/βλαστό) εμφανίστηκε στο υπόστρωμα με 1,0 mg L⁻¹ BA σε συνδυασμό με 0,5 mg L⁻¹ NAA (Πίν. II.Π.66). Το υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού (16,1) παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα που περιείχε 8,0 mg L⁻¹ BA σε συνδυασμό με 0,1 mg L⁻¹ NAA, λόγω περισσότερων κανονικών παραχθέντων βλαστών ανά έκφυτο (Πίν. II.Π.66). Η προσθήκη 0,1 ή 0,5 mg L⁻¹ NAA στα υποστρώματα με 0,5 ή 1,0 mg L⁻¹ BA οδήγησε στην εξάλειψη των υπερενυδατωμένων βλαστών (Πίν. II.Π.66). Στα υποστρώματα που περιείχαν BA σε συγκέντρωση 2,0 ή 4,0 mg L⁻¹ η προσθήκη 0,1 mg L⁻¹ NAA μείωσε κατά πολύ το μέσο αριθμό υπερενυδατωμένων βλαστών ανά έκφυτο σε σύγκριση με τα υποστρώματα που περιείχαν μόνο BA χωρίς NAA (Πίν. II.Π.65, II.Π.66), ενώ η προσθήκη 0,5 mg L⁻¹ NAA εξάλειψε την εμφάνιση υπερενυδατωμένων βλαστών (Πίν. II.Π.66). Επιπλέον στο υπόστρωμα MS χωρίς PGRs παρατηρήθηκε ριζοβολία σε ποσοστό (78%), ενώ το ποσοστό καλογένεσης ήταν 43 - 100% στα υποστρώματα που περιείχαν NAA (δεν παρουσιάζονται δεδομένα).

Πίνακας Π.Π.66. Επίδραση της συγκέντρωσης BA και NAA, στην αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου, κατά την έκτη (6^η) υποκαλλιέργεια του *C. pereta*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα, το Νοέμβριο 2014.

BA / NAA (mg L ⁻¹) / (mg L ⁻¹)	Ποσοστό (%)		Μέσος	Μέσο Μήκος	Μέσος	Μέσος Αριθμός	Δυν.
	Βλαστ/ ση ¹	Βλαστ/ ση ²	Αριθμός Βλαστών ³	Βλαστών ³ (cm)	Αριθμός Κόμβων ³	Υπερενυδατωμέν ων Βλαστών ⁴	Πολ/ σμού
0,0 / 0,0 ±	97 a	0 b	2,1 cd	2,0 a	3,1 bc	0,0 b	6,3 cd
0,5 / 0,1	97 a	0 b	1,7 d	1,9 a	3,6 ab	0,0 b	5,9 cd
0,5 / 0,5	86 b	0 b	1,8 cd	1,8 ab	3,3 bc	0,0 b	5,1 d
1,0 / 0,1	89 b	0 b	3,3 b	1,9 a	3,4 bc	0,0 b	10,0 bc
1,0 / 0,5	86 b	0 b	1,8 cd	1,8 ab	4,3 a	0,0 b	6,7 bcd
2,0 / 0,1	70 c	7 a	3,7 b	1,1 c	2,3 de	0,3 a	5,9 bcd
2,0 / 0,5	83 cd	0 b	3,4 b	1,0 c	2,2 e	0,0 b	6,2 bcd
4,0 / 0,1	73 c	7 a	3,6 b	1,2 bc	1,9 e	0,3 a	5,0 cd
4,0 / 0,5	73 c	0 b	2,9 bc	1,0 c	2,0 e	0,0 b	4,3 d
8,0 / 0,1	80 cd	7 a	6,5 a	1,1 c	3,1 bcd	0,5 a	16,1 a
8,0 / 0,5	93 a	0 b	3,9 b	1,1 c	2,7 cde	0,0 b	9,8 b
<i>F</i> _{BA}	-	-	-	***	***	-	-
<i>F</i> _{NAA}	-	-	-	NS	NS	-	-
<i>F</i> _{BA x NAA}	***	***	*	NS	NS	***	**
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***	***	***	***	***	***	***

± Τα δεδομένα δεν συμμετέχουν στην 2-way ANOVA

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικά ή *, **, ***: σημαντικά σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$, $P \leq 0,001$, αντίστοιχα, $n=40$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών³ x Μέσος αριθμός κόμβων³

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς

² Τα έκφυτα σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς

³ Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί

⁴ Υπερενυδατωμένοι βλαστοί

Επιπλέον για την αντιμετώπιση της υπερενυδάτωσης δοκιμάστηκε και η αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ από 8 g L⁻¹ σε 12 g L⁻¹ (7^η υποκαλλιέργεια). Έκφυτα κορυφής και κόμβου καλλιεργήθηκαν είτε σε υπόστρωμα MS με άγαρ 8 g L⁻¹ χωρίς PGRs ή εμπλουτισμένο με 8,0 mg L⁻¹ BA και 0,1 mg L⁻¹ NAA είτε σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με 8,0 mg L⁻¹ BA και άγαρ σε συγκέντρωση 8 ή 12 g L⁻¹. Το υψηλότερο ποσοστό εκφύτων που αντέδρασαν ήταν 100% και παρατηρήθηκε είτε στο υπόστρωμα MS με άγαρ 8 g L⁻¹ χωρίς PGRs είτε στο υπόστρωμα με 8,0 mg L⁻¹ BA στερεοποιημένο με 12 g L⁻¹ άγαρ (Πίν. Π.Π.67). Η υψηλότερη παραγωγή κανονικών βλαστών (9,4 βλαστοί/έκφυτο) παρατηρήθηκε, στο υπόστρωμα περιείχε 8,0 mg L⁻¹ BA και 12 g L⁻¹ άγαρ, ενώ το

υπόστρωμα MS χωρίς PGRs έδωσε μεγαλύτερου μήκους βλαστούς (2,0 cm) οι οποίοι είχαν και περισσότερους κόμβους (2,5 κόμβοι/βλαστό) (Πίν. II.Π.67, Εικ. II.Π.58). Το υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού (7,7) παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα που περιείχε 8,0 mg L⁻¹ BA και 12 g L⁻¹ άγαρ, λόγω των περισσότερων παραχθέντων κανονικών βλαστών ανά έκφυτο (Πίν. II.Π.67). Ο υψηλότερος αριθμός υπερενυδατωμένων βλαστών (1,7 υπερενυδατωμένοι βλαστοί/έκφυτο) παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα που περιείχε 8,0 mg L⁻¹ BA στερεοποιημένο με 8 g L⁻¹ άγαρ (Πίν. II.Π.67). Η αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ από 8 g L⁻¹ σε 12 g L⁻¹, μείωσε το μέσο αριθμό υπερενυδατωμένων βλαστών, το ίδιο αποτέλεσμα αλλά σε μικρότερο ποσοστό παρατηρήθηκε και όταν στο υπόστρωμα 8,0 mg L⁻¹ BA και 8 g L⁻¹ άγαρ προστέθηκε 0,1 mg L⁻¹ NAA (Πίν. II.Π.67). Επιπλέον στο υπόστρωμα MS χωρίς PGRs παρατηρήθηκε ριζοβολία σε υψηλό ποσοστό 99%, ενώ στο υπόστρωμα με NAA παρατηρήθηκε καλογένεση σε υψηλό ποσοστό (95%) (δεν παρουσιάζονται δεδομένα).

Πίνακας II.Π.67. Επίδραση της συγκέντρωσης άγαρ (8 ή 12 g L⁻¹), με την παρουσία ή μη NAA, στην αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου, κατά την 7^η υποκαλλιέργεια του *C. nepeta*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα, το Νοέμβριο 2014.

BA / NAA / Άγαρ (mg L ⁻¹) / (mg L ⁻¹) / (g L ⁻¹)	Ποσοστό (%)		Μέσος Αριθμός Βλαστών ³	Μέσο Μήκος Βλαστών ³ (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ³	Μέσος Αριθμός Υπερενυδατωμ ένων Βλαστών	Δυν. Πολ/ σμού
	Βλαστ/ ση ¹	Βλαστ/ ση ²					
0,0 / 0,0 / 8	100 a	0,0 c	2,9 c	2,0 a	2,5 a	0,0 c	4,4 c
8,0 / 0,0 / 8	80 b	7,5 a	4,7 d	0,8 b	1,9 b	1,7 a	4,2 c
8,0 / 0,0 / 12	100 a	0,0 c	9,4 a	0,8 b	1,4 c	0,7 b	7,7 a
8,0 / 0,1 / 8	80 b	2,5 b	5,7 b	0,9 b	1,9 b	1,1 ab	5,2 b
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***	***	***	***	***	***	***

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

***: σημαντικά σε $P \leq 0,001$, $n=30$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών³ x Μέσος αριθμός κόμβων³

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς

² Τα έκφυτα σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς

³ Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί

⁴ Υπερενυδατωμένοι βλαστοί



Εικόνα II.Π.58. Αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου *C. nepeta*, στα αναγραφόμενα υποστρώματα, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα, κατά τη 7^η υποκαλλιέργεια. Η μπάρα αντιπροσωπεύει μήκος 1 cm.

II.Π.3.4.3 *In vitro* ριζοβολία μικρομοσχευμάτων

Κατά τη διερεύνηση της *in vitro* ριζοβολίας είτε από την καλλιέργεια που εγκαταστάθηκε από ενήλικα φυτά, είτε από την καλλιέργεια που εγκαταστάθηκε από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα, επιλέχθηκαν μη υπερενυδατωμένοι μικροβλαστοί, για τη λήψη μικρομοσχευμάτων από το κορυφαίο τμήμα, μαζί με το επάκριο μερίστωμα, μήκους 1,5 - 2,0 cm, με σκοπό να εξεταστεί η επίδραση της συγκέντρωσης του θρεπτικού υποστρώματος MS, της συγκέντρωσης του IBA και της συνεχούς ή για μίας εβδομάδας παρουσίας του IBA σε στερεό υπόστρωμα καλλιέργειας. Συγκεκριμένα μικρομοσχεύματα καλλιεργήθηκαν σε στερεό υπόστρωμα πλήρους ή μισής δύναμης MS με 20 g L⁻¹ σακχαρόζη και διάφορες συγκεντρώσεις IBA (0,0, 0,5, 1,0, 2,0 ή 4,0 mg L⁻¹). Σε μια άλλη μεταχείριση μικρομοσχεύματα καλλιεργήθηκαν επί μία εβδομάδα σε υπόστρωμα MS χωρίς IBA ή με 0,5, 1,0, 2,0 ή 4,0 mg L⁻¹ IBA, και στη συνέχεια μεταφέρθηκαν σε υπόστρωμα πλήρους ή μισής δύναμης MS για πέντε εβδομάδες.

Ριζοβολία μικρομοσχευμάτων από καλλιέργεια ενήλικων φυτών

Το ποσοστό ριζοβολίας ήταν υψηλό (80 - 100%) είτε στο υπόστρωμα μισής δύναμης MS χωρίς IBA ή με 0,5 - 4,0 mg L⁻¹ IBA σε συνεχή εφαρμογή για έξι εβδομάδες, είτε στο υπόστρωμα πλήρους δύναμης MS με 0,5 - 4,0 mg L⁻¹ IBA για μια εβδομάδα και στη συνέχεια μεταφορά σε υπόστρωμα μισής δύναμης MS για πέντε εβδομάδες (Πίν. II.Π.68). Ενώ σε όλες τις μεταχειρίσεις που περιείχαν πλήρους δύναμης MS το ποσοστό ριζοβολίας έπεσε

και μέχρι το 20% (Πίν. Π.Π.68). Το μεγαλύτερο αριθμό ριζών (5,0 - 5,4 ρίζες ανά μικρομόσχευμα), αλλά και το μεγαλύτερο μήκος ριζών (1,7 - 1,8 cm), σημείωσε το υπόστρωμα μισής δύναμης MS χωρίς IBA ή με 0,5 - 4,0 mg L⁻¹ IBA, σε συνεχή εφαρμογή για έξι εβδομάδες (Πίν. Π.Π.68, Εικ. Π.Π.61). Γενικά τα μικρομοσχεύματα που καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα μισής δύναμης MS χωρίς IBA ή με 1,0 - 4,0 mg L⁻¹ IBA σε συνεχή καλλιέργεια για έξι εβδομάδες σχημάτισαν στατιστικά σημαντικά περισσότερες ρίζες με μεγαλύτερο μέσο μήκος ανά μικρομόσχευμα από εκείνους που καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS χωρίς IBA ή με 1,0 - 4,0 mg L⁻¹ IBA για την πρώτη εβδομάδα καλλιέργειας και μεταφορά για πέντε εβδομάδες καλλιέργειας σε υπόστρωμα μισής δύναμης MS (Πίν. Π.Π.68, Εικ. Π.Π.59). Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η *in vitro* ριζοβολία των μικρομοσχευμάτων ήταν επιτυχής σε υπόστρωμα μισής δύναμης MS χωρίς IBA ή με 0,5 - 4,0 mg L⁻¹ IBA σε συνεχή εφαρμογή για έξι εβδομάδες (Πίν. Π.Π.68), ενώ το πλήρους δύναμης MS ιδιαίτερα όταν συνδυάστηκε με IBA μείωσε το ποσοστό ριζοβολίας των μικρομοσχευμάτων, καθώς και τον αριθμό και το μήκος των ριζών (Πίν. Π.Π.68). Επιπλέον παράλληλα με τη ριζοβολία παρατηρήθηκε επιμήκυνση των μικρομοσχευμάτων και έκπτυξη με ταυτόχρονη επιμήκυνση πλάγιων βλαστών σε όλα τα υποστρώματα. Πιο συγκεκριμένα στο υπόστρωμα χωρίς IBA παρατηρήθηκε έκπτυξη 2 - 4 βλαστών/μικρομόσχευμα, στα υπόστρωμα με 0,5 και 1,0 mg L⁻¹ IBA 4 - 8 βλαστών/μικρομόσχευμα, ενώ στα υποστρώματα που περιείχαν 2,0 και 4,0 mg L⁻¹ IBA 8 - 12 βλαστών/μικρομόσχευμα (Εικ. Π.Π.59).



Εικόνα Π.Π.59. Ριζοβολία μικρομοσχευμάτων *C. nepeta*, από το κορυφαίο τμήμα, μαζί με το επάκριο μερίστωμα σε υπόστρωμα μισής δύναμης MS χωρίς IBA ή με 0,5 - 4,0 mg L⁻¹ IBA σε συνεχή εφαρμογή για έξι εβδομάδες, που ελήφθησαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από ενήλικα αυτοφυή φυτά. Η κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει μήκος 1 cm.

Πίνακας II.Π.68. Επίδραση του υποστρώματος και του IBA (διάρκεια της εφαρμογής και της συγκέντρωσης) στη ριζοβολία των μικρομοσχευμάτων της *C. nepeta*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από ενήλικα αυτοφυή φυτά.

Περίοδος καλλιέργειας/υπόστρωμα + IBA συγκέντρωση (mg L ⁻¹)	Ριζοβολία (%)	Μέσος αριθμός ριζών	Μέσο μήκος ριζών (cm)
6 εβδομάδες / ½ MS	90 b	4,6 bcd	0,7 fg
6 εβδομάδες / MS	70 d	3,6 cde	0,6 fg
6 εβδομάδες / MS+0,5 IBA	20 h	1,0 h	2,8 a
6 εβδομάδες / MS+1,0 IBA	50 e	3,2 def	0,6 fg
6 εβδομάδες / MS+2,0 IBA	30 g	4,0 cde	1,2 cde
6 εβδομάδες / MS+4,0 IBA	30 g	3,3 def	0,6 fg
6 εβδομάδες / ½ MS+0,5 IBA	92 b	5,0 abc	1,7 bc
6 εβδομάδες / ½ MS+1,0 IBA	100 a	5,0 abc	1,7 bc
6 εβδομάδες / ½ MS+2,0 IBA	92 b	5,4 a	1,8 a
6 εβδομάδες / ½ MS+4,0 IBA	92 b	5,1 ab	1,7 bc
1 εβδομάδα / MS + 5 εβδομάδες / ½ MS	90 b	5,1 ab	1,6 bcd
1 εβδομάδα / MS+0,5 IBA + 5 εβδομάδες / ½ MS	90 b	4,9 abcd	1,3 cde
1 εβδομάδα / MS+1,0 IBA + 5 εβδομάδες / ½ MS	100 a	3,3 def	1,1 def
1 εβδομάδα / MS+2,0 IBA + 5 εβδομάδες / ½ MS	100 a	3,9 cde	1,0 ef
1 εβδομάδα / MS+4,0 IBA + 5 εβδομάδες / ½ MS	80 c	4,0 cde	1,7 bc
1 εβδομάδα / MS+0,5 IBA + 5 εβδομάδες / MS	50 e	3,0 efg	0,2 g
1 εβδομάδα / MS+1,0 IBA + 5 εβδομάδες / MS	40 f	2,3 fgh	0,3 g
1 εβδομάδα / MS+2,0 IBA + 5 εβδομάδες / MS	40 f	1,0 h	0,3 g
1 εβδομάδα / MS+4,0 IBA + 5 εβδομάδες / MS	40 f	1,3 gh	0,3 g
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***	***	***

Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. ***: σημαντικά σε $P \leq 0,001$, $n=24$.

Ριζοβολία μικρομοσχευμάτων από καλλιέργεια σποροφύτων

Το ποσοστό ριζοβολίας ήταν υψηλό (83 - 100%) είτε στο υπόστρωμα μισής δύναμης MS χωρίς IBA ή με 0,5 - 4,0 mg L⁻¹ IBA σε συνεχή εφαρμογή για έξι εβδομάδες, είτε στο υπόστρωμα πλήρους δύναμης MS με 0,5 - 4,0 mg L⁻¹ IBA για την πρώτη εβδομάδα καλλιέργειας και στη συνέχεια μεταφορά σε υπόστρωμα μισής δύναμης MS για πέντε εβδομάδες (Πίν. II.Π.69). Ενώ σε όλες τις μεταχειρίσεις που περιείχαν πλήρους δύναμης MS το ποσοστό ριζοβολίας έπεσε και μέχρι το 25% (Πίν. II.Π.69). Γενικά τα μικρομοσχεύματα που καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα μισής δύναμης MS χωρίς IBA ή με 1,0 - 4,0 mg L⁻¹ IBA σε συνεχή καλλιέργεια για έξι εβδομάδες σχημάτισαν περισσότερες ρίζες με μεγαλύτερο μέσο μήκος ανά μικρομόσχευμα από εκείνους που καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα MS χωρίς IBA ή με 1,0 - 4,0 mg L⁻¹ IBA για την πρώτη εβδομάδα καλλιέργειας και μεταφορά

για πέντε εβδομάδες καλλιέργειας σε υπόστρωμα μισής δύναμης MS (Πίν. II.Π.69). Το μεγαλύτερο αριθμό ριζών (5,3 - 5,6 ρίζες ανά μικρομόσχευμα), αλλά και το μεγαλύτερο μήκος ριζών (1,5 - 1,7 cm), σημείωσε το υπόστρωμα μισής δύναμης MS με 0,5 - 4,0 mg L⁻¹ IBA, σε συνεχή εφαρμογή για έξι εβδομάδες (Πίν. II.Π.69, Εικ. II.Π.60). Από τα παραπάνω προκύπτει ότι η *in vitro* ριζοβολία των μικρομοσχευμάτων ήταν πετυχημένη σε υπόστρωμα μισής δύναμης MS χωρίς IBA ή με 0,5 - 4,0 mg L⁻¹ IBA σε συνεχή εφαρμογή για έξι εβδομάδες (Πίν. II.Π.69). Το πλήρους δύναμης MS ιδιαίτερα όταν συνδυάστηκε με IBA αναστέλλει τη ριζοβολία των μικρομοσχευμάτων, καθώς και τον αριθμό και το μήκος των ριζών (Πίν. II.Π.69). Επιπλέον παράλληλα με τη ριζοβολία παρατηρήθηκε επιμήκυνση των μικρομοσχευμάτων και έκπτυξη με ταυτόχρονη επιμήκυνση πλάγιων βλαστών σε όλα τα υποστρώματα. Πιο συγκεκριμένα στο υπόστρωμα χωρίς IBA παρατηρήθηκε έκπτυξη 2 βλαστών/μικρομόσχευμα, στα υπόστρωμα με 0,5 και 1,0 mg L⁻¹ IBA 4 - 6 βλαστών/μικρομόσχευμα, ενώ στα υποστρώματα που περιείχαν 2,0 και 4,0 mg L⁻¹ IBA 6 - 8 βλαστών/μικρομόσχευμα (Εικ. II.Π.60).



Εικόνα II.Π.60. Ριζοβολία μικρομοσχευμάτων *C. nepeta*, από το κορυφαίο τμήμα, μαζί με το επάκριο μερίστωμα σε υπόστρωμα μισής δύναμης MS χωρίς IBA ή με 0,5 - 4,0 mg L⁻¹ IBA σε συνεχή εφαρμογή για έξι εβδομάδες, που ελήφθησαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα. Η κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει μήκος 1 cm.

Πίνακας Π.Π.69. Επίδραση του υποστρώματος και του IBA (διάρκεια της εφαρμογής και της συγκέντρωσης) στη ριζοβολία των μικρομοσχευμάτων του *C. nepeta*, που ελήφθησαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα.

Περίοδος καλλιέργειας/υπόστρωμα + IBA συγκέντρωση (mg L ⁻¹)	Ριζοβολία (%)	Μέσος αριθμός ριζών	Μέσο μήκος ριζών (cm)
6 εβδομάδες / ½ MS	100 a	4,5 bcd	0,8 fg
6 εβδομάδες / MS	75 d	3,2 efg	0,7 fg
6 εβδομάδες / MS+0,5 IBA	42 e	3,2 efg	0,6 fg
6 εβδομάδες / MS+1,0 IBA	42 e	4,2 bcde	0,5 gh
6 εβδομάδες / MS+2,0 IBA	33 f	4,5 abcd	0,6 fgh
6 εβδομάδες / MS+4,0 IBA	25 g	3,7 def	0,9 efg
6 εβδομάδες / ½ MS+0,5 IBA	92 b	5,3 ab	1,7 a
6 εβδομάδες / ½ MS+1,0 IBA	100 a	5,4 ab	1,6 a
6 εβδομάδες / ½ MS+2,0 IBA	100 a	5,5 ab	1,7 a
6 εβδομάδες / ½ MS+4,0 IBA	83 c	5,6 a	1,5 ab
1 εβδομάδα / MS + 5 εβδομάδες / ½ MS	100 a	4,7 abc	1,3 bc
1 εβδομάδα / MS+0,5 IBA + 5 εβδομάδες / ½ MS	83 c	4,9 abc	1,2 bcd
1 εβδομάδα / MS+1,0 IBA + 5 εβδομάδες / ½ MS	100 a	3,7 def	1,1 cde
1 εβδομάδα / MS+2,0 IBA + 5 εβδομάδες / ½ MS	83 c	4,0 cde	1,1 cde
1 εβδομάδα / MS+4,0 IBA + 5 εβδομάδες / ½ MS	83 c	3,9 cde	0,9 efg
1 εβδομάδα / MS+0,5 IBA + 5 εβδομάδες / MS	42 e	2,8 fgh	0,2 i
1 εβδομάδα / MS+1,0 IBA + 5 εβδομάδες / MS	33 f	2,5 gh	0,2 hi
1 εβδομάδα / MS+2,0 IBA + 5 εβδομάδες / MS	42 e	1,6 h	0,2 hi
1 εβδομάδα / MS+4,0 IBA + 5 εβδομάδες / MS	33 f	1,3 h	0,2 hi
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***	***	***

Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούν από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. ***: σημαντικά σε $P \leq 0,001$, $n=24$.

Ριζοβολία συστάδων μικρομοσχευμάτων από καλλιέργεια ενήλικων φυτών ή σποροφύτων

Σε επόμενο πείραμα συστάδες μικροβλαστών προερχόμενοι είτε από καλλιέργεια ενήλικων φυτών ή σποροφύτων τοποθετήθηκαν για ριζοβολία σε υπόστρωμα MS μισής δύναμης χωρίς IBA. Το ποσοστό ριζοβολίας ήταν πολύ υψηλό (96%) ανεξάρτητα από την προέλευση των συστάδων (δεδομένα από 46 συστάδες). Ο μέσος αριθμός ριζών που παράχθηκε ήταν 8,4 και 8,5 ρίζες ανά συστάδα μικροβλαστών (καλλιέργεια από ενήλικα φυτά ή από σπορόφυτα, αντίστοιχα) με μέσο μήκος 1,3 cm (δεν παρουσιάζονται δεδομένα, Εικ. Π.Π.61). Παράλληλα με τη ριζογένεση παρατηρήθηκε και επιμήκυνση των επιμήκυνση των βλαστών (Εικ. Π.Π.61).



Εικόνα II.11.61. Ριζοβολία συστάδων μικροβλαστών *C. pereta*, από την καλλιέργεια που εγκαταστάθηκε από ενήλικα φυτά και από σπορόφυτα, σε θρεπτικό υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS. Η κάθε μπάρα αντιπροσωπεύει μήκος 1 cm.

II.11.3.4.4 Εγκλιματισμός φυταρίων *ex vitro*

Ριζοβολημένα μικρομοσχεύματα (φυτάρια), καθ' όλη τη διάρκεια του έτους, είτε από καλλιέργεια σποροφύτων, ή καλλιέργεια ενήλικων φυτών αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο, μεταφέρθηκαν *ex vitro* σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (1:1, v/v). Ο αριθμός των φυταρίων που μεταφέρονταν για *ex vitro* εγκλιματισμό κάθε φορά ήταν 80 (10 δοχεία, 8 φυτά ανά δοχείο). Οι ριζοβολημένες συστάδες είτε από καλλιέργεια ενήλικων φυτών ή από καλλιέργεια σποροφύτων, μεταφέρθηκαν *ex vitro* σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (1:1, v/v) το Μάρτιο ($n=40$, 8 φυτά ανά δοχείο, 5 δοχεία). Τα φυτάρια τόσο από την καλλιέργεια σποροφύτων όσο και από καλλιέργεια ενήλικων φυτών εγκλιματίστηκαν επιτυχώς σε υψηλό ποσοστό 80 - 85%, ενώ οι συστάδες μικροβλαστών σε 100% (Εικ. II.11.62α).

Μετά την ολοκλήρωση του εγκλιματισμού (1 μήνα), ακολούθησε μεταφύτευση σε γλάστρα 10 cm σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (2:1, v/v). Τα φυτά λιπαίνονταν με υδατοδιαλυτό πλήρες λίπασμα Nutrileaf 20:20:20 σε συγκέντρωση $2,0 \text{ g L}^{-1}$ μια φορά το μήνα. Η ανάπτυξη των φυτών ήταν 100% επιτυχής κατά τους τρεις επόμενους μήνες από τη μεταφύτευσή τους σε ατομική γλάστρα (Εικ. II.11.62β).



Εικόνα II.Π.62. Φυτάρια *C. nepeta* ένα μήνα μετά τον εγκλιματισμό (α) και ριζοβολημένες συστάδες μικροβλαστών από ενήλικα φυτά δύομιση μήνες μετά τον εγκλιματισμό (β).

II.Π.3.5 *Scabiosa hymettia*

II.Π.3.5.1 Εγκατάσταση καλλιέργειών *in vitro*

Από ενήλικα αυτοφυή φυτά

Στην αρχική εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας της *S. hymettia* με έκφυτα προερχόμενα από ενήλικα αυτοφυή φυτά, παρουσιάστηκαν πολλές δυσκολίες, λόγω του υψηλού ποσοστού μολύνσεων.

Πιο συγκεκριμένα στην πρώτη προσπάθεια εγκατάστασης από ενήλικα αυτοφυή φυτά του *S. hymettia*, τον Απρίλιο 2013, τα έκφυτα κορυφής κάηκαν, πιθανώς λόγω της υψηλής συγκέντρωσης χλωρίνης που χρησιμοποιήθηκε κατά την απολύμανση του φυτικού υλικού (Πίν. II.Π.70).

Στις επόμενες προσπάθειες (Απρίλιο 2013, Ιούλιο 2013, Σεπτέμβριο 2013, Οκτώβριο 2013, Απρίλιο 2014, Μάιο 2014, και Φεβρουάριο 2015) παρατηρήθηκε υψηλό ποσοστό μολύνσεων (61 - 100%), ενώ όσα έκφυτα δεν μολύνθηκαν δεν αντέδρασαν, έτσι η εγκατάσταση αρχικής καλλιέργειας από αυτοφυή φυτά ήταν αποτυχής (Πίν. II.Π.70).

Στην προσπάθεια του Ιανουαρίου 2014 έγινε επιτυχής εγκατάσταση εκφύτων κορυφής που κόπηκαν από αυτοφυή φυτά από την Πάρνηθα. Το ποσοστό μολύνσεων λόγω του μεγάλου χρόνου παραμονής στο υδατικό διάλυμα χλωρίνης μηδενίστηκε, όμως το 50% των εκφύτων καήκαν (Πίν. II.Π.70). Από αυτά που δεν κάηκαν αντέδρασε μόνο το 50%, με επιμήκυνση του εκφύτου, χωρίς σχηματισμό άλλων βλαστών (Πίν. II.Π.71).

Πίνακας II.Π.70. Αποτελεσματικότητα απολύμανσης σε πειράματα αρχικής εγκατάστασης εκφύτων *S. hymettia* από ενήλικα αυτοφυή φυτά από την Πάρνηθα και από σπορόφυτα, τα οποία είχαν βλαστήσει σε πλαστικά κιβώτια σποράς με υπόστρωμα τύρφης - περλίτη στο θερμοκήπιο.

Προέλευση Εκφύτων	Έτος	Μήνας	Απολύμανση			Ποσοστό Μολύνσεων (%)
			Χρόνος Εμβάπτισης στην Αιθανόλη	Συγκέντρωση χλωρίνης εμπορίου (%)	Χρόνος Απολύμανσης (min)	
Έκφυτα ενήλικων αυτοφυών φυτών	2013	Απρίλιος	15 sec	20 ή 30	15	-
	2013	Απρίλιος	15 sec	10 ή 15	10	100
	2013	Ιούλιος	15 sec	10 ή 15	10	90
	2013	Σεπ/ριος	15 sec	20 ή 30	10	75
	2013	Οκτώβριος	15 sec	20 ή 30	10	100
	2014	Ιαν/ριος [±]	15 sec	30	20	0
	2014	Απρίλιος	1 min	30	15 ή 20	69-74
	2014	Μάιος	5 min	30	20	61
	2015	Φεβ/ριος	5 min	30	20	100
Έκφυτα νεαρών φυτών	2015	Οκτώβριος	5 min	30	10	30
αναπτυσσόμενων στο θερμοκήπιο	2015	Νοέμβριος	1 min	20	10	100
Έκφυτα από <i>ex</i>	2015	Αύγουστος	1 min	20	20	71-88
<i>in vitro</i> σπορόφυτα	2015	Νοέμβριος	30 sec	30	20	80-90

[±] Επιτυχής αρχική εγκατάσταση από ενήλικα αυτοφυή φυτά (βλ. Πίν. II.Π.70)

Πίνακας II.Π.71. Αντίδραση εκφύτων κορυφής από ενήλικα αυτοφυή φυτά, κατά την αρχική εγκατάσταση σε υπόστρωμα MS τον Ιανουάριο 2014.

PGRs (mg L ⁻¹)	Ποσοστό Βλαστ/σης ¹ (%)	Μέσος Αριθμός Βλαστών ²	Μέσο Μήκος Βλαστών ² (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ²	Δυν. Πολ/σμού
0,0	58	1,0	1,0	1,0	0,6

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹(%) x Μέσος αριθμός βλαστών² x Μέσος αριθμός κόμβων²

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενδατωμένους μαζί με μη υπερενδατωμένους βλαστούς

² Μη υπερενδατωμένοι βλαστοί

Από νεαρά φυτά αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο

Στην αρχική εγκατάσταση (Οκτώβριος 2015) από νεαρά φυτά αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου το ποσοστό μολύνσεων ήταν 30%, όμως παρατηρήθηκε υψηλό ποσοστό καψίματος των εκφύτων (57%), πιθανώς λόγω του μεγάλου χρόνου παραμονής των εκφύτων στην αιθανόλη (5 min) και της υψηλής συγκέντρωσης (30%) χλωρίνης (Πίν. II.Π.70).

Πραγματοποιήθηκε και δεύτερο πείραμα το Νοέμβριο 2015 με χαμηλότερη συγκέντρωση υδατικού διαλύματος χλωρίνης (20%) και μικρότερη παραμονή των εκφύτων στην αιθανόλη (1 min), όπου όλα τα έκφυτα μολύνθηκαν.

Από ex vitro ανεπτυγμένα σπορόφυτα

Στην αρχική εγκατάσταση (Αύγουστος 2015) από σπορόφυτα, τα οποία είχαν βλαστήσει σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (1:1, v/v) στο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου, το ποσοστό μολύνσεων ήταν πολύ υψηλό (71 - 88%) σε όλα τα υποστρώματα (Πίν. II.Π.70) και ο περαιτέρω πολλαπλασιασμός κατέστη δυνατός από 3 - 4 έκφυτα που αντέδρασαν από κάθε υπόστρωμα. Στο υπόστρωμα MS είτε χωρίς PGRs ή εμπλουτισμένο με $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ TDZ δεν αντέδρασε κανένα έκφυτο, ενώ στα υπόλοιπα υποστρώματα αντέδρασε το 50 - 70% των εκφύτων που δεν μολύνθηκαν. Το μέσο μήκος βλαστών και ο μέσος αριθμός κόμβων ήταν μεγαλύτερα στο υπόστρωμα με $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA χωρίς ή με $0,1 \text{ mg L}^{-1}$ NAA. (Πίν. II.Π.72).

Λόγω του υψηλού ποσοστού μολύνσεων των εκφύτων στο πρώτο πείραμα εγκατάστασης από *ex vitro* σπορόφυτα, πραγματοποιήθηκε και δεύτερο πείραμα το Νοέμβριο 2015 με υψηλότερη συγκέντρωση υδατικού διαλύματος χλωρίνης (30%) και μικρότερη παραμονή των εκφύτων στην αιθανόλη (1 min). Το ποσοστό μολύνσεων ήταν υψηλότερο (90 - 100%) σε σύγκριση με το πρώτο πείραμα, με αποτέλεσμα την ολοκληρωτική απώλεια της καλλιέργειας.

Πίνακας Π.Π.72. Αντίδραση εκφύτων κορυφής, που προήλθαν τον Αύγουστο 2015 από σπορόφυτα αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο, κατά την αρχική εγκατάσταση.

PGRs (mg L ⁻¹)	Ποσοστό μολύνσεων (%)	Ποσοστό Βλαστ/σις ¹ (%)	Μέσος Αριθμός Βλαστών ²	Μέσο Μήκος Βλαστών ² (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ²	Δυν. Πολ/σμού
0,0	85	0 c	0,0 b	0,0 d	0,0 c	0,0 d
1,0 BA	79	70 a	1,0 a	3,4 a	6,9 a	8,1 a
1,0 ZEAT	88	50 b	1,0 a	2,7 bc	2,7 b	2,3 c
1,0 BA / 0,1 NAA	81	67 a	1,0 a	2,7 ab	5,8 a	6,5 b
1,0 ZEAT / 0,1 NAA	88	50 b	1,0 a	1,3 c	2,7 b	2,3 c
1,0 TDZ	71	0 c	0,0 b	0,0 d	0,0 c	0,0 d
<i>F</i> _{one-way ANOVA}		***	NS	*	***	***

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικά ή ***: σημαντικά σε $P \leq 0,001$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹(%) x Μέσος αριθμός βλαστών² x Μέσος αριθμός κόμβων²

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς

² Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί

Από *in vitro* σπορόφυτα

Λόγω αποτυχίας της βλάστησης των σπόρων *in vitro* δεν κατέστη δυνατή η εγκατάσταση *in vitro* αρχικής καλλιέργειας από σπορόφυτα.

Π.Π.3.5.2 Πολλαπλασιασμός βλαστών σε *in vitro* καλλιέργεια

Εγκατεστημένη από ενήλικα φυτά

Κατά τα στάδια πολλαπλασιασμού του *S. hymettia* (1^η - 5^η υποκαλλιέργεια) από ενήλικα φυτά που είχε εγκατασταθεί τον Ιανουάριο 2014, το ποσοστό αντίδρασης των εκφύτων κυμάνθηκε από 50 - 100% σε υπόστρωμα μισής ή πλήρους δύναμης MS χωρίς PGRs ή πλήρους δύναμης MS με 0,5 mg L⁻¹ ZEAT (Πίν. Π.Π.73). Όσον αφορά τον αριθμό των παραχθέντων βλαστών και το μήκος αυτών, παρατηρήθηκε μόνο επιμήκυνση του εκφύτου (Πίν. Π.Π.73, Εικ. Π.Π.63α, β, γ, δ, ε).

Στην έκτη υποκαλλιέργεια έκφυτα κορυφής και κόμβου τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα MS με 1,0 mg L⁻¹ BA, στο οποίο κανένας τύπος εκφύτου δεν αντέδρασε.

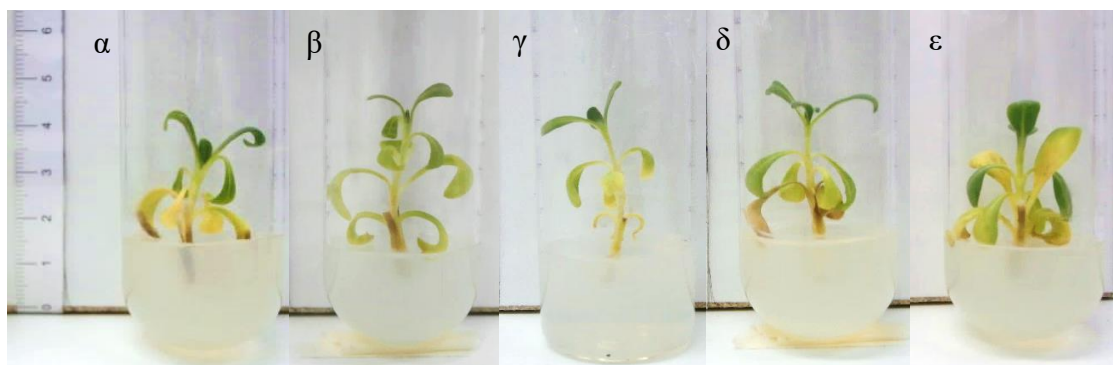
Πίνακας Π.Π.73. Αντίδραση εκφύτων κορυφής του *S. hymettia*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί τον Ιανουάριο 2014 από ενήλικα αυτοφυή φυτά, κατά την πρώτη, δεύτερη, τρίτη, τέταρτη και πέμπτη υποκαλλιέργεια.

Υποκαλλιέργεια	PGRs (mg L ⁻¹)	Ποσοστό Βλαστ/σης ¹ (%)	Μέσος Αριθμός Βλαστών ²	Μέσο Μήκος Βλαστών ² (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ²	Δυν. Πολ/σμού
1 ^η	0,5 ZEAT	64	1,0	1,3	1,0	0,6
2 ^η	½ MS	100	1,0	2,7	2,5	2,5
3 ^η	MS	50	1,0	2,5	2,2	1,1
4 ^η	MS	100	1,0	2,3	2,0	2,2
5 ^η	MS	50	1,0	2,0	2,0	1,0
6 ^η	1,0 BA	0	-	-	-	-

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών² x Μέσος αριθμός κόμβων²

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς

² Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί



Εικόνα Π.Π.63. Αντίδραση εκφύτων κορυφής του *S. hymettia*, που προήλθαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί τον Ιανουάριο 2014 από ενήλικα αυτοφυή φυτά, κατά την πρώτη (α), δεύτερη (β), τρίτη (γ), τέταρτη (δ) και πέμπτη (ε) υποκαλλιέργεια.

Εγκατεστημένη από ex vitro σπορόφυτα

Στην υποκαλλιέργεια που ακολούθησε την αρχική καλλιέργεια εκφύτων (Αύγουστο 2015) από *ex vitro* σπορόφυτα, το ποσοστό αντίδρασης των εκφύτων ήταν υψηλό (71 - 78%), ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στο ρυθμό πολλαπλασιασμού στα δύο υποστρώματα (MS με 1,0 mg L⁻¹ BA ή με 1,0 mg L⁻¹ BA και 0,1 mg L⁻¹ NAA) που δοκιμάστηκαν (Πίν. Π.Π.74).

Στη δεύτερη υποκαλλιέργεια έκφυτα κορυφής και κόμβου τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα MS με 1,0 mg L⁻¹ BA, στο οποίο κανένας τύπος εκφύτου δεν αντέδρασε.

Πίνακας Π.Π.74. Αντίδραση εκφύτων κορυφής *S. hymettia*, από σπορόφυτα αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο, κατά την πρώτη υποκαλλιέργεια.

BA / NAA (mg L ⁻¹) / (mg L ⁻¹)	Ποσοστό Βλαστ/ση ¹ (%)	Μέσος Αριθμός Βλαστών ²	Μέσο Μήκος Βλαστών ² (cm)	Μέσος Αριθμός Κόμβων ²	Δυν. Πολ/σμού
1,0 / 0,0	78 a	1,1 a	0,9 b	2,6 a	2,2 a
1,0 / 0,1	71 a	1,0 a	1,2 a	4,0 a	2,8 a
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	NS	NS	*	***	NS

Οι μέσοι επί της στήλης διαχωρίζονται σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικά ή *: σημαντικά σε $P \leq 0,05$, $n=18$.

Δυναμικό πολλαπλασιασμού = Βλαστογένεση¹ (%) x Μέσος αριθμός βλαστών² x Μέσος αριθμός κόμβων²

¹ Τα έκφυτα σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς

² Μη υπερενυδατωμένοι βλαστοί

Εγκατεστημένη από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα

Λόγω αποτυχίας της βλάστησης των σπόρων *in vitro* δεν κατέστη δυνατή η εγκατάσταση *in vitro* αρχικής καλλιέργειας από σπορόφυτα και φυσικά και ο περαιτέρω πολλαπλασιασμός.

Π.Π.3.5.3 *In vitro* ριζοβολία μικρομοσχευμάτων

Κατά τη διερεύνηση της *in vitro* ριζοβολίας από την καλλιέργεια που εγκαταστάθηκε από ενήλικα φυτά, επιλέχθηκαν μικρομοσχεύματα, μήκους 2,0 - 2,5 cm, από το κορυφαίο τμήμα, μαζί με το επάκριο μερίστωμα. Τα μικρομοσχεύματα τοποθετήθηκαν σε υπόστρωμα μισής δύναμης MS χωρίς IBA ή με 0,5 ή 1,0 ή 2,0 ή 4,0 mg L⁻¹ IBA. Στο υπόστρωμα χωρίς IBA δεν παρατηρήθηκε ριζοβολία, ενώ η ριζοβολία ήταν απολύτως επιτυχής (100%) στο υπόστρωμα με 1,0 mg L⁻¹ IBA, και μεγαλύτερος αριθμός (10,7) και μήκος ριζών (4,5 cm) παρατηρήθηκε σε αυτό με 4,0 mg L⁻¹ IBA, όμως στο συγκεκριμένο υπόστρωμα το ποσοστό ριζοβολίας ήταν πολύ χαμηλό (30%) (Πίν. Π.Π.75, Εικ. Π.Π.64).

Π.Π.3.5.4 Εγκλιματισμός φυταρίων *ex vitro*

Τα φυτάρια (ριζοβολημένα μικρομοσχεύματα), από ενήλικα φυτά, που μεταφέρθηκαν *ex vitro*, εγκλιματίστηκαν επιτυχώς (100%) σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (1:1, v/v).

Πίνακας Π.Π.75. Επίδραση της συγκέντρωσης του IBA στη ριζοβολία των μικρομοσχευμάτων *S. hymettia*, σε θρεπτικό υπόστρωμα ½ MS που ελήφθησαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από ενήλικα φυτά.

IBA (mg L ⁻¹)	Ριζοβολία (%)	Μέσος αριθμός ριζών	Μέσο μήκος ριζών (cm)
0,0 IBA	0 d	0,0 e	0,0 e
0,5 IBA	30 c	2,3 d	0,7 d
1,0 IBA	100 a	4,4 c	1,5 c
2,0 IBA	50 b	7,0 b	3,4 b
4,0 IBA	30 c	10,7 a	4,5 a
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***	***	***

Οι μέσοι επί της στήλης ακολουθούν από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.***: σημαντικά σε $P \leq 0,001$, $n=10$.



Εικόνα Π.Π.64. Επίδραση της συγκέντρωσης του IBA στη ριζοβολία μικρομοσχευμάτων *S. hymettia*, που ελήφθησαν από την καλλιέργεια που είχε εγκατασταθεί από ενήλικα φυτά, σε θρεπτικό υπόστρωμα ½ MS.

Π.Π.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα διατριβή αναπτύχθηκε για πρώτη φορά μια πλήρης μέθοδος για το μικροπολλαπλασιασμό των ειδών *Anthyllis barba-jovis*, *Clinopodium creticum*, *Clinopodium nepeta* με χρήση τόσο ενήλικου όσο και νεανικού φυτικού υλικού. Για το είδος *Ballota acetabulosa* κατέστη δυνατός ο μικροπολλαπλασιασμός μόνο από νεανικό φυτικό υλικό, ενώ για το είδος *Scabiosa hymettia* δεν κατέστη δυνατή η ανάπτυξη αποδοτικού πρωτοκόλλου *in vitro* πολλαπλασιασμού.

Anthyllis barba-jovis

Όταν ξεκίνησε η παρούσα μελέτη, αλλά και μέχρι και σήμερα στη διεθνή βιβλιογραφία δεν υπήρχε καμιά σχετική αναφορά όσον αφορά τον *in vitro* πολλαπλασιασμό του είδους *A. barba-jovis*.

Όσον αφορά στην εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας *A. barba-jovis* με έκφυτα προερχόμενα από ενήλικα καλλιεργούμενα φυτά, παρουσιάστηκαν πολλές δυσκολίες, λόγω του υψηλού ποσοστού μολύνσεων. Πιο συγκεκριμένα έκφυτα που συλλέχθηκαν από ενήλικα καλλιεργούμενα φυτά είτε κατά τη διάρκεια του φθινοπώρου είτε κατά τη διάρκεια της άνοιξης μολύνθηκαν όλα. Η προσπάθεια για εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας από νεαρά φυτά που αναπτύσσονταν στο θερμοκήπιο ήταν επιτυχής με έκφυτα κορυφής σε υπόστρωμα 1,0 mg L⁻¹ BA με μικρό ποσοστό αντίδρασης (30%) ή με έκφυτα πρώτου και δεύτερου κόμβου (αριθμώντας από την κορυφή προς τα κάτω) σε υπόστρωμα 1,0 ή 1,5 mg L⁻¹ BA με πάρα πολύ μικρό ποσοστό αντίδρασης (7 - 8%). Το επιμελές και σχολαστικό πλύσιμο των εκφύτων σε τρεχούμενο νερό βρύσης, ακολουθούμενο με εμβάπτισή τους σε αιθανόλη 90% για 10 sec και ακολούθως ανάδευση σε υδατικό διάλυμα χλωρίνης εμπορίου 30% για 10 min, είχε ως αποτέλεσμα τη σχετικά επιτυχή απολύμανση των εκφύτων, αλλά πιθανώς οδήγησε σε καταστροφή των ιστών τους (κάψιμο) δεδομένου ότι τα περισσότερα έκφυτα που δεν μολύνθηκαν δεν αντέδρασαν. Όμως χαμηλότερη συγκέντρωση χλωρίνης (20%) για 10 min, είχε ως αποτέλεσμα την εμφάνιση υψηλού ποσοστού μολύνσεων (78 - 87%) των εκφύτων.

Η εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας *A. barba-jovis* με έκφυτα προερχόμενα από σπορόφυτα, δεν παρουσίασε καμία δυσκολία. Η επιλογή των τριών θρεπτικών υποστρωμάτων που δοκιμάστηκαν (MS, WPM και SH) και ο εμπλουτισμός με 0,5 mg L⁻¹ BA για την *in vitro* αρχική εγκατάσταση καλλιεργειών από σπορόφυτα, στηρίχθηκε σε μια υπάρχουσα βιβλιογραφική αναφορά για ένα άλλο είδος *Anthyllis*, το *A. cytisoides* (Gavidia

et al., 1997). Έκφυτα κορυφής ή πρώτου κόμβου ή κοτυληδικού κόμβου αντέδρασαν σε πολύ υψηλό ποσοστό (90 - 100%) σε όλα τα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν, παρόμοια αποτελέσματα παρατήρησαν οι Gavidia *et al.* (1997) στην αντίδραση εκφύτων κορυφής ή κοτυληδικού κόμβου *A. cytisoides*, καθώς και οι Μαρτίνη και Παπαφωτίου (2016) στην αντίδραση εκφύτων κορυφής και κόμβου *A. hemanniae* από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα. Όσον αφορά των μέσο αριθμό των παραχθέντων βλαστών ήταν παρόμοιος και στα τρία θρεπτικά υποστρώματα (MS, WPM και SH) χωρίς την παρουσία PGRs, ανεξάρτητα από τον τύπο του εκφύτου, ενώ οι Gavidia *et al.* (1997) στο *A. cytisoides* παρατήρησαν υψηλότερη παραγωγή βλαστών στα έκφυτα κοτυληδικού κόμβου στο υπόστρωμα SH χωρίς PGRs. Τα υποστρώματα που περιείχαν PGRs σχημάτισαν περισσότερους βλαστούς (σχεδόν διπλάσιο αριθμό) σε σύγκριση με τα υποστρώματα χωρίς PGRs ανεξάρτητα του τύπου του εκφύτου ή του θρεπτικού υποστρώματος. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρονται και από τους Μαρτίνη και Παπαφωτίου (2016) στο *A. hemanniae*, όπου στο θρεπτικό υπόστρωμα MS με BA σχηματίστηκε μεγαλύτερος αριθμός βλαστών σε σύγκριση με το υπόστρωμα MS χωρίς την παρουσία BA. Τέλος το υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού παρατηρήθηκε στο θρεπτικό υπόστρωμα MS με 0,5/0,1 mg L⁻¹ BA/NAA και στους τρεις τύπους εκφύτου.

Κατά το στάδιο πολλαπλασιασμού τόσο της καλλιέργειας από σπορόφυτα όσο της καλλιέργειας από νεαρά φυτά θερμοκηπίου παρατηρήθηκε υψηλό ποσοστό αντίδρασης των εκφύτων (90 - 100%), παρόμοιο ποσοστό αντίδρασης έχει παρατηρηθεί και από τους Μαρτίνη και Παπαφωτίου (2016) στο *A. hemanniae* από ενήλικα αυτοφυή φυτά. Υπό την παρουσία BA ή ZEAT παρατηρήθηκε η μεγαλύτερη παραγωγή βλαστών, ενώ τα υποστρώματα με 2iP έδωσαν μεγαλύτερο μήκος βλαστού με περισσότερους κόμβους σε σύγκριση με τα υποστρώματα που περιείχαν BA ή ZEA ή KIN. Στο *A. hemanniae*, επίσης, η παρουσία πρωτίστως BA και δευτερευόντως ZEAT έδωσε μεγαλύτερο αριθμό παραχθέντων βλαστών σε σύγκριση με τις KIN και 2iP, ενώ το υπόστρωμα με 2iP ή χωρίς PGRs έδωσε πιο επιμήκεις βλαστούς (Μαρτίνη και Παπαφωτίου, 2016). Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και από τους Gavidia *et al.* (1997) οι οποίοι έκριναν απαραίτητη την παρουσία BA στο υπόστρωμα για την ανάπτυξη πλευρικών βλαστών και το σχηματισμό πολλαπλών βλαστών, ιδιαίτερα στις καλλιέργειες από ενήλικα φυτά, στο είδος *A. cytisoides* (Gavidia *et al.*, 1997).

Σε όλα τα στάδια των καλλιεργειών, είτε από σπορόφυτα ή από νεαρά φυτά, παρουσιάστηκε έντονα η υπερενυδάτωση των βλαστών. Η παρουσία κυτοκινίνης και ειδικά της BA και ZEAT είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του ποσοστού των εκφύτων που

σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς και κατά συνέπεια τη μείωση του ποσοστού των εκφύτων που σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς. Η αύξηση λοιπόν της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης στο υπόστρωμα οδήγησε σε αύξηση τόσο του αριθμού των κανονικών (φυσιολογικών) όσο και του αριθμού των υπερενυδατωμένων βλαστών ανά έκφυτο, κυρίως όταν χρησιμοποιήθηκε ZEAT ή BA. Όσον αφορά τις κυτοκινίνες KIN και 2iP έδωσαν τα χαμηλότερα ποσοστά υπερενυδατωμένων βλαστών, χωρίς όμως μεγάλη παραγωγή βλαστών. Υψηλά ποσοστά υπερενυδάτωσης έχουν παρατηρηθεί κατά το μικροπολλαπλασιασμό και άλλων ξηροφυτικών ειδών της Μεσογείου, όπως τα *Anthyllis cytisoides* (Gavidia *et al.*, 1997), *Globularia alypum* L. (Bertsouklis *et al.*, 2003) και *Lithodora zahnii* (Papafotiou and Kalantzis, 2009). Από την άλλη μεριά σε υπόστρωμα χωρίς PGRs δεν παρατηρήθηκαν υπερενυδατωμένοι βλαστοί με παρόμοια αποτελέσματα να έχουν αναφερθεί και σε έναν αριθμό άλλων ειδών συμπεριλαμβανομένων μεσογειακών ξηροφυτικών (Andrade *et al.*, 1999, Ivanova and Van Staden, 2011, Kadota Niimi, 2003). Ωστόσο, αυτό το υπόστρωμα δεν μπορεί να προταθεί για το στάδιο πολλαπλασιασμού, καθώς δεν οδήγησε σε υψηλό αριθμό παραχθέντων βλαστών ανά έκφυτο.

Συγκριτικά με τις PGRs (ZEAT, BA, KIN και 2iP), η ZEAT και το BA αποδείχθηκαν πιο αποτελεσματικές στον πολλαπλασιασμό των βλαστών. Όμως λόγω του υψηλού κόστους της ZEAT για περαιτέρω πολλαπλασιασμό των καλλιεργειών προτείνεται η χρήση BA, με την προϋπόθεση να αντιμετωπιστεί το φαινόμενο της υπερενυδάτωσης, όπως παρουσιάζεται στη συνέχεια. Υπάρχουν πολλές αναφορές σχετικά με την επίδραση των κυτοκινινών στην υπερενυδάτωση των βλαστών σε *in vitro* καλλιέργειες. Σε έρευνες που έχουν γίνει η υπερενυδάτωση περιορίστηκε όταν υποδιπλασιάστηκε η συγκέντρωση του BA και ως παραδείγματα μπορούν να αναφερθούν τα *Allium sativum*, *Chlorophytum borivilianum* και *Lithodora zahnii* (Sharma and Mohan, 2006, Papafotiou and Kalantzis, 2009, Liu *et al.*, 2017). Όμως οι Kevers *et al.* (2004) αναφέρουν ότι η αντιμετώπιση της υπερενυδάτωσης όταν οφείλεται στην παρουσία κυτοκινινών είναι πιο δύσκολη, διότι η παρουσία των κυτοκινινών είναι απαραίτητη στα θρεπτικά υποστρώματα για το σχηματισμό βλαστών.

Για να περιοριστεί ο αριθμός των υπερενυδατωμένων βλαστών τόσο στην καλλιέργεια από νεαρά φυτά όσο από σπορόφυτα δοκιμάστηκε ο εμπλουτισμός του υποστρώματος με αυξίνη (NAA) σε συγκέντρωση 0,1 ή 0,5 mg L⁻¹, καθώς και η αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ από 8 g L⁻¹ σε 12 g L⁻¹. Ως κυτοκινίνη χρησιμοποιήθηκε το BA, δεδομένης της υψηλής τιμής της ZEAT και ως συγκέντρωση 4,0 mg L⁻¹, γιατί έδωσε το μεγαλύτερο αριθμό βλαστών, αλλά μεγάλο ποσοστό αυτών ήταν υπερενυδατωμένοι. Ο εμπλουτισμός του 4-BA-

υποστρώματος είτε με 0,1 ή με 0,5 mg L⁻¹ NAA και η στερεοποίησή του με 12 g L⁻¹ άγαρ οδήγησε σε μείωση των υπερενυδατωμένων βλαστών με ταυτόχρονη αύξηση των κανονικών, διατηρώντας το συνολικό αριθμό βλαστών (κανονικών και υπερενυδατωμένων) σε παρόμοια επίπεδα με το 4-BA-υπόστρωμα με 0,1 ή 0,5 mg L⁻¹ NAA και 8 g L⁻¹ άγαρ και με το 4-BA-υπόστρωμα χωρίς NAA και 12 g L⁻¹ άγαρ, τόσο στα έκφυτα προερχόμενα από καλλιέργεια ενήλικων φυτών όσο και στα έκφυτα προερχόμενα από καλλιέργεια σποροφύτων. Υπάρχουν πολλές αναφορές σχετικά με τον περιορισμό της υπερενυδάτωσης μέσω της αύξησης της συγκέντρωσης του άγαρ (von Arnold and Eriksson, 1984, Bertsouklis *et al.*, 2003, Papafotiou and Kalantzis, 2009).

Η ριζοβολία των μικρομοσχευμάτων που προήλθαν από την καλλιέργεια που εγκαταστάθηκε τόσο από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα ηλικίας ενός μηνός όσο και νεαρά φυτά ηλικίας δυο ετών παρουσίασαν παρόμοια συμπεριφορά, όπως έχει αναφερθεί από τους Gavidia *et al.* (1997) στο συγγενικό είδος *A. cytisoides*. Όσον αφορά το θρεπτικό υπόστρωμα, ενδείκνυται η χρήση μισής δύναμης υποστρώματος MS, καθώς απεδείχθη ως το πλέον κατάλληλο υπόστρωμα ριζοβολίας σε σύγκριση με το πλήρους δύναμης MS ή μισής δύναμης WPM ή SH. Το υπόστρωμα μισής δύναμης χρησιμοποιείται αρκετά συχνά με επιτυχία για *in vitro* ριζοβολία, καθώς οι χαμηλές συγκεντρώσεις θρεπτικών ουσιών επηρεάζουν θετικά τη ριζοβολία μικροβλαστών (Murashige, 1979, Saha *et al.*, 2011, Zhang *et al.*, 2017).

Η προσθήκη IBA στο υπόστρωμα μισής δύναμης MS σε συνεχή καλλιέργεια για έξι εβδομάδες, ανεξαρτήτου του τύπου του μικρομοσχεύματος και της προέλευσης αυτού, δεν επηρέασε το ποσοστό ριζοβολίας, το οποίο κυμάνθηκε σε υψηλές τιμές (90 - 100%). Υψηλό ποσοστό ριζοβολίας των μικρομοσχευμάτων από το κορυφαίο τμήμα, μαζί με το επάκριο μερίστωμα έχει αναφερθεί και από τους Gavidia *et al.* (1997), ανεξαρτήτως του χειρισμού τους με αυξίνη στο *A. cytisoides*, αντίθετα στο είδος *A. hermanniae* οι Μαρτίνη και Παπαφωτίου (2016) αναφέρουν ότι το ποσοστό ριζοβολίας κυμάνθηκε από 33 έως 72%. Όσον αφορά τη συγκέντρωση του IBA παρατηρήθηκε ότι αύξησή της στα υποστρώματα οδήγησε σε αύξηση του αριθμού των ριζών με ταυτόχρονη μείωση του μήκους τους. Αυτή η αρνητική σχέση μεταξύ του αριθμού και του μήκους των ριζών έχει αναφερθεί επίσης και σε μικρομοσχεύματα άλλων μεσογειακών ειδών, όπως του *Teucrium capitatum* και *Limoniastrum monopetalum* (Martini and Papafotiou, 2020, Papafotiou and Martini. 2016, Salehi, 2006). Αντιθέτως οι Μαρτίνη και Παπαφωτίου (2016), στο συγγενικό είδος *A. hermanniae*, αναφέρουν ότι η αύξηση του IBA οδήγησε τόσο σε αύξηση του αριθμού των

ριζών όσο και στην επιμήκυνση του μήκους τους, κάτι που παρατηρήθηκε και στην παρούσα διατριβή στο είδος *S. hymettia*.

Επιπλέον στα μικρομοσχεύματα από το μέσον του μικροβλαστού παράλληλα με τη ριζοβολία παρατηρήθηκε και έκπτυξη πλάγιων βλαστών (2 - 3 βλαστοί/μικρομόσχευμα), με αποτέλεσμα τη δημιουργία πολύκλαδων φυταρίων προς εγκλιματισμό, τα οποία δύνανται να έχουν πλατύτερη κόμη φυτού χωρίς κορυφολόγημα.

Τα φυτάρια (ριζοβολημένα μικρομοσχεύματα) και των δύο τύπων μικρομοσχευμάτων είτε από καλλιέργεια σποροφύτων, ή από καλλιέργεια νεαρών φυτών αναπτυσσόμενων στο θερμοκήπιο, που μεταφέρθηκαν *ex vitro* σε υπόστρωμα τύρφης - περλίτη 1:1, εγκλιματίστηκαν επιτυχώς σε υψηλό ποσοστό 92 - 98%, διατηρώντας τα χαρακτηριστικά των μητρικών φυτών. Παρόμοιο ποσοστό επιβίωσης έχει αναφερθεί και για το *A. cytisoides* (Gavidia *et al.*, 1997) και το *A. hemanniae* (Μαρτίνη και Παπαφωτίου, 2016).

Ballota acetabulosa

Στη Ελληνική και διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχουν αναφορές, μέχρι και σήμερα σχετικά με τον *in vitro* πολλαπλασιασμό του *B. acetabulosa*.

Όσον αφορά την εγκατάσταση αρχικής *in vitro* καλλιέργειας του *B. acetabulosa* από ενήλικα αυτοφυή φυτά, δεν κατέστη δυνατή, πιθανώς λόγω των πυκνών τριχιδίων που υπάρχουν κατά μήκος όλου του βλαστού που είχε ως αποτέλεσμα την καταστροφή των αρχικών καλλιεργειών λόγω μολύνσεων. Μη εγκατάσταση αρχικής καλλιέργειας έχει αναφερθεί και για άλλα μεσογειακά αρωματικά/φαρμακευτικά φυτά της οικογένειας Lamiales, όπως *Rosmarinus officinalis* (Misra και Chaturvedi, 1984), *Lavandula latifolia* (Sánchez-Gras and Calvo, 1996), *L. stoechas* (Nobre, 1996), που παρουσίασαν επίσης δυσκολίες στη δημιουργία καλλιεργειών από ώριμα μητρικά φυτά, καθώς και το αυτοφυές ξηροφυτικό της Μεσογείου *Teucrium capitatum* (Paparotiou and Martini, 2016).

Η προσπάθεια εγκατάστασης *in vitro* αρχικής καλλιέργειας από νεαρά φυτά που αναπτύσσονταν στο θερμοκήπιο επετεύχθη με πάρα πολύ μικρό ποσοστό αντίδρασης (4 - 8%) σε υπόστρωμα MS χωρίς ή με 1,0 mg L⁻¹ BA ή ZEAT και για τους δύο τύπους εκφύτων (κορυφής και κόμβου), ενώ τα ποσοστά μολύνσεων ήταν 50 - 58%. Οι Paparotiou and Martini (2016) αναφέρουν ότι στο *T. capitatum* αν και μόνο το 10% των εκφύτων που συλλέχθηκαν από φυτά αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο μολύνθηκαν, το ποσοστό αντίδρασης κυμάνθηκε σε χαμηλά ποσοστά (13 - 25%), ανεξάρτητα από το τύπο της κυτοκινίνης στο υπόστρωμα.

Η εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας *B. acetabulosa* με έκφυτα προερχόμενα από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα, δεν παρουσίασε καμία δυσκολία, παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και για άλλα είδη της οικογένειας Lamiaceae, όπως: *Salvia brachyodon* (Mišić, 2006), *Lavandula angustifolia* και *Lavandula latifolia* L. (Al-Bakhit *et al.*, 2007), *Thymbra spicata* L. var. *spicata* L. (Daneshvar-Royandezagh *et al.*, 2009) και *Micromeria juliana* Tošić *et al.* (2015).

Τόσο κατά την αρχική εγκατάσταση όσο κατά το στάδιο του πολλαπλασιασμού του *B. acetabulosa* από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα, παρατηρήθηκε ότι η παρουσία κυτοκινίνης στο υπόστρωμα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις αύξησε το ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς ή υπερενυδατωμένη μάζα και μείωσε το ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς. Επιπλέον στις υψηλότερες συγκεντρώσεις κυτοκινινών παρατηρήθηκε αύξηση των παραχθέντων βλαστών, τόσο των κανονικών όσο και των υπερενυδατωμένων, κυρίως όταν χρησιμοποιήθηκε ZEAT ή BA και στους δύο τύπους εκφύτων (κορυφής ή κόμβου).

Η υπερενυδάτωση παρουσιάζεται συχνά κατά το μικροπολλαπλασιασμό και άλλων ειδών της οικογένειας Lamiaceae όπως *Salvia nemorosa* (Skała and Wysokińska, 2004), *Lavandula dentata* (Echeverrigaray *et al.*, 2005), *Salvia miltiorrhiza* (Chen *et al.*, 2005) και *Salvia guaranitica* (Echeverrigaray *et al.*, 2010), αλλά και σε άλλα ξηροφυτικά είδη, όπως η *Globularia alypum* L. (Bertsouklis *et al.*, 2003), *Lithodora zahnii* (Papafotiou and Kalantzis, 2009), *Anthyllis barba-jovis* (Trigka and Papafotiou, 2017). Το ποσοστό υπερενυδάτωσης στα διάφορα είδη εξαρτάται τόσο από τον τύπο της κυτοκινίνης που χρησιμοποιείται όσο και από τη συγκέντρωσή της (Ochatt *et al.*, 2002, Sharma and Mohan, 2006, Ivanova and Van Staden, 2008, Pavlovic *et al.*, 2012, Ravanfar *et al.*, 2014). Έτσι σε διάφορες μελέτες που έχουν γίνει για να περιοριστεί το ποσοστό της υπερενυδάτωσης υποδιπλασιάστηκε η συγκέντρωση της κυτοκινίνης που χρησιμοποιήθηκε, τέτοια παραδείγματα μπορούν να αναφερθούν για τα είδη *Allium sativum*, *Chlorophytum borivilianum* και *Lithodora zahnii* (Sharma and Mohan, 2006, Papafotiou and Kalantzis, 2009, Liu *et al.*, 2017).

Στο υπόστρωμα χωρίς PGR δεν παρατηρήθηκαν υπερενυδατωμένοι βλαστοί όπως παρόμοια έχει αναφερθεί και σε έναν αριθμό άλλων ειδών συμπεριλαμβανομένων των μεσογειακών ξηροφυτικών (Andrade *et al.*, 1999, Ivanova and Van Staden, 2011, Kadota Niimi, 2003). Ωστόσο, αυτό το υπόστρωμα δεν μπορεί να προταθεί για το στάδιο πολλαπλασιασμού του *B. acetabulosa*, καθώς δεν οδήγησε σε υψηλό αριθμό παραχθέντων βλαστών ανά έκφυτο.

Όσον αφορά τις κυτοκινίνες (ZEAT, BA, KIN και 2iP), η ZEAT και το BA αποδείχθηκαν πιο αποτελεσματικές στον πολλαπλασιασμό των βλαστών. Όμως δεδομένου του υψηλού κόστους της ZEAT για τον περαιτέρω πολλαπλασιασμό των καλλιεργειών προτείνεται η χρήση BA, με την προϋπόθεση να αντιμετωπιστεί το φαινόμενο της υπερενυδάτωσης, κάτι το οποίο έγινε και αναφέρετε παρακάτω.

Δεδομένου ότι η συγκέντρωση του άγαρ στο υπόστρωμα μπορεί να παρέμβει στην εμφάνιση υπερενυδάτωσης (Pâques and Boxus, 1987a, Debergh *et al.*, 1992), στην παρούσα έρευνα δοκιμάστηκε η χρήση αυξημένης συγκέντρωσης άγαρ. Τα αποτελέσματα έδειξαν ότι με την αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ μειώθηκε το ποσοστό εκφύτων που σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς, αλλά ταυτόχρονα μειώθηκε και το ποσοστό υπερενυδατωμένων βλαστών. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν επίσης αναφερθεί και για άλλα ξηροφυτικά είδη, όπως η *Lithodora zahni* (Papafotiou and Kalantzis, 2009) και *Globularia alypum* (Bertsouklis *et al.*, 2003).

Στην παρούσα μελέτη η *in vitro* ριζοβολία των μικρομοσχευμάτων από καλλιέργεια σποροφύτων ήταν απολύτως επιτυχής (100%) σε υπόστρωμα πλήρους δύναμης MS χωρίς ή με 0,5 - 4,0 mg L⁻¹ IBA, σε συνεχή εφαρμογή για έξι εβδομάδες, ανεξάρτητα από την προέλευσής τους (από το κορυφαίο τμήμα και από το μεσαίο τμήμα του μικροβλαστού). Το μεγαλύτερο αριθμό ριζών έδωσε το υπόστρωμα με συγκέντρωση 0,5 ή 1,0 mg L⁻¹ IBA και για τους δύο τύπους μικρομοσχευμάτων, ενώ το υπόστρωμα με 0,0 ή 4,0 mg L⁻¹ IBA έδωσε λιγότερες ρίζες μικρότερου μήκους. Επιπλέον στα μικρομοσχεύματα από το μέσου του μικροβλαστού παράλληλα με τη ριζοβολία παρατηρήθηκε και έκπτυξη πλάγιων βλαστών (2 - 7 βλαστοί/μικρομόσχευμα), με αποτέλεσμα τη δημιουργία πολύκλαδων φυταρίων έτοιμων για εγκλιματισμό, με το πλεονέκτημα της αποφυγής πιθανού κορυφολογήματος για απόκτηση συμπαγούς φυτού.

Παράλληλα η *in vitro* ριζοβολία των συστάδων μικροβλαστών από καλλιέργεια σποροφύτων ήταν πετυχημένη (100%) σε υπόστρωμα μισής δύναμης MS χωρίς IBA ή με 0,5 - 4,0 mg L⁻¹ IBA, σε συνεχή εφαρμογή για έξι εβδομάδες. Επιπλέον παρατηρήθηκε ότι η αύξηση της συγκέντρωσης του IBA στα υποστρώματα οδήγησε σε αύξηση του αριθμού των ριζών χωρίς όμως να επηρεαστεί το μήκος τους. Παρόμοιο αποτέλεσμα έχει αναφερθεί για το είδος *Dianthus caryophyllus* (Salehi, 2006).

Τα φυτάρια (ριζοβολημένα μικρομοσχεύματα) και των δύο τύπων μικρομοσχευμάτων και οι συστάδες μικροβλαστών από καλλιέργεια σποροφύτων, που μεταφέρθηκαν *ex vitro*, εγκλιματίστηκαν επιτυχώς (100%) σε υπόστρωμα τύρφης - περλίτη 1:1.

Clinopodium creticum* και *Clinopodium nepeta

Όσον αφορά τον *in vitro* μικροπολλαπλασιασμό των ειδών *Clinopodium creticum* και *Clinopodium nepeta* στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχει μόνο μια αναφορά η οποία αφορά στο είδος *C. nepeta* (Pistelli *et al.*, 2013).

Η αρχική *in vitro* καλλιέργεια του *C. creticum* από ενήλικα φυτά, εγκαταστάθηκε σε σχετικά υψηλό ποσοστό (ποσοστό μολύνσεων 15 - 38%, αντίδραση εκφύτων 53 - 79%, 3 - 4 βλαστοί ανά έκφυτο) σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με 1,0 mg L⁻¹ ZEAT και για τους δύο τύπους εκφύτου (κορυφής και κόμβου), ενώ το συγγενικό είδος *C. nepeta* εγκαταστάθηκε σε υψηλότερο ποσοστό σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με 1,0 mg L⁻¹ BA. Οι Pistelli *et al.* (2013) για την αρχική εγκατάσταση του *C. nepeta* χρησιμοποίησαν υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με 0,5 mg L⁻¹ BA, όπως και οι Papafotiou *et al.*, 2017 σε αρκετά ξηροφυτικά είδη της Μεσογειακής χλωρίδας συμπεριλαμβανομένων και μερικών ειδών της οικογένειας Lamiaceae, που αντέδρασαν επιτυχέστερα σε θρεπτικό υπόστρωμα με χαμηλές συγκεντρώσεις BA (0,25 - 0,5 mg L⁻¹). Άλλα είδη της οικογένειας Lamiaceae όπως για παράδειγμα για τα είδη *Mentha piperita* και *Ocimum gratissimum* (Saha *et al.*, 2010, 2012), παρουσίασαν καλύτερη αντίδραση σε υπόστρωμα που περιείχε υψηλότερη συγκέντρωση BA (1,0 - 2,0 mg L⁻¹).

Η εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας τόσο του *C. creticum* όσο και του *C. nepeta* με έκφυτα προερχόμενα από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα, δεν παρουσίασε καμία δυσκολία. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και για το συγγενικό είδος *C. odorum* (Diaz *et al.*, 2012), άλλα και για άλλα είδη της οικογένειας Lamiaceae, όπως *Salvia brachyodon* (Mišić, 2006), *Lavandula angustifolia* και *Lavandula latifolia* L. (Al-Bakhit *et al.*, 2007), *Thymbra spicata* L. var. *spicata* L. (Daneshvar-Royandezagh *et al.*, 2009) και *Micromeria juliana* Tošić *et al.* (2015).

Όσον αφορά τον πολλαπλασιασμό των βλαστών του *C. creticum* και του *C. nepeta* είτε από ενήλικα φυτά ή από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα, παρατηρήθηκε ότι η παρουσία κυτοκινίνης στο υπόστρωμα σε υψηλότερες συγκεντρώσεις, αύξησε το ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς και μείωσε το ποσοστό αυτών που σχημάτισαν υπερενυδατωμένους μαζί με μη υπερενυδατωμένους βλαστούς. Επιπλέον στις υψηλότερες συγκεντρώσεις κυτοκινινών παρατηρήθηκε αύξηση των παραχθέντων βλαστών, τόσο των κανονικών όσο και των υπερενυδατωμένων, κυρίως όταν χρησιμοποιήθηκε ZEAT ή BA. Όπως αναφέρθηκε και ανωτέρω, στα άλλα είδη που συζητήθηκε ο *in vitro* πολλαπλασιασμός τους, η υπερενυδάτωση παρουσιάζεται συχνά κατά την *in vitro* καλλιέργεια και άλλων Μεσογειακών ειδών, όπως η *Anthyllis cytisoides*

(Gavidia *et al.*, 1997), *Globularia alypum* L. (Bertsouklis *et al.*, 2003), *Lithodora zahni* (Papafotiou and Kalantzis, 2009), *Anthyllis barba-jovis* (Trigka and Papafotiou, 2017).

Στο υπόστρωμα χωρίς PGR δεν παρατηρήθηκαν υπερενυδατωμένοι βλαστοί σύμφωνα με παρόμοια αποτελέσματα και σε έναν αριθμό άλλων ειδών συμπεριλαμβανομένων μεσογειακών ξηροφυτικών (Andrade *et al.*, 1999, Ivanova and Van Staden, 2011, Kadota Niimi, 2003). Ωστόσο, αυτό το υπόστρωμα δεν μπορεί να προταθεί για το στάδιο πολλαπλασιασμού του *C. nepeta*, καθώς δεν οδήγησε σε υψηλό αριθμό παραχθέντων βλαστών ανά έκφυτο.

Σε ότι αφορά το είδος της κυτοκινίνης (ZEAT, BA, KIN και 2iP), η ZEAT και το BA αποδείχθηκαν πιο αποτελεσματικές στον πολλαπλασιασμό των βλαστών, με τη ZEAT να συνιστάται λόγω χαμηλότερου κόστους.

Για την αντιμετώπιση και εξάλειψη της υπερενυδάτωσης αρχικά εξετάστηκε η πιθανή λύση της χρήσης χαμηλής συγκέντρωσης NAA σε συνδυασμό με BA. Η προσθήκη 0,1 ή 0,5 mg L⁻¹ NAA στα υποστρώματα με χαμηλότερες συγκεντρώσεις BA (0,5 ή 1,0 mg L⁻¹) οδήγησε στην εξάλειψη των υπερενυδατωμένων βλαστών τόσο στα έκφυτα προερχόμενα από καλλιέργεια ενήλικων φυτών όσο και στα έκφυτα προερχόμενα από καλλιέργεια σποροφύτων και για το *C. creticum* και για το *C. nepeta*. Στα υποστρώματα που περιείχαν BA σε σχετικά υψηλή συγκέντρωση (2,0 ή 4,0 mg L⁻¹) η προσθήκη 0,1 mg L⁻¹ NAA μείωσε ελάχιστα την εμφάνιση υπερενυδατωμένων βλαστών σε σύγκριση με τα υποστρώματα που περιείχαν BA χωρίς NAA, ενώ η προσθήκη 0,5 mg L⁻¹ NAA εξάλειψε την εμφάνιση υπερενυδατωμένων βλαστών. Τέλος στα υποστρώματα που περιείχαν 8,0 mg L⁻¹ BA η προσθήκη NAA μείωσε την εμφάνιση υπερενυδατωμένων βλαστών αλλά δεν ήταν ικανή να την εξαλείψει.

Δεδομένου ότι η συγκέντρωση του άγαρ στο υπόστρωμα μπορεί να παρέμβει στην εμφάνιση υπερενυδάτωσης μέσω της ρύθμισης του υδατικού δυναμικού του υποστρώματος, της διάχυσης των μικροστοιχείων και της πρόσληψης των κυτοκινινών από τα έκφυτα (Pâques and Boxus, 1987a, Debergh *et al.*, 1992), δοκιμάστηκε η αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ από 8 g L⁻¹ σε 12 g L⁻¹. Ως αποτέλεσμα η αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ επέφερε μια αντίστροφη συσχέτιση με τη συχνότητα της υπερενυδάτωσης και στα δύο είδη *Clinopodium* που μελετήθηκαν. Δηλαδή η αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ, εξάλειψε το ποσοστό των εκφύτων που σχημάτισαν μόνο υπερενυδατωμένους βλαστούς και μείωσε των αριθμών των υπερενυδατωμένων βλαστών τόσο στα έκφυτα προερχόμενα από καλλιέργεια ενήλικων φυτών όσο και στα έκφυτα προερχόμενα από καλλιέργεια σποροφύτων. Η αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ έχει αναφερθεί να μειώνει το ποσοστό

σηματισμού υπερενυδατωμένων βλαστών σε *in vitro* καλλιέργειες και άλλων Μεσογειακών ειδών όπως τα *Lithodora zahnii* (Papafotiou and Kalantzis, 2009) και *Globularia alypum* (Bertsouklis *et al.*, 2003).

Συγκρίνοντας τις δύο μεθόδους για την αντιμετώπιση της υπερενυδάτωσης, τόσο η αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ όσο και η προσθήκη χαμηλής συγκέντρωσης αυξίνης στο υπόστρωμα ήταν εξίσου αποτελεσματικές στη μείωση της υπερενυδάτωσης.

Η *in vitro* ριζοβολία των μικρομοσχευμάτων από το κορυφαίο τμήμα, μαζί με το επάκριο μερίστωμα ήταν πετυχημένη σε υπόστρωμα μισής δύναμης MS χωρίς IBA ή με 0,5 - 4,0 mg L⁻¹ IBA σε συνεχή εφαρμογή για έξι εβδομάδες και για τα δύο είδη, ανεξάρτητα από την προέλευση των μικρομοσχευμάτων (ενήλικα φυτά ή σπορόφυτα). Η χρήση πλήρους δύναμης MS ιδιαίτερα όταν συνδυάστηκε με IBA μείωσε το ποσοστό ριζοβολίας των μικρομοσχευμάτων, καθώς και τον αριθμό και το μήκος των ριζών. Οι Pistelli *et al.* (2013) αναφέρουν ότι τα μικρομοσχεύματα από το κορυφαίο τμήμα, μαζί με το επάκριο μερίστωμα του *C. nepeta* ριζοβόλησαν 100% σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με 0.2 mg L⁻¹ NAA, ενώ οι Diaz *et al.* (2012) για το είδος *C. odorum* αναφέρουν ότι επετεύχθη ριζοβολία σε υψηλό ποσοστό (90%) όταν τα έκφυτα τοποθετούνταν στα υποστρώματα υποκαλλιέργειας είτε αυτά είχαν εμπλουτιστεί ή όχι με PGRs, γεγονός που υποδηλώνει ότι η παρουσία NAA στα υποστρώματα δεν είναι απαραίτητη για τη ριζοβολία, όπως διαπιστώθηκε και σε όλα τα είδη πλην του *S. hymettia*, που μελετήθηκαν στην παρούσα Διατριβή.

Επίσης η *in vitro* ριζοβολία των συστάδων μικροβλαστών και των δύο ειδών, τόσο από καλλιέργεια ενήλικων φυτών όσο και από καλλιέργεια σποροφύτων ήταν πετυχημένη σε υπόστρωμα μισής δύναμης MS, λόγω του υψηλού ποσοστού ριζοβολίας (96-97%) που παρατηρήθηκε και του υψηλού αριθμού παραχθέντων ριζών.

Ο εγκλιματισμός των φυταρίων (ριζοβολημένων μικρομοσχευμάτων) τόσο του *C. creticum* όσο και του *C. nepeta*, σε *ex vitro* συνθήκες έγινε χωρίς ιδιαίτερα προβλήματα και τα φυτάρια επιβίωσαν σε πολύ υψηλό ποσοστό (80 - 90%), ανεξάρτητα από την προέλευση των μικρομοσχευμάτων (ενήλικα φυτά ή σπορόφυτα), διατηρώντας τα χαρακτηριστικά των μητρικών φυτών. Επίσης, οι συστάδες βλαστών τόσο από την καλλιέργεια σποροφύτων όσο από την καλλιέργεια ενήλικων νεαρών φυτών εγκλιματίστηκαν σε ποσοστό 100%. Υψηλό ποσοστό (85%) εγκλιματισμού αναφέρουν και οι Diaz *et al.* (2012) για φυτάρια του είδους *C. odorum*, μετά από ένα μήνα από την τοποθέτησή τους σε μίγμα χώματος κήπου με άμμο (2:1).

Scabiosa hymettia

Δεδομένου της ελλειπούς πληροφόρησης στη βιβλιογραφία μέχρι και σήμερα για τον *in vitro* μικροπολλαπλασιασμό του είδους *S. hymettia*, στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν έγιναν προσπάθειες διερεύνησης του μικροπολλαπλασιασμού του είδους ξεκινώντας τόσο από ενήλικα φυτά όσο και από σπορόφυτα.

Στην αρχική εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργεια του *S. hymettia* με έκφυτα προερχόμενα από ενήλικα αυτοφυή φυτά, παρουσιάστηκαν πολλές δυσκολίες, λόγω του υψηλού ποσοστού μολύνσεων. Μετά από πολλές προσπάθειες, εγκαταστάθηκε σε σχετικά υψηλό ποσοστό (αντίδραση εκφύτων 58%) σε υπόστρωμα MS χωρίς PGRs με έκφυτα κορυφής. Όμως λόγω ισχυρής κυριαρχίας της κορυφής παρατηρήθηκε μόνο επιμήκυνση των εκφύτων, παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και για το είδος *Knautia sarajevensis* (Karalija *et al.*, 2017) που ανήκει στην ίδια οικογένεια με το *S. hymettia*. Κατά τις υποκαλλιέργειες το ποσοστό αντίδρασης των εκφύτων κυμάνθηκε από 50 - 100% σε υπόστρωμα μισής ή πλήρους δύναμης MS χωρίς PGRs ή με 0,5 mg L⁻¹ ZEAT, αποτέλεσμα που έρχεται σε αντίθεση με τα αποτελέσματα της έρευνας των Hosoki and Nojima (2004) στο είδος *S. caucasica* cv. *Caucasica Blue*, οι οποίοι δεν παρατήρησαν καμία αντίδραση στο υπόστρωμα MS χωρίς PGRs. Σε όλα τα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν στις διάφορες υποκαλλιέργειες, επίσης παρατηρήθηκε μόνο επιμήκυνση των εκφύτων, με αποτέλεσμα τη μη έκπτυξη περισσότερων βλαστών.

Κατά την αρχική εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας εκφύτων κορυφής από σπορόφυτα αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο το ποσοστό μολύνσεων κυμαινόταν σε υψηλά επίπεδα σε όλα τα υποστρώματα, ενώ από τα έκφυτα που δεν μολύνθηκαν αντέδρασε ένα υψηλό ποσοστό (50 - 70%) σε όλα τα υποστρώματα εκτός από το υπόστρωμα MS χωρίς PGRs ή με 1,0 mg L⁻¹ TDZ όπου δεν παρατηρήθηκε καμία αντίδραση. Στα υποστρώματα που παρατηρήθηκε αντίδραση τα έκφυτα δεν σχημάτισαν νέους βλαστούς αλλά μόνο επιμηκύνθηκαν. Το υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού παρατηρήθηκε στο υπόστρωμα με 1,0 mg L⁻¹ BA, υπόστρωμα που προτάθηκε και από τους Hosoki and Nojima (2004) για την αρχική εγκατάσταση του είδους *S. caucasica* cv. *Caucasica Blue* από μητρικά φυτά που αναπτύσσονταν στο θερμοκήπιο σε ελεγχόμενες συνθήκες. Κατά τις υποκαλλιέργειες το ποσοστό αντίδρασης των εκφύτων ήταν υψηλό (71 - 78%), ενώ δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά στο δυναμικό πολλαπλασιασμού όταν στο υπόστρωμα με BA προστέθηκε και NAA σε χαμηλή συγκέντρωση. Οι Hosoki and Nojima (2004) αναφέρουν ότι κατά το στάδιο πολλαπλασιασμού του *S. caucasica* cv. *Caucasica Blue* ο εμπλουτισμός του υποστρώματος με BA είναι απαραίτητος για την αντίδραση εκφύτων κόμβου, μεσογονατίου, μίσχου ή

μίσχου με φύλλο, ενώ οι Wang *et al.* (2013) για το είδος *S. tschiliensis* αναφέρουν ότι το BA ήταν πιο αποτελεσματικό σε σύγκριση με την KIN και για τους δύο τύπους εκφύτων που δοκίμασαν (φύλλα ή μίσχος).

Λόγω αποτυχίας της βλάστησης των σπόρων *in vitro* δεν κατέστη δυνατή η εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας από σπορόφυτα.

Η *in vitro* ριζοβολία μικρομοσχευμάτων από το κορυφαίο τμήμα του βλαστού, μαζί με το επάκριο μερίστωμα, από την καλλιέργεια που εγκαταστάθηκε από ενήλικα φυτά, ήταν επιτυχής (100%) σε υπόστρωμα $\frac{1}{2}$ MS με $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ IBA, ενώ μεγαλύτερος αριθμός και μήκος ριζών παρατηρήθηκε στη συγκέντρωση $4,0 \text{ mg L}^{-1}$ IBA, όμως στο συγκεκριμένο υπόστρωμα το ποσοστό ριζοβολίας ήταν πολύ χαμηλό (30%). Επιπλέον στο υπόστρωμα με $\frac{1}{2}$ MS χωρίς IBA δεν παρατηρήθηκε ριζοβολία, σε αντίθεση με τα υπόλοιπα είδη που μελετήθηκαν στην παρούσα Διατριβή. Οι Wang *et al.* (2013) αναφέρουν ότι τα μικρομοσχεύματα από το κορυφαίο τμήμα, μαζί με το επάκριο μερίστωμα του είδους *S. tschiliensis*, ριζοβόλησαν σε υψηλό ποσοστό στο υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με $1,0$ ή $2,0 \text{ mg L}^{-1}$ IBA (71 - 74% αντίστοιχα).

Τα φυτάρια (ριζοβολημένα μικρομοσχεύματα), από ενήλικα φυτά, που μεταφέρθηκαν *ex vitro*, εγκλιματίστηκαν επιτυχώς (100%) σε υπόστρωμα τύρφης - περλίτη 1:1. Υψηλό ποσοστό εγκλιματισμού αναφέρουν και οι Hosoki and Nojima (2004) για το είδος *S. caucasica* cv. Caucasica Blue (85 - 90%) σε υπόστρωμα άμμου με μίγμα φλοιού (2:1, v/v) και οι Wang *et al.* (2013) για το είδος *S. tschiliensis* (70%) σε μίγμα τύρφης: βερμικουλίτη: άμμου (4:3:2).

II.II.5. ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

Anthyllis barba-jovis

Για την εγκατάσταση αρχικής *in vitro* καλλιέργειας του *A. barba-jovis* από νεαρά φυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν έκφυτα κορυφής, πρώτου και δεύτερου κόμβου σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με 1,0 ή 1,5 mg L⁻¹ BA. Ενώ για την εγκατάσταση από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα μπορούν να χρησιμοποιηθούν έκφυτα κορυφής ή πρώτου κόμβου ή κοτυληδικού κόμβου σε υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με 0,5 mg L⁻¹ BA, σε συνδυασμό με 0,1 mg L⁻¹ NAA. Στο στάδιο του πολλαπλασιασμού των βλαστών, έκφυτα προερχόμενα από καλλιέργεια ενήλικων φυτών και από καλλιέργεια σποροφύτων ανταποκρίθηκαν με παρόμοιο τρόπο στην *in vitro* καλλιέργεια. Για τον περαιτέρω πολλαπλασιασμό των καλλιεργειών προτείνεται η χρήση υποστρώματος MS εμπλουτισμένο με 4,0 mg L⁻¹ BA σε συνδυασμό με 0,1 mg L⁻¹ NAA και στερεοποιημένο με 12 g L⁻¹ άγαρ τόσο για την καλλιέργεια από νεαρά φυτά όσο και για την καλλιέργεια από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα, καθώς δίνει υψηλότερο αριθμό κανονικών (φυσιολογικών) βλαστών και χαμηλότερο αριθμό υπερενυδατωμένων βλαστών ανά έκφυτο και κατ' επέκταση υψηλότερο δυναμικό πολλαπλασιασμού. Για την *in vitro* ριζοβολία και των δύο τύπων μικρομοσχευμάτων, μόσχευμα κορυφής και μόσχευμα μέσης, τόσο από την καλλιέργεια νεαρών φυτών όσο και από την καλλιέργεια σποροφύτων προτείνεται υπόστρωμα μισής δύναμης MS χωρίς IBA ή με 0,5 - 4,0 mg L⁻¹ IBA για πιο πλούσιο και συμπαγές ριζικό σύστημα, σε συνεχή εφαρμογή για έξι εβδομάδες. Επιπλέον ο εγκλιματισμός των φυταρίων σε συνθήκες *ex vitro* γίνεται χωρίς κανένα πρόβλημα σε μίγμα τύρφης – περλίτη (1:1, v/v).

Ballota acetabulosa

Για την εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας του *B. acetabulosa* από νεαρά φυτά αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο ενδείκνυται η χρήση θεραπευτικού υποστρώματος MS εμπλουτισμένο με 1,0 mg L⁻¹ BA. Ενώ για την εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα προτείνεται το υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με 1,0 mg L⁻¹ BA ή 2,0 mg L⁻¹ KIN. Όσον αφορά το στάδιο του πολλαπλασιασμού των βλαστών, για την απόκτηση περισσότερων φυσιολογικών βλαστών (μη υπερενυδατωμένων) με ελάχιστο αριθμό υπερενυδατωμένων, προτείνεται η χρήση υποστρώματος MS εμπλουτισμένο με 0,5 ή 1,0 mg L⁻¹ BA στερεοποιημένο με 12 g L⁻¹ άγαρ. Για την *in vitro* ριζοβολία και των δύο τύπων μικρομοσχευμάτων, κορυφής και μέσης, προτείνεται υπόστρωμα πλήρους δύναμης

MS με 0,5 - 1,0 mg L⁻¹ IBA σε συνεχή εφαρμογή για έξι εβδομάδες. Ενώ για την *in vitro* ριζοβολία των συστάδων μικροβλαστών προτείνεται υπόστρωμα μισής δύναμης MS με 4,0 mg L⁻¹ IBA σε συνεχή εφαρμογή για έξι εβδομάδες. Επιπλέον ο εγκλιματισμός των φυταρίων σε συνθήκες *ex vitro* γίνεται χωρίς κανένα πρόβλημα σε μίγμα τύρφης – περλίτη (1:1, v/v).

Clinopodium creticum* και *Clinopodium nepeta

Για την εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας του *C. creticum* από ενήλικα φυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν και οι δύο τύποι εκφύτων (κορυφής και κόμβου). Η καλλιέργεια ενδείκνυται να γίνεται σε θρεπτικό υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με 1,0 mg L⁻¹ ZEAT και για τους δύο τύπους εκφύτων. Ενώ για το συγγενικό είδος *C. nepeta* προτείνεται το υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με 1,0 mg L⁻¹ BA. Όσον αφορά το στάδιο του πολλαπλασιασμού των βλαστών και των δύο ειδών, έκφυτα προερχόμενα από καλλιέργεια ενήλικων φυτών και από καλλιέργεια σποροφύτων ανταποκρίθηκαν με παρόμοιο τρόπο στην *in vitro* καλλιέργεια. Για την απόκτηση περισσότερων φυσιολογικών βλαστών (μη υπερενυδατωμένων) με ελάχιστο αριθμό υπερενυδατωμένων, προτείνεται υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με 8,0 mg L⁻¹ BA και άγαρ 12 g L⁻¹ ή με 8,0 mg L⁻¹ BA και 0,1 mg L⁻¹ NAA. Για την *in vitro* ριζοβολία των μικροβλαστών και των συστάδων μικροβλαστών προτείνεται και για τα δύο είδη υπόστρωμα μισής δύναμης MS χωρίς IBA ή με 0,5 - 4,0 mg L⁻¹ IBA σε συνεχή εφαρμογή για έξι εβδομάδες για απόκτηση φυτών με περισσότερους πλάγιους βλαστούς. Ο εγκλιματισμός των φυταρίων σε συνθήκες *ex vitro* γίνεται χωρίς κανένα πρόβλημα σε μίγμα τύρφης – περλίτη (1:1, v/v).

Scabiosa hymettia

Με βάση τα αποτελέσματα αυτής της έρευνας η εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας της *S. hymettia* τόσο από ενήλικα αυτοφυή φυτά, όσο και από σπορόφυτα αναπτυσσόμενα στο θερμοκήπιο ήταν πολύ δύσκολη λόγω του υψηλού ποσοστού μολύνσεων. Προτείνεται η χρήση MS είτε χωρίς PGRs ή με 1,0 mg L⁻¹ BA για αρχική εγκατάσταση. Ως πρωτόκολλο πολλαπλασιασμού προτείνεται υπόστρωμα MS πλήρες ή μισής δύναμης με 1,0 mg L⁻¹ BA με ή χωρίς 0,1 mg L⁻¹ NAA, το οποίο όμως δεν ενδείκνυται για πολλαπλασιασμό του είδους σε επιχειρηματική κλίμακα λόγω του χαμηλού δυναμικού του. Για την *in vitro* ριζοβολία των μικρομοσχευμάτων προτείνεται υπόστρωμα μισής δύναμης MS με 1,0 mg L⁻¹ IBA σε συνεχή εφαρμογή για έξι εβδομάδες.

Ο εγκλιματισμός των φυταρίων σε συνθήκες *ex vitro* γίνεται επιτυχώς σε μίγμα τύρφης – περλίτη (1:1, v/v).

Π.Π.6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Aicha, N., Rachida, T.C. and El Abdelmalek, M. (2013). Micropropagation of *Thymus satureioides* (Coss.) an endangered medicinal plant of Morocco. *Inter. J. Agric. Tech.* 9(2): 487-501.
- Ainaa, O.O., Quesenberry, K.H. and Galloa, M. (2015). Culture vessel and auxin treatments affect *in vitro* rooting and *ex vitro* survival of six *Arachis paraguariensis* genotypes. *Sci. Hortic.* 183: 167-171.
- Al-Bakhit, A.A., Sawwan, J.S. and Al-Mahmoud, M.S. (2007). In vitro propagation of two *Lavandula* species: *Lavandula angustifolia* and *Lavandula latifolia* L. *Medica Jordan J. Agric. Sci.* 3(1): 16-24.
- Al-Khateeb, A.A. (2008). The problems facing the use of tissue culture technique in date palm *Phoenix dactylifera* (L.). *Sci. J. King Faisal Univ.* 9: 85-104
- Al-Qudah, T.S., Shibli, R.A. and Alali, F.Q. (2011). In vitro propagation and secondary metabolites production in wild germander (*Teucrium polium* L.). *In Vitro Cell Dev. Biol. Plant.* 47(4): 496-505.
- Amira, S., Dade, M., Schinella, G. and Ríos, J.L. (2012). Anti-inflammatory, anti-oxidant, and apoptotic activities of four plant species used in folk medicine in the Mediterranean basin. *Pak. J. Pharm. Sci.* 25: 65-72.
- Andrade, L.B., Echeverrigaray, S., Fracaro, F., Pauletti, G.F. and Rota, L. (1999). The effect of growth regulators on shoot propagation and rooting of common lavender (*Lavandula vera* DC). *Plant Cell Tiss. Org.* 56: 79-82.
- Arikat, N.A., Jawad, F.M., Karam, N.S. and Shibli, R.A. (2004). Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticosa* Mill.). *Sci. Hort.* 100(1-4):193-202.
- Azizi, M., Esmaeili, G., Aroei, H. and Samiei, L. (2018). Micropropagation of *Astragalus adscendens*: A source of Gaz-angabin Manna in Iran, Persian Manna.
- Bairu, M.W., Stirk, W.A., Dolezal, K. and Van Staden, J. (2007). Optimizing the micropropagation protocol for the endangered *Aloe polyphylla*: can meta-topolin and its derivatives serve as replacement for benzyladenine and zeatin? *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 90: 15-23
- Bakhtiar, Z., Mirjalili, M.H. and Sonboli, A. (2016). *In vitro* callus induction and micropropagation of *Thymus persicus* (Lamiaceae), an endangered medicinal plant. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* 16(1): 48-54.
- Bennett, I.J., McComb, J.A., Tonkin, C.M. and McDavid, D.A.J. (1994). Alternating cytokinins in multiplication media stimulates *in vitro* shoot growth and rooting of *Eucalyptus globulus* Labill. *Ann. Bot.* 74: 53-58.
- Bertsouklis, K., Papafotiou, M. and Balotis, G. (2003). Effect of medium on *in vitro* growth and *ex vitro* establishment of *Globularia alypum* L. *Acta Hort.* 616: 177-180.
- Canhoto, J.M. (2010). Biotecnologia vegetal, da clonagem de plantas à transformação genética. Imprensa da Universidade de Coimbra.
- Casanova, E., Moysset, L. and Trillas, M.I. (2008). Effect of agar concentration and vessel closure on the organogenesis and hyperhydricity of adventitious carnation shoots. *Biol. Plantarum.* 52(1): 1-8.
- Chakrabarty, D., Park, S.Y., Ali, M.B., Shin, K.S. and Paek, K.Y. (2006). Hyperhydricity in apple: ultrastructural and physiological aspects. *Tree Physiol.* 26: 377-388.
- Chalupa, V. (1988). Large scale micropropagation of *Quercus robur* (L). using adenine-type cytokinins and thidiazuron to stimulate shoot proliferation. *Biol. Plant.* 30(6): 414-421.
- Chawla, H.S. (2009). Introduction to plant biotechnology, 3rd ed. Science Publis. Inc., New Hampshire.
- Chen, U.C., Shiau, Y.J., Tsay, H.S. and Hsia, C.N. (2005). Influence of cytokinin and ventilating container closure on shoot proliferation and hyperhydricity of *in vitro* *Salvia miltiorriza* culture. *J. Taiwan Agric. Res.* 54: 93-102.
- Conforti, F., Marrelli, M., Statti, G., Menichini, F., Uzunov, D., Solimene, U. and Menichini, F. (2012). Comparative chemical composition and antioxidant activity of *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp. *glandulosa* (Req.) Nyman and *Calamintha grandiflora* (L.) Moench (Labiatae). *Nat. Prod. Res.* 25: 91-97.
- Couladis, M., Tzakou, O., Verykokidou, E. and Harvala, C. (2003). Screening of some Greek aromatic plants for antioxidant activity. *Phytother. Res.* 17: 194-195.
- Daneshvar-Royandezagh, S., Khawar, K.M. and Ozcan, S. (2009). *In Vitro* micropropagation of garden thyme (*Thymbra Spicata* L. Var. *Spicata* L.) collected from southeastern turkey using cotyledon node. *Biotechnol. Equip.* 23(3): 1319-1321.
- Debergh, P., Aitken-Christie, J., Cohen, D., Grout, B., Von Arnold, S., Zimmerman, R. and Ziv, M. (1992). Reconsideration of the term 'vitrification' as used in micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 30: 135-140.
- Dewir, Y.H., Chakrabarty, D., Ali, M.B., Hahn, E.J. and Paek, K.Y. (2006). Lipid peroxidation and antioxidant enzyme activities of *Euphorbia milii* hyperhydric shoots. *Environ. Exp. Bot.* 58: 93-99.

- Diaz, M.S., Palacio, L., Figueroa, A.C. and Goleniowski, M.E. (2012). *In vitro* propagation of muna-muna (*Clinopodium odorum* (Griseb.) Harley). Biotechnol. Res. In.
- Diogo, M.G., Seco, M.F., Moldão-Martins, M., Alves, V., Coelho, M.T., Gonçalves, J.C. and Canavarro, M.C. (2013). Micropropagation of *Pterospartum tridentatum* (L.) Willk–Multiplication Phase. Acta Hort. 990: 391-396.
- Doneso, I. (1987). Factors influencing vitrification of carnation and conifers. Acta Hort. 212: 67-176.
- Dulger, B. and Sener, A. (2010). Evaluation of antimicrobial activity of *Ballota acetabulosa*. African J. Microbiol. Res. 4: 1235-1238.
- Echeverrigaray, S. Basso, R. and Andrade, L.B. (2005). Micropropagation of *Lavandula dentata* from axillary buds of field-grown adult plants. Biol. Plant. 49: 439-442.
- Echeverrigaray, S., Carrer, R.P. and Andrade, L.B. (2010). Micropropagation of *Salvia guaranitica* Benth. through axillary shoot proliferation. Braz. Arch. Biol. Technol. 53(4): 883-888.
- Echeverrigaray, S., Carrer, R.P. and Andrade, L.B. (2010). Micropropagation of *Salvia guaranitica* Benth. through axillary shoot proliferation. Braz. Arch. Biol. Technol. 53(4): 883-888.
- Edwin, F. George, Michael, A. Hall and Geert-Jan De Klerk. (2007). Plant growth regulators II: Cytokinins, their analogues and antagonists.
- El Bouzdoudi, B., Saïdi, R., El Ansari, Z.N., L’bachir El Kbiach, M., Martin, P., Badoc, A. and Lamarti, A. (2017). Micropropagation of carob (*Ceratonia siliqua* L.) through adventitious buds of immature embryonic cotyledons. Am. J. Plant Sci. 8(09): 2180.
- El-Gengaihi, S., Taha, H.S. and Kamel, A.M. (2006). *In vivo* and *in vitro* comparative studies of *Origanum* species. J. Food Agri. Environ. 4(3/4): 127.
- Esmaeili, G., Azizi, M., Aroei, H. and Samiei, L. (2016). Micropropagation of *Astragalus adscendens*: A source of Gaz-angabin Manna in Iran, Persian Manna.
- Farooq, A., Mandal, B.B. and Sandhya, G. (2008). Effect of some growth regulators on rooting of carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) under *in vitro* condition. Appl. Biol. Res. 10: 193-201.
- Fki, L., Bouaziz, N., Kriaa, W., Benjemaa-Masmoudi, R., Gargouri-Bouزيد, R., Rival, A. and Drira, N. (2011). Multiple bud cultures of ‘Barhee’ date palm (*Phoenix dactylifera*) and physiological status of regenerated plants. J. Plant Physiol. 168: 1694-1700.
- Frank, T., Kavers, C., Gaspar, T., Dommes, J., Deby, C., Greimess, R., Didier, S. and Duspont, G.D. (2004). Hyperhydricity of *Prunus avium* shoots cultured on gelreite: a controlled stress response. Plant Physiol. Biochem. 42: 519-527.
- Furmanowa, M. and Olszowska, O. (1992). Micropropagation of thyme (*Thymus vulgaris* L.). In: High-Tech and Micropropagation III. 230-243. Springer, Berlin, Heidelberg.
- Gaspar, T. (1987). Vitrification: morphological, physiological, and ecological aspects. In: Bonga, J.M. and Durzan, D.J. (eds). Cell and tissue culture in forestry. General principles and biotechnology. Martinus Nijhoff, Dordrecht. 152-166.
- Gaspar, T., Kevers, C., Penel, C., Greppin, H., Reid, D.M. and Thorpe, T.A. (1996). Review. Plant hormones and plant growth regulators in plant tissue culture. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 32: 272-289.
- Gavidia, I., Zaragoza, C., Segura, J. and Perez-Bermudez, P. (1997). Plant regeneration from juvenile and adult *Anthyllis cytisoides*, a multipurpose leguminous shrub. J. Plant Physiol. 150: 714-718.
- George, E.F. and De Klerk, G.J. (2008). The components of plant tissue culture media. In: Macro and micro-nutrients. In: George, E.F., Hall, M.A. and De Klerk, G.J. (eds.). Plant propagation by tissue culture, 3rd ed. Springer, Dordrecht. 65-114.
- George, E.F. and Debergh, P.C. (2008). Micropropagation: uses and methods. In: George, E.F., Hall, M.A. and De Klerk, G.J. (eds.). Plant propagation by tissue culture, 3rd ed. Springer, Dordrecht. 29-64.
- Georgiou, V., Chimona, C. and Rhizopoulou, S. (2017). Micropropagation of carob tree (*Ceratonia siliqua*): Somatic embryogenesis from immature seeds. World J. Res. Rev. 5(2): 1-4.
- Gribble, K. (1999). The influence of relative humidity on vitrification, growth and morphology of *Gypsophila paniculata* (L.). Plant Growth Regul. 27: 179-188.
- Grzegorzczuk, I. and Wysokińska, H. (2011). A protocol for synthetic seeds from *Salvia officinalis* L. shoot tips. Acta Biol Crac Ser Bot. 53(1): 80-85.
- Hakim, L., Islam, M. R., Mamun, A.N.K., Ahmed, G. and Khan, R. (2010). Clonal propagation of carob (*Ceratonia siliqua* L., Fabaceae). Bangladesh J. Bot. 39(1): 15-19.
- Hazarika, B.N. (2006). Review. Morpho-physiological disorders in *in vitro* culture of plants. Sci. Hortic. 108: 105-120.
- Hill, P., Gutierrez, B., Carmack, L. and Kopp, O.R. (2015). Micropropagation of *Astragalus holmgreniorum* (Holmgren milkvetch), an endemic and endangered species. Plant Cell Tissue and Organ Cult. 121(2): 381-387.
- Hosoki, T. and Nojima, S. (2004). Micropropagation of *Scabiosa caucasica* bieb. cv. Caucasica blue. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 40(5): 482.

- Hsina, T. and El Mtili, N. (2012). Micropropagation of the female tree *Ceratonia siliqua*. Cahiers UAE 6(7): 7-12.
- Huang, L.C., Huang, B.L. and Murashige, T. (1998) A micropropagation protocol for *Cinnamomum camphora*. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 34: 141–146
- Iconomou-Petrovich, G.N. and Nianiou-Obeidat, I. (1998). Micropropagation of *Origanum vulgare* subsp. *hirtum* (Mt. Taygetos). In: Progress in Botanical Research. 509-512. Springer, Dordrecht.
- Irina, G. (2008). Effects of different plant hormones on *Salvia officinalis* cultivated in vitro. Int. J. Botany. 4(4): 430-436.
- Ivanova, M. and Van Staden, J. (2011). Influence of gelling agent and cytokinins on the control of hyperhydricity in *Aloe polyphylla*. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 104:13-21.
- Ivanova, M. and Van Staden, J. (2008). Effect of ammonium ions and cytokinins on hyperhydricity and multiplication rate of *in vitro* regenerated shoots of *Aloe polyphylla*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 92: 227-231.
- Ivanova, M. and Van Staden, J. (2009). Nitrogen source, concentration, and NH₄⁺: NO₃⁻ ratio influence shoot regeneration and hyperhydricity in tissue cultured *Aloe polyphylla*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 99: 167-174.
- Ivanova, M. and Van Staden, J. (2010). Natural ventilation effectively reduces hyperhydricity in shoot cultures of *Aloe polyphylla* Schonland ex Pillans. Plant Growth Regul. 60: 143-150
- Jain, A., Kantia, A. and Kothari, S.L. (2001). *De novo* differentiation of shoot buds from leaf-callus of *Dianthus caryophyllus* (L.) and control of hyperhydricity. Sci. Hort. 87: 319-326.
- Janarthanam, B. and Sumathi, E. (2012). Plantlet regeneration from nodal explants of *Ocimum citriodorum* Vis. Bangladesh J. Sci. Ind. Res. 47: 433-436.
- Javed, S.B., Anis, M., Khan, P.R. and Aref, I.M. (2013). *In vitro* regeneration and multiplication for mass propagation of *Acacia ehrenbergiana* Hayne: a potential reclament of denude arid lands. Agrofor. Syst. 87(3): 621-629.
- Jouanneau, J.P. (1970). Renouvellement des protéines et effet spécifique de la kinétine sur des cultures de cellules de tabac. Physiol. Plant. 23: 232-244.
- Jouanneau, J.P. (1971). Contrôle par les cytokinines de la synchronisation des mitoses dans les cellules de tabac. Exp. Cell Res. 67: 329-337.
- Jouanneau, J.P. (1975). Protein synthesis requirement for the cytokinin effect upon tobacco cell division. Exp. Cell Res. 91: 184-190.
- Juncker, B. and Favre, J.M. (1989). Clonal effects in propagating oak trees via *in vitro* culture. Plant Cell Tissue and Organ Cult. 19: 267-276.
- Kadota, M. and Niimi, Y. (2003). Effects of cytokinin types and their concentrations on shoot proliferation and hyperhydricity in vitro pear cultivar shoots. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 72: 261-265.
- Karalija, E., Zeljković, S.C., Tarkowski, P., Muratović, E. and Parić, A. (2018). Media composition affects seed dormancy, apical dominance and phenolic profile of *Knautia sarajevensis* (Dipsacaceae), Bosnian endemic. Acta Bot. Croat. 77(1): 70-79.
- Kataeva, N.V., Alexandrova, I.G., Butenko, R.G. and Dragavtceva, E.V. (1991). Effect of applied and internal hormones on vitrification and apical necrosis of different plants cultured *in vitro*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 27: 149-154.
- Kevers, C. and Gaspar, T. (1985). Vitrification of carnation in vitro: changes to ethylene production, ACC level and capacity to convert ACC to ethylene. Plant Cell Tissue Organ Cult. 4: 215-223.
- Kevers, C., Frank, T., Strasser, R.J., Dommès, J. and Gaspar, T. (2004). Hyperhydricity of micropropagated shoots: a typically stress-induced change of physiological state. Plant Cell Tissue Organ Cult. 77: 181-191.
- Kharrazi, M., Nemati, H., Tehranifar, A., Bagheri, A. and Sharifi, A. (2011). *In Vitro* Culture of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) Focusing on the problem of vitrification. J. Biol. Environ. Sci. 5(13): 1-6.
- Kharrazi, M., Nemati, H., Tehranifar, A., Bagheri, A. and Sharifi, A. (2011). *In Vitro* Culture of Carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) focusing on the problem of vitrification. J. Biolog. Environ. Sci. 5: 1-6.
- Kozai, T., Kitaya, Y., Fujiwara, K. and Adelberg, J. (1995). Environmental control for large scale production of *in vitro* plantlets. In: Terzi, M., Cella, R. and Falavigna, A. (ed.). Current issues in plant molecular and cellular biology. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 947-955.
- Kulaeva, O.N. (1980). Cytokinin action on enzyme activities in plants. pp. 119-128 in Skoog F. (ed.) 1980 (q.v.).
- Lai, C.C., Lin, H.M., Nalawade, S.M., Fang, W. and Tsay, H.S. (2005). Hyperhydricity in shoot cultures of *Scrophularia yoshimurae* can be effectively reduced by ventilation of culture vessels. J. Plant Physiol. 162: 355-361.
- Lane, W.D. (1992). Micropropagation of apple (*Malus domestica* Borkh.). In: Bajaj, Y.P.S. (ed). Biotechnology in agriculture and forestry, vol. 18. High-tech and micropropagation II. Springer-Verlag, Berlin. 229-243.

- Lee, Y.H., Kim, H.S., Kim, M.S., Kim, Y.S., Joung, H. and Jeon, J.H. (2009). Reduction of shoot hyperhydricity in micropropagated potato plants via antisense inhibition of a chCu/ZnSOD gene. *J. Korean Soc. Appl. Biol. Chem.* 52: 397-400.
- Liu, M., Jiang, F., Kong, X., Tian, J., Wu Z. and Wu, Z. (2017). Effects of multiple factors on hyperhydricity of *Allium sativum* L. *Sci. Hortic.* 217: 285-296.
- Lucchesini, M., Bertoli, A., Mensuali-Sodi, A., Cappelli, E., Noccioli, C., Luciardi, L. and Pistelli, L. (2010). *Cytisus aeolicus* Guss. ex Lindl. in vitro cultures and genistin production. *Open Life Sci.* 5(1): 111-120.
- Lucchesini, M., Monteforti, G., Mensuali-Sodi, A. and Serra, G. (2006). Leaf ultrastructure, photosynthetic rate and growth of myrtle plantlets under different *in vitro* culture conditions. *Biol. Plant.* 50: 161-168.
- Łuczkiwicz, M. and Piotrowski, A. (2005). Two-stage system for micropropagation of several *Genista* plants producing large amounts of phytoestrogens. *Z. Naturforsch C.* 60(7-8): 557-566.
- Machakova, I., Zazimalova, E. and George, E.F. (2008). Plant growth regulators I: Introduction; auxins, their analogues and inhibitors. In: George, E.F., Hall, M.A. and De Klerk, G.J. (eds.). *Plant propagation by tissue culture*, 3rd ed. Springer, Dordrecht. 175-204.
- Majada, J.P., Sierra, M.I. and Sánchez-Tamés, R. (2001). Air exchange rate affects the *in vitro* developed leaf cuticle of carnation. *Sci. Hort.* 87: 121-130.
- Majada, J.P., Tadeo, F., Fal, M.A. and Sanchez-Tames, R. (2000). Impact of culture vessel ventilation on the anatomy and morphology of micropropagated carnation *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 63: 207-214.
- Makunga, N.P. and Van Staden, J. (2008). An efficient system for the production of clonal plantlets of the medicinally important aromatic plant: *Salvia africana-lutea* L. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 92(1): 63-72.
- Mallait, M. (1988). Diversification des fleurs coupées par les plantes vivaces: La Scabieuse du Caucase; une espèce à promouvoir pour le plein champ. *P.H.M.-Revue Horticole.* 284: 51-53.
- Manzanera, J.A. and Pardos, J.A. (1990). Micropropagation of juvenile and adult *Quercus ruber* (L.). *Plant Cell Tissue and Organ Cult.* 21: 1-8.
- Marin, A., Gella, R. and Herrero, M. (1988). Stomatal structure and functioning as a response to environmental changes in acclimatized micropropagated *Prunus cerasus*. *L. Ann. Bot.* 62: 663-670.
- Marks, T.R. and Myers, P.E. (1992). Effect of explant location upon early culture development *in vitro*. *J. Hortic. Sci.* 67(5): 583-591.
- Marks, T.R. and Myers, P.E. (1992). Evidence for bud origin influencing performance during micropropagation. *Acta Hortic.* 314: 205-212.
- Martini, A.N. and Papafotiou, M. (2011). Effect of thidiazuron on blastogenesis and subsequent rhizogenesis of *XMalosorbus florentina* Zucc. *Acta Hortic.* 923: 169-176.
- Martini, A.N. and Papafotiou, M. (2020). *In vitro* propagation and NaCl tolerance of the multipurpose medicinal halophyte *Limoniastrum monopetalum*. *HortScience.*, 55(4): 436-443.
- McCown, B.H. and Lloyd, G. (1981). Woody plant medium (WPM), a revised mineral formulation for micro-culture of woody plant species. *HortScience.* 16: 453.
- Miladinović, D.L., Ilić, B.S., Mihajilov-Krstev, T.M., Nikolić, N.D., Miladinović, L.C. and Cvetković, O.G. (2012). Investigation of the chemical composition-antibacterial activity relationship of essential oils by chemometric methods. *Anal. Bioanal. Chem.* 403: 1007-1018.
- Millam, S. (2011). *Plant Tissue Culture, Development and Biotechnology*. Edited by RN Rignano and DJ Gray. Boca Raton, FL, USA: CRC Press/Taylor and Francis Group (2010), pp. 33-39.
- Misic, D., Grubisic, D. and Konjevic, R. (2006). Micropropagation of *Salvia brachyodon* through nodal explants. *Biol. Plantarum.* 50(3): 473-476.
- Misra, P. and Chaturvedi, H.C. (1984). Micropropagation of *Rosmarinus officinalis* L. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* 3: 163-168.
- Monteuuis, O., Galiana, A. and Goh, D. (2012). *In vitro* propagation of *Acacia mangium* and *A. mangium* × *A. auriculiformis*. In *Protocols for Micropropagation of Selected Economically-Important Horticultural Plants*, Humana Press, Totowa, NJ, pp: 199-211.
- Morone Fortunato, I., Ruta, C. and Tagarelli, A. (2006). Different species of broom and related propagation protocols [*Cytisus scoparius* (L.) Link; *Spartium junceum* L.; *Genista aspalathoides* Lam.; *Calicotome spinosa* (L.) Link]. *Italus Hortus* (Italy).
- Murashige, T. (1979). Principles of rapid propagation, p. 14-24. In: K.W. Hughes, R. Henke, and M. Constantin (eds). *Propagation of higher plants through tissue culture: A bridge between research and application*. Tech. Information Center, U.S. Dept. of Energy.
- Murashige, T. and Skoog, F. (1962). A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco cultures. *Physiol. Plant.* 15: 473-497.
- Musarurwa, H.T., van Staden, J. and Makunga, N.P. (2010). *In vitro* seed germination and cultivation of the aromatic medicinal *Salvia stenophylla* (Burch. ex Benth.) provides an alternative source of α -bisabolol. *Plant Growth Regul.* 61(3): 287-295.

- Mylona, P. and Dolan, L. (2002). The root meristem. In: McManus, M.T. and Weit, B.E. (eds). Meristematic tissues in plant growth and development. Sheffield Academic, Sheffield. 279-292.
- Naghmouchi, S., Khoudja, M. L., Romero, A. and Boussaid, M. (2012). Micropropagation of carob, *Ceratonia siliqua* L., by apex culture: Micropropagation du caroube, *Ceratonia siliqua* L., par cultures de méristèmes. *Acta Bot. Gall.* 159(3): 357-361.
- Nichols, D. (1992). *Scabiosa*, *Scabiosa columbaria*. *Plant Varieties J.* 4: 20-21.
- Nobre, J. (1996). *In vitro* cloning and micropropagation of *Lavandula stoechas* from field-grown plants. *Plant cell Tiss. Org. cult.* 46: 151-155.
- Ochatt, S.J., Muneaux, E., Machado, C., Jacas, L. and Pontecaille, C. (2002). The hyperhydricity of *in vitro* regenerants of grass pea (*Lathyrus sativus* L.) is linked with an abnormal DNA content. *J. Plant Physiol.* 159: 1021-1028.
- Olmos, E., Piqueras, A., Martinez-Solano, J.R. and Hellin, E. (1997). The subcellular localization of peroxidase and the implication of oxidative stress in hyperhydrated leave of regenerated carnation shoots. *Plant Sci.* 130: 97-105.
- Oluk, E.A. and Çakýr, A. (2009). Micropropagation of *Origanum sipyleum* L., an endemic medicinal herb of Turkey. *Afr. J. Biotechnol.* 8(21).
- Orlikowska, T. (1987). Vitrification problem in the *in vitro* culture of fruit tree rootstocks. *Acta Hortic.* 212: 239-244.
- Ozudogru, E.A., Kaya, E., Kirdok, E. and 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(2): 309-320.
- Papafotiou, M. and Kalantzis, A. (2009). Studies on *in vitro* propagation of *Lithodora zahnii*. *Acta Hortic.* 813: 465-470.
- Papafotiou, M. and Martini, A.N. (2016). *In vitro* seed and clonal propagation of the Mediterranean aromatic and medicinal plant *Teucrium capitatum*. *HortScience.* 51(4): 403-411.
- Papafotiou, M., Martini, A.N. and Vlachou, G. (2017). *In vitro* propagation as a tool to enhance the use of native ornamentals in archaeological sites of Greece. *Acta Hortic.* 1155: 301-308.
- Pâques, M. and Boxus, Ph. (1987a). Vitrification: A phenomenon related to tissue water content. *Acta Hortic.* 212: 245-252.
- Pâques, M. and Boxus, Ph. (1987b). Vitrification: Review of literature. *Acta Hortic.* 212: 155-166.
- Park, S.W., Jeon, J.H., Kim, H.S., Park, Y.M., Aswath, C. and Joung, H. (2004). Effect of sealed and vented gaseous microenvironments on the hyperhydricity of potato shoots *in vitro*. *Sci. Hortic.* 99: 199-205.
- Pavlović, S., Adžić, S., Cvikić, D., Zdravković, J. and Zdravković, M. (2012). *In vitro* culture as a part of *Brassica oleracea* var. *capitata* L. breeding. *Genetika.* 44(3): 611-618.
- Perry, P.L., Ueno, K. and Shetty, K. (1999). Reversion to hyperhydration by addition of antibiotics to remove *Pseudomonas* in unhyperhydrated oregano tissue culture. *Process Biochem.* 34: 717-723.
- Phan, C.T. and Letouze, R. (1983). A comparative study of chlorophyll, phenolic and protein contents, and hydroxycinnamate. CoA ligase activity. *Plant Sci. Lett.* 36: 323-327.
- Phitos, D., Constantinidis, T. and Kamari, G. (2009). The red data book of rare and threatened plants of Greece, Vol. II (E-Z), Hellenic Botanical Society (HBS). Patra. 287-288.
- Picoli, E.A., Otoni, W.C., Figueira, M.L., Carolino, S.M., Almeida, R. S., Silva, E. A., Carvalho, C.R. and Fontes, E.P. (2001). Hyperhydricity in *in vitro* eggplant regenerated plants: structural characteristics and involvement of BiP (Binding Protein). *Plant Sci.* 160(5): 857-868.
- Piqueras, A., Cortina, M., Serna, M.D. and Casas, J.L. (2002). Polyamines and hyperhydricity in micropropagated carnation plants. *Plant Sci.* 162: 671-678.
- Pistelli, L., Nocchioli, C., Angiolillo, F.D. and Pistelli, L. (2013). Composition of volatile in micropropagated and field grown aromatic plants from Tuscany Islands. *Acta Biochim. Pol.* 60(1): 43-50.
- Preece, J. (2008). Stock plant physiological factors affecting growth and morphogenesis. In: George, E.F., Hall, M.A. and De Klerk, G.J. (eds.). *Plant propagation by tissue culture*, 3rd ed. Springer, Dordrecht. 403-422.
- Raja, H.D. and Arockiasamy, D.I. (2008). *In vitro* Propagation of *Mentha viridis* L. from Nodal and Shoot tip Explants. *Plant Tissue Cult. Biotechnol.* 18(1): 1-6.
- Ravanfar, S.A., Salim, S., Aziz, M.A., Abdullah, S.N.A. and Rashid, A.A. (2014). Influence of phenyl-urea and adenine-type cytokinins on direct adventitious shoot regeneration of cabbage (*Brassica oleracea* subsp. *capitata*) "KY Cross". *Plant Biotechnol.* 31(3): 275-280.
- Romano, A., Barros, S. and Martins-Loucao, M. (2002). Micropropagation of the Mediterranean tree *Ceratonia siliqua*. *Plant Cell, Tissue Organ Cult.* 68: 35-41.
- Romeijn, G. and Van Lammeren, A.A. (1999). Plant regeneration through callus initiation from anthers and ovules of *Scabiosa columbaria*. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 56(3): 169-177.
- Saha, S., Dey, T. and Ghosh., P. (2011). Micropropagation of *Ocimum kilimandscharicum* Guerke (Labiatae). *Acta Biol. Crac. Ser. Bot.* 52: 50-58.

- Saha, S., Ghosh, P.D. and Sengupta, C. (2010). *In vitro* multiple shoot regeneration of *Mentha piperita*. J. Trop. Med. Plants 11:89-92.
- Saha, S., Kader, A., Sengupta, C. and Ghosh, P. (2012). In vitro propagation of *Ocimum gratissimum* L. (Lamiaceae) and its evaluation of genetic fidelity using RAPD marker. Am. J. Plant Sci. 3: 64-74.
- Saher, S., Fernandez-Garcia, N., Piqueras, A., Hellin, E. and Olmos, E. (2005a). Reducing properties, energy efficiency and carbohydrate metabolism in hyperhydric and normal carnation shoots cultured *in vitro*: a hypoxia stress? Plant Physiol. Biochem. 43: 573-582.
- Saher, S., Piqueras, A., Hellin, E. and Olmos, E. (2004). Hyperhydricity in micropropagated carnation shoots: the role of oxidative stress. Physiol. Plant. 120: 152-161.
- Saher, S., Piqueras, A., Hellin, E. and Olmos, E. (2005b). Prevention of hyperhydricity in micropropagated carnation shoots by bottom cooling: implications of oxidative stress. Plant Cell Tissue Organ Cult. 81: 149-158.
- Salehi, H. (2006). Can a general shoot proliferation and rooting medium be used for a number of carnation cultivars? Afr. J. Biotechnol. 5: 25-30.
- Samantaray, A., Sial, P. and Kar, M. (2012). Micro-propagation and biochemical analysis of Spear Mint (*Mentha spicata*). Indian J. Innov. Develop. 1: 489-493.
- Sánchez-Gras, M.C. and Calvo, M.C. (1996). Micropropagation of *Lavandula latifolia* through nodal bud culture of mature plants. Plant Cell Tiss. Org. Cult. 45: 259-261.
- Schenk, R.U. and Hildebrandt, A.C. (1972). Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can. J. Bot. 50: 199-204.
- Schulte-Scherlebeck, H. (1996). Kulturinformation zu *Scabiosa caucasica*. Zierpflanzenbau. 11: 480.
- Serret, M.D., Trillas, M.I., Matas, J. and Araus, J.L. (1997). The effect of different closure types, light, and sucrose concentrations on carbon isotope composition and growth of *Gardenia jasminoides* plantlets during micropropagation and subsequent acclimation *ex vitro*. Plant Cell Tissue Organ Cult. 47: 217-230.
- Sharma, S., Shahzad, A., Kumar, J. and Anis, M. (2014). *In vitro* propagation and synseed production of scarlet salvia (*Salvia splendens*). Rendiconti Lincei. 25(3): 359-368.
- Sharma, U. and Mohan, J.S.S. (2006). Reduction of vitrification in *in vitro* raised shoots of *Chlorophytum borivilinum* (Sant. and Fernand.), a rare potent medicinal herb. Indian J. Exp. Biol. 44: 499-505.
- Skala, E. and Wysokińska, H. (2004). *In vitro* regeneration of *Salvia nemorosa* (L.) from shoot tips and leaf explants. In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant. 40(6): 596-602.
- Smith, M.A.L. and Spomer, L.A. (1995). Vessels, gels, liquid media, and support systems. In: Aitken-Christie, J., Kozai, T. and Smith, M.L. (ed.), Automation and environmental control in plant tissue culture. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht. 371-404.
- Starman, T.W., Cerny, T.A. and MacKenzie, A.J. (1995). Productivity and profitability of some field-grown specialty cut flowers. HortScience 30: 1217-1220.
- Stojičić, D., Tošić, S., Slavkowska, V., Zlatković, B., Budimir, S., Janošević, D. and Uzelac, B. (2016). Glandular trichomes and essential oil characteristics of *in vitro* propagated *Micromeria pulegium* (Rochel) Benth. (Lamiaceae). Planta. 244(2): 393-404.
- Thorpe, T., Stasolla, C., Yeung, E.C., De Klerk, G.J., Roberts, A. and George, E.F. (2008). The components of plant tissue culture media II: Organic additions, osmotic and pH effects, and support systems. In: George, E.F., Hall, M.A. and De Klerk, G.J. (eds.). Plant propagation by tissue culture, 3rd ed. Springer, Dordrecht. 115-174.
- Tornero, O.P., C. Tallón, C. and Porras, I. (2009). *Citrus limon* micropropagation: Effect of different phytohormones on multiplication and rooting. Acta Hort. 839: 57-62.
- Tošić, S., Nikolić, S., Jovanović, M., Zlatković, B. and Stojičić, D. (2015). Micropropagation of *Micromeria juliana* (L.) Benth. ex Rchb. (Lamiaceae). Biologica Nyssana. 6(1).
- Tošić, S., Nikolić, S., Jovanović, M., Zlatković, B. and Stojičić, D. (2015). Micropropagation of *Micromeria juliana* (L.) Benth. ex Rchb. (Lamiaceae). Biologica Nyssana. 6(1).
- Tošić, S., Stojičić, D., Slavkowska, V., Mihailov-Krstev, T., Zlatković, B., Budimir, S. and Uzelac, B. (2019). Phytochemical composition and biological activities of native and *in vitro*-propagated *Micromeria croatica* (Pers.) Schott. (Lamiaceae). Planta. 1-13.
- Trigiano, R.N. and Gray, D.J. (2016). Plant tissue culture, development and biotechnology. CRC Press.
- Trigka, M. and Papafotiou, M. (2017). *In vitro* propagation of *Anthyllis barba-jovis* from seedling tissues. Acta Hort. 1189: 473-748.
- Van Staden, J., Zazimalova, E. and George, E.F. (2008). Plant growth regulators II: cytokinins, their analogues and antagonists. In: George, E.F., Hall, M.A. and De Klerk, G.J. (eds.). Plant propagation by tissue culture, vol I the background, 3rd ed. Springer, Dordrecht. 205-226.
- Vieitez, A.M., Balleston, A., Sanose, M.C. and Vieitez, E. (1985). Anatomical and chemical studies of vitrified shoots of chestnut regenerated *in vitro*. Physiol. Plant. 65: 177-184.

- Vieitez, A.M., Sanchez, M.C., Amo-Marco, J.B. and Ballester, A. (1994). Forced flushing of branch segments as a method for obtaining reactive explants of mature *Quercus robur* trees for micropropagation. *Plant Cell Tissue and Organ Cult.* 37: 287-295.
- von Arnold, S. and Eriksson, T. (1984). Effect of agar concentration on growth and anatomy of adventitious shoots of *Picea abies* (L.) Karst. *Plant Cell Tiss.Org. Cult.* 3(3): 257-264.
- Wang, J., Liu, K., Xu, D., Wang, Q., Bi, K., Song, Y. and Zhang, L. (2013). Rapid micropropagation system *in vitro* and antioxidant activity of *Scabiosa tchiliensis* Grunning. *Plant Growth Regul.* 69(3): 305-310.
- Wang, Y.L., Wang, X.D., Zhao, B. and Wang, Y.C. (2007). Reduction of hyperhydricity in the culture of *Lepidium meyenii* shoots by the addition of rare earth. *Plant Growth Regul.* 52: 151-159.
- Webster, C.A. and Jones, O.P. (1989). Micropropagation of the apple rootstock M.9: effect of sustained subculture on apparent rejuvenation *in vitro*. *J. Hortic. Sci.* 64(4): 421-428.
- Wu, Z., Chen L.J. and Long Y.J. (2009). Analysis of ultrastructure and reactive oxygen species of hyperhydric garlic (*Allium sativum* L.) shoots. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 45: 483-490.
- Yadav, M.K., Gaur, A.K. and Garg, G.K. (2003). Development of suitable protocol to overcome hyperhydricity in carnation during micropropagation. *Plant Cell Tissue Organ Cult.* 72: 153-156.
- Yildirim, M.U. (2013). Micropropagation of *Origanum acutidens* (Hand. - Mazz.) IETSWAART using stem node explants. *Sci. World J.*
- Zhang, Y., Sun, D. and Hu, S. (2017). *In vitro* propagation of medicinal and ornamental plant *Lysimachia davurica*. *Eur. J. Hortic. Sci.* 82(1): 54-60.
- Ziv, M. (1986). *In vitro* hardening and acclimatization of tissue culture plants. In: Withers, A.W. and Alderson, P.G. (eds). *Plant tissue culture and its agricultural applications*. Butterworth, London. 187-196.
- Ziv, M. (1991a). Quality of micropropagated plants - Vitrification. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 27: 64-69.
- Ziv, M. (1991b). Vitrification: morphological and physiological disorders of *in vitro* plants. In: Debergh, P.C. and Zimmerman, R.H. (eds). *Micropropagation: technology and application*. Kluwer, Dordrecht. 45-64.
- Ziv, M. and Ariel, T. (1988). The relationship between cell wall deformity and stomatal malfunction in the leaves of carnation *in vitro*. In: *Proc. Intl. Soc. Plant Mol. Biol. Congress, Jerusalem*. 425.
- Ziv, M. and Ariel, T. (1992). On the relation between vitrification and stomatal cell wall deformity in carnation leaves *in vitro*. *Acta Hortic.* 314: 121-129.
- Ziv, M., Schwartz, A. and Fleminger, D., (1987). Malfunctioning stomata in vitrous leaves of carnation plants propagated *in vitro*: implication for hardening. *Plant Sci.* 52: 127-134.
- Μαρτίνη, Α.Ν. και Παπαφωτίου, Μ. (2016). Επίδραση της φυσιολογίας του εκφύτου και των φυτορρυθμιστικών ουσιών στον *in vitro* πολλαπλασιασμό της *Anthyllis hermanniae* L. Πρακτικά Ελληνικής Εταιρείας της Επιστήμης Οπωροκηπευτικών, 27 Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο, 28-29 Οκτωβρίου 2015, Βόλος. 17(B): 209-214.

ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ - ΜΟΣΧΕΥΜΑΤΑ ΒΛΑΣΤΟΥ - ΑΝΑΠΤΥΞΗ ΦΥΤΑΡΙΩΝ

ΙΙ.ΙΙΙ. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Η χρήση των μοσχευμάτων βλαστού αποτελεί τον επικρατέστερο τρόπο αγενούς πολλαπλασιασμού πολλών καλλωπιστικών ειδών σε παγκόσμιο επίπεδο.

Στα πλαίσια της παρούσας διατριβής, αξιολογήθηκε η δυνατότητα αγενούς πολλαπλασιασμού πέντε αυτοφυών ειδών της ελληνικής και μεσογειακής χλωρίδας, ήτοι τα *Anthyllis barba-jovis*, *Ballota acetabulosa*, *Clinopodium creticum*, *Clinopodium nepeta* και *Scabiosa hymettia*. Η επιλογή των ειδών έγινε διότι παρουσιάζουν χαρακτηριστικά που τα καθιστούν κατάλληλα για αξιοποίηση και χρήση ως καλλωπιστικά φυτά τόσο στο αστικό όσο και στο περιαστικό τοπίο, με έμφαση στα φυτοδώματα, τους αρχαιολογικούς χώρους και γενικώς σε έργα αποκατάστασης τοπίου.

Μελετήθηκε η επίδραση της εποχής λήψης των μοσχευμάτων, της συγκέντρωσης και του χρόνου εφαρμογής ορμόνης ριζοβολίας. Επιπλέον αναπτύχθηκε μια πλήρης μέθοδος ανάπτυξης των παραπάνω ειδών ξεκινώντας από ριζοβολημένα μοσχεύματα, με εξαίρεση εκτός από το *A. barba-jovis* που χρησιμοποιήθηκαν *in vitro* παραγμένα φυτάρια ως πολλαπλασιαστικό υλικό. Η διεξαγωγή των πειραμάτων έλαβε χώρα σε υαλόφρακτο θερμοκήπιο του εργαστηρίου της Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής τοπίου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών.

Μοσχεύματα κορυφής βλαστού, από επιλεγμένα ενήλικα φυτά, τοποθετήθηκαν για ριζοβολία, τον Ιανουάριο (χειμώνα), τον Απρίλιο (άνοιξη), τον Αύγουστο (καλοκαίρι) και τον Οκτώβριο (φθινόπωρο). Η βάση των μοσχευμάτων εμβαπτίστηκε σε (ινδολ-3-βουτυρικό οξύ) IBA υπό μορφή σκόνης ριζοβολίας για ποώδη/ημι-ξυλώδη ή ξυλώδη μοσχεύματα, καθώς και σε διαλύματα IBA - αιθανόλης - νερού συγκέντρωσης 0 (μάρτυρας), 1000, 2000 ή 3000 mg L⁻¹, για 1 ή 5 min. Τα μοσχεύματα τοποθετήθηκαν για ριζοβολία σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (1:1, v / v) στο σύστημα υδρονέφωσης του θερμοκηπίου.

Υψηλότερα ποσοστά ριζοβολίας παρατηρήθηκαν στα μοσχεύματα *B. acetabulosa* που συλλέχθηκαν την άνοιξη, και δευτερευόντως το φθινόπωρο, ενώ αντιθέτως το καλοκαίρι ήταν η πλέον ακατάλληλη εποχή για τη ριζοβολία των μοσχευμάτων. Την άνοιξη υψηλότερη ριζοβολία επετεύχθη στην επέμβαση με διαλύματα IBA συγκέντρωσης 1000 - 3000 mg L⁻¹ για 1 min, με ιδανική συγκέντρωση τα 2000 mg L⁻¹ (98% ριζοβολία), ενώ το φθινόπωρο με διάλυμα IBA 2000 mg L⁻¹ για 5 min (83% ριζοβολία). Η χρήση σκόνης IBA για ξυλώδη

μοσχεύματα ήταν πιο αποτελεσματική συγκριτικά με τη χρήση σκόνης για ημι-ξυλώδη μοσχεύματα σε όλες τις εποχές.

Η ριζοβολία των μοσχευμάτων του *A. barba-jovis* ήταν ανεπιτυχής, σε όλες τις εποχές και σε όλες τις μεταχειρίσεις που δοκιμάστηκαν, αντίθετα η ριζοβολία των μοσχευμάτων της *C. creticum* και *C. nepeta* δεν επηρεάστηκε ούτε από τη συγκέντρωση, ούτε από το χρόνο εμφάνισης και έγινε με απόλυτη σχεδόν επιτυχία σε όλες τις μεταχειρίσεις και σε όλες τις εποχές με ποσοστό ριζοβολίας 100% στο *C. nepeta* και 80 έως 100% στο *C. creticum*.

Ο πολλαπλασιασμός του *S. hymettia* με μόσχευμα κορυφής βλαστού ήταν απολύτως επιτυχής, το φθινόπωρο και το χειμώνα, με εμφάνιση των μοσχευμάτων σε 1000 mg L⁻¹ IBA για 1 min (100% ριζοβολία). Το καλοκαίρι ήταν η πλέον ακατάλληλη εποχή για τη ριζοβολία των μοσχευμάτων, ενώ την άνοιξη υψηλότερα ποσοστά ριζοβολίας παρατηρήθηκαν μετά από εμφάνιση των μοσχευμάτων σε διάλυμα 1000 και 3000 mg L⁻¹ IBA για 5 min (60 ή 68% αντίστοιχα).

Τα έρριζα μοσχεύματα μεταφυτεύονταν σε γλάστρες που περιείχαν διάφορα υποστρώματα (τύρφη: περλίτη, 2:1, ή εμπλουτισμένη τύρφη: περλίτη, 2:1, ή τύρφη: περλίτη: κομπόστα στεμφύλων, 1:1:1, ή τύρφη: περλίτη: κομπόστα στεμφύλων, 3:2:1, ή έδαφος: περλίτη: κομπόστα στεμφύλων, 3:2:1) και δέχονταν διάφορες επεμβάσεις λίπανσης. Εξαιρέση αποτέλεσε το *A. barba-jovis* που λόγω ανεπιτυχούς ριζοβολίας των μοσχευμάτων χρησιμοποιήθηκαν *in vitro* παραγμένα φυτάρια, για την ανάπτυξη πρωτόκολλου παραγωγής.

Για τη ανάπτυξη και των πέντε υπό μελέτη φυτικών ειδών καταλληλότερη πρακτική αποδείχθηκε η χρήση υποστρώματος τύρφης: περλίτη (2:1, v/v) και η λίπανση μηνιαίως, με χαμηλή συγκέντρωση ισορροπημένο λίπασμα (20:20:20, 2 g L⁻¹). Απαραίτητη προϋπόθεση για τη φυσιολογική ανάπτυξη των φυταρίων των ειδών *B. acetabulosa*, *C. creticum* και *C. nepeta* είναι η φτωχή λίπανση, διαφορετικά τα φυτά παράγουν μακρείς, υδαρείς βλαστούς που έρπουν. Επομένως, η χρήση υψηλών δόσεων λιπάσματος ή εμπλουτισμένης τύρφης δε συνιστάται, επιπλέον για την παραγωγή διακλαδισμένων φυταρίων είναι απαραίτητο να γίνεται κορυφολόγημα.

II.III. ΣΚΟΠΟΣ

Με απώτερο στόχο την αξιοποίησή των ειδών *Anthyllis barba-jovis*, *Ballota acetabulosa*, *Clinopodium creticum*, *Clinopodium nepeta* και *Scabiosa hymettia* ως καλλωπιστικά φυτά σε διάφορες εφαρμογές αστικού και περιαστικού πρασίνου, καθώς και σε χώρους με υποβαθμισμένο εδαφικό περιβάλλον, όπως οι αρχαιολογικοί χώροι, και δεδομένου ότι δεν έχουν βρεθεί αναφορές για τον πολλαπλασιασμό και τη φυτωριακή καλλιέργεια των ειδών αυτών, στην παρούσα ενότητα μελετήθηκε ο αγενής πολλαπλασιασμός των ειδών με μόσχευμα βλαστού και η περαιτέρω ανάπτυξή τους σε φυτωριακές συνθήκες.

Συγκεκριμένα διερευνήθηκε η επίδραση της εποχής συλλογής των μοσχευμάτων, καθώς και της εφαρμογής ορμόνης ριζοβολίας (IBA) σε διάφορες μορφές και συγκεντρώσεις στη ριζοβολία μοσχευμάτων κορυφής βλαστού, και η ανάπτυξη φυταρίων σε διάφορα υποστρώματα υπό διαφορετικές επεμβάσεις λίπανσης.

II.III.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Στον αγενή πολλαπλασιασμό, χρησιμοποιούνται τμήματα του μητρικού φυτού για την παραγωγή των νέων φυτών. Ανάλογα με το είδος του φυτικού τμήματος που χρησιμοποιείται για αγενή αναπαραγωγή όσο και με τον τρόπο που επιτυγχάνεται ο αγενής πολλαπλασιασμός των φυτών διαχωρίζεται σε περαιτέρω υποκατηγορίες (π.χ. πολλαπλασιασμός με μοσχεύματα, διαίρεση, καταβολάδες, παραφυάδες). Το χαρακτηριστικό γνώρισμα της αγενούς αναπαραγωγής είναι η γενετική σταθερότητα η οποία εξασφαλίζει απογόνους, ακριβή αντίγραφα των μητρικών φυτών, που ονομάζονται κλώνοι, δηλαδή γενετικά ομοιόμορφα φυτά που προέρχονται από ένα γονέα.

II.III.1.1 Μοσχεύματα

Ο πολλαπλασιασμός με μοσχεύματα αποτελεί τον πιο διαδεδομένο τρόπο αγενούς αναπαραγωγής. Με τον όρο μόσχευμα εννοούμε το φυτικό τμήμα το οποίο όταν αποχωρίζεται από το μητρικό φυτό μπορεί κάτω από κατάλληλες συνθήκες να δημιουργήσει ένα νέο φυτό απόλυτα όμοιο με το αρχικό. Για να είναι επιτυχής ο πολλαπλασιασμός, τα μοσχεύματα θα πρέπει να λαμβάνονται τη σωστή χρονική περίοδο, από το κατάλληλο μέρος του φυτού και από υγιή και εύρωστα μητρικά φυτά. Ανάλογα με το τμήμα του φυτού που χρησιμοποιείται, τα μοσχεύματα μπορεί να είναι ρίζα, φύλλο, βλαστός ή φύλλο-οφθαλμός. Τα μοσχεύματα βλαστών μπορούν να χωριστούν σε τέσσερις ομάδες: σκληρού ξύλου, ημί-σκληρου ξύλου, μαλακού ξύλου και ποώδη (Hartmann *et al.*, 2002).

Τα μοσχεύματα ως μέσο πολλαπλασιασμού έχουν πολλά πλεονεκτήματα σε σχέση με τα σπορόφυτα. Διατηρούν ορισμένα επιθυμητά χαρακτηριστικά, μέσω της επιλογής επιθυμητών κλώνων (Hartmann *et al.*, 2002, Tchoundjeu *et al.*, 2004).

Η περίοδος ριζοβολίας των μοσχευμάτων μετά την εφαρμογή ορμόνης ριζοβολίας ποικίλλει από είδος σε είδος. Μπορεί να διαρκέσει από μερικές εβδομάδες έως δώδεκα εβδομάδες ή και περισσότερο (Zencirkiran, 2013). Η ριζοβολία των μοσχευμάτων είναι ένα σημαντικό μέσο αγενούς πολλαπλασιασμού που ασκείται στη δενδροκομία και την ανθοκομία για μαζική παραγωγή βελτιωμένου υλικού μέσα σε σύντομο χρονικό διάστημα (Nanda and Anand, 1970). Η ικανότητα ριζοβολίας των μοσχευμάτων διαφορετικών φυτικών ειδών, ωστόσο, ποικίλει σημαντικά (Nanda *et al.*, 1967, 1968). Μερικά φυτικά είδη ριζοβολούν με ευκολία, άλλα με δυσκολία και ακόμα άλλα δεν ριζοβολούν ποτέ ακόμη και με την εφαρμογή ορμονών ριζοβολίας. Οι ερευνητές έχουν καταλήξει στο συμπέρασμα ότι ο

σχηματισμός ρίζας διέπεται από ένα σύμπλεγμα παραγόντων και όχι μόνο από ουσίες ανάπτυξης, αναστολείς ή ιστολογικά χαρακτηριστικά.

Π.ΙΙΙ.1.2 Παράγοντες που επηρεάζουν τη ριζοβολία των μοσχευμάτων

Η ικανότητα ριζοβολίας των μοσχευμάτων επηρεάζεται σημαντικά από διάφορους παράγοντες, όπως οι διαφορετικές θέσεις συλλογής των μοσχευμάτων από το βλαστό (Al-Salem and Karam, 2001, Bhardwaj and Mishra, 2005, Agbo and Obi, 2007), η ηλικία του μητρικού φυτού (Husen and Pal, 2006), οι φυσιολογικές συνθήκες του μητρικού φυτού (Mitchell *et al.*, 2004), οι περιβαλλοντικές συνθήκες κατά τη ριζοβολία (Ragonezi *et al.*, 2010, Repáč *et al.*, 2011) και η εφαρμογή ορμονών ριζοβολίας (Hartmann *et al.*, 2002, Gehlot *et al.*, 2014). Επιπλέον, η κατάσταση των υδατανθράκων, ως συνάρτηση της διαμέτρου και του μήκους του μοσχεύματος, θεωρείται πολύ σημαντική για την επιτυχία της ριζοβολίας (Nanda and Anand 1970, Tschaplinski and Blake 1989, Rossi 1991). Η αποθήκευση (Fege and Phipps 1984), ο χρόνος συλλογής (Phipps and Netzer 1981, Fege and Phipps 1984, Hannerz *et al.*, 1999), και η επεξεργασία πριν από τη ριζοβολία - όπως π.χ. η εμβάπτιση των μοσχευμάτων σε νερό (Hansen and Netzer 1993) αποτελούν επίσης σημαντικούς παράγοντες που επηρεάζουν την επιτυχία της ριζοβολίας των μοσχευμάτων.

(α) Επίδραση των διαφορετικών τμημάτων λήψης των μοσχευμάτων

Έχουν συχνά παρατηρηθεί διακυμάνσεις της ικανότητας ριζοβολίας μεταξύ των μοσχευμάτων που λαμβάνονται από διαφορετικά τμήματα του βλαστού (Al-Salem and Karam 2001, Husen, 2004, Agbo and Obi 2007, Husen and Pal 2007a, Amri *et al.*, 2010). Οι διαφορετικές θέσεις συλλογής των μοσχευμάτων από το βλαστό επηρεάζουν τη συνολική ποιότητα, τη δυνατότητα ριζοβολίας και τη μεταγενέστερη ανάπτυξη των ριζοβολημένων μοσχευμάτων (Tchoundjeu and Leakey 1996, Husen and Pal 2003).

Επιπλέον η επίδραση της θέσης συλλογής του μοσχεύματος στο σχηματισμό ριζών μπορεί να προκληθεί από μεταβολές του βαθμού ευαισθησίας κατά μήκος του στελέχους (Hartmann and Kester, 1983) ή από σταδιακές μεταβολές στις περιβαλλοντικές συνθήκες όπως η ακτινοβολία και η ποιότητα του φωτός.

Τέλος, οι Zalesny *et al.*, 2003 αναφέρουν ότι τα υψηλότερα ποσοστά ριζοβολίας των μοσχευμάτων από τη βάση του βλαστού συνδέονται ενδεχομένως με την αυξημένη αποθήκευση υδατανθράκων στην περιοχή αυτή και με τις διαφορές στην οργανογενετική δραστηριότητα κατά μήκος του βλαστού.

(β) Επίδραση του μεγέθους των μοσχευμάτων

Το αρχικό μέγεθος των μοσχευμάτων είναι ένας πολύ σημαντικός παράγοντας που εμπλέκεται την ικανότητα ριζοβολίας και την ανάπτυξη των ριζών των μοσχευμάτων (Burgess *et al.*, 1990, Foster *et al.*, 2000, Vigl and Rewald 2014).

Επιπλέον πολύ ερευνητές αναφέρουν ότι τα μοσχεύματα με μεγαλύτερη διάμετρο και μεγαλύτερο μήκος οδηγούν σε καλύτερη επιβίωση και ανάπτυξη των μοσχευμάτων υπό κανονικές συνθήκες (Leakey 1982, Hannerz *et al.*, 1999, Vigl and Rewald 2014). Όμως το μέγεθος των μοσχευμάτων δεν είναι μια απλή μεταβλητή, επηρεάζεται από τη θέση των μοσχευμάτων πάνω στο βλαστό και την ηλικία τόσο του μητρικού φυτού όσο και του βλαστού από όπου αποκόπτεται το μόσχευμα (Hoad and Leakey 1992, Leakey 2004).

Τέλος, υπάρχουν δύο αλληλεπιδράσεις οι οποίες μπορεί να επηρεάζουν την ικανότητα ριζοβολίας των βλαστών. Η μια είναι μεταξύ του μήκους του μοσχεύματος και της περιοχής που καταλαμβάνουν τα φύλλα (Tchoundjeu and Leakey 1996) και η άλλη μεταξύ του μήκους του μοσχεύματος και της διαμέτρου του μοσχεύματος (Hoad and Leakey 1992, Leakey *et al.*, 1992, Tchoundjeu and Leakey 1996).

(γ) Επίδραση της ηλικίας

Η επίδραση της ηλικίας του μητρικού φυτού στην ικανότητα ριζοβολίας των μοσχευμάτων βλαστών έχει αναφερθεί σε πολλά δενδρώδη φυτά, όπως αναφέρουν οι Stenvall *et al.* (2004), οι Bhardwaj and Mishra (2005), οι Husen and Pal (2007b) και οι Oruni-Frimpong *et al.* (2008). Οι ίδιοι ερευνητές αναφέρουν ότι η ικανότητα σχηματισμού τυχαίων ριζών στα μοσχεύματα μειώνεται με την αύξηση της ηλικίας των μητρικών φυτών. Η μείωση της ικανότητας ριζοβολίας των μοσχευμάτων που λαμβάνονται από μητρικά φυτά μεγάλης ηλικίας μπορεί να οφείλεται σε μείωση της περιεκτικότητας σε ενδογενείς αυξίνες ή μείωση της ευαισθησίας των γερασμένων ιστών στους προαγωγούς ριζοβολίας και/ή σε συσσώρευση ανασταλτικών ουσιών που παρεμποδίζουν τη ριζοβολία (Husen and Pal 2006, Oruni-Frimpong *et al.*, 2008).

Κατά συνέπεια τα μοσχεύματα που λαμβάνονται από νεαρά μητρικά φυτά θεωρούνται γενικά ότι ριζοβολούν εύκολα κάτι που πιθανώς οφείλεται στη χαμηλή παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών (Husen and Pal 2006) και στην παρουσία μεγάλων συγκεντρώσεων αυξινών (Tetsumura *et al.*, 2001, Fabbri *et al.*, 2004, Vakouftsis *et al.*, 2009).

(δ) Επίδραση της εφαρμογής εξωγενών αυξινών

Οι αυξίνες είναι φυτικές ορμόνες που συμμετέχουν σε πολλές αναπτυξιακές διεργασίες, συμπεριλαμβανόμενου του τυχαίου σχηματισμού ρίζας. Το ινδολ-3-βουτανικό οξύ (IBA), το α-ναφθαλινοξικό οξύ (NAA) και το ινδολο-3-οξικό οξύ (IAA) είναι σήμερα οι πιο ευρέως χρησιμοποιούμενες αυξίνες για την προώθηση του σχηματισμού ριζών στα μοσχεύματα στελέχους (Fogaça and Fett-Neto 2005, Blythe *et al.*, 2007). Οι Hartmann *et al.* (2011) και ο Macdonald (1987) ανέφεραν ότι στην εμπορική παραγωγή των φυτών συνήθως χρησιμοποιούν μεταχειρίσεις με αυξίνες για να αυξήσουν τα συνολικά ποσοστά ριζοβολίας, να επιταχύνουν την έναρξη του σχηματισμού της ρίζας, να βελτιώσουν τον αριθμό και την ποιότητα των ριζών και να ενθαρρύνουν την ομοιομορφία της ριζοβολίας.

Επιπλέον η εφαρμογή αυξινών ενισχύει την ταχύτητα μετακίνησης των υδατανθράκων και άλλων θρεπτικών ουσιών στη βάση των μοσχευμάτων (Leakey *et al.*, 1982, Davies *et al.*, 1990, Aminah *et al.*, 1995). Πιο συγκεκριμένα, η εφαρμογή αυξίνης (IBA) επηρεάζει την υδρόλυση πολυσακχαριτών με αποτέλεσμα την αύξηση της περιεκτικότητας σε φυσιολογικά ενεργά σάκχαρα που απαιτούνται για την παροχή ενέργειας στους μεριστοματικούς ιστούς και αργότερα στις ρίζες (Husen and Pal 2007a, Husen 2008).

Ο Davies (1984) αναφέρει ότι ορισμένα είδη καθίστανται ευαίσθητα στις αυξίνες μόνο κατά τη διάρκεια συγκεκριμένων περιόδων του έτους ή ότι οι αυξίνες περιορίζονται κατά τις περιόδους υψηλού σχηματισμού ριζών. Η εξωγενής εφαρμογή της αυξίνης μπορεί να έχει προωθητική, ή και ανασταλτική επίδραση στη ριζοβολία των μοσχευμάτων, ανάλογα με το ενδογενές επίπεδο των ουσιών που ρυθμίζουν την ανάπτυξη (Haissig, 1979) ή την ευαισθησία ιστού (Visser *et al.*, 1996). Η ευαισθησία του φυτικού ιστού σε εφαρμογή εξωγενούς αυξίνης μπορεί επίσης να αυξηθεί όταν τα φυτά αναπτύσσονται ενεργά και το νερό και τα θρεπτικά συστατικά δεν περιορίζουν (Campen *et al.*, 1990, Trewavas, 1991).

Οι συγκεντρώσεις αυξίνης που υπερβαίνουν ένα ορισμένο επίπεδο έχουν παρατηρηθεί ότι αναστέλλουν ή μειώνουν την ικανότητα ριζοβολίας των μοσχευμάτων των διαφόρων ειδών (Leakey *et al.*, 1982, Chong *et al.*, 1992, Puri and Verma, 1996, Akwatulira *et al.*, 2011), υποδεικνύοντας έτσι ότι πρέπει να οριστούν οι βέλτιστες συγκεντρώσεις αυξινών για τη ριζοβολία του κάθε είδους (Leakey *et al.*, 1982, Chong *et al.*, 1992).

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν πάρα πολλές μελέτες που έχουν επικεντρωθεί στις επιδράσεις των αυξινών στη ριζοβολία των μοσχευμάτων και στην ανάπτυξη των φυτών. Για παράδειγμα οι Abu-Zahra *et al.* (2011) εξέτασαν την επίδραση 6 διαφορετικών συγκεντρώσεων NAA και ενός μάρτυρα (χωρίς αυξίνη) στη *Schefflera arboricola*, οι Stefancic *et al.* (2005) διερεύνησαν τις επιδράσεις των IAA και IBA στο *Prunus spp.*, οι Şeker *et al.* (2010)

μελέτησαν την επίδραση των IBA, NAA και IBA+NAA σε μοσχεύματα *Arbutus unedo* L. μαλακού ξύλου και ημί-σκληρου ξύλου και οι Sevik and Güney (2013a, 2013b) και οι Toracoglu *et al.* (2016) ανέλυσαν την επίδραση των IAA, IBA, NAA και GA₃ στο *Melissa officinalis* και στο *Ficus benjamina* L. αντίστοιχα. Όλες αυτές οι έρευνες οδήγησαν στο συμπέρασμα ότι η εφαρμογή αυξίνης επηρεάζει θετικά την ικανότητα ριζοβολίας των μοσχευμάτων.

Τα εμπορικά προϊόντα "ορμόνες ριζοβολίας" που διατίθενται στην αγορά είναι σε διάφορα σκευάσματα, όπως υγρά συμπυκνώματα, υδατοδιαλυτά άλατα και δισκία, σκόνες σε μίγμα με talk (Blythe *et al.*, 2007).

(ε) Επίδραση της ανάπτυξης

Αν και η ανάπτυξη δεν συσχετίζεται με τη ριζοβολία, μπορεί να ανταγωνιστεί την ανάπτυξη τυχαίων ριζών (Biran and Halevy, 1973, Howard, 1996). Η καθυστέρηση λοιπόν στη ριζοβολία των μοσχευμάτων μπορεί να οφείλεται στον ανταγωνισμό των μεταβολιτών ή ρυθμιστών ανάπτυξης, συμπεριλαμβανομένων των αυξινών (Biran and Halevy, 1973, Kevers *et al.*, 1997). Ο ανταγωνισμός για τα θρεπτικά συστατικά ενδέχεται να είναι ιδιαίτερα σημαντικός κατά τη διάρκεια της άνοιξης όταν η ταχεία βλαστική ανάπτυξη ακολουθείται από την ανθοφορία.

Σύμφωνα με πολλούς ερευνητές η επίδραση της ανθοφορίας στη ριζοβολία διαφέρει μεταξύ των ειδών. Οι McComb and Wroth (1986) αναφέρουν ότι τα μοσχεύματα της καλοκαιρινής ανθοφορίας *Eucalyptus resinifera* δεν σχηματίζουν εύκολα ρίζες κατά τη διάρκεια της ανθοφορίας. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρουν και οι (Kibbler *et al.*, 2004) στο είδος *Backhousia citriodora*. Η αρνητική επίδραση της ανθοφορίας στη ριζοβολία του *B. citriodora* αποδείχθηκε από την αύξηση του ρυθμού ριζογένεσης το φθινόπωρο και το χειμώνα, περίοδο όπου το είδος βρίσκεται στο στάδιο ανάπτυξης (Kibbler *et al.*, 2004).

Τέλος, οι αλλαγές στη δραστηριότητα ανάπτυξης των μητρικών φυτών έχουν συσχετιστεί με την εποχική διακύμανση της ικανότητας ριζοβολίας των μοσχευμάτων (Howard, 1996). Στα δυσχερή προς ριζοβολίας είδη όπως το *Syringa vulgaris* και το *Continus coggygria*, η ριζοβολία περιορίστηκε σε περιόδους βλαστικής ανάπτυξης. Αντίθετα, στα εύκολα για ριζοβολία είδη, όπως το *Forsythia × intermedia* η ριζοβολία δεν επηρεάστηκε από τη βλαστική περίοδο, με αποτέλεσμα η ριζοβολία να είναι επιτυχείς ανεξάρτητα από το ρυθμό ανάπτυξης των βλαστών (Kibbler *et al.*, 2004).

(ζ) Επίδραση του χρόνου συλλογής

Ο χρόνος μέσα στο έτος κατά τον οποίο λαμβάνονται τα μοσχεύματα είναι ένας σημαντικός παράγοντας στην παραγωγή τυχαίων ριζών και έχει αποδοθεί στη φυσιολογική κατάσταση του βλαστού (Klein *et al.*, 2000). Αυτή η εποχιακή διακύμανση στη ριζοβολία των μοσχευμάτων μπορεί να αποδοθεί σε αλλαγές στους ενδογενείς ρυθμιστές της ανάπτυξης των φυτών (Vieitez and Pena 1968, Smith and Wareing 1972a,b), σε μεταβολές στη δραστικότητα του οφθαλμού (Roberts and Fuchigami 1973, Roberts *et al.*, 1974), στην περιεκτικότητα των μοσχευμάτων σε υδρολυτικά ένζυμα, υδατάνθρακες και άμυλο (Nanda and Anand 1970, Rossi 1991) και στις περιβαλλοντικές συνθήκες τόσο του υποστρώματος όσο και της ατμόσφαιρας (Abdou *et al.*, 2004, Elgimabi, 2008).

Εκτιμάται λοιπόν ότι οι περιβαλλοντικές επιρροές μπορούν να δράσουν μέσω της ευαισθησίας ή της μεταβολής του επιπέδου της ενδογενούς αυξίνης, αφού οι εποχιακές μεταβολές στα επίπεδα της αυξίνης συσχετίστηκαν με την ικανότητα ριζοβολίας, αλλά το αποτέλεσμα εξειδικευμένο για τα διάφορα είδη (Davies, 1984, Carmen, 1993).

(η) Επίδραση της θερμοκρασίας στο σχηματισμό ριζών

Οι επιδράσεις της θερμοκρασίας κατά το σχηματισμό ριζών έχουν συχνά αναφερθεί. Γενικά, ανάλογα με το είδος, ο αριθμός των ριζών ανά μόσχευμα (Howard, 1968, Gislerod, 1983, Wang 1987), το ποσοστό ριζοβολίας (Heide, 1964, Howard, 1968) και η ταχύτητα σχηματισμού ριζών (Alley and Peterson, 1977, Friis, 1987) αυξάνονται με την αύξηση της θερμοκρασίας. Όμως σε υπερθετικές θερμοκρασίες η ριζοβολία καταστέλλεται ή αναστέλλεται (Gislerod, 1983).

Κατά συνέπεια η βέλτιστη θερμοκρασία για το σχηματισμό ριζών ποικίλλει ανάλογα με το είδος του φυτού και μπορεί να επηρεαστεί περαιτέρω από διάφορους παράγοντες όπως η εφαρμογή ρυθμιστών ανάπτυξης (Jain and Nanda, 1972, Appelgren and Heide, 1972), το επίπεδο της εδαφικής υγρασίας στο υπόστρωμα πολλαπλασιασμού (Gislerod, 1983) και οι συνθήκες φωτισμού κατά τη διάρκεια της ριζοβολίας (Gislerod, 1983, Wang, 1987). Ο Hansen (1989) αναφέρει ότι η βέλτιστη θερμοκρασία ριζοβολίας των μοσχευμάτων είναι μεταξύ 20 και 30 °C, εκτός ελαχίστων εξαιρέσεων. Επίσης οι ανασταλτικές επιδράσεις στο σχηματισμό ρίζας των χαμηλών θερμοκρασιών έχουν αναφερθεί συχνά σε διάφορα είδη όπως, π.χ. στο *Begonia* (Runger, 1959) και στο *Pisum sativum* (Fischer, 1981).

Πολλοί ερευνητές αναφέρουν ότι η επιτυχία της ριζοβολίας των μοσχευμάτων συχνά συσχετίζεται με τη θερμοκρασία του περιβάλλοντος των μητρικών φυτών πριν από τη λήψη μοσχευμάτων (Anand and Heberlein, 1975, Dykeman, 1976, Worrall, 1976, Hansen, 1990).

Αν και η βέλτιστη ριζοβολία έχει συσχετιστεί με ειδικές θερμοκρασίες (Hansen, 1990), η μεταβολή της θερμοκρασίας μπορεί επίσης να έχει επίδραση στην ικανότητα ριζοβολίας των μοσχευμάτων (Moe, 1990).

(θ) Επίδραση του τύπου του υποστρώματος ριζοβολίας

Η χρήση υποστρωμάτων υψηλής ποιότητας θεωρείται ιδιαίτερα σημαντική για τη ριζοβολία των μοσχευμάτων, λαμβάνοντας υπόψη ότι κατά τη έναρξη της αλλά και κατά την ανάπτυξη των ριζών, τα μοσχεύματα είναι ιδιαίτερα ευαίσθητα στους αρνητικούς παράγοντες του υποστρώματος. Κατά κύριο λόγο τα υλικά που χρησιμοποιούνται ευρέως για την εγκατάσταση ριζοβολίας μοσχευμάτων είναι η τύρφη και ο περλίτης.

Η τύρφη είναι ένα οργανικό υλικό που χρησιμοποιείται σε πολλές χώρες του κόσμου συνήθως για την καλλιέργεια ανθοκομικών, κηπευτικών φυτών και στην παραγωγή δενδρυλλίων. Είναι κατάλληλη για ελάφρυνση του χώματος, ώστε να αποκτήσει καλύτερη δυνατότητα στράγγισης και συγκράτηση επαρκούς ποσότητας νερού, χωρίς να δημιουργεί προβλήματα στην ανάπτυξη των ριζών. Ο περλίτης είναι ένα ηφαιστειακό υαλώδες πέτρωμα που χρησιμοποιείται ευρέως στη ριζοβολία των μοσχευμάτων, για το λόγο ότι βελτιώνει τον αερισμό του εδάφους, είναι χημικά αδρανής, συγκρατεί υγρασία και είναι καλό σταθεροποιητής της θερμοκρασίας (Şimşek, 1993, Hartmann *et al.*, 2002).

II.III.1.3 Ο αγενής πολλαπλασιασμός με μοσχεύματα ειδών της οικογένειας Fabaceae

Σχετικά με τον αγενή πολλαπλασιασμό του *A. barba-jovis*, αλλά και του γένους *Anthyllis* δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές, έτσι ανατρέξαμε σε βιβλιογραφικές αναφορές για είδη της οικογένειας Fabaceae. Ενδεικτικά αναφέρονται οι παρακάτω:

Ο Tipton (1990) για το είδος *Cercis canadensis* var. *mexicana*, αναφέρει ότι τα μοσχεύματα ριζοβόλησαν μόνο όταν συλλέχθηκαν τέσσερις εβδομάδες μετά την έκπτυξη της νέας βλάστησης (αρχές της άνοιξης). Οι Karam and Gebre (2004) για ένα άλλο είδος *Cercis*, το *C. siliquastrum*. μελέτησαν την επίδραση της θέσης του μοσχεύματος πάνω στο βλαστό, την επιρροή της συγκέντρωσης του IBA, αλλά και την εποχής λήψης των μοσχευμάτων. Η ριζοβολία ήταν επιτυχής μόνο στη συλλογή του καλοκαιριού. Το ποσοστό της ριζοβολίας δεν επηρεάστηκε σημαντικά από τη συγκέντρωση του IBA, αλλά τα μοσχεύματα από το κορυφαίο τμήμα του βλαστού παρουσίασαν υψηλότερη ριζοβολία (43%) σε σύγκριση με τα μοσχεύματα από τη βάση του βλαστού (13%).

Οι Swamy *et al.* (2002), στο είδος *Robinia pseudoacacia* βρήκαν ότι τα μοσχεύματα από νεαρά δέντρα ηλικίας 2 ετών ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό σε όλες τις εποχές

σε σύγκριση με τα μοσχεύματα από ενήλικα δέντρα ηλικίας 15 ετών. Όσον αφορά την εποχή συλλογής των μοσχευμάτων υψηλότερα ποσοστά ριζοβολίας επιτεύχθηκαν την άνοιξη σε σύγκριση με το καλοκαίρι και το χειμώνα. Η εφαρμογή NAA ευνόησε τη ριζοβολία σε σύγκριση με το IBA, με το υψηλότερο ποσοστό ριζοβολίας να παρατηρείται στα 500 mg L⁻¹.

Π.ΙΙ.1.4 Ο αγενής πολλαπλασιασμός με μοσχεύματα ειδών της οικογένειας **Lamiaceae**

Σχετικά με τον αγενή πολλαπλασιασμό του *B. acetabulosa*, του *C. creticum* και του *C. nepeta*, αλλά και των αντίστοιχων γενών δεν υπάρχουν βιβλιογραφικές αναφορές, έτσι ανατρέξαμε σε βιβλιογραφικές αναφορές που υπάρχουν για την οικογένεια Lamiaceae. Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν πολλές αναφορές για αγενή πολλαπλασιασμό ειδών αυτής της οι περισσότερες εκ των οποίων αφορούν στα γένη *Mentha*, *Lavandula*, *Origanum*, *Salvia* και *Thymus*. Ενδεικτικά αναφέρονται μερικές από αυτές:

Οι Ayanoğlu *et al.* (2002) σε μοσχεύματα *Salvia indica* L. και *Satureja thymbra* L. δοκίμασαν διάφορες συγκεντρώσεις IBA. Η εφαρμογή IBA είχε θετική επίδραση στη ριζοβολία των μοσχευμάτων και για τα δύο είδη φυτών. Παρόμοια αποτελέσματα παρατήρησαν και οι Ayanoğlu *et al.* (2000a) σε μοσχεύματα λεβάντας (*Lavandula stoechas* L.), με τα υψηλότερα ποσοστά ριζοβολίας να έχουν καταγραφεί μετά από εφαρμογή 4000 mg L⁻¹ IBA, ενώ τα χαμηλότερα στη μεταχείριση χωρίς ορμόνη ριζοβολίας (0,0 mg L⁻¹ IBA).

Σε τρία είδη του γένους *Thymus* (*T. capitatus*, *T. serpyllum* και *T. vulgaris*) οι Iapichino *et al.* (2006) διαπίστωσαν θετική επίδραση του IBA είχε θετική επίδραση στη ριζοβολία των μοσχευμάτων.

Στο *Teucrium capitatum* μοσχεύματα κορυφής βλαστού με ή χωρίς εκπτυγμένους πλάγιους βλαστούς ριζοβόλησαν σε υψηλό ποσοστό (70-90%) μετά από εφαρμογή διαλύματος 1000 - 2000 mg L⁻¹ IBA την άνοιξη και το φθινόπωρο

Η θετική επίδραση του IBA στη ριζοβολία μοσχευμάτων διάφορων φαρμακευτικών και αρωματικών ειδών της οικογένειας Lamiaceae (Labiatae) έχει αναφερθεί και από άλλους ερευνητές, όπως για τα *Mentha piperita* L. and *Melissa officinalis* L. (Kuris *et al.*, 1980), *Origanum onites* L. (Oğuz *et al.*, 1997), *Origanum vulgare* L., *Salvia officinalis* L. (Arslan *et al.*, 1995, Ayanoğlu and Özkan, 2000), *Origanum vulgare* var. *hirtum* (Sarıhan *et al.*, 2003), *Salvia officinalis* L. (Nicola *et al.*, 2005) και *Thymbra spicata* L. (Şekeroğlu *et al.*, 2001).

Π.ΙΙΙ.1.5 Ο αγενής πολλαπλασιασμός με μοσχεύματα ειδών της οικογένειας *Caprifoliaceae*

Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχει μόνο μια γενική αναφορά για τον αγενή πολλαπλασιασμό του γένους *Scabiosa*, στην οποία αναφέρεται ότι η καταλληλότερη συγκέντρωση ορμόνης ριζοβολίας είναι τα 1000 mg L⁻¹ IBA (Kroin, 2009).

Όσον αφορά τον αγενή πολλαπλασιασμό σε είδη της οικογένειας *Caprifoliaceae* υπάρχουν ελάχιστες αναφορές. Οι Lee *et al.* (2002) στο είδος *Weigela subsessilis* μελέτησαν επίδραση του τύπου του μοσχεύματος (σκληρού, μαλακού, ημί-σκληρου) και της εφαρμογής τριών διαφορετικών αυξινών (NAA, IBA, IAA). Παρατήρησαν ότι τα μοσχεύματα μαλακού ξύλου ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό σε σύγκριση με τα μοσχεύματα σκληρού ή ημί-σκληρου ξύλου. Η εφαρμογή αυξίνης προώθησε τη ριζοβολία και στους τρεις τύπους μοσχευμάτων. Στα μοσχεύματα σκληρού ξύλου και ημί-σκληρου ξύλου παρατήρησαν ότι η εφαρμογή NAA προώθησε περισσότερο τη ριζοβολία σε σύγκριση με το IBA και IAA, με τη συγκέντρωση των 500 mg L⁻¹ NAA να δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα. Στα μοσχεύματα μαλακού ξύλου και οι τρεις τύποι αυξίνης έδωσαν παρόμοια ποσοστά ριζοβολίας, ανεξάρτητα από τη συγκέντρωση.

Μοσχεύματα τρέχουσας βλάστησης *Lonicera canadensis*, μήκους 10 - 13cm, ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό (49%) τον Ιούνιο σε σύγκριση με τα μοσχεύματα που τοποθετήθηκαν τον Ιούλιο (10%) και τον Αύγουστο (20%), μετά την εφαρμογή 3.000 mg L⁻¹ IBA υπό μορφή σκόνης (Cartabiano, 2013).

Σε δύο είδη *Lonicera*, *Lonicera cuminata* και *Lonicera macranthoides*, οι Wang *et al.* (2019) μελέτησαν την επίδραση της εποχής λήψης των μοσχευμάτων (άνοιξη, καλοκαίρι, φθινόπωρο), τη συγκέντρωση και το χρόνο εφαρμογής δύο ρυθμιστών ανάπτυξης (NAA, IBA) και ενός βιοδιεργέτη (ABT). Την άνοιξη το υψηλότερο ποσοστό ριζοβολίας επιτεύχθηκε μετά από 1 - 2h εμβάπτιση των μοσχευμάτων σε 200 mg L⁻¹ ABT και για τα δύο είδη, ενώ το καλοκαίρι ριζοβόλησε μόνο το 3% των μοσχευμάτων. Το φθινόπωρο το ABT προώθησε περισσότερο τη ριζοβολία σε σύγκριση με το NAA και IBA, με τη συγκέντρωση των 100 mg L⁻¹ ABT για 2 - 4h να δίνει τα καλύτερα αποτελέσματα.

II.III.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ

II.III.2.1 ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

II.III.2.1.1 Περίοδος συλλογής μοσχευμάτων

Με στόχο να προσδιοριστεί η κατάλληλη περίοδος συλλογής μοσχευμάτων, μοσχεύματα κορυφής βλαστού συλλέγονταν από επιλεγμένα ενήλικα αυτοφυή φυτά των ειδών *B. acetabulosa*, *S. hymettia* και από ενήλικα καλλιεργούμενα φυτά των ειδών *A. barba-jovis*, *C. creticum*, *C. nepeta*, τέσσερις φορές κατά τη διάρκεια του έτους, τον Ιανουάριο, τον Απρίλιο, τον Αύγουστο και τον Οκτώβριο, ενδεικτικά για τις τέσσερις εποχές, δηλαδή του χειμώνα, της άνοιξης, του καλοκαιριού και του φθινοπώρου.

II.III.2.1.2 Εγκατάσταση μοσχευμάτων προς ριζοβολία

Σε όλες τις εποχές, τα μοσχεύματα υποβλήθηκαν σε επέμβαση με IBA, είτε υπό μορφή σκόνης ριζοβολίας για ποώδη/ημιξυλώδη ή ξυλώδη μοσχεύματα Rooton DP (0,066% ή 0,2% κ.β. IBA σε σκόνη, Εταιρεία Συντονισμού Γεωργικών Επιχειρήσεων ΑΕ, Ελλάδα), ή ως διάλυμα σε αιθανόλη - νερού (1:1, v/v), σε συγκέντρωση 0 (μάρτυρας), 1000, 2000 ή 3000 mg L⁻¹, με δύο χρόνους εμφύπτσης, 1 ή 5 min. Οι βάσεις των μοσχευμάτων βυθίστηκαν (περίπου 1,5 - 2,0 cm) στο διάλυμα IBA και στη συνέχεια τοποθετήθηκαν για ριζοβολία σε πλαστικούς δίσκους τετραγωνικών κυψελίδων (διαστάσεις κυψελών: 5,0 x 5,0 x 5,0 cm), που περιείχαν τύρφη (με διορθωμένο pH από 5,5 έως 6,5, Klasmann-Delmann GmbH, Geeste, Germany) και περλίτη (σωματίδια διαμέτρου 1 έως 5 mm, Perloflor, ISOCON SA, Αθήνα, Ελλάδα) σε μίγμα 1:1 (v / v). Αρχικά οι πλαστικοί δίσκοι με τα προς ριζοβολία μοσχεύματα τοποθετήθηκαν για 2 εβδομάδες για τα είδη *A. barba-jovis*, *B. acetabulosa*, *S. hymettia* και για 1 εβδομάδα για τα είδη *C. creticum* και *C. nepeta*, σε σύστημα υδρονέφωσης στο θερμαινόμενο υαλόφρακτο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γ.Π.Α. (37°58'53.94"N, 23°42'25,01"E) και εν συνεχεία σε πάγκο του θερμοκηπίου σε ημι-σκιερή θέση για έξι εβδομάδες.

Π.ΙΙΙ.2.1.3 Ανάπτυξη ριζοβολημένων μοσχευμάτων

Τα φυτάρια που παράγονταν από τα μοσχεύματα κορυφής βλαστού μεταφυτεύονταν στη συνέχεια σε γλάστρες (1.3 l) που περιείχαν διάφορα υποστρώματα, δέχονταν διάφορες λιπάνσεις, προκειμένου να επιταχυνθεί η ανάπτυξη των ριζοβολημένων μοσχευμάτων, έτσι ώστε να αναπτυχθεί ένα πλήρες πρωτόκολλο παραγωγής (αναλυτικές λεπτομέρειες παρουσιάζονται σε κάθε είδος). Η ανάπτυξή τους αξιολογήθηκε σε μηνιαία βάση για τρεις μήνες.

Π.ΙΙΙ.2.1.4 Υλικά υποστρωμάτων ανάπτυξης ριζοβολημένων μοσχευμάτων

Τα υλικά που χρησιμοποιήθηκαν στα διάφορα μίγματα υποστρωμάτων στα πειράματα ανάπτυξης είναι τα ακόλουθα:

- α) τύρφη (τύρφη με διορθωμένο pH από 5.5 έως 6.5, Klasmann-Delmann GmbH, Geeste, Germany)
- β) περλίτης (1 - 5 mm, Perloflor, ISOCON S.A., Athens, Greece)
- γ) Κόμποστ Στεμφύλων, έχει pH 7.8, EC 1287 $\mu\text{mhos/cm}$, N 2,01% (by volume), P 1,464 mg kg^{-1} , K 15,190 mg kg^{-1} , Mg 2,013 mg kg^{-1} και Ca 3,667 mg kg^{-1} (Parafotiou *et al.*, 2013).
- δ) Εμπλουτισμένη τύρφη (με διορθωμένο pH από 5.5 έως 6.5, N-P-K 14-10-18 από 1,0 / 1,5 kg m^{-2} , Klasmann-Delmann GmbH, Geeste, Germany)

Η λίπανση πραγματοποιήθηκε με Nutrileaf 60, 20-20-20 (Miller Chemical και Fertilizer Corp., Hanover, PA, Η.Π.Α.)

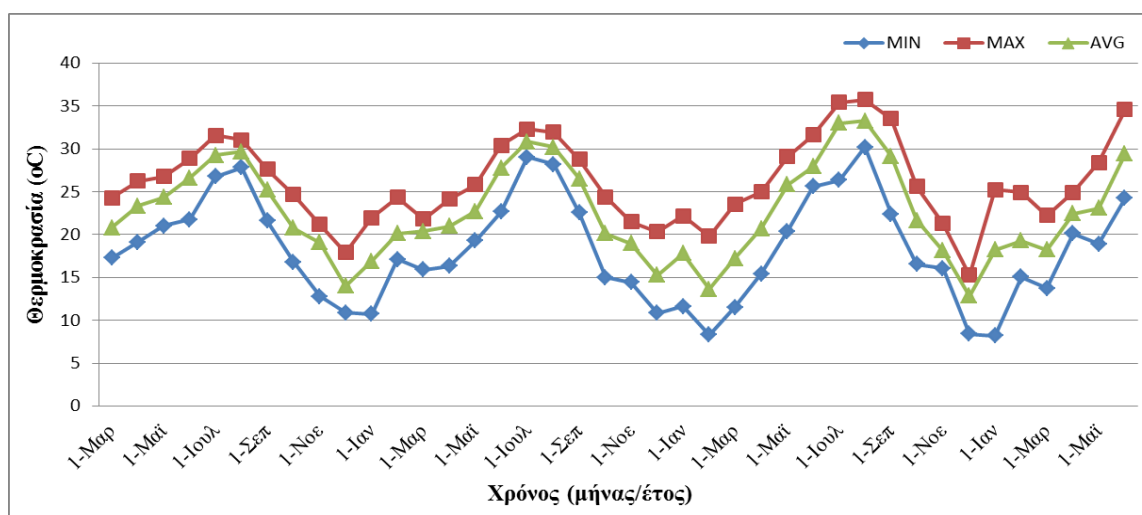
Π.ΙΙΙ.2.1.5 Συνθήκες ριζοβολίας και ανάπτυξης των μοσχευμάτων

(α) Συνθήκες θερμοκρασίας στο γυάλινο θερμαινόμενο θερμοκήπιο

Στο σχήμα Π.ΙΙΙ.1 παρουσιάζονται η μέγιστη, η ελάχιστη και η μέση θερμοκρασία στο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γ.Π.Α. Το θερμοκήπιο τους καλοκαιρινούς μήνες βαφόταν για μείωση της θερμοκρασίας.

(β) Συχνότητα ψεκασμού υδρονέφωσης

Στην υδρονέφωση η συχνότητα ψεκασμού από το Μάιο έως το Σεπτέμβριο ήταν 15 sec ανά 15 min, ενώ από τον Οκτώβριο έως τον Απρίλιο 15 sec ανά 30 min, ενώ η θερμοκρασία του υποστρώματος διατηρούταν στους 22 °C, με καλώδιο ηλεκτρικής αντίστασης.



Σχήμα Π.ΙΙΙ.1. Μέγιστη, ελάχιστη και μέση θερμοκρασία στο θερμοκήπιο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου, Γ.Π.Α. κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

Π.ΙΙΙ.2.1.6 Πειραματικά σχέδια - Εκτίμηση αποτελεσμάτων

(α) Εκτίμηση αποτελεσμάτων στο στάδιο της ριζοβολίας των μοσχευμάτων

Τα ποσοστά ριζοβολίας εκτιμήθηκαν κάθε δύο εβδομάδες για τέσσερις - οκτώ συνολικά εβδομάδες (ανάλογα με το είδος του φυτού), εξετάζοντας την εμφάνιση ρίζας μέσα από την οπή στο κάτω μέρος κάθε κυψελίδας, καθώς και την αντίσταση του μοσχεύματος στο τράβηγμα, ως ένδειξη αγκίστρωσης λόγω ριζοβολίας.

Χρησιμοποιήθηκαν 20 μοσχεύματα ανά χειρισμό (τέσσερις επαναλήψεις με πέντε μοσχεύματα ανά θεραπεία), σε κάθε εποχή. Ο αριθμός των επαναλήψεων (n) κάθε πειράματος αναγράφεται στους πίνακες.

(β) Εκτίμηση αποτελεσμάτων στο στάδιο της ανάπτυξης των ριζοβολημένων μοσχευμάτων

Τα πειράματα ανάπτυξης των φυταρίων στα διάφορα υποστρώματα διαρκούσαν τρεις μήνες και για κάθε είδος καταγράφονταν σε μηνιαία διαστήματα το ποσοστό επιβίωσης των φυταρίων, ο αριθμός και το μήκος των κύριων βλαστών, και ο αριθμός των σχηματιζόμενων πλάγιων βλαστών. Ο αριθμός των επαναλήψεων (n) κάθε πειράματος αναγράφεται στους πίνακες.

II.III.2.1.7 Στατιστική ανάλυση

Στα πειράματα ακολουθήθηκε το Εντελώς Τυχαιοποιημένο Σχέδιο (ΕΤΣ) και εφαρμόστηκαν μονοπαραγοντικά, διπαραγοντικά και τριπαραγοντικά σχέδια, ανάλογα με το κάθε επιμέρους πειραματικό στάδιο. Η σημαντικότητα των αποτελεσμάτων ελέγχθηκε με ανάλυση της διασποράς (ANOVA) και η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο Students σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$ ή $P \leq 0,001$. 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 τα σύμβολο (* ή ** ή ***) δίπλα από κάθε τιμή του F , δηλώνει ότι οι τιμές αυτές του F ήταν σημαντικές σε επίπεδο σημαντικότητας 5% ή 1% ή 0,1%. Στο τέλος κάθε πίνακα αποτελεσμάτων αναγράφεται ο αριθμός των επαναλήψεων που χρησιμοποιήθηκαν ανά επέμβαση.

II.III.2.2 ΕΙΔΙΚΟ ΜΕΡΟΣ

II.III.2.2.1 *Anthyllis barba-jovis*

II.III.2.2.1.1 Μοσχεύματα βλαστού

Μοσχεύματα κορυφής βλαστού, μήκους 15 cm περίπου, συλλέχθηκαν από καλλιεργούμενα ενήλικα άτομα *A. barba-jovis*, από το Βοτανικό Κήπο της Φιλοδασικής Ένωσης Αθηνών (Δάσος Καισαριανής Βύρωνα) (37°57'37.0"N, 23°47'53.4"E), τον Απρίλιο (Εικ. II.III.1α), τον Αύγουστο (Εικ. II.III.1β), τον Οκτώβριο (Εικ. II.III.1γ) και τον Ιανουάριο (Εικ. II.III.1δ), ενδεικτικά για τις τέσσερις εποχές, δηλαδή της άνοιξης, του καλοκαιριού, του φθινοπώρου και του χειμώνα. Τα πειράματα διεξήχθησαν δύο χρόνια, το 2013 και το 2014.



Εικόνα II.III.1. Τυπικά μοσχεύματα κορυφής βλαστού *A. barba-jovis* συλλογής άνοιξης (α), καλοκαίρι (β), φθινόπωρο (γ) και χειμώνα (δ).

II.III.2.2.1.2 Ανάπτυξη φυταρίων

Επειδή η ριζοβολία των μοσχευμάτων ήταν ανεπιτυχής, για το πείραμα ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκαν *in vitro* παραγμένα φυτάρια *A. barba-jovis*.

Τα φυτάρια μεταφέρθηκαν για *ex vitro* εγκλιματισμό σε φυτοδοχείο (όγκου 500 ml) με υπόστρωμα τύρφης : περλίτη (1:1, v/v). Τα φυτοδοχεία καλύφθηκαν με πλαστική μεμβράνη sanitas και τοποθετήθηκαν σε θάλαμο ελεγχόμενων συνθηκών (20 °C), 16h φωτοπερίοδο) για μία εβδομάδα, πριν τη μεταφορά τους σε θερμαινόμενο θερμοκήπιο (αναλυτική περιγραφή στο II.II.2.1.3). Πριν τη μεταφορά τους στο θερμοκήπιο αφαιρέθηκε η πλαστική μεμβράνη sanitas από τα φυτοδοχεία.

Μετά την ολοκλήρωση του εγκλιματισμού (1 μήνα), ακολούθησε μεταφύτευση των εγκλιματισμένων φυταρίων σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (2:1, v/v) και λιπαίνονταν μία φορά το μήνα με 2 ή 4 g L⁻¹ με υδατοδιαλυτό λίπασμα (Nutrileaf 60, 20-20-20), 100 ml διαλύματος ανά φυτό ή σε υπόστρωμα εμπλουτισμένης τύρφης: περλίτη (2:1, v/v), χωρίς λίπανση.

II.III.2.2.2 *Ballota acetabulosa*

II.III.2.2.2.1 Μοσχεύματα βλαστού

Μονοστέλεχα μοσχεύματα κορυφής βλαστού, μήκους 15 cm περίπου, συλλέχθηκαν από επιλεγμένα ενήλικα αυτοφυή φυτά *B. acetabulosa*, από την Πάρνηθα (38°08'10.8"N, 23°44'36.4"E), τον Απρίλιο (Εικ. II.III.2α), τον Αύγουστο (Εικ. II.III.2β), τον Οκτώβριο (Εικ. I.III.2γ) και τον Ιανουάριο (Εικ. II.III.2δ), ενδεικτικά για τις τέσσερις εποχές, δηλαδή της άνοιξης, του καλοκαιριού, του φθινοπώρου και του χειμώνα. Τα πειράματα διεξήχθησαν δύο χρόνια, το 2013 και το 2014, αλλά λόγω της ομοιότητας των αποτελεσμάτων, τα αποτελέσματα για τα δύο έτη υπολογίστηκαν μαζί.

Νωρίς την άνοιξη (Μάρτιο) εκπτύσσονται οι νεαροί βλαστοί, και η περίοδος της επιμήκυνση και της βλαστική τους ανάπτυξη διαρκεί έως της αρχές του καλοκαιριού. Έτσι την άνοιξη (Απρίλιο) τα μοσχεύματα συλλέχθηκαν από τους νέους βλαστούς, οι οποίοι είχαν επιμηκυνθεί και είχαν το κατάλληλο μήκος που επέτρεψε τη συλλογή μοσχευμάτων. Το καλοκαίρι οι βλαστοί ξυλοποιούνται, ενώ παράλληλα αρχίζει και ο σχηματισμός ταξιανθιών. Η περίοδος ανθοφορίας διαρκεί μέχρι τις αρχές Αυγούστου. Αυτή την περίοδο το φυτό παρουσιάζει μία ξερή – χλωρωτική εμφάνιση. Ως εκ τούτου, τον Ιούλιο, συλλέχθηκαν ξυλώδη χλωρωτικά μοσχεύματα χωρίς άνθη. Το φθινόπωρο τα φυτά συνεχίζουν να έχουν χλωρωτική

εμφάνιση, γι' αυτό τα μοσχεύματα που συλλέχθηκαν τον Οκτώβριο είχαν παρόμοια εμφάνιση με τα μοσχεύματα το καλοκαιριού. Προς το τέλος του φθινοπώρου - αρχές χειμώνα τα φυτά αρχίζουν να ανακάμπτουν και τα μοσχεύματα που συλλέχθηκαν τον Ιανουάριο ήταν ξυλώδη στελέχη. Σε όλα τα μοσχεύματα αφαιρέθηκαν τα κατώτερα φύλλα.



Εικόνα Π.ΙΙΙ.2. Τυπικά μοσχεύματα κορυφής βλαστού *B. acetabulosa* συλλογής άνοιξης (α), καλοκαίρι (β), φθινόπωρο (γ) και χειμώνα (δ).

Π.ΙΙΙ.2.2.2.2 Ανάπτυξη φυταρίων

Τα φυτάρια που παράγονταν από τα μοσχεύματα μεταφυτεύονταν στη συνέχεια σε διάφορα υποστρώματα, δέχονταν διάφορες λιπάνσεις και παρακολουθείτο η ανάπτυξή τους σε μηνιαία βάση για τρεις μήνες.

- I. Τα φυτάρια που παράχθηκαν από τα μοσχεύματα του χειμώνα 2012 μεταφυτεύθηκαν το Μάρτιο 2013 σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (2:1, v/v) και λιπαίνονταν μία φορά το μήνα με 2 ή 4 g L⁻¹ με υδατοδιαλυτό λίπασμα (Nutrileaf 60, 20-20-20), 100 ml διαλύματος ανά φυτό ή σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη: κομπόστα στεμφύλων (1:1:1, v/v/v), χωρίς λίπανση.
- II. Τα φυτάρια που παράχθηκαν από τα μοσχεύματα του άνοιξης 2013 μεταφυτεύθηκαν το Μάρτιο 2013 σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (2:1, v/v) και λιπαίνονταν μία φορά το μήνα με 2 ή 4 g L⁻¹ με υδατοδιαλυτό λίπασμα (Nutrileaf 60, 20-20-20), 100 ml διαλύματος ανά φυτό ή σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη: κομπόστα στεμφύλων (3:2:1, v/v/v), χωρίς λίπανση.
- III. Τα φυτάρια που παράχθηκαν από τα μοσχεύματα του καλοκαιριού 2013 μεταφυτεύθηκαν το Μάρτιο 2013 σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (2:1, v/v) και λιπαίνονταν μία φορά το μήνα με 2 ή 4 g L⁻¹ με υδατοδιαλυτό λίπασμα (Nutrileaf 60, 20-20-20), 100 ml διαλύματος ανά φυτό ή σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη: κομπόστα στεμφύλων (3:2:1,

v/v/v), χωρίς λίπανση ή σε έδαφος: περλίτη: κομπόστα στεμφύλων (3:2:1, v/v/v), χωρίς λίπανση.

II.III.2.2.3 *Clinopodium creticum* - *Clinopodium nepeta*

II.III.2.2.3.1 Μοσχεύματα βλαστού

Μονοστέλεχα μοσχεύματα κορυφής βλαστού της *C. creticum* (Εικ. II.III.3α) και της *C. nepeta* (Εικ. II.III.3β), μήκους 15 cm περίπου, συλλέχθηκαν από ενήλικα φυτά που καλλιεργούνταν στο θερμοκήπιο του εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής τοπίου του Γ.Π.Α (37°58'57.8"N, 23°42'18.9"E). Το πείραμα πραγματοποιήθηκε για ένα χρόνο. Τα μοσχεύματα συλλέχθηκαν τον Αύγουστο 2013, Οκτώβριο 2013, Ιανουάριο 2014 και Απρίλιο 2014.

Τα ενήλικα φυτά της *C. creticum* είχαν προέλθει τρία ριζοβολημένα μοσχεύματα *C. creticum* που μας παραχωρήθηκαν από το Μεσογειακό Αγρονομικό Ινστιτούτου Χανίων, ενώ της *C. nepeta* από μοσχεύματα από ενήλικα αυτοφυή φυτά που βρέθηκαν στον Αρχαιολογικό Χώρο Αμφιάρειο, Ωρωπός, Αττική (38°17'28.4"N, 23°50'46.7"E).



Εικόνα II.III.3. Τυπικό μονοστέλεχο μόσχευμα κορυφής βλαστού *C. creticum* (α) και *C. nepeta* (β).

II.III.2.2.3.2 Ανάπτυξη φυταρίων

Τα φυτάρια που παράγονταν από τα μοσχεύματα και των δύο ειδών μεταφυτεύονταν στη συνέχεια σε διάφορα υποστρώματα, δέχονταν διάφορες λιπάνσεις και παρακολουθείτο η ανάπτυξή τους σε μηνιαία βάση για τρεις μήνες.

- I. Τα φυτάρια που παράχθηκαν από τα μοσχεύματα του Ιανουαρίου 2014 και του Απριλίου μεταφυτεύθηκαν το Μάρτιο και τον Απρίλιο του 2014, αντίστοιχα, σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (2:1, v/v) και λιπαίνονταν μία φορά το μήνα με 2 ή 4 g L⁻¹ με

υδατοδιαλυτό λίπασμα (Nutrileaf 60, 20-20-20), 100 ml διαλύματος ανά φυτό ή σε υπόστρωμα εμπλουτισμένης τύρφης: περλίτη (2:1, v/v), χωρίς λίπανση.

II.III.2.2.3 Καταστροφικό πείραμα

Τον Ιουλίου 2014 μετά το τέλος του πειράματος ανάπτυξης (Μάρτιος 2014 - Ιούνιος 2014) πραγματοποιήθηκε καταστροφικό πείραμα, στο οποίο μετρήθηκε το νωπό και ξηρό βάρος του υπέργειου μέρους του φυτού, καθώς και το νωπό και ξηρό βάρος του υπόγειου μέρους.

- I. Νωπό Βάρος υπέργειου μέρους (g): Το υπέργειο μέρος κόπηκε στη βάση του κεντρικού βλαστού 1 cm πάνω από το υπόστρωμα ανάπτυξης και χωρίστηκε σε δύο μέρη. Το ένα μέρος ήταν από 0 - 20 cm και το άλλο από 20 cm και πάνω. Τοποθετήθηκαν σε χάρτινες σακούλες και αμέσως μετρήθηκε το νωπό βάρος τους σε ζυγό ακριβείας.
- II. Ξηρό Βάρος υπέργειου μέρους (g): Μετά την ξήρανση του υπέργειου μέρους στο ξηραντήριο στους 75 °C για τρεις μέρες, μετρήθηκε το βάρος των αποξηραμένων βλαστών σε ζυγό ακριβείας.
- III. Νωπό Βάρος ρίζας (g): Οι ρίζες αφού ξεπλύθηκαν πολύ καλά με άφθονο νερό για να απομακρυνθεί όλο το υπόστρωμα, τοποθετήθηκαν για 10 min σε χαρτί για να απορροφήσει την περίσσια υγρασίας. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε χάρτινες σακούλες και μετρήθηκε το νωπό βάρος τους σε ζυγό ακριβείας.
- IV. Ξηρό Βάρος ρίζας (g): Μετά την ξήρανση των ριζών στο ξηραντήριο στους 75 °C για τρεις μέρες, μετρήθηκε το βάρος των αποξηραμένων ριζών σε ζυγό ακριβείας.

II.III.2.2.4 *Scabiosa hymettia*

II.III.2.2.4.1 Μοσχεύματα βλαστού

Μοσχεύματα *S. hymettia* από την κορυφή της βλάστησης που το καθένα φέρει 2 - 4 πλάγιους βλαστούς, μήκους 15 cm περίπου, συλλέχθηκαν από ενήλικα αυτοφυή φυτά από την Πάρνηθα (38°08'06.7"N, 23°44'32.8"E), τον Απρίλιο (Εικ. II.III.4α), τον Αύγουστο (Εικ. II.III.4β), τον Οκτώβριο (Εικ. II.III.4γ) και τον Ιανουάριο (Εικ. II.III.4δ), ενδεικτικά για τις τέσσερις εποχές, δηλαδή της άνοιξης, του καλοκαιριού, του φθινοπώρου και του χειμώνα. Τα πειράματα διεξήχθησαν δύο χρόνια, το 2013 και το 2014, αλλά λόγω της ομοιότητας των αποτελεσμάτων των δύο ετών, τα αποτελέσματα για το έτος υπολογίστηκαν μαζί.

Από τα φυτά *S. hymettia* εκπύσσονται νέοι βλαστοί στις αρχές της άνοιξης (Μάρτιο) και η βλαστική ανάπτυξή τους διαρκεί μέχρι τις αρχές του καλοκαιριού. Έτσι, την άνοιξη (Απρίλιος), τα μοσχεύματα συλλέχθηκαν από τους νέους βλαστούς, οι οποίοι είχαν το κατάλληλο μήκος που επέτρεπε τη συλλογή μοσχεύματος. Η ανάπτυξη των βλαστών ολοκληρώθηκε τον Ιούνιο, όπου και ακολούθησε η ανθοφορία, η οποία διήρκησε μέχρι τις αρχές Αυγούστου. Οι σπόροι ήταν ώριμοι και έτοιμοι προς συλλογή από τις αρχές Αυγούστου μέχρι τα τέλη Σεπτεμβρίου. Στις αρχές Αυγούστου τα φυτά που είχαν ανθίσει πρώτα παρουσίασαν ελαφριά χλώρωση. Πιο συγκεκριμένα τα κατώτερα φύλλα μαραίνονταν και στη συνέχεια ξηραίνονταν, ενώ τα φύλλα της κορυφής ήταν χλωρωτικά. Ως εκ τούτου, τον Αύγουστο, συλλέχθηκαν ξυλώδη μοσχεύματα χωρίς ανθοταξία. Από τα μέσα του φθινοπώρου τα φυτά άρχιζαν να ανακάμπτουν από την ξηρασία και να εκπύσσονται νέα φύλλα, γι' αυτό τα μοσχεύματα που συλλέχθηκαν τον Οκτώβριο ήταν ξυλώδη στελέχη χωρίς χλωρωτική εμφάνιση. Από τα μέσα του χειμώνα εμφανίζονται οι νέοι βλαστοί (μασχαλαιά) στο κορυφαίο τμήμα του βλαστού. Τα μοσχεύματα που συλλέχθηκαν τον Ιανουάριο ήταν ξυλώδη στελέχη με νέα φύλλα. Όλα τα παλαιά, κιτρινωπά φύλλα αφαιρέθηκαν από τα μοσχεύματα πριν την τοποθέτησή τους για ριζοβολία (Εικ. II.III.5).

Τα μοσχεύματα τοποθετήθηκαν για 2 εβδομάδες στην υδρονέφωση και ακολούθως στον πάγκο του θερμοκηπίου σε ημι-σκιερή θέση για έξι εβδομάδες. Το ποσοστό ριζοβολίας εκτιμήθηκαν κάθε δύο εβδομάδες για οχτώ συνολικά εβδομάδες.



Εικόνα II.III.4. Τυπικά μοσχεύματα κορυφής της βλάστησης *S. hymettia* συλλογής άνοιξης (α), καλοκαίρι (β), φθινόπωρο (γ) και χειμώνα (δ).



Εικόνα II.III.5. Μόσχευμα *S. hymettia* πριν (α) και μετά (β) την αφαίρεση των παλαιών, κιτρινισμένων φύλλων.

II.III.2.2.4.2 Ανάπτυξη φυταρίων

Τα φυτάρια που παράγονταν από τα μοσχεύματα μεταφυτεύονταν στη συνέχεια σε διάφορα υποστρώματα, δέχονταν διάφορες λιπάνσεις και παρακολουθείτο η ανάπτυξή τους σε μηνιαία βάση για τρεις μήνες.

- I. Τα φυτάρια που παράχθηκαν από τα μοσχεύματα του Απριλίου 2013 μεταφυτεύθηκαν τον Ιούλιο 2013 σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (2:1, v/v) και λιπαίνονταν μία φορά το μήνα με 2 ή 4 g L⁻¹ με υδατοδιαλυτό λίπασμα (Nutrileaf 60, 20-20-20), 100 ml διαλύματος ανά φυτό ή σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτης: κομπόστα στεμφύλων (1:1:1, v/v/v), χωρίς λίπανση.
- II. Τα φυτάρια που παράχθηκαν από τα μοσχεύματα του Αυγούστου 2013 μεταφυτεύθηκαν τον Οκτώβριο 2013 σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (2:1, v/v) και λιπαίνονταν μία φορά το μήνα με 2 ή 4 g L⁻¹ με υδατοδιαλυτό λίπασμα (Nutrileaf 60, 20-20-20), 100 ml διαλύματος ανά φυτό ή σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη: κομπόστα στεμφύλων (3:2:1, v/v/v), χωρίς λίπανση.
- III. Τα φυτάρια που παράχθηκαν από τα μοσχεύματα του Οκτωβρίου 2013 - 2014 μεταφυτεύθηκαν τον Ιανουάριο 2014 - 2015 σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (2:1, v/v) και λιπαίνονταν μία φορά το μήνα με 2 ή 4 g L⁻¹ με υδατοδιαλυτό λίπασμα (Nutrileaf 60, 20-20-20), 100 ml διαλύματος ανά φυτό ή σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη: κομπόστα στεμφύλων (3:2:1, v/v/v), χωρίς λίπανση ή σε έδαφος: περλίτη: κομπόστα στεμφύλων (3:2:1, v/v/v), χωρίς λίπανση.
- IV. Τα φυτάρια που παράχθηκαν από τα μοσχεύματα του Ιανουαρίου 2014 - 2015, Απριλίου 2014 - 2015, Αυγούστου 2014 - 2015, Οκτώβριο 2014 - 2015, μεταφυτεύθηκαν το Μάρτιο 2014 - 2015, Ιούλιο 2014 - 2015, Οκτώβριο 2014 - 2015 και Ιανουάριο 2015 - 2016 (αντίστοιχα) σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (2:1, v/v) και λιπαίνονταν μία φορά το

μήνα με 2 ή 4 g L⁻¹ με υδατοδιαλυτό λίπασμα (Nutrileaf 60, 20-20-20), 100 ml διαλύματος ανά φυτό ή σε υπόστρωμα εμπλουτισμένης τύρφη: περλίτη (2:1, v/v), χωρίς λίπανση.

Σε όλα τα πειράματα εκτός από το (III) πείραμα, πάρθηκαν οι εξής μετρήσεις: αριθμός των κύριων βλαστών, μήκος κύριων βλαστών (η μέτρησή του γινόταν από το χείλος της γλάστρας) και αριθμός πλαγίων βλαστών. Στο (III) πείραμα πάρθηκαν οι εξής μετρήσεις: αριθμός των κύριων βλαστών και ύψος μόνο του μεγαλύτερου βλαστού (η μέτρησή του γινόταν από το υπόστρωμα ανάπτυξης).

II.III.2.2.4.3 Καταστροφικό πείραμα

Τον Ιουλίου 2014 και 2015 μετά το τέλος των πειραμάτων ανάπτυξης Μάρτιος 2014 - Ιούνιος 2014 και Μάρτιος 2015 - Ιούνιος 2015, αντίστοιχα, πραγματοποιήθηκε καταστροφικό πείραμα, στο οποίο μετρήθηκαν το νωπό και ξηρό βάρος του υπέργειου μέρους του φυτού και το νωπό και ξηρό βάρος του υπόγειου μέρους των φυτών.

- I. Νωπό Βάρος υπέργειου μέρους (g): Το υπέργειο μέρος κόπηκε στη βάση του κεντρικού βλαστού 1 cm πάνω από το υπόστρωμα ανάπτυξης. Τοποθετήθηκαν σε χάρτινες σακούλες και αμέσως μετρήθηκε το νωπό βάρος τους σε ζυγό ακριβείας.
- II. Ξηρό Βάρος υπέργειου μέρους (g): Μετά την ξήρανση του υπέργειου μέρους στο ξηραντήριο στους 75 °C για τρεις μέρες, μετρήθηκε το βάρος των αποξηραμένων βλαστών σε ζυγό ακριβείας.
- III. Νωπό Βάρος ρίζας (g): Οι ρίζες αφού ξεπλύθηκαν πολύ καλά με άφθονο νερό για να απομακρυνθεί όλο το υπόστρωμα, τοποθετήθηκαν για 10 min σε χαρτί για να απορροφήσει την περίσσια υγρασία. Στη συνέχεια τοποθετήθηκαν σε χάρτινες σακούλες και μετρήθηκε το νωπό βάρος τους σε ζυγό ακριβείας.
- IV. Ξηρό Βάρος ρίζας (g): Μετά την ξήρανση των ριζών στο ξηραντήριο στους 75 °C για τρεις μέρες, μετρήθηκε το βάρος των αποξηραμένων ριζών σε ζυγό ακριβείας.

II.III.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

II.III.3.1 *Anthyllis barba-jovis*

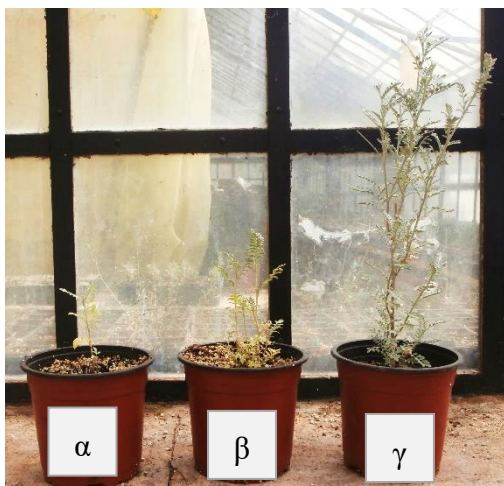
II.III.3.1.1 Μοσχεύματα βλαστού

Ο πολλαπλασιασμός του είδους με μοσχεύματα κορυφής βλαστού, μήκους 15 cm περίπου που συλλέχθηκαν από ενήλικα φυτά *A. barba-jovis*, δεν ήταν επιτυχής σε καμία εποχή και με καμία μεταχείριση και τις δύο χρονιές που διεξήχθη.

II.III.3.1.2 Ανάπτυξη φυταρίων

Επειδή η ριζοβολία των μοσχευμάτων ήταν ανεπιτυχής, για το πείραμα ανάπτυξης χρησιμοποιήθηκαν *in vitro* παραγμένα φυτάρια *A. barba-jovis*.

Τα φυτάρια, τρεις μήνες μετά τη μεταφύτευση, επιβίωσαν 100% σε όλες τις μεταχειρίσεις που δοκιμάστηκαν. Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ως προς τον αριθμό των κύριων βλαστών που σχηματίστηκαν μεταξύ των διαφόρων υποστρωμάτων μεταφύτευσης, ενώ το μέσο μήκος των κύριων βλαστών ήταν μεγαλύτερο στα φυτάρια που δέχθηκαν λίπανση ανεξαρτήτως συγκέντρωσης (Πίν. II.III.1). Περισσότεροι πλάγιοι βλαστοί ανά κύριο βλαστό σχηματίστηκαν από τα φυτάρια που λιπαίνονταν με υψηλή συγκέντρωση λιπάσματος (4 g L^{-1}), χωρίς στατιστικά σημαντική διαφορά από τα φυτάρια που δέχτηκαν χαμηλή συγκέντρωση λιπάσματος (2 g L^{-1}) (Πίν. II.III.1, Εικ. II.III.6).



Εικόνα II.III.6. Φυτόριο *A. barba-jovis* αμέσως μετά την τοποθέτησε σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (2:1, v/v) (α), 30 ημέρες (β) και 90 ημέρες (γ) μετά από την εφαρμογή λίπανσης με 2 g L^{-1} Nutrileaf.

Πίνακας Π.ΙΙΙ.1. Επίδραση του υποστρώματος μεταφύτευσης και της λίπανσης στην ανάπτυξη *in vitro* φυταρίων *A. barba-jovis*, κατά τη διάρκεια των τριών μηνών της περιόδου εγκατάστασης (Δεκέμβριο 2014 με Μάρτιο 2015).

Χρόνος (ημέρες)	Υπόστρωμα μεταφύτευσης			F
	Τύρφη-Περλίτης 2:1 (v/v), λίπανση ανά 30 ημέρες (2 g L ⁻¹)	Τύρφη-Περλίτης 2:1 (v/v), λίπανση ανά 30 ημέρες (4 g L ⁻¹)	Τύρφη Εμπλουτισμένη- Περλίτης 2:1 (v/v), χωρίς λίπανση	
Επιβίωση φυταρίων (%)				
	100	100	100	
Αριθμός κύριων βλαστών				
0	1,0 ± 0,0 a	1,0 ± 0,0 a	1,0 ± 0,0 a	NS
30	1,0 ± 0,0 a	1,0 ± 0,0 a	1,0 ± 0,0 a	NS
60	1,0 ± 0,0 a	1,0 ± 0,0 a	1,0 ± 0,0 a	NS
90	1,0 ± 0,0 a	1,0 ± 0,0 a	1,0 ± 0,0 a	NS
Μήκος κύριων βλαστών (cm)				
0	7,5 ± 1,1 a	7,5 ± 1,3 a	7,4 ± 1,1 a	NS
30	11,1 ± 1,4 a	10,8 ± 0,3 a	10,1 ± 1,5 a	NS
60	21,0 ± 1,6 a	21,8 ± 1,5 a	15,7 ± 1,4 b	*
90	36,5 ± 1,8 a	37,9 ± 2,0 a	30,4 ± 1,0 b	**
Αριθμός πλάγιων βλαστών ανά κύριο βλαστό				
0	0,1 ± 0,1 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	NS
30	2,3 ± 0,5 a	2,3 ± 0,7 a	1,0 ± 0,2 a	NS
60	4,9 ± 0,6 a	4,2 ± 0,6 a	2,7 ± 0,4 b	*
90	16,5 ± 1,0 ab	17,5 ± 0,9 a	14,3 ± 0,4 b	*

Οι μέσοι ± τυπικό σφάλμα επί της γραμμής ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικά ή *, **: σημαντικά σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$, αντίστοιχα, $n=30$.

II.III.3.2 *Ballota acetabulosa*

II.III.3.2.1 Μοσχεύματα βλαστού

Η τριπαραγοντική ανάλυση ανέδειξε αλληλεπίδραση μεταξύ της εποχής συλλογής των μοσχευμάτων, της συγκέντρωσης διαλύματος IBA και του χρόνου εμβάπτισης των μοσχευμάτων στο IBA (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται), έτσι τα αποτελέσματα της ριζοβολίας των μοσχευμάτων αναλύθηκαν χωριστά για κάθε εποχή χρησιμοποιώντας διπαραγοντική ανάλυση.

Η ριζοβολία των μοσχευμάτων του *B. acetabulosa* επηρεάστηκε τόσο από την εποχή όσο και από τη μέθοδο εφαρμογής της ορμόνης ριζοβολίας. Η διπαραγοντική ανάλυση έδειξε σημαντική αλληλεπίδραση ανάμεσα στη συγκέντρωση της ορμόνης ριζοβολίας και το χρόνο εφαρμογής σε όλες τις εποχές (Πίν. II.III.2).

Η ορμόνη ριζοβολίας για σε σκόνη για ημι-ξυλώδη μοσχεύματα παρεμπόδισε τη ριζοβολία σε όλες τις εποχές.

Την άνοιξη παρατηρήθηκαν τα υψηλότερα ποσοστά ριζοβολίας σε σχέση με τις άλλες εποχές. Το υψηλότερο ποσοστό ριζοβολίας (97,5%) επιτεύχθηκε μετά από εμβάπτιση των μοσχευμάτων σε διάλυμα με 2000 mg L⁻¹ IBA για 1 min, χωρίς διαφορά από το ποσοστό ριζοβολίας (87,5%) μοσχευμάτων που εμβάπτιστηκαν σε 3000 mg L⁻¹ IBA για 1 min (Πίν. II.III.2). Η σκόνη για ξυλώδη μοσχεύματα έδωσε παρόμοια ποσοστά ριζοβολίας με το μάρτυρα (Πίν. II.III.2).

Το καλοκαίρι παρατηρήθηκαν σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά ριζοβολίας (<30%) από την άνοιξη και οι επεμβάσεις που ξεχώρισαν ήταν η εμβάπτιση σε διάλυμα 3000 mg L⁻¹ IBA για 1 min ή σε διάλυμα 1000 mg L⁻¹ IBA για 5 min χωρίς διαφορά από τη σκόνη για ξυλώδη μοσχεύματα (Πίν. II.III.2).

Το φθινόπωρο το ποσοστό ριζοβολίας κυμάνθηκε σε παραπλήσια ποσοστά στις περισσότερες μεταχειρίσεις και το υψηλότερο ποσοστό ριζοβολίας παρατηρήθηκε μετά από χειρισμό με 2000 mg L⁻¹ IBA με χρόνο εμβάπτισης 5 min (82,5%), ενώ στη σκόνη για ημι-ξυλώδη μοσχεύματα παρατηρήθηκε το χαμηλότερο ποσοστό ριζοβολίας (25%) (Πίν. II.III.2).

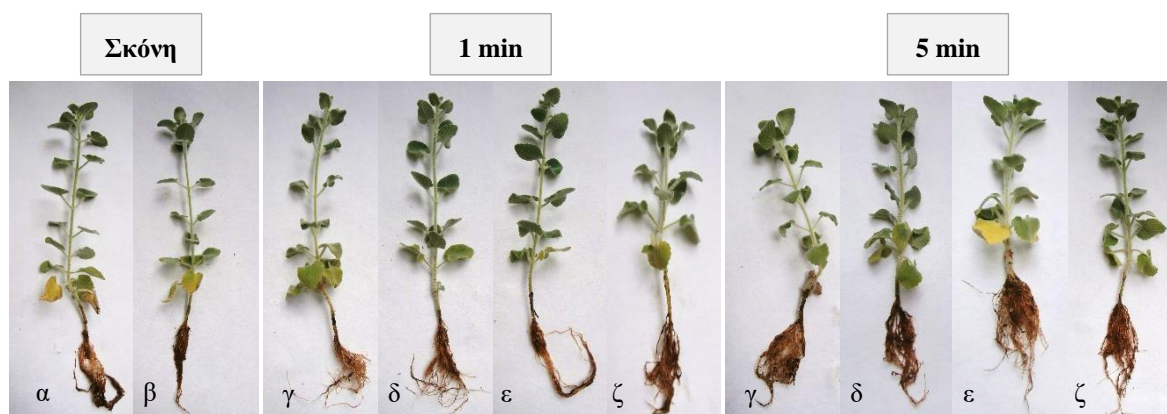
Το χειμώνα γενικά παρατηρήθηκαν χαμηλά ποσοστά ριζοβολίας (<50%) και οι επεμβάσεις που ξεχώρισαν ήταν η εμβάπτιση σε διάλυμα με 1000 - 3000 mg L⁻¹ IBA για 1 min ή η εφαρμογή σκόνης για ξυλώδη μοσχεύματα, ενώ η σκόνη για ημι-ξυλώδη μοσχεύματα έδωσε το χαμηλότερο ποσοστό ριζοβολίας (10%) (Πίν. II.III.2, Εικ. II.III.7).

Αναφορικά με τη χρήση ορμόνης ριζοβολίας IBA υπό μορφή σκόνης για ξυλώδη μοσχεύματα ήταν πιο αποτελεσματική και το ποσοστό ριζοβολίας κυμάνθηκε από 25 - 52,5%,

συγκριτικά με τη χρήση σκόνης για ημιξυλώδη μοσχεύματα που οδήγησε σε ποσοστά χαμηλότερα από 25% την άνοιξη, φθινόπωρο και χειμώνα που έφθασε σχεδόν μηδενικές τιμές το καλοκαίρι (Πίν. II.ΙΙΙ.2).

Η εφαρμογή IBA προώθησε τη ριζοβολία των μοσχευμάτων σε σύγκριση με το μάρτυρα, ενώ ο χρόνος εμφάνισης των μοσχευμάτων για 1 min ήταν πιο αποτελεσματός από τα 5 min (Πίν. II.ΙΙΙ.2). Τα μοσχεύματα που εμβαπτίστηκαν για 1 min σε συγκέντρωση από 1000 έως 3000 mg L⁻¹, ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό σε σύγκριση με το μάρτυρα, σε όλες τις εποχές (Πίν. II.ΙΙΙ.2). Από την άλλη πλευρά, τα μοσχεύματα εμβαπτίστηκαν για 5 min, σε συγκέντρωση από 1000 έως 3000 mg L⁻¹, ριζοβόλησαν σε παρόμοιο ποσοστό σε σύγκριση με το μάρτυρα, σε όλες τις εποχές, εκτός από τα μοσχεύματα που συλλέχθηκαν το φθινόπωρο, που ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό μετά από εμβάπτιση σε διάλυμα 2000 mg L⁻¹ IBA για 5 min (Πίν. II.ΙΙΙ.2).

Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι η άνοιξη και το φθινόπωρο ευνοούν τη ριζοβολία, ενώ αντίθετα το καλοκαίρι ήταν η πλέον ακατάλληλη εποχή για τη ριζοβολία των μοσχευμάτων.



Εικόνα II.ΙΙΙ.7. Μοσχεύματα *B. acetabulosa*, συλλογής Ιανουαρίου, που ριζοβόλησαν σε σκόνη IBA για ξυλώδη μοσχεύματα (α), για ημι- ξυλώδη μοσχεύματα (β) και σε 0 (Μάρτυρας) (γ), 1000 (δ), 2000 (ε) ή 3000 (ζ) mg L⁻¹ IBA για 1 ή 5 min.

Πίνακας II.III.2. Επίδραση της συγκέντρωσης IBA, του χρόνου εμφάνισης, καθώς και του τρόπου εφαρμογής του IBA, στο ποσοστό ριζοβολίας των μοσχευμάτων της *B. acetabulosa* στις τέσσερις εποχές.

Συγκέντρωση IBA (mg L ⁻¹) / Χρόνος (min)	Εποχή συλλογής			
	Άνοιξη	Καλοκαίρι	Φθινόπωρο	Χειμώνα
Σκόνη – ξυλώδη*	40,0 ± 2,5 cd	25,0 ± 4,0 ab	52,5 ± 4,7 bc	40,0 ± 2,5 abc
Σκόνη – ημιξυλώδη*	5,0 ± 3,1 e	0,0 ± 0,0 e	25,0 ± 4,0 e	10,0 ± 4,7 e
0 / 1	45,0 ± 6,4 cd	5,0 ± 3,1 de	35,0 ± 7,3 de	20,0 ± 6,4 de
1000 / 1	75,0 ± 5,6 b	17,5 ± 3,1 bc	57,5 ± 6,4 b	45,0 ± 5,0 ab
2000 / 1	97,5 ± 2,5 a	17,5 ± 3,1 bc	55,0 ± 6,5 b	45,0 ± 5,0 ab
3000 / 1	87,5 ± 4,0 a	30,0 ± 6,4 a	50,0 ± 6,8b cd	50,0 ± 0,0 a
0 / 5	47,5 ± 4,7 cd	12,5 ± 0,0 cd	37,5 ± 4,0 cde	35,0 ± 6,1 bc
1000 / 5	37,5 ± 4,0 d	25,0 ± 4,0 ab	45,0 ± 6,4 bcd	20,0 ± 5,0 de
2000 / 5	50,0 ± 5,6 c	15,0 ± 2,5 c	82,5 ± 5,0 a	30,0 ± 5,0 cd
3000 / 5	45,0 ± 3,1 cd	15,0 ± 2,5 c	42,5 ± 6,4 bcd	35,0 ± 6,1 bc
<i>F</i> _{Χρόνου}	-	-	-	-
<i>F</i> _{Συγκέντρωσης IBA}	-	-	-	-
<i>F</i> _{Χρόνου x Συγκέντρωσης IBA}	***	**	*	**
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	***	***	***	***

* Τα δεδομένα δεν συμμετέχουν στην 2-way ANOVA

Οι μέσοι ± τυπικό σφάλμα επί της γραμμής ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

*, **, ***: σημαντικά σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$, $P \leq 0,001$, αντίστοιχα, $n=40$.

II.III.3.2.2 Ανάπτυξη φυταρίων

Τα φυτάρια που παράχθηκαν από μοσχεύματα του χειμώνα 2012, την άνοιξη 2013 και καλοκαίρι 2013, τρεις μήνες μετά τη μεταφύτευση, επιβίωσαν σε υψηλά επίπεδα σε όλες τις μεταχειρίσεις (73 - 100%) (Πίν. II.III.3, II.III.4, II.III.5).

Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ως προς τον αριθμό των κύριων βλαστών που σχηματίστηκαν στα φυτάρια στο πείραμα ανάπτυξης Μάρτιο με Ιούνιο (2014), ενώ στα πειράματα ανάπτυξης Ιούνιο με Σεπτέμβριο (2014) και Νοέμβριο (2013) με Φεβρουάριο (2014) τα φυτάρια που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (2:1, v/v) σχημάτισαν περισσότερους κύριους βλαστούς ανεξαρτήτως της λίπανσης που εφαρμόστηκε σε σύγκριση με τα υποστρώματα που περιείχαν κομπόστα στεμφύλων (Πίν. II.III.3, II.III.4, II.III.5, Εικ. II.III.8).

Στατιστικές διαφορές δεν παρατηρήθηκαν επίσης στον αριθμό των κόμβων των κύριων βλαστών στα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν στα πειράματα ανάπτυξης Ιούνιο με Σεπτέμβριο (2014) και Νοέμβριο (2013) με Φεβρουάριο (2014), ενώ στο πείραμα ανάπτυξης Νοέμβριο (2013) με Φεβρουάριο (2014) υψηλότερος αριθμός κόμβων παρατηρήθηκε στα υποστρώματα που περιείχαν τύρφη: περλίτη (2:1, v/v) ανεξαρτήτως της λίπανσης που εφαρμόστηκε (Πίν. II.ΙΙΙ.3, II.ΙΙΙ.4, II.ΙΙΙ.5).

Όσον αφορά το μήκος των κύριων βλαστών ήταν μεγαλύτερο στα φυτάρια που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (2:1, v/v) ανεξαρτήτως της λίπανσης που εφαρμόστηκε σε σύγκριση με τα υποστρώματα που περιείχαν κομπόστα στεμφύλων (Πίν. II.ΙΙΙ.3, II.ΙΙΙ.4, II.ΙΙΙ.5, Εικ. II.ΙΙΙ.8).

Τέλος, στο πείραμα ανάπτυξης Μάρτιο με Ιούνιο (2014), περισσότεροι πλάγιοι βλαστοί ανά κύριο βλαστό σχηματίστηκαν από τα φυτάρια που λιπαίνονταν με χαμηλή συγκέντρωση λιπάσματος σε σχέση με αυτά που λιπαίνονταν με υψηλή συγκέντρωση και με αυτά που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα με κομπόστα στεμφύλων και δε λιπάνθηκαν (Πίν. II.ΙΙΙ.3). Στο πείραμα ανάπτυξης Ιούνιο με Σεπτέμβριο (2014), περισσότεροι πλάγιοι βλαστοί ανά κύριο βλαστό σχηματίστηκαν από τα φυτάρια που λιπαίνονταν είτε με υψηλή, είτε με χαμηλή συγκέντρωση λιπάσματος σε σχέση με αυτά που δεν δέχθηκαν λίπανση (Πίν. II.ΙΙΙ.4), ενώ στο πείραμα ανάπτυξης Νοέμβριο (2013) με Φεβρουάριο (2014) τα φυτάρια δεν σχημάτισαν πλάγιους βλαστούς σε κανένα υπόστρωμα μεταφύτευσης που δοκιμάστηκε.



Εικόνα II.ΙΙΙ.8. Χαρακτηριστική ανάπτυξη φυταρίων *B. acetabulosa*, μετά από 3 μήνες καλλιέργεια σε: τύρφη: περλίτη (2:1, v/v) με 4 g L^{-1} Nutrileaf (α) και με 2 g L^{-1} Nutrileaf (β), τύρφη: περλίτης: κομπόστα στεμφύλων (3:2:1, v/v/v), χωρίς λίπανση (γ) και έδαφος: περλίτη: κομπόστα στεμφύλων (3:2:1, v/v/v), χωρίς λίπανση (δ).

Πίνακας Π.ΙΙΙ.3. Επίδραση του υποστρώματος μεταφύτευσης και της λίπανσης στην ανάπτυξη ριζοβολημένων μοσχευμάτων βλαστού χειμώνα 2012 του *B. acetabulosa*, κατά τη διάρκεια των τριών μηνών της περιόδου εγκατάστασης (Μάρτιο με Ιούνιο 2013).

Χρόνος (ημέρες)	Υπόστρωμα μεταφύτευσης			F
	Τύρφη-Περλίτης 2:1 (v/v), λίπανση ανά 30 ημέρες (2 g L ⁻¹)	Τύρφη-Περλίτης 2:1 (v/v), λίπανση ανά 30 ημέρες (4 g L ⁻¹)	Τύρφη-Περλίτης- Κομπόστα Στεμφύλων 1:1:1 (v/v), χωρίς λίπανση	
Επιβίωση φυταρίων (%)				
	80	87	73	
Αριθμός κύριων βλαστών				
0	1,5 ± 0,2 a	1,5 ± 0,3 a	1,2 ± 0,1 a	NS
30	1,5 ± 0,2 a	1,5 ± 0,3 a	1,3 ± 0,1 a	NS
60	1,8 ± 0,4 a	1,7 ± 0,3 a	1,4 ± 0,2 a	NS
90	1,9 ± 0,4 a	1,7 ± 0,3 a	1,5 ± 0,2 a	NS
Μήκος κύριων βλαστών (cm)				
0	5,4 ± 0,9 a	5,8 ± 0,6 a	5,1 ± 1,0 a	NS
30	23,4 ± 2,2 a	18,4 ± 1,3 b	16,3 ± 1,2 b	*
60	35,4 ± 3,4 a	28,5 ± 2,8 a	27,2 ± 2,0 a	NS
90	43,2 ± 3,3 a	36,9 ± 2,9 ab	31,4 ± 2,4 b	*
Αριθμός κόμβων ανά κύριο βλαστό				
0	3,8 ± 0,4 a	3,9 ± 0,4 a	4,2 ± 0,5 a	NS
30	6,9 ± 0,6 a	6,9 ± 0,6 a	6,1 ± 0,4 a	NS
60	10,1 ± 0,7 a	10,2 ± 1,4 a	8,0 ± 0,5 a	NS
90	12,2 ± 0,7 a	11,7 ± 1,6 a	8,9 ± 0,7 a	NS
Αριθμός πλάγιων βλαστών ανά κύριο βλαστό				
0	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	-
30	0,2 ± 0,2 a	0,2 ± 0,2 a	0,0 ± 0,0 a	NS
60	5,8 ± 1,5 a	4,9 ± 1,1 a	2,2 ± 0,6 a	NS
90	11,4 ± 1,6 a	6,9 ± 0,9 b	3,0 ± 0,8 c	***

Οι μέσοι ± τυπικό σφάλμα επί της γραμμής ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικά ή *, ***: σημαντικά σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,001$, αντίστοιχα, $n=15$.

Πίνακας Π.ΙΙΙ.4. Επίδραση του υποστρώματος μεταφύτευσης και της λίπανσης στην ανάπτυξη ριζοβολημένων μοσχευμάτων βλαστού άνοιξης 2013 του *B. acetabulosa*, κατά τη διάρκεια των τριών μηνών της περιόδου εγκατάστασης (Ιούνιο με Σεπτέμβριο 2013).

Χρόνος (ημέρες)	Υπόστρωμα μεταφύτευσης			F
	Τύρφη-Περλίτης 2:1 (v/v), λίπανση ανά 30 ημέρες (2 g L ⁻¹)	Τύρφη-Περλίτης 2:1 (v/v), λίπανση ανά 30 ημέρες (4 g L ⁻¹)	Τύρφη-Περλίτης- Κομπόστα Στεμφύλων 3:2:1 (v/v), χωρίς λίπανση	
Επιβίωση φυταρίων (%)				
	85	90	80	
Αριθμός κύριων βλαστών				
0	1,2 ± 0,2 a	1,0 ± 0,0 a	1,3 ± 0,2 a	NS
30	1,3 ± 0,2 b	1,9 ± 0,2 a	1,3 ± 0,2 b	*
60	2,8 ± 0,3 a	3,1 ± 0,2 a	1,8 ± 0,2 b	*
90	3,7 ± 0,4 a	3,2 ± 0,2 ab	2,4 ± 0,3 b	*
Μήκος κύριων βλαστών (cm)				
0	13,2 ± 1,2 a	12,9 ± 0,8 a	13,9 ± 1,5 a	NS
30	20,2 ± 1,6 a	17,8 ± 2,2 a	16,1 ± 2,0 a	NS
60	26,5 ± 1,5 a	25,4 ± 1,2 a	16,4 ± 2,5 b	*
90	29,6 ± 1,4 a	25,8 ± 0,8 a	16,7 ± 2,1 b	*
Αριθμός κόμβων ανά κύριο βλαστό				
0	6,9 ± 0,5 a	7,1 ± 0,3 a	7,5 ± 2,5 a	NS
30	9,9 ± 0,7 a	8,3 ± 0,7 a	8,6 ± 0,7 a	NS
60	9,1 ± 0,8 a	9,1 ± 0,6 a	10,0 ± 1,1 a	NS
90	11,2 ± 0,8 a	9,1 ± 0,4 a	10,6 ± 0,9 a	NS
Αριθμός πλάγιων βλαστών ανά κύριο βλαστό				
0	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	-
30	3,5 ± 0,6 a	4,6 ± 0,8 a	2,4 ± 0,5 a	NS
60	5,9 ± 0,8 a	6,8 ± 0,9 a	4,5 ± 1,0 a	NS
90	8,2 ± 0,9 a	9,6 ± 1,2 a	4,9 ± 1,0 b	**

Οι μέσοι ± τυπικό σφάλμα επί της γραμμής ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικά ή **: σημαντικά σε $P \leq 0,01$, $n=20$.

Πίνακας Π.ΙΙΙ.5. Επίδραση του υποστρώματος μεταφύτευσης και της λίπανσης στην ανάπτυξη μοσχευμάτων κορυφής βλαστού καλοκαιριού 2013 *B. acetabulosa*, κατά τη διάρκεια των τριών μηνών της περιόδου εγκατάστασης (Νοέμβριο 2013 με Φεβρουάριο 2014).

Χρόνος (ημέρες)	Υπόστρωμα μεταφύτευσης				F
	Τύρφη-Περλίτης 2:1 (v/v), λίπανση ανά 30 ημέρες (2 g L ⁻¹)	Τύρφη-Περλίτης 2:1 (v/v), λίπανση ανά 30 ημέρες (4 g L ⁻¹)	Τύρφη-Περλίτης- Κομπόστα Στεμφύλων 3:2:1 (v/v), χωρίς λίπανση	Έδαφος-Περλίτης- Κομπόστα Στεμφύλων 3:2:1 (v/v), χωρίς λίπανση	
Επιβίωση φυταρίων (%)					
	100	82	100	100	
Αριθμός κύριων βλαστών					
0	1,7 ± 0,3 a	1,4 ± 0,2 a	1,5 ± 0,3 a	1,0 ± 0,0 a	NS
30	3,2 ± 0,4 a	4,1 ± 0,6 a	3,3 ± 0,4 a	2,5 ± 0,5 a	NS
60	3,3 ± 0,5 a	4,8 ± 0,8 a	3,4 ± 0,4a	2,6 ± 0,6 a	NS
90	3,7 ± 0,4 ab	4,9 ± 0,7 a	3,2 ± 0,4 b	2,6 ± 0,6 b	*
Μήκος κύριων βλαστών (cm)					
0	9,6 ± 0,8 a	11,8 ± 2,1 a	9,4 ± 0,8 a	11,4 ± 0,7 a	NS
30	13,6 ± 1,0 a	12,1 ± 1,9 a	10,6 ± 1,3 a	10,3 ± 0,8 a	NS
60	24,4 ± 2,5 a	22,5 ± 1,8 a	14,3 ± 1,5 b	15,4 ± 1,2 b	***
90	59,1 ± 5,7 a	52,2 ± 3,2 a	23,1 ± 2,0 b	26,6 ± 3,3 b	***
Αριθμός κόμβων ανά βλαστό					
0	2,1 ± 0,2 a	1,4 ± 0,2 bc	1,7 ± 0,2 ab	1,2 ± 0,1 c	*
30	3,5 ± 0,4 a	3,0 ± 0,4 a	2,6 ± 0,3 a	3,2 ± 0,2 a	NS
60	7,3 ± 0,6 a	5,9 ± 0,6 ab	3,8 ± 0,4 c	5,1 ± 0,5 bc	***
90	14,0 ± 1,4 a	12,4 ± 0,9 a	6,9 ± 0,4 b	9,2 ± 0,9 b	***
Αριθμός πλάγιων βλαστών ανά κύριο βλαστό					
0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	-
30	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	-
60	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	-
90	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	-

Οι μέσοι ± τυπικό σφάλμα επί της γραμμής ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικά ή *, ***: σημαντικά σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,001$, αντίστοιχα, $n=11$.

II.III.3.3 *Clinopodium creticum* και *Clinopodium nepeta*

II.III.3.3.1 Μοσχεύματα βλαστού

Η ριζοβολία των μοσχευμάτων του *C. creticum* και *C. nepeta* δεν επηρεάστηκε ούτε από τη συγκέντρωση, ούτε από το χρόνο εμφύτευσης και έγινε με απόλυτη σχεδόν επιτυχία σε όλες τις μεταχειρίσεις και σε όλες τις εποχές με ποσοστό ριζοβολίας 100% στο *C. nepeta* και 80 έως 100% στο *C. creticum* (Πίν. II.III.6, II.III.7, Εικ. II.III.9α, β).

Πίνακας II.III.6. Επίδραση της συγκέντρωσης IBA, του χρόνου εμφύτευσης, καθώς και του τρόπου εφαρμογής του IBA, στο ποσοστό ριζοβολίας των μοσχευμάτων του *C. creticum* στις τέσσερις εποχές.

Συγκέντρωση IBA (mg L ⁻¹) / Χρόνος (min)	Εποχή συλλογής			
	Καλοκαίρι	Φθινόπωρο	Χειμώνα	Άνοιξη
Σκόνη – ημιξυλώδη*	90,0 ± 6,1 ab	80,0 ± 9,4 b	100,0 ± 0,0 a	80,0 ± 9,4 b
Σκόνη – ξυλώδη*	100,0 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a
0 / 1	80,0 ± 5,0 b	100,0 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a	80,0 ± 20,0 b
1000 / 1	100,0 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a
2000 / 1	90,0 ± 6,1 ab	90,0 ± 6,1 ab	100,0 ± 0,0 a	80,0 ± 20,0 b
3000 / 1	80,0 ± 5,0 b	100,0 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a
0 / 5	90,0 ± 6,1 ab	100,0 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a
1000 / 5	90,0 ± 6,1 ab	100,0 ± 0,0 a	90,0 ± 10,0 a	100,0 ± 0,0 a
2000 / 5	100,0 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a	90,0 ± 10,0 a	100,0 ± 0,0 a
3000 / 5	90,0 ± 10,0 ab	80,0 ± 12,3 b	90,0 ± 10,0 a	100,0 ± 0,0 a
<i>F</i> _{Χρόνου}	NS	-	NS	NS
<i>F</i> _{Συγκέντρωσης IBA}	NS	-	NS	NS
<i>F</i> _{Χρόνου x Συγκέντρωσης IBA}	NS	*	NS	NS
<i>F</i> _{one-way ANOVA}	*	*	NS	NS

* Τα δεδομένα δεν συμμετέχουν στην 2-way ANOVA

Οι μέσοι ± τυπικό σφάλμα επί της γραμμής ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικά ή *: σημαντικά σε $P \leq 0,05$, $n=40$.

Πίνακας Π.ΙΙΙ.7. Επίδραση της συγκέντρωσης IBA, του χρόνου εμφάνισης, καθώς και του τρόπου εφαρμογής του IBA, στο ποσοστό ριζοβολίας των μοσχευμάτων του *C. nepeta* στις τέσσερις εποχές.

Συγκέντρωση IBA (mg L ⁻¹) / Χρόνος (min)	Εποχή συλλογής			
	Καλοκαίρι	Φθινόπωρο	Χειμώνα	Άνοιξη
Σκόνη – ημιξυλώδη	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
Σκόνη – ξυλώδη	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
0 / 1	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
1000 / 1	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
2000 / 1	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
3000 / 1	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
0 / 5	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
1000 / 5	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
2000 / 5	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0
3000 / 5	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	100,0 ± 0,0	90,0 ± 10,0

Οι μέσοι ± τυπικό σφάλμα επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. NS: μη σημαντικά, $n=40$.



Εικόνα Π.ΙΙΙ.9. Ριζοβολημένα μοσχεύματα *C. creticum* (α) *C. nepeta* (β).

Π.ΙΙΙ.3.3.2 Ανάπτυξη φυταρίων

Clinopodium creticum

Τα φυτάρια που παράχθηκαν από μοσχεύματα *C. creticum* του Ιανουαρίου 2014 και του Απριλίου 2014, κατά τη διάρκεια και των τεσσάρων μηνών καλλιέργειας (Μάρτιος - Ιούνιος 2014 και Ιούλιος - Οκτώβριος 2014, αντίστοιχα) αντέδρασαν το ίδιο σε ότι αφορά στο ύψος των βλαστών ανεξαρτήτως υποστρώματος και λίπανσης. Όμως τα φυτάρια οδηγήθηκαν στην παραγωγή μακρών, ερπόντων και υδαρών βλαστών, που δεν είναι φυσιολογικός ούτε επιθυμητός τρόπος ανάπτυξης (Πίν. Π.ΙΙΙ.8, Π.ΙΙΙ.9, Εικ. Π.ΙΙΙ.10).

Πίνακας Π.ΙΙΙ.8. Επίδραση του υποστρώματος μεταφύτευσης και της λίπανσης στην ανάπτυξη μοσχευμάτων βλαστού χειμώνα του *C. creticum*, κατά τη διάρκεια των τριών μηνών της περιόδου εγκατάστασης (Μάρτιο - Ιούνιο 2014).

Χρόνος (ημέρες)	Υπόστρωμα μεταφύτευσης			F
	Τύρφη-Περλίτης 2:1 (v/v), λίπανση ανά 30 ημέρες (2 g L ⁻¹)	Τύρφη-Περλίτης 2:1 (v/v), λίπανση ανά 30 ημέρες (4 g L ⁻¹)	Τύρφη Εμπλουτισμένη- Περλίτης 1:1 (v/v), χωρίς λίπανση	
Επιβίωση φυταρίων (%)				
	100	100	100	
Μεταβολή μέσου μήκους βλαστών (cm)				
0	12,8 ± 1,3 a	12,3 ± 1,5 a	14,6 ± 1,1 a	NS
30	24,4 ± 1,9 a	27,1 ± 2,6 a	29,1 ± 3,2 a	NS
60	37,1 ± 2,3 a	44,4 ± 2,3 a	44,9 ± 4,2 a	NS
90	52,7 ± 2,1 a	58,6 ± 3,4 a	60,3 ± 3,9 a	NS

Οι μέσοι ± τυπικό σφάλμα επί της γραμμής ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. NS: μη σημαντικά.

Πίνακας Π.ΙΙΙ.9. Επίδραση του υποστρώματος μεταφύτευσης και της λίπανσης στην ανάπτυξη μοσχευμάτων βλαστού άνοιξης του *C. creticum*, κατά τη διάρκεια των τριών μηνών της περιόδου εγκατάστασης (Ιούλιο - Οκτώβριο 2014).

Χρόνος (ημέρες)	Υπόστρωμα μεταφύτευσης			F
	Τύρφη-Περλίτης 2:1 (v/v), λίπανση ανά 30 ημέρες (2 g L ⁻¹)	Τύρφη-Περλίτης 2:1 (v/v), λίπανση ανά 30 ημέρες (4 g L ⁻¹)	Τύρφη Εμπλουτισμένη- Περλίτης 1:1 (v/v), χωρίς λίπανση	
Επιβίωση φυταρίων (%)				
	100	100	100	
Μεταβολή μέσου μήκους βλαστών (cm)				
0	18,9 ± 0,8 a	22,5 ± 1,7 a	22,6 ± 1,8 a	NS
30	30,0 ± 0,9 a	36,5 ± 2,0 a	31,0 ± 3,5 a	NS
60	35,4 ± 1,4 a	42,3 ± 2,4 a	37,9 ± 3,3 a	NS
90	39,2 ± 1,8 a	43,8 ± 2,3 a	42,8 ± 2,6 a	NS

Οι μέσοι ± τυπικό σφάλμα επί της γραμμής ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. NS: μη σημαντικά.



Εικόνα Π.ΙΙΙ.10. Χαρακτηριστική ανάπτυξη φυταρίων *C. creticum*, μετά από καλλιέργεια 3 μηνών σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (1:1, v/v) με 4 g L^{-1} Nutrileaf (α) και με 2 g L^{-1} Nutrileaf (β), εμπλουτισμένης τύρφης: περλίτη (1:1, v/v), χωρίς λίπανση (γ) (Περίοδος ανάπτυξης Μάρτιος – Ιούνιος 2014).

Clinopodium nepeta

Τα φυτάρια που παράχθηκαν από μοσχεύματα *C. nepeta* του Ιανουαρίου 2014 και του Απριλίου 2014, κατά τη διάρκεια και των τεσσάρων μηνών καλλιέργειας (Μάρτιος - Ιούνιος 2014 και Ιούλιος - Οκτώβριος 2014, αντίστοιχα) αντέδρασαν το ίδιο και στα τρία υποστρώματα. Άρα ούτε το υπόστρωμα ούτε οι λιπάνσεις δεν επηρέασαν το ύψος των βλαστών. Όμως τα φυτάρια οδηγήθηκαν στην παραγωγή μακριών, ερπόντων και υδαρών βλαστών, που δεν είναι φυσιολογικός ούτε επιθυμητός τρόπος ανάπτυξης (Πίν. Π.ΙΙΙ.10, Π.ΙΙΙ.11, Εικ. Π.ΙΙΙ.10).

Πίνακας Π.ΙΙΙ.10. Επίδραση του υποστρώματος μεταφύτευσης και της λίπανσης στην ανάπτυξη μοσχευμάτων βλαστού χειμώνα του *C. nepeta*, κατά τη διάρκεια των τριών μηνών της περιόδου εγκατάστασης (Μάρτιο – Ιούνιο 2014).

Χρόνος (ημέρες)	Υπόστρωμα μεταφύτευσης			F
	Τύρφη-Περλίτης 2:1 (v/v), λίπανση ανά 30 ημέρες (2 g L ⁻¹)	Τύρφη-Περλίτης 2:1 (v/v), λίπανση ανά 30 ημέρες (4 g L ⁻¹)	Τύρφη Εμπλουτισμένη- Περλίτης 1:1 (v/v), χωρίς λίπανση	
Επιβίωση φυταρίων (%)				
	100	100	100	
Μεταβολή μέσου μήκους βλαστών (cm)				
0	34,1 ± 2,0 a	30,8 ± 2,0 a	31,6 ± 2,0 a	NS
30	56,7 ± 2,6 a	54,2 ± 2,2 a	57,4 ± 2,2 a	NS
60	82,5 ± 2,2 a	77,0 ± 2,3 a	79,3 ± 2,7 a	NS
90	94,9 ± 3,3 a	89,2 ± 2,7 a	94,2 ± 3,4 a	NS

Οι μέσοι ± τυπικό σφάλμα επί της γραμμής ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. NS: μη σημαντικά, $n=20$.

Πίνακας Π.ΙΙΙ.11. Επίδραση του υποστρώματος μεταφύτευσης και της λίπανσης στην ανάπτυξη μοσχευμάτων βλαστού άνοιξης του *C. nepeta*, κατά τη διάρκεια των τριών μηνών της περιόδου εγκατάστασης (Ιούλιο – Οκτώβριο 2014).

Χρόνος (ημέρες)	Υπόστρωμα μεταφύτευσης			F
	Τύρφη-Περλίτης 2:1 (v/v), λίπανση ανά 30 ημέρες (2 g L ⁻¹)	Τύρφη-Περλίτης 2:1 (v/v), λίπανση ανά 30 ημέρες (4 g L ⁻¹)	Τύρφη Εμπλουτισμένη- Περλίτης 1:1 (v/v), χωρίς λίπανση	
Επιβίωση φυταρίων (%)				
	100	100	100	
Μεταβολή μέσου μήκους βλαστών (cm)				
0	24,6 ± 1,7 a	22,6 ± 1,4 a	28,0 ± 1,4 a	NS
30	41,0 ± 2,7 a	33,1 ± 3,2 a	40,6 ± 3,8 a	NS
60	46,4 ± 2,9 a	45,3 ± 2,4 a	49,4 ± 2,2 a	NS
90	49,2 ± 3,2 a	48,6 ± 2,7 a	52,1 ± 3,3 a	NS

Οι μέσοι ± τυπικό σφάλμα επί της γραμμής ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. NS: μη σημαντικά.



Εικόνα Π.ΙΙΙ.11. Χαρακτηριστική ανάπτυξη φυταρίων *C. nepeta*, μετά από καλλιέργεια 3 μηνών σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (1:1, v/v) με 4 g L^{-1} Nutrileaf (α) και με 2 g L^{-1} Nutrileaf (β), εμπλουτισμένης τύρφης: περλίτη (1:1, v/v), χωρίς λίπανση (γ). (Περίοδος ανάπτυξης Μάρτιος – Ιούνιος 2014).

Π.ΙΙΙ.3.3.3 Καταστροφικό πείραμα

Clinopodium creticum - *Clinopodium nepeta*

Τον Ιούλιο 2014 μετά το τέλος του πειράματος ανάπτυξης (Μάρτιος 2014 - Ιούνιος 2014) και των δύο ειδών πραγματοποιήθηκε καταστροφικό πείραμα, στο οποίο μετρήθηκε το νωπό και ξηρό βάρος του υπέργειου και του υπόγειου τμήματος των 20 φυτών ανά μεταχείριση.

Τα φυτά του είδους *C. creticum* που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (2:1, v/v) και λιπαίνονταν μηνιαία με τη μεγαλύτερη συγκέντρωση λιπάσματος είχαν μεγαλύτερο νωπό και ξηρό βάρος σε σύγκριση με τα φυτά που λιπαίνονταν με τη χαμηλή συγκέντρωση λιπάσματος και με αυτά που καλλιεργήθηκαν σε εμπλουτισμένη τύρφη: περλίτη (2:1, v/v), χωρίς λίπανση (Πίν. Π.ΙΙΙ.12). Όσον αφορά το νωπό και ξηρό βάρος του υπόγειου τμήματος δεν υπήρχε καμία σημαντική διαφορά (Πίν. Π.ΙΙΙ.12).

Όσον αφορά τα φυτά του είδους *C. nepeta* που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα με τύρφη: περλίτη (2:1, v/v) και δέχονταν μια λίπανση ανά 30 μέρες με 4 g L^{-1} Nutrileaf, είχαν μεγαλύτερο νωπό και ξηρό βάρος σε σύγκριση από τα φυτά που καλλιεργήθηκαν σε τύρφη: περλίτη (2:1, v/v) αλλά δέχονταν λίπανση ανά 30 μέρες με 2 g L^{-1} Nutrileaf ή από αυτά που καλλιεργήθηκαν σε εμπλουτισμένη τύρφη και περλίτη (2:1, v/v), χωρίς λίπανση (Πίν. Π.ΙΙΙ.13). Όσον αφορά το νωπό και ξηρό βάρος του υπόγειου τμήματος δεν υπήρχε καμία σημαντική διαφορά (Πίν. Π.ΙΙΙ.13).

Πίνακας Π.ΙΙΙ.12. Επίδραση του υποστρώματος μεταφύτευσης και της λίπανσης στο νωπό και ξηρό βάρος του υπέργειου και υπόγειου μέρους του *C. creticum*, του πειράματος εγκατάστασης Μαρτίου - Ιουνίου 2014.

Μετρήσεις	Υπόστρωμα μεταφύτευσης			F
	Τύρφη-Περλίτης 2:1 (v/v), λίπανση ανά 30 ημέρες (2 g L ⁻¹)	Τύρφη-Περλίτης 2:1 (v/v), λίπανση ανά 30 ημέρες (4 g L ⁻¹)	Τύρφη Εμπλουτισμένη- Περλίτης 1:1 (v/v), χωρίς λίπανση	
Υπέργειο τμήμα (Φύλλα και Βλαστοί)				
Νωπό Βάρος	15,3 ± 0,4 b	20,2 ± 1,4 a	10,1 ± 0,7 c	***
Ξηρό Βάρος	5,2 ± 0,3 b	7,3 ± 0,4 a	3,6 ± 0,3 c	***
Υπόγειο τμήμα (Ρίζες)				
Νωπό Βάρος	14,9 ± 0,9 a	14,2 ± 1,2 a	13,1 ± 0,9 a	NS
Ξηρό Βάρος	2,6 ± 0,2 a	2,6 ± 0,2 a	2,3 ± 0,2 a	NS

Οι μέσοι ± τυπικό σφάλμα επί της γραμμής ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικά ή ***: σημαντικά σε $P \leq 0,001$, $n=20$.

Πίνακας Π.ΙΙΙ.13. Επίδραση του υποστρώματος μεταφύτευσης και της λίπανσης στο νωπό και ξηρό βάρος του υπέργειου και υπόγειου μέρους του *C. nepeta*, του πειράματος εγκατάστασης Μαρτίου - Ιουνίου 2014.

Μετρήσεις	Υπόστρωμα μεταφύτευσης			F
	Τύρφη-Περλίτης 2:1 (v/v), λίπανση ανά 30 ημέρες (2 g L ⁻¹)	Τύρφη-Περλίτης 2:1 (v/v), λίπανση ανά 30 ημέρες (4 g L ⁻¹)	Τύρφη Εμπλουτισμένη- Περλίτης 1:1 (v/v), χωρίς λίπανση	
Υπέργειο τμήμα (Φύλλα και Βλαστοί)				
Νωπό Βάρος	15,3 ± 0,9 b	21,2 ± 0,9 a	9,23 ± 0,6 c	***
Ξηρό Βάρος	6,5 ± 0,2 b	8,6 ± 0,4 a	3,6 ± 0,2 c	***
Υπόγειο τμήμα (Ρίζες)				
Νωπό Βάρος	12,4 ± 0,8 a	13,2 ± 0,6 a	13,2 ± 0,8 a	NS
Ξηρό Βάρος	1,8 ± 0,1 a	2,0 ± 0,1 a	1,7 ± 0,1 a	NS

Οι μέσοι ± τυπικό σφάλμα επί της γραμμής ακολουθούνται από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικά ή ***: σημαντικά σε $P \leq 0,001$, $n=20$.

II.III.3.4 *Scabiosa hymettia*

II.III.3.4.1 Μοσχεύματα βλαστού

Η τριπαραγοντική ανάλυση ανέδειξε αλληλεπίδραση μεταξύ της εποχής συλλογής των μοσχευμάτων, της συγκέντρωσης διαλύματος IBA και του χρόνου εμφάνισης των μοσχευμάτων στο IBA (τα αποτελέσματα δεν παρουσιάζονται), έτσι τα αποτελέσματα της ριζοβολίας των μοσχευμάτων αναλύθηκαν χωριστά για κάθε εποχή χρησιμοποιώντας διπαραγοντική ανάλυση.

Η ριζοβολία των μοσχευμάτων *S. hymettia* επηρεάστηκε τόσο από την εποχή όσο και από τη μέθοδο εφαρμογής της ορμόνης ριζοβολίας. Η διπαραγοντική ανάλυση έδειξε σημαντική αλληλεπίδραση ανάμεσα στη συγκέντρωση της ορμόνης ριζοβολίας και το χρόνο εφαρμογής σε όλες τις εποχές εκτός από το χειμώνα που επηρεάστηκε τόσο από τη συγκέντρωση του IBA που δοκιμάστηκε όσο και από το χρόνο εμφάνισης των μοσχευμάτων σε αυτό (Πίν. II.III.14).

Το χειμώνα παρατηρήθηκαν υψηλά ποσοστά ριζοβολίας που έφθασαν το 100% όταν τα μοσχεύματα εμφάνιστηκαν σε διάλυμα 1000 mg L^{-1} IBA για 1 min ή όταν εφαρμόστηκε σκόνη ριζοβολίας για ξυλώδη μοσχεύματα, ενώ παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν όταν τα μοσχεύματα εμφάνιστηκαν σε διάλυμα με 2000 ή 3000 mg L^{-1} IBA για 1 min (Πίν. II.III.14).

Το φθινόπωρο το υψηλότερο ποσοστό ριζοβολίας (100%) παρατηρήθηκε όταν τα μοσχεύματα εμφάνιστηκαν σε διάλυμα 1000 mg L^{-1} IBA για 1 min, χωρίς στατιστική διαφορά από τα μοσχεύματα που εμφάνιστηκαν σε διάλυμα με 3000 mg L^{-1} IBA για 1 min ή όταν εφαρμόστηκε σκόνη ριζοβολίας για ξυλώδη μοσχεύματα. Στη σκόνη για ημι-ξυλώδη μοσχεύματα και στο διάλυμα χωρίς IBA ανεξάρτητα του χρόνου εφαρμογής αυτού στα μοσχεύματα παρατηρήθηκε το χαμηλότερο ποσοστό ριζοβολίας (50 - 62,5%) (Πίν. II.III.14).

Την άνοιξη το υψηλότερο ποσοστό ριζοβολίας (67,5%) επιτεύχθηκε μετά από εμφάνιση των μοσχευμάτων σε διάλυμα με 3000 mg L^{-1} IBA για 5 min, χωρίς διαφορά από το ποσοστό ριζοβολίας μοσχευμάτων (60,0%) που εμφάνιστηκαν σε διάλυμα με 1000 mg L^{-1} IBA για 5 min (Πίν. II.III.14, Εικ. II.III.12). Ενώ η σκόνη για ημι-ξυλώδη μοσχεύματα και η εφαρμογή διαλύματος χωρίς IBA ανεξάρτητα του χρόνου εφαρμογής αυτού στα μοσχεύματα έδωσαν τα χαμηλότερα ποσοστά ριζοβολίας (7,5 - 12,5%) (Πίν. II.III.14, Εικ. II.III.12).

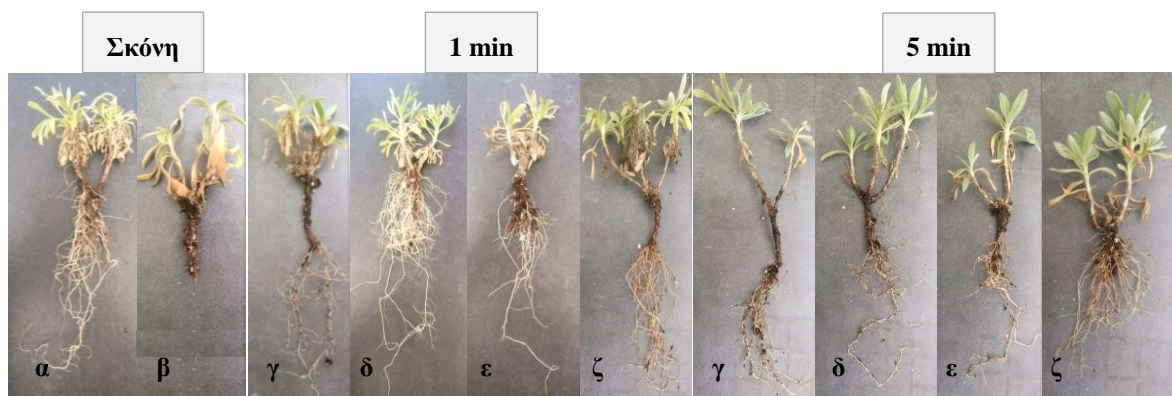
Το καλοκαίρι παρατηρήθηκαν σημαντικά χαμηλότερα ποσοστά ριζοβολίας (<45%) σε σχέση με τις άλλες εποχές και οι επεμβάσεις που ξεχώρισαν ήταν η εμφάνιση των

μοσχευμάτων σε διάλυμα 1000 mg L^{-1} IBA για 1 min ή η εφαρμογή σκόνης ριζοβολίας για ξυλώδη μοσχεύματα (Πίν. II.ΙΙΙ.14).

Σε όλες τις εποχές, τα μοσχεύματα που είχαν υποστεί μεταχείριση με σκόνη ριζοβολίας για ημι-ξυλώδη μοσχεύματα ριζοβόλησαν σε χαμηλότερα ποσοστά, σε σύγκριση με εκείνα που εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα 1000 mg L^{-1} IBA για 1 min (το τελευταίο περιέχει παρόμοια ποσότητα ορμόνης ριζοβολίας με τη σκόνη), ενώ παρόμοια αποτελέσματα παρατηρήθηκαν με τα μοσχεύματα που εμβαπτίστηκαν σε διάλυμα χωρίς IBA (μάρτυρα) για 1 ή 5 min (Πίν. II.ΙΙΙ.14). Η χρήση διαλύματος αιθανόλης, χωρίς IBA, είχε παρεμποδιστική δράση στη ριζοβολία σε όλες τις εποχές, εκτός του φθινοπώρου (Πίν. II.ΙΙΙ.14).

Αναφορικά με τη χρήση ορμόνης ριζοβολίας IBA υπό μορφή σκόνης για ξυλώδη μοσχεύματα ήταν πιο αποτελεσματική σε όλες τις εποχές, συγκριτικά με τη χρήση σκόνης για ημιξυλώδη μοσχεύματα (Πίν. II.ΙΙΙ.14).

Η εφαρμογή IBA προώθησε τη ριζοβολία των μοσχευμάτων σε σύγκριση με το μάρτυρα, ενώ ο χρόνος εμβάπτισης των μοσχευμάτων για 1 min ήταν πιο αποτελεσματικός από τα 5 min στα μοσχεύματα που συλλέχθηκαν το φθινόπωρο και το χειμώνα, ενώ αντίθετα αποτελέσματα παρατηρήθηκαν στα μοσχεύματα που συλλέχθηκαν την άνοιξη (Πίν. II.ΙΙΙ.14). Από τα παραπάνω αποτελέσματα διαπιστώνεται ότι ο μεγαλύτερος χρόνος εμβάπτισης των μοσχευμάτων στην αυξίνη μειώνει το ποσοστό ριζοβολίας σε όλες τις εποχές εκτός από την άνοιξη. Τα μοσχεύματα που εμβαπτίστηκαν για 1 και 5 min σε συγκέντρωση από 1000 έως 3000 mg L^{-1} , ριζοβόλησαν σε υψηλότερο ποσοστό σε σύγκριση με το μάρτυρα, σε όλες τις εποχές, εκτός από τα μοσχεύματα που συλλέχθηκαν το καλοκαίρι, που ριζοβόλησαν σε χαμηλότερο ποσοστό μετά από εμβάπτιση σε διάλυμα 2000 και 3000 mg L^{-1} IBA για 1 min (Πίν. II.ΙΙΙ.14).



Εικόνα II.ΙΙΙ.12. Μοσχεύματα *S. hymettia*, συλλογής Απριλίου, που ριζοβόλησαν σε σκόνη IBA για ξυλώδη μοσχεύματα (α), για ημι-ξυλώδη μοσχεύματα (β) και σε 0 (Μάρτυρας) (γ), 1000 (δ), 2000 (ε) ή 3000 (ζ) mg L^{-1} IBA για 1 ή 5 min.

Πίνακας Π.ΙΙΙ.14. Επίδραση της συγκέντρωσης IBA, του χρόνου εμφύπτωσης, καθώς και του τρόπου εφαρμογής του IBA, στο ποσοστό ριζοβολίας των μοσχευμάτων του *S. hymettia* στις τέσσερις εποχές.

Συγκέντρωση IBA (mg L ⁻¹) / Χρόνος (min)	Εποχή συλλογής			
	Χειμώνας	Άνοιξη	Καλοκαίρι	Φθινόπωρο
Σκόνη – ημιξυλώδη*	62,5 ± 6,9 c	12,5 ± 4,0 de	0,0 ± 0,0 d	50,0 ± 5,6 d
Σκόνη – ξυλώδη*	100,0 ± 0,0 a	50,0 ± 4,0 bc	45,0 ± 5,0 a	92,5 ± 5,0 ab
0 / 1	65,0 ± 2,5 c	12,5 ± 5,6 de	17,5 ± 0,0 b	55,0 ± 3,1d
1000 / 1	100,0 ± 0,0 a	25,0 ± 4,0 d	37,5 ± 0,0 a	100,0 ± 0,0 a
2000 / 1	87,5 ± 4,0 ab	47,5 ± 6,1 bc	12,5 ± 0,0 bc	82,5 ± 6,4 b
3000 / 1	90,0 ± 4,7 ab	40,0 ± 4,7 c	0,0 ± 0,0 d	92,5 ± 5,0 ab
0 / 5	45,0 ± 5,0 d	7,5 ± 3,1 e	2,5 ± 0,0 cd	62,5 ± 6,9 d
1000 / 5	82,5 ± 8,5 b	60,0 ± 4,7 ab	15,0 ± 0,0 b	82,5 ± 3,1 b
2000 / 5	85,0 ± 4,7 b	50,0 ± 4,0 bc	17,5 ± 0,0 b	80,0 ± 3,1 bc
3000 / 5	80,0 ± 3,1 b	67,5 ± 5,0 a	2,5 ± 0,0 cd	67,5 ± 5,0 cd
<i>F</i> Χρόνου	***	-	-	-
<i>F</i> Συγκέντρωσης IBA	***	-	-	-
<i>F</i> Χρόνου x Συγκέντρωσης IBA	NS	***	**	**
<i>F</i> one-way ANOVA	***	***	***	***

* Τα δεδομένα δεν συμμετέχουν στην 2-way ANOVA

Οι μέσοι ± τυπικό σφάλμα επί της στήλης ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. NS: μη σημαντικά ή **, ***: σημαντικά σε $P \leq 0,01$, $P \leq 0,001$, αντίστοιχα, $n=40$.

Π.ΙΙΙ.3.4 2 Ανάπτυξη φυταρίων

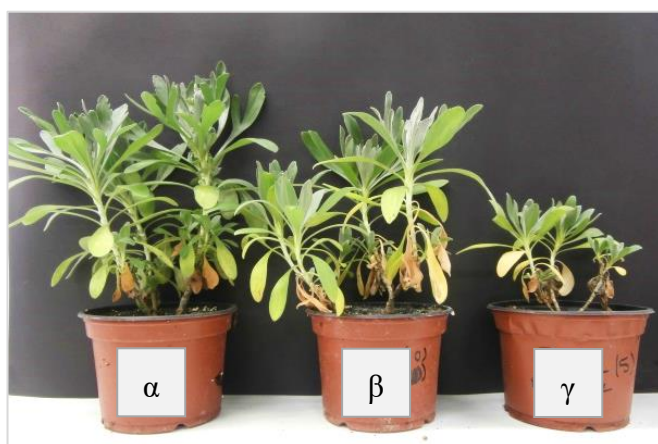
Τα φυτάρια που παράχθηκαν από μοσχεύματα της άνοιξης 2013, τρεις μήνες μετά τη μεταφύτευση, επιβίωσαν κατά 100% στα υποστρώματα με τύρφη: περλίτη, ενώ στο υπόστρωμα με τύρφη: περλίτη: κομπόστα στεμφύλων το ποσοστό επιβίωσης έπεσε στο 35% (Πίν. Π.ΙΙΙ.15). Τα φυτάρια που παράχθηκαν από μοσχεύματα του καλοκαιριού 2013 και του φθινοπώρου 2014, επιβίωσαν σε ικανοποιητικό βαθμό σε όλα τα υποστρώματα ανάπτυξης (80 - 100%) (Πίν. Π.ΙΙΙ.16, Πίν. Π.ΙΙΙ.17). Στο πρώτο πείραμα ανάπτυξης (άνοιξη 2013) παρατηρήθηκε χαμηλό ποσοστό επιβίωσης στο υπόστρωμα που περιείχε κομπόστα στεμφύλων, ενώ στα επόμενα 2 πειράματα (καλοκαίρι 2013 και φθινόπωρο 2014) το ποσοστό επιβίωσης σε αυτό το υπόστρωμα ήταν παρόμοιο με τα άλλα υποστρώματα (80 - 100%).

Ως προς τον αριθμό των κύριων βλαστών που σχηματίστηκαν, δεν παρατηρήθηκαν διαφορές μεταξύ των διαφόρων υποστρωμάτων μεταφύτευσης και στα τρία πειράματα ανάπτυξης (Πίν. Π.ΙΙΙ.15, Π.ΙΙΙ.16, Π.ΙΙΙ.17). Το μήκος των κύριων βλαστών των φυταρίων

στα πειράματα ανάπτυξης του Ιούλιο με Οκτώβριο (2013) και Οκτώβριο (2013) με Ιανουάριο (2014) ήταν μεγαλύτερο στα φυτάρια που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη και δέχθηκαν λίπανση ανεξαρτήτως συγκέντρωσης (Πίν. Π.ΙΙΙ.15, Π.ΙΙΙ.16, Εικ. Π.ΙΙΙ.13, Π.ΙΙΙ.14). Τα φυτάρια στο πείραμα ανάπτυξης Ιανουάριο με Απρίλιο (2014) δεν παρουσίασαν διαφορές στο μήκος βλαστού σε κανένα υπόστρωμα που δοκιμάστηκε (Πίν. Π.ΙΙΙ.17). Περισσότεροι πλάγιοι βλαστοί ανά κύριο βλαστό σχηματίστηκαν από τα φυτάρια που λιπαίνονταν με την υψηλή συγκέντρωση λιπάσματος σε σχέση με αυτά που λιπαίνονταν με τη χαμηλή κατά την περίοδο εγκατάστασης Ιουλίου με Οκτώβριο 2013 και Οκτώβριο 2013 με Ιανουάριο 2014, ενώ τα φυτάρια που μεταφυτεύθηκαν σε υπόστρωμα με κομπόστα στεμφύλων και δε λιπάνθηκαν δεν παρατηρήθηκε έκπτυξη πλάγιων βλαστών (Πίν. Π.ΙΙΙ.15, Π.ΙΙΙ.16, Εικ. Π.ΙΙΙ.13, Π.ΙΙΙ.14). Οι πλάγιοι βλαστοί όπου σχηματίστηκαν, εκπτύχθηκαν σε όλο το μήκος των κύριων βλαστών, ακόμη και κοντά στη βάση.



Εικόνα Π.ΙΙΙ.13. Χαρακτηριστικό φυτάριο σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (2:1, v/v) με 4 g L^{-1} Nutrileaf (α) και με 2 g L^{-1} Nutrileaf (β), τύρφης: περλίτη : κομπόστα στεμφύλων (1:1:1, v/v/v), χωρίς λίπανση (γ). (Περίοδος ανάπτυξης Ιούλιος - Οκτώβριος 2013).



Εικόνα Π.ΙΙΙ.14. Χαρακτηριστικό φυτάριο σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (2:1, v/v) με 4 g L^{-1} Nutrileaf (α) και με 2 g L^{-1} Nutrileaf (β), τύρφης: περλίτη : κομπόστα στεμφύλων (3:2:1, v/v/v), χωρίς λίπανση (γ). (Περίοδος ανάπτυξης Οκτώβριος 2013 - Ιανουάριο 2014).

Πίνακας Π.ΙΙΙ.15. Επίδραση του υποστρώματος μεταφύτευσης και της λίπανσης στην ανάπτυξη ριζοβολημένων μοσχευμάτων άνοιξης 2013 του *S. hymettia*, κατά τη διάρκεια των τριών μηνών της περιόδου εγκατάστασης (Ιούλιο με Οκτώβριο 2013).

Χρόνος (ημέρες)	Υπόστρωμα μεταφύτευσης			F
	Τύρφη-Περλίτης 2:1 (v/v), λίπανση ανά 30 ημέρες (2 g L ⁻¹)	Τύρφη-Περλίτης 2:1 (v/v), λίπανση ανά 30 ημέρες (4 g L ⁻¹)	Τύρφη-Περλίτης- Κομπόστα Στεμφύλων 1:1:1 (v/v), χωρίς λίπανση	
Επιβίωση φυταρίων (%)				
	100	100	35	
Αριθμός κύριων βλαστών				
0	2,9 ± 0,2 a	2,5 ± 0,2 a	2,6 ± 0,3 a	NS
30	3,0 ± 0,2 a	2,5 ± 0,2 a	2,6 ± 0,3 a	NS
60	3,2 ± 0,2 a	2,5 ± 0,2 a	2,6 ± 0,3 a	NS
90	3,3 ± 0,3 a	2,5 ± 0,2 a	2,6 ± 0,3 a	NS
Μήκος κύριων βλαστών (cm)				
0	5,4 ± 0,2 a	5,5 ± 0,4 a	4,2 ± 0,3 a	NS
30	6,2 ± 0,3 a	6,5 ± 0,4 a	4,9 ± 0,4 b	*
60	6,4 ± 0,2 a	6,8 ± 0,4 a	4,9 ± 0,4 b	**
90	6,6 ± 0,2 a	7,2 ± 0,4 a	5,2 ± 0,4 b	**
Αριθμός πλάγιων βλαστών ανά κύριο βλαστό				
0	0,0 ± 0,0 a	0,4 ± 0,4 a	0,0 ± 0,0 a	NS
30	0,0 ± 0,0 b	1,1 ± 0,5 a	0,0 ± 0,0 b	*
60	0,0 ± 0,0 b	1,5 ± 0,7 a	0,0 ± 0,0 b	*
90	0,3 ± 0,2 b	1,7 ± 0,8 a	0,0 ± 0,0 c	*

Οι μέσοι ± τυπικό σφάλμα επί της γραμμής ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. NS: μη σημαντικά ή *, **: σημαντικά σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,01$, αντίστοιχα, $n=20$.

Πίνακας Π.ΙΙΙ.16. Επίδραση του υποστρώματος μεταφύτευσης και της λίπανσης στην ανάπτυξη ριζοβολημένων μοσχευμάτων καλοκαιριού 2013 του *S. hymettia*, κατά τη διάρκεια των τριών μηνών της περιόδου εγκατάστασης (Οκτώβριο 2013 με Ιανουάριο 2014).

Χρόνος (ημέρες)	Υπόστρωμα μεταφύτευσης			F
	Τύρφη-Περλίτης 2:1 (v/v), λίπανση ανά 30 ημέρες (2 g L ⁻¹)	Τύρφη-Περλίτης 2:1 (v/v), λίπανση ανά 30 ημέρες (4 g L ⁻¹)	Τύρφη-Περλίτης- Κομπόστα Στεμφύλων 3:2:1 (v/v), χωρίς λίπανση	
Επιβίωση φυταρίων (%)				
	100	100	80	
Αριθμός κύριων βλαστών				
0	2,7 ± 0,3 a	2,7 ± 0,4 a	2,9 ± 0,8 a	NS
30	2,7 ± 0,3 a	2,8 ± 0,4 a	3,1 ± 0,4 a	NS
60	2,8 ± 0,4 a	3,1 ± 0,4 a	3,1 ± 0,4 a	NS
90	2,8 ± 0,4 a	3,2 ± 0,4 a	3,3 ± 0,4 a	NS
Μήκος κύριων βλαστών (cm)				
0	3,5 ± 0,6 a	3,5 ± 0,5 a	3,9 ± 0,7 a	NS
30	5,5 ± 0,7 a	6,1 ± 0,7 a	4,9 ± 0,8 a	NS
60	7,1 ± 1,4 a	9,6 ± 0,9 a	7,2 ± 0,7 a	NS
90	8,6 ± 1,7 ab	11,4 ± 0,9 a	7,5 ± 0,6 b	*
Αριθμός πλάγιων βλαστών ανά κύριο βλαστό				
0	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	NS
30	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	NS
60	3,5 ± 1,7 ab	7,1 ± 2,8 a	0,0 ± 0,0 b	*
90	4,4 ± 2,0 ab	8,4 ± 2,1 a	0,0 ± 0,0 b	*

Οι μέσοι ± τυπικό σφάλμα επί της γραμμής ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.
NS: μη σημαντικά ή *: σημαντικό σε $P \leq 0,05$, $n=20$.

Πίνακας Π.ΙΙΙ.17. Επίδραση του υποστρώματος μεταφύτευσης και της λίπανσης στην ανάπτυξη ριζοβολημένων μοσχευμάτων φθινόπωρου 2013 του *S. hymettia*, κατά τη διάρκεια των τριών μηνών της περιόδου εγκατάστασης (Ιανουάριο με Απρίλιο 2014).

Χρόνος (ημέρες)	Υπόστρωμα μεταφύτευσης				F
	Τύρφη-Περλίτης 2:1 (v/v), λίπανση ανά 30 ημέρες (2 g L ⁻¹)	Τύρφη-Περλίτης 2:1 (v/v), λίπανση ανά 30 ημέρες (4 g L ⁻¹)	Τύρφη-Περλίτης- Κομπόστα Στεμφύλων 3:2:1 (v/v), χωρίς λίπανση	Έδαφος-Περλίτης- Κομπόστα Στεμφύλων 3:2:1 (v/v), χωρίς λίπανση	
Επιβίωση φυταρίων (%)					
	100	100	100	100	
Αριθμός κύριων βλαστών					
0	2,4 ± 0,3 a	2,7 ± 0,3 a	2,2 ± 0,3 a	2,7 ± 0,4 a	NS
30	2,9 ± 0,3 a	2,5 ± 0,5 a	2,6 ± 0,5 a	3,2 ± 0,5 a	NS
60	2,9 ± 0,3 a	2,4 ± 0,4 a	2,7 ± 0,4 a	2,8 ± 0,4 a	NS
90	2,8 ± 0,3 a	2,4 ± 0,4 a	2,7 ± 0,4 a	3,2 ± 0,4 a	NS
Μήκος κύριων βλαστών (cm)					
0	9,7 ± 0,4 a	10,0 ± 0,3 a	8,1 ± 0,5 b	9,7 ± 0,5 a	NS
30	10,1 ± 0,7 a	10,3 ± 0,7 a	9,8 ± 0,5 a	9,3 ± 0,6 a	NS
60	11,3 ± 0,6 b	13,0 ± 0,9 ab	13,4 ± 0,6 a	12,2 ± 0,7 ab	*
90	13,7 ± 1,0 a	14,2 ± 0,7 a	13,3 ± 0,6 a	12,7 ± 0,7 a	NS

Οι μέσοι ± τυπικό σφάλμα επί της γραμμής ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$.

NS: μη σημαντικά ή *: σημαντικό σε $P \leq 0,05$, $n=20$.

Στα επόμενα πειράματα ανάπτυξης από το Μάρτιο του 2014 μέχρι το Απρίλιο του 2016 χρησιμοποιήθηκαν τρεις διαφορετικές μεταχειρίσεις ήτοι, τύρφη: περλίτη (2:1, v/v) με 4 g L⁻¹ λίπανση μια φορά το μήνα, τύρφη: περλίτη (2:1, v/v) με 2 g L⁻¹ λίπανση μια φορά το μήνα και εμπλουτισμένη τύρφη: περλίτη (2:1, v/v) χωρίς λίπανση. Τα φυτάρια μετά το πέρας κάθε πειράματος επιβίωσαν σε υψηλό ποσοστό (83 - 100%) και στα τρία υποστρώματα ανάπτυξης (Πίν. 18, 19, 20, 21). Δεν παρατηρήθηκαν διαφορές ως προς τον αριθμό των κύριων βλαστών που σχηματίστηκαν. Ως προς το μέσο μήκος των κύριων βλαστών παρατηρήθηκε επιμήκυνση των φυταρίων στο υπόστρωμα που περιείχε τύρφη: περλίτη (2:1, v/v) ανεξαρτήτως της συγκέντρωσης λιπάσματος που εφαρμόστηκε σε όλα τα πειράματα, εκτός από τα πειράματα από το Μάρτιο – Ιούνιο (2014 και 2015), όπου δεν παρατηρήθηκε καμία διαφορά (Πίν. Π.ΙΙΙ.18, Π.ΙΙΙ.19, Π.ΙΙΙ.20, Π.ΙΙΙ.21, Εικ. Π.ΙΙΙ.15, Π.ΙΙΙ.16, Π.ΙΙΙ.17, Π.ΙΙΙ.18). Οι

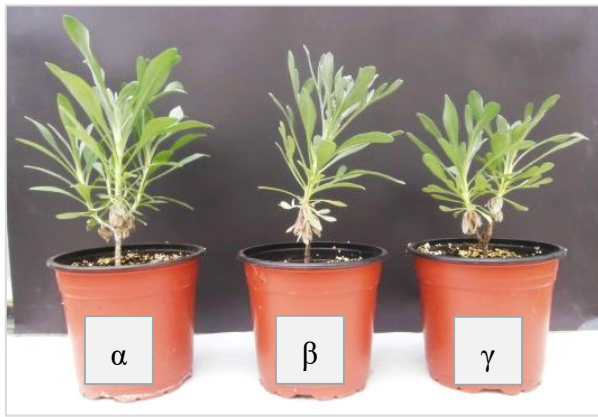
περισσότεροι πλάγιοι βλαστοί ανά κύριο βλαστό σχηματίστηκαν από τα φυτάρια στο υπόστρωμα που περιείχε τύρφη: περλίτη (2:1, v/v) ανεξαρτήτως της συγκέντρωσης λιπάσματος που εφαρμόστηκε, εκτός από τα πειράματα από τον Ιούλιο – Οκτώβριο (2014 και 2015), όπου δεν παρατηρήθηκε έκπτυξη πλάγιων βλαστών σε κανένα υπόστρωμα ανάπτυξης (Πίν. Π.ΙΙΙ.18, Π.ΙΙΙ.19, Π.ΙΙΙ.20, Π.ΙΙΙ.21, Εικ. Π.ΙΙΙ.15, Π.ΙΙΙ.16, Π.ΙΙΙ.17, Π.ΙΙΙ.18). Οι πλάγιοι βλαστοί όπου σχηματίστηκαν, εκπτύχθηκαν σε όλο το μήκος των κύριων βλαστών, ακόμη και κοντά στη βάση.

Η ανάπτυξη των φυταρίων *S. hymettia* δεν παρουσίασε καμία δυσκολία στα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν, ωστόσο η εμπλουτισμένη τύρφη οδήγησε σε μικρότερη επιμήκυνση των βλαστών και στην έκπτυξη μικρότερου αριθμού πλάγιων βλαστών. Αυτό πιθανότατα οφείλεται στο ότι η εμπλουτισμένη τύρφη παρέχει πολύ λιγότερα θρεπτικά συστατικά στα φυτάρια σε σύγκριση με τη μηνιαία λίπανση (χαμηλή ή υψηλή, 2 ή 4 g L⁻¹ ισορροπημένου λιπάσματος 20:20:20, αντίστοιχα).

Συμπερασματικά, για την ανάπτυξη των φυταρίων των τεσσάρων παραπάνω ειδών προτείνεται η χρήση υποστρώματος τύρφης: περλίτη (2:1, v/v) και η λίπανση με χαμηλή συγκέντρωση ισορροπημένου λιπάσματος (20:20:20, 2 g L⁻¹) ανά μήνα.



Εικόνα Π.ΙΙΙ.15. Χαρακτηριστικό φυτάριο σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (2:1, v/v) με 4 g L⁻¹ Nutrileaf (α) και με 2 g L⁻¹ Nutrileaf (β), εμπλουτισμένης τύρφης: περλίτη (2:1, v/v), χωρίς λίπανση (γ). (Περίοδος ανάπτυξης Μάρτιος - Ιούνιος 2015).



Εικόνα Π.ΙΙΙ.16. Χαρακτηριστικό φυτάριο σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (2:1, v/v) με 4 g L^{-1} Nutrileaf (α) και με 2 g L^{-1} Nutrileaf (β), εμπλουτισμένης τύρφης: περλίτη (2:1, v/v), χωρίς λίπανση (γ). (Περίοδος ανάπτυξης Ιούλιος - Οκτώβριος 2015).



Εικόνα Π.ΙΙΙ.17. Χαρακτηριστικό φυτάριο σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (2:1, v/v) με 4 g L^{-1} Nutrileaf (α) και με 2 g L^{-1} Nutrileaf (β), εμπλουτισμένης τύρφης: περλίτη (2:1, v/v), χωρίς λίπανση (γ). (Περίοδος ανάπτυξης Οκτώβριος 2015 - Ιανουάριος 2016).



Εικόνα Π.ΙΙΙ.18. Χαρακτηριστικό φυτάριο σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (2:1, v/v) με 4 g L^{-1} Nutrileaf (α) και με 2 g L^{-1} Nutrileaf (β), εμπλουτισμένης τύρφης: περλίτη (2:1, v/v), χωρίς λίπανση (γ). (Περίοδος ανάπτυξης Ιανουάριος - Απρίλιος 2016).

Πίνακας Π.ΙΙΙ.18. Επίδραση του υποστρώματος μεταφύτευσης και της λίπανσης στην ανάπτυξη ριζοβολημένων μοσχευμάτων χειμώνα 2014 και 2015 του *S. hymettia*, κατά τη διάρκεια των τριών μηνών της περιόδου εγκατάστασης (Μάρτιο με Ιούνιο 2014 και 2015).

Χρόνος (ημέρες)	Υπόστρωμα μεταφύτευσης			F
	Τύρφη-Περλίτης 2:1 (v/v), λίπανση ανά 30 ημέρες (2 g L ⁻¹)	Τύρφη-Περλίτης 2:1 (v/v), λίπανση ανά 30 ημέρες (4 g L ⁻¹)	Τύρφη Εμπλουτισμένη- Περλίτης 2:1 (v/v), χωρίς λίπανση	
Επιβίωση φυταρίων (%)				
	100	100	100	
Αριθμός κύριων βλαστών				
0	3,3 ± 0,3 a	3,6 ± 0,3 a	3,4 ± 0,3 a	NS
30	3,5 ± 0,3 a	3,9 ± 0,3 a	3,8 ± 0,3 a	NS
60	3,5 ± 0,3 a	4,1 ± 0,3 a	4,1 ± 0,4 a	NS
90	3,5 ± 0,3 a	4,3 ± 0,3 a	4,2 ± 0,4 a	NS
Μήκος κύριων βλαστών (cm)				
0	5,2 ± 0,2 a	4,7 ± 0,2 a	5,2 ± 0,2 a	NS
30	6,6 ± 0,2 a	6,2 ± 0,3 a	6,6 ± 0,2 a	NS
60	9,8 ± 0,3 a	9,7 ± 0,4 a	10,3 ± 0,4 a	NS
90	13,2 ± 0,6 a	13,5 ± 0,8 a	13,3 ± 0,7 a	NS
Αριθμός πλάγιων βλαστών ανά κύριο βλαστό				
0	0,1 ± 0,1 a	0,1 ± 0,1 a	0,1 ± 0,1 a	NS
30	0,9 ± 0,3 a	0,4 ± 0,1 a	0,9 ± 0,3 a	NS
60	2,9 ± 0,4 a	3,2 ± 0,4 a	2,1 ± 0,4 a	NS
90	6,2 ± 0,7 ab	7,8 ± 0,9 a	4,5 ± 0,6 b	**

Οι μέσοι ± τυπικό σφάλμα επί της γραμμής ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. NS: μη σημαντικά ή **: σημαντικό σε $P \leq 0,01$, $n=40$.

Πίνακας Π.ΙΙΙ.19. Επίδραση του υποστρώματος μεταφύτευσης και της λίπανσης στην ανάπτυξη ριζοβολημένων μοσχευμάτων άνοιξης 2014 και 2015 του *S. hymettia*, κατά τη διάρκεια των τριών μηνών της περιόδου εγκατάστασης (Ιούλιο με Οκτώβριο 2014 και 2015).

Χρόνος (ημέρες)	Υπόστρωμα μεταφύτευσης			F
	Τύρφη-Περλίτης 2:1 (v/v), λίπανση ανά 30 ημέρες (2 g L ⁻¹)	Τύρφη-Περλίτης 2:1 (v/v), λίπανση ανά 30 ημέρες (4 g L ⁻¹)	Τύρφη Εμπλουτισμένη- Περλίτης 2:1 (v/v), χωρίς λίπανση	
Επιβίωση φυταρίων (%)				
	100	100	83	
Αριθμός κύριων βλαστών				
0	2,6 ± 0,2 a	2,5 ± 0,2 a	2,6 ± 0,1 a	NS
30	2,6 ± 0,2 a	2,5 ± 0,2 a	2,6 ± 0,1 a	NS
60	2,6 ± 0,2 a	2,5 ± 0,2 a	2,6 ± 0,1 a	NS
90	2,6 ± 0,2 a	2,5 ± 0,2 a	2,6 ± 0,1 a	NS
Μήκος κύριων βλαστών (cm)				
0	4,8 ± 0,2 a	4,5 ± 0,2 a	4,2 ± 0,2 a	NS
30	5,8 ± 0,2 a	5,6 ± 0,2 ab	5,0 ± 0,2 b	*
60	6,4 ± 0,2 a	6,5 ± 0,3 a	5,2 ± 0,2 b	***
90	7,3 ± 0,2 a	7,3 ± 0,3 a	5,5 ± 0,2 b	***
Αριθμός πλάγιων βλαστών ανά κύριο βλαστό				
0	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	NS
30	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	NS
60	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	NS
90	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	NS

Οι μέσοι ± τυπικό σφάλμα επί της γραμμής ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's t test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. NS: μη σημαντικά ή *, ***, σημαντικά σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,001$, αντίστοιχα, $n=40$.

Πίνακας Π.ΙΙΙ.20. Επίδραση του υποστρώματος μεταφύτευσης και της λίπανσης στην ανάπτυξη ριζοβολημένων μοσχευμάτων καλοκαιριού 2014 και 2015 του *S. hymettia*, κατά τη διάρκεια των τριών μηνών της περιόδου εγκατάστασης (Οκτώβριο 2014 και 2015 με Ιανουάριο 2015 και 2016).

Χρόνος (ημέρες)	Υπόστρωμα μεταφύτευσης			F
	Τύρφη-Περλίτης 2:1 (v/v), λίπανση ανά 30 ημέρες (2 g L ⁻¹)	Τύρφη-Περλίτης 2:1 (v/v), λίπανση ανά 30 ημέρες (4 g L ⁻¹)	Τύρφη Εμπλουτισμένη- Περλίτης 2:1 (v/v), χωρίς λίπανση	
Επιβίωση φυταρίων (%)				
	100	100	95	
Αριθμός κύριων βλαστών				
0	2,2 ± 0,2 a	2,0 ± 0,2 a	2,2 ± 0,2 a	NS
30	2,2 ± 0,2 a	2,0 ± 0,2 a	2,2 ± 0,2 a	NS
60	2,2 ± 0,2 a	2,0 ± 0,2 a	2,2 ± 0,2 a	NS
90	2,2 ± 0,2 a	2,0 ± 0,2 a	2,2 ± 0,2 a	NS
Μήκος κύριων βλαστών (cm)				
0	3,7 ± 0,2 a	4,3 ± 0,2 a	4,0 ± 0,2 a	NS
30	4,7 ± 0,2 b	5,3 ± 0,2 a	4,5 ± 0,2 b	*
60	6,4 ± 0,2 a	6,8 ± 0,2 a	5,7 ± 0,2 b	***
90	9,6 ± 0,3 a	9,4 ± 0,3 a	7,0 ± 0,3 b	***
Αριθμός πλάγιων βλαστών ανά κύριο βλαστό				
0	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	NS
30	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	NS
60	0,4 ± 0,1 a	0,5 ± 0,1 a	0,0 ± 0,0 a	***
90	1,6 ± 0,2 a	1,4 ± 0,2 a	0,4 ± 0,1 b	***

Οι μέσοι ± τυπικό σφάλμα επί της γραμμής ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. NS: μη σημαντικά ή *, ***: σημαντικά σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,001$, αντίστοιχα, $n=40$.

Πίνακας Π.ΙΙΙ.21. Επίδραση του υποστρώματος μεταφύτευσης και της λίπανσης στην ανάπτυξη ριζοβολημένων μοσχευμάτων φθινοπώρου 2014-2015 του *S. hymettia*, κατά τη διάρκεια των τριών μηνών της περιόδου εγκατάστασης (Ιανουάριο με Απρίλιο 2015 και 2016).

Χρόνος (ημέρες)	Υπόστρωμα μεταφύτευσης			F
	Τύρφη-Περλίτης 2:1 (v/v), λίπανση ανά 30 ημέρες (2 g L ⁻¹)	Τύρφη-Περλίτης 2:1 (v/v), λίπανση ανά 30 ημέρες (4 g L ⁻¹)	Τύρφη Εμπλουτισμένη- Περλίτης 2:1 (v/v), χωρίς λίπανση	
Επιβίωση φυταρίων (%)				
	100	100	100	
Αριθμός κύριων βλαστών				
0	1,9 ± 0,2 a	1,7 ± 0,1 a	1,8 ± 0,2 a	NS
30	1,9 ± 0,2 a	1,7 ± 0,1 a	1,8 ± 0,2 a	NS
60	2,0 ± 0,2 a	1,7 ± 0,1 a	1,9 ± 0,2 a	NS
90	2,0 ± 0,2 a	1,7 ± 0,1 a	1,9 ± 0,2 a	NS
Μήκος κύριων βλαστών (cm)				
0	4,0 ± 0,2 a	3,8 ± 0,2 a	3,7 ± 0,2 a	NS
30	5,2 ± 0,2 a	5,3 ± 0,2 a	4,9 ± 0,2 b	*
60	7,4 ± 0,3 a	7,5 ± 0,3 a	5,8 ± 0,2 b	***
90	10,6 ± 0,5 a	10,5 ± 0,3 a	8,3 ± 0,3 b	***
Αριθμός πλάγιων βλαστών ανά κύριο βλαστό				
0	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	0,0 ± 0,0 a	NS
30	0,0 ± 0,0 a	0,1 ± 0,1 a	0,1 ± 0,1 a	NS
60	0,5 ± 0,1 a	0,7 ± 0,2 a	0,5 ± 0,3 a	NS
90	3,4 ± 0,8 a	3,5 ± 0,7 a	1,8 ± 0,6 b	***

Οι μέσοι ± τυπικό σφάλμα επί της γραμμής ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. NS: μη σημαντικά ή *, ***: σημαντικά σε $P \leq 0,05$, $P \leq 0,001$, αντίστοιχα, $n=40$.

Π.ΙΙΙ.3.4.3 Καταστροφικό πείραμα

Τον Ιούλιο 2014 και 2015 μετά το τέλος των πειραμάτων ανάπτυξης Μαρτίου 2014 - Ιουνίου 2014 και Μαρτίου 2015 - Ιουνίου 2015, αντίστοιχα, πραγματοποιήθηκε καταστροφικό πείραμα, στο οποίο μετρήθηκε το νωπό και ξηρό βάρος του υπέργειου και του υπόγειου τμήματος των 20 φυτών ανά μεταχείριση.

Το νωπό και ξηρό βάρος του υπέργειου μέρους διέφερε στα διάφορα υποστρώματα (Πίν. Π.ΙΙΙ.22). Τα φυτά που αναπτύχθηκαν σε τύρφη: περλίτη (2:1, v/v) και δέχονταν μια λίπανση ανά 30 μέρες με 4 g L⁻¹ Nutrileaf 20-20-20, είχαν μεγαλύτερο νωπό και ξηρό βάρος σε σύγκριση με τα φυτά που αναπτύχθηκαν σε τύρφη: περλίτη (2:1, v/v) και δέχονταν μια λίπανση ανά 30 μέρες με 2 g L⁻¹ Nutrileaf 20-20-20, καθώς και σε σχέση με αυτά που αναπτύχθηκαν σε εμπλουτισμένης τύρφης: περλίτη (2:1, v/v), χωρίς λίπανση (Πίν. Π.ΙΙΙ.22).

Όσον αφορά το νωπό και ξηρό βάρος του υπόγειου μέρους δεν διέφερε στις διάφορες επεμβάσεις (Πίν. Π.ΙΙΙ.22).

Πίνακας Π.ΙΙΙ.22. Επίδραση του υποστρώματος μεταφύτευσης και της λίπανσης στο νωπό-ξηρό βάρος του υπέργειου και υπόγειου τμήματος του *S. hymettia*, του πειράματος εγκατάστασης Μαρτίου- Ιουνίου 2014-2015.

Μετρήσεις	Υπόστρωμα μεταφύτευσης			F
	Τύρφη-Περλίτης 2:1 (v/v), λίπανση ανά 30 ημέρες (2 g L ⁻¹)	Τύρφη-Περλίτης 2:1 (v/v), λίπανση ανά 30 ημέρες (4 g L ⁻¹)	Τύρφη Εμπλουτισμένη-Περλίτης 2:1 (v/v), χωρίς λίπανση	
Υπέργειο Τμήμα (Φύλλα - Βλαστοί)				
Νωπό	19,2 ± 1,3 b	25,6 ± 1,7 a	13,8 ± 0,9 c	***
Ξηρό	5,5 ± 0,4 b	7,0 ± 0,5 a	4,6 ± 0,4 b	***
Υπόγειο Τμήμα (Ρίζα)				
Νωπό	9,6 ± 0,8 a	10,2 ± 0,9 a	10,5 ± 1,1 a	NS
Ξηρό	1,9 ± 0,2 a	1,9 ± 0,2 a	2,0 ± 0,2 a	NS

Οι μέσοι ± τυπικό σφάλμα επί της γραμμής ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's *t* test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$. NS: μη σημαντικά ή ***: σημαντικά σε $P \leq 0,001$, $n=40$.

II.III.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Όταν ξεκίνησε η παρούσα μελέτη, αλλά και μέχρι και σήμερα στη διεθνή βιβλιογραφία δεν υπάρχουν αναφορές τόσο για τον αγενή πολλαπλασιασμό με μοσχεύματα βλαστού όσο και για τη φυτωριακή ανάπτυξη των ειδών *A. barba-jovis*, *B. acetabulosa*, *C. creticum*, *C. nepeta* και *S. hymettia* ξεκινώντας από μοσχεύματα βλαστού όσο και για την ανάπτυξη των υπό μελέτη ειδών.

Όσον αφορά τον αγενή πολλαπλασιασμό των ειδών, διερευνήθηκε η επίδραση της εποχής συλλογής των μοσχευμάτων, της συγκέντρωσης και της μεθόδου εφαρμογής της ορμόνης ριζοβολίας.

A. barba-jovis

Η ριζοβολία των μοσχευμάτων του *A. barba-jovis* ήταν ανεπιτυχής, σε όλες τις εποχές και σε όλες τις μεταχειρίσεις που δοκιμάστηκαν και τις δύο χρονιές που διεξήχθη. Στη βιβλιογραφία αναφέρονται και άλλα είδη της οικογένειας *Fabaceae* που ριζοβολούν δύσκολα, όπως το *Cercis siliquastrum* (Karam and Gebre, 2004) και το συγγενικό του είδος *C. canadensis* var. *Mexicana* (Tipton, 1990), ενώ και ο Hartmann *et al.* (1997) αναφέρει ότι τα είδη *Cercis* είναι δύσκολο να ριζοβολήσουν. Δυσκολία στη ριζοβολία παρουσιάζουν και πολλά ξυλώδη φυτά άλλων οικογενειών, όπως ο *Acer griseum* (Sapindaceae, Dirr και Heuser, 1987) και *Arbutus unedo* L. (Ericaceae, Metaxas *et al.*, 2004), *Syringa vulgaris* (Oleaceae) και *Continus coggygria* (Anacardiaceae). (Kibbler *et al.*, 2004). Ο Hartmann *et al.* (1997) αναφέρει ότι στα δύσκολα προς ριζοβολία ξυλώδη είδη πρέπει να εφαρμόζεται αυξίνη σε υψηλότερες συγκεντρώσεις σε σύγκριση με τα τρυφερά, παχύφυτα και εύκολα προς ριζοβολία είδη που χρειάζονται χαμηλότερες συγκεντρώσεις. Σε πολλά φυτά, η εφαρμογή του IBA δεν έχει καμία επίδραση στη ριζοβολία των μοσχευμάτων (Hinesley *et al.*, 1994, Shiembo *et al.*, 1996, Karam and Gebre, 2004), ωστόσο, σε πολλά ξυλώδη είδη ο τυχαίος σχηματισμός ρίζας προωθείται μετά από εφαρμογή αυξίνης (Davies and Joiner, 1980, Al Barazi and Schwabe, 1982, Perkins and Kling, 1987, Jull *et al.*, 1994). Όσον αφορά την ανάπτυξη των *in vitro* παραγμένων φυταρίων *A. barba-jovis* δεν παρουσίασε καμία δυσκολία στα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν, ωστόσο η εφαρμογή λίπανση ανεξαρτήτως της συγκέντρωσης οδήγησαν σε μεγαλύτερη επιμήκυνση του κύριου βλαστού και στο σχηματισμό περισσότερων πλάγιων βλαστών.

B. acetabulosa

Από τα αποτελέσματα προκύπτει ότι η άνοιξη και το φθινόπωρο ευνόησαν τη ριζοβολία, ενώ αντίθετα το καλοκαίρι ήταν η πλέον ακατάλληλη εποχή για τη ριζοβολία των μοσχευμάτων. Αυτή η συμπεριφορά συμφωνεί με την εποχική διακύμανση του ποσοστού ριζοβολίας και άλλων θαμνωδών ειδών της μεσογειακής ξηροφυτικής βλάστησης ή και της οικογένειας Lamiaceae, όπως το *Cistus monspeliensis*, *C. salvifolius*, *C. x purpureus*, *Coronilla valentina*, *Dorycnium hirsutum*, *Lavandula pinnata*, *Lavatera acerifolia*, *Medicago arborea*, *Phlomis fruticosa* και *Teucrium fruticans* (review από τους Frangi and Nicola, 2004) και το *Limoniastrum monopetalum* (Akoumianaki-Ioannidou *et al.*, 2016). Η εποχιακή διακύμανση στη ριζοβολία των μοσχευμάτων έχει αποδοθεί σε αλλαγές στους ενδογενείς ρυθμιστές της ανάπτυξης των φυτών (Vieitez and Pena 1968, Smith and Wareing 1972a,b), σε μεταβολές στη δραστηριότητα του οφθαλμού (Roberts and Fuchigami 1973, Roberts *et al.*, 1974), στην περιεκτικότητα των μοσχευμάτων σε υδρολυτικά ένζυμα, υδατάνθρακες και άμυλο (Nanda and Anand 1970, Rossi 1991) και στις περιβαλλοντικές συνθήκες τόσο του υποστρώματος όσο και της ατμόσφαιρας (Abdou *et al.*, 2004, Elgimabi, 2008). Εκτιμάται λοιπόν ότι οι περιβαλλοντικές επιρροές μπορούν να δράσουν μέσω της ευαισθησίας ή της μεταβολής του επιπέδου της ενδογενούς αυξίνης, αφού οι εποχιακές μεταβολές στα επίπεδα της αυξίνης συσχετίστηκαν με την ικανότητα ριζοβολίας, αλλά το αποτέλεσμα είναι εξειδικευμένο για τα διάφορα είδη (Davies, 1984, Carmen, 1993).

Στη βιβλιογραφία υπάρχουν πολλές μελέτες που αναφέρουν ότι η εφαρμογή αυξίνης επηρεάζει θετικά τη ικανότητα ριζοβολίας μοσχευμάτων αρωματικών και φαρμακευτικών ειδών, όπως για τα είδη *Salvia indica* L., *Satureja thymbra* L. (Ayanoğlu *et al.*, 2002), *Thymus capitatus*, *T. Serpyllum*, *T. vulgaris* (Iapichino *et al.*, 2006) και *Melissa officinalis* (Sevik and Güney, 2013a, 2013b), κάτι το οποίο διαπιστώθηκε και στην παρούσα μελέτη για το είδος *B. acetabulosa*. Η εφαρμογή του IBA έχει αναφερθεί ότι αυξάνει σημαντικά τον τυχαίο σχηματισμό ριζών σε πάρα πολλά είδη (Hartmann *et al.*, 1997, De Klerk *et al.*, 1999, Nicola *et al.*, 2005), κάτι το οποίο θα μπορούσε να αποδοθεί στη μετακίνηση υδατανθράκων και άλλων θρεπτικών συστατικών στη βάση των μοσχευμάτων (Middleton *et al.*, 1978, Leakey *et al.*, 1982).

Όσον αφορά την ανάπτυξη του είδους *B. acetabulosa* δεν παρουσίασε καμία δυσκολία στα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν. Ωστόσο η λίπανση και η έλλειψη κορυφολογήματος των φυταρίων οδήγησε στην παραγωγή μακριών ερπόντων, υδαρών βλαστών, που δεν είναι ο φυσιολογικός και επιθυμητός τρόπος ανάπτυξης. Κατά τους Cline (1994) και Leyser (2003) η κυριαρχία της κορυφής καθορίζει το βαθμό διακλάδωσης και τη μορφή του υπέργειου

τμήματος του φυτού. Συνεπώς για την παραγωγή διακλαδισμένων φυταρίων, τα οποία θα είναι πιο ελκυστικά στους καταναλωτές είναι απαραίτητη προϋπόθεση η εφαρμογή κορυφολογήματος. Επιπλέον τα φυτά που αναπτύχθηκαν σε υπόστρωμα που περιείχε κομπόστα στεμφύλων παρατηρήθηκε μικρότερη επιμήκυνση των βλαστών και μικρότερος αριθμός πλάγιων βλαστών σε σύγκριση με τα άλλα υποστρώματα ανάπτυξης που δοκιμάστηκαν, που πιθανώς οφείλεται στην αποδόμηση της κομπόστας στεμφύλων με αργό ρυθμό, με αποτέλεσμα την απελευθέρωση με βραδύ ρυθμό των θρεπτικών ουσιών της, κυρίως αζώτου (Manios, 2004). Επιπρόσθετα οι Agehara and Warncke (2004) αναφέρουν ότι η απελευθέρωση αζώτου από την κομπόστα κατά τους χειμερινούς μήνες είναι μικρότερη σε σύγκριση με τους καλοκαιρινούς μήνες. Αυτή η διαφορά πιθανώς να οφείλεται στις χαμηλές και στις υψηλές θερμοκρασίες του χειμώνα και το καλοκαιριού αντίστοιχα.

C. creticum* και *C. nepeta

Η ριζοβολία των μοσχευμάτων της *C. creticum* και *C. nepeta* δεν επηρεάστηκε ούτε από τη συγκέντρωση, ούτε από το χρόνο εμφάνισης στην ορμόνη ριζοβολίας και έγινε με απόλυτη σχεδόν επιτυχία σε όλες τις μεταχειρίσεις και σε όλες τις εποχές (100% στο *C. nepeta* και 80 - 100% στο *C. creticum*). Έτσι τα μοσχεύματα και των δύο ειδών μπορούν να ριζοβολήσουν καθ' ολοκληρίαν, σε όλες τις εποχές χωρίς καν τη χρήση ορμόνης ριζοβολίας.

Όσον αφορά την ανάπτυξη των φυταρίων των ειδών *C. creticum* και *C. nepeta* δεν παρουσίασε καμία δυσκολία στα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν, ωστόσο χαρακτηριζόταν από το φαινόμενο της κυριαρχίας της κορυφής, με αποτέλεσμα τα φυτά σε συνδυασμό με τη λίπανση να παράγουν μακριούς, υδαρείς, έρποντες βλαστούς, που δεν είναι ο φυσιολογικός και επιθυμητός τρόπος ανάπτυξης. Κατά τους Cline (1994) και Leyser (2003) η κυριαρχία της κορυφής καθορίζει το βαθμό διακλάδωσης και τη μορφή του υπέργειου τμήματος του φυτού. Συνεπώς για την παραγωγή διακλαδισμένων φυταρίων, τα οποία θα είναι πιο ελκυστικά στους καταναλωτές είναι απαραίτητη προϋπόθεση η εφαρμογή κορυφολογήματος, εκτός και αν το φυτό προορίζεται για τη χρήση κρεμαστά καλάθια ή εδαφοκάλυψη.

S. hymettia

Το φθινόπωρο και ο χειμώνας ευνόησαν τη ριζοβολία, ενώ αντίθετα το καλοκαίρι ήταν η πλέον ακατάλληλη εποχή για τη ριζοβολία των μοσχευμάτων του *S. hymettia*. Το καλοκαίρι έχει αποδειχθεί ότι είναι η πλέον ακατάλληλη εποχή για τη ριζοβολία μοσχευμάτων και άλλων ειδών της οικογένειας Caprifoliaceae, όπως για τα είδη *Lonicera canadensis* (Cartabiano, 2013) και *Lonicera cuminata* και *Lonicera macranthoides* (Wang et al., 2019),

ενώ οι Alvarez-Cordero (1979) τον αποτελεσματικό πολλαπλασιασμό του είδους *Artemisia tridentata* αναφέρουν ότι καταλληλότερη εποχή συλλογής είναι ο χειμώνας, όπως διαπιστώθηκε και στην παρούσα μελέτη για το *S. hymettia*.

Τα παραπάνω αποτελέσματα καταδεικνύουν την εποχική διακύμανση του ποσοστού ριζοβολίας και παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και από τους Frangi and Nicola (2004, review) και τους Akoumianaki-Ioannidou *et al.* (2016), σε άλλα θαμνώδη είδη της μεσογειακής ξηροφυτικής βλάστησης, όπως το *Cistus monspeliensis*, *C. salvifolius*, *C. x purpureus*, *Coronilla valentina*, *Dorycnium hirsutum*, *Lavandula pinnata*, *Lavatera acerifolia*, *Medicago arborea*, *Phlomis fruticosa*, *Teucrium fruticans* και *Limoniastrum monopetalum*. Αυτή η εποχιακή διακύμανση στη ριζοβολία των μοσχευμάτων μπορεί να οφείλεται σε παράγοντες όπως η δραστικότητα του οφθαλμού, η περιεκτικότητα των μοσχευμάτων σε υδρολυτικά ένζυμα, υδατάνθρακες και άμυλο, οι περιβαλλοντικές συνθήκες του υποστρώματος και της ατμόσφαιρας, αλλά και σε αλλαγές στους ενδογενείς ρυθμιστές της ανάπτυξης των φυτών (Vieitez and Pena 1968, Nanda and Anand 1970, Smith and Wareing 1972a, b, Roberts and Fuchigami 1973, Roberts *et al.*, 1974, Rossi 1991, Abdou *et al.*, 2004, Elgimabi, 2008).

Η εφαρμογή IBA προώθησε τη ριζοβολία των μοσχευμάτων σε σύγκριση με το μάρτυρα, ενώ ο αυξανόμενος χρόνος εμφάνισης των μοσχευμάτων στην αυξίνη μειώνει το ποσοστό ριζοβολίας σε όλες τις εποχές εκτός από την άνοιξη. Η θετική επίδραση της εφαρμογής αυξίνης στη ριζοβολία μοσχευμάτων ξυλωδών ειδών, έχει αναφερθεί και από άλλους ερευνητές, όπως για τα *Schefflera arboricola* (Abu-Zahra *et al.*, 2011), *Prunus* spp. (Stefancic *et al.*, 2005), *Arbutus unedo* L. (Şeker *et al.*, 2010) και *Ficus benjamina* L. (Topacoglu *et al.*, 2016).

Ως αποτελεσματικότερη συγκέντρωση απεδείχθη τα 1000 mg L⁻¹ IBA, η οποία έχει απεδειχθεί η καταλληλότερη για τη ριζοβολία μοσχευμάτων κορυφής και άλλων ειδών *Scabiosa* (Kroin, 2009), αλλά και άλλων ξηροφυτικών ειδών, όπως *Stachys*, *Hypericum*, *Lavandula* (Kroin, 2009), *Salvia officinalis*, *S. triloba* (Kacar *et al.*, 2009), *Salvia indica*, *Helichrysum plicatum* και *Satureja officinalis* (Ananoglu *et al.*, 2002).

Όσον αφορά την επιβίωση των φυταρίων στα διάφορα υποστρώματα ανάπτυξης ήταν υψηλή (80 - 100%) σε όλα τα υποστρώματα που δοκιμάστηκαν και σε όλα τα πειράματα ανάπτυξης, εκτός από το πρώτο πείραμα ανάπτυξης στο υπόστρωμα που περιείχε κομπόστα στεμφύλων που ήταν μόλις 35%. Αυτό πιθανόν να οφείλεται στο βαθμό ωριμότητας της κομπόστας στεμφύλων. Η ωριμότητα και η σταθερότητα του κομπόστ είναι δύο πολύ σημαντικές παράμετροι που πρέπει να καθορίζονται για να αποφευχθούν προβλήματα τόσο

στην ανάπτυξη των φυτών όσο και στη θνησιμότητά τους. Η σταθερότητα αναφέρεται στο στάδιο της αποδόμηση της οργανικής ύλης και η ωριμότητα ορίζει το βαθμό ωρίμανσης της κομπόστ (California Quality Compost Council, 2001). Πολλοί παράγοντες στα μη επαρκώς ώριμα κομπόστ μπορούν να επηρεάσουν την ανάπτυξη των φυτών, όπως οι υψηλές αναλογίες C: N, υψηλές συγκεντρώσεις οργανικών οξέων και άλλων φυτοτοξικών ενώσεων, υψηλή μικροβιακή δραστηριότητα και υψηλοί ρυθμοί αναπνοής (Jimenez and Garcia, 1989).

Η ταχεία αποδόμηση ενός μη επαρκώς ώριμου κομπόστ μπορεί να προκαλέσει μείωση της συγκέντρωσης του οξυγόνου στο έδαφος με αποτέλεσμα τη δημιουργία ενός αναερόβιου και έντονα μειωμένου περιβάλλοντος σε οξυγόνο στο επίπεδο του ριζικού συστήματος (Brinton, 2000). Το φυτό αντιδρά στις ανασταλτικές συνθήκες του περιβάλλοντος μειώνοντας το μεταβολικό του ρυθμό, μειώνοντας το ρυθμό αναπνοής των ριζών, μειώνοντας την απορρόφηση των θρεπτικών συστατικών και επιβραδύνοντας τη σύνθεση και τη μεταφορά της γιββερελλίνης και της κυτοκίνινης προς τα εναέρια μέρη του φυτού (Bonneau and Souchier, 1980).

Ο Cottenie (1981) αναφέρει ότι η δημιουργία ανασταλτικών συνθηκών στο έδαφος αυξάνει τη διαλυτότητα πολλών βαρέων μετάλλων, αυτό μπορεί να προκαλέσει αύξηση της απορρόφησης και της συγκέντρωσής τους στο φυτό, η οποία μπορεί να φτάσει τα φυτοτοξικά επίπεδα. Επιπλέον όπως έχει επισημανθεί από πολλούς συγγραφείς, το πιο σημαντικό αποτέλεσμα της εφαρμογής ενός μη επαρκώς ώριμου κομπόστ είναι η δέσμευση του διαθέσιμου αζώτου του εδάφους από μικροβιακούς πληθυσμούς (Duggan, 1973, Juste, 1980), και αυτό μπορεί να προκαλέσει σοβαρές ελλείψεις αζώτου στο φυτό (Bengtson and Cornette, 1973, Hortenstine and Rothwell, 1973, Terman *et al.*, 1973).

Επιπλέον τα φυτάρια που καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα που περιείχε κομπόστα στεμφύλων είχαν μικρότερο μήκος βλαστών και μικρότερο αριθμό πλάγιων βλαστών, που πιθανώς οφείλεται στον αργό ρυθμό αποδόμησης της κομπόστας στεμφύλων, με αποτέλεσμα το βραδύ ρυθμό απελευθέρωσης των θρεπτικών ουσιών της (Manios, 2004). Επιπρόσθετα τα φυτά που καλλιεργήθηκαν σε υπόστρωμα που περιείχε κομπόστα στεμφύλων είχαν πιθανώς στη διάθεσή τους μικρότερη συγκέντρωση αζώτου για την προώθηση της επιμήκυνσης των βλαστών σε σύγκριση με τα φυτά στα υποστρώματα με τύρφη: περλίτη που είχαν δεχθεί λίπανση με ισορροπημένο λίπασμα. Οι Agehara and Warncke (2004) αναφέρουν ότι η απελευθέρωση αζώτου από την κομπόστα κατά τους χειμερινούς μήνες είναι μικρότερη σε σύγκριση με τους καλοκαιρινούς μήνες, λόγω των χαμηλών και υψηλών θερμοκρασιών του χειμώνα και το καλοκαιριού αντίστοιχα.

II.III.5. ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΟ ΠΡΩΤΟΚΟΛΛΟ

A. barba-jovis

Η ριζοβολία των μοσχευμάτων του *A. barba-jovis* ήταν ανεπιτυχής, σε όλες τις εποχές και σε όλες τις μεταχειρίσεις που δοκιμάστηκαν. Όσον αφορά την ανάπτυξη των *in vitro* παραγμένων φυταρίων *A. barba-jovis* προτείνεται η χρήση υποστρώματος τύρφης: περλίτη (2:1, v/v) και λίπανση μηνιαίως, με χαμηλή συγκέντρωση (2 g L^{-1}) ισορροπημένου λιπάσματος (20:20:20).

B. acetabulosa

Για αποτελεσματικό βλαστικό πολλαπλασιασμό του είδους *B. acetabulosa* μοσχεύματα κορυφής πρέπει να συλλέγονται άνοιξη και φθινόπωρο. Την άνοιξη προτείνεται η εμφύτευση της βάσης των μοσχευμάτων σε διαλύματα IBA αιθανόλης: νερού (1:1, v/v) συγκέντρωσης $1000 - 3000 \text{ mg L}^{-1}$ για 1 min, με ιδανική συγκέντρωση τα 2000 mg L^{-1} , ενώ για το φθινόπωρο η εμφύτευση σε διάλυμα IBA 2000 mg L^{-1} για 5 min.

Για την ανάπτυξη των φυταρίων προτείνεται η χρήση υποστρώματος τύρφης: περλίτη (2:1, v/v) και λίπανση με χαμηλή συγκέντρωση (2 g L^{-1}) ισορροπημένου λιπάσματος (20:20:20) ανά μήνα, ενώ για την παραγωγή διακλαδισμένων φυταρίων, απαραίτητη πρακτική είναι η εφαρμογή κορυφολογήματος, για λήψη συμμετρικής, συνεκτικής κόμης.

C. creticum και *C. nepeta*

Μοσχεύματα των ειδών *C. creticum* και *C. nepeta* μπορούν να ριζοβολήσουν καθ' ολοκληρίαν, σε όλες τις εποχές χωρίς καν τη χρήση ορμόνης ριζοβολίας. Για την ανάπτυξη των φυταρίων προτείνεται η χρήση υποστρώματος τύρφης: περλίτη (2:1, v/v) και η λίπανση με χαμηλή συγκέντρωση (2 g L^{-1}) ισορροπημένου λιπάσματος (20:20:20) ανά μήνα, ενώ για την παραγωγή διακλαδισμένων φυταρίων, τα οποία θα είναι πιο ελκυστικά στους καταναλωτές είναι απαραίτητη προϋπόθεση η εφαρμογή κορυφολογήματος, εκτός και αν το φυτό προορίζεται για τη χρήση κρεμαστά καλάθια ή εδαφοκάλυψη.

S. hymettia

Για αποτελεσματικό πολλαπλασιασμό του είδους *S. hymettia* μοσχεύματα κορυφής πρέπει να συλλέγονται το φθινόπωρο και το χειμώνα. Τόσο το φθινόπωρο όσο και το χειμώνα προτείνεται είτε η εμφύτευση της βάσης των μοσχευμάτων σε διαλύματα IBA αιθανόλης:

νερού (1:1, v/v) συγκέντρωσης 1000 mg L^{-1} για 1 min είτε η εφαρμογή σκόνη ριζοβολίας για ξυλώδη μοσχεύματα.

Όσον αφορά την ανάπτυξη των φυταρίων προτείνεται η χρήση υποστρώματος τύρφης: περλίτη (2:1, v/v) και λίπανση με χαμηλή συγκέντρωση (2 g L^{-1}) ισορροπημένου λιπάσματος (20:20:20) ανά μήνα.

II.III.6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abdou, M.A., Mohamed, M.A.H. and Attia, F.A. (2004). Physiological studies on *Ficus benjamina* plants. 1: Effect of cutting collection. IBA and nofatrein on chemical composition, rootability of cutting and transplants growth. *J. Agric. Sci. Mansoura Univ.* 29(2): 775-785.
- Abu-Zahra, T.R., Hasan, M., Al-Shadaideh, A.N. and Abubaker, S. (2011). Effect of different auxin concentrations on umbrella tree (*Schefflera arboricola*) rooting. *Agricultural Science Digest.* 31(4): 312-315.
- Agbo, C.U. and Obi, I.U. (2007). Variability in propagation potentials of stem cuttings of different physiological ages of *Gongronema latifolia* Benth. *World J. Agric. Sci.* 3(5): 576-581.
- Agehara, S. and Warncke, D.D. (2004). Soil moisture and temperature effects on nitrogen release from organic nitrogen sources. *S.S.S.A.J.* 69(6): 1844-1855.
- Akoumianaki-Ioannidou, A., Martini, A.N. and Papafotiou, M. (2016). Rooting and establishment of *Limoniastrum monopetalum* (L.) Boiss stem-tip cuttings. *Afr. J. Plant Sci.* Vol. 10(1): 23-31.
- Akwatulira, F., Gwali, S., Okullo, J.B.L., Ssegawa, P., Tumwebaze, S.B., Mbwambo, J.R. and Muchugi, A. (2011). Influence of rooting media and indole-3-butyric acid (IBA) concentration on rooting and shoot formation of *Warburgia ugandensis* stem cuttings. *Afr. J. Plant Sci.* 5(8): 421-429.
- Al Barazi, Z. and Schwabe, W.W. (1982). Rooting softwood cuttings of adult *Pistacia vera*. *J. Hortic. Sci.* 57: 247-252.
- Alley, C.J. and Peterson, J.E. (1977). Grapevine propagation. IX. Effects of temperature, refrigeration, and indolebutyric acid on callusing, bud push, and rooting of dormant cuttings. *Am. J. Enol. Vitic.* 28: 1-7.
- Al-Salem, M.M. and Karam, N.S. (2001). Auxin, wounding, and propagation medium affect rooting response of stem cuttings of *Arbutus andrachne*. *J. Hort. Sci.* 36: 976-988.
- Alvarez-Cordero, E. (1979). Stem cutting propagation of big sagebrush (*Artemisia tridentata* Nutt.). *J. Range Manage.* 32(2): 141-143.
- Aminah, H., Dick, J.M., Leakey, R., Grace, J. and Smith, R. (1995). Effect of indole butyric acid (IBA) on stem cuttings of *Shorea leprosula*. *For. Ecol. Manage.* 72(2): 199-206.
- Amri, E., Lyaruu, H.V.M., Nyomora, A.S. and Kanyeka, Z.L. (2010). Vegetative propagation of African Blackwood (*Dalbergia melanoxylon* Guill. and Perr.): Effects of age of donor plant, IBA treatment and cutting position on rooting ability of stem cuttings. *New For.* 39(2): 183-194.
- Anand, V.K. and Heberlein, G.T. (1975). Seasonal changes in the effects of auxin on rooting in stem cuttings of *Ficus infectoria*. *Physiol. Plant.* 34: 330-334.
- Ananoglu, F., Mert, A., Erdogan, C. and Kaya, A. (2002). Propagation of some native grown medicinal plants by stem cuttings. *J. Herbs Spices Med. Plants* 9: 405-411.
- Appelgren, M. and Heide, O.M. (1972). Regeneration in *Streptocarpus* leaf discs and its regulation by temperature and growth substances. *Physiol. Plant.* 27: 417-423.
- Arslan, N., Gürbüz, B. and Yılmaz, G. (1995). Seed setting rate and the effects of cutting month and indole butyric acid on rooting of stem cuttings in sage (*Salvia officinalis* L.). *Turkish J. Agric. Forest.* 19: 83-87.
- Ayanoğlu, F. and Özkan, C.F. (2000). Change in tissue mineral elemental concentration during root initiation and development of *Salvia officinalis* L. cuttings and IBA effects. *Turkish J. Agric. Forest.* 24: 677-682.
- Ayanoğlu, F., Mert, A., Erdoğan, C. and Kaya, D.A. (2000a). The effects of different locations and hormone doses on the rooting of cuttings of Karabaş lavender (*Lavandula stoechas* L.) grown in the flora of Hatay. *Turk. J. Agric. For.* 24(5): 607-610.
- Ayanoğlu, F., Mert, A., Erdoğan, C. and Kaya, D.A. (2002). Propagation of some native grown medicinal plants by stem cuttings. *J. Herbs Spices Med. Plants* 9(4): 405-411.
- Bengtson, G.W. and Cornette, J. (1973). Disposal of composted municipal waste in a plantation of young slash pine: Effects on soil and trees. *J. Environ. Qual.* 2: 441-444.
- Bhardwaj, D.R. and Mishra, V.K. (2005). Vegetative propagation of *Ulmus villosa*: Effects of plant growth regulators, collection time, type of donor and position of shoot on adventitious root formation in stem cuttings. *New For.* 29: 105-116.
- Biran, I. and Halevy, A.H. (1973). The relationship between rooting of dahlia cuttings and the presence and type of bud. *Physiol. Plant.* 28: 244-247.
- Blythe, E.K., Sibley, J.L., Tilt, K.M. and Ruter, J.M. (2007). Methods of auxin application in cutting propagation: A review of 70 years of scientific discovery and commercial practice. *J. Environ. Hort.* 25: 166-185.
- Bonneau, M. and Souchier, B. (1980). *Constituants et propriétés du sol.* Masson et Cie, Paris.
- Brinton, W.F. (2000). How compost maturity affects plant and root performance in container grown media. *J. Biodynamics.*

- Burgess, D., Hendrickson, O. and Roy, L. (1990). The importance of initial cutting size for improving the growth performance of *Salix alba* L. *Scand. J. For. Res.* 5(1-4): 215-224.
- California Compost Quality Council (CCQC). (2001). Compost maturity index.
- Campan, R., Weston, G.D., Howard, B.H. and Harrison-Murray, R.S. (1990). Enhanced rooting potential in MM106 apple rootstock shoots grown in a polythene tunnel. *J. Hort. Sci.* 65: 367-374.
- Carmen, P. (1993). The propagation of Australian native plants from cuttings at the Australian National Botanic Gardens. *Int. Plant Prop. Soc.* 43: 60-63.
- Cartabiano, J.A. (2013). Optimizing propagation of *Ceanothus americanus* L., (New Jersey Tea), *Corylus cornuta* Marsh. (Beaked filbert), *Lonicera canadensis* Bartr. (American fly honeysuckle), and *Viburnum acerifolium* L. (Mapleleaf viburnum) by softwood stem cuttings.
- Chong, C., Allen, O.B. and Barnes, H.W. (1992). Comparative rooting of stem cuttings of selected woody landscape shrub and tree taxa to varying concentrations of IBA in talc, ethanol and glycol carriers. *J. Environ. Hortic.* 10(4): 245-250.
- Cline, M.G. (1994). The role of hormones in apical dominance. New approaches to an old problem in plant development. *Physiol. Plant.* 90(1): 230-237.
- Cottenie, A. (1981). Sludge treatment and disposal in relation to heavy metals. International Conference on Heavy Metals in the Environment (ICHMET). Amsterdam, Commission of the European Communities (CEC). 167-175.
- Davies, F.T. (1984). Shoot RNA, cambial activity and indolebutyric acid effectivity in seasonal rooting of juvenile and mature *Ficus pumila* cuttings. *Physiol. Plant.* 62: 571-575.
- Davies, F.T. and Joiner, J.N. (1980). Growth regulator effects on adventitious root formation in leaf bud cuttings of juvenile and mature *Ficus pumila*. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 105: 91-95.
- Davies, F.T., Hartmann, H. and Kester, D. (1990). *Plant propagation: principles and practices*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs.
- De Klerk, G., Van Der Krieken, W. and De Jong, J.C. (1999). Review. The formation of adventitious roots: New concepts, new possibilities. *In Vitro Cell. Dev. Biol.* 35(3): 189-199.
- Dirr, M.A. and Heuser, C.W. (1987). *The reference manual of woody plant propagation*. Univ. Press. Athens, Ga.
- Duggan, J.C. (1973). Utilization of municipal refuse compost. I. Field-scale compost demonstrations. *Compost Sci.* 14: 24-25.
- Dykeman, B. (1976). Temperature relations in root initiation and development of cuttings. *Int. Plant Prop. Soc.* 26: 201-207.
- Elgimabi, M. (2008). Effect of season of cutting and humidity on propagation of (*Ixora coccinea*). *Adv. Biol. Res.* 2(5-6): 108-110.
- Fabbri, A., Bartolini, G., Lambardi, M. and Kailis, S. (2004). *Olive propagation manual*. Landlinks Press, Collingwood, Australia.
- Fege, A.S. and Phipps, H. (1984). Effect of collection date and storage conditions on field performances of *Populus* hardwood cuttings. *Can. J. For. Res.* 14: 119-123.
- Fischer, P. (1981). Temperatur- og indstr-lingsforholdenes betydning for roddannelse og vækst I aertestiklinger. Thesis, Royal Vet. Agric. Univ. Copenhagen. 1-104.
- Fogaca, C.M. and Fett-Neto, A.G. (2005). Role of auxin and its modulators in the adventitious rooting of *Eucalyptus* species differing in recalcitrance. *Plant Growth. Regul.* 45: 1-10.
- Foster, G.S., Stelzer, H. and McRae, J. (2000). Loblolly pine cutting morphological traits: effects on rooting and field performance. *New For.* 19(3): 291-306.
- Frangi, P. and Nicola, S. (2004). Study of propagation by cuttings of Mediterranean native species with ornamental potential (in Italian). *Italus Hortus.* 4: 191-193.
- Friis, K. (1987). Rodning af *Centradenia inaequilateralis* 'Cascade'. Virkning at temperatur i rodningsmediet samt fungicidbehandling af moderplanter. *Tidsskr. Planteavl.* 91: 263-267.
- Gehlot, A., Gupta, R.K., Tripathi, A., Arya, I.D. and Arya, S. (2014). Vegetative propagation of *Azadirachta indica*: effect of auxin and rooting media on adventitious root induction in mini-cuttings. *Adv. For. Sci.* 1(1): 1-9.
- Gislerod, H.R. (1983). Physical conditions of propagation media and their influence on the rooting of cuttings. III. The effect of air content and temperature in different propagation media on the rooting of cuttings. *Plant Soil.* 75: 1-14.
- Haissig, B.E. (1979). Influence of aryl esters of indole-3-acetic acid and indole-3-butyric acids on adventitious root primordium initiation and development. *Physiol. Plant.* 47: 29-33.
- Hannerz, M., Almqvist, C. and Ekberg, I. (1999). Rooting success of cuttings from young *Picea abies* in transition to flowering competent phase. *Scand. J. For. Res.* 14(6): 498-504.
- Hansen, E.A. and Netzer, D.A. (1993). *Guidelines for establishing poplar plantations in the north-central U.S.* St. Paul (MN): USDA Forest Service, North Central Forest Experiment Station. Research Note NC-363. 5.

- Hansen, J. (1989). Influence of cutting position and temperature during rooting on adventitious root formation and axillary bud break of *Stephanotis floribunda*. *Sci. Hortic.* 40(4): 345-354.
- Hansen, J. (1990). Influence of cutting position and temperature during rooting on adventitious root formation and axillary bud break of *Stephanotis floribunda*. *Sci. Hort.* 40: 345-354.
- Hartmann, H.D., Kester, D.E., Davies, F.J. and Geneve, R.L. (1997). *Plant propagation: principles and practices*. Prentice Hall, New Jersey. 770.
- Hartmann, H.T. and Kester, D.E. (1983). *Plant propagation, principles and practices*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, N.J. 727.
- Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davie, F.T. and Geneve, R.L. (2002). *Plant propagation, principles and practices*. Pearson Education, Inc., Upper Saddle River, N.J., USA. 880.
- Hartmann, H.T., Kester, D.E., Davies, F.T. and Geneve, R.L. (2011). *Hartmann and Kester's plant propagation: Principles and practices*. 8th edition. Prentice Hall, Upper Saddle River, N.J.
- Heide, O.M. (1964). Effects of light and temperature on the regeneration ability of *Begonia* leaf cuttings. *Physiol. Plant.* 17: 789-804.
- Hinesley, L.E., Blazich, F.A. and Snelling, L.K. (1994). Propagation of Atlantic white cedar by stem cuttings. *Hort. Science.* 29: 217-219.
- Hoad, S.P. and Leakey, R. (1992). Morphological and physiological factors induced by light quality and affecting rooting in *Eucalyptus grandis*. In: *Mass production technology for genetically improved fast-growing forest tree species. 1*: 51-58.
- Hortenstine, C.C. and Rothwell, D.F. (1973). Pelletized municipal refuse compost as a soil amendment and nutrient source for sorghum. *J. Environ. Qual.* 2: 343-345.
- Howard, B.H. (1968). The influence of 4 (indolyl-3) butyric acid and basal temperature on the rooting of apple rootstock hardwood cuttings. *J. Hortic. Sci.* 43: 23-31.
- Howard, B.H. (1996). Relationships between shoot growth and rooting of cuttings in three contrasting species of ornamental shrub. *J. Hort. Sci.* 71: 591-605.
- Husen, A. (2004). Clonal propagation of *Dalbergia sissoo* Roxb. by softwood nodal cuttings: Effects of genotypes, application of IBA and position of cuttings on shoots. *Silvae Genet.* 53: 50-55.
- Husen, A. (2008). Clonal propagation of *Dalbergia sissoo* Roxb. and associated metabolic changes during adventitious root primordium development. *New For.* 36: 13-27.
- Husen, A. and Pal, M. (2003). Clonal propagation of *Tectona grandis* Linn. f. by leafy stem cuttings: Effects of branch position and auxin treatment on the rooting ability. *Int. Conf. Qua. Tim. Pro. Teak. Sus. For. Manage. Peechi, Kerala State*.
- Husen, A. and Pal, M. (2006). Variation in shoot anatomy and rooting behaviour of stem cutting in relation to age of donor plants in teak (*Tectona grandis* Linn. f.). *New For.* 31: 57-73.
- Husen, A. and Pal, M. (2007a). Effect of branch position and auxin treatment on clonal propagation of *Tectona grandis* Linn. f. *New For.* 34: 223-233.
- Husen, A. and Pal, M. (2007b). Metabolic changes during adventitious root primordium development in *Tectona grandis* Linn. f. (teak) cuttings as affected by age of donor plants and auxin (IBA and NAA) treatment. *New For.* 33: 309-323.
- Iapichino, G., Arnone, C., Bertolini, M. and Amico Roxas, U. (2006). Propagation of three *Thymus* species by stem cuttings. In: *I International Symposium on the Labiatae: Advances in production, biotechnology and utilization.* 723: 411-414.
- Jain, M.K. and Nanda, K.K. (1972). Effect of temperature and some antimetabolites on the interaction effects of auxin and nutrition in rooting etiolated stem segments of *Salix tetrasperma*. *Physiol. Plant.* 27: 169-172.
- Jimenez, E.I. and V.P. Garcia. (1989). Evaluation of city refuse compost maturity: a review. *Biol. Wastes* 27: 115-142.
- Jull, L.G., Warren, S.L. and Blazich, F.A. (1994). Rooting 'Yoshino' *Cryptomeria* stem cuttings as influenced by growth stage, branch order, and IBA treatment. *HortScience.* 29: 1532-1535.
- Juste, C. (1980). Avantages et inconvenients de l'utilisation des composts d'ordures ménagères comme amendement organique des sols ou supports de culture. *International Conference on Compost. Madrid, Spain. Min. Obras Publicas.*
- Kacar, O., Azkan, N. and Coplu, N. (2009). Effects of different rooting media and indole butyric acid on rooting of stem cuttings in sage (*Salvia officinalis* L. and *Salvia triloba* L.). *J. Food Agric. Environ.* 7: 349-352.
- Karam, N.S. and Gebre, G.H. (2004). Rooting of *Cercis siliquastrum* cuttings influenced by cutting position on the branch and indole-butyric acid. *J. Hortic. Sci. Biotechnol.* 79(5): 792-796.
- Kevers, C., Hausman, J., Faivre-Rampant, O., Evers, D. and Gaspar, T. (1997). Hormonal control of adventitious rooting: progress and questions. *J. Appl. Bot.* 71: 71-79.
- Kibbler, H., Johnston, M.E. and Williams, R.R. (2004). Adventitious root formation in cuttings of *Backhousia citriodora* F. Muell. 1. Plant genotype, juvenility and characteristics of cuttings. *Sci. Hort.* 102: 133-143.

- Klein, J.D., Cohen, S. and Hebbe, Y. (2000). Seasonal variation in rooting ability of myrtle (*Myrtus communis* L.) cuttings. *Sci. Hortic.* 83(1): 71-76.
- Kroin, J. (2009). Propagation of plants from cuttings using rooting solutions by foliar methods. Combined Proceedings International Plant Propagators' Society. 59: 437-453.
- Kuris, A., Atlaman, A. and Putievsky, E. (1980). Rooting and initial establishment of stem cuttings of oregano, peppermint and balm. *Horti. Abstr.* 93-95.
- Leakey, R. (1983). Stockplant factors affecting root initiation in cuttings of *Triplochiton scleroxylon* K. Schum., an indigenous hardwood of West Africa. *J. Hortic. Sci.* 58: 277-290.
- Leakey, R., Dick, J. and Newton, A. (1992). Stock plant-derived variation in rooting ability: The source of physiological youth. In: Proceedings of the symposium for mass production technology for genetically improved fast growing forest tree species. 14-18.
- Leakey, R.R.B. (2004). Physiology of vegetative reproduction. In: Burley, J., Evans, J. and Youngquist, J.A. (eds.). *Encyclopedia of forest sciences*. Academic Press, London, UK. 1655-1668.
- Leakey, R.R.B., Chapman, V.R. and Longman, K.A. (1982). Physiological studies for tropical tree improvement and conservation. Some factors affecting root initiation in cuttings of *Triplochiton scleroxylon* K. Schum. *For. Ecol. Manage.* 4(1): 53-66.
- Lee, H.D., Kim, S.D., Kim, H.H., Lee, J.W., Kim, J.H., Yun, T. and Lee, C.H. (2002). Effect of cutting time, cultivation media and growth regulators on rooting of *Weigela subsessilis* LH Bailey cuttings. *Korean J. Plant Res.* 15(3): 269-278.
- Leyser, O. (2003). Regulation of shoot branching by auxin. *Trends Plant Sci.* 8(11): 541-545.
- Macdonald, B. (1987). *Practical woody plant propagation for nursery growers*. Timber Press, Portland, OR.
- Manios, T. (2004). The composting potential of different organic solid wastes: experience from the island of Crete. *Environ. Int.* 29(8): 1079-1089.
- Martini, A.N., Papafotiou, M. and Akoumianaki-Ioannidou, A. (2017). Vegetative propagation by stem cuttings and establishment of the Mediterranean aromatic and medicinal plant *Teucrium capitatum*. *ActaHort.* 1189: 455-460.
- Mccomb, J.A. and Wroth, M. (1986). Vegetative propagation of *Eucalyptus resinifera* and *E. maculata* using coppice cuttings and micropagation. *Aust. J. For. Res.* 16: 231-242.
- Metaxas, D.J., Syros, T.D., Yupsanis, T. and Economou, A.S. (2004). Peroxidases during adventitious rooting in cuttings of *Arbutus unedo* and *Taxus baccata* as affected by plant genotype and growth regulator treatment. *Plant Growth Regul.* 44(3): 257-266.
- Middleton, W., Jarvis, B.C. and Booth, A. (1978). The effects of ethanol on rooting and carbohydrate metabolism in stem cuttings of *Phaseolus aureus* Roxb. *New Phytol.* 81(2): 279-285.
- Mitchell, R., Zwolinski, J. and Jones, N. (2004). A review on the effects of donor maturation on rooting and field performance of conifer cuttings. *South Afr. For. J.* 201(1): 53-63.
- Moe, R. (1990). Effect of day and night temperature alternations and of plant growth regulators on stem elongation and flowering of the long-day plant *Campanula isophylla* Moretti. *Sci. Hort.* 43: 291-305.
- Nanda, K.K. and Anand, V.K. (1970). Seasonal changes in auxin effects on rooting of stem cuttings of *Populus nigra* and its relationship with mobilization of starch. *Physiol. Plant.* 23: 99-107.
- Nanda, K.K., Purohit, A.N. and Bala, A. (1967). Effect of photoperiod, auxins and gibberellic acid on rooting of stem cuttings of *Bryophyllum tubiflorum*. 20: 1096-1102.
- Nanda, K.K., Purohit, A.N., Bala, A. and Anand, V.K. (1968). Seasonal rooting response of stem cuttings of some forest tree species to auxins. *Indian Forester.* 94: 154-162.
- Nicola, S., Fontana, E., Hoeberechts, J. and Saglietti, D. (2005). Rooting products and cutting timing on sage (*Salvia officinalis* L.) propagation. *Acta Hort.* 676: 135-141.
- Oğuz, B., Kahraman, D., Kıtıkı, A., Sarı, O. and Dizdaroğlu, T. (1997). İzmir Kekığı (*Origanum onites* L.) çeliklerinde köklendirme olanaklarının araştırılması. T.C. Tarım ve Köy İşleri Bakanlığı. Tarımsal Araştırmalar Genel Müd., Ege Tarımsal Araştırma Ens.Müd. Sonuç Raporu. 1-7.
- Opuni-Frimpong, E., Karnosky, D.F., Storer, A.J. and Cobbinah, J.R. (2008). Key roles of leaves, stockplant age, and auxin concentration in vegetative propagation of two African mahoganies: *Khaya anthotheca* Welw. and *Khaya ivorensis* A. Chev. *New For.* 36(2): 115-123.
- Papafotiou, M., Pergialioti, N., Tassoula, L., Massas I., Kargas G. (2013). Growth of native aromatic xerophytes in an extensive Mediterranean green roof as affected by substrate type and depth and irrigation frequency. *HortScience.* 48(10):1327-1333.
- Perkins, L.M. and Kling, G.J. (1987). Root regeneration in *Magnolia x soulangiana* and *Magnolia x 'Betty'* in response to auxin applications. *HortScience.* 22: 889-891.
- Phipps, H.M. and Netzer, D.A. (1981). The influence of collection time and storage temperature on *Populus* hardwood cutting development. *Tree Planters' Notes.* 32: 33-36.
- Puri, S. and Verma, R.C. (1996). Vegetative propagation on *Dalbergia sissoo* Roxb. using softwood and hardwood stem cuttings. *J. Arid Environ.* 34(2): 235-245.

- Ragonezi, C., Klimaszewska, K., Castro, M.R., Lima, M., De Oliveira, P. and Zavattieri, M.A. (2010). Adventitious rooting of conifers: Influence of physical and chemical factors. *Trees*. 24(6): 975-992.
- Repac, I., Vencurik, J. and Balandá, M. (2011). Testing of microbial additives in the rooting of Norway spruce (*Picea abies* (L.) Karst.) stem cuttings. *J. For. Sci.* 57(12): 555-564.
- Roberts, A.N. and Fuchigami, L.H. (1973). Seasonal changes in auxin effect on rooting of Douglas-fir stem cuttings as related to bud activity. *Physiol. Plant.* 28: 215-221.
- Roberts, A.N., Tomasovic, B.J. and Fuchigami, L.H. (1974). Intensity of bud dormancy in Douglas-fir and its relation to scale removal and rooting ability. *Ibid.* 31: 211-216.
- Rossi, P. (1991). Length of cuttings in juvenile development of a hybrid poplar clone. *New For.* 5: 211-218.
- Runger, W. (1959). Ober den Einfluss der Temperatur und der Tageslänge auf die Bildung und Entwicklung der Adventivwurzeln und -triebe und Blattstecklingen von *Begonia* 'Konkurrent' und 'Marina'. *Gartenbauwissenschaft*. 24: 472-487.
- Sarıhan, E.O., İpek, A. and Arslan, N. (2003). The effect of indole butyric acide (IBA) on rooting of cuttings from oregano (*Origanum vulgare* var. *hirtum*). V. Field Crops Congress of Turkey. 367-372.
- Şeker, M., Akcal, A., Sakaldaş, M. and Gundoğdu, M.A. (2010). Farklı celik alma donemleri ile oksin dozlarının kocayemişin (*Arbutus unedo* L.) koklenme oranı üzerine etkilerinin belirlenmesi, Uludağ Üniversitesi Ziraat Fakültesi, Dergisi. 24(1).
- Şekeroğlu, N., Kırpık, M. and Özgüven, M. (2001). Effects of different rooting media and IBA concentrations on rooting of *Thymbra spicata* L. Workshop on Agricultural and quality aspects of medicinal and aromatic plants. Adana, Türkiye. 211-216.
- Sevik, H. and Guney, K. (2013). Effects of IAA, IBA, NAA, and GA3 on rooting and morphological features of *Melissa officinalis* L. stem cuttings. *Sci. World J.* Article ID 909507. 5.
- Sevik, H. and Guney, K. (2013). Effects of some hormone applications on morphological features of *Melissa officinalis* L. root cuttings. *Soil-Water J.* 2(2): 1647-1652.
- Shiembo, P.N., Newton, A.C. and Leakey, R.R.B. (1996). Vegetative propagation of *Gnetum africanum* Welw., a leafy vegetable from West Africa. *J. Hortic. Sci.* 71: 149-155.
- Şimşek, Y. (1993). Orman Ağaçların Islahına Giriş, Ormançılık Araştırma Enstitüsü Yayınları, Ankara. 312.
- Smith, N.G. and Wareing, P.F. (1972). Rooting of hardwood cuttings in relation to bud dormancy and the auxin content of the excised stems. *New Phytol.* 71: 63-80.
- Smith, N.G. and Wareing, P.F. (1972). The rooting of actively growing and dormant leafy cuttings in relation to endogenous hormone levels and photoperiod. *Ibid.* 71: 483-500.
- Stefancic, M., Stampar, F. and Osterc, G. (2005). Influence of IAA and IBA on root development and quality of *Prunus* GiSela 5 leafy cuttings. *HortScience*. 40(7): 2052-2055.
- Stenvall, N., Haapala, T. and Pulkkinen, P. (2004). Effect of genotype, age and treatment of stock plants on propagation of hybrid aspen (*Populus tremula* x *Populus tremuloides*) by root cuttings. *Scand. J. For. Res.* 19: 303-311.
- Swamy, S. L., Puri, S. and Singh, A. K. (2002). Effect of auxins (IBA and NAA) and season on rooting of juvenile and mature hardwood cuttings of *Robinia pseudoacacia* and *Grewia optiva*. *New For.* 23(2): 143-157.
- Tchoundjeu, Z. and Leakey, R.R.B. (1996). Vegetative propagation of African mahogany: Effects of auxin, node position, leaf area and cutting length. *New For.* 11: 125-136.
- Tchoundjeu, Z., Mpeck, M.L., Asaah, E. and Amougou, A. (2004). The role of vegetative propagation in the domestication of *Pausinystalia johimbe* K. Schum, a highly threatened medicinal species of West and Central Africa. *For. Ecol. Manag.* 188: 175-183.
- Terman, G.L., Soileau, J.M. and Allen, S.E. (1973). Municipal waste compost: Effects on crop yields and nutrient content in greenhouse pot experiments. *J. Environ. Qual.* 2: 84-89.
- Tetsumura, T., Tao, R. and Sugiura, A. (2001). Some factors affecting the rooting of softwood cuttings of Japanese persimmon. *J. Japan Soc. Hort. Sci.* 70: 275-280.
- Tipton, J.L. (1990). Vegetative propagation of Mexican redbud, larchleaf goldenweed, littleleaf ash, and evergreen sumac. *HortScience*. 25(2): 196-198.
- Topacoglu, O., Sevik, H., Guney, K., Unal, C., Akkuzu, E. and Sivacioglu, A. (2016). Effect of rooting hormones on the rooting capability of *Ficus benjamina* L. cuttings. *Şumar. List.* 140(1-2): 39-44.
- Trewavas, A.J. (1991). How do plant growth substances work? II. *Plant Cell Environ.* 14: 1-12.
- Tschaplinski, T.J. and Blake, T.J. (1989). Correlation between early root production, carbohydrate metabolism, and subsequent biomass production in hybrid poplar. *Can. J. Bot.* 67: 2168-2174.
- Vakouftsis, G., Syros, T., Kostas, S., Economou, A.S., Tsoulpha, P., Scaltsoyiannes, A. and Metaxas, D. (2009). Effect of IBA, time of cutting collection, type of cuttings and rooting substrate on vegetative propagation in *Cupressus macrocarpa* (Goldcrest). *Propag. Ornament. Plants.* 9(2): 65-70.
- Vieitez, E. and Pena, J. (1968). Seasonal rhythm of rooting of *Salix atrocinerea* cuttings. *Physiol. Plant.* 21: 544-555.

- Vigl, F. and Rewald, B. (2014). Size matters? The diverging influence of cutting length on growth and allometry of two Salicaceae clones. *Biomass Bioenergy*. 60: 130-136.
- Visser, E.J.W., Cohen, J.D., Barendse, G.W.M., Blom, C.W.P.M. and Voesenek, L.A.C.J. (1996). An ethylene-mediated increase in sensitivity to auxin induces adventitious root formation in flooded *Rumex palustris* Sm. *Plant Physiol*. 112(4): 1687-1692.
- Wang, H., Yang, Y., Sun, Y., Wang, L. and Deng, Q. (2019). Study on the cutting propagation of *Lonicera cuminata* and *Lonicera macranthoides*. *IOP Conf. Ser. Earth Environ. Sci.* 237(5): 052038.
- Wang, Y.T. (1987). Effect of warm medium, light intensity, BA, and parent leaf on propagation of golden pothos. *HortScience*. 22: 597-599.
- Worrall, R.J. (1976). Effects of time of collection, growing-conditions of mother plants and growth regulators on rooting of cuttings of *Telopea speciosissima* (Proteaceae). *Sci. Hort.* 5: 153-160.
- Zalesny, R.S., Hall, R.B., Bauer, E.O. and Riemenschneider, D.E. (2003). Shoot position affects root initiation and growth of dormant unrooted cuttings of *Populus*. *Silvae. Genet.* 52(8): 273-279.
- Zencirkiran, M. (2013). Peyzaj Bitkileri 1. Nobel Akademik Yayıncılık, Ankara. 475.

**ΕΝΟΤΗΤΑ ΙΙΙ - ΑΝΑΔΕΙΞΗ ΑΡΧΑΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΧΩΡΩΝ ΜΕ
ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΑΥΤΟΦΥΩΝ ΦΥΤΙΚΩΝ ΕΙΔΩΝ**

III. ΑΝΑΔΕΙΞΗ ΑΡΧΑΙΟΛΟΓΙΚΩΝ ΧΩΡΩΝ ΜΕ ΤΗ ΧΡΗΣΗ ΑΥΤΟΦΥΩΝ ΦΥΤΙΚΩΝ ΕΙΔΩΝ

III. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα φυτά που αυτοφύονται σε αρχαία κτίρια και αρχαιολογικά ερείπια αποτελούν σοβαρή απειλή για τη διατήρησή τους. Ο έλεγχος αυτών των ζιζανίων είναι δαπανηρός, ενώ η χρήση ζιζανιοκτόνων μπορεί να οδηγήσει σε σοβαρά οικολογικά προβλήματα. Η χρήση κατάλληλων αυτοφυών θαμνωδών ειδών σε αρχαιολογικούς θα μπορούσε να συμβάλει στη διατήρηση του χαρακτήρα του χώρου, να αναδείξει το τοπίο, ενώ με πυκνή φύτευση των ειδών αυτών δύναται να αποτραπεί την ανεξέλεγκτη διάδοση επιβλαβών φυτικών ειδών. Αντικείμενο της παρούσας ερευνητικής εργασίας ήταν διερεύνηση της ικανότητας εγκατάστασης στο φυσικό περιβάλλον 5 αυτοφυών ειδών της ελληνικής και μεσογειακής χλωρίδας με σκοπό την αξιοποίησή τους σε αρχαιολογικούς χώρους.

Για τη διεξαγωγή των πειραμάτων χρησιμοποιήθηκαν φυτά τεσσάρων μηνών, των ειδών *Ballota acetabulosa*, *Clinopodium creticum*, *Clinopodium nepeta* και *Scabiosa hymettia*, που παράχθηκαν από μοσχεύματα βλαστού, τα οποία φυτεύτηκαν σε τρεις αρχαιολογικούς χώρους της Ελλάδας, με διαφορετικό μικροκλίμα, την Παλαιοχριστιανική Αμφίπολη (Ν. Σερρών), την Κολώνα (Αίγινα) και την Αρχαία Μεσσήνη (Ν. Μεσσηνίας), το Δεκέμβριο του 2013, το Μάρτιο και το Δεκέμβριο του 2014. Τα φυτά δεν αρδεύθηκαν και κάθε τρεις μήνες γινόταν μηχανική (με το χέρι) ζιζανιοκτονία. Τον Απρίλιο του 2015 διεξήχθη μία ακόμη φύτευση στο Βοτανικό Κήπο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου (Γ.Π.Α.), όπου η επιφάνεια του εδάφους καλύφθηκε με μαύρο γεωφάσμα για τον έλεγχο ζιζανίων και τα φυτά αρδεύονταν ανά 15 ημέρες, κατά τη θερινή περίοδο (Ιούνιος - Σεπτέμβριος). Στη φύτευση αυτή εγκαταστάθηκαν και φυτά *Anthyllis barba-jovis* τα οποία είχαν παραχθεί *in vitro*.

Τα ποσοστά επιβίωσης των φυτών όλων των φυτεύσεων καταγράφηκαν το Σεπτέμβριο του 2015. Στην «Παλαιοχριστιανική Αμφίπολη» Σερρών, τα *B. acetabulosa*, *C. nepeta*, και *S. hymettia* επιβίωσαν σε υψηλό ποσοστό (> 70%), ενώ το είδος *C. creticum* σε ποσοστό 30%. Στον αρχαιολογικό χώρο «Κολώνα» στην Αίγινα, το είδος *B. acetabulosa* από 40 έως 70%, το *S. hymettia* σε πολύ χαμηλό ποσοστό (12,5%), ενώ τα είδη *C. creticum* και *C. nepeta* δεν επιβίωσαν. Στην Αρχαία Μεσσήνη, τα *B. acetabulosa*, *C. creticum* και *S. hymettia* επιβίωσαν σε υψηλά ποσοστά ($\geq 60\%$), ενώ το είδος *C. nepeta* σε ποσοστό (40%). Στο

Βοτανικό κήπο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου στο Γ.Π.Α. το ποσοστό επιβίωσης όλων των ειδών ήταν πολύ υψηλό (90 - 100%).

Συμπερασματικά, το είδος *B. acetabulosa* έδειξε τη μεγαλύτερη προσαρμοστικότητα και ικανότητα εγκατάστασης χωρίς άρδευση σε όλη την Ελλάδα. Το *C. nepeta* εγκαταστάθηκε καλύτερα στη Β. Ελλάδα, το *C. creticum* στη Νότια Ελλάδα, σε αντίστοιχες περιοχές όπου αυτοφύονται, ενώ το *S. hymettia* επιβίωσε σε πολύ χαμηλό ποσοστό στον αρχαιολογικό χώρο «Κολώνα» στην Αίγινα, όπου το κλίμα είναι πιο θερμό και ξηρό. Η χρήση γεωφάσματος για τον έλεγχο των ζιζανίων και η εφαρμογή αραιών αρδεύσεων κατά τη διάρκεια της θερμής και ξηρής περιόδου του καλοκαιριού συνέβαλαν στην αποτελεσματικότερη εγκατάσταση όλων των φυτικών ειδών στο Γ.Π.Α.

III. ΣΚΟΠΟΣ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκε η ικανότητα επιβίωσης και εγκατάστασης των θαμνωδών αυτοφυών ειδών *A. barba-jovis*, *B. acetabulosa*, *C. creticum*, *C. nepeta*, και *S. hymettia*, στο φυσικό περιβάλλον (σε τρεις αρχαιολογικούς χώρους, ήτοι «Κολώνα» στην Αίγινα, «Παλαιοχριστιανική Αμφίπολη» Σερρών, «Αρχαία Μεσσήνη» και στο Βοτανικό Κήπου του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γ.Π.Α), με ελάχιστες καλλιεργητικές φροντίδες με στόχο την αξιοποίησή τους ως καλλωπιστικών φυτών σε αρχαιολογικούς χώρους της Ελλάδας.

III.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Οι αρχαιολογικοί χώροι είναι συνυφασμένοι στη συνείδηση του επισκέπτη με τη χλωρίδα και την πολιτιστική κληρονομιά της χώρας μας, και αποτελούν πρόκληση για τον Αρχιτέκτονα Τοπίου, ώστε οι φυτεύσεις σε αυτούς να συμβάλλουν στην ενοποίηση του φυσικού τοπίου με το μνημειακό δομημένο χώρο (Ζάχος, 1998, Blasi, 2008). Η χρήση αυτοφυών θαμνωδών ειδών σε αρχαιολογικούς θα μπορούσε να συμβάλει στη διατήρηση του χαρακτήρα του χώρου, να αναδείξει το τοπίο, ενώ με πυκνή φύτευση των ειδών αυτών δύναται να αποτραπεί η ανεξέλεγκτη διάδοση επιβλαβών για το μνημείο φυτικών ειδών. Συχνά, οι φυτεύσεις που γίνονται σε αρχαιολογικούς χώρους, γίνονται κατακερματισμένα, χωρίς να λαμβάνεται υπ' όψιν το σύνολο του αρχαιολογικού χώρου και της ευρύτερης περιοχής και χωρίς εις βάθος μελέτη της καταλληλότητας των ειδών, ως προς την προέλευση και τις εδαφοκλιματικές απαιτήσεις.

III.1.1 Ιστορική αναδρομή της συνύπαρξης αυτοφυούς βλάστησης και αρχαιολογικών χώρων

Το 18^ο αιώνα η λατρεία των ερειπίων γίνεται όλο και εντονότερη. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η περίφημη «Μεγάλη Περιήγηση» (Grand Tour), η οποία περιελάμβανε την απαραίτητη επίσκεψη σε αρχαιολογικούς χώρους (αρχαιοελληνικά και ρωμαϊκά μνημεία), ιστορικά τοπία και μοναδικές παρθένες τοποθεσίες σπάνιας φυσικής ομορφιάς σε παραμεσόγειες χώρες (<https://bit.ly/2y3p1p9>, Μπακιριτζή, 2007). Στα τέλη του αιώνα ο John Sibthorp (1758 - 1796), καθηγητής της Βοτανικής στην Οξφόρδη, ταξίδευσε σε όλη την Ελλάδα μελετώντας την άγρια βλάστησή της. Επιστρέφοντας στην Αγγλία, μαζί με τρεις χιλιάδες άγνωστα έως τότε φυτικά είδη, άρχισε αμέσως τη συγγραφή του 7-τόμου του βιβλίου «Flora Graeca», το οποίο εκδόθηκε μετά το θάνατό του (<https://bit.ly/3cNLBAI>). Τέλος του 18^ο αιώνα αρχές του 19^ο αιώνα κάνει την εμφάνισή του το κίνημα του Ρομαντισμού, το οποίο ακολούθησε ιστορικά την περίοδο του Διαφωτισμού. Ο Ρομαντισμός στράφηκε προς τη φύση, δίνοντάς της σημαντική θέση σε κάθε μορφή έκφρασης.

Παράλληλη την ίδια εποχή η αισθητική αξία των ερειπίων και των μνημείων έχαιρε υψηλής εκτίμησης και η βλάστηση πάνω σε αυτά θεωρούνταν ότι βελτιώνει τη γραφικότητα τόσο του γενικού συνόλου του τοπίου όσο και του κάθε μνημείου ξεχωριστά (Pinna and Salvadori, 2008). Λίγο αργότερα, ο Charles Buls (1837 - 1914), Βέλγος πολιτικός και δήμαρχος της πόλης των Βρυξελλών, είχε δηλώσει στο «La restauration des monuments

anciens» ότι η βλάστηση θα μπορούσε μερικές φορές να χρησιμεύσει για να «συγκαλύψει» τις «πληγές» του μνημείου αναλαμβάνοντας έναν ρόλο «εναρμόνισης» των παραμορφώσεων (Rapalo, 2017).

Κατά το 19^ο αιώνα και πιο συγκεκριμένα το 1832 συντάσσεται το πρώτο πολεοδομικό έργο της Αθήνας από τους αρχιτέκτονες Σταμάτιο Κλεάνθη και Edward Schaubert (Jokilehto, 2011, pp. 89 - 91), προτού ακόμη αυτή ανακηρυχθεί πρωτεύουσα του Ελληνικού κράτους. Την ίδια χρονιά σε υπόμνημα τους προς τον Αντιβασιλέα αναφέρουν: «...*Ο χώρος μεταξύ των μνημείων θα μπορούσε να διαμορφωθεί σε κήπο με δένδρα και χλοοτάπητα [...]* ούτως ώστε το σύνολο να γίνει μουσείο αρχαίας τέχνης που δεν θα υπήρχε δεύτερο στον κόσμο» (culture.gr, 2002, Κανέλλου, 2019). Οι προτάσεις των Κλεάνθη και Edward Schaubert έμειναν σε θεωρητικό πλαίσιο μέχρι τη δεκαετία του 1950 (Μαλλούχου-Tufano, 2000).

Κατά τη διάρκεια του μεσοπολέμου, οι εργασίες αποκατάστασης και στήριξης του Νικόλαου Μπαλάνου (1860 - 1942, Έλληνας πολιτικός μηχανικός), αναμόρφωσαν την εικόνα της Ακρόπολης που έως τότε ήταν «*σωρός ερειπίων*» (<https://bit.ly/3bFpZGt>). Την ίδια περίοδο ο Γεώργιος Οικονόμου (1882 - 1951), αρχαιολόγος και καθηγητής του Εθνικού και Καποδιστριακού Πανεπιστημίου Αθηνών, υποστηρίζει ότι η βλάστηση μπορεί να παίζει ποικίλους ρόλους στους ελλαδικούς αρχαιολογικούς χώρους και επιπλέον αναφέρει συγκεκριμένα είδη που μπορούν να εγκατασταθούν σε αυτούς. Κατά την άποψη του Γ. Οικονόμου, η «βλάστηση» έπρεπε να έχει διαδραματίσει το ρόλο της πλήρωσης της «*ζώνης προστασίας*» (ή «*ζώνης σεβασμού*») που θα δημιουργηθεί γύρω από έναν αρχαιολογικό χώρο, προκειμένου να τον προστατεύσει από τα «*σύγχρονα πολεοδομικά έργα και καταστροφές*», δεδομένου ότι «*η έννοια του ιερού επιτυγχάνεται μόνο μέσω της απομόνωσης*» (Rapalo, 2017).

Το 1931 από τον Ιταλό Alfredo Lensi προτάθηκε "το θέμα της συμβατότητας μεταξύ των φυτικών ειδών και των αρχιτεκτονικών μορφών ενός μνημειακού κτηρίου" στο βιβλίο του με τίτλο «*Le rôle esthétique de la végétation, in La conservation des Monument d'art et d'histoire*» (μετάφραση: Ο αισθητικός ρόλος της βλάστησης, στη διατήρηση των μνημείων τέχνης και ιστορίας) (Rapalo, 2017). Ερωτήσεις σχετικά με το ρόλο της βλάστησης τέθηκαν επίσης από το Victor Horta (1861-1947) αρχιτέκτονα του Βελγίου, ο οποίος στο βιβλίο του με τίτλο «*Entourage des monuments - Principes généraux, in La conservation des Monuments*» (μετάφραση: Περιβάλλον μνημείων - γενικές αρχές, στη διατήρηση των μνημείων), που εκδόθηκε το 1931, δήλωσε: «*Όσον αφορά το ρόλο του πρασίνου γύρω από τα μνημεία, αυτό το σημαντικό στοιχείο της διακόσμησης σπάνια χρησιμοποιήθηκε με σύνεση*

τον τελευταίο αιώνα. Βεβαίως, το πράσινο και οι καλλιέργειες είναι ένα απίστευτα ενδιαφέρον αξεσουάρ, στις περιπτώσεις όπου το αρχιτεκτονικό περιβάλλον δεν υπάρχει πλέον». (Rapalo, 2017).

III.1.2 Αναγκαιότητα βλάστησης στους αρχαιολογικούς χώρους – Θετικές επιδράσεις της βλάστησης στους αρχαιολογικούς χώρους

Τα τελευταία χρόνια η Ευρωπαϊκή Ένωση στηρίζει οικονομικά την ανάδειξη των αρχαιολογικών χώρων με στόχο την προστασία και διαχείριση της πολιτιστικής κληρονομιάς (<https://bit.ly/36kjAyT>). Οι εργασίες που πραγματοποιούνται περιλαμβάνουν συνήθως αρχικά τη συντήρηση των αρχαιολογικών κτισμάτων, την οριοθέτηση του χώρου με περίφραξη, τοποθέτηση επεξηγηματικών πινακίδων, κατασκευή χώρων αναψυχής, απομάκρυνση αυτοφυούς βλάστησης όπου είναι απαραίτητο και εισαγωγή νέων φυτικών ειδών (νέες φυτεύσεις).

(α) Ο αισθητικός – λειτουργικός ρόλος της βλάστησης στους αρχαιολογικούς χώρους

Η αισθητική απόλαυση που προσδίδει η βλάστηση στο τοπίο είναι ποικίλη, συνεχής και πολύπλευρη ερεθίζοντας όλες τις ανθρώπινες αισθήσεις, εξαρτώμενη τόσο από τα φυτικά είδη και τις αλλαγές που έχει το υπέργειο μέρος τους μέσα στο χρόνο, όσο και από την ηλικία, τη ψυχοσύνθεση, τις εμπειρίες του κάθε ανθρώπου. Πέρα, όμως από τη δημιουργία ενός ωραίου αισθητικού αποτελέσματος στο αρχαιολογικό χώρο, η εγκατάσταση φυτικών ειδών με βάση το κατάλληλο φυτοτεχνικό σχεδιασμό μπορεί να αποτελέσει εργαλείο ανάδειξης του αρχαιολογικού τοπίου, αλλά συγχρόνως να βελτιώσει και τη λειτουργικότητα του χώρου.

- 1) Η ύπαρξη βλάστησης στους αρχαιολογικούς χώρους μπορεί να καθοδηγήσει τους επισκέπτες σε επιθυμητά μονοπάτια.
- 2) Με την παρουσία δέντρων, ιδιαίτερα στον ελλαδικό χώρο, ορίζει σημεία στάσης και ανάπαυσης, κυρίως κατά τους ζεστούς καλοκαιρινούς μήνες με παρατεταμένη ηλιοφάνεια, προσφέροντας πολύτιμη σκιά και δροσιά.
- 3) Επιπλέον η παρουσία βλάστησης κοντά σε συγκεκριμένα μνημεία μπορεί να αποτελέσει εστιακά σημεία παρασύροντας τους επισκέπτες προς αυτό το σημείο (Robinson, 1992, Nelson, 2004).
- 4) Η εγκατάσταση φύτευσης γύρω από τον αρχαιολογικό χώρο μπορεί να αποτελέσει την πιο οικονομική και συμβατή λύση περίφραξης(οριοθέτησης του αρχαιολογικού χώρου),

με το πιο ωραίο αισθητικό αποτέλεσμα. Βέβαια τα φυτικά είδα που θα επιλεγθούν θα πρέπει να είναι από το ευρύτερο περιβάλλον της κάθε περιοχής ώστε να υπάρχει σύνδεση με τη γλωρίδα του κάθε τόπου, επιπλέον η περίφραξη με φυτικά είδη λειτουργεί και ως φόντο για τα αρχαιολογικά μνημεία (Hackett, 1979).

- 5) Η παρουσία βλάστησης μειώνει την οπτική επαφή με τις γειτονικές δραστηριότητες.
- 6) Η ύπαρξη βλάστησης κάνει τον αρχαιολογικό χώρο ευχάριστο και φιλικό, προσδίδοντάς του όλα τα επιθυμητά χαρακτηριστικά ενός τόπου αναψυχής, δημιουργώντας αφενός θετικά αισθήματα στους επισκέπτες και αφετέρου τους φέρνει κοντά στη φύση (Ντάφης, 1989).
- 7) Η βλάστηση στους αρχαιολογικούς χώρους μπορεί να προστατεύσει τα μνημεία από τους ισχυρούς ανέμους, λειτουργώντας ως φυσικός ανεμοφράκτης.
- 8) Κατά τους καλοκαιρινούς μήνες, η ύπαρξη βλάστησης κοντά σε κτιριακές εγκαταστάσεις, όπως τα μουσεία, τα πωλητήρια, τους χώρους υποδοχής μπορεί να ανακουφίσει από το δυσμενή συνδυασμό των υψηλών θερμοκρασιών και της υψηλής υγρασίας.
- 9) Οι αρχαιολογικοί αυτοί χώροι αφενός αποτελούν νησίδες προστασίας της βιοποικιλότητας και καταφύγια σπάνιων ειδών της γλωρίδας και της πανίδας και αφετέρου είναι χώροι πρασίνου ακόμα και εάν η συντήρηση είναι ελλιπής με αποτέλεσμα την άναρχη βλάστηση. Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι η περιοχή της Ακροπόλεως στην Αθήνα, όπου βρέθηκαν σπάνια είδη στον ελληνικό χώρο, όπως το είδος *M. acropolitana* Halácsy ή *Satureja acropolitana* (Halácsy) που φύεται μόνο στην περιοχή αυτή. Το 2006 βρέθηκε ένας μικρός πληθυσμός 200 φυτών, η θέση των οποίων κρατείται μυστική για λόγους ασφαλείας (Γιαννίτσαρος και Ζερβού, 1998, <https://bit.ly/2S6zXJy>).

(β) Ο εκπαιδευτικός ρόλος της βλάστησης στους αρχαιολογικούς χώρους

Οι αρχαιολογικοί και ιστορικοί χώροι εδώ και πολλές δεκαετίες αποτελούν χώρους επίσκεψης από σχολεία στο πλαίσιο του μαθήματος της ιστορίας, επιδιώκοντας την εξοικείωση των μαθητών με την ιστορική δόμηση, τα μνημεία, τους αρχαιολογικούς χώρους με απώτερο σκοπό τη διδασκαλία της πολιτιστικής κληρονομιάς (Stone, 2004). Η άμεση επαφή των παιδιών τόσο με τα αρχαιολογικά μνημεία όσο και με τη φύση έχει τεράστια αξία για την αγωγή και τη ψυχολογία τους.

Ο αρχαιολογικός και ιστορικός ρόλος της βλάστησης στους αρχαιολογικούς χώρους

Ο παράγοντας βλάστηση αποτελεί αφενός τεκμήριο ιστορικής μαρτυρίας με την εξέλιξη των καλλιεργειών και της αυτοφυούς βλάστησης και αφετέρου το κλειδί για την ερμηνεία του παρελθόντος (Rackham and Moody, 1998).

- 1) Η αυτοφυής βλάστηση σε ορισμένες περιπτώσεις υποβοηθά τον εντοπισμό αρχαιολογικών καταλοίπων υποδηλώνοντας τη θέση των θαμμένων μνημείων (Ceschin *et al.*, 2012).
- 2) Πέρα από τον εντοπισμό φυτικών καταλοίπων η ύπαρξη κήπων συνήθως συμπεραίνεται έμμεσα με την ανασκαφή στοιχείων όπως π.χ. ύπαρξη αρδευτικών δικτύων, φυτοδοχείων, κ.λπ. (Μπακιρτζή, 2009).
- 3) Τόσο τα αρχαιολογικά ευρήματα, όπως τοιχογραφίες, οικιακά σκεύη, αγροτικά εργαλεία και νομίσματα, όσο και τα αρχιτεκτονικά μέλη, μας δίνουν πληροφορίες για τα φυτικά είδη που υπήρχαν σε κάθε περιοχή (Μπάουμαν, 1999). Χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι αυτά των Κορινθιακών κιονόκρανων και η πληθώρα νομισμάτων που έχουν βρεθεί σε ανασκαφές σε όλο τον Ελλαδικό χώρο που απεικονίζουν διάφορα φυτά ή γεωργικά προϊόντα. Πιο συγκεκριμένα η ανακάλυψη του Κορινθιακού κιονόκρανου έγινε από τον Καλλίμαχο (5ος αιώνας π.Χ.), γνωστό γλύπτη της εποχής, που εμπνεύστηκε από το φυτό άκανθος (*Acanthus mole*) που φυόταν στην περιοχή (<https://bit.ly/3e7RJEl>). Σε ανασκαφές σε όλο τον Ελλαδικό χώρο έχουν βρεθεί πληθώρα νομισμάτων, που απεικονίζουν διάφορα φυτικά είδη, όπως το δίδραχμο της Μαρώνειας (400-350 π.Χ.) στη Θράκη που απεικονίζει μια κληματίδα αμπελιού και ο αργυρός στατήρ της Καμείρου (500 - 480 π.Χ.) στη Ρόδο ένα φύλλο συκιάς. (<https://bit.ly/3d6LlO5>).

(γ) Ο οικονομικός ρόλος της βλάστησης στους αρχαιολόγους χώρους

Η παρουσία βλάστησης εντός και εκτός του αρχαιολογικού χώρου αναδεικνύει και αναβαθμίζει τόσο τον αρχαιολογικό χώρο όσο και την ευρύτερη περιοχή, γίνεται πόλος έλξης τουριστών με αποτέλεσμα την αύξηση των εσόδων του ίδιου του αρχαιολογικού χώρου, αλλά και των τοπικών επιχειρήσεων (Tsavaropoulos and Fragou, 2013).

Επιπλέον οι εργασίες συντήρησης των νέων εγκαταστημένων φυτών αλλά και ο περιορισμός της αυτοφυούς βλάστησης, ειδικά κατά τους καλοκαιρινούς μήνες, προϋποθέτει τη συνεχή απασχόληση εξειδικευμένου προσωπικού (Μπακιρτζή, 2009).

(δ) Ο προστατευτικός ρόλος της βλάστησης στα αρχαιολογικά μνημεία

Η ύπαρξη βλάστησης μέσα στον αρχαιολογικό χώρο μπορεί να προσφέρει και προστασία στα ίδια τα αρχαιολογικά μνημεία είτε αποτρέποντας τη διάβρωση του εδάφους είτε προστατεύοντάς τα από τα έντονα φυσικά φαινόμενα π.χ. πλημμύρες, κατολισθήσεις. Τα φυτικά είδη που κρίνονται πιο αποτελεσματικά για τη μείωση της διάβρωσης του εδάφους είναι τα ξυλώδη είδη λόγω των μορφολογικών χαρακτηριστικών τους π.χ. το σχήμα τους, την πυκνότητα του φυλλώματός τους, τη μορφολογία του ριζικού του συστήματος ή και συνδιασμό αυτών (Gray, 1995). Εκτός από τα ξυλώδη είδη και τα ποώδη φυτικά είδη, προσφέρουν προστασία στο έδαφος από την επιφανειακή διάβρωση, σχηματίζοντας εδαφοκάλυψη (Gray, 1995, Altieri and Pinna, 2008). Χαρακτηριστικό παράδειγμα είναι το Αρχαίο θέατρο Μεσσήνης, όπου ο χώρος γύρω από το θέατρο φυτεύτηκε με γκαζόν.

III.1.3 Αρνητικές επιδράσεις της βλάστησης στους αρχαιολογικούς χώρους

Εκτός από το θετικό ρόλο της βλάστησης στους αρχαιολογικούς χώρους, η ανεξέλεγκτη βλάστηση αλλοιώνει την εμφάνιση των αρχαιολογικών χώρων, επιφέροντας αρνητικές επιπτώσεις.

Τα προβλήματα που σχετίζονται με την ύπαρξη βλάστησης στους αρχαιολογικούς χώρους κατατάσσονται στις εξής δύο κατηγορίες: α) άμεσες και β) έμμεσες επιδράσεις.

Στις άμεσες επιδράσεις είναι:

- 1) Η βιοχημική διάβρωση, αλλοίωση των μνημείων από το ριζικό σύστημα των διάφορων φυτικών ειδών. Διάφορα φυτικά είδη, όπως το *Parietaria judaica* L. (κ.ο. περδικάκι) εκκρίνουν χημικές ουσίες οι οποίες διασπούν και καταστρέφουν τα δομικά υλικά των μνημείων (Mishra *et al.*, 1995, Lisci *et al.*, 2003, Pinna and Salvadori, 2008). Ο βαθμός της καταστροφής εξαρτάται τόσο από τη χημική ουσία που εκκρίνεται όσο και το δομικό υλικό του μνημείου (Lisci *et al.*, 2003).
- 2) Η μηχανική καταστροφή των δομικών υλικών των μνημείων από τη διείδυση των ριζών καθώς αναπτύσσονται. Ορισμένα αυτοφυή φυτά με το εκτεταμένο ριζικό τους σύστημα διειδύουν σε ήδη υπάρχουσες ρωγμές διαταράσσοντας και διαρρηγνύοντας τη συνοχή των υλικών προκαλώντας νέες ρωγμές (Mishra *et al.*, 1995, Οικονόμου, 1998, Lisci *et al.*, 2003, Pinna and Salvadori, 2008). Εκτεταμένη είναι η υποβάθμιση ή ακόμη και η καταστροφή που υφίστανται τα κατάλοιπα που βρίσκονται μέσα στο έδαφος π.χ. κατακόμβες, τάφοι, τα μη ανασκαμμένα κατάλοιπα από το ριζικό σύστημα ορισμένων

φυτικών ειδών, κυρίως δενδρωδών, όπως του *Laurus nobilis* L. (κ.ο. δάφνη) και του *Pinus pinea* L. (κ.ο. κουκουναριά) (Giuliani, 1996, Albertano *et al.*, 2008, Caneva *et al.*, 2009). Επιπλέον πολλά φυτικά είδη αναπτύσσονται είτε ανάμεσα είτε γύρω από τα ψηφιδωτά και με τις ρίζες τους, οι οποίες κατευθύνονται κάτω από τη στρώση των ψηφίδων, προκαλούν την αποκόλλησής της ή τη χαλάρωση της πρόσφυσης με το υπόστρωμα (Roby and Alberti, 2008).

- 3) Επιπρόσθετα το ριζικό σύστημα επειδή διατηρεί αυξημένη υγρασία μπορεί να επιφέρει αλλαγές στο μικροπεριβάλλον των μνημείων (Almeida, *et al.*, 1994, Mishra *et al.*, 1995, Ζάχος, 1998).
- 4) Τα φυτά λόγω του βάρους τους επιβαρύνουν τη στατικότητα των μνημείων προκαλώντας πολλές φορές ακόμη και κατάρρευση τμήματος ή και ολόκληρου του μνημείου (Mishra *et al.*, 1995, Lisci *et al.*, 2003).
- 5) Από χημικές αναλύσεις που έχουν γίνουν έχει αποδειχθεί ότι μικροοργανισμοί, όπως είναι τα βακτήρια και οι μύκητες, οδηγούν στην υποβάθμιση των μνημείων λόγω των μεταβολικών οξέων που παράγονται από αυτά με αποτέλεσμα τη διάβρωση των μνημείων (Butin *et al.*, 1996, Wollenzien *et al.*, 1997, Videla *et al.*, 2000).
- 6) Η παρουσία βλάστησης για μεγάλο χρονικό διάστημα στην επιφάνεια των μνημείων ενδέχεται να προκαλέσει την εμφάνιση δυσχρωμιών στα δομικά υλικά των μνημείων εξαιτίας των χρωστικών ουσιών που περιέχουν τα διάφορα μέρη των φυτών (Ζιαγάκη, 2012), όπως τα φύλλα και άνθη που περιέχουν χλωροφύλλη και ανθοκυανίνες αντίστοιχα.

Στις έμμεσες επιδράσεις είναι:

- 1) Η ανεξέλεγκτη βλάστηση επηρεάζει αρνητικά την αισθητική εικόνα των αρχαιολογικών χώρων και προσδίδει εικόνα εγκατάλειψης και μηδενικής συντήρησης τους προκαλώντας θλίψη και απογοήτευση (Mishra *et al.*, 1995, Pinna and Salvadori, 2008).
- 2) Η υπερβολική ανάπτυξη της βλάστησης μπορεί να συγκαλύψει περιοχές του μνημείου δυσκολεύοντας την κατανόηση της διάρθρωσης τους (Mishra *et al.*, 1995, Γιαννοπολίτης, 1998, Lisci *et al.*, 2003).
- 3) Προκαλεί δυσκολίες στην πρόσβαση των επισκεπτών στους αρχαιολογικούς χώρους (Ζάχος, 1998, Οικονόμου, 1998).
- 4) Παρεμποδίζονται οι εργασίες συντήρησης και αποκατάστασης του αρχαιολογικού χώρου και των μνημείων (Mishra *et al.*, 1995)

- 5) Η πυκνή βλάστηση ενδέχεται να εγκυμονεί κινδύνους για τους επισκέπτες και τους εργαζόμενους λόγω μη καλής οπτικής του ανάγλυφου του εδάφους (Μπακιρτζή, 2009)

III.1.4 Σχεδιασμός φυτεύσεων στους αρχαιολογικούς χώρους

Ο διεθνής χάρτης για τη συντήρηση και αποκατάσταση των μνημείων και τοποθεσιών (Χάρτα της Βενετίας, 1964), είναι μια διεθνής σύμβαση που υπογράφηκε με το τέλος του 2ου Διεθνούς Συνεδρίου Αρχιτεκτόνων και Τεχνικών Ιστορικών Μνημείων. Στα άρθρα της ορίζονται οι κανόνες για την Αποκατάσταση και Συντήρηση Μνημείων και Μνημειακών Συνόλων, οι οποίοι ενσωματώνονται στις Εθνικές νομοθεσίες των χωρών που τη συνυπογράφουν, συμπεριλαμβανομένης και της Ελλάδας. (Μαλλούχου-Tufano, 2015). Στο 1ο άρθρο της αναφέρεται: *«Η έννοια ενός ιστορικού μνημείου δεν καλύπτει μόνο το μεμονωμένο αρχιτεκτονικό έργο αλλά και την αστική ή αγροτική τοποθεσία που μαρτυρεί έναν ιδιαίτερο πολιτισμό, μια ενδεικτική εξέλιξη ή ένα ιστορικό γεγονός. Αυτό ισχύει όχι μόνο για τις μεγάλες δημιουργίες αλλά και για τα ταπεινά έργα που με τον καιρό απέκτησαν πολιτιστική σημασία»*. Η Αρχιτεκτονική Τοπίου μπορεί να συμβάλει με σεβασμό στην ανάδειξη και τη διατήρηση των σημαντικών μνημειακών εγκαταστάσεων.

Ο σχεδιασμός φυτεύσεων (Planting design) αποτελεί αναπόσπαστο κομμάτι της συνολικής αρχιτεκτονικής τοπίου και διέπεται από αξίες αισθητικές, λειτουργικές, κοινωνικές, αλλά και οικολογικές (Μπακιρτζή, 2009). Περιλαμβάνει την επιλογή και ενσωμάτωση φυτικών ειδών τόσο εντός όσο και εκτός του αρχαιολογικού χώρου. Η επιλογή των ειδών πρέπει να αποτελεί αποτέλεσμα της διερεύνησης και αξιολόγησης της χλωρίδας της κάθε περιοχής, αρχαίων και ιστορικών δεδομένων και της, επιδιωκόμενης κατάστασης (Parafotiou *et al.*, 2017b).

Δυστυχώς όμως δεν αναδεικνύεται στο μέγιστο βαθμό το αισθητικό αποτέλεσμα της βλάστησης εξ' αιτίας ακατάλληλου σχεδιασμού φυτεύσεων (Robinson, 1992).

Οι φυτεύσεις σε έναν αρχαιολογικό χώρο πρέπει να έχουν λειτουργικό, αισθητικό, προστατευτικό χαρακτήρα ή και συνδυασμό αυτών. Οι λειτουργικές φυτεύσεις έχουν ως στόχο την επίλυση προβλημάτων σχετικά με τη χρηστικότητα του χώρου, όπως για παράδειγμα την οριοθέτηση της περιοχής και την καθοδήγηση των επισκεπτών σε επιθυμητά μονοπάτια (Parafotiou *et al.*, 2017c, d, e) Οι αισθητικές (καλλωπιστικές) φυτεύσεις έχουν ως στόχο την ανάδειξη του ιστορικού χαρακτήρα των αρχαιολογικών χώρων και μνημείων, τη βελτίωση του χώρου και την επικάλυψη ατελειών ή δυσλειτουργιών του χώρου. Ενώ οι προστατευτικές φυτεύσεις έχουν ως στόχο τη μείωση

της διάβρωσης, αλλά και την προστασία του χώρου και μνημείων από δυσμενή καιρικά φαινόμενα (άνεμο, ηλιακή ακτινοβολία) (Ζιαγάκη, 2012).

Εντός των αρχαιολογικών χώρων και πάρκων αναγκαιότητα φύτευσης παρουσιάζεται στις τοποθεσίες στάσης και παρατήρησης για τους επισκέπτες, στην οροθετημένη περίμετρο του επισκέψιμου χώρου, σε χώρους υποδοχής (εισόδους) και παραμονής των επισκεπτών (πωλητήρια, αναψυκτήρια κλπ), ενώ εκτός των αρχαιολογικών χώρων στο χώρο στάθμευσης των οχημάτων. Ιδιαίτερη μέριμνα πρέπει να λαμβάνεται μετά την ολοκλήρωση των εργασιών, για τη συντήρηση των εγκατεστημένων φυτεύσεων, ώστε αυτές να επιτελούν ικανοποιητικά το σκοπό εφαρμογής τους. (Ζιαγάκη, 2012).

III.1.5 Η επιλογή των φυτικών ειδών για τη φύτευση ενός οργανωμένου αρχαιολογικού χώρου

Η επιλογή των κατάλληλων φυτικών ειδών σε σχέση με τις εδαφοκλιματικές συνθήκες του αρχαιολογικού χώρου αποτελεί πρωταρχικό μέλημα στη διαδικασία σύνταξης μιας φυτοτεχνικής μελέτης φύτευσης. Οι ιδιαιτερότητες των συστατικών στοιχείων του αρχαιολογικού χώρου πρέπει να αξιολογούνται προσεκτικά ώστε αφενός να προστατευτούν και αφετέρου να αναδειχθούν με τη φύτευση (Matteini, 2006). Έτσι, η επιλογή των ειδών πρέπει να αποτελεί αποτέλεσμα της διερεύνησης και αξιολόγησης της χλωρίδας της κάθε περιοχής, αρχαίων και ιστορικών δεδομένων και της επιδιωκόμενης κατάστασης (Papafofiou *et al.*, 2017b). Ιστορικά δεδομένα αντλούνται συνήθως από τις ιστορικές πηγές, τα αρχαιολογικά ευρήματα (τοιχογραφίες, ψηφιδωτά, οικιακά σκεύη, νομίσματα) και τα αρχαιοβοτανικά ευρήματα (γύρη, οι απολιθωμένοι φλοιοί, αποτυπώματα φυτικών καταλοίπων), επιπρόσθετα μπορούν να αντληθούν και από τη μυθολογία. (Altieri and Pinna, 2008, Caneva, 1999, Μπάουμαν, 1999, Renfrew and Bahn, 2001).

Υπάρχουν αναρίθμητες αναφορές σε διάφορα είδη φυτών σε γραπτά κείμενα, αντικείμενα τέχνης καθημερινής χρήσης και λατρευτικά σκεύη (Μπάουμαν, 1999), που προσφέρουν άμεσες ή έμμεσες πληροφορίες για την ύπαρξη συγκεκριμένων φυτών. Η μελέτη των αρχαιοβοτανικών ευρημάτων βοηθά στη γνώση της χλωρίδας μιας περιοχής και επιπλέον παρέχει πολύτιμα περιβαλλοντικά και κλιματολογικά δεδομένα (Renfrew and Bahn, 2001). Στη μυθολογία αναφέρονται πολλά αυτοφυή είδη, τα οποία είτε συνδέονται με κάποιο τοπικό μύθο ή με κάποια θεότητα, χαρακτηριστικά παραδείγματα είναι η ελιά που συνδέεται με την Αθηνά, η Δάφνη με τον Απόλλωνα, η άμπελος με το Διόνυσο κ.α. (Caneva, 1999).

Η εισαγωγή ξενικών φυτικών ειδών σε αρχαιολογικούς χώρους πρέπει να αποφεύγεται, ιδίως αν δεν είμαστε σίγουροι για τη μη επιθετική συμπεριφορά τους. Έτσι, είδη όπως τα *Agave americana* (αθάνατος), *Ailanthus altissima* (αείλανθος), *Robinia pseudoacacia* (ψευδοακακία) κ.α. είναι ακατάλληλα για μεσογειακούς αρχαιολογικούς χώρους (Altieri and Pinna, 2008), ιδίως τα δύο τελευταία τα οποία είναι εξαιρετικά επεκτατικά, και απειλούν την κατάσταση διατήρησης των μνημείων (Celesti-Graporow and Blasi, 2004) και μειώνοντας τη βιοποικιλότητα των οικοσυστημάτων στα οποία εισβάλλουν (Vila *et al.*, 2006, Motard *et al.*, 2011).

Το σημαντικότερο κριτήριο επιλογής των φυτικών ειδών που θα εγκατασταθούν σε ένα αρχαιολογικό χώρο είναι οι άμεσες και έμμεσες αρνητικές επιπτώσεις που θα έχουν στα μνημεία. Στις άμεσες αρνητικές επιπτώσεις περιλαμβάνονται η μηχανική καταστροφή των δομικών υλικών των μνημείων από τη διεύθυνση των ριζών και η συγκάλυψη μερών του μνημείου από την κόμη του φυτού. Έτσι είδη που αναπτύσσουν βαθύ και εξαπλωμένο ριζικό σύστημα, όπως το *Cistus* sp. (λαβανιά) και το *Cercis siliquastrum* (κουτσουπιά) θα πρέπει να αποφεύγονται. Οι φυτικοί οργανισμοί προκειμένου να διατηρηθούν, αλλά και να εξελιχθούν, διαθέτουν μηχανισμούς αναπαραγωγής, που πρέπει να λαμβάνονται υπόψη κατά την επιλογή των κατάλληλων φυτικών ειδών για φύτευση. Είναι χαρακτηριστική η περίπτωση του αρχαιολογικού χώρου της Ελευσίνας, όπου η διάδοση των σπερμάτων των εγκατεστημένων δένδρων ελιάς έχει οδηγήσει στην ανάπτυξη μεγάλου αριθμού νεαρών σποροφύτων ελιάς επί των μνημείων εγκυμονώντας και προξενώντας μηχανική καταστροφή σε αυτά (Παπαφωτίου κ.ά. 2009, Papafotiou *et al.*, 2010a, Papafotiou *et al.*, 2010b).

Στις έμμεσες επιπτώσεις περιλαμβάνεται η μεταβολή του μικροκλίματος που ενδέχεται να οδηγήσει στην ανάπτυξη μικροοργανισμών, λόγω αυξημένης σκίασης και υγρασίας (Altieri and Pinna, 2008) και κατά επέκταση στην υποβάθμιση των μνημείων (Videla *et al.*, 2000). Τέλος θα πρέπει να λαμβάνονται υπόψη τα εδαφοκλιματικά στοιχεία της περιοχής πρέπει να προκειμένου να επιλέγονται τα κατάλληλα φυτικά είδη (Caneva, 1997).

III.1.6 Επιδράσεις ζιζανίων στην ανάπτυξη των φυτικών ειδών

Η παρουσία ζιζανίων στους αρχαιολογικούς χώρους είναι ανεπιθύμητη καθώς συμβάλει στη δημιουργία εικόνας εγκατάλειψης.

Ο πλήρης έλεγχος των ζιζανίων είναι στόχος στη βιολογική παραγωγή και αναμφισβήτητα σε οποιοδήποτε αγροτικό σύστημα βασισμένο στο πεδίο και απαιτεί πολλές ικανότητες και γνώσεις (Bond and Grundy, 2001, Ματζίρης, 2012). Η διαχείριση των ζιζανίων είναι σημαντική για τη μείωση του ανταγωνισμού για το νερό και τα θρεπτικά

συστατικά, τη μείωση του φυσικού περιβάλλοντος για τα παράσιτα, τη βελτίωση της προσβασιμότητας για άλλες δραστηριότητες (π.χ. κλάδεμα των φυτών κτλ.) και τη βελτίωση της αισθητικής ενός αγροτεμαχίου, κήπου, χώρου αστικού πρασίνου κτλ.

Τα περισσότερα ζιζάνια συνήθως προσαρμόζονται σε περιβάλλοντα με συχνές διαταραχές όπου υπάρχει περιορισμένος ανταγωνισμός για το φως, το νερό και τα θρεπτικά συστατικά σε πρόσφατα διαταραγμένα εδάφη (Radosevich *et al.*, 2007). Τα ζιζάνια που δημιουργούνται από τους σπόρους τροφοδοτούνται από πολύ περιορισμένους, με αποτέλεσμα τα μικρά, πρόσφατα αναδυόμενα φυτά είναι πολύ επιρρεπή σε διαταραχές. Έτσι τα ζιζάνια που προέρχονται από τους σπόρους μπορούν να ελεγχθούν με πρακτικές που (α) αποθαρρύνουν τη βλάστηση, (β) εμποδίζουν το νεοεμφανιζόμενο φυτό να λαμβάνει ηλιακό φως ή άλλους πόρους και (γ) καταστρέφουν ή ξεριζώνουν τα νέο-αναδυόμενα. Τα ζιζάνια που εγκαθίστανται ή εξαπλώνονται από ριζώματα ή στόλωνες είναι συχνά το πιο δύσκολα να ελεγχθούν και να αντιμετωπιστούν (Chicouene, 2007).

Η αντιμετώπιση των ζιζανίων μπορεί να γίνει με διάφορες μεθόδους, όπως καλλιεργητικές, μηχανικές, φυτοτεχνικές και χημικές. Στις καλλιεργητικές μεθόδους αναφέρονται η χρήση σπόρου απαλλαγμένου από σπέρματα ζιζανίων, η χρήση απολυμασμένων εδαφικών μειγμάτων και το βοτάνισμα των ζιζανίων όταν είναι στα αρχικά στάδια ανάπτυξής τους. Στις μηχανικές μεθόδους εντάσσονται η χρήση χορτοκοπτικών / θαμνοκοπτικών μηχανημάτων, η χρήση μηχανημάτων ελαφριάς και επιφανειακής κατεργασίας του εδάφους. Στις φυτοτεχνικές μεθόδους εντάσσονται η εδαφοκάλυψη με φυτικά υπολείμματα (mulching), ή με γεώφασμα και άλλα αδρανή υλικά (Kanellou *et al.*, 2017b), η ηλιοαπολύμανση (Kanellou *et al.*, 2017c) και η κάλυψη του εδάφους με πυκνή φύτευση μιας άλλης καλλιέργειας, όπως η δημιουργία λειμώνων με κατάλληλα αυτοφυή είδη (Kanellou *et al.*, 2017d) Στις χημικές μεθόδους γίνεται καταστροφή της ανεπιθύμητης βλάστησης με τη χρήση ζιζανιοκτόνων. Η εφαρμογή των ζιζανιοκτόνων απαιτεί γνώση, εμπειρία, αλλά και μεγάλη προσοχή (Ματζίρης, 2012). Στοχευμένη εφαρμογή ζιζανιοκτόνων ή άλλων χημικών είναι ιδιαίτερα αποτελεσματική μέθοδος για την αντιμετώπιση ξυλωδών ζιζανίων (Parafotiou *et al.*, 2010a)

Τα βιολογικά ζιζανιοκτόνα θα μπορούσαν να αποτελέσουν ένα πολύτιμο εργαλείο για την καταπολέμηση των ζιζανίων. Τα τελευταία χρόνια έχουν δοκιμαστεί πολλά τέτοια σκευάσματα, όπως τα αιθέρια έλαια διάφορων φυτικών ειδών. Η αποτελεσματικότητα των ζιζανιοκτόνων αυτών εξαρτάται, ανάλογα με την περιοχή, τον τύπο ζιζανίων ακόμη και με το κλίμα (Brainard *et al.*, 2013). Υπάρχουν αντικρουόμενες μελέτες σχετικά με την αποτελεσματικότητα των βιολογικών ζιζανίων. Οι Granatstein *et al.*, 2014, Ingels *et al.*,

2013, Shrestha *et al.*, 2012 αναφέρουν ότι τα βιολογικά ζιζανιοκτόνα ήταν αναποτελεσματικά στην καταπολέμηση των ζιζανίων, ενώ οι Tahir *et al.* (2015) διαπίστωσαν θετική επίδραση κατά των ζιζανίων. Οι Shrestha *et al.* (2012) διαπίστωσαν ότι ενώ το αιθέριο έλαιο λεμονιού ήταν αναποτελεσματικό στην καταπολέμηση των ζιζανίων, το *D*-λιμονενίο, χημική ουσία που υπάρχει σε υψηλό ποσοστό στο αιθέριο έλαιο του λεμονιού, θα μπορούσε να παρέχει έως και 95% θετική επίδραση στην καταπολέμηση των ζιζανίων. Ωστόσο, το κόστος ζιζανιοκτόνου με *D*-λιμονενίου μπορεί να είναι υψηλό σε σχέση με άλλες εφαρμογές (Shrestha *et al.*, 2012, 2013). Γενικά, αυτές οι ουσίες ήταν πιο αποτελεσματικές σε ετήσια πλατύφυλλα ζιζάνια και λιγότερο αποτελεσματικά σε αγρωστώδη και πολυετή φυτά (Brainard *et al.*, 2013).

Η καύση ή φλόγιση είναι φυσική μέθοδος περιορισμού των ζιζανίων, η οποία χρησιμοποιείται τυπικά όταν υπάρχει γυμνός χώρος εξαιτίας του κινδύνου πυρκαγιάς. Επιπλέον μπορεί να χρησιμοποιηθεί σε περιπτώσεις όπου απαγορεύεται η χρήση ζιζανιοκτόνων (Hansen *et al.*, 2004, Rask *et al.*, 2012). Η φλόγα καταστρέφει μόνο την υπέργεια ανάπτυξη των φυτών, διασπώντας τα κυτταρικά τοιχώματα. Επομένως, είναι πολύ αποτελεσματική στον έλεγχο των ζιζανίων που έχουν αναδυθεί πρόσφατα από τους σπόρους αλλά λιγότερο αποτελεσματικά στον έλεγχο των μεγαλύτερων ζιζανίων (Ascard, 1994, 1995, Cinseros and Zandstra, 2008, Sivesind *et al.*, 2009, Shrestha *et al.*, 2012). Επιπλέον εξαρτάται από το είδος του ζιζανίου τα αγρωστώδη είδη είναι πιο ανθεκτικά σε σχέση με τα πλατύφυλλα (Ulloa *et al.*, 2010a, b, Wszelaki *et al.*, 2007) και τα πολυετή σε σχέση με τα ετήσια (Datta and Knezevic, 2013). Η μέθοδος έχει εφαρμοστεί με επιτυχία και για αντιμετώπιση ζιζανίων σε αρχαιολογικούς χώρους (Kanellou *et al.*, 2015, 2017a).

Ανάλογα με την υλική σύνθεση τα γεωφάσματα χωρίζονται στα φυσικά (γιούτα, κοκοφοίνικα, σιζάλ, άχυρο δημητριακών και φύλλα φοίνικα) ή στα συνθετικά (νάιλον, πολυπροπυλένιο, πολυεστέρα και πολυαιθυλένιο) (Rickson, 2006). Η υλική σύνθεση των γεωφασμάτων καθορίζει τη μακροζωία τους: τα φυσικά προϊόντα διαρκούν περίπου δύο έως πέντε χρόνια, ενώ τα συνθετικά προϊόντα διαρκούν 25 χρόνια (Schurholz, 1992, Oosthuizen and Kruger, 1994).

Επιπλέον ανάλογα με τον τύπο κατασκευής χωρίζονται στα διαπερατά / υφαντά και στα μη διαπερατά / πλαστικά φύλλα. Η κυριότερη διαφορά ανάμεσα στο πολυαιθυλένιο (μη διαπερατό / πλαστικό φύλλο) και το υφαντό πολυπροπυλαίνιο είναι ότι το δεύτερο είναι αδιαπέρατο από τη βροχή, τον αέρα και την ηλιακή ακτινοβολία ενώ το πολυπροπυλένιο έχει διάφορους βαθμούς διαπερατότητας, που επιτρέπουν στη βροχή, στον αέρα και στην ηλιακή ακτινοβολία να περάσουν.

Εναλλακτικά, τα βιοδιασπώμενα γεωφάσματα μπορεί να είναι μια ενδιαφέρουσα εναλλακτική λύση αντί των συνθετικών πλαστικών υλικών κάλυψης του εδάφους και παρόμοιων πλαστικών κάλυψης, βελτιώνοντας κατάσταση της ρύπανσης του εδάφους ενώ παράλληλα παρέχουν έλεγχο των ζιζανίων (Benoit *et al.*, 2006, Girgenti *et al.*, 2012). Η βιοαποικοδόμηση των υλικών αυτών παρέχει τόσο άνθρακα όσο και ενέργεια για την ανάπτυξη των εγκαταστημένων φυτών (Maier *et al.*, 2009). Ωστόσο, οι έρευνες σχετικά με την ανάπτυξη ξυλώδων φυτών που περιβάλλονται από φυτικά υπολείμματα είναι αντιφατικές, καθώς υπάρχουν αναφορές ότι η ανάπτυξη των φυτών δεν επηρεάστηκε ή μειώθηκε όταν το αγροτεμάχιο καλύπτονταν από φυτικά υπολείμματα (Arnold *et al.*, 2005) και άλλες ότι η ανάπτυξη των φυτών ευνοήθηκε (Watson and Kupkowskim 1991).

Για την εδαφοκάλυψη μπορούν να χρησιμοποιηθούν και οργανικά υπολείμματα (φύλλα, άχυρο, πριονίδια, φλοιός δέντρων, κομμάτια ξύλου κλπ.). Πολλά από αυτά τα υλικά λειτουργούν επίσης ως άμεσο σύστημα κομποστοποίησης, βελτιώνοντας έτσι τη δομή του εδάφους, μειώνοντας τη θερμοκρασία του εδάφους και προσθέτοντας θρεπτικά συστατικά σε αυτό (Granatstein *et al.*, 2014, Karp *et al.*, 2006). Ωστόσο οι ιδιότητες του υλικού κάλυψης από οργανικά υπολείμματα μπορεί είτε να αποτρέψει είτε να διεγείρει την εμφάνιση ζιζανίων (Teasdale and Mohler, 2000).

Από έρευνες που έχουν γίνει έχει βρεθεί ότι τα οργανικά υπολείμματα, όπως τα κομμάτια ξύλου, το άχυρο, η κομπόστα, είναι πιο αποτελεσματικά στον έλεγχο των ζιζανίων από ότι το γεωφάσμα, ωστόσο μειονεκτικός παράγοντας για τη χρήση τους είναι αφενός το υψηλό κόσμος αγοράς τους και αφετέρου ότι η αποτελεσματικότητά τους μειώνεται με την πάροδο του χρόνου, απαιτώντας αντικατάσταση τους κάθε χρόνο (Strik *et al.*, 2009, Ingels *et al.*, 2013).

Η κάλυψη του εδάφους με τα κατάλληλα φυτικά είδη έχει βρεθεί ότι μπορεί να καταστείλει τα ανταγωνιστικά ζιζάνια και να αναβαθμίσει μια υποβαθμισμένη περιοχή. Η χρήση εδαφοκάλυψης με φυτικά είδη σε αρχαιολογικούς χώρους πέραν της προστασίας από ανεπιθύμητα ζιζάνια βελτιώνει και την αισθητική του χώρου (Kanellou *et al.*, 2017d), ενώ επιπλέον μπορεί να προστατεύσει από φαινόμενα διάβρωσης του εδάφους (Altieri and Pinna, 2008).

Η διαχείριση της ανεπιθύμητης βλάστησης αποτελεί καίριο ζητούμενο και στόχο του προγράμματος συντήρησης του πρασίνου στους αρχαιολογικούς χώρους και πρέπει να ακολουθεί τις αρχές της αειφορίας, ώστε οι χώροι αυτοί να προστατεύονται με γνώμονα την προστασία του περιβάλλοντος και να αναδεικνύονται τα μνημειακά στοιχεία.

III.1.7 Καλλιεργητικές φροντίδες

Μια επιτυχής καλλιέργεια αποτελεί συνάρτηση μιας σειράς εργασιών και φροντίδων που αποσκοπούν στην εξασφάλιση γρήγορης, όσο και υγιεινής ανάπτυξης των φυτών.

Η άρδευση κατά τη διάρκεια της εγκατάστασης θεωρείται συχνά ένα κρίσιμο βήμα για τη μακροπρόθεσμη ανάπτυξη και επιβίωση, ιδιαίτερα σε περιοχές με ημιυπαίθριες επιδράσεις όπως οι περιοχές της Ανατολικής Μεσογείου (Montague *et al.*, 2007, Siles *et al.*, 2010, Becerra *et al.*, 2013).

Η θετική επίδραση του ποτίσματος επιβεβαιώνει τα αποτελέσματα πολυάριθμων μελετών και αποδεικνύει ότι συμβάλλει στην υπερνίκηση της υψηλής καταπόνησης από το νερό που υφίστανται τα νεαρά φυτά κατά τη διάρκεια του καλοκαιριού (περίοδος ξηρασίας) στη Μεσόγειο (Rey-Benayas and Camacho-Cruz, 2004, Castro *et al.*, 2005).

Οι Costello and Paul (1975) διαπίστωσαν ότι τα φυτά που παράγονται σε φυτοδοχεία συχνά αποτυγχάνουν να εγκατασταθούν στο χώμα λόγω της αποξήρανσης της μπάλας χώματος που καλύπτει τη ρίζα και της επακόλουθης υδατικής καταπόνησης (associated water stress). Η αποξήρανση της μπάλας χώματος που καλύπτει τη ρίζα μπορεί να συμβεί επειδή τα φυτά σε φυτοδοχεία σε ένα φυτώριο παραγωγής αρδεύονται τουλάχιστο μια φορά την ημέρα κατά τους καλοκαιρινούς μήνες, ενώ τα πρόσφατα μεταφυτευμένα φυτά είτε έχουν πολύ χαμηλότερη συχνότητα άρδευσης είτε καθόλου (Costello and Paul 1975), επιπλέον υπάρχει περιορισμένη ποσότητα διαθέσιμου νερού στη μπάλα χώματος ενός νέο-μεταφυτευόμενου φυτού που έχει μεγαλώσει σε φυτοδοχείο.

Τα μεταφυτευμένα φυτά δεν μπορούν να απορροφήσουν υγρασία από το εξωτερικό της μπάλας χώματος μέχρι να δημιουργηθούν ρίζες στο περιβάλλον χώμα (Wright *et al.*, 2004). Η γρήγορη ανάπτυξη ρίζας στο έδαφος είναι κρίσιμη για την επιβίωση των φυτών που καλλιεργούνται με δοχεία (Arnold *et al.*, 2005, Kraus, 1998). Ωστόσο, οι περιβαλλοντικοί παράγοντες μπορούν να αυξήσουν το στρες των φυτών και να καθυστερήσουν την εγκατάσταση των ξυλωδών φυτών στο έδαφος (Montague *et al.*, 2000b).

III.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΦΥΤΕΥΣΕΩΝ

III.2.1 Οι χώροι εγκατάστασης

Για την εγκατάσταση των ειδών επιλέχθηκαν τρεις αρχαιολογικοί χώροι, ήτοι η «Κολώνα» στη Νήσο Αίγινα, ΝΑ Ελλάδα ($37^{\circ}45'02.1''\text{N}$, $23^{\circ}25'23.2''\text{E}$), η «Παλαιοχριστιανική Αμφίπολη» στο Νομό Σερρών, Β. Ελλάδα ($40^{\circ}49'13.9''\text{N}$, $23^{\circ}50'51.7''\text{E}$) και η «Αρχαία Μεσσήνη» στο Νομό Μεσσηνίας, ΝΔ Ελλάδα ($37^{\circ}10'31.8''\text{N}$, $21^{\circ}55'13.7''\text{E}$) (Εικ. III.1). Επιπλέον πραγματοποιήθηκε μια ακόμη φύτευση στο Βοτανικό κήπο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γ.Π.Α. ($37^{\circ}58'58.4''\text{N}$, $23^{\circ}42'20.0''\text{E}$). Υπογραμμίζεται ότι για την εγκατάσταση των φυτών στους αρχαιολογικούς χώρους ζητήθηκαν και εκδόθηκαν άδειες από τις αρμόδιες εφορίες αρχαιοτήτων στους εν λόγω αρχαιολογικούς χώρους.



Εικόνα III.1. Οι περιοχές εγκατάστασης των φυτικών ειδών (<https://bit.ly/2VQPAqK>).

III.2.1.1 Αρχαιολογικός χώρος Κολώνας

Ο αρχαιολογικός χώρος της Κολώνας βρίσκεται στη βορειοδυτική πλευρά του νησιού, κοντά στο λιμάνι και τη σύγχρονη πόλη της Αίγινας. Ο λόφος ονομάστηκε Κολώνα από τους Βενετσιάνους ναυτικούς που είχαν ως σημάδι προσανατολισμού τους τις κολώνες του ναού του Απόλλωνος που δεσπόζει σ' αυτόν.

Περιλαμβάνει τα ερείπια της προϊστορικής πόλης και του ναού του Απόλλωνα, οικιστικά κατάλοιπα διαδοχικών οικισμών καθώς και τμήματα του υστερορωμαϊκού τείχους της Ακρόπολης. Στο χώρο υπάρχει ακόμη Μουσείο το οποίο φιλοξενεί ευρήματα από τον αρχαιολογικό χώρο. (Παπασταύρου, 2012).

III.2.1.2 Αρχαία Μεσσήνη

Ο αρχαιολογικός χώρος της Αρχ. Μεσσήνης βρίσκεται στο νοτιοδυτικό τμήμα της Πελοποννήσου και είναι μια από τις σημαντικότερες σε μέγεθος και διατήρηση πόλεις της αρχαιότητας με πλούσιο μνημειακό περιεχόμενο και το προνόμιο να μην έχει καταστραφεί ή καλυφθεί από νεότερους οικισμούς. Η αρχαία πόλη ιδρύθηκε το 369 π.Χ. από το Θηβαίο Επαμεινώνδα και τους Αργείους συμμάχους του ως πρωτεύουσα της αυτόνομης Μεσσηνίας. (Θέμελης, 2014).

III.2.1.3 Χριστιανική (Παλαιοχριστιανική) Αμφίπολη Σερρών

Ο αρχαιολογικός χώρος της Αμφίπολης βρίσκεται σε μικρή απόσταση νότια του χωριού Αμφίπολη στην κορυφή υπερκείμενου λόφου (Ζήκος, 1989). Η Αμφίπολη ήταν από τις σημαντικότερες πόλεις της Μακεδονίας κατά τους αρχαίους χρόνους και διατήρησε την ακμή της κατά τη διάρκεια των ελληνιστικών αλλά και ρωμαϊκών χρόνων. Βασική παράμετρο συνιστά ότι λόγω της διέλευσης της Εγνατίας οδού από την Αμφίπολη η πόλη παρέμεινε σπουδαία και στους παλαιοχριστιανικούς χρόνους.

III.2.2 Το κλίμα των περιοχών περαμάτων

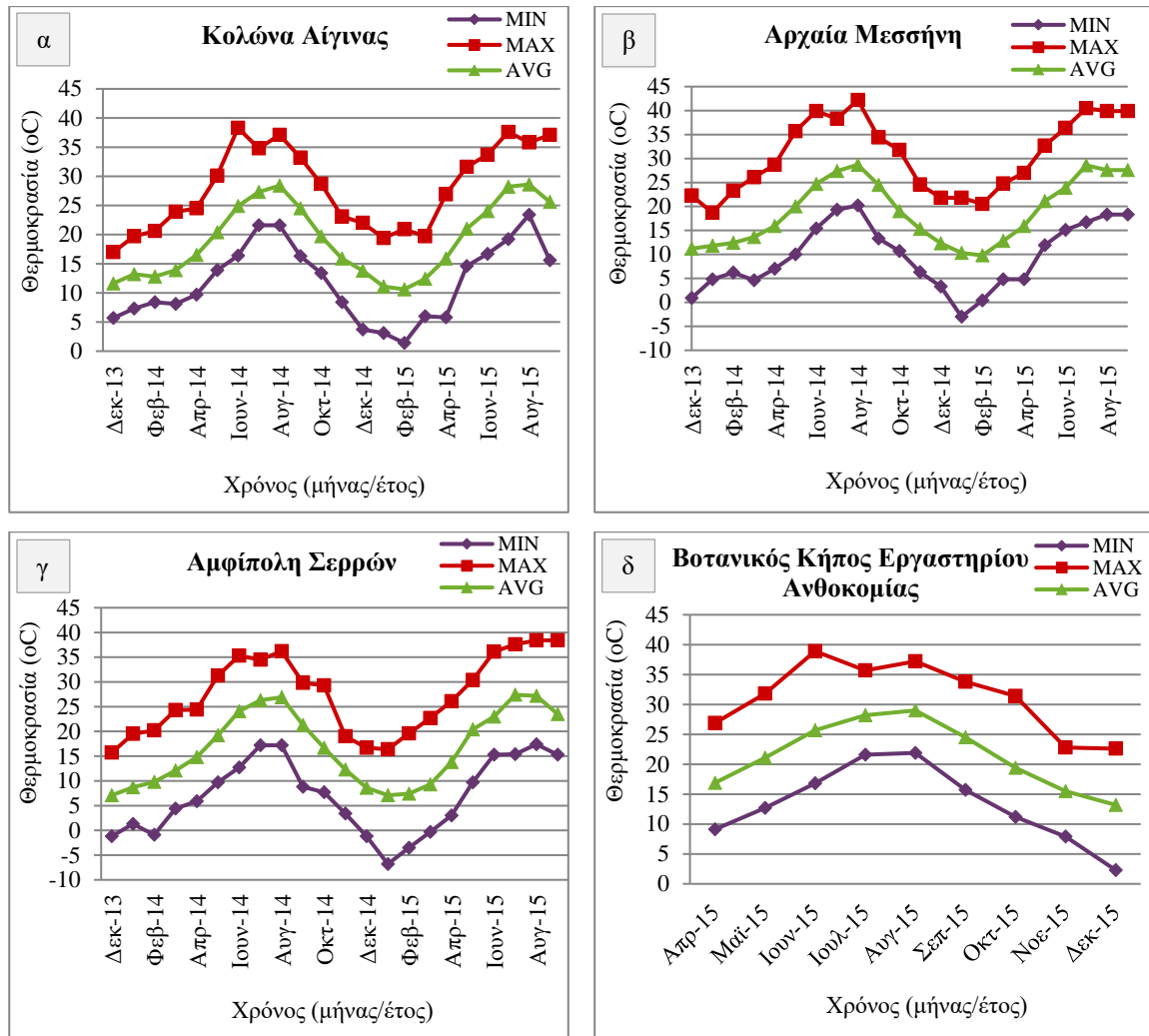
Δίδονται στοιχεία ετήσιας διακύμανσης των παραμέτρων θερμοκρασίας (μέση, μέγιστη και ελάχιστη), υετού, αλλά και τα ομβροθερμικά σχήματα για τους τέσσερεις χώρους εγκατάστασης (τρεις αρχαιολογικούς χώρους και το Βοτανικό κήπο του εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής τοπίου) των υπό μελέτη αυτοφυών ειδών.

Τα στοιχεία που παρατίθενται στη συνέχεια αποκτήθηκαν από την εφαρμογή Γεώκλιμα, της Εθνικής Μετεωρολογικής Υπηρεσίας (<http://meteosearch.meteo.gr/>), η οποία είναι ένα ολοκληρωμένο Γεωγραφικό Σύστημα Κλιματικής Πληροφορίας, που διαχειρίζεται, αναλύει

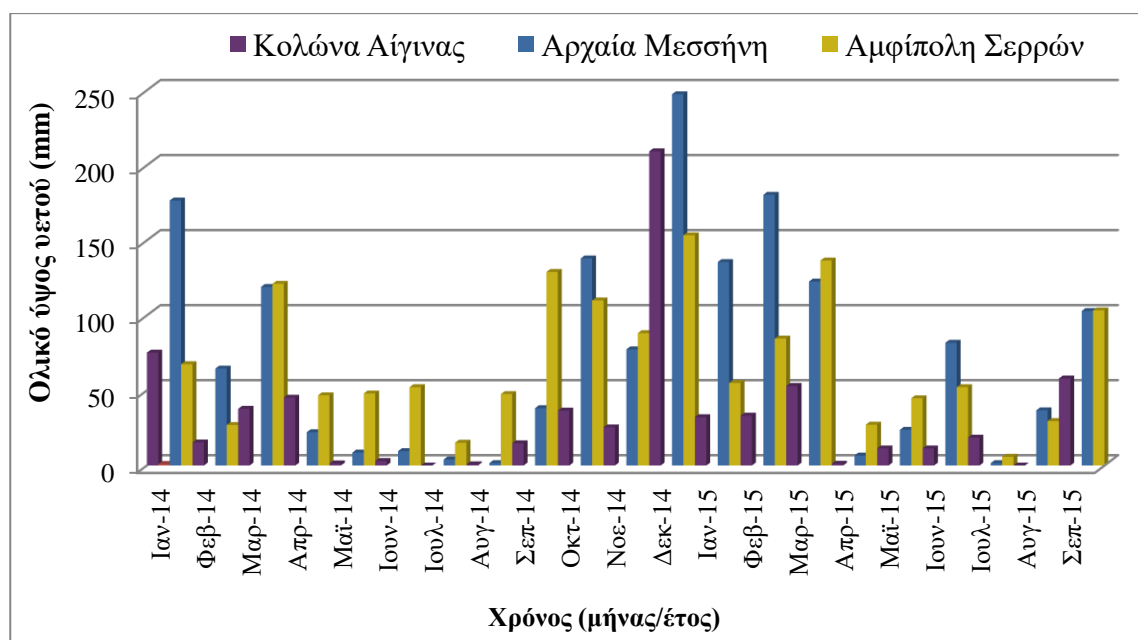
και χαρτογραφεί το σύνολο της κλιματικής πληροφορίας, που αφορά τη χώρα μας. Τα δεδομένα αφορούν τους πλησιέστερους μετεωρολογικούς σταθμούς των χώρων εκτέλεσης πειραμάτων.

Στο σχήμα III.1α, β, γ, δ παρουσιάζεται η μέγιστη, ελάχιστη και μέση μηνιαία θερμοκρασία για τους τρεις αρχαιολογικούς χώρους και το Βοτανικό κήπο του εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής τοπίου του Γ.Π.Α. Παρατηρείται ότι τις χαμηλότερες τιμές μέσων θερμοκρασιών παρουσιάζει η Αμφίπολη Σερρών σε σύγκριση με τους άλλους δύο αρχαιολογικούς χώρους καθ' όλη τη διάρκεια του έτους (Σχ. III.1α, β, γ). Στην Κολώνα, τους θερινούς μήνες η μέση μηνιαία θερμοκρασία κυμαίνεται από 24 °C έως 29 °C και για τα δύο έτη, ενώ η μέση μηνιαία θερμοκρασία τον Ιανουάριο, είναι 13 °C και 11 °C για το έτος 2014 και 2015 αντίστοιχα (Σχ. III.1α). Η Αρχαία Μεσσήνη παρουσιάζει παρόμοιες θερμοκρασίες με την Κολώνα τόσο στους θερινούς όσο και στους χειμωνιάτικους μήνες (Σχ. III.1α, β). Στην Αμφίπολη Σερρών η μέση μηνιαία θερμοκρασία φτάνει τον Ιανουάριο τους 9 °C και 7 °C για το έτος 2014 και 2015 αντίστοιχα, ενώ κατά τους καλοκαιρινούς μήνες η μέση μηνιαία θερμοκρασία κυμαίνεται από 23 °C έως 27 °C (Σχ. III.1γ). Κατά τους καλοκαιρινούς μήνες η μέγιστη θερμοκρασία παρατηρείται στην Αρχαία Μεσσήνη (41 °C και 42 °C για το έτος 2014 και 2015 αντίστοιχα) και ακολουθεί η Κολώνα με 38 °C και για τα δύο έτη (Σχ. III.1α, β). Στην Αμφίπολη Σερρών η ελάχιστη θερμοκρασία κατά τους χειμερινούς μήνες πέφτει κάτω από τους 0 °C και πιο συγκεκριμένα τον Ιανουάριο του 2015 έφτασε τους -7 °C (Σχ. III.1γ). Φαίνεται λοιπόν ότι η Κολώνα και η Αρχαία Μεσσήνη, έχουν ήπιους χειμώνες και θερμά καλοκαίρια, σε σχέση με την Αμφίπολη Σερρών, όπου παρουσιάζονται ψυχροί χειμώνες, χωρίς θερμοκρασιακές εξάρσεις το θέρος (Σχ. III.1α, β). Από την άλλη μεριά ο Βοτανικός κήπος του εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής τοπίου του Γ.Π.Α. παρουσιάζει κατά τους θερινούς μήνες μέση μηνιαία θερμοκρασία από 25 °C έως 29 °C, η μέγιστη θερμοκρασία έφτασε τους 39 °C, ενώ οι χαμηλότερες θερμοκρασίες τους χειμερινούς μήνες πλησίασαν τους 0 °C (Σχ. III.1δ).

Από το σχήμα III.2 του μηνιαίου ύψους υετού διακρίνεται ότι κατά την περίοδο υψηλών βροχοπτώσεων (Οκτώβριο έως Μάρτιο), υψηλότερα επίπεδα υετού παρουσιάζει η Αρχαία Μεσσήνη και ακολουθεί η Αμφίπολη Σερρών. Το ύψος υετού είναι υψηλότερο το Δεκέμβριο του 2015 αγγίζοντας το 247 mm, 209 mm και 153 mm για την Αρχαία Μεσσήνη, Αμφίπολη Σερρών και Κολώνα αντίστοιχα. Το ύψος του υετού είναι χαμηλό κατά τους θερινούς μήνες, κυρίως τον Ιούλιο μήνα. Υψηλότερα επίπεδα υετού κατά τους θερινούς μήνες παρουσιάζει η Αμφίπολη Σερρών, ενώ χαμηλότερα η Κολώνα.



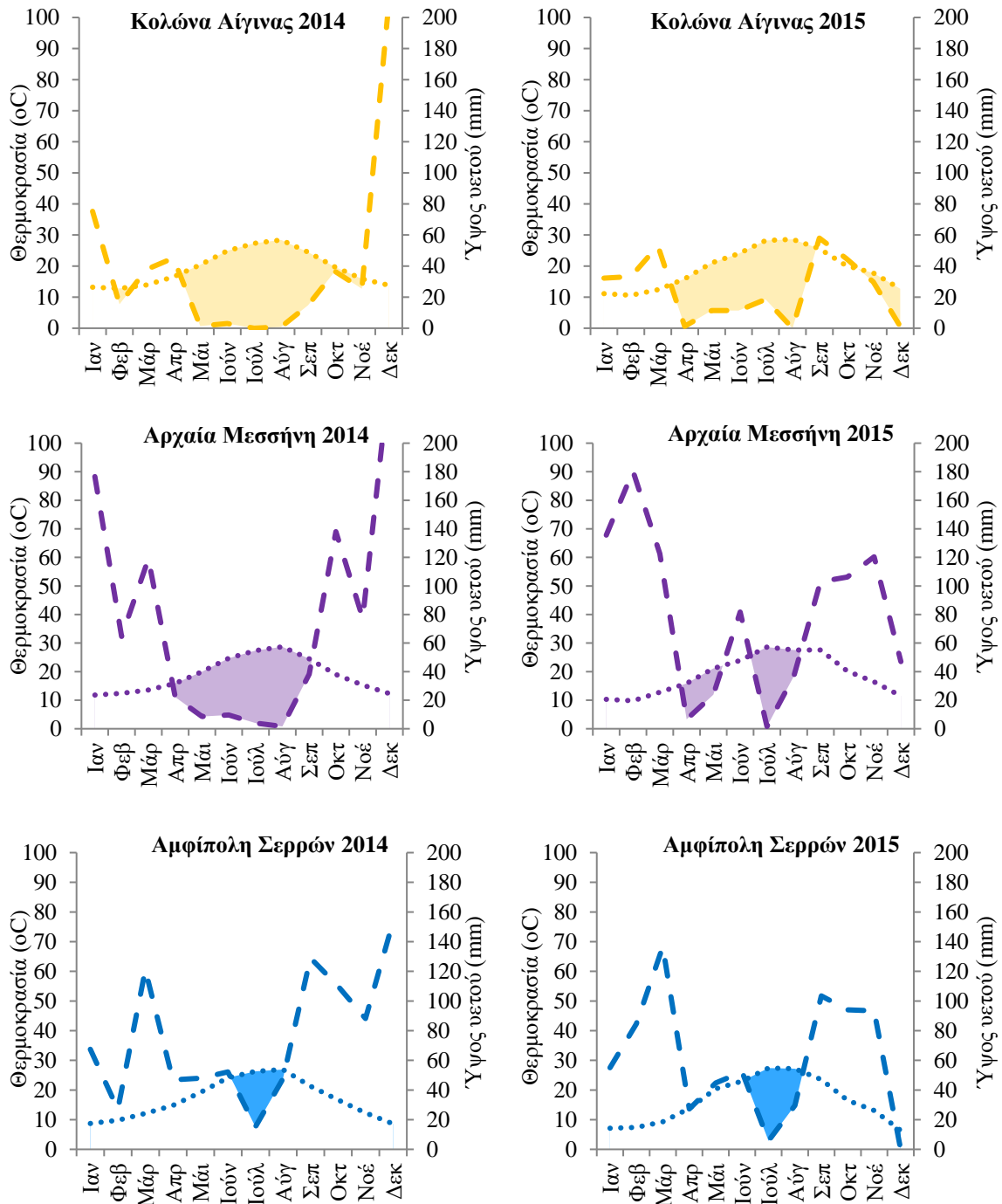
Σχήμα III.1. Μέγιστη, ελάχιστη και μέση θερμοκρασία στον αρχαιολογικό χώρο Κολώνα στην Αίγινα (α), Αρχαία Μεσσήνη (β), Αμφίπολη Σερρών (γ) και στο Βοτανικό κήπο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου, Γ.Π.Α (δ) κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.



Σχήμα III.2. Διακύμανση του ύψους νετού στους τρεις αρχαιολογικούς χώρους, κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

Στο σχήμα III.3 και III.4 δίνονται επιμέρους ομβροθερμικά σχήματα των τριών αρχαιολογικών χώρων για τα έτη 2014 - 2015 και για το Βοτανικό Κήπο του εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής τοπίου του Γ.Π.Α. για το έτος 2015. Σε αυτά παρουσιάζονται ταυτόχρονα δύο σημαντικές παράμετροι του κλίματος, η μέση μηνιαία θερμοκρασία και το μηνιαίο ύψος του νετού, καθ' όλη τη διάρκεια του έτους. Στα σχήματα η κλίμακα που ακολουθείται είναι 1:2 σε ότι αφορά την κλίμακα της θερμοκρασίας προς τη κλίμακα του ύψους νετού, έτσι ώστε να είναι συγκρίσιμες οι περίοδοι ξηρασίας, που παρουσιάζονται με γραμμοσκίαση στα σχήματα.

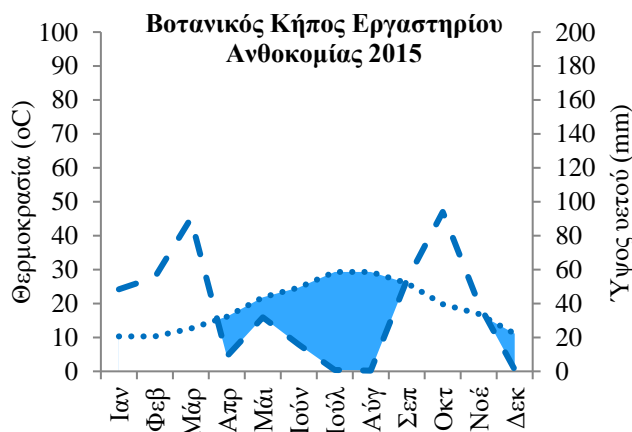
Το 2014 και το 2015 παρατηρείται ότι η Κολώνα παρουσιάζει την πιο εκτεταμένη περίοδο ξηρασίας, ενώ αντίθετα η Αμφίπολη την πιο περιορισμένη περίοδο ξηρασίας. Η περίοδος ξηρασίας στην Κολώνα παρατηρείται από τον Απρίλιο έως τον Οκτώβριο για το 2014 και από τον Απρίλιο έως τον Αύγουστο για το 2015, ενώ στην Αμφίπολη από τον Ιούνιο έως τον Αύγουστο και για τα δύο έτη. Στην Αρχαία Μεσσήνη το 2014 η περίοδος ξηρασίας ήταν από τον Απρίλιο έως τον Αύγουστο, ενώ το 2015 παρατηρούνται δύο περίοδοι ξηρασίας. Η πρώτη περίοδος είναι τους μήνες Απρίλιο και Μάιο και η δεύτερη τον Ιούλιο και τον Αύγουστο.



Σχήμα III.3. Ομβροθερμικά διαγράμματα των τριών αρχαιολογικών περιοχών: Κολώνα Αίγινας, Αρχαία Μεσσήνη και Αμφίπολη Σερρών κατά τα έτη 2014 και 2015. Η γραμμοσκιασμένη περιοχή αντιπροσωπεύει την ξηρή περίοδο.

Από τις κλιματικές παραμέτρους φαίνεται ότι η Κολώνα παρουσιάζει ήπιους χειμώνες και θερμά καλοκαίρια, με ιδιαίτερα εκτεταμένες περιόδους ξηρασίας. Η Αρχαία Μεσσήνη παρουσιάζει επίσης ήπιους χειμώνες και θερμά καλοκαίρια, ενώ η Αμφίπολη παρουσιάζει ψυχρούς χειμώνες και ήπια καλοκαίρια, με περιορισμένη περίοδο ξηρασίας, λόγω των υψηλών βροχοπτώσεων.

Στο Σχήμα III.4 δίνεται το ομβροθερμικό σχήμα του Βοτανικού Κήπου του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής τοπίου του Γ.Π.Α. για το έτος 2015. Παρατηρείται λοιπόν ότι στο Βοτανικό κήπο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γ.Π.Α. και κατά επέκταση η ευρύτερη περιοχή παρουσιάζει εκτεταμένη περίοδο ξηρασίας από τον Απρίλιο έως το Σεπτέμβριο 2015. Σε σχέση με τους αρχαιολογικούς χώρους Κολώνα στην Αίγινα, Αρχαία Μεσσήνη και Αμφίπολη Σερρών, ο Βοτανικός κήπος του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου παρουσιάζει παρόμοια ομβροθερμικά χαρακτηριστικά με τον αρχαιολογικό χώρο Κολώνα στην Αίγινα, κάτι το οποίο ίσως ήταν αναμενόμενο διότι ο συγκεκριμένος αρχαιολογικός χώρος είναι ο κοντινότερος στο Γεωπονικό Πανεπιστήμιο Αθηνών (Σχ. III.2, III.3).



Σχήμα III.4. Ομβροθερμικά διαγράμματα κατά το έτος 2015 στο Βοτανικό Κήπο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γ.Π.Α. Η γραμμοσκιασμένη περιοχή αντιπροσωπεύει την ξηρή περίοδο.

III.2.3 Φυτικό υλικό και εγκατάσταση πειραμάτων

Φυτάρια των ειδών *B. acetabulosa*, *C. creticum*, *C. nepeta*, και *S. hymettia*, ηλικίας 4 μηνών, με πλούσιο ριζικό σύστημα (Εικ. III.2), που προήλθαν από μοσχεύματα βλαστού, εγκαταστάθηκαν στους τρεις αρχαιολογικούς χώρους, ήτοι «Κολώνα» στη Αίγινα, στην «Παλαιοχριστιανική Αμφίπολη» Σερρών και στην «Αρχαία Μεσσήνη», καθώς και στο Βοτανικό Κήπο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γ.Π.Α. στον οποίο εγκαταστάθηκαν και φυτάρια *A. barba-jovis* που προήλθαν από *in vitro* πολλαπλασιασμό.

Τα μοσχεύματα μετά τη ριζοβολία τους είχαν μεταφυτευτεί σε γλάστρες 1.3 L, με υπόστρωμα τύρφης : περλίτη (2:1, v/v) μέχρι την εγκατάστασή τους στους αρχαιολογικούς χώρους.

Πραγματοποιήθηκαν τρεις φυτεύσεις, Δεκέμβριο 2013, Μάρτιο 2014 και Δεκέμβριο 2014 στους τρεις αρχαιολογικούς χώρους. Τον Απρίλιο του 2015 πραγματοποιήθηκε μία ακόμη φύτευση στο Βοτανικό Κήπο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου, Γ.Π.Α. με σκοπό να εξεταστεί η επίδραση του μαύρου γεωφάσματος για τον έλεγχο των ζιζανίων, καθώς και η αραιή άρδευση κατά τη ξηρή περίοδο (καλοκαίρι) στην επιβίωση των φυτών.

- Το Δεκέμβριο 2013 και στους τρεις αρχαιολογικούς χώρους φυτεύτηκαν τα είδη: *B. acetabulosa* και *S. hymettia*.
- Το Μάρτιο 2014 φυτεύτηκαν τα είδη: *B. acetabulosa*, *C. creticum*, και *C. nepeta* και *S. hymettia*, εκτός από τον αρχαιολογικό χώρο «Κολώνα» στη Αίγινα που φυτεύτηκαν τα είδη: *B. acetabulosa* και *S. hymettia*.
- Το Δεκέμβριο 2014 και στους τρεις αρχαιολογικούς χώρους φυτεύτηκαν τα είδη: *B. acetabulosa*, *C. nepeta*, *C. creticum*, *S. hymettia*.
- Τον Απρίλιο 2015 στο Βοτανικό κήπο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γ.Π.Α. φυτεύτηκαν τα είδη: *A. barba-jovis*, *B. acetabulosa*, *C. creticum*, *C. nepeta*, και *S. hymettia*,

Τα φυτά που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή εγκαταστάθηκαν ανάμεικτα σε συνδυασμό με τα υπόλοιπα είδη που διερευνήθηκαν στα πλαίσια του Προγράμματος ARCHAEOSCAPE (2012 - 2015) – ΘΑΛΗΣ, ήτοι *Anthyllis hermanniae*, *Asphodelus fistulosus*, *Atriplex halimus*, *Limoniastrum monopetalum* και *Teucrium capitatum* σε θέσεις που προέκυψαν βάση της αρχιτεκτονικής μελέτης που έγινε στα πλαίσια του ίδιου

προγράμματος (Papafotiou *et al.*, 2017c, Papafotiou *et al.*, 2017d, Papafotiou *et al.*, 2017e), (Εικ. III.3, III.4, III.5, Σχ. III.5).

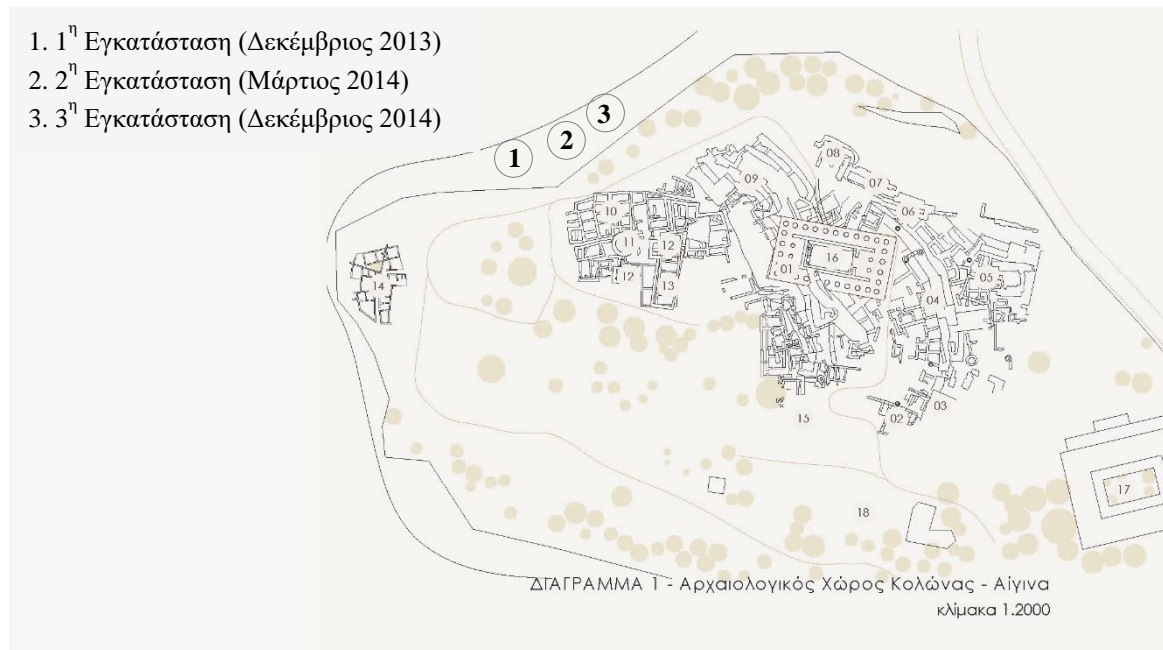
Τα φυτά φυτεύτηκαν σε τριγωνική διάταξη και οι αποστάσεις φύτευσης ήταν 50 cm επί της γραμμής και 50 cm μεταξύ των γραμμών για το είδος *A. barba-jovis* και 30 cm επί της γραμμής και 30 cm μεταξύ των γραμμών για τα είδη *B. acetabulosa*, *C. nepeta*, *C. creticum* και *S. hymettia* (Σχ. III.5, Εικ. III.6)

Και στους τρεις αρχαιολογικούς χώρους, σκαλιζόταν ελαφρά το έδαφος, αφαιρούνταν τα ζιζάνια (Εικ. III.7α), και τοποθετούνταν τα φυτά στις κατάλληλες θέσεις φύτευσης σύμφωνα με τη φυτοτεχνική μελέτη (Εικ. 7 III.β, γ). Τα φυτά δεν αρδεύονταν και κάθε τρεις μήνες, κατά τις επισκέψεις στους αρχαιολογικούς χώρους, αφαιρούνταν τα ζιζάνια, γύρω από κάθε φυτό, με το χέρι (Εικ. III.8α, β). Για κάθε εγκατάσταση καταγράφηκε το ποσοστό επιβίωσης του κάθε είδους, καθώς και το ύψος και η μέση διάμετρος (μέσος όρος της μεγαλύτερης διαμέτρου και της κάθετης προς αυτήν) του κάθε φυτού. Η λήψη των μετρήσεων γινόταν κάθε τρεις μήνες, από την ημερομηνία της κάθε εγκατάστασης και μέχρι το Σεπτέμβριο 2015.

Στη φύτευση που πραγματοποιήθηκε στο Βοτανικό κήπο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γ.Π.Α., η επιφάνεια του εδάφους καλύφθηκε με μαύρο γεώφασμα (υδατοπερατό πολυπροπυλένιο, βάρος 100 g m⁻², Rigas Pack SA, Ελλάδα) προς αποτροπή επανεμφάνισης των ζιζανίων (Εικ. III.9). Σε αυτή την εγκατάσταση τα φυτά δέχθηκαν άρδευση με κανόνι (ανά δεκαπενθήμερο) κατά τη θερινή περίοδο (από Ιούνιο έως Σεπτέμβριο).



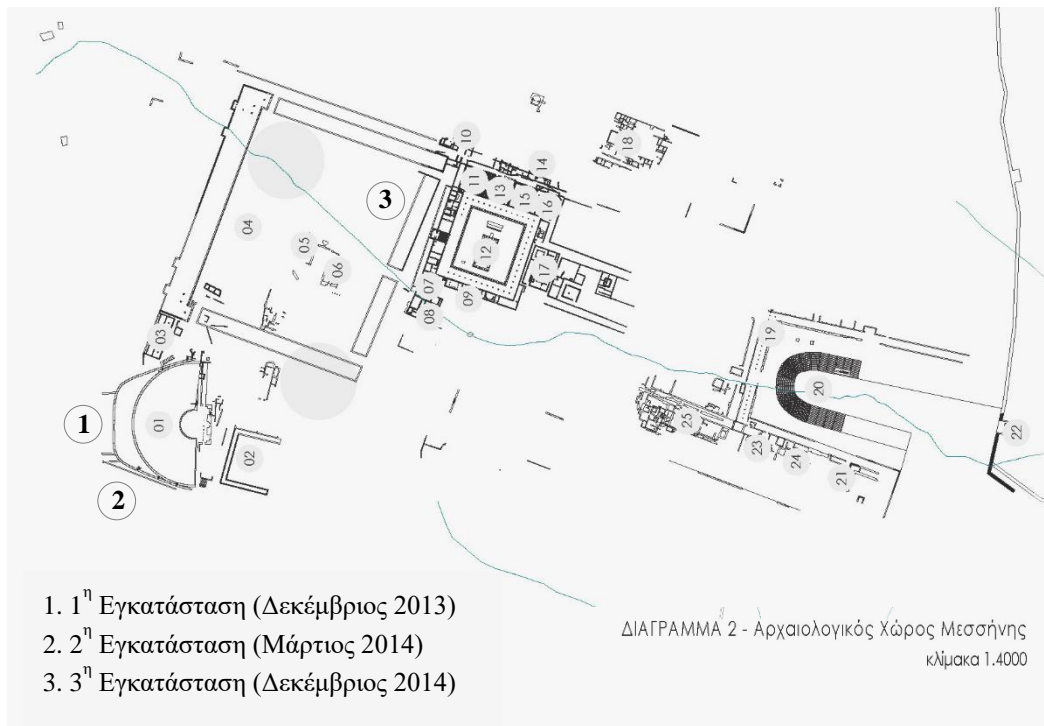
Εικόνα III.2. Άτομα *S. hymettia* (α) και *B. acetabulosa* (β), ηλικίας τεσσάρων μηνών, με πλούσιο ριζικό σύστημα, έτοιμα προς φύτευση.



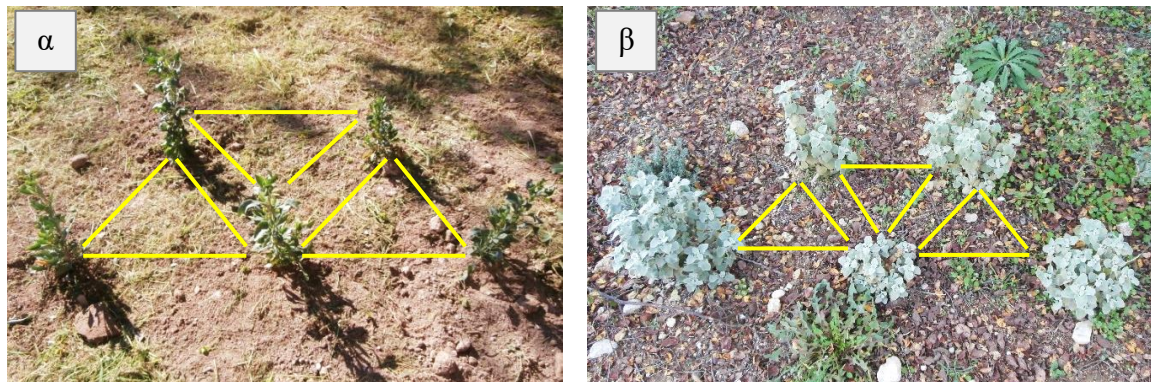
Εικόνα III.3. Θέσεις πειραματικών φυτεύσεων στον αρχαιολογικό χώρο «Κολώνα» στην Αίγινα.



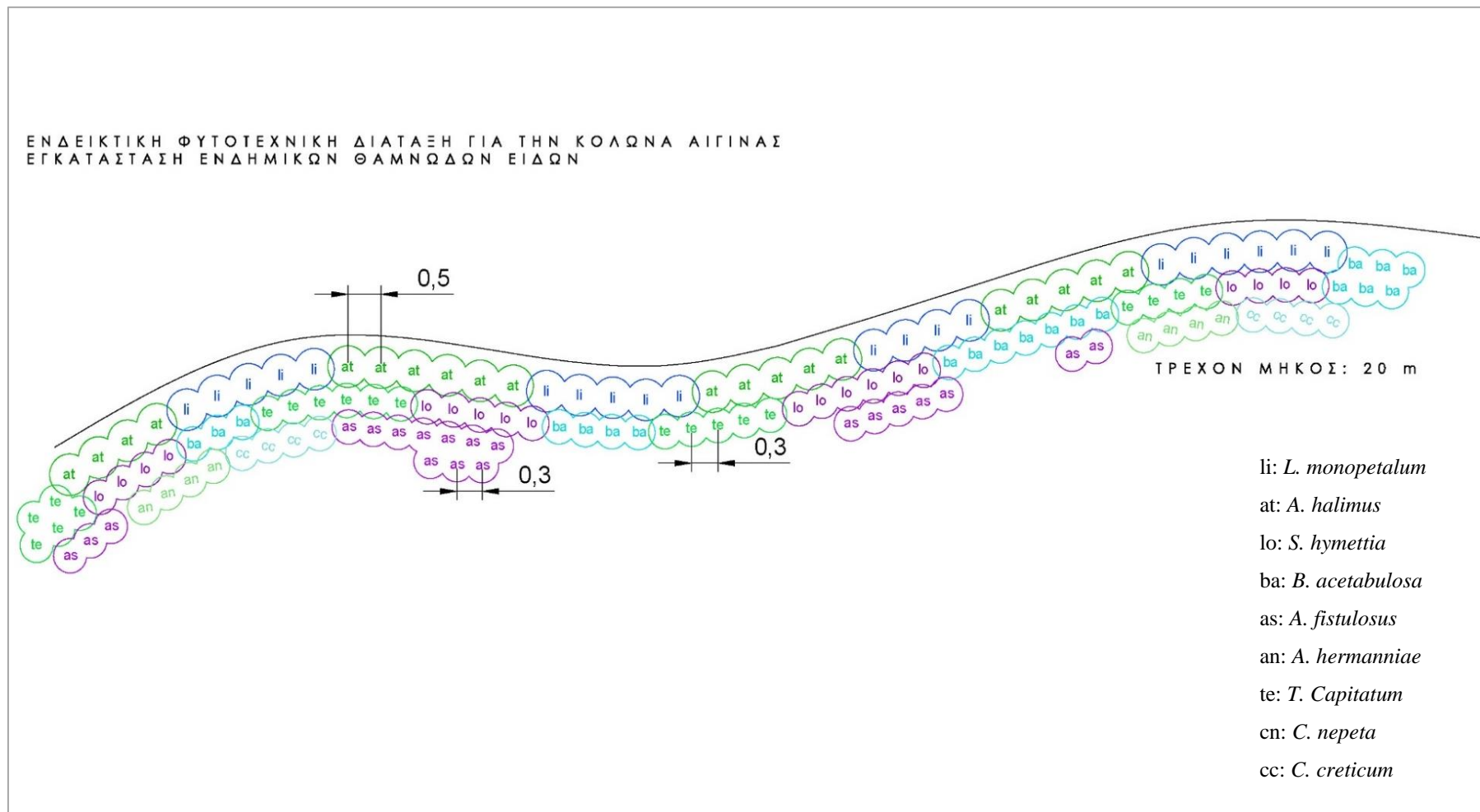
Εικόνα III.4. Θέσεις πειραματικών φυτεύσεων στον αρχαιολογικό χώρο «Παλαιοχριστιανική Αμφίπολη» Σερρών.



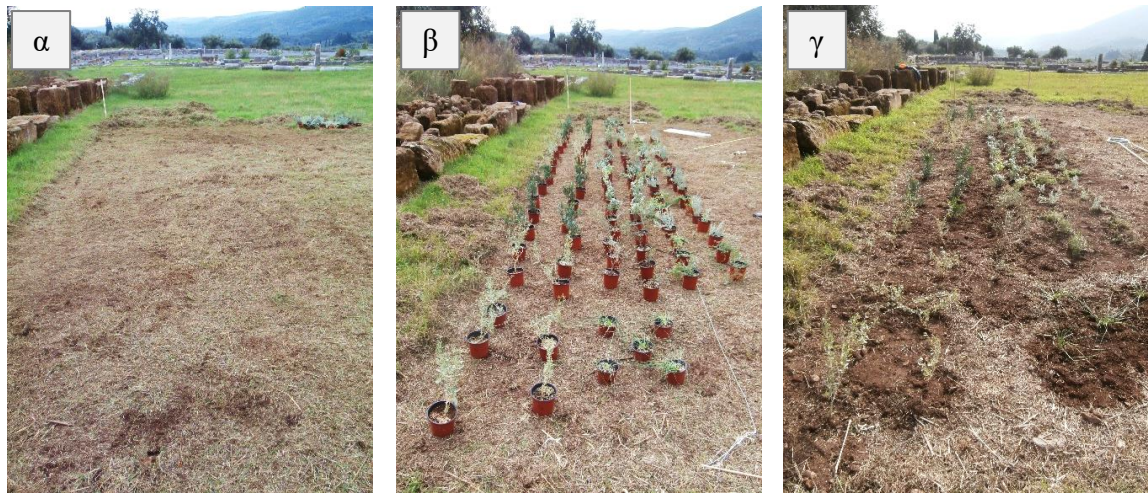
Εικόνα III.5. Θέσεις πειραματικών φυτεύσεων στον αρχαιολογικό χώρο «Αρχαία Μεσσήνη» Μεσσηνίας.



Εικόνα III.6. Τριγωνική διάταξη φυτευμένων φυτών *L. monopetalum* (α) και *B. acebabulosa* (β).



Σχήμα III.5. Ενδεικτική φυτοτεχνική διάταξη για τον αρχαιολογικό χώρο «Κολώνα» στην Αίγινα.



Εικόνα III.7. Αρχαία Μεσσήνη, 3^η εγκατάσταση: Προετοιμασία εδάφους (α), τοποθέτηση (β) και φύτευση των φυτικών ειδών (γ).



Εικόνα III.8. Πριν την αφαίρεση ζιζανίων με το χέρι, στον αρχαιολογικό χώρο «Κολώνα» στην Αίγινα (α) και μετά την αφαίρεση (β) (Λήψη φωτογραφιών: Δεκέμβριος 2014).



Εικόνα III.9. Τοποθέτηση γεωφάσματος και φύτευση (α και β), στο Βοτανικό Κήπο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γ.Π.Α. (Λήψη φωτογραφιών: Απρίλιος 2015).

III.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

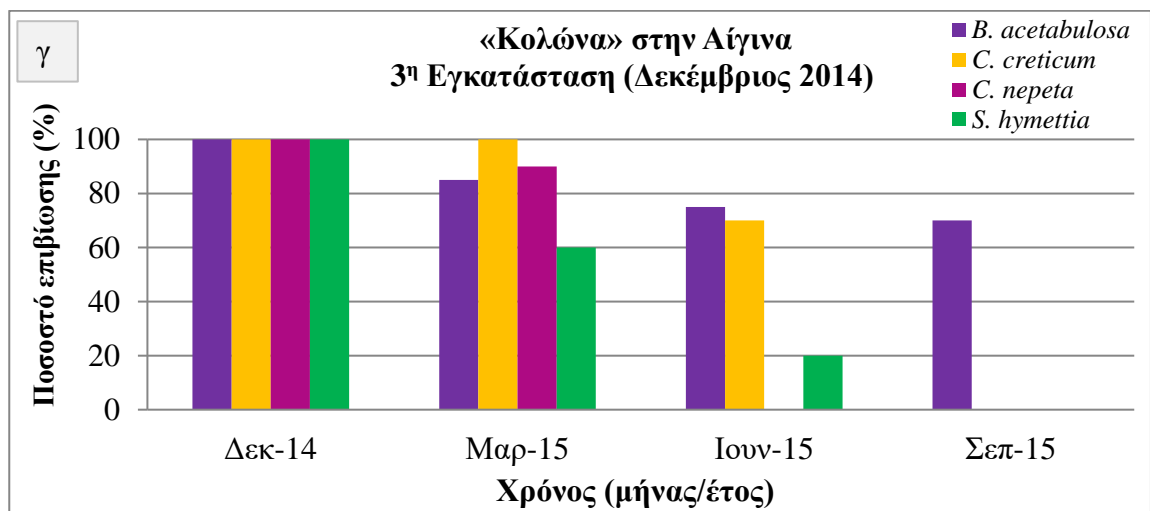
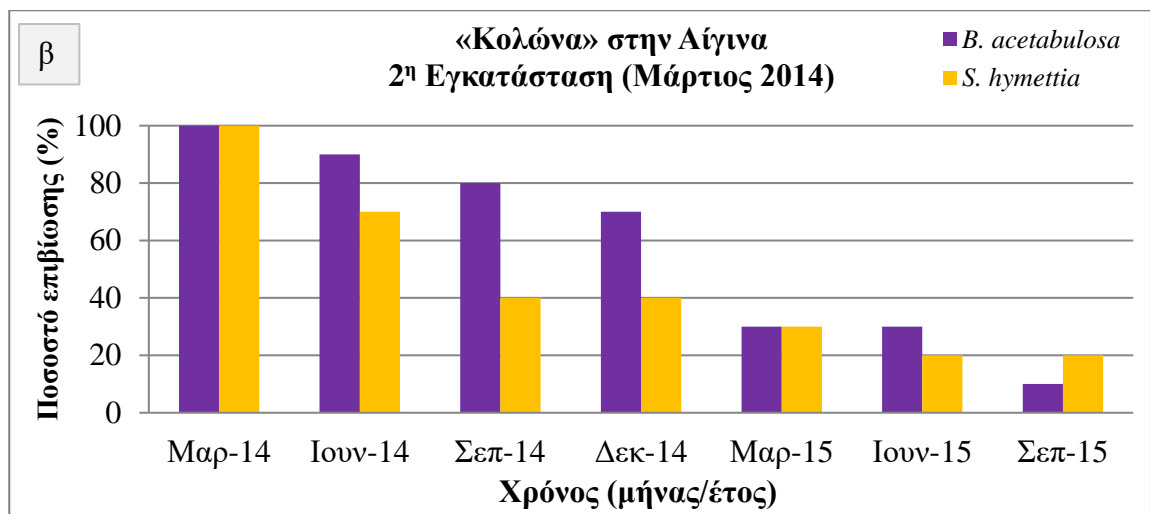
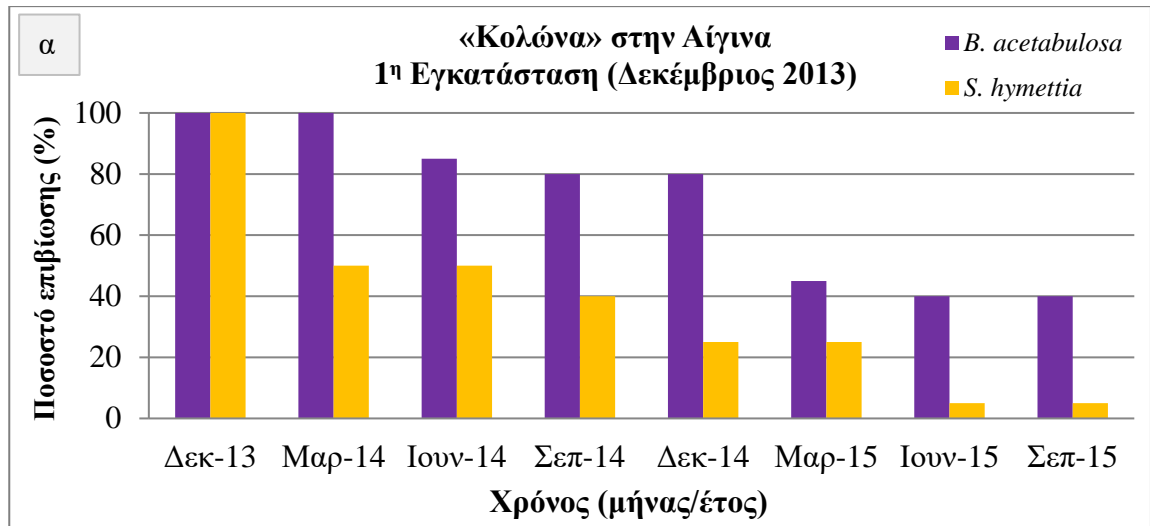
III.3.1 Επιβίωση των φυτικών ειδών

III.3.1.1 Αρχαιολογικός χώρος «Κολώνα»

Στον αρχαιολογικό χώρο «Κολώνα» στην Αίγινα, κατά την πρώτη εγκατάσταση, το Δεκέμβριο 2013, το είδος *B. acetabulosa* ένα χρόνο μετά τη φύτευση, επιβίωσε σε ποσοστό 80%, ενώ μετά από ενάμιση χρόνο το ποσοστό επιβίωσης μειώθηκε στο 40% (Σχ. III.6α). Στο είδος *S. hymettia* από τους πρώτους τρεις μήνες το ποσοστό επιβίωσης είχε πέσει κάτω από το 50%, ενώ στην τελευταία μέτρηση δεκαοκτώ μήνες μετά την εγκατάσταση δεν ξεπερνούσε το 5% (Σχ. III.6α).

Κατά τη δεύτερη εγκατάσταση, το Μάρτιο 2014, τα είδη *B. acetabulosa* και *S. hymettia*, ένα χρόνο μετά την εγκατάσταση είχαν επιβιώσει σε ποσοστό 70 και 40% αντίστοιχα. Όμως στην επόμενη μέτρηση το Μάρτιο 2015 παρατηρήθηκε μία απότομη μείωση του ποσοστού επιβίωσης των φυτών του *B. acetabulosa* με αποτέλεσμα το ποσοστό να πέσει στο 30%, ίδιο ποσοστό είχε και το είδος *S. hymettia*. Ενάμιση χρόνο μετά, το ποσοστό επιβίωσης του είδους *B. acetabulosa* ήταν 10% και του *S. hymettia* 20% (Σχ. III.6β).

Στην τρίτη εγκατάσταση, το Δεκέμβριο 2014, τα είδη *B. acetabulosa*, *C. creticum* και *S. hymettia*, έξι μήνες μετά τη φύτευση τους είχαν επιβιώσει σε ποσοστό πάνω από 60%, ενώ το *C. nepeta* δεν είχε επιβιώσει (Σχ. III.6γ). Στη τελευταία μέτρηση, Σεπτέμβριο 2015, το μόνο είδος που επιβίωσε ήταν το *B. acetabulosa* σε ποσοστό 70% (Σχ. III.6γ).

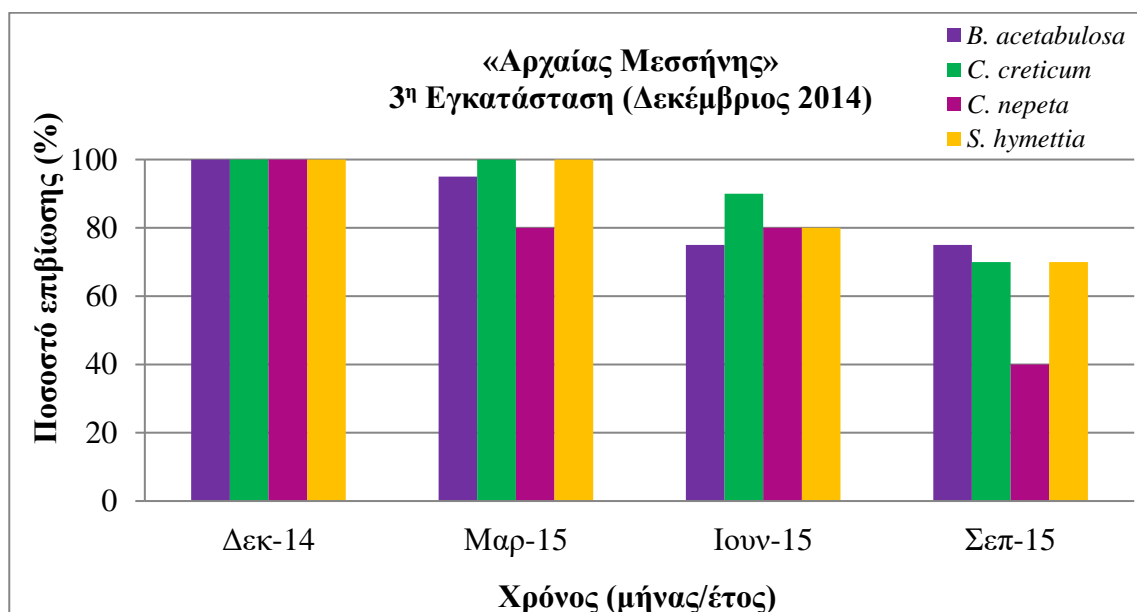


Σχήμα III.6. Επιβίωση των αναγραφόμενων ειδών στην Κολώνα Αίγινας, στη φύτευση του Δεκεμβρίου 2013 (α), Μαρτίου 2014 (β) και Δεκεμβρίου 2014 (γ).

III.3.1.2. Αρχαιολογικός χώρος της «Αρχαίας Μεσσήνης» Μεσσηνίας

Από την πρώτη εγκατάσταση που έγινε το Δεκέμβριο 2013 στον αρχαιολογικό χώρο της «Αρχαίας Μεσσήνης» λήφθηκε μόνο μία μέτρηση, ενώ από την εγκατάσταση το Μάρτιο 2014, δεν λήφθηκε καμία μέτρηση, διότι τα φυτά καταστράφηκαν κατά την εκτέλεση αρχαιολογικών εργασιών. Από τη μοναδική μέτρηση που λήφθηκε το Μάρτιο 2013, από τα φυτά που εγκαταστάθηκαν το Δεκέμβριο 2013, το ποσοστό επιβίωσης των ειδών *B. acetabulosa* και *S. hymettia* ήταν 35% και 50% αντίστοιχα.

Στην τρίτη εγκατάσταση, το Δεκέμβριο 2014, εννέα μήνες μετά τη φύτευση, τα είδη *B. acetabulosa*, *C. creticum* και *S. hymettia* επιβίωσαν σε υψηλό ποσοστό (70 - 90%), ενώ το είδος *C. nepeta* σε χαμηλό ποσοστό (40%) (Σχ. III.7).



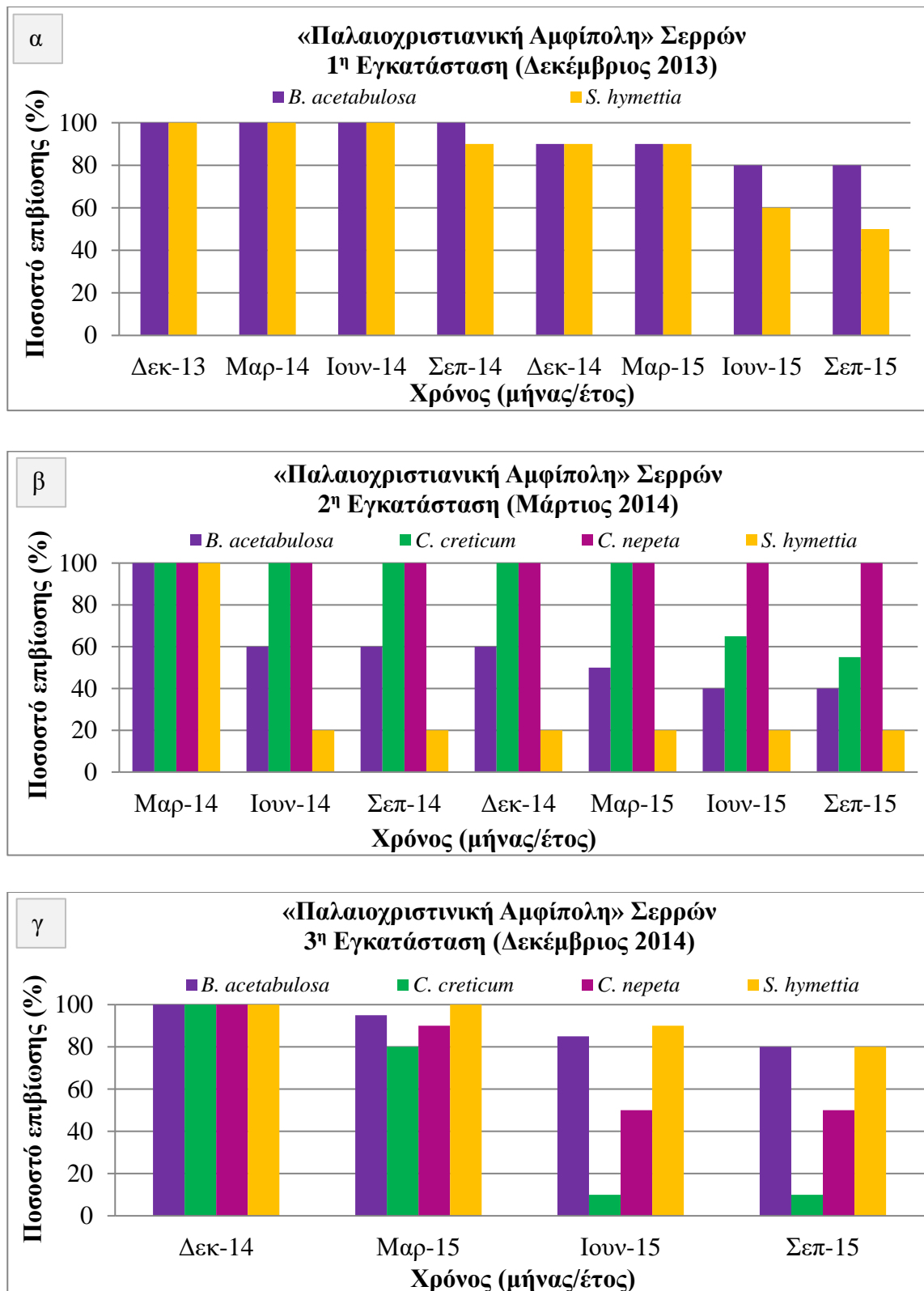
Σχήμα III.7. Επιβίωση των αναγραφόμενων ειδών στην Αρχαία Μεσσήνη, στη φύτευση του Δεκεμβρίου 2014.

III.3.1.3. Αρχαιολογικός χώρος «Παλαιοχριστιανική Αμφίπολη» Σερρών

Στην «Παλαιοχριστιανική Αμφίπολη» Σερρών, στη Βόρεια Ελλάδα, κατά την πρώτη εγκατάσταση το Δεκέμβριο 2013, το ποσοστό επιβίωσης των ειδών *B. acetabulosa* και *S. hymettia* μετά το πέρας του πρώτου χειμώνα ήταν πολύ υψηλό (90%). Στην τελευταία μέτρηση, το Σεπτέμβριο 2015, το ποσοστό επιβίωσης του *B. acetabulosa* παρέμεινε υψηλό (80%), ενώ του *S. hymettia* μειώθηκε στο 50% (Σχ. III.8α).

Κατά τη δεύτερη εγκατάσταση, Μάρτιος 2014, τα είδη *C. creticum* και *C. nepeta*, ένα χρόνο μετά τη φύτευση, είχαν επιβιώσει όλα, ενώ το ποσοστό επιβίωσης του *B. acetabulosa* ήταν 60% και του *S. hymettia* είχε πέσει στο 20%. Στην τελευταία μέτρηση, Σεπτέμβριο 2015, εξακολουθούσαν να επιβιώνουν όλα τα φυτά του *C. nepeta*, ενώ το ποσοστό επιβίωσης του *C. creticum* μειώθηκε στο ήμισυ. Το ποσοστό επιβίωσης του *S. hymettia* παρέμεινε στο 20%, ενώ του *B. acetabulosa* μειώθηκε στο 20% (Σχ. III.8β).

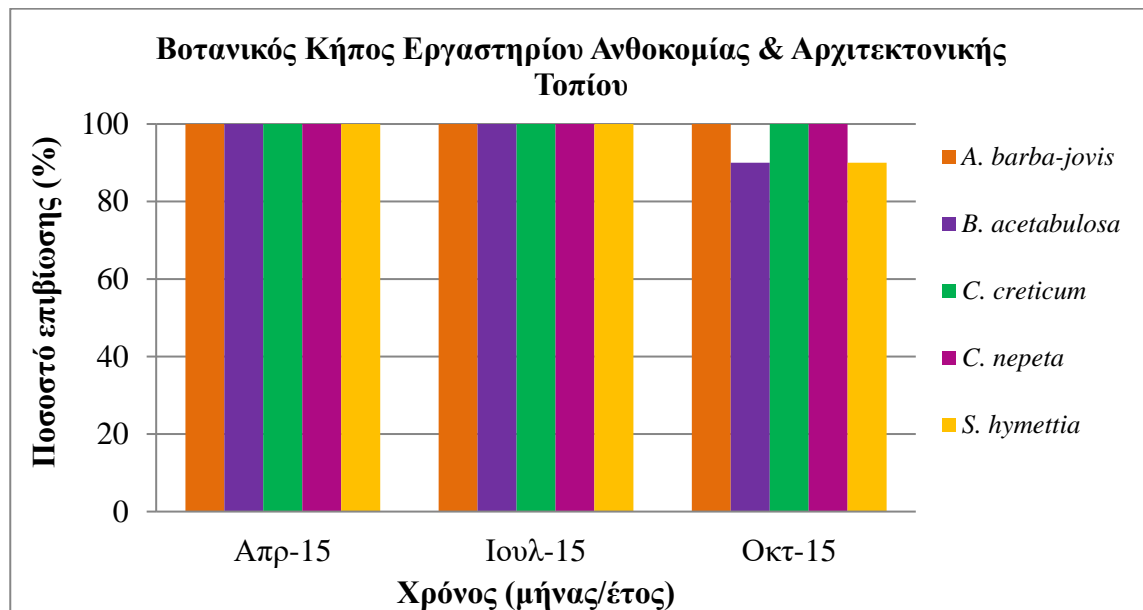
Κατά την τρίτη εγκατάσταση, Δεκέμβριος 2014, τα είδη *B. acetabulosa* και *S. hymettia* μετά τον πρώτο χειμώνα επιβίωσαν σε υψηλό ποσοστό, πάνω από 80%. Το υψηλό ποσοστό το διατήρησαν και μετά από 9 μήνες μετά τη μεταφύτευση. Το είδος *C. nepeta* μετά από 9 μήνες καλλιέργειας επιβίωσε σε ποσοστό 50%, ενώ το *C. creticum* σε πολύ χαμηλό ποσοστό, ήτοι μόνο 10% (Σχ. III.8γ).



Σχήμα III.8. Επιβίωση των αναγραφόμενων ειδών στην Παλαιοχριστιανική Αμφίπολη Σερρών, στη φύτευση του Δεκεμβρίου 2013 (α), Μαρτίου 2014 (β) και Δεκεμβρίου 2014 (γ).

III.3.1.4. Βοτανικός Κήπος του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γ.Π.Α.

Κατά την εγκατάσταση που πραγματοποιήθηκε στο Βοτανικό Κήπο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γ.Π.Α. τον Απρίλιο 2015, 6 μήνες μετά την εγκατάσταση και τα 5 είδη επιβίωσαν σε πολύ υψηλό ποσοστό (90 - 100%) (Σχ. III.9).



Σχήμα III.9. Επιβίωση των αναγραφόμενων ειδών στο Βοτανικό Κήπο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γ.Π.Α., στη φύτευση του Απριλίου 2015.

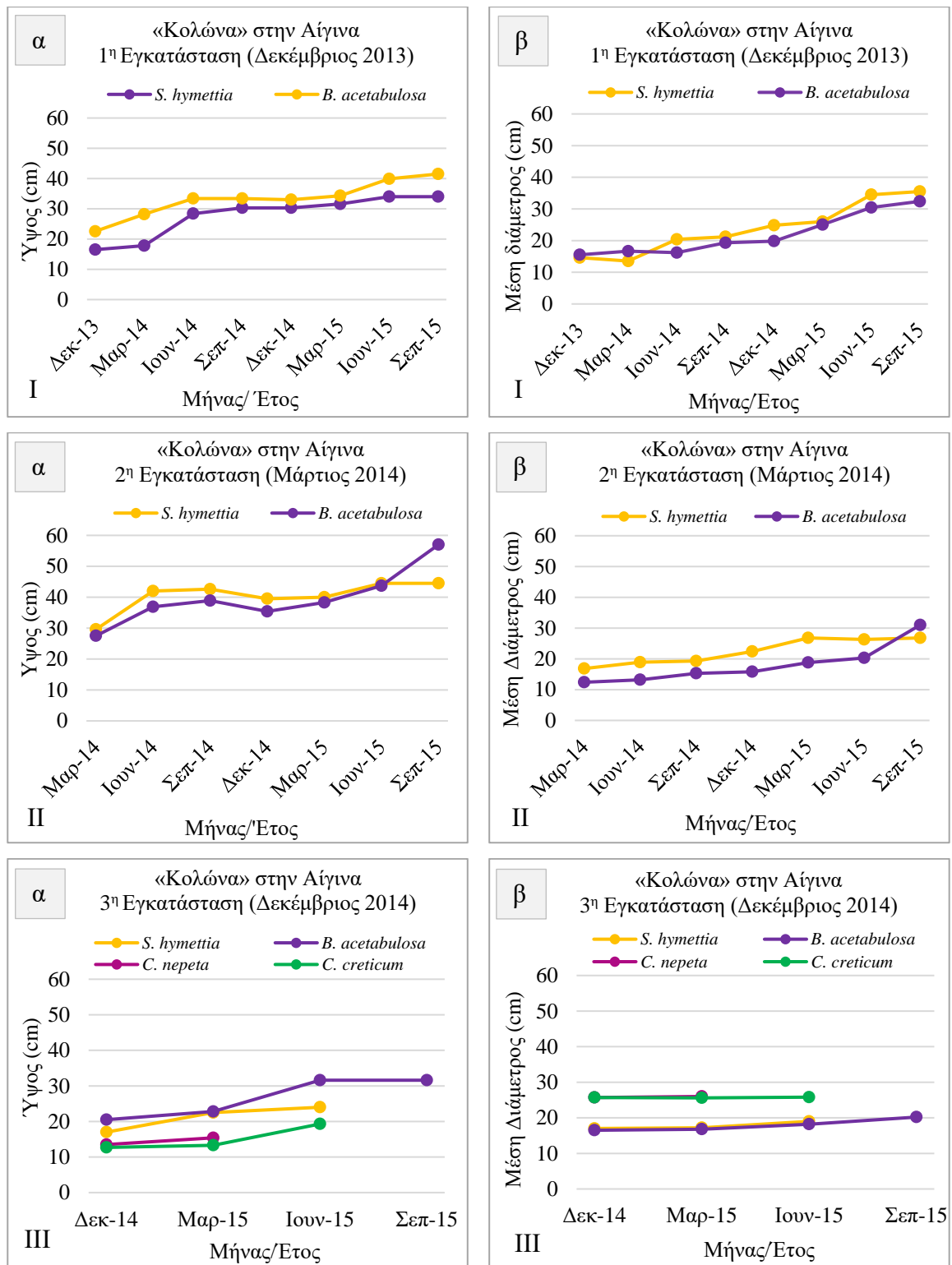
III.3.2 Ανάπτυξη φυτικών ειδών

III.3.2.1 Αρχαιολογικός χώρος «Κολώνα» στην Αίγινα

Στον αρχαιολογικό χώρο «Κολώνα» στην Αίγινα, κατά την πρώτη εγκατάσταση το Δεκέμβριο 2013 το είδος *B. acetabulosa* άρχισε από τους πρώτους μήνες της εγκατάστασης να αναπτύσσεται σε ύψος, ενώ το *S. hymettia* μετά το πρώτο τρίμηνο. Από το Ιούνιο 2014 μέχρι το Μάρτιο 2015 τα φυτά σταμάτησαν να αναπτύσσονται σε ύψος, ενώ στην τελευταία μέτρηση το Σεπτέμβριο 2015 τα είδη *B. acetabulosa* και *S. hymettia* είχαν ύψος 41,5 και 34 cm αντίστοιχα (Σχ. III.10Iα). Όσον αφορά τη διάμετρο της κόμης των φυτών μέχρι το Δεκέμβριο 2014 είχε αυξηθεί ελάχιστα. Μετά το πρώτο χρόνο τα είδη άρχισαν να αυξάνονται σε όγκο. Στην τελευταία μέτρηση η διάμετρος και στα δύο είδη ήταν παρόμοια (32,4 - 35,5 cm) (Σχ. III.10Iβ).

Κατά τη δεύτερη εγκατάσταση Μάρτιο 2014, και τα δύο είδη, *B. acetabulosa* και *S. hymettia*, άρχισαν να αναπτύσσονται σε ύψος από το μήνα της εγκατάστασης μέχρι το Σεπτέμβριο 2014. Από το Σεπτέμβριο 2014 μέχρι το Μάρτιο 2015 δεν παρατηρήθηκε αύξηση του ύψους των φυτών. Τους επόμενους μήνες παρατηρήθηκε μεταβολή του ύψους και των δύο ειδών, με το είδος του *B. acetabulosa* να εμφανίζει τη μεγαλύτερη μεταβολή (Σχ. III.10IIα). Όσον αφορά τη μέση διάμετρο των φυτών μέχρι το πρώτο χρόνο παρέμεινε στα ίδια επίπεδα, ενώ τους επόμενους μήνες παρατηρήθηκε αύξηση της διαμέτρου και στα δύο είδη (Σχ. III.10IIβ).

Κατά την τρίτη εγκατάσταση το Δεκέμβριο 2014 το είδος *B. acetabulosa* παρουσίασε τη μεγαλύτερη μεταβολή του ύψους, ενώ όσον αφορά τη μέση διάμετρο δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές και στα τέσσερα είδη (Σχ. III.10IIIα, β).

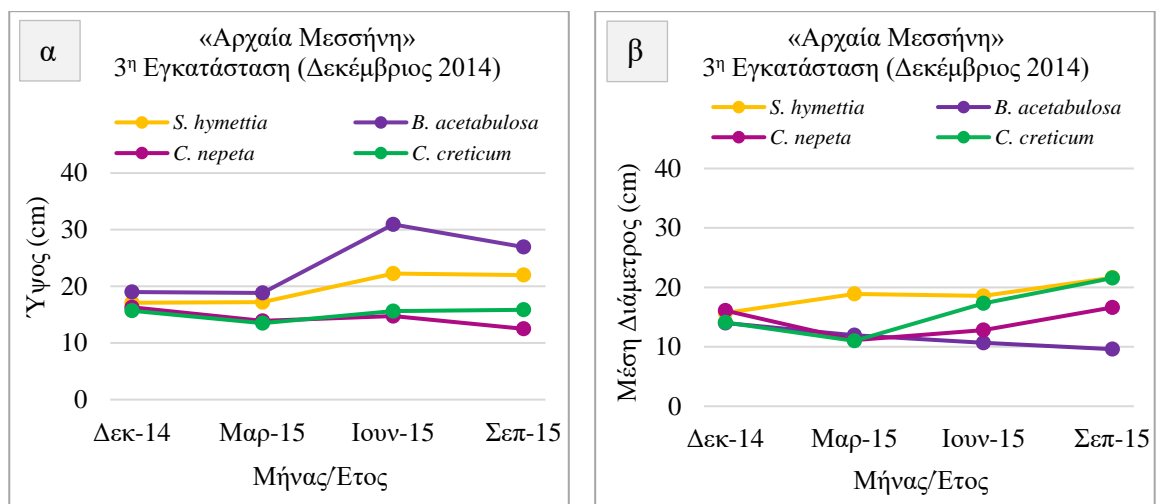


Σχήμα III.10. Η ανάπτυξη του ύψους (α), και της διαμέτρου (β) των ειδών που φυτεύτηκαν το Δεκέμβριο 2014, το Μάρτιο 2014 και Δεκέμβριο 2014 στον αρχαιολογικό χώρο «Κολώνα» στην Αίγινα.

III.3.2.2 Αρχαιολογικός χώρος της «Αρχαίας Μεσσήνης» Μεσσηνίας

Στον αρχαιολογικό χώρο «Αρχαία Μεσσήνη» κατά την πρώτη εγκατάσταση το Δεκέμβριο 2013, στα *B. acetabulosa* και *S. hymettia* δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές διαφοροποιήσεις ως προς την ανάπτυξη (ύψος και η μέση διάμετρος) των φυτών που επιβίωσαν, τρεις μήνες μετά την εγκατάστασή τους, ενώ στη δεύτερη εγκατάσταση δεν ελήφθησαν μετρήσεις, διότι τα φυτά καταστράφηκαν κατά την εκτέλεση αρχαιολογικών εργασιών.

Κατά την τρίτη εγκατάσταση Μάρτιο 2014, και στα τέσσερα είδη δεν καταγράφηκαν σημαντικές μεταβολές όσος αφορά την ανάπτυξη των φυτών κατά τους τρεις πρώτους μήνες μετά τη μεταφύτευση. Τους επόμενους μήνες παρατηρήθηκε μια αύξηση του ύψους των ειδών *B. acetabulosa* και *S. hymettia*. Όσον αφορά τη μέση διάμετρο δεν παρατηρήθηκαν σημαντικές μεταβολές (Σχ. III.11α, β).

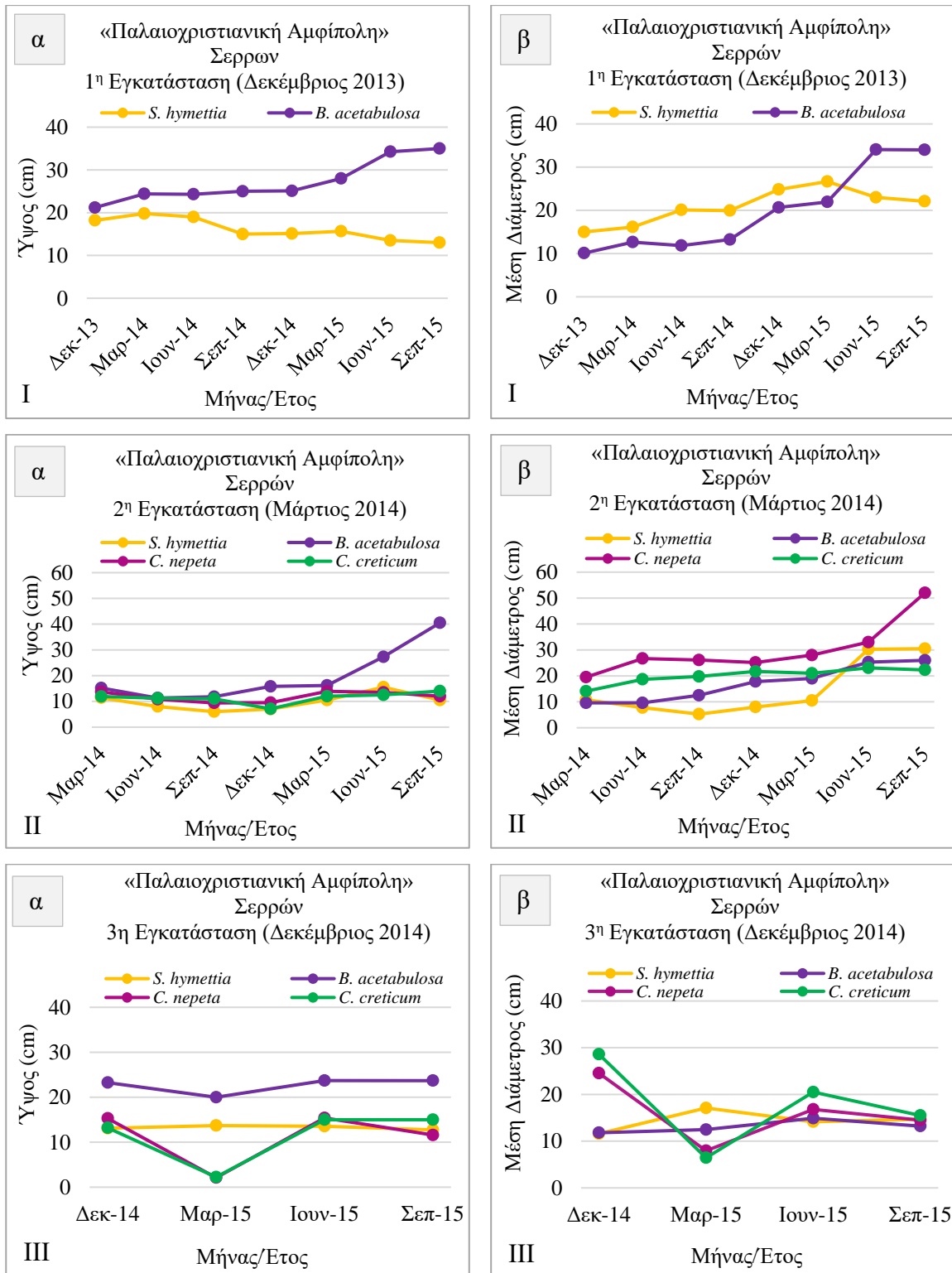


Σχήμα III.11. Η ανάπτυξη του ύψους (α), και της διαμέτρου (β) των ειδών που φυτεύτηκαν το Δεκέμβριο 2014 στον αρχαιολογικό χώρο «Αρχαίας Μεσσήνης» στη Μεσσήνη.

III.3.2.3 Αρχαιολογικός χώρος «Παλαιοχριστιανική Αμφίπολη» Σερρών

Στην «Παλαιοχριστιανική Αμφίπολη» Σερρών, κατά την πρώτη εγκατάσταση, το Δεκέμβριο 2013, το ύψος του *S. hymettia* παρέμεινε σταθερό τους πρώτους 6 μήνες, τον Ιούνιο 2014 παρατηρήθηκε μείωση του ύψους, που πιθανόν οφείλετο στο ότι ξεράθηκαν κάποια φυτά (Σχ. III.12Iα). Τους επόμενους μήνες το ύψος παρέμεινε σχεδόν σταθερό. Όσον αφορά τη μέση διάμετρο κόμης από το Μάρτιο μέχρι τον τελευταίο μήνα μέτρησης, το Σεπτέμβριο 2015, παρατηρήθηκε σταθερή αύξησή της, μέχρι το Μάρτιο 2015, ενώ τους επόμενους μήνες παρατηρήθηκε μείωση, η οποία πιθανόν οφείλεται στην απώλεια φυτών (Σχ. III.12Iβ). Στο ύψος του *B. acetabulosa* παρατηρήθηκε μικρή μεταβολή στο πρώτο χρόνο, ενώ τους επόμενους μήνες αυξανόταν σταθερά, κάτι ανάλογο παρατηρήθηκε και στη μέση διάμετρο με τη μόνη διαφορά ότι η αύξηση της άρχισε το Σεπτέμβριο 2014 και με πιο αυξανόμενους ρυθμούς (Σχ. III.12Iα, β). Και στα δύο είδη αυξήθηκε η διάμετρος μετά το πρώτο φθινόπωρο από την εγκατάσταση (Σχ. III.12Iβ).

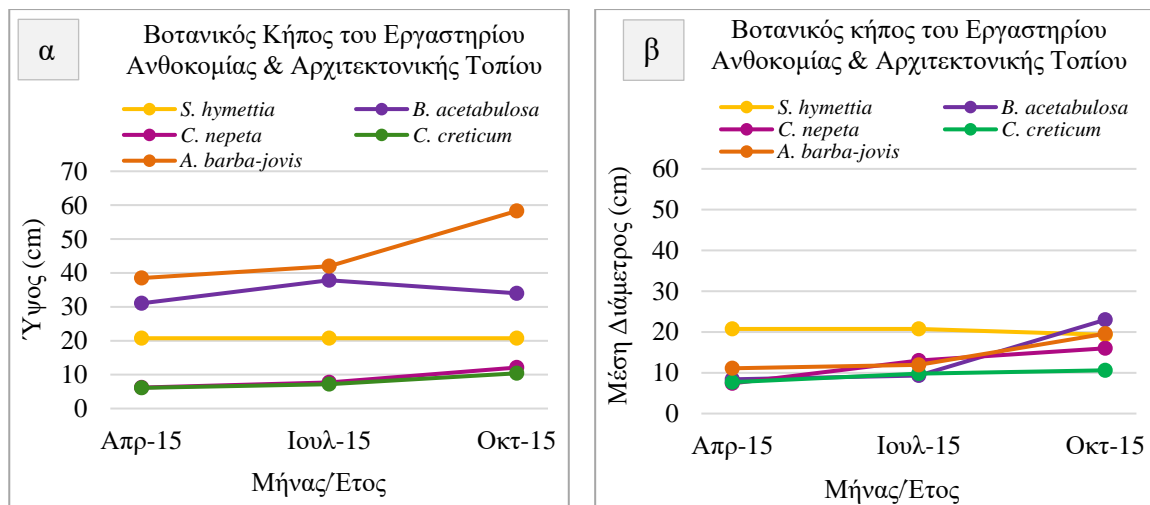
Κατά τη δεύτερη εγκατάσταση, Μάρτιος 2014, τη μεγαλύτερη μεταβολή στο ύψος την είχε το είδος *B. acetabulosa* μετά το πρώτο χρόνο εγκατάστασης, ενώ τα υπόλοιπα είδη παρέμειναν στο ίδιο σχεδόν ύψος (Σχ. III.12IIα). Όσον αφορά τη μέση διάμετρο μέχρι το πρώτο χρόνο εγκατάστασης παρέμενε σταθερή σε όλα τα είδη. Από το Μάρτιο 2015 παρατηρήθηκε αύξηση της διαμέτρου, η οποία ήταν μεγαλύτερη στο είδος *C. nepeta* (Σχ. III.12IIβ). Στα άλλα δύο είδη *B. acetabulosa* και *S. hymettia* τόσο το ύψος όσο και η μέση διάμετρος παρέμειναν σταθερά καθ' όλη τη διάρκεια παρατήρησης (Σχ. III.12IIα, β).



Σχήμα III.12. Η ανάπτυξη του ύψους (α), και της διαμέτρου (β) των ειδών που φυτεύτηκαν το Δεκέμβριο 2014, το Μάρτιο 2014 και Δεκέμβριο 2014 στον αρχαιολογικό χώρο «Παλαιοχριστιανική Αμφίπολη» Σερρών.

III.3.3.4 Βοτανικός κήπος του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γ.Π.Α.

Στην εγκατάσταση που πραγματοποιήθηκε στο Βοτανικό Κήπο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γ.Π.Α., μεγαλύτερη αύξηση του ύψους παρατηρήθηκε στο είδος *A. barba-jovis* μετά τους τέσσερεις μήνες εγκατάστασης, ενώ δεν παρατηρήθηκε σημαντική μεταβολή όσον αφορά τη διάμετρο και στα 5 πέντε είδη που φυτεύτηκαν (Σχ. III.13α, β).



Σχήμα III.13. Η ανάπτυξη του ύψους (α), και της διαμέτρου (β) των ειδών που φυτεύτηκαν τον Απρίλιο 2015 στο Βοτανικό Κήπο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γ.Π.Α.

III.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Για τον αρχαιολογικό χώρο «Κολώνα» στην Αίγινα αξιολογώντας τα αποτελέσματα και των τριών εγκαταστάσεων, διαπιστώθηκε ότι το είδος *B. acetabulosa* επιβίωσε σε μέτριο ποσοστό, το είδος *S. hymettia* σε αρκετά χαμηλό ποσοστό, ενώ τα είδη *C. creticum* και *C. nepeta* δεν επιβίωσαν.

Στον αρχαιολογικό χώρο «Παλαιοχριστιανική Αμφίπολη» Σερρών, τα *B. acetabulosa*, *C. nepeta* και *S. hymettia* επιβίωσαν σε αρκετά ικανοποιητικό ποσοστό σύμφωνα με την ευρύτερη γεωγραφική εξάπλωση που τα χαρακτηρίζει στον ελληνικό χώρο. Ενδιαφέρον εύρημα αποτέλεσε η ικανότητα επιβίωσης και εγκατάστασης του *S. hymettia*, είδος που απαντά στους ορεινούς όγκους της Κεντρικής και Νότιας Ελλάδας, καθώς και των Νησιών του Δυτικού Αιγαίου, σε υψόμετρο έως 1200 m, ενώ το ποσοστό επιβίωσης του *C. creticum* ήταν πολύ χαμηλό. Το *C. creticum* είναι είδος που απαντά στη Νότια Ελλάδα, όπου επικρατούν πιο ήπιες συνθήκες περιβάλλοντος, ως εκ' τούτου οι πολύ χαμηλές θερμοκρασίες της Β. Ελλάδας τους χειμερινούς μήνες πιθανόν να είχαν ως αποτέλεσμα το μεγάλο ποσοστό θνησιμότητας του είδους.

Όσον αφορά τον αρχαιολογικό χώρο «Αρχαίας Μεσσήνης», τα είδη *B. acetabulosa*, *C. creticum*, και *S. hymettia* επιβίωσαν σε υψηλά ποσοστά, ενώ το είδος *C. nepeta* σε μέτριο ποσοστό.

Από τα παραπάνω αποτελέσματα προκύπτει ότι είδος *B. acetabulosa* εγκαταστάθηκε σε υψηλό ποσοστό σε όλους τους αρχαιολογικούς χώρους, παρουσιάζοντας τη μεγαλύτερη προσαρμοστικότητα, ενώ το είδος το *S. hymettia* στις μη παράκτιες περιοχές. Το *C. nepeta* εγκαταστάθηκε καλύτερα στη Β. Ελλάδα, ενώ το *C. creticum* στη Νότια Ελλάδα, σε αντίστοιχες περιοχές όπου αυτοφύονται. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και από τους (Papafoitiou *et al.*, 2017a) για τα είδη *A. halimus* και *L. monopetalum*, τα οποία επιβίωσαν σε υψηλότερο ποσοστό στον Αρχαιολογικό χώρο της Αίγινας, ως είδη που απαντούν σε παράκτιες περιοχές και συνεπώς ανθεκτικά σε αντίξοες συνθήκες (ηλιοφάνεια, άνεμο) και σε υψηλά επίπεδα αλατότητας, συνθήκες οι οποίες επικρατούν στο συγκεκριμένο αρχαιολογικό χώρο και στην ευρύτερη περιοχή, ενώ απέτυχαν να εγκατασταθούν στη Β. Ελλάδα.

Τέλος στο Βοτανικό Κήπο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γ.Π.Α., το ποσοστό επιβίωσης όλων των ειδών, συμπεριλαμβανομένου του είδους *A. barba-jonis*, που δεν εγκαταστάθηκε στους αρχαιολογικούς χώρους, ήταν πολύ υψηλό.

Η αποτελεσματικότερη εγκατάσταση όλων των ειδών στο Βοτανικό Κήπο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γ.Π.Α., σε σύγκριση με τις φυτεύσεις στους αρχαιολογικούς χώρους, πιθανόν οφείλεται μερικώς στην τοποθέτηση γεωφάσματος για τον έλεγχο των ζιζανίων, καθώς και στην εφαρμογή αραιών αρδεύσεων κατά τη διάρκεια του θέρους. Η αποτελεσματικότητα του μαύρου γεωφάσματος για τη διαχείριση των ζιζανίων έχει αποδειχθεί σε διάφορες μελέτες που αφορούν είδη οπωροφόρων δένδρων (Walsh *et al.*, 1996, Guerra και Steenwerth, 2012), με πρόσθετα οφέλη, όπως μεγαλύτερη ανάπτυξη των δέντρων, μεγαλύτερες αποδόσεις παραγωγής και υψηλότερη θερμοκρασία του εδάφους. Επιπρόσθετα η άρδευση κατά τη διάρκεια της θερμής περιόδου φάνηκε ότι ενίσχυσε την επιβίωση και την ανάπτυξη των ειδών, αποτέλεσμα που έρχεται σε συμφωνία και με άλλες έρευνες (Siles *et al.*, 2010, Becerra *et al.*, 2013). Η άρδευση και η χρήση μεγαλύτερων φυτών αυξάνουν την επιβίωση των ειδών που έχουν αυξημένες υδατικές απαιτήσεις, ενώ είναι λιγότερο σημαντική για τα ξηροφυτικά είδη (Becerra *et al.*, 2013). Η χρήση γεωφάσματος σε συνδυασμό με τη μείωση της άρδευσης κατά τη διάρκεια ξηρής θερμής περιόδου σε τέσσερα ξυλώδη είδη συνέβαλε στην επιβίωση διαφόρων καλλιεργειών με μικρές υδατικές απαιτήσεις (Montague *et al.*, 2007, Dale, 2000).

III.5. ΓΕΝΙΚΟ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑ

Το είδος *B. acetabulosa* εγκαταστάθηκε σε ικανοποιητικό ποσοστό σε όλους τους αρχαιολογικούς χώρους, παρουσιάζοντας τη μεγαλύτερη προσαρμοστικότητα. Το *C. nepeta* εγκαταστάθηκε καλύτερα στη Β. Ελλάδα, το *C. creticum* στη Ν. Ελλάδα, σε αντίστοιχες περιοχές όπου αυτοφύονται, ενώ το *S. hymettia* στις μη παράκτιες περιοχές.

III.6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Albert, T., Karp, K., Starast, M. and Paal, T. (2010). The effect of mulching and pruning on the vegetative growth and yield of the half-high blueberry. *Agron. Res.* 8(1): 759-769.
- Albertano, P., Urzi, C. and Caneva, G. (2008). Tombs, catacombs and other hypogean environments. In: *Plant biology for cultural heritage*. The Getty Conservation Institute (GCI). Los Angeles, U.S.A. 183-190.
- Almeida, M., Mouga, T. and Barracosa, P. (1994). The weathering ability of higher plants. The case of *Ailanthus altissima* (Miller) Swingle. *Int. Biodeter. Biodegr.* 33: 333-343.
- Altieri, A. and Pinna, D. (2008). Outdoor environments. In: *Plant biology for cultural heritage*. The Getty Conservation Institute (GCI). Los Angeles, U.S.A. 287-294.
- Arnold, M.A., McDonald, G.V. and Bryan, D.L. (2005). Planting depth and mulch thickness affect establishment of green ash (*Fraxinus pennsylvanica*) and bougainvillea golden-rain tree (*Koelreuteria bipinnata*). *Arboric. J.* 31: 163-170.
- Ascard, J. (1994). Dose response models for flame weeding in relation to plant size and density. *Weed Res.* 34: 377-385.
- Ascard, J. (1995). Effects of flame weeding in weed species at different developmental stages. *Weed Res.* 35: 397-411.
- Becerra, P.I., Cruz, G., Ríos, S. and Castelli, G. (2013). Importance of irrigation and plant size in the establishment success of different native species in a degraded ecosystem of Chile. *Bosque.* 34: 103-111.
- Benoit, D.L., Vincent, C. and Chouinard, G. (2006). Management of weeds, apple sawfly (*Hoplocampa testudinea* Klug) and plum curculio (*Conotrachelus nenuphar* Herbst) with cellulose sheeting. *Crop Prot.* 25: 331-337.
- Bettini, C., Maffei, G., Pisani-Sartorio, G., Bedello-Tata, M. and Giuliani, R. (1996). Monumenti e vegetazione: quale possibilità di convivenza? *Bollettino d'arte.* 81(95): 129-141.
- Bond, W. and Grundy, A.C. (2001). Non-chemical weed management in organic farming systems. *Weed Res.* 41: 383-405.
- Brainard, D.C., Curran, W.S., Bellinder, R.R., Ngouajio, M., VanGessel, M.J., Haar, M.J., Thomas-Lanini, W. and Masiunas, J.B. (2013). Temperature and relative humidity affect weed response to vinegar and clove oil. *Weed Technol.* 27: 156-164.
- Butin, H., Pehl, L., Hoog, G. and Wollenzien, U. (1996). *Trimmatostroma abietis* sp. nov. (Hyphomycetes) and related species. *Antonie van Leeuwenhoek.* 69(3): 203-209.
- Camp, J. (1986). *The athenian agora: Excavations in the heart of classical Athens*. Thames and Hudson, London. 87.
- Caneva, G., Galotta, G., Cancellieri, L. and Savo, V. (2009). Tree roots and damages in the Jewish catacombs of Villa Torlonia (Roma). *J. Cult. Herit.* 10: 53-62.
- Carroll, M. (2003). *Earthy paradises. Ancient Gardens in History and Archaeology*, British Museum, London.
- Castro, J., Zamora, R., Hódar, J.A. and Gómez, J.M. (2005). Alleviation of summer drought boosts establishment success of *Pinus sylvestris* in a Mediterranean mountain: An experimental approach. *Plant Ecol.* 181(2): 191.
- Celesti-Grapow, L. and Blasi, C. (2004). The role of alien and native weeds in the deterioration of archaeological remains in Italy. *Weed Technol.* 18: 1508-1513.
- Ceschin, S., Kumbaric, A., Caneva, G. and Zuccarello, V. (2012). Testing flora as a bioindicator of buried structures in the archaeological area of Maxentius's villa (Rome, Italy). *J. Archaeol. Sci.* 39:1288-1295.
- Chicouene, D. (2007). Mechanical destruction of weeds: A review. *Agron. Sustain. Dev.* 27: 19-27.
- Cineros, J. and Zandstra, B. (2008). Flame weeding effects on several weeds species. *Weed Technol.* 22: 290-295.
- Costello, L. and Paul, J.L. (1975). Moisture relations in transplanted container plants. *HortScience.* 10: 371-372.
- Cowell, F.R. (1978). *The garden as a fine art, from antiquity to the modern times*. Boston. 34, 43.
- Dale, A. (2000). Black plastic mulch and between-row cultivation increase blackcurrant yields. *HortTechnology* 10, 307-308.
- Datta, A. and Knezevic, S. (2013). Flaming as an alternative weed control method for conventional and organic agronomic crop production systems: A review. *Adv. Agron.* 118: 399-428.
- Girgenti, V., Peano, C., Giuggioli, N.R., Giraud, E. and Guerrini, S. (2012). First results of biodegradable mulching on small berry fruits. *Acta Hort.* 926: 571-576.
- Giuliani, R. (1996). Il ruolo degli apparati radicali delle specie arboree nel degrado delle catacomb. In: *Monumenti e vegetazione: quale possibilità di convivenza?* Bollettino d'Arte. Ministero per i beni culturali e ambientali. Roma, Italia. 6(95): 139-141.

- Gray, D. (1995). Influence of vegetation on the stability of slopes. 2-25.
- Greenly, K.M. and Rakow, D.A. (1995). The effect of wood mulch type and depth on weed and tree growth and certain soil parameters. *Arboric. J.* 21: 225-232.
- Grieshop, M.J., Hanson, E., Schilder, A., Isaacs, R., Mutch, D., Garcia-Salazar, C., Longstroth, M. and Sadowsky, J. (2012). Status update on organic blueberries in Michigan. *Int. J. Fruit Sci.* 12: 232-245.
- Guerra, B. and Steenwerth, K. (2012). Influence of floor management technique on grapevine growth, disease pressure, and juice and wine composition: A review. *Am. J. Enol. Vitic.* 63: 149-164.
- Hackett, B. (1979). Planting design. U.K. 68-69.
- Hansen, P., Kristoffersen, P. and Kristensen, K. (2004). Strategies for nonchemical weed control on public paved areas in Denmark. *Pest Manag. Sci.* 60: 600-604.
- Herrera L.K. and Videla H. The importance of atmospheric effects on biodeterioration of cultural heritage constructional materials. *Int. Biodeter. Biodegr.* 54: 125-130.
- Hild, A.L. and Morgan, D.L. (1993). Mulch effects on crown growth of five southwestern shrub species. *J. Environ. Hortic.* 11: 41-43.
- Ingels, C.A., Lanini, T., Klonsky, K.M. and Demoura, R. (2013). Effects of weed and nutrient management practices in organic pear orchards. *Acta Hortic.* 1001: 175-183.
- Jokilehto, J. (2011). A history of architectural conservation. New York, U.S.A. 69-100, 174-212, 137-176, 245-294.
- Kanellou E., Economou G., Papafotiou M., Ntoulas N., Lyra D. and Knezevic S. (2017a). Flame weeding at archaeological sites of the Mediterranean region. *Weed Technol.* 31: 396-403
- Kanellou, E., Papafotiou, M., Knezevic S., Lyra, D., Ntoulas, N., Economou, G. (2015). Flame weeding: a new approach in weed control for archaeological sites, 17th European Weed Research Society Symposium on "Weed management in changing environments", 23-26 June 2015, Montpellier, France.
- Kanellou, E., Papafotiou, M., Lefas, P. and Petrocheilou, A. (2017b). Testing inert materials for reburial and paving purposes as a weed elimination method at archaeological sites. *Acta Hortic.* 1189: 73-76
- Kanellou, E., Papafotiou, M., Economou, G. and Ntoulas, N. (2017c). Testing soil solarization as an alternative method for weed suppression at archaeological sites. *Acta Hortic.* 1189: 69-72.
- Kanellou, E., Papafotiou, M., Economou, G. and Paraskevopoulou, A.T. (2017d). Developing wildflower meadows for the enhancement of the archaeological landscape. *Acta Hortic.* 1189: 43-48.
- Kraus, H.T. (1998). Effects of mulch on soil moisture and growth of desert willow. *HortTechnology.* 8: 588-590
- Larsson, L. (1997). Evaluation of mulching in organically grown black currant (*Ribes nigrum*) in terms of its effects on the crop and the environment. *Acta Univ. Agric. Suec. Agrar.*
- Lisci, M., Monte, M. and Pacini, E. (2003). Lichens and higher plants on stone: A review. *Int. Biodeter. Biodegr.* 51: 1-17.
- Litzow, M. and Pellett, H. (1983). Influence of mulch materials on growth of green ash. *Arboric. J.* 9: 7-11.
- Maier, R.M., Pepper, I.L. and Gerba, G.P. (2009). Environmental microbiology. Burlington, Elsevier Academic Press.
- Maureen, C. (2003). Earthly paradises: Ancient gardens in history and archaeology. British Museum, London. 18.
- Miller, H. (1941). The colossus of Maroussi. New Directions Publisher, Norfolk.
- Mishra, A., Jain, K. and Garg, K. (1995). Role of higher plants in the deterioration of historic buildings. *Sci. Tot. Environ.* 167: 375-392.
- Montague, T., Kjelgren, R. and Rupp, L. (2000). Gas exchange and growth of two transplanted, field-grown tree species in an arid climate. *HortScience.* 35: 763-768.
- Montague, T., Kjelgren, R. and Rupp, L. (2000). Surface energy balance affects gas exchange and growth of two irrigated landscape tree species in an arid climate. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 125: 299-309.
- Montague, T., McKenney, C., Maurer, M. and Winn, B. (2007). Influence of irrigation volume and mulch on establishment of select shrub species. *Arboricult. Urb. For.* 33: 202-209.
- Motard, E., Muratet, A., Clair-Maczulajtys, D. and Machon, N. (2011). Does the invasive species *Ailanthus altissima* threaten floristic diversity of periurban forests? *C. R. Biol.* 334: 872-879.
- Muntoni, A. (1993). Italo Gismondi and the lesson of Ostia Antica. *Rassegna* 55: The archaeology of architects. Bologna. 74-81.
- Nelson, W. (2004). Planting design: A manual of theory and practice. Champaign Illinois.
- Oosthuizen, D. and Kruger, D. (1994). The use of Sisal fiber as natural geotextile to control erosion. In: Rao, G.V. and Balan, K. (Eds.), Coir geotextiles - Emerging trends. Proceeding of the 5th International Conference on Geotextiles, Geomembranes and Related Products, Singapore. 18-23.
- Papafotiou, M., Kanellou, E. and Economou, G. (2010a). Alternative practices for vegetation management in archaeological sites - The case of Eleusis. *Acta Hortic.* 881: 879-883.

- Papafotiou, M., Kanellou, E. and Economou, G. (2010b). Vegetation management and restoration of a roman villa garden in the archaeological site of Eleusis. Paper presented at: 8th Int. Symposium on Conservation of Monuments in the Mediterranean Basin. Patras, Greece.
- Papafotiou, M., Bertsouklis, K.F., Martini, A.N., Vlachou, G., Akoumianaki-Ioannidou, A., Kanellou, E., and Kartsonas, E. D. (2017a). Evaluation of the establishment of native Mediterranean plant species suggested for landscape enhancement in archaeological sites of Greece. *Acta Hort. 1189*: 177-180.
- Papafotiou, M., Kanellou, E. and Economou, G. (2017b). Integrated design and management of vegetation at archaeological sites to protect monuments and enhance the historical landscape. *Acta Hort. 1189*: 1-10.
- Papafotiou, M., Marco-Martinez, G., Petrocheilou, A. and Kanellou, E. (2017c). Design proposal to increase functionality and enhance the landscape by native plants at the archaeological site of Kolona, Aegina island, Greece. *Acta Hort. 1189*: 93-96.
- Papafotiou, M., Marco-Martinez, G., Petrocheilou, A. and Kanellou, E. (2017d). Design proposal involving native plants for the historical site of Early Christian Amfipolis, Greece. *Acta Hort. 1189*: 97-102.
- Papafotiou, M., Marco-Martinez, G., Petrocheilou, A. and Kanellou, E. (2017e). Design proposal to increase functionality and aesthetics of archaeological sites: The case study of Ancient Messene, Greece. In VI International Conference on Landscape and Urban Horticulture. *1189*: 103-108.
- Pellett, H. (1983). Influence of mulch materials on growth of green ash. *Arboric. J.* 9: 7-11.
- Pinna, D. and Salvadori, O. (2008). Processes of biodeterioration: General mechanisms. In: *Plant biology for cultural heritage*. The Getty Conservation Institute. Los Angeles, U.S.A. 1534.
- Radosevich, S.R., Holt, J.S. and Ghera, C.M. (2007). *Ecology of weeds and invasive plants: Relationship to agriculture and natural resource management*. New York. 589.
- Rapalo, M.C. (2017). Alle origini della conservazione del paesaggio in Belgio: Il contributo originale di Louis Van der Swaelmen.
- Rask, A., Kristoffersen, P. and Andreansen, C. (2012). Controlling grass weeds on hard surfaces: Effects of time intervals between flame treatments. *Weed Technol.* 26: 83-88.
- Rey-Benayas, J.M., Camacho-Cruz A. (2004). Performance of *Quercus ilex* saplings planted in abandoned Mediterranean cropland after long-term interruption of their management. *For. Ecol. Manag.* 194: 223-233.
- Rickson, R.J. (2006). Controlling sediment at source: An evaluation of erosion control geotextiles. *Earth Surf. Proc. Land.* 31: 550-560.
- Robinson, N. (1992). *The planting design handbook*. Gower Publications, England.
- Roby, T. and Alberti, L. (2008). Technician training for the maintenance of *in situ* mosaics. The Getty Conservation Institute. Los Angeles, U.S.A.
- Schurholz, H. (1992). Use of coir woven geotextiles in Europe. Paper presented to the UK Coir Geotextile Seminar.
- Shaw, M. The Aegean garden. *American Journal of Archaeology (AJA)*. 97(94): 661-685.
- Shrestha, A., Kurtural, S.K., Fidelibus, M.W., Dervishian, G. and Konduru, S. (2013). Efficacy and cost of cultivators, steam, or an organic herbicide for weed control in organic vineyards in the San Joaquin Valley of California. *HortTechnology*. 23: 99-108.
- Shrestha, A., Moretti, M. and Mourad, N. (2012). Evaluation of thermal implements and organic herbicides for weed control in a nonbearing almond (*Prunus dulcis*) orchard. *Weed Technol.* 26: 110-116.
- Siles, G., Rey, P.J., Alcántara, J.M., Bastida, J.M. and Herreros, J.L. (2010). Effects of soil enrichment, watering and seedling age on establishment of Mediterranean woody species. *Acta Oecol.* 36: 357-364.
- Sivesind, E.C., Leblanc, M.L., Cloutier, D.C. and Seguin, P. (2009). Weed response to flame weeding at different developmental stages. *Weed Technol.* 23: 438-443.
- Stevenson, D.S., Neisen, G.H. and Cornelsen, A. (1986). The effect of woven plastic mulch, herbicides, grass sod and nitrogen on 'Foch' grapes under irrigation. *HortScience*. 21: 439-441.
- Stone, P. (2004). *Education and the historic environment in the 21st century*. Education and the historic environment. Routledge, London. 1-10.
- Strik, B., Larco, H., Buller, G. and Julian, J. (2009). The economics of establishing blueberries for organic production in Oregon - A comparison of weed management systems. *Acta Hort.* 810: 457-464.
- Tahir, I.I., Svensson, S.E. and Hansson, D. (2015). Floor management systems in anorganic apple orchard affect fruit quality and storage life. *HortScience*. 50: 434-441.
- Tarara, J.M. (2000). Microclimate modification with plastic mulch. *HortScience*. 35: 169-180.
- Teasdale, J.R. and Mohler, C.L. (2000). The quantitative relationship between weed emergence and the physical properties of mulches. *Weed Sci.* 48: 358-392.
- Ulloa, S., Datta, A. and Knezevic, S. (2010). Tolerance of selected weed species to broadcast flaming at different growth stages. *Crop Prot.* 29: 1381-1388.
- Ulloa, S., Datta, A., Cavalieri, S. and Knezevic, S. (2010). Popcorn (*Zea mays* L. var *everta*) yield and yield components as influenced by the timing of broadcast flaming. *Crop Prot.* 29: 1496-1501.

- Videla, H.A., Guiamet, P.S. and De Saravia, S.G. (2000). Biodeterioration of Mayan archaeological sites in the Yucatan Peninsula, Mexico. *Int. biodeter. biodegr.* 46(4): 335-341.
- Vila, M., Tessier, M., Suehs, C.M., Brundu, G., Carta, L., Galanidis, A., Lambdon, P., Manca, M., Medail, F., Moragues, E., Traveset, A., Troumbis, A.Y. and Hulme, P.E. (2006). Local and regional assessments of the impacts of plant invaders on vegetation structure and soil properties of Mediterranean islands. *J. Biogeogr.* 33: 853-861.
- Vogiatzakis, I. (1999). An appraisal of the Mediterranean flora and vegetation and its conservation needs. Geographical Paper no. 131. Department of Geography, University of Reading, Reading.
- Walsh, B.D., Salmins, S., Buszard, D.J. and MacKenzie, A.F. (1996). Impact of soil management systems on organic dwarf apple orchards and soil aggregate stability, bulk density, temperature and water content. *Can. J. Soil Sci.* 76: 203-209.
- Watson, G.W. (1988). Organic mulch and grass competition influence tree root development. *Arboric. J.* 14: 200-203.
- Watson, G.W. and Kupkowski, G. (1991). Effects of a deep layer of mulch on the soil environment and tree root growth. *Arboric. J.* 17: 242-245.
- Whitcomb, C.E. (1980). Effects of black plastic and mulches on growth and survival of landscape plants. *Arboric. J.* 6: 10-12.
- Wollenzien, U., Hoog, G., Krumbein, W. and Uijthof, J. (1997). *Sacrinomyces petricola*, a new microcolonial fungus from marble in the Mediterranean basin. *Antonie van Leeuwenhoek.* 77: 281-288.
- Wright, A.N., Warren, S.L., Blazich, F.A. and Blum, U. (2004). Root and shoot growth periodicity of *Kalmia latifolia* 'Sarah' and *Ilex crenata* 'Compacta'. *HortScience.* 39: 243-247.
- Wszelaki, A., Doohan, D. and Alexandrou, A. (2007). Weed control and crop quality in cabbage [*Brassica oleraceae* (capitata group)] and tomato (*Lycopersicon lycopersicum*) using propane flamer. *J. Crop Prot.* 26: 134-144.
- Γιαννίταρος, Α. και Ζερβού, Σ. (1998). Η χλωρίδα της Ακροπόλεως των Αθηνών και των γύρω αρχαιολογικών χώρων. Αυτοφυής βλάστηση.
- Γιαννοπολίτης, Κ. (1998). Αντιμετώπιση ανεπιθύμητης βλάστησης σε αρχαιολογικούς χώρους. Εργασία που παρουσιάστηκε στην: Δημερίδα για την αυτοφυή βλάστηση στους αρχαιολογικούς χώρους, Ένωση Φίλων Ακροπόλεως. Αθήνα.
- Ζάχος, Κ. (1998). Αυτοφυής χλωρίδα στους αρχαιολογικούς χώρους: Η ελληνική εμπειρία. Αυτοφυής βλάστηση.
- Ζήκος, Ν. (1989). Αμφίπολις (Αθήνα: Υπουργείο Πολιτισμού και Αθλητισμού, Ταμείο Αρχαιολογικών Πόρων και Απαλλοτριώσεων)
- Ζιαγάκη, Α. (2012). Διαμόρφωση περιβάλλοντος χώρου γύρω από το βυζαντινό τείχος της Δράμας, Διπλωματική Εργασία. Πτυχιακή Μελέτη, Καβάλα.
- Θέμελης, Π. (2014). Αρχαία Μεσσήνη. (Αθήνα: Υπουργείο Πολιτισμού και Αθλητισμού, Ταμείο Αρχαιολογικών Πόρων και Απαλλοτριώσεων).
- Μαλλούχου-Tufano, Φ. (2000). Από τον 19ο αιώνα στον 21ο αιώνα: Μεταμορφώσεις του αρχαιολογικού τοπίου στην Αθήνα. Αθήνα: Από την κλασική εποχή έως σήμερα (5ος αι. π.Χ.- 2000μ.Χ). Συλλογικός τόμος. Αθήνα.
- Μαλλούχου-Tufano, Φ. (2015). Προστασία και διαχείριση μνημείων: Ιστορικές και θεωρητικές προσεγγίσεις. Σύνδεσμος Ελληνικών Ακαδημαϊκών Βιβλιοθηκών. Αθήνα.
- Ματζίρης, Ε. (2012). Έλεγχος των ζιζανίων σε έργα ανάπτυξης και συντήρησης αστικού πρασίνου. Εισηγήση στο 17ο Επιστημονικό Συνέδριο. Ζιζανιολογία, Γεωργία, Αστικό Πράσινο, Ελληνική Ζιζανιολογική Εταιρεία. 98-99.
- Μπάουμαν, Έ. (1999). Η ελληνική χλωρίδα στο μύθο, στην τέχνη, στη λογοτεχνία. Έκδοση της Ελληνικής Εταιρείας Προστασίας της Φύσεως. Αθήνα.
- Μπακιρτζή, Ο.Μ. (2007) Η συμβολή της Αρχιτεκτονικής Τοπίου στη Διαχείριση της βλάστησης σε αρχαιολογικούς χώρους και περιβάλλοντες χώρους μνημείων. Διδακτορική Διατριβή, Θεσσαλονίκη.
- Ντάφης, Σ. (1989). Δασοκομία πόλεων. Πανεπιστημιακές σημειώσεις, Αριστοτέλειο Πανεπιστήμιο Θεσσαλονίκης.
- Οικονόμου, Γ. (1998). Προβλήματα που προκύπτουν από την παρουσία της αυτοφυούς βλάστησης στους αρχαιολογικούς χώρους. Αυτοφυής βλάστηση. 65-67.
- Παπασταύρου, Ε. (2012). Αρχαιολογικός χώρος Κολώνας. Οδυσσεύς, Υπουργείο Πολιτισμού και Αθλητισμού http://odysseus.culture.gr/h/3/gh351.jsp?obj_id=245

- Παπαφωτίου, Μ., Κανέλλου, Η. και Οικονόμου, Φ. (2009). Διαχείριση βλάστησης στον αρχαιολογικό χώρο της Ελευσίνας και μελέτη διαχείρισης πρασίνου σε Ρωμαϊκή Βίλλα του χώρου. Εργασία που παρουσιάστηκε στο: 23ο Συνέδριο της Ελληνικής Εταιρίας της Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών. Κρήτη, Χανιά.
- Rackham, O. and Moody, J. (1998). Η δημιουργία του Κρητικού τοπίου. Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης. Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας, Ηράκλειο Κρήτης.
- Renfrew, C. and Paul, B. (2001). Αρχαιολογία: Θεωρίες, μεθοδολογία και πρακτικές εφαρμογές. Έκδοση Ινστιτούτου του Βιβλίου Α. Καρδαμίτσα. Αθήνα.

**ΕΝΟΤΗΤΑ IV – ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ
ΤΩΝ ΕΙΔΩΝ *Clinopodium creticum* ΚΑΙ
*Clinopodium nepeta***

IV. ΧΗΜΙΚΗ ΣΥΣΤΑΣΗ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ ΤΩΝ ΕΙΔΩΝ *Clinopodium creticum* ΚΑΙ *Clinopodium nepeta*

IV. ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Αντικείμενο μελέτης του συγκεκριμένου κεφαλαίου της παρούσας Διατριβής αποτέλεσε ο προσδιορισμός της απόδοσης αιθερίου ελαίου και η καταγραφή της χημικής σύστασης αυτού, σε σχέση με την εποχή και το περιβάλλον καλλιέργειας των αρωματικών φυτών της οικογένειας Lamiaceae, *Clinopodium creticum* και *Clinopodium nepeta*. Τα δύο παραπάνω φυτικά είδη καλλιεργήθηκαν είτε εντός μη θερμαινόμενου υαλόφρακτου θερμοκηπίου ή υπαίθρια στο Ανθοκομείο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου, ενώ η συλλογή των φυτικών δειγμάτων έγινε ανά δύο μήνες, από Ιούνιο 2016 έως Απρίλιο 2017, σε διαφορετικά στάδια ανάπτυξης των φυτών. Επιπλέον ελήφθησαν φυτικά δείγματα από *in vitro* καλλιέργεια των δύο παραπάνω φυτικών ειδών για να διερευνηθεί η χημική σύσταση του αιθερίου ελαίου που παράγεται σε *in vitro* καλλιέργεια και να γίνει σύγκριση του με το χημικό προφίλ των *ex vitro* καλλιεργούμενων φυτών. Με τον ποιοτικό προσδιορισμό των συστατικών, που έγινε με αέρια χρωματογραφία – φασματοσκοπία μάζας (GC-MS), χαρακτηρίστηκε το μεγαλύτερο ποσοστό (%) των συστατικών των αιθερίων ελαίων που παραλήφθησαν με τη συσκευή Clevenger. Διαπιστώθηκε ότι υπάρχει επίδραση της εποχής αλλά και του περιβάλλοντος καλλιέργειας στη σύσταση των αιθερίων ελαίων των φυτών που εξετάστηκαν.

Για το είδος *C. creticum* η μέση εκατοστιαία περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο κυμάνθηκε από 0,5 έως 2,5% στα φυτά εκτός θερμοκηπίου και ανάλογη διακύμανση παρατηρήθηκε στα φυτά εντός θερμοκηπίου (0,7 - 1,9%). Η υψηλότερη απόδοση καταγράφηκε τον Αύγουστο και για τις δύο μεταχειρίσεις, όπου τα φυτά ήταν σε ανθοφορία, ενώ πολύ χαμηλή απόδοση καταγράφηκε το Φεβρουάριο (βλαστική περίοδος). Αναφορικά με την ποιοτική σύσταση του αιθερίου ελαίου ταυτοποιήθηκαν 37 συστατικά, εκ των οποίων σε υψηλότερες συγκεντρώσεις το εποξείδιο της πιπεριτόνης (7,1 - 58,3%), το εποξείδιο της πιπεριτενόνης (1,3 - 25,1%), η μενθόνη (0,2 - 6,7%), το λιμονένιο (3,3 - 11,9%), και το δ-γερμακρένιο (1,3 - 10,0%). Το εποξείδιο της πιπεριτενόνης ήταν ιδιαίτερα αυξημένο το Φεβρουάριο και Απρίλιο, ενώ το εποξείδιο της πιπεριτενόνης το Φεβρουάριο εμφάνισε τη χαμηλότερη συγκέντρωση, ανεξαρτήτως θέσης καλλιέργειας. Η συνολική ποσότητα αιθερίου ελαίου των φυτών

στο ύπαιθρο ήταν ελάχιστα μεγαλύτερη σε σχέση με του θερμοκηπίου. Το εποξείδιο της πιπεριτόνης, το λιμονένιο και η μενθόνη παρουσίασαν τα υψηλότερα ποσοστά στα φυτά που βρίσκονταν στο ύπαιθρο, σε σχέση με αυτά εντός του θερμοκηπίου σε όλες τις εποχές δειγματοληψίας, ενώ το εποξείδιο της πιπεριτενόνης το Φεβρουάριο, Απρίλιο και Οκτώβριο και το δ-γερμακρένιο όλους τους μήνες παρουσίασαν τα υψηλότερα ποσοστά στα φυτά εντός θερμοκηπίου.

Για το είδος *C. nepeta* η μέση εκατοστιαία περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο κυμάνθηκε από 0,9 έως 2,6% στα φυτά εκτός θερμοκηπίου και ανάλογη διακύμανση παρατηρήθηκε στα φυτά εντός θερμοκηπίου (1,2 - 2,5%). Όπως και στο *C. creticum* η υψηλότερη απόδοση καταγράφηκε τον Αύγουστο και για τις δύο μεταχειρίσεις, όπου τα φυτά ήταν σε ανθοφορία, ενώ πολύ χαμηλή απόδοση καταγράφηκε το Φεβρουάριο (βλαστική περίοδος). Αναφορικά με την ποιοτική σύσταση του αιθερίου ελαίου ταυτοποιήθηκαν 35 συστατικά, εκ των οποίων σε υψηλότερες συγκεντρώσεις η πουλεγόνη (12,5 - 31,0%), το εποξείδιο της πιπεριτενόνης (3,8 - 31,8%), η ισομενθόνη (2,3 - 23,0%), το εποξείδιο της πιπεριτόνης (4,6 - 16,4%) και το λιμονένιο (2,1 - 8,8%). Στη συγκέντρωση των ανωτέρω ενώσεων παρατηρήθηκε εποχική διακύμανση. Η πουλεγόνη, το εποξείδιο της πιπεριτόνης και η ισομενθόνη εμφάνισαν υψηλότερες συγκεντρώσεις το Φεβρουάριο, όταν το εποξείδιο της πιπεριτενόνης και το λιμονένιο εμφάνισαν τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις τους. Η πουλεγόνη, το εποξείδιο της πιπεριτόνης και η ισομενθόνη εμφάνισαν υψηλότερες συγκεντρώσεις το Φεβρουάριο, όταν το εποξείδιο της πιπεριτενόνης και το λιμονένιο εμφάνισαν τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις τους. Η πουλεγόνη και το λιμονένιο παρουσίασαν τα υψηλότερα ποσοστά στα φυτά εκτός θερμοκηπίου, σε σχέση με αυτά του θερμοκηπίου σε όλες της εποχές δειγματοληψίας, πλην του Ιουνίου για το λιμονένιο. Το εποξείδιο της πιπεριτόνης παρουσίασε τα υψηλότερα ποσοστά στα φυτά εντός θερμοκηπίου, σε σχέση με αυτά εκτός θερμοκηπίου, πλην του Αυγούστου.

Όσον αφορά τη μέση εκατοστιαία περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο από *in vitro* αναπτυγμένους μικροβλαστούς στο είδος *C. creticum* ήταν 1,1%, ενώ στο είδος *C. nepeta* ήταν 1,7%. Αναφορικά με την ποιοτική σύσταση του αιθερίου ελαίου του *C. nepeta* ταυτοποιήθηκαν 21 συστατικά εκ των οποίων η πουλεγόνη (10,5%), εποξείδιο της πιπεριτενόνης (34,2%), την ισομενθόνη (4,6%), το εποξείδιο της πιπεριτόνης (15,0%) και το λιμονένιο (10,0%), ενώ για το *C. creticum* ταυτοποιήθηκαν 23 συστατικά εκ των οποίων το εποξείδιο της πιπεριτενόνης (59,9%), το εποξείδιο της πιπεριτόνης (11,5%) και το λιμονένιο (9,7%).

Η συγκριτική μελέτη της σύστασης των αιθερίων ελαίων από *in vitro* αναπτυγμένους μικροβλαστούς και από *ex vitro* καλλιεργούμενα φυτά, έδειξε μεγάλη ομοιότητα μεταξύ των δύο χημικών προφίλ τόσο για το είδος *C. creticum* όσο και για το είδος *C. nepeta*.

Συμπερασματικά διαπιστώθηκε ότι η καλλιέργεια του *C. nepeta* και *C. creticum* είναι δυνατόν να γίνει με επιτυχία υπό κάλυψη για την εκμετάλλευση των αιθερίων ελαίων της. Επιπλέον, *in vitro* καλλιέργειες μπορούν να αποτελέσουν μια έγκυρη εναλλακτική λύση για να παραχθούν γρήγορα μεγάλες ποσότητες φυτικού υλικού με από παρόμοιο χημικό προφίλ με τα αντίστοιχα *ex vitro* καλλιεργούμενα φυτά, ενώ παράλληλα προστατεύεται το φυσικό οικοσύστημα, από την παράνομη συλλογή αυτοφυών φυτών από το φυσικό περιβάλλον.

IV. ΣΚΟΠΟΣ

Η μελέτη της διακύμανσης της απόδοσης και της χημικής σύστασης των αιθερίων ελαίων των φυτών προσφέρει χρήσιμες πληροφορίες για τον κατάλληλο χρόνο συλλογής του φυτικού υλικού, ενώ η καταγραφή της χημικής σύστασης του αιθερίου ελαίου σε σχέση με το περιβάλλον καλλιέργειας των φυτικών ειδών, παρέχει ωφέλιμες πληροφορίες για την ενδεικνύομενη μέθοδο καλλιέργειας.

Σκοπός της παρούσας εργασίας ήταν ο προσδιορισμός της απόδοσης αιθερίου ελαίου και η καταγραφή της χημικής σύστασης αυτού, σε σχέση με την εποχή και το περιβάλλον καλλιέργειας των αρωματικών ειδών *C. creticum* και *C. nepeta*. Για το σκοπό αυτό φυτά από τα παραπάνω είδη καλλιεργήθηκαν είτε εντός μη θερμαινόμενου υαλόφρακτου θερμοκηπίου ή υπαίθρια ή *in vitro*. Η συλλογή του φυτικού υλικού έγινε σε διάφορες εποχές - στάδια ανάπτυξης των φυτών.

IV.1. ΕΙΣΑΓΩΓΗ

Τα αιθέρια έλαια είναι πολύπλοκα μίγματα πτητικών ουσιών, αμφότερα, πολικών και μη πολικών ενώσεων (Masango, 2005), που αποτελούνται κυρίως από τερπενοειδή και οξυγονωμένα παράγωγα τους. Λαμβάνονται από διάφορα μέρη του φυτού (π.χ. ταξιανθίες, φύλλα, βλαστούς, σπόρους, καρπούς και ρίζες) και προσδίδουν στο φυτό που τα παράγει τη χαρακτηριστική οσμή.

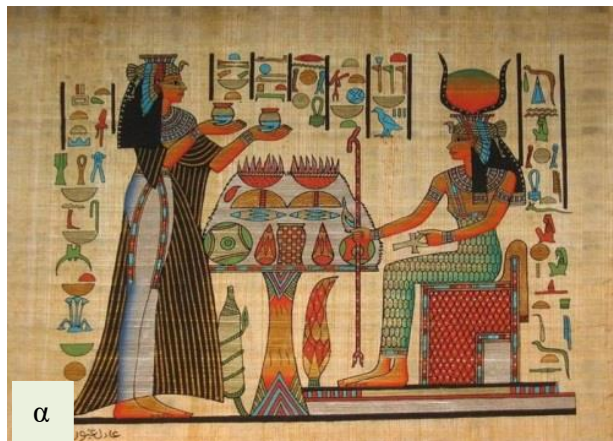
IV.1.1 Τα αρωματικά/φαρμακευτικά φυτά και τα αιθέρια έλαιά τους κατά το παρελθόν, στη νεότερη και σύγχρονη εποχή

Τα αρωματικά/φαρμακευτικά φυτά από την αρχαιότητα μέχρι σήμερα διαδραμάτισαν καθοριστικό ρόλο στην παραδοσιακή ιατρική αρκετών πολιτισμών.

Η πρώτη καταγραφή της χρήσης των ελαίων οφείλεται στους Αιγυπτίους οι οποίοι τα χρησιμοποιούσαν όχι μόνο ως τροφή αλλά και για θεραπευτικούς (παρασκευή φαρμάκων), καλλωπιστικούς σκοπούς (παρασκευή αρωμάτων και καλλυντικών) και για την παρασκευή αλοιφών, απαραίτητων για την ταρίχευση των νεκρών (μουμιοποίηση) (Εικ. IV.1α). Τα μυστικά των αιθερίων ελαίων πέρασαν αργότερα στους Αρχαίους Έλληνες γιατρούς, όπως το Διοσκουρίδη, το Γαληνό, τον Ιπποκράτη και άλλους, οι οποίοι προχώρησαν στην επιστημονική αναβάθμιση της εφαρμογής τους, χωρίς ωστόσο να σταματήσει η χρήση των βοτάνων στη μαγειρική (ως αρτυματικό), στην αρωματοποιία και τη βαφική (Εικ. IV.1β).

Στα Ομηρικά έπη (9^{ος} - 8^{ος} αιώνας π.Χ.) αναφέρονται αρκετά φυτά, συνήθως με ατελείς περιγραφές π.χ. τα «ανδροφόνα ή θυμοφθόρα φάρμακα», δηλητηριώδη βότανα με τα οποία επάλειφαν τα βέλη ή δηλητηρίαζαν την τροφή, τα «ήπια ή οδυνήφατα φάρμακα» που τα χρησιμοποιούσαν ως παυσίπονα και τα «λυγρά ή κακά φάρμακα» που προκαλούσαν αμνησία (<https://bit.ly/3ehRJCi>). Αναλυτικότερα, στην Οδύσσεια γίνεται εκτενής αναφορά για το φυτό *Asphodelus aestivus* (ασφόδελος), σύμφωνα με την οποία οι ψυχές των ηρώων που είχαν πέσει στην Τροία συναντήθηκαν σε ένα λιβάδι γεμάτο με ασφόδελους (Όμηρος, Οδ. 11.539 - 24.3) (Μπάουμαν, 1999). Αν ανατρέξουμε λοιπόν στην Ελληνική μυθολογία, ο ασφόδελος ο κοίλος (*Asphodelus fistulosus*), ίσως να είναι το άλλο είδος που στόλιζε τα Ηλύσια Πεδία, τη χώρα των νεκρών (Μπάουμαν, 1999). Επίσης σε χαρακτηριστικό σημείο της Ιλιάδας όταν τραυματίστηκε ο Μενέλαος κατά τη διάρκεια του Τρωϊκού πολέμου, ο ιατρός *Μαχάων* τραβώντας το βέλος τοποθέτησε στην πληγή «ήπια φάρμακα», για να το θεραπεύσει.

Παρόμοια στο ίδιο έπος, όταν τραυματίζεται ο *Ευρύπυλος*, ο φίλος του ο *Πάτροκλος* πασπάλισε την πληγή με καταπραϋντικά φάρμακα τρίβοντάς τη με ρίζα πικρή που σταματούσε τους πόνους.



Εικόνα IV.1. Η τέχνη του μακιγιάζ στην αρχαία Αίγυπτο (α) και αιθέρια έλαια στην αρχαία Ελλάδα. Πηγή: (α) <https://bit.ly/2K1F8HT> και (β) <https://bit.ly/2W9ZmBC>

Είναι κοινή διαπίστωση ότι στην Αρχαία Ελλάδα τα αιθέρια έλαια, τα αρώματα, τα καλλυντικά, οι σκιές ματιών και οι βαφές δέρματος και μαλλιών ήταν σε καθολική χρήση. Κατά τη διάρκεια του 8^{ου} και 7^{ου} αιώνα π.Χ. η εξαγωγή και η πώληση των ειδών αυτών αποτέλεσαν σημαντικό μέρος των συναλλαγών γύρω από τη Μεσόγειο, με αποτέλεσμα οι Έλληνες έμποροι να κυριαρχούν στις αγορές των αιθερίων ελαίων και αρωμάτων. Επίσης, τις αρωματικές ουσίες τις χρησιμοποιούσαν στο φαγητό τους (ως καρυκεύματα), στην παραδοσιακή ιατρική (για τη θεραπεία διαφόρων ασθενειών) και στη θρησκεία (θυμιάματα, θυμιατά). Τα σκεύη που χρησιμοποιούσαν οι Αρχαίοι Έλληνες για την αποθήκευση αρωμάτων ήταν οι Λήκυθοι, τα Αλάβαστρα, οι Αμφορείς και οι Πέλικες. Επιπλέον άνθισε και η τέχνη της αρωματοποιίας, κυρίως στην Αθήνα και στην Κρήτη. Αυτές οι περιοχές αποτέλεσαν εμπορικά κέντρα του αρχαίου ελληνικού κόσμου εξαιτίας της εύκολης εισαγωγής και εξαγωγής των αρωμάτων (Βαλαμώτη, 1997). Αναφορές φυτών σημειώνονται και στα Ορφικά έπη (6^{ος} π.Χ. αιώνας) όπου γίνεται λόγος για τον κέδρο, το ψύλλιον (*Plantago psyllium*), τον κνίκιο (*Carthamus tinctorius*), την αγχούσα (*Anchusa tinctoria* L.), το μανδραγόρα (*Mandragora officinarum*), την ανεμώνη (*Anemone hepatica*) κ.ά. Αναφορές ως προς την αρωματοθεραπεία συναντώνται ακόμη και στη Βίβλο όπου υπάρχει περιγραφή περίπου τριάντα φαρμακευτικών φυτών (<https://bit.ly/3cYjEGR>).

Η χρήση αρωμάτων ενέπνευσε τους κλασικούς Έλληνες συγγραφείς και γιατρούς της αρχαιότητας, οι οποίοι έγραψαν διάφορα συγγράμματα στα οποία αναφέρουν με πολλές λεπτομέρειες τις θεραπευτικές ιδιότητες και τον τρόπο χρήσης των φυτών. Οι πιο σημαντικοί από αυτούς είναι ο Ιπποκράτης, ο Αριστοτέλης, ο Θεόφραστος και ο Πλίνιος. Κεντρικό σημείο αναφοράς αποτελεί ο *Ιπποκράτης* (460 - 370 π.Χ.) που είναι σήμερα γνωστός ως πατέρας της ιατρικής, ο οποίος ταξινόμησε τα αρωματικά φυτά σύμφωνα με τις ιδιότητες των ουσιών τους ως θερμά ή ψυχρά, ξηρά ή υγρά. Ήταν ο πρώτος που αναζήτησε τα πραγματικά αίτια των ασθενειών, προσπαθώντας να τις θεραπεύσει με τη χρήση βοτάνων. Στα σωζόμενα έργα του αναφέρεται σε 237 είδη φυτών με τις φαρμακευτικές τους ιδιότητες, χωρίς δυστυχώς να τα περιγράφει. Ο *Δημόκριτος* (460 - 370 π.Χ.) την ίδια περίοδο έγραψε ένα έργο για τη Γεωπονία. Ο *Αριστοτέλης* (384 - 322 π.Χ.) διέθετε πλούσιο βοτανικό υλικό της Ελλάδας και της Ασίας οφειλόμενο στο Μέγα Αλέξανδρο (356 - 323 π.Χ.), μέσω των εκστρατειών του. Έχοντας τον τίτλο του Βοτανολόγου έγραψε το «Περί Φυτών» του οποίου μόνο αποσπάσματα διασώθηκαν, ενώ ίδρυσε Βοτανικό Κήπο όπου δίδονταν μαθήματα Βοτανικής. Επιπρόσθετα ο *Διοκλής ο Καρύστιος* (375 - 295 π.Χ.) έγραψε το *Ριζοτομικόν* που θεωρείται το αρχαιότερο φαρμακογνωστικό έργο και πηγή όλων των φαρμακολόγων. Αποσπάσματα του διασώθηκαν και θεωρείται πως χρησιμοποιήθηκαν για τα έργα των Θεόφραστου, Διοσκουρίδη και Πλινίου.

Λίγο αργότερα, ο *Θεόφραστος* (372 - 287 π.Χ.) με το έργο του «Περί Φυτών Ιστορίας» έθεσε τις βάσεις της σύγχρονης Βοτανικής, αφού για την περιγραφή και ταξινόμηση των φυτών βασίστηκε σε βιολογικές παρατηρήσεις. Μέσα στις τόσες άλλες πληροφορίες που δίνει ο Θεόφραστος ένα πολύ μεγάλο μέρος αφορά τις φαρμακευτικές και αρωματικές ιδιότητες των φυτών. Στο φυτολογικό λεξικό του Θεόφραστου, γίνεται μία λεπτομερής περιγραφή του είδους *Teucrium polium* και αναφέρεται ότι στη λαϊκή θεραπευτική χρησιμοποιείται για παθήσεις της αναπνευστικής οδού και για δερματικά προβλήματα.

Επίσης ο *Πεδάνιος Διοσκορίδης* (10 - 90 μ.Χ.), έγραψε το κλασικό κείμενο «Περί ύλης ιατρικής» (*De Materia Medica*) γύρω στο 60 μ.Χ., όπου περιελάμβανε πάνω από 600 θεραπευτικά φυτά και παρέμεινε σαν ένα πρότυπο εγχειρίδιο για 1500 χρόνια. Πολλές από τις δράσεις των φυτών αυτών είναι οικείες έως και σήμερα (<https://bit.ly/2LWwV6V>). Στο ίδιο σύγγραμμα ο Διοσκουρίδης περιγράφει το φυτό *B. acetabulosa* ως Ψευδοδίκταμο. Ο Γάιος Πλίνιος Σεκούνδος (23 - 79 μ.Χ.) στο

σύγγραμμά του «Φυσική Ιστορία» (το οποίο αποτελείται από 37 τόμους), στους τόμους 12 - 19 αναφέρεται στη βοτανική, ενώ στους τόμους 20 - 27 στη χρήση των φυτών στην ιατρική.

Παράλληλα κατά το *Μεσαίωνα* (476 - 1492 μ.Χ.) η διάδοση των γνώσεων πάνω στα αρωματικά/φαρμακευτικά φυτά και στις ιδιότητες τους μεταλαμπαδεύτηκε μέσω των Σταυροφόρων κατά την επιστροφή τους από τα ταξίδια τους στους Ιερούς Τόπους. Επιπλέον εκείνη την εποχή τα μοναστήρια ήταν κέντρα βοτανοθεραπείας. Είχαν ιδρύσει νοσοκομεία με ειδικούς κήπους για την καλλιέργεια φυτών, από τα οποία οι μοναχοί έφτιαχναν τα φαρμακευτικά ποτά, τα έλαια και τις αλοιφές που χρειάζονταν για τη θεραπεία των ασθενειών.

Κατά την περίοδο της Αναγέννησης (15^{ος} - 17^{ος} αιώνας), λόγω των συνθετικών φαρμάκων που άρχισαν να παρασκευάζονται, η χρήση των αρωματικών/φαρμακευτικών φυτών εγκαταλείφθηκε. Το 16^ο αιώνα ο *Παράκελσος* (1493 - 1541 μ.Χ.) (γιατρός και αλχημιστής) έφερε επανάσταση στις Ευρωπαϊκές απόψεις για τη φροντίδα της υγείας, υποστηρίζοντας την επιστροφή στα πιο απλά φάρμακα. Κατά το 16^ο και 17^ο αιώνα δημοσιεύθηκαν πολλά βοτανολόγια, που σκοπός τους ήταν να βοηθήσουν όσους ασχολούνταν ή φιλοδοξούσαν να ασχοληθούν με τη βοτανοθεραπεία και τη χρήση των φυτών.

Στη χώρα μας κατά την εποχή της Τουρκοκρατίας (1453 - 1821 μ.Χ.), η χρήση των φυτών αυτών ήταν, επίσης, πολύ διαδεδομένη. Τα αρωματικά/φαρμακευτικά φυτά χρησιμοποιούνταν σύμφωνα με διάφορες οικογενειακές παραδόσεις ή με τις οδηγίες των πρακτικών γιατρών (<https://bit.ly/2LWwV6V>). Το 18^ο αιώνα με την εμφάνιση της σύγχρονης επιστημονικής έρευνας, η βοτανική και η ιατρική διαχωρίστηκαν και το 19^ο αιώνα με την ανάπτυξη της Χημείας, η βοτανολογία εκτοπίστηκε εντελώς. (<https://bit.ly/3cYjEGR>). Σήμερα σε πολλές ανεπτυγμένες χώρες, καθώς οι καταναλωτές αναζητούν έναν πιο φυσικό και υγιεινό τρόπο ζωής, παρατηρείται μια αυξανόμενη τάση επιστροφής σε φαρμακευτικά προϊόντα προερχόμενα από αρωματικά/φαρμακευτικά φυτά.

IV.1.2 Αρωματικά - Φαρμακευτικά φυτά

Η διάκριση μεταξύ αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών δεν είναι ξεκάθαρη, καθώς πολλές φορές διαθέτουν και τις δύο ιδιότητες. Ο όρος αρωματικά αποδίδεται πρωτίστως σε φυτά που περιέχουν στους ιστούς τους αρωματικές ουσίες δηλαδή αιθέρια έλαια. Αυτά τα αιθέρια έλαια κάνουν τα φυτά να έχουν ευχάριστη για τον

άνθρωπο οσμή και οι χρήσεις αυτών συνδέονται με την παρασκευή αρωμάτων και άλλων εύοσμων προϊόντων και χρήση στη μαγειρική (αρτυματικά φυτά). Αντίθετα ο όρος φαρμακευτικά αποδίδεται σε φυτά που παράγουν μια ή περισσότερες δραστικές ενώσεις, οι οποίες χρησιμοποιούνται για την πρόληψη ή τη θεραπεία ασθενειών.

Τα αρωματικά/φαρμακευτικά φυτά λοιπόν αποτελούν τη βάση της υγειονομικής περιθάλψης σε όλο τον κόσμο από τις πρώτες ημέρες της ανθρωπότητας και εξακολουθούν να χρησιμοποιούνται ευρέως τόσο στις αναπτυσσόμενες όσο και στις αναπτυγμένες χώρες (Abbas, 2009, Taiga, 2009, Taiga and Friday, 2009, Hendawy *et al.*, 2010, Pacifico *et al.*, 2015). Συνιστά διαπίστωση γενικής αποδοχής ότι οι άνθρωποι σε όλο τον κόσμο χρησιμοποιούν μεταξύ 50.000 και 80.000 ανθοφόρων φυτών για ιατρικούς σκοπούς (Naguib, 2011). Αναλυτικότερα σύμφωνα με τον Παγκόσμιο Οργανισμό Υγείας (WHO 2004, 2007), τα αρωματικά/φαρμακευτικά φυτά είναι γνωστό ότι χρησιμοποιούνται από το 70% έως 80% του παγκόσμιου πληθυσμού για θεραπευτικούς σκοπούς (Prabuseenivasan and Jayakumar, 2006, Tere and Sokmen, 2007) και παρά το γεγονός ότι πολλά από αυτά έχουν αντικατασταθεί από συνθετικά φάρμακα, η ζήτηση για φυσικά προϊόντα συνεχώς αυξάνεται.

IV.1.3 Τα ελληνικά αρωματικά - φαρμακευτικά φυτά

Η Ελλάδα, σε σχέση με την έκτασή της, διαθέτει ιδιαίτερα πλούσιους φυτογενετικούς πόρους και έναν εξαιρετικά υψηλό αριθμό διαφορετικών φυτών. Σύμφωνα λοιπόν με νεότερα στοιχεία η χλωρίδα της Ελλάδας περιλαμβάνει 6.620 είδη αυτοφυή taxa (φυτικά είδη και υποείδη) τα οποία αντιστοιχούν στο 26% της μεσογειακής χλωρίδας (Dimopoulos *et al.*, 2013). Μεγάλο ποσοστό αυτών (περίπου 20%) είναι ενδημικά φυτά της Ελλάδας και πολλά είναι σπάνια ή χαρακτηρίζονται ως απειλούμενα (τρωτά, κινδυνεύοντα και κρίσιμως κινδυνεύοντα) (Dimopoulos *et al.*, 2013). Από αυτά τα 500 - 600 φυτά χαρακτηρίζονται ως αρωματικά/φαρμακευτικά. Εξάλλου οι εδαφοκλιματικές συνθήκες της χώρας μας ευνοούν ιδιαίτερα την ανάπτυξη αρωματικών/φαρμακευτικών φυτών και μάλιστα εξαιρετικής ποιότητας (Παπαναγιώτου *et al.*, 2001).

Η πλειονότητα των ελληνικών αρωματικών/φαρμακευτικών φυτών ανήκει στις οικογένειες Apiaceae, Asteraceae, Geraniaceae, Lamiaceae (Labiatae), Myrtaceae, Pinaceae και Rutaceae.

Ένας μεγάλος αριθμός ειδών είναι σπάνια και ενδημικά. Στη χώρα μας αυτοφύονται μερικά από τα πλέον εξαιρετικά είδη αρωματικών/φαρμακευτικών ειδών όπως: ο

βασιλικός (*Ocimum basilicum* L.), ο δίκταμος (*Origanum dictamnus* L.), το θυμάρι (*Thymus* sp.), η λεβάντα (*Lavandula* sp.), η μαντζουράνα (*Origanum majorana* L.), το μελισσόχορτο (*Melissa officinalis* L.), η μέντα (*Mentha piperita* L.), η ρίγανη (*Origanum* sp.), το τσάι του βουνού (*Sideritis* sp.), το φασκόμηλο (*Salvia officinalis* L.), το χαμομήλι (*Matricaria chamomilla* L.), και άλλα. Πολλά από αυτά τα είδη συλλέγονται απευθείας από το φυσικό περιβάλλον και διακινούνται στην αγορά με την αρχική τους μορφή π.χ. τσάι του βουνού, ρίγανη κ.τ.λ. και άλλα καλλιεργούνται, συλλέγονται και μεταποιούνται σε άλλες μορφές για να διανεμηθούν στην αγορά π.χ. η λεβάντα.

Σύμφωνα με στοιχεία του Υπουργείου Αγροτικής Ανάπτυξης και Τροφίμων (Υπ.Α.Α.Τ., 2018) η καλλιεργούμενη έκταση με αρωματικά φυτά στην Ελλάδα κατά το έτος 2016 και 2017 ανήλθε σε 99.6311 και 110.826 στρέμματα αντίστοιχα. Τα τελευταία χρόνια, κυρίως στις οικονομικά αναπτυγμένες χώρες παρατηρείται μια αυξανόμενη τάση στη ζήτηση φαρμάκων, καλλυντικών και γενικά προϊόντων που περιέχουν φυσικά συστατικά, κυρίως φυτικής προέλευσης.

Συμπερασματικά τα αρωματικά/φαρμακευτικά φυτά μπορούν να χρησιμοποιηθούν είτε ως χλωρό ή ξηρό φυτικό υλικό, είτε ως παραλαμβανόμενο αιθέριο έλαιο. Οι κύριες χρήσεις των αρωματικών/φαρμακευτικών ειδών, αλλά και των αιθερίων ελαίων ή άλλων βιοδραστικών συστατικών τους είναι: α) στη μαγειρική (σαν αφεψίματα, βότανα, καρκεύματα και μπαχαρικά) είτε φρέσκα ή αποξηραμένα, β) στη ζαχαροπλαστική – ποτοποιία – βιομηχανία τροφίμων (σαν αρωματικά, βελτιωτικά γεύσης αρώματος), γ) στην αρωματοποιία (σε καλλυντικά), δ) στην ιατρική (σαν συστατικά σκευασμάτων), ε) μελισσοκομία (παραγωγή μελιού από της μέλισσες) και ζ) στην αρχιτεκτονική τοπίου (σε βραχόκηπους, κήπους, φυτοδώματα κ.ά.) (Κατσιώνης και Χατζοπούλου, 2010). Σημαντικές δυνατότητες αξιοποίησης των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών έχουν να κάνουν με τη λήψη φυτικών χρωστικών ουσιών (π.χ. φλαβονοειδή, καροτενοειδή κ.λπ.) και έχουν ως κυριότερη χρήση την αντικατάσταση συνθετικών χρωστικών στη χρώση τροφίμων.

IV.1.4 Παράγοντες που επηρεάζουν την παραγωγή και τη σύσταση των αιθερίων ελαίων στα φυτά

Η απόδοση και η ποιότητα του αιθερίου ελαίου ενός φυτού επηρεάζεται από μια σειρά παραγόντων. Οι σημαντικότεροι εξ' αυτών είναι το είδος του φυτού, οι κλιματικές συνθήκες, η εποχή συλλογής, το στάδιο ανάπτυξης κατά τη συλλογή, τα διαφορετικά τμήματα του φυτού που συλλέγονται και τέλος η μέθοδος παραλαβής του αιθερίου ελαίου (Lahlou, 2004, Figueiredo *et al.*, 2008, Brenes and Roura, 2010).

Τα δεδομένα της βιβλιογραφίας υποδεικνύουν σαφώς την παρουσία ενός αξιοσημείωτου χημικού πολυμορφισμού και μιας μεγάλης ενδοειδικής παραλλακτικότητας. Ορισμένοι συγγραφείς παρατήρησαν ότι η σύσταση του αιθερίου ελαίου φάνηκε να είναι ανεξάρτητη από τη γεωγραφική προέλευση του δείγματος (Baldovini *et al.*, 2000, Fathi and Sefidkon, 2012), ενώ άλλοι ανέφεραν μια ισχυρή χημική παραλλακτικότητα της σύστασής του ανάλογα με τη γεωγραφική προέλευση των δειγμάτων (Marongiu *et al.*, 2010, Teles *et al.*, 2013), καθώς και τις περιβαλλοντικές συνθήκες στη φύση (Mahmoud and Croteau, 2003, Ait-Ouazzou *et al.*, 2012, Čavar *et al.*, 2013). Πιο συγκεκριμένα, οι Cook *et al.* (2007) μελέτησαν τη σύσταση αιθερίου ελαίου της *Calamintha glandulosa* από το νησί της Ζακύνθου. Έκαναν ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό αιθερίου ελαίου από διάφορα φυτικά όργανα (π.χ. φύλλα, βλαστούς, ταξιανθίες) αλλά και διερεύνησαν την επίδραση της περιόδου ανάπτυξης του φυτού (περίοδος ανάπτυξης και περίοδος ανθοφορίας). Από την έρευνα αυτή παρατηρήθηκαν διαφορές στο ποσοστό των κύριων συστατικών μεταξύ των αιθερίων ελαίων από τα διάφορα όργανα του φυτού στο ίδιο αναπτυξιακό στάδιο, καθώς και μεταξύ των ίδιων οργάνων σε διαφορετικές περιόδους ανάπτυξης. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί από τους Kizil *et al.* (2008) σε ένα είδος ρίγανης (*Origanum onites*) και από τους Ait-Ouazzou *et al.* (2012) σε ένα είδος μέντας (*Mentha pulegium*). Τέλος πολλές βιβλιογραφικές αναφορές έχουν αναφερθεί στην επίδραση των διαφόρων μεθόδων αποξήρανσης και απόσταξης τόσο στην απόδοση όσο και στη σύσταση του αιθερίου ελαίου των φυτών (Riela *et al.*, 2008, Tibaldi *et al.*, 2013, Wong *et al.*, 2014).

IV.1.5 Ο ρόλος των αιθερίων ελαίων

Τα αιθέρια έλαια έχουν χρησιμοποιηθεί από την αρχαιότητα τόσο για θεραπευτικούς όσο και για καλλωπιστικούς λόγους. Μέχρι το 1940 ο κύριος ρόλος των αιθερίων ελαίων ήταν στο να αρωματίζουν τα σύνθετα (χημικά) φάρμακα, τα οποία είχαν αντικαταστήσει τα παραδοσιακά βότανα. Σήμερα, τα αιθέρια έλαια έχουν λάβει μεγάλη προσοχή ως δυνητικά χρήσιμες βιοδραστικές ενώσεις με ιδιαίτερη έμφαση στις αντιμικροβιακές, κυτταροστατικές και εντομοκτόνες δραστηριότητές τους. Τα αιθέρια έλαια παράγονται από διάφορα αρωματικά φυτά, τα οποία γενικά εντοπίζονται σε εύκρατες και θερμές περιοχές, όπως οι μεσογειακές και τροπικές χώρες, όπου αντιπροσωπεύουν ένα σημαντικό μέρος της παραδοσιακής φαρμακοποιίας (Bakkali *et al.*, 2008).

Έχουν χρησιμοποιηθεί ευρέως ως αρώματα τροφίμων (Burt, 2004) και λόγω των αντιοξειδωτικών, αντιμικροβιακών και αντιβακτηριακών τους ιδιοτήτων αποτέλεσαν τη βάση πολλών εφαρμογών, συμπεριλαμβανομένης της επεξεργασίας ακατέργαστων και επεξεργασμένων τροφίμων, των φαρμακευτικών προϊόντων, της εναλλακτικής ιατρικής και των φυσικών θεραπειών (Kalemba and Kunicka, 2003, Reichling *et al.*, 2009, Pietrella *et al.*, 2011, Naveed *et al.*, 2013, Iqbal *et al.*, 2013, Tongnuanchan and Benjakul, 2014). Επιπλέον τα αιθέρια έλαια έχουν βιολογικές δραστηριότητες που τα καθιστούν ικανά για να χρησιμοποιηθούν ως ζιζανιοκτόνα, εντομοκτόνα και εντομοαπωθητικά (Mahmoud and Croteau, 2002, Abraham, *et al.*, 2003, Burfield and Reekie, 2005, Waliwitiya *et al.*, 2009, Dhingra *et al.*, 2011).

IV.1.6 Μέθοδοι παραλαβής αιθερίων ελαίων

Η παραλαβή των αιθερίων ελαίων από τα φυτά μπορεί να επιτευχθεί με διάφορες τεχνικές απόσταξης, όπως: απόσταξη με ατμό (steam distillation-SD), υδροαπόσταξη (hydrodistillation-HD), μικροαπόσταξη με υδρατμούς εκχύλισης με οργανικό διαλύτη (microsteam distillation-MSDE), απόσταξη με κενό (vacuum head space distillation-VHSD), με μικροκύματα (microwave assisted extraction-MAE) και με έκθλιψη (expression) του φυτού ή μέρους αυτού (Bicchi, 2000).

IV.1.6.1 Υδροαπόσταξη

Από όσες προαναφέρθηκαν η υδροαπόσταξη είναι η μέθοδος που χρησιμοποιείται κατά κύριο λόγο σε εργαστηριακή κλίμακα. Η συσκευή της υδροαπόσταξης η οποία χρησιμοποιείται μέχρι και σήμερα, ονομάζεται Clevenger από το όνομα αυτού που τη

σχεδίασε το 1928. Το προς απόσταξη φυτικό υλικό (π.χ. άνθη, βλαστοί, καρποί κτλ.) τοποθετείται σε σφαιρική φιάλη με αποσταγμένο νερό. Όταν αρχίσει ο βρασμός οι σχηματιζόμενοι υδρατμοί, οι οποίοι αποτελούν ένα μίγμα αιθερίου ελαίου και ατμού συμπυκνώνονται όταν περάσουν από τον ψυκτήρα και είναι έτοιμοι προς συλλογή.

IV.1.7 Ποιοτικός – Ποσοτικός προσδιορισμός συστατικών αιθερίων ελαίων

Για τον ποιοτικό και ποσοτικό προσδιορισμό συστατικών αιθερίων ελαίων συνήθως χρησιμοποιείται η αέρια χρωματογραφία – φασματοσκοπία μάζας (GC-MS) (Keravis, 1997, Marston and Hostetmann, 2009).

IV.1.7.1 Αέρια χρωματογραφία – φασματοσκοπία μάζας (GC-MS)

Η αέρια χρωματογραφία – φασματοσκοπία μάζας (GC-MS) είναι μια αναλυτική μέθοδος που συνδυάζει τα χαρακτηριστικά της αέριας χρωματογραφίας και της φασματοσκοπίας μάζας για τον εντοπισμό διαφόρων ουσιών (Sparkman *et al.*, 2011).

Έτσι η σύζευξη της αέριας χρωματογραφίας με τη φασματοσκοπία μάζας (GC-MS) σχηματίζει ένα όργανο που επιτρέπει τον ικανοποιητικό διαχωρισμό των μιγμάτων στα επιμέρους συστατικά τους και στη συνέχεια παρέχει ποιοτικές και ποσοτικές πληροφορίες σχετικά με τη χημική δομή της κάθε ένωσης (Kite *et al.*, 2003, Amigo *et al.*, 2008, McMaster, 2008, Singh *et al.*, 2012).

Αναλυτικότερα, η GC-MS παρέχει τη δυνατότητα: 1) ταυτοποίησης και ποσοτικού προσδιορισμού πτητικών και ημι-πτητικών οργανικών ενώσεων σε πολύπλοκα μίγματα, 2) προσδιορισμού του μοριακού βάρους των οργανικών ενώσεων σε πολύπλοκα μίγματα, 3) το συντακτικό προσδιορισμό άγνωστων οργανικών ενώσεων σε πολύπλοκα μίγματα με τη δυνατότητα αντιστοίχισης με τα φάσματα αναφοράς (Hites, 1997).

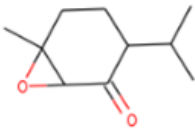
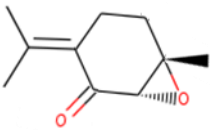
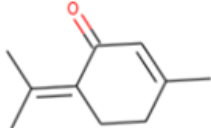
IV.1.8 Χημική σύσταση του αιθερίου ελαίου του *Clinopodium creticum*

Στη βιβλιογραφία υπάρχει μόνο μια αναφορά σχετικά με τη σύσταση του αιθερίου ελαίου του είδους *C. creticum*, στην οποία ανιχνεύτηκαν 38 ενώσεις (Karouzou *et al.*, 1996). Οι κυριότερες χημικές ενώσεις που βρέθηκαν ήταν το εποξειδίο της πιπεριτόνης (συν. οξειδίο της πιπεριτόνης), το εποξειδίο της πιπεριτενόνης (συν. οξειδίο της πιπεριτενόνης) και η πιπεριτενόνη (Πίν. IV.1).

Στο *C. creticum* υπάρχει ένας αξιοσημείωτος χημικός πολυμορφισμός και μεγάλη ενδοειδική παραλλακτικότητα (Karousou *et al.*, 1996). Πιο συγκεκριμένα οι Karousou

et al. (1996) στην έρευνά τους ανέλυσαν δείγματα *C. creticum* από τρεις διαφορετικές περιοχές του Νομού Χανίων της Κρήτης (φαράγγι της Σαμαριάς, του Ίμπρου και του Ίλιγγα). Εκτός από τις διαφορές στο συνολικό αριθμό των ενώσεων που ανιχνεύτηκαν και στους τρεις πληθυσμούς, η κύρια χημική ομάδα ήταν τα οξυγονωμένα μονοτερπένια με κύριους εκπροσώπους το εποξειδίο της πιπεριτόνης (33,8 - 59,9%), το εποξειδίο της πιπεριτενόνης (26,4 - 41,3%) και η πιπεριτενόνη σε πολύ μικρότερες ποσότητες (15 - 17,8%). Αναλυτικότερα στον πληθυσμό από το φαράγγι της Σαμαριάς το εποξειδίο της πιπεριτόνης βρέθηκε σε συγκέντρωση 35,4%, το εποξειδίο της πιπεριτενόνης 29,8% και η πιπεριτενόνη 17,8%. Επίσης στο αιθέριο έλαιο του πληθυσμού που αυτοφύεται στο φαράγγι του Ίμπρου το υψηλότερο ποσοστό ανιχνεύτηκε στο εποξειδίο της πιπεριτόνης (59,9%) και ακολούθησε το εποξειδίο της πιπεριτενόνης σε ποσοστό 26,4%. Αντίθετα η πιπεριτενόνη ανιχνεύτηκε σε πολύ χαμηλό ποσοστό (1,5%). Ενώ στον πληθυσμό από το φαράγγι του Ίλιγγα το υψηλότερο ποσοστό ανιχνεύτηκε στο εποξειδίο της πιπεριτενόνης (41,3%), ακολούθησαν το εποξειδίο της πιπεριτόνης και η πιπεριτενόνη με ποσοστά 33,8% και 12,2% αντίστοιχα.

Πίνακας IV.1. Οι χημικές δομές, οι χημικοί τύποι, τα ονόματα, το μοριακό βάρος και οι αριθμοί CAS κάποιων από τα πιο κοινά συστατικά του αιθερίου ελαίου του *C. creticum*.

Χημική δομή	Χημική Ονομασία	Χημικός τύπος	Μοριακό Βάρος	Αριθμός CAS
	Piperitone epoxide	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	168.236	5286-38-4
	Piperitenone epoxide	C ₁₀ H ₁₄ O ₂	166.220	35178-55-3
	Piperitenone	C ₁₀ H ₁₄ O	150.221	35178-55-3

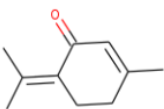
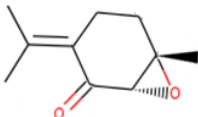
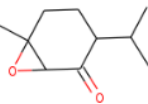
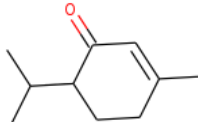
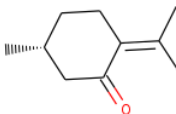
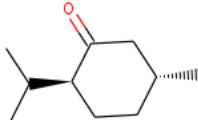
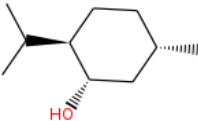
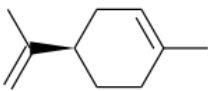
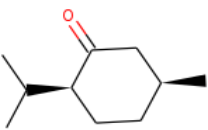
Πηγή: <https://www.chemeo.com> και <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

IV.1.9 Χημική σύσταση του αιθερίου ελαίου του *Clinopodium nepeta*

Τα στοιχεία της βιβλιογραφίας σχετικά με τη σύσταση του αιθερίου ελαίου του *C. nepeta* υποδεικνύουν σαφώς την ύπαρξη ενός αξιοσημείωτου χημικού πολυμορφισμού και μεγάλης ενδοειδικής παραλλακτικότητας. Η σύσταση αιθερίου ελαίου άλλοτε φαίνεται να είναι ανεξάρτητη της γεωγραφικής προέλευσης του δείγματος (Baldovini *et al.*, 2000, Karousou *et al.*, 2012) και άλλοτε αναφέρεται ισχυρή χημική παραλλακτικότητα ανάλογα με την προέλευση των δειγμάτων (Marongiu *et al.*, 2010) και τις περιβαλλοντικές συνθήκες στο χώρο που αναπτυσσόταν το μητρικό φυτό από όπου λαμβάνονταν τα δείγματα (Ćavar *et al.*, 2013). Οι χημειότυποι που περιγράφονται είναι ποικίλοι, αλλά τα κύρια συστατικά του αιθερίου ελαίου γενικά ανήκουν στα C-3 οξυγονωμένα παράγωγα π-μεθανίου όπως η πουλεγόνη, μενθόνη, ισομενθόνη, και πιπεριτόνη και πιπεριτενόνη με τα οξείδια τους ή, πιο σπάνια, στις C-6 οξυγονωμένες π-μεθανίου ενώσεις όπως η καρβόνη και τα παραγωγά της (Πίν. IV.2) (Ćavar *et al.*, 2013, Formisano *et al.*, 2007). Με βάση τη βιβλιογραφία διακρίνονται τουλάχιστον τρεις χημειότυποι ελαίων, με ορισμένες εξαιρέσεις:

- (I) Ο πρώτος και ο πιο άφθονος αποτελείται από την πουλεγόνη ως το κύριο συστατικό που συνδέεται με άλλες ενώσεις. Δύο βασικές παραλλαγές αυτού του χημειότυπου μπορούν να οριστούν ως εξής: (1) από πουλεγόνη και μενθόνη ή/και ισομενθόνη, μενθόλη και τα ισομερή του και (2) η πουλεγόνη συνδέεται με πιπεριτενόνη ή με τα οξείδια της πιπεριτόνης και της πιπεριτενόνης
- (II) Ο δεύτερος χημειότυπος μπορεί να θεωρηθεί ως το εποξείδιο της πιπεριτόνης ή εποξείδιο της πιπεριτόνης / εποξείδιο της πιπεριτενόνης. Μία παραλλαγή πιπεριτόνης/πιπεριτενόνης αυτού του χημειότυπου έχει αναφερθεί μόνο για ένα φυτικό υλικό προερχόμενο από την Κροατία (Ćavar *et al.*, 2013).
- (III) Τέλος, ο πιο σπάνιος διακρίνεται από την παρουσία καρβόνης και 1,8-cineole.

Πίνακας IV.2. Οι χημικές δομές, οι χημικοί τύποι, τα ονόματα, το μοριακό βάρος και οι αριθμοί CAS κάποιων από τα πιο κοινά συστατικά του αιθερίου ελαίου του *C. nepeta*.

Χημική δομή	Χημική Ονομασία	Χημικός τύπος	Μοριακό Βάρος	Αριθμός CAS
	piperitenone	C ₁₀ H ₁₄ O	150.22	491-09-8
	piperitenone epoxide	C ₁₀ H ₁₄ O ₂	166.22	35178-55-3
	piperitone epoxide	C ₁₀ H ₁₆ O ₂	168.236	5286-38-4
	piperitone	C ₁₀ H ₁₆ O	152.23	89-81-6
	pulegone	C ₁₀ H ₁₆ O	152.23	89-82-7
	menthone	C ₁₀ H ₁₈ O	154.25	14073-97-3
	Menthol	C ₁₀ H ₂₀ O	156.27	15356-70-4
	<i>D</i> -limonene	C ₁₀ H ₁₆	136.23	5989-27-5
	Isomenthone	C ₁₀ H ₁₈ O	154.25	18309-28-9

Πηγή: <https://www.chemo.com> και <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>

Φυτικό υλικό από την Ελλάδα έχει βρεθεί ότι έχει πολύ μεταβλητή σύσταση. Οι Souleles *et al.* (1987) σε δείγματα *C. nepeta* από τη Λευκάδα ανίχνευσαν πουλεγόνη σε ποσοστό 39,7%, μενθόνη (24,7%) και ισομενθόνη (25,6%). Τρία χρόνια μετά οι Kokkalou and Stefanou (1990) ανίχνευσαν τουλάχιστο 46 ενώσεις στο αιθέριο έλαιο του *C. nepeta*, ως σημαντικά συστατικά βρέθηκαν δύο διαστερεοϊσομερή του οξειδίου της πιπεριτόνης (55%) και της -μπισαμπολόλης (8,5%).

Επιπλέον μια άλλη μελέτη παρουσίασε ως σημαντικά συστατικά την πουλεγόνη (41,0%), μενθόνη (32,0%), πιπεριτόνη (7,3%) και την πιπεριτενόνη (7,0%) (Couladis and Tzakou 2001), ενώ δύο χημειότυποι έχουν σημειωθεί από άλλους ερευνητές (Karousou *et al.*, 2012). Ο πρώτος ήταν πλούσιος σε πουλεγόνη και/ή μενθόνη και/ή ισομενθόνη, το άθροισμα των ποσοστών αυτών των τριών κετονών κυμαινόταν από 56,8% έως 89,9%. Ο δεύτερος χημειότυπος βρέθηκε να είναι πλούσιος σε cis- και trans-οξείδια της πιπεριτόνης και/ή οξείδια της πιπεριτενόνης και το άθροισμα αυτών των τριών οξειδίων κυμάνθηκε από 65,5% έως 90,0%. Έχει αναφερθεί επίσης η συνύπαρξη δύο χημειοτύπων στον ίδιο πληθυσμό (Ενδο-πληθυσμιακή μεταβολή) για φυτικά δείγματα από το νησί της Ζακύνθου (Cook *et al.*, 2007). Οι C-3 οξυγονωμένες π-μενθανίου ενώσεις και το πρόδρομο λιμονένιο τους αποτελούσαν το 68,8% έως 92,8% του αιθερίου ελαίου. Τα κύρια συστατικά του πρώτου χημειοτύπου ήταν η πουλεγόνη, μενθόνη, πιπεριτενόνης και πιπεριτόνης, ενώ τα cis- και trans- οξείδια της πιπεριτόνης, το λιμονένιο και το εποξείδιο της πιπεριτενόνης σημειώθηκαν για το δεύτερο χημειότυπο. Η μελέτη περιελάμβανε διάφορα φυτικά όργανα (ταξιανθίες, φύλλα και στελέχη) και διαφορετικές περιόδους ανάπτυξης του φυτού (περίοδος βλάστησης / περίοδος ανθοφορίας). Διαφορές παρατηρήθηκαν στο ποσοστό των κύριων συστατικών μεταξύ των αιθερίων ελαίων από τα διάφορα όργανα του φυτού στο ίδιο αναπτυξιακό στάδιο, καθώς και μεταξύ των ίδιων οργάνων σε διαφορετικές περιόδους ανάπτυξης.

IV.1.10 Πουλεγόνη-Η κύρια χημική ένωση αιθερίου ελαίου του *C. nepeta*

Η (R)-5-Methyl-2-(1-methylethylidene) cyclohexanone είναι μια μονοτερπενική κετόνη, γνωστή ως πουλεγόνη, απαντάται φυσικά στα φυτά της οικογένειας Lamiaceae και η περιεκτικότητά της σε διάφορα έλαια ποικίλλει ανάλογα με τους διάφορους παράγοντες όπως, η προέλευση του φυτού, οι ετήσιες καιρικές συνθήκες, η εποχή συλλογής, η ηλικία του μητρικού φυτού, η περίοδος ανθοφορίας, τη θέση και το χρόνο φύτευσης (Kumar *et al.*, 2000, Lawrence, 2006).

Η πουλεγόνη απομονώθηκε για πρώτη φορά από το αιθέριο έλαιο της *Mentha pulegium* L. (Baser *et al.*, 1998). Είναι πρακτικά αδιάλυτη σε νερό αλλά αναμίξιμη με αιθανόλη, διαιθυλαιθέρα και χλωροφόρμιο. Δύο εναντιομερή απαντώνται στη φύση, ενώ η R-(+)-μορφή είναι η πιο άφθονη στα αιθέρια έλαια (Lawrence, 2006, Barceloux, 2008). Βιογενετικά, η πουλεγόνη προέρχεται από το τερπινολένιο μέσω της πιπεριτενόνης. Είναι επίσης ο πρόδρομος της μενθόνης και της ισομενθόνης (Σχ. IV.1). Γενικά απαντάται σε συνδυασμό με μία ή περισσότερες από τις προαναφερθείσες ενώσεις ή την άμεση πρόδρομη πιπεριτενόνη (Perez-Alonso *et al.*, 1992).

Επιπλέον η πουλεγόνη θεωρείται ως ένα από τα σημαντικότερα κοινά συστατικά του αιθερίου ελαίου του *C. nepeta* (Demirci *et al.*, 2011, Cook *et al.*, 2007, Baldovini *et al.*, 2000, Tibaldi *et al.*, 2013, Marongiu *et al.*, 2010, Araniti *et al.*, 2012), όπου μπορεί να φτάσει μέχρι και 85% (Božović *et al.*, 2017). Σε συνδυασμό με τη μενθόνη, αντιπροσωπεύει το πιο συχνό χημειότυπο στα αιθέρια έλαια αυτού του είδους, με σαφή διαφορά στην αναλογία τους ανάλογα με το στάδιο ανάπτυξης του φυτού. Εκτός από το *C. nepeta*, η πουλεγόνη μπορεί επίσης να αποτελέσει σημαντικό συστατικό των αιθερίων ελαίων και για άλλα είδη *Clinopodium*, όπως το *C. sylvatica* Bromf (Burzo *et al.*, 2006, Bensouici *et al.*, 2013), το *C. grandiflora* (L.) Moench (Souleles and Argyriadou, 1990) και το *C. pamphylica* Boiss. Et Heldr. (Baser, 2002, Alan *et al.*, 2011).

Η πουλεγόνη είναι κύριο συστατικό του αιθερίων ελαίου για πάρα πολλά είδη μέντας, όπως για παράδειγμα της *Mentha pulegium* L. (Zekri *et al.*, 2013, Sardashti and Adhami, 2013, Rocha *et al.*, 2015) και της *M. longifolia* (L.) Hudson (Salman *et al.*, 2015). Επιπλέον ορισμένα είδη *Micromeria* και *Satureja* έχουν αναφερθεί ως πλούσια πηγή πουλεγόνης, όπως για παράδειγμα η *Micromeria thymifolia* (Scop.) Fritsch (Marinković *et al.*, 2003), η *Satureja brownei* (Sw.) Briq. (Rojas and Usubillaga, 2000), η *S. glabella* (Michx.) Briq. και *S. Darwinii* (Benth.) Briq. (Niemeyer, 2010).

Οι συγγραφείς κατέληξαν στο συμπέρασμα ότι η αντιμικροβιακή και αντιβακτηριακή δραστηριότητα των ειδών *Clinopodium* φαίνεται να οφείλεται στις μονοτερπενικές ενώσεις του ελαίου (Adzet and Passet, 1972). Ενώ τα τελευταία χρόνια έχει αποδείχθηκε ότι η πουλεγόνη, αυτό το οξυγονωμένο μονοτερπένιο παρουσιάζει πολλές διαφορετικές βιολογικές δραστηριότητες ως αντιμικροβιακό (Dhingra *et al.*, 2011, González-Chávez *et al.*, 2011), αντισταμινικό (De Urbina *et al.*, 1990), σπασμωδικό (Umezū, 2010, De Sousa *et al.*, 2011) και ηπατοτοξικό (Bruneton, 2009, Peixoto *et al.*, 2016) μεταξύ άλλων. Αναφέρεται επίσης ότι η πουλεγόνη έχει

εντομοκτόνες, εντομοαπωθητικές (Dhingra *et al.*, 2011, Waliwitiya *et al.*, 2009) και αντιπαρασιτικές (Oka *et al.*, 2000) ιδιότητες.

Συνοψίζοντας η πουλεγόνη έχει αναγνωρισθεί ως Generally Recognized as Safe status (GRAS) από τη διεθνή Υπηρεσία Τροφίμων και Φαρμάκων από το 1965. Επιπλέον έχει συμπεριληφθεί από το Συμβούλιο της Ευρώπης το 1974 στον κατάλογο των τεχνητών αρωματικών ουσιών που μπορούν να προστεθούν προσωρινά στα τρόφιμα χωρίς κίνδυνο για τη δημόσια υγεία (Baser *et al.*, 1998). Ως εκ τούτου, χρησιμοποιείται εμπορικά ευρέως ως αρωματικός παράγοντας στην αρωματοποιία ως βασικό συστατικό για τα αρώματα και για διάφορα φαρμακευτικά προϊόντα, αλλά για την παρασκευή οδοντόκρεμας και στοματικού διαλύματος (Dhingra *et al.*, 2011).

IV.1.11 Εποξειδίο της πιπεριτόνης – Η κύρια χημική ένωση αιθερίου ελαίου του *C. creticum*

Η 7-Oxabicyclo[4.1.0]heptan-2-one, 6-methyl-3-(1-methylethyl)-, γνωστή ως εποξειδίο της πιπεριτόνης, συν. οξειδίο της πιπεριτόνης, είναι επίσης μια μονοτερπενική κετόνη παρόμοια με την πουλεγόνη.

Οι Karousou *et al.* (1996) στην έρευνά τους ανέλυσαν δείγματα *C. creticum* από τρεις διαφορετικές περιοχές στα Λευκά όρη του Νομού Χανίων της (φαράγγι της Σαμαριάς, του Ίμπρου και του Ίλιγγα). Και στις τρεις περιοχές το εποξειδίο της πιπεριτόνης βρέθηκε σε υψηλά ποσοστά από 33,8 έως 59,9%. Ενώ το 2012 οι Karousou *et al.* μελέτησαν τη σύσταση τριών ειδών *Calmintha*, το *C. glandulosa* το *C. nepeta* και το *C. menthifolia*, στα οποία επίσης βρέθηκε οξειδίο της πιπεριτόνης. Συγκεκριμένα, στο *C. glandulosa* το ποσοστό του cis οξειδίου της πιπεριτόνης βρέθηκε μέχρι και 78,8%, υψηλό ποσοστό βρέθηκε και στο *C. menthifolia* (μέχρι 88,2%), ενώ στο *C. nepeta* ήταν πολύ χαμηλό (μέχρι 5,2%). Αντίθετα το ποσοστό του trans οξειδίου της πιπεριτόνης βρέθηκε υψηλό στο *C. nepeta* (μέχρι 77,1%) και πολύ χαμηλό στα *C. menthifolia* και *C. glandulosa*.

Επιπλέον σε φυτικό υλικό *C. nepeta* (L.) Savi subsp. *glandulosa* από τη Λευκάδα, ως κύριο συστατικό ανιχνεύτηκε το εποξειδίο της πιπεριτόνης με ποσοστό (55%) (Kokkalou and Stefanou, 1990). Επιπροσθέτως *C. nepeta* ssp. *glandulosa* από τη Σερβία και την Αλγερία βρέθηκε να περιέχει 59% και 22% αντίστοιχα εποξειδίο της πιπεριτόνης (Miladinović *et al.*, 2012, Labiod *et al.*, 2015). Ενώ το *C. nepeta* ssp. *glandulosa* από διάφορες περιοχές του Βελγίου βρέθηκε να περιέχει εποξειδίο της πιπεριτόνης από 30,8 έως 74,2% (De Pooter *et al.*, 1986a, 1986b, 1987). Επίσης

δείγματα *C. nepeta* (L.) Savi. από τη Δαλματία κοντά στο Split, έχει βρεθεί ότι περιέχει μονοτερπενικά οξείδια όπως το εποξείδιο της πιπεριτόνης σε ποσοστό 46,0%, το εποξείδιο της πιπεριτενόνης σε ποσοστό 12,7% και το λιμονένιο σε ποσοστό 10,9% (Mastelić *et al.*, 1998).

Σε σύγκριση με την πουλεγόνη και με το εποξείδιο της πιπεριτενόνης, το εποξείδιο της πιπεριτόνης δεν διαθέτει τον επιπλέον κυκλικό διπλό δεσμό μεταξύ C4 και C7, με αποτέλεσμα τη μείωση της αντιμικροβιακής δραστηριότητας αυτής της ένωσης. (Oumzil *et al.*, 2002).

IV.1.12 Εποξείδιο της πιπεριτενόνης - Μία από τις κύριες χημικές ενώσεις των αιθερίων ελαίων του *C. nepeta* και *C. creticum*

Το εποξείδιο της πιπεριτενόνης, συν. οξείδιο της πιπεριτενόνης, είναι ένα σημαντικό χημικό συστατικό των αιθερίων ελαίων του γένους *Clinopodium*. Αυτό το οξυγονωμένο μονοτερπένιο παρουσιάζει ενδιαφέρουσες δραστηριότητες, συμπεριλαμβανόμενες των καρδιαγγειακών (Lahlou *et al.*, 2001), αντιμικροβιακών (Zekri *et al.*, 2013, Arruda *et al.*, 2006), και εντομοκτόνων (Tripathi *et al.*, 2004, Boughdad *et al.*, 2011).

Ορισμένα είδη *Clinopodium* αναγνωρίζονται ως αρκετά πλούσια σε εποξείδιο της πιπεριτενόνης. Για παράδειγμα, δείγματα *C. nepeta* από τη Σαρδηνία, την Πίζα και τη Liguria (Βόρεια Της Ιταλίας) χαρακτηρίστηκαν από την υψηλή περιεκτικότητα σε εποξείδιο της πιπεριτενόνης (19,1%, 22% και 14,9% αντίστοιχα) (Marongiu *et al.*, 2010, Panizzi *et al.*, 1993, Perrucci *et al.*, 1994), ενώ *C. nepeta* ssp. *glandulosa* από το Βέλγιο βρέθηκε να περιέχει μέχρι και 52% εποξείδιο της πιπεριτενόνης (De Pooter *et al.*, 1986, 1987, Krimer *et al.*, 1992).

Η έρευνα των Couladis and Tzakou (2001) με φυτικό υλικό ελληνικής προέλευσης του *C. nepeta* ssp. *glandulosa* έδειξε την πιπεριτόνη (7,3%) και την πιπεριτενόνη (7%) ως δευτερεύον σημαντικά συστατικά. Λίγα χρόνια μετά οι Cook *et al.* (2007) αναφέρουν τη συνύπαρξη δύο χημειοτύπων στο *C. nepeta* ssp. *glandulosa* από το νησί της Ζακύνθου (Ενδο-πληθυσμιακή μεταβολή). Στον πρώτο χημειότυπο τα κύρια συστατικά ήταν η πουλεγόνη, η μενθόνη, η πιπεριτενόνη και η πιπεριτόνη, ενώ στο δεύτερο τα οξείδια cis- και trans- πιπεριτόνης, το λιμονένιο και το εποξείδιο της πιπεριτενόνης.

Εκτός από το *C. nepeta*, το εποξειδίο της πιπεριτενόνης μπορεί επίσης να αποτελέσει σημαντικό συστατικό των αιθερίων ελαίων και για άλλα είδη *Calamintha*, όπως στο *C. incana* από την Τουρκία (66,6%) (Tümen *et al.*, 1995).

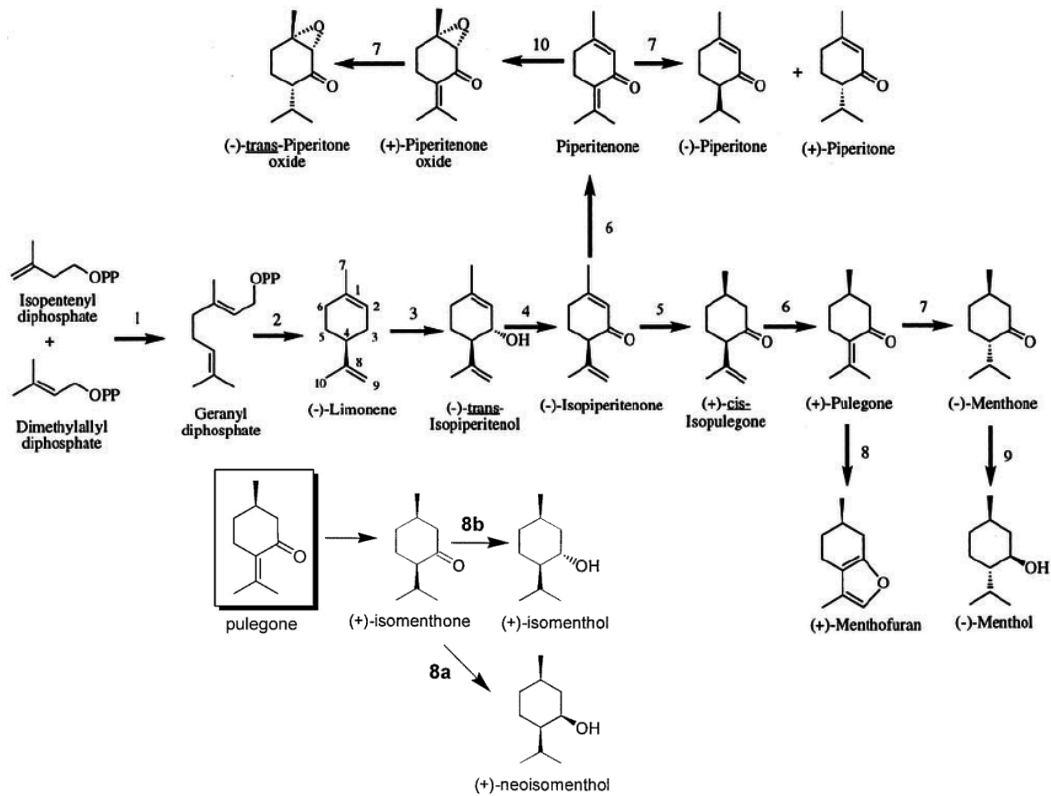
Το εποξειδίο της πιπεριτενόνης είναι κύριο συστατικό του αιθερίων ελαίου για πάρα πολλά είδη μέντας, όπως για παράδειγμα της *Mentha x villosa* (Teles *et al.*, 2013, Lima *et al.*, 2014), της *M. microphylla* (Tomei *et al.*, 2003), της *M. spicata* (Pavela *et al.*, 2014, Oray *et al.*, 2013, Padalia *et al.*, 2013) και της *M. rotundifolia* (Riahi *et al.*, 2013). Η ανάλυση του αιθερίου ελαίου της *M. longifolia* έδειξε επίσης σημαντική ποσότητα σε εποξειδίο της πιπεριτενόνης (Hussain *et al.*, 2010, Iqbal *et al.*, 2013, Pavela *et al.*, 2014). Τέλος το αιθέριο έλαιο της *M. aquatica* var. *crispa* από το Νότιο Βιετνάμ αναγνωρίστηκε επίσης ως πλούσιο σε εποξειδίο της πιπεριτενόνης (έως και 91,2%) (Thach *et al.*, 2013).

Σύμφωνα με πρόσφατες έρευνες, το εποξειδίο της πιπεριτενόνης είναι επίσης το κύριο συστατικό μερικών αιθερίων ελαίων *Satureja* (Lamiaceae). Για παράδειγμα, η *S. parvifolia* από την Αργεντινή περιέχει 69,8% εποξειδίο της πιπεριτενόνης (Viturro *et al.*, 2000, Cabana *et al.*, 2013), ενώ η ενδημική *S. kallarica* από το Ιράν περιέχει σε ποσοστό 71,2% (Pirbalouti *et al.*, 2014).

Το εποξειδίο της πιπεριτενόνης έχει αξιολογηθεί σε σχέση με τις ακόλουθες διαφορετικές βιολογικές δραστηριότητες: καρδιοαγγειακές, υποτασικές, βραδυκαρδικές, εντομοκτόνες, αντιρυπανοσωμιακές, αντισχιστοσωμιακές, αντιμικροβιακές και αντιαλγαισθησιακές ιδιότητες. Πρόσφατες έρευνες έχουν δείξει ότι το εποξειδίο της πιπεριτενόνης έχει ισχυρή τοξική επίδραση έναντι των προνυμφών του είδους *Aedes aegypti* (Lima *et al.*, 2014), αλλά και κατά άλλων ειδών κουνουπιών (Tripathi *et al.*, 2004, Koliopoulos *et al.*, 2010). Παράλληλα έχουν αξιολογηθεί οι βιολογικές επιδράσεις του οξειδίου της πιπεριτενόνης σε ενήλικα άτομα του παρασίτου των ανθρώπων *Schistosoma mansoni* (Plathelminths). Η έρευνα αυτή έδειξε ότι οι υψηλές συγκεντρώσεις εποξειδίου της πιπεριτενόνης προκάλεσαν θνησιμότητα των ενήλικων σκωλήκων *S. mansoni* (Matos-Rocha *et al.*, 2013). Επίσης έχει αποδειχθεί η αντιβακτηριακή δράση του εναντίον του *Staphylococcus aureus* και αντιμυκητική δραστηριότητα εναντίον του *Candida albicans* (Arruda *et al.*, 2006).

Επίσης έχει αναλυθεί η πιθανή δράση επί των μυών των ινδικών χοιριδίων και η επίδραση του στη μέση αορτική πίεση και στον καρδιακό ρυθμό αρουραίων (Sousa *et al.*, 1997, Lahlou *et al.*, 2001). Ως κύριο συμπέρασμα προέκυψε ότι το εποξειδίο της πιπεριτενόνης είχε μια χαλαρωτική, κατασταλτική δραστηριότητα στους μυς των

ινδικών χοιριδίων και ότι η οξεία χορήγηση του οξειδίου της πιπεριτενόνης προκάλεσε βραχυχρόνια και δοσοεξαρτώμενη μείωση της αρτηριακής πίεσης, ακολουθούμενη από σημαντική βραδυκαρδία.



Σχήμα IV.1. Οι κυριότεροι οδοί για τη βιοσύνθεση μονοτερπενίου και τα υπεύθυνα ένζυμα: geranyl diphosphate synthase (1); (-)-limonene synthase (2); cytochrome P450 (-)-limonene-3-hydroxylase (3); (-)-trans-isopiperitenol dehydrogenase (4); (-)-isopiperitenone reductase (5); (+)-cis-isopulegone isomerase (6); (+)-PR (7); cytochrome P450 (+)-MFS (8); (-)-menthone reductase (8a) (-)-menthone:(-)-menthol reductase; (8b) menthone:(+)-neomenthol reductase; (9); and the terpenoid epoxidase (10). (Mahmoud and Croteau, 2003, Tuner and Croteau, 2004, Benlarbi *et al.*, 2014, Božović *et al.*, 2015).

IV.1.13 Χημικό προφίλ αιθερίου ελαίου από *in vitro* καλλιέργεια – Σύγκριση με τα *ex vitro* καλλιεργούμενα φυτά

Είναι γνωστό ότι ο μικροπολλαπλασιασμός μπορεί να αποτελέσει μια έγκυρη εναλλακτική λύση για να παραχθούν γρήγορα μεγάλες ποσότητες άνοσου φυτικού υλικού που χαρακτηρίζονται από παρόμοιο χημικό προφίλ με τα αντίστοιχα *ex vitro* καλλιεργούμενα φυτά, προϊόντα που δεν απαντώνται στη φύση, ανεξαρτησία από κλιματικούς παράγοντες, εξάλειψη γεωγραφικών και πολιτικών ορίων κτλ. (Matkowski, 2008). Επιπλέον έχει αποδειχθεί ότι πολλές χημικές ενώσεις μπορούν να συσσωρευτούν σε *in vitro* καλλιέργεια σε υψηλότερες συγκέντρωσες από ό, τι σε *ex vitro* καλλιεργούμενα φυτά (Lila, 2005, Gounaris, 2010, Pistelli *et al.*, 2013).

Η *in vitro* καλλιέργεια φυτικών ιστών μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την πρόκληση ποσοτικών και ποιοτικών τροποποιήσεων στην παραγωγή δευτερογενών μεταβολιτών των φυτών (Amaral and Silva, 2003) με την αλλαγή τόσο της σύστασης του θρεπτικού υποστρώματος (π.χ. παρουσία ή μη ρυθμιστών ανάπτυξης κτλ.) όσο και με την αλλαγή των συνθηκών καλλιέργειας (Collin, 2001). Η επίδραση της *in vitro* καλλιέργειας και των ρυθμιστών ανάπτυξης στην απόδοση και στη σύσταση του αιθερίου ελαίου έχει μελετηθεί από διάφορους ερευνητές και έχουν αναφερθεί ποικίλες επιδράσεις στα προφίλ παραγωγής δευτερογενών μεταβολιτών σε σύγκριση με τα μητρικά φυτά (El-Keltawi and Croteau, 1987, Sudriá *et al.*, 2001, Fraternali *et al.*, 2003, Santos-Gomes and Fernandes-Ferreira, 2003, Tavares *et al.*, 2004, Silva *et al.*, 2005, Affonso *et al.*, 2007, Affonso *et al.*, 2009).

Η ομοιότητα της σύστασης έχει αναφερθεί και σε άλλα φαρμακευτικά είδη της οικογένειας Lamiaceae, π.χ. *Salvia sclarea* (Kuzma *et al.*, 2009), *Salvia fruticosa* Mill. (Arikat *et al.*, 2004), *Thymus vulgaris* L. (Affonso *et al.*, 2009) *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Morone-Fortunato and Avato, 2008), *Minthostachys mollis* (Chebel *et al.*, 1998), *Mentha spicata* (Hirata *et al.*, 1990). Από την άλλη πλευρά, υπάρχουν συγκριτικές μελέτες οι οποίες έδειξαν πολυάριθμες διαφορές μεταξύ των δύο χημικών προφίλ του αιθερίου ελαίου, όπως για τα είδη *C. nepeta* (Pistelli *et al.*, 2013), *Salvia przewalskii* (Skała *et al.*, 2007) και *Eryngium planum* (Thiem *et al.*, 2011).

IV.2. ΥΛΙΚΑ ΚΑΙ ΜΕΘΟΔΟΙ ΠΑΡΑΛΑΒΗΣ ΑΙΘΕΡΙΟΥ ΕΛΑΙΟΥ

IV.2.1 Φυτικό υλικό

Τα είδη *C. creticum* και *C. nepeta* επιλέχθηκαν για τη μελέτη της επίδρασης του περιβάλλοντος καλλιέργειας και της εποχής στη σύσταση του αιθερίου ελαίου τους. Γι' αυτό το σκοπό, φυτά καλλιεργήθηκαν υπαίθρια, σε θερμοκήπιο και *in vitro*.

Ex vitro φυτά: Το φυτικό υλικό του *C. nepeta* προήλθε από φυτά ηλικίας έξι μηνών, τα οποία αναπτύχθηκαν από μοσχεύματα βλαστού ενήλικων φυτών *C. nepeta*, που αυτοφύονταν στον Ωρωπό (Ν. Αττικής). Το φυτικό υλικό του *C. creticum* προήλθε από φυτά ηλικίας έξι μηνών, τα οποία αναπτύχθηκαν με μοσχεύματα βλαστού από τρία μητρικά φυτά *C. creticum*, ευγενής παραχώρηση του Μεσογειακού Αγρονομικού Ινστιτούτου Χανίων. Τα φυτά του πειράματος ήταν εγκαταστημένα σε φυτοδοχεία (10 l) με υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (2:1), που βρίσκονταν αφενός εντός μη θερμαινόμενου υαλόφρακτου θερμοκηπίου, με σύστημα δροσισμού τους θερινούς μήνες και κουρτίνα σκίασης/θερμοκουρτίνα και αφετέρου υπαίθρια, στον ανθοκομείο του εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών (37°58'57.7"N, 23°42'17.2"E).

In vitro μικροβλαστοί: Αρχικά πραγματοποιήθηκε εγκατάσταση αρχικής καλλιέργειας από τα ενήλικα (μητρικά) φυτά και των δύο ειδών (αναλυτική περιγραφή στο II.Π.3.3.1 για το είδος *C. creticum* και στο II.Π.3.4.1 για το είδος *C. nepeta*). Στη συνέχεια πραγματοποιήθηκαν 6 υποκαλλιέργειες για την παραλαβή *in vitro* μικροβλαστών προς χρήση για την εξαγωγή του αιθερίου ελαίου με σκοπό αρχικά τον προσδιορισμό της απόδοσης και την καταγραφή της χημικής σύστασης αυτού και εν συνεχεία τη σύγκριση του με το αιθέριο έλαιο των *ex vitro* φυτών. Έκφυτα κορυφής και κόμβου καλλιεργήθηκαν σε γυάλινα βάζα τύπου Magenta, όγκου 100 ml, τα οποία καλύπτονταν με σκληρό πλαστικό καπάκι (Sigma, magenta-B caps). Το κάθε βάζο περιείχε 25 ml υπόστρωμα MS χωρίς φυτορυθμιστικές ουσίες, με 30 g L⁻¹ σακχαρόζη και pH 5.7 - 5.8. Εν συνεχεία τα βάζα τοποθετούνταν σε θάλαμο ανάπτυξης ελεγχόμενων συνθηκών, σε θερμοκρασία 25±2 °C και σε φωτοπερίοδο 16 h πλήρους φωτός έντασης 4.000 lx (37,5 μmol m⁻² s⁻¹) που παρέχονταν από λευκούς λαμπτήρες φθορισμού. Σε κάθε υποκαλλιέργεια, για κάθε είδος, χρησιμοποιούνταν 40 βάζα (4 έκφυτα/βάζο).

IV.2.2 Συλλογή και Αποθήκευση φυτικών δειγμάτων

Ex vitro: Η συγκομιδή του φυτικού υλικού από τα *ex vitro* μητρικά φυτά τόσο εντός όσο και εκτός του υαλόφρακτου θερμοκηπίου (υπαίθρια) και των δύο ειδών έγινε ανά δύο μήνες, από Ιούνιο 2016 έως Απρίλιο 2017. Για κάθε δειγματοληπτική περίοδο η συγκομιδή των δειγμάτων πραγματοποιήθηκε κατά τις πρωινές ώρες.

In vitro μικροβλαστοί: Μετά το τέλος της κάθε υποκαλλιέργειας, δηλαδή μετά από 6 εβδομάδες, γινόταν η εξαγωγή των φυταρίων από το υπόστρωμα MS. Στη συνέχεια αφαιρούνταν η ρίζα (εάν υπήρχε) ή το κάτω μέρος του φυταρίου, έτσι ώστε να παραληφθεί μόνο το πάνω εναέριο μέρος. Πραγματοποιήθηκαν 6 υποκαλλιέργειες και το φυτικό υλικό συγκεντρώθηκε όλο μαζί.

Όλα τα δείγματα ζυγίζονταν σε ζυγό ακριβείας και ακολούθησε η μεταφορά των δειγμάτων σε κατάλληλο χώρο για περαιτέρω φυσική ξήρανση.

IV.2.3 Διαδικασία ξήρανσης - Προετοιμασία δειγμάτων

Όλα τα φυτικά δείγματα είτε από τα *ex vitro* φυτά είτε από *in vitro* μικροβλαστούς υπέστησαν ήπια ξήρανση υπό σκιά (Poludennij and Zhuravlev, 1989), για την αναστολή κάθε είδους διεργασίας που θα μπορούσε να οδηγήσει σε αλλοίωση του φυτού. Όταν το βάρος των δειγμάτων σταθεροποιείτο, τα δείγματα ζυγίζοντουσαν με τη βοήθεια ζυγού τύπου PJ3600 (Mettler –Toledo DeltaRnage). Στη συνέχεια τα δείγματα διαχωρίστηκαν σε φύλλα και στελέχη. Στις κοπές Ιουνίου, Αυγούστου, Οκτωβρίου και Δεκέμβριου υπήρχαν άνθη, τα οποία συμπεριελήφθησαν στα δείγματα μαζί με τα φύλλα. Στους *in vitro* μικροβλαστούς δεν υπήρχαν άνθη και δεν έγινε διαχωρισμός των στελεχών και των φύλλων.

IV.2.4 Παραλαβή αιθερίου ελαίου με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης Clevenger

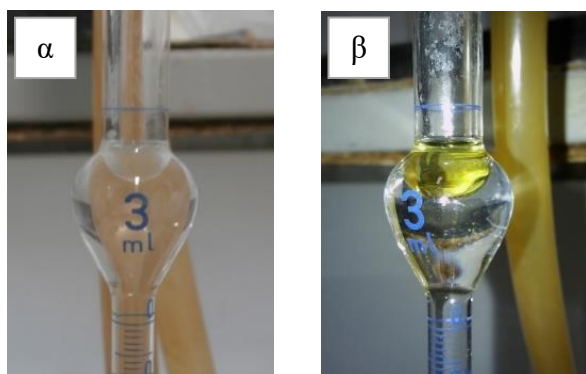
Η παραλαβή αιθερίου ελαίου από το αφυδατωμένο φυτικό υλικό των *ex vitro* φυτών και η ανάλυση του, γινόταν ξεχωριστά για κάθε περίοδο συγκομιδής, εντός 1 - 2 μηνών από την περίοδο συλλογής του, ενώ των *in vitro* μικροβλαστών μετά τη συγκέντρωση των δειγμάτων από τις 6 υποκαλλιέργειες. Για την παραλαβή του αιθερίου ελαίου με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης χρησιμοποιήθηκε συσκευή τύπου Clevenger.

Το ξηρό δείγμα (30 g για τα *ex vitro* φυτά και 15 g για τους *in vitro* αναπτυγμένους μικροβλαστούς) αφού πρώτα λειοτριβήθηκε (Εικ. IV.2α, β), ώστε να γίνει σκόνη, τοποθετήθηκε μαζί με 500 ml απιονισμένου νερού στη σφαιρική φιάλη, η οποία θερμαίνεται με τη χρήση θερμομανδύα. Οι υδρατμοί που σχηματίζονται μαζί με τα

πητικά συστατικά φτάνουν στον ψυκτήρα, στον οποίο κυκλοφορεί νερό βρύσης και υγροποιούνται. Το νερό ανακυκλώνεται, ενώ η φάση του αιθερίου ελαίου σταδιακά συγκεντρώνεται στο βαθμονομημένο σε ml σωλήνα. Η διάρκεια της απόσταξης ήταν 3 h. Στο τέλος της απόσταξης γινόταν ποσοτικός προσδιορισμός του παραγόμενου ελαίου στη βαθμονομημένη συσκευή Clevenger, το έλαιο συλλεγόταν και αποθηκευόταν στους $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$, μέχρι την ανάλυσή του με GC-MS (Εικ. IV.3α, β). Πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις από κάθε περίοδο δειγματοληψίας και στα δύο είδη, καθώς και στο φυτικό υλικό από *in vitro* καλλιέργεια.



Εικόνα IV.2. Φυτικό υλικό *C. creticum* (αριστερά) και *C. nepeta* (δεξιά), πριν (α) και μετά (β) τη λειοτρίβηση.



Εικόνα IV.3. Αιθέριο έλαιο *C. creticum* (λευκού χρώματος) (α) και *C. nepeta* (κίτρινου χρώματος) (β) πριν την παραλαβή τους.

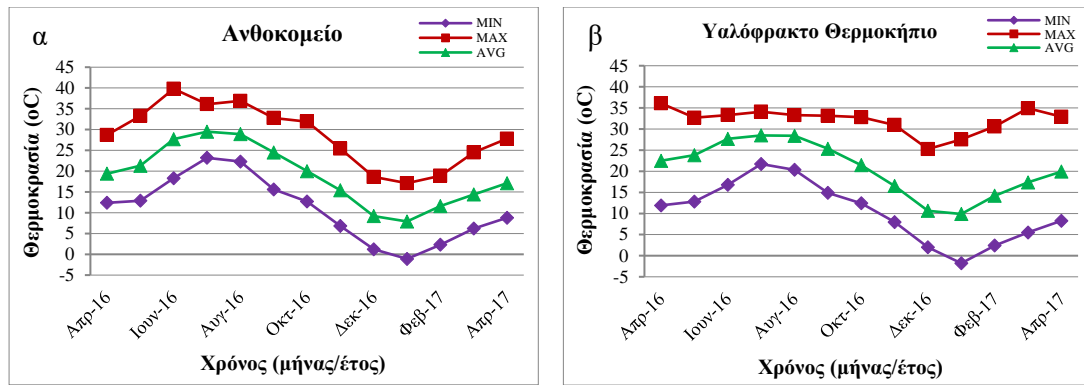
IV.2.5 Ανάλυση με αέρια χρωματογραφία – φασματογράφο μάζας (GC-MS)

Η ποιοτική ανάλυση του αιθερίου ελαίου πραγματοποιήθηκε με τη χρήση αέριου χρωματογράφου (GC) (Hewlett Packard 5890 II), εφοδιασμένου με τριχοειδή στήλη Rtx-5MS (30m X 0,25 mm, πάχος film 0,25 μm) και έναν ανιχνευτή φασματογράφο μάζας Hewlett Packard 5972 (70 eV). Τα προς ανάλυση δείγματα αραιώθηκαν 1/100(v/v) με ακετόνη καθαρότητας 99,8%. Το φέρον αέριο ήταν το ήλιο. Η αρχική θερμοκρασία της στήλης ήταν $60\text{ }^{\circ}\text{C}$ και αύξανε σταδιακά έως τους $250\text{ }^{\circ}\text{C}$ με ρυθμό $3\text{ }^{\circ}\text{C}/\text{min}$. Η συνολική διάρκεια της μεθόδου ήταν 50 min. Οι θερμοκρασίες του εγχυτήρα

και του ανιχνευτή ήταν 220 και 290 °C αντίστοιχα. Ποσότητα 1μL εισήχθησε στον εισαγωγέα χειροκίνητα με ένεση. Πραγματοποιήθηκαν 3 επαναλήψεις από κάθε περίοδο δειγματοληψίας και στα δύο είδη, καθώς και στο φυτικό υλικό από *in vitro* καλλιέργεια. Ως διαλύτης χρησιμοποιήθηκε ακετόνη καθαρότητας 99,8%. Η αναγνώριση των συστατικών βασίστηκε στη σύγκριση των σχετικών δεικτών συγκράτησης και των φασμάτων από το MS, με αυτών των βιβλιοθηκών Nist 98 και Wiley 275 με δεδομένα του συστήματος GC-MS και από δεδομένα της βιβλιογραφίας (Adams, 2007).

IV.2.6 Συνθήκες θερμοκρασίας στο μη θερμαινόμενο υαλόφρακτο θερμοκήπιο και στον υπαίθριο χώρο του Ανθοκομείου

Στο σχήμα IV.2 παρουσιάζονται η μέγιστη, η ελάχιστη και η μέση θερμοκρασία του Ανθοκομείου και του υαλόφρακτου θερμοκηπίου του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου κατά τη διάρκεια των πειραμάτων. Η μέση θερμοκρασία κατά τη χειμερινή περίοδο (Δεκεμβρίου - Φεβρουαρίου) και των δύο χρόνων στο υαλόφρακτο θερμοκήπιο ήταν υψηλότερη (10 - 16 °C) σε σχέση με τη μέση θερμοκρασία στο υπαίθρο (8 - 14 °C). Τον Ιούλιο 2016 καταγράφηκε η υψηλότερη μέση θερμοκρασία τόσο εκτός (30 °C) όσο και εντός θερμοκήπιο (29 °C), ενώ η χαμηλότερη τον Ιανουάριο 2016 (8 °C για τα φυτά εκτός και 10 °C για τα φυτά εντός θερμοκηπίου) (Σχ. IV.2). Όσον αφορά τη μέγιστη θερμοκρασία στο υαλόφρακτο θερμοκήπιο παρέμεινε σχεδόν σταθερή κατά τους μήνες Μαΐου - Νοεμβρίου και γενικά δεν ξεπέρασε τους 35 °C. Αντίθετα η μέγιστη θερμοκρασία στο υπαίθρο κατά τους θερινούς μήνες έφτασε και μέχρι τους 40 °C (Σχ. IV.2). Γενικά η μέγιστη θερμοκρασία στο υαλόφρακτο θερμοκήπιο δεν παρουσίαζε μεγάλες διακυμάνσεις μέσα στο έτος (25 - 35 °C), ενώ αντίθετα στο υπαίθρο οι διακυμάνσεις ήταν μεγάλες (17 - 40 °C). Τέλος η ελάχιστη θερμοκρασία τόσο εκτός όσο και εντός θερμοκηπίου ήταν παρόμοια και στα δύο χρόνια που πραγματοποιήθηκαν τα πειράματα (Σχ. IV.2).



Σχήμα IV.2. Μέγιστη, ελάχιστη και μέση θερμοκρασία στο Ανθοκομείο (α) και στο υαλόφρακτο θερμοκήπιο (β) του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής κήπου του Γ.Π.Α., κατά τη διάρκεια των πειραμάτων.

IV.2.7 Στατιστική ανάλυση

Η σημαντικότητα των αποτελεσμάτων ελέγχθηκε με ανάλυση της διασποράς (ANOVA). Το κριτήριο που χρησιμοποιούμε για τη στατιστική αυτή δοκιμασία είναι το κριτήριο του F (F test) και η σύγκριση των μέσων έγινε με τη μέθοδο με Student's t test 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.

IV.3. ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

IV.3.1 Χημική σύσταση και εποχική διακύμανση του αιθερίου ελαίου του *C. creticum*

Ο προσδιορισμός της απόδοσης αιθερίου ελαίου και η καταγραφή της χημικής σύστασης αυτού, σε σχέση με την εποχή και το περιβάλλον καλλιέργειας του *C. creticum* παρουσιάζονται στους πίνακες IV.3 και IV.4. Το αιθέριο έλαιο του *C. creticum* που παραλήφθηκε ήταν λευκού χρώματος (Εικ. IV.3α) και η μέση εκατοστιαία περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο κυμάνθηκε από 0,5 έως 2,5% στα φυτά υπαίθρου και ανάλογη διακύμανση παρατηρήθηκε στα φυτά εντός θερμοκηπίου (0,7 - 1,9%) (Πίν. IV.3, IV.4). Ο μέσος όρος αιθερίου ελαίου των φυτών στο υπαίθρο ήταν ελάχιστα μεγαλύτερος σε σχέση με του θερμοκηπίου. Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έδειξε ότι οι διαφορές στην απόδοση μεταξύ των διαφορετικών περιόδων συλλογής τόσο στα φυτά εκτός θερμοκηπίου όσο και στα φυτά εντός θερμοκηπίου είναι σημαντικές. Η μεγαλύτερη απόδοση και για τις δύο μεταχειρίσεις παρατηρήθηκε τον Αύγουστο (2,5% για τα φυτά εκτός και 1,9% για τα φυτά εντός θερμοκηπίου), ενώ η μικρότερη απόδοση το Φεβρουάριο (0,5% για τα φυτά εκτός και 0,9% για τα φυτά εντός θερμοκηπίου) (Πίν. IV.3, IV.4). Ιδιαίτερα υψηλές αποδόσεις καταγράφηκαν από Ιούνιο έως Οκτώβριο, διάστημα που τα φυτά ήταν σε ανθοφορία, με την υψηλότερη απόδοση να καταγράφεται τον Αύγουστο και για τις δύο μεταχειρίσεις, ενώ πολύ χαμηλή απόδοση καταγράφηκε το Φεβρουάριο, ιδίως για τα φυτά εκτός θερμοκηπίου (Πίν. IV.3, IV.4).

Από την ανάλυση του αιθερίου ελαίου του *C. creticum*, καταγράφηκαν 42 συστατικά εκ των οποίων ταυτοποιήθηκαν τα 37 και για τις δύο μεταχειρίσεις (Σχ. IV.3α, β, γ, δ και IV.4α, β, γ, δ). Στα δείγματα όλων των περιόδων που εξετάστηκαν, τα 42 συστατικά που καταγράφηκαν αποτελούν το 95,6 - 99,9% του συνόλου του αιθερίου ελαίου που απομονώθηκε από τα φυτά εκτός θερμοκηπίου και το 91,8 - 99,1% του συνόλου του αιθερίου ελαίου που απομονώθηκε από τα φυτά εντός θερμοκηπίου (Πίν. IV.3, IV.4).

Το αιθέριο έλαιο του *C. creticum* χαρακτηρίζεται από την παρουσία οξυγονωμένων μονοτερπενίων (56,9 - 83,2% για τα εκτός και 50,7 - 80,8% για τα εντός θερμοκηπίου φυτά), ακολουθούμενα από τους μονοτερπενικούς υδρογονάνθρακες (8,4 - 15,5% για τα εκτός και 6,3 - 15,1% για τα εντός θερμοκηπίου φυτά) και τους σεσκιτερπενικούς

υδρογονάνθρακες (5,0 - 10,1% για τα εκτός και 7,5 - 24,8% για τα εντός θερμοκηπίου φυτά) (Πίν. IV.3, IV.4).

Η συγκέντρωση των κύριων ομάδων του υπό μελέτη φυτού διαφέρει σημαντικά μεταξύ των περιόδων που εξετάστηκαν τόσο στα εκτός όσο και στα εντός θερμοκηπίου φυτά (Πίν. IV.3, IV.4). Όσον αφορά για τα φυτά εκτός θερμοκηπίου τα οξυγονωμένα μονοτερπένια παρουσιάζουν την υψηλότερη συγκέντρωση τον Απρίλιο (83,2%) και τη χαμηλότερη τον Αύγουστο (56,9%), περίοδο που οι σесκιτερπενικοί υδρογονάνθρακες παρουσίασαν την υψηλότερη συγκέντρωση (10,1%), χωρίς διαφορά από τους μήνες Ιούνιο και Οκτώβριο (9,7% και 9,4% αντίστοιχα). Ενώ οι μονοτερπινικοί υδρογονάνθρακες παρουσίασαν την υψηλότερη συγκέντρωση τον Αύγουστο και Οκτώβριο (13,9% και 15,5% αντίστοιχα) και τη χαμηλότερη τον Απρίλιο (8,4%) (Πίν. IV.3). Στα φυτά εντός θερμοκηπίου τα οξυγονωμένα μονοτερπένια παρουσιάζουν την υψηλότερη συγκέντρωση τον Απρίλιο (80,8%) και τη χαμηλότερη το Δεκέμβριο (50,7%), περίοδο που οι σесκιτερπενικοί υδρογονάνθρακες παρουσίασαν την υψηλότερη συγκέντρωση (24,8%). Ενώ οι μονοτερπινικοί υδρογονάνθρακες παρουσίασαν την υψηλότερη συγκέντρωση τον Αύγουστο και τον Οκτώβριο (15,1% και 14,0% αντίστοιχα), ενώ τη χαμηλότερη το Φεβρουάριο (6,3%) (Πίν. IV.4).

Οι κύριοι εκπρόσωποι των οξυγονωμένων μονοτερπενίων ήταν το εποξειδίο της πιπεριτόνης (7,1 - 58,3%), το εποξειδίο της πιπεριτενόνης (1,3 - 25,1%) και η μενθόνη (0,2 - 6,7%), των μονοτερπενικών υδρογονανθράκων το D-λιμονένιο (3,3 - 11,9%), και των σесκιτερπενικών υδρογονανθράκων το δ-γερμακρένιο (1,3 - 10,0%) (Πίν. IV.3, IV.4). Στη συγκέντρωση των ανωτέρω ενώσεων παρατηρήθηκε επίσης εποχική διακύμανση και στις δύο θέσεις καλλιέργειας, η οποία περιγράφεται λεπτομερειακός σε κάθε θέση καλλιέργειας.

Στα φυτά εκτός θερμοκηπίου το εποξειδίο της πιπεριτενόνης και το δ-γερμακρένιο είχαν το υψηλότερο ποσοστό κατά την περίοδο Ιούνιο - Οκτώβριο, με ποσοστό που κυμαινόταν από 21,5 έως 23,3% για το εποξειδίο της πιπεριτενόνης, ενώ για το δ-γερμακρένιο παρέμεινε σταθερό στο 3,6%, επιπλέον το δ-γερμακρένιο είχε υψηλό ποσοστό (3,9%) και το μήνα Απρίλιο. Η μενθόνη και το 2-υδροξυπιπεριτόνη είχαν υψηλότερο ποσοστό (6,7% και 5,0% αντίστοιχα) το Φεβρουάριο, το D-λιμονένιο τους μήνες Αύγουστο και Οκτώβριο (11,0 και 11,9% αντίστοιχα), το εποξειδίο της πιπεριτόνης τον Απρίλιο με ποσοστό 58,3%, ενώ η πουλεγόνη και ο οξικός εστέρας διυδροκαρβεόλης τον Αύγουστο με ποσοστό 4,2% και 4,1% αντίστοιχα. Στο εποξειδίο της πιπεριτενόνης, στο δ-γερμακρένιο, στην πουλεγόνη και στον οξικό εστέρα

διυδροκαρβεόλης το χαμηλότερο ποσοστό καταγράφηκε το Φεβρουάριο (1,3%, 1,3%, 0,4% και 0,6% αντίστοιχα), για τη μενθόνη και το εποξείδιο της πιπεριτόνης τον Αύγουστο (1,7% και 12,1% αντίστοιχα), για το *D*-λιμονένιο (7,1%) το Δεκέμβριο και για το 2-υδροξυπιπεριτόνη τον Απρίλιο με ποσοστό 0,1% (Πίν. IV.3).

Στα φυτά εντός θερμοκηπίου το εποξείδιο της πιπεριτενόνης και η πουλεγόνη είχαν το υψηλότερο ποσοστό (21,1 - 25,1% και 1,8 - 2,1% αντίστοιχα) κατά την περίοδο Ιούνιο - Οκτώβριο, το εποξείδιο της πιπεριτόνης τον Απρίλιο (53,6%), το *D*-λιμονένιο τους μήνες Αύγουστο και Οκτώβριο (9,1 και 10,0% αντίστοιχα), η μενθόνη (1,3%) τον Ιούνιο, το 2-υδροξυπιπεριτόνη (4,9%) το Φεβρουάριο, ενώ το δ -γερμακρένιο (10,0%) και ο οξικός εστέρας διυδροκαρβεόλης (6,6%) το Δεκέμβριο. Στο *D*-λιμονένιο και στο εποξείδιο της πιπεριτενόνης το χαμηλότερο ποσοστό (3,3 - 4,1% και 11,9 - 12,0% αντίστοιχα) καταγράφηκε κατά την περίοδο Δεκεμβρίου - Φεβρουαρίου, ενώ για το εποξείδιο της πιπεριτόνης και το 2-υδροξυπιπεριτόνη κατά την περίοδο Αύγουστο - Δεκεμβρίου με ποσοστό 7,1 - 8,1% και 0,6% αντίστοιχα, επιπλέον για το 2-υδροξυπιπεριτόνη καταγράφηκε και το μήνα Απρίλιο με ποσοστό 0,5%. Όσον αφορά τη μενθόνη το χαμηλότερο ποσοστό (0,2 - 0,4%) παρουσιάστηκε τον Οκτώβριο και το Δεκέμβριο, για το δ -γερμακρένιο (3,2%) και την πουλεγόνη (0,4%) το Φεβρουάριο, ενώ για τον οξικό εστέρα διυδροκαρβεόλης τον Απρίλιο με ποσοστό 0,3% (Πίν. IV.4).

Συγκρίνοντας τα αιθέρια έλαια των φυτών εντός και εκτός θερμοκηπίου παρατηρούμε το εποξείδιο της πιπεριτόνης, το *D*-λιμονένιο, η μενθόνη και η πουλεγόνη παρουσίασαν τα υψηλότερα ποσοστά στα φυτά που βρίσκονταν στο ύπαιθρο, σε σχέση με αυτά εντός του θερμοκηπίου σε όλες τις εποχές δειγματοληψίας, καθώς και η 2-υδροξυπιπεριτόνη πλην του Ιουνίου και Απριλίου (Σχ. IV.5α, β, γ, δ). Το λιμονένιο ήταν ιδιαίτερα αυξημένο τον Αύγουστο και Οκτώβριο και στις δύο μεταχειρίσεις (Σχ. IV.5α), ενώ η πουλεγόνη παρουσίασε την υψηλότερη συγκέντρωση τον Αύγουστο για τα φυτά που βρίσκονται στο ύπαιθρο (Σχ. IV.5γ). Η μενθόνη παρουσίασε την υψηλότερη συγκέντρωση το Φεβρουάριο για τα φυτά που βρίσκονται στο ύπαιθρο, ενώ ο οξικός εστέρας διυδροκαρβεόλης και το δ -γερμακρένιο το Δεκέμβριο στα φυτά εντός θερμοκηπίου (Σχ. IV.5β, ζ, θ). Το εποξείδιο της πιπεριτενόνης το Φεβρουάριο, Απρίλιο και Οκτώβριο (Σχ. IV.5η) και το δ -γερμακρένιο όλους τους μήνες παρουσίασαν τα υψηλότερα ποσοστά στα φυτά εντός θερμοκηπίου (Σχ. IV.5θ), όπως και ο οξικός εστέρας διυδροκαρβεόλης εκτός από τον Απρίλιο μήνα (Σχ. IV.5ζ). Το εποξείδιο της πιπεριτόνης ήταν ιδιαίτερα αυξημένο το Φεβρουάριο και Απρίλιο, εμφανίζοντας την υψηλότερη συγκέντρωση τον Απρίλιο στα φυτά που βρίσκονταν στο ύπαιθρο (Σχ.

IV.5δ). Το εποξειδίο της πιπεριτενόνης το Δεκέμβριο και Φεβρουάριο εμφάνισε τα χαμηλότερα ποσοστά, ανεξαρτήτως θέσης καλλιέργειας, έχοντας ιδιαίτερα χαμηλή τιμή στο ύπαιθρο το Φεβρουάριο, ενώ αντίθετα η 2-υδροξυπιπεριτόνη το Φεβρουάριο παρουσίασε την υψηλότερη συγκέντρωση τόσο στα εκτός όσο και στα εντός θερμοκηπίου φυτά (Σχ. IV.5η, ε).

.

Πίνακας IV.3. Σύσταση (%) του αιθερίου ελαίου του *C. creticum* από φυτά εκτός υαλόφρακτου θερμοκηπίου που παραλήφθηκε - απομονώθηκε με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης και προσδιορίστηκε με GC/MS κατά τους μήνες αναγραφόμενους μήνες.

		Ιούνιος	Αύγουστος	Οκτώβριος	Δεκέμβριος	Φεβρουάριος	Απρίλιος	
	R.I.exp							
	Συστατικό							
1.	936	α-πινένιο	0,5	0,6	1,0	0,5	0,6	0,4
2.	974	σαβινένιο	0,1	0,1	0,2	0,1	0,1	nd
3.	978	β-πινένιο	0,7	0,8	1,0	0,6	0,8	0,5
4.	988	β-μυρκένιο	0,3	0,4	0,5	0,2	nd	nd
5.	992	3-οκτανόλη	1,0	0,8	1,0	1,0	0,3	0,2
6.	1017	α-τερπινένιο	0,1	0,2	0,2	0,2	nd	nd
7.	1028	D-λιμονένιο[†]	8,4^c	11,0^a	11,9^a	7,1^d	10,0^b	7,5^{cd}
8.	1060	γ-τερπινένιο	0,3	0,5	0,4	0,4	nd	nd
9.	1088	τερπινολένιο	0,1	0,3	0,3	0,1	nd	nd
10.	1100	βουτυρικός εστέρας 2,2 διμεθυλο βουτανίου	0,1	0,1	0,1	nd	nd	nd
11.	1156	μενθόνη[†]	2,7^c	1,7^d	1,7^d	3,2^b	6,7^a	2,3^c
12.	1168	βορνεόλη	0,4	0,4	0,3	0,3	0,3	0,2
13.	1177-1181	τερπινεν-4-όλη + Άγνωστο (M ¹)**	1,7	1,9	2,2	3,2	3,0	0,3
14.	1191	α-τερπινεόλη	0,4	0,3	0,3	0,3	0,2	0,1
15.	1194	διυδροκαρβεόλη	0,4	1,6	1,9	1,0	nd	0,4
16.	1204	Άγνωστο (M ²)**	1,4	0,8	1,2	2,4	3,3	nd
17.	1240	πουλεγόνη[†]	3,0^b	4,2^a	2,4^{bc}	1,5^d	0,4^f	0,8^e
18.	1253	εποξειδίο της πιπεριτόνης^{*†}	21,2^d	12,1^e	19,1^d	34,6^c	51,9^b	58,3^a

19.	1273	2-κυκλοεξεν-1-όνη, 2-υδροξυ-6-μεθυλ-3-(1-μεθυλαιθυλ)	0,4	0,4	0,5	1,8	2,3	0,7
20.	1275	ισοπιπεριτενόνη	0,3	nd	nd	nd	nd	nd
21.	1280	Άγνωστο (M ³)**	0,3	0,1	0,2	0,6	1,0	nd
22.	1290	Άγνωστο (M ⁴)**	7,4	7,7	6,9	4,7	0,7	0,1
23.	1293	θυμόλη	1,0	0,6	0,8	1,5	2,0	0,6
24.	1301	2-υδροξυπιπεριτόνη[†]	2,0^c	1,1^d	1,9^c	3,7^b	5,0^a	0,1^e
25.	1307	οξικός εστέρας διυδροκαρβεόλης*[†]	2,2^b	4,1^a	2,0^b	2,2^b	0,6^c	1,9^b
26.	1311	6-υδροξυ-καρβοτανακετόνη	0,2	0,1	0,2	0,7	0,9	nd
27.	1329	οξικός εστέρας ισο-διυδροκαρβεόλης	1,6	3,1	1,3	1,2	0,4	1,8
28.	1337	οξικός εστέρας καρβεόλης	0,3	0,8	0,2	0,1	nd	0,2
29.	1342	πιπεριτενόνη	1,3	1,2	1,2	1,3	0,4	2,0
30.	1353	α-κουμπεμπένιο	0,1	0,1	0,1	0,1	nd	nd
31.	1365	εποξειδίο της πιπεριτενόνης[†]	22,5^a	23,3^a	21,5^a	13,7^b	1,3^c	13,5^b
32.	1380	α-κοπαένιο	1,2	1,2	1,2	1,1	0,9	0,9
33.	1388	β-μπουρμπονένιο	0,4	0,5	0,3	0,2	0,9	0,2
34.	1393	β-ελεμένιο	0,4	0,4	0,5	0,5	0,2	0,2
35.	1400	Άγνωστο (M ⁵)**	4,8	5,2	4,5	2,8	0,1	0,1
36.	1424	β-καρνοφυλλένιο	2,4	2,9	2,3	1,7	1,0	1,3
37.	1479	β-κοπαένιο	0,1	0,2	0,1	tr	nd	nd
38.	1485	δ-γερμακρένιο[†]	3,6^a	3,6^a	3,6^a	2,9^b	1,3^c	3,9^a
39.	1499	δικυκλογερμακρένιο	1,0	0,7	0,7	0,8	0,5	1,2
40.	1516	β-μπισαβολένιο	nd	nd	nd	nd	nd	nd
41.	1525	γ-καδινένιο	0,1	0,1	0,1	0,1	nd	nd

42.	1485	δ-καδινένιο	0,4	0,4	0,5	0,4	0,2	0,2
Μονοτερπένια								
		Οξυγονωμένα [†]	61,6 ^d	56,9 ^e	57,5 ^{de}	70,3 ^c	75,4 ^b	83,2 ^a
		Υδρογονάνθρακες [†]	10,5 ^{dc}	13,9 ^a	15,5 ^a	9,2 ^{cd}	11,5 ^b	8,4 ^d
Σεσκιτερπένια								
		Οξυγονωμένα [†]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		Υδρογονάνθρακες [†]	9,7 ^a	10,1 ^a	9,4 ^a	7,8 ^b	5,0 ^c	7,9 ^b
Άλλα								
		Άγνωστα	1,1 ^a	0,9 ^a	1,1 ^a	1,0 ^a	0,3 ^b	0,2 ^b
Σύνολο συστατικών (%)			96,8	95,6	96,3	98,8	97,3	99,9
Απόδοση αιθερίου ελαίου ^{***}			2,04±0,04 ^b	2,5±0,11 ^a	2,17±0,02 ^b	2,05±0,10 ^{cb}	0,49±0,03 ^d	1,72±0,10 ^c

R.I.exp. Experimental Retention Index

*Correct isomer not identified

** Main qualifying ions (m/z) and their relative abundance (%)

Άγνωστο (M¹): 139 (100), 97 (59), 69 (55), 55 (49)**

Άγνωστο (M²): 139 (100), 97 (59), 69 (58), 55 (56)**

Άγνωστο (M³): 84 (100), 82 (59), 85 (48), 97 (18), 135 (11), 168 (9)**

Άγνωστο (M⁴): 138 (100), 137 (91), 68 (96), 67 (89), 123 (43), 166 (6,5)**

Άγνωστο (M⁵): 166 (100), 123 (60), 105 (22), 137 (19), 69 (18)**

***v/w %: όγκος (mL) αιθερίου ελαίου σε βάρος ξηρού 100 g φυτικού υλικού. Οι μέσοι (±τυπικό σφάλμα) επί της ίδιας γραμμής ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's t test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$

[†]Οι μέσοι επί της ίδιας γραμμής ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's t test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$

tr, trace (<0,1%), nd: not detected

Πίνακας IV.4: Σύσταση (%) του αιθερίου ελαίου του *C. creticum* από φυτά εντός υαλόφρακτου θερμοκηπίου που παραλήφθηκε - απομονώθηκε με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης και προσδιορίστηκε με GC/MS κατά τους αναγραφόμενους μήνες.

			Ιούνιος	Αύγουστος	Οκτώβριος	Δεκέμβριος	Φεβρουάριος	Απρίλιος
	R.I.exp	Συστατικό						
1.	936	<i>α</i> -πινένιο	0,5	0,8	0,9	0,6	0,9	0,5
2.	974	σαβινένιο	0,1	0,2	0,2	0,1	0,1	nd
3.	978	<i>β</i> -πινένιο	0,6	1,1	1,1	0,5	1,0	0,7
4.	988	<i>β</i> -μυρκένιο	0,2	0,5	0,5	0,2	nd	nd
5.	992	3-οκτανόλη	0,7	0,8	0,9	0,3	0,5	0,2
6.	1017	<i>α</i> -τερπινένιο	0,3	0,7	0,6	0,7	0,3	nd
7.	1028	<i>D</i>-λιμονένιο[†]	6,3^b	10,0^a	9,1^a	4,1^c	3,3^c	5,9^b
8.	1060	<i>γ</i> -τερπινένιο	0,8	1,2	1,1	1,1	0,5	0,2
9.	1088	τερπινολένιο	0,3	0,6	0,5	0,6	0,2	nd
10.	1100	βουτυρικός εστέρας 2,2 διμεθυλο βουτανίου	0,1	0,1	0,1	0,1	nd	nd
11.	1156	μενθόνη[†]	1,3^a	0,6^c	0,4^d	0,2^d	0,6^c	0,9^b
12.	1168	βορνεόλη	0,3	0,2	0,1	0,1	0,1	0,2
13.	1177-1181	τερπινεν-4-όλη + Άγνωστο (M ¹)**	2,9	2,9	2,6	3,4	3,8	0,7
14.	1191	<i>α</i> -τερπινεόλη	0,3	0,3	0,3	0,1	0,2	0,1
15.	1194	διυδροκαρβεόλη	1,4	2,2	2,8	10,5	3,5	2,5
16.	1204	Άγνωστο (M ²)**	1,4	0,5	0,5	0,5	3,1	nd
17.	1240	πουλεγόνη[†]	1,8^a	2,1^a	1,9^a	0,7^b	0,4^c	0,6^b
18.	1253	εποξειδίο της πιπεριτόνης*[†]	19,4^c	7,5^d	8,1^d	7,1^d	40,5^b	53,6^a

19.	1273	2-κυκλοεξεν-1-όνη, 2-υδροξυ-6-μεθυλ-3-(1-μεθυλαιθυλ)	0,4	0,4	0,4	0,2	2,2	0,2
20.	1275	ισοπιπεριτενόνη	nd	nd	nd	nd	nd	nd
21.	1280	Άγνωστο (M ³)**	0,3	0,0	0,1	0,1	0,9	0,6
22.	1290	Άγνωστο (M ⁴)**	7,3	7,8	8,1	3,9	4,1	0,1
23.	1293	θυμόλη	0,9	0,4	0,4	0,6	2,4	1,1
24.	1301	2-υδροξυπιπεριτόνη[†]	2,0^b	0,6^c	0,6^c	0,6^c	4,9^a	0,5^c
25.	1307	οξικός εστέρας διυδροκαρβεόλης*[†]	2,7^c	4,2^b	3,8^b	6,6^a	1,2^d	0,3^e
26.	1311	6-υδροξυ-καρβοτανακετόνη	0,1	0,5	0,4	0,2	0,5	nd
27.	1329	οξικός εστέρας ισο-διυδροκαρβεόλης	0,4	4,3	4,4	6,2	0,8	1,1
28.	1337	οξικός εστέρας καρβεόλης	0,5	0,9	0,6	0,5	nd	nd
29.	1342	πιπεριτενόνη	1,6	1,6	1,5	1,3	0,7	1,2
30.	1353	α-κουμπεμπένιο	0,1	0,0	0,1	0,1	0,1	nd
31.	1365	εποξείδιο της πιπεριτενόνης[†]	22,1^a	23,5^a	25,1^a	12,0^c	11,9^c	17,8^b
32.	1380	α-κοπαένιο	1,3	1,6	1,6	2,9	1,2	1,1
33.	1388	β-μπουρμπονένιο	nd	nd	nd	nd	nd	nd
34.	1393	β-ελεμένιο	0,8	0,8	0,6	1,7	0,5	0,5
35.	1400	Άγνωστο (M ⁵)**	4,6	5,5	5,6	3,5	2,3	0,2
36.	1424	β-καρνοφυλλένιο	2,4	2,8	2,8	4,7	1,1	1,2
37.	1479	β-κοπαένιο	0,1	0,2	0,2	0,3	tr	nd
38.	1485	δ-γερμακρένιο[†]	4,2^c	5,3^b	5,4^b	10,0^a	3,2^d	5,4^b
39.	1499	δικυκλογερμακρένιο	1,0	1,3	1,1	2,7	0,9	1,5
40.	1516	β-μπισαβολένιο	nd	0,2	tr	0,4	nd	nd
41.	1525	γ-καδινένιο	0,2	0,3	0,3	0,6	0,1	nd

42.	1485	δ-καδινένιο	0,5	0,7	0,7	1,5	0,4	0,2
Μονοτερπένια								
		Οξυγονωμένα [†]	58,1 ^c	52,2 ^d	53,4 ^d	50,7 ^d	73,7 ^b	80,8 ^a
		Υδρογονάνθρακες [†]	9,1 ^b	15,1 ^a	14,0 ^a	7,9 ^{bc}	6,3 ^c	7,3 ^{bc}
Σεσκιτερπένια								
		Οξυγονωμένα [†]	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
		Υδρογονάνθρακες [†]	10,6 ^c	13,2 ^b	12,8 ^b	24,8 ^a	7,5 ^d	9,9 ^{cd}
Άλλα								
			0,8 ^{ab}	0,9 ^{ab}	1,0 ^a	0,4 ^{bc}	0,5 ^{bc}	0,2 ^c
Άγνωστα								
			13,6 ^a	13,8 ^a	14,3 ^a	8,0 ^c	10,4 ^b	0,9 ^d
Σύνολο συστατικών (%)			92,2	95,7	95,5	91,8	98,4	99,1
Απόδοση αιθερίου ελαίου ^{***}			1,61±0,05 ^b	1,92±0,13 ^a	1,56±1,13 ^{bc}	1,33±0,05 ^{cd}	0,70±0,05 ^e	1,20±0,05 ^d

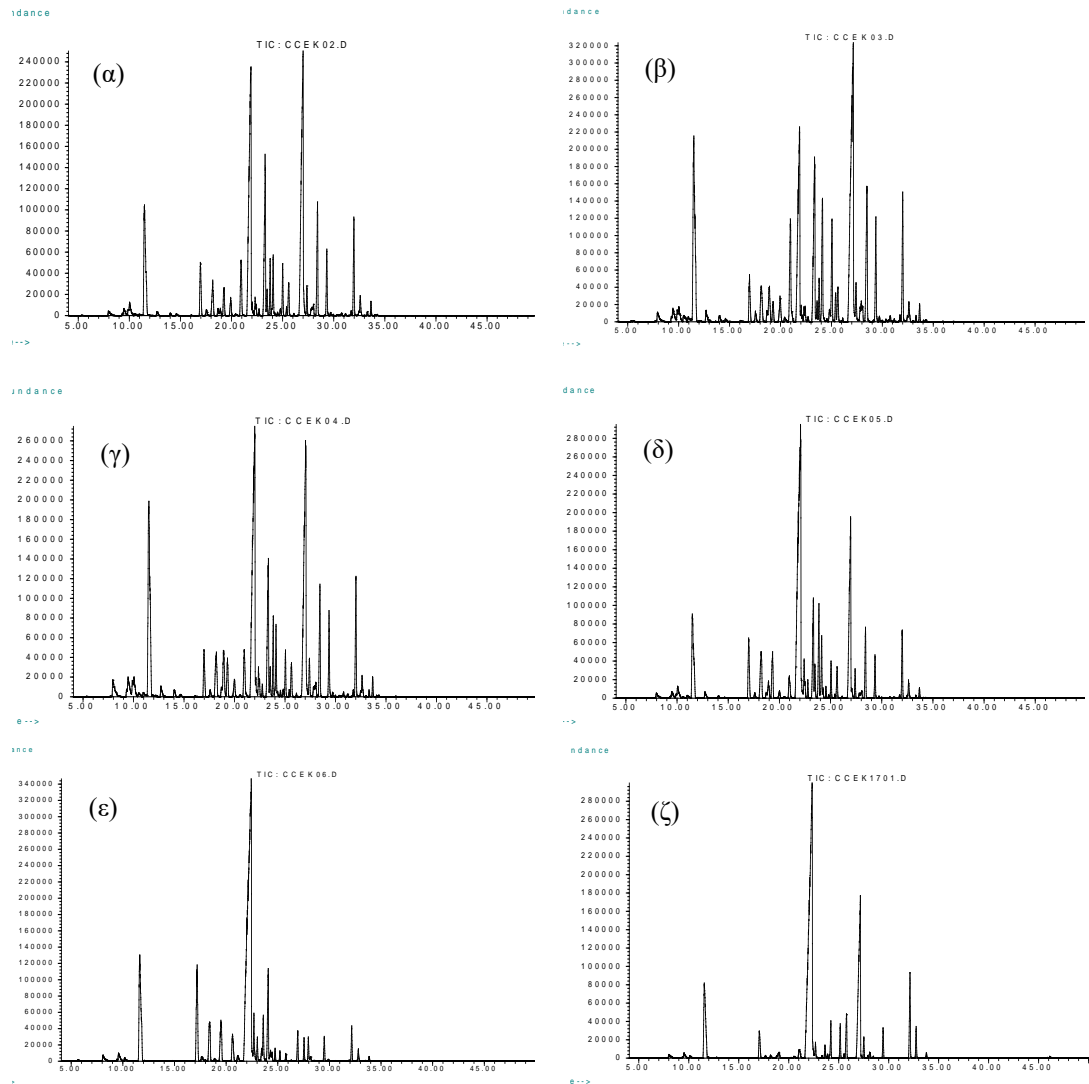
R.I.exp. Experimental Retention Index

*Correct isomer not identified

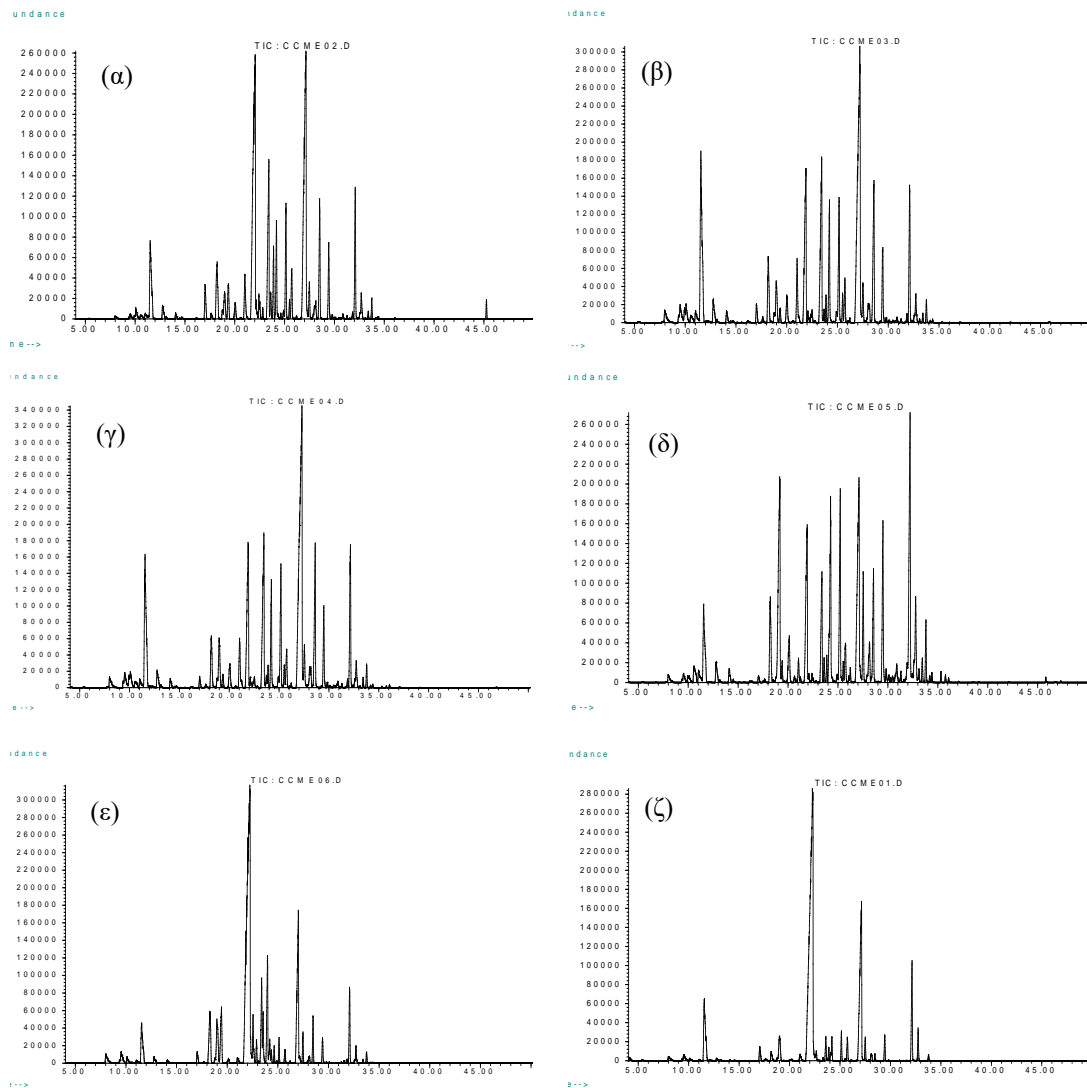
** Main qualifying ions (m/z) and their relative abundance (%)

Άγνωστο (M¹): 139 (100), 97 (59), 69 (55), 55 (49)**Άγνωστο (M²): 139 (100), 97 (59), 69 (58), 55 (56)**Άγνωστο (M³): 84 (100), 82 (59), 85 (48), 97 (18), 135 (11), 168 (9)**Άγνωστο (M⁴): 138 (100), 137 (91), 68 (96), 67 (89), 123 (43), 166 (6,5)**Άγνωστο (M⁵): 166 (100), 123 (60), 105 (22), 137 (19), 69 (18)*****v/w %: όγκος (mL) αιθερίου ελαίου σε βάρος ξηρού 100 g φυτικού υλικού. Οι μέσοι (±τυπικό σφάλμα) επί της ίδιας γραμμής ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's t test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$ [†]Οι μέσοι επί της ίδιας γραμμής ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's t test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$

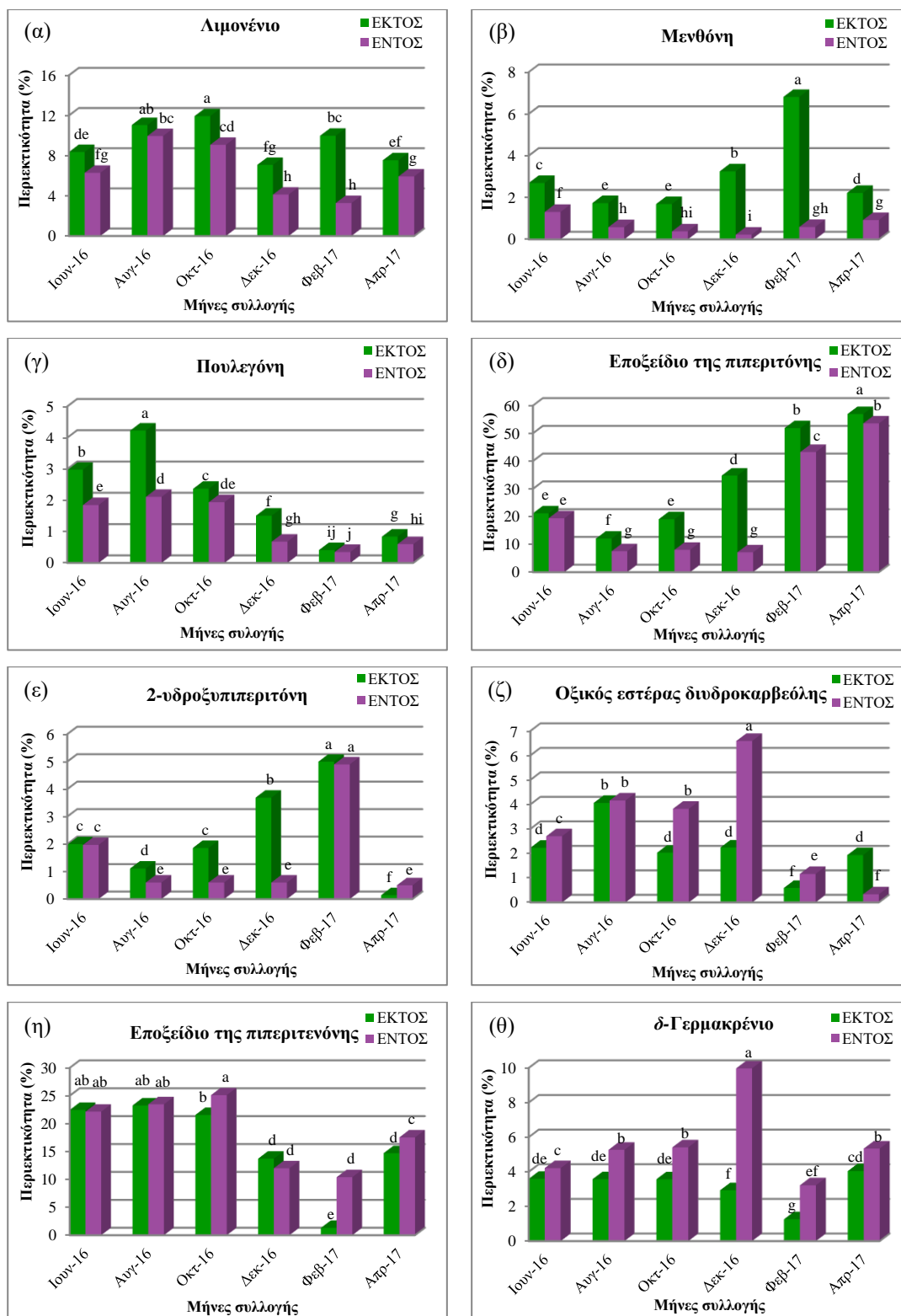
tr, trace (<0,1%), nd: not detected



Σχήμα IV.3. Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα συστατικών του αιθερίου ελαίου *C. creticum* από φυτά εκτός υαλόφρακτου θερμοκηπίου που απομονώθηκε με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης και προσδιορίστηκαν με GC/MS κατά τους μήνες Ιουνίου 2016 (α), Αυγούστου 2016 (β), Οκτωβρίου 2016 (γ), Δεκεμβρίου 2016 (δ), Φεβρουαρίου 2017 (ε) και Απριλίου 2017 (ζ).



Σχήμα IV.4. Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα συστατικών του αιθερίου ελαίου *C. creticum* από φυτά εντός υαλόφρακτου θερμοκηπίου που απομονώθηκε με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης και προσδιορίστηκαν με GC/MS κατά τους μήνες Ιουνίου 2016 (α), Αυγούστου 2016 (β), Οκτωβρίου 2016 (γ), Δεκεμβρίου 2016 (δ), Φεβρουαρίου 2017 (ε) και Απριλίου 2017 (ζ).



Σχήμα IV.5. Σχηματική απεικόνιση της ποσοτικής διαφοροποίησης στα φυτά εκτός θερμοκηπίου (υπαίθρου), σε σχέση με αυτά του θερμοκηπίου του *C. creticum*, στα κύρια συστατικά λιμονένιο (α), μενθόνη (β), πουλεγόνη (γ), εποξειδίο της πιπεριτόνης (δ), 2-υδροξυπιπεριτόνη (ε), οξικός εστέρας διυδροκαρβεόλης (ζ), εποξειδίο της πιπεριτενόνης (η) και δ-γερμακρένιο (θ).

3.2 Χημική σύσταση και εποχική διακύμανση του αιθερίου ελαίου του *C. nepeta*

Ο προσδιορισμός της απόδοσης αιθερίου ελαίου και η καταγραφή της χημικής σύστασης αυτού, σε σχέση με την εποχή και το περιβάλλον καλλιέργειας του *C. nepeta* παρουσιάζονται στους πίνακες IV.5 και IV.6. Το αιθέριο έλαιο του *C. nepeta* που παραλήφθηκε ήταν κίτρινου χρώματος (Εικ. IV.3β) και η μέση εκατοστιαία περιεκτικότητά του κυμάνθηκε από 0,9 έως 2,6% στα φυτά υπαίθρου και ανάλογη διακύμανση παρατηρήθηκε στα φυτά εντός θερμοκηπίου (1,2 - 2,5%) (Πίν. IV.5, IV.6). Η στατιστική επεξεργασία των αποτελεσμάτων έδειξε ότι οι διαφορές στην απόδοση μεταξύ των διαφορετικών περιόδων συλλογής τόσο στα φυτά εκτός θερμοκηπίου όσο και στα φυτά εντός θερμοκηπίου είναι σημαντικές. Η μεγαλύτερη απόδοση και για τις δύο μεταχειρίσεις παρατηρήθηκε τον Αύγουστο (2,6% για τα φυτά εκτός και 2,5% για τα φυτά εντός), ενώ η μικρότερη απόδοση το Φεβρουάριο (0,9% για τα φυτά εκτός και 1,2% για τα φυτά εντός) (Πίν. IV.5, IV.6). Γενικά ότι οι υψηλότερες αποδόσεις και για τις δύο μεταχειρίσεις καταγράφηκαν από Ιούνιο έως Οκτώβριο, όπου τα φυτά ήταν σε ανθοφορία, καθώς και τον Απρίλιο, ενώ πολύ χαμηλή απόδοση καταγράφηκε το Φεβρουάριο (Πίν. IV.5, IV.6).

Από την ανάλυση του αιθερίου ελαίου του *C. nepeta* που έγινε με GC-MS, καταγράφηκαν 39 συστατικά εκ των οποίων ταυτοποιήθηκαν τα 35 και για τις δύο μεταχειρίσεις (Σχ. IV.6α, β, γ, δ και IV.7α, β, γ, δ). Στα δείγματα όλων των περιόδων που εξετάστηκαν, τα 39 συστατικά που καταγράφηκαν αποτελούν το 95,4 - 98,8% του συνόλου του αιθερίου ελαίου που απομονώθηκε για τα φυτά εκτός θερμοκηπίου και το 95,2 - 98,6% για τα φυτά εντός θερμοκηπίου (Πίν. IV.5, IV.6). Το αιθέριο έλαιο του *C. nepeta* χαρακτηρίζεται από την παρουσία οξυγονωμένων μονοτερπενίων (55,0 - 77,3% για τα εκτός και 55,9 - 76,7% για τα εντός θερμοκηπίου φυτά), ακολουθούμενα από τους μονοτερπενικούς υδρογονάνθρακες (3,0 - 10,7% για τα εκτός και 3,3 - 10,5% για τα εντός θερμοκηπίου φυτά) και τους σεσκιτερπενικούς υδρογονάνθρακες (7,0 - 16,1% για τα εκτός και 8,2 - 16,2% για τα εντός θερμοκηπίου φυτά).

Η συγκέντρωση των κύριων ομάδων του υπό μελέτη φυτού διαφέρει σημαντικά μεταξύ των περιόδων που εξετάστηκαν στα τόσο στα εκτός όσο και στα εντός θερμοκηπίου φυτά. Όσον αφορά για τα φυτά εκτός θερμοκηπίου τα οξυγονωμένα μονοτερπένια παρουσιάζουν την υψηλότερη συγκέντρωση τους μήνες Φεβρουάριο και Απρίλιο (77,3 και 76,7% αντίστοιχα) και τη χαμηλότερη το Δεκέμβριο (55,0%), περίοδο που οι σεσκιτερπενικοί υδρογονάνθρακες παρουσίασαν την υψηλότερη

συγκέντρωση (16,1%). Ενώ οι μονοτερπινικοί υδρογονάνθρακες παρουσίασαν τη χαμηλότερη συγκέντρωση το Φεβρουάριο (3,0%) και την υψηλότερη τον Αύγουστο (10,7%), περίοδο που οι σесκιτερπενικοί υδρογονάνθρακες είχαν τη χαμηλότερη συγκέντρωση (7,0%) (Πίν. IV.5). Ενώ στα φυτά εντός θερμοκηπίου τα οξυγονωμένα μονοτερπένια παρόμοια με τα φυτά εκτός θερμοκηπίου παρουσιάζουν την υψηλότερη συγκέντρωση τον Απρίλιο (76,7%), ενώ τη χαμηλότερη το Δεκέμβριο (55,9%). Οι μονοτερπινικοί υδρογονάνθρακες παρουσίασαν τη χαμηλότερη συγκέντρωση το Φεβρουάριο και τον Απρίλιο (3,7% και 3,3% αντίστοιχα) και την υψηλότερη τον Ιούνιο (10,5%), ενώ οι σесκιτερπενικοί υδρογονάνθρακες διατήρησαν σταθερά την υψηλή συγκέντρωση από το Δεκέμβριο έως τον Απρίλιο (14,3 - 16,2%) και τη χαμηλή από τον Ιούνιο μέχρι τον Οκτώβριο (4,1 - 4,4%) (Πίν. IV.6).

Οι κύριοι εκπρόσωποι των οξυγονωμένων μονοτερπενίων ήταν η πουλεγόνη (12,5 - 32,0%), το εποξείδιο της πιπεριτενόνης (3,8 - 31,8%), η ισομενθόνη (2,3 - 23,0%) και το εποξείδιο της πιπεριτόνης (4,6 - 16,4%), των μονοτερπενικών υδρογονανθράκων το *D*-λιμονένιο (2,1 - 8,8%), και των σесκιτερπενικών υδρογονανθράκων το δ -γερμακρένιο (1,9 - 6,5%) και δικυκλογερμακρένιο (2,1 - 5,3%) (Πίν. IV.5, IV.6). Στη συγκέντρωση των ανωτέρω ενώσεων παρατηρήθηκε επίσης εποχική διακύμανση και στις δύο θέσεις καλλιέργειας, η οποία περιγράφεται λεπτομερειακός σε κάθε θέση καλλιέργειας.

Στα φυτά εκτός θερμοκηπίου το εποξείδιο της πιπεριτενόνης, το δ -γερμακρένιο και το δικυκλογερμακρένιο παρουσίασαν το υψηλότερο ποσοστό (31,8%, 5,7% και 4,8% αντίστοιχα) τον Απρίλιο, επιπλέον το εποξείδιο της πιπεριτενόνης είχε υψηλό ποσοστό τον Οκτώβριο (31,0%). Ενώ για τις ενώσεις πουλεγόνη, εποξείδιο της πιπεριτόνης και ισομενθόνη το υψηλότερο ποσοστό παρατηρήθηκε το Φεβρουάριο (30,0%, 15,2% και 23,0% αντίστοιχα), επιπλέον η πουλεγόνη τον Απρίλιο με ποσοστό 32,0%. Τέλος το *D*-λιμονένιο εμφάνισε υψηλότερο ποσοστό τον Αύγουστο (8,8%) και τον Οκτώβριο (8,0%). Το Φεβρουάριο όπου η ισομενθόνη, η πουλεγόνη και το εποξείδιο της πιπεριτόνης εμφάνισαν το υψηλότερο ποσοστό, το *D*-λιμονένιο και εποξείδιο της πιπεριτενόνης είχαν το χαμηλότερο ποσοστό (2,4% και 3,8% αντίστοιχα). Στην ισομενθόνη το χαμηλότερο ποσοστό (2,3 - 2,6%) καταγράφηκε τους μήνες Ιούνιο, Οκτώβριο και Δεκέμβριο, στην πουλεγόνη (14,1 - 15,5%), στο δ -γερμακρένιο (1,9 - 2,2%) και στο δικυκλογερμακρένιο (2,1%) τον Αύγουστο - Οκτώβριο και στο εποξείδιο της πιπεριτόνης τον Ιούνιο με ποσοστό 4,6% (Πίν. IV.5).

Στα φυτά εντός θερμοκηπίου η ισομενθόνη, η πουλεγόνη και το εποξείδιο της πιπεριτόνης παρουσίασαν το υψηλότερο ποσοστό (10,4%, 24,7% και 16,4% αντίστοιχα) το Φεβρουάριο μήνα, επιπλέον η πουλεγόνη είχε υψηλό ποσοστό τον Απρίλιο (25,3%). Ενώ το *D*-λιμονένιο παρουσίασε το υψηλότερο ποσοστό τους μήνες Ιούνιο και Οκτώβριο (7,2 - 8,7% αντίστοιχα), το εποξείδιο της πιπεριτενόνης από τον Ιούνιο έως τον Οκτώβριο (25,9 - 28,6%), ενώ το δ -γερμακρένιο και δικυκλογερμακρένιο τον Απρίλιο (6,5% και 5,3% αντίστοιχα). Όσον αφορά το χαμηλότερο ποσοστό στο *D*-λιμονένιο (2,1%) και στο εποξείδιο της πιπεριτενόνης (12,1%) καταγράφηκε το Φεβρουάριο, επιπλέον στο *D*-λιμονένιο τον Απρίλιο με ποσοστό (2,6%). Ενώ στην ισομενθόνη το χαμηλότερο ποσοστό καταγράφηκε τον Οκτώβριο και Δεκέμβριο (2,6% και 2,7% αντίστοιχα), στην πουλεγόνη τον Αύγουστο και Οκτώβριο (12,7 και 12,5% αντίστοιχα), στον εποξείδιο της πιπεριτόνης τον Ιούνιο και Δεκέμβριο με ποσοστό 8,5% και στους δύο μήνες, τέλος στο δ -γερμακρένιο και στο δικυκλογερμακρένιο καταγράφηκε από τον Ιούνιο έως τον Οκτώβριο (2,4 - 2,7% και 2,2 - 2,6% αντίστοιχα) (Πίν. IV.6).

Συγκρίνοντας τα αιθέρια έλαια των φυτών εντός και εκτός θερμοκηπίου παρατηρούμε ότι η πουλεγόνη και το λιμονένιο παρουσίασαν τα υψηλότερα ποσοστά στα φυτά εκτός θερμοκηπίου, σε σχέση με αυτά του θερμοκηπίου σε όλες της εποχές δειγματοληψίας, πλην του Ιουνίου για το λιμονένιο (Σχ. IV.8α, γ). Η ισομενθόνη τον Αύγουστο και Φεβρουάριο παρουσίασε τα υψηλότερα ποσοστά στα φυτά εκτός θερμοκηπίου, σε σχέση με αυτά του θερμοκηπίου, ενώ το αντίθετο παρατηρείται τον Απρίλιο και Ιούνιο (Σχ. IV.8β). Το εποξείδιο της πιπεριτόνης παρουσίασε τα υψηλότερα ποσοστά στα φυτά εντός θερμοκηπίου, σε σχέση με αυτά εκτός θερμοκηπίου, πλην του Αυγούστου (Σχ. IV.8δ). Το εποξείδιο της πιπεριτενόνης παρουσίασε τα υψηλότερα ποσοστά στα φυτά εκτός θερμοκηπίου τον Ιούνιο, Οκτώβριο και Απρίλιο (Σχ. IV.8ε). Η πουλεγόνη, το εποξείδιο της πιπεριτόνης και η ισομενθόνη εμφάνισαν υψηλότερες συγκεντρώσεις το Φεβρουάριο, όταν το εποξείδιο της πιπεριτενόνης και το λιμονένιο εμφάνισαν τις χαμηλότερες συγκεντρώσεις τους και στις δύο μεταχειρίσεις (Σχ. IV.8α, β, γ, δ, ε). Το δ -γερμακρένιο και το δικυκλογερμακρένιο είχαν παρόμοια συμπεριφορά. Πιο συγκεκριμένα τον Ιούνιο και το Δεκέμβριο το δ -γερμακρένιο και το δικυκλογερμακρένιο παρουσίασαν τα υψηλότερα ποσοστά στα φυτά εκτός θερμοκηπίου, σε σχέση με αυτά του θερμοκηπίου, ενώ το αντίθετο παρατηρείται κατά τις περιόδους Αύγουστο - Οκτώβριο και Φεβρουάριο - Απρίλιο (Σχ. IV.8ζ, η).

Πίνακας IV.5. Σύσταση (%) του αιθερίου ελαίου του *C. nepeta* από φυτά εκτός υαλόφρακτου θερμοκηπίου που παραλήφθηκε - απομονώθηκε με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης και προσδιορίστηκε με GC/MS κατά τους αναγραφόμενους μήνες.

			Ιούνιος	Αύγουστος	Οκτώβριος	Δεκέμβριος	Φεβρουάριος	Απρίλιος
	R.I.exp	Συστατικό						
1.	938	<i>α</i> -πινένιο	0,2	0,6	0,6	0,6	0,2	0,2
2.	981	<i>β</i> -πινένιο	0,4	0,6	0,6	0,6	0,3	0,4
3.	990	<i>β</i> -μυρκένιο	0,3	0,5	0,3	0,4	0,1	0,1
4.	994	3-οκτανόλη	2,5	2,9	3,0	2,7	1,0	1,2
5.	1032	<i>D</i>-λιμονένιο[†]	7,1^b	8,8^a	8,0^a	5,5^c	2,4^e	4,2^d
6.	1062	<i>γ</i> -τερπινένιο	nd	0,2	0,1	0,1	nd	nd
7.	1095	3-νονανόλη	0,2	0,6	0,3	0,2	nd	nd
8.	1099	trans-ένυδρο σαβινένιο	0,1	nd	0,1	0,1	nd	nd
9.	1102	<i>n</i> -νονανάλη	0,1	0,4	0,1	0,1	1,0	0,3
10.	1165	ισομενθόνη[†]	2,5^c	5,3^b	2,3^c	2,6^c	23,0^a	4,7^b
11.	1178	ισοπουλεγόνη*	0,6	0,3	0,3	1,1	0,9	0,4
12.	1182	Άγνωστο (M ¹)**	0,5	0,8	0,4	0,3	0,7	nd
13.	1205	Άγνωστο (M ²)**	0,3	0,9	0,5	0,5	1,3	nd
14.	1225	2-αιθενυλ-1-μεθοξυ-3-μεθυλοβενζόλιο	1,0	0,8	1,1	0,9	0,1	0,1
15.	1240	πουλεγόνη[†]	20,3^b	14,1^d	15,5^d	17,6^c	30,0^a	32,0^a
16.	1256	εποξειδίο της πιπεριτόνης*[†]	4,6^d	11,3^b	6,1^c	6,2^c	15,2^a	5,7^c
17.	1275	ισοπιπεριτενόνη	0,9	0,9	1,0	0,6	0,5	0,5
18.	1293	Άγνωστο (M ³)**	8,8	7,2	9,9	7,1	1,3	0,2

19.	1298	θυμόλη	0,6	1,0	0,7	0,8	1,0	0,3
20.	1301	2-υδροξυπιπεριτόνη	0,3	0,9	0,4	0,5	1,5	nd
21.	1309	καρβακρόλη	0,5	0,1	0,1	0,4	0,3	nd
22.	1343	πιπεριτενόνη	1,2	0,7	1,0	1,9	1,1	1,3
23.	1366	εποξειδίο της πιπεριτενόνης[†]	27,6^b	25,0^c	31,0^a	23,2^c	3,8^d	31,8^a
24.	1383	α-κοπαένιο	0,2	0,2	0,3	0,5	0,1	0,3
25.	1392	β-μπουρμπονένιο	0,7	0,3	0,8	0,3	0,2	0,2
26.	1397	β-ελεμένιο	0,3	0,2	0,2	0,4	0,2	0,2
27.	1407	Άγνωστο (M ⁴)**	5,8	4,6	6,3	5,2	0,5	0,4
28.	1428	β-καρνοφυλλένιο	2,6	1,6	1,8	3,9	3,8	3,5
29.	1436	β-κοπαένιο	0,2	0,1	0,2	0,4	0,2	nd
30.	1447	αρομαδενδρένιο	0,2	0,1	0,1	0,3	0,1	nd
31.	1461	α-καρνοφυλλένιο	0,1	0,1	0,2	0,4	0,2	0,2
32.	1470	cis-μουουρόλα-4(14)5-διένιο	0,2	0,1	0,1	0,3	0,2	0,1
33.	1483	γ-μουρολένιο	0,2	0,1	0,1	0,3	0,2	nd
34.	1489	δ-γερμακρένιο[†]	3,3^c	1,9^d	2,2^d	4,4^b	3,5^c	5,7^a
35.	1504	δικυκλογερμακρένιο[†]	3,2^c	2,1^d	2,1^d	4,2^b	3,5^c	4,8^a
36.	1520	γ-καδινένιο	0,2	0,1	0,1	0,3	0,1	nd
37.	1528	δ-καδινένιο	0,2	0,1	0,1	0,3	0,2	nd
38.	1544	α-καδινένιο	tr	nd	nd	0,1	nd	nd
39.	1591	σπαθουλενόλη	0,1	tr	0,2	0,1	nd	nd
Μονοτερπένια								
		Οξυγονωμένα [†]	59,2 ^b	59,6 ^b	58,5 ^b	55,0 ^c	77,3 ^a	76,7 ^a
		Υδρογονάνθρακες [†]	8,0 ^{bc}	10,7 ^a	9,6 ^b	7,2 ^c	3,0 ^e	4,9 ^d

Σεσκιτερπένια							
Οξυγονωμένα [†]	0,1	0,0	0,2	0,1	0,0	0,0	
Υδρογονάνθρακες [†]	11,6 ^c	7,0 ^d	8,3 ^d	16,1 ^a	12,5 ^{bc}	15 ^{ab}	
Άλλα	3,8 ^a	4,7 ^a	4,5 ^a	3,9 ^a	2,1 ^b	1,6 ^b	
Άγνωστα	15,4 ^{ab}	13,5 ^b	17,1 ^a	13,1 ^b	3,8 ^c	0,6 ^d	
Σύνολο συστατικών	98,1	95,5	98,2	95,4	98,7	98,8	
Απόδοση αιθερίου ελαίου ***	2,49± 0,06 ^a	2,62±0.03 ^a	2,43±0,06 ^a	1,55±0,05 ^c	0,91±0,04 ^d	2,11±0,07 ^b	

R.I.exp. Experimental Retention Index

*Correct isomer not identified

**Main qualifying ions (m/z) and their relative abundance (%)

Άγνωστο (M¹): 139 (100), 55 (62), 69 (61), 97 (59)**

Άγνωστο (M²): 139 (100), 97 (67), 69 (64), 55 (61)**

Άγνωστο (M³): 138 (100), 137 (91), 68 (96), 67 (89), 123 (43), 166 (6,5)**

Άγνωστο (M⁴): 166 (100), 123 (60), 105 (22), 137 (19), 69 (18)**

***v/w %: όγκος (mL) αιθερίου ελαίου σε βάρος ξηρού 100 g φυτικού υλικού. Οι μέσοι (±τυπικό σφάλμα) επί της ίδιας γραμμής ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's t test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$

[†]Οι μέσοι επί της ίδιας γραμμής ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's t test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$

tr, trace (<0.1%), nd: not detected

Πίνακας IV.6. Σύσταση (%) του αιθερίου ελαίου του *C. nepeta* από φυτά εντός υαλόφρακτου θερμοκηπίου που παραλήφθηκε - απομονώθηκε με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης και προσδιορίστηκε με GC/MS κατά τους αναγραφόμενους μήνες.

			Ιούνιος	Αύγουστος	Οκτώβριος	Δεκέμβριος	Φεβρουάριος	Απρίλιος
	R.I.exp	Συστατικό						
1.	938	α -πινένιο	0,6	0,4	0,7	0,5	0,5	0,2
2.	981	β -πινένιο	0,7	0,5	0,7	0,5	0,8	0,4
3.	990	β -μυρκένιο	0,4	0,4	0,5	0,4	0,3	0,1
4.	994	3-οκτανόλη	2,9	2,6	2,6	2,5	1,8	1,0
5.	1032	D-λιμονένιο^T	8,7^a	6,7^b	7,2^{ab}	4,7^c	2,1^d	2,6^d
6.	1062	γ -τερπινένιο	0,1	0,1	0,1	0,1	nd	nd
7.	1095	3-νονανόλη	0,3	0,4	0,3	0,2	0,3	0,2
8.	1099	trans-ένυδρο σαβινένιο	0,1	nd	nd	nd	nd	nd
9.	1102	<i>n</i> -νονανάλη	0,2	0,2	0,1	0,1	nd	nd
10.	1165	ισομενθόνη^T	4,0^c	3,8^c	2,6^d	2,7^d	10,4^a	8,4^b
11.	1178	ισοπουλεγόνη*	0,3	0,2	nd	1,1	1,1	0,4
12.	1182	Άγνωστο (M ¹)**	0,4	0,6	0,8	0,2	nd	nd
13.	1205	Άγνωστο (M ²)**	0,7	0,8	0,9	0,7	0,7	nd
14.	1225	2-αιθενυλ-1-μεθοξυ-3-μεθυλοβενζόλιο	1,0	1,2	1,1	1,0	1,0	0,1
15.	1240	πουλεγόνη^T	15,5^b	12,7^c	12,5^c	15,1^b	24,7^a	25,3^a
16.	1256	εποξειδίο της πιπεριτόνης^{c,T}	8,5^d	9,2^c	10,2^c	8,5^d	16,4^a	12,4^b
17.	1275	ισοπιπεριτενόνη	1,0	1,0	0,9	0,8	0,6	0,5
18.	1293	Άγνωστο (M ³)**	8,6	9,7	9,1	7,7	4,0	0,2

19.	1298	θυμόλη	0,8	0,9	1,0	0,9	1,2	0,3
20.	1301	2-υδροξυπιπεριτόνη	0,8	0,9	1,0	0,8	1,8	nd
21.	1309	καρβακρόλη	0,3	0,1	2,1	0,6	0,5	0,1
22.	1343	πιπεριτενόνη	1,2	0,8	2,1	1,3	1,2	1,4
23.	1366	εποξείδιο της πιπεριτενόνης[†]	25,9^{ab}	28,6^a	27,9^a	24,1^b	12,1^c	27,9^a
24.	1383	α-κοπαένιο	0,3	0,3	0,3	0,4	0,2	0,2
25.	1392	β-μπουρμπονένιο	0,6	0,8	0,7	0,8	0,2	nd
26.	1397	β-ελεμένιο	0,2	0,2	0,2	0,4	0,3	0,2
27.	1407	Άγνωστο (M ⁴)**	5,7	6,4	6,0	5,5	2,4	0,4
28.	1428	β-καρνοφυλλένιο	2,0	1,7	1,5	3,2	3,7	3,6
29.	1436	β-κοπαένιο	0,2	0,1	0,1	0,3	0,3	nd
28.	1447	αρομαδενδρένιο	0,1	0,2	0,2	0,4	0,3	nd
31.	1461	α-καρνοφυλλένιο	0,2	0,2	0,2	0,3	0,3	0,2
32.	1470	cis-μουουρόλα-4(14)5-διένιο	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	0,1
33.	1483	γ-μουρολένιο	0,2	0,1	0,1	0,2	0,2	nd
34.	1489	δ-γερμακρένιο[†]	2,7^c	2,4^c	2,4^c	4,2^b	4,1^b	6,5^a
35.	1504	δικυκλογερμακρένιο[†]	2,6^c	2,4^c	2,2^c	4,1^b	3,9^b	5,3^a
36.	1520	γ-καδινένιο	0,1	0,1	0,1	0,2	0,2	nd
37.	1528	δ-καδινένιο	0,2	0,2	0,1	0,3	0,3	0,1
38.	1544	α-καδινένιο	0,1	tr	nd	0,1	0,1	nd
39.	1591	σπαθουλενόλη	0,1	0,1	nd	0,1	nd	nd
Μονοτερπένια								
		Οξυγονωμένα [†]	58,4 ^{cd}	58,2 ^{cd}	60,3 ^c	55,9 ^d	70,0 ^b	76,7 ^a
		Υδρογονάνθρακες [†]	10,5 ^a	8,1 ^b	9,2 ^{ab}	6,2 ^c	3,7 ^d	3,3 ^d

Σεσκιτερπένια

Οξυγονωμένα [†]	0,1	0,1	0,0	0,1	0,0	0,0
Υδρογονάνθρακες [†]	9,7 ^b	8,8 ^b	8,2 ^b	15,1 ^a	14,3 ^a	16,2 ^a
Άλλα	4,4 ^a	4,4 ^a	4,1 ^{ab}	3,8 ^{ab}	3,1 ^b	1,3 ^c
Άγνωστα	15,4 ^{ab}	17,5 ^a	16,8 ^a	14,1 ^b	7,1 ^c	0,6 ^d
Σύνολο συστατικών (%)	98,5	97,1	98,6	95,2	98,2	98,1
Απόδοση αιθερίου ελαίου***	2,42±0,05 ^a	2,48±0,10 ^a	2,18±0,04 ^a	1,53±0,09 ^b	1,13±0,05 ^c	2,22±0,08 ^a

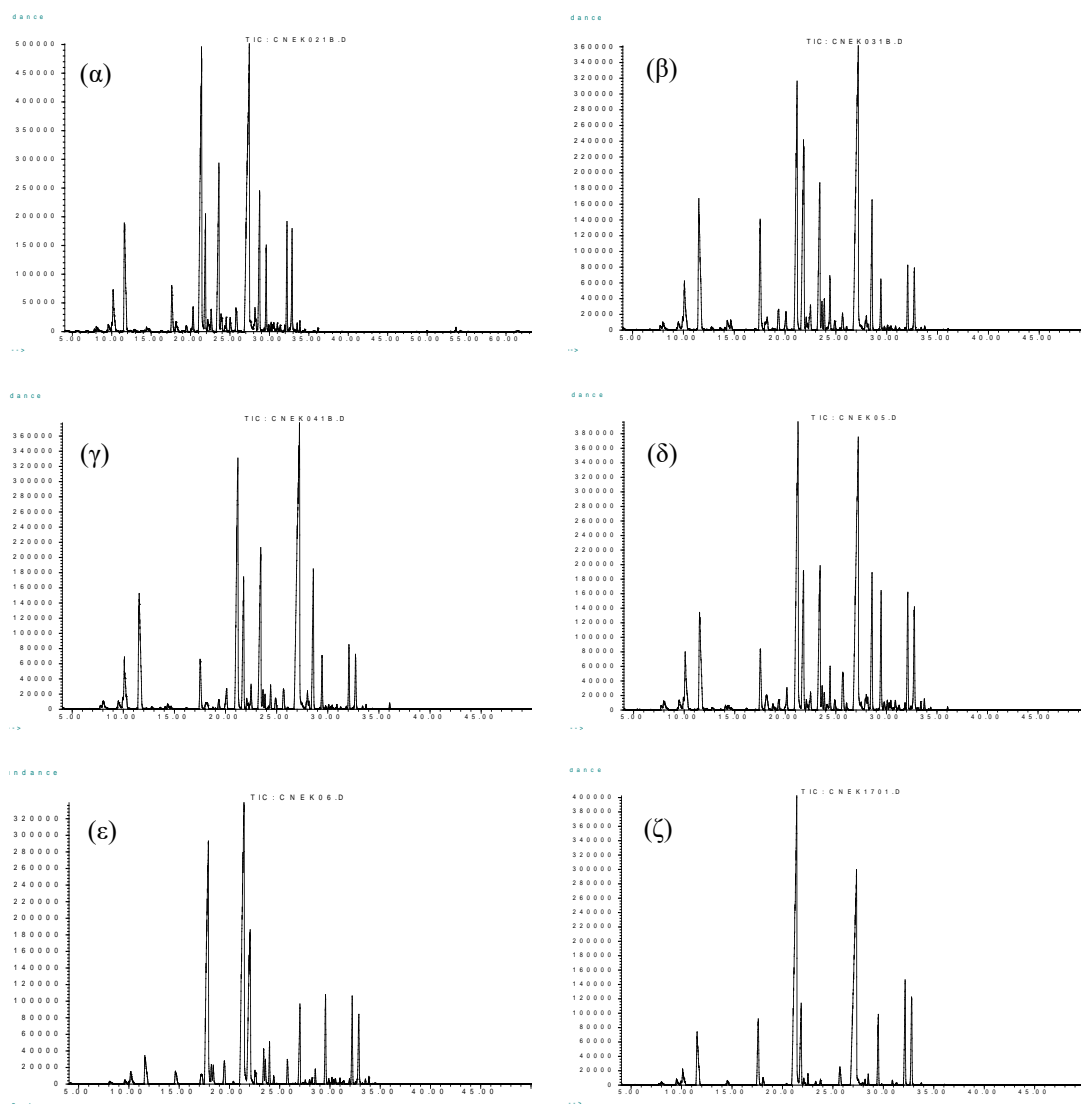
R.I.exp. Experimental Retention Index

*Correct isomer not identified

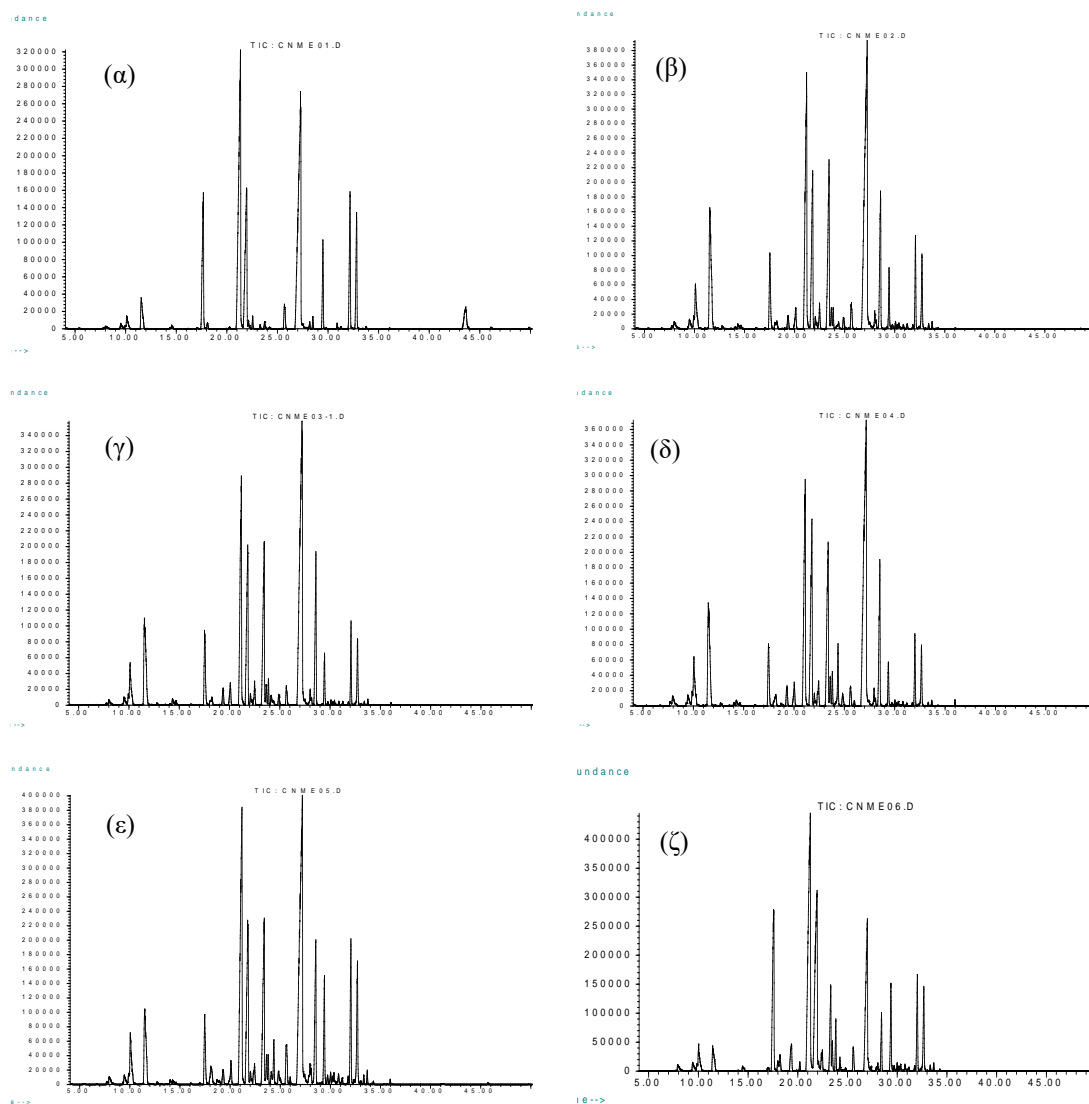
**Main qualifying ions (m/z) and their relative abundance (%)

Άγνωστο (M¹): 139 (100), 55 (62), 69 (61), 97 (59)**Άγνωστο (M²): 139 (100), 97 (67), 69 (64), 55 (61)**Άγνωστο (M³): 138 (100), 137 (91), 68 (96), 67 (89), 123 (43), 166 (6,5)**Άγνωστο (M⁴): 166 (100), 123 (60), 105 (22), 137 (19), 69 (18)*****v/w %: όγκος (mL) αιθερίου ελαίου σε βάρος ξηρού 100 g φυτικού υλικού. Οι μέσοι (±τυπικό σφάλμα) επί της ίδιας γραμμής ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's t test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$ [†]Οι μέσοι επί της ίδιας γραμμής ακολουθούμενοι από το ίδιο γράμμα δεν διαφέρουν στατιστικά σημαντικά σύμφωνα με το Student's t test σε επίπεδο σημαντικότητας $P \leq 0,05$

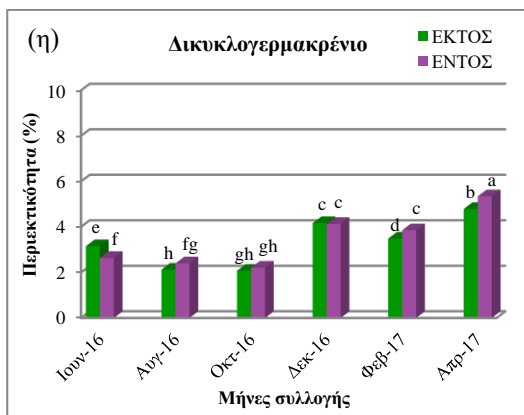
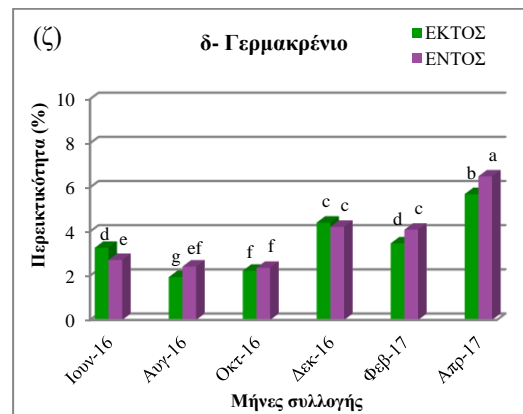
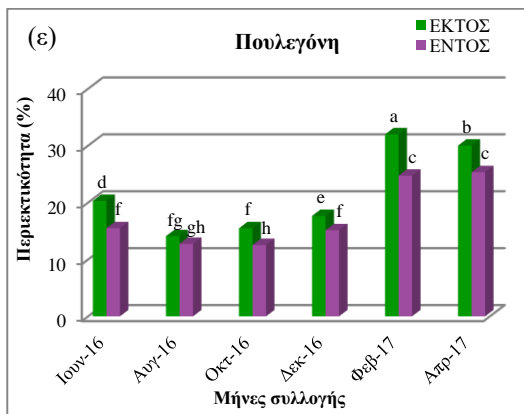
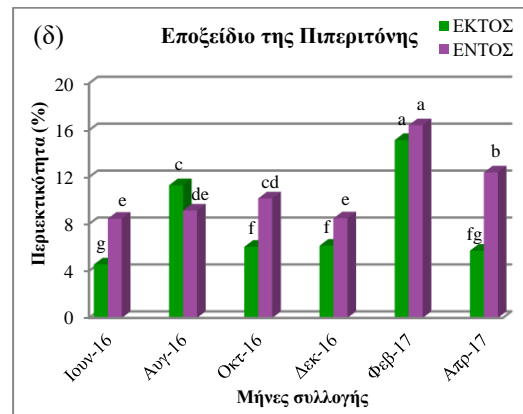
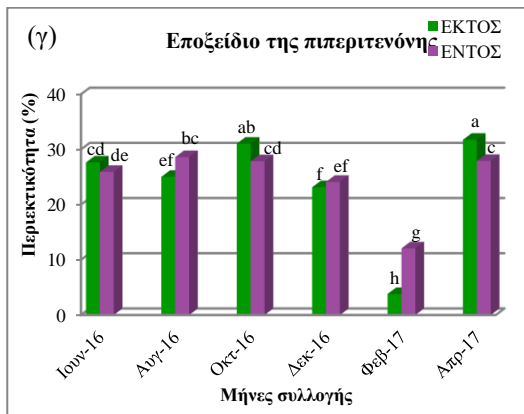
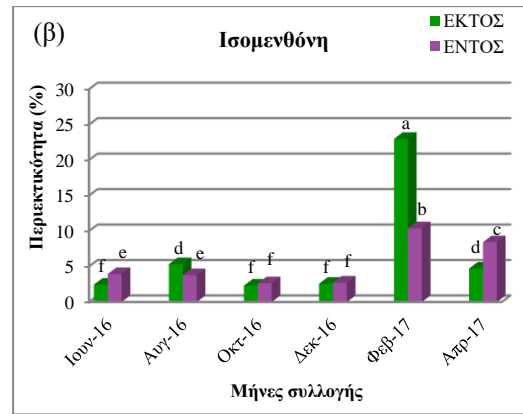
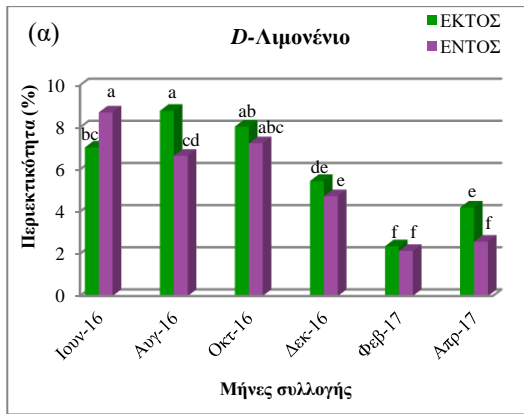
tr, trace (<0.1%), nd: not detected



Σχήμα IV.6. Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα συστατικών του αιθερίου ελαίου *C. perota* από φυτά εκτός ναλόφρακτου θερμοκηπίου που απομονώθηκε με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης και προσδιορίστηκαν με GC/MS κατά τους μήνες Ιουνίου 2016 (α), Αυγούστου 2016 (β), Οκτωβρίου 2016 (γ), Δεκεμβρίου 2016 (δ), Φεβρουαρίου 2017 (ε) και Απριλίου 2017 (ζ).



Σχήμα IV.7. Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα συστατικών του αιθερίου ελαίου *C. pereta* από φυτά εντός υαλόφρακτου θερμοκηπίου που απομονώθηκε με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης και προσδιορίστηκαν με GC/MS κατά τους μήνες Ιουνίου 2016 (α), Αυγούστου 2016 (β), Οκτωβρίου 2016 (γ), Δεκεμβρίου 2016 (δ), Φεβρουαρίου 2017 (ε) και Απριλίου 2017 (ζ).



Σχήμα IV.8. Σχηματική απεικόνιση της ποσοτικής διαφοροποίησης στα φυτά εκτός θερμοκηπίου, σε σχέση με αυτά του θερμοκηπίου (υπαίθρου) του *C. nepeta*, στα κύρια συστατικά λιμονένιο (α), ισομενθόνη (β), πουλεγόνη (γ), εποξειδίο της πιπεριτόνης (δ), εποξειδίο της πιπεριτενόνης (ε), δ-γερμακρένιο (ζ) και δικυκλογερμακρένιο (η).

3.3 Χημική σύσταση του αιθερίου ελαίου του *C. creticum* και *C. nepeta* από *in vitro* αναπτυγμένους μικροβλαστούς

Όσον αφορά το είδος *C. creticum* η μέση εκατοστιαία περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο από *in vitro* αναπτυγμένους μικροβλαστούς ήταν 1,1%. Από την ανάλυση του αιθερίου ελαίου, καταγράφηκαν 25 συστατικά εκ των οποίων ταυτοποιήθηκαν τα 23 (Πίν. IV.7, Σχ. IV.9α). Τα 25 συστατικά που καταγράφηκαν αποτελούν το 94,7% του συνόλου του αιθερίου ελαίου που απομονώθηκε. Το αιθέριο έλαιο του υπό μελέτη είδους χαρακτηρίζεται από την παρουσία οξυγονωμένων μονοτερπενίων (74,3%), ακολουθούμενα από τους μονοτερπενικούς υδρογονάνθρακες (11,6%) και τους σесκιτερπενικούς υδρογονάνθρακες (6,8%). Οι κύριοι εκπρόσωποι των οξυγονωμένων μονοτερπενίων ήταν το εποξείδιο της πιπεριτενόνης (59,9%) και το εποξείδιο της πιπεριτόνης (11,5%), των μονοτερπενικών υδρογονανθράκων το *D*-λιμονένιο (9,7%) και των σесκιτερπενικών υδρογονανθράκων το β -καρνοφυλλένιο (3,6%) και το δ -γερμακρένιο (2,7%) (Πίν. IV.7).

Στο είδος *C. nepeta* η μέση εκατοστιαία περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο από *in vitro* αναπτυγμένους μικροβλαστούς ήταν 1,7%. Από την ανάλυση του αιθερίου ελαίου που έγινε με GC-MS, καταγράφηκαν 23 συστατικά εκ των οποίων ταυτοποιήθηκαν τα 21 (Πίν. IV.8, Σχ. IV.9β). Τα 23 συστατικά που καταγράφηκαν αποτελούν το 91,9% του συνόλου του αιθερίου ελαίου που απομονώθηκε. Το αιθέριο έλαιο του *C. nepeta* χαρακτηρίζεται από την παρουσία οξυγονωμένων μονοτερπενίων (71,6%), ακολουθούμενα από τους μονοτερπενικούς υδρογονάνθρακες (10,7%) και τους σесκιτερπενικούς υδρογονάνθρακες (8,8%). Οι κύριοι εκπρόσωποι των οξυγονωμένων μονοτερπενίων ήταν το εποξείδιο της πιπεριτενόνης (34,2%), η πουλεγόνη (15,0%), το εποξείδιο της πιπεριτόνης (15,0%) και η ισομενθόνη (4,6%), των μονοτερπενικών υδρογονανθράκων το *D*-λιμονένιο (10,0%) και των σесκιτερπενικών υδρογονανθράκων το δ -γερμακρένιο (2,9%) και δικυκλογερμακρένιο (5,2%) (Πίν. IV.8).

Πίνακας IV.7. Σύσταση (%) του αιθερίου ελαίου του *C. creticum* από *in vitro* αναπτυγμένους μικροβλαστούς που παραλήφθηκε - απομονώθηκε με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης και προσδιορίστηκε με GC/MS σε συγκεντρωτικό δείγμα 6 υποκαλλιιεργειών.

	R.I.exp	Συστατικό	(%)
1.	936	<i>α</i> -πινένιο	0,5
2.	978	<i>β</i> -πινένιο	0,8
3.	988	<i>β</i> -μυρκένιο	0,1
4.	992	3-οκτανόλη	1,0
5.	1028	<i>D</i>-λιμονένιο	9,7
6.	1060	<i>γ</i> -τερπινένιο	0,1
7.	1088	τερπινολένιο	0,1
8.	1168	βορνεόλη	0,1
9.	1177	τερπινεν-4-όλη	0,4
10.	1191	<i>α</i> -τερπινεόλη	0,3
11.	1240	πουλεγόνη	0,2
12.	1250-1252	εποξειδίο της πιπεριτόνης *	11,5
13.	1275	ισοπιπεριτενόνη	0,2
14.	1280	Άγνωστο (M ¹)**	0,4
15.	1293	θυμόλη	0,1
16.	1304	καρβακρόλη	0,4
17.	1307	οξικός εστέρας διυδροκαρβεόλης*	0,4
18.	1329	οξικός εστέρας ισο-διυδροκαρβεόλης	0,4
19.	1342	Πιπεριτενόνη	0,7
20.	1365	εποξειδίο της πιπεριτενόνης	59,9
21.	1400	Άγνωστο (M ²)**	0,6
22.	1424	<i>β</i>-καρνοφυλλένιο	3,6
23.	1457	<i>α</i> -καρνοφυλλένιο	0,3
24.	1485	<i>δ</i>-γερμακρένιο	2,7
25.	1525	<i>δ</i> -καδινένιο	0,2
Μονοτερπένια			
		Οξυγονωμένα	74,3
		Υδρογονάνθρακες	11,6
Σεσκιτερπένια			
		Οξυγονωμένα	0,0
		Υδρογονάνθρακες	6,8
Άλλα			1,0
Άγνωστα			1,0
Σύνολο συστατικών (%)			94,7
Απόδοση αιθερίου ελαίου***			1,1

R.I.exp. Experimental Retention Index

*Correct isomer not identified

** Main qualifying ions (m/z) and their relative abundance (%)

Άγνωστο (M¹): 138 (100), 137 (91), 68 (96), 67 (89), 123 (43), 166 (6,5)**

Άγνωστο (M²): 166 (100), 123 (60), 105 (22), 137 (19), 69 (18)**

***v/w %: όγκος (mL) αιθερίου ελαίου σε 100g βάρος ξηρού φυτικού υλικού

Πίνακας IV.8. Σύσταση (%) του αιθερίου ελαίου του *C. nepeta* από *in vitro* αναπτυγμένους μικροβλαστούς που παραλήφθηκε - απομονώθηκε με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης και προσδιορίστηκε με GC/MS σε συγκεντρωτικό δείγμα 6 υποκαλλιεργειών.

	R.I.exp	Συστατικό	(%)
1.	938	<i>α</i> -πινένιο	0,2
2.	981	<i>β</i> -πινένιο	0,2
3.	990	<i>β</i> -μυρκένιο	0,3
4.	994	3-οκτανόλη	0,2
5.	1032	<i>D</i>-λιμονένιο	10,0
6.	1102	<i>n</i> -νονανόλη	0,1
7.	1156	μενθόνη	0,2
8.	1165	ισομενθόνη	4,6
9.	1178	ισοπουλεγόνη*	0,1
10.	1240	πουλεγόνη	15,0
11.	1256	εποξείδιο της πιπεριτόνης *	15,5
12.	1275	ισοπιπεριτενόνη	0,3
13.	1293	Άγνωστο (M ¹)	0,2
14.	1298	θυμόλη	0,2
15.	1309	καρβακρόλη	0,5
16.	1343	πιπεριτενόνη	1,0
17.	1366	εποξείδιο της πιπεριτενόνης	34,2
18.	1397	<i>β</i> -ελεμένιο	0,1
19.	1407	Άγνωστο (M ²)	0,3
20.	1428	<i>β</i>-καρνοφυλλένιο	0,5
21.	1470	<i>cis</i> -μουουρόλα-4(14)5-διένιο	0,1
22.	1489	<i>δ</i>-γερμακρένιο	2,9
23.	1504	δικυκλογερμακρένιο	5,2
Μονοτερπένια			
		Οξυγονωμένα	71,6
		Υδρογονάνθρακες	10,7
Σεσκιτερπένια			
		Οξυγονωμένα	0,0
		Υδρογονάνθρακες	8,8
Άλλα			0,3
Άγνωστα			0,5
Σύνολο συστατικών (%)			91,9
Απόδοση αιθερίου ελαίου***			1,7

R.I.exp. Experimental Retention Index

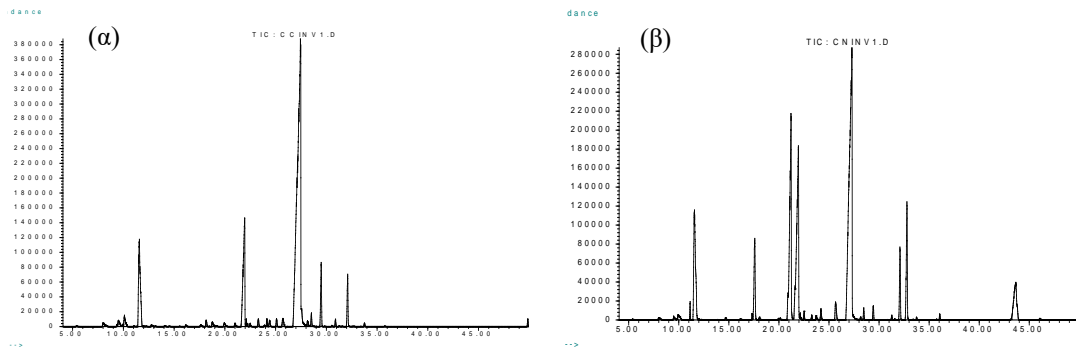
*Correct isomer not identified

** Main qualifying ions (m/z) and their relative abundance (%)

Άγνωστο (M¹): 138 (100), 137 (91), 68 (96), 67 (89), 123 (43), 166 (6,5)

Άγνωστο (M²): 166 (100), 123 (60), 105 (22), 137 (19), 69 (18)

***v/w %: όγκος (mL) αιθερίου ελαίου σε βάρος ξηρού φυτικού υλικού (σε g)



Σχήμα IV.9. Χαρακτηριστικό χρωματογράφημα συστατικών αιθερίου ελαίου από *in vitro* αναπτυγμένους μικροβλαστούς *C. creticum* (α) και *C. nepeta* (β) που απομονώθηκε με τη μέθοδο της υδροαπόσταξης και προσδιορίστηκαν με GC/MS.

IV.3.4 Συγκριτική μελέτη των αιθερίων ελαίων από *in vitro* αναπτυγμένους μικροβλαστούς και *ex vitro* καλλιεργούμενα φυτά

Τα χημικά προφίλ των αιθερίων ελαίων και των δύο φυτικών ειδών (*C. creticum* και *C. nepeta*) φυταρίων ανεπτυγμένων *in vitro* ήταν πολύ παρόμοια, με τα αντίστοιχα χημικά προφίλ των *ex vitro* καλλιεργούμενων φυτών (Πίν. IV.3, IV.4, IV.5, IV.6, IV.7, IV.8). Όμως ο αριθμός των ενώσεων που καταγράφηκε ήταν πολύ μικρότερος στα δείγματα από την *in vitro* καλλιέργεια για τα δύο είδη (Πίν. V.3, IV.4, IV.5, IV.6, IV.7, IV.8). Πιο συγκεκριμένα στο *C. creticum* καταγράφηκαν 42 ενώσεις στα *ex vitro* φυτά και 25 στα *in vitro*, ενώ για το είδος *C. nepeta* 39 ενώσεις για τα *ex vitro* φυτά και 23 για τα *in vitro*.

C. creticum

Στο αιθέριο έλαιο του *C. creticum* τόσο από τα *ex vitro* όσο και από τα *in vitro* φυτά η κύρια χημική ομάδα των απομονωμένων ενώσεων ήταν τα οξυγονωμένα μονοτερπένια με κύριους εκπροσώπους το εποξειδίο της πιπεριτόνης και το εποξειδίο της πιπεριτενόνης, ακολουθημένη από τους μονοτερπενικούς υδρογονάνθρακες *D*-λιμονένιο, και τους σεσκιτερπενικούς υδρογονάνθρακες δ -γερμακρένιο. Κάτι που πρέπει να αναφερθεί είναι ότι στο υλικό από τους *in vitro* αναπτυγμένους μικροβλαστούς δεν ανιχνεύτηκε η μενθόνη, η 2-υδροξυπιπεριτόνη και το δικυκλογερμακρένιο, ενώ στα δείγματα από τα *ex vitro* φυτά οι τρεις αυτές ενώσεις ανιχνεύτηκαν σε ποσοστό μέχρι και 6,7%, 5,0% και 2,7% αντίστοιχα. Αντίθετα η καρβακρόλη ήταν η μόνη χημική ένωση που δεν ανιχνεύτηκε στα δείγματα από τα *ex*

in vitro φυτά, ενώ εμφανίστηκε αν και σε πολύ μικρό ποσοστό (0,4%) στο υλικό από τους *in vitro* αναπτυγμένους μικροβλαστούς (Πίν. IV.3, IV.4, IV.7).

Η ανάλυση των δειγμάτων από τις *ex vitro* καλλιέργειες του Φεβρουαρίου, εντός και εκτός θερμοκηπίου, περίοδος όπου τα φυτά βρισκόταν στο στάδιο ανάπτυξης και των *in vitro* μικροβλαστών του *C. creticum* έδειξε παρόμοια σύνθεση σε μονοτερπένια (80 - 86,9% και 85,9%, αντίστοιχα) και σεσκιτερπένια (5,0 - 7,5% και 6,8%, αντίστοιχα) (Πίν. IV.3, IV.4, IV.7). Οι κύριες χημικές ενώσεις και των δύο καλλιεργειών ήταν το εποξείδιο της πιπεριτόνης, το εποξείδιο της πιπεριτενόνης, το *D*-λιμονένιο. Στις *ex vitro* καλλιέργειες το εποξείδιο της πιπεριτόνης ανιχνεύτηκε σε υψηλότερο ποσοστό (40,5 - 51,9%) σε σύγκριση με τους *in vitro* ανεπτυγμένους μικροβλαστούς (11,5%), αντίθετα το εποξείδιο της πιπεριτενόνης εμφανίστηκε σε υψηλότερο ποσοστό (59,9%) στους *in vitro* ανεπτυγμένους μικροβλαστούς σε σύγκριση με τις *ex vitro* καλλιέργειες (1,3 - 11,9%) (Πίν. IV.3, IV.4, IV.7). Το *D*-λιμονένιο ήταν υψηλότερο στους *in vitro* ανεπτυγμένους μικροβλαστούς και στην *ex vitro* καλλιέργεια εκτός θερμοκηπίου (υπαίθρου). Κάτι που πρέπει να αναφερθεί είναι ότι στο υλικό από *ex vitro* καλλιεργούμενα φυτά ανιχνεύτηκαν η 2-υδροξυπιπεριτόνη σε συγκέντρωση 4,9 - 5,0%, καθώς και η μενθόνη σε υψηλή συγκέντρωση (6,7%) στην *ex vitro* καλλιέργεια εκτός θερμοκηπίου, οι οποίες δεν ανιχνεύτηκαν στο υλικό από *in vitro* ανεπτυγμένους μικροβλαστούς (Πίν. IV.3, IV.4, IV.7).

C. nepeta

Στο αιθέριο έλαιο του *C. nepeta* τόσο από τα *ex vitro* όσο και από τα *in vitro* φυτά η κύρια χημική ομάδα των απομονωμένων ενώσεων ήταν τα οξυγονωμένα μονοτερπένια με κύριους εκπροσώπους την πουλεγόνη, το εποξείδιο της πιπεριτενόνης, την ισομενθόνη και το εποξείδιο της πιπεριτόνης, ακολουθημένη από τους μονοτερπενικούς υδρογονάνθρακες *D*-λιμονένιο, και τους σεσκιτερπενικούς υδρογονάνθρακες δ -γερμακρένιο και δικυκλογερμακρένιο. Η μενθόνη ήταν η μόνη χημική ένωση που δεν ανιχνεύτηκε στα δείγματα από τα *ex vitro* φυτά, ενώ εμφανίστηκε αν και σε πολύ μικρό ποσοστό (0,2%) στο υλικό από τους *in vitro* αναπτυγμένους μικροβλαστούς (Πίν. IV.5, IV.6, IV.8).

Η ανάλυση των δειγμάτων από τις *ex vitro* καλλιέργειες του Φεβρουαρίου, εντός και εκτός θερμοκηπίου, περίοδος όπου τα φυτά βρισκόταν στο στάδιο ανάπτυξης και των *in vitro* μικροβλαστών του *C. nepeta* έδειξε παρόμοια σύνθεση σε μονοτερπένια (73,7 - 80,3% και 81,8%, αντίστοιχα) και σεσκιτερπένια (12,5 - 14,3% και 8,8%, αντίστοιχα)

(Πίν. IV.5, IV.6, IV.7). Οι κύριες χημικές ενώσεις και των δύο καλλιιεργειών ήταν το εποξειδίο της πιπεριτόνης, η πουλεγόνη, η ισομενθόνη, το εποξειδίο της πιπεριτενόνης, το *D*-λιμονένιο, το δ -γεσμακρένιο και το δικυκλογεσμακρένιο. Στις *ex vitro* καλλιέργειες η πουλεγόνη και η ισομενθόνη ανιχνεύτηκαν σε υψηλότερο ποσοστό (24,7 – 30,0% και 10,4 – 23,0%, αντίστοιχα) σε σύγκριση με τους *in vitro* ανεπτυγμένους μικροβλαστούς (15,0% και 4,6%, αντίστοιχα), αντίθετα το *D*-λιμονένιο και το εποξειδίο της πιπεριτενόνης εμφανίστηκαν σε υψηλότερο ποσοστό (10,0% και 34,2%, αντίστοιχα) στους *in vitro* ανεπτυγμένους μικροβλαστούς σε σύγκριση με τις *ex vitro* καλλιέργειες (2,1 - 2,4% και 3,8 - 12,1% αντίστοιχα) (Πίν. IV.5, IV.6, IV.8). Το εποξειδίο της πιπεριτόνης, το δ -γεσμακρένιο και το δικυκλογεσμακρένιο ήταν σε παρόμοια συγκέντρωση τόσο στις *ex vitro* όσο και στην *in vitro* καλλιέργεια (Πίν. IV.5, IV.6, IV.8).

IV.4. ΣΥΖΗΤΗΣΗ – ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στα πειράματα που πραγματοποιήθηκαν, διερευνήθηκε η απόδοση αιθερίου ελαίου και η καταγραφή της χημικής σύστασης αυτού στα είδη *C. creticum* και *C. nepeta*, σε σχέση με την εποχή και το περιβάλλον καλλιέργειας τους. Η μέση εκατοστιαία περιεκτικότητα του αιθερίου ελαίου του *C. nepeta* κυμάνθηκε από 0,9 έως 2,6% στα φυτά εντός και εκτός θερμοκηπίου και ανάλογη διακύμανση παρατηρήθηκε στα φυτά εντός και εκτός θερμοκηπίου του *C. creticum* (0,5 - 2,5%).

Γενικά και στα δύο είδη ο μέσος όρος αιθερίου ελαίου των φυτών στο ύπαιθρο ήταν ελάχιστα μεγαλύτερος σε σχέση με του θερμοκηπίου. Η μεγαλύτερη απόδοση και για τις δύο μεταχειρίσεις (εντός ή εκτός θερμοκηπίου) παρατηρήθηκε τον Αύγουστο (2,5 - 2,6% *C. nepeta* και 1,9 - 2,5% *C. creticum*), ενώ η μικρότερη απόδοση το Φεβρουάριο (0,9% *C. nepeta* και 0,5% *C. creticum*). Γενικά οι υψηλότερες αποδόσεις καταγράφηκαν από Ιούνιο έως Οκτώβριο, όπου τα φυτά ήταν σε ανθοφορία, καθώς και τον Απρίλιο, ενώ πολύ χαμηλή απόδοση καταγράφηκε το Φεβρουάριο. Παρόμοια απόδοση (2,0%) κατέγραψαν και οι Souleles *et al.* (1987) σε φυτά *C. nepeta* από τη Λευκάδα τον Αύγουστο, περίοδο που τα φυτά βρίσκονταν στα στάδιο της ανθοφορίας, ενώ οι Couladis and Tzakou (2001) σε πληθυσμό από την Κόρινθο αναφέρουν απόδοση 3,3% στο ίδιο αναπτυξιακό στάδιο. Αυτή η περιοδικότητα της απόδοσης σε αιθέριο έλαιο χαρακτηρίζει και άλλα φυτά της οικογένειας Lamiaceae όπως *Clinopodium pulegium* (Slavkovska *et al.*, 2013), διάφορα είδη *Mentha* (Hussain *et al.*, 2010) και *Origanum* (Putievsky *et al.*, 1988, Kokkini *et al.*, 2002, Kizil *et al.*, 2008).

Στο αιθέριο έλαιο του *C. creticum*, εντός και εκτός θερμοκηπίου καταγράφηκαν 42 συστατικά εκ' των οποίων ταυτοποιήθηκαν τα 37, ενώ μικρότερο αριθμό ενώσεων (26) ταυτοποίησαν οι Karousou *et al.* (1996) σε αυτοφυείς πληθυσμούς *C. cretica* στα Λευκά Όρη. Στα δείγματα όλων των περιόδων που εξετάστηκαν, τα 42 συστατικά που καταγράφηκαν αποτελούν το 91,8 - 99,1% του συνόλου του αιθερίου ελαίου που απομονώθηκε. Η κύρια χημική ομάδα των απομονωμένων ενώσεων ήταν τα οξυγονωμένα μονοτερπένια με κύριους εκπροσώπους το εποξείδιο της πιπεριτόνης, το εποξείδιο της πιπεριτενόνης και η μενθόνη, ακολουθημένη από το μονοτερπενικό υδρογονάνθρακα *D*-λιμονένιο, και το σεσκιτερπένιο δ -γερμακρένιο. Και οι Karousou *et al.* (1996) στους τρεις πληθυσμούς που μελέτησαν αναφέρουν ως κύρια χημική ομάδα των απομονωμένων ενώσεων τα οξυγονωμένα μονοτερπένια, με κύριους

εκπροσώπους το εποξειδίο της πιπεριτόνης, την πιπεριτενόνη και το εποξειδίο της πιπεριτενόνης.

Στο αιθέριο έλαιο του *C. nepeta* εντός και εκτός θερμοκηπίου καταγράφηκαν 39 συστατικά εκ' των οποίων ταυτοποιήθηκαν τα 35, ενώ μικρότερο αριθμό ενώσεων ταυτοποίησαν οι Souleles *et al.* (1987) και Couladis and Tzakou (2001) σε φυτά *C. nepeta* (27 και 23 αντίστοιχα) από διάφορες περιοχές της Ελλάδας. Στο αιθέριο έλαιο από αυτοφυή φυτά *C. nepeta* από την Ιταλία ταυτοποιήθηκαν μέχρι και 57 ενώσεις (Negro *et al.*, 2013), την ίδια χρονιά οι Pistelli *et al.* (2013) ταυτοποίησαν 31 ενώσεις από φυτικό υλικό από την Κεντρική Ιταλία, ενώ οι Debbabi *et al.* (2020) από την Τυνησία από 23 έως 42 ενώσεις. Από τα προηγούμενα προκύπτει ότι υπάρχει μεγάλη παραλλακτικότητα στη σύνθεση του αιθερίου ελαίου της *C. nepeta*. Στα δείγματα όλων των περιόδων που εξετάστηκαν τα 39 συστατικά που καταγράφηκαν αποτελούν το 95,2 - 98,9% του συνόλου του αιθερίου ελαίου που απομονώθηκε. Η κύρια χημική ομάδα των απομονωμένων ενώσεων είναι τα οξυγονωμένα μονοτερπένια, με κύριους εκπροσώπους τη πουλεγόνη, το εποξειδίο της πιπεριτενόνης, την ισομενθόνη και το εποξειδίο της πιπεριτόνης, ακολουθημένη από το μονοτερπενικό υδρογονάνθρακα *D*-λιμονένιο και τα σεσκτερπένια δ -γερμακρένιο και δικυκλογερμακρένιο. Παρόμοια αποτελέσματα αναφέρουν και οι Souleles *et al.* (1987) και οι Couladis and Tzakou (2001) σε δείγματα από τη Λευκάδα και την Κόρινθο αντίστοιχα, οι οποίοι αναφέρουν ως κύρια χημική ομάδα των απομονωμένων ενώσεων τα οξυγονωμένα μονοτερπένια, αντίθετα οι Pistelli *et al.* (2013) αναφέρουν ως κύρια χημική ομάδα των απομονωμένων ενώσεων από φυτικό υλικό *C. nepeta* από την Ιταλία τους μονοτερπενικούς υδρογονάνθρακες.

Πιο συγκεκριμένα οι Souleles *et al.* (1987) ανίχνευσαν σε υψηλό ποσοστό την πουλεγόνη (39,7%), την ισομενθόνη (25,6%) και τη μενθόνη (24,7%), ενώ οι Couladis and Tzakou (2001) την πουλεγόνη (41,0%) και μενθόνη (32,0%).

Πιο πρόσφατα οι Karousou *et al.* (2012) ανέλυσαν το αιθέριο έλαιο από τρία διαφορετικά είδη *Calamintha* (*C. glandulosa*, *C. nepeta* και *C. menthifolia*) από τη Βόρεια Ελλάδα και την Κρήτη. Όσον αφορά το *C. nepeta* προσδιόρισαν υψηλά ποσοστά μενθόνης (39,6%), πουλεγόνης (21,8%) και *trans*- οξειδίου πιπεριτόνης (11,6%). Στο αιθέριο έλαιο του φυτού από τη περιοχή της Ιταλίας (Pistelli *et al.*, 2013) βρέθηκαν υψηλές συγκεντρώσεις λιμονένιου (34,8%), καρυφυλλενίου (10,3%) και δ -γερμακρενίου (10,7%), ενώ οι Negro *et al.* (2013) από φυτικό υλικό από τη Νότια Ιταλία ταυτοποίησαν τέσσερεις κύριες χημικές ενώσεις, την πιπεριτόνη, την πιπεριτενόνη, την

πουλεγόνη και τη μενθόνη σε διάφορες συγκεντρώσεις ανάλογα με την περιοχή συλλογής. Οι Hodaj-Çeliku *et al.* (2017) ανέλυσαν το αιθέριο έλαιο από το υπέργειο μέρος του *C. nepeta* κατά την περίοδο της ανθοφορίας από την Αλβανία και προσδιόρισαν υψηλά ποσοστά πουλεγόνης (31,7%), ισομενθόνης (12,7%) και σπαθουλενόλης (20,0%). Στο αιθέριο έλαιο δύο υποειδών *C. nepeta* από την Τυνησία βρέθηκαν υψηλές συγκεντρώσεις οξυγονωμένων μονοτερπενίων, με κύριους εκπροσώπους το εποξειδίο της πιπεριτενόνης (23,4 - 39,3%) και το εποξειδίο της πιπεριτόνης (16,3 - 51,7%). (Negro *et al.*, 2013). Αντίθετα οι Pistelli *et al.* (2013) σε φυτικό υλικό *C. nepeta* από την Ιταλία ανίχνευσαν σε υψηλό ποσοστό (54%) μονοτερπενικούς υδρογονάνθρακες, με κύριους εκπρόσωπους το α -πινένιο (6,3%), το β -πινένιο (8,4%) και το λιμονένιο (34,8%).

Στη συγκέντρωση των κύριων ενώσεων που ανιχνεύτηκαν (πουλεγόνη, εποξειδίο της πιπεριτενόνης, ισομενθόνη μενθόνη, εποξειδίο της πιπεριτόνης, *D*-λιμονένιο, δ -γερμακρένιο και δικυκλογερμακρένιο) και για τα δύο φυτικά είδη που μελετήθηκαν παρατηρήθηκε επίσης εποχική διακύμανση εντός και εκτός θερμοκηπίου, όπως έχει παρατηρηθεί από τους Villa-Ruano *et al.* (2015) σε *Clinopodium macrostemum* var. *laevigatum*, τους Yesil Celiktas *et al.* (2007) σε *Rosmarinus officinalis*, Argyropoulo *et al.* (2007) σε *Lippia citriodora* και τους Müller-Riebau *et al.* (1997) σε *Thymbra spicata* L. var. *spicata*, *Satureja thymbra* L., *Salvia fruticosa* L., *Laurus nobilis* L. και *Mentha pulegium* L.

Ένα αρκετά γενικευμένο συμπέρασμα για το είδος *C. nepeta* θα μπορούσε να είναι ότι κατά το στάδιο της ανάπτυξης το Φεβρουάριο παρατηρήθηκε αύξηση της ισομενθόνης και του εποξειδίου της πιπεριτόνης, ενώ κατά το στάδιο της ανθοφορίας παρατηρήθηκε μείωση των προαναφερθέντων ενώσεων και αύξηση του λιμονένιου και του οξειδίου της πιπεριτενόνης. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και από τους De Rooter *et al.* (1986b) και Cook *et al.* (2007) για το ίδιο είδος. Πιο συγκεκριμένα οι De Rooter *et al.* (1986b) αναφέρουν ότι οι συγκεντρώσεις των δύο εποξειδίων είναι αντιστρόφως ανάλογες κατά τη διάρκεια του έτους στο είδος *C. nepeta* ssp. *glandulosa*, με την περιεκτικότητα σε εποξειδίο της πιπεριτενόνης να είναι υψηλότερη το καλοκαίρι, ενώ το εποξειδίο της πιπεριτόνης το φθινόπωρο. Οι Cook *et al.* (2007) για το ίδιο είδος αναφέρουν ότι τα τελικά προϊόντα της βιοσύνθεσης μονοτερπενίου κατά το στάδιο της ανάπτυξης (Απρίλιο) δηλ. το *trans* - εποξειδίο της πιπεριτόνης και η μενθόνη στο χημειότυπο I και II, αντίστοιχα, παρουσίασαν τις υψηλότερες συγκεντρώσεις, ενώ κατά την ανθοφορία (Σεπτέμβριο) παρατηρήθηκε μείωση των προαναφερθέντων ενώσεων

και αύξηση του λιμονένιου και του οξειδίου πιπεριτενόνης, στο χημειότυπο I και της πουλεγόνης, πιπεριτενόνης και πιπεριτόνης στο χημειότυπο II. Ένα παρόμοια γενικευμένο συμπέρασμα θα μπορούσε να δοθεί και για το είδος *C. creticum* στο οποίο παρατηρούμαι ότι κατά το στάδιο της ανάπτυξης το Φεβρουάριο παρατηρήθηκε αύξηση της μενθόνης ενώ κατά το στάδιο της ανθοφορίας παρατηρήθηκε αύξηση του λιμονένιου, εποξειδίου της πιπεριτενόνης, πουλεγόνης. Τα αποτελέσματα συμφωνούν με τις προαναφερθείσες βιβλιογραφίες, με μόνη εξαίρεση το εποξείδιο της πιπεριτόνης το οποίο βρέθηκε σε αυξημένη συγκέντρωση τόσο κατά το στάδια της ανάπτυξης (Φεβρουάριο) όσο και κατά ανθοφορία του Απρίλιου, ενώ κατά τους καλοκαιρινούς μήνες παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσης μέχρι και 80%. Η πουλεγόνη είχε υψηλή συγκέντρωση τόσο κατά το στάδια της ανάπτυξης (Φεβρουάριο) όσο και κατά την ανθοφορία του Απρίλιου, ενώ κατά τους καλοκαιρινούς μήνες, όπου τα φυτά βρίσκονται σε ανθοφορία παρατηρήθηκε μείωση της συγκέντρωσής της κατά 50%. Παρόμοια αποτελέσματα σχετικά με την εποχική διακύμανση της σύστασης της πουλεγόνης, έχουν αναφερθεί και από τους Villa-Ruano *et al.* (2015) σε ένα άλλο είδος *Clinopodium* από τη περιοχή του Οαχάκα του Μεξικού, το *Clinopodium macrostemum* var. *laevigatum*.

Όπως αναφέρθηκε πιο πάνω στο αιθέριο έλαιο του *C. nepeta* ανιχνεύτηκαν τόσο η πουλεγόνη και ισομενθόνη όσο και το εποξείδιο της πιπεριτενόνης και το εποξείδιο της πιπεριτόνης. Με βάση τα αποτελέσματα αυτά και τη βιβλιογραφία μπορούμε να αναφέρουμε ότι στο υπό μελέτη είδος, παρατηρείται η συνύπαρξη δύο χημειότυπων του τύπου I και II. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί από τους De Rooter *et al.* (1987) και τους Negro *et al.* (2013) σε πληθυσμούς *C. nepeta* από το Βέλγιο και τη Νότια Ιταλία, αντίστοιχα. Έχει επίσης αναφερθεί η συνύπαρξη δύο χημειοτύπων σε φυτικά δείγματα από τον ίδιο πληθυσμό από το νησί της Ζακύνθου (Ενδο-πληθυσμιακή μεταβολή) (Cook *et al.*, 2007). Ωστόσο, θα πρέπει να εξεταστεί πολύ μεγαλύτερο δείγμα για τη διερεύνηση του βιοχημικού πολυμορφισμού σε επίπεδο πληθυσμού, προτού καταλήξουμε σε οποιοδήποτε συμπέρασμα.

Όσον αφορά τη μέση εκατοστιαία περιεκτικότητα σε αιθέριο έλαιο από *in vitro* αναπτυγμένους μικροβλαστούς στο είδος *C. creticum* ήταν 1,1%, ενώ στο είδος *C. nepeta* ήταν 1,7%. Από την ανάλυση του αιθερίου ελαίου του *C. creticum* και *C. nepeta* καταγράφηκαν 23 και 25 συστατικά, εκ των οποίων ταυτοποιήθηκαν τα 21 και 23, αντίστοιχα. Όσον αφορά το *C. nepeta*, παρόμοιο αριθμό ενώσεων αλλά διαφορετικές ενώσεις ταυτοποίησαν οι Pistelli *et al.* (2013) σε φυτά *C. nepeta* από *in vitro*

αναπτυγμένους μικροβλαστούς, ενώ για το *C. creticum* δεν υπάρχουν αντίστοιχες μελέτες στη βιβλιογραφία.

Τα 23 συστατικά που καταγράφηκαν για το είδος *C. nepeta* αποτελούν το 90,9%, με κύρια χημική ομάδα τα οξυγονωμένα μονοτερπένια, με κύριους εκπροσώπους τη πουλεγόνη, το εποξειδίο της πιπεριτενόνης, την ισομενθόνη και το εποξειδίο της πιπεριτόνης, ακολουθημένη από το μονοτερπενικό υδρογονάνθρακα *D*-λιμονένιο και τα σεσκτηρπένια δ -γερμακρένιο και δικυκλογερμακρένιο. Αντίθετα οι Pistelli *et al.* (2013) στην ανάλυση του αιθερίου ελαίου του *C. nepeta* δεν κατέγραψαν τη παρουσία πουλεγόνης, οξειδίου της πιπεριτενόνης, ισομενθόνης και εποξειδίου της πιπεριτόνης, ενώ το μεγαλύτερο ποσοστό το κατείχαν οι μονοτερπενικοί υδρογονάνθρακες με κύριους εκπροσώπους το β -πινένιο (42,5%) και το *D*-λιμονένιο (15,0%). Επιπλέον ανίχνευσαν σε υψηλό ποσοστό το *cis*-μουουρόλα-3,5-διένιο με ποσοστό 13,9% και το *cis*-μουουρόλα-4(14)5-διένιο με ποσοστό 9,1%. Τέλος τα 25 συστατικά που καταγράφηκαν για το είδος *C. creticum* αποτελούν το 94,7%, με κύρια χημική ομάδα τα οξυγονωμένα μονοτερπένια, με κύριους εκπροσώπους το εποξειδίο της πιπεριτενόνης και το εποξειδίο της πιπεριτόνης ακολουθημένη από το μονοτερπενικό υδρογονάνθρακα *D*-λιμονένιο και τα σεσκτηρπένια β -καρυοφυλλένιο και δ -γερμακρένιο.

Τα χημικά προφίλ των αιθερίων ελαίων και των δύο φυτικών ειδών προερχόμενα από *in vitro* αναπτυγμένους μικροβλαστούς ήταν παρόμοια, με τα αντίστοιχα χημικά προφίλ των *ex vitro* φυτών (είτε εντός είτε εκτός θερμοκηπίου), αντίθετα οι Pistelli *et al.* (2013) για το είδος *C. nepeta* αναφέρουν διαφορές μεταξύ των χημικών προφίλ *in vitro* και των *ex vitro* φυτών.

Όσον αφορά τον αριθμό των ενώσεων που καταγράφηκαν στα δείγματα από την *in vitro* καλλιέργεια ήταν σχεδόν ο υποδιπλάσιος για τα δύο είδη σε σχέση με τον αριθμό των ενώσεων που ανιχνεύτηκαν στα *ex vitro* φυτά. Πιο συγκεκριμένα στο *C. creticum* ανιχνεύτηκαν 42 ενώσεις για τα *ex vitro* φυτά και 25 για το υλικό από την *in vitro* καλλιέργεια, ενώ για το είδος *C. nepeta* 39 ενώσεις για τα *ex vitro* φυτά και 23 για τα *in vitro*, κάτι που αποδίδεται στην πολύ μικρή συγκέντρωση των ουσιών (χαμηλότερη από 1%) και έρχεται σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Pistelli *et al.* (2013) που ανίχνευσαν μικρότερο αριθμό ενώσεων (25) στους *in vitro* ανεπτυγμένους μικροβλαστούς σε σύγκριση με τα *ex vitro* καλλιεργούμενα φυτά (31).

Η μέση εκατοστιαία απόδοση σε αιθέριο έλαιο των *C. creticum* και *C. nepeta* στις *ex vitro* καλλιέργειες του Φεβρουαρίου, εντός και εκτός θερμοκηπίου, περιόδος όπου

τα φυτά βρισκόταν στο στάδιο ανάπτυξης ήταν μικρότερη (0,5 - 0,7% και 0,9 - 1,13%, αντίστοιχα) σε σχέση με των *in vitro* μικροβλαστών (1,1% και 1,7%, αντίστοιχα). Οι Hirata *et al.* (1990) σε μη ανθισμένα φυτά *Mentha spicata* από *in vitro* και *ex vitro* καλλιέργεια βρήκαν παρόμοια απόδοση σε αιθέριο έλαιο (0,9 – 1,3% και 1,0 – 1,5%, αντίστοιχα), ενώ οι Amaral-Baroli *et al.* (2016) σε μη ανθισμένα φυτά *Ocimum basilicum* βρήκαν υψηλότεροι απόδοση σε αιθέριο έλαιο στην *ex vitro* καλλιέργεια, αν και με πολύ μικρή διαφορά (0,1% *ex vitro* και 0,01% *in vitro* καλλιέργεια). Οι Thiem *et al.* (2011) και οι Nogueira and Romano (2002) σε ανθισμένη *ex vitro* και σε μη ανθισμένη *in vitro* καλλιέργεια *Eryngium planum* και *Lavandula viridis*, αντίστοιχα, βρήκαν ότι η απόδοση σε αιθέριο έλαιο της *ex vitro* καλλιέργειας ήταν υψηλότερη σε σύγκριση με της *in vitro* καλλιέργειας, κάτι το οποίο ωφείλεται στο στάδιο ανθοφορίας που βρίσκονταν τα *ex vitro* φυτά. Τέλος οι Manan *et al.* (2016) σε ανθισμένα τόσο *ex vitro* όσο και *in vitro* φυτά *Ocimum basilicum* βρήκαν υψηλότερη απόδοση στα *ex vitro* φυτά. Η υψηλότερη απόδοση σε αιθέριο έλαιο κατά το στάδιο της ανθοφορίας έχει αναφερθεί σε πάρα πολλά φυτά της οικογένειας Lamiaceae (Kizil *et al.*, 2008, Ait-Ouazzou *et al.*, 2012, Zekri *et al.*, 2013, Zantar *et al.*, 2015).

Η ανάλυση των δειγμάτων από την *ex vitro* καλλιέργεια του Φεβρουαρίου και των *in vitro* μικροβλαστών των *C. creticum* και *C. nepeta* έδειξε παρόμοια σύνθεση σε μονοτερπένια και σεσκιτερπένια, με τα μονοτερπένια να κατέχουν την υψηλότερη συγκέντρωση, παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και από τους Pistelli *et al.* (2013) σε φυτικό υλικό του ίδιους είδους από την Ιταλία. Υψηλότερο ποσοστό ήταν οξυγονωμένα μονοτερπένια, σε σύγκριση με τους μονοτερπενικούς υδρογονάνθρακες και στην *ex vitro* και στην *in vitro* καλλιέργεια. Αντίθετα οι Pistelli *et al.* (2013) σε φυτικό υλικό *C. nepeta* από την Ιταλία (Πίζα) αναφέρουν υψηλότερο ποσοστό σε μονοτερπενικούς υδρογονάνθρακες σε σύγκριση με τα οξυγονωμένα μονοτερπένια και στις δύο καλλιέργειες (*in vitro* και *ex vitro*), κάτι το οποίο μπορεί να αποδοθεί στις διαφορετικές εδαφοκλιματικές συνθήκες και στο διαφορετικό μικροκλίμα της περιοχής.

Οι κύριες χημικές ενώσεις του *C. creticum* και των δύο καλλιεργειών κατά το στάδιο της βλαστικής ανάπτυξης ήταν το εποξειδίο της πιπεριτόνης, το εποξειδίο της πιπεριτενόνης, το *D*-λιμονένιο. Στις *ex vitro* καλλιέργειες το εποξειδίο της πιπεριτόνης ανιχνεύτηκε σε υψηλότερο ποσοστό σε σύγκριση με τους *in vitro* ανεπτυγμένους μικροβλαστούς, το αντίθετο αντίθετα με το εποξειδίο της πιπεριτενόνης. Δεδομένου ότι το εποξειδίο της πιπεριτενόνης είναι πρόδρομη ένωση του εποξειδίου της πιπεριτόνης, τα παραπάνω αποτελέσματα οδηγούν στο συμπέρασμα ότι στις *ex vitro* καλλιέργειες το

ένζυμο cytochrome P450 (+)-MFS επιδρά σε υψηλότερο βαθμό, με αποτέλεσμα τη μετατροπή υψηλότερου ποσοστού οξειδίου της πιπεριτενόνης σε εποξειδίο της πιπεριτόνης, το αντίθετο συμβαίνει στην *in vitro* καλλιέργεια (Σχ. IV.1, Mahmoud and Croteau, 2003, Tuner and Croteau, 2004, Benlarbi *et al.*, 2014, Božović *et al.*, 2015). Το *D*-λιμονένιο ανιχνεύτηκε σε υψηλότερο ποσοστό στους *in vitro* ανεπτυγμένους μικροβλαστούς και στην *ex vitro* καλλιέργεια εκτός θερμοκηπίου.

Οι κύριες χημικές ενώσεις του *C. nepeta* και των δύο καλλιεργειών κατά το στάδιο της βλαστικής ανάπτυξης ήταν το εποξειδίο της πιπεριτόνης, η πουλεγόνη, η ισομενθόνη, το εποξειδίο της πιπεριτενόνης, το *D*-λιμονένιο, το δ -γερμακρένιο και το δικυκλογερμακρένιο. Στις *ex vitro* καλλιέργειες η πουλεγόνη και η ισομενθόνη ανιχνεύτηκαν σε υψηλότερο ποσοστό σε σύγκριση με τους *in vitro* ανεπτυγμένους μικροβλαστούς, ενώ το εποξειδίο της πιπεριτενόνης εμφανίστηκε σε υψηλότερο ποσοστό στους *in vitro* ανεπτυγμένους μικροβλαστούς, κάτι το οποίο οδηγεί στο συμπέρασμα ότι διαφορετικά βιοσυνθετικά μονοπάτια λαμβάνουν χώρα στην *ex vitro* και *in vitro* καλλιέργεια (Σχ. IV.1, Mahmoud and Croteau, 2003, Tuner and Croteau, 2004, Benlarbi *et al.*, 2014, Božović *et al.*, 2015). Τα μονοπάτια που θα ακολουθηθούν κάθε φορά εξαρτώνται από την παρουσία και τη συγκέντρωση των αντίστοιχων ενζύμων σε κάθε καλλιέργεια. Το *D*-λιμονένιο ανιχνεύτηκε σε υψηλότερο ποσοστό στους *in vitro* ανεπτυγμένους μικροβλαστούς σε σύγκριση με την *ex vitro* καλλιέργεια, ενώ το εποξειδίο της πιπεριτόνης, το δ -γερμακρένιο και το δικυκλογερμακρένιο είχαν παρόμοια συγκέντρωση.

Γενικότερα απαντούν διαφορετικές και αντικρουόμενες πληροφορίες στη διεθνή βιβλιογραφία όσον αφορά στη σύγκριση της σύστασης του αιθερίου ελαίου από *in vitro* καλλιέργεια και από *ex vitro* καλλιεργούμενα φυτά υπάρχουν αντικρουόμενες απόψεις. Η ομοιότητα της σύστασης έχει αναφερθεί και σε άλλα φαρμακευτικά είδη της οικογένειας Lamiaceae, π.χ. *Salvia sclarea* (Kuzma *et al.*, 2009), *Salvia fruticosa* Mill. (Arikat *et al.*, 2004), *Thymus vulgaris* L. (Affonso *et al.*, 2009) *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Morone-Fortunato and Avato, 2008), *Minthostachys mollis* (Chebel *et al.*, 1998), *Mentha spicata* (Hirata *et al.*, 1990). Αντιθέτως, υπάρχουν συγκριτικές μελέτες οι οποίες έδειξαν πολυάριθμες διαφορές μεταξύ των δύο χημικών προφίλ του αιθερίου ελαίου, όπως για τα είδη *C. nepeta* (Pistelli *et al.*, 2013), *Salvia przewalskii* (Skała *et al.*, 2007) και *Eryngium planum* (Thiem *et al.*, 2011).

IV.5. ΓΕΝΙΚΑ ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- Η υψηλότερη απόδοση σε αιθέριο έλαιο καταγράφηκε και για τα δύο είδη τον Αύγουστο, ενώ η χαμηλότερη το Φεβρουάριο.
- Και τα δύο είδη είχαν υψηλή απόδοση σε αιθέρια έλαια κατά την ανθοφορία (Ιούνιο - Φεβρουάριο), καθώς και τον Απρίλιο, τόσο εντός, όσο και εκτός θερμοκηπίου.
- Υψηλότερες αποδόσεις αιθερίου ελαίου σε όλες τις εποχές δειγματοληψίας καταγράφηκαν στα φυτά στο ύπαιθρο και για τα δύο είδη.
- Η κύρια χημική ομάδα που ανιχνεύτηκε στο αιθέριο έλαιο και των δύο ειδών ήταν τα οξυγονωμένα μονοτερπένια, ακολουθούμενη από τους μονοτερπενικούς υδρογονάνθρακες και τα σεσκιτερπένια.
- Για το *C. creticum*, οι κύριοι εκπρόσωποι των οξυγονωμένων μονοτερπενίων ήταν το εποξειδίο της πιπεριτόνης, το εποξειδίο της πιπεριτενόνης και η μενθόνη, των μονοτερπενικών υδρογονανθράκων το *D*-λιμονένιο και των σεσκιτερπενικών υδρογονανθράκων το δ -γερμακρένιο.
- Για το είδος *C. nepeta*, οι κύριοι εκπρόσωποι των οξυγονωμένων μονοτερπενίων ήταν η πουλεγόνη, το εποξειδίο της πιπεριτενόνης, η ισομενθόνη και το εποξειδίο της πιπεριτόνης, των μονοτερπενικών υδρογονανθράκων το *D*-λιμονένιο και των σεσκιτερπενικών υδρογονανθράκων το δ -γερμακρένιο και το δικυκλογερμακρένιο.
- Στη συγκέντρωση των ανωτέρω ενώσεων παρατηρήθηκε επίσης εποχική διακύμανση και στις δύο θέσεις *ex vitro* καλλιέργειας (εντός και εκτός θερμοκηπίου) και για τα δύο υπό μελέτη είδη.
- Γενικά, διαπιστώθηκε αύξηση της ισομενθόνης, μενθόνης και του εποξειδίου της πιπεριτόνης κατά το στάδιο της βλαστικής ανάπτυξης το Φεβρουάριο, ενώ κατά το στάδιο της ανθοφορίας παρατηρήθηκε μείωση των προαναφερθέντων ενώσεων και αύξηση του λιμονένιου, οξειδίου της πιπεριτενόνης, πουλεγόνης.
- Η ανάλυση του αιθερίου ελαίου του *C. nepeta*, ανέδειξε τη συνύπαρξη δύο χημειότυπων και θα ήταν εξαιρετικά ενδιαφέρον να εξεταστεί περαιτέρω ο βιοχημικός πολυμορφισμός σε επίπεδο πληθυσμού.

- Στο αιθέριο έλαιο από *in vitro* αναπτυγμένους μικροβλαστούς, ανιχνεύτηκε μικρότερος αριθμός ενώσεων σε σχέση με τα αντίστοιχα αιθέρια έλαια των καλλιεργούμενων φυτών και για τα δύο υπό μελέτη είδη.
- Όσον αφορά στα χημικά προφίλ των αιθερίων ελαίων και των δύο φυτικών ειδών προερχόμενα, από *in vitro* αναπτυγμένους μικροβλαστούς, αυτά ήταν παρεμφερή με τα αντίστοιχα χημικά προφίλ των *ex vitro* καλλιεργούμενων φυτών.
- Διαπιστώθηκε ότι η καλλιέργεια των *C. nepeta* και *C. creticum* είναι δυνατόν να γίνει με επιτυχία υπό κάλυψη για την εκμετάλλευση των αιθερίων ελαίων της. Η ανθοφορία σε βλαστούς ανεξαρτήτως μήκους από το Μάρτιο έως το Δεκέμβριο του 2016, αποδίδεται στις υψηλές θερμοκρασίες του έτους και φανερώνει την επίδραση της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος στην ανάπτυξη και στην ανθοφορία. Ως εκ τούτου μπορεί να διερευνηθεί η ρύθμιση της θερμοκρασίας σε επίπεδα κατάλληλα για την ενίσχυση της ανθοφορίας και συνεπώς διατήρηση της αυξημένης μέσης (%) περιεκτικότητας των αιθερίων ελαίων και τη σταθερότητα της συγκέντρωσης των χημικών ενώσεων, σε θερμοκηπιακή καλλιέργεια.
- Τα αποτελέσματα καταδεικνύουν τη δυνατότητα επιλογής του μικροπολλαπλασιασμού για την παραγωγή σε σύντομο χρονικό διάστημα, φυτικού υλικού με παρόμοιο χημικό προφίλ με των αντίστοιχων *ex vitro* καλλιεργούμενων φυτών. Μπορεί επίσης να αποτελέσει το εφαλτήριο για τη διερεύνηση της επίδρασης των φυτορυθμιστικών ουσιών στη σύσταση του αιθερίου ελαίου και την επιλογή εκείνων που θα οδηγήσουν ταυτόχρονα τόσο σε ικανοποιητική παραγωγή βλαστών και υψηλότερη απόδοση σε αιθέριο έλαιο όσο και στην παραγωγή υψηλών συγκεντρώσεων σημαντικών χημικών ενώσεων.

IV.6. ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ

- Abbas, J.A. (2009). The effect of nitrogenous and phosphate fertilizers of the properties on the vegetative growth and aromatical oil yield of local mint (*Mentha spicata* L.), Am.-Eurasian J. Sustain. Agric. 3(2): 262-265.
- Abraham, D., Francischini, A.C., Pergo, E.M, Kelmer-Bracht, A.M. and Ishii-Iwamoto, E. (2003). Effects of α -pinene on the mitochondrial respiration of maize seedlings. Plant Physiol. Biochem. 41: 985-991.
- Adams, R.P. (2007). Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry (Vol. 456). Carol Stream, IL: Allured publishing corporation.
- Adzet, T. and Passet, J. (1972). Chemotaxonomie du genre *Satureja-Calamintha*. Riv. Ital. Essenz. 54: 482-486.
- Affonso, V.R., Bizzo, H.R., Lage, C.L.S. and Sato, A. (2009). Influence of growth regulators in biomass production and volatile profile of *in vitro* plantlets of *Thymus vulgaris* (L.). J. Agric. Food Chem. 57(14): 6392-6395.
- Ait-Ouazzou, A., Lorán, S., Arakrak, A., Laglaoui, A., Rota, C., Herrera, A., Pagán, R. and Conchello, P. (2012). Evaluation of the chemical composition and antimicrobial activity of *Mentha pulegium*, *Juniperus phoenicea* and *Cyperus longus* essential oils from Morocco. Food Res. Int. 45: 313-319.
- Alan, S., Kürkçüoğlu, M. and Baser, K.H.C. (2011). The composition of the essential oils of *Calamintha pampylica* subspecies. Turk. J. Biol. 35: 259-265.
- Amaral, C.L.F. and Silva, A.B. (2003). Melhoramento biotecnológico de plantas medicinais. Biotecnol. Cienc. Desenvolvimento. 30: 55-59.
- Amaral-Baroli, A., Lago, J. H.G., de Almeida, C.V., de Almeida, M., Scotti, M.T., Leone, G.F., Soares, M.G. Cavalari, A.A. and Sartorelli, P. (2016). Variability in essential oil composition produced by micropropagated (*in vitro*), acclimated (*ex vitro*) and in-field plants of *Ocimum basilicum* (Lamiaceae). Ind. Crops and Prod. 86: 180-185.
- Amigo, J.M., Skov, T., Coello, J., MasPOCH, S. and Bro, R. (2008). Trends in analytical chemistry. 27(8): 714-725.
- Araniti, F., Lupini, A., Sorgonà, A., Statti, G.A. and Abenavoli, M.R. (2012). Phytotoxic activity of foliar volatiles and essential oils of *Calamintha nepeta* (L.) Savi. Nat. Prod. Res. 27: 1651-1656.
- Argyropoulou, C., Daferera, D., Tarantilis, P.A., Fasseas, C. and Polissiou, M. (2007). Chemical composition of the essential oil from leaves of *Lippia citriodora* H.B.K. (Verbenaceae) at two developmental stages. Biochem. Syst. Ecol. 35: 831-837.
- Arikat, N.A., Jawad, F.M., Karam, N.S. and Shibli, R.A. (2004). Micropropagation and accumulation of essential oils in wild sage (*Salvia fruticosa* Mill.). Sci. Hort. 100(1-4): 193-202.
- Arruda, T.A., Antunes, R.M.P., Catão, R.M.R. and Lima, E.O. (2006). Preliminary study of the antimicrobial activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and its analogues. Culture. 16: 307-311.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils. - A review. Food Chem. Toxicol. 46: 446-475.
- Baldovini, N., Ristorcelli, D., Tomi, F. and Casanova, J. (2000). Intraspecific variability of the essential oil of *Calamintha nepeta* from Corsica (France). Flavour Fragr. J. 15: 50-54.
- Barceloux, D.G. (2008). Medical toxicology of natural substances: Foods, fungi, medicinal herbs, plants, and venomous animals. 1st ed. JohnWiley and Sons: Hoboken, N.J., USA. 563-567.
- Baser, K.H.C. (2002). Aromatic biodiversity among the flowering plant taxa of Turkey. Pure Appl. Chem. 74: 527-545.
- Baser, K.H.C., Kirimer, N. and Tümen, G. (1998). Pulegone-rich essential oils of Turkey. - Review. J. Essent. Oil Res. 10: 1-8.
- Benlarbi, K.H., Elmtili, N., Macías, F.A. and Galindo, J.C.G. (2014). Influence of *in vitro* growth conditions in the production of defence compounds in *Mentha pulegium* (L.). Phytochem. Lett. 8: 233-244.
- Bensouici, C., Benmerache, A., Chibani, S., Kabouche, A., Abuhamdah, S., Semra, Z. and Kabouche, Z. (2013). Antibacterial activity and chemical composition of the essential oil of *Satureja calamintha* ssp. *sylvatica* from Jijel, Algeria. Pharm. Lett. 5: 224-227.
- Bicchi, C. (2000). Encyclopedia of separation science. Level III. Essential oils. - Distillation. Academic Press. 2744-2755.
- Boughdad, A., Elkasimi, R. and Kharchafi, M. (2011). Activité insecticide des huiles essentielles de *Mentha*. sur *Callosobrochus maculatus* (F.) (Coleoptera, Bruchidae). In Proceedings of the AFPP - Neuvième Conférence Internationale sur les ravageurs en Agriculture, Montpellier, France.

- Božović, M., Garzoli, S., Sabatino, M., Pepi, F., Baldisserotto, A., Andreotti, E., Romagno, C., Mai, A., Manfredini, S., and Ragno, R. (2017). Essential oil extraction, chemical analysis and anti-*Candida* activity of *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp. *glandulosa* (Req.). *Ball - New approaches. Molecules*. 22: 203.
- Božović, M., Pirolli, A. and Ragno, R. (2015). *Mentha suaveolens* Ehrh. (Lamiaceae): Essential oil and its main constituent piperitenone oxide: Biological activities and chemistry. *Molecules*. 20: 8605-8633.
- Brenes, A. and Roura, E. (2010). Essential oils in poultry nutrition: Main effects and modes of action. *Anim. Feed Sci. Technol.*
- Bruneton, J. (2009). *Pharmacognosie: Phytochimie, plantes médicinales*. 4th ed. Tec. and Doc. Lavoisier, Paris, France. 1268.
- Burfield, T. and Reekie, S.L. (2005). Mosquitoes, malaria and essential oils. *Intern. J. Aromather.* 15: 30-41.
- Burt, S. (2004). Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods. - A review. *Int. J. Food Microbiol.* 94: 223-253.
- Burzo, I., Mihaescu, D., Dobrescu, A., Ambarus, S., Falticeanu, M. and Badulescu, L. (2006). Contribution to the knowledge of the composition of the essential oils from five *Calamintha* species cultivated in Romania. *Alexandru Ioan Cuza University, Iași*. 52: 39-42.
- Cabana, R., Silva, L.R., Valenão, P., Viturro, C.I. and Andrade, P.B. (2013). Effect of different extraction methodologies on the recovery of bioactive metabolites from *Satureja parvifolia* (Phil.) Epling (Lamiaceae). *Ind. Crops Prod.* 48: 49-56.
- Ćavar, S., Vidić, D. and Maksimović, M. (2013). Volatile constituents, phenolic compounds, and antioxidant activity of *Calamintha glandulosa* (Req.) Benth. *J. Sci. Food Agric.* 93: 1758-1764.
- Chebel, A.V., Koroch, A.R., Juliani, H.R., Juliani, H.R. and Trippi, V.S. (1998). Micropropagation of *Minthostachys mollis* (H.B.K.) Grieseb. and essential oil composition of clonally propagated plants. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* 34: 249-251.
- Collin, H.A. (2001). Secondary product formation in plant tissue cultures. *Plant Growth Regul.* 34: 119-134.
- Cook, C.M., Lanaras, T. and Kokkini, S. (2007). Essential oils of two *Calamintha glandulosa* (Req.) Benth. chemotypes in a wild population from Zakynthos, Greece. *J. Essent. Oil Res.* 19: 534-539.
- Couladis, M. and Tzakou, O. (2001). Essential oil of *Calamintha nepeta* subsp. *glandulosa* from Greece. *J. Essent. Oil Res.* 13: 11-12.
- De Pooter, H.L. and Schamp, N.M. (1986a). Comparison of the volatile composition of some *Calamintha/Satureja* species. In *Progress in essential oil research, Proceedings of the International Symposium on Essential Oils*, Holzmunder, Neuhaus, Germany. Brunke, E.J. (ed.) Walter de Gruyter: Berlin, Germany. 139-150.
- De Pooter, H.L., de Buyck, L.F. and Schamp, N.M. (1986b). The volatiles of *Calamintha nepeta* subsp. *glandulosa*. *Phytochemistry*. 25: 691-694.
- De Pooter, H.L., Goetghebeur, P. and Schamp, N. (1987). Variability in composition of the essential oil of *Calamintha nepeta*. *Phytochemistry*. 26: 3355-3356.
- De Sousa, D.P., Nóbrega, F.F.F., De Lima, M.R.V. and De Almeida, R.N. (2011). Pharmacological activity of (R)-(+)-pulegone, a chemical constituent of essential oils. *Z. Naturforsch.* 66: 353-359.
- De Urbina, A.V.O., Martin, M.L., Montero, M.J., Carron, R., Sevilla, M.A. and San Roman, L. (1990). Antihistaminic activity of pulegone on the guinea-pig ileum. *J. Pharm. Pharmacol.* 42: 295-296.
- Debbabi, H., Mokni, R.E., Chaieb, I., Nardoni, S., Maggi, F., Caprioli, G. and Hammami, S. (2020). Chemical Composition, Antifungal and Insecticidal Activities of the Essential Oils from Tunisian *Clinopodium nepeta* Subsp. *nepeta* and *Clinopodium nepeta* Subsp. *glandulosum*. *Molecules*. 25(9): 2137-2149.
- Demirci, B., Temel, H.E., Portakal, T., Kırmızıbekmez, H., Demirci, F. and Baser, K.H.C. (2011). Inhibitory effect of *Calamintha nepeta* subsp. *glandulosa* essential oil on lipoxigenase. *Turk. J. Biochem.* 36: 290-295.
- Dhingra, A.K., Chopra, B., Bhardwaj, S. and Dhar, K.L. (2011). Synthesis and characterization of novel pulegone derivatives as substitutes of 4-(1,1 dimethylethyl) cyclohexan-1-ol acetate. *J. Pharm. Res.* 4: 19-21.
- Dimopoulos, P., Raus, T., Bergmeier, E., Constantinidis, T., Iatrou, G., Kokkini, S., Strid, A. and Tzanoudakis, D. (2013). *Vascular plants of Greece: An annotated checklist*. *Englera* 31. Botanic Garden and Botanical Museum Berlin-Dahlem, Berlin and Hellenic Botanical Society, Athens.
- El-Keltawi, N.E. and Croteau, R. (1987). Influence of foliar applied cytokinins on growth and essential oil content of several members of the Lamiaceae. *Phytochemistry*. 26: 891-895.

- Fathi, E. and Sefidkon, F. (2012). Influence of drying and extraction methods on yield and chemical composition of the essential oil of *Eucalyptus sargentii*. 1035-1042.
- Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G. and Scheffer, J.J.C. (2008). Factors affecting secondary metabolite production in plants: volatile components and essential oils. *Flav. Fragr. J.* 23: 213-226.
- Formisano, C., Rigano, D., Napolitano, F., Senatore, F., Apostolides, A.N., Piozzi, F. and Rosselli, S. (2007). Volatile constituents of *Calamintha organifolia* Boiss. growing wild in Lebanon. *Nat. Prod. Commun.* 2: 1253-1256.
- Fraternal, D., Giamperi, L., Ricci, D., Rocchi, M.B.L., Guidi, L., Epifano, F. and Marcotullio, M.C. (2003). The effect of triacntanol on micropropagation and on secretory system of *Thymus mastichina*. *Plant Cell Tiss. Organ Cult.* 74: 87-97.
- González-Chávez, M.M., Cárdenas-Ortega, N.C., Méndez-Ramos, C.A. and Pérez-Gutiérrez, S. (2011). Fungicidal properties of the essential oil of *Hesperozygis marifolia* on *Aspergillus flavus* Link. *Molecules.* 16: 2501-2506.
- Gounaris, Y. (2010). Biotechnology for the production of essential oils, flavours and volatile isolates. - A review. *Flavour. Fragr. J.* 25: 367-386.
- Hendawy, S.F., Ezz El-Din, A.A., Aziz, E.E. and Omer, E.A. (2010). Productivity and oil quality of *Thymus vulgaris* (L.) under organic fertilization conditions. *Ozean J. Appl. Sci.* 3: 203-216.
- Hirata, T., Murakami, S., Ogihara, K. and Suga, T. (1990). Volatile monoterpenoid constituents of the plantlets of *Mentha spicata* produced by shoot tip culture. *Phytochemistry.* 29(2): 493-495.
- Hites, R.A. (1997). Gas chromatography mass spectrometry. *Handbook of Instrumental Techniques for Analytical Chemistry.* 609-626.
- Hodaj-Çeliku, E., Tsiftoglou, O., Shuka, L., Abazi, S., Hadjipavlou-Litina, D. and Lazari, D. (2017). Antioxidant activity and chemical composition of essential oils of some aromatic and medicinal plants from Albania. *Nat. Prod. Commun.* 12(5).
- Hussain, A.I., Anwar, F., Nigam, P.S., Ashraf, M. and Gilani, A.H. (2010). Seasonal variation in content, chemical composition and antimicrobial and cytotoxic activities of essential oils from four *Mentha* species. *J. Sci. Food Agric.* 90: 1827-1836.
- Iqbal, T., Hussain, A.I., Chatha, S.A.S., Naqvi, S.A.R. and Bokhari, T.H. (2013). Antioxidant activity and volatile and phenolic profiles of essential oil and different extracts of wild mint (*Mentha longifolia*) from the Pakistani flora. *J. Anal. Methods Chem.* 536-490.
- Kalemba, D. and Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Curr. Med. Chem.* 10: 813-829.
- Karousou, R., Hanlidou, E. and Lazari, D. (2012). Essential-oil diversity of three *Calamintha* species from Greece. *Chem. Biodivers.* 9: 1364-1372.
- Karousou, R., Kokkini, S., Bessiere, J.M. and Vokou, D. (1996). *Calamintha cretica* (Lamiaceae), a Cretan endemic: Distribution and essential oil composition. *Nord. J. Bot.* 16(3): 247-251.
- Keravis, G. (1997). Spectrométrie de masse et chromatographie dans l'analyse des plantes aromatiques et huiles essentielles. In: Benjilali, B., Ettalibi, M., Ismaili-Alaoui, M. and Zrira, S. (eds.). *Proceedings of the Intern. Congr. Arom. Medicinal Plants & Essential Oils.* (Acres Editions). Rabat, Morocco. 379-384
- Kite, G.C., Veitch, N.C., Grayer, R.J. and Simmonds, M.S.J. (2003). Biochemical systematics and ecology. 31: 813-843.
- Kizil, S., Ipek, A., Arslan, N. and Khawar, K.M. (2008). Effect of different developing stages on some agronomical characteristics and essential oil composition of oregano (*Oreganum onites*). *New Zealand J. Crop Hortic. Sci.* 36(1): 71-76.
- Kokkalou, E. and Stefanou, E. (1990). The volatile oil of *Calamintha nepeta* (L.) Savi ssp. *glandulosa* (Req.) Ball, endemic to Greece. *Flavour Fragr. J.* 5: 23-26.
- Kokkini, S., Hanlidou, E., Karousou, R. and Lanaras, T. (2002). Variation of pulegone content in pennyroyal (*Mentha pulegium* L.) plants growing wild in Greece. *J. Essent. Oil Res.* 14: 224-227.
- Kokkini, S., Karousou, R., Dardioti, A., Krigas N. and Lanaras, T. (1997). Autumn essential oils of Greek oregano. *Phytochemistry.* 44(5): 883-886.
- Koliopoulos, G., Pitarokili, D., Kioulos, E., Michaelakis, A. and Tzakou, O. (2010). Chemical composition and larvicidal evaluation of *Mentha*, *Salvia* and *Melissa* essential oils against the West Nile virus mosquito *Culex pipiens*. *Parasitol. Res.* 107: 327-335.
- Krimer, N., Baser, K.H.C., Özek, T. and Kürkçüoğlu, M. (1992). Composition of the essential oil of *Calamintha nepeta* subsp. *glandulosa*. *J. Essent. Oil Res.* 4: 189-190.
- Kumar, S., Bahl, J.R., Bansal, R.P., Kukreja, A.K., Garg, S.N. and Naqvi, A.A. (2000). Profits of Indian menthol mint *Mentha arvensis* cultivars at different stages of crop growth in northern plains. *J. Med. Aromat. Plant Sci.* 22: 774-786.

- Kuźma, Ł., Kalemba, D., Różalski, M., Różalska, B., Więckowska-Szakiel, M., Krajewska, U. and Wysokińska, H. (2009). Chemical composition and biological activities of essential oil from *Salvia sclarea* plants regenerated *in vitro*. *Molecules*. *14*(4): 1438-1447.
- Labioud, R., Aouadi, S. and Bouhaddouda, N. (2015). Chemical composition and antifungal activity of essential oil from *Satureja Calamintha nepeta* against phytopathogens fungi. *Int. J. Pharm. Pharm. Sci.* *7*: 208-211.
- Lahlou, M. (2004). Essential oils and fragrance compounds: bioactivity and mechanisms of action. *Flavour Fragr. J.* *19*: 159-165.
- Lahlou, S., Carneiro-Leão, R.F.L., Leal-Cardoso, J.H. and Toscano, C.F. (2001). Cardiovascular effects of the essential oil of *Mentha x villosa* and its main constituent, piperitenone oxide, in normotensive anaesthetised rats: Role of the autonomic nervous system. *Planta Med.* *67*: 638-643.
- Lawrence, B.M. (2006). Mint: The genus *Mentha*. Taylor Fr. Group: Boca Raton, FL, USA. 576.
- Lila, M.A. (2005). Valuable secondary products from *in vitro* culture. In: *Plant Development and Biotechnology*. Trigiano, R.N. and Gray, D. (eds.). CRC Press: Boca Raton, FL, USA. 285-289.
- Lima, T.C., Da Silva, T.K.M., Silva, F.L., Barbosa-Filho, H.M., Mayo Marques, M.O., Santos, R.L.C., Cavalcanti, S.C.D.H. and De Sousa, D.P. (2014). Larvacidal activity of *Mentha x villosa* Hudson essential oil, rotundifolone and derivatives. *Chemosphere*. *104*: 37-43.
- Mahmoud, S.S. and Croteau, R.B. (2002). Strategies for transgenic manipulation of monoterpene biosynthesis in plants. - Review. *Trends Plant Sci.* *7*: 366-373.
- Mahmoud, S.S. and Croteau, R.B. (2003). Menthofuran regulates essential oil biosynthesis in peppermint by controlling a downstream monoterpene reductase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. *100*: 14481-14486.
- Manan, A.A., Taha, R.M., Mubarak, E.E. and Elias, H. (2016). *In vitro* flowering, glandular trichomes ultrastructure, and essential oil accumulation in micropropagated *Ocimum basilicum* L. *In Vitro Cell. Dev. Biol. Plant.* *52*(3): 303-314.
- Marinković, B., Vuković-Gačić, B., Kneiević-Vukcević, P.D., Soković, M. and Duletić-Lausević, S. (2003). Antibacterial activity of the essential oil of *Micromeria thymifolia* and *M. albanica* (Lamiaceae). *Bocconea*. *16*: 1131-1134.
- Marongiu, B., Piras, A., Porcedda, S., Falconieri, D., Maxia, A., Gonçalves, M.J., Cavaleiro, C. and Salgueiro, L. (2010). Chemical composition and biological assays of essential oils of *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp. *nepeta* (Lamiaceae). *Nat. Prod. Res.* *24*: 1734-1742.
- Marston, A. and Hostettmann, K. (2009). Natural product analysis over the last decades. *Planta Med.* *75*(7): 672-682.
- Masango, P. (2005). Cleaner production of essential oils by steam distillation. *J. Clean. Prod.* *13*: 833-839.
- Mastelić, J., Miloš, M., Kuštrak, D. and Radonić, A. (1998). The essential oil and glycosidically bound volatile compounds of *Calamintha nepeta* (L.) Savi. *Croat. Chem. Acta*. *71*: 147-154.
- Matkowski, A. (2008). Plant *in vitro* culture for the production of antioxidants. - A review. *Biotechnol. Adv.* *26*: 548-560.
- Matos-Rocha, T., Dos Santos Cavalcanti, M., Barbosa-Filho, J., Lúcio, A., Veras, D., Feitosa, A., Júnior, J., Almeida, R., Marques, M., Alves, L. and Brayner, F. (2013). *In vitro* evaluation of schistosomicidal activity of essential oil of *Mentha x villosa* and some of its chemical constituents in adult worms of *Schistosoma mansoni*. *Planta Med.* *79*(14): 1307-1312.
- McMaster, M.C. (2008). GC/MS. A Practical User's Guide. 2nd ed. WileyInterscience. 3-20 and 119-135.
- Miladinović, D.L., Ilić, B.S., Mihajilov-Krstev, T.M., Nikolić, N.D., Miladinović, L.C. and Cvetković, O.G. (2012). Investigation of the chemical composition-antibacterial activity relationship of essential oils by chemometric methods. *Anal. Bioanal. Chem.* *403*: 1007-1018.
- Morone-Fortunato, I. and Avato, P. (2008). Plant development and synthesis of essential oils in micropropagated and mycorrhiza inoculated plants of *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Link) Ietswaart. *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* *93*: 139-149.
- Müller-Riebau, F.J., Berger, B.M., Yegen, O. and Cakir, C. (1997). Seasonal variations in the chemical compositions of essential oils of selected aromatic plants growing wild in Turkey. *J. Agric. Food Chem.* *45*(12): 4821-4825.
- Naguib, N.Y.M. (2011). Organic vs chemical fertilization of medicinal plants: a concise review of researches. *Adv. Environ. Biol.* *5*: 394-400.
- Naveed, R., Hussain, I., Mahmood, M.S. and Akhtar, M. (2013). *In vitro* and *in vivo* evaluation of antimicrobial activities of essential oils extracted from some indigenous spices. *Pak. Vet. J.* *33*: 413-417.

- Negro, C., Notarnicola, S., De Bellis, L. and Miceli, A. (2013). Intraspecific variability of the essential oil of *Calamintha nepeta* subsp. *nepeta* from Southern Italy (Apulia). *Nat. Prod. Res.* 27(4-5): 331-339.
- Niemeyer, H.M. (2010). Composition of essential oils from *Satureja darwinii* (Benth.) Briq. and *Satureja multiflora* (R.et P.) Briq. (Lamiaceae): relationship between chemotype and oil yielded in *Satureja* spp. *J. Essent. Oil Res.* 22: 477-482.
- Nogueira, J. M. F., & Romano, A. (2002). Essential oils from micropropagated plants of *Lavandula viridis*. *Phytochemical Analysis: Int. J. Plant Chem.and Biochem. Tech.* 13(1): 4-7.
- Oka, Y., Nacar, S., Putievsky, E., Ravid, U., Yaniv, Z. and Spiegel, Y. (2000). Nematicidal activity of essential oils and their components against the root-knot nematode. *Phytopathology.* 90: 710-715.
- Orav, A., Kapp, K. and Raal, A. (2013). Chemosystematic markers for the essential oils in leaves of *Mentha* species cultivated or growing naturally in Estonia. *Proc. Estonian Acad. Sci.* 62: 175-186.
- Oumzil, H., Ghoulami, S., Rhajaoui, M., Ildrissi, A., Fkih-Tetouani, S., Faid, M. and Benjouad, A. (2002). Antibacterial and antifungal activity of essential oils of *Mentha suaveolens*. *Phytother. Res.* 16: 727-731.
- Pacifico, S., Galasso, S., Piccolella, S., Kretschmer, N., Pan, S.P., Marciano, S., Bauer, R. and Monaco, P. (2015). Seasonal variation in phenolic composition and antioxidant and anti-inflammatory activities of *Calamintha nepeta* (L.) Savi. *Food Res. Int.* 69: 121-132.
- Padalia, R.C., Verma, R.S., Chauhan, A., Sundaresan, V. and Chanotiya, C.S. (2013). Essential oil composition of sixteen elite cultivars of *Mentha* from western Himalayan region, India. *Maejo. Int. J. Sci. Technol.* 7: 83-93.
- Panizzi, L., Flamini, G., Cioni, P.L. and Morelli, I. (1993). Composition and antimicrobial properties of essential oils of four Mediterranean Lamiaceae. *J. Ethnopharmacol.* 39: 167-170.
- Pavela, R., Kaffková, K. and Kumšta, M. (2014). Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from different *Mentha* L. and *Pulegium* species against *Culex quinquefasciatus* say (Diptera: Culicidae). *Plant Prot. Sci.* 50: 1-36.
- Peixoto, I.T.A., Furletti, V.F., Anibal, P.C., Figueira, G.M., Sartoratto, A., De Busato Feiria, S.N., Duarte, M.C.T. and Höfling, J.F. (2016). A survey of essential oils from *Mentha* spp. as an antimicrobial potential agent against *Candida* species. *Adv. Med. Plant Res.* 4: 58-72.
- Perez-Alonso, J., Velasco-Negueruela, A. and Saez, J.A.L. (1992). The volatiles of two *Calamintha* species growing in Spain, *Calamintha sylvatica* Bromf. and *C. nepeta* (L.) Savi. *Acta Hort.* 335: 255-260.
- Perrucci, S., Mancianti, F., Cioni, P.L., Flamini, G., Morelli, I. and Macchioni, G. (1994). *In vitro* antifungal activity of essential oils against some isolated of *Microsporium canis* and *Microsporium gypseum*. *Planta Med.* 60: 184-187.
- Pietrella, D., Angiolella, L., Vavala, E., Rachini, A., Mondello, F., Ragno, R., Bistoni, F. and Vecchiarelli, A. (2011). Beneficial effect of *Mentha suaveolens* essential oil in the treatment of vaginal candidiasis assessed by real-time monitoring of infection. *BMC Complement. Altern. Med.* 11: 18.
- Pirbalouti, A.G., Vosoghi, N., Craker, L. and Shirmardi, H. (2014). Chemical composition of the essential oil of *Satureja kallarica* Jamzad. *J. Essent. Oil Res.* 26: 228-231.
- Pistelli, L., Noccioli, C., Angiolillo, F.D. and Pistelli, L. (2013). Composition of volatile in micropropagated and field grown aromatic plants from Tuscany Islands. *Acta Biochim. Pol.* 60(1): 43-50.
- Prabuseenivasan, S., Jayakumar, M. and Ignacimuthu, S. (2006). *In vitro* antibacterial activity of some plant essential oils. *BMC Complement. Altern. Med.* 6: 39.
- Putievsky, E., Ravid, U. and Dud, N. (1988). Phenological and seasonal influences on essential oil of a cultivated clone of *Origanum vulgare* L. *J. Agric. Food Sci.* 43: 225-228.
- Reichling, J., Schnitzler, P., Suschke, U. and Saller, R. (2009). Essential oils of aromatic plants with antibacterial, antifungal, antiviral, and cytotoxic properties. - An overview. *Forsch. Komplement. Res. Complement. Med.* 16: 79-90.
- Riahi, L., Elferchichi, M., Ghazghazi, H., Jebali, J., Ziadi, S., Aouadhi, C., Chograni, H., Zaouali, Y., Zoghalmi, N. and Mliki, A. (2013). Phytochemistry, antioxidant and antimicrobial activities of the essential oils of *Mentha rotundifolia* L. in Tunisia. *Ind. Crops Prod.* 43: 883-889.
- Riela, S., Bruno, M., Formisano, C., Rigano, D., Rosselli, S., Saladino, M.L. and Senatore, F. (2008). Effects of solvent-free microwave extraction on the chemical composition of essential oil of *Calamintha nepeta* (L.) Savi compared with the conventional production method. *J. Sep. Sci.* 31: 1110-1117.
- Rocha, D., Novo, M., Matos, O., Figueiredo, A.C., Delgado, M., Cabral, M.D., Liberato, M. and Moiteiro, C. (2015). Potential of *Mentha pulegium* for mosquito control. *Rev. Ciênc. Agrár.* 38: 155-165.

- Rojas, L.B. and Usabillaga, A. (2000). Composition of the essential oil of *Satureja brownei* (SW.) Briq. from Venezuela. *Flavour Fragr. J.* 15: 21-22.
- Salman, M., Abdel-Hameed, E.S., Bazaid, S. and Dabi, M.M. (2015). Chemical composition for hydrodistillation essential oil of *Mentha longifolia* by gas chromatography-mass spectrometry from north regions in Kingdom of Saudi Arabia. *Pharm. Chem.* 7: 34-40.
- Santos-Gomes, P.C. and Fernandes-Ferreira, M. (2003). Essential oils produced by *in vitro* shoots of sage (*Salvia officinalis*). *J. Agric. Food Chem.* 51: 2260-2266.
- Sardashti, A. and Adhami, Y. (2013). Chemical composition of the essential oil of *Mentha pulegium* L. from Taftan Area by means of gas chromatography/mass spectrometry (GC/MS). *J. Med. Plant Res.* 7: 3003-3007.
- Silva, S., Sato, A., Lage, C.L. S., San Gil, R.A.S., De Azevedo, D. and Esquibel, M.A. (2005). Essential oil composition of *Mellisa officinalis* L. *in vitro* produced under the influence of growth regulators. *J. Braz. Chem. Soc.* 16: 1387-1390.
- Singh, S., Handa, T., Narayanam, M., Sahu, A., Junwal, M. and Shah, R.P. (2012). *J. Pharm. Biomed. Anal.* 69: 148-173.
- Skala, E., Kalemba, D., Wajs, A., Różalski, M., Krajewska, U., Różalska, B., Więckowska- Szakiel, M. and Wysokińska, H. (2007). *In vitro* propagation and chemical and biological studies of the essential oil of *Salvia przewalskii* Maxim. *Z. Naturforsch.* 62: 839-848.
- Slavkovska, V., Zlatkovic, B., Brauchler, C., Stojanovic, D., Tzakou, O. and Couladis, M. (2013). Variations of essential oil characteristics of *Clinopodium pulegium* (Lamiaceae) depending on phenological stage. *Bot. Serb.* 37(2): 97-104.
- Souleles, C. and Argyriadou, N. (1990). The volatile constituents of *Calamintha grandiflora*. *Planta Med.* 56: 234-235.
- Souleles, C., Argyriadou, N. and Philianos, S. (1987). Constituents of the essential oil of *Calamintha nepeta*. *J. Nat. Prod.* 50: 510-511.
- Sousa, P.J.C., Magalhães, P.J.C., Lima, C.C., Oliveira, V.S. and Leal-Cardoso, J.H. (1997). Effects of piperitenone oxide on the intestinal smooth muscle of the guinea pig. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 30: 787-779.
- Sparkman, O.D., Penton, Z. and Kitson, F.G. (2011). *Gas chromatography and mass spectrometry: A practical guide.* Academic Press
- Sudriá, C., Palazón, J., Cusidó, R., Bonfill, M., Piñol, M.T. and Morales, C. (2001). Effect of benzyladenine and indolebutyric acid on ultrastructure, glands formation, and essential oil accumulation in *Lavandula dentata* plantlets. *Biol. Plant.* 44: 1-6.
- Taiga, A. (2009). Efficacy of selected plant extracts in the control of fungal dry rot of white Yam (*Dioscorea rotundata*) tubers in Kogi State, Nigeria. *Am.-Eurasian J. Sustain. Agric.* 3(3): 310-313.
- Taiga, A. and Friday, E. (2009). Variations in phytochemical properties of selected fungicidal aqueous extracts of some plant leaves in Kogi State, Nigeria. *Am.-Eurasian J. Sustain. Agric.* 3(3): 407-409.
- Tavares, E.S., Lopes, D., Bizzo, H.R., Lage, C.L.S. and Leitão, S. (2004). Kinetin enhanced linalool production by *in vitro* plantlets of *Lippia alba*. *J. Essent. Oil Res.* 16: 405-408.
- Teles, S., Pereira, J.A., Santos, C.H.B., Menezes, R.V., Malheiro, R., Lucchese, A.M. and Silva, F. (2013). Effect of geographical origin on the essential oil content and composition of fresh and dried *Mentha villosa* Hudson leaves. *Ind. Crops Prod.* 46: 1-7.
- Tepe, B. and Sokmen, A. (2007). Production and optimisation of rosmarinic acid by *Satureja hortensis* (L.) callus cultures. *Nat. Prod. Res.* 21: 1133-1144.
- Thach, L.N., Nhung, T.H., My, V.T.N. and Tran, H. (2013). The new rich source of rotundifolone: *Mentha aquatica* Linn. var. *crispa* oil from microwave-assisted hydrodistillation. *J. Essent. Oil Res.* 25: 39-43.
- Thiem, B., Kikowska, M., Kurowska, A. and Kalemba, D. (2011). Essential oil composition of the different parts and *in vitro* shoot culture of *Eryngium planum* L. *Molecules.* 16(8): 7115-7124.
- Tibaldi, G., Fontana, E. and Nicola, S. (2013). Postharvest management affects spearmint and calamint essential oils. *J. Sci. Food Agric.* 93: 580-586.
- Tomei, P.E. and Manganelli, R.E.U. (2003). Composition of the essential oil of *Mentha microphylla* from the gennargentu mountains (Sardinia, Italy). *J. Agric. Food Chem.* 51: 3614-3617.
- Tongnuanchan, P. and Benjakul, S. (2014). Essential oils: Extraction, bioactivities, and their uses for food preservation. *J. Food Sci.* 79: 1231-1249.
- Tripathi, A.K., Prajapati, V., Ahmad, A., Aggarwal, K.K. and Khanuja, S.P.S. (2004). Piperitenone oxide astoxic, repellent, and reproduction retardant toward malarial vector *Anopheles stephensi* (Diptera: Anophelinae). *J. Med. Entomol.* 41: 691-698.
- Tümen, G., Baser, K.H.C., Kürkcüoglu, M. and Demircakmak, B. (1995). Composition of the essential oil of *Calamintha incana* (Sm.) Boiss. from Turkey. *J. Essent. Oil Res.* 7: 679-680.

- Turner, G.W., Croteau, R. (2004). Organization of monoterpene biosynthesis in *Mentha*. Immunocytochemical localizations of geranyl diphosphate synthase, limonene-6-hydroxylase, isopiperitenol dehydrogenase, and pulegone reductase. *Plant Physiol.* 136: 4215–4227
- Umezu, T. (2010). Evidence for dopamine involvement in ambulation promoted by pulegone in mice. *Pharmacol. Biochem. Behav.* 94: 497-502.
- Villa-Ruano, N., Pacheco-Hernández, Y., Cruz-Durán, R. and Lozoya-Gloria, E. (2015). Volatiles and seasonal variation of the essential oil composition from the leaves of *Clinopodium macrostemum* var. *laevigatum* and its biological activities. *Ind. Crops Prod.* 77: 741-747.
- Vituro, C.I., Molina, A., Guy, I., Charles, B., Guinaudeau, H. and Fournet, A. (2000). Essential oils of *Satureja boliviana* and *S. parvifolia* growing in the region of Jujuy, Argentina. *Flavour Fragr. J.* 15: 377-382.
- Waliwitiya, R., Kennedy, C.J. and Lowenberger, C.A. (2009). Larvicidal and oviposition-altering activity of monoterpenoids, trans-anethole and rosemary oil to the yellow fever mosquito *Aedes aegypti* (Diptera: Culicidae). *Pest Manag. Sci.* 65: 241-248.
- WHO guidelines for assessing quality of herbal medicines with reference to contaminants and residues. (2007). World Health Organization, Geneva.
- WHO guidelines on safety monitoring of herbal medicines in pharmacovigilance systems. (2004). World Health Organization, Geneva.
- Wong, Y.C., Ahmad-Mudzaqqir, M.Y. and Wan-Nurdiyana, W.A. (2014). Extraction of essential oil from cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*). *Orient. J. Chem.* 30: 37-47.
- Yesil Celiktas, O., Hames Kocabas, E.E., Bedir, E., Vardar Sukan, F., Ozek, T. and Baser, K.H.C. (2007). Antimicrobial activities of methanol extracts and essential oils of *Rosmarinus officinalis*, depending on location and seasonal variations. *Food Chem.* 100: 553-559.
- Zantar, S., El Garrouj, D., Pagán, R., Chabi, M., Laglaoui, A., Bakkali, M. and Zerrouk, M. H. (2015). Effect of harvest time on yield, chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Thymus vulgaris* and *Mentha pulegium* essential oils. *Eur. J. Med. Plants.* 69-77.
- Zekri, N., Sabri, H., Khannouchi, S., El Belghiti, M.A. and Zair, T. (2013). Phytochemical study and fumigant toxicity of *Mentha suaveolens* Ehrh. essential oil from Morocco against adults of *S. oryzae* (L.). *Aust. J. Basic Appl. Sci.* 7: 599-606.
- Μπάουμαν, Ε. (1999). Η ελληνική χλωρίδα στο μύθο, στην τέχνη και στη λογοτεχνία. Έκδοση 2^η. Μακρής, Ι. Α.Ε.-Γραφικές Τέχνες. 114-162.
- Παπαναγιώτου, Ε., Παπανικολάου, Κ. και Ζαμανίδης, Σ. (2001). Η καλλιέργεια των αρωματικών και φαρμακευτικών φυτών στην Ελλάδα, Γεωργία-Κτηνοτροφία. 1:36-42.
- Υπ.Α.Α.Τ. (2018). Αρωματικά – Φαρμακευτικά φυτά.

ΕΝΟΤΗΤΑ V – ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

V. ΓΕΝΙΚΗ ΣΥΖΗΤΗΣΗ - ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στόχος της παρούσας διατριβής ήταν η μελέτη πέντε ελληνικών και μεσογειακών ειδών, ήτοι *Anthyllis barba-jovis*, *Ballota acetabulosa*, *Clinopodium creticum*, *Clinopodium nepeta* και *Scabiosa hymettia*, με στόχο την αξιοποίησή τους ως καλλωπιστικών, καθώς και για αποκατάσταση τοπίου με έμφαση στο τοπίο αρχαιολογικών χώρων, ήτοι χώρων με ιδιαίτερες απαιτήσεις σε σχέση με τη βλάστησή τους.

Για το σκοπό αυτό μελετήθηκε και αξιολογήθηκε η δυνατότητα πολλαπλασιασμού τους εγγενώς με σπόρο και αγενώς *in vitro* και μοσχεύματα βλαστού. Σε ότι αφορά στον πολλαπλασιασμό με σπόρο μελετήθηκε η οικοφυσιολογία του σπόρου και ειδικότερα χειρισμοί για διακοπή τυχόν ληθάργου, κατάλληλες θερμοκρασίες βλάστησης και η επίδραση της αποθήκευσης στη βλαστικότητα. Αναφορικά με το βλαστικό πολλαπλασιασμό με μοσχεύματα βλαστού, διερευνήθηκε η επίδραση της εποχής λήψης των μοσχευμάτων, της συγκέντρωσης και του χρόνου εφαρμογής ορμόνης ριζοβολίας. *In vitro*, διερευνήθηκε η επίδραση της ηλικίας του μητρικού φυτού (ενήλικα ή νεανικά φυτά) στον πολλαπλασιασμό, η επίδραση των φυτορρυθμιστικών ουσιών στον πολλαπλασιασμό και τη ριζοβολία των μικροβλαστών, καθώς και η επίλυση του προβλήματος της υπερενυδάτωσης των ιστών, ενώ εξετάστηκε η δυνατότητα εγκλιματισμού των φυταρίων *ex vitro*. Επίσης μελετήθηκε η εγκατάσταση των ειδών σε τρεις αρχαιολογικούς χώρους με διαφορετικά μικροκλίματα. Επιπρόσθετα, στα *C. creticum* και *C. nepeta* προσδιορίστηκε η απόδοση αιθερίου ελαίου και η χημική σύσταση αυτού σε φυτά που καλλιεργούνταν υπαίθρια, υπό κάλυψη (θερμοκήπιο) και *in vitro*.

Ο πολλαπλασιασμός με σπόρο, των ειδών *A. barba-jovis*, *B. acetabulosa*, *C. creticum* και *C. nepeta* ήταν επιτυχής σε ένα ευρύ φάσμα θερμοκρασιών από 10 έως 30 °C, με άριστο εύρος 15 - 20 °C, το οποίο έχει αναφερθεί ως κατάλληλο για τη βλάστηση και του *Anthyllis cytisoides* (Sabre *et al.*, 2017), όπως και άλλων τυπικών μεσογειακών ειδών, όπως τα *Coridothymus capitatus*, *Dianthus fruticosus*, *Globularia alypum*, *Mentha aquatic*, *Origanum vulgare subsp. hirtum*, *Phlomis brevibracteata*, *P. cypria ssp. Satureja thymra*, *Phlomis lychnitis*, *Sideritis athoa*, *Sideritis tragoriganum*, *Sideritis syriaca ssp. syriaca*, καθώς και για όλα τα είδη *Arbutus* που απαντούν στη χλωρίδα της Ελλάδας (Thanos and Doussi 1995, Thanos *et al.*, 1995, Galmés *et al.*, 2006, Luna *et al.*, 2008, Papafotiou and Stragas, 2009, Papafotiou and Kalantzis, 2009, Kadis and Georghiou, 2010, Bertsouklis and Papafotiou, 2013).

Οι σπόροι του *A. barba-jovis* εμφάνισαν φυσικό λήθαργο, επαληθεύοντας προηγούμενη σχετική αναφορά των Morbidoni *et al.* (2008), και γι' αυτό ο μηχανικός σκαριφισμός του είδους κρίνεται απαραίτητος για την αύξηση του ποσοστού βλάστησης. Η υψηλή βλαστικότητα αμέσως μετά τη συλλογή των σπόρων των ειδών *B. acetabulosa*, *C. creticum* και *C. nepeta*, χωρίς προμεταχείριση, υποδηλώνει την απουσία λήθαργου, κάτι που χαρακτηρίζει αρκετά είδη της οικογένειας Lamiaceae, όπως το *Clinopodium. sandaliotica*, *Clinopodium vulgare*, *Sideritis athoa*, *Phlomis lychnitis*, *Sideritis tragoriganum*, *Thymus mastichina* (Angelova *et al.*, 1994, Luna *et al.*, 2008, Papafotiou and Stragas, 2009, Mattana *et al.*, 2016). Η υψηλή βιωσιμότητα των σπόρων του *A. barba-jovis* έως και δύο χρόνια από τη συλλογής τους είναι σε συμφωνία με τα αποτελέσματα των Morbidoni *et al.* (2008), αλλά περαιτέρω αποθήκευση των σπόρων, για χρονικό διάστημα μεγαλύτερο των 3 ετών, των *A. barba-jovis* και *B. acetabulosa*, οδήγησε σε μείωση της ικανότητα επιβίωσης των σπόρων.

Οι σπόροι του *S. hymettia* είχαν πολύ χαμηλή ικανότητα βλάστησης σε *ex vitro* συνθήκες, ενώ *in vitro* η βλάστηση του σπόρου ήταν αδύνατη, πιθανά λόγω στειρότητας ή παραγωγής μη αληθινών σπόρων όπως έχει αναφερθεί από τους Ackerman and Hamernik (1994).

Όσον αφορά στην εγκατάσταση *in vitro* αρχικής καλλιέργειας από ενήλικα φυτά των ειδών *A. barba-jovis*, *B. acetabulosa* και *S. hymettia*, ήταν εξαιρετικά δύσκολη ή δεν κατέστη δυνατή λόγω του υψηλού ποσοστού μολύνσεων. Εξ' αυτών, μόνο το είδος *S. hymettia* εγκαταστάθηκε *in vitro* από ενήλικα αυτοφυή φυτά, με χρήση εκφύτων κορυφής βλαστού και υποστρώματος MS είτε χωρίς PGRs ή με $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA, ενώ το *A. barba-jovis* εγκαταστάθηκε από νεαρά φυτά (2 ετών) που αναπτύσσονταν σε θερμοκήπιο, επίσης σε υπόστρωμα MS με $1,0 - 1,5 \text{ mg L}^{-1}$ BA. Για την εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας από ενήλικα φυτά του *C. creticum* ενδείκνυται η χρήση εκφύτων κορυφής και κόμβου και υποστρώματος MS εμπλουτισμένου με $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ ZEAT, ενώ για το συγγενικό είδος *C. nepeta* προτείνεται το υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA. Η αποτελεσματικότερη συγκέντρωση κυτοκινίνης για την εγκατάσταση *in vitro* αρχικής καλλιέργειας ειδών από ενήλικα φυτά διαφέρει μεταξύ των ειδών. Οι Pistelli *et al.* (2013) και οι Papafotiou *et al.* (2017) αναφέρουν ότι η αρχική εγκατάσταση ειδών της οικογένειας Lamiaceae γίνεται επιτυχέστερα σε υπόστρωμα με χαμηλές συγκεντρώσεις BA ($0,25 - 0,5 \text{ mg L}^{-1}$), ενώ οι (Saha *et al.*, 2010, 2012) προτείνουν τη χρήση υψηλότερης συγκέντρωσης BA ($1,0 - 2,0 \text{ mg L}^{-1}$).

Η εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας *A. barba-jovis*, *B. acetabulosa*, *C. creticum* και *C. nepeta* από *in vitro* καλλιεργούμενα σπορόφυτα, έγινε σε υψηλότερο ποσοστό, με έκφυτα κορυφής και κόμβου, σε υπόστρωμα MS είτε χωρίς PGRs ή με $0,5 - 1,0 \text{ mg L}^{-1}$ BA ή ZEAT,

σε συμφωνία με τα αποτελέσματα που έχουν αναφερθεί για άλλα είδη της οικογένειας Lamiaceae, όπως το *Calamintha odorum*, *Lavandula angustifolia* και *Lavandula latifolia*, *Salvia brachyodon*, *Micromeria juliana*, *Thymbra spicata* var. *spicata* (Mišić, 2006, Al-Bakhit *et al.*, 2007, Daneshvar-Royandezagh *et al.*, 2009, Diaz *et al.*, 2012, Tošić *et al.* 2015) και της Fabaceae, όπως τα *Anthyllis hermanniae* και *A. cytisoides* (Gavidia *et al.* 1997, Μαρτίνη και Παπαφωτίου, 2016).

Κατά το στάδιο πολλαπλασιασμού των *in vitro* καλλιεργειών, τόσο της καλλιέργειας από σπορόφυτα, όσο και αυτής από ενήλικα ή νεαρά φυτά θερμοκηπίου των ειδών *A. barbajovis*, *B. acetabulosa*, *C. creticum* και *C. nepeta* παρατηρήθηκε υψηλό ποσοστό αντίδρασης των εκφύτων. Η αύξηση της συγκέντρωσης των κυτοκινινών, ιδιαίτερα των BA και ZEAT και σε μικρότερο βαθμό των KIN και 2iP, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των σχηματιζόμενων βλαστών ανά έκφυτο, αλλά συγχρόνως επέφερε και αύξηση της υπερενυδάτωσης, όπως έχει παρατηρηθεί κατά το μικροπολλαπλασιασμό και άλλων ξηροφυτικών ειδών της Μεσογείου, όπως τα *Anthyllis cytisoides* (Gavidia *et al.*, 1997), *Globularia alypum* L. (Bertsouklis *et al.*, 2003) και *Lithodora zahnii* (Papafotiou and Kalantzis, 2009). Για την αντιμετώπιση της υπερενυδάτωσης που η εμφάνισή της αποτελεί σημαντικό πρόβλημα στις *in vitro* καλλιεργείες, εξετάστηκε η χρήση υψηλότερης συγκέντρωσης άγαρ (von Arnold and Eriksson, 1984, Bertsouklis *et al.*, 2003, Papafotiou and Kalantzis, 2009), αλλά και η χρήση αυξίνης. Έτσι η προσθήκη αυξίνης (NAA) σε συγκέντρωση 0,1 ή 0,5 mg L⁻¹, καθώς και η αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ από 8 g L⁻¹ σε 12 g L⁻¹ σε υπόστρωμα με 4,0 ή 8,0 mg L⁻¹ BA εξάλειψε την υπερενυδάτωση με ταυτόχρονη αύξηση του αριθμού των παραγόμενων βλαστών σε πολύ υψηλό επίπεδο και ως εκ' τούτου τα υποστρώματα αυτά είναι αποτελεσματικά και ενδείκνυνται για χρήση σε επιχειρηματική κλίμακα.

Για τον πολλαπλασιασμό του είδους *S. hymettia* προτείνεται η χρήση υποστρώματος MS πλήρους ή μισής δύναμης, εμπλουτισμένου με 1,0 mg L⁻¹ BA με ή χωρίς 0,1 mg L⁻¹ NAA, το οποίο όμως δεν ενδείκνυται για πολλαπλασιασμό του είδους σε επιχειρηματική κλίμακα λόγω του χαμηλού δυναμικού του.

Η ριζοβολία των μικρομοσχευμάτων των προαναφερθέντων ειδών που προήλθαν από καλλιεργείες, που εγκαταστάθηκαν τόσο από νεαρά φυτά, όσο και από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα, παρουσίασε παρόμοια συμπεριφορά και ήταν επιτυχής σε υπόστρωμα πλήρους δύναμης MS χωρίς ή με 0,5 - 4,0 mg L⁻¹ IBA σε συνεχή εφαρμογή για έξι εβδομάδες. Ενδιαφέρον εύρημα αποτέλεσε ότι παράλληλα με τη ριζοβολία παρατηρήθηκε και έκπτυξη πλάγιων βλαστών, με αποτέλεσμα τη δημιουργία πολύκλαδων φυταρίων για εγκλιματισμό,

με το πλεονέκτημα της αποφυγής πιθανού κορυφολογήματος για απόκτηση συμπαγούς φυτού. Για τα είδη *A. barba-jonis* και *B. acetabulosa* διερευνήθηκε και η επίδραση της προέλευσης του μικρομοσχεύματος από το κορυφαίο τμήμα ή από το μεσαίο τμήμα του μικροβλαστού και διαπιστώθηκε εξίσου ικανότητα για επιτυχή ριζοβολία. Το αποτέλεσμα αυτό είναι ιδιαίτερα σημαντικό και μπορεί να αξιοποιηθεί για την *in vitro* ριζοβολία αυτών των ειδών, που επιδεικνύουν ταχεία επιμήκυνση μικροβλαστών, σε επιχειρηματική κλίμακα, όπου ως συνήθης πρακτική δεν χρησιμοποιείται το μεσαίο τμήμα του μικροβλαστού. Οι συστάδες μικροβλαστών του *B. acetabulosa*, *C. creticum* και *C. nepeta* ριζοβόλησαν επιτυχώς *in vitro*, σε υπόστρωμα μισής δύναμης MS, χωρίς IBA, ενώ για την *in vitro* ριζοβολία των μικρομοσχευμάτων *S. hymettia* προτείνεται η χρήση υποστρώματος μισής δύναμης MS με $1,0 \text{ mg L}^{-1}$ IBA, σε συνεχή εφαρμογή για έξι εβδομάδες.

Ο εγκλιματισμός των φυταρίων, όλων των ειδών, σε *ex vitro* συνθήκες έγινε με πολύ υψηλά ποσοστά επιτυχίας (80 - 100%) σε μίγμα τύρφης – περλίτη (1:1, v/v).

Σε ότι αφορά στη ριζοβολία μοσχευμάτων βλαστού, δοκιμάστηκε λήψη μοσχευμάτων στις τέσσερις εποχές του έτους και μεταχειρίσεις με αυξίνη είτε σε μορφή σκόνης για ποώδη/ημι-ξυλώδη ή ξυλώδη μοσχεύματα ή σε αλκοολούχο υδατικό διάλυμα (0 - 3000 mg L^{-1} IBA, για 1 ή 5 min.). Ο πολλαπλασιασμός του *A. barba-jonis* με μοσχεύματα βλαστού ήταν ανεπιτυχής, σε όλες τις εποχές και σε όλες τις μεταχειρίσεις που δοκιμάστηκαν, αντίθετα η ριζοβολία των μοσχευμάτων της *C. creticum* και *C. nepeta* έγινε με απόλυτη σχεδόν επιτυχία σε όλες τις μεταχειρίσεις και σε όλες τις εποχές. Στη διεθνή βιβλιογραφία υπάρχουν είδη που ριζοβολούν εύκολα, όπως το *Forsythia × intermedia* (Oleaceae), το *Salvia indica* (Lamiaceae) και το *Helichrysum plicatum* subsp. *Plicatum* (Asteraceae) και άλλα που ριζοβολούν δύσκολα, όπως τα είδη *Cercis canadensis* var. *mexicana*, *C. siliquastrum*, *Robinia pseudoacacia* της οικογένειας Fabaceae και το *Satureja. thymbra* της οικογένειας Lamiaceae (Tipton, 1990, Ayanoğlu *et al.*, 2002, Swamy *et al.* 2002), Karam and Gebre, 2004).

Στο ποσοστό ριζοβολίας μοσχευμάτων των ειδών *B. acetabulosa* και *S. hymettia* παρατηρήθηκε εποχική διακύμανση. Πιο συγκεκριμένα, υψηλότερα ποσοστά ριζοβολίας παρατηρήθηκαν στα μοσχεύματα *B. acetabulosa* που συλλέχθηκαν την άνοιξη και το φθινόπωρο, για το είδος *S. hymettia* το φθινόπωρο και το χειμώνα, ενώ αντιθέτως το καλοκαίρι ήταν η πλέον ακατάλληλη εποχή για τη ριζοβολία των μοσχευμάτων και των δύο προαναφερθέντων ειδών. Αυτή η εποχική διακύμανση του ποσοστού ριζοβολίας έχει αναφερθεί και από τους Frangi and Nicola (2004) και τους Akoumianaki-Ioannidou *et al.* (2016), σε άλλα θαμνώδη είδη της μεσογειακής ξηροφυτικής βλάστησης, όπως το *Cistus*

monspeliensis, *C. salvifolius*, *C. x purpureus*, *Coronilla valentina*, *Dorycnium hirsutum*, *Lavandula pinnata*, *Lavatera acerifolia*, *Medicago arborea*, *Phlomis fruticosa*, *Teucrium fruticans* και *Limoniastrum monopetalum*. Το καλοκαίρι έχει αποδειχθεί ότι είναι η πλέον ακατάλληλη εποχή για τη ριζοβολία μοσχευμάτων και άλλων ειδών της οικογένειας Caprifoliaceae, όπως για τα είδη *Lonicera canadensis* (Cartabiano, 2013) και *Lonicera cuminata* και *Lonicera macranthoides* (Wang *et al.*, 2019), αλλά και άλλων θαμνωδών μεσογειακών ειδών όπως το *Limoniastrum monopetalum* (Akoumianaki-Ioannidou *et al.*, 2016).

Όσον αφορά τη συγκέντρωση του IBA για το είδος *B. acetabulosa*, την άνοιξη προτείνεται συγκέντρωση 2000 mg L⁻¹, για 1 min, ενώ το φθινόπωρο για 5 min. Για το είδος *S. hymettia* τόσο το φθινόπωρο όσο και το χειμώνα προτείνεται συγκέντρωση 1000 mg L⁻¹ για 1 min ή εφαρμογή σκόνη ριζοβολίας για ξυλώδη μοσχεύματα. Η θετική επίδραση της εφαρμογής αυξίνης στη ριζοβολία μοσχευμάτων ξυλωδών ειδών, έχει αναφερθεί και από άλλους ερευνητές, όπως για τα *Schefflera arboricola* (Abu-Zahra *et al.*, 2011), *Prunus* spp. (Stefancic *et al.*, 2005), *Arbutus unedo* L. (Şeker *et al.*, 2010) και *Ficus benjamina* L. (Topacoglu *et al.*, 2016). Η χρήση IBA σε συγκέντρωση 1000 mg L⁻¹ έχει αναφερθεί ως αποτελεσματικότερη συγκέντρωση και για τη ριζοβολία μοσχευμάτων κορυφής του γένους *Scabiosa* (Kroin, 2009), αλλά και άλλων ξηροφυτικών ειδών, όπως *Stachys*, *Hypericum*, *Lavandula* (Kroin, 2009), *Salvia officinalis*, *S. triloba* (Kacar *et al.*, 2009), *Salvia indica*, *Helichrysum plicatum* και *Satureja officinalis* (Ananoglu *et al.*, 2002), ενώ για το είδος *Limoniastrum monopetalum* αποτελεσματικότερη συγκέντρωση IBA έχει αναφερθεί τα 1000 ή 2000 mg L⁻¹ (Akoumianaki-Ioannidou *et al.*, 2016).

Η περαιτέρω ανάπτυξη των φυταρίων όλων των ειδών έγινε με επιτυχία σε υπόστρωμα τύρφης: περλίτη (2:1, v/v) και λίπανση χαμηλής συγκέντρωσης (2 g L⁻¹), ισορροπημένου λιπάσματος (20:20:20), ανά μήνα. Ειδικότερα για τα είδη *B. acetabulosa*, *C. creticum* και *C. nepeta* προτείνεται η εφαρμογή κορυφολογήματος για την παραγωγή διακλαδισμένων φυταρίων, περισσότερο ελκυστικών στους καταναλωτές.

Όσον αφορά στην εγκατάσταση των ειδών στους αρχαιολογικούς χώρους, το είδος *B. acetabulosa* παρουσίασε τη μεγαλύτερη προσαρμοστικότητα σε όλη την Ελλάδα, ενώ το *S. hymettia* εγκαταστάθηκε επιτυχώς στις μη παράκτιες περιοχές, ιδιαίτερα στη Β. Ελλάδα. Το *C. nepeta* εγκαταστάθηκε καλύτερα στη Β. Ελλάδα, ενώ το *C. creticum* στη Νότια Ελλάδα, σε αντίστοιχες περιοχές όπου αυτοφύονται. Παρόμοια αποτελέσματα έχουν αναφερθεί και από τους (Parafotiou *et al.*, 2017a) για τα είδη *A. halimus* και *L. monopetalum*, τα οποία επιβίωσαν σε υψηλότερο ποσοστό στον Αρχαιολογικό χώρο της Αίγινας, ως είδη που

απαντούν σε παράκτιες περιοχές και συνεπώς ανθεκτικά σε έντονη ηλιοφάνεια, ισχυρούς ανέμους και υψηλά επίπεδα αλατότητας, συνθήκες οι οποίες επικρατούν στο συγκεκριμένο αρχαιολογικό χώρο και στην ευρύτερη περιοχή, ενώ απέτυχαν να εγκατασταθούν στη Β. Ελλάδα. Επιπρόσθετα παρατηρήθηκε ότι η χρήση γεωφάσματος για τον έλεγχο των ζιζανίων και η εφαρμογή αραιών αρδεύσεων κατά τη διάρκεια της θερμής και ξηρής περιόδου του καλοκαιριού συνέβαλαν στην αποτελεσματικότερη εγκατάσταση όλων των φυτικών ειδών. Η αποτελεσματικότητα του μαύρου γεωφάσματος για τη διαχείριση των ζιζανίων έχει αποδειχθεί σε διάφορες μελέτες που αφορούν είδη οπωροφόρων δένδρων (Walsh et al., 1996, Guerra και Steenwerth, 2012), ενώ η άρδευση κατά τη διάρκεια της θερμής περιόδου ενισχύει την επιβίωση και την ανάπτυξη των ειδών (Siles et al., 2010, Becerra et al., 2013).

Σε ότι αφορά στην απόδοση αιθερίου ελαίου των δύο ειδών καλαμίνθας, ήταν υψηλότερη στα φυτά *C. creticum* και *C. nepeta* που καλλιεργήθηκαν υπαίθρια σε σύγκριση με τα θερμοκηπιακά. Η υψηλότερη απόδοση αιθερίου ελαίου και για τα δύο είδη ανεξαρτήτως θέσης καλλιέργειας καταγράφηκε τον Αύγουστο (περίοδος ανθοφορίας), ενώ η χαμηλότερη το Φεβρουάριο (βλαστική περίοδος). Αυτή η περιοδικότητα της απόδοσης σε αιθέριο έλαιο χαρακτηρίζει και άλλα φυτά της οικογένειας Lamiaceae, όπως το *Clinopodium pulegium* (Slavkowska et al., 2013), διάφορα είδη *Mentha* (Hussain et al., 2010) και *Origanum* (Putievsky et al., 1988, Kokkini et al., 2002, Kizil et al., 2008). Τα *in vitro* φυτάρια και των δύο ειδών (σε βλαστική κατάσταση) έδωσαν υψηλότερη απόδοση αιθερίου ελαίου σε σύγκριση με τα *ex vitro* φυτά, υπαίθρια ή θερμοκηπιακά του Φεβρουαρίου.

Αναφορικά με την ποιοτική σύσταση του αιθερίου ελαίου, η κύρια χημική ομάδα που ανιχνεύτηκε στο αιθέριο έλαιο και των δύο ειδών ήταν τα οξυγονωμένα μονοτερπένια, ακολουθούμενη από τους μονοτερπενικούς υδρογονάνθρακες και τα σεσκιτερπένια. Παρόμοιες κύριες χημικές ενώσεις έχουν αναφερθεί και από τους Karousou et al. (1996) σε *C. creticum*, τους Souleles et al. (1987) και τους Couladis and Tzakou (2001) σε φυτά *C. nepeta*, από πληθυσμούς που αυτοφύονται στην Ελλάδα, αντίθετα οι Pistelli et al. (2013) αναφέρουν ως κύρια χημική ομάδα των απομονωμένων ενώσεων από φυτικό υλικό *C. nepeta* από την Ιταλία τους μονοτερπενικούς υδρογονάνθρακες.

Στους κύριους εκπροσώπους των χημικών ομάδων παρατηρήθηκε επίσης εποχική διακύμανση και στις δύο θέσεις *ex vitro* καλλιέργειας (εντός και εκτός θερμοκηπίου) και για τα δύο υπό μελέτη είδη. Παρόμοια αποτελέσματα σχετικά με την εποχική διακύμανση των χημικών ενώσεων, έχουν αναφερθεί και από τους De Pooter et al. (1986b) και Cook et al.

(2007) για το ίδιο είδος και οι Villa-Ruano *et al.* (2015) σε ένα άλλο είδος *Clinopodium*, το *Clinopodium macrostemum* var. *laevigatum*.

Η συγκριτική μελέτη της σύστασης των αιθερίων ελαίων από *in vitro* αναπτυγμένους μικροβλαστούς και από *ex vitro* καλλιεργούμενα φυτά, έδειξε μεγάλη ομοιότητα μεταξύ των δύο χημικών προφίλ τόσο για το είδος *C. creticum* όσο και για το είδος *C. nepeta*. Η ομοιότητα της σύστασης έχει αναφερθεί και σε άλλα φαρμακευτικά είδη της οικογένειας Lamiaceae, π.χ. *Salvia sclarea* (Kuzma *et al.*, 2009), *Salvia fruticosa* Mill. (Arikat *et al.*, 2004), *Thymus vulgaris* L. (Affonso *et al.*, 2009) *Origanum vulgare* L. ssp. *hirtum* (Morone-Fortunato and Avato, 2008), *Minthostachys mollis* (Chebel *et al.*, 1998), *Mentha spicata* (Hirata *et al.*, 1990). Αντιθέτως, υπάρχουν συγκριτικές μελέτες οι οποίες έδειξαν πολυάριθμες διαφορές μεταξύ των δύο χημικών προφίλ του αιθερίου ελαίου, όπως για τα είδη *C. nepeta* (Pistelli *et al.*, 2013), *Salvia przewalskii* (Skała *et al.*, 2007) και *Eryngium planum* (Thiem *et al.*, 2011).

Διαπιστώθηκε λοιπόν ότι η καλλιέργεια των *C. nepeta* και *C. creticum* είναι δυνατόν να γίνει με επιτυχία υπό κάλυψη για την εκμετάλλευση των αιθερίων ελαίων της. Η ανθοφορία σε βλαστούς ανεξαρτήτως μήκους από το Μάρτιο έως το Δεκέμβριο του 2016, αποδίδεται στις υψηλές θερμοκρασίες του έτους και φανερώνει την επίδραση της θερμοκρασίας του περιβάλλοντος στην ανάπτυξη και στην ανθοφορία. Ως εκ τούτου μπορεί να διερευνηθεί η ρύθμιση της θερμοκρασίας σε επίπεδα κατάλληλα για την ενίσχυση της ανθοφορίας και συνεπώς διατήρηση της αυξημένης μέσης (%) περιεκτικότητας των αιθερίων ελαίων και τη σταθερότητα της συγκέντρωσης των χημικών ενώσεων, σε θερμοκηπιακή καλλιέργεια. Επιπρόσθετα, ο μικροπολλαπλασιασμός μπορεί να αποτελέσει αποτελεσματική μέθοδο για την παραγωγή σε σύντομο χρονικό διάστημα, φυτικού υλικού με παρόμοιο χημικό προφίλ με των αντίστοιχων *ex vitro* καλλιεργούμενων φυτών. Ταυτόχρονα αποτελεί το εφελτήριο για τη διερεύνηση της επίδρασης των φυτορρυθμιστικών ουσιών στη σύσταση του αιθερίου ελαίου και την επιλογή εκείνων που θα οδηγήσουν σε ικανοποιητική παραγωγή βλαστών και υψηλότερη απόδοση σε αιθέριο έλαιο με ταυτόχρονη παραγωγή υψηλών συγκεντρώσεων σημαντικών χημικών ενώσεων.

Συνοψίζοντας, η παρούσα Διατριβή ανέδειξε πέντε είδη αυτοφυών φυτών της Μεσογείου, με πρωτόκολλα πολλαπλασιασμού και φυτωριακής καλλιέργειας, έτοιμα για εισαγωγή στην επιχειρηματική ανθοκομία και στην Αρχιτεκτονική του Τοπίου, στα πλαίσια της γενικά αποδεκτής πλέων τάσης των τελευταίων ετών, χρήσης αυτοφυών φυτών σε κηποτεχνικές διαμορφώσεις και αναπλάσεις τοπίου, με στόχο τη βιοποικιλότητα, την ανθεκτικότητα και τη διατήρηση του χαρακτήρα του τοπίου.

Από τη μελέτη της πορείας βλάστησης στους αρχαιολογικούς χώρους και πέραν των φυτεύσεων που προτείνουμε μέσω του προγράμματος «ARCHAEOSCAPE - Ολοκληρωμένη διαχείριση της βλάστησης σε αρχαιολογικούς χώρους, για την προστασία του μνημείου και την ανάδειξη του ιστορικού τοπίου» - THALIS, προτείνονται μια σειρά δράσεων κι εφαρμογών για τους επισκέπτες των αρχαιολογικών χώρων.

1) Οι επισκέπτες των μουσείων θα μπορούσαν μέσω ηλεκτρονικών υπολογιστών, να ενημερώνονται για τα αυτοφυή φυτά π.χ. την επιστημονική και κοινή ονομασία τους, τα βοτανικά χαρακτηριστικά τους, τις χρήσεις τους τόσο κατά την αρχαιότητα όσο και στη σύγχρονη εποχή.

2) Στους εξωτερικούς χώρους προτείνεται η τοποθέτηση σχετικών πινακίδων με τα ανωτέρω στοιχεία σε αντιστοιχία με το κάθε εγκατεστημένο είδος αυτοφυούς φυτού.

3) στα πωλητήρια των αρχαιολογικών χώρων θα μπορούσαν να διατίθενται: α) ενημερωτικά έντυπα ή εγχειρίδια, καθώς και φωτογραφικό υλικό και κάρτες με τα αυτοφυή φυτά που συναντώνται σε αρχαιολογικούς χώρους, β) γλαστράκια προς πώληση με φυτά που χαρακτηρίζουν τον αρχαιολογικό χώρο (π.χ. φυτιλάκι, καλαμίνθα, σκαμπιόσα), γ) αποξηραμένα φυτά για να χρησιμοποιηθούν ως αρτυματικά - μπαχαρικά και για αφέψημα, δ) κρέμες - σαπούνια και γενικότερα καλλυντικά προϊόντα παρασκευασμένα από τα ίδια φυτά, ε) αιθέρια έλαια προερχόμενα απ' αυτά τα φυτά, διαφυλαγμένα σε μυροδοχεία με βάση αρχαία πρότυπα αλλά και κατασκευές σχεδιασμένες από σύγχρονους σχεδιαστές, με σκοπό να τα προμηθεύονται οι επισκέπτες των χώρων και να αποτελούν γι' αυτούς δυνατό ενθύμιο από την «αίσθηση» του αρχαιολογικού χώρου, τα χρώματα και αρώματα της Ελλάδας.

ΕΝΟΤΗΤΑ VI – ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ

VI. ΔΗΜΟΣΙΕΥΜΕΝΕΣ ΕΡΓΑΣΙΕΣ

Διεθνή περιοδικά με σύστημα κριτών

- **Vlachou, G.**, Papafotiou M. and Bertsouklis K.F. (2019). Studies on Seed Germination and Micropropagation of *Clinopodium nepeta*: A Medicinal and Aromatic Plant. HortScience., 54(9) 1558-1564.
- **Vlachou, G.**, Papafotiou M. and Bertsouklis K.F. (2020). Seed germination, micropropagation from adult and juvenile origin explants and address of hyperhydricity of the Cretan endemic herb *Calamintha cretica*. Not. Bot. Horti Agrobo. (Accepted, In press).

Διεθνή Συνέδρια

- **Vlachou, G.**, Papafotiou, M. and Bertsouklis, K.F. (2015). Studies on *in vitro* propagation of *Anthyllis barba-jovis* L. Acta Hortic. 1155: 317-320.
- Papafotiou, M., Martini, A.N. and **Vlachou, G.** (2015). *In vitro* propagation as a tool to enhance the use of native ornamentals in archaeological sites of Greece. Acta Hortic. 1155: 301-308.
- Bertsouklis, K.F., Martini, A.N., **Vlachou, G.**, Akoumianaki-Ioannidou, A., Kanellou, E., Kartsonas, E.D. and Papafotiou, M. (2016). Evaluation of the establishment of native Mediterranean plant species suggested for landscape enhancement in archaeological sites of Greece. Acta Hortic. 1189: 177-180.
- **Vlachou, G.**, Papafotiou, M. and Bertsouklis, K.F. (2016a). *In vitro* propagation of *Ballota acetabulosa*. Acta Hortic. 1113: 171-174.
- **Vlachou, G.**, Papafotiou, M. and Bertsouklis, K.F. (2016b). *In vitro* propagation of *Calamintha nepeta*. Acta Hortic. 1113: 189-194.
- **Vlachou, G.**, Papafotiou, M. and Bertsouklis, K.F. (2017). The effect of cytokinin type and concentration on micropropagation of *Calamintha cretica*. Acta Hortic. 1189: 477-480.
- **Vlachou, G.**, Papafotiou, M., Akoumianaki-Ioannidou, A. and Bertsouklis, K.F. (2019). Propagation of *Scabiosa hymettia* (Boiss. & Spruner) by stem cuttings. Acta Hortic. 1242: 763-766.
- Papafotiou M., **Vlachou G.**, Trigka M., Martini A.N. and Bertsouklis, K.F. (2019). The xerophytic parterre of the historic botanical garden of Agricultural University of Athens. XVI Optima Meeting (Αθήνα-Ελλάδα, 2-5/10/2019).

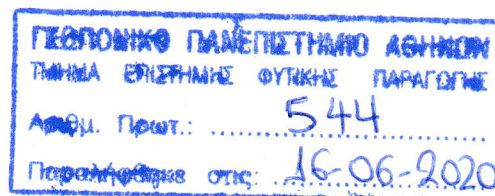
- **Vlachou G.**, Trigka M. and Papafotiou M. (2019). Effect of plant growth regulators and agar concentration on shoot multiplication and hyperhydricity of *Anthyllis barba-jovis*. I International Symposium on Botanical Gardens and Landscapes (Μπανγκόκ-Ταϊλάνδη, 2-4/12/2019).

Εθνικά Συνέδρια

- Ακουμιανάκη, Α., Παπαφωτίου, Μ., **Βλάχου, Γ.** και Μαρτίνη, Α. (2015). Πολλαπλασιασμός της *Ballota acetabulosa* με σπόρο και μοσχεύματα. Πρακτικά Ελληνικής Εταιρείας της Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών, 26^ο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο, 15-18 Οκτωβρίου 2013, Καλαμάτα, τόμος 16(β), 414-417.
- **Βλάχου, Γ.** και Παπαφωτίου, Μ. (2015a). Διερεύνηση του *in vitro* πολλαπλασιασμού της *Anthyllis barba-jovis*. Πρακτικά Ελληνικής Εταιρείας της Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών, 26^ο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο, 15-18 Οκτωβρίου 2013, Καλαμάτα, τόμος 16(β), 488-490.
- **Βλάχου, Γ.**, Παπαφωτίου, Μ. και Μπερτσουκλής, Κ.Φ. (2015c). *In vitro* πολλαπλασιασμός της *Calamintha nepeta*. Πρακτικά Ελληνικής Εταιρείας της Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών, 26^ο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο, 15-18 Οκτωβρίου 2013, Καλαμάτα, τόμος 16(β), 418-421.
- Παπαφωτίου, Μ., **Βλάχου, Γ.** και Μπερτσουκλής, Κ.Φ. (2015a). *In vitro* πολλαπλασιασμός της *Ballota acetabulosa*. Πρακτικά Ελληνικής Εταιρείας της Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών, 26^ο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο, 15-18 Οκτωβρίου 2013, Καλαμάτα, τόμος 16(β), 410-413.
- **Βλάχου, Γ.**, Παπαφωτίου, Μ., Ακουμιανάκη Α. και Μπερτσουκλής, Κ.Φ. (2016). Πολλαπλασιασμός της *Lomelosia hymettia* με μοσχεύματα βλαστού. Πρακτικά Ελληνικής Εταιρείας της Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών, 27^ο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο, 28-30 Σεπτεμβρίου 2015, Βόλος, τόμος 17(β), 251-254.
- **Βλάχου Γ.** και Παπαφωτίου, Μ. (2016). Επίδραση του είδους και της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης στον *in vitro* πολλαπλασιασμό της *Calamintha cretica*. Πρακτικά Ελληνικής Εταιρείας της Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών, 27^ο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο, 28-30 Σεπτεμβρίου 2015, Βόλος.
- Τρίγκα, Μ., Παπαφωτίου Μ. και **Βλάχου, Γ.** (2016). Διερεύνηση της βλαστικότητας του σπόρου της *Anthyllis barba-jovis*. Πρακτικά Ελληνικής Εταιρείας της Επιστήμης των Οπωροκηπευτικών, 27^ο Πανελλήνιο Επιστημονικό Συνέδριο, 28-30 Σεπτεμβρίου 2015, Βόλος, τόμος 17(β), 240-244.

- **Βλάχου, Γ.**, Μαρτίνη, Α.Ν., Ακουμιανάκη-Ιωαννίδου, Α., Παπαφωτίου, Μ. (2017). Επίδραση εποχής και χειρισμών στη ριζοβολία μοσχευμάτων βλαστού της *Ballota acetabulosa* (L.) Benth. 15^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Βοτανικής Εταιρείας, 14-17 Σεπτεμβρίου 2017, Χανιά, Περίληψη pp. 74.
- Τρίγκα, Μ., Παπαφωτίου Μ. και **Βλάχου, Γ.** (2017). Διερεύνηση της βλαστικότητας του σπόρου της *Anthyllis barba-jovis* L. 28^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Επιστήμης Οπωροκηπευτικών, 16-20 Οκτωβρίου 2017, Θεσσαλονίκη, 133-136.
- **Βλάχου, Γ.**, Παπαφωτίου, Μ., Δαφερέρα Δ. και Ταραντίλης, Π. (2017). Εποχική Διακύμανση της χημικής σύστασης αιθερίου ελαίου σε φυτά *Calamintha cretica* εντός και εκτός θερμοκηπίου. 28^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Επιστήμης Οπωροκηπευτικών, 16-20 Οκτωβρίου 2017, Θεσσαλονίκη, 236-239.
- **Βλάχου, Γ.**, Παπαφωτίου, Μ., Δαφερέρα Δ. και Ταραντίλης, Π. (2017). Εποχική Διακύμανση της χημικής σύστασης αιθερίου ελαίου σε φυτά *Calamintha nepeta* εντός και εκτός θερμοκηπίου. 28^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Επιστήμης Οπωροκηπευτικών, 16-20 Οκτωβρίου 2017, Θεσσαλονίκη, 240-243.
- **Βλάχου, Γ.**, Παπαφωτίου, Μ. και Μπερτσουκλής, Κ.Φ. (2017). Πολλαπλασιασμός των *Calamintha nepeta* και *C. cretica* με μοσχεύματα βλαστού και μελέτη της βλαστικότητας των σπόρων. 28^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Επιστήμης Οπωροκηπευτικών, 16-20 Οκτωβρίου 2017, Θεσσαλονίκη, 93-97.
- **Βλάχου, Γ.**, Μαρτίνη Α.Ν., Ακουμιανάκη-Ιωαννίδου Α. και Παπαφωτίου Μ. (2019). Εποχική διακύμανση της ριζοβολίας μοσχευμάτων του *Ballota acetabulosa* (L.) Benth. 29^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Επιστήμης Οπωροκηπευτικών, 15-18 Οκτωβρίου 2019, Πάτρα, Περίληψη, pp. 174.
- **Βλάχου, Γ.**, Τρίγκα, Μ. και Παπαφωτίου, Μ. (2019). Αντιμετώπιση της υπερενυδάτωσης στην *in vitro* καλλιέργεια της *Anthyllis barba-jovis* L. 29^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Επιστήμης Οπωροκηπευτικών, 15-18 Οκτωβρίου 2019, Πάτρα, Περίληψη, pp. 166.
- **Βλάχου, Γ.**, Τρίγκα, Μ. και Παπαφωτίου, Μ. (2019). Μικροπολλαπλασιασμός της *Anthyllis barba-jovis* με έκφυτα από σπορόφυτα – Διερεύνηση της επίδρασης του είδους και της συγκέντρωσης της κυτοκινίνης. 29^ο Πανελλήνιο Συνέδριο Ελληνικής Εταιρείας Επιστήμης Οπωροκηπευτικών, 15-18 Οκτωβρίου 2019, Πάτρα, Περίληψη, pp. 22.

ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ – ΠΡΑΚΤΙΚΟ ΑΞΙΟΛΟΓΗΣΗΣ



ΓΕΩΠΟΝΙΚΟ ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΑΘΗΝΩΝ
ΣΧΟΛΗ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ ΤΩΝ ΦΥΤΩΝ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΕΡΓΑΣΤΗΡΙΟ ΑΝΘΟΚΟΜΙΑΣ ΚΑΙ ΑΡΧΙΤΕΚΤΟΝΙΚΗΣ ΤΟΠΙΟΥ
ΔΙΕΥΘΥΝΤΡΙΑ: ΚΑΘΗΓΗΤΡΙΑ Δρ. ΜΑΡΙΑ ΠΑΠΑΦΩΤΙΟΥ
Ιερά οδός 75, Αθήνα 118 55 - Τηλ. 210 5294552 - Fax 210 5294553 - Email: mpapaf@aua.gr

ΠΡΟΣ
ΤΜΗΜΑ ΕΠΙΣΤΗΜΗΣ ΦΥΤΙΚΗΣ ΠΑΡΑΓΩΓΗΣ
ΓΡΑΜΜΑΤΕΙΑ Π.Μ.Σ.

Αθήνα 11 Ιουνίου 2020

α.π.

ΠΡΑΚΤΙΚΟ

«Συνεδρίαση επταμελούς εξεταστικής επιτροπής για την αξιολόγηση της Διδακτορικής Διατριβής της υποψήφιας Διδάκτορος κας **Γεωργίας Π. Βλάχου**»

Σήμερα 11 Ιουνίου και ώρα 13:30 συνήλθε στη Βιβλιοθήκη του Γ.Π.Α. η Εξεταστική Επιτροπή, που ορίστηκε από τη Γενική Συνέλευση του Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής του Γ.Π.Α. και αποτελείται από τους:

1. Παπαφωτίου Μαρία, Καθηγήτρια Γ.Π.Α.
2. Ακουμιανάκη – Ιωαννίδου Αναστασία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γ.Π.Α.
3. Παρασκευοπούλου Αγγελική, Επίκουρη Καθηγήτρια Γ.Π.Α.
4. Ταραντίλης Πέτρος, Καθηγητής Γ.Π.Α.
5. Τρίγκας Παναγιώτης, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α.
6. Οικονόμου Γαρυφαλλιά, Καθηγήτρια Γ.Π.Α.
7. Χατζηδημητρίου Μαριάννα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γ.Π.Α.

για την κρίση του πρωτότυπου και της συμβολής στην επιστήμη, της Διδακτορικής Διατριβής με τίτλο «**Διερεύνηση μεθόδων πολλαπλασιασμού αυτοφυών ειδών κατάλληλων για χρήση ως καλλωπιστικών φυτών σε αρχαιολογικούς χώρους**» που εκπόνησε η υποψήφια Διδάκτωρ κα **Γεωργία Π. Βλάχου**.

Στην αρχή της συνεδρίασης της Εξεταστικής Επιτροπής η υποψήφια προέβη στην παρουσίαση της Διδακτορικής Διατριβής ενώπιον της Επιτροπής και ακροατηρίου και στη συνέχεια απάντησε στις ερωτήσεις που τις υποβλήθηκαν. Εν συνεχεία η Εξεταστική Επιτροπή αποσύρθηκε και συσκέφθηκε σύμφωνα με το Νόμο.

Η Επιτροπή διαπίστωσε ότι η παρουσίαση της υποψήφιας Διδάκτορος ήταν άριστη και οι απαντήσεις που έδωσε στα ερωτήματα που της υποβλήθηκαν ήταν κατάλληλες, πλήρεις και ορθές. Η Επιτροπή ομόφωνα έκρινε ότι η έρευνα στην παρούσα Διατριβή, επί της διερεύνησης μεθόδων πολλαπλασιασμού αυτοφυών ειδών κατάλληλων για χρήση ως καλλωπιστικών φυτών σε αρχαιολογικούς χώρους, περιλαμβάνει πρωτότυπα

αποτελέσματα που αφορούν (α) στην ανάπτυξη πρωτοκόλλων πολλαπλασιασμού με σπόρο, μικροπολλαπλασιασμό και μοσχεύματα βλαστού, των μεσογειακών αυτοφυών ειδών *Anthyllis barba-jovis*, *Ballota acetabulosa*, *Clinopodium creticum*, *Clinopodium nepeta* και *Scabiosa hymettia* (β) στην ανάπτυξη πρωτοκόλλων φυτωριακής καλλιέργειας, καθώς και στη διερεύνηση της ικανότητας επιβίωσης *in situ* σε αρχαιολογικούς χώρους των ειδών αυτών, και (γ) στη συγκριτική αξιολόγηση της απόδοσης και της χημικής σύστασης του αιθερίου ελαίου σε φυτά υπαίθριας, θερμοκηπιακής και *in vitro* καλλιέργειας των *C. creticum* και *C. nepeta*. με στόχο την περαιτέρω αξιοποίηση των δύο αυτών ειδών στη δημιουργία νέων πρόσθετων τροφίμων, καλλυντικών και υγαιοπροστατευτικών συμπληρωμάτων.

Όσον αφορά τον πολλαπλασιασμό με σπόρο, διερευνήθηκαν για πρώτη φορά και προσδιορίστηκαν οι οριακές τιμές της θερμοκρασίας για τη βλάστηση του σπόρου των πέντε ειδών, η ύπαρξη ή μη ληθάργου, η επίδραση της φωτοπερίοδου, καθώς και η επίδραση του χρόνου διατήρησης - αποθήκευσης στη βλαστικότητα των σπόρων *in vitro* και *ex vitro*. Στο είδος *A. barba-jovis* διαπιστώθηκε φυσικός λήθαργος, ο οποίος αντιμετωπίστηκε με μηχανικό σκαριφισμό. Το εύρος των θερμοκρασιών για τη βλάστηση των σπόρων των ειδών *A. barba-jovis*, *B. acetabulosa*, *C. creticum* και *C. nepeta* κυμάνθηκε από 10 έως 30 °C, με άριστες θερμοκρασίες 15 - 20 °C, όπου η βλαστικότητα ήταν πολύ υψηλή. Η αποθήκευση των σπόρων σε θερμοκρασία δωματίου για 1 - 2 έτη δεν επέδρασε στη βλαστικότητα, ενώ αποθήκευση πέραν των τριών ετών μείωσε τη βλαστικότητα των *A. barba-jovis* και *B. acetabulosa*. Οι σπόροι του *S. hymettia* εμφάνισαν πολύ χαμηλή ικανότητα βλάστησης σε *ex vitro* συνθήκες, ενώ σε *in vitro* συνθήκες η βλάστηση του σπόρου δεν επετεύχθη.

Στον *in vitro* πολλαπλασιασμό αναπτύχθηκε για πρώτη φορά μια πλήρης μέθοδος για το μικροπολλαπλασιασμό αυτών των πέντε ειδών ξεκινώντας είτε από ενήλικα φυτά ή από σπορόφυτα. Η εγκατάσταση καλλιέργειας του *A. barba-jovis*, *B. acetabulosa* και *S. hymettia* με έκφυτα προερχόμενα από ενήλικα αυτοφυή ή καλλιεργούμενα φυτά, παρουσίασε πολλές έως αξεπέραστες δυσκολίες, λόγω του υψηλού ποσοστού μολύνσεων. Εξ' αυτών μόνο το είδος *S. hymettia* εγκαταστάθηκε *in vitro* από ενήλικα αυτοφυή φυτά, με χρήση εκφύτων κορυφής βλαστού και υποστρώματος MS είτε χωρίς φυτορρυθμιστικές ουσίες ή με 1,0 mg L⁻¹ BA, ενώ το *A. barba-jovis* εγκαταστάθηκε από νεαρά φυτά (2 ετών) που αναπτύσσονταν σε θερμοκήπιο, επίσης σε υπόστρωμα MS με 1,0 - 1,5 mg L⁻¹ BA. Για την εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας από ενήλικα φυτά του *C. creticum* ενδείκνυται η χρήση εκφύτων κορυφής και κόμβου και υποστρώματος MS εμπλουτισμένου με 1,0 mg L⁻¹ ZEAT, ενώ για το συγγενικό είδος *C. nepeta* προτείνεται το υπόστρωμα MS εμπλουτισμένο με 1,0 mg L⁻¹ BA. Η εγκατάσταση *in vitro* καλλιέργειας *A. barba-jovis*, *B. acetabulosa*, *C. creticum* και *C. nepeta* από *in vitro* καλλιεργούμενα σπορόφυτα, έγινε σε υψηλότατο ποσοστό, με έκφυτα κορυφής και κόμβου, σε υπόστρωμα MS είτε χωρίς PGRs ή με 0,5 - 1,0 mg L⁻¹ BA ή ZEAT.

Κατά το στάδιο πολλαπλασιασμού των *in vitro* καλλιεργειών, τόσο της καλλιέργειας από σπορόφυτα, όσο και αυτής από ενήλικα ή νεαρά φυτά θερμοκηπίου των ειδών *A. barba-jovis*, *B. acetabulosa*, *C. creticum* και *C. nepeta* παρατηρήθηκε υψηλό ποσοστό αντίδρασης των εκφύτων, ενώ η προσθήκη κυτοκινίνης στο υπόστρωμα (από 0,5 - 8,0 mg L⁻¹), ειδικά των BA και ZEAT και λιγότερο των KIN και το 2iP, είχε ως αποτέλεσμα την αύξηση του αριθμού των βλαστών ανά έκφυτο, αναλογικά με τη συγκέντρωση αυτών, αλλά συγχρόνως επέφερε και αύξηση της υπερενυδάτωσης. Το σημαντικό πρόβλημα της υπερενυδάτωσης, διερευνήθηκε και αντιμετωπίστηκε με την προσθήκη της αυξίνης NAA σε συγκέντρωση 0,1 ή 0,5 mg L⁻¹, ή την αύξηση της συγκέντρωσης του άγαρ από 8 g L⁻¹ σε 12 g L⁻¹. Αυτή η εφαρμογή όχι μόνο εξάλειψε την



υπερενυδάτωση των ιστών αλλά επέφερε και ταυτόχρονη αύξηση του αριθμού των βλαστών σε πολύ υψηλό επίπεδο και ως εκ τούτου τα υποστρώματα με 4,0 ή 8,0 mg L⁻¹ BA με 0,1 mg L⁻¹ NAA και 12 g L⁻¹ άγαρ ενδείκνυνται για χρήση σε επιχειρηματική κλίμακα.

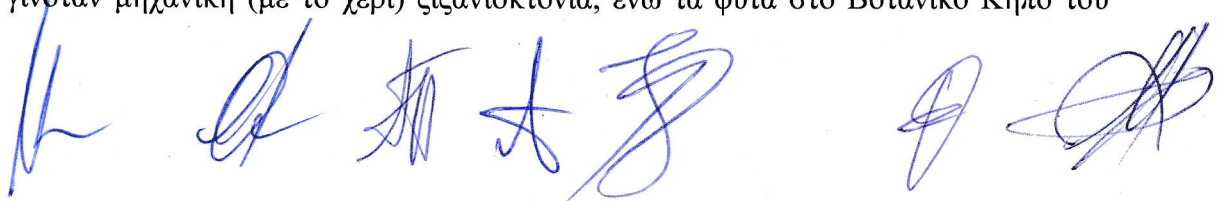
Η ριζοβολία των μικρομοσχευμάτων των προαναφερθέντων ειδών που προήλθαν από την καλλιέργεια που εγκαταστάθηκε τόσο από *in vitro* ανεπτυγμένα σπορόφυτα όσο και από νεαρά φυτά παρουσίασαν παρόμοια συμπεριφορά και ήταν επιτυχής σε υπόστρωμα μισής δύναμης MS χωρίς ή με 0,5 - 4,0 mg L⁻¹ σε IBA σε συνεχή εφαρμογή για έξι εβδομάδες. Ιδιαίτερο εύρημα ήταν ότι, αυξανομένης της συγκέντρωσης IBA, παράλληλα με τη ριζοβολία παρατηρήθηκε και έκπτυξη πλάγιων βλαστών, με αποτέλεσμα τη δημιουργία πολύκλαδων φυταρίων έτοιμων για εγκλιματισμό, με το πλεονέκτημα της αποφυγής πιθανού κορυφολογήματος για απόκτηση συμπαγούς φυτού. Για τα είδη *A. barba-jovis* και *B. acetabulosa* διερευνήθηκε για πρώτη φορά η επίδραση του τύπου μικρομοσχεύματος (μόσχευμα κορυφής μικροβλαστού ή μέσης) στην ριζοβολία, παρατηρώντας ότι και οι δύο τύποι μικρομοσχεύματος ριζοβόλησαν χωρίς καμία δυσκολία και με παρόμοιο τρόπο. Επιπρόσθετα διερευνήθηκε η *in vitro* ριζοβολία συστάδων μικροβλαστών του *B. acetabulosa*, *C. creticum* και *C. nepeta*, η οποία ήταν επιτυχής σε υπόστρωμα μισής δύναμης MS χωρίς IBA.

Ο εγκλιματισμός των φυταρίων όλων των ειδών σε *ex vitro* συνθήκες έγινε με πολύ υψηλά ποσοστά επιτυχίας σε μίγμα τύρφης - περλίτη (1:1, v/v).

Για τα υπό μελέτη είδη δεν υπάρχει βιβλιογραφική αναφορά αναφορικά με τον πολλαπλασιασμό με μοσχεύματα βλαστού. Έγινε λήψη μοσχευμάτων στις τέσσερις εποχές του έτους και μεταχειρίσεις με αυξίνη είτε σε μορφή σκόνης για ποώδη/ημι-ξυλώδη ή ξυλώδη μοσχεύματα ή σε αλκοολούχο υδατικό διάλυμα (0 - 3000 mg L⁻¹ IBA για 1 ή 5 min.). Η ριζοβολία των μοσχευμάτων της *C. creticum* και *C. nepeta* έγινε με απόλυτη σχεδόν επιτυχία σε όλες τις μεταχειρίσεις και σε όλες τις εποχές. Στο ποσοστό ριζοβολίας μοσχευμάτων των ειδών *B. acetabulosa* και *S. hymettia* παρατηρήθηκε εποχική διακύμανση. Πιο συγκεκριμένα, υψηλότερα ποσοστά ριζοβολίας παρατηρήθηκαν στα μοσχεύματα *B. acetabulosa* που συλλέχθηκαν την άνοιξη και το φθινόπωρο, για το είδος *S. hymettia* το φθινόπωρο και το χειμώνα, ενώ αντιθέτως το καλοκαίρι ήταν η πλέον ακατάλληλη εποχή για τη ριζοβολία των μοσχευμάτων και των δύο ειδών. Ο πολλαπλασιασμός του *A. barba-jovis* με μοσχεύματα βλαστού ήταν ανεπιτυχής, σε όλες τις εποχές και σε όλες τις μεταχειρίσεις που δοκιμάστηκαν.

Η περαιτέρω ανάπτυξη των φυταρίων όλων των ειδών έγινε χωρίς καμία δυσκολία και προτείνεται η χρήση υποστρώματος τύρφης: περλίτη (2:1, v/v) και η λίπανση με χαμηλή συγκέντρωση (2 g L⁻¹), ισορροπημένου λιπάσματος (20:20:20), ανά μήνα. Επιπλέον, ενδείκνυται η εφαρμογή κορυφολογήματος, για τα είδη *B. acetabulosa*, *C. creticum* και *C. nepeta*, για την παραγωγή διακλαδισμένων φυταρίων, πιο ελκυστικών στους καταναλωτές, εκτός και αν το φυτό προορίζεται για τη χρήση κρεμαστά καλάθια ή εδαφοκάλυψη.

Για πρώτη φορά πραγματοποιήθηκε εγκατάσταση των ειδών *B. acetabulosa*, *C. creticum*, *C. nepeta* και *S. hymettia*, σε τρεις αρχαιολογικούς χώρους με διαφορετικό μικροκλίμα: την Παλαιοχριστιανική Αμφίπολη (Ν. Σερρών), την Κολώνα (Αίγινα) και την Αρχαία Μεσσήνη (Ν. Μεσσηνίας). Επιπρόσθετα διεξήχθη μία ακόμη φύτευση στον Βοτανικό Κήπο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου (Γ.Π.Α.). Τα φυτά στους αρχαιολογικούς χώρους δεν αρδεύθηκαν και κάθε τρεις μήνες γινόταν μηχανική (με το χέρι) ζιζανιοκτονία, ενώ τα φυτά στο Βοτανικό Κήπο του



Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου αρδεύονταν ανά 15 ημέρες, κατά τη θερινή περίοδο (Ιούνιος - Σεπτέμβριος), επιπλέον η επιφάνεια του Βοτανικού κήπου καλύφθηκε με μαύρο γεωφάσμα για τον έλεγχο ζιζανίων. Το *B. acetabulosa* έδειξε τη μεγαλύτερη προσαρμοστικότητα και ικανότητα εγκατάστασης χωρίς άρδευση σε όλη την Ελλάδα. Το *C. nepeta* εγκαταστάθηκε καλύτερα στη Β. Ελλάδα, ενώ το *C. creticum* στη Νότια Ελλάδα σε αντίστοιχες περιοχές όπου αυτοφύονται. Επιπρόσθετα παρατηρήθηκε ότι η χρήση γεωφάσματος για τον έλεγχο των ζιζανίων και η εφαρμογή αραιών αρδεύσεων κατά τη διάρκεια της θερμής και ξηρής περιόδου του καλοκαιριού συνέβαλαν στην αποτελεσματικότερη εγκατάσταση όλων των φυτικών ειδών.

Παράλληλα για πρώτη φορά μελετήθηκε ο προσδιορισμός της απόδοσης αιθερίου ελαίου και η καταγραφή της χημικής σύστασης αυτού, σε σχέση με την εποχή (διαφορετικά στάδια ανάπτυξης των φυτών) και το περιβάλλον καλλιέργειας (εντός μη θερμαινόμενου υαλόφρακτου θερμοκηπίου, ή υπαίθρια στο Ανθοκομείο του Εργαστηρίου Ανθοκομίας και Αρχιτεκτονικής Τοπίου) των αρωματικών φυτών της οικογένειας *Lamiaceae*, *C. creticum* και *C. nepeta*. Η απόδοση αιθερίου ελαίου ήταν υψηλότερη στα φυτά που καλλιεργήθηκαν υπαίθρια σε σύγκριση με τα θερμοκηπιακά. Η υψηλότερη απόδοση αιθερίου ελαίου και για τα δύο είδη ανεξαρτήτως θέσης καλλιέργειας καταγράφηκε τον Αύγουστο (περίοδος ανθοφορίας), ενώ η χαμηλότερη το Φεβρουάριο (βλαστική περίοδος). Αναφορικά με την ποιοτική σύσταση του αιθερίου ελαίου, η κύρια χημική ομάδα που ανιχνεύτηκε στο αιθέριο έλαιο και των δύο ειδών ήταν τα οξυγονωμένα μονοτερπένια, ακολουθούμενη από τους μονοτερπενικούς υδρογονάνθρακες και τα σεσκιτερπένια. Στους κύριους εκπροσώπους των χημικών ομάδων παρατηρήθηκε εποχική διακύμανση και στις δύο θέσεις *ex vitro* καλλιέργειας (αγρός, θερμοκήπιο) και για τα δύο υπό μελέτη είδη.

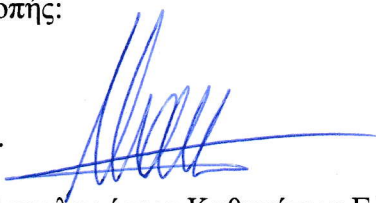
Επιπρόσθετα έγινε σύγκριση και διερευνήθηκε για πρώτη φορά η χημική σύσταση του αιθερίου ελαίου που παράγεται σε *in vitro* καλλιέργεια με το χημικό προφίλ των *ex vitro* καλλιεργούμενων φυτών. Η συγκριτική μελέτη, έδειξε μεγάλη ομοιότητα μεταξύ των δύο χημικών προφίλ τόσο για το είδος *C. creticum* όσο και για το είδος *C. nepeta* καταδεικνύοντας τη δυνατότητα επιλογής του μικροπολλαπλασιασμού για την παραγωγή σε σύντομο χρονικό διάστημα, φυτικού υλικού με παρόμοιο χημικό προφίλ με των αντίστοιχων *ex vitro* καλλιεργούμενων φυτών.


Συνοψίζοντας, η παρούσα Διατριβή ανέδειξε πέντε είδη αυτοφυών φυτών της Μεσογείου, με πρωτόκολλα πολλαπλασιασμού και φυτωριακής καλλιέργειας, έτοιμα για εισαγωγή στην επιχειρηματική ανθοκομία και στην Αρχιτεκτονική του Τοπίου, στα πλαίσια της γενικά αποδεκτής πλέον τάσης των τελευταίων ετών, χρήσης αυτοφυών φυτών σε κηποτεχνικές διαμορφώσεις και αναπλάσεις τοπίου, αλλά και ιδιαίτερων τοπίων, όπως οι αρχαιολογικοί χώροι, με στόχο τη βιοποικιλότητα, την ανθεκτικότητα και τη διατήρηση του χαρακτήρα του τοπίου, ενώ επιπλέον διερεύνησε και τη δυνατότητα αξιοποίησης κάποιων εξ αυτών για δημιουργία νέων πρόσθετων τροφίμων, καλλυντικών και υγειοπροστατευτικών συμπληρωμάτων.

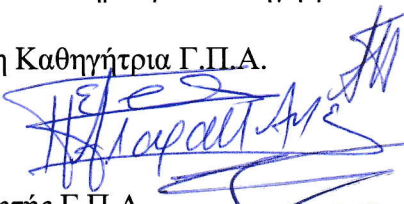
Η επιτροπή κρίνει ότι, για την πληρέστερη ανάδειξη του περιεχομένου της παρούσας Διατριβής, ο τίτλος της Διατριβής πρέπει να τροποποιηθεί, και από «Διερεύνηση μεθόδων πολλαπλασιασμού αυτοφυών ειδών κατάλληλων για χρήση ως καλλωπιστικών φυτών σε αρχαιολογικούς χώρους» να γίνει **«Πολλαπλασιασμός και φυτωριακή καλλιέργεια αυτοφυών ειδών της Μεσογειακής χλωρίδας, για την αξιοποίηση ως καλλωπιστικών, ιδιαίτερα σε αρχαιολογικούς χώρους, καθώς και στη δημιουργία νέων πρόσθετων τροφίμων, καλλυντικών και υγειοπροστατευτικών συμπληρωμάτων».**

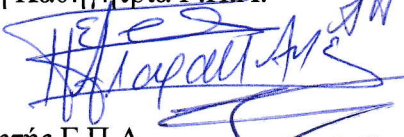
Με βάση τα ανωτέρω στοιχεία η Εξεταστική Επιτροπή κρίνει ομόφωνα ότι το περιεχόμενο της Διδακτορικής Διατριβής της κας Γεωργίας Βλάχου διακρίνεται για την πρωτοτυπία και την αρτιότητα του και συμβάλλει στην πρόοδο της επιστήμης. Γι' αυτό **ομόφωνα προτείνει** στη Γενική Συνέλευση του Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής την αναγόρευση της **κας Γεωργίας Π. Βλάχου σε Διδάκτορα του Τμήματος Επιστήμης Φυτικής Παραγωγής του Γεωπονικού Πανεπιστημίου Αθηνών με βαθμό Άριστα.**

Τα μέλη της επταμελούς Εξεταστικής Επιτροπής:


Παπαφωτίου Μαρία, Καθηγήτρια Γ.Π.Α. 

Ακουμιανάκη – Ιωαννίδου Αναστασία, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γ.Π.Α. 

Παρασκευοπούλου Αγγελική, Επίκουρη Καθηγήτρια Γ.Π.Α. 

Ταραντίλης Πέτρος, Καθηγητής Γ.Π.Α. 

Τρίγκας Παναγιώτη, Επίκουρος Καθηγητής Γ.Π.Α. 

Οικονόμου Γαρυφαλλιά, Καθηγήτρια Γ.Π.Α. 

Χατζηδημητρίου Μαριάννα, Αναπληρώτρια Καθηγήτρια Γ.Π.Α. 